

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2020-518289

(P2020-518289A)

(43) 公表日 令和2年6月25日 (2020.6.25)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 5/0783 (2010.01)	C 1 2 N 5/0783	4 B 0 6 5
A 6 1 K 35/17 (2015.01)	A 6 1 K 35/17	4 C 0 8 4
A 6 1 P 31/00 (2006.01)	A 6 1 P 31/00	4 C 0 8 7
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 0 5	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 78 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2020-512082 (P2020-512082)	(71) 出願人	513200313
(86) (22) 出願日	平成30年5月3日 (2018.5.3)		キングス・カレッジ・ロンドン
(85) 翻訳文提出日	令和1年12月25日 (2019.12.25)		イギリス国, ロンドン グレーター ロン
(86) 国際出願番号	PCT/EP2018/061413		ドン ダブリューシー2アール 2エルエ
(87) 国際公開番号	W02018/202808		ス, ストランド
(87) 国際公開日	平成30年11月8日 (2018.11.8)	(71) 出願人	519391608
(31) 優先権主張番号	1707048.3		ガンマデルタ セラピューティクス リミ
(32) 優先日	平成29年5月3日 (2017.5.3)		ティッド
(33) 優先権主張国・地域又は機関	英国 (GB)		イギリス国 ダブリュ 1 2 7エフキュー
		(74) 代理人	110002572
			特許業務法人平木国際特許事務所
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ガンマデルタ T 細胞の増幅、組成物およびその使用

(57) 【要約】

本発明は、非造血組織を細胞源として、 $\gamma\delta$ T細胞を増幅する方法を提供する。さらに、増幅された $\gamma\delta$ T細胞の組成物、および前記 $\gamma\delta$ T細胞を用いた方法（例えば、養子T細胞療法の一部）を提供する。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

以下のステップ：

- (i) 非造血組織から得られた $\gamma\delta$ T細胞の集団を提供するステップ；
- (ii) 前記 $\gamma\delta$ T細胞を、効果的な量の
 - (a) IL-2またはIL-9；
 - (b) IL-15；および
 - (c) IL-21

の存在下で少なくとも5日間培養して増幅された $\gamma\delta$ T細胞の集団を生成するステップ；

10

を含む、 $\gamma\delta$ T細胞を増幅させる方法。

【請求項 2】

ステップ(ii)が、さらにIL-4の存在下での $\gamma\delta$ T細胞の培養を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

以下のステップ：

- (i) 非造血組織から得られた $\gamma\delta$ T細胞の集団を提供するステップ；
 - (ii) 前記 $\gamma\delta$ T細胞を、IL-2と、IL-15と、IL-21、ストロマ細胞由来因子 (SDF)、IL-1 β 、IL-12、IL-18およびIL-33からなる群より選択される少なくとも1つの因子と、の存在下で少なくとも5日間培養して、増幅された $\gamma\delta$ T細胞の集団を生成するステップ；
- を含む、 $\gamma\delta$ T細胞を増幅させる方法。

20

【請求項 4】

ステップ(ii)が、外因性TCR経路アゴニストの不存在下での $\gamma\delta$ T細胞の培養を含む、請求項 1～3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 5】

ステップ(ii)が、無血清培地での $\gamma\delta$ T細胞の培養を含む、請求項 1～4 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 6】

ステップ(i)の後、分離された $\gamma\delta$ T細胞の集団を生成するために、前記 $\gamma\delta$ T細胞を非造血細胞から分離する工程をさらに含み、かつ、

30

ステップ(ii)が以下を含む：

- (a) 実質的にストロマ細胞との接触がない、 $\gamma\delta$ T細胞の培養；
- (b) 実質的に腫瘍細胞との接触がない、 $\gamma\delta$ T細胞の培養；および/または
- (c) 実質的に支持細胞との接触がない、 $\gamma\delta$ T細胞の培養；

請求項 1～5 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 7】

以下のステップ：

- (i) 非造血細胞および $\gamma\delta$ T細胞を含む非造血組織を提供するステップ；
 - (ii) $\gamma\delta$ T細胞を非造血細胞から分離して、分離された $\gamma\delta$ T細胞の集団を得るステップ；
 - (iii) 前記 $\gamma\delta$ T細胞を、IL-2と、IL-15と、IL-21、SDF、IL-1 β 、IL-12、IL-18およびIL-33からなる群より選択される因子と、の存在下で少なくとも5日間培養して、増幅された $\gamma\delta$ T細胞の集団を生成するステップ；
- を含む、 $\gamma\delta$ T細胞を増幅させる方法。

40

【請求項 8】

前記非造血組織は、ヒトまたは非ヒト動物の対象から得られたものである、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】

ステップ(ii)が、IL-2、IL-15およびIL-21の存在下での $\gamma\delta$ T細胞の培養を含む、請求項 7 または 8 に記載の方法。

50

【請求項 10】

ステップ(ii)が無血清培地での $\gamma\delta$ T細胞の培養を含む、請求項7～9のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 11】

ステップ(iii)が、実質的にストロマ細胞と前記 $\gamma\delta$ T細胞との接触がない条件下での $\gamma\delta$ T細胞の培養を含む、請求項7～10のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 12】

ステップ(iii)が、外因性TCR経路アゴニストが存在しない条件下での $\gamma\delta$ T細胞の培養を含む、請求項7～11のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 13】

非造血細胞から $\gamma\delta$ T細胞を分離するステップが、非造血組織から細胞を放出させるように構築された合成スキャホールド上での $\gamma\delta$ T細胞の培養を含む、請求項6～12のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 14】

非造血細胞から $\gamma\delta$ T細胞を分離するステップが、IL-2および/またはIL-15の存在下での $\gamma\delta$ T細胞と非造血細胞との培養を含む、請求項6～13のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 15】

分離されたリンパ球の集団が分離された $\gamma\delta$ T細胞の集団を含み、前記分離された $\gamma\delta$ T細胞の集団が分離されたV δ 1 T細胞の集団を含む、請求項6～14のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 16】

前記分離されたリンパ球の集団の1～10%が、増幅前の $\gamma\delta$ T細胞である、請求項15に記載の方法。

【請求項 17】

前記分離されたリンパ球の集団の1～10%が、増幅前のV δ 1 T細胞である、請求項15または16に記載の方法。

【請求項 18】

前記分離された $\gamma\delta$ T細胞の集団の少なくとも80%が、増幅前のV δ 1 T細胞である、請求項6～17のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 19】

前記分離された $\gamma\delta$ T細胞の集団の10%未満が、増幅前のV δ 2 T細胞である、請求項6～18のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 20】

$\alpha\beta$ T細胞および/またはNK細胞は、前記分離された $\gamma\delta$ T細胞の集団から除去される、請求項6～19のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 21】

増幅前に、前記分離された $\gamma\delta$ T細胞の集団が、少なくとも10%のCCR3⁺細胞、少なくとも10%のCCR4⁺細胞、少なくとも10%のCCR7⁺細胞、少なくとも10%のCCR8⁺細胞、または少なくとも10%のCD103⁺細胞を含む、請求項6～20のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 22】

増幅前に、前記分離された $\gamma\delta$ T細胞の集団が、参照となる血液常在性V δ 2 T細胞の集団と比較して、高頻度のCCR3⁺細胞、CCR4⁺細胞、CCR7⁺細胞および/またはCCR8⁺細胞を含む、請求項6～21のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 23】

前記分離されたV δ 1 T細胞の集団が、参照となる血液常在性V δ 1 T細胞の集団と比較して、高頻度のNKG2D⁺細胞、CD56⁺細胞、CD69⁺細胞および/またはTIM3⁺細胞を含む、請求項14～22のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 24】

14日間以内の培養で、増幅された $\gamma\delta$ T細胞の集団が、増幅前の分離された $\gamma\delta$ T細胞

10

20

30

40

50

の集団と比較して、少なくとも20倍の数の $\gamma\delta$ T細胞を含む、請求項1～23のいずれか1項に記載の方法。

【請求項25】

21日間以内の培養で、増幅された $\gamma\delta$ T細胞の集団が、増幅前の分離された $\gamma\delta$ T細胞の集団と比較して、少なくとも50倍の数の $\gamma\delta$ T細胞を含む、請求項1～24のいずれか1項に記載の方法。

【請求項26】

前記増幅された $\gamma\delta$ T細胞の集団が、増幅されたV δ 1 T細胞の集団を含む、請求項1～25のいずれか1項に記載の方法。

【請求項27】

14日間以内の培養で、増幅されたV δ 1 T細胞の集団が、増幅前の分離されたV δ 1 T細胞の集団と比較して、少なくとも20倍の数のV δ 1 T細胞を含む、請求項26に記載の方法。

