

(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
2024年12月19日(19.12.2024)



(10) 国際公開番号
WO 2024/257872 A1

(51) 国際特許分類:

C12N 5/10 (2006.01) C12N 15/62 (2006.01)
C12N 5/071 (2010.01) C12Q 1/06 (2006.01)
C12N 5/0783 (2010.01) C12Q 1/68 (2018.01)
C12N 15/12 (2006.01) G01N 33/50 (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2024/021754

(22) 国際出願日: 2024年6月14日(14.06.2024)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:

特願 2023-099695 2023年6月16日(16.06.2023) JP

(71) 出願人: 武田薬品工業株式会社(TAKEDA PHARMACEUTICAL COMPANY LIMITED) [JP/JP]; 〒5410045 大阪府大阪市中央区道修町四丁目1番1号 Osaka (JP).

(72) 発明者: 大垣 総一郎 (OGAKI, Soichiro); 〒2510012 神奈川県藤沢市村岡東二丁目2番地の1 武田薬品工業株式会社内 Kanagawa

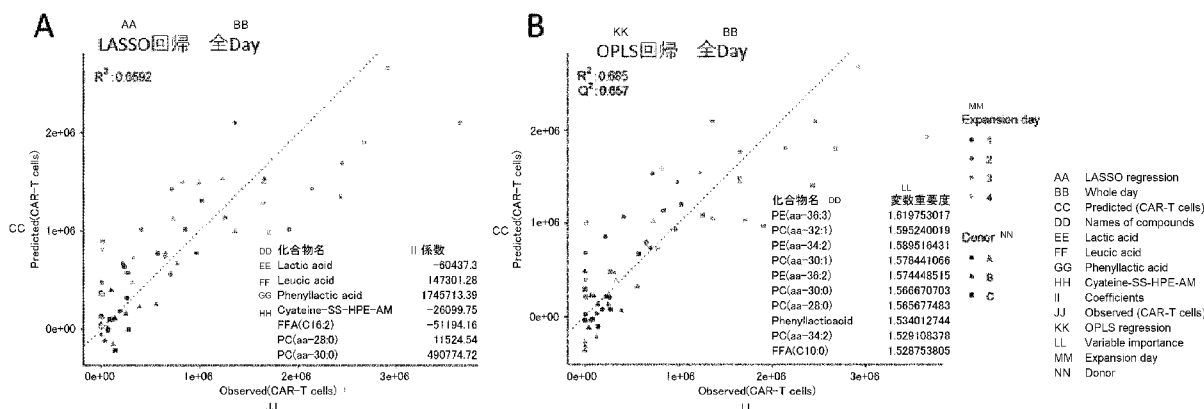
(JP). 荒木 秀夫(ARAKI, Hideo); 〒2510012 神奈川県藤沢市村岡東二丁目2番地の1 武田薬品工業株式会社内 Kanagawa (JP). 飯田 友峰(IIDA, Tomomine); 〒2510012 神奈川県藤沢市村岡東二丁目2番地の1 武田薬品工業株式会社内 Kanagawa (JP).

(74) 代理人: 弁理士法人三枝国際特許事務所(SAEGUSA & PARTNERS); 〒5410045 大阪府大阪市中央区道修町1-7-1 北浜コニシビル 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, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK,

(54) Title: METHOD FOR PREDICTING GENE TRANSFER RATE

(54) 発明の名称: 遺伝子導入率予測方法



(57) Abstract: Disclosed is a method for predicting the gene transfer rate in animal cell and/or the number of gene-transferred cells in the animal cells, the method comprising (1) a step for measuring a component in a supernatant of a culture obtained by the culturing of gene-transferred animal cells and (2) a step for predicting the gene transfer rate and/or the number of gene-transferred cells on the basis of a value measured in step (1).

(57) 要約: 開示されているのは、動物細胞の遺伝子導入率及び／又は遺伝子導入細胞数の予測方法であって、(1) 遺伝子導入した動物細胞が培養された培養上清の成分を測定する工程、及び(2) 工程(1)で測定した値に基づいて遺伝子導入率及び／又は遺伝子導入細胞数を予測する工程を含む方法である。

SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA,
UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

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

添付公開書類:

- 国際調査報告 (条約第21条(3))
- 明細書の別個の部分として表した配列リスト (規則5.2(a))

明 細 書

発明の名称： 遺伝子導入率予測方法

技術分野

[0001] 本発明は、遺伝子導入率及び／又は遺伝子導入細胞数の予測方法に関する。

(発明の背景)

[0002] 近年、キメラ抗原受容体（CAR）－T細胞などの遺伝子組換え細胞医薬品（遺伝子導入した／された細胞製剤）の研究開発が盛んに行われている。CAR－T細胞などの遺伝子組換え細胞医薬品では、全体の細胞数に導入遺伝子の割合をかけることで製品の量を規定している。そのため、CAR－T細胞製品では、製造工程、出荷及び投薬においてCAR導入率は最も重要な指標になっている。しかしながら、従来、細胞への遺伝子導入率の測定法にはフローサイトメトリーが用いられているが、測定から解析までの時間が長いこと（6－7時間）と複雑な工程（細胞の染色工程が手作業）が必要という問題がある。例えば、非特許文献1では、フローサイトメトリーを使用して、CAR－T細胞の測定を行ったことが報告されている。

先行技術文献

非特許文献

[0003] 非特許文献1：Cytometry Part B: Clinical Cytometry, Volume 100, Issue 2, p. 218-224

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0004] 本発明は、従来法と比較して簡便且つ効率的に細胞の遺伝子導入率及び／又は遺伝子導入細胞数の測定が可能となる、遺伝子導入率及び／又は遺伝子導入細胞数の予測方法等を提供することを課題とする。

課題を解決するための手段

[0005] 本発明者らは、上記目的を達成すべく鋭意研究を重ねた結果、遺伝子導入

細胞と非導入細胞で培養上清の成分に違いがあることを見出し、細胞を培養する培地を分析し、培地の成分（例えば、培地中の代謝物、pH、細胞外小胞）を指標とすることで、動物細胞の遺伝子導入率及び／又は遺伝子導入細胞数を簡便且つ効率的に予測することが可能となるという知見を得た。

[0006] 本発明は、これら知見に基づき、更に検討を重ねて完成されたものであり、次の動物細胞の遺伝子導入率及び／又は遺伝子導入細胞数の予測方法を提供するものである。

[0007] [1] 動物細胞の遺伝子導入率及び／又は遺伝子導入細胞数の予測方法であって、

(1) 遺伝子導入した動物細胞が培養された培養上清の成分を測定する工程、及び

(2) 工程(1)で測定した値に基づいて遺伝子導入率及び／又は遺伝子導入細胞数を予測する工程

を含む方法。

[2] 工程(1)において、培養上清のpH、代謝物又は細胞外小胞の測定を行う、[1]に記載の方法。

[3] 前記代謝物が、有機酸、糖類、脂質、ビタミン、アミン類、核酸類、アミノ酸及びその他代謝物イオンからなる群から選択される少なくとも1種である、[2]に記載の方法。

[4] 前記有機酸が、デセン酸、ドデセン酸、ミリストレイン酸、パルミチン酸、パルミトレイン酸、ヘキサデカジエン酸、ステアリン酸、オレイン酸、リノール酸、 γ -リノレン酸、 α -リノレン酸、アラキジン酸、エイコセン酸、エイコサジエン酸、ミード酸、アラキドン酸、ドコサペンタエン酸、ドコサヘキサエン酸、ネルボン酸、2-ヒドロキシ吉草酸、2-オキソグルタル酸、インドキシル硫酸、4-ピリドキシ酸、硫酸4エチルフェニル、アジピン酸、クエン酸、フマル酸、乳酸、リンゴ酸、フェニル乳酸、パントテン酸、ピペコリン酸、ピルビン酸、タルトロン酸、パラクレゾール硫酸、及びキサンツレン酸からなる群から選択される少なくとも1種である、[3]

に記載の方法。

〔5〕前記糖類がフルクトース、イノシトール、ガラクトース、グルコース、及びスクロースからなる群から選択される少なくとも1種である、〔3〕又は〔4〕に記載の方法。

〔6〕前記脂質がセラミド、Hex2-セラミド、Hex-セラミド、コレステロール、コレステロール硫酸塩、カルジオリピン、モノグリセロール、リゾホスファチジルコリン、リゾホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジン酸、ホスファチジルコリン、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルグリセロール、ホスファチジルイノシトール、ホスファチジルセリン、スフィンゴミエリン、ジヒドロスフィンゴミエリン、トリグリセリド、グリセロール3リン酸、及びガングリオシドGM3からなる群から選択される少なくとも1種である、〔3〕～〔5〕のいずれかに記載の方法。

〔7〕前記ビタミンが α トコフェロール、ニコチンアミド、及びコリンからなる群から選択される少なくとも1種である、〔3〕～〔6〕のいずれかに記載の方法。

〔8〕前記アミン類がエタノールアミン、及びエタノールアミンリン酸からなる群から選択される少なくとも1種である、〔3〕～〔7〕のいずれかに記載の方法。

〔9〕前記核酸類がアデノシン、及びメチルチオアデノシンからなる群から選択される少なくとも1種である、〔3〕～〔8〕のいずれかに記載の方法。

〔10〕前記アミノ酸がアシルカルニチン、アラニン、アルギニン、アスパラギン、アスパラギン酸、 β -アラニン、システイン、システイン-HPE-AM、システイン-SS-HPE-AM、ジメチルグリシン、グルタミン酸、グルタミン、グリシン、イソロイシン、ロイシン、ロイシン酸、リシン、メチオニン、ホモシステイン-HPE-AM、N-アセチル- β -アラニン、N-アセチルシステイン、N-アセチルセリン、N-アセチルトリプトファン、N-カルバモイル-アスパルテート、O-アセチルセリン、オルニチン、ピログルタミン酸、フェニルアラニン、

プロリン、セリン、S-スルホシステイン、タウリン、スレオニン、トリプトファン、チロシン、及びバリンからなる群から選択される少なくとも1種である、[3]～[9]に記載の方法。

[11] 前記その他代謝物イオンがアンモニウムイオン、カリウムイオン、カルシウムイオン、ナトリウムイオン、ピロリン酸、硫酸、亜硫酸、フェノール硫酸、及びSS-bis-HPE-AMからなる群から選択される少なくとも1種である、[3]～[10]のいずれかに記載の方法。

[12] 工程(1)における培養上清の成分の測定を、ラマン分光法により行う、[1]～[11]のいずれかに記載の方法。

[13] 工程(2)において、培養上清の1種類の成分に基づいて遺伝子導入率及び／又は遺伝子導入細胞数の予測を行う、[1]～[12]のいずれかに記載の方法。

[14] 工程(2)において、培養上清の2種以上の成分の組合せに基づいて遺伝子導入率及び／又は遺伝子導入細胞数の予測を行う、[1]～[12]のいずれかに記載の方法。

[15] 工程(2)において、遺伝子導入前後の培養上清の成分の変化を遺伝子導入率及び／又は遺伝子導入細胞数の予測に使用する、[1]～[14]のいずれかに記載の方法。

[16] 前記動物細胞が、免疫細胞である、[1]～[15]のいずれかに記載の方法。[17] 前記免疫細胞が、T細胞又はNK細胞である、[16]に記載の方法。

[18] 前記動物細胞が、上皮細胞である、[1]～[15]のいずれかに記載の方法。

[18a] 前記動物細胞が、肝がん細胞である、[18]に記載の方法。

[18b] 前記動物細胞が、ヒト細胞である、[1]～[18a]のいずれかに記載の方法。

[19] 前記遺伝子が、キメラ抗原受容体をコードする核酸である、[1]～[18b]のいずれかに記載の方法。

〔20〕遺伝子導入した細胞製剤の製造方法であって、動物細胞が培養された培養上清の成分を測定し、測定した値に基づいて遺伝子導入率及び／又は遺伝子導入細胞数を測定する工程を含む方法。

発明の効果

〔0008〕 本発明の遺伝子導入率及び／又は遺伝子導入細胞数の予測方法によれば、従来法と比較して複雑な工程が必要なく簡便な操作（例えば、必要な操作は測定装置による自動的な測定のみ）で細胞の遺伝子導入率及び／又は遺伝子導入細胞数の測定が可能である。さらに、本発明の遺伝子導入率及び／又は遺伝子導入細胞数の予測方法によれば、効率的（例えば、5分未満の短時間）に細胞の遺伝子導入率の測定が可能となる。また、培養上清を使用するため細胞のサンプリングが不要なため攪拌工程がなく細胞へのダメージも少ない。例えば、CAR-T細胞製品の製造工程・品質管理工程において、遺伝子導入前と遺伝子導入後に培養上清の成分を測定することで、短時間で簡便に細胞を傷つけずにCAR導入率及び導入細胞数を把握でき、基準を満たした製品が製造できているか確認することが可能となる。

図面の簡単な説明

〔0009〕〔図1〕実施例1の結果を示す図である。遺伝子を導入していないコントロールのT細胞（UTD）とCAR遺伝子を導入したCAR-T細胞での、（A）培養後の細胞数、（B）生存率、（C）CAR導入効率、（D）細胞培養後の上清の写真（N=3）、（E）培養上清のpH（N=4、* $p<0.05$ 、p値はt検定により解析した）。グラフ中の値は平均値±標準偏差（以下も同様）

〔図2〕実施例1の結果を示す図である。遺伝子を導入していないコントロールのT細胞（UTD）とCAR遺伝子を導入したCAR-T細胞での培養後の上清中の各成分を示すグラフである。（A）グルタミン（Gln）、（B）グルタミン酸（Glu）、（C）グルコース（Gluc）、（D）乳酸（Lac）、（E）アンモニウムイオン（ NH_4^+ ）、（F）ナトリウムイオン（ Na^+ ）、（G）カリウムイオン（ K^+ ）、（H）カルシウムイオン（ Ca^{++} ）（N=4、* $p<0.05$ 、p値はt検定により解析した）。

[図3]実施例2の結果を示す図である。(A)実験の模式図、各培養時点での(B)細胞密度、培養上清中の(C)グルコース、(D)乳酸、(E)グルタミン、(F)グルタミン酸、(G)アンモニウムイオンの量を示すグラフ(N=4、* $p<0.05$ 、** $p<0.01$ 、*** $p<0.001$ 、p値はt検定により解析した。)

[図4]実施例3の結果を示す図である。UTDもしくはCAR-T細胞でのグルコース取り込み能を示すグラフ(N=3、* $p<0.0001$ 、p値はt検定により解析した)。

[図5-1]実施例4の結果を示す図である。(A)実験の模式図、(B)作製した細胞の細胞密度とCAR導入効率を示すグラフ。

[図5-2]実施例4の結果を示す図である。培養最終日での培養上清中の各成分と細胞密度又はCARが導入されたT細胞(CAR-T)密度との相関を示すグラフ(C-D: 乳酸、E-F: アンモニウムイオン)。

[図5-3]実施例4の結果を示す図である。培養最終日での培養上清中の各成分と細胞密度又はCARが導入されたT細胞(CAR-T)密度との相関を示すグラフ(G-H: pH、I-J: グルタミン、K-L: グルコース)。

[図5-4]実施例4の結果を示す図である。培養最終日での培養上清中の各成分と細胞密度またはCARが導入されたT細胞(CAR-T)密度との相関を示すグラフ(M-N: グルタミン酸、O-P: ナトリウムイオン、Q-R: カリウムイオン、O-P: カルシウムイオン)。

[図6]実施例5の結果を示す図である。増幅工程中の各日程における、(A)細胞密度、(B)CAR導入効率を示すグラフ。

[図7]実施例5の結果を示す図である。増幅工程中の全日程での培養上清中の各成分と細胞密度又はCAR-T細胞密度との相関を示すグラフ(A-B: 乳酸、C-D: アンモニウムイオン、E-F: pH、G-H: グルタミン、I-J: グルコース)。

[図8]実施例6の結果を示す図である。UTDとCAR-T細胞での上清中での成分の違いをボルケーノプロットにより示したグラフ。横軸がUTDとCAR-T細胞での各成分の量の差についてWilliams検定を行い、CAR導入効率が

最も高い条件での変化量の推定値を示す。左がCAR-T細胞で減少し、右がCAR-T細胞で増加した成分を表す。また縦軸は増幅工程中の各日程での各成分の量の差のWilliams検定の $-\text{Log}(p \text{ value})$ を表す。

[図9]実施例7の結果を示す図である。増幅2日目での(A) PC(aa-30:0)、(B) PE(aa-36:2)、(C) PC(aa-32:1)、増幅3日目での(D) FFA(C10:1)、(E) PC(aa-30:1)、増幅4日目での(F) Phenyllactic acid、(G) PC(aa-28:0)、(H) FFA(C10:1)、(I) PC(aa-30:1)によるCAR-T細胞数(cells/mL)の予測を示すグラフ。

[図10-1]実施例7の結果を示す図である。増幅工程中の各日程での培養上清中の成分からの(A-C) LASSO回帰分析でのCAR-T細胞数(cells/mL)の予測を示すグラフ。

[図10-2]実施例7の結果を示す図である。増幅工程中の各日程での培養上清中の成分からの(D-G) OPLS回帰分析でのCAR-T細胞数(cells/mL)の予測を示すグラフ。

[図11]実施例7の結果を示す図である。全増幅工程期間中での培養上清中の成分からの単回帰分析でのCAR-T細胞数(cells/mL)の予測を示すグラフ。(A) Phenyllactic acid、(B) FFA(C10:1)、(C) PC(aa-28:0)、(D) PC(aa-30:0)、(E) PC(aa-30:1)、(F) PC(aa-32:1)、(G) PE(aa-34:2)、(H) PE(aa-36:2)、(I) PE(aa-36:3)。

[図12]実施例7の結果を示す図である。全増幅工程期間中での培養上清中の成分からの(A) LASSO回帰分析、(B) OPLS回帰分析でのCAR-T細胞数(cells/mL)の予測を示すグラフ。

[図13]実施例8の結果を示す図である。遺伝子を導入していないコントロールのSK-HEP-1細胞(UTD)とCAR遺伝子を導入したSK-HEP-1細胞での培養後の(A) CAR導入効率、(B) 上清中の乳酸を示すグラフ(N=4、* $p < 0.05$ 、p値はt検定により解析した)。

[図14]実施例9の結果を示す図である。遺伝子を導入していないコントロールのgdT細胞(UTD)とCAR遺伝子を導入したCAR-gdT細胞での培

養後の（A）CAR導入効率、（B）上清中の乳酸を示すグラフ。

[図15]実施例10の結果を示す図である。CAR-NK細胞数と培養上清中の成分との相関を示す図である。

[図16-1]実施例11の結果を示す図である。UTDとCAR-T細胞での上清中の（A）エクソソームの粒子径を示すグラフ、（B）エクソソームのプロテオーム解析の結果を示すボルケーノプロット（横軸が発現量の比、縦軸がp値）。

[図16-2]実施例11の結果を示す図である。（C）UTDとCAR-T細胞由来エクソソーム上で優位に発現の変わるタンパク質を示す表。

[図16-3]実施例11の結果を示す図である。（D）CAR-T細胞数とCD63陽性エクソソームの相関を示すグラフ。

[図17]実施例12の結果を示す図である。UTDとCAR-T細胞の培養上清について取得したラマン分光スペクトルの二次微分の（A）全体と（B）差があるピークの一例。

発明を実施するための形態

[0010] 以下、本発明の実施の形態について詳細に説明する。

[0011] 「～を含む（comprise(s)又はcomprising）」とは、その語句に続く要素の包含を示すがこれに限定されないことを意味する。したがって、その語句に続く要素の包含は示唆するが、他の任意の要素の除外は示唆しない。「～からなる（consist(s) of又はconsisting of）」とは、その語句に続くあらゆる要素を包含し、かつ、これに限定されることを意味する。したがって、「～からなる」という語句は、列挙された要素が要求されるか又は必須であり、他の要素は実質的に存在しないことを示す。「～から本質的になる（consist(s) essentially of又はconsisting essentially of）」とは、その語句に続く任意の要素を包含し、かつ、その要素について本開示で特定された活性又は作用に影響しない他の要素に限定されることを意味する。したがって、「～から本質的になる」という語句は、列挙された要素が要求されるか又は必須であるが、他の要素は任意選択であり、それらが列挙された要素

の活性又は作用に影響を及ぼすかどうかに応じて、存在させる場合もあり、存在させない場合もあることを示す。

[0012] 本明細書において、「多能性幹細胞 (pluripotent stem cell)」とは、胚性幹細胞 (ES細胞) 及びこれと同様の分化多能性、すなわち生体の様々な組織 (内胚葉、中胚葉、外胚葉の全て) に分化する能力を潜在的に有する細胞を指す。ES細胞と同様の分化多能性を有する細胞としては、「人工多能性幹細胞」 (本明細書中、「iPS細胞」と称することもある) が挙げられる。多能性幹細胞がES細胞又はヒト胚に由来する任意の細胞である場合、その細胞は胚を破壊して作製された細胞であっても、又は胚を破壊することなく作製された細胞であってもよく、好ましくは、胚を破壊することなく作製された細胞である。

[0013] 本明細書において、「細胞集団 (population)」とは、同じ種類又は異なる種類の2以上の細胞を意味する。「細胞集団 (population)」は、同じ種類又は異なる種類の細胞の一塊 (mass) をも意味する。

[0014] 本明細書において、「培養」とは、細胞をインビトロ環境において維持し、又は／及び増殖させることを指す。「培養する」とは、組織外又は体外で、例えば、細胞培養ディッシュ又はフラスコ中で細胞を持続させ、又は／及び増殖させることを意味する。

[0015] 本発明は、動物細胞の遺伝子導入率及び／又は遺伝子導入細胞数の予測方法であって、(1) 遺伝子導入した動物細胞が培養された培養上清の成分を測定する工程、及び
(2) 工程(1)で測定した値に基づいて遺伝子導入率及び／又は遺伝子導入細胞数を予測する工程
を含むことを特徴とする。

[0016] 本発明における「遺伝子導入率」とは、細胞への核酸の導入率をいい、例えば、全細胞中の核酸が導入された細胞の割合、細胞集団における核酸の取り込み量、又は全細胞集団における導入遺伝子の発現率である。導入遺伝子がCARの場合、CAR陽性率と記載することもある。

[0017] 本発明における「遺伝子導入細胞数」とは、細胞集団において遺伝子が導入された細胞の数である。導入遺伝子がCARの場合、CAR陽性細胞数と記載することもある。

