

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7679001号
(P7679001)

(45)発行日 令和7年5月19日(2025.5.19)

(24)登録日 令和7年5月9日(2025.5.9)

(51)国際特許分類

F I

C 1 2 N 5/10 (2006.01)

C 1 2 N 5/0783(2010.01)

C 1 2 N 15/12 (2006.01)

C 1 2 N 5/10

C 1 2 N 5/0783

C 1 2 N 15/12

Z N A

請求項の数 13 (全40頁)

(21)出願番号	特願2023-573464(P2023-573464)	(73)特許権者	523442828
(86)(22)出願日	令和4年5月31日(2022.5.31)		ヴァクセル - バイオ
(65)公表番号	特表2024-520103(P2024-520103 A)		V A X C E L L - B I O
(43)公表日	令和6年5月21日(2024.5.21)		大韓民国 ジョンラナム - ド ファスン -
(86)国際出願番号	PCT/KR2022/007782		ゲン ファスン - ウップ サンダン - ギル
(87)国際公開番号	WO2022/255793	(73)特許権者	1 2 - 5 5
(87)国際公開日	令和4年12月8日(2022.12.8)		515020429
審査請求日	令和5年11月28日(2023.11.28)		コンジュ ナショナル ユニバーシティ
(31)優先権主張番号	10-2021-0070778		インダストリー - ユニバーシティ コオ
(32)優先日	令和3年6月1日(2021.6.1)		ポレイション ファウンデーション
(33)優先権主張国・地域又は機関	韓国(KR)		K O N G J U N A T I O N A L U N I
			V E R S I T Y I N D U S T R Y - U
			N I V E R S I T Y C O O P E R A T
			I O N F O U N D A T I O N
			大韓民国、3 1 4 - 7 0 1 チュンチョ
			最終頁に続く

(54)【発明の名称】 フィーダー細胞を含むナチュラルキラー細胞増殖用組成物

(57)【特許請求の範囲】

【請求項 1】

B 7 H 6、C D 1 3 7 L 及び I L - 1 5 を発現するフィーダー細胞としての A R H 7 7 細胞を含む、ナチュラルキラー細胞 (n a t u r a l k i l l e r c e l l) 増殖用組成物。

【請求項 2】

前記 A R H 7 7 細胞が I L - 1 5 R α をさらに発現することを特徴とする、請求項 1 に記載のナチュラルキラー細胞増殖用組成物。

【請求項 3】

B 7 H 6、C D 1 3 7 L 及び I L - 1 5 を発現する、A R H 7 7 細胞であるフィーダー細胞株。

【請求項 4】

前記 A R H 7 7 細胞であるフィーダー細胞株が、I L - 1 5 R α をさらに発現することを特徴とする、請求項 3 に記載のフィーダー細胞株。

【請求項 5】

(1) B 7 H 6 遺伝子、C D 1 3 7 L 遺伝子及び I L - 1 5 遺伝子をウイルス発現ベクターで形質転換して組換えウイルスを産生するステップと、

(2) A R H 7 7 細胞であるフィーダー細胞に前記組換えウイルスを添加して培養するステップとを含む、B 7 H 6、C D 1 3 7 L 及び I L - 1 5 を発現する A R H 7 7 細胞で

あるフィーダー細胞の製造方法。

【請求項 6】

前記ステップ (1) において、IL - 15 R α 遺伝子をさらに形質転換することを特徴とする、請求項 5 に記載の ARH77 細胞であるフィーダー細胞の製造方法。

【請求項 7】

前記ウイルスが、レンチウイルス (l e n t i v i r u s) またはレトロウイルス (r e t r o v i r u s) であることを特徴とする、請求項 5 に記載の ARH77 細胞であるフィーダー細胞の製造方法。

【請求項 8】

B7H6、CD137L 及び IL - 15 を発現する ARH77 細胞であるフィーダー細胞と末梢血単核球 (p e r i p h e r a l b l o o d m o n o n u c l e a r c e l l) を培養するステップを含む、ナチュラルキラー細胞増殖方法。

10

【請求項 9】

前記 ARH77 細胞であるフィーダー細胞が、IL - 15 R α をさらに発現することを特徴とする、請求項 8 に記載の ナチュラルキラー細胞増殖方法。

【請求項 10】

培養液が、ペニシリン (p e n i c i l l i n)、ストレプトマイシン (s t r e p t o m y c i n)、グルタミン (g l u t a m i n e)、ゲンタマイシン (g e n t a m y c i n)、ウシ胎児血清 (f e t a l b o v i n e s e r u m) ヒト血清 (h u m a n s e r u m)、メルカプトエタノール (m e r c a p t o e t h a n o l)、エタノールアミン (e t h a n o l a m i n e)、アスコルビン酸 (a s c o r b i c a c i d) 及び亜セレン酸ナトリウム (s o d i u m s e l e n i t e) からなる群から選択される少なくとも 1 つを含むことを特徴とする、請求項 8 に記載の ナチュラルキラー細胞増殖方法。

20

【請求項 11】

培養液が、グルタミン (g l u t a m i n e)、ゲンタマイシン (g e n t a m y c i n)、ヒト血清 (h u m a n s e r u m)、メルカプトエタノール (m e r c a p t o e t h a n o l)、エタノールアミン (e t h a n o l a m i n e)、アスコルビン酸 (a s c o r b i c a c i d) 及び亜セレン酸ナトリウム (s o d i u m s e l e n i t e) からなる群から選択される少なくとも 1 つを含むことを特徴とする、請求項 8 に記載の ナチュラルキラー細胞増殖方法。

30

【請求項 12】

組換えヒトインターロイキン - 2 (r e c o m b i n a n t h u m a n I n t e r l e u k i n - 2)、組換えヒトインターロイキン - 21 (r e c o m b i n a n t h u m a n I n t e r l e u k i n - 2) 及び組換えヒトインターロイキン - 15 (r e c o m b i n a n t h u m a n I n t e r l e u k i n - 15) からなる群から選択される少なくとも 1 つを添加するステップをさらに含むことを特徴とする、請求項 8 に記載の ナチュラルキラー細胞増殖方法。

【請求項 13】

(a) 組換えヒトインターロイキン - 2 (r e c o m b i n a n t h u m a n I n t e r l e u k i n - 2)、及び組換えヒトインターロイキン - 21 (r e c o m b i n a n t h u m a n I n t e r l e u k i n - 2) を添加し、(b) 組換えヒトインターロイキン - 2 (r e c o m b i n a n t h u m a n I n t e r l e u k i n - 2)、及び組換えヒトインターロイキン - 15 (r e c o m b i n a n t h u m a n I n t e r l e u k i n - 15) を添加するステップをさらに含むことを特徴とする、請求項 8 に記載の ナチュラルキラー細胞増殖方法。

40

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、フィーダー細胞 (f e e d e r c e l l) を含むナチュラルキラー細胞増

50

殖用組成物及びナチュラルキラー細胞増殖方法に関する。具体的には、本発明は、B7H6、CD137L、IL-15及びIL-15R α からなる群から選択される少なくとも1つの遺伝子を発現するように形質転換されたフィーダー細胞を用いてナチュラルキラー細胞を増殖する方法に関する。

【背景技術】

【0002】

ナチュラルキラー細胞(Natural Killer Cell; NK細胞)は、自然免疫を担う代表的な細胞であり、様々な種類の腫瘍細胞とウイルスに感染した細胞に細胞傷害性を示し、大きな顆粒を保有しているリンパ球の一種である。NK細胞は、ヒト末梢血リンパ球の5~10%を占めており、T細胞とは異なり、肝臓や骨髄で成熟する。一般に、免疫細胞は、それらの表面に提示した主要組織適合複合体(Major histocompatibility complex; MHC)タンパク質を介して感染した細胞を検知し、様々なサイトカインとアポトーシスを誘導する化学物質を分泌することによって感染した細胞を除去するが、NK細胞は、抗原と結合した主要組織適合複合体がなくても異常な細胞を認識して除去することができるため、即時の免疫反応を誘導することができる。

10

【0003】

NK細胞の機能に対する欠陥は、多くの疾患で報告されており、特に癌患者の場合、ほとんどのNK細胞が不活化されていることが知られている。一部の研究者は、NK細胞をインビトロで増殖させ、活性化する方法について研究を進め、インビトロで増幅されたNK細胞を様々な癌腫に対して反応させたところ、優れた細胞傷害性(cytotoxicity)を示すことを証明した。

20

【0004】

よって、NK細胞を増殖するための方法が研究されており、NK細胞の選択的増幅のための効率的な方法の一つとして、フィーダー細胞(feeder cell)を利用する研究が行われている。しかしながら、NK細胞を増幅する方法の明確なメカニズムは知られていない。

【0005】

NK細胞の増幅のためのフィーダー細胞として、同種(allogenic)または自己(autologous)末梢血単核球(peripheral blood mononuclear cell; PBMC)及び癌細胞株(Cancer cell lines)が用いられており、癌細胞株としては、HFWT、a Wilms tumor-derived cell line、EBV-LCL(EBV transformed lymphoblastoid cells)などが知られている。

30

【0006】

本発明者らは、B7H6を発現するフィーダー細胞が優れたNK細胞増殖効果を有することを発見し、また、これまで知られていたフィーダー細胞に加えて、ARH77細胞も優れたフィーダー細胞であり、NK細胞増殖効果を有することを見出し、本発明を完成するに至った。

【先行技術文献】

40

【非特許文献】

【0007】

【文献】Hiroyuki Fujisaki, Harumi Kakuda, Noriko Shimasaki, Chihaya Imai, Jing Ma, Timothy Lockey, et al. (2009) EXPANSION OF HIGHLY CYTOTOXIC HUMAN NATURAL KILLER CELLS FOR CANCER CELL THERAPY. Cancer Res. Author manuscript. 2009 May 1; 69(9): 4010-4017

【文献】Denman CJ, Senyukov VV, Somanchi SS, Phatarpekar PV, Kopp LM, et al. (2012) Membrane-

50

Bound IL-21 Promotes Sustained Ex Vivo Proliferation of Human Natural Killer Cells.
PLOS ONE 7(1): e30264

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

本発明は、B7H6、CD137L、IL-15及びIL-15R α からなる群から選択される少なくとも1つの遺伝子を発現するように形質転換されたフィーダー細胞を含むナチュラルキラー細胞増殖用組成物を提供することを目的とする。

【0009】

また、本発明は、B7H6、CD137L、IL-15及びIL-15R α からなる群から選択される少なくとも1つの遺伝子を発現するように形質転換されたフィーダー細胞株及びそれをを用いたナチュラルキラー細胞増殖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】

【0010】

本発明は、B7H6遺伝子を発現するように形質転換されたフィーダー細胞を含むナチュラルキラー細胞増殖用組成物を提供する。

【0011】

本発明は、B7H6、CD137L、IL-15及びIL-15R α からなる群から選択される少なくとも1つの遺伝子を発現するように形質転換されたフィーダー細胞を含むナチュラルキラー細胞増殖用組成物を提供する。

【0012】

本発明の組成物は、B7H6を発現するフィーダー細胞を含んでもよく、前記フィーダー細胞は、CD137L、IL-15及びIL-15R α からなる群から選択される少なくとも1つをさらに発現してもよい。

【0013】

好ましくは、本発明の組成物は、B7H6、CD137L及びIL-15を発現するフィーダー細胞を含んでもよい。

【0014】

より好ましくは、本発明の組成物は、B7H6、CD137L、IL-15及びIL-15R α を発現するフィーダー細胞を含んでもよい。

【0015】

本発明のフィーダー細胞は、ARH77またはK562細胞であってもよく、好ましくは、ARH77細胞であってもよい。

【0016】

本発明は、B7H6を発現するフィーダー細胞株を提供する。

【0017】

本発明のフィーダー細胞株は、CD137L、IL-15及びIL-15R α からなる群から選択される少なくとも1つをさらに発現してもよい。

【0018】

本発明のフィーダー細胞株は、ARH77またはK562細胞株であってもよい。

【0019】

さらに、本発明は、

(1) B7H6遺伝子をウイルス発現ベクターで形質転換して組換えウイルスを産生するステップと、

(2) フィーダー細胞に前記組換えウイルスを添加して培養するステップと、を含む、B7H6を発現するフィーダー細胞の製造方法を提供する。

【0020】

本発明の前記形質転換遺伝子は、CD137L、IL-15及びIL-15R α からなる群から選択される少なくとも1つの遺伝子をさらに含んでもよい。

10

20

30

40

50

【0021】

本発明の前記ウイルスは、レンチウイルス (l e n t i v i r u s) またはレトロウイルス (r e t r o v i r u s) であってもよい。