【請求項28】

21日間以内の培養で、増幅されたV δ 1 T細胞の集団が、増幅前の分離されたV δ 1 T細胞の集団と比較して、少なくとも50倍の数のV δ 1 T細胞を含む、請求項26または27に記載の方法。

【請求項29】

増幅された $\gamma\delta$ T細胞の集団がCD27を発現する、請求項1～28のいずれか1項に記載の方法。

【請求項30】

増幅された $\gamma\delta$ T細胞の集団が、分離された $\gamma\delta$ T細胞の集団よりも、高いCD27発現量の中央値を示す、請求項29に記載の方法。

【請求項31】

増幅された $\gamma\delta$ T細胞の集団が、分離された $\gamma\delta$ T細胞の集団と比較して、少なくとも2倍のCD27発現量の中央値を示す、請求項30に記載の方法。

【請求項32】

増幅された $\gamma\delta$ T細胞の集団が、分離された $\gamma\delta$ T細胞の集団と比較して、高頻度のCD27⁺細胞を有する、請求項29に記載の方法。

【請求項33】

増幅された $\gamma\delta$ T細胞の集団が、分離された $\gamma\delta$ T細胞の集団と比較して、少なくとも5%高頻度のCD27⁺細胞を有する、請求項32に記載の方法。

【請求項34】

増幅されたV δ 1 T細胞の集団がCD27を発現する、請求項26～28のいずれか1項に記載の方法。

【請求項35】

増幅されたV δ 1 T細胞の集団が、分離されたV δ 1 T細胞の集団よりも、高いCD27発現量の中央値を示す、請求項34に記載の方法。

【請求項36】

増幅されたV δ 1 T細胞の集団が、分離されたV δ 1 T細胞の集団と比較して、少なくとも2倍のCD27発現量の中央値を示す、請求項35に記載の方法。

【請求項37】

増幅されたV δ 1 T細胞の集団が、分離されたV δ 1 T細胞の集団と比較して、高頻度のCD27⁺細胞を有する、請求項34～36のいずれか1項に記載の方法。

【請求項38】

増幅されたV δ 1 T細胞の集団が、分離されたV δ 1 T細胞の集団と比較して、少なくとも5%高頻度のCD27⁺細胞を有する、請求項37に記載の方法。

【請求項39】

増幅された $\gamma\delta$ T細胞の集団が、分離された $\gamma\delta$ T細胞の集団よりも、低いTIGIT平均発現量を示す、請求項1～38のいずれか1項に記載の方法。

【請求項40】

10

20

30

40

50

増幅された $\gamma\delta$ T細胞の集団が、分離された $\gamma\delta$ T細胞の集団よりも、少なくとも50%低いTIGIT平均発現量を示す、請求項39に記載の方法。

【請求項41】

増幅された $\gamma\delta$ T細胞の集団が、分離された $\gamma\delta$ T細胞の集団よりも、低頻度のTIGIT⁺細胞を有する、請求項39または40に記載の方法。

【請求項42】

増幅された $\gamma\delta$ T細胞の集団が、分離された $\gamma\delta$ T細胞の集団よりも、少なくとも20%低頻度のTIGIT⁺細胞を有する、請求項41に記載の方法。

【請求項43】

増幅されたV δ 1 T細胞の集団が、分離されたV δ 1 T細胞の集団よりも、低いTIGIT平均発現量を示す、請求項26～28、または34～38のいずれか1項に記載の方法。

10

【請求項44】

増幅されたV δ 1 T細胞の集団が、分離されたV δ 1 T細胞の集団よりも、少なくとも50%低いTIGIT平均発現量を示す、請求項43に記載の方法。

【請求項45】

増幅されたV δ 1 T細胞の集団が、分離されたV δ 1 T細胞の集団よりも、低頻度のTIGIT⁺細胞を有する、請求項26～28、または34～38のいずれか1項に記載の方法。

【請求項46】

増幅されたV δ 1 T細胞の集団が、分離されたV δ 1 T細胞の集団よりも、少なくとも20%低頻度のTIGIT⁺細胞を有する、請求項45に記載の方法。

20

【請求項47】

増幅された $\gamma\delta$ T細胞の集団における、CD124、CD215、CD360、CTLA4、CD1b、BTLA、CD39、CD45RA、Fasリガンド、CD25、ICAM-1、CD31、KLRG1、CD30、およびCD2からなる群から選択される1以上のマーカーの平均発現量が、分離された $\gamma\delta$ T細胞の集団と比較して高い、請求項1～46のいずれか1項に記載の方法。

【請求項48】

増幅された $\gamma\delta$ T細胞の集団における、CD124、CD215、CD360、CTLA4、CD1b、BTLA、CD39、CD45RA、Fasリガンド、CD25、ICAM-1、CD31、KLRG1、CD30、およびCD2からなる群から選択される1以上のマーカーを発現する細胞が、分離された $\gamma\delta$ T細胞の集団と比較して高頻度である、請求項1～47のいずれか1項に記載の方法。

30

【請求項49】

増幅された $\gamma\delta$ T細胞の集団における、Nkp44、Nkp46、ICAM-2、CD70、CD28、CD103、Nkp30、LAG3、CCR4、CD69、PD-1およびCD64からなる群から選択される1以上のマーカーの平均発現量が、分離された $\gamma\delta$ T細胞の集団と比較して低い、請求項1～48のいずれか1項に記載の方法。

【請求項50】

増幅された $\gamma\delta$ T細胞の集団における、Nkp44、Nkp46、ICAM-2、CD70、CD28、CD103、Nkp30、LAG3、CCR4、CD69、PD-1およびCD64からなる群から選択される1以上のマーカーを発現する細胞が、分離された $\gamma\delta$ T細胞の集団と比較して低頻度である、請求項1～49のいずれか1項に記載の方法。

40

【請求項51】

増幅されたV δ 1 T細胞の集団における、CD124、CD215、CD360、CTLA4、CD1b、BTLA、CD39、CD45RA、Fasリガンド、CD25、ICAM-1、CD31、KLRG1、CD30、およびCD2からなる群から選択される1以上のマーカーの平均発現量が、分離されたV δ 1 T細胞の集団と比較して高い、請求項26～28、34～38、43または45のいずれか1項に記載の方法。

【請求項52】

増幅された $\gamma\delta$ T細胞の集団における、CD124、CD215、CD360、CTLA4、CD1b、BTLA、CD39、CD45RA、Fasリガンド、CD25、ICAM-1、CD31、KLRG1、CD30、およびCD2からなる群から選択される1以上のマーカーを発現する細胞が、分離された $\gamma\delta$ T細胞の集団と比較して高頻度である、請求項26～28、34～38、43、45または51のいずれか1項

50

に記載の方法。

【請求項 5 3】

増幅された $\gamma \delta$ T細胞の集団における、Nkp44、Nkp46、ICAM-2、CD70、CD28、CD103、Nkp30、LAG3、CCR4、CD69、PD-1およびCD64からなる群から選択される1以上のマーカーの平均発現量が、分離された $\gamma \delta$ T細胞の集団と比較して低い、請求項 2 6 ~ 2 8、3 4 ~ 3 8、4 3、4 5、5 1または5 2のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 5 4】

増幅された $\gamma \delta$ T細胞の集団における、Nkp44、Nkp46、ICAM-2、CD70、CD28、CD103、Nkp30、LAG3、CCR4、CD69、PD-1およびCD64からなる群から選択される1以上のマーカーを発現する細胞が、分離された $\gamma \delta$ T細胞の集団と比較して低頻度である、請求項 2 6 ~ 2 8、3 4 ~ 3 8、4 3、4 5または5 1 ~ 5 3のいずれか1項に記載の方法。

10

【請求項 5 5】

ステップ(iii)が、実質的にストロマ細胞との接触がない、 $\gamma \delta$ T細胞の培養を含む、請求項 8 ~ 5 4のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 5 6】

ステップ(iii)が、実質的に支持細胞との接触がない、 $\gamma \delta$ T細胞の培養を含む、請求項 8 ~ 5 5のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 5 7】

ステップ(iii)が、実質的に腫瘍細胞との接触がない、 $\gamma \delta$ T細胞の培養を含む、請求項 8 ~ 5 5のいずれか1項に記載の方法。

20

【請求項 5 8】

前記非造血組織が腫瘍組織ではない、請求項 1 ~ 5 7のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 5 9】

前記非造血組織が皮膚である、請求項 1 ~ 5 8のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 6 0】

請求項 1 ~ 5 9のいずれかの方法により得られた、増幅された $\gamma \delta$ T細胞。

【請求項 6 1】

分離された集団の $\gamma \delta$ T細胞の少なくとも50%がCD27を発現し、実質的にTIGITを発現しない、分離された $\gamma \delta$ T細胞の集団。

