

(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
2016年1月21日(21.01.2016)



(10) 国際公開番号

WO 2016/010155 A1

- (51) 国際特許分類:
C12N 5/0783 (2010.01) A61P 37/02 (2006.01)
A61K 35/17 (2015.01) A61P 37/08 (2006.01)
A61P 31/12 (2006.01) C12N 5/095 (2010.01)
A61P 35/00 (2006.01) C12N 15/09 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2015/070624
- (22) 国際出願日: 2015年7月17日(17.07.2015)
- (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:
62/026,348 2014年7月18日(18.07.2014) US
62/026,358 2014年7月18日(18.07.2014) US
- (72) 発明者; および
- (71) 出願人: 河本 宏(KAWAMOTO, Hiroshi) [JP/JP];
〒6060816 京都府京都市左京区下鴨松ノ木町 8
5-1 Kyoto (JP).
- (72) 発明者: 金子 新(KANEKO, Shin); 〒6068501 京都
府京都市左京区吉田本町 3 6 番地 1 国立大学
法人京都大学内 Kyoto (JP). 増田 喬子(MASUDA,
Kyoko); 〒6068501 京都府京都市左京区吉田本町
3 6 番地 1 国立大学法人京都大学内 Kyoto

(JP). 前田 卓也(MAEDA, Takuya); 〒6068501 京都
府京都市左京区吉田本町 3 6 番地 1 国立大学
法人京都大学内 Kyoto (JP). 永野 誠治(NAGANO,
Seiji); 〒6068501 京都府京都市左京区吉田本町 3
6 番地 1 国立大学法人京都大学内 Kyoto (JP).
桂 義元(KATSURA, Yoshimoto); 〒6068397 京都府
京都市左京区聖護院川原町 5 3 メディカルイ
ノベーションセンター アストリム株式会社内
Kyoto (JP).

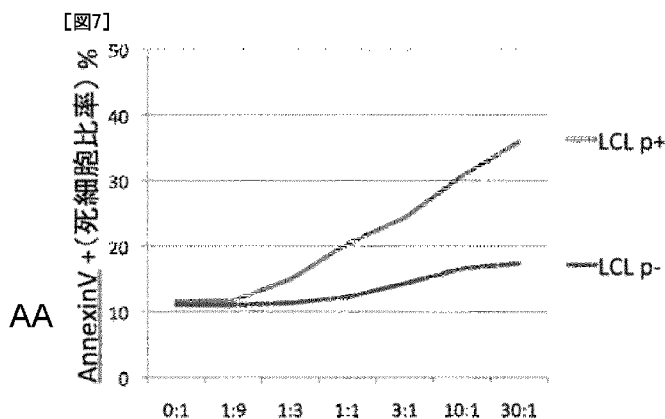
(74) 代理人: 鮫島 睦, 外(SAMEJIMA, Mutsumi et al.);
〒5300017 大阪府大阪市北区角田町 8 番 1 号梅
田阪急ビルオフィスタワー青山特許事務所
Osaka (JP).

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保
護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA,
BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN,
CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES,
FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN,
IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR,
LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX,
MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH,
PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK,
SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA,
UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

[続葉有]

(54) Title: PRODUCTION METHOD FOR PLURIPOTENT STEM CELLS HAVING ANTIGEN-SPECIFIC T CELL RECEPTOR GENE

(54) 発明の名称: 抗原特異的 T 細胞受容体遺伝子を有する多能性幹細胞の製造方法



AA AmmexinV + (dead cell ratio)%

(57) Abstract: Provided is a method for inducing T cells for immunotherapy, including: a step (1) in which human pluripotent stem cells having a WT1 antigen-specific T cell receptor or an Epstein-Barr virus antigen-specific T cell receptor are provided; and a step (2) in which progenitor T cells or mature T cells are induced from the pluripotent stem cells from step (1). iPS cells, in particular, can be suitably used as the pluripotent stem cells. The human pluripotent stem cells having an antigen-specific T cell receptor can be obtained by inducing iPS cells from T cells having the desired antigen specificity or by introducing the desired antigen-specific T cell receptor to the iPS cells. T cells obtained by using this method can be used in immunotherapy for a variety of immune-related diseases including cancer and infectious diseases.

(57) 要約: (1) WT1 抗原特異的 T 細胞受容体または Epstein-Barr ウイルス関連抗原特異的 T 細胞受容体を有するヒト多能性幹細胞を提供する工程、および (2) 工程 (1) の多能性幹細胞から T 前駆細胞あるいは成熟 T 細胞を

誘導する工程を含む、免疫細胞療法用 T 細胞を誘導する方法を提供する。多能性幹細胞としては特に iPS 細胞が好適に用いられる。抗原特異的 T 細胞受容体を有するヒト多能性幹細胞は、所望の抗原特異性を有する T 細胞から iPS 細胞を誘導しても、iPS 細胞へ所望の抗原特異的 T 細胞受容体を導入して得てもよい。本願の方法で得られる T 細胞は、がん、感染症をはじめ様々な免疫関連疾患の免疫細胞療法に用いることができる。

WO 2016/010155 A1



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

SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

- 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：

抗原特異的T細胞受容体遺伝子を有する多能性幹細胞の製造方法

技術分野

[0001] 本願は特定の抗原特異的T細胞受容体遺伝子を有する多能性幹細胞の製造方法に関する。本願また、当該多能性幹細胞からT細胞を誘導する方法に関する。本願はさらに、当該多能性幹細胞から誘導されたT細胞を用いる免疫細胞療法に関する。

背景技術

[0002] WT1 (Wilms tumor 1) 抗原はがん抗原として研究が進められている抗原の一つで、多くの種類の固形がんのケースで高頻度に発現している。悪性腫瘍としての形質維持に関与していると考えられており、またがん幹細胞が発現していることが多いとされている。WT1をワクチンとして投与することによりWT1抗原特異的CTL (cytotoxic T Lymphocyte = 細胞障害性T細胞) を誘導する方法は、臨床試験が行われている。

[0003] WT1抗原特異的T細胞受容体 (TCR = T cell receptor) 遺伝子が単離されており、それを患者の正常T細胞 (多くのクローンの集合体) に発現させて患者の体内に戻す (自家移植) という遺伝子治療について臨床試験が実施されている。TCR発現の際に、患者の正常T細胞がもともと発現しているTCRをsiRNA等により抑制する。

[0004] Epstein-Barr (EB) ウイルスは多様な病気の原因になるウイルスであるが、伝染性単核球症、悪性リンパ腫 (バーキットリフォーマ)、上咽頭がんなどのがんの原因ともなる。EBウイルスに感染した細胞は、ウイルス由来のタンパク分子を発現するので、それらを抗原として用いることができる。すなわち、がんでありながら異物抗原を発現しており、免疫治療の対象としやすいという利点がある。

[0005] EBウイルス関連抗原のうち、免疫細胞療法における標的抗原としてはLMP2(

latent membrane protein 2) 抗原がよく利用されている。LMP2 抗原特異的 T 細胞レセプター (TCR = T cell receptor) 遺伝子が単離されていて、それを患者の正常 T 細胞 (多くのクローンの集合体) に発現させて患者の体内に戻す (自家移植) という遺伝子治療が計画されている。TCR 発現の際に、患者の正常 T 細胞がもともと発現している TCR は siRNA 等により抑制する。

[0006] この TCR 遺伝子療法には、少なくとも以下の 3 つの問題がある。1) レトロウイルスベクターを用いて TCR 遺伝子の導入が行われるが、これはすなわち遺伝子治療であり、導入を受けた患者の T 細胞ががん化する可能性がある。2) siRNA による内因性 TCR の抑制は完全ではなく、多様な内因性 TCR α 鎖や TCR β 鎖と導入した TCR α 鎖や TCR β 鎖とのスワッピング等により、患者の組織を攻撃するような想定外の反応性が出現する危険性がある。3) 患者ごとに T 細胞の回収、遺伝子改変、投与を行う必要があり、事前準備ができず治療に時間がかかる。

[0007] 患者の末梢血から WT1 特異的 CTL 等を採取してペプチドの存在下に増幅させ、自家移植を行う方法が提案されているが、かかる方法は IL-21 の添加により相当効率よく行われるようになっている (Capuis et al, Science Translational Medicine, 5: 174ra27, 2013)。しかしながら、この方法においても 4) WT1 特異的 CTL を大量に増やすのは技術的に困難である。5) 増幅したクローンの TCR の親和性や特異性における能力が患者ごとに異なるので、安定した結果が得られず、また交叉反応性などの危険性が発生するが患者ごとの予測が困難である等の問題がある。

先行技術文献

特許文献

[0008] 特許文献 1 : W02011/096482

非特許文献

[0009] 非特許文献 1 : Chapuis et al, Sci Transl Med, 5:174ra27, 2013

非特許文献 2 : Vizcardo et al., Cell Stem Cell. 12: 31-36, 2013.

非特許文献 3 : Takahashi and Yamanaka, Cell 126, 663-673 (2006)

非特許文献 4 : Takahashi et al., Cell 131, 861-872 (2007)

非特許文献5: Grskovic et al., Nat. Rev. Drug Discov. 10, 915-929(2011)

非特許文献6: Anticancer Research 32(12); 5201-5209, 2012

非特許文献7: Jurgens et al, Journal of Clinical Investigation, 26:22, 2006

非特許文献8: Morgan R.A. et al, Science, 314:126. 2006

非特許文献9: Timmermans et al., Journal of Immunology, 2009, 182: 6879-6888

非特許文献10: Blood 111:1318 (2008)

非特許文献11: Nature Immunology 11: 585 (2010)

発明の概要

[0010] 本願は、特定の抗原、特にWT1抗原およびEBウイルス関連抗原に特異的なT細胞受容体遺伝子を有する多能性幹細胞を製造する方法を提供することを目的とする。本願はまた、当該多能性幹細胞からT細胞を誘導する方法を提供することを目的とする。本願はさらに、当該多能性幹細胞から誘導されたT細胞を用いる免疫細胞療法を提供することを目的とする。

[0011] 本願はまた、特定の抗原、特にWT1抗原およびEBウイルス関連抗原に特異的なT細胞受容体遺伝子を有する多能性幹細胞を提供することを目的とする。

[0012] 本願の第1の態様においては提供者からWT1抗原特異的T細胞またはEBウイルス関連抗原特異的T細胞を単離または誘導し、当該T細胞から多能性幹細胞を誘導する方法を提供する。多能性幹細胞としてiPS細胞を誘導する場合、T細胞から誘導されたiPS細胞をT-iPS細胞法という。WT1抗原特異的T細胞の提供者は健常人であっても、WT1抗原を有する癌患者であってもよい。EBウイルス関連抗原特異的T細胞の提供者は健常人であっても、EBウイルスが関連する疾患に罹患した患者であっても、発症はしていないがEBウイルスに感染経験のある健常人であってもよい。

[0013] 本願の第2の態様においては、WT1抗原特異的T細胞受容体遺伝子またはEBウイルス関連抗原特異的T細胞受容体遺伝子を多能性幹細胞へ導入する工程を含む、特定の抗原特異的T細胞受容体遺伝子を有する多能性幹細胞

を提供する方法に関する。なお、本明細書において、iPS細胞にTCR遺伝子を導入した細胞をTCR-iPS細胞といい、多能性幹細胞としてiPS細胞を用いる場合、かかる方法をTCR-iPS細胞法という。

[0014] 本願はさらに、WT1抗原特異的T細胞受容体遺伝子またはEBウイルス関連抗原を有する多能性幹細胞からT前駆細胞または成熟T細胞を誘導する工程を含む、免疫細胞療法用T細胞の製造方法を提供する。

[0015] 本願の方法で得られるT前駆細胞または成熟T細胞は、細胞免疫療法に用いることができる。細胞免疫療法においては、本願の成熟T細胞は自家移植のみならず、HLAが一定以上一致した他人への他家移植による治療において特に好適に用いることができる。

[0016] 他人由来のT細胞を移植するというアイデアは、従来よく知られている免疫細胞療法の常識に反するものである。例えば血液系の悪性腫瘍（白血病など）では、造血幹細胞を移植する骨髄移植が行われるが、ドナーの骨髄がレシピエントによって拒絶されないように、通常はレシピエントと一致したHLA型のドナーから移植される。しかしながら他人間においては、HLA以外の多くのタンパク分子においてアミノ酸配列が不一致であり、ドナーT細胞はこれらの不一致を攻撃対象と認識し得る。その結果、移植したドナーT細胞の一部がレシピエントの体の細胞を攻撃する反応であるいわゆる移植片対宿主反応が生じる。HLAが一致していない場合は、この移植片対宿主反応はさらに強く起こる。これらは実際に骨髄移植後に高頻度に認められている。そのような背景から、医療関係者の間では「他人のT細胞を移植するのは危険」というのは常識である。

[0017] しかるに本願の発明により得られる特定の抗原特異的T細胞受容体遺伝子を有する多能性幹細胞から誘導されたT細胞を用いることにより、従来の技術認識における問題を予想外にも解決することができる。

[0018] すなわち、第1の態様であるT-iPS細胞法は遺伝子治療ではないので、遺伝子導入に起因する細胞癌化の危険性は生じない。またiPS細胞から再生されるCTLでは内在性のTCRの再構成が抑制され導入したTCRしか発現しないので、想

定外の危険が生じることが無い。また、iPS段階で内在性TCR遺伝子の発現を制御すればより安全である。TCR-iPS細胞はクローンとして扱えるので、遺伝子挿入箇所を同定して安全なクローンを確定して用いることで遺伝子を傷つける危険性を回避できる。

[0019] 本願においては、特定の抗原特異的T細胞受容体を有する多能性幹細胞をつくり、当該多能性幹細胞からT前駆細胞または成熟T細胞を誘導してこれを細胞免疫療法に用いる。かかる方法を採用することにより移植する細胞は単一の特異性を有するT細胞になるために移植片対宿主反応を起こす心配がなく、自家移植のみならず他家移植が可能になることを初めて見出した。すなわち、本願によってはじめて「T細胞を他人に移植する」ことが可能となる。

[0020] 今まで提案されている種々のiPS細胞から分化誘導させたT細胞以外の細胞や組織を移植する治療法では、当該細胞が一生涯生着し続けることが期待されている。従って、他家移植を前提とするiPS細胞ストック事業においてiPS細胞から分化誘導される細胞を移植する際には、患者は免疫抑制剤を飲み続ける必要がある。この点は、自家iPS細胞と比して不利な点である。しかるに、本願におけるT-iPSまたはTCR-iPS細胞由来T細胞の場合、一定期間後に拒絶される。すなわちドナーとレシピエント間でHLAが一定以上一致するとはいえ、他人間ではマイナー組織適合抗原が一致しないのでいずれは拒絶される。この点で、iPS細胞を用いた他の細胞の他家移植とは全く異なり予想外の優れた効果が示される。

[0021] T-iPS細胞、TCR-iPS細胞ともに患者ごとにつくる必要はなく、あらかじめ多くの種類のT-iPS細胞やTCR-iPS細胞をつくっておくことができる。よってT-iPS細胞、TCR-iPS細胞レベル、またはかかる細胞から誘導したT前駆細胞もしくはT細胞レベルでバンク化することが可能である。すなわち、本願によってはじめて「T細胞を他人に移植する」を施行する体制の構築が大幅に加速されることになった。また、治療までの時間が短縮できるだけでなく、移植する前に移植細胞の品質の確認ができるというメリットもある。

図面の簡単な説明

[0022] [図1]実施例1において健常人ボランティア由来T細胞からLMP2テトラマー陽性、CD8陽性T細胞が誘導されたことを示すFACS解析結果。

[図2]実施例1においてHLA-A2402を有しかつEBウイルス既感染者でもある健常人ボランティアの末梢血よりLMP2ペプチドを用いて誘導されたT細胞が、ペプチド特異的キラー活性を有することを示す図。

[図3]LMP2ペプチド特異的T細胞から誘導されたiPS細胞コロニーの写真。

[図4]LMP2ペプチド特異的T細胞から誘導されたT-iPS細胞のT細胞への分化誘導過程(Day13)の細胞のFACS解析結果。

[図5]LMP2ペプチド特異的T細胞から誘導されたT-iPS細胞のT細胞への分化誘導過程(Day36)の細胞のFACS解析結果。

[図6]LMP2ペプチド特異的T細胞から誘導されたT-iPS細胞のT細胞への分化誘導過程(Day41)の細胞のFACS解析結果。LMP2特異的成熟T細胞(CTL)が得られたことが確認された。

[図7]LMP2ペプチド特異的T細胞から誘導されたT-iPS細胞から再生した成熟T細胞(CTL)のLMP2抗原特異的キラー活性を示す図。標的細胞としてLCLを用い、LMP2ペプチド存在(p+)、非存在(p-)下でのT細胞のキラー活性を観察した。

