

(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
2020年12月17日(17.12.2020)



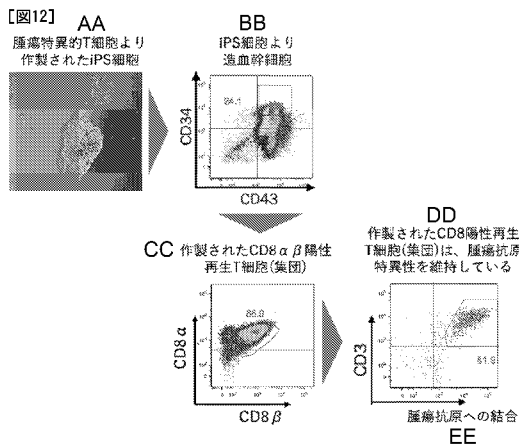
(10) 国際公開番号

WO 2020/251046 A1

- (51) 国際特許分類:
A61K 39/00 (2006.01) A61K 35/17 (2015.01)
A61P 35/00 (2006.01) A61K 35/545 (2015.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2020/023308
- (22) 国際出願日: 2020年6月12日(12.06.2020)
- (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 2019-111293 2019年6月14日(14.06.2019) JP
- (71) 出願人: サイアス株式会社 (THYAS CO. LTD.) [JP/JP]; 〒6068304 京都府京都市左京区吉田下阿達町4-6-29 Kyoto (JP). 国立大学法人京都大学 (KYOTO UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒6068501 京都府京都市左京区吉田本町3-6番地1 Kyoto (JP).
- (72) 発明者: 安井 裕 (YASUI Yutaka); 〒6048381 京都府京都市中京区西ノ京職司町1-8-1 Kyoto (JP). 等 泰道 (HITOSHI Yasumichi); 〒6068304 京都府京都市左京区吉田下阿達町4-6-29 サイアス株式会社内 Kyoto (JP). 上野 博之 (UENO Hiroyuki); 〒6068304 京都府京都市左京区吉田下阿達町4-6-29 サイアス株式会社内 Kyoto (JP). 金子 新 (KANEKO Shin); 〒6068501 京都府京都市左京区吉田本町3-6番地1 Kyoto (JP).
- (74) 代理人: 特許業務法人謝国際特許商標事務所 (SHA PATENT AND TRADEMARK FIRM); 〒5300047 大阪府大阪市北区西天満4-6-3-503 Osaka (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, 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, 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, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, 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,

(54) Title: MEDICINAL COMPOSITION

(54) 発明の名称: 医薬組成物



- AA iPS cell produced from tumor-specific T cell
 BB Hematopoietic stem cells from iPS cells
 CC Produced CD8αβ-positive regenerated T cells (population)
 DD Produced CD8-positive regenerated T cells (population) maintain tumor antigen-specificity
 EE Binding to tumor antigen

(57) Abstract: The present invention provides a medicinal composition containing a T cell population that exhibits an excellent antigen specificity and has genetic diversity, and a method for preventing or treating cancer using the medicinal composition.

(57) 要約: 本発明は、抗原に対する特異性に優れ、かつ遺伝的多様性を有するT細胞集団を含有する医薬組成物および該医薬組成物を使用するがんの予防または治療方法を提供する。



WO 2020/251046 A1

LT, LU, LV, MC, 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：

- 一 国際調査報告（条約第21条(3)）

明 細 書

発明の名称： 医薬組成物

技術分野

[0001] 本発明は、抗原に対する特異性に優れ、かつ遺伝的多様性を有するT細胞集団を含有する医薬組成物および該医薬組成物を使用するがんの予防または治療方法に関する。

背景技術

[0002] T細胞は、細菌もしくはウイルス等の外来病原体またはがん細胞等の異常な細胞に対する免疫応答において中心的な役割を果たしている。このため、T細胞の機能低下は、病原体感染やがんの原因となると考えられている。T細胞の機能低下に起因する疾患に対して、T細胞の補充や再生は、疾患の病態改善や治療に極めて有効な手段となり得る。

[0003] ヒトおよびマウスを用いた研究において、感染症やがんに対するT細胞補充療法を行う際、遺伝的多様性を有するT細胞集団を用いる方法により、目的とする組織や抗原に対する多角的な免疫反応を誘導することができる。また、この方法は、抗原の発現低下や変異による免疫逃避（イミュンエスケープ）の影響を受けにくいいため、高い治療効果が得られることが知られている。

[0004] さらに、iPS細胞等の多能性幹細胞を経由して増幅したT細胞を用いたT細胞補充療法が提案されている。iPS細胞を製造するための原料として、目的の抗原に対して特異的なT細胞を使用することにより、元のT細胞と同じ抗原特異性を示す再生T細胞を製造することが可能である（非特許文献1；本文献の内容は、その全体が参照により本明細書に援用される。）。この方法によれば、樹立されたiPS細胞は、単一細胞由来の細胞集団（コロニー）単位で初期化される。この方法により、細胞性状が安定しており、目的の細胞・組織への分化効率が良く、変異や異常のないことが遺伝子解析等により確認されたiPS細胞株を利用することが可能になる。ここで、クローンの品質や患者に対する適合性を確認するためには、クローンを1個ずつ検査する必要がある、こ

のためクローン化は重要な工程と考えられている。

[0005] 従来技術として、T細胞へのT細胞受容体 (T cell receptor : TCR) やキメラ抗原受容体 (chimeric antigen receptor : CAR) の遺伝子を導入した遺伝子改変T細胞が報告されているが、導入される前記受容体の遺伝子配列は単一である (特許文献1~3)。また、末梢血T細胞から製造したiPS細胞を再分化させ、元のT細胞と同一の抗原特異性を有するT細胞を製造する方法が報告されているが、遺伝的多様性の付与については言及されていない (特許文献4)。

先行技術文献

特許文献

- [0006] 特許文献1 : 特表2017-534261
特許文献2 : 特表2017-530694
特許文献3 : 特表2018-514204
特許文献4 : 特開2017-158559

非特許文献

- [0007] 非特許文献1 : Nishimura T, et al. Generation of rejuvenated antigen-specific T cells by reprogramming to pluripotency and redifferentiation . Cell Stem Cell. 2013;12:114-126.

発明の概要

発明が解決しようとする課題

- [0008] iPS再生T細胞療法は、患者個人のT細胞からiPS細胞 (T-iPS細胞) を作製した後、このT-iPS細胞を用いてT細胞を再生し、この再生T細胞を患者の治療に利用する方法である。
- [0009] 通常、iPS細胞株を利用する方法では、クローン化を行うが、クローン化することとは、選択したクローン以外を除くことを意味している。従って、T細胞より樹立されたiPS細胞をクローン化した場合、元のT細胞集団に存在する遺伝的多様性は完全に失われてしまうことになる。これは、単一の抗原

エピトープを対象とした免疫反応しか利用できないということを意味する。しかしながら、単一の抗原エピトープを対象とする免疫反応では、抗原分子の発現低下や変異による免疫逃避（イミュンエスケープ）の影響を受けやすく、T細胞補充療法において高い治療効果を得にくいのではないかという問題が生じる。一方、従来から行われているT細胞補充療法では、遺伝的多様性を有するT細胞集団を用いることができるが、体外でのT細胞集団の増幅によりT細胞が疲弊し、抗原に対する免疫反応が低下するという問題がある。

[0010] 臨床現場では、上記の問題を克服するT細胞補充療法が望まれており、抗原に対する免疫反応が維持され、かつ遺伝的多様性を有するT細胞集団の提供および該T細胞集団を用いた有効ながんの予防または治療方法の提供が要望されている。

[0011] 本発明は、抗原に対する特異性に優れ、かつ遺伝的多様性を有するT細胞集団を含有する医薬組成物および該医薬組成物を用いるがんの予防または治療方法を提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0012] 本発明の目的は、以下の発明により達成される。

[1]

T細胞を有効成分として含む医薬組成物であって、
該T細胞が、

- (i) がんワクチン抗原に対する特異性を有すること、
- (ii) CD3およびCD45が陽性であること、および、
- (iii) IFN- γ （インターフェロンガンマ）を産生すること、

を特徴とする、医薬組成物。

[2]

前記がんワクチン抗原が、GPC3、WT1、XAGE 1、LMP2およびネオアンチゲンからなる群より選択される1種類以上である、[1]に記載の医薬組成物。

[3]

前記がんワクチン抗原が、GPC3である、[1]に記載の医薬組成物。

〔4〕

前記T細胞が、 $\alpha\beta$ T細胞、 $\gamma\delta$ T細胞、ヘルパーT細胞、細胞傷害性T細胞、ナチュラルキラー（NK）T細胞またはこれらの混合物である、〔1〕に記載の医薬組成物。

〔5〕

前記T細胞が、細胞傷害性T細胞である、〔1〕に記載の医薬組成物。

〔6〕

前記細胞傷害性T細胞が、がんワクチンを接種したがん患者からT細胞を採取し、該がんワクチンに含まれるがんワクチン抗原に対する細胞傷害性T細胞を画分し、画分した細胞傷害性T細胞を増幅して得られたT細胞である、〔5〕に記載の医薬組成物。

〔7〕

前記T細胞より、CD137発現T細胞を選択する工程、IFN- γ 産生T細胞を選択する工程、および抗原ペプチド-HLA複合体が結合するT細胞を選択する工程からなる群より選ばれる1以上の工程を用いて、細胞傷害性T細胞を画分することを特徴とする、〔6〕に記載の医薬組成物。

〔8〕

IL-2、IL-7、IL-15およびIL-21からなる群から選択される1種以上のサイトカインの存在下、細胞傷害性T細胞を増幅することを特徴とする、〔6〕に記載の医薬組成物。

〔9〕

前記細胞傷害性T細胞が、iPS細胞より細胞傷害性T細胞への再分化を誘導して得られた再生T細胞集団である、〔5〕に記載の医薬組成物。

〔10〕

前記iPS細胞が、GPC3、WT1、XAGE 1、LMP2およびネオアンチゲンからなる群より選択される1種類以上のがんワクチン抗原をT細胞と接触させ、該がんワクチン抗原に対する特異性を有するT細胞から作製される、〔9〕に記載の医薬組成物。

[1 1]

前記iPS細胞が、がんワクチン抗原GPC3をT細胞と接触させ、GPC3に対する特異性を有するT細胞から作製される、〔9〕に記載の医薬組成物。

[1 2]

前記T細胞が、がん患者または健常者の末梢血を採取した、〔10〕または〔11〕に記載の医薬組成物。

[1 3]

前記T細胞が、がん患者の末梢血を採取した、〔10〕または〔11〕に記載の医薬組成物。

[1 4]

前記再分化は、 $CD8\alpha$ $CD8\beta$ 両陽性のT細胞をフローサイトメーターを用いて、分画することを含む、〔9〕に記載の医薬組成物。

[1 5]

さらに細分化したT細胞をフィトヘマグルチニン (PHA) および自家または他家のフィーダー細胞とともに培養し、成熟培養を行うことを含む、〔9〕に記載の医薬組成物。

[1 6]

前記T細胞は、 $CD8\alpha/CD8\beta$ ダブルポジティブ成熟T細胞である、〔1〕～〔15〕のいずれかに記載の医薬組成物。

[1 7]

前記T細胞のCD3の発現率は、70%以上である、〔1〕～〔16〕のいずれかに記載の医薬組成物。

[1 8]

前記T細胞がIFN- γ /IL-2産生能を有する、〔1〕～〔17〕のいずれかに記載の医薬組成物。

[1 9]

前記T細胞の生存率は、60%以上である、〔1〕～〔18〕のいずれかに記載の医薬組成物。

〔20〕

さらに薬学的に許容される添加剤を含む、〔1〕～〔19〕のいずれかに記載の医薬組成物。

〔21〕

前記添加剤が、細胞培養液、生理食塩水および緩衝液からなる群より選択される1種類以上である、〔20〕に記載の医薬組成物。

〔22〕

がんワクチンと併用することを特徴とする、〔1〕～〔21〕のいずれかに記載の医薬組成物。

〔23〕

がんワクチンと同時に投与されることを特徴とする、〔1〕～〔21〕のいずれかに記載の医薬組成物。

〔24〕

がんワクチンの投与前または投与後に投与されることを特徴とする、〔1〕～〔21〕のいずれかに記載の医薬組成物。

〔25〕

前記がんワクチンに含まれるがんワクチン抗原が、GPC3、WT1、XAGE 1、LM P2およびネオアンチゲンからなる群より選択される1種類以上である、〔22〕～〔24〕のいずれかに記載の医薬組成物。

〔26〕

前記がんワクチンに含まれるがんワクチン抗原が、GPC3である、〔22〕～〔24〕のいずれかに記載の医薬組成物。

〔27〕

一回投与分の量として、 1×10^6 個以上のT細胞を有する、〔1〕～〔26〕のいずれか1項に記載の医薬組成物。

〔28〕

〔1〕～〔27〕のいずれか1項に記載の医薬組成物を有する抗がん剤。

〔29〕

がんの予防または治療のための、〔1〕～〔27〕のいずれか1項に記載の医薬組成物。

〔30〕

がんが、卵巣がん、肝芽腫、肝細胞がん、胃がん、食道がん、膵臓がん、腎細胞がん、乳がん、悪性黒色腫、非小細胞肺癌、子宮頸がん、膠芽腫、前立腺がん、神経芽腫瘍、慢性リンパ性白血病、甲状腺乳頭がん、大腸がん、およびB細胞非ホジキンリンパ腫からなる群より選択される、〔29〕に記載の医薬組成物。

〔31〕

がん患者に対して、〔30〕に記載の医薬組成物の有効量を投与することを特徴とする、該がん患者におけるがんの予防または治療方法。

〔32〕

前記投与が単回投与または複数回投与である、〔31〕に記載のがんの予防または治療方法。

発明の効果

[0013] 本発明により、がんワクチン抗原に対する特異性に優れ、かつ遺伝的多様性を有するT細胞を含有する医薬組成物を提供することができる。本発明にかかるT細胞を有効成分として含む医薬組成物を、がんワクチンと併用することにより、がんに対するT細胞補充療法として、優れたがんの予防または治療方法を提供することが可能となる。

図面の簡単な説明

[0014] [図1]肺がん患者の摘出腫瘍から分離されたT細胞集団のうち、それぞれのTCRのV β 鎖を有するT細胞の割合を示す図である。本図中のV β 1～V β 23は、分離されたT細胞集団がTCRの遺伝的多様性を有するT細胞集団であることを示す。

[図2]iPS細胞を介して製造された再生T細胞集団のうち、それぞれのTCRのV β 鎖を有するT細胞の割合を示す図である。本図中のV β 1～V β 23は、再生されたT細胞集団も遺伝的多様性を有するT細胞集団であることを示す。

[図3]GPC3ペプチドを用いて増幅培養し、活性化マーカーを発現させたT細胞

集団をフローサイトメーターにより解析した結果を示す図である。CD4およびCD14のいずれも発現していない分画（左図）にゲーティングをし、CD8およびCD137で展開した（右図）。本図より、GPC3に指向性を有するCD8/CD137ダブルポジティブ細胞が高い割合で増幅されていることが示される。

[図4]GPC3ペプチドを用いて増幅培養し、活性化マーカーを発現させたT細胞集団について、CD8およびCD137の両方を発現している細胞集団を濃縮し、図3と同様にして、フローサイトメーターにより解析した結果を示す図である。CD8ネガティブセレクションにより、図3と比較すると、CD4を発現している細胞が除去されていることが示される（左図）。また、CD137ポジティブセレクションにより、CD137を発現していない細胞も除去されていることが示される（右図）。従って、GPC3に指向性を有するCD8/CD137ダブルポジティブ細胞が高い割合で濃縮されていることが示される。

[図5]GPC3に指向性を持つT細胞集団から初期化されたiPS細胞を、CD8陽性T細胞へと再分化誘導を行った結果を示す図である。再分化誘導を行った細胞に対し、抗体(CD3-APC/Cy7、CD4-BV421、CD8a-PerCP/Cy5.5、CD8b-PE、TCRab-FITC、CD45-BV510、およびGPC3-HLA複合体(Dextramer)-APC)で染色し、フローサイトメーター(BD FACSAria (登録商標) II)を用いて解析した。再分化したCD8陽性T細胞はCD8aおよびCD8b両陽性であり、GPC3Dextramerに高い割合で結合することが示される。

[図6]肺がん患者の末梢血単核球にWT1オーバーラップペプチドを加えて増幅培養し、活性化マーカーを発現させたT細胞集団を、図3と同様にして解析を行った結果を示す図である。本図より、WT1に指向性を有するCD8/CD137ダブルポジティブ細胞が高い割合で増幅されていることが示される。

[図7]WT1 オーバーラップペプチドを用いて増幅培養し、活性化マーカーを発現させたT細胞集団に対し、図4と同様にして解析を行った結果を示す図である。本図より、WT1に指向性を有するCD8/CD137ダブルポジティブ細胞が高い割合で濃縮されていることが示される。

[図8]非がん患者（健常人）の末梢血単核球に対して、EBV LMP2Aオーバーラ

ップペプチドを用いて増幅培養し、活性化マーカーを発現させたT細胞集団を、図3と同様にして解析を行った結果を示す図である。本図より、EBV LMP2Aに指向性を有するCD8/CD137ダブルポジティブ細胞が高い割合で増幅されていることが示される。