30

【請求項 6 2】

分離された集団の $\gamma \delta$ T細胞の少なくとも50%がV δ 1を発現する、請求項 6 1に記載の分離された $\gamma \delta$ T細胞の集団。

【請求項 6 3】

請求項 6 0に記載の増幅された $\gamma \delta$ T細胞、または、請求項 6 1若しくは6 2に記載の分離された $\gamma \delta$ T細胞の集団を含む、医薬組成物。

【請求項 6 4】

対象における癌または感染症の治療方法に使用するための、請求項 6 3に記載の医薬組成物。

【請求項 6 5】

対象における癌または感染症の治療用薬剤の製造における、請求項 6 3に記載の医薬組成物の使用。

40

【請求項 6 6】

治療に効果的な量の、請求項 1 ~ 5 9のいずれか1項に記載の方法により得られた増幅された $\gamma \delta$ T細胞、請求項 6 0に記載の増幅された $\gamma \delta$ T細胞、請求項 6 1若しくは6 2に記載の分離された集団、または、請求項 6 3に記載の医薬組成物を、治療を要する対象に投与するステップを含む、養子T細胞療法により対象を治療する方法。

【請求項 6 7】

増幅された $\gamma \delta$ T細胞の治療に効果的な量は、1投与あたり 10×10^{12} 細胞未満である、請求項 6 6に記載の方法。

【請求項 6 8】

50

前記治療を要する対象への1以上の追加の治療剤の投与を含む、請求項66または67に記載の方法。

【請求項69】

前記1以上の追加の治療剤は、免疫療法剤、細胞傷害剤、成長阻害剤、放射線治療剤、血管新生阻害剤、およびこれらの組み合わせからなる群から選択される、請求項68に記載の方法。

【請求項70】

前記1以上の追加の治療剤は、前記増幅された $\gamma\delta$ T細胞と同時に投与される、請求項68または69に記載の方法。

【請求項71】

前記1以上の追加の治療剤は、前記増幅された $\gamma\delta$ T細胞の投与後に投与される、請求項68または69に記載の方法。

【請求項72】

前記追加の治療剤が、免疫療法剤である、請求項68～71のいずれか1項に記載の方法。

【請求項73】

治療に有効な量の請求項63に記載の医薬組成物を、治療を要する対象に投与するステップを含む、養子T細胞療法により対象を治療する方法。

【請求項74】

前記対象がヒトである、請求項66～73のいずれか1項に記載の方法。

【請求項75】

前記ヒトがヒト癌患者である、請求項74に記載の方法。

【請求項76】

前記ヒト癌患者が固形癌に対する治療を受けている、請求項75に記載の方法。

【請求項77】

前記ヒトはウイルス感染に対する治療を受けている、請求項76に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【背景技術】

【0001】

癌に対するT細胞免疫療法での高まる関心は、特に、PD1、CTLA4および他の受容体により発揮される阻害経路の臨床的に媒介される拮抗作用により脱抑制される場合に、癌細胞を認識し、かつ宿主保護的な機能的潜在能力を媒介する、CD8+およびCD4+ $\alpha\beta$ T細胞のサブセットの明白な能力に焦点を当てられてきた。それにもかかわらず、多くの疑問が残っている。例えば、そのような治療の有効性が乏しいと思われる多数の主要な臨床的状況があるようである。多くの場合に深刻な有害事象が生じ、有効性または有害事象を予測する能力が極端に限られており、かつ、従来の抗原特異的CD8+およびCD4+ $\alpha\beta$ T細胞応答の活性化に先行しなければならない、宿主が腫瘍細胞を感知することを可能にする相互作用（「免疫原性」）についての説明がほとんどない。

【0002】

ガンマデルタT細胞（ $\gamma\delta$ T細胞）は、明確に特徴的な $\gamma\delta$ T細胞受容体（TCR）をその表面に発現するT細胞のサブセットである。このTCRは1本のガンマ（ γ ）鎖と1本のデルタ（ δ ）鎖から成り立っている。ヒト $\gamma\delta$ T細胞は、広く1つまたは2つ—末梢血液常在性 $\gamma\delta$ T細胞と非造血組織常在性 $\gamma\delta$ T細胞に分類される。ほとんどの血液常在性 $\gamma\delta$ T細胞はV δ 2 TCRを発現するが、組織常在性 $\gamma\delta$ TCR細胞ではこれは一般的ではなく、V δ 1および/または他のV δ 鎖が使用される。非造血組織常在性 $\gamma\delta$ T細胞を多量に得ることは容易ではなく、分離・増幅の定型的なプロトコールも存在しないため、治療への適用のための特徴付けや研究は、十分には進められてこなかった。したがって、これを研究し、潜在的に養子T細胞療法等の療法に適用するために十分な量の非造血組織常在性 $\gamma\delta$ T細胞を、分離・増幅する方法については、解決を望まれる課題が存在する。

【発明の概要】

【0003】

本発明は、非造血組織源（例えば、非造血組織由来 $\gamma\delta$ T細胞、例えば、非造血組織由来V δ 1 T細胞）から $\gamma\delta$ T細胞（例えば、皮膚由来 $\gamma\delta$ T細胞および/または非V δ 2 T細胞、例えば、V δ 1 T細胞および/またはDN T細胞）を増幅する方法を提供する。増幅方法は、実質的にTCRによる刺激のない条件下で、並びに/または、IL-4、IL-15、IL-21及び/若しくはIL-2の存在する条件下で、 $\gamma\delta$ T細胞（例えば、非造血組織のストロマ細胞から分離された $\gamma\delta$ T細胞）を培養するステップを含む。さらに、増幅された $\gamma\delta$ T細胞（例えば、非造血組織由来 $\gamma\delta$ T細胞、例えば、非造血組織由来V δ 1 T細胞）、および $\gamma\delta$ T細胞の使用法（例えば、養子T細胞療法の一部、例えば、癌治療のためのもの）が提供される。

10

【0004】

一つの態様において、本発明は、 $\gamma\delta$ T細胞を以下のステップにより増幅する方法を特徴とする：(i)非造血組織から得られた $\gamma\delta$ T細胞の集団を提供するステップ；(ii) IL-2と、IL-15と、IL-4、IL-21、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-12、IL-18、IL-33、IGF-1、IL-1 β 、ヒト血小板溶解物（HPL）およびストロマ細胞由来因子-1（SDF-1）からなる群より選択される因子と、の存在下で少なくとも5日間培養して、増幅された $\gamma\delta$ T細胞の集団を生成するステップ。例えば、 $\gamma\delta$ T細胞は、IL-2、IL-15、およびIL-4；IL-2、IL-15およびIL-21；またはIL-2、IL-15、IL-4、およびIL-21の存在下で培養することができる。

【0005】

:

他の態様においては、本発明は、以下のステップにより $\gamma\delta$ T細胞を増幅する方法を提供する；(i)非造血組織から得られた $\gamma\delta$ T細胞の集団を提供するステップ；(ii)前記 $\gamma\delta$ T細胞を、効果的な量のIL-2、IL-4、IL-15および IL-21の存在下で、少なくとも5日間培養して増幅された $\gamma\delta$ T細胞の集団を生成するステップ。

20

【0006】

前述の両態様の一部の実施形態においては、前記 $\gamma\delta$ T細胞は、少なくとも5日間、IL-2、IL-4、IL-15およびIL-21に同時に曝される。一部の実施形態においては、ステップ(ii)は、外因性TCR経路アゴニストのない条件下での $\gamma\delta$ T細胞の培養を含む。一部の実施形態においては、前記方法は、ステップ(i)の後に、非造血細胞から $\gamma\delta$ T細胞を分離して、分離された $\gamma\delta$ T細胞の集団を生成するステップをさらに含み、かつ、ステップ(ii)は、以下を含む：(a)実質的にストロマ細胞との接触がない、 $\gamma\delta$ T細胞の培養；(b)実質的に腫瘍細胞との接触がない、 $\gamma\delta$ T細胞の培養；および/または(c)実質的に支持細胞との接触がない、 $\gamma\delta$ T細胞の培養。

