

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5994144号  
(P5994144)

(45) 発行日 平成28年9月21日(2016.9.21)

(24) 登録日 平成28年9月2日(2016.9.2)

(51) Int.Cl.

F 1

C 12 N 5/0783 (2010.01)  
C 12 M 1/00 (2006.01)  
C 12 M 3/00 (2006.01)  
C 07 K 17/00 (2006.01)

C 12 N 5/0783  
C 12 M 1/00  
C 12 M 3/00  
C 07 K 17/00

C

Z

請求項の数 4 (全 7 頁)

(21) 出願番号 特願2013-209749 (P2013-209749)  
(22) 出願日 平成25年10月6日 (2013.10.6)  
(65) 公開番号 特開2015-73442 (P2015-73442A)  
(43) 公開日 平成27年4月20日 (2015.4.20)  
審査請求日 平成28年3月15日 (2016.3.15)

早期審査対象出願

(73) 特許権者 504246568  
株式会社セレックス  
東京都品川区大崎1丁目6番1号  
(74) 代理人 100088904  
弁理士 庄司 隆  
(74) 代理人 100124453  
弁理士 資延 由利子  
(74) 代理人 100135208  
弁理士 大杉 卓也  
(74) 代理人 100152319  
弁理士 曽我 亜紀  
(72) 発明者 益山 純一  
栃木県小山市東城南4-15-8  
審査官 田中 晴絵

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 NK細胞培養容器及びNK細胞培養方法

## (57) 【特許請求の範囲】

## 【請求項1】

単核球を含む生体試料を、抗CD3アゴニスト抗体及び抗CD52アゴニスト抗体が結合したビーズを収納する生体試料と接する面がシクロオレフィンポリマーで形成された培養容器に添加して培養することを含むNK細胞培養方法。

## 【請求項2】

NK細胞を培養するためのNK細胞培養容器であって、  
生体試料と接する面がシクロオレフィンポリマーで形成されており、並びに、  
抗CD3アゴニスト抗体及び抗CD52アゴニスト抗体が該生体試料と接する面にコーティングされていることを特徴とするNK細胞培養容器。

10

## 【請求項3】

単核球を含む生体試料を、生体試料と接する面がシクロオレフィンポリマーで形成されており並びに抗CD3アゴニスト抗体及び抗CD52アゴニスト抗体が該生体試料と接する面にコーティングされている培養容器に添加して培養することを含むNK細胞培養方法。

## 【請求項4】

NK細胞を培養するためのNK細胞培養容器であって、  
生体試料と接する面がシクロオレフィンポリマーで形成されており、並びに、  
抗CD3アゴニスト抗体及び抗CD52アゴニスト抗体が結合したビーズを含むことを特徴とするNK細胞培養容器。

## 【発明の詳細な説明】

20

**【技術分野】****【0001】**

本発明は、NK細胞培養容器及びNK細胞培養方法に関する。

**【背景技術】****【0002】**

自己末梢血リンパ球を用いた癌への免疫細胞療法には、主に増殖する細胞によって、Tリンパ球療法、Tリンパ球療法、NK細胞療法、NKTリンパ球療法等に分類される。

通常、リンパ球は、抗体、サイトカイン、ある種の刺激物質を用いて最初に強く刺激することでリンパ球は活性化し分化の方向を決めるとともに増殖能を獲得する。活性化リンパ球は、リンパ球増殖因子（インターリューキン2など）の存在下で増殖を開始し、特定のリンパ球亜群の優位な増殖を継続する。

**【0003】**

Tリンパ球では、抗CD3抗体が最初の刺激に使用され、以後IL-2の存在下でTリンパ球を持続的に増殖させ、通常2週間の培養後に使用される。当初、抗CD3抗体によるリンパ球刺激は、プラスチック製培養フラスコに抗体を固相化させて使用していたが煩雑なため微生物汚染の可能性があった。

