(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2025年2月13日(13.02.2025)

WIPO | PCT

(10) 国際公開番号
WO 2025/033358 A1

(51) 国際特許分類:
C12N 15/13 (2006.01) *C07K 19/00* (2006.01)
A61K 35/17 (2015.01) *C12N 5/10* (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01) *C12N 5/0789* (2010.01)
A61P 37/04 (2006.01) *C12N 15/12* (2006.01)
C07K 14/725 (2006.01) *C12N 15/62* (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)

(21) 国際出願番号： PCT/JP2024/027781

(22) 国際出願日： 2024年8月2日(02.08.2024)

(25) 国際出願の言語： 日本語

(26) 国際公開の言語： 日本語

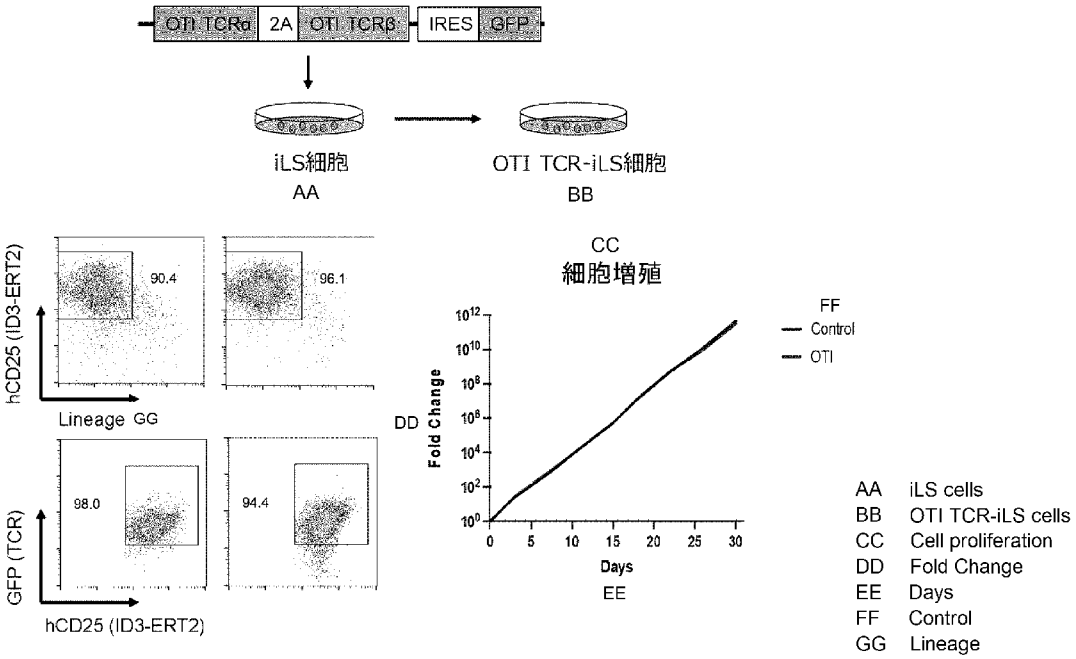
(30) 優先権データ：
特願 2023-127747 2023年8月4日(04.08.2023) JP

(71) 出願人: 学校法人東京理科大学(**TOKYO UNIVERSITY OF SCIENCE FOUNDATION**) [JP/JP]; 〒1628601 東京都新宿区神楽坂一丁目３番地 Tokyo (JP). 第一三共株式会社(**DAIICHI SANKYO COMPANY, LIMITED**) [JP/JP]; 〒1038426 東京都中央区日本橋本町三丁目５番１号 Tokyo (JP).

(72) 発明者: 伊川 友活(**IKAWA, Tomokatsu**); 〒1628601 東京都新宿区神楽坂一丁目３番地 学校法人東京理科大学内 Tokyo (JP). 重廣 司(**SHIGEHIRO, Tsukasa**); 〒1628601 東京都新宿区神楽坂一丁目３番地 学校法人東京理科大学内 Tokyo (JP). 春山 宗忠(**HARUYAMA, Munetada**); 〒1038426 東京都

(54) **Title:** METHOD FOR PRODUCING IMMUNE CELLS

(54) 発明の名称： 免疫細胞の製造方法



(57) **Abstract:** Disclosed are a means capable of stably producing TCR-T cells and CAR-T/CAR-NK cells, and a means for treating diseases such as tumors and autoimmune diseases by applying said means. One aspect of the method for producing TCR/CAR/CAAR-expressing immune cells according to the present invention is a method for producing TCR/CAR/CAAR-expressing immune cells by introducing an exogenous receptor gene into pluripotent blood progenitor cells and then inducing differentiation into immune cells. Another aspect of the method for

WO 2025/033358 A1

[続葉有]

中央区日本橋本町三丁目５番１号 第一三共株式会社内 Tokyo (JP).

(74) 代理人: 弁理士法人谷川国際特許事務所 (TANIGAWA AND PARTNERS, PATENT FIRM); 〒1020072 東京都千代田区飯田橋一丁目７番１０号山京別館８０１ Tokyo (JP).

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, ME, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告（条約第21条(3)）

— 明細書の別個の部分として表した配列リスト（規則5.2(a)）

producing TCR/CAR/CAAR-expressing immune cells according to the present invention is a method for producing TCR/CAR/CAAR-expressing immune cells by inducing differentiation of pluripotent blood progenitor cells into immune cells and then introducing an exogenous receptor gene. As the pluripotent blood progenitor cells, induced leukocyte stem (iLS) cells or T/NK progenitor cells can be preferably used.

(57) 要約：TCR-T細胞やCAR-T/CAR-NK細胞を安定的に生産できる手段、及び、該手段を応用した腫瘍や自己免疫疾患等の疾患の治療手段が開示されている。本発明によるTCR/CAR/CAAR発現免疫細胞の生産方法の１つの態様は、多能性血液前駆細胞に外因性受容体遺伝子を導入してから免疫細胞に分化誘導することにより、TCR/CAR/CAAR発現免疫細胞を生産する方法である。本発明によるTCR/CAR/CAAR発現免疫細胞の生産方法のもう１つの態様は、多能性血液前駆細胞を免疫細胞に分化誘導してから外因性受容体遺伝子を導入することにより、TCR/CAR/CAAR発現免疫細胞を生産する方法である。多能性血液前駆細胞としては、人工白血球幹細胞（iLS）又はT/NK前駆細胞を好ましく用いることができる。

明　細　書

発明の名称 ： 免疫細胞の製造方法

技術分野

[0001] 本発明は、所望の抗原を特異的に認識するT細胞受容体（TCR）、キメラ抗原受容体（CAR）などの外因性受容体を発現する免疫細胞の生産方法、該方法を利用して免疫細胞療法剤を製造する方法、及び、当該免疫細胞を用いた疾患の治療方法、並びに、Ｔ／ＮＫ前駆細胞を大量に製造する方法など、に関する。

背景技術

[0002] 腫瘍特異的TCRやキメラ抗原受容体（CAR）を導入したT細胞（TCR-T細胞，CAR-T細胞）およびCARを導入したNK細胞（CAR-NK細胞）は、新たながん治療戦略として期待されている。免疫細胞療法で使用するTCR-T細胞、CAR-T細胞及びCAR-NK細胞の作製方法としては、患者自身から採取されたT細胞/NK細胞や、臍帯血等に由来するT細胞／NK細胞、公知のT細胞株／NK細胞株にTCR遺伝子又はCAR遺伝子を導入して作製する方法の他、iPS細胞にCAR遺伝子を導入した後にNK細胞に分化誘導してCAR-NK細胞を調製する方法も提案されている（非特許文献１）。実用化されているCAR-T療法（キムリア(登録商標)、イエスカルタ(登録商標)）では、患者自身から白血球アフェレーシスにより採取した白血球からCAR-T細胞を作製する。

[0003] しかし、TCR-T細胞やCAR-T/CAR-NK細胞は患者の体内で疲弊し、十分な細胞傷害活性を持続できない問題点が指摘されている。細胞移植を適宜繰り返して治療効果を持続させるという観点からも、これら腫瘍特異的免疫細胞を安定的に生産する方法の開発が不可欠であるが、その開発は不十分である。

[0004] 一方、多能性及び自己複製能を維持した状態で造血系細胞を増幅する技術が種々知られている。そのうちの１つが、非特許文献２、３及び特許文献１に開示される、本願発明者らのグループが開発した、マウスおよびヒトの多能性血液前駆細胞を大量に増幅することのできる方法である。この方法では

、造血幹・前駆細胞（HSPC）にId3を導入することにより細胞内のE2Aを阻害した上で、B細胞への分化を誘導する条件下で培養する。これにより、白血球（T細胞、B細胞、ミエロイド細胞等）への分化能と自己複製能を有する多能性血液前駆細胞が大量に増幅される。このようにして得られた多能性血液前駆細胞は、生体内に移植すると主に白血球を作り出すことから、人工白血球幹（induce Leukocyte Stem; iLS）細胞と命名された。iLS細胞は少なくとも数か月にわたり生体外で増幅可能であることが示されている。

[0005] また、本願発明者らは、マウスを用いた研究においてT細胞およびNK細胞への分化能を持つT/NK前駆細胞（pT/NK細胞）を生成、増幅する方法も報告している（非特許文献２、４、５）。この方法では、IL-7、SCF及びFlt3-Lをそれぞれ10 ng/mLで培地に添加し、Notchリガンドの共存下でマウス造血幹・前駆細胞を培養する。これにより、多能性（T細胞、NK細胞、及びミエロイド細胞への分化能）を維持した自己複製能を有するpT/NK細胞が生成する。この方法でも、マウスのpT/NK細胞を少なくとも数か月にわたり生体外で増幅可能であることが確認されている。

[0006] 他のグループが開発した方法としては、例えば、血清アルブミンに代えてポリビニルアルコールを培地に添加して造血幹細胞を培養することにより、未分化な状態でマウス造血幹細胞を増幅培養する方法が知られている（非特許文献６）。この方法でも、マウス造血幹細胞を未分化な状態で１か月以上増幅培養することができる。

先行技術文献

特許文献

[0007] 特許文献1：WO 2009/113595 A1

非特許文献

[0008] 非特許文献1：Guozhu Xie et al., EBioMedicine 59 (2020) 102975

非特許文献2：Ikawa et al. Science, vol.329, pp.93-96, 2 July 2010

非特許文献3：Ikawa et al. Stem Cell Rep, vol. 5, pp. 716-727, November 10, 2015

非特許文献4：Ikawa et al. J Exp Med. vol.190, pp.1617-1625, December 6, 1999

非特許文献5：Ikawa et al. PNAS, vol.98, pp.5164-5169, April 24, 2001

非特許文献6：Adam C. Wilkinson et al., Nature, vol. 571, pp. 117-121 (2019)

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0009] 本発明の１つの目的は、TCR-T細胞やCAR-T/CAR-NK細胞を安定的に生産できる手段を提供することにある。本発明のさらなる目的は、該手段を応用した疾患の治療手段を提供することにある。また、本発明の別の課題として、マウスを用いた非特許文献２、４、５に記載の方法をヒト造血幹細胞に適用した試験において、ヒトのT/NK前駆細胞の増幅に限界があることが新たに確認されたことが挙げられる。そのため、本発明の目的には、ヒトの免疫細胞療法に適用するためにヒトT/NK前駆細胞の増幅効率を向上させた新たな方法を開発することも含まれる。

課題を解決するための手段

[0010] 本願発明者らは、鋭意研究の結果、人工白血球幹細胞やT/NK前駆細胞のような多能性血液前駆細胞にTCR遺伝子又はCAR遺伝子を導入して増幅し、T細胞やNK細胞、マクロファージ等の免疫細胞に分化誘導することにより、効率よく安定的にTCR又はCAR発現免疫細胞を調製できること、本願発明者らのグループが開発した人工白血球幹細胞又はT/NK前駆細胞の増幅方法によりこれら多能性血液前駆細胞を調製することにより、TCR又はCAR発現免疫細胞を大量生産できること、該増幅方法で調製した多能性血液前駆細胞を免疫細胞に分化してからTCR又はCAR遺伝子を導入した場合にも効率よく安定的にTCR又はCAR発現免疫細胞を調製できることを見出した。また、本願発明者らのこれまでの研究により、マウスT/NK前駆細胞の調製においては、IL-7、SCF及びFlt3-Lの濃度を非特許文献２、４、５で報告した10 ng/mLよりもさらに高めて25～50 ng/mL程度まで増やすことでより増幅効率が高まることが判明しているとこ

ろであるが、ヒトT/NK前駆細胞の調製においては、これらのサイトカインをマウス細胞と同様に各10～50 ng/mLの高濃度で用いると増幅効率は１０～５０倍程度にとどまり、さらに、細胞の分化がT/NK前駆細胞で止まらずNK細胞まで分化する細胞が多く発生するという問題も見出された。これらの問題を解決すべく鋭意検討した結果、ヒトT/NK前駆細胞の調製工程においてSCF、Flt3-L、IL-7の濃度を10 ng/mL未満に低減させることでヒトpT/NK細胞の増幅効率を大幅に高まること、更にTPO又はM-CSFを組み合わせた培養条件では３００～６００倍の増幅が達成されること、当該培養条件にて製造したヒトT/NK前駆細胞から調製されたヒトCAR-NK細胞が良好な抗腫瘍効果を有することを見出した。これらの知見に基づきさらに研究を進めることにより、本発明者らは以下の態様を包含する本願発明を完成した。

[0011] [１] T細胞受容体（TCR）、キメラ抗原受容体（CAR）又はキメラ自己抗体受容体（CAAR）である外因性受容体を発現する免疫細胞の生産方法であって、

造血幹細胞を含む細胞集団より、多能性血液前駆細胞を調製する工程、

前記外因性受容体をコードする遺伝子を多能性血液前駆細胞に導入することにより、前記外因性受容体を発現する多能性血液前駆細胞を調製する工程、及び

前記外因性受容体を発現する多能性血液前駆細胞を免疫細胞に分化誘導する工程

を含む、方法。

[２] TCR、CAR又はCAARである外因性受容体を発現する免疫細胞の生産方法であって、

造血幹細胞を含む細胞集団より、多能性血液前駆細胞を調製する工程、

多能性血液前駆細胞を免疫細胞に分化誘導する工程、及び

前記外因性受容体をコードする遺伝子を免疫細胞に導入する工程

を含み、前記多能性血液前駆細胞が、人工白血球幹細胞又はT/NK前駆細胞である、方法。

[３] 前記多能性血液前駆細胞が、人工白血球幹細胞又はT/NK前駆細胞であ

る、[１]記載の方法。

[４] 前記多能性血液前駆細胞が人工白血球幹細胞であり、多能性血液前駆細胞を調製する工程において、造血幹細胞を含む細胞集団を、細胞内の転写因子E2Aの機能を阻害した状態で、B細胞への分化を誘導する条件下で培養することにより、人工白血球幹細胞を調製する、[１]又は[２]記載の方法。

[５] E2Aの機能の阻害が、分化抑制因子Idを造血幹細胞内で強制発現させることにより行われる、[４]記載の方法。

[６] 前記多能性血液前駆細胞がT/NK前駆細胞であり、多能性血液前駆細胞を調製する工程において、造血幹細胞を含む細胞集団をNotchリガンドの共存下で培養することにより、T/NK前駆細胞を調製する、[１]又は[２]記載の方法。

[７] 造血幹細胞を含む細胞集団を、SCF、TPO及びG-CSFをそれぞれ100 ng/mL以上の濃度で含む培地でNotchリガンドの非共存下で培養した後、Notchリガンドの共存下で培養する、[６]記載の方法。

[８] 前記免疫細胞が、T細胞、NK細胞、マクロファージ、又はB細胞である、[１]～[７]のいずれか１項に記載の方法。

[９] 外因性受容体がTCRであり、前記免疫細胞がT細胞である、[８]記載の方法。

[１０] 外因性受容体がCAR又はCAARであり、前記免疫細胞が、T細胞、NK細胞、又はマクロファージである、[８]記載の方法。

[１１] 外因性受容体が抗原特異的受容体であり、前記抗原が腫瘍抗原である、[１]～[１０]のいずれか１項に記載の方法。

[１２] 免疫細胞療法により治療されうる疾患（例えば腫瘍又は自己免疫疾患）に対する免疫細胞療法剤の製造方法であって、

造血幹細胞を含む細胞集団より、多能性血液前駆細胞を調製する工程、

CAAR又は標的抗原（例えば、腫瘍抗原）を特異的に認識するTCR若しくはCARである外因性受容体をコードする遺伝子を多能性血液前駆細胞に導入することにより、前記外因性受容体を発現する多能性血液前駆細胞を調製する工程

、

前記外因性受容体を発現する多能性血液前駆細胞をT細胞に分化誘導することにより、前記外因性受容体を発現するT細胞（TCR-T、CAR-T又はCAAR-T細胞）を調製する工程、

TCR-T、CAR-T又はCAAR-T細胞をTCR刺激し、CD8陽性細胞傷害性TCR-T、CAR-T又はCAAR-T細胞へ分化誘導する工程、及び

CD8陽性細胞傷害性TCR-T若しくはCAR-T細胞を、前記抗原が発現する細胞に起因する疾患（例えば、腫瘍抗原を発現する腫瘍）に対する免疫細胞療法剤として調製するか、又は、CD8陽性細胞傷害性CAAR-T細胞を自己免疫疾患に対する免疫細胞療法剤として調製する工程

を含む、方法。

[１３] 免疫細胞療法により治療されうる疾患（例えば、腫瘍又は自己免疫疾患）に対する免疫細胞療法剤の製造方法であって、

造血幹細胞を含む細胞集団より、多能性血液前駆細胞を調製する工程、

多能性血液前駆細胞をT細胞に分化誘導する工程、

前記T細胞をTCR刺激した後、CAAR又は標的抗原（例えば腫瘍抗原）を特異的に認識するTCR若しくはCARである外因性受容体をコードする遺伝子を導入することにより、CD8陽性細胞傷害性TCR-T、CAR-T又はCAAR-T細胞を調製する工程、及び

CD8陽性細胞傷害性TCR-T若しくはCAR-T細胞を、前記抗原が発現する細胞に起因する疾患（例えば、腫瘍抗原を発現する腫瘍）に対する免疫細胞療法剤として調製するか、又は、CD8陽性細胞傷害性CAAR-T細胞を自己免疫疾患に対する免疫細胞療法剤として調製する工程

を含み、前記多能性血液前駆細胞が、人工白血球幹細胞又はT/NK前駆細胞である、方法。

[１４] 免疫細胞療法により治療されうる疾患（例えば、腫瘍又は自己免疫疾患）に対する免疫細胞療法剤の製造方法であって、

造血幹細胞を含む細胞集団より、多能性血液前駆細胞を調製する工程、

CAAR又は腫瘍抗原を特異的に認識するCARであるキメラ受容体をコードする遺伝子を多能性血液前駆細胞に導入することにより、前記キメラ受容体を発現する多能性血液前駆細胞を調製する工程、

前記キメラ受容体を発現する多能性血液前駆細胞をNK細胞又はマクロファージに分化誘導することにより、前記キメラ受容体を発現するNK細胞（CAR-NK若しくはCAAR-NK細胞）又はマクロファージ（CAR-マクロファージ若しくはCAAR-マクロファージ）を調製する工程、及び

CAR-NK細胞若しくはCAR-マクロファージを、前記抗原を発現する細胞に起因する疾患（例えば、腫瘍抗原を発現する腫瘍）に対する免疫細胞療法剤として調製するか、又は、CAAR-NK細胞若しくはCAAR-マクロファージを自己免疫疾患に対する免疫細胞療法剤として調製する工程

を含む、方法。

[１５] 調製した前記キメラ受容体を発現するNK細胞又はマクロファージを受容体刺激する工程をさらに含み、受容体刺激後のキメラ受容体発現NK細胞又はマクロファージを前記免疫細胞療法剤として調製する、[１４]記載の方法。

[１６] 免疫細胞療法により治療されうる疾患（例えば、腫瘍又は自己免疫疾患）に対する免疫細胞療法剤の製造方法であって、

造血幹細胞を含む細胞集団より、多能性血液前駆細胞を調製する工程、

多能性血液前駆細胞をNK細胞又はマクロファージに分化誘導する工程、

NK細胞又はマクロファージを受容体刺激した後、CAAR又は標的抗原（例えば、腫瘍抗原）を特異的に認識するCARであるキメラ受容体をコードする遺伝子を導入することにより、キメラ受容体を発現するNK細胞（CAR-NK若しくはCAAR-NK細胞）又はマクロファージ（CAR-マクロファージ若しくはCAAR-マクロファージ）を調製する工程、及び

CAR-NK細胞若しくはCAR-マクロファージを、前記抗原を発現する細胞に起因する疾患（例えば、腫瘍抗原を発現する腫瘍）に対する免疫細胞療法剤として調製するか、又は、CAAR-NK細胞若しくはCAAR-マクロファージを自己免

疫疾患に対する免疫細胞療法剤として調製する工程
を含み、前記多能性血液前駆細胞が、人工白血球幹細胞又はT/NK前駆細胞である、方法。

[１７] 患者の免疫細胞療法により治療されうる疾患（例えば、腫瘍又は自己免疫疾患）を治療する方法であって、

造血幹細胞を含む細胞集団より、多能性血液前駆細胞を調製する工程、

CAAR又は標的抗原（例えば腫瘍抗原）を特異的に認識するTCR若しくはCARである外因性受容体をコードする遺伝子を多能性血液前駆細胞に導入することにより、前記外因性受容体を発現する多能性血液前駆細胞を調製する工程、

前記外因性受容体を発現する多能性血液前駆細胞をT細胞に分化誘導することにより、前記外因性受容体を発現するT細胞であるTCR-T、CAR-T又はCAAR-T細胞を調製する工程、

TCR-T、CAR-T又はCAAR-T細胞をTCR刺激し、CD8陽性細胞傷害性TCR-T、CAR-T又はCAAR-T細胞へ分化誘導する工程、及び

CD8陽性細胞傷害性TCR-T若しくはCAR-T細胞を、前記抗原を発現する細胞に起因する疾患（例えば、腫瘍抗原を発現する腫瘍）を有する患者に投与するか、又は、CD8陽性細胞傷害性CAAR-T細胞を自己免疫疾患患者に投与する工程を含む、方法。

[１８] 患者の免疫細胞療法により治療されうる疾患（例えば、腫瘍又は自己免疫疾患）を治療する方法であって、

造血幹細胞を含む細胞集団より、多能性血液前駆細胞を調製する工程、

多能性血液前駆細胞をT細胞に分化誘導する工程、

前記T細胞をTCR刺激した後、CAAR又は標的抗原（例えば、腫瘍抗原）を特異的に認識するTCR若しくはCARである外因性受容体をコードする遺伝子を導入することにより、CD8陽性細胞傷害性TCR-T、CAR-T又はCAAR-T細胞を調製する工程、及び

CD8陽性細胞傷害性TCR-T若しくはCAR-T細胞を、前記抗原を発現する細胞に

起因する疾患（例えば、腫瘍抗原を発現する腫瘍）を有する患者に投与するか、又は、CD8陽性細胞傷害性CAAR-T細胞を自己免疫疾患患者に投与する工程を含み、前記多能性血液前駆細胞が、人工白血球幹細胞又はT/NK前駆細胞である、方法。

[１９] 患者の免疫細胞療法により治療されうる疾患（例えば、腫瘍又は自己免疫疾患）を治療する方法であって、

造血幹細胞を含む細胞集団より、多能性血液前駆細胞を調製する工程、

CAAR又は標的抗原（例えば、腫瘍抗原）を特異的に認識するCARであるキメラ受容体をコードする遺伝子を多能性血液前駆細胞に導入することにより、前記キメラ受容体を発現する多能性血液前駆細胞を調製する工程、

前記キメラ受容体を発現する多能性血液前駆細胞をNK細胞又はマクロファージに分化誘導することにより、CAR-NK細胞、CAAR-NK細胞、CAR-マクロファージ又はCAAR-マクロファージであるキメラ受容体発現免疫細胞を調製する工程、

CAR-NK細胞若しくはCAR-マクロファージを、前記抗原を発現する細胞に起因する疾患（たとえば、腫瘍抗原を発現する腫瘍）を有する患者に投与するか、又は、CAAR-NK細胞若しくはCAAR-マクロファージを自己免疫疾患患者に投与する工程

を含む、方法。

[２０] 調製した前記キメラ受容体発現免疫細胞を受容体刺激する工程をさらに含み、受容体刺激後のキメラ受容体発現免疫細胞を前記患者に投与する、[１９]記載の方法。

[２１] 患者の免疫細胞療法により治療されうる疾患（例えば、腫瘍又は自己免疫疾患）を治療する方法であって、

造血幹細胞を含む細胞集団より、多能性血液前駆細胞を調製する工程、

多能性血液前駆細胞をNK細胞又はマクロファージに分化誘導する工程、

NK細胞又はマクロファージを受容体刺激した後、CAAR又は標的抗原（たとえば、腫瘍抗原）を特異的に認識するCARであるキメラ受容体をコードする遺

伝子を導入することにより、CAR-NK細胞、CAAR-NK、CAR-マクロファージ又はCAAR-マクロファージを調製する工程、及び

CAR-NK細胞若しくはCAR-マクロファージを、前記抗原を発現する細胞に起因する疾患（たとえば、腫瘍抗原を発現する腫瘍）を有する患者に投与するか、又は、CAAR-NK細胞若しくはCAAR-マクロファージを自己免疫疾患患者に投与する工程

を含み、前記多能性血液前駆細胞が、人工白血球幹細胞又はT/NK前駆細胞である、方法。

[２２] 患者の標的抗原を発現する細胞に起因する疾患（たとえば、腫瘍）を治療する方法であって、

下記(1)又は(2)により、CAR-マクロファージを調製する工程：

(1) 造血幹細胞を含む細胞集団より多能性血液前駆細胞を調製し、標的抗原（たとえば、腫瘍抗原）を特異的に認識するCARをコードする遺伝子を前記多能性血液前駆細胞に導入することにより、前記CARを発現する多能性血液前駆細胞を調製した後、該CAR発現多能性血液前駆細胞をマクロファージに分化誘導する工程；

(2) 造血幹細胞を含む細胞集団より人工白血球幹細胞又はT/NK前駆細胞を調製し、マクロファージに分化誘導して受容体刺激した後、前記CARをコードする遺伝子を導入する工程；

下記(3)又は(4)により、CAR-T細胞を調製する工程：

(3) 造血幹細胞を含む細胞集団より多能性血液前駆細胞を調製し、前記CARをコードする遺伝子を前記多能性血液前駆細胞に導入することにより、前記CARを発現する多能性血液前駆細胞を調製し、該CAR発現多能性血液前駆細胞をT細胞に分化誘導した後にTCR刺激することにより、CD8陽性細胞傷害性TCR-T又はCAR-T細胞へ分化誘導する工程；

(4) 造血幹細胞を含む細胞集団より人工白血球幹細胞又はT/NK前駆細胞を調製し、T細胞に分化誘導してTCR刺激した後、前記CARをコードする遺伝子を導入する工程；及び

CAR-マクロファージとCAR-T細胞を組み合わせて、前記抗原を発現する細胞に起因する疾患（たとえば、腫瘍抗原を発現する腫瘍）を有する患者に投与する工程

を含む、方法。

[２３] 患者の標的抗原を発現する細胞に起因する疾患（たとえば、腫瘍）を治療する方法であって、

下記工程(1)又は(2)により、CAR-マクロファージを調製する工程：

(1) 造血幹細胞を含む細胞集団より多能性血液前駆細胞を調製し、標的抗原（たとえば、腫瘍抗原）を特異的に認識するCARをコードする遺伝子を前記多能性血液前駆細胞に導入することにより、前記CARを発現する多能性血液前駆細胞を調製した後、該CAR発現多能性血液前駆細胞をマクロファージに分化誘導する工程；

(2) 造血幹細胞を含む細胞集団より人工白血球幹細胞又はT/NK前駆細胞を調製し、マクロファージに分化誘導して受容体刺激した後、前記CARをコードする遺伝子を導入する工程；

下記工程(5)又は(6)により、CAR-NK細胞を調製する工程：

(5) 造血幹細胞を含む細胞集団より多能性血液前駆細胞を調製し、前記CARをコードする遺伝子を前記多能性血液前駆細胞に導入することにより、前記CARを発現する多能性血液前駆細胞を調製した後、該CAR発現多能性血液前駆細胞をNK細胞に分化誘導する工程；

(6) 造血幹細胞を含む細胞集団より人工白血球幹細胞又はT/NK前駆細胞を調製し、NK細胞に分化誘導して受容体刺激した後、前記CARをコードする遺伝子を導入する工程；及び

CAR-マクロファージとCAR-NK細胞を組み合わせて、前記抗原を発現する細胞に起因する疾患（たとえば、腫瘍抗原を発現する腫瘍）を有する患者に投与する工程

を含む、方法。

[２４] 前記工程(5)が、前記CAR発現多能性血液前駆細胞をNK細胞に分化誘

導してCAR-NK細胞を調製した後、CAR-NK細胞を受容体刺激することをさらに含む、[２３]記載の方法。

[２５] 前記工程(1)が、前記CAR発現多能性血液前駆細胞をマクロファージに分化誘導してCAR-マクロファージを調製した後、CAR-マクロファージを受容体刺激することをさらに含む、[２２]～[２４]のいずれか１項に記載の方法。

[0012] 上記の[１２]～[２５]において、好ましくは、標的抗原は腫瘍抗原であり、且つ、抗原を発現する細胞に起因する疾患は前記腫瘍抗原を発現する腫瘍である。

[0013] 本発明は、更に下記の方法、細胞等を提供する。

[２６] ヒト造血幹細胞を含む細胞集団を、Notchリガンドの共存下、SCF、Flt3-L及びIL-7をそれぞれ1 ng/mL以上10 ng/mL未満の濃度で含む培地で培養する工程を含む、ヒトT/NK前駆細胞の製造方法。

[２７] 前記培地が、TPO及びM-CSFの少なくともいずれか一方をさらに含む、[２６]記載の方法。

[２８] 前記ヒト造血幹細胞を含む細胞集団が、ヒト造血幹細胞を含む細胞集団をSCF、TPO及びG-CSFをそれぞれ100 ng/mL以上の濃度で含む培地でNotchリガンドの非共存下培養した後の細胞集団である、[２６]～[２７]のいずれか１項に記載の方法。

[２９] [２６]～[２８]のいずれか１項に記載の方法により、ヒトT/NK前駆細胞を製造する工程、及び

製造したヒトT/NK前駆細胞を、Notchリガンドの非共存下、IL-7, Flt3-L, SCF及びIL-15を含む培地で培養することにより、ヒトNK細胞を分化誘導する工程

を含む、ヒトNK細胞の製造方法。

[３０] 前記T/NK前駆細胞がヒトT/NK前駆細胞であり、多能性血液前駆細胞を調製する工程において、ヒト造血幹細胞を含む細胞集団から[２６]～[２８]のいずれか１項に記載の方法によりヒトT/NK前駆細胞を製造する、請求項６

又は７記載の前記免疫細胞の生産方法。

[３１]

前記免疫細胞がヒトNK細胞であり、前記多能性血液前駆細胞を免疫細胞に分化誘導する工程において、ヒトT/NK前駆細胞を、Notchリガンドの非共存下、IL-7, Flt3-L, SCF及びIL-15を含む培地で培養することにより、ヒトNK細胞を分化誘導する、[３０]記載の前記免疫細胞の生産方法。

[３２] CD122陽性であることを特徴とする、培養ヒトT/NK前駆細胞。ここで、前記培養ヒトT/NK前駆細胞は、好ましくは、CD3陰性、CD4陰性、CD8陰性、CD56陰性、CD161陰性及びCD7陽性からなる群から選択される１，２，３，４、５又は６個の表面抗原発現条件をさらに満たす細胞である。

[３３] ヒト臍帯血より分離されたヒト臍帯血NK細胞よりも、成熟度の指標となるCD16及びKIRの発現並びに疲弊マーカーTIGITの発現が低いことにより、前記ヒト臍帯血NK細胞よりも幼若かつ疲弊度が低いことを特徴とする、培養ヒトNK細胞。

[0014] 上記本発明の免疫細胞療法により治療されうる疾患に対する免疫細胞療法剤の製造方法には、以下の態様が包含される。

[i-1] 前記多能性血液前駆細胞がヒトT/NK前駆細胞であり、多能性血液前駆細胞を調製する工程において、ヒト造血幹細胞を含む細胞集団から[２６]～[２８]のいずれか１項に記載の方法によりヒトT/NK前駆細胞を製造する、[１２]～[１６]のいずれか１項に記載の免疫細胞療法剤の製造方法。

[i-2] 前記多能性血液前駆細胞がヒトT/NK前駆細胞であり、前記免疫細胞がヒトNK細胞であり、多能性血液前駆細胞を調製する工程において、ヒト造血幹細胞を含む細胞集団から[２６]～[２８]のいずれか１項に記載の方法によりヒトT/NK前駆細胞を製造し、前記多能性血液前駆細胞を免疫細胞に分化誘導する工程において、ヒトT/NK前駆細胞を、Notchリガンドの非共存下、IL-7, Flt3-L, SCF及びIL-15を含む培地で培養することにより、ヒトNK細胞を分化誘導する、[１４]～[１６]のいずれか１項に記載の免疫細胞療法剤の製造方法。

[0015] 上記本発明の患者の免疫細胞療法により治療されうる疾患を治療する方法には、以下の態様が包含される。

[ii-1] 前記多能性血液前駆細胞がヒトT/NK前駆細胞であり、多能性血液前駆細胞を調製する工程において、ヒト造血幹細胞を含む細胞集団から[２６]～[２８]のいずれか１項に記載の方法によりヒトT/NK前駆細胞を製造する、[１７]～[２１]のいずれか１項に記載の患者の免役細胞療法により治療されうる疾患を治療する方法。

[ii-2] 前記多能性血液前駆細胞がヒトT/NK前駆細胞であり、前記免疫細胞がヒトNK細胞であり、多能性血液前駆細胞を調製する工程において、ヒト造血幹細胞を含む細胞集団から[２６]～[２８]のいずれか１項に記載の方法によりヒトT/NK前駆細胞を製造し、前記多能性血液前駆細胞を免疫細胞に分化誘導する工程において、ヒトT/NK前駆細胞を、Notchリガンドの非共存下、IL-7, Flt-3L, SCF及びIL-15を含む培地で培養することにより、ヒトNK細胞を分化誘導する、[１９]～[２１]のいずれか１項に記載の患者の疾患を治療する方法。

[0016] 上記本発明の患者の標的抗原を発現する細胞に起因する疾患を治療する方法には、以下の態様が包含される。

[iii-1] 前記多能性血液前駆細胞がヒトT/NK前駆細胞であり、造血幹細胞を含む細胞集団からの多能性血液前駆細胞の調製が、[２６]～[２８]のいずれか１項に記載の方法により行われる、[２２]～[２５]のいずれか１項に記載の患者の標的抗原を発現する細胞に起因する疾患を治療する方法。

[iii-2] 前記多能性血液前駆細胞がヒトT/NK前駆細胞であり、前記NK細胞がヒトNK細胞であり、造血幹細胞を含む細胞集団からの多能性血液前駆細胞の調製が、[２６]～[２８]のいずれか１項に記載の方法により行われ、前記NK細胞への分化誘導が、ヒトT/NK前駆細胞を、Notchリガンドの非共存下、IL-7, Flt3-L, SCF及びIL-15を含む培地で培養することにより行われる、[２３]又は[２４]記載の患者の標的抗原を発現する細胞に起因する疾患を治療する方法。

発明の効果

[0017] 本願発明によれば、TCR-T、CAR-T、CAAR-T、CAR-NK、CAAR-NK細胞等のTCR/CAR/CAAR発現免疫細胞を安定的に生産することができる。本願発明者らのグループが開発した人工白血球幹細胞又はT/NK前駆細胞の増幅方法により多能性血液前駆細胞を調製することで、TCR/CAR/CAAR発現免疫細胞を安定的に大量生産できる。腫瘍抗原又は細菌、ウイルス等の病原体に特異的な抗原を特異的に認識する抗原特異的受容体を用いて作製したTCR/CAR発現免疫細胞は、患者体内の腫瘍細胞又は病原体感染細胞に対し細胞傷害活性を発揮するので、腫瘍や感染症に対する免疫細胞療法剤として、腫瘍や感染症の治療に利用できる。また、任意の自己抗原に基づいて設計されたCAARを用いて作製したCAAR発現免疫細胞は、患者体内で当該自己抗原を認識する病原性B細胞に対し細胞傷害活性を発揮するので、当該自己抗原ないし病原性B細胞を病因とする自己免疫疾患に対する免疫細胞療法剤として自己免疫疾患の治療に利用できる。本発明によれば、かかる免疫細胞療法剤を安定的に大量生産することも可能なので、腫瘍や感染症、自己免疫疾患等の疾患の治療に大いに貢献する。

図面の簡単な説明

[0018] [図1A]人工白血球幹（induced Leukocyte Stem; iLS）細胞を説明した図である。iLS細胞は自己複製能を有する多能性血液前駆細胞であり、T細胞、B細胞等の白血球への分化能を持つ。

[図1B]T/NK前駆細胞（pT/NK細胞）を説明した図である。造血幹・前駆細胞を高濃度サイトカイン共存下で培養することにより、CD34陽性造血幹細胞を増幅させる。次いで、該細胞をOP9/delta-like-1(DLL1）細胞等によってNotchシグナル刺激下で培養することにより、多能性（T細胞、NK細胞、及びミエロイド細胞への分化能）を維持した自己複製能を有するpT/NKが生成する。

[図2]（上段）OTI TCRを発現するiLS細胞の作製方法の概略図。（下段左）OTI TCR遺伝子を導入したiLS細胞のFCM解析。Lineageマーカー(-)、ヒトCD25(+)、GFP(+)のOTI TCR発現iLS（OTI TCR-iLS）細胞が高頻度で検出された。（

下段右）iLS細胞培養の条件下で培養したOTI TCR-iLS細胞及びコントロール細胞（OTI TCR遺伝子を含まない空レトロウイルスをスピンインフェクションしたiLS細胞）の増殖をfold changeで表したグラフである。

[図3]（A）OTI TCR-iLS細胞からT細胞（CD4/CD8ダブルポジティブ（DP）細胞）を分化誘導する工程の概略。（B）誘導開始後7日、14日及び21日の細胞を採取して行ったFCM解析。培養14日目にDP細胞が出現し、培養21日目には70%以上の割合でDP細胞が生成される。

[図4]OTI TCR-iLS細胞から生成されたDP細胞の割合と増幅率を示す。DP細胞の割合は50-60%を示し、iLS細胞は約1500倍のDP細胞を生成する。

[図5]OTI TCR-iLS細胞から生成されたDP細胞をCD8陽性T細胞へ誘導する工程の概略。DP細胞は$OVA_{257-264}$をパルスした抗原提示細胞（APC）と７日間共培養することにより、90%以上のCD8陽性T細胞が誘導される。このCD8陽性T細胞はOTI TCRを発現し、多くはeffector memory(EM)T細胞とcentral memory(CM)T細胞である。この過程で細胞は5倍程度増幅する。

[図6]抗CD19 CAR発現iLS細胞（抗CD19 CAR-iLS細胞）からCD8陽性T細胞を誘導する工程の概略。抗CD19 CAR-iLS細胞とOP9/DLL1細胞を共培養することによりDP細胞へ分化誘導する。培養21日目にDP細胞が生成される。次にDP細胞をソートし、抗CD3/CD28抗体で刺激し、CD8T陽性細胞へ誘導する。培養４日後にCD8陽性T細胞が生成される。

[図7]（A）OTI TCR-iLS細胞由来CD8陽性T細胞（OTI T-iLS細胞）の抗原特異的サイトカイン放出評価試験の工程概略。（B、C）OVA抗原提示細胞又はPMA + イオノマイシンで刺激したOTI TCR-iLS細胞由来CD8陽性T細胞を細胞内染色し、サイトカインの放出を調べた結果である。BはFCM解析の２パラメータヒストグラムであり、Cはこれをグラフ化したもの。Unstim., Unstimulは刺激なしの細胞、APCはOVAを提示していないマウス脾臓細胞と共培養した細胞、OVA + APCはOVA抗原提示細胞で刺激した細胞、PMA/IonoはPMA + イオノマイシンで刺激した細胞。MFI：median fluorescence intensity。

[図8]（上段）OTI T-iLS細胞の細胞傷害活性評価試験の工程概略。（下段）O

VA抗原を導入したB16メラノーマ細胞株（B16-OVA細胞）及びNeo遺伝子を導入したB16メラノーマ細胞株（B16-Neo細胞）をターゲット細胞、OTI T-iLS細胞及びOTI Tgマウス脾臓由来T細胞をエフェクター細胞として、各エフェクター細胞の細胞傷害活性を調べた結果である。

[図9]（上段）B16-OVA細胞担がんマウスを用いたOTI T-iLS細胞の抗腫瘍活性評価試験の工程概略。（下段左）各処置群の担がんマウスの腫瘍体積。（下段右）各処置群の担がんマウスの生存率。Untreated, NTは処置なし、IL-2はIL-2処置のみ、OTI-iLS + IL-2はOTI T-iLS細胞及びIL-2で処置、OTI-SP + IL-2はOTI Tgマウス脾臓由来T細胞及びIL-2で処置。

[図10](A) iLS細胞からCAR-NK細胞を誘導する工程の概略。(B) 実施例で使用したレトロウイルスベクターのマウス用抗CD19 CAR配列の模式図。(C) 抗CD19 CAR遺伝子導入pT/NK細胞（抗CD19 CAR-pT/NK細胞）および分化誘導後の抗CD19 CAR導入NK細胞（抗CD19 CAR-NK細胞）のFCM解析結果。高い割合（70%以上）で抗CD19 CAR-NK細胞が生成されていることを示す。

[図11]ヒトCD19を導入したB16メラノーマ細胞（B16-hCD19細胞）及びヒトCD19を導入していないB16メラノーマ細胞（B16細胞）に対する、抗CD19 CAR-NK細胞の細胞傷害活性。

[図12]抗CD19 CAR-iLS細胞からマクロファージへの分化誘導。誘導開始から１週間後（Day 7）にFCM解析したところ、CD11b陽性F4/80陽性MHC classII（I-A）陽性マクロファージの生成が確認された。

[図13]（上段）ヒト臍帯血CD34陽性細胞（hCB-CD34陽性細胞）からpT/NK細胞を作製し、NK細胞へ分化誘導する工程の概略。（下段）hCB-CD34陽性細胞の培養開始から１７日目（左）及び２５日目（中）にFCM解析により各表面抗原マーカー分子の発現を調べた。培養開始１７日目の細胞集団からセルソーターにより単離したpT/NK細胞、及びhCB-CD34陽性細胞をStemline II培地で増幅したヒト臍帯血造血幹・前駆細胞（hCB-HSPC）をNK細胞分化誘導条件でそれぞれ培養し、生成したNK細胞数を比較した（右）。

[図14]pT/NK細胞由来のNK細胞を標的細胞であるK562白血病細胞株（K562細胞

）との共培養又はPMA＋イオノマイシン処理により刺激し、サイトカイン放出能をFCM解析した。

[図15]pT/NK細胞由来NK細胞及びhCB-HSPC由来NK細胞のK562細胞に対する細胞傷害活性。

[図16A]pT/NK細胞由来の抗CD19 CAR-NK細胞及び抗GD2 CAR-NK細胞の作製に使用したレンチウイルスベクターのヒト用の抗CD19 CAR配列及び抗GD2 CAR配列の模式図（上段）。マーカータンパク質Venusに対するFCM解析によって、導入遺伝子の発現を維持していることを確認した（下段）。MockはVenusのみをレンチウイルスで導入した細胞。

[図16B]pT/NK細胞由来抗CD19 CAR-NK細胞のNALM6白血病細胞株（NALM6細胞）に対する抗原特異的な細胞傷害活性。

[図17]VSV-G又はGALVエンベロープを用いて作製したレンチウイルスのpT/NK細胞への遺伝子導入効率を比較した。

[図18A]GALVエンベロープを用いて作製したCAR遺伝子発現レンチウイルスでpT/NK細胞に遺伝子導入した。マーカータンパク質Venusに対するFCM解析によって、導入遺伝子の発現を維持していることを確認した。MockはVenusのみをレンチウイルスで導入した細胞。

[図18B]GALVエンベロープを用いて作製したCAR遺伝子発現レンチウイルスで遺伝子導入して得たCAR-pT/NK細胞をNK細胞に分化誘導し、CAR遺伝子を安定発現するpT/NK細胞由来NK細胞を得た。MockはVenusのみをレンチウイルスで導入した細胞。

[図19]マウス骨髄由来の造血幹・前駆細胞（Mouse HSPC, Lineage-Sca1-ckit+: LSK）をOP9/DLL1フィーダー細胞上で、SCF, IL-7及びFlt3-Lをそれぞれ10 ng/mlもしくは30 ng/mlの濃度で培地に添加して2週間培養した後、pT/NK細胞数を計測した結果である。

[図20]hCB-CD34陽性細胞からpT/NK細胞を生成・増幅するための至適なサイトカイン濃度を検討した結果である。上段は培養工程の概略。下段左は、表１に示した条件1～13のサイトカイン濃度で6週間培養後に計測したpT/NK細胞数

。下段右は、条件1及び条件4での培養で得られたpT/NK細胞数を経時的に示したグラフである。

[図21]（A）実施例B-2における培養プロトコールの概略。（B）hCB-CD34陽性細胞からの細胞の増殖率。（C）NK細胞生成後のFCM解析の結果。（D）hCB-HSPCからNK細胞を直接誘導した場合とpT/NK細胞増幅法を用いた場合のNK細胞の産生数。

[図22]（A）実施例B-3において、ヒト臍帯血より採取したNK細胞（CB-NK細胞）、ヒト末梢血より採取したNK細胞（PB-NK細胞）、及びヒトpT/NK細胞由来NK細胞を、10ng/ml rhIL-15を添加したMEMα培地中で２週間培養した後の細胞増殖率。（B）マイトマイシン処理したaAPCと各NK細胞を1:2のE:T比で混合し、200 IU/mlのrhIL-2を含むMEMα培地でNK細胞を増幅した際の増幅率。

[図23A]実施例B-4において、pT/NK細胞由来NK細胞のNK細胞関連受容体の発現量をFCM解析によって評価した結果である（１パラメータヒストグラム）。

[図23B]実施例B-4において、pT/NK細胞由来NK細胞のNK細胞関連受容体の発現量をFCM解析によって評価した結果である（１パラメータヒストグラムをグラフ化したもの）。

[図24]実施例B-5において、pT/NK細胞由来NK細胞のK562細胞に対する細胞傷害活性をPB-NK細胞あるいはCB-NK細胞と比較した結果である。（A）NK細胞とK562細胞を種々のE:T比で混合し、4時間共培養した後、K562細胞の死細胞割合をFCM解析した結果。（B，C）活性化されたNK細胞が産生するエフェクター分子の発現量の評価。Bは２パラメータヒストグラムであり、Cはこれをグラフ化したもの。

