

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6086904号
(P6086904)

(45) 発行日 平成29年3月1日 (2017.3.1)

(24) 登録日 平成29年2月10日 (2017.2.10)

(51) Int. Cl.

F I

C 1 2 N 5/0783 (2010.01)

C 1 2 N 5/0783

C 1 2 N 5/078 (2010.01)

C 1 2 N 5/078

C 1 2 N 5/07 (2010.01)

C 1 2 N 5/07 Z N A

A 6 1 P 35/00 (2006.01)

A 6 1 P 35/00

A 6 1 P 35/02 (2006.01)

A 6 1 P 35/02

請求項の数 24 (全 25 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2014-510941 (P2014-510941)
 (86) (22) 出願日 平成24年5月21日 (2012.5.21)
 (65) 公表番号 特表2014-515259 (P2014-515259A)
 (43) 公表日 平成26年6月30日 (2014.6.30)
 (86) 国際出願番号 PCT/IB2012/052545
 (87) 国際公開番号 W02012/156958
 (87) 国際公開日 平成24年11月22日 (2012.11.22)
 審査請求日 平成27年5月12日 (2015.5.12)
 (31) 優先権主張番号 105714
 (32) 優先日 平成23年5月19日 (2011.5.19)
 (33) 優先権主張国 ポルトガル (PT)

(73) 特許権者 511115734
 インスティテュート デ メディシナ モ
 レキュラー
 ポルトガル国, リジュボア 1 6 4 9 - 0
 2 8, エディフィシオ エガス モニズ,
 アヴェニウ プロフェソ エガス モニズ
 110000800
 (74) 代理人 特許業務法人創成国際特許事務所
 (72) 発明者 デ・カルヴァーリョ・イ・シルヴァ・サン
 トス, ブルーノ・ミゲル
 ポルトガル ペー 1 1 5 0 - 2 6 0 リ
 ジュボア ファ パッソス マヌエル 7
 8 - 4. ディーティーオー

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 γ δ T細胞を含むリンパ球の細胞株、その組成物、及びその製造方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

機能的な天然細胞障害性受容体を発現させる $V\delta 1^+$ $\gamma\delta$ T細胞を含むリンパ球の細胞株であって、

前記天然細胞障害性受容体はNK p 30を含むことを特徴とする細胞株。

【請求項 2】

請求項 1 記載の細胞株であって、

機能的な天然細胞障害性受容体を発現させる $V\delta 1^+$ $\gamma\delta$ T細胞の単一集団をなす細胞株。

【請求項 3】

請求項 1 又は 2 記載の細胞株であって、

$V\delta 2^+$ $\gamma\delta$ T細胞をさらに含む細胞株。

【請求項 4】

請求項 1 ～ 3 のいずれか一項に記載の細胞株であって、

前記リンパ球は末梢血サンプル由来であることを特徴とする細胞株。

【請求項 5】

請求項 1 ～ 4 のいずれか一項に記載の細胞株であって、

前記天然細胞障害性受容体はNK p 44を含むことを特徴とする細胞株。

【請求項 6】

請求項 1 ～ 5 のいずれか一項に記載の細胞株であって、

10

20

前記天然細胞障害性受容体はNK p 46を含むことを特徴とする細胞株。

【請求項 7】

請求項 1～6 のいずれか一項に記載の細胞株であって、
グランザイム B を発現させる細胞を含む細胞株。

【請求項 8】

請求項 1～7 のいずれか一項に記載の細胞株の細胞を含む組成物。

【請求項 9】

請求項 8 記載の組成物であって、
注射可能な物質であることを特徴とする組成物。

【請求項 10】

請求項 8 又は 9 記載の組成物であって、
薬剤に使用するための組成物。

【請求項 11】

請求項 10 記載の組成物であって、
自己又は異種の養子細胞療法、腫瘍又は癌治療、腫瘍又は癌免疫療法、及び／又は、白血
血病治療に使用するための組成物。

【請求項 12】

請求項 10 記載の組成物であって、
急性リンパ性白血病、急性骨髄性白血病、慢性骨髄性白血病、慢性リンパ性白血病、多
発性骨髄腫、バーキットリンパ腫、濾胞性リンパ腫、乳癌、肺癌、前立腺癌、結腸癌、膀
胱癌、腎細胞癌、又は、皮膚メラノーマの治療に使用するための組成物。

【請求項 13】

請求項 10 記載の組成物であって、
ウィルス感染の治療に使用するための組成物。

【請求項 14】

請求項 13 記載の組成物であって、
前記ウィルスはヘルペスウイルス科又はレトロウイルス科由来であることを特徴とする
組成物。

【請求項 15】

請求項 1～7 のいずれか一項に記載の細胞株の製造方法であって、
 $\gamma\delta$ PBL を分離する工程と、
適切な培地に、 $\gamma\delta$ TCR アゴニスト及び少なくとも 1 つの γ_c - サイトカインを添加
して、前記 $\gamma\delta$ PBL を培養する工程とを備え、
前記 $\gamma\delta$ TCR アゴニスト及び γ_c - サイトカインの添加は、前記 $\gamma\delta$ PBL の少なく
とも 40 % が天然細胞障害性受容体を発現させるまで、実行されることを特徴とする方法
。

【請求項 16】

請求項 15 記載の方法であって、
前記 $\gamma\delta$ TCR アゴニスト及び γ_c - サイトカインの添加は、前記 $\gamma\delta$ PBL の少なく
とも 40 % が NK p 30 を発現させるまで、実行されることを特徴とする方法。

【請求項 17】

請求項 15 又は 16 記載の方法であって、
前記 $\gamma\delta$ TCR アゴニストは、フィトヘムアグルチニン、抗 CD 3 モノクローナル抗体
、抗 $\gamma\delta$ TCR モノクローナル抗体、又は、これらの混合物であることを特徴とする方法
。

【請求項 18】

請求項 17 記載の方法であって、
前記 $\gamma\delta$ TCR アゴニストの濃度の範囲が 0.01～100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ であることを特
徴とする方法。

【請求項 19】

10

20

30

40

50

請求項 15～18 のいずれか一項に記載の方法であって、
前記 γ_c -サイトカインは、IL-2、IL-4、IL-9、IL-12、IL-15、IL-21、又は、これらの混合物であることを特徴とする方法。

【請求項 20】

請求項 19 記載の方法であって、
前記 γ_c -サイトカインの濃度の範囲が、1～10000 U/ml であることを特徴とする方法。

【請求項 21】

請求項 20 記載の方法であって、
前記 γ_c -サイトカインの濃度の範囲が、100～1000 U/ml であることを特徴とする方法。 10

【請求項 22】

請求項 15～21 のいずれか一項に記載の方法であって、
前記 $\gamma\delta$ TCR アゴニスト及び γ_c -サイトカインの添加時間の範囲が、2～60 日であることを特徴とする方法。

【請求項 23】

請求項 22 記載の方法であって、
前記 $\gamma\delta$ TCR アゴニスト及び γ_c -サイトカインの添加時間の範囲が、9～25 日であることを特徴とする方法。

【請求項 24】 20

請求項 23 記載の方法であって、
前記 $\gamma\delta$ TCR アゴニスト及び γ_c -サイトカインの添加時間の範囲が、10～15 日であることを特徴とする方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、 $\gamma\delta$ T 細胞を含むリンパ球の細胞株、その組成物、及びその製造方法に関し、また、医学的使用、すなわち薬剤に使用するための医学的使用、並びに癌免疫療法に使用するための医学的使用に関する。

【背景技術】 30

【0002】

腫瘍は、形質転換細胞を認識し破壊できる様々なリンパ球分画を含む非常に複雑な免疫系を持ったホストにおいて発症する。リンパ球が常に腫瘍形成の監視を繰り返す間、癌細胞は分子戦略を発現し、免疫学的監視を回避し、ホスト免疫系の圧力の下で競合的に選択されることが、現在広く知られている。「癌免疫編集 (cancer immunoediting)」と呼ばれる動的プロセスは癌免疫療法への大きな障害を構成すると考えられている。

【0003】

多数の免疫回避機構の間で、白血病とリンパ腫のプライマリーサンプルがしばしば、非古典的な MHC (major histocompatibility complex: 主要組織適合遺伝子複合体) タンパク質を下方制御し、ULBP1 がカウンター受容体 NKG2D を発現する $\gamma\delta$ T 細胞によって血液腫瘍を発現させるのに重要であることが最近示された (非特許文献 1)。 40

【0004】

$\gamma\delta$ T 細胞は、健常者の 1～10% の抹消血リンパ球 (PBL: peripheral blood lymphocytes) を構成する生得的なリンパ球であり、実験室で試験される、非常に機能的な血液腫瘍細胞株を標的にすることができる。しかしながら、多くのリンパ性白血病プライマリーサンプルが十分に活性化された $V\gamma 9 V\delta 2$ T 細胞に耐性を示すということ (非特許文献 1～2)、そして、優勢な $\gamma\delta$ PBL の分画も耐性を示すということが示された。さらに、 $V\gamma 9 V\delta 2$ T 細胞の活性化因子の体内投与を含む臨床試験は、血液腫瘍又は固形腫瘍を有する患者の 10～33% に限定された客観的反応により、ある程度の成果を示した。さらに、客観的反応は報告されなかったので、活性化した/増殖した $V\delta 2^+$ 細胞の 50

養子移植を含む実験の結果は少なかった。実際に、自己の $V\delta 2^+$ T細胞のシンプルな体外増殖は、体内でその監視を回避する腫瘍を観察すると、患者への再注射ではほとんど治療効果がなかった可能性があった。

【0005】

癌免疫療法は、細胞障害性リンパ球によって腫瘍細胞認識に依存する。 $\gamma\delta$ T細胞は、様々な動物腫瘍モデルで重要な役割を果たすMHC非制限キラーリンパ球の集団である。それにも関わらず、ヒト血液腫瘍の大部分は、特定のアゴニストで活性化された $\gamma\delta$ 抹消血リンパ球(PBL)と、非常によく見られる $V\gamma 9 V\delta 2$ T細胞受容体(TCR:T-cell receptor)に耐性があるということを示した。この点は、現在の $\gamma\delta$ T細胞媒介免疫療法に重要な制約を構成した。

10

【0006】

従って、体内に存在する天然コンポーネントに耐える腫瘍を検出するために、 $\gamma\delta$ T細胞をさらなる認識メカニズムに与えるストラテジーを授けることが不可欠である。

【0007】

天然細胞障害性受容体は、10年以上前にA. Moretta等によって同定され、NK細胞の抗腫瘍機能において重要な相乗的役割を果たすことが示された。実際、NKp30及びNKp46は、特定のNK細胞マーカーの2つであることが広く知られている。

【0008】

非特許文献3は、抹消血 $\gamma\delta$ T細胞のNK受容体の発現を開示した。しかしながら、開示された $\gamma\delta$ T細胞は本発明の $\gamma\delta$ T細胞と異なる。非特許文献3はまた、本発明とは逆に、NKp30がこのような $\gamma\delta$ T細胞において発現しないということを示した。相違点のいくつかは次の通りである。

20

- ・治療法((IFN- γ , TNF- α + 抗CD3モノクローナル抗体 + IL-1 β + IL-2 + IL-15) ;
- ・ $\gamma\delta$ T細胞の表現型(NKp30 $^-$ 及びNKp46 $^-$; さらに、 $\gamma\delta$ T細胞の62%が $V\delta 2^+$ サブタイプに属する) ;
- ・ $\gamma\delta$ T細胞の20%未満がCD56 $^+$ である ;
- ・ $\gamma\delta$ T細胞の20%未満がCD8 $^+$ である ;
- ・NKp44の発現レベルが、 $\gamma\delta$ TCR/CD3複合体の刺激によって変調しない(従って、異なる分子メカニズムが含まれ、そして、細胞でのNKp44発現を誘導する)。