最近は、密封ポリエチレン製バッグに抗CD3抗体を固相化させたものが市販され、フラスコと同等かそれ以上のTリンパ球の刺激と増殖を誘導でき、またready to useで提供されるため、品質・安全性に優れたバッグとして汎用されるようになっている。

**【0004】**

抗CD3抗体と抗CD52抗体の2つの抗体で末梢血リンパ球を刺激することで、Tリンパ球の一方的な増殖を抑え、NK細胞を優位に誘導する方法が開発された。この方法も、Tリンパ球のように、ポリエチレン樹脂製バッグに抗体を固相化させて、NK細胞を誘導することができる。

**【先行技術文献】****【特許文献】****【0005】**

【特許文献1】特開2005-058103

**【発明の概要】****【発明が解決しようとする課題】****【0006】**

抗CD3抗体と抗CD52抗体の2つの抗体で末梢血リンパ球を刺激することで、NK細胞を優位に誘導する方法は、Tリンパ球のように、ポリエチレン樹脂製バッグに抗体を固相化させて、NK細胞を誘導することができる。しかしながら、多数の症例で検討すると、NK細胞の誘導が低い症例が少なからず存在する。症例によってポリエチレン樹脂製バッグは微生物汚染に対し優れた密封性を有するもののNK細胞誘導が低い場合があり、この低NK細胞誘導を高める培養容器開発の必要性がある。

一方、従来、抗CD3抗体と抗CD52抗体による末梢血リンパ球の刺激はプラスチック培養フラスコが使用されてきたが、この場合もNK細胞誘導能が低い症例が存在する。上述したフラスコ培養の問題点のほか、バッグ培養では末梢血リンパ球を入れる前にバッグ内の抗体洗浄の工程が必要なため、培養法がより簡便で、かつNK細胞誘導効率が高い方法の開発が必要である。

**【課題を解決するための手段】****【0007】**

本発明者等は、上記課題を解決すべく鋭意検討した結果、単核球を含む生体試料を、生体試料と接する面の一部又は全部がシクロオレフィンポリマーで形成されており、並びに、抗CD3抗体及び抗CD52抗体が該生体試料と接する面の一部又は全部にコーティングされていることを特徴とする細胞培養容器で培養することにより、高いNK細胞増殖効率（高いNK細胞誘導効率）を得ることができるることを確認して、本発明を完成了。

**【0008】**

10

20

30

40

50

すなわち、本発明は以下からなる。

1. NK細胞を培養するためのNK細胞培養容器であって、

生体試料と接する面の一部又は全部がシクロオレフィンポリマーで形成されており、並びに、

抗CD3抗体及び抗CD52抗体が該生体試料と接する面の一部又は全部にコーティングされていることを特徴とするNK細胞培養容器。

2. 単核球を含む生体試料を、生体試料と接する面の一部又は全部がシクロオレフィンポリマーで形成されており並びに抗CD3抗体及び抗CD52抗体が該生体試料と接する面の一部又は全部にコーティングされている培養容器に添加して培養することを含むNK細胞培養方法。 10

3. 単核球を含む生体試料を、抗CD3抗体及び抗CD52抗体が結合したビーズを収納する培養容器に添加して培養することを含むNK細胞培養方法。

4. 単核球を含む生体試料を、抗CD3抗体及び抗CD52抗体が結合したビーズを収納する生体試料と接する面の一部又は全部がシクロオレフィンポリマーで形成された培養容器に添加して培養することを含むNK細胞培養方法。

#### 【発明の効果】

#### 【0009】

本発明のNK細胞培養容器及び抗体結合ビーズを用いたNK細胞培養方法は、NK細胞培養効率が高い。

#### 【図面の簡単な説明】 20

#### 【0010】

【図1】ポリエチレン培養パック及びシクロオレフィンポリマー培養パックを用いたNK細胞培養の比較結果

【図2】抗体結合磁気ビーズと抗体結合プラスチック培養プレートのNK細胞培養の比較結果

#### 【発明を実施するための形態】

#### 【0011】

本発明は、生体試料と接する面の一部又は全部がシクロオレフィンポリマーで形成されており並びに抗CD3抗体及び抗CD52抗体が該生体試料と接する面の一部又は全部にコーティングされていることを特徴とするNK細胞培養容器、並びに、該NK細胞培養容器を用いてのNK細胞培養方法である。以下に、本発明のNK細胞培養容器及びNK細胞培養方法を詳細に説明する。 30