[図9]EBV LMP2A オーバーラップペプチドを用いて増幅培養し、活性化マーカーを発現させたT細胞集団に対し、図4と同様にして解析を行った結果を示す図である。本図より、EBV LMP2Aに指向性を有するCD8/CD137ダブルポジティブ細胞が高い割合で濃縮されていることが示される。

[図10]GPC3に指向性を持つT細胞集団から初期化されたiPS細胞を、CD8シングルポジティブT細胞へ再分化誘導することにより得た再生T細胞集団が、GPC3ペプチドを発現した標的細胞に対して特異的な細胞傷害活性を有することを示す図である。(A)再生T細胞集団をフローサイトメトリー解析した結果を示す図である。(B)再生T細胞集団の細胞傷害活性を、GPC3ペプチドを発現した、または発現しない標的細胞で比較した結果を示す図である。

[図11]再生T細胞製品の製造プロセスを示す図である。

[図12]腫瘍抗原反応性T細胞(腫瘍特異的T細胞)由来のiPS細胞からCD8 α /CD8 β 両陽性の再生T細胞の製造工程を示す図である。

[図13]本発明の細胞製品の規格の目標値の設定を示す図である。

[図14]GPC3ペプチドを用いて増幅培養されたT細胞集団(左)および、iPS細胞への初期化を経て再分化誘導されたCD8陽性細胞(右)における細胞疲弊マーカーの発現解析した結果を示す図である。それぞれの細胞に対し、抗体(TIGIT-Pacific Blue、PD-1-APC/Cy7)で染色し、フローサイトメーター(BD FACSAria(登録商標)II)を用いて解析した。iPS細胞への初期化を介することで、細胞疲弊マーカーの発現割合が低下していることが示される。

[図15]本発明の再生T細胞がIFN- γ /IL-2産生能を有する結果を示す図である。刺激あり又は刺激なしの再生T細胞の表面抗原を抗体(CD45-BV510、CD8 α -PerCP/Cy5.5、CD8 β -APC、CD19-FITC)で染色し、固定、細胞膜透過処理した。透過処理後、サイトカイン抗体(IFN- γ -APC/Cy7、IL-2-PE)で染色し、フ

ローサイトメーター（BD FACSAria（登録商標）II）を用いて、サイトカインを産生した再生T細胞の割合を解析した。刺激を受けた再生T細胞は高い割合でIFN- γ /IL-2を産生することが示唆される。

発明を実施するための形態

- [0015] 「がんワクチン」とは、がんもしくは腫瘍特異的タンパク質またはペプチドであって、がんまたは腫瘍関連抗原に由来し、がんまたは腫瘍特異的免疫応答を誘導するための「がんワクチン抗原」を含む組成物である。がんもしくは腫瘍に特異的な抗原であるがん組織またはタンパク質もしくはペプチドで抗原パルスされた樹状細胞等の細胞ワクチン、投与された生体内で抗原を発現するウイルスDNAまたはRNAワクチン、および、増殖を抑制したがんもしくは腫瘍細胞およびこれらの破砕物もしくは溶解物を含む組成物も「がんワクチン」に含まれる。さらに、細菌菌体、細菌抽出物および β グルカン等の非特異的免疫賦活剤、ならびにアデノウイルス等の腫瘍溶解性ウイルスも「がんワクチン」に含まれる。
- [0016] 通常、がんワクチンは、免疫応答を増強するためのアジュバントを含んでいる。がんワクチンに含まれるがんワクチン抗原は、生体に投与された後、抗原提示細胞（主として樹状細胞およびマクロファージ）に貪食され、その細胞内部で処理されて、8~30残基程度のアミノ酸からなるエピトープペプチドとなり、主要組織適合遺伝子複合体（major histocompatibility complex : MHC）クラスIまたはクラスIIと結合した複合体として、抗原提示細胞の表面で提示される。エピトープペプチドの長さは、MHCクラスIの場合はアミノ酸8~11残基、またMHCクラスIIの場合はアミノ酸13~30残基である。細胞傷害性T細胞およびヘルパーT細胞の表面に発現するT細胞受容体（TCR）は、それぞれMHCクラスI/ペプチド複合体またはMHCクラスII/ペプチド複合体を特異的に認識する。その結果、これらのT細胞は活性化されて抗腫瘍効果を発揮する。即ち、細胞傷害性T細胞はワクチン抗原に含まれているものと同じエピトープペプチドを提示するがん細胞を認識・破壊し、ヘルパーT細胞はインターフェロン（IFN）- γ やインターロイキン（IL）-2等のサイトカインおよび

ケモカインの分泌を通じて細胞傷害性T細胞の働きを増強する。ヘルパーT細胞には、CD40リガンド（CD40L）／CD40経路を介して抗原提示細胞の抗原提示能力やB細胞の抗原特異的免疫グロブリン（Ig）G抗体産生を増強する働きもある。

[0017] 本発明において、がんまたは腫瘍特異的免疫応答を誘導するための「がんワクチン抗原」の好ましい例としては、GPC3、WT1、XAGE 1、LMP2ならびに遺伝子変異およびスプライシングの異常による新規腫瘍抗原（ネオアンチゲン）等の腫瘍関連抗原が挙げられ、より好ましくはGPC3であるが、これらに限定されない。「ネオアンチゲン」とは、変異またはスプライシングの異常を生じた遺伝子から生み出された抗原である。がん細胞には遺伝子の変異が非常に多く蓄積しており、患者ごとにその変異部位や変異の程度が異なる。また、正常な体内には存在しない非自己抗原であるため、T細胞はネオアンチゲンを発現するがん細胞を強く傷害することが可能である。本発明において、ネオアンチゲンは、がん細胞に含まれる遺伝子変異またはスプライシングの異常を患者ごとに検査し、変異または異常部位を含むペプチドまたはタンパク質を合成し、または腫瘍組織から抽出し、ワクチンとして用いるものを指す。

[0018] 本発明において、Xペプチドとは、抗原ペプチドを意味し、該抗原ペプチドの好ましい例としては、GPC3、WT1、XAGE 1、LMP2ならびに遺伝子変異およびスプライシングの異常による新規腫瘍抗原（ネオアンチゲン）等の腫瘍関連抗原が挙げられ、より好ましくはGPC3であるが、これらに限定されない。

[0019] 「T細胞」とは、細胞表面にT細胞受容体（T cell receptor：TCR）と呼ばれる抗原受容体を発現している細胞である。本発明のT細胞は、（i）がんワクチン抗原に対する特異性を有すること、（ii）CD3およびCD45が陽性であること、および（iii）IFN- γ を産生することを特徴とする。「がんワクチン抗原に対する特異性を有する」とは、がんワクチン抗原もしくはその分解物が結合した主要組織適合抗原（MHC）クラスIまたはクラスIIに選択的なT細胞の結合／接合、および、がんワクチン抗原もしくはその分解物が結合した主要

組織適合抗原クラスIもしくはクラスIIへの選択的な結合／接合により生じるT細胞の反応を意味し、標的とするがんワクチン抗原以外のものが結合した主要組織適合抗原クラスIもしくはクラスIIへのT細胞の結合／接合は認めないことを指す。がんワクチン抗原もしくはその分解物が結合した主要組織適合抗原クラスIまたはクラスIIは、細胞上に発現されたものでもよく、がんワクチンもしくはその分解物が結合した主要組織適合抗原IまたはIIのタンパク質の複合体でもよい。がんワクチン抗原が結合した主要組織適合抗原IまたはIIへの結合／接合により生じるT細胞の反応には、細胞傷害性、IFN- γ およびグランザイムの産生、ならびにT細胞活性化マーカーの発現等が挙げられる。

[0020] 本発明で使用するT細胞の用語は、T細胞集団および再生T細胞集団を含む。「T細胞集団」とは、CD3およびCD45が陽性であるリンパ球であり、抗原を認識するT細胞受容体（TCR）の遺伝子配列が集団として多様な細胞集団である。従って、生体から採取されたT細胞は、多様な抗原に対する特異性を有するT細胞集団である。生体内に存在するT細胞は、T前駆細胞が胸腺内で発分化する際に、TCR遺伝子のランダムな組み換えが生じることにより、個々のT細胞が異なるTCR遺伝子配列を有し、あらゆる抗原に対して免疫反応を引き起こすことが可能となっている。個々のT細胞が有するTCRはそれぞれ特異的に認識する抗原またはペプチド配列が決定しているものの、T細胞を集団として捉えることにより、そのT細胞集団が、多様な抗原を免疫対象とすることが理解できる。従って、生体から採取されたT細胞は、遺伝的多様性を有するT細胞集団である。

[0021] 「再生T細胞集団」とは、生体から採取された前記遺伝的多様性を有するT細胞集団を、iPS細胞への初期化を介して再生したT細胞集団であり、初期化前のT細胞集団の遺伝的多様性を維持しつつ、かつ抗原に対する指向性を有するT細胞集団である。「指向性を有する」とは、個々のT細胞がそれぞれ別々の抗原エピトープまたはペプチド配列を特異的に認識しつつ、T細胞集団としては、標的とする組織または抗原に対する免疫反応を示すことである。なお、遺伝的多様性を有するT細胞集団から樹立されたiPS細胞は、TCR遺伝子を発

現していないが、組み換えで生じたTCRの遺伝子情報をDNAに保持しており、T細胞集団の遺伝的多様性を維持する。かかるiPS細胞は、個々の細胞については、TCRの遺伝子配列が異なる細胞集団である。

[0022] 本発明において、T細胞は哺乳動物由来であることが好ましく、ヒト（がん患者また非がん患者）由来であることがより好ましい。前記がん患者また非がん患者は、がんワクチンを投与されたことがあるか、現在投与されているか、または今後投与される予定の患者が好ましい。投与されるがんワクチンは、1種類またはそれ以上投与されてもよい。T細胞としては、 $\alpha\beta$ T細胞、 $\gamma\delta$ T細胞、ヘルパーT細胞、細胞傷害性T細胞、およびナチュラルキラー（NK）T細胞が挙げられるが、好ましくは細胞傷害性T細胞である。また、T細胞の採取源としては、侵襲性が低いことから末梢血が好ましいが、それに限定されない。その他の好ましい採取源として、がん組織もしくは腫瘍組織もしくはその他の組織もしくは臓器、または血液、臍帯血、リンパ液、組織液（組織間液、細胞間液および間質液）、体腔液（腹水、胸水、心嚢液、脳脊髄液、関節液および眼房水）、鼻汁、尿等の体内のすべての採取源が挙げられる。本発明の一態様において、好ましいT細胞は、腫瘍組織由来T細胞である。腫瘍組織由来T細胞は、通常、腫瘍浸潤T細胞である。

[0023] 生体内には、あらゆる抗原に対して反応できるように、非常に多様なT細胞が存在しているが、大部分はT細胞補充療法において標的とする抗原とは無関係なT細胞である。そのため、がんワクチン抗原に反応性のあるT細胞集団をあらかじめ濃縮して使用することはがん治療において有効である。一方、多量のT細胞を得るため、濃縮したT細胞集団を増幅すると、T細胞が疲弊し、抗原に対する免疫反応が低下するという問題がある。この問題を解決するためには、上記の濃縮したT細胞集団をiPS細胞へと初期化し、初期化前のT細胞集団の遺伝的多様性を維持したままT細胞へ再分化を誘導して得られた再生T細胞集団を使用することが好ましい。

[0024] T細胞集団の濃縮は、1種以上のがんワクチン抗原と接触させることにより活性化し、増殖したT細胞を分離し、回収することにより達成される。T細胞

をがんワクチン抗原と接触させると、T細胞受容体によるがんワクチン抗原の認識および共刺激シグナルを受けることにより、T細胞は活性化する。接触させる方法としては、例えば、がんワクチン抗原またはがんワクチン抗原を含む生体組織もしくはその破砕物もしくはその溶解物を添加した培養液を用いて、抗原提示細胞およびT細胞を含む末梢血単核球の培養を行う。培養液中には、IL-2、IL-7、IL-15、IL-21等のサイトカインを加えることにより、効率的に目的のT細胞を増幅させることが可能である。増幅培養したT細胞は、細胞膜表面にCD137分子およびIFN- γ 等の機能性分子を発現する。これらの機能性分子に対して、蛍光タンパク質または磁気ビーズにより標識した特異的抗体で染色し、フローサイトメーターを用いたソーティング、または磁石を用いた分離により、目的のがんワクチン抗原に対する指向性を有するT細胞を濃縮することができる。T細胞の濃縮は、がんワクチンを接種したがん患者から採取したT細胞を用いて行うこともできる。

[0025] T細胞の濃縮は、以下のように行うこともできる。抗原提示細胞およびT細胞を含む単核球分画を培養し、がんワクチン抗原を培養液中に添加する過程において、繰り返してがんワクチン抗原とT細胞を接触させることにより、反応性のT細胞が増殖し、T細胞集団全体に対する割合が上昇する。一方、添加したがんワクチン抗原に反応しないT細胞は活性化されることがなく、*in vitro*での培養中にT細胞集団における割合が徐々に低下し、最終的には死滅する。このため、一定期間の培養後には、培養液中に添加したがんワクチン抗原に特異的な反応性を有しつつ、認識するがんワクチン抗原エピトープまたはペプチド配列において多様性を有するT細胞集団が濃縮して得られる。

[0026] T細胞集団の濃縮方法として、抗原ペプチド-HLA (human leukocyte antigen、ヒト白血球抗原) 複合体のオリゴマーが結合するT細胞を選択する方法も挙げられる。この方法では、特定のHLA型およびそのHLAが提示可能な標的抗原ペプチドの複合体からなるオリゴマーを蛍光色素で標識し、オリゴマーが結合した細胞を、フローサイトメーターを用いてソーティングすることにより、標的とする組織または抗原に対する指向性を有するT細胞を得ることがで

きる。T細胞集団を濃縮するに当たり、これらの方法は、単独または組み合わせて使用してもよい。

[0027] 上述の濃縮したT細胞集団は、iPS細胞へと初期化し、前記濃縮したT細胞集団の遺伝的多様性を維持したまま培養することができる。iPS細胞の製造方法は当該分野で公知である。iPS細胞は、好ましくは、前記濃縮したT細胞集団へ初期化因子を導入することによって製造される。ここで、初期化因子としては、例えば、Oct3/4、Sox2、Sox1、Sox3、Sox15、Sox17、Klf4、Klf2、c-Myc、N-Myc、L-Myc、Nanog、Lin28、Fbx15、ERas、ECAT15-2、Tcl1、beta-catenin、Lin28b、Sall1、Sall4、Esrrb、Nr5a2、Tbx3またはGlis1等の遺伝子または遺伝子産物が挙げられ、これらの初期化因子は、単独で用いてもよく、また組み合わせて用いてもよい。

[0028] 生体内に存在するT細胞集団は、TCR遺伝子配列が集団として多様であり、その意味で遺伝子多様性を有している。このT細胞集団から樹立されたiPS細胞は、この遺伝的多様性を維持したまま培養される。iPS細胞を培養する場合、好ましくは、継代が行われる。しかしながら、一般的な継代方法では、継代に用いる細胞以外の細胞は破棄されるので、遺伝的多様性を有するT細胞集団から樹立されたiPS細胞の多様性が徐々に失われる。これに対して、本発明においては、好ましくは、iPS細胞を樹立した後、培養器を洗浄して、好ましくはiPS細胞以外の細胞を除去しながら、iPS細胞をクローン化することなく回収し、別の培養器に継代する。そして係る継代を繰り返すことにより、本発明において使用される再生T細胞集団へ再分化させるためのiPS細胞を得ることができる。

[0029] iPS細胞の培養に用いられる培養液としては、特に限定されないが、動物細胞の培養に用いられる培養液を基礎培養液とし、これにiPS細胞の未分化能を維持するためのサイトカイン類を添加して調製することができる。基礎培養液としては、例えば、Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM) 培養液、Medium 199培養液、Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM) 培養液、 α MEM培養液、Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM) 培養液、Ham's

F12培養液、RPMI 1640培養液、Fischer's、Neurobasal Medium 培養液(ライフテクノロジー社)、StemFit (登録商標) AK03N (味の素ヘルシーサプライ社) およびこれらの混合培養液が挙げられる。培養液には、血清を添加してもよく、または無血清であってもよい。サイトカイン類としては、好ましくは、bFGFが挙げられ、培養液中におけるその濃度は、例えば、1~100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (好ましくは50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) である。

[0030] iPS細胞の培養方法は、接着培養または浮遊培養であってもよいが、接着培養が好ましい。iPS細胞の分離方法としては、例えば、セルスクレーパー等により力学的に分離する方法、プロテアーゼ活性を有する分離溶液、コラゲナーゼ活性を有する分離溶液、またはプロテアーゼ活性およびコラゲナーゼ活性を有する分離溶液 (例えば、Accutase (登録商標) およびAccumax (登録商標) 等) を用いた分離方法が挙げられる。

