

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2021-514185

(P2021-514185A)

(43) 公表日 令和3年6月10日(2021.6.10)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 5/0783 (2010.01)	C 1 2 N 5/0783	4 B 0 6 5
A 6 1 K 35/17 (2015.01)	A 6 1 K 35/17	Z 4 C 0 8 7
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	4 H 0 4 5
A 6 1 P 37/04 (2006.01)	A 6 1 P 37/04	
C 1 2 N 5/0735 (2010.01)	C 1 2 N 5/0735	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 38 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2020-543276 (P2020-543276)
 (86) (22) 出願日 平成31年2月14日 (2019. 2. 14)
 (85) 翻訳文提出日 令和2年9月24日 (2020. 9. 24)
 (86) 国際出願番号 PCT/CA2019/050181
 (87) 国際公開番号 W02019/157597
 (87) 国際公開日 令和1年8月22日 (2019. 8. 22)
 (31) 優先権主張番号 62/630, 497
 (32) 優先日 平成30年2月14日 (2018. 2. 14)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関 米国 (US)

(71) 出願人 513193738
 サニーブルック リサーチ インスティテュート
 カナダ国 エム4エヌ 3エム5 オンタリオ州, トロント, ベイビュー アベニュー 2075, エー3 33
 (74) 代理人 100102978
 弁理士 清水 初志
 (74) 代理人 100102118
 弁理士 春名 雅夫
 (74) 代理人 100160923
 弁理士 山口 裕孝
 (74) 代理人 100119507
 弁理士 刑部 俊

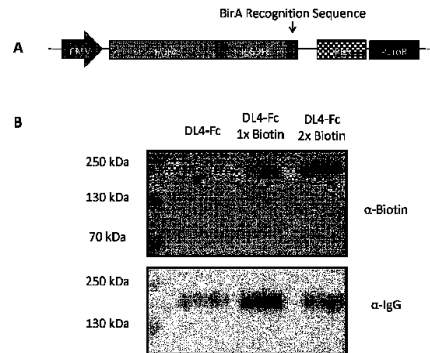
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 T細胞系列の細胞を発生させるための方法

(57) 【要約】

(a) 幹細胞および始原細胞を含む試料を、浮遊支持体にコンジュゲートしたNotchリガンドとともに培養する段階、および (b) T細胞系列の細胞を単離する段階を含む、T細胞系列の細胞を発生させる方法を提供する。一態様では、T細胞系列の細胞は、始原T細胞または成熟T細胞である。該細胞の組成物、キット、および使用も提供する。

FIGURE 1



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

(a) 幹細胞または始原細胞を含む試料を、浮遊支持体にコンジュゲートしたNotchリガンドとともに培養する段階、および

(b) T細胞系列の細胞を単離する段階を含む、T細胞系列の細胞を発生させる方法。

【請求項 2】

前記浮遊支持体が、粒子である、請求項1記載の方法。

【請求項 3】

前記浮遊支持体が、マイクロビーズである、請求項1または2記載の方法。

10

【請求項 4】

前記幹細胞または始原細胞が、前記Notchリガンドとともに浮遊培養される、請求項1～3のいずれか一項記載の方法。

【請求項 5】

前記幹細胞が、造血幹細胞 / 始原細胞 (HSPC)、胚幹細胞、または人工多能性幹細胞 (iPSC) から選択される、請求項1～4のいずれか一項記載の方法。

【請求項 6】

前記幹細胞が、 $CD34^+$ または $CD34^+CD38^{-/lo}$ HSPCである、請求項1～5のいずれか一項記載の方法。

【請求項 7】

前記幹細胞が、 $CD34^+$ 造血前駆細胞であり、任意で、iPSCから分化した $CD34^+$ 造血前駆細胞である、請求項1～4のいずれか一項記載の方法。

20

【請求項 8】

前記Notchリガンドが、DL4である、請求項1～7のいずれか一項記載の方法。

【請求項 9】

前記T細胞系列の細胞が、始原T (proT) 細胞である、請求項1～8のいずれか一項記載の方法。

【請求項 10】

前記幹細胞または始原細胞が、ヒト細胞であり、前記proT細胞が、表現型 $CD34^+CD7^+$ または $CD7^+CD5^+CD1a^-$ を有する、請求項9記載の方法。

30

【請求項 11】

前記幹細胞または始原細胞が、マウス細胞であり、任意で、系列- $CD117^+$ Sca-1+マウス細胞であり、前記proT細胞が、表現型 $CD25^+$ または $CD25^+CD90^+$ を有する、請求項10記載の方法。

【請求項 12】

前記T細胞系列の細胞が、 $CD4^+CD8^+$ 二重陽性細胞、 $CD4^+CD8^+CD3^+$ 二重陽性細胞、 $CD8^+CD3^+$ 単一陽性細胞、または $CD4^+CD3^+$ 単一陽性細胞である、請求項1～8のいずれか一項記載の方法。

【請求項 13】

前記幹細胞または始原細胞が、間質細胞を含まない培地で培養される、請求項1～12のいずれか一項記載の方法。

40

【請求項 14】

前記幹細胞または始原細胞が、浮遊支持体に付着した少なくとも1つのT細胞共刺激分子とともに培養され、該少なくとも1つのT細胞共刺激分子が任意でVCAM1である、請求項1～13のいずれか一項記載の方法。

【請求項 15】

請求項1～14のいずれか一項記載の方法により発生した、T細胞系列の細胞。

【請求項 16】

始原T細胞、 $CD4^+CD8^+$ 二重陽性細胞、 $CD4^+CD8^+CD3^+$ 二重陽性細胞、 $CD8^+CD3^+$ 単一陽性細胞、または $CD4^+CD3^+$ 単一陽性細胞である、請求項15記載の細胞。

50

【請求項 17】

(a) Notchリガンドと(b)マイクロビーズとを含み、該Notchリガンドが該マイクロビーズにコンジュゲートしている、浮遊Notchリガンド。

【請求項 18】

(i) 前記マイクロビーズが6.5~100 μmの直径を有し、かつ/または(ii)前記NotchリガンドのC末端が前記マイクロビーズにコンジュゲートしている、請求項17記載の浮遊Notchリガンド。

【請求項 19】

T細胞系列の細胞を発生させるための、請求項17または18記載の浮遊Notchリガンドの使用。

10

【請求項 20】

(i) (a) Notchリガンドと(b)浮遊支持体とを含み、該Notchリガンドが該浮遊支持体にコンジュゲートしている、浮遊Notchリガンド、および

(ii) T細胞系列の細胞を発生させるための該浮遊Notchリガンドの使用説明書を含む、キット。

【請求項 21】

(i) (a) Notchリガンドと(b)浮遊支持体とを含み、該Notchリガンドが該浮遊支持体にコンジュゲートしている、浮遊Notchリガンド、および

(ii) 培養培地

を含む、キット。

20

【請求項 22】

前記浮遊Notchリガンドが、マイクロビーズにコンジュゲートしたDL4を含む、請求項20または21記載のキット。

【請求項 23】

(iii) 浮遊支持体に付着した少なくとも1つのT細胞共刺激分子をさらに含み、該少なくとも1つのT細胞共刺激分子が任意でVCAM1である、請求項20~22のいずれか一項記載のキット。

【請求項 24】

T細胞数の増加を要する状態を有する対象を治療する方法であって、

(i) (a) 幹細胞または始原細胞を含む試料を、浮遊支持体にコンジュゲートしたNotchリガンドとともに培養すること、および(b) T細胞系列の細胞を単離することを含む、T細胞系列の細胞を発生させる段階、ならびに

(ii) 有効量の該T細胞系列の細胞を該対象に投与する段階を含む、方法。

30

【請求項 25】

前記T細胞系列の細胞が、始原T細胞である、請求項24記載の方法。

【請求項 26】

前記T細胞系列の細胞が、CD4+CD8+二重陽性細胞、CD4+CD8+CD3+二重陽性細胞、CD8+CD3+単一陽性細胞、またはCD4+CD3+単一陽性細胞である、請求項23記載の方法。

【請求項 27】

前記T細胞系列の細胞が、成熟T細胞である、請求項23記載の方法。

40

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本願は、2018年2月14日に出願された米国特許仮出願第62/630,497号の優先権の恩典を主張するものであり、その全体が参照により本明細書に組み入れられる。

【0002】

分野

本願は、T細胞系列の細胞を発生させる方法、組成物、およびキット、ならびに該細胞

50

の使用に関する。具体的には、本願は、始原T細胞および成熟T細胞を発生させる方法、組成物、およびキット、ならびに該細胞の使用に関する。

【背景技術】

【0003】

背景

T細胞は適応免疫の重要なメディエーターであり、病原体に対する、およびがん免疫療法における治療剤として利用することができる。造血幹細胞移植 (HSCT) は、広範な悪性および非悪性の障害の有効な治療を提供するが、治療前に必要なプレコンディショニングレジメンの結果として、T細胞の回復が大幅に遅れてしまう (Krengerら, 2011)。骨髓 (BM) 中で発生する大半の他の造血系列と違って、T細胞の発生は、BM由来の始原細胞が胸腺に移動することを要し、胸腺に入ってきたリンパ球始原細胞は、T系列細胞への分化を誘導する重要なシグナルを受ける (Shah and Zuniga-Pflucker, 2014)。

10

【0004】

入ってくるリンパ球始原細胞に胸腺間質細胞によって送達される主要シグナルは、胸腺皮質上皮細胞によって発現されるNotchリガンド、Delta様-4に媒介される (Thompson and Zuniga-Pflucker, 2011)。リンパ球始原細胞によって発現されるNotch受容体は、Notch受容体の活性化が有効に誘導されるために、Delta様-4担持細胞により誘導される機械的けん引力を要する (D'Souzaら, 2010; Gordonら, 2015; Meloty-Kapellaら, 2012)。また、T細胞の発生は、一定した、かつ高いレベルのNotch受容体活性化を要することもわかっている (Schmittら, 2004)。Notch1受容体シグナルまたはDelta様-4誘導性シグナルの非存在下では、胸腺でT細胞発生が起きず、代わりにB細胞などの代替のリンパ球系列が発生する。このように、胸腺内のT細胞の発生は、Notchシグナリング経路を前提としている (Zuniga-Pflucker, 2004)。

20

【0005】

HSCTの文脈では、コンディショニングおよび老化それぞれの結果である胸腺の機能不全または委縮は、移植HSCがリンパ球を生産する能力の限界と相まって、胸腺でのT細胞発生の程度を制限する (Porter and June, 2005)。このことは不十分な免疫監視につながり、患者は感染症に罹患しやすくなり、かつ/またはがんが再発しやすくなり、今も大きな臨床的難関とされている。

【0006】

始原T (proT) 細胞の養子移入は、ヒトまたはマウスのproT細胞が、それらの由来が異種であれ同種であれ免疫不全マウスの胸腺に生着することが示されていることから、T細胞再構成を増強させる有望なストラテジーとして台頭している (Awongら, 2009; Awongら, 2013; Zakrzewskiら, 2006; Zakrzewskiら, 2008)。ProT細胞は、発生的に未成熟であり、ホストの胸腺内で正負の選択を受ける。したがって、ProT細胞はレシピエントの主要組織適合抗原 (MHC) に制限されて、移植片対宿主病 (GVHD) 関連の臨床的難関を回避できるホスト寛容T細胞を与える。重要なことは、proT細胞の移植によって、胸腺の構造が復旧し、その後のHSC由来始原細胞の胸腺播種が改善することである。proT細胞は、本来の再生医療特性に加えて、がん治療用に腫瘍関連抗原 (TAA) に対する特異性を付与すべくT細胞受容体 (TCR) およびキメラ抗原受容体 (CAR) について改変され得、また個別仕様の応答プログラムを形成するために合成遺伝子回路についても改変され得る。

30

40

【0007】

この分野で未解決の難問は、種々のソースのヒト造血幹細胞 / 始原細胞 (HSPC) から大量のproT細胞を発生させられるように容易に拡大化できる、臨床に適した系の開発である。これまでの方法は、NotchリガンドDelta様-1 (DL1) またはDelta様-4 (DL4) を発現するマウス由来OP9細胞に依拠しているが、このアプローチを臨床に応用するにはいくつか課題がある (Awongら, 2009; Awongら, 2013)。間質細胞を含まないアプローチのストラテジーのほとんどが、二次元 (2D) 組織培養プラットフォームに依拠しており、したがってNotchリガンドDL1またはDL4は、組織培養プレートに固定化される (Gehreら, 2015; Reimannら, 2012; Simonsら, 2017)。血管細胞接着分子-1 (VCAM-1) のようなさらなる接着

50

受容体リガンドも、このフォーマットに含まれている (Shuklaら, 2017)。こうしたストラテジーを用いて生産されたヒトproT細胞は、免疫不全マウスの胸腺を成功裏に再構成することが示されている。このような進歩は心強いが、これらのアプローチを治療用proT細胞の発生に利用することは、臨床用製造のための大規模処理の必要性により制限され、臨床に適用可能な大規模な数の細胞をルーチンに発生させる有効な方法ではない。理想は、真に拡張可能なプラットフォームによって、閉じた自動バイオリアクター系におけるproT細胞の増殖が可能になることである (Lipsitzら, 2016)。

【発明の概要】

【0008】

概要

10

本発明者らは、マウスまたはヒト造血幹細胞 / 始原細胞 (HSPC) および人工多能性幹細胞 (iPSC) からT細胞系列の細胞を発生させる、無細胞ビーズベース系を開発した。Notchリガンドの非プレート結合浮遊体 (たとえばDL4- μ ビーズ) が、始原T細胞および成熟T細胞などのT系列細胞の有効な発生を可能にする。

【0009】

したがって、本開示は、(a) 幹細胞または始原細胞を含む試料を、浮遊支持体にコンジュゲートしたNotchリガンドとともに培養する段階、および (b) T細胞系列の細胞を単離する段階を含む、T細胞系列の細胞を発生させる方法を提供する。

【0010】

一態様では、浮遊支持体が、粒子である。

20

【0011】

別の態様では、浮遊支持体が、マイクロビーズである。

【0012】

一態様では、幹細胞または始原細胞が、Notchリガンドとともに浮遊培養される。

【0013】

別の態様では、幹細胞が、造血幹細胞 / 始原細胞 (HSPC)、胚幹細胞、または人工多能性幹細胞 (iPSC) から選択される。

【0014】

別の態様では、幹細胞が、ヒト幹細胞であり、任意でCD34⁺またはCD34⁺CD38⁻ HSPCである。

30

【0015】

別の態様では、幹細胞が、CD34⁺造血前駆細胞であり、任意で、iPSCから分化したCD34⁺造血前駆細胞である。

【0016】

別の態様では、Notchリガンドが、DL1またはDL4である。

【0017】

別の態様では、T細胞系列の細胞が、始原T (proT) 細胞である。

【0018】

別の態様では、幹細胞または始原細胞が、ヒト細胞であり、proT細胞が、表現型CD34⁺CD7⁺またはCD7⁺CD5⁺CD1a⁻を有する。

40

【0019】

別の態様では、幹細胞または始原細胞が、マウス細胞であり、任意で系列⁻CD117⁺Sca-1⁺のマウス細胞であり、proT細胞が、表現型CD25⁺またはCD25⁺CD90⁺を有する。

【0020】

別の態様では、T細胞系列の細胞が、CD4⁺CD8⁺二重陽性細胞、CD4⁺CD8⁺CD3⁺二重陽性細胞、CD8⁺CD3⁺単一陽性細胞、またはCD4⁺CD3⁺単一陽性細胞である。

【0021】

別の態様では、幹細胞または始原細胞が、間質細胞を含まない培地で培養される。

【0022】

別の態様では、幹細胞または始原細胞が、浮遊支持体に付着した少なくとも1つのT細胞

50

共刺激分子とともに培養され、該少なくとも1つのT細胞共刺激分子は任意でVCAM1である。

【0023】

本開示はまた、T細胞系列の細胞を提供し、該細胞は、(a)幹細胞または始原細胞を含む試料を、浮遊支持体にコンジュゲートしたNotchリガンドとともに培養する段階、および(b)T細胞系列の細胞を単離する段階を含む、T細胞系列の細胞を発生させる方法により発生される。

【0024】

一態様では、細胞が、始原T細胞、CD4⁺CD8⁺二重陽性細胞、CD4⁺CD8⁺CD3⁺二重陽性細胞、またはCD8⁺CD3⁺単一陽性細胞、CD4⁺CD3⁺単一陽性細胞である。

10

【0025】

本開示は、(a)Notchリガンドと(b)浮遊支持体、任意でマイクロビーズ、とを含み、該Notchリガンドが該浮遊支持体にコンジュゲートしている、浮遊Notchリガンドも提供する。

【0026】

一態様では、浮遊支持体がマイクロビーズであり、(i)該マイクロビーズは6.5~100 μmの直径、任意で20~30 μmの直径を有し、かつ/または(ii)該NotchリガンドのC末端領域が該マイクロビーズにコンジュゲートしている。

【0027】

本開示は、T細胞系列の細胞を発生させるための浮遊Notchリガンドの使用も提供する。

20

【0028】

本開示は、(i)(a)Notchリガンドと(b)浮遊支持体とを含み、該Notchリガンドが該浮遊支持体にコンジュゲートしている、浮遊Notchリガンド、および(ii)T細胞系列の細胞を発生させるための該浮遊Notchリガンドの使用説明書、を含むキットも提供する。