[0018] 本発明の「動物細胞の遺伝子導入率及び／又は遺伝子導入細胞数の予測方法」における「及び／又は」とは、本発明の予測方法は、遺伝子導入率と遺伝子導入細胞数の双方を予測する方法でもあり、いずれか一方を測定する方法でもあることを意味する。より好ましくは、遺伝子導入細胞数の予測方法である。

[0019] ・工程（１）

工程（１）では、遺伝子導入した動物細胞が培養された培養上清の成分の測定を行う。

[0020] 動物細胞の種類は、特に限定されず、各種の動物細胞を広く使用することができる。動物細胞の種類としては、例えば、脾細胞、神経細胞、グリア細胞、膵臓β細胞、骨髓細胞、メサングウム細胞、ランゲルハンス細胞、表皮細胞、上皮細胞、内皮細胞、繊維芽細胞、繊維細胞、筋細胞（例：骨格筋細胞、心筋細胞、筋芽細胞、筋衛星細胞）、脂肪細胞、免疫細胞（例：マクロファージ、T細胞、B細胞、ナチュラルキラー細胞（NK細胞）、肥満細胞、好中球、好塩基球、好酸球、単球、巨核球）、滑膜細胞、軟骨細胞、骨細胞、骨芽細胞、破骨細胞、乳腺細胞、肝細胞、間質細胞、卵細胞及び精細胞、並びにこれらの細胞に分化誘導可能な幹細胞（神経幹細胞、造血幹細胞、間葉系幹細胞、歯髄幹細胞、iPS細胞、ES細胞などの多能性幹細胞を含む）、前駆細胞、血球系細胞、卵母細胞及び受精卵が挙げられる。T細胞には、αβT細胞、γδT細胞、ヘルパーT細胞、細胞傷害性T細胞、制御性T細胞、サプレッサーT細胞、腫瘍浸潤T細胞、メモリーT細胞、ナイーブT細胞、NKT細胞、TCR-T細胞、STAR受容体T細胞、CAR-T細胞（例：CAR-αβT細胞、CAR-gd T細胞）などが包含される。さらに、動物細胞は、初代細胞、上記幹細胞（例：iPS細胞）等をin vitroで分化誘導して作製した上記細胞も含む。また、動物細胞は、各種のがん細胞

胞も包含する。動物細胞は、1種のみ、又は2種以上を含むものであってもよい。

[0021] また、動物細胞の由来生物は特に限定されず、そのような生物としては、哺乳類、例えば、ヒト、マウス、ラット、ウシ、ウマ、ブタ、ウサギ、イヌ、ネコ、ヤギ、サル、チンパンジーなどが例示される。中でも、ヒトが好ましい。

[0022] 動物細胞は、外来遺伝子を導入した動物細胞である。「外来遺伝子」は、動物細胞に所望のタンパク質を発現させるために、外部より導入される遺伝子又はモノマーヌクレオチドであり、動物細胞の用途に応じて適宜選択することができる。本発明における「遺伝子導入した動物細胞」とは、遺伝子導入を試みて、実際に遺伝子が導入された動物細胞、及び遺伝子が導入されなかった動物細胞の両方の意味を含む。また、本発明において「遺伝子導入された（動物）細胞」は、実際に遺伝子が導入された（動物）細胞を意味する。「遺伝子導入した細胞」と「遺伝子導入された細胞」は文脈により相互互換的に用いられ得る。

[0023] 外来遺伝子は、例えば、CAR（キメラ抗原受容体）を発現するための遺伝子とすることができる。外来遺伝子は、例えば、CARを発現するための遺伝子と、サイトカイン及び／又はケモカインを発現するための遺伝子とすることができる。動物細胞が発現するCARは基本的に、一般的又は公知のCARと同様に、（i）がん細胞の細胞表面抗原を認識する抗原認識部位（例えば、一本鎖抗体、リガンド、ペプチドなど）、（ii）細胞膜貫通領域、及び（iii）T細胞の活性化を誘導するシグナル伝達領域、の各部位のペプチドが、必要に応じてスペーサーを介して連結することによって構成されている。その他の外来遺伝子としては、TCR（T細胞受容体）、STARR（Synthetic T cell receptor and antigen receptor）、chimeric TAC（T cell antigen coupler）receptor、自殺遺伝子（iCas9、HSV-TK等）、サイトカイン（インターロイキン、ケモカイン等）、T細胞活性化抑制因子（免疫チェックポイント因子（CTLA-4、PD-1、TIM-3

、LAG-3、TGIT、BTLA、VISTA（PD-1H）等）、CD160、Cbl-b、内因性TCR等）の発現を抑制する分子、T細胞活性化促進因子（CD28、ICOS、CD137、OX40、CD27、GITR、BAFFR、TACI、BMCA、CD40L等）などが挙げられる。

[0024] 外来遺伝子を動物細胞に導入するための手段は特に限定されるものではなく、公知又は一般的な各種の手段を採用することができる。典型的には上記外来遺伝子は、発現ベクターを用いて動物細胞に導入し、発現させる。発現ベクターは、直鎖状でも環状でもよく、プラスミドなどの非ウイルスベクターでも、ウイルスベクターでも、トランスポゾンによるベクターでもよい。

[0025] 発現ベクターを動物細胞に導入するための手法は、実施形態に応じた適切なものとすることができる。例えば、ウイルス感染法、リン酸カルシウム法、リポフェクション法、マイクロインジェクション法、エレクトロポレーション法などの公知の方法により、発現ベクターを動物細胞に導入することができる。発現ベクターは、公知の手段によって、また適宜市販のキットを用いて（その指示書に従って）、各手法における使用に適した形態に調製することができる。

[0026] 発現ベクターは、ウイルス感染法により動物細胞に導入することができる。ウイルスベクターとしては、例えば、レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクターが挙げられる。これらのウイルスベクターを用いる場合は、対応する市販のキットを用いて、所望の外来遺伝子を含むベクター及び各ウイルスのパッケージングベクター（プラスミド）を宿主細胞にトランスフェクションして組換えウイルスを作製した後、得られた組換えウイルスを動物細胞に感染させるようにすればよい。

[0027] 外来遺伝子が複数の場合、全ての外来遺伝子が1つの発現ベクターに含まれていてもよいし、すべての外来遺伝子がそれぞれ別個の発現ベクターに含まれていてもよいし、複数の外来遺伝子のうちの一部は1つの発現ベクター

に含まれ、残りはそれぞれ別個の発現ベクターに含まれていてもよい。1つの発現ベクターに複数の外来遺伝子が含まれる場合、上流側から下流側に向けてどの順序でそれらの外来遺伝子が配置されるかは特に限定されるものではない。

[0028] 外来遺伝子は、所望のタンパク質又はポリペプチドのアミノ酸配列に応じて、それをコードする塩基配列を有する核酸（ポリヌクレオチド）により構成することができる。当業者であれば、所望のタンパク質（ポリペプチド）を動物細胞において発現させることのできる発現ベクターを設計し、作製することが可能である。発現ベクターが含む核酸は、化学的なDNA合成反応により作製してもよいし、cDNAとして作製（クローニング）してもよい。

[0029] 発現ベクターは、外来遺伝子に加えて、必要に応じて、プロモーター、ターミネーター、エンハンサー、開始コドン、終止コドン、ポリアデニル化シグナル、核局在化シグナル（NLS）、マルチクローニングサイト（MCS）等の配列を含んでいてもよい。発現ベクターは更に、レポーター遺伝子（例えば、各色の蛍光タンパク質をコードする遺伝子）、薬剤選択遺伝子（例えば、カナマイシン耐性遺伝子、アンピシリン耐性遺伝子、ピューロマイシン耐性遺伝子）、自殺遺伝子（例えば、ジフテリアA毒素、単純ヘルペスチミジンキナーゼ（HSV-TK）、カルボキシペプチダーゼG2（CPG2）、カルボキシルエステラーゼ（CA）、シトシンデアミナーゼ（CD）、チトクロームP450（cyt-450）、デオキシシチジンキナーゼ（dCK）、ニトロレダクターゼ（NR）、プリンヌクレオシドホスホリラーゼ（PNP）、チミジンホスホリラーゼ（TP）、水痘帯状疱疹ウイルスチミジンキナーゼ（VZV-TK）、キサンチンーグアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ（XGPRT）、誘導性カスパーゼ9（inducible caspase 9）などをコードする遺伝子）のような“機能的遺伝子”をコードする核酸（塩基配列）を含んでいてもよい。

[0030] 「核酸」とは、モノマーヌクレオチド、又はヌクレオチド及び該ヌクレオチドと同等の機能を有する分子が重合した分子であればいかなるものでもよ

く、例えば、リボヌクレオチドの重合体であるRNA、デオキシリボヌクレオチドの重合体であるDNA、リボヌクレオチド及びデオキシリボヌクレオチドが混合した重合体、及びヌクレオチド類似体を含むヌクレオチド重合体を挙げることができ、さらに、核酸誘導体を含むヌクレオチド重合体であってもよい。核酸は、一本鎖核酸又は二本鎖核酸であってもよい。二本鎖核酸には、一方の鎖に対し、他方の鎖がストリンジェントな条件でハイブリダイズする二本鎖核酸も含まれる。

[0031] ヌクレオチド類似体としては、RNA又はDNAと比較して、ヌクレアーゼ耐性の向上又は、安定化させるため、相補鎖核酸とのアフィニティーを上げるため、あるいは細胞透過性を上げるため、あるいは可視化させるために、リボヌクレオチド、デオキシリボヌクレオチド、RNA又はDNAに修飾を施した分子であればいかなる分子でもよい。ヌクレオチド類似体としては、天然に存在する分子でも非天然の分子でもよく、例えば、糖部修飾ヌクレオチド類似体（例：2'－O－メチルリボースで置換されたヌクレオチド類似体、2'－O－プロピルリボースで置換されたヌクレオチド類似体、2'－O－メトキシエトキシリボースで置換されたヌクレオチド類似体、2'－O－メトキシエチルリボースで置換されたヌクレオチド類似体、2'－O－[2－（グアニジウム）エチル]リボースで置換されたヌクレオチド類似体、2'－フルオロリボースで置換されたヌクレオチド類似体、架橋構造型人工核酸（BNA：Bridged Nucleic Acid）、ロックド人工核酸（LNA：Locked Nucleic Acid）、エチレン架橋構造型人工核酸（ENA：Ethylene bridged nucleic acid）、ペプチド核酸（PNA）、オキシペプチド核酸（OPNA）、ペプチドリボ核酸（PRNA））、リン酸ジエステル結合修飾ヌクレオチド類似体（例：ホスフォロチオエート結合に置換されたヌクレオチド類似体、N3'－P5' ホスフォアミデート結合に置換されたヌクレオチド類似体）等が挙げられる。

[0032] 核酸誘導体としては、核酸に比べ、ヌクレアーゼ耐性を向上させるため、安定化させるため、相補鎖核酸とのアフィニティーを上げるため、細胞透過

性を上げるため、あるいは可視化させるために、該核酸に別の化学物質を付加した分子であればいかなる分子でもよく、その具体例としては、5' - ポリアミン付加誘導体、コレステロール付加誘導体、ステロイド付加誘導体、胆汁酸付加誘導体、ビタミン付加誘導体、Cy 5 付加誘導体、Cy 3 付加誘導体、6 - F A M 付加誘導体、ビオチン付加誘導体等を挙げることができる。

[0033] 本発明の別の実施態様において、外来遺伝子に代えてタンパク質、s i R N A、s h R N A、d s R N A、m i R N A、アンチセンス核酸などを動物細胞に導入してもよく、外来遺伝子以外にもこれらのものを動物細胞に導入しても培養上清の成分を測定することにより細胞の遺伝子導入率の測定が可能となる。

[0034] 工程（１）の培養で使用される培地は、動物細胞の培養に用いられる培地を基礎培地として使用することができる。基礎培地としては、動物細胞の培養に使用できるものであれば特に限定されず、例えば、A I M V、X - V I V O - 1 5、N e u r o B a s a l、E G M 2、T e S R、B M E、B G J b、C M R L 1 0 6 6、グラスゴーMEM、改良MEM亜鉛オプション、I M D M、1 9 9 培地、イーグルMEM、 α M E M、D M E M、H a m、R P M I - 1 6 4 0、フィッシャー培地、T細胞培養用の市販の各種製品（例えば、CTS™ OpTmizer™ T-Cell Expansion Basal Medium (Thermo Fisher Scientific社)、CTS OpTmizer Pro Serum Free Medium (Thermo Fisher Scientific社)、CTS OpTmizer Pro™ (Thermo Fisher Scientific社)、CTS™ OpTmizer™ T-Cell Expansion Supplement (Thermo Fisher Scientific社)、4Cell Nutri-T GMPリンパ球用培地 (Sartorius社)、PRIME-XV T Cellシリーズ (富士フイルム和光純薬株式会社)、ImmunoCult-XF T cell expansion medium (株式会社ベリタス)、RPMI 1640 Mediumシリーズ (Thermo Fisher Scientific社)、iMediam for T培地 (株式会社GCリンフォテック)、TexMACS™ Medium (Miltenyi Biotec社)、Excellerate™ T Cell Expansion Media, Xeno-Free (R&D Systems社) など)、NK細胞の市販培地（例えば、LGM-3 (ロンザ株式

会社)、X-VIVO™ 15無血清リンパ球培地(ロンザ株式会社)、Advanced RPMI 1640 Medium (Thermo Fisher Scientific社)、EALI™ 515-NKシリーズ(株式会社ボルドバイオテクノロジー)、ExCellerate™ Human NK Cell Expansion Media, Xeno-Free (R&D Systems社)、またNK細胞拡大培養用KitであるBIN KIT内のNK Cell Initial Medium及びNK Cell Subculture Medium(株式会社日本バイオセラピー研究所)、KBN NK Kit内のKBM NKCC-1,-2(コージンバイオ株式会社)などが挙げられる。培地は、血清を含有していてもよいし、無血清でもよい。培地はまた、血清代替物(例えば、アルブミン、トランスフェリン、Knockout Serum Replacement(KSR)、CTS Immune Cell SR(Thermo Fisher Scientific社)、脂肪酸、インスリン、コラーゲン前駆体、微量元素、2-メルカプトエタノール、3'-チオールグリセロール、ITS-サプリメント、B27(商標)サプリメント等)を含有していてもよい。さらに、培地には、脂質、アミノ酸(非必須アミノ酸等)、L-グルタミン、ビタミン、増殖因子、サイトカイン、抗生物質、抗酸化剤、ピルビン酸、緩衝剤、無機塩類などの1つ以上の物質も含有することができる。培地のpHは、培養開始時は、通常7.0~7.8、好ましくは7.2~7.6である。培養開始後は培養する細胞の種類及び培養期間によって変化するが、例えば6.8~7.8である。培地は、使用前にはコンタミネーションを防止するため、濾過、紫外線照射、加熱滅菌、放射線照射等の方法により好ましくは滅菌される。培養条件は、特に制限されず、培養温度は、例えば、37~42℃程度、好ましくは37~39℃程度であり、CO₂濃度は、例えば2%~10%、好ましくは2~5%であり、酸素濃度は、例えば1~20%、好ましくは5~20%である。

[0035] 「培養上清の成分」としては、遺伝子導入率及び／又は遺伝子導入細胞数の予測に使用することができるものであれば特に限定されない。培養上清の成分としては、例えば、培養上清のpH、代謝物、細胞外小胞などが挙げられる。なお、本発明において、培養上清の成分には、培養上清のpHも含まれるものとする。代謝物としては、例えば、有機酸、糖類、脂質、ビタミン

、アミン類、核酸類、アミノ酸、その他代謝物イオンなどが挙げられる。

[0036] 代謝物における有機酸としては、例えば、デセン酸、ラウリン酸、ドデセン酸、ミリスチン酸、ミリストレイン酸、パルミチン酸、パルミトレイン酸、ヘキサデカジエン酸、ステアリン酸、オレイン酸、バクセン酸、リノール酸、 γ -リノレン酸、 α -リノレン酸、エレオステアリン酸、アラキジン酸、エイコセン酸、エイコサジエン酸、ミード酸、アラキドン酸、ベヘン酸、ドコサペンタエン酸、ドコサヘキサエン酸、リグノセリン酸、ネルボン酸、2-ヒドロキシ吉草酸、2-オキソグルタル酸、インドキシル硫酸、4-ピリドキシ酸、硫酸4エチルフェニル、アジピン酸、クエン酸、cis-アコニット酸、イソクエン酸、オキサロコハク酸、オキサロ酢酸、フマル酸、コハク酸、乳酸、リンゴ酸、フェニル乳酸、パントテン酸、ピペコリン酸、ピルビン酸、タルトロン酸、パラクレゾール硫酸、キサンツレン酸などが挙げられる。有機酸としては、中でも、乳酸、2-ヒドロキシ吉草酸、インドキシル硫酸、4-ピリドキシ酸、フェニル乳酸、キサンツレン酸が好ましい。

[0037] 代謝物における糖類としては、例えば、フルクトース、イノシトール、ガラクトース、グルコース、スクロース、マルトース、ラクトースなどが挙げられる。糖類としては、中でも、グルコース、フルクトースが好ましい。

[0038] 代謝物における脂質としては、例えば、セラミド、Hex2-セラミド、Hex-セラミド、コレステロール、コレステロール硫酸塩、カルジオリピン、モノグリセロール、ジグリセロール、リゾホスファチジルコリン、リゾホスファチジルエタノールアミン、リゾホスファチジルグリセロール、リゾホスファチジルイノシトール、リゾホスファチジルセリン、ホスファチジン酸、ホスファチジルコリン、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルグリセロール、ホスファチジルイノシトール、ホスファチジルセリン、スフィンゴミエリン、ジヒドロスフィンゴミエリン、トリグリセリド、グリセロール3リン酸、ガングリオシドGM3などが挙げられる。脂質としては、より具体的には、セラミド(16:0)、Hex2-セラミド((16:0)、及び(24:1))、Hex-セラミド((16:0)、及び(24:1))、コレステロール、コレステロール硫酸塩、カルジオリピ

ン((aaaa-70:5)、(aaaa-70:6)、(aaaa-72:6)、及び(aaaa-72:7))、モノグリセロール((e-16:0)、(a-16:1)、(a-18:1)、及び(a-20:0))、リゾホスファチジルコリン((a-14:0)、(a-16:0)、(a-16:1)、(a-18:0)、(a-18:1)、(a-18:2)、及び(a-20:4))、リゾホスファチジルエタノールアミン((a-18:0)、(a-18:1)、及び(a-20:4))、ホスファチジン酸((aa-32:0)、(aa-32:1)、(aa-34:1)、(aa-36:1)、(aa-36:2)、及び(aa-36:3))、ホスファチジルコリン((aa-28:0)、(aa-30:0)、(aa-30:1)、(aa-32:0)、(aa-32:1)、(aa-32:2)、(aa-34:0)、(aa-34:1)、(aa-34:2)、(aa-36:1)、(aa-36:2)、(aa-36:3)、(aa-36:4)、(aa-36:6)、(aa-38:1)、(aa-38:2)、(aa-38:3)、(aa-38:4)、(aa-38:5)、(aa-38:6)、(aa-38:7)、(aa-40:2)、(aa-40:3)、(aa-40:4)、(aa-40:5)、(aa-40:6)、(aa-40:7)、(aa-42:5)、(aa-42:6)、(aa-42:7)、(ae-26:0)、(ae-28:0))、(ae-30:0)、(ae-32:0)、(ae-32:1)、(ae-34:0)、(ae-34:1)、(ae-34:2)、(ae-36:2)、(ae-36:3)、(ae-36:4)、(ae-38:4)、及び(ae-38:5))、ホスファチジルエタノールアミン((aa-28:0)、(aa-30:0)、(aa-30:1)、(aa-32:0)、(aa-32:1)、(aa-32:2)、(aa-34:0)、(aa-34:1)、(aa-34:2)、(aa-34:3)、(aa-34:4)、(aa-36:1)、(aa-36:2)、(aa-36:3)、(aa-36:4)、(aa-36:5)、(aa-38:2)、(aa-38:3)、(aa-38:4)、(aa-38:5)、(aa-38:6)、(aa-38:7)、(aa-40:3)、(aa-40:4)、(aa-40:5)、(aa-40:6)、(aa-40:7)、(aa-40:8)、(ae-32:1)、(ae-32:2)、(ae-34:1)、(ae-34:2)、(ae-34:3)、(ae-34:4)、(ae-36:2)、(ae-36:3)、(ae-36:4)、(ae-36:5)、(ae-36:6)、(ae-38:3)、(ae-38:4)、(ae-38:5)、(ae-38:6)、(ae-38:7)、(ae-40:5)、(ae-40:6)、(ae-40:7)、及び(ae-40:8))、ホスファチジルグリセロール((aa-32:0)、(aa-32:1)、(aa-34:1)、(aa-34:2)、(aa-36:1)、(aa-36:2)、及び(aa-36:3))、ホスファチジリンイノシトール((aa-32:1)、(aa-34:1)、(aa-34:2)、(aa-36:1)、(aa-36:2)、(aa-36:3)、(aa-38:2)、(aa-38:3)、(aa-38:4)、(aa-38:5)、(aa-38:6)、(aa-40:3)、(aa-40:4)、(aa-40:5)、及び(aa-40:6))、ホスファチジルセリン((aa-32:1)、(aa-34:0)、(aa-34:1)、(aa-34:2)、(aa-36:1)、(aa-36:2)、(aa-36:3)、(aa-38:2)、(aa-38:3)、(aa-38:4)、(aa-38:5)、(aa-40:4)、及び(aa-40:5))、スフィン

