

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6983771号
(P6983771)

(45) 発行日 令和3年12月17日 (2021. 12. 17)

(24) 登録日 令和3年11月26日 (2021. 11. 26)

(51) Int. Cl.	F I
C 1 2 N 5/0783 (2010. 01)	C 1 2 N 5/0783 Z N A
C 1 2 N 15/09 (2006. 01)	C 1 2 N 15/09 Z
C 1 2 N 5/0789 (2010. 01)	C 1 2 N 5/0789
A 6 1 K 35/17 (2015. 01)	A 6 1 K 35/17 Z
A 6 1 P 35/00 (2006. 01)	A 6 1 P 35/00

請求項の数 17 (全 156 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2018-522655 (P2018-522655)	(73) 特許権者	506115514
(86) (22) 出願日	平成28年10月28日 (2016. 10. 28)		ザ リージェンツ オブ ザ ユニバーシ ティ オブ カリフォルニア
(65) 公表番号	特表2018-533364 (P2018-533364A)		The Regents of the University of Calif ornia
(43) 公表日	平成30年11月15日 (2018. 11. 15)		アメリカ合衆国, カリフォルニア州 94 607-5200, オークランド, フラン クリン ストリート 1111, 12番 フロア
(86) 国際出願番号	PCT/US2016/059375		
(87) 国際公開番号	W02017/075389	(74) 代理人	100102978
(87) 国際公開日	平成29年5月4日 (2017. 5. 4)		弁理士 清水 初志
審査請求日	令和1年10月25日 (2019. 10. 25)	(74) 代理人	100102118
(31) 優先権主張番号	62/359, 456		弁理士 春名 雅夫
(32) 優先日	平成28年7月7日 (2016. 7. 7)		
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	62/265, 204		
(32) 優先日	平成27年12月9日 (2015. 12. 9)		
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 幹細胞からT細胞を作製する方法および該T細胞を用いた免疫療法的方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

幹細胞または前駆細胞から成熟CD4⁺CD8⁻または成熟CD8ab⁺CD4⁻ T細胞の組成物を調製するための方法であって、該方法は、

a) 外因性Notchリガンドを発現する間質細胞の選択細胞株；

b) 造血幹細胞または前駆細胞の集団

を含む三次元 (3D) 細胞凝集体を培養する工程を含み、

該3D細胞凝集体が、T細胞への幹細胞または前駆細胞のインビトロでの分化に十分な期間、インスリン、FLT3L、IL-7およびアスコルビン酸を含む、血清不含培地中で培養され；

該造血幹細胞または前駆細胞が、(i) 胚性幹細胞 (ESC)、誘導多能性幹細胞 (iPSC) もしくはヒト胚性中胚葉前駆細胞由来の培養物中で生成された、または(ii) 骨髄、臍帯血、胸腺、末梢血もしくは動員血から単離された、
前記方法。

【請求項 2】

3D細胞凝集体を形成させるための幹細胞または前駆細胞および間質細胞の遠心分離をさらに含む、請求項1記載の方法。

【請求項 3】

間質細胞が、完全な、部分的な、または改変されたNotchリガンドをコードする外因性ヌクレオチド配列を有し、該Notchリガンドが、DLL4、DLL1、JAG1、JAG2、またはそれら

の組み合わせである、請求項1記載の方法。

【請求項4】

間質細胞が、マウス間質細胞株、ヒト間質細胞株、インビトロで多能性幹細胞から分化した間質細胞の選択集団、またはそれらの組み合わせである、請求項1記載の方法。

【請求項5】

間質細胞が、外因性ヒト主要組織適合複合体（MHC）、外因性抗原特異的共刺激分子もしくはサイトカイン、外因性抗原、またはそれらの組み合わせを発現する、請求項1記載の方法。

【請求項6】

幹細胞または前駆細胞が、外因性T細胞受容体（TCR）、キメラ抗原受容体（CAR）、およびHLA発現または機能の遺伝子改変の1つまたは複数を含む、請求項1記載の方法。

10

【請求項7】

3D細胞凝集体由来のT細胞が、対立遺伝子排除または遺伝子改変により内因性TCRを発現しない、または該T細胞が内因性TCR遺伝子の遺伝子座に挿入された外因性TCR遺伝子を含む、請求項1記載の方法。

【請求項8】

3D細胞凝集体由来のT細胞が、外因性TCRおよびCARの一方または両方を発現する、および該T細胞が先天性様T細胞に特徴的なマーカーを発現する、請求項1記載の方法。

【請求項9】

請求項1記載の方法により産生されたT細胞の集団。

20

【請求項10】

T細胞が先天性様T細胞に特徴的なマーカーを発現する、請求項9記載のT細胞の集団。

【請求項11】

T細胞が、外因性TCRおよびCARの一方または両方を発現する、請求項9記載のT細胞の集団。

【請求項12】

CARがCD19 CARを含む、請求項11記載のT細胞の集団。

【請求項13】

外因性TCRがNY-ESO-1特異的TCRである、請求項11記載のT細胞の集団。

【請求項14】

T細胞が、ナチュラルキラーT細胞、ガンマ-デルタT細胞、サプレッサーT細胞、抗原特異的T細胞、上皮内リンパ球T細胞、もしくはそれらの組み合わせである、請求項9記載のT細胞の集団。

30

【請求項15】

請求項9記載のT細胞の集団を含む、患者を治療するための薬学的組成物。

【請求項16】

患者におけるがん、自己免疫疾患、移植片対宿主疾患または移植片拒絶を治療するための請求項9記載のT細胞の集団を含む、薬学的組成物。

【請求項17】

T細胞が患者に対して同種異系である、請求項15または16記載の薬学的組成物。

40

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、2015年10月30日に提出された米国仮特許出願第62/248,931号、2015年12月9日に提出された米国仮特許出願第62/265,204号、および2016年7月7日に提出された米国仮特許出願第62/359,456号の優先権の恩典を主張するものである。上記の各開示の全内容が、免責条項なしに参照により本明細書に具体的に組み入れられる。

【0002】

発明の背景

50

本発明は、米国国立衛生研究所によって授与された助成金番号HL066992の下で政府支援によりなされた。政府は、本発明において一定の権利を有する。

【0003】

1. 発明の分野

本発明は、概して、細胞培養および発生の分野に関する。より特には、幹細胞または前駆細胞からのT細胞の産生に関する。

【背景技術】

【0004】

2. 関連技術の説明

現在の改変T細胞療法（TCR改変およびCAR-T手法を含む）は、自家末梢血T細胞を遺伝子改変することに依存する（すなわち、改変のためのT細胞は、それらを受容するであろう同じ患者から単離される）。同種異系（非自己）レシピエントに移植すると、ドナーT細胞の同種反応性により、移植片対宿主疾患（GVHD）として知られるレシピエントにおける組織損傷の症候群をもたらす得るため、自家手法が要される。しかしながら、現在後期臨床試験中である自家細胞療法の商品化への急速な後押しにもかかわらず、患者特異的な自家改変T細胞療法の使用は、極めて労働および費用集約的であり、かつ拡張性が不確定である。さらに、自家改変T細胞療法の使用は、そこから正常なT細胞が十分に回収され得ない患者（例えば、リンパ球減少患者）またはT細胞が機能的に損なわれている患者（例えば、HIV/AIDS患者；加齢に伴う免疫機能不全の結果として高齢患者）においては、除外されるか、効力が小さい。これら多くの懸案事項を考慮すると、同種反応性でない、すぐに使える改変T細胞療法を生み出す方法は、養子細胞療法の分野における満たされていない大きな商業的ニーズである。

【発明の概要】

【0005】

改変T細胞を作製するための方法および結果として生じるT細胞の組成物を本明細書に記載する。一部の態様において、T細胞は同種反応性でなく、外因性TCRおよび/またはCARを発現する。これらのT細胞は、「すぐに使える」T細胞療法に有用であり、患者自身のT細胞の使用を要しない。それゆえ、本方法は、より費用効果が高くより労働集約度が低いT細胞免疫療法を提供する。これらのT細胞を用いた免疫療法的方法も記載する。

【0006】

本開示の局面は、胚性幹細胞、多能性幹細胞、造血幹細胞もしくは前駆細胞、または本明細書に記載される当技術分野において公知の幹細胞もしくは前駆細胞など、あまり分化していない細胞からT細胞を産生する新規な三次元細胞培養システムに関する。特定の態様において、システムは、血清不含培地を用いる工程を伴う。ある特定の局面において、新規システムは、間質細胞および幹細胞または前駆細胞を含む三次元細胞凝集体の培養のための神経細胞発生に適した血清不含培地を用い、T細胞、あるいはより具体的には抗原特異的T細胞、またはインビトロで陽性もしくは陰性選択を受けたT細胞を産生する。本開示の態様において、3D細胞凝集体は、T細胞への幹細胞または前駆細胞のインビトロでの分化に十分な期間、インスリンを含む血清不含培地中で培養される。一部の態様において、T細胞は、特異的抗原に対する高い親和力をT細胞に提供する陽性選択を受ける。

【0007】

したがって、本開示の局面は、三次元（3D）細胞凝集体および培地を含む、細胞培養組成物に関する。一部の態様において、3D細胞凝集体は、a) 間質細胞の選択集団；および/またはb) 幹細胞もしくは前駆細胞の選択集団、を含む。a) またはb) は、特定の態様において排除され得るまたは実質的に排除され得ることが具体的に企図される。ある特定の態様において、細胞、特に間質細胞のうちの1つまたは複数は、Notchリガンドを発現し得る。一部の態様において、Notchリガンドは外因性である。一部の態様において、Notchリガンドは内因性である。他の態様において、培地は、外部から添加されたNotchリガンドを含み得る。さらなる態様において、外部から添加されたNotchリガンドは、固体支持体に付着され得る、または固定化され得る。例えば、一部の態様において、間質細胞は、ト

ランスフェクションまたは形質導入によって細胞内に導入され得る（または、以前に導入されている）、Notchリガンドをコードする外因性ヌクレオチド配列を有する。ある特定の態様において、培養組成物は、Notchリガンドを含み得ない、または外部から添加されたNotchリガンドを含み得ない。

【0008】

本明細書において用いられる「notchリガンド」という用語には、完全な（全長）、部分的な（切り取られた形態）、もしくは改変された（保存的変異など、1つまたは複数の変異を含む）notchリガンド、ならびに任意の種由来のNotchリガンド、または全長Notchリガンドの少なくとも1種の活性もしくは機能を保持するそれらのフラグメントが含まれる。notchリガンドを模倣するペプチドも含まれる。Notchリガンドは、「標準的（canonical）notchリガンド」または「非標準的（non-canonical）notchリガンド」であり得る。標準的notchリガンドは、N末（NT）ドメイン、それに続くデルタ/セラート/LAG-2（DSL）ドメインおよび直列に配置された複数の上皮成長因子（EGF）様リピートを典型的に含む、細胞外ドメインによって特徴付けられる。隣接するNTドメインと合わせたDSLドメイン、ならびにデルタおよびOSM-11様タンパク質（DOS）モチーフを含有する最初の2つのEGFリピートは、典型的に、標準的リガンドがNotchに結合するのに要される。一部の標準的リガンドの細胞内ドメインは、Notchシグナル伝達とは無関係な役割を果たすカルボキシ端PSD-95/Dlg/ZO-1リガンド（PDZL）モチーフを含有する。C.エレガンス（C. elegans）DSLリガンドは、DOSモチーフを欠くが、DOSのみを含有するリガンドと協働してNotchシグナル伝達を活性化することが提案されている。例証的な標準的notchリガンドには、デルタ様リガンド4（DLL4）、デルタ様リガンド1（DLL1）、Jagged 1（JAG1）、Jagged 2（JAG2）、デルタ様リガンド3（DLL3）、およびX-デルタ2が含まれるが、それらに限定されるわけではなく、他の類似の例証的な標準的リガンドが、付加的な態様において企図される。

【0009】

非標準的notchリガンドは、DSLドメイン（デルタ/セラート/LAG-2）を欠き、構造的に多様であり、内在性のおよびGPI連結した膜タンパク質、ならびに様々な分泌タンパク質を含む。「notchリガンドフラグメント」または「標準的notchリガンドフラグメント」が本明細書において言及される場合、フラグメントは、notchに結合するフラグメントであることが企図される。非標準的notchリガンドの例には、コンタクチン-1、NOV/CCN3、コンタクチン-6、ペリオスチン/OSF-2、DLK2/EGFL9、Pref-1/DLK1/FA1、DNER、トロンプスポンジン-2、MAGP-1/MFAP2、トロンプスポンジン-3、MAGP-2/MFAP5、トロンプスポンジン-4、およびネトリン-1が含まれるが、それらに限定されるわけではない。

【0010】

一部の態様において、培地はビタミンをさらに含む。一部の態様において、培地は、ビオチン、酢酸DLアルファトコフェロール、DLアルファトコフェロール、ビタミンA、塩化コリン、パントテン酸カルシウム、パントテン酸、葉酸ニコチンアミド、ピリドキシン、リボフラビン、チアミン、イノシトール、ビタミンB12のうちの1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、もしくは13種（およびその中に導き出せる任意の値域）を含み、あるいは培地は、それらの組み合わせもしくはそれらの塩を含む。一部の態様において、培地は、ビオチン、酢酸DLアルファトコフェロール、DLアルファトコフェロール、ビタミンA、塩化コリン、パントテン酸カルシウム、パントテン酸、葉酸ニコチンアミド、ピリドキシン、リボフラビン、チアミン、イノシトール、およびビタミンB12を含むまたはそれらから本質的になる。一部の態様において、ビタミンは、ビオチン、酢酸DLアルファトコフェロール、DLアルファトコフェロール、ビタミンA、またはそれらの組み合わせもしくは塩を含むまたはそれらから本質的になる。一部の態様において、培地はタンパク質をさらに含む。一部の態様において、タンパク質には、アルブミンもしくはウシ血清アルブミン、BSAの一画分、カタラーゼ、インスリン、トランスフェリン、スーパーオキシドジスムターゼ、またはそれらの組み合わせが含まれる。一部の態様において、培地は、コルチコステロン、D-ガラクトース、エタノールアミン、グルタチオン、L-カルニチン、リノール

酸、リノレン酸、プロゲステロン、プトレシン、亜セレン酸ナトリウム、もしくはトリヨード (triiodo) -I-サイロニン、またはそれらの組み合わせのうちの1種または複数種をさらに含む。一部の態様において、培地は、B-27 (登録商標) サプリメント、ゼノフリーB-27 (登録商標) サプリメント、GS21 (商標) サプリメント、またはそれらの組み合わせのうちの1種または複数種を含む。一部の態様において、培地は、アミノ酸、単糖、無機イオンを含む、またはさらに含む。一部の態様において、アミノ酸には、アルギニン、シスチン、イソロイシン、ロイシン、リジン、メチオニン、グルタミン、フェニルアラニン、トレオニン、トリプトファン、ヒスチジン、チロシン、もしくはバリン、またはそれらの組み合わせが含まれる。一部の態様において、無機イオンには、ナトリウム、カリウム、カルシウム、マグネシウム、窒素、もしくはリン、またはそれらの組み合わせもしくは塩が含まれる。一部の態様において、培地は、モリブデン、バナジウム、鉄、亜鉛、セレン、銅、もしくはマンガン、またはそれらの組み合わせのうちの1種または複数種をさらに含む。ある特定の態様において、培地は、本明細書において述べられる1種もしくは複数種のビタミン、および/または本明細書において述べられる1種もしくは複数種のタンパク質、および/または以下のもの：コルチコステロン、D-ガラクトース、エタノールアミン、グルタチオン、L-カルニチン、リノール酸、リノレン酸、プロゲステロン、プトレシン、亜セレン酸ナトリウム、もしくはトリヨード-I-サイロニン、B-27 (登録商標) サプリメント、ゼノフリーB-27 (登録商標) サプリメント、GS21 (商標) サプリメント、アミノ酸 (アルギニン、シスチン、イソロイシン、ロイシン、リジン、メチオニン、グルタミン、フェニルアラニン、トレオニン、トリプトファン、ヒスチジン、チロシン、またはバリンなど)、単糖、無機イオン (ナトリウム、カリウム、カルシウム、マグネシウム、窒素、および/またはリンなど) もしくはそれらの塩、および/またはモリブデン、バナジウム、鉄、亜鉛、セレン、銅、もしくはマンガンのうちの1種もしくは複数種を含むまたはそれらから本質的になる。

【0011】

ある特定の局面における培地は、AIM V、X-VIVO-15、NeuroBasal、EGM2、TeSR、BME、BGJb、CMRL 1066、グラスゴーMEM、改良MEM亜鉛オプション、IMDM、199培地、イーグルMEM、αMEM、DMEM、Ham、RPMI-1640、およびフィッシャー培地のいずれかならびにそれらの任意の組み合わせなど、動物細胞を培養するために用いられる培地を基礎培地として用いて調製され得るが、培地は、それが動物細胞を培養するために用いられ得る限り、それらに特に限定され得ない。特に、培地はゼノフリーであり得る、または化学的に規定され得る。

【0012】

培地は、血清含有もしくは血清不含培地、またはゼノフリー培地であり得る。異種動物由来構成要素による汚染を阻止する局面から、血清は、幹細胞のものと同一動物に由来し得る。血清不含培地は、未加工または未精製の血清を有しない培地を指し、したがって、精製された血液由来構成要素または動物組織由来構成要素 (成長因子など) を有する培地を含み得る。

【0013】

培地は、血清の任意の代替物を含有しても含有しなくてもよい。血清の代替物には、アルブミン (脂質に富んだアルブミン、ウシアルブミン、組換えアルブミンまたはヒト化アルブミンなどのアルブミン代用物、植物デンプン、デキストラン、およびタンパク質加水分解物など)、トランスフェリン (または、他の鉄輸送体)、脂肪酸、インスリン、コラーゲン先駆体、微量元素、2-メルカプトエタノール、3'-チオグリセロール (thiolglycerol)、またはそれらの同等物を適当に含有する材料が含まれ得る。血清の代替物は、例えば国際公報第98/30679号 (その全体が本明細書に組み入れられる) に開示される方法によって調製され得る。あるいは、より多くの利便性のために、任意の市販の材料が使用され得る。市販の材料には、ノックアウト血清代替品 (knockout Serum Replacement) (KSR)、化学的に規定された脂質濃縮型 (Chemically-defined Lipid concentrated) (Gibco)、およびGlutamax (Gibco) が含まれる。

【0014】

さらなる態様において、培地は、細胞発生に適した血清不含培地であり得る。例えば、培地は、3D細胞凝集体からT細胞を産生するのに有効な濃度で、B-27（登録商標）サプリメント、ゼノフリーB-27（登録商標）サプリメント（thermofisher.com/us/en/home/technical-resources/media-formulation.250.htmlにおけるワールドワイドウェブで入手可能）、NS21サプリメント（Chen et al., J Neurosci Methods, 2008 Jun 30; 171(2):239-247、その全体が本明細書に組み入れられる）、GS21（商標）サプリメント（amsbio.com/B-27.aspxにおけるワールドワイドウェブで入手可能）、またはそれらの組み合わせを含み得る。

【0015】

ある特定の態様において、培地は、ビオチン；酢酸DLアルファトコフェロール；DLアルファトコフェロール；ビタミンA（アセテート）などのビタミン；BSA（ウシ血清アルブミン）またはヒトアルブミン、脂肪酸不含のフラクシオンV；カタラーゼ；ヒト組換えインスリン；ヒトトランスフェリン；スーパーオキシドジスムターゼなどのタンパク質；コルチコステロン；D-ガラクトース；エタノールアミンHCl；グルタチオン（還元型）；L-カルニチンHCl；リノール酸；リノレン酸；プロゲステロン；プトレシン2HCl；亜セレン酸ナトリウム；および/またはT3（トリヨード-L-サイロニン）などの他の構成要素のうちの1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20種、またはそれを上回る種類を含み得る。

【0016】

さらなる態様において、培地は、外部から添加されたアスコルビン酸を含み得る。培地は、1種または複数種の外部から添加された脂肪酸もしくは脂質、アミノ酸（非必須アミノ酸など）、ビタミン、成長因子、サイトカイン、抗酸化物質、2-メルカプトエタノール、ピルビン酸、緩衝剤、および/または無機塩も含有し得る。

【0017】

培地構成要素のうちの1種または複数種は、少なくとも、多くとも、または約0.1、0.5、1、2、3、4、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、150、180、200、250ng/L、ng/ml、μg/ml、mg/ml、またはその中に導き出せる任意の値域の濃度で添加され得る。

【0018】

用いる培地には、約0.1ng/mL～約500ng/mL、より特には1ng/mL～100ng/mL、または少なくとも、多くとも、もしくは約0.1、0.5、1、2、3、4、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、150、180、200、250ng/L、ng/ml、μg/ml、mg/ml、もしくはその中に導き出せる任意の値域の濃度で、少なくとも1種の外部から添加されるサイトカインを補充し得る。適切なサイトカインには、FLT3リガンド（FLT3L）、インターロイキン7（IL-7）、幹細胞因子（SCF）、トロンボポエチン（TPO）、IL-2、IL-4、IL-6、IL-15、IL-21、TNF-アルファ、TGF-ベータ、インターフェロン-ガンマ、インターフェロン-ラムダ、TSLP、チモペンチン、プレオトロフィン（pleiotrophin）、および/またはミッドカインが含まれるが、それらに限定されるわけではない。特に、培養培地は、FLT3LおよびIL-7のうちの少なくとも一方を含み得る。より特に、培養物は、FLT3LおよびIL-7の両方を含み得る。

【0019】

ある特定の態様において、3D細胞凝集体は、コラーゲン、ゼラチン、ポリ-L-リジン、ポリ-D-リジン、ラミニン、およびフィブロネクチン、ならびにそれらの混合物、例えばマトリゲル（商標）、ならびに溶解細胞膜調製物など、規定されたまたは規定されていない外因性細胞外マトリックスを含み得る。他の態様において、3D細胞凝集体は、外因性マトリックスまたは足場を含まない。

【0020】

他の培養条件は、適当に規定され得る。例えば、培養温度は、少なくとも、多くとも、または約20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、

10

20

30

40

50

38、39、40℃（またはその中に導き出せる任意の値域）などの約20～40℃であり得るが、とはいえ温度は、これらの値よりも上または下であり得る。CO₂濃度は、約2%～10%、例えば約2～5%、またはその中に導き出せる任意の値域など、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10%（またはその中に導き出せる任意の値域）であり得る。酸素分圧は、少なくとももしくは約1、5、8、10、20%、またはその中に導き出せる任意の値域であり得る。

【0021】

間質細胞および幹細胞または前駆細胞は、任意の比率、例えば約100:1、80:1、40:1、20:1、10:1、5:1、1:1、1:5、1:10、1:20、1:40、1:80、および/もしくは1:100、またはその中に導き出せる任意の値域で存在し得る。

10

【0022】

一部の態様において、間質細胞は、マウス間質細胞株、ヒト間質細胞株、初代間質細胞の選択集団、インビトロで多能性幹細胞から分化した間質細胞の選択集団、またはそれらの組み合わせであり得る。一部の態様において、間質細胞は、本明細書において記載される方法における開始材料として用いられるものと同じ、幹細胞または前駆細胞の集団から分化する。一部の態様において、間質細胞はヒト細胞から分化する。一部の態様において、間質細胞はヒト多能性幹細胞から分化する。一部の態様において、間質細胞は、ヒトまたは非ヒトHSPCまたはPSC細胞から分化する。

【0023】

さらなる態様において、間質細胞またはその前駆体は遺伝子改変され得る。例えば、間質細胞は、外因性ヒト主要組織適合複合体（MHC）を発現し得る。さらなる態様において、間質細胞は、外因性抗原特異的共刺激分子、サイトカイン、抗原、もしくは細胞外マトリックスタンパク質、またはT細胞の分化、増殖、もしくは機能を調節する任意の生理活性分子もしくは遺伝子などの任意のT細胞調節因子を発現し得る。一部の態様において、間質細胞（または前駆体）は、抗原またはHLA分子を発現するように操作される。

20

【0024】

一部の態様において、細胞凝集体は、腫瘍細胞または腫瘍抗原を含むまたはさらに含む。一部の態様において、細胞凝集体は、外因性主要組織適合複合体（MHC）を含む。一部の態様において、MHCはヒトMHCである。一部の態様において、細胞凝集体は、外因性抗原特異的共刺激分子、サイトカイン、抗原、もしくは細胞外マトリックスタンパク質、またはT細胞の分化、増殖、もしくは機能を調節する任意の生理活性分子もしくは遺伝子などの任意のT細胞調節因子を含む。一部の態様において、間質細胞（または前駆体）は、抗原またはHLA分子を発現するように操作される。

30

【0025】

ある特定の態様において、幹細胞もしくは前駆細胞は、胚性幹細胞、造血幹細胞もしくは前駆細胞、骨髓、臍帯血、末梢血、胸腺から単離された細胞より選択され得る、または幹細胞もしくは前駆細胞は、インビトロで胚性幹細胞（ESC）もしくは誘導多能性幹細胞（iPSC）から分化したものであり得る。初代組織またはESCもしくはiPSC由来の幹細胞または前駆細胞は、起源がヒトまたは非ヒト動物（例えば、マウス）由来であり得る。

【0026】

さらなる態様において、幹細胞または前駆細胞は遺伝子改変され得る。例えば、幹細胞または前駆細胞は、外因性T細胞受容体（TCR）もしくはキメラ抗原受容体（CAR）、またはその両方を発現し得る。さらなる態様において、幹細胞または前駆細胞は、外因性インバリアントナチュラルキラーT細胞（iNKT）関連TCRを発現し得る。なおさらなる態様において、幹細胞または前駆細胞は、外因性抗原特異的TCRを発現する、またはT細胞の分化、増殖、もしくは機能を調節する遺伝子の外因性遺伝子改変を有する。

40

【0027】

一部の態様において、本明細書において記載される培養組成物および方法において用いられる幹細胞もしくは前駆細胞または間質細胞は、以前に凍結されている細胞である。一部の態様において、細胞は凍結されたことがない。一部の態様において、細胞は、少なく

50

とも、多くとも、または正確に0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45、または50回（またはその中に導き出せる任意の値域）継代されている。

【0028】

ある特定の態様において、間質細胞、幹細胞もしくは前駆細胞、またはその中で産生されたT細胞などの細胞集団のいずれかは、少なくとも、約、または多くとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、50、60、70、80、90、100、200、300、400、500、 1×10^3 、 2×10^3 、 3×10^3 、 4×10^3 、 5×10^3 、 6×10^3 、 7×10^3 、 8×10^3 、 9×10^3 、 1×10^4 、 2×10^4 、 3×10^4 、 4×10^4 、 5×10^4 、 6×10^4 、 7×10^4 、 8×10^4 、 9×10^4 、 1×10^5 、 2×10^5 、 3×10^5 、 4×10^5 、 5×10^5 、 6×10^5 、 7×10^5 、 8×10^5 、 9×10^5 、 1×10^6 、または 2×10^6 個の細胞（またはその中に導き出せる任意の値域）を含み得る。特定の態様において、幹細胞または前駆細胞は1~200,000個である。

10

【0029】

本開示の局面は、幹細胞または前駆細胞からT細胞組成物を調製するための方法にも関し、該方法は、a) Notchリガンドを発現する間質細胞の選択集団；b) 幹細胞または前駆細胞の選択集団、を含む三次元（3D）細胞凝集体を培養する工程を含み、該3D細胞凝集体は、T細胞への幹細胞または前駆細胞のインビトロでの分化に十分な期間、インスリンを含む血清不含培地中で培養される。培養組成物は、培養組成物および培養培地の構成要素として、本明細書において記載される任意の態様を含み得る。さらに、本開示の方法の局面において用いられる細胞は、培養組成物における使用に適した、本明細書において記載される任意の幹細胞もしくは前駆細胞または間質細胞であり得る。

20

【0030】

本明細書において記載される組成物および方法は、該方法が、ある特定の表現型を有するT細胞を調製するためのものであるように改変され得る。一部の態様において、方法は、以下の表現型を有するT細胞：CD4⁺CD8⁻ T細胞、CD4⁻CD8⁺ T細胞、CD34⁺ CD7⁺ CD1a⁺細胞、CD3⁺ TCRab⁺、CD3⁺ TCRgd⁺、CD3⁺ TCRab⁺ CD4⁺ CD8⁻、CD3⁺ TCRab⁺ CD8⁺ CD4⁻、CD3⁺ TCRab⁺ CD4⁺ CD8⁻ CD45RO⁻ CD45RA⁺、CD3⁺ TCRab⁺ CD8⁺ CD4⁻ CD45RO⁻ CD45RA⁺、CD3⁺ TCRab⁺ CD4⁺ CD8⁻ CD45RO⁻ CD45RA⁺ CCR7⁺、CD3⁺ TCRab⁺ CD8⁺ CD4⁻ CD45RO⁻ CD45RA⁺ CCR7⁺、CD3⁺ TCRab⁺ CD4⁺ CD8⁻ CD45RO⁻ CD45RA⁺ CD27⁺、CD3⁺ TCRab⁺ CD8⁺ CD4⁻ CD45RO⁻ CD45RA⁺ CD27⁺、CD34⁺ CD7⁺ CD1a⁺細胞、CD34⁺CD5⁺CD7⁺、CD34⁺CD5⁺CD7⁻、ナチュラルキラーT細胞、調節性T細胞、抗原特異的T細胞、上皮内リンパ球T細胞、あるいはCD45⁺、CD11b⁺、CD11b⁻、CD15⁺、CD15⁻、CD24⁺、CD24⁻、CD114⁺、CD114⁻、CD182⁺、CD182⁻、CD4⁺、CD4⁻、CD14⁺、CD14⁻、CD11a⁺、CD11a⁻、CD91⁺、CD91⁻、CD16⁺、CD16⁻、CD3⁺、CD3⁻、CD25⁺、CD25⁻、Foxp3⁺、Foxp3⁻、CD8⁺、CD8⁻、CD19⁺、CD19⁻、CD20⁺、CD20⁻、CD24⁺、CD24⁻、CD38⁺、CD38⁻、CD22⁺、CD22⁻、CD61⁺、CD61⁻、CD16⁺、CD16⁻、CD56⁺、CD56⁻、CD31⁺、CD31⁻、CD30⁺、CD30⁻、CD38⁺、および/もしくはCD38⁻、またはそれらの組み合わせである細胞を調製するためのものである。例として、上皮内リンパ球（IEL）は、間質細胞において同族抗原を発現させることによって調製され得る。

30

【0031】

一部の態様において、方法は、3D細胞凝集体を形成させるために幹細胞または前駆細胞および間質細胞の遠心分離をさらに含む。方法は、三次元（3D）細胞凝集体を培養する工程を含み得る。3D細胞凝集体は、外因性Notchリガンドを発現する間質細胞の選択集団と、幹細胞または前駆細胞の選択集団とを含む。培地成分の代替物のいずれかは、上記のとおりであり得る。

40

【0032】

さらなる態様において、培養は、遠心分離を用いて3D細胞凝集体を形成する工程を含み得る。培養は、少なくとも、多くとも、または正確に約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、もしくは48時間、日間、もしくは週間、またはその中に導き出せる任意の値域など、任意の長さの期間であり得る。付加的な態様において、培養は、細胞継代を伴っても伴わなくてもよい。

50

【0033】

一部の態様において、方法は、インビトロで分化したT細胞由来の内因的に発現したTCRをさらに含む。一部の態様において、方法は、T細胞を刺激する工程をさらに含む。一部の態様において、T細胞を抗原提示細胞で刺激する。一部の態様において、抗原提示細胞は腫瘍抗原を提示する。

【0034】

さらなる態様において、3D細胞凝集体由来のT細胞をそれを必要としている対象に投与する工程、または3D細胞凝集体由来のT細胞をさらに分化させる工程、を含む方法または段階が提供され得る。

【0035】

一部の態様において、3D細胞凝集体由来のT細胞は、対立遺伝子排除により内因性TCRを発現しない。他の態様において、3D細胞凝集体由来のT細胞は、外因性TCRまたはCARを発現する。

【0036】

上記の細胞培養組成物を培養し、それによってT細胞を産生する工程を含む、T細胞を産生するための方法が提供され得る。前駆細胞が外因性抗原特異的TCRまたはCARを発現する、抗原特異的T細胞を産生するための方法としてさらに規定され得る上記の方法も提供され得る。

【0037】

T細胞を産生するための方法が提供され得る、または培養方法のいずれかは、3D細胞凝集体由来のT細胞を産生し得る。ある特定の局面における方法は、四量体もしくは抗TCR抗体を用いて、CD4⁺CD8⁻ T細胞、CD4⁻CD8⁺ T細胞、CD34⁺ CD7⁺ CD1a⁺細胞、CD3⁺ TCRab⁺、CD3⁺ TCRgd⁺、CD3⁺ TCRab⁺ CD4⁺ CD8⁻、CD3⁺ TCRab⁺ CD8⁺ CD4⁻、CD3⁺ TCRab⁺ CD4⁺ CD8⁻ CD45RO⁻ CD45RA⁺、CD3⁺ TCRab⁺ CD8⁺ CD4⁻ CD45RO⁻ CD45RA⁺、CD3⁺ TCRab⁺ CD4⁺ CD8⁻ CD45RO⁻ CD45RA⁺ CCR7⁺、CD3⁺ TCRab⁺ CD8⁺ CD4⁻ CD45RO⁻ CD45RA⁺ CCR7⁺、CD3⁺ TCRab⁺ CD4⁺ CD8⁻ CD45RO⁻ CD45RA⁺ CD27⁺、CD3⁺ TCRab⁺ CD8⁺ CD4⁻ CD45RO⁻ CD45RA⁺ CD27⁺、CD34⁺ CD7⁺ CD1a⁺細胞、CD34⁺CD5⁺CD7⁺、CD34⁺CD5⁺CD7⁻、ナチュラルキラーT細胞、調節性T細胞、抗原特異的T細胞の数を、改変された抗原を用いてCAR T細胞の数を、蛍光マーカーを用いて形質導入されたT細胞の数を検出する工程、それらに従ってもしくは逆らって選択する工程、またはそれらの数を増加させる工程、あるいはそれらの組み合わせをさらに含む得る。一部の態様において、上皮内リンパ球は、CD4⁻ CD8⁺、CD4⁺ CD8⁻、CD4⁺ CD8⁺、CD4⁻ CD8⁻、TCRab⁺、TCRgd⁺、CD5⁺CD7⁺、CD5⁺CD7⁺CD3⁻CD4⁻CD8⁻、CD5⁺CD7⁺CD3⁻CD4⁻CD8aa、またはそれらの組み合わせである。一部の態様において、CD4⁻ CD8⁺、CD4⁺ CD8⁻、CD4⁺ CD8⁺、CD4⁻ CD8⁻、TCRab⁺、TCRgd⁺、CD5⁺CD7⁺、CD5⁺CD7⁺CD3⁻CD4⁻CD8⁻、および/またはCD5⁺CD7⁺CD3⁻CD4⁻CD8aaなどの上皮内リンパ球は排除される。

【0038】

対象におけるT細胞の数を増加させるための、または対象における疾患もしくは病状を治療するための方法が提供され得、該方法は、本明細書において記載されるように調製された有効量のT細胞もしくは抗原特異的T細胞、または外因性TCRを含むものなど、本開示の任意のT細胞を対象に投与する工程を含む。一部の態様において、T細胞は、本明細書において記載される細胞表面マーカーを有する。

【0039】

対象は、任意の動物、特にマウス、非ヒト霊長類、またはヒトであり得る。さらなる局面において、対象は、自己免疫疾患、がん、感染症、免疫不全、またはそれらの組み合わせを有するまたはその危険性があると判定されている可能性がある。

【0040】

さらなる態様において、3D細胞凝集体からT細胞を産生するのに有効な濃度の血清不含培地を用いて三次元(3D)細胞凝集体を培養する工程を含む、自己抗原と反応しないT細胞を産生するための方法が提供され得る。ある特定の局面において、3D細胞凝集体は、a) 外因性Notchリガンドを発現する間質細胞の選択集団、およびb) 幹細胞または前駆細胞

10

20

30

40

50

の選択集団を含み、a) またはb) の1種または複数種の細胞は、外因性自己抗原を発現し；それによって該3D細胞凝集体は、自己抗原と反応しないT細胞を産生する。さらなる局面において、a) またはb) の細胞のうちの1種または複数種は、外因性自己MHCを発現するまたは発現しない。

【0041】

本開示の局面は、本明細書において記載される方法によって作製されるT細胞に関する。一部の態様において、T細胞は、本開示を通じて記載される特異的表現型、細胞表面マーカー、または特徴を有する。

【0042】

したがって、本開示の局面は、キメラ抗原受容体 (CAR) を含む単離されたT細胞またはT細胞の集団に関し、該T細胞は、上皮内リンパ球表現型を有する。一部の態様において、T細胞はTCR⁻である。一部の態様において、T細胞は、CD4⁻ CD8⁺、CD4⁺ CD8⁻、CD4⁺ CD8⁺、CD4⁻ CD8⁻、TCRab⁺、TCRgd⁺、CD5⁺CD7⁺、CD5⁺CD7⁺CD3⁻CD4⁻CD8⁻、CD5⁺CD7⁺CD3⁻CD4⁻CD8^{aa}、またはそれらの組み合わせである。一部の態様において、T細胞はCD5⁺CD7⁺CD3⁻CD4⁻CD8⁻である。一部の態様において、T細胞はCD5⁺CD7⁺CD3⁻CD4⁻CD8^{aa}である。一部の態様において、CARはCD19 CARを含む。一部の態様において、T細胞は外因性TCRをさらに含む。一部の態様において、T細胞はCD3⁺である。一部の態様において、T細胞は、CD4⁺CD8⁻ T細胞、CD4⁻CD8⁺ T細胞、CD34⁺ CD7⁺ CD1a⁺細胞、CD3⁺ TCRab⁺、CD3⁺ TCRgd⁺、CD3⁺ TCRab⁺ CD4⁺ CD8⁻、CD3⁺ TCRab⁺ CD8⁺ CD4⁻、CD3⁺ TCRab⁺ CD4⁺ CD8⁻ CD45RO⁻ CD45RA⁺、CD3⁺ TCRab⁺ CD8⁺ CD4⁻ CD45RO⁻ CD45RA⁺、CD3⁺ TCRab⁺ CD4⁺ CD8⁻ CD45RO⁻ CD45RA⁺ CCR7⁺、CD3⁺ TCRab⁺ CD8⁺ CD4⁻ CD45RO⁻ CD45RA⁺ CCR7⁺、CD3⁺ TCRab⁺ CD4⁺ CD8⁻ CD45RO⁻ CD45RA⁺ CD27⁺、CD3⁺ TCRab⁺ CD8⁺ CD4⁻ CD45RO⁻ CD45RA⁺ CD27⁺、CD34⁺ CD7⁺ CD1a⁺細胞、CD34⁺CD5⁺CD7⁺、CD34⁺CD5⁺CD7⁻、ナチュラルキラーT細胞、調節性T細胞、抗原特異的T細胞、上皮内リンパ球T細胞、あるいはCD45⁺、CD11b⁺、CD11b⁻、CD15⁺、CD15⁻、CD24⁺、CD24⁻、CD114⁺、CD114⁻、CD182⁺、CD182⁻、CD4⁺、CD4⁻、CD14⁺、CD14⁻、CD11a⁺、CD11a⁻、CD91⁺、CD91⁻、CD16⁺、CD16⁻、CD3⁺、CD3⁻、CD25⁺、CD25⁻、Foxp3⁺、Foxp3⁻、CD8⁺、CD8⁻、CD19⁺、CD19⁻、CD20⁺、CD20⁻、CD24⁺、CD24⁻、CD38⁺、CD38⁻、CD22⁺、CD22⁻、CD61⁺、CD61⁻、CD16⁺、CD16⁻、CD56⁺、CD56⁻、CD31⁺、CD31⁻、CD30⁺、CD30⁻、CD38⁺、もしくはCD38⁻、またはそれらの組み合わせである細胞である。さらなる局面は、単離されたT細胞またはT細胞の集団に関し、該T細胞は外因性TCRまたはCARを発現し、かつ該T細胞は、CD4⁺CD8⁻ T細胞、CD4⁻CD8⁺ T細胞、CD34⁺ CD7⁺ CD1a⁺細胞、CD3⁺ TCRab⁺、CD3⁺ TCRgd⁺、CD3⁺ TCRab⁺ CD4⁺ CD8⁻、CD3⁺ TCRab⁺ CD8⁺ CD4⁻、CD3⁺ TCRab⁺ CD4⁺ CD8⁻ CD45RO⁻ CD45RA⁺、CD3⁺ TCRab⁺ CD8⁺ CD4⁻ CD45RO⁻ CD45RA⁺、CD3⁺ TCRab⁺ CD4⁺ CD8⁻ CD45RO⁻ CD45RA⁺ CCR7⁺、CD3⁺ TCRab⁺ CD8⁺ CD4⁻ CD45RO⁻ CD45RA⁺ CCR7⁺、CD3⁺ TCRab⁺ CD4⁺ CD8⁻ CD45RO⁻ CD45RA⁺ CD27⁺、CD3⁺ TCRab⁺ CD8⁺ CD4⁻ CD45RO⁻ CD45RA⁺ CD27⁺、CD34⁺ CD7⁺ CD1a⁺細胞、CD34⁺CD5⁺CD7⁺、CD34⁺CD5⁺CD7⁻、ナチュラルキラーT細胞、調節性T細胞、抗原特異的T細胞、上皮内リンパ球T細胞、CD45⁺、CD11b⁺、CD11b⁻、CD15⁺、CD15⁻、CD24⁺、CD24⁻、CD114⁺、CD114⁻、CD182⁺、CD182⁻、CD4⁺、CD4⁻、CD14⁺、CD14⁻、CD11a⁺、CD11a⁻、CD91⁺、CD91⁻、CD16⁺、CD16⁻、CD3⁺、CD3⁻、CD25⁺、CD25⁻、Foxp3⁺、Foxp3⁻、CD8⁺、CD8⁻、CD19⁺、CD19⁻、CD20⁺、CD20⁻、CD24⁺、CD24⁻、CD38⁺、CD38⁻、CD22⁺、CD22⁻、CD61⁺、CD61⁻、CD16⁺、CD16⁻、CD56⁺、CD56⁻、CD31⁺、CD31⁻、CD30⁺、CD30⁻、CD38⁺、もしくはCD38⁻、またはそれらの組み合わせである細胞である。一部の態様において、T細胞はT細胞の集団であり、該T細胞の集団は、成熟ナイーブCD8またはCD4シングルポジティブ細胞である細胞を少なくとも50%含む。一部の態様において、T細胞は、少なくとも、多くとも、または正確に5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、または100%の成熟ナイーブCD8シングルポジティブおよび/またはCD4シングルポジティブ細胞（またはその中に導き出せる任意の値域）を含む。一部の態様において、細胞は、外因性インバリエントナチュラルキラーT細胞 (iNKT) 関連TCRを発現する。一部の態様において、細胞は、幹細胞または前駆細胞からインビトロで分化したものである。一部の態様において、幹細胞または前駆細胞は、胚性幹細胞、誘導多能性幹細胞

10

20

30

40

50

胞、ヒト中胚葉前駆細胞、中胚葉前駆細胞、ヒト胚性中胚葉前駆細胞、造血幹細胞もしくは前駆細胞、骨髄から単離された細胞、臍帯血から単離された細胞、末梢血から単離された細胞、胸腺から単離された細胞、またはインビトロで胚性幹細胞（ESC）もしくは誘導多能性幹細胞（iPSC）から分化した細胞より選択される。一部の態様において、内因性TCRは、対立遺伝子排除により抑制されている。

【0043】

付加的な態様において、遺伝子編集、相同組換えもしくは非相同組換え、RNA仲介性遺伝子送達、または任意の従来の核酸送達法など、任意の遺伝子改変組成物または方法を用いて、外因性核酸を細胞内に導入し得るまたはゲノムDNAを編集し得る。遺伝子改変法

10

【0044】

遺伝子改変は、インビトロまたはインビボでの選択またはスクリーニングまたはイメージングを支援する、選択可能なまたはスクリーニング可能なマーカーの導入も含み得る。特に、インビボ造影剤または自殺遺伝子が外因的に発現され得る、または開始細胞もしくは子孫細胞に添加され得る。さらなる局面において、方法は、画像誘導による養子細胞療法を伴い得る。

【0045】

本開示の局面は、外因性TCRおよび/またはCARを含むインビトロで分化させたT細胞またはT細胞先駆体を患者に投与する工程を含む、患者を治療するための方法に関する。一部の態様において、外因性TCRおよび/またはCARを含むインビトロで分化させたT細胞またはT細胞先駆体の使用が企図される。外因性TCRは、任意の規定された抗原特異性のものであり得る。一部の態様において、それは、意図されるレシピエントに対する不在のまたは低下した同種反応性に基づいて選択される（例には、ある特定のウイルス特異的TCR、外来物特異的TCR、または癌-精巣抗原特異的TCRが含まれる）。外因性TCRが同種反応性でない例において、T細胞分化の間、外因性TCRは、対立遺伝子排除と呼ばれる発生過程を通じて内因性TCR遺伝子座の再編成および/または発現を抑制し、同種反応性でない外因性TCRのみを発現しゆえに同種反応性でないT細胞をもたらす。一部の態様において、外因性TCRの選定は、必ずしも同種反応性の欠如に基づいて規定され得るわけではない。一部の態様において、内因性TCR遺伝子は、それらがタンパク質を発現しないように、遺伝子編集によ

20

30

【0046】

一部の態様において、本明細書において記載される方法は、外因性TCRを発現する幹細胞および前駆細胞に関し、該方法、組成物、または細胞は、本明細書において開示される態様をさらに含む。この場合、幹細胞または前駆細胞はインビトロで分化し得る。一部の態様において、幹細胞または前駆細胞はCD34+細胞である。

【0047】

一部の態様において、T細胞は、外因性TCRおよび付加的な抗原またはリガンド認識受容体を含む。一部の態様において、付加的な抗原認識受容体は、CDR（相補性決定領域）に基づく抗原認識受容体である。一部の態様において、外因性TCRは、TCR-アルファおよびTCR-ベータ遺伝子から発現したタンパク質を含む。一部の態様において、外因性TCRは、TCR-ガンマおよびTCR-デルタ遺伝子から発現したタンパク質を含む。一部の態様において、外因性TCRは、TCR-アルファおよびTCR-ベータ遺伝子から発現したタンパク質を含み、抗原認識受容体は、TCR-ガンマおよびTCR-デルタ遺伝子から発現したタンパク質を含む。一部の態様において、外因性TCRは、TCR-ガンマおよびTCR-デルタ遺伝子から発現したタンパク質を含み、抗原認識受容体は、TCR-アルファおよびTCR-ベータ遺伝子から発現したタンパク質を含む。

40

【0048】

一部の態様において、付加的な抗原認識受容体はTCR分子ではない。一部の態様におい

50

て、付加的な抗原認識受容体はキメラ抗原受容体分子（CAR）である。一部の態様において、CARは腫瘍抗原特異的CAR（すなわち、腫瘍抗原を認識するCAR）である。一部の態様において、CARはウイルス抗原特異的CAR（すなわち、ウイルス抗原を認識するCAR）である。これらの態様において、外因性TCRが、T細胞発生の間、対立遺伝子排除を仲介するが、患者へ移植されると、意図される抗腫瘍または抗ウイルス反応性がCARによって仲介され、外因性TCRは不活性な「パッセンジャー」である。

【0049】

一部の態様において、外因性TCRは第一の抗原に特異的であり、付加的な抗原認識受容体は第二の抗原に特異的である。これによりT細胞は二重特異性を有し、付加的な抗原受容体によって1つの特異性が付与され、外因性TCRによって1つの特異性が付与される。一部の態様において、第一および第二の抗原は、患者のがん細胞によって発現されるがん細胞抗原である。例えば、患者は、公知であるがんを有し得る、または患者のがんの抗原は、実験的に決定され得る。一部の態様において、抗原は、がんに関連することが当技術分野において公知である。一部の態様において、抗原は、実験的に決定される。例えば、患者のがん性細胞は単離され、細胞表面タンパク質の発現についてまたは免疫原性新抗原について分析され得る。第一および第二の抗原が、患者のがん細胞によって発現されるがん抗原である場合、T細胞は、同じがん細胞に対する二重特異性を呈する。これは、抗原の一方が抗原下方調節（または他のメカニズム）によって喪失した場合に、がんによる免疫回避を限定するという点において有利である。それゆえ、対立遺伝子排除を誘導するために用いられる外因性TCRは、機能的な抗腫瘍または抗ウイルス特異性を付与し、二重標的

10

20

【0050】

一部の態様において、外因性TCRは、ウイルス特異的TCR、外来物特異的TCR、がん細胞特異的TCR、細菌特異的TCR、または癌-精巢抗原特異的TCRである。外因性TCRに結合する抗原は、当技術分野において公知であり得る、またはそのような抗原を発現する細胞に対するT細胞応答の分析から実験的に決定され得る。

30

【0051】

一部の態様において、T細胞は、レシピエントに対して同種異系である。

【0052】

一部の態様において、患者はがんを有する。一部の態様において、方法は、対象におけるがんを治療するためのものである。一部の態様において、がんは、肺癌、前立腺癌、卵巣癌、精巣癌、脳がん、皮膚癌、黒色腫、結腸癌、直腸癌、胃癌、食道癌、気管癌、頭頸部癌、膵臓癌、肝臓癌、乳癌、卵巣癌、リンパ腫および多発性骨髄腫を含めたリンパ系がん、白血病、骨または軟部組織の肉腫、子宮頸癌、ならびに外陰癌より選択される。

【0053】

一部の態様において、方法は、精製され得る、他の分子にコンジュゲートされ得る、または細胞もしくは細胞様ビヒクルによって提示され得る抗原の投与をさらに含み、該抗原は外因性TCRによって認識される。これは、投与された改変T細胞のインビボ増殖を引き起こすために行われ得る。

40

【0054】

一部の態様において、方法は、患者への投与前に、T細胞と活性化組成物とを接触させる工程をさらに含む。例えば、T細胞は、以下に従って活性化され得る。

T細胞サブセット	CTL	Th1	Th1/Th2	Th1	Th17	Treg	Th2/Th9
活性化因子	抗 CD3/28; 抗 CD2; IL-2, IL-21, IL-15, IL-7, PMA; イオノマイシン; PHA; 過バナジン酸	抗 CD3/CD28; IL-2; PMA; イオノマイシン; PHA; 過バナジン酸	抗 CD3/CD28; IL-2; PMA; イオノマイシン; PHA; 過バナジン酸	IFN- α	IL6; IL- 21	IL-2; IL-7; IL- 15	IL-4

10

【0055】

T細胞の活性化のためのキットも市販されている。例となるキットは、抗ビオチン粒子（例えば、MACSiBeadまたはDYNABEADS（登録商標））、ならびにヒトCD2、CD3、およびCD28に対するビオチン化抗体を含む。ビオチン化抗体がロードされた抗ビオチン粒子を用いて、抗原提示細胞を模倣し、PBMC由来の休止T細胞ならびに精製T細胞を活性化する。T細胞増殖は、培養および培養の14日目の再活性化によって達成される。他のキットは、直接コンジュゲートされた抗CD3/28マイクロビーズ；多量体抗体複合体を含み得る；またはCD2などの代替的T細胞タンパク質を標的にする抗体を用い得る。T細胞は、例えばConA、PHA、およびPWMなどのマイトジェンによっても活性化され得る。

20

【0056】

一部の態様において、外因性TCRは非同種反応性である。「非同種反応性」という用語は、レシピエントに移植された場合に免疫反応性を引き起こさないタンパク質を指す。一部の態様において、外因性TCRは不活性であり、それが臨床的に重大な毒性を引き起こさないことを意味する。

【0057】

一部の態様において、患者は、微生物感染症を有するまたは有する危険性がある。ある特定の態様において、患者は、微生物感染症について検査されている。一部の態様において、第一および第二の抗原は、同じウイルスタイプによって、または該ウイルスタイプに感染した細胞によって発現されるウイルス抗原である。一部の態様において、第一および第二の抗原は、同じ細菌によって、または該細菌に感染した細胞において発現される細菌細胞抗原である。一部の態様において、第一および第二の抗原は、同じ微生物の細胞、または該微生物に感染した細胞によって発現される微生物細胞抗原である。

30

【0058】

一部の態様において、外因性TCRはNY-ESO-1特異的TCRである。

【0059】

一部の態様において、方法は、患者への抗原提示細胞の投与をさらに含む。一部の態様において、抗原提示細胞は樹状細胞である。一部の態様において、抗原提示細胞は人工抗原提示細胞である。一部の態様において、抗原提示細胞は、外因性TCRによって認識される抗原をロードされている。抗原提示細胞に抗原をロードする方法は、当技術分野において公知である。一部の態様において、抗原提示細胞は自家である。単離された抗原提示細胞（治療されている患者から単離され得る）は、典型的に、IL-4および/またはGM-CSFなどの成熟因子で処理される。次いで、抗原提示細胞を抗原（外因性TCRに特異的な抗原など）でパルスし、抗原がロードされたAPCを産生し得る。一部の態様において、抗原がロードされたAPCを、LPS、インターフェロンガンマ、TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、および/またはPGE2などの炎症誘発性サイトカインとともに培養する（接触させる）。方法は、抗原がロードされたAPCを凍結する工程、抗原がロードされたAPCを融解する工程、および抗原がロードされたAPCを患者に投与する工程をさらに含み得る。

40

【0060】

付加的な抗原またはリガンド受容体の形質導入に関係なく、外因性TCRはまた、対立遺

50

伝子排除をさせ、かつ/または幹細胞および前駆細胞から生成される改変レギュレーター/サプレッサーT細胞に抗原特異性もしくは付加的機能を付与するために用い得る。

【0061】

一部の態様において、インビトロで分化させたT細胞は、T調節性細胞であるように操作される。一部の態様において、T細胞は、FOXP3の発現をさらに含む。一部の態様において、T細胞は、FOXP3を発現するように操作されるまたは選択される。一部の態様において、FOXP3発現は構成的である。FOXP3の発現は、T細胞に調節的機能性を付与し得る。それゆえ、T細胞は、患者における自己免疫または同種反応性を抑制するのに有用であるサプレッサーT細胞であり得る。この手法の例は、対立遺伝子排除されたFOXP3 T調節性細胞を産生するようにも操作された幹細胞および前駆細胞への外因性TCRの導入であろう；この場合、外因性TCRは、必ずしも低下した同種反応性に基づいて選択され得るわけではない。

10

【0062】

上記で開示される方法のいずれかの一部の態様において、対象は、自己免疫疾患、移植片対宿主疾患 (GVHD)、または移植片拒絶を有するまたは有する危険性がある。対象は、そのような疾患を有すると診断された対象、または遺伝子解析または家族歴解析に基づいてそのような疾患にかかりやすい傾向を有すると判定されている対象であり得る。対象は、移植の準備中である、または移植を受けたことがある対象でもあり得る。一部の態様において、方法は、自己免疫疾患、GVHD、または移植片拒絶を治療するためのものである。

【0063】

本明細書において記載される方法において記載されるものなど、改変T細胞も本開示の範囲内である。したがって、ある特定の局面は、外因性TCRを含むインビトロで分化させたT細胞に関する。一部の態様において、TCRは、ウイルステ異的TCR、外来物特異的TCR、がん細胞特異的TCR、細菌特異的TCR、または癌-精巢抗原特異的TCRである。一部の態様において、T細胞は、付加的な抗原またはリガンド認識受容体をさらに含む。一部の態様において、外因性TCRは、TCR-アルファおよびTCR-ベータ遺伝子から発現したタンパク質を含む。一部の態様において、外因性TCRは、TCR-ガンマおよびTCR-デルタ遺伝子から発現したタンパク質を含む。一部の態様において、外因性TCRは、TCRシグナル伝達を模倣する操作された分子である。一部の態様において、外因性TCRは、TCR-アルファおよびTCR-ベータ遺伝子から発現したタンパク質を含み、抗原認識受容体は、TCR-ガンマおよびTCR-デルタ遺伝子から発現したタンパク質を含む。一部の態様において、外因性TCRは、TCR-ガンマおよびTCR-デルタ遺伝子から発現したタンパク質を含み、抗原認識受容体は、TCR-アルファおよびTCR-ベータ遺伝子から発現したタンパク質を含む。一部の態様において、付加的な抗原認識受容体はTCR分子ではない。一部の態様において、付加的な抗原認識受容体はキメラ抗原受容体 (CAR) である。一部の態様において、CARは腫瘍抗原特異的CARである。一部の態様において、CARはウイルス抗原特異的CARである。一部の態様において、外因性TCRは第一の抗原に特異的であり、付加的な抗原認識受容体は第二の抗原に特異的である。一部の態様において、第一および第二の抗原は、がんの細胞によって発現されるがん細胞抗原である。一部の態様において、第一および第二の抗原は、ウイルスまたは該ウイルスに感染した細胞によって発現されるウイルス抗原である。一部の態様において、第一および第二の抗原は、細菌の細胞または該細菌に感染した細胞によって発現される細菌細胞抗原である。一部の態様において、外因性TCRはNY-ESO-1特異的TCRである。一部の態様において、T細胞は、FOXP3の発現をさらに含む。一部の態様において、T細胞は、FOXP3を発現するように操作されるまたは選択される。一部の態様において、FOXP3発現は構成的である。

20

30

40

【0064】

一部の態様において、細胞には、 $CD4^+CD8^-$ T細胞、 $CD4^-CD8^+$ T細胞、 $CD34^+ CD7^+ CD1a^+$ 細胞、 $CD3^+ TCRab^+$ 、 $CD3^+ TCRgd^+$ 、 $CD3^+ TCRab^+ CD4^+ CD8^-$ 、 $CD3^+ TCRab^+ CD8^+ CD4^-$ 、 $CD3^+ TCRab^+ CD4^+ CD8^- CD45RO^- CD45RA^+$ 、 $CD3^+ TCRab^+ CD8^+ CD4^- CD45RO^- CD45RA^+$ 、 $CD3^+ TCRab^+ CD4^+ CD8^- CD45RO^- CD45RA^+ CCR7^+$ 、 $CD3^+ TCRab^+ CD8^+ CD4^- CD45RO^- CD45RA^+ CCR7^+$ 、 $CD3^+ TCRab^+ CD4^+ CD8^- CD45RO^- CD45RA^+ CD27^+$ 、 $CD3^+ TCRab^+ CD8^+ CD4^- CD45RO^-$

50

CD45RA⁺ CD27⁺、CD34⁺ CD7⁺ CD1a⁺細胞、CD34⁺CD5⁺CD7⁺、CD34⁺CD5⁺CD7⁻、ナチュラルキラーT細胞、または調節性T細胞、抗原特異的T細胞が含まれる。一部の態様において、CD4⁺CD8⁻ T細胞、CD4⁻CD8⁺ T細胞、CD34⁺ CD7⁺ CD1a⁺細胞、CD3⁺ TCRab⁺、CD3⁺ TCRgd⁺、CD3⁺ TCRab⁺ CD4⁺ CD8⁻、CD3⁺ TCRab⁺ CD8⁺ CD4⁻、CD3⁺ TCRab⁺ CD4⁺ CD8⁻ CD45RO⁻ CD45RA⁺、CD3⁺ TCRab⁺ CD8⁺ CD4⁻ CD45RO⁻ CD45RA⁺、CD3⁺ TCRab⁺ CD4⁺ CD8⁻ CD45RO⁻ CD45RA⁺ CCR7⁺、CD3⁺ TCRab⁺ CD8⁺ CD4⁻ CD45RO⁻ CD45RA⁺ CCR7⁺、CD3⁺ TCRab⁺ CD4⁺ CD8⁻ CD45RO⁻ CD45RA⁺ CD27⁺、CD3⁺ TCRab⁺ CD8⁺ CD4⁻ CD45RO⁻ CD45RA⁺ CD27⁺、CD34⁺ CD7⁺ CD1a⁺細胞、CD34⁺CD5⁺CD7⁺、CD34⁺CD5⁺CD7⁻、ナチュラルキラーT細胞、調節性T細胞、抗原特異的T細胞は排除される。一部の態様において、細胞は、本明細書において記載される細胞表面マーカーを含む、または細胞は、本明細書において記載される細胞表面マーカーを発現しない。一部の態様において、細胞は上皮内リンパ球 (IEL) を含む。一部の態様において、上皮内リンパ球は、CD4⁻ CD8⁺、CD4⁺ CD8⁻、CD4⁺ CD8⁺、CD4⁻ CD8⁻、TCRab⁺、TCRgd⁺、CD5⁺CD7⁺、CD5⁺CD7⁺CD3⁻CD4⁻CD8⁻、CD5⁺CD7⁺CD3⁻CD4⁻CD8aa、またはそれらの組み合わせである。一部の態様において、CD4⁻ CD8⁺、CD4⁺ CD8⁻、CD4⁺ CD8⁺、CD4⁻ CD8⁻、TCRab⁺、TCRgd⁺、CD5⁺CD7⁺、CD5⁺CD7⁺CD3⁻CD4⁻CD8⁻、および/またはCD5⁺CD7⁺CD3⁻CD4⁻CD8aaなどの上皮内リンパ球は排除される。

【0065】

さらなる局面は、外因性TCRによって認識される抗原にコンジュゲートした作用物質を患者に投与する工程を含む、外因性TCR発現T細胞を有する患者における外因性TCR発現T細胞への作用物質の送達のための方法に関する。一部の態様において、外因性TCRは不活性である。一部の態様において、作用物質は除去剤である。例えば、作用物質は、作用物質-抗原と細胞表面上のTCRとが接触すると細胞を除去する細胞傷害性物質であり得る。除去剤には、例えばメトトレキサート、アミノプテリン、6-メルカプトプリン、6-チオグアニン、シタラビン、5-フルオロウラシル、ダカルバジン (decarbazine) ; メクロレタミン、チオテパ (thioepa)、クロラムブシル、メルファラン、カルムスチン (BSNU)、マイトマイシンC、ロムスチン (CCNU)、1-メチルニトロソ尿素、シクロホスファミド (cyclophosphamide)、メクロレタミン、ブスルファン、ジブロモマンニトール、ストレプトゾトシン、マイトマイシンC、シス-ジクロロジアミン白金 (II) (DDP)、シスプラチン、およびカルボプラチン (パラプラチン) などのアルキル化剤; ダウノルビシン (以前はダウノマイシン)、ドキソルビシン (アドリアマイシン)、デトルビシン、カルミノマイシン、イダルビシン、エピルビシン、ミトキサントロン、およびビサントレンを含めた、アントラサイクリン; ダクチノマイシン (アクチノマイシンD)、ブレオマイシン、カリケアミシン、ミトラマイシン、およびアントラマイシン (AMC) を含めた、抗生物質; ビンカアルカロイド、ビンクリスチンおよびビンブラスチン、パクリタキセル (タキソール)、リシン、シュードモナス外毒素、ゲムシタビン、サイトカラシンB、グラミシジンD、エチジウムブロマイド、エメチン、エトポシド、テニポシド (tenoposide)、コルヒチン (colchicin)、ジヒドロキシアントラセン (anthracin) ジオン、1-デヒドロテストステロン、グルココルチコイド、プロカイン、テトラカイン、リドカイン、プロプラノロール、ピューロマイシン、プロカルバジン、ヒドロキシ尿素、アスパラギナーゼ、コルチコステロイド、ミトタン (mytotane) (O,P'-(DDD))、インターフェロンなどの抗有糸分裂 (antimytotic) 剤、ならびにこれらの除去剤の混合物が含まれるが、それらに限定されるわけではない。さらなる除去剤には、カルボプラチン、シスプラチン、パクリタキセル、ゲムシタビン、カリケアミシン、ドキソルビシン、5-フルオロウラシル、マイトマイシンC、アクチノマイシンD、シクロホスファミド、ビンクリスチン、およびブレオマイシンなどの化学療法剤が含まれるが、それらに限定されるわけではない。

【0066】

さらなる局面は、本開示の改変T細胞 (すなわち、外因性TCRを発現するインビトロで分化させたT細胞) のインビトロ選択および単離のための方法に関する。方法は、T細胞を含む組成物と、外因性TCRに特異的に結合する作用物質とを接触させて、作用物質-TCR発現細胞複合体を作製する工程、および組成物から該作用物質-TCR発現細胞複合体を精製する

10

20

30

40

50

工程を含む。作用物質は、外因性TCRに特異的に結合する抗体、ペプチド-MHC多量体、または外因性TCRを特異的に認識する他の任意の分子であり得る。一部の態様において、作用物質を固体支持体に付着させる。固体支持体は、ビーズ（例えば、磁気性またはセファロース）、組織培養ディッシュ、カバースリップ、またはアレイなどのプレートであり得る。固体支持体は精製カラムでもあり得る。一部の態様において、方法は、作用物質に特異的に結合する二次分子の投与をさらに含む。二次分子は、例えば一次抗体に結合する二次抗体であり得る。一部の態様において、二次分子を固体支持体に付着させる。一部の態様において、方法は、組成物からの固体支持体および結合分子の分離をさらに含む。分離は、固体支持体から非結合分子を洗浄すること、および/または遠心分離もしくはカラム分離などの他の分離技法によって行われ得る。一部の態様において、方法は、固体支持体および結び付いた分子を1回または複数回洗浄する工程をさらに含む。一部の態様において、一次または二次分子を蛍光分子法と共役させてもよく、フローサイトメトリー/蛍光活性化細胞選別によって分離を行い得る。一部の態様において、方法は、作用物質-TCR発現細胞複合体から作用物質を解離する工程をさらに含む。一部の態様において、方法は、他のT細胞マーカー、例えばCD4、CD8、CD45RA、CD45RO、CCR7/CD197、CD62L、CD27、CD28、およびCD1aの包含または排除に基づいて、TCR発現細胞をさらに精製する工程をさらに含む。一部の態様において、方法は、精製されたTCR発現細胞を培養する工程をさらに含む。一部の態様において、方法は、精製されたTCR発現細胞を凍結する工程をさらに含む。

10

【0067】

20

さらなる局面は、本明細書において記載される外因性TCRを発現するインビトロで分化させたT細胞を作製する方法に関し、該方法は、外因性TCRまたはTCR誘導体を幹細胞または免疫前駆細胞内に移入する工程；および該幹細胞または免疫前駆細胞をT細胞またはT細胞先駆体に分化させる工程を含む。分化は、当技術分野において公知の方法に合わせてまたは本明細書において記載される分化/培養法に従って実施され得る。一部の態様において、幹細胞または免疫前駆細胞を、分化剤との接触の前に、同時に、および/または後に、同族MHCおよび/またはペプチド分子と接触させる。

【0068】

一部の態様において、幹細胞または免疫前駆細胞をT細胞に分化させる工程は、幹細胞または免疫前駆細胞と、Notchリガンドを異所的に発現する間質細胞とを共培養する工程を含む。一部の態様において、間質細胞はOP9細胞である。一部の態様において、Notchリガンドはデルタ様1 (Dll1) である。一部の態様において、Notchリガンドは、本明細書において、または参照により本明細書に組み入れられる米国特許第7,795,404号など当技術分野において記載されるものである。一部の態様において、方法は、共培養した幹細胞または免疫前駆細胞および間質細胞と、Flt-3リガンドおよび/またはIL-7および/または幹細胞因子/Kitリガンドおよび/またはトロンプオエチンとを接触させる工程をさらに含む。一部の態様において、幹細胞または免疫前駆細胞をT細胞に分化させる工程は、a) 外因性Notchリガンドを発現する間質細胞の選択集団；b) 幹細胞または前駆細胞の選択集団を含む三次元 (3D) 細胞凝集体を、3D細胞凝集体からT細胞を産生するのに有効な濃度でB-27 (登録商標) サプリメント、ゼノフリーB-27 (登録商標) サプリメント、GS21 (商標) サプリメント、アスコルビン酸、Flt-3リガンド、IL-7、またはそれらの組み合わせを含む血清不含培地とともに培養する工程を含み、該3D細胞凝集体はT細胞を産生する。一部の態様において、方法は、下記の態様の1つまたは複数をさらに含む。

30

40

【0069】

一部の態様において、T細胞集団または細胞の組成物は、CD4⁺CD8⁻ T細胞、CD4⁻CD8⁺ T細胞、CD34⁺ CD7⁺ CD1a⁺細胞、CD3⁺ TCRab⁺、CD3⁺ TCRgd⁺、CD3⁺ TCRab⁺ CD4⁺ CD8⁻、CD3⁺ TCRab⁺ CD8⁺ CD4⁻、CD3⁺ TCRab⁺ CD4⁺ CD8⁻ CD45RO⁻ CD45RA⁺、CD3⁺ TCRab⁺ CD8⁺ CD4⁻ CD45RO⁻ CD45RA⁺、CD3⁺ TCRab⁺ CD4⁺ CD8⁻ CD45RO⁻ CD45RA⁺ CCR7⁺、CD3⁺ TCRab⁺ CD8⁺ CD4⁻ CD45RO⁻ CD45RA⁺ CCR7⁺、CD3⁺ TCRab⁺ CD4⁺ CD8⁻ CD45RO⁻ CD45RA⁺ CD27⁺、CD3⁺ TCRab⁺ CD8⁺ CD4⁻ CD45RO⁻ CD45RA⁺ CD27⁺、CD34⁺ CD7⁺ CD1a⁺細胞、CD34⁺CD5⁺CD7⁺、CD34⁺

50

CD5+CD7⁻、ナチュラルキラーT細胞、または調節性T細胞、および/または抗原特異的T細胞を含む。一部の態様において、CD4⁺CD8⁻ T細胞、CD4⁻CD8⁺ T細胞、CD34⁺ CD7⁺ CD1a⁺細胞、CD3⁺ TCRab⁺、CD3⁺ TCRgd⁺、CD3⁺ TCRab⁺ CD4⁺ CD8⁻、CD3⁺ TCRab⁺ CD8⁺ CD4⁻、CD3⁺ TCRab⁺ CD4⁺ CD8⁻ CD45R0⁻ CD45RA⁺、CD3⁺ TCRab⁺ CD8⁺ CD4⁻ CD45R0⁻ CD45RA⁺、CD3⁺ TCRab⁺ CD4⁺ CD8⁻ CD45R0⁻ CD45RA⁺ CCR7⁺、CD3⁺ TCRab⁺ CD8⁺ CD4⁻ CD45R0⁻ CD45RA⁺ CCR7⁺、CD3⁺ TCRab⁺ CD4⁺ CD8⁻ CD45R0⁻ CD45RA⁺ CD27⁺、CD3⁺ TCRab⁺ CD8⁺ CD4⁻ CD45R0⁻ CD45RA⁺ CD27⁺、CD34⁺ CD7⁺ CD1a⁺細胞、CD34+CD5+CD7⁺、CD34+CD5+CD7⁻、ナチュラルキラーT細胞、調節性T細胞、および/または抗原特異的T細胞は排除される。一部の態様において、上皮内リンパ球は、CD4⁻ CD8⁺、CD4⁺ CD8⁻、CD4⁺ CD8⁺、CD4⁻ CD8⁻、TCRab⁺、TCRgd⁺、CD5+CD7⁺、CD5+CD7+CD3-CD4-CD8⁻、CD5+CD7+CD3-CD4-CD8aa、またはそれらの組み合わせである。一部の態様において、CD4⁻ CD8⁺、CD4⁺ CD8⁻、CD4⁺ CD8⁺、CD4⁻ CD8⁻、TCRab⁺、TCRgd⁺、CD5+CD7⁺、CD5+CD7+CD3-CD4-CD8⁻、および/またはCD5+CD7+CD3-CD4-CD8aaなどの上皮内リンパ球は排除される。

10

【0070】

一部の態様において、T細胞集団または細胞の組成物は、少なくともまたは多くとも5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、または100%（またはその中に導き出せる任意の値域）の、本明細書において記載される表現型および/または細胞マーカーを有する生細胞を含む。細胞は、1、1.5、2、2.5、3、3.5、4、4.5、5、5.5、6、6.5、7、8、9、10、11、12、13、14、15、または16週目（またはその中に導き出せる任意の値域）のAT0由来であり得る。

20

【0071】

一部の態様において、T細胞集団または細胞の組成物は、少なくともまたは多くとも1:0.1、1:0.2、1:0.3、1:0.4、1:0.5、1:0.6、1:0.7、1:0.8、1:0.9、1:1、1:1.1、1:1.2、1:1.3、1:1.4、1:1.5、1:1.6、1:1.7、1:1.8、1:1.9、1:2、1:2.1、1:2.2、1:2.3、1:2.4、1:2.5、1:2.6、1:2.7、1:2.8、1:2.9、1:3、1:3.1、1:3.2、1:3.3、1:3.4、1:3.5、1:3.6、1:3.7、1:3.8、1:3.9、1:4、1:4.1、1:4.2、1:4.3、1:4.4、1:4.5、1:4.6、1:4.7、1:4.8、1:4.9、1:5、1:5.1、1:5.2、1:5.3、1:5.4、1:5.5、1:5.6、1:5.7、1:5.8、1:5.9、1:6、1:6.1、1:6.2、1:6.3、1:6.4、1:6.5、1:6.6、1:6.7、1:6.8、1:6.9、1:7、1:7.1、1:7.2、1:7.3、1:7.4、1:7.5、1:7.6、1:7.7、1:7.8、1:7.9、1:8、1:8.1、1:8.2、1:8.3、1:8.4、1:8.5、1:8.6、1:8.7、1:8.8、1:8.9、1:9、1:9.1、1:9.2、1:9.3、1:9.4、1:9.5、1:9.6、1:9.7、1:9.8、1:9.9、1:10、1:10.5、1:11、1:11.5、1:12、1:12.5、1:13、1:13.5、1:14、1:14.5、1:15、1:20、1:25、1:30、1:35、1:40、1:45、または1:50（またはその中に導き出せる任意の値域）の比率の、生細胞:本明細書において記載される表現型および/もしくは細胞マーカーを有する細胞、またはその比率の、本明細書において記載される表現型および/もしくは細胞マーカーを有する細胞:生細胞を含む。

30

【0072】

本明細書における使用として、単数形は、1つまたは複数を意味し得る。特許請求の範囲における使用として、「含む (comprising)」という単語と併せて用いられる場合、単数形は、1つまたは1つを上回る数を意味し得る。

【0073】

特許請求の範囲における「または」という用語の使用は、代替物のみを指すことまたは代替物は相互排他的であることが明示的に示されていない限り、「および/または」を意味するために用いられるが、とはいえ本開示は、代替物のみを指す定義および「および/または」を支持する。本明細書において使用するとき、「別の」は、少なくとも第二のまたはそれを上回るものを意味し得る。本明細書において述べられる1つまたは複数の態様は、特許請求の範囲において特異的に排除され得ることが企図される。

40

【0074】

本出願を通して、「約」という用語は、値が、装置、値を決定するために採用されている方法、または調査対象の間で存在する変動、の誤差についての固有の変動を含むことを示すために用いられる。

50

【0075】

「からなる」または「から本質的になる」という用語は、本明細書において述べられる任意の態様において、「含む (comprising)」という用語に代わって置換され得る。

【0076】

[本発明1001]

幹細胞または前駆細胞からT細胞の組成物を調製するための方法であって、該方法は、

a) Notchリガンドを発現する間質細胞の選択集団；

b) 幹細胞または前駆細胞の選択集団

を含む三次元 (3D) 細胞凝集体を培養する工程を含み、該3D細胞凝集体は、T細胞への幹細胞または前駆細胞のインビトロでの分化に十分な期間、インスリン、ビオチン、トランスフェリン、およびアルブミンを含む血清不含培地中で培養される、方法。

10

[本発明1002]

幹細胞または前駆細胞からT細胞の組成物を調製するための方法であって、該方法は、

a) Notchリガンドを発現する間質細胞の選択集団；

b) 幹細胞または前駆細胞の選択集団

を含む三次元 (3D) 細胞凝集体を培養する工程を含み、該3D細胞凝集体は、T細胞への幹細胞または前駆細胞のインビトロでの分化に十分な期間、インスリンを含む血清不含培地中で培養される、方法。

[本発明1003]

Notchリガンドが外因性Notchリガンドである、本発明1002の方法。

20

[本発明1004]

3D細胞凝集体を形成させるための幹細胞または前駆細胞および間質細胞の遠心分離をさらに含む、本発明1002または1003の方法。

[本発明1005]

培地が、外部から添加されたアスコルビン酸をさらに含む、本発明1002～1004のいずれかの方法。

[本発明1006]

培地が、外部から添加されたFLT3リガンド (FLT3L)、インターロイキン7 (IL-7)、幹細胞因子 (SCF)、トロンボポエチン (TPO)、幹細胞因子 (SCF)、トロンボポエチン (TPO)、IL-2、IL-4、IL-6、IL-15、IL-21、TNF-アルファ、TGF-ベータ、インターフェロン-ガンマ、インターフェロン-ラムダ、TSLP、チモペンチン、プレオトロフィン (pleiotropin)、ミッドカイン、またはそれらの組み合わせをさらに含む、本発明1002～1005のいずれかの方法。

30

[本発明1007]

培地がビタミンをさらに含む、本発明1002～1006のいずれかの方法。

[本発明1008]

ビタミンが、ビオチン、酢酸DLアルファトコフェロール、DLアルファ-トコフェロール、ビタミンA、塩化コリン、パントテン酸カルシウム、パントテン酸、葉酸ニコチンアミド、ピリドキシン、リボフラビン、チアミン、イノシトール、ビタミンB12、またはそれらの組み合わせもしくはそれらの塩を含む、本発明1007の方法。

40

[本発明1009]

ビタミンが、ビオチン、酢酸DLアルファトコフェロール、DLアルファ-トコフェロール、ビタミンA、またはそれらの組み合わせもしくは塩を含む、本発明1008の方法。

[本発明1010]

培地がタンパク質をさらに含む、本発明1002～1009のいずれかの方法。

[本発明1011]

タンパク質が、アルブミンもしくはウシ血清アルブミン、BSAの一画分、カタラーゼ、インスリン、トランスフェリン、スーパーオキシドジスムターゼ、またはそれらの組み合わせを含む、本発明1010の方法。

[本発明1012]

50

培地が、コルチコステロン、D-ガラクトース、エタノールアミン、グルタチオン、L-カルニチン、リノール酸、リノレン酸、プロゲステロン、プトレシン、亜セレン酸ナトリウム、もしくはトリヨード (triiodo) -I-サイロニン、またはそれらの組み合わせをさらに含む、本発明1002~1011のいずれかの方法。