[図25]実施例B-6において、ヒトpT/NK細胞由来NK細胞の凍結保存に対する影響を評価した結果である。（A）凍結融解後のpT/NK細胞由来NK細胞のリカバリー率（凍結後の細胞数／凍結前の細胞数×100）。（B）凍結融解後のヒトpT/NK細胞由来NK細胞の増殖能。（C）凍結融解したpT/NK細胞由来NK細胞のK562細胞に対する細胞傷害活性。

[図26]実施例B-7において、hCB-HSPCからpT/NK細胞への分化・増殖を促進す

る因子を探索した結果。hCB-HSPCをOP9/DLL1フィーダー細胞上でrhIL-7、rhFlt3-L及びrhSCFを各5 ng/ml存在下に培養する系に、10 ng/mlの各サイトカインもしくは0.1mMのニコチンアミドを添加し、pT/NK細胞の増幅率を算出した。

[図27]実施例B-8において、TPO又はM-CSFがヒトpT/NK細胞の生成を促進する濃度を検討した結果。hCB-HSPCをOP9/DLL1フィーダー細胞上でrhIL-7、rhFlt3-L及びrhSCFを各5 ng/ml存在下に培養する系に、0～50 ng/mlの濃度でTPO又はM-CSFを添加し、HSPC1個あたりのpT/NK細胞の細胞数を調べた。

[図28]実施例B-9において、TPO又はM-CSFを添加して増幅したヒトpT/NK細胞のNK細胞への分化能を評価した結果。

[図29]実施例B-10において、TPOがヒト骨髄由来HSPC（hBM-HSPC）からpT/NK細胞への誘導に対しても有効かどうかを検討した結果。上段は培養プロトコールの概略。中段は、hBM-HSPCから生成増幅させたpT/NK細胞、及びこのpT/NK細胞から誘導したNK細胞のFCM解析。下段は、この培養系を用いて５週間増幅したpT/NK細胞から誘導したNK細胞数をTPOの有無で比較した結果である。

[図30A]実施例B-11において、hBM-HSPCから誘導したpT/NK由来NK細胞のNK細胞関連受容体の発現量をFCM解析によって評価した結果（１パラメータヒストグラム）。

[図30B]hCB-HSPCより誘導したヒトT/NK前駆細胞由来のNK細胞（pT/NK-NK細胞）、ヒトCB-NK細胞及びヒトPB-NK細胞で、活性化受容体、抑制性受容体及び疲弊化マーカーの発現を比較した結果である。

[図30C]hCB-HSPCより誘導したヒトpT/NK-NK細胞、ヒトCB-NK細胞及びヒトPB-NK細胞で遺伝子発現を比較したRNA-seqデータである。

[図31]実施例B-12において、hBM-HSPCから誘導したpT/NK細胞由来NK細胞のK562細胞に対する細胞傷害活性を評価した結果。NK細胞とK562細胞を種々のE:T比で混合して培養後、K562細胞の死細胞割合をFCM解析した。

[図32]pT/NK細胞の特異的マーカーの同定（実施例B-13）。（A）pT/NK細胞におけるCD122（IL-2 receptor βサブユニット）の発現をFCM解析により評価した。（B）C

D122陽性細胞の増殖能を評価するために行ったCFSEアッセイ。（C）CD122陽性細胞のT細胞とNK細胞への分化能の評価。

[図33]実施例C-1で構築した、ヒトpT/NK細胞由来の抗CD19 CAR-NK細胞及び抗HER2 CAR-NK細胞の作製に使用したレトロウイルスベクターのCAR配列の模式図。

[図34]ヒトpT/NK細胞由来NK細胞からの抗CD19 CAR-NK細胞及び抗HER2 CAR-NK細胞の生成（実施例C-2）。（A）図３３に示したベクターを用いてヒトpT/NK細胞由来NK細胞に各CAR遺伝子を導入し、GFPが陽性のCAR-NK細胞をセルソーターにより単離したのち、aAPCと共培養することによって、さらに増幅させた。培養後、GFPの発現をFCM解析し、導入遺伝子の安定的な発現を確認した。（B）抗CD19 CAR-NK細胞あるいは抗HER2 CAR-NK細胞の抗原特異的な細胞傷害活性。各標的細胞と種々のE:T比で混合し共培養した後、FCM解析によって標的細胞の死細胞割合を測定した。

[図35]ヒトpT/NK細胞へのCAR遺伝子の導入（実施例C-3）。図３３に示したベクターを用いてヒトpT/NK細胞に抗CD19 CAR遺伝子もしくは抗HER2 CAR遺伝子を導入し、GFP発現を指標として各CAR遺伝子を発現するpT/NK細胞を単離、増幅させた。増幅後のpT/NK細胞において、導入遺伝子が安定して発現することが確認された。

[図36]CAR遺伝子を導入したヒトｐT/NK細胞からCAR-NK細胞への分化誘導（実施例C-4）。（A）CAR遺伝子を導入したpT/NK細胞からCAR-NK細胞の作製スキーム。（B）得られたCAR-NK細胞をaAPC及びIL-2の存在下で培養して増幅した。増幅後のCAR-pT/NK細胞由来CAR-NK細胞をFCM解析し、導入遺伝子を安定して発現するCAR-NK細胞の作製を確認した。（C）CAR-NK細胞はCAR遺伝子を導入したヒトpT/NK細胞あたり1 x 10^4個程度産生された。

[図37]CAR遺伝子を導入したpT/NK細胞由来CAR-NK細胞の標的細胞に対する細胞傷害活性の評価（実施例C-5）。

[図38]pT/NK細胞由来抗HER2 CAR-NK細胞（pT/NK-CAR-NK）、CB-NK由来抗HER2 CAR-NK細胞（CB-CAR-NK）、PB-NK由来抗HER2 CAR-NK細胞（PB-CAR-NK）の代

表的なNK細胞関連受容体のFCM解析を実施した（実施例C-6）。

[図39]CAR遺伝子を導入したpT/NK細胞由来抗HER2 CAR-NK細胞、CB-NK由来抗HER2 CAR-NK細胞、PB-NK由来抗HER2 CAR-NK細胞の細胞傷害活性（実施例C-7）。

[図40A]実施例C-8におけるCAR遺伝子を導入したヒトpT/NK細胞由来CAR-NK細胞のin vivo抗腫瘍活性評価のプロトコールの概略。

[図40B]CAR-NK細胞を投与した担がんマウスにおける腫瘍の増殖を生体発光イメージングにより測定した。

[図40C]上段は、CAR-NK細胞を投与した担がんマウスにおける腫瘍の増殖の経時変化。下段は、各マウス群の体重の変化。

発明を実施するための形態

[0019] 本発明において、「免疫細胞療法」とは、免疫細胞が有する生体防御機能を活用して疾患の原因となる細胞や組織を減少させ、又は、除去する事で疾患を治療する方法を意味する。代表的な免疫細胞療法としては、腫瘍組織に含まれる細胞に特異的に発現する抗原を特異的に認識するCARを発現させた免疫細胞により、当該抗原を発現する細胞を減少させ、又は、除去する事で腫瘍を治療するCAR免疫細胞療法が挙げられるが、例えば自己免疫疾患の治療のためにB細胞特異的抗原を標的とした免疫療法、細菌やウイルス感染症を治療するために、当該細菌やウイルスに特異的な抗原を標的とした免疫細胞により、細菌やウイルス感染した細胞を減少させ、又は除去する免疫細胞療法なども含まれる。「標的抗原を発現する細胞に起因する疾患」には、このような様々な疾患が含まれ、代表的なものは、腫瘍、自己免疫疾患、細菌感染症、ウイルス感染症などが挙げられる。「標的抗原を発現する細胞」という語には、その細胞が本来有する核やミトコンドリアのゲノムから標的抗原を発現している態様だけではなく、その細胞に感染した細菌やウイルスが当該細胞内で標的抗原を発現している態様も包含される。

[0020] 本発明において、外因性受容体という語は、T細胞受容体（TCR）、キメラ抗原受容体（CAR）、又はキメラ自己抗体受容体（CAAR）を意味する。本明細

書では、「TCR、CAR又はCAARを「TCR/CAR/CAAR」と表記することがある。「外因性受容体を発現する細胞」という語には、TCR/CAR/CAAR発現細胞（細胞は例えば多能性血液前駆細胞、以下同じ）、TCR/CAR発現細胞、TCR/CAAR発現細胞、CAR/CAAR発現細胞、TCR発現細胞、CAR発現細胞、及びCAAR発現細胞が包含される。

また、本発明において、抗原特異的受容体という語は、TCR又はCARを意味する。本明細書では、「TCR又はCAR」を「TCR/CAR」と表記することがある。「抗原特異的受容体を発現する細胞」という語には、TCR/CAR発現細胞、TCR発現細胞、及びCAR発現細胞が包含される。本明細書中に用いられる「腫瘍抗原を特異的に認識するTCR若しくはCAR」、それを利用した腫瘍の治療」などの表現は、本発明のTCR/CAR発現細胞の利用形態の一つの態様を記載したものであって、腫瘍以外の細胞に発現する抗原を標的としたTCR/CAR発現細胞は当該抗原を発現した細胞を減少させるか又は除去することで治療される疾患（たとえば、自己免疫疾患、細菌感染症など）の治療に利用できるため、前記の記載が含まれる発明であっても腫瘍以外の疾患に適用可能である。

また、本発明において、キメラ受容体という語は、CAR又はCAARを意味する。本明細書では、「CAR又はCAAR」を「CAR/CAAR」と表記することがある。「キメラ受容体を発現する細胞」という語には、CAR/CAAR発現細胞、CAR発現細胞、及びCAAR発現細胞が包含される。

[0021] TCRは、この分野で周知の通り、T細胞が抗原を認識する際に使用する、T細胞表面に存在する受容体であり、αβ鎖又はγδ鎖の二量体で構成される。多くのT細胞がαβ鎖の二量体で構成されるTCR（αβTCR）を持つαβ T細胞であり、本発明において免疫細胞に発現させるTCRとしては、通常はαβTCRを利用する。

[0022] CARは、この分野で周知の通り、抗原を特異的に認識する抗体由来の抗原認識部と、CD8、CD28等の細胞表面分子に由来する膜貫通ドメインと、CD28、4-IBB、OX40、2B4等の共刺激性受容体分子の細胞内シグナル伝達ドメインに由来する１つ又は複数の共刺激ドメインと、CD3ζ分子の細胞内シグナル伝達ド

メインに由来する活性化ドメインとを連結して人工的に作製された、抗原を特異的に認識できる受容体である。抗原認識部としては、所望の抗原を特異的に認識する抗体の重鎖可変領域（VH）および軽鎖可変領域（VL）を適当なリンカーで連結した構造の短鎖可変領域フラグメント（scFv）を好ましく用いることができる。標的抗原は腫瘍抗原に限定されず、特定の細胞を減少させ、又は除去することで治療効果が期待される細胞に特徴的又は特異的に発現する抗原であれば、さまざまな抗原を採用することができる。例えば、CD19のようなB細胞に特異的に発現する抗原に対するCARは、血液がんのみならず、自己免疫疾患の治療にも有用である。共刺激ドメインは、CARを発現させる免疫細胞の種類に応じて好適なものを適宜選択することも可能であり、例えば非特許文献１には、NK細胞に発現させるCARの共刺激ドメインとして2B4由来のドメインを利用できることが報告されている。

[0023] CARと類似したキメラ受容体として、CAAR（Chimeric Auto-Antibody Receptor）が周知である（WO2022/196719、WO2016/07006、Ellebrecht et al, Science, 08 Jul 2016: Vol. 353, Issue 6295, pp. 179-184、などを参照）。CAARは、CARにおける抗原認識部が自己抗原に由来する抗原由来部である点で異なるが、それ以外の分子構成はCARと同様である。抗原由来部は、通常自己免疫疾患の原因である自己抗原の一部または全部のアミノ酸配列を含むオリゴペプチド又はポリペプチドにより構成される。CAARを発現させた免疫細胞は、自己抗原を認識する病原性B細胞表面のB細胞受容体（BCR）に結合し、自己免疫疾患の原因となる病原性B細胞が減少する事によって自己免疫疾患の治療効果を示すことが報告されている。このような自己免疫疾患と自己抗原の例としては、尋常性天疱瘡におけるDSG3、重症性筋無力症におけるニコチン性アセチルコリン受容体αサブユニットなどが知られている。

[0024] 本発明において、「Notchリガンド共存下での培養」とは、Notchリガンドと培養対象細胞が接触可能な条件で培養することにより、当該細胞のNotchシグナルを刺激し亢進することができる培養条件を意味する。用いるNotchリガンドの形態としては、Notchリガンドタンパク質を組み換えタンパク質として

採用してもよく、当該タンパク質を発現した細胞（たとえばフィーダー細胞）として採用してもよく、Notchリガンドタンパク質を含む当該細胞の培養物（たとえば、培養上清、細胞破砕物など）を採用してもよい。好ましく使用できるNotchリガンドとしては、Delta-like 1（DLL1、ヒト遺伝子はGene ID: 28514、NCBI Reference Sequence: NM_005618.4、配列番号１９、２０）、Delta-like 4（DLL4、ヒト遺伝子はGene ID: 54567、NCBI Reference Sequence: NM_019074.4、配列番号２１、２２）等のDelta-likeリガンドを挙げることができる。なお、本願でNotchリガンドとして利用可能なDLL1及びDLL4のアミノ酸配列は配列番号２０及び２２に示した配列に限定されず、これらの配列と９０％以上、例えば９５％以上、又は９８％以上の同一性を有するアミノ酸配列のタンパク質もDLL1及びDLL4として利用可能である。Notchリガンド共存下で上記細胞集団を培養する方法としては、例えば、Notchリガンドを発現するフィーダー細胞上で対象細胞を培養する方法、Notchリガンドタンパク質（少なくとも細胞外領域を含むその断片でもよい）、又はNotchリガンドを発現するフィーダー細胞の培養物で内表面を被覆した培養容器（プレート、シャーレ等）内で上記細胞集団を培養する方法が挙げられる。Notchリガンドを発現するフィーダー細胞は様々なものが知られており、細胞バンク等から容易に入手できる。具体例として、Notchリガンドを強制発現させたOP9細胞（OP9/DLL1細胞等）、Tst-4細胞（Tst-4/DLL1細胞等）、S17細胞（S17/DLL1細胞等）、及びMS-5細胞（MS-5/DLL1細胞等）等が挙げられる。

[0025] 本発明において「Notchリガンド非共存下の培養」とは、実質的にNotchリガンドを含まない培養系における培養を意味する。実質的にNotchリガンドを発現しないフィーダー細胞との共培養は、Notchリガンド非共存下の培養に該当する。本発明における「Notchリガンド非共存下の培養」では、実質的にNotchリガンドを発現しないフィーダー細胞を使用してもよいが、基本的には使用する必要はない。

[0026] ヒトのT/NK前駆細胞、未成熟NK細胞、及び成熟NK細胞は、それぞれ以下のマーカー発現パターンにより定義づけられる細胞であることが知られている

。未成熟NK細胞は臍帯血から分離されたNK細胞（臍帯血NK細胞）の表現型と類似していること、成熟NK細胞は末梢血から分離されたNK細胞（末梢血NK細胞）の表現型を表していることが知られている。

ヒトT/NK前駆細胞：CD3陰性、CD4陰性、CD8陰性、CD56陰性、CD161陰性、かつCD7陽性（$CD3^-$ $CD4^-$ $CD8^-$ $CD56^-$ $CD161^-$ $CD7^+$）

ヒト未成熟NK細胞：CD3陰性、CD4陰性、CD8陰性、CD56陽性、CD161陽性、CD16陰性、かつKIR陰性（$CD3^-$ $CD4^-$ $CD8^-$ $CD56^+$ $CD161^+$ $CD16^-$ KIR^-）

ヒト成熟NK細胞：CD3陰性、CD4陰性、CD8陰性、CD56陽性、CD161陽性、CD16陽性、かつKIR陽性（$CD3^-$ $CD4^-$ $CD8^-$ $CD56^+$ $CD161^+$ $CD16^+$ KIR^+）

[0027] CD16及びKIR（killer cell immunoglobulin-like receptor）はヒトNK細胞の成熟度の指標となる成熟マーカーとして知られる。NK細胞は、成熟が進むに従い、CD16及びKIRの発現量が増大する。CD16及びKIRの発現が陽性のNK細胞のうち、これらマーカーの発現量が低いほど、より幼若であると評価される。

[0028] 本発明が提供する発明のうちの一つである培養ヒトT/NK前駆細胞は、生体から分離され培養された、又は多能性血液前駆細胞等の多能性細胞からin vitroで分化誘導され培養された、ヒトT/NK前駆細胞であり、CD122陽性であることを特徴とする。CD122がヒトT/NK前駆細胞の特異的マーカーとなることは、下記実施例において本願発明者らが初めて見出したことである。本発明の培養ヒトT/NK前駆細胞は、さらに、CD3陰性、CD4陰性、CD8陰性、CD56陰性、CD161陰性及びCD7陽性からなる群から選択される１、２、３、４、５又は６個の表面抗原発現条件を満たす細胞であり得る。１つの態様において、本発明の培養ヒトT/NK前駆細胞は、CD122陽性、かつCD3陰性である。別の態様において、本発明の培養ヒトT/NK前駆細胞は、CD122陽性、CD3陰性、かつCD4陰性である。さらに別の態様において、本発明の培養ヒトT/NK前駆細胞は、CD122陽性、CD3陰性、CD4陰性、かつCD8陰性である。さらに別の態様において、本発明の培養ヒトT/NK前駆細胞は、CD122陽性、CD3陰性、CD4陰性、CD8陰性、かつCD56陰性である。さらに別の態様において、本発明の培養ヒトT/NK前

駆細胞は、CD122陽性、CD3陰性、CD4陰性、CD8陰性、CD56陰性、かつCD161陰性である。さらに別の態様において、本発明の培養ヒトT/NK前駆細胞は、CD122陽性、CD3陰性、CD4陰性、CD8陰性、CD56陰性、CD161陰性、かつCD7陽性である。これらの表面抗原マーカーの発現は、各表面抗原マーカーに対する抗体を用いたフローサイトメーター、各表面抗原マーカーの発現を検出するプライマー・プローブを用いたリアルタイムPCRなどの周知の手法により調べることができる。

[0029] I. 外因性受容体を発現する免疫細胞の生産方法

本発明による、TCR、CAR又はCAARである外因性受容体を発現する免疫細胞の生産方法には、外因性受容体遺伝子の導入ステップの違いにより２つの態様がある。

[0030] 態様Ａは、多能性血液前駆細胞に外因性受容体遺伝子を導入してから免疫細胞に分化誘導することにより、TCR/CAR/CAAR発現免疫細胞を生産する方法であり、造血幹細胞を含む細胞集団より、多能性血液前駆細胞を調製する工程；前記外因性受容体をコードする遺伝子を多能性血液前駆細胞に導入することにより、前記外因性受容体を発現する多能性血液前駆細胞を調製する工程；及び前記外因性受容体を発現する多能性血液前駆細胞を免疫細胞に分化誘導する工程を含む。

[0031] 態様Ｂは、多能性血液前駆細胞を免疫細胞に分化誘導してから外因性受容体遺伝子を導入することにより、TCR/CAR/CAAR発現免疫細胞を生産する方法であり、造血幹細胞を含む細胞集団より、多能性血液前駆細胞を調製する工程；多能性血液前駆細胞を免疫細胞に分化誘導する工程；及び前記外因性受容体をコードする遺伝子を免疫細胞に導入する工程を含む。

[0032] 免疫細胞には、T細胞、NK細胞、マクロファージ、及びB細胞が包含される。

[0033] 外因性受容体がTCRである場合、NK細胞、マクロファージ及びB細胞ではTCRだけ導入しても機能しないため、多能性血液前駆細胞をT細胞に分化誘導することが好ましい。もっとも、TCRと複合体を形成してTCRシグナルを細胞内に

伝達するCD3をTCRとともにNK細胞に導入することにより、TCRによる抗原特異的なシグナル伝達を誘導するシステムが開発されており（Mensali et al., eBioMed. 40. 106-117 (2019)）、この技術を用いれば、NK細胞、マクロファージ及びB細胞でもTCRを機能させることができる。従って、本発明には、TCRを発現するNK細胞、マクロファージ又はB細胞の作製も包含され、この場合はTCR遺伝子と組み合わせてCD3遺伝子も細胞に導入する。

[0034] 外因性受容体がCARである場合、CARはNK細胞、マクロファージ及びB細胞など様々な免疫細胞で機能できるので、上記した種々の免疫細胞に好ましく分化誘導できる。

[0035] CAARはCARを応用したキメラ受容体であり、CARと同様にCAARもNK細胞、マクロファージ及びB細胞など様々な免疫細胞で機能できるといえるので、外因性受容体がCAARである場合も上記した種々の免疫細胞に好ましく分化誘導できる。

[0036] I-1. 多能性血液前駆細胞の調製（態様Ａ、態様Ｂ）

多能性血液前駆細胞とは、造血幹細胞よりも分化の方向性が制限されているが、複数の細胞系列に分化可能な多能性を有しており、かつ自己複製能を有する細胞である。本発明では、多能性血液前駆細胞として人工白血球幹細胞（iLS）又はT/NK前駆細胞を好ましく用いることができる。

[0037] 造血幹細胞を含む細胞集団は、臍帯血、骨髄液、又は末梢血から得ることができ、通常、造血幹細胞及び造血前駆細胞を含む。ヒト造血幹細胞は、CD34陽性、CD59陽性、CD90/Thy1陽性、CD38弱陽性又は陰性、c-Kit陰性又は弱陽性、かつLineageマーカー陰性（$CD34^+$ $CD59^+$ $CD90/Thy1^+$ $CD38^{low/-}$ $c\text{-}Kit^{-/low}$ Lin^-）として決定される。例えば、CD34＋細胞をセルソーティング又は磁気ビーズにより分離回収することにより、造血幹細胞を含む細胞集団（造血幹細胞が概ね３％以上、例えば７％以上を占める細胞集団）を得ることができる。

[0038] 後述するように、本発明により生産したTCR/CAR/CAAR発現免疫細胞を腫瘍や自己免疫疾患の治療に用いる場合には、一般に患者自身には由来しない臍帯血の他、患者から採取した骨髄液又は末梢血より造血幹細胞を含む細胞集

団を得て、患者自身の細胞に由来する多能性血液前駆細胞を調製することも可能である。

[0039] 多能性血液前駆細胞がiLS細胞の場合、その調製方法は非特許文献２、３及び特許文献１に記載されるように公知であり、造血幹細胞を含む細胞集団を、細胞内の転写因子E2A（別名transcription factor 3（TCF3））の機能を阻害した状態で、B細胞への分化を誘導する条件下で培養することにより、iLS細胞を調製することができる。

[0040] E2Aの機能を阻害する方法としては、例えば、E2Aと結合してE2Aが標的遺伝子に作用するのを抑制する因子を増強する方法、E2Aの機能ドメインを不活性化したドミナントネガティブ変異体を導入する方法、E2Aの制御下にあるか若しくはE2Aと協働的に機能する他の転写因子の発現または活性を阻害する方法等が挙げられるが、分化抑制因子Id（Inhibitor of DNA binding）を造血幹細胞内で強制発現させる方法が好ましい。Idタンパク質はE2A等のEタンパク質をドミナントネガティブに阻害することが知られており（Norton, J.D. et al., Trends Cell Biol. 8, 58-65 (1998); 及びSayegh, C.E. et al., Nat. Immunol. 4, 586-593 (2003)）、Idタンパク質を造血幹細胞内で強制発現させることにより、E2Aと結合してE2Aが標的遺伝子に作用するのを抑制することができる。

[0041] Id因子は、哺乳動物において４種類存在するId1～Id4のうちのいずれを用いてもよい。Id1～Id4の遺伝子配列情報はGenBank等のデータベースに登録されており、容易に入手できる。例えば、ヒトId1遺伝子の配列情報はNM_002165（transcript variant 1）及びNM_181353（transcript variant 2）、ヒトId2遺伝子の配列情報はNM_002166、ヒトId3遺伝子の配列情報はNM_002167、ヒトId4遺伝子の配列情報はNM_001546のアクセション番号でGenBankに登録されている。これらのうち、下記実施例で利用したNM_002167のヒトId3遺伝子及びタンパク質の配列を配列表の配列番号５、６にそれぞれ示す。これらの公知の配列情報に基づいて適当なプライマーを設計し、Idを発現する細胞や組織から抽出したRNAを鋳型としてRT-PCRを行い、IdをコードするDNAを増幅す

ることができる。得られたDNAを、哺乳動物細胞内で恒常的に強いプロモーター活性を発揮する適当なプロモーター（CMVプロモーター、SV40プロモーター、LTRプロモーター等）の制御下で適当な発現ベクターに組み込み、造血幹細胞を含む細胞集団に導入することにより、Idタンパク質を造血幹細胞内で強制発現させることができる。発現ベクターとしては、レトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、レンチウイルスベクター等の動物ウイルスベクターを好ましく利用できるが、哺乳動物細胞用のプラスミドベクターも利用可能である。細胞内でのId因子の発現を持続させるため、IdをコードするDNAは、造血幹細胞の染色体に組み込まれるように導入することが好ましく、導入遺伝子を染色体に組み込むことができるレトロウイルスベクターやレンチウイルスベクターを好ましく用いることができる。IdをコードするDNAを搭載させたこれらのウイルスベクターをスピンインフェクション法などにより細胞に感染させることで、ランダムインテグレーションによりIdをコードするDNAを染色体に組み込むことができる。もっとも、持続発現型センダイウイルスベクター（例、J. Biol. Chem. 282, 27383-27391, 2007）のように染色体外で安定に存在できるウイルスベクターを用いて導入することも可能である。

[0042] Id因子の強制発現によるE2A阻害の態様としては、細胞内で恒常的にE2Aを阻害する恒常的E2A阻害と、一定の条件下でのみE2Aを阻害するコントロールされたE2A阻害が挙げられる。後の工程で、TCR遺伝子又はCAR遺伝子を導入後の多能性血液前駆細胞をB細胞に分化誘導する場合には、E2A阻害を解除できるよう、コントロールされたE2A阻害を行うことが好ましい。B細胞以外の免疫細胞に分化誘導する場合は、恒常的E2A阻害でもよいが、コントロールされたE2A阻害も好ましく利用できる。

[0043] 恒常的E2A阻害は、哺乳動物細胞内で恒常的に強いプロモーター活性を発揮する適当なプロモーターの制御下でId因子をコードするDNAを発現させればよい。

[0044] コントロールされたE2A阻害の方法としては、下記実施例で行われている、

ヒトエストロゲンレセプターのリガンド結合ドメインを利用した、4-ヒドロキシタモキシフェン（4-OHT）によりE2A阻害をコントロールするシステムが挙げられる。このシステムでは、Id因子をコードするDNAの下流にヒトエストロゲンレセプター（hER）のリガンド結合ドメイン配列を連結したID-ER遺伝子を細胞に導入し、Id因子のC末側にhERリガンド結合ドメインが融合したID-ERタンパク質を細胞内で発現させる。4-OHT非存在下では、発現したID-ERタンパク質が細胞質内にとどまるが、4-OHT存在下では、ID-ERタンパク質が核内に移行し、転写因子E2Aを阻害する（非特許文献３）。従って、培地に4-OHTを添加してiLS細胞を培養すれば、iLS細胞を分化させずに維持できる。免疫細胞に分化誘導する際には、4-OHTを培地に添加する必要はないので、4-OHT非添加の培地で分化誘導を行えばよい。

[0045] hERリガンド結合ドメインの配列としては、配列番号１に示す塩基配列中の370～1311位の配列を好ましく用いることができる。この配列は、GenBank Accession No. NM_000125のhERアイソフォーム１（配列番号７）のリガンド結合ドメイン配列（配列番号７の1078～2019位；当該942塩基の領域の配列を配列番号９に示す）に数箇所の塩基置換を加えたhERリガンド結合ドメイン変異型（ERT2）の配列である。配列番号１は、ID-ER遺伝子の好ましい一例である、ヒトID3遺伝子cDNA全長にERT2配列を融合させたID3-ERT2遺伝子の塩基配列である。もっとも、ID-ER遺伝子に利用するhERリガンド結合ドメインをコードする配列はこの変異型配列に限定されず、配列番号９に示したhERアイソフォーム１のリガンド結合ドメインの塩基配列において、１０個以下の塩基が置換又は付加された配列を、hERリガンド結合ドメイン配列として利用可能である。Id因子をコードするDNAの3’末端に適宜スペーサー配列を介してhERリガンド結合ドメイン配列を連結した構造のDNAを、ID-ER遺伝子として用いることができる。

[0046] ID遺伝子（Id因子をコードするDNA）、又はID-ER遺伝子には、遺伝子導入のマーカーとなる任意のタンパク質をコードするDNAを連結してよい。遺伝子導入処理後の造血幹細胞を含む細胞集団より、マーカータンパク質を発現す

る細胞をセルソーターにより分離回収することにより、ID遺伝子又はID-ER遺伝子が導入されてId因子を発現している造血幹細胞を取得できる。

[0047] Id因子の発現等によりE2Aが阻害された造血幹細胞を取得した後、該細胞を、B細胞への分化を誘導する条件下で培養する。コントロールされたE2A阻害を行った場合には、E2A阻害条件で（ヒトエストロゲンレセプターのリガンド結合ドメインを利用したシステムの場合には、4-OHTの共存下で）、B細胞への分化誘導培養を行う。

[0048] B細胞への分化を誘導する条件下での培養とは、B細胞への分化支持能を有するフィーダー細胞上での培養であり、培地には適当量のサイトカインを添加する。B細胞への分化支持能を有するフィーダー細胞としては、OP9細胞、TSt-4細胞、S17細胞、MS-5細胞等が挙げられる。上記サイトカインとしては、例えば、IL-7、Flt3-L、SCF等をそれぞれ0.1～20 ng/mL程度の濃度で用いることができる。

[0049] 多能性血液前駆細胞がT/NK前駆細胞（pT/NK細胞）の場合、その調製方法は非特許文献２、４、５に記載されるように公知であり、CD34陽性の造血幹細胞を含む細胞集団を、Notchシグナルの共存下で適当量のサイトカインを添加し培養することにより、T細胞およびNK細胞への分化能と自己複製能を有するpT/NK細胞を生成することができる。サイトカインとしては、SCF, IL-7及びFlt3-Lを好ましく用いることができる。マウス細胞の場合は、SCF, IL-7及びFlt3-Lをそれぞれ10～50ng/mlの濃度、特に25～50ng/mlの高濃度で培地に添加し、Notchシグナル共存下で培養することにより、pT/NK細胞が旺盛に増幅する。一方、ヒト造血幹細胞からpT/NK細胞を大量生産する場合は、SCF, IL-7及びFlt3-Lを上記よりも低濃度で用いることが好ましい。具体的には、下記実施例のA-2-10、B-1及びB-2等に示したように、同じサイトカインをそれぞれ1 ng/mL以上10 ng/ml未満の低濃度で培地に添加し、Notchシグナル共存下で培養することにより、pT/NK細胞を大量に増幅することができる。また、ヒト細胞の場合は、培地にさらにTPOもしくはM-CSFを加えることにより、さらに数倍ものpT/NK細胞の増幅が可能となる（実施例のB-8～B-10等参照）。ヒ

ト造血幹細胞からのpT/NK細胞の製造については、「II．ヒトT／NK前駆細胞の製造方法」において詳述する。

[0050] CD34陽性の造血幹細胞を含む細胞集団をNotchリガンドの共存下で培養することにより、造血幹細胞のNotchシグナルを刺激し亢進することができる。Notchリガンド共存下での培養という語の定義、使用するNotchリガンドの形態、好ましく使用できるNotchリガンド、Notchリガンド共存下での培養方法については上述の通りである。

[0051] 前記方法に用いられるヒト造血幹細胞は、事前に増幅操作が施されていてもよい。このような増幅培養の方法としては例えば、造血幹細胞を含む細胞集団を、SCF、TPO及びG-CSFをそれぞれ100 ng/mL以上の高濃度で含む培地で、Notchリガンド非共存下で培養する方法が例示される。造血幹細胞を上記した高濃度のサイトカインの存在下、Notchリガンド非共存下で培養することで、CD34陽性の造血幹細胞が増幅する。このような増幅培養は、本発明において造血幹細胞を含む細胞集団を使用する方法の全てに適用することができる。すなわち、本発明において使用する、造血幹細胞を含む細胞集団は、上記の増幅培養によりCD34陽性の造血幹細胞を増幅した後の細胞集団であってもよい。

[0052] I-2．多能性血液前駆細胞への外因性受容体遺伝子の導入（態様Ａ）

態様Ａでは、iLS細胞やpT/NK細胞等の多能性血液前駆細胞に、外因性受容体をコードする遺伝子（TCR遺伝子、CAR遺伝子又はCAAR遺伝子）を導入し、該受容体を発現する多能性血液前駆細胞を調製する。所望により、外因性受容体遺伝子に加えて、他の遺伝子（例えばCD3遺伝子）を多能性血液前駆細胞に導入してもよい。

[0053] 外因性受容体が抗原特異的受容体の場合、ターゲットとする抗原は、TCR/CARを発現する多能性血液前駆細胞ないし免疫細胞の用途に応じて選択できる。これら細胞を腫瘍の治療に用いる場合には、腫瘍抗原を選択する。腫瘍抗原の具体例としては、GD2（細胞表面の糖脂質であり、神経芽腫で特異的に発現）、WT1（Wilms腫瘍遺伝子であり、白血病や種々の固形がんで発現）、サ

バイビン（アポトーシス阻害分子（inhibitor of apoptosis; IAP）ファミリーに属し、多くの固形がん及び血液がんで発現）、MAGE-A3及びMAGE-A4（メラノーマ、食道がん、非小細胞肺がん、頭頸部がん、膀胱がんなど多くの癌種において発現）、チロシナーゼ（メラノーマ抗原）、gp100（メラノーマ抗原）、CEA（大腸がんで発現）、Melan-A（メラノーマ抗原）、TRP-2（メラノーマ抗原）、CDK4（cyclin-dependent kinase 4, メラノーマで発現）、NY-ESO-1（滑膜細胞肉腫で高頻度に発現し、その他の腫瘍でも発現）、HER2（乳がん、卵巣がんなどで発現）、MUC-1（乳がん、肺がん、膵臓がん、大腸がんなど多くのがんに高発現）、p53（様々ながん種で発現）などを挙げることができる。

[0054] いずれの腫瘍抗原も、遺伝子配列、アミノ酸配列等の配列情報が公知であり、腫瘍抗原を特異的に認識する抗体が公知であるか、常法により作出可能である。腫瘍抗原を特異的に認識する抗体の可変領域配列を利用して、CAR遺伝子を設計、作製することができる。なお、抗原の種類によらず、ヒト由来の細胞でCARを発現させる場合には、CARの細胞内ドメイン（共刺激ドメイン及び活性化ドメイン）にはヒトタンパク質由来のドメインを利用することが好ましい。

[0055] 所望の抗原を認識するTCR遺伝子は、抗原特異的キラーT細胞クローンから得ることができる。所望の抗原タンパク質、又はそのCTLエピトープペプチドを樹状細胞等の抗原提示細胞に取り込ませて、CTLエピトープペプチドを細胞表面に提示した抗原提示細胞を調製し、この抗原提示細胞をT細胞と共存培養することにより両者を接触させることで、所望の抗原に特異的なキラーT細胞クローンを得ることができる。

[0056] また、所望の抗原を認識するTCR遺伝子を搭載した発現ベクターが既に公知である場合には、そのような発現ベクターからPCR増幅してTCR遺伝子を調製することができる。

[0057] 腫瘍抗原以外の抗原の例としては、ウイルス抗原や寄生虫抗原を挙げることができる。ウイルス抗原の具体例としては、肝炎ウイルス（HBV、HCV等）

、ヒトパピローマウイルス、ヒト免疫不全ウイルス等のウイルスの構成タンパク質が挙げられ、寄生虫抗原としては、マラリア原虫タンパク質等を挙げることができる。これらの抗原も遺伝子配列及びアミノ酸配列等の情報が公知であるので、上記と同様にして、これらの抗原を特異的に認識するTCRやCARの遺伝子を得ることができる。

[0058] 外因性受容体がCAARの場合、CAARを発現する多能性血液前駆細胞ないし免疫細胞は自己免疫疾患の治療に用いることができる。CAARの抗原由来部に利用する自己抗原は、自己免疫疾患の原因として知られている様々な自己抗原から選択できる。自己免疫疾患と自己抗原の代表例は上記した通りであるが、これ等に限定されない。例えば、尋常性天疱瘡の治療の場合にはDSG3に基づいて、重症性筋無力症の治療の場合にはニコチン性アセチルコリン受容体αサブユニットに基づいて、CAARの抗原由来部を設計することができる。

[0059] 外因性受容体遺伝子やCD3遺伝子への多能性血液前駆細胞への導入は、基本的には、ID遺伝子又はID-ER遺伝子の造血幹細胞への導入と同様の方法で行うことができる。ヒトpT/NK細胞への遺伝子導入においては、ウイルスベクターで遺伝子導入する際に、ウイルスのエンベロープとしてテナガザル白血病ウイルス（Gibbon-ape leukemia virus; GALV）のエンベロープを用いることにより、遺伝子導入の効率を高めることができる。具体的には、GALVエンベロープを有するTCR/CAR/CAAR遺伝子発現ウイルスを作製し、これをpT/NK細胞にスピンインフェクション法等により感染させればよい。本発明においては、例えば、配列番号１６又は２４に示すアミノ酸配列と９０％以上、例えば９５％以上、又は９８％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列のタンパク質をGAVLエンベロープとして用いることができる。配列番号２４に示すアミノ酸配列は、GenBankにAF055060.1で登録されているGALV SEATO strainのエンベロープ遺伝子（配列番号２３）にコードされるアミノ酸配列である。配列番号１６に示すアミノ酸配列は、GALVエンベロープの膜ドメイン及び細胞質ドメイン（配列番号２４に示すアミノ酸配列中の627-685番残基）をマウス白血病ウイルス（Mouse Leukemia virus; MuLV）エンベロープの膜ドメイン及

び細胞質ドメインに置き換えることでウイルス粒子へのGALVエンベロープタンパク質の挿入効率を高めたGALVエンベロープの合成遺伝子GALV-MTR（配列番号１５）（Caeser et al. Nat Commun. 2019 Oct 4;10(1)4543）にコードされるアミノ酸配列である。

[0060] 導入遺伝子に連結したマーカータンパク質を発現する細胞をセルソーターにより分離回収することにより、外因性受容体遺伝子が導入されて該受容体を発現している細胞を単離できる。単離した受容体発現細胞は、多能性を有する状態を維持しながら、適宜培地やフィーダー細胞を交換しながら培養し増幅させる。コントロールされたE2A阻害により作製したiLS細胞に外因性受容体遺伝子を導入する場合には、E2A阻害条件でiLS細胞を培養しながら遺伝子導入、単離及び増幅を行う。4-OHTによりE2A阻害をコントロールするシステムを利用した場合、4-OHTを含む培地を用いて受容体遺伝子導入、単離及び増幅を行なう。

[0061] I-3. 外因性受容体を発現する多能性前駆細胞の免疫細胞への分化誘導（態様Ａ）

態様Ａでは、増幅したTCR/CAR/CAAR発現多能性血液前駆細胞を、T細胞、NK細胞、マクロファージ、又はB細胞等の免疫細胞に分化誘導する。コントロールされたE2A阻害により作製したiLS細胞を用いた場合、このステップでは、E2A阻害条件を継続する必要はない。例えば、4-OHTによりE2A阻害をコントロールするシステムを利用した場合、分化誘導処理の開始時には4-OHTを含む培地を用いてもよいが、その後は4-OHTを含まない培地を用いて分化誘導処理を進めてよい。

[0062] 多能性血液前駆細胞がiLS細胞の場合は、T細胞、NK細胞、マクロファージ、及びB細胞等の様々な免疫細胞に分化誘導できる。一方、pT/NK細胞は、T細胞、NK細胞及びミエロイド細胞（マクロファージ等）への分化能を有するがB細胞への分化能は有しないため、多能性血液前駆細胞がpT/NK細胞の場合はT細胞、NK細胞又はマクロファージ、好ましくはNK細胞又はマクロファージ、特に好ましくはNK細胞に分化誘導する。

[0063] 一般に、TCR発現T細胞（TCR-T細胞）及びCAR発現T細胞（CAR-T細胞）を作製する場合にはiLS細胞が好ましく用いられ、CAR又はCAARを発現するNK細胞（CAR-NK細胞、CAAR-NK細胞）及びCAR又はCAARを発現するマクロファージ（CAR-マクロファージ、CAAR-マクロファージ）を作製する場合にはpT/NK細胞及びiLS細胞、特にpT/NK細胞が好ましく用いられる。

[0064] １つの態様において、TCR/CAR/CAAR発現多能性血液前駆細胞はTCR発現iLS細胞であり、T細胞に分化誘導してTCR-T細胞を取得する。

[0065] 別の態様において、TCR/CAR/CAAR発現多能性血液前駆細胞はCAR発現iLS細胞であり、T細胞、NK細胞、マクロファージ若しくはB細胞に分化誘導してCAR-T細胞、CAR-NK細胞、CAR-マクロファージ若しくはCAR発現B細胞（CAR-B細胞）を取得するか、又は、T細胞、NK細胞若しくはマクロファージに分化誘導してCAR-T細胞、CAR-NK細胞若しくはCAR-マクロファージを取得する。

さらに別の態様において、TCR/CAR/CAAR発現多能性血液前駆細胞はCAAR発現iLS細胞であり、T細胞、NK細胞、マクロファージ若しくはB細胞に分化誘導してCAAR-T細胞、CAAR-NK細胞、CAAR-マクロファージ若しくはCAAR-B細胞を取得するか、又は、T細胞、NK細胞若しくはマクロファージに分化誘導してCAAR-T細胞、CAAR-NK細胞若しくはCAAR-マクロファージを取得する。

[0066] さらに別の態様において、TCR/CAR/CAAR発現多能性血液前駆細胞はTCR/CAR/CAAR発現pT/NKであり、T細胞に分化誘導してTCR/CAR/CAAR-T細胞を取得する。

さらに別の態様において、TCR/CAR/CAAR発現多能性血液前駆細胞はCAR発現pT/NKであり、NK細胞に分化誘導してCAR-NK細胞を取得する。

さらに別の態様において、TCR/CAR/CAAR発現多能性血液前駆細胞はCAAR発現pT/NK細胞であり、NK細胞に分化誘導してCAAR-NK細胞を取得する。

さらに別の態様において、TCR/CAR/CAAR発現多能性血液前駆細胞はCAR発現pT/N細胞Kであり、マクロファージに分化誘導してCAR-マクロファージを取得する。

さらに別の態様において、TCR/CAR/CAAR発現多能性血液前駆細胞はCAAR発

現pT/NK細胞であり、マクロファージに分化誘導してCAAR-マクロファージを取得する。

[0067] さらに別の態様において、TCR/CAR/CAAR発現多能性血液前駆細胞はTCR発現iLS細胞であり、該細胞はさらにCD3を発現する。該細胞を、NK細胞、マクロファージ若しくはB細胞に分化誘導してTCR発現NK細胞、TCR発現マクロファージ若しくはTCR発現B細胞（いずれもCD3も発現している）を取得するか、又は、NK細胞若しくはマクロファージに分化誘導してTCR発現NK細胞若しくはTCR発現マクロファージ（いずれもCD3も発現している）を取得する。

[0068] さらに別の態様において、TCR/CAR/CAAR発現多能性血液前駆細胞はTCR発現pT/NK細胞であり、該細胞はさらにCD3を発現する。該細胞をNK細胞又はマクロファージに分化誘導して、TCR発現NK細胞又はTCR発現マクロファージを取得する。

[0069] TCR/CAR/CAAR発現多能性血液前駆細胞のT細胞への分化誘導

TCR、CAR又はCAARを発現する多能性血液前駆細胞のT細胞への分化誘導では、まず、Notchシグナルを刺激した状態、すなわちNotchリガンド共存下で、適当量のサイトカインを培地に添加して培養する。Notchシグナルを刺激する方法は上述の通りであり、Notchリガンドを発現するフィーダー細胞上で培養する方法（そのようなフィーダー細胞の具体例は上記した通り）、Notchリガンドタンパク質（少なくとも細胞外領域を含むその断片でもよい）で内表面を被覆した培養容器で培養する方法がある。上記サイトカインとしては、例えば、IL-7、Flt3-L等をそれぞれ0.1～10 ng/mL程度の濃度で用いることができる。適宜、培地交換と、フィーダー細胞を用いる場合にはフィーダー細胞の交換とを行いながら培養を続ける。誘導開始から３週間程度で、未熟なT細胞であるCD4/CD8ダブルポジティブ（DP）細胞が生成する。

[0070] DP細胞をTCR刺激することで、CD8陽性のキラーT細胞（細胞傷害性T細胞）へ分化誘導できる。DP細胞をTCR刺激する方法としては、抗CD3抗体及び抗CD28抗体でDP細胞を処理する方法や、外因性受容体が抗原特異的受容体の場合には、導入した抗原特異的受容体が認識する抗原を提示した抗原提示細胞（樹

状細胞など）とDP細胞を共培養する方法が挙げられる。導入した外因性受容体が、4-IBB由来の副刺激受容体分子細胞内シグナル伝達ドメインを用いたCAR又はCAARである場合には、抗CD3抗体及び抗4-IBB抗体でDP細胞を処理する方法も利用できる。適当なサイトカイン（IL-7、IL-15、IL-2等）を含む培地中で、上記いずれかの方法によりDP細胞をTCR刺激することにより、CD8陽性CAR-T細胞又はCD8陽性CAAR-T細胞を生成し増幅することができる。

[0071] TCR/CAR/CAAR発現多能性血液前駆細胞のNK細胞への分化誘導

CAR又はCAARを発現する多能性血液前駆細胞のNK細胞への分化誘導は、多能性血液前駆細胞が有する分化能の広さに応じて方法が異なる。

CAR又はCAARを発現するiLS細胞の場合は、適当なサイトカイン（例えば、IL-15及びIL-2）を含む培地で、B細胞への分化支持能を有するフィーダー細胞上で、又はフィーダーフリーの条件下で培養することにより、CAR/CAAR-NK細胞を生成できる。

CAR又はCAARを発現するpT/NK細胞の場合は、適当なサイトカイン（例えば、IL-7, Flt3-L, SCF、IL-15）を含む培地で培養することにより、CAR/CAAR-NK細胞を生成できる。この培養では、Notchリガンドは存在していても、存在していなくてもよい。好ましくはNotchリガンド非共存下の培養である。

[0072] TCR及びCD3を発現する多能性血液前駆細胞のNK細胞への分化誘導も、CAR又はCAARを発現する多能性血液前駆細胞のNK細胞への分化誘導と同様にして実施できる。