ゴミエリン((14:0)、(16:0)、(16:1)、(18:0)、(20:0)、(22:0)、(22:1)、(24:0)、(24:1)、(24:2)、(24:3)、(26:1)、及び(26:2))、ジヒドロスフィンゴミエリン(16:0)、トリグリセリド((aaa-42:0)、(aaa-44:0)、(aaa-44:2)、(aaa-46:0)、(aaa-46:1)、(aaa-46:2)、(aaa-48:0)、(aaa-48:1)、(aaa-48:3)、(aaa-50:0)、(aaa-50:1)、(aaa-50:2)、(aaa-50:3)、(aaa-50:4)、(aaa-52:1)、(aaa-52:2)、(aaa-52:3)、(aaa-52:4)、(aaa-52:5)、(aaa-54:1)、(aaa-54:2)、(aaa-54:3)、(aaa-54:4)、(aaa-54:5)、(aaa-54:6)、(aaa-54:7)、(aaa-56:3)、(aaa-56:4)、(aaa-56:5)、(aaa-56:6)、(aaa-56:7)、(aaa-56:8)、(aaa-58:4)、(aaa-58:5)、(aaa-58:6)、(aaa-58:7)、(aaa-58:8)、(aaa-58:9)、(aaa-60:7)、及び(aaa-60:8))、グリセロール3リン酸、ガングリオシド GM3((16:0)及び(24:1))などが挙げられる。脂質としては、中でも、コレステロール硫酸塩、FFA(C10:1)、FFA(C16:2)、FFA(C22:5)、MG(a-16:1)、PC(aa-28:0)、PC(aa-30:0)、PC(aa-30:1)、PC(aa-32:1)、PC(aa-34:2)、PE(aa-34:2)、PE(aa-36:2)、PE(aa-36:3)、SM(16:0)が好ましい。

[0039] 代謝物におけるビタミンとしては、例えば、 α トコフェロール、ニコチンアミド、コリン、レチノール、エルゴカルシフェロール、コレカルシフェロール、トコトリエノール、フィロキノン、メナキノン、チアミン、リボフラビン、ニコチン酸、パントテン酸、ピリドキサール、ピリドキサミン、ピリドキシン、ビオチン、葉酸、シアノコバラミン、メチルコバラミン、ヒドロキソコバラミン、アスコルビン酸などが挙げられる。

[0040] 代謝物におけるアミン類としては、例えば、エタノールアミン、エタノールアミンリン酸などが挙げられる。

[0041] 代謝物における核酸類としては、例えば、アデノシン、メチルチオアデノシン、グアノシン、5-メチルウリジン、ウリジン、シチジンなどが挙げられる。核酸類としては、中でも、メチルチオアデノシンが好ましい。

[0042] 代謝物におけるアミノ酸としては、例えば、アシルカルニチン（例えば、アシルカルニチン(C5:0)）、アラニン、アルギニン、アスパラギン、アスパラギン酸、 β -アラニン、システイン、システイン-HPE-AM、システイン-SS-H

PE-AM、ジメチルグリシン、グルタミン酸、グルタミン、グリシン、イソロイシン、ロイシン、ロイシン酸、リシン、メチオニン、ホモシステイン-HPE-AM、N-アセチル- β -アラニン、N-アセチルシステイン、N-アセチルセリン、N-アセチルトリプトファン、N-カルバモイル-アスパルテート、O-アセチルセリン、オルニチン、ピログルタミン酸、フェニルアラニン、プロリン、セリン、S-スルフォシステイン、タウリン、スレオニン、トリプトファン、チロシン、バリンなどが挙げられる。アミノ酸としては、中でも、アラニン、アルギニン、システイン-SS-HPE-AM、ロイシン酸、N-アセチルシステイン、N-アセチルセリン、ピログルタミン酸、S-スルフォシステインが好ましい。

[0043] 代謝物におけるその他代謝物イオンとしては、例えば、アンモニウムイオン、カリウムイオン、カルシウムイオン、ナトリウムイオン、ピロリン酸、硫酸、亜硫酸、フェノール硫酸、SS-bis-HPE-AMなどが挙げられる。その他代謝物イオンとしては、中でも、アンモニウムイオン、カリウムイオン、カルシウムイオン、SS-bis-HPE-AMが好ましい。

[0044] 細胞外小胞は、さまざまな種類の細胞から分泌、放出等される膜構造を有する微小な小胞である。細胞外小胞は、タンパク質、microRNA、mRNA等の機能分子を包含して種々の細胞から分泌され、生体内の細胞間コミュニケーションの媒介役として機能することが知られている。細胞外小胞としては、例えば、エクソソーム、マイクロベシクル、アポトーシス小体等が挙げられる。エクソソームの大きさは例えば直径30nm~100nm程度であり、マイクロベシクルの大きさは例えば直径100nm~1.0 μ m程度であり、アポトーシス小体の大きさは例えば直径1.0 μ m~5.0 μ m程度である。細胞外小胞は、培養上清から、公知の方法に従って又は準じて、精製、分離、濃縮することができ、そのような方法としては、例えば、超遠心法（例えばペレットダウン法、スクロースクッション法、密度勾配遠心法等）、イムノアフィニティー担体を用いる方法、ゲルろ過法、フィールド・フロー分画法、FACS法等が挙げられる。また、細胞外小胞の精製、分離、濃縮は、市販のキットなどを用いて行うことも可能である。細胞外小

胞としては、エクソソームが好ましい。

[0045] 培養上清の成分を測定する方法としては、培養上清の成分を測定（特に、定量）することができるものであれば特に限定されず、例えば、各種市販の測定装置を使用して測定する方法、各種市販の測定試薬及び測定キットを使用して測定する方法などが挙げられる。また、培養上清の成分の測定は、ラマン分光法により行うこともできる。培養上清の細胞外小胞の測定について、粒子を物理的に評価する場合の基本的パラメーターは、粒径とゼータ電位であり、粒径解析装置としては、透過型電子顕微鏡（TEM）、液中原子間力顕微鏡（AFM）、ナノ粒子追跡解析（NTA）及びコールターカウンター方式による粒径解析装置、フローサイトメーターなどが挙げられる。そして、細胞外小胞の構成成分であるタンパク質、microRNA、mRNA等については、トランスクリプトーム、プロテオーム等の、いわゆるオミクス解析で用いられている種々の手法（例えば、マイクロアレイ、シーケンサー、ウェスタンブロット、質量分析法等）を使用することができる。細胞外小胞の測定では、細胞外小胞（特にエクソソーム）の粒子径を測定することが好ましく、また細胞外小胞（特にエクソソーム）に包含されるタンパク質を測定することも好ましい。

[0046] 上記のような培養上清の代謝物の測定装置としては、例えば、FLEX2（Novo biomedical社）、STAT PROFILE Primeシリーズ（Novo biomedical社）、Cedex分析装置シリーズ（Roche Diagnostics社）、ABL800 FLEX血液ガス分析装置シリーズ（RADIOMETER社）、REBEL細胞培養成分分析計（株式会社エス・ティ・ジャパン）、バイオフィローBFシリーズ（王子計測機器株式会社）、ラッピドポイント500e血液ガス分析装置（SIEMENS Healthineers社）、細胞外フラックスアナライザーXFシリーズ（プライムテック株式会社）などが挙げられる。培養上清のpHの測定装置としては、例えば、各種市販のpHメーターなどが挙げられる。培養上清の細胞外小胞の測定装置としては、例えば、ナノ粒子解析システム NANOSIGHTシリーズ（日本カンタム・デザイン株式会社）、EXOVIEW IMAGER（Quntum Design社）、ExoCounter（シスメックス株式

会社)、VIDEODROPナノ粒子イメージングアナライザー(メイワフォーシス株式会社)、NanoFCM(メイワフォーシス株式会社)、Exoidナノ粒子マルチアナライザー(メイワフォーシス株式会社)、ZE5 Cell Analyzerシリーズ(Bio-Rad Laboratories社)、CytoFLEXシリーズ(Thermo Fisher Scientific社)、BD FACSymphony™ シリーズ(BD Bioscience)、ナノ粒子径・濃度カウンターnCS1(Spectradyne社)、ディスク遠心式粒子径分布測定装置 CPS Disc Centrifugeシリーズ(CPS Instruments社)、レーザー回折・散乱式粒子径分布測定装置 Bettersizer2600(Betterisize社)などが挙げられる。ラマン分光法による測定装置としては、例えば、RamanRxn Systemsシリーズ(Endless+Hauser社)、LabRAM HR Evolution、LC-Raman System、AFM Raman、LabRAM Soleil、XploRA PLUS、Standard Microscope Spectroscopy Systems(株式会社堀場製作所)、inViaシリーズ、Virsaファイバーラマン装置、RA816、RA802(Renishaw社) TRS100、RapID、Vaya(Agilent Technologies社)、ProCellics(Merck Millipore社)、Ramina Process Analyzer(Thermo Fisher Scientific社)、BioPAT Spectro(Sartorius社)、BRAVO、SENTERRAII、MultiRAM、RAM II(Bruker社)などが挙げられる。測定装置による培養上清の成分の測定は、公知の方法に従い実施することができ、例えば、測定装置のマニュアルに従って実施することができる。

[0047] ・工程(2)

工程(2)では、工程(1)で測定した値に基づいて遺伝子導入率及び／又は遺伝子導入細胞数の予測を行う。

[0048] 後述する実施例において、培養上清の成分の測定値(pH、濃度など)と遺伝子導入率及び／又は遺伝子導入細胞数が相関していることが確認されているので、培養上清の成分の測定値を使用することで遺伝子導入率及び／又は遺伝子導入細胞数の予測を行うことができる。本発明において「予測」とは、「測定」と同じ意味で使用され、互換的に使用され得る。

[0049] 培養上清の成分の測定値を細胞集団の遺伝子導入率及び／又は遺伝子導入細胞数の予測に使用する方法としては、例えば、遺伝子導入率及び／又は遺

伝子導入細胞数が既知の細胞における遺伝子導入率及び／又は遺伝子導入細胞数と培養上清の成分の測定値とに基づいて検量線を作成し、当該検量線を用いて工程（１）で測定した値から得られたパラメーターから遺伝子導入率及び／又は遺伝子導入細胞数を決定することが挙げられる。検量線は、最小二乗法などの常法によりソフトウェアなどを使用して作成することができる。

[0050] 工程（２）において、培養上清の１種類の成分に基づいて遺伝子導入率及び／又は遺伝子導入細胞数の予測を行ってもよいし、培養上清の２種以上の成分の組合せに基づいて遺伝子導入率及び／又は遺伝子導入細胞数の予測を行ってもよい。培養上清の２種以上の成分の組合せを用いる場合、組合せは３種以上、４種以上、５種以上、６種以上、７種以上、８種以上、９種以上、１０種以上などが挙げられ、上限は特に限定されず、例えば、３０種以下、２０種以下、１０種以下などが挙げられる。

[0051] 培養上清の代謝物である、グルタミン、グルコース、カリウムイオン、カルシウムイオンは遺伝子導入率及び遺伝子導入細胞数と負の相関があり、乳酸、アンモニウムイオン、PC(aa-28:0)、PC(aa-30:0)、PC(aa-30:1)、PC(aa-32:1)、PC(aa-34:2)、PC(aa-36:2)、PC(aa-36:3)、FFA(C10:1)、フェニル乳酸は遺伝子導入細胞数と正の相関がある。また、培養上清のpHは、遺伝子導入率及び遺伝子導入細胞数と負の相関がある。

[0052] 培養日数ごとで、例えば、グルタミン、グルタミン酸、グルコース、カリウムイオン、カルシウムイオン、乳酸、アンモニウムイオン、pH、PC(aa-28:0)、PC(aa-30:0)、PC(aa-30:1)、PC(aa-32:1)、PC(aa-36:2)、FFA(C10:1)、フェニル乳酸などを単独で細胞集団の遺伝子導入率及び／又は遺伝子導入細胞数の予測に使用できる。培養日数ごとでは細胞集団の遺伝子導入率及び／又は遺伝子導入細胞数の予測を行う場合は、複数の成分を組み合わせで予測を行うこともできる。そのような予測に使用する成分としては、例えば、アラニン、アルギニン、N-アセチルシステイン、S-メチル-5-チオアデノシン、インドキシル硫酸、SS-bis-HPE-AM、N-アセチルセリン、2-ヒ

ドロキシ吉草酸、PC(aa-28:0)、PC(aa-30:0)、PC(aa-30:1)、PC(aa-32:1)、PE(aa-34:2)、PE(aa-36:2)、PE(aa-36:3)、FFA(C10:1)、FFA(C16:2)、FFA(C22:5)、乳酸、ロイシン酸、フェニル乳酸、SM(16:0)、フルクトース、4-ピロキシ酸、MG(a-16:1)、キサントレン酸、ピログルタミン酸、S-スルホシステイン、コレステロール硫酸塩などが挙げられる。

[0053] 培養日数にかかわらず細胞集団の遺伝子導入率及び／又は遺伝子導入細胞数の予測を行う場合は、PC(aa-28:0)、PC(aa-30:0)、PC(aa-30:1)、PC(aa-32:1)、PC(aa-34:2)、PC(aa-36:2)、PC(aa-36:3)、FFA(C10:1)、フェニル乳酸などを単独で細胞集団の遺伝子導入率及び／又は遺伝子導入細胞数の予測に使用できる。培養日数にかかわらず細胞集団の遺伝子導入率及び／又は遺伝子導入細胞数の予測を行う場合は、複数の成分を組み合わせることで予測を行うことが好ましい。そのような予測に使用する成分としては、例えば、PC(aa-28:0)、PC(aa-30:0)、PC(aa-30:1)、PC(aa-32:1)、PC(aa-34:2)、PE(aa-34:2)、PE(aa-36:2)、PE(aa-36:3)、FFA(C10:1)、FFA(C16:2)、乳酸、ロイシン酸、フェニル乳酸、システイン-SS-HPE-AMなどが挙げられる。

[0054] 培養上清の2種以上の成分の組合せに基づいて遺伝子導入率及び／又は遺伝子導入細胞数の予測を行う場合は、例えば、多変量解析により予測を行うことができ、特に回帰分析により得られた予測モデルを用いる方法が挙げられる。そのような回帰分析の方法としては、回帰分析を行えるものであればよく、例えば、ラッソ回帰、PLS (Partial Least Squares)、OPLS (Orthogonal Partial Least Squares)、リッジ回帰、エラスティックネット回帰、主成分回帰、部分最小二乗回帰、ランダムフォレスト、ニューラルネットワーク、ディープラーニング、サポートベクターマシーンなどが挙げられる。また、これらの回帰分析の結果から変数重要度の高い成分を選択することが可能であり、このように選択された成分を予測に使用することができる。多変量解析を行う場合は、このような変数重要度が低い成分であったとしても、多変量解析で使用することで精度向上に寄与する。そのため、変数重要度が低い成分、単独では遺伝子導入率及び／又は遺伝子導入細胞数と相

関を示さない成分であっても、遺伝子導入率及び／又は遺伝子導入細胞数の予測に使用可能である。

[0055] 後述する実施例において、培養上清の細胞外小胞の測定値（特にエクソソームの粒子径、エクソソームタンパク質のプロファイル）と遺伝子導入率及び／又は遺伝子導入細胞数が相関していることが確認されているので、培養上清の細胞外小胞の測定値を使用することで遺伝子導入率及び／又は遺伝子導入細胞数の予測を行うことができる。細胞外小胞の粒子径は遺伝子導入率及び遺伝子導入細胞数と負の相関がある。細胞外小胞に包含されるタンパク質としては、例えば図 16C に記載のタンパク質などを単独で又は 2 種以上組み合わせて細胞集団の遺伝子導入率及び／又は遺伝子導入細胞数の予測に使用できる。

[0056] 後述する実施例において、培養上清の成分のラマン分光法による測定値（ラマン分光スペクトル）と遺伝子導入率及び／又は遺伝子導入細胞数が相関していることが確認されているので、培養上清の成分のラマン分光法による測定値を使用することで遺伝子導入率及び／又は遺伝子導入細胞数の予測を行うことができる。例えば、ラマン分光スペクトルのピークの高さを細胞集団の遺伝子導入率及び／又は遺伝子導入細胞数の予測に使用できる。

[0057] 工程（2）において、遺伝子導入前後の培養上清の成分の変化を遺伝子導入率及び／又は遺伝子導入細胞数の予測に使用することもできる。後述する実施例において、遺伝子導入前後で培養上清の成分が変化していることが示されている。

[0058] 遺伝子（例；キメラ抗原受容体をコードする核酸）導入細胞が $\alpha\beta$ T 細胞である場合、工程（1）で測定する成分としては乳酸、アンモニウムイオン、pH、グルタミン、グルコース、Phenyllactic acid、FFA(C10:1)、PC(aa-28:0)、PC(aa-30:0)、PC(aa-30:1)、PC(aa-32:1)、PE(aa-34:2)、PE(aa-36:2)及びPE(aa-36:3) からなる群から選択される少なくとも 1 種が好ましく、乳酸、アンモニウムイオン、pH、グルタミン及びグルコースからなる群から選択される少なくとも 1 種がより好ましい。

- [0059] 遺伝子（例；キメラ抗原受容体をコードする核酸）導入細胞がNK細胞である場合、工程（１）で測定する成分としては乳酸、アンモニウムイオン、グルコース、グルタミン酸、ナトリウムイオン及びpHからなる群から選択される少なくとも１種が好ましい。
- [0060] 遺伝子（例；キメラ抗原受容体をコードする核酸）導入細胞がg d T細胞である場合、工程（１）で測定する成分としては乳酸が好ましい。
- [0061] 本発明の遺伝子導入した細胞製剤の製造方法（本明細書において、単に「本発明の製造方法」と称することがある）は、
（１）動物細胞が培養された培養上清の成分を測定し、測定した値に基づいて遺伝子導入率及び／又は遺伝子導入細胞数を測定する工程を含むことを特徴とする。
- [0062] 本発明の製造方法は、
（１１）動物細胞に遺伝子を導入する工程を更に含んでもよい。
- [0063] 本発明の製造方法の工程（１）及び（１１）は、前述する方法により実施することができる。本発明の製造方法により製造される細胞製剤（以下、本発明の細胞製剤と称することがある）は、公知の手段（例えば、日本薬局方に記載の方法等）に従って、有効量の遺伝子導入した動物細胞を薬学的に許容される担体と混合するなどして、非経口製剤として製造することが好ましい。本発明の細胞製剤は、注射剤、懸濁剤、点滴剤等の非経口製剤として製造することが好ましい。非経口的な投与方法としては、静脈内、動脈内、筋肉内、腹腔内、皮下投与などの方法が挙げられる。薬学的に許容される担体としては、例えば、溶剤、基剤、希釈剤、賦形剤、無痛化剤、緩衝剤、保存料、安定剤、懸濁剤、等張化剤、界面活性剤、溶解補助剤等が挙げられる。
- [0064] 本発明の細胞製剤の投与量は、患者の体重、年齢、性別、症状などの種々の条件に応じて適宜決定することができる。また、１回で投与してもよく、複数回にわたって投与してもよい。本発明の細胞製剤は、非経口投与に適した公知の形態、例えば、注射又は注入剤とすることができる。また、本発明

の細胞製剤は、細胞を安定に維持するために、生理食塩水、リン酸緩衝生理食塩水（PBS）、培地等を含んでもよい。培地としては、特に限定するものではないが、RPMI、AIM-V、X-VIVO10などの培地が挙げられるが、これらに限定されない。また、該細胞製剤には医薬的に許容される担体（例：ヒト血清アルブミン）、保存剤等が安定化の目的で添加されていてもよい。本発明の細胞製剤は、ヒトを含む哺乳動物に対して適用されるものである。

[0065] 本発明の遺伝子導入率及び／又は遺伝子導入細胞数の予測方法によれば、フローサイトメトリーなどを使用する従来法では手作業が必要であったのに対して、そのような複雑な工程が必要なく、例えば、必要な操作は測定装置による自動的な測定のための簡便な操作で細胞の遺伝子導入率及び／又は遺伝子導入細胞数の測定が可能である。さらに、本発明の遺伝子導入率及び／又は遺伝子導入細胞数の予測方法によれば、従来法では6-7時間かかるのに対して、例えば、5分未満の短時間で効率的に細胞の遺伝子導入率の測定が可能となる。また、サンプリングが不要なため攪拌工程がなく細胞へのダメージも少ない。そして、本発明の方法、細胞の種類に特に制限は無く、様々な細胞に適用可能がある。本発明の方法は、CAR-T細胞療法などの遺伝子治療への応用が想定される。

[0066] 本明細書及び請求の範囲で使用される場合、特に文脈上必要とされない限り、単数形の用語は複数形を含み、複数形の用語は単数形を含むものとする。したがって、単数形の冠詞（例えば、英語の場合は「a」、「an」、「the」など）は、特に言及しない限り、その複数形の概念をも含むことが理解されるべきである。

実施例

[0067] 以下、本発明を更に詳しく説明するため実施例を挙げる。しかし、本発明はこれら実施例等になんら限定されるものではない。

[0068] <培地>

CAR- $\alpha\beta$ T細胞（以下、単にCAR-T細胞とも記載する）及びCAR

— g d T細胞培養培地：OpTmizer CTS T-Cell Expansion basal medium (Thermo Fisher Scientific社) に2.6% OpTmizer Expansion Basal Supplement (Thermo Fisher Scientific社) , 1% L-Glutamine (Thermo Fisher Scientific社) , 1% Streptomycin, 2% CTS Immune Cell SR (Thermo Fisher Scientific社) を添加し、基礎培地を作製した。そこに20 IU/mLもしくは40 IU/mLになるようにMACS GMP IL-2 (Miltenyi Biotec社) を添加した。

SK-HEP-1細胞培養培地：MEM, L-Gln (+) (Thermo Fisher Scientific社) に10% FBS (Biosera社) , 1% Non-essential amino acids (富士フイルム和光純薬株式会社) , 1% Penicillin-Streptomycin solution (富士フイルム和光純薬株式会社) , 1 mM Sodium pyruvate (富士フイルム和光純薬株式会社) を添加し作製した。

[0069] <CAR-T細胞及びCAR-g d T細胞の製造>

Leukopak (Charles River Laboratories社) 又はg d T細胞 (Charles River Laboratories社) を融解後に、細胞を 2.0×10^6 cells/mL以下になるようにCAR-T細胞及びCAR-g d T細胞培養培地で希釈した（製造前の原材料）。細胞懸濁液：MACS GMP T-Cell TransACT (Miltenyi Biotec社) =17.5:1になるように培養バッグに播種し、36時間超-48時間未満で培養した。培養後の細胞をLOVO Cell processing system (Fresenius Kabi社) もしくは遠心機を用いて培養培地で希釈し、レトロネクチン（商標）（タカラバイオ株式会社）とCAR遺伝子を導入したレトロウイルスで事前にコートしておいた培養バッグに 6.07×10^5 cells/cm²以下で播種し、翌日まで培養した。 2.2×10^6 cells/cm²以下で培養ボトル (G-REX, Wilson Wolf社) に播種し、3-7日間培養し、CAR-T細胞及びCAR-g d T細胞を製造した（増幅工程）。なお、使用したCAR遺伝子は配列番号1に示される塩基配列を有する（以下のSK-HEP-1細胞の場合も同じである）。