【0022】

本発明の前記フィーダー細胞は、A R H 7 7 または K 5 6 2 細胞であってもよい。

【0023】

また、本発明は、B 7 H 6 を発現するフィーダー細胞と末梢血単核球 (p e r i p h e r a l b l o o d m o n o n u c l e a r c e l l) を培養するステップを含む、ナチュラルキラー細胞増殖方法を提供する。

【0024】

本発明の前記フィーダー細胞は、C D 1 3 7 L、I L - 1 5 及び I L - 1 5 R α からなる群から選択される少なくとも1つをさらに発現してもよい。

【0025】

本発明の前記フィーダー細胞は、A R H 7 7 または K 5 6 2 細胞であってもよい。

【0026】

本発明の前記培養液は、ペニシリン (p e n i c i l l i n)、ストレプトマイシン (s t r e p t o m y c i n)、グルタミン (g l u t a m i n e)、ゲンタマイシン (g e n t a m y c i n)、ウシ胎児血清 (f e t a l b o v i n e s e r u m)、ヒト血清 (h u m a n s e r u m)、メルカプトエタノール (m e r c a p t o e t h a n o l)、エタノールアミン (e t h a n o l a m i n e)、アスコルビン酸 (a s c o r b i c a c i d) 及び亜セレン酸ナトリウム (s o d i u m s e l e n i t e) からなる群から選択される少なくとも1つを含んでもよく、好ましくは、グルタミン (g l u t a m i n e)、ゲンタマイシン (g e n t a m y c i n)、ヒト血清 (h u m a n s e r u m)、メルカプトエタノール (m e r c a p t o e t h a n o l)、エタノールアミン (e t h a n o l a m i n e)、アスコルビン酸 (a s c o r b i c a c i d) 及び亜セレン酸ナトリウム (s o d i u m s e l e n i t e) からなる群から選択される少なくとも1つを含んでもよい。

【0027】

本発明の前記増殖方法は、組換えヒトインターロイキン - 2 (r e c o m b i n a n t h u m a n I n t e r l e u k i n - 2)、組換えヒトインターロイキン - 21 (r e c o m b i n a n t h u m a n I n t e r l e u k i n - 21) 及び組換えヒトインターロイキン - 15 (r e c o m b i n a n t h u m a n I n t e r l e u k i n - 15) からなる群から選択される少なくとも1つを添加するステップをさらに含んでもよい。

【0028】

好ましくは、(a) 組換えヒトインターロイキン - 2 (r e c o m b i n a n t h u m a n I n t e r l e u k i n - 2)、及び組換えヒトインターロイキン - 21 (r e c o m b i n a n t h u m a n I n t e r l e u k i n - 21) を添加し、(b) 組換えヒトインターロイキン - 2 (r e c o m b i n a n t h u m a n I n t e r l e u k i n - 2)、及び組換えヒトインターロイキン - 15 (r e c o m b i n a n t h u m a n I n t e r l e u k i n - 15) を添加するステップをさらに含んでもよい。

【0029】

また、本発明の増殖方法で製造されたナチュラルキラー細胞株を提供する。

【発明の効果】

【0030】

本発明による B 7 H 6、C D 1 3 7 L、I L - 1 5 及び I L - 1 5 R α からなる群から選択された少なくとも1つの遺伝子が発現されたフィーダー細胞を用いてナチュラルキラー細胞 (N K 細胞) を増殖させると、周知のフィーダー細胞を用いる方法と比較して、より高いレベルの増幅率、純度及び細胞傷害性を有する N K 細胞が得られるといった効果を奏することにより、N K 細胞を用いた様々な免疫細胞治療などで非常に有用に用いることができる。

10

20

30

40

50

【図面の簡単な説明】

【 0 0 3 1 】

【図 1】レンチウイルスベクター構造を示す図である。

【図 2 a】ARH 7 7 細胞において、各遺伝子導入の順序及び遺伝子発現細胞の選択過程を示す図である。

【図 2 b】ARH 7 7 細胞において、各遺伝子導入の順序及び遺伝子発現細胞の選択過程を示す図である。

【図 3】K 5 6 2 細胞、B 7 H 6 発現 K 5 6 2 (K 5 6 2 - B 7 H 6) 細胞及び C D 1 3 7 L 発現 K 5 6 2 (K 5 6 2 - C D 1 3 7 L) 細胞を介して得られた N K 細胞の増幅率を示す図である。

10

【図 4】K 5 6 2 細胞、B 7 H 6 発現 K 5 6 2 (K 5 6 2 - B 7 H 6) 細胞及び C D 1 3 7 L 発現 K 5 6 2 (K 5 6 2 - C D 1 3 7 L) 細胞を介して得られた N K 細胞の増幅率を示す図である。

【図 5】K 5 6 2 細胞、B 7 H 6 発現 K 5 6 2 (K 5 6 2 - B 7 H 6) 細胞及び C D 1 3 7 L 発現 K 5 6 2 (K 5 6 2 - C D 1 3 7 L) 細胞を介して得られた N K 細胞の純度を示す図である。

【図 6】K 5 6 2 細胞、B 7 H 6 発現 K 5 6 2 (K 5 6 2 - B 7 H 6) 細胞及び C D 1 3 7 L 発現 K 5 6 2 (K 5 6 2 - C D 1 3 7 L) 細胞を介して得られた N K 細胞の純度を示す図である。

【図 7】K 5 6 2 細胞、B 7 H 6 発現 K 5 6 2 (K 5 6 2 - B 7 H 6) 細胞及び C D 1 3 7 L 発現 K 5 6 2 (K 5 6 2 - C D 1 3 7 L) 細胞を介して得られた N K 細胞の細胞傷害性を示す図である。

20

【図 8】K 5 6 2 細胞、B 7 H 6 発現 K 5 6 2 (K 5 6 2 - B 7 H 6) 細胞及び C D 1 3 7 L 発現 K 5 6 2 (K 5 6 2 - C D 1 3 7 L) 細胞を介して得られた N K 細胞の細胞傷害性を示す図である。

【図 9】ARH 7 7 細胞及び I L 1 5 R α 発現 ARH 7 7 (ARH 7 7 - I L 1 5 R α) 細胞を介して得られた N K 細胞の増幅率を示す図である。【図 10】ARH 7 7 細胞及び I L 1 5 R α 発現 ARH 7 7 (ARH 7 7 - I L 1 5 R α) 細胞を介して得られた N K 細胞の純度を示す図である。【図 11】ARH 7 7 細胞及び I L 1 5 R α 発現 ARH 7 7 (ARH 7 7 - I L 1 5 R α) 細胞を介して得られた N K 細胞の細胞傷害性を示す図である。

30

【図 12】ARH 7 7 細胞及び K 5 6 2 細胞を介して得られた N K 細胞の増幅率を示す図である。

【図 13】ARH 7 7 細胞及び K 5 6 2 細胞を介して得られた N K 細胞の純度を示す図である。

【図 14】ARH 7 7 細胞及び K 5 6 2 細胞を介して得られた N K 細胞の純度を示す図である。

【図 15】ARH 7 7 細胞及び K 5 6 2 細胞を介して得られた N K 細胞の細胞傷害性を示す図である。

【図 16】ARH 7 7 細胞及び K 5 6 2 細胞の N K 細胞活性において重要な役割を果たす受容体発現の平均蛍光強度 (M F I) を示す図である。

40

【図 17】ARH 7 7 細胞及び K 5 6 2 細胞の N K 細胞活性において重要な役割を果たす受容体発現の平均蛍光強度 (M F I) を示す図である。

【図 18】ARH 7 7 細胞及び K 5 6 2 細胞の N K 細胞活性において重要な役割を果たす受容体発現の平均蛍光強度 (M F I) を示す図である。

【図 19】ARH 7 7 細胞及び K 5 6 2 細胞の N K 細胞活性において重要な役割を果たす受容体発現の平均蛍光強度 (M F I) を示す図である。

【図 20】ARH 7 7 細胞及び K 5 6 2 細胞の N K 細胞活性において重要な役割を果たす受容体発現の平均蛍光強度 (M F I) を示す図である。

【図 21】ARH 7 7 細胞及び K 5 6 2 細胞の N K 細胞活性において重要な役割を果たす

50

受容体発現の平均蛍光強度 (MFI) を示す図である。

【図 22】ARH77 細胞及び K562 細胞の NK 細胞活性において重要な役割を果たす受容体発現の平均蛍光強度 (MFI) を示す図である。

【図 23】B7H6、CD137L 及び IL-15 発現 ARH-77 (ARH77-B7H6-CD137L-IL15) 細胞、B7H6、CD137L、IL-15 及び IL-15R α 発現 ARH77 (ARH77-B7H6-CD137L-IL15-IL15R α) 細胞、及び B7H6、CD137L、IL-15 及び IL-15R α 発現 K562 (K562-B7H6-CD137L-IL15-IL15R α) 細胞を介して得られた NK 細胞の増幅率を示す図である。

【図 24】B7H6、CD137L 及び IL-15 発現 ARH-77 (ARH77-B7H6-CD137L-IL15) 細胞、B7H6、CD137L、IL-15 及び IL-15R α 発現 ARH77 (ARH77-B7H6-CD137L-IL15-IL15R α) 細胞、及び B7H6、CD137L、IL-15 及び IL-15R α 発現 K562 (K562-B7H6-CD137L-IL15-IL15R α) 細胞を介して得られた NK 細胞の純度を示す図である。

10

【図 25】B7H6、CD137L 及び IL-15 発現 ARH-77 (ARH77-B7H6-CD137L-IL15) 細胞、B7H6、CD137L、IL-15 及び IL-15R α 発現 ARH77 (ARH77-B7H6-CD137L-IL15-IL15R α) 細胞、及び B7H6、CD137L、IL-15 及び IL-15R α 発現 K562 (K562-B7H6-CD137L-IL15-IL15R α) 細胞を介して得られた NK 細胞の細胞傷害性を示す図である。

20

【発明を実施するための形態】

【0032】

以下、添付図面を参照して、本発明が属する技術分野における通常の知識を有する者が容易に実施できるように、本願の実施形態及び実施例について詳しく説明する。しかしながら、本願は、様々な形態で実施され得るので、以下に説明する実施形態及び実施例に限定されるものではない。

【0033】

本願明細書全体において、ある部分がある構成要素を「含む」という場合、これは特に断らない限り、他の構成要素を除外するのではなく、他の構成要素をさらに含んでもよいことを意味する。

30

【0034】

本発明は、B7H6 遺伝子を発現するように形質転換されたフィーダー細胞を含むナチュラルキラー細胞増殖用組成物及び増殖方法に関する。

【0035】

本発明は、B7H6、CD137L、IL-15 及び IL-15R α からなる群から選択される少なくとも 1 つの遺伝子を発現するように形質転換されたフィーダー細胞を含むナチュラルキラー細胞増殖用組成物及び増殖方法に関する。

【0036】

本発明において、「B7H6」なる用語は、ナチュラルキラー細胞受容体 NKp30 のリガンドを意味する。

40

【0037】

本発明に係る B7H6 遺伝子は、配列番号 1 の塩基配列からなってもよく、前記塩基配列の相同体が本発明の範囲内に含まれる。具体的には、前記遺伝子は、配列番号 1 の塩基配列とそれぞれ 70% 以上、好ましくは 80% 以上、さらに好ましくは 90% 以上、最も好ましくは 95% 以上の配列相同性を有する塩基配列を含んでもよい。

【0038】

本発明において、「CD137L」なる用語は、CD137 のリガンドを意味する。

【0039】

本発明に係る CD137L 遺伝子は、配列番号 2 の塩基配列からなってもよく、前記塩

50

基配列の相同体が本発明の範囲内に含まれる。具体的には、前記遺伝子は、配列番号 1 の塩基配列とそれぞれ 70% 以上、好ましくは 80% 以上、さらに好ましくは 90% 以上、最も好ましくは 95% 以上の配列相同性を有する塩基配列を含んでもよい。

【0040】

本発明において、「IL-15」なる用語は、インターロイキン-15 (interleukin-15) であり、上皮細胞で産生されるサイトカイン (cytokine) を意味する。

【0041】

本発明に係る IL-15 遺伝子は、配列番号 3 の塩基配列からなってもよく、前記塩基配列の相同体が本発明の範囲内に含まれる。具体的には、前記遺伝子は、配列番号 1 の塩基配列とそれぞれ 70% 以上、好ましくは 80% 以上、さらに好ましくは 90% 以上、最も好ましくは 95% 以上の配列相同性を有する塩基配列を含んでもよい。

10

【0042】

本発明において、「IL-15R α 」なる用語は、インターロイキン 15 受容体アルファ鎖 (interleukin 15 receptor α -chain) を指す。