30

【0009】

非特許文献3は、NKp44を発現させる抹消血 $\gamma\delta$ T細胞を開示した。NKp44は、機能的であり、腫瘍細胞(骨髄腫細胞)の認識及び除去をもたらす。しかしながら、 $\gamma\delta$ T細胞の8 $\pm$ 7%だけがNKp44を発現させ、 $\gamma\delta$ T細胞の多く(62%)が $V\delta 2^+$ サブタイプに属する(それらは $V\delta 1^-$ である)。NKp30及びNKp46は $\gamma\delta$ T細胞に発現せず、これらの細胞の20%未満がCD8 $^+$ 又はCD56 $^+$ であった。

【0010】

従って、開示された $\gamma\delta$ T細胞株は総合的に、本願発明者等が同定した $\gamma\delta$ T細胞株と異なる。本願発明者等の細胞株における $\gamma\delta$ T細胞の95%超は通常、 $V\delta 1^+$ サブタイプに属し、これらの $V\delta 1^+$ $\gamma\delta$ T細胞の(通常30%を超える)高い割合は機能的なNKp44を発現させる。重要なことに、NKp44はNKp30との相乗効果を示し、顕著に腫瘍細胞を認識して滅殺する能力を強くする(図5B)。NCR間のこのような協同は、所望の効果(癌の除去)を獲得するのに重要であり、事前に同定されたNKp44 $^+$ $\gamma\delta$ T細胞には見られない。

40

【0011】

非特許文献4は、NK細胞及び $\gamma\delta$ T細胞でのNKGD受容体の共通の発現を開示した。非特許文献4はまた、 $\gamma\delta$ T細胞の増殖及び活性化が抗腫瘍反応を生むことを述べている。しかしながら、本発明は反対に、 $\gamma\delta$ 細胞はNKp30 $^-$ 及びNKp46 $^-$ である。

【0012】

50

特許文献1は、実質的に精製された $\gamma\delta$ T細胞の認識に基づいた白血病の治療方法を開示した。本方法は、リンパ球の活性化と、その増殖とを備える。主な相違点は以下の通りである。

- ・治療法（プレートに結合させた（plate-bound）固定化抗TCR抗体＋放射線照射“フィーダ”腫瘍B細胞）；
- ・ $\gamma\delta$ T細胞（NKp30⁺、NKp44⁺、NKp46⁺、CD8⁺）。

【0013】

特許文献2は、 $\gamma\delta$ T細胞のような細胞障害性細胞団を分離する工程と、治療薬及び細胞障害性細胞の認識工程とを備える、患者の癌を減少する方法を開示した。本発明との主な相違点は、 $\gamma\delta$ T細胞が遺伝子学的に変更され、化学療法薬に抵抗するというこ

10

【先行技術文献】

【特許文献】

【0014】

【特許文献1】国際公開第00/44893号

【特許文献2】国際公開第2011/053750号

【非特許文献】

【0015】

【非特許文献1】Lanca, T. et al., "The MHC class Ib protein ULBP1 is a nonredundant determinant of leukemia/lymphoma susceptibility to gammadelta T-cell cytotoxicity", Blood 115:2407-2411; 2010

20

【非特許文献2】Gomes, A.Q. et al., "Identification of a panel of ten cell surface protein antigens associated with immunotargeting of leukemias and lymphomas by peripheral blood gammadelta T cells", Haematologica 95:1397-1404, 2010

【非特許文献3】von Lilienfeld-Toal, M., J. Nattermann, et al. (2006). "Activated gammadelta T cells express the natural cytotoxicity receptor natural killer p44 and show cytotoxic activity against myeloma cells." Clin Exp Immunol 144(3):528-533

【非特許文献4】Rey, J., C. Veuillen, et al. (2009). "Natural killer and gammadelta T cells in haematological malignancies: enhancing the immune effectors." Trends Mol Med 15(6): 275-284

30

【発明の概要】

【0016】

本発明は、機能的な天然細胞障害性受容体（NCR）を発現させる $V\delta 1^+$ $\gamma\delta$ T細胞を含む、又は当該 $V\delta 1^+$ $\gamma\delta$ T細胞から構成される抹消血リンパ球の細胞株に関する。より好ましい実施形態において、天然細胞障害性受容体は、NKp30を含む、又は当該NKp30から構成される。

【0017】

より好ましい実施形態において、開示した細胞株はさらに、 $V\delta 2^+$ $\gamma\delta$ T細胞を含む。

40

【0018】

開示した細胞株の他のより好ましい実施形態において、天然細胞障害性受容体はさらに、NKp44、NKp46、又はその混合物を含む。

【0019】

開示した細胞株の他の好ましい実施形態において、細胞株は、グランザイムBを発現させ得る。

【0020】

開示した主題はさらに、細胞株を備える組成物を含む。より好ましい実施形態において、組成物は注射可能な物質である。好ましい実施形態において、注射可能な組成物は、機能的な天然細胞障害性受容体を発現させる、80%以上、すなわち、80%、85%、9

50

0%、95%の機能的 $\gamma\delta 1^+ \gamma\delta T$ 細胞から構成される細胞集団を含み、より好ましくは、天然細胞障害性受容体はNKp30を含み、又はNKp30から構成され、そして、機能的な天然細胞障害性受容体を発現させる1億個以上の $\gamma\delta 1^+ \gamma\delta T$ 細胞を含むことを特徴とする。好ましくは、組成物はまた、薬学的に許容可能な物質又はキャリアと、より好ましくは、ヒト血清アルブミンのような安定剤とを含む。細胞は、自己移植、すなわち、同じ生物学的製剤由来（又は同じドナー由来）の自己移植であることが好ましい。より好ましくは、細胞は、開示した主題により説明された方法等の方法によって得られる。

【0021】

開示した主題の他の態様は、本発明に開示した細胞株の細胞を含む組成物の薬剤における使用である。

10

【0022】

より好ましい実施形態において、本発明の開示した組成物は、自己又は異種の養子細胞療法、腫瘍又は癌治療、腫瘍又は癌免疫療法、及び／又は、白血病治療に使用し、あるいは、急性リンパ性白血病、急性骨髄性白血病、慢性骨髄性白血病、慢性リンパ性白血病、多発性骨髄腫、バーキットリンパ腫、濾胞性リンパ腫、乳癌、肺癌、前立腺癌、結腸癌、膀胱癌、腎細胞癌、又は、皮膚メラノーマ等の治療のために使用する。

【0023】

より好ましい実施形態において、本発明で開示した組成物は、ウィルス感染の治療に使用され得る。すなわち、処置されるウィルスは、ヘルペスウイルス科、又はレトロウイルス科等由来である。

20

【0024】

開示した主題はさらに、 $\gamma\delta PBL$ を分離する工程を含む、開示した細胞株の製造方法を含む。より好ましい実施形態において、測定サンプル (starting sample) は、抹消血サンプル、又はその画分を含む血液、並びに、バフィーコート細胞、単核細胞及び低密度単核細胞を含む血液であってもよい。細胞は、密度勾配遠心法等の公知技術を用いて、血液の測定サンプルから得てもよい。すべての $\gamma\delta PBL$ は、磁性標的された抗TCR $\gamma\delta^+$ 抗体を用いたポジティブ選択、又はTCR $\gamma\delta^-$ 細胞の枯渇／除去を介して分離される。 $\gamma\delta PBL$ は、RPMI 1640又はIMDM等の任意の適切な哺乳類細胞の培地で維持される。

【0025】

30

開示した主題はさらに、 $\gamma\delta TCR$ アゴニストの存在下で、好ましくは可溶性又は固定化された前記アゴニストの添加（より好ましくは連続添加）によって、そして、少なくとも1つの γ_c -サイトカインの存在下で、好ましくは前記サイトカインの添加（より好ましくは連続添加）によって、適切な培地でこのような細胞を培養する方法を含む。前記 $\gamma\delta TCR$ アゴニスト及び γ_c -サイトカインは、培養時に、また培養期間を通じて、好ましくは3～6日毎に細胞の前記培養物に添加され、前記培養物中における $\gamma\delta TCR$ アゴニスト及び γ_c -サイトカインの濃度が常に一般的に0より大きい。

【0026】

好ましい実施形態において、前記 $\gamma\delta TCR$ アゴニスト及び γ_c -サイトカインの添加は、細胞の少なくとも40%、より好ましくは、少なくとも50%、60%、70%、75%、80%、85%、95%が天然障害性受容体を発現させるまで実行され得る。より好ましい実施形態において、前記 $\gamma\delta TCR$ アゴニスト及び γ_c -サイトカインの添加は、天然障害性受容体、すなわちNKp30を含む又はNKp30からなる天然障害性受容体を発現させる、5000万個、1億個、2億個を超える生存能力があり機能的な細胞が達成されるまで実行され得る。

40

【0027】

開示した方法のより好ましい実施形態において、前記 $\gamma\delta TCR$ アゴニスト及び γ_c -サイトカインの添加は、少なくとも40%の細胞、より好ましくは少なくとも50%、60%、70%、75%、80%、85%、95%、100%の細胞がNKp30を発現させるまで実行され得る。

50

【0028】

開示した方法のより好ましい実施形態において、 $\gamma\delta$ TCRアゴニストは、植物レクチン（フィトヘムアグルチニン-PHAを含む）、抗CD3モノクローナル抗体（OKT3 mAbを含む）、抗 $\gamma\delta$ TCRモノクローナル抗体、又は、これらの混合物を含むがこれに限定されるものではない、すべての $V\delta 1^+ \gamma\delta$ PBL中で発現する $\gamma\delta$ TCR/CD3受容体複合体を活性化し、刺激し、又は誘発し得る可溶性の又は固定化された分子又は化合物であってもよい。他のアゴニストの抗体が $V\delta 1^+ \gamma\delta$ TCRに使用されてもよい。用語「抗体（antibodies）」は、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、抗体フラグメント、一本鎖抗体、一本鎖可変フラグメント、及び組み換え技術によって作られた結合パートナーを含む。より好ましくは、 $\gamma\delta$ TCRアゴニストの濃度の範囲は、0.01 ~ 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ であり、さらにより好ましくは1 ~ 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ であってもよい。

10

【0029】

開示した方法のより好ましい実施形態において、「 γ_c -サイトカインは」、共通サイトカイン受容体 γ （ガンマ）鎖ファミリーのサイトカイン、好ましくは、インターロイキン、すなわち、IL-2、IL-4、IL-7、IL-9、IL-12、IL-15、IL-21、又は、これらの混合物等を意味する。使用されるインターロイキンは、人間由来又は動物由来、好ましくは人間由来であってもよい。また、インターロイキンは、野生型タンパク質、あるいは、任意の生物学的に活性なフラグメント又は変異体であってもよく、すなわち、その受容体を結合可能で、本発明の方法の条件の $\gamma\delta$ T細胞の活性化を含み得る。より好ましくは、サイトカインは、他の分子、例えばペプチド、ポリペプチド、又は生物学的に活性なタンパク質と融合又は複合して水溶性であってもよい。好ましくは、ヒト組み換え γ_c -サイトカインが使用される。より好ましくは、インターロイキンの濃度の範囲は、1 ~ 10000 U/ml、さらに好ましくは100 ~ 1000 U/mlであってもよい。

20

【0030】

開示した方法の他の好ましい実施形態において、前記 $\gamma\delta$ TCRアゴニスト及び γ_c -サイトカインの添加は、2 ~ 60日間実行され、より好ましくは9 ~ 25日間、さらにより好ましくは10 ~ 15日間、すなわち、11、12、13、14日間実行されてもよい。

【0031】

本発明は、 $\gamma\delta$ T細胞を含む末梢血リンパ球の細胞株、その組成物、及びその製造方法において、好ましくは、薬剤に使用するため、すなわち癌免疫療法に使用するために、NKp30、NKp44及びNKp46を発現させることを特徴とする。