[図8]LMP2ペプチド特異的T細胞から誘導されたT-iPS細胞から再生した成熟T細胞(CTL)のナチュラルキラー細胞様キラー活性を観察した結果を示す図。

[図9]クローンLMP2#1由来再生CTLのLCLに対するペプチド特異的細胞傷害活性を示す図。

[図10]実施例2において得られたクローンLMP2#13由来再生CTLのLCLに対するペプチド特異的細胞傷害活性を示す図。

[図11]実施例3において健常人ボランティア由来T細胞からWT1テトラマー陽性、CD8陽性T細胞が誘導されたことを示すFACS解析結果。

[図12]WT1ペプチド特異的T細胞から誘導されたiPS細胞コロニーの写

真。

[図13]WT1ペプチド特異的T細胞から誘導されたT-iPS細胞のT細胞への分化誘導過程(Day13)の細胞のFACS解析結果。

[図14]WT1ペプチド特異的T細胞から誘導されたT-iPS細胞のT細胞への分化誘導過程(Day36)の細胞のFACS解析結果。

[図15]実施例3で得たクローンWT1#9由来再生CTLのLCLに対するペプチド特異的細胞傷害活性を示す図。

[図16]実施例4で得たクローンWT1#3-3由来再生CTLのLCLに対するペプチド特異的細胞傷害活性を示す図。

[図17]クローンWT1#3-3由来再生CTLの白血病細胞株THP1に対する細胞傷害活性を示す。細胞傷害活性はHLAクラスIに対する抗体で完全にブロックされた。

[図18]クローンWT1#3-3由来再生CTLの白血病細胞株HL60に対する細胞傷害活性を示す。細胞傷害活性はHLAクラスIに対する抗体で完全にブロックされた。

[図19]pTA2ベクター。

[図20]CS-UbC-RfA-IRES2-Venusベクター。

[図21]WT1特異的TCR遺伝子をiPS細胞に導入することが出来たことを示す図。

発明を実施するための形態

[0023] 本明細書ならびに請求の範囲において「多能性幹細胞」とは、生体に存在する多くの細胞に分化可能である多能性を有し、かつ、自己増殖能を併せもつ幹細胞である。多能性幹細胞には、例えば胚性幹(ES)細胞、核移植により得られるクローン胚由来の胚性幹(natES)細胞、胚性生殖細胞(「EG細胞」)、人工多能性幹(iPS)細胞などが例示される。本願では特に、多能性幹細胞は、好ましくは、哺乳動物の多能性幹細胞であり、より好ましくはヒト多能性幹細胞である。

[0024] 本願明細書および請求の範囲において、「T細胞」とは表面にT細胞受容体(TCR)と賞される抗原受容体を発現している細胞を意味する。T細胞

から i P S 細胞を誘導しても T C R が維持されることは、例えば WO 2 0 1 1 / 0 9 6 4 8 2 および Vizcardo et al., Cell Stem Cell 12, 31-36 2013 に報告されている。

[0025] 本願の第1の態様においては、所望の抗原特異的 T 細胞から i P S 細胞を得る。i P S 細胞へと誘導される T 細胞としては、好ましくは C D 3 を発現しており、且つ C D 4 及び C D 8 からなる群から選択される少なくとも一の分子が発現している T 細胞である。このようなヒト T 細胞としては、例えば、C D 4 陽性細胞であるヘルパー／制御性 T 細胞、C D 8 陽性細胞である細胞傷害性 T 細胞、ナイーブ T 細胞 (C D 4 5 R A + C D 6 2 L + 細胞)、セントラルメモリー T 細胞 (C D 4 5 R A - C D 6 2 L + 細胞)、エフェクターメモリー T 細胞 (C D 4 5 R A - C D 6 2 L - 細胞)、及びターミナルエフェクター T 細胞 (C D 4 5 R A + C D 6 2 L - 細胞) が挙げられる。

[0026] ヒト T 細胞は、ヒトの組織から公知の手法により単離することができる。ヒトの組織としては、前記 T 細胞を含む組織であれば特に制限はないが、例えば、末梢血、リンパ節、骨髓、胸腺、脾臓、臍帯血、病変部組織が挙げられる。これらの中では、ヒトに対する侵襲性が低く、調製が容易であるという観点から、末梢血、臍帯血が好ましい。ヒト T 細胞を単離するための公知の手法としては、例えば、後述の実施例に示すような C D 4 等の細胞表面マーカーに対する抗体と、セルソーターとを用いたフローサイトメトリーが挙げられる。また、サイトカインの分泌や機能性分子の発現を指標に、所望の T 細胞を単離することも出来る。かかる場合、例えば、T 細胞は、T h 1 タイプか T h 2 タイプかで分泌されるサイトカインが異なるので、そのようなサイトカインを指標に選別して、所望の T h タイプを有する T 細胞を単離することができる。また、グランザイムやパーフォリンなどの分泌又は産生を指標として、細胞傷害性 (キラー) T 細胞を単離することが出来る。

[0027] WT1 抗原特異的な細胞障害性 T 細胞は、ヒトより常法により取得したリンパ球を、WT1 抗原またはそのエピトープペプチドにて刺激して得ることができる。WT1 抗原のエピトープペプチドは複数が同定されており、WT1 特異的細胞障

害性T細胞を誘導する方法も良く知られている。または、WT1抗原を発現するがん細胞を用いてリンパ球を刺激してもよい。

[0028] WT1抗原特異的細胞傷害性T細胞は、WT1抗原を発現する癌に罹患している患者またはかかる癌の既往のある対象の細胞から誘導しても、健常人から誘導してもよい。

[0029] EBウイルス関連抗原特異的な細胞障害性T細胞は、ヒトより常法により取得したリンパ球を、EBウイルス関連抗原、例えばLMP2抗原またはそのエピトープペプチドにて刺激して得ることができる。EBウイルス関連抗原のエピトープペプチドは複数が同定されており、EBウイルス関連抗原特異的細胞障害性T細胞を誘導する方法も良く知られている。または、EBウイルス関連抗原を発現するがん細胞を用いてリンパ球を刺激してもよい。

[0030] EBウイルス関連抗原特異的細胞傷害性T細胞は、EBウイルス感染症やEBウイルス関連のがんを発症した患者の細胞から誘導しても、EBウイルスキャリアの健常人から誘導しても、EBウイルスに感染した経験のない健常人から誘導してもよい。

[0031] 一般に抗原特異的なT細胞は感染症やがんの患者本人から採取することが考えられている。それは、抗原特異的T細胞は感染症やがん患者の体内で増幅されており、特定の反応性のT細胞を検出／採取しやすいと考えられているからである。本願ではそのように疾病を有する患者から疾病に関連する抗原に特異的なT細胞を採取し、それを他家移植用のT-iPS細胞の材料にする方法を提供する。一方で、本願においては健常人から抗原特異的T細胞を得る方法も提供する。健常人のT細胞から得たT-iPS細胞を用いることにより、下記の効果が得られる：

1) 健常人の細胞から種々の抗原特異的T細胞を誘導することができるため、予め多くの種類のTCR遺伝子を有するT-iPS細胞をつくっておくことができる。

2) 健常人を対象とするので、T-iPSバンクを作製にあたってドナーを集めやすい。

[0032] 特定の抗原特異的ヒトT細胞を単離する場合、「WT1抗原特異的またはEBウイルス関連抗原特異的なT細胞を含むヒト培養細胞またはヒトの組織より、目的の抗原を固定化したアフィニティカラム等を用いて精製する方法を採用することができる。また、所望の抗原を結合させたMHC（主要組織適合遺伝子複合体）を4量体化させたもの（いわゆる「MHCテトラマー」）を用いて、ヒトの組織より特定の抗原特異性、例えばWT1抗原やEBウイルス関連抗原に特異性を有するT細胞を精製する方法も採用することができる。

[0033] 上記のごとく得られるWT1またはEBウイルス関連抗原特異的なT細胞から多能性幹細胞を誘導する。T細胞から多能性幹細胞細胞を得るには、例えばVizcardo et al., Cell Stem Cell 12, 31-36 2013に記載の方法を持ちいてもよい。例えば治療対象とする疾患に対する免疫を獲得した対象から所望の抗原特異的T細胞を得、この細胞へヤマナカ因子を導入してT-iPS細胞を得ることができる（Takahashi and Yamanaka, Cell 126, 663-673 (2006), Takahashi et al., Cell 131, 861-872(2007) and Grskovic et al., Nat. Rev. Drug Discov. 10, 915-929(2011)）。

[0034] 人工多能性幹(iPS)細胞は、特定の初期化因子を、体細胞に作用させることによって作製することができる、ES細胞とほぼ同等の特性を有する体細胞由来の人工の幹細胞である（K. Takahashi and S. Yamanaka (2006) Cell, 126:663-676; K. Takahashi et al. (2007), Cell, 131:861-872; J. Yu et al. (2007), Science, 318:1917-1920; Nakagawa, M.ら, Nat. Biotechnol. 26:101-106 (2008); 国際公開WO 2007/069666）。初期化因子は、ES細胞に特異的に発現している遺伝子、その遺伝子産物もしくはnon-coding RNAまたはES細胞の未分化維持に重要な役割を果たす遺伝子、その遺伝子産物もしくはnon-coding RNA、あるいは低分子化合物によって構成されてもよい。初期化因子に含まれる遺伝子として、例えば、Oct3/4、Sox2、Sox1、Sox3、Sox15、Sox17、Klf4、Klf2、c-Myc、N-Myc、L-Myc、Nanog、Lin28、Fbx15、ERas、ECAT15-2、Tcl1、beta-catenin、Lin28b、Sall1、Sall4、Esrrb、Nr5a2、Tbx3または

Glis1等が例示され、これらの初期化因子は、単独で用いても良く、組み合わせて用いても良い。初期化因子の組み合わせとしては、W02007/069666、W02008/118820、W02009/007852、W02009/032194、W02009/058413、W02009/057831、W02009/075119、W02009/079007、W02009/091659、W02009/101084、W02009/101407、W02009/102983、W02009/114949、W02009/117439、W02009/126250、W02009/126251、W02009/126655、W02009/157593、W02010/009015、W02010/033906、W02010/033920、W02010/042800、W02010/050626、W02010/056831、W02010/068955、W02010/098419、W02010/102267、W02010/111409、W02010/111422、W02010/115050、W02010/124290、W02010/147395、W02010/147612、Huangfu D, et al. (2008), Nat. Biotechnol., 26: 795-797、Shi Y, et al. (2008), Cell Stem Cell, 2: 525-528、Eminli S, et al. (2008), Stem Cells. 26:2467-2474、Huangfu D, et al. (2008), Nat Biotechnol. 26:1269-1275、Shi Y, et al. (2008), Cell Stem Cell, 3, 568-574、Zhao Y, et al. (2008), Cell Stem Cell, 3:475-479、Marson A, (2008), Cell Stem Cell, 3, 132-135、Feng B, et al. (2009), Nat Cell Biol. 11:197-203、R.L. Judson et al., (2009), Nat. Biotechnol., 27:459-461、Lyssiotis CA, et al. (2009), Proc Natl Acad Sci U S A. 106:8912-8917、Kim JB, et al. (2009), Nature. 461:649-643、Ichida JK, et al. (2009), Cell Stem Cell. 5:491-503、Heng JC, et al. (2010), Cell Stem Cell. 6:167-74、Han J, et al. (2010), Nature. 463:1096-100、Mali P, et al. (2010), Stem Cells. 28:713-720、Maekawa M, et al. (2011), Nature. 474:225-9.に記載の組み合わせが例示される。（本段落に記載の文献は引用により本願の一部を構成する）

[0035] 初期化因子は、その形態に応じた公知の方法にて体細胞へ接触、または体細胞内へ導入すればよい。

[0036] タンパク質の形態の場合、例えばリポフェクション、細胞膜透過性ペプチド（例えば、HIV由来のTATおよびポリアルギニン）との融合、マイクロインジェクションなどの手法によって体細胞内に導入してもよい。

[0037] DNAの形態の場合、例えば、ウイルス、プラスミド、人工染色体などのベクター、リポフェクション、リポソーム、マイクロインジェクションなどの手法によって体細胞内に導入することができる。ウイルスベクターとしては、レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクター（以上、Cell, 126, pp.663-676, 2006; Cell, 131, pp.861-872, 2007; Science, 318, pp.1917-1920, 2007）、アデノウイルスベクター（Science, 322, 945-949, 2008）、アデノ随伴ウイルスベクター、センダイウイルスベクター（WO 2010/008054）などが例示される。また、人工染色体ベクターとしては、例えばヒト人工染色体（HAC）、酵母人工染色体（YAC）、細菌人工染色体（BAC、PAC）などが含まれる。プラスミドとしては、哺乳動物細胞用プラスミドを使用しうる（Science, 322:949-953, 2008）。ベクターには、核初期化物質が発現可能なように、プロモーター、エンハンサー、リボゾーム結合配列、ターミネーター、ポリアデニル化サイトなどの制御配列を含むことができるし、さらに、必要に応じて、薬剤耐性遺伝子（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など）、チミジンキナーゼ遺伝子、ジフテリアトキシン遺伝子などの選択マーカー配列、緑色蛍光タンパク質（GFP）、 β グルクロニダーゼ（GUS）、FLAGなどのレポーター遺伝子配列などを含むことができる。また、上記ベクターには、体細胞へ一旦導入して作用させた後、初期化因子をコードする遺伝子もしくはプロモーターとそれに結合する初期化因子をコードする遺伝子を共に切除するために、それらの前後にLoxP配列を有してもよい。（本段落に記載の文献は引用により本願の一部を構成する）

[0038] 初期化因子がRNAの形態の場合、例えばリポフェクション、マイクロインジェクションなどの手法によって体細胞内に導入しても良い。分解を抑制するため、5-メチルシチジンおよびpseudouridine（TriLink Biotechnologies）を取り込ませたRNAを初期化因子として用いても良い（Warren L, (2010) Cell Stem Cell, 7:618-630）。（本段落に記載の文献は引用により本願の一部を構成する）

[0039] iPS細胞誘導のための培養液は、例えば、10～15%FBSを含有するDMEM、DME

M/F12又はDME培養液（これらの培養液にはさらに、LIF、penicillin/streptomycin、puromycin、L-グルタミン、非必須アミノ酸類、 β -メルカプトエタノールなどを適宜含むことができる。）または市販の培養液[例えば、マウスES細胞培養用培養液(TX-WES培養液、トロンボX社)、霊長類ES細胞培養用培養液（霊長類ES/iPS細胞用培養液、リプロセル社）、無血清培地（mTeSR、Stem cell Technology社）]などが例示される。

[0040] iPS細胞誘導の例としては、たとえば、37℃、5%CO₂存在下にて、10%FBS含有DMEM又はDMEM/F12培養液上で体細胞と初期化因子とを接触させ約4～7日間培養し、その後、細胞をフィーダー細胞(たとえば、マイトマイシンC処理ST0細胞、SNL細胞等)上にまきなおし、体細胞と初期化因子の接触から約10日後からbFGF含有霊長類ES細胞培養用培養液で培養することによって、該接触から約30～約45日又はそれ以上ののちにES様コロニーを生じさせることができる。

[0041] あるいは、37℃、5% CO₂存在下にて、フィーダー細胞(たとえば、マイトマイシンC処理ST0細胞、SNL細胞等)上で10%FBS含有DMEM培養液（これにはさらに、LIF、ペニシリン/ストレプトマイシン、ピューロマイシン、L-グルタミン、非必須アミノ酸類、 β -メルカプトエタノールなどを適宜含むことができる。）で体細胞と初期化因子を接触させて培養し、約25～約30日又はそれ以上ののちにES様コロニーを生じさせることができる。望ましくは、フィーダー細胞の代わりに、初期化される体細胞そのものを用いる（Takahashi K, et al. (2009), PLoS One. 4:e8067またはW02010/137746）、もしくは細胞外基質（例えば、Laminin-5 (W02009/123349)、Laminin-10 (US2008/0213885)、その断片 (W02011/043405) およびマトリゲル (BD社)）を用いる方法が例示される。（本段落に記載の文献は引用により本願の一部を構成する）

[0042] この他にも、血清を含有しない培地を用いてiPS細胞を樹立する方法も例示される（Sun N, et al. (2009), Proc Natl Acad Sci U S A. 106:15720-15725）。さらに、樹立効率を上げるため、低酸素条件（0.1%以上、15%以下の酸素濃度）によりiPS細胞を樹立しても良い（Yoshida Y, et al. (2009), Ce

ll Stem Cell, 5:237-241またはW02010/013845)。(本段落に記載の文献は引用により本願の一部を構成する)

[0043] iPS細胞の樹立効率を高めるための成分として、ヒストンデアセチラーゼ (HDAC) 阻害剤 [例えば、バルプロ酸 (VPA)、トリコスタチンA、酪酸ナトリウム、MC 1293、M344等の低分子阻害剤、HDACに対するsiRNAおよびshRNA (例、HDAC1 siRNA Smartpool・ (Millipore)、HuSH 29mer shRNA Constructs against HDAC1 (OriGene)等) 等の核酸性発現阻害剤など]、MEK阻害剤 (例えば、PD184352、PD98059、U0126、SL327およびPD0325901)、Glycogen synthase kinase-3阻害剤 (例えば、BioおよびCHIR99021)、DNAメチルトランスフェラーゼ阻害剤 (例えば、5-azacytidine)、ヒストンメチルトランスフェラーゼ阻害剤 (例えば、BIX-01294 等の低分子阻害剤、Suv39h1、Suv39h2、SetDB1およびG9aに対するsiRNAおよびshRNA等の核酸性発現阻害剤など)、L-channel calcium agonist (例えばBayk8644)、酪酸、TGF β 阻害剤またはALK5阻害剤 (例えば、LY364947、SB431542、616453およびA-83-01)、p53阻害剤 (例えばp53に対するsiRNAおよびshRNA)、ARID3A阻害剤 (例えば、ARID3Aに対するsiRNAおよびshRNA)、miR-291-3p、miR-294、miR-295およびmir-302などのmiRNA、Wnt Signaling (例えばsoluble Wnt3a)、神経ペプチドY、プロスタグランジン類 (例えば、プロスタグランジンE2およびプロスタグランジンJ2)、hTERT、SV40LT、UTF1、IRX6、GLIS1、PITX2、DMRTB1等が知られている。iPS細胞の樹立の際にはかかる樹立効率の改善目的にて用いられる成分を添加した培養液を用いてもよい。