【0043】

本発明に係る IL-15R α 遺伝子は、配列番号 4 の塩基配列からなってもよく、前記塩基配列の相同体が本発明の範囲内に含まれる。具体的には、前記遺伝子は、配列番号 1 の塩基配列とそれぞれ 70% 以上、好ましくは 80% 以上、さらに好ましくは 90% 以上、最も好ましくは 95% 以上の配列相同性を有する塩基配列を含んでもよい。

20

【0044】

本発明に用いられる用語「フィーダー細胞 (feeder cells; 支持細胞)」は、分裂して増殖する能力はないが、代謝活性があるため、様々な代謝物質を産生して標的 NK 細胞の増殖を助ける細胞を意味する。本発明で用いてもよいフィーダー細胞としては、遺伝子が導入された動物細胞株 (cell line) や各種サイトカインまたは化合物で処理された末梢血白血球細胞 (PBL)、自己または他人の末梢血白血球細胞、T 細胞、B 細胞または多単核球 (monocyte) などがあり、好ましくは、遺伝子が導入された動物細胞株を用いてもよく、より好ましくは、ARH77 細胞であってもよいが、それらに限定されるものではない。本発明が属する技術分野において通常使用可能であることが知られている他のフィーダー細胞も本発明の目的に合致する限り、制限なく使用することができる。

30

【0045】

本発明に用いられる「発現ベクター」なる用語は、適切な宿主細胞において標的タンパク質または標的 RNA を発現することができるベクターであり、遺伝子挿入物が発現するように作動可能に連結された (operably linked) 必須の調節要素を含む遺伝子制作物を言う。

【0046】

本発明において、「作動可能に連結された (operably linked)」なる用語は、一般的な機能を果たすように、核酸発現制御配列と、標的タンパク質または RNA をコードする核酸配列とが機能的に連結 (functional linkage) されていることを意味する。例えば、プロモーターと、タンパク質または RNA をコードする核酸配列とは機能的に連結され、コードする核酸配列の発現に影響を及ぼすことができる。組換え発現ベクターとの作動的連結は、当技術分野において周知の遺伝子組み換え技術を用いて達成することができ、部位特異的 DNA 切断及び連結は、当該技術分野において一般に知られている酵素などを用いる。

40

【0047】

本発明で使用可能な発現ベクターとしては、プラスミドベクター、コスミド (cosmid) ベクター、バクテリオファージベクター、ウイルスベクターなどが挙げられるが、それらに限定されるものではなく、好ましくは、ウイルスベクターであってもよく、より好ましくは、レンチウイルス (lentivirus) またはレトロウイルス (retrovirus) である。

50

ovirus)ベクターであってもよいが、それらに限定されるものではない。さらに、適切な発現ベクターとしては、プロモーター(promoter)、オペレーター(operator)、開始コドン(initiation codon)、終止コドン(termination codon)、ポリアデニル化シグナル(polyadenylation signal)、エンハンサー(enhancer)などの発現制御配列に加えて、膜標的化または分泌のためのシグナル配列(signal sequence)またはリーダー配列(leader sequence)など、目的に応じて様々に製造してもよい。発現ベクターのプロモーターは、構成的(constitutive)または誘導性(inducible)であってもよい。また、発現ベクターは、ベクターを含む宿主細胞を選択するための選択マーカーを含み、複製が可能な発現ベクターである場合、複製起点を含む。

10

【0048】

本発明において、「末梢血単核球(peripheral blood mononuclear cell; PBMC)」なる用語は、血液中に存在する球状の核を有する細胞を意味し、そのような末梢血単核球には、B細胞、T細胞、マクロファージ(macrophage)、樹状細胞(dendritic cell)、ナチュラルキラー細胞(NK cell; natural killer cell)などの免疫細胞が含まれている。

【0049】

本発明の「IL-2(インターロイキン-2)」は、成熟したNK細胞の増殖と活性化を促進する機能を有していることが報告されている。IL-2を欠くヒトとマウスでは、NK細胞の数が著しく減少するという報告があるが、一方では、IL-2及びIL-2R α の欠乏は、間接的にNK細胞の数と活性化に影響を及ぼすという研究結果もあり、IL-2R鎖は、IL-15受容体の形成に関与することが知られている。

20

【0050】

本発明の「IL-15(インターロイキン-15)」に関して、IL-15またはIL-15R α を欠くマウスでは、NK細胞が認められないという事実と、IL-15産生に必要な転写因子インターフェロン(interferon; IFN)-調節因子1を欠くマウスでは、NK細胞が欠乏していることが判明された。よって、IL-15がNK細胞分化に関与することと、IL-15は、NK細胞で発現されるIL-15受容体を介してNK細胞の増殖と分化を直接的に促進することが知られている。

30

【0051】

本発明の「IL-21(インターロイキン-21)」は、transcription-3(STAT-3)を刺激することによりNK細胞のテロメア長(telomere length)を増加させ、NK細胞の活性、成長、増幅に重要な役割を果たすことが知られている。特に、ヒトCD34+造血幹細胞において、IL-15との組合せによってNK細胞の成長を助けることが報告されており、膜結合型の(membrane-bound; mb)IL-21を介してNK細胞を増幅する際に、インターフェロン・ガンマ(IFN- γ)の発現や細胞傷害性が増加することが確認された。さらに、培養液へのIL-21の継続した注入よりも、最初の1回だけ注入することがNK細胞の増幅に有効であることが報告されている。

40

【0052】

以下、実施例を挙げて本発明をさらに詳しく説明するが、下記の実施例は説明を目的とするものに過ぎず、本願発明の範囲を限定しようとする意図ではない。

【0053】

[製造例]

B7H6、CD137L、IL-15及びIL-15R α 発現ARH77(ARH77-B7H6-CD137L-IL15-IL15R α)細胞の産生

B7H6、CD137L、IL-15及びIL-15R α の遺伝子をクローニングし、次いで各遺伝子のcDNAをレンチウイルス発現ベクターであるpLVX-EF1 α -I

50

RES - Puro (Takara社, 日本) プラスミドにトランスファーすることで、レンチウイルスを産生した。

【0054】

図1に示すように、CD137L遺伝子、B7H6とEGFP遺伝子、IL-15とRFP-647遺伝子、及びIL-15R α とBFP遺伝子を、それぞれのpLVX-EF1 α -IRES-Puroプラスミドマルチクローニング部位に挿入した。各遺伝子が導入されたレンチウイルスプラスミド(10 μ g)をLenti-XTM Packaging Single shots (Takara社)と共にHEK 293T細胞にトランスフェクトし、10% FBSを含むDMEM培養液中で48~72時間培養し、組換えレンチウイルスを産生した。

10

【0055】

フィーダー細胞に各遺伝子を形質導入するために、ARH77細胞とK562細胞をそれぞれ24ウェルプレートにウェル当たり 2×10^5 個ずつ分注し、その後、各ウェルに組換えレンチウイルスをpolybrene (8 μ g/mL)と共に加えた。温度25、1,500gで2時間遠心分離し、その後、37、5%CO₂条件下の培養器で48時間培養した後、培養液を除去し、新鮮な培養液に(2mL/ウェル)交換しながら培養を維持し続けた。形質導入1週間後、全ての細胞をそれぞれ回収し、細胞分類装置であるBD FACS Aria (登録商標) IIIを用いて蛍光陽性細胞のみを分離し、それらの細胞を10% FBSを含むRPMI 1640培養液中で培養し続けた。

【0056】

20

前記と同様の方法で、ARH77細胞とK562細胞に各遺伝子を図2に示すような手順で導入し、選別過程を経てARH77-B7H6-CD137L-IL15-IL15R α 及びK562-B7H6-CD137L-IL15-IL15R α 細胞を生産した。

【0057】

B7H6、CD137L、IL-15及びIL-15R α の塩基配列を下記表1に示す。

【0058】

30

40

50

【表 1】

遺伝子	配列番号	塩基配列
B 7 H 6	配列番号 1	ATGGCGCACGGGCCGCGCTCCTGCTCCT
		GCCCGC GCTCCTGCTCCTGCCGGCGCTC
		CTGGTCCTGGTCCT GTGGTTCGGGACGG
		CCAGCTCAGGTCTCCTGCAAG TGGAGAT
		GGCAGGGAAGACTCAGAAGGTGCTCCT A
		AATGATACTGCCACCATTGTCTGCAAAAT
		CCATG GTTACCACCATCTGGACATCACA
		GTAATGGGTATT ACCTGGTATTGGAAGC
		ATCAGGCCTCTGCAACGGA AGTTAAACT
		GTTTGAGTTTTTTTGGTGACCATCAAAT G
		ATATTACGATCTGGAGCCTACGTGTCTCA
		AAGGA GGCTGCAAAGGGGGGATGCCTCC
		CTCCAGCTGCCA GGCGTCCAGCTGAAGG
		AAGCAGGAGAGTACCGAT GTGAGGTGGT
		GGTCACCCCTTACAAAGCAGTGGGA ACA
		GTCAACCTGGAGGTTGTGGCTTACCCCGT
		CAG CAGCTTGTCTCCAGAGCAAGCCATG
		GTGAAAGAAA ATGAAGAACAACCTTATTT
		TGTGTATGGCAAGTAGG TTCTACCCCAA
		GAACATTACCATAACATGGAAAAA GTGG
		ACCCCAAAGGATCCCCGGTATCTGGAGGT
		TT CTGAGGGCATCATTACTAATGGTACC
		ACCGAAGAT GAGGATGGCATGTTTAGTG
		TCACTAGTTACTTGAT GGTGAAGCCCTC
		TTTGGAAGACAATATGACTGTCT ATCAG
		TGTGTGGTATGGCATGAATCCTTGCCAAT
		C TCCCAGAGCCGCAACTTCACCTTGATT

10

20

30

40

50

CD137L	配列番号2	ATGCGCCCCCGCAGCGACGCCGCCCGGA CCCCCGA GGCCCCGCGGCCGCCCGCGCCC CCGGGCCGCACCT GCAGCCCGCTGCCCT GGGCGCTGAGCGCCGCGATG CTGCTGCT CGTCGGCACCTGCGCCGCCTGCGCGCT C CGCGCCTGGGTGGTCCCCGGGCCCCGGCC CCCCCG CGCTCCCCGCGCTCCCCGCGCTC CCGCGCCCCCTGC CGGACGCCGGCGCCC GCCTCCCCGACTCCCCGCAG GCCGTGTT CGCGCAGCTGGTGGCCCGAGATGTACA G CTGAAGGAAGGACCCCTGCGCTGGTACAG TGACC CGGGCCTGGCAGGTGTATTCCTG GGGCCGGGCCTG AGTTATGACCAGCACA CTCGGGAGCTGATGGTGGT GGAACCCGG GCTCTACTATGTTTTCTTGACCTGAA G CTGCAGCGGGTAATGTCCAGCACGGGCTC CGGCT CTGTCTCTGCTGCCCTGCACCTG CAGCCACTTGGCA CCGAGGCTGCAGCCC TGGACCTGACCTTGGACCTG CCTCCACC ATCCTCGGAGGCCCGTGACTCAGCAGC T GGTTTCCAGGGCAGCCTGCTGCACCTGGA CGCAG GCCAGCGCCTCCGTGTTCACTTG CGAGCTGAGGCA GGGGCCACCCCTGCCT GGCAGCTGGCACAAGGTGC CACGATCTT GGGCCTCTTCAGAGTGGCCACCAAAG TC CCCACTGGACTCCCCTCGTCATGGCCCAT GGAC ACGGGGCCTGGGTCCCCGCCCTG GATGGAGAATA A
--------	-------	--

10

20

30

40

50

IL-15	配列番号3	a a t t g g c a g g a c g t g a t a c t t g a t t t g g a a a a a a t t g a c a a t c t t a t t c a a t c t a t a c a t a t g g a t a c c a c t c t g t a t a c t g a a a g t g a t g t g c a t c c c a g t t g c a a a g t a a c c g c g a t g a a g t g c t t t c t c c t g g a g t t a g g t g t t a t c t c g c t c g a g t c c g g c a g t c a t c c c a t t a a g g a a g c a g t a g a g a a c c t c a t c a t c c t c g c a a a c a g t g a t c t g t c t t c g a a g g g g a a t a t a a c t g a a a c g g g a t g c a a a g a a t g t g a a g a a c t g g a g g a a a a g a g t a t t a a g g a g t t t t t g c a g a g t t t c g t g c a t a t c g t a c a a a t g t t c a t c a a c t c c t c t
-------	-------	---