[本発明1013]

培地が、B-27 (登録商標) サプリメント、ゼノフリーB-27 (登録商標) サプリメント、GS21 (商標) サプリメント、またはそれらの組み合わせを含む、本発明1002~1012のいずれかの方法。

[本発明1014]

培地が、アミノ酸、単糖、無機イオンを含むまたはさらに含む、本発明1002~1013のいずれかの方法。

10

[本発明1015]

アミノ酸が、アルギニン、シスチン、イソロイシン、ロイシン、リジン、メチオニン、グルタミン、フェニルアラニン、トレオニン、トリプトファン、ヒスチジン、チロシン、もしくはバリン、またはそれらの組み合わせを含む、本発明1014の方法。

[本発明1016]

無機イオンが、ナトリウム、カリウム、カルシウム、マグネシウム、窒素、もしくはリン、またはそれらの組み合わせもしくは塩を含む、本発明1014の方法。

[本発明1017]

培地が、モリブデン、バナジウム、鉄、亜鉛、セレン、銅、もしくはマンガン、またはそれらの組み合わせをさらに含む、本発明1002~1016のいずれかの方法。

20

[本発明1018]

3D細胞凝集体が、規定された外因性細胞外マトリックスを含む、本発明1002~1017のいずれかの方法。

[本発明1019]

3D細胞凝集体が、外因性マトリックスまたは足場を含まない、本発明1002~1017のいずれかの方法。

[本発明1020]

間質細胞が、Notchリガンドをコードする外因性ヌクレオチド配列を有する、本発明1002~1019のいずれかの方法。

30

[本発明1021]

Notchリガンドが、完全な、部分的な、または改変されたDLL4、DLL1、JAG1、JAG2、またはそれらの組み合わせである、本発明1002~1020のいずれかの方法。

[本発明1022]

幹細胞または前駆細胞が、胚性幹細胞 (ESC)、誘導多能性幹細胞 (iPSC)、ヒト胚性中胚葉前駆細胞、造血幹細胞もしくは前駆細胞、骨髓から単離された細胞、臍帯血から単離された細胞、末梢血から単離された細胞、胸腺から単離された細胞、またはインビトロでESCもしくはiPSCから分化させた細胞より選択される、本発明1002~1021のいずれかの方法。

40

[本発明1023]

間質細胞：幹細胞または前駆細胞の比率が約1:5~1:20である、本発明1002~1022のいずれかの方法。

[本発明1024]

間質細胞が、マウス間質細胞株、ヒト間質細胞株、初代間質細胞の選択集団、インビトロで多能性幹細胞から分化した間質細胞の選択集団、またはそれらの組み合わせである、本発明1002~1023のいずれかの方法。

[本発明1025]

間質細胞が、インビトロで造血幹細胞または前駆細胞から分化した間質細胞の選択集団である、本発明1002~1023のいずれかの方法。

[本発明1026]

50

間質細胞が、外因性ヒト主要組織適合複合体（MHC）を発現する、本発明1002～1025のいずれかの方法。

[本発明1027]

間質細胞が、外因性抗原特異的共刺激分子またはサイトカインを発現する、本発明1002～1026のいずれかの方法。

[本発明1028]

間質細胞が外因性抗原を発現する、本発明1002～1027のいずれかの方法。

[本発明1029]

幹細胞または前駆細胞が以前に凍結されている、本発明1002～1028のいずれかの方法。

[本発明1030]

幹細胞または前駆細胞が凍結されたことがない、本発明1002～1028のいずれかの方法。

[本発明1031]

幹細胞または前駆細胞が、外因性T細胞受容体（TCR）もしくはキメラ抗原受容体（CAR）、またはその両方を発現する、本発明1002～1030のいずれかの方法。

[本発明1032]

幹細胞または前駆細胞が、内因性T細胞受容体（TCR）もしくはキメラ抗原受容体（CAR）、またはその両方を発現する、本発明1002～1030のいずれかの方法。

[本発明1033]

幹細胞または前駆細胞が、外因性インバリアントナチュラルキラーT細胞（iNKT）関連TCRを発現する、本発明1002～1032のいずれかの方法。

[本発明1034]

幹細胞または前駆細胞が、外因性抗原特異的TCR、選択もしくはスクリーニングマーカー、インビボ追跡マーカーもしくはインビボイメージングマーカーを発現する、またはHLA遺伝子座、ナチュラルキラー細胞受容体もしくはリガンドの外因性遺伝子改変を有する、本発明1002～1033のいずれかの方法。

[本発明1035]

幹細胞または前駆細胞の数が1,000～200,000個である、本発明1002～1034のいずれかの方法。

[本発明1036]

培養が約2～10週間の期間である、本発明1002～1035のいずれかの方法。

[本発明1037]

培養が細胞継代を伴わない、本発明1002～1036のいずれかの方法。

[本発明1038]

四量体もしくは抗TCR抗体を用いて、CD4⁺CD8⁻ T細胞、CD4⁻CD8⁺ T細胞、CD34⁺ CD7⁺ CD1a⁺細胞、CD3⁺ TCRab⁺細胞、CD3⁺ TCRgd⁺細胞、CD3⁺ TCRab⁺ CD4⁺ CD8⁻細胞、CD3⁺ TCRab⁺ CD8⁺ CD4⁻細胞、CD3⁺ TCRab⁺ CD4⁺ CD8⁻ CD45RO⁻ CD45RA⁺細胞、CD3⁺ TCRab⁺ CD8⁺ CD4⁻ CD45RO⁻ CD45RA⁺細胞、CD3⁺ TCRab⁺ CD4⁺ CD8⁻ CD45RO⁻ CD45RA⁺ CCR7⁺細胞、CD3⁺ TCRab⁺ CD8⁺ CD4⁻ CD45RO⁻ CD45RA⁺ CCR7⁺細胞、CD3⁺ TCRab⁺ CD4⁺ CD8⁻ CD45RO⁻ CD45RA⁺ CD27⁺細胞、CD3⁺ TCRab⁺ CD8⁺ CD4⁻ CD45RO⁻ CD45RA⁺ CD27⁺細胞、CD34⁺ CD7⁺ CD1a⁺細胞、CD34⁺ CD5⁺ CD7⁺細胞、CD34⁺ CD5⁺ CD7⁻細胞、ナチュラルキラーT細胞、調節性T細胞、上皮内リンパ球（IEL）、抗原特異的T細胞の数を、改変された抗原を用いてCAR T細胞の数を、蛍光マーカーを用いて形質導入されたT細胞の数を、またはそれらの組み合わせを検出する工程をさらに含む、本発明1002～1037のいずれかの方法。

[本発明1039]

四量体もしくは抗TCR抗体を用いて、CD4⁺CD8⁻ T細胞、CD4⁻CD8⁺ T細胞、CD34⁺ CD7⁺ CD1a⁺細胞、CD3⁺ TCRab⁺細胞、CD3⁺ TCRgd⁺細胞、CD3⁺ TCRab⁺ CD4⁺ CD8⁻細胞、CD3⁺ TCRab⁺ CD8⁺ CD4⁻細胞、CD3⁺ TCRab⁺ CD4⁺ CD8⁻ CD45RO⁻ CD45RA⁺細胞、CD3⁺ TCRab⁺ CD8⁺ CD4⁻ CD45RO⁻ CD45RA⁺細胞、CD3⁺ TCRab⁺ CD4⁺ CD8⁻ CD45RO⁻ CD45RA⁺ CCR7⁺細胞、CD3⁺ TCRab⁺ CD8⁺ CD4⁻ CD45RO⁻ CD45RA⁺ CCR7⁺細胞、CD3⁺ TCRab⁺ CD4⁺ CD8⁻ CD45RO⁻ CD45RA⁺ CD27⁺細胞、CD3⁺ TCRab⁺ CD8⁺ CD4⁻ CD45RO⁻ CD45RA⁺ CD27⁺細胞、CD34⁺ CD7⁺ CD1a⁺細胞

10

20

30

40

50

、CD34+CD5+CD7+細胞、CD34+CD5+CD7-細胞、ナチュラルキラーT細胞、調節性T細胞、上皮内リンパ球（IEL）、抗原特異的T細胞を、改変された抗原を用いてCAR T細胞を、蛍光マーカーを用いて形質導入されたT細胞を、またはそれらの組み合わせを選択する工程をさらに含む、本発明1002～1038のいずれかの方法。

[本発明1040]

四量体もしくは抗TCR抗体を用いて、CD4⁺CD8⁻ T細胞、CD4⁻CD8⁺ T細胞、CD34⁺ CD7⁺ CD1a⁺細胞、CD3⁺ TCRab⁺細胞、CD3⁺ TCRgd⁺細胞、CD3⁺ TCRab⁺ CD4⁺ CD8⁻細胞、CD3⁺ TCRab⁺ CD8⁺ CD4⁻細胞、CD3⁺ TCRab⁺ CD4⁺ CD8⁻ CD45RO⁻ CD45RA⁺細胞、CD3⁺ TCRab⁺ CD8⁺ CD4⁻ CD45RO⁻ CD45RA⁺細胞、CD3⁺ TCRab⁺ CD4⁺ CD8⁻ CD45RO⁻ CD45RA⁺ CCR7⁺細胞、CD3⁺ TCRab⁺ CD8⁺ CD4⁻ CD45RO⁻ CD45RA⁺ CCR7⁺細胞、CD3⁺ TCRab⁺ CD4⁺ CD8⁻ CD45RO⁻ CD45RA⁺ CD27⁺細胞、CD3⁺ TCRab⁺ CD8⁺ CD4⁻ CD45RO⁻ CD45RA⁺ CD27⁺細胞、CD34⁺ CD7⁺ CD1a⁺細胞、CD34+CD5+CD7+細胞、CD34+CD5+CD7-細胞、ナチュラルキラーT細胞、調節性T細胞、上皮内リンパ球（IEL）、抗原特異的T細胞の数を、改変された抗原を用いてCAR T細胞の数を、蛍光マーカーを用いて形質導入されたT細胞の数を、またはそれらの組み合わせを増加させる工程をさらに含む、本発明1002～1039のいずれかの方法。

10

[本発明1041]

3D細胞凝集体由来のT細胞を、それを必要としている対象に投与する工程をさらに含む、本発明1002～1040のいずれかの方法。

[本発明1042]

3D細胞凝集体由来のT細胞を分化させる工程をさらに含む、本発明1002～1040のいずれかの方法。

20

[本発明1043]

3D細胞凝集体由来のT細胞が、対立遺伝子排除により内因性TCRを発現しない、本発明1002～1042のいずれかの方法。

[本発明1044]

3D細胞凝集体由来のT細胞が、外因性TCRまたはCARを発現する、本発明1002～1043のいずれかの方法。

[本発明1045]

前記期間が2～16週間である、本発明1002～1044のいずれかの方法。

[本発明1046]

T細胞が陽性選択を受ける、本発明1002～1045のいずれかの方法。

30

[本発明1047]

細胞凝集体が腫瘍細胞または腫瘍抗原をさらに含む、本発明1002～1046のいずれかの方法。

[本発明1048]

T細胞から内因的に発現したTCRを単離する工程をさらに含む、本発明1002～1047のいずれかの方法。

[本発明1049]

T細胞を刺激する工程をさらに含む、本発明1048の方法。

[本発明1050]

T細胞を抗原提示細胞で刺激する、本発明1049の方法。

40

[本発明1051]

抗原提示細胞が腫瘍抗原を提示する、本発明1050の方法。

[本発明1052]

a) i) Notchリガンドを発現する間質細胞の選択集団；

ii) 幹細胞または前駆細胞の選択集団

を含む三次元（3D）細胞凝集体と、

b) インスリンを含む血清不含培地と

を含む、細胞培養組成物。

[本発明1053]

50

Notchリガンドが外因性Notchリガンドである、本発明1052の組成物。

[本発明1054]

培地が、外部から添加されたアスコルビン酸をさらに含む、本発明1052または1053の組成物。

[本発明1055]

培地が、外部から添加されたFLT3リガンド（FLT3L）、インターロイキン7（IL-7）、幹細胞因子（SCF）、トロンボポエチン（TPO）、IL-2、IL-4、IL-6、IL-15、IL-21、TNF-アルファ、TGF-ベータ、インターフェロン-ガンマ、インターフェロン-ラムダ、TSLP、チモペンチン、プレオトロフィン、ミッドカイン、またはそれらの組み合わせをさらに含む、本発明1052～1054のいずれかの組成物。

10

[本発明1056]

培地がビタミンをさらに含む、本発明1052～1055のいずれかの組成物。

[本発明1057]

ビタミンが、ビオチン、酢酸DLアルファトコフェロール、DLアルファ-トコフェロール、ビタミンA、塩化コリン、パントテン酸カルシウム、パントテン酸、葉酸ニコチンアミド、ピリドキシン、リボフラビン、チアミン、イノシトール、ビタミンB12、またはそれらの組み合わせもしくはそれらの塩を含む、本発明1056の組成物。

[本発明1058]

ビタミンが、ビオチン、酢酸DLアルファトコフェロール、DLアルファ-トコフェロール、ビタミンA、またはそれらの組み合わせもしくは塩を含む、本発明1056の組成物。

20

[本発明1059]

培地がタンパク質をさらに含む、本発明1052～1058のいずれかの組成物。

[本発明1060]

タンパク質が、アルブミンもしくはウシ血清アルブミン、BSAの一画分、カタラーゼ、インスリン、トランスフェリン、スーパーオキシドジスムターゼ、またはそれらの組み合わせを含む、本発明1059の組成物。

[本発明1061]

培地が、コルチコステロン、D-ガラクトース、エタノールアミン、グルタチオン、L-カルニチン、リノール酸、リノレン酸、プロゲステロン、プトレシン、亜セレン酸ナトリウム、もしくはトリヨード-I-サイロニン、またはそれらの組み合わせをさらに含む、本発明1052～1060のいずれかの組成物。

30

[本発明1062]

培地が、B-27（登録商標）サプリメント、ゼノフリーB-27（登録商標）サプリメント、GS21（商標）サプリメント、またはそれらの組み合わせを含む、本発明1052～1061のいずれかの組成物。

[本発明1063]

培地が、アミノ酸、単糖、もしくは無機イオン、またはそれらの組み合わせを含むまたはさらに含む、本発明1052～1062のいずれかの組成物。

[本発明1064]

アミノ酸が、アルギニン、シスチン、イソロイシン、ロイシン、リジン、メチオニン、グルタミン、フェニルアラニン、トレオニン、トリプトファン、ヒスチジン、チロシン、もしくはバリン、またはそれらの組み合わせを含む、本発明1063の組成物。

40

[本発明1065]

無機イオンが、ナトリウム、カリウム、カルシウム、マグネシウム、窒素、もしくはリン、またはそれらの組み合わせもしくは塩を含む、本発明1063の組成物。

[本発明1066]

培地が、モリブデン、バナジウム、鉄、亜鉛、セレン、銅、もしくはマンガン、またはそれらの組み合わせをさらに含む、本発明1052～1065のいずれかの組成物。

[本発明1067]

3D細胞凝集体が、規定された外因性細胞外マトリックスを含む、本発明1052～1066のい

50

ずれかの組成物。

[本発明1068]

3D細胞凝集体が、外因性マトリックスまたは足場を含まない、本発明1052～1067のいずれかの組成物。

[本発明1069]

間質細胞が、Notchリガンドをコードする外因性ヌクレオチド配列を有する、本発明1052～1068のいずれかの組成物。

[本発明1070]

Notchリガンドが、完全な、部分的な、または改変されたDLL4、DLL1、JAG1、JAG2、またはそれらの組み合わせである、本発明1052～1069のいずれかの組成物。

10

[本発明1071]

幹細胞または前駆細胞が、ESC、iPSC、ヒト胚性中胚葉前駆細胞、造血幹細胞もしくは前駆細胞、骨髄から単離された細胞、臍帯血から単離された細胞、末梢血から単離された細胞、胸腺から単離された細胞、またはインビトロでESCもしくはiPSCから分化させた細胞より選択される、本発明1052～1070のいずれかの組成物。

[本発明1072]

間質細胞：幹細胞または前駆細胞の比率が約1:5～1:20である、本発明1052～1071のいずれかの組成物。

[本発明1073]

間質細胞が、マウス間質細胞株、ヒト間質細胞株、初代間質細胞の選択集団、インビトロで多能性幹細胞から分化した間質細胞の選択集団、またはそれらの組み合わせである、本発明1052～1072のいずれかの組成物。

20

[本発明1074]

間質細胞が、インビトロで造血幹細胞または前駆細胞から分化した間質細胞の選択集団である、本発明1052～1073のいずれかの組成物。

[本発明1075]

幹細胞または前駆細胞が以前に凍結されている、本発明1052～1074のいずれかの組成物。

[本発明1076]

幹細胞または前駆細胞が凍結されたことがない、本発明1052～1074のいずれかの組成物。
59. 間質細胞が、外因性ヒト主要組織適合複合体（MHC）を発現する、本発明1052～1076のいずれかの組成物。

30

[本発明1077]

間質細胞が、外因性抗原特異的共刺激分子、サイトカイン、抗原、もしくは細胞外マトリックスタンパク質、またはT細胞の分化、増殖、もしくは機能を調節する他の任意の生理活性分子もしくは遺伝子を発現する、本発明1052～1076のいずれかの組成物。

[本発明1078]

幹細胞または前駆細胞が、外因性T細胞受容体（TCR）もしくはキメラ抗原受容体（CAR）、またはその両方を発現する、本発明1052～1077のいずれかの組成物。

[本発明1079]

幹細胞または前駆細胞が、外因性インバリアントナチュラルキラーT細胞（iNKT）関連TCRを発現する、本発明1052～1078のいずれかの組成物。

40

[本発明1080]

幹細胞または前駆細胞が、外因性抗原特異的TCRを発現する、またはT細胞の分化、増殖、もしくは機能を調節する遺伝子の外因性遺伝子改変を有する、本発明1052～1079のいずれかの組成物。

[本発明1081]

幹細胞または前駆細胞の数が1～200,000個である、本発明1052～1080のいずれかの組成物。

[本発明1082]

50

本発明1052～1081のいずれかの細胞培養組成物を培養し、それによってT細胞を産生する工程を含む、T細胞を産生するための方法。

[本発明1083]

前駆細胞が外因性抗原特異的TCRまたはCARを発現する、抗原特異的T細胞を産生するための方法としてさらに規定される、本発明1082の方法。

[本発明1084]

四量体もしくは抗TCR抗体を用いて、 $CD4^+CD8^-$ T細胞、 $CD4^-CD8^+$ T細胞、 $CD34^+ CD7^+ CD1a^+$ 細胞、 $CD3^+ TCRab^+$ 細胞、 $CD3^+ TCRgd^+$ 細胞、 $CD3^+ TCRab^+ CD4^+ CD8^-$ 細胞、 $CD3^+ TCRab^+ CD8^+ CD4^-$ 細胞、 $CD3^+ TCRab^+ CD4^+ CD8^- CD45RO^- CD45RA^+$ 細胞、 $CD3^+ TCRab^+ CD8^+ CD4^- CD45RO^- CD45RA^+$ 細胞、 $CD3^+ TCRab^+ CD4^+ CD8^- CD45RO^- CD45RA^+ CCR7^+$ 細胞、 $CD3^+ TCRab^+ CD8^+ CD4^- CD45RO^- CD45RA^+ CCR7^+$ 細胞、 $CD3^+ TCRab^+ CD4^+ CD8^- CD45RO^- CD45RA^+ CD27^+$ 細胞、 $CD34^+ CD7^+ CD1a^+$ 細胞、 $CD34^+ CD5^+ CD7^+$ 細胞、 $CD34^+ CD5^+ CD7^-$ 細胞、ナチュラルキラーT細胞、調節性T細胞、上皮内リンパ球（IEL）、抗原特異的T細胞の数を、改変された抗原を用いてCAR T細胞の数を、蛍光マーカーを用いて形質導入されたT細胞の数を、またはそれらの組み合わせを検出する工程をさらに含む、本発明1082または1083の方法。

10

[本発明1085]

四量体もしくは抗TCR抗体を用いて、 $CD4^+CD8^-$ T細胞、 $CD4^-CD8^+$ T細胞、 $CD34^+ CD7^+ CD1a^+$ 細胞、 $CD34^+ CD7^+ CD1a^+$ 細胞、 $CD3^+ TCRab^+$ 細胞、 $CD3^+ TCRgd^+$ 細胞、 $CD3^+ TCRab^+ CD4^+ CD8^-$ 、 $CD3^+ TCRab^+ CD8^+ CD4^-$ 細胞、 $CD3^+ TCRab^+ CD4^+ CD8^- CD45RO^- CD45RA^+$ 細胞、 $CD3^+ TCRab^+ CD8^+ CD4^- CD45RO^- CD45RA^+$ 細胞、 $CD3^+ TCRab^+ CD4^+ CD8^- CD45RO^- CD45RA^+ CCR7^+$ 細胞、 $CD3^+ TCRab^+ CD8^+ CD4^- CD45RO^- CD45RA^+ CCR7^+$ 細胞、 $CD3^+ TCRab^+ CD4^+ CD8^- CD45RO^- CD45RA^+ CD27^+$ 細胞、 $CD3^+ TCRab^+ CD8^+ CD4^- CD45RO^- CD45RA^+ CD27^+$ 細胞、 $CD34^+ CD7^+ CD1a^+$ 細胞、 $CD34^+ CD5^+ CD7^+$ 細胞、 $CD34^+ CD5^+ CD7^-$ 細胞、ナチュラルキラーT細胞、調節性T細胞、上皮内リンパ球（IEL）、抗原特異的T細胞の数を、改変された抗原を用いてCAR T細胞の数を、蛍光マーカーを用いて形質導入されたT細胞の数を、またはそれらの組み合わせを増加させる工程をさらに含む、本発明1082～1084のいずれかの方法。

20

[本発明1086]

キメラ抗原受容体（CAR）を含む単離されたT細胞またはT細胞の集団であって、該T細胞は上皮内リンパ球表現型を有する、単離されたT細胞またはT細胞の集団。

30

[本発明1087]

T細胞がTCR-である、本発明1087のT細胞。

[本発明1088]

$CD4^- CD8^+$ 、 $CD4^+ CD8^-$ 、 $CD4^+ CD8^+$ 、 $CD4^- CD8^-$ 、 $TCRab^+$ 、 $TCRgd^+$ 、 $CD5^+ CD7^+$ 、 $CD5^+ CD7^-$ 、 $CD3^- CD4^- CD8^-$ 、 $CD5^+ CD7^+ CD3^- CD4^- CD8aa$ 、またはそれらの組み合わせである、本発明1086のT細胞。

[本発明1089]

$CD5^+ CD7^+ CD3^- CD4^- CD8^-$ である、本発明1088の単離されたT細胞。

[本発明1090]

$CD5^+ CD7^+ CD3^- CD4^- CD8aa$ である、本発明1089の単離されたT細胞。

40

[本発明1091]

CARがCD19 CARを含む、本発明1086～1090のいずれかの単離されたT細胞。

[本発明1092]

外因性TCRをさらに含む、本発明1086～1091のいずれかの単離されたT細胞。

[本発明1093]

$CD3^+$ である、本発明1092の単離されたT細胞。

[本発明1094]

$CD4^+CD8^-$ T細胞、 $CD4^-CD8^+$ T細胞、 $CD34^+ CD7^+ CD1a^+$ 細胞、 $CD3^+ TCRab^+$ 、 $CD3^+ TCRgd^+$ 細胞、 $CD3^+ TCRab^+ CD4^+ CD8^-$ 細胞、 $CD3^+ TCRab^+ CD8^+ CD4^-$ 細胞、 $CD3^+ TCRab^+ CD4^+ CD8^- CD45RO^- CD45RA^+$ 細胞、 $CD3^+ TCRab^+ CD8^+ CD4^- CD45RO^- CD45RA^+$ 細胞、 $CD3^+ TCRab^+ CD$

50

4+ CD8- CD45RO- CD45RA+ CCR7+細胞、CD3+ TCRab+ CD8+ CD4- CD45RO- CD45RA+ CCR7+細胞、CD3+ TCRab+ CD4+ CD8- CD45RO- CD45RA+ CD27+細胞、CD3+ TCRab+ CD8+ CD4- CD45RO- CD45RA+ CD27+、CD34⁺ CD7⁺ CD1a⁺細胞、CD34+CD5+CD7+細胞、CD34+CD5+CD7-細胞、ナチュラルキラーT細胞、調節性T細胞、抗原特異的T細胞、上皮内リンパ球T細胞、あるいはCD45+、CD11b+、CD11b-、CD15+、CD15-、CD24+、CD24-、CD114+、CD114-、CD182+、CD182-、CD4+、CD4-、CD14+、CD14-、CD11a+、CD11a-、CD91+、CD91-、CD16+、CD16-、CD3+、CD3-、CD25+、CD25-、Foxp3+、Foxp3-、CD8+、CD8-、CD19+、CD19-、CD20+、CD20-、CD24+、CD24-、CD38+、CD38-、CD22+、CD22-、CD61+、CD61-、CD16+、CD16-、CD56+、CD56-、CD31+、CD31-、CD30+、CD30-、CD38+、もしくはCD38-、またはそれらの組み合わせである細胞である、本発明1086～1093のいずれかの単離されたT細胞。

10

[本発明1095]

外因性TCRまたはCARを発現し、かつCD4⁺CD8⁻ T細胞、CD4⁻CD8⁺ T細胞、CD34⁺ CD7⁺ CD1a⁺細胞、CD3+ TCRab+、CD3+ TCRgd+、CD3+ TCRab+ CD4+ CD8-、CD3+ TCRab+ CD8+ CD4-、CD3+ TCRab+ CD4+ CD8- CD45RO- CD45RA+、CD3+ TCRab+ CD8+ CD4- CD45RO- CD45RA+、CD3+ TCRab+ CD4+ CD8- CD45RO- CD45RA+ CCR7+、CD3+ TCRab+ CD8+ CD4- CD45RO- CD45RA+ CCR7+、CD3+ TCRab+ CD4+ CD8- CD45RO- CD45RA+ CD27+、CD3+ TCRab+ CD8+ CD4- CD45RO- CD45RA+ CD27+、CD34⁺ CD7⁺ CD1a⁺細胞、CD34+CD5+CD7+、CD34+CD5+CD7-、ナチュラルキラーT細胞、調節性T細胞、抗原特異的T細胞、上皮内リンパ球T細胞、CD45+、CD11b+、CD11b-、CD15+、CD15-、CD24+、CD24-、CD114+、CD114-、CD182+、CD182-、CD4+、CD4-、CD14+、CD14-、CD11a+、CD11a-、CD91+、CD91-、CD16+、CD16-、CD3+、CD3-、CD25+、CD25-、Foxp3+、Foxp3-、CD8+、CD8-、CD19+、CD19-、CD20+、CD20-、CD24+、CD24-、CD38+、CD38-、CD22+、CD22-、CD61+、CD61-、CD16+、CD16-、CD56+、CD56-、CD31+、CD31-、CD30+、CD30-、CD38+、もしくはCD38-細胞、またはそれらの組み合わせを有する細胞である、単離されたT細胞またはT細胞の集団。

20

[本発明1096]

T細胞がT細胞の集団であり、かつ該T細胞の集団は、成熟ナイーブCD8またはCD4シングルポジティブ細胞である細胞を少なくとも50%含む、本発明1086～1096のいずれかのT細胞。

[本発明1097]

外因性インバリアントナチュラルキラーT細胞 (iNKT) 関連TCRを発現する、本発明1086～1096のいずれかのT細胞。

30

[本発明1098]

幹細胞または前駆細胞からインビトロで分化させた、本発明1086～1097のいずれかのT細胞。

[本発明1099]

幹細胞または前駆細胞が、ESC、iPSC、ヒト胚性中胚葉前駆細胞、造血幹細胞もしくは前駆細胞、骨髄から単離された細胞、臍帯血から単離された細胞、末梢血から単離された細胞、胸腺から単離された細胞、またはインビトロでESCもしくはiPSCから分化させた細胞より選択される、本発明1098のT細胞。

40

[本発明1100]

内因性TCRが対立遺伝子排除により抑制されている、本発明1086～1099のいずれかのT細胞。

[本発明1101]

外因性TCRを含むインビトロで分化させたT細胞またはT細胞先駆体を患者に投与する工程を含む、患者を治療するための方法。

[本発明1102]

T細胞が、外因性TCRおよび付加的な抗原またはリガンド認識受容体を含む、本発明1101の方法。

[本発明1103]

外因性TCRがNKT由来のTCRを含む、本発明1101または1102の方法。

50

[本発明1104]

外因性TCRが、TCR-アルファおよびTCR-ベータ遺伝子から発現されたタンパク質を含む、本発明1101～1103のいずれかの方法。

[本発明1105]

外因性TCRが、TCR-ガンマおよびTCR-デルタ遺伝子から発現されたタンパク質を含む、本発明1101～1103のいずれかの方法。

[本発明1106]

外因性TCRが、TCR-アルファおよびTCR-ベータ遺伝子から発現されたタンパク質を含み、かつ抗原認識受容体が、TCR-ガンマおよびTCR-デルタ遺伝子から発現されたタンパク質を含む、本発明1101～1103のいずれかの方法。

10

[本発明1107]

外因性TCRが、TCR-ガンマおよびTCR-デルタ遺伝子から発現されたタンパク質を含み、かつ抗原認識受容体が、TCR-アルファおよびTCR-ベータ遺伝子から発現されたタンパク質を含む、本発明1101～1103のいずれかの方法。

[本発明1108]

付加的な抗原認識受容体がTCR分子ではない、本発明1102の方法。

[本発明1109]

外因性TCRが、TCRシグナル伝達を模倣する改変された分子である、本発明1101～1108のいずれかの方法。

[本発明1110]

付加的な抗原認識受容体がキメラ抗原受容体（CAR）である、本発明1102または1108の方法。

20

[本発明1111]

CARが腫瘍抗原特異的CARである、本発明1110の方法。

[本発明1112]

外因性TCRが第一の抗原に特異的であり、かつ付加的な抗原認識受容体が第二の抗原に特異的である、本発明1102～1111のいずれかの方法。

[本発明1113]

第一および第二の抗原が、患者のがん細胞によって発現されるがん細胞抗原である、本発明1112の方法。

30

[本発明1114]

外因性TCRが、ウイルス特異的TCR、外来物特異的TCR、がん細胞特異的TCR、細菌特異的TCR、または癌-精巢抗原特異的TCRである、本発明1101～1113のいずれかの方法。

[本発明1115]

T細胞が、レシピエントに対して同種異系である、本発明1101～1114のいずれかの方法。

[本発明1116]

患者のがんを有する、本発明1101～1115のいずれかの方法。

[本発明1117]

対象におけるがんを治療するためのものである、本発明1116の方法。

40

[本発明1118]

がんが、肺癌、前立腺癌、卵巣癌、精巣癌、脳がん、皮膚癌、黒色腫、結腸癌、直腸癌、胃癌、食道癌、気管癌、頭頸部癌、膵臓癌、肝臓癌、乳癌、卵巣癌、リンパ腫および多発性骨髄腫を含めたリンパ系がん、白血病、骨または軟部組織の肉腫、子宮頸癌、ならびに外陰癌より選択される、本発明1116または1117の方法。

[本発明1119]

外因性TCRによって認識される抗原の投与をさらに含む、本発明1101～1118のいずれかの方法。

[本発明1120]

抗原が、精製される、他の分子にコンジュゲートされる、または細胞もしくは細胞様ビ

50

ヒクルによって提示される、本発明1119の方法。

[本発明1121]

外因性TCRが同種反応性でない、本発明1101～1120のいずれかの方法。

[本発明1122]

外因性TCRが不活性である、本発明1101～1121のいずれかの方法。

[本発明1123]

一部の態様において、CARは、ウイルス抗原特異的CARまたは細菌抗原特異的CARである。

[本発明1124]

患者が、微生物感染症を有するまたは有する危険性がある、本発明1101～1115または1119～1123のいずれかの方法。

10

[本発明1125]

第一および第二の抗原が、同じウイルスタイプによって、または該ウイルスタイプに感染した細胞によって発現されるウイルス抗原である、本発明1124の方法。

[本発明1126]

第一および第二の抗原が、同じ細菌によって、または該細菌に感染した細胞において発現される細菌細胞抗原である、本発明1124の方法。

[本発明1127]

外因性TCRがNY-ESO-1特異的TCRである、本発明1101～1123のいずれかの方法。

[本発明1128]

20

患者への抗原提示細胞の投与をさらに含む、本発明1101～1127のいずれかの方法。

[本発明1129]

抗原提示細胞が樹状細胞である、本発明1128の方法。

[本発明1130]

抗原提示細胞が人工抗原提示細胞である、本発明1128の方法。

[本発明1131]

抗原提示細胞に、外因性TCRまたはCARによって認識される抗原がロードされている、本発明1128～1130のいずれかの方法。

[本発明1132]

T細胞がFOXP3の発現をさらに含む、本発明1101～1131のいずれかの方法。

30

[本発明1133]

T細胞が、FOXP3を発現するように操作されるまたは選択される、本発明1132の方法。

[本発明1134]

FOXP3発現が構成的である、本発明1133の方法。

[本発明1135]

対象が、自己免疫疾患、移植片対宿主疾患（GVHD）、または移植片拒絶を有するまたは有する危険性がある、本発明1132～1134のいずれかの方法。

[本発明1136]

自己免疫疾患、GVHD、または移植片拒絶を治療するためのものである、本発明1135の方法。

40

[本発明1137]

外因性TCRを含む、インビトロで分化させたT細胞またはT細胞先駆体。

[本発明1138]

TCRが、ウイルス特異的TCR、外来物特異的TCR、がん細胞特異的TCR、細菌特異的TCR、または癌-精巣抗原特異的TCRである、本発明1137のT細胞。

[本発明1139]

付加的な抗原認識受容体をさらに含む、本発明1137または1138のT細胞。

[本発明1140]

外因性TCRが、TCR-アルファおよびTCR-ベータ遺伝子から発現されたタンパク質を含む、本発明1138または1139のT細胞。

50

[本発明1141]

外因性TCRが、TCR-ガンマおよびTCR-デルタ遺伝子から発現されたタンパク質を含む、
本発明1138または1139のT細胞。

[本発明1142]

外因性TCRが、TCR-アルファおよびTCR-ベータ遺伝子から発現されたタンパク質を含み、
かつ抗原認識受容体が、TCR-ガンマおよびTCR-デルタ遺伝子から発現されたタンパク質
を含む、本発明1139のT細胞。

[本発明1143]

外因性TCRが、TCR-ガンマおよびTCR-デルタ遺伝子から発現されたタンパク質を含み、
かつ抗原認識受容体が、TCR-アルファおよびTCR-ベータ遺伝子から発現されたタンパク質
を含む、本発明1139のT細胞。

10

[本発明1144]

付加的な抗原認識受容体がTCR分子ではない、本発明1139のT細胞。

[本発明1145]

付加的な抗原認識受容体がキメラ抗原受容体（CAR）である、本発明1139または1144のT
細胞。

[本発明1146]

CARが腫瘍抗原特異的CARである、本発明1145のT細胞。

[本発明1147]

CARがウイルス抗原特異的CARである、本発明1145のT細胞。

20

[本発明1148]

外因性TCRが第一の抗原に特異的であり、かつ付加的な抗原認識受容体が第二の抗原に
特異的である、本発明1138～1144のいずれかのT細胞。

[本発明1149]

第一および第二の抗原が、がんの細胞によって発現されるがん細胞抗原である、本発明
1148のT細胞。

[本発明1150]

第一および第二の抗原が、ウイルスまたは該ウイルスに感染した細胞によって発現され
るウイルス抗原である、本発明1148のT細胞。

[本発明1151]

第一および第二の抗原が、細菌の細胞または該細菌に感染した細胞によって発現される
細菌抗原である、本発明1148のT細胞。

30

[本発明1152]

外因性TCRがNY-ESO-1特異的TCRである、本発明1137～1149のいずれかのT細胞。

[本発明1153]

FOXP3の発現をさらに含む、本発明1137～1152のいずれかのT細胞。

[本発明1154]

FOXP3を発現するように操作されるまたは選択される、本発明1153のT細胞。

[本発明1155]

FOXP3発現が構成的である、本発明1154のT細胞。

40

[本発明1156]

抗原にコンジュゲートした作用物質を患者に投与する工程を含む、外因性TCR発現T細胞
を有する患者における外因性TCR発現T細胞への作用物質の送達のための方法であって、該
抗原は該外因性TCRによって認識される、方法。

[本発明1157]

外因性TCRが不活性である、本発明1156の方法。

[本発明1158]

作用物質が除去剤である、本発明1156または1157の方法。

[本発明1159]

T細胞を含む組成物と、外因性TCRに特異的に結合する作用物質とを接触させて、作用物

50

質-TCR発現細胞複合体を作製する工程、および

組成物から該作用物質-TCR発現細胞複合体を精製する工程

を含む、本発明1137～1155のいずれかのT細胞のインビトロ選択および単離のための方法
。

[本発明1160]

作用物質が抗体である、本発明1159の方法。

[本発明1161]

作用物質がペプチド-MHC多量体である、本発明1159の方法。

[本発明1162]

作用物質を固体支持体に付着させる、本発明1159～1161のいずれかの方法。

10

[本発明1163]

作用物質に特異的に結合する二次分子の投与をさらに含む、本発明1159～1161のいずれかの方法。

[本発明1164]

二次分子を固体支持体に付着させる、本発明1163の方法。

[本発明1165]

組成物からの固体支持体および結合分子の分離をさらに含む、本発明1162～1164のいずれかの方法。

[本発明1166]

固体支持体および結び付いた分子を1回または複数回洗浄する工程をさらに含む、本発明1165の方法。

20

[本発明1167]

作用物質または二次分子を蛍光分子とコンジュゲートさせる、本発明1159～1165のいずれかの方法。

[本発明1168]

作用物質-TCR発現細胞複合体を精製する工程が、フローサイトメトリー、蛍光活性化細胞選別（FACS）、ビーズ、および/またはカラムを含む、本発明1159～1167のいずれかの方法。

[本発明1169]

作用物質-TCR発現細胞複合体を精製する工程が、他のT細胞マーカーに基づく精製を含む、本発明1159～1168のいずれかの方法。

30

[本発明1170]

他のT細胞マーカーが、CD4、CD8、CD45RA、CD45RO、CCR7/CD197、CD62L、CD27、CD28、およびCD1aのうちの1つまたは複数である、本発明1169の方法。

[本発明1171]

作用物質-TCR発現細胞複合体から作用物質を解離させる工程をさらに含む、本発明1159～1170のいずれかの方法。

[本発明1172]

精製されたTCR発現細胞を培養する工程をさらに含む、本発明1159～1166のいずれかの方法。

40

[本発明1173]

精製されたTCR発現細胞を凍結する工程をさらに含む、本発明1159～1172のいずれかの方法。

[本発明1174]

a) 外因性TCRまたはTCR誘導体を幹細胞または前駆細胞に移入する工程；および
b) 該幹細胞または前駆細胞をT細胞またはT細胞先駆体に分化させる工程
を含む、本発明1137～1155のいずれかのT細胞を作製する方法。

[本発明1175]

幹細胞または前駆細胞を、分化剤との接触の前に、同時に、および/または後に、同族MHCおよび/またはペプチド分子と接触させる、本発明1174の方法。

50

[本発明1176]

幹細胞または前駆細胞をT細胞に分化させる工程が、幹細胞または前駆細胞を、Notchリガンドを発現する間質細胞と共培養することを含む、本発明1174または1175の方法。

[本発明1177]

間質細胞がOP9細胞、MS5、またはHS27細胞である、本発明1176の方法。

[本発明1178]

Notchリガンドがデルタ様1 (Dll1) である、本発明1176または1177の方法。

[本発明1179]

共培養した幹細胞または前駆細胞および間質細胞を、Flt-3リガンドおよび/またはIL-7と接触させる工程をさらに含む、本発明1176～1178のいずれかの方法。

10

[本発明1180]

幹細胞または免疫前駆細胞をT細胞に分化させる工程が、本発明1002～1052のいずれかの方法を含む、本発明1174または1175の方法。

[本発明1181]

対象におけるT細胞の数を増加させるための、または対象における疾患もしくは病状を治療するための方法であって、有効量の、本発明1002～1052のいずれかに従って調製されたT細胞もしくは抗原特異的T細胞、または本発明1137～1155もしくは1086～1100のいずれかのT細胞を対象に投与する工程を含む、方法。

[本発明1182]

対象が、自己免疫疾患、がん、感染症、免疫不全、またはそれらの組み合わせを有するまたはその危険性があると判定されている、本発明1181の方法。

20

[本発明1183]

T細胞が調節性T細胞である、本発明1181または1182の方法。

[本発明1184]

対象が、自己免疫疾患を有するまたはその危険性があると判定されている、本発明1183の方法。

[本発明1185]

三次元 (3D) 細胞凝集体からT細胞を産生するのに有効な濃度の血清不含培地を用いて3D細胞凝集体を培養する工程を含む、自己抗原と反応しないT細胞を産生するための方法であって、該3D細胞凝集体は、a) Notchリガンドを発現する間質細胞の選択集団、およびb) 幹細胞または前駆細胞の選択集団を含み、a) またはb) の1種または複数種の細胞は、外因性自己抗原を発現し；それによって該3D細胞凝集体は、自己抗原と反応しないT細胞を産生する、方法。

30

[本発明1186]

a) またはb) の細胞のうちの1種または複数種が外因性自己MHCを発現する、本発明1185の方法。

本発明の他の目的、特質、および利点は、以下の詳細な説明から明白になるであろう。しかしながら、この詳細な説明から、本発明の精神および範囲の内にある様々な変化および改変が当業者に明白になるであろうため、本発明の好ましい態様が示されているものの、詳細な説明および具体的な例は、例証としてのみ与えられることが理解されるべきである。

40

【図面の簡単な説明】

【0077】

以下の図面は本明細書の一部を形成し、かつ本発明のある特定の局面をさらに実証するために含まれる。本明細書において提示される具体的な態様についての詳細な説明と組み合わせてこれらの図面のうちの1つまたは複数参照することにより、本発明はよりよく理解され得る。

【0078】

【図1】図1A～1B：人工胸腺オルガノイド (ATO) における臍帯血 (CB) CD34+ HSPCからのヒトT細胞の生成。CB CD34+ HSPCを、ATOにおいて7週間分化させた。A) CD3+TCR α β +

50

T細胞の漸進的発生を示したATOの週1回の分析（CD14- CD56-細胞に対してゲート制御して（gated on）、それぞれ単球およびNK細胞を排除した）。B）成熟CD8+およびCD4+ T細胞の発生を示した、CD3+ TCR α β +細胞に対してゲート制御されたATOの週1回の分析。

【図2】図2A～2B：ATOにおける臍帯血CD34+ HSPCからの抗原特異的なTCR改変T細胞の生成、およびATOにおけるヒトMHC分子の発現による陽性選択の増強。CB CD34+ HSPCに、HLA-A*02:01の背景でNY-ESO-1_{157～165}に特異的なTCRをコードするレンチウイルスを形質導入し、ATOにおいて6週間分化させた。A）TCR（HLA-A*02:01/NY-ESO-1_{157～165}四量体を用いて検出される）、CD3、CD8、CD45RA、CD27、およびCCR7の発現によって実証される、ATOにおける成熟したナイーブの抗原特異的なCD8+ T細胞の生成。各パネルは、最後のパネルからの逐次的ゲート制御を表す。B）ATO間質細胞区画においてHLA-A*02:01を発現するよう

10

【図3】図3A～G：ATOシステムにおけるヒトT細胞発生の効率および再現性。（a）ATOモデルの図解。（b）表示した週における、CB CD34+CD3- HSPCからのT細胞分化の動態（CD14-CD56-細胞に対してゲート制御して、それぞれ骨髄およびNK細胞を排除した）。（c）2つの分類スキームに基づく、ATOにおける初期CD34+胸腺T細胞前駆体表現型の維持（（b）に示されるCD34+細胞に対してゲート制御された）。（d）CB HSPCおよびMS-5細胞（左）またはMS5-hDLL1細胞（すなわち、ATO）（右）で生成された4週目のオルガノイドにおける、CD3に対する免疫蛍光染色。（e）1:10～1:30のHSPC：間質細胞比で、 $2\sim5\times10^4$ 個のHSPCで開始された生物学的複製CB ATO（n=18）における全細胞増殖。（f）単球（CD14+）、NK細胞（CD56+）、またはT系統細胞（CD7+CD5+）頻度（全細胞に対してゲート制御された）；ならびに（g）6週目の生物学的複製ATO（n=18）における、T細胞および先駆体頻度（CD14-CD56-細胞に対してゲート制御された）。

20

【図4】図4A～C：ATOにおける胸腺リンパ球形成およびナイーブT細胞発生の再現。（a）全CD14-CD56-および（b）CD3+TCR α β +細胞、に対してゲート制御された12週目のCB ATOとヒト出生後胸腺との間のT細胞分化の比較。（c）12週目のATOまたは胸腺における、未成熟（CD45RA-CD45RO+）および成熟（CD45RA+CD45RO-）ナイーブT細胞の生成（表示されるCD8SPまたはCD4SP下位ゲートとともに、CD3+TCR α β +細胞に対してゲート制御された）。

【図5】図5A～F：複数種のHSPC供給源およびサブセットからのT細胞の生成。ヒト臍帯血（CB）、成体骨髄（BM）、G-CSF動員末梢血（MPB）、または非動員末梢血（PB）由来のCD34+CD3- HSPCで開始された6週目のATOにおける効率的なT細胞発生。（a）全CD14-CD56-細胞、および（b）CD14-CD56-CD3+TCR α β + T細胞に対してゲート制御した。（c）CD14-CD56-または（d）CD14-CD56-CD3+TCR α β + T細胞に対してゲート制御された、6週目のATOにおける、CB、BM、およびMPB由来のLin-CD34+CD38-造血幹細胞（HSC）富化画分からのT細胞分化。（e）CD14-CD56-細胞、および（f）（e）に示されるCD34+細胞に対してゲート制御された、成体BM HSCおよび前駆体サブセットで開始された3週目のATOにおけるT細胞分化。

30

【図6】図6A～E：ATO由来T細胞のTCR多様性および機能。（a）TCR V β 使用法についてのフローサイトメトリー分析によって示される、7週目のATO（n=5）またはヒト胸腺（n=4）からの、CD8SP T細胞における生理学的TCR多様性の生成。（b）PMA/イオノマイシンで12時間処理された選別されたATO由来DP、CD8SP、およびCD4SP細胞における、インターフェロン γ およびIL-4産生に対する細胞内染色。（c）抗CD3/CD28およびIL-2に応答した、ATO由来CD8SP細胞の増殖（CFSE希釈）および活性化（CD25の上方調節）。（d）PMA/イオノマイシンに応答したインターフェロン γ 産生によって示される、臍帯血（CB）、骨髄（BM）、または動員末梢血（MPB）由来のHSPCで開始されたATOから単離されたCD8SP細胞の比較可能な応答（空の分析チャネルに対して示される）、および（e）抗CD3/CD28およびIL-2に

40

【図7】図7A～G：ATOにおけるTCR改変T細胞の分化および対立遺伝子排除。（a）TCR形質導入（上の列）またはモック形質導入（下の列）CB HSPCで開始された7週目のATOにおけるHLA-A*0201/NY-ESO-1_{157～165}特異的TCR改変T細胞の効率的な生成。プロットは、各ブ

50

ロットの上に表示される逐次的下位ゲートとともに、CD14-CD56-細胞に対してゲート制御されている。(b) 1:20のHSPC対間質細胞比で 3×10^4 個のCB HSPCで生成された、6週目のTCR形質導入対モック形質導入ATOにおける全細胞増殖の増強。(c) HSPCおよび間質の両方の数を減少させることによる、5週目のTCR形質導入ATOにおける細胞増殖の増強。ATOは、1:20のHSPC対間質細胞比で 3×10^4 個または 7.5×10^3 個のTCR形質導入CB HSPCのいずれかで生成された。(d) ATO由来TCR形質導入CD8SP T細胞の細胞傷害性刺激。K562細胞、またはCD80および同族ペプチド-MHCを発現するK562人工APCとの共培養後の、インターフェロン γ 産生およびCD107a膜動員(CD3+四量体+CD8SPに対してゲート制御されたT細胞)。(e) 抗CD3/CD28およびIL-2に应答した、TCR形質導入またはモック形質導入ATO由来のCD8SP T細胞の細胞増殖。(f) TCR形質導入(n=3)または非形質導入(n=5)ATO由来のCD8SP細胞のTCR V β 多様性。TCR形質導入ATO由来の四量体+CD3+CD8SP細胞(n=3)、または非形質導入ATO由来のCD3+CD8SP細胞(n=5)に対してゲート制御された、フローサイトメトリーによって判定されるV β 頻度。(g) TCR形質導入ATO由来の四量体+CD3+CD8SP細胞における形質導入されたV β 13.1鎖についての富化を示した、(f)からの代表的なフローサイトメトリープロット。非形質導入ATOまたはヒト胸腺由来のCD3+CD8SP T細胞が、比較のために示されている。

10

【図8】図8A~C: MHC改変ATOにおけるTCR改変T細胞の陽性選択の増強。(a) ATOにおける造血系および/または間質系「自己」MHC発現をモデル化する手法の図解。造血系HLA-A*02:01発現は、HLA型付けされたドナーCBユニットを用いることによって達成され、かつ間質系発現は、HLA-A*02:01を発現するレンチウイルスによるMS4-hDLL1細胞の形質導入によって達成された。すべてのHSPCに、HLA-A*02:01拘束NY-ESO-1特異的TCRを形質導入した。

20

(b) ATOにおける四量体+CD8SP T細胞の陽性選択に対する、間質系および造血系「自己」MHC発現の相乗効果。細胞はCD14-CD56-に対してゲート制御されており、そして逐次的下位ゲートはプロットの上に表示されている。(c) CD45RA、CD27、およびCCR7の上方調節、ならびにCD45ROおよびCD1aの下方調節によって示される、間質系HLA-A*02:01発現を有するATOにおける成熟ナイーブT細胞表現型へのTCR改変T細胞の成熟の増強。すべてのプロットは、四量体+CD3+CD8SP T細胞に対してゲート制御されている。

【図9】図9A~B: ATO細胞増殖およびT細胞分化は、インプットHSPC数およびHSPC:間質細胞比に関連している。(a) 変動的な数のCD34+CD3- CB HSPCおよび一定の間質細胞(MS5-hDLL1)数、または(b) 変動的な数のHSPCおよび間質細胞、で生成された6週目のATOからの細胞増殖およびT細胞頻度のデータ。ATOあたり最も低いインプットHSPC数(7,500個の細胞)、および1:20~1:40のHSPC:間質細胞比で、最適な全体のおよび成熟したT細胞増殖が見られた。

30

【図10】図10A~G: ATOにおけるT細胞分化は高度に再現可能であり、かつB27ロット、ゼノフリーB27、または間質照射によって影響を受けない。単一CBサンプルから生成されかつB27サプリメントの4つの異なるロット(A~Dで標識された)とともに培養された6週目のATOにおける、(a) 全ATO細胞産出量、(b) 骨髄(CD14+)もしくはNK細胞(CD56+)分化、または(c) B細胞(CD19+)もしくはT細胞分化、に対するB27ロット変動の有意な効果なし。技術的ATO複製(n=2~3)が、各B27ロットに対して示されている。すべてのATOは、1:20のHSPC:間質細胞比で、 3×10^4 個のHSPCで準備した。(d) ゼノフリーB27とのB27の置換は、6週目のATOにおける細胞数または(e) T細胞分化に影響を有しなかった。(f) 表示される線量で照射されたMS5-hDLL1細胞で生成されたATOは、比較可能なT細胞分化を示した(CD14-CD56-細胞に対してゲート制御された)、または(g) (f)に示されるCD3+TCR α β +細胞に対してゲート制御された。

40

【図11】図11A~C: ATO対単層システムにおける陽性選択の増強。(a) 単層共培養と比較した、ATO(すなわち、RB27を用いた3D培養におけるMS5-hDLL1)におけるT細胞陽性選択および成熟の増強。6週目の単層培養(左)を、3Dオルガノイド培養(右)と比較し、かつ表示されるOP9-DL1とのクロスオーバー比較を含んだ。方法において記載されるように、OP9-DL1単層共培養のための標準培地はMEM α /20% FCSであり、そしてATOのための標準培地はRB27であった。親MS-5細胞株(DLL1を形質導入されていない)を用いた単層また

50

はオルガノイド培養も示されている。すべてのプロットは、CD14-CD45-細胞、またはプロットの上に表示されるCD3+TCR α β +下位ゲートに対してゲート制御されている。6週目の時点での、標準OP9-DL1単層培養対ATOにおける、関連細胞集団の (b) パーセントおよび (c) 増殖倍率。培養は、同じCBユニットを用いて並行して開始された。ATOは、1:20のHSPC対間質細胞比で、 3×10^4 個のHSPCで準備した。

【図12】図12A~C：ATOにおける胸腺リンパ球形成およびナイーブT細胞表現型の再現。

(a) 6~10週目の間の、ATOにおけるCD3+TCR α β +CD8SPおよびCD4SP細胞の漸進的分化。ATOを、同じドナーCB HSPCから並行して培養し、かつ表示される週の時点で連続的に分析した。細胞はCD14-CD56-TCR α β +CD3+細胞に対してゲート制御されており、そして逐次的下位ゲート (CD8SPまたはCD4SP) はプロットの上に表示されている。(b、c) ヒト胸腺における対応する集団と比較した、12週目のATO由来ナイーブCD8SPおよびCD4SP T細胞を特徴付けする付加的なマーカー。すべての細胞は、CD14-CD56-CD3+TCR α β +に対してゲート制御され、かつ (b) CD8SPまたは (c) CD4SP細胞に対して下位ゲート制御されている。

【図13】図13A~F：複数種のHSPC供給源およびサブセットからのT細胞の生成。(a) 種々のヒト臍帯血 (CB)、成体骨髄 (BM)、G-CSF動員末梢血 (MPB)、または非動員末梢血 (PB) HSPC由来の6週目のATOにおける、CD34+細胞の維持。(b) (a) に示されるCD34+細胞に対してゲート制御された、CD34+ T細胞前駆体サブセットの表現型。(c) (a) に示されるHSPC供給源を用いた6週目のATOにおける、全細胞および関連T細胞サブセットの増殖倍率。増殖倍率は、HSPCの開始数に対するものである。ATOは、1:20のHSPC対間質細胞比で、ATOあたり 3×10^4 個のCD34+CD3- HSPCを用いて準備した。種々のHSPC供給源由来の造血幹細胞 (HSC) 富化 (Lin-CD34+CD38-) 画分から開始された6週目のATOにおける、(d) CD34+細胞の維持、および (e) CD34+ T細胞前駆体の表現型。(f) 精製されたBM造血幹サブセットおよび前駆体サブセットで開始された3週目のATOにおける、全細胞の増殖倍率。ATOは、1:15~1:40のHSPC対間質細胞比で、ATOあたり $2 \sim 4 \times 10^4$ 個の各集団で開始された。データは、HSPCの開始数に対するものである。

【図14】図14A~B：ATOシステムにおける、ヒトT細胞発生の効率および再現性。(a) 6週目の時点での、ATOにおける細胞タイプの頻度。上のパネル：単球 (CD14+)、NK細胞 (CD56+)、B細胞 (CD19+)、HSPC (CD34+)、または T系統細胞 (CD7+CD5+) の頻度 (全細胞に対してゲート制御された)。中央のパネル：T細胞先駆体およびTCR+ T細胞の頻度 (CD14-CD56-細胞に対してゲート制御された)。下のパネル：DPならびに成熟CD8およびCD4シングルポジティブ (SP) T細胞の頻度 (CD3+TCR α β +細胞に対してゲート制御された)。(b) ATOあたり $7.5 \sim 22.5 \times 10^3$ 個のCB HSPCから、6週目の時点でATOあたり生成された全細胞数およびCD3+TCR α β +CD8SP T細胞。データは、11個の生物学的複製に対して示されている (エラーバーは標準偏差を示す)。

【図15】図15A~D：複数種のHSPC供給源およびサブセットからのT細胞の生成。(a) CB、新生児胸腺、BM、またはMPBから単離された7500個のCD34+CD3-細胞から生成されたATOにおける、12週間にわたるT細胞分化動態。T細胞先駆体および成熟T細胞の頻度についての平均およびSDが、組織あたり3つの技術的複製から示されており、そしてデータは、2つの異なる実験の代表的なものである。(b) (a) に示されるATO由来の全細胞およびCD3+TCR α β +CD8SP T細胞の数。(c) 6週目の時点での、ATOにおける成体BM HSPC (CD34+lin-) および先駆体 (LMPPおよびCLP) サブセットのT細胞分化潜在性 (ゲートが表示される)。(d) (c) に示されるATO由来の全細胞およびCD3+TCR α β +CD8SP T細胞の数。技術的三つ組の平均およびSDが示されており、そしてデータは、3つの生物学的複製の代表的なものである。

【図16】図16A~F：ATO由来T細胞のTCR多様性および機能。(a) TCR V β ファミリー発現の頻度についてのフローサイトメトリー分析によって示される、7週目のATO (n=5) またはヒト胸腺 (n=4) からの、CD3+TCR α β +CD8SP T細胞におけるTCR多様性の生成。(b) TCR V α および (c) TCR V β CDR3領域のディープシーケンシングによる、ATO、胸腺、および末梢血 (PB) ナイーブT細胞由来のCD3+TCR α β +CD8SP T細胞におけるTCRクロノタイプ多様性。個々のクロノタイプの頻度が示されている。データは、3つの生物学的複製

の代表的なものである。(d) PMA/イオノマイシンで6時間処理されたATO由来CD3+TCR α β +CD8SP T細胞による、多機能的なサイトカイン産生。データは、3つの異なる実験の代表的なものである。(e) 抗CD3/CD28およびIL-2に应答した、5日後のATO由来CD3+TCR α β +CD8SP細胞の増殖(CFSE希釈)および活性化(CD25および4-1BBの上方調節)。データは、2つの個々の実験の代表的なものである。(f) 7および14日後の、抗CD3/CD28およびIL-2に应答した、開始細胞数に対するATO由来CD3+TCR α β +CD8SP T細胞のATO後の増殖。技術的三つ組の平均およびSDが示されており、そしてデータは、3つの生物学的複製の代表的なものである。

【図17】図17A~F: ATOにおけるTCR改変T細胞の分化および対立遺伝子排除。(a) 従来のT細胞発生を示す、TCR形質導入CB ATO由来のCD3+TCR α β +四量体+ T細胞上での、CD8 α およびCD8 β の共発現、ならびにCD56およびCD16発現の欠如。データは、3つの生物学的複製の代表的なものである。(b) $7.5 \sim 18 \times 10^3$ 個の開始CB HSPCで生成された、6または7週目の時点でのTCR形質導入対モック形質導入ATOにおける、HSPCの開始数に対する全細胞産出量および細胞収量の増強。生物学的複製実験の平均およびSDが示されている(モック n=3、TCR n=8、**p=0.002)。(c) 人工抗原提示細胞(aAPC)による、ATO由来TCR改変T細胞の細胞傷害性刺激。K562細胞、またはCD80と、非関連(MART1_{26~35})もしくは同族(NY-ESO1_{156~165})ペプチドを提示するHLA-A*02:01一本鎖三量体とを発現するK562 aAPCに应答した、CD3+四量体+CD8SP T細胞のサイトカイン産生およびCD107a膜動員。データは、3つの生物学的複製の代表的なものである。(d) 72時間の、非関連(MART1)または同族(NY-ESO-1) aAPCに应答した、ATO由来CD3+四量体+CD8SP T細胞の増殖(CFSE希釈) および活性化(CD25上方調節)。データは、2つの生物学的複製の代表的なものである。(e) 7および14日後の、抗CD3/CD28およびIL-2またはIL-7/IL-15に应答した、開始細胞数に対するTCR形質導入ATOからのATO由来CD3+TCR α β +CD8SP T細胞のATO後の増殖。技術的三つ組の平均およびSDが示されており、そしてデータは、3つの生物学的複製の代表的なものである。(f) フローサイトメトリー分析によって示される、非形質導入(n=5) ATOと比較した、TCR形質導入(n=3) ATO由来のCD3+TCR α β +四量体+CD8SP細胞における、内因性TCR V β の対立遺伝子排除。エラーバーはSDを表す。

【図18】図18A~F: ATO由来TCR改変T細胞による抗原特異的腫瘍細胞殺傷。(a、b) 抗原陽性腫瘍細胞に対する、ATO由来TCR改変T細胞のインビトロ細胞傷害性。HLA-A*02:01/NY-ESO-1157~165特異的TCR形質導入ATO由来のCD8SP T細胞を、抗CD3/28+IL-2で36時間活性化し、かつK562細胞、非関連(MART1_{26~35})もしくは同族(NY-ESO1_{156~165})ペプチドを提示するHLA-A*02:01一本鎖三量体を形質導入されたK562細胞(それぞれ、K562-MART-1およびK562-ESO)、またはHLA-A*02:01+NY-ESO-1+U266多発性骨髄腫細胞株とともに共インキュベートした。(a) 初期(アネキシンV+DAPI-)または後期(アネキシンV+DAPI+)アポトーシス腫瘍細胞パーセントを、9時間の時点でフローサイトメトリーによって判定した。エフェクター:標的(E:T)比を、共培養の開始時点における四量体+ T細胞パーセントに基づいて算出した。データは、2つの生物学的複製の代表的なものである。(b) (a)に示される細胞傷害性アッセイに対する特異的細胞死。全アネキシンV+細胞を、T細胞を受けなかったウェルにおける自然発生的(非特異的)細胞死に対して調整した。(c) T細胞の長期にわたるATO後の活性化/増殖後の、保持された抗原特異性。TCR形質導入ATOから単離されたCD8SP T細胞を、抗CD3/28およびIL-2で14日間増殖させ、かつ(a)に記載されるように細胞傷害性アッセイを実施した。同じ条件下で14日間増殖させたTCR形質導入末梢血CD8+ ドナーT細胞を用いたアッセイが、比較のために示されている。(d~f) ATO由来TCR改変T細胞によるインビボ腫瘍制御。TCR形質導入ATO由来のCD8SP T細胞を、(c)に記載されるように14日間活性化/増殖させた。(d) 5.7×10^6 個のT細胞(四量体染色による、 4.5×10^6 個の抗原特異的T細胞を含む)またはPBSを、 2.5×10^5 個のルシフェラーゼ形質導入K562-ESOまたはK562-MART腫瘍細胞を3日前に皮下に埋め込まれたNSGマウスにIV注射した。(e) ATO CD8SPに対するK562-ESO対K562-MART1腫瘍細胞の应答。生物発光を表示される時点で記録した。1群あたり2~3匹のマウスに対する平均およびSDが示されている(PBS n=2、K562-ESO n=3またはK562-MART1 n=2を有するTCR形質導入ATO T細胞)

10

20

30

40

50

($^{**}p=0.00033$ 、 $^{***}p=0.000066$)。(f) (d) および (e) に記載されるアッセイからの選択されたマウスの生物発光イメージング。中央の列は、腫瘍が成長した、ATO CD8SP T細胞で処理された合計3匹のK562-ES0担持マウスのうちの唯一のマウスを示していることに留意されたい。

【図 1 9】図19：ATOは固形組織様構造を形成する。CB HSPCおよびMS5-hDLL1（すなわち、ATO）（左）、親MS-5細胞（中央）、またはMS5-hDLL1細胞のみ（右）で生成された6週目の3D培養物の組織構築を示した、ヘマトキシリンおよびエオシン染色。倍率は、 $100\times$ （上の列）または $400\times$ （下の列）である。

【図 2 0】図20A～B：ATOあたりのHSPCの開始数は、HSPCあたりの細胞収量に影響を及ぼすが、全細胞産出量またはT細胞分化にはそうではない。(a) 変動的な数のCD34+CD3- CB HSPC (ATOあたり $0.3\sim 30\times 10^3$ 個) および一定の数のMS5-hDLL1間質細胞 (ATOあたり 1.5×10^5 個) で生成された6週目のATOにおける、インプットHSPCあたりの全細胞数および収量。より多くのATO (1:20の比率で、 30×10^3 個のHSPCおよび 6×10^5 個の間質細胞を用いた) を有する右に、比較が示されている。(b) (a) に記載されるATOにおける、T細胞先駆体および成熟T細胞頻度。三つ組のATOの平均およびSDが示されている。データは、2つの生物学的複製の代表的なものである。

【図 2 1】図21A～K：ATOにおけるT細胞分化は高度に再現可能であり、かつB27ロット変動、ゼノフリーB27、または間質照射によって影響を受けない。単一CB (ATOあたり 7.5×10^3 個のCD34+CD3- HSPC) から生成されかつB27サブプリメントの4つの異なるロット (A～Dで標識された) を用いて培養された6週目のATOにおける、(a) T系統コミットメント、(b) T細胞分化、または (d) 全細胞数、に対するB27ロット変動の有意な効果なし。複製ATO ($n=2\sim 3$) が、各B27ロットに対して示されている。(e) ゼノフリーB27とのB27の置換は、6週目のATOにおけるT細胞分化または (f) 全細胞数に有意な影響を有しなかった。ATO生成前の20～80GyでのMS5-hDLL1間質細胞の照射は、(g～i) T細胞分化、または (j) 全細胞およびCD3+TCR $\alpha\beta$ +CD8SP T細胞の数、にほとんど影響を有しなかった。三つ組のATOの平均およびSDが示されている。データは、2つの個々の実験の代表的なものである。

(h) におけるフロープロットは、(g) に示されるCD3+TCR $\alpha\beta$ +ゲートからの細胞を示している。(k) 6週目の時点での機械的分断によるATO由来の細胞の収集は、 $>99\%$ のヒト造血系CD45+細胞 (上)、および $<0.5\%$ GFP+間質 (下) の懸濁をもたらした。ヒトおよびマウス細胞の頻度が、8つの生物学的複製ATOに対して示されている。

【図 2 2】図22：ATO対単層培養システムにおける陽性選択の増強。6週目の時点での、OP9-DL1単層培養対ATOにおける、単球 (CD14+)、NK細胞 (CD56+)、B細胞 (CD19+)、HSPC (CD34+)、またはT系統細胞 (CD7+CD5+)、ならびにT細胞先駆体およびT頻度細胞タイプの頻度 (逐次的ゲートが各グラフに表示されている)。培養は、単層およびATO培養に対して同じCBユニットを用いて開始された。データは、3つの生物学的複製の代表的なものである。

【図 2 3】図23A～B：ATOにおける胸腺リンパ球形成およびナイーブT細胞表現型の再現。(a) 出生後胸腺と比較した、CB ATOにおけるHLA-DR+細胞の頻度 (CD45+細胞に対してゲート制御された)。(b) 複数のHLA-DR+抗原提示細胞 (APC) 集団が、6週目のATOに存在している。逐次的ゲートが各プロットの上に示されている。HLA-DR+集団には、単球 (CD14+)、顆粒球 (CD66b+)、B細胞 (CD19+)、HSPC (CD34+)、形質細胞様DC (CD303+CD123+)、CLEC9A+ DC (CD141+CLEC9A+)、およびCD1c+ DC (CD1c+CLEC9A-) が含まれる。出生後胸腺からの対になった分析が、比較のために示されている。(a) および (b) におけるデータは、3つの生物学的複製の代表的なものである。

【図 2 4】図24A～B：(a) DPの初期の現れおよび (b) T細胞コミットしたCD34+CD7+前駆体、によって明らかにされた、3週目のATOにおける、LMPPおよびCD24- CLPからのT細胞コミットメントの早発。b) におけるデータは、a) に示されるCD34+細胞に対してゲート制御されている。データは、2つの生物学的複製の代表的なものである。

【図 2 5】図25A～E：ATO由来T細胞のTCR多様性および機能的検証。(a) ヒト胸腺細胞と同様に、RAG1およびRAG2は、ATO由来CD3+CD4+CD8+ (DP) において発現するが、成熟CD3+C

10

20

30

40

50

D8SP T細胞ではそうではない。FACS選別されたATO由来および出生後胸腺由来のT細胞集団におけるB2Mの発現に対して、RAG1およびRAG2に対する定量的RT-PCRが示されている。三つ組の反応についての平均およびSDが示されている。(b) TCR V β ファミリー発現の頻度についてのフローサイトメトリー分析によって示される、7週目のATO (n=5) またはヒト胸腺 (n=4) から単離されたCD3+TCR α β +CD4SP T細胞におけるTCR多様性の生成。(c) PMA/イオノマイシンで6時間処理された12週目のATO由来CD4SP T細胞によるサイトカイン産生。データは、2つの生物学的複製の代表的なものである。(d) 抗CD3/CD28およびIL-2に応答した、5日後の臍帯血 (CB) およびATO由来 (12週目) CD4SP T細胞の増殖 (CTV希釈) および活性化 (CD25の上方調節)。データは、2つの個々の実験の代表的なものである。

(e) 7および14日後の、抗CD3/CD28およびIL-2に応答した、開始細胞数に対するATO由来CD4SP T細胞のATO後の増殖。技術的三つ組の平均およびSDが示されている。

【図26】図26A~D: ATOにおけるTCR改変T細胞の分化および対立遺伝子排除。(a) ATO由来TCR改変T細胞は、増殖および再刺激にもかかわらず、従来のT細胞表現型を保持する。HLA-A*0201/NY-ESO-1_{157~165}特異的TCRを形質導入されたCB HSPCから生成されたATO由来のCD8SP T細胞を、抗CD3/28ビーズ+IL-2で活性化し、IL-2中で増殖させ、かつ14日目に抗CD3/28ビーズで再刺激した。CD8 α およびCD8 β の保たれた表面共発現を、フローサイトメトリーによって確認した。データは、2つの生物学的複製の代表的なものである。(b) TCR形質導入CB ATO由来のCD3+TCR α β +四量体+CD8SP T細胞についてのフローサイトメトリーV β 分析。データは、5つの生物学的複製の代表的なものである。(c) HLA-A*02:01/MART1_{26~35}特異的TCRを用いた、ATOにおけるTCR形質導入CB HSPCからのTCR改変T細胞の生成。6週目の時点での分化が示されている (各プロットの上に示された逐次的ゲートとともに、全CD14-CD56- ATO細胞に対してゲート制御された)。データは、2つの生物学的複製の代表的なものである。(d) CD80と、MART1_{26~35}またはNY-ESO1_{156~165}ペプチドのいずれかを提示するHLA-A*02:01一本鎖三量体とを発現する人工抗原提示細胞 (aAPC) による、MART1特異的およびNY-ESO-1特異的なATO由来TCR改変T細胞の抗原特異的刺激。6時間の時点における、CD107a膜動員および細胞内IFN γ 染色が示されている。

【図27】図27A~B: MHC改変ATOにおける、TCR改変T細胞の陽性選択の増強。(a) 単一ドナー由来のTCR形質導入CB HSPC、および標準のまたはHLA-A*02:01形質導入されたMS5-hDLL1間質細胞のいずれかで生成された6週目のATOにおける、TCR改変CD3+TCR α β +四量体+CD8SP T細胞の産生の増強。逐次的ゲートが各プロットの上に示されている。(b) (a) に示されるMHC改変ATOにおける、成熟ナイーブT細胞表現型へのTCR改変T細胞の正常な成熟。細胞は、CD3+V β 13.1+四量体+CD8SP T細胞に対してゲート制御されている。データは、3つの生物学的複製の代表的なものである。

【図28】図28A~C: 非改変ヒト間質株HS27aは、T細胞分化を支持しない。ヒト間質細胞株 (HS27a) を、ベクター仲介性notchリガンド発現なしで、ATOシステムにおいて用いた。3つの異なる臍帯血サンプル由来のCD34+ HSPCを検査した: (a) E37、(b) E43、(c) E68。4週目の時点で、臍帯血ドナーのいずれも、Notchシグナル伝達の非存在下で、CD5+CD7+ T細胞コミットした細胞を生成し得なかった。示されるデータは、別様に示されていない限り、CD45+CD56-CD14-でゲート制御されている。

【図29】図29A~F: ヒト間質株HS27aにおけるNotchリガンド発現は、ATOにおけるT細胞分化を支持し得る。hDLL1を発現するように、レンチウイルス形質導入により操作されたHS27aで作製されたATOからのデータが示されている。同じ3つの臍帯血サンプル由来のCD34+ HSPCが図28に示されている: (a, b) E37、(c, d) E43、および (e, f) E68。HS27a-hDLL1 ATOを用いたデータが、MS5-hDLL1間質を陽性対照として用いて得られたデータと比較されている。4週目の時点で、臍帯血ドナーの3つすべてが、HS27a-hDLL1およびMS5-hDLL1 ATOの両方において、CD5+CD7+ T細胞コミットした細胞を生成した。示されるデータは、別様に示されていない限り、CD45+CD56-CD14-でゲート制御されている。

【図30】図30: 4週目のHS27a-DLL1 ATOにおいて生成されたCD8+細胞の大多数は、CD3またはTCR $\alpha\beta$ を発現しない。MS5-hDLL1 ATOおよびHS27a-DLL1 ATOからの比較するデータが示されている。

10

20

30

40

50

【図 3 1】図31A～C：HS27a-hDLL1 ATOは、成熟T細胞の分化を支持し得る。3つの異なる臍帯血集団（a）E37、（b）E43、（c）E68を用いた、MS5-hDLL1 ATOおよびHS27a-hDLL1 ATOにおけるT細胞分化（4週目の時点での）が示されている。データは、右のパネルにおける付加的なCD3+TCRabゲート制御とともに、CD45+CD56-CD14-でゲート制御されている。

【図 3 2】図32A～B：5週目の時点での、ATOにおけるヒト胚性中胚葉前駆体（hEMP）細胞（hESCから生成された）からのT細胞分化。CD56-CD14-ゲート制御されたT細胞集団が（a）に示されている。示される付加的なゲート制御とともに、CD56-CD14-ゲート制御された細胞が（b）に示されている（下の列）。

【図 3 3】図33A～B：ATOにおける、hEMPからのT細胞分化の動態。3、5、および7週間の時点での、示されるようにゲート制御された集団が（a）に示されている。CD3+TCRab細胞はCD8ab+であることを示した、7週目の時点での分化についてのさらなる分析が（b）に示されている。

10

【図 3 4】図34A～B：hES由来hEMPは、成熟ナイーブ表現型を有するT細胞を産生する。ATOの5週目の時点での分析が示されている。（a）TCRab+CD3+集団は、CD4+およびCD8+細胞、ならびにDP細胞から構成される。（b）CDSP8および（c）CDSP4細胞、についてのさらなる分析。

【図 3 5】図35A～B：hEMP由来T細胞における成熟マーカーの発現。5週目の時点でのCD8SP細胞についての分析が（a）に示されている。5週目の時点でのCD4SP細胞についての分析が（b）に示されている。

【図 3 6】図36：T細胞生成は、複数種のhESC株にわたって再現可能である。3種の異なるhESC株から生成されたhEMPは、ATOシステムにおいてT細胞を生成した。

20

【図 3 7】図37：ATOシステムを用いたiPSCからのT細胞生成。この図は、iPSC株（HLA.A02.02、健常ドナー由来の皮膚線維芽細胞）が、ATOシステムにおいてT細胞を生成したことを実証している。データは6週目からのものである。

【図 3 8】図38A～B：ATO中で直接凝集した未分化hESCは、T細胞を生成し得る。5週目（a）および7週目（b）のATO由来のT細胞集団が示されている。

【図 3 9】図39：JAG1を発現する間質細胞を用いた、ATOシステムにおけるhEMPからの成熟T細胞の生成。

【図 4 0】図40：hEMPからATOシステムにおいて生成されたT細胞は、多様なTCR Vbレパートリーを示す。5週目の時点での、hEMPからATO（CD8SP）において生成されたT細胞のTCR Vbファミリー使用法についてのフローサイトメトリー分析が示されている。結果を、胸腺細胞におけるTCR Vbファミリー使用法と比較した。

30

【図 4 1】図41A～B：hESC由来T細胞は、抗CD3/CD28およびIL2に応答して、増殖およびCD25上方調節を呈する。hESC由来のATO（5週目）において生成されたCD8 SP T細胞を、インビトロで機能的に検査した。（a）単離された細胞を、CTV（セルトラッカーバイオレット）で染色し、かつCD3/CD28活性化ビーズとともに5日間インキュベートした。細胞は、CTVの希釈、ならびにCD25の活性化および発現によって示される、複数回の細胞分裂を受けた。（b）単離された細胞をPMA/イオノマイシンで6時間処理し、そして細胞内染色は、細胞傷害性サイトカイン（IFN γ 、IL2、TNF α ）の産生を示した。

【図 4 2】図42：ATOシステムにおける、hESCからの改変T細胞の生成のためのスキーマ。H1 hESCに、GFPを発現するopt1G4ベクター（NY-ESO TCR）を形質導入した。GFP+細胞を単離して増殖させることによって、H1 NY-ESO TCR hESC株を作出した。次いで、細胞を上記の同じプロトコールに付して、T細胞分化を誘導した。

40

【図 4 3】図43A～B：NY-ESO TCR改変T細胞の特徴付け。（a）3週目および（b）5週目からのFACSデータが示されている。非形質導入hESC（H1）およびTCR形質導入hESCからのデータが示されている。hESC由来のATOにおいて生成された改変T細胞を、GFPおよび四量体の発現、ならびにT細胞分化に対するマーカー発現（DP、CD3+/TCR+ CD8SP）によって同定した。

【図 4 4】図44A～B：（a）改変されたhESC由来CD8SP T細胞は、成熟ナイーブ表現型を示すこと、および（b）成熟マーカーが、改変されたES由来T細胞において発現したことが見

50

出された。

【図 4 5】図45は、単離されたNY-ESO TCR CD8SP細胞が、ATO（5週目）後の5日目に、CD3/28またはaAPC刺激があると活性化を受けることを示している。

【図 4 6】図46は、単離されたNY-ESO TCR CD8SP細胞が、刺激に応答して、細胞傷害性サイトカイン（IFNg、IL2、TNFa）を産生したことを示している。