[0031] iPS細胞は、好ましくは、 $1 \times 10^3 \sim 1 \times 10^4$ cells/cm²、 $1 \times 10^4 \sim 1 \times 10^5$ cells/cm²または $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$ cells/cm²の細胞密度に到達した場合に、別の培養器に継代される。継代の回数は、iPS細胞を分化誘導し、T細胞補充療法に必要な量の再生T細胞集団を得るために必要なiPS細胞が得られれば何回でもよく、好ましくは、1~5回または5~10回である。

[0032] 得られた遺伝的多様性を有するiPS細胞は、T細胞への再分化を誘導するためにそのまま使用してもよいし、または必要な時まで凍結保存してもよい。細胞の凍結保存方法は、当業者に周知である。

[0033] 本発明において使用される再生T細胞集団は、上述の濃縮されたT細胞集団の遺伝的多様性を維持し、かつ、T細胞の活性化に使用したがんワクチン抗原に対する指向性を有する。

[0034] 本発明において使用される再生T細胞集団は、好ましくは、培養した前記iPS細胞を、造血前駆細胞を経てCD4/CD8ダブルポジティブT細胞に分化させることによって得られ、または、造血前駆細胞およびCD4/CD8ダブルポジティブT細胞を経て、CD8シングルポジティブT細胞に分化させることによって得られる。

- [0035] 造血前駆細胞 (hematopoietic progenitor cells、HPC) とは、リンパ球、好酸球、好中球、好塩基球、赤血球、または巨核球等の血球系細胞に分化可能な細胞である。なお、造血前駆細胞と造血幹細胞は、区別されるものではなく、特に断らない限り同一の細胞を指す。造血幹細胞／前駆細胞は、例えば、表面抗原であるCD34および／またはCD43がポジティブであることによって認識される。
- [0036] 造血前駆細胞は、好ましくは、ビタミンC類を添加した培養液中でiPS細胞を培養することによって製造される。ここで、「ビタミンC類」とは、L-アスコルビン酸およびその誘導体を指し、「L-アスコルビン酸誘導体」とは、生体内で酵素反応によりビタミンCに変換されるものを意味する。L-アスコルビン酸の誘導体としては、例えば、リン酸ビタミンC、アスコルビン酸グルコシド、アスコルビルエチル、ビタミンCエステル、テトラヘキシルデカン酸アスコルビル、ステアリン酸アスコルビルおよびアスコルビン酸-2リン酸-6パルミチン酸が挙げられる。L-アスコルビン酸の誘導体は、好ましくは、リン酸ビタミンCであり、例えば、リン酸-Lアスコルビン酸ナトリウムまたはリン酸-L-アスコルビン酸マグネシウム等のリン酸-Lアスコルビン酸塩が挙げられる。ビタミンC類は、例えば、培養液において、5~500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度で含有される。
- [0037] 造血前駆細胞の製造に用いる培養液は、特に限定されないが、動物細胞の培養に用いられる培養液を基礎培養液とし、これにビタミンC類等を添加して調製することができる。基礎培養液としては、例えば、Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM) 培養液、Medium 199培養液、Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM) 培養液、 α MEM培養液、Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM) 培養液、Ham's F12培養液、RPMI 1640培養液、Fischer's培養液、Neurobasal Medium (ライフテクノロジーズ社)、StemPro34 (ライフテクノロジーズ社) およびこれらの混合培養液が挙げられる。培養液には、血清が含有されていてもよく、または無血清であってもよい。必要に応じて、基礎培養液は、例えば、アルブミン、インスリン、トランスフェリン、セ

レン、脂肪酸、微量元素、2-メルカプトエタノール、チオールグリセロール、脂質、アミノ酸、L-グルタミン、非必須アミノ酸、ビタミン、増殖因子、低分子化合物、抗生物質、抗酸化剤、ピルビン酸、緩衝剤、無機塩類、およびサイトカイン等から選ばれる1つ以上の物質も含有し得る。

[0038] 造血前駆細胞の製造に用いる培養液には、BMP4 (Bone morphogenetic protein 4)、VEGF (vascular endothelial growth factor)、bFGF (basic fibroblast growth factor)、SCF (stem cell factor)、TPO (トロンボポエチン)、およびFLT-3L (Flt3 ligand) からなる群より選ばれるサイトカインをさらに添加してもよい。これらの濃度は、例えば、BMP4は1~100 ng/mLであり、VEGFは1~100 ng/mLであり、bFGFは1~100 ng/mLであり、SCFは10~100 ng/mLであり、TPOは1~100 ng/mLであり、またFLT-3Lは1~100 ng/mLである。

[0039] 造血前駆細胞の培養液には、TGF β 阻害剤を培養液に添加してもよい。「TGF β 阻害剤」とは、TGF β ファミリーのシグナル伝達に干渉する低分子阻害剤であり、例えば、SB431542およびSB202190 (R.K.Lindemann et al., Mol. Cancer 2: 20 (2003))、SB505124 (GlaxoSmithKline)、NPC30345、SD093、SD908およびSD208 (Scios)、ならびにLY2109761、LY364947およびLY580276 (Lilly Research Laboratories) が挙げられ、培養液への添加濃度は、好ましくは0.5~100 μ Mである。

[0040] iPS細胞は、C3H10T1/2 (Takayama N., et al. J Exp Med. 2817-2830, 2010)、または異種由来のストローマ細胞 (Niwa A et al. J Cell Physiol. 2009 Nov; 221 (2) :367-77) 等のフィーダー細胞と共培養してもよいが、好ましくは、フィーダー細胞を使用せずにiPS細胞の培養が行われる。

[0041] 造血前駆細胞の製造時のiPS細胞の培養方法は、接着培養または浮遊培養であってもよいが、浮遊培養が好ましい。例えば、iPS細胞は、使用したディッシュに対して80%コンフルエントになるまで培養されたコロニーを分離し、単細胞に解離させたのちに、浮遊培養に供することができる。iPS細胞の分離方法としては、例えば、セルスクレーパー等で力学的に分離する方法、プロ

テアーゼ活性およびコラゲナーゼ活性を有する分離溶液（例えば、Accutase（登録商標）およびAccumax（登録商標）等）、またはコラゲナーゼ活性を有する分離溶液を用いた分離方法が挙げられる。

[0042] 浮遊培養とは、細胞を培養容器に対して非接着の状態では培養することである。浮遊培養は、特に限定はされないが、細胞との接着性を向上させる目的で人工的な処理（例えば、細胞外マトリックス等によるコーティング処理）が施されていない培養容器、または人工的に接着を抑制する処理（例えば、ポリヒドロキシエチルメタクリル酸（poly-HEMA）もしくは非イオン性の界面活性ポリオール（Pluronic F-127等）によるコーティング処理）した培養容器を使用して行うことができる。浮遊培養の際には、胚様体（EB）を形成させて培養することが好ましい。

[0043] 造血前駆細胞は、iPS細胞を培養することにより得られるネット様構造物（iPS-sacとも称する）から調製することもできる。ここで、「ネット様構造物」とは、iPS細胞由来の立体的な嚢状（内部に空間を伴うもの）構造体で、内皮細胞集団等で形成され、内部に造血前駆細胞を含む構造体である。

[0044] iPS細胞から造血前駆細胞を製造するために培養する際の温度条件は、特に限定されないが、例えば、約37℃～約42℃程度、好ましくは約37℃～約39℃程度である。また、培養期間については、当業者であれば造血前駆細胞の細胞数等をモニターしながら、適宜決定することが可能である。造血前駆細胞が得られる限り、培養日数は特に限定されないが、例えば、少なくとも6日以上、7日以上、8日以上、9日以上、10日以上、11日以上、12日以上、13日以上、または14日以上であり、好ましくは14日である。培養期間が長いことについては、造血前駆細胞の製造において問題とされない。また、低酸素条件で培養してもよく、本発明の一態様において、低酸素条件としては、例えば、15%、10%、9%、8%、7%、6%、5%またはそれら未満の酸素濃度が挙げられる。

[0045] 「CD4/CD8ダブルポジティブT細胞」とは、T細胞のうち、表面抗原のCD4およびCD8が共に陽性である細胞（CD8⁺ CD4⁺）を指し、T細胞は、表面抗原であ

るCD3およびCD45が陽性であることによって認識できることから、CD4/CD8ダブルポジティブT細胞は、CD4、CD8、CD3およびCD45が陽性である細胞として同定することができる。CD4/CD8ダブルポジティブT細胞は、誘導によってCD4シングルポジティブ細胞またはCD8シングルポジティブ細胞へと分化させることができる。

[0046] CD4/CD8ダブルポジティブT細胞は、p38阻害剤および/またはSDF-1を添加した培養液中で、造血前駆細胞を培養する工程を含む方法によって製造することができる。

[0047] 「p38阻害剤」とは、p38タンパク質（p38MAPキナーゼ）の機能を阻害する物質として定義される。p38阻害剤は、例えば、p38の化学的阻害剤、p38のドミナントネガティブ変異体、またはそれをコードする核酸が挙げられるが、これらに限定されない。

[0048] p38の化学的阻害剤としては、SB203580(4-(4-フルオロフェニル)-2-(4-メチルスルホニルフェニル)-5-(4-ピリジル)-1H-イミダゾール)およびその誘導体、SB202190(4-(4-フルオロフェニル)-2-(4-ヒドロキシフェニル)-5-(4-ピリジル)-1H-イミダゾール)およびその誘導体、SB239063(trans-4-[4-(4-フルオロフェニル)-5-(2-メトキシ-4-ピリミジニル)-1H-イミダゾール-1-イル]シクロヘキサノール)およびその誘導体、SB220025およびその誘導体、PD169316、RPR200765A、AMG-548、BIRB-796、SC10-469、SCI0-323、VX-702、またはFR167653が挙げられるが、これらに限定されない。これらの化合物は市販されており、例えば、SB203580、SB202190、SC239063、SB220025およびPD169316についてはCalbiochem社、SC10-469およびSCI0-323についてはScios社等から入手可能である。p38阻害剤は、例えば、約1 μ M~約50 μ Mの範囲で培養液に添加される。

[0049] p38のドミナントネガティブ変異体としては、p38のDNA結合領域に位置する180位のスレオニンをアラニンに点変異させたp38T180A、ならびにヒトおよびマウスにおけるp38の182位のチロシンをフェニルアラニンに点変異させたp38Y182F等が挙げられる。

- [0050] SDF-1 (Stromal cell-derived factor 1) は、SDF-1 α またはその成熟型だけでなく、SDF-1 β 、SDF-1 γ 、SDF-1 δ 、SDF-1 ϵ もしくはSDF-1 ϕ 等のアイソフォーム、またはそれらの成熟型であってもよく、もしくはこれらの任意の割合の混合物等であってもよい。好ましくは、SDF-1 α が使用される。なお、SDF-1は、CXCL-12またはPBSFと称される場合もある。
- [0051] SDF-1は、そのケモカインとしての活性を有する限り、そのアミノ酸配列中の1または数個のアミノ酸が置換、欠失および／または付加されていてもよく、また同様に糖鎖が置換、欠失および／または付加されていてもよい。SDF-1において少なくとも4つのシステイン残基（ヒトSDF-1 α の場合、Cys30、Cys32、Cys55およびCys71）が保持されており、かつ天然体のアミノ酸配列に対して90%以上の同一性を有する範囲であれば、アミノ酸変異が許容される。SDF-1は、哺乳動物、例えば、ヒト、例えば、サル、ヒツジ、ウシ、ウマ、ブタ、イヌ、ネコ、ウサギ、ラット、またはマウス等の非ヒト哺乳動物のものであってもよい。例えば、ヒトのSDF-1 α として、GenBank登録番号:NP_954637で登録されているタンパク質が使用でき、SDF-1 β として、GenBank登録番号:NP_000600で登録されているタンパク質が使用できる。
- [0052] SDF-1は、市販のものを使用してもよいし、天然から精製されたものを使用してもよいし、またはペプチド合成や遺伝子工学的手法によって製造されたものを使用してもよい。SDF-1は、例えば、約10 ng/mL～約100 ng/mLの範囲で培養液に添加される。
- [0053] CD4/CD8ダブルポジティブT細胞の製造に用いる培養液は、特に限定されないうが、動物細胞の培養に用いられる培養液を基礎培養液とし、これにp38阻害剤および／またはSDF-1、さらに好ましくはビタミンC類を添加して調製することができる。なお、CD4/CD8ダブルポジティブT細胞の製造において使用されるビタミンC類の種類は、例えば上述のとおりであるが、ビタミンC類の濃度は、例えば、5～200 μ g/mLである。基礎培養液としては、例えばIscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM) 培養液、Medium 199培養液、Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM) 培養液、 α MEM培養液、Dulbecco's modifi

ed Eagle's Medium (DMEM) 培養液、Ham's F12培養液、RPMI 1640培養液、Fischer's Neurobasal Medium培養液（ライフテクノロジーズ社）、およびこれらの混合培養液が挙げられる。培養液には、血清を添加してもよく、または無血清であってもよい。必要に応じて、基礎培養液には、例えば、アルブミン、インスリン、トランスフェリン、セレン、脂肪酸、微量元素、2-メルカプトエタノール、チオールグリセロール、脂質、アミノ酸、L-グルタミン、非必須アミノ酸、ビタミン、増殖因子、低分子化合物、抗生物質、抗酸化剤、ピルビン酸、緩衝剤、無機塩類、およびサイトカイン等から選ばれる1つ以上の物質も含有し得る。

- [0054] CD4/CD8ダブルポジティブT細胞の製造に用いる培養液には、SCF、TPO（トロンボポエチン）、FLT-3LおよびIL-7からなる群より選ばれるサイトカインをさらに添加してもよい。これらの濃度は、例えば、SCFは10~100 ng/mLであり、TPOは10~200 ng/mLであり、FLT-3Lは1~100 ng/mLであり、IL-7は1~100 ng/mLである。
- [0055] CD4/CD8ダブルポジティブT細胞の製造時に、造血前駆細胞はフィーダー細胞を用いて培養してもよいが、好ましくはフィーダー細胞を用いずに培養を行う。
- [0056] 造血前駆細胞は、接着培養しても、または浮遊培養してもよいが、接着培養することが好ましい。接着培養の場合、培養容器をコーティングして用いてもよい。例えば、コーティング剤としては、マトリゲル (Niwa A, et al. PLoS One. 6(7):e22261, 2011)、コラーゲン、ゼラチン、ラミニン、ヘパラン硫酸プロテオグリカン、レトロネクチン、Fc-DLL4またはエンタクチン、およびこれらの組み合わせが挙げられる。
- [0057] 胚様体を浮遊培養して造血前駆細胞を得た場合は、これを単細胞に解離させたのちに、接着培養を行うことが好ましい。
- [0058] CD4/CD8ダブルポジティブT細胞を製造するために造血前駆細胞を培養する際の培養温度条件は、特に限定されないが、例えば、約37°C~約42°C程度が好ましく、約37°C~約39°C程度がより好ましい。また、培養期間については

、当業者であれば、CD4/CD8ダブルポジティブT細胞の細胞数等をモニターしながら、適宜決定することが可能である。CD4/CD8ダブルポジティブT細胞が得られる限り、培養日数は特に限定されないが、例えば、少なくとも10日以上、12日以上、14日以上、16日以上、18日以上、20日以上、22日以上、または23日以上であり、好ましくは23日である。

[0059] 得られたCD4/CD8ダブルポジティブT細胞は、単離して用いても良く、他の細胞種が含有される細胞集団として用いても良い。単離する場合、CD4、CD8、CD3およびCD45からなる群より選ばれる、いずれか一つの指標を用いて単離することができる。当該単離の方法は、当業者に周知の方法を用いることができ、例えば、CD4、CD8、CD3またはCD45に対する抗体により標識し、フローサイトメーターを用いて単離する方法、または所望の抗原を固定化したアフィニティカラム等を用いて精製する方法が挙げられる。

[0060] 「CD8シングルポジティブT細胞」とは、T細胞のうち、表面抗原のCD8が陽性である細胞 (CD8⁺ CD4⁻) を指し、細胞傷害性T細胞とも呼ばれる。T細胞は、表面抗原であるCD3およびCD45が陽性であることによって認識できることから、CD8シングルポジティブT細胞は、CD8、CD3およびCD45が陽性であり、CD4が陰性である細胞として同定することができる。

[0061] CD8シングルポジティブT細胞は、副腎皮質ホルモン剤を添加した培養液中で、CD4/CD8ダブルポジティブT細胞を培養する工程を含む方法によって製造することができる。

[0062] 副腎皮質ホルモン剤は、好ましくは、糖質コルチコイドまたはその誘導体であり、例えば、酢酸コルチゾン、ヒドロコルチゾン、酢酸フルドロコルチゾン、プレドニゾン、トリアムシノン、メチルプレドニゾン、デキサメタゾン、ベタメタゾン、またはプロピオン酸ベクロメタゾンが挙げられる。好ましくは、副腎皮質ホルモン剤は、デキサメタゾンである。培養液中におけるその濃度は、例えば、1~100 nMである。