[0070] <CAR-NK細胞の製造>

PBMC (Charles River Laboratories社) を融解後に、BINKIT（商標） for NK cells expansion from PBMCs (株式会社日本バイオセラピー研究所) を用

いて培養し、レトロネクチン（商標）（タカラバイオ株式会社）とCAR遺伝子を導入したレトロウイルスを用いてCAR-NK細胞を製造した。

[0071] <SK-HEP-1細胞へのCAR遺伝子の導入>

SK-HEP-1細胞（ATCC社）が 2.0×10^6 cells/mL以下になるようにSK-HEP-1細胞培養培地で希釈し、レトロネクチン（タカラバイオ株式会社）とCAR遺伝子を導入したレトロウイルスで事前にコートしておいた培養プレートに 6.07×10^5 cells/cm²以下で播種し、4日間培養することで、SK-HEP-1細胞へCAR遺伝子を導入した。

[0072] <フローサイトメトリーを用いた遺伝子導入効率の測定>

BD FACSCanto IIフローサイトメーター（BD Biosciences社）でCAR抗原を用いて遺伝子導入効率を測定した。

[0073] <細胞環境分析装置を用いた培養上清成分の測定>

バイオプロファイルFLEX2（Novo biomedical社）で培養上清の成分を定量化した。

[0074] <グルコース取り込み能の測定>

グルコース取り込み検出キットGreen（株式会社同仁化学研究所）を用いて、マニュアルに従ってグルコース取り込み能を測定した。

[0075] <メタボローム・リポドーム解析>

培養上清に9倍量のメタノールを添加してボルテックスしてホモジナイズした後、親水性相互作用クロマトグラフィー/タンデム質量分析（HILIC/MS/MS）、リポドミクス、ガスクロマトグラフィー/タンデム質量分析（GC/MS/MS）による分析を行った。

[0076] HILIC/MS/MSでは、100 μ Lのホモジネートを21,500g、4℃で5分間遠心分離した。得られた76 μ Lの上清を4 μ Lの400 mMギ酸アンモニウムと混合した。この混合物をボルテックスし、21,500g、4℃で5分間遠心分離を行った。上清2 μ Lを、UHPLC Nexera液体クロマトグラフィーシステム（株式会社島津製作所）と5500QTRAP質量分析計（AB Sciex Pte社）からなる液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析（LC/MS/MS）システムに注入した。クロマトグラフィー

分離は、ZIC-cHILICカラム (2.1×100 mm, 3 μ m, Merck Millipore社) を用いた。代謝物の検出にはSelected reaction monitoring (SRM) を用い、各代謝物の存在量はSRMクロマトグラム上のピーク面積として評価した。

[0077] リピドミクスは、ホモジネートを遠心分離して得た上清2 μ LをUltimate3000 RSLC system (Thermo Fisher Scientific社) とQ Exactive HF-X mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific社) からなるLC/MS/MSシステムにより分析した。液体クロマトグラフィーによる分離は、逆相カラムCORTECS T3 (2.1×50 mm, 2.7 μ m, 120Å, Waters社) を用いて実施した。

[0078] GC/MS/MS分析は、ホモジネートを遠心分離して得た上清10 μ Lを窒素気流で乾燥させた後、オキシメーションとトリメチルシリル化の2段階の反応により誘導体化して実施した。反応混合物1 μ LをGCインジェクター80オートサンプラー (Agilent Technologies社) を用いてAgilent 7890Bシリーズガスクロマトシステムに注入した。ガスクロマトグラフによる分離は、J&W Scientific DB-5MS-DG カラム (30 m×0.25 mm i.d., df = 0.25 μ m, Agilent Technologies社) により実施した。各標的分子をSRMで検出し、そのピーク面積をMassHunterソフトウェア (Agilent Technologies社) で評価した。

[0079] <メタボローム・リピドームデータの統計解析>

統計解析ソフトRを用い、メタボローム・リピドーム解析で取得した培養上清の代謝物の測定データについて統計解析を行った。遺伝子導入をしていないT細胞 (UTD) とCAR-T細胞の上清成分の差について、UTDを対照群としたときに、各成分との差がCAR導入率に応じて大きくなると仮定してWilliams検定を行った。また、全代謝物について、各代謝物ごとにCAR細胞数との単回帰分析を行った。また、多変量解析としてLASSO回帰、OPLS回帰を行い、CAR細胞数への回帰に寄与する成分の選択もしくは変数重要度を分析した。回帰については、増幅工程中の各日程ごと、及び全日程での測定値について解析した。

[0080] <エクソソームの粒子計解析>

培養上清中のエクソソームをMagCapture™ Exosome Isolation Kit PS ver.

2（富士フイルム和光純薬株式会社）を用いて単離した。その後、ナノサイト LM10（日本カンタム・デザイン株式会社）を用いて粒子径を測定した。

[0081] <エクソソームのプロテオーム解析>

培養上清中のエクソソームをMagCapture™ Exosome Isolation Kit PS ver. 2（富士フイルム和光純薬株式会社）を用いて単離した。エクソソーム懸濁液に8倍容の冷アセトン（富士フイルム和光純薬株式会社）を添加してから-20℃の条件下で一晩静置した。遠心処理（15,000×g、4℃、20分間）によって生じた上清を除去し、沈殿は冷アセトンに懸濁した。懸濁液を転倒混和後に再び遠心し（15,000×g、4℃、5分間）、上清を除去した。最後に沈殿を風乾した（室温で30分間静置）。乾燥した沈殿物を可溶化緩衝液〔8M尿素（富士フイルム和光純薬株式会社）、50 mM Tris-HCl, pH 8.0（株式会社ニッポンジーン、312-90061）〕10μLに溶解した（タンパク質溶解液）。タンパク質溶解液の全量をトリプシン（Promega社）による加水分解に供した。すなわち、タンパク質溶解液に100 mMジチオトレイトール（DTT）（富士フイルム和光純薬株式会社）溶液1.1μLを加え37℃で30分間保温した（DTT終濃度：10 mM）。続いて250 mMヨードアセトアミド（IAA）（富士フイルム和光純薬株式会社、095-02151）溶液1.2μLを加え暗所で20分間静置した（IAA終濃度：25 mM）（還元アルキル化）。還元アルキル化処理後に50 mM Tris-HCl（pH 8.0）を27.7μL加えて溶液の尿素濃度を2 Mまで下げた。最後に1μg/μLトリプシン溶液1μLを加え、37℃で16時間保温して加水分解反応をおこなった（トリプシン終濃度24.4 ng/μL）。反応後のペプチド溶液にはC18 + SDB STAGE Tipによる脱塩処理を施した（Rappsilber, J. et al., Anal. Chem. 2003, 75: 663-70）。脱塩処理後の試料を減圧下で乾燥した。乾燥済みのペプチド試料を、水（富士フイルム和光純薬株式会社、210-01303）、アセトニトリル（同、018-19853）及びトリフルオロ酢酸（同、204-02743）からなる溶媒（体積比98:2:0.1）を用いて溶解した。溶解の際は、総タンパク質量（2μg相当分）から計算して0.1μg/μLになるように添加溶媒の容積を調整し、LC-MS/MSに供した。

[0082] LC-MS/MSにより各試料から得られた測定データを次の手順で処理した。すなわち、Thermo Fisher Scientific社のソフトウェア、Proteome Discoverer (ver. 3.0) (以下、「PD 3.0」) (<https://www.thermofisher.com/jp/ja/home/industrial/mass-spectrometry/liquid-chromatography-mass-spectrometry-lc-ms/lc-ms-software/multi-omics-data-analysis/proteome-discoverer-software.html>) を用いて、各LC-MS/MSデータのピーク整列化及び配列データベース検索をおこなった。配列データベース検索には、Sequest HTソフトウェアを用いた。有意とみなしたペプチドの同定情報を各検出ピークに連結し、連結された検出ピークの強度値を当該ペプチドの検出強度とした〔2種類：正規化前の検出強度“Abundance”及び正規化後の強度“Abundances (Normalized)”〕。ピーク検出強度の正規化処理はPD 3.0のアルゴリズムに従っておこなった。

[0083] <ラマン分光の測定>

Endress+Hauser社製ラマン分析装置 RamanRxn2システムを用いて培養上清中のラマン分光を測定した。その後、得られたスペクトルに対し、統計解析ソフトRを用いて二次微分を行い、CAR遺伝子の導入率の異なるサンプル間のスペクトルを比較した。

[0084] 実施例1：CAR遺伝子導入によるT細胞での培養上清成分の変化

CAR-T細胞を製造し、製造後の細胞密度、生存率、遺伝子導入効率を測定した。結果を図1に示す。その結果CAR遺伝子導入の有無により生存率は若干の減少がみられたが（図1B）、細胞密度には変化がなかった（図1A）。しかしフェノールレッドを含む培養上清では遺伝子を導入していないT細胞（UTD）に比べて、CAR-T細胞でpHが低くなり、酸性になっていることが観察された（図1D-1E）。さらに上清成分中の変化を調べるために、代謝物の測定を実施した。結果を図2に示す。その結果、CAR-T細胞の培養上清では、UTDと比較してグルタミン（Gln）、グルコース（Gluc）、カリウムイオン、カルシウムイオンの減少、乳酸（Lac）、アンモニウムイオンの増加がみられた。しかしグルタミン酸（Glu）とナトリウムイオンに

については変化が見られなかった（図2A－2H）。

[0085] 実施例2：CAR遺伝子導入によるT細胞での代謝の変化

実施例1で培養上清に変化が見られたため、CAR遺伝子導入によるT細胞での代謝の変化を確認した。結果を図3に示す。遺伝子導入をしていないT細胞（UTD）とCAR-T細胞を製造後に、新鮮培地に置換し、培養した。その後、1、3、6又は24時間後にセルカウントと培養上清の解析を実施した（図3A）。24時間培養中は細胞数の増加はUTDとCAR-T細胞では見られなかった（図3B）。しかしCAR-T細胞の培養上清では、グルコースの低下と乳酸の増加が観察され、解糖系の亢進が確認された（図3C－3D）。またCAR-T細胞の培養上清では、グルタミンの低下とアンモニウムイオンの増加も観察され、グルタミン代謝の亢進も確認された（図3E－3G）。この結果から、CAR遺伝子導入により代謝が変化することが確認された。

[0086] 実施例3：CAR遺伝子導入によるT細胞でのグルコース取り込み量の変化

実施例2の結果より、CAR遺伝子導入により代謝が変化することが確認されたために、実際のグルコースの取り込み量の定量化を実施した。結果を図4に示す。その結果、CAR遺伝子導入によりグルコースの取り込み量が増加することを確認した。

[0087] 実施例4：培養上清中の成分から製造終了日でのCAR-T細胞数の予測

実施例1－3の結果よりCAR-T細胞数は、培養上清中の成分と相関することが推察される。このことを確認するために、1ドナーのT細胞からCAR遺伝子を導入したT細胞と導入していないT細胞を準備した。その後に、遺伝子導入したT細胞が0、25、50、75、100%になるように細胞を混和し、4日間培養し、細胞数には大きな違いがないもののCAR導入率に関しては、混合比に応じた割合のCAR-T細胞を含む細胞集団を作製した（図5－1A、B）。製造終了日に培養上清と細胞密度、CAR-T細胞密度で相関を確認したところ、どの培養上清中の成分も細胞密度とは相関を示さなかった。

。一方、CAR-T細胞密度に関しては、乳酸とアンモニウムイオンとは正に相関を示し、pH、グルタミン、グルコースとは負の相関を示した。しかし他の成分ではCAR-T細胞密度とは相関を示さなかった（図5-2C-F、図5-3G-L、図5-4M-T）。この結果から、製造終了日においては培養上清中の乳酸、アンモニウムイオン、pH、グルタミン、グルコースからCAR-T細胞数を予測することができる。

[0088] 実施例5：複数ドナーを用いた培養上清中の成分から経時的なCAR-T細胞数の予測

実施例4と同じ製造方法を用いて、3ドナーのT細胞からCAR-T細胞を準備し、さらに増幅1-4日目の全て培養日に細胞密度とCAR導入率を測定した。結果を図6A-Bに示す。その後、実施例4で見つかった培養成分から細胞密度とCAR-T細胞密度との相関を確認したところ、CAR-T細胞密度とも相関を示すが、細胞密度でより高い相関を示した（図7A-J）。

[0089] 実施例6：メタボローム・リピドーム解析を用いた培養上清の網羅的な解析

実施例5で使用した培養上清を用いてメタボローム・リピドーム解析を実施した。遺伝子導入をしていないT細胞（UTD）とCAR-T細胞の上清成分の差について、UTDを対照群としたときに、各成分との差がCAR導入率に応じて大きくなると仮定してWilliams検定を行い、CAR導入率に応じて差が大きくなる成分を抽出した。結果を図8に示す。縦軸をWilliams検定での $-\log(p \text{ value})$ 、横軸をCAR導入率が最も高い条件での変化量の推定値とすることで、CAR導入率依存的に上清に蓄積される成分が右上、CAR導入率依存的に消費される成分が左上にプロットされる。図中の脂質成分の略号は以下の通りである。PC：ホスファチジルコリン、PE：ホスファチジルエタノールアミン、SM：スフィンゴミエリン、FFA：遊離脂肪酸。さらに詳細な分類として、グリセロールと脂肪酸の結合がエステル結合のものをa、エーテル結合のものをeとして表記し、a及びeの数はグリセロール部分に結合す

る脂肪酸残基の数を示している。また、結合している脂肪酸残基の総炭素数(x)と二重結合数(y)を $x : y$ として表記する。たとえば、PC(aa-34:1)はホスファチジルコリンのグリセロール部分に2つの脂肪酸がエステル結合で結合しており、その脂肪酸残基の総炭素数が34個であり、その中に二重結合が1個存在することを示している。また、HPE-AMは β -(4-hydroxyphenyl)ethyl iodoacetamideの略号であり、パースルフィド、ポリスルフィド等の硫黄化合物を安定化して検出するために使用される。したがって、図中のCysteine-SS-HPE-AMはシステインパースルフィド等、SS-bis-HPE-AMは H_2S_2 等の硫黄代謝物を示している。

[0090] PE(aa-34:2)、PC(aa-30:1)、PE(aa-36:2)、PC(aa-30:0)、FFA(C10:1)などがCAR導入率依存的に上清に蓄積し、FFA(C16:2)、Arginine、GlutamineなどがCAR導入率依存的に消費されることが観察された。

[0091] 実施例7：メタボローム・リピドーム解析を用いた培養上清中の成分からのCAR-T細胞数の予測

実施例5で使用した培養上清を用いてメタボローム・リピドーム解析を実施し、CAR-T細胞数を予測できる成分があるかどうかを確認した。

[0092] 全代謝物について、各代謝物の測定値を細胞密度で 10^6 細胞あたりに補正し、CAR-T細胞数との単回帰分析を行った。結果を図9に示す。増幅工程中の各日程ごとで単回帰における決定係数 R^2 の高い成分として増幅2日目でのPC(aa-30:0)、PC(aa-32:1)、PE(aa-36:2)、増幅3日目でのFFA(C10:1)、PC(aa-30:1)、増幅4日目でのFFA(C10:1)、PC(aa-28:0)、PC(aa-30:1)、Phenyllactic acidが抽出された。また、同じ補正值に対し、多変量解析としてLASSO回帰、OPLS回帰を行い、CAR-T細胞数への回帰に寄与する成分の選択もしくは変数重要度を分析した。結果を図10に示す。LASSO回帰について増幅工程中の増幅2, 3, 4日目でのCAR-T細胞数の実測と予測を示し(図10A-C)、回帰の際に選択された代謝物の係数を同じグラフ内に示した。OPLS回帰についても同様に増幅工程中の増幅1, 2, 3, 4日目でのCAR-T細胞数の実測と予測を示し(図10D-G)、その際の変数重要度の高い代謝物を同じグ

ラフ内に示した。

[0093] また、全日程での測定値についても同様に単回帰、LASSO回帰、OPLS回帰を実施し、日程を区別せずにCAR-T細胞数が予測できるかを確認した。結果を図 1 1 - 1 2 に示す。単回帰における決定係数 R^2 の高い成分としてPhenyllactic acid, FFA(C10:1)、PC(aa-28:0)、PC(aa-30:0)、PC(aa-30:1)、PC(aa-32:1)、PE(aa-34:2)、PE(aa-36:2)、PE(aa-36:3)が抽出された (図 1 1 A - 1))。また、LASSO回帰での予測とその際に選択された化合物とその係数 (図 1 2 A))、OPLS回帰での予測とその際に変数重要度の高かった化合物を確認した (図 1 2 B))。

[0094] 実施例 8 : CAR 遺伝子導入によるSK-Hep-1細胞での代謝の変化

肝癌細胞株であるSK-Hep-1細胞を用いて導入細胞 (つまり、T細胞以外) に関係なく、実施例 1 で用いたCAR 遺伝子導入により細胞の代謝が変化するかを確認した。結果を図 1 3 に示す。実施例 1 と同様にCAR 遺伝子導入により、培養上清中の乳酸の増加が観察された。

[0095] 実施例 9 : CAR 遺伝子導入によるg d T細胞での代謝の変化

g d T細胞を用いて、実施例 1 で用いたCAR 遺伝子導入により細胞の代謝が変化するかを確認した。結果を図 1 4 に示す。その結果、CAR 遺伝子導入により、培養上清中の乳酸の増加が観察された。

[0096] 実施例 1 0 : CAR 遺伝子導入によるNK細胞での代謝の変化

CAR-NK細胞を製造し、培養上清中の成分とCAR-NK細胞数での相関を確認した。結果を図 1 5 に示す。CAR-NK細胞数と乳酸、アンモニウムイオンは正に相関し、グルコース、グルタミン酸、ナトリウムイオン、pHは負に相関した。培養上清の成分からCAR-NK細胞数を予測することができる。

[0097] 実施例 1 1 : CAR 遺伝子導入によるエクソソームの変化

実施例 1 で用いたCAR 遺伝子導入により培養上清中の細胞小胞であるエクソソームが変化するかを確認した。結果を図 1 6 に示す。エクソソームの粒子径がCAR 遺伝子を導入することでT細胞と比べて小さくなることを確

認した（図 1 6 A）。次にエクソソームのプロファイルを確認するために C A R－T 細胞又は T 細胞由来のエクソソームのプロテオーム解析を実施した。ボルケーノプロット解析の結果、C A R－T 細胞と T 細胞でエクソソームタンパク質のプロファイルが変化していた（図 1 6 B）。C A R－T 細胞で有意に増加しているエクソソームタンパク質に関して t 検定を実施した（図 1 6 C、N=3）。さらに、C A R－T 細胞数を予測するための図 1 6 C の中のタンパク質を 1 例として解析を実施したところ、CD63 陽性エクソソームから C A R－T 細胞数を予測できることを確認した（図 1 6 D、 $R^2=0.9846$ ）。

[0098] 実施例 1 2：C A R 遺伝子導入によるラマン分光の変化

実施例 1 で用いた C A R 遺伝子導入により培養上清のラマン分光が変化するかを確認した。結果を図 1 7 に示す。図 1 7 A で取得したラマン分光スペクトルの二次微分の全体を示す。様々なピークで C A R 導入細胞と非導入細胞で差がみられた。図 1 7 B にそのピークの一例を示した。

[0099] 本出願は、日本で 2 0 2 3 年 6 月 1 6 日に出願された特願 2 0 2 3－9 9 6 9 5 号を基礎としており、その内容は本明細書にすべて包含される。

請求の範囲

- [請求項1] 動物細胞の遺伝子導入率及び／又は遺伝子導入細胞数の予測方法であって、
- (1) 遺伝子導入した動物細胞が培養された培養上清の成分を測定する工程、及び
- (2) 工程(1)で測定した値に基づいて遺伝子導入率及び／又は遺伝子導入細胞数を予測する工程を含む方法。
- [請求項2] 工程(1)において、培養上清のpH、代謝物又は細胞外小胞の測定を行う、請求項1に記載の方法。
- [請求項3] 前記代謝物が、有機酸、糖類、脂質、ビタミン、アミン類、核酸類、アミノ酸及びその他代謝物イオンからなる群から選択される少なくとも1種である、請求項2に記載の方法。
- [請求項4] 前記有機酸が、デセン酸、ドデセン酸、ミリストレイン酸、パルミチン酸、パルミトレイン酸、ヘキサデカジエン酸、ステアリン酸、オレイン酸、リノール酸、 γ -リノレン酸、 α -リノレン酸、アラキジン酸、エイコセン酸、エイコサジエン酸、ミード酸、アラキドン酸、ドコサペンタエン酸、ドコサヘキサエン酸、ネルボン酸、2-ヒドロキシ吉草酸、2-オキソグルタル酸、インドキシル硫酸、4-ピリドキシ酸、硫酸4エチルフェニル、アジピン酸、クエン酸、フマル酸、乳酸、リンゴ酸、フェニル乳酸、パントテン酸、ピペコリン酸、ピルビン酸、タルトロン酸、パラクレゾール硫酸、及びキサンツレン酸からなる群から選択される少なくとも1種である、請求項3に記載の方法。
- [請求項5] 前記糖類がフルクトース、イノシトール、ガラクトース、グルコース、及びスクロースからなる群から選択される少なくとも1種である、請求項3に記載の方法。
- [請求項6] 前記脂質がセラミド、Hex2-セラミド、Hex-セラミド、コレステロ

ール、コレステロール硫酸塩、カルジオリピン、モノグリセロール、リゾホスファチジルコリン、リゾホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジン酸、ホスファチジルコリン、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルグリセロール、ホスファチジルイノシトール、ホスファチジルセリン、スフィンゴミエリン、ジヒドロスフィンゴミエリン、トリグリセリド、グリセロール3リン酸、及びガングリオシドGM3からなる群から選択される少なくとも1種である、請求項3に記載の方法。