30

【0007】

他の態様においては、 $\gamma\delta$ T細胞を増幅する方法は、以下のステップを含む：(i)非造血組織、非造血細胞を含む組織、および $\gamma\delta$ T細胞を提供するステップ；(ii)非造血細胞から $\gamma\delta$ T細胞を分離して、分離された $\gamma\delta$ T細胞の集団を得るステップ；および(iii) IL-2と、IL-15と、IL-4、IL-21、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-12、IL-18、IL-33、IGF-1、IL-1 β 、HPLおよびSDF-1からなる群より選択される因子と、の存在下で少なくとも5日間培養して、増幅された $\gamma\delta$ T細胞の集団を生成するステップ。一部の実施形態において、ステップ(ii)は、 $\gamma\delta$ T細胞のIL-2、IL-15、IL-4および/またはIL-21（例えば、IL-2、IL-15、およびIL-4；IL-2、IL-15およびIL-21；またはIL-2、IL-15、IL-4、およびIL-21）の存在下の培養を含む。一部の実施形態において、 $\gamma\delta$ T細胞は、IL-2、IL-15、IL-4および/またはIL-21に同時に曝される。一部の実施形態において、ステップ(iii)は、実質的に $\gamma\delta$ T細胞とストロマ細胞との接触のない条件下での $\gamma\delta$ T細胞の培養を含む。一部の実施形態において、ステップ(iii)は、外因性TCR経路アゴニストのない条件下での $\gamma\delta$ T細胞の培養を含む。

40

【0008】

他の態様においては、本発明は、以下のステップを含む $\gamma\delta$ T細胞を増幅する方法を特徴とする：(i)非造血組織から得られた $\gamma\delta$ T細胞の集団を提供するステップ；(ii) $\gamma\delta$

50

T細胞を、効果的な量のIL-2、IL-4、IL-15およびIL-21の存在下で、少なくとも5日間培養して増幅された $\gamma\delta$ T細胞の集団を生成するステップ。 $\gamma\delta$ T細胞は、IL-2、IL-4、IL-15およびIL-21に、例えば少なくとも5日間、同時に曝されてもよく、あるいは、他の因子に曝される前に、1以上の因子に曝されてもよい。一部の実施形態において、ステップ(ii)は、 $\gamma\delta$ T細胞を、効果的な量のヒト組み換えIL-2、ヒト組み換えIL-4、ヒト組み換えIL-15およびヒト組み換えIL-21の存在下で、少なくとも5日間培養して増幅された $\gamma\delta$ T細胞の集団を生成することを含む。一部の実施形態において、ステップ(ii)は、外因性TCR経路アゴニスト（例えば、抗CD3）のない条件下、例えば、実質的なTCR経路の活性化がない条件下での $\gamma\delta$ TCR細胞の培養を含む。一部の実施形態においては、ステップ(ii)は、1ng/mLから1,000 ng/mL（例えば、約10 ng/mL、または約100 ng/mL）の濃度のIL-21の存在下での $\gamma\delta$ T細胞の培養を含む。ステップ(ii)は、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-12、IL-18、IL-33、IGF-1、IL-1 β 、ヒト血小板溶解物（HPL）およびストロマ細胞由来因子-1（SDF-1）からなる群から選択された1以上の因子の存在下での $\gamma\delta$ T細胞の培養を含んでもよい。

10

【0009】

他の態様において、以下のステップによって $\gamma\delta$ T細胞を増幅する方法が提供される：(i)非造血組織から得られた $\gamma\delta$ T細胞の集団を提供するステップ；(ii) $\gamma\delta$ T細胞を、効果的な量のIL-2およびIL-15の存在下で、少なくとも5日間培養して増幅された $\gamma\delta$ T細胞の集団を生成するステップ。この態様の一部の実施形態において、 $\gamma\delta$ T細胞を細胞は、IL-2とIL-15に同時に曝される。ステップ(ii)は、外因性TCR経路アゴニストがない条件、または実質的にTCR経路の活性化がない条件下での $\gamma\delta$ T細胞の培養を含んでもよい。一部の実施形態において、ステップ(ii)は、IL-4、IL-21、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-12、IL-18、IL-33、IGF-1、IL-1 β 、HPLおよびSDF-1からなる群から選択された1以上の因子の存在下での $\gamma\delta$ T細胞の培養を含む。一部の実施形態において、 $\gamma\delta$ T細胞は、IL-4および/またはIL-21の存在下で培養される。一部の実施形態において、ステップ(ii)は、IL-2、IL-4、IL-15およびIL-21の存在下での $\gamma\delta$ T細胞の培養を含む。IL-21の濃度は、1 ng/mL から1,000 ng/mL（例えば、10 ng/mL または100 ng/mL）とすることができる。

20

【0010】

さらに他の態様において、本発明は、以下のステップによって $\gamma\delta$ T細胞を増幅する方法を特徴とする：(i)非造血組織から得られた $\gamma\delta$ T細胞の集団を提供するステップ；(ii) $\gamma\delta$ T細胞を、実質的にTCR経路の活性化のない条件下で、少なくとも5日間培養して増幅された $\gamma\delta$ T細胞の集団を生成するステップ。一部の実施形態において、ステップ(ii)は、IL-2とIL-15の存在下での $\gamma\delta$ T細胞の培養を含む。一部の例において、 $\gamma\delta$ T細胞は、IL-4とIL-15に同時に曝される。一部の実施形態において、ステップ(ii)は、IL-4、IL-21、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-12、IL-18、IL-33、IGF-1、IL-1 β 、HPLおよびSDF-1からなる群から選択された1以上の因子の存在下での $\gamma\delta$ T細胞の培養を含む。例えば、 $\gamma\delta$ T細胞は、IL-4、IL-21または両方の存在下で培養されてもよい。一部の実施形態において、 $\gamma\delta$ T細胞は、IL-2、IL-4、IL-15およびIL-21の存在下で培養される。IL-21の濃度は、1ng/mLから1,000 ng/mL（例えば、10 ng/mLまたは100ng/mL）とすることができる。

30

40

【0011】

前述のいずれかの態様の一部の実施形態において、本発明の方法は、さらに、ステップ(i)の後に、 $\gamma\delta$ T細胞を非造血細胞から分離して、分離された $\gamma\delta$ T細胞の集団を生成するステップを含み、かつ、ステップ(ii)は、実質的にストロマ細胞との接触のない条件下、実質的に腫瘍細胞との接触のない条件下、および/または実質的に支持細胞（例えば、放射線照射された支持細胞、B細胞、または抗原提示細胞）との接触のない条件下での $\gamma\delta$ T細胞の培養を含む。

【0012】

他の態様において、ここでは、以下のステップによって $\gamma\delta$ T細胞を増幅する方法を特徴とする：(i)非造血細胞および $\gamma\delta$ T細胞を含む非造血組織を提供するステップ；(ii)

50

$\gamma\delta$ T細胞を非造血細胞から分離して、分離された $\gamma\delta$ T細胞の集団を得るステップ；(i) 前記 $\gamma\delta$ T細胞を、実質的にストロマ細胞と $\gamma\delta$ T細胞との接触のない条件下で、少なくとも5日間培養して、増幅された $\gamma\delta$ T細胞の集団を得るステップ。一部の実施形態において、ステップ(iii)は、外因性TCR経路アゴニストのない条件および/または実質的にTCR経路の活性化がない条件下での $\gamma\delta$ T細胞の培養を含む。一部の実施形態において、ステップ(iii)は、IL-2およびIL-15の存在下での $\gamma\delta$ T細胞の培養を含む。例えば、 $\gamma\delta$ T細胞は、IL-2およびIL-15に同時に曝されてもよい。一部の実施形態において、ステップ(iii)は、IL-4、IL-21、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-12、IL-18、IL-33、IGF-1、IL-1 β 、HPLおよびSDF-1からなる群から選択された1以上の因子の存在下での $\gamma\delta$ T細胞の培養を含む。例えば、一部の例において、ステップ(iii)は、IL-4、IL-21またはその両方の存在下での $\gamma\delta$ T細胞の培養を含む。一部の実施形態において、ステップ(iii)は、IL-2、IL-4、IL-15およびIL-21の存在下での $\gamma\delta$ T細胞の培養を含む。IL-21の濃度は、1ng/mLから1,000 ng/mL（例えば、10 ng/mLまたは100 ng/mL）とすることができる。