[0063] CD8シングルポジティブT細胞の製造に用いる培養液は、特に限定されないが、動物細胞の培養に用いられる培養液を基礎培養液とし、これに副腎皮質

ホルモン剤を添加して調製することができる。基礎培養液としては、例えば、Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM) 培養液、Medium 199培養液、Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM) 培養液、 α MEM培養液、Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM) 培養液、Ham's F12培養液、RPMI 1640培養液、Fischer's Neurobasal Medium培養液（ライフテクノロジーズ社）、およびこれらの混合培養液が挙げられる。培養液には、血清を添加してもよく、または無血清であってもよい。必要に応じて、基礎培養液は、例えば、アルブミン、インスリン、トランスフェリン、セレン、脂肪酸、微量元素、2-メルカプトエタノール、チオールグリセロール、脂質、アミノ酸、L-グルタミン、非必須アミノ酸、ビタミン、増殖因子、低分子化合物、抗生物質、抗酸化剤、ピルビン酸、緩衝剤、無機塩類、およびサイトカイン等から選ばれる1つ以上の物質も含有し得る。

[0064] CD8シングルポジティブT細胞の製造に用いる培養液は、抗CD3抗体、ビタミンC類、またはサイトカインをさらに含有することが好ましい。当該サイトカインとしては、例えば、IL-2およびIL-7等が挙げられる。

[0065] 抗CD3抗体としては、CD3を特異的に認識する抗体であれば特に限定されないが、例えば、OKT3クローンから産生される抗体が挙げられる。抗CD3抗体の培養液中における濃度は、例えば、10~1000 ng/mLである。

[0066] CD8シングルポジティブT細胞の製造に用いるビタミンC類は、例えば上述したものであり、上述と同じ条件で用いることができる。

[0067] CD8シングルポジティブT細胞の製造に用いるサイトカインの培養液中における濃度は、例えば、IL-2は10~1000 U/mLであり、IL-7は1~100 ng/mLである。

[0068] CD8シングルポジティブT細胞を製造するためのCD4/CD8ダブルポジティブT細胞を培養する際の温度条件は、特に限定されないが、例えば、約37°C~約42°C程度が好ましく、約37°C~約39°C程度がより好ましい。また、培養期間については、当業者であればCD8シングルポジティブT細胞の細胞数等をモニターしながら、適宜決定することが可能である。CD8シングルポジティブT細胞

が得られる限り、培養日数は特に限定されないが、例えば、少なくとも1日以上、2日以上、3日以上、4日以上、または5日以上であり、好ましくは3日である。

[0069] 本発明の一態様において、維持される遺伝的多様性の程度は、好ましくは原料の遺伝的多様性を有するT細胞集団の30%以上、より好ましくは40%以上、さらに好ましくは50%以上である。維持される遺伝的多様性の程度は、例えば、TCRV β 解析キット（BECKMAN COULTER社：カタログ番号IM-3497）を用いたTCRV β 遺伝子のレパトア解析に基づき、確認することができる。TCRV β 解析キット（BECKMAN COULTER社：カタログ番号IM-3497）を用いたTCRV β 遺伝子のレパトア解析より、本発明の一態様において維持される遺伝的多様性の程度は、原料の遺伝的多様性を有するT細胞集団の40%以上を維持していることが確認された。

[0070] 本発明の、再生T細胞の生存率は、60%以上、より好ましくは70%以上、さらに好ましくは80%以上である。生存率は、セルカウンターによる解析を行い、死細胞へ特異的に取り込まれるトリパンブルーなどの色素の取り込みのない細胞の割合で算出される。

[0071] 本発明の、再生T細胞のCD3の発現率は、70%以上、より好ましくは80%以上、さらに好ましくは90%以上である。CD3の発現率は、フローサイトメトリーを用いて算出される。

[0072] 本発明の再生T細胞は、疲弊マーカーの発現割合は、30%以下、より好ましくは20%以下、さらに好ましくは10%以下である。再生T細胞の疲弊マーカーの発現割合は、それぞれのT細胞に対し、抗体(TIGIT-Pacific Blue、PD-1-APC/Cy7)で染色し、フローサイトメーター(BD FACSAria (登録商標) II)を用いて解析することができる。

[0073] 本発明の再生T細胞がIFN-g/IL-2産生能を有する(図15)。

再生T細胞を刺激する物質として、PMA (Phorbol 12-Myristate 13 Acetate、WAKO社)の終濃度が20 ng/mLおよびION (Ionomycin、WAKO社)の終濃度が1 μ g/mLとなるようPMA/ION溶液を作製した。再生T細胞にPMA/ION溶液およびM

onensin (BioLegend社) を加え4時間刺激した。刺激後、細胞の表面抗原を抗体 (CD45-BV510、CD8 α -PerCP/Cy5.5、CD8 β -APC、CD19-FITC) で染色し、Fixation Buffer (BioLegend) で固定、Permeabilization Buffer (BioLegend) で細胞膜透過処理した。透過処理後、サイトカイン抗体 (IFN-g-APC/Cy7、IL-2-PE) で染色し、フローサイトメーター (BD FACSAria (登録商標) II) を用いて、サイトカインを産生した再生T細胞の割合を解析した。サイトカイン産生した再生T細胞 (CD19- CD45+ CD8a+ CD8b+細胞) の割合をPMA/ION刺激有りとは刺激無しで比較したところ、刺激有りの方が優位に両サイトカイン及び各サイトカインを産生する細胞の割合が多かった。これらの結果から、得られた再生T細胞はIFN-g/IL-2産生能を有していると示唆される。

[0074] 本発明の、T細胞を有効成分として含む医薬組成物は、がん治療対象を処置するために使用することができる。本発明の医薬組成物は、製剤技術分野において慣用の方法、例えば、日本薬局方に記載の方法等により製造することができる。本発明の医薬組成物は、薬学的に許容される添加剤を含んでもよい。該添加剤としては、例えば、細胞培養液、生理食塩水や適当な緩衝液 (例えば、リン酸系緩衝液) 等が挙げられる。

[0075] 本発明の医薬組成物は、T細胞を生理食塩水や適当な緩衝液 (例えばリン酸系緩衝液) 等に懸濁することによって製造することができる。所望の治療効果が発揮されるように、一回投与分の量として、例えば 1×10^7 個以上の細胞を含有させることが好ましい。より好ましくは 1×10^8 個以上、さらに好ましくは 1×10^9 個以上である。細胞の含有量は、適用対象の性別、年齢、体重、患部の状態、細胞の状態等を考慮して適宜調整することができる。本発明の医薬組成物には、T細胞の他、細胞を保護する目的でジメチルスルフォキシド (DMSO) および血清アルブミン等を含有させてもよい。また、細菌の混入を阻止する目的で抗生物質等ならびに細胞の活性化および分化を促す目的でビタミン類やサイトカイン等を含有させてもよい。さらに、製剤上許容される他の成分 (例えば、担体、賦形剤、崩壊剤、緩衝剤、乳化剤、懸濁剤、無痛化剤、安定剤、保存剤、防腐剤、生理食塩水等) を本発明の医薬組成物に含

有させてもよい。

[0076] 本発明のT細胞を有効成分として含む医薬組成物は、低温凍結保存することができる。低温凍結保存する場合、温度は、細胞の保存に適した温度であれば特に限定されない。例えば、 -20°C 、 -80°C および $-120\sim-196^{\circ}\text{C}$ が挙げられる。低温凍結保存する場合、細胞は、バイアル等の適切な容器中で保存することができる。T細胞の凍結時および解凍時の細胞損傷リスクを最小限にするための操作は、当業者には周知である。

[0077] T細胞の冷凍保存においては、T細胞を培養液から回収し、緩衝液または培養液により洗浄し、細胞数を計数し、遠心分離等により濃縮して、凍結媒質（例えば、10% DMSOを含む培養液）中に懸濁した後、低温凍結保存する。T細胞は、複数の培養容器で培養した細胞を合わせ、単一ロットにすることができる。本発明のT細胞を含む医薬組成物は、バイアル等の容器当たり、例えば、 5×10^4 個 $\sim 9\times 10^{10}$ 個のT細胞を含むが、対象とするがんの種類、投与対象、投与経路等に応じて変更することができる。

[0078] 本発明のT細胞を含む医薬組成物の投与経路としては、例えば、輸注、腫瘍内注射、動注、門脈注、腹腔内投与等が挙げられる。但し、本発明の医薬組成物中の有効成分であるT細胞が患部に送達される限り、投与経路はこれに限られるものではない。投与スケジュールとしては、単回投与または複数回投与とすることができる。複数回投与の期間は例えば、2～4週間に1回投与を繰り返す方法または半年から1年に1回投与を繰り返す方法等を採用することができる。投与スケジュールの作成においては、対象患者の性別、年齢、体重、病態等を考慮することができる。

[0079] 本発明のT細胞を含む医薬組成物を、がんの予防または治療に使用する場合において、他家移植である場合、拒絶反応を起こしにくいという観点から、T細胞を採取されるがん患者または非がん患者は、がん治療のために、本発明の医薬組成物を投与されるがん患者と、HLAの型が一致していることが好ましい。また、本発明の医薬組成物が投与されるがん患者と、T細胞を採取されるがん患者とは同一人であることがより好ましい。すなわち、他家移植より自

家的な移植によるがん治療がより好ましい。

- [0080] 本発明の医薬組成物は、がんの予防または治療のために用いられる。がんとしては、卵巣がん、肝芽腫、肝細胞がん、胃がん、食道がん、膵臓がん、腎細胞がん、乳がん、悪性黒色腫、非小細胞肺癌、子宮頸がん、膠芽腫、前立腺がん、神経芽腫瘍、慢性リンパ性白血病、甲状腺乳頭がん、大腸がん、およびB細胞非ホジキンリンパ腫が挙げられるが、これらに限定されない。
- [0081] がんの予防または治療のために、本発明のT細胞を含む医薬組成物とがんワクチンとを組み合わせる場合、本発明の医薬組成物およびがんワクチンの投与時期は限定されず、本発明の医薬組成物およびがんワクチンの投与を、投与対象に対し、同時に投与してもよく、また時間差をおいて投与してもよい。本発明の医薬組成物とがんワクチンとは別々に製剤化されていてもよく、また両者が混合された合剤であってもよい。本発明の医薬組成物およびがんワクチンの投与量は、临床上用いられている投与量に準ずればよく、疾患、投与対象、投与経路、薬物との組み合わせ等により適宜選択することができる。
- [0082] 本発明の医薬組成物およびがんワクチンの投与形態は特に限定されず、最終的に、本発明の医薬組成物およびがんワクチンの両方が投与されればよい。このような投与形態としては、例えば、（1）本発明の医薬組成物およびがんワクチンを一体として製剤化して得られる単一の製剤の投与、（2）本発明の医薬組成物およびがんワクチンの同一投与経路による同時投与、（3）本発明の医薬組成物およびがんワクチンの同一投与経路による時間差をおいた個別投与、（4）本発明の医薬組成物およびがんワクチンの異なる投与経路による同時投与、（5）本発明の医薬組成物およびがんワクチンの異なる投与経路による時間差をおいた個別投与（例えば、まず、がんワクチンを投与し、次に本発明の医薬組成物を投与する。または、その逆の順序で投与する。）等が挙げられる。
- [0083] 本発明の医薬組成物とがんワクチンとを組み合わせることにより、以下のような優れた効果を得ることができる。

(1) 本発明の医薬組成物またはがんワクチンを単独で投与する場合に比べて、その投与量を軽減することができる、

(2) 本発明の医薬組成物およびがんワクチンの投与により、長い治療期間を設定することができる、

(3) 本発明の医薬組成物およびがんワクチンの投与により、治療効果の持続を図ることができる、および、

(4) 本発明の医薬組成物およびがんワクチンとの併用により、抗がんまたは抗腫瘍効果における相乗効果が得られる。

[0084] 本発明の一態様において、がんペプチドワクチン(例えば、GPC3を含有するがんワクチン)を投与した肝芽腫患者の末梢血からGPC3に対する細胞傷害性T細胞を単離および増幅し、T細胞を得ることができる。得られたT細胞は、GPC3に対する抗原特異性を維持し、GPC3を発現するがん細胞(腫瘍)に対する抗原特異的な細胞傷害性を有することから、有効なT細胞を含有する医薬組成物を得ることができる。

[0085] 本発明の一態様において、がんペプチドワクチン(例えば、GPC3を含有するがんワクチン)を投与した肝芽腫患者の末梢血からGPC3に対する細胞傷害性T細胞を単離および増幅し、単離および増幅された細胞傷害性T細胞をiPS細胞に初期化し、次に該iPS細胞より細胞傷害性T細胞への再分化を誘導して、再生T細胞を得ることができる。得られた再生T細胞は、GPC3に対する抗原特異性を維持し、GPC3を発現するがん細胞に対する抗原特異的な細胞傷害性を有することから、有効な再生T細胞を含有する医薬組成物を得ることができる。

[0086] 本発明を以下の実施例でさらに具体的に説明するが、本発明の範囲はこれらの実施例に限定されない。

実施例

[0087] 本発明の細胞製品の製造方法

本発明の細胞製品の製造方法を図11に示す。

本発明の細胞製品の製造は図11に示す1から15までの工程で進められる。

(1) 患者にがんワクチン(Xペプチド+IFA)を投与し、抗原Xに対する免疫

応答を惹起する。

- (2) 患者より末梢血を採取し単核球を分離する
- (3) 得られた単核球を試験管内にてXペプチドで刺激し抗原X特異的T細胞を増幅単離する。
- (4) 得られた抗原X特異的T細胞にセンダイウイルスベクター を用いて山中4因子とSV40T抗原を導入し初期化を行う
- (5) 樹立されたIPS細胞を多くのクローンを含んだまま増幅培養し一次凍結ストック作製する。
- (6) 一次凍結ストックより二次凍結ストックを作製する。
- (7) 二次凍結ストックを融解し増幅培養を行う。
- (8) 増幅培養の後、分化培養より血球細胞を含む胚葉体の形成を誘導する。
- (9) 誘導された胚葉体からフローサイトメーターを用いて造血幹細胞を分画する。
- (10) 得られた造血幹細胞をT細胞分化誘導因子と共に培養し未熟T細胞を得る。
- (11) この時点での細胞集団を一旦凍結保存する。ここまでの操作を繰り返し十分量の未熟T細胞を確保する。
- (12) 未熟T細胞の凍結ストックを凍結融解し培養を開始する。
- (13) CD8 α CD8 β 両陽性のT細胞をフローサイトメーターにて分画する。
- (14) 得られた細胞をPHA+自家または他家のフィーダー細胞とともに培養し成熟培養を行う。
- (15) 培養後、T細胞を洗浄後、凍結保存し治療に備える。

[0088] 原料細胞の入手

Xペプチド+IFA投与による感作 (図11(1)) : 患者にがんワクチン (Xペプチド+IFA) を投与し、生体内においてXペプチド特異的に反応するT細胞

の細胞増殖を促す。前記の患者より末梢血を採取し、単核球の単離を行う（IFA : Incomplete Freund's adjuvant、不完全フロイントアジュバント）。

[0089] （工程1）T細胞の濃縮

がんワクチン抗原（GPC3、WT1、XAGE 1、LMP2またはネオアンチゲン）を培養液に添加してT細胞集団と接触させ、200 U/mL IL-2、10 ng/mL IL-15および10 ng/mL IL-21を添加したRPMI-1640培養液（10%ヒトAB血清、1%ペニシリン-ストレプトマイシン-グルタミンを含む）中で12日間培養を行った。培養液に添加する腫瘍関連抗原は、ペプチドの場合は1~100 mg/mLの濃度で添加し、また、がんワクチン抗原として生体組織またはその破砕物を用いる場合は、1~2 mm角に細断した組織片を、培養液を含むチューブあたり1~5個程度添加してT細胞集団と接触させることが好ましい。生体組織の溶解物の場合は、該溶解物を培養液に添加してT細胞集団と接触させることが好ましい。培養後12日目に、同一のがんワクチン抗原を再度接触させ、さらに24時間培養することにより、がんワクチン抗原に指向性を有するT細胞に対して活性化マーカーを発現させた。培養した細胞集団に対し、CD8分子以外の血球分画マーカーを用いたネガティブセレクション（CD8+ T cell Isolation Kit, Miltenyi Biotech社）、および活性化マーカーであるCD137またはIFN- γ に対するポジティブセレクション（CD137 MicorBead KitまたはCytokine capture system-IFN- γ , Miltenyi Biotech社）を行うことにより、がんワクチン抗原に指向性を有するCD8シングルポジティブT細胞のみを濃縮した（図11（2））。

[0090] 前記の工程において抗原ペプチド-HLA複合体を用いる場合、使用するT細胞集団は、上記がんワクチン抗原と接触させて12日間の培養を行った細胞集団、または該培養を行っていない細胞集団のいずれであってもよい。得られた細胞集団に、蛍光標識された目的の抗原ペプチド-HLA複合体を加えて、先に30分間染色後、その他の血球マーカー（CD8、CD4およびCD14）に対する蛍光標識抗体を加えてさらに30分間染色を行った。染色後、回収した細胞をリン酸緩衝液で洗浄した後、フローサイトメーターを用いて、抗原ペプチド-HL