10

20

30

40

50

I L - 1 5 R	配列番号 4	<pre> a t g g c g c g g a c g g g g c g g a c g g g g c c g c c g c t c c g g g g c c g c c g g c t c c c c g c g c t c c c c g c g c t c c c c g c g c t g c t g c t g c t g c t g c t g c c g c t c c g g c c c g c g a c g c c g g g c a t c a c a t g c c c t c c t c c c a c a t c t g t c a a a c a c g c a g a t a t c c a g g t c a a g a g t t a c a g c g t g a g c t c c a a g g a a c g g t a c a c t t g t a a c t c t g g c t t c a a g c g g a a a g c c g g g a c a t c c a g c c t g a c t g a g t g t g t g c t c a a c a a g a c c a c c a a c a c t g c c c a c t g g a c a a t c c c c a g t c t c a a g t g c a t c a g a g a c c c c t c c c t g a c t c a c c t a a g g c c a t c c t c c t c a g a c g t g c c g g c a g g g g t g a c c c c a g a g c c a g a g a g c a c c t c c c t t t c t g g a a a a g a g c c a a c t t t c a c t t c c a a g t c a g a c a c c a a a g t g g c c a c a a a g c c a a c t a t t g t g c c a g g c t c c a g g c c g a t g c c g t c a a a g c c t c c t g c t a c a g g a a c c a c a g g g c t g a t c a g t a a t g a a c c c t c c t c c c a a g c c c c a t c t c a g a c a a c a g c a a a g g c c t t g g a a c a c a c t c c c t c t g c c t c c c a g g a g a c g c c a </pre>
-------------	--------	--

10

20

30

40

【実施例 1】

【0059】

B7H6またはCD137L発現フィーダー細胞 (feeder cell) によるNK細胞活性の効果

1 - 1 . NK細胞増幅率 (expansion rate) の評価

B7H6またはCD137Lの発現によるNK細胞活性の効果を確認するために、K562細胞、B7H6発現K562 (K562 - B7H6) 細胞及びCD137L発現K562 (K562 - CD137L) 細胞を用いて、NK細胞の増幅率を評価した。

【0060】

50

密度勾配遠心分離法を用いて、健康な共血者の末梢血液からP B M Cを分離してP B Sで2回洗浄し、その後、 3×10^6 個のP B M Cを100 Gyでガンマ放射線照射した、それぞれのフィーダー細胞（K 5 6 2細胞、K 5 6 2 - B 7 H 6細胞またはK 5 6 2 - C D 1 3 7 L細胞） 5×10^5 個と共に、24ウェルプレートで2 mL / ウェルの培養液で、37℃、5% CO₂条件下の培養器で共助培養した。

【0061】

培養液は、R P M I 1 6 4 0培養液に10%のウシ胎児血清（F B S）、100 U / mLのペニシリン、100 µg / mLのストレプトマイシン、及び4 mmol / LのL - グルタミンを添加して使用し、培養開始日から1週間は、培養液に10 U / mLの組換えヒトインターロイキン（r h I L）- 2と5 ng / mLのr h I L - 21を添加し、培養1週間後からは、培養液に100 U / mLのr h I L - 2と5 ng / mLのr h I L - 15を添加して28日間培養した。培養液を1～2日ごとに新しい培養液に交換した。

10

【0062】

培養14日、21日及び28日に培養した細胞を回収し、回収された細胞内のNK細胞（C D 3 -、C D 5 6 +細胞）の割合（純度）をフローサイトメトリー（f l o w c y t o m e t r y）で確認し、回収された細胞のうち生きている細胞の総数にNK細胞の割合を掛けて、総NK細胞数を計算した。同様の方法で、培養前P B M C内のNK細胞の総数を計算し、培養14日目、21日目及び28日目のそれぞれのNK細胞総数を培養前のNK細胞数で除して、NK細胞の増幅率を計算した。

20

【0063】

前記実験結果を下記表2及び3、並びに図3及び4に示す。

【0064】

【表2】

倍数（fold）	2週		3週		4週	
	平均値	SD	平均値	SD	平均値	SD
K 5 6 2	61	30	167	58	291	141
K 5 6 2 / B 7 H 6	72	23	378	136	1383	495

30

【0065】

【表3】

倍数（fold）	2週		3週		4週	
	平均値	SD	平均値	SD	平均値	SD
K 5 6 2	61	30	167	58	291	141
K 5 6 2 / C D 1 3 7 L	82	13	835	778	3344	1621

40

【0066】

50

表 2 及び図 3 に示すように、K 5 6 2 細胞を介して得られた N K 細胞は、4 週培養後に 2 9 1 倍の増幅率を示したのに対し、B 7 H 6 発現 K 5 6 2 (K 5 6 2 - B 7 H 6) 細胞を介して得られた N K 細胞は、4 週培養後に 1 , 3 8 3 倍の増幅率を示した。

【 0 0 6 7 】

また、表 3 及び図 4 に示すように、C D 1 3 7 L 発現 K 5 6 2 (K 5 6 2 - C D 1 3 7 L) 細胞が得られた N K 細胞は、4 週間培養後に 3 , 3 4 4 倍増幅率を示した。

【 0 0 6 8 】

よって、B 7 H 6 発現 K 5 6 2 (K 5 6 2 - B 7 H 6) 細胞は、K 5 6 2 細胞と比較して 4 倍以上の増幅率を示し、C D 1 3 7 L 発現 K 5 6 2 (K 5 6 2 - C D 1 3 7 L) 細胞は、1 1 倍以上の増幅率を示しており、より優れた N K 細胞の増幅効果を有することが分かる。

10

【 0 0 6 9 】

1 - 2 . N K 細胞の純度 (p u r i t y) の評価

B 7 H 6 または C D 1 3 7 L の発現による N K 細胞活性の効果を確認するために、K 5 6 2 細胞、B 7 H 6 発現 K 5 6 2 (K 5 6 2 - B 7 H 6) 細胞及び C D 1 3 7 L 発現 K 5 6 2 (K 5 6 2 - C D 1 3 7 L) 細胞を用いて、N K 細胞の純度を評価した。

【 0 0 7 0 】

実施例 1 - 1 と同様の方法で P B M C を分離し、放射線照射された各フィーダー細胞と共助培養した。培養前の P B M C と培養後 1 4 日、2 1 日及び 2 8 日に回収した各細胞を、蛍光結合したヒト C D 3 及び C D 5 6 モノクローナル抗体で染色し、その後、フローサイトメトリーにより N K 細胞の純度を評価した。各細胞内の C D 3 - C D 5 6 + N K 細胞の割合を、N K 細胞の純度で評価した。

20

【 0 0 7 1 】

前記実験結果を下記表 4 及び 5、並びに図 5 及び 6 に示す。

【 0 0 7 2 】

【表 4】

純度	2 週		3 週		4 週	
	平均値	S D	平均値	S D	平均値	S D
K 5 6 2	9 3	2	9 4	1	9 2	3
K 5 6 2 / B 7 H 6	9 6	1	9 7	1	9 6	2

30

【 0 0 7 3 】

【表 5】

純度	2 週		3 週		4 週	
	平均値	S D	平均値	S D	平均値	S D
K 5 6 2	9 3	2	9 4	1	9 2	3
K 5 6 2 / C D 1 3 7 L	9 5	1	9 6	1	9 5	3

40

50

【 0 0 7 4 】

表 4 及び 5、並びに図 5 及び 6 に示すように、K 5 6 2 細胞、B 7 H 6 発現 K 5 6 2 (K 5 6 2 - B 7 H 6) 細胞及び C D 1 3 7 L 発現 K 5 6 2 (K 5 6 2 - C D 1 3 7 L) 細胞を介して得られた N K 細胞は、いずれも 9 0 % 以上の純度を示した。

【 0 0 7 5 】

よって、B 7 H 6 発現 K 5 6 2 (K 5 6 2 - B 7 H 6) 細胞及び C D 1 3 7 L 発現 K 5 6 2 (K 5 6 2 - C D 1 3 7 L) 細胞は、いずれも高純度の N K 細胞を増殖させ得ることが分かる。

【 0 0 7 6 】

1 - 3 . N K 細胞の細胞傷害性 (c y t o t o x i c i t y) の評価

10

B 7 H 6 または C D 1 3 7 L の発現による N K 細胞活性の効果を確認するために、K 5 6 2 細胞、B 7 H 6 発現 K 5 6 2 (K 5 6 2 - B 7 H 6) 細胞及び C D 1 3 7 L 発現 K 5 6 2 (K 5 6 2 - C D 1 3 7 L) 細胞を用いて、増殖した N K 細胞の癌細胞に対する細胞傷害性能を評価した。

【 0 0 7 7 】

実施例 1 - 1 と同様の方法で増殖した N K 細胞の K 5 6 2 細胞に対する殺傷能力を、W S T - 8 (B i o t o o l 社 , 米国) を用いた高感度比色分析 (c o l o r i m e t r i c a s s a y) で測定した。N K 細胞の標的癌細胞である K 5 6 2 細胞 (1×10^5 個 / $100 \mu\text{L}$ 培養液) を 9 6 ウェルプレートに分注し、次いで、 2.5×10^4 個の増殖した N K 細胞を入れて混合した後 (e f f e c t o r : t a r g e t r a t i o = 0 . 2 5 : 1) 1 , 5 0 0 r p m で 3 分間遠心分離し、それを 3 7 、5 % C O ₂ 条件下の培養器で培養した。培養 3 時間後、各ウェルに $10 \mu\text{L}$ 容量の W S T - 8 を加え、さらに 1 時間培養した後、4 5 0 n m 波長で S p e c t r a M a x (M o l e c u l a r D e v i c e s 社 , 米国) を用いて吸光度 (A 4 5 0) を測定し、以下の計算式を用いて、N K 細胞により死滅した癌細胞の割合 (%) を算出した。

20

【 0 0 7 8 】

毒性 (C y t o t o x i c i t y , %) = 1 0 0 % - 1 0 0 \times [A 4 5 0 \text{ of e f f e c t o r c e l l t r e a t e d t a r g e t c e l l s } - A 4 5 0 \text{ of e f f e c t o r c e l l s }] / [A 4 5 0 \text{ of t a r g e t c e l l s } - A 4 5 0 \text{ of t a r g e t c e l l s w i t h o u t W S T - 8 }]

30

【 0 0 7 9 】

前記実験結果を下記表 6 及び 7、並びに図 7 及び 8 に示す。

【 0 0 8 0 】

【表 6】

毒性 (%)	2 週		3 週		4 週	
	平均値	S D	平均値	S D	平均値	S D
K 5 6 2	6 2	7	6 3	0	5 5	1 2
K 5 6 2 / B 7 H 6	8 5	1	7 6	1 3	5 9	9

40

【 0 0 8 1 】

50

【表 7】

毒性 (%)	2 週		3 週		4 週	
	平均値	S D	平均値	S D	平均値	S D
K 5 6 2	6 2	7	6 3	0	5 5	1 2
K 5 6 2 / C D 1 3 7 L	7 8. 5	9. 1 9 2 3 8 8	7 6. 5	0. 7 0 7 1 0 7	7 2	1 1. 3 1 3 7 1

10

【 0 0 8 2 】

表 6 及び 7、並びに図 7 及び 8 に示すように、B 7 H 6 発現 K 5 6 2 (K 5 6 2 - B 7 H 6) 細胞及び C D 1 3 7 L 発現 K 5 6 2 (K 5 6 2 - C D 1 3 7 L) 細胞を介して得られた N K 細胞は、K 5 6 2 細胞を介して得られた N K 細胞よりも高い細胞傷害性を示した。

【 0 0 8 3 】

よって、B 7 H 6 発現 K 5 6 2 (K 5 6 2 - B 7 H 6) 細胞及び C D 1 3 7 L 発現 K 5 6 2 (K 5 6 2 - C D 1 3 7 L) 細胞は、より高いレベルの細胞傷害性を示す N K 細胞を増殖させ得ることが分かる。

20

【実施例 2】

【 0 0 8 4 】

I L 1 5 R α 発現フィーダー細胞 (f e e d e r c e l l) による N K 細胞活性の効果 2 - 1 . N K 細胞増幅率 (e x p a n s i o n r a t e) の評価

I L 1 5 R α の発現による N K 細胞活性の効果を確認するために、A R H 7 7 細胞及び I L 1 5 R α 発現 A R H 7 7 (A R H 7 7 - I L 1 5 R α) 細胞を用いて、N K 細胞の増幅率を評価した。

【 0 0 8 5 】

実施例 1 - 1 と同様の方法で実験を行い、培養液には I L - 2 と I L - 1 5 のみを添加して培養し、3 週間評価した。前記実験結果を下記表 8 及び図 9 に示す。