【0013】

他の態様において、本発明は、以下のステップによって $\gamma\delta$ T細胞を増幅させる方法を提供する：(i)非造血組織を提供するステップ、ここで、前記組織は非造血細胞及び $\gamma\delta$ T細胞を含む組織である；(ii) $\gamma\delta$ T細胞を非造血細胞から分離して、分離された $\gamma\delta$ T細胞の集団を得るステップ；(iii)前記 $\gamma\delta$ T細胞を、IL-2およびIL-15の存在下で、少なくとも5日間培養して、増幅された $\gamma\delta$ T細胞の集団を得るステップ。一部の実施形態において、ステップ(iii)は、実質的にストロマ細胞と $\gamma\delta$ T細胞の接触のない条件下での $\gamma\delta$ T細胞の培養を含む。一部の実施形態において、ステップ(iii)は、外因性TCR経路アゴニストのない条件、または実質的にTCR経路の活性化がない条件下での $\gamma\delta$ T細胞の培養を含む。一部の実施形態において、ステップ(iii)は、IL-2およびIL-15の存在下での $\gamma\delta$ T細胞の培養を含む。 $\gamma\delta$ T細胞は、IL-2およびIL-15に同時に曝されてもよい。一部の例において、ステップ(iii)は、IL-4、IL-21、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-12、IL-18、IL-33、IGF-1、IL-1 β 、HPLおよびSDF-1からなる群から選択された1以上の因子の存在下での $\gamma\delta$ T細胞の培養を含む。例えば、 $\gamma\delta$ T細胞は、IL-2および/またはIL-21の存在下で培養されてもよい。一部の実施形態において、ステップ(iii)は、IL-2、IL-4、IL-15およびIL-21の存在下での $\gamma\delta$ T細胞の培養を含む。IL-21の濃度は、1ng/mLから1,000ng/mL（例えば、10ng/mLまたは100ng/mL）とすることができる。

【0014】

さらに他の態様において、ここでは、以下のステップによって $\gamma\delta$ T細胞を増幅する方法を特徴とする：(i)非造血組織を提供するステップ、ここで、前記組織は非造血細胞及び $\gamma\delta$ T細胞を含む組織である；(ii) $\gamma\delta$ T細胞を非造血細胞から分離して、分離された $\gamma\delta$ T細胞の集団を得るステップ；(iii)前記 $\gamma\delta$ T細胞を、実質的にTCR経路の活性化のない条件下で、少なくとも5日間培養して、増幅された $\gamma\delta$ T細胞の集団を得るステップ。一部の例において、ステップ(iii)は、外因性TCR経路アゴニストのない条件および/または実質的にストロマ細胞と $\gamma\delta$ T細胞との接触のない条件下での $\gamma\delta$ T細胞の培養を含む。一部の実施形態において、ステップ(iii)は、IL-2およびIL-15の存在下での $\gamma\delta$ T細胞の培養を含む。例えば、 $\gamma\delta$ T細胞は、IL-2およびIL-15に同時に曝されてもよい。一部の実施形態において、ステップ(iii)は、IL-4、IL-21、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-12、IL-18、IL-33、IGF-1、IL-1 β 、HPLおよびSDF-1からなる群から選択された1以上の因子の存在下での $\gamma\delta$ T細胞の培養を含む。例えば、 $\gamma\delta$ T細胞は、IL-2および/またはIL-21の存在下で培養されてもよい。一部の実施形態において、ステップ(iii)は、IL-2、IL-4、IL-15およびIL-21の存在下での $\gamma\delta$ T細胞の培養を含む。IL-21の濃度は、1ng/mLから1,000ng/mL（例えば、10ng/mLまたは100ng/mL）とすることができる。

【0015】

前述のいずれかの方法の一部の実施形態において、非造血細胞から $\gamma\delta$ T細胞を分離するステップは、非造血組織から細胞を放出させるように構築された、合成スキャホールド上での $\gamma\delta$ T細胞の培養を含む。一部の例において、非造血細胞からの $\gamma\delta$ T細胞の分離

は、IL-2、IL-15またはその両方の存在下での $\gamma\delta$ T細胞と非造血細胞との培養を含む。一部の実施形態において、分離されたリンパ球の集団は、分離された $\gamma\delta$ T細胞の集団を含み、分離された $\gamma\delta$ T細胞の集団は、分離されたV δ 1 T細胞および/またはダブルネガティブ（DN細胞）の集団を含む。一部の実施形態において、増幅ステップの前の段階で、分離されたリンパ球の集団の1~10%は、 $\gamma\delta$ T細胞である。一部の実施形態において、増幅ステップの前の段階で、分離されたリンパ球の集団の1~10%は、V δ 1 T細胞である。増幅ステップの前段階で、分離された $\gamma\delta$ T細胞の集団の少なくとも80%はV δ 1 T細胞であってもよく、および/または分離された $\gamma\delta$ T細胞の10%未満がV δ 2 T細胞であってもよい。一部の実施形態において、 $\alpha\beta$ T細胞および/またはNK細胞は、分離された $\gamma\delta$ T細胞の集団から除去される（例えば、増幅工程の前）。 10

【0016】

一部の実施形態において、増幅工程の前段階で、分離された $\gamma\delta$ T細胞の集団は、少なくとも10%のCCR3⁺細胞、少なくとも10%のCCR4⁺細胞、少なくとも10%のCCR7⁺細胞、少なくとも10%のCCR8⁺細胞、または少なくとも10%のCD103⁺細胞を含む。一部の実施形態において、増幅工程の前段階で、分離された $\gamma\delta$ T細胞の集団は、参照となる集団（例えば、参照となる血液常在性V δ 2 T細胞の集団）と比較して多数のCCR3⁺細胞、CCR4⁺細胞、CCR7⁺細胞、および/またはCCR8⁺細胞を含む。一部の実施形態において、増幅工程の前段階で、分離されたV δ 1 T細胞の集団は、参照となる集団（例えば、参照となる血液常在性V δ 2 T細胞の集団）と比較して、多数のNKG2D⁺細胞、CD56⁺細胞、CD69⁺細胞および/またはTIM3⁺細胞を含む。 20

【0017】

前述のいずれかの態様の一部の実施形態において、増幅ステップの間の14日以内の培養で、増幅された $\gamma\delta$ T細胞の集団は、増幅ステップ前の分離された $\gamma\delta$ T細胞の集団と比較して、少なくとも20倍の数の $\gamma\delta$ T細胞を含む。これに加えて、または、これに代えて、増幅ステップの間の21日以内の培養で、増幅された $\gamma\delta$ T細胞の集団が、増幅前の分離された $\gamma\delta$ T細胞の集団と比較して、少なくとも50倍の数の $\gamma\delta$ T細胞を含み得る。増幅された $\gamma\delta$ T細胞の集団は、増幅されたV δ 1 T細胞の集団を含む。一部の実施形態において、増幅ステップの間の14日以内の培養で、増幅されたV δ 1 T細胞の集団が、増幅前の分離されたV δ 1 T細胞の集団と比較して、少なくとも20倍の数のV δ 1 T細胞を含む。これに加えて、または、これに代えて、増幅ステップの間の21日以内の培養で、増幅されたV δ 1 T細胞の集団が、増幅前の分離されたV δ 1 T細胞の集団と比較して、少なくとも50倍の数のV δ 1 T細胞を含む。 30

【0018】

前述のいずれかの態様の一部の実施形態において、増幅された $\gamma\delta$ T細胞の集団はCD27を発現する。例えば、増幅された $\gamma\delta$ T細胞の集団は、分離された $\gamma\delta$ T細胞の集団よりも高いCD27表面発現量の中央値を示し得る。一部の例において、増幅された $\gamma\delta$ T細胞の集団は、分離された $\gamma\delta$ T細胞の集団と比較して少なくとも2倍のCD27表面発現量の中央値を示す。これに加えて、または、これに代えて、増幅された $\gamma\delta$ T細胞の集団は、分離された $\gamma\delta$ T細胞の集団よりも多数のCD27⁺細胞を有し得る。例えば、増幅された $\gamma\delta$ T細胞の集団が、分離された $\gamma\delta$ T細胞の集団と比較して少なくとも5%多くのCD27⁺細胞を有し得る。一部の実施形態において、増幅されたV δ 1 T細胞の集団はCD27を発現する。一部の実施形態において、増幅されたV δ 1 T細胞の集団は、分離されたV δ 1 T細胞の集団よりも高いCD27表面発現量の中央値を示す。例えば、増幅されたV δ 1 T細胞の集団は、分離されたV δ 1 T細胞の集団と比較して少なくとも2倍のCD27表面発現量の中央値を示し得る。これに加えて、または、これに代えて、増幅されたV δ 1 T細胞の集団は、分離されたV δ 1 T細胞の集団よりも高頻度のCD27⁺細胞を有し得る。例えば、増幅されたV δ 1 T細胞の集団が、分離されたV δ 1 T細胞の集団と比較して少なくとも5%高頻度のCD27⁺細胞を有し得る。 40