A複合体およびCD8分子を発現している細胞のみをソーティングすることにより、目的のがんワクチン抗原に対する指向性を有するT細胞を濃縮した（図11（3））。

[0091]（工程2）iPS細胞への初期化（図11（4））

続いて、T細胞を15mlチューブに回収し、約250 μ LのRPMI-1640培養液に浮遊させた後、CytoTune-iPS 2.0キット（株式会社IDファーマ社：カタログ番号DV-0304）を用いて、MOI=5となる力価で初期化に必要な4因子（Oct3/4、Sox2、Klf4およびc-Myc）を含むセンダイウイルスを培養液に添加し、37 $^{\circ}$ Cで2時間インキュベートした。インキュベーション後には、RPMI-1640培養液を用いてT細胞を洗浄し、培養液中からウイルスを除去した。

[0092] 続いて、磁気ビーズを除くため、ピペッティングによりビーズと細胞とを分離させた後、磁石付きのスタンドにチューブを静置することにより、培養液中に浮遊したT細胞のみを回収した。

[0093] 得られたT細胞を、iMatrix-511（Nippi社：カタログ番号892011）を0.5 μ g/cm²でコーティングした6 cmディッシュ上に播種し、RPMI-1640培養液中で、37 $^{\circ}$ C、5%CO₂に設定したインキュベーターを用いて培養を開始した。

[0094] 6 cmディッシュ上で培養を開始した翌日から、細胞が含まれていない培養上清を半量除去し、StemFit（登録商標）AK03N（味の素ヘルシーサプライ社）に1 mMバルプロ酸を添加した樹立用培養液を、除去した培養液と同量加えた。

[0095] 以降、同様の半量培養液交換を毎日行いながら、20~40日間培養を続けることにより、6 cmディッシュ中に多数のiPS細胞コロニーを得た。一定量のコロニーが得られた段階で、樹立用培養液からiPS細胞用培養液（StemFit AK03Nのみ）に交換して培養を継続した。

[0096]（工程3）樹立したiPS細胞の遺伝的多様性を維持したままの培養（図11（5））

iPS細胞のコロニーが肉眼で確認できる程度に成長した段階で、iPS細胞を、新しくiMatrix-511をコーティングした6 cmディッシュへと継代した。

- [0097] 継代においては、ディッシュに接着しているiPS細胞をPBS(-)により洗浄した後、TrypLeSelect (ライフテクノロジーズ社：カタログ番号A12859-01) を添加して約7分間インキュベートすることにより、iPS細胞を剥離し、単一の細胞へと分散させた。細胞を、iPS細胞用培養液で洗浄し、細胞数を計測した。次に、分散させた細胞を、新たにiMatrix-511コートした6 cmディッシュに1500 cells/cm²の密度で播種した。ここで、回収されたiPS細胞は破棄することなく、すべて新たなディッシュへ播種した。
- [0098] 回収した細胞をすべて植え継ぐことにより、徐々に培養スケールが拡大する。そこで、樹立後から3~5継代を行い、iPS細胞を用いたT細胞補充療法に必要な量のiPS細胞が得られた段階で、以下の手順で細胞を凍結保存した。
- [0099] 継代と同じ手順でiPS細胞を回収したのち、TCプロテクター (DSファーマ社：カタログ番号KBTCP001) 等の細胞凍結液に細胞を浮遊させ、-1℃/分の速さで-80℃まで温度を下げてiPS細胞を凍結した。iPS細胞を安定的かつ長期間保存するためには、さらに液体窒素 (-196℃) 中で保存することが望ましい (図11(6))。
- [0100] (工程4) 再生T細胞集団の製造 (図11(8))
凍結保存したT-iPS細胞を解凍し、増幅培養を行う (図11(7))。
超低接着処理された6ウェルプレート (CORNING社：カタログ番号3471) に、工程3で得られたiPS細胞を $3 \times 10^5 \sim 6 \times 10^5$ 個/ウェルで播種し (Day 0)、EB培養液 (10 μg/mL ヒトインスリン、5.5 μg/mL ヒトトランスフェリン、5 ng/mL 亜セレン酸ナトリウム、2 mM L-グルタミン、45 mM α-モノチオグリセロールおよび50 μg/mL アスコルビン酸を含むStemPro34) に10 ng/mL BMP4、5 ng/mL bFGF、15 ng/mL VEGF、2 μM SB431542を加えて、低酸素条件下 (5%O₂) で5日間培養した (Day 5)。
- [0101] 続いて、50 ng/mL SCF、30 ng/mL TPO、10 ng/mL Flt3Lを添加し、さらに5~9日間培養した (~Day 14) (図11(9))。
- [0102] 得られた造血前駆細胞は、Fc-DLL4 (5 μg/mL) (Sino Biological Inc.) およびRetronectin (5 μg/mL) (タカラバイオ株式会社) でコーティングし

た4ウェルプレート上で、50 ng/mL SCF、50 ng/mL IL-7、50 ng/mL Flt3L、100 ng/mL TPO、15 μ M SB203580 (Tocris Bioscience) および30 ng/mL SDF-1 α (PeproTech) を添加した α MEM培養液 (15% FBS、2 mM L-グルタミン、100 U/mLペニシリン、100 ng/mL ストレプトマイシン、55 μ M 2-メルカプトエタノール、50 μ g/ml アスコルビン酸、10 μ g/mL ヒトインスリン、5.5 μ g/mL ヒトトランスフェリンおよび5 ng/mL 亜セレン酸ナトリウムを含む) 中で21日間培養を行った (Day 35) (図11(10))。

[0103] 未熟リンパ球凍結保存：前記培養で誘導された未熟リンパ球細胞を回収して、TCプロテクター等の細胞凍結液を用いて細胞を凍結保存した (図11(11))。

[0104] 凍結保存した未熟リンパ球細胞を解凍し (図11(12))、Day 35にフローサイトメーターを用いてCD45、CD3、CD4およびCD8のすべてが陽性のCD4/CD8ダブルポジティブ細胞 (DP細胞) 分画、またはCD45、CD3、CD8 α およびCD8 β のすべてが陽性のCD8 α /CD8 β ダブルポジティブ細胞分画を得た (図11(13))。

[0105] 前記培養で誘導された未熟リンパ球細胞より得られたCD4/CD8ダブルポジティブ細胞を、96ウェルプレート上で、15%ウシ胎児血清、500 ng/mL 抗CD3抗体 (eBioscience)、200 U/mL IL-2、10 ng/mL IL-7および10 nMデキサメタゾンを添加したRPMI 1640培養液中で2日間培養した (Day 37)。細胞を、15%ウシ胎児血清を添加したRPMI 1640培養液で洗浄することにより抗体を除去し、15%ウシ胎児血清および10 ng/mL IL-7を添加したRPMI 1640培養液でさらに5日間培養することにより、CD8シングルポジティブT細胞を得た (Day 42)。前記培養で誘導された未熟リンパ球細胞よりCD8 α /CD8 β ダブルポジティブ細胞を、96ウェルプレート上で、15%ウシ胎児血清、2 μ g/mL フィトヘマグルチニン (PHA)、40Gy放射線照射済末梢血単核球 (PBMC)、200 U/mL IL-2、10 ng/mL IL-7、5 ng/mL IL-15、5 ng/mL IL-21、50 μ g/mLアスコルビン酸、2 mM L-グルタミン、100 U/mL ペニシリン、100 ng/mL ストレプトマイシン、インスリン・トランスフェリン・セレンウム混合溶液 (Thermo Fish

er Scientific社：ITS-G solution、カタログ番号 41400045) を添加した α M EM培養液中で21日間培養し、CD8 α /CD8 β ダブルポジティブ成熟T細胞を得た (図11(14))。

[0106] 洗浄、成熟T細胞凍結

前工程で得られた成熟T細胞増幅をPBSを用いて細胞を洗浄した後、TCプロテクター等の細胞凍結液を用いて細胞を凍結保存した (図11(15))。

実施例 1

[0107] 前記の方法に基づき、肺がん患者の摘出腫瘍から分離された遺伝的多様性を有するT細胞集団からiPS細胞を樹立し、遺伝的多様性を有するT細胞へと再分化誘導を行った。

[0108] T細胞が発現するT細胞受容体 (TCR) の遺伝的多様性は、一般的にDNAやRNAのシーケンス解析により決定されるが、TCRのV β 鎖の各セグメントに特異的に結合する抗体パネルを用いて、簡易に検出することも可能である。

[0109] TCRV β 解析キット (BECKMAN COULTER社：カタログ番号IM-3497) を用いて、肺がん患者の摘出腫瘍から分離されたT細胞集団のTCRレパトアを解析した (図1)。患者検体中には、約1~13%の割合で、それぞれのV β 鎖を発現する細胞が含まれており、遺伝的多様性を有するT細胞集団であることが確認された。これらのT細胞集団を上記の方法によりiPS細胞へと初期化した。

[0110] iPS細胞は多能性を有する幹細胞であり、TCR遺伝子を含むT細胞関連の遺伝子は発現していない。即ち、TCR遺伝子の多様性を未分化なiPS細胞の段階で解析することは困難である。樹立されたiPS細胞は、遺伝的多様性を失わないように継代したのち、造血前駆細胞段階を経てT細胞へと分化誘導を行った。

[0111] 再生されたT細胞が発現するTCRのレパトアを、上記のキットを用いて解析した (図2)。iPS細胞の樹立およびT細胞の分化誘導に伴って、V β の2、3、4、7.1、7.2、8、12、14、16、20および21.3のセグメントを発現するT細胞の多様性は失われたが、約半数のV β レパトアが保存されており、再生されたT細胞集団が遺伝的多様性を有するT細胞集団であることが確認された。

実施例 2

[0112] がん抗原の1つであるGPC3に対し、ペプチドワクチンを投与された患者から末梢血を採取し、密度勾配遠心法を用いて単核球画分を分離した。この細胞集団の 2×10^6 個の細胞を、24ウェルプレートに加え、10 mg/mLの濃度のGPC3ペプチドを用いて、上記の工程1に従って、GPC3に指向性を有するT細胞を増幅培養した。培養した細胞を再びGPC3ペプチドと接触させ、24時間培養することにより活性化マーカーを発現させた。この細胞集団を、抗体（CD4-BV421、CD8-PerCP/Cy5.5、CD14-FITCおよびCD137-PE）で染色し、フローサイトメーター（BD FACSAria（登録商標）II）を用いて、GPC3指向性を有するT細胞集団の割合を解析した。（図3）。その結果、GPC3に指向性を有するCD8/CD137ダブルポジティブ細胞が高い割合で増幅されていることが示された。この細胞集団に対し、磁気ビーズを用いて、CD8およびCD137の両方を発現し、GPC3に指向性を有するT細胞集団を濃縮した（図4）。この細胞集団を、上記の工程2および3に従ってiPS細胞へと初期化した後、上記の工程4に従って、CD8シングルポジティブ細胞への再分化誘導を行った。再分化誘導されたCD8陽性細胞を抗体（CD3-APC/Cy7、CD4-BV421、CD8a-PerCP/Cy5.5、CD8b-PE、TCRa-b-FITC、CD45-BV510、およびGPC3-HLA複合体(Dextramer)-APC）で染色し、フローサイトメーター（BD FACSAria（登録商標）II）を用いて解析した（図5）。その結果、再分化誘導されたCD8陽性細胞がCD4を発現していないこと、CD8aおよびCD8b両陽性であること、GPC3 Dextramerに対して高い割合で結合することが示された（図5）。

実施例 3

[0113] 肺がん患者の末梢血から単核球を分離し、腫瘍抗原の1つであるWT1のオーバーラップペプチド（PepTivator WT1, Miltenyi Biotech社）と接触させることにより、実施例2と同様にして、WT1に指向性を有するT細胞集団を増幅培養した。WT1オーバーラップペプチドは、 $1 \mu\text{g/mL}$ で培養液に添加した。培養した細胞を、再びWT1オーバーラップペプチドと接触させることにより、活性化マーカーを発現させた。それを解析した結果、WT1に指向性を有するCD8/CD137ダブルポジティブ細胞が高い割合で増幅されていることが示された（

図6)。この細胞集団に対し、磁気ビーズを用いて、CD8およびCD137の両方を発現し、WT1に指向性を有するT細胞集団を濃縮した(図7)。

実施例 4

[0114] 非がん患者(健常人)の末梢血から単核球を分離し、ウイルス抗原の1つであるEBV LMP2Aのオーバーラップペプチド(PepTivator EBV LMP2A, Miltenyi Biotech社)と接触させることにより、実施例2と同様にして、EBV LMP2Aに指向性を有するT細胞集団を増幅培養した。EBV LMP2Aオーバーラップペプチドは、 $1\mu\text{g}/\text{mL}$ で培養液に添加した。培養した細胞を、再びEBV LMP2Aオーバーラップペプチドと接触させることにより、活性化マーカーを発現させた。それを解析した結果、EBV LMP2Aに指向性を有するCD8/CD137ダブルポジティブ細胞が高い割合で増幅されていることが示された(図8)。この細胞集団に対し、磁気ビーズを用いて、CD8およびCD137の両方を発現し、EBV LMP2Aに指向性を有するT細胞集団を濃縮した(図9)。

実施例 5

[0115] GPC3に指向性を持つT細胞集団から、iPS細胞を経由して作製された再生T細胞集団が、GPC3ペプチドを発現する標的細胞に対して特異的な細胞傷害活性を有することを確認した。

[0116] 肝臓がん患者の末梢血から単核球を分離し、実施例2と同様にして、GPC3ペプチドと接触させることにより、GPC3に指向性を有するT細胞集団を増幅培養し、さらに濃縮した。この濃縮した細胞集団を、上記の工程2および3に従ってiPS細胞へと初期化した後、上記の工程4に従って、CD8シングルポジティブ細胞への再分化誘導を行った。得られた再生T細胞集団は、フローサイトメトリー解析により、CD8は、 $\text{CD8}\alpha\beta$ ヘテロダイマーとして存在することが確認された(図10A)。

[0117] 標的細胞として、EBウイルスに感染させて不死化させたB細胞を用いた。この標的細胞をGPC3ペプチド($1\mu\text{M}$)存在下または非存在下で培養し、GPC3ペプチド発現細胞およびGPC3ペプチド非発現細胞を作製した。標的細胞に対する再生T細胞集団の細胞傷害活性は、N-SPC非RI細胞障害性アッセイキット(

テクノ・スズタ社)を用いて測定した。GPC3ペプチド発現または非発現標的細胞をBM-HT Reagentで処理し、BM-HT Reagentを細胞内に取り込ませた。その後、標的細胞を洗浄し、過剰のBM-HT Reagentを除去した。この標的細胞と再生T細胞集団とを2時間共培養し、培養上清をEu solution (ユーロピウム溶液)に添加した。傷害された標的細胞から培養液中に漏出するHTキレートはHT/Eu複合体となり、これをレーザー光で励起し、時間分解蛍光を測定することにより細胞傷害活性を評価した。細胞傷害活性は、次式により算出した。

$$\text{細胞傷害活性 (\%)} = \left[\left(\text{再生T細胞存在下での培養上清中の蛍光量} \right) - \left(\text{再生T細胞非存在下での培養上清中の蛍光量} \right) \right] / \left[\left(\text{全標的細胞を溶解した溶解液中の蛍光量} \right) - \left(\text{再生T細胞非存在下での培養上清中の蛍光量} \right) \right] \times 100$$

共培養時の再生T細胞と標的細胞との細胞数比は、20 : 1、10 : 1および5 : 1とした。その結果、GPC3ペプチド発現標的細胞に対する再生T細胞集団の細胞傷害活性が示され、その活性は標的細胞に対する再生T細胞の細胞数の増加に応じて増強された(図10B)。一方、再生T細胞集団は、GPC3ペプチドを発現しない標的細胞に対して、細胞傷害活性を示さなかった(図10B)。これらの結果から、得られた再生T細胞集団は、GPC3に対する抗原特異性を維持し、GPC3を発現する標的細胞に対する抗原特異的な細胞傷害活性を有することが示された。

実施例 6

[0118] 本発明の細胞製品の製造方法の1例

本発明の細胞製品の製造方法の1例を図12に示す。

腫瘍抗原X反応性T細胞(腫瘍特異的T細胞)由来のiPS細胞からCD8 α /CD8 β 両陽性の再生T細胞の製造工程を示す図である。胚様体形成法を用いて腫瘍抗原X反応性T細胞由来のiPS細胞より造血幹細胞の分化誘導を行い、フローサイトメーターにてCD34/CD43両陽性の造血幹細胞を単離する。得られたCD34/CD43両陽性の造血幹細胞をT細胞分化誘導因子と共に培養し(T細胞誘導)、未熟T細胞の分化誘導を行う。フローサイトメーターを用いて誘導されたCD8 α /CD

8β 両陽性の未熟T細胞を単離し、PHA及びフィーダー細胞と共に培養し成熟T細胞を得る。このCD3陽性の成熟T細胞は腫瘍抗原X反応性である(データは代表的な1例を示したものであり、図中の数字はその出現頻度(%)を示す。)