30

【 0 0 8 6 】

【表 8】

倍数 (f o l d)	1 週		2 週		3 週	
	平均値	S D	平均値	S D	平均値	S D
A R H 7 7	1. 7	1. 0 1	6 4. 1	2 6. 2	2 2 2. 4	8 8. 3
A R H 7 7 / I L 1 5 R α	3. 6	1. 3 1	9 8. 7	1 8. 8	3 8 8. 1	1 1 1. 1

40

【 0 0 8 7 】

表 8 及び図 9 に示すように、A R H 7 7 細胞を介して得られた N K 細胞は、3 週間培養後に 2 2 2 倍の増幅率を示したのに対し、I L 1 5 R α 発現 A R H 7 7 (A R H 7 7 - I L 1 5 R α) 細胞を介して得られた N K 細胞は、3 週間培養後に 3 8 8 倍の増幅率を示した。

【 0 0 8 8 】

よって、I L 1 5 R α 発現 A R H 7 7 (A R H 7 7 - I L 1 5 R α) 細胞は、A R H 7

50

7細胞と比較して1.5倍以上の増幅率を示しており、より優れたNK細胞の増幅効果を有することが分かる。

【0089】

2-2. NK細胞の純度(purity)の評価

IL15R α の発現によるNK細胞活性の効果を確認するために、ARH77細胞及びIL15R α 発現ARH77 (ARH77-IL15R α)細胞を用いて、NK細胞の純度を評価した。

【0090】

実施例1-2と同様の方法で実験を行い、3週間評価した。前記実験結果を下記表9及び図10に示す。

【0091】

【表9】

純度	1週		2週		3週	
	平均値	SD	平均値	SD	平均値	SD
ARH77	59	0.16	70	0.05	70	0.04
ARH77/I L15R α	63	0.07	79	0.07	78	0.04

【0092】

表9及び図10に示すように、ARH77細胞を介して得られたNK細胞は、59~70%の純度を示したのに対し、IL15R α 発現ARH77 (ARH77-IL15R α)細胞を介して得られたNK細胞は63~79%とより高い純度を示した。

【0093】

よって、IL15R α 発現ARH77 (ARH77-IL15R α)細胞を介して得られたNK細胞は、より高い純度を有し、IL15R α 発現ARH77 (ARH77-IL15R α)細胞は、より高い純度のNK細胞を増殖させ得ることが分かる。

【0094】

2-3. NK細胞の細胞傷害性(cytotoxicity)の評価

IL15R α の発現によるNK細胞活性の効果を確認するために、ARH77細胞及びIL15R α 発現ARH77 (ARH77-IL15R α)細胞を用いて、増殖したNK細胞の癌細胞に対する細胞傷害性能を評価した。

【0095】

実施例1-3と同様の方法で実験を行い、3週間評価した。前記実験結果を下記表10及び図11に示す。

【0096】

10

20

30

40

50

【表 1 0】

毒性 (%)	1 週		2 週		3 週	
	平均値	S D	平均値	S D	平均値	S D
ARH 7 7	3 5 . 6	6 . 4 5	6 3 . 2	1 . 4 2	6 1 . 2	7 . 6 2
ARH 7 7 / I L 1 5 R α	4 7 . 1	7 . 4 4	7 4 . 1	3 . 1 2	6 4 . 9	3 . 1 2

10

【 0 0 9 7】

表 1 0 及び図 1 1 に示すように、IL 1 5 R α 発現 ARH 7 7 (ARH 7 7 - IL 1 5 R α) 細胞を介して得られたNK細胞は、ARH 7 7 細胞を介して得られたNK細胞よりも高い細胞傷害性を示した。

【 0 0 9 8】

よって、IL 1 5 R α 発現 ARH 7 7 (ARH 7 7 - IL 1 5 R α) 細胞は、より高いレベルの細胞傷害性を示すNK細胞を増殖させ得ることが分かる。

【実施例 3】

20

【 0 0 9 9】

ARH 7 7 細胞のNK細胞刺激の効果

3 - 1 . NK細胞増幅率 (expansion rate) の評価

ARH 7 7 細胞のNK細胞刺激の効果を確認するために、ARH 7 7 細胞及びK 5 6 2 細胞を用いてNK細胞の増幅率を評価した。

【 0 1 0 0】

実施例 1 - 1 と同様の方法でP B M Cを分離し、放射線照射されたARH 7 7 細胞またはK 5 6 2 細胞と共助培養した。培養前のP B M Cと培養後 1 4 日、2 1 日及び 2 8 日に回収した各細胞を、蛍光結合したヒトCD 3 及びCD 5 6 モノクローナル抗体で染色し、その後、フローサイトメトリーによりNK細胞 (CD 3 - CD 5 6 + 細胞) の純度を評価した。回収された細胞のうち生きた細胞の総数にNK細胞の割合を乗じて、総NK細胞数を計算した。同様の方法で、培養前P B M C内のNK細胞の総数を計算し、培養 1 4 日目、2 1 日目及び 2 8 日目のそれぞれのNK細胞総数を培養前のNK細胞数で除して、NK細胞の増幅率を計算した。

30

【 0 1 0 1】

前記実験結果を下記表 1 1 及び図 1 2 に示す。

【 0 1 0 2】

【表 1 1】

増幅率 (fold)	2 週		3 週		4 週	
	平均値	S D	平均値	S D	平均値	S D
ARH 7 7	2 3 4	1 7 6	1 3 1 3	1 6 2 8	1 3 7 6	1 3 8 6
K 5 6 2	1 5 0	2 6 7	4 7 7	7 6 6	6 2 7	7 9 8

40

【 0 1 0 3】

表 1 1 及び図 1 2 に示すように、K 5 6 2 細胞を介して得られたNK細胞は、4 週間培養後に 6 2 7 倍の増幅率を示したのに対し、ARH 7 7 細胞を介して得られたNK細胞は

50

、4週間培養後に1376倍の増幅率を示した。

【0104】

よって、ARH77細胞は、2倍以上優れたNK細胞の増幅効果を有することが分かる。

【0105】

3-2. NK細胞の純度(purity)の評価

ARH77細胞のNK細胞刺激の効果を確認するために、ARH77細胞及びK562細胞を用いて、得られたNK細胞の純度を評価した。

【0106】

実施例1-2と同様の方法で、フローサイトメトリーにより細胞内CD3 - CD56 + NK細胞の割合を測定して純度を評価した。実験結果を下記表12、並びに図13及び14に示す。

【0107】

【表12】

純度	2週		3週		4週	
	平均値	SD	平均値	SD	平均値	SD
ARH77	83.1	18	77.6	19	69.0	20
K562	68.8	29	59.7	29	46.1	27

【0108】

表12、並びに図13及び14に示すように、K562細胞を介して得られたNK細胞は、46.1～68.7%の純度を示したのに対し、ARH77細胞を介して得られたNK細胞は、69.0～83.1%のより高い純度を示した。

【0109】

よって、ARH77細胞を介して得られたNK細胞が、より高い純度を有することが分かる。

【0110】

3-3. NK細胞の細胞傷害性(cytotoxicity)の評価

ARH77細胞のNK細胞刺激の効果を確認するために、ARH77細胞及びK562細胞を用いて、得られたNK細胞の細胞傷害性を評価した。

【0111】

実施例1-3と同様の方法で、ARH77細胞またはK562細胞を用いて得られたNK細胞の癌細胞に対する細胞傷害性能を測定した。実験結果を下記表13及び図15に示す。

【0112】

【表13】

毒性(%)	2週		3週		4週	
	平均値	SD	平均値	SD	平均値	SD
ARH77	56	13	61	11	50	10
K562	60	9	62	13	52	17

【0113】

表13及び図15に示すように、ARH77細胞及びK562細胞を介して得られたN

K細胞の細胞傷害性は、有意であることが確認された。

【0114】

よって、ARH77細胞は、K562細胞と同様のレベルの細胞傷害性を示すNK細胞を増殖させ得ることが分かる。

【0115】

3-4. NK細胞発現形質 (phenotype) の評価

ARH77細胞のNK細胞刺激効果を確認するために、ARH77細胞及びK562細胞を用いて得られたNK細胞の受容体発現 (receptor expression) を評価した。その結果を下記表14~20、及び図16~22に示す。

【0116】

【表14】

NK p46 MFI	2週		3週		4週	
	平均値	SD	平均値	SD	平均値	SD
ARH77	5	3	6	4	5	4
K562	3	2	3	2	4	3

10

【0117】

【表15】

CD16 MFI	2週		3週		4週	
	平均値	SD	平均値	SD	平均値	SD
ARH77	41	15	76	37	69	26
K562	33	18	60	38	36	34

20

【0118】

【表16】

CD158b MFI	2週		3週		4週	
	平均値	SD	平均値	SD	平均値	SD
ARH77	17	30	11	19	16	10
K562	44	71	24	22	17	11

30

【0119】

40

【表 1 7】

NK p 4 4 M F I	2 週		3 週		4 週	
	平均値	S D	平均値	S D	平均値	S D
AR H 7 7	6	4	1 3	5	8	4
K 5 6 2	4	3	6	4	4	1

10

【 0 1 2 0】

【表 1 8】

NK p 3 0 M F I	2 週		3 週		4 週	
	平均値	S D	平均値	S D	平均値	S D
AR H 7 7	2 1	1 1	1 6	1 2	1 3	1 0
K 5 6 2	1 6	1 0	8	8	5	3

20

【 0 1 2 1】

【表 1 9】

NK G 2 D M F I	2 週		3 週		4 週	
	平均値	S D	平均値	S D	平均値	S D
AR H 7 7	1 7	9	1 7	7	1 0	4
K 5 6 2	1 3	6	1 0	6	4	1

30

【 0 1 2 2】

【表 2 0】

D N A M - 1 M F I	2 週		3 週		4 週	
	平均値	S D	平均値	S D	平均値	S D
AR H 7 7	1 4	5	1 9	1 0	1 6	1 1
K 5 6 2	1 1	2	1 4	2	1 3	4

40

【 0 1 2 3】

表 1 4 ~ 2 0、及び図 1 6 ~ 2 2 に示すように、A R H 7 7 細胞は、C D 1 5 8 b を除く全ての測定値において K 5 6 2 細胞よりさらに高い平均蛍光強度 (M F I) を示し、N K 細胞の機能を抑制する C D 1 5 8 b では、さらに低い平均蛍光強度を示した。よって、A R H 7 7 細胞は、K 5 6 2 細胞よりも N K 細胞活性に重要な受容体をより良好に発現することが確認された。

50

【 0 1 2 4 】

そこから、K 5 6 2 細胞と比較して、A R H 7 7 細胞がフィーダー細胞 (f e e d e r c e l l) としてより優れたN K 細胞刺激効果を有することが分かる。

【実施例 4】

【 0 1 2 5 】

B 7 H 6、C D 1 3 7 L、I L 1 5 及び I L 1 5 R α 発現フィーダー細胞のN K 細胞刺激の効果

B 7 H 6、C D 1 3 7 L、I L 1 5 - 及び I L 1 5 R α 発現フィーダー細胞 (f e e d e r c e l l) によるN K 細胞刺激の効果を確認するために、A R H 7 7 細胞及びK 5 6 2 細胞を用いてそれぞれの遺伝子を発現させ、下記実験を行った。

10

【 0 1 2 6 】

4 - 1 . N K 細胞増幅率 (e x p a n s i o n r a t e) の評価

B 7 H 6、C D 1 3 7 L、I L 1 5 及び I L 1 5 R α 発現フィーダー細胞 (f e e d e r c e l l) によるN K 細胞刺激の効果を確認するために、前記遺伝子を発現させたA R H 7 7 細胞及びK 5 6 2 細胞を用いて、N K 細胞の増幅率を評価した。

【 0 1 2 7 】

実施例 1 - 1 と同様の方法でP B M C を分離し、放射線照射された各フィーダー細胞と共助培養した。培養前のP B M C と培養後 1 4 日、2 1 日及び 2 8 日に回収した細胞において、フローサイトメトリーによってN K 細胞 (C D 3 - C D 5 6 + 細胞) の純度を評価し、その後、前記と同様の方法でN K 細胞の増幅率を計算した。