【0029】

本開示は、(i)(a)Notchリガンドと(b)浮遊支持体とを含み、該Notchリガンドが該浮遊支持体にコンジュゲートしている、浮遊Notchリガンド、および(ii)培養培地、を含むキットをさらに提供する。

【0030】

キットの一態様では、浮遊Notchリガンドは、マイクロビーズにコンジュゲートしたDL4を含む。

30

【0031】

別の態様では、キットは、(iii)浮遊支持体に付着した少なくとも1つのT細胞共刺激分子、をさらに含み、該少なくとも1つのT細胞共刺激分子は任意でVCAM1である。

【0032】

本開示は、T細胞数の増加を要する状態を有する対象を治療する方法であって、(i)(a)幹細胞または始原細胞を含む試料を、浮遊支持体にコンジュゲートしたNotchリガンドとともに培養すること、および(b)T細胞系列の細胞を単離することを含む、T細胞系列の細胞を発生させる段階、ならびに(ii)有効量の該T細胞系列の細胞を該対象に投与する段階を含む、方法を、さらに提供する。

40

【0033】

一態様では、T細胞系列の細胞は、始原T細胞である。

【0034】

別の態様では、T細胞系列の細胞は、成熟T細胞である。

【0035】

別の態様では、T細胞系列の細胞は、CD4⁺CD8⁺二重陽性細胞、CD4⁺CD8⁺CD3⁺二重陽性細胞、CD8⁺CD3⁺単一陽性細胞、またはCD4⁺CD3⁺単一陽性細胞である。

【0036】

本願の他の特徴および利点は、以下の詳細な説明から明らかになる。ただし、詳細な

50

説明および具体例は本願の好ましい態様を示すものであって、この詳細な説明から当業者には本願の趣旨および範囲内でのさまざまな変化形態および変更形態が明らかになることから、説明の目的でのみ提供されることを理解されたい。

【図面の簡単な説明】

【0037】

以下、本発明の態様を図面に関して記載する。

【0038】

【図1】DL4-Fcコンストラクトの設計およびビオチン化を示す。A) DL4-Fc融合コンストラクトを、その成分であるヒトDL4の細胞外ドメイン、精製目的、およびヒトIgG3のFc領域(IgG3Fc)とともに図示している。B) 化学的にビオチン化されたDL4-Fcの、非還元条件下で抗ビオチン(上)および抗ヒトIgG(下)を用いたウエスタンブロット分析。

10

【図2】第1世代DL4- μ ビーズによるNotchレポーター細胞の活性化を示す。A) 化学的にビオチン化されたDL4-Fcタンパク質をSA被覆ビーズにコンジュゲートさせて、50 nmのゴールドナノ粒子(GNP)から100 μ mの μ ビーズまでのランダム方向第1世代DL4- μ ビーズを形成した。B) 3×10^4 個の3T3-N1Cluc細胞を、陰性対照としてhIgGでまたは図示の異なる濃度のDL4-Fcで事前処理したプレートでインキュベートした。あるいは、細胞を異なる数のDL4- μ ビーズとともに無処理プレートでインキュベートした。各条件のビーズ数の総計は同じ表面積を表し、したがってDL4-Fc分子の同じ総数を表した。播種から24時間後に細胞を溶解させ、ルシフェラーゼ活性について分析した。

20

【図3】第1世代DL4- μ ビーズを用いた、マウスHSCからのT細胞発生の誘導を示す。マウス胎仔肝由来HSPCを、非コンジュゲート μ ビーズまたはDL4- μ ビーズとともに、FBS、SCF、IL-7およびFlt3-Lを含有する培地で、7日間インキュベートした。同時培養物を収集し、T系列(CD25⁺)細胞、B系列(CD19⁺)細胞、またはミエロイド(CD11b⁺)細胞の存在について、フローサイトメトリーを用いて分析した。プロット中の数は、各四分画領域内の細胞のパーセンテージを示す。

30

【図4】DL4-Fcの部位特異的ビオチン化を示す。A) DL4-Fc融合コンストラクトを、BirA認識配列(AviTag^(商標))をC末端に含むように再設計し、ビオチン部分が酵素BirAによりそこにコンジュゲートできるようにした。B) 化学的にビオチン化されたDL4-Fcの、非還元条件下で抗ヒトIgG(上)および抗ビオチン(下)を用いたウエスタンブロット分析。

40

【図5】第1世代と第2世代のDL4- μ ビーズのNotch活性化能力の差を示す。A) BirA-ビオチン化DL4-Fcタンパク質をSA被覆ビーズにコンジュゲートさせて、方向指定第2世代DL4- μ ビーズを形成した。B) 3×10^4 個の3T3-N1Cluc細胞を、IgG-もしくはDL4-Fcプレート結合対照上で、または第1もしくは第2世代DL4- μ ビーズ(25 μ m)とともに、インキュベートした。播種から24時間後に細胞を溶解させ、ルシフェラーゼ活性について分析した。

50

【図6】 μ ビーズのサイズがNotch活性化に及ぼす影響の評価を示す。6.5 μ m~100 μ mの範囲のサイズのDL4- μ ビーズを、 3×10^4 個の3T3-N1Cluc細胞とともに一晚インキュベートした。プレート結合(PB) IgGおよびDL4-Fcが、それぞれ陰性対照および陽性対照として含まれた。各条件のビーズ数の総計は同じ表面積を表し、したがってDL4-Fc分子の同じ総数を表した。播種から24時間後に細胞を溶解させ、ルシフェラーゼ活性について分析した。

【図7】さまざまな濃度のDL4-Fcおよび異なる組成の μ ビーズにより誘導されるNotch活性化を示す。A) 一定数の直径25 μ mのSA被覆 μ ビーズに、DL4-Fcの量を増加させてコンジュゲートさせることにより、DL4- μ ビーズを調製した。 μ ビーズのコア組成の変化がNotch活性化能力に及ぼす効果を評価するために、直径25 μ mの磁気 μ ビーズが含まれた。B) ビオチン化DL4-Fcを、等サイズのSA- μ ビーズまたはプロテインG- μ ビーズに結合させて、Fc領域への結合がNotch活性化に等しく有効であるかどうかを決定した。DL4- μ ビーズを 3×10^4 個の3T3-N1Cluc細胞とともに一晚インキュベートした。陰性対照としてプレート結合IgGが含まれた。播種から24時間後に細胞を溶解させ、ルシフェラーゼ活性について分析した。

60

【図 8】第2世代DL4- μ ビーズを用いた、マウスHSPCからのT細胞発生の誘導を示す。1x10³個、3x10³個、または8x10³個のマウス胎仔肝由来HSPCを、非コンジュゲート μ ビーズまたはDL4- μ ビーズと、10:1 (ビーズ:細胞) の比率で、FBS、SCF、IL-7、およびFlt3-Lを含有する培地で、7日間インキュベートした。同時培養物を収集し、T系列 (CD25⁺) 細胞、B系列 (CD19⁺) 細胞、またはミエロイド (CD11b⁺) 細胞の存在について、フローサイトメトリーを用いて分析した。プロット中の数は、各四分画領域内の細胞のパーセンテージを示す。

【図 9】HSPC対DL4- μ ビーズ比の最適化を示す。マウス胎仔肝由来HSPCを次の条件で7日間培養した：非コンジュゲート μ ビーズ、プレート結合DL4-Fc (PB-DL4)、または3倍滴定のDL4- μ ビーズ。培養物を、CD11b⁺ ミエロイド細胞およびCD19⁺ B系列細胞の阻害、ならびにproT (CD90⁺ CD25⁺) 細胞の出現について、フローサイトメトリーを用いて分析した。

【図 10 A】DL4- μ ビーズと同時培養したHSPCからのヒトT系列細胞の発生の進行を示す。A) ヒト臍帯血由来CD34⁺細胞を、非コンジュゲート μ ビーズ、プレート結合DL4-Fc、またはDL4- μ ビーズとともに、StemSpan (商標) T Cell Progenitor Expansion Supplementを補充したStemSpan (商標) SFEM IIで、14日間培養した。2日おきに (矢印) 細胞を収集し、フローサイトメトリーを用いてCD34、CD5、CD1a、およびCD7の表面発現について分析した。

【図 10 B】DL4- μ ビーズと同時培養したHSPCからのヒトT系列細胞の発生の進行を示す。B) 細胞の数も数えて、全細胞増殖率について査定した。増殖倍率は、図示の日の合計数を、0日目の培養開始時の当初播種量で割ることにより計算した。

【図 11】DL4- μ ビーズを用いて発生させた成熟ヒトT細胞の存在についての分析を示す。ヒト臍帯血由来CD34⁺細胞を、DL4- μ ビーズとともに、StemSpan (商標) T Cell Progenitor Expansion Supplementを補充したStemSpan (商標) SFEM IIで培養した。28日目および47日目に細胞を収集し、CD34、CD5、CD1a、CD4、CD8、およびCD3の表面発現について分析した。矢印で示すように、CD3の同時発現が、SPゲート細胞、DPゲート細胞、またはDNゲート細胞のどれでも示されている。

【図 12】DL4- μ ビーズが、G-CSFおよびPlerixafor (PLX) 動員末梢血 (mobilized peripheral blood) (mPB) に由来するCD34⁺細胞からT細胞発生を誘導することを示す。臍帯血、および成人 (n=3) に由来するG-CSFおよびPLXで5日間処理した3x10³個のCD34⁺細胞を、9,000個のDL4- μ ビーズとともにインキュベートした。A) T細胞発生への進行を、細胞表面マーカーCD5、CD7、およびCD34の発現について、フローサイトメトリーを用いて14日目に分析した。B) 14日目に細胞数の計測を血球計を用いて行い、増殖倍率を開始細胞数に基づき計算した。臍帯血 (CB) を用いた増殖率を、比較演算子として用いた。

【図 13】DL4- μ ビーズを用いた人工多能性幹細胞 (iPSC) からのT細胞発生の初期および後期の誘導を示す。ヒトiPSCを、まずは中胚葉運命へ、次いでCD34⁺プレ造血性運命に分化するよう誘導した。(A) MACSを用いて濃縮した3x10³個のCD34⁺細胞を27x10³個のDL4- μ ビーズとともにインキュベートし、それらのT細胞発生への進行を6日目、8日目、10日目、および12日目に、CD5、CD7、およびCD34の細胞表面発現について、フローサイトメトリーを用いて分析した。B) 14日目、28日目、および35日目の培養物を、成熟T細胞の存在について、T細胞共受容体CD4およびCD8、ならびにCD3の細胞表面マーカーを用いて分析した。逆向きの三角形は、分析した日を意味する。RCN; 相対細胞数。

【図 14】T細胞由来iPSC (T-iPSC) からのT細胞発生の初期および後期の誘導を示す。T-iPSCを、中胚葉へ、次いでプレ造血性運命へと誘導した。MACSを用いて濃縮した3x10³個のCD34⁺細胞を27x10³個のDL4- μ ビーズとともにインキュベートし、それらのT細胞発生への進行を12日目 (D12) および24日目 (D24) に、CD5、CD7 (T細胞発生初期)、ならびにCD4、CD8、CD3、およびTCR (T細胞発生後期) の細胞表面発現について、フローサイトメトリーを用いて分析した。

【図 15】組み換えVCAM1-Fcのピオチン化を示す。組み換えVCAM1-Fcは、DL4-Fcと同様に、VCAM-1細胞外ドメイン、IgG3 Fcドメイン、およびAvi-タグピオチン化部位からなるよ

10

20

30

40

50

うに遺伝子改変した。VCAM1-FcをHEK293T細胞内で発現させ、培地に分泌させた後、プロテインGがコンジュゲートしたビーズを用いて精製し、そしてBirA酵素によりインビトロでビオチン化した。R&D Systems (R&D) から入手可能な市販のVCAM1-Fc、ラボで精製したVCAM1-Fc (-Fc)、およびインビトロでビオチン化したVCAM1-Fc (ビオチン) の各試料を、ポリアクリルアミドゲルに電気泳動させた。ウエスタン免疫ブロット分析を用いて、A) VCAM-Fc試料のサイズおよび濃度を、抗VCAM-1抗体を用いて、互いに比較し、かつB) ビオチン化タンパク質の存在を抗ビオチン抗体により検出した。

【図16】VCAM-1およびDL4がヒトT細胞発生に及ぼす複合効果を示す。DL4-Fc (DL4) とともにビオチン化VCAM1-Fc (VCAM) を図示の異なる比率で μ ビーズに結合させ、非コンジュゲート μ ビーズ (UN) およびDL4- μ ビーズと比較した。DL4-Fcの量は一定の1 μ g/2x10⁵ SA- μ ビーズとしたが、VCAM-Fcは、0.01 μ g (100:1)、0.1 μ g (10:1)、1 μ g (1:1)、および10 μ g (1:10) を添加した。次に、DL4:VCAM1- μ ビーズを3x10³個のCB由来CD34⁺細胞とともにインキュベートし、7日目にT細胞発生の進行についてCD34、CD7、およびCD5細胞表面マーカーを用いて分析した。

【図17】免疫不全NOD-SCID IL2r^{null} (NSG) マウス胸腺への始原T (proT) 細胞の移植を示す。ヒトCB由来CD34⁺細胞を、DL4- μ ビーズとともに7日間インキュベートした。フローサイトメトリーを用いてCD34⁺ CD7⁺始原T (proT) 細胞をソートし、そして3x10⁵個を免疫不全NSGマウスに静脈注射した。図示のように、IL-7注射のブーストは、3~4日の間隔で与えた。3週間後、胸腺を収集し、処理した。フローサイトメトリー分析を用いて、生 (DAPI⁻) ヒト造血細胞 (CD45⁺) を同定した。また、電子的にゲートをかけた生CD45⁺細胞について、細胞表面マーカーCD19 (B細胞)、CD33 (ミエロイド細胞)、CD3、CD4、およびCD8 (T細胞) を用いて系列分析を行った。

【図18】胸腺へのproT細胞の移植、およびそれらのその後の骨髄および二次リンパ器官、脾臓への移動を示す。7日目のCB-HSPC/DL4- μ ビーズ培養物からソートされたProT細胞を、NSGマウスに注射した。注射から12週間後、胸腺 (T)、骨髄 (BM)、および脾臓 (S) を収集し、処理して、フローサイトメトリーを用いてCD45⁺ヒト造血細胞の生着を査定した (上パネル)。ヒトCD45⁺細胞に電子的にゲートをかけて、成熟T細胞の存在について、図示のように各器官で細胞表面マーカーCD3、CD4、CD8、およびTCR を用いて決定した。

【図19】細胞成分からの磁気DL4- μ ビーズの分離を示す。2x10⁵個のCD34⁺ CB由来HSPCを、T25フラスコで、1.8x10⁶個の鉄酸化物で被覆されたDL4- μ ビーズとともに培養した。A) 培養5日目、CD34⁺ CD7⁺ proT細胞のパーセンテージを決定した。B) この培養物を、次に、AutoMACSを介する分離に供し、結合しなかった細胞成分から磁化粒子を分離した。陰性画分は、機器の磁化プローブに結合しなかった成分を意味する。陽性は、結合した画分である。血球計を用いて各画分のビーズおよび細胞の含量を数え、もとの混合物 (ソート前) と比較した。各画分の細胞を左側のバーに、そしてビーズを右側のバーに示す。

【発明を実施するための形態】

【0039】

詳細な説明

上述したように、本発明者らは、マウスまたはヒト造血幹細胞 / 始原細胞 (HSPC) または人工多能性幹細胞 (iPSC) などの幹細胞または始原細胞からT細胞系列の細胞を発生させる、無細胞ビーズベース系を開発した。Notchリガンドの非プレート結合浮遊体 (たとえばDL4- μ ビーズ) が、始原T細胞および成熟T細胞などのT系列細胞の有効な発生を可能にする。

【0040】

1. 細胞を発生させる方法

したがって、本開示は、(a) 幹細胞または始原細胞を含む試料を、浮遊支持体にコンジュゲートしたNotchリガンドとともに培養する段階、および (b) T細胞系列の細胞を単離する段階を含む、T細胞系列の細胞を発生させる方法を提供する。

【0041】

10

20

30

40

50

「T細胞系列の細胞」という用語は、その細胞を、他のリンパ球細胞、および赤血球またはミエロイドの系列の細胞と区別する、T細胞またはその前駆細胞もしくは始原細胞の少なくとも1つの表現型特徴を示す細胞を指す。そのような表現型特徴としては、T系列に特異的な1種類または複数種類のタンパク質が細胞またはその前駆細胞もしくは始原細胞に発現すること、あるいはT細胞に特異的な生理的、形態的、機能的、または免疫的な特徴を挙げることができる。