。

実施例 7

[0119] 本発明の細胞製品の規格

本発明の細胞製品の規格の目標値の設定を図13に示す。

製品の規格の目標値を以下のように設定している。各種試験の概略は以下の通りである。1) 無菌試験: 製品パッケージ中のバクテリアを否定する試験で第十七改正日本薬局方(直接法)、第十七改正日本薬局方(メンブランフィルター法)、微生物迅速試験法(バクテアラート)等により実施する。陰性であることを確認する。2) ウイルス試験: 細胞製品にヒトに病原性を示すヒトのウイルスであるHIV-1, HIV-2, HBV, HCV, HTLV, ParvoB19, EBV, CMV, WNVを否定する試験。陰性であることを確認する。3) マイコプラズマ試験: 細胞製品にマイコプラズマ感染のないことを否定する試験で、第十七改正日本薬局方 参考情報準拠(培養法、DNA染色法、NAT法)にて実施される。陰性であることを確認する。4) エンドトキシン試験: グラム陰性菌の細胞壁成分を否定する試験、第十七改正日本薬局方(カイネティック比濁法)等により実施する。検出限界以下であることを確認する。5) STR(Short Tandem Repeat)試験: 細胞製品が患者由来であることを確認する試験で、同一性の確認、製品内のクロスコンタミネーションの検出のために実施。遺伝子中のShortTandemRepeatをuPCRにて検出し遺伝子型を確認する。受け入れ時の患者細胞と製造された製品でのSTR遺伝子型が一致することを確認する。6) 細胞数: セルカウンターにて解析をする。細胞製品の総数とし 1.5×10^9 以上の収量であることを確認する。7) 生存率: セルカウンターにて解析をする。死細胞へ特異的に取り込まれるトリパンブルーなどの色素の取り込みのない細胞の割合で検出される。生存率が80%以上であることを確認する。8) 凍結融解後の生存率: 凍結した細胞製剤として出荷をされるが、融解後の生存率

が80%以上であることをあらかじめ確認する。9) 細胞形態：顕微鏡による観察にて、細胞の形態がリンパ球様であることを確認する。10) 核型検査：細胞製品の染色体に異常の無いことを簡易核型解析(Q-band解析)、G-band解析、FISH解析等により確認。11) 異物検査：肉眼にて製品のパッケージに異物がないことを確認する。12) センダイウイルスの残存試験；初期化因子を導入するときに用いたセンダイウイルスが細胞製品に残存していないことをqPCRにて検証する。検出限界以下であることを確認する。13) T細胞マーカーの解析：細胞製品がT細胞であることを確認するために、フローサイトメトリーによりT細胞のマーカー、例えば、CD3分子の発現を解析する。陰性対照に対して発現の高い細胞の割合が90%以上であることを確認する。

実施例 8

[0120] 本発明の再生T細胞の疲弊マーカーの発現低下

本発明の再生T細胞の疲弊マーカーの発現低下を図14に示す。工程1に従って増幅培養されたGPC3指向性T細胞集団(左)および、工程4に従って再分化誘導されたCD8陽性細胞(右)における細胞疲弊マーカーの発現を解析した。それぞれの細胞に対し、抗体(TIGIT-Pacific Blue、PD-1-APC/Cy7)で染色し、フローサイトメーター(BD FACSAria (登録商標) II)を用いて解析した。増幅されたGPC3指向性T細胞集団は約70%の細胞がいずれかの細胞疲弊マーカーを発現しているのに対し、再分化誘導されたCD8陽性細胞では細胞疲弊マーカーの発現割合が10%程度に低下している。

実施例 9

[0121] 本発明の再生T細胞のPMA/ION刺激におけるIFN- γ IL-2産生

本発明の再生T細胞がIFN- γ /IL-2産生能を有する結果を図15に示す。

再生T細胞を刺激する物質として、PMA (Phorbol 12-Myristate 13 Acetate、WAKO社)の終濃度が20 ng/mLおよびION (Ionomycin、WAKO社)の終濃度が1 μ g/mLとなるようPMA/ION溶液を作製した。再生T細胞にPMA/ION溶液およびMonensin (BioLegend社)を加え4時間刺激した。刺激後、細胞の表面抗原を抗体 (CD45-BV510、CD8 α -PerCP/Cy5.5、CD8 β -APC、CD19-FITC)で染色し、Fi

xation Buffer (BioLegend) で固定、Permeabilization Buffer (BioLegend) で細胞膜透過処理した。透過処理後、サイトカイン抗体 (IFN- γ -APC/Cy7、IL-2-PE) で染色し、フローサイトメーター (BD FACSAria (登録商標) II) を用いて、サイトカインを産生した再生T細胞の割合を解析した。サイトカイン産生した再生T細胞 (CD19⁻ CD45⁺ CD8a⁺ CD8b⁺細胞) の割合をPMA/ION 刺激有りと刺激無しで比較したところ、刺激有りの方が優位に両サイトカイン及び各サイトカインを産生する細胞の割合が多かった。これらの結果から、得られた再生T細胞はIFN- γ /IL-2産生能を有していると示唆される。

請求の範囲

- [請求項1] T細胞を有効成分として含む医薬組成物であって、
該T細胞が、
(i) がんワクチン抗原に対する特異性を有すること、
(ii) CD3およびCD45が陽性であること、および、
(iii) IFN- γ を産生すること、
を特徴とする、医薬組成物。
- [請求項2] 前記がんワクチン抗原が、GPC3、WT1、XAGE 1、LMP2およびネオアンチゲンからなる群より選択される1種類以上である、請求項1に記載の医薬組成物。
- [請求項3] 前記がんワクチン抗原が、GPC3である、請求項1に記載の医薬組成物。
- [請求項4] 前記T細胞が、 $\alpha\beta$ T細胞、 $\gamma\delta$ T細胞、ヘルパーT細胞、細胞傷害性T細胞、ナチュラルキラー(NK)T細胞またはこれらの混合物である、請求項1に記載の医薬組成物。
- [請求項5] 前記T細胞が、細胞傷害性T細胞である、請求項1に記載の医薬組成物。
- [請求項6] 前記細胞傷害性T細胞が、がんワクチンを接種したがん患者からT細胞を採取し、該がんワクチンに含まれるがんワクチン抗原に対する細胞傷害性T細胞を画分し、画分した細胞傷害性T細胞を増幅して得られたT細胞である、請求項5に記載の医薬組成物。
- [請求項7] 前記T細胞より、CD137発現T細胞を選択する工程、IFN- γ 産生T細胞を選択する工程、および抗原ペプチド-HLA複合体が結合するT細胞を選択する工程からなる群より選ばれる1以上の工程を用いて、細胞傷害性T細胞を画分することを特徴とする、請求項6に記載の医薬組成物。
- [請求項8] IL-2、IL-7、IL-15およびIL-21からなる群から選択される1種以上のサイトカインの存在下、細胞傷害性T細胞を増幅することを特徴と

する、請求項 6 に記載の医薬組成物。

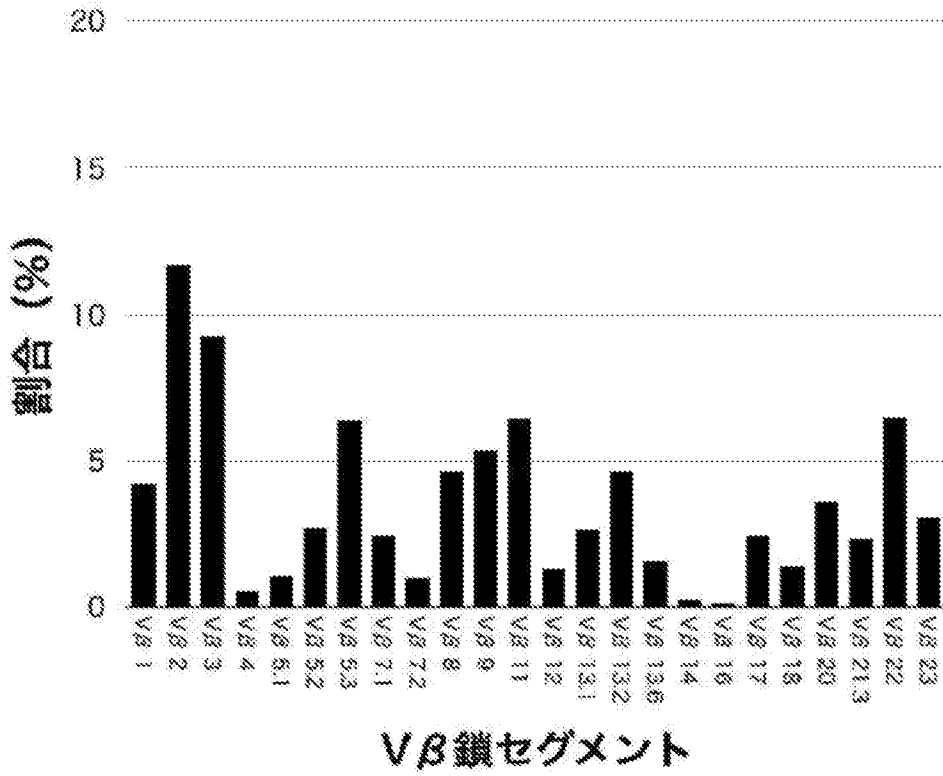
- [請求項9] 前記細胞傷害性T細胞が、iPS細胞より細胞傷害性T細胞への再分化を誘導して得られた再生T細胞集団である、請求項 5 に記載の医薬組成物。
- [請求項10] 前記iPS細胞が、GPC3、WT1、XAGE 1、LMP2およびネオアンチゲンからなる群より選択される 1 種類以上のがんワクチン抗原をT細胞と接触させ、該がんワクチン抗原に対する特異性を有するT細胞から作製される、請求項 9 に記載の医薬組成物。
- [請求項11] 前記iPS細胞が、がんワクチン抗原GPC3をT細胞と接触させ、GPC3に対する特異性を有するT細胞から作製される、請求項 9 に記載の医薬組成物。
- [請求項12] 前記T細胞が、がん患者または健常者の末梢血を採取した、請求項 10 または 11 に記載の医薬組成物。
- [請求項13] 前記T細胞が、がん患者の末梢血を採取した、請求項 10 または 11 に記載の医薬組成物。
- [請求項14] 前記再分化は、CD8 α CD8 β 両陽性のT細胞をフローサイトメーターを用いて、分画することを含む、請求項 9 に記載の医薬組成物。
- [請求項15] さらに細分化したT細胞をフィットヘマグルチニン (PHA) および自家または他家のフィーダー細胞とともに培養し、成熟培養を行うことを含む、請求項 9 に記載の医薬組成物。
- [請求項16] 前記T細胞は、CD8 α /CD8 β ダブルポジティブ成熟T細胞である、請求項 1 ~ 15 のいずれか1項に記載の医薬組成物。
- [請求項17] 前記T細胞のCD3の発現率は、70%以上である、請求項 1 ~ 16 のいずれか1項に記載の医薬組成物。
- [請求項18] 前記T細胞がIFN- γ IL-2産生能を有する、請求項 1 ~ 17 のいずれか1項に記載の医薬組成物。
- [請求項19] 前記T細胞の生存率は、60%以上である、請求項 1 ~ 18 のいずれか1項に記載の医薬組成物。

- [請求項20] さらに薬学的に許容される添加剤を含む、請求項1～19のいずれか1項に記載の医薬組成物。
- [請求項21] 前記添加剤が、細胞培養液、生理食塩水および緩衝液からなる群より選択される1種類以上である、請求項20に記載の医薬組成物。
- [請求項22] がんワクチンと併用することを特徴とする、請求項1～21のいずれか1項に記載の医薬組成物。
- [請求項23] がんワクチンと同時に投与されることを特徴とする、請求項1～21のいずれか1項に記載の医薬組成物。
- [請求項24] がんワクチンの投与前または投与後に投与されることを特徴とする、請求項1～21のいずれか1項に記載の医薬組成物。
- [請求項25] 前記がんワクチンに含まれるがんワクチン抗原が、GPC3、WT1、XAGE1、LMP2およびネオアンチゲンからなる群より選択される1種類以上である、請求項22～24のいずれか1項に記載の医薬組成物。
- [請求項26] 前記がんワクチンに含まれるがんワクチン抗原が、GPC3である、請求項22～24のいずれか1項に記載の医薬組成物。
- [請求項27] 一回投与分の量として、 1×10^6 個以上のT細胞を有する、請求項1～26のいずれか1項に記載の医薬組成物。
- [請求項28] 請求項1～27のいずれか1項に記載の医薬組成物を有する抗がん剤。
- [請求項29] がんの予防または治療のための、請求項1～27のいずれか1項に記載の医薬組成物。
- [請求項30] がんが、卵巣がん、肝芽腫、肝細胞がん、胃がん、食道がん、膵臓がん、腎細胞がん、乳がん、悪性黒色腫、非小細胞肺癌、子宮頸がん、膠芽腫、前立腺がん、神経芽腫瘍、慢性リンパ性白血病、甲状腺乳頭がん、大腸がん、およびB細胞非ホジキンリンパ腫からなる群より選択される、請求項29に記載の医薬組成物。
- [請求項31] がん患者に対して、請求項30に記載の医薬組成物の有効量を投与することを特徴とする、該がん患者におけるがんの予防または治療方

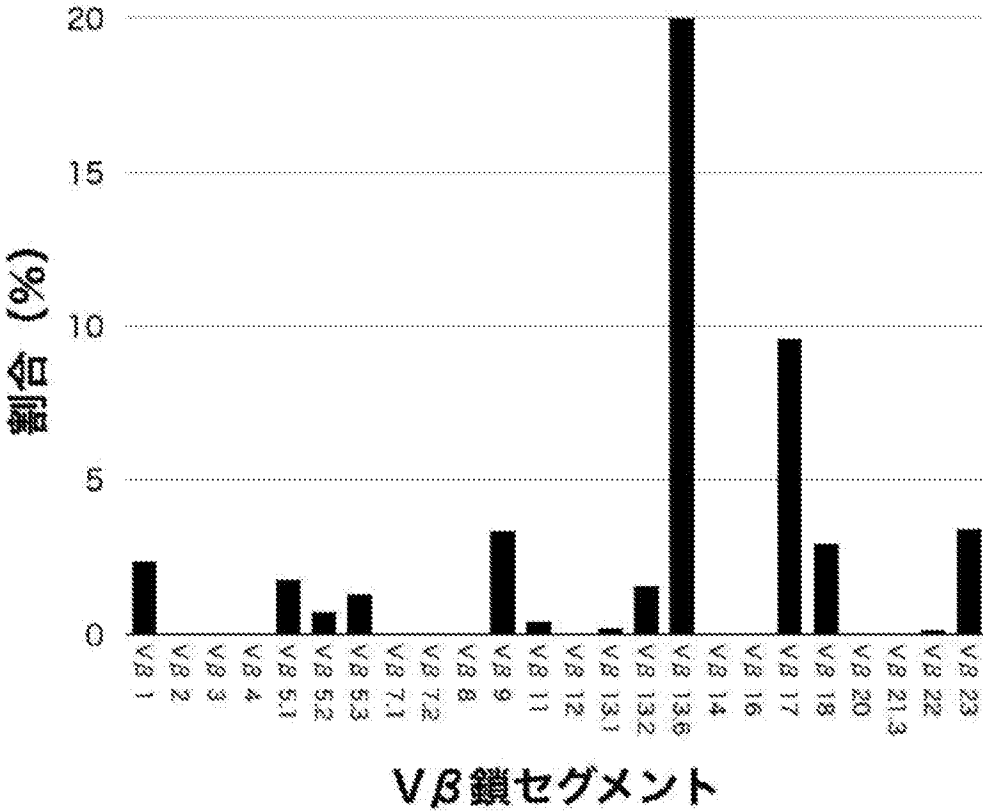
法。

[請求項32] 前記投与が単回投与または複数回投与である、請求項31に記載のがんの予防または治療方法。

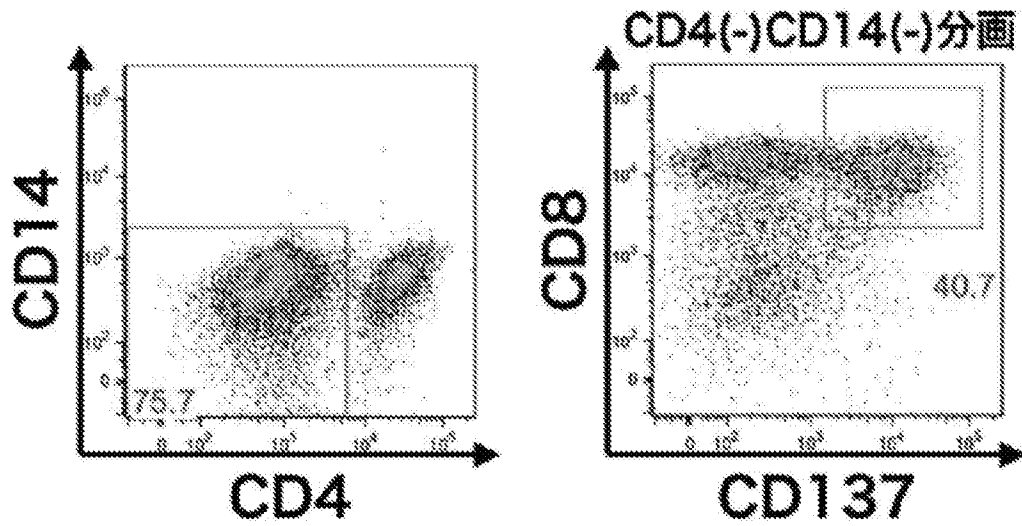
[図1]