[請求項7] 前記ビタミンが α トコフェロール、ニコチンアミド、及びコリンからなる群から選択される少なくとも1種である、請求項3に記載の方法。

[請求項8] 前記アミン類がエタノールアミン、及びエタノールアミンリン酸からなる群から選択される少なくとも1種である、請求項3に記載の方法。

[請求項9] 前記核酸類がアデノシン、及びメチルチオアデノシンからなる群から選択される少なくとも1種である、請求項3に記載の方法。

[請求項10] 前記アミノ酸がアシルカルニチン、アラニン、アルギニン、アスパラギン、アスパラギン酸、 β -アラニン、システイン、システイン-HP E-AM、システイン-SS-HPE-AM、ジメチルグリシン、グルタミン酸、グルタミン、グリシン、イソロイシン、ロイシン、ロイシン酸、リシン、メチオニン、ホモシステイン-HPE-AM、N-アセチル- β -アラニン、N-アセチルシステイン、N-アセチルセリン、N-アセチルトリプトファン、N-カルバモイル-アスパルテート、O-アセチルセリン、オルニチン、ピログルタミン酸、フェニルアラニン、プロリン、セリン、S-スルフォシステイン、タウリン、スレオニン、トリプトファン、チロシン、及びバリンからなる群から選択される少なくとも1種である、請求項3に記載の方法。

[請求項11] 前記その他代謝物イオンがアンモニウムイオン、カリウムイオン、

カルシウムイオン、ナトリウムイオン、ピロリン酸、硫酸、亜硫酸、フェノール硫酸、及びSS-bis-HPE-AMからなる群から選択される少なくとも1種である、請求項3に記載の方法。

[請求項12] 工程(1)における培養上清の成分の測定を、ラマン分光法により行う、請求項1に記載の方法。

[請求項13] 工程(2)において、培養上清の1種類の成分に基づいて遺伝子導入率及び／又は遺伝子導入細胞数の予測を行う、請求項1に記載の方法。

[請求項14] 工程(2)において、培養上清の2種以上の成分の組合せに基づいて遺伝子導入率及び／又は遺伝子導入細胞数の予測を行う、請求項1に記載の方法。

[請求項15] 工程(2)において、遺伝子導入前後の培養上清の成分の変化を遺伝子導入率及び／又は遺伝子導入細胞数の予測に使用する、請求項1に記載の方法。

[請求項16] 前記動物細胞が、免疫細胞である、請求項1に記載の方法。

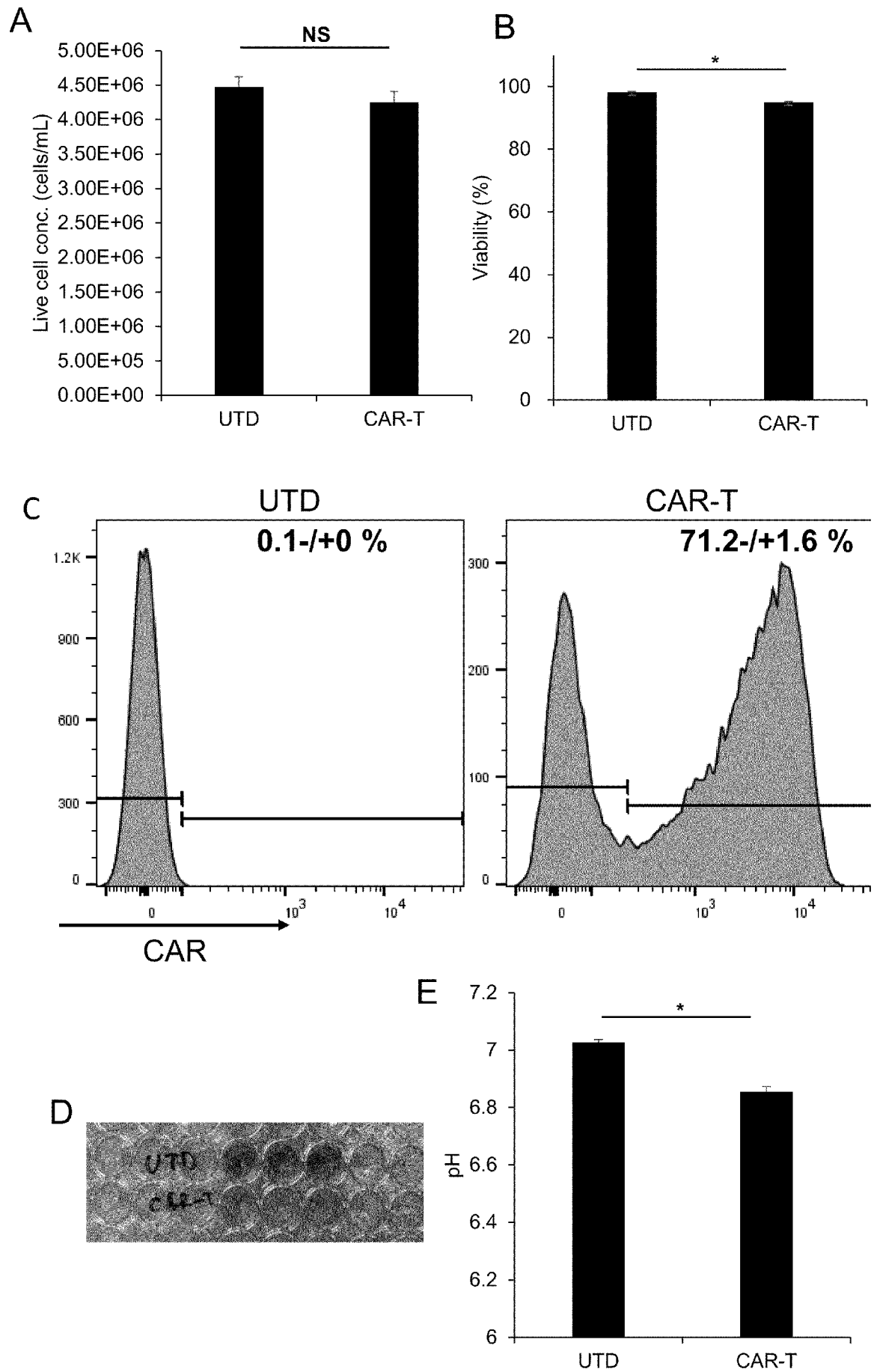
[請求項17] 前記免疫細胞が、T細胞又はNK細胞である、請求項16に記載の方法。

[請求項18] 前記動物細胞が、上皮細胞である、請求項1に記載の方法。

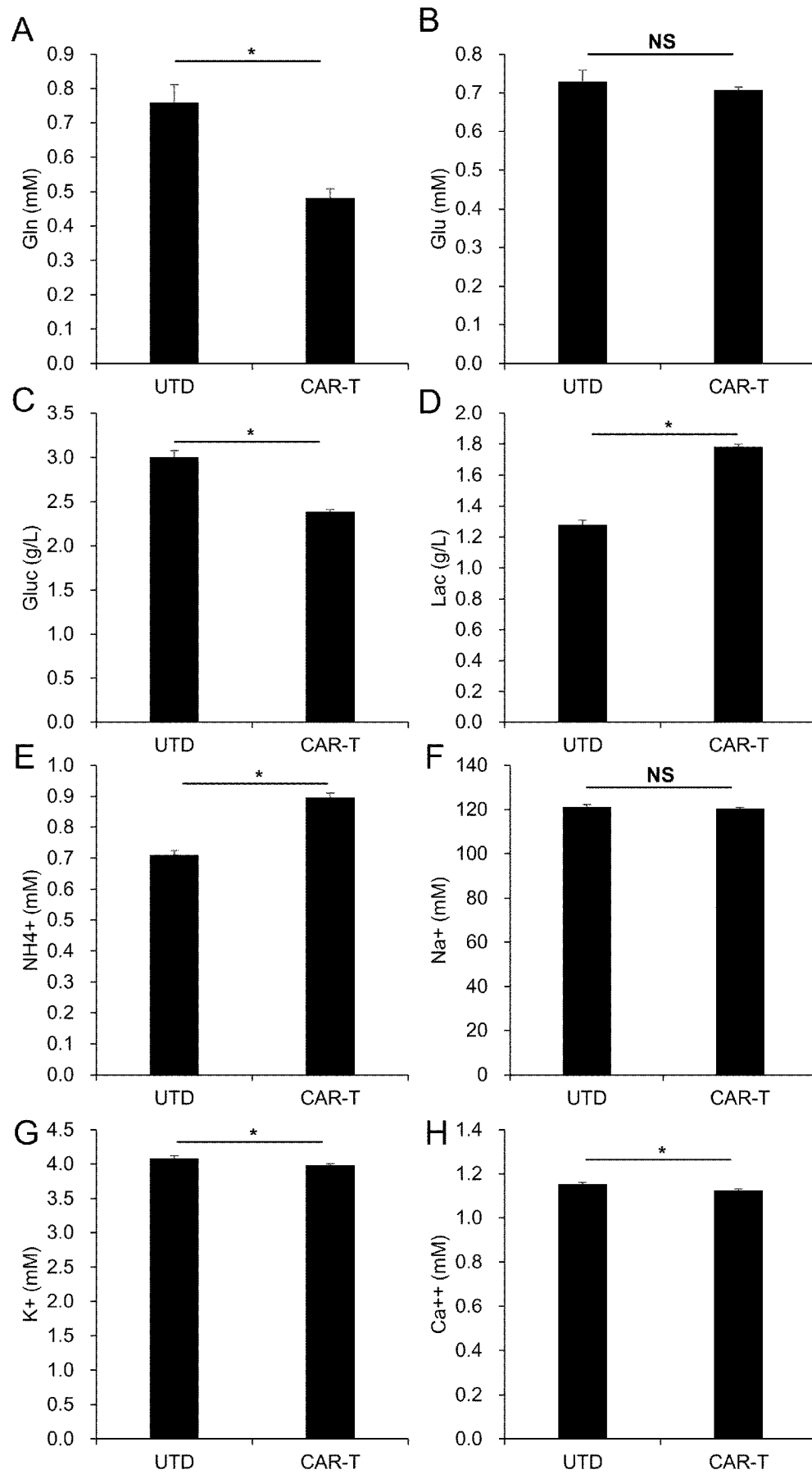
[請求項19] 前記遺伝子が、キメラ抗原受容体をコードする核酸である、請求項1に記載の方法。

[請求項20] 遺伝子導入した細胞製剤の製造方法であって、動物細胞が培養された培養上清の成分を測定し、測定した値に基づいて遺伝子導入率及び／又は遺伝子導入細胞数を測定する工程を含む方法。

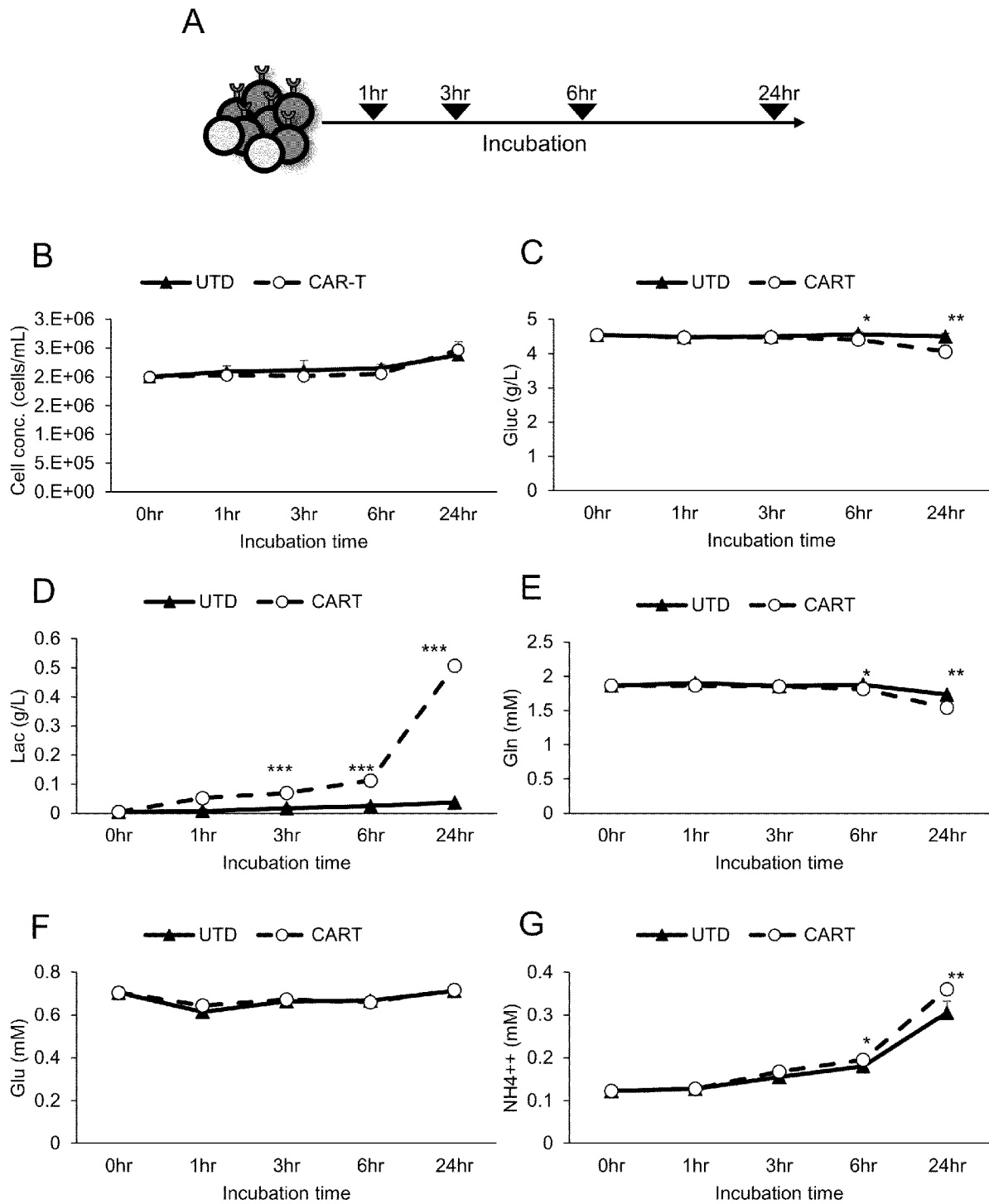
[図1]



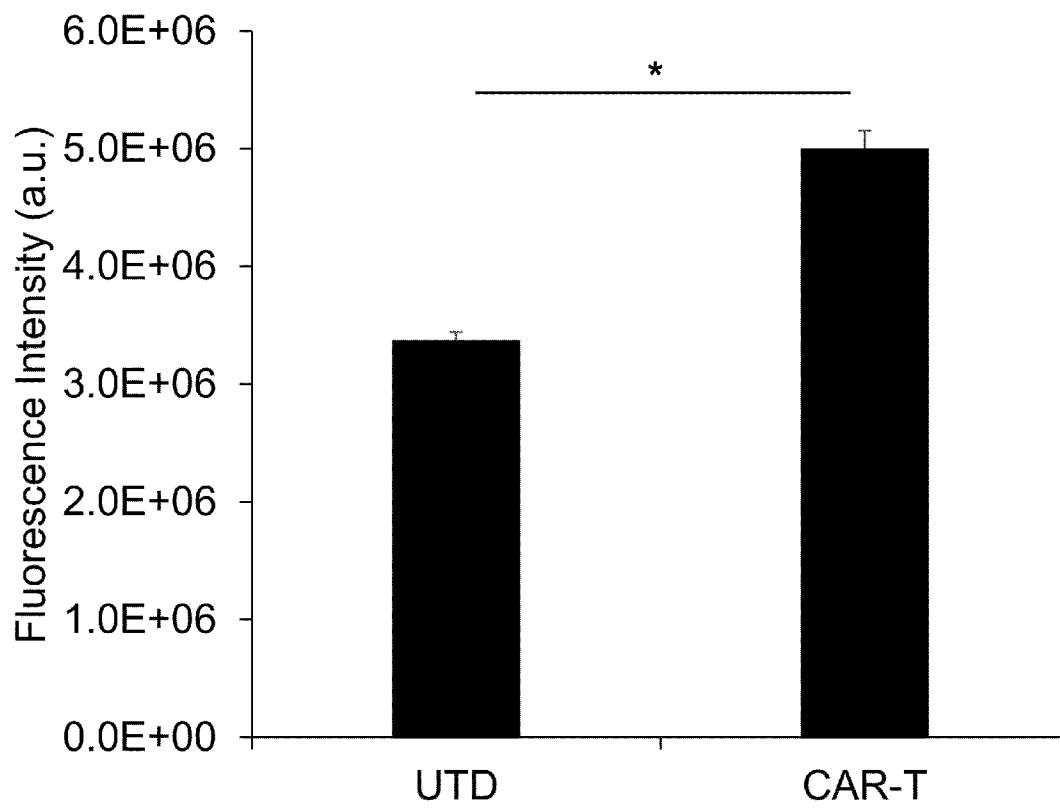
[図2]



[図3]

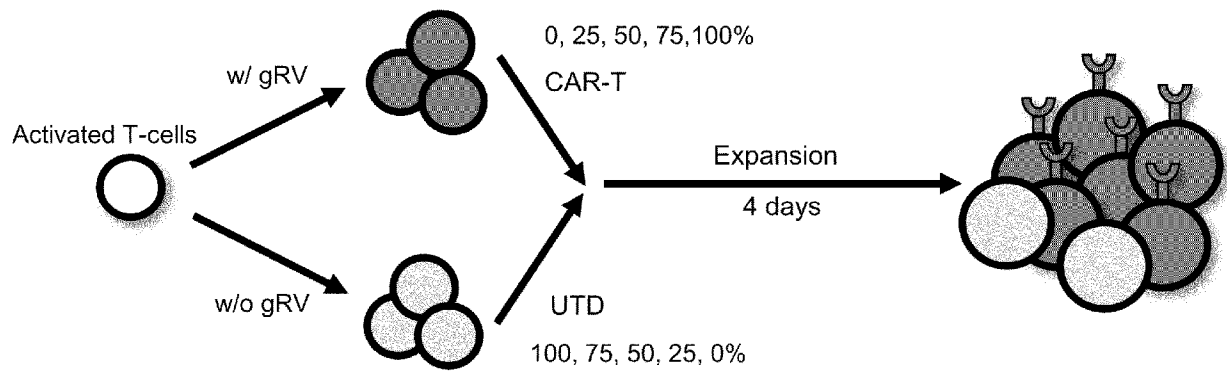


[図4]

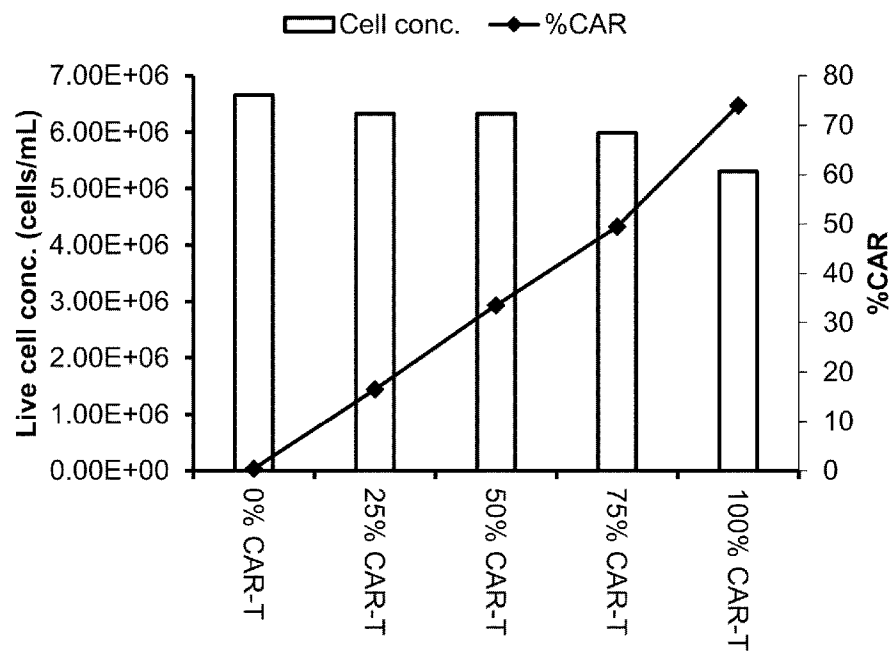
 $*p<0.0001$ 

[図5-1]