20

【 0 1 2 8 】

前記実験結果を下記表 2 1 に示す。

【 0 1 2 9 】

30

40

50

【表 2 1】

増幅率 (fold)	2 週		3 週		4 週	
	平均値	SD	平均値	SD	平均値	SD
ARH-77	234	176	1, 3 13	162 8	1, 3 76	1, 3 86
ARH-77/B7H6/IL-15	99	84	364	419	568	928
ARH-77/137L/IL-15	631	356	6, 9 10	3, 9 31	43, 448	48, 524
ARH-77/B7H6/IL-15/IL-15R α	116	92	352	238	480	420
ARH-77/137L/IL-15/IL-15R α	640	388	7, 3 91	4, 6 84	33, 231	34, 541
ARH-77/B7H6/137L/IL-15	757	386	9, 8 21	8, 4 77	39, 732	35, 137
ARH-77/B7H6/137L/IL-15/IL-15R α	746	360	10, 030	7, 3 58	28, 983	19, 224
K562	150	267	477	766	627	798
K562/B7H6/137L/IL-15	571	342	5, 3 98	1, 3 68	36, 353	21, 864
K562/B7H6/137L/IL-15/IL-15R α	748	424	10, 445	9, 0 98	25, 742	15, 439

【0130】

表 2 1 に示すように、B7H6、CD137L 及び IL-15 発現 ARH-77 (ARH77-B7H6-CD137L-IL15) 細胞、B7H6、CD137L、IL-15 及び IL-15R α 発現 ARH77 (ARH77-B7H6-CD137L-IL15-IL15R α) 細胞、及び B7H6、CD137L、IL-15 及び IL-15R α 発現 K562 (K562-B7H6-CD137L-IL15-IL15R α) 細胞は、3 週目に最も優れた NK 細胞の増幅率を示すことが確認された。

【0131】

4-2. NK 細胞の純度 (purity) の評価

B7H6、CD137L、IL15 及び IL15R α 発現フィーダー細胞 (feede

r c e l l) によるNK細胞刺激の効果を確認するために、前記遺伝子を発現させた A R H 7 7 細胞及び K 5 6 2 細胞を用いて、NK細胞の純度を評価した。

【 0 1 3 2 】

実施例 1 - 2 と同様の方法で、フローサイトメトリーにより細胞内 C D 3 - C D 5 6 + NK細胞の割合を測定して純度を評価した。実験結果を下記表 2 2 に示す。

【 0 1 3 3 】

【表 2 2 】

純度	2 週		3 週		4 週	
	平均値	S D	平均値	S D	平均値	S D
ARH-77	83	18	78	19	69	20
ARH-77/B7H6/IL-15	83	15	70	22	60	28
ARH-77/137L/IL-15	94	5	92	7	87	12
ARH-77/B7H6/IL-15/IL-15R α	83	20	80	22	75	25
ARH-77/137L/IL-15/IL-15R α	95	5	92	8	86	12
ARH-77/B7H6/137L/IL-15	95	4	94	5	88	9
ARH-77/B7H6/137L/IL-15/IL-15R α	94	4	93	6	89	9
K562	69	29	60	29	46	27
K562/B7H6/137L/IL-15	97	3	96	4	93	8
K562/B7H6/137L/IL-15/IL-15R α	95	4	95	5	91	7

【 0 1 3 4 】

表 2 2 に示すように、B7H6、CD137L 及び IL-15 発現 ARH-77 (ARH77-B7H6-CD137L-IL15) 細胞、B7H6、CD137L、IL-15 及び IL-15R α 発現 ARH77 (ARH77-B7H6-CD137L-IL15-IL15R α) 細胞、B7H6、CD137L、及び IL-15 発現 K562 (K562-B7H6-CD137L-IL15) 細胞、並びに B7H6、CD137L、IL-

15 及び IL-15R α 発現 K562 (K562-B7H6-CD137L-IL15-IL15R α) 細胞を介して得られた NK 細胞は、4 週目までに約 90% 以上の純度を示すことが確認された。

【0135】

4-3. NK 細胞の細胞傷害性 (cytotoxicity) の評価

B7H6、CD137L、IL15 及び IL15R α 発現フィーダー細胞 (feeder cell) による NK 細胞刺激の効果を確認するために、前記遺伝子を発現させた ARH77 細胞及び K562 細胞を用いて、増殖した NK 細胞の癌細胞に対する細胞傷害性を評価した。

【0136】

実施例 1-3 と同様の方法で、各遺伝子発現フィーダー細胞を用いて増殖した NK 細胞の癌細胞に対する細胞傷害性能を測定した。実験結果を下記表 23 に示す。

【0137】

10

20

30

40

50

【表 2 3】

毒性 (%)	2 週		3W		4W	
	平均値	S D	平均値	S D	平均値	S D
ARH-77	56	13	61	11	50	10
ARH-77/B7H6/IL-15	60	9	58	11	39	16
ARH-77/137L/IL-15	59	10	66	12	50	9
ARH-77/B7H6/IL-15/IL-15R α	64	8	67	5	44	15
ARH-77/137L/IL-15/IL-15R α	64	9	63	10	55	11
ARH-77/B7H6/137L/IL-15	61	13	65	11	65	11
ARH-77/B7H6/137L/IL-15/IL-15R α	61	11	64	11	67	14
K562	60	9	62	13	52	17
K562/B7H6/137L/IL-15	66	8	72	10	55	15
K562/B7H6/137L/IL-15/IL-15R α	65	12	65	12	64	13

【0138】

表 23 に示すように、B7H6、CD137L 及び IL-15 発現 ARH-77 (ARH77-B7H6-CD137L-IL15) 細胞、B7H6、CD137L、IL-15 及び IL-15R α 発現 ARH77 (ARH77-B7H6-CD137L-IL15-IL15R α) 細胞、及び B7H6、CD137L、IL-15 及び IL-15R α 発現 K562 (K562-B7H6-CD137L-IL15-IL15R α) 細胞を介して得られた NK 細胞は、4 週目まで毒性が維持されるが、残りの細胞を用いた NK 細胞は、毒性が低下することが確認された。

【0139】

よって、B7H6、CD137L 及び IL-15 発現 ARH-77 (ARH77-B7H6-CD137L-IL15) 細胞、B7H6、CD137L、IL-15 及び IL-15R α 発現 ARH77 (ARH77-B7H6-CD137L-IL15-IL15R

α) 細胞、及び B 7 H 6、C D 1 3 7 L、I L - 1 5 及び I L - 1 5 R α 発現 K 5 6 2 (K 5 6 2 - B 7 H 6 - C D 1 3 7 L - I L 1 5 - I L 1 5 R α) 細胞が、フィーダー細胞 (f e e d e r c e l l) として優れた N K 細胞刺激の効果を有することが分かる。

【実施例 5】

【0140】

N K 細胞最適化培地におけるフィーダー細胞の N K 細胞刺激の効果

実施例 3 において、フィーダー細胞 (f e e d e r c e l l) として N K 細胞刺激に優れた効果を有する B 7 H 6、C D 1 3 7 L 及び I L - 1 5 発現 A R H - 7 7 (A R H 7 7 - B 7 H 6 - C D 1 3 7 L - I L 1 5) 細胞、B 7 H 6、C D 1 3 7 L、I L - 1 5 及び I L - 1 5 R α 発現 A R H 7 7 (A R H 7 7 - B 7 H 6 - C D 1 3 7 L - I L 1 5 - I L 1 5 R α) 細胞、及び B 7 H 6、C D 1 3 7 L、I L - 1 5 及び I L - 1 5 R α 発現 K 5 6 2 (K 5 6 2 - B 7 H 6 - C D 1 3 7 L - I L 1 5 - I L 1 5 R α) 細胞を用いて、以下の実験を行った。

10

【0141】

5 - 1 . N K 細胞増幅率 (e x p a n s i o n r a t e) の評価

前記 3 つの遺伝子組み換えフィーダー細胞 (f e e d e r c e l l) を用いた N K 細胞刺激の効果を確認するために、N K 細胞に最適化された培地を用いて、N K 細胞の増幅率を評価した。

【0142】

実施例 1 - 1 と同様の方法で P B M C を分離し、放射線照射された各フィーダー細胞と共助培養した。培養液は、D M E M 培養液に 3 0 % の H A M ' S F 1 2、1 0 % のヒト血清 (H S)、1 0 μ g / m L のゲンタマイシン、1 x G l u t a m a x、1 0 μ M の β - メルカプトエタノール、5 0 μ M のエタノールアミン、2 0 μ g / m L のアスコルビン酸及び 5 n g / m L の亜セレン酸ナトリウムを添加して使用し、培養開始日から 1 週間は、培養液に 1 0 U / m L の組換えヒトインターロイキン (r h I L) - 2 と 5 n g / m L の r h I L - 2 1 を添加し、培養 1 週間後からは、培養液に 1 0 0 U / m L の r h I L - 2 と 5 n g / m L の r h I L - 1 5 を添加して 2 8 日間培養した。

20

【0143】

培養液を 1 ~ 2 日ごとに新しい培養液に交換した。培養 1 4 日、2 1 日及び 2 8 日に培養した細胞を回収し、回収された細胞内の N K 細胞 (C D 3 -、C D 5 6 + 細胞) の割合 (純度) をフローサイトメトリー (f l o w c y t o m e t r y) で確認し、回収された細胞のうち生きている細胞の総数に N K 細胞の割合を掛けて、総 N K 細胞数を計算した。

30

【0144】

同様の方法で、培養前 P B M C 内の N K 細胞の総数を計算し、培養 1 4 日目、2 1 日目及び 2 8 日目のそれぞれの N K 細胞総数を培養前の N K 細胞数で除して、N K 細胞の増幅率を計算した。

【0145】

前記実験結果を下記表 2 4 及び図 2 3 に示す。

【0146】

40

【表 2 4】

増幅率 (fold)	2 週		3 週		4 週	
	平均値	S D	平均値	S D	平均値	S D
ARH-77	745	287	5, 1 30	2, 8 06	9, 9 35	7, 5 24
ARH-77/B7H6/137L /IL-15	175 2	876	24, 539	11, 282	73, 276	46, 272
ARH-77/B7H6/137L /IL-15/IL-15R α	215 4	1, 3 07	29, 633	16, 672	132 , 68 3	80, 843
K562	516	531	6, 0 57	8, 0 17	9, 5 13	12, 002
K562/B7H6/137L/I L-15/IL-15R α	872	625	14, 685	10, 278	37, 904	29, 125

10

20

【0147】

表 2 4 及び図 2 3 に示すように、B7H6、CD137L、IL-15 及び IL-15 R α 発現 ARH77 (ARH77-B7H6-CD137L-IL15-IL15R α) 細胞は、NK 細胞増幅に最も優れた効果を有することが確認された。

30

【0148】

具体的には、B7H6、CD137L、IL-15 及び IL-15 R α 発現 ARH77 (ARH77-B7H6-CD137L-IL15-IL15R α) 細胞を用いた NK 細胞は、4 週間培養後の B7H6、CD137L、IL-15 及び IL-15 R α 発現 K562 (K562-B7H6-CD137L-IL15-IL15R α) 細胞を用いた NK 細胞と比較して、増幅率が約 3.5 倍高いことが確認された。

【0149】

5-2. NK 細胞の純度 (purity) の評価

実施例 4-1 の 3 つの遺伝子組み換えフィーダー細胞 (feeder cell) による NK 細胞刺激の効果を確認するために、NK 細胞に最適化された培地を用いて、NK 細胞の純度を評価した。

40

【0150】

実施例 1-2 と同様の方法で、フローサイトメトリーにより細胞内 CD3 - CD56 + NK 細胞の割合を測定して純度を評価した。実験結果を下記表 2 5 及び図 2 4 に示す。

【0151】

【表 2 5】

純度	2 週		3 週		4 週	
	平均値	SD	平均値	SD	平均値	SD
ARH-77	83	24	84	20	85	14
ARH-77/B7H6/137L /IL-15	89	12	90	9	89	7
ARH-77/B7H6/137L /IL-15/IL-15R α	87	15	87	13	89	9
K562	77	26	77	23	77	17
K562/B7H6/137L/I L-15/IL-15R α	83	6	86	11	86	12

【0152】

表 2 5 及び図 2 4 に示すように、B7H6、CD137L 及び IL-15 発現 ARH-77 (ARH77-B7H6-CD137L-IL15) 細胞、B7H6、CD137L、IL-15 及び IL-15R α 発現 ARH77 (ARH77-B7H6-CD137L-IL15-IL15R α) 細胞、及び B7H6、CD137L、IL-15 及び IL-15R α 発現 K562 (K562-B7H6-CD137L-IL15-IL15R α) 細胞を介して得られた NK 細胞は、いずれも 4 週まで約 85% 以上の純度を維持することが確認された。特に、ARH77 細胞を用いた NK 細胞の純度が、より優れていることを確認した。

【0153】

5-3. NK 細胞の細胞傷害性 (cytotoxicity) の評価

前記 3 つの遺伝子組み換えフィーダー細胞 (feeder cell) による NK 細胞刺激の効果を確認するために、NK 細胞に最適化された培地を用いて、NK 細胞の細胞傷害性を評価した。