#### 【0012】

#### (NK細胞)

本発明で使用するNK細胞は、自体公知の方法で取得したいかなるNK細胞も利用することができる。

なお、NK細胞の提供者（ドナー）とNK細胞の被提供者（レシーピエント）は、同種であることが好ましい。例えば、ドナーがヒトの場合には、レシーピエントはヒトである。

また、NK細胞の提供者とNK細胞の被提供者は、同一個体であることがより好ましい。例えば、ドナーが提供者Xの場合には、レシーピエントは提供者Xである。 40

#### 【0013】

#### (NK細胞培養)

本発明のNK細胞培養とは、NK細胞の分化、刺激、変異、誘導、維持、増殖、活性化等を意味するが、特に限定されない。

#### 【0014】

#### (NK細胞の取得方法)

本発明で使用するNK細胞は、自体公知の方法で取得することができる（参照：特許第5016732号）。NK細胞は、末梢血、リンパ節、胸腺、骨髄、腫瘍、胸水、腹水又は臍帯血から採取された単核球、より好ましくは末梢血単核球から誘導して取得する。

例えば、末梢血から比重遠心法により、NK細胞を含む単核球を回収することができる。 50

## 【0015】

## (NK細胞の活性化方法)

NK細胞活性化方法では、Tリンパ球及びNK細胞を含む単核球にCD3アゴニスト（特に、抗CD3抗体）及びCD52アゴニスト（特に、抗CD52抗体）による刺激を与えることにより、NK細胞をTリンパ球よりも活性化させることができ、NK細胞をK562等と混合させることなく安全に且つ簡単に増殖することができる。

特に、Tリンパ球及びNK細胞を含む単核球に抗CD3抗体及び抗CD52抗体による刺激を、IL-2存在下で行うことにより、IL-2単独刺激に比べ、NK細胞をTリンパ球よりも増殖させることができる。また、NK細胞活性化方法を用いればNK細胞を1000倍以上にも増殖させることができる（参照：特開2005-124568）。 10

## 【0016】

## (生体試料)

本発明で使用する生体試料は、抗CD3抗体及び抗CD52抗体による刺激により、NK細胞を培養することができれば特に限定されないが、末梢血、リンパ節、胸腺、骨髓、腫瘍、胸水、腹水又は臍帯血から採取された単核球、より好ましくは末梢血単核球を列挙することができる。

## 【0017】

## (シクロオレフィンポリマー)

本発明で使用するシクロオレフィンポリマー（「シクロオレフィン」、「COP」と称する場合がある）は、好ましくは、COPを主成分（50質量%以上、60質量%以上、70質量%以上、80質量%以上、90質量%以上）とする組成物からなる。なお、COPとは、環状オレフィン構造を有するポリマーを意味する。 20

さらに、シクロオレフィンポリマーは、市販されており、例えば、ZEONEX（登録商標）（ゼオネックス：日本ゼオン株式会社）等を使用することができる。

## 【0018】

## (抗CD3抗体及び抗CD52抗体)

本発明で使用する抗CD3抗体及び抗CD52抗体は、生体試料と接触することにより、NK細胞を培養することができれば特に限定されない。また、抗CD3抗体及び抗CD52抗体のコーティングとは、シクロオレフィンポリマー又は培養容器の生体試料の接触面になんらかの力（共有結合、水素結合、静電気的相互作用、疎水的相互作用等）で結合されている状態を意味する。 30

## 【0019】

## (ビーズ)

本発明で使用するビーズは、抗CD3抗体及び抗CD52抗体を結合できれば特に限定されない。特に、好ましいビーズは、回収が容易できることを考慮すれば、磁気ビーズである。