【0042】

T細胞系列の細胞は、(a) T細胞系列になることが決定している始原細胞または前駆細胞（本明細書に記載される「始原T細胞」または「proT細胞」）；(b) CD25+未成熟T細胞；(c) CD4またはCD8系列への分化決定を経た細胞（たとえばCD4+CD8^{lo}TCR^{int}細胞）；(d) TCR遺伝子再構成を特徴とする；(e) CD4+CD8+二重陽性（DP）である前駆胸腺細胞；(f) CD4-CD8+またはCD4+CD8-および任意でTCR^{hi}；(g) CD3+CD90+；(h) CD4-CD8+またはCD4+CD8-であり、TCR^{hi}である単一陽性（SP）細胞；(i) TCR⁻および/またはTCR⁺；(j) 複数のV鎖のいずれかの発現を特徴とする（たとえばV⁻³、-6、および17a）；あるいは(k) TCR/CD3^{hi}、CD4-CD8+またはCD4+CD8-として特徴付けられ得る成熟および機能性または活性化T細胞、であり得る。

10

【0043】

一態様では、T細胞系列の細胞は、「始原T細胞」または「proT細胞」である。「始原T細胞」または「proT細胞」という用語は、本明細書で用いられる場合、成熟T細胞または成熟リンパ球へと成熟することができるT細胞を意味する。

20

【0044】

一態様では、始原T細胞は、ヒト始原T細胞である。ヒト始原T細胞の表現型としては、CD34+CD7+およびCD7+CD5+CD1a⁻が挙げられる。別の態様では、始原T細胞は、マウス始原T細胞である。マウス始原T細胞の表現型としては、CD25+が挙げられる。

【0045】

別の態様では、T細胞系列の細胞は、CD4およびCD8二重陽性（DP）細胞であり、CD4+CD8+およびCD4+CD8+CD3+表現型を特徴とする。別の態様では、T細胞系列の細胞は、CD4またはCD8単一陽性（SP）細胞であり、CD4-CD8+、CD4+CD8-、またはCD4-CD8+CD3+、CD4+CD8-CD3+を特徴とする。

【0046】

「浮遊支持体」という用語は、本明細書で用いられる場合、Notchリガンドまたは他のT細胞共刺激分子にコンジュゲートすると、該Notchリガンド（または共刺激分子）が培養培地中に浮遊することを可能にする、任意の材料を指す。浮遊支持体は、多様な材料から作ることができ、また、さまざまなフォーマットであり得る。浮遊支持体として用いることができる支持体の例としては、限定ではないが、粒子、ビーズ（マイクロビーズを含む）、タンパク質、脂質、核酸分子、フィルター、ファイバー、スクリーン、メッシュ、チューブ、中空ファイバー、生物学的組織、およびそれらの任意の組み合わせが挙げられる。

30

【0047】

一態様では、浮遊支持体は粒子である。粒子は、限定ではないが球、長円、棒、長方形など、どのような形状でもよい。粒子は、限定ではないが、天然もしくは合成ポリマー、天然もしくは合成ワックス、セラミクス、金属、生物学的材料、またはそれらの組み合わせなど、さまざまな材料であり得る。

40

【0048】

一態様では、浮遊支持体は、マイクロビーズである。「マイクロビーズ」または「μビーズ」という用語は、本明細書で用いられる場合、0.01 μm (10 nm) ~ 500 μmの直径、任意で1~200 μmの直径を有する、球状または略球状のビーズを指す。別の態様では、マイクロビーズは、6.5~100 μm、任意で20~30 μm、24~26 μm、または25 μmの直径を有する。

【0049】

50

本明細書では、さまざまなタイプのマイクロビーズが想定される。一態様では、マイクロビーズは、ポリマー、シリカ、または磁気マイクロビーズである。他の態様では、マイクロビーズは、ポリスチレンマイクロビーズ、ゴールドナノ粒子、またはDynabeadである。別の態様では、マイクロビーズは、乳酸とグリコール酸とのコポリマー（PLGA）である。

【0050】

タンパク質を支持体にコンジュゲートさせるさまざまな手段が当技術分野で公知である。タンパク質は、浮遊支持体、たとえばマイクロビーズに、直接または間接的にコンジュゲートさせることができる。

【0051】

一態様では、本明細書に記載されるNotchリガンドを、ビオチン/ストレプトアビジン系を用いて浮遊支持体にコンジュゲートさせる。その場合、Notchリガンドをビオチン化してから、ストレプトアビジン被覆浮遊支持体（たとえば、ストレプトアビジン被覆マイクロビーズ）にコンジュゲートさせる。別の態様では、本明細書に記載されるNotchリガンドを、プロテインGまたはプロテインAを介して浮遊支持体にコンジュゲートさせる。

【0052】

「Notchリガンド」という用語は、本明細書で用いられる場合、造血幹細胞/始原細胞をはじめとする多数の異なる哺乳類細胞の膜に存在するNotch受容体ポリペプチドに結合することができるリガンドを指す。ヒト細胞で同定されているNotch受容体としては、Notch-1、Notch-2、Notch-3、およびNotch-4が挙げられる。Notchリガンドは、典型的には、20~22個のアミノ酸を含む特徴的なDSLドメイン（D-デルタ、S-セレート、およびL-Lag2）をアミノ末端に有し、かつ3~8個のEGFリピートを細胞外表面に有する。

【0053】

Notchリガンドという用語には、Notchシグナリングに結合し関与することができる抗Notch抗体およびアプタマー（たとえばDNAアプタマー）も含まれる。

【0054】

T細胞系列の細胞の分化および増殖を促進し、かつ維持するNotchリガンドが選択される。Notchリガンドは、ヒト由来であってもよいし、またはげっ歯類、イヌ、ネコ、ブタ、ヒツジ、ウシ、ヤギ、および霊長類などの哺乳類種を含め、他の種に由来してもよい。

【0055】

Notchリガンドの具体例としては、Deltaファミリーが挙げられる。Deltaファミリーには、Delta-1（Genbankアクセッション番号AF003522、ホモサピエンス（Homo sapiens））、Delta-3（Genbankアクセッション番号AF084576、ラット（Rattus norvegicus））、Delta様1（DL1；Genbankアクセッション番号NM_005618およびNP_005609、ホモサピエンス；Genbankアクセッション番号X80903、148324、ハツカネズミ（M. musculus））、Delta様3（Genbankアクセッション番号NM_053666、N_446118、ラット）、Delta-4（Genbankアクセッション番号AF273454、BAB18580、ハツカネズミ；Genbankアクセッション番号AF279305、AAF81912、ホモサピエンス）、およびDelta様4（DL4；Genbankアクセッション番号Q9NR61、AAF76427、AF253468、NM_019074、ホモサピエンス；Genbankアクセッション番号NM019454、ハツカネズミ）が含まれる。Notchリガンドは、市販されており、または組み換えDNA技法により生産し、そしてさまざまな純度にすることもできる。

【0056】

「Notchリガンド」という用語には、標準的な技法により同定され得る既知のNotchリガンドのホモログも含まれる。「ホモログ」は、既知のNotchリガンドのいずれかに対し、アミノ酸配列相同性か核酸配列相同性のいずれかの配列相同性を示す遺伝子産物を指す。Notchリガンドは、対応するNotchリガンドに対し、アミノ酸レベルで、少なくとも20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、好ましくは90%、より好ましくは95%、最も好ましくは98~99%同一であり得る。

【0057】

一態様では、Notchリガンドのホモログは、N末端にDSLドメインを含み、かつ細胞外表

10

20

30

40

50

面に3~8個のEGF様リピートを有する。好適なホモログは、Notch受容体に結合することもできる。Notch受容体への結合は、インビトロ結合アッセイを含め、当技術分野で公知なさまざまな方法により決定することができる。

【0058】

「Notchリガンド」という用語には、既知のNotchリガンドの変異体または変種も含まれる。「変異体」という用語は、1つまたは複数のアミノ酸付加、置換、または欠失により野生型配列とは異なる一次アミノ酸配列を有するポリペプチドを指す。好ましくは、変異体は、野生型配列に対し少なくとも90%の配列同一性を有する。好ましくは、変異体は、全野生型配列に対し20個以下の変異を有する。より好ましくは、変異体は、全野生型配列に対し10個以下の変異、最も好ましくは5個以下の変異を有する。

10

【0059】

任意で、Notchリガンドは、少なくとも1つのタンパク質タグを含む。タンパク質タグは、Notchリガンドなどの関心対象のタンパク質に付加されたペプチド配列である。このタンパク質タグは、関心対象のタンパク質に直接または間接的に連結することができる。当技術分野ではさまざまなタンパク質タグが公知であり、多数の目的で用いられ得る。一態様では、Notchリガンドは、Fcタグ（Fc融合タンパク質としても公知）を含む。本明細書で用いられる場合、「Fc」という用語は、IgGのFcドメインを指す。ある特定の態様では、NotchリガンドDL4がFcと融合している（DL4-Fc）。別の態様では、タグはHisタグである。さらなる態様では、タグは、Notchリガンドのオリゴマー化を促進する分子である。たとえば、COMP（軟骨オリゴマー基質タンパク質）の小ドメインをNotchリガンド（たとえばDL4）と融合させて、DL4ペンタマーを形成することができる。同様にフェリチンを用いて、DL4マルチマーを形成することができる。

20

【0060】

本明細書に記載される方法では、幹細胞および始原細胞を含む試料を培養することにより、T細胞系列の細胞を発生させる。幹細胞または始原細胞は、限定ではないが、臍帯血、胚、胚組織、胎仔組織、骨髄、および血液などの任意の好適なソースから得ることができる。一態様では、幹細胞または始原細胞は、造血幹細胞または始原細胞（HSPC）である。別の態様では、幹細胞は、胚幹細胞（ESC）である。さらなる態様では、幹細胞または始原細胞は、人工多能性幹細胞である。別の態様では、幹細胞または始原細胞は、CD34⁺造血前駆細胞であり、任意で、ESCまたはiPSCから分化したCD34⁺造血内皮前駆細胞、またはESCまたは多能性幹細胞（PSC）から分化したCD34⁺プレ造血細胞である。CD34⁺細胞を得るためのさまざまな分化プロトコルが当技術分野で公知である。治療応用では、T細胞系列の細胞を発生させるのに用いられる幹細胞または始原細胞を、治療すべき患者から採取することができる。

30

【0061】

「造血幹細胞/始原細胞」、「造血幹細胞または始原細胞」、または「HSPC」という用語は、本明細書で用いられる場合、T細胞系列の細胞などの他の細胞型に分化することができる未分化造血細胞を指す。HSPCは、限定ではないが、骨髄、臍帯血、および動員末梢血（mPB）などの多数のソースから得ることができる。HSPCは、肝臓、卵黄嚢、または背側大動脈などの、いくつかの胎仔および胚の部位から得られることもできる。HSPCは、培養中のESCまたはiPSCの分化を誘導することによって、得られることもできる。

40

【0062】

「胚幹細胞」または「ESC」という用語は、本明細書で用いられる場合、発生する胚の生殖系列に統合され、そしてその一部となる能力を有する未分化胚幹細胞を指す。

【0063】

「人工多能性幹細胞」または「iPSC」という用語は、本明細書で用いられる場合、遡って胚様の多能性状態へと初期化された、皮膚または血液などの体細胞に由来する細胞を指す。一態様では、iPSCは、既知または未知のTCR特異性を有するT細胞（たとえば、がんに対する特異性を有するTCRを担持するT細胞）に由来する。

【0064】

50

典型的には、まず、幹細胞または始原細胞を含有する試料の非幹細胞または成熟細胞を枯渇させる。当技術分野で公知の陰性および陽性選択方法が、幹細胞または始原細胞の濃縮のために用いられ得る。たとえば、蛍光活性化細胞ソーター、または特定の細胞表面抗原を有する細胞に結合する磁気ビーズを用いて、細胞表面の抗原に基づき細胞をソートすることができる。陰性選択カラムが、系列特異的表面抗原を発現する細胞を取り除くのに用いられ得る。

【0065】

ある態様では、幹細胞または始原細胞を含有する試料を、系列陰性(Lin⁻)画分と系列陽性(Lin⁺)画分とに分ける。Lin⁻画分を、CD34⁺細胞に関してソートすることができる。

10

【0066】

始原細胞または幹細胞を、本明細書に記載される好適な条件で培養して、T細胞系列の細胞を発生させる。好ましくは、細胞を、浮遊支持体にコンジュゲートした1つまたは複数のNotchリガンドの存在下で、T細胞系列の細胞が形成するのに十分な時間だけ培養する。

【0067】

本明細書に記載される方法の1つの利点は、T細胞系列の細胞を浮遊培養できることである。ある態様では、始原細胞または幹細胞を、マイクロビーズなどの浮遊支持体にコンジュゲートしたNotchリガンドとともに、浮遊培養する。浮遊培養では、細胞は培養培地に自由に浮かんで増殖する。これに対し、接着培養では、細胞は人工基板上で単層として増殖する。

20

【0068】

別の態様では、始原細胞または幹細胞を、バイオリアクター中、任意で閉鎖または閉鎖自動バイオリアクター中、浮遊支持体にコンジュゲートしたNotchリガンドとともに、浮遊培養する。一態様では、浮遊支持体は、バイオリアクターに適合する直径を有するマイクロビーズである。さまざまなバイオリアクターが当技術分野で公知であり、バッチ式、流加式、または連続式バイオリアクターを挙げることができる。連続式バイオリアクターの一例は、連続式攪拌槽リアクターモデルである。

【0069】

培養物中のさまざまな濃度の始原細胞または幹細胞が想定される。たとえば、培養物の始原細胞または幹細胞の濃度は、培地1 mlあたり細胞1個から数百万個までの何個でもよい。

30

【0070】

一態様では、マイクロビーズにコンジュゲートしたNotchリガンド対始原細胞または幹細胞の比は、1:1~27:1、任意で5:1~15:1、8:1~10:1、または9:1である。この比は、本明細書では「マイクロビーズ対細胞比」とも呼ばれる。

【0071】

本発明者らは、浮遊支持体に対するNotchリガンドの方向を指定することによって、Notchシグナリングを増強できることも示した。したがって、一態様では、NotchリガンドのC末端を浮遊支持体にコンジュゲートさせる。これは、たとえば、酵素的にビオチン分子にコンジュゲートし得る配列をNotchリガンドのC末端の端部に付加することによって、作製することができる。別の態様では、C末端領域に存在する融合タンパク質のFcセグメント、Notchリガンド-Fcを、浮遊支持体にコンジュゲートしたプロテインAまたはプロテインGに直に結合させることができる。

40

【0072】

T細胞系列の細胞の分化決定および分化を促進する1種類または複数種類の正のサイトカインも、培養に添加することができる。該サイトカインは、ヒト由来であってもよく、または他の種に由来してもよい。培養物中のサイトカインの濃度は、典型的には約1~10 ng/mlである。本願で使用され得るサイトカインの代表例は次のとおりである:Flt-3-リガンドの全メンバー、ならびにインターロイキン-7(IL-7)および幹細胞因子。一態様では、

50

本明細書で用いられるサイトカインは、Flt-3-リガンド、およびIL-7、および幹細胞因子である。サイトカインは、等モルの、またはより多量のグリコサミノグリカン、たとえばヘパリンスルファートと組み合わせて用いてもよい。サイトカインは、市販されており、または組み換えDNA技法により生産し、そしてさまざまな純度にすることもできる。一部のサイトカインは、標準的な生化学的技法により、細胞株の培養培地から精製することができる。

【0073】

1つまたは複数の追加の分子を、浮遊支持体にそれぞれコンジュゲートさせて、培養に添加してもよい。一態様では、追加の分子は、T細胞発生を促進する（たとえば、T細胞系列の細胞の分化決定および分化を促進する）分子であり、本明細書では「T細胞共刺激分子」とも呼ばれる。一例では、本発明者らは、マイクロビーズにコンジュゲートしたDL4およびVCAM1をHSPCとともに培養し、T細胞系列への分化が加速されたことを示した。したがって、一態様では、T細胞共刺激分子はVCAM1である。本明細書で用いられる場合、「VCAM1」という用語は、血管細胞接着分子1（VCAM1）または表面抗原分類106（CD106）としても公知の血管細胞接着タンパク質1を指し、ヒトではVCAM1遺伝子にコードされるタンパク質である。「VCAM1」という用語には、VCAM1の変異体または変種も含まれる。別の態様では、T細胞共刺激分子は、サイトカインもしくはケモカイン（幹細胞因子、IL-7、CCL25、またはCXCR4）、主要組織適合抗原（MHC）クラスIもしくはクラスII、または共刺激（CD80、CD86）分子である。任意で、T細胞共刺激分子は、少なくとも1つのタンパク質タグを含む。さまざまなタンパク質タグが当技術分野で公知であり、多数の目的で用いられ得る。一態様では、T細胞共刺激分子は、Fcタグ（Fc融合タンパク質としても公知）を含む。

10

20

30

40

50

【0074】

始原細胞および幹細胞は、条件培地、非条件培地、または胚幹細胞培地を含む培養培地で培養され得る。好適な条件培地の例としては、胚線維芽細胞（たとえばヒト胚線維芽細胞またはマウス胚線維芽細胞）により条件付けられたIMDM、DMEM、もしくはMEM、または同等の培地が挙げられる。好適な非条件培地の例としては、イスコフ改変ダルベッコ培地（IMDM）、DMEM、もしくはMEM、または同等の培地が挙げられる。培養培地は、血清（たとえばウシ血清、ウシ胎仔血清、仔ウシ血清、ウマ血清、ヒト血清、または人工血清代用品）を含んでいてもよく、または血清を含まなくてもよい。本方法で有用な培地の他の例としては、StemCell Technologiesの培地（StemSpan^{（商標）}SFEM II）または任意の他の市販されている同等の培地が挙げられる。