[0044] 上記培養の間には、培養開始2日目以降から毎日1回新鮮な培養液と培養液交換を行う。核初期化に使用する体細胞の細胞数は、限定されないが、培養ディッシュ100cm²あたり約 5×10^3 ～約 5×10^6 細胞の範囲である。

[0045] iPS細胞は、形成したコロニーの形状により選択することが可能である。一方、体細胞が初期化された場合に発現する遺伝子 (例えば、Oct3/4、Nanog) と連動して発現する薬剤耐性遺伝子をマーカー遺伝子として導入し、対応する薬剤を含む培養液 (選択培養液) で培養を行うことにより樹立したiPS細胞

を選択することができる。また、マーカー遺伝子として蛍光タンパク質遺伝子を導入し、蛍光顕微鏡で観察することによって、発光酵素遺伝子の場合は発光基質を加えることによって、iPS細胞を選択することができる。誘導されたiPS細胞（T-iPS細胞）は由来するT細胞のT細胞受容体遺伝子を維持する。

[0046] 本願の第2の態様においては、WT1遺伝子またはEBウイルス関連抗原特異的TCRの遺伝子を多能性幹細胞へ導入する。

種々のがんについてWT1やEBウイルスに対する抗原特異的TCR遺伝子が報告されている(例えばAnticancer Research 32(12); 5201-5209, 2012 および Jurgens et al, Journal of Clinical Investigation, 26:22, 2006)。TCR遺伝子はまた、所望の抗原特異的T細胞をがん患者や感染症患者から単離または誘導し、当該T細胞からTCRの遺伝子を単離してもよい。本願においては、所望の抗原特異的TCR遺伝子をドナー細胞から誘導された多能性幹細胞、例えばiPS細胞へ導入する。TCR遺伝子のiPS細胞への導入は常套の方法で行えばよく、例えばMorgan R.A. et al, Science, 314:126, 2006に記載の方法に準じて行えば良い。具体的にはTCR遺伝子を適当なベクターに載せてiPS細胞へ導入すればよい。例えば、ウイルス、プラスミド、人工染色体などのベクター、リポフェクション、リポソーム、マイクロインジェクションなどの手法によって体細胞内に導入することができる。ウイルスベクターとしては、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、センダイウイルスベクターなどが例示される。また、人工染色体ベクターとしては、例えばヒト人工染色体(HAC)、酵母人工染色体(YAC)、細菌人工染色体(BAC、PAC)などが含まれる。プラスミドとしては、哺乳動物細胞用プラスミドを使用する。ベクターには、TCRが発現可能なように、プロモーター、エンハンサー、リボゾーム結合配列、ターミネーター、ポリアデニル化サイトなどの制御配列を含むことができるし、さらに、必要に応じて、薬剤耐性遺伝子(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など)、チミジンキナーゼ遺伝子、ジフテリアトキシン遺伝子な

どの選択マーカー配列、緑色蛍光タンパク質(GFP)、 β グルクロニダーゼ(GUS)、FLAGなどのレポーター遺伝子配列などを含むことができる。

[0047] 所望のTCR遺伝子を有している多能性幹細胞を、T前駆細胞または成熟T細胞へと分化誘導する。多能性幹細胞からT細胞への分化誘導方法としては、例えばTimmermans et al., Journal of Immunology, 2009, 182: 6879-6888 に記載の方法が挙げられる。

[0048] 本明細書ならびに請求の範囲において「T前駆細胞」とは、造血細胞の中の最も未分化な細胞である造血幹細胞に相当する段階から、正の選択/負の選択を受ける直前の細胞の段階に相当するまでを含む。T細胞の分化についてはBlood 111:1318 (2008) およびNature Immunology 11: 585 (2010) に説明されている。

[0049] T細胞には大きく分けて $\alpha\beta$ T細胞と $\gamma\delta$ T細胞があり、 $\alpha\beta$ T細胞にはキラーT細胞とヘルパーT細胞が含まれる。本願は全てのT細胞を対象とする。T細胞はT前駆細胞およびT成熟細胞のいずれをも含むものとし、好ましくはCD3を発現しており、且つCD4及びCD8からなる群から選択される少なくとも一の分子が発現しているT細胞を言うものとする。

[0050] いろいろな種類の固形がんや血液系のがんで高率にWT1抗原の発現が確認されている。本願は、かかるWT1抗原を発現する癌の免疫細胞療法へ応用することができる。

[0051] 本願によって、WT1がん抗原やEB関連抗原、例えばLMP2をターゲットとするT細胞製剤が提供される。具体例として、健常人のWT1抗原特異的T細胞やLMP2抗原特異的T細胞に由来するT-iPS細胞を作製し、そのT-iPS細胞から作製したT細胞を用いることができる。T-iPS細胞が由来する健常人の細胞を用いてそのT-iPS細胞から再生されたT細胞の機能を確認した上で、そのT-iPS細胞をバンク化して保存しておく。

治療対象とするのはWT1抗原を発現するがんにかかった患者のHLAを調べ、バンク化したT-iPS細胞から適合するHLA由来の細胞を選択し、当該T-iPS細胞から作製したT細胞を用いて細胞免疫治療が可能である。T-iPS細胞を予めT細胞

まで分化誘導させた上で凍結保存しておけば、より多くの患者により迅速に投与できる。また投与した細胞はいずれ拒絶されるので投与細胞のがん化のリスクは考えなくてよい。

[0052] 本願の免疫細胞療法においては、誘導されたT細胞を適当な媒体、例えば生理的食塩水やPBSに懸濁してHLAが一定以上一致する対象とする患者へ投与する。ドナーと患者とのHLA型は、完全に一致する場合、ドナーがHLAハプロタイプホモの場合には、少なくともその一方のHLAハプロタイプが一致する場合が例示される。患者への投与は経静脈的に行えばよい。投与量は限定的ではないが、成熟T細胞とする場合には 10^6 - 10^7 細胞/kgで、1回ないし複数回、患者へ経静脈投与する。T前駆細胞とする場合には、その10分の1-1000分の1程度の投与量でよい。

[0053] 投与細胞数は特に限定されず、患者の年齢、性別、身長、体重、対象疾患、症状等に応じて適宜定めればよい。最適な投与細胞数は臨床試験により適宜決定すればよい。

T細胞は多様な抗原を攻撃対象とすることができ、本願の方法はがん、感染症、自己免疫疾患、アレルギーなどいろいろな疾患を対象とした免疫細胞療法への応用が可能である。

[0054] WT1遺伝子は、例えば、白血病、骨髓異形成症候群、多発性骨髄腫、悪性リンパ腫などの造血器腫瘍、胃癌、大腸癌、肺癌、乳癌、胚細胞癌、肝癌、皮膚癌、膀胱癌、前立腺癌、子宮癌、子宮頸癌、卵巣癌などの固形癌において天然型で高発現しており、WT1特異的なT-iPS細胞またはTCR-iPS細胞からCTL細胞を分化誘導した細胞を用いる場合には、WT1遺伝子を発現するこれら種々の癌の免疫細胞療法への応用が可能である。

[0055] また、Epstein-Barr (EB) ウイルスは多様な病気の原因になるウイルスであるが、伝染性単核球症、悪性リンパ腫（バーキットリフォーマ）、上咽頭がんなどのがんの原因ともなる。EBウイルス関連抗原であるLMP2抗原特異的なTCRを有するT-iPS細胞またはTCR-iPS細胞からCTL細胞を分化誘導した細胞を用いる場合には、EBウイルス関連の感染症や

癌、例えばホジキン病、バーキットリンパ腫、鼻咽頭癌、一部の胃癌、移植後の免疫療法への応用が可能である。

実施例 1

[0056] E Bウイルス感染患者より得た末梢血単核球由来のLMP2抗原に特異性を有するT細胞よりT-iPS細胞を誘導し（クローンLMP2#1）、当該T-iPS細胞よりLMP2抗原特異的CTL（再生LMP2-CTL#1）を誘導した。

[0057] E Bウイルスは急性期には伝染性単核球症の原因となり、また時にバーキットリンパ腫などのがんの原因ともなるウイルスである。実施例でT細胞を提供しているのは、E Bウイルスに感染歴のある健常人である。このウイルスは、感染後リンパ球内に生涯にわたってとどまるので、この提供者はいわゆるE Bウイルスキャリアーである。従ってこの提供者は、発症はしていないが、慢性ウイルス感染者とみなすことができる。

[0058] 1) LMP2抗原特異的細胞傷害性Tリンパ球（CTL）の増幅

i)以下の培地を用いた。

樹状細胞用培地: CellGro (CellGenix)

[表1]

T細胞用培地		
	配合量	培地中の最終濃度
RPMI	45ml	
human AB serum	5ml	10%
Total	50ml	

ii) 以下のLMP2ペプチドを用いた。

LMP2: IYVLVMLVL（配列番号1）

LMP2テトラマーはMBLより購入した。

iii)以下のLCL(Lymphoblastoid cell line)を用いた。

京都大学病院血液腫瘍内科（日本国京都府京都市）にて健常人ボランティアAから採取されたHLA-A2402を有するLCLを用いた。健常人ボランティアAはEBウイルス既感染者であり、そのHLA型はHLA-A*02:06/24:02 ; B*39:01/40:02; C*07:02/15:02; DRB1*04:10/09:01である。

[0059] A. ヒト末梢血より単球由来樹状細胞の誘導

1. HLA-A2402を有しかつEBウイルス既感染者でもある健常人ボランティアAの末梢血よりCD14 microbeadsを用いて単球を単離した。洗浄後、樹状細胞用培地を加え、 $5 \times 10^5/\text{mL}$ に調整した。
 2. 最終濃度GM-CSF 800 U/mL (or 50 ng/mL)、IL-4 200 U/mL (or 40 ng/mL)になるようサイトカインを加えた。6-well plateに5 mL/wellでまく。37℃、5% CO₂でインキュベートした。
 3. インキュベートを3日間（以下“Day 3”様に記載する）した後に、培養上清を2.5 mL/wellずつ、静かに取って捨てた。新しい樹状細胞用培地にGM-CSFを800 U/mL、IL-4を200 U/mLの濃度になるように加えた。
 4. 各wellに3 mLずつ、新しい樹状細胞用培地を加えた。
 5. Day 6に未成熟MoDCをプレートから回収し、少量の新しい樹状細胞用培地に浮遊させた。
 6. $5 \times 10^5/\text{mL}$ になるように細胞濃度を調整した。
 7. GM-CSF（以下、最終濃度：800 U/mL）、IL-4（200 U/mL）、TNF- α （10 ng/mL）、PGE2（1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）を加え、24穴プレートに約 $5 \times 10^5/1 \text{ mL}/\text{well}$ で細胞を播種した。
 8. 37℃、5% CO₂で24時間培養した。
 9. 上記培養の最後の2時間にペプチドを加えた。ペプチドの最終濃度は10 μm とした。
- DCを回収し、T細胞用培地で2回洗浄した。
10. DCの細胞数を数え、T細胞用培地で $2 \times 10^5/\text{mL}$ に調製した。

[0060] B. ヒト末梢血よりT細胞の単離と樹状細胞との共培養

1. Aと同一の健常人ボランティアの末梢血より、CD3 microbeadsを用いてMACSにてT細胞を単離した。洗浄後、T細胞用培地を加え、 $2 \times 10^6/\text{mL}$ に調整した。この時一部の細胞をフローサイトメトリ解析のために取り分けた。
2. 24穴プレートに、DC浮遊液（ $2 \times 10^5/\text{mL}$ ）を0.5mL/well、T細胞浮遊液（ $2 \times 10^5/\text{mL}$ ）を0.5mL/wellとなるように加えた。（DC：T = $1 \times 10^5/\text{well}$ ： $1 \times$

$10^6/\text{well} = 1:10$)

3. 3日目にIL-7（最終濃度5 ng/mL）、IL-15（最終濃度 10 ng/mL）を加えた。
4. 14日目に細胞を回収した。

[0061] C. LCLへのペプチド添加

1. LCLを培養中から回収し、35Gyの放射線照射を行った。
2. T細胞用培地に浮遊させ、 $5 \times 10^5/\text{mL}$ となるように調整した。
3. ペプチドを100nMで添加し2時間培養した。
4. LCLを回収し、T細胞用培地で洗浄後、 $2 \times 10^5/\text{mL}$ となるように調整した。

[0062] D. LCLと樹状細胞で刺激したT細胞の共培養

1. 樹状細胞で刺激したT細胞をT細胞用培地に浮遊させ、 $2 \times 10^6 \text{ cells/mL}$ の濃度に懸濁した。
2. 24穴プレートに、ペプチドを加えて培養したLCL浮遊液（ $2 \times 10^5/\text{mL}$ ）を0.5mL/well、T細胞浮遊液（ $2 \times 10^5/\text{mL}$ ）を0.5mL/wellとなるように加えた（LCL:T = $1 \times 10^5/\text{well} : 1 \times 10^6/\text{well} = 1:10$ ）。同時にペプチドを100nMとなるように添加した。
3. 3日目にIL-7（最終濃度5 ng/mL）、IL-15（最終濃度 1 ng/mL）を加えた。1週間ごとにサイトカインを添加したT細胞用培地で培地交換しながら2週間培養を行った。（LCLによるペプチド刺激1クール目）
4. 再度100nMのペプチドと加えた培地でLCLを2時間培養し、ここに CTLを加えた。
5. 3日目にIL-7（最終濃度5 ng/mL）とIL-15（最終濃度 1 ng/mL）を加えた。1週間ごとにサイトカインを添加したT細胞用培地で培地交換しながら2週間培養を行った。（LCLによるペプチド刺激2クール目）
6. フローサイトメトリー解析により、CD8陽性T細胞中にCD8陽性LMP-2テトラマー陽性細胞が80%以上の割合で検出されることを確認した。結果を図1に示す。

[0063] E. LMP2特異的CTLの抗原特異的キラー活性の測定

1. 標的細胞として用いるOUN-1白血病細胞株をCFSEラベルし、T細胞用培地に懸濁後、LMP2ペプチド1nM存在下で2時間培養を行った。
2. 96穴U底プレートに、ペプチド刺激によって増殖したLMP2特異的キラーT細胞とOUN-1白血病細胞株をそれぞれ0:1、1:9、1:3、1:1、3:1となるように混合し、ペプチド存在下もしくは非存在下において標的細胞の死細胞比率をCFSE陽性分画中に見られるAnnexinVとPI(Propidium Iodide)の比率によって検定した。結果を図2に示す。
3. LMP2特異的キラーT細胞は標的細胞に対し、抗原特異的キラー活性を示すことを確認した。

[0064] 2) LMP2-T-iPS細胞の樹立

A. LMP2特異的CTLの活性化

1. MACS beadsによりCD8陽性細胞を濃縮した。
2. 全ての細胞をT細胞用培地に浮遊させ、IL-7（最終濃度5 ng/mL）、IL-15（最終濃度 10 ng/mL）を加えた。さらにDynabeads Human T-Activator CD3/CD28をT細胞:beadsが1:1となるように添加し、2日間培養することでCD8陽性細胞を活性化した。

[0065] B. センダイウィルスによる山中4因子とSV40の導入

1. 活性化させたLMP2特異的CTLをT細胞用培地に浮遊させ、山中4因子とSV40が組み込まれたセンダイウィルスを培地中に添加し、そのまま2日間培養した。
2. T細胞用培地で洗浄し、さらにIL-7（最終濃度5 ng/mL）、IL-15（最終濃度 1ng/mL）を加えたT細胞用培地で2日間培養した。
3. 全ての細胞を回収後、IL-7（最終濃度5 ng/mL）、IL-15（最終濃度 1ng/mL）を添加したT細胞用培地でT細胞を懸濁し、フィーダー細胞上に播種した。
4. 2日目にiPS細胞用培地にて半量交換し、翌日から毎日iPS細胞用培地への半量交換を行い続け、培養を続けた。

[0066] C. iPS細胞コロニーのピックアップ

1. 培養3週間後にiPS細胞コロニーを目視により確認した。
2. 200 μ Lチップによりコロニーを物理的に拾い上げた。
3. 各クローンを個別にiPS細胞として樹立した。得られたクローンの写真を図3に示す。

[0067] 3) LMP2-iPS細胞からT細胞への分化誘導

各培地として下記の組成を用いた。

[表2]

medium A (OP9ストローマ細胞維持用)		最終濃度
α MEM	500mL	
FCS	125mL	(20%)
ペニシリン/ストレプトマイシン溶液	6.25mL	(1%)
Total	631.25mL	

*ペニシリン/ストレプトマイシン溶液は、ペニシリン10000U/mLおよびストレプトマイシン10000 μ g/mLからなり、それぞれの最終濃度を100U/mLおよび100 μ g/mLとした。