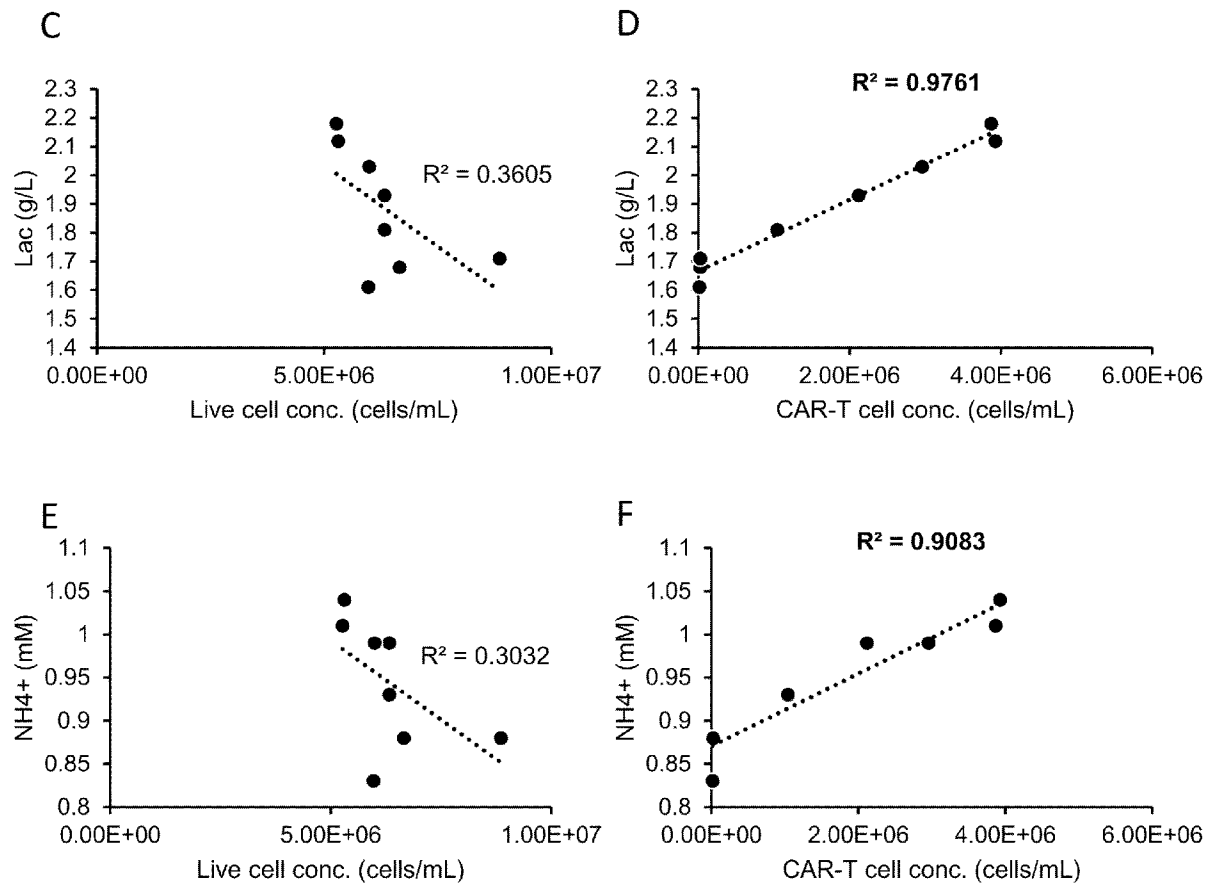
A



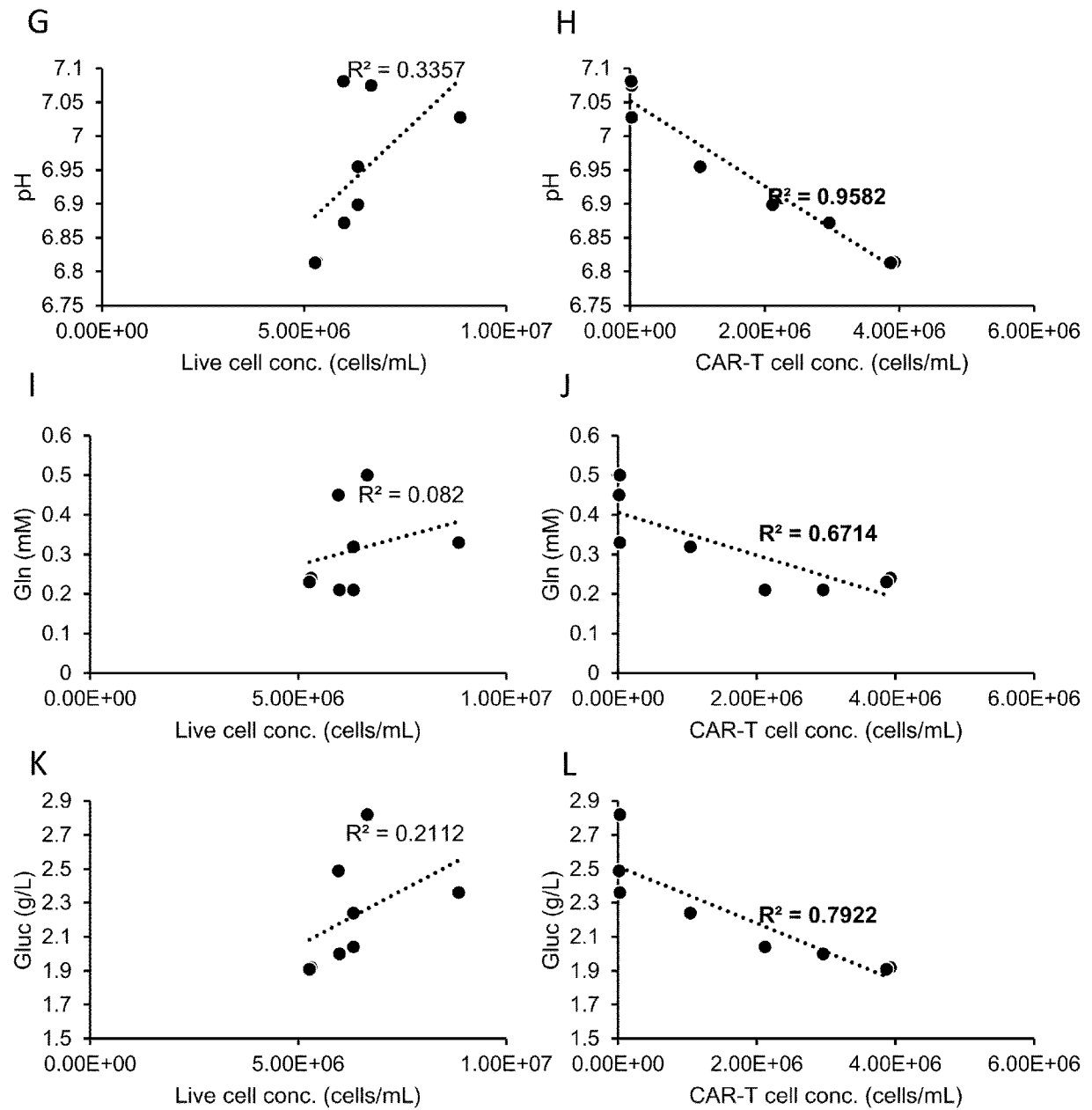
B



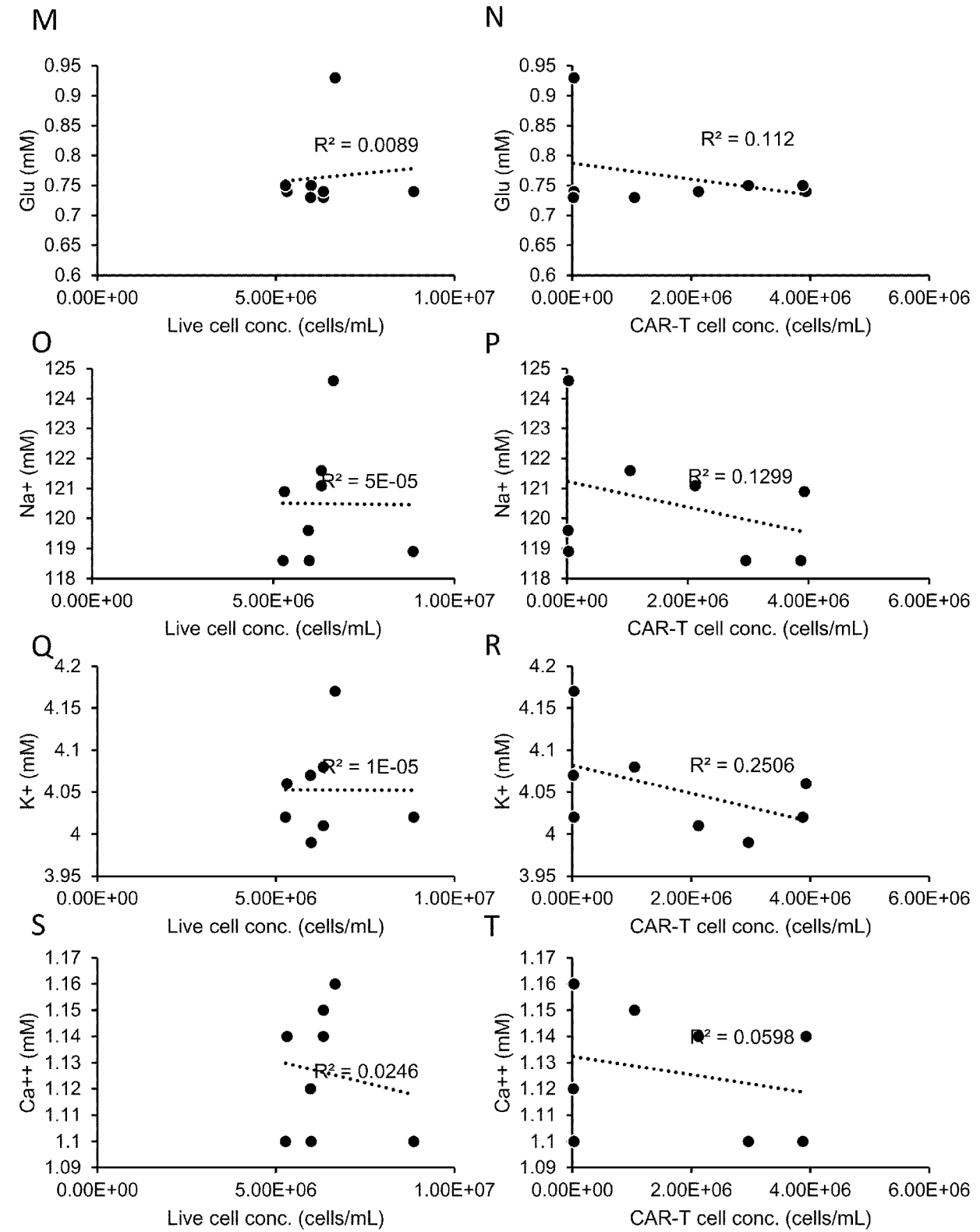
[図5-2]



[図5-3]

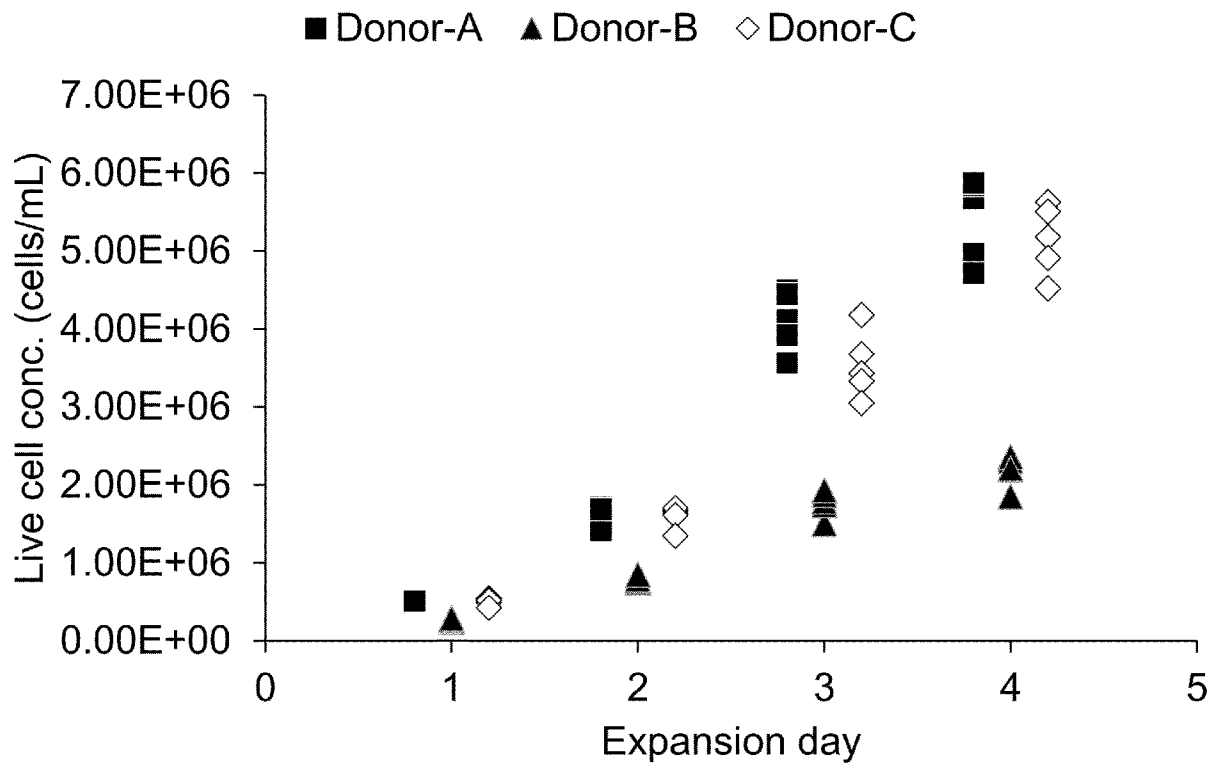


[図5-4]

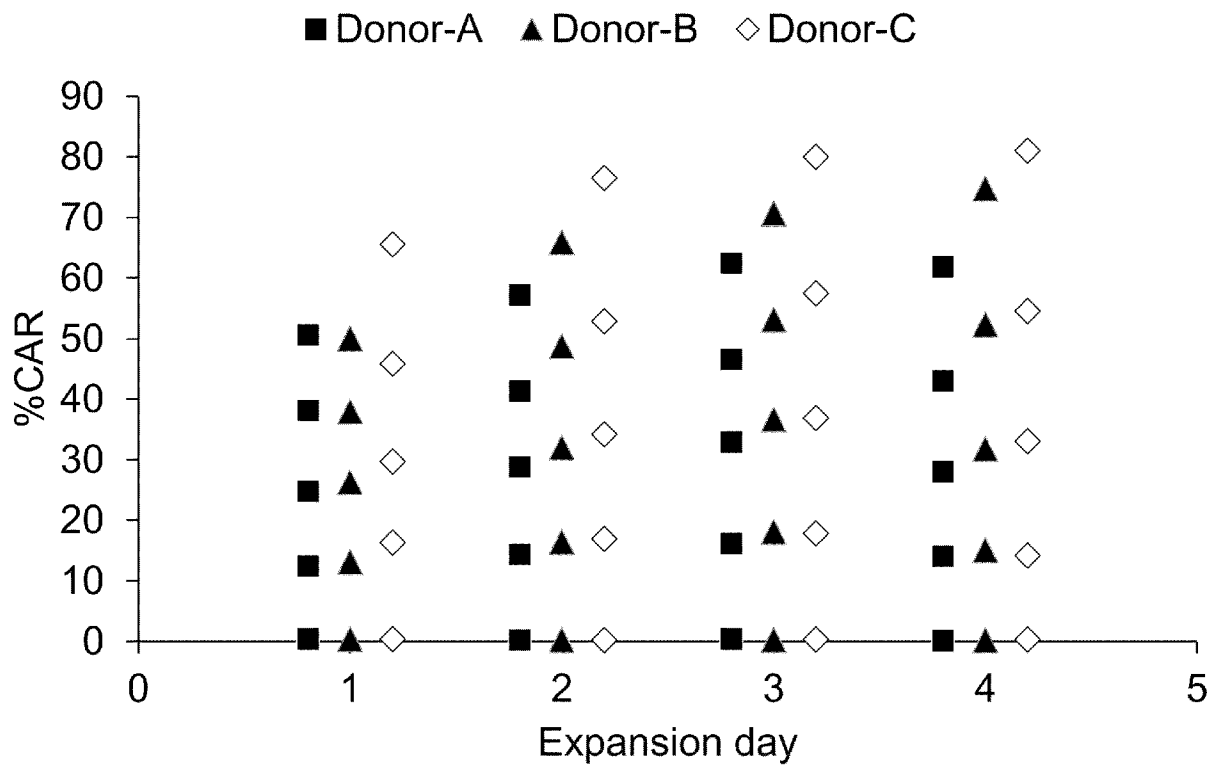


[図6]

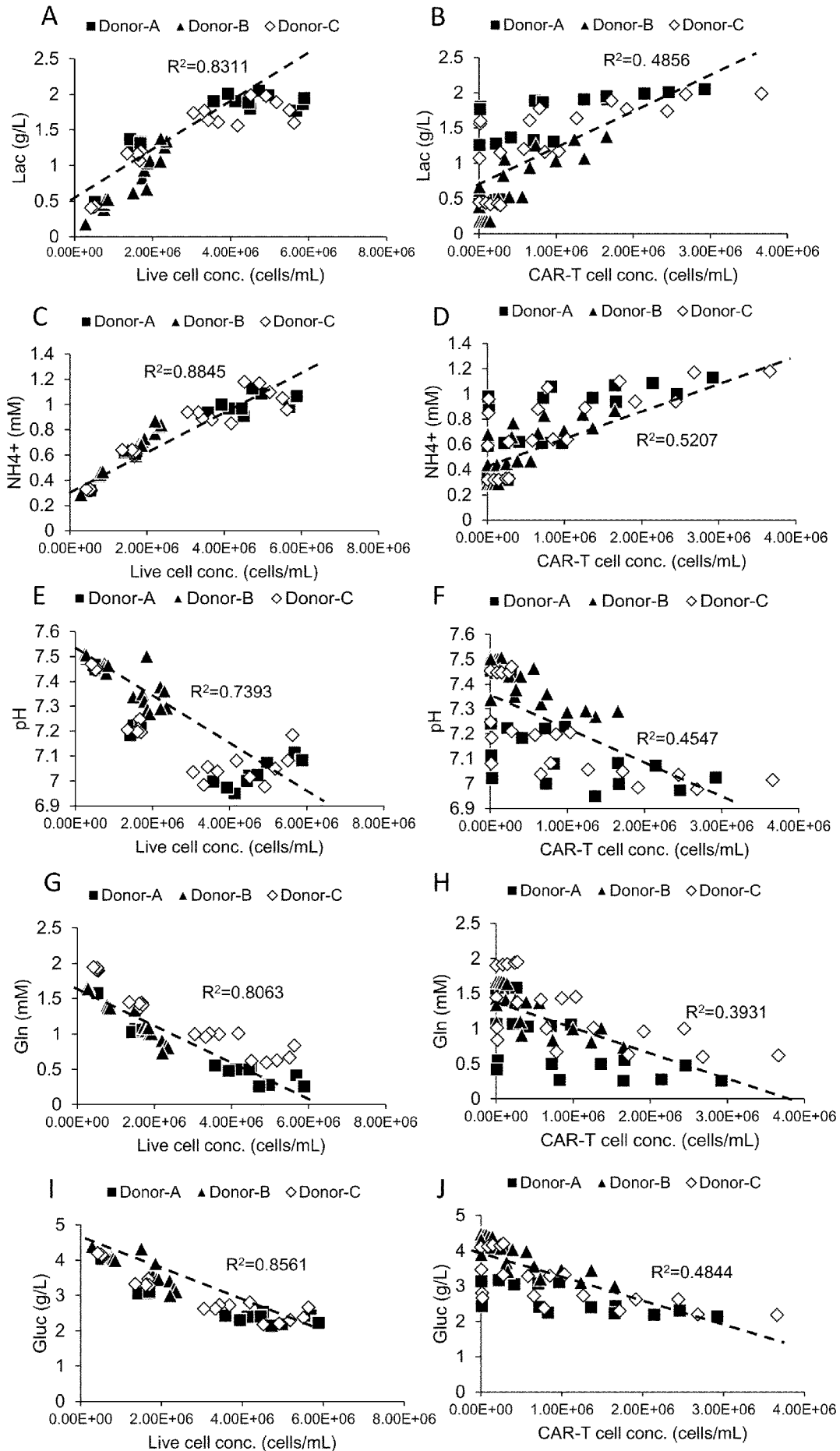
A



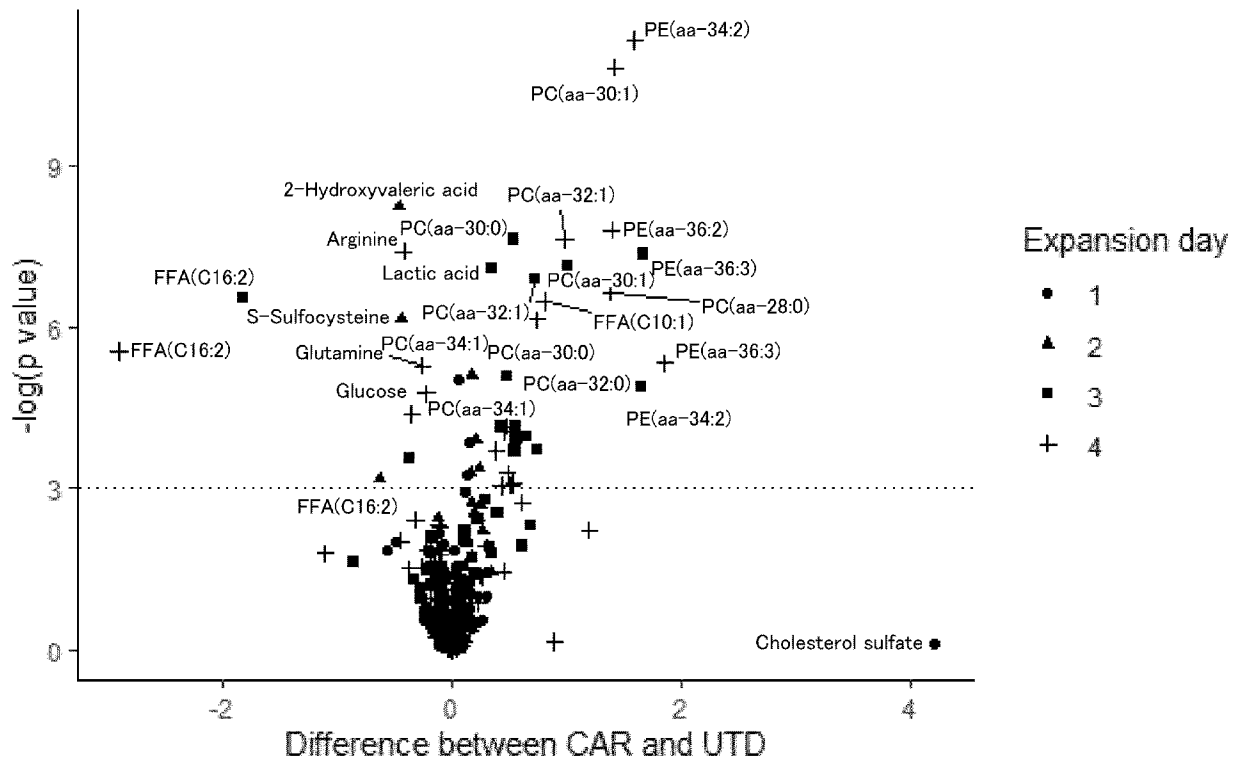
B



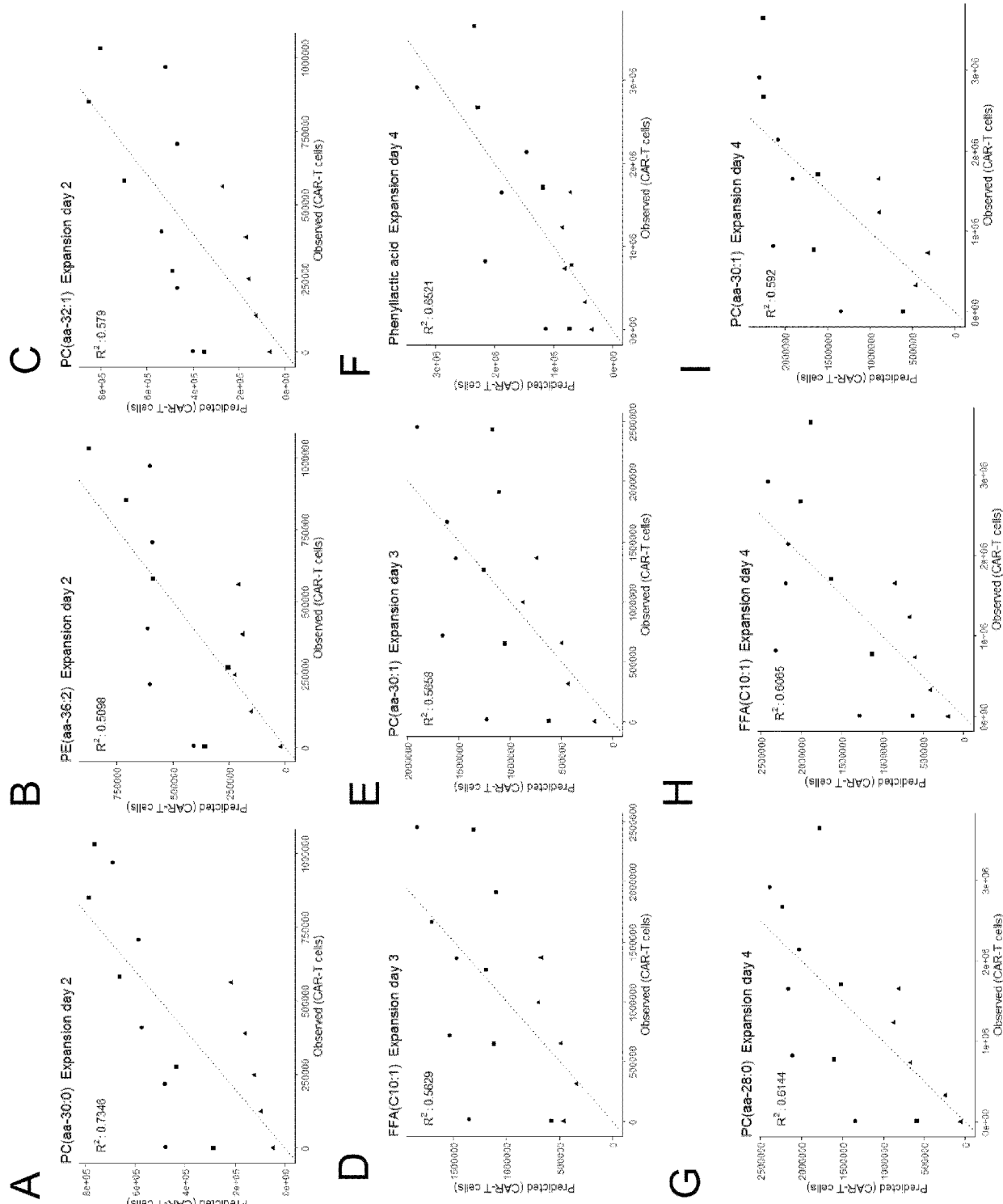
[図7]