[0073] 生成するCAR/TCR/CAAR-NK細胞は十分な増殖能を有しているが、所望により受容体刺激を行ってさらに増殖能を高めてもよい。膜結合型IL-21(memIL-21)及び4-1BBリガンド(41BBL)を発現するK562白血病細胞株とCAR/TCR-NK細胞を共培養する方法や、IL-12、IL-15、IL-18、IL-21及びIL-2等のサイトカインの存在下でCAR/TCR/CAAR-NK細胞を培養する方法などにより、CAR/TCR/CAAR-NK細胞を受容体刺激することができる。

[0074] TCR/CAR/CAAR発現多能性血液前駆細胞のマクロファージへの分化誘導

CAR又はCAARを発現する多能性血液前駆細胞をマクロファージに分化誘導す

る場合、適当なサイトカイン（例えば、SCF, M-CSF, IL-3及びIL-6）を含む培地でOP9細胞上で培養することにより、CAR又はCAARを発現するマクロファージ（CAR/CAAR-マクロファージ）を生成できる。

TCR及びCD3を発現する多能性血液前駆細胞のマクロファージへの分化誘導も、CAR又はCAARを発現する多能性血液前駆細胞のマクロファージへの分化誘導と同様にして実施できる。

[0075] 生成するCAR/TCR/CAAR-マクロファージは十分な増殖能を有しているが、所望により受容体刺激を行ってさらに増殖能を高めてもよい。M-CSF又はGM-CSFの存在下でCAR/TCR/CAAR-マクロファージを培養する方法などにより、CAR/TCR/CAAR-マクロファージを受容体刺激することができる。

[0076] TCR/CAR/CAAR発現多能性血液前駆細胞のB細胞への分化誘導

CAR又はCAARを発現する多能性血液前駆細胞のB細胞への分化誘導では、適当なサイトカイン（例えば、IL-7やSCF）を含む培地でOP9細胞上で培養することにより、CAR/CAAR-B細胞を生成できる。

TCR及びCD3を発現する多能性血液前駆細胞のB細胞への分化誘導も、CAR又はCAARを発現する多能性血液前駆細胞のB細胞への分化誘導と同様にして実施できる。

[0077] I-4. 多能性血液前駆細胞の免疫細胞への分化誘導（態様Ｂ）

態様Ｂでは、調製した多能性血液前駆細胞を免疫細胞に分化誘導する。この分化誘導は、基本的にはI-3.と同様の方法により実施できる。iLS細胞の場合はT細胞、NK細胞、マクロファージ、及びB細胞等の様々な免疫細胞に分化誘導できること、pT/NKの場合はT細胞、NK細胞又はマクロファージ、好ましくはNK細胞又はマクロファージ、特に好ましくはNK細胞に分化誘導すること、TCR発現T細胞（TCR-T細胞）、CAR発現T細胞（CAR-T細胞）及びCAAR発現T細胞（CAAR-T細胞）を作製する場合にはiLS細胞が好ましく用いられ、CAR又はCAARを発現するNK細胞（CAR-NK細胞、CAAR-NK細胞）及びCAR又はCAARを発現するマクロファージ（CAR-マクロファージ、CAAR-マクロファージ）を作製する場合にはpT/NK及びiLS細胞、特にpT/NK細胞が好ましく用いられることは、態

様Ｂにおいても同様である。

[0078] １つの態様において、多能性血液前駆細胞はiLS細胞であり、T細胞に分化誘導する。次の工程において、TCR遺伝子を導入する。

別の態様において、多能性血液前駆細胞はiLS細胞であり、T細胞、NK細胞、マクロファージ若しくはB細胞に分化誘導するか、又はT細胞、NK細胞若しくはマクロファージに分化誘導する。次の工程において、CAR遺伝子を導入する。

さらに別の態様において、多能性血液前駆細胞はiLS細胞であり、T細胞、NK細胞、マクロファージ若しくはB細胞に分化誘導するか、又はT細胞、NK細胞若しくはマクロファージに分化誘導する。次の工程において、CAAR遺伝子を導入する。

[0079] さらに別の態様において、多能性血液前駆細胞はpT/NK細胞であり、T細胞に分化誘導する。次の工程において、TCR遺伝子を導入する。

さらに別の態様において、多能性血液前駆細胞はpT/NK細胞であり、NK細胞に分化誘導する。次の工程において、CAR遺伝子を導入する。

さらに別の態様において、多能性血液前駆細胞はpT/NK細胞であり、NK細胞に分化誘導する。次の工程において、CAAR遺伝子を導入する。

さらに別の態様において、多能性血液前駆細胞はpT/NK細胞であり、マクロファージに分化誘導する。次の工程において、CAR遺伝子を導入する。

さらに別の態様において、多能性血液前駆細胞はpT/NK細胞であり、マクロファージに分化誘導する。次の工程において、CAAR遺伝子を導入する。

[0080] さらに別の態様において、多能性血液前駆細胞はiLS細胞であり、NK細胞、マクロファージ若しくはB細胞に分化誘導するか、又はNK細胞若しくはマクロファージに分化誘導する。次の工程において、TCR遺伝子を導入するとともに、CD3遺伝子をさらに導入する。

[0081] さらに別の態様において、多能性血液前駆細胞はpT/NK細胞であり、NK細胞又はマクロファージに分化誘導する。次の工程において、TCR遺伝子を導入するとともに、CD3遺伝子をさらに導入する。

[0082] I-5. 免疫細胞への外因性受容体遺伝子の導入（態様Ｂ）

免疫細胞にTCR、CAR又はCAARを導入する際には、免疫細胞の種類に応じた受容体刺激（T細胞の場合はTCR刺激という）が必要であり、受容体刺激後の免疫細胞に外因性受容体遺伝子を導入する。以下、一般的な遺伝子導入前の細胞刺激方法を記載するが、細胞の種類に応じた刺激方法はこの分野において周知であり、これら以外の方法でも実施可能である。外因性受容体遺伝子の細胞への導入には、I-1.でiLS細胞の調製方法において説明したように、レトロウイルスベクターやレンチウイルスベクター等の動物ウイルスベクターを好ましく用いることができる。所望により、外因性受容体遺伝子と同時にCD3遺伝子の導入も行ってよい。

[0083] T細胞にTCR/CAR/CAAR遺伝子を導入する場合は、抗CD3抗体（合わせて抗CD28抗体を加えてもよい）及びIL-2によってT細胞をTCR刺激して増殖させた後、ウイルスベクターを用いてスピンインフェクション法などによりTCR/CAR/CAAR遺伝子を導入する。

[0084] NK細胞にCAR/CAAR遺伝子、又はTCR遺伝子とCD3遺伝子とを導入する場合は、適当なサイトカイン（IL-2単独、又はIL-2、IL-15及びIL-21）の存在下で、膜結合型IL-21(memIL-21)及び4-1BBリガンド(41BBL)を発現するK562白血病細胞株とNK細胞を共培養することにより、NK細胞を受容体刺激して増殖させる。その後、ウイルスベクターを用いてスピンインフェクション法などにより遺伝子を導入する。

[0085] マクロファージにCAR/CAAR遺伝子、又はTCR遺伝子とCD3遺伝子とを導入する場合は、M-CSF又はGM-CSFによりマクロファージを受容体刺激して増殖させた後、ウイルスベクターを用いてスピンインフェクション法などにより遺伝子を導入する。

[0086] B細胞にCAR/CAAR遺伝子、又はTCR遺伝子とCD3遺伝子とを導入する場合は、分化段階に応じて、IL-7及びSCF等のサイトカイン、又はCD40リガンドにより受容体刺激して増殖させた後、ウイルスベクターを用いてスピンインフェクション法などにより遺伝子を導入する。

[0087] 外因性受容体遺伝子を導入した後は、一定期間（数日～数週間程度）、受容体刺激を継続してもよい。

[0088] 外因性受容体が抗原特異的受容体である場合の、該受容体が認識する抗原の好ましい例、外因性受容体がCAARである場合の、抗原由来部に利用する自己抗原の具体例、CAR遺伝子又はCAAR遺伝子の設計方法やTCR遺伝子の調製方法は、I-2.に記載したとおりである。

[0089] II. ヒトT/NK前駆細胞の製造方法

本発明は、ヒトのT/NK前駆細胞の増幅において、マウス細胞に適用した非特許文献２に記載の方法よりも改善された増幅効率を達成した新規なヒトT/NK前駆細胞の製造方法、当該新規製造方法で製造されたT/NK前駆細胞からT細胞又はNK細胞へ分化誘導する工程を含むT細胞又はNK細胞の製造方法、新規製造方法と前述の外因性受容体を発現させる工程を組み合わせた、外因性受容体を発現したT細胞又はNK細胞の製造方法などを提供する。

[0090] 本発明のヒトT/NK前駆細胞の製造方法（ヒトpT/NK細胞製造法）は、ヒト造血幹細胞を含む細胞集団を、Notchリガンドの共存下、SCF、Flt3-L及びIL-7をそれぞれ1 ng/mL以上10 ng/mL未満の濃度で含む培地（以下、この工程で使用する培地を「ヒトpT/NK細胞誘導培地」という）で培養する工程を含む。マウスの場合と異なり、ヒトpT/NK細胞誘導培地ではSCF、Flt3-L及びIL-7の濃度として上記した低濃度を採用することにより、ヒトpT/NK細胞を大量に生成・増幅することができる。さらに、ヒトpT/NK細胞誘導培地にTPO及びM-CSFの少なくともいずれかを所定濃度で添加した場合には、ヒトpT/NK細胞の産生量をさらに数倍に増大することができる。

[0091] ヒトpT/NK細胞製造法において使用するヒト造血幹細胞を含むヒト細胞集団は、I-1.において説明した通りのものを使用できる。当該ヒト細胞集団は、上述の増幅培養を行った後の細胞集団でもよい。Notchリガンド共存下での培養も前述の通りであり、I-1.において説明したNotchリガンド及び培養条件を適宜採用することができる。Notchリガンドとしては、組み換えタンパク質を採用してもよく、Notchリガンドを発現するフィーダー細胞を採用してもよい

。

[0092] ヒトpT/NK細胞誘導培地に含まれるSCF、Flt3-L及びIL-7の濃度は、1 ng/mL以上10 ng/mL未満の範囲で適宜選択することができる。３種とも同一の濃度であってもよいし、３種のうちの一部又は全部が上記範囲内で異なる濃度であってもよい。好ましくはそれぞれ3～7 ng/mLの範囲から適宜選択される濃度であり、より好ましくはそれぞれ4～6 ng/mLの範囲から適宜選択される濃度であり、さらにより好ましくはそれぞれ約5 ng/mLである。

[0093] ヒトpT/NK細胞誘導培地に含まれるTPOの濃度は、1～100 ng/mLの範囲で適宜選択することができる。当該TPO濃度は、例えば1～80 ng/mL、1～70 ng/mL、1～60 ng/mL、1～55 ng/mL、1～50ng/mL、5～80 ng/mL、5～70 ng/mL、5～60 ng/mL、5～55 ng/mL、5～50ng/mL、10～80 ng/mL、10～70 ng/mL、10～60 ng/mL、10～55 ng/mL、又は10～50 ng/mLであってよい。

[0094] ヒトpT/NK細胞誘導培地に含まれるM-CSFの濃度は、1～100 ng/mLの範囲で適宜選択することができる。当該M-CSF濃度は、例えば1～50 ng/mL、1～40 ng/mL、1～30 ng/mL、5～50 ng/mL、5～40 ng/mL、5～30 ng/mL、5～25 ng/mL、7～50 ng/mL、7～40 ng/mL、7～30 ng/mL、又は7～25 ng/mLであってよい。

[0095] ヒトpT/NK細胞誘導培地において、TPOとM-CSFは、いずれか一方のみを含んでいてもよく、両方を含んでいてもよい。当該培地として特に好ましいものの例としては、SCF、Flt3-L及びIL-7をそれぞれ4～6 ng/mL又は5 ng/mLの濃度、TPOを10～55 ng/mL又は10～50 ng/mLの濃度で含む培地を挙げることができる。

[0096] 本発明の方法に用いる培地は、通常の細胞培養に用いられる培地や造血細胞の培養のために調製された培地など、特に限定されずに利用することができる。一般的な細胞培養に用いられる培地の代表的なものとしては、IMDM（Iscove's Modified Dulbecco's Medium）、αMEM（alpha Modified Eagle's Minimum Essential Medium）、DMEM（Dulbecco's Modified Eagle's Medium）、ハムF12培地（Ham's Nutrient Mixture F12）、マッコイ5A培地（McCoy's

5A Medium）、EMEM（Eagle's Minimum Essential Medium）、RPMI1640培地などを例示することができる。また、造血細胞の培養に適した無血清培地の代表的なものとしては、StemPro34（インビトロジェン社製）、Stemline（シグマアルドリッチ社製）、Stemline II（シグマアルドリッチ社製）、X-VIVO 10（ロンザ社製）、X-VIVO 15（ロンザ社製）、X-VIVO 20（ロンザ社製）、HPGM（ロンザ社製）、StemSpan H3000（ステムセルテクノロジー社製）、StemSpanSFEM（ステムセルテクノロジー社製）、QBSF-60（クオリティバイオロジカル社製）、などを例示することができる。また、目的に応じて、無血清条件で培養しても良く、FBSのような血清又は、Knockout Serum Replacement(Gibco社）のような血清代替物を添加した条件を採用しても良い。

[0097] 培養期間は特に限定されないが、例えば７～５６日間（好ましくは２８～４２日間）であり、前記培地は１～7日（好ましくは、３～４日）の間隔で新鮮な培地に交換することが好ましい。

[0098] その他の培養条件は、通常の細胞培養に採用される条件を適宜選択する事ができる。培養温度としては、例えば３５～３９℃であり、０～１０％のCO_2存在下で行うことができる。ヒトpT/NK細胞製造法におけるNotchリガンド共存下での培養は、Notchリガンドを発現するフィーダー細胞を用いる方法でもよいし、Notchリガンドタンパク質等で内表面を被覆した培養容器を用いる別の方法でもよい。

[0099] 本発明によるヒトNK細胞の製造方法は、ヒトpT/NK細胞製造法によりヒトT/NK前駆細胞を製造する工程と、製造したヒトT/NK前駆細胞を、Notchリガンドの非共存下、IL-7, Flt3-L, SCF及びIL-15を含む培地で培養することにより、ヒトNK細胞を分化誘導する工程とを含む。下記実施例のB-2.に記載したように、ヒトT/NK前駆細胞からのヒトNK細胞の分化誘導においては、Notchリガンドを発現するフィーダー細胞を使用せずに、Notchリガンド非共存下で上記４種のサイトカインを含む培地で培養を行なうことで、Notchリガンド共存下で培養した場合と比べて約12～30倍のNK細胞を生産することができる。

[0100] IL-7, Flt3-L, SCF及びIL-15は、それぞれ1～50 ng/ml程度、例えば5～30

ng/ml程度で用いることができる。例えば、IL-15及びFlt3-Lはそれぞれ1～30 ng/ml程度、又は5～20 ng/ml程度で、SCF及びIL-15はそれぞれ5～50 ng/ml程度、又は10～40 ng/ml程度で使用してよい。２～４週間程度の期間、適宜培地交換しながら上記のフィーダーフリー培養を行なうことで、NK細胞の生産量を上述の通りに大幅に向上できる。

[0101] 上述のヒトpT/NK細胞製造法で得られたヒトNK細胞は、幼若状態が維持されており、特徴的な表面抗原プロファイルを呈する。本発明は、このような表面抗原で特徴づけられる培養ヒトNK細胞をも提供する。

[0102] 本発明が提供する培養ヒトNK細胞は、ヒト臍帯血より分離されたヒト臍帯血NK細胞よりも、成熟度の指標となるCD16及びKIR（killer cell immunoglobulin-like receptor）の発現並びに疲弊マーカーTIGIT（T cell immunoreceptor with Ig and ITIM domains; NCBI Gene ID: 201633, NCBI Reference Sequence: NM_173799.4）の発現が低いことにより、前記ヒト臍帯血NK細胞よりも幼若かつ疲弊度が低いことを特徴とする。この分野において、ヒト臍帯血NK細胞は、ヒト末梢血NK細胞等の他のヒトNK細胞と比べて成熟度が幼若であることが知られているが、下記実施例B-11に示されるように、本発明のヒトpT/NK細胞製造法により製造されるヒトT/NK前駆細胞から誘導されるヒトNK細胞はヒト臍帯血NK細胞よりもさらに幼若である。また、本発明の培養ヒトNK細胞は、NK細胞の疲弊度の指標となる疲弊マーカーTIGITの発現がヒト臍帯血NK細胞より低く、疲弊度が低いという特徴も有する。このように、本発明の培養ヒトNK細胞は、ヒト体内に天然に存在するヒトNK細胞とは異なる特徴を有する細胞である。本発明の培養ヒトNK細胞におけるCD16、KIR及びTIGITの発現量は、それぞれ独立して、ヒト臍帯血NK細胞における発現量の1/2倍以下、1/3倍以下、1/4倍以下、1/5倍以下、1/6倍以下、1/7倍以下、又は1/8倍以下であってよい。

[0103] KIRには、KIR2DL2（killer cell immunoglobulin like receptor, two Ig domains and long cytoplasmic tail 2; NCBI Gene ID: 3803, NCBI Reference Sequence: NM_014219.3）及びKIR2DL3（killer cell immunoglobulin lik

e receptor, two Ig domains and long cytoplasmic tail 3; NCBI Gene ID: 3804, NCBI Reference Sequence: NM_015868.3）が包含される。本発明の培養ヒトNK細胞におけるKIRの発現は、KIR2DL2の発現、KIR2DL3の発現のどちらでもよく、両者の発現でもよい。

[0104] 本発明の培養ヒトNK細胞は、さらに、ヒト臍帯血NK細胞及びヒト末梢血NK細胞と比べて、CCR3，CCR6，CCR7，CCR8，及びCCR9から選択される１、２、３、４又は５個の遺伝子の発現が高いという特徴を有していてよい。本発明の培養ヒトNK細胞の表面抗原マーカーCD3，CD4，CD8，CD56，及びCD161の発現は他のヒトNK細胞と同様であり、CD3陰性，CD4陰性，CD8陰性，CD56陽性，かつCD161陽性である。

[0105] これらの表面抗原マーカーの発現は、各表面抗原マーカーに対する抗体を用いたフローサイトメーター、各表面抗原マーカーの発現を検出するプライマー・プローブを用いたリアルタイムPCRなどの周知の手法により調べることができる。

[0106] III. 腫瘍又は自己免疫疾患に対する免疫細胞療法剤の製造

本発明による腫瘍又は自己免疫疾患に対する免疫細胞療法剤の製造方法は、CD8陽性細胞傷害性のTCR-T、CAR-T又はCAAR-T細胞を免疫細胞療法剤として製造する製造方法１と、CAR-NK細胞、CAAR-NK細胞、CAR-マクロファージ又はCAAR-マクロファージを免疫細胞療法剤として製造する製造方法２がある。製造方法１と製造方法２にはそれぞれ、上記態様Ａの方法で各受容体発現細胞を生産する方法と、上記態様Ｂの方法で各受容体発現細胞を生産する方法の２通りがある。

[0107] 製造方法１Ａ

製造方法１Ａは、多能性血液前駆細胞に外因性受容体遺伝子を導入してから免疫細胞に分化誘導する、態様ＡのTCR/CAR/CAAR発現免疫細胞生産方法により、CD8陽性細胞傷害性TCR-T、CAR-T又はCAAR-T細胞を生産し、これを腫瘍又は自己免疫疾患に対する免疫細胞療法剤とする方法であり、以下の工程１Ａ－１～１Ａ－５を含む。

造血幹細胞を含む細胞集団より、多能性血液前駆細胞を調製する工程１Ａ－１。

CAAR又は腫瘍抗原を特異的に認識するTCR若しくはCARである外因性受容体をコードする遺伝子を多能性血液前駆細胞に導入することにより、前記外因性受容体を発現する多能性血液前駆細胞を調製する工程１Ａ－２。

前記外因性受容体を発現する多能性血液前駆細胞をT細胞に分化誘導することにより、前記外因性受容体を発現するT細胞（TCR-T、CAR-T又はCAAR-T細胞）を調製する工程１Ａ－３。

TCR-T、CAR-T又はCAAR-T細胞をTCR刺激し、CD8陽性細胞傷害性TCR-T、CAR-T又はCAAR-T細胞へ分化誘導する工程１Ａ－４。

CD8陽性細胞傷害性TCR-T若しくはCAR-T細胞を、上記腫瘍抗原を発現する腫瘍に対する免疫細胞療法剤として調製するか、又は、CD8陽性細胞傷害性CAAR-T細胞を自己免疫疾患に対する免疫細胞療法剤として調製する工程１Ａ－５。

[0108] 製造方法１Ｂ

製造方法１Ｂは、多能性血液前駆細胞を免疫細胞に分化誘導してから外因性受容体遺伝子を導入する、態様ＢのTCR/CAR/CAAR発現免疫細胞生産方法により、CD8陽性細胞傷害性TCR-T、CAR-T又はCAAR-T細胞を生産し、これを腫瘍又は自己免疫疾患に対する免疫細胞療法剤とする方法であり、以下の工程１Ｂ－１～１Ｂ－４を含む。

造血幹細胞を含む細胞集団より、多能性血液前駆細胞を調製する工程１Ｂ－１。

多能性血液前駆細胞をT細胞に分化誘導する工程１Ｂ－２。

T細胞をTCR刺激した後、CAAR又は腫瘍抗原を特異的に認識するTCR若しくはCARである外因性受容体をコードする遺伝子を導入することにより、CD8陽性細胞傷害性TCR-T、又CAR-T又はCAAR-T細胞を調製する工程１Ｂ－３。

CD8陽性細胞傷害性TCR-T若しくはCAR-T細胞を、上記腫瘍抗原を発現する腫瘍に対する免疫細胞療法剤として調製するか、又は、CD8陽性細胞傷害性CAAR

-T細胞を自己免疫疾患に対する免疫細胞療法剤として調製する工程１Ｂ－４。

[0109] 製造方法２Ａ

製造方法２Ａは、多能性血液前駆細胞に外因性受容体遺伝子を導入してから免疫細胞に分化誘導する、態様ＡのTCR/CAR/CAAR発現免疫細胞生産方法により、CAR-NK細胞、CAAR-NK細胞、CAR-マクロファージ又はCAAR-マクロファージを生産し、これを腫瘍又は自己免疫疾患に対する免疫細胞療法剤とする方法であり、以下の工程２Ａ－１～２Ａ－４を含む。

造血幹細胞を含む細胞集団より、多能性血液前駆細胞を調製する工程２Ａ－１。

CAAR又は腫瘍抗原を特異的に認識するCARであるキメラ受容体をコードする遺伝子を多能性血液前駆細胞に導入することにより、前記キメラ受容体を発現する多能性血液前駆細胞を調製する工程２Ａ－２。

前記キメラ受容体を発現する多能性血液前駆細胞をNK細胞又はマクロファージに分化誘導することにより、前記キメラ受容体を発現するNK細胞（CAR-NK若しくはCAAR-NK細胞）又はマクロファージ（CAR-マクロファージ若しくはCAAR-マクロファージ）を調製する工程２Ａ－３。

CAR-NK細胞若しくはCAR-マクロファージを、上記腫瘍抗原を発現する腫瘍に対する免疫細胞療法剤として調製するか、又は、CAAR-NK細胞若しくはCAAR-マクロファージを自己免疫疾患に対する免疫細胞療法剤として調製する工程２Ａ－４。

[0110] CAR/CAAR-NK細胞及びCAR/CAAR-マクロファージは、受容体刺激前でも十分な増殖能を有するため、受容体刺激なしで免疫細胞療法剤として調製し、患者への投与に用いることができる。さらに活性化して増殖能を高めるため、工程２Ａ－３の後、調製したCAR/CAAR-NK細胞又はCAR/CAAR-マクロファージを受容体刺激する工程を実施してもよい。この場合、工程２Ａ－４では、受容体刺激後のCAR/CAAR-NK細胞又はCAR/CAAR-マクロファージを免疫細胞療法剤として調製する。

[0111] 製造方法２Ｂ

製造方法２Ｂは、多能性血液前駆細胞を免疫細胞に分化誘導してから外因性受容体遺伝子を導入する、態様ＢのTCR/CAR/CAAR発現免疫細胞生産方法により、CAR-NK細胞、CAAR-NK細胞、CAR-マクロファージ又はCAAR-マクロファージを生産し、これを腫瘍又は自己免疫疾患に対する免疫細胞療法剤とする方法であり、以下の工程２Ｂ－１～２Ｂ－４を含む。

造血幹細胞を含む細胞集団より、多能性血液前駆細胞を調製する工程２Ｂ－１。

多能性血液前駆細胞をNK細胞又はマクロファージに分化誘導する工程２Ｂ－２。

NK細胞又はマクロファージを受容体刺激した後、CAAR又は腫瘍抗原を特異的に認識するCARであるキメラ受容体をコードする遺伝子を導入することにより、前記キメラ受容体を発現するNK細胞（CAR-NK若しくはCAAR-NK細胞）又はマクロファージ（CAR-マクロファージ若しくはCAAR-マクロファージ）を調製する工程２Ｂ－３。

CAR-NK細胞若しくはCAR-マクロファージを、上記腫瘍抗原を発現する腫瘍に対する免疫細胞療法剤として調製するか、又は、CAAR-NK細胞若しくはCAAR-マクロファージを自己免疫疾患に対する免疫細胞療法剤として調製する工程２Ｂ－４。

[0112] 製造方法２Ｂでは、CAR遺伝子の導入の際に細胞を受容体刺激するため、工程２Ｂ－３で得られるCAR/CAAR-NK細胞又はCAR/CAAR-マクロファージは既に高い増殖能を有しており、さらなる受容体刺激なしで好ましく免疫細胞療法剤に調製することができる。

[0113] 製造方法１Ａの工程１Ａ－１～工程１Ａ－４、並びに製造方法２Ａの工程２Ａ－１～工程２Ａ－３及びCAR/CAAR-NK細胞又はCAR/CAAR-マクロファージを受容体刺激する工程は、I-1.～I-3.に記載した通りに実施できる。

[0114] 製造方法１Ｂの工程１Ｂ－１～工程１Ｂ－３、及び製造方法２Ｂの工程２Ｂ－１～工程２Ｂ－３は、I-1.、I-4.及びI-5.に記載した通りに実施できる

。

[0115] 各製造方法の最終工程である、工程１Ａ－５、工程１Ｂ－４、工程２Ａ－４、及び工程２Ｂ－４は、外因性受容体ないしキメラ受容体を発現する細胞を、該受容体が特異的に認識する腫瘍抗原を発現する腫瘍に対する免疫細胞療法剤として（受容体がTCR又はCARの場合）、又は自己免疫疾患に対する免疫細胞療法剤として（受容体がCAARの場合）、それぞれ調製（製剤化）する工程である。受容体発現細胞は、一般に、腫瘍又は自己免疫疾患の患者に静脈内投与、腹腔内投与、又は腫瘍内投与（腫瘍患者の場合）により投与されるので、これらの投与経路に適した媒体中に細胞を含有する点滴静注剤、点滴剤ないし注射剤等として製剤することができる。媒体としては、例えば、2.5～5%程度のヒト血清アルブミン、0.2～0.5%程度の塩化ナトリウム、凍結保護剤として3～8%程度のジメチルスルホキシド等を含有する水性媒体（例えば高純度の滅菌水）を用いることができる。投与１回分（例えば点滴静注剤１バッグ）の製剤中の受容体発現細胞数は、細胞の種類、腫瘍の種類等に応じて適宜設定できるが、例えば、生細胞数として1×10^5～1×10^9個程度とすることができる。

[0116] 上記した本発明の製造方法により、TCR-T細胞を含む腫瘍に対する免疫細胞療法剤、CAR-T細胞を含む腫瘍に対する免疫細胞療法剤、CAR-NK細胞を含む腫瘍に対する免疫細胞療法剤、CAR-マクロファージを含む腫瘍に対する免疫細胞療法剤、CAAR-NK細胞を含む自己免疫疾患に対する免疫細胞療法剤、及びCAAR-マクロファージを含む自己免疫疾患に対する免疫細胞療法剤を製造することができる。これらの細胞免疫療法剤は、それぞれ単独で腫瘍又は自己免疫疾患の治療に用いることができる。あるいは、CAR-マクロファージを含む腫瘍に対する免疫細胞療法剤を、TCR-T細胞、CAR-T細胞又はCAR-NK細胞を含む１種類以上の免疫細胞療法剤と組み合わせて腫瘍患者に投与することも可能である。複数の免疫細胞療法剤を組み合わせる場合、各免疫細胞療法剤の免疫細胞が発現する外因性受容体（この場合の外因性受容体は抗原特異的受容体である）は、全て同一の腫瘍抗原を認識する受容体であってもよいし、一

部又は全ての受容体が異なる腫瘍抗原を認識するものであってもよい。「組み合わせて投与する」という語は、複数の剤を同時に、順次に、又は別々に患者に投与することを意味する。順次に投与するとは、１の剤の投与が完了した後すぐに続けて次の剤の投与を行なうことをいう。別々に投与とは、間隔を空けて複数の剤を投与することをいい、例えば同日中に数時間程度以上の間隔を空けて、あるいは１クールの治療期間中の別の日に投与することをいう。複数の免疫細胞療法剤を組み合わせて投与する場合は、順次に又は別々に患者に投与することが好ましい。

[0117] 本発明によれば、腫瘍抗原を発現する様々な腫瘍に対して有効な免疫細胞療法剤、並びに、自己抗原が特定されている自己免疫疾患に対して有効な免疫細胞療法剤を製造できる。腫瘍抗原を発現する腫瘍の例は上記した通りであり、神経芽腫、メラノーマ、食道がん、非小細胞肺がん等の肺がん、頭頸部がん、膀胱がん、大腸がん、滑膜細胞肉腫、乳がん、卵巣がん、及び膵臓がんを包含する様々な固形がん、並びに白血病をはじめとする様々な血液がんに対して免疫細胞療法剤を製造することができる。自己免疫疾患と自己抗原の例も上述した通りであり、尋常性天疱瘡、重症性筋無力症を包含する様々な自己免疫疾患に対して免疫細胞療法剤を製造することができる。さらに上述の通り、本発明によれば、感染症に対して有効な免疫細胞療法剤も製造できる。

[0118] 免疫細胞療法剤による治療対象の患者は主としてヒトであるが、その他の哺乳動物も含め、腫瘍を罹患する様々な動物が対象になりうる。

[0119] これらの免疫細胞療法剤（各種のTCR/CAR/CAAR発現免疫細胞ないし多能性血液前駆細胞）を用いた腫瘍又は自己免疫疾患の治療については、下記「III．腫瘍又は自己免疫疾患の治療」でさらに説明する。

[0120] IV．腫瘍又は自己免疫疾患の治療

本発明による腫瘍又は自己免疫疾患の治療方法は、上記のようにして製造できる免疫細胞療法剤を用いて腫瘍又は自己免疫疾患を治療する方法であり、以下の態様がある。

[0121] 治療方法１ａ

治療方法１ａは、多能性血液前駆細胞に外因性受容体遺伝子を導入してから免疫細胞に分化誘導する、態様ＡのTCR/CAR/CAAR発現免疫細胞生産方法により、CD8陽性細胞傷害性TCR-T、CAR-T又はCAAR-T細胞を生産し、これを患者に投与して腫瘍又は自己免疫疾患を治療する方法であり、以下の工程１ａ－１～工程１ａ－５を含む。

造血幹細胞を含む細胞集団より、多能性血液前駆細胞を調製する工程１ａ－１。

CAAR又は腫瘍抗原を特異的に認識するTCR若しくはCARである外因性受容体をコードする遺伝子を多能性血液前駆細胞に導入することにより、前記外因性受容体を発現する多能性血液前駆細胞を調製する工程１ａ－２。

前記外因性受容体を発現する多能性血液前駆細胞をT細胞に分化誘導することにより、前記外因性受容体を発現するT細胞であるTCR-T、CAR-T又はCAAR-T細胞を調製する工程１ａ－３。

TCR-T、CAR-T又はCAAR-T細胞をTCR刺激し、CD8陽性細胞傷害性TCR-T、CAR-T又はCAAR-T細胞へ分化誘導する工程１ａ－４。

CD8陽性細胞傷害性TCR-T若しくはCAR-T細胞を、上記腫瘍抗原を発現する腫瘍を有する患者に投与するか、又は、CD8陽性細胞傷害性CAAR-T細胞を自己免疫疾患患者に投与する工程１ａ－５。

[0122] 治療方法１ｂ

治療方法１ｂは、多能性血液前駆細胞を免疫細胞に分化誘導してから外因性受容体遺伝子を導入する、態様ＢのTCR/CAR/CAAR発現免疫細胞生産方法により、CD8陽性細胞傷害性TCR-T、CAR-T又はCAAR-T細胞を生産し、これを患者に投与して腫瘍又は自己免疫疾患を治療する方法であり、以下の工程１ｂ－１～工程１ｂ－４を含む。

造血幹細胞を含む細胞集団より、多能性血液前駆細胞を調製する工程１ｂ－１。

多能性血液前駆細胞をT細胞に分化誘導する工程１ｂ－２。

T細胞をTCR刺激した後、CAAR又は腫瘍抗原を特異的に認識するTCR若しくはCARである外因性受容体をコードする遺伝子を導入することにより、CD8陽性細胞傷害性TCR-T、CAR-T又はCAAR-T細胞を調製する工程１ｂ－３。

CD8陽性細胞傷害性TCR-T若しくはCAR-T細胞を、上記腫瘍抗原を発現する腫瘍を有する患者に投与するか、又は、CD8陽性細胞傷害性CAAR-T細胞を自己免疫疾患患者に投与する工程１ｂ－４。

[0123] 治療方法２ａ

治療方法２ａは、多能性血液前駆細胞に外因性受容体遺伝子を導入してから免疫細胞に分化誘導する、態様ＡのTCR/CAR/CAAR発現免疫細胞生産方法により、CAR-NK細胞、CAAR-NK細胞、CAR-マクロファージ又はCAAR-マクロファージを生産し、これを患者に投与して腫瘍又は自己免疫疾患を治療する方法であり、以下の工程２ａ－１～工程２ａ－４を含む。

造血幹細胞を含む細胞集団より、多能性血液前駆細胞を調製する工程２ａ－１。

CAAR又は腫瘍抗原を特異的に認識するCARであるキメラ受容体をコードする遺伝子を多能性血液前駆細胞に導入することにより、前記キメラ受容体を発現する多能性血液前駆細胞を調製する工程２ａ－２。

前記キメラ受容体を発現する多能性血液前駆細胞をNK細胞又はマクロファージに分化誘導することにより、CAR-NK細胞、CAAR-NK細胞、CAR-マクロファージ又はCAAR-マクロファージであるキメラ受容体発現免疫細胞を調製する工程２ａ－３。

CAR-NK細胞又はCAR-マクロファージを、上記腫瘍抗原を発現する腫瘍を有する患者に投与するか、又は、CAAR-NK細胞若しくはCAAR-マクロファージを自己免疫疾患患者に投与する工程２ａ－４。

[0124] III.の製造方法２Ａで説明した通り、CAR-NK細胞、CAAR-NK細胞、CAR-マクロファージ及びCAAR-マクロファージは受容体刺激前でも十分な増殖能を有するため、受容体刺激せずにこれらのキメラ受容体発現免疫細胞を患者に投与することができる。あるいは、工程２ａ－３の後、調製したキメラ受容体発

現免疫細胞を受容体刺激し、さらに増殖能を高めてから患者に投与してもよい。

[0125] 治療方法２ｂ

治療方法２ｂは、多能性血液前駆細胞を免疫細胞に分化誘導してから外因性受容体遺伝子を導入する、態様ＢのTCR/CAR/CAAR発現免疫細胞生産方法により、CAR-NK細胞、CAAR-NK細胞、CAR-マクロファージ又はCAAR-マクロファージを生産し、これを患者に投与して腫瘍又は自己免疫疾患を治療する方法であり、以下の工程２ｂ－１～工程２ｂ－４を含む。

造血幹細胞を含む細胞集団より、多能性血液前駆細胞を調製する工程２ｂ－１。

多能性血液前駆細胞をNK細胞又はマクロファージに分化誘導する工程２ｂ－２。

NK細胞又はマクロファージを受容体刺激した後、CAAR又は腫瘍抗原を特異的に認識するCARであるキメラ受容体をコードする遺伝子を導入することにより、CAR-NK細胞、CAAR-NK細胞、CAR-マクロファージ又はCAAR-マクロファージを調製する工程２ｂ－３。

CAR-NK細胞又はCAR-マクロファージを、上記腫瘍抗原を発現する腫瘍を有する患者に投与するか、又は、CAAR-NK細胞若しくはCAAR-マクロファージを自己免疫疾患患者に投与する工程２ｂ－４。

[0126] 治療方法３

治療方法３は、CAR-マクロファージとCAR-T細胞を組み合わせて患者に投与して腫瘍を治療する方法であり、以下の工程３－１～工程３－３を含む。

下記(1)又は(2)により、CAR-マクロファージを調製する工程３－１：

(1) 造血幹細胞を含む細胞集団より多能性血液前駆細胞を調製し、腫瘍抗原を特異的に認識するCARをコードする遺伝子を前記多能性血液前駆細胞に導入することにより、前記CARを発現する多能性血液前駆細胞を調製した後、該CAR発現多能性血液前駆細胞をマクロファージに分化誘導する工程；

(2) 造血幹細胞を含む細胞集団より人工白血球幹細胞又はT/NK前駆細胞

を調製し、マクロファージに分化誘導して受容体刺激した後、前記CARをコードする遺伝子を導入する工程。

下記(3)又は(4)により、CAR-T細胞を調製する工程３－２：

(3) 造血幹細胞を含む細胞集団より多能性血液前駆細胞を調製し、前記CARをコードする遺伝子を前記多能性血液前駆細胞に導入することにより、前記CARを発現する多能性血液前駆細胞を調製し、該CAR発現多能性血液前駆細胞をT細胞に分化誘導した後にTCR刺激することにより、CD8陽性細胞傷害性TCR-T又はCAR-T細胞へ分化誘導する工程；

(4) 造血幹細胞を含む細胞集団より人工白血球幹細胞又はT/NK前駆細胞を調製し、T細胞に分化誘導してTCR刺激した後、前記CARをコードする遺伝子を導入する工程。

CAR-マクロファージとCAR-T細胞を組み合わせて、前記腫瘍抗原を発現する腫瘍を有する患者に投与する工程３－３。

[0127] 治療方法４

治療方法４は、CAR-マクロファージとCAR-NK細胞を組み合わせて患者に投与して腫瘍を治療する方法であり、以下の工程４－１～工程４－３を含む。

下記工程(1)又は(2)により、CAR-マクロファージを調製する工程４－１：

(1) 造血幹細胞を含む細胞集団より多能性血液前駆細胞を調製し、腫瘍抗原を特異的に認識するCARをコードする遺伝子を前記多能性血液前駆細胞に導入することにより、前記CARを発現する多能性血液前駆細胞を調製した後、該CAR発現多能性血液前駆細胞をマクロファージに分化誘導する工程；

(2) 造血幹細胞を含む細胞集団より人工白血球幹細胞又はT/NK前駆細胞を調製し、マクロファージに分化誘導して受容体刺激した後、前記CARをコードする遺伝子を導入する工程。

下記工程(5)又は(6)により、CAR-NK細胞を調製する工程４－２：

(5) 造血幹細胞を含む細胞集団より多能性血液前駆細胞を調製し、前記CARをコードする遺伝子を前記多能性血液前駆細胞に導入することにより、前記CARを発現する多能性血液前駆細胞を調製した後、該CAR発現多能性血液前

駆細胞をNK細胞に分化誘導する工程；

(6) 造血幹細胞を含む細胞集団より人工白血球幹細胞又はT/NK前駆細胞を調製し、NK細胞に分化誘導して受容体刺激した後、前記CARをコードする遺伝子を導入する工程。

CAR-マクロファージとCAR-NK細胞を組み合わせて、前記腫瘍抗原を発現する腫瘍を有する患者に投与する工程４－３。

[0128] III.の製造方法２Ａで説明した通り、CAR-NK細胞及びCAR-マクロファージは受容体刺激前でも十分な増殖能を有するため、工程３－１(1)、工程４－１(1)及び工程４－２(5)においても、受容体刺激は必須ではない。あるいは、工程３－１(1)、工程４－１(1)及び工程４－２(5)において、調製したCAR-NK細胞及びCAR-マクロファージを受容体刺激し、さらに増殖能を高めたものを患者に投与してもよい。

[0129] 治療方法１ａの工程１ａ－１～工程１ａ－４、治療方法２ａの工程２ａ－１～工程２ａ－３、治療方法３の工程３－１(1)及び工程３－２(3)、治療方法４の工程４－１(1)及び工程４－２(5)、並びに、治療方法２ａ、治療方法３及び治療方法４で任意に行われるCAR-NK細胞、CAAR-NK細胞、CAR-マクロファージ又はCAAR-マクロファージを受容体刺激する工程は、I-1.～I-3.に記載した通りに実施できる。

[0130] 治療方法１ｂの工程１ｂ－１～工程１ｂ－３、治療方法２ｂの工程２ｂ－１～工程２ｂ－３、治療方法３の工程３－１(2)及び工程３－２(4)、並びに治療方法４の工程４－１(2)及び工程４－２(6)は、I-1.、I-4.及びI-5.に記載した通りに実施できる。

[0131] 上記各態様の治療方法において、多能性血液前駆細胞ないし人工白血球幹細胞又はT/NK前駆細胞は、臍帯血（通常、患者自身には由来しない）から調製してもよいし、患者から採取した骨髄液又は末梢血より造血幹細胞を含む細胞集団を得て、患者自身の細胞に由来する多能性血液前駆細胞ないし人工白血球幹細胞又はT/NK前駆細胞を調製してもよい。

[0132] 工程１ａ－５、工程１ｂ－４、工程２ａ－４、工程２ｂ－４、工程３－３

及び工程４－３において、外因性受容体を発現する免疫細胞は、III.で説明した通りに点滴静注剤等の適当な剤形に調製し、腫瘍患者又は自己免疫疾患患者に投与する。免疫細胞を投与する腫瘍患者は、当該免疫細胞に発現させた外因性受容体（この場合の受容体は抗原特異的受容体である）が認識する腫瘍抗原を発現する腫瘍を有する患者である。また、免疫細胞を投与する自己免疫疾患患者は、当該免疫細胞に発現させたCAARの抗原由来部に採用した自己抗原ないし該自己抗原を認識する病原性B細胞を病因とする自己免疫疾患を有する患者である。患者への投与は1回でもよいし、適当な間隔を空けて2回以上投与してもよい。工程３－３及び工程４－３では、CAR-マクロファージとCAR-T/CAR-NK細胞を、それぞれ１回ずつ投与してもよし、それぞれ適当な間隔を空けて２回以上投与してもよい。「組み合わせて投与する」という語の意味はIII.で説明した通りである。各免疫細胞の投与量は、投与する細胞の種類、腫瘍の種類、患者の体重等に応じて異なり得るが、１回の投与において生細胞数として1×10^5～1×10^9個程度を投与すればよい。

[0133] 従来のTCR-T/CAR-T/CAR-NK療法では、抗がん剤治療などによって患者体内のリンパ球を低減した後にTCR-T/CAR-T/CAR-NK細胞を投与する。本発明による腫瘍の治療方法においても、腫瘍抗原特異的なTCR又はCARを発現する免疫細胞の投与に先立ち、患者体内のリンパ球を低減する前処置を行ってよい。

[0134] 治療対象の腫瘍は、外因性受容体（この場合は抗原特異的受容体）が認識する腫瘍抗原を発現する腫瘍である。また、治療対象の自己免疫疾患は、CAARの抗原由来部に採用した自己抗原ないし当該自己抗原を認識する病原性B細胞を病因とする自己免疫疾患である。腫瘍及び自己免疫疾患の具体例は、I-2.において腫瘍抗原及び自己抗原の具体例と共に挙げた通りである。

実施例

[0135] 以下、本発明を実施例に基づきより具体的に説明する。もっとも、本発明は下記実施例に限定されるものではない。

[0136] A. TCR又はCARを発現する免疫細胞の作製

A-1. 実験材料

培地

培地はRoswell Park Memorial Institute (RPMI)-1640 (Sigma-Aldrich)、Isocove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM；Sigma-Aldrich)、Minimum Essential Medium alpha (MEMα; Invitrogen社)、Stemline II (Sigma-Aldrich) を用いた。すべての培地において、100 μg/mL ペニシリン、100 U/mL ストレプトマイシンを添加した。また、RPMI-1640およびIMDMには10% ウシ胎児血清 (FBS; Gibco) を、MEMαには20% FBSを添加した。RPMI-1640に1% MEM Non-Essential Amino Acid Solution (Gibco)、1 mM Sodium Pyruvate (Gibco)を加えた培地をRPMIコンプリート (RPMIcomp) として用いた。

[0137] サイトカイン

組換えヒト(rh)インターロイキン-2 (IL-2)、IL-7、IL-15、FMS-related tyrosine kinase 3 ligand (Flt3-L)、Stem cell factor (SCF)、トロンボポエチン (TPO)、およびGranulocyte-colony stimulating factor (G-CSF)、組換えマウス (rm) IL-3、IL-6、IL-7、IL-15、SCF、Flt3-L、TPO、およびMacrophage-stimulating factor (M-CSF)はR&D systems社より購入した。

[0138] レトロウイルスの作製

ID3-ERT2レトロウイルスベクターは既報（非特許文献３）のものを用いた。このレトロウイルスベクターは、ヒトID3遺伝子cDNA全長にヒトエストロゲンレセプターのリガンド結合ドメイン変異型 (ERT2) 配列を融合させたID3-ERT2遺伝子を公知のpCSRetレトロウイルスベクターにクローニングして構築したベクターである。配列番号１に示すID3-ERT2遺伝子の塩基配列中、1～357位がヒトID3遺伝子cDNAであり、370～1311位がERT2リガンド結合ドメイン変異型配列である。

[0139] OTI-TCR遺伝子（OVA抗原特異的に反応するT細胞受容体の遺伝子、図２上段、配列番号１７）をコードするプラスミド（murine TCR OTI-2A.pMIG II）はaddgene社より購入した。配列番号１７に示すOTI-TCR遺伝子の塩基配列中、1～828位（配列番号１８のアミノ酸配列では1～276番残基）がOTI TCR α鎖配列であり、829～882位（277～294番残基）がT2A自己切断ペプチド配列であり

、883～1821位（295～607番残基）がOTI TCR βlink配列である。

[0140] hCD19-m28z-CAR遺伝子を搭載したpMIGII-hCD19-m28z-CARプラスミドは、マウスIgG2aκシグナルペプチド遺伝子の下流に3xFlag遺伝子、ヒトCD19特異的FMC63抗体単鎖可変領域フラグメント遺伝子、マウスCD28の細胞膜ドメインと細胞内シグナルドメイン、およびマウスCD3ε細胞内シグナルドメイン遺伝子を融合させ構築した（図10B）。配列番号３に示すhCD19-m28z-CAR遺伝子の塩基配列中、1～60位がマウスIgG2aκシグナルペプチド配列、61～126位が3xFlag遺伝子、127～870位がヒトCD19特異的FMC63抗体単鎖可変領域フラグメント遺伝子であり、871～312位がマウスCD28の細胞膜ドメインと細胞内シグナルドメイン遺伝子、1183～1521位がマウスCD3ε細胞内シグナルドメイン遺伝子配列である。