30

【0032】

本発明は、白血病細胞株及び慢性リンパ性白血病患者の新生細胞の滅殺を直接媒介する、天然障害性受容体（NCRs）を発現させる $V\delta 2^{(-)} V\delta 1^+ \gamma\delta$ PBLsの新規な分画を特徴とする。NCR $^+ V\delta 1^+ T$ 細胞が、機能的なPI-3K/AKTシグナル伝達を要求するプロセスを介して、 γ_c -サイトカイン及び汎TCRアゴニストによる刺激で、全体の $\gamma\delta$ PBLから分化し、大きくなるということを見出した。驚くべきことに、このような分画は安定して、NKp30、NKp44、及びNKp46と、リンパ性白血病細胞に対する細胞障害性を増強することを関連する高濃度のグランザイムBとを発現させる。特別な機能獲得及び機能損失の実験により、NKp46を除く、NKp30及びNKp44が、TCR-非依存性の白血病細胞認識の非冗長性で相乗的な役割を果たすことを証明した。従って、NCR $^+ V\delta 1^+ T$ 細胞は、ヒトの癌の養子細胞免疫療法のための、誘導可能で特化したキラーリンパ球集団から構成される。

40

【図面の簡単な説明】

【0033】

【図1a】汎T細胞マイトジェンで活性化された、増強した抗白血病細胞障害性の $\gamma\delta$ PBL培養を示す図。

【図1b】汎T細胞マイトジェンで活性化された、増強した抗白血病細胞障害性の $\gamma\delta$ P

50

B L培養を示す図。

【図1c】汎T細胞マイトジェンで活性化された、増強した抗白血病細胞障害性の $\gamma\delta$ PBL培養を示す図。

【図2a】汎T細胞マイトジェンで活性化された $\gamma\delta$ PBL中の天然細胞障害性受容体発現の誘導を示す図。

【図2b】汎T細胞マイトジェンで活性化された $\gamma\delta$ PBL中の天然細胞障害性受容体発現の誘導を示す図。

【図2c】汎T細胞マイトジェンで活性化された $\gamma\delta$ PBL中の天然細胞障害性受容体発現の誘導を示す図。

【図3a】天然細胞障害性受容体が選択的に発現し、 $V\delta 1^+$ T細胞を急速に増殖させることを示す図。

10

【図3b】天然細胞障害性受容体が選択的に発現し、 $V\delta 1^+$ T細胞を急速に増殖させることを示す図。

【図4a】AKT-依存 γ_c -サイトカイン及びTCRシグナル伝達が $V\delta 1^+$ T細胞におけるNKp30発現を誘導することを示す図。

【図4b】AKT-依存 γ_c -サイトカイン及びTCRシグナル伝達が $V\delta 1^+$ T細胞におけるNKp30発現を誘導することを示す図。

【図5】NKp30及びNKp44がNCR $^+$ $\gamma\delta$ PBLによって滅殺する腫瘍細胞に影響を与えることを示す図。

【図6a】NCR $^+$ $\gamma\delta$ PBLが、プライマリーリンパ球性白血病に対して、増大した細胞障害性を与える安定した分画であることを示す図。

20

【図6b】NCR $^+$ $\gamma\delta$ PBLが、プライマリーリンパ球性白血病に対して、増大した細胞障害性を与える安定した分画であることを示す図。

【図6c】NCR $^+$ $\gamma\delta$ PBLが、プライマリーリンパ球性白血病に対して、増大した細胞障害性を与える安定した分画であることを示す図。

【図7】PHA/I L-2で活性化された $\gamma\delta$ PBLにおけるNKp30に対するアイソタイプコントロール染色を示す図。

【図8】 $V\gamma 9V\delta 2$ PBLがPHA-誘導アポトーシスに影響され易くないことが好ましいことを示す図。

【図9】PHA/I L-2で活性化された $\gamma\delta$ PBL培養物中の $V\delta 1^+$ T細胞濃縮を示す図。

30

【図10】新たに分離された $\gamma\delta$ PBLがNKp30を発現させないことを示す図。

【図11】TCRとI L-2シグナル伝達が増殖性の $V\delta 1^+$ T細胞においてNKp30発現を誘導することを示す図。

【図12】NCR $^+$ $V\delta 1^+$ PBLにおけるCD56の発現増加を示す図。

【図13】B7h6が多くのリンパ性白血病サンプルにおいて過剰発現しないことを示す図。

【図14】PHA/I L-2で活性化された培養物における $\gamma\delta$ PBLの表現型を示す図。

【図15】NKp30 $^+$ $\gamma\delta$ PBLが、様々な組織起源由来の癌細胞に対して高い細胞障害性があることを示す図。

40

【発明を実施するための形態】

【0034】

添付図面は、本発明を説明するために好ましい実施形態を提供し、本発明の範囲を限定するものではない。

【0035】

図1a、図1b、図1cは、汎T細胞マイトジェンで活性化された、増強した抗白血病細胞障害性の $\gamma\delta$ PBL培養を示す図。(A)： $\gamma\delta$ 末梢血リンパ球($\gamma\delta$ PBL)は、健常被験者の末梢血からMACS(磁気細胞分離装置)で分離され(左図)、HMB-P P/I L-2又はPHA/I L-2のいずれか一方で4~19日間刺激された。活性化は、CD69発現増加(中央図；新たに分離したコントロール細胞のレベルは影を付してい

50

る)、及びC F S E希釈(右図;点線は初期C F S Eレベルを示す)に対するフローサイトメトリー法によって評価された。(B-C):事前活性化(Aで14日間)された $\gamma\delta$ P B Lを、D D A O s eラベルされた白血病細胞と3時間同時培養した。腫瘍細胞溶解は、アネキシンV染色法によって評価され、フローサイトメトリー法を使用した。(B):B v 1 7 3白血病細胞株に対する異なるドナーの代表的な結果である。割合はアネキシンV⁺腫瘍細胞に関する。基底腫瘍細胞アポトーシス($\gamma\delta$ P B Lがない場合)は、 $<5\%$ であった。(C):4つの白血病標的細胞腫を有する6つの異なるドナーの結果の要約である。エラーバーはS D (n=6, * p<0.05; ** p<0.01)を示す。(D):新たに分離され、H M B-P P/I L-2活性化され、そして、P H A/I L-2活性化された $\gamma\delta$ P B L中のG z m B m R N A濃度のリアルタイムP C R数量化である。この図のデータは同じ結果の2~3の独立した実験の代表である。

10

【0036】

図2 a、図2 b、図2 cは、汎T細胞マイトジェンで活性化された $\gamma\delta$ P B L中の天然細胞障害性受容体発現の誘導を示す図である。 $\gamma\delta$ P B Lは、図1で示されたように4~19日間培養され、様々なNK受容体の表面発現はフローサイトメトリー法によって分析された。(A):H M B-P P/I L-2(灰色)又はP H A/I L-2(黒色)で活性化され、6つの独立の健常ドナーから抽出された10日間の培養物中のN K G 2 D、2 B 4、及びD N A M-1に対する結果である。エラーバーはS D (n=6; p>0.05)を示す。(B):(A)と同じ培養物中のN K p 3 0の発現を示す。F A C Sプロットは、3つの個々のドナー由来の培養物に対応する。割合はN K p 3 0⁺ $\gamma\delta$ P B Lに関する。アイソタイプコントロール染色法、図7に示される。(C-D):新たに分離され、H M B-P P/I L-2活性化され、そして、P H A/I L-2活性化された $\gamma\delta$ P B L中の、N K p 4 4 (C)及びN K p 4 6 (D) m R N A濃度のリアルタイムP C R数量化である。(E):19日まで分析された、(A)で示された培養物中のN K p 3 0⁺細胞の割合の変遷。(F):全体の $\gamma\delta$ P B L、又は、P H A/I L-2活性化された $\gamma\delta$ P B L培養物からF A C S選別された(純度:>99%)N K p 3 0⁽⁻⁾ $\gamma\delta$ P B L (Bの場合)におけるN K p 3 0発現の誘導を示す。細胞は、P H A/I L-2で14日間刺激された。この図のデータは同じ結果の2~4の独立した実験の代表である。

20

【0037】

図3 a、図3 bは、天然細胞障害性受容体が選択的に発現し、V δ 1⁺T細胞を急速に増殖させることを示す図である。(A): $\gamma\delta$ P B Lは、C F S Eで標的されて、図1に示されるように、又はT細胞マイトジェンの非存在下で(すなわち、I L-2のみ)培養される。流動細胞測定法により、7日後の培養物中のC F S E希釈及びV δ 2 T C R発現を分析する。(B):全体の $\gamma\delta$ P B L中のV δ 1⁺又はV δ 2⁺の割合が、P H A/I L-2により19日間まで培養された。エラーバーはS D (N=3)を示す。(C):P H A/I L-2活性化された $\gamma\delta$ P B L分画におけるN K p 3 0発現を示す。V δ 1⁺又はV δ 2⁺細胞は、末梢血からF A C S分離され、C F S Eで標的され、P H A/I L-2で7日間培養された。割合は、各細胞区分(長方形で示されたC F S E標的による)でのN K p 3 0⁺に関する。(D):19日間のP H A/I L-2刺激後のV δ 1⁺T細胞におけるN K p 3 0、N K p 4 4、及びN K p 4 6の発現を示す。アイソタイプのm A bコントロール染色も示されている。この図のデータは同じ結果の2~3の独立した実験の代表である。

30

40

【0038】

図4 a、図4 bは、A K T-依存 γ_c -サイトカイン及びT C Rシグナル伝達が、V δ 1⁺T細胞におけるN K p 3 0発現を誘導することを示す図である。(A-B):フローサイトメトリー法は、I L-2又はI L-5の存在下で、それのみで、あるいは、P H A又はO K T 3(抗C D 3 m A b)との組み合わせで、7日間培養後、 $\gamma\delta$ P B L培養物からプレゲートされたV δ 1⁺T細胞でN K p 3 0発現を分析する。(C):P H A/I L-2活性化された $\gamma\delta$ P B Lにおける抗T C R $\gamma\delta$ ブロッキングm A bの効果のN K p 3 0誘導を示す。影付き灰色は、7日間コントロール培養物中でプレゲートされたN K p 3

50

0⁺細胞である。(D) : C F S Eで事前標的された、P H A / I L - 2 活性化された $\gamma \delta$ P B L における N K p 3 0 誘導での化学阻害剤 L Y 2 9 4 0 0 2 及び U O 1 2 6 の効果を示す。この図のデータは同じ結果の 2 ~ 3 の独立した実験の代表である。

【0039】

図 5 は、N K p 3 0 及び N K p 4 4 は、N C R⁺ $\gamma \delta$ P B L によって滅殺する腫瘍細胞に影響を与える。(A) : N K p 3 0、N K p 4 4、及び N K p 4 6 の機能評価は、P H A / I L - 2 で活性化されて増殖した $\gamma \delta$ P B L によって F c γ R⁺ P 8 1 5 標的細胞株の、4 時間、⁵¹ C r リリースリダイレクト滅殺アッセイ (エフェクタ : 標的の比率を 2 : 1) において、特殊なモノクローナル抗体を使用する。データは、3 通りで実施された 8 つの独立の実験の平均値及び S D として表す (* p < 0. 0 5, *** p < 0. 0 0 1 ; n s = 統計的に有意差なし)。(B) P H A / I L - 2 で活性化されて増殖した $\gamma \delta$ P B L によって白血病細胞株 M o l t - 4 の滅殺アッセイでの N K p 3 0、N k p 4 4 及び N K p 4 6 へのブロッキング抗体 (又はコントロール I g G 1 アイソタイプのコントロール) の効果を示す。ここで、抗 T C R をブロックし、 $\gamma \delta$ m A b (T C R) がまた添加されたことに留意されたい。腫瘍細胞の死滅は、図 1 に示されるように、アネキシン V 染色によって評価した。エラーバーは、S D (n = 3, ** p < 0. 0 1 ; *** p < 0. 0 0 1) を示す。