【0019】

前述のいずれかの態様の一部の実施形態において、増幅された $\gamma\delta$ T細胞の集団は、分 50

離された $\gamma\delta$ T細胞の集団よりも低いTIGIT表面発現量の中央値を示す。例えば、増幅された $\gamma\delta$ T細胞の集団は、分離された $\gamma\delta$ T細胞の集団よりも少なくとも50%低いTIGIT表面発現量の中央値を示し得る。これに加えて、または、これに代えて、増幅された $\gamma\delta$ T細胞の集団は、分離された $\gamma\delta$ T細胞の集団よりも低頻度のTIGIT⁺細胞を有し得る。例えば、増幅された $\gamma\delta$ T細胞の集団は、分離された $\gamma\delta$ T細胞の集団よりも少なくとも20%低頻度のTIGIT⁺細胞を有し得る。一部の実施形態において、増幅されたV δ 1 T細胞の集団は、分離されたV δ 1 T細胞の集団よりも低いTIGIT表面発現量の中央値を示す。例えば、増幅されたV δ 1 T細胞の集団は、分離されたV δ 1 T細胞の集団よりも少なくとも50%低い、TIGIT表面発現量の中央値を示し得る。これに加えて、または、これに代えて、増幅されたV δ 1 T細胞の集団は、分離されたV δ 1 T細胞の集団よりも低頻度のTIGIT⁺細胞を有し得る。例えば、増幅されたV δ 1 T細胞の集団は、分離されたV δ 1 T細胞の集団よりも少なくとも20%低頻度のTIGIT⁺細胞を有し得る。

10

【0020】

前述のいずれかの態様の一部の実施形態において、増幅された $\gamma\delta$ T細胞の集団における、CD124、CD215、CD360、CTLA4、CD1b、BTLA、CD39、CD45RA、Fasリガンド、CD25、ICAM-1、CD31、KLRG1、CD30、およびCD2からなる群から選択される1以上のマーカーの表面発現量は、参照となる集団と比較して（例えば、分離された $\gamma\delta$ T細胞の集団と比較して、例えば、増幅前の分離された $\gamma\delta$ T細胞の集団と比較して）高い値を示す。これに加えて、または、これに代えて、増幅された $\gamma\delta$ T細胞の集団における、CD124、CD215、CD360、CTLA4、CD1b、BTLA、CD39、CD45RA、Fasリガンド、CD25、ICAM-1、CD31、KLRG1、CD30、およびCD2からなる群から選択される1以上のマーカーを発現する細胞の数は、参照となる集団と比較して（例えば、分離された $\gamma\delta$ T細胞の集団と比較して、例えば、増幅前の分離された $\gamma\delta$ T細胞の集団と比較して）高頻度となり得る。一部の実施形態において、増幅された $\gamma\delta$ T細胞の集団における、NKp44、NKp46、ICAM-2、CD70、CD28、CD103、NKp30、LAG3、CCR4、CD69、PD-1およびCD64からなる群から選択される1以上のマーカーの表面発現量は、参照となる集団と比較して（例えば、分離された $\gamma\delta$ T細胞の集団と比較して、例えば、増幅前の分離された $\gamma\delta$ T細胞の集団と比較して）低い値を示す。これに加えて、または、これに代えて、増幅された $\gamma\delta$ T細胞の集団における、NKp44、NKp46、ICAM-2、CD70、CD28、CD103、NKp30、LAG3、CCR4、CD69、PD-1およびCD64からなる群から選択される1以上のマーカーを発現する細胞の数は、参照となる集団と比較して（例えば、分離された $\gamma\delta$ T細胞の集団と比較して、例えば、増幅前の分離された $\gamma\delta$ T細胞の集団と比較して）低頻度となり得る。

20

30

【0021】

一部の実施形態において、増幅されたV δ 1 T細胞の集団における、CD124、CD215、CD360、CTLA4、CD1b、BTLA、CD39、CD45RA、Fasリガンド、CD25、ICAM-1、CD31、KLRG1、CD30、およびCD2からなる群から選択される1以上のマーカーの表面発現量は、参照となる集団と比較して（例えば、分離された $\gamma\delta$ T細胞の集団と比較して、例えば、増幅前の分離された $\gamma\delta$ T細胞の集団と比較して）高い値を示す。一部の実施形態において、増幅されたV δ 1 T細胞の集団における、CD124、CD215、CD360、CTLA4、CD1b、BTLA、CD39、CD45RA、Fasリガンド、CD25、ICAM-1、CD31、KLRG1、CD30、およびCD2からなる群から選択される1以上のマーカーを発現する細胞の数は、参照となる集団と比較して（例えば、分離された $\gamma\delta$ T細胞の集団と比較して、例えば、増幅前の分離された $\gamma\delta$ T細胞の集団と比較して）高頻度となる。一部の実施形態において、増幅された $\gamma\delta$ T細胞の集団における、NKp44、NKp46、ICAM-2、CD70、CD28、CD103、NKp30、LAG3、CCR4、CD69、PD-1およびCD64からなる群から選択される1以上のマーカーの表面発現量は、参照となる集団と比較して（例えば、分離された $\gamma\delta$ T細胞の集団と比較して、例えば、増幅前の分離された $\gamma\delta$ T細胞の集団と比較して）低い値を示す。他の実施形態において、増幅された $\gamma\delta$ T細胞の集団における、NKp44、NKp46、ICAM-2、CD70、CD28、CD103、NKp30、LAG3、CCR4、CD69、PD-1およびCD64からなる群から選択される1以上のマーカーを発現する細胞の数は、参照となる集団と比較して（例えば、分離された $\gamma\delta$ T細胞の集団と比較して、例えば、増幅前の

40

50

分離された $\gamma\delta$ T細胞の集団と比較して) 低頻度となる。

【0022】

前述のいずれかの態様の一部の実施形態において、ステップ(iii)は、実質的にストロマ細胞との接触がない、実質的に支持細胞との接触がない、および/または、実質的に腫瘍細胞との接触がない、 $\gamma\delta$ T細胞の培養を含む。一部の実施形態において、非造血組織は、腫瘍細胞ではない。

【0023】

前述のいずれかの態様の一部の実施形態において、非造血組織は皮膚である（例えば、ヒトの皮膚、例えば、パンチ生検で取得された皮膚）。他の実施形態において、非造血組織は消化管組織である。

【0024】

前述のいずれかの態様および実施形態において、 $\gamma\delta$ T細胞を増幅する方法は、in vitro で実施され得る。

【0025】

前述のいずれかの態様および実施形態において、非造血組織を提供するステップは、対象（例えば、ヒトまたは非ヒト動物の対象）から得られた非造血細胞を提供ステップであり得る。

【0026】

他の態様において、本発明は、前述の態様のいずれか1つの方法によって得られた、増幅された $\gamma\delta$ T細胞を特徴とする。

【0027】

他の態様において、本発明は、前記態様の増殖された $\gamma\delta$ T細胞を含む医薬組成物を提供する。一部の実施形態において、医薬組成物は、さらに、免疫療法剤、細胞傷害剤、成長阻害剤、放射線治療剤、血管新生阻害剤、および2以上の薬剤の組み合わせからなる群から選択される、追加の治療剤を含む。一部の実施形態において、前記追加の治療剤は、免疫療法剤である（例えば、IL-2、例えば、低用量のIL-2、例えば、1日当たり $0.3 \times 10^6 \sim 3.0 \times 10^6$ IUのIL-2、例えば、1日当たり 1.0×10^6 IUのIL-2）。

【0028】

他の態様において、本発明は、養子T細胞療法によって対象を治療する方法に使用するための、前述の態様の医薬組成物を特徴とする。

【0029】

他の態様において、本発明は、養子T細胞療法によって対象を治療する方法に使用するための、前述のいずれかの態様の増殖された $\gamma\delta$ T細胞を特徴とする。

【0030】

さらに他の態様において、本発明は、対象の癌（例えば固形癌）、感染症（例えばサイトメガロウイルス（CMV）感染）、または免疫疾患を治療するための薬剤の製造における、前述のいずれかの態様の増殖された $\gamma\delta$ T細胞またはその医薬組成物の使用を提供する。

【0031】

他の態様において、本発明は、対象の癌（例えば固形癌）、感染症（例えばサイトメガロウイルス（CMV）感染）、または免疫疾患を治療する方法に使用するための、前述のいずれかの態様の増殖された $\gamma\delta$ T細胞またはその医薬組成物を提供する。

【0032】

他の態様において、本発明は、治療に効果的な量の、前述のいずれかの実施形態の方法によって得られた増幅された $\gamma\delta$ T細胞を、治療を要する対象へ投与する、養子T細胞療法により対象を治療する方法を提供する。一部の実施形態において、増幅された $\gamma\delta$ T細胞の治療に効果的な量は、1投与あたり 10×10^{12} 細胞未満、または治療コースを通して 10×10^{12} 細胞未満である。一部の実施形態において、前記方法は、さらに治療を要する対象への、1以上の追加の治療剤の投与を含む。追加の治療剤は、免疫療法剤、細胞傷害剤、成長阻害剤、放射線治療剤、血管新生阻害剤、および、これらの2以上の薬剤の組み合わ