[0141] これらの遺伝子を内包するレトロウイルスは、Plat E細胞（Cell Biolabs Inc.）に目的プラスミドとVSV-GプラスミドをFuGENE 6 Transfection Reagent (Roche)を用いて導入することによって、作製した。

[0142] レンチウイルスの作製

レンチウイルスベクターはCSIIベクターを用いた。CAR遺伝子等の目的遺伝子をコードするプラスミド、Gag/Polプラスミド、Revプラスミド、およびVSV-GもしくはGALVエンベローププラスミドをFuGENE 6 Transfection Reagent (Roche)を用いて293T細胞に導入することにより、目的遺伝子を発現するレンチウイルスを作製した。GALVエンベローププラスミドには、合成遺伝子GALV-MTR（Mouse Leukemia virus（MuLV）由来の膜ドメイン及び細胞質ドメインでGALVエンベロープの相当する領域を置き換えたエンベロープをコードする遺伝子、配列番号１５）を含む市販のphCMV-GALV-MTRを用いた。

[0143] A-2. 実験及び結果

A-2-1. iLS細胞の作製

C57BL/6マウスから骨髄液を採取し、Lineage（CD90, B220, Gr-1, CD11b, Ter119)陰性でc-KitおよびSca-Iが陽性のLSK細胞をセルソーター（FACS Aria III）により単離した。LSK細胞をOP9フィーダー細胞上に播種し、30 ng/mL

rmIL-7, 30 ng/mL rmFlt3-L, 30 ng/mL rmSCF, および30 ng/mL rmTPOを添加したRPMIcomp培地中で、37℃、5% CO_2の環境下にて培養した。4-6日後に細胞を回収し、ID3-ERT2遺伝子をレトロウイルスを用いてスピンインフェクション法により導入した。ID3-ERT2遺伝子導入細胞を判別・単離できるように、遺伝子導入のマーカーとしてヒトCD25を利用し、ID3-ERT2遺伝子にヒトCD25遺伝子を連結して細胞に導入した。ヒトCD25陽性のID3-ERT2遺伝子導入細胞を、セルソーターにより単離した。ソーティングしたiLS細胞をOP9細胞上においてiLS細胞用培地（10 ng/mL rmIL-7、 10 ng/mL rmFlt3-L、10 ng/mL rmSCF、および40 nM 4-ヒドロキシタモキシフェン（4-OHT）を添加したIMDM）で培養した。iLS細胞は3-4日おきに新たなOP9細胞上に継代し、増幅させた。約１ヶ月後に安定して増殖するiLS細胞をFCM解析により確認し、以降の実験に使用した（図１）。

[0144] A-2-2. iLS細胞へのがん特異的受容体の遺伝子導入

がん特異的受容体を安定発現するiLS細胞を作製するため、iLS細胞へOTI-TCR遺伝子もしくはhCD19-m28z-CAR遺伝子を、レトロウイルスを用いてスピンインフェクション法により導入した。遺伝子導入後、マーカータンパク質であるGFPが陽性のiLS細胞をセルソーターにより単離した。単離したOTI-TCR遺伝子導入iLS（OTI TCR-iLS）細胞およびhCD19-m28z-CAR遺伝子導入iLS（CD19-CAR iLS）細胞をiLS細胞培養の条件下で培養し、維持および増幅させた（図２、図１０）。

[0145] A-2-3. がん特異的受容体遺伝子導入iLS細胞のT細胞誘導

OTI TCR-iLS細胞もしくはCD19-CAR iLS細胞をOP9/Delta-like 1（OP9/DLL1）細胞上に播種し、5 ng/mL rmIL-7、5 ng/mL rmFlt3-Lおよび40 nM 4-OHTを添加したMEMα中で培養した。3-4日ごとに4-OHTを除く上記の培地で半量の培地を交換し、１週間後に新たなOP9/DLL1細胞上にiLS細胞を播種した。２週間培養したのち、1 ng/mL rmIL-7、1 ng/mL rmFlt3-Lを含むMEMαで培養した。誘導開始から３週間後に細胞を回収し、CD4/CD8ダブルポジティブ（DP）細胞をCD8a (Ly-2) MicroBeads (Miltenyi Biotech) により単離した（図３、４

、６）。

[0146] OTI TCR-iLS細胞から生成されたDP細胞をTCR刺激するため、C57BL/6マウスから脾臓細胞を採取し、10 μg/mL mitomycin C（MMC）で2.5時間処理し、抗原提示細胞として用いた。OTI TCR-iLS細胞由来のDP細胞とMMC処理した抗原提示細胞を2:1の割合で混合し、5 ng/mL rmIL-7、5 ng/mL rmIL-15、50 IU/mL rhIL-2、および10 μg/mL OVAペプチド（$OVA_{257-264}$）を含有するRPMIcomp培地中で共培養することによって、TCR刺激を行ったところ、CD8T細胞が生成された（図５）。

[0147] 一方で、CD19-CAR iLS細胞から生成されたDP細胞は、5 ng/mL rmIL-7、5 ng/mL rmIL-15、および50 IU/mL rhIL-2を添加したRPMIcomp培地で、抗CD3および抗CD28抗体をコートしたプレート上で培養することによって、TCR刺激をおこなった。TCR刺激から１週間後に細胞を回収し、5 ng/mL rmIL-7、5 ng/mL rmIL-15、および50 IU/mL rhIL-2を添加したRPMIcomp培地中で、TCR非刺激下で、さらに４日間培養した。これをFCM解析により解析し、CD8陽性CAR-T細胞が生成されたことを確認した（図６）。

[0148] A-2-4. OTI TCR-iLS細胞由来CD8陽性T細胞の抗原特異的サイトカイン放出評価

OVA抗原提示細胞はC57BL/6マウスから採取した脾臓細胞を1 μg/mL $OVA_{257-264}$と1時間培養することにより得た。OTI TCR-iLS細胞由来CD8陽性T細胞を10倍量のOVA抗原提示細胞と混合、もしくは、10 ng/mL PMAと1 μg/mL イオノマシンで処理し、1/1000量のPE-Cy7結合CD107a抗体と1xProtein transport inhibitor（eBioscience）を添加したRPMIcomp培地中で培養した。6時間後に細胞内染色を行いサイトカインの発現量をFCM解析により評価した。その結果、iLS細胞由来OTI TCR-T細胞は刺激により活性化し、CD107a、IFNγ, TNFaの発現が認められた（図７）。

[0149] A-2-5. OTI TCR-iLS細胞由来CD8陽性T細胞の細胞傷害活性

500 ng/mL IFNγを一晩処理したOVA抗原を安定発現するB16（B16-OVA）細胞もしくは選択マーカーのネオマイシンのみを発現するB16（B16-Neo）をCel

l Tracer Far-Red（Invitrogen）で染色した。その後、OTI TCR-iLS細胞由来CD8陽性T細胞あるいはOTI Tgマウス（OTI-TCR遺伝子を発現するトランスジェニックマウス）脾臓のCD8T細胞と異なる比率で混合し、50 IU/mL rhIL-2を添加したRPMIcomp培地中で、18時間共培養した。共培養後、死細胞をLive/Dead Near-IR（Invitrogen）で染色し、FCM解析によって、死細胞の割合を測定したところ、iLS細胞由来OTI TCR-T細胞はOTI Tgマウス脾臓由来T細胞と同様に高い細胞傷害活性を示した（図８）。

[0150] A-2-6. OTI TCR-iLS細胞由来CD8陽性T細胞のin vivo抗腫瘍活性

C57BL/6マウスに、1x10^5 B16-OVA細胞を皮下移植しB16-OVA担がんマウスを作製した。移植から5日後に、担がんマウスに対して、4GyでX線照射したのちに、3x10^6 OTI TCR T-iLS細胞を尾静脈投与した。T細胞移植日から3日間、50000 IU rhIL-2を毎日１回腹腔内投与した。腫瘍径を経時的に測定し、TCR-T細胞の抗腫瘍活性を評価した。腫瘍体積は(短辺)^{2}x(長辺)x0.5で算出した。その結果、iLS由来OTI TCR-T細胞はOTI Tgマウス由来T細胞と同等の抗腫瘍活性を示した（図９）。

[0151] A-2-7. CD19-CAR iLS細胞からNK細胞への分化誘導

CD19-CAR iLS細胞をOP9細胞上に播種し、10 ng/mL rmIL-15および100 IU/mL rhIL-2を添加したRPMIcomp培地で10日間培養した。その結果、高い割合でCAR-NK細胞が生成された（図１０）。

[0152] A-2-8. iLS細胞由来CD19-CAR-NK細胞の細胞傷害活性

CD19-CAR-NK細胞とヒトCD19を発現したB16メラノーマ細胞株を様々な細胞比で混合し、4時間共培養したところ、ヒトCD19を発現させていないB16メラノーマ細胞株と比較して高い細胞傷害活性を示すことが明らかとなった（図１１）。

[0153] A-2-9. CD19-CAR iLS細胞からマクロファージへの分化誘導

CD19-CAR iLS細胞をOP9細胞上に播種し、10 ng/mL rmSCF、5 ng/mL rmM-CSF、5 ng/mL rmIL-3、および 5 ng/mL rmIL-6を添加したIMDM中で培養した。４日後に半量の培地交換をおこなった。誘導開始から１週間培養したのち、F

CM解析を実施したところ、CD11b陽性F4/80陽性MHC classII（I-A）陽性のマクロファージの生成が確認された（図１２）。したがって、CAR iLS細胞はCAR-マクロファージを生成する能力を持つことが明らかとなった。

[0154] A-2-10. ヒト臍帯血CD34陽性細胞からpT/NKの作製

hCB-CD34陽性細胞は理化学研究所バイオリソース研究センターより入手した。hCB-CD34陽性細胞を100 ng/mL rhSCF、100 ng/mL rhTPO、および100 ng/mL rhG-CSFを添加したStemline II培地で1週間培養し、増幅させた。この細胞をOP9/DLL1細胞上に播種し、5 ng/mL rhIL-7、5 ng/mL rhFlt3-L、5 ng/mL rhSCFを添加したMEMαで培養したところ、培養17日目にpT/NK細胞（$CD5^+CD7^+$細胞）が生成された（図１３下段左）。

[0155] A-2-11. pT/NK細胞からNK細胞への分化誘導

pT/NK細胞をOP9/DLL1細胞上に播種し、20 ng/mL rhIL-7、10 ng/mL rhFlt3-L、20 ng/mL rhSCF、および10 ng/mL rhIL-15を添加したMEMαで培養することによって、NK細胞へと分化させた。NK細胞への分化効率をFCM解析によって評価した。また、比較対象として、Stemline II培地で増幅後のhCB-HSPCをOP9/DLL1細胞上に播種し、20 ng/mL rhIL-7、10 ng/mL rhFlt3-L、20 ng/mL rhSCF、および10 ng/mL rhIL-15を添加し、培養することによりNK細胞へと誘導した。その結果、pT/NK細胞はhCB-HSPCよりも17倍多くのNK細胞を生成することが明らかとなった（図１３下段右）。

[0156] A-2-12. pT/NK細胞由来NK細胞のサイトカイン放出アッセイ

pT/NK細胞由来のNK細胞のサイトカイン産生能を評価するため、NK細胞を標的細胞である白血病細胞株K562細胞株（K562細胞）と混合、もしくは、10 ng/mL PMAと1 μg/mL イオノマシンで処理し、1/500量のAPC結合CD107a抗体と1xProtein transport inhibitorを含むMEMα培地中で培養した。４時間後、細胞内染色を行い、サイトカインのFCM解析を実施したところ、標的細胞により活性化されることが明らかとなった（図１４）。

[0157] A-2-13. pT/NK細胞由来NK細胞の細胞傷害活性

pT/NK細胞由来NK細胞あるいはhCB-HSPC由来NK細胞とK562細胞を様々な細胞

比で混合し、4時間共培養したところ、pT/NK細胞由来NK細胞はhCB-HSPC由来NK細胞と同程度の高い細胞傷害活性を示すことが明らかとなった（図１５）。

[0158] A-2-14. pT/NK細胞由来NK細胞への遺伝子導入

pT/NK細胞由来のNK細胞へCAR遺伝子を導入しCAR-NK細胞を作製した。CAR遺伝子としては、細胞内ドメインにヒトタンパク質を用いて構築した、ヒトCD19を特異的に認識する抗CD19 CAR遺伝子（配列番号１１、１２）、及び神経芽腫抗原であるGD2を特異的に認識するCARをコードする抗GD2 CAR遺伝子（配列番号１３、１４）を用いた。配列番号１１の抗CD19 CAR遺伝子配列中、1-63位（配列番号１２の1-21 AA）がCD8αシグナルペプチド配列、64-129位（22-43 AA）が3xFlag遺伝子、130-864位（44-288 AA）が抗CD19 scFv（抗体Clone FMC63）遺伝子、874-1014位（292-338 AA）がヒトCD8αヒンジ領域遺伝子、1024-1119位（342-373 AA）がヒトCD28膜貫通ドメイン遺伝子、1120-1245位（374-415 AA）がヒト4-1BB細胞内シグナルドメイン遺伝子、1252-1593位（418-531 AA）がヒトCD3ζ細胞内シグナルドメイン遺伝子である。配列番号１３の抗GD2 CAR遺伝子配列では、130-867位（配列番号１４の44-289 AA）が抗GD2 scFv（抗体Clone 14g2a）遺伝子であり、その上流及び下流の配列は配列番号１１と同一である（1-63位（1-21 AA）がCD8αシグナルペプチド配列、64-129位（22-43 AA）が3xFlag配列、877-1017位（293-339 AA）がヒトCD8αヒンジ領域、1027-1122位（343-374 AA）がヒトCD28膜貫通ドメイン、1123-1248位（375-416 AA）がヒト4-1BB細胞内シグナルドメイン、1255-1596位（419-532 AA）がヒトCD3ζ細胞内シグナルドメイン）。

[0159] 膜結合型IL-21(memIL-21)および4-1BB ligand(41BBL)を安定発現するK562（K562/memIL-21/41BBL）細胞を10μｇ/mL マイトマイシンCで2.5時間処理した。マイトマイシンC処理K562/memIL-21/41BBL細胞とpT/NK細胞由来NK細胞を２：１の比率で混合し、200 IU/mL rhIL-2を添加したMEMα培地中で培養することによって、NK細胞を増幅させた。１週間培養後、NK細胞を10 ng/mL rhIL-15, 10 ng/mL rhIL-21および100 IU/mL rhIL-2を含むMEMα培地中で２日間培養し、抗CD19または抗GD2 CAR遺伝子をレンチウイルスを用いてスピンイン

フェクション法により導入した。マーカータンパク質であるVenus陽性のCAR-NK細胞をセルソーターにより単離したのち、K562/memIL-21/41BBL細胞と共培養することによって、さらに、増幅させた。増幅後、Venusの発現に対するFCM解析を実施することによって、いずれも導入遺伝子の発現を維持していることを確認した（図１６Ａ）。

[0160] A-2-15. pT/NK細胞由来抗CD19 CAR-NK細胞の細胞傷害活性

まず、B細胞性白血病株であり、CD19抗原を発現しているNALM6細胞をCell Tracer Far-Red（Invitrogen）で染色した。次に、pT/NK細胞由来の抗CD19 CAR-NK細胞をNALM6細胞と１：１の比率で混合し、４時間共培養した。共培養後、死細胞をLive/Dead Near-IR（Invitrogen）で染色し、FCM解析を用いて、死細胞の割合を測定したところ、抗原特異的にCAR-NK細胞が細胞傷害活性を示した（図１６Ｂ）。

[0161] A-2-16. pT/NK細胞へのCAR遺伝子導入

VSV-G又はGALVエンベロープを用いたレンチウイルスでpT/NK細胞への遺伝子導入効率（遺伝子はVenusのみをコードする遺伝子を使用）を比較した結果を図１７に示す。GALVエンベロープを使用することで導入効率が上昇した。

[0162] GALVエンベロープ（配列番号１６）を用いて作製したCAR遺伝子をコードするレンチウイルスを、生成されたpT/NK細胞へ遺伝子導入した。レトロネクチンをコートするプレート上にレンチウイルスを播種し、2000xgで１．５時間遠心し、レンチウイルスをレトロネクチンへ結合させたのちに、pT/NK細胞を播種した。800xgで１０分間遠心後、インキュベータ内で培養した。CAR遺伝子が導入された細胞をセルソーターによって、ソートし、CAR遺伝子導入pT/NK細胞（CAR-pT/NK細胞）を得た（図１８Ａ）。得られたCAR-pT/NK細胞をNK細胞誘導条件下で培養することによって、CAR遺伝子を安定発現するpT/NK細胞由来NK細胞を得た（図１８Ｂ）。

[0163] B. ヒトpT/NK細胞増幅法及びヒトpT/NK細胞からNK細胞への分化誘導方法の検討

B-1. ヒトpT/NK細胞誘導のためのサイトカイン濃度の検討

hCB-CD34陽性細胞からpT/NK細胞を生成・増幅する至適なサイトカイン濃度を検討した。理化学研究所バイオリソース研究センターより入手したhCB-CD34陽性細胞由来のHSPC（CD34陽性細胞を増幅した細胞集団）をOP9/DLL1フィーダー細胞上で（Notchシグナル共存下で）、recombinant human（rh）IL-7, rhFlt3-L, rhSCFを表１に示すサイトカイン濃度で添加し6週間培養した。培養後、pT/NK細胞の産生数をFCM解析で評価した。

[0164] これまでの検討から、マウスpT/NK細胞は、サイトカイン濃度を非特許文献２で報告した10 ng/mlとするよりも、25 ng/ml～50 ng/ml程度に高めた方が増幅効率が大幅に高まることが確認されている。図１９は、Mouse HSPC（Lineage-Sca1-ckit+: LSK）をOP9/DLL1フィーダー細胞上で、SCF, IL-7及びFlt3-Lをそれぞれ10 ng/mlもしくは30 ng/mlの濃度で培地に添加して2週間培養した後、pT/NK細胞数を計測した結果である。10 ng/mlでも1個のHSPCから約10000個と大量のpT/NK細胞が生成するが、各サイトカイン濃度を30ng/mlに高めると1個のHSPCから生成するpT/NK細胞は約60000個とさらに大幅に増幅した。

[0165] 一方、ヒトpT/NK細胞の場合はマウスpT/NK細胞とは異なり、図２０に示すように、高濃度（≧25ng/ml）のサイトカインを添加した場合にはヒトpT/NK細胞は増幅されず、rhIL-7, rhFlt3-L, rhSCFをそれぞれ5ng/mlで添加した場合に最も効率的にヒトpT/NK細胞を増幅できることが明らかとなった。上記A-2-10では、この検討結果に基づいて各サイトカインをそれぞれ5ng/mlで使用した。

[0166]

[表1]

Condition	IL-7 (ng/mL)	Flt3-L (ng/mL)	SCF (ng/mL)
1	50	50	50
2	25	25	25
3	10	10	10
4	5	5	5
5	50	5	5
6	25	5	5
7	10	5	5
8	5	50	5
9	5	25	5
10	5	10	5
11	5	5	50
12	5	5	25
13	5	5	10

[0167] B-2. ヒトpT/NK細胞増幅法を用いたNK細胞の大量産生

pT/NK細胞を用いて生成されたNK細胞の数を評価した。培養プロトコールを図２１Ａに示す。まず、hCB-HSPCを増幅するために、CD34陽性細胞を100ng/ml rhTPO, 100ng/ml rhSCF, 100ng/ml rhG-CSFを添加したStemline II培地を用いて１週間培養した。増幅したHSPCをOP9/DLL1細胞上で5ng/ml rhIL-7, 5ng/ml rhFlt3-L, 5ng/ml rhSCFを含むMEMα培地で培養し、pT/NK細胞を生成及び増幅させた。培養４週間後に10ng/ml rhIL-15, 10ng/ml rhFlt3-L, 20ng/ml rhIL-7, 20ng/ml rhSCFを含むMEMα培地でNotchシグナル非共存下で培養することによって、pT/NK細胞をNK細胞へ分化誘導した。比較対照として、既報（Li et al, Cell Stem Cell, Vol. 23, Issue 2, pp.181-192.e5, August 02, 2018）の培養法（HSPCを10ng/ml rhIL-15, 10ng/ml rhFlt3-L, 20ng/ml IL-7, 20ng/ml rhSCFを含むMEMα培地で培養する）を用いて、NK細胞を直接分化誘導した。図２１ＢにはCB-CD34陽性細胞からの細胞の増殖率を示す。図２１ＣにはNK細胞生成後のFCM解析の結果を示す。図２１ＤにはHSPCからNK細胞

を直接誘導した場合（従来法）とpT/NK細胞増幅法を用いた場合のNK細胞の産生数を示す。これらの結果から、本手法を用いるとpT/NK細胞からCD56陽性NK細胞を大量産生できることが明らかとなった。従来法と比較して200-500倍のNK細胞を産生した。また、pT/NK細胞をNK細胞へ分化誘導する際にNotchリガンドを発現するフィーダー細胞を用いてNotchリガンド共存培養を行った上記A-2-11に記載の方法によると、pT/NK細胞からのNK細胞の産生量は従来法の17倍であるから、NK細胞分化誘導の際にNotchシグナル非共存下で培養を行なう本手法とA-2-11記載の方法を比較すると、本手法によるNK細胞の産生量はA-2-11記載の方法の約12～30倍であり、本手法によればNK細胞の産生量をさらに大幅に向上できる。

[0168] B-3. ヒトpT/NK細胞由来NK細胞の増殖能

pT/NK細胞由来NK細胞の増殖能を評価した。比較対照としてCB（ヒト臍帯血）またはPB（ヒト末梢血）より採取したNK細胞（それぞれCB-NK, PB-NK）を用いた。

図２２Ａには10ng/ml rhIL-15を添加したMEMα培地中で２週間培養した後の細胞増殖率を示す。図２２Ｂには、MMC（マイトマイシン）処理したaAPC（artificial antigen presenting cell、NK細胞を刺激するリガンドを発現させた細胞）と1:2のE:T比で混合し、200 IU/mlのrhIL-2を含むMEMα培地でNK細胞を増幅した際の細胞数を示す。aAPCは培養1週間後に新たに添加し、計2週間培養した。この結果、pT/NK由来NK細胞はCB-NK細胞やPB-NK細胞と同程度の増殖能を持つことが明らかとなった。

[0169] B-4. ヒトpT/NK細胞由来NK細胞の表面抗原マーカーの発現（図２３）

pT/NK由来NK細胞のNK細胞関連受容体の発現量をFCM解析によって評価した。

pT/NK由来NK細胞はNKp44, NKp46, NKG2Dの発現量がCB-NK細胞及びPB-NK細胞と同程度であった。一方で、PB-NK細胞と比較してCD16やKIR2DL2/L3の発現量が低く、CB-NK細胞と比較してNKG2Aの発現量が低いことが明らかとなった。これらのことから、pT/NK由来NK細胞は成熟早期段階であると考えられた。

また、pT/NK細胞由来NK細胞はTIGITの発現がCB-NK細胞やPB-NK細胞と比較して顕著に低く、疲弊化度が低いことが示唆された。

[0170] B-5. ヒトpT/NK細胞由来NK細胞の細胞傷害活性

pT/NK細胞由来NK細胞のK562細胞に対する細胞傷害活性をPBあるいはCB由来のNK細胞と比較した。NK細胞とK562細胞を種々のE:T比で混合したのち、4時間共培養した。培養後、K562細胞の死細胞割合をFCM解析によって評価した（図２４Ａ）。また、活性化されたNK細胞のエフェクター分子の発現量を評価するため、NK細胞とK562細胞を1:2のE:T比で混合し、1/500量のAPC結合CD107a抗体と1xProtein transport inhibitorを含むMEMα培地中で培養した。4時間後に細胞内染色を行い、サイトカインの発現量をFCM解析した（図２４Ｂ）。

pT/NK由来NK細胞はCB-NK細胞やPB-NK細胞と同程度の高い細胞傷害活性を示した。また、K562細胞刺激によるエフェクター分子の発現量もCB-NK細胞やPB-NK細胞と同程度あることが示された（図２４C）。

[0171] B-6. 凍結保存したヒトpT/NK細胞由来NK細胞の機能

pT/NK由来NK細胞の凍結保存に対する影響を評価した。凍結融解後のpT/NK細胞由来NK細胞数を測定し、Recovery rate（凍結後の細胞数／凍結前の細胞数100）を算出した。その結果、凍結融解後でも凍結前の60-100％のNK細胞が得られた（図２５Ａ）。次に、凍結融解後のpT/NK細胞由来NK細胞をaAPC及び200 IU/ml rhIL-2を添加した培地で培養することによって、細胞増殖能を評価した。2週間の共培養によって、細胞が200-650倍程度増幅したことから、凍結保存によって、NK細胞の増殖能が失われていないことが確認された（図２５Ｂ）。続いて、pT/NK細胞由来NK細胞をaAPC及び200 IU/ml rhIL-2を添加した培地で共培養後、K562細胞に対する細胞傷害活性を評価した。NK細胞とK562細胞を種々のE:T比で4時間培養したのち、K562細胞の死細胞割合をFCM解析により測定した。その結果、凍結pT/NK細胞由来NK細胞は凍結前と同様に高い細胞傷害活性を維持していることが示された（図２５Ｃ）。

[0172] B-7. ヒトpT/NK細胞の増幅を促進する因子の探索

hCB-HSPCからpT/NK細胞への分化・増殖を促進する因子を探索するため、hCB-HSPCをOP9/DLL1細胞上で5ng/ml rhIL-7, 5ng/ml rhFlt3-L, 5ng/ml rhSCF存在下に培養する系に、10ng/mlの各サイトカインもしくは0.1mMのニコチンアミドを添加し、pT/NK細胞の増幅率を算出した。その結果、M-CSF, TPO, IL-6, G-CSFおよびニコチンアミドがpT/NK細胞の分化・増殖を促進することが明らかとなった（図２６）。

[0173] B-8. TPOおよびM-CSFによるヒトpT/NK細胞の増幅

TPOもしくはM-CSFがpT/NK細胞の生成を促進する濃度を検討した。hCB-HSPCをOP9/DLL1細胞上で5ng/ml rhIL-7, 5ng/ml rhFlt3-L, 5ng/ml rhSCF存在下に培養する系に、0-50ng/mlのTPOもしくはM-CSFを添加し、pT/NK細胞の増殖率を検討した。その結果、10-50ng/ml TPOもしくは10-25ng/ml M-CSFを加えるとpT/NKの分化・増殖を促進することが明らかとなった（図２７）。

[0174] B-9. TPOあるいはM-CSFによって増幅したヒトpT/NK細胞のNK細胞産生能

TPOあるいはM-CSFを添加して増幅したpT/NK細胞のNK細胞への分化能を評価した。すなわち、hCB-HSPCをOP9/DLL1細胞上で5ng/ml rhIL-7, 5ng/ml rhFlt3-L, 5ng/ml rhSCFに加えて、25ng/ml TPOもしくはM-CSFを添加した培地で4週間培養し、pT/NK細胞を増幅させた。次にpT/NK細胞を10ng/ml rhIL-15, 10ng/ml rhFlt3-L, 20ng/ml rhIL-7, 20ng/ml rhSCFを含むMEMα培地で培養することによってNK細胞へ分化誘導した。その結果、それぞれのサイトカインを添加しない場合と比較して、TPOで4.3倍、M-CSFで1.6倍のNK細胞が得られた（図２８）。

[0175] B-10. TPOによる骨髄HSPCからpT/NK細胞およびNK細胞への誘導

TPOが骨髄由来HSPCからpT/NKへの誘導に対しても有効かどうかを明らかにするため、ヒト骨髄由来CD34陽性細胞を100ng/ml rhTPO, 100ng/ml rhSCF, 100ng/ml rhG-CSFを添加したStemline II培地を用いて１週間培養した後、OP9/DLL1細胞上で5ng/ml rhIL-7, 5ng/ml rhFlt3-L, 5ng/ml rhSCFおよび25ng/ml TPOを含むMEMα培地で8週間培養し、pT/NK細胞を生成・増幅させた。その結果、TPOを加えることによって骨髄由来pT/NK細胞が数倍増幅することが明

らかとなった（図２９下段左）。また、この培養５週間目のpT/NKからNK細胞を誘導したところ、TPOを添加しない場合と比較して約100倍程度のNK細胞が得られた（図２９下段右）。

[0176] B-11. ヒトHSPCから誘導したpT/NK細胞由来のNK細胞の表面抗原マーカーの発現

ヒト骨髄HSPCから誘導したpT/NK細胞由来のNK細胞（hBM-pT/NK由来NK細胞）のNK細胞関連受容体の発現量をFCM解析によって評価した。その結果、hCB血由来NK細胞と同様に、NKp44, NKp46, NKG2Dの発現が認められたもののCD16, KIR（KIR2DL2/L3）の発現が低く、成熟初期段階のNK細胞であることが示唆された（図３０Ａ）。

[0177] ヒト臍帯血HSPCより誘導したヒトT/NK前駆細胞由来のNK細胞（pT/NK-NK細胞）、ヒトCB-NK細胞及びヒトPB-NK細胞で、活性化受容体、抑制性受容体及び疲弊化マーカーの発現を比較した結果を図３０Ｂに示す。CB-NK細胞は成熟度が低い幼若なNK細胞であることが知られているが、ヒトpT/NK-NK細胞はCB-NK細胞よりもさらに幼若であるという特徴を有していた。また、ヒトpT/NK-NK細胞では疲弊度マーカーであるTIGITの発現もCB-NK細胞より低く、疲弊度も低いという特徴を有していた。

[0178] 図３０Ｃは、ヒト臍帯血HSPCより誘導したヒトpT/NK-NK細胞、ヒトCB-NK細胞及びヒトPB-NK細胞で遺伝子発現を比較したRNA-seqデータである。ヒトpT/NK-NK細胞（NK.pTNK_1～3）は、CCR3, CCR6, CCR7, CCR8, 及びCCR9がヒトCB-NK細胞（NK.CB_1～3）及びヒトPB-NK細胞（NK.PB_1～3）と比べて高発現していた。

[0179] B-12. 骨髄HSPCから分化したNK細胞の細胞傷害活性

hBM-pT/NK細胞由来NK細胞のK562細胞に対する細胞傷害活性を評価した。NK細胞とK562細胞を種々のE:T比で混合したのち、４時間共培養した。培養後のK562細胞の死細胞割合をFCM解析したところ、hBM-pT/NK細胞由来NK細胞はK562細胞に対して高い抗がん活性を示した（図３１）。

[0180] B-13. pT/NK細胞の特異的マーカーの同定

pT/NK細胞におけるCD122（IL-2 receptor βサブユニット）の発現をFCM解析により評価した（図３２Ａ）。pT/NK細胞はProT1（$CD7^+CD5^-CD1a^-$）細胞、ProT2（$CD7^+CD5^+CD1a^-$）細胞、PreT（$CD7^+CD5^+CD1a^+$）細胞の3つの分画を含む。CD122はNotchシグナルを受ける前の造血前駆細胞である$CD34^+CD7^-$細胞で発現が認められず、ProT1（$CD7^+CD5^-CD1a^-$）細胞及びProT2（$CD7^+CD5^+CD1a^-$）細胞において高発現し、PreT（$CD7^+CD5^+CD1a^+$）細胞で発現が低下した。CD122はマウスではNK前駆細胞のマーカーとして使われている（非特許文献４）がヒトでは報告がない。すなわち、CD122はヒトT/NK前駆細胞の新規マーカー分子であると考えられた。このCD122陽性細胞の増殖能を評価するためCFSEアッセイを行なった（図３２Ｂ）。10μg/ml CFSEを添加した0.1% BSA/PBS中で染色後、CD122陽性細胞をセルソーターにより単離し、OP9/DLL1細胞上で5ng/ml rhIL-7, 5ng/ml rhFlt3-L, 5ng/ml rhSCF存在下に１週間培養したのちに、CFSEの蛍光強度をFCMで解析した。その結果、CD122陽性細胞は高い増殖能を有することが示された。次に、CD122陽性細胞のT細胞とNK細胞への分化能を評価した（図３２Ｃ）。hCB由来HSPCをOP9/DLL1細胞上で2週間培養後、Lineage marker陰性CD122陽性細胞をセルソーターにより単離し、T細胞及びNK細胞誘導条件下において培養した。CD122陽性細胞はCD4/CD8ダブルポジティブ（DP）細胞とCD56陽性NK細胞の両方を生成したことから、pT/NK細胞であることが示唆された。

[0181] C. ヒトpT/NK細胞由来CAR-NK細胞の作製と機能評価

C-1. CARレトロウイルスベクター

pMYs-IGレトロウイルスベクターへ抗CD19 CAR遺伝子もしくは抗HER2 CAR遺伝子を搭載し、pMYs-CD19 CAR-BBz-IG（図３３中段）及びpMYs-HER2 CAR-BBz-IG（図３３下段）ベクターを作製した。

[0182] C-2. pT/NK細胞由来NK細胞から生成したCAR-NK細胞

pT/NK細胞由来NK細胞へレトロウイルスを用いてスピンインフェクション法によりCAR遺伝子を導入した。マーカータンパク質であるGFPが陽性のCAR-NK細胞をセルソーターにより単離したのち、aAPCと共培養することによって、さらに増幅させた。培養後、GFPの発現をFCM解析し、導入遺伝子が安定して

発現していることを確認した（図３４Ａ）。次に、抗CD19 CAR-NK細胞あるいは抗HER2 CAR-NK細胞の抗原特異的な細胞傷害活性を評価した。pT/NK細胞由来の抗CD19 CAR-NK細胞をCD19抗原陽性のB細胞性白血病細胞株NALM6（NALM6細胞）と、抗HER2 CAR-NK細胞をHER2抗原陽性の乳がん細胞株MDA-MB-453（MDA-MB-453細胞）とそれぞれ種々のE:T比で混合し、4時間共培養したのちに、FCM解析によって標的細胞の死細胞割合を測定した。その結果、抗CD19 CAR-NK細胞、抗HER2 CAR-NK細胞とも、Mock NK細胞と比較して標的細胞に対し高い細胞傷害活性を示した（図３４Ｂ）。

[0183] C-3. pT/NK細胞へのCAR遺伝子の導入

pT/NK細胞に抗CD19 CAR遺伝子もしくは抗HER2 CAR遺伝子を導入し、マーカータンパク質であるGFPを発現する細胞をセルソーターにより単離後、OP9/DLL1細胞上で5ng/ml rhIL-7, 5ng/ml rhFlt3-L, 5ng/ml rhSCF存在下に2週間培養し、増幅させた。培養後のpT/NK細胞におけるGFPの発現をFCM解析した結果、pT/NK細胞は導入遺伝子を安定して発現することが示された（図３５）。

[0184] C-4. CAR-pT/NK細胞からCAR-NK細胞への分化誘導

CAR遺伝子を導入したpT/NK細胞（CAR-pT/NK細胞）からCAR-NK細胞の作製を試みた。図３６ＡはCAR-pT/NK細胞からCAR-NK細胞の作製スキームを示す。CAR-pT/NK細胞をOP9/DLL1細胞上で5ng/ml rhIL-7, 5ng/ml rhFlt3-L, 5ng/ml rhSCF存在下に培養して増幅させた後、10ng/ml rhIL-15, 10ng/ml rhFlt3-L, 20ng/ml IL-7, 20ng/ml rhSCFを含むMEMα培地で培養することにより、NK細胞へ誘導した。得られたCAR-NK細胞を2週間、aAPC及び200 IU/ml rhIL-2を含む培地で培養することによって増幅させた。図３６Ｂには培養42日目におけるCAR-pT/NK細胞由来CAR-NK細胞のFCM解析の結果を示し、導入遺伝子を安定して発現するNK細胞が作製されたことが確認できる。また、CAR-NK細胞はCAR-pT/NK細胞あたり1 x 10^4個程度産生されることが明らかとなった（図３６Ｃ）。

[0185] C-5. CAR-pT/NK細胞由来CAR-NK細胞の細胞傷害活性

CAR-pT/NK細胞由来CAR-NK細胞の標的細胞に対する細胞傷害活性を評価した

。抗CD19 CAR-NK細胞とNALM6細胞を、もしくは抗HER2 CAR-NK細胞とMDA-MB-453細胞をそれぞれ4時間共培養したのちに、FCM解析した。その結果、いずれも抗原特異的な細胞傷害活性を有することが示された（図３７）。

[0186] C-6. CAR-pT/NK細胞由来CAR-NK細胞の細胞表面マーカーの発現

pT/NK由来抗HER2 CAR-NK細胞、CB由来抗HER2 CAR-NK細胞、PB由来抗HER2 CAR-NK細胞の代表的なNK細胞関連受容体の発現量をFCMにより解析した。その結果を図３８に示す。pT/NK細胞由来抗HER2 CAR-NK細胞はCB由来抗HER2 CAR-NK細胞、PB由来抗HER2 CAR-NK細胞と比較して、より成熟初期段階のNK細胞の表現型を示した。また、pT/NK細胞由来抗HER2 CAR-NK細胞はCB由来抗HER2 CAR-NK細胞、PB由来抗HER2 CAR-NK細胞と比較して、TIGITの発現量が低かった。

[0187] C-7. CAR-pT/NK細胞由来CAR-NK細胞の細胞傷害活性

pT/NK, CB-NK, PB-NK由来の抗HER2CAR-NK細胞をそれぞれMDA-MB-453と4時間共培養後に、MDA-MB-453細胞の死細胞の割合をFCM解析により測定した。その結果、pT/NK細胞由来抗HER2 CAR-NK細胞はCB由来抗HER2 CAR-NK細胞、PB由来抗HER2 CAR-NK細胞よりも優れた抗がん活性を示した（図３９）。

[0188] C-8. CAR-pT/NK細胞由来CAR-NK細胞のin vivo抗腫瘍活性

pT/NK細胞由来抗HER2 CAR-NK細胞のin vivoにおける抗腫瘍活性を評価した。まず、1 x 10^6個のルシフェラーゼ安定発現MDA-MB-453細胞をNOD. Cg-Prkdc^{scid}/IL2rg^{tm1Sug}/ShiJic (NOG)マウスへ皮下移植し、担がんマウスを作製した。MDA-MB-453細胞移植から14, 17, 21, 24日後に5 x 10^6個のCAR-NK細胞を尾静脈から投与した。また、50000 IU rhIL-2を2-3日おきに計13回、腹腔内へ投与した。腫瘍の増殖を生体発光イメージングにより測定した。

その結果、CB由来抗HER2 CAR-NK細胞及びpT/NK由来Mock NK細胞投与群において腫瘍増殖の抑制は認められなかったのに対して、pT/NK由来抗HER2 CAR-NK細胞投与群では顕著に腫瘍の増殖が抑制された（図４０Ｂ、図４０Ｃ上段）。また、いずれのNK細胞投与群においても体重減少は確認されず（図４０Ｃ下段）、重篤な副作用も認められなかった。

請求の範囲

[請求項1] T細胞受容体（TCR）、キメラ抗原受容体（CAR）又はキメラ自己抗体受容体（CAAR）である外因性受容体を発現する免疫細胞の生産方法であって、

造血幹細胞を含む細胞集団より、多能性血液前駆細胞を調製する工程、

前記外因性受容体をコードする遺伝子を多能性血液前駆細胞に導入することにより、前記外因性受容体を発現する多能性血液前駆細胞を調製する工程、及び

前記外因性受容体を発現する多能性血液前駆細胞を免疫細胞に分化誘導する工程

を含む、方法。

[請求項2] TCR、CAR又はCAARである外因性受容体を発現する免疫細胞の生産方法であって、

造血幹細胞を含む細胞集団より、多能性血液前駆細胞を調製する工程、

多能性血液前駆細胞を免疫細胞に分化誘導する工程、及び

前記外因性受容体をコードする遺伝子を免疫細胞に導入する工程

を含み、前記多能性血液前駆細胞が、人工白血球幹細胞又はT/NK前駆細胞である、方法。

[請求項3] 前記多能性血液前駆細胞が、人工白血球幹細胞又はT/NK前駆細胞である、請求項１記載の方法。

[請求項4] 前記多能性血液前駆細胞が人工白血球幹細胞であり、多能性血液前駆細胞を調製する工程において、造血幹細胞を含む細胞集団を、細胞内の転写因子E2Aの機能を阻害した状態で、B細胞への分化を誘導する条件下で培養することにより、人工白血球幹細胞を調製する、請求項１又は２記載の方法。

[請求項5] E2Aの機能の阻害が、分化抑制因子Idを造血幹細胞内で強制発現さ

せることにより行われる、請求項４記載の方法。

[請求項6] 前記多能性血液前駆細胞がT/NK前駆細胞であり、多能性血液前駆細胞を調製する工程において、造血幹細胞を含む細胞集団をNotchリガンドの共存下で培養することにより、T/NK前駆細胞を調製する、請求項１又は２記載の方法。

[請求項7] 造血幹細胞を含む細胞集団を、SCF、TPO及びG-CSFをそれぞれ100 ng/mL以上の濃度で含む培地でNotchリガンドの非共存下で培養した後、Notchリガンドの共存下で培養する、請求項６記載の方法。

[請求項8] 前記免疫細胞が、T細胞、NK細胞、マクロファージ、又はB細胞である、請求項１～７のいずれか１項に記載の方法。

[請求項9] 外因性受容体がTCRであり、前記免疫細胞がT細胞である、請求項８記載の方法。

[請求項10] 外因性受容体がCAR又はCAARであり、前記免疫細胞が、T細胞、NK細胞、又はマクロファージである、請求項８記載の方法。

[請求項11] 外因性受容体が抗原特異的受容体であり、前記抗原が腫瘍抗原である、請求項１～１０のいずれか１項に記載の方法。

[請求項12] 腫瘍又は自己免疫疾患に対する免疫細胞療法剤の製造方法であって、

造血幹細胞を含む細胞集団より、多能性血液前駆細胞を調製する工程、

CAAR又は腫瘍抗原を特異的に認識するTCR若しくはCARである外因性受容体をコードする遺伝子を多能性血液前駆細胞に導入することにより、前記外因性受容体を発現する多能性血液前駆細胞を調製する工程、

前記外因性受容体を発現する多能性血液前駆細胞をT細胞に分化誘導することにより、前記外因性受容体を発現するT細胞（TCR-T、CAR-T又はCAAR-T細胞）を調製する工程、

TCR-T、CAR-T又はCAAR-T細胞をTCR刺激し、CD8陽性細胞傷害性TCR-

T、CAR-T又はCAAR-T細胞へ分化誘導する工程、及び

CD8陽性細胞傷害性TCR-T若しくはCAR-T細胞を、前記腫瘍抗原を発現する腫瘍に対する免疫細胞療法剤として調製するか、又は、CD8陽性細胞傷害性CAAR-T細胞を自己免疫疾患に対する免疫細胞療法剤として調製する工程

を含む、方法。

[請求項13] 腫瘍又は自己免疫疾患に対する免疫細胞療法剤の製造方法であって、

造血幹細胞を含む細胞集団より、多能性血液前駆細胞を調製する工程、

多能性血液前駆細胞をT細胞に分化誘導する工程、

前記T細胞をTCR刺激した後、CAAR又は腫瘍抗原を特異的に認識するTCR若しくはCARである外因性受容体をコードする遺伝子を導入することにより、CD8陽性細胞傷害性TCR-T、CAR-T又はCAAR-T細胞を調製する工程、及び

CD8陽性細胞傷害性TCR-T若しくはCAR-T細胞を、前記腫瘍抗原を発現する腫瘍に対する免疫細胞療法剤として調製するか、又は、CD8陽性細胞傷害性CAAR-T細胞を自己免疫疾患に対する免疫細胞療法剤として調製する工程

を含み、前記多能性血液前駆細胞が、人工白血球幹細胞又はT/NK前駆細胞である、方法。

[請求項14] 腫瘍又は自己免疫疾患に対する免疫細胞療法剤の製造方法であって、

造血幹細胞を含む細胞集団より、多能性血液前駆細胞を調製する工程、

CAAR又は腫瘍抗原を特異的に認識するCARであるキメラ受容体をコードする遺伝子を多能性血液前駆細胞に導入することにより、前記キメラ受容体を発現する多能性血液前駆細胞を調製する工程、

前記キメラ受容体を発現する多能性血液前駆細胞をNK細胞又はマクロファージに分化誘導することにより、前記キメラ受容体を発現するNK細胞（CAR-NK若しくはCAAR-NK細胞）又はマクロファージ（CAR-マクロファージ若しくはCAAR-マクロファージ）を調製する工程、及び

CAR-NK細胞若しくはCAR-マクロファージを、前記腫瘍抗原を発現する腫瘍に対する免疫細胞療法剤として調製するか、又は、CAAR-NK細胞若しくはCAAR-マクロファージを自己免疫疾患に対する免疫細胞療法剤として調製する工程

を含む、方法。

[請求項15] 調製した前記キメラ受容体を発現するNK細胞又はマクロファージを受容体刺激する工程をさらに含み、受容体刺激後のキメラ受容体発現NK細胞又はマクロファージを前記免疫細胞療法剤として調製する、請求項１４記載の方法。

[請求項16] 腫瘍又は自己免疫疾患に対する免疫細胞療法剤の製造方法であって、

造血幹細胞を含む細胞集団より、多能性血液前駆細胞を調製する工程、

多能性血液前駆細胞をNK細胞又はマクロファージに分化誘導する工程、

NK細胞又はマクロファージを受容体刺激した後、CAAR又は腫瘍抗原を特異的に認識するCARであるキメラ受容体をコードする遺伝子を導入することにより、キメラ受容体を発現するNK細胞（CAR-NK若しくはCAAR-NK細胞）又はマクロファージ（CAR-マクロファージ若しくはCAAR-マクロファージ）を調製する工程、及び

CAR-NK細胞若しくはCAR-マクロファージを、前記腫瘍抗原を発現する腫瘍に対する免疫細胞療法剤として調製するか、又は、CAAR-NK細胞若しくはCAAR-マクロファージを自己免疫疾患に対する免疫細胞療法剤として調製する工程

を含み、前記多能性血液前駆細胞が、人工白血球幹細胞又はT/NK前駆細胞である、方法。

[請求項17] 患者の腫瘍又は自己免疫疾患を治療する方法であって、

造血幹細胞を含む細胞集団より、多能性血液前駆細胞を調製する工程、

CAAR又は腫瘍抗原を特異的に認識するTCR若しくはCARである外因性受容体をコードする遺伝子を多能性血液前駆細胞に導入することにより、前記外因性受容体を発現する多能性血液前駆細胞を調製する工程、

前記外因性受容体を発現する多能性血液前駆細胞をT細胞に分化誘導することにより、前記外因性受容体を発現するT細胞であるTCR-T、CAR-T又はCAAR-T細胞を調製する工程、