【図 4 7】図47は、人工抗原提示細胞（K562）に応答した、改変されたhESC由来（hEMP）T細胞の特異的活性化を実証している。分析は、同族（NY-ESO）ペプチドを発現するaAPCに応答した、しかし非関連（MART-1）ペプチドではそうではない、細胞傷害性サイトカイン（IFNg、IL2、TNFa）の産生および脱顆粒（CD107a）を示した。

【図 4 8】図48は、TCR形質導入ES由来T細胞が、抗CD3/CD28に応答して堅牢な増殖を示したことを示している。 10

【図 4 9】図49は、標準（コンプリート）B27（Comp）と比較した、単一の構成要素（インスリン（-ins）、Vit A、抗酸化物質（AO））を欠損しているB27サプリメントの種々のバージョン、または生体異物不含（ゼノフリー）を用いたデータを示している。ATO培養を、CD34+CD3-臍帯血HSPCで開始し、かつ6週目の時点で分析した。CD5+CD7+ T細胞先駆体である培養物の全細胞数および%が示されている。

【図 5 0】図50は、コンプリートB27（Comp）と比較した、単一の構成要素（インスリン（-ins）、Vit A、抗酸化物質（AO））を欠損しているB27サプリメントの種々のバージョン、または生体異物不含（ゼノフリー）を用いたデータを示している。データは、インスリンがT細胞コミットメントに必須であり、そしてビタミンAおよび抗酸化物質が細胞産出量を促すことを示している。 20

【図 5 1】図51は、後に続く実験において用いられる、第二世代CD19標的CARの設計を描写している。

【図 5 2】図52は、ATOにおけるCAR発現（すなわち、GFP+）が、CD3-TCRab-およびCD3-TCRgd-であるT系統細胞（CD5+およびCD7+）に大きく限定されることを実証した、CAR形質導入CB ATOについてのFACS分析を示している。

【図 5 3】図53は、ATO由来CAR-T細胞が、非従来のT細胞分化、すなわちCD5+CD7+CD3-TCRab-CD4-CD8-を呈示することを実証した、CAR形質導入CB ATOについてのFACS分析を示している。モック形質導入ATOが、比較のために示されている。

【図 5 4】図54は、CB ATO由来CAR-T細胞が、ナイーブT細胞表現型（CD45RA+）を呈示し、かつ表現型上では成熟している（CD27+CCR7+）ことを示している。 30

【図 5 5】図55は、CB ATO由来CAR-T細胞が、CD2および細胞内CD3eを発現することを示している。

【図 5 6】図56A～B：ATO由来CB CAR-T細胞は、CD4-CD8-（DN）でありまたはCD8ααホモ二量体を発現し（a）、かつIEL（およびNK細胞）と関連したCD56およびCD16を発現する（b）。

【図 5 7】図57は、ATOにおけるCAR-T細胞アゴニスト選択の仮説的モデルを示している。

【図 5 8】図58は、TCR共形質導入による、CB ATO CAR-T細胞におけるCD3/TCR複合体発現（しかし、CD4またはCD8発現ではない）の復元を実証している。

【図 5 9】図59は、CB ATO由来CAR+TCR+ T細胞における機能的TCR再構成を示している。ATO由来CAR-T細胞。 40

【図 6 0】図60は、CB ATO由来CD19 CAR-T細胞についての機能的分析を示している。CD19+細胞に応答した、サイトカイン放出およびCAR-T細胞の活性化（CD19ペクターを形質導入したK562、Nalm6およびRaji細胞）（付加的な活性化/共刺激なしで分析）。

【図 6 1】図61は、CB ATO由来CAR-T細胞に対する細胞傷害性アッセイを示している。CD19+標的はNalm6であり、CD19-対照はK562（非形質導入）である。

【図 6 2】図62は、IEL様CD8aa CAR-T細胞の産生（おそらく、アゴニスト選択を通じた）が、種々の共活性化およびCAR構築物のscFvドメインにわたって観察されることを、CB-ATOにおいて示している。

【図 6 3】図63は、CAR形質導入ヒトES細胞が、ATOにおいてCAR-T細胞を生成し得ること 50

を示している。細胞は、CD45+に対してゲート制御されている。非形質導入H1 hESCまたはCAR形質導入hESCのいずれかから生成されたhEMP由来のATOの1～4週目の時点での分析が示されている。

【図64】図64は、ヒトES細胞からのATO由来CAR-T細胞が、非従来のT細胞分化を呈することを示している。細胞は、CD45+に対してゲート制御されている。非形質導入H1 hESCまたはCAR形質導入hESCのいずれかから生成されたhEMP由来のATOの1～4週目の時点での分析が示されている。

【図65】図65は、ヒトES細胞からのATO由来CAR-T細胞が、CD8ベータを発現しないことを示している。示された時点における2つの実験（657および659）からのデータが示されている。細胞は、非形質導入H1 hESCまたはCAR形質導入hESCのいずれかから生成されたhEMPから生成され、かつCD45+に対してゲート制御されている。

【図66】図66A～Bは、ヒトES細胞からのATO由来CAR-T細胞が、PMA/イオノマイシンにตอบสนองしてサイトカインを産生することを示している。活性化は、(a)におけるインターフェロンガンマおよびTNFアルファに対する、ならびに(b)におけるインターフェロンガンマおよびIL-2に対する細胞内染色によって示される。データは、5週目のATOからのものである。

【図67】図67は、ヒトES細胞からのATO由来CAR-T細胞が、CD19+標的細胞（Cd19+K562、Nalm6、RAJI細胞）にตอบสนองして、しかし親（Cd19-）K562細胞ではそうではなく、サイトカインを産生しかつ脱顆粒することを示している。データは、5週目のhESC-ATOからのものであり、そして細胞は、CD7+CD45RA+としてゲート制御されている。

【図68】図68は、ATO（MS5-DLL1）および単層（OP9-DLL1）システムの両方とも、CD34+ T細胞前駆体の維持、およびCD5+CD7+ T細胞先駆体へのコミットメントを可能にすることを示している。3つの異なるCBサンプル（E37、E43、E68）に由来する、示されるようにゲート制御された、4週目のCB-ATOが示されている。

【図69】図69は、ATOおよびOP9-DLL1システムの両方とも、CD5およびCD7の発現によって示されるように、T細胞系統への細胞のコミットメントを可能にすることを示している。しかしながら、ATOシステムは、CD4+CD8+ダブルポジティブ細胞（DP）の生成において非常に優れている。3つの異なるCBサンプル（E37、E43、E68）に由来する、示されるようにゲート制御された、4週目のCB-ATOが示されている。

【図70】図70は、CB-ATOシステムにおいて、しかしOP9-DLL1単層システムではなく、DPおよびCD8SPであるTCRab+CD3+細胞の堅牢な集団の堅牢な生成を示している。3つの異なるCBサンプル（E37、E43、E68）に由来する、示されるようにゲート制御された、4週目のCB-ATOが示されている。

【図71】図71は、図70において提示されるデータの数字表記を示している。

【発明を実施するための形態】

【0079】

例証的な態様の説明

I. 序論

レシピエント患者に対して同種異系であり得る非同種反応性T細胞を産生するための組成物および方法が記載される。これは、より費用効果が高くより労働集約度が低い療法、および自家T細胞療法が可能でない個体における免疫療法を提供する、当技術分野における重大な改善である。さらに、改変T細胞の生成のための新規な組成物および方法が提供される。これらの組成物および方法は、一部には、高度に標準化された血清不含構成要素および間質細胞株を用いて、ヒトHSPCからの堅牢かつ再現性の高いT細胞分化を促す、人工胸腺オルガノイド（ATO）3D培養物を含む細胞培養組成物の発見に基づいて提供される。ある特定の態様において、ATOにおけるT細胞分化は、内因性の胸腺リンパ球形成を厳密に模倣し、かつ単層共培養とは対照的に、多様なTCRレパートリーおよび抗原ナীব表現型を有する機能的CD3+ TCR α β + CD8+およびCD4+ T細胞の効率的な陽性選択を支持することが発見された。

【0080】

非限定的な例として、細胞培養組成物は、少なくとも、NY-ESO-1癌関連抗原などの抗原に特異的なTCRを形質導入されたHSPCに由来する、ナイーブの、対立遺伝子排除された、TCR改変された抗原特異的T細胞の生成において用いられ得る。

【0081】

さらなる態様において、ATOにおける陽性選択は、自家造血細胞上の自己MHCによって推進されるが、自己MHCの間質細胞発現によっても操作されて、インビトロでの陽性選択をモデル化し得るまたは増強し得ることが、このトランスジェニックTCRシステムを用いて実証された。

【0082】

ゆえに、ATOなどの3D細胞培養組成物は、造血、免疫再生、宿主免疫、および細胞免疫療法に関する広範な調査を前進させる潜在力を有する、T細胞発生全体の簡便で、すぐに使える、かつ高度に標準化されたモデルを提供する。

【0083】

本明細書において記載される方法および組成物は、技術の重大な進歩となる。人工胸腺オルガノイド態様は、HSPCからの以前のT細胞分化法を上回るいくつかの利点を提供する。有益性には、以下のもののうちの1つまたは複数が含まれるが、それらに限定されるわけではない。

- ・ATOは、最も重要なことには、成熟ナイーブT細胞（CD4SPおよびCD8SPの両方）を含む、造血幹細胞・前駆細胞（HSPC）からのT細胞分化のすべてのステージを生成する。
- ・ATOにおいてHSPCから成熟T細胞を生成し得る能力は、HSPCにおいて遺伝子（例えば、TCRまたはCAR）を発現させることによって、ATOシステムが改変T細胞を生成するように改変されることを可能にする。
- ・ATOシステムは、間質区画（MS5）において遺伝子を発現させることによって改変され得る。
- ・ATO培養物は血清不含であり得、ゆえにウシ胎仔血清（FCS）のロット間変動の制約、またはFCS含有培地を用いた臨床的橋渡し（translation）の問題を有しない。

【0084】

ヒトHSPCのインビトロT細胞分化の他のモデルとの比較は、それらの差を例証し、かつ本明細書において提供される方法および細胞の有益性を実証する。例えば、OP9-DL1システムは、2005年頃以来、ヒトHSPCからのT細胞分化のゴールドスタンダードと見なされてきた。該システム（カナダ、トロントのJuan Carlos Zuniga-Pfluckerの研究室によって開発された）は、notchリガンドのデルタ様リガンド1（DL1としても知られるDLL1）を形質導入されたマウス間質細胞株（OP9）由来の単層を用いて、マウス（Schmitt et al, Immunity, 2002）またはヒト（La Motte-Mohs, BLOOD 2005）HSPCのいずれかからT細胞コミットメントを誘導する。HSPCは、ウシ胎仔血清およびサイトカインを含有する培地中にてOP9-DL1単層上で共培養される。このシステムの変動は、DLL1の代わりにDLL4を用い（OP9-DLL4）；DLL4を用いた結果は、DLL1と有意には異なる。

【0085】

しかしながら、OP9-DL1システムは問題を有する。例えば、成熟T細胞の取るに足らない産生がある。OP9-DL1（またはOP9-DLL4）単層は、臍帯血（CB）HSPCから初期ステージのT細胞コミットメント（CD7+CD5+/-細胞）を誘導し得るが、CD4+CD8+（DP）ステージを過ぎた分化は、たとえあったとしてもごくわずかのCD8+またはCD4+シングルポジティブ（SP）成熟T細胞を有し、極めて非効率的である（LaMotte Mohs, BLOOD 2005を参照されたい）。La Motte-Mohs, Blood 2005からの図4は、これを示している。Zuniga-Pfluckerグループからのより最近の刊行物（Awong et al, BMC Immunol 2011）は、よくても約2~4%の成熟CD8+細胞、すなわちCD8+CD3+CD1a-CD27+細胞を有する、60~70日経過したOP9-DL1/CB HSPC培養物からのデータを示した（8% CD8+、40%はCD3+CD27+であったというAwongからの図1において）。

【0086】

OP9-DL1モデルに関して公開している他の先導的グループは、ベルギーからのもの（様

10

20

30

40

50

々にVandekerckhove、Plum、Taghonからの論文)である。Zuniga-Pfluckerグループと同様に、ベルギーグループは、CB HSPCを用いた場合に、よくても5%のCD3+TCRab+細胞およびたとえあったとしても非常に珍しいSP8およびSP4を示した(de Smedt et al Haematologica, 2011)。留意すべきことに、このグループによる別の論文では、培養が、ヒト胸腺から単離されたHSPCで開始されたために、より高頻度の成熟T細胞が見られた。胸腺において、CD34+ HSPCは、T細胞分化のための胸腺シグナルにすでに曝露されているプロT細胞を主に含み、ゆえに刺激されてT細胞を生成する。Van Coppenolle et al, 2009の図2Aを参照されたい(胸腺に由来するHSPC)。

【0087】

OP9-DL1システムにおける成熟T細胞の乏しい分化のさらなる証拠として、Awong et al, 2011における表1は、そのような培養物における収量を示しており：各単一のCD34+CD38-CB HSPCから、わずか0.27~1.16個のTCRab+CD3+細胞が生成された(n=6)。比較すると、ATOシステムは、CB HSPCあたり1,000~2,000個のTCRab+CD3+細胞を生成し得る(Seet et al, 2016)。

【0088】

他の証拠によって、OP9-DL1は、HSPCの他の(CB以外の)臨床的供給源を用いると、さらに劣ることが示されている。他の供給源(すなわち、骨髓、BM、または動員末梢血(MPB))は、CBを用いるよりもさらに非効率的でかつ信頼性がないため、OP9-DL1を用いたほとんどのすべての論文はCB HSPCを用いている。

【0089】

Plumグループは、OP9-DL1間質上でCBとBM HSPCとを直接比較した(De Smedt et al, Haematologica 2011)。彼らは、論文の図2において、BM HSPCにより開始された培養が、CBと比較して、約10%の頻度のDPおよびTCRab+CD3+細胞を有することを示している(BM対CBでそれぞれ、1~2%対12%DPおよび0.7%対5%CD3+TCRab+)。

【0090】

比較すると、ATOシステムは、HSPCのすべての供給源(BM、MPB、休止PB、胸腺、CB)からの非常に効率的な分化の方法である(Seet et al, 2016を参照されたい)。

【0091】

さらに、OP9-DL1は、血清不含培地中で生存できない。本発明者らは、3D凝集体およびRB27培地においてOP9-DL1を用いて、MS5-DL1からATOの知見を再現することができていない。OP9-DL1は、血清不含条件で生存できないようである。

【0092】

以前に開発された胎児胸腺器官培養物(FTOC)は、空気流体界面を用いて、ヒトHSPCとともに播種されかつウシ胎仔血清含有培地中で成長させたヒト胎児胸腺のインタクトなフラグメントからなる3D培養物である。notchリガンドはヒト胸腺上皮細胞(TEC)によって供給されるため、形質導入は要されない。FTOCシステムに関する論文のほとんどは、マウスT細胞分化のためにこれを用いている(Anderson et al, Annu Rev Immunol. 1996)。

【0093】

その上、FTOCは、インタクトな胸腺フラグメントに残る同種異系ヒトT細胞の存在が理由で、臨床的橋渡しに実現可能でなく；加えて、アッセイは、大きな実験的可変性および定量困難を示している。ヒト胎児組織の限定された利用可能性は、臨床的橋渡しを完全に除外し、かつFTOCの実験的使用でさえ非常に困難にする。FTOCは、上記の制約が理由で、OP9-DL1またはOP9-DLL4によって置き換えられている。

【0094】

出生後胸腺オルガノイドは、胸腺微小環境を調べるためにCrooksグループによって開発された(Chung et al, Stem Cells 2014)。それらは、出生後胸腺に由来するヒトTECおよび胸腺間葉によって形成され、10~21日間単層として別個に培養され、次いで臍帯血HSPCとともに遠心分離されて3D凝集体を形成する、3D培養物からなる。このモデルはATOと概念的に類似し、違いとして、1. 初代胸腺組織の使用、2. 血清の要求、3. 形質導入を介してよりもむしろTECからの内因性notchリガンド発現への依存、がある。しかし、出生

後胸腺オルガノイドに関しては以下のような問題が存在する。初代ヒト胸腺組織は、それが心臓外科患者から入手されるため、得ることが非常に困難であり、稀かつ限定された数の施設からのみしか入手可能でない。加えて、胸腺間質の質および量は非常に変動的であり、そのためT細胞分化に一貫性がなく、収量が乏しい。胸腺組織はCB HSPCに対して同種異系であるため、このモデルは免疫学的な課題を生じる。これらすべての理由から、このモデルは、臨床的使用に実現可能でなく、定量的および再現性の観点から実験的使用にも問題がある。下記でより詳細に述べる理由から、本発明で提供される方法および組成物は、以前に開発された方法を上回る利点を有する。

【0095】

II. 定義

「外因性TCR」という用語は、インビトロで細胞内に移入される（すなわち、遺伝子移入/形質導入/トランスフェクション技法によって）、TCR遺伝子またはTCR遺伝子誘導体を指す。外因性TCR遺伝子は、レシピエント細胞のゲノム内に挿入される。一部の態様において、挿入はランダム挿入である。TCR遺伝子のランダム挿入は、当技術分野において公知の方法によって容易に達成される。一部の態様において、TCR遺伝子は、内因性遺伝子座（内因性TCR遺伝子の遺伝子座など）内に挿入される。一部の態様において、細胞は、内因性遺伝子座ではない遺伝子座に挿入される1つまたは複数のTCR遺伝子を含む。一部の態様において、細胞は、マーカーまたは耐性遺伝子などの異種配列をさらに含む。

【0096】

「キメラ抗原受容体」または「CAR」という用語は、免疫エフェクター細胞に任意の特異性を移植する、改変された受容体を指す。これらの受容体は、T細胞にモノクローナル抗体の特異性を移植するために用いられ、レトロウイルスまたはレンチウイルスベクターによって、コード配列の移入が促進される。これら受容体は、種々の供給源由来の部分から構成されるため、キメラと呼ばれる。これらの分子の最も一般的な形態は、CD3-ゼータ膜貫通およびエンドドメイン（endodomain）；CD28もしくは41BB細胞内ドメイン、またはそれらの組み合わせに融合された、モノクローナル抗体に由来する単鎖可変フラグメント（scFv）の融合体である。このような分子は、その標的のscFvによる認識に応答してシグナルの伝達をもたらす。このような構築物の例には14g2a-ゼータがあり、これは、ハイブリドマ14g2a（ジシアログングリオシドGD2を認識する）に由来するscFvの融合体である。T細胞がこの分子を発現すると（通常、オンコレトロウイルスベクター形質導入によって達成される）、GD2を発現する標的細胞（例えば、神経芽腫細胞）を認識して殺傷する。悪性B細胞を標的にするために、研究者らは、B系統分子のCD19に特異的なキメラ免疫受容体を用いてT細胞の特異性を方向づけ直している。免疫グロブリン重鎖および軽鎖の可変部分を、柔軟性のあるリンカーによって融合して、scFvを形成する。このscFvの前に、新生タンパク質を小胞体に向かわせて後続の表面発現を指揮するシグナルペプチド（切断される）が先行する。柔軟性のあるスペーサーにより、scFvは種々の方向に配向することが可能になって、抗原結合を可能にする。膜貫通ドメインは、細胞内に突出し所望のシグナルを伝達する、シグナル伝達エンドドメインの元の分子に通常由来する典型的な疎水性 α ヘリックスである。

【0097】

「抗原」という用語は、免疫系にそれに対する抗体を産生させる、またはそれに対してT細胞が応答する、任意の物質を指す。一部の態様において、抗原は、長さが5~50アミノ酸である、あるいは少なくとも、多くとも、または正確に5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、125、150、175、200、250、もしくは300アミノ酸、またはその中に導き出せる任意の値域であるペプチドである。

【0098】

「レシピエントに対して同種異系の」という用語は、レシピエントから単離されていない細胞を指すことを意図される。一部の態様において、細胞は患者から単離されていない。一部の態様において、細胞は、遺伝的に合致した個体（適合する遺伝子型を有する親類など）から単離されていない。

【0099】

「不活性の」という用語は、不要な臨床毒性をもたらさないものを指す。これは、オンターゲットまたはオフターゲット毒性のいずれかであり得る。「不活性」は、公知のまたは予測される臨床安全性データに基づき得る。

【0100】

「ゼノフリー (XF)」または「動物性構成要素不含 (ACF)」または「動物質不含」という用語は、培地、細胞外マトリックス、または培養条件との関連で用いられる場合、異種動物由来の構成要素を本質的に含まない培地、細胞外マトリックス、または培養条件を指す。ヒト細胞を培養する工程に関して、マウスなどの非ヒト動物の任意のタンパク質は、外来物構成要素である。ある特定の局面において、ゼノフリーマトリックスは、いかなる非ヒト動物由来の構成要素も本質的に不含であり得、それゆえマウスフィーダー細胞またはマトリゲル (商標) は排除される。マトリゲル (商標) は、ラミニン (主要構成要素)、コラーゲンIV、ヘパリン硫酸プロテオグリカン、およびエンタクチン/ニドゲンを含むように、細胞外マトリックスタンパク質に富んだ腫瘍であるエンゲルブレス・ホルム・スワーム (Engelbreth-Holm-Swarm) (EHS) マウス肉腫から抽出された、可溶化基底膜調製物である。

10

【0101】

「規定された」という用語は、培地、細胞外マトリックス、または培養条件との関連で用いられる場合、およそすべての構成要素の性質および量が公知である培地、細胞外マトリックス、または培養条件を指す。

20

【0102】

「化学的に規定された培地」とは、およそすべての成分の化学的性質およびそれらの量が公知である培地を指す。これらの培地は合成培地とも呼ばれる。化学的に規定された培地の例には、TeSR (商標) が含まれる。

【0103】

細胞は、それらが要素の10%未満を有する場合、本明細書において用いられる、血清、シグナル伝達阻害剤、動物性構成要素もしくはフィーダー細胞、外因性遺伝要素、またはベクター要素など、ある特定の試薬または要素を「実質的に不含」であり、そしてそれらが要素の1%未満を有する場合、ある特定の試薬または要素を「本質的に不含」である。しかしながら、全細胞集団の0.5%未満または0.1%未満しか外因性遺伝要素またはベクター要素を含んでいない細胞集団が、さらにより望ましい。

30

【0104】

培養物、マトリックス、もしくは培地が、それぞれ当業者に公知の従来の検出法を用いて検出可能なレベルよりも低いこれらの試薬のレベルを有する場合、またはこれらの作用物質が、培養物、マトリックス、もしくは培地に外的に添加されていない場合、培養物、マトリックス、または培地は、血清、シグナル伝達阻害剤、動物性構成要素、またはフィーダー細胞など、ある特定の試薬または要素を「本質的に不含」である。血清不含培地は、血清を本質的に不含であり得る。

【0105】

「末梢血細胞」とは、血液の循環プール内に見出される、赤血球、白血球、および血小板を含めた、血液の細胞性構成要素を指す。

40

【0106】

「造血幹細胞および前駆細胞」または「造血先駆細胞」とは、造血系統にコミットするが、さらなる造血分化が可能であり、そして造血幹細胞、複能性 (multipotential) 造血幹細胞 (血球芽細胞)、骨髓前駆体、巨核球前駆体、赤血球前駆体、およびリンパ系前駆体を含む細胞を指す。「造血幹細胞 (HSC)」とは、骨髓 (単球およびマクロファージ、好中球、好塩基球、好酸球、赤血球、巨核球/血小板、樹状細胞)、およびリンパ系統 (T細胞、B細胞、NK細胞) を含めた、すべての血液細胞タイプを生じさせる複能性幹細胞である。

【0107】

50

造血幹細胞および前駆細胞は、CD34を発現しても発現しなくてもよい。造血幹細胞は、CD133を共発現し得、かつCD38発現に対して陰性、CD90に対して陽性、CD45RAに対して陰性、系統マーカーに対して陰性、またはそれらの組み合わせであり得る。造血前駆/先駆細胞には、CD34(+)/CD38(+)細胞およびCD34(+)/CD45RA(+)/lin(-)CD10+（共通のリンパ系前駆細胞）、CD34(+)/CD45RA(+)/lin(-)CD10(-)CD62L(高)（リンパ系刺激された複能性前駆細胞）、CD34(+)/CD45RA(+)/lin(-)CD10(-)CD123+（顆粒球-単球前駆細胞）、CD34(+)/CD45RA(-)/lin(-)CD10(-)CD123-（巨核球-赤血球前駆細胞）が含まれる。

【0108】

「ベクター」または「構築物」（時には、遺伝子送達または遺伝子移入「ビヒクル」と称される）とは、インビトロまたはインビボのいずれかで、宿主細胞に送達される対象となるポリヌクレオチドを含む、高分子、分子の複合体、またはウイルス粒子を指す。ポリヌクレオチドは、直鎖状または環状分子であり得る。

10

【0109】

よく見られるタイプのベクターである「プラスミド」は、染色体DNAから独立して複製し得る、染色体DNAとは別個の染色体外DNA分子である。ある特定の場合、それは環状でありかつ二本鎖である。

【0110】

「発現構築物」または「発現カセット」によって、転写を指揮し得る核酸分子を意味する。発現カセットは、少なくともプロモーター、またはプロモーターと機能的に同等の構造を含む。エンハンサーなどの付加的なエレメント、および/または転写終結シグナルも含まれ得る。

20

【0111】

「外因性の」という用語は、細胞もしくは生物内のタンパク質、遺伝子、核酸、もしくはポリヌクレオチドとの関連で用いられる場合、人工的手段によって細胞もしくは生物内に導入されているタンパク質、遺伝子、核酸、もしくはポリヌクレオチドを指す、または細胞との関連で、単離されかつその後人工的手段によって他の細胞もしくは生物に導入された細胞を指す。外因性核酸は、異なる生物もしくは細胞由来であり得る、またはそれは、該生物もしくは細胞内に天然に存在する核酸の1つもしくは複数の付加的コピーであり得る。外因性細胞は異なる生物由来であり得る、またはそれは同じ生物由来であり得る。非限定的な例として、外因性核酸は、天然細胞のものとは異なる染色体位置にある、またはそうでなければ、天然に見出されるものとは異なる核酸配列によって隣接される。

30

【0112】

「に相当する」という用語は、ポリヌクレオチド配列が、参照ポリヌクレオチド配列のすべてもしくは一部分と相同である（すなわち、同一であり、厳正には進化的に関連していない）ことを、またはポリペプチド配列が、参照ポリペプチド配列と同一であることを意味するために本明細書において用いられる。対比的に、「に相補的な」という用語は、相補的配列が、参照ポリヌクレオチド配列のすべてまたは一部分と相同であることを意味するために本明細書において用いられる。例証のために、「TATAC」というヌクレオチド配列は、「TATAC」という参照配列に相当し、かつ「GTATA」という参照配列に相補的である。

40

【0113】

特定のタンパク質を「コードする」、「遺伝子」、「ポリヌクレオチド」、「コード領域」、「配列」、「セグメント」、「フラグメント」、または「導入遺伝子」は、適当な調節配列の制御下に置かれた場合に、インビトロまたはインビボで転写され、さらに任意で遺伝子産物、例えばポリペプチドに翻訳される、核酸分子である。コード領域は、cDNA、ゲノムDNA、またはRNA形態のいずれかで存在し得る。DNA形態で存在する場合、核酸分子は、一本鎖（すなわち、センス鎖）または二本鎖であり得る。コード領域の境界は、5'（アミノ）端における開始コドン、および3'（カルボキシ）端における翻訳終止コドンによって決定される。遺伝子には、原核生物または真核生物mRNA由来のcDNA、原核生物また

50

は真核生物DNA由来のゲノムDNA配列、および合成DNA配列が含まれるが、それらに限定されるわけではない。転写終結配列は、通常、遺伝子配列に対して3'に位置する。

【0114】

「細胞」という用語は、当技術分野においてその最も広い意味で本明細書において用いられ、そして多細胞生物の組織の構造単位であり、それを外側から単離する膜構造によって囲まれ、自己複製する能力を有し、かつ遺伝情報およびそれを発現するためのメカニズムを有する生体を指す。本明細書において用いられる細胞は、天然に存在する細胞または人工的に改変された細胞（例えば、融合細胞、遺伝子改変された細胞など）であり得る。

【0115】

本明細書において使用するとき、「幹細胞」という用語は、自己複製が可能な多能性または複能性である細胞を指す。典型的には、幹細胞は傷害組織を再生し得る。本明細書における幹細胞は、胚性幹（ES）細胞、誘導多能性幹細胞、または組織幹細胞（組織特異的幹細胞、つまり体性幹細胞とも呼ばれる）であり得るが、それらに限定されるわけではない。

【0116】

「胚性幹（ES）細胞」とは、初期胚に由来する多能性幹細胞である。ES細胞は1981年に最初に確立され、それは1989年以来ノックアウトマウスの産生にも適用されている。1998年、ヒトES細胞が確立され、それは現在再生医学に利用可能になりつつある。

【0117】

ES細胞とは異なり、組織幹細胞は、限定された分化潜在性を有する。組織幹細胞は、組織内の特定の位置に存在し、かつ分化しない細胞内構造を有する。それゆえ、組織幹細胞の多能性は典型的に低い。組織幹細胞は、より高い核/細胞質比を有し、かつ細胞内オルガネラをほとんど有しない。ほとんどの組織幹細胞は、低い多能性、長い細胞周期、および個体の寿命を超えた増殖能を有する。組織幹細胞は、皮膚系、消化器系、骨髄系、神経系など、細胞が由来する部位に基づいてカテゴリーに分けられる。皮膚系における組織幹細胞には、表皮幹細胞、毛包幹細胞などが含まれる。消化器系における組織幹細胞には、膵（共通）幹細胞、肝幹細胞などが含まれる。骨髄系における組織幹細胞には、造血幹細胞、間葉系幹細胞などが含まれる。神経系における組織幹細胞には、神経幹細胞、網膜幹細胞などが含まれる。

【0118】

iPS細胞またはiPSCと一般に略される「誘導多能性幹細胞」とは、リプログラミング因子と称されるある特定の因子を導入することによって、線維芽細胞、造血細胞、筋細胞、神経、表皮細胞など、非多能性細胞、典型的には成体体細胞、つまり最終分化した細胞から人工的に調製された多能性幹細胞の一種を指す。

【0119】

「多能性」とは、1つもしくは複数の組織もしくは器官、または特に三胚葉のいずれか：内胚葉（胃内側内壁、消化管、肺）、中胚葉（筋肉、骨、血液、泌尿生殖器）、もしくは外胚葉（表皮組織および神経系）を構成するすべての細胞に分化する潜在性を有する幹細胞を指す。本明細書において用いられる「多能性幹細胞」は、三胚葉のいずれかに由来する細胞、例えば全能性細胞または誘導多能性細胞の直系の子孫、に分化し得る細胞を指す。

【0120】

核酸分子に関連した「機能的に連結された」によって、2種またはそれを上回る種類の核酸分子（例えば、転写される対象となる核酸分子、プロモーター、およびエンハンサーエレメント）が、核酸分子の転写を可能にするように接続されることを意味する。ペプチドおよび/またはポリペプチド分子に関連した「機能的に連結された」によって、2種またはそれを上回る種類のペプチドおよび/またはポリペプチド分子が、融合体の各ペプチドおよび/またはポリペプチド構成要素の少なくとも1つの特性を有する単一ポリペプチド鎖、すなわち融合ポリペプチドを産出するように接続されることを意味する。融合ポリペプチドは特にキメラである、すなわち異種分子から構成される。

【0121】

III. T細胞受容体 (TCR) および外因性TCRを生成するための方法

T細胞受容体またはTCRとは、抗原のフラグメントを主要組織適合複合体 (MHC) 分子に結合したペプチドとして認識することに関与する、Tリンパ球 (T細胞) の表面に見出される分子である。TCRは、2つの異なるタンパク質鎖から構成される (つまり、それはヘテロ二量体である)。ヒトにおけるT細胞の95%において、TCRは、アルファ (α ; 本明細書において「a」とも称される) およびベータ (β -本明細書において「b」とも称される) 鎖からなり、一方でT細胞の5%において、TCRは、ガンマおよびデルタ (γ/δ) 鎖からなる。この比率は、個体発生の間および罹患した状態において、ならびに種々の種において変化する。

10

【0122】

TCRが抗原ペプチドおよびMHC (ペプチド/MHC) と関わる場合、Tリンパ球は、シグナル伝達、つまり関連する酵素、共受容体、特化したアダプター分子、および活性化されたもしくは放出された転写因子によって仲介される一連の生化学的事象を通じて活性化される。TCRは、通常、不変のCD3鎖分子との複合体の一部として発現される非常に可変的なアルファ (α) およびベータ (β) 鎖からなる、ジスルフィド連結した膜アンカー型ヘテロ二量体タンパク質である。この受容体を発現するT細胞は、 $\alpha:\beta$ (または、 $\alpha\beta$ もしくは ab) T細胞と称されるが、とはいえ少数のT細胞は、可変的なガンマ (γ -本明細書において「g」とも称される) およびデルタ (δ -本明細書において「d」とも称される) 鎖によって形成される代替的受容体を発現し、 $\gamma\delta$ (または gd) T細胞と称される。

20

【0123】

各鎖は、2つの細胞外ドメイン: 可変 (V) 領域および定常 (C) 領域から構成され、免疫グロブリンスーパーファミリー (IgSF) ドメインの両方は逆平行 β シートを形成する。定常領域は、その後に膜貫通領域および短い細胞質尾部が続く細胞膜の近位にあり、一方で可変領域はペプチド/MHC複合体に結合する。

【0124】

TCR α 鎖および β 鎖の両方の可変ドメインはそれぞれ、3つの超可変領域または相補性決定領域 (CDR) を有し、一方で β 鎖の可変領域は、通常抗原と接触しない超可変性の付加的エリア (HV4) を有し、それゆえ CDR と見なされない。

【0125】

30

残りは、TCRの2つの領域に、 α および β 鎖の界面に、ならびにCD3シグナル伝達複合体の近くにあると思われる β 鎖フレームワーク領域に位置する。CDR3は、プロセシングされた抗原を認識することに関与する主たるCDRであるが、とはいえアルファ鎖のCDR1も、抗原ペプチドのN末部分と相互作用することが示されており、一方で β 鎖のCDR1は、ペプチドのC末部分と相互作用する。CDR2は、MHCを認識すると思われる。 β 鎖のCDR4は、抗原認識に参加しないと思われるが、スーパー抗原と相互作用することが示されている。TCRドメインの定常ドメインは、システイン残基がジスルフィド結合を形成する短い接続配列からなり、それは2本の鎖間で連結を形成する。

【0126】

IgSFタンパク質のメンバーであるTCRは、それが抗体およびBCRと比較され得ることを意味する。類似性の観点から、TCRは、重鎖がその結晶化可能な画分 (Fc) がいないことを除いて、重鎖および軽鎖を有する抗体半分のようなものである (注記: 個体発生的に、TCRアルファはVJ組換えを受け、そのためそれは軽鎖のようであり; TCRベータはVDJ組換えを受け、そのためそれは重鎖のようである)。そのため、TCRは、個体発生的に抗体の抗体結合フラグメントの1つのようである。TCRの2つのサブユニットは一緒に絡み合う。抗体はそのFc領域を用いて、生得的白血球上のFc受容体に結合するのに対して、TCRは、細胞膜上にすでにドッキングされている。しかしながら、それは、その短い細胞質尾部が原因でシグナル伝達自体を仲介することができず、そのためTCRは、抗体がシグナル伝達を始動するためにFcRへの結合を要するのとちょうど同じように、その場所でシグナル伝達を実行するためにCD3およびゼータをなおも要する。このように、T細胞に対するMHC-TCR-CD3相互作

40

50

用は、骨髄性白血球に対するAg-Ig-FcR相互作用、およびB細胞に対するAg-Ig-CD79相互作用と機能的に類似している。

【0127】

抗原特異的TCRを生成する方法は、当技術分野において公知である。方法は、例えば、1) 関心対象のタンパク質（例えば、腫瘍抗原、シーケンシングデータからの新抗原など）に由来する公知のまたは予測されるHLA拘束ペプチドエピトープを合成する工程；2) これらを、抗原提示細胞（増殖のための）または四量体（直接選別のための）を介して、そこからTCR配列が抽出されることになるT細胞のプール（例えば、腫瘍-ag特異的T細胞の場合、腫瘍浸潤リンパ球）に提示する工程；3) 抗原特異的T細胞を選択するまたはスクリーニングする工程（例えば、四量体結合に基づいて、抗原特異的T細胞を選別するFACS）；4) TCR遺伝子（すなわち、TCRのアルファおよびベータ鎖、またはガンマおよびデルタ鎖）をクローニングし（RT-PCRを介して）かつシーケンシングする工程であって；クローニングしかつシーケンシングする工程は、集団または単一細胞レベルのいずれかに対して行われ得る、工程；および5) 例えば、末梢血T細胞にこれらの配列を形質導入し、かつ同族ペプチド-MHC複合体を発現する標的細胞に対するそれらの反応性を評価することによりTCRクローンの機能を検査することによって、TCR特異性を確認しかつ分析する工程を含む。反応性は、通常、サイトカイン産生（例えば、インターフェロンガンマ）に基づいて測定される。

10

【0128】

IV. 細胞培養組成物および方法

20

人工胸腺オルガノイド（ATO）などの3D培養組成物は、幹細胞からのヒトT細胞のインビトロ生成のための、最適化された非常に効率的でかつ高度に再現性のあるすぐに使える解決策である。T細胞分化の既存の実験モデルとは対照的に、3D培養組成物のある特定の局面は、血清不含条件を用い、ヒト胸腺組織または専売の足場材料を回避し、かつ幹細胞からの十分に機能的な成熟ヒトT細胞の陽性選択および堅牢な生成を促す。インビトロT細胞発生のための潜在的に商業的なプラットフォームとして、3D培養組成物は、競合技術と比較して、効率、再現性、拡張性、ならびに費用および労働の低下を提供する。非限定的な商業的適用には、ヒトT細胞発生のインビトロ実験モデル化、および色々な幹細胞供給源からの改変T細胞免疫療法のインビトロ産生が含まれ得る。

【0129】

30

ある特定の態様において、ヒト幹細胞および/または前駆細胞（HSPC）からの機能的T細胞のインビトロ生成のための、最適化された三次元（3D）培養システムが提供され得る。結果として生じた細胞3D構造は、人工胸腺オルガノイド（ATO）と呼ばれ得る。

【0130】

特定の態様において、このシステムは、FLT3リガンド（FLT3L）、インターロイキン7（IL-7）、B27、およびアスコルビン酸を含有する最適化培地の存在下での、ヒトHSPC と、Notchリガンドを発現する間質細胞との3D構造内での凝集を含み得る。空気-流体界面での培養を可能にする条件も存在し得る。造血細胞と間質細胞との間の3D細胞-細胞相互作用と合わせた、可溶性因子（サイトカイン、アスコルビン酸、B27構成要素、および間質細胞由来因子）からのATO内での組み合わせシグナル伝達は、ヒトTシステムコミットメント、陽性選択、および機能的成熟T細胞への効率的な分化を促す。

40

【0131】

具体的な態様において、開発された、ヒトDLL1を形質導入されたMS-5マウス間質細胞株（以後、MS5-hDLL1）と、ヒト臍帯血、骨髄、またはG-CSF動員末梢血から単離されたCD34⁺ HSPCとの凝集を伴う、3D培養組成物の方法（例えば、ATO産生）が提供され得る。最高1×10⁶個のHSPCを、最適化された比率（典型的に、1:10のHSPC対間質細胞）でMS5-hDLL1細胞と混合する。

【0132】

例えば、凝集は、混合した細胞懸濁液の遠心分離（「圧縮凝集」）、それに続く細胞不含上清の吸引によって達成される。特定の態様において、次いで、細胞ペレットは5~10u

50

lの分化培地中のスラリーとして吸引され得、かつ0.4umナイロントランスウェル培養インサート上に液滴として移され、それは分化培地のウェル中で浮遊し、インサートの底が培地と接触し、かつ上端が空気と接触することを可能にする。

【0133】

例えば、分化培地は、RPMI-1640、5ng/mlヒトFLT3L、5ng/mlヒトIL-7、4%血清不含B27サプリメント、および30uM L-アスコルビン酸から構成される。培地は、培養インサート周辺から3~4日間ごとに完全に置き換えられ得る。培養の最初の2週間の間、細胞凝集体は、ATOとして自己体系化し得、そして初期T細胞系統コミットメントおよび分化が生じる。ある特定の局面において、ATOを少なくとも6週間培養して、最適なT細胞分化を可能にする。ATOからの造血細胞の取り戻しは、ピペッティングによりATOを分散させることによって達成される。

10

【0134】

プロトコールの変動は、具体的には効力に対する変動的影響を有する代替的構成要素の使用を容認する。

【0135】

基礎培地RPMIは、いくつかの市販の代替物（例えば、IMDM）に代わって置換され得る。

【0136】

用いられる間質細胞株は、以前に記載されたマウス骨髓細胞株のMS-5 (Itoh et al, 1989) であるが、MS-5は、類似のマウス間質細胞株（例えば、OP9、S17）、ヒト間質細胞株（例えば、HS-5、HS-27a）、初代ヒト間質細胞、またはヒト多能性幹細胞由来の間質細胞に代わって置換され得る。

20

【0137】

間質細胞株に、ヒトDLL1 cDNAをコードするレンチウイルスを形質導入するが、遺伝子送達の方法、ならびにNotchリガンド遺伝子は変動し得る。代替的Notchリガンド遺伝子には、DLL4、JAG1、JAG2、およびその他が含まれる。Notchリガンドには、参照により本明細書に組み入れられる米国特許第7795404号および第8377886号に記載されるものも含まれる。Notchリガンドには、デルタ1、3、および4、ならびにJagged 1、2がさらに含まれる。

【0138】

HSPCのタイプおよび供給源には、骨髓、臍帯血、末梢血、胸腺、もしくは他の初代供給源；または、ヒト胚性幹細胞（ESC）もしくは誘導多能性幹細胞（iPSC）に由来するHPSCが含まれ得る。

30

【0139】

サイトカイン条件を変動させ得る：例えば、FLT3LおよびIL-7のレベルを変化させて、T細胞分化動態を変更し得；幹細胞因子（SCF/KITリガンド）、トロンプオエチン（TPO）、IL-2、IL-15などの他の造血サイトカインを添加し得る。

【0140】

遺伝子改変をある特定の構成要素に導入して、また、抗原特異的T細胞を生成し得、そして陽性および陰性選択をモデル化し得る。これらの改変の例には、抗原特異的な対立遺伝子排除されたナイーブT細胞の生成のための、抗原特異的T細胞受容体（TCR）またはキメラ抗原受容体（CAR）をコードするレンチウイルスベクターによるHSPCの形質導入；特化したリンパ系細胞への系統コミットメントを指揮する1種または複数種の遺伝子によるHSPCの形質導入が含まれる。例えば、ATOにおいて機能的iNKT細胞を生成するための、インバリエントナチュラルキラーT細胞（iNKT）関連TCRによるHSPCの形質導入；ATOにおいてTCR改変もしくは非改変T細胞の両方の陽性選択および成熟を増強するための、ヒトMHC遺伝子によるATO間質細胞株（例えば、MS5-hDLL1）の形質導入；ならびに/またはATOにおいてCAR T細胞の陽性選択を増強するための、抗原+共刺激分子もしくはサイトカインによるATO間質細胞株の形質導入。

40

【0141】

V. 細胞培養条件

50

本明細書において記載される3D細胞凝集体の培養のための、ならびにT細胞の産生および/またはその陽性/陰性選択のための、細胞培養条件が提供され得る。ある特定の局面において、選択集団の開始細胞は、少なくとももしくは約 10^4 、 10^5 、 10^6 、 10^7 、 10^8 、 10^9 、 10^{10} 、 10^{11} 、 10^{12} 、 10^{13} 個の細胞、またはその中に導き出せる任意の値域を含み得る。開始細胞集団は、少なくとももしくは約 10 、 10^1 、 10^2 、 10^3 、 10^4 、 10^5 、 10^6 、 10^7 、 10^8 細胞/ml、またはその中に導き出せる任意の値域の播種密度を有し得る。

【0142】

B. 培養容器

3D細胞凝集体またはその子孫細胞を培養するために用いられる培養容器には、それがその中で幹細胞を培養し得る限り、フラスコ、組織培養用フラスコ、ディッシュ、ペトリディッシュ、組織培養用ディッシュ、マルチディッシュ、マイクロプレート、マイクロウェルプレート、マルチプレート、マルチウェルプレート、マイクロスライド、チャンバースライド、チューブ、トレー、CellSTACK（登録商標）チャンバー、培養バッグ、およびローラーボトルが含まれ得るが、それらに特に限定されるわけではない。幹細胞は、培養の必要性に応じて、少なくとももしくは約0.2、0.5、1、2、5、10、20、30、40、50ml、100ml、150ml、200ml、250ml、300ml、350ml、400ml、450ml、500ml、550ml、600ml、800ml、1000ml、1500ml、またはその中に導き出せる任意の値域の容量で培養され得る。ある特定の態様において、培養容器は、生物学的に活性な環境を支持する任意の装置またはシステムを指し得るバイオリアクターであり得る。バイオリアクターは、少なくとももしくは約2、4、5、6、8、10、15、20、25、50、75、100、150、200、500リットル、1、2、4、6、8、10、15立方メートル、またはその中に導き出せる任意の値域の容量を有し得る。

【0143】

培養容器は細胞接着性または非接着性であり得、そして目的に応じて選択され得る。細胞接着性培養容器を、細胞外マトリックス（ECM）など、細胞接着のための物質のいずれかでコーティングして、細胞への容器表面の接着性を向上させ得る。細胞接着のための物質は、幹細胞またはフィーダー細胞（用いられる場合）に付着することを意図される任意の材料であり得る。細胞接着のための物質には、コラーゲン、ゼラチン、ポリ-L-リジン、ポリ-D-リジン、ラミニン、およびフィブロネクチン、ならびにそれらの混合物、例えばマトリゲル（商標）、ならびに溶解細胞膜調製物が含まれる。

【0144】

C. マトリックス構成要素

様々な規定されたマトリックス構成要素が、培養法または組成物において用いられ得る。例えば、参照によりその全体として組み入れられるLudwig et al. (2006a; 2006b) に記載されるように、多能性細胞成長のための固体支持体を提供する手段として、組み合わせでの組換えコラーゲンIV、フィブロネクチン、ラミニン、およびビトロネクチンを用いて、培養表面をコーティングし得る。

【0145】

マトリックス組成物を表面に固定化して、細胞のための支持体を提供し得る。マトリックス組成物は、1種または複数種の細胞外マトリックス（ECM）タンパク質および水性溶媒を含み得る。「細胞外マトリックス」という用語は、当技術分野において認められている。その構成要素には、以下のタンパク質：フィブロネクチン、ラミニン、ビトロネクチン、テネイシン、エンタクチン、トロネスポンジン、エラスチン、ゼラチン、コラーゲン、フィブリリン、メロシン、アンコリン（anchurin）、コンドロネクチン、リンクタンパク質、骨シアロタンパク質、オステオカルシン、オステオポンチン、エピネクチン、ヒアルロネクチン、ウンデュリン（undulin）、エピリグリン、およびカリニンのうちの1種または複数種が含まれる。他の細胞外マトリックスタンパク質は、参照により本明細書に組み入れられるKleinman et al., (1993)に記載されている。「細胞外マトリックス」という用語は、細胞外マトリックスとしてのその特徴付けが当業者によって容易に判定可能であろうため、将来発見され得る現時点で未知の細胞外マトリックスを包含することが意図される。

【0146】

一部の局面において、マトリックス組成物における総タンパク質濃度は、約1ng/mL～約1mg/mLであり得る。一部の態様において、マトリックス組成物における総タンパク質濃度は、約1μg/mL～約300μg/mLである。より好ましい態様において、マトリックス組成物における総タンパク質濃度は、約5μg/mL～約200μg/mLである。

【0147】

細胞外マトリックス (ECM) タンパク質は、天然起源のものであり得、かつヒトまたは動物組織から精製され得る。あるいは、ECMタンパク質は、本来、遺伝子操作された組換えタンパク質または合成であり得る。ECMタンパク質は、天然のまたは改変された、タンパク質全体またはペプチドフラグメントの形態であり得る。細胞培養のためのマトリックスにおいて有用であり得るECMタンパク質の例には、ラミニン、コラーゲンI、コラーゲンIV、フィブロネクチン、およびビトロネクチンが含まれる。一部の態様において、マトリックス組成物は、フィブロネクチンの合成により生成されたペプチドフラグメント、または組換えフィブロネクチンを含む。

10

【0148】

なおさらなる態様において、マトリックス組成物は、少なくともフィブロネクチンおよびビトロネクチンの混合物を含む。一部の他の態様において、マトリックス組成物は、好ましくはラミニンを含む。

【0149】

マトリックス組成物は、好ましくは単一タイプの細胞外マトリックスタンパク質を含む。一部の態様において、マトリックス組成物は、特に前駆細胞の培養との使用のためのフィブロネクチンを含む。例えば、適切なマトリックス組成物は、ニュージャージー州 (N. J.) Franklin LakesのBecton, Dickinson & Co. (BD) によって販売されるヒトフィブロネクチン (Cat#354008) など、ヒトフィブロネクチンをダルベッコリン酸緩衝生理食塩水 (DPBS) 中に5μg/mL～約200μg/mLのタンパク質濃度まで希釈することによって調製され得る。特定の例において、マトリックス組成物は、RetroNectin (登録商標) などのフィブロネクチンフラグメントを含む。RetroNectin (登録商標) は、中心の細胞結合ドメイン (III型リピート、8、9、10)、高アフィニティーヘパリン結合ドメインII (III型リピート、12、13、14)、およびヒトフィブロネクチンの選択的スプライシングを受けたIIICS領域内のCS1部位を含有する、(574アミノ酸の) 約63kDaのタンパク質である。

20

30

【0150】

一部の他の態様において、マトリックス組成物はラミニンを含み得る。例えば、適切なマトリックス組成物は、ラミニン (Sigma-Aldrich (St. Louis, Mo.) ; Cat#L6274およびL2020) をダルベッコリン酸緩衝生理食塩水 (DPBS) 中に5μg/mL～約200μg/mLのタンパク質濃度まで希釈することによって調製され得る。

【0151】

一部の態様において、マトリックス組成物は、マトリックスがまたはその構成要素タンパク質がヒト起源のもののみであるという点において、ゼノフリーである。これは、ある特定の研究適用に望ましくあり得る。例えば、ヒト細胞を培養するゼノフリーマトリックスでは、ヒト起源のマトリックス構成要素が用いられ得、いかなる非ヒト動物性構成要素も排除され得る。ある特定の局面において、マトリゲル (商標) は、培養組成物から基質として排除され得る。マトリゲル (商標) は、マウス腫瘍細胞から分泌されるゼラチン状タンパク質混合物であり、そしてBD Biosciences (New Jersey, USA) から市販されている。この混合物は、多くの組織において見出される複雑な細胞外環境に似ており、そして細胞培養のための基質として細胞生物学者によって頻繁に用いられるが、それは望ましくない外来物抗原または汚染物質を導入し得る。

40

【0152】

VI. 選択可能なまたはスクリーニング可能なマーカー

ある特定の態様において、外因性核酸を含有する細胞は、発現ベクターまたは外因性核酸内にマーカーを含ませることによって、インビトロまたはインビボで同定され得る。そ

50

のようなマーカーは、細胞に同定可能な変化を付与し得、発現ベクターを含有する細胞の容易な同定を可能にする。一般的に、選択マーカーは、選択を可能にする特性を付与するものであり得る。陽性選択マーカーは、該マーカーの存在がその選択を可能にするものであり得、一方で陰性選択マーカーは、その存在がその選択を阻止するものである。陽性選択マーカーの例は、薬物耐性マーカーである。

【0153】

薬物選択マーカーを含ませることは、通常、形質転換体のクローニングおよび同定に役立ち、例えばネオマイシン、ピューロマイシン、ハイグロマイシン、DHFR、GPT、ゼオシン、およびヒスチジノールに対する耐性を付与する遺伝子は、有用な選択マーカーである。条件の履行に基づいて形質転換体の識別を可能にする表現型を付与するマーカーに加えて、その基礎が比色分析であるGFPなどのスクリーニング可能なマーカーを含めた、他のタイプのマーカーも企図される。あるいは、単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ (tk) またはクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ (CAT) など、陰性選択マーカーとしてのスクリーニング可能な酵素が利用され得る。当業者であれば、おそらくFACS分析と併せて、どのように免疫学的マーカーを採用するかも知っているであろう。用いられるマーカーは、それが、遺伝子産物をコードする核酸と同時に発現され得る限り、重要でないと考えられる。選択およびスクリーニング可能なマーカーのさらなる例は、当業者に周知である。

【0154】

選択可能なマーカーには、細胞内に外来種DNAを導入することを意図されるトランスフェクションまたは他の手順の成功を示す、実験室微生物学、分子生物学、および遺伝子操作において用いられるレポーター遺伝子の一種が含まれ得る。選択可能なマーカーは、抗生物質耐性遺伝子であることが多く；外来種DNAを導入する手順に供された細胞を、抗生物質を含有する培地上で成長させ、そして成長し得るそれらの細胞は、導入された遺伝物質の取り込みおよび発現に成功している。選択可能なマーカーの例には、ジェネティシンに対する抗生物質耐性を付与する、Abicr遺伝子またはTn5由来Neo遺伝子が含まれる。

【0155】

スクリーニング可能なマーカーには、研究者が、必要および不要な細胞を区別することを可能にする、レポーター遺伝子が含まれ得る。本発明のある特定の態様は、特異的な細胞系統を示すレポーター遺伝子を利用する。例えば、レポーター遺伝子は、発現エレメント内で、かつ同時発現のための、心室または心房選択的な遺伝子のコード領域と通常関連付けされた心室または心房選択的な調節エレメントの制御下に位置し得る。レポーターは、特異的な系統の細胞が、それらを薬物もしくは他の選択圧下に置くことなくまたはそうでなければ細胞生存率を危険にさらすことなく、単離することを可能にする。

【0156】

そのようなレポーターの例には、細胞表面タンパク質（例えば、CD4、HAエピトープ）、蛍光タンパク質、抗原決定基、および酵素（例えば、 β -ガラクトシダーゼ）をコードする遺伝子が含まれる。ベクター含有細胞は、例えば、細胞表面タンパク質、またはベクターによりコードされた酵素によって蛍光産物に変換され得る基質に対する蛍光でタグ付けされた抗体を用いたFACSによって、単離され得る。

【0157】

具体的な態様において、レポーター遺伝子は蛍光タンパク質である。ほぼ全可視光スペクトルに渡る蛍光発光スペクトルプロファイルを特質とする、幅広い蛍光タンパク質遺伝的変種が開発されている（非限定的な例に関しては、表1を参照されたい）。元のエクオレア・ビクトリア (*Aequorea victoria*) クラゲ緑色蛍光タンパク質における突然変異誘発の努力は、色が青色から黄色に及び、かつ生物学研究において最も広く用いられているインビボレポーター分子の一部である、新たな蛍光プローブをもたらしている。オレンジおよび赤色のスペクトル領域で発光するより長い波長の蛍光タンパク質が、海洋アネモネ、ディスコソーマ・ストリアタ (*Discosoma striata*)、および花虫 (Anthozoa) 綱に属するサンゴ礁から開発されている。シアン、緑色、黄色、オレンジ、および深紅色の蛍光

発光を有する類似のタンパク質を産生するために、さらにほかの種が掘り出されている。蛍光タンパク質の輝度および安定性を向上させるための開発研究努力は継続中であり、ゆえにそれらの総合的有用性を向上させている。

【0158】

(表1) 蛍光タンパク質の特性

タンパク質 (頭字語)	励起 極大 (nm)	発光 極大 (nm)	モル 吸光 係数	量子 収量	インビボ での 構造	相対輝度 (EGFPに 対する%)
GFP (wt)	395/475	509	21,000	0.77	単量体 *	48
緑色蛍光タンパク質						
EGFP	484	507	56,000	0.60	単量体 *	100
AcGFP	480	505	50,000	0.55	単量体 *	82
TurboGFP	482	502	70,000	0.53	単量体 *	110
Emerald	487	509	57,500	0.68	単量体 *	116
Azami Green	492	505	55,000	0.74	単量体	121
ZsGreen	493	505	43,000	0.91	四量体	117
青色蛍光タンパク質						
EBFP	383	445	29,000	0.31	単量体 *	27
Sapphire	399	511	29,000	0.64	単量体 *	55
T-Sapphire	399	511	44,000	0.60	単量体 *	79
シアン蛍光タンパク質						
ECFP	439	476	32,500	0.40	単量体 *	39
mCFP	433	475	32,500	0.40	単量体	39
Cerulean	433	475	43,000	0.62	単量体 *	79
CyPet	435	477	35,000	0.51	単量体 *	53
AmCyan1	458	489	44,000	0.24	四量体	31
Midori-Ishi Cyan	472	495	27,300	0.90	二量体	73
mTFP1 (Teal)	462	492	64,000	0.85	単量体	162
黄色蛍光タンパク質						
EYFP	514	527	83,400	0.61	単量体 *	151
Topaz	514	527	94,500	0.60	単量体 *	169
Venus	515	528	92,200	0.57	単量体 *	156
mCitrine	516	529	77,000	0.76	単量体	174
YPet	517	530	104,000	0.77	単量体 *	238
PhiYFP	525	537	124,000	0.39	単量体 *	144

10

20

30

40

ZsYellow1	529	539	20,200	0.42	四量体	25
mBanana	540	553	6,000	0.7	単量体	13
オレンジおよび赤色蛍光タンパク質						
Kusabira Orange	548	559	51,600	0.60	単量体	92
mOrange	548	562	71,000	0.69	単量体	146
dTomato	554	581	69,000	0.69	二量体	142
dTomato-Tandem	554	581	138,000	0.69	単量体	283
DsRed	558	583	75,000	0.79	四量体	176
DsRed2	563	582	43,800	0.55	四量体	72
DsRed-Express (T1)	555	584	38,000	0.51	四量体	58
DsRed-Monomer	556	586	35,000	0.10	単量体	10
mTangerine	568	585	38,000	0.30	単量体	34
mStrawberry	574	596	90,000	0.29	単量体	78
AsRed2	576	592	56,200	0.05	四量体	8
mRFP1	584	607	50,000	0.25	単量体	37
JRed	584	610	44,000	0.20	二量体	26
mCherry	587	610	72,000	0.22	単量体	47
HcRed1	588	618	20,000	0.015	二量体	1
mRaspberry	598	625	86,000	0.15	単量体	38
HcRed-Tandem	590	637	160,000	0.04	単量体	19
mPlum	590	649	41,000	0.10	単量体	12
AQ143	595	655	90,000	0.04	四量体	11
* 弱い二量体						

【0159】

VII. 外因性遺伝子編集

ある特定の態様において、改変されたヌクレアーゼを用いて、本明細書において用いられる任意の細胞、特に培養法または組成物における間質細胞または幹細胞もしくは前駆細胞などの開始細胞、の遺伝子改変のための外因性核酸配列を導入し得る。

【0160】

遺伝子編集、または改変されたヌクレアーゼを用いたゲノム編集 (GEEN) とは、人工的に操作されたヌクレアーゼ、つまり「分子ハサミ」を用いてDNAが挿入される、置き換えられる、またはゲノムから除去される、遺伝子操作の一種である。該ヌクレアーゼは、ゲノムにおける所望の位置に特異的二本鎖断裂 (DSB) を生じさせ、相同組換え (HR) および非相同末端結合 (NHEJ) という天然の過程によって、誘導された断裂を修復する細胞の内因性メカニズムを活用する。

【0161】

非限定的な改変されたヌクレアーゼには、ジンクフィンガーヌクレアーゼ (ZFN)、転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ (TALEN)、CRISPR/Cas9システム、および改変されたメガヌクレアーゼが再改変されたホーミングエンドヌクレアーゼが含まれる。当技

10

20

30

40

50

術分野において公知の改変されたヌクレアーゼのいずれかが、方法および組成物のある特定の局面において用いられ得る。

【0162】

遺伝子の機能またはタンパク質機能を理解するために、配列特異的なやり方でそれを妨害しかつ生物に対するその効果をモニターすることが、遺伝子解析において一般に実践されている。しかしながら、一部の生物では、部位特異的突然変異誘発を実施することが困難でありまたは不可能であり、それゆえ短RNA干渉 (siRNA) によって関心対象の遺伝子をサイレンシングするなど、より間接的な方法が用いられなければならない。それにもかかわらず、siRNAによる遺伝子分断は、可変的であり得かつ不完全であり得る。ZFNなどのヌクレアーゼを用いた遺伝子編集は、改変されたヌクレアーゼが、DNA結合特異性を改変す

10

【0163】

微生物種によく見出されるメガヌクレアーゼは、非常に長い認識配列 (>14bp) を有し、ゆえにそれらを天然に非常に特異的にするという固有の特性を有する。これを生かして、ゲノム編集において部位特異的DSBを作製し得る；しかしながら、その課題は、すべての考え得る標的配列を網羅するには十分なメガヌクレアーゼが公知でない、またはこれま

20

【0164】

メガヌクレアーゼは、おそらくよりストリンジェントなDNA配列認識が理由で、ZFNなどの方法と比較して、細胞においてより毒性を引き起こしにくいという有益性を有するが；

30

【0165】

メガヌクレアーゼに対立するものとして、ZFNおよびTALENの背後にある概念は、ジンクフィンガーおよび転写活性化因子様エフェクター (TALE) などの特異的DNA配列認識ペプチドに後に連結されると考えられる非特異的DNA切り込み酵素により多く基づく。1つのやり方は、そのDNA認識部位および切断部位が、制限酵素の中ではあまり見られない状況である互いに分離しているエンドヌクレアーゼを見出すことであった。この酵素が見出されれば、認識能を有しないであろうため非常に非特異的であると考えられる、その切断部分を分離することができるであろう。次いで、この部分を、非常に高い特異性につながり得る配列認識ペプチドに連結することができるであろう。そのような特性を有する制限酵素の例はFokIである。その上、FokIは、ヌクレアーゼ活性を有するために二量体化を要するという利点を有し、そしてこれは、各ヌクレアーゼパートナーは一意的DNA配列を認識するであろうため、特異性が劇的に増加することを意味する。この効果を増強するために、FokIヌクレアーゼは、ヘテロ二量体としてのみ機能し得かつ触媒活性の増加を有し得るよう

40

【0166】

ZFNおよびTALENの両方のヌクレアーゼ部分は類似の特性を有するものの、これらの改変

50

されたヌクレアーゼ間の差は、それらのDNA認識ペプチドにある。ZFNはCys2-His2ジンクフィンガーに、そしてTALENはTALEに依存する。これらのDNA認識ペプチドドメインの両方は、それらがそれらのタンパク質において組み合わせで天然に見出されるという特徴を有する。Cys2-His2ジンクフィンガーは、典型的に、3bp離れているリピートで生じ、かつ転写因子などの色々な核酸相互作用タンパク質において多様な組み合わせで見出される。他方でTALEは、アミノ酸と認識されるヌクレオチド対との間で1対1の認識比率を有するリピートで見出される。ジンクフィンガーおよびTALEの両方とも反復パターンで生じるため、種々の組み合わせを試して多種多様な配列特異性を創出し得る。ジンクフィンガーはこれらの点においてより確立されており、そして他の方法の中でも、モジュール組み立て（トリプレット配列と相関したジンクフィンガーを1列に付着させて、要される配列を網羅する場合）、OPEN（細菌システムにおける、ペプチドドメインの低ストリンジェンシー選択対ペプチド組み合わせの高ストリンジェンシー選択が後に続くトリプレットヌクレオチド対最終標的）などの手法、およびジンクフィンガーライブラリーの細菌ワンハイブリッドスクリーニングは、部位特異的ヌクレアーゼを作製するために用いられている。

10

【0167】

VIII. 外因性遺伝子送達

ある特定の態様において、ベクターは、本明細書において用いられる任意の細胞、特に培養法または組成物における間質細胞または幹細胞もしくは前駆細胞などの開始細胞、の遺伝子改変のための外因性核酸配列を含むように構築され得る。これらのベクターの構成要素および送達法についての詳細は、下記で開示される。

20

【0168】

A. ベクター

当業者であれば、標準的組換え技法によりベクターを構築する十分な能力を備えているであろう（例えば、両方とも参照により本明細書に組み入れられる、Maniatis et al., 1988およびAusubel et al., 1994を参照されたい）。

【0169】

ベクターは、遺伝子送達および/もしくは遺伝子発現をさらに調節する、またはそうでなければ標的細胞に有益な特性を提供する、他の構成要素または機能性も含み得る。そのような他の構成要素には、例えば、細胞への結合または標的化に影響する構成要素（細胞タイプまたは組織特異的な結合を仲介する構成要素を含む）；細胞によるベクター核酸の取り込みに影響する構成要素；取り込み後の細胞内のポリヌクレオチドの局在に影響する構成要素（核局在を仲介する作用物質など）；およびポリヌクレオチドの発現に影響する構成要素が含まれる。

30

【0170】

そのような構成要素には、ベクターによって送達された核酸を取り込んでおりかつ発現中である細胞を検出するまたは選択するために用いられ得る検出可能なおよび/または選択のマーカーなど、マーカーも含まれ得る。そのような構成要素は、ベクターの天然の特質として提供され得る（結合および取り込みを仲介する構成要素または機能性を有する特定のウイルスベクターの使用など）、またはベクターは、そのような機能性を提供するように改変され得る。多種多様のそのようなベクターが当技術分野において公知であり、かつ一般的に利用可能である。ベクターが宿主細胞内に維持された場合、ベクターは、宿主細胞のゲノム内に組み込まれた自律的構造として、有糸分裂の間該細胞によって安定に複製され得る、または宿主細胞の核もしくは細胞質内に維持され得る。

40

【0171】

B. 調節エレメント

ベクターに内包された真核生物発現カセットは、（5'から3'方向に）タンパク質コード配列に機能的に連結された真核生物転写プロモーター、介在配列を含むスプライシングシグナル、および転写終結/ポリアダニル化配列を特に含有する。

【0172】

i. プロモーター/エンハンサー

50

「プロモーター」とは、転写の開始および割合が制御される核酸配列の領域である制御配列である。それは、そこでRNAポリメラーゼおよび他の転写因子などの調節タンパク質および分子が結合して、核酸配列の特異的転写を開始し得る、遺伝子エレメントを含有し得る。「機能的に配置された」、「機能的に連結された」、「制御下にある」、および「転写制御下にある」という語句は、プロモーターが、その配列の転写開始および/または発現を制御する核酸配列との関連で、正しい機能的な位置および/または配向にあることを意味する。

【0173】

プロモーターは、一般的に、RNA合成のための開始部位を配置するように機能する配列を含む。この最もよく知られた例はTATAボックスであるが、例えば哺乳類ターミナルデオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼ遺伝子に対するプロモーターおよびSV40後期遺伝子に対するプロモーターなど、TATAボックスを欠く一部のプロモーターでは、開始部位自体を覆う個別のエレメントが、開始の場所を固定することを助ける。付加的なプロモーターエレメントは、転写開始の頻度を調節する。典型的に、これらは開始部位の30~110bp上流の領域に位置するが、とはいえいくつかのプロモーターは、開始部位の下流にある機能的なエレメントを同じように含有することが示されている。コード配列をプロモーター「の制御下に」置くために、転写リーディングフレームの転写開始部位の5'端を、選定されたプロモーターの「下流」（すなわち、3'）に配置する。「上流の」プロモーターは、DNAの転写を刺激しかつコードされたRNAの発現を促進する。

【0174】

プロモーターエレメント間の間隔はしばしば柔軟性があり、そのためプロモーター機能は、エレメントが互いに対して反転したまたは動いた場合に保たれる。tkプロモーターにおいて、プロモーターエレメント間の間隔は、活性が減衰し始める前の、50bp離れたところまで増加され得る。プロモーターに応じて、個々のエレメントは協調的にまたは独立して機能して転写を活性化し得るように見える。プロモーターは、核酸配列の転写活性化に関与するシス作用性調節配列を指す「エンハンサー」と併せて用いられても用いられなくてもよい。

【0175】

プロモーターは、コードセグメントおよび/またはエクソンの上流に位置する5'非コード配列を単離することによって得られうるように、核酸配列と天然に関連しているものでありうる。そのようなプロモーターは、「内因性」と称され得る。同様に、エンハンサーは、その配列の下流または上流のいずれかに位置する、核酸配列と天然に関連しているものであり得る。あるいは、コード核酸セグメントを、その天然環境において核酸配列と通常関連していないプロモーターを指す、組換えまたは異種プロモーターの制御下に配置することによって、ある特定の利点を得られる。組換えまたは異種エンハンサーは、その天然環境において核酸配列と通常関連していないエンハンサーも指す。そのようなプロモーターまたはエンハンサーには、他の遺伝子のプロモーターまたはエンハンサー、ならびに他の任意のウイルス、または原核細胞もしくは真核細胞から単離されたプロモーターまたはエンハンサー、ならびに「天然に存在」しない、すなわち種々の転写調節領域の種々のエレメント、および/または発現を変更する変異を含有するプロモーターまたはエンハンサーが含まれ得る。例えば、組換えDNA構築において最もよく用いられているプロモーターには、β-ラクタマーゼ（ペニシリナーゼ）、ラクトース、およびトリプトファン（trp）プロモーターシステムが含まれる。プロモーターおよびエンハンサーの核酸配列を合成により産生することに加えて、配列は、本明細書において開示される組成物と結び付けた、PCR（商標）を含めた組換えクローニングおよび/または核酸増幅技術を用いて産生され得る（それぞれ参照により本明細書に組み入れられる、米国特許第4,683,202号および第5,928,906号を参照されたい）。さらに、ミトコンドリア、葉緑体などの非核オルガネラ内の配列の転写および/または発現を指揮する制御配列が同じように採用され得ることが企図される。

【0176】

当然ながら、発現に選定されたオルガネラ、細胞タイプ、組織、器官、または生物においてDNAセグメントの発現を有効に指揮するプロモーターおよび/またはエンハンサーを採用することは重要である。分子生物学の技術分野における当業者であれば、一般的に、タンパク質発現のためのプロモーター、エンハンサー、および細胞タイプ組み合わせの使用を知っている（例えば、参照により本明細書に組み入れられる、Sambrook et al. 1989を参照されたい）。採用されるプロモーターは、構成的であり、組織特異的であり、誘導性であり、かつ/または、組換えタンパク質および/もしくはペプチドの大規模産生において有利であるなど、導入されたDNAセグメントの高レベルの発現を指揮する適当な条件下で有用であり得る。プロモーターは、異種または内因性であり得る。

【0177】

その上、任意のプロモーター/エンハンサーの組み合わせ（例えば、epd.isb-sib.ch/におけるワールドワイドウェブを通じた、真核生物プロモーターデータベース（Eukaryotic Promoter Data Base）EPDBのとおり）を用いても、発現を推進し得る。T3、T7、またはSP6細胞質発現システムの使用は、別の考え得る態様である。真核細胞は、適当な細菌ポリメラーゼが送達複合体の一部としてまたは付加的な遺伝子発現構築物として提供された場合、ある特定の細菌プロモーターからの細胞質転写を支持し得る。

【0178】

プロモーターの非限定的な例には、SV40初期もしくは後期プロモーター、サイトメガロウイルス（CMV）最初期プロモーター、ラウス肉腫ウイルス（RSV）初期プロモーターなど、初期もしくは後期ウイルスプロモーター；例えばベータアクチンプロモーター（Ng, 1989; Quitsche et al., 1989）、GADPHプロモーター（Alexander et al., 1988, Ercolani et al., 1988）、メタロチオネインプロモーター（Karin et al., 1989; Richards et al., 1984）など、真核細胞プロモーター；ならびに、サイクリックAMP応答エレメントプロモーター（cre）、血清応答エレメントプロモーター（sre）、ホルボールエステルプロモーター（TPA）、および最小TATAボックス付近の応答エレメントプロモーター（tre）など、接続された応答エレメントプロモーターが含まれる。ヒト成長ホルモンプロモーター配列（例えば、Genbankアクセッション番号X05244、ヌクレオチド283～341に記載されるヒト成長ホルモン最小プロモーター）、またはマウス乳腺腫瘍プロモーター（ATCCから入手可能、Cat番号ATCC 45007）を用いることも可能である。具体的な例は、ホスホグリセリン酸キナーゼ（PGK）プロモーターであり得る。

【0179】

ii. プロテアーゼ切断部位/自己切断ペプチド、および内部リボソーム結合部位

適切なプロテアーゼ切断部位および自己切断ペプチドは、当業者に公知である（例えば、Ryan et al., 1997; Scymczak et al., 2004を参照されたい）。プロテアーゼ切断部位の例は、ポティウイルスNIaプロテアーゼ（例えば、タバコエッチウイルス（tobacco etch virus）プロテアーゼ）、ポティウイルスHCプロテアーゼ、ポティウイルスP1（P35）プロテアーゼ、ビモウイルス（byovirus）NIaプロテアーゼ、ビモウイルスRNA-2コードプロテアーゼ、アフトウイルス（aphthovirus）Lプロテアーゼ、エンテロウイルス（enterovirus）2Aプロテアーゼ、ライノウイルス2Aプロテアーゼ、ピコルナ3Cプロテアーゼ、コモウイルス24Kプロテアーゼ、ネボウイルス（nepovirus）24Kプロテアーゼ、RTSV（イネツングロ（rice tungro）球形ウイルス）3C様プロテアーゼ、PY/IF（パースニップ黄色斑点ウイルス）3C様プロテアーゼ、トロンビン、Xa因子、およびエンテロキナーゼの切断部位である。その高い切断ストリンジェンシーにより、TEV（タバコエッチウイルス）プロテアーゼ切断部位が用いられ得る。

【0180】

例示的な自己切断ペプチド（「シス作用性加水分解エレメント」、CHYSELとも呼ばれる、deFelipe (2002)を参照されたい）は、ポティウイルスおよびカルジオウイルス（cardiovirus）2Aペプチドに由来する。特定の自己切断ペプチドは、FMDV（口蹄疫ウイルス）、ウマ鼻炎Aウイルス、ゾセア・アシグナ（*Thosea asigna*）ウイルス、およびブタテッシュウイルスに由来する2Aペプチドより選択され得る。

【0181】

ポリシストロン性メッセージにおけるコード配列の効率的な翻訳には、特異的な開始シグナルも用いられ得る。これらのシグナルは、ATG開始コドンまたは近接配列を含む。ATG開始コドンを含めた外因性翻訳制御シグナルは、提供される必要があり得る。当業者であれば、容易にこれを決定し得かつ必要なシグナルを提供し得るであろう。インサート全体の翻訳を確実にするために、開始コドンは、所望のコード配列のリーディングフレームと「インフレーム」でなければならないことは周知である。外因性翻訳制御シグナルおよび開始コドンは、天然または合成のいずれかであり得る。発現の効率は、適当な転写エンハンサーエレメントを含むことによって増強され得る。

【0182】

ある特定の態様において、内部リボソーム侵入部位（IRES）エレメントの使用は、多重遺伝子、つまりポリシストロン性のメッセージを作出するために用いられる。IRESエレメントは、5'メチル化キャップ依存的翻訳のリボソームスキャンモデルを迂回し得、かつ内部部位で翻訳を始め得る（Pelletier and Sonenberg, 1988）。哺乳類メッセージ由来のIRES（Macejak and Sarnow, 1991）と同じように、ピコルナウイルスファミリーの2つのメンバー（ポリオおよび脳心筋炎）由来のIRESエレメントが記載されている（Pelletier and Sonenberg, 1988）。IRESエレメントは、異種オープンリーディングフレームに連結され得る。それぞれがIRESによって分離された複数のオープンリーディングフレームが一括に転写され得、ポリシストロン性メッセージが作出される。IRESエレメントにより、各オープンリーディングフレームは、効率的な翻訳のためにリボソームに接近可能である。複数の遺伝子が、単一メッセージを転写する単一プロモーター/エンハンサーを用いて効率的に発現され得る（それぞれが参照により本明細書に組み入れられる、米国特許第5,925,565号および第5,935,819号を参照されたい）。

【0183】

iii. マルチクロニングサイト

ベクターは、そのうちのいずれかを標準的組換え技術と併せて用いてベクターを消化し得る、多数の制限酵素部位を含有する核酸領域であるマルチクロニングサイト（MCS）を含み得る（例えば、参照により本明細書に組み入れられる、Carbonelli et al., 1999、Levenson et al., 1998、およびCocea, 1997を参照されたい）。「制限酵素消化」とは、核酸分子内の特異的位置でのみ機能する酵素による核酸分子の触媒的切断を指す。これらの制限酵素の多くは市販されている。そのような酵素の使用は、当業者によって広く理解されている。しばしば、ベクターを、MCS内で切り込む制限酵素を用いて直線化またはフラグメント化して、外因性配列がベクターにライゲーションされることを可能にする。「ライゲーション」とは、互いに連続していても連続していなくてもよい2つの核酸フラグメント間でホスホジエステル結合を形成する過程を指す。制限酵素およびライゲーション反応を伴う技法は、組換え技術の技術分野における当業者に周知である。

【0184】

iv. スプライシング部位

ほとんどの転写される真核生物RNA分子は、RNAスプライシングを受けて、一次転写産物からイントロンを除去する。真核生物ゲノム配列を含有するベクターは、タンパク質発現のための転写産物の適正なプロセッシングを確実にするために、ドナーおよび/またはアクセプターのスプライシング部位を要し得る（例えば、参照により本明細書に組み入れられる、Chandler et al., 1997を参照されたい）。

【0185】

v. 終結シグナル

ベクターまたは構築物は、少なくとも1つの終結シグナルを含み得る。「終結シグナル」または「ターミネーター」は、RNAポリメラーゼによるRNA転写産物の特異的終結に関するDNA配列から構成される。ゆえに、ある特定の態様において、RNA転写産物の産生を終わらせる終結シグナルが企図される。ターミネーターは、望ましいメッセージレベルを達成するためにインビボが必要であり得る。

【0186】

真核生物系において、ターミネーター領域は、ポリアデニル化部位を曝露するように新たな転写産物の部位特異的切断を可能にする、特異的DNA配列も含み得る。これは、転写産物の3'端に一続きの約200個のA残基（ポリA）を付加するように、特化した内因性ポリメラーゼにシグナルを送る。このポリA尾部で修飾されたRNA分子は、より安定であるように見え、かつより効率的に転写される。ゆえに、真核生物を伴う他の態様において、ターミネーターは、RNAの切断のためのシグナルを含み、そしてターミネーターシグナルは、メッセージのポリアデニル化を促進する。ターミネーターおよび/またはポリアデニル化部位エレメントは、メッセージレベルを増強するように、かつカセットから他の配列への読み通しを最小限に抑えるように働き得る。