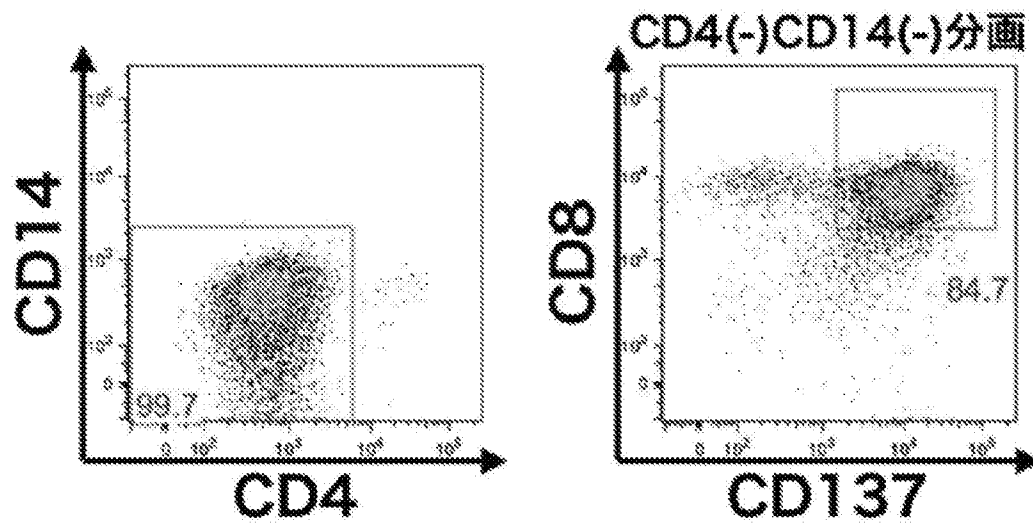
[図2]



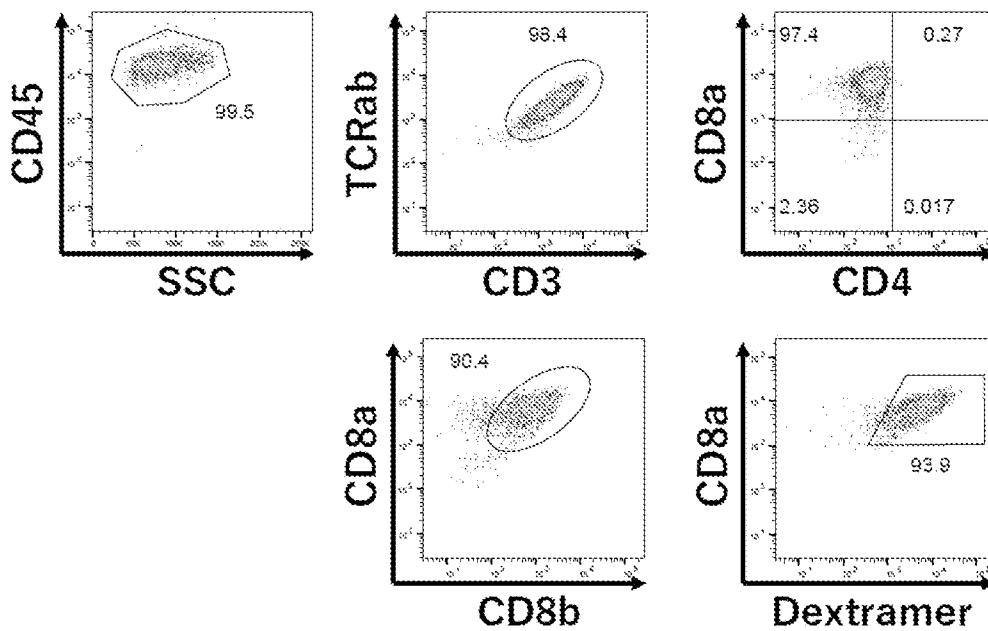
[図3]



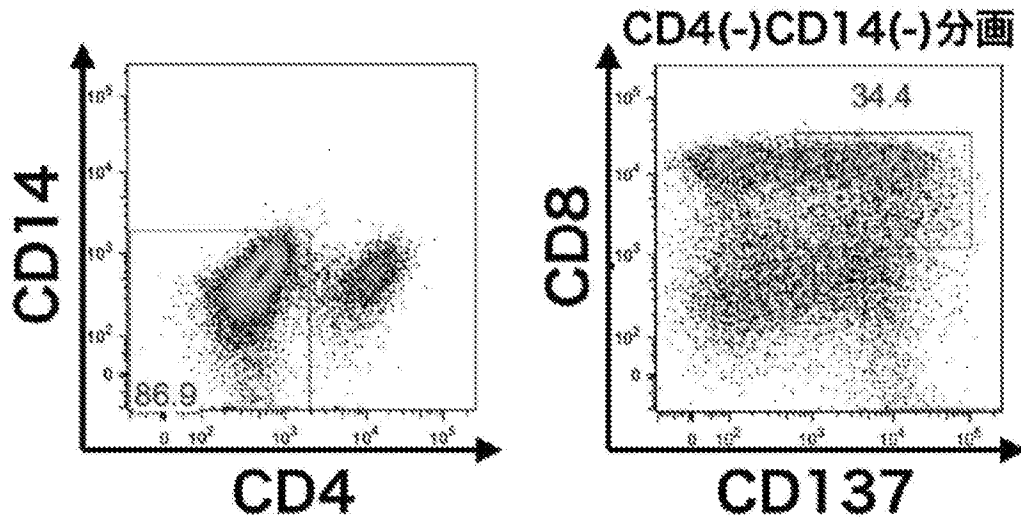
[図4]



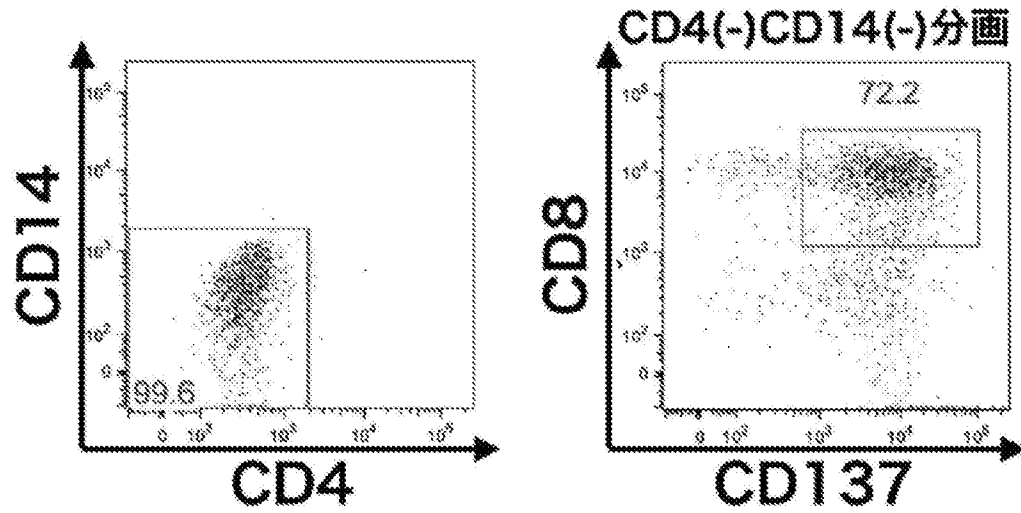
[図5]



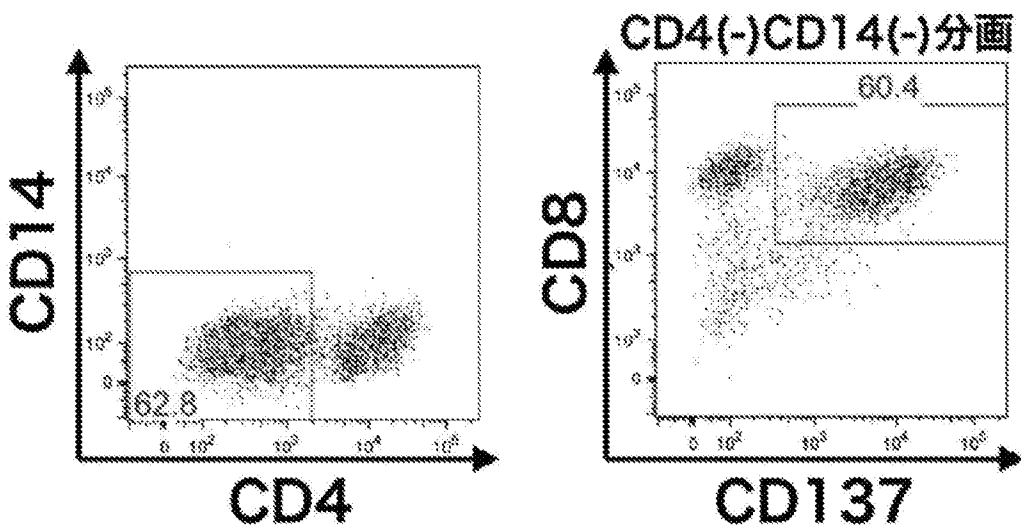
[図6]



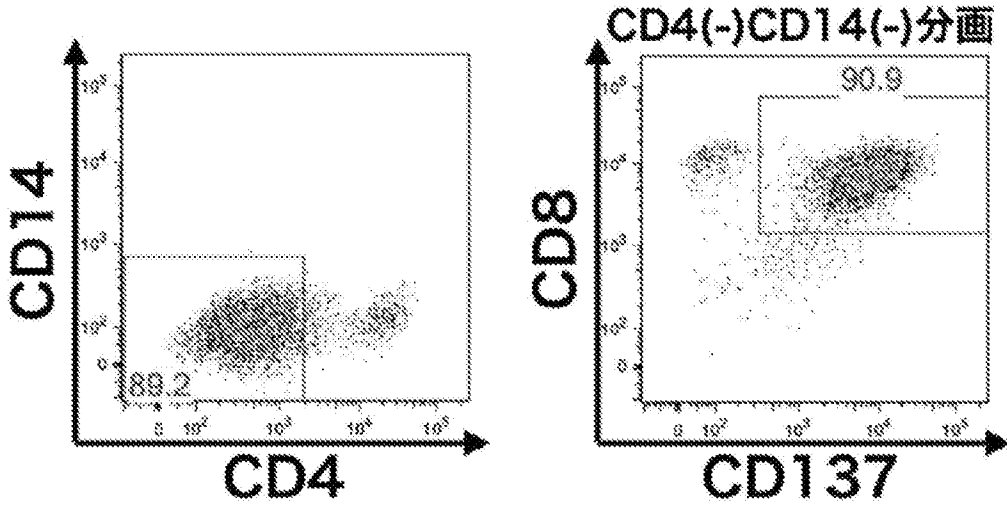
[図7]



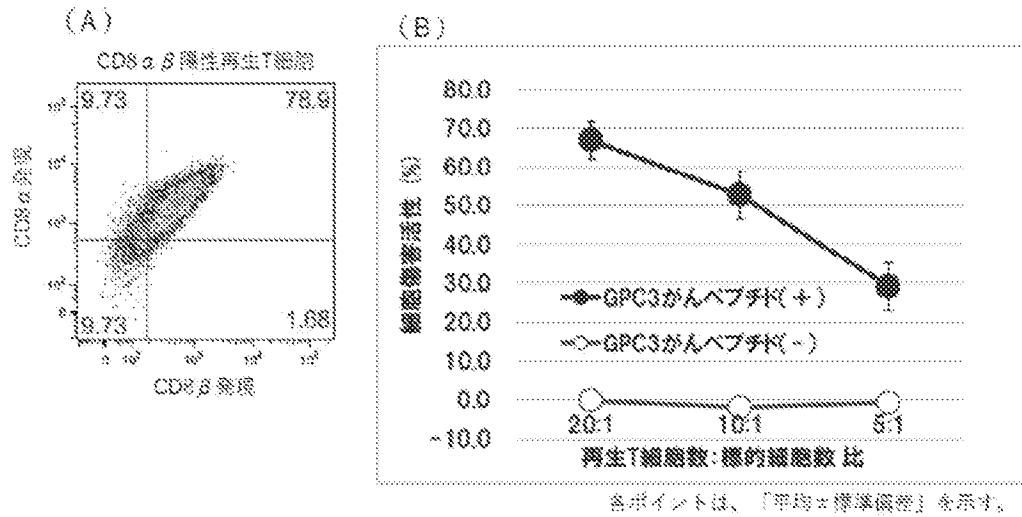
[図8]



[図9]

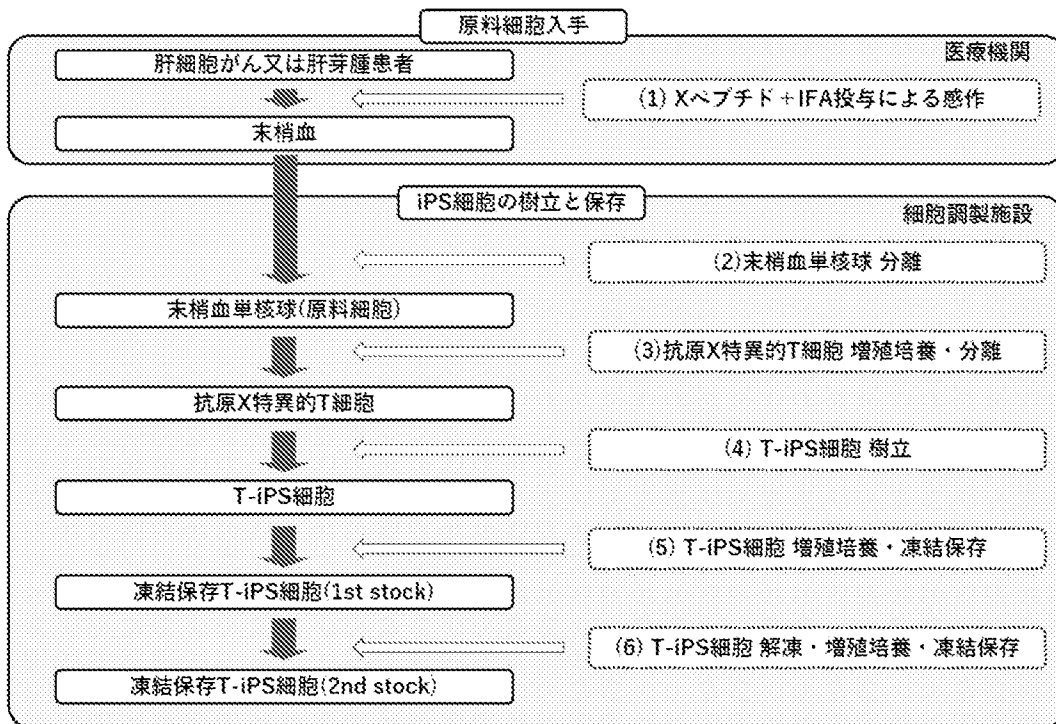


[図10]