【0154】

実施例 1-3 と同様の方法で、各遺伝子発現フィーダー細胞を用いて増殖した NK 細胞の癌細胞に対する細胞傷害性を測定した。実験結果を下記表 2 6 及び図 2 5 に示す。

【0155】

【表 2 6】

毒性 (%)	2 週		3 週		4 週	
	平均値	SD	平均値	SD	平均値	SD
ARH-77	72	5	79	12	78	6
ARH-77/B7H6/137L /IL-15	70	11	78	15	82	5
ARH-77/B7H6/137L /IL-15/IL-15R α	66	10	79	13	83	5
K562	67	10	69	22	80	6
K562/B7H6/137L/I L-15/IL-15R α	72	11	83	7	84	7

【0156】

表 2 6 及び図 2 5 に示すように、B7H6、CD137L 及び IL-15 発現 ARH-77 (ARH77-B7H6-CD137L-IL15) 細胞、B7H6、CD137L、IL-15 及び IL-15R α 発現 ARH77 (ARH77-B7H6-CD137L-IL15-IL15R α) 細胞、及び B7H6、CD137L、IL-15 及び IL-15R α 発現 K562 (K562-B7H6-CD137L-IL15-IL15R α) 細胞を介して得られた NK 細胞は、いずれも優れた細胞傷害性を示すことが確認された。

【0157】

結局、前記の実験結果から、B7H6、CD137L、IL-15 及び IL-15R α 発現 ARH77 (ARH77-B7H6-CD137L-IL15-IL15R α) 細胞が、フィーダー細胞 (feeder cell) として最も優れた NK 細胞刺激の効果を有することが分かる。