10

【0187】

企図されるターミネーターには、例えばウシ成長ホルモンターミネーターなどの遺伝子の終結配列、または例えばSV40ターミネーターなどのウイルス終結配列を例えば含むがそれらに限定されない、本明細書において記載されるまたは当業者に公知である、転写の任意の公知のターミネーターが含まれる。ある特定の態様において、終結シグナルは、配列切り取りなどによる、転写可能なまたは翻訳可能な配列の欠如であり得る。

【0188】

vi. ポリアデニル化シグナル

発現、特に真核生物発現では、典型的に、転写産物の適正なポリアデニル化をもたらすポリアデニル化シグナルが含まれる。ポリアデニル化シグナルの性質は、実践の成功に極めて重要ではないと考えられ、そして任意のそのような配列が採用され得る。例示的な態様は、好都合でありかつ様々な標的細胞において十分に機能することが知られる、SV40ポリアデニル化シグナルまたはウシ成長ホルモンポリアデニル化シグナルを含む。ポリアデニル化は、転写産物の安定性を増加させ得る、または細胞質輸送を促し得る。

20

【0189】

vii. 複製の起点

宿主細胞内でベクターを繁殖させるために、それは、複製部位の1つまたは複数の起点（「ori」と称されることが多い）、例えば上記のEBVのoriP、または分化プログラミングにおいて類似のもしくは上昇した機能を有する遺伝子操作されたoriPに相当する核酸配列を含有し得、それは、そこで複製が開始される特異的核酸配列である。あるいは、上記の他の染色体外で複製するウイルスの複製起点、または自律複製配列（ARS）が採用され得る。

30

【0190】

C. ベクター送達

培養組成物または方法の開始細胞内への遺伝子改変または外因性核酸の導入は、本明細書において記載されるまたは当業者に公知であろう、細胞の形質転換のための核酸送達のための任意の適切な方法を用い得る。そのような方法には、エキスピボトランスフェクション（Wilson et al., 1989; Nabel et al., 1989）による、マイクロインジェクション（Harland and Weintraub, 1985; 参照により本明細書に組み入れられる、米国特許第5,789,215号）を含めたインジェクション（それぞれが参照により本明細書に組み入れられる、米国特許第5,994,624号、第5,981,274号、第5,945,100号、第5,780,448号、第5,736,524号、第5,702,932号、第5,656,610号、第5,589,466号、および第5,580,859号）による；エレクトロポレーション（参照により本明細書に組み入れられる、米国特許第5,384,253号；Tur-Kaspa et al., 1986; Potter et al., 1984）による；リン酸カルシウム沈殿（Graham and Van Der Eb, 1973; Chen and Okayama, 1987; Rippe et al., 1990）による；ポリエチレングリコールが後に続くDEAE-デキストラン（Gopal, 1985）を用いることによる；直接超音波負荷（Fechheimer et al., 1987）による；リポソーム仲介性トランスフェクション（Nicolau and Sene, 1982; Fraley et al., 1979; Nicolau et al., 1987; Wong et al., 1980; Kaneda et al., 1989; Kato et al., 1991）および受容体仲介性トランスフェクション（Wu and Wu, 1987; Wu and Wu, 1988）による；微粒子銃（PCT出願第WO

40

50

94/09699号および第95/06128号；米国特許第5,610,042号；第5,322,783号、第5,563,055号、第5,550,318号、第5,538,877号、および第5,538,880号、そしてそれぞれが参照により本明細書に組み入れられる）による；炭化ケイ素繊維との攪拌（Kaeppler et al., 1990；それぞれが参照により本明細書に組み入れられる、米国特許第5,302,523号および第5,464,765号）による；アグロバクテリウム（*Agrobacterium*）仲介性形質転換（それぞれが参照により本明細書に組み入れられる、米国特許第5,591,616号および第5,563,055号）による；プロトプラストのPEG仲介性形質転換（Omirulleh et al., 1993；それぞれが参照により本明細書に組み入れられる、米国特許第4,684,611号および第4,952,500号）による；乾燥/阻害仲介性DNA取り込み（Potrykus et al., 1985）による；ならびに、そのような方法の任意の組み合わせなどのDNAの直接送達が含まれるが、それらに限定されるわけではない。これらの技法の適用により、オルガネラ、細胞、組織、または生物は、安定にまたは一時的に形質転換され得る。

10

【0191】

i. リポソーム仲介性トランスフェクション

ある特定の態様において、核酸は、例えばリポソームなどの脂質複合体に封入され得る。リポソームは、リン脂質二重層膜および内側の水性媒体によって特徴付けされる小胞構造である。多重膜リポソームは、水性媒体によって分離された多数の脂質層を有する。リン脂質が過剰な水溶液中に懸濁された場合、それらは自然発生的に形成される。脂質構成要素は、閉じた構造の形成前に自己再編成を受け、かつ脂質二重層の間に水および溶解した溶質を封入する（Ghosh and Bachhawat, 1991）。Lipofectamine（Gibco BRL）またはSuperfect（Qiagen）と複合した核酸も企図される。用いられるリポソームの量は、リポソームならびに用いられる細胞の性質によって変動し得、例えば1～10百万個の細胞あたり約5～約20 μ gのベクターDNAが企図され得る。

20

【0192】

インビトロでの外来種DNAのリポソーム仲介性核酸送達および発現は、非常に成功している（Nicolau and Sene, 1982；Fraley et al., 1979；Nicolau et al., 1987）。培養ニワトリ胚、HeLa、およびヘパトーマ細胞における外来種DNAのリポソーム仲介性送達および発現の実現可能性も実証されている（Wong et al., 1980）。

【0193】

ある特定の態様において、リポソームは、血球凝集性ウイルス（HVJ）と複合し得る。これは、細胞膜との融合を促し、かつリポソームに封入されたDNAの細胞侵入を促進することが示されている（Kaneda et al., 1989）。他の態様において、リポソームは、核非ヒストン染色体タンパク質（HMG-1）と複合され得るまたはそれと併せて採用され得る（Kato et al., 1991）。さらにさらなる態様において、リポソームは、HVJおよびHMG-1の両方と複合され得るまたはそれらと併せて採用され得る。他の態様において、送達ビヒクルは、リガンドおよびリポソームを含み得る。

30

【0194】

ii. エレクトロポレーション

ある特定の態様において、核酸は、エレクトロポレーションを介して細胞内に導入される。エレクトロポレーションは、細胞とDNAとの懸濁液の高電圧放電への曝露を伴う。レシピエント細胞は、機械的創傷により、形質転換に対してより感受性を高くされ得る。また、用いられるベクターの量は、用いられる細胞の性質によって変動し得、例えば1～10百万個の細胞あたり約5～約20 μ gのベクターDNAが企図され得る。

40

【0195】

エレクトロポレーションを用いた真核細胞のトランスフェクションは、かなり成功している。この様式で、マウスプレBリンパ球にヒトカップ-免疫グロブリン遺伝子がトランスフェクトされており（Potter et al., 1984）、そしてラット肝細胞にクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ遺伝子がトランスフェクトされている（Tur-Kaspa et al., 1986）。

【0196】

50

iii. リン酸カルシウム

他の態様において、核酸は、リン酸カルシウム沈殿を用いて細胞に導入される。この技法を用いて、ヒトKB細胞にアデノウイルス5のDNAがトランスフェクトされている（Graham and Van Der Eb, 1973）。またこの様式で、マウスL（A9）、マウスC127、CHO、CV-1、BHK、NIH3T3、およびHeLa細胞に、ネオマイシンマーカー遺伝子がトランスフェクトされ（Chen and Okayama, 1987）、そしてラット肝細胞に色々なマーカー遺伝子がトランスフェクトされた（Rippe et al., 1990）。

【0197】

iv. DEAE-デキストラン

別の態様において、核酸は、ポリエチレングリコールが後に続くDEAE-デキストランを用いて細胞内に送達される。この様式で、レポータープラスミドは、マウス骨髄腫および赤白血球病細胞内に導入された（Gopal, 1985）。

【0198】

IX. 細胞培養適用

本明細書において記載される培養組成物を用いて、下記で例示される商業的または臨床的な適用を有するT細胞を産生し得る。

【0199】

方法は、免疫療法のための、幹細胞からの抗原特異的T細胞のインビトロ産生のために提供され得る。特異的抗原に応答するように遺伝子操作されたT細胞の使用は、がんおよび感染性疾患のための養子細胞療法への有望な調査の手法である。改変T細胞ストラテジーは、抗原特異性を伝えるT細胞受容体（TCR）およびキメラ抗原受容体（CAR）による形質導入；ならびに、（例えば、阻害性シグナル伝達を下方調節する、ウイルス共受容体を欠失させる、またはいわゆる自殺遺伝子を導入することによって、）移入したT細胞の効力または安全性を向上させる遺伝子改変を含む。

【0200】

今日まで、改変T細胞の調査的療法は、末梢血T細胞を用いている。この手法は、いくつかの悪性および感染性疾患の臨床試験において効力を実証しているが、以下の理由で問題のあるままである。第一に、養子移入したT細胞は、インビボで経時的に数が減少し、腫瘍またはウイルス特異的免疫の終局的喪失をもたらす。第二に、T細胞のエクスピボでの活性化および増殖が、効率的な遺伝子形質導入を促すのに要されることが多く、T細胞疲弊および免疫潜在力の減退をもたらし得る。第三に、TCR改変T細胞の場合、トランスジェニックおよび内因性TCR鎖の誤対合が、減衰した抗原認識またはオフターゲット毒性/自己免疫を有するハイブリッド受容体をもたらし得る（またはCAR T細胞の場合、高度に活性化したT細胞上の内因性TCRの残余の発現も、オフターゲット毒性につながり得る）。

【0201】

ATOを用いた幹細胞からの改変T細胞のデノボ生成は、以下のように、改変T細胞療法のこれらの制約を克服する潜在力を有する：1) HSPC（前胸腺（pre-thymic）である）へのTCRまたはCAR遺伝子の導入は、発生中のT細胞における内因性TCR遺伝子座の再編成を抑制し（対立遺伝子排除）、トランスジェニック抗原受容体のみを発現するT細胞をもたらす、ゆえにTCR鎖誤対合またはパッセンジャーTCR発現によるオフターゲット毒性の危険性を軽減する；ならびに2) HSPCは、ナイーブの疲弊していない表現型を有する抗原特異的T細胞を生成する潜在性を有し、それによって養子療法に利用可能なT細胞の質および長寿を増強する。さらに、対立遺伝子排除された抗原特異的T細胞の生成は、内因性ドナーTCR発現による移植片対宿主疾患（GVHD）の危険性なく、同種異系ドナーにおいて用いられ得るすぐに使える抗原特異的T細胞ライブラリーを開発する機会を与える。これらの利点にもかかわらず、幹細胞または前駆細胞からの抗原特異的T細胞の発生のための商業的手法は現在存在しない。

【0202】

ATOシステムが妥当に用いられ得る臨床的適用の具体的な例には、以下が含まれる。

【0203】

10

20

30

40

50

養子細胞による抗腫瘍または抗ウイルス免疫療法のための、HSPCからの自家TCRおよび/またはCAR改変T細胞のインビトロ産生。自家HSPC供給源には、臍帯血、骨髄、および動員末梢血が含まれる。

【0204】

iPSCを含めたヒト多能性幹細胞からの自家TCRおよび/またはCAR改変T細胞のインビトロ産生。

【0205】

養子細胞療法のための商業的に拡張可能なすぐに使える生成物としての、HSPCまたは多能性幹細胞からの同種異系の（HLA合致したまたはHLA改変された）TCRまたはCAR改変T細胞のインビトロ産生。上記で述べられるように、対立遺伝子排除により、TCRおよび/またはCAR形質導入された前胸腺HSPCから産生されたT細胞は、内因性TCRを発現せず、かつ同種異系のレシピエントに移植された場合、オフターゲットGVHDの危険性を伴わないはずである。この目的のために用いられる幹細胞をさらに選択してまたは遺伝子改変して、同種異系の宿主における子孫T細胞生着を増強し得る（例えば、HLA合致したHSPCを用いることによって、または同種免疫認識を減少させる、HLA遺伝子座もしくはNK細胞リガンドの遺伝子改変によって）。

【0206】

ATO由来T細胞のインビボ機能を増強する、TCRおよび/またはCARの導入の有無にかかわらず、幹細胞における非抗原受容体遺伝子の改変。例には、PD-1、TIM-3、もしくはLAG-3などの共阻害性受容体；TGF β などの阻害性シグナル伝達経路；または、CCR5などのウイルス侵入共受容体、の遺伝子不活性化またはノックダウンが含まれる。

【0207】

例えば薬物毒性アッセイにおける、T細胞の発生および機能に対する薬学的または生物学的化合物の効果をモデル化するための、胸腺オルガノイドとしての3D培養物凝集体の使用。これを自家患者細胞とのATOの使用に拡張して、患者特異的薬理ゲノム学的または疾患特異的な相互作用をモデル化し得る。

【0208】

方法および組成物は、T細胞発生を調べるための研究ツールの使用のために提供され得る。上記のように、ATOなどの3D細胞凝集体は、幹細胞および前駆細胞、ならびに造血幹細胞・前駆細胞（HSPC）、ならびに胚性幹細胞（ESC）および誘導多能性幹細胞（iPSC）を含むヒト多能性幹細胞を含めた、複数種の幹細胞供給源からのヒトT細胞発生の調査のための強力なツールである。

【0209】

T細胞発生をモデル化するための研究室において現在実践される実験方法は、いくつかの重要な制約を有する。

【0210】

OP9-DL1および類似の間質細胞に基づく単層システムは、HSPCに対する「フィーダー層」として、Notchリガンド（典型的に、マウスDl1またはDl4）を形質導入された不死化マウス骨髄細胞株を用いる。OP9-DL1上でのヒトHSPCのインビトロ共培養は、T細胞系統へのコミットメントをもたらすが、T細胞の陽性選択は大きく損なわれ、これらのシステムにおける成熟した機能的T細胞の著しい欠損をもたらす。間質細胞共培養システムは、非常に労働集約的であり、そして効率および再現性は、ウシ胎仔血清ロットを含めた複数の変数に依存している。

【0211】

胎児胸腺器官培養（FTOC）法は、微小環境として、造血細胞を枯渇させたインタクトなまたは再凝集したマウスまたはヒトの胎児胸腺組織を用いて、HSPCからのインビトロT細胞発生を調べる。これらの方法は、非常に労働集約的であり、低効率のT細胞生成をもたらす、定量的アッセイのための限定された能力を提供し、組織の時間経過および質による実験的可変性が高く、かつ初代胸腺組織への入手可能性によって限定される。

【0212】

足場に基づくオルガノイドは、典型的に、生体材料マトリックス上に播種された初代胸腺間質細胞または類似の細胞タイプ（例えば、皮膚線維芽細胞）を用いる。これらのシステムは、低い効率および拡張性、乏しい再現性、ならびに専売的地域材料の限定された利用可能性によって限定される。

【0213】

インビボヒトT細胞発生の他種（xenogeneic）（マウス）モデルは、T細胞分化の効率が非常に可変的でありかつ定量性に乏しく、そして多くの手法は、免疫不全マウスへのヒト胎児胸腺、肝臓、および骨髄細胞またはフラグメントの埋め込みも要する。

【0214】

これらの手法とは対照的に、ATOは「すぐに使える」構成要素および血清不含条件を用いて、初代組織またはウシ胎仔血清の使用により生じる生物学的可変性を低下させ；かつ専売的地域材料の使用を回避する。重要なことには、ATOは、大幅に改善された陽性選択を支持し、インビトロでの成熟T細胞およびT細胞の陽性/陰性選択を可能にする。ゆえに、ATOは、インビトロでのT細胞発生を調べるためのツールとして商品化され得る。

【0215】

本明細書において記載される方法および組成物は、がんまたは他の治療上関連する抗原に対する新たな抗原特異的TCRを開発するツールとしても用いられ得る。例えば、ATO由来T細胞は、公開された方法を用いた腫瘍関連抗原または新抗原に対する反応性、および公開された方法を用いてこれらの応答T細胞から同定された抗原特異的TCR配列に基づいて選択され得る。本発明者らは、ATOが最小限の陰性選択でまたは陰性選択なしで、T細胞の生成を提供し得ると仮説を立てたため、自己抗原に対する高い親和力を有するTCRが生成され得、内因性の「胸腺教育を受けた」T細胞プールとは区別できる新規なTCRレパートリーが提供される。第二の方法は、ATOにおけるT細胞発生の間に腫瘍関連抗原を導入することであり、それは、反応性T細胞クローンのアゴニスト選択（および、IEL様分化）を、それらがATO内で発生するにつれて誘導するはずであり；次いで、これらの細胞およびそれらのTCR配列は、標準的方法によって同定され得る。単離されたTCR配列は、養子免疫療法のための本明細書において記載される適用および方法の下流においても用いられ得る。

【0216】

本明細書において記載される方法および組成物には、胚性幹細胞および/または前駆細胞を増殖させるための方法および組成物も含まれ得る。US 20060205072、US 7344881、US 20060205071、US 20020076747、およびUS 20030044978（参照により本明細書に組み入れられる）に記載されるものなど、当技術分野において公知の方法は、本開示の組成物および方法に含まれ得る。

【0217】

本明細書において記載される方法および組成物には、ES細胞、HSPC/PSC、および/またはCD34+細胞など、細胞の増殖能を増加させるための方法および組成物も含まれ得る。例示的な化合物には、エクスピボでのCD34+細胞の増殖を達成する、HSC835（Novartisによって商品化された）が含まれる。他の化合物は、参照により本明細書に組み入れられるUS 8,927,281に記載されている。

【0218】

X. 開始細胞の供給源

多能性幹細胞または造血幹細胞もしくは前駆細胞などの開始細胞は、選択されたT細胞系統に沿った分化のための特定の組成物または方法において用いられ得る。間質細胞を用いて、幹細胞または前駆細胞と共培養し得る。

【0219】

A. 間質細胞

間質細胞は、任意の器官の、例えば骨髄、胸腺、子宮粘膜（子宮内膜）、前立腺、および卵巣における、結合組織細胞である。それらは、その器官の実質細胞の機能を支持する細胞である。線維芽細胞（間葉系間質細胞/MSFとしても知られる）および周皮細胞は、中でも最もよく見られるタイプの間質細胞である。

【0220】

間質細胞と腫瘍細胞との間の相互作用は、がんの成長および進行において主要な役割を担うことが知られている。加えて、サイトカインネットワーク（例えば、M-CSF、LIF）を局所的に調節することによって、骨髄間質細胞は、ヒトの造血および炎症過程に関与することが記載されている。

【0221】

骨髄、胸腺、および他の造血器官における間質細胞は、細胞-細胞リガンド-受容体相互作用を通じて、ならびにサイトカインおよびケモカインを含めた可溶性因子の放出を通じて、造血細胞および免疫細胞発生を調節する。これらの組織における間質細胞は、幹細胞維持、系統特異性およびコミットメント、ならびにエフェクター細胞タイプへの分化を調節するニッチを形成する。

10

【0222】

間質は、非悪性宿主細胞から作製される。間質細胞は、その上で組織特異的細胞タイプ、およびある場合には腫瘍が成長し得る、細胞外マトリックスも提供する。

【0223】

B. 造血幹細胞および前駆細胞

造血幹細胞および前駆細胞の重大な医学的潜在性が理由で、胚性幹細胞からの造血前駆細胞の分化のための方法を改善しようと試みる実質的な仕事が行われている。ヒト成体において、主として骨髄に存在する造血幹細胞は、血液系のすべての細胞に分化する造血（CD34+）前駆細胞の異質集団を産生する。成体ヒトにおいて、造血前駆体は増殖分化し、毎日何千億という成熟血液細胞の生成をもたらす。造血前駆細胞は、臍帯血にも存在している。インビトロにおいて、ヒト胚性幹細胞は、造血前駆細胞に分化し得る。造血前駆細胞は、下記のように、末梢血のサンプルからも増殖または富化され得る。造血細胞は、ヒト起源、マウス起源、または他の任意の哺乳類種のものであり得る。

20

【0224】

造血前駆細胞の単離には、細胞選別機、抗体をコーティングした磁気ビーズを用いた磁気分離、充填カラム；アフィニティークロマトグラフィー；補体および細胞毒素を含むがそれらに限定されない、モノクローナル抗体に接合したもしくはモノクローナルと併せて用いられる細胞毒性剤；ならびに、固体マトリックス、例えばプレートに付着した抗体を用いた「パニング」を含めた任意の選択法、または他の任意の好都合な技法が含まれる。

30

【0225】

分離または単離技法の使用には、物理（密度勾配遠心分離および向流遠心分離）、細胞表面（レクチンおよび抗体アフィニティー）、および生体染色特性（ミトコンドリア結合色素rho123およびDNA結合色素Hoechst 33342）の差に基づくものが含まれるが、それらに限定されるわけではない。精確な分離を提供する技法には、FACS（蛍光活性化細胞選別）またはMACS（磁気活性化細胞選別）が含まれるがそれらに限定されるわけではなく、それは、変動的な洗練度、例えば複数の色チャンネル、低角度でかつ鈍感な光散乱検出チャンネル、インピーダンスチャンネルなどを有し得る。

【0226】

先行技法、または細胞タイプ純度を評価するために用いられる技法（フローサイトメトリーなど）において利用される抗体は、酵素、磁気ビーズ、コロイド状磁気ビーズ、ハプテン、蛍光色素、金属化合物、放射性化合物、薬物、またはハプテンを含むがそれらに限定されない同定可能な作用物質にコンジュゲートされ得る。抗体にコンジュゲートされ得る酵素には、アルカリホスファターゼ、ペルオキシダーゼ、ウレアーゼ、および β -ガラクトシダーゼが含まれるが、それらに限定されるわけではない。抗体にコンジュゲートされ得る蛍光色素には、フルオレセインイソチオシアネート、テトラメチルローダミンイソチオシアネート、フィコエリトリン、アロフィコシアニン、およびTexas Redが含まれるが、それらに限定されるわけではない。抗体にコンジュゲートされ得る付加的な蛍光色素に関しては、Haugland, Molecular Probes: Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals (1992-1994)を参照されたい。抗体にコンジュゲートされ得る金属化合物

40

50

には、フェリチン、コロイド金、および特にコロイド状超常磁性ビーズが含まれるが、それらに限定されるわけではない。抗体にコンジュゲートされ得るハプテンには、ビオチン、ジゴキシゲニン (digoxigenin)、オキサゾロン (oxazalone)、およびニトロフェノールが含まれるが、それらに限定されるわけではない。抗体にコンジュゲートされ得るまたは組み込まれ得る放射性化合物は当技術分野に公知であり、そしてテクネチウム99m (99Tc)、¹²⁵I、ならびに¹⁴C、³H、および³⁵Sを含むがそれらに限定されない任意の放射性核種を含むアミノ酸を含むが、それらに限定されるわけではない。

【0227】

アフィニティークラムなど、精確な分離を可能にする、陽性選択のための他の技法が採用され得る。方法は、約20%未満、好ましくは約5%未満の残余量までの非標的細胞集団の除去を可能にすべきである。

10

【0228】

細胞は、光散乱特性ならびに様々な細胞表面抗原のそれらの発現に基づいて選択され得る。精製された幹細胞は、FACS分析による低側散乱および低～中の前方散乱を有する。サイトスピン調製物は、成熟リンパ系細胞と成熟顆粒球との間のサイズを有する富化された幹細胞を示している。

【0229】

例えばSutherland et al. (1992)の方法、および米国特許第4,714,680号に記載されるものを用いて、培養前に、接種集団をCD34+細胞について富化することも可能である。例えば、細胞を、系統特異的マーカーを発現するそれらの細胞を除去する陰性選択に供する。例証的な態様において、細胞集団は、非CD34+造血細胞および/または特定の造血細胞サブセットの枯渇のための陰性選択に供され得る。陰性選択は、CD2、CD4、およびCD8などのT細胞マーカー；CD10、CD19、およびCD20などのB細胞マーカー；単球マーカーのCD14；NK細胞マーカーのCD2、CD16、およびCD56、または任意の系統特異的マーカーを含めた、いろいろな分子の細胞表面発現に基づいて実施され得る。陰性選択は、例えばMACSまたはカラム分離により、他の細胞タイプの分離に用いられ得る抗体（例えば、CD2、CD3、CD11b、CD14、CD15、CD16、CD19、CD56、CD123、およびCD235a）のカクテルなど、いろいろな分子の細胞表面発現に基づいて実施され得る。

20

【0230】

本明細書において使用するとき、系統陰性 (LIN-) とは、系統コミットした細胞と関連した少なくとも1種のマーカー、例えばT細胞 (CD2、3、4、および8など)、B細胞 (CD10、19、および20など)、骨髄細胞 (CD14、15、16、および33など)、ナチュラルキラー (「NK」) 細胞 (CD2、16、および56など)、RBC (グリコホリンAなど)、巨核球 (CD41)、マスト細胞、好酸球、もしくは好塩基球と関連したマーカー、またはCD38、CD71、およびHLA-DRなどの他のマーカーを欠く細胞を指す。好ましくは、系統特異的マーカーには、CD2、CD14、CD15、CD16、CD19、CD20、CD33、CD38、HLA-DR、およびCD71のうちの少なくとも1種が含まれるが、それらに限定されるわけではない。より好ましくは、LIN-は、少なくともCD14およびCD15を含むと考えられる。さらなる精製は、例えばc-kit+またはThy-1+についての陽性選択によって達成され得る。さらなる富化は、当技術分野において公知の方法による、ミトコンドリア結合色素ローダミン123の使用、およびローダミン+細胞の選択によって達成され得る。高度に富化された組成物は、CD34+、好ましくはCD34+LIN-、そして最も好ましくはCD34+ Thy-1+ LIN-である細胞の選択的単離によって得ることができる。幹細胞において高度に富化された集団およびそれらを得るための方法は、当業者に周知であり、例えばPCT/US94/09760；PCT/US94/08574；およびPCT/US94/10501に記載される方法を参照されたい。

30

40

【0231】

特化した系統の細胞を最初に取り出すことによって細胞を分離する、様々な技法が採用され得る。モノクローナル抗体は、特定の細胞系統および/または分化のステージと関連したマーカーを同定するのに特に有用である。抗体を固体支持体に付着させて、粗分離を可能にし得る。採用される分離技法は、回収される対象となる画分の生存率の保持を最大

50

限に高めるべきである。種々の効力の様々な技法を採用して、「比較的粗い」分離を達成し得る。そのような分離は、存在する全細胞の最高10%、通常多くて約5%、好ましくは多くて約1%が、保持される対象となる細胞集団とともに残る非所望の細胞である場合である。採用される特定の技法は、分離の効率、関連する細胞毒性、遂行の容易さおよび速度、ならびに洗練された設備および/または技術的技能の必要性に依存する。

【0232】

前駆細胞の選択は、細胞に特異的なマーカーだけで達成される必要はない。陰性選択および陽性選択の組み合わせを用いることによって、富化された細胞集団を得ることができる。

【0233】

10

C. 血液細胞の供給源

造血幹細胞（HSC）は、通常骨髓に存在するが、血中に押し込まれ得、末梢血中の多数のHSCを収集するために臨床的に用いられる動員と称される過程である。一般的に好まれる1種の動員剤は、顆粒球コロニー刺激因子（G-CSF）である。

【0234】

末梢血中を循環するCD34+造血幹細胞または前駆体は、非摂動状態で、またはG-CSFのような造血成長因子の外部投与に続く動員の後に、アフエレーシス技法によって回収され得る。動員に続いて回収される幹細胞または前駆細胞の数は、摂動状態でのアフエレーシス後に得られるものよりも大きい。本発明の特定の局面において、細胞集団の供給源は、インビボで造血幹細胞または前駆細胞を富化する必要があるため、その細胞が外的に適用された因子によって動員されていない対象である。

20

【0235】

本明細書において記載される方法における使用のための細胞の集団は、ヒト細胞、非ヒト霊長類細胞、齧歯類細胞（例えば、マウスまたはラット）、ウシ細胞、ヒツジ細胞、ブタ細胞、ウマ細胞、ヒツジ細胞、イヌ細胞、およびネコ細胞などの哺乳類細胞、またはそれらの混合物であり得る。非ヒト霊長類細胞にはアカゲザル細胞が含まれる。細胞は、動物、例えばヒト患者から得ることができる、またはそれらは細胞株由来であり得る。細胞が動物から得られる場合、それらはそれ自体として、例えば分離していない細胞（すなわち、混合集団）として用いられてよい；それらは、例えば形質転換によって、まず培養下で確立されていてよい；またはそれらは、予備精製法に供されていてよい。例えば、細胞集団は、細胞表面マーカーの発現に基づく陽性もしくは陰性選択によって操作され得る；インビトロもしくはインビボで1種もしくは複数種の抗原で刺激され得る；インビトロもしくはインビボで1種もしくは複数種の生物学的調節因子で処理され得る；またはこれらのいずれかもしくはすべての組み合わせ。

30

【0236】

細胞の集団には、末梢血単核細胞（PBMC）、混合集団を含有する全血またはその画分、脾臓細胞、骨髓細胞、腫瘍浸潤リンパ球、白血球除去によって得られた細胞、生検組織、リンパ節、例えば腫瘍から流出しているリンパ節が含まれる。適切なドナーには、免疫されたドナー、免疫されていない（ナイーブの）ドナー、処理されたまたは処理されていないドナーが含まれる。「処理された」ドナーとは、1種または複数種の生物学的調節因子に曝露されているものである。「処理されていない」ドナーは、1種または複数種の生物学的調節因子に曝露されていない。

40

【0237】

例えば、末梢血単核細胞（PBMC）は、当技術分野において公知の方法に従って、記載されるように得ることができる。そのような方法の例は、Kim et al. (1992); Biswas et al. (1990); Biswas et al. (1991)によって述べられている。

【0238】

細胞の集団から先駆細胞を得る方法も、当技術分野において周知である。先駆細胞は、hSCF、hFLT3、および/もしくはIL-3などの様々なサイトカインを用いて増殖させ得る（Akina et al., 1996）、またはCD34+細胞は、MACSもしくはFACSを用いて富化され得る。上

50

記で言及されるように、陰性選択技法を用いても、CD34+細胞を富化し得る。

【0239】

対象から細胞サンプルを得、次いでそれを所望の細胞タイプについて富化することも可能である。例えば、本明細書において記載されるように、PBMCおよび/またはCD34+造血細胞は、血液から単離され得る。細胞は、所望の細胞タイプの細胞表面上のエピトープに結合する抗体による単離および/または活性化などの色々な技法を用いて、他の細胞からも単離され得る。用いられ得る別の方法には、受容体の関わりによって細胞を活性化することなく、特異的細胞タイプについて選択的に富化する、細胞表面マーカーに対する抗体を用いた陰性選択が含まれる。

【0240】

骨髓細胞は、腸骨稜、大腿骨、脛骨、脊椎、肋骨、または他の髓腔から得ることができ、骨髓は患者から採取され得、かつ様々な分離および洗浄手順を通じて単離され得る。骨髓細胞の単離のための例示的な手順は、以下の段階：a) 3つの画分への骨髓懸濁液の遠心力による分離、および中間画分、つまりバフィーコートの回収；b) 段階（a）からのバフィーコート画分を、分離液、一般にはFicoll（Pharmacia Fine Chemicals ABの商標）中でもう一度遠心分離し、かつ骨髓細胞を含有する中間画分を回収する；ならびに、c) 再輸血可能な骨髓細胞の回復のための段階（b）からの回収画分の洗浄、を含む。

【0241】

D. 多能性幹細胞

本明細書において記載される組成物および方法に適した細胞は、造血幹細胞および前駆細胞であり得、インビトロで多能性幹細胞の分化からも調製され得る。一部の態様において、本明細書において記載される方法において用いられる細胞は、ATO内に直接播種される多能性幹細胞（胚性幹細胞または誘導多能性幹細胞）である。さらなる態様において、本明細書において記載される方法および組成物において用いられる細胞は、中胚葉前駆体、血管内皮前駆体、または造血前駆体などであるがそれらに限定されない、PSCの誘導体または子孫である。

【0242】

「多能性幹細胞」という用語は、3つすべての胚葉、つまり内胚葉、中胚葉、および外胚葉の細胞を生じさせ得る細胞を指す。理論上、多能性幹細胞は身体の任意の細胞に分化し得るが、多能性についての実験的判定は、典型的に、各胚葉のいくつかの細胞タイプへの多能性細胞の分化に基づく。一部の態様において、多能性幹細胞は、胚盤胞の内部細胞塊に由来する胚性幹（ES）細胞である。他の態様において、多能性幹細胞は、リプログラミング体細胞に由来する誘導多能性幹細胞である。ある特定の態様において、多能性幹細胞は、体細胞核移入に由来する胚性幹細胞である。

【0243】

胚性幹（ES）細胞は、胚盤胞の内部細胞塊に由来する多能性細胞である。ES細胞は、発生中の胚の外側の栄養外胚葉の層を除去し、次いで非成長細胞のフィーダー層上で内部細胞を培養することによって単離され得る。適当な条件下で、増殖性の未分化ES細胞のコロニーが産生される。コロニーは取り出され得、個々の細胞に解離され得、次いで新鮮なフィーダー層上に再プレーティングされ得る。再プレーティングされた細胞は増殖し続け得、未分化ES細胞の新たなコロニーが産生される。次いで、新たなコロニーは取り出され得、解離され得、再度再プレーティングされ得、かつ成長させられ得る。未分化ES細胞を「継代培養する」または「継代する」この過程を何度も繰り返して、未分化ES細胞を含有する細胞株を産生し得る（米国特許第5,843,780号；第6,200,806号；第7,029,913号）。

「初代細胞培養」とは、胚盤胞の内部細胞塊など、組織から直接得られた細胞の培養である。「継代培養」とは、初代細胞培養に由来する任意の培養である。

【0244】

マウスES細胞を得るための方法は周知である。1つの方法において、マウスの129系列由来の着床前胚盤胞を、マウス抗血清で処理して栄養外胚葉（trophoectoderm）を除去し、かつ内部細胞塊を、ウシ胎仔血清を含有する培地中にて、化学的に不活性化されたマウス

10

20

30

40

50

胎仔線維芽細胞のフィーダー細胞層上で培養する。発育する未分化ES細胞のコロニーを、ウシ胎仔血清の存在下でマウス胎仔線維芽細胞フィーダー層上で継代培養して、ES細胞の集団を産生する。一部の方法において、マウスES細胞は、血清含有培養培地にサイトカイン白血病阻害因子（LIF）を添加することによって、フィーダー層の非存在下で成長し得る（Smith, 2000）。他の方法において、マウスES細胞は、骨形成タンパク質およびLIFの存在下にて血清不含培地中で成長し得る（Ying et al., 2003）。

【0245】

ヒトES細胞は、以前に記載された方法を用いて、胚盤胞から得ることができる（Thomson et al., 1995; Thomson et al., 1998; Thomson and Marshall, 1998; Reubinoff et al., 2000）。1つの方法において、5日目のヒト胚盤胞をウサギ抗ヒト脾臓細胞抗血清に曝露し、次いで1:5希釈のモルモット補体に曝露して、栄養外胚葉細胞を溶解する。インタクトな内部細胞塊から溶解した栄養外胚葉細胞を除去した後、内部細胞塊を、ガンマ不活性化マウス胎仔線維芽細胞のフィーダー層上で、かつウシ胎仔血清の存在下で培養する。9～15日後、内部細胞塊に由来する細胞の凝集塊を化学的に（すなわち、トリプシンに曝露して）または機械的に解離し得、かつウシ胎仔血清を含有する新鮮な培地およびマウス胎仔線維芽細胞のフィーダー層に再プレーティングし得る。さらなる増殖があると、未分化形態学を有するコロニーを、マイクロピペットによって選択し、凝集塊に機械的に解離し、かつ再プレーティングする（米国特許第6,833,269号を参照されたい）。ES様形態学は、明らかに高い核対細胞質比および目立った核小体を有する小型コロニーとして特徴付けられる。結果として生じたES細胞は、短時間のトリプシン処理によって、またはマイクロピペットによる個々のコロニーの選択によってルーチン的に継代され得る。一部の方法において、ヒトES細胞は、塩基性線維芽細胞増殖因子の存在下にて線維芽細胞のフィーダー層上でES細胞を培養することによって、血清なしで成長し得る（Amit et al., 2000）。他の方法において、ヒトES細胞は、塩基性線維芽細胞増殖因子を含有する「馴化」培地の存在下にて、マトリゲル（商標）またはラミニンなどのタンパク質マトリックス上で細胞を培養することによって、フィーダー細胞層なしで成長し得る（Xu et al., 2001）。培地は、線維芽細胞と共培養することによって前もって馴化される。

【0246】

アカゲザルおよびコモンマーモセットES細胞の単離のための方法も公知である（Thomson, and Marshall, 1998; Thomson et al., 1995; Thomson and Odorico, 2000）。

【0247】

ES細胞の別の供給源は、確立されたES細胞株である。様々なマウス細胞株およびヒトES細胞株が公知であり、そしてそれらの成長および繁殖のための条件が規定されている。例えば、マウスCGR8細胞株は、マウス系列129胚の内部細胞塊から確立され、そしてCGR8細胞の培養物は、フィーダー層なしでLIFの存在下で成長し得る。さらなる例として、ヒトES細胞株H1、H7、H9、H13、およびH14はThompsonらによって確立された。加えて、H9株のサブクローンH9.1およびH9.2が開発されている。

【0248】

ES細胞の供給源は、胚盤胞、胚盤胞の内部細胞塊を培養することによって由来する細胞、または確立された細胞株の培養物から得られた細胞であり得る。ゆえに、本明細書において使用するとき、「ES細胞」という用語は、胚盤胞の内部細胞塊細胞、内部細胞塊の培養物から得られたES細胞、およびES細胞株の培養物から得られたES細胞を指し得る。

【0249】

誘導多能性幹（iPS）細胞は、ES細胞の特徴を有するが、分化した体細胞のリプログラミングによって得られる細胞である。誘導多能性幹細胞は、様々な方法によって得られている。1つの方法において、成体ヒト皮膚線維芽細胞に、レトロウイルス形質導入を用いて、転写因子Oct4、Sox2、c-Myc、およびKlf4をトランスフェクトする（Takahashi et al., 2007）。トランスフェクトされた細胞を、塩基性線維芽細胞増殖因子（bFGF）を補充した培地中でSNLフィーダー細胞（LIFを産生するマウス細胞線維芽細胞細胞株）上にプレーティングする。およそ25日後、ヒトES細胞コロニーに似たコロニーが培養下に現れる。

ES細胞様コロニーを選び、かつbFGFの存在下にてフィーダー細胞上で増殖させる。

【0250】

細胞特徴に基づき、ES細胞様コロニーの細胞は誘導多能性幹細胞である。誘導多能性幹細胞は、形態学的にヒトES細胞に類似しており、かつ様々なヒトES細胞マーカーを発現する。また、ヒトES細胞の分化をもたらすことが知られている条件下で成長させた場合、誘導多能性幹細胞はそれに応じて分化する。例えば、誘導多能性幹細胞は、神経構造および神経マーカーを有する細胞に分化し得る。

【0251】

別の方法において、ヒト胎児または新生児線維芽細胞に、レンチウイルス形質導入を用いて、4種の遺伝子Oct4、Sox2、Nanog、およびLin28をトランスフェクトする (Yu et al., 2007)。感染後12〜20日目に、ヒトES細胞形態学を有するコロニーが目に見えるようになる。コロニーを選んで増殖させる。コロニーを作り上げている誘導多能性幹細胞は、形態学的にヒトES細胞に類似しており、様々なヒトES細胞マーカーを発現し、かつマウスへの注射後、神経組織、軟骨、および腸上皮を有するテラトーマを形成する。

【0252】

マウスから誘導多能性幹細胞を調製する方法も公知である (Takahashi and Yamanaka, 2006)。iPS細胞の誘導は、典型的に、Soxファミリー由来の少なくとも1つのメンバー、およびOctファミリー由来の少なくとも1つのメンバーの発現またはそれらへの曝露を要する。SoxおよびOctは、ES細胞同一性を特定する転写調節階層の中心であると考えられる。例えば、Soxは、Sox-1、Sox-2、Sox-3、Sox-15、またはSox-18であり得；OctはOct-4であり得る。Nanog、Lin28、Klf4、またはc-Mycのような付加的因子は、リプログラミング効率を増加させ得；特異的セットのリプログラミング因子は、Sox-2、Oct-4、Nanog、および任意でLin-28を含むセット；または、Sox-2、Oct4、Klf、および任意でc-Mycを含むセットであり得る。

【0253】

IPS細胞は、ES細胞のように、SSEA-1、SSEA-3、およびSSEA-4 (Developmental Studies Hybridoma Bank、米国国立小児保健・人間発達研究所 (National Institute of Child Health and Human Development)、Bethesda Md.)、ならびにTRA-1-60およびTRA-1-81 (Andrews et al., 1987) に対する抗体を用いた、免疫組織化学またはフローサイトメトリーによって同定され得るまたは確認され得る特徴的な抗原を有する。胚性幹細胞の多能性は、8〜12週齢の雄SCIDマウスの後脚筋におよそ $0.5 \sim 10 \times 10^6$ 個の細胞を注射することによって確認され得る。三胚葉のそれぞれの少なくとも1種の細胞タイプを示すテラトーマが発生する。

【0254】

XI. 分化した細胞の遺伝子変更

ある特定の態様における細胞は、分化の前または後のいずれに、細胞の遺伝子操作によって1つまたは複数の遺伝子変更を含有するように作製され得る (US 2002/0168766)。外因性核酸もしくはポリヌクレオチドが、人工的操作の任意の適切な手段によって細胞内に移入されている場合、または細胞が、ポリヌクレオチドを受け継いでいる元の変更された細胞の子孫である場合、細胞は「遺伝子変更された」、「遺伝子改変された」、または「トランスジェニック」であると言われる。例えば、細胞は、それらが、制限された発生系統細胞にまたは最終分化した細胞に進行する前または後のいずれかに、テロメラーゼ逆転写酵素を発現するように細胞を遺伝子変更することによって、それらの複製潜在力を増加させるように加工され得る (US 2003/0022367)。

【0255】

ある特定の態様において、外因性核酸構築物を含有する細胞は、選択可能なまたはスクリーニング可能なマーカーなど、発現ベクター内にマーカーを含ませることによって、インビトロまたはインビボで同定され得る。そのようなマーカーは、発現ベクターを含有する細胞の容易な同定を可能にする同定可能な変化を細胞に付与する、または組織特異的プロモーターを用いることによって、分化した心臓細胞を富化するもしくは同定することを

10

20

30

40

50

助ける。例えば、心筋細胞分化の局面において、心臓トロポニンI (cTnI)、心臓トロポニンT (cTnT)、サルコメアミオシン重鎖 (MHC)、GATA-4、Nkx2.5、N-カドヘリン、 β 1-アドレナリン受容体、ANF、MEF-2ファミリーの転写因子、クレアチンキナーゼMB (CK-MB)、ミオグロビン、または心房性ナトリウム利尿因子 (ANF) のプロモーターなど、心臓特異的プロモーターが用いられ得る。神経分化の局面において、TuJ-1、Map-2、Dcx、またはシナプシンを含むがそれらに限定されない、神経特異的プロモーターが用いられ得る。肝細胞分化の局面において、ATT、Cyp3a4、ASGPR、FoxA2、HNF4a、またはAFPを含むがそれらに限定されない、決定的な内胚葉および/または肝細胞特異的プロモーターが用いられ得る。

【0256】

一般的に、選択可能なマーカーは、選択を可能にする特性を付与するものである。陽性選択可能なマーカーは、該マーカーの存在がその選択を可能にするものであり、一方で陰性選択可能なマーカーは、その存在がその選択を阻止するものである。陽性選択可能なマーカーの例は、薬物耐性マーカーである。

【0257】

薬物選択マーカーを含ませることは、通常、形質転換体のクローニングおよび同定に役立ち、例えばブラストサイジン、ネオマイシン、ピューロマイシン、ハイグロマイシン、DHFR、GPT、ゼオシン、およびヒスチジノールに対する耐性を付与する遺伝子は、有用な選択可能なマーカーである。条件の履行に基づいて形質転換体の識別を可能にする表現型を付与するマーカーに加えて、その基礎が比色分析であるGFPなどのスクリーニング可能なマーカーを含めた、他のタイプのマーカーも企図される。あるいは、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ (CAT) などのスクリーニング可能な酵素が利用され得る。当業者であれば、おそらくFACS分析と併せて、どのように免疫学的マーカーを採用するかも知っているであろう。用いられるマーカーは、それが、遺伝子産物をコードする核酸と同時に発現され得る限り、重要でないと考えられる。選択可能なおよびスクリーニング可能なマーカーのさらなる例は、当業者に周知である。

【0258】

XII. 疾患および病状の治療

そのような障害に対して検査で陽性と出ている個体、障害の1つもしくは複数の症状を有する個体、またはそのような病状もしくは関連する病状を発症する危険性があると思われる個体に対して、方法が採用され得る。一部の態様において、本明細書において記載される組成物および方法を用いて、本明細書において列挙されるおよび/または当技術分野において公知の障害の炎症性または自己免疫性構成要素を治療する。

【0259】

本開示のある特定の局面は、がんの治療および/またはがん抗原の使用に関する。治療される対象となるがんまたは抗原は、当技術分野において公知の任意のがん、または例えば上皮癌、(例えば、乳房、消化管、肺)、前立腺癌、膀胱癌、肺(例えば、小細胞肺癌、結腸癌、卵巣癌、脳がん、胃癌、腎細胞癌腫、膵臓癌、肝臓癌、食道癌、頭頸部癌、または結腸直腸癌と関連した抗原であり得る。一部の態様において、治療される対象となるがんまたは抗原は、以下のがんのうちの1つ由来のものである：副腎皮質癌腫、原因不明の骨髓様化生、AIDS関連のがん(例えば、AIDS関連のリンパ腫)、肛門癌、虫垂癌、星細胞腫(例えば、小脳および大脳)、基底細胞癌腫、胆管癌(例えば、肝外)、膀胱癌、骨がん、(骨肉腫および悪性線維性組織球腫)、脳腫瘍(例えば、神経膠腫、脳幹神経膠腫、小脳または大脳星細胞腫(例えば、毛様細胞性星細胞腫、びまん性星細胞腫、退形成性(悪性)星細胞腫)、悪性神経膠腫、上衣腫、乏突起膠腫(oligodenglioma)、髄膜腫、髄膜肉腫、頭蓋咽頭腫、血管芽腫、髄芽腫、テント上原始神経外胚葉腫瘍、視経路および視床下部神経膠腫、ならびに神経膠芽腫)、乳癌、気管支腺腫/カルチノイド、カルチノイド腫瘍(例えば、消化管カルチノイド腫瘍)、原発不明の癌腫、中枢神経系リンパ腫、子宮頸癌、結腸癌、結腸直腸癌、慢性骨髓増殖性障害、子宮内膜癌(例えば、子宮癌)、上衣腫、食道癌、ユーイングファミリーの腫瘍、眼がん(例えば、眼内黒色腫および網

10

20

30

40

50

膜芽細胞腫)、胆嚢癌、胃腸(胃)癌、消化管カルチノイド腫瘍、消化管間質腫瘍(GIST)、胚細胞腫瘍(例えば、頭蓋外、性腺外、卵巣)、妊娠性絨毛性腫瘍、頭頸部癌、肝細胞(肝臓)癌(例えば、肝臓癌腫および肝細胞癌(heptoma))、下咽頭癌、膵島細胞癌腫(内分泌膵臓)、咽頭部癌、咽頭部癌、白血病、口唇および口腔癌、口内癌、肝臓癌、肺癌(例えば、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、肺の腺癌、および肺の扁平上皮癌)、リンパ系新生物(例えば、リンパ腫)、髄芽腫、卵巣癌、中皮腫、転移性扁平上皮性頸部癌、口癌、多発性内分泌腺腫症候群、骨髄異形成症候群、骨髄異形成性/骨髄増殖性疾患、鼻腔および副鼻腔癌、鼻咽頭癌、神経芽細胞腫、神経内分泌癌、口腔咽頭癌、卵巣癌(例えば、上皮性卵巣癌、卵巣胚細胞腫瘍、卵巣低悪性度腫瘍)、膵臓癌、副甲状腺癌、陰茎癌、腹膜の癌、咽頭癌、褐色細胞腫、松果体芽細胞腫およびテント上原始神経外胚葉腫瘍、下垂体腺腫、胸膜肺芽腫、リンパ腫、原発性中枢神経系リンパ腫(小膠細胞腫)、肺リンパ管筋腫症、直腸癌、腎臓癌、腎盂および尿管癌(移行細胞癌)、横紋筋肉腫、唾液腺癌、皮膚癌(例えば、非黒色腫(例えば、扁平上皮細胞癌腫)、黒色腫、およびメルケル細胞癌腫)、小腸癌、扁平上皮細胞癌、精巣癌、咽喉癌、胸腺腫および胸腺癌腫、甲状腺癌、結節性硬化症、尿道癌、陰癌、外陰癌、ウィルムス腫瘍、および移植後リンパ増殖性障害(PTLD)、母斑症に伴う異常血管増殖、浮腫(脳腫瘍に伴うものなど)、またはメーグス症候群。

10

【0260】

本開示のある特定の局面は、自己免疫病状の治療および/または自己免疫関連抗原の使用に関する。治療される対象となる自己免疫疾患または抗原は、当技術分野において公知の任意の自己免疫病状、または例えば糖尿病、移植片拒絶、GVHC、関節炎(急性関節炎、慢性関節リウマチ、痛風または通風性関節炎、急性通風性関節炎、急性免疫学的関節炎、慢性炎症性関節炎、変性性関節炎、II型コラーゲン誘発性関節炎、感染性関節炎、ライム関節炎、増殖性関節炎、乾癬性関節炎、スティル病、脊椎関節炎、および若年発症型関節リウマチなどの関節リウマチ、骨関節炎、慢性進行性関節炎(arthritis chronica progrediente)、変形性関節炎、原発性慢性多発性関節炎(polyarthrititis chronica primaria)、反応性関節炎、ならびに強直性脊椎炎)、炎症性過剰増殖性皮膚疾患、尋常性乾癬、滴状(gutatte)乾癬、膿疱性乾癬、および爪の乾癬などの乾癬、枯草熱およびヨブ症候群などのアトピー性疾患を含めたアトピー、接触皮膚炎、慢性接触皮膚炎、剥脱性皮膚炎、アレルギー性皮膚炎、アレルギー性接触皮膚炎、疱疹状皮膚炎、貨幣状皮膚炎、脂漏性皮膚炎、非特異的皮膚炎、一次刺激性接触皮膚炎、およびアトピー性皮膚炎を含めた皮膚炎、x連鎖高IgM症候群、アレルギー性眼内炎症性疾患、慢性自己免疫蕁麻疹を含めた慢性アレルギー性蕁麻疹および慢性特発性蕁麻疹などの蕁麻疹、筋炎、多発性筋炎/皮膚筋炎、若年性皮膚筋炎、中毒性表皮壊死症、強皮症(全身性強皮症を含む)、全身性硬化症などの硬化症、脊髄-視覚(spino-optical)MS、一次進行型MS(PPMS)、および再発寛解型MS(RRMS)などの多発性硬化症(MS)、全身性進行性硬化症、アテローム性動脈硬化症、動脈硬化症、播種性硬化症、失調性硬化症、視神経脊髄炎(NMO)、炎症性腸疾患(IBD)(例えば、クローン病、自己免疫仲介性消化管疾患、潰瘍性結腸炎(ulcerative colitis)、潰瘍性結腸炎(colitis ulcerosa)、顕微鏡的結腸炎、コラーゲン蓄積結腸炎、ポリープ性結腸炎、壊死性全腸炎、および貫壁性結腸炎などの結腸炎、ならびに自己免疫性炎症性腸疾患)、腸炎、壊疽性膿皮症、結節性紅斑、原発性硬化性胆管炎、成人または急性呼吸窮迫症候群(ARDS)を含めた呼吸窮迫症候群、髄膜炎、ブドウ膜のすべてまたは一部の炎症、虹彩炎、脈絡膜炎、自己免疫性血液障害、リウマチ性脊椎炎、リウマチ性滑膜炎、遺伝性血管性浮腫、髄膜炎に見られる脳神経損傷、妊娠性疱疹、妊娠性類天疱瘡、陰囊搔痒、自己免疫性早発卵巣不全、自己免疫病状による突発性聴力喪失、アナフィラキシーならびにアレルギー性およびアトピー性鼻炎などのIgE仲介性疾患、ラスムッセン脳炎ならびに辺縁系および/または脳幹脳炎などの脳炎、前部ブドウ膜炎、急性前部ブドウ膜炎、肉芽腫性ブドウ膜炎、非肉芽腫性ブドウ膜炎、水晶体抗原性(phacoantigenic)ブドウ膜炎、後部ブドウ膜炎、または自己免疫性ブドウ膜炎などのブドウ膜炎、原発性GN、免疫仲介性GN、膜性GN(膜性腎症)、特発性膜性GNまたは特発性膜性腎症、I型およびII型を

20

30

40

50

含めた膜性または膜状増殖性GN (MPGN)、ならびに急速進行性GNなどの慢性または急性糸球体腎炎など、ネフローゼ症候群を有するおよび有しない糸球体腎炎 (GN)、増殖性腎炎、自己免疫性多腺性内分泌不全、形質細胞限局性亀頭炎を含めた亀頭炎、亀頭包皮炎、遠心性環状紅斑、色素異常性固定性紅斑、多形性紅斑、環状肉芽腫、光沢苔癬、硬化性萎縮性苔癬、慢性単純性苔癬、棘状苔癬、扁平苔癬、葉状魚鱗癬、表皮剥離性角質増殖症、前癌性角化症、壊疽性膿皮症、アレルギー性の病状および応答、アレルギー反応、アレルギー性またはアトピー性湿疹、皮脂欠乏性湿疹、汗疱状湿疹、および水疱性掌蹠湿疹を含めた湿疹、気管支喘息 (asthma bronchiale)、気管支喘息 (bronchial asthma)、および自己免疫性喘息などの喘息、T細胞の浸潤および慢性炎症性応答に伴う病状、妊娠中の胎児A-B-O血液型など外来種抗原に対する免疫反応、慢性肺炎症性疾患、自己免疫性心筋炎、白血球粘着不全症、ループス腎炎、ループス脳炎、小児ループス、非腎性ループス、腎外ループス、円板状ループスおよび円板状エリテマトーデス、脱毛性ループス (alopecia lupus)、皮膚SLEまたは亜急性皮膚SLEなどの全身性エリテマトーデス (SLE)、新生児ループス症候群 (NLE)、ならびに播種性紅斑性狼瘡を含めたループス、小児インスリン依存性糖尿病 (IDDM) を含めた若年発症型 (I型) 糖尿病、および成人発症型糖尿病 (II型糖尿病)、および自己免疫性糖尿病に関連した抗原であり得る。サイトカインおよびTリンパ球によって仲介される急性および遅延型過敏症に関連した免疫応答、サルコイドーシス、リンパ腫様肉芽腫症、ウェゲナー肉芽腫症を含めた肉芽腫症、無顆粒球症、脈管炎、大型脈管炎 (リウマチ性多発筋痛症および巨細胞性 (高安) 動脈炎を含む)、中型脈管炎 (川崎病および結節性多発動脈炎/結節性動脈周囲炎を含む)、顕微鏡的多発動脈炎、免疫性脈管炎、CNS脈管炎、皮膚脈管炎、過敏性脈管炎、全身性壊死性脈管炎などの壊死性脈管炎、ならびにチャグ・ストラウス脈管炎または症候群 (CSS) およびANCA関連小型脈管炎などのANCA関連脈管炎を含めた脈管炎、側頭動脈炎、再生不良性貧血、自己免疫性再生不良性貧血、クームス陽性貧血、ダイヤモンド・ブラックファン貧血、溶血性貧血、または自己免疫性溶血性貧血 (AIHA) を含めた免疫性溶血性貧血、アジソン病、自己免疫性好中球減少症、汎血球減少症、白血球減少症、白血球漏出を伴う疾患、CNS炎症性障害、アルツハイマー病、パーキンソン病、敗血症 (septicemia) に続発するものなどの多臓器傷害症候群、外傷または出血、抗原-抗体複合体仲介性疾患、抗糸球体基底膜疾患、抗リン脂質抗体症候群、アレルギー性神経炎、ベーチェット病/症候群、キャッスルマン症候群、グッドパスチャー症候群、レイノー (Reynaud's) 症候群、シェーグレン症候群、スティーブンス・ジョンソン症候群、水疱性類天疱瘡および皮膚類天疱瘡などの類天疱瘡、天疱瘡 (尋常性天疱瘡、落葉性天疱瘡、粘膜類天疱瘡性天疱瘡、および紅斑性天疱瘡を含む)、自己免疫性多腺性内分泌障害、ライター病または症候群、熱傷、妊娠高血圧腎症、免疫複合体腎炎などの免疫複合体障害、抗体仲介性腎炎、多発性ニューロパチー、IgM多発性ニューロパチーまたはIgM仲介性ニューロパチーなどの慢性ニューロパチー、慢性または急性ITPを含めた特発性血小板減少症紫斑病 (ITP) などの自己免疫性または免疫仲介性血小板減少症、特発性角強膜炎 (cerato-scleritis) などの強膜炎、上強膜炎、自己免疫性精巣炎および卵巣炎を含めた精巣および卵巣の自己免疫性疾患、原発性甲状腺機能低下症、副甲状腺機能低下症、自己免疫性甲状腺炎、橋本病、慢性甲状腺炎 (橋本甲状腺炎)、または亜急性甲状腺炎などの甲状腺炎を含めた自己免疫性内分泌疾患、自己免疫性甲状腺疾患、特発性甲状腺機能低下症、グレーブス病、自己免疫性多腺性症候群 (または多腺性内分泌障害症候群) などの多腺性症候群、ランバート・イートン筋無力症候群またはイートン・ランバート症候群などの神経学的腫瘍随伴症候群を含めた腫瘍随伴症候群、スティッフマンまたはスティッフパーソン症候群、アレルギー性脳脊髄炎 (allergic encephalomyelitis) またはアレルギー性脳脊髄炎 (encephalomyelitis allergica) および実験的アレルギー性脳脊髄炎 (EAE)、実験的自己免疫性脳脊髄炎などの脳脊髄炎、胸腺腫関連重症筋無力症などの重症筋無力症、小脳変性症、神経性筋緊張病、オプソクロノスまたはオプソクロノス・ミオクロノス症候群 (OMS)、および感覚性ニューロパチー、多巣性運動ニューロパチー、シーハン症候群、自己免疫性肝炎、慢性肝炎、ルポイド肝炎、巨細胞性肝炎、慢性活動性肝炎または自己免疫性慢性活動性肝炎、リンパ性間質性

10

20

30

40

50

肺炎 (pneumonitis) (LIP)、閉塞性細気管支炎 (非移植性) 対NSIP、ギラン・バレー症候群、ベルガー病 (IgA腎症)、特発性IgA腎症、線状IgA皮膚症、急性熱性好中球皮膚症、角層下膿疱症、一過性棘融解性皮膚症、原発性胆汁性肝硬変および肺硬変などの肝硬変、自己免疫性腸症候群、セリアックまたはシリアック病、セリアックスプルー (グルテン性腸症)、難治性スプルー、特発性スプルー、クリオグロブリン血症、筋萎縮性 (amyotrophic) 側索硬化症 (ALS; ルー・ゲーリック病)、冠動脈疾患、自己免疫性内耳疾患 (AIED) などの自己免疫性耳疾患、自己免疫性聴力喪失、難治性または再発した (relapsed) もしくは再発中の (relapsing) 多発軟骨炎などの多発軟骨炎、肺胞蛋白症、コーガン症候群/非梅毒性間質性角膜炎、ベル麻痺、スウィート病/症候群、酒さ性自己免疫、帯状疱疹 (zoster) に伴う疼痛、アミロイドーシス、非がん性リンパ球増加症、単クローン性B細胞リンパ球増加症 (例えば、良性単クローン性免疫グロブリン血症および意義不明の単クローン性免疫グロブリン血症、MGUS) を含む原発性リンパ球増加症、末梢ニューロパチー、腫瘍随伴症候群、てんかん、片頭痛、不整脈、筋障害、難聴、失明、周期性四肢麻痺、およびCNSのチャネル病などのチャネル病、自閉症、炎症性ミオパチー、巣状または分節性または巣状分節性の糸球体硬化症 (FSGS)、内分泌性眼症 (ophthalmopathy)、ブドウ膜網膜炎、網脈絡膜炎、自己免疫性肝臓病学的障害、線維筋痛症、多発性内分泌不全、シュミット症候群、副腎炎、胃萎縮症、初老期認知症、自己免疫性脱髄疾患および慢性炎症性脱髄性多発性ニューロパチーなどの脱髄疾患、ドレスラー症候群、円形脱毛症 (alopecia areata)、全頭脱毛症、CREST症候群 (石灰沈着症、レイノー現象、食道運動障害、手指硬化症 (sclerodactyl)、および毛細血管拡張症)、例えば抗精子抗体による、雄性および雌性自己免疫性不妊症、混合性結合組織疾患、シャーガス病、リウマチ熱、反復流産、農夫肺、多形性紅斑、開心術後症候群、クッシング症候群、愛鳥家肺、アレルギー性肉芽腫性血管炎、良性リンパ球性血管炎、アルポート症候群、アレルギー性肺炎および線維化性肺炎などの肺炎、間質性肺疾患、輸血反応、ハンセン病、マラリア、リーシュマニア症、キパノソミアシス (kypanosomiasis)、住血吸虫症、回虫症などの寄生虫疾患、アスペルギルス症、サムター (Sampter's) 症候群、カプラン症候群、デング熱、心内膜炎、心内膜心筋線維症、びまん性間質性肺線維症、間質性肺線維症、肺線維症、特発性肺線維症、嚢胞性線維症、眼内炎、持久性隆起性紅斑 (erythema elevatum et durum)、胎児赤芽球症、好酸球性筋膜炎 (faciitis)、シュルマン症候群、フェルティ症候群、フィラリア症 (filariasis)、慢性毛様体炎、異時性 (heterochronic) 毛様体炎、虹彩毛様体炎 (急性または慢性)、またはフックス (Fuch's) 毛様体炎などの毛様体炎、ヘノッホ・シェーンライン紫斑病、ヒト免疫不全ウイルス (HIV) 感染症、SCID、後天性免疫不全症候群 (AIDS)、エコーウイルス感染症、敗血症 (sepsis)、内毒素血症、膵炎、甲状腺中毒症 (thyrotoxicosis)、パルボウイルス感染症、風疹ウイルス感染症、ワクチン接種後症候群、先天性風疹感染症、エプスタイン・バーウイルス感染症、流行性耳下腺炎、エバンス (Evan's) 症候群、自己免疫性性腺機能不全、シデナム舞踏病、レンサ球菌感染後腎炎、閉鎖性血栓性血管炎 (thromboangitis obliterans)、甲状腺機能亢進症、脊髄瘍、脈絡膜炎、巨細胞性多発筋痛症、慢性過敏性肺炎、乾性角結膜炎、流行性角結膜炎、特発性腎炎症候群、微小変化ネフロパシー、良性家族性および虚血再灌流傷害、移植臓器再灌流、自己免疫性網膜炎、関節炎、気管支炎、慢性閉塞性気道/肺疾患、珪肺症、アフタ、アフタ性口内炎、動脈硬化性障害、アスペルニオゲネシス (asperniogenesis)、自己免疫性溶血、ベック病、クリオグロブリン血症、デュピュイトラン拘縮、水晶体過敏性眼内炎 (endophthalmitis phacoanaphylactica)、アレルギー性腸炎、癩性結節性紅斑、特発性顔面麻痺、慢性疲労症候群、リウマチ性熱病、ハンマン・リッチ病、感音性 (sensoneural) 聴力喪失、発作性ヘモグロビン尿症 (haemoglobinuria paroxysmatica)、性腺機能低下症、限局性回腸炎 (ileitis regionalis)、白血球減少症、伝染性単核球症 (mononucleosis infectiosa)、横断性 (transverse) 脊髄炎、原発性特発性粘液水腫、ネフローゼ、交感性眼炎 (ophthalmia sympathica)、肉芽腫性精巣炎、膵炎、急性多発性神経根炎、壊疽性膿皮症、ケルヴァン甲状腺炎 (thyreoiditis)、後天性脾臓萎縮症、非悪性胸腺腫、白斑、毒素性ショック症候群、食中毒、T細胞の浸潤に伴う病状、白血球粘着不

10

20

30

40

50

全症、サイトカインおよびTリンパ球によって仲介される急性および遅延型過敏症と関連した免疫応答、白血球漏出を伴う疾患、多臓器傷害症候群、抗原-抗体複合体仲介性疾患、抗糸球体基底膜疾患、アレルギー性神経炎、自己免疫性多腺性内分泌障害、卵巣炎、原発性粘液水腫、自己免疫性萎縮性胃炎、交感性眼炎、リウマチ性疾患、混合性結合組織疾患、ネフローゼ症候群、脾臓炎、多内分泌腺不全、自己免疫性多腺性症候群I型、成人発症型特発性副甲状腺機能低下症（AOIH）、拡張型心筋症などの心筋症、後天性表皮（epidermolysis）水疱症（EBA）、ヘモクロマトーシス、心筋炎、ネフローゼ症候群、原発性硬化性胆管炎、化膿性または非化膿性副鼻腔炎、急性または慢性副鼻腔炎、篩骨洞炎、前頭洞炎、上顎洞炎、または蝶形骨洞炎、好酸球増多症、肺浸潤性好酸球増多症、好酸球増多筋痛症候群、レフラー（Löffler's）症候群、慢性好酸球性肺炎（pneumonia）、熱帯性肺好酸球増多症、気管支肺アスペルギルス症、アスペルギルス腫、または好酸球含有肉芽腫などの好酸球関連障害、アナフィラキシー、血清反応陰性脊椎関節炎（spondyloarthritides）、多内分泌腺自己免疫疾患、硬化性胆管炎、強膜、上強膜、慢性粘膜皮膚カンジダ症、ブルトン症候群、一過性乳児低ガンマグロブリン血症、ウィスコット・アルドリッチ症候群、毛細血管拡張性運動失調症候群、血管拡張症、膠原病と関連した自己免疫障害、リウマチ、神経学的疾患、リンパ節炎、血圧応答の低下、血管機能不全、組織傷害、心血管虚血、痛覚過敏、腎虚血、脳虚血、および血管新生を伴う疾患、アレルギー性過敏性障害、糸球体腎炎、再灌流傷害、虚血再灌流障害、心筋または他の組織の再灌流傷害、リンパ腫様気管支炎、炎症性皮膚症、急性炎症性構成要素による皮膚症、多臓器不全、水疱性疾患、腎皮質壊死、急性化膿性髄膜炎または他の中枢神経系炎症性障害、眼および眼窩の炎症性障害、顆粒球輸血関連症候群、サイトカイン誘導性毒性、ナルコレプシー、急性重症炎症、慢性難治性炎症、腎盂炎、動脈内過形成、消化性潰瘍、弁膜炎、移植片対宿主疾患、接触過敏症、喘息性気道過反応、ならびに子宮内膜症も企図される。

【0261】

さらなる局面は、微生物感染症の治療もしくは阻止、および/または微生物抗原の使用に関する。治療されるもしくは阻止される対象となる微生物感染症または抗原は、当技術分野において公知の任意の微生物感染症、または例えば炭疽病、子宮頸癌（ヒトパピローマウイルス）、ジフテリア、A型肝炎、B型肝炎、ヘモフィルス・インフルエンザb型（Hib）、ヒトパピローマウイルス（HPV）、インフルエンザ（Flu）、日本脳炎（JE）、ライム病、麻疹、髄膜炎（meningococcal）、サル痘、流行性耳下腺炎、百日咳、肺炎（pneumococcal）、ポリオ、狂犬病、ロタウイルス、風疹、帯状疱疹（shingles）（帯状ヘルペス）、天然痘、破傷風、腸チフス、結核（TB）、水痘（水疱瘡）、および黄熱と関連した抗原であり得る。

【0262】

一部の態様において、方法および組成物は、個体にワクチン接種して感染症を阻止するためのものであり得る。

【実施例】

【0263】

XIII. 実施例

以下の実施例は、本発明の好ましい態様を実証するために含まれる。後に続く実施例において開示される技法は、本発明の実践において十分に機能することを本発明者によって発見された技法であり、ゆえにその実践のための好ましい形式をなすと考えられ得ることは、当業者によって解されるべきである。しかしながら、当業者であれば、本開示に照らして、本発明の精神および範囲から逸脱することなく、多くの変化が、開示される具体的な態様においてもたらされ得、かつなおも同様または類似の結果を達成し得ることを解するべきである。

【0264】

実施例1—T細胞を産生するための3Dオルガノイドシステムの開発

ヒトT細胞発生のためのすぐに使える3Dオルガノイドシステムの開発—目標は、OP9-DL1システムによって例示される、Notchリガンドを形質導入された間質細胞株の可能性を高

めて、T細胞の分化および選択における3D相互作用の役割を調べるための標準化された人工胸腺オルガノイドシステムを開発することであった。しかしながら、OP9-DL1細胞は、長期培養下で安定ではなく、T支持潜在力を維持しかつ脂質生成形質転換を阻止するために数日ごとに細胞変化を要する。3D培養物は数週間安定であることを要されるため、長期にわたるインタクトな培養物を可能にするであろう培養および細胞構成要素を同定することが求められた。さらに、OP9-DL1システムの効力は、ウシ胎仔血清（FCS）ロットの生物学的変動に対して非常に感受性が高く、ゆえに本発明者らは、T細胞分化を再現可能に支持し得る血清不含培養条件も同定しようとした。

【0265】

血清不含B27サプリメント、FLT3L、IL-7、およびアスコルビン酸を補充したRPMI（以後、RB27）は、標準的血清条件と同程度にOP9-DL1システム内でのT細胞分化を促したが、間質細胞生存率および造血細胞増殖は低いことが見出された。対照的に、MS-5マウス骨髓間質細胞株は、RB27中での長期生存率を保持するが、予想どおり、T細胞分化を支持しなかった。それゆえ、本発明者らは、MS-5細胞に全長ヒトDLL1 cDNAを形質導入して（以後、MS5-hDLL1）、RB27中での長期安定性を有するT支持株を作出した。DLL1は、それが、ヒト胸腺において発現される生理学的関連Notchリガンドであることが示されているため、DLL1にわたって選択された。これらの条件におけるT細胞分化を検査するために、臍帯血（CB）CD34+HSPCを、FACSによりCD3+細胞枯渇し、かつMS5-hDLL1単層上に播種した。血清不含RB27中でのMS5-hDLL1共培養は、T系統コミットメントおよびCB HSPCからの初期T細胞分化を支持した。造血系増殖は、標準的培地条件でのOP9-DL1システム上と比較して、RB27中

【0266】

次に、本発明者らは、MS5-hDLL1/血清不含RB27を用いて、標準化された3D人工胸腺オルガノイド（ATO）システムを作製した。ATOを作製するために、MS5-hDLL1細胞を、T細胞枯渇したヒト臍帯血（CB）CD34+ HSPCとともに凝集させた。入手可能性および再現性を最大限に高めるために、本発明者らは、専売の足場材料または外因性ECMの使用を回避し、その代わりにマウス再凝集胸腺器官培養物（RTOC）から適応させた遠心分離再凝集手法を用いた。RTOCからのデータは、空気-流体界面培養がT細胞発生を増強することも実証しているように、ATOを市販の0.4μmトランスウェルインサート上に配備し、その底は培地との接触が、上端は空気との接触が可能になった。新たな間質層への造血細胞の連続的移動を要する単層共培養とは異なり、ATOは、インサート周辺からの週2回の培地およびサイトカインの交換である唯一の介入を有して、最高10週間インタクトな状態で培養された。いったん配備されると、ATOは、密着した3D構造を形成した。ATOは、2週目までに光学顕微鏡下で非常に細胞密度が高く、かつ10週目を通じて外見は安定したままであった。一部の態様において、構造は封入される。

【0267】

CB CD34+ CD3- HSPCで開始されたATOは、OP9-DL1またはMS5-DLL1単層共培養物と比較して、T系統分化の加速した動態を明らかにした。2週目のATOにおけるT系統コミットメントは、TコミットしたCD34+ CD1a+ CD7+初期胸腺前駆体（ETP）表現型、ならびに重複するプロ-T1およびプロ-T2表現型の明瞭な出現を特徴とした。予期されるとおり、CD34+ CD1a+ CD7+ ETPステージを越えたT細胞分化は、親MS-5細胞株で作製されたオルガノイドにおいては観察されず、それはその代わりに骨髓およびB細胞発生を支持した。ATO内で、CD34- CD7+ CD5+ CD4- CD8-（「ダブルネガティブ」、DN）T細胞前駆体は、2週目の時点で細胞の大多数となったが、その後、CD7+ CD4+ CD3-未成熟シングルポジティブ（ISP）およびCD4+ CD8+ダブルポジティブ（DP）集団の相互増加とともに減少した。まとめると、ATOにおける初期T細胞分化は、天然ヒト胸腺のものと整然とかつ厳密に似ていた。

【0268】

次に、本発明者らは、ATO内での β 選択および陽性選択の効率を検討した。ATO DP先駆体は、早くも2週目にCD3およびTCR $\alpha\beta$ の表面発現を示し、それは、6週目を通じて増加し、 β 選択の通過の成功を示した。ATOにおけるCD3+ TCR $\alpha\beta$ + DP細胞の頻度は、ヒト胸腺のものに匹敵し、その両方とも、OP9-DL1およびMS5-hDLL1単層培養物と比較して高かった。重要なことには、成熟したCD3+ TCR $\alpha\beta$ + CD8+およびCD4+シングルポジティブ (SP) T細胞は、4週目までにATOに出現し、7週目を通じて頻度が増加し、ATOにおける機能的陽性選択と一致した。7週目のATOにおけるCD3+ TCR $\alpha\beta$ + CD8+およびCD4+ SP細胞の頻度は、それぞれ、標本が合致したOP9-DL1およびMS5-hDLL1単層共培養物においてよりも高かった。CD3+ TCR $\alpha\beta$ + CD8+およびCD4+ SP細胞の両方がATOにおいて観察されたものの、CD4+細胞に対するCD8+細胞の比率は、ヒト胸腺においてもよりも高く、ATOにおける陽性選択されたCD8+細胞の相対的優越性を示した。最後に、CD3+ TCR $\gamma\delta$ +細胞は、ATOにおいて容易に同定され、かつ胸腺においてと同様に大部分がCD8- CD4-であった。まとめると、これらのデータは、ATOが、単層共培養システムと比較して、迅速でかつ堅牢なT細胞分化、および成熟ヒトT細胞の大幅に改善された陽性選択を促すことを実証している。

【0269】

ATOにおけるTCR多様性および機能的ナイーブT細胞の生成一次に、本発明者らは、ATOにおいて生成されたT細胞が多様なTCRを発現し、かつ機能的に成熟していることを検査した。ATOにおいて生成されたCD3+ CD8 SP T細胞内で、TCR V β 鎖セグメント使用法についてのフローサイトメトリー分析は、ヒト胸腺から単離されたCD8 SP細胞のものに匹敵する分布を明らかにし、多様な多クローン性TCRレパートリーと一致した。ATO由来CD3+ TCR $\alpha\beta$ + SP T細胞も、CD45ROの下方調節、ならびにCD45RA、CD27、およびCCR7の上方調節に基づく成熟ナイーブの表現型を示した。留意すべきことに、CD3+ TCR $\alpha\beta$ + CD8およびCD4 SP細胞の両方のサブセットは、CD45RO+ CD45RA-であったが、これらは、CD45ROと同様に、胸腺内成熟の間および胸腺移出 (egress) の前に下方調節されるCD1aのそれらの発現が理由で、メモリーT細胞よりもむしろ、DP先駆体から出現した未成熟T細胞として同定された。次に、本発明者らは、抗原刺激に応答して活性化およびクローン増殖され得るATO由来T細胞の能力を検査した。予期されるとおり、精製されたATO由来CD8 SP T細胞は、TCRシグナル伝達模倣体PMA/イオノマイシンに応答してインターフェロンガンマ (IFN γ) を発現し、かつCFSE希釈およびCD25の上方調節によって実証されるように、CD3/28ライゲーションおよびIL-2に応答して活性化誘導性増殖を受けた。ゆえに、ATOは、多様なTCRレパートリーを有する機能的ナイーブT細胞を生成し得た。

【0270】

複数種の造血組織からのT細胞の生成以前への報告は、動員末梢血を含めたHSPCの成体供給源からのT細胞発生は、OP9-DL1システム内で非常に非効率的であることを示している。逆に、T細胞発生は、それぞれ高頻度のリンパ球コミットしたおよびT細胞コミットした前駆体が理由で、CBおよび出生後胸腺から単離されたCD34+ HSPCから特に効率的であり得る。それゆえ、本発明者らは、末梢血、G-CSF動員末梢血、および定常状態の成体骨髄から単離された精製CD34+ HSPCからのT細胞発生を支持し得るATOの能力を検査した。本発明者らは、ATOにおけるT細胞発生は、臍帯血と同程度の効率を有して、分析されたすべての供給源から進み、かつ同程度の数の成熟CD4+およびCD8+ T細胞をもたらすことを見出した。さらに、臍帯血、骨髄、および動員末梢血由来の、造血幹細胞について高度に富化されている精製CD34+ Lin- CD38- CD45RA- HSPCは、同程度の効率でT細胞を生成した。ゆえに、ATOは、HSPCの臨床的に関連する供給源からの (form) 発生を可能にし、かつ複数種の幹細胞および前駆細胞タイプからのT系統潜在性およびT細胞分化を調べるための貴重な調査的ツールとしての役割も果たし得る。

【0271】

ATOの構造的局面一次に、本発明者らは、ATOにおけるT細胞分化の構造的局面を検討した。2~6週目の間のATOの一連のヘマトキシリンおよびエオシン (H&E) 切片は、小型でかつ細胞組織様の体系化を実証した。CD3についての免疫蛍光染色は、CD3+細胞が、ATOの優先的に外側縁で高密度クラスターを形成することを実証した。ゆえに、ATOにおけるT細胞