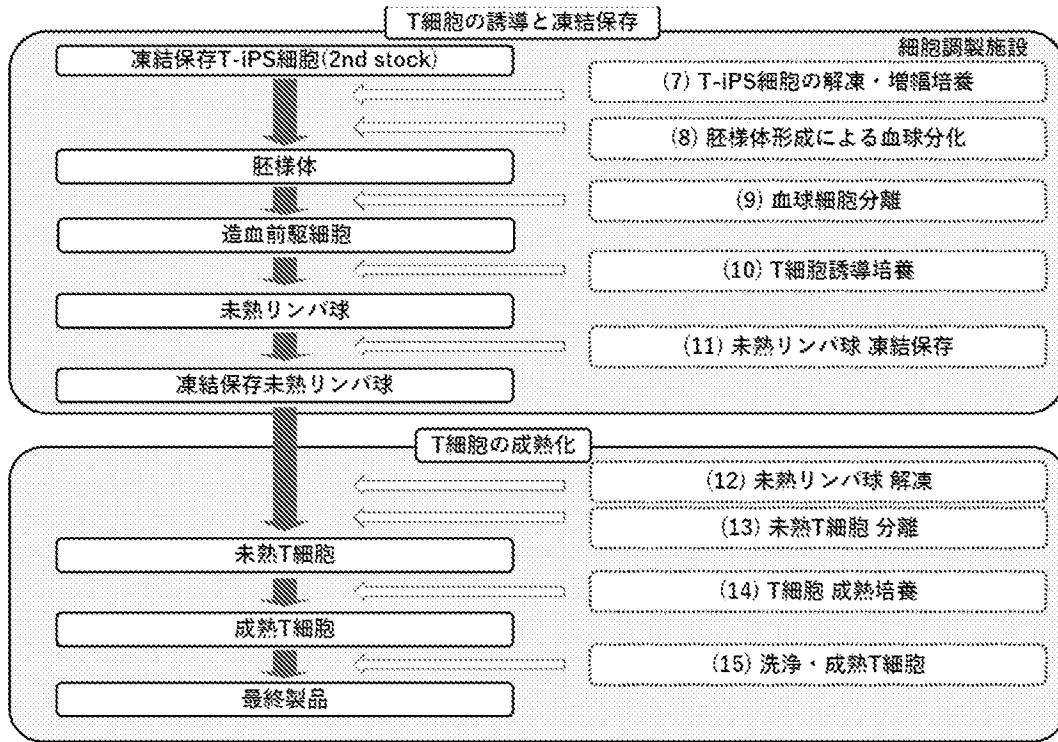


各ポイントは、「平均±標準偏差」を示す。

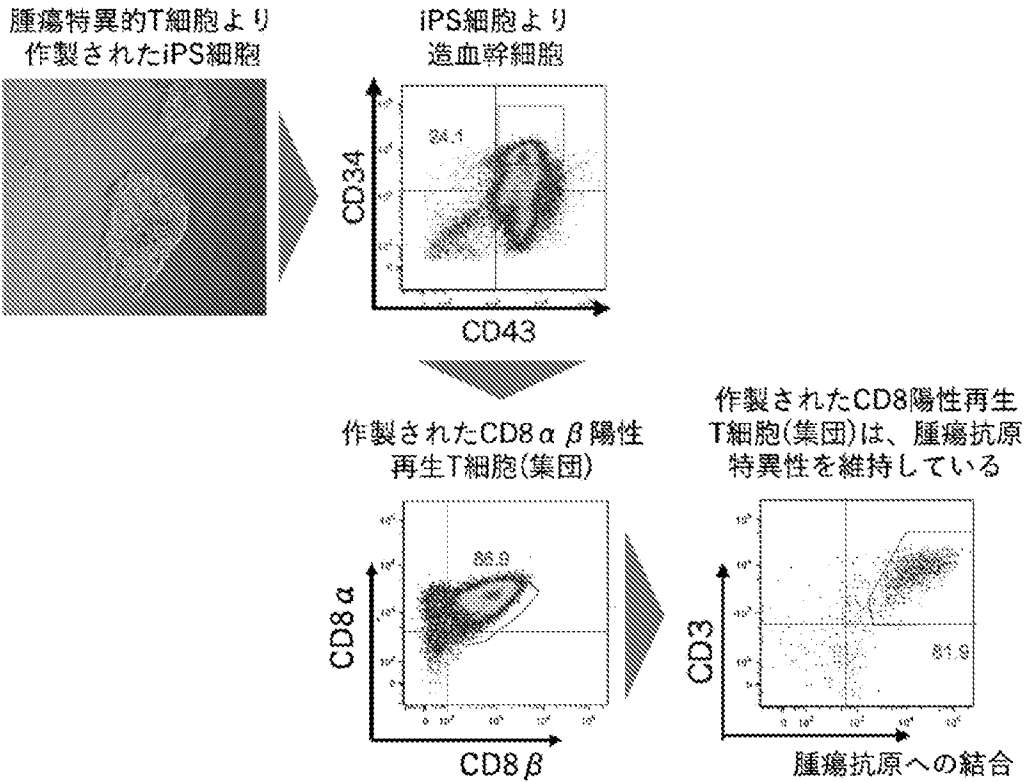
[図11A]



[図11B]



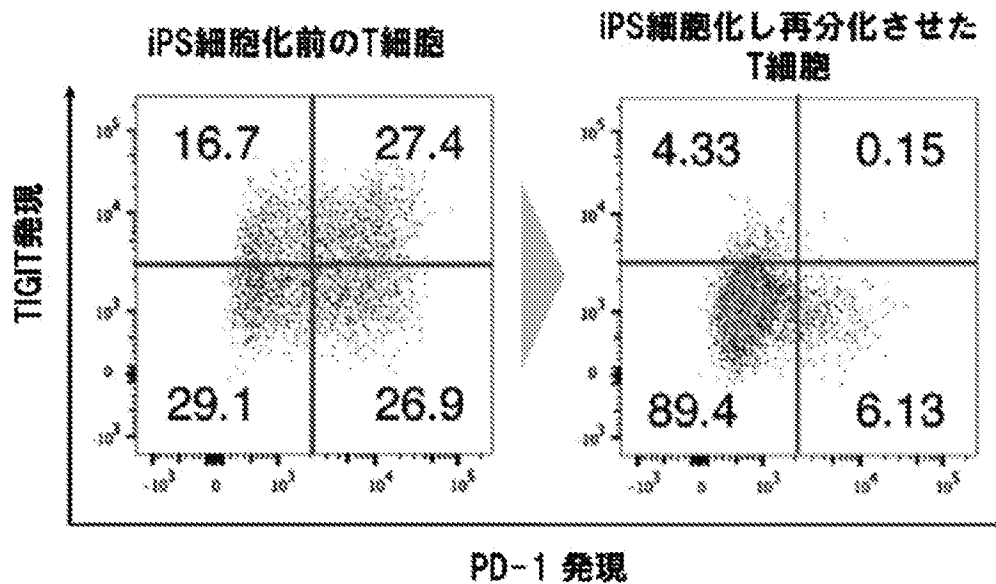
[図12]



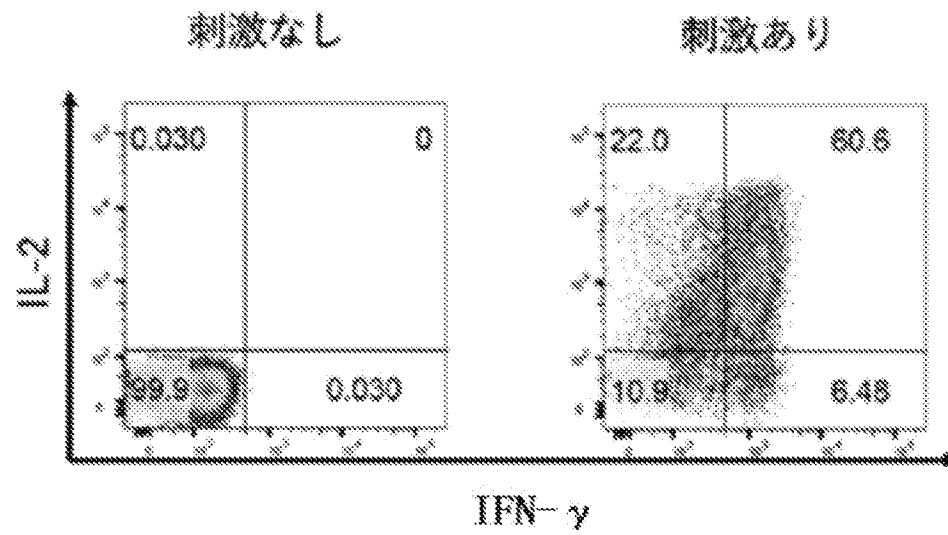
[図13]

規格項目	製品性能
無菌試験	陰性
ウイルス試験	陰性
マイコプラズマ試験	陰性
エンドトキシン試験	検出限界以下
STR(Short Tandem Repeat)試験	一致
細胞数	1.5X10e9以上
生存率	80%以上
凍結融解後の生存率	80%以上
細胞形態	リンパ球様
核型	異常なし
異物	肉眼にて認めない
センダイウイルスの残存	検出限界以下
T細胞マーカー (CD3)	90%以上

[図14]



[図15]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2020/023308

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER A61K 39/00(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i; A61K 35/17(2015.01)i; A61K 35/545(2015.01)i FI: A61K35/17 Z; A61K39/00 H; A61K35/545; A61P35/00 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) A61K39/00; A61P35/00; A61K35/17; A61K35/545 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 1971-2020 Registered utility model specifications of Japan 1996-2020 Published registered utility model applications of Japan 1994-2020 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) JSTPlus/JMEDPus/JST7580 (JDreamIII); CPlus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS (STN)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	VIZCARD, R. et al., "Regeneration of human tumor antigen-specific T cells from iPSCs derived from mature CD8(+) T cells", Cell Stem Cell, 2013, vol. 12, no. 1, pp. 31-6, summary, fig. 1, page 31, right column, paragraph [0001]	1, 4, 5, 9, 14, 16-24, 27-32
Y		6-8, 12, 13, 15, 18
A	塚本 博丈ほか, T細胞を介した抗腫瘍免疫応答、実験医学, 2013, vol. 31, no. 12 (extra edition), pp. 32-39, section "3) Effector T cells and memory T cells", non-official translation (TSUKAMOTO, Hirotake et al., "Anti-tumor immune response via T cells", Experimental medicine)	1-32
Y	WO 2019/070021 A1 (THYAS CO., LTD.) 11.04.2019 (2019-04-11) paragraphs [0014]-[0076], examples	6-8, 12, 13
<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 03 August 2020 (03.08.2020)		Date of mailing of the international search report 18 August 2020 (18.08.2020)
Name and mailing address of the ISA/ Japan Patent Office 3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915, Japan		Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2020/023308

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2011/096482 A1 (THE UNIVERSITY OF TOKYO) 11.08.2011 (2011-08-11) claims 1-7, paragraph [0042], examples 1-6	15, 18
X	WO 2016/010155 A1 (KAWAMOTO, Hiroshi) 21.01.2016 (2016-01-21) paragraph [0010], examples 1, 3	1-5, 9-12, 14, 16-32
Y		6-8, 12, 13, 15, 18
X	WO 2017/221975 A1 (KYOTO UNIVERSITY) 28.12.2017 (2017-12-28) example 3	1-5, 9-11, 14, 16-32
Y		6-8, 12, 13, 15, 18
A	SAITO, Hidehito et al., "Reprogramming of Melanoma Tumor-Infiltrating Lymphocytes to Induced Pluripotent Stem Cells", Stem Cells International, 2016, vol. 2016, Article ID 8394960, abstract, supplementary material	1-32
P, X	WO 2020/027094 A1 (THYAS CO., LTD.) 06.02.2020 (2020-02-06) claims 1-22	1-32

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/JP2020/023308

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
WO 2019/070021 A1 WO 2011/096482 A1	11 Apr. 2019 11 Aug. 2011	(Family: none) US 2013/0078226 A1 claims 1-7, paragraph [0160], examples A1-A6	
WO 2016/010155 A1	21 Jan. 2016	US 2017/0009206 A1 US 2017/0267972 A1 paragraph [0020], examples 1, 3 EP 3170895 A1 AU 2015290561 A	
WO 2017/221975 A1	28 Dec. 2017	US 2019/0330596 A1 example 3 EP 3476934 A1 CN 109415699 A	
WO 2020/027094 A1	06 Feb. 2020	(Family: none)	

<p>A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC）） A61K 39/00(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i; A61K 35/17(2015.01)i; A61K 35/545(2015.01)i FI: A61K35/17 Z; A61K39/00 H; A61K35/545; A61P35/00</p>																																						
<p>B. 調査を行った分野</p> <p>調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC）） A61K39/00; A61P35/00; A61K35/17; A61K35/545</p> <p>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</p> <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922 - 1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971 - 2020年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996 - 2020年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994 - 2020年</td> </tr> </table> <p>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); Cplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS (STN)</p>			日本国実用新案公報	1922 - 1996年	日本国公開実用新案公報	1971 - 2020年	日本国実用新案登録公報	1996 - 2020年	日本国登録実用新案公報	1994 - 2020年																												
日本国実用新案公報	1922 - 1996年																																					
日本国公開実用新案公報	1971 - 2020年																																					
日本国実用新案登録公報	1996 - 2020年																																					
日本国登録実用新案公報	1994 - 2020年																																					
<p>C. 関連すると認められる文献</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>引用文献の カテゴリー*</th> <th>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</th> <th>関連する 請求項の番号</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td>VIZCARD0, R et al., Regeneration of human tumor antigen-specific T cells from iPSCs derived from mature CD8(+) T cells, Cell Stem Cell, 2013, Vol.12, No.1, p.31-6 Summary, Fig.1, 第31頁右欄第1パラグラフ</td> <td>1,4,5,9,14, 16-24,27-32</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td></td> <td>6-8,12,13,15,18</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>塚本 博丈ほか, T細胞を介した抗腫瘍免疫応答, 実験医学, 2013, Vol.31, No.12 (増刊), p.32-39 「3) エフェクターT細胞とメモリーT細胞」の項</td> <td>1-32</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>WO 2019/070021 A1 (サイアス株式会社) 11.04.2019 (2019 - 04 - 11) [0014]-[0076], 実施例</td> <td>6-8,12,13</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>WO 2011/096482 A1 (国立大学法人東京大学) 11.08.2011 (2011 - 08 - 11) 請求項1-7, [0042], 実施例1-6</td> <td>15,18</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>WO 2016/010155 A1 (河本 宏) 21.01.2016 (2016 - 01 - 21) [0010], 実施例1,3</td> <td>1-5,9-12,14,16-32</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td></td> <td>6-8,12,13,15,18</td> </tr> </tbody> </table> <p><input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input checked="" type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。</p> <table border="0"> <tr> <td>* 引用文献のカテゴリー</td> <td>“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</td> </tr> <tr> <td>“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</td> <td>“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</td> </tr> <tr> <td>“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</td> <td>“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</td> </tr> <tr> <td>“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）</td> <td>“&” 同一パテントファミリー文献</td> </tr> <tr> <td>“O” 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献</td> <td></td> </tr> <tr> <td>“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</td> <td></td> </tr> </table>			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	VIZCARD0, R et al., Regeneration of human tumor antigen-specific T cells from iPSCs derived from mature CD8(+) T cells, Cell Stem Cell, 2013, Vol.12, No.1, p.31-6 Summary, Fig.1, 第31頁右欄第1パラグラフ	1,4,5,9,14, 16-24,27-32	Y		6-8,12,13,15,18	A	塚本 博丈ほか, T細胞を介した抗腫瘍免疫応答, 実験医学, 2013, Vol.31, No.12 (増刊), p.32-39 「3) エフェクターT細胞とメモリーT細胞」の項	1-32	Y	WO 2019/070021 A1 (サイアス株式会社) 11.04.2019 (2019 - 04 - 11) [0014]-[0076], 実施例	6-8,12,13	Y	WO 2011/096482 A1 (国立大学法人東京大学) 11.08.2011 (2011 - 08 - 11) 請求項1-7, [0042], 実施例1-6	15,18	X	WO 2016/010155 A1 (河本 宏) 21.01.2016 (2016 - 01 - 21) [0010], 実施例1,3	1-5,9-12,14,16-32	Y		6-8,12,13,15,18	* 引用文献のカテゴリー	“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	“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	“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	“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	“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	“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）	“&” 同一パテントファミリー文献	“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	
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	VIZCARD0, R et al., Regeneration of human tumor antigen-specific T cells from iPSCs derived from mature CD8(+) T cells, Cell Stem Cell, 2013, Vol.12, No.1, p.31-6 Summary, Fig.1, 第31頁右欄第1パラグラフ	1,4,5,9,14, 16-24,27-32																																				
Y		6-8,12,13,15,18																																				
A	塚本 博丈ほか, T細胞を介した抗腫瘍免疫応答, 実験医学, 2013, Vol.31, No.12 (増刊), p.32-39 「3) エフェクターT細胞とメモリーT細胞」の項	1-32																																				
Y	WO 2019/070021 A1 (サイアス株式会社) 11.04.2019 (2019 - 04 - 11) [0014]-[0076], 実施例	6-8,12,13																																				
Y	WO 2011/096482 A1 (国立大学法人東京大学) 11.08.2011 (2011 - 08 - 11) 請求項1-7, [0042], 実施例1-6	15,18																																				
X	WO 2016/010155 A1 (河本 宏) 21.01.2016 (2016 - 01 - 21) [0010], 実施例1,3	1-5,9-12,14,16-32																																				
Y		6-8,12,13,15,18																																				
* 引用文献のカテゴリー	“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																																					
“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	“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																																					
“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	“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																																					
“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）	“&” 同一パテントファミリー文献																																					
“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																																						
<p>国際調査を完了した日</p> <p>03.08.2020</p>	<p>国際調査報告の発送日</p> <p>18.08.2020</p>																																					
<p>名称及びあて先</p> <p>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</p>	<p>権限のある職員（特許庁審査官）</p> <p>小堀 麻子 4U 2938</p> <p>電話番号 03-3581-1101 内線 3452</p>																																					

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 Y	WO 2017/221975 A1 (国立大学法人京都大学) 28.12.2017 (2017 - 12 - 28) 実施例3	1-5, 9-11, 14, 16-32 6-8, 12, 13, 15, 18
A	SAITO, Hidehito et al., Reprogramming of Melanoma Tumor-Infiltrating Lymphocytes to Induced Pluripotent Stem Cells, Stem Cells International, 2016, Vol. 2016, Article ID 8394960 Abstract, Supplementary Material	1-32
P, X	WO 2020/027094 A1 (サイアス株式会社) 06.02.2020 (2020 - 02 - 06) 請求項1-22	1-32

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/JP2020/023308

引用文献	公表日	パテントファミリー文献	公表日
WO 2019/070021 A1	11.04.2019	(ファミリーなし)	
WO 2011/096482 A1	11.08.2011	US 2013/0078226 A1 Claims 1-7, [0160], Examples A1-A6 US 2017/0009206 A1	
WO 2016/010155 A1	21.01.2016	US 2017/0267972 A1 [0020], Examples 1,3 EP 3170895 A1 AU 2015290561 A	
WO 2017/221975 A1	28.12.2017	US 2019/0330596 A1 Example 3 EP 3476934 A1 CN 109415699 A	
WO 2020/027094 A1	06.02.2020	(ファミリーなし)	