【0040】

図 6 a、図 6 b、図 6 c は、N C R⁺ $\gamma \delta$ P B L が、プライマリーリンパ球性白血病に対して、増大した細胞障害性を与える安定した分画であることを示す図である。N K p 3 0⁺ 及び N K p 3 0⁽⁻⁾ の $\gamma \delta$ P B L は、1 4 日間 P H A / I L - 2 で活性化された培養物から F A C S 分離された。(A) : 精製された集団における N K p 3 0 発現の再分析を示す。(B) : 新たに分離された $\gamma \delta$ P B L と比較された、N K p 3 0⁽⁻⁾ 又は N K p 3 0⁺ の $\gamma \delta$ T 細胞における、N K p 4 4 (左図) 及び N K p 4 6 (右図) の m R N A 濃度のリアルタイム P C R 数量化である。エラーバーは S D (n = 3) を表す。(C) : 分離された N K p 3 0⁺ $\gamma \delta$ P B L は、I L - 2 の存在下で培養された。1 4 日後の N K p 3 0、N K p 4 4 及び N K p 4 6 の発現の分析を示す。(D) : N K p 3 0⁽⁻⁾ 又は N K p 3 0⁺ の $\gamma \delta$ T 細胞、又は新たに分離された $\gamma \delta$ P B L は、(図 1 のように) 白血病細胞株 B v 1 7 3 を有する滅殺アッセイ中で使用された。腫瘍細胞の死滅は、アネキシン V 染色によって評価された (n = 3, * p < 0. 0 5)。(E) : 新たに分離された、N K p 3 0⁽⁻⁾ 又は N K p 3 0⁺ $\gamma \delta$ T 細胞における G z m B m R N A 濃度のリアルタイム P C R 数量化である。エラーバーは S D (n = 3) を表す。(F - G) : 6 つの異なるドナーから得て、H M B - P P / I L - 2 又は P H A / I L - 2 で活性化された $\gamma \delta$ P B L を有する (図 1 のように) 滅殺アッセイに使用される、5 つのプライマリー B 細胞慢性リンパ球性白血病に対する代表的なプロット (F) 及びデータサマリー (G) である。H M B - P P / I L - 2 で活性化された培養物からの N C R⁽⁻⁾ $\gamma \delta$ P B L (灰色棒グラフ) は、P H A / I L - 2 で活性化された培養物からの N C R⁺ $\gamma \delta$ P B L (黒色棒グラフ) と比較される。エラーバーは S D を表す (n = 6, * P < 0. 0 5 ; ** p < 0. 0 1 ; *** P < 0. 0 0 1)。

【0041】

図 7 は、P H A / I L - 2 で活性化された $\gamma \delta$ P B L における N K p 3 0 に対するアイソタイプコントロール染色を示す図である。I g G 1 のフローサイトメトリーは、図 1 ~ 図 2 に示される P B L 由来のゲート内の T C R $\gamma \delta$ ⁺ 細胞において染色した。データは 6 つの独立の実験を代表する。

【0042】

図 8 は、V γ 9 V δ 2 P B L が P H A - 誘導アポトーシスに選択的に影響され易くないことを示す図である。 $\delta \gamma$ P B L は、図 1 及び図 3 に示されたように H M B - P P / I L - 2 又は P H A / I L - 2 で培養される。事前にゲートした V δ 2⁺ 細胞内のアポトーシスのアネキシン V⁺ 細胞は、7 日間培養後、フローサイトメトリー法によって分析された。

10

20

30

40

50

【0043】

図9は、PHA/I L-2で活性化された $\gamma\delta$ PBL培養物中の $V\delta 1^+$ T細胞濃縮を示す図である。 $\gamma\delta$ PBLは、図1及び図3に示されたように、19日間、PHA/I L-2で培養され、 $V\delta 1$ TCR及びCD3発現に対して、フローサイトメトリー法によって分析される。

【0044】

図10は、新たに分離された $\gamma\delta$ PBLがNKp30を発現させないことを示す図である。2つの健常ドナーから新たに分離された $\gamma\delta$ PBLにおけるNKp30及び $V\delta 1$ TCR発現に対するフローサイトメトリーデータである。データは15の異なる健常ドナーを代表する。

10

【0045】

図11は、TCRとI L-2シグナル伝達が増殖性の $V\delta 1^+$ T細胞においてNKp30発現を誘導することを示す図である。抹消血からFACS分離され、CFSEで標的され、OKT3及びI L-2が存在又は不存在の状態7日間培養した、 $V\delta 1^+$ T細胞におけるNKp30発現である。

【0046】

図12は、NCR $^+$ $V\delta 1^+$ PBLにおけるCD56の発現増加を示す図である。PHA/I L-2で19日間活性化され、NKp30 $^-$ 又はNKp30 $^+$ 細胞でゲートさせた $V\delta 1^+$ PBLにおけるCD56及びCD27発現に対するフローサイトメトリーデータである。

20

【0047】

図13は、B7h6が多くのリンパ性白血病サンプルにおいて過剰発現しないことを示す図である。(A)急性リンパ性白血病細胞株；(B)T細胞の急性リンパ性白血病患者のサンプル；(C)B細胞慢性リンパ性白血病患者サンプルで、B7h6発現に対するリアルタイムPCR数量化である。健常で新たなPBMCは、リファレンス(破線)として示される。B7h6濃度は、ハウスキーピング遺伝子Gusb及びPsmb6に正規化され、任意の単位で表した。3通りで測定したSDを表す。

【0048】

図14は、PHA/I L-2活性化された培養物における $\gamma\delta$ PBLの表現型を示す図である。 $\gamma\delta$ PBLは、図1及び図3に示されたように、19日間、PHA/I L-2で培養され、(A) $V\delta 1$ TCR及びCD3発現；(B)CD11c及びCD8発現に対して、フローサイトメトリー法によって分析される。PHA/I L-2で活性化された細胞が、実線で描かれている。

30

【0049】

図15は、NKp30 $^+$ $\gamma\delta$ PBLが、様々な組織起源由来の癌細胞に対して高い細胞障害性があることを示す図である。 $\gamma\delta$ 抹消血リンパ球($\gamma\delta$ PBL)は、健康被験者の抹消血からMACS分離され、PHA/I L-2で2週間刺激された。NKp30 $^+$ $\gamma\delta$ PBLはさらに、FACS分離され、そして、以下の腫瘍細胞株団を有する3h滅殺アッセイに使用される：急性リンパ性白血病(ALL(RS4-11))、急性骨髄性白血病(AML(HL-60))、慢性骨髄性白血病(CML(K562))、慢性リンパ性白血病(CLL(MEC-1))、骨髄腫(KMM1)、バーキットリンパ腫(RAJI)、濾胞性リンパ腫(DOHH2)、乳癌(MDA231)、肺癌(NCI-H520)、前立腺癌(PC3)、結腸癌(HCT116)、膀胱癌(UM-UC-3)、腎細胞癌(VMRC-RCW)、皮膚メラノーマ(MEL-1)。腫瘍細胞死滅は、アネキシンV染色によって評価される($n=3$, * $P<0.05$)。

40

【0050】

開示した主題は、 $\gamma\delta$ T細胞を含む抹消血リンパ球の細胞株、その組成物、及びその製造方法、並びに、薬剤、すなわち、癌治療への使用に関する。これらの $\gamma\delta$ T細胞は、 $V\delta 1^+$ T細胞受容体(TCR:T cell receptor)及び機能的な天然細胞障害性受容体(NCRs:natural cytotoxicity receptors)を発現させる。NCRsは、 γ_c -サイト

50

カイン及び $V\delta 1^+$ TCRにより相乗的にもたらされるAKT-依存シグナル伝達によって $V\delta 1^+$ T細胞において発現増加する。

【0051】

本発明は、十分に活性化した $V\gamma 9V\delta 2$ PBLに強い抵抗性を示す血液腫瘍を標的とする、新規な $V\delta 1^+$ PBLを開示する。このような $V\delta 1^+$ 集団は、特別な滅殺機能を、誘導した天然細胞障害性受容体の発現に帰さねばならず、そして、大部分はNK-特異マーカーとしてみなされた。 $V\delta 1^+$ 及び $V\delta 2^+$ 細胞は定常的にNCRを発現させるけれども、これらは γ_c -ファミリーサイトカイン及び $V\delta 1^+$ TCRにより相乗的にもたらされるAKT-依存シグナル伝達によって $V\delta 1^+$ 細胞において選択的に発現増加され得るということを見出した。また、NKp30及びNKp44は共に、 $NCR^+V\delta 1^+$ PBLにおいて機能的であり、決定的にリンパ性白血病細胞の強化した標的化に寄与するということが分かった。

10

【0052】

開示した主題は、 γ_c -サイトカイン及び分裂促進的(PHA又はOKT3)刺激の組合せに関し、血液腫瘍に対する増加細胞障害性活性を与える多くの $V\delta 1^+$ PBL分画においてNCR発現を誘導する。PHAは、非生理的なT細胞マイトジェンであるけれども、NCR導入の効果が $V\delta 1^+$ PBLでTCR/CD3複合体を架橋することによって十分に再現されるということを示す。従って、NCR導入は、 $V\delta^+$ 細胞のTCR媒介増殖と結びつく一方、 γ_c サイトカインシグナルを要求する。

【0053】

20

誘導可能なNCRにおいて、NKp30は、NKp30を発現させる細胞の割合(図3D)；NKp30トリガーの $V\delta 1^+$ T細胞の細胞障害性のさらなる強化(図5A)；そして、NKp30遮断で滅殺する白血病細胞における有意な減少(図5B)に基づき、 $V\delta 1^+$ T細胞の抗腫瘍活性に対して最も重要である。それにも関わらず、NKp44(NKp46は除く)はまた、 $NCR^+V\delta 1^+$ 細胞において機能的であり(図5A)、増強する腫瘍標的に対するNKp30と協同する(図5B)。

【0054】

NKp30及びNKp44は、ウィルス感染細胞のヒトNK細胞認識において意味づけられる。腫瘍に関して、抗体媒介ブロック実験は骨髓腫及び骨髓腫細胞の標的において重要な役割を果たした。さらに、NCR発現不足は、AML患者の低い生存率と臨床的に関

30

【0055】

$V\delta 1^+$ T細胞が既にウィルス感染に対応できるとき、 $V\delta 1^+$ T細胞は、胎児期／若年期の間、主要 $\gamma\delta$ T細胞分画である。成人において、 $V\delta 1^+$ T細胞増殖は、CMV感染、HIV-1感染、及び、上皮由来又は造血由来の腫瘍と関連した。活性化した $V\delta 1^+$ T細胞の養子移植に対する魅力的な見通しは、 $V\delta 1^+$ T細胞が特に組織に存在する能力を示すことができ、その後、 $V\delta 1^+$ T細胞が $V\delta 2^+$ カウンタパートを循環するに反して、 $V\delta 1^+$ T細胞が組織関連リンパ球であることが好ましい(Groh, Spies, Science 1998)ということである。興味深いことに、粘膜表面で、 $V\delta 1^+$ T細胞の存在量は、IL-15に起因し、そして、TCR遺伝子再構成をコントロールするクロマチン修飾を誘導する。

40

【0056】

本発明は、 $NCR^+V\delta 1^+$ 細胞がプライマリーリンパ性白血病細胞を標的にすることができ、特に、 $V\delta 1^+$ T細胞がプライマリー白血病細胞又はリンパ腫細胞の効果的ではないキラー細胞であると報告されていることを考慮すると興味深い。本発明はまた、体外PHA処置で($\gamma\delta$ PBLの間で) $V\delta 1^+$ T細胞の優先的な増殖を開示する(図3B)。このことは、優性の $V\delta 2^+$ カウンタパートの選択的アポトーシスに起因しないことから(図8)、PHA依存TCRシグナルを受けると、 $V\delta 1^+$ 細胞の増殖優位性に由来しなければならない(図3A-B)。 $V\delta 1^+$ T細胞は($V\delta 2^+$ 細胞と比較すると)CD27共受容体の非常に高い濃度を発現させることを観察した。ヒトとマウスにおいて、C