[0068] [表3]

medium B (T細胞分化誘導用)		(最終濃度)
α MEM	500mL	
FCS	125mL	(20%)
ペニシリン/ストレプトマイシン溶液	5mL	(1%)
hrIL-7 (stock: 10 μ g/ml)	315 μ L	(5ng/mL)
hrFlt-3L (stock: 10 μ g/ml)	315 μ L	(5ng/mL)
hrSCF (stock: 10 μ g/ml)	630 μ L	(10ng/mL)
Total	631.26mL	

*ペニシリン/ストレプトマイシン溶液は、ペニシリン10000U/mLおよびストレプトマイシン10000 μ g/mLからなり、それぞれの最終濃度を100U/mLおよび100 μ g/mLとした。

[0069]

[表4]

medium C (未熟T細胞から成熟T細胞誘導用)	(最終濃度)	
α MEM	500mL	
FCS	125mL	(20%)
ペニシリン/ストレプトマイシン溶液	5mL	(1%)
hrIL-7 (stock: 10 μ g/ml)	315 μ L	(5ng/mL)
Total	630.315mL	

*ペニシリン/ストレプトマイシン溶液は、ペニシリン100000U/mLおよびストレプトマイシン10000 μ g/mLからなり、それぞれの最終濃度を100U/mLおよび100 μ g/mLとした。

[0070] OP9細胞の準備

0.1%ゼラチン/PBS溶液6mlを10cm培養ディッシュに入れ、37°Cで30分以上静置した。コンフルエントになったOP9細胞をトリプシン/EDTA溶液で剥がし、1/4相当量をゼラチンコートした10cm培養ディッシュに播種した。培地はmedium Aを10mlとなるように加えた。

4日後に播種したOP9細胞培養ディッシュに新たにmedium Aを10ml加え、全量が20mlとなるようにした。

[0071] iPS細胞からの血球前駆細胞誘導

共培養に使用するOP9細胞の培地を吸引し、新しいmedium Aに交換した。またiPS細胞培養ディッシュの培地も同様に吸引し、新しいmedium Aを10ml加えた。EZ-passageローラーでiPS細胞塊を切った。カットしたiPS細胞塊を200 μ lピペットマンでピペッティングすることで浮遊させ、目視でおおよそ600個のiPS細胞塊をOP9細胞上に播種した。

iPS細胞1クローンあたり3枚以上のディッシュを用い、継代するときには細胞を一度一つに合わせてから同じ枚数に再分配することでディッシュ間のばらつきを減らした。

[0072] Day 1 (培地交換)

iPS細胞塊が接着し分化し始めているかどうかを確認し、培地を新しいmedium A 20mlに交換した。

Day 5 (培地半量交換)

半量分の培地を新しいmedium A 10mlに交換した。

Day 9 (培地交換)

半量分の培地を新しいmedium A 10mlに交換した。

Day 13 (誘導した中胚葉細胞をOP9細胞上からOP9/DLL1細胞上へ移しかえる)

培地を吸引し、HBSS(+Mg+Ca)で細胞表面上の培地を洗い流した。その後250U collagenase IV/HBSS(+Mg+Ca) 溶液10mlを加え、37℃で45分間培養した。

[0073] Collagenase溶液を吸引し、PBS(-)10mlで洗い流した。その後5mlの0.05%トリプシン/EDTA溶液を加え、37℃で20分培養した。培養後、細胞が膜状に剥がれてくるのでピペッティングにより物理的に細かくした(接着細胞同士を離すため)。ここに新しいmedium Aを20ml加え、さらに37℃で45分間培養した。培養後、浮遊細胞を含む上清を、100 μ mのメッシュを通して回収した。4℃、1200rpmで7分間遠心し、ペレットを10mlのmedium Bに懸濁させた。このうち1/10をFACS解析用にとりわけ、残りの細胞を新たに用意したOP9/DLL1細胞上に播種した。複数枚のディッシュから得た細胞をプールした場合、元々の枚数と同じ枚数になるように再分配して細胞を播き直した。

[0074] 得られた細胞に造血前駆細胞が含まれているかどうかを確認するために抗CD34抗体、抗CD43抗体を用いてFACS解析した。結果を図4に示す。CD34^{low}CD43⁺細胞分画に十分な細胞数が確認できたことから、造血前駆細胞が誘導されていると確認した。

[0075] C. 血球前駆細胞からのT細胞分化誘導

次いで細胞をOP9/DLL1細胞上に播種した。この工程において、CD34^{low}CD43⁺細胞分画の細胞のソーティングは行わなかった。(この分画をソーティングした場合、得られる細胞数が減少してしまうことやソーティングによる細胞へのダメージから、ソーティングしなかった場合に比べてT細胞への分化誘導効率が落ちることがある。)

[0076] 培養期間中に分化段階を確認するためにFACS解析を行うが、全ての期間において培養中に死細胞が多くみられた。そのためFACS解析時にはPI (Propidi

um Iodide)、7-AADなどを用い、死細胞除去したうえで解析を行った。

[0077] Day 16 (細胞の継代)

OP9細胞に緩く接着している細胞を、穏やかに複数回ピペティングし、100 μ mのメッシュを通して50mlコニカルチューブに回収した。4°C、1200rpmで7分間遠心し、ペレットを10mlのmedium Bに懸濁させた。これらの細胞を新たに用意したOP9/DLL1細胞上に播種した。

[0078] Day 23 (細胞の継代): 血液細胞コロニーが見え始める。

OP9細胞に緩く接着している細胞を、穏やかに複数回ピペティングし、100 μ mのメッシュを通して50mlコニカルチューブに回収した。4°C、1200rpmで7分間遠心し、ペレットを10mlのmedium Bに懸濁させた。

[0079] Day 36: LMP2テトラマー陽性T細胞の確認。

LMP2特異的T細胞が誘導されているかどうかを確かめるために抗CD3抗体、LMP2テトラマーを用いてFACS解析した。

結果を図5に示す。T細胞マーカーであるCD3⁺細胞がみられるようになり、一部の細胞はCD3⁺LMP2テトラマー⁺にまで分化していることが確認された。

[0080] D. 未熟T細胞段階から成熟キラーT細胞段階への誘導

Day36において、フローサイトメトリーでLMP2陽性T細胞を確認後、成熟キラーT細胞(CD8SP細胞)を誘導するためにここでIL-15を添加した。24穴プレートに新たにOP9/DLL1細胞を用意しておき、medium Cに懸濁したT細胞を3x10⁵個/wellとなるように播種し。ここにIL-15(最終濃度10ng/mL)を添加した。

[0081] Day41: 成熟キラーT細胞が現れる。

IL-15添加の5日目に、FACS解析した。結果を図6に示す。成熟CD8シングルポジティブ細胞が生成したことが確認された。

[0082] 4) 再生したLMP2特異的CTLの抗原特異的キラー活性の測定

1. 標的細胞として用いるLCLをCFSEラベルし、T細胞用培地に懸濁後、LMP2ペプチド1nM存在下で2時間培養を行った。

2. 96穴U底プレートに、再生したCD8T細胞と標的細胞として用いるLCLをれ

ぞれ0:1、1:9、 1:3、 1:1、 3:1、10:1、30:1となるように混合し、ペプチド存在下 (p+) もしくは非存在下 (p-) において標的細胞の死細胞比率をCFSE陽性分画中に見られるAnnexinVとPI(Propidium Iodide)によって検定した。

3. 結果を図7に示す。LMP2特異的キラーT細胞は標的細胞として用いたLCL (HLA-A2402) に対し、抗原特異的キラー活性を示すことが確認された。

[0083] 5) 再生したLMP2特異的CTLのナチュラルキラー細胞様キラー活性の測定

1. 標的細胞としてHLAを表面に発現しないK562細胞株 (アロ反応性) と健康人ボランティアAの自己末梢単核球 (MA p-) (オート反応性) を用いた。これらの細胞をCFSEにてラベルし、T細胞用培地に懸濁した。

2. 96穴U底プレートに、再生したCD8 T細胞と標的細胞として用いるLCLをそれぞれ0:1、1:9、 1:3、 1:1、 3:1となるように混合し、標的細胞の死細胞比率をCFSE陽性分画中に見られるAnnexinVとPI(Propidium Iodide)によって検定した。

3. 結果を図8に示す。LMP2特異的キラーT細胞は自己末梢単核球 (MA p-) は傷害しなかったが、K562に対して高いキラー活性を示したことから、ナチュラルキラー様キラー活性を示すことを確認した。

[0084] 6) 再生したLMP2特異的CTLの抗原特異的キラー活性の測定
方法)

1. 標的細胞として用いるLCLをCFSEラベルし、T細胞用培地に懸濁後、LMP2ペプチド存在下で2時間培養を行った。

2. 96穴U底プレートに、再生したCD8シングルポジティブT細胞 (再生LMP2-CTL(#1)) と標的細胞として用いるLCLをそれぞれ0:1、1:3、1:1、3:1、9:1となるように混合し、いろいろな濃度のLMP2ペプチド存在下もしくは非存在下において共培養を行った。6時間後に、標的細胞の死細胞比率をCFSE陽性分画中に見られるAnnexinV陽性細胞率によって検定した。結果を図9に示す。

3. 再生LMP2-CTL(#1)はペプチドをロードした標的細胞に対して高い抗原特異的細胞傷害活性を示した。

[0085] 7) クローンLMP2#1のTCR α 鎖および β 鎖の配列を決定した。

TCR α 鎖 TRAV26-1*01-CIVTRFYTDKLIF-TRAJ34*01 (配列番号3)

TCR β 鎖 TRBV14*02-CASSSPGSRPYNEQFF-TRBJ2-1*01 (配列番号4)

実施例 2

[0086] 実施例1とは別の健常人ボランティアから、実施例1の手順に従いLMP2ペプチド特異的CTLを誘導し、当該CTLからT-iPS細胞を誘導し(クローンLMP2#13)、更にT-iPS細胞からCD8シングルポジティブT細胞(再生LMP2-CTL(#13))を得た。使用したLMP2ペプチドは実施例1と同じである。得られた再生LMP2-CTL(#13)のペプチド特異的CTL活性を、ペプチドをロードしたLC細胞を標的細胞として用いた細胞傷害活性により確認した。結果を図10に示す。実施例2の健常人ボランティアはEBウイルス既感染者(EBNA抗体陽性)であり、下記HLA型を有する：

HLA-A*02:10/24:02 ; B*07:02/40:06; C*07:02/08:01; DRB1*04:05/04:05

[0087] 再生LMP2-CTL(#13)はペプチドをロードした標的細胞に対して高い抗原特異的細胞傷害活性を示した。

[0088] また、常法によりクローンLMP2#13のTCR α 鎖、 β 鎖のアミノ酸配列を特定した。

TCR α 鎖 TRAV25*01-CAGERGSTLGRLYF-TRAJ18*01 (配列番号5)

TCR β 鎖 TRBV7-9*03-CASSPLSTGNYEQYF-TRBJ2-7*01 (配列番号6)

実施例 3

[0089] 健常人ボランティアの末梢血より誘導したWT1抗原特異的細胞傷害性T細胞(CTL)からT-iPS細胞を誘導し(クローンWT1#9)、当該T-iPS細胞よりWT1抗原特異的成熟T細胞(再生WT1-CTL(#9))を誘導した。

[0090] 実施例は、以下の構成である。

- 1) WT1抗原特異的CTLの増幅
- 2) WT1-T-iPS細胞の樹立
- 3) WT1-T-iPS細胞からCD8シングルポジティブT細胞(CTL)への分化誘導
- 4) 3)で得た再生WT1-CTLの抗原特異的細胞傷害活性の確認

[0091] 1) WT1抗原特異的CTLの増幅

i) 用いた培地は以下の通りである。

[表5]

T細胞用培地	配合量	培地中の最終濃度
RPMI	45 ml	
human AB serum	5 ml	10%
Total	50 ml	

ii) 用いたWT1ペプチドは以下の通りである。

WT1 (改変型: CYTWNQMNL (配列番号2)、Cancer Immunol. Immunothera. 51: 614 (2002))

以下で使用しているWT1ペプチド、WT1テトラマーともに改変型を用いた。

iii) 用いたLCL (Lymphoblastoid cell line) は以下のとおりである

京都大学病院血液腫瘍内科 (日本国京都府京都市) にて健常人ボランティアから採取されたHLA-A2402を有するLCLを用いた。

[0092] A. ヒト末梢血からのT細胞の単離とペプチドによる刺激

1. 健常人ボランティアの末梢血より単核球をFicollによって精製し、T細胞培地で懸濁した。健常人ボランティアのHLA型はHLA-A*02:01/24:02; B*15:01/15:11; C*03:03/08:01; DRB1*12:01/12:02である。
2. 96穴U底プレートに1穴あたり $2.5 \times 10^5/\text{mL}$ となるように細胞を播種し、ペプチドを $10 \mu\text{m}$ となるように添加した。
3. 3日目にIL-2 (最終濃度 12.5 U/mL)、IL-7 (最終濃度 5 ng/mL)、IL-15 (最終濃度 1 ng/mL) を加え、1週間ごとにサイトカインを添加したT細胞用培地で培地交換しながら2週間培養を行った。

[0093] B. LCLへのペプチド添加

1. LCLを回収し、35Gyの放射線照射を行った。
2. T細胞用培地に浮遊させ、 $5 \times 10^5/\text{mL}$ となるように調整した。
3. ペプチドを 100 nM で添加し2時間培養した。
4. LCLを回収し、T細胞用培地で洗浄後、 $2 \times 10^5/\text{mL}$ となるように調整した。

[0094] C. ペプチドをパルスしたLCLとT細胞との共培養

1. ペプチド刺激を加えた後、2週間培養したT細胞を回収し、洗浄後にT細胞用培地に懸濁し、 $2 \times 10^6/\text{mL}$ に調整した。この時一部の細胞をフローサイトメトリー解析のために取り分けた。
2. 24穴プレートに、ペプチドを加えて培養したLCLの浮遊液 ($2 \times 10^5/\text{mL}$) を0.5mL/well、T細胞浮遊液 ($2 \times 10^5/\text{mL}$) を0.5mL/wellとなるように加えた (LCL: T = $1 \times 10^5/\text{well}$: $1 \times 10^6/\text{well}$ = 1:10)。
3. 3日目にIL-2(最終濃度 12.5U/mL)、IL-7(最終濃度5 ng/mL)、IL-15(最終濃度 1 ng/mL)を加えた。1週間ごとにサイトカインを添加したT細胞用培地で培地交換しながら2週間培養を行った。(LCLによるペプチド刺激1クール目)
4. 再度100nMのペプチドと加えた培地でLCLを2時間培養し、ここにCTLを加えた。
5. 3日目にIL-2(最終濃度 12.5U/mL)、IL-7(最終濃度5 ng/mL)、IL-15(最終濃度 1 ng/mL)を加えた。1週間ごとにサイトカインを添加したT細胞用培地で培地交換しながら2週間培養を行った。(LCLによるペプチド刺激2クール目)
6. 再度100nMのペプチドと加えた培地でLCLを2時間培養し、ここにCTLを加えた。
7. 3日目にIL-2(最終濃度 12.5U/mL)、IL-7(最終濃度5 ng/mL)、IL-15(最終濃度 1 ng/mL)を加えた。1週間ごとにサイトカインを添加したT細胞用培地で培地交換しながら2週間培養を行った。(LCLによるペプチド刺激3クール目)
8. フローサイトメトリー解析を行った。結果を図11に示す。CD8陽性WT1テトラマー陽性分画がCD8陽性T細胞中に60%以上の割合で検出されることを確認した。

[0095] 2) WT1-T-iPS細胞の樹立

A. WT1特異的CTLの活性化

1. MACS beadsによりCD8陽性細胞を濃縮した。
2. 全ての細胞をT細胞用培地に浮遊させ、IL-2（最終濃度 12.5U/mL）、IL-7（最終濃度5 ng/mL）、IL-15（最終濃度 1ng/mL）を加えた。さらにDynabeads Human T-Activator CD3/CD28をT細胞：beadsが1：1となるように添加し、2日間培養することでCD8陽性細胞を活性化した。

[0096] B. センダイウィルスによる山中4因子とSV40の導入

1. 活性化させたWT1特異的CTLをT細胞用培地に浮遊させ、山中4因子とSV40が組み込まれたセンダイウィルスを培地中に添加し、そのまま2日間培養した。
2. T細胞用培地で洗浄し、さらにIL-2（最終濃度 12.5U/mL）、IL-7（最終濃度5 ng/mL）、IL-15（最終濃度 1ng/mL）を加えたT細胞用培地で2日間培養した。
3. 全ての細胞を回収後、サイトカインを含まないT細胞用培地でT細胞を懸濁し、フィーダー細胞上に播種した。
4. 2日目にiPS細胞用培地に半量交換し、翌日から毎日iPS細胞用培地への半量交換を行い続け、培養を続けた。

[0097] C. iPS細胞コロニーのピックアップ

1. 3週間後にiPS細胞コロニーを目視により確認した。
2. 200ulチップによりコロニーを物理的に拾い上げた。
3. 各クローンを個別に樹立した。得られたクローンのコロニーを図12に示す。

[0098] 3) WT1-T-iPS細胞からT細胞への分化誘導

各培地の組成を下記に示す。

[表6]

medium A (OP9ストローマ細胞維持用)		最終濃度
α MEM	500mL	
FCS	125mL	(20%)
ペニシリン/ストレプトマイシン溶液	6.25mL	(1%)
Total	631.25mL	