[図8]

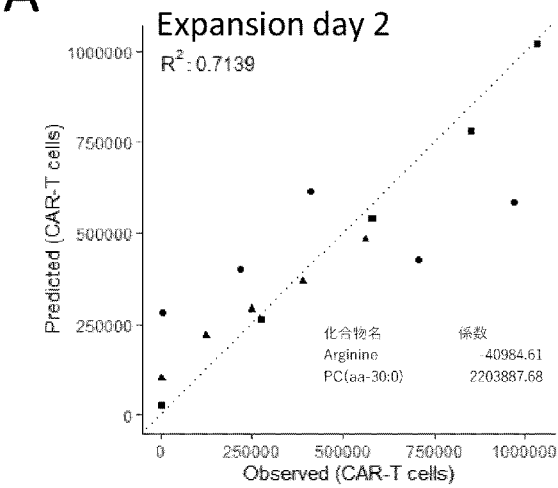


[図9]

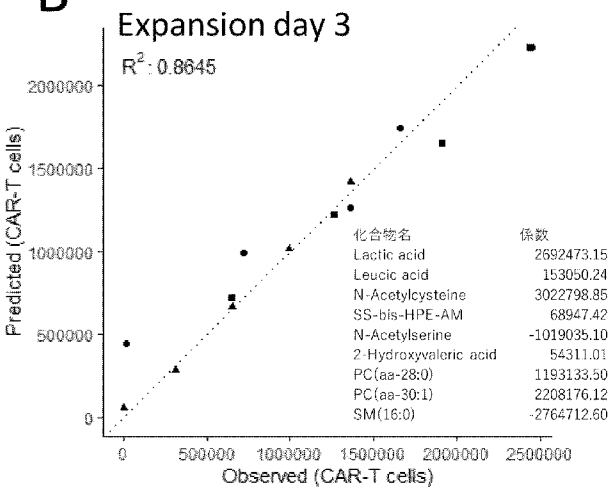


[図10-1]

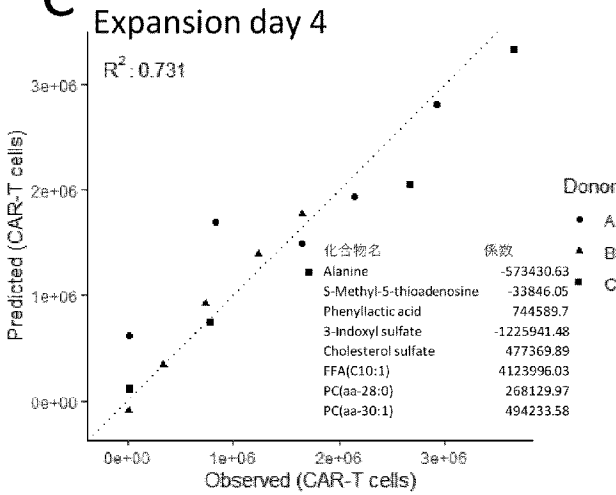
A LASSO回帰



B

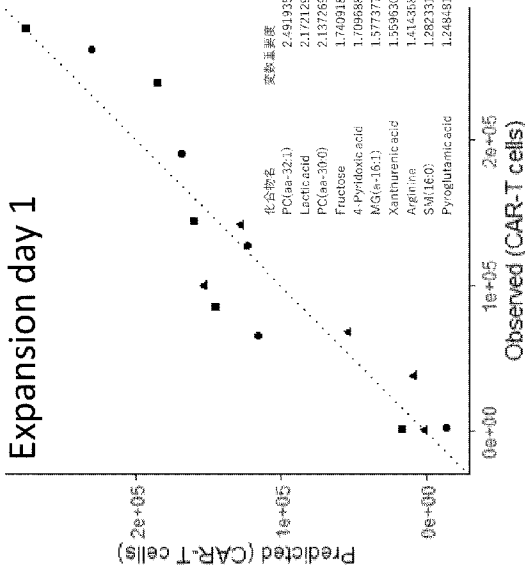


C

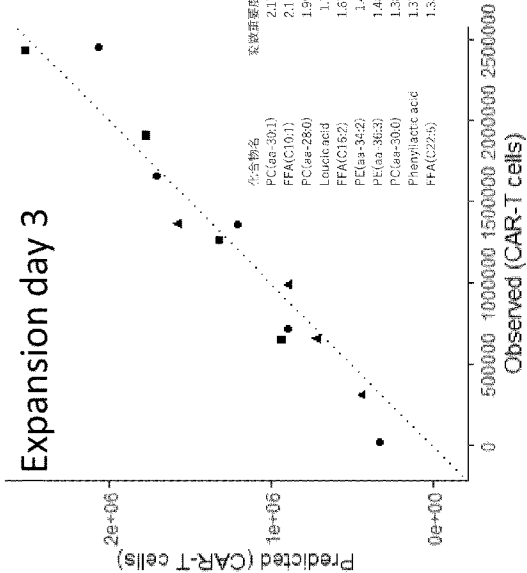


[図10-2]

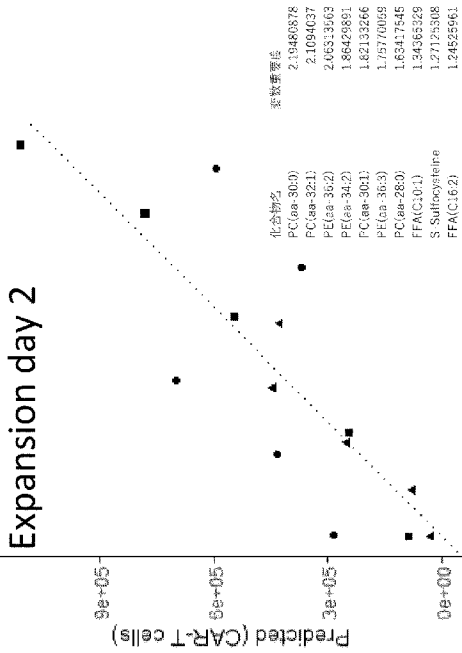
D OPLS回帰



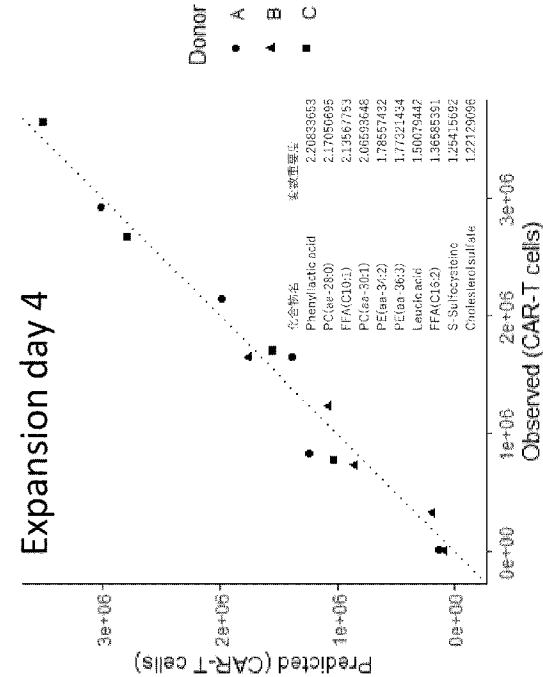
F



E

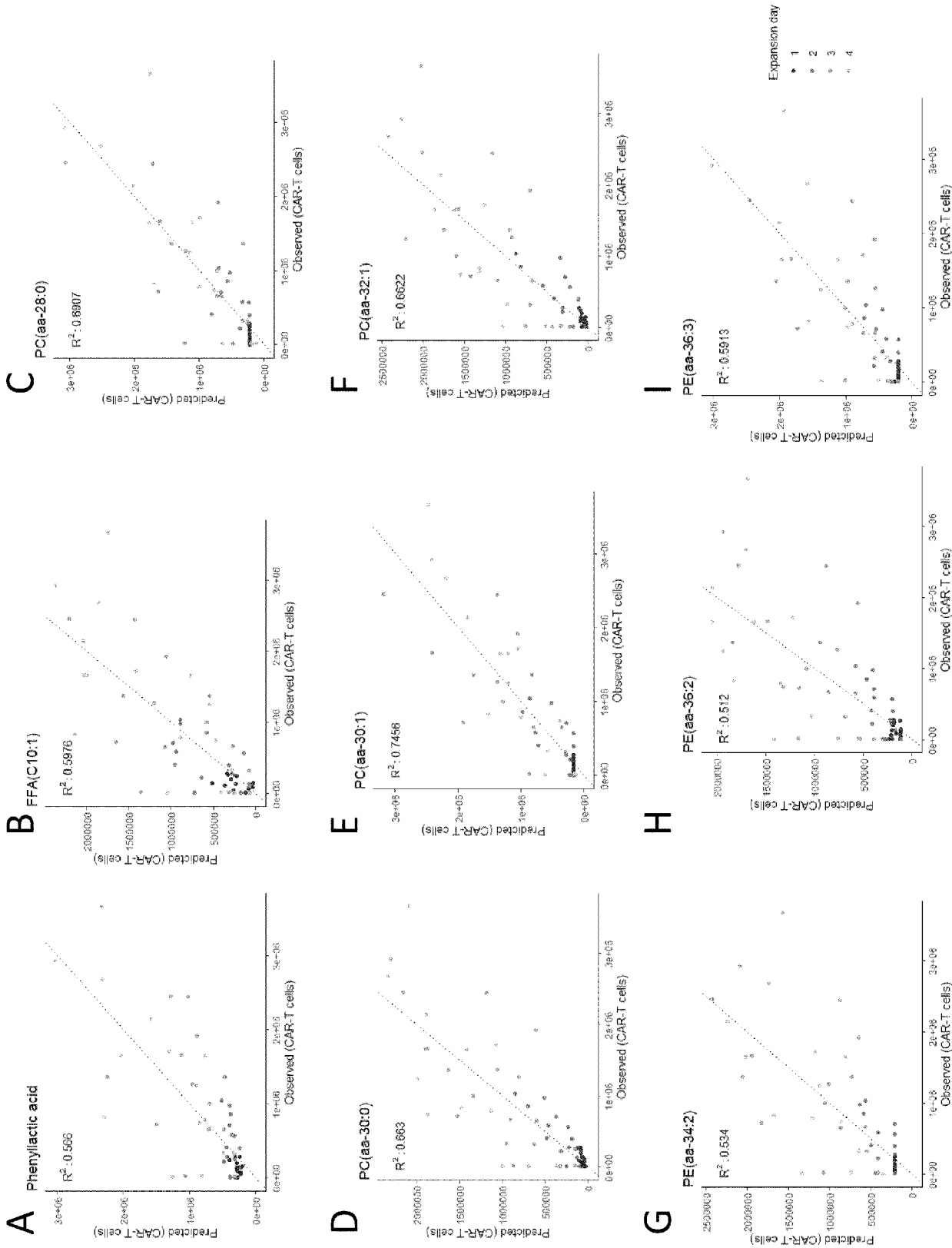


G

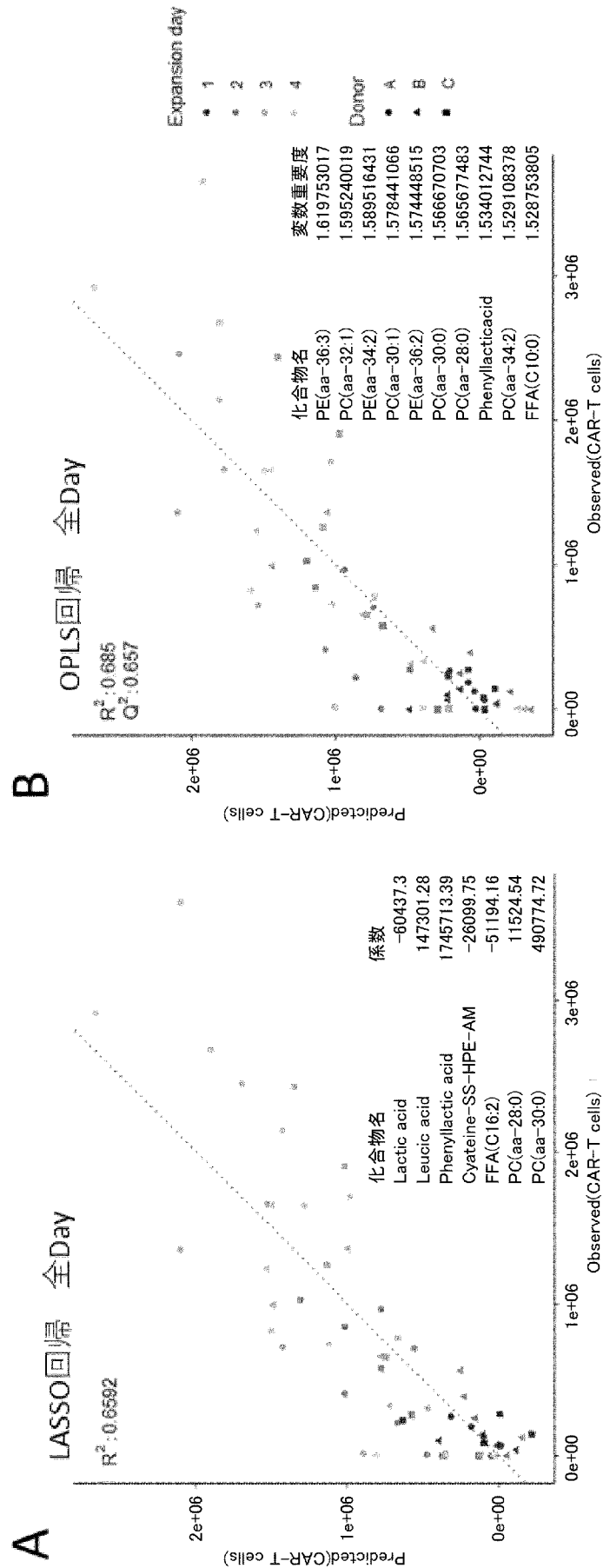


Donor
● A
▲ B
■ C

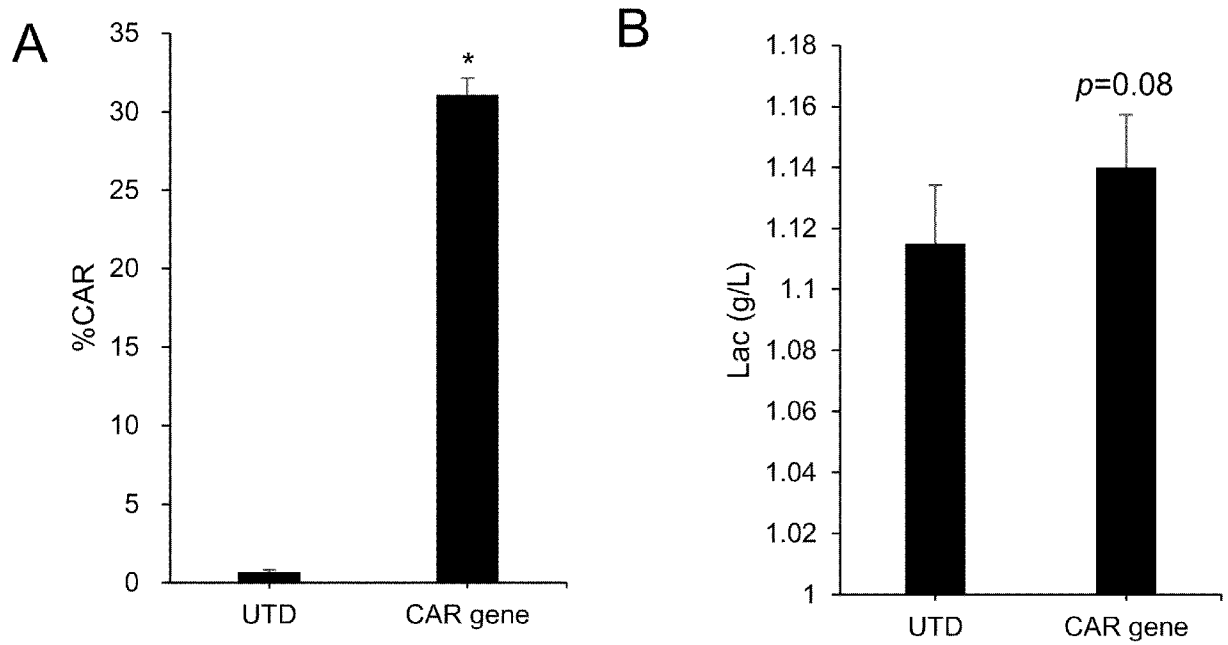
[図11]



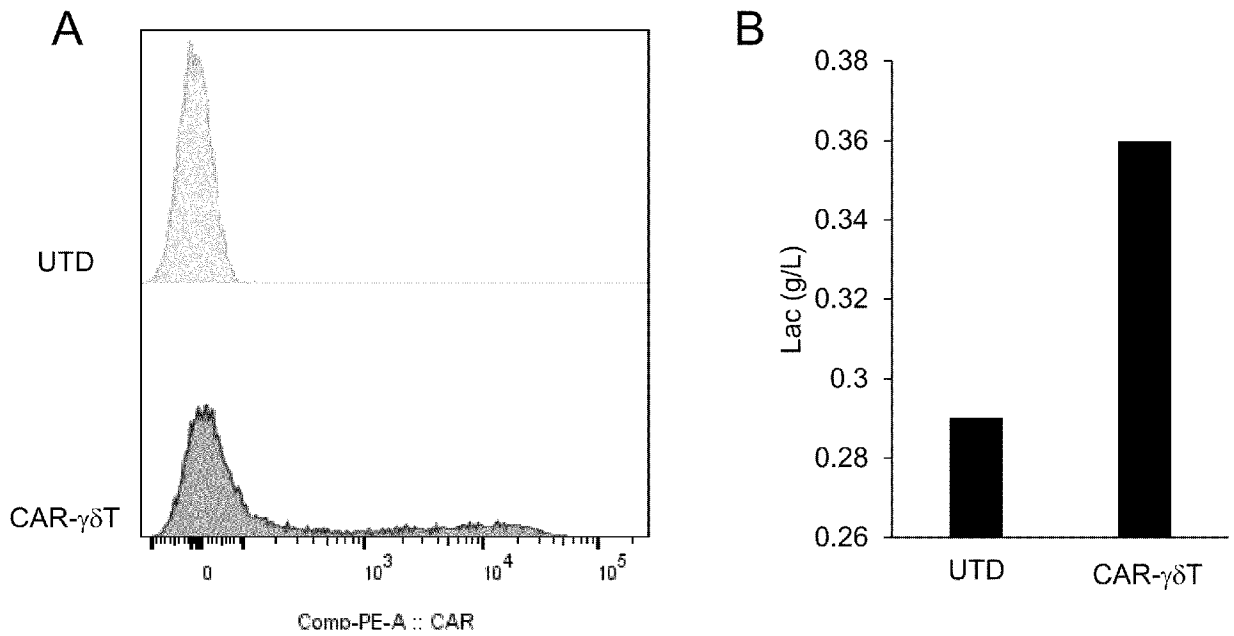
[図12]



[図13]



[図14]