TCR-T、CAR-T又はCAAR-T細胞をTCR刺激し、CD8陽性細胞傷害性TCR-T、CAR-T又はCAAR-T細胞へ分化誘導する工程、及び

CD8陽性細胞傷害性TCR-T若しくはCAR-T細胞を、前記腫瘍抗原を発現する腫瘍を有する患者に投与するか、又は、CD8陽性細胞傷害性CAAR-T細胞を自己免疫疾患患者に投与する工程

を含む、方法。

[請求項18] 患者の腫瘍又は自己免疫疾患を治療する方法であって、

造血幹細胞を含む細胞集団より、多能性血液前駆細胞を調製する工程、

多能性血液前駆細胞をT細胞に分化誘導する工程、

前記T細胞をTCR刺激した後、CAAR又は腫瘍抗原を特異的に認識するTCR若しくはCARである外因性受容体をコードする遺伝子を導入することにより、CD8陽性細胞傷害性TCR-T、CAR-T又はCAAR-T細胞を調製する工程、及び

CD8陽性細胞傷害性TCR-T若しくはCAR-T細胞を、前記腫瘍抗原を発現する腫瘍を有する患者に投与するか、又は、CD8陽性細胞傷害性CAA

R-T細胞を自己免疫疾患患者に投与する工程
を含み、前記多能性血液前駆細胞が、人工白血球幹細胞又はT/NK前駆細胞である、方法。

[請求項19] 患者の腫瘍又は自己免疫疾患を治療する方法であって、
造血幹細胞を含む細胞集団より、多能性血液前駆細胞を調製する工程、
CAAR又は腫瘍抗原を特異的に認識するCARであるキメラ受容体をコードする遺伝子を多能性血液前駆細胞に導入することにより、前記キメラ受容体を発現する多能性血液前駆細胞を調製する工程、
前記キメラ受容体を発現する多能性血液前駆細胞をNK細胞又はマクロファージに分化誘導することにより、CAR-NK細胞、CAAR-NK細胞、CAR-マクロファージ又はCAAR-マクロファージであるキメラ受容体発現免疫細胞を調製する工程、
CAR-NK細胞若しくはCAR-マクロファージを、前記腫瘍抗原を発現する腫瘍を有する患者に投与するか、又は、CAAR-NK細胞若しくはCAAR-マクロファージを自己免疫疾患患者に投与する工程
を含む、方法。

[請求項20] 調製した前記キメラ受容体発現免疫細胞を受容体刺激する工程をさらに含み、受容体刺激後のキメラ受容体発現免疫細胞を前記患者に投与する、請求項１９記載の方法。

[請求項21] 患者の腫瘍又は自己免疫疾患を治療する方法であって、
造血幹細胞を含む細胞集団より、多能性血液前駆細胞を調製する工程、
多能性血液前駆細胞をNK細胞又はマクロファージに分化誘導する工程、
NK細胞又はマクロファージを受容体刺激した後、CAAR又は腫瘍抗原を特異的に認識するCARであるキメラ受容体をコードする遺伝子を導入することにより、CAR-NK細胞、CAAR-NK、CAR-マクロファージ又はC

AAR-マクロファージを調製する工程、及び

CAR-NK細胞若しくはCAR-マクロファージを、前記腫瘍抗原を発現する腫瘍を有する患者に投与するか、又は、CAAR-NK細胞若しくはCAAR-マクロファージを自己免疫疾患患者に投与する工程

を含み、前記多能性血液前駆細胞が、人工白血球幹細胞又はT/NK前駆細胞である、方法。

[請求項22] 患者の腫瘍を治療する方法であって、

下記(1)又は(2)により、CAR-マクロファージを調製する工程：

(1) 造血幹細胞を含む細胞集団より多能性血液前駆細胞を調製し、腫瘍抗原を特異的に認識するCARをコードする遺伝子を前記多能性血液前駆細胞に導入することにより、前記CARを発現する多能性血液前駆細胞を調製した後、該CAR発現多能性血液前駆細胞をマクロファージに分化誘導する工程；

(2) 造血幹細胞を含む細胞集団より人工白血球幹細胞又はT/NK前駆細胞を調製し、マクロファージに分化誘導して受容体刺激した後、前記CARをコードする遺伝子を導入する工程；

下記(3)又は(4)により、CAR-T細胞を調製する工程：

(3) 造血幹細胞を含む細胞集団より多能性血液前駆細胞を調製し、前記CARをコードする遺伝子を前記多能性血液前駆細胞に導入することにより、前記CARを発現する多能性血液前駆細胞を調製し、該CAR発現多能性血液前駆細胞をT細胞に分化誘導した後にTCR刺激することにより、CD8陽性細胞傷害性TCR-T又はCAR-T細胞へ分化誘導する工程；

(4) 造血幹細胞を含む細胞集団より人工白血球幹細胞又はT/NK前駆細胞を調製し、T細胞に分化誘導してTCR刺激した後、前記CARをコードする遺伝子を導入する工程；及び

CAR-マクロファージとCAR-T細胞を組み合わせて、前記腫瘍抗原を発現する腫瘍を有する患者に投与する工程

を含む、方法。

[請求項23] 患者の腫瘍を治療する方法であって、

下記工程(1)又は(2)により、CAR-マクロファージを調製する工程：

(1) 造血幹細胞を含む細胞集団より多能性血液前駆細胞を調製し、腫瘍抗原を特異的に認識するCARをコードする遺伝子を前記多能性血液前駆細胞に導入することにより、前記CARを発現する多能性血液前駆細胞を調製した後、該CAR発現多能性血液前駆細胞をマクロファージに分化誘導する工程；

(2) 造血幹細胞を含む細胞集団より人工白血球幹細胞又はT/NK前駆細胞を調製し、マクロファージに分化誘導して受容体刺激した後、前記CARをコードする遺伝子を導入する工程；

下記工程(5)又は(6)により、CAR-NK細胞を調製する工程：

(5) 造血幹細胞を含む細胞集団より多能性血液前駆細胞を調製し、前記CARをコードする遺伝子を前記多能性血液前駆細胞に導入することにより、前記CARを発現する多能性血液前駆細胞を調製した後、該CAR発現多能性血液前駆細胞をNK細胞に分化誘導する工程；

(6) 造血幹細胞を含む細胞集団より人工白血球幹細胞又はT/NK前駆細胞を調製し、NK細胞に分化誘導して受容体刺激した後、前記CARをコードする遺伝子を導入する工程；及び

CAR-マクロファージとCAR-NK細胞を組み合わせて、前記腫瘍抗原を発現する腫瘍を有する患者に投与する工程

を含む、方法。

[請求項24] 前記工程(5)が、前記CAR発現多能性血液前駆細胞をNK細胞に分化誘導してCAR-NK細胞を調製した後、CAR-NK細胞を受容体刺激することをさらに含む、請求項２３記載の方法。

[請求項25] 前記工程(1)が、前記CAR発現多能性血液前駆細胞をマクロファージに分化誘導してCAR-マクロファージを調製した後、CAR-マクロファージを受容体刺激することをさらに含む、請求項２２～２４のいずれか

１項に記載の方法。

[請求項26] ヒト造血幹細胞を含む細胞集団を、Notchリガンドの共存下、SCF、Flt3-L及びIL-7をそれぞれ1 ng/mL以上10 ng/mL未満の濃度で含む培地で培養する工程を含む、ヒトT/NK前駆細胞の製造方法。

[請求項27] 前記培地が、TPO及びM-CSFの少なくともいずれか一方をさらに含む、請求項２６記載の方法。

[請求項28] 前記ヒト造血幹細胞を含む細胞集団が、ヒト造血幹細胞を含む細胞集団をSCF、TPO及びG-CSFをそれぞれ100 ng/mL以上の濃度で含む培地でNotchリガンドの非共存下培養した後の細胞集団である、請求項２６～２７のいずれか１項に記載の方法。

[請求項29] 請求項２６～２８のいずれか１項に記載の方法によりヒトT/NK前駆細胞を製造する工程、及び

製造したヒトT/NK前駆細胞を、Notchリガンドの非共存下、IL-7, Flt3-L, SCF及びIL-15を含む培地で培養することにより、ヒトNK細胞を分化誘導する工程

を含む、ヒトNK細胞の製造方法。

[請求項30] 前記T/NK前駆細胞がヒトT/NK前駆細胞であり、多能性血液前駆細胞を調製する工程において、ヒト造血幹細胞を含む細胞集団から請求項２６～２８のいずれか１項に記載の方法によりヒトT/NK前駆細胞を製造する、請求項６又は７記載の前記免疫細胞の生産方法。

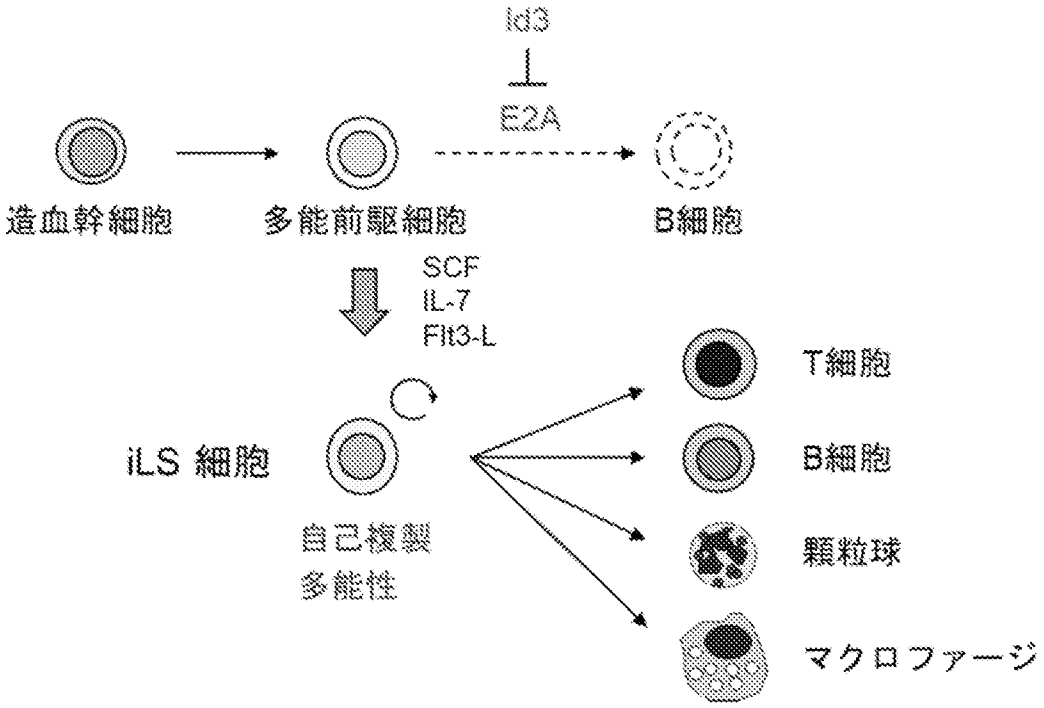
[請求項31] 前記免疫細胞がヒトNK細胞であり、前記多能性血液前駆細胞を免疫細胞に分化誘導する工程において、ヒトT/NK前駆細胞を、Notchリガンドの非共存下、IL-7, Flt3-L, SCF及びIL-15を含む培地で培養することにより、ヒトNK細胞を分化誘導する、請求項３０記載の前記免疫細胞の生産方法。

[請求項32] CD122陽性であることを特徴とする、培養ヒトT/NK前駆細胞。

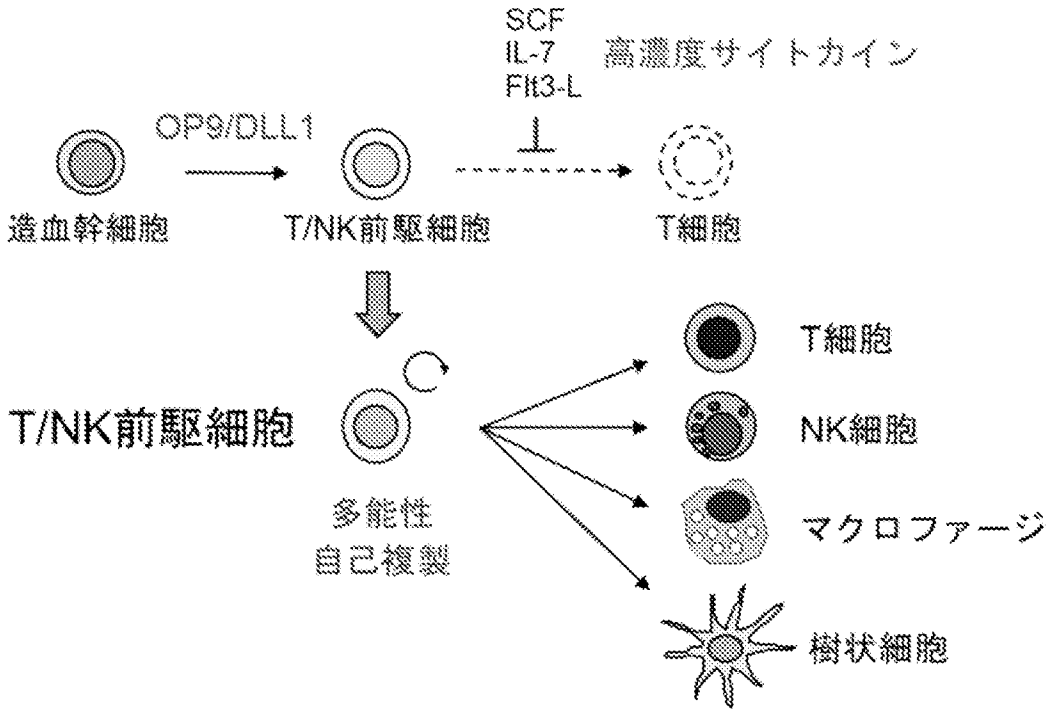
[請求項33] ヒト臍帯血より分離されたヒト臍帯血NK細胞よりも、成熟度の指標となるCD16及びKIRの発現並びに疲弊マーカーTIGITの発現が低いこと

により、前記ヒト臍帯血NK細胞よりも幼若かつ疲弊度が低いことを特徴とする、培養ヒトNK細胞。

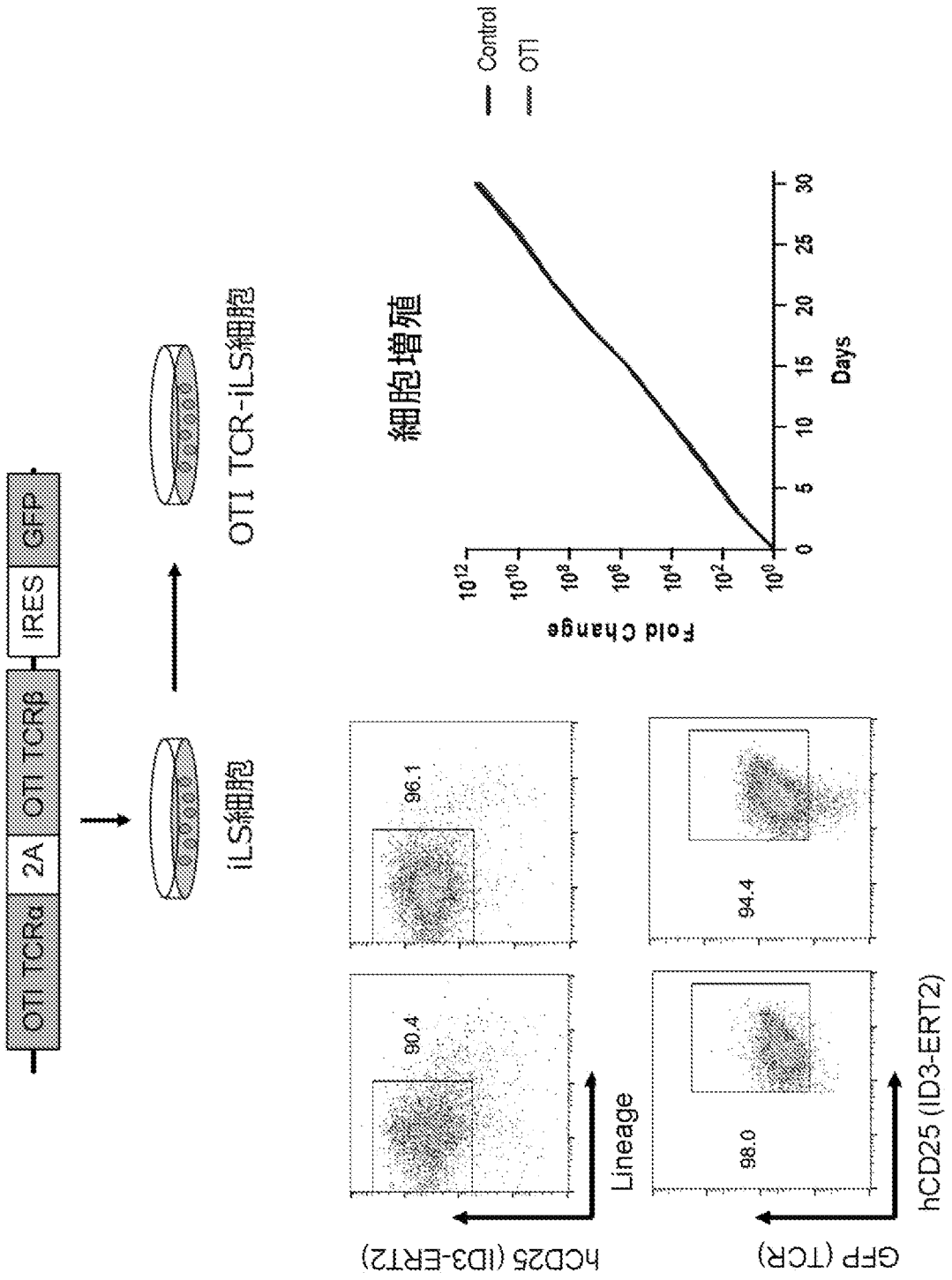
[図1A]


Id3
E2A
造血幹細胞
多能前駆細胞
B細胞
SCF
IL-7
Flt3-L
iLS 細胞
自己複製
多能性
T細胞
B細胞
顆粒球
マクロファージ

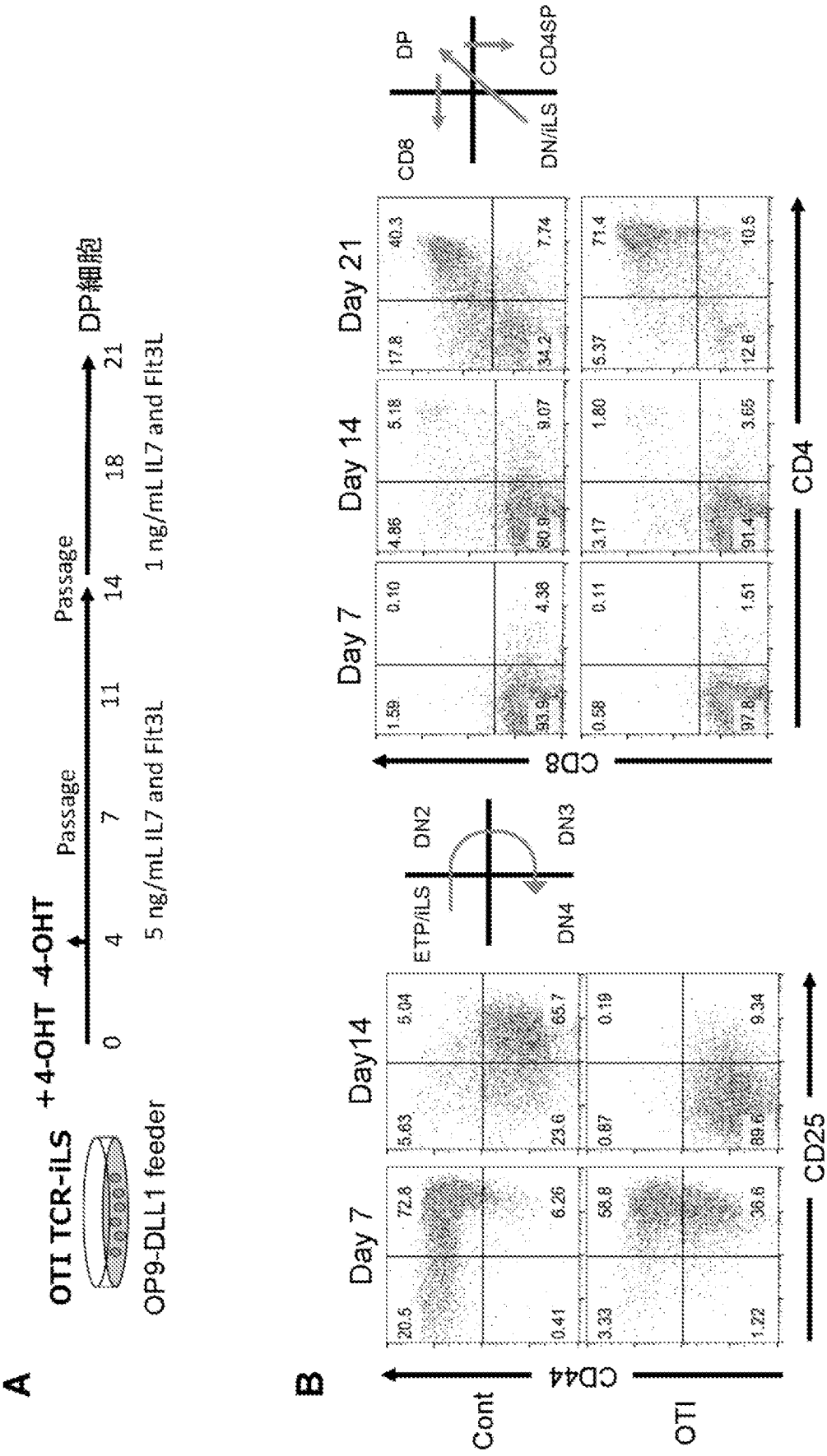
[図1B]


SCF
IL-7
Flt3-L
高濃度サイトカイン
OP9/DLL1
造血幹細胞
T/NK前駆細胞
T細胞
T/NK前駆細胞
多能性
自己複製
T細胞
NK細胞
マクロファージ
樹状細胞

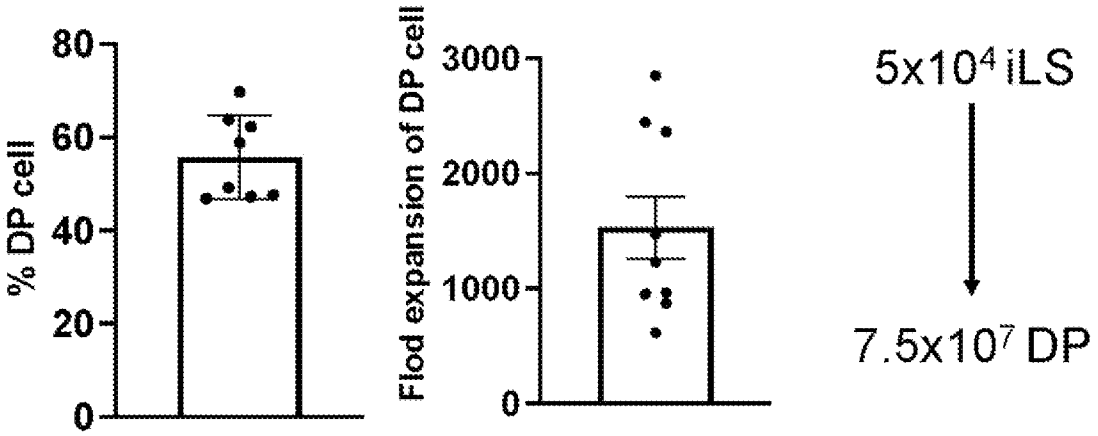
[図2]


OTI TCRα
2A
OTI TCRβ
IRES
GFP
iLS細胞
OTI TCR-iLS細胞
細胞増殖
Control
OTI
Fold Change
Days
96.1
90.4
94.4
98.0
Lineage
hCD25 (ID3-ERT2)
GFP (TCR)
hCD25 (ID3-ERT2)

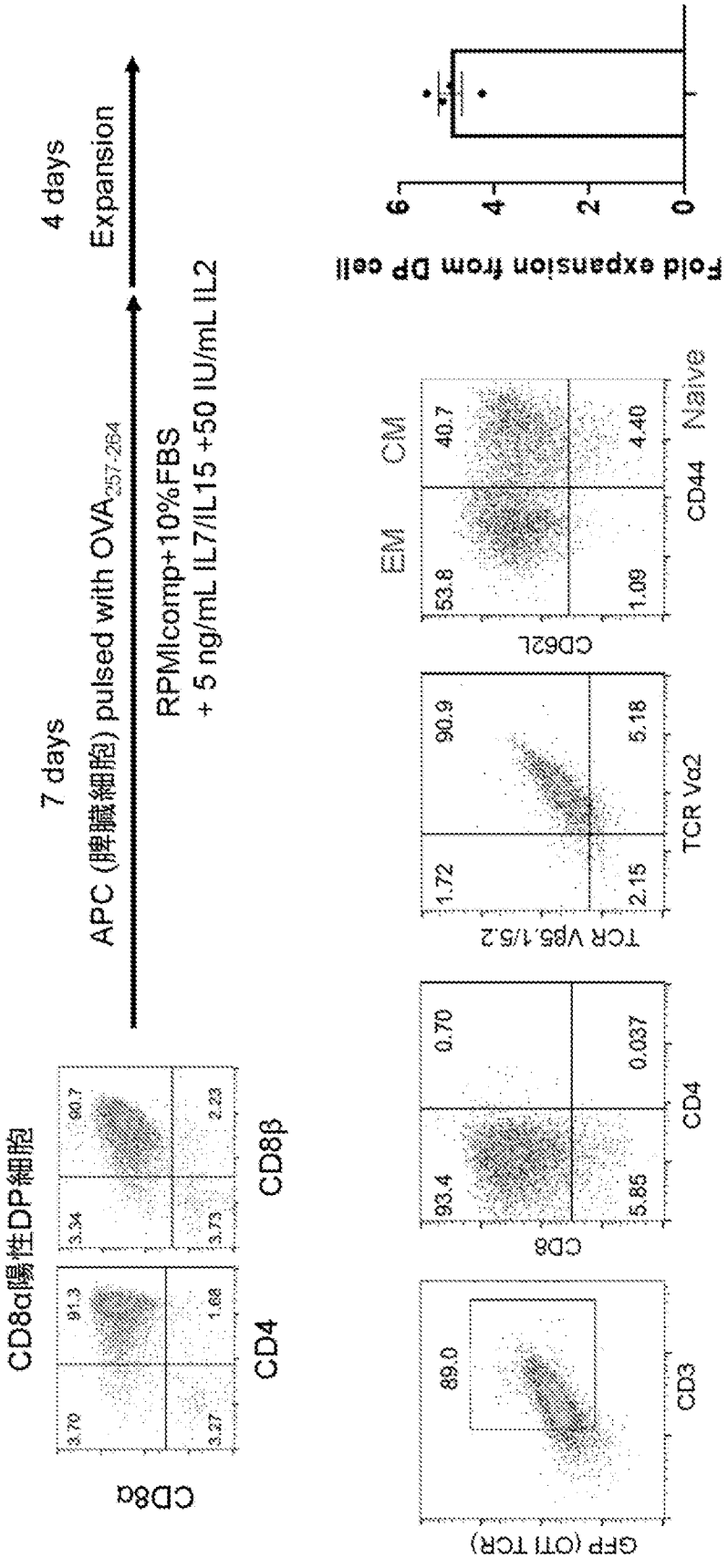
[図3]


A
OTI TCR-iLS
+4-OHT
-4-OHT
Passage
Passage
DP細胞
0
4
7
11
14
18
21
OP9-DLL1 feeder
5 ng/mL IL7 and Flt3L
1 ng/mL IL7 and Flt3L
B
Cont
OTI
CD44
CD25
Day 7
Day14
ETP/iLS
DN2
DN3
DN4
CD8
CD4
Day 7
Day 14
Day 21
DP
CD4SP
DN/iLS
CD8

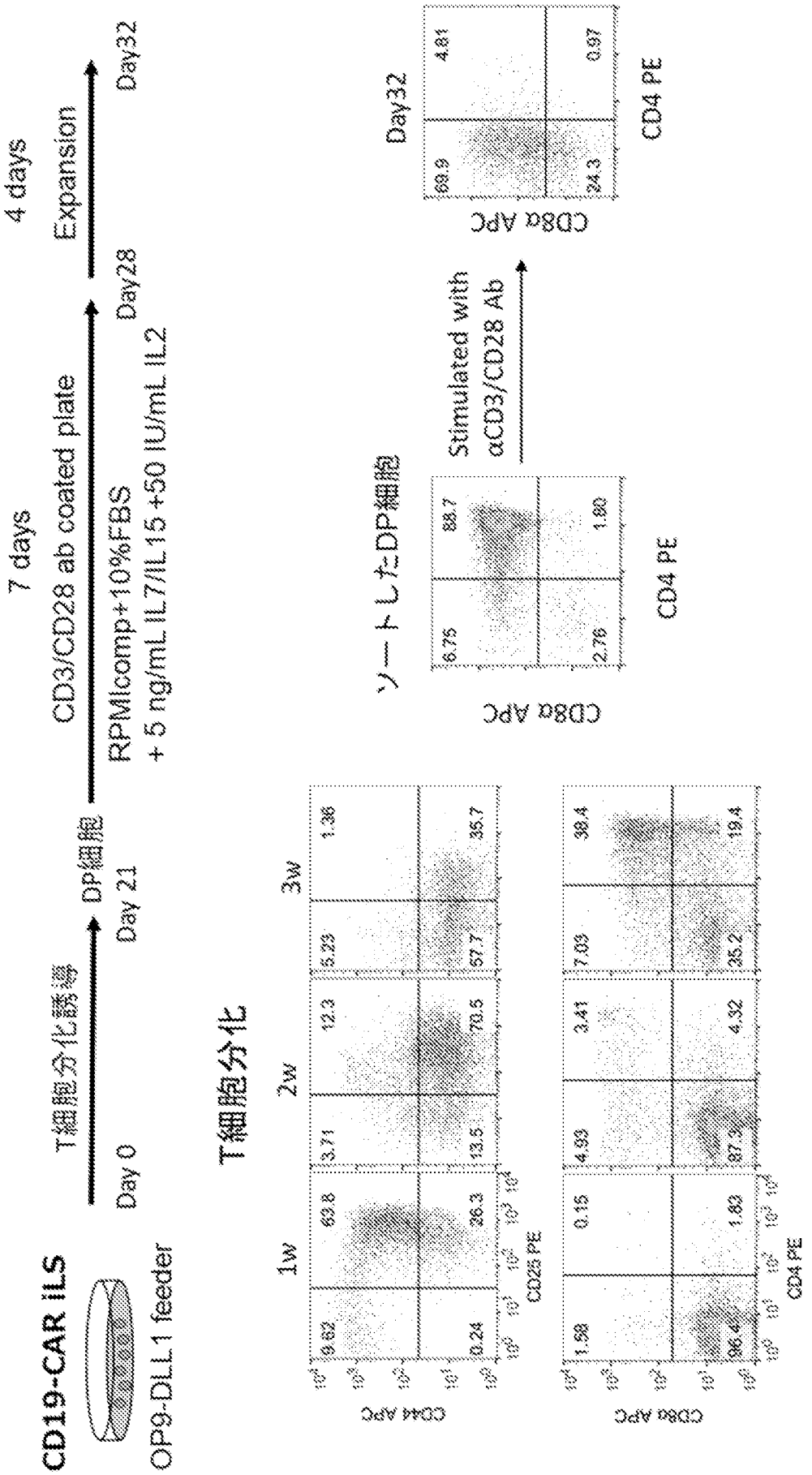
[図4]


% DP cell
80
60
40
20
0
Flod expansion of DP cell
3000
2000
1000
0
5x10⁴ iLS
7.5x10⁷ DP

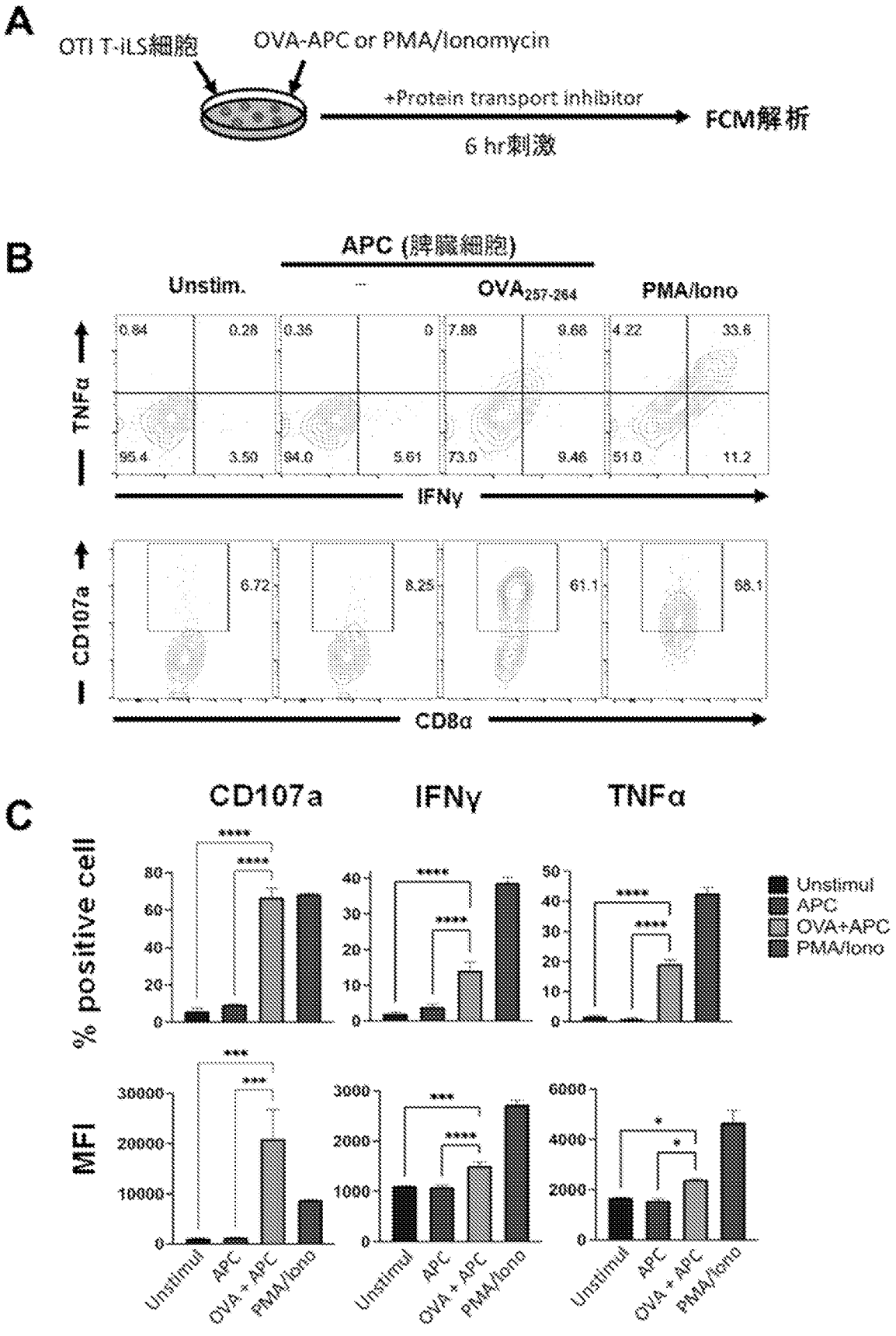
[図5]


CD8α陽性DP細胞
CD8α
CD8β
CD4
3.70
91.3
3.34
60.7
3.27
1.68
3.73
2.23
7 days
APC (脾臓細胞) pulsed with OVA257-264
RPMIcomp+10%FBS
+ 5 ng/mL IL7/IL15 +50 IU/mL IL2
4 days
Expansion
Fold expansion from DP cell
6
4
2
0
GFP (OT1 TCR)
89.0
CD3
CD8
93.4
0.70
5.85
0.037
CD4
TCR Vβ5.1/5.2
1.72
90.9
2.15
5.18
TCR Vα2
CD62L
EM
CM
53.8
40.7
1.09
4.40
CD44
Naive

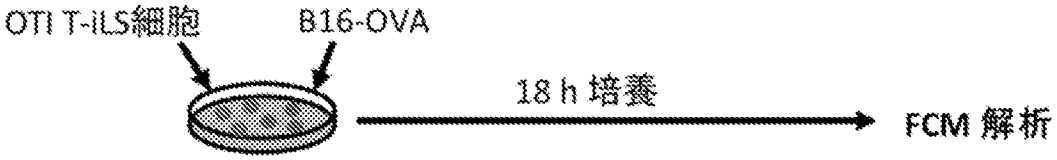
[図6]

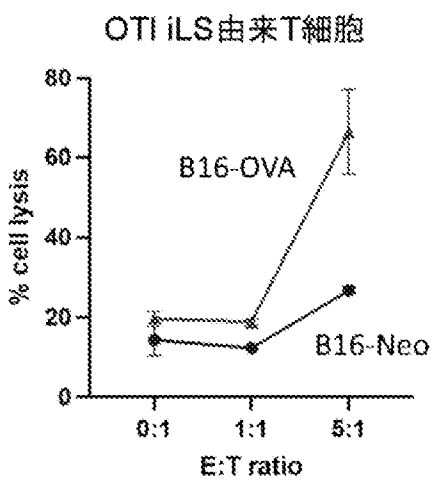

CD19-CAR iLS
OP9-DLL1 feeder
T細胞分化誘導
Day 0
Day 21
DP細胞
7 days
RPMIcomp+10%FBS
+ 5 ng/mL IL7/IL15 +50 IU/mL IL2
4 days
CD3/CD28 ab coated plate
Day28
Expansion
Day32
T細胞分化
1w
2w
3w
CD44 APC
CD25 PE
CD8α APC
CD4 PE
ソートしたDP細胞
Stimulated with
αCD3/CD28 Ab
Day32
CD8α APC
CD4 PE

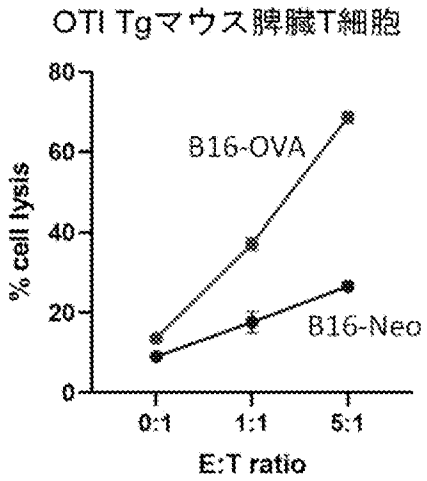
[図7]


A
OTI T-iLS細胞
OVA-APC or PMA/Ionomycin
+Protein transport inhibitor
6 hr刺激
FCM解析
B
APC (脾臓細胞)
Unstim.
OVA257-264
PMA/Iono
TNFα
IFNγ
CD107a
CD8α
0.64
0.28
0.36
0
7.88
8.66
4.22
33.8
95.4
3.50
84.0
5.61
73.0
9.46
51.0
11.2
6.72
8.25
61.1
88.1
C
CD107a
IFNγ
TNFα
% positive cell
MFI
Unstimul
APC
OVA+APC
PMA/Iono
Unstimul
APC
OVA + APC
PMA/Iono

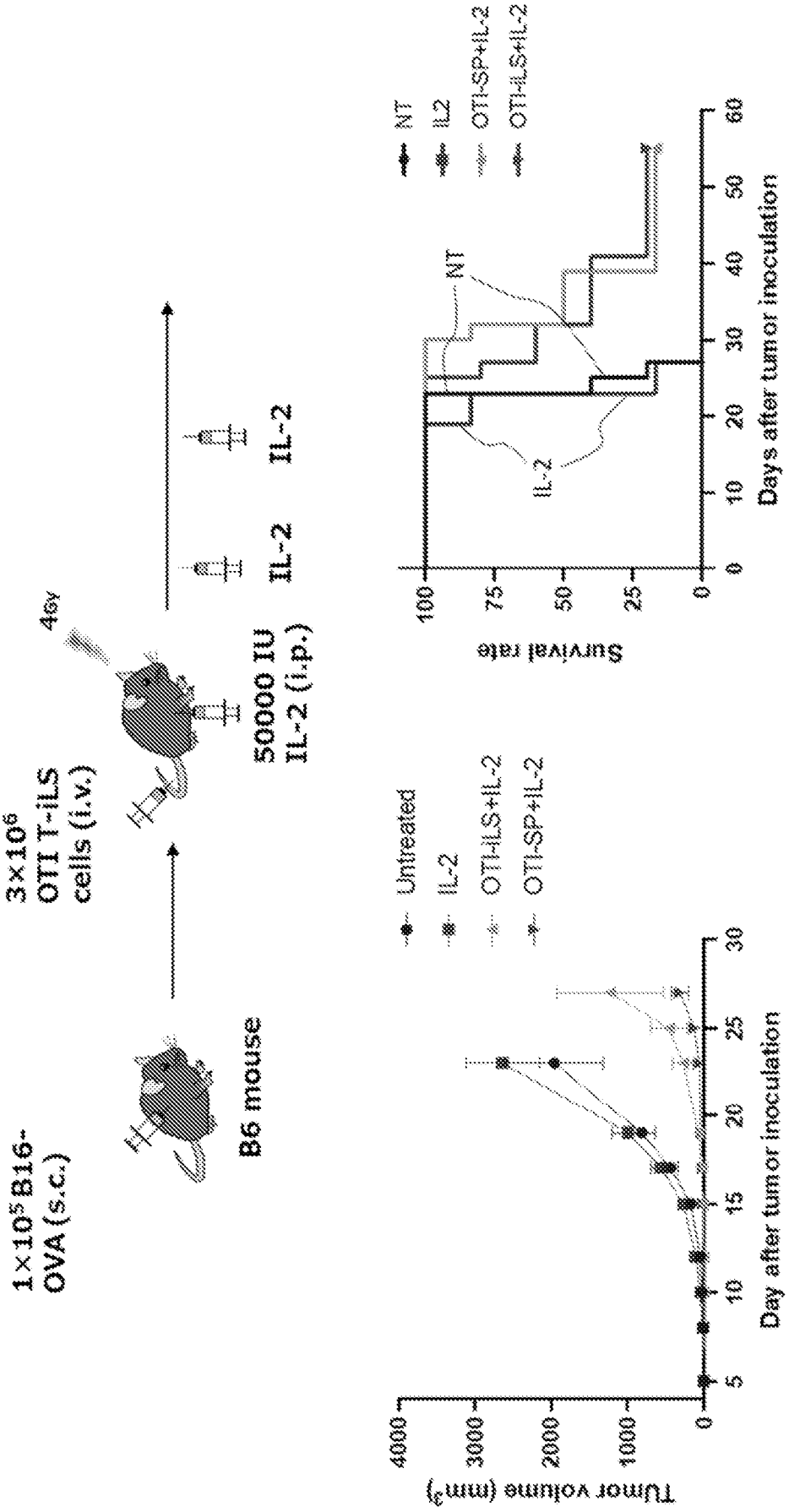
[図8]


OTI T-iLS細胞
B16-OVA
18 h 培養
FCM 解析

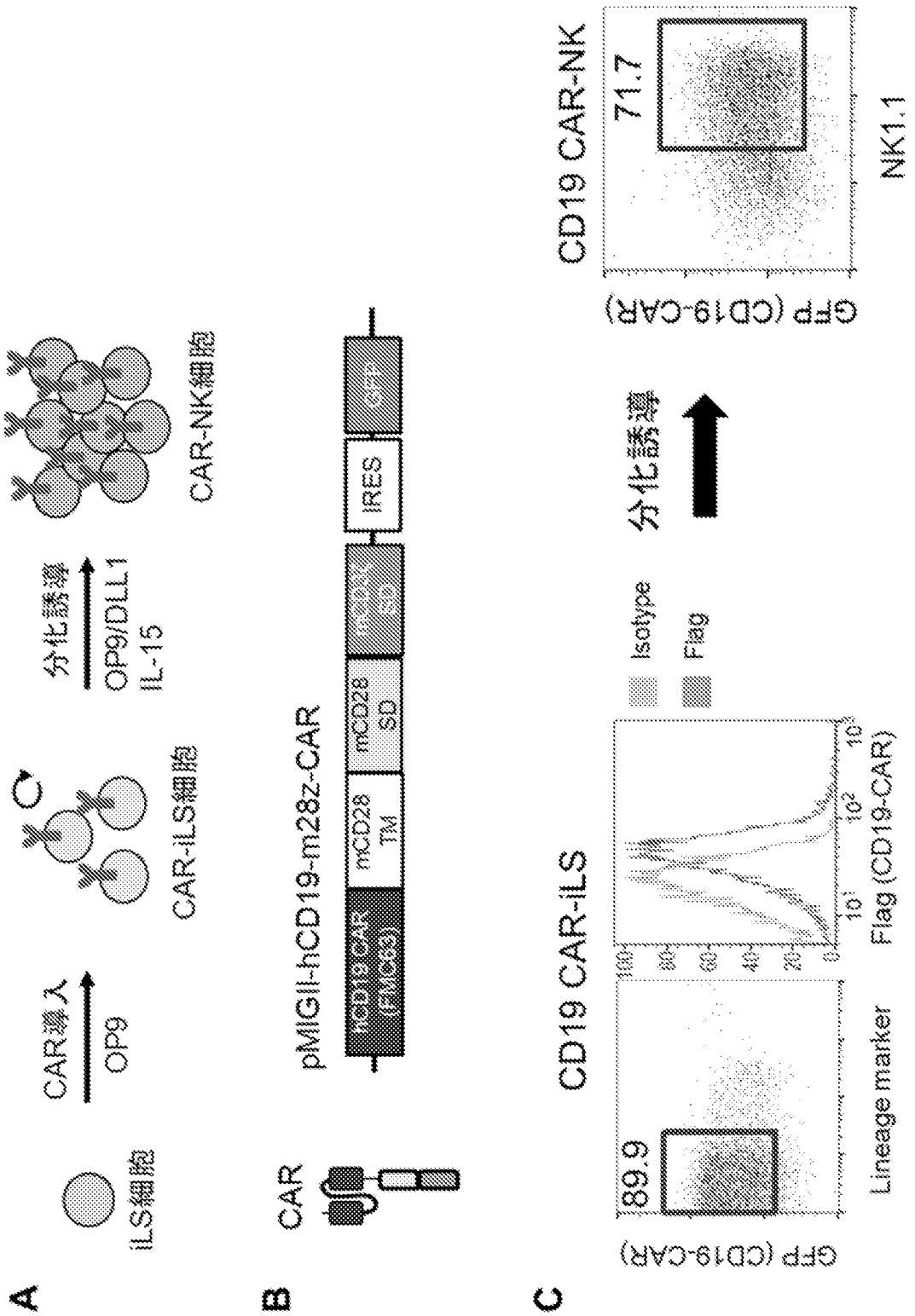

OTI iLS由来T細胞
% cell lysis
80
60
40
20
0
B16-OVA
B16-Neo
0:1
1:1
5:1
E:T ratio


OTI Tgマウス脾臓T細胞
% cell lysis
80
60
40
20
0
B16-OVA
B16-Neo
0:1
1:1
5:1
E:T ratio

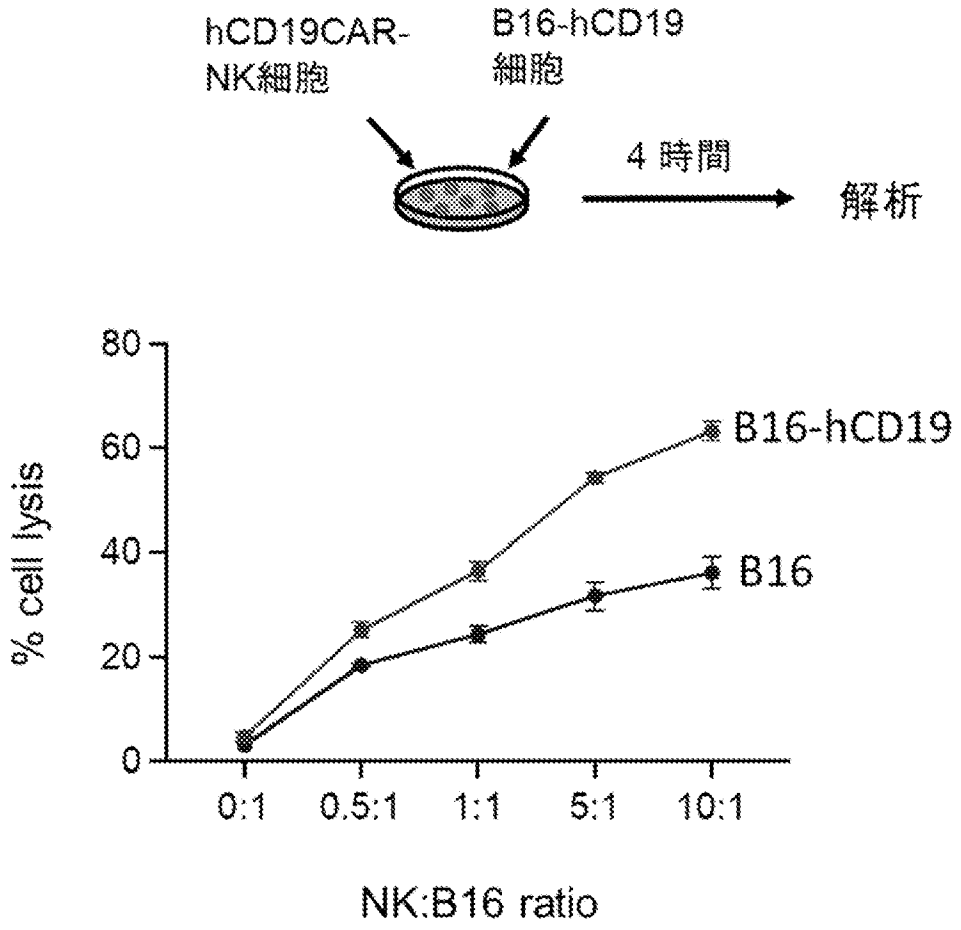
[図9]