*ペニシリン/ストレプトマイシン溶液は、ペニシリン10000U/mLおよびストレ

プトマイシン10000 $\mu\text{g/mL}$ からなり、それぞれの最終濃度を100U/mLおよび100 $\mu\text{g/mL}$ とした。

[0099] [表7]

medium B (T細胞分化誘導用)		(最終濃度)
α MEM	500mL	
FCS	125mL	(20%)
ペニシリン/ストレプトマイシン溶液	5mL	(1%)
hrIL-7 (stock: 10 $\mu\text{g/mL}$)	315 μL	(5ng/mL)
hrFlt-3L (stock: 10 $\mu\text{g/mL}$)	315 μL	(5ng/mL)
hrSCF (stock: 10 $\mu\text{g/mL}$)	630 μL	(10ng/mL)
Total	631.26mL	

*ペニシリン/ストレプトマイシン溶液は、ペニシリン10000U/mLおよびストレプトマイシン10000 $\mu\text{g/mL}$ からなり、それぞれの最終濃度を100U/mLおよび 100 $\mu\text{g/mL}$ とした。

[0100] OP9細胞の準備

0.1% ゼラチン/PBS溶液6mlを10cm培養ディッシュに入れ、37°Cで30分以上静置した。コンフルエントになったOP9細胞をトリプシン/EDTA溶液で剥がし、1/4相当量をゼラチンコートした10cm培養ディッシュに播種した。培地はmedium Aを10mlとなるように加えた。

4日後に播種したOP9細胞培養ディッシュに新たにmedium Aを10ml加え、全量が20mlとなるようにした。

[0101] iPS細胞からの血球前駆細胞誘導

共培養に使用するOP9細胞の培地を吸引し、新しいmedium Aに交換した。またiPS細胞培養ディッシュの培地も同様に吸引し、新しいmedium Aを10ml加えた。EZ-passageローラーでiPS細胞を切った。カットしたiPS細胞塊を200 μL ピペットマンでピペッティングすることで浮遊させ、目視でおおよそ600個のiPS細胞塊をOP9細胞上に播種した。

iPS細胞1クローンあたり3枚以上のディッシュを用い、継代するときには細胞を一度一つに合わせてから同じ枚数に再分配することでディッシュ間のばらつきを減らした。

Day 1 (培地交換)

iPS細胞塊が接着し分化し始めているかどうかを確認し、培地を新しいmedium A 20mlに交換した。

Day 5 (培地半量交換)

半量分の培地を新しいmedium A 10mlに交換した。

Day 9 (培地交換)

半量分の培地を新しいmedium A 10mlに交換した。

Day 13 (誘導した中胚葉細胞をOP9細胞上からOP9/DLL1細胞上へ移しかえる)

培地を吸引し、HBSS(+Mg+Ca)で細胞表面上の培地を洗い流した。その後250U collagenase IV/HBSS(+Mg+Ca) 溶液10mlを加え、37℃で45分間培養した。Collagenase溶液を吸引し、PBS(-)10mlで洗い流す。その後5mlの0.05%トリプシン/EDTA溶液を加え、37℃で20分培養した。培養後、細胞が膜状に剥がれてくるので、ピペッティングにより物理的に細かくした(接着細胞同士を離すため)。ここに新しいmedium Aを20ml加え、さらに37℃で45分間培養した。培養後、浮遊細胞を含む上清を、100 μ mのメッシュを通して回収した。4℃、1200rpmで7分間遠心し、ペレットを10mlのmedium Bに懸濁させた。このうち1/10をFACS解析用にとりわけ、残りの細胞を新たに用意したOP9/DLL1細胞上に播種した。複数枚のディッシュから得た細胞をプールした場合、元々の枚数と同じ枚数になるように再分配して細胞を播き直した。

[0102] 得られた細胞に造血前駆細胞が含まれているかどうかを確かめるために抗CD34抗体、抗CD43抗体を用いてFACS解析した。結果を図13に示す。CD34^{low}CD43⁺細胞分画に十分な細胞数が確認できたことから、造血前駆細胞が誘導されていると確認した。

[0103] C. 血球前駆細胞からのT細胞分化誘導

次いで細胞をOP9/DLL1細胞上に播種した。この工程において、CD34^{low}CD43⁺細胞分画の細胞のソーティングは行わなかった。この分画をソーティングした場合、得られる細胞数が減少してしまうことやソーティングによる細胞へのダメージから、ソーティングしなかった場合に比べてT細胞への分

化誘導効率が落ちることがある。

Day 16 (細胞の継代)

OP9細胞に緩く接着している細胞を、穏やかに複数回ピペティングし、100 μ mのメッシュを通して50mlコニカルチューブに回収した。4°C、1200rpmで7分間遠心し、ペレットを10mlのmedium Bに懸濁させた。これらの細胞を新たに用意したOP9/DLL1細胞上に播種した。

Day 23 (細胞の継代): 血液細胞コロニーが見え始める。

OP9細胞に緩く接着している細胞を、穏やかに複数回ピペティングし、100 μ mのメッシュを通して50mlコニカルチューブに回収した。4°C、1200rpmで7分間遠心し、ペレットを10mlのmedium Bに懸濁させた。

Day 36 : WT1テトラマー陽性T細胞の確認。

WT1特異的T細胞が誘導されているかどうかを確かめるために抗CD3抗体、WT1テトラマーを用いてFACS解析した。結果を図14に示す。

T細胞マーカーであるCD3⁺細胞がみられるようになり、大部分の細胞はCD3⁺WT1テトラマー⁺にまで分化していることが確認された。

[0104] 上記のとおり、誘導されたT細胞が、元のT細胞と同じ抗原特異性を示すT細胞となることが確認された。また、得られたT細胞は成熟した細胞が出す表面抗原を発現していることから、機能的によく成熟していることが確認された。

[0105] また、クローンWT1#9のTCR α 鎖および β 鎖の配列を常法により決定した。

TCR α 鎖 TRAV12-3*01-CAMIRGNTDKLIF-TRAJ34*01 (配列番号7)

TCR β 鎖 TRBV5-5*02-CASSFPSYEQYF-TRBJ2-7*01 (配列番号8)

[0106] 4) WT1-T-iPS細胞分化誘導されたT細胞の抗原特異的細胞傷害活性

1. 標的細胞として用いるLCLをCFSEラベルし、T細胞用培地に懸濁後、WT1ペプチド(配列番号2)の存在下で2時間培養を行った。
2. 96穴U底プレートに、再生したCD8シングルポジティブT細胞と標的細胞として用いるLCLをそれぞれ0:1、1:3、1:1、3:1、9:1となるように混合し、い

ろいろな濃度のペプチド存在下もしくは非存在下において共培養を行った。6時間後に、標的細胞の死細胞比率をCFSE陽性分画中に見られるAnnexinV陽性細胞率によって検定した。

[0107] 再生WT1-CTL (#9) はペプチドをロードした標的細胞に対して高い抗原特異的細胞傷害活性を示した(図15)。

実施例 4

[0108] 実施例3と同一の健常人ボランティアから、実施例3の手順に従いWT1ペプチド特異的CTLを誘導し、当該CTLからT_H1PS細胞(クローンWT1#3-3)を誘導し、更にT_H1PS細胞からCD8シングルポジティブT細胞(再生WT1-CTL(#3-3))を得た。使用したWT1ペプチドは実施例3と同じである。得られた再生WT1-CTL(#3-3)のペプチド特異的CTL活性を、当該ペプチドをロードしたLC細胞を標的細胞として用いた細胞傷害活性試験により確認した。

[0109] 結果を図16に示す。再生WT1-CTL(#3-3)はペプチドをロードした標的細胞に対して高い抗原特異的細胞傷害活性を示した。

[0110] また、再生WT1-CTL(#3-3)のWT1抗原を発現する白血病細胞株THP1並びに同じくWT1抗原を発現する白血病細胞株HL60に対する細胞傷害活性、並びにHLAクラスIに対する抗体によってその細胞傷害活性がブロックできるかどうかを調べた。結果を図17および図18に示す。

再生WT1-CTL(#3-3)はWT1を発現するTHP-1およびHL60株両方に対して細胞傷害活性を示し、かかる細胞傷害活性はHLAクラスIに対する抗体で完全にブロックされた。この結果から、再生WT1-CTL(#3-3)はWT1抗原特異的に白血病細胞を殺傷していると考えられる。

[0111] クローンWT1#3-3のTCRの α 鎖、 β 鎖の配列を決定した。

TCR α 鎖 TRAV12-1*01-CVVRGGGFKTIF-TRAJ9*01 (配列番号9)

TCR β 鎖 TRBV20-1*01-CSARAGTGGANVLTF-TRBJ2-6*01 (配列番号10)

実施例 5

[0112] クラスI拘束性WT1抗原特異的TCRを導入したHLAハプロタイプホモ i

P S細胞の作製

導入する対象の細胞としては実施例2と同じく京都大学再生医科学研究所再生免疫学分野（日本国京都府京都市）にて健常人末梢血単球より作製されたHLAハプロタイプホモ型iPS細胞を用いた。

導入したWT1特異的TCR遺伝子は、京都大学再生医科学研究所再生免疫学分野（日本国京都府京都市）にてClonn#9とClone#3-3からクローニングされたクラスI拘束性WT1特異的TCR遺伝子である。

[0113] 1) RACE (rapid amplification of cDNA ends) 法によるWT1特異的TCRのクローニング

クローンとなるように増幅したWT1特異的CTLもしくはWT1-T-iPS細胞から誘導されたCTLからRNAを調整する。SMARTer RACE cDNA増幅キット（クロンテック社）を用いて完全長cDNAを得、これを鋳型とした。TCR α 鎖の3'側からのプライマー（CACAGGCTGTCTTACAATCTTGCAGATC（配列番号11））もしくはTCR β 鎖の3'側からのプライマー2種（CTCCACTTCCAGGGCTGCCTTCA（配列番号12）またはTGACCTGGGATGGTTTTGGAGCTA（配列番号13））を用い、PCR反応によってWT1-TCRの二本鎖cDNAを得た。得られた二本鎖cDNAをpTA2ベクター（東洋紡社、図19）に組み込み、細胞株に導入することでWT1 TCRの特異性などの検定を行った。

[0114] 2) WT1-TCRを組み込んだレンチウィルスベクターの作製

独立行政法人理化学研究所 バイオリソースセンター 細胞運命情報解析技術開発サブチーム（日本国茨城県つくば市）より提供されたCS-UbC-RfA-IRES2-Venusベクター（図20）を用い、GatewayシステムによりWT1-TCRを導入したCS-UbC-RfA-IRES2-Venus/WT1-TCRを作製した。

[0115] 3) WT1-TCRを組み込んだレンチウィルス上清の作製

CS-UbC-RfA-IRES2-Venus/WT1-TCRをX-treamGENE9（ロシュ社）を用いてパッケージング細胞LentiX-293Tに導入した。翌日に培地交換を行い、2日目にレンチウィルスを含む培養上清を回収し、レンチウィルス上清として用いた。

[0116] 4) WT1-TCR transduced-T-iPS細胞の樹立

LMP2-T-iPS細胞をTrypLE Select (ライフテクノロジーズ社)を用いて完全な単一細胞とする。遠心後、ペレットをレンチウイルス上清で懸濁し、32°C, 3000rpmで1時間遠心し、LMP2-T-iPS細胞に感染させることでWT1-TCRをLMP2-T-iPS細胞に導入した。

[0117] 2. 遺伝子導入後のiPS細胞を単個細胞懸濁液とし、フローサイトメトリーで解析した。結果を図21に示す。Clonn#9とClone#3-3ともにWT1特異的TCR遺伝子がiPS細胞に導入されていることが確認された。

請求の範囲

- [請求項1] (1) WT 1 抗原特異的 T 細胞受容体を有するヒト多能性幹細胞を提供する工程、および
- (2) 工程 (1) の多能性幹細胞から T 前駆細胞あるいは成熟 T 細胞を誘導する工程
- を含む、免疫細胞療法用 T 細胞を誘導する方法。
- [請求項2] WT 1 抗原特異的 T 細胞受容体を有するヒト多能性幹細胞が、WT 1 抗原特異的ヒト T 細胞から多能性幹細胞を誘導することによって得られる、請求項 1 記載の方法。
- [請求項3] WT 1 抗原特異的ヒト T 細胞が、免疫細胞療法対象者ではなく、WT 1 抗原を発現するがんに罹患しているあるいは同疾患の既往のあるヒトから得られた T 細胞である、請求項 2 記載の方法。
- [請求項4] WT 1 抗原特異的ヒト T 細胞が、免疫細胞療法対象者ではなく、WT 1 抗原を発現するがんに罹患したことのないヒトから得られた T 細胞である、請求項 2 に記載の方法。
- [請求項5] WT 1 抗原特異的 T 細胞受容体を有するヒト多能性幹細胞が、ヒト多能性幹細胞へ WT1 抗原特異的 T 細胞受容体遺伝子を導入することによって得られた多能性幹細胞である、請求項 1 に記載の方法。
- [請求項6] (1) Epstein-Barr ウイルス関連抗原特異的 T 細胞受容体を有するヒト多能性幹細胞を提供する工程、および
- (2) 工程 (1) の多能性幹細胞から T 前駆細胞あるいは成熟 T 細胞を誘導する工程
- を含む、免疫細胞療法用 T 細胞を誘導する方法。
- [請求項7] Epstein-Barr ウイルス関連抗原特異的 T 細胞受容体を有するヒト多能性幹細胞が、Epstein-Barr ウイルス関連抗原特異的ヒト T 細胞から多能性幹細胞を誘導することによって得られる、請求項 6 記載の方法。
- [請求項8] Epstein-Barr ウイルス関連抗原特異的ヒト T 細胞が、免疫細胞療法対象者ではなく、Epstein-Barr ウイルス関連疾患に罹患しているあるい

は同疾患の既往のあるヒトから得られたT細胞である、請求項7記載の方法。

[請求項9] Epstein-Barrウイルス関連抗原特異的ヒトT細胞が、免疫細胞療法対象者ではなく、Epstein-Barrウイルス関連疾患に罹患したことのないヒトから得られたT細胞である、請求項7に記載の方法。

[請求項10] Epstein-Barrウイルス関連抗原特異的T細胞受容体を有するヒト多能性幹細胞が、Epstein-Barrウイルス関連抗原特異的T細胞受容体遺伝子をヒト多能性幹細胞へ導入することによって得られたものである、請求項6記載の方法。

[請求項11] Epstein-Barrウイルス関連抗原特異的ヒトT細胞が、LMP2抗原特異的T細胞である、請求項7～9何れかに記載の方法。

[請求項12] 抗原特異的T細胞受容体を有するヒト多能性幹細胞が、免疫細胞療法対象者のHLA型に完全に一致あるいは一部が一致するHLA型を有するヒト由来の多能性幹細胞である、請求項1～11いずれかに記載の方法。

[請求項13] 抗原特異的T細胞受容体を有するヒト多能性幹細胞が、免疫細胞療法対象者のHLAの何れか一方のハプロタイプをホモで有しているハプロタイプホモ接合型のHLAを有しているヒトから得られたT細胞である、請求項12記載の方法。

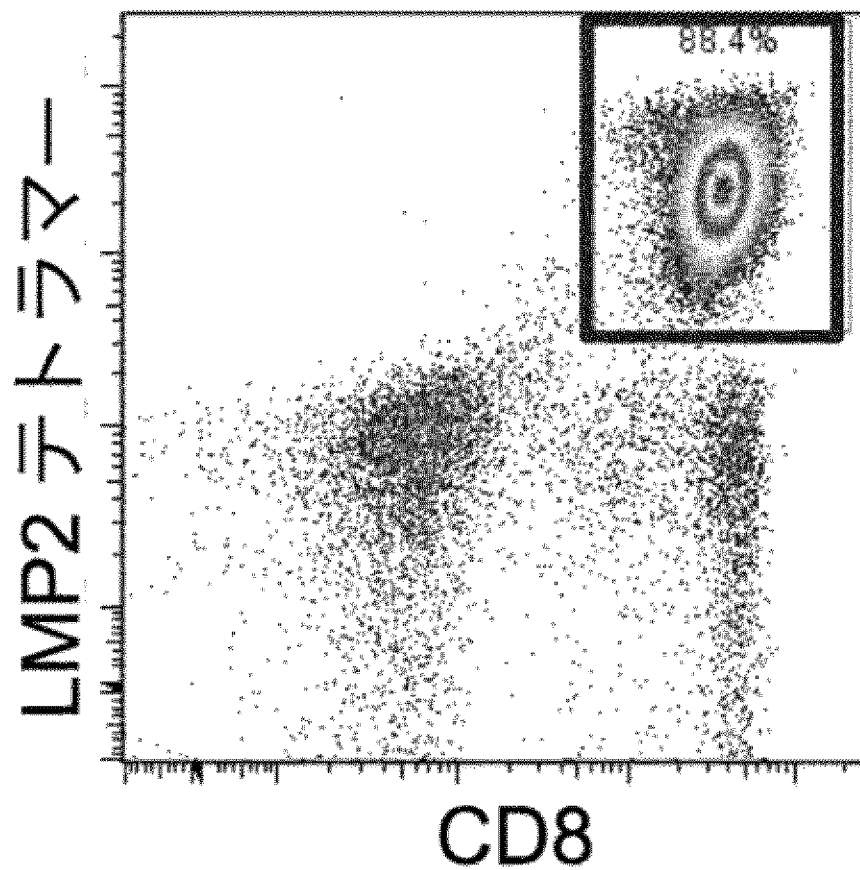
[請求項14] さらに、多能性幹細胞から誘導されたT前駆細胞または成熟T細胞を、免疫細胞療法対象者由来のリンパ球と共培養して当該T細胞が患者に対するアロ反応性を有していないことを確認する工程を含む、請求項1～13何れかに記載の免疫細胞療法用T細胞を誘導する方法。