## 【0020】

## (NK細胞培養容器)

本発明のNK細胞培養容器は、少なくも、生体試料と接する面の一部又は全部がシクロオレフィンポリマーで形成されており、並びに、抗CD3抗体及び抗CD52抗体が該生体試料と接する面の一部又は全部にコーティングされている。 40

なお、生体試料、培養液等を収納する容器本体は、いかなる形状でも良いが、輸送、収納等を考慮すると、バック形状が好ましい。なお、容器本体とは、生体試料、培養液等を収納する部分を意味するが、容器本体自体が培養容器となることができる。

## 【0021】

## (NK細胞培養方法)

本発明のNK細胞培養方法は、以下の方法を例示することができる。

(1) 単核球を含む生体試料を、生体試料と接する面の一部又は全部がシクロオレフィンポリマーで形成されており並びに抗CD3抗体及び抗CD52抗体が該生体試料と接する面の一部又は全部にコーティングされている培養容器に添加して培養する方法。

(2) 単核球を含む生体試料を、抗CD3抗体及び抗CD52抗体が結合したビーズを収納す 50

る培養容器に添加して培養する方法。

(3) 単核球を含む生体試料を、抗CD3抗体及び抗CD52抗体が結合したビーズを収納する生体試料と接する面の一部又は全部がシクロオレフィンポリマーで形成された培養容器に添加して培養する方法。

#### 【0022】

以下に示す実施例によって本発明を具体的に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

#### 【実施例1】

#### 【0023】

(シクロオレフィンポリマー性バッグを用いたNK細胞培養)

10

シクロオレフィンポリマー性バッグを用いたNK細胞培養を、ポリエチレン樹脂性バッグを用いたNK細胞培養と比較した。詳細は、以下の通りである。

#### 【0024】

(方法)

抗CD3抗体及び抗CD52抗体を、それぞれ、ポリエチレン樹脂性バッグ {タゼッタ(未処理バッグ)}、コーディンバイオ社製)及びシクロオレフィンポリマー性バッグ(フコク社製)に、固相化した。

具体的には、抗CD3抗体100ng/ml(OKT3; ヤンセンファーマ社製)及び抗CD52抗体20μg/ml(MabCampath; サノフィ社製)をPBS(コーディンバイオ社製)に添加して、抗体溶液を調整した。

20

次に、該抗体溶液9mlを90cm<sup>2</sup>の面積に調整した両バッグにそれぞれ添加した。

該添加後24時間4~8に静置後、両バッグを20mlのPBSで2回洗浄した。

該洗浄後、健常人末梢血単核球(PBMC)4×10<sup>7</sup>を含む培養液(Cellex NKGM-1; コージンバイオ社製)40ml、さらに自己血漿4ml、IL-2 500U/mlを両バックに加えて、5%CO<sub>2</sub>、37で培養した。

さらに、両バッグに適時に適量の培養液を追加し、多数のコロニーが観察できた時点で、1LのCellex NKGM-1(コーディンバイオ社製)を含むバッグに移し、適量の培養液とIL-2を追加しながら、さらに10日間培養した。

該培養後、増殖リンパ球を3×10<sup>5</sup>個採取し、これを蛍光標識抗体(抗CD3抗体と抗CD56抗体)で染色し、フローサイトメータでNK細胞(CD3-CD56+)の比率を検出し、比較した。

30

#### 【0025】

(結果)

フローサイトメータでNK細胞(CD3-CD56+)の比率の検出結果を図1に示す。図1に記載の結果から明らかのように、シクロオレフィン樹脂性バッグを用いたNK細胞培養は、ポリエチレンポリマー性バッグを用いたNK細胞培養と比較して、約5倍のNK細胞培養効果を得られた。

#### 【実施例2】

#### 【0026】

(抗体結合磁気ビーズを用いたNK細胞培養)

抗体結合磁気ビーズを用いたNK細胞培養を、抗体結合プラスチック培養プレートを用いたNK細胞培養と比較した。詳細は、以下の通りである。

40

#### 【0027】

(方法)