1×10^5 B16-OVA (s.c.)
B6 mouse
3×10^6 OTI T-iLS cells (i.v.)
4Gy
50000 IU IL-2 (i.p.)
IL-2
IL-2
Untreated
IL-2
OTI-iLS+IL-2
OTI-SP+IL-2
Tumor volume (mm^3)
Day after tumor inoculation
NT
IL2
OTI-SP+IL2
OTI-iLS+IL-2
NT
IL-2
Survival rate
Days after tumor inoculation

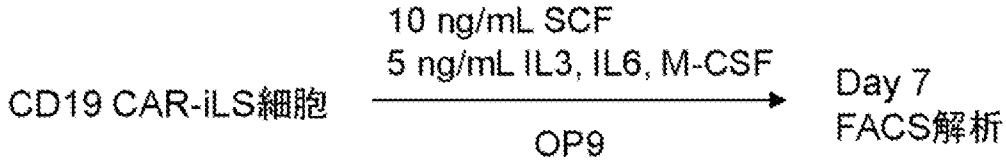
[図10]

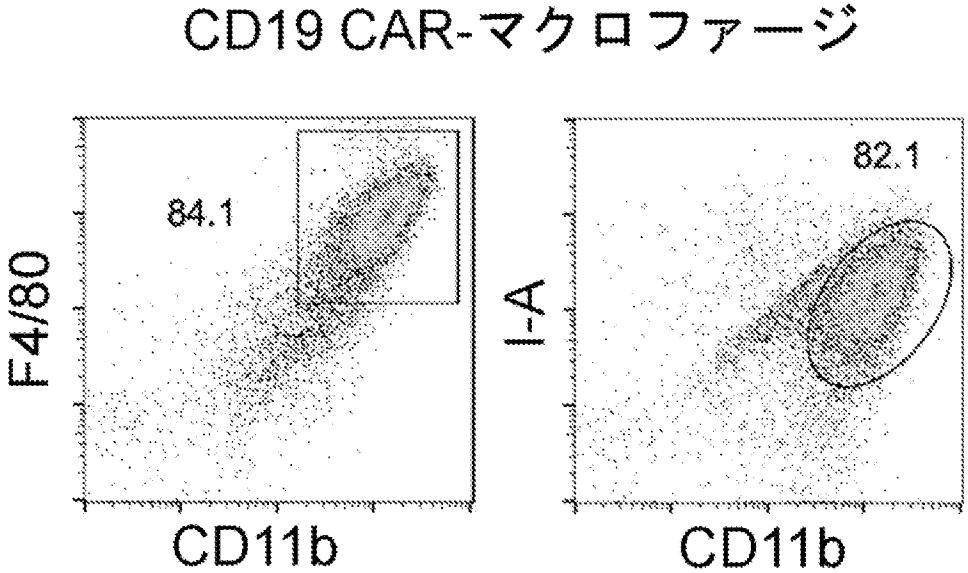

A
iLS細胞
CAR導入
OP9
CAR-iLS細胞
分化誘導
OP9/DLL1
IL-15
CAR-NK細胞
B
CAR
pMIGII-hCD19-m28z-CAR
mCD28
TM
mCD28
SD
IRES
GFP
C
CD19 CAR-iLS
Isotype
Flag
分化誘導
89.9
GFP (CD19-CAR)
Lineage marker
Flag (CD19-CAR)
CD19 CAR-NK
71.7
GFP (CD19-CAR)
NK1.1

[図11]

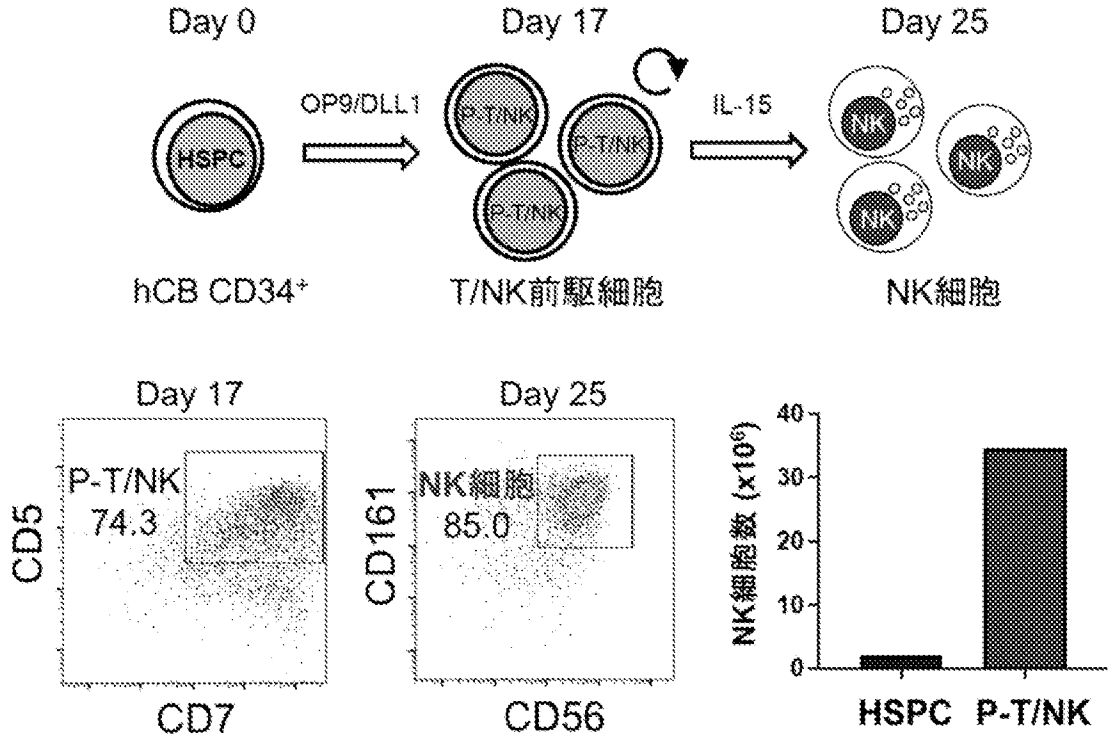

hCD19CAR-
NK細胞
B16-hCD19
細胞
4 時間
解析
% cell lysis
80
60
40
20
0
B16-hCD19
B16
0:1
0.5:1
1:1
5:1
10:1
NK:B16 ratio

[図12]

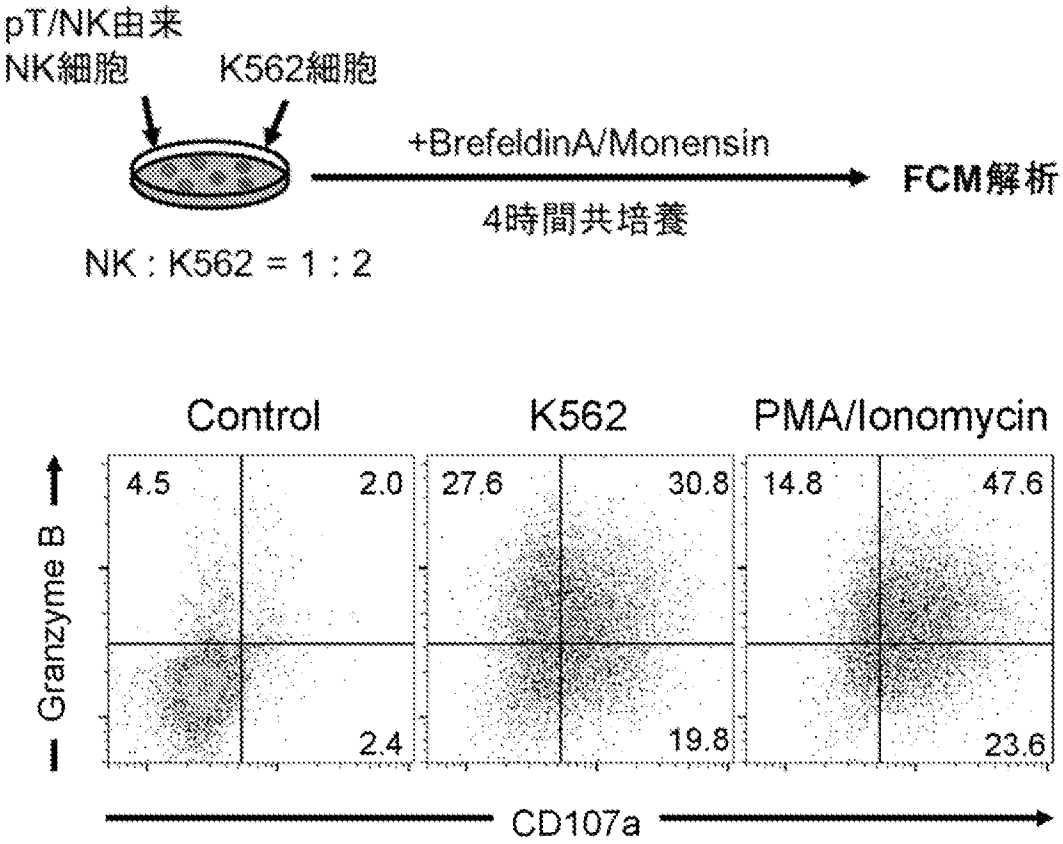

CD19 CAR-iLS細胞
10 ng/mL SCF
5 ng/mL IL3, IL6, M-CSF
OP9
Day 7
FACS解析


CD19 CAR-マクロファージ
F4/80
84.1
CD11b
I-A
82.1
CD11b

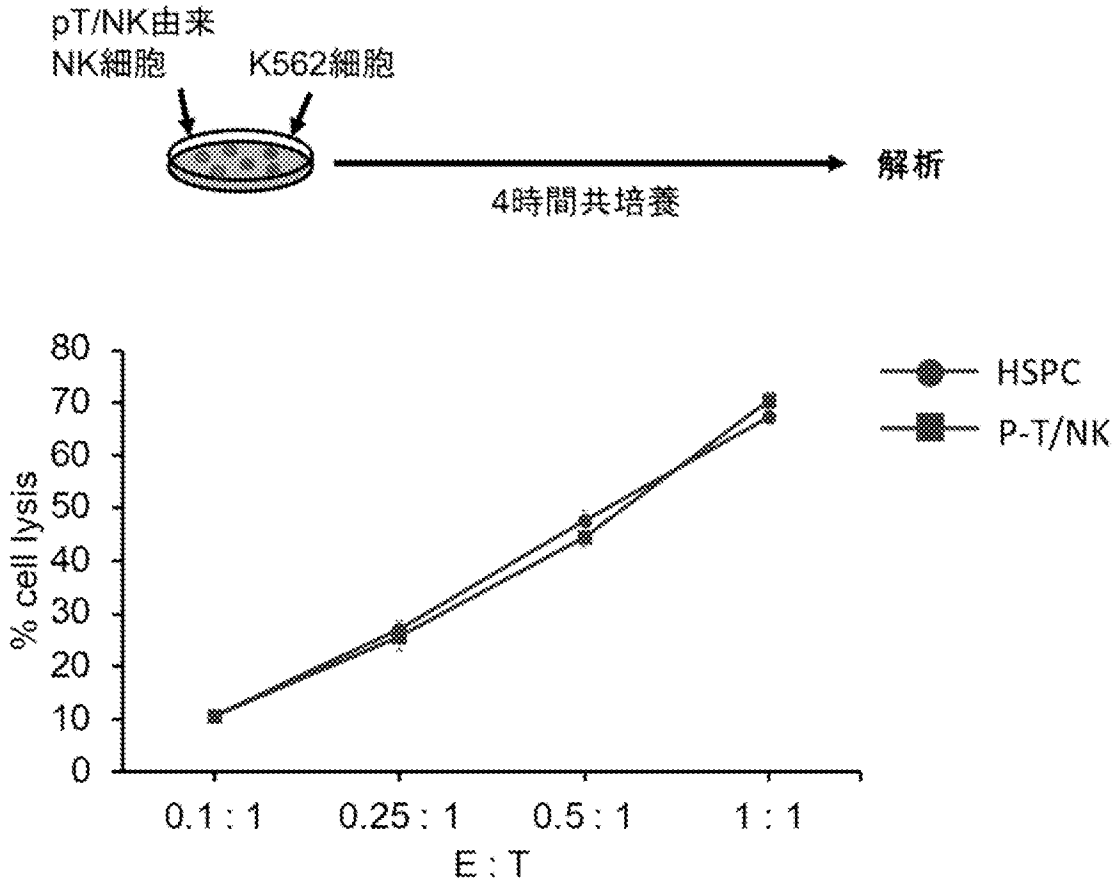
[図13]


Day 0
Day 17
Day 25
HSPC
OP9/DLL1
P-T/NK
IL-15
NK
hCB CD34+
T/NK前駆細胞
NK細胞
Day 17
Day 25
CD5
P-T/NK
74.3
CD7
CD161
NK細胞
85.0
CD56
NK細胞数 (x10^6)
40
30
20
10
0
HSPC
P-T/NK

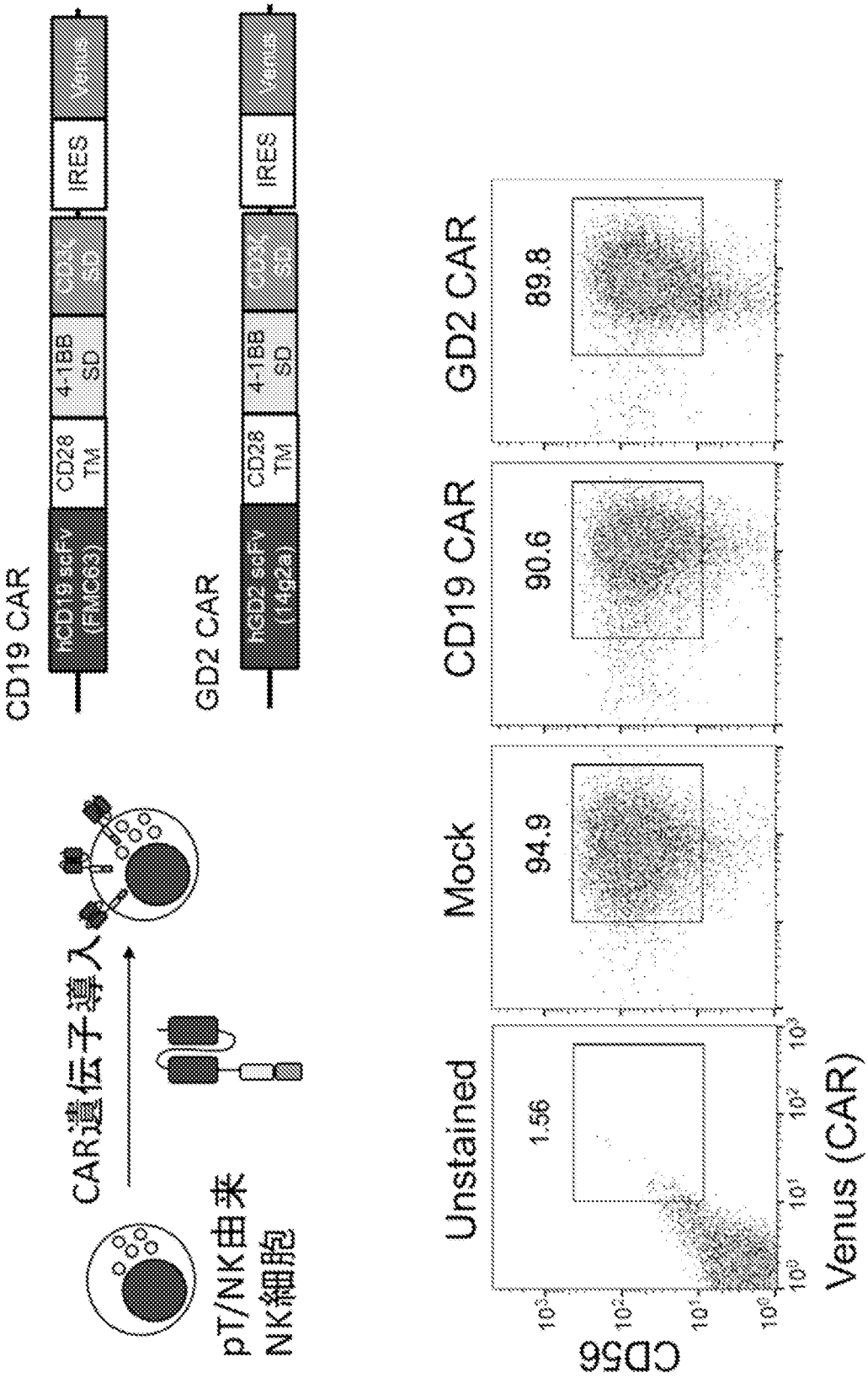
[図14]


pT/NK由来
NK細胞
K562細胞
+BrefeldinA/Monensin
4時間共培養
FCM解析
NK : K562 = 1 : 2
Control
K562
PMA/Ionomycin
Granzyme B
4.5
2.0
2.4
27.6
30.8
19.8
14.8
47.6
23.6
CD107a

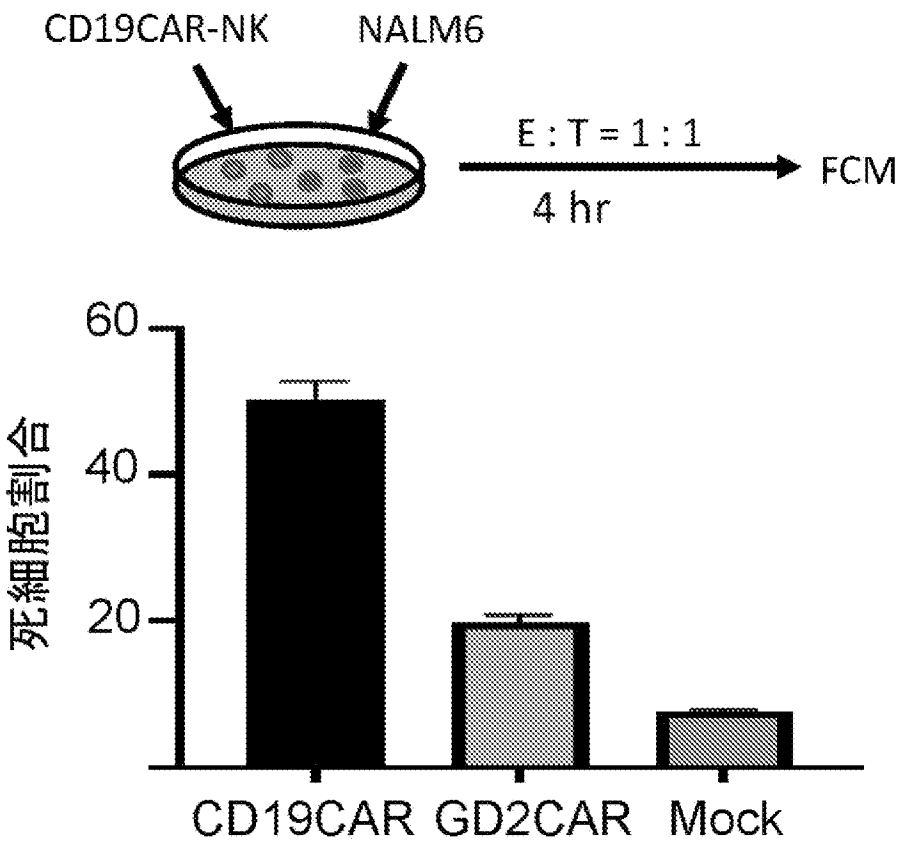
[図15]


pT/NK由来
NK細胞
K562細胞
解析
4時間共培養
80
70
60
50
40
30
20
10
0
% cell lysis
0.1 : 1
0.25 : 1
0.5 : 1
1 : 1
E : T
HSPC
P-T/NK

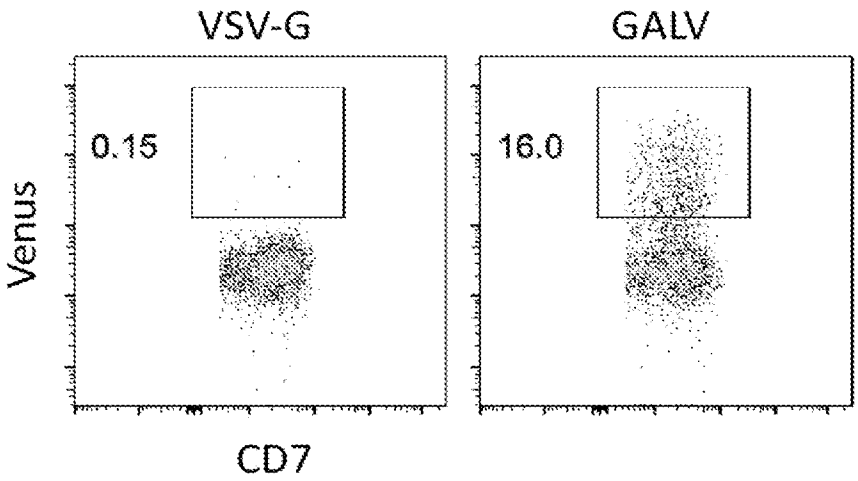
[図16A]


CD19 CAR
hCD19 scFv (FMC63)
CD28 TM
4-1BB SD
CD3ζ SD
IRES
Venus
GD2 CAR
hGD2 scFv (14g2a)
CD28 TM
4-1BB SD
CD3ζ SD
IRES
Venus
CAR遺伝子導入
pT/NK由来
NK細胞
Unstained
Mock
CD19 CAR
GD2 CAR
1.56
94.9
90.6
89.8
CD56
Venus (CAR)

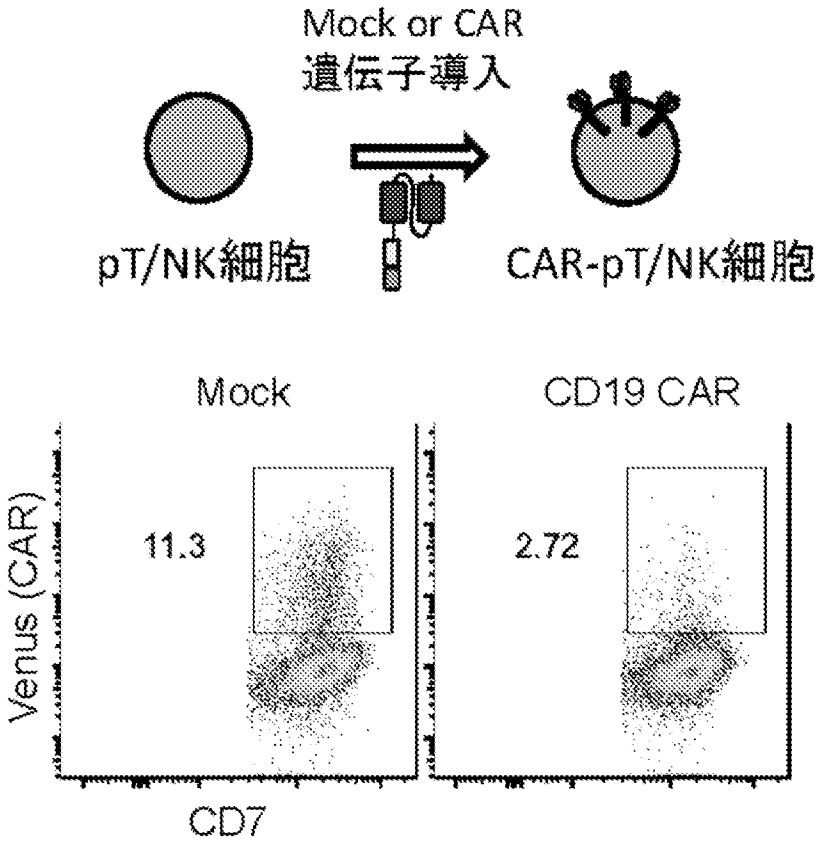
[図16B]


CD19CAR-NK
NALM6
E : T = 1 : 1
4 hr
FCM
60
40
20
死細胞割合
CD19CAR
GD2CAR
Mock

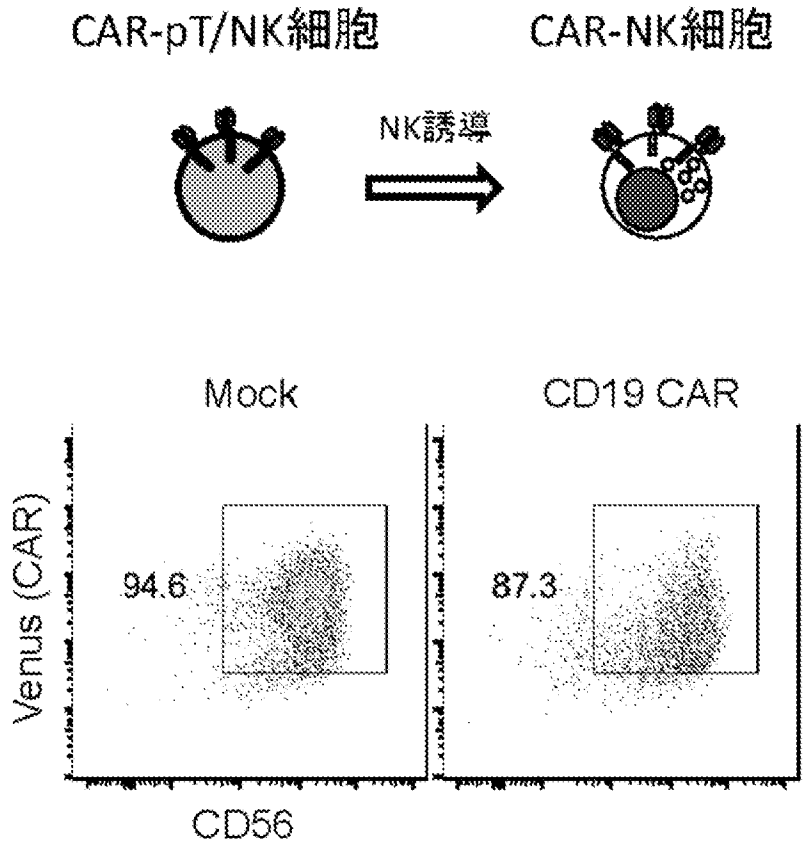
[図17]


VSV-G
GALV
0.15
16.0
Venus
CD7

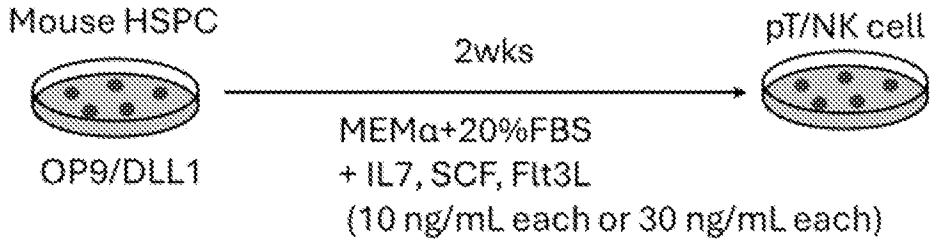
[図18A]

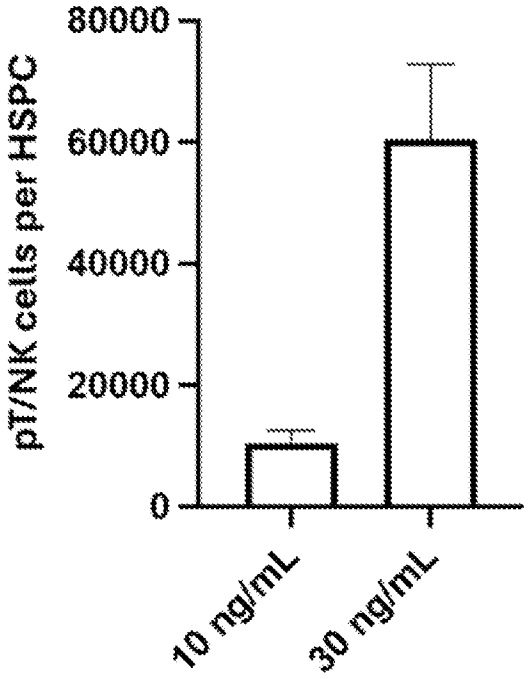

Mock or CAR
遺伝子導入
pT/NK細胞
CAR-pT/NK細胞
Mock
CD19 CAR
Venus (CAR)
11.3
2.72
CD7

[図18B]

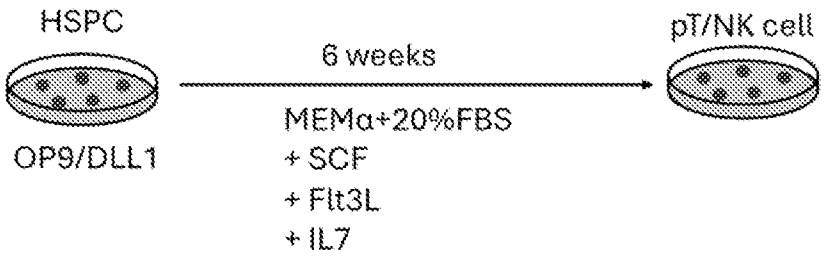

CAR-pT/NK細胞
CAR-NK細胞
NK誘導
Mock
CD19 CAR
Venus (CAR)
94.6
87.3
CD56

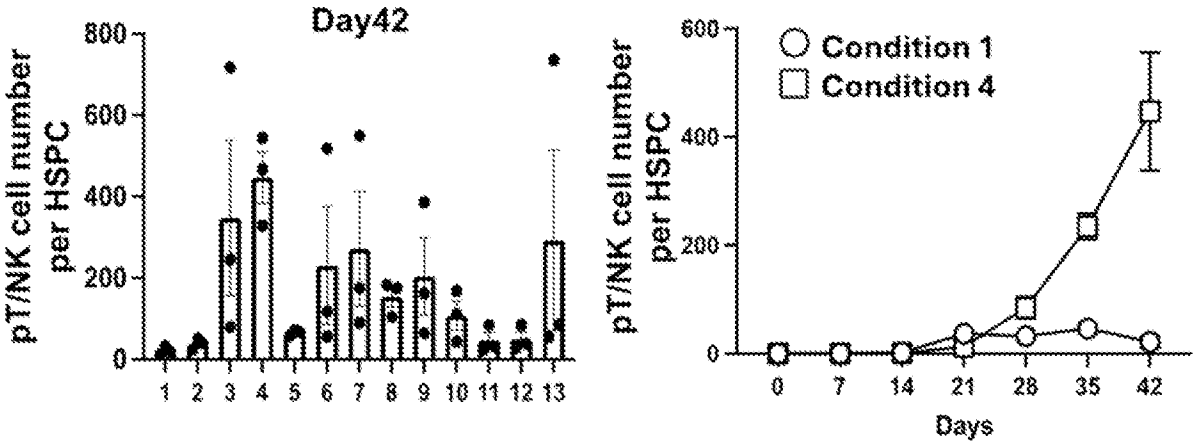
[図19]


Mouse HSPC
2wks
pT/NK cell
OP9/DLL1
MEMα+20%FBS
+ IL7, SCF, Flt3L
(10 ng/mL each or 30 ng/mL each)

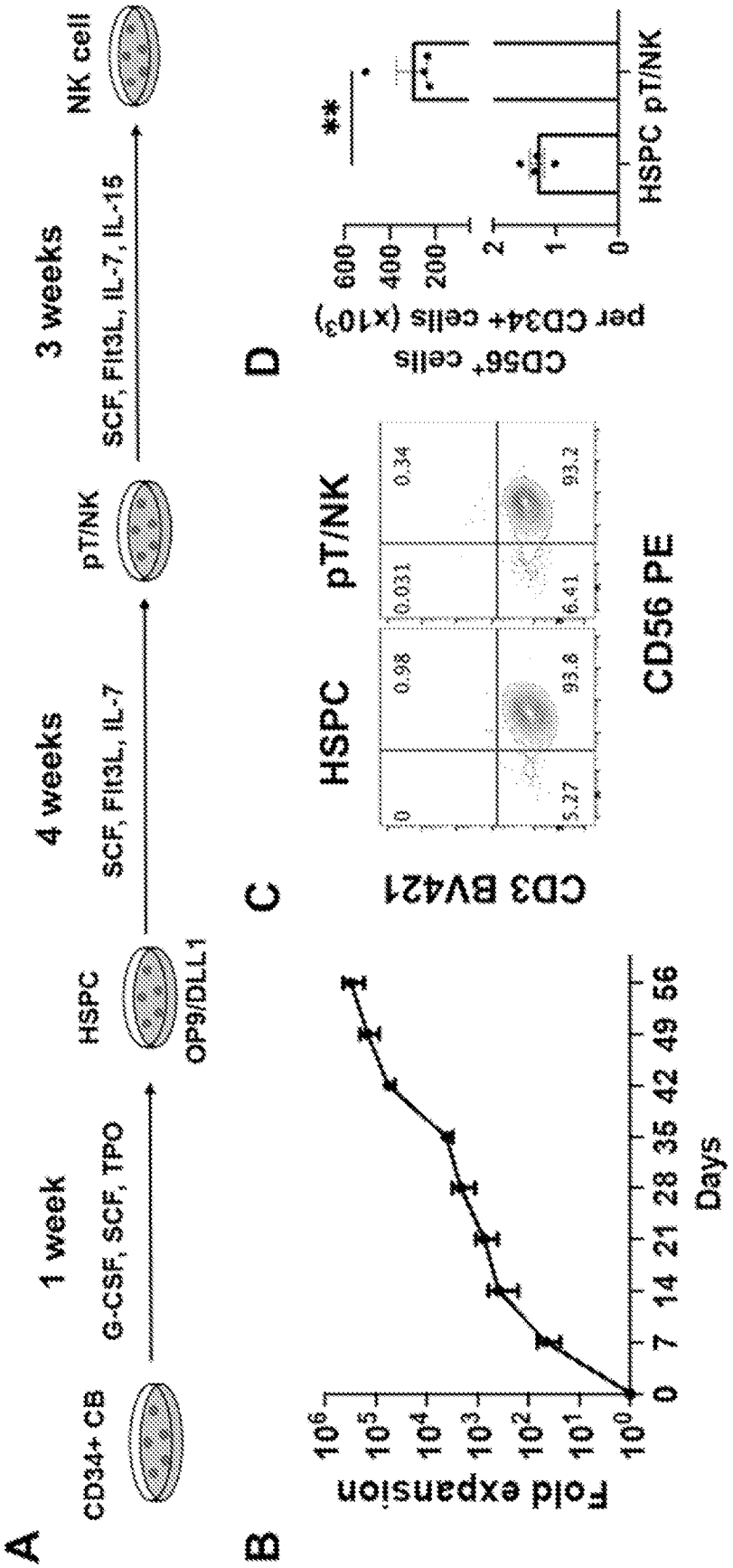

80000
60000
40000
20000
0
pT/NK cells per HSPC
10 ng/mL
30 ng/mL

[図20]

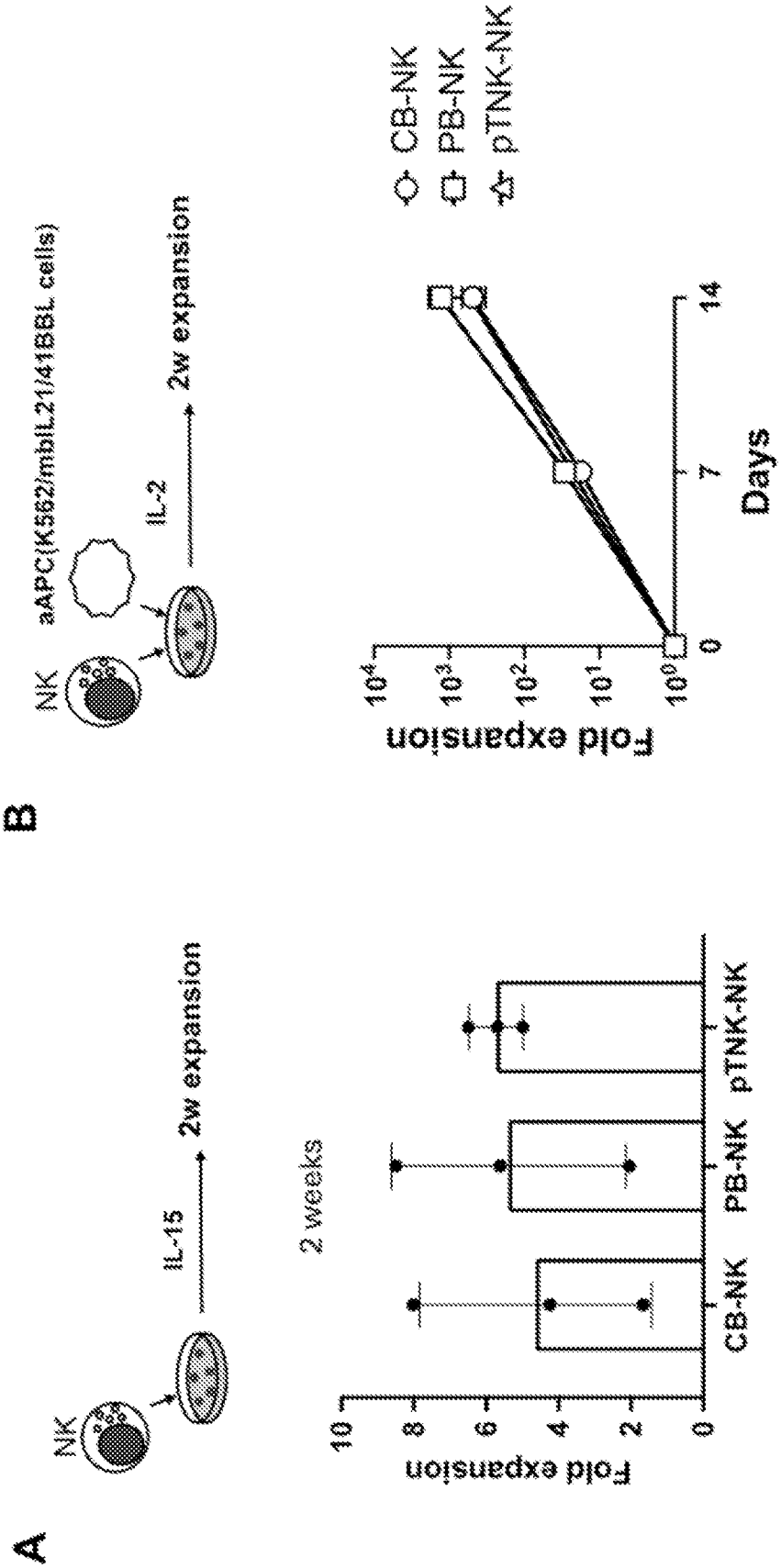

HSPC
6 weeks
pT/NK cell
OP9/DLL1
MEMα+20%FBS
+ SCF
+ Flt3L
+ IL7


Day42
pT/NK cell number per HSPC
800
600
400
200
0
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13
pT/NK cell number per HSPC
600
400
200
0
Condition 1
Condition 4
0 7 14 21 28 35 42
Days

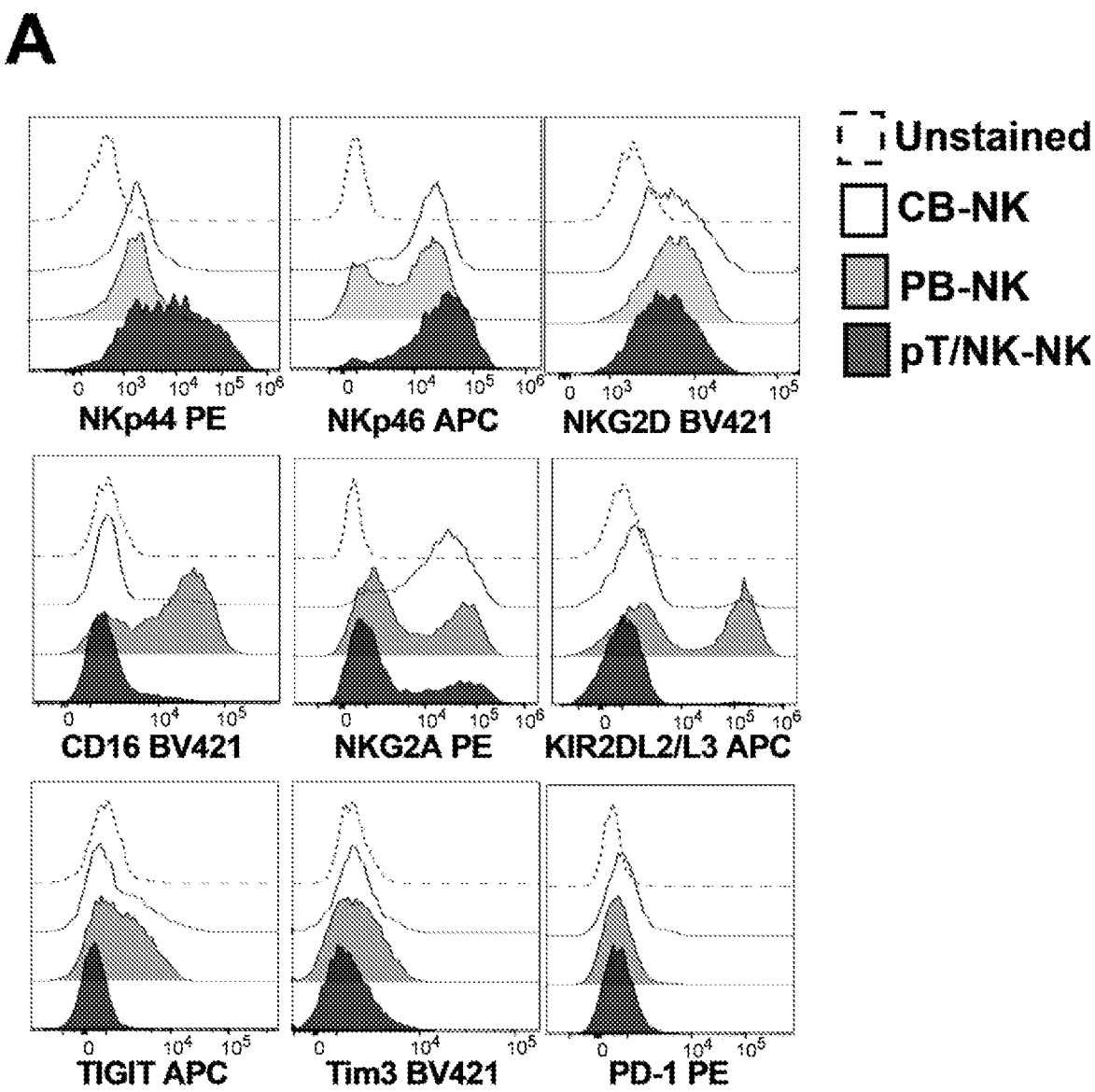
[図21]


A
CD34+ CB
1 week
G-CSF, SCF, TPO
HSPC
OP9/DLL1
4 weeks
SCF, Flt3L, IL-7
pT/NK
3 weeks
SCF, Flt3L, IL-7, IL-15
NK cell
B
Fold expansion
Days
C
HSPC
pT/NK
CD3 BV421
CD56 PE
D
CD56+ cells per CD34+ cells (x10³)
HSPC
pT/NK