発生は、多数の造血細胞間での細胞-細胞接触を促す細胞構築内で生じ、ヒト胸腺内での条件に似ている。

【0272】

ATOにおける改変された抗原特異的T細胞の分化および対立遺伝子排除—がん関連複合体またはウイルスペプチド-MHC (pMHC) 複合体に対する特異性を有するTCRの、末梢血T細胞における強制発現は、抗腫瘍および抗ウイルス免疫療法への有望な手法である。HSPCからの抗原特異的T細胞のデノボ生成は、末梢T細胞のTCR形質導入を上回る、安全性および効力において重大な利点を提供し得る。機能的T細胞がATOにおいて生成されたため、本発明者らは、CD34+ HSPCからTCR改変された抗原特異的T細胞を生成し得る能力についてシステムを検査した。

10

【0273】

健常ドナー由来の臍帯血CD34+ HSPCに、HLA-A*0201によって提示される癌関連NY-ESO-1_{157~165}ペプチドに特異的な以前に特徴付けされたレンチウイルスTCR α β 構築物を形質導入した。ATOにおける抗原特異的細胞の分化を、HLA-A*0201/NY-ESO-1_{157~165}四量体、および形質導入されたV β 13.1セグメントに対する抗体を用いてモニターした。ATOにおいて、3週目における初回分析の時点で四量体陽性細胞の明瞭な分化があり、そのすべては、V β 13.1および表面CD3に対して陽性であった。興味深いことに、CD3および形質導入されたTCRの共発現は、最初、CD34- CD7+ CD5+ DN細胞ならびにCD4 ISP様およびDP様T細胞先駆体において見られたが、4~6週目から、次第にDPおよびCD8 SP集団に限られた。これは、機能的TCRの存在下におけるDNステージでの β 選択の迂回、それに続く比較的保たれた分化および適当なMHCクラスIに拘束された陽性選択と一致した。対照的に、対照ATO由来のモック形質導入細胞は、その後にCD8+およびCD4+ T細胞の両方の陽性選択が続く、DPステージでのCD3およびTCR α β の通常の発現を実証した。これらの観察結果は、トランスジェニックTCRによる内因性TCR α および β 遺伝子座の対立遺伝子排除と一致した。実際、四量体+ CD3+ CD8 SP細胞の>95%は、代替的セグメントの排除に対して、形質導入されたV β 13.1セグメントを発現した。

20

【0274】

次に、本発明者らは、ATO由来抗原特異的T細胞が機能的に成熟していることを確認した。モック形質導入ATO由来のCD8 SP T細胞と同様に、四量体+ CD8 SP細胞は、成熟ナイーブCD45RA+ CD45RO- CD1a^低 CD27+ CCR7+表現型への成熟を呈した。対照ATOに見られるように、残りのCD45RO+細胞はCD1a⁺であり、活性化された/メモリーの表現型に対立するものとして、DPプールからの最近の出現と一致した。四量体+ CD8 SP T細胞（または、モック形質導入ATO由来の同等のTCR α β + CD8 SP細胞）を選別し、かつHLA-A*0201、ベータ-2-ミクログロブリン、CD80、およびNY-ESO-1_{157~165} (ESO+) またはMART-1由来の非関連対照ペプチド (MART1+) のいずれかを共発現する、K562に基づく人工抗原提示細胞 (aAPC) に曝露した。予想どおり、抗原特異的T細胞は、ESO+ aAPCに応答してインターフェロンガンマを産生し、脱顆粒したが (LAMP1/CD107aの膜輸送を特徴とする)、MART1+ aAPCではそうではなかった。モック形質導入ATO由来のT細胞は、いずれのaAPCにも応答して有意な活性化を受けなかった。抗原特異的T細胞は、ESO+ aAPCに応答して増殖した。aAPCによって仲介される持続性インビトロ増殖は、14日間を超えて維持され得た。最後に、aAPC刺激された抗原特異的T細胞は、NY-ESO-1ペプチドでパルスされたHLA-A*0201+ K562標的細胞を抗原投与された場合、抗原特異的腫瘍細胞殺傷を実証したが、MART-1ペプチドではそうではなかった。まとめると、ATOは、機能的な抗原特異的T細胞のデノボ生成および操作のための堅牢なシステムを提供する。

30

40

【0275】

ATOを操作して、陽性選択の過程を具体的に調べ、かつ増強し得ることが実証された。胸腺における陽性選択は、発生中の胸腺細胞と皮質上皮細胞 (cTEC) との相互作用を通じて生じる。cTECを欠くATOにおいて、陽性選択は、自家造血細胞上の自己MHCとの相互作用によって仲介されるという仮説を立てた。これを検査するために、HLA-A*0201陽性および陰性のドナー由来のCB HSPCに、上記のようなHLA-A*0201/NY-ESO-1_{157~165}特異的TCRを

50

形質導入し、ATOにおいてT細胞に分化させた。このモデルを用いて、本発明者らは、ドナーHLA-A*0201が、CCR7の上方調節として、陽性選択の増強と関連した質的变化を誘導することに加えて、CD8SP細胞のパーセンテージを改善させることを見出した。興味深いことに、ATOにおけるMS5-hDLL1間質細胞内でのHLA-A*02:01の異所性発現は、HLA-A*02:01陰性ドナーATOにおいてCD8SPパーセンテージをやや改善し、かつHLA-A*02:01+ドナーHSPCを有するATOにおいてそれを大幅に増強した。これは、ATOをヒトHLAによる形質導入によって操作して、陽性選択される抗原特異的T細胞の生成を増強し得ること、および同種異系TCRおよびMHC形質導入された間質との組み合わせで用いられたATOが、ヒトT細胞における陽性選択の機構的調査のための精密に規定されたシステムを提供することを実証した。

【0276】

実施例2—人工胸腺オルガノイドは、ヒト造血幹細胞からのTCR改変T細胞の陽性選択および対立遺伝子排除を誘導する

改変T細胞療法は、がんおよび慢性ウイルス感染症の治療のための前例のない機会を提供する。造血幹細胞・前駆細胞（HSPC）から改変T細胞を直接生成し得る能力は、同種反応性を含めた、末梢血T細胞の使用に伴う主な治療的制約を克服する潜在力を有する。臍帯血、骨髄、および末梢血HSPCからの、天然のおよびTCR改変されたヒトT細胞の非常に効率的なインビトロでの分化および陽性選択を支持する、臨床的に関連する人工胸腺オルガノイド（ATO）システムが本明細書において記載される。ATO由来T細胞は、ナイーブ表現型、多様なTCRレパートリー、ならびにTCR依存的活性化および増殖を呈した。ATO由来TCR改変T細胞もナイーブ表現型に成熟し、さらに対立遺伝子排除の誘導と一致した内因性TCR発現の完全に近い欠如を示した。ゆえに、ATOは、養子細胞療法のためのナイーブの非同種反応性の改変T細胞の生成のための簡便でかつ直接的な方法を提示する。

【0277】

抗原特異的T細胞受容体（TCR）を発現するように操作されたT細胞を用いた養子細胞療法は、悪性腫瘍および慢性ウイルス感染症のための、標的化されたかつ潜在的に治療的な治療を提供する。現在の戦略は、成熟した循環T細胞の遺伝子改変およびエキソビボ増殖に依存する。これらの手法は、抗原特異的反応性の低下または自己免疫の誘導の潜在性ととともに、再輸血後の限定されたインビボ活性、ならびに形質導入されたおよび内因性のTCR鎖間での誤対合を含めた、主な治療的制約を課す。さらに、内因性TCR発現によって付与された同種反応性は、ほとんどの手法を自家T細胞の使用に制限しており、それは究極的に、費用の増加、限定された産生能、およびリンパ球減少症の状況における患者不適格性により療法への接近を限定し得る。造血幹細胞・前駆細胞（HSPC）からの改変T細胞のインビトロ生成は、ナイーブの抗原特異的T細胞のデノボ生成、および対立遺伝子排除による内因性TCR発現の抑制を同時に可能にすることによって、これらの問題を解決する潜在力を有する。

【0278】

胸腺におけるT細胞発生の時空間的複雑さにより、インビトロT細胞分化の方法は、今までのところ、ヒトT細胞発生を完全に再現することはできていない。そのような方法における主要な進歩は、古典的OP9-DL1共培養システムにおいて実証される、Notchリガンドを形質導入されたマウス間質細胞株が、マウスまたはヒトHSPCからのインビトロT細胞分化を支持し得るという発見であった。このおよび類似の単層システムにおいて、ヒトHSPCは、T系統コミットメントおよび初期T細胞分化を受ける。しかしながら、生産的に再編成されたTCRを有するT細胞先駆体の陽性選択は損なわれ、かつCD8+またはCD4+シングルポジティブ（SP）T細胞への最小限の成熟しか見られない。本発明者らおよび他の研究者らは、マウスまたはヒト胸腺組織を用いた三次元（3D）オルガノイドシステムが、インビトロにおけるヒトT細胞の改善された陽性選択および成熟を支持することを示した。しかしながら、これらのシステムは、低い細胞産出量、高い実験的可変性、および初代胸腺組織への依存性が原因で、治療的適用のためのT細胞の生成に適していない。それゆえ、本発明者らは、HSPCからのヒトT細胞の分化および陽性選択を支持し得、一方で標準化された構成要素、再現性、および拡張性などの主な橋渡しの特性を保持する、人工オルガノイドシス

10

20

30

40

50

テムの開発を追求した。

【0279】

DLL1を形質導入された間質細胞株および血清不含のすぐに使える構成要素に基づく、人工胸腺オルガノイド（ATO）システムの開発が、本実施例において記載される。単層システムとは対照的に、ATOは、ヒト臍帯血、骨髄、および末梢血CD34⁺ HSPCからの、ヒトCD3⁺TCR α β +CD8SPおよびCD4SP T細胞の堅牢なインビトロ分化、陽性選択、および成熟を支持した。ATO由来成熟T細胞は、抗原刺激に応答して、抗原ナীব表現型、多様なTCRレパートリー、および活性化/増殖を呈した。ATOは、腫瘍関連抗原NY-ESO-1に特異的なHLA-A*02:01拘束TCRを形質導入されたHSPCからの、抗原特異的TCR改変T細胞の非常に効率的な分化も支持した。ATO由来改変T細胞は、ナীব表現型を呈し、かつ抗原特異的な活性化および細胞傷害性刺激を受けた。TCR改変T細胞の陽性選択は、ATO間質細胞における同族主要組織適合複合体（MHC）の発現によってさらに増強された。最後に、ATOにおいて生成されたTCR改変T細胞は、発生の間の対立遺伝子排除の誘導と一致した内因性TCR発現の完全に近い欠如を呈し、そして養子細胞療法のための非同種反応性の改変T細胞を生成することへの直接的かつ効率的な手法を示唆した。

10

【0280】

A. 結果

1. インビトロヒトT細胞分化のための最適化された人工胸腺オルガノイドシステムの開発
1つの目標は、HSPCからのヒトT細胞のインビトロ陽性選択および成熟を支持し得る臨床上に橋渡し可能なオルガノイドシステムを開発することであった。初代胸腺組織の使用を回避するために、DLL1を形質導入された間質細胞株を、3Dオルガノイド培養においてヒトT細胞発生を支持し得る能力について検査した。本発明者らおよび他の研究者らは、OP9-DL1システムにおけるT細胞分化が、ウシ胎仔血清の特異的ロットおよび間質細胞の頻繁な変化に依存して非常に可変的であることを観察したため、本発明者らは、オルガノイド培養においてT細胞分化を一貫して支持し得る血清不含条件を同定することも求めた。専売の足場材料の使用を回避するために、本発明者らは、間質細胞が遠心分離によってHSPCと凝集しかつ空気-流体界面で細胞培養インサート上に配備される、胸腺組織に基づくオルガノイドにおいて有効であることが示された圧縮再凝集技法を用いた（図3A）。これらの3D培養において、本発明者らは、T細胞枯渇したCD34⁺臍帯血（CB）HSPCからのヒトT細胞分化を強く支持するものとして、ヒトDLL1を形質導入されたMS-5マウス骨髄間質細胞株（以後、MS5-hDLL1）を同定した。さらに、本発明者らは、MS5-hDLL1オルガノイド培養において堅牢なヒトT細胞分化を一貫して支持する新規な血清不含培地として、B27、神経幹および胚性幹細胞培養において用いられる多構成要素添加物、ならびにFLT3L、IL-7、ならびにアスコルビン酸を補充されたRPMI（以後、「RB27」）を同定した。

20

30

【0281】

この最適化された人工胸腺オルガノイド（ATO）システムは、2週目までのCD5⁺CD7⁺細胞の優勢、ならびにCD4⁺ISPおよびCD4⁺CD8⁺（DP）細胞の現れによって示されるように、CB CD34⁺CD3⁺ HSPCからの迅速でかつ堅牢なT系統コミットメントを誘導した（図3B）。成熟CD3⁺TCR α β +細胞は、早くも2週目に出現しかつ経時的に増加し、6週目に平均25%に到達した（図3BおよびG）。CD3⁺TCR α β +細胞は、初期の時点で圧倒的にDPであったが、次第にCD8SP、およびより低い程度にCD4SP T細胞に成熟し、ATOにおける陽性選択と一致した。

40

【0282】

ATOは、長期にわたる培養下でさえ原始前駆細胞からの進行中のT細胞分化を持続させた。6週目の時点で、複能性CD34⁺CD7⁺CD1a⁻初期胸腺前駆体（ETP）、ならびに下流にあるCD34⁺CD7⁺CD1a⁻およびCD34⁺CD7⁺CD1a⁺ T系統前駆体を含めた、胸腺T細胞前駆体の3つすべての表現型ステージが存在した（図3C）。代替的な分類スキームに基づき、プロ-T1およびプロ-T2前駆体表現型も、CD34⁺画分において同定された（図3C）。CD19⁺ B細胞頻度は経時的に減少し、NKおよび骨髄頻度は全体にわたって低かった（図3B、F~G）。ATOの組織学的切片は、豊富なリンパ系細胞を有する高密度な組織様構築を実証し（データ示さず）

50

、そのクラスターはCD3に対して陽性であった（図3D）。インプットHSPCに対するATOにおける細胞増殖は6週目の時点で平均で80倍であり（図3E）、種々の生物学的CBユニット間で増殖の変動が見られたものの、先駆体および成熟T細胞は、すべてのサンプルから一貫して生成された（ $n=18$ ）（図3G）。全細胞増殖も、開始細胞数、およびHSPC対間質細胞の比率に反比例し、一部の組み合わせでインプットHSPCよりも最高800倍の増加を有した（図9A、B）。細胞増殖およびT細胞分化の両方の高い再現性は、技術的複製（ $n=11$ ）およびB27の異なるロット（ $n=4$ ）にわたって見られた（図10A～C）。臨床的橋渡しにとって重大なことには、ゼノフリーB27を補充された培地（ヒト血清アルブミンを含有する）を用いた（図10D～E）、または照射された間質細胞で作製された（図10F～B）ATOにおいて、比較可能なT細胞分化が見られた。

10

【0283】

同じドナーCB HSPCを用いたOP9-DL1単層培養システムと比較した場合、ATOは、CD3+TCR $\alpha\beta$ + T細胞の際立って優れた生成を明らかにした（図11A～C）。以前の報告と一致して、OP9-DL1単層は、効率的なT系統コミットメント（CD7+CD5+）、ならびにETP、プロ-T、およびCD4 ISPステージを通じた進行を支持したが、DP、CD3+TCR $\alpha\beta$ +, および成熟SP細胞の非効率的な生成を支持し、そのすべてはATOにおいて容易に発生した（図11B～C）。実際、最適な陽性選択および成熟は、ATOシステムの3つすべての構成要素：3D構造、MS5-hDLL1間質細胞、およびRB27培地を要した（図11A）。MS5-hDLL1とは対照的に、OP9-DL1は、RB27中で生存しにくく、かつオルガノイド培養においてT細胞分化の乏しい支持を示した。DLL1発現を欠く親MS-5細胞株は、単層または3D培養のいずれにおいてもT細胞発生を

20

【0284】

要約すると、ATOは、CD34+ HSPCからの堅牢でかつ再現可能なT細胞分化を支持する、標準化された血清不含オルガノイドシステムを提供し、ヒトTCR $\alpha\beta$ +およびTCR $\gamma\delta$ + T細胞の陽性選択および成熟を可能にする。

【0285】

2. ATOにおける胸腺ナイーブT細胞発生の再現

次に、長期ATOにおけるT細胞分化を、出生後ヒト胸腺におけるものと比較した。12週目のCB ATOは、胸腺と同程度の頻度のT系統コミットした（CD5+CD7+）およびCD34+のT細胞前駆体を示し（図4A）、一方でDPおよびSP頻度は、胸腺においてよりも、12週目のATOにおいてより進歩したT細胞成熟を示唆した（図4A）。胸腺に見られるように、ATOにおけるCD3+細胞の大多数はTCR $\alpha\beta$ +であり、より少なくはあるが一致したTCR $\gamma\delta$ +集団を有した（図4A）。ATO由来CD3+TCR $\alpha\beta$ +細胞の中で、成熟CD8SPおよびCD4SP T細胞の生成は、6～12週目の間に増加した（図4Bおよび図12A）。胸腺とは対照的に、ATOは、CD8SP T細胞に対して比例的により少ないCD4SP T細胞を呈し、おそらくCD4+ T細胞発生のより遅い動態を反映し；CD4+細胞は、分析された最も遠い時点の12週目まで頻度が増加し続けた（図4Bおよび図12A）。

30

【0286】

胸腺に見られるように、ATO由来CD3+TCR $\alpha\beta$ +CD8SPおよびCD4SP T細胞は、「未成熟ナイーブ」（CD45RA-CD45RO+CD27+CCR7-CD1a^高）から「成熟ナイーブ」（CD45RA+CD45RO-CD27+CCR7+CD1a^低）表現型に移した（図4Cおよび図12A～C）。ATOにおいて、これは6～12週目の間に生じ、かつ胸腺においてよりも、12週目のATOにおいてより高い頻度の成熟ナイーブT細胞をもたらした（図4Cおよび図12B～C）。未成熟および成熟ナイーブサブセットの両方は、CD62LおよびCD28を共発現し、CD127およびCD31のサブセット共発現を有し、後者は血中における最近の胸腺移住T細胞と関連していた（図12B～C）。活性化マーカーCD25は、ATO由来CD8SP T細胞上で発現しなかったが、CD4SP T細胞のサブセット上では観察された（図12B～C）。まとめると、これらのデータは、胸腺および血液において見出されるものに類似した本物のナイーブT細胞の出現に至る、ヒト胸腺と比較したATOにおけるT細胞分化の顕著な忠実性を示している。

40

【0287】

50

3. 複数種のHSPC供給源およびサブセットからのT細胞分化

すべての臨床的に関連するHSPC供給源、すなわち成体骨髄 (BM)、G-CSF動員末梢血 (MPB)、および非動員末梢血 (PB) からの、先駆体およびCD3+TCR $\alpha\beta$ + T細胞の同程度の頻度を有する、効率的なT細胞分化が見られた (図5A~Bおよび図13A、B)。全細胞増殖も、HSPC供給源にわたって匹敵した (図13C)。CB、BM、またはMPB由来の高度に富化された造血幹細胞 (HSC) 画分 (Lin-CD34+CD38) は、同程度に堅牢なT細胞分化を実証し (図5C~Dおよび図13D~E)、これらの供給源からのT細胞潜在性が、既存のリンパ系コミットした前駆体とは無関係であることを示唆した。

【0288】

ATOにおけるT細胞分化は、精製されたリンパ系前駆体からも開始された。3週間の時点で、成体BMリンパ系刺激された複能性前駆体 (LMPP) およびCD24-共通リンパ系前駆体 (CLP) は、HSCまたは未分画CD34+ HSPCのいずれかよりも迅速かつ効率的に、CD4 ISPおよびDPステージを通じて分化した (図5E~F)。対照的に、主としてBおよびNK細胞潜在性を所有するCD24+ CLPは、低い細胞産出量を有してATOにおいて成長しにくかった (図13F)。ゆえに、ATOは、ヒト幹細胞および前駆細胞集団からのT系統潜在性を評価するためのツールとして働き得る。

【0289】

4. ATO由来T細胞のTCR多様性および機能

次に、本発明者らは、ATOにおいて生成された成熟T細胞のTCR多様性および機能の特徴付けした。共通TCR V β セグメントに対するATO由来CD3+TCR $\alpha\beta$ +CD8SP T細胞についてのフローサイトメトリーは、ヒト胸腺由来の対応するCD8SP T細胞のものに著しく類似した多様性を明らかにした (図6A)。重要なことには、偏ったV β 使用法もクローン選択も観察されず、それぞれ、非従来のT細胞サブセットまたはクローン増殖した成熟T細胞の、ATOにおける優勢に反論した。

【0290】

ATO由来CD8SP T細胞は、PMA/イオノマイシンに応答して強いIFN γ および低いIL-4産生を呈し、細胞傷害性表現型と一致した (図6B)。CD4SP細胞は、IFN γ +およびIL-4+細胞の両方を産生し、それぞれTh1およびTh2極性化と一致し；そして、DP細胞は刺激にほとんど応答せず、それらの未成熟状態と一致した (図6B)。ATO由来CD8SP細胞は、抗CD3/CD28抗体およびIL-2に応答して、増殖およびCD25の上方調節も受けた (図6C)。さらに、CB、BM、またはMPB ATOから生成されたCD8SP細胞は、PMA/イオノマイシンに応答したIFN γ の同程度の産生 (図6D)、ならびに抗CD3/CD28およびIL-2によるインビトロ増殖を呈した (図6E)。要約すると、ATOにおいて生成された成熟T細胞は、生理学的なTCR多様性、および抗原刺激に対する機能的応答を呈した。

【0291】

5. ATOにおけるナイーブTCR改変T細胞の生成

次に、本発明者らは、HSPCからのTCR改変T細胞のインビトロ生成にATOを適応させた。CB CD34+CD3- HSPCに、NY-ESO-1_{157~165} に特異的なHLA-A*02:01拘束TCRの α および β 鎖をコードするレンチウイルスベクターを形質導入した。6週目の時点で、TCR形質導入ATOは、モック形質導入対照と同程度の頻度のCD5+CD7+ Tコミットした細胞を示したが、CD3+TCR $\alpha\beta$ + T細胞を際立って増加させ、その大多数は、四量体、または形質導入されたV β 13.1鎖に対する抗体での染色によって見られるように、形質導入されたTCRを発現した (図7A)。CD8SP細胞の頻度は、モック形質導入対照由来の四量体+細胞とCD3+TCR $\alpha\beta$ +細胞との間で同程度であったが、四量体+CD8SP細胞は、成熟ナイーブ表現型 (すなわち、CD45RA+CD45RO-CD27+CCR7+CD1a^低) への加速した成熟を呈示した (図7A)。非形質導入ATOと同様に、エフェクター/メモリー表現型への分化は観察されなかった (図7A)。

【0292】

TCR形質導入は、ATOにおける全細胞増殖の増強ももたらした (図7B)、その大多数は四量体+CD3+ T細胞であった。インプットHSPCに対する全細胞増殖は、TCR形質導入ATOにおいて典型的に150倍であったが (図7A)、ATOあたりの開始HSPCおよび間質細胞数を限定する

10

20

30

40

50

ことによって700倍を上回ってさらに増加し得た（図7C）。ゆえに、7,500個のTCR形質導入HSPCで開始された単一のATOは、およそ 5×10^6 個の細胞を生成し得、そのうちのおよそ 7.5×10^5 個（15%）は、四量体+CD3+CD8SP成熟ナイーブT細胞であった（図7A～C）。

【0293】

TCR形質導入ATOからのATO由来CD8SP細胞は、同族ペプチド-MHCおよびCD80を発現する人工抗原提示細胞に応答して、それぞれIFN γ 産生およびCD107a膜動員によって測定される抗原特異的活性化および脱顆粒を受けたが、親K562細胞に対してはそうではなかった（図7D）。さらに、TCR形質導入ATO由来のCD8SP T細胞は、抗CD3/CD28およびIL-2に応答して、モック形質導入ATO由来のものと同等のインビトロ増殖を受けた（図7E）。

【0294】

ATO由来TCR改変T細胞におけるV β 多様性についての分析は、四量体+CD8SP T細胞の98%を上回る割合が、形質導入されたV β 13.1セグメントのみを発現することを明らかにし（図7F～G）、TCR改変T細胞の分化の間の内因性TCR発現の完全に近い対立遺伝子排除と一致した。ゆえに、ATOは、HSPCからの機能的TCR改変T細胞の堅牢な分化、およびTCRの誘導を支持し、細胞増殖を増強し、かつ内因性TCR発現を欠く成熟ナイーブT細胞の分化を促進した。

【0295】

6. MHC改変ATOにおけるTCR改変T細胞の陽性選択の増強

胸腺における陽性選択は、T細胞先駆体上のTCRと胸腺間質細胞および造血細胞上の自己MHCとの間の相互作用によって仲介される。ゆえに、ATOにおける「自己」MHCの造血系または間質系発現が、TCR改変T細胞の陽性選択を増強し得るかどうかを検討された。HLA-A*02:01陽性または陰性ドナーを用いて、ATO内での陽性選択に対する自己MHCの造血系発現の効果を検査し、そして間質細胞MHC発現を、HLA-A*02:01を形質導入されたMS5-hDLL1細胞を用いてATOを生成することによって検査した（図8A）。すべての場合において、HSPCにHLA-A*02:01拘束NY-ESO-1特異的TCRを形質導入し、そして四量体+CD3+CD8SP T細胞の頻度を、陽性選択の読み出しとして用いた。HLA-A*02:01の造血系発現は、四量体+CD8SP T細胞の陽性選択に対して穏やかな効果のみを発揮した（図8B）。対照的に、ATO間質細胞におけるHLA-A*02:01の発現は、四量体+CD8SP T細胞の陽性選択を際立って増強し、かつドナー造血系HLA-02:01発現と相乗的であった（図8B）。MHC改変ATOにおけるTCR改変T細胞は、CCR7の上方調節を含めた、成熟ナイーブ表現型へのより大きな成熟も呈し（図8C）、増強した陽性選択と一致した。要約すると、TCR形質導入HSPCおよびMHC形質導入間質細胞を含むATOは、インビトロでのヒトT細胞の陽性選択をモデル化するための多目的システム、ならびに養子細胞療法のためのインビトロ由来TCR改変T細胞の陽性選択および成熟を増強するための簡便な方法である。

【0296】

B. 注釈

インビトロにおいて胸腺リンパ球形成を誠実に再現し得る能力は、抗原ナイーブ状態および内因性TCR発現の欠如を含めた、望ましい治療的形質を有する改変T細胞の産生のための固有の機会を与える。本明細書で実証されるように、標準化されたすぐに使える構成要素を用いて、ATOシステムは、HSPCからの胸腺リンパ球形成を誠実に再現し、胸腺または末梢血由来のナイーブT細胞に厳密に似ている成熟CD3+TCR $\alpha\beta$ +CD8SPおよびCD4SP T細胞の産生に至る。

【0297】

ATOは、OP9-DL1システムなど、インビトロT細胞分化の既存の方法と比較して、明確な生物学的および橋渡しの利点を提供する。第一に、ATOは、ヒトT細胞の陽性選択および成熟を支持し、その両方とも単層システムでは損なわれている。同一のATO構成要素で準備した単層培養が非効率的なT細胞分化をもたらしたように、ATOにおける陽性選択の増強は3D構造に依存している。これは、低い効率ではあるが、FTOC、または胸腺構成要素を用いた再凝集3D培養における陽性選択の支持と一致している。3D相互作用が、T細胞先駆体と、DLL1などの発生リガンドまたは自己MHCなどの選択的リガンドとの間の接触の価数

および/または持続期間を増加させることによって、T細胞発生を支持することは可能である。あるいは、3D立体配置は、間質細胞および造血細胞間でのクロストークを促し得る、または2Dでは別様に可能でない機械的力および/もしくは代謝的变化を通じてT細胞先駆体に対して発生シグナルを発揮し得る。

【0298】

既存の方法を上回るATOシステムの別の主要な進歩は、骨髄および休止のまたは動員された末梢血を含めた、HSPCの臨床的に関連する成体供給源からの非常に効率的なT細胞分化である。OP9-DL1システムを用いた調査は、CB、BM、またはMPB16~19からのTCR α β + T細胞の非効率的な発生を示しており、休止末梢血HSPCに関するデータは報告されていない。OP9-DL1でのT細胞発生の改善が出生後胸腺由来CD34+細胞に関して報告されており、胸腺微小環境によるこれらの前駆体集団の刺激と一致するが、ヒト胸腺は、治療的橋渡しのためのHSPCの非実用的な供給源のままである。

10

【0299】

ATOシステムは、技術的簡便性、再現性、および潜在的拡張性も提供する。血清不含培地の使用は、単層システムにおいてウシ胎仔血清を用いて観察される著しい可変性を回避し、そして簡便な培地交換を有して培養の持続期間（最高12週間）の間ATOをインタクトに維持し得る能力は、単層システムに関しては要される、新鮮な間質細胞上への細胞の頻繁な移動を回避する。ATO産生とゼノフリー試薬および間質細胞照射とを組み合わせ得る能力と合わせた、すぐに使える構成要素の使用、具体的には初代間質細胞または専売の足場材料の回避は、養子療法のためのT細胞を生成するための臨床グレードのプラットフォームへのATOの橋渡しを促すはずである。該システムの簡便性は、ヒトT細胞発生および陽性選択をモデル化することに関心がある研究室において、方法の簡単な採択も可能にする。

20

【0300】

本明細書で実証されるように、ATOシステムは、HSPCからのTCR改変ナイーブT細胞のインビトロ生成のための非常に効率的な方法である。ヒトHSPCからのTCR改変T細胞の分化は、OP9-DL1システムにおいて実証されているが、これらの場合、CD8SP細胞への成熟は損なわれ（典型的に、培養物の0~2%のみに当たる）、胸腺由来CD34+細胞を用いて最も高い効率が達成された。対照的に、ATOは、CB HSPCからのTCR改変T細胞の堅牢な陽性選択を支持し、MPB HSPCを用いて類似の結果が観察された（示さず）。ATOにおいて達成された成熟ナイーブT細胞表現型は、養子移入されたT細胞のインビボ生存および活性の向上が、より低く活性化された表現型と相関することを示した調査に基づき、改変された末梢血T細胞を上回る、ATO由来改変細胞の明確な利点であり得る。間質細胞における同族MHCの発現による、ATOにおける改変T細胞の陽性選択の増強は、ATO由来改変T細胞の質および収量を増加させるためのさらなる道を提供する。

30

【0301】

T細胞分化を通じた、形質導入されたTCRのATOにおける存在は、内因性TCR遺伝子座の完全に近い対立遺伝子排除を仲介し、移植されたマウスおよびヒトHSPCを用いたインビボ調査と一致した。改変末梢血T細胞上での潜在的に同種反応性の内因性TCRの発現は、拡張可能なすぐに使える養子T細胞療法の開発の主要な障壁であり、現在、自家改変T細胞の労働集約的な個別化された産生を必要としている。同種異系の改変T細胞療法を開発するための戦略は、遺伝子編集ツールを用いた内因性TCR/CD3発現の分断、またはウイルス特異的T細胞のTCR形質導入を含むが；しかしながら、そのような手法の両方とも、インビボ機能に潜在的に支障をきたす、遺伝子改変されたT細胞の大掛かりな操作および増殖を要する。ゆえに、ナイーブの対立遺伝子排除された改変T細胞のデノボ生成のためのATOの使用は、養子細胞療法のための非同種反応性T細胞を産生するための非常に効率的な代替的戦略を提示する。

40

【0302】

C. 方法

1. ヒトCD34+CD3- HSPCの単離

50

新生児臍帯血を、UCLAにおいて正常分娩からの捨てられた胎盤から得た。骨髄 (BM) を、UCLAにおいて同種異系BMドナー収集物からの捨てられた材料を通じて健常成体ドナーから得た、またはAllCells Inc. (Alameda, CA) から購入した。G-CSF動員末梢血を、UCLAにおいて同種異系幹細胞移植供与のためにアフレーシスを受けた同意している健常成体ドナーから得た。非動員末梢血を、UCLA CFARウイルス学中核部 (Virology Core) を通じて健常成体ドナーから得た。すべての組織サンプルを、UCLA IRBに承認されたプロトコルまたは適用除外の下で得た。すべてのサンプルを、Ficoll-Paque (GE Healthcare Life Sciences, Pittsburgh, PA) 勾配遠心分離、それに続くCD34 MicroBead Kit UltraPure (Miltenyi, Auburn CA) を用いた磁気細胞選別 (MACS) によるCD34+細胞の陽性選択によって、単核細胞について富化した。別様に付記されていない限り、CD34+細胞富化画分を、MACS後に冷凍保存した。使用前に、細胞を融解し、かつ残余のT細胞を、CD34+CD3-細胞を選別することによってFACSにより排除し、それを直ちにATOに播種または下記のように形質導入した。一部の実験では、ATOに播種する前に、HSCをLin-CD34+CD38-細胞についてFACS選別によって富化した。HSPCのHLA型付けは、高分解能配列特異的オリゴヌクレオチド (SSO) ビーズを用いて、UCLA免疫遺伝学センター (Immunogenetics Center) によって実施された。

10

【0303】

2. ヒト骨髄前駆体サブセットの単離

CD34+ HSPCを、上記のように新鮮なBM吸引物から富化し、かつ、以下のマーカー：全HSPC (CD34+)、HSC (CD34+CD38-CD45RA)、LMPP (CD34+CD38+CD45RA+CD10-CD62L高)、CD24- CLP (CD34+CD38+CD45RA+CD10+CD24-)、およびCD24+ CLP (CD34+CD38+CD45RA+CD10 CD24+) と組み合わせた、CD45の陽性発現および系統マーカーの発現不在 (CD3、CD14、CD19、CD56、およびCD235a; 「Lin-」) に基づき、幹/前駆体集団についてFACSによって直ちに選別した。

20

【0304】

3. ヒト胸腺細胞の単離

出生後ヒト胸腺を、ロサンゼルス子ども病院 (Children's Hospital Los Angeles) (C HLA) において、心臓手術を受けた患者からの捨てられた廃棄物として、IRB適用除外の下で得た。胸腺フラグメントをRPMI中で細かく刻み、かつピペッティングによって分断して懸濁液中に胸腺細胞を放出し、その後に70 μmナイロン製ストレーナーの通過が続いた。細胞を、新鮮な同日または翌日に分析した。胸腺およびATO由来のT細胞前駆体についてのフローサイトメトリー分析は、以下の表面表現型：初期胸腺前駆体 (ETP; CD34+CD7-CD1a-)、CD1a- プロ-T (CD34+CD7+CD1a-)、およびCD1a+ プロ-T (CD34+CD7+CD1a+) ; または、CD5- プロ-T (プロ-T1; CD34+CD7+CD5-) およびCD5+ プロ-T (プロ-T2; CD34+CD7+CD5+) を用いた。胸腺およびATO由来のT細胞および先駆体は、以下の表現型：全T系統細胞 (CD7+CD5+)、ダブルネガティブ (DN; CD4-CD8-)、CD4未成熟シングルポジティブ (CD4 ISP; CD5+CD4+CD3)、ダブルポジティブ (DP; CD4+CD8+)、CD8SP (CD3+TCR α β+CD8+CD4-)、CD4SP (CD3+TCR α β+CD8-CD4+)、未成熟ナイーブ (CD8SPまたはCD4SPであるCD45RA-CD45RO+)、成熟ナイーブ (CD8SPまたはCD4SPであるCD45RA+CD45RO-) と組み合わせた、CD14-CD56-として規定された。未成熟のおよび成熟したナイーブ表現型を、CD1a、CD27、CD28、およびCCR7に対して共染色することによって確認した。

30

40

【0305】

4. 細胞株

MS-5マウス間質細胞株を贈与として得た。MS5-hDLL1を生成するために、MS-5細胞に、ヒトDLL1およびGFPをコードするレンチウイルスベクターを形質導入した。最も高い5% GFP発現細胞をFACSによって選別し、かつDMEM/10% FCS中で継代した。安定な発現を、培養の数週間後にGFP発現に対するフローサイトメトリーによって確認した。MS5-hDLL1細胞にヒトHLA-A*02:01レンチウイルスベクター (Dr. David Baltimore, Caltechからの贈与) を形質導入し、それに続くヒトHLA-A2を認識する抗体 (BB7.2) (Biolegend, San Diego, CA) を用いた形質導入された細胞のFACS選別によって、MS5-hDLL1-A2.1細胞を作製した

50

。OP9-DL1細胞株は、Dr. Juan Carlos Zuniga-Pflucker（トロント大学）からの贈与であり、そして0.1%ゼラチンコーティングされたフラスコ中にてMEM α （ThermoFisher Scientific, Grand Island, NY）/20% FBS中で継代した。K562細胞株はATCCから得た。K562-CD80/HLA-A*02:01/NY-ESO-1 aAPC細胞株は、Dr. Antoni Ribas（UCLA）からの贈与であった。

【0306】

5. 人工胸腺オルガノイド（ATO）培養

MS5-hDLL1（またはMS-5もしくはOP9-DL1、付記されるとおり）細胞をトリプシン処理によって収集し、かつ、RPMI 1640（Corning, Manassas, VA）、4% B27サプリメント（ThermoFisher Scientific, Grand Island, NY）、PBS中で再構成された30mM L-アスコルビン酸2-リン酸セスキマグネシウム塩水和物（Sigma-Aldrich, St. Louis, MO）、1% ペニシリン/ストレプトマイシン（Gemini Bio-Products, West Sacramento, CA）、1% Glutamax（ThermoFisher Scientific, Grand Island, NY）、5ng/ml rhFLT3L、および5ng/ml rhIL-7（Peprotech, Rocky Hill, NJ）から構成される血清不含ATO培養培地（「RB27」）中に再懸濁した。RB27は毎週新鮮にされた。表示される実験において、4%ゼノフリーB27がB27の代わりに置換された。実験に応じて、 $1.5 \sim 6 \times 10^5$ 個のMS5-hDLL1細胞を、1.5ml エッペンドルフチューブ中にてATOあたり $5 \times 10^2 \sim 1 \times 10^5$ 個の精製CD34+CD3-細胞（または他のHSPC集団、表示されるとおり）と組み合わせ、かつスイングバケット遠心分離機にて4℃で5分間300gで遠心分離した。上清を慎重に除去し、かつ細胞ペレットを短時間のボルテックスによって再懸濁した。各ATOに対して、0.4 μ m Millicellトランスウェルインサート（EMD Millipore, Billerica, MA; Cat. PICMORG50）を、1ウェルあたり1mlのRB27を含有する6ウェルプレートに置いた。ATOをプレーティングするために、インサートを取り出してプレートの端に休ませ、過剰な培地を流出させた。細胞スラリーをATOあたり5~8 μ lに調整し、20 μ lピペットチップ内に吸い上げ、ピペットチップの端部に液滴を形成させて細胞インサート上に穏やかに堆積させることによってプレーティングした。細胞インサートを、1mLのRB27を含有するウェルに置き戻した。細胞インサート周辺からの吸引、それに続く1mlの新鮮なRB27/サイトカインでの置き換えによって、培地を3~4日間ごとに完全に交換した。ATOをこの形式で最高12週間培養した。表示される時点で、各ウェルにFACSバッファ（PBS/0.5% ウシ血清アルブミン（album）/2mM EDTA）を添加し、かつ1ml「P1000」ピペットでピペッティングすることによってATOを短時間分散させ、それに続く70 μ m ナイロン製ストレーナーの通過によって、ATO細胞を収集した。一部の実験では、MS5-hDLL1細胞の単一細胞懸濁液を、ATOにおける使用前に表示される線量で γ 照射した。

【0307】

6. T細胞単層共培養

OP9-DL1単層培養を、当技術分野において以前に記載されたように準備した。簡潔には、OP9-DL1を、使用の1~2日前に、0.1%ゼラチンコーティングされた12ウェルプレートに播種して、70~80%コンフルエンスに到達させた。培地を単層から吸引し、かつ $1 \times 10^4 \sim 1.5 \times 10^4$ 個の精製CD34+CD3- HSPCを、MEM α 、20% FBS、30mM L-アスコルビン酸、5ng/ml rhFLT3L、および5ng/ml rhIL-7から構成される2mlの培地中、間質単層上にプレーティングした。一部の実験では、MS-5またはMS5-hDLL1がOP9-DL1の代わりに置換され、かつRB27が培養培地として置換された。細胞を収集し、70 μ m ナイロン製ストレーナーを通して濾過し、かつ新鮮な培地中に再プレーティングすることによって、細胞を4~5日間ごとに新たな間質細胞単層に移した。コンフルエントの場合、細胞を、新鮮な間質層を含有する複数のウェルに分けた。培養を最高10週間維持した。

【0308】

7. レンチウイルスベクターおよび形質導入

ヒトDLL1の全長コード配列を、ヒトuniversal reference RNAセット（Agilent Technologies, Santa Clara, CA）からのRT-PCRによって、第三世代レンチウイルスベクターpCCL-c-MNDU3-X-IRES-eGFP（Dr. Donald Kohn, UCLAからの贈与）内にクローニングした。HLA-A*02:01レンチウイルスベクターpHAGE6-HGHSS-HLAA2.1-IRES-ZsGreenは、Dr. David Bal

timore (Caltech) からの贈与であった。HLA-A*02:01/NY-ESO-1_{157~165}に特異的なコドン最適化TCRの α および β 鎖をコードする第三世代レンチウイルスベクターは以前に記載されており、そしてDr. Antoni Ribas (UCLA) からの贈与であった。レンチウイルス粒子のパッケージングおよび濃度は、以前に記載されたように実施された。簡潔には、293T細胞 (ATCC) に、TransIT 293T (Mirus Bio, Madison, WI) を用いて、レンチウイルスベクタープラスミド、pCMV- Δ R8.9、およびpCAGGS-VSVGを17時間共トランスフェクトし、その後20mM酪酸ナトリウムによる8時間の処理が続き、その後に血清不含UltraCulture中での48時間の細胞上清の生成が続いた。上清を、メーカーのプロトコールに従い、Amicon Ultra-15 100Kフィルター (EMD Millipore, Billerica, MA) を用いたタンジェンシャルフロー濾過によって濃縮し、かつ-80Cで保管した。HSPC形質導入に関しては、 $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$ 個のFACS選別されたCD34+CD3- HSPCを、50ng/mlの組換えヒトSCF、FLT3L、およびTP0、ならびに10ng/ml IL-3 (Peprotech, Rocky Hill, NJ) を補充された1ml X-VIVO-15 (Lonza, Basel, Switzerland) 中、20 μ g/mlレトロネクチン (Clontech, Mountain View, CA) でコーティングされた6ウェル非処理プレートに12~18時間プレーティングし、その後、濃縮されたレンチウイルス上清を100の感染多重度 (MOI) で添加した。モック形質導入細胞を、同一の条件で、しかしベクターの添加なしで培養した。細胞を形質導入の24時間後に収集し、洗浄し、かつATOに播種した。示されていない限り、TCR形質導入HSPCは、HLA-A*02:01+ CBユニット由来であった。

【0309】

8. 免疫組織化学

ヘマトキシリンおよびエオシン (H&E) 画像に関しては、ATOをHistogel (ThermoFisher Scientific, Grand Island, NY) に包埋し、かつ10%中性緩衝ホルマリン (ThermoFisher Scientific, Grand Island, NY) 中で一晚固定した。5 μ m切片およびH&E染色は、UCLAトランスレーショナル病理学中核研究室 (Translational Pathology Core Laboratory) (TPCL) によって実施された。免疫蛍光イメージングに関しては、各ATO周辺の培養インサートをメスで切り込み、それに続いて膜およびATOをTissue-Tek OCT (VWR Radnor, PA) に包埋し、ドライアイス上で凍結させることによって、ATOを単離した。5 μ mの凍結切片を10%中性緩衝ホルマリン中で固定し、1:50希釈の抗CD3 (クローンUCHT1; Biolegend, San Diego, CA) で4°Cにて一晚染色し、続いてその後、室温でAlexaFluor 594コンジュゲート抗マウスIgG (H+L) (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) とインキュベーションした。H&Eおよび免疫蛍光画像を、AxioCam MRMおよびAxioVisionソフトウェアを備えたZeiss AzioImager M2 (Zeiss, Jena, Germany) で取得した。

【0310】

9. 細胞内サイトカイン染色

ATO由来のCD8SP、CD4SP、またはDP細胞を、抗CD8および抗CD4抗体を用いたFACSによって選別し、かつ5%熱不活性化ヒトAB血清 (Gemini Bio-Products, West Sacramento, CA) を有する200 μ l AIM V (ThermoFisher Scientific, Grand Island, NY) 中、96ウェルU底プレートにプレーティングした。PMA/イオノマイシン/タンパク質輸送阻害剤カクテルまたは対照タンパク質輸送阻害剤カクテル (両方とも、eBioscience, San Diego, CA製) を各ウェルに添加し、かつ一晚インキュベートした。細胞を、固定、ならびに細胞内染色バッファーキット (eBioscience, San Diego, CA) による透過化、ならびにIFN γ およびIL-4に対する抗体 (Biolegend, San Diego, CA) によるサイトカイン染色の前に、CD3、CD4、およびCD8 (Biolegend, San Diego, CA)、ならびにUV455固定可能な生存率色素 (eBioscience, San Diego, CA) で染色した。

【0311】

10. T細胞活性化および増殖アッセイ

CFSE増殖アッセイに関しては、ATO由来CD8SP T細胞をFACSによって選別し、かつメーカーのプロトコールに従い、5 μ M CFSE (Biolegend, San Diego, CA) で標識した。標識された細胞を、5% AB血清および20ng/ml rhIL-2 (Peprotech, Rocky Hill, NJ) またはIL-2のみを補充されたAIM V中、抗CD3/CD28ビーズ (ThermoFisher Scientific, Grand Island, NY) で刺激し、48時間培養した。細胞を、固定、ならびに細胞内染色バッファーキット (eBioscience, San Diego, CA) による透過化、ならびにIFN γ およびIL-4に対する抗体 (Biolegend, San Diego, CA) によるサイトカイン染色の前に、CD3、CD4、およびCD8 (Biolegend, San Diego, CA)、ならびにUV455固定可能な生存率色素 (eBioscience, San Diego, CA) で染色した。

d, NY) とともにインキュベートし、CD25 (Biolegend, San Diego, CA) に対して共染色し、かつ5日目にフローサイトメトリーによって分析した。インビトロ細胞増殖アッセイに関しては、 1×10^4 個のFACS選別されたATO由来CD8SP T細胞を、20ng/ml rhIL-2および $1 \times$ 抗CD3/CD28四量体抗体複合体 (Stem Cell Technologies, Vancouver, BC, Canada) を補充された200 μ l Immunocult XF培地 (Stem Cell Technologies, Vancouver, BC, Canada) 中、96ウェルU底プレートにプレーティングした。必要に応じてより大きなウェルに再プレーティングするとともに、新鮮な培地およびサイトカインを2~3日間ごとに添加した。新鮮な抗CD3/CD28を7および14日目に添加した。細胞を血球計数器で毎週カウントした。

【0312】

10

11. 人工APC (aAPC) CTL刺激アッセイ

5×10^4 個の全ATO由来CD8SP T細胞を、6週目のTCR形質導入ATOから選別し、200 μ l AIM V/5% ヒトAB血清中、96ウェルU底プレートにて、CD80を発現するK562に基づくaAPC、およびHLA-A*02:01/B2M/NY-ESO-1_{157~165}一本鎖三量体 (Dr. Antoni Ribas、UCLAからの贈与)、または親K562細胞とともに、5:1のT細胞:K562比で一晩共培養した。CD170a-APC抗体 (Biolegend, San Diego, CA) を、培養の最後の4時間、タンパク質輸送阻害剤カクテル (eBioscience, San Diego, CA) と一緒に1:50の最終希釈でウェルに添加し、その後に、上記の固定、透過化、および細胞内サイトカイン染色が続いた。

【0313】

12. TCR V β 分析

20

7週目のATOまたは出生後胸腺由来の全細胞を、IOtest Beta Mark TCR Vキット (Beckman Coulter, Indianapolis, IN) と併せて、CD3、CD4、CD8、およびTCR γ δ に対して染色した。CD3+TCR γ δ -CD8+CD4-細胞を、V β 分析のためにゲート制御した。TCR形質導入ATOに関しては、6週目の全ATO細胞を、APCコンジュゲートHLA-A*02:01/NY-ESO-1_{157~165}四量体 (MBL International, Woburn, MA) でも標識し、かつV β 分析のためにCD3+TCR γ δ -四量体+CD8+CD4-に対してゲート制御した。

【0314】

13. フローサイトメトリーおよび抗体

すべてのフローサイトメトリー染色は、PBS/0.5% BSA/2mM EDTA中、氷上で30分間実施された。抗体染色の前に、FcX (Biolegend, San Diego, CA) をすべてのサンプルに5分間添加した。四量体共染色に関しては、氷上での付加的な20分間の抗体の添加前に、PEまたはAPCコンジュゲート四量体 (MBL International, Woburn, MA) を、室温で10分間、1:50の最終希釈で細胞に添加した。分析前に、DAPIをすべてのサンプルに添加した。分析は、UCLA広域幹細胞研究センターフローサイトメトリー中核部 (Broad Stem Cell Research Center Flow Cytometry Core) にて、LSRII Fortessa、およびARIAまたはARIA-H機器でのFACS (BD Biosciences, San Jose, CA) で実施された。すべての分析に関して、DAPI+細胞をゲートをかけて外し、かつ単一細胞を、FSC-H対FSC-WおよびSSC-H対SSC-Wプロファイルに基づいてゲート制御した。表面および細胞内染色に用いられた抗体クローンは、Biolegend (San Diego, CA) : CD1a (HI149)、CD3 (UCHT1)、CD4 (RPA-T4)、CD5 (UCHT2)、CD8 (RPA-T8)、CD10 (6H6)、CD14 (M5E2)、CD19 (HIB19)、CD24 (ML5)、CD25 (BC96)、CD27 (O323)、CD28 (CD28.2)、CD31 (WM59)、CD34 (581)、CD38 (HIT2)、CD45 (HI30)、CD45RA (HI100)、CD45RO (UCHL1)、CD56 (HCD56)、CD107a (H4A3)、CD127 (A019D5)、CD235a (HI264)、CCR7 (G043H7)、HLA-A2 (BB7.2)、インターフェロン γ (4S.B3)、IL-4 (MP4-25D2)、TCR α β (IP26)、TCR γ δ (B1)、V β 13.1 (H131)、ヒト系統カクテル (CD3、CD14、CD19、CD20、CD56) ; または、BD Biosciences (San Jose, CA) : CD7 (M-T701)、およびCD62L (DREG-56)、から得た。

【0315】

実施例3: 人工胸腺オルガノイドは、ヒト造血幹細胞からのTCR改変T細胞の陽性選択および対立遺伝子排除を誘導する

改変T細胞療法は、がんおよび慢性ウイルス感染症の治療のための前例のない機会を提

50

供する。造血幹細胞・前駆細胞（HSPC）から改変T細胞を直接生成し得る能力は、同種反応性を含めた、末梢血T細胞の使用に伴う主な治療的制約を克服する潜在力を有する。本実施例は、臍帯血、骨髄、および末梢血HSPCからの、天然のおよびTCR改変されたヒトT細胞の非常に効率的なインビトロ分化および陽性選択を支持する、臨床的に関連する人工胸腺オルガノイド（ATO）システムを記載する。ATO由来T細胞は、ナイーブ表現型、多様なTCRレパートリー、ならびにTCR依存的活性化および増殖を呈した。ATO由来TCR改変T細胞もナイーブ表現型に成熟し、さらにインビトロおよびインビボでの抗原特異的腫瘍殺傷、ならびに対立遺伝子排除の誘導と一致した内因性TCR V β 発現の完全に近い欠如を示した。ゆえに、ATOは、養子細胞療法のためのナイーブでかつ潜在的に非同種反応性の改変T細胞の生成のための効率的な方法を提示する。

10

【0316】

抗原特異的T細胞受容体（TCR）を発現するように操作されたT細胞を用いた養子細胞療法は、悪性腫瘍および慢性ウイルス感染症のための、標的化されたかつ潜在的に治療的な治療を提供する。現在の戦略は、成熟した循環T細胞の遺伝子改変およびエクスピボ増殖に依存する。これらの手法は、抗原特異的反応性の低下または自己免疫の誘導の潜在性ととともに、再輸血後の限定されたインビボ活性、ならびに形質導入されたおよび内因性のTCR鎖間での誤対合を含めた、いくつかの治療的制約を課す。さらに、内因性TCR発現によって付与された同種反応性は、ほとんどの手法を自家T細胞の使用に制限しており、それは究極的に、費用の増加、限定された産生能、およびリンパ球減少症の状況における患者不適格性により療法への接近を限定し得る。造血幹細胞・前駆細胞（HSPC）からの改変T細胞のインビトロ生成は、ナイーブの抗原特異的T細胞のデノボ生成、および対立遺伝子排除による内因性TCR発現の抑制を同時に可能にすることによって、これらの問題を解決する潜在力を有する。

20

【0317】

胸腺におけるT細胞発生の時空間的複雑さにより、インビトロT細胞分化の方法は、今までのところ、ヒトT細胞発生を完全に再現することはできていない。そのような方法における主要な進歩は、古典的OP9-DL1共培養システムにおいて実証される、Notchリガンドを形質導入されたマウス間質細胞株が、マウスまたはヒトHSPCからのインビトロT細胞分化を支持し得るという発見であった。このおよび類似の単層システムにおいて、ヒトHSPCは、T系統コミットメントおよび初期T細胞分化を受ける。しかしながら、生産的に再編成されたTCRを有するT細胞先駆体の陽性選択は損なわれ、かつCD8+またはCD4+シングルポジティブ（SP）T細胞への最小限の成熟しか見られない。本発明者らは、マウスまたはヒト胸腺組織を用いた三次元（3D）オルガノイドシステムが、インビトロにおけるヒトT細胞の改善された陽性選択および成熟を支持することを示した。しかしながら、これらのシステムは、低い細胞産出量、高い実験的可変性、および初代胸腺組織への依存性が原因で、治療的適用のためのT細胞の生成に適していない。それゆえ、本発明者らは、HSPCからのヒトT細胞の分化および陽性選択を支持し得、一方で標準化された構成要素、再現性、および拡張性などの主な橋渡しの特性を保持する、人工オルガノイドシステムの開発を追求した。

30

【0318】

本実施例は、DLL1を形質導入された間質細胞株および血清不含のすぐに使える構成要素に基づく、人工胸腺オルガノイド（ATO）システムの開発を示している。単層システムとは対照的に、ATOは、ヒト臍帯血、骨髄、および末梢血CD34+ HSPCからの、ヒトCD3+TCR $\alpha\beta$ +CD8SPおよびCD4SP T細胞の堅牢なインビトロ分化、陽性選択、および成熟を支持した。ATO由来成熟T細胞は、抗原刺激に応答して、抗原ナイーブ表現型、多様なTCRレパートリー、および活性化/増殖を呈した。ATOは、腫瘍関連抗原NY-ESO-1に特異的なHLA-A*02:01拘束TCRを形質導入されたHSPCからの、TCR改変された抗原特異的T細胞の非常に効率的な分化も支持した。TCR改変T細胞の陽性選択は、ATO間質細胞における同族主要組織適合複合体（MHC）の発現によってさらに増強された。ATO由来TCR改変T細胞は、ナイーブ表現型を呈し、かつインビトロおよびインビボでの堅牢な腫瘍殺傷を有する抗原特異的活性化を

40

50

受けた。最後に、ATOにおいて生成されたTCR改変T細胞は、発生の際の対立遺伝子排除の誘導と一致した内因性V β TCR発現の完全に近い欠如を呈し、そして養子細胞療法のための非同種反応性の改変T細胞を生成することへの直接的かつ効率的な手法を示唆した。

【0319】

I. 結果

A. インビトロヒトT細胞分化のための最適化された人工胸腺オルガノイドシステムの開発

目標は、HSPCからのヒトT細胞のインビトロ陽性選択および成熟を支持し得る臨床的に橋渡し可能なオルガノイドシステムを開発することであった。初代胸腺組織の使用を回避するために、本発明者らは、DLL1を形質導入された間質細胞株を、3Dオルガノイド培養においてヒトT細胞発生を支持し得る能力について検査した。OP9-DL1システムにおけるT細胞分化は、ウシ胎仔血清の特異的ロットに依存して非常に可変的であることが観察され、そして本発明者らは、オルガノイド培養においてT細胞分化を一貫して支持し得る血清不含条件を同定することを求めた。専売の足場材料の使用を回避するために、間質細胞が遠心分離によってHSPCと凝集しかつ空気-流体界面で細胞培養インサート上に配備される、胸腺組織に基づくオルガノイドにおいて有効であることが示された圧縮再凝集技法が用いられた(図3A)。これらの3D培養において、本発明者らは、T細胞枯渇したCD34+臍帯血(CB) HSPCからのヒトT細胞分化を強く支持するものとして、ヒトDLL1を形質導入されたMS-5マウス骨髓間質細胞株(以後、MS5-hDLL1)を同定した。さらに、本発明者らは、MS5-hDLL1オルガノイド培養において堅牢なヒトT細胞分化を一貫して支持する新規な血清不含培地として、B27、神経幹および胚性幹細胞培養において用いられる多構成要素添加物、ならびにFLT3L、IL-7、ならびにアスコルビン酸を補充されたRPMI(以後、「RB27」)を同定した。

【0320】

この最適化された人工胸腺オルガノイド(ATO)システムは、2週目までのCD5+CD7+細胞の優勢、ならびにCD4+CD3-未成熟シングルポジティブ(ISP)細胞およびCD4+CD8+(DP)細胞の現れによって示されるように、CB CD34+CD3- HSPCからの迅速でかつ堅牢なT系統コミットメントを誘導した(図3B)。より成熟したCD3+TCR $\alpha\beta$ +細胞は、早くも4週目に出現しかつ経時的に増加し、6週目に平均約30%に到達した(図3B、14A)。より小さな画分のCD3+TCR $\gamma\delta$ +T細胞も生成された(図14A)。CD3+TCR $\alpha\beta$ +細胞は、初期の時点で圧倒的にDPであったが(図14A)、次第にCD8SP、およびより低い程度にCD4SP T細胞に成熟し、ATOにおける陽性選択と一致した。

【0321】

CD34+前駆細胞は、調べられたすべての時点でATOにおいて検出可能なままであり、そして6週目の時点で、胸腺T細胞前駆体の3つすべての表現型ステージ：複能性CD34+CD7-CD1a-初期胸腺前駆体(ETP)、ならびに発生的に下流にあるCD34+CD7+CD1a-およびCD34+CD7+Cd1a+ T系統前駆体、をなおも含んだ(図3C)。代替的な分類スキームに基づき、プロ-T1およびプロ-T2前駆体表現型も、CD34+画分内で同定された(図3C)。CD19+ B細胞頻度は経時的に減少し、かつNKおよび骨髓頻度は全体にわたって低かった(図3B、14A)。ATOの組織学的切片は、豊富なリンパ系細胞を有する高密度な組織様構築を実証し(図19)、そのクラスターはCD3に対して陽性であった(図3D)。

【0322】

各ATOは、典型的に、6週目の時点で約 2×10^6 個の全細胞を生成したが(図14B)；しかしながら、HSPCあたりのATO細胞収量は、播種されたHSPCの数、およびHSPC対間質細胞の比率に反比例し、最も低い比率でHSPCあたり4~5,000細胞の収量が生成された(図20A)。ATOにおける先駆体および成熟T細胞の頻度は、損なわれた成熟T細胞発生を示した、多数の間質細胞(ATOあたり 6×10^5 個)で生成されたATOを除いて、当初のHSPC数および比率にわたって同程度であった(図20B)。ゆえに、1:20という最適なHSPC対間質細胞比を有するより小さなATO(典型的に、ATOあたり7500個のHSPC: 6×10^5 個の間質細胞)を、さらなる実験に用いた。細胞産出量およびT細胞分化の両方の高い再現性は、技術的複製($n=11$)およびB27の4つの異なるロットにわたって観察された(図21A~D)。橋渡しの適切

なことは、ゼノフリー-B27を補充された培地（ヒト血清アルブミンを含有する）を用いた（図21E～F）、または照射された間質細胞を含有する（図21G～J）ATOにおいても、比較可能なT細胞分化および細胞産出量が見られた。ATOにおいて生成された造血細胞の回復は、単純な機械的分断および細胞懸濁液の回収によって達成され、それは、>99%のCD45+造血細胞および<0.5%の間質細胞をもたらした（図21K）。

【0323】

同じドナーCB HSPCを用いたOP9-DL1単層培養システムと比較した場合、ATOは、CD3+TCR $\alpha\beta$ + T細胞の際立って優れた生成を明らかにした（図11A、22）。以前の報告と一致して、OP9-DL1単層は、効率的なT系統コミットメント（CD7+CD5+）、ならびにETP、プロ-T、およびCD4 ISPステージを通じた進行を支持したが、DP、CD3+TCR $\alpha\beta$ +, および成熟SP細胞の非効率的な生成を支持し、そのすべてはATOにおいて容易に発生した（図11A、22）。実際、OP9-DL1は、RB27中で生存しにくく、かつ3D培養においてT細胞分化の乏しい支持を示したように、最適な陽性選択および成熟は、ATOシステムの3つすべての構成要素：3D構造、MS5-hDLL1間質細胞、およびRB27培地を要した（図11A）。DLL1発現を欠く親MS-5細胞株は、単層または3D培養のいずれにおいてもT細胞発生を支持しなかった（図11A）。

【0324】

要約すると、ATOは、CD34+ HSPCからの堅牢でかつ再現可能なT細胞分化を支持する、標準化された血清不含3Dシステムを提供し、ヒトTCR $\alpha\beta$ + T細胞の陽性選択および成熟を可能にする。

【0325】

B. ATOにおける胸腺ナイーブT細胞発生の再現

次に、ATOにおけるT細胞分化を、出生後ヒト胸腺におけるものと比較した。12週目のCB ATOは、胸腺と同程度の頻度のT系統コミットした（CD5+CD7+）およびCD34+の前駆体を示した（図4A）。胸腺に見られるように、ATOにおけるCD3+ T細胞の大多数はTCR $\alpha\beta$ +であったが、容易に検出可能なTCR $\gamma\delta$ +集団も一貫して見られた（図4A）。ATO由来CD3+TCR $\alpha\beta$ +細胞の中で、成熟CD8SPおよびCD4SP T細胞の生成は、6～12週目の間に増加した（図4Bおよび図12A～C）。胸腺とは対照的に、ATOは、CD8SP T細胞に対して比例的により少ないCD4SP T細胞を呈した。

【0326】

胸腺に見られるように、ATO由来CD3+TCR $\alpha\beta$ +CD8SPおよびCD3+TCR $\alpha\beta$ +CD4SP T細胞は、「未成熟ナイーブ」（CD45RA-CD45RO+CD27+CCR7-CD1a高）から「成熟ナイーブ」（CD45RA+CD45RO-CD27+CCR7+CD1a低）表現型に推移した（図4C、図12A～C）。ATOにおいて、これは6～12週目の間に生じ、かつ胸腺においてよりも、12週目のATOによってより高い頻度の成熟ナイーブT細胞をもたらした（図4C、図12B～C）。未成熟および成熟ナイーブサブセットの両方は、CD62LおよびCD28を共発現し、CD127およびCD31のサブセット共発現を有し、後者のマーカーは血中における最近の胸腺移住T細胞と関連していた（図12B～C）。活性化マーカーCD25は、ATO由来CD8SP T細胞上で発現しなかったが、CD4SP T細胞のサブセット上では観察された（図12B～C）。まとめると、これらのデータは、胸腺および血液において見出されるものに類似した本物のナイーブT細胞の出現に至る、ヒト胸腺と比較したATOにおけるT細胞分化の顕著な忠実性を示している。

【0327】

ATOにおける成熟CD4SP T細胞の後期出現を考慮すると、樹状細胞もATOにおいて発生し得、かつMHCクラスII発現を通じて陽性選択を仲介し得ると仮定された。実際、珍しいHLA-DR+細胞が、胸腺におけるものと同程度の頻度でATOに存在した（図23A）。この集団についてのさらなる分析は、単球、B細胞、ならびに形質細胞様の、CLEC9A+の、およびCD1c+の樹状細胞を含めた抗原提示細胞を明らかにしており、そのすべては胸腺にも存在する（図23B）。

【0328】

C. 複数種のHSPC供給源およびサブセットからのT細胞分化

すべての臨床的に関連するHSPC供給源、すなわち成体骨髄（BM）、G-CSF動員末梢血（M

10

20

30

40

50

PB)、および非動員末梢血 (PB) からの、先駆体およびCD3+TCR $\alpha\beta$ + T細胞の同程度の頻度を有する、ATOにおける効率的なT細胞分化が見られた (図3A~B、15A~B、13A~B)。これらの供給源由来およびまた胸腺由来のHSPCは、T細胞分化の種々の動態を呈示したが (図15A)、しかしながらT細胞産出量は、HSPC供給源にわたって匹敵した (図3d)。CB、BM、またはMPB由来の高度に富化された造血幹細胞 (HSC) 画分 (lin-CD34+CD38-) は、同程度に堅牢なT細胞分化を実証した (図5C~D、図13D~E)。

【0329】

ATOは、BMから単離された精製リンパ系前駆体からのT細胞分化も誘導した (図15C~D)。リンパ系刺激された複能性前駆体 (LMPP) およびCD24-共通リンパ系前駆体 (CLP) は、HSC (示さず) または未分画CD34+lin- HSPCのいずれかよりも迅速に分化した (図24A~B) 10。対照的に、主としてBおよびNK細胞潜在性を所有するCD24+ CLPは、ATOにおいて乏しいT細胞分化および細胞産出量をもたらした (図15C~D、24A)。ゆえに、ATOは、ヒト幹細胞および前駆細胞集団からのT系統潜在性を評価するためのツールとして働き得る。

【0330】

D. ATO由来T細胞のTCR多様性および機能

胸腺と同様に、RAG1およびRAG2は、ATO由来DPにおいて発現した (図25A)。ATO由来のCD3+TCR $\alpha\beta$ +CD8SP (図16A) およびCD3+TCR $\alpha\beta$ +CD4SP (図25B) T細胞におけるTCR V β ファミリー使用法についてのフローサイトメトリー分析は、ヒト胸腺由来の対応するT細胞のものに著しく類似した多様性を明らかにした。加えて、胸腺CD8SP細胞およびPBナイーブCD8+ T細胞におけるものに匹敵する、CD3+TCR $\alpha\beta$ +CD8SPにおける非常に多様なTCRレパートリーが、TCR V α およびV β CDR3領域のディープシーケンシングによって見られた (図16B~C)。重要なことには、偏ったV α またはV β 使用法は観察されず、非従来のT細胞サブセットまたはクローン増殖させた成熟T細胞の、ATOにおける優勢に反論した。 20

【0331】

ATO由来CD8SP T細胞は、細胞傷害性表現型と一致する、PMA/イオノマイシンに応答した多機能的なIFN γ 、TNF α 、およびIL-2産生 (図16D)、それだけでなく抗CD3/CD28およびIL-2刺激に応答した堅牢な増殖ならびにCD25および4-1BBの上方調節を呈した (図16E)。ATO由来CD4SP細胞は、IFN γ およびIL-2を産生し、かつ抗CD3/CD28およびIL-2に応答して増殖した (図25C~D)。ATOから単離されたCD8SP (図16F) およびCD4SP (図25E) の数は、抗CD3/CD28およびIL-2により、14日間にわたってそれぞれ約60倍および約40倍増殖させた 30。要約すると、ATOにおいて生成された成熟T細胞は、生理学的なTCR多様性、および抗原刺激に対する機能的応答を呈した。

【0332】

E. ATOにおけるナイーブTCR改変T細胞の生成

次に、本発明者らは、HSPCからのTCR改変T細胞のインビトロ生成にATOを適応させた。CB CD34+CD3- HSPCに、NY-ESO-1_{157~165} ペプチドに特異的なHLA-A*02:01拘束TCRのコドン最適化 α および β 鎖をコードするレンチウイルスベクターを形質導入した。7週目の時点で、TCR形質導入ATOは、モック形質導入対照と同程度の頻度のCD5+CD7+ T系統細胞を示したが、CD3+TCR $\alpha\beta$ + T細胞を際立って増加させ、その大多数は、四量体、または形質導入されたV β 13.1鎖に対する抗体での染色によって見られるように、形質導入されたTCRを発現した (図7A)。CD8SP細胞の頻度は、モック形質導入対照由来のCD3+TCR $\alpha\beta$ +四量体+細胞とCD3+TCR $\alpha\beta$ +細胞との間で同程度であったが、四量体+CD8SP細胞は、成熟ナイーブ表現型 (すなわち、CD45RA+CD45RO-CD27+CCR7+CD1a^低) への加速した成熟を呈示した (図7A) 40。留意すべきことに、四量体+CD8SP細胞は、NK細胞および上皮内リンパ球と関連したマーカーであるCD16またはCD56の発現なく、従来のCD8 $\alpha\beta$ T細胞表現型を呈示した (図17A)。

【0333】

TCR形質導入は、ATOからの有意に増強した細胞収量ももたらした (HSPCあたり平均約450個の細胞) (図17B)、その大多数はCD3+四量体+ T細胞であった。ゆえに、7,500個のTCR形質細胞HSPCで開始された単一のATOは、典型的に約4 $\times$ 10⁶個の細胞を生成し、そのうち 50

のおよそ15% (6×10^5 個)は、7週目までにCD3+四量体+ CD8SPCD45RA+ 成熟ナイーブT細胞であった(図7A、17B)。

【0334】

TCR形質導入ATOからのATO由来CD8SP細胞は、CD80および同族HLA-A*02:01/NY-ESO-1ペプチド-MHC一本鎖三量体を発現する人工抗原提示細胞(aAPC)に応答して、抗原特異的活性化($\text{IFN } \gamma$ 、 $\text{TNF } \alpha$ 、およびIL-2産生)、脱顆粒(CD107a膜動員)(図17C)、および増殖(図17ED)を受けたが、非関連のHLA-A*02:01/MART-1 aAPCまたは親K562細胞に対してはそうではなかった。さらに、TCR形質導入ATOから単離されたCD8SP T細胞は、抗CD3/CD28およびIL-2またはIL-7/IL-15のいずれかに応答して、堅牢な増殖を示した(図17E)。四量体+細胞は、長期にわたる増殖および再活性化の後でさえ、従来のCD8 α β 表現型をさら

10

【0335】

ATO由来TCR改変T細胞におけるV β 多様性についてのフローサイトメトリー分析は、四量体+ CD8SP T細胞の98%を上回る割合が、形質導入されたV β 13.1セグメントのみを発現することを明らかにし(図7F、26B)、ATOにおけるTCR改変T細胞の分化の間の内因性V β 発現の完全に近い対立遺伝子排除と一致した。ゆえに、ATOは、HSPCからの機能的TCR改変T細胞の堅牢な分化、およびTCRの誘導を支持し、細胞増殖を増強し、かつ内因性TCR V β 発現を欠く成熟ナイーブT細胞の分化を促進した。

【0336】

上記の知見を、NY-ESO-1 TCRを超えて拡張し得るかどうかを検査するために、コドン最適化HLA-A*02:01拘束MART-1特異的TCRを用いてATOを生成した。これらのATOから単離されたCD3+四量体+CD8SPは、ナイーブT細胞表現型を実証し(図26C)、かつMART-1 aAPCに応答して $\text{IFN } \gamma$ およびCD107a表面発現を上方調節したが、NY-ESO-1 aAPCではそうではなかった(図26D)。

20

【0337】

F. MHC改変ATOにおけるTCR改変T細胞の陽性選択の増強

胸腺における陽性選択は、T細胞先駆体上のTCRと胸腺間質細胞および造血細胞上の自己MHCとの間の相互作用によって仲介される。ゆえに、ATOにおける「自己」MHCの間質系発現の増加が、TCR改変T細胞の陽性選択を増強し得るかどうかを検討された。HLA-A*02:01陽性HPSCに、HLA-A*02:01拘束NY-ESO-1特異的TCRを形質導入し、かつ対照MS5-hDLL1間質、またはHLA-A*02:01を形質導入されたMS5-hDLL1と組み合わせた(図27A)。ATO間質細胞におけるHLA-A*02:01の発現は、四量体+CD3+CD8SP T細胞の陽性を増強し(図27A)、一方で成熟ナイーブ表現型への正常な分化を維持した(図27B)。

30

【0338】

G. ATO由来TCR改変T細胞による抗原特異的腫瘍殺傷

次に、本発明者らは、ATO由来TCR改変T細胞の抗原特異的細胞傷害性を検査した。NY-ESO-1特異的TCR形質導入ATOから単離されかつインビトロで36時間活性化された精製CD8SP T細胞は、NY-ESO-1発現細胞株(HLA-A*02:01/NY-ESO-1 pMHC複合体を形質導入したK562細胞；および、NY-ESO-1抗原が内因的に発現しているHLA-A*02:01+ U266多発性骨髄腫細胞株)においてアポトーシスを強力に誘導したが、親K562細胞、または非関連のHLA-A*02:01/MART-1 pMHCを発現するK562細胞に対してはほとんど活性を示さなかった(図18A~B)。さらに、抗原特異的細胞傷害性は、長期にわたる(14日間)インビトロ増殖後に保たれ、従来のT細胞表現型の保持と一致し(図18C)；細胞傷害性は、同じ期間増殖させたTCR形質導入PB CD8+ T細胞のものと同程度であった(図18C)。これらの結果と一致して、増殖させたATO由来TCR改変T細胞は、同族(K562-ESO) pMHC抗原を発現するK562腫瘍を皮下生着させたNSGマウスにおいて疾患負荷を有意に制御し得たが、非関連の(K562-MART1) pMHC抗原ではそうではなかった(図18D~F)。

40

【0339】

II. 注釈

インビトロにおいて胸腺リンパ球形成を忠実に再現し得る能力は、抗原ナイーブ状態お

50

よび内因性TCR発現の欠如を含めた、望ましい治療的形質を有する改変T細胞の産生のための固有の機会を与える。本明細書で実証されるように、標準化されたすぐに使える構成要素を用いて、ATOシステムは、HSPCからのT細胞のコミットメントおよび分化の正常なステージを効率的に開始、維持し、胸腺および末梢血由来のナイーブの従来のT細胞に近似する成熟CD3+TCR α β +CD8SPおよびCD3+TCR α β +CD4SP T細胞の産生に至る。

【0340】

ATOは、インビトロT細胞分化の既存の方法と比較して、明確な生物学および橋渡しの利点を提供する。第一に、ATOは、ヒトT細胞の陽性選択および成熟を支持し、その両方とも単層システムでは損なわれている。同一の構成要素で準備した単層培養が非効率的なT細胞分化をもたらしたように、ATOにおける陽性選択の増強は3D構造に依存している。これは、低い効率ではあるが、FTOC、または胸腺構成要素を用いた再凝集3D培養における観察された陽性選択と一致している。3D相互作用が、T細胞先駆体と、DLL1などの発生リガンドまたは自己MHCなどの選択的リガンドとの間の接触の価数および/または持続期間を増加させることによって、T細胞発生の改善を支持することは可能である。あるいは、3D立体配置は、間質細胞および造血細胞間でのクロストークを促し得る、または2Dでは別様に可能でない機械的力および/もしくは代謝的变化を通じてT細胞先駆体に対して発生シグナルを発揮し得る。

10

【0341】

既存の方法を上回るATOシステムの別の主要な進歩は、臍帯血、骨髄、および休止のまたは動員された末梢血を含めた、HSPCの臨床的に関連する成体供給源からの非常に効率的なT細胞分化である。現在の単層システムは、CB、BM、またはMPBからのTCR α β + T細胞の非効率的な発生のみを可能にし；休止末梢血HSPCに関するデータは報告されていない。

20

【0342】

本明細書で実証されるように、ATOシステムは、HSPCからTCR改変ナイーブT細胞も生成し得る。ヒトHSPCからのTCR改変T細胞の分化は、OP9-DL1システムにおいて実証されているが、これらの報告において、CD3+CD8SP細胞への成熟は損なわれ（典型的に、培養物の0～2%のみに当たる）、胸腺由来CD34+細胞を用いて最も高い効率が達成された。対照的に、ATOは、MPB HSPCを用いて観察された類似の結果を有して、CB HSPCからのTCR改変T細胞の堅牢な陽性選択を支持した（示さず）。ATOにおいて達成された成熟ナイーブT細胞表現型は、養子移入されたT細胞のインビボ生存および活性の向上が、より低く分化し活性化された表現型と相関することを示した調査に基づき、改変された末梢血T細胞を上回る、ATO由来改変細胞の明確な利点も提供し得る。ATO間質細胞における同族MHCの発現による、TCR改変ナイーブT細胞の陽性選択の増強は、成熟したATO由来抗原特異的T細胞の収量を増加させるためのさらなる道を提供する。

30

【0343】

T細胞分化を通じた、形質導入されたTCRのATOにおける存在は、内因性V β TCR遺伝子座の完全に近い対立遺伝子排除を仲介し、移植されたマウスおよびヒトHSPCのインビボ調査と一致した。改変末梢血T細胞上での潜在的に同種反応性の内因性TCRの発現は、拡張可能なすぐに使える養子T細胞療法の開発の主要な障壁であり、自家改変T細胞の労働集約的な個別化された産生を必要としている。同種異系の改変T細胞療法を開発するためのストラテジーは、遺伝子編集による内因性TCR/CD3発現の分断、またはウイルス特異的T細胞のTCR形質導入を含むが；しかしながら、そのような手法の両方とも、後続のインビボ機能に潜在的に支障をきたす、遺伝子改変されたT細胞の大掛かりな操作および増殖を要する。ゆえに、ナイーブの対立遺伝子排除された改変T細胞のデノボ生成のためのATOの使用は、養子細胞療法のための非同種反応性T細胞を産生するための非常に効率的な代替的ストラテジーを提示する。

40

【0344】

ATOシステムは、技術的簡便性、再現性、および潜在的拡張性も提供する。血清不含培地の使用は、単層システムにおいてウシ胎仔血清を用いて観察される著しい可変性を回避し、そして簡便な培地交換を有して培養の持続期間（最高20週間）の間ATOをインタクト