10

20

30

40

50

せからなる群から選択され得る。前記追加の治療剤は、増殖された $\gamma\delta$ T細胞と同時に、増殖された $\gamma\delta$ T細胞の投与前に、または増殖された $\gamma\delta$ T細胞の投与後に投与され得る。一部の実施形態において、追加の治療剤は、免疫療法剤である。1つの実施形態において、免疫療法剤はIL-2である（例えば、低用量のIL-2、例えば、1日当たり $0.3 \times 10^6 \sim 3.0 \times 10^6$ IUのIL-2、例えば、1日当たり 1.0×10^6 IUのIL-2）。これらの実施形態は、養子T細胞療法による対象の治療方法における、本明細書に記載の方法により得られる増幅された $\gamma\delta$ T細胞（または、これらの $\gamma\delta$ T細胞を含む医薬組成物）の使用に関連する、前述および後述のいずれの態様にも適用される。

【0033】

他の態様において、本発明は、治療に効果的な量の、前述のいずれかの態様に記載の医薬組成物を、治療を必要とする対象に投与する、養子T細胞療法により対象を治療する方法を特徴とする。

【0034】

前述のいずれかの態様の一部の実施形態において、前記対象はヒト（例えばヒト癌患者（例えば、固形癌のための治療を受けているヒト癌患者）、または感染症（例えば、CMV等のウイルス感染症）の治療を受けているヒト癌患者）である。

【0035】

他の態様において、本発明は、以下のステップを含む $\gamma\delta$ T細胞を増幅させる方法の特徴とする：(i)非造血組織から得られた $\gamma\delta$ T細胞の集団を提供するステップ；(ii)前記 $\gamma\delta$ T細胞を、効果的な量の(a)IL-2またはIL-9；(b)IL-15；および(c)IL-21の存在下で少なくとも5日間培養して増幅された $\gamma\delta$ T細胞の集団を生成するステップ。一部の実施形態において、 $\gamma\delta$ T細胞は、ステップ(ii)でさらにIL-4の存在下で培養される。

【0036】

さらに他の態様において、本発明は、以下のステップにより $\gamma\delta$ T細胞を増幅させる方法の特徴とする：(i)非造血組織から得られた $\gamma\delta$ T細胞の集団を提供するステップ；(ii) IL-2と、IL-15と、IL-21、ストロマ細胞由来因子（SDF、例えばSDF-1）、IL-1 β 、IL-12、IL-18およびIL-33からなる群より選択される因子と、の存在下で少なくとも5日間培養して、増幅された $\gamma\delta$ T細胞の集団を生成するステップ。一部の実施形態において、ステップ(ii)は、外因性TCR経路アゴニストのない条件下での $\gamma\delta$ T細胞の培養を含む。一部の実施形態において、ステップ(ii)は、無血清培地での $\gamma\delta$ T細胞の培養を含む。一部の実施形態において、ステップ(i)の後に、 $\gamma\delta$ T細胞は、非造血細胞から分離され、分離された $\gamma\delta$ T細胞の集団が生成される。加えて、ステップ(ii)は、実質的にストロマ細胞の接触がない条件、実質的に腫瘍細胞の接触がない条件、および/または実質的に支持細胞の接触がない条件下での $\gamma\delta$ T細胞の培養を含む。

【0037】

他の態様において、本発明は、以下のステップを通して $\gamma\delta$ T細胞を増幅させる方法の特徴とする：(i)非造血組織を提供するステップ、ここで、前記組織は非造血細胞及び $\gamma\delta$ T細胞を含む組織である；(iii) IL-2と、IL-15と、IL-21、SDF、IL-1 β 、IL-12、IL-18およびIL-33からなる群より選択される因子と、の存在下で少なくとも5日間培養して、増幅された $\gamma\delta$ T細胞の集団を生成するステップ。 $\gamma\delta$ T細胞は、IL-2、IL-15およびIL-21の存在下で培養されてもよい。これに加えて、または、これに代えて、 $\gamma\delta$ T細胞は、無血清培地で培養されてもよい。

【0038】

さらに他の態様において、本発明は、前述したいずれかの増幅された $\gamma\delta$ T細胞の集団の表現型を有する、分離された $\gamma\delta$ T細胞の集団を特徴とする。例えば、一部の実施形態において、分離された $\gamma\delta$ T細胞の少なくとも50%はCD27を発現し、実質的にはTIGITを発現しない。一部の実施形態において、分離された $\gamma\delta$ T細胞の少なくとも50%はV δ 1を発現する。

【0039】

他の態様において、本発明は、前述の態様の分離された $\gamma\delta$ T細胞の医薬組成物を含む

。

【0040】

他の態様において、本明細書に記載される医薬組成物を使用が提供される。

【0041】

他の態様において、本発明は、治療に効果的な量の、上記の増幅された $\gamma\delta$ T細胞、上記の分離された集団、または上記の医薬組成物を、治療の必要な対象に投与する、養子T細胞療法により対象を治療する方法と特徴とする。

【0042】

本発明のそれぞれの態様の範囲において、本明細書に記載されるいずれの実施形態も、他の記載された実施形態と組み合わせることができる。

【図面の簡単な説明】

【0043】

【図1A】ヒト皮膚が明らかな常在性 $\gamma\delta$ T細胞の集団を含むことを示す図である。図1A：皮膚常在性リンパ球を、Clarkら(Clark et al., Journal of Investigational Dermatology, 2006, 126 (5) : 1059-70)により公開されている器官型細胞培養「Clarkプロトコール」を用いて単離した。CD45⁺細胞のうちで、抗CD3はT細胞を染色するために、抗CD56抗体はNK細胞(CD3⁻CD56⁺)を特定するために、それぞれ用いた。CD3⁺細胞のうちで、汎 $\gamma\delta$ T細胞受容体に対する抗体は皮膚常在性 $\gamma\delta$ T細胞を特定するために、抗CD8 α はCD3⁺の汎 $\gamma\delta$ TCR⁺ゲート内の従来のCD4およびCD8陽性 $\alpha\beta$ T細胞の割合を特定するために用いた。

【図1B】ヒト皮膚が明らかな集団常在性 $\gamma\delta$ T細胞集団を含むことを示す図である。図1Bは、Clarkプロトコールを用いた7~10名のドナーに関するこれらの実験の概要を示す。このプロトコールを用いると、ヒト皮膚内のリンパ球が皮膚線維芽細胞と接触したままとなり、サイトカインが全く添加されないか、またはインターロイキン-2(IL-2)、インターロイキン-15(IL-15)もしくはIL-2およびIL-15が添加され、これにより、IL-15またはIL-2およびIL-15を培養物に添加した場合に若干大きな $\gamma\delta$ T細胞の集団であったこと以外は、サイトカインの使用が、皮膚常在性リンパ球の組成を変化させないことを示し、Clarkらによるプロトコールの有効性を実証した。3週間の器官型皮膚培養後のリンパ球組成は、4名のドナーに関する概要として、記載されたサイトカインを用いて示す。

【図1C】ヒト皮膚が常在性 $\gamma\delta$ T細胞の明らかな集団を含むことを示す図である。図1C：皮膚常在性 $\gamma\delta$ 細胞は、主にV δ 1発現 $\gamma\delta$ T細胞を含み(76.24% $\pm$ 17.3)、V δ 2発現T細胞の小さな集団(3.06% $\pm$ 6.1)ならびにV δ 1およびV δ 2に対しての染色が陰性である汎 $\gamma\delta$ TCR陽性細胞(本明細書中ではダブルネガティブ(DN) $\gamma\delta$ T細胞とも称される)の集団(20.7% $\pm$ 13.97)を含む。健康なボランティアの血液の対照染色により、血液中では $\gamma\delta$ T細胞の優勢集団はV δ 2 TCR鎖を発現したので、ヒト $\gamma\delta$ T細胞の強い限局性が示される。

【図1D】ヒト皮膚が常在性 $\gamma\delta$ T細胞の明らかな集団を含むことを示す図である。図1D：皮膚常在性 $\gamma\delta$ T細胞は、慢性的に活性化されていたT細胞に以前に関連付けられたマーカーを示すが、これらのマーカーは慢性的活性化を必ずしも反映せず、組織常在性の特徴的な指標である。ヒストグラムは、 $\gamma\delta$ T細胞(塗りつぶしヒストグラム)および各抗体に対する適切なアイソタイプ対照(白色ヒストグラム)に対する記載されたマーカーの染色を示す。