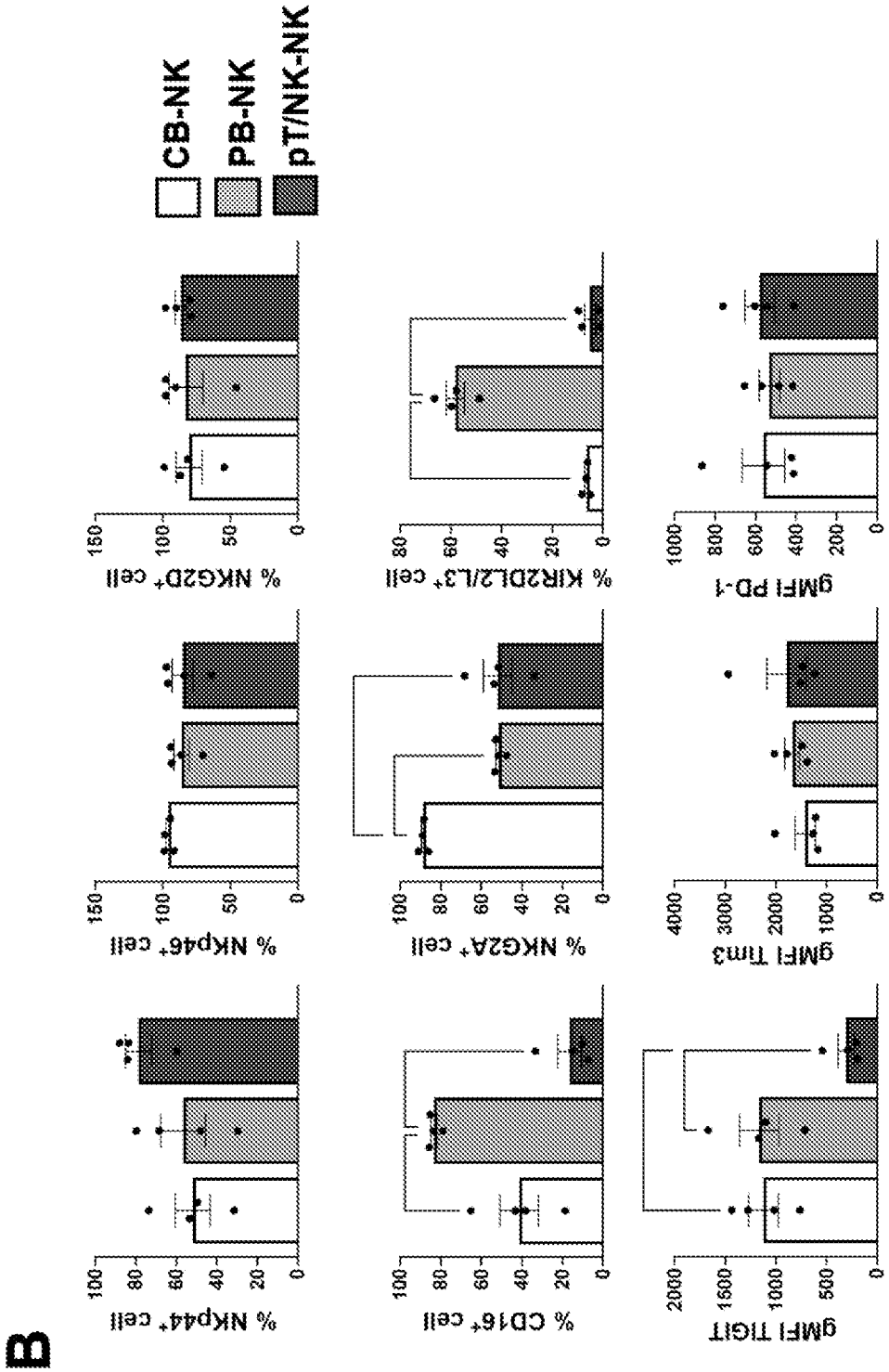
[図22]


A
NK
IL-15
2w expansion
2 weeks
Fold expansion
10
8
6
4
2
0
CB-NK
PB-NK
pTNK-NK
B
NK
aAPC(K562/mbIL21/41BBL cells)
IL-2
2w expansion
CB-NK
PB-NK
pTNK-NK
Fold expansion
10^4
10^3
10^2
10^1
10^0
0
7
14
Days

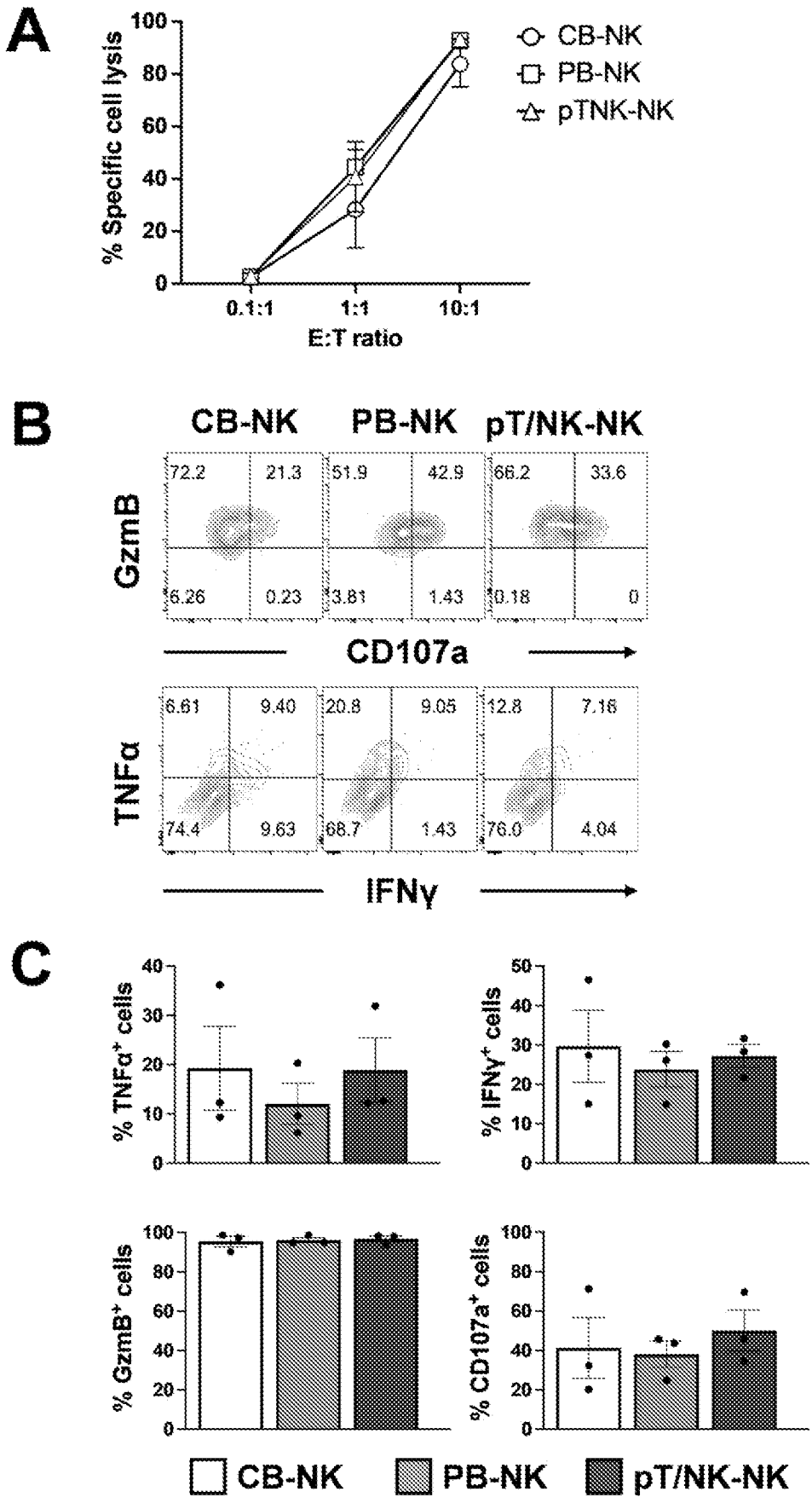
[図23A]


A
Unstained
CB-NK
PB-NK
pT/NK-NK
NKp44 PE
NKp46 APC
NKG2D BV421
CD16 BV421
NKG2A PE
KIR2DL2/L3 APC
TIGIT APC
Tim3 BV421
PD-1 PE

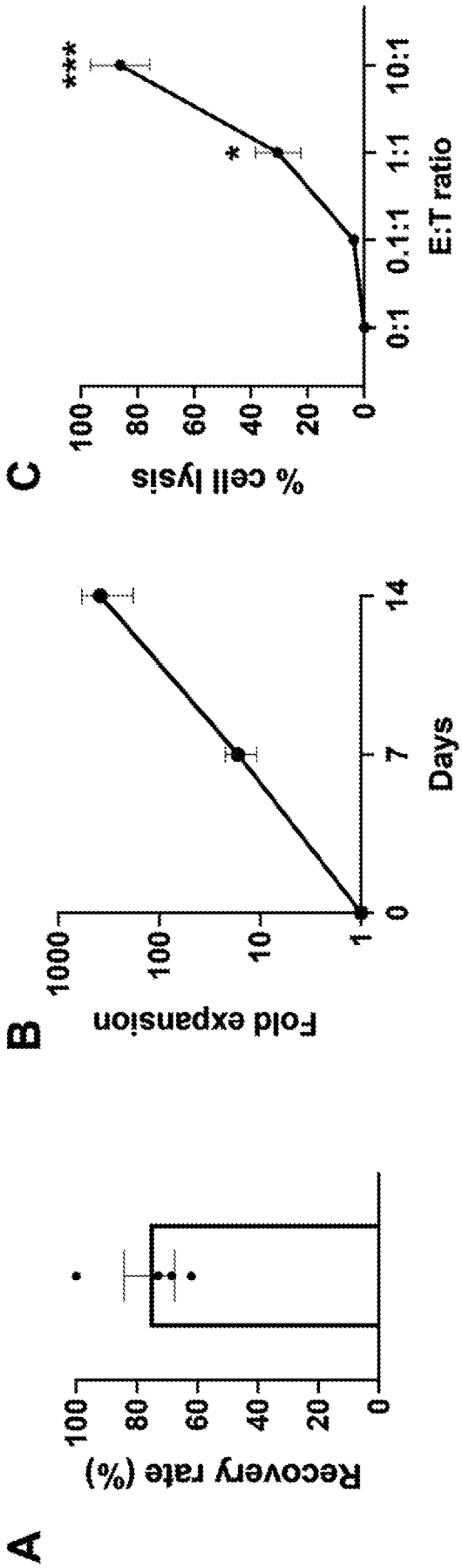
[図23B]


B
CB-NK
PB-NK
pT/NK-NK
% NKp44+ cell
% CD16+ cell
gMFI TIGIT
% NKp46+ cell
% NKG2A+ cell
gMFI Tim3
% NKG2D+ cell
% KIR2DL2/L3+ cell
gMFI PD-1

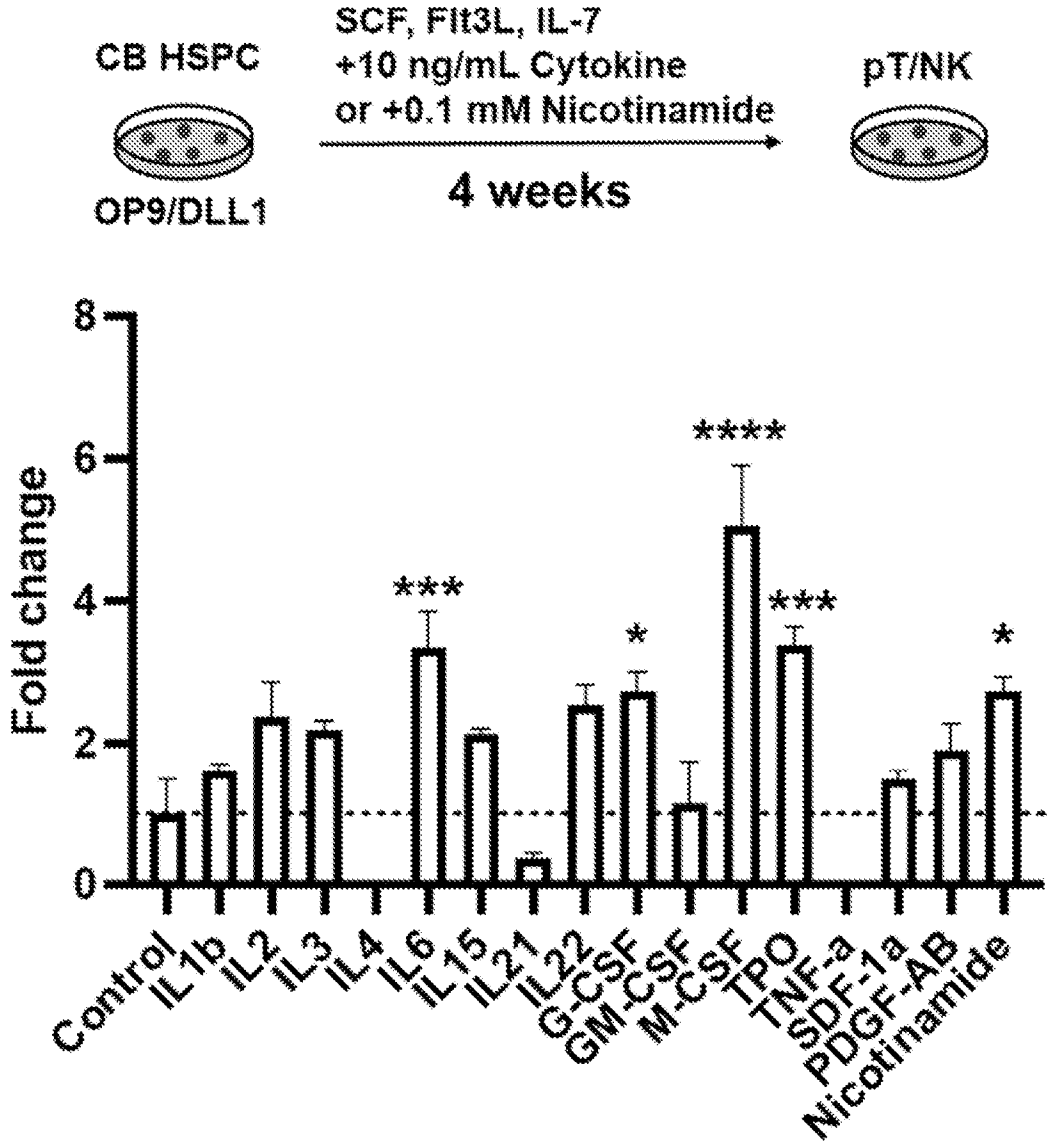
[図24]


A
% Specific cell lysis
100
80
60
40
20
0
0.1:1
1:1
10:1
E:T ratio
CB-NK
PB-NK
pTNK-NK
B
CB-NK
PB-NK
pT/NK-NK
GzmB
72.2
21.3
6.26
0.23
51.9
42.9
3.81
1.43
66.2
33.6
0.18
0
CD107a
TNFα
6.61
9.40
74.4
9.63
20.8
9.05
68.7
1.43
12.8
7.16
76.0
4.04
IFNγ
C
% TNFα+ cells
% IFNγ+ cells
% GzmB+ cells
% CD107a+ cells
CB-NK
PB-NK
pT/NK-NK

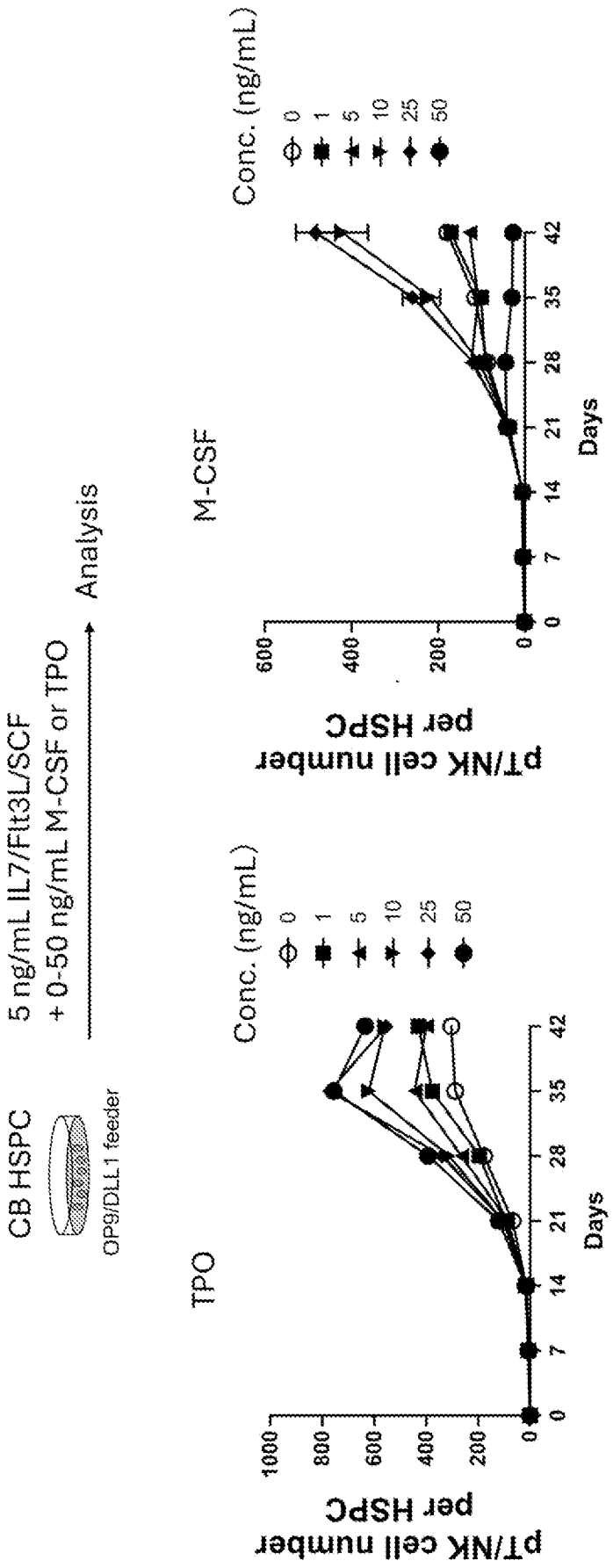
[図25]


A
Recovery rate (%)
100
80
60
40
20
0
B
Fold expansion
1000
100
10
1
0
7
14
Days
C
% cell lysis
100
80
60
40
20
0
0:1
0.1:1
1:1
10:1
E:T ratio
*
***

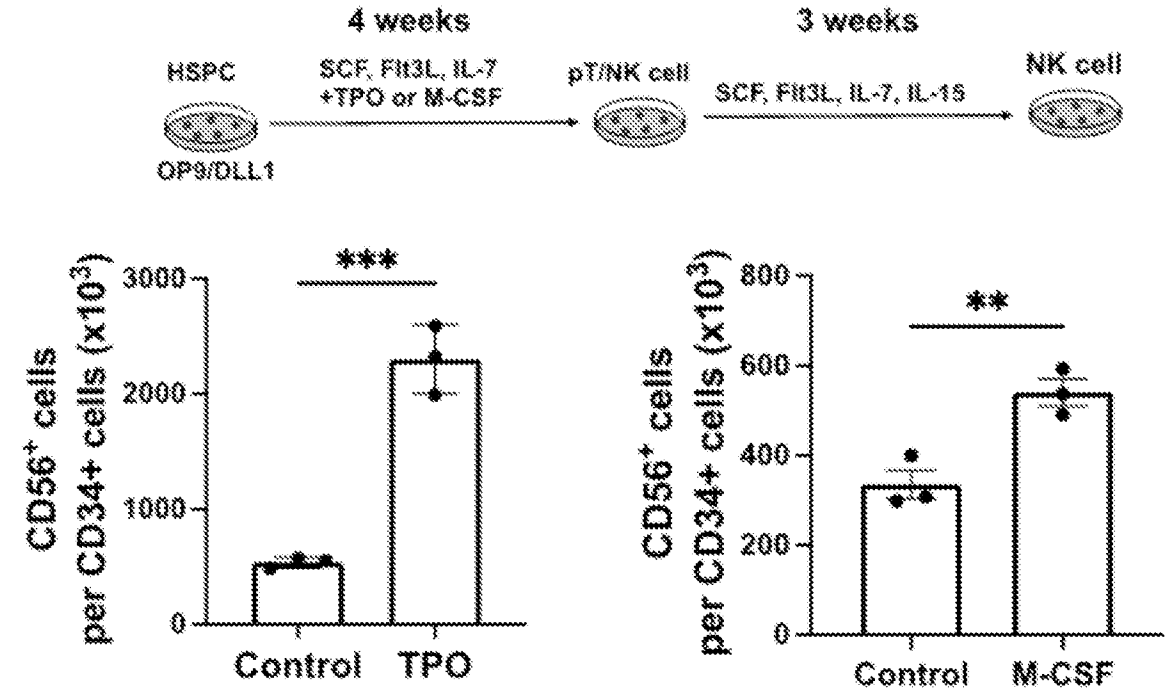
[図26]


CB HSPC
OP9/DLL1
SCF, Flt3L, IL-7
+10 ng/mL Cytokine
or +0.1 mM Nicotinamide
4 weeks
pT/NK
Fold change
0
2
4
6
8
***
*
****
***
*
Control
IL1b
IL2
IL3
IL4
IL6
IL15
IL21
IL22
G-CSF
GM-CSF
M-CSF
TPO
TNF-a
SDF-1a
PDGF-AB
Nicotinamide

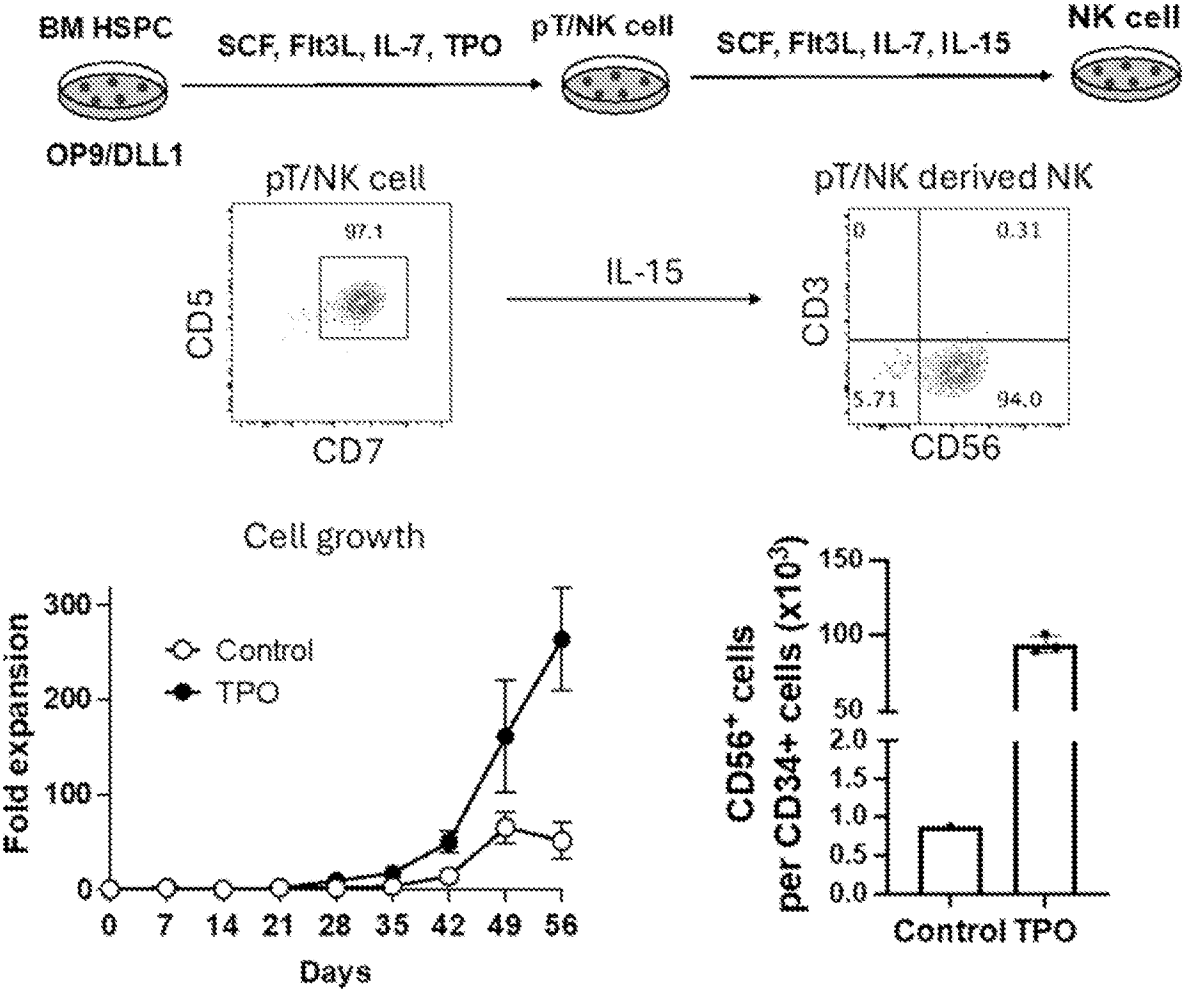
[図27]


CB HSPC
OP9/DLL1 feeder
5 ng/mL IL7/Flt3L/SCF
+ 0-50 ng/mL M-CSF or TPO
Analysis
TPO
M-CSF
Conc. (ng/mL)
0
1
5
10
25
50
pT/NK cell number per HSPC
Days
0
7
14
21
28
35
42
200
400
600
800
1000

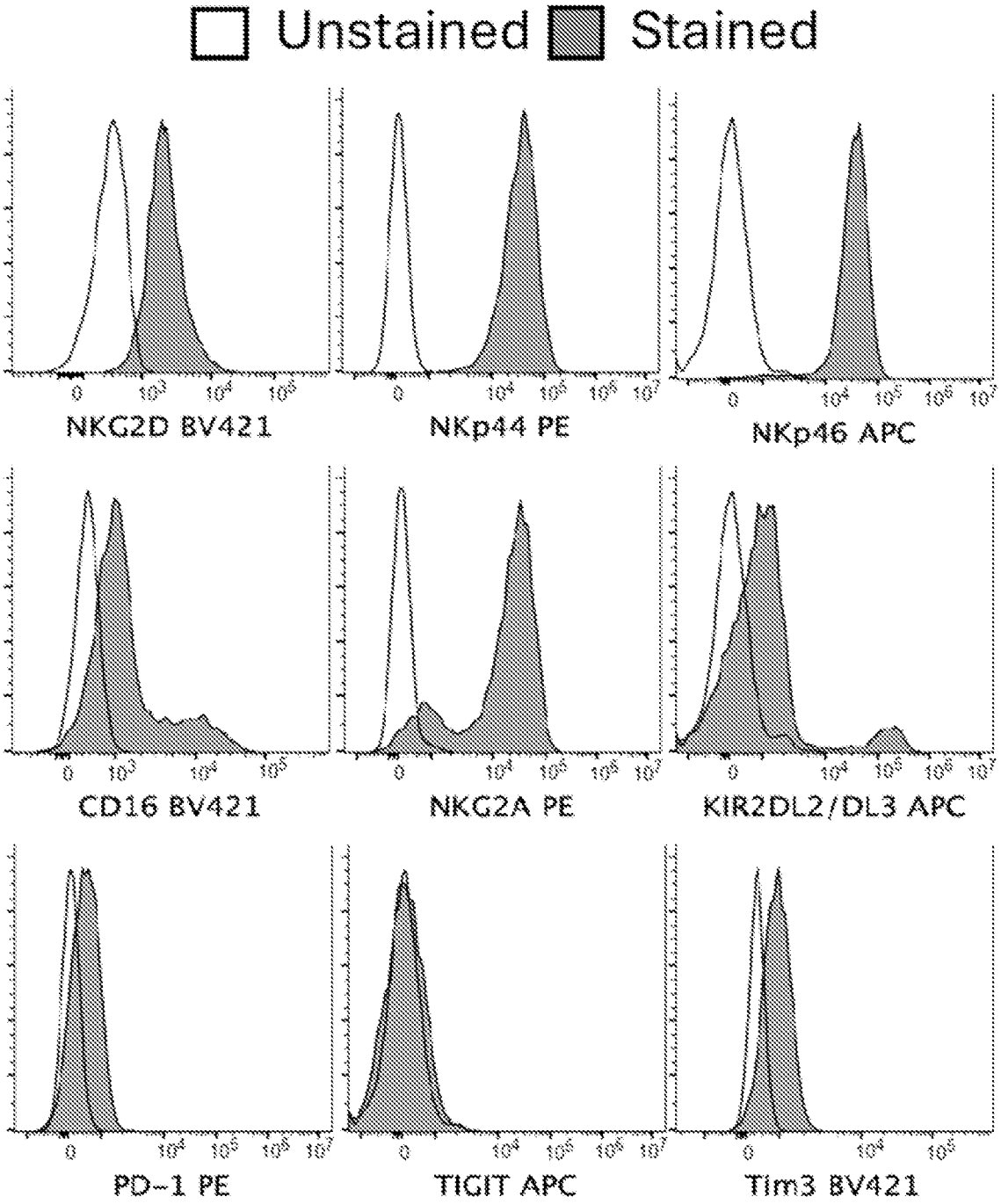
[図28]


4 weeks
3 weeks
HSPC
SCF, Flt3L, IL-7
+TPO or M-CSF
pT/NK cell
SCF, Flt3L, IL-7, IL-15
NK cell
OP9/DLL1
***
CD56+ cells per CD34+ cells (x10^3)
3000
2000
1000
0
Control
TPO
**
800
600
400
200
0
Control
M-CSF

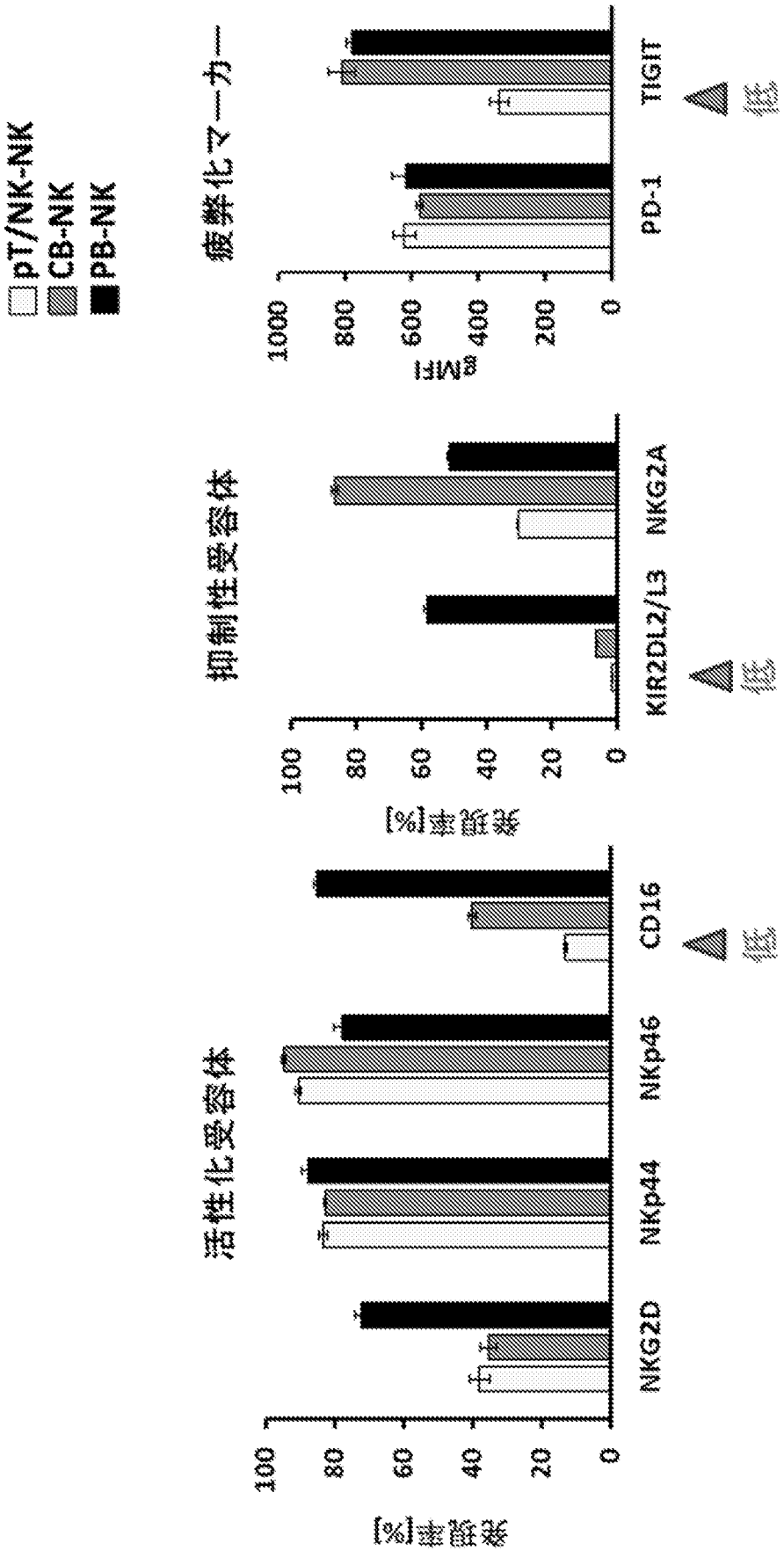
[図29]


BM HSPC
SCF, Flt3L, IL-7, TPO
pT/NK cell
SCF, Flt3L, IL-7, IL-15
NK cell
OP9/DLL1
pT/NK cell
97.1
CD5
CD7
IL-15
pT/NK derived NK
0
0.31
5.71
94.0
CD3
CD56
Cell growth
Fold expansion
300
200
100
0
Control
TPO
0 7 14 21 28 35 42 49 56
Days
CD56+ cells per CD34+ cells (x10^3)
150
100
50
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
Control TPO

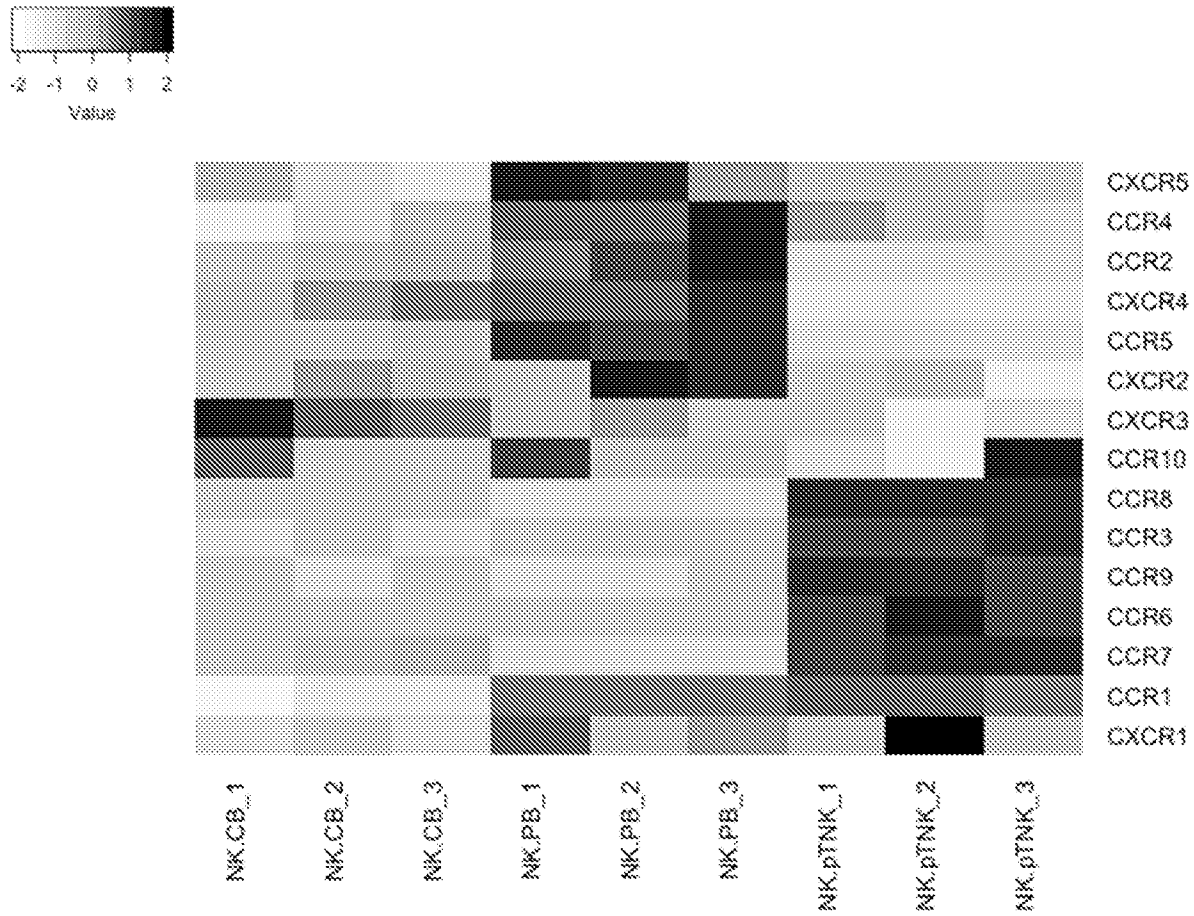
[図30A]


Unstained
Stained
NKG2D BV421
NKp44 PE
NKp46 APC
CD16 BV421
NKG2A PE
KIR2DL2/DL3 APC
PD-1 PE
TIGIT APC
Tim3 BV421

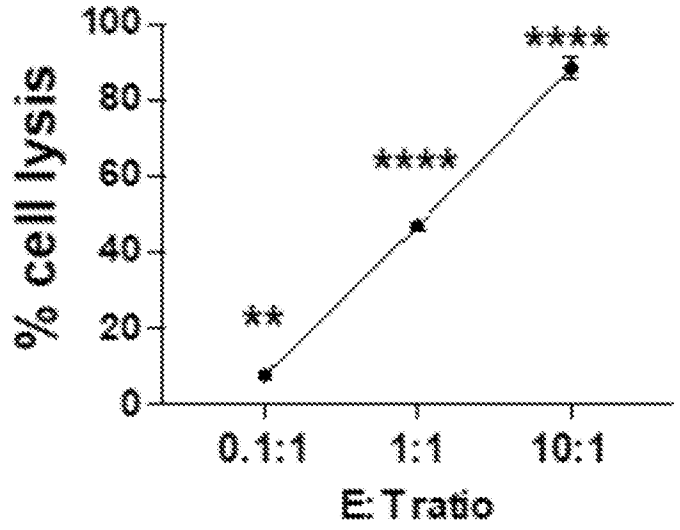
[図30B]


pT/NK-NK
CB-NK
PB-NK
疲弊化マーカー
gMFI
1000
800
600
400
200
0
PD-1
TIGIT
低
抑制性受容体
発現率[%]
100
80
60
40
20
0
KIR2DL2/L3
NKG2A
低
活性化受容体
発現率[%]
100
80
60
40
20
0
NKG2D
NKp44
NKp46
CD16
低

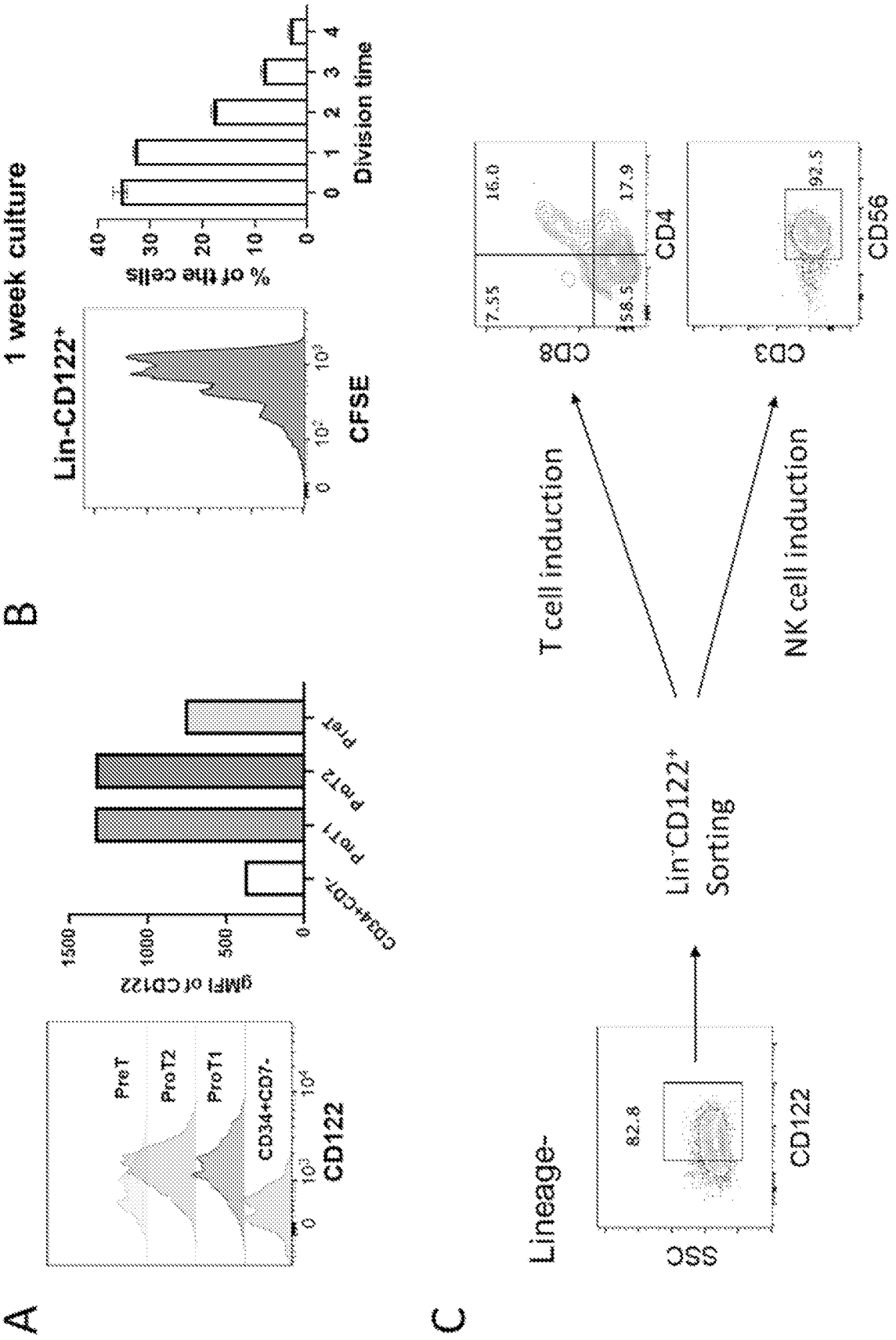
[図30C]


-2 -1 0 1 2
Value
CXCR5
CCR4
CCR2
CXCR4
CCR5
CXCR2
CXCR3
CCR10
CCR8
CCR3
CCR9
CCR6
CCR7
CCR1
CXCR1
NK.CB_1
NK.CB_2
NK.CB_3
NK.PB_1
NK.PB_2
NK.PB_3
NK.pTNK_1
NK.pTNK_2
NK.pTNK_3

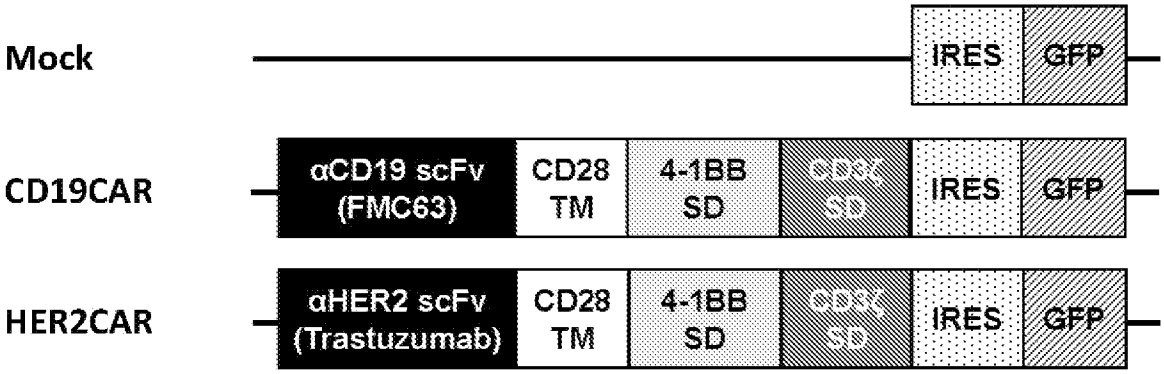
[図31]


100
80
60
40
20
0
% cell lysis
**
****
****
0.1:1
1:1
10:1
E:T ratio

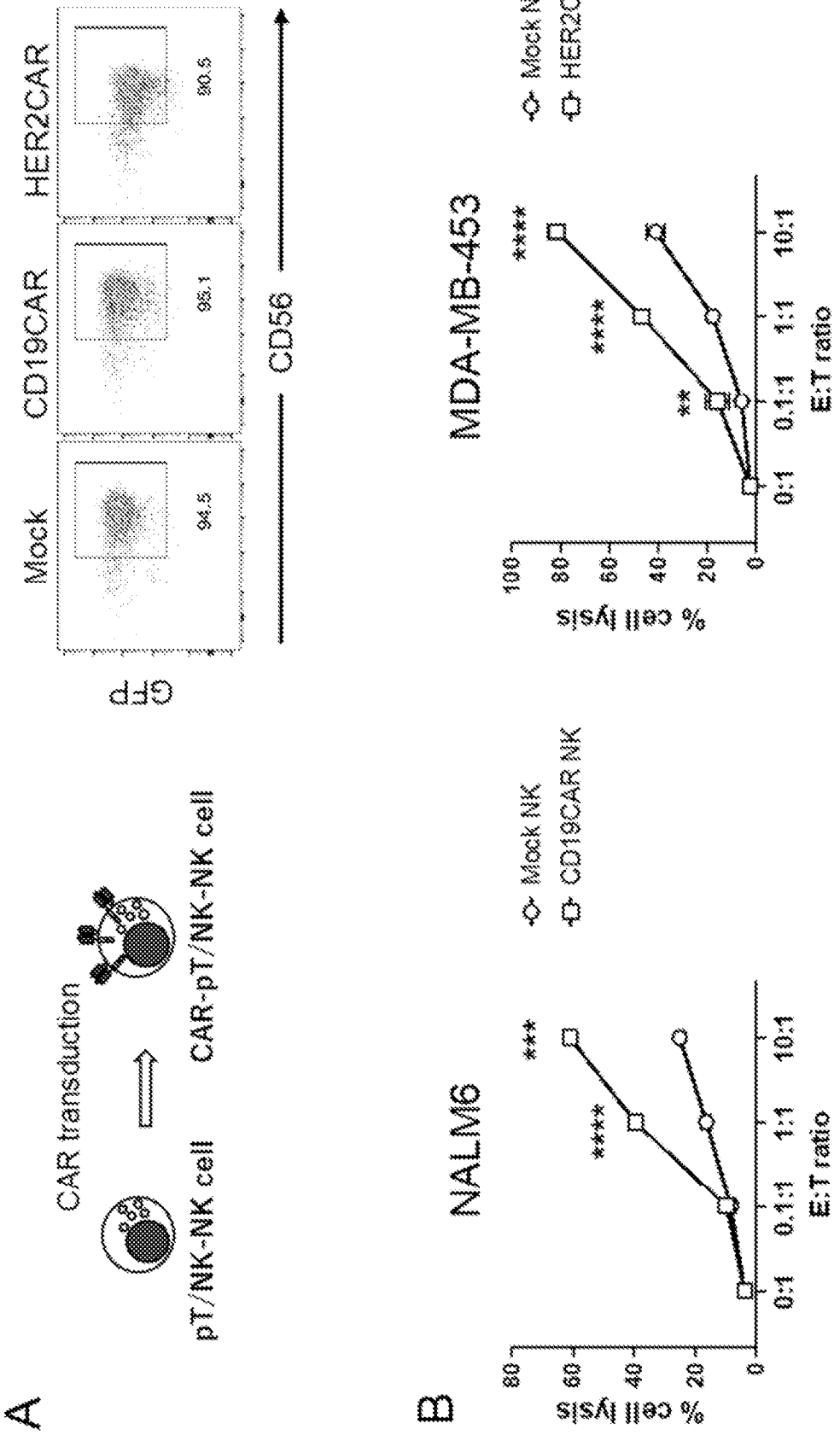
[図32]