50

に維持し得る能力は、単層システムに関しては要される、新鮮な間質細胞上への細胞の頻繁な移動を回避する。T細胞の非常に純度の高い集団は、機械的解離によってATOから容易に回収され、かつ標準的方法によってさらに精製されて<0.5%の汚染している間質細胞を除去し得る。ATO産生とゼノフリー試薬および間質細胞照射とを組み合わせ得る能力と合わせた、すぐに使える構成要素の使用、具体的には初代間質細胞または専売の足場材料の回避は、養子療法のためのT細胞を生成するための臨床グレードのプラットフォームへのATOの橋渡しを簡便化するであろう。該システムの簡便性は、ヒトT細胞発生および陽性選択をモデル化することに関心がある研究室において、方法の簡単な採択をさらに可能にする。

【0345】

10

III. 方法

A. ヒトCD34+CD3- HSPCの単離

新生児へその緒臍帯血を、UCLAにおいて分娩からの捨てられた臍帯および胎盤ユニットから得た。骨髓 (BM) を、UCLAにおいて同種異系BMドナー収集物からの捨てられた材料を通じて健康成体ドナーから得た、またはAllCells Inc. (Alameda, CA) から購入した。G-CSF動員末梢血を、UCLAにおいて同種異系幹細胞移植供与のためにアフエーシスを受けた同意している健康成体ドナーから得た。非動員末梢血を、UCLA CFARウイルス学中核部を通じて健康成体ドナーから得た。すべての組織サンプルを、UCLA IRBに承認されたプロトコールまたは適用除外の下で得た。すべてのサンプルを、Ficoll-Paque (GE Healthcare Life Sciences, Pittsburgh, PA) 勾配遠心分離、それに続くCD34 MicroBead Kit UltraPure (Miltenyi, Auburn CA) を用いた磁気細胞選別 (MACS) によるCD34+細胞の陽性選択によって、単核細胞について富化した。別様に付記されていない限り、CD34+細胞富化画分を、MACS後に冷凍保存した。使用前に、細胞を融解し、かつ残余のT細胞を、CD34+CD3-細胞を選別することによってFACSにより枯渇させ、それを直ちにATOに播種または下記のように形質導入した。一部の実験では、ATOに播種する前に、HSCをLin-CD34+CD38-細胞についてFACSによって富化した。TCR形質導入実験において用いられたHSPCは、HLA-A*02:01+ CBユニット由来のものであった。高分解能HLA-A2型付けは、配列特異的オリゴヌクレオチド (SSO) ビーズを用いて、UCLA免疫遺伝学センターによって実施された。

20

【0346】

B. ヒト骨髓前駆体サブセットの単離

30

CD34+ HSPCを、上記のように新鮮なBM吸引物から富化し、かつ、以下のマーカー：全HSPC (CD34+)、HSC (CD34+CD38-CD45RA-)、LMPP (CD34+CD38+CD45RA+CD10-CD62L^高)、CD24- CLP (CD34+CD38+CD45RA+CD10+CD24-)、およびCD24+ CLP (CD34+CD38+CD45RA+CD10CD24+) と組み合わせた、CD45の陽性発現および系統マーカーの発現不在 (CD3、CD14、CD19、CD56、およびCD235a；「Lin-」) に基づき、幹/前駆体集団についてFACSによって直ちに選別した。

【0347】

C. ヒト胸腺細胞の単離

出生後ヒト胸腺を、ロサンゼルス子ども病院 (CHLA) において、心臓手術を受けた患者からの捨てられた廃棄物として、IRB適用除外の下で得た。胸腺フラグメントをRPMI中で細かく刻み、かつピペッティングによって分断して懸濁液中に胸腺細胞を放出し、その後70 μmナイロン製ストレーナーの通過が続いた。細胞を、新鮮な同日または翌日に分析した。胸腺およびATO由来のT細胞前駆体についてのフローサイトメトリー分析は、以下の表面表現型：初期胸腺前駆体 (ETP；CD34+CD7-CD1a-)、CD1a- プロ-T (CD34+CD7+CD1a-)、およびCD1a+ プロ-T (CD34+CD7+CD1a+)；または、CD5- プロ-T (プロ-T1；CD34+CD7+CD5-) およびCD5+ プロ-T (プロ-T2；CD34+CD7+CD5+) を用いた。胸腺およびATO由来のT細胞および先駆体は、以下の表現型：全T系統細胞 (CD7+CD5+)、ダブルネガティブ (DN；CD4-CD8-)、CD4未成熟シングルポジティブ (CD4 ISP；CD5+CD4+CD3-)、ダブルポジティブ (DP；CD4+CD8+)、CD8SP (CD3+TCR α β +CD8+CD4-)、CD4SP (CD3+TCR α β +CD8-CD4+)、未成熟ナイーブ (CD8SPまたはCD4SPであるCD45RA-CD45RO+)、成熟ナイーブ (CD8SP

40

50

またはCD4SPであるCD45RA+CD45RO-)と組み合わせた、CD14-CD56-として規定された。未成熟のおよび成熟したナイーブ表現型を、CD1a、CD27、CD28、およびCCR7に対して共染色することによって確認した。

【0348】

D. 初代ヒトT細胞の単離

胸腺T細胞を、上記のように胸腺細胞調製物から単離し、そして末梢血および臍帯血CD8+ T細胞を、上記のように単核細胞画分から単離した。すべての供給源からのCD8+ T細胞単離は、CD8+ T細胞単離キット (Miltenyi) を用いた、CD8SP T細胞についての磁気ビーズ富化によるものであった。一部の実験では、胸腺T細胞をFACSによってさらに精製して、CD4 ISPまたはDP先駆体およびPB T細胞を枯渇させて、ナイーブT細胞 (CD45RO-CCR7+) を単離した。

【0349】

E. 細胞株

MS-5マウス間質細胞株を贈与として得た。MS5-hDLL1を生成するために、MS-5細胞に、ヒトDLL1およびGFPをコードするレンチウイルスベクターを形質導入した。最も高い5% GFP発現細胞をFACSによって選別し、かつDMEM/10% FCS中で継代した。安定な発現を、培養の数週間後にGFP発現に対するフローサイトメトリーによって確認し、そしてDLL1発現を、qRT-PCRおよびDNAシーケンシングによって確認した。MS5-hDLL1細胞にヒトHLA-A*02:01レンチウイルスベクター (Dr. David Baltimore, Caltechからの贈与) を形質導入し、それに続くヒトHLA-A2を認識する抗体 (BB7.2) (Biolegend, San Diego, CA) を用いた形質導入された細胞のFACS選別によって、MS5-hDLL1-A2.1細胞を作製した。OP9-DL1細胞株 (マウスD111を発現する) は、Dr. Juan Carlos Zuniga-Pflucker (トロント大学) からの贈与であり、そして0.1%ゼラチンコーティングされたフラスコ中にてMEM α (ThermoFisher Scientific, Grand Island, NY) /20% FBS中で継代した。K562細胞株はATCCから得、そしてRPMI/10% FCS中で維持した。K562 aAPCを、全長ヒトCD80およびHLA-A*02:01/B2M/NY-ESO-1_{157~165}またはMART-1_{26~35}一本鎖三量体 (SCT; Dr. David Baltimore, Caltechからの贈与) をコードするレンチウイルスベクターによるK562細胞の共形質導入によって生成した。K562標的細胞を、いずれかのSCT単独による形質導入によって作製した。K562インビボ標的細胞を、ホタルルシフェラーゼレンチウイルスベクター (Dr. Donald Kohn, UCLAからの贈与)、それに続くいずれかのSCTによる逐次的な形質導入によって作製した。K562形質導入体を、使用前にFACS選別した。U266多発性骨髄腫細胞株は、Dr. John Chute (UCLA) からの贈与であり、そしてRPMI/10% FCS中で維持した。

【0350】

F. 人工胸腺オルガノイド (ATO) 培養

MS5-hDLL1 (またはMS-5もしくはOP9-DL1、付記されたとおり) 細胞をトリプシン処理によって収集し、かつ、RPMI 1640 (Corning, Manassas, VA)、4% B27サプリメント (ThermoFisher Scientific, Grand Island, NY)、PBS中で再構成された30 μ M L-アスコルビン酸2-リン酸セスキマグネシウム塩水和物 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)、1% ペニシリン/ストレプトマイシン (Gemini Bio-Products, West Sacramento, CA)、1% Gluta max (ThermoFisher Scientific, Grand Island, NY)、5ng/ml rhFLT3L、および5ng/ml rhIL-7 (Peprotech, Rocky Hill, NJ) から構成される血清不含ATO培養培地 (「RB27」) 中に再懸濁した。RB27は毎週新鮮にされた。表示される実験において、4%ゼノフリーB27がB27の代わりに置換された。実験に応じて、 $1.5 \sim 6 \times 10^5$ 個のMS5-hDLL1細胞を、1.5ml エッペンドルフチューブ中にてATOあたり $3 \times 10^2 \sim 1 \times 10^5$ 個の精製CD34+CD3-細胞 (または他のHSPC集団、表示されたとおり) と組み合わせ、かつスイングバケット遠心分離機にて4℃で5分間300gで遠心分離した。上清を慎重に除去し、かつ細胞ペレットを短時間のボルテックスによって再懸濁した。各ATOに対して、0.4 μ m Millicellトランスウェルインサート (EMD Millipore, Billerica, MA; Cat. PICMORG50) を、1ウェルあたり1mlのRB27を含有する6ウェルプレートに置いた。ATOをプレーティングするために、インサートを取り出してプレートの端に休ませ、過剰な培地を流出させた。細胞スラリーをATOあたり5~8

μlに調整し、20 μlピペットチップ内に吸い上げ、ピペットチップの端部に液滴を形成させて細胞インサート上に穏やかに堆積させることによってプレーティングした。細胞インサートを、1mLのRB27を含有するウェルに置き戻した。細胞インサート周辺からの吸引、それに続く1mlの新鮮なRB27/サイトカインでの置き換えによって、培地を3~4日間ごとに完全に交換した。ATOをこの形式で最高20週間培養した。表示される時点で、各ウェルにFACSバッファー (PBS/0.5% ウシ血清アルブミン/2mM EDTA) を添加し、かつ1ml「P1000」ピペットでピペッティングすることによってATOを短時間分散させ、それに続く70 μmナイロン製ストレーナーの通過によって、ATO細胞を収集した。一部の実験では、MS5-hDLL1細胞の単一細胞懸濁液を、ATOにおける使用前に表示される線量でγ照射した。

【0351】

10

G. T細胞単層共培養

OP9-DL1単層培養を、以前に記載されたように準備した。簡潔には、OP9-DL1細胞を、使用の1~2日前に、0.1%ゼラチンコーティングされた12ウェルプレートに播種して、70~80%コンフルエンスに到達させた。培地を単層から吸引し、かつ $1 \times 10^4 \sim 1.5 \times 10^4$ 個の精製CD34+CD3- HSPCを、MEM α、20% FBS、30 μM L-アスコルビン酸、5ng/ml rhFLT3L、および5ng/ml rhIL-7から構成される2mlの培地中、間質単層上にプレーティングした。一部の实验では、MS-5またはMS5-hDLL1がOP9-DL1の代わりに置換され、かつRB27が培養培地として置換された。細胞を収集し、70 μmナイロン製ストレーナーを通して濾過し、かつ新鮮な培地中に再プレーティングすることによって、細胞を4~5日間ごとに新たな間質細胞単層に移した。コンフルエントの場合、細胞を、新鮮な間質層を含有する複数のウェルに分けた。培養を最高10週間維持した。

20

【0352】

H. レンチウイルスベクターおよび形質導入

ヒトDLL1の全長コード配列を、ヒトuniversal reference RNAセット (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) からのRT-PCRによって、第三世代レンチウイルスベクターpCCL-c-MNDU3-X-IRES-eGFP (Dr. Donald Kohn, UCLAからの贈与) 内にクローニングした。ヒトCD80を、pCCL-c-MNDU3内に同様にクローニングした。HLA-A*02:01/NY-ESO-1_{157~165}に特異的なTCRのコード最適化αおよびβ (Vb13.1) 鎖をコードする第三世代レンチウイルスベクター (1G4 TCRクローンに由来する) は以前に記載されており、そしてDr. Antoni Ribas (UCLA) からの贈与であった。コード最適化HLA-A*02:01/MART-1_{26~35}特異的TCR (F5 TCRクローンに由来する) は、Dr. Donald Kohn (UCLA) からの贈与であった。HLA-A*02:01およびHLA-A*02:01/B2M/NY-ESO-1_{157~165}またはHLA-A*02:01/B2M/MART-1_{26~35}一本鎖三量体に対するコード配列は、Dr. David Baltimore (Caltech) からの贈与であり、そしてpCCL-c-MNDU3-X-IRES-mStrawberry内にサブクローニングされた。レンチウイルス粒子のパッケージングおよび濃度は、以前に記載されたように実施された。簡潔には、293T細胞 (ATCC) に、TransIT 293T (Mirus Bio, Madison, WI) を用いて、レンチウイルスベクタープラスミド、pCMV-ΔR8.9、およびpCAGGS-VSVGを17時間共トランスフェクトし、その後20mM酪酸ナトリウムによる8時間の処理が続き、その後血清不含UltraCulture中での48時間の細胞上清の生成が続いた。上清を、4℃で40分間4000xgでAmicon Ultra-15 100Kフィルター (EMD Millipore, Billerica, MA) を用いたタンジェンシャルフロー濾過によって濃縮し、かつアリコートとして-80℃で保管した。HSPC形質導入に関しては、 $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$ 個のFACS選別されたCD34+CD3- HSPCを、50ng/mlの組換えヒトSCF、FLT3L、およびTPO、ならびに10ng/ml IL-3 (Peprotech, Rocky Hill, NJ) を補充された1ml X-VIVO-15 (Lonza, Basel, Switzerland) 中、20 μg/mlレトロネクチン (Clontech, Mountain View, CA) でコーティングされた6ウェル非処理プレートに12~18時間プレーティングし、その後、濃縮されたレンチウイルス上清を100の感染多重度 (MOI) で添加した。モック形質導入細胞を、ベクターの添加なしの同一の条件で培養した。細胞を形質導入の24時間後に収集し、洗浄し、かつATOに播種した。末梢血T細胞の形質導入に関しては、以前に記載されたように、健常ドナー由来のCD8+ T細胞を、CD8+ T細胞単離キット (Miltenyi) を用いた磁気陰性選択によって単離し、かつ形質導入の4日前に、抗CD3/CD28ビーズ (ThermoF

30

40

50

isher Scientific) および20ng/ml IL-2を有するAIM V/5%ヒトAB中で活性化/増殖させた。形質導入されたT細胞を、その後、使用前にIL-2 (20ng/ml) 中で増殖させた。

【0353】

I. 免疫組織化学

ヘマトキシリンおよびエオシン (H&E) 画像に関しては、ATOをHistogel (ThermoFisher Scientific, Grand Island, NY) に包埋し、かつ10%中性緩衝ホルマリン (ThermoFisher Scientific, Grand Island, NY) 中で一晩固定した。5 μ m切片およびH&E染色は、UCLA トランスレーショナル病理学中核研究室 (TPCL) によって実施された。免疫蛍光イメージングに関しては、各ATO周辺の培養インサートをメスで切り込み、それに続いて膜およびATOをTissue-Tek OCT (VWR Radnor, PA) に包埋し、ドライアイス上で凍結させることによって、ATOを単離した。5 μ mの凍結切片を10%中性緩衝ホルマリン中で固定し、1:50希釈の抗CD3 (クローンUCHT1; Biolegend, San Diego, CA) で4°Cにて一晩染色し、続いてその後、室温でAlexaFluor 594コンジュゲート抗マウスIgG (H+L) (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) とインキュベーションした。H&Eおよび免疫蛍光画像を、AxioCam MR MおよびAxioVisionソフトウェアを備えたZeiss AxioImager M2 (Zeiss, Jena, Germany) で取得した。

【0354】

J. T細胞サイトカインアッセイ

ATO由来の成熟したCD8SPまたはCD4SP細胞を、CD8+またはCD4+単離キット (Miltenyi) を用いた磁気陰性選択によって単離し、かつFACSによって選別して、CD45RO+細胞 (未成熟ナイーブT細胞およびCD4ISP先駆体を含有する) をさらに枯渇させた。精製されたT細胞集団を、5%ヒトAB血清 (Gemini Bio-Products, West Sacramento, CA) を有する200 μ l AIM V (ThermoFisher Scientific, Grand Island, NY) 中、96ウェルU底プレートにプレATINGした。PMA/イオノマイシン/タンパク質輸送阻害剤カクテルまたは対照タンパク質輸送阻害剤カクテル (eBioscience, San Diego, CA) を各ウェルに添加し、かつ6時間インキュベートした。細胞を、固定、ならびに細胞内染色バッファーキット (eBioscience, San Diego, CA) による透過化、ならびにIFN γ 、TNF α 、IL-2、IL-4、またはIL-17Aに対する抗体 (Biolegend, San Diego, CA) による細胞内染色の前に、CD3、CD4、およびCD8 (Biolegend, San Diego, CA)、ならびにUV455固定可能な生存率色素 (eBioscience, San Diego, CA) で染色した。

【0355】

K. T細胞活性化および増殖アッセイ

CFSE増殖アッセイに関しては、ATO由来CD8SPまたはCD4SP T細胞を、上記のように陰性選択MACSによって単離し (上記のCD4SP T細胞のさらなるFACS精製とともに)、かつメーカーのプロトコールに従い、5 μ M CFSE (Biolegend, San Diego, CA) で標識した。標識された細胞を、5% AB血清および20ng/ml rhIL-2 (Peprotech, Rocky Hill, NJ) を補充されたAIM V中、抗CD3/CD28ビーズ (ThermoFisher Scientific, Grand Island, NY) とともにインキュベートし、かつCD25または4-1BB (Biolegend, San Diego, CA) に対して共染色し、かつ5日目にフローサイトメトリーによって分析した。一部の実験では、メーカーのプロトコールに従い、標識化に関して、CFSEがCellTrace Violet (CTV; ThermoFisher) の代わりに置換された。インビトロ細胞増殖アッセイに関しては、上記のように単離された $5 \times 10^3 \sim 1 \times 10^4$ 個のATO由来CD8SPまたはCD4SP T細胞を、200 μ l中96ウェルU底プレートにプレATINGし、かつ抗CD3/28ビーズ、および20ng/mL IL-2または5ng/mL IL-7のいずれか、および5ng/mL IL-15 (Peprotech) で活性化/増殖させた。ビーズを4日目に除去し、かつ必要に応じてより大きなウェルに再プレATINGするとともに、新鮮な培地およびサイトカインを2~3日間ごとに添加した。細胞を血球計数器で毎週カウントした。一部の実験では、細胞を、新鮮な抗CD3/CD28ビーズで14日目に再刺激した。

【0356】

L. 人工APC (aAPC) CTL刺激アッセイ

1×10^5 個の全ATO由来CD8SP T細胞を、上記のようにMACSによって6週目のTCR形質導入AT

10

20

30

40

50

0から単離し、かつ200 μ l AIM V/5%ヒトAB血清中、96ウェルU底プレートにて、CD80を発現するK562由来aAPC、およびHLA-A*02:01/B2M/NY-ESO-1_{157~165}もしくはHLA-A*02:01/B2M/MART-1_{26~35}のいずれかの一本鎖三量体、または親K562細胞とともに、4:1のT細胞:K562比で6時間共培養した。CD170a-APC抗体 (Biolegend, San Diego, CA) を、培養の持続期間の間、タンパク質輸送阻害剤カクテル (eBioscience, San Diego, CA) と一緒に1:50の最終希釈でウェルに添加した。次いで、上記のように、細胞を表面マーカーに対して染色し、固定し、透過化し、かつサイトカインに対して細胞内染色した。

【0357】

M. TCR V β 表現型分析

7週目のATOまたは出生後胸腺由来の全細胞を、IOtest Beta Mark TCR Vキット (Beckman Coulter, Indianapolis, IN) と併せて、CD3、CD4、CD8、およびTCR γ δ に対して染色した。CD3+TCR γ δ -CD8+CD4-細胞を、V β 分析のためにゲート制御し、かつV β ファミリー使用法を、チューブごとの3種の異なるV β 抗体に当たる、FITC+、PE+、またはFITC+PE+細胞パーセントによって判定した。TCR形質導入ATOのV β 分析に関しては、6~7週目のATO由来の全細胞を、表面抗体染色の前に、APCコンジュゲートHLA-A*02:01/NY-ESO-1_{157~165}四量体 (MBL International, Woburn, MA) で10分間付加的に標識し、かつ細胞を、V β 分析のためにCD3+TCR γ δ -四量体+CD8+CD4-に対してゲート制御した。

【0358】

N. TCRレパートリーシーケンシング

全RNAを、メーカーの指示書に従いRNeasy Microキット (Qiagen) を用いて、40,000~200,000個のATOもしくは胸腺CD8SP、またはPB CD45RO- CCR7+ナイーブCD8+ T細胞からFACSによって精製した。RNAの濃度および質を、Agilent RNA 6000 Nanoチップを用いて判定した。再編成されたTCR可変遺伝子を含む標的cDNAライブラリーを、以下のような改変を有するSMARTer PCR cDNA合成キット (Clontech) を用いて、5'-RACEによって調製した。第一鎖cDNAを、メーカーのプロトコールを用いるがポリ-dTプライマー (5'-T30VN-3') を置換して、3.5~500ngの全RNAから調製した。二本鎖TCR α およびTCR β cDNAライブラリーを、Advantage 2 PCRキット (Clontech) を用いて、セミネステッドPCRによって別個に調製した。TCR α cDNAの初回増幅は、メーカーの順方向Universal Primer Mixと、TRAC

(5'-GCCACAGCACTGTTGCTCTTGAAGTCC-3' (SEQ ID NO. 1))

に結合する1対の逆方向プライマーとによる、0.5 μ Lの第一鎖反応 (=TE中、2.5 μ Lの1:5希釈) を用いた。TCR α cDNAのセミネステッド増幅は、メーカーの順方向Primer IIAと、TRAC

(5'-X5GGCAGGGTCAGGGTTCTGGAT-3' (SEQ ID NO. 2))

に結合するバーコード化された逆方向プライマーとにより行われ、式中、X5は、ディープシーケンシング前のサンプルプールを可能にする5ntのサンプル特異的バーコードである。TCR β cDNAの増幅は同様であるが、初回増幅は、TRBC

(5'-CCACCAGCTCAGCTCCACGTG-3' (SEQ ID NO. 3))

に結合する逆方向プライマーにより実施され、かつセミネステッド増幅は、TRBC

(5'-X5GGGAACACSTTKTTCAGGTCCTC-3' (SEQ ID NO. 4))

に結合するバーコード化されたプライマーにより行われた。TCR α およびTCR β cDNA調製物を、DNA Clean and Concentrator-5キット (Zymo Research) を用いて浄化した。Illuminaアダプターライゲーション、およびMiSeqシーケンサー (Illumina) での2 $\times$ 150bpのペアエンドシーケンシングの前に、最高10サンプルからのTCR α およびTCR β cDNA調製物をプールした。サンプル特異的バーコードを用いた逆多重化の後、BLATを用いて、読み取りを、IMGTデータベースからダウンロードされたヒトTRAV、TRAJ、TRBV、TRBD、およびTRBJ配列のすべての考え得る組み合わせを含むカスタム参照データベースと並べた。最高のBLATヒットを、「-maxAligns=1-ignoreIntrons」オプションを用いたBLAT一式のpslCdnafilterユーティリティで同定し、そしてクロノタイプ頻度を、カスタムPerlスクリプトを用いて算出した。

10

20

30

40

50

【0359】

O. インビトロ細胞傷害性アッセイ

CD8SP T細胞を、上記のとおり、機械的分断および磁気陰性選択によってATOから単離した。T細胞を、抗CD3/CD28ビーズ (ThermoFisher Scientific) および20ng/ml IL-2を有するAIM V/5%ヒトAB血清中、96ウェル丸底プレートで36時間活性化した。長期増殖のため、細胞をIL-2中で最高14日間さらに培養した。細胞傷害性アッセイに関しては、AIM V/5%ヒトAB血清中、1ウェルあたり 1×10^5 個の細胞から開始して、T細胞の2倍の連続希釈を、96ウェル丸底プレート中にウェルごとにプレーティングした。HLA-A*02:01/NY-ESO-1_{157~165}もしくはHLA-A*02:01/MART-1_{26~35}一本鎖三量体を形質導入されたK562標的細胞、またはNY-ESO-1を内因的に発現するHLA-A*02:01+ U266を、1ウェルあたり 5×10^4 個の細胞でプレーティングした。標的細胞のアポトーシス細胞死を、9時間の時点でアネキシンV/D API染色によって定量化した。抗原特異的T細胞パーセントを、四量体染色によって判定し、かつそれを用いて、各ウェルのエフェクター:標的 (E:T) 比を適及的に算出した。T細胞を受けたウェルから、T細胞を受けていないウェルにおけるアネキシンV+標的細胞パーセントを差し引くことによって、T細胞特異的細胞死を算出した。

10

【0360】

インビボ腫瘍アッセイ

すべての動物実験は、UCLA学長動物実験委員会 (UCLA Chancellor's Animal Research Committee) によって承認されたプロトコールの下で行われた。4~6週齢のNOD.Cg-Prkdcscid Il2rgtm1Wjl/SzJ (NSG) マウス (Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine) に、HLA-A*02:01/NY-ESO-1_{157~165}またはMART-1_{26~35}一本鎖三量体およびホタルルシフェラーゼ (上記) を形質導入された 2×10^5 個のK562標的細胞を皮下に埋め込んだ。マウスを、ルシフェリンの腹腔内注射によって、3日目に腫瘍生物発光に対して撮像した。上記のように、ATO由来CD8SP T細胞を単離し、かつ14日間活性化/増殖させた。腫瘍の埋め込み後の3日目に、 5.7×10^6 個 (注射の日の四量体染色によって判定される、 4.5×10^6 個の抗原特異的T細胞を含有する) を、眼窩後方静脈を通じて注射した。対照マウスへのPBSの注射も実施した。腫瘍生物発光を少なくとも21日間3~4日間ごとに繰り返し、その後、疾患負荷基準に基づいてマウスを屠殺した。

20

【0361】

P. フローサイトメトリーおよび抗体

すべてのフローサイトメトリー染色は、PBS/0.5% BSA/2mM EDTA中、氷上で30分間実施された。抗体染色の前に、FcX (Biolegend, San Diego, CA) をすべてのサンプルに5分間添加した。四量体共染色に関しては、氷上での付加的な20分間の抗体の添加前に、PEまたはAPCコンジュゲートHLA-A*02:01/NY-ESO-1_{157~165}またはHLA-A*02:01/MART-1_{26~35}四量体 (MBL International, Woburn, MA) を、室温で10分間、1:50の最終希釈で細胞に添加した。分析前に、DAPIをすべてのサンプルに添加した。分析は、UCLA広域幹細胞研究センターフローサイトメトリー中核部にて、LSRII Fortessa、およびARIAまたはARIA-H機器でのFACS (BD Biosciences, San Jose, CA) で実施された。すべての分析に関して、DAPI+細胞をゲートをかけて外し、かつ単一細胞を、FSC-H対FSC-WおよびSSC-H対SSC-Wに基づいてゲート制御した。表面および細胞内染色に用いられた抗体クローンは、Biolegend (San Diego, CA) : CD1a (HI149)、CD3 (UCHT1)、CD4 (RPA-T4)、CD5 (UCHT2)、CD8 (SK1)、CD10 (6H6)、CD14 (M5E2)、CD19 (HIB19)、CD24 (ML5)、CD25 (BC96)、CD27 (O323)、CD28 (CD28.2)、CD31 (WM59)、CD34 (581)、CD38 (HIT2)、CD45 (HI30)、CD45RA (HI100)、CD45RO (UCHL1)、CD56 (HCD56)、CD107a (H4A3)、CD127 (A019D5)、CD235a (HI264)、CCR7 (G043H7)、HLA-A2 (BB7.2)、インターフェロン γ (4S.B3)、IL-2 (MQ1-17H12)、IL-4 (MP4-25D2)、IL-17A (BL168)、TCR $\alpha\beta$ (IP26)、TCR $\gamma\delta$ (B1)、TNF α (Mab11)、V β 13.1 (H131)、ヒト系統カクテル (CD3、CD14、CD19、CD20、CD56) ; ならびに、BD Biosciences (San Jose, CA) : CD7 (M-T701)、およびCD62L (DREG-56)、から得た。

30

40

【0362】

50

実施例4：種々の間質細胞がATOモデルシステムにおいて用いられ得る

ATOシステムがより橋渡しの的であるために、他の間質細胞株を、マウス起源由来であるMS5-hDLL1を置き換え得るそれらの能力について検査した。HS27a細胞はヒト骨髓細胞株であり、そしてそれは低レベルの成長因子を分泌するため有力な候補である。HS27a細胞にhDLL1を形質導入することによって、Notchリガンド（hDLL1）を発現するHS27a細胞株を生成した。高レベルのhDLL1を発現する細胞をFACSによって精製し、増殖させた。Notchシグナル伝達の非存在下で、ATOシステムにおけるHS27a細胞は、T細胞分化を支持し得なかった（図28A～C）。MS5間質細胞に加えて、HS27aは、3つの異なる臍帯血サンプル調製物において、ATOシステムにおけるT細胞分化を支持し得ることが見出された、図29A～C。図30に示されるように、HS27a-DLL1 ATOにおいて見られるCD8+細胞の堅牢な集団における細胞の大多数は、それらが（the）CD3およびTCRabを発現しないため、従来のCD8SP細胞ではない。成熟マーカーの使用は、HS27a-hDLL1間質細胞が、3つの異なる臍帯血調製物からのTCRab+CD3+ CD8SPおよびCD4SP細胞の生成を有して、成熟T細胞の分化を支持し得ることを示している（図31A～C）。しかしながら、効率は、MS5-hDLL1 ATOにおいてよりも低い。

【0363】

実施例5：幹細胞および前駆細胞の種々の供給源は、ATOシステムを用いてT細胞に分化し得る

本明細書において記載されるATOシステムは、（種々の供給源由来の）ヒト造血幹細胞からインビトロで機能的なナイーブT細胞を生成する効率的でかつ堅牢なモデルである。このシステムは、ヒト胚性幹細胞（hESC）から成熟した機能的なナイーブヒトT細胞を生成するために適応している。本発明者らは、最初期中胚葉コミットした前駆体に相当しかつすべての中胚葉系統（平滑筋、心筋細胞、造血系統、間葉系統）を生じさせ得る、胚性中胚葉前駆体（hEMP）集団を同定した。このhEMP集団は、Epcamマーカー（CD326）の発現の喪失およびCD56の発現の増大によって規定され、そしてFACSによって容易に単離され得る（例えば、Evseenko et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 2010 Aug 3;107(31):13742-7を参照されたい）。簡潔には、MEF（マウス胎仔線維芽細胞）上で培養されたhESCは、80～90%コンフルエンスでマトリゲルに移され得る。いったん移されると（0日目）、細胞は、アクチビン、BMP4、VEGF、bFGFを含む培地中で培養される。1～2日後、BMP4、VEGF、およびbFGFを含む新たな培地が添加される。3～4日目に、細胞は、EPCAMのそれらの喪失およびCD56の増大に基づいて選別され得る。hEMP集団を単離し、かつそれとMS5-hDLL1間質細胞とを凝集させることによって、ES由来ATOシステムを作製した。そのプロトコールは、RPMI-B27培地（SCF/IL7/Flt3Lの添加を有する）の使用によるT細胞分化の誘導前に、ATOにEGM2培地および造血系サイトカイン（SBおよびSFT3）を供給する、2週間の造血系誘導を要する。hEMPのステージにおける3D凝集は、T細胞の生成を支持することが見出された。OP9細胞（ATOではない）上でhEMPから分化した単離されたCD34+からのATOの生成は、T細胞分化を支持しなかった（データ示さず）。幹細胞の選択集団としてのhESCによるATOに由来するT細胞集団が図32に示されている。hESC由来のATOシステムにおけるT細胞の分化の動態、およびCD8ab SP細胞の生成が図33に示されている。図34～35に示されるように、hESC由来のATOにおいて生成されたT細胞は、臍帯血細胞を用いて観察されるものと同様に、成熟ナイーブ表現型のマーカーを発現する。図36に示されるように、hESCの使用は、複数種の幹細胞供給源にわたって再現可能である。図36は、3種の異なるhESC株由来のATOシステム（4週目）からのT細胞分化を示している。ATOシステムは、iPSC株からの成熟T細胞の生成を可能にした（図37）。さらに、未分化hESC（単離されたhEMPの代わりに）の3D凝集、それに続く以前に記載された種々の分化培地の使用は、同様にT細胞の生成を可能にした（図38）。さらに、複数種のNotchリガンドがATOシステムにおいて用いられ得る。図39に示されるように、ATOシステムは、間質細胞株が、hDLL1の代わりにhJAG1を発現する場合、hESCからのT細胞成熟も支持し得る。hESC由来のATOシステムにおいて生成されたT細胞は、多様なTCR Vbレパートリーを示すことも見出された（図40）。図41に示されるように、hESC由来T細胞は、抗CD3/CD28およびIL2に応答して、増殖およびCD25上方調節を呈する。単離された細胞をCTV（セルトラッカーバイオレット）で染色し、かつCD3/CD28

10

20

30

40

50

活性化ビーズとともに5日間インキュベートした。細胞は、CTVの希釈によって示される複数回の細胞分裂、およびCD25の発現によって示される活性化を受けた（図41A）。さらなる実験において、単離された細胞を、PMA/イオノマイシンで6時間処理し、そして細胞内染色は、刺激に応答した細胞傷害性サイトカイン（IFNg、IL2、TNFa）の産生を示した（図41B）。

【0364】

次に、外因性TCRを発現するように操作されたT細胞が、開始材料としてhESCを用いたATOシステムから生成され得るかどうかを判定することが求められた。H1 hESCに、GFPを発現するopt1G4ベクター（NY-ESO TCR）を形質導入した。GFP+細胞を単離し、増殖させることによって、H1 NY-ESO TCR hESC株を作製した。次いで、細胞を上記の同じプロトコールに付して、T細胞分化を誘導した。これは図42に描写されている。hESC由来のATOにおいて生成された改変T細胞は、GFPおよび四量体の発現によってモニターされ得る。これらの細胞は、T細胞分化の古典的なやり方（DP、CD3+/TCR+ CD8SP）に従った（図43）。5週目の時点で、改変hESC由来CD8SP T細胞は、成熟ナイーブ表現型：CD45 RA+、CD27+、CD62L+、CD31+を示している（図44A～B）。hESC由来のATOにおいて生成された改変CD8SP T細胞（5週目）をインビトロで機能的に検査した。単離された細胞をCTV（セルトラッカーバイオレット）で染色し、かつCD3/CD28活性化ビーズとともに、またはCD80および同族HLA-A*02:01/NY-ESO-1ペプチド-MHC一本鎖三量体もしくは非関連のHLA-A*02:01/MART-1 aAPCを発現する人工抗原提示細胞（aAPC）の存在下で5日間インキュベートした。細胞は、CD3/28活性化、および同族ペプチドを発現するaAPCに応答して、CTVの希釈によって示される複数回の細胞分裂、およびCD25の発現によって示される活性化を受けた（図45）。このアッセイにおいて、細胞は、非関連ペプチドを発現するaAPCの存在下で生存しなかった。さらなる実験において、単離された細胞を、PMA/イオノマイシンで6時間処理した。細胞内染色は、刺激に応答した細胞傷害性サイトカイン（IFNg、IL2、TNFa）の産生を示した（図46）。細胞は、CD107aの発現によって示される脱顆粒も受けた（図46）。2つの個々のアッセイにおいて、単離された細胞を、CD80および同族HLA-A*02:01/NY-ESO-1ペプチド-MHC一本鎖三量体または非関連のHLA-A*02:01/MART-1 aAPCを発現する人工抗原提示細胞（aAPC）の存在下で6時間インキュベートした。分析は、同族ペプチドを発現するaAPCに応答した、細胞傷害性サイトカイン（IFNg、IL2、TNFa）の産生および脱顆粒（CD107a）を示したが、非関連のものではそうではなかった。1つの代表的な実験が図47に示されている。次に、単離された細胞を、それらの増殖能について検査した。それらをCD3/CD28ビーズで4日間活性化し、かつ5%ヒトAB血清およびIL2（20ng/ml）を補充されたAIM V培地中で2週間維持した。結果は、2週間の時点での細胞の20倍の増殖を示している（図48）。

【0365】

実施例6：ATO培地補充

B27サプリメントの構成要素を検査して、ATOシステムへのそれらの相対的な寄与を判定した。下記の表は、B27サプリメントの構成要素を示す。

ビタミン	ビオチン	10
	酢酸 DL アルファトコフェロール	
	DL アルファートコフェロール	
	ビタミン A(アセテート)	
タンパク質	BSA、脂肪酸不含画分 V	10
	カタラーゼ	
	ヒト組換えインスリン	
	ヒトトランスフェリン	
	スーパーオキシドジスムターゼ	
他の構成要素	コルチコステロン	20
	D-ガラクトース	
	エタノールアミン HCl	
	グルタチオン(還元型)	
	L-カルニチン HCl	
	リノール酸	
	リノレン酸	
	プロゲステロン	
	プトレシン 2HCl	
	亜セレン酸ナトリウム	
	T3(トリヨード-I-サイロニン)	

【0366】

臍帯血ATO (CD34+CD3- HSPCで開始された) を準備した、B27サプリメントのどの構成要素が必須であるかを判定した。コンプリート (標準) B27 (「B27 comp」) を、単一の構成要素の欠失を除いて同一である4種のサプリメント (すべて、同じメーカーによって供給された) : ビタミンAなし (B27-Vit A)、抗酸化物質なし (B27-A0)、インスリンなし (B27-インスリン)、および生体異物構成要素なし (B27ゼノフリー) と比較した。示されるデータは、両方とも6週間の時点における2つの独立した実験からのものである。グラフは、全細胞産出量 (上) およびT細胞コミットした細胞 (CD5+CD7+) の% (下) を示している。図49~50に示されるように、インスリンは、ATOシステムにおけるT細胞コミットメントに必須であること、ならびにビタミンAおよび抗酸化物質は細胞増殖を促すことが判定された。さらに、B27のゼノフリー処方、非ゼノフリーと比較して、ATOにおけるT細胞分化および増殖に対して類似の結果を与える。結論として、インスリンはATOにおけるT細胞産生に必須であり、生体異物不含はコンプリートB27と同等であり、そしてVit Aおよび抗酸化物質は、細胞産出量を増強するがT細胞分化に必須ではない。

【0367】

実施例7：人工胸腺オルガノイド（ATO）システムを用いた、ヒト造血幹細胞/前駆細胞からのCAR-T細胞の生成

本調査において、本発明者らは、ATOにおける正常なT細胞分化に対するCARシグナル伝達の効果を判定し、ATO由来CAR-T細胞のインビトロおよびインビボ機能ならびに抗腫瘍効力を判定し、かつCARがTCR対立遺伝子排除を仲介し得る能力を判定しようと追及した。この目標に向けて、CD19標的化CARを臍帯血CD34+CD3⁻ HSPC内に形質導入した。次いで、これらの細胞をATOシステムに4～6週間の期間供した。

【0368】

図52に示されるように、ATOにおけるCAR発現は、T系統細胞に大きく限定される。キメラ抗原受容体（CAR）は、表面発現およびシグナル伝達に関してCD3またはTCRサブユニットに依存しないため、それらは複数の細胞系統において発現し得る。CD19特異的第二世代（CD28/CD3ゼータ）CARおよびeGFPをコードするベクターを形質導入されたCD34+CD3⁻ CB HSPCの系統産出量を、標準的ATO培養（すなわち、MS5-hDLL1間質、5ng/ml FLT3Lおよび5ng/ml IL-7を補充されたRB27培地）において検査した。簡潔には、7500個の形質導入されたHSPCを、1:20のHSPC:間質細胞比で凝集させ、かつ4週間記載されるように培養した。4週間の時点で、ATOを分断し、かつ全ヒト細胞を（本明細書で示される）系統マーカーについて分析した。eGFP⁺（CAR⁺）の単球（CD14⁺）、顆粒球（CD66b⁺）、B細胞（CD19⁺）、またはNK細胞（CD56⁺）はほとんどなかった。CAR⁺細胞の大多数は、CD5⁺およびCD7⁺であり、T細胞系統と一致した。留意すべきことに、CAR⁺細胞は、CD3、TCRab、およびTCRgd発現の完全に近い欠如を呈示し、非従来のT細胞分化を示唆した。

【0369】

ATO由来CAR-T細胞は、非従来のT細胞分化を呈示する。モックまたはCD19特異的第二世代（CD28/CD3ゼータ）CARのいずれかを形質導入されたCB HSPCで開始された4週目のATO由来の細胞を、T細胞マーカーについて分析した。CAR形質導入細胞（GFP⁺に対してゲート制御された）は、圧倒的にT系統（CD5+CD7⁺）であったが、DN～DP～SP T細胞分化の典型的なパターンを示さなかった。その代わり、ほとんどの細胞はDNまたはCD8SPであった（中央の列）。さらに、ATO CAR-T細胞におけるCD3/TCR表面発現の証拠はなかった。これは図53に示されている。非従来のT細胞分化にもかかわらず、ATO由来CAR-T細胞（CD19特異的第二世代（CD28/CD3ゼータ）CARを形質導入されたCB HSPC由来）は、CD27およびCCR7の共発現とともにCD45RA+CD45RO⁻として特徴付けされる正常なナイーブT細胞表現型を呈示した（図54）。これらの細胞はCD62Lも共発現した（示さず）。

【0370】

ATO由来CAR-T細胞は、CD2および細胞内CD3を発現する。図55に示されるように、ATO由来CAR-T細胞（CD19特異的第二世代（CD28/CD3ゼータ）CARを形質導入されたCB HSPC由来）は、CD5、CD7、CD2、および細胞内CD3を共発現し、T系統細胞としてのそれらの同一性を裏付けている。

【0371】

ATO由来CAR-T細胞は、DNまたはCD8 $\alpha\alpha$ ⁺のいずれかである。ATO由来CAR-T細胞（CD19特異的第二世代（CD28/CD3ゼータ）CARを形質導入されたCB HSPC由来）は、ヒト胸腺、またはTCR形質導入HSPCから生成されたATO由来T細胞のいずれかからの従来のT細胞とは対照的に、CD8ベータを発現しない（図56A）。それらは、CD56およびCD16を含めた、先天性様T細胞に特徴的なマーカーも発現する（図56B）。まとめると、ATO由来CAR-T細胞は、ヒト上皮内リンパ球（IEL）に似ている。

【0372】

ATOにおけるそのIEL様CAR-T細胞分化は、ATOにおける同族抗原との相互作用、および/またはCARを通じた緊張性（tonic）シグナル伝達のいずれかを通じて生じるアゴニスト選択（すなわち、CARを通じた強いシグナル伝達）によって推進されると仮説が立てられる。初期T細胞分化の間の（例えば、DNステージにおける）強いシグナル伝達は、発生中のT細胞が、従来のT細胞分化を迂回し、かつIEL様系統への非古典的分化に入るように推進する（図57）。

【0373】

ATO由来CAR-T細胞は、それがCARとともに形質導入された場合、TCRを発現し得る。ATOにおいて4週間培養された、CAR（CD19特異的第二世代（CD28/CD3ゼータ））および/またはTCR（コドン最適化1G4 TCR）を共形質導入されたCB HSPCは、CD3および形質導入されたTCRを共発現するCAR+細胞（GFP+）をもたらした（四量体染色によって示される）（図58）。これは、T細胞としてのそれらの同一性と一致する（CD3サブユニットはTCR発現に要されるため）。留意すべきことに、TCRの形質導入は、ATOにおけるCAR-T細胞の非従来のIEL様分化に影響を及ぼさない。

【0374】

形質導入されたTCRを共発現するATO由来CAR-T細胞は、CARおよびTCR抗原シグナル伝達によって活性化される。CAR（CD19特異的第二世代（CD28/CD3ゼータ））またはCARおよびTCR（コドン最適化1G4 TCR）を共形質導入されたCB HSPCから生成されたATO由来全GFP+細胞を、6週目のATOから単離し、かつ非特異的K562細胞、CD19（CAR標的）またはHLA-A*02:01/B2M/NYES01157~165の一本鎖三量体（TCR標的）を形質導入されたK562細胞とともに6時間共インキュベートした。T細胞活性化を、インターフェロンガンマに対する細胞内染色、およびCD107aに対する表面染色によって分析した。CAR+TCR共形質導入ATO由来のT細胞は、CARおよびTCR標的細胞の両方に応答した（図59）。

【0375】

ATO由来CD19 CAR-T細胞は、付加的な活性化/共刺激なしで、CD19+細胞に応答して機能的である。CAR（CD19特異的第二世代（CD28/CD3ゼータ））を形質導入されたCB HSPCから生成されたATO由来全GFP+細胞を、6週目のATOから単離し、かつ非特異的K562細胞、CD19を形質導入されたK562細胞（CAR標的）、CD19+ Nalm-6白血病細胞株、またはCD19+ Rajiリンパ腫細胞株とともに6時間共インキュベートした。T細胞活性化を、インターフェロンガンマ、TNFα、およびIL-2に対する細胞内染色、ならびにCD107aに対する表面染色によって分析した。ATO由来CAR-T細胞は、外因性サイトカインの添加なしで、標的細胞に応答して活性化を受けた（図60）。

【0376】

図61は、ATO由来CD19 CAR-T細胞が細胞傷害性であることを示している。CAR（CD19特異的第二世代（CD28/CD3ゼータ））を形質導入されたCB HSPCから生成されたATO由来全GFP+細胞を、6週目のATOから単離し、種々のエフェクター対標的（E:T）比で、非特異的K562細胞またはCD19+ Nalm-6白血病細胞株とともに9時間共インキュベートした。腫瘍細胞株のアポトーシスを、アネキシンV/DAPI染色によって測定した。

【0377】

図62に示されるように、ATOにおけるIEL様分化（すなわち、アゴニスト選択）は、種々のCAR構築物に関して見られる。種々のCAR構築物：CD19特異的第一世代（CD3ゼータ）、第二世代（CD28/CD3ゼータまたは4-1BB/CD3ゼータ）；またはGD2特異的第二世代（CD28/CD3ゼータ）CAR、を形質導入されたCB HSPC。ATOにおける分化を、6週間の時点で評価した（形質導入されたGFP+細胞に対してゲート制御して）。すべてのCAR構築物に関して、類似のIEL様T細胞分化が見られた。

【0378】

実施例8：ATOにおけるCAR形質導入ES細胞からのCAR-T細胞分化

ヒトES細胞からのATO由来CAR-T細胞は、PMA/イオノマイシンに応答してサイトカインを産生する。5週目のATOからのH1またはH1-CAR由来CD45+細胞を、PMA/イオノマイシンで6時間処理した。活性化は、インターフェロンガンマおよびIL-2に対する細胞内染色によって示される。

【0379】

H1、またはCD19特異的第二世代（CD26/CD3ゼータ）CARを形質導入されたH1細胞のいずれかからのT細胞分化。H1-CAR株に、CARおよびeGFPをコードするレンチウイルスを安定に形質導入した。H1またはH1-CAR細胞を、記載されるようにhEMPステージに分化させ、そして選別されたhEMPを、MS5-hDLL1細胞と凝集させ、かつ記載されるように分化させた（簡

10

20

30

40

50

潔には、EGM2培地中+1週間のTGFベータ阻害、それに続くSCF、FLT3L、TPO、およびIL-3の1週間の添加、それに続く付加的な最高6週間のATO培養のための、SCF、FLT3L、およびIL-3を有するRB27への培地交換)。ATO培養条件の開始後1~4週目から、CD45+細胞が上に示されている。T系統分化は、CD5およびCD7の共発現によって示される。CAR形質導入ヒトES細胞は、ATOにおいてCAR-T細胞を生成し得ることが見出された(図63)。

【0380】

ATO培養条件の開始後1~4週目からのH1またはH1-CAR由来CD45+細胞は、CB HSPC ATO由来CAR-T細胞と同様に、T細胞成熟の通常マーカーの非存在を示している。DPステージT細胞の存在がなく、ほとんどの細胞はDNである。H1およびH1-CAR ATOにおけるCD4^弱細胞は、未成熟なシングルポジティブCD4 (ISP4) T細胞先駆体である可能性が高い。図64に示されるように、ヒトES細胞からのATO由来CAR-T細胞は、非従来のT細胞分化を呈する。図65に示されるように、ヒトES細胞からのATO由来CAR-T細胞は、CD8ベータを発現しない。ATO培養条件の開始後1~4週目からのH1またはH1-CAR由来CD45+細胞は、CB HSPC ATO由来CAR-T細胞と同様に、CD8ベータの非存在を示している。ヒトES細胞からのATO由来CAR-T細胞は、PMA/イオノマイシンに応答してサイトカインを産生することがさらに見出された(図66A~B)。5週目のATOからのH1またはH1-CAR由来CD45+細胞を、PMA/イオノマイシンで6時間処理した。活性化は、インターフェロンガンマおよびTNFアルファ(図66A)、またはインターフェロンガンマおよびIL-2(図66B)に対する細胞内染色によって示される。最後に、ヒトES細胞からのATO由来CAR-T細胞は、標的細胞に反応して、サイトカインを産生しかつ脱顆粒することが見出された(図67)。4週目のATOからのH1-CAR由来全GFP+細胞を、CD19- K562細胞、CD19を形質導入されたK562細胞、またはCD19+ Nalm-6もしくはRAJI細胞株とともに6時間共培養した。活性化を、CD107aに対する表面染色、およびインターフェロンガンマに対する細胞内染色によって測定した。分析に関しては、成熟表現型(CD45RA+) CAR-T細胞をゲート制御した。

【0381】

実施例9：T細胞分化に対するATOシステムの利点

A. 末梢血(PB) T細胞にTCRを形質導入する標準的な免疫療法手法を上回る、HSPC/ATOにおいてTCRを発現させることの一部の利点

PB T細胞は、それらが特異的な抗腫瘍TCRを発現するように形質導入された場合、既存の多様なTCRレパートリーを有する。ゆえに、内因性TCR鎖とトランスジェニックTCRとの誤対合が自家細胞に関して生じ得；これは、抗腫瘍特異性の減退、または新規な自己反応性の誤対合TCRの生成をもたらし得る。ATO由来TCR改変T細胞における内因性TCR β 再編成の対立遺伝子排除により、形質導入されたおよび内因性のTCR鎖間での誤対合の危険性は、大幅に低下するはずである。

【0382】

上記で言及されるように、ATOにおける初期T細胞分化の間のTCRの発現は、内因性TCR β 鎖の対立遺伝子排除につながる(Seet et alを参照されたい)。この現象は、患者と反応しないであろうT細胞を生成するために、同種異系HSPCを用いることの治療的可能性を高める。対照的に、PB由来の同種異系T細胞は、それらの多様な内因性TCRレパートリーが、移植片対宿主疾患(GvHD)の危険性を伴うと考えられるため、治療的に用いられ得られない。ゆえに、ATOシステムにおいて誘導される対立遺伝子排除は、免疫療法のための、同種異系ドナーからのすぐに使える生成物の開発を可能にし得る。

【0383】

B. PB T細胞にCARを形質導入する標準的な免疫療法手法を上回る、HSPC/ATOにおいてキメラ抗原受容体(CAR)を発現させることの一部の利点

CART細胞療法の通常的手法は、PBにおいてCARを発現させることである。ゆえに、そのように生成されたCART細胞は、内因性発現により多様なTCRも発現する。対照的に、HSPCのCAR形質導入は、上皮内リンパ球(IEL)と同様に、CD3-TCR-表現型を有するT細胞を産生する。TCR発現の非存在は、同種異系レシピエントにおいてGvHDを阻止するはずであり、普遍的な生成物の可能性を提示する。

【0384】

C. HSPCからTCR改変T細胞を生成する、OP9-DL1を上回るATOの利点

ベルギーのBart Vandekerckhoveのグループは、TCR形質導入されたCD34+胸腺プロ-T細胞またはCD34+動員末梢血 (MPB) HSPCのいずれかから未成熟T細胞先駆体を生成するために、OP9-DL1を用いている (Snauwaert, et. al, Leukemia, 2014)。しかしながら、このシステムにおいて、細胞の<1%が、14日目 (胸腺プロ-T) または33日目 (MPB) の時点で成熟CD8+ T細胞であった。TCR形質導入細胞の大多数は、DPステージで停止し、T細胞成熟を支持し得るOP9-DL1の乏しい能力と一致した。本方法は、より多くの成熟CD8+ T細胞を産生する。

【0385】

D. ヒト多能性幹細胞 (hPSC) からのT細胞分化に対する、OP9-DL1を上回るATOを用いることの利点

OP9-DL1 (またはD114) は、以前は、hPSC (hESCまたはhiPSCのいずれか) からのT細胞分化のための唯一のシステムであった。OP9-DL1では、PSCからの細胞収量は非常に乏しく、T細胞分化はCB HSPCよりもさらに悪い。対照的に、hPSC (hESCまたはiPSCの両方) からのT細胞分化は、ATOシステムにおいて非常に効率的である。成熟ナイーブCD8およびCD4 SP細胞は、CB HSPCよりもPSCからさらにより迅速に産生される。hPSCから成熟T細胞を産生する能力は、本当にすぐに使える普遍的な生成物が、hPSCの遺伝子編集により容易に生成されて、免疫反応性遺伝子を除去し得るまたは置き換え得ることを意味する。単一のPSC由来T細胞生成物が、複数の潜在的患者に利用可能であると考えられ、患者特異的生成物を作製することにおいて存在する時間および費用の現在の制約を克服する。加えて、化学療法後のリンパ球減少症患者から十分な自家T細胞を収集するという問題は、回避されることが考えられる。

【0386】

E. ATOシステム対OP9-DLL1における、臍帯血から分化したT細胞の比較

前の実施例は、CD34+臍帯血細胞およびMS5-hDLL1間質を用いたATOシステムと、インビトロヒトT細胞分化のための技術プロトコルの現状：OP9-D111システムとの間の比較を示している。OP9-DLL1に対するATOシステムの優位性のさらなる証拠を提供するために、3つの異なる臍帯血ドナー (E37、E43、E68) からのATOを生成し、かつOP9-DLL1間質上での分化と比較した。図68は、4週目の時点での、両システムにおけるCD34+およびT細胞前駆体の維持を示している (図68)。両システムは、CD5およびCD7の発現によって示されるように、T細胞系統への細胞のコミットメントを可能にする。しかしながら、ATOシステムは、CD4CD8ダブルポジティブ細胞 (DP) の生成において非常に優れている (図69)。すでに4週目の時点で、ATOシステムは、TCRab+CD3+細胞の堅牢な集団の生成を可能にし、かつそれらの一部はすでにCD8SPであるが、一方でOP9-hDLL1は、はるかにより非効率的であり、かつOP9-hDLL1システムから産生された生存細胞の量は、治療的および商業的な生存率に対して十分なT細胞の産生を可能にしない (図70)。図70におけるデータの数字表記は、図71に示されている。

【0387】

本明細書において開示されかつ主張される方法のすべては、本開示に照らして、過度の実験なしに作製され得かつ実行され得る。本発明の組成物および方法は、好ましい態様の観点から記載されているものの、本発明の概念、精神、および範囲から逸脱することなく、本明細書において記載される方法に、および方法の段階においてまたは一連の段階において、変動が適用され得ることは当業者に明白であろう。より具体的には、両方が化学的および生理学的に関連しているある特定の作用物質は、本明細書において記載される作用物質に代わって置換され得る一方で、同じまたは類似の結果が達成されるであろうことは明白であろう。当業者に明白なすべてのそのような類似の置換体および改変は、添付の特許請求の範囲によって規定される本発明の精神、範囲、および概念の範囲内にあると見なされる。

【0388】

参考文献

以下の参考文献は、それらが、本明細書において明記されるものに補足的な、例示的な手続きのまたは他の詳細を提供する程度まで、参照により本明細書に具体的に組み入れられる。

Aasen and Belmonte, *Nat. Protoc.*, 5(2):371-382, 2010.

Abboud *et al.*, *Blood*, 58:1148-1154, 1981.

- Adams, *J. Virol.*, 61(5):1743–1746, 1987.
- Aiyar *et al.*, *EMBO J.*, 17(21):6394–6403, 1998.
- Akkina *et al.*, *J. Virol.*, 70(4):2581–2585, 1996.
- Alexander *et al.*, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 85:5092–5096, 1988.
- Altmann *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103(38):14188–14193, 2006.
- Amit *et al.*, *Dev. Bio.*, 227:271–278, 2000.
- Anderson and Jenkinson, *J Immunol.* 2008 Dec 1;181(11):7435–6. 10
- Andrews *et al.*, In: *Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells*, Robertson (Ed.), IRL Press, 207–246, 1987.
- Animal Cell Culture*, Freshney (Ed.), 1987.
- Aravind and Landsman, *Nucleic Acids Res.*, 26(19):4413–4421, 1998.
- Ausubel *et al.*, *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y., 1994.
- Awong, *et al*, *BMC Immunol.* 2011 Mar 23;12:22. 20
- Baer *et al.*, *Biochemistry*, 39:7041–7049, 2000.
- Baer *et al.*, *Nature*, 310(5974):207–211, 1984.
- Bain *et al.*, *Biochem. J.*, 408(3):297–315, 2007.
- Bennett *et al*, *J. Biol. Chem.*, 277:34, 2002.
- Bertrand *et al.*, *J. Mol Biol.*, 333(2):393–407, 2003.
- Bingham, *Cell*, 90(3):385–387, 1997.
- Biswas *et al.*, *Annals NY Acad. Sci.*, 590:582–583, 1990. 30
- Biswas, *et al.*, *J. Clin. Microbiol.*, 29:2228–2233, 1991.
- Bochkarev *et al.*, *Cell*, 84(5):791–800, 1996.
- Bode *et al.*, *Biol. Chem.*, 381:801–813, 2000.
- Bode *et al.*, *Gene Ther. Mol. Biol.*, 6:33–46, 2001.
- Bode *et al.*, *Science*, 255(5041):195–197, 1992.
- Bublitz, *Mol. Cell Biochem.*, 108(2):141–4, 1991.
- Byrne *et al.*, *Nature*, 450(7169):497–502, 2007. 40
- Carbonelli *et al.*, *FEMS Microbiol. Lett.*, 177(1):75–82, 1999.
- Chadwick *et al.*, *Blood*, 102(3):906–15, 2003.
- Chandler *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94(8):3596–601, 1997.
- Chang, *et al.*, *Frontiers in Bioscience*, 12:4393–4401, 2007.
- Chaudhuri *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98(18):10085–10089, 2001.
- Chen and Okayama, *Mol. Cell Biol.*, 7(8):2745–2752, 1987.

- Chen *et al.*, *Cell*, 133:1106-1117, 2008.
- Chesne *et al.*, In: *Liver Cells and Drugs*, Guillouzo (Ed.), John Libbey Eurotext, London, 343-350, 1988
- Chin *et al.*, *Molecular Brain Res.*, 137(1-2):193-201, 2005.
- Chow *et al.*, *Cytometry Commun. Clinical Cytometry*, 46:72-78, 2001.
- Christ *et al.*, *Haematologica*, 92(9):1165-72, 2007.
- Chung, et al, *Stem Cells*, 2014 Sept 32:2386-96 10
- Clark et al, *J Clin Invest.* 2005 Nov;115(11):3239-49. Epub 2005 Oct 13.
- Coccea, *Biotechniques*, 23(5):814-816, 1997.
- Current Protocols in Molecular Biology and Short Protocols in Molecular Biology, 1987 and 1995.
- DaCosta *et al.*, *Molec. Pharmacol.*, 65(3):744-752, 2004.
- Davies *et al.*, *Biochem J.*, 351:95-105, 2000.
- de Gouville *et al.*, *Drug News Perspective*, 19(2):85-90, 2006. 20
- De Oliveira, et al, *Hum Gene Ther.* 2013 Oct;24(10):824-39.
- deFelipe, *Prog. Brain Res.*, 136:215-38, 2002.
- Delaney *et al.*, *Nat. Med.*, 16(2):232-236, 2010.
- Dhar *et al.*, *Cell*, 106(3):287-296, 2001.
- Doe *et al.*, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 32:89-98, 2007.
- Doevendans *et al.*, *J. Mol. Cell Cardiol.*, 32:839, 2000.
- Downey *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 271(35):21005- 21011, 1996. 30
- Eliasson and Jönsson, *J. Cell Physiol.*, 222(1):17-22, 2010.
- Embryonic Stem Cell Differentiation *in vitro*, 1993.
- English *et al.*, *Trends in Pharmac. Sci.*, 23(1):40-45, 2002.
- Ercolani *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 263:15335-15341, 1988.
- Ermakova *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 271(51):33009-33017, 1996.
- Evans *et al.*, *Nature*, 292:154, 1981.
- Evans, *et al.*, In: *Cancer Principles and Practice of Oncology*, Devita *et al.* (Eds.), Lippincot- 40
Raven, NY, 1054-1087, 1997.
- Fauser *et al.*, *Stem Cells*, 1:73-80, 1981
- Fechheimer *et al.*, *Proc Natl. Acad. Sci. USA*, 84:8463-8467, 1987.
- Fernandes *et al.*, *Nature Cell Biology*, 6:1082-1093, 2004.
- Fernandes, *et al.*, *J. Biotechnology*, 132(2):227-236, 2007.
- Fischer *et al.*, *J. Virol.*, 71:5148-5146, 1997.

- Fraley *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76:3348-3352, 1979.
- Frame *et al.*, *Biochemical J.*, 359:1-16, 2001.
- Frappier and O'Donnell, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88(23):10875–10879, 1991.
- Gahn and Schildkraut, *Cell*, 58(3):527-535, 1989.
- Gahn and Sugden, *J. Virol.*, 69(4):2633–2636, 1995.
- Garrick *et al.*, *Nat. Genet.*, 18:56-59, 1998.
- Gebhart and Wang, *J. Cell Sci.*, 56233-244, 1982. 10
- Gellibert, *et al.*, *J. Med. Chem.*, 49(7):2210-2221, 2006.
- Gene Targeting, A Practical Approach, IRL Press at Oxford University Press, 1993.
- Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells, 1987.
- Ghosh and Bachhawat, In: *Liver Diseases, Targeted Diagnosis and Therapy Using Specific Receptors and Ligands*, Wu *et al.* (Eds.), Marcel Dekker, NY, 87-104, 1991.
- Giannoni, *et al.*, *Mol Ther.* 2013 May;21(5):1044-54.
- Golde *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77:593-596, 1980. 20
- Gomez-Lechon *et al.*, *Anal. Biochem.*, 236:296, 1996.
- Gopal, *Mol. Cell Biol.*, 5:1188-1190, 1985.
- Gould *et al.*, *Intl. J. Neuropsychopharmacology*, 7:387-390, 2004.
- Gould *et al.*, *Pharmacological Res.*, 48:49-53, 2003.
- Graham and Van Der Eb, *Virology*, 52:456-467, 1973.
- Greber *et al.*, *Stem Cells*, 25:455-464, 2007.
- Gschweng *et al.*, *Cancer Res.* 2014 Sep 15;74(18):5173-83. 30
- Guide to Techniques in Mouse Development, 1993.
- Harb *et al.*, *PLoS One*, 3(8):e3001, 2008.
- Harland and Weintraub, *J. Cell Biol.*, 101(3):1094-1099, 1985.
- Haugland, In: *Molecular Probes: Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals*, 1992-1994.
- Hegde *et al.*, *Nature*, 359(6395):505–512, 1992.
- Hess *et al.*, *Blood*, 104(6):1648-55, 2004. 40
- Hu and Yang, *Cell Mol Immunol.* 2012 May;9(3):232-6.
- Hung *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98(4):1865–1870, 2001.
- Igelmund *et al.*, *Pflugers Arch.*, 437:669, 1999.
- In vitro* Methods in Pharmaceutical Research, Guillouzo (Ed.), Academic Press, 411-431, 1997.
- Inman *et al.*, *Molec. Pharmacol.*, 62(1):65-74, 2002.

- Ishizaki, *et al.*, *Mol. Pharmacol.*, 57:976-983, 2000.
- Itoh, *et al.*, *Exp Hematol.* 1989 Feb;17(2):145-53.
- Jainchill *et al.*, *J. Virol.*, 4:549, 1969.
- Jenke *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101 (31), 11322–11327, 2004.
- Julien *et al.*, *Virology*, 326(2):317–328, .2004.
- Kadaja-Saarepuu *et al.*, *Oncogene*, 27(12):1705-1715, 2008.
- Kaeppler *et al.*, *Plant Cell Reports* 9: 415-418, 1990. 10
- Kaminska *et al.* , *Acta Biochimica Polonica*, 52(2):329-337, 2005.
- Kanda *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 21(10):3576–3588, .2001.
- Kaneda *et al.*, *Science*, 243:375-378, 1989.
- Karin *et al.* *Cell*, 36:371-379,1989.
- Kato *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 266:3361-3364, 1991.
- Keller *et al.*, *Curr. Opin. Cell Biol.*, 7(6):862-9, 1995.
- Keller *et al.*, *Curr. Opin. Cell Biol.*, 7:862-869, 1995. 20
- Kennedy and Sugden, *Mol. Cell. Biol.*, 23(19):6901–6908, 2003.
- Kennedy *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100:14269-14274, 2003.
- Kim *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 275(40):31245–31254, 2000.
- Kim *et al.*, *J. Virol.*, 66:3879-3882, 1992.
- Kim *et al.*, *Virology*, 239(2):340–351, 1997.
- Kim *et al.*, *Xenobiotica*, 38(3):325-339, 2008.
- Kirchmaier and Sugden, *J. Virol.*, 69(2):1280-1283, 1995. 30
- Kirchmaier and Sugden, *J. Virol.*, 72(6):4657–4666, 1998.
- Kirkeby *et al.*, *Biochem. Biophys. Meth.*, 24:225, 1992.
- Klein *et al.*, *Neoplasia*, 8:1-8, 2006.
- Kleinman *et al.*, *J. Biometer. Sci. Polymer Edn.*, 5:1-11, 1993.
- Klimanskaya *et al.*, *Lancet.*, 365:P1636-1641, 2005.
- Kodama *et al.*, *J. Cell. Physiol.*, 112:89, 1982.
- La Motte-Mohs, *et al.*, *Blood*. 2005 Feb 15;105(4):1431-9. 40
- Langle-Rouault *et al.*, *J. Virol.*, 72(7):6181–6185, 1998.
- Lapenna, *et al.*, *PLoS One*. 2013 Jul 23;8(7):e69572.
- Leight and Sugden, *Mol. Cell Bio.*, 21:4149-61, 2001.
- Levenson *et al.*, *Hum. Gene Ther.*, 9(8):1233-1236, 1998.
- Levitskaya *et al.*, *Nature*, 375(6533):685–688, 1995.
- Levitskaya *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94(23):12616–12621, 1997.

- Lindner and Sugden, *Plasmid*, 58:1-12, 2007.
- Loh *et al.*, *Blood*, 113(22):5476-5479, 2009.
- Ludwig *et al.*, *Nat. Biotechnol.*, 24(2):185-187, 2006b.
- Ludwig *et al.*, *Nat. Methods*, 3(8):637-46, 2006a.
- Lusis, *Blood*, 57:13-21, 1981.
- Macejak and Sarnow, *Nature*, 353:90-94, 1991.
- Mackey and Sugden, *Mol. Cell. Biol.*, 19(5):3349–3359, 1999. 10
- Mackey *et al.*, *J. Virol.*, 69(10):6199–6208, 1995.
- Maniatis, *et al.*, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1988.
- Manipulating the Mouse Embryo A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1994.
- Manzini *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103(47):17672–17677, 2006.
- Marechal *et al.*, *J. Virol.*, 73(5):4385–4392, 1999. 20
- Martin, *et al.*, *Nature Immunology*, 6:111-184, 2005.
- Martin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78:7634, 1981.
- Marvin *et al.*, *Genes Dev.*, 15:316, 2001.
- Mattingly *et al.*, *J. Pharmacol. Experimen. Therap.*, 316:456-465, 2006.
- Meek *et al.*, *BMC Immunol.* 2011 Feb 18;12:17.
- Middleton and Sugden, *J. Virol.*, 66(1):489-495, 1992.
- Miyoshi *et al.*, *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.*, 9:227-237, 1998. 30
- Mohtashami *et al.*, *Int Immunol.* 2013 Oct;25(10):601-11.
- Nabel *et al.*, *Science*, 244(4910):1342-1344, 1989.
- Nakajima *et al.*, *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 52:319-324, 2003.
- Nakano *et al.*, *Science*, 272, 722, 1996.
- Nanbo and Sugden, *EMBO J.*, 26:4252-62, 2007.
- Narazaki *et al.*, *Circulation*, 118(5): 498-506, 2008.
- Ng *et al.*, *Development*, 132(5):873-84, 2005. 40
- Ng, *Nuc. Acid Res.*, 17:601-615, 1989.
- Nicola, *et al.*, *Blood*, 54:614-627, 1979.
- Nicolau and Sene, *Biochim. Biophys. Acta*, 721:185-190, 1982.
- Nicolau *et al.*, *Methods Enzymol.*, 149:157-176, 1987.
- Niller *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 270(21):12864–12868, 1995.
- Noble *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Science, USA*, 102:6990-6995, 2005.

Ockerman, *Clin. Chim. Acta*, 17:201, 1968.

Ogawa *et al.*, *J. Cell Sci.*, 120:55-65, 2007.

Okabe, *J. Cell. Phys.*, 110:43-49, 1982.

Omirulleh *et al.*, *Plant Mol. Biol.*, 21(3):415-428, 1993.

Palamaro *et al.*, *Int Immunol.* 2013 Dec;25(12):703-14.

Passonneau and Lauderdale, *Anal. Biochem.*, 60:405-415, 1974.

PCT Appln. 2005/123902

10

PCT Appln. WO 1998/30679

PCT Appln. WO 2001/088100

PCT Appln. WO 2001/51616

PCT Appln. WO 2002/076976

PCT Appln. WO 2003/004626

PCT Appln. WO 2003/050251

PCT Appln. WO 2003/059913

20

PCT Appln. WO 2003/062225

PCT Appln. WO 2003/062227

PCT Appln. WO 2003/062227

PCT Appln. WO 2004/039796

PCT Appln. WO 2005/080554

PCT Appln. WO 2005/123902

PCT Appln. WO 2007/113505

30

PCT Appln. WO 2008/006583

PCT Appln. WO 2008/094597

PCT Appln. WO 2010/0003757

PCT Appln. WO 94/09699

PCT Appln. WO 95/06128

PCT Appln. WO 98/30679

PCT Appln. WO 99/20741

40

Pelletier and Sonenberg, *Nature*, 334(6180):320-325, 1988.

Piechaczek *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, 27(2):426-428, 1999.

Potrykus *et al.*, *Mol. Gen. Genet.*, 199(2):169-177, 1985.

Potter *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:7161-7165, 1984.

Properties and uses of Embryonic Stem Cells: Prospects for Application to Human Biology and Gene Therapy, 1998.

- Quitsche *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 264:9539-9545, 1989.
- Rawlins *et al.*, *Cell*, 42((3):859–868, 1985.
- Reisman and Sugden, *Mol. Cell. Biol.*, 6(11):3838-3846, 1986.
- Reisman *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 5(8):1822–1832, 1985.
- Richards *et al.*, *Cell*, 37:263-272, 1984.
- Rinehart *et al.*, *J. Clinical Oncol.*, 22:4456-4462, 2004.
- Ring *et al.*, *Diabetes*, 52:588-595, 2003. 10
- Rippe, *et al.*, *Mol. Cell Biol.*, 10:689-695, 1990.
- Ritzi *et al.*, *J. Cell Sci.*, 116(Pt 19):3971–3984, 2003.
- Rossi *et al.*, *Cell*, 132:681-696, 2008.
- Ryan *et al.*, *J. Gen. Virol.*, 78:(Pt 4):699-723, 1997.
- Sambrook *et al.*, In: *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989.
- Sasaki *et al.*, *Pharmacol. Ther.*, 93:225-232, 2002. 20
- Scalia *et al.*, *J. Cell. Biochem.*, 82:610, 2001.
- Schaarschmidt *et al.*, *EMBO J.*, 23(1):191–201, .2004.
- Schaffer *et al.*; *Gene*, 302(1-2):73-81, 2003.
- Schepers *et al.*, *EMBO J.*, 20(16):4588-4602, 2001.
- Schmitt, et al, *Nat Immunol.* 2004 Apr;5(4):410-7.
- Schneider *et al.*, *Genes Dev.*, 15:304, 2001.
- Scymczak *et al.*, *Nat. Biotechnol.*, 22(5):589-94 2004. 30
- Sears *et al.*, *J. Virol.*, 77(21):11767-11780, 2003.
- Sears *et al.*, *J. Virol.*, 78(21):11487–11505, 2004.
- Sheehan and Hrapchak, In: *Theory and Practise of Histotechnology*, 2nd Ed., Battelle Memorial Institute, Columbus, OH, 1987.
- Shiojiri, *J. Embryol. Exp. Morph.*, 62:139, 1981.
- Shire *et al.*, *J. Virol.*, 73(4):2587–2595, 1999.
- Smith, In: *Origins and Properties of Mouse Embryonic Stem Cells*, *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.*, 2000. 40
- Snauwaert, et al, *Leukemia*. 2014 Apr;28(4):830-41.
- Su *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88(23):10870-19874, 1991.
- Sugden and Warren, *J. Virol.*, 63(6):2644-2649, 1989.
- Sun *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 106(37):15720-15725, 2009.
- Sutherland *et al.*, *Exp. Hematol.*, 20:590, 1992.

- Suzuki *et al.*, *Cancer Res.*, 67(5):2351-2359, 2007.
- Suzuki *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103:10294-10299., 2006.
- Takahashi and Yamanaka, *Cell.*, 126(4):663-676, 2006.
- Takahashi *et al.*, *Cell*, 126(4):663-76, 2007.
- Takahashi *et al.*, *Cell*, 131:861-872, 2007.
- Thompson, In: *Selected Histochemical and Histopathological Methods*, Tomas (Ed.),
Sprungfield, IL, 1966. 10
- Thomson and Marshall, *Curr. Top. Dev. Biol.*, 38:133-165, 1998.
- Thomson and Odorico, *Trends Biotechnol.*, 18(2):53-57, 2000.
- Thomson *et al.* *Proc. Natl. Acad. Scie. USA*, 92:7844-7848, 1995.
- Thomson *et al.*, *Science*, 282:114, 1998.
- Tojo, *et al.*, *Cancer Science*, 96(11):791-800, 2005,
- Tur-Kaspa *et al.*, *Mol. Cell Biol.*, 6:716-718, 1986.
- U.S. Patent 4,683,202 20
- U.S. Patent 4,684,611
- U.S. Patent 4,714,680
- U.S. Patent 4,952,500
- U.S. Patent 5,302,523
- U.S. Patent 5,322,783
- U.S. Patent 5,384,253
- U.S. Patent 5,464,765 30
- U.S. Patent 5,478,838
- U.S. Patent 5,538,877
- U.S. Patent 5,538,880
- U.S. Patent 5,550,318
- U.S. Patent 5,563,055
- U.S. Patent 5,563,055
- U.S. Patent 5,580,859 40
- U.S. Patent 5,589,466
- U.S. Patent 5,591,616
- U.S. Patent 5,610,042
- U.S. Patent 5,656,610
- U.S. Patent 5,702,932
- U.S. Patent 5,728,581

U.S. Patent 5,736,524	
U.S. Patent 5,780,448	
U.S. Patent 5,789,215	
U.S. Patent 5,843,780	
U.S. Patent 5,925,565	
U.S. Patent 5,928,906	
U.S. Patent 5,935,819	10
U.S. Patent 5,945,100	
U.S. Patent 5,981,274	
U.S. Patent 5,994,624	
U.S. Patent 6,200,806	
U.S. Patent 6,602,711	
U.S. Patent 6,833,269	
U.S. Patent 7,029,913	20
U.S. Publn. 2002/0076976	
U.S. Publn. 2002/0086005	
U.S. Publn. 2002/0168766	
U.S. Publn. 2003/0022367	
U.S. Publn. 2003/0059913	
U.S. Publn. 2003/0062225	
U.S. Publn. 2003/0062227	30
U.S. Publn. 2003/0087919	
U.S. Publn. 2003/0125344	
U.S. Publn. 2003/0211603	
U.S. Publn. 2004/0002507	
U.S. Publn. 2004/0039796	
U.S. Publn. 20040002508	
U.S. Publn. 20040014755	40
U.S. Publn. 2005/0192304	
U.S. Publn. 2005/0209261	
U.S. Publn. 2007/0116680	
U.S. Publn. 2007/0238170	
U.S. Publn. 2008/0038820	
U.S. Publn. 2008/0171385	

- U.S. Publn. 2008/0226558
- U.S. Publn. 2008/0254003
- U.S. Publn. 20080004287
- U.S. Publn. 20080038820
- U.S. Publn. 20080226558
- U.S. Publn. 20080254003
- U.S. Publn. 2009/0047739 10
- Van Coppenolle, et al, *J Immunol.* 2009 Oct 15;183(8):4859-70.
- van der Laarse *et al.*, *Biotech Histochem.* 67:303, 1992.
- Van Lent, et al, *J Immunol.* 2007 Oct 15;179(8):4959-68.
- Vatakis, et al, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011 Dec 20;108(51):E1408-16.
- Vodyanik *et al.*, *Blood*, 108(6):2095-105, 2006.
- Wagman, *Current Pharmaceutical Design*, 10:1105-1137, 2004.
- Wang *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 26(3):1124–1134, 2006. 20
- Wang *et al.*, *Nat. Biotechnol.*, 25(3):317-8, 2007.
- Watabe and Miyazono, *Cell Res.*, 19:103-115, 2009.
- Watanabe *et al.*, *Nat. Neurosci.*, 8(3):288-96, 2005.
- Wege, et al, *Curr Top Microbiol Immunol.* 2008;324:149-65.
- Wilson *et al.*, *Science*, 244:1344-1346, 1989.
- Wobus *et al.*, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 27:752, 1995,
- Wong *et al.*, *Gene*, 10:87-94, 1980. 30
- Wrzesinski *et al.*, *Clinical Cancer Res.*, 13(18):5262-5270, 2007.
- Wu and Wu, *Biochemistry*, 27: 887-892, 1988.
- Wu and Wu, *J. Biol. Chem.*, 262:4429-4432, 1987.
- Wu *et al.*, *J. Virol.*, 76(5):2480-2490, 2002.
- Wysokenski and Yates, *J. Virol.*, 63(6):2657–2666, 1989.
- Xu *et al.*, *Cell Stem Cell*, 3:196-206., 2008.
- Xu *et al.*, *Nat. Biotechnol.*, 19:971-974, 2001. 40
- Yasmineh *et al.*, *Clin. Biochem.*, 25:109, 1992.
- Yates and Guan, *J. Virol.*, 65(1):483–488, 1991.
- Yates *et al.*, *J. Virol.*, 74(10):4512–4522, 2000.
- Yates *et al.*, *Nature*, 313:812-815, 1985.
- Yates *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:3806-3810, 1984.
- Yates, *Cancer Cells*, (6)197–205, 1988.