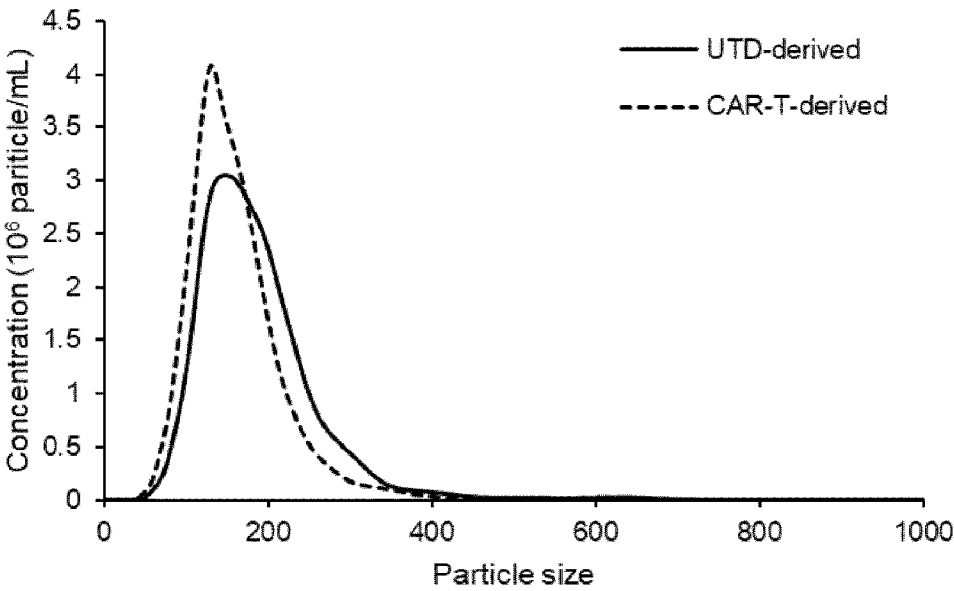


[図15]

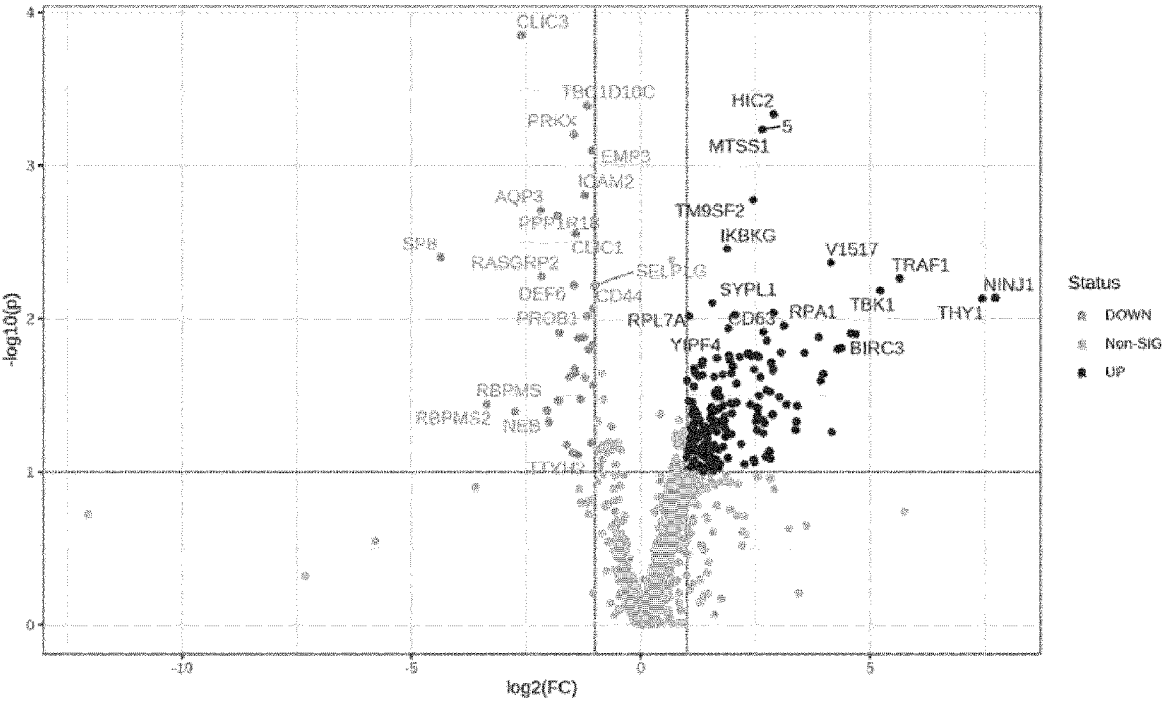
成分	R
グルタミン	-0.29
グルコース	-0.85
グルタミン酸	-0.74
乳酸	0.68
アンモニウムイオン	0.66
ナトリウムイオン	-0.82
カリウムイオン	0.47
カルシウムイオン	0.02
pH	-0.73

[図16-1]

A



B



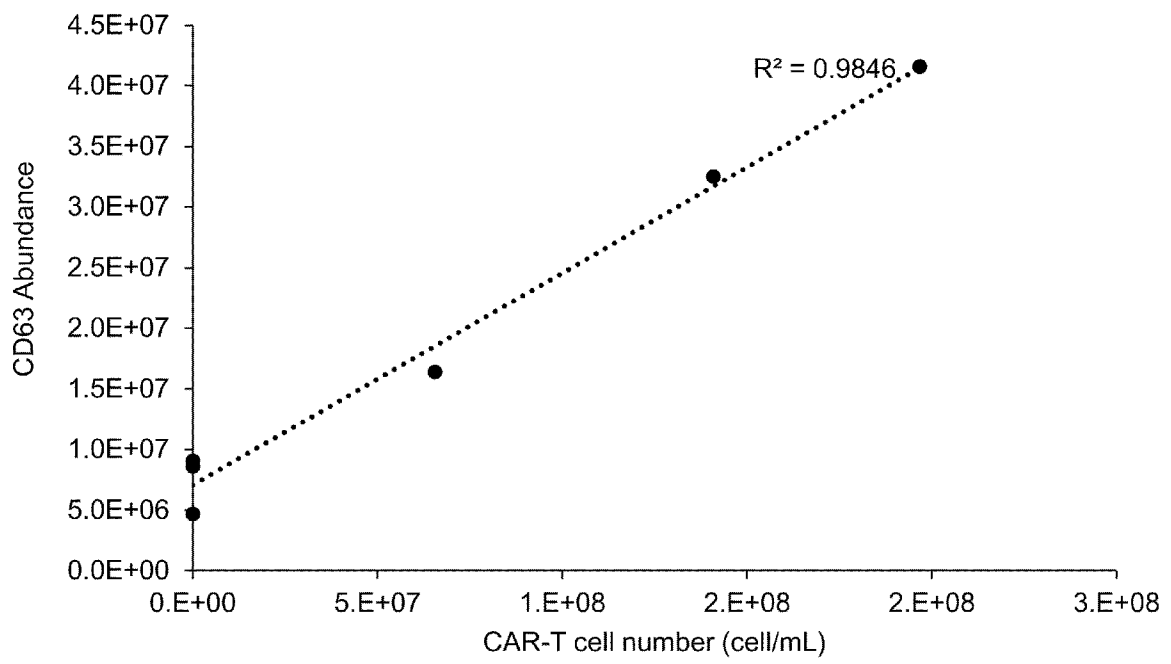
[図16-2]

C

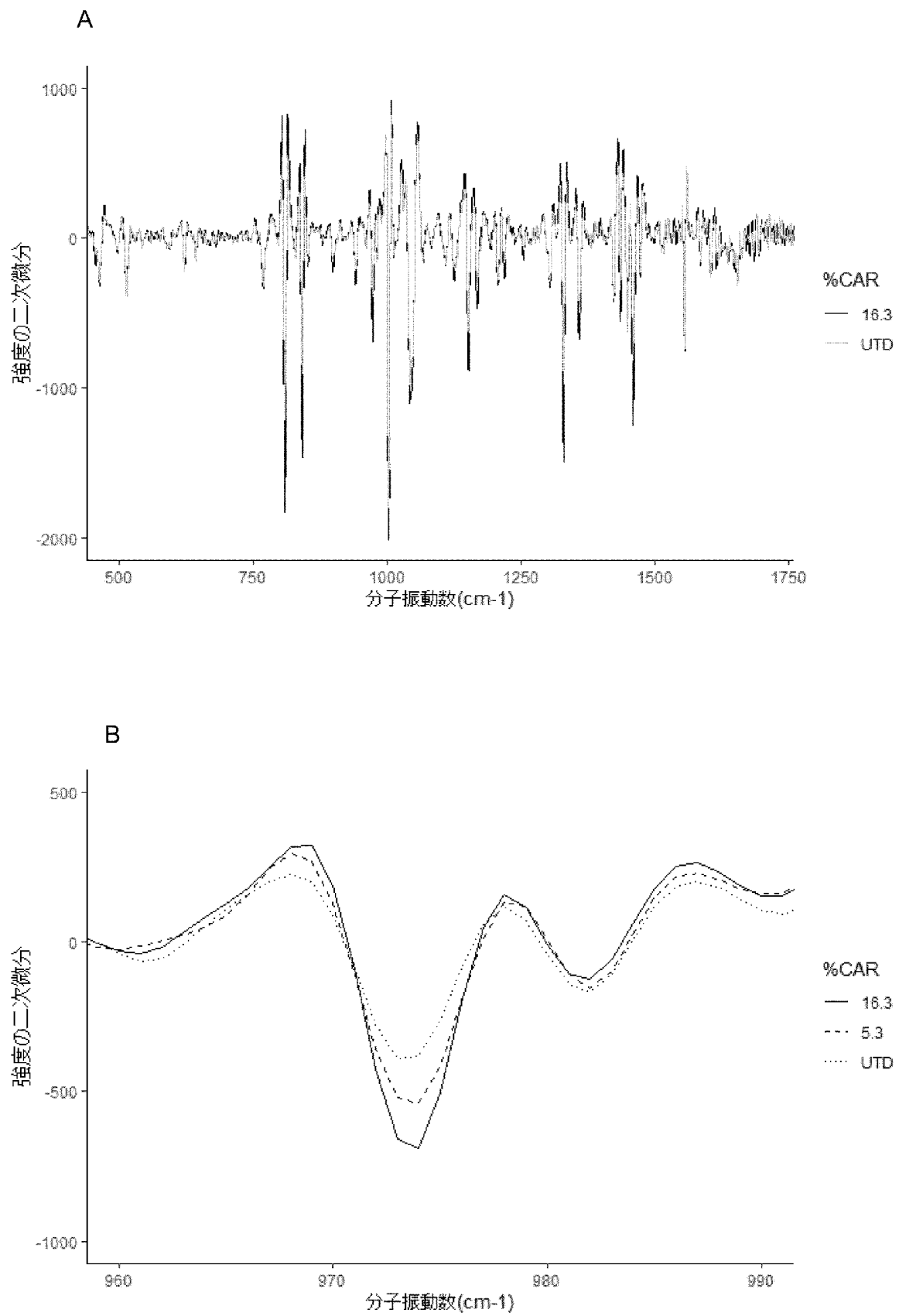
Protein	p.value	Protein	p.value	Protein	p.value	Protein	p.value
CAR	0.00433	RPL7A	0.009619	SRSF6	0.022713	ITGAM	0.036354
PSMB10	4.69E-06	PRKCSH	0.011101	EEF1D	0.022817	IL2RB	0.036445
FAM102A	2.50E-05	RNF167	0.01147	DPP4	0.022854	IGF2R	0.036894
GALNT2	5.68E-05	YIPF4	0.011603	HLA-DQA1	0.022989	RPL38	0.03709
CLIC3	0.000141	BUB3	0.01178	M6PR	0.023285	RSU1	0.037841
APOL3	0.000181	HLA-DPA1	0.012206	ANP32A	0.023312	TNIP1	0.037863
TBC1D10C	0.000406	NIBAN2	0.012351	ANP32B	0.023312	B2M	0.037868
HIC2	0.00046	HLA-DQB1	0.012464	SLC38A5	0.023475	NDP1P1	0.038263
MTSS1	0.000582	BIRC3	0.01257	EMB	0.023956	RPL27	0.038732
PRKX	0.000625	P2RX4	0.012734	FOPS	0.024068	JAK3	0.038879
PFFKB4	0.000758	TRAF3	0.013226	HLA-DRB3	0.02412	HLA-C	0.039162
ATAD5	0.000758	C16orf54	0.013281	TSPAN18	0.024157	HNRNPK	0.039306
EMP3	0.0008	ST00A4	0.013498	SLC3A3R1	0.024234	HLA-A	0.039711
PIK3R1	0.000917	HLA-DRB1	0.013925	PPP3CB	0.024256	CHD3	0.039724
IL1RAP	0.000947	KIFC1	0.014934	PPP3CA	0.024256	NDUFB2	0.040007
RPS24	0.001109	SCAPER	0.014934	ABHD17B	0.024429	NEB	0.040598
CCR5	0.001157	COPB2	0.015295	CLN3	0.025367	PSMF1	0.040688
ITGB1BP1	0.001174	CCDC148	0.015568	RPLP0	0.025381	RTN3	0.040938
IL32	0.001308	ELAVL1	0.015671	EPSTB1	0.025496	TNF	0.041692
TMEM33	0.001382	CUX1	0.015783	SLC23A2	0.026418	CLIC5	0.041849
TMEM200A	0.001505	CUX1.1	0.015783	RPS3	0.026578	RPSA	0.042102
ATP2C1	0.001507	HLA-DQA1	0.015854	IQGAP2	0.027284	PRSS1	0.042162
IFNG	0.001558	TGOLN2	0.015953	MERTK	0.027588	PRSS2	0.042162
ICAM2	0.001559	TAX1BP1	0.016233	RPS28	0.027852	PRSS3P2	0.042162
TM9SF2	0.001677	RNH1	0.016397	SDC4	0.027906	FNBP1	0.042283
MCM7	0.00185	TNFRSF4	0.016606	SQSTM1	0.029123	SLC9A6	0.0423
AQP3	0.001954	RPA3	0.016638	FAM3C	0.029243	RAB9A	0.042397
PPP1R19	0.002121	GGT1	0.016699	SLAMF7	0.029317	SLC2A3	0.042467
REEP6	0.002733	ARHGAP3	0.017085	TRAF5	0.02932	TFR3	0.042635
CLIC1	0.00278	P2RY10	0.017149	ICAM1	0.029969	HSPA9	0.042695
PROM6	0.002965	ZNF43	0.017377	CXCR4	0.030088	DYNC2H1	0.042857
ADCY7	0.003149	HLA-DRA	0.01739	PI4K2A	0.030345	YIPF6	0.043336
VDAC1	0.003205	KRIT1	0.017574	KCNN4	0.030799	SLC38A1	0.043485
CPM	0.003459	ATL2	0.017758	PANX1	0.031067	END4	0.044984
IKBK6	0.003506	SCAMP3	0.01778	ADGRE5	0.031225	CDH7	0.045627
TNFSF10	0.003697	ADA	0.018087	CD74	0.031905	CADM1	0.045724
SP8	0.003983	TMEM165	0.018435	YBX1	0.032202	FLNB	0.045879
CHMP4A	0.00416	RPS5	0.018883	ABCC1	0.032498	CDK1	0.045973
RNF19A	0.00449	SNX17	0.019099	PTGFRN	0.032599	RPS2	0.046014
WWP2	0.004749	DHCR24	0.019183	RPL9	0.032618	TSPAN3	0.04621
RASGRP2	0.00531	NEXMIF	0.019358	NFATC4	0.033614	SLC3A2	0.046327
TRAF1	0.005485	CNBP	0.019785	SERINC5	0.033892	GOLGA7B	0.046357
DEF6	0.006068	GNG4	0.019892	SNX18	0.034342	GOSR1	0.046673
SELPLG	0.006102	RPS12	0.019908	CBFA2T3	0.0344	STAT1	0.046723
TBK1	0.006581	ITGA3	0.020358	RUNX1T1	0.0344	GLIPR2	0.046908
PTPRK	0.006605	TNFAIP3	0.020399	RACK1	0.034785	CCR7	0.047118
IL21R	0.006654	TNFRSF15	0.021029	CD83	0.035067	SLC38A2	0.047127
NINJ1	0.007366	CTSD	0.02111	FSCN1	0.035151	SASH3	0.047178
THY1	0.007425	LIME1	0.02127	RPS9	0.035534	TNFRSF1E	0.047211
SYPL1	0.007926	LY75	0.021424	SLC35B2	0.035552	MVP	0.047357
IFNGR1	0.008033	ATP5F1A	0.021709	SLC39A8	0.035873	CD55	0.048027
CD44	0.008663	GNA15	0.021787	MRPS5	0.036075	CCM2	0.048266
RPA1	0.009148	INCENP	0.021817	TRAF2	0.03614	GSPT1	0.048617
CD63	0.009409	UBQLN2	0.022369	RBPM52	0.036301	ULK3	0.048814
PROB1	0.009549	MSN	0.022633	RBPM5	0.036301	RPS20	0.048858
						NSD3	0.049666
						SLC39A14	0.049957

[図16-3]

D



[図17]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2024/021754

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 5/10(2006.01)i; *C12N 5/071*(2010.01)i; *C12N 5/0783*(2010.01)i; *C12N 15/12*(2006.01)i; *C12N 15/13*(2006.01)i;
C12N 15/62(2006.01)i; *C12Q 1/06*(2006.01)i; *C12Q 1/68*(2018.01)i; *G01N 33/50*(2006.01)i

FI: C12N5/10; C12N15/12; C12N15/13; C12N15/62 Z; C12N5/071; C12N5/0783; C12Q1/68; G01N33/50 Z; C12Q1/06
ZNA

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N5/10; C12N5/071; C12N5/0783; C12N15/12; C12N15/13; C12N15/62; C12Q1/06; C12Q1/68; G01N33/50

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

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

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

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

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 10-509318 A (CHANG, Lungji) 14 September 1998 (1998-09-14) examples 1, 4	1-3, 13-20
A	examples 1, 4	4-12
Y	US 2019/0226994 A1 (CELLTOOL GMBH) 25 July 2019 (2019-07-25) claims, paragraphs [0062], [0070], [0076], [0083], [0086], examples	1-20
Y	JP 2007-524375 A (DIVERSA CORPORATION) 30 August 2007 (2007-08-30) claims, paragraph [0132]	1-20
Y	WO 2021/005729 A1 (SHIMADZU CORPORATION) 14 January 2021 (2021-01-14) claims, abstract	1-20

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
“D” document cited by the applicant in the international application
“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date
“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

“&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

26 August 2024

Date of mailing of the international search report

03 September 2024

Name and mailing address of the ISA/JP

**Japan Patent Office (ISA/JP)
3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915
Japan**

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2024/021754

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

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
 - a. ☒ forming part of the international application as filed.
 - b. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)),
☐ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.
2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/JP2024/021754

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
JP	10-509318	A	14 September 1998	WO	1996/014332	A1	
				examples 1, 4			
				US	5693508	A	
US	2019/0226994	A1	25 July 2019	WO	2018/007415	A1	
JP	2007-524375	A	30 August 2007	WO	2005/032496	A2	
				claims, p. 68, line 30 to p. 69, line 18			
				JP	2010-284168	A	
				US	2007/0202566	A1	
				US	2014/0128590	A1	
				US	2016/0060609	A1	
				EP	2853593	A1	
				EP	3299465	A1	
WO	2021/005729	A1	14 January 2021	US	2022/0246231	A1	
				claims, abstract			

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））

C12N 5/10(2006.01)i; C12N 5/071(2010.01)i; C12N 5/0783(2010.01)i; C12N 15/12(2006.01)i;
C12N 15/13(2006.01)i; C12N 15/62(2006.01)i; C12Q 1/06(2006.01)i; C12Q 1/68(2018.01)i;
G01N 33/50(2006.01)i
FI: C12N5/10; C12N15/12; C12N15/13; C12N15/62 Z; C12N5/071; C12N5/0783; C12Q1/68; G01N33/50 Z;
C12Q1/06 ZNA

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC））

C12N5/10; C12N5/071; C12N5/0783; C12N15/12; C12N15/13; C12N15/62; C12Q1/06; C12Q1/68; G01N33/50

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

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

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

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

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X	JP 10-509318 A (チャン, ランージ) 14.09.1998 (1998-09-14) 実施例 1, 実施例 4	1-3, 13-20
A	実施例 1, 実施例 4	4-12
Y	US 2019/0226994 A1 (CELLT00L GMBH) 25.07.2019 (2019-07-25) 特許請求の範囲, 段落 0062, 0070, 0076, 0083, 0086, 実 施例	1-20
Y	JP 2007-524375 A (ダイヴァーサ コーポレイション) 30.08.2007 (2007-08-30) 特許請求の範囲, 段落 0132	1-20
Y	WO 2021/005729 A1 (株式会社島津製作所) 14.01.2021 (2021-01-14) 特許請求の範囲, 要約	1-20

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☒ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー
“A” 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
“D” 国際出願で出願人が先行技術文献として記載した文献
“E” 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に
公表されたもの
“L” 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若し
くは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を
付す）
“O” 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
“P” 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の
後に公表された文献

“T” 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と抵
触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引
用するもの
“X” 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性
又は進歩性がないと考えられるもの
“Y” 特に関連のある文献であって、当該文献と他の 1 以上の文献
との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がな
いと考えられるもの
“&” 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日
26.08.2024

国際調査報告の発送日
03.09.2024

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

権限のある職員（特許庁審査官）

白井 美香保 4B 4502

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

第 I 欄 スクレオチド又はアミノ酸配列（第 1 ページの 1. c の続き）

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

- a. ☒ 出願時における国際出願の一部を構成する配列表
- b. ☐ 国際出願日後に、国際調査のために提出された配列表（PCT規則13の3.1(a)）
☐ 配列表が出願時の国際出願の開示の範囲を超えるものではない旨の陳述書が添付されていた。

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

3. 補足意見：

国際調査報告
パテントファミリーに関する情報

国際出願番号

PCT/JP2024/021754

引用文献			公表日	パテントファミリー文献			公表日
JP	10-509318	A	14.09.1998	WO	1996/014332	A1	
				実施例 1, 実施例 4			
				US	5693508	A	
US	2019/0226994	A1	25.07.2019	WO	2018/007415	A1	
JP	2007-524375	A	30.08.2007	WO	2005/032496	A2	
				特許請求の範囲, 第 6 8 頁 第 3 0 行 - 第 6 9 頁第 1 8 行			
				JP	2010-284168	A	
				US	2007/0202566	A1	
				US	2014/0128590	A1	
				US	2016/0060609	A1	
				EP	2853593	A1	
				EP	3299465	A1	
WO	2021/005729	A1	14.01.2021	US	2022/0246231	A1	
				特許請求の範囲, 要約			