A
PreT
ProT2
ProT1
CD34+CD7-
CD122
gMFI of CD122
CD34+CD7-
proT1
proT2
preT
B
1 week culture
Lin-CD122+
CFSE
% of the cells
Division time
C
Lineage-
SSC
82.8
CD122
Lin-CD122+
Sorting
T cell induction
NK cell induction
CD8
CD4
7.55
16.0
58.5
17.9
CD3
CD56
92.5

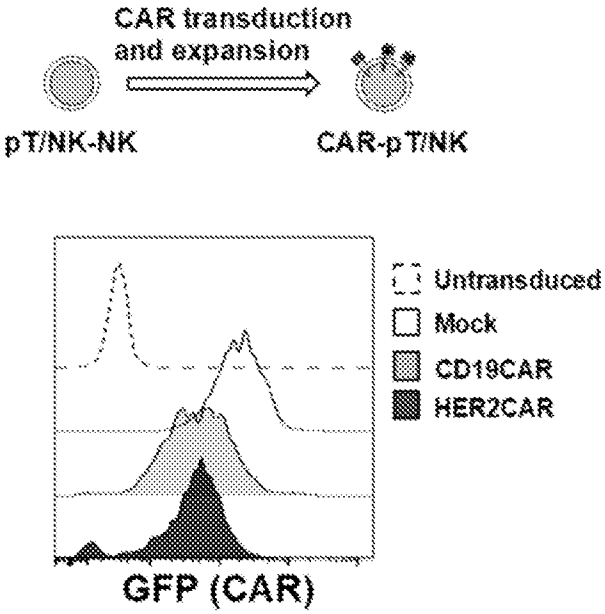
[図33]


Mock
IRES
GFP
CD19CAR
αCD19 scFv (FMC63)
CD28 TM
4-1BB SD
CD3ζ SD
IRES
GFP
HER2CAR
αHER2 scFv (Trastuzumab)
CD28 TM
4-1BB SD
CD3ζ SD
IRES
GFP

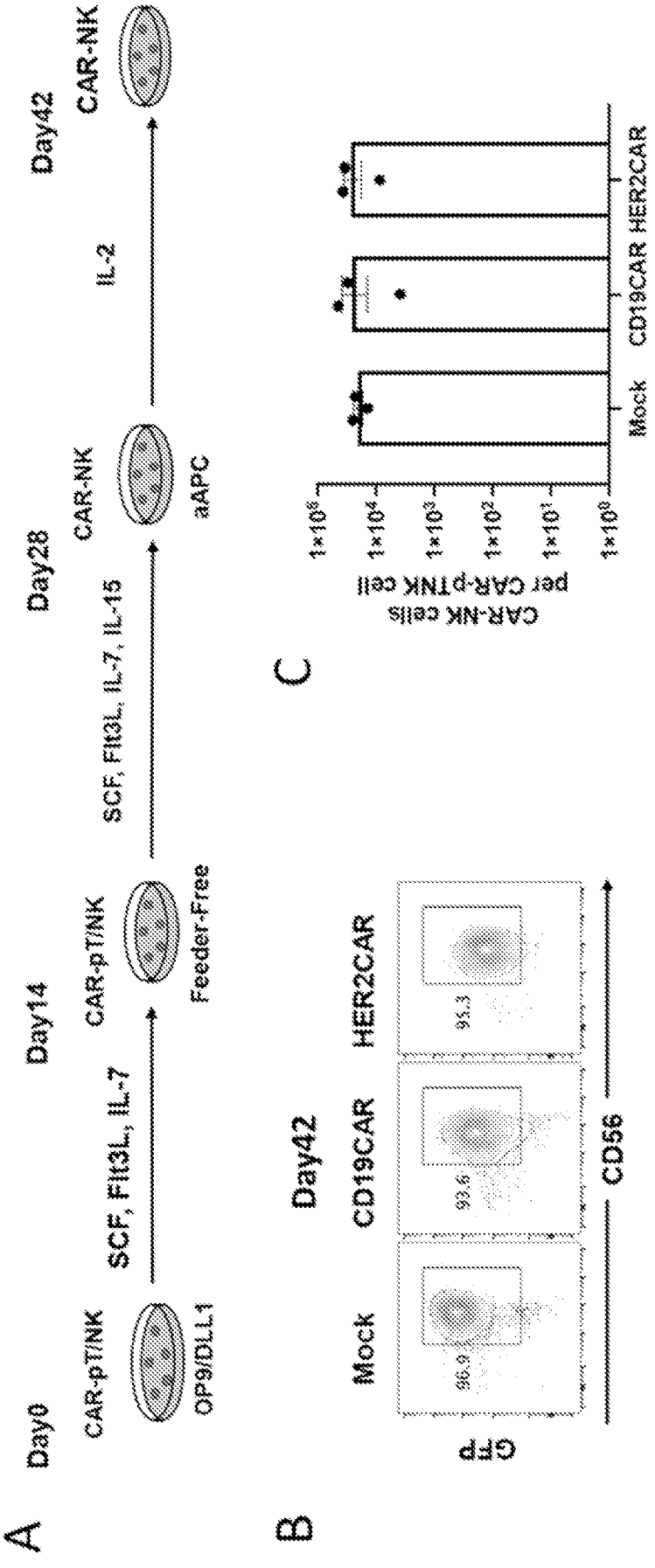
[図34]


A
CAR transduction
pT/NK-NK cell
CAR-pT/NK-NK cell
GFP
Mock
CD19CAR
HER2CAR
94.5
98.1
90.5
CD56
B
NALM6
MDA-MB-453
Mock NK
CD19CAR NK
HER2CAR NK
% cell lysis
E:T ratio
0:1
0.1:1
1:1
10:1
***
****
**

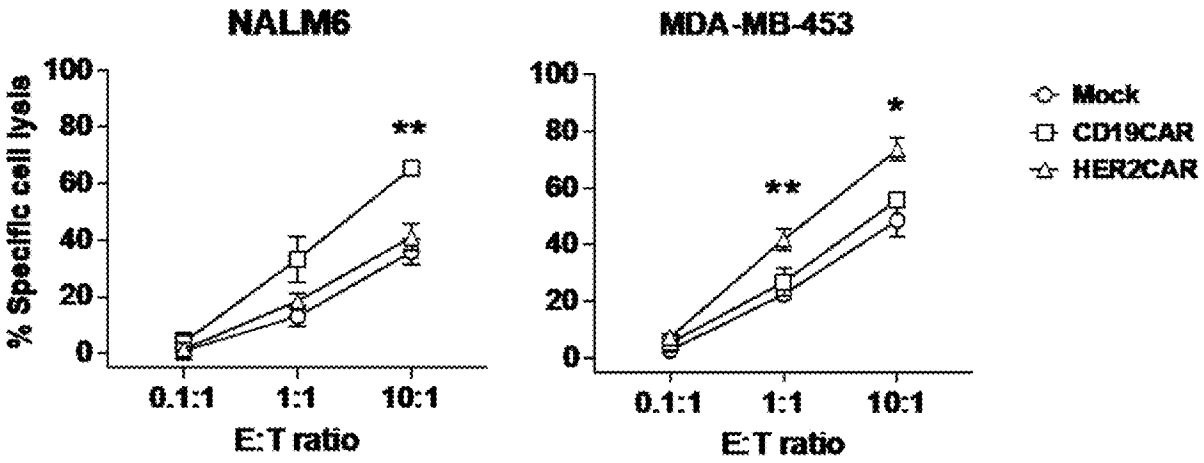
[図35]


CAR transduction
and expansion
pT/NK-NK
CAR-pT/NK
Untransduced
Mock
CD19CAR
HER2CAR
GFP (CAR)

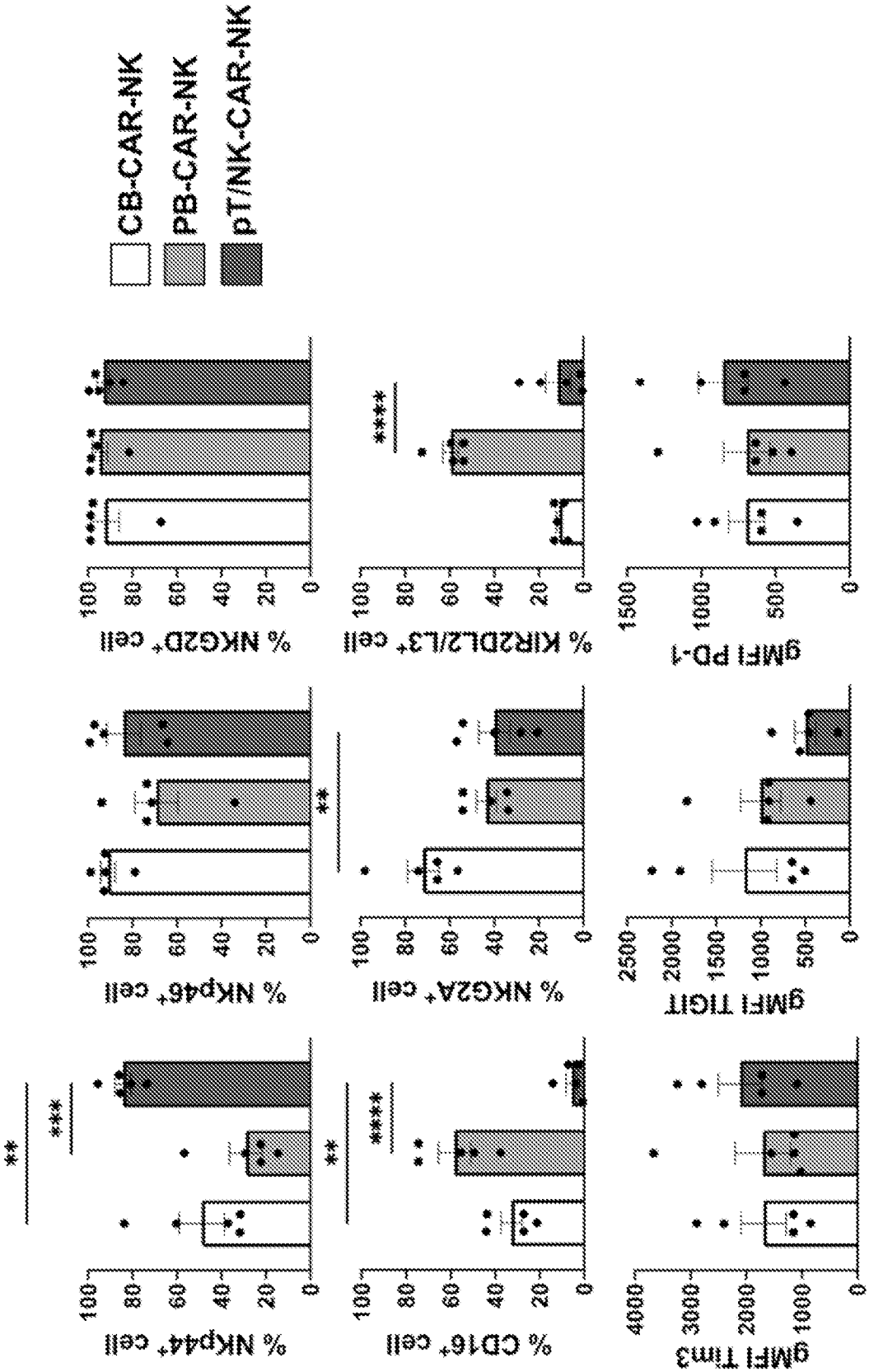
[図36]


A
Day0
Day14
Day28
Day42
CAR-pT/NK
OP9/DLL1
SCF, Flt3L, IL-7
CAR-pT/NK
Feeder-Free
SCF, Flt3L, IL-7, IL-15
CAR-NK
aAPC
IL-2
CAR-NK
B
Day42
Mock
CD19CAR
HER2CAR
GFP
96.9
93.6
95.3
CD56
C
CAR-NK cells per CAR-pTNK cell
1×10^6
1×10^5
1×10^4
1×10^3
1×10^2
1×10^1
1×10^0
Mock
CD19CAR
HER2CAR

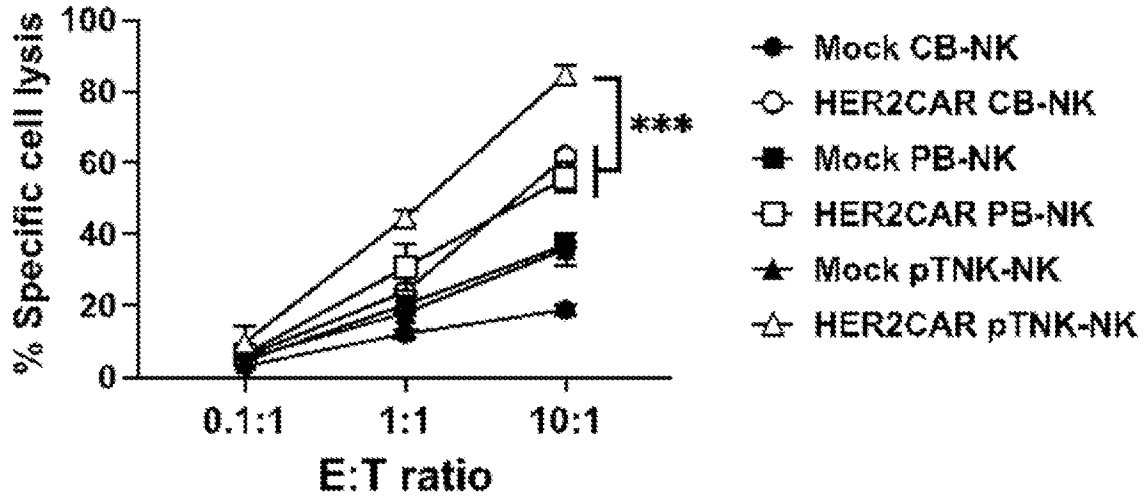
[図37]


NALM6
MDA-MB-453
% Specific cell lysis
100
80
60
40
20
0
**
*
0.1:1
1:1
10:1
E:T ratio
Mock
CD19CAR
HER2CAR

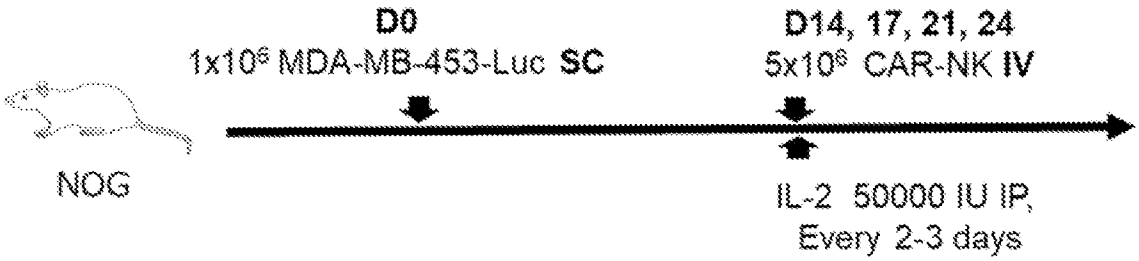
[図38]


CB-CAR-NK
PB-CAR-NK
pT/NK-CAR-NK
% NKp44+ cell
% CD16+ cell
gMFI Tim3
% NKp46+ cell
% NKG2A+ cell
gMFI TIGIT
% NKG2D+ cell
% KIR2DL2/L3+ cell
gMFI PD-1

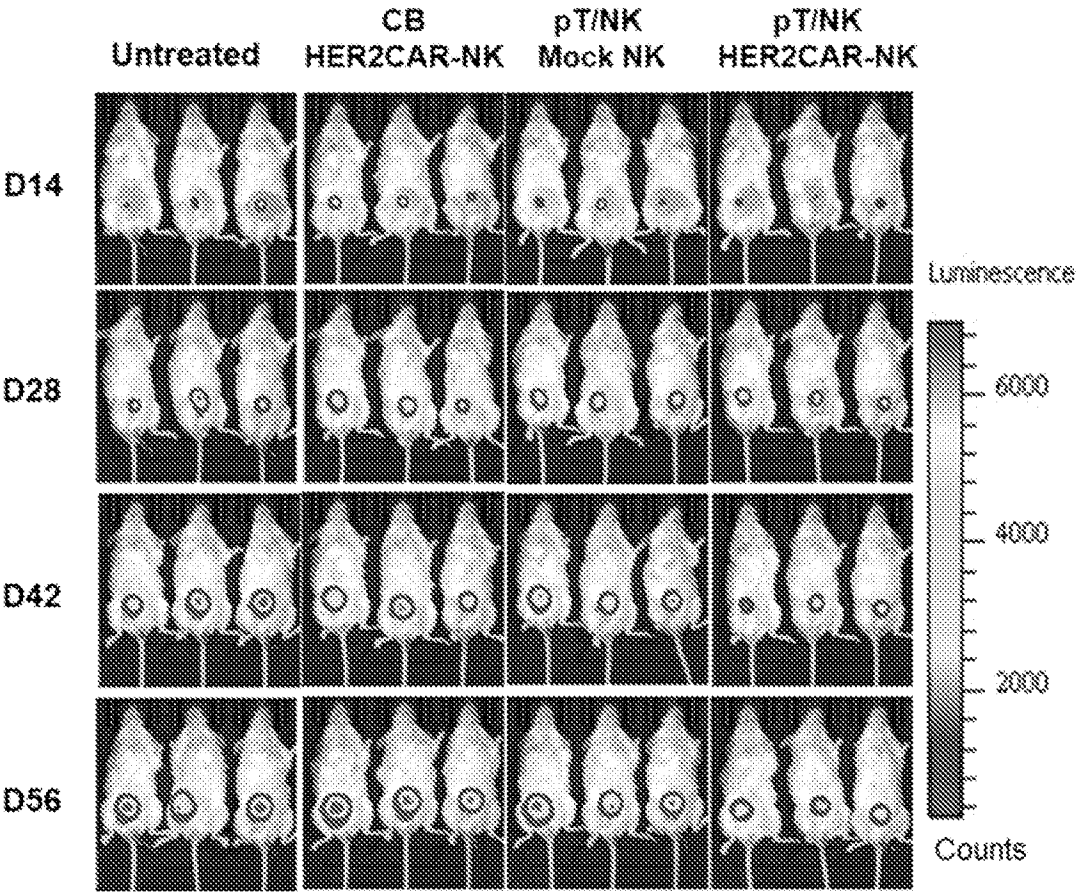
[図39]



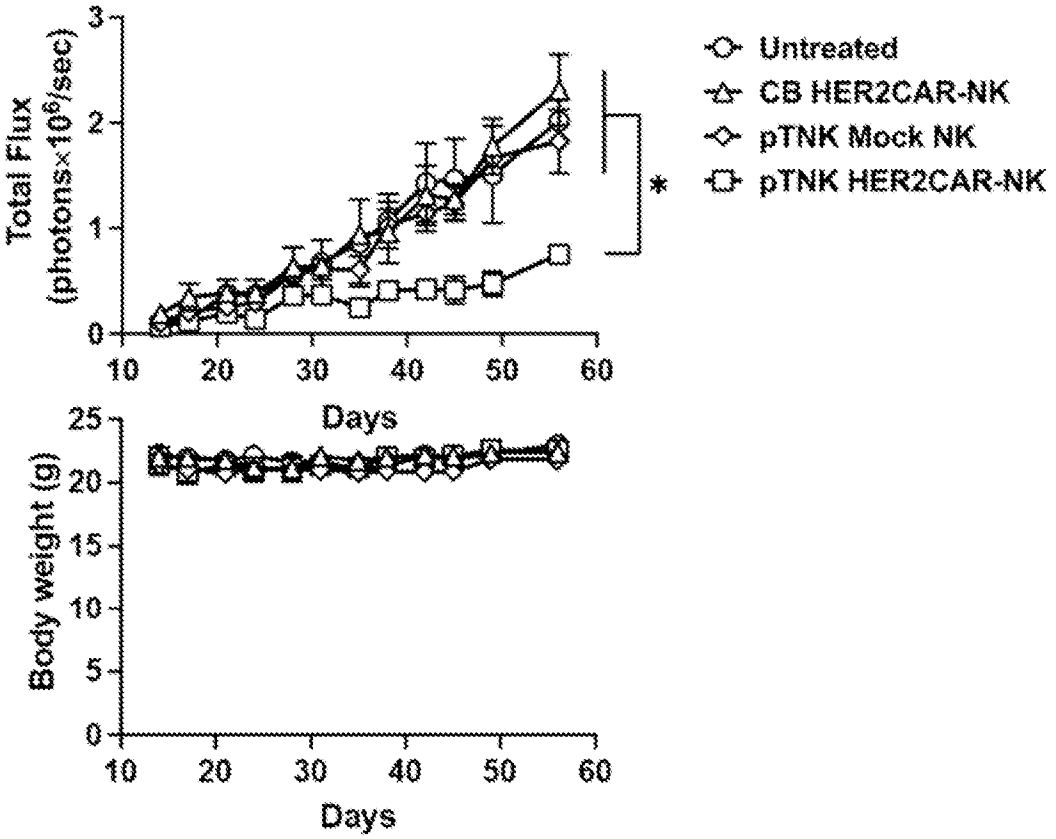
[図40A]



[図40B]



[図40C]


Total Flux
(photons×10⁶/sec)
3
2
1
0
10
20
30
40
50
60
Days
Untreated
CB HER2CAR-NK
pTNK Mock NK
pTNK HER2CAR-NK
*
Body weight (g)
25
20
15
10
5
0
10
20
30
40
50
60
Days

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2024/027781

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 15/13(2006.01)i; ***A61K 35/17***(2015.01)i; ***A61P 35/00***(2006.01)i; ***A61P 37/04***(2006.01)i; ***C07K 14/725***(2006.01)i; ***C07K 16/28***(2006.01)i; ***C07K 19/00***(2006.01)i; ***C12N 5/10***(2006.01)i; ***C12N 5/0789***(2010.01)i; ***C12N 15/12***(2006.01)i; ***C12N 15/62***(2006.01)i

FI: C12N15/13; C12N15/12; C12N15/62 Z; C07K14/725; C07K16/28; C07K19/00; C12N5/0789; A61P35/00; A61P37/04; A61K35/17; C12N5/10 ZNA

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N15/13; A61K35/17; A61P35/00; A61P37/04; C07K14/725; C07K16/28; C07K19/00; C12N5/10; C12N5/0789; C12N15/12; C12N15/62

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Published examined utility model applications of Japan 1922-1996
Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2024
Registered utility model specifications of Japan 1996-2024
Published registered utility model applications of Japan 1994-2024

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

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

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	PAASCH, Daniela et al., "Ex Vivo Generation of CAR Macrophages from Hematopoietic Stem and Progenitor Cells for Use in Cancer Therapy", Cells, 2022, 11, 994, DOI: 10.3390/cells11060994 Abstract, Figure 3	1, 8, 10, 11, 14, 15, 19, 20
Y		1, 3-5, 8-11, 22-25
X	WO 2020/022512 A1 (KYOTO UNIVERSITY) 30 January 2020 (2020-01-30) claim 1, paragraph [0027]	1, 8-12, 17
Y		22-25
X	JP 2021-525066 A (GLYCOSTEM THERAPEUTICS B.V.) 24 September 2021 (2021-09-24) claim 1	1, 8, 10, 11, 14, 15, 19, 20
Y		22-25

☑ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☑ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"D" document cited by the applicant in the international application
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
09 October 2024	**22 October 2024**
Name and mailing address of the ISA/JP **Japan Patent Office (ISA/JP)** **3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915** **Japan**	Authorized officer Telephone No.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	IKAWA, Tomokatsu et al., "Induced Developmental Arrest of Early Hematopoietic Progenitors Leads to the Generation of Leukocyte Stem Cells", Stem Cell Reports, 2015, vol. 5, no. 5, pages 716-727, DOI: 10.1016/j.stemcr.2015.09.012 abstract, page 721, right column, line 3 to page 722, left column, line 11	1-5, 8-11, 13, 16, 18, 21-25
Y	WO 2016/010154 A1 (KAWAMOTO, Hiroshi) 21 January 2016 (2016-01-21) claims	1, 3-5, 8-11, 22-25
Y	WO 2018/168829 A1 (KYOTO UNIVERSITY) 20 September 2018 (2018-09-20) claim 1, paragraph [0079], fig. 2A	2, 4, 5-11, 13, 16, 18, 21-25, 30, 31
X	JP 2020-517237 A (FUJIFILM CELLULAR DYNAMICS INC.) 18 June 2020 (2020-06-18) claim 1, example 1, fig. 1	32, 33
Y		1-3, 6-11, 13, 16, 18, 21-25, 30, 31
Y	JP 2016-539659 A (OSPEDALE SAN RAFFAELE S.R.L.) 22 December 2016 (2016-12-22) claim 33, example 1	1, 3, 6-11, 22-25, 30, 31
Y	WO 2023/060163 A2 (BOARD OF REGENTS, THE UNIVERSITY OF TEXAS SYSTEM) 13 April 2023 (2023-04-13) claim 24	22-25
X	JP 2021-518130 A (CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE) 02 August 2021 (2021-08-02) paragraphs [0131], [0205]-[0212]	26-29, 32, 33

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2024/027781

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

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

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

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2024/027781

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

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

Document 1: PAASCH, Daniela et al., "Ex Vivo Generation of CAR Macrophages from HematopoieticStem and Progenitor Cells for Use in Cancer Therapy", Cells, 2022, 11, 994, DOI: 10.3390/cells11060994
Document 2: WO 2020/022512 A1 (KYOTO UNIVERSITY) 30 January 2020 (2020-01-30)
Document 3: JP 2021-525066 A (GLYCOSTEM THERAPEUTICS B.V.) 24 September 2021 (2021-09-24)

Invention 1: The invention in claims 1, 3, 12, 14-15, 17, and 19-20,
the invention specified by selecting (1), (3), or (5) in claims 22 and 23, and
the invention referring back to the invention in claims 1, 3, and 22-23 in claims 4-11, 24-25, and 30-31

The invention in claims 1, 3, 12, 14-15, 17, and 19-20, the invention specified by selecting (1), (3), or (5) in claims 22 and 23, and the invention referring back to the invention in claims 1, 3, and 22-23 in claims 4-11, 24-25, and 30-31 have the technical feature of "a method for producing immunocytes expressing an exogenous receptor, which is T cell receptor (TCR), chimera antigen receptor (CAR), or chimera autoantibody receptor (CAAR), the method comprising a step for preparing pluripotent blood progenitor cells from a cell population comprising hematopoietic stem cells, a step for preparing pluripotent blood progenitor cells expressing the exogenous receptor by introducing a gene encoding the exogenous receptor into pluripotent blood progenitor cells, and a step for inducing differentiation of the pluripotent blood progenitor cells expressing the exogenous receptor to immunocytes," and thus are classified as invention 1.

Invention 2: The invention in claims 2, 13, 16, 18, and 21,
the invention specified by selecting (2) and (4) or (2) and (6) in the invention in claims 22 and 23, and
the invention referring back to the invention in claims 2 and 22-23 in claims 4-11, 24-25, and 30-31

Claim 2 shares with claim 1 classified as invention 1 the common technical feature of "a method for producing immunocytes expressing an exogenous receptor, which is T cell receptor (TCR), chimera antigen receptor (CAR), or chimera autoantibody receptor (CAAR), the method comprising a step for preparing pluripotent blood progenitor cells from a cell population comprising hematopoietic stem cells, a step for introducing a gene encoding the exogenous receptor into cells, and a step for inducing differentiation of pluripotent blood progenitor cells to immunocytes." However, this technical feature does not make a contribution over the prior art in light of the content disclosed in documents 1-3, and thus cannot be said to be a special technical feature. Moreover, there is no other same or corresponding special technical feature among these inventions.

Furthermore, claim 2 does not depend from claim 1. In addition, claim 2 is not substantially identical to or similarly closely related to any of the claims classified as invention 1.

Therefore, claim 2 cannot be classified as invention 1.

Moreover, claim 2 has the special technical feature of "a method for producing immunocytes expressing an exogenous receptor, which is TCR, CAR, or CAAR, the method comprising a step for preparing pluripotent blood progenitor cells from a cell population comprising hematopoietic stem cells, a step for inducing differentiation of the pluripotent blood progenitor cells to immunocytes, and a step for introducing a gene encoding the exogenous receptor into the immunocytes, the pluripotent blood progenitor cells being artificial leucocyte stem cells or T/NK progenitor cells," and thus is classified as invention 2.

Similar conclusions are made regarding the invention in claims 13, 16, 18, and 21,
the invention specified by selecting (2) and (4) or (2) and (6) in the invention in claims 22 and 23, and
the invention referring back to the invention in claims 2 and 22-23 in claims 4-11, 24-25, and 30-31.

Invention 3: Claims 26-29

Claims 26-29 share with claim 1 classified as invention 1 and claim 2 classified as invention 2 the common technical feature of "a method for producing immunocytes from a cell population comprising hematopoietic progenitor cells." However, this technical feature does not make a contribution over the prior art in light of the content disclosed in documents 1-3, and thus cannot be said to be a special technical feature. Moreover, there is no other same or corresponding special technical feature among these inventions.

Furthermore, claims 26-29 do not depend from claims 1 or 2. In addition, claims 26-29 are not substantially identical to or similarly closely related to any of the claims classified as invention 1 or 2.

Therefore, claims 26-29 cannot be classified as either invention 1 or 2.

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

Moreover, claims 26-29 have the special technical feature of "a method for producing human T/NK progenitor cells, the method comprising a step for culturing a cell population comprising human hematopoietic stem cells in a culture medium comprising SCF, Flt3-L, and IL-7 each in concentrations of 1 ng/mL to less than 10 ng/mL in the presence of a Notch ligand," and thus are classified as invention 3.

Invention 4: Claim 32

Claim 32 shares with claim 1 classified as invention 1, claim 2 classified as invention 2, and claim 26 classified as invention 3 the common technical feature of "immune progenitor cells." However, this technical feature does not make a contribution over the prior art in light of the content disclosed in documents 1-3, and thus cannot be said to be a special technical feature. Moreover, there is no other same or corresponding special technical feature among these inventions.

Furthermore, claim 32 does not depend from claims 1, 2, or 26. In addition, claim 32 is not substantially identical to or similarly closely related to any of the claims classified as inventions 1, 2, or 3.

Therefore, claim 32 cannot be classified as any of inventions 1, 2, or 3.

Moreover, claim 32 has the special technical feature of "cultured human T/NK progenitor cells characterized in being CD122-positive," and thus is classified as invention 4.

Invention 5: Claim 33

Claim 33 shares with claim 1 classified as invention 1, claim 2 classified as invention 2, claim 26 classified as invention 3, and claim 32 classified as invention 4 the common technical feature of "immunocytes." However, this technical feature does not make a contribution over the prior art in light of the content disclosed in documents 1-3, and thus cannot be said to be a special technical feature. Moreover, there is no other same or corresponding special technical feature among these inventions.

Furthermore, claim 33 does not depend from claims 1, 2, 26, or 32. In addition, claim 33 is not substantially identical to or similarly closely related to any of the claims classified as inventions 1, 2, 3, or 4.

Therefore, claim 33 cannot be classified as any of inventions 1, 2, 3, or 4.

Moreover, claim 32 has the special technical feature of being "cultured human NK cells characterized in being less mature and having a lower degree of exhaustion than human umbilical cord blood NK cells isolated from human umbilical cord blood as a result of lower expression of CD16 and KIR, which serve as indices of maturity, and the exhaustion marker TIGIT than the human umbilical cord blood NK cells," and thus is classified as invention 5.

1. ☑ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

☑ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/JP2024/027781

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
WO 2020/022512 A1	30 January 2020	US 2021/0381008 A1 claim 1, paragraph [0098] EP 3845638 A1 CN 112752838 A	
JP 2021-525066 A	24 September 2021	US 2022/0064599 A1 claim 1 WO 2019/229109 A1 EP 3802796 A1 CN 112204133 A KR 10-2021-0016567 A	
WO 2016/010154 A1	21 January 2016	US 2017/0304417 A1 claims EP 3170896 A1 CN 107002036 A	
WO 2018/168829 A1	20 September 2018	US 2020/0129551 A1 claim 1, paragraph [0132], fig. 2A EP 3597734 A1	
JP 2020-517237 A	18 June 2020	US 2020/0123501 A1 claim 1, example 1, fig. 1 WO 2018/195175 A1 EP 3612557 A1 KR 10-2019-0141190 A CN 110891967 A	
JP 2016-539659 A	22 December 2016	US 2016/0256492 A1 claim 38, example 1 WO 2015/059674 A1 EP 3060670 A1 KR 10-2016-0075676 A CN 106062201 A	
WO 2023/060163 A2	13 April 2023	(Family: none)	
JP 2021-518130 A	02 August 2021	US 2021/0002612 A1 paragraphs [0115], [0254]-[0261] WO 2019/180394 A1 EP 3768828 A1	

国際調査報告

国際出願番号
PCT/JP2024/027781

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

C12N 15/13(2006.01)i; A61K 35/17(2015.01)i; A61P 35/00(2006.01)i; A61P 37/04(2006.01)i; C07K 14/725(2006.01)i; C07K 16/28(2006.01)i; C07K 19/00(2006.01)i; C12N 5/10(2006.01)i; C12N 5/0789(2010.01)i; C12N 15/12(2006.01)i; C12N 15/62(2006.01)i
FI: C12N15/13; C12N15/12; C12N15/62 Z; C07K14/725; C07K16/28; C07K19/00; C12N5/0789; A61P35/00; A61P37/04; A61K35/17; C12N5/10 ZNA

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（ＩＰＣ））

C12N15/13; A61K35/17; A61P35/00; A61P37/04; C07K14/725; C07K16/28; C07K19/00; C12N5/10; C12N5/0789; C12N15/12; C12N15/62

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	１９２２－１９９６年
日本国公開実用新案公報	１９７１－２０２４年
日本国実用新案登録公報	１９９６－２０２４年
日本国登録実用新案公報	１９９４－２０２４年

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

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

C. 関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー*	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
X	PAASCH, Daniela et al., “Ex Vivo Generation of CAR Macrophages from Hematopoietic Stem and Progenitor Cells for Use in Cancer Therapy”, Cells, 2022, 11, 994, DOI: 10.3390/cells11060994 要約、Figure 3	1,8,10,11,14,15,19,20
Y		1,3-5,8-11,22-25
X	WO 2020/022512 A1 (国立大学法人京都大学) 30.01.2020 (2020-01-30) 請求項１、［００２７］	1,8-12,17
Y		22-25
X	JP 2021-525066 A (グリコステム セラピューティクス ベスローテン フェンノートシャップ) 24.09.2021 (2021-09-24) 請求項１	1,8,10,11,14,15,19,20
Y		22-25

☑ Ｃ欄の続きにも文献が列挙されている。

☑ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー
“A” 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
“D” 国際出願で出願人が先行技術文献として記載した文献
“E” 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
“L” 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
“O” 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
“P” 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献
“T” 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
“X” 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
“Y” 特に関連のある文献であって、当該文献と他の１以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
“&” 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日	国際調査報告の発送日
09.10.2024	22.10.2024

名称及びあて先
日本国特許庁(ISA/JP)
〒100-8915
日本国
東京都千代田区霞が関三丁目４番３号

権限のある職員（特許庁審査官）
田中　晴絵 4B 9739

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C.　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー*	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
Y	IKAWA, Tomokatsu et al., “Induced Developmental Arrest of Early Hematopoietic Progenitors Leads to the Generation of Leukocyte Stem Cells”, Stem Cell Reports, 2015, Vol. 5, No. 5, p.716-727, DOI: 10.1016/j.stemcr.2015.09.012 要約、７２１頁右欄３行～７２２頁左欄１１行	1-5,8-11,13,16,18,21-25
Y	WO 2016/010154 A1 (河本　宏) 21.01.2016 (2016-01-21) 特許請求の範囲	1,3-5,8-11,22-25
Y	WO 2018/168829 A1 (国立大学法人京都大学) 20.09.2018 (2018-09-20) 請求項１、［００７９］、図２Ａ	2,4,5-11,13,16,18,21-25,30,31
X Y	JP 2020-517237 A (フジフィルム セルラー ダイナミクス, インコーポレイテッド) 18.06.2020 (2020-06-18) 請求項１、実施例１、図１	32,33 1-3,6-11,13,16,18,21-25,30,31
Y	JP 2016-539659 A (オスペダーレ サン ラファエレ エス. アール. エル) 22.12.2016 (2016-12-22) 請求項３３、実施例１	1,3,6-11,22-25,30,31
Y	WO 2023/060163 A2 (BOARD OF REGENTS, THE UNIVERSITY OF TEXAS SYSTEM) 13.04.2023 (2023-04-13) 請求項２４	22-25
X	JP 2021-518130 A (サントル ナショナル デ ラ ルシェルシュ シアンティフィック) 02.08.2021 (2021-08-02) ［０１３１］、［０２０５］－［０２１２］	26-29,32,33

国際調査報告

国際出願番号
PCT/JP2024/027781

第Ⅰ欄　　ヌクレオチド又はアミノ酸配列（第１ページの１．ｃの続き）

1. この国際出願で開示されたヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、以下の配列表に基づき国際調査を行った。

a. ☑ 出願時における国際出願の一部を構成する配列表

b. ☐ 国際出願日後に、国際調査のために提出された配列表（ＰＣＴ規則13の3.1(a)）

☐ 配列表が出願時の国際出願の開示の範囲を超えるものではない旨の陳述書が添付されていた。

2. ☐ この国際出願で開示されたヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、この国際調査報告は、WIPO標準ST.26に準拠する配列表なしで有意義な国際調査をすることができる限度において作成された。

3. 補足意見:

第Ⅲ欄　　発明の単一性が欠如しているときの意見（第１ページの３の続き）

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

文献１：PAASCH, Daniela et al., “Ex Vivo Generation of CAR Macrophages from HematopoieticStem and Progenitor Cells for Use in Cancer Therapy”, Cells, 2022, 11, 994, DOI: 10.3390/cells11060994
文献２：WO 2020/022512 A1 (国立大学法人京都大学) 30.01.2020 (2020-01-30)
文献３：JP 2021-525066 A (グリコステム セラピューティクス ベスローテン フェンノートシャップ)24.09.2021 (2021-09-24)

（発明１）請求項１，３，１２，１４－１５，１７，１９－２０に係る発明、
請求項２２，２３において（１）、（３）又は（５）を選択して特定される発明、及び、
請求項４－１１，２４－２５，３０－３１において、前記請求項１，３，２２－２３に係る発明を引用する発明

請求項１，３，１２，１４－１５，１７，１９－２０に係る発明、請求項２２，２３において（１）、（３）又は（５）を選択して特定される発明、及び、請求項４－１１，２４－２５，３０－３１において、前記請求項１，３，２２－２３に係る発明を引用する発明は、「T細胞受容体（TCR）、キメラ抗原受容体（CAR）又はキメラ自己抗体受容体（CAAR）である外因性受容体を発現する免疫細胞の生産方法であって、造血幹細胞を含む細胞集団より、多能性血液前駆細胞を調製する工程、前記外因性受容体をコードする遺伝子を多能性血液前駆細胞に導入することにより、前記外因性受容体を発現する多能性血液前駆細胞を調製する工程、及び前記外因性受容体を発現する多能性血液前駆細胞を免疫細胞に分化誘導する工程を含む、方法。」という技術的特徴を有しているので、発明１に区分する。

（発明２）請求項２，１３，１６，１８，２１に係る発明、
請求項２２、２３に係る発明において（２）及び（４）又は（２）及び（６）を選択して特定される発明、及び、
請求項４－１１、２４－２５、３０－３１において、前記請求項２、２２－２３に係る発明を引用する発明

請求項２は、発明１に区分された請求項１と、「T細胞受容体（TCR）、キメラ抗原受容体（CAR）又はキメラ自己抗体受容体（CAAR）である外因性受容体を発現する免疫細胞の生産方法であって、造血幹細胞を含む細胞集団より、多能性血液前駆細胞を調製する工程、前記外因性受容体をコードする遺伝子を細胞に導入する工程、及び、多能性血液前駆細胞を免疫細胞に分化誘導する工程を含む、方法。」という共通の技術的特徴を有している。しかしながら、当該技術的特徴は、文献１～３の開示内容に照らして、先行技術に対する貢献をもたらすものではないから、当該技術的特徴は、特別な技術的特徴であるとはいえない。また、これらの発明の間には、他に同一の又は対応する特別な技術的特徴は存在しない。
さらに、請求項２は、請求項１の従属請求項ではない。また、請求項２は、発明１に区分されたいずれの請求項に対しても実質同一又はそれに準ずる関係にはない。
したがって、請求項２は発明１に区分できない。
そして、請求項２は、「TCR、CAR又はCAARである外因性受容体を発現する免疫細胞の生産方法であって、造血幹細胞を含む細胞集団より、多能性血液前駆細胞を調製する工程、多能性血液前駆細胞を免疫細胞に分化誘導する工程、及び前記外因性受容体をコードする遺伝子を免疫細胞に導入する工程を含み、前記多能性血液前駆細胞が、人工白血球幹細胞又はT/NK前駆細胞である、方法。」という特別な技術的特徴を有しているので、発明２に区分する。

請求項１３，１６，１８，２１に係る発明
請求項２２、２３に係る発明において（２）及び（４）又は（２）及び（６）を選択して特定される発明、及び、
請求項４－１１，２４－２５，３０－３１において、前記請求項２，２２－２３に係る発明を引用する発明についても、同様に判断される。

（発明３）請求項２６－２９
請求項２６－２９は、発明１に区分された請求項１及び発明２に区分された請求項２と、「造血前駆細胞を含む細胞集団から、免疫細胞を生産する方法」という共通の技術的特徴を有している。しかしながら、当該技術的特徴は、文献１～３の開示内容に照らして、先行技術に対する貢献をもたらすもの

第Ⅲ欄　　発明の単一性が欠如しているときの意見（第１ページの３の続き）

ではないから、当該技術的特徴は、特別な技術的特徴であるとはいえない。また、これらの発明の間には、他に同一の又は対応する特別な技術的特徴は存在しない。

さらに、請求項２６－２９は、請求項１及び２の従属請求項ではない。また、請求項２６－２９は、発明１又は２に区分されたいずれの請求項に対しても実質同一又はそれに準ずる関係にはない。

したがって、請求項２６－２９は発明１又は２のいずれにも区分できない。

そして、請求項２６－２９は、「ヒト造血幹細胞を含む細胞集団を、Notchリガンドの共存下、SCF、Flt3-L及びIL-7をそれぞれ1 ng/mL以上10 ng/mL未満の濃度で含む培地で培養する工程を含む、ヒトT/NK前駆細胞の製造方法。」という特別な技術的特徴を有しているので、発明３に区分する。

（発明４）請求項３２

請求項３２は、発明１に区分された請求項１、発明２に区分された請求項２、及び、発明３に区分された請求項２６と、「免疫前駆細胞」という共通の技術的特徴を有している。しかしながら、当該技術的特徴は、文献１～３の開示内容に照らして、先行技術に対する貢献をもたらすものではないから、当該技術的特徴は、特別な技術的特徴であるとはいえない。また、これらの発明の間には、他に同一の又は対応する特別な技術的特徴は存在しない。

さらに、請求項３２は、請求項１、２及び２６の従属請求項ではない。また、請求項３２は、発明１、２又は３に区分されたいずれの請求項に対しても実質同一又はそれに準ずる関係にはない。

したがって、請求項３２は発明１、２又は３のいずれにも区分できない。

そして、請求項３２は、「CD122陽性であることを特徴とする、培養ヒトT/NK前駆細胞。」という特別な技術的特徴を有しているので、発明４に区分する。

（発明５）請求項３３

請求項３２は、発明１に区分された請求項１、発明２に区分された請求項２、発明３に区分された請求項２６、及び、発明４に区分された請求項３２と、「免疫細胞」という共通の技術的特徴を有している。しかしながら、当該技術的特徴は、文献１～３の開示内容に照らして、先行技術に対する貢献をもたらすものではないから、当該技術的特徴は、特別な技術的特徴であるとはいえない。また、これらの発明の間には、他に同一の又は対応する特別な技術的特徴は存在しない。

さらに、請求項３３は、請求項１、２、２６及び３２の従属請求項ではない。また、請求項３３は、発明１、２、３又は４に区分されたいずれの請求項に対しても実質同一又はそれに準ずる関係にはない。

したがって、請求項３３は発明１、２、３又は４のいずれにも区分できない。

そして、請求項３２は、「ヒト臍帯血より分離されたヒト臍帯血NK細胞よりも、成熟度の指標となるCD16及びKIRの発現並びに疲弊マーカーTIGITの発現が低いことにより、前記ヒト臍帯血NK細胞よりも幼若かつ疲弊度が低いことを特徴とする、培養ヒトNK細胞。」という特別な技術的特徴を有しているので、発明５に区分する。

国際調査報告

国際出願番号
PCT/JP2024/027781

第Ⅲ欄　発明の単一性が欠如しているときの意見（第１ページの３の続き）

1. ☑ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求項について作成した。

2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求項について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。

3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求項のみについて作成した。

4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求項について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

☐ 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。

☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。

☑ 追加調査手数料の納付はあったが、異議申立てはなかった。

国際調査報告
パテントファミリーに関する情報

国際出願番号
PCT/JP2024/027781

引用文献	公表日	パテントファミリー文献	公表日
WO 2020/022512 A1	30.01.2020	US 2021/0381008 A1 請求項１、［００９８］ EP 3845638 A1 CN 112752838 A	
JP 2021-525066 A	24.09.2021	US 2022/0064599 A1 請求項１ WO 2019/229109 A1 EP 3802796 A1 CN 112204133 A KR 10-2021-0016567 A	
WO 2016/010154 A1	21.01.2016	US 2017/0304417 A1 特許請求の範囲 EP 3170896 A1 CN 107002036 A	
WO 2018/168829 A1	20.09.2018	US 2020/0129551 A1 請求項１、［０１３２］、図２Ａ EP 3597734 A1	
JP 2020-517237 A	18.06.2020	US 2020/0123501 A1 請求項１、実施例１、図１ WO 2018/195175 A1 EP 3612557 A1 KR 10-2019-0141190 A CN 110891967 A	
JP 2016-539659 A	22.12.2016	US 2016/0256492 A1 請求項３８、実施例１ WO 2015/059674 A1 EP 3060670 A1 KR 10-2016-0075676 A CN 106062201 A	
WO 2023/060163 A2	13.04.2023	（ファミリーなし）	
JP 2021-518130 A	02.08.2021	US 2021/0002612 A1 ［０１１５］、［０２５４］－［０２６１］ WO 2019/180394 A1 EP 3768828 A1	