【0075】

一態様では、培養条件は、始原細胞または幹細胞を十分な時間かけて培養して、調製物中の細胞にproT細胞を形成させることを伴う。別の態様では、培養条件は、始原細胞または幹細胞を十分な時間かけて培養して、調製物中の細胞に成熟T細胞、たとえば成熟SP T細胞を形成させることを伴う。細胞は、所望の細胞組成物を得るのに必要な適切な時間だけ維持され得ることが、理解されよう。任意で、始原細胞または幹細胞は、少なくとも6、8、10、12、14、21、28、35、または42日間培養される。一例では、始原細胞または幹細胞は、本明細書に記載されるNotchリガンドとともに、4~21日、6~18日、または7~14日間培養されて、proT細胞を発生させる。別の例では、始原細胞または幹細胞は、本明細書に記載されるNotchリガンドとともに、少なくとも21、28、35、または42日間培養されて、成熟T細胞を発生させる。

【0076】

本願の方法は、多数のT細胞系列細胞の発生を可能にする。具体的には、一態様では、培養14日目以降に、幹細胞または始原細胞の当初開始数の50倍、75倍、100倍、125倍、150倍、175倍、または200倍を超える細胞増殖率が得られる。

【0077】

「単離される」という用語は、本明細書で用いられる場合、始原細胞が、天然環境にある該細胞には見られる細胞物質または生物学的物質から分離または精製されていることを

意味する。該細胞はそれによって自然界に存在する姿と区別される。

【0078】

「細胞 (a cell)」または「該細胞 (the cell)」という用語には、複数の細胞 (cells) も含まれる。

【0079】

II. 浮遊Notchリガンド

本発明者らは、新規の浮遊Notchリガンドも開発した。本明細書で用いられる場合、「浮遊Notchリガンド」という用語は、浮遊細胞培養に使用されるNotchリガンドを指す。

【0080】

したがって、本開示は、本明細書に記載される浮遊Notchリガンドも提供する。浮遊Notchリガンドは、(a) Notchリガンドと (b) 浮遊支持体とを含み、該Notchリガンドは該浮遊支持体にコンジュゲートしている。 10

【0081】

具体的には、本発明者らは、直径25 μm のマイクロビーズにDL4を直にコンジュゲートさせると、強力かつ持続的なシグナルを送達して、HSPCがT細胞系列の細胞になるよう誘導することを示した。したがって、一態様では、浮遊支持体は、10~100 μm 、任意で20~30 μm 、24~26 μm 、または25 μm の直径を有するマイクロビーズである。

【0082】

本発明者らは、浮遊支持体に対するNotchリガンドの方向を指定することによって、Notchシグナリングを増強できることを、さらに示した。したがって、別の態様では、NotchリガンドのC末端を浮遊支持体にコンジュゲートさせる。上述したように、これは、たとえば、ビオチン分子に酵素的にコンジュゲートし得る配列をNotchリガンドのC末端の端部に付加することによって、作製することができる。 20

【0083】

Notchリガンドは、任意でDL4であり、タグ、たとえばFcタグと融合させてもよい。

【0084】

本明細書ではまた、浮遊T細胞共刺激分子も提供される。本明細書で用いられる場合「浮遊T細胞共刺激分子」という用語は、浮遊細胞培養に使用されるT細胞共刺激分子を指す。浮遊T細胞共刺激分子は、(a) T細胞共刺激分子と (b) 浮遊支持体とを含み、該T細胞共刺激分子は該浮遊支持体にコンジュゲートしている。 30

【0085】

T細胞共刺激分子は、任意でVCAM1であり、タグ、たとえばFcタグと融合させてもよい。

【0086】

III. キット

浮遊Notchリガンドは、T細胞系列の細胞を発生させるのに使用されるキットとして調製され、かつ包装されている場合がある。

【0087】

したがって、本明細書ではまた、T細胞系列の細胞を製造するための、浮遊Notchリガンドを含むキットも提供され、該浮遊Notchリガンドは、(a) Notchリガンドと (b) 浮遊支持体とを含み、該Notchリガンドは該浮遊支持体にコンジュゲートしている。任意で、浮遊Notchリガンドは、保存料および/または緩衝液中に収容され、該キットは、浮遊Notchリガンドを吐出するためのパイアルまたはシリンジなどのデバイスをさらに含む。 40

【0088】

一態様では、キットは、幹細胞および始原細胞を含む試料を浮遊Notchリガンドとともに培養するための培養培地をさらに含む。培養培地の例としては、条件培地、非条件培地、または胚幹細胞培地が挙げられる。培養培地は、血清（たとえばウシ血清、ウシ胎仔血清、仔ウシ血清、ウマ血清、ヒト血清、または人工血清代用品）を含んでいてもよく、または血清を含まなくてもよい。有用な培養培地の他の例としては、StemCell培地、または任意の他の市販されている同等の培地が挙げられる。

【0089】

別の態様では、キットは、浮遊支持体にそれぞれコンジュゲートした、1種類または複数種類の追加の分子をさらに含む。一態様では、追加の分子は、T細胞発生を促進する（たとえば、T細胞系列の細胞の分化決定および分化を促進する）分子であり、本明細書では「T細胞共刺激分子」とも呼ばれる。別の態様では、T細胞共刺激分子はVCAM1である。

【0090】

培地は、任意で、T細胞系列の細胞の分化決定および分化を促進する1種類または複数種類のサイトカインを含む。該サイトカインは、ヒト由来であってもよく、または他の種に由来してもよい。培養物中のサイトカインの濃度は、典型的には約1~10 ng/mlである。本願で使用され得るサイトカインの代表例は次のとおりである：Flt-3-リガンドの全メンバー、ならびにインターロイキン-7（IL-7）および幹細胞因子。一態様では、本明細書で用いられるサイトカインは、Flt-3-リガンドならびにIL-7および幹細胞因子である。サイトカインは、等モルの、またはより多量のグリコサミノグリカン、たとえばヘパリンスルファートと組み合わせて用いてもよい。サイトカインは、市販されており、または組み換えDNA技法により生産し、そしてさまざまな純度にすることもできる。一部のサイトカインは、標準的な生化学的技法により、細胞株の培養培地から精製することができる。

10

【0091】

一態様では、キットは、本明細書に記載の試薬用の1つまたは複数の容器を含む。

【0092】

さまざまな態様で、試薬の使用手引きを提供する印刷された取扱説明書もキットに含まれ得る。「取扱説明書」または「使用説明書」という用語は、典型的には、試薬の濃度または浮遊Notchリガンドの量、および/または少なくとも1つのアッセイ法パラメーター、たとえば混合すべき浮遊Notchリガンドと細胞との相対量、培養時間、温度、培地条件等について記載した、わかりやすい表現を含む。たとえば、一態様では、取扱説明書は、(a) 幹細胞および始原細胞を含む試料を、浮遊支持体にコンジュゲートしたNotchリガンドとともに培養する段階、および(b) T細胞系列の細胞を単離する段階を含む方法について記載している。

20

【0093】

IV.T細胞系列の細胞

本開示は、本明細書に記載される方法、系、およびキットにより発生したT細胞系列の細胞、または該細胞の子孫である有系分裂もしくは分化細胞をさらに提供する。

30

【0094】

一態様では、本開示は、本明細書に記載される方法により発生した「始原T細胞」または「proT細胞」を提供する。別の態様では、始原T細胞はヒト始原T細胞であり、たとえばCD34+CD7+またはCD7+CD5+CD1a-を特徴とするヒト始原T細胞である。

【0095】

別の態様では、始原T細胞はマウス始原T細胞であり、たとえばCD25+を特徴とするマウス始原T細胞である。

【0096】

本開示は、CD4+CD8+またはCD4+CD8+CD3+を特徴とする二重陽性（DP）T細胞も提供する。本開示は、CD4-CD8+、CD4+CD8-、またはCD8+CD3+、CD4+CD3+を特徴とする単一陽性（SP）細胞であるT細胞系列の細胞をさらに提供する。

40

【0097】

一態様では、本明細書に記載される方法により発生したT細胞系列の細胞（たとえば、始原T細胞または成熟T細胞）は、腫瘍関連抗原（TAA）に対する特異性を付与すべくT細胞受容体（TCR）またはキメラ抗原受容体（CAR）について改変される。このように改変された細胞は、がんなどの病気の治療に有用であり得る。

【0098】

別の局面では、本開示は、本明細書に記載される方法により発生したT細胞系列の単離細胞と、薬学的に許容される希釈剤または担体とを含む、薬学的組成物を提供する。

【0099】

50

好適な希釈剤および担体が、たとえばRemington's Pharmaceutical Sciencesに記載されている。これに基づくと、組成物には、限定ではないが、1種類または複数種類の薬学的に許容されるビヒクルまたは希釈剤といっしょにproT細胞の溶液が含まれ、好適なpHを有し、かつ生理的液体と等張である緩衝液中に収容されている。

【0100】

薬学的組成物には、限定ではないが、凍結乾燥粉末、または水性もしくは非水性滅菌注射液もしくは懸濁液が含まれ、これらは抗酸化剤、バッファー、静菌剤、および組成物を所期のレシピエントの組織または血液と実質的に適合させる溶質をさらに含有し得る。そのような組成物中に存在し得る他の成分としては、たとえば水、界面活性剤（たとえばTween^(商標)）、アルコール、ポリオール、グリセリン、および植物油が挙げられる。即時注射液および懸濁液を、滅菌粉末、顆粒、錠剤、または濃縮液もしくは懸濁液から調製してもよい。組成物は、たとえば限定ではないが、患者への投与前に滅菌水または生理食塩水を用いて再構成される凍結乾燥粉末として供給してもよい。

10

【0101】

薬学的組成物には、低温保存液も含まれる。一態様では、本明細書に記載される方法により発生したT細胞系列の細胞が、適切な培地で、たとえば薬学的に許容されるまたはGMP等級の培地で低温保存され、そして任意で、それを必要とする対象への投与用に製剤化される。

【0102】

好適な薬学的に許容される担体には、薬学的組成物の生物学的活性の有効性を妨げず、本質的に化学的に不活性であり、かつ非毒性の組成物が含まれる。好適な薬学的担体の例としては、限定ではないが、水、生理食塩水、グリセロール溶液、エタノール、N-(1(2,3-ジオレイルオキシ)プロピル)N,N,N-トリメチルアンモニウムクロリド (DOTMA)、ジオレシル-ホスホチジル-エタノールアミン (DOPE)、およびリボソームが挙げられる。そのような組成物は、治療有効量の化合物を、患者に直接投与する形態を提供するのに好適な量の担体とともに、含有している。

20

【0103】

組成物は、たとえば、非経口、静脈内、皮下、筋内、頭蓋内、眼窩内、点眼、脳室内、関節内、脊髄内、大槽内、腹腔内、鼻腔内、エアロゾル、または経口投与で投与され得る。非経口投与では、本明細書に記載されるpro-T細胞の溶液が、ヒドロキシプロピルセルロースなどの界面活性剤と適切に混合された水中で調製され得る。分散液はまた、グリセロール、液体ポリエチレングリコール、DMSO、およびアルコールを含むか含まないそれらの混合物中、ならびに油中で、調製され得る。通常の保存および使用条件下では、これらの調製物は、微生物の増殖を防止する保存料を含有する。当業者であれば、好適な製剤の調製の仕方を心得ている。

30

【0104】

好ましくは、T細胞系列の細胞は、疾患状態の治療を必要とする対象の該治療に有効な量だけ存在する。一態様では、T細胞系列の細胞は、造血始原細胞の移植の増強を必要とする対象の該増強に有効な量だけ存在する。任意で、組成物は、移植されるT細胞系列の細胞または組織をさらに含む。一態様では、組織は、胸腺を含む。別の態様では、組織は、器官を含む。

40

【0105】

V. 治療応用

インビトロ由来のヒト始原T細胞を発生させ、そしてそれらの安全性をヒト/マウス免疫移植モデルで試験できれば、T系列の免疫関連障害を治療する細胞ベースのアプローチの道が開かれる (Legrandら, 2006; van den Brinkら, 2004)。T細胞は、ウイルス性および細菌性の病原体を認識し除去する、適応免疫系の主要なエフェクターアームである。T細胞性急性リンパ性白血病 (T-ALL) などの特定の稀な血液がんでは、T細胞が増殖して健全な免疫細胞を締め出し、正常な免疫機能をかく乱させる (Ferrandoら, 2002; Wengら, 2004)。化学療法はがん患者に治療的恩恵を与え得ることもあるが、往々にして免疫不

50

全および日和見感染感受性をもたらし得る。日和見感染はまた、HIV感染後にCD4⁺T細胞が枯渇しているAIDS患者にとって重大な懸念をもたらす。免疫不全は依然としてHIV/AIDSおよびがんにおける重大な懸念であるが、適切な調節コントロールが効かないT細胞が自己組織に対し免疫応答を生じる自己免疫疾患では、免疫活動亢進も同等に問題となる。

【0106】

したがって、本願は、T細胞数の増加を要する状態を有する対象を治療する方法であって、

(i) (a) 幹細胞または始原細胞を含む試料を、浮遊支持体、任意で粒子またはマイクロビーズにコンジュゲートしたNotchリガンドとともに培養すること、および (b) T細胞系列の細胞を単離することを含む、T細胞系列の細胞を発生させる段階、ならびに

(ii) 有効量の該T細胞系列の細胞を、それを必要とする対象に投与する段階を含む、方法を、さらに提供する。

【0107】

一態様では、T細胞系列の細胞は、始原T細胞である。

【0108】

別の態様では、T細胞系列の細胞は、成熟T細胞である。

【0109】

本開示は、T細胞数の増加を要する状態を有する対象を治療するための、本明細書に記載される方法により発生したT細胞系列の細胞、任意で始原T細胞または成熟T細胞の使用も提供する。

【0110】

本開示は、たとえば疾患または外傷に冒された組織を交換しかつ/または再生するための再生医療に使用される、本明細書に記載される方法により発生したT細胞系列の細胞、任意で始原T細胞または成熟T細胞の使用も提供する。

【0111】

本明細書で用いられる場合、「有効量」または「治療有効量」という語句は、所望の結果を得るのに必要な用量および期間の、有効な量を意味する。有効量は、対象の疾患状態、年齢、性別、体重などの要因により変わり得る。そのような量に対応する所与の細胞調製物の量は、薬学的製剤、投与ルート、疾患または障害のタイプ、治療される対象またはホストの個性等、さまざまな要因により変わるが、それでも当業者によりルーチンの決定され得る。「有効量」は、好ましくは、T細胞系列の細胞を、治療される対象に移植するのに有効な量である。

【0112】

「治療する」または「治療」という用語は、本明細書で用いられる場合、ならびに当技術分野で周知であるところでは、臨床結果を含め有益なまたは所望の結果を得るためのアプローチを意味する。有益なまたは所望の臨床結果としては、限定ではないが、検出が可能か不可能かを問わず、1つまたは複数の症状または状態の軽減または改善、疾患の程度の低下、疾患が安定した（すなわち悪化していない）状態、疾患の伝播の予防、疾患進行の遅延または緩慢化、疾患状態の改善または緩和、疾患再発率の低下、および（部分的か全体的かを問わず）軽快を挙げることができる。「治療する」および「治療」はまた、治療を受けなかった場合の予測寿命と比較して寿命が延びることを意味し得る。「治療する」および「治療」は、本明細書で用いられる場合、予防治療も含む。

【0113】

「対象」という用語は、本明細書で用いられる場合、動物界のあらゆるメンバーを意味し、好ましくはヒトである。

【0114】

「T細胞数の増加を要する状態」は、健常な動物と比較してT細胞レベルが低下した任意の状態を含み、限定ではないが、免疫不全、がん、遺伝性疾患（たとえば、原発性免疫不全疾患（PID））、感染性疾患、免疫障害、および自己免疫状態が挙げられる。

【0115】

10

20

30

40

50

上述したように、本明細書に記載されるT細胞系列の細胞は、腫瘍関連抗原を特異的に認識するT細胞受容体 (TCR) またはキメラ抗原受容体 (CAR) を発現するように改変され得る。

【0116】

したがって、本願は、対象のがんを治療する方法も含み、該方法は、
 (i) (a) 幹細胞または始原細胞を含む試料を、浮遊支持体、任意で粒子またはマイクロビーズにコンジュゲートしたNotchリガンドとともに培養すること、および (b) T細胞系列の細胞を単離することを含む、T細胞系列の細胞を発生させる段階、ならびに
 (ii) 有効量の該T細胞系列の細胞を、それを必要とする対象に投与する段階
 を含み、該T細胞系列の細胞は、腫瘍関連抗原に対する特異性を付与すべくT細胞受容体 (TCR) またはキメラ抗原受容体 (CAR) について改変される。