50

D 2 7 刺激はサイクリン D 2 発現を強め、体外及び体内での $\gamma \delta$ T 細胞増殖を促進させる。

【0057】

本発明は、 $V\delta 1^+$ 細胞での V C R 発現の効果的な誘導が T C R 刺激に依存し；その不
存在下では、 γ_c - サイトカインが V C R 発現の非常に少量の発現上昇をもたらし得るこ
を示す（図 4 A - B）。従って、T C R シグナルは、 $N C R^+ V\delta 1^+$ リンパ球によっ
て、N C R 媒介腫瘍細胞認識の上流にある。

【0058】

臨床的観点において、本発明は、体外で N C R を誘導する方法と、増殖させて患者に非
常に多量の細胞を注射する最適な方法とを示す。これらの細胞の活性化状態は潜在的に、
少量の I L - 2 の投与を介して体内で維持され、十分に N C R 発現を持続する。

【0059】

PHA / I L - 2 活性化 N K p 3 0 $^+$ $\gamma \delta$ T 細胞は、C D 1 1 c 及び C D 8 を発現させ
ることが好ましい。C D 1 c は、他のリンパ球において通常発現する接着分子であり、腫
瘍細胞の認識において作用することが分かった。

【0060】

[材料及び方法]

（ヒト抹消血 $\gamma \delta$ T 細胞の分離） 抹消血は、匿名の健康被験者から収集され、P B S （
Invitrogen Gibco社）により 1 : 1 （v / v）で希釈し、1 5 0 0 r p m で、2 5 ° C で 3
0 分間、1 : 3 の体積比（希釈血液 3 に対してフィコール 1）にフィコールパックで分
離される。界面に含有する単核細胞は収集されて（P B S 中で）洗浄され、 $\delta \gamma$ T 細胞が
、（好ましくは、F I T C 標的された抗 $\gamma \delta$ 抗体を用いた）ポジティブ選択を介して、又
は、（ビチオン標的された抗体の混合物（Miltenyi Biotec社）を用いた）ネガティブ選
択を介して、磁気的な細胞分離によって、（純度 9 5 % 以上に）分離された。

【0061】

（細胞培養） 分離された $\gamma \delta$ P B L は、1 0 % ウシ胎児血清が添加された 2 m M の L -
グルタミン（L-Glutamine）（Invitrogen Gibco社）、1 m M ピルビン酸ナトリウム（Inv
itrogen Gibco社）、5 0 m g / m L のペニシリン / ストレプトマイシン（Invitrogen Gi
bco社）の R P M I 1 6 4 0 を用いて、丸底の 9 6 個のウェルプレートにおいて、3 7 ° C
、5 % C O ₂ で、1 0 ⁶ 細胞数 / m L 培養された。細胞は、1 0 0 U / m l の r h I L -
2 （Roche Applied Science社）の存在下で、1 0 n M の H M B - P P （4 - ヒドロキシ
3 - メチル - 2 - ブテニルニリン酸塩（Echelon Biosciences社））、及び 1 μ g / m l
のフィトヘマアグルチニン（PHA）（Sigma-Aldrich社）を用いて、又はこれらを用い
ることなく、増殖させた。細胞は洗浄され、培地は 5 ~ 6 日毎に交換された。N K p 3 0
発現の誘導を観察するために、 $\gamma \delta$ P B L は、1 0 0 U / m l の r h I L 2 （Roche Appl
ied Science社）、1 μ g / m l の可溶性抗 C D 3 抗体（好ましくは、eBioscience社、cl
one OKT3）、及び 2 0 n g / m l の r h I L - 1 5 （Biolegend社）の存在下で又は不存
在下で、培養された。T C R 遮断のために、新たに分離された $\gamma \delta$ P B L は、C F S E 標
的され、そして、1 μ g / m l の PHA 及び 1 0 0 U / m l の r h I L 2 が添加された完
全培地中で、1 : 2 0 に希釈された抗 T C R $\gamma \delta$ T C R （Beckman Coulter社、clone IMM
U510）で、7 日間培養された。シグナル伝達の化学阻害剤の効果を観察するために、MEK
inhibitor U0126 及び PI-3K inhibitor LY294002 （Calbiochem社）が 2 時間の培養時間で
1 0 m M 添加され、そして、1 0 0 U / m l の r h I L 2 及び 1 μ g / m l の PHA の培
養物中に 7 日間維持された。

【0062】

（フローサイトメトリー法を用いた細胞分離） N K p 3 0 及び $V\delta 1^+$ T C R 発現に基
づく $\gamma \delta$ P B L の分離のために、PHA / I L - 2 活性化培養物由来の細胞が、抗 N K p
3 0 （Biolegend社、clone P30-15）、抗 $V\delta 1$ （Thermo Fisher Scientific社、clone T
S8.2）で染色され、そして、FACS Aria セルソーター（BD Biosciences社）で分離された。

【0063】

10

20

30

40

50

(白血病患者サンプル) B細胞慢性リンパ性白血病は、インフォームドコンセント及び治験審査委員会承認 (Instituto Portugues de Oncologia de Lisboa, Portugal) の後、診察時に、患者の抹消血から採取した。サンプルは、フィコールパックで密度遠心分離によって濃縮され、そして、(上述の) 10% RPMI 1640 で2回洗浄された。

【0064】

(体外腫瘍滅殺アッセイ) 全ての腫瘍細胞株が(上述の) 完全10% RPMI 1640 で培養され、希釈により $10^5 \sim 10^6$ 細胞数/mL で維持され、3~4日毎に1:3 に分割した。細胞障害性アッセイのために、磁気的に精製された $\gamma\delta$ PBL は、IL-2 (100 U/mL)、並びに、 $1 \mu\text{g/mL}$ の PHA 又は 10 nM の HMB-PP の存在下で、7~19日間、事前に活性化された。受容体ブロックのために、 $\gamma\delta$ PBL は、ブロック抗体である、抗NKp30 (clone F252)、抗NKp44 (clone KS38)、抗NKp46 (clone KL247)、又は抗TCR $\gamma\delta$ (Beckman Coulter社, clone IMMU510) を用いて、2時間培養された。ブロック抗体は、滅殺アッセイの培地中で維持された。腫瘍細胞株又は白血病プライマリーサンプルは、CellTrace Far Red DDAO-SE ($1 \mu\text{M}$; Molecular Probes社, Invitrogen) で染色され、各 3×10^4 個の腫瘍細胞が、丸底96個のウェルプレート上で、 37°C 、5% CO_2 の RPMI 中で、3時間、 3×10^5 個の $\gamma\delta$ T細胞を使って培養された。そして、細胞は、アネキシンV-FITC (BD Biosciences社) で培養され、フローサイトメトリー法で分析された。再分析滅殺アッセイのために、標準 ^{51}Cr リリースアッセイ (standard ^{51}Cr release assay) の間、PHA/IL-2 活性化 $\gamma\delta$ PBL は NCR アゴニストである、抗NKp30 (clone AZ20)、抗NKp44 (clone Z231) 又は抗NKp46 (clone Bab281) を用いて4時間培養された。

【0065】

(フローサイトメトリー法分析) 細胞は、次の蛍光性モノクローナル抗体で標的される: 抗CD3-PerCP-Cy5.5 (eBioscience社, clone OKT3)、抗TCR $\gamma\delta$ -FITC (eBioscience社, clone B1.1)、抗CD69-PE (BD Pharmingen社, clone FN50)、抗NKG2D-PE/Cy7 (Biolegend社, clone 1D11)、抗2B4-APC (Biolegend社, clone C1.7)、抗DNAM-1-Alexa-Fluor647 (Biolegend社, clone DX11)、抗NKp30-APC (Biolegend社, clone P30-15)、抗Vd2 TCR-PE (Biolegend社, clone B6)、抗NKp44-APC (Biolegend社, clone P44-8)、抗NKp46-AlexaFluor647 (Biolegend社, clone 9E2)、抗Vd1 TCR-FITC (Thermo Fisher Scientific社, clone TS8.2)、抗NKp30-PE (Biolegend社, clone P30-15)、抗Mouse IgG1 κ -APC Isotype Ctrl (Biolegend社, clone MOPC-21)、抗Mouse IgG1 κ -PE Isotype Ctrl (Biolegend社, clone MOPC-21)、抗CD27-APC/Cy7 (Biolegend社, clone 0323)、抗CD56-APC (Biolegend社, clone HCD56)。細胞増殖は、標準CFSE染色方法(好ましくは、CellTrace CFSE細胞増殖キット, Invitrogen社; 最終濃度 0.5 mM) に従って測定され、一方、アポトーシスはアネキシンV-FITC (BD Pharmingen社) 染色法によって評価された。細胞は、FACSCantoフローサイトメトリー法 (BD Pharmingen社) で分析された。

【0066】

(RNA分離及びcDNA製造) 全てのRNAはメーカーの方法に従いRNeasyミニキット (Qiagen社, Hilden, ドイツ連邦共和国) を用いて抽出される。濃度及び純度は、分光光度測定によって決定され、整合性はRNA 6000 Nano Assayを用いたAgilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies社, Palo Alto, カナダ) を用いて確認された。全てのRNAは、ランダムヘキサマー及びSuperscript II first strand synthesisの試薬 (Invitrogen社) を用いてcDNAに逆転写された。

【0067】

(リアルタイムPCR数量化 (qPCR)) qPCRは、SYBR Green detection system (Applied Biosystems社) を用いてABI Prism 7500 FAST Sequence Detection Systemで実行された。プライマーは、Primer3 v.0.4.0オンラインプログラムを用いて設計した (<http://primer3.sourceforge.net>)。各スクリプトに対して、数量化は検量線法を用いて行った。 β_2 -ミクログロブリン ($\beta_2\text{m}$)、グルクロニダーゼ β (Gusb)、及びプロテアソームサブユニット ベータタイプ 6 (Psm b6) は遺伝子発現の正常化のため

のハウスキーピングコントロールとして使用された。次のプライマーが使用された。

【0068】

【化1】

- *b2m* - forward CTAT CCAG CGTA CTCC AAAG ATTC, reverse
CTTG CTGA AAGA CAAG TCTG AATG;

- *Psmb6* - forward GGCG GCTA CCTT ACTA GCTG, reverse
AAAC TGCA CGGC CATG ATA;

10

- *Gusb* - forward TGCA GCGG TGTA CTTC TG, reverse CCTT
GACA GAGA TCTG GTAA TCA;

- *B7-H6* - forward TCAC CAAG AGGC ATTC CGAC CT, reverse
ACCA CCTC ACAT CGGT ACTC TC;

20

- *Nkp44* - forward CCGT CAGA TTCT ATCT GGTG GT, reverse
CACA CAGC TCTG GGTC TGG;

- *Nkp46* - forward AAGA CCCC ACCT TTCC TGA, reverse
TGCT GGCT CGCT CTCT AGT;

30

- *Gzmb*- forward GGGG GACC CAGA GATT AAAA, reverse CCAT
TGTT TCGT CCAT AGGA G.