Ye *et al.*, *Blood*, 114(27):5473-5480, 2009.

Yin *et al.*, *Science*, 301(5638):1371-1374, 2003.

Ying *et al.*, *Cell*, 115:281-292, 2003.

Ying, *Nature*, 453:519-23, 2008.

Yoshida *et al.*, *Cell Stem Cell*, 5(3):237-41, 2009.

Yu and Thompson, *Genes Dev.* 22(15):1987-97, 2008.

Yu *et al.*, *Science*, 318:1917-1920, 2007.

Yu *et al.*, *Science*, 324(5928):797-801, 2009.

Zhang *et al.*, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 48:2542-2545, 2009.

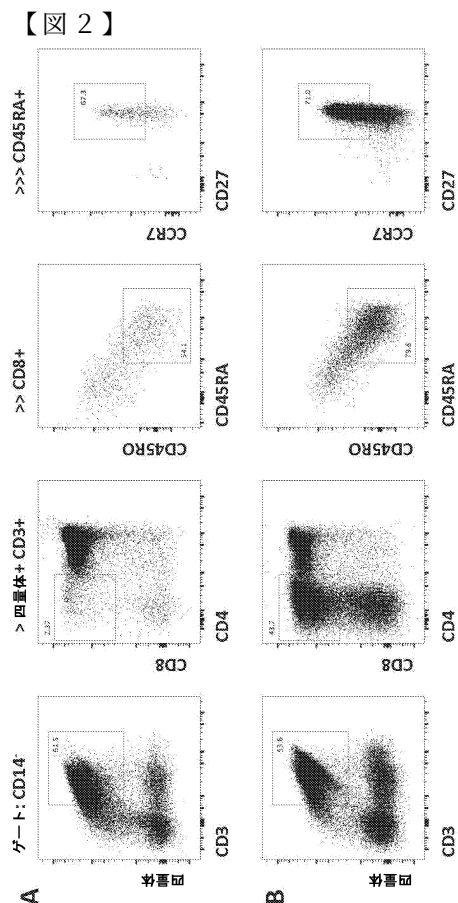
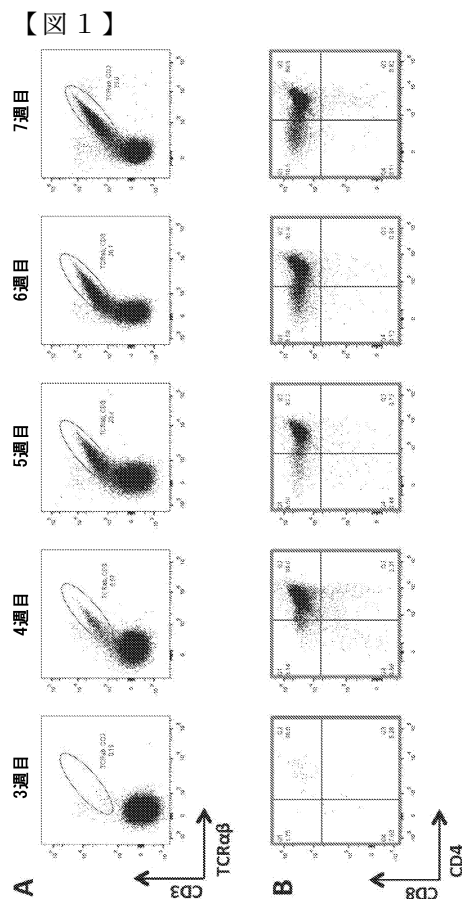
Zhang *et al.*, *Bioorganic Med. Chem. Letters*, 10:2825-2828, 2000.

Zhang, *et al.*, *Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi.*, 23(1):82-86, 2009.

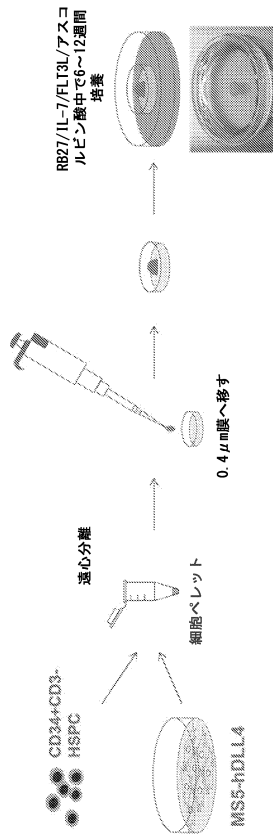
Zhao, *et al.*, *Cancer Res.* 2007 Mar 15;67(6):2425-9.

Zhou *et al.*, *EMBO J.*, 24(7):1406-1417, 2005

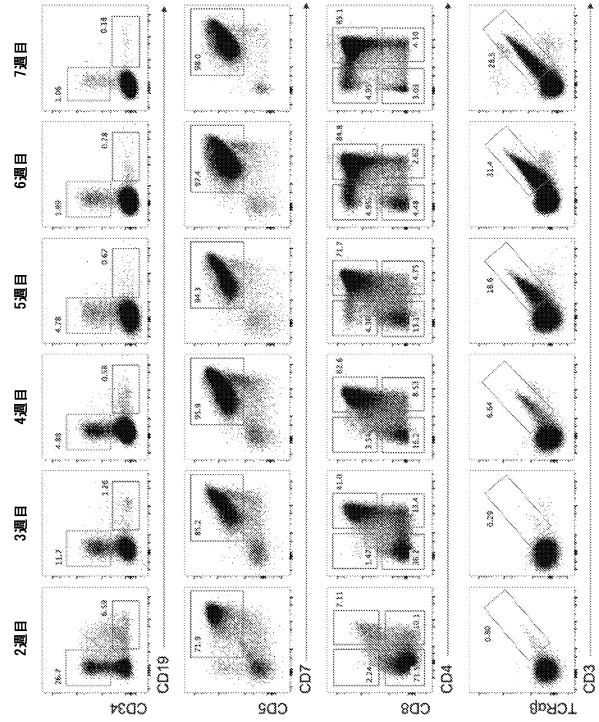
10



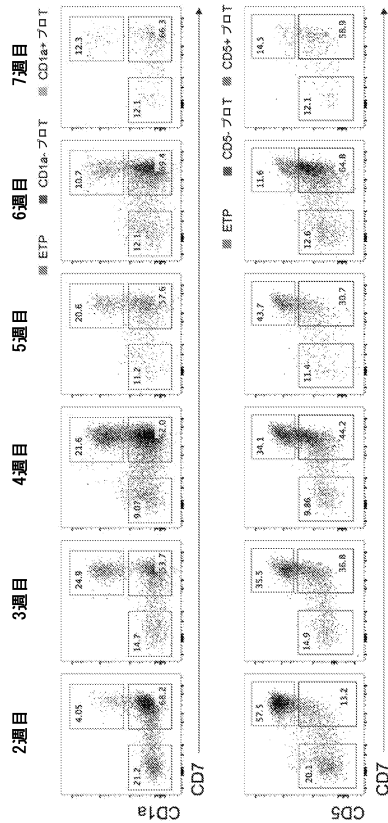
【図 3 A】



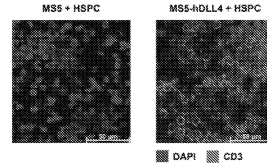
【図 3 B】



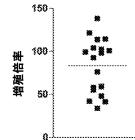
【図 3 C】



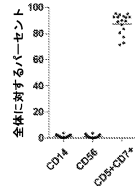
【図 3 D】



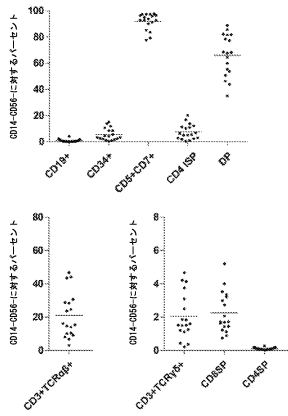
【図 3 E】



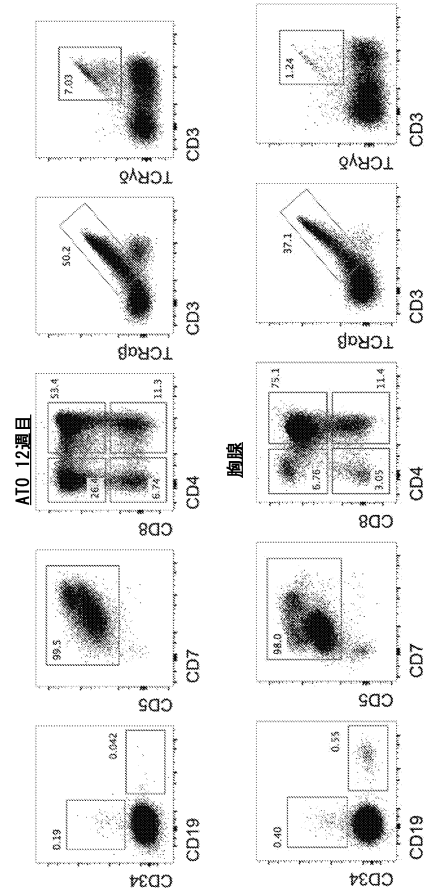
【図 3 F】



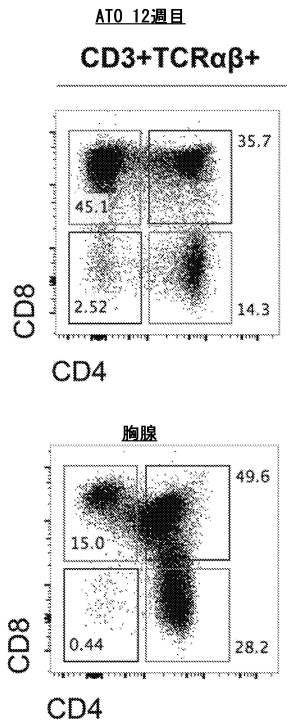
【図 3 G】



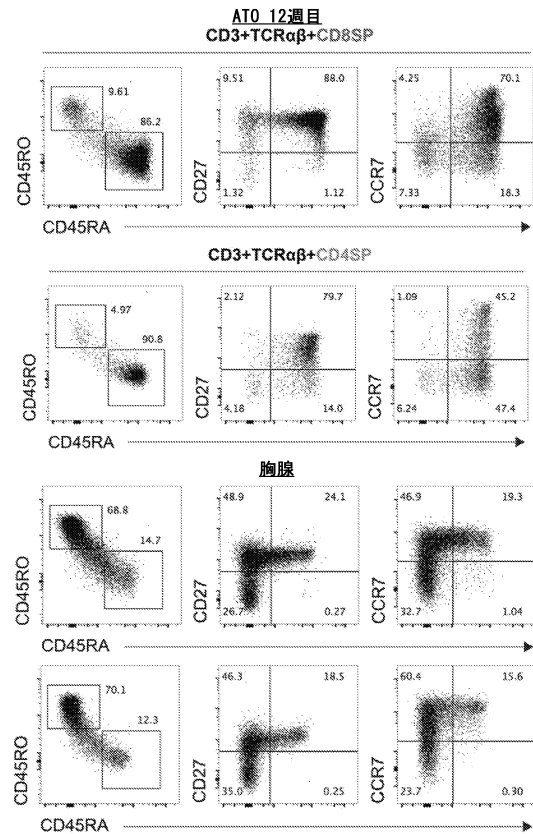
【図 4 A】



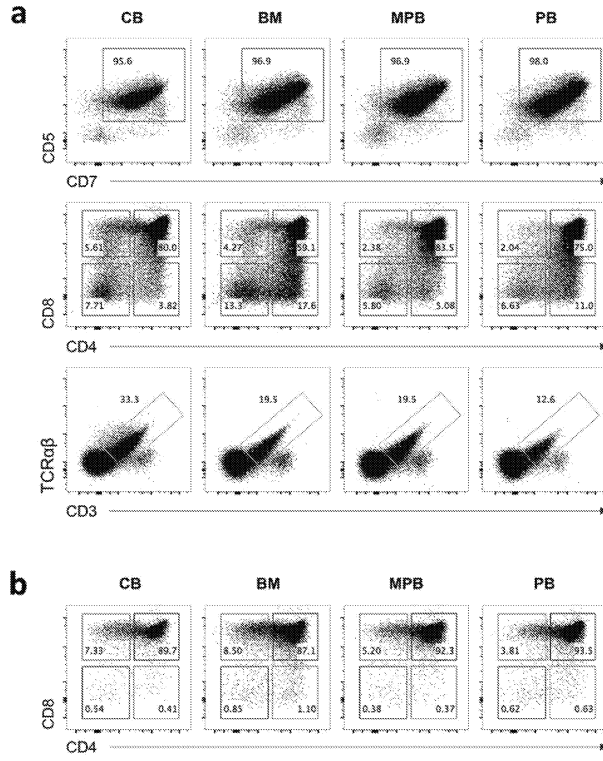
【図 4 B】



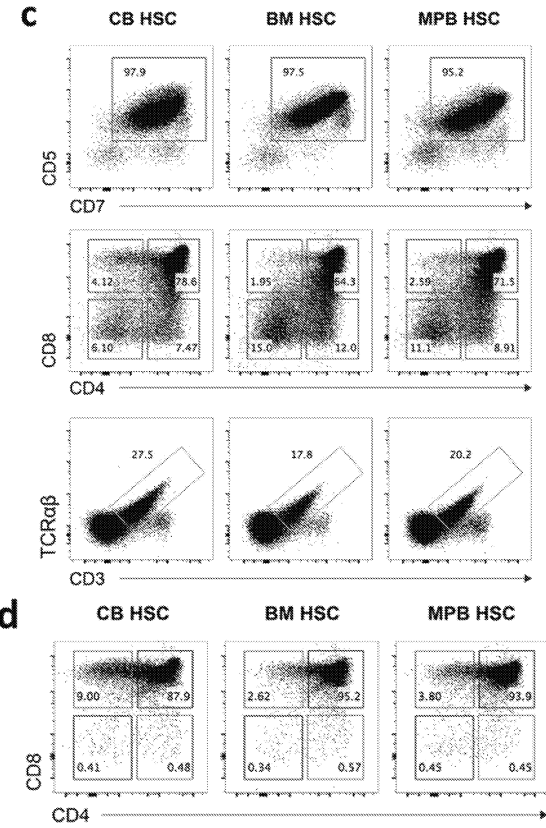
【図 4 C】



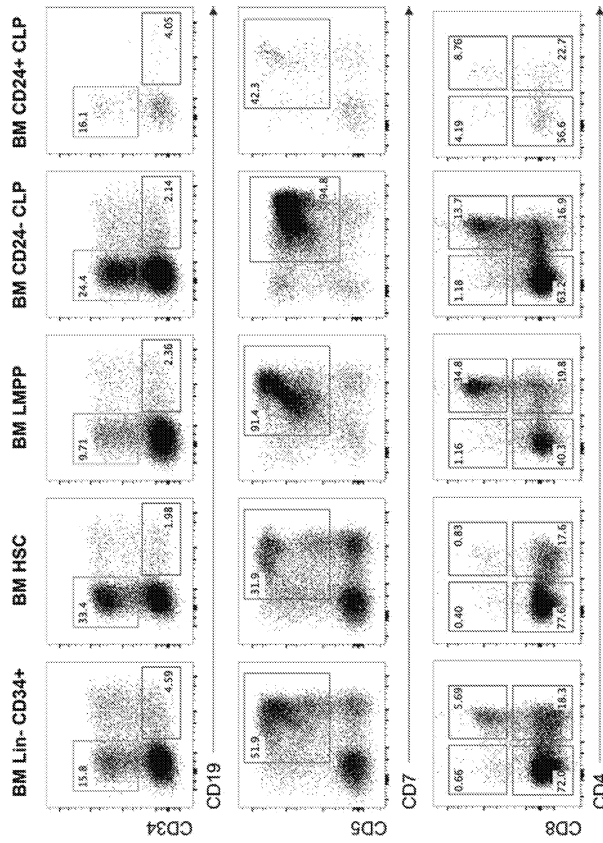
【図 5-1】



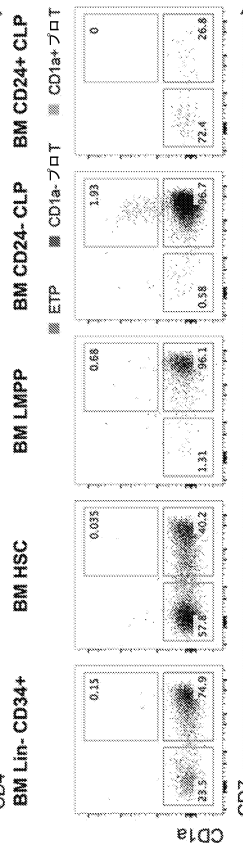
【図 5-2】

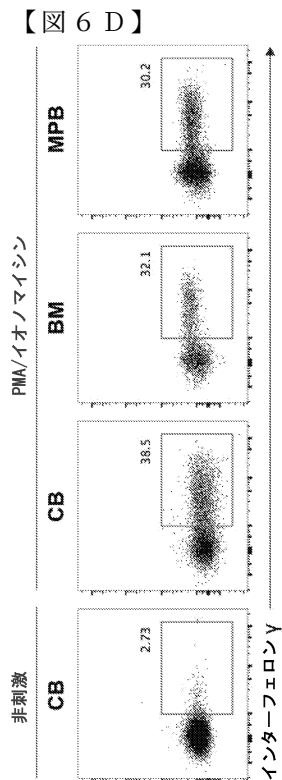
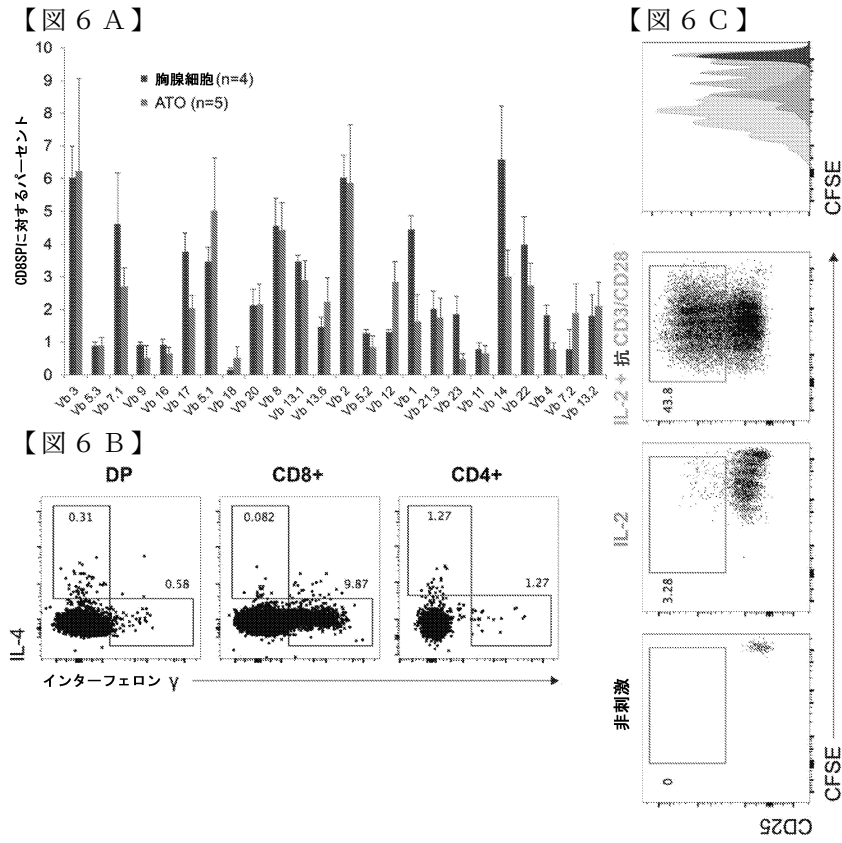


【図 5 e】

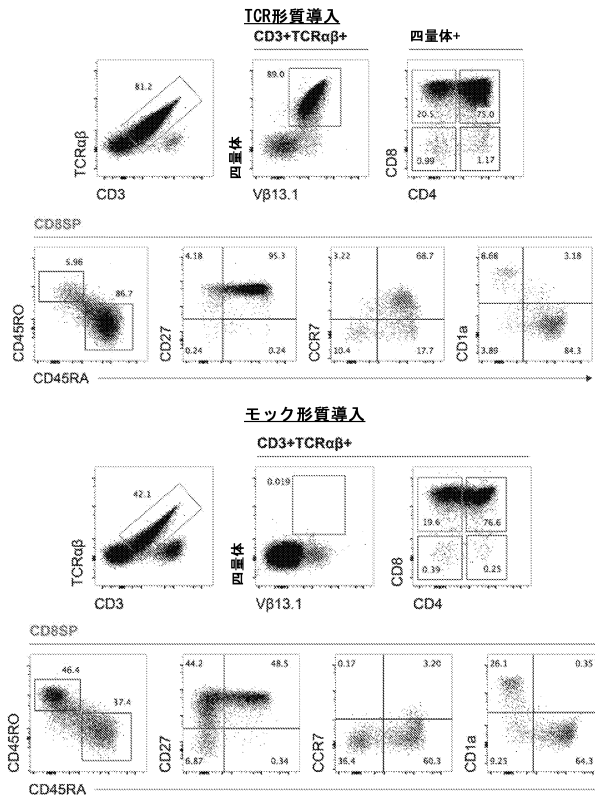


【図 5 f】

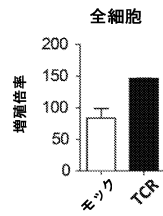




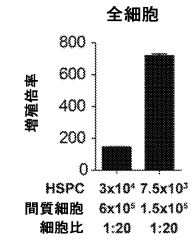
【図 7 A】



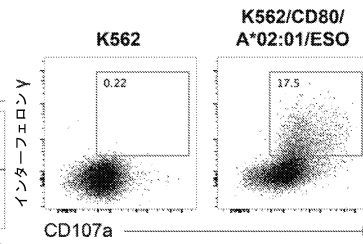
【図 7 B】



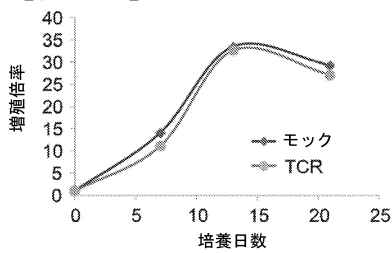
【図 7 C】



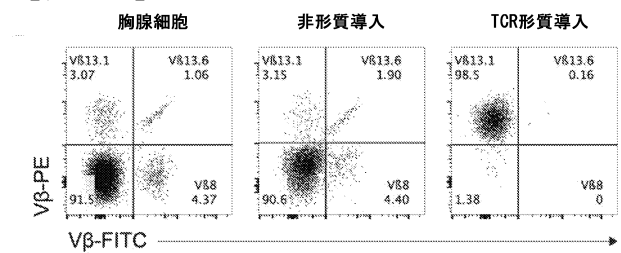
【図 7 D】



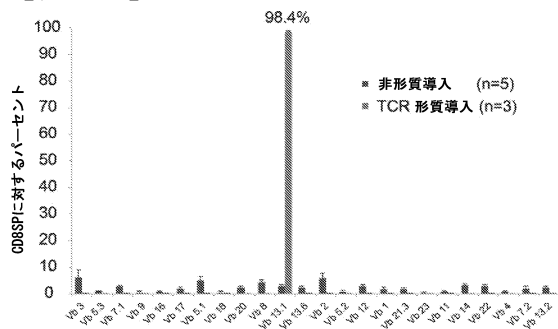
【図 7 E】



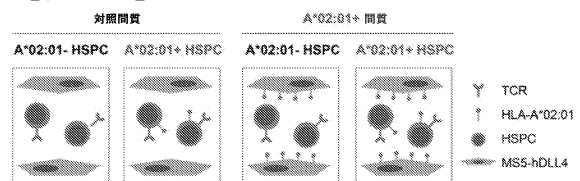
【図 7 G】



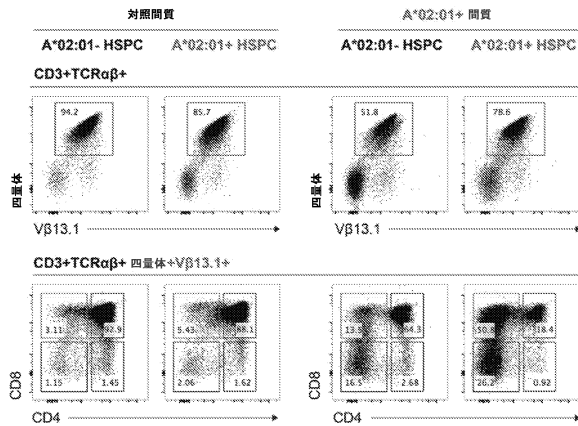
【図 7 F】



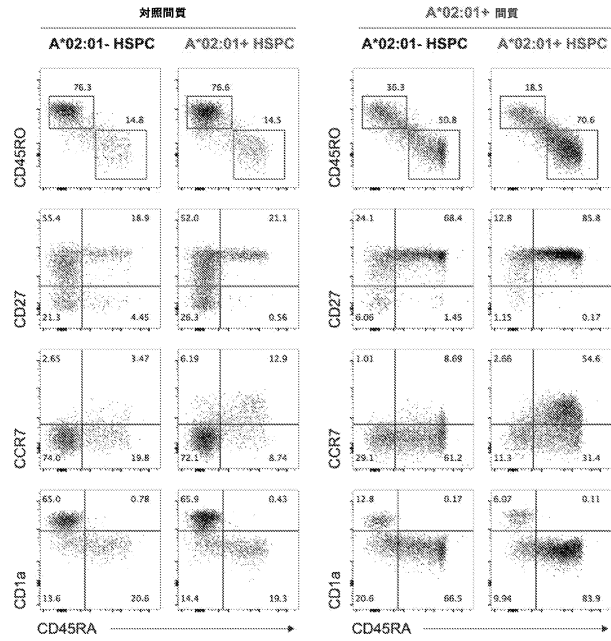
【図 8 A】



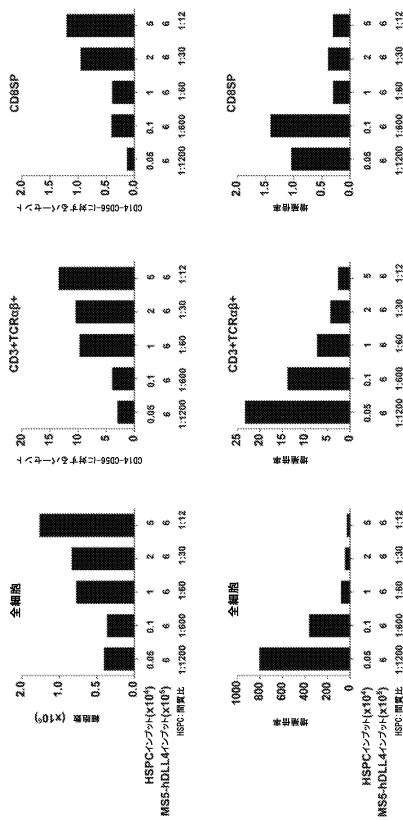
【図 8 B】



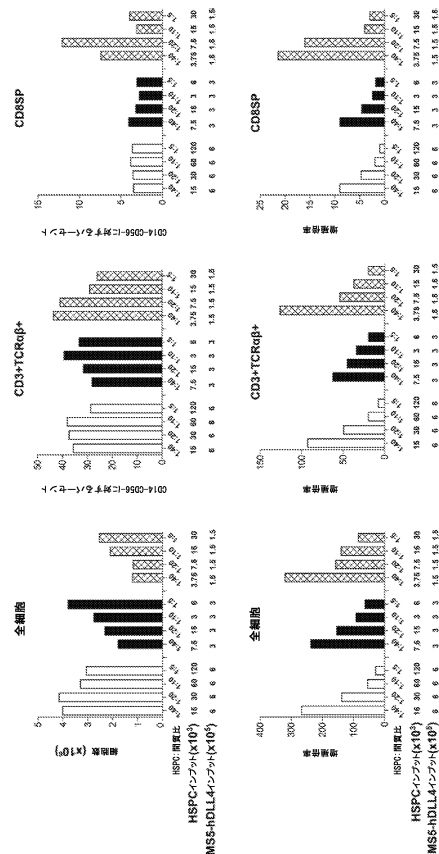
【図 8 C】



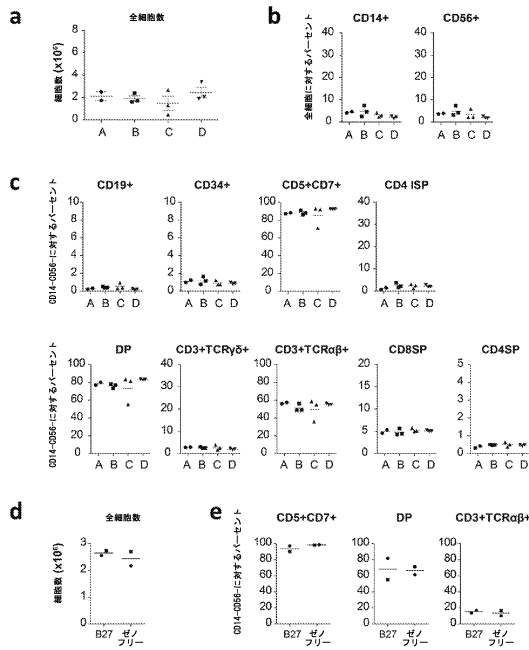
【図 9 A】



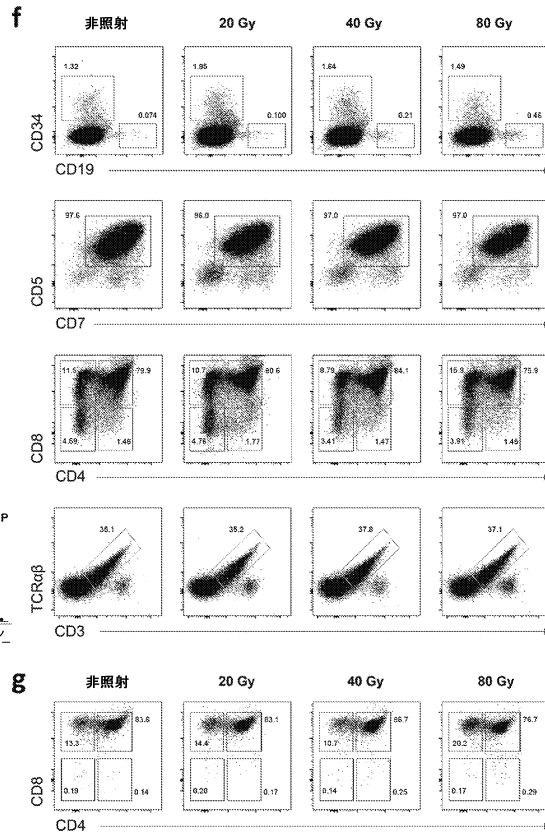
【図 9 B】



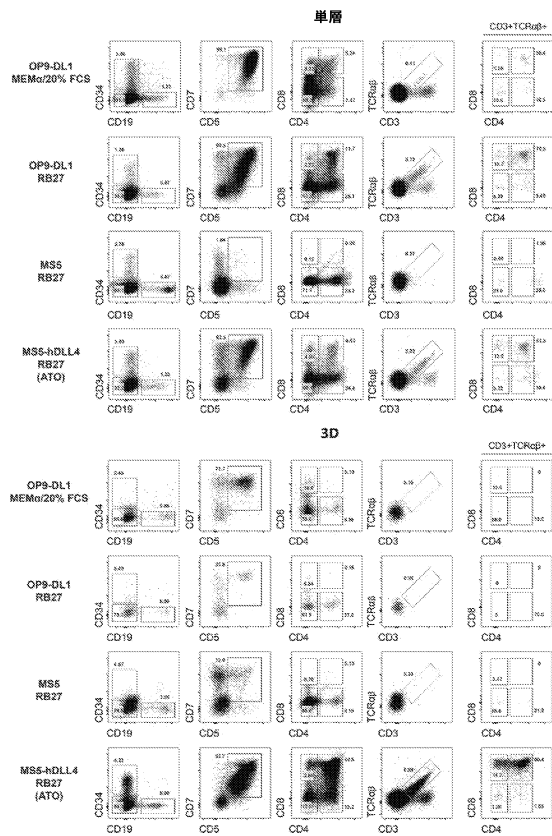
【図10-1】



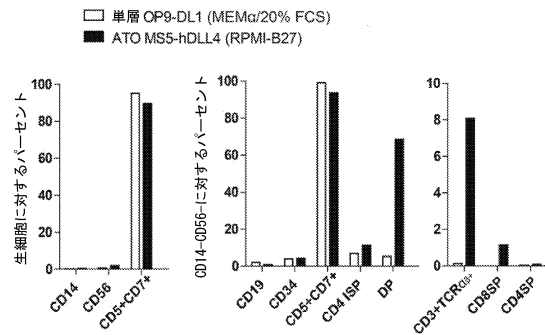
【図10-2】

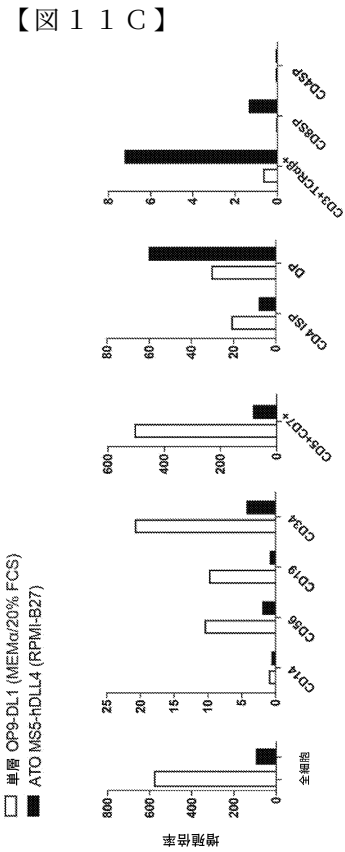


【図11A】

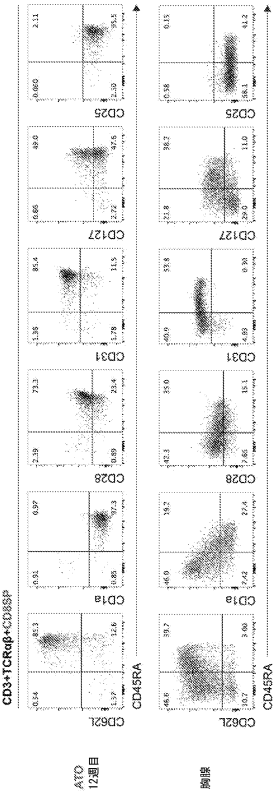


【図11B】

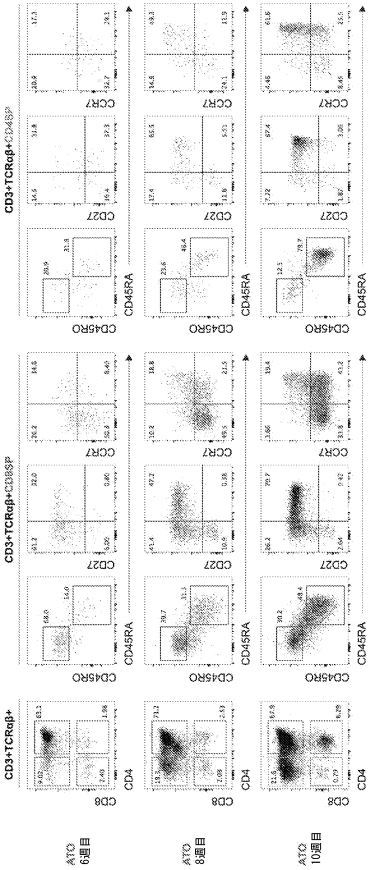




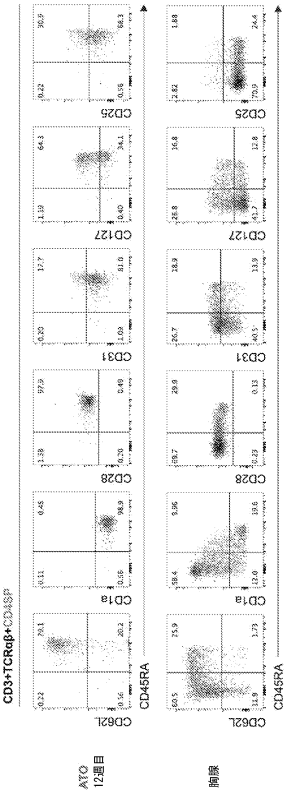
【図 1 2 B】



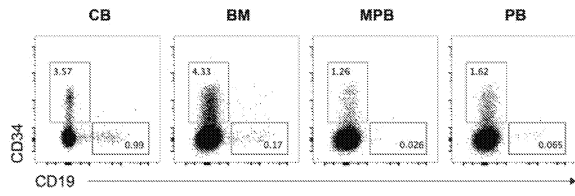
【図 1 2 A】



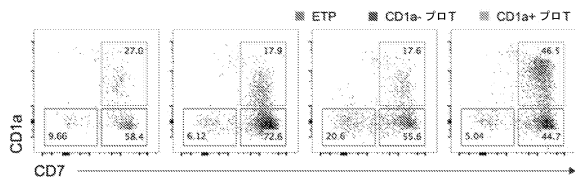
【図 1 2 C】



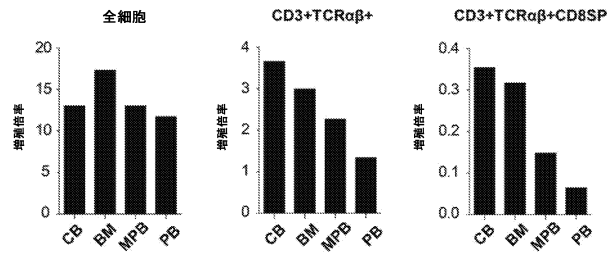
【図 1 3 A】



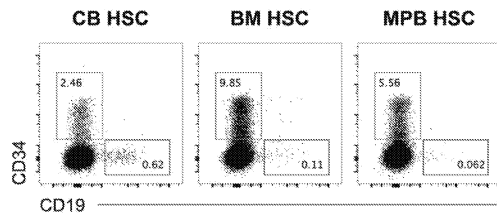
【図 1 3 B】



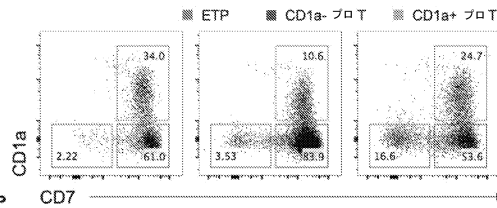
【図 1 3 C】



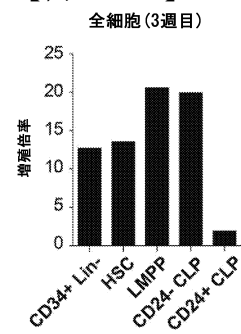
【図 1 3 D】



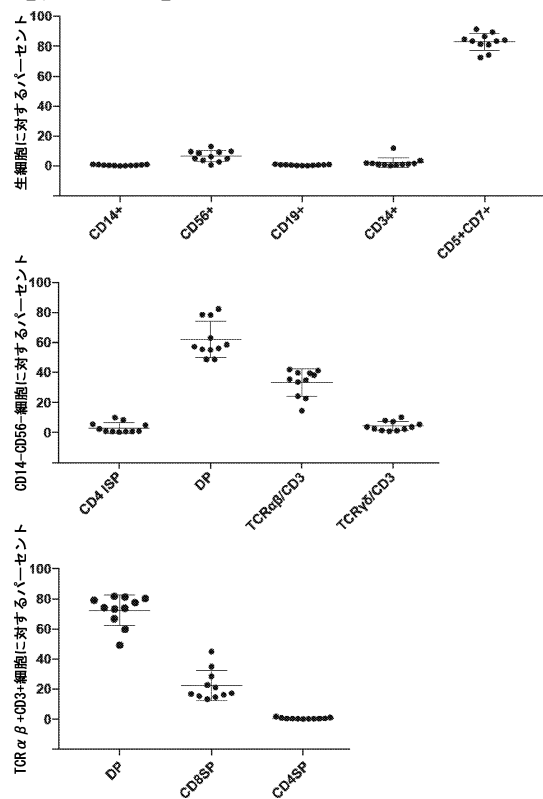
【図 1 3 E】



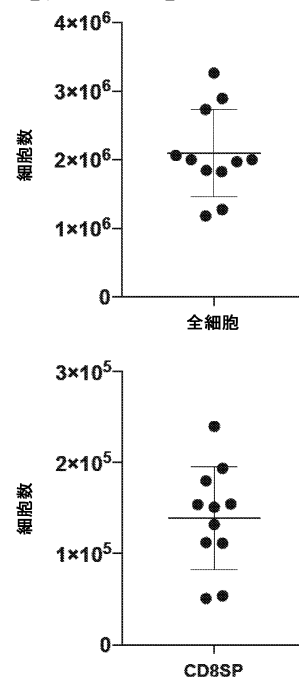
【図 1 3 F】



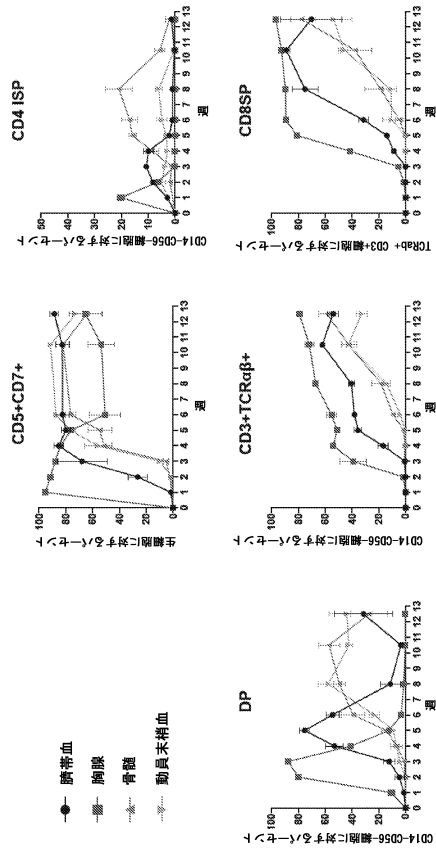
【図 1 4 A】



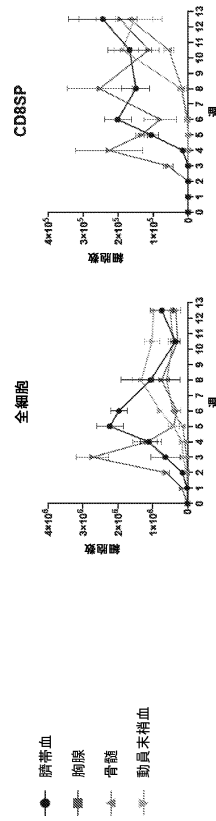
【図 1 4 B】



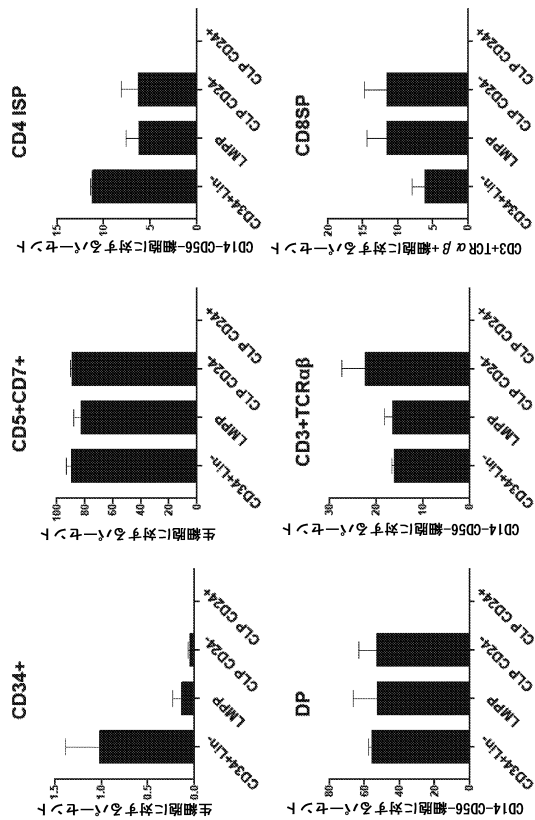
【図 15 A】



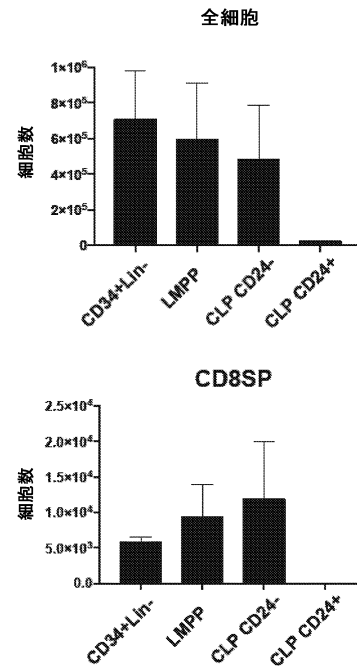
【図 15 B】



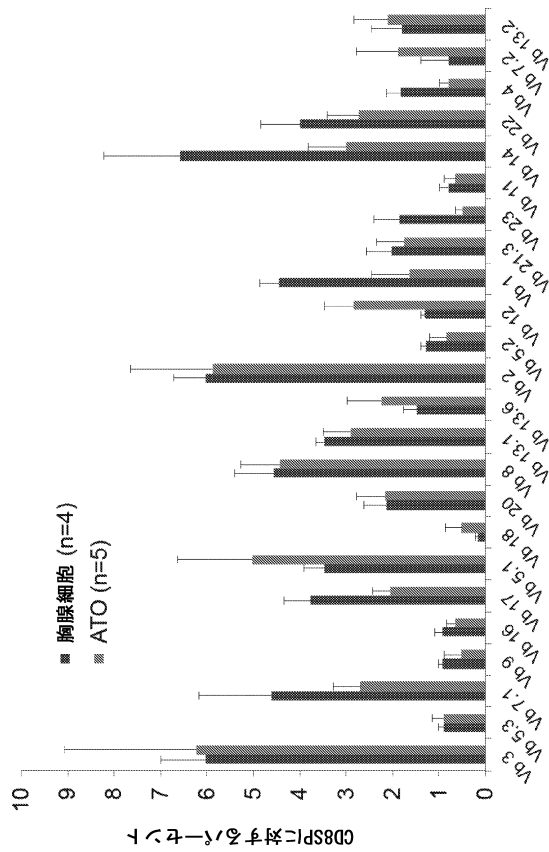
【図 15 C】



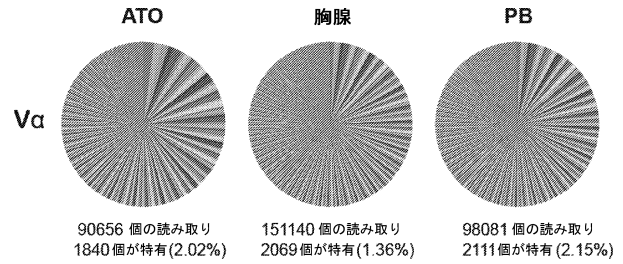
【図 15 D】



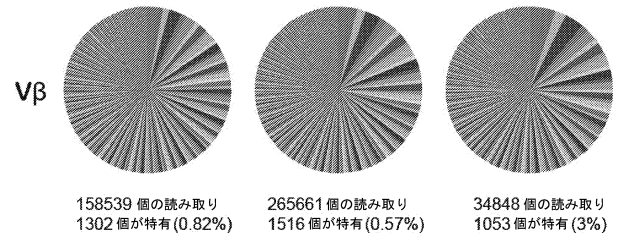
【図 1 6 A】



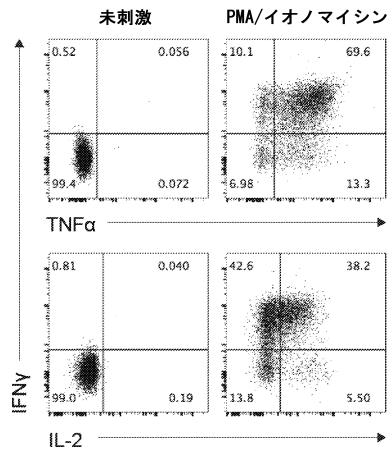
【図 1 6 B】



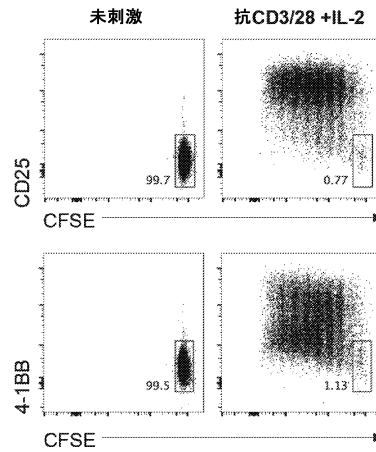
【図 1 6 C】



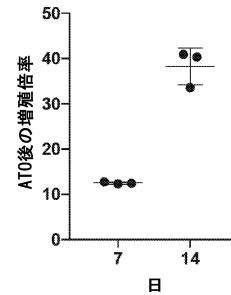
【図 1 6 D】

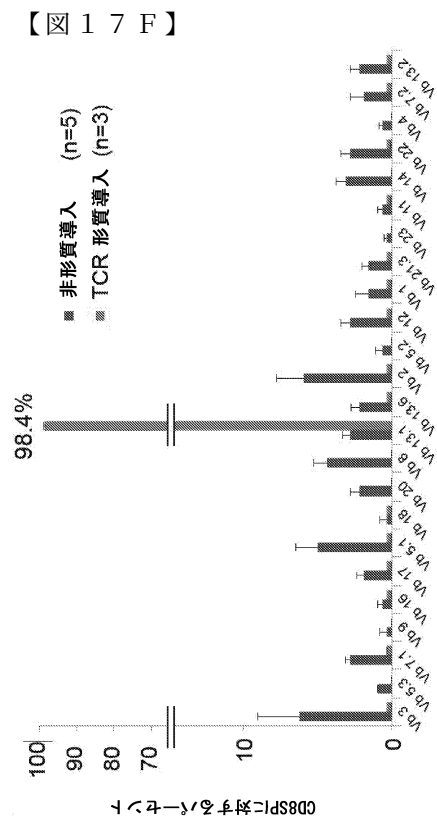
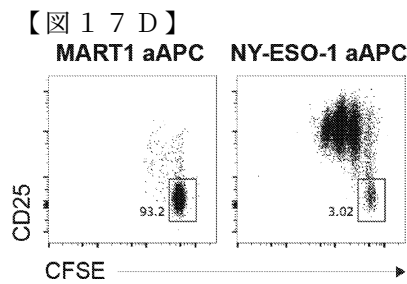
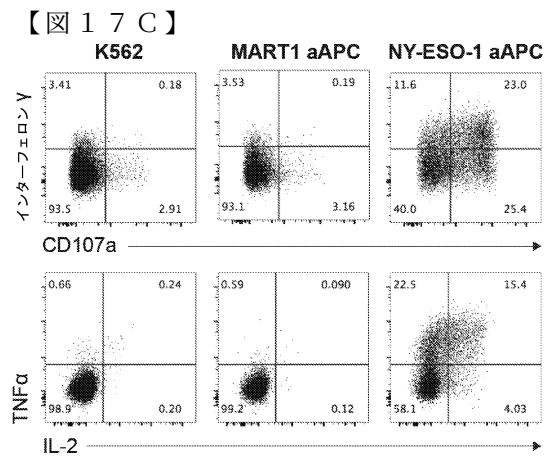
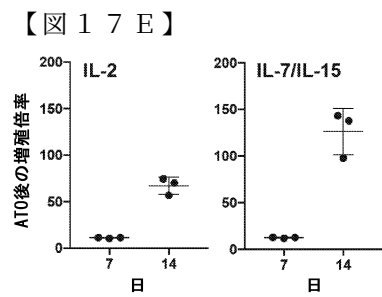
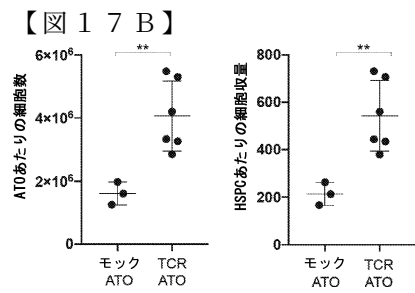
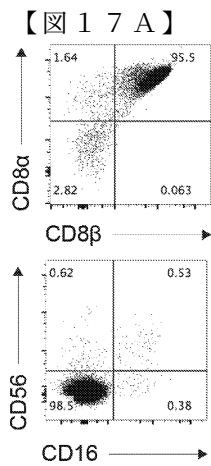


【図 1 6 E】

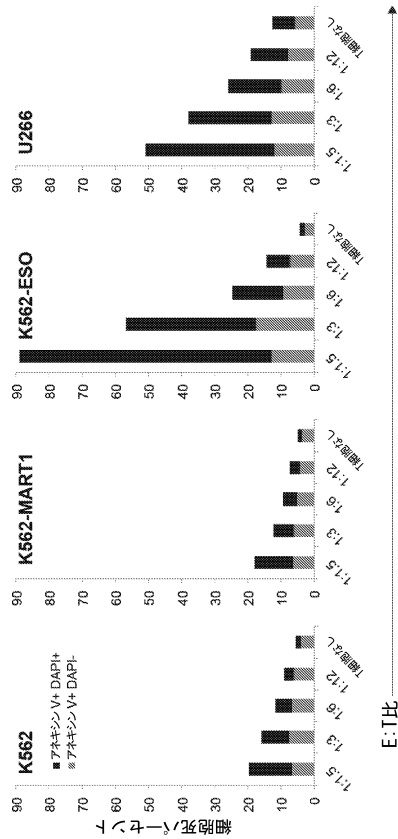


【図 1 6 F】

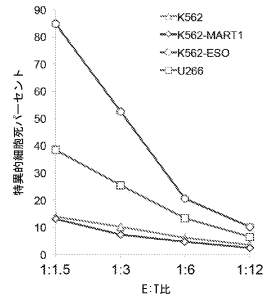




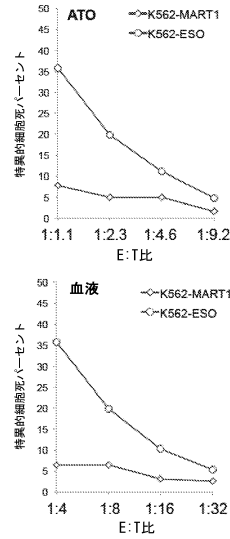
【図 18 A】



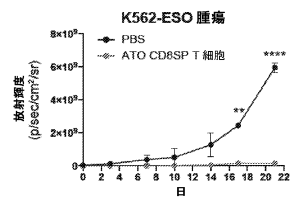
【図 18 B】



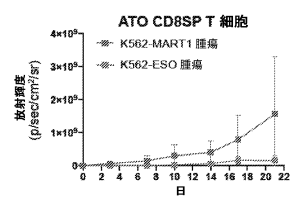
【図 18 C】



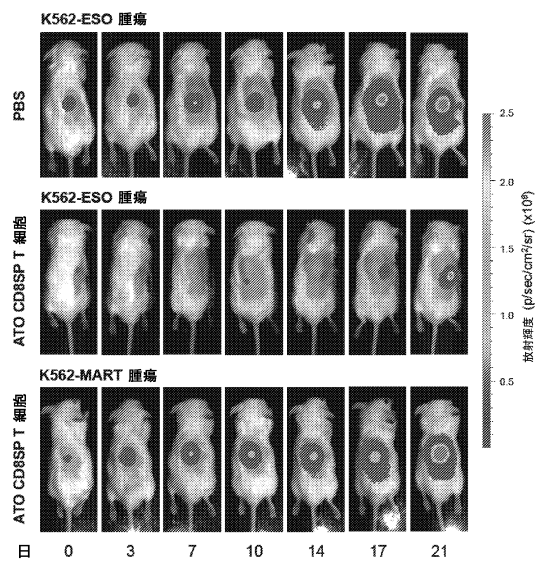
【図 18 D】



【図 18 E】

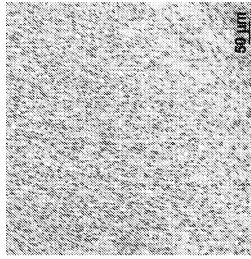


【図 18 F】

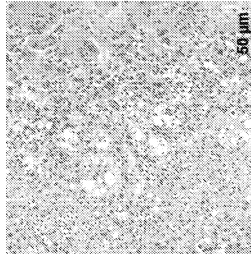


【図 19】

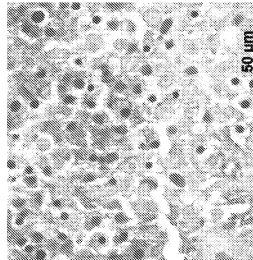
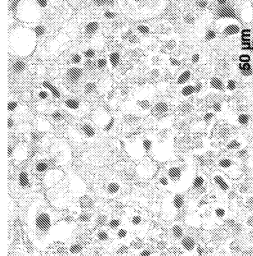
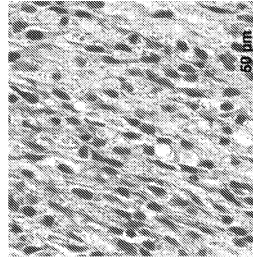
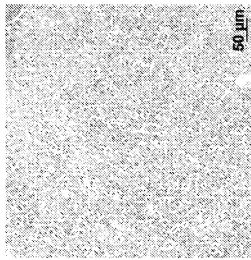
MS5-hDLL1



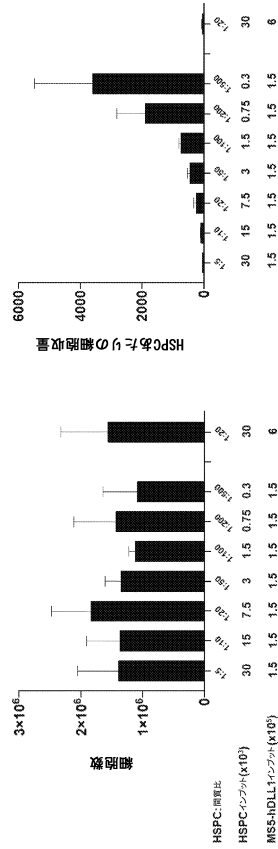
MS5 + HSPC



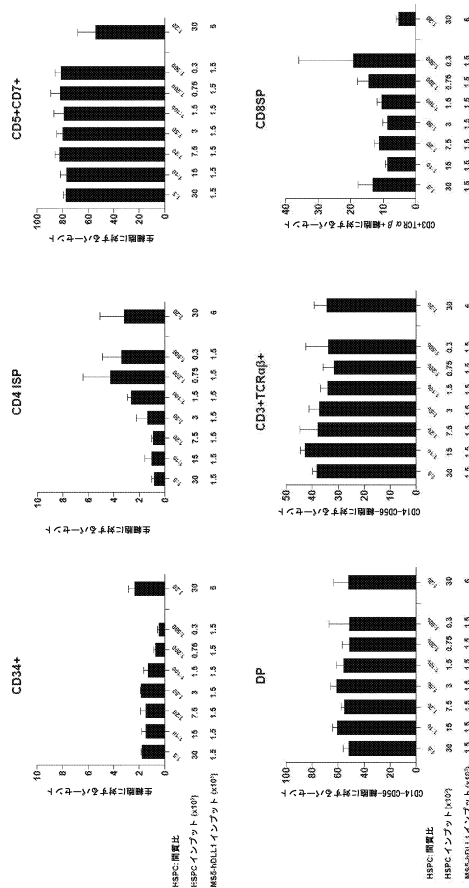
MS5-hDLL1 + HSPC



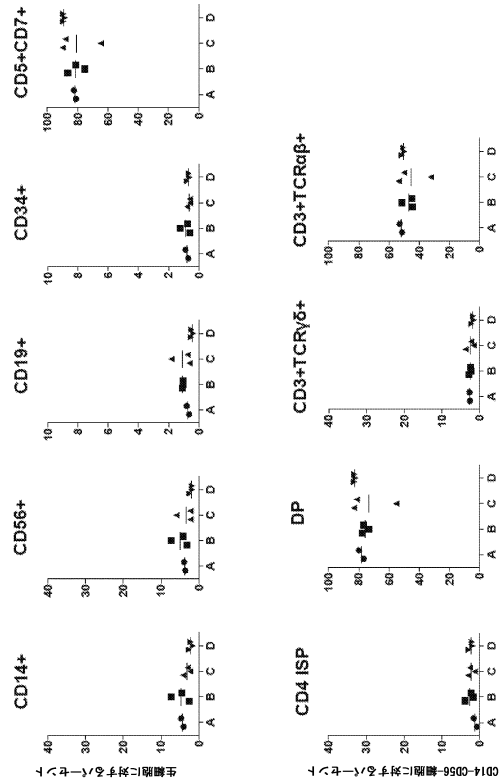
【図 20 A】



【図 20 B】



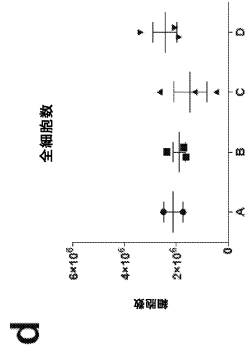
【図 21 - 1】



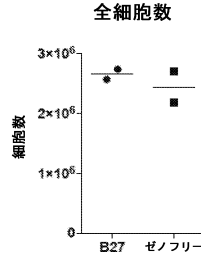
a

b

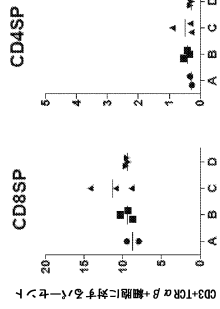
【図 2 1 - 2】



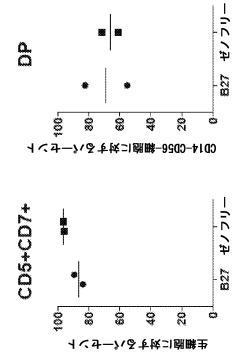
【図 2 1 F】



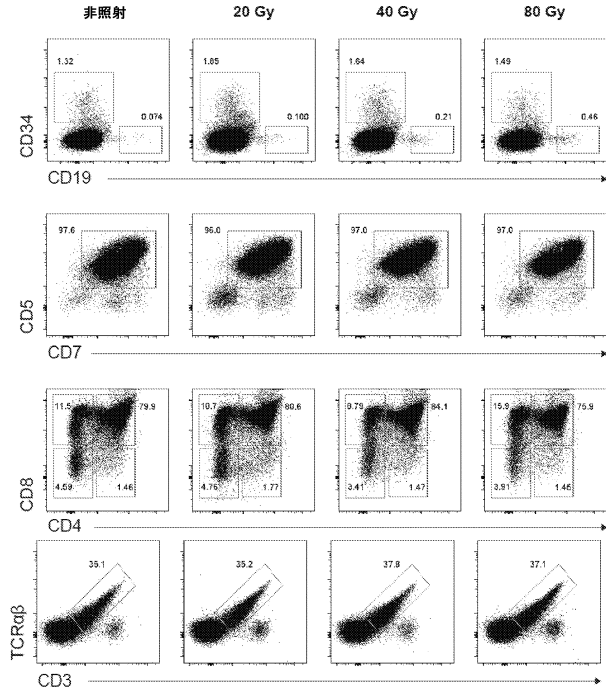
c



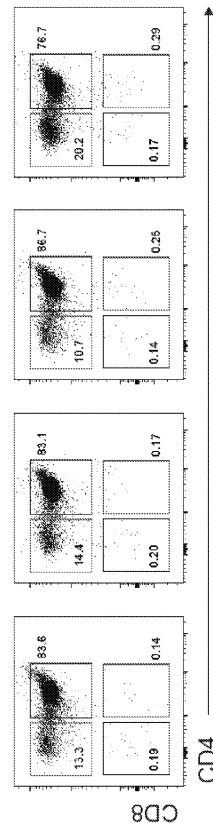
e



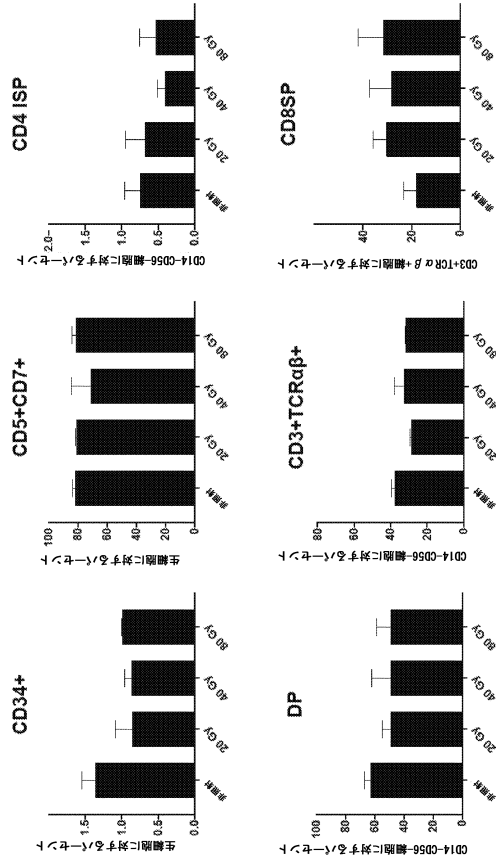
【図 2 1 G】



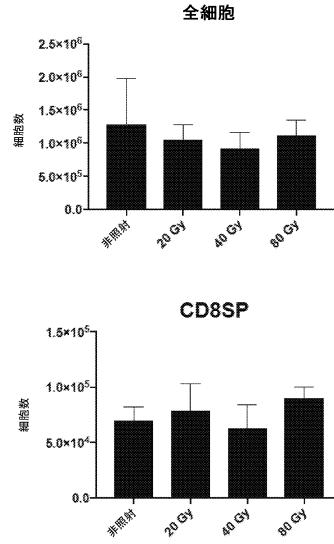
【図 2 1 H】



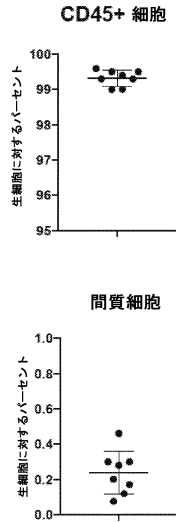
【図 2 1 I】



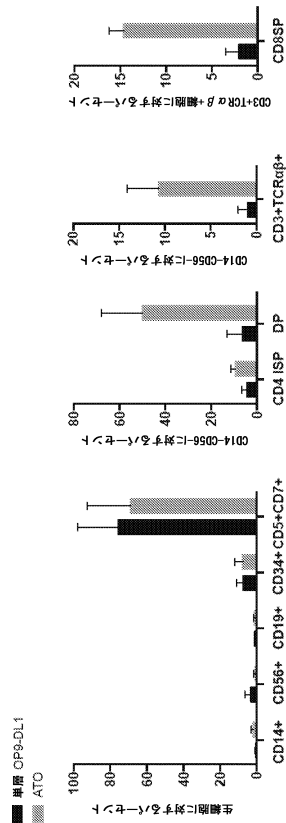
【図 2 1 J】



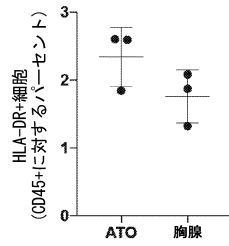
【図 2 1 K】



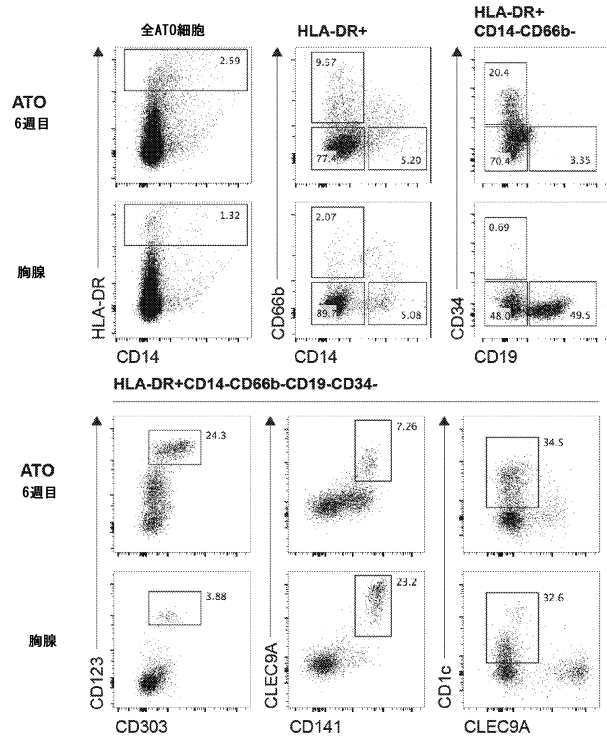
【図 2 2】



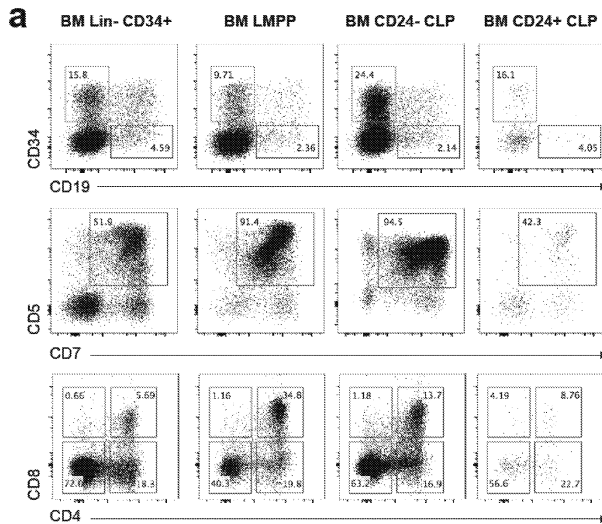
【図 2 3 A】



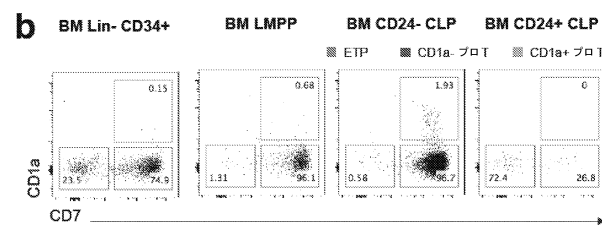
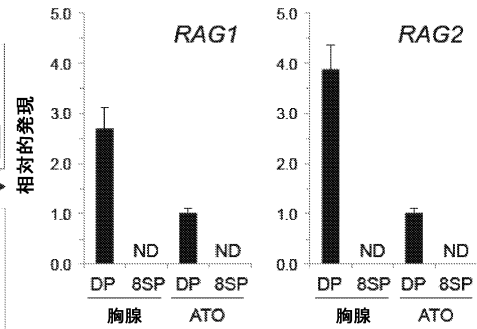
【図 2 3 B】