[請求項15] ヒト多能性幹細胞がヒトiPS細胞である請求項1～14何れかに記載の方法。

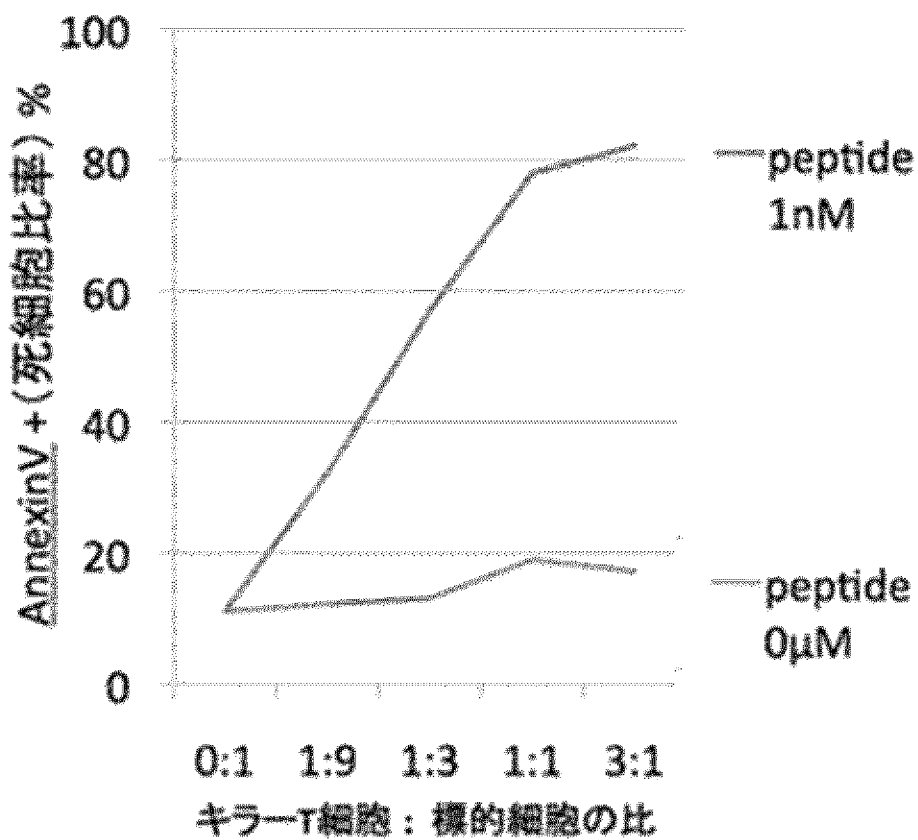
[請求項16] 免疫細胞療法が、がん、感染症、自己免疫疾患およびアレルギーからなる群から選択される疾患を治療するためのものである、請求項1～15いずれかに記載の方法。

- [請求項17] がんがE Bウイルス関連のがんである、請求項1 6記載の方法。
- [請求項18] 感染症がE Bウイルス関連である、請求項1 6記載の方法。
- [請求項19] がんがW T 1 遺伝子を発現するがんである、請求項1 6記載の方法。

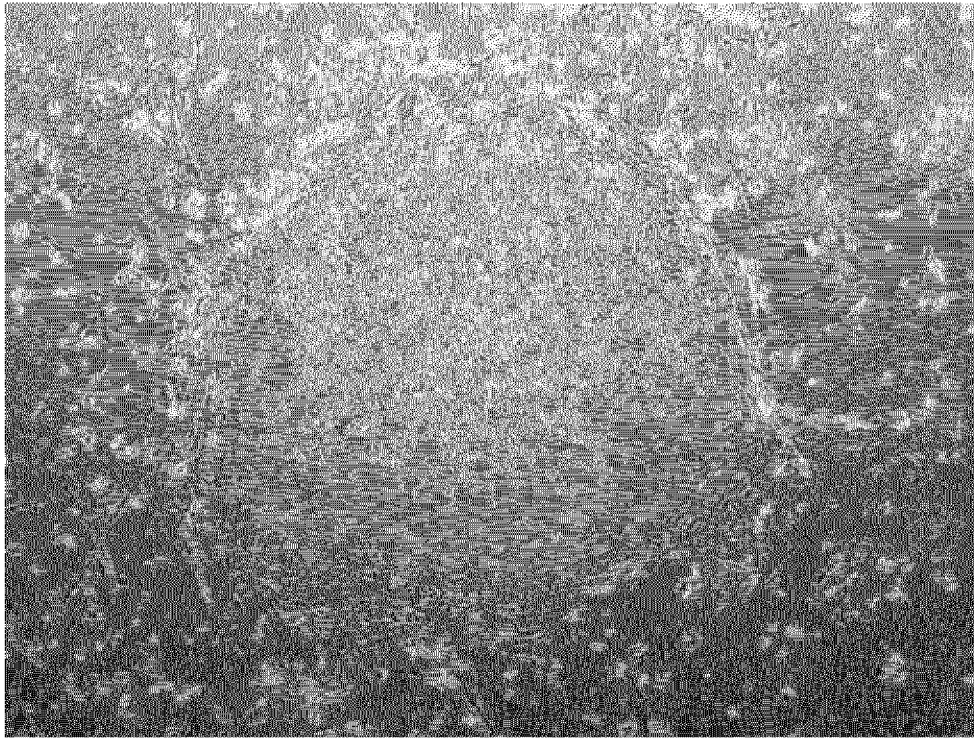
[図1]



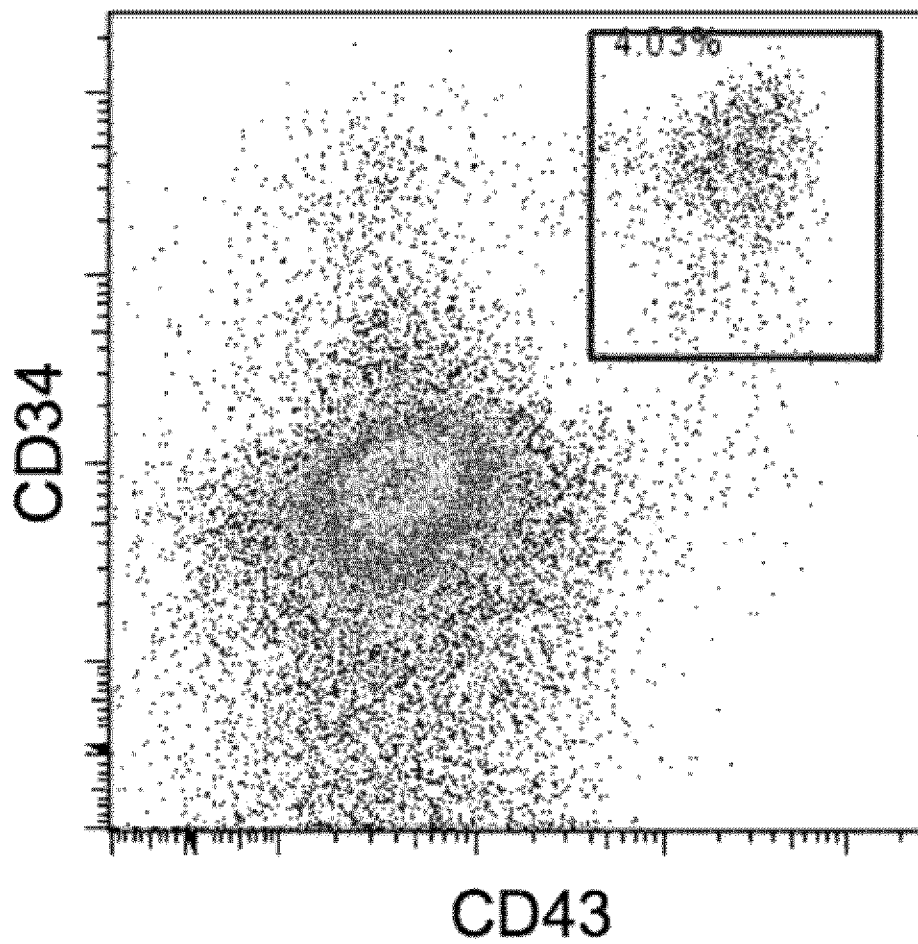
[図2]



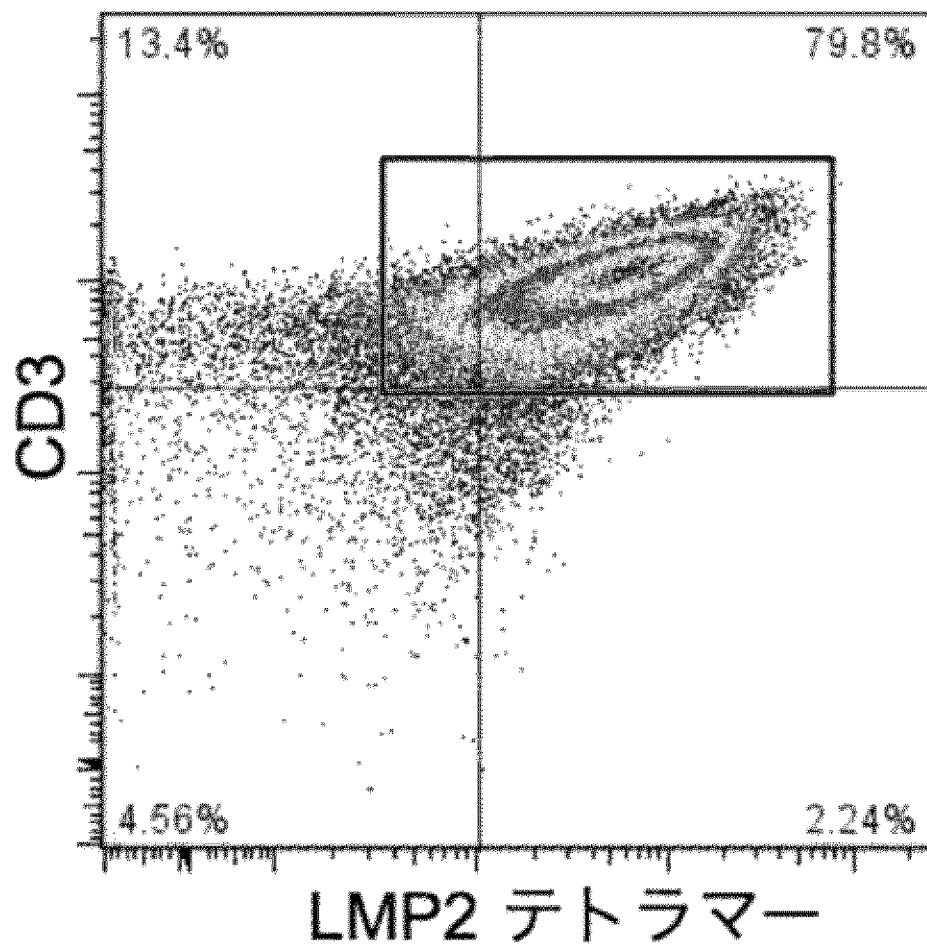
[図3]



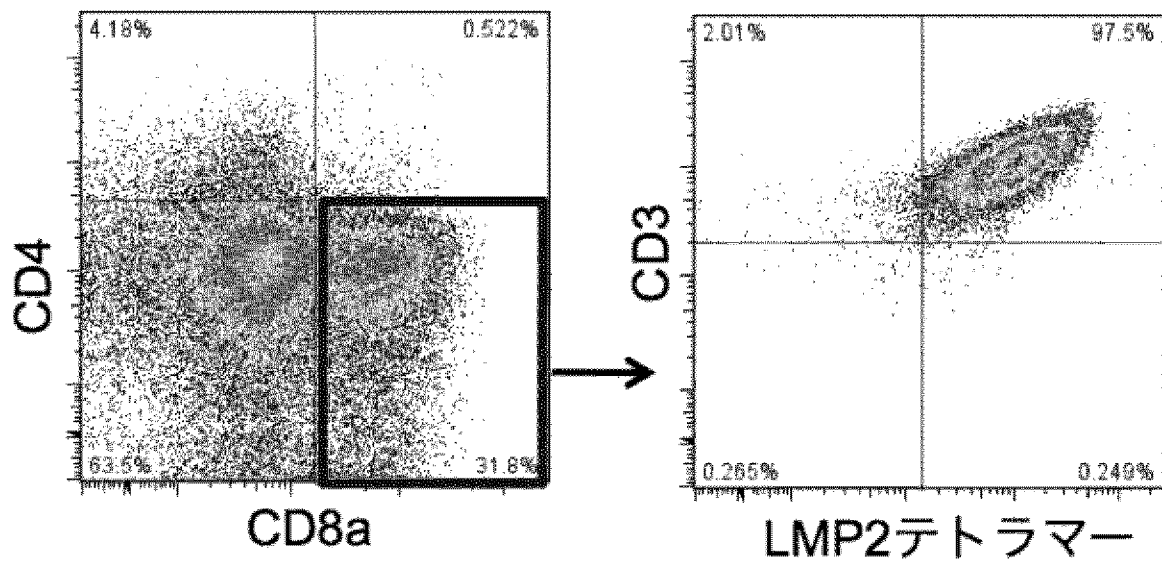
[図4]



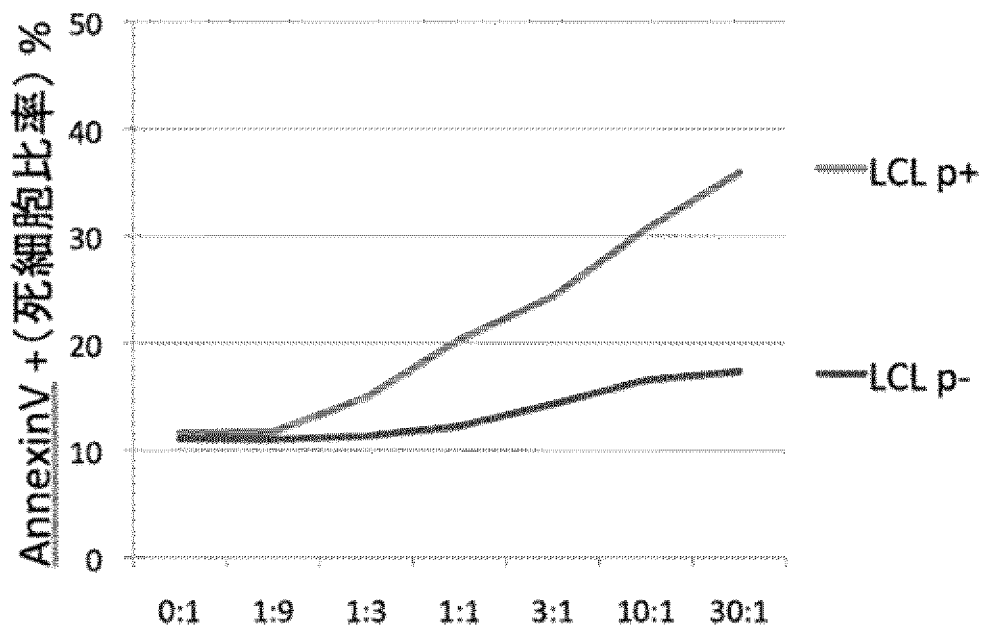
[図5]



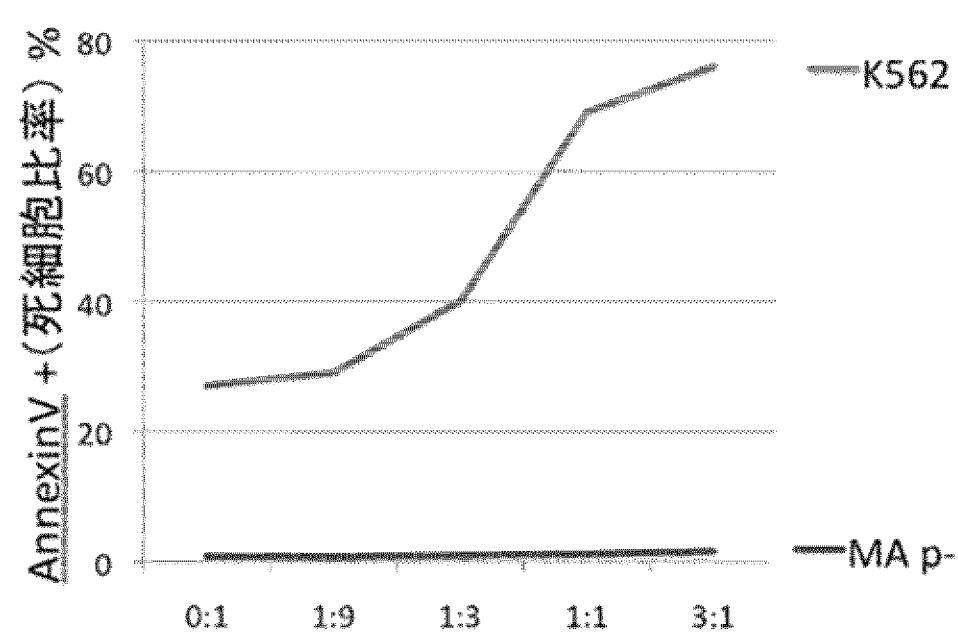
[図6]