【0069】

全てのサンプルは3通りで実行され、3回繰り返された。qPCRの分析結果は、ABI SDS v1.1 シーケンス分析ソフトウェア (Applied Biosystems社) を用いて実行された。

【0070】

(統計分析) 亜集団間の相違は、スチューデントのt検定を用いて評価され、有意差が * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ であるとき、示された。

【0071】

40

[結果]

(汎T細胞マイトジェンで活性化された $\gamma\delta$ PBL 培養物の強化された細胞障害性)

PHA、強力なT細胞マイトジェンとして作用する植物レクチン、又は特殊な $V\gamma 9 V 2 TCR$ アゴニスト HMB-PP で活性化された (IL-2 存在下で常に維持される) $\gamma\delta$ PBL 培養物の抗腫瘍滅殺能力を比較した (Morita, C.T., Jin, C., Sarikonda, G., and Wang, H. 2007. "Nonpeptide antigens, presentation mechanisms, and immunological memory of human Vgamma2Vdelta2 T cells: discriminating friend from foe through the recognition of prenyl pyrophosphate antigens." Immunol Rev 215:59-76)

。レジメンは共に、細胞増殖及び CD69 発現上昇 (図1A) によって評価されるように、活性化 $\gamma\delta$ PBL で同じように効果的であるけれども、PHAで活性化されたサンプル

50

は常に、HMB-P Pで刺激された（同じドナー由来の）サンプルよりも、優れた造血器腫瘍細胞株のキラーであったことに留意されたい（図1 B～1 C）。このことは、治験された全てのドナーについて共通し（図1 B）、グランザイムBのより高い発現（図1 D）と、リンパ球細胞障害性機構の重要な要素と関連する。グランザイムB発現がなかった、注目すべきことに、新たに分離された $\gamma\delta$ PBL（図1 D）は、上述の通り、非常に低い抗白血病細胞障害性（＜10%の死滅）を示した。

【0072】

PHA刺激 $\gamma\delta$ PBL培養物の優れた細胞障害性機能は、HMB-P Pが顕著に優性なV γ 9V δ 2PBL分画の非常に強力な活性化因子であるという驚くべき発見に至った（Morita, C.T., Jin, C., Sarikonda, G., and Wang, H. 2007. "Nonpeptide antigens, presentation mechanisms, and immunological memory of human Vgamma2Vdelta2 T cells: discriminating friend from foe through the recognition of prenyl pyrophosphate antigens. Immunol Rev 215:59-76"）。HMB-P P活性化した $\gamma\delta$ PBLと比較すると、PHA刺激培養物は、BV-173、REH、HPB-ALL等の様々な抵抗性白血病細胞株に対して向上した細胞障害性を示し、そして、重要なNKG2DリガンドULBP1の発現不足を示した。これらのデータは、汎T細胞マイトジェンPHAが中期（1～3週間）の $\gamma\delta$ PBL培養物の細胞障害能力を増加させることができ、そして、養子細胞免疫治療に対して非常に価値があるということを示している。

【0073】

（汎T細胞マイトジェンで活性化された $\gamma\delta$ PBLでのNCR発現の誘導）

PHA活性化した $\gamma\delta$ PBL培養物の高められた細胞障害性の原因となるメカニズムを調べた。上記データは、NKG2D、DNAM-1、又は2B4等の受容体の異なる発現によって説明され得る。全て事前に、キラーリンパ球によって腫瘍細胞認識に関与することが分かった。しかしながら、これらの候補はPHA活性化された $\gamma\delta$ PBL培養物とHMB-P P活性化された $\gamma\delta$ PBL培養物の間で、異なる発現はなかった（図2 A）。一方、予想外に、天然細胞障害性受容体Nkp30、すなわち、重要なNK細胞の細胞障害性のトリガーは特に、PHA刺激 $\gamma\delta$ PBLで発見された（図2 B、図7）。さらに、他のNCRファミリーメンバー、すなわち、Nkp44及びNkp46はまた、選択的に、これらのサンプルで発現した（図2 C～図2 D、以下参照）。

【0074】

Nkp30⁺細胞の増殖は、培養時間とともに直実に増加し（図2 E）、細胞増殖とNkp30の誘導との関連性を示した。想像できない、新たなサンプルにおける非常に少ない経験（図2 E）により、微小分画の構造的発現Nkp30がPHA刺激 $\gamma\delta$ PBL培養物において増殖されることが好ましいという可能性がある。この点を明らかにするために、高純度FACS精製されたNkp30⁽⁻⁾細胞（＞99%）を用いて実施を行い、Nkp30⁽⁻⁾細胞がPHA+IL-2刺激で区別されない細胞と同じように効率的なNkp30発現をもたらす得るということが示された。さらに、この条件下で、Nkp30⁽⁻⁾細胞及びNkp30⁺細胞は、同程度に増殖し、さらに、この条件下で、Nkp30⁺細胞の選択的発現と相反した。この結果は、Nkp30発現がPHA/IL-2治療によって $\gamma\delta$ PBL活性化で新たに誘導され、細胞増殖に結びつくということを示唆している。

【0075】

（NCRはV δ 1⁺T細胞を増殖することによって選択的に発現する）

HMB-P PがV γ 9V δ 2細胞の最適なアゴニストであることを考慮すれば、HMB-P Pと比べると、PHAを用いた処置が選択的に $\gamma\delta$ PBL間でV δ 2⁽⁻⁾細胞を増殖させた（図3 A）。この点は、2つの実験条件におけるV δ 2⁺細胞アポトーシスにおける差異によるものではない（図8）。他の分画は健康成人の抹消血内に非常に少ないので、顕著に増殖する最も適したV δ 2⁽⁻⁾集団は（図3 A）は、V δ 1⁺細胞である。V δ 1対V δ 2のTCRにおける利用が評価されると、（19日後の全ての $\gamma\delta$ T細胞のうち、80%を超える）劇的なV δ 1⁺細胞富化がPHA活性化培養物内で見られた。（

図3B；図9）。逆に、上述したように、HMB-P P活性化された培養物は次第に、V δ 2⁺細胞によって多数を占めるようになった（図3A）。

【0076】

NKp30発現の誘導は、分離されたV δ 1⁺又はV δ 2⁺細胞の対応する培養物において試験され、PHA+IL-2を用いて刺激された。新たに分離されたV δ 1⁺とV δ 2⁺細胞はNKp30を発現させず（図10）、このNCRは堅調にV δ 1⁺細胞ではなくV δ 2⁺細胞内で誘導された（図3C）。さらに、次のCFSE希釈によって、V δ 1⁺細胞の進行性の分裂でNKp30⁺細胞の著しい蓄積を示した（図3C）。これらのデータは、PHA/IL-2培養物中のV δ 1⁺細胞の活性化が同時に細胞増殖によりNKp30発現を誘導するというを示唆している。

10

【0077】

NKp30⁺細胞の高い割合（>50%）は通常、2～3週間後培養物中で検出されるのに対して、NKp44（～30%）及びNKp46（<20%）はV δ 1⁺細胞の低い比率で発現する（図3D）。さらに、NKp44⁺V δ 1⁺細胞又はNKp46⁺V δ 1⁺細胞の多くはまた、NKp30を発現させた（図3D）。従って、NKp30が誘導可能なNCR⁺V δ 1⁺分画の最も有益なマーカーである考えられる。

【0078】

（NCR誘導はAKT-依存 γ_c -サイトカイン及びTCRシグナル伝達を要求する）

NCR⁺V δ 1⁺T細胞の分化に対して要求される特定のシグナル伝達を調べた。第1に、活性化プロトコルの2つのコンポーネント、すなわち、IL-2及びPHAが分離された。IL-2又はその関連した γ_c -サイトカイン、IL-15だけが、NKp30発現を誘導するのに十分であるが、PHA/IL-2（又はPHA/IL-15）コンビネーションを比較すると、効果はあまり大きくなかった（図4A）。一方、PHAだけでは培養物を生存可能に維持することができず、 $\gamma\delta$ T細胞の生存において γ_c -サイトカインの重要な役割、特に活性化／増殖と一致した。

20

【0079】

PHAは広く使用されるT細胞マイトジェンであったけれども、TCRを含む、一連の表面受容体を架橋できる非生理的な化合物でもある。従って、PHA刺激の分子媒介物はV δ 1⁺TCR複合体であり得る。PHA及びOKT3mAbの能力を比較すると、特に、TCR複合体のCD3 ϵ 鎖を架橋し、V δ 1⁺T細胞において（IL-2又はIL-15と結合したとき）NKp30発現を誘導する。OKT3は十分に、これらのアッセイにおいてPHAを再現することができ（図4A～図4B）、そして、増殖したV δ 1⁺T細胞においてNKp30を誘導する（図11）。さらに、PHA/IL-2培養物におけるTCR $\gamma\delta$ 遮断はNKp30誘導を抑制した（図4C）。これらのデータは、PHA処置がV δ 1⁺PBLでNCR発現を誘導するTCRシグナル伝達をもたらすということを示唆している。さらに、サイトカインのみと、OKT3（又はPHA）との併用療法との間の差異は、この処置において、 γ_c -サイトカインとTCRシグナル伝達との間の著しい相乗効果を強調する（図4A～図4B）。

30

【0080】

さらにNCR誘導の分子メカニズムを詳しく調査するために、 γ_c -サイトカイン受容体及び／又はTCRシグナルの重要なシグナル伝達路の下流に化学的阻害剤を用いた。JAKシグナルをブロックすることはNCR誘導前に多くの細胞死滅をもたらす一方、PI-3K/AKT阻害剤LY294002との同時培養は特に、増殖したV δ 1⁺T細胞におけるNKp30誘導を抑制する（図4D）。AKT培養は、 γ_c -サイトカイン及び（TCR $\gamma\delta$ シグナルを含む）TCRシグナルを伝達することに関与する。一方、MAPK/Erk阻害剤U0126は、増殖したV δ 1⁺T細胞においてNKp30誘導で検出可能な効果はなかった（図4D）。重要なことに、LY294002の選択的な効果は細胞増殖からNCR誘導を解離し、V δ 1⁺T細胞の増殖が、NKp30発現を誘導するのに不可欠であるが（図3C；図11）、十分ではない（図4D）。総合的に、これらのデータは、AKT-依存 γ_c -サイトカイン及びTCRシグナルは協同し、V δ 1⁺T細胞に

40

50

おけるNK p 3 0 発現を誘導する。

【0081】

(機能的なNK p 3 0 及びNK p 4 4 はV δ 1⁺ PBLによって死滅する腫瘍細胞をもたらす)

V δ 1⁺ 増加 (> 80 % ; 図9 A) PBL培養物でのNCR調節の影響を評価するために、機能取得実験及び機能欠損実験に取り組み、図3 DのNCRと同じレベルでNCRを発現させた。第1に、リバースAb-依存細胞障害性アッセイを使用することによって、NK p 4 6を除く、NK p 3 0 又はNK p 4 4 の架橋がP 8 1 5 腫瘍細胞標的の溶解における非常に有意な増加を提供することを見出した(図5 A)。これらのデータは、誘導したNK p 3 0 及びNK p 4 4 が機能的であり、介在する腫瘍細胞を死滅させるということを示す。NK p 3 0 及びNK p 4 4 は白血病細胞を標的にする非冗長性の役割を果たす場合に評価するために、NCR特有のmAbの受容体遮断実験を実施した。NK p 3 0 及びNK p 4 4 の封鎖で腫瘍細胞溶解において、有意な減少が観察された(図5 B)。図5 Aの結果から予想されたように、NK p 4 6 遮断は腫瘍細胞死滅に影響を及ぼした。興味深いことに、NK p 3 0 とNK p 4 4 の間の相乗効果も、はっきりと観察された。注目すべき、(抗NCRmAbのみ、又は抗NCRmAbと結合した) 任意の状況におけるTCR γ δ 封鎖は、滅殺アッセイの間でニュートラルイベントであった(図5 B)。これらのデータは、NCR⁺ V δ 1⁺ PBLによって標的にする白血病細胞がNK p 3 0 及びNK p 4 4 の相乗的な機能によってほとんど媒介されたTCR独立イベントであることを示唆している。

10

20

【0082】

(NCR⁺ V δ 1⁺ PBLは、抵抗性のプライマリーリンパ性白血病を標的にするキラーを特定化する)

NCR⁺ V δ 1⁺ PBLの抗腫瘍潜在能力を十分に特徴付けるために、NK p 3 0⁺ 細胞が、高い純度 (> 99 %) でFACS分離され(図6 A)、一連の機能的なアッセイが実行された。予想されたように(図3 D)、分離されたNK p 3 0⁺ 細胞はまた、NK p 4 4 及びNK p 4 6 を発現させ(図6 B)、3種類のNCRが、2週間IL-2のみで培養されると、精製された細胞の表面で非常に安定化した(図6 C)。これらのデータは、安定したVCR⁺ V δ 1⁺ T細胞分画の可能な増殖を示した。