10

【0117】

本開示は、がんを有する対象を治療するための、本明細書に記載される方法により発生したT細胞系列の細胞、任意で始原T細胞または成熟T細胞の使用も提供し、該T細胞系列の細胞は、腫瘍関連抗原に対する特異性を付与すべくT細胞受容体 (TCR) またはキメラ抗原受容体 (CAR) について改変される。任意で、iPSCは、既知または未知のTCR特異性を有するT細胞 (たとえば、がんに対する特異性を有するTCRを担持するT細胞) に由来し得、その場合これらのT-iPSCは、本明細書に記載される方法によりT細胞を発生させるのに用いられ得る。

20

【0118】

以下の非限定的な実施例は、本願を例示している。

【実施例】

【0119】

実施例 1

材料および方法:

造血幹細胞ソース

Research Ethics Board of Sunnybrook Health Sciences Centreが制定した承認済みガイドラインにしたがい、同意が得られた分娩後の母親からヒト臍帯血 (UCB) 試料をシリンジで抽出して採取し、抗凝血性クエン酸リン酸デキストロス入り血液バックユニット (イリノイ州ディアフィールドのBaxter Healthcare) に回収した。回収から24時間以内にFicoll密度遠心法によりUCB単核細胞を単離し、EasySep Human CD34 Positive Selection Kit (ブリティッシュコロンビア州バンクーバーのStemcell Technologies) をメーカー取扱説明書にしたがって用いて、系列陰性 (Lin^-) CD34⁺細胞を予め濃縮した。ヒトHSPCを単離するために、 Lin^- 細胞を抗ヒトCD38-APCおよび抗ヒトCD34-PE mAbで染色し、そしてBD Biosciences FACSAriaソーター (カリフォルニア州サンホセのBD) を用いてCD34⁺CD38⁻細胞をソートした。ソートされたヒトHSPCは、ソート後分析により、純度99%超と決定された。臍帯血由来CD34⁺細胞の一部、および動員末梢血 (mPB) 由来CD34⁺細胞の全部を、Stemcell Technologiesから購入した。mPBについては、ボランティアを、G-CSF (回収3~5日前に最大10 μ g/kg/日のG-CSF) とPlerixafor (回収1日前に最大0.24 mg/kg) との組み合わせで処置した。

30

40

【0120】

DL4-Fcの設計および生産

ヒトDLL4の細胞外ドメイン (アミノ酸残基 [aa] 1~529) のコード配列のC末端に、リンカー配列により離間させて、ヒスチジン (His) タグ、続いてヒトIgG3のFc部分 (ヒンジ領域を含む) およびBir1A認識配列 (Avitag^(商標)) を融合させることで、Delta様-4を遺伝子改変してpDL4-Fc-His-Bプラスミドコンストラクトを作製した。これらの方法に用いられ得る他のコンストラクトとしては、i) IgG1のFc部分と融合させたヒトDLL4 (aa1~524)、ii) IgG1のFc部分と融合させたアルカリホスファターゼ (aa1~17) ヒトDLL4 (aa27~524) のシグナル配列; iii) C末端でStreptagIIおよび6xHisと融合させたヒトDLL4 (aa1~524)、iv) C末端で10xHisと融合させたアルカリホスファターゼ (aa1~17) ヒト

50

DLL4 (aa27~524) のシグナル配列、およびそれらの任意の組み合わせが挙げられる。このコンストラクトをpIRESpuro2哺乳類発現プラスミド(カリフォルニア州マウンテンビューのClontech)に挿入した。得られたプラスミドを、標準的なCaPO₄トランスフェクト法を用いてHEK-293T細胞にトランスフェクトし、プラスミドが安定して統合された細胞を、標準DMEM [10% (v/v) FBS、2mMのGlutamax、ペニシリン(100 U/ml) / ストレプトマイシン(100 mg/ml) (すべてイリノイ州ロックフォードのThermo Fisher Scientificの製品)、2 mMの2-メルカプトエタノール(ミシガン州セントルイスのSigma-Aldrich)を補充] に添加した2 mg/mLのピューロマイシンに対する耐性に基づき選択した。細胞を増殖させ、Freestyle 293発現培地(Thermo Fisher Scientific)に移して成長させた。培地に分泌されたDL4-Fc融合タンパク質を、AKTAprime plus(マサチューセッツ州マールボロのGE Healthcare Life Sciences)自動クロマトグラフィー装置に取り付けたHiTrapプロテインG親和性カラム(GE Healthcare)を用いて精製した。

10

【0121】

VCAM1-Fcの設計および生産

組み換えVCAM1-Fcは、DL4-Fcと同様、VCAM-1細胞外ドメイン、IgG3 Fcドメイン、およびAvitag(商標)ビオチン化部位を含むように遺伝子改変した。VCAM1-Fc融合タンパク質の製造および精製に用いた材料および方法は、上記のDL4-Fc融合タンパク質のものと同一であった。

【0122】

DL4-FcおよびVCAM1-Fcのビオチン化

1個のDL4-Fc分子につき2個のビオチン分子となる最適モル比で、NHS-活性化ビオチンを精製DL4-Fcに添加した。PBS中の透析またはバッファー交換により、反応しなかったNHS-ビオチンを混合物から除去し、そしてビオチン組込みをHABA(4'-ヒドロキシアゾベンゼン-2-カルボン酸)法(Pierce Biotin Quantitation Kit、製品番号28005)により評価した。その後、ビオチン化DL4-Fcを4℃で保存した。

20

【0123】

DL4-Fcの方向をストレプトアビジン(SA)被覆表面に向けるために、BirA-500 Kit(Av idity)をメーカー取扱説明書にしたがい用いて、1個のビオチン分子を、DL4-FcのFc領域のAviTag(商標)配列に酵素的にコンジュゲートさせた。簡単に説明すると、反応体積500 μLのPBS中500 μgのDL4-Fcに、2.5 μgのBirAを添加し、室温で1時間インキュベートした。残ったビオチンがあれば除去するために、40K MWCO Zeba(商標) Spin Desalting Column(Thermo-Fisher)をメーカー取扱説明書にしたがい用いて、350 μLの精製DL4-Fcタンパク質を脱塩した。その後、ビオチン化DL4-Fcを4℃で保存した。Avitag(商標)含有VCAM1-Fcタンパク質は、上記と同じ方法および材料を用いて、C末端がビオチン化された。

30

【0124】

ストレプトアビジン被覆マイクロビーズへのビオチン化DL4-Fcのコンジュゲーション

1 μgのビオチン化DL4-Fcを、直径1 μmから100 μmまでさまざまなサイズのストレプトアビジン(SA)被覆ポリスチレンμビーズ(イリノイ州レイクフォレストのSpherotech)とともにインキュベートした。DL4-Fcを、SA被覆Dynabeads(Thermo-Fisher)および50 nmナノゴールド粒子にもコンジュゲートさせ、それぞれ2 mLのPBS中、30分間室温でインキュベートし、10分おきに渦流により混合した。どの場合も、粒子の表面積は、2x10⁵個の25 μm SA-μビーズに等しかった。DL4-Fcコンジュゲートビーズを4 mLのPBSで洗浄し、そして3000 x gで10分間スピンドウンした。結合しなかったリガンドがあれば混合物から除去するために、およびDL4-Fc含量をアッセイしてμビーズとの結合を査定するために、上澄みを慎重に回収した。2回目の洗浄後、DL4-μビーズをさまざまな体積のPBSに再び浮遊させて、テキストに記載の表示の濃度を得た。非コンジュゲートμビーズを並行して調製し、陰性対照とした。

40

【0125】

DL4-FcおよびVCAM1-FcとSA-μビーズとの複合コンジュゲーションでは、DL4-Fc量は、S

50

A- μ ビーズ 2×10^5 個につき $1 \mu\text{g}$ と一定に維持したが、VCAM1-Fcは、 $0.01 \mu\text{g}$ ($100:1$)、 $0.1 \mu\text{g}$ ($10:1$)、 $1 \mu\text{g}$ ($1:1$)、および $10 \mu\text{g}$ ($1:10$)を添加した。

【0126】

Notch活性化レポーター細胞株、3T3-N1Clucの発生

Notch応答性エレメント (8x RBPJコンセンサス結合部位) を、プロモーターを持たない pGL4.17 [luc2/Neo] プラスミド (Promega) に挿入した。こうして、ネオマイシン耐性を与えながら、ルシフェラーゼ酵素の発現によりNotch活性化を知らせる、1個のプラスミドを作製した (pGL4.17-N1Repと名付けた)。次に、NIH3T3細胞を、pMIGR-NOTCH1 (ペンシルバニア大学Warren Pear博士の寄贈) およびpGL4.17N1Repプラスミドを用いてトランスフェクトした。ネオマイシン処理 ($1 \mu\text{g}/\text{mL}$) に耐性のあった細胞を最初に選択してから、GFPを発現した細胞をフローサイトメトリーによりソートした。次に、NIH3T3細胞のクローンを、96ウェルプレートへの単細胞捕集により単離した。次に、各クローンの、プレート結合DL4-Fcに対する活性化に対する応答を測定した (一晚、 $20 \mu\text{g}/\text{mL}$ で捕集)。最低量のバックグラウンドおよび最高のNotch活性化応答を有する、3T3N1Clucと名付けたクローンを増殖させ、Notch受容体活性化を測定する実験の実施に用いた。

10

【0127】

Notch活性化を測定するための3T3-N1Clucのルシフェラーゼアッセイ

標準組織培養 (TC) 処理した平底96ウェルプレート中の 3×10^4 個の3T3-N1Cluc細胞にDL4- μ ビーズを添加し、5% FBSを補充した MEM中で一晚インキュベートした。細胞を溶解させ、Firefly Luciferase Assay Kit 2.0 (カリフォルニア州フレモントのBiotium) をメーカー取扱説明書にしたがい用いて、ルシフェラーゼ活性についてアッセイした。簡単に説明すると、増殖培地を除去し、細胞をPBSで洗浄してから、溶解バッファーを添加した。細胞を -80°C で10分間凍結させてから解凍することにより溶解させ、次いでライセートを96ウェル平底不透明ポリスチレンプレート (Corning) に移した。D-ルシフェリンを調製し、各ウェルに自動ディスペンサーで添加し、Synergy H1プレートリーダー (バーモント州ウィヌースキのBioTek Instruments Inc.) を用いて分析した。 $50 \mu\text{L}$ /ウェルのタンパク質 ($5 \sim 20 \mu\text{g}/\text{mL}$) を平底96ウェルプレートに4で一晚吸着させてから翌日洗浄し、3T3-N1Cluc細胞を播種することにより、ヒトIgGおよびDL4-Fcのプレート結合対照を前日に調製した。

20

【0128】

被覆DL4-FcプレートおよびDL4- μ ビーズとHSPCとの培養

異なる数のDL4- μ ビーズを、 3×10^3 個のマウス $\text{Lin}^- \text{Sca-1}^+ \text{cKit}^+$ HSC (C57BL6マウスの骨髄からフローサイトメトリーによりソート) に添加して、細胞対ビーズ比を $1:1$ 、 $1:3$ 、 $1:9$ 、および $1:27$ とした。各条件で、細胞-ビーズの組み合わせを、丸底96ウェルプレートの単一ウェルで、 $200 \mu\text{L}$ のIMDM [20% BIT (STEMCELL Technologies)、1% Glutamax (Thermo)、 $50 \text{ ng}/\text{mL}$ のSCF、 $10 \text{ ng}/\text{mL}$ のFlt3L、および $10 \text{ ng}/\text{mL}$ のIL-7 (ミネソタ州ミネアポリスのR&D Systems) を補充] 中、インキュベートした。 $50 \mu\text{L}$ /ウェルのタンパク質 ($20 \mu\text{g}/\text{mL}$) を平底96ウェルプレートに4で一晚吸着させてから翌日洗浄し、細胞を播種することにより、ヒトIgGおよびDL4-Fcのプレート結合対照を前日に調製した。同時培養7日目に細胞を収集し、抗マウス抗体CD45、CD25、CD44、CD90、CD11b、およびCD19で染色し、それからLSR IIサイトメーター (BD Biosciences) で分析した。

30

40

【0129】

ヒトHSPCの場合、UCBからフローサイトメトリーにより $\text{Lin}^- \text{CD34}^+ \text{CD38}^{-/lo}$ 細胞をソートし、96丸底ウェルプレートの1ウェルあたり 4×10^3 個の細胞を36,000個のDL4- μ ビーズとともに、StemSpan (商標) T Cell Progenitor Expansion Supplement (Stemcell Technologies) を補充した $200 \mu\text{L}$ のStemSpan (商標) SFEM II (Stemcell Technologies) 中で14日間培養し、7日目に50%の培地を交換した。14日を超えた培養物については、細胞を収集し、数を数え、新しいDL4- μ ビーズとともに播種した。同時培養14日目に、細胞増殖率を決定するために細胞の数を数え、CD34、CD5、CD1a、およびCD7に対する抗体で染色して、系列の進行についてアッセイした。proT細胞ステージ後の成長についてアッセイするた

50

めに、さらに後の時点で、細胞をCD4、CD8、およびCD3に対する抗体でも染色した。

【0130】

ヒト人工多能性幹細胞 (iPSC) からCD34⁺ 造血細胞への、または造血内皮細胞からT細胞への分化

初期化hiPSC株を、線維芽細胞 (AIStemBio Cat #iPSC11) およびT細胞 (Harvard Stem Cell Science Cat # STiPS A3) から誘導した。これらをMatrigel上でmTeSR培地 (StemCellTech) で培養した。自己凝集EBを発生させるため、iPSCをコラゲナーゼBで20分処理してから、短時間のトリプシン-EDTA工程を行った。細胞スクレーパーで細胞をそっと掻きとって、小さい凝集体を作った。EBは、BMP-4の存在下でStemPro-34 (Invitrogen) 中、最初の24時間の培養の間に発生し、次いでBMP-4およびbFGFの存在下でさらに24時間培養し、それからBMP-4、bFGF、およびSBの存在下でさらに48時間 (2~4日目) 培養した。4日目に、BMP-4およびSBを除去し、VEGF、IL-6、IL-11、IGF-1、SCF、EPO、TPO、Flt-3、IL-3、およびDKK1 (すべて、カリフォルニア州オーバンのMiltenyi Biotec、またはR&D Systemsのサイトカイン) と置き換えた。5% CO₂/5% O₂/90% N₂の低酸素環境で8日間、培養を維持した。8日目に、記載されている (Kennedyら, 2012) ようにして、細胞をMACSを用いてCD34⁺細胞について濃縮し、DL4-μビーズに加えてStemSpan (商標) T Cell Progenitor Expansion Supplement (Stemcell Technologies) を補充したStemSpan (商標) SFEM II (Stemcell Technologies) とともに上記のようにインキュベートして、T細胞を発生させた。

10

20

【0131】

免疫不全マウスへの始原T細胞の養子移入

免疫不全マウスへの養子移入の準備として、大量のヒトHPSC/DL4-μビーズ培養物を準備した。2x10⁵個のCD34⁺ HSPCを、1.8x10⁶個のDL4-μビーズとともに、T25フラスコ (The Rmo Scientific) 内で7~10日間インキュベートし、このとき、CD34⁺ CD7⁺細胞と同定された始原T (proT) 細胞を、FACSAria細胞ソーター (カリフォルニア州サンホセBD Biosciences) を用いてソートした。あるいは、HSPCを鉄酸化物で被覆されたDL4-μビーズとともに培養する場合、細胞成分からのDL4-μビーズの磁気分離を、autoMACS-pro細胞ソーター (Miltenyi Biotec) を用いて実施した。proT細胞を、3~6日齢の免疫不全NOD-Scid/IL2r^{null} (NSG) 新生仔の肝内に注射した。各マウスに、3~5x10⁵個のproT細胞とともに、-MEM中総量50 μlのhIL-7 (0.5 μg/マウス) および抗IL-7モノクローナル抗体 (mAb)、クローンM25 (2.5 μg/マウス) を与えた。マウスは、3~4日おきにIL-7/M25カクテルでブーストされた。移植後3週または12週でリンパ器官の胸腺、脾臓、および骨髄を収集した。各器官から単細胞浮遊物を調製し、染色し、LSR-IIサイトメーター (BD Biosciences) を用いて分析した。細胞死マーカー4'-6-ジアミジノ-2-フェニルインドール (DAPI) を排除した生細胞、およびヒトCD45を発現している細胞に、電子的にゲートをかけることにより、移植を査定した。

30

40

【0132】

結果:

DL4-μビーズは強力なNotchシグナリングを誘導する

本発明者らの実験室での過去の研究で、DL4融合タンパク質、DL4-Fcを標準TC処理ウェル/プレート表面に固定化すると、マウスおよびヒトHSPCにおいて、T系列細胞の発生を誘導するのに十分なNotchシグナリングを誘導できることが示された (Shuklaら, 2017)。しかし、この2Dフォーマットは、拡張性、およびT細胞発生を促進する強力かつ一定したNotchシグナルを送達する能力に、限界がある。

40

【0133】

Taqviら (2006) のチームは、2.8 μm磁気ビーズをDL4により機能化しようと試み、これらをマウスHSCと同時培養した。この混合物を、間に透過性インサートを挟んでOP9細胞に載せた。これによって、幹細胞と間質細胞との物理的接触を防いだが、分化の促進に必須の可溶性因子は通過させた。DL4機能化μビーズとの培養から多少のCD90⁺ (Thy1) 細胞は出現したが、Thy1の発現は決定的なT系列マーカーではない。重要なことに、CD19⁺ B細胞