10

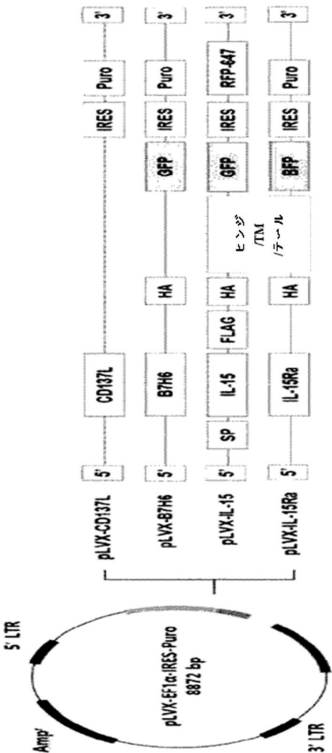
20

30

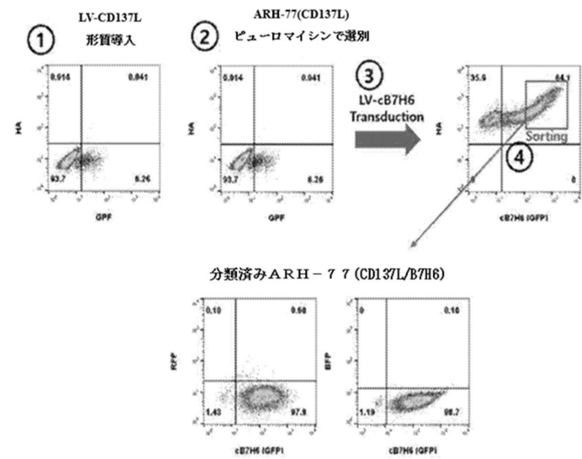
40

50

【図面】
【図 1】



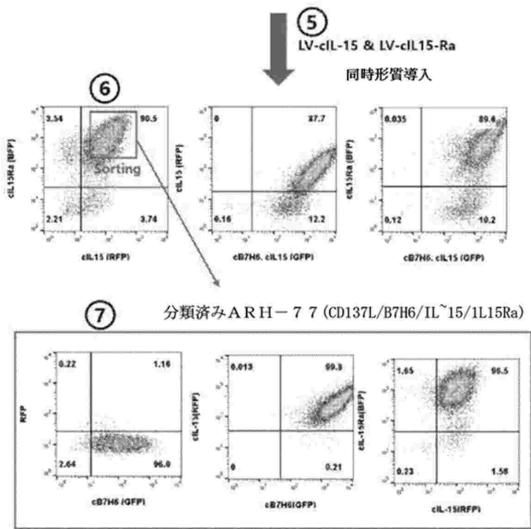
【図 2 a】



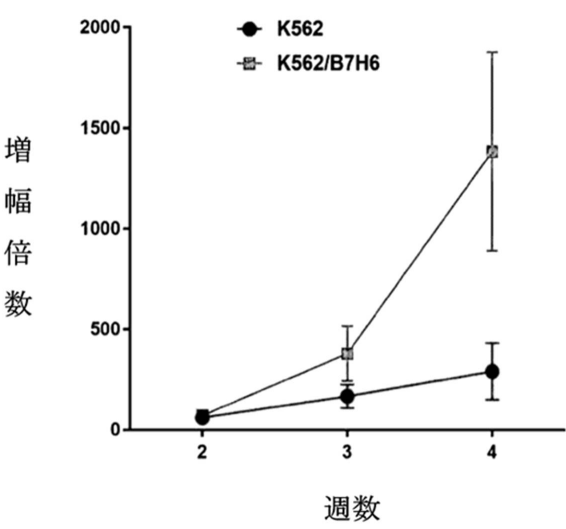
10

20

【図 2 b】



【図 3】

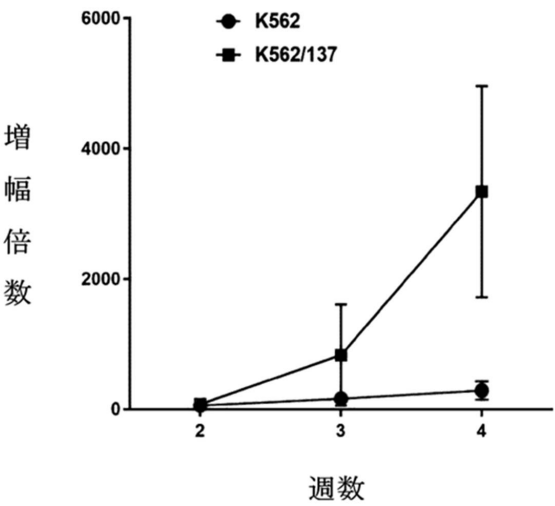


30

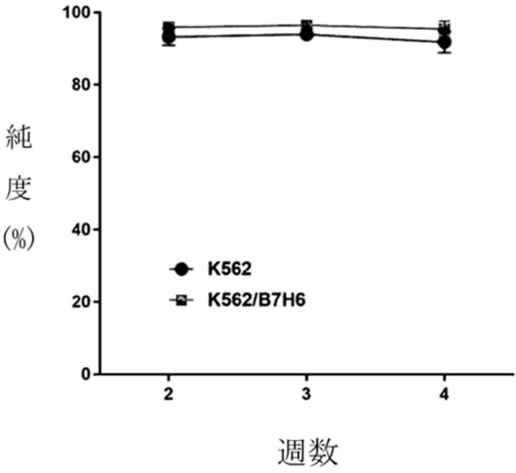
40

50

【図 4】

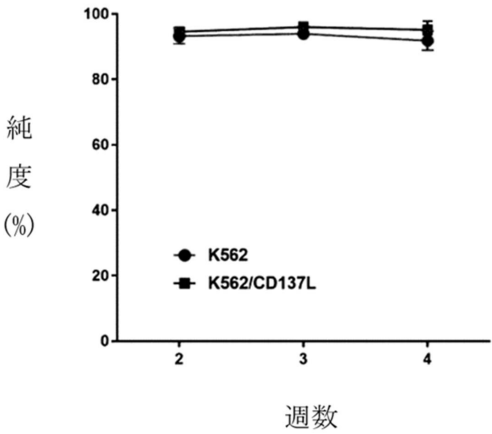


【図 5】

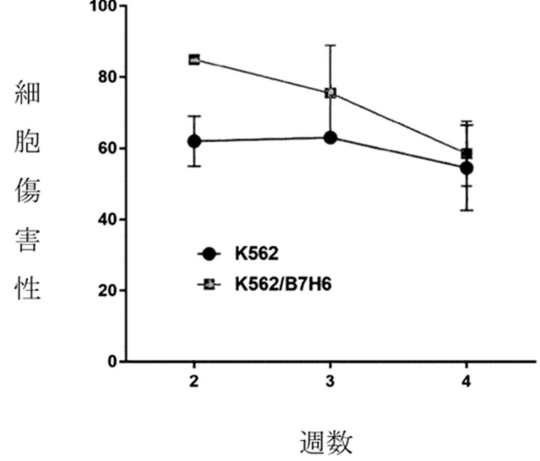


10

【図 6】



【図 7】



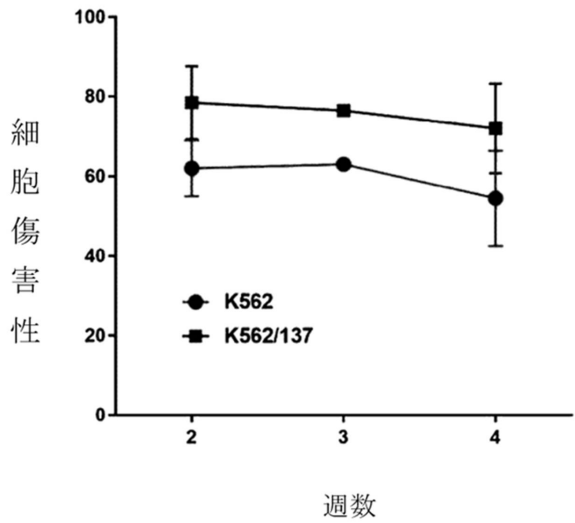
20

30

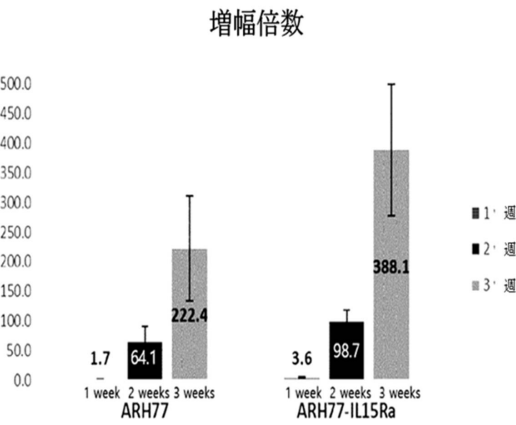
40

50

【図 8】

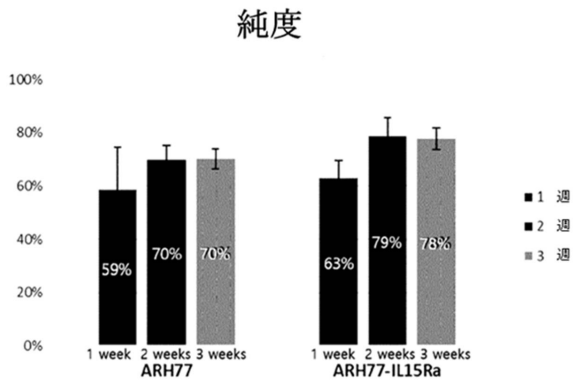


【図 9】

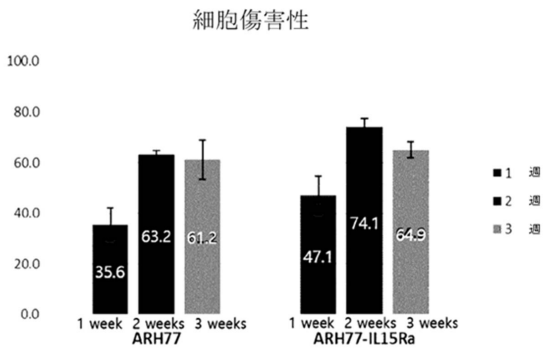


10

【図 10】



【図 11】



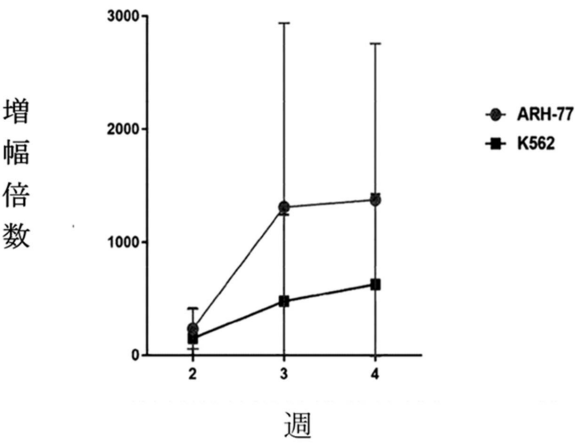
20

30

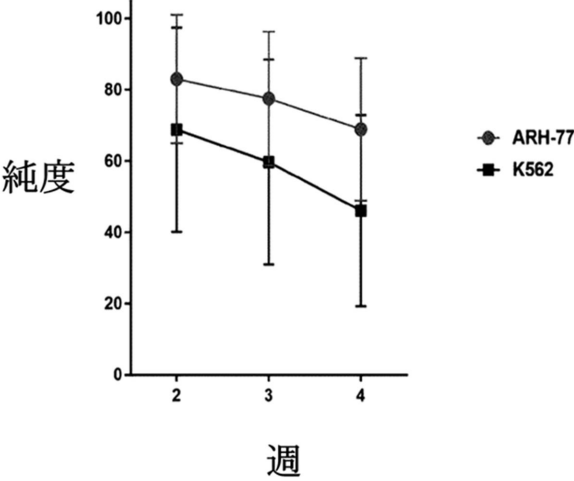
40

50

【図 1 2】

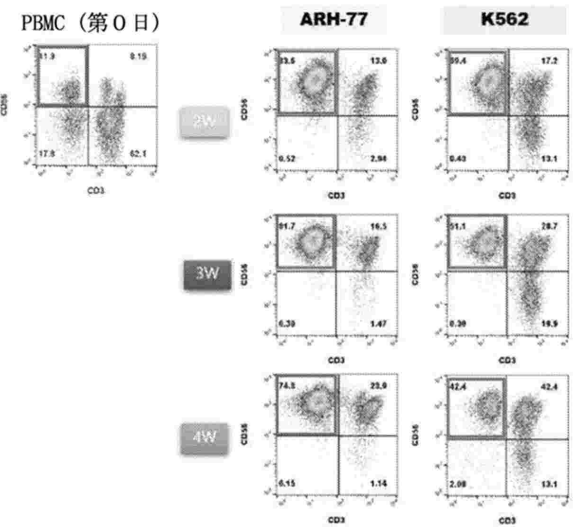


【図 1 3】

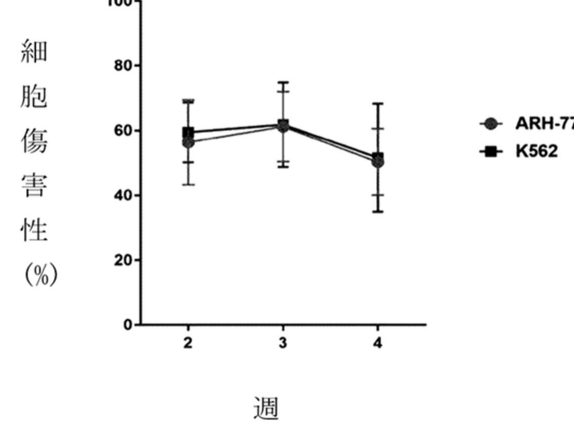


10

【図 1 4】



【図 1 5】



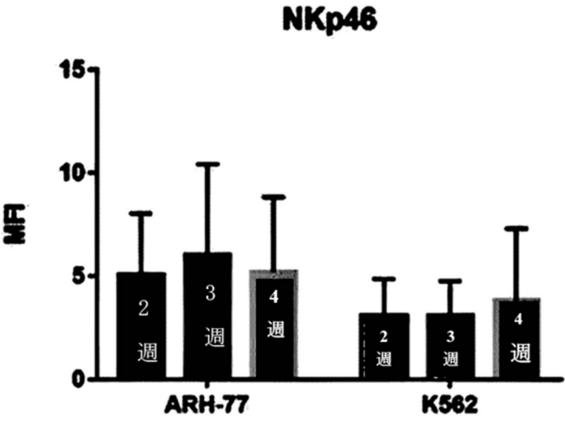
20

30

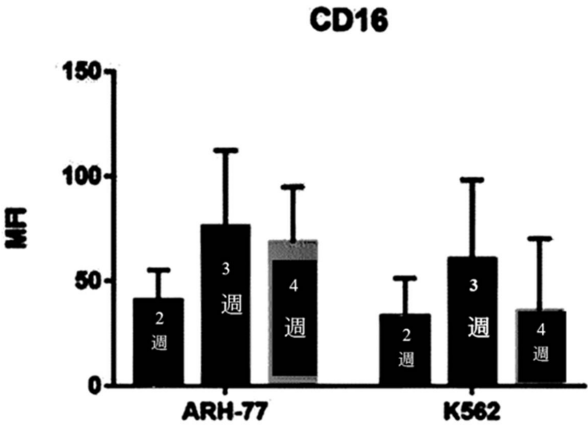
40

50

【図 16】

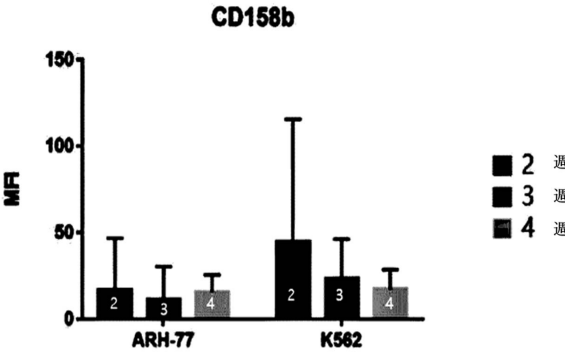


【図 17】

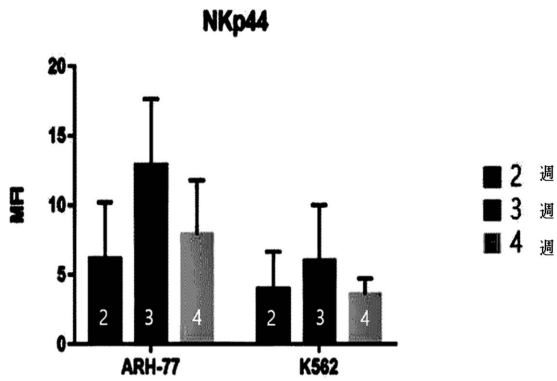


10

【図 18】



【図 19】



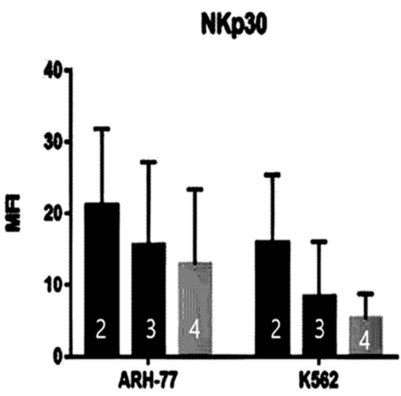
20

30

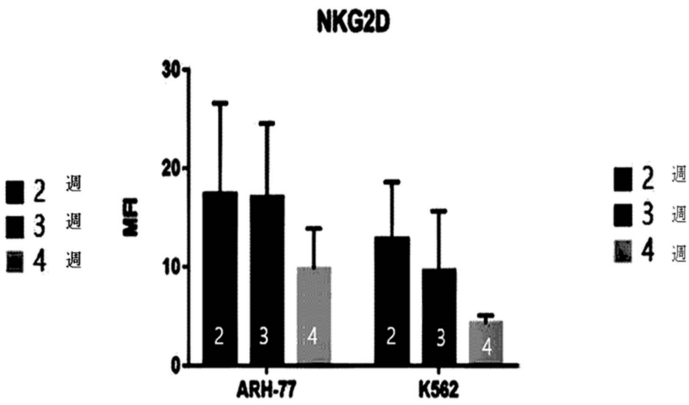
40

50

【 図 2 0 】

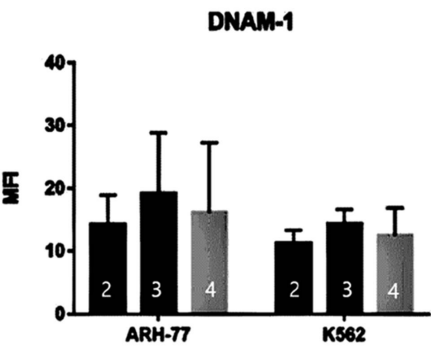


【 図 2 1 】

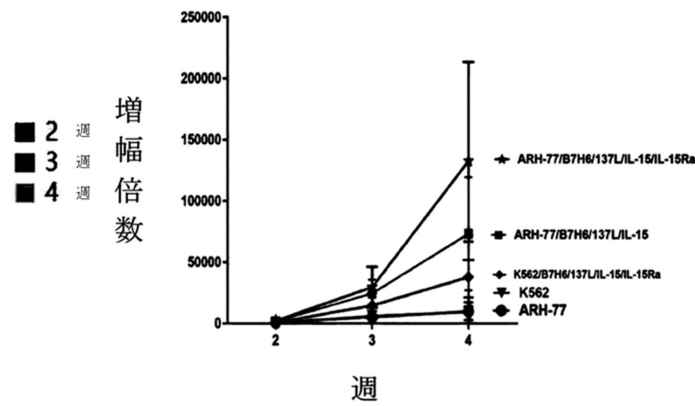


10

【 図 2 2 】



【 図 2 3 】



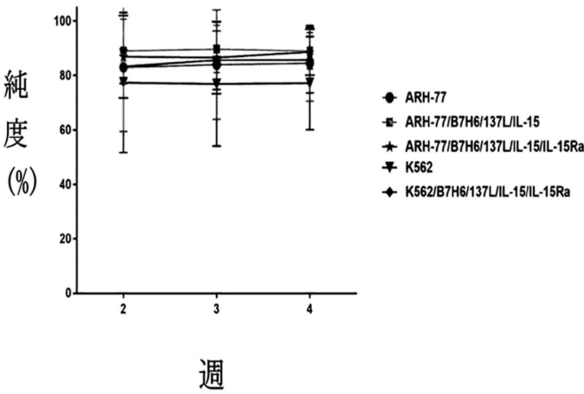
20

30

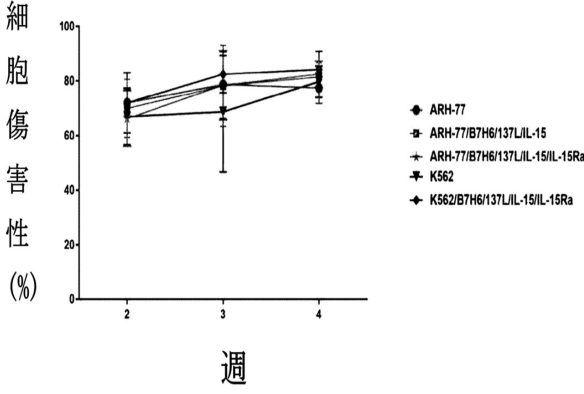
40

50

【 図 2 4 】



【 図 2 5 】



10

【 配列表 】

0007679001000001.app

20

30

40

50

フロントページの続き

ンナム - ド コンジュ - シ コンジュデハク - ロ、 5 6

5 6 , G o n g j u d a e h a k - r o G o n g j u - s i C h u n g c h e o n g n a m - d
o 3 1 4 - 7 0 1 , R e p u b l i c o f K o r e a

(74)代理人 100121728

弁理士 井関 勝守

(74)代理人 100165803

弁理士 金子 修平

(74)代理人 100179648

弁理士 田中 咲江

(74)代理人 100222885

弁理士 早川 康

(74)代理人 100140338

弁理士 竹内 直樹

(74)代理人 100227695

弁理士 有川 智章

(74)代理人 100170896

弁理士 寺園 健一

(74)代理人 100219313

弁理士 米口 麻子

(74)代理人 100161610

弁理士 藤野 香子

(72)発明者 キム サンギ

大韓民国 グァンジュ ドン - グ バムシル - ロ 6 9

(72)発明者 イ ジュンヘン

大韓民国 グァンジュ ソーグ ハナム - デロ 7 1 0 ボン - ギル 2 0、5 0 5 - 8 0 5

(72)発明者 イ ジェジュン

大韓民国 グァンジュ ブク - グ ソガン - ロ 1 5 0、1 0 5 - 1 3 0 1

審査官 松原 寛子

(56)参考文献 中国特許出願公開第 1 0 3 4 8 4 4 2 9 (C N , A)

米国特許出願公開第 2 0 1 9 / 0 2 9 8 7 6 9 (U S , A 1)

Cancer , 1984年 , Vol.54 , p.1893-1903

(58)調査した分野 (Int.Cl. , D B 名)

C 1 2 N 1 / 0 0 - 7 / 0 8

C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)

C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)