【0083】

NK p 3 0⁺ 細胞の細胞障害性機能が決定されると、抵抗性白血病細胞株Bv173等の増加した標的が(NK p 3 0⁽⁻⁾ カウンタパートと比較すると) 観察された(図6 D)。この点は、グランザイムBの高い発現率で証明された(図6 E)。さらに、NK p 3 0 発現はまた、CD56発現の密接に関連し(図12)、そして、V δ 2⁺ T細胞を含むヒトリンパ球の細胞障害性に関連付けられた。

30

【0084】

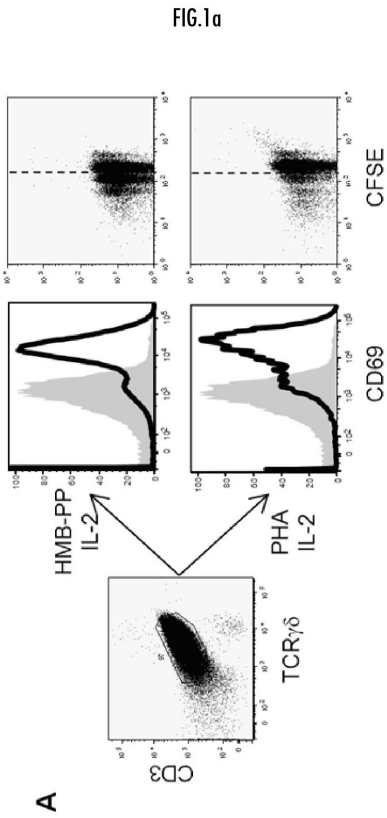
最終的に、慢性リンパ性白血病患者から採取されたプライマリーサンプルを用いた機能的滅殺アッセイを実行した。重要なことに、HMB-PP/IL-2活性化した γ δ PBLは、NCRを発現させなかった(図2 B)。PHA/IL-2で活性化した γ δ PBL培養物から分離されたNCR⁺ 細胞の抗腫瘍細胞障害性活性と当該活性とを比較した。6つの異なるドナーから採取したNCR⁺ γ δ PBLは常に、より効果的にプライマリーB-CLL細胞の除去に効果的であった。