50

胞も出現した。T細胞の発生を促進し、かつB細胞の発生を阻害するのに必要な、持続的なNotch活性化には閾値がある。B細胞がなおも存在したという事実は、この系がNotchシグナリングを活性化させ、かつ持続させる能力を持たなかったことを実証している。実際、ビーズ対細胞比を1:1から5:1へ増加させると、B細胞分化が促進され、かつThy1発現が妨害された。細胞ベースのまたはプレート結合Notchリガンドが強力なNotchシグナリングを誘導するための既知の要件と併せて、 μ ビーズフォーマットに存在した可溶性Notchリガンドが、Notchシグナルの必要なレベルを誘導できなかった、という見解は、このアプローチをHSPCからのT細胞発生には適用できそうにないことを示唆している。また、この種の研究は、まだヒトCD34⁺細胞を用いて実施する段階ではない。こうして、DL4により機能化された μ ビーズが、HSPCからのT細胞発生を誘導するのに要求される、必要な、一定した、かつ高いレベルのNotchシグナリングを提供できるかどうか、そして容易に拡張され臨床使用に応用できるかどうかは、未確定のままとなった。

10

【0134】

したがって、本発明者らは、DL4-Fcを μ ビーズにコンジュゲートさせることで、Notch受容体に有効に結合でき、かつHSPCとともに浮遊して機能することができ、したがって規模拡大にも適する、高次DL4マルチマープラットフォームが作製できるかどうかを調査した。

【0135】

DL4-Fcを μ ビーズに連結しやすくするために、SA被覆ポリスチレンビーズに結合させる準備として、DL4-Fcを化学的にビオチン化した(図1A)。DL4-Fcへのビオチン組込みをウエスタンブロットにより確認し(図1B)、その後の μ ビーズへのコンジュゲーションを、コンジュゲーションの前と後に収集した上澄みのタンパク質定量化によりアッセイした。ビーズサイズがNotchシグナリング伝達に及ぼす影響を評価するために、非ビオチン化DL4-Fcを共有結合的に50 nmのNHS活性化ゴールドナノ粒子に、ビオチン化DL4-Fcを1 μ mのSA被覆Dynabeads(商標)ならびに25 μ mおよび100 μ mのポリスチレンビーズに、コンジュゲートさせた(図2)。機能化したビーズを、ルシフェラーゼ遺伝子をレポーターとして用いてNotch活性化を知らせる3T3-N1Clucとともにインキュベートした。各条件のビーズ数の総計は同じ表面積を表し、したがってDL4-Fc分子の同じ総数を表した。ビーズのサイズは、ルシフェラーゼ活性のレベルで示される、DL4-FcビーズがNotchシグナリングを活性化する能力に影響することが示された(図2B)。なお、直径25 μ mのDL4- μ ビーズが、同じ材料の他のサイズのビーズと比較して、または1 μ mのDynabeadsおよび50 nmのナノ粒子と比較して、Notch受容体の活性化を最適に増強した。

20

30

【0136】

25 μ mのDL4- μ ビーズで得られたNotchシグナリングのレベルは、T系列分化の誘導に必要であることがわかっている、20 μ g/mLのプレート結合(PB)DL4-Fcと等価の既知のレベルよりも高かった。次に、IL-7、Flt3L、およびSCFを添加したDL4- μ ビーズが、マウスHSCとともに7日間インキュベートされることにより、T細胞発生を誘導する能力を持つかどうかを決定した。その結果、41%の細胞でCD25が発現したことからわかるように、DL4- μ ビーズとともにインキュベートすると、マウスHSCは容易にproT細胞を発生させたことが示された(図3)。これに対し、PB-DL4-Fcでは、4%の細胞でしかCD25の発現が誘導されなかった。DL4- μ ビーズはまた、Notchシグナリングにより阻止されることが知られている代替のB細胞(CD19⁺)およびミエロイド(CD11b⁺)系列の成績を阻害した。

40

【0137】

μ ビーズに対するDL4-Fcの方向指定コンジュゲーションはNotchシグナリング誘導を増強する

ランダム方向第1世代DL4- μ ビーズに改良を加えるために、本発明者らは、DL4-Fcの方向をビーズ表面に対し相対的に指定することが、Notchシグナリング伝達を増強するかどうかを調査した。そのために、1個のビオチン分子が酵素的にコンジュゲートできるBirA認識配列(AviTag(商標))をC末端に有する、DL4-Fcを設計した(図4)。3T3N1Cluc細胞ルシフェラーゼ活性により査定すると、これら第2世代DL4- μ ビーズのインキュベーション

50

オンにより、Notchシグナリングのレベルが大幅に増加した(図5)。この方向指定コンジュゲーション法を用いて、ビーズサイズがNotch伝達に及ぼす影響を再度査定した。結果は、直径100 μm 、25 μm 、10 μm 、および6.5 μm のビーズすべてがNotchを活性化する能力を有したが、直径25 μm のビーズが最も有効であったことを示した(図6)。ビーズ対細胞の最適比も評価し、ビーズ対細胞の比が3:1のとき、プレート結合対照と比較して、Notch活性化が10倍増加したことが決定された(図6)。

【0138】

次に、Notchシグナリングを最適に活性化するビーズ1個あたりのDL4-Fcの量を決定するために、SA μ ビーズがビオチン化DL4-Fcで飽和していたかどうかについて調査した。異なる量のDL4-Fc(0.01、0.1、1、および10 μg)を同数の25 μm SA-ビーズにインキュベートさせた。次に、ビーズを3T3-N1Cluc細胞とともに一晩インキュベートした。結果は、 2.25×10^5 個のSA- μ ビーズにつき1 μg のDL4-Fcが最大の応答を与えたことを示し、DL4- μ ビーズの活性が飽和していたことが示唆された(図7A)。磁化25 μm ポリスチレンビーズ(鉄酸化物で被覆)が、Notch活性化において、それらの非磁化カウンターパートと同じく有効であることも実証された(図7A)。また、SA- μ ビーズを同直径のプロテインG- μ ビーズに替えても、DL4-FcがNotchを活性化する能力に大差はなかった(図7B)。

10

【0139】

こうして、これらの結果により、次のパラメーターが確立された：i) ビーズのサイズ、ii) DL4分子の方向、およびiii) ビーズ対細胞比。これらのパラメーターの最適化は、Notch活性の刺激、およびT細胞発生のための最適条件の決定に影響した。また、DL4-Fcをビーズにロードするにあたって最大の活性を得るためのDL4-Fc対ビーズ比が決定され、そしてビーズを磁化してもNotch活性に何ら影響はない。さらに、同様にDL4-FcのFc領域に結合するプロテインG- μ ビーズは、DL4-FcをSA- μ ビーズと同様に方向づけた。

20

【0140】

HSPCからのT細胞発生を最大化するDL4- μ ビーズ条件

上記の結果に基づき、本発明者らは次に、同じ要因がT細胞発生に影響するかどうかの決定に取り掛かった。これについて、まずはマウスHSPCを用いて試験した。図8に示すように、DL4- μ ビーズは、PB-DL4よりも有効にマウスT細胞の発生を誘導した。

【0141】

proT細胞の発生を最大化するためのHSPC対DL4- μ ビーズの最適比を決定するために、 3×10^3 個のHSPCを、DL4- μ ビーズ数を3倍ずつ増加させながら、各条件でインキュベートした(図9)。インキュベーションの7日後、HSPCのproT細胞(CD25⁺)への分化について、異なるHSPC:DL4- μ ビーズ比を分析した。約1:9でCD25⁺細胞の最高パーセンテージが得られたため、これが最適なHSPC:DL4- μ ビーズ比と思われる。HSPC:ビーズ数の比を1:27に増加させても、T系列の分化は向上しなかった。

30

【0142】

DL4- μ ビーズを用いてのヒトT細胞発生の動態および拡大

次に、CD34⁺UCB由来HSPCからヒトT細胞発生を誘導するためのDL4- μ ビーズの使用について検証した。そのために、上記で確定した最適HSPC:DL4- μ ビーズ比、1:9を用いた。細胞を2日おきに数え、フローサイトメトリー分析を実施した。結果は、培養4日目には、CD34、CD7、およびCD5を同時発現するヒトproT細胞の出現を示した(図10A)。これらの結果は、DL4- μ ビーズとともにインキュベートされたヒトHSPCでは、ロバストなproT細胞表現型(CD34⁺CD7⁺またはCD7⁺CD5⁺CD1a⁻)が達成されたが、非コンジュゲート μ ビーズまたはPB-DL4-Fcでは達成されなかったことを実証しており、プレート結合DL4-Fcと比較すると、DL4- μ ビーズのほうが、Notchを活性化する能力が高いことが確認された。

40

【0143】

臨床に適したproT細胞の収率を得るための1つの難関は、十分な細胞数を得ることの難しさである。これに取り組むために、発生中の細胞増殖率も査定したところ、14日目には当初開始数の150倍を超える全細胞増殖率が得られたことが判明した(図10B)。

【0144】

50

DL4- μ ビーズは成熟ヒトT細胞の発生を促進する

次に、DL4- μ ビーズがNotchを活性化する増加した能力が、発生中の細胞をT細胞発生の後期のステージへと分化するよう誘導でき、したがって培養後期でより成熟した表現型が発現されるかどうかについて、調査した(図11)。28日目と47日目の両方の培養物の分析から、CD4⁺CD8⁺二重陽性(DP)細胞が細胞の約25%を占めたことが示された。興味深いことに、47日目の培養物は、CD4⁺CD8⁺CD3⁺DP細胞およびCD8⁺CD3⁺単一陽性(SP)細胞の出現を示した。これらの結果は、DL4- μ ビーズにより誘導された強力なNotchシグナリングは、PB-DL4-Fcを用いた過去の試みで見られたT細胞成熟の発生障害を克服できることを示している。

【0145】

DL4- μ ビーズとともに培養すると、動員末梢血(mPB)由来HSPCはT系列細胞に分化する

成人mPBは、潜在的にUCBよりも容易に入手可能なHSPCのソースであるが、それは一人から得られるHSPCの数がUCBの約100倍だからである。T系列発生の個体発生を比較するために、異なる3人からのmPB由来CD34⁺ HSPCをDL4- μ ビーズとともに培養し、UCB由来HSPC培養物と比較した(図12A)。14日目、T細胞発生の進行はCB由来HSPCと非常によく似ており、proT細胞群(CD34⁺CD7⁺)の同様のパーセンテージが観測された。しかし14日以降の増殖率は、mPB由来HSPCで110倍だったのに対し、CB由来細胞は190倍近くになった(図12B)。

【0146】

DL4- μ ビーズを用いてのiPSCにおけるT細胞発生の誘導

本明細書に記載される方法により、線維芽細胞に由来するヒトiPSCを、CD34⁺プレ造血前駆細胞に分化するよう誘導した。CD34⁺細胞をDL4- μ ビーズとともにインキュベートして、それらが発生の初期(図13A)および後期(図13B)に多能性細胞をT系列へと誘導する能力を決定した。発生初期は、CD7細胞表面マーカー、続いてCD5の正常な獲得が示される。T細胞発生後期は、28日目のCD4⁺未成熟単一陽性(iSP)マーカー、そして35日目の単一陽性マーカーCD8細胞の獲得を特徴とする。特筆すべきはT細胞受容体(TCR)成分のCD3という細胞表面マーカーの存在であり、この培養物における成熟T細胞の存在を示唆している。

【0147】

iPSCがT細胞に由来する場合(T-iPSC)、TCR およびTCR 遺伝子座がすでに遺伝子再編成されており、T系列運命へと再分化すると、細胞は、すでに再編成されているTCRを発現することになる。発生のどのステージでTCRがT-iPSC由来細胞によって発現されるかを決定するために、CD34⁺プレ造血始原細胞をDL4- μ ビーズとともにインキュベートした。12日目に調査した培養物は、細胞の40%で細胞表面にTCR およびCD3が発現したこと、成熟T細胞マーカーCD4およびCD8はまだ発現していなかったが、80%の細胞が初期T細胞マーカーCD7を発現したこと、を示した(図14、左側のパネル)。CD7⁺細胞にゲートをかけると、70%超のTCR およびCD3の発現を示した。24日目には、細胞の80%超がTCR およびCD3を発現し、これらの細胞の多くがCD4およびCD8の発現を獲得していた(図14、右側のパネル)。

【0148】

VCAM-1はHSPCのT細胞への分化を加速した

SA- μ ビーズが他のビオチン化分子を付加するためのモジュラーベースとして機能できるかどうかを決定するために、VCAM-1の機能的効果を調査した。VCAM-1をプレート結合DL4に付加すると、HSPCのT細胞への分化が加速されることが、過去に示されている(Shuklaら, 2017)。ここでは、新たな融合タンパク質、VCAM1-Fcを遺伝子設計し、発現させ、ビオチン化した。免疫プロット分析を用いて、この生成されたVCAM1-Fcは、市販のVCAM1製品と同じサイズであることを決定した(図15、左側のパネル)。また、BirA酵素ビオチン化の標的配列を含むVCAM1-Fcは、ビオチン化されたことが実証された(図15、右側のパネル)。次に、固定量のDL4-Fcとともに、ビオチン化VCAM1-Fcを、SA- μ ビーズの表面の被覆に用い、そしてUCB由来HSPCとともに培養した。7日目の培養物の分析により、概して

10

20

30

40

50

、VCAM1-Fc/DL4-Fc比が高いほど、分化速度が加速されたことが実証された(図16)。これによって、VCAM-1の活性と、T細胞発生に關与する共刺激分子を制御下で付加するためのプラットフォームとしてのμビーズのフレキシビリティとが、実証された。

【0149】

免疫不全マウスへの始原T細胞の移植およびその後の周辺への移動

HSPC/DL4-μビーズ培養物に由来するCD34⁺ CD7⁺始原T(proT)細胞が胸腺に生着する能力を査定するために、免疫不全NSGマウスモデルを選んだ。proT細胞の生産を段階的に拡大して、96ウェルプレートからT25フラスコに切り替えた。7日目の培養物からProT細胞をソートし、NSG新生仔の肝内に注射した。初期の生着を第3週で調査すると、胸腺内でヒトCD45⁺細胞の存在が示され、そのほとんどが二重陽性CD4⁺ CD8⁺(DP)成熟T細胞ステージ

10

【0150】

移植後第12週の分析によると、proT細胞の更新が生じない胸腺内で、ヒトCD45⁺細胞がほぼすべてCD4およびCD8 SPへと分化し成熟していた(図18)。成熟CD4およびCD8 SPは、胸腺から脾臓へ、そして骨髄にも移動したようであった。このことは、proT細胞が、胸腺内で成熟し、そして二次リンパ器官へと正常に移動する能力を持っていたことを実証した。

【0151】

培養物中の細胞成分からのμビーズの分離

20

臨床目的でHSPC/DL4-μビーズ同時培養物からproT細胞を大規模生産するのに備えて、鉄酸化物で被覆されたDL4-μビーズを同時培養細胞から分離するAutoMACS(Miltenyi)の能力について査定した(図19A)。臨床承認されているCliniMACS(Miltenyi)と同様に機能するAutoMACSは、μビーズを細胞成分から完全に単離し(図19B)、細胞画分中にμビーズは検出できなかった。これに対し、ビーズ画分では、単離されたμビーズに捕捉された、または付着したままの細胞があった。

【0152】

まとめ

本明細書では、マウスとヒト両方のHSPCならびにiPSCからT細胞を発生させる無細胞ビーズベース系の開発について記載している。非プレート結合または浮遊Notchリガンド、たとえばDL4-μビーズは、T系列細胞の有効な発生を可能にする独自のストラテジーを表しており、大規模なバイオリアクターベースの浮遊培養で容易に実現でき、かつプレート結合アプローチに付随する発生障害、ならびに非効率性および拡張面の短所を克服する可能性を有する。

30

【0153】

これまでの研究は、無細胞支持体の系における未成熟proT細胞ステージ後のヒトT系列細胞の発生については実証していない。また、本明細書における結果は、無細胞支持体培養系を用いたiPSCからのproTならびに成熟SP CD4およびCD8細胞といったT系列細胞の発生を初めて示すものである。本明細書では、本明細書に記載される浮遊Notchリガンド培養系が成熟SP T細胞の出現を可能にすることが示され、本明細書に記載されるDL4-μビーズにより得られたNotchシグナリングが、プレート結合アプローチで見られるT細胞成熟の発生障害を克服できたことが示されている。

40

【0154】

参考文献

Awong, G., Herer, E., Surh, C.D., Dick, J.E., La Motte-Mohs, R.N., and Zuniga-Pflucker, J.C. (2009). Characterization in vitro and engraftment potential in vivo of human progenitor T cells generated from hematopoietic stem cells. *Blood* 114, 972-982.

Awong, G., Singh, J., Mohtashami, M., Malm, M., La Motte-Mohs, R.N., Benveniste, P.M., Serra, P., Herer, E., van den Brink, M.R., and Zuniga-Pflucker, J.C. (2013). Human proT-cells generated in vitro facilitate hematopoietic stem cell-derived T-lymphopoiesis in vivo and restore thymic architecture. *Blood* 122, 4210-4219.