【図2A】Clarkプロトコールを介してヒト皮膚から直接的に誘導された皮膚常在性 $\gamma\delta$ T細胞が、T細胞を活性化するための従来の手段による活性化に際していわゆるTH1偏向性応答を示すこと、および同様にNKG2Dリガンド単独による活性化に際してTH1偏向性応答を示すことを示す図である。図2A：皮膚常在性 $\gamma\delta$ T細胞は、活性化(activatory)およびNK細胞関連受容体NKG2D(塗りつぶしヒストグラム；白色ヒストグラムにより表されるアイソタイプと比較)の強い発現を示す。プレート結合型組み換えMICA(NKG2D受容体に対する公知のリガンドのうちの1種類)を用いた活性化時には、皮膚 $\gamma\delta$ T細胞は、応答がブロッキングNKG2D抗体の存在下では解消されるので、いずれの他の刺激も用いずに、か

つTCRライゲーションとは独立に応答する。細胞は、プレフェルジンAおよび100単位のIL-2/mLの存在下で6時間刺激し、続いて、CD107aに対する染色により脱顆粒について分析した。TNF α およびINF- γ の産生は、表面染色後の透過化およびそれに続く細胞内サイトカインの染色により分析した。ホルボール12-ミリステート13-アセテート(P)をイオノマイシン(I)と組み合わせて、T細胞の活性化についての陽性対照として用いた。

【図2B】Clarkプロトコールを介してヒト皮膚から直接的に誘導された皮膚常在性 $\gamma\delta$ T細胞が、T細胞を活性化するための従来の手段による活性化に際していわゆるTH1偏向性応答を示すこと、および同様にNKG2Dリガンド単独による活性化に際してTH1偏向性応答を示すことを示す図である。図2B：皮膚常在性 $\gamma\delta$ T細胞は、TH1偏向性応答を示す。 $\gamma\delta$ T細胞は、Clarkプロトコールを用いて回収し、PMAおよびイオノマイシンを用いて6時間、プレフェルジンAの存在下で刺激し、細胞内サイトカインに対して染色した。ヒト皮膚から新鮮に単離された $\gamma\delta$ T細胞は、刺激時にTNF α およびINF- γ を産生するが、Th2またはTH-17細胞と関連付けられるサイトカイン(例えば、IL-4、IL-17A、IL-13、IL-22)は少量または検出不可能な量でしか産生せず、一方で、従来のCD4 $^{+}$ $\alpha\beta$ T細胞は、はるかに多様なサイトカイン産生を示す。

【図2C】Clarkプロトコールを介してヒト皮膚から直接的に誘導された皮膚常在性 $\gamma\delta$ T細胞が、T細胞を活性化するための従来の手段による活性化に際していわゆるTH1偏向性応答を示すこと、および同様にNKG2Dリガンド単独による活性化に際してTH1偏向性応答を示すことを示す図である。図2C：ヒト皮膚から直接的に誘導されたリンパ球のうち、様々なレベルのNKG2D受容体が、 $\gamma\delta$ T細胞、CD8a $^{+}$ の従来の $\alpha\beta$ T細胞およびNK細胞により発現される。これらの細胞の中で、NK細胞はNKG2Dリガンド単独に対する曝露に応答するが、T細胞の中では、 $\gamma\delta$ T細胞の集団だけが、いかなるTCR刺激も存在しない中でのNKG2Dリガンドを用いた刺激に際してサイトカイン応答を示す(フローサイトメトリードットプロットの上段を参照されたい)。応答は、可溶性のブロッキング抗NKG2D抗体を用いて遮断することができ、このことは、応答が排他的にNKG2D受容体を介していることを示す。

【図2D】Clarkプロトコールを介してヒト皮膚から直接的に誘導された皮膚常在性 $\gamma\delta$ T細胞が、T細胞を活性化するための従来の手段による活性化に際していわゆるTH1偏向性応答を示すこと、および同様にNKG2Dリガンド単独による活性化に際してTH1偏向性応答を示すことを示す図である。図2D：皮膚常在性 $\gamma\delta$ T細胞のうち、V δ 1 $\gamma\delta$ T細胞およびDN $\gamma\delta$ T細胞のみが、組み換えMICA単独により活性化される生来様の能力を示す(*により表される)。皮膚中に少数が見出されるV δ 2発現T細胞は、そのような応答を示さない。

【図3A】皮膚常在性 $\gamma\delta$ T細胞のみが、強い活性化および増幅を伴って、皮膚間質からの分離に対して応答することを示す図である。図3A：皮膚常在性リンパ球は、Clarkプロトコールを用いて単離した。3週間の器官型培養後、皮膚リンパ球を回収し、線維芽細胞をはじめとするいかなる残余の皮膚細胞からも分離し、1百万個のリンパ球/mLの密度で組織培養ウェルに移し、100U/mLのIL-2を添加した。さらに3週間後、常在性 $\gamma\delta$ T細胞は著しく増幅しており、皮膚リンパ球培養物中で富化されていた。この著明な増幅現象は、皮膚常在性 $\gamma\delta$ T細胞に限定されており、このことは、大多数のV δ 1 $^{+}$ T細胞が3週間のうちに平均して127.18倍に増幅し、一方で、従来の $\alpha\beta$ T細胞は平均で5.21倍しか増幅しなかった(これは20倍を超えて低いことになる)ことにより表される。

【図3B】皮膚常在性 $\gamma\delta$ T細胞のみが、強い活性化および増幅を伴って、皮膚間質からの分離に対して応答することを示す図である。図3B：皮膚常在性V δ 1 $^{+}$ T細胞は、マーカーKi-67(細胞周期を示す)を14日間にわたって強くアップレギュレーションすることにより、組織の除去に応答する(アイソタイプ対照は破線で示される白色ヒストグラムにより表され;0日目でのKi-67発現は白色ヒストグラムにより表され;7日目のKi-67発現は明灰色ヒストグラムにより表され;14日目のKi-67発現は濃灰色ヒストグラムにより表される)。さらに、皮膚間質と接触している場合にはIL-2受容体アルファ(CD25)に対して大部分が陰性である皮膚常在性V δ 1T細胞は、組織からの分離後にはCD25をアップレギュレーションする(アイソタイプ対照：破線ヒストグラム、0日目染色：明灰色ヒストグラム

10

20

30

40

50

、7日目染色：濃灰色ヒストグラム）。

【図3C】皮膚常在性 $\gamma\delta$ T細胞のみが、強い活性化および増幅を伴って、皮膚間質からの分離に対して応答することを示す図である。図3C：Ki-67の蛍光強度中央値（MFI）により示される高速の細胞周期は、 $V\delta 1^+$ T細胞により代表される皮膚常在性 $\gamma\delta$ T細胞でのみ見られ、従来の $\alpha\beta$ T細胞でもNK細胞でも見られず、これらの細胞ではMFIは実際に14日間の間に減少する。

【図3D】皮膚常在性 $\gamma\delta$ T細胞のみが、強い活性化および増幅を伴って、皮膚間質からの分離に対して応答することを示す図である。図3D：ストロマ細胞から分離された皮膚リンパ球は、3週間の培養後に著しく富化された常在性 $\gamma\delta$ T細胞の集団を示す。この $\gamma\delta$ T細胞の集団は、大多数の $V\delta 1$ 陽性細胞（77.49%±17.04）および汎 $\gamma\delta$ TCR陽性DN T細胞（21.46%±16.92）を含有する。Clarkプロトコールを用いて新鮮に回収された皮膚リンパ球で見られる当初の小さな $V\delta 2$ T細胞の集団は減少していき、組織 $\gamma\delta$ T細胞の3週間の増幅後にはほとんど失われる（0.6%±1.204）。

【図4A】皮膚常在性 $\gamma\delta$ T細胞が、組織の除去に対して応答し、かつ皮膚ストロマ細胞、特に線維芽細胞による接触依存的メカニズムを介して抑制されることを示す図である。図4A：混合型皮膚リンパ球を、Clarkプロトコールの通りに器官型培養し、3週間後に回収した。次に、混合型リンパ球を自家皮膚線維芽細胞のコンフルエント層の上に、および線維芽細胞から産生される可溶性阻害因子の存在について制御するためにトランスウェル（transwell）中に、播種した。14日後、存在する細胞の絶対数を介して算出される増幅倍率を、 $\gamma\delta$ T細胞および従来の $\alpha\beta$ T細胞について測定した。皮膚常在性 $\gamma\delta$ T細胞は、組織から分離され、かつ線維芽細胞が存在する場合には著しい増幅を示したが、自家線維芽細胞との直接的な細胞接触がない場合にのみ著しい増幅を示した。従来の $\alpha\beta$ T細胞は、試験したいずれの条件でもそのような応答を示さなかった。

【図4B】皮膚常在性 $\gamma\delta$ T細胞が、組織