40

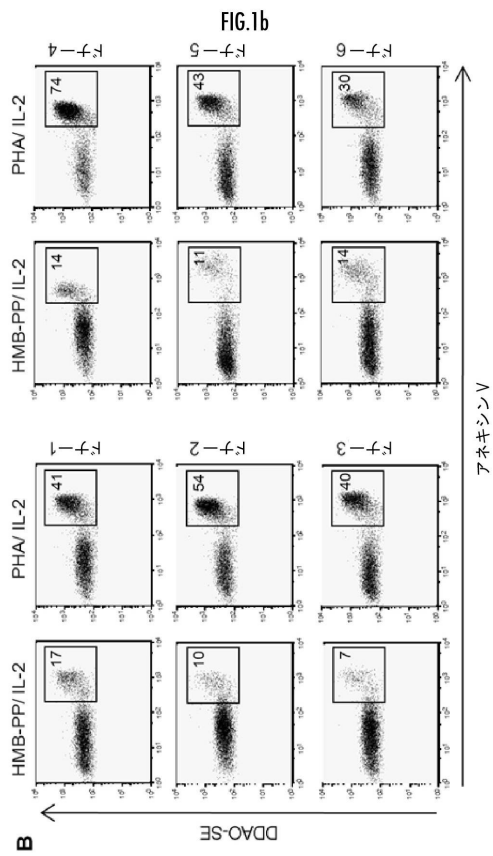
【0085】

もちろん、本発明は、上述した実施形態に制限されないが、当業者であれば本発明の基本的思想から逸脱することなく変更することができる。

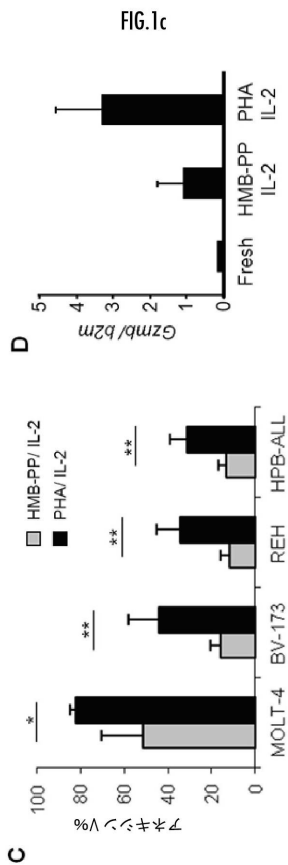
【図 1 a】



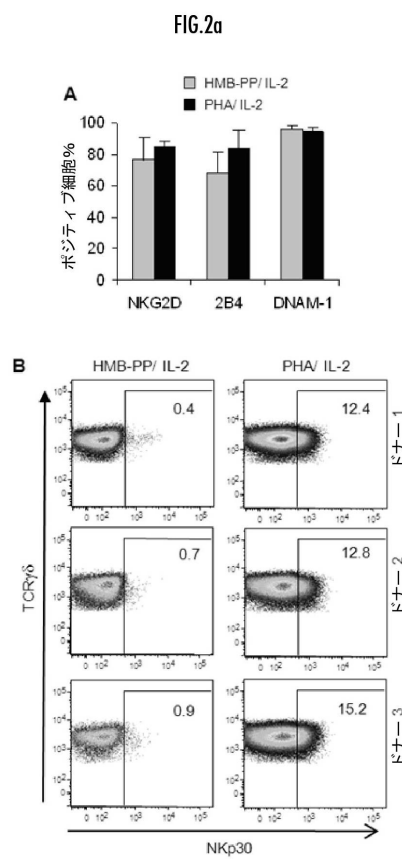
【図 1 b】



【図 1 c】

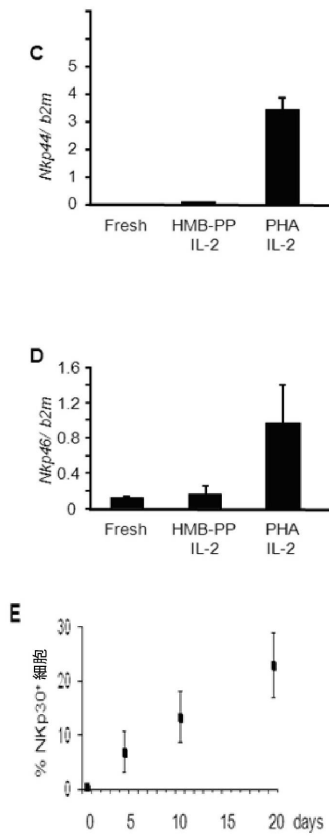


【図 2 a】



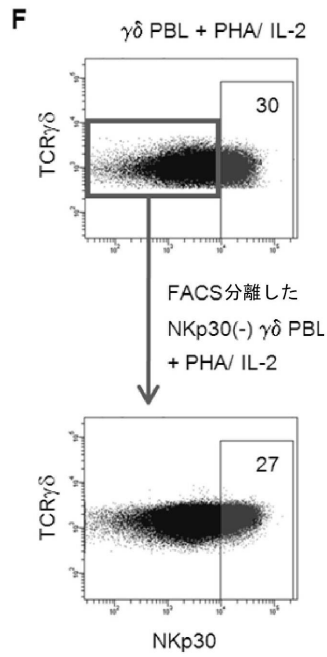
【図 2 b】

FIG.2b



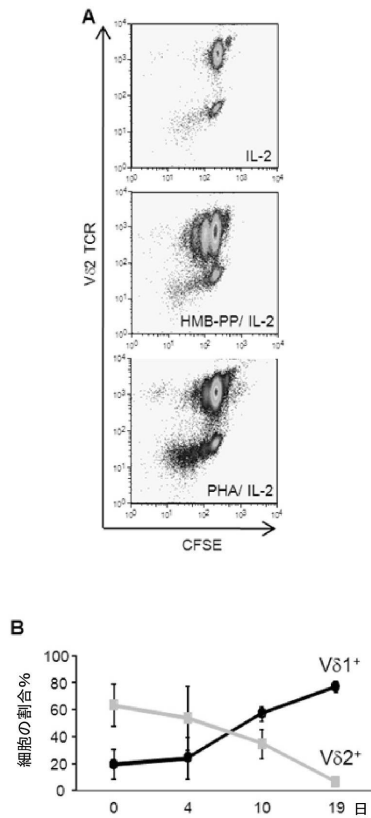
【図 2 c】

FIG.2c



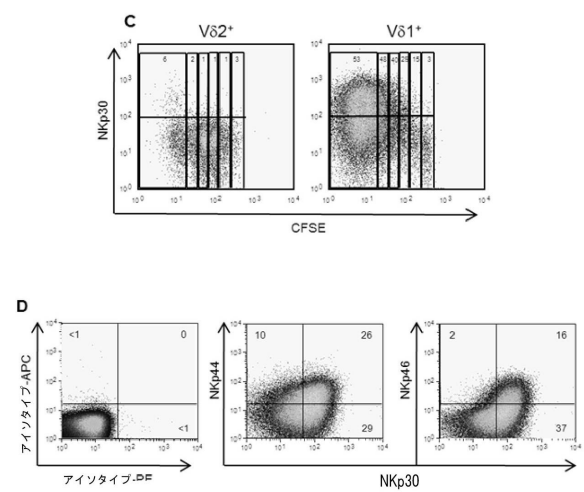
【図 3 a】

FIG.3a

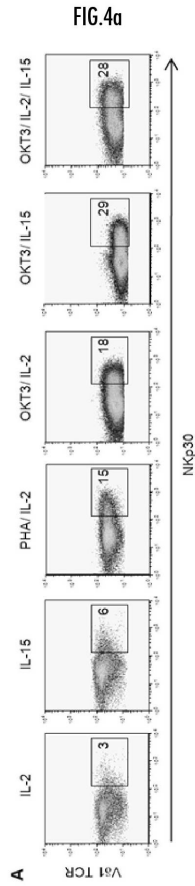


【図 3 b】

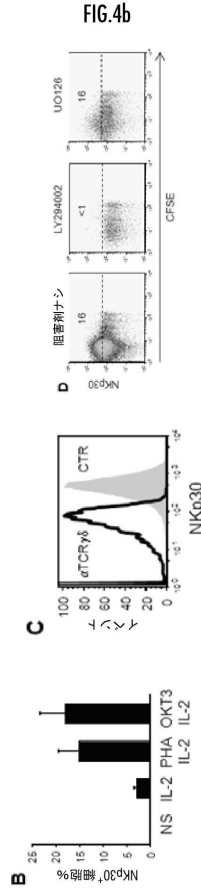
FIG.3b



【図 4 a】

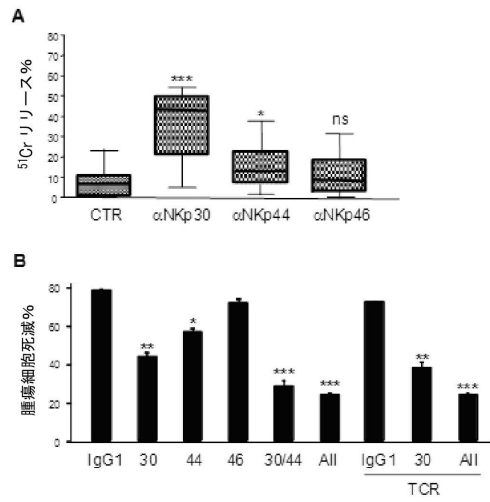


【図 4 b】



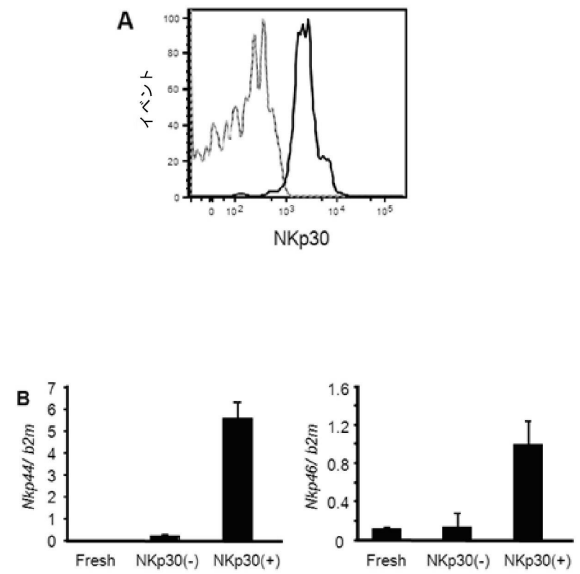
【図 5】

FIG.5

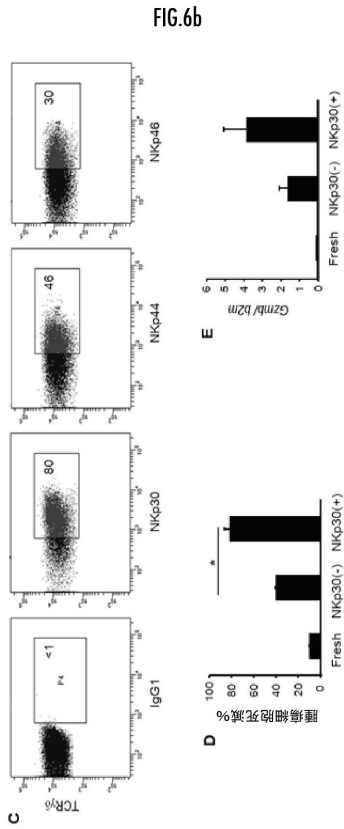


【図 6 a】

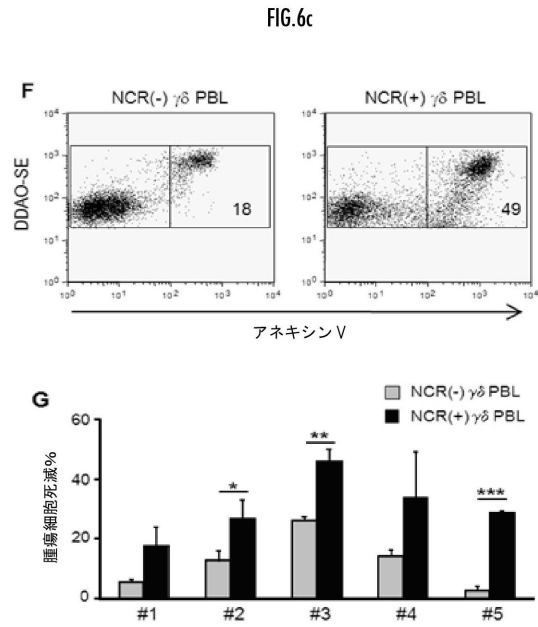
FIG.6a



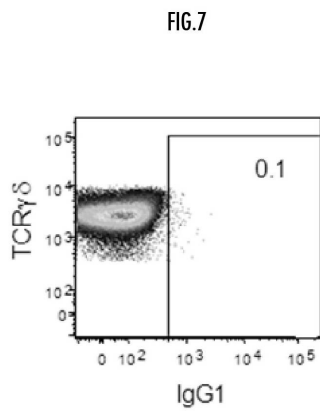
【図 6 b】



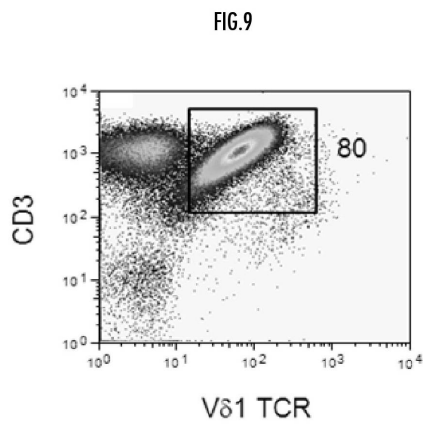
【図 6 c】



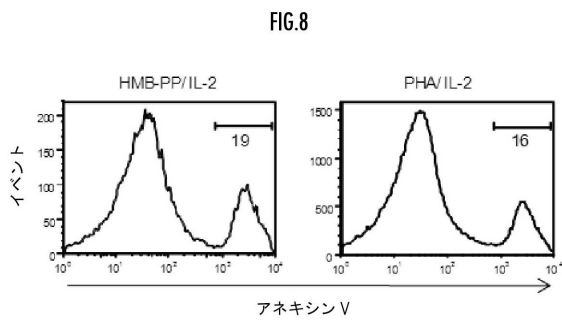
【図 7】



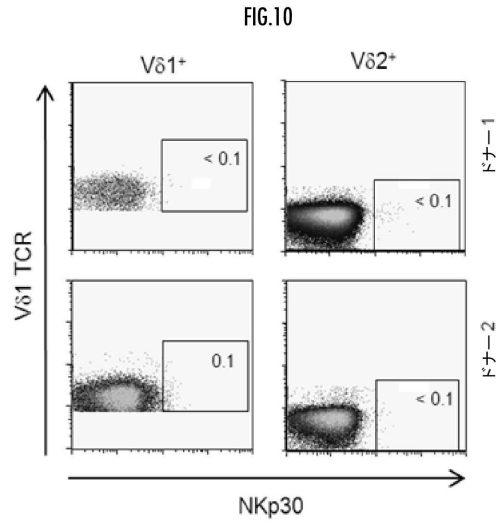
【図 9】



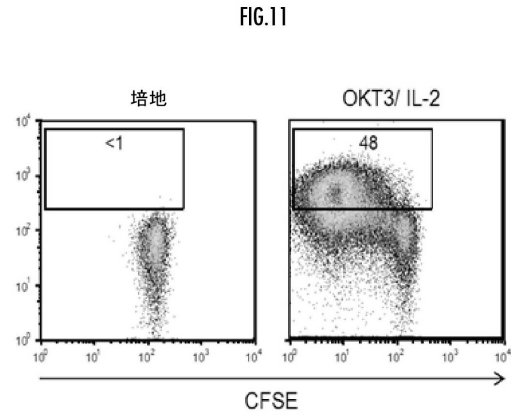
【図 8】



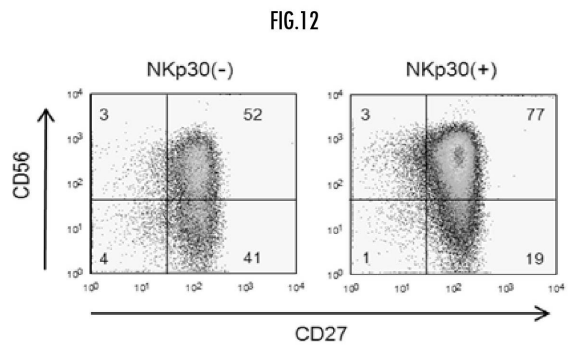
【図 10】



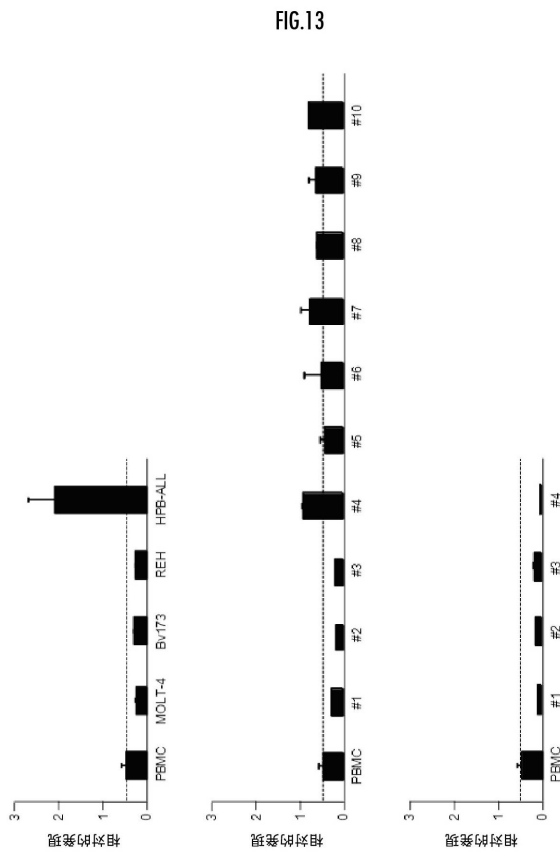
【図 11】



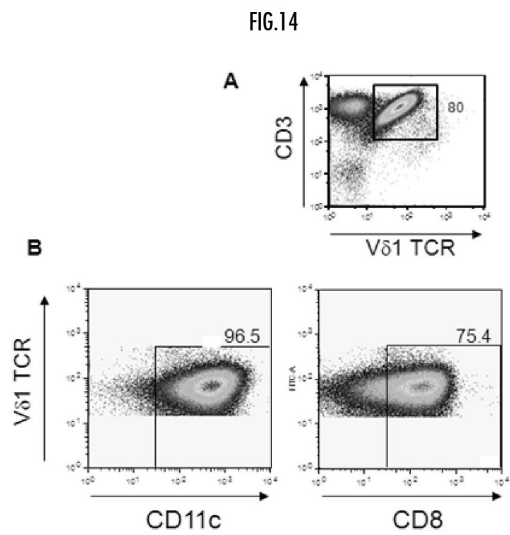
【図 12】



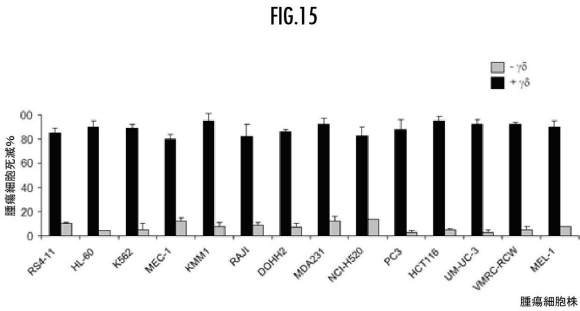
【図 13】



【図 14】



【図 1 5】



【配列表】

0006086904000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
A 6 1 P 37/02	(2006.01)	A 6 1 P 37/02	
A 6 1 P 31/14	(2006.01)	A 6 1 P 31/14	
A 6 1 P 31/22	(2006.01)	A 6 1 P 31/22	
A 6 1 K 35/14	(2015.01)	A 6 1 K 35/14	Z
A 6 1 P 15/00	(2006.01)	A 6 1 P 15/00	
A 6 1 P 11/00	(2006.01)	A 6 1 P 11/00	
A 6 1 P 13/08	(2006.01)	A 6 1 P 13/08	
A 6 1 P 1/14	(2006.01)	A 6 1 P 1/14	
A 6 1 P 13/10	(2006.01)	A 6 1 P 13/10	
A 6 1 P 13/12	(2006.01)	A 6 1 P 13/12	
A 6 1 P 17/00	(2006.01)	A 6 1 P 17/00	

(72)発明者 ヴァルガス・コレイラ, ダニエル
ポルトガル ペー 2 8 5 5 - 2 6 4 コロイオス ピニャル ド ヴィダルヌメロ 2 4 フ
ア ダス ノゲイラス

審査官 原 大樹

(56)参考文献 AIDS, 2 0 0 8 年, Vol.22, p.217-226
J. Exp. Med., 2 0 1 0 年, Vol.207, No.4, p.807-821
JAIDS, 2 0 0 3 年, Vol.33, No.4, p.420-425
Infection, 2 0 0 9 年, Vol.37, Suppl. II, p.81-82, P0 075

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
C 1 2 N 1 / 0 0 - 5 / 2 8
C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0
C 0 7 K 1 / 0 0 - 1 9 / 0 0
MEDLINE/B I O S I S / E M B A S E / W P I D S / W P I X / C A p l u s (S T N
)
J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)