D'Souza, B., Meloty-Kapella, L., and Weinmaster, G. (2010). Canonical and non-canonical Notch ligands. *Curr Top Dev Biol* 92, 73-129.

10

Ferrando, A.A., Neuberg, D.S., Staunton, J., Loh, M.L., Huard, C., Raimondi, S.C., Behm, F.G., Pui, C.H., Downing, J.R., Gilliland, D.G., *et al.* (2002). Gene expression signatures define novel oncogenic pathways in T cell acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Cell* 1, 75-87.

Gordon, W.R., Zimmerman, B., He, L., Miles, L.J., Huang, J., Tiyanont, K., McArthur, D.G., Aster, J.C., Perrimon, N., Loparo, J.J., *et al.* (2015). Mechanical Allosteric: Evidence for a Force Requirement in the Proteolytic Activation of Notch. *Dev Cell* 33, 729-736.

20

Kennedy, M., Awong, G., Sturgeon, C.M., Ditadi, A., LaMotte-Mohs, R., Zuniga-Pflucker, J.C., and Keller, G. (2012). T lymphocyte potential marks the emergence of definitive hematopoietic progenitors in human pluripotent stem cell differentiation cultures. *Cell Rep* 2, 1722-1735.

Krenger, W., Blazar, B.R., and Hollander, G.A. (2011). Thymic T-cell development in allogeneic stem cell transplantation. *Blood* 117, 6768-6776.

Legrand, N., Weijer, K., and Spits, H. (2006). Experimental models to study development and function of the human immune system in vivo. *J Immunol* 176, 2053-2058.

30

Meloty-Kapella, L., Shergill, B., Kuon, J., Botvinick, E., and Weinmaster, G. (2012). Notch ligand endocytosis generates mechanical pulling force dependent on dynamin, epsins, and actin. *Dev Cell* 22, 1299-1312.

Porter, D.L., and June, C.H. (2005). T-cell reconstitution and expansion after hematopoietic stem cell transplantation: 'T' it up! *Bone Marrow Transplant* 35, 935-942.

Schmitt, T.M., Ciofani, M., Petrie, H.T., and Zuniga-Pflucker, J.C. (2004). Maintenance of T cell specification and differentiation requires recurrent notch receptor-ligand interactions. *J Exp Med* 200, 469-479.

Shah, D.K., and Zuniga-Pflucker, J.C. (2014). An overview of the intrathymic intricacies of T cell development. *J Immunol* 192, 4017-4023.

Shukla, S., Langley, M.A., Singh, J., Edgar, J.M., Mohtashami, M., Zuniga-Pflucker, J.C., and Zandstra, P.W. (2017). Progenitor T-cell differentiation from hematopoietic stem cells using Delta-like-4 and VCAM-1. *Nat Methods* 14, 531-538.

10

Thompson, P.K., and Zuniga-Pflucker, J.C. (2011). On becoming a T cell, a convergence of factors kick it up a Notch along the way. *Semin Immunol* 23, 350-359.

van den Brink, M.R., Alpdogan, O., and Boyd, R.L. (2004). Strategies to enhance T-cell reconstitution in immunocompromised patients. *Nat Rev Immunol* 4, 856-867.

Weng, A.P., Ferrando, A.A., Lee, W., Morris, J.P.t., Silverman, L.B., Sanchez-Irizarry, C., Blacklow, S.C., Look, A.T., and Aster, J.C. (2004). Activating mutations of NOTCH1 in human T cell acute lymphoblastic leukemia. *Science* 306, 269-271.

20

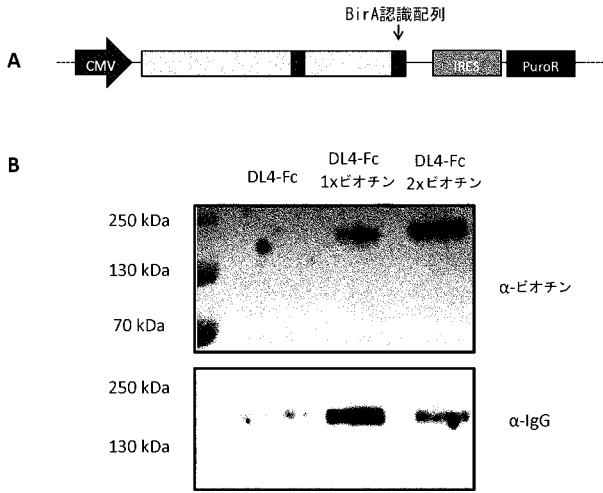
Zakrzewski, J.L., Kochman, A.A., Lu, S.X., Terwey, T.H., Kim, T.D., Hubbard, V.M., Muriglan, S.J., Suh, D., Smith, O.M., Grubin, J., *et al.* (2006). Adoptive transfer of T-cell precursors enhances T-cell reconstitution after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Nat Med* 12, 1039-1047.

Zakrzewski, J.L., Suh, D., Markley, J.C., Smith, O.M., King, C., Goldberg, G.L., Jenq, R., Holland, A.M., Grubin, J., Cabrera-Perez, J., *et al.* (2008). Tumor immunotherapy across MHC barriers using allogeneic T-cell precursors. *Nat Biotechnol* 26, 453-461.

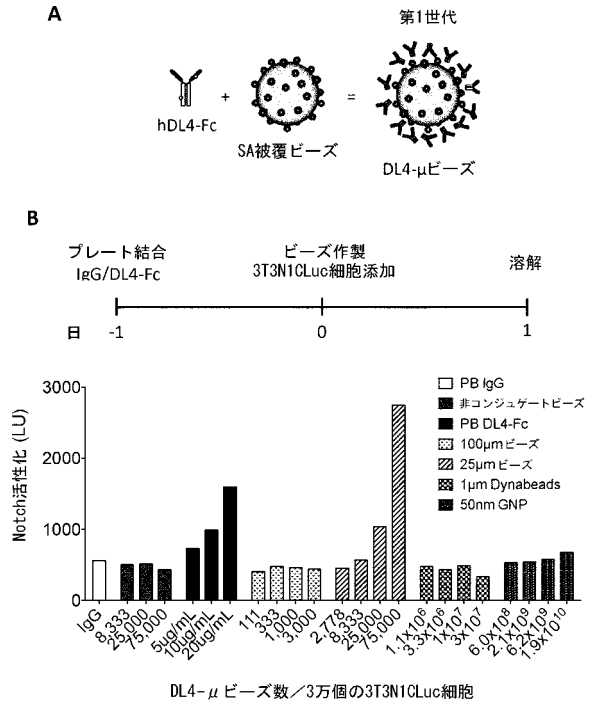
30

Zuniga-Pflucker, J.C. (2004). T-cell development made simple. *Nat Rev Immunol* 4, 67-72.