磁気ビーズは、Dynabeads Tosylactivated M-450(Dynal社)を使用した。具体的には、ビーズ100μl(4×10<sup>7</sup> beads)をPBSで2回洗浄後、PBS 1mlに浮遊させ、さらに抗CD3抗体100ng/ml(OKT3; ヤンセンファーマ社製)及び抗CD52抗体20μg/ml(MabCampath; サノフィ社製)を添加し、室温で24時間回転させ搅拌した。搅拌後、抗CD3抗体及び抗CD52抗体結合磁気ビーズをPBSで2回洗浄し、0.1%ウシ血清アルブミン添加PBS 200μlに浮遊させて、抗CD3抗体及び抗CD52抗体結合磁気ビーズを含む抗体液を作成した。

次に、コトロールとして、24穴プラスチック培養プレート(ベクトン・ディキンソン社)

50

製、カタログ番号3047)の各穴に、磁気ビーズを含まない上記濃度の抗体液0.4mlを加え、24時間4~8で静置し、使用直前にPBSで2回洗浄し、抗体結合プレートを用意した。

次に、比較的NK細胞増殖能の低い2名の健常人由来のPBMC  $1 \times 10^6$ 個を含む自己血漿10%、IL-2 500U/mlを含む培養液(Cellex NKGM-1; コージンバイオ社製)1mlを、抗体未処理24穴プレート(本発明)及び抗体結合24穴プレート(コントロール)の各穴に添加した。抗体未処理プレートに添加したPBMCに対し、抗体結合磁気ビーズを $2.5 \mu l (1 \times 10^6$  beads)を添加した。添加後、プレートを5%CO<sub>2</sub>、37で培養した。

3~4日目にコロニーが多数できたところで、その1/10液量を新しいプレートに移し、これに1mlの培養液とIL-2 200U/ml添加した。

以後10日間、適宜分割し、培養液、IL-2を追加した。

10

培養14日目に、抗体結合磁気ビーズ(本発明)及び抗体結合プレート(コントロール)で刺激した増殖リンパ球をそれぞれ $3 \times 10^5$ 個採取し、これを蛍光標識抗体(抗CD3抗体と抗CD56抗体)で染色し、フローサイトメータでNK細胞(CD3-CD56+)の比率を検出、比較した。

#### 【0028】

##### (結果)

フローサイトメータでNK細胞(CD3-CD56+)の比率の検出結果を図2に示す。図2に記載の結果から明らかなように、抗体結合磁気ビーズを用いたNK細胞培養は、抗体結合プラスチックプレートで刺激させたNK細胞培養と比較して、約2倍のNK細胞培養効果を得られた。

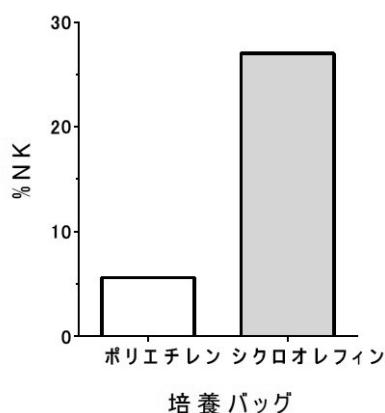
20

#### 【産業上の利用可能性】

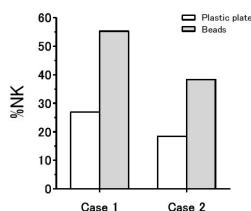
#### 【0029】

本発明では、高効率のNK細胞培養容器及びNK細胞培養方法を提供することができる。

【図1】



【図2】



---

フロントページの続き

(56)参考文献 特開2013-143970(JP,A)  
特開2011-001315(JP,A)  
特開2006-340698(JP,A)  
特開2008-048653(JP,A)  
特開2009-106160(JP,A)  
特表2004-538331(JP,A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 5/0783  
C07K 17/00  
C12M 1/00  
C12M 3/00  
Capplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)  
JSTPplus/JMEDplus/JST7580(JDreamIII)