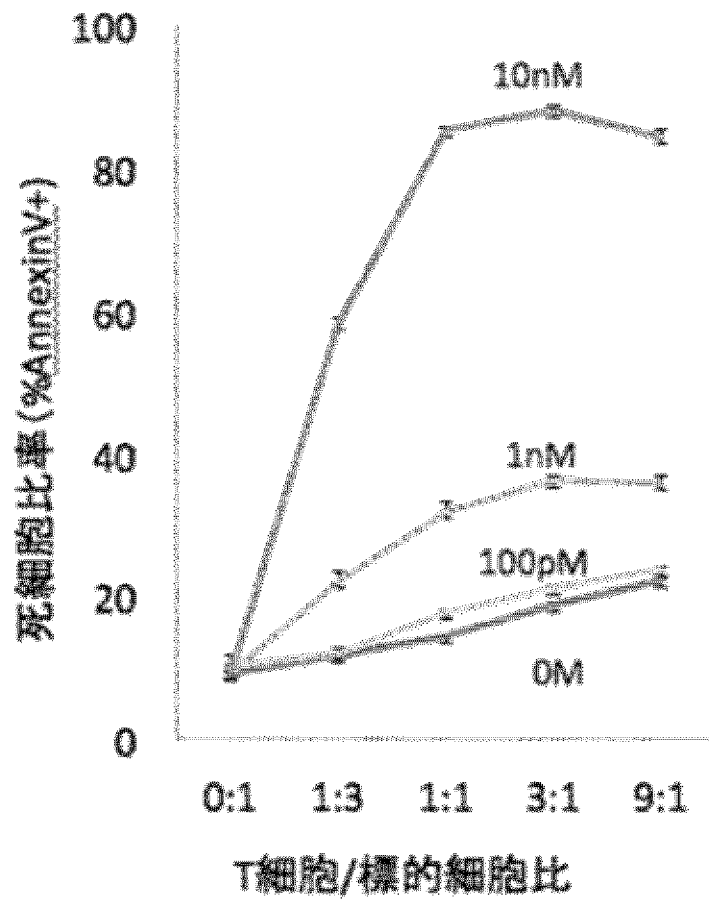
[図7]



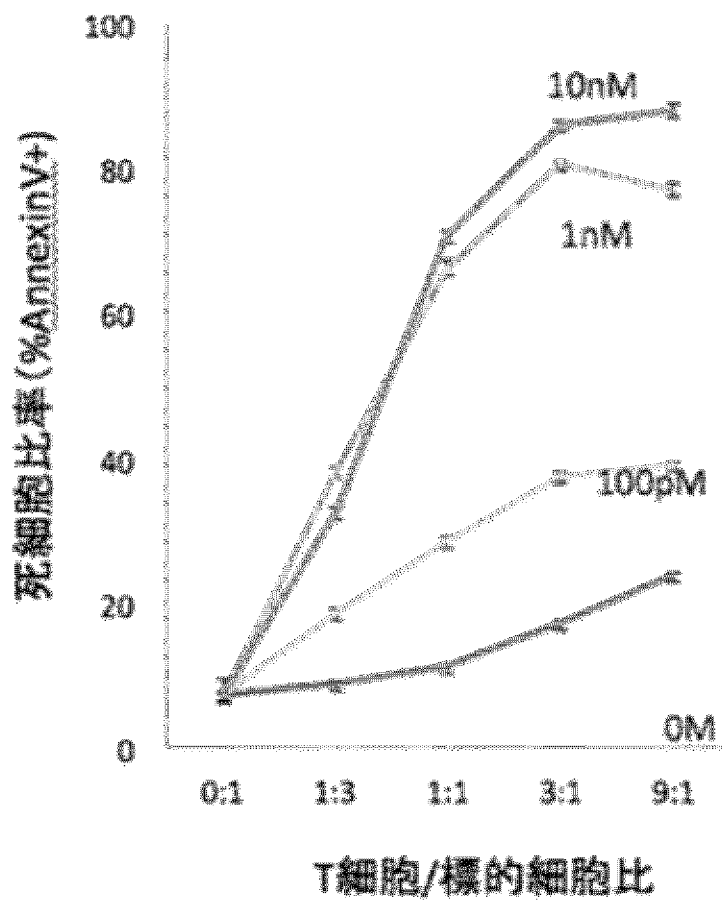
[図8]



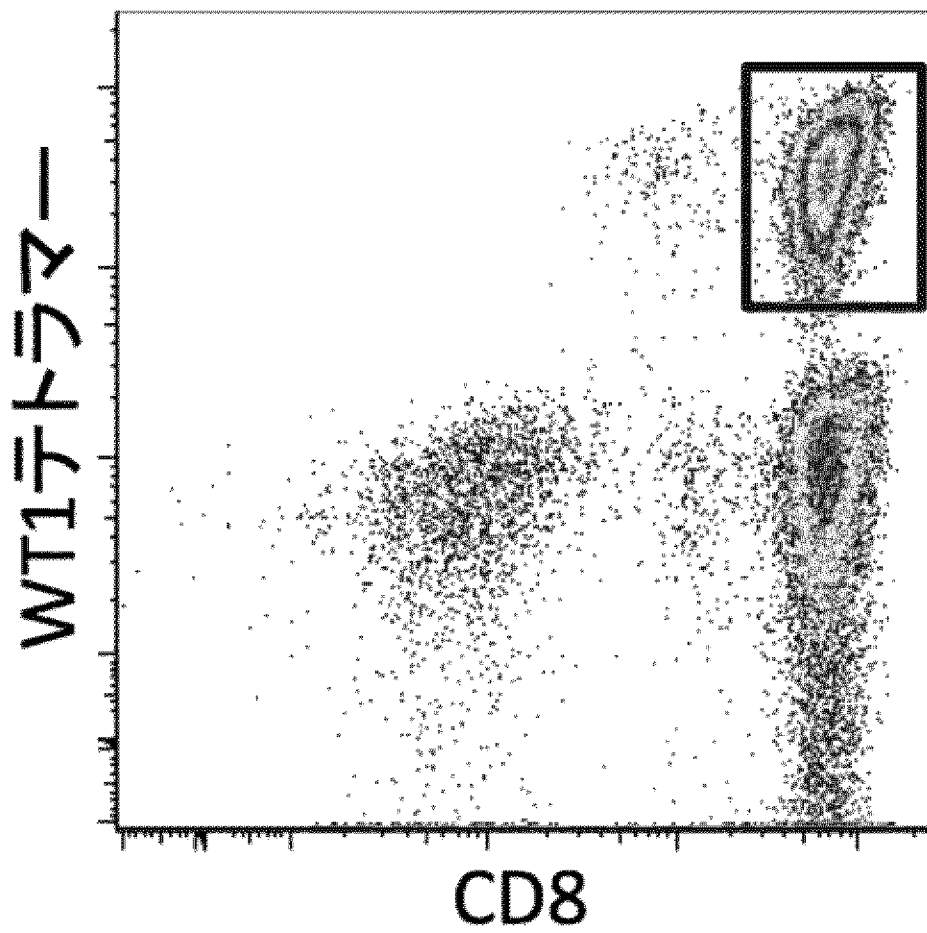
[圖9]



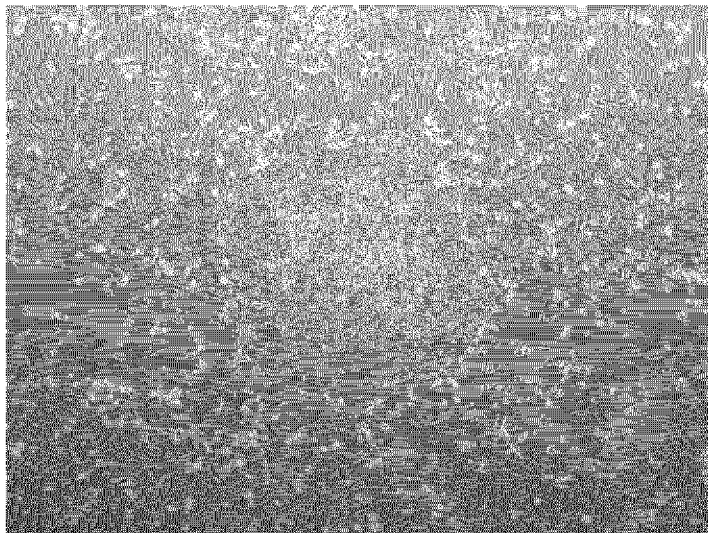
[図10]



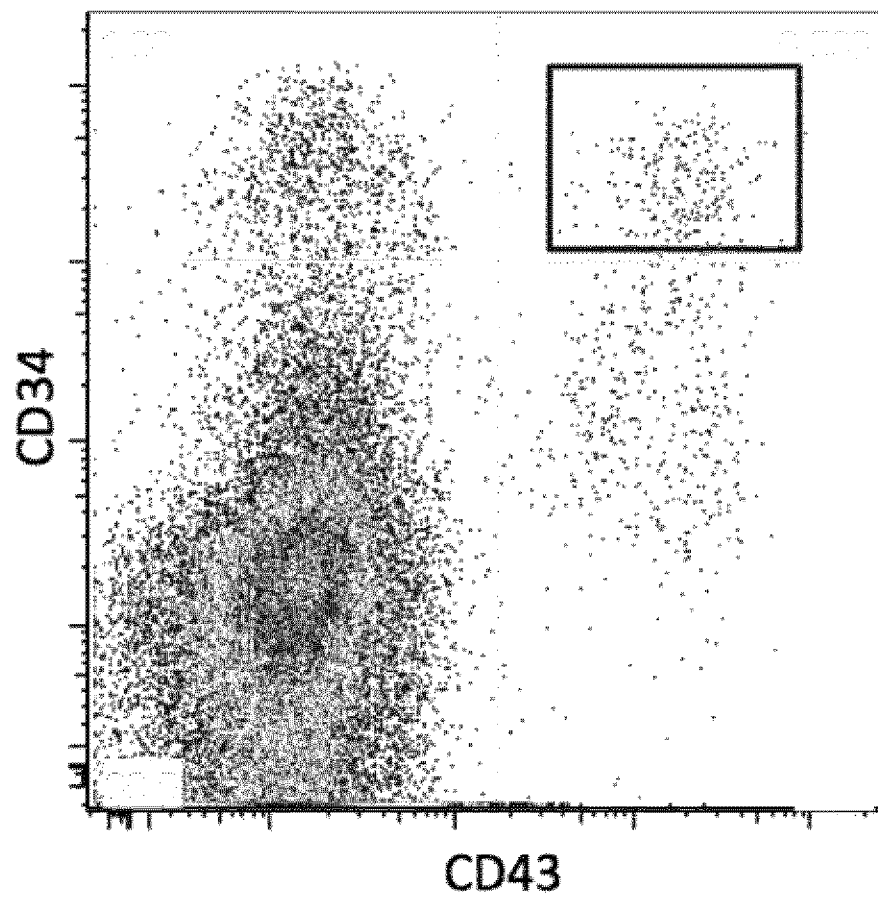
[図11]



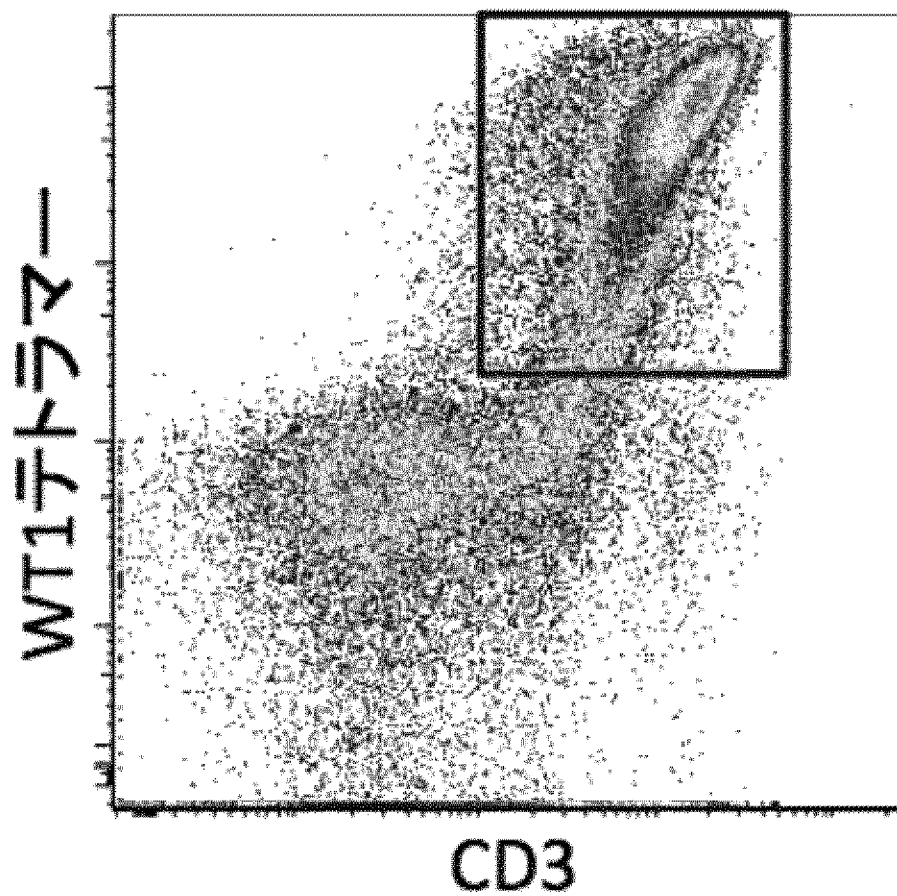
[図12]



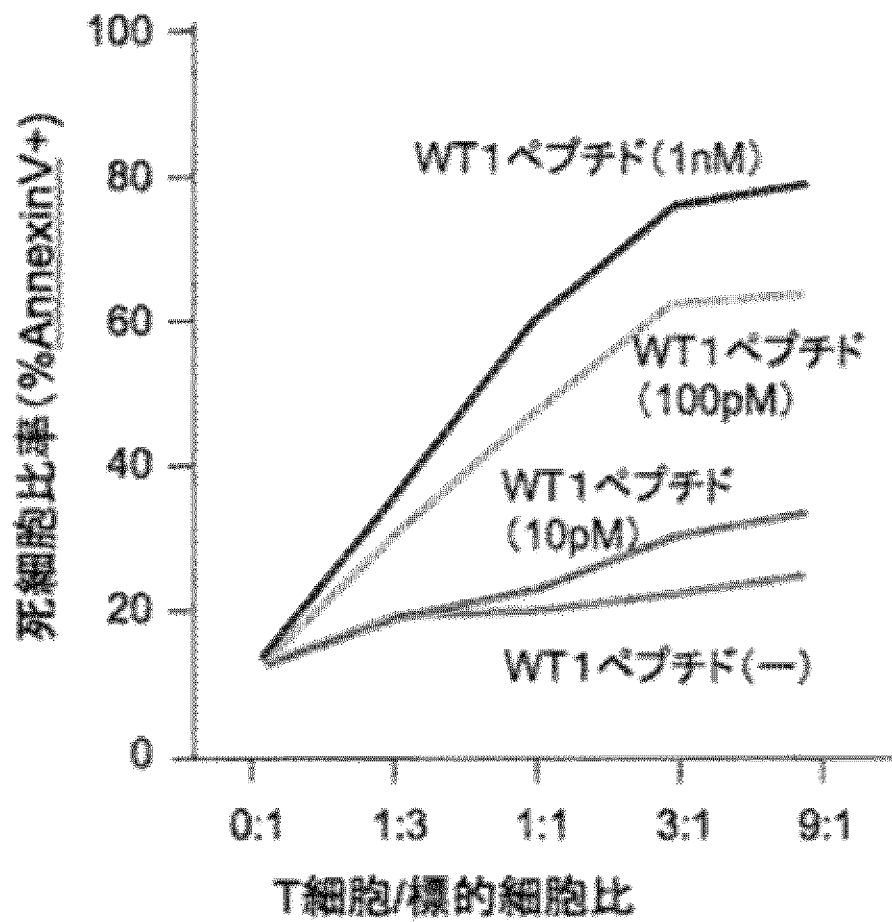
[図13]