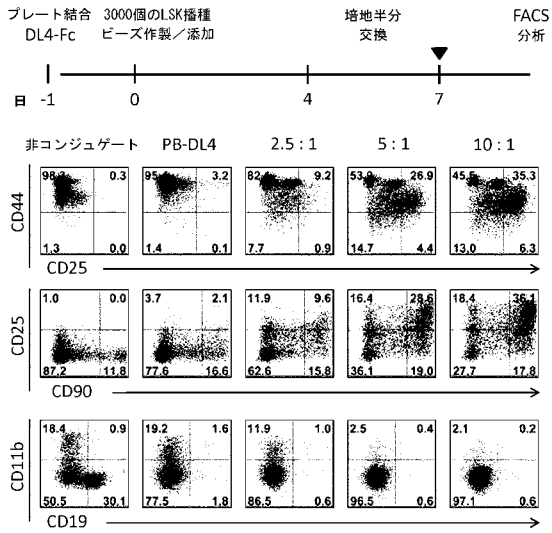
【 図 1 】



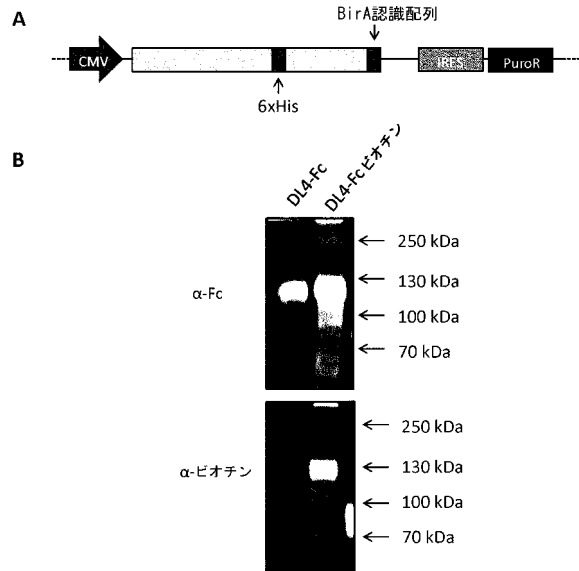
【 図 2 】



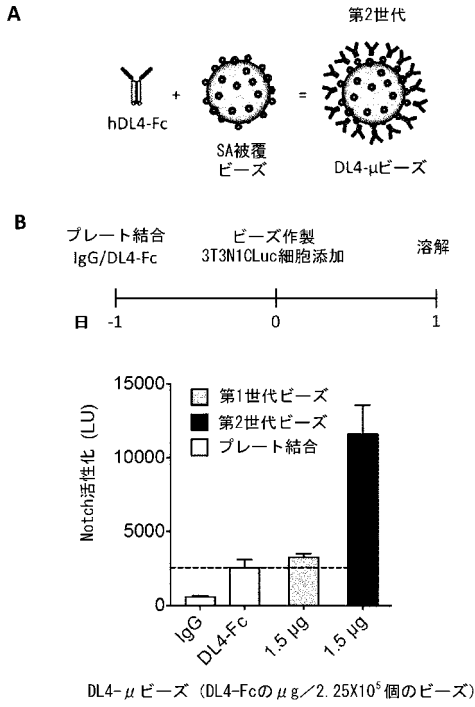
【 図 3 】



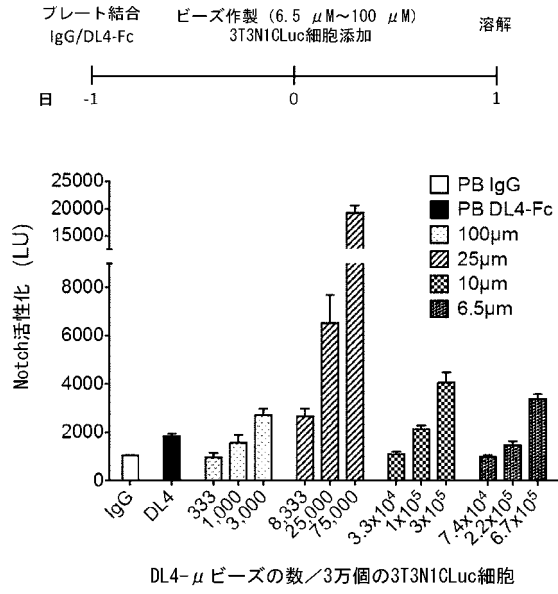
【 図 4 】



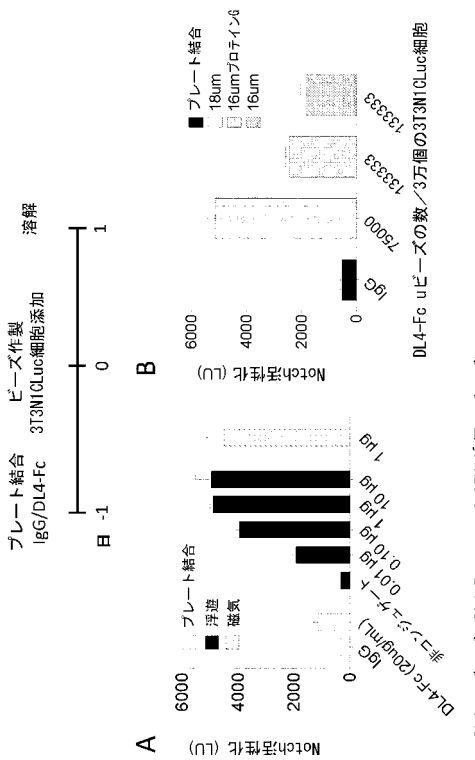
【 図 5 】



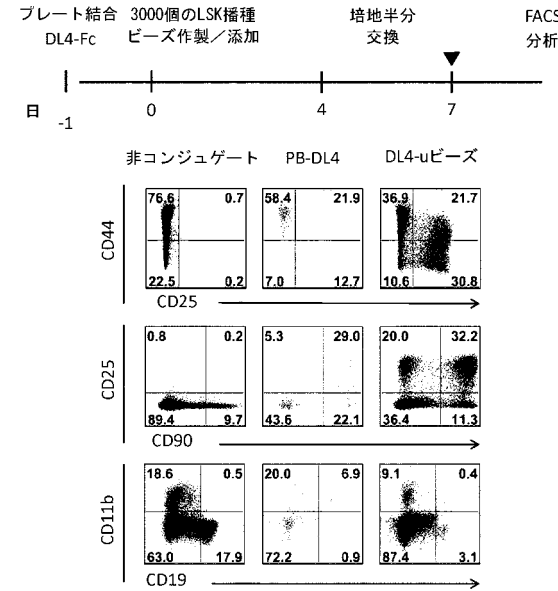
【 図 6 】



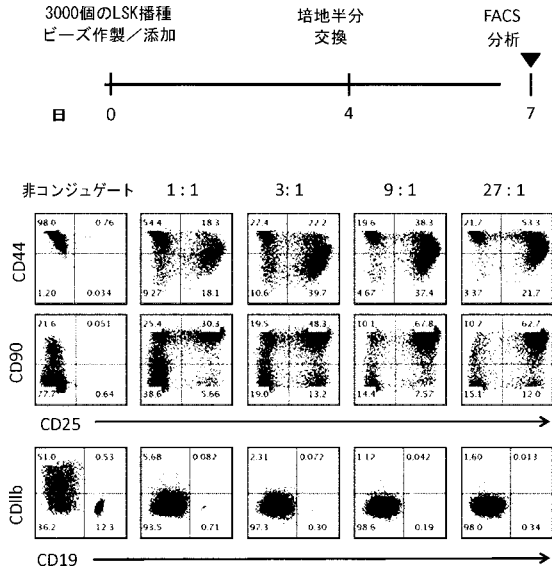
【 図 7 】



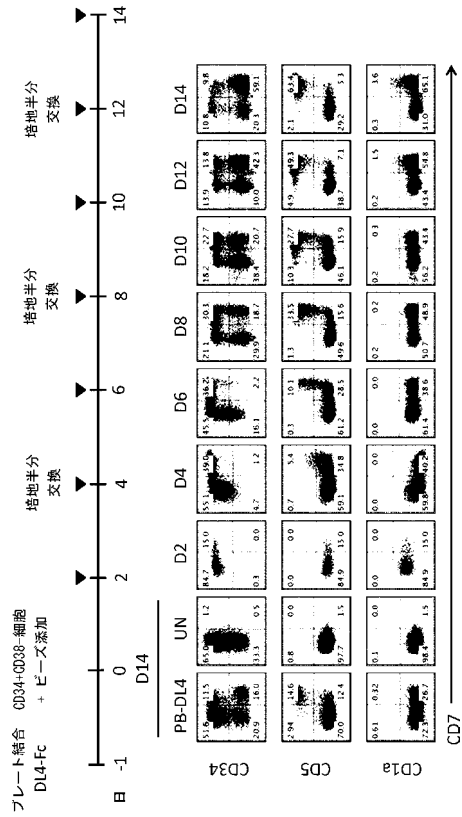
【 図 8 】



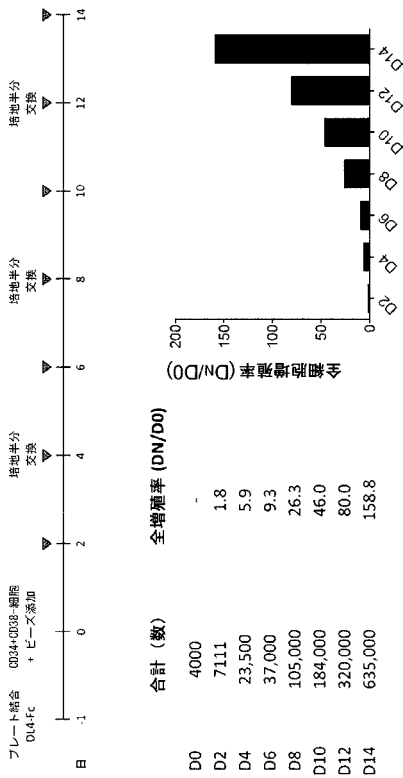
【図9】



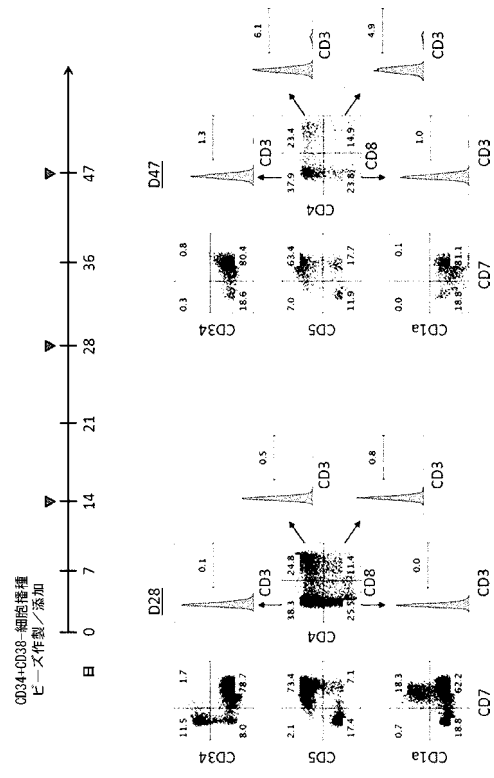
【図10A】



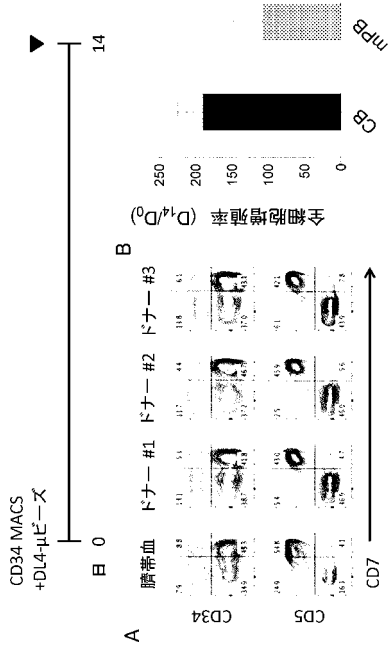
【図10B】



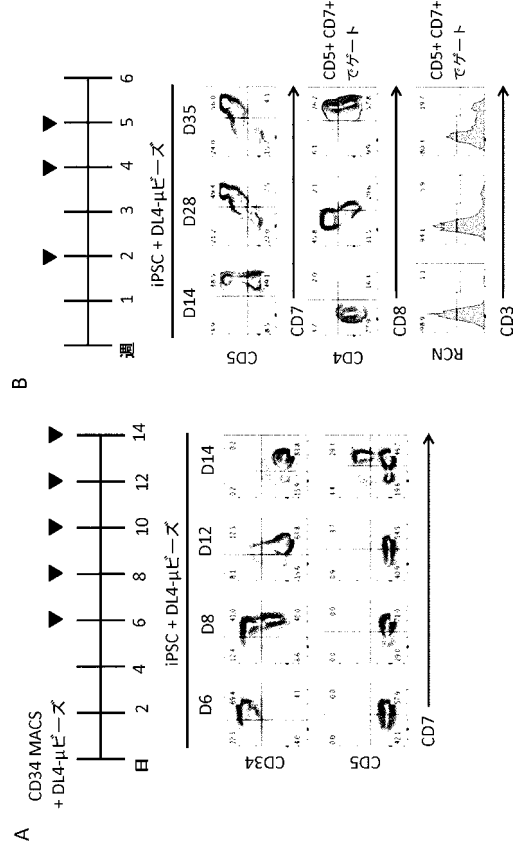
【図11】



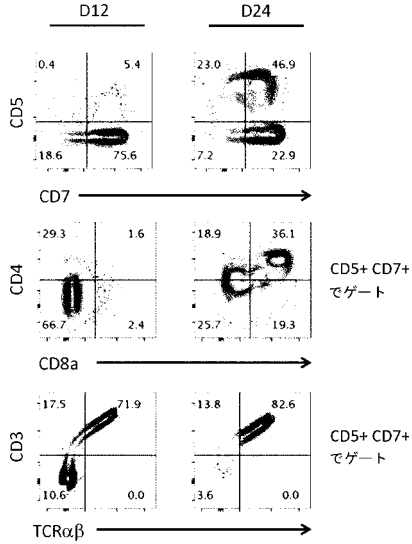
【 図 1 2 】



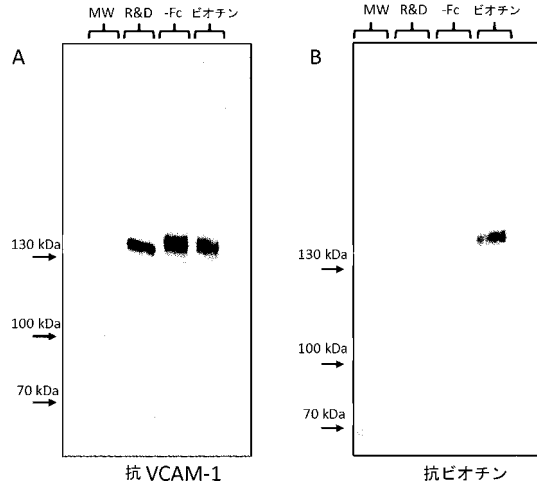
【 図 1 3 】

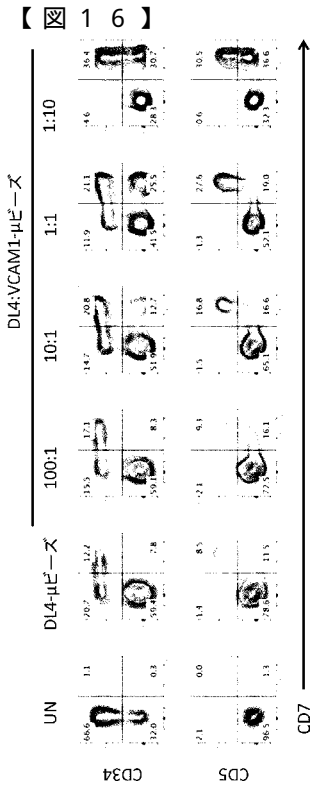


【 図 1 4 】

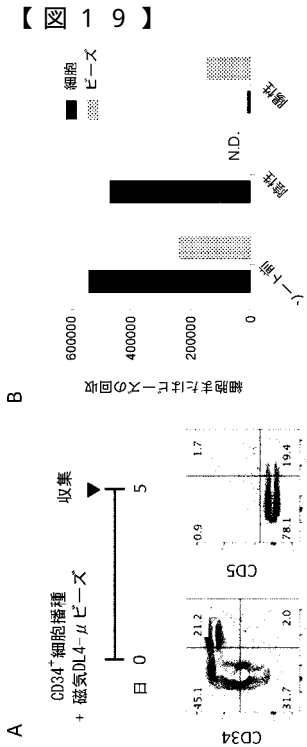
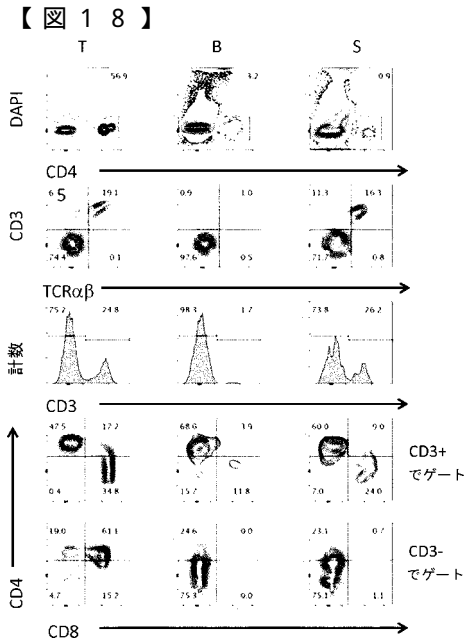
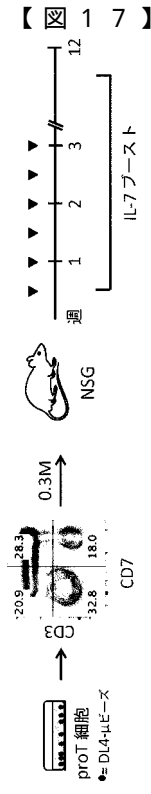


【 図 1 5 】





CD7 ↑



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/CA2019/050181
<p>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC: <i>C12N 5/0783</i> (2010.01), <i>A61K 35/17</i> (2015.01), <i>C07K 14/705</i> (2006.01), <i>C07K 17/00</i> (2006.01), <i>C12N 5/071</i> (2010.01), <i>C12N 5/0735</i> (2010.01) <i>C12N 5/0789</i> (2010.01)</p> <p>According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC</p>		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) Keywords used across the whole IPC		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic database(s) consulted during the international search (name of database(s) and, where practicable, search terms used) Databases: Questel Orbit, PubMed, SCOPUS, GOOGLE SCHOLAR Keywords: Notch ligand, particle or bead or microbead or dynabead, stem or progenitor cell, T cell		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	WO 2007/027226 A2 (ROY AND TAQVI) 08 March 2007 (08-03-2007) See whole document	1 to 13, 15 to 22, 24 to 27 14 and 23
X Y	TAQVI et al. "Biomaterial-based notch signaling for the differentiation of hematopoietic stem cells into T cells". JOURNAL OF BIOMEDICAL MATERIALS RESEARCH. PART A. December 2006 (12-2006), vol. 79, no. 3, pages 689-697, ISSN: 1549-3296 See whole document	1 to 13, 15 to 22, 24 to 27 14 and 23
X Y	LIU et al. "Identification of Domains for Efficient Notch Signaling Activity in Immobilized Notch Ligand Proteins". JOURNAL OF CELLULAR BIOCHEMISTRY. April 2017 (04-2017), vol. 118, no. 4, pages 785-796, ISSN: 0730-2312 See whole document	1 to 13, 15 to 22, 24 to 27 14 and 23
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> 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 "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 11 April 2019 (11-04-2019)		Date of mailing of the international search report 23 May 2019 (23-05-2019)
Name and mailing address of the ISA/CA Canadian Intellectual Property Office Place du Portage 1, C114 - 1st Floor, Box PCT 50 Victoria Street Gatineau, Quebec K1A 0C9 Facsimile No.: 819-953-2476		Authorized officer Cynthia Bruce-Payne (819) 639-7765

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CA2019/050181

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	REIMANN et al. "Human T-lymphoid progenitors generated in a feeder-cell-free Delta-like-4 culture system promote T-cell reconstitution in NOD/SCID/yc(-/-) mice". STEM CELLS. August 2012 (08-2012), vol. 30, no. 8, pages 1771-1780, ISSN: 1066-5099 See whole document	15 and 16
Y	WO 2017/173551 A1 (ZANDSTRA et al.) 12 October 2017 (12-10-2017) See whole document	14 and 23
Y	SHUKLA et al. "Progenitor T-cell differentiation from hematopoietic stem cells using Delta-like-4 and VCAM-1". NATURE METHODS. May 2017 (05-2017), vol. 14, no. 5, pages 531-538, ISSN: 1548-7091 See whole document	14 and 23
X	WO 03/087159 A2 (BODMER et al.) 23 October 2003 (23-10-2003)	17 to 19
A	DALLAS et al. "Enhanced T-cell reconstitution by hematopoietic progenitors expanded ex vivo using the Notch ligand Delta1". BLOOD. 15 April 2007 (15-04-2007), vol. 109, no. 8, pages 3579-3587, ISSN: 006-4971	
A	GEHRE et al. "A stromal cell free culture system generates mouse pro-T cells that can reconstitute T-cell compartments in vivo". EUROPEAN JOURNAL OF IMMUNOLOGY. March 2015 (03-2015), vol. 45, no. 3, pages 932-942, ISSN: 0014-2980	
A	SIMONS et al. "Generation of adult human T-cell progenitors for immunotherapeutic applications". JOURNAL OF ALLERGY AND CLINICAL IMMUNOLOGY. April 2018 (04-2018) Epub 5 December 2017 (05-12-2017), vol. 141, no. 4, pages 1491-1494, ISSN: 0091-6749	
A	ROH and ROY "Engineering approaches for regeneration of T lymphopoiesis". BIOMATERIALS RESEARCH. 29 June 2016 (29-06-2016), vol., 20, page 20, ISSN: 2055-7124 (Electronic)	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CA2019/050181

Patent Document Cited in Search Report	Publication Date	Patent Family Member(s)	Publication Date
WO2007027226A2	08 March 2007 (08-03-2007)	WO2007027226A2 WO2007027226A3	08 March 2007 (08-03-2007) 26 April 2007 (26-04-2007)
WO2017173551A1	12 October 2017 (12-10-2017)	WO2017173551A1 CA3019845A1 CN109312307A EP3440198A1	12 October 2017 (12-10-2017) 12 October 2017 (12-10-2017) 05 February 2019 (05-02-2019) 13 February 2019 (13-02-2019)
WO03087159A2	23 October 2003 (23-10-2003)	WO03087159A2 WO03087159A3 AU2002327974A1 AU2002339157A1 AU2003226537A1 AU2003226537A8 AU2003255735A1 AU2003267563A1 CA2454937A1 CA2465304A1 CA2497226A1 EP1409005A1 EP1410018A1 EP1446424A2 EP1448599A2 EP1465924A2 EP1492816A2 EP1525221A1 EP1537145A1 EP1585543A1 EP1646400A1 EP1646400B1 US2004253245A1 US2005025751A1 US2005026831A1 US2005059093A1 US2005137130A1 US2005220886A1 US2005261477A1 US2006002924A1 US2006172011A1 US2006204508A1 US2006205823A1 US2010303867A1 WO03011317A1 WO03012441A1 WO03029293A2 WO03029293A3 WO03041735A2 WO03041735A3 WO03042246A2 WO03042246A3 WO2004013179A1 WO2004024764A1 WO2004060262A2 WO2004060262A3 WO2004064863A1 WO2004082710A1 WO2004083372A2 WO2004083372A3 WO2005012349A2 WO2005012349A3	23 October 2003 (23-10-2003) 05 February 2004 (05-02-2004) 14 April 2003 (14-04-2003) 26 May 2003 (26-05-2003) 27 October 2003 (27-10-2003) 27 October 2003 (27-10-2003) 23 February 2004 (23-02-2004) 30 April 2004 (30-04-2004) 13 February 2003 (13-02-2003) 22 May 2003 (22-05-2003) 25 March 2004 (25-03-2004) 21 April 2004 (21-04-2004) 21 April 2004 (21-04-2004) 18 August 2004 (18-08-2004) 25 August 2004 (25-08-2004) 13 October 2004 (13-10-2004) 05 January 2005 (05-01-2005) 27 April 2005 (27-04-2005) 08 June 2005 (08-06-2005) 19 October 2005 (19-10-2005) 19 April 2006 (19-04-2006) 21 July 2010 (21-07-2010) 16 December 2004 (16-12-2004) 03 February 2005 (03-02-2005) 03 February 2005 (03-02-2005) 17 March 2005 (17-03-2005) 23 June 2005 (23-06-2005) 06 October 2005 (06-10-2005) 24 November 2005 (24-11-2005) 05 January 2006 (05-01-2006) 03 August 2006 (03-08-2006) 14 September 2006 (14-09-2006) 14 September 2006 (14-09-2006) 02 December 2010 (02-12-2010) 13 February 2003 (13-02-2003) 13 February 2003 (13-02-2003) 10 April 2003 (10-04-2003) 12 August 2004 (12-08-2004) 22 May 2003 (22-05-2003) 25 September 2003 (25-09-2003) 22 May 2003 (22-05-2003) 25 September 2003 (25-09-2003) 12 February 2004 (12-02-2004) 25 March 2004 (25-03-2004) 22 July 2004 (22-07-2004) 09 December 2004 (09-12-2004) 05 August 2004 (05-08-2004) 30 September 2004 (30-09-2004) 30 September 2004 (30-09-2004) 04 November 2004 (04-11-2004) 10 February 2005 (10-02-2005) 24 March 2005 (24-03-2005)

フロントページの続き

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 5/0789 (2010.01)	C 1 2 N 5/0789	
C 1 2 N 5/074 (2010.01)	C 1 2 N 5/074	
C 0 7 K 14/705 (2006.01)	C 0 7 K 14/705	
C 0 7 K 17/00 (2006.01)	C 0 7 K 17/00	

(81) 指定国・地域 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, 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, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT

(74) 代理人 100142929
弁理士 井上 隆一

(74) 代理人 100148699
弁理士 佐藤 利光

(74) 代理人 100128048
弁理士 新見 浩一

(74) 代理人 100129506
弁理士 小林 智彦

(74) 代理人 100205707
弁理士 小寺 秀紀

(74) 代理人 100114340
弁理士 大関 雅人

(74) 代理人 100114889
弁理士 五十嵐 義弘

(74) 代理人 100121072
弁理士 川本 和弥

(72) 発明者 スニガ - プフルッカー ジュアン カルロス
カナダ エム5エイチ 0エイ6 オンタリオ州 トロント キング ストリート ウエスト 2
24 スイート# 3902

(72) 発明者 モータシャミ マフムード
カナダ エム2エヌ 1ダブリュ2 オンタリオ州 トロント バーネット アベニュー 295

(72) 発明者 トロットマン - グラント アシュトン
カナダ エム1シー 3ジー7 オンタリオ州 トロント バスゲイト ドライブ 110

F ターム(参考) 4B065 AA90X AA92X AA93X AA94X BD39 CA44
4C087 AA01 AA02 AA04 BB37 CA04 DA20 DA32 MA66 NA14 ZB09
ZB22 ZB26
4H045 AA10 AA20 AA30 BA60 CA40 DA50 EA20

【要約の続き】