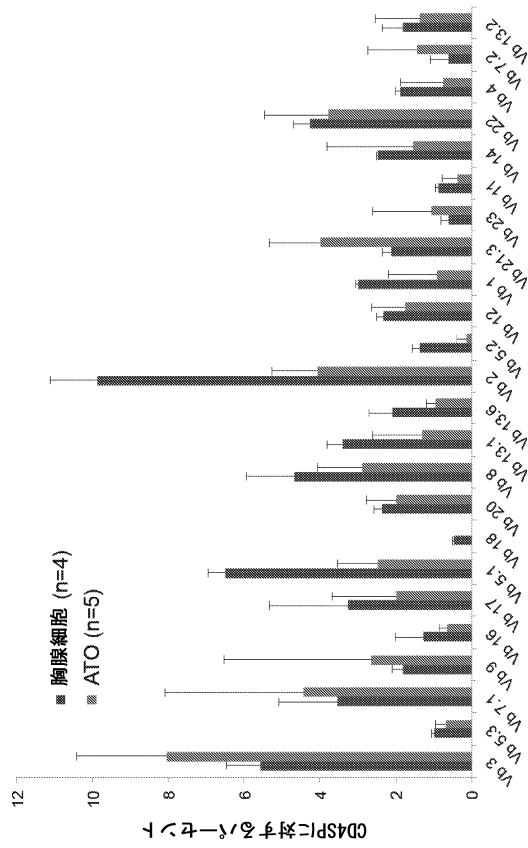
【図 2 4】



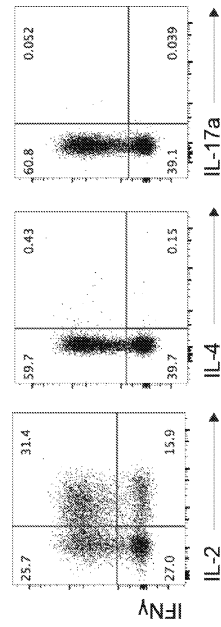
【図 2 5 A】



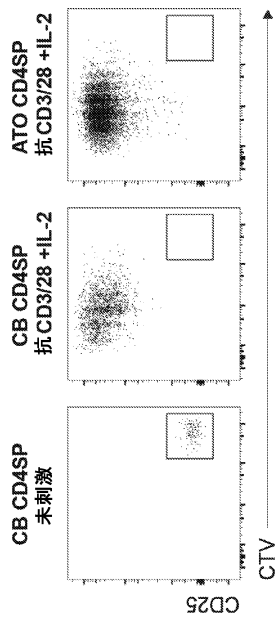
【図 2 5 B】



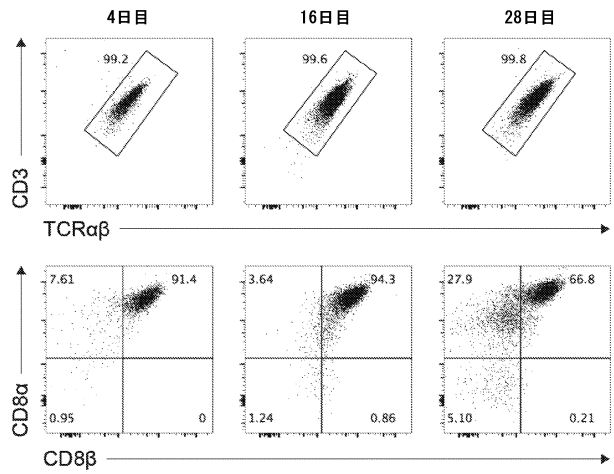
【図 2 5 C】



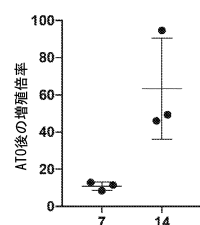
【図 2 5 D】



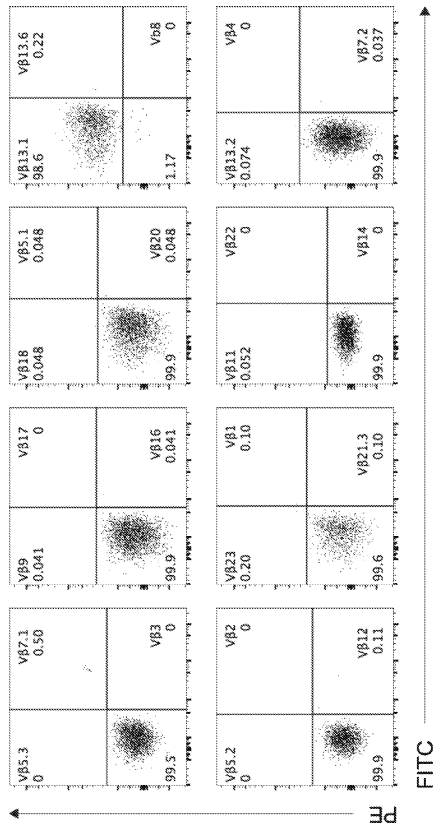
【図 2 6 A】



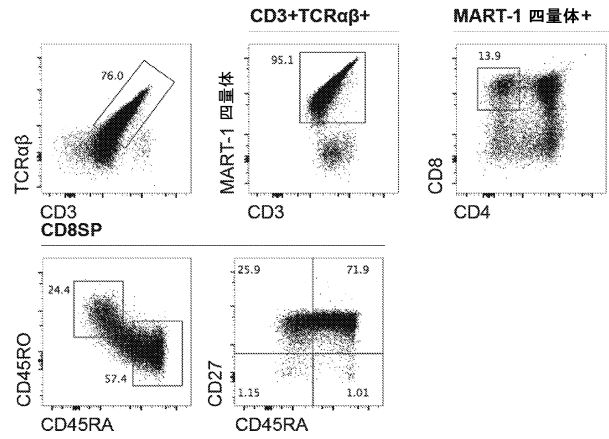
【図 2 5 E】



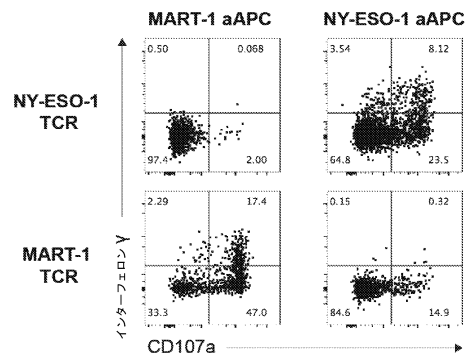
【図 26 B】



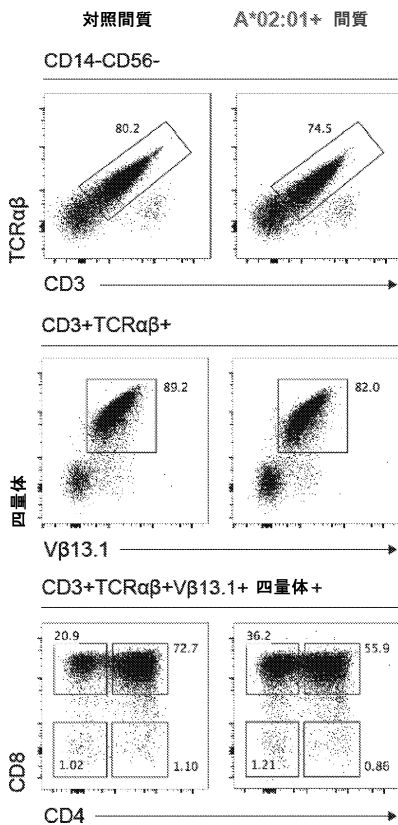
【図 26 C】



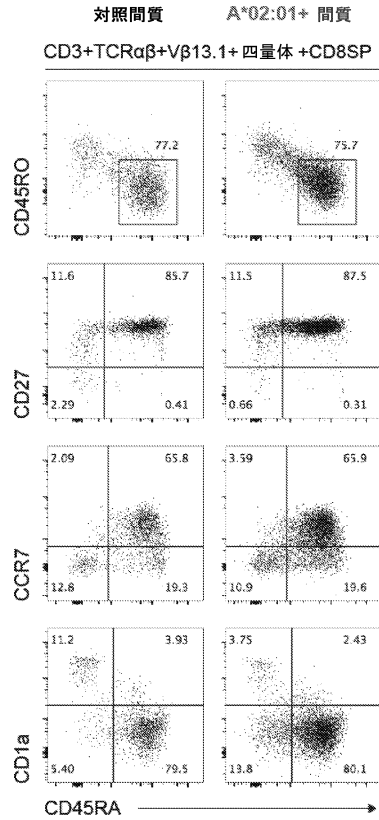
【図 26 D】



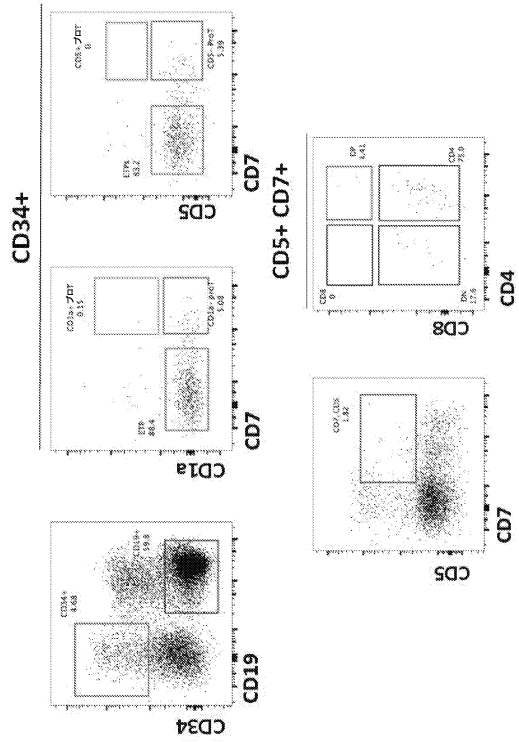
【図 27 A】



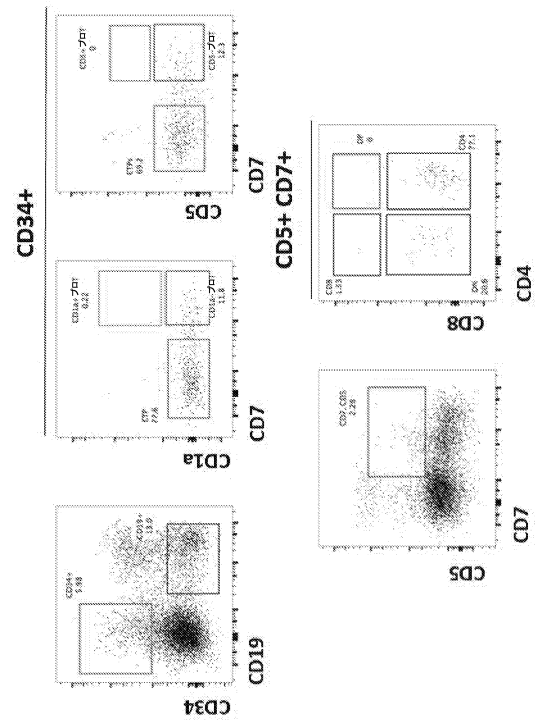
【図 27 B】



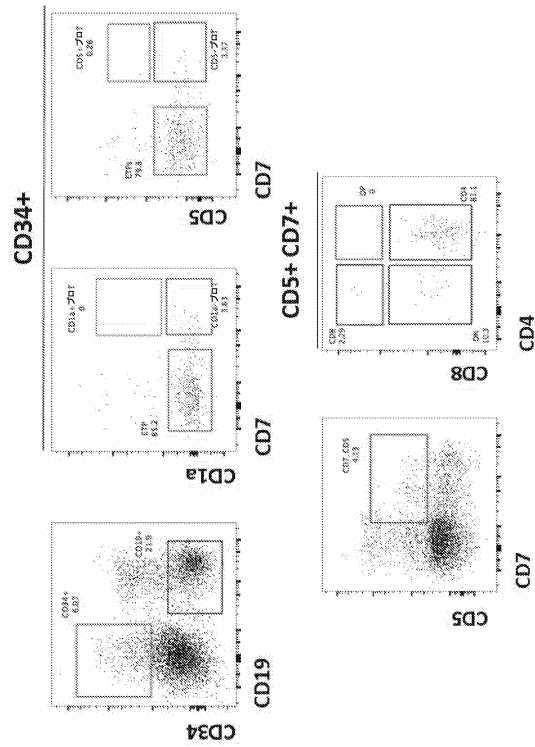
【図 28 A】



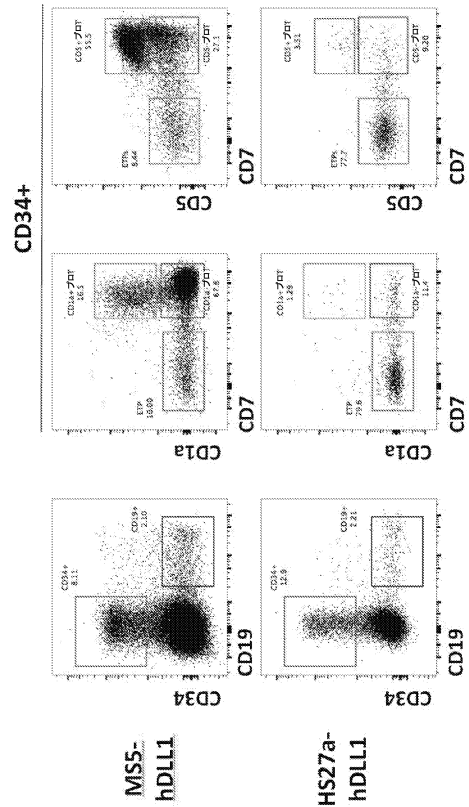
【図 28 B】



【図 28 C】



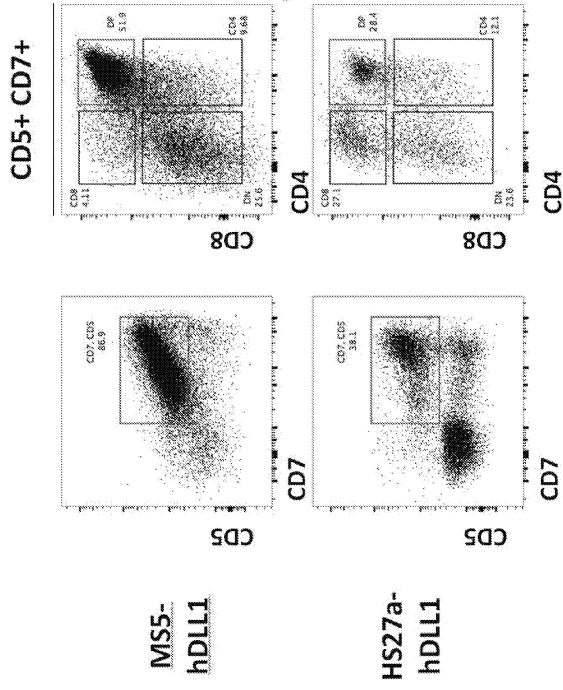
【図 29 A】



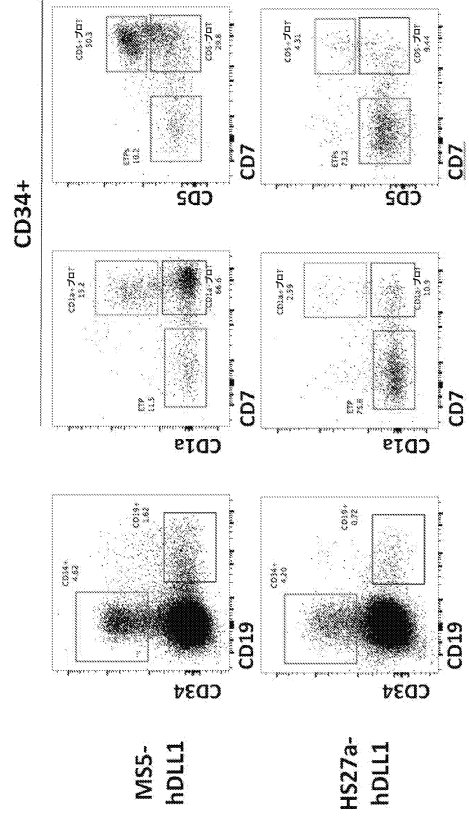
MS5-
hDLL1

HS27a-
hDLL1

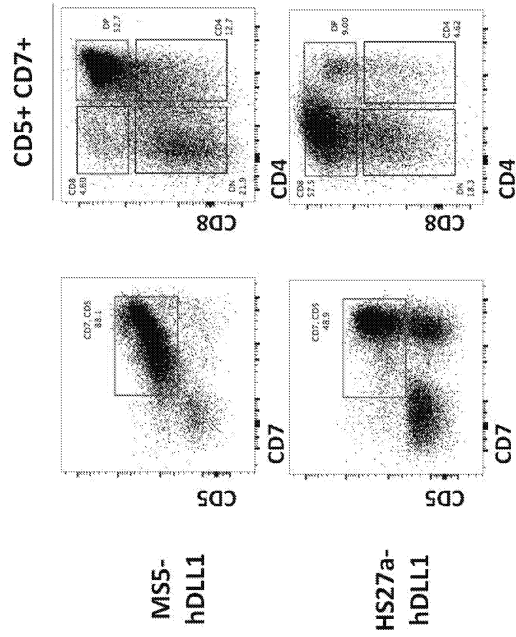
【図 29 B】



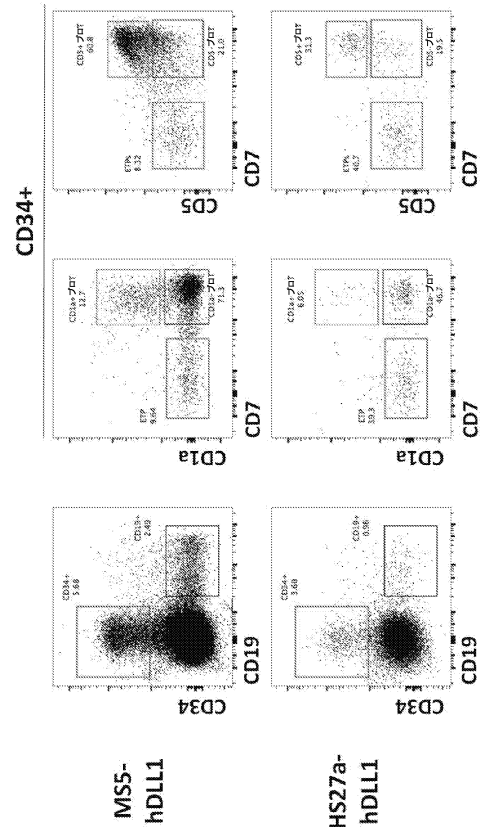
【図 29 C】



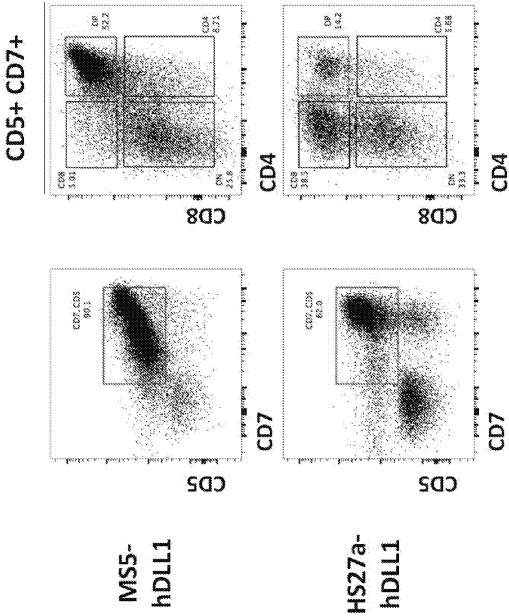
【図 29 D】



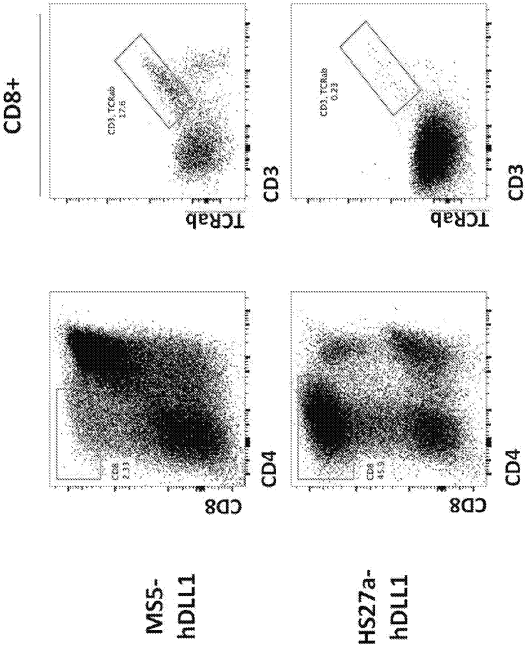
【図 29 E】



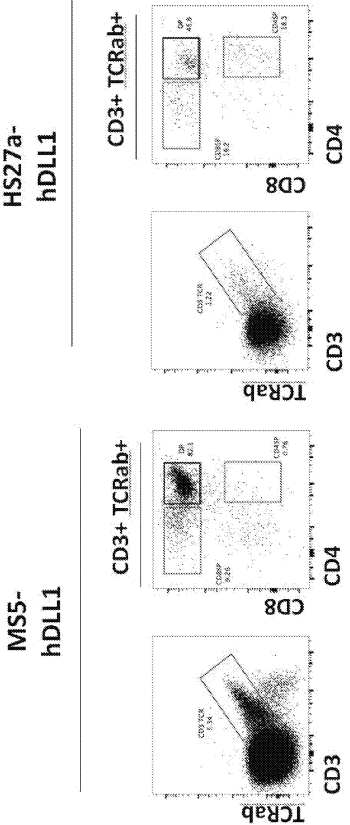
【図 29 F】



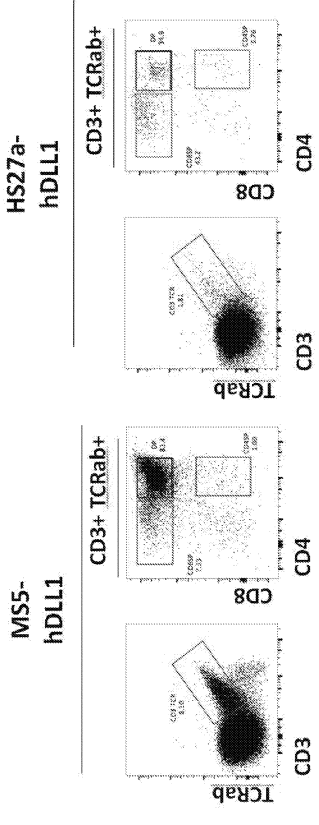
【図 30】



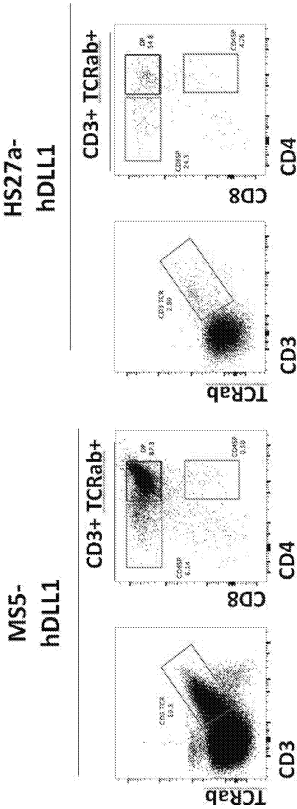
【図 31 A】



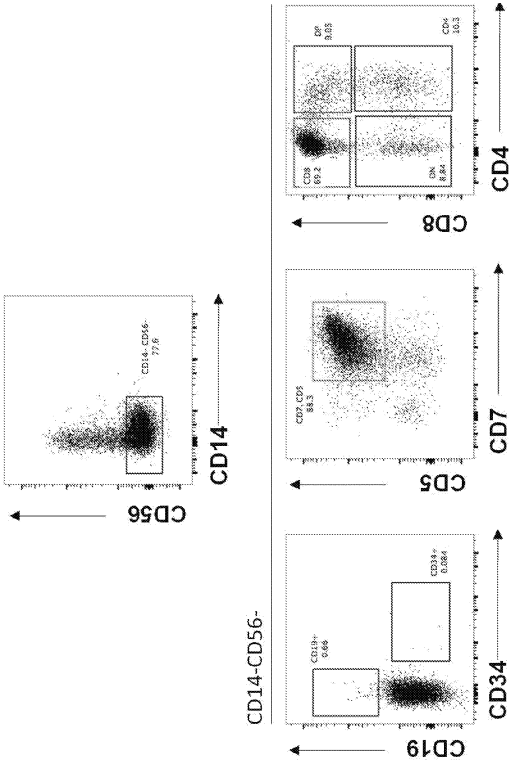
【図 31 B】



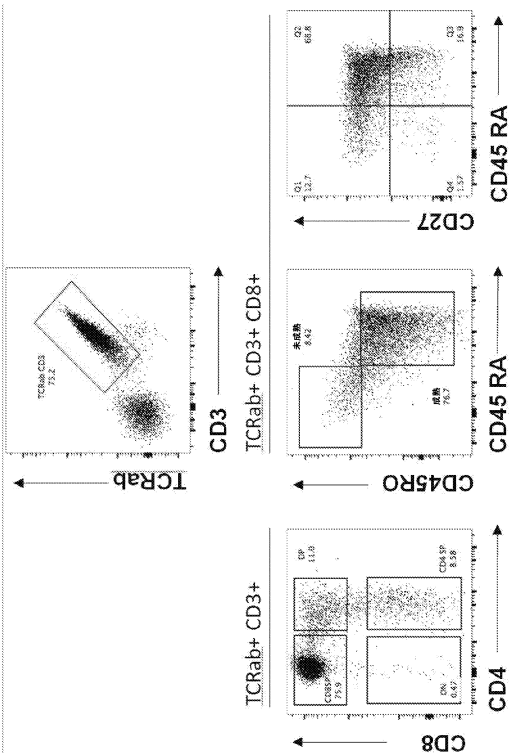
【図 3 1 C】



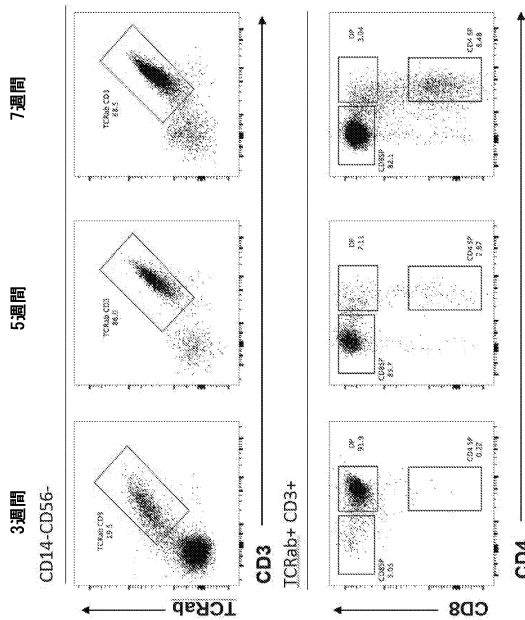
【図 3 2 A】



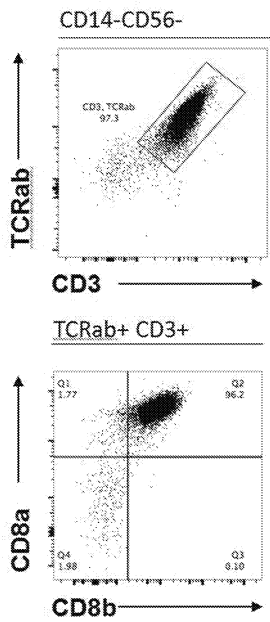
【図 3 2 B】



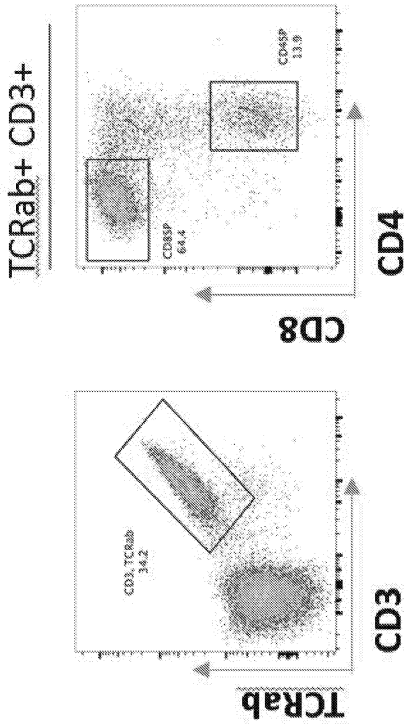
【図 3 3 A】



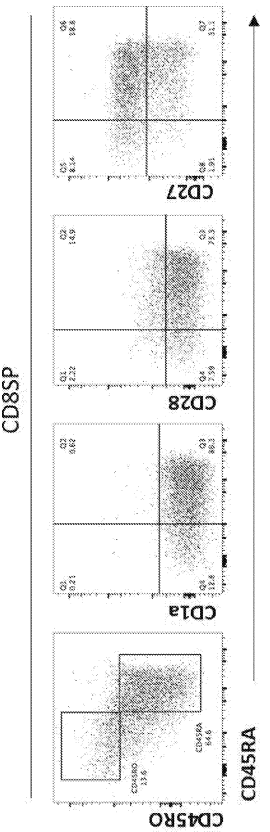
【図 3 3 B】
7週間



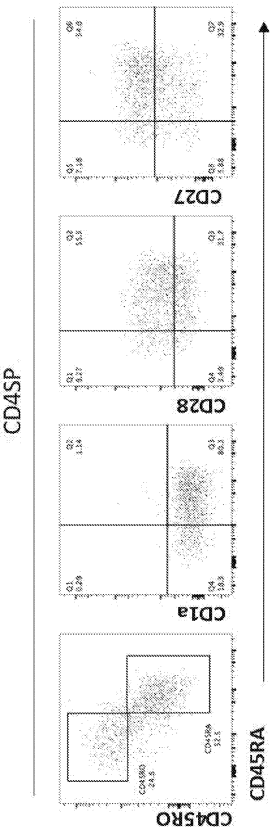
【図 3 4 A】



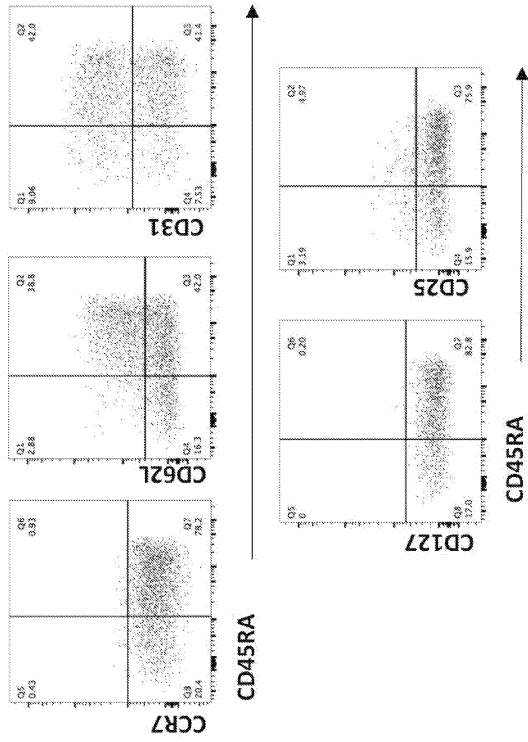
【図 3 4 B】



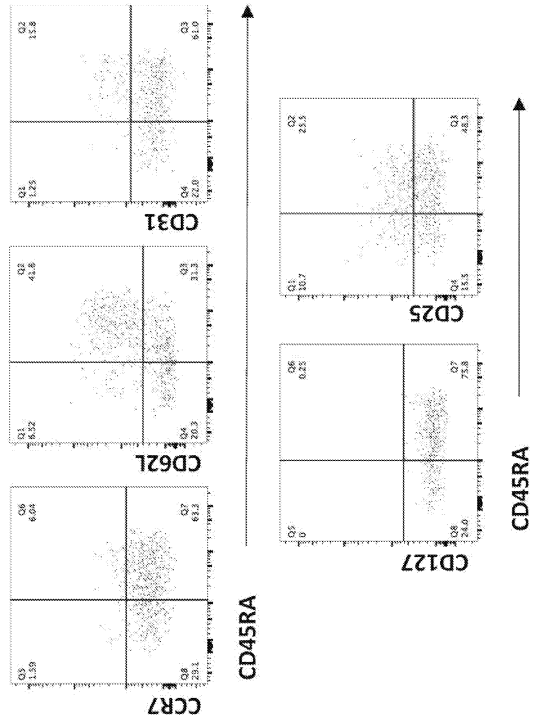
【図 3 4 C】



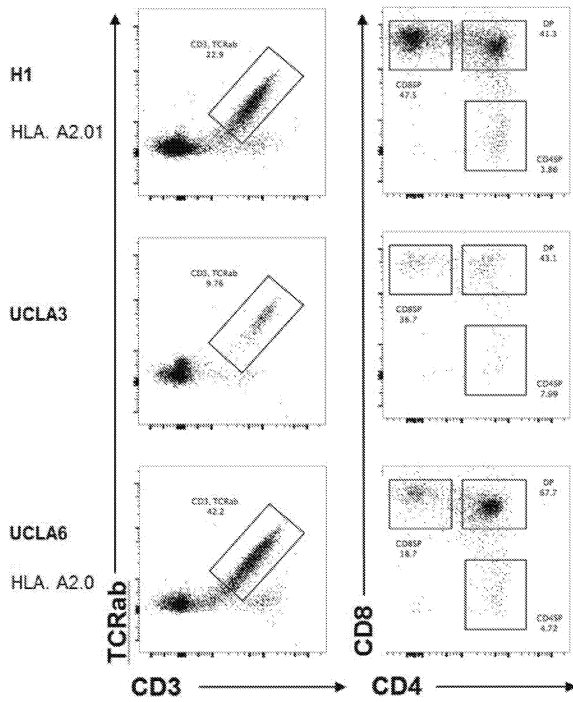
【図 3 5 A】



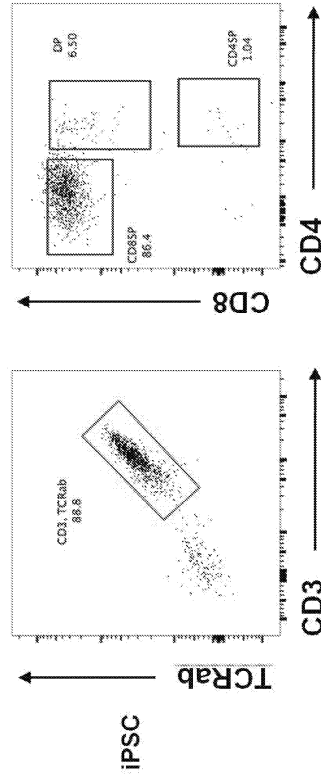
【図 3 5 B】

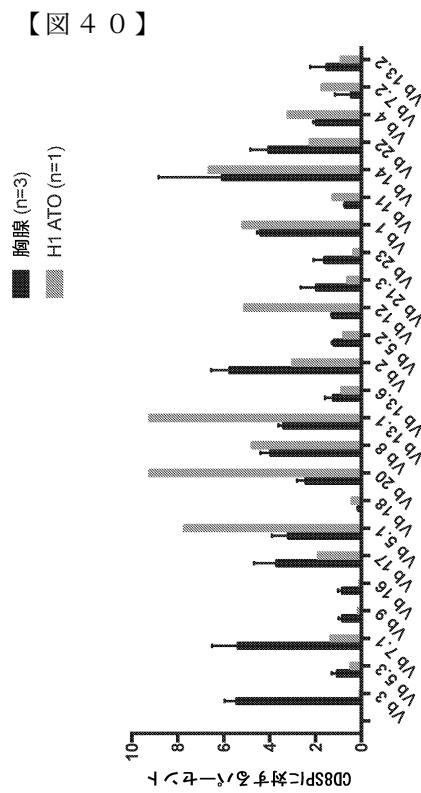
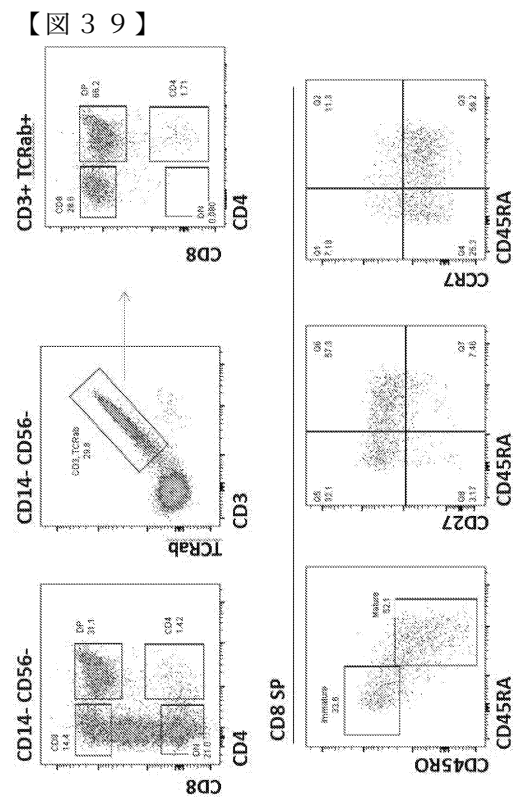
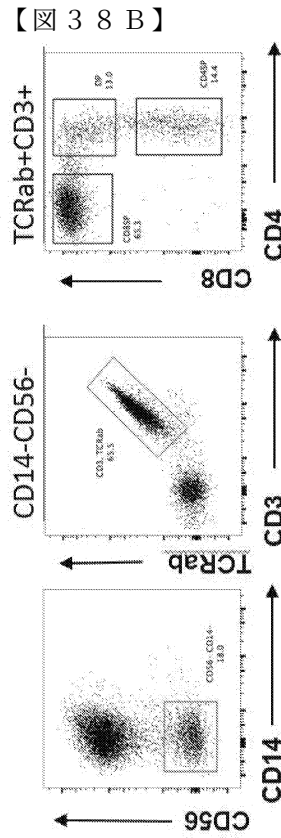
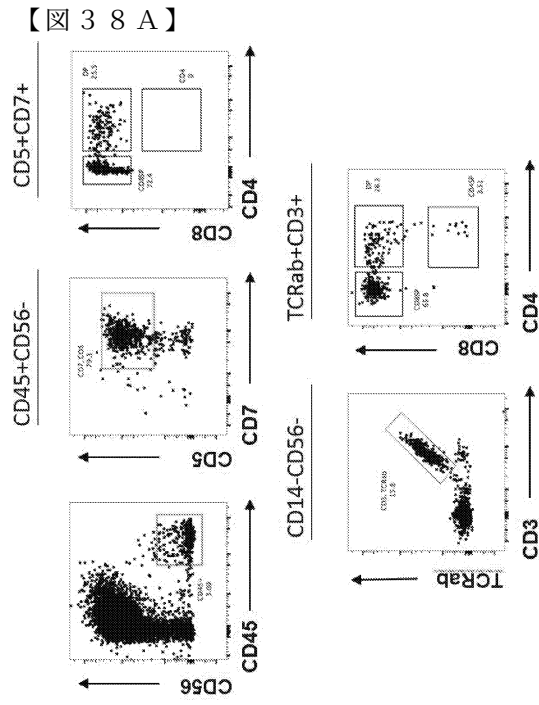


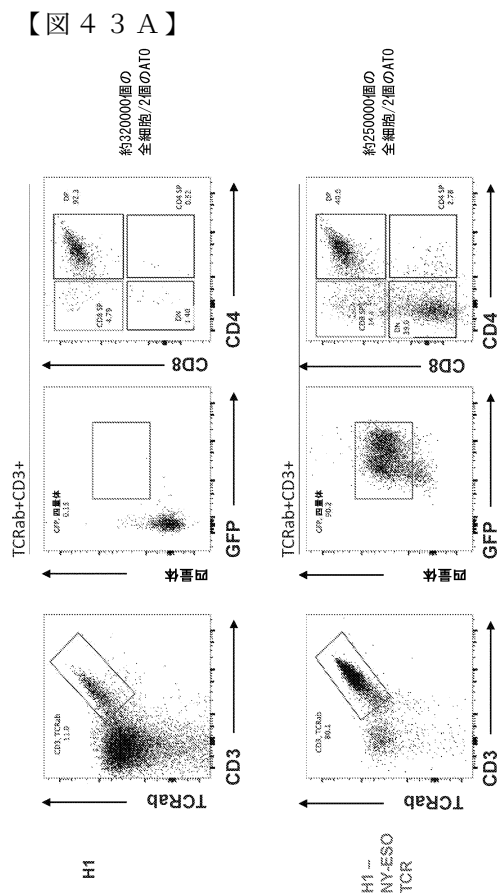
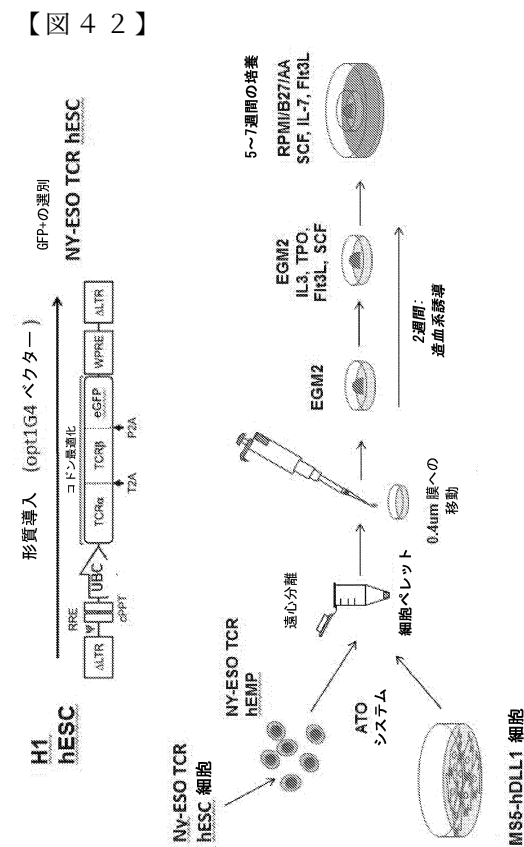
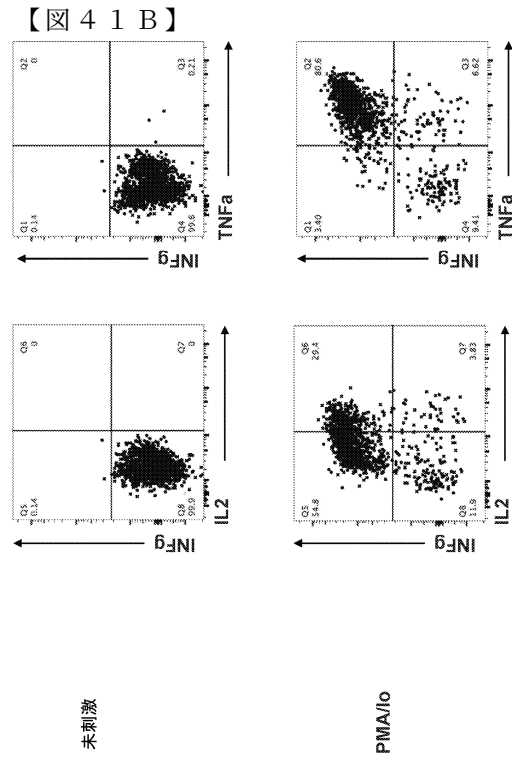
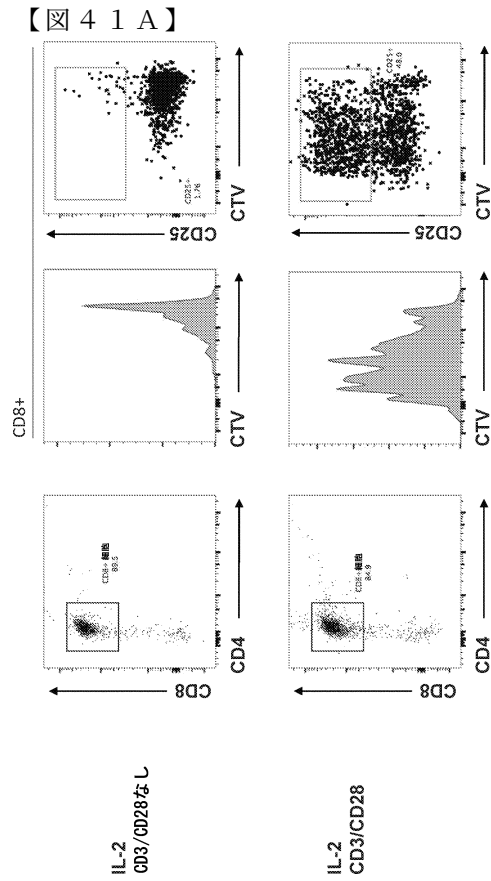
【図 3 6】



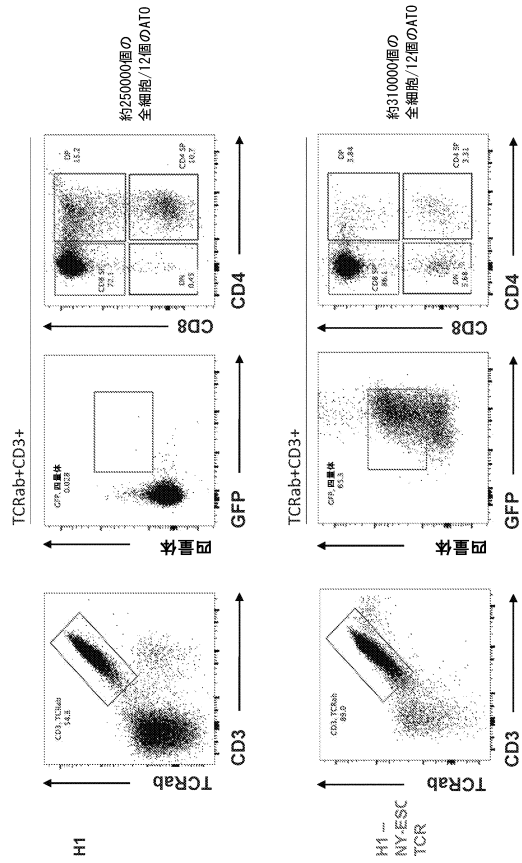
【図 3 7】



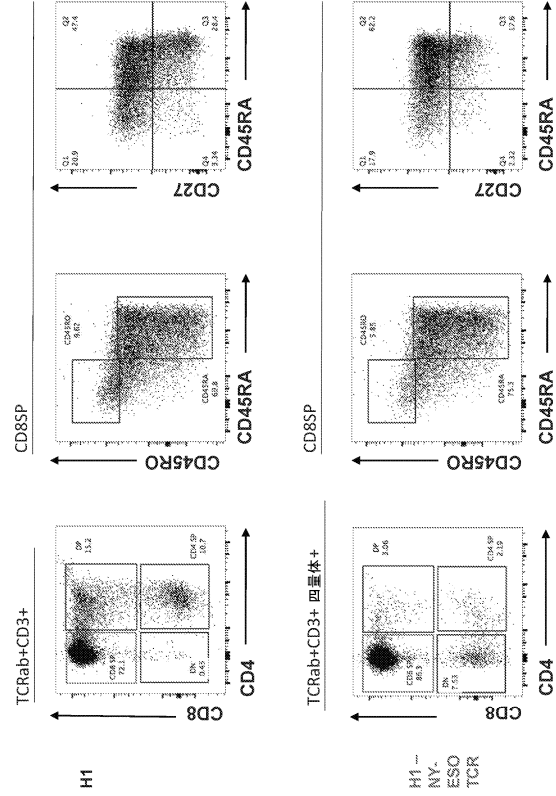




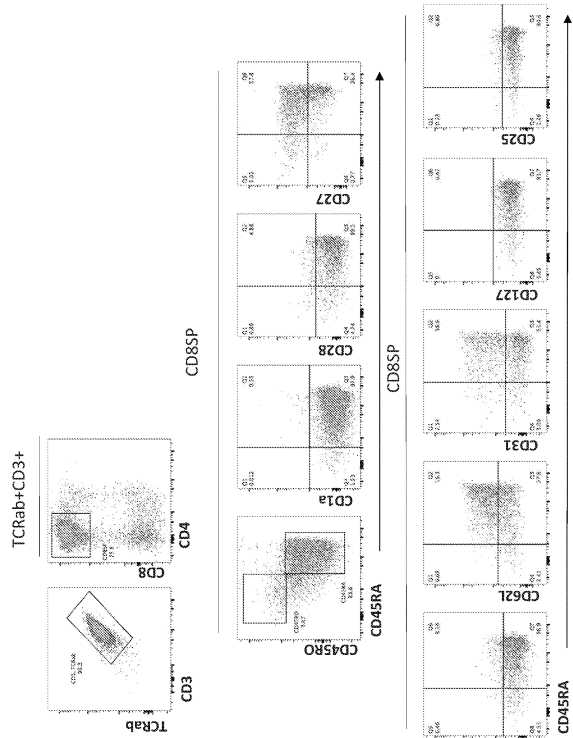
【図 4 3 B】



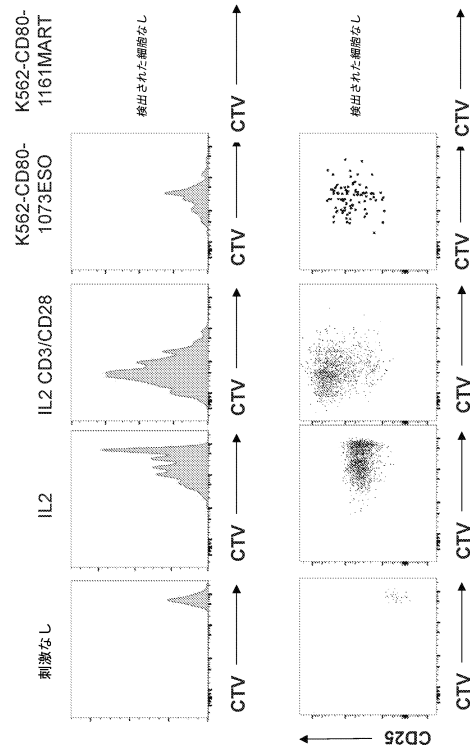
【図 4 4 A】



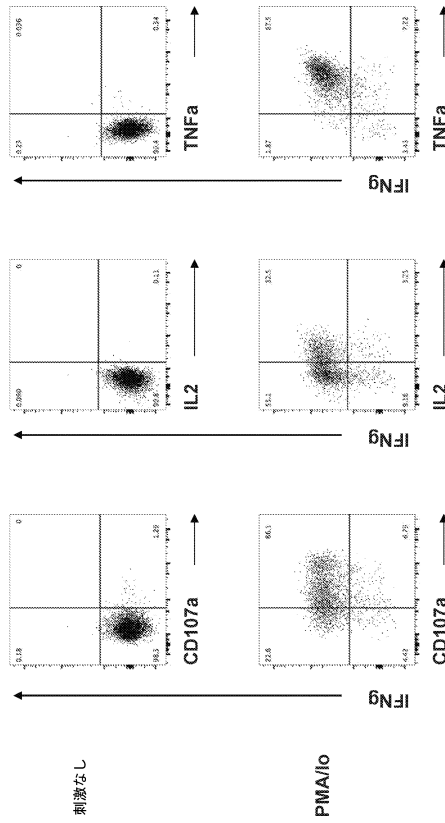
【図 4 4 B】



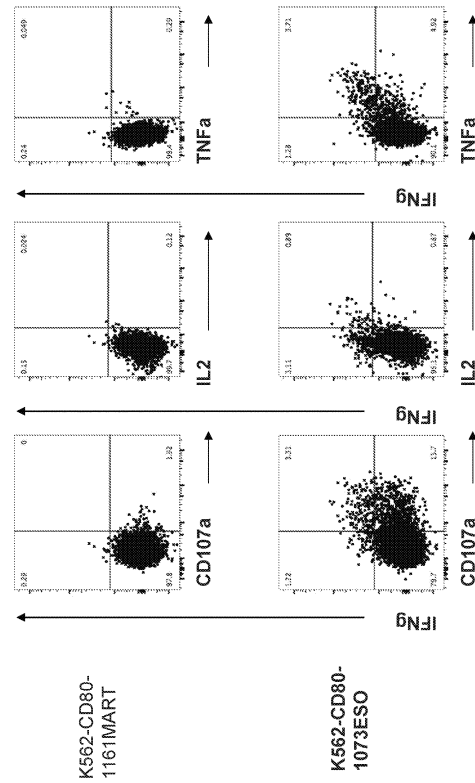
【図 4 5】



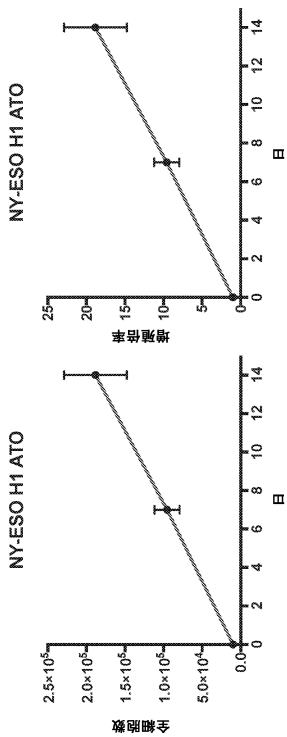
【図 4 6】



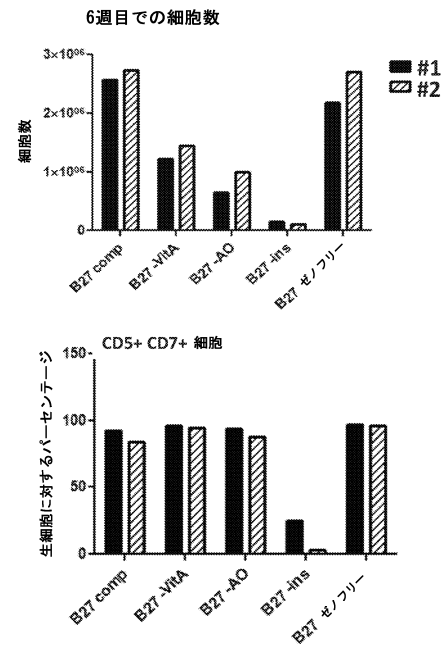
【図 4 7】

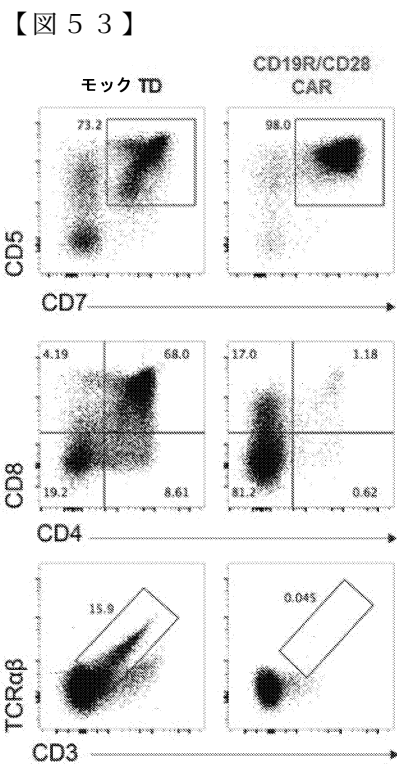
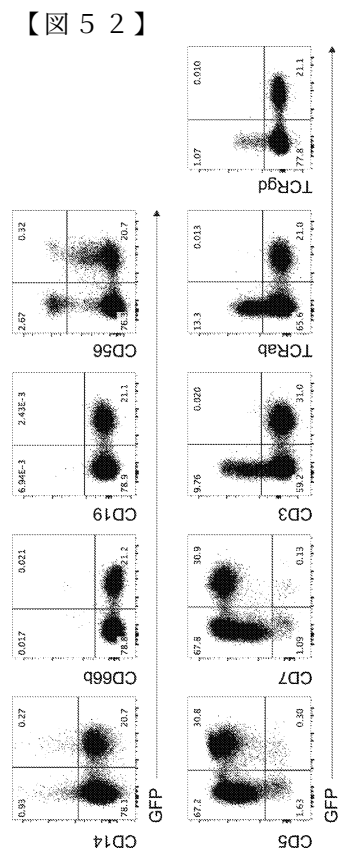
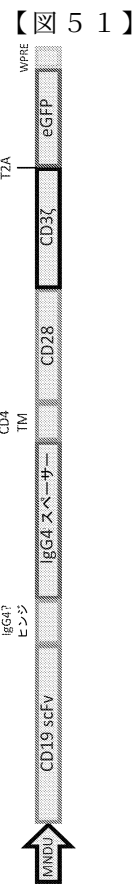
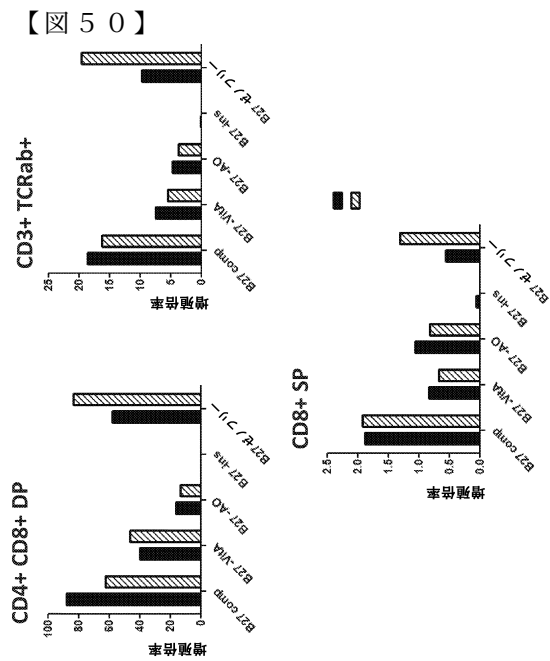


【図 4 8】

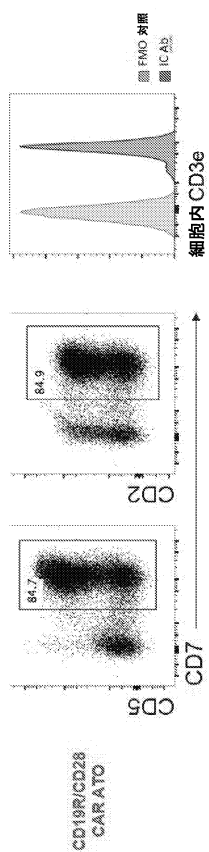


【図 4 9】

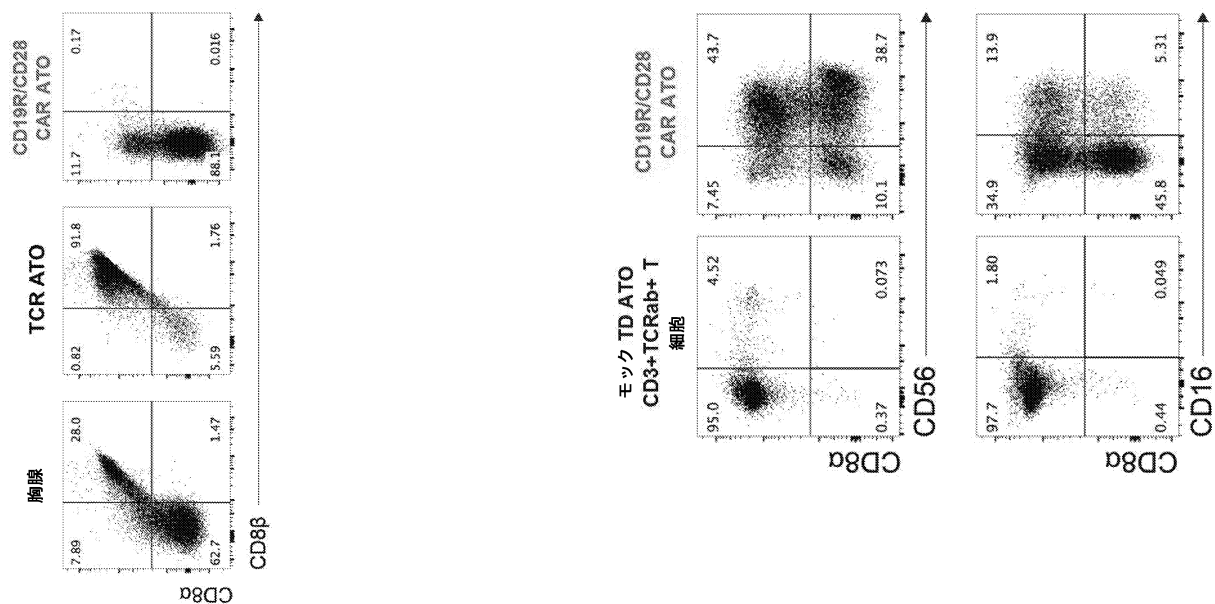




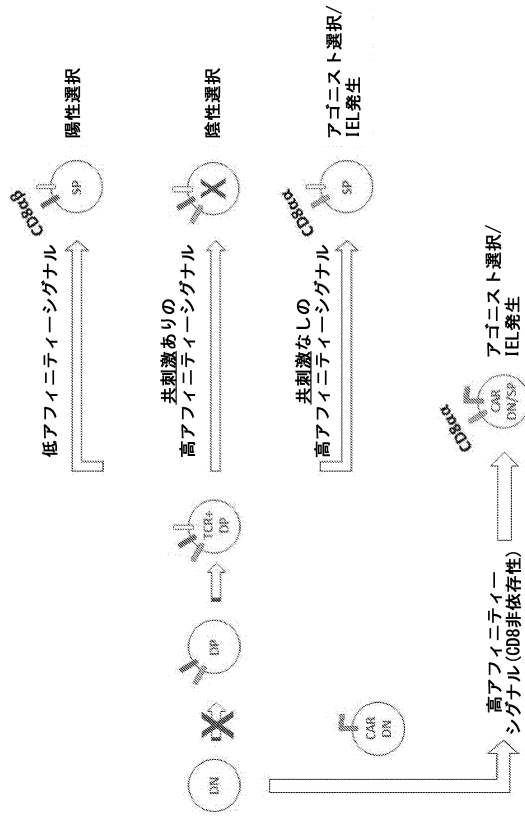
【図 5 5】



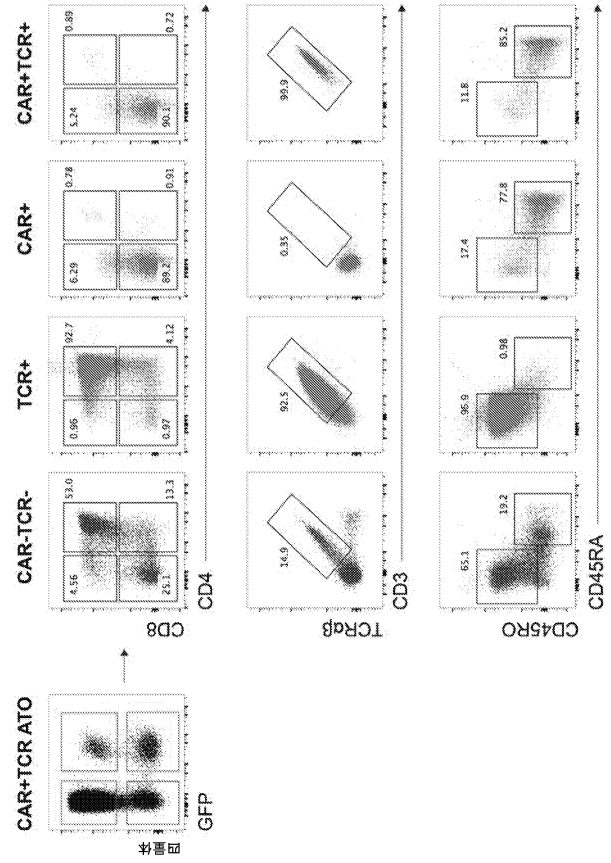
【图 5 6 B】



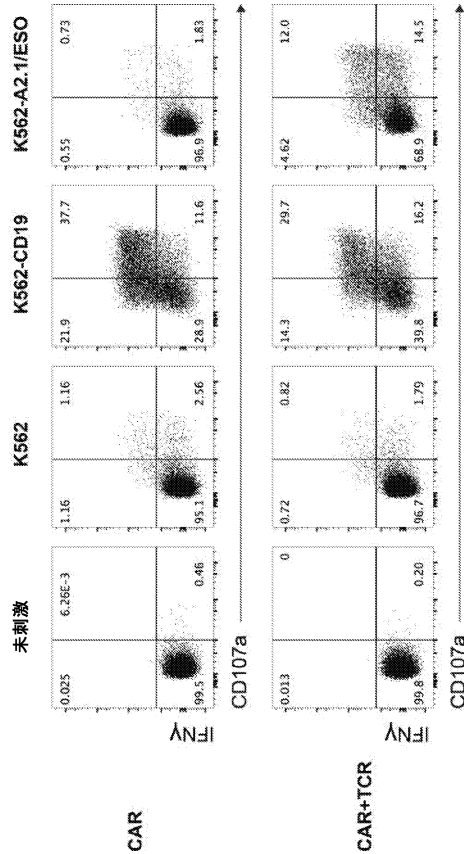
【図 57】



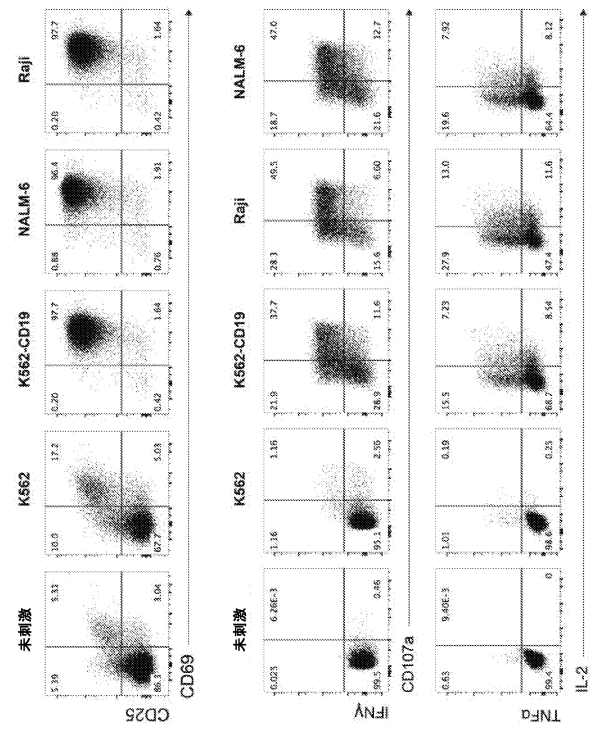
【図 58】



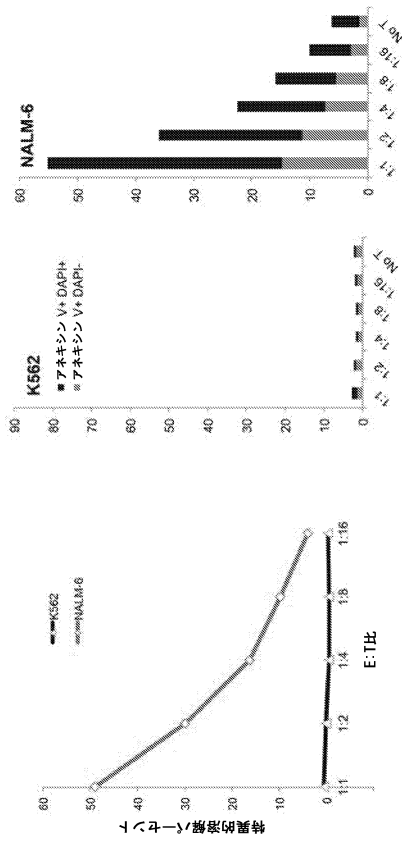
【図 59】



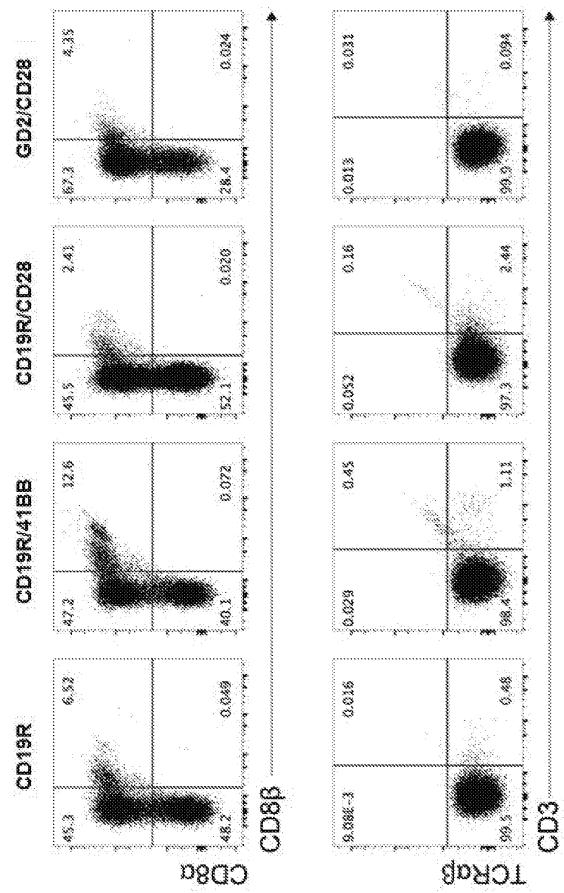
【図 60】



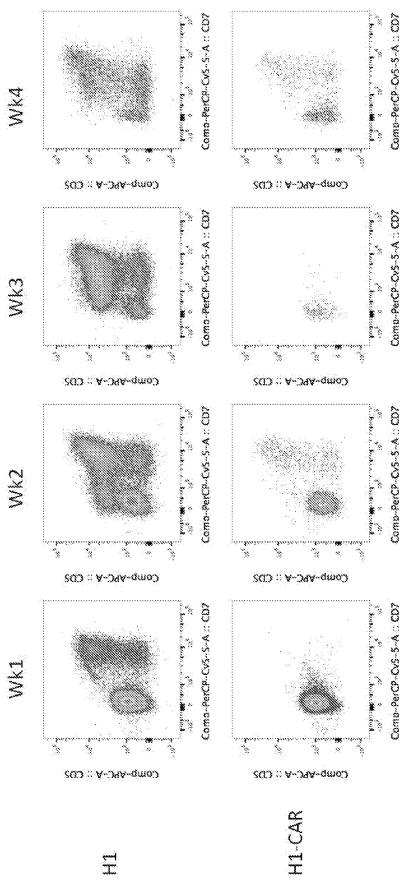
【図 6 1】



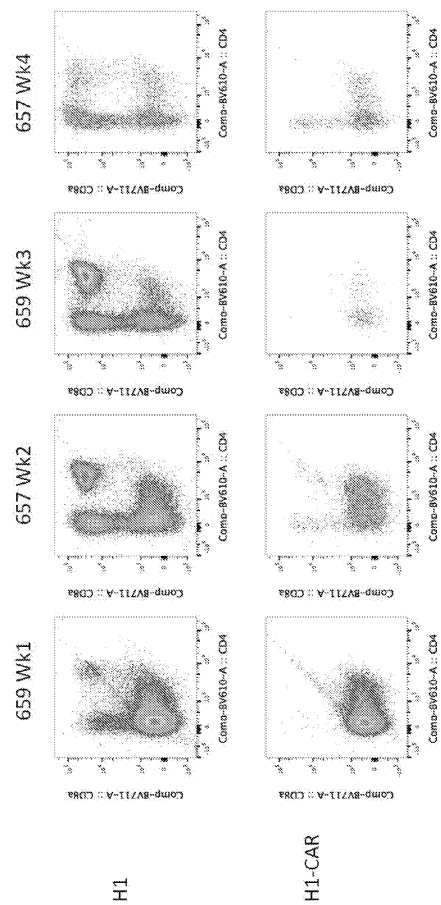
【図 6 2】



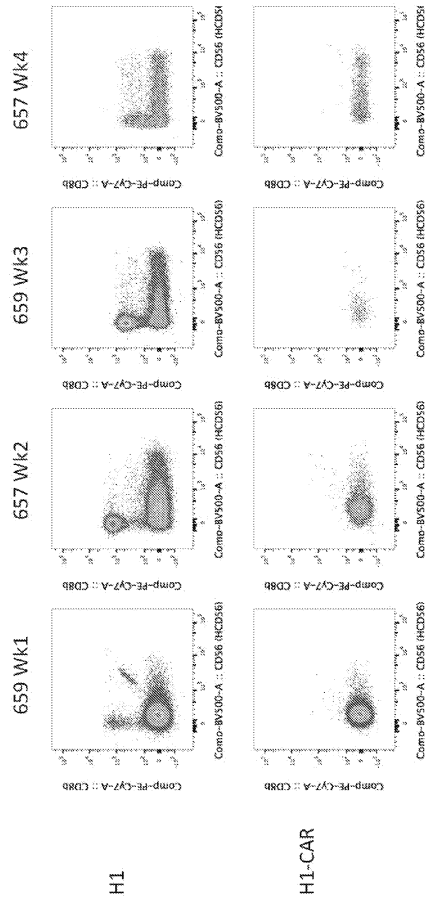
【図 6 3】



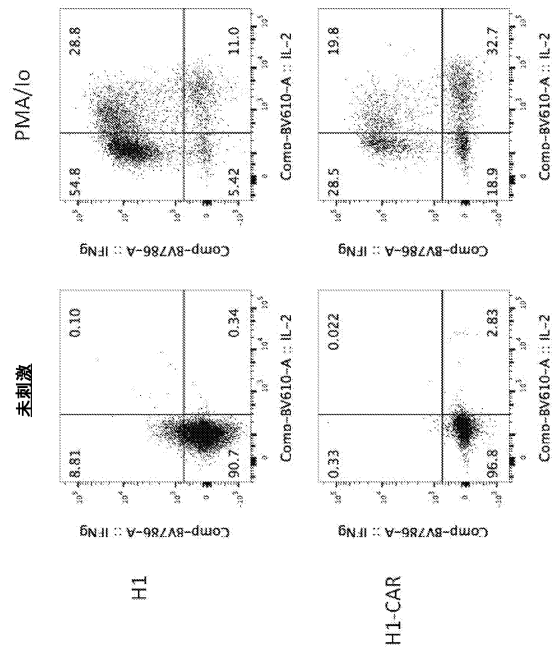
【図 6 4】



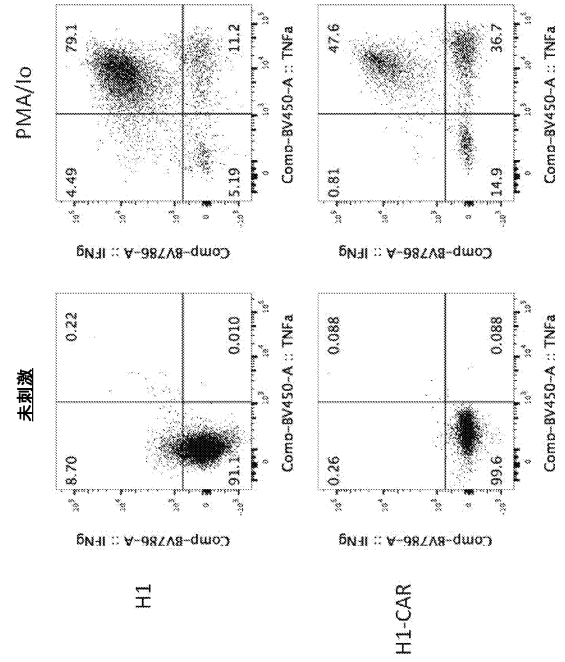
【図 6 5】



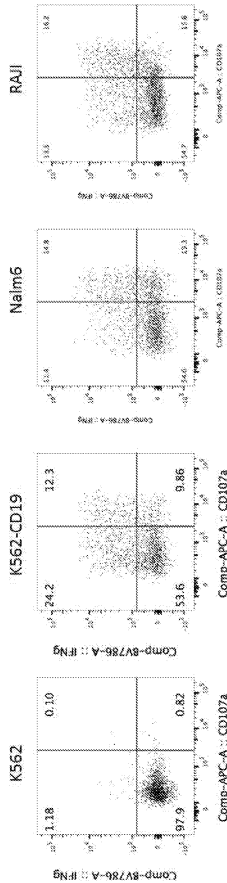
【図 6 6 B】



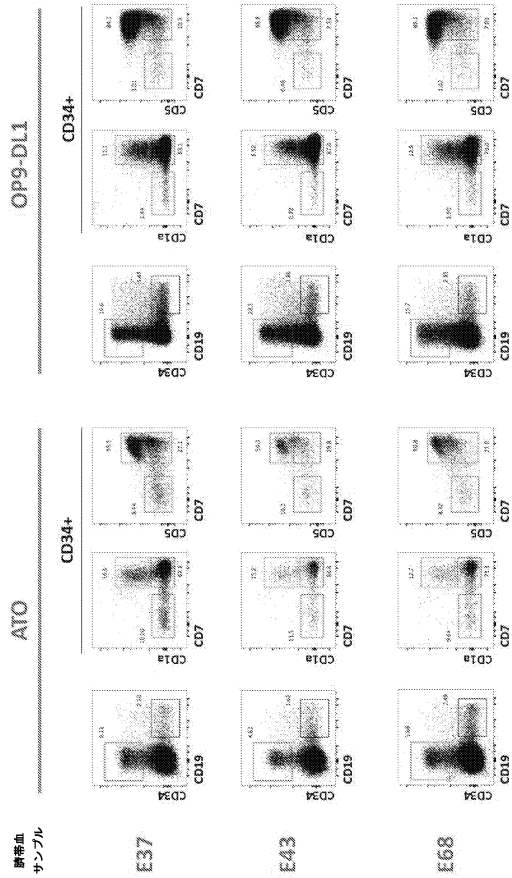
【図 6 6 A】



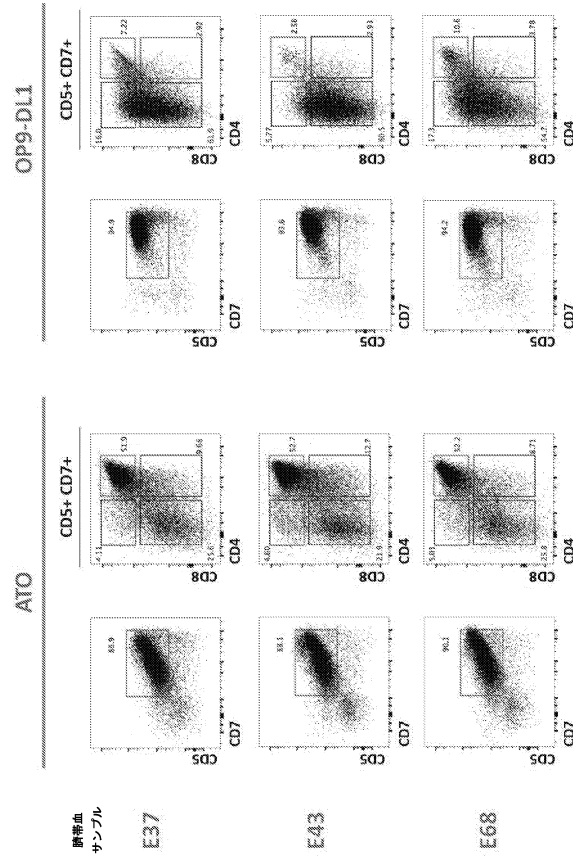
【図 6 7】



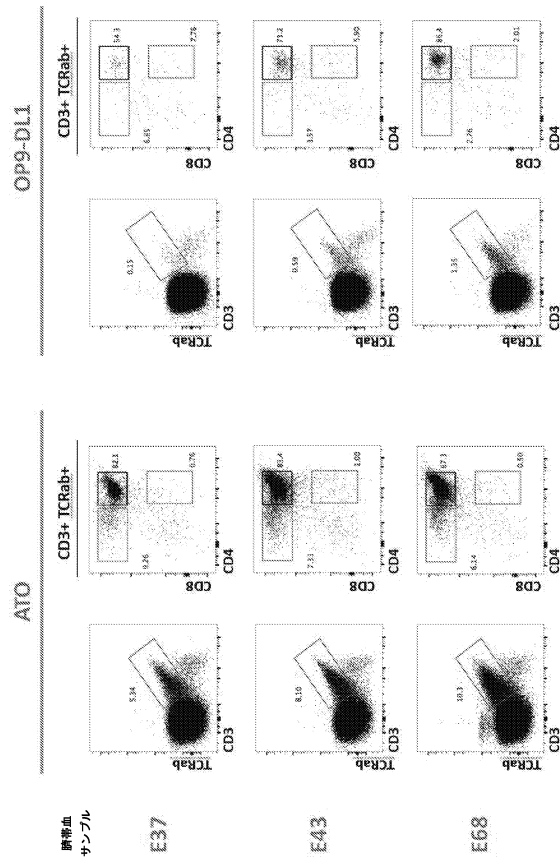
【図 68】



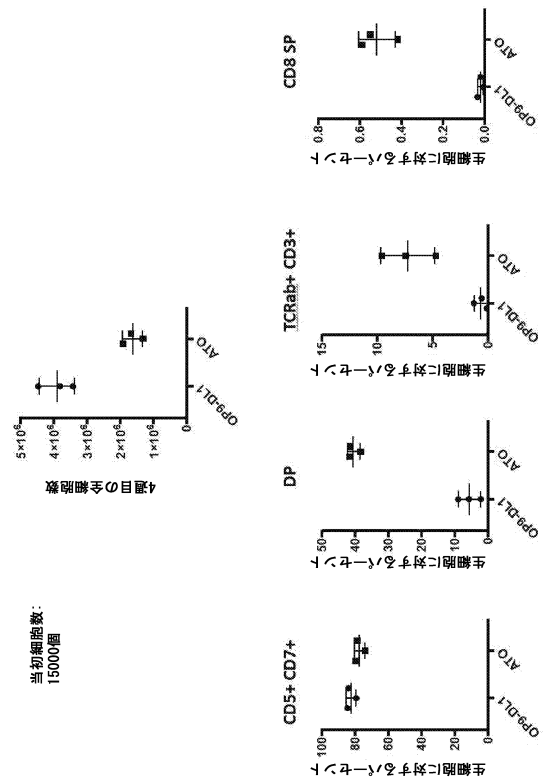
【図 69】



【図 70】



【図 71】



【配列表】

0006983771000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
A 6 1 P 35/02 (2006.01)		A 6 1 P 35/02	
A 6 1 K 39/12 (2006.01)		A 6 1 K 39/12	
A 6 1 K 39/02 (2006.01)		A 6 1 K 39/02	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)		A 6 1 P 43/00	1 2 1
A 6 1 K 35/15 (2015.01)		A 6 1 K 35/15	Z
A 6 1 P 37/06 (2006.01)		A 6 1 P 37/06	
A 6 1 K 47/55 (2017.01)		A 6 1 K 47/55	
A 6 1 P 31/12 (2006.01)		A 6 1 P 31/12	
A 6 1 P 31/04 (2006.01)		A 6 1 P 31/04	
C 1 2 Q 1/6876 (2018.01)		C 1 2 Q 1/6876	Z

(31)優先権主張番号 62/248,931

(32)優先日 平成27年10月30日(2015.10.30)

(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

(74)代理人 100160923

弁理士 山口 裕孝

(74)代理人 100119507

弁理士 刑部 俊

(74)代理人 100142929

弁理士 井上 隆一

(74)代理人 100148699

弁理士 佐藤 利光

(74)代理人 100128048

弁理士 新見 浩一

(74)代理人 100129506

弁理士 小林 智彦

(74)代理人 100205707

弁理士 小寺 秀紀

(74)代理人 100114340

弁理士 大関 雅人

(74)代理人 100121072

弁理士 川本 和弥

(72)発明者 クロックス ゲイ エム.

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 94607-5200 オークランド フランクリン ストリート 1111 トウエルフス フロア ザ リージェンツ オブ ザ ユニバーシティ オブ カリフォルニア内

(72)発明者 モンテルーハーゲン アメリー

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 94607-5200 オークランド フランクリン ストリート 1111 トウエルフス フロア ザ リージェンツ オブ ザ ユニバーシティ オブ カリフォルニア内

(72)発明者 シート クリストファー エス.

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 94607-5200 オークランド フランクリン ストリート 1111 トウエルフス フロア ザ リージェンツ オブ ザ ユニバーシティ オブ カリフォルニア内

審査官 大久保 智之

(56)参考文献 米国特許出願公開第2006/0073591 (US, A1)

特表2012-509659 (JP, A)

国際公開第2014/138315 (WO, A1)

BRILE CHUNG et al., Stem Cells, 2014年, Vol.32, p.2386-2396

Mark C. Poznansky et al., Nature Biotechnology, 1999年, Vol.18, p.729-734

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 5/00