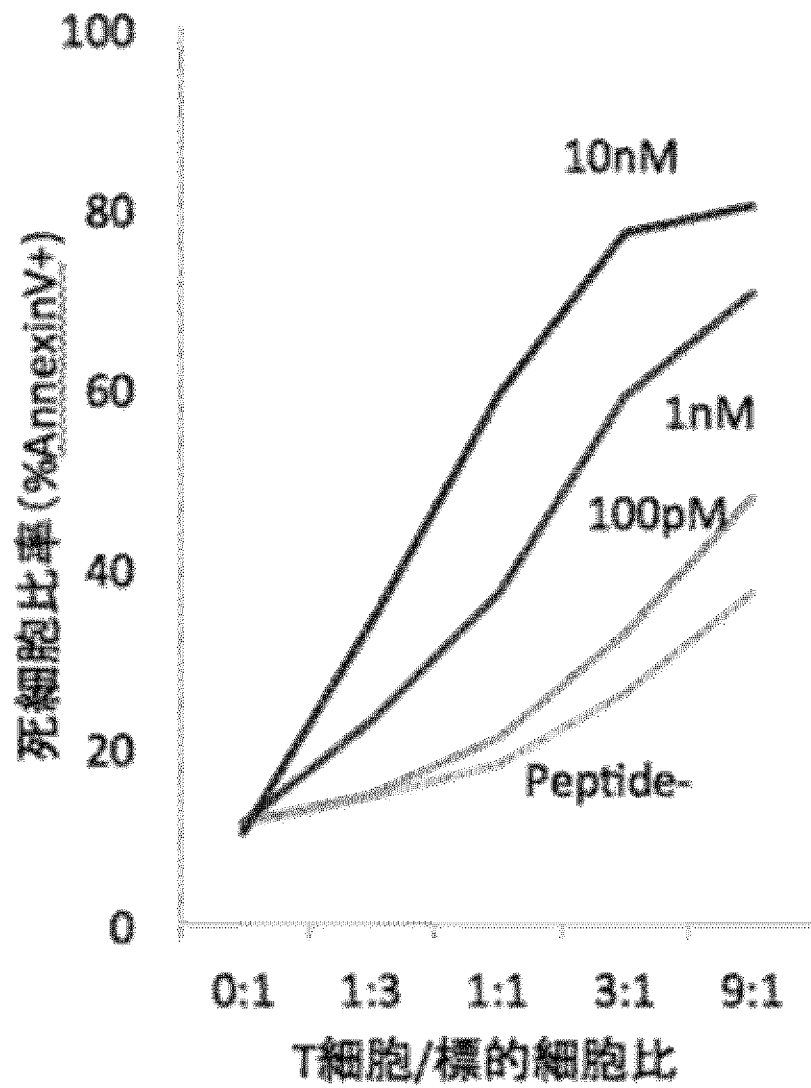
[図14]



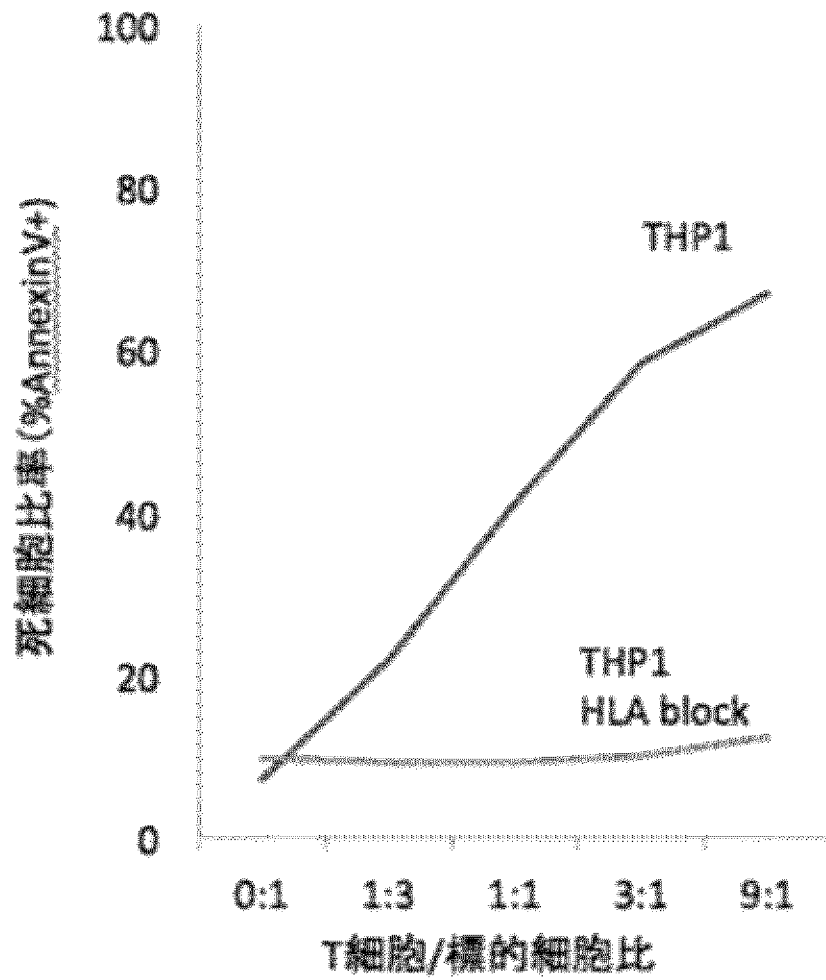
[図15]



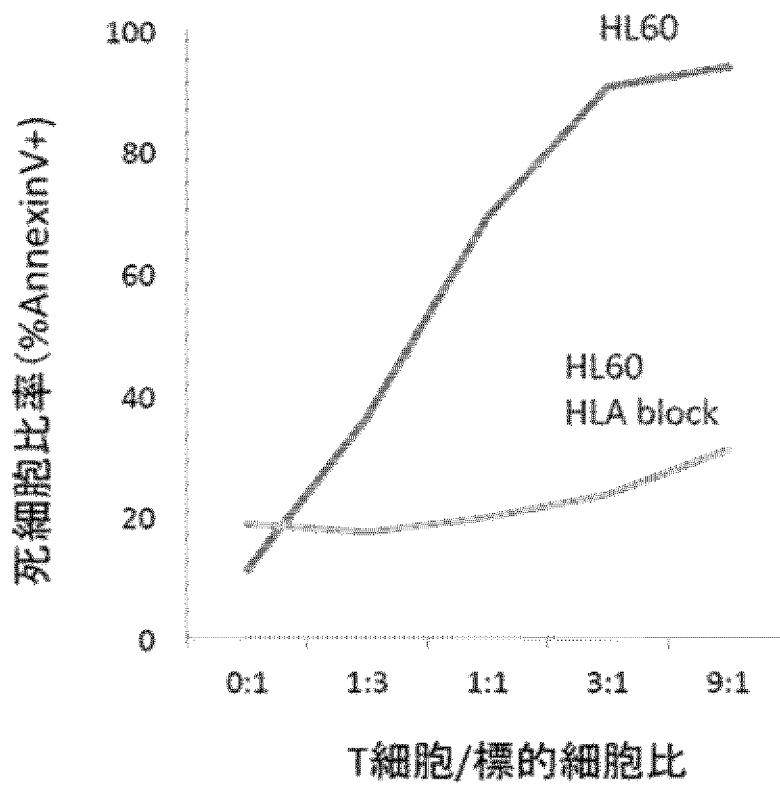
[圖16]



[圖17]



[圖18]



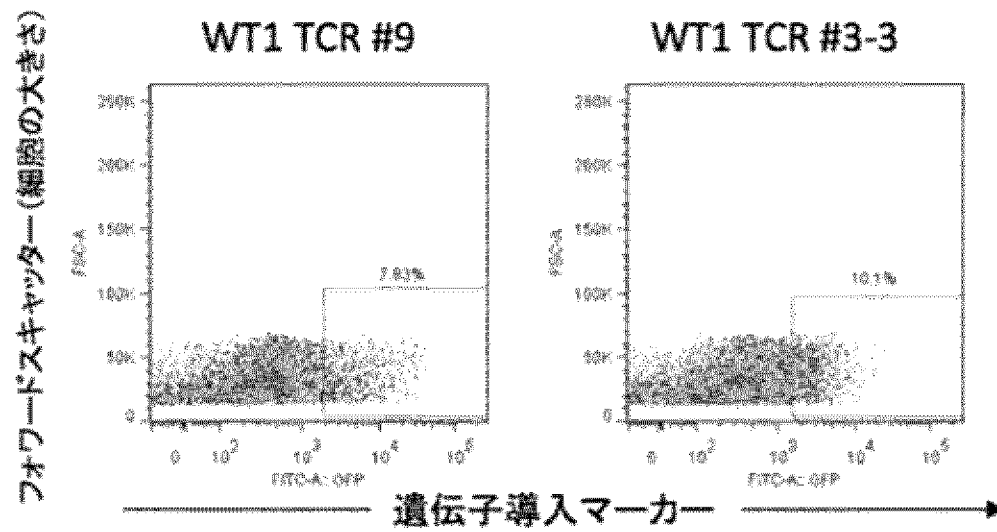
CS-UbC-RfA-IRES2-Venus
12241 bp

Key features and restriction sites:

- Top:** MluI 228, CMV promoter, Amp^r, ColE1 ori, SV40 pA, Zeo^r.
- Right:** NotI 1521, RRE, 3' SA, cPPT+CTS, UbC, attR1, Qm.
- Bottom Right:** Agel 3821, XhoI 3827, EcoRI 3832, PstI 3837, NotI 3976, BamHI 4047, BspEI 4293, EcoRI 4297, MluI 4744, BamHI 4750.
- Bottom:** PstI 5419, BamHI 5565, ApaI 5685, attR2, ccdB, Venus, IRES2, PRE.
- Bottom Left:** HpaI 6906, XbaI 6900, XhoI 6892, EcoRI 6879, PstI 6363.
- Left:** PmeI 8229, ApaI 8223, BspEI 8029, BGH pA, U5, R, del U3, f1 ori, SV40 pro/ori.

Plasmid size: 12241 bp

[図21]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2015/070624

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C12N5/0783(2010.01)i, A61K35/17(2015.01)i, A61P31/12(2006.01)i, A61P35/00(2006.01)i, A61P37/02(2006.01)i, A61P37/08(2006.01)i, C12N5/095(2010.01)i, C12N15/09(2006.01)i 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) C12N5/0783, A61K35/17, A61P31/12, A61P35/00, A61P37/02, A61P37/08, C12N5/095, C12N15/09 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2015 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2015 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2015 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CAPplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS/WPIX (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	Takuya MAEDA et al., "iPS Saibo Gijutsu o Mochiita Gan Kogen Tokuiteki T-Saibo no Saisei", Regenerative Medicine, 2014.01, vol.13, Suppl. 2014, page 226, O-29-2	6-12, 15-18 1-19
Y	Hiroshi KAWAMOTO, "Application of the iPSC technology to immune cell therapy against cancer", Clinical Oncology, 2013, vol.12, no.4, pages 450 to 459	1-19
Y	Atsutaka MINAGAWA et al., "3.iPS Saibo kara no Kogen Tokuiteki T-Saibo Yudo to Sono Rinsho Oyo", Hematology Frontier, 2014.01, vol.24, no. 2, pages 39 to 45	1-19
☒ 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 "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 14 August 2015 (14.08.15)		Date of mailing of the international search report 25 August 2015 (25.08.15)
Name and mailing address of the ISA/ Japan Patent Office 3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915, Japan		Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2015/070624

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	KAWAMOTO Hiroshi et al., Regeneration of antigen specific T cells using the iPSC technology: A novel strategy for cancer immunotherapy, The 18th Japanese Association of Cancer Immunology Sokai Program/Shorokushu, 2014.06, page 50, S1-3	1-19
Y	Hiroshi KAWAMOTO et al., "Shokika ni yoru Kogen Tokuiteki T-Saibo no Cloning to Bank-ka Koso", Regenerative Medicine, 2014.01, vol.13, Suppl. 2014, page 176, SY-25-4	1-19
Y	TAMANAKA Taichi et al., Recognition of a Natural WT1 Epitope by a Modified WT1 Peptide-specific T-Cell Receptor, Anticancer Research, 2012, Vol.32, p.5201-5210	1-19
Y	RIOLOBOS Laura et al., HLA Engineering of Human Pluripotent Stem Cells, Molecular Therapy, 2013, Vol.21, No.6, p.1232-1241	1-19
Y	JP 2006-306822 A (Japan Science and Technology Agency), 09 November 2006 (09.11.2006), paragraph [0027] (Family: none)	1-19
Y	Atsutaka MINAGAWA et al., "Genome Edit o Riyo shita, iPS Saibo yori no Kogen Tokuiteki T-Saibo no Saisei", The 18th Japanese Association of Cancer Immunology Sokai Program/Shorokushu, 2014.06, page 161, Q19-3	1-19
Y	LEI Fengyang et al., In Vivo Programming of Tumor Antigen-Specific T Lymphocytes from Pluripotent Stem Cells to Promote Cancer Immunosurveillance, Cancer Research, 2011, Vol. 71, No.14, p.4742-4747	1-19
Y	LEI Fengyang et al., Dual signals of TCR and Notch promote antigen-specific T cell development from pluripotent stem cells (P4370), The Journal of Immunology, 2013, Vol.190, 177.18	1-19
Y	JURGENS Lisa A. et al., Transduction of Primary Lymphocytes with Epstein-Barr Virus (EBV) Latent Membrane Protein-Specific T-Cell Receptor Induces Lysis of Virus-Infected Cells: A Novel Strategy for the Treatment of Hodgkin's Disease and Nasopharyngeal Carcinoma, Journal of Clinical Immunology, 2006, Vol.26, No.1, p.22-32	1-19

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2015/070624

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	THEMELI Maria et al., Generation of tumor-targeted human T lymphocytes from induced pluripotent stem cells for cancer therapy, Nature Biotechnology, 2013, Vol.31, No.10, p.928-933	1-19

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. C12N5/0783(2010.01)i, A61K35/17(2015.01)i, A61P31/12(2006.01)i, A61P35/00(2006.01)i, A61P37/02(2006.01)i, A61P37/08(2006.01)i, C12N5/095(2010.01)i, C12N15/09(2006.01)i

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))

Int.Cl. C12N5/0783, A61K35/17, A61P31/12, A61P35/00, A61P37/02, A61P37/08, C12N5/095, C12N15/09

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	1 9 2 2 - 1 9 9 6 年
日本国公開実用新案公報	1 9 7 1 - 2 0 1 5 年
日本国実用新案登録公報	1 9 9 6 - 2 0 1 5 年
日本国登録実用新案公報	1 9 9 4 - 2 0 1 5 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)

CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS/WPIX(STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X Y	前田卓也他, iPS 細胞技術を用いたがん抗原特異的 T 細胞の再生, 再生医療, 2014.01, Vol.13, Suppl.2014, p.226, 0-29-2	6-12, 15-18 1-19
Y	河本宏, iPS 細胞技術のがん治療への応用, 腫瘍内科, 2013, Vol.12, No.4, p.450-459	1-19
Y	南川淳隆他, 3. iPS 細胞からの抗原特異的 T 細胞誘導とその臨床応用, 血液フロンティア, 2014.01, Vol.24, No.2, p.39-45	1-19

☒ 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

「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矛盾するものではなく、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

1 4 . 0 8 . 2 0 1 5

国際調査報告の発送日

2 5 . 0 8 . 2 0 1 5

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5

東京都千代田区霞が関三丁目 4 番 3 号

特許庁審査官 (権限のある職員)

原 大樹

4 N

5 2 7 8

電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 4 8 8

C (続き) . 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
Y	KAWAMOTO Hiroshi et al., Regeneration of antigen specific T cells using the iPSC technology: A novel strategy for cancer immunotherapy, 第 18 回日本がん免疫学会総会プログラム／抄録集, 2014. 06, p. 50, S1-3	1-19
Y	河本宏他, 初期化による抗原特異的 T 細胞のクローニングとバンク化構想, 再生医療, 2014. 01, Vol. 13, Suppl. 2014, p. 176, SY-25-4	1-19
Y	TAMANAKA Taichi et al., Recognition of a Natural WT1 Epitope by a Modified WT1 Peptide-specific T-Cell Receptor, Anticancer Research, 2012, Vol. 32, p. 5201-5210	1-19
Y	RIOLOBOS Laura et al., HLA Engineering of Human Pluripotent Stem Cells, Molecular Therapy, 2013, Vol. 21, No. 6, p. 1232-1241	1-19
Y	JP 2006-306822 A (独立行政法人科学技術振興機構) 2006. 11. 09, [0027] (ファミリーなし)	1-19
Y	MINAGAWA Atsutaka et al., ゲノムエディットを利用した、iPS 細胞よりの抗原特異的 T 細胞の産生, 第 18 回日本がん免疫学会総会プログラム／抄録集, 2014. 06, p. 161, Q19-3	1-19
Y	LEI Fengyang et al., In Vivo Programming of Tumor Antigen-Specific T Lymphocytes from Pluripotent Stem Cells to Promote Cancer Immunosurveillance, Cancer Research, 2011, Vol. 71, No. 14, p. 4742-4747	1-19
Y	LEI Fengyang et al., Dual signals of TCR and Notch promote antigen-specific T cell development from pluripotent stem cells (P4370), The Journal of Immunology, 2013, Vol. 190, 177.18	1-19

C (続き) . 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
Y	JURGENS Lisa A. et al., Transduction of Primary Lymphocytes with Epstein-Barr Virus (EBV) Latent Membrane Protein-Specific T-Cell Receptor Induces Lysis of Virus-Infected Cells: A Novel Strategy for the Treatment of Hodgkin's Disease and Nasopharyngeal Carcinoma, Journal of Clinical Immunology, 2006, Vol.26, No.1, p.22-32	1-19
A	THEMELI Maria et al., Generation of tumor-targeted human T lymphocytes from induced pluripotent stem cells for cancer therapy, Nature Biotechnology, 2013, Vol.31, No.10, p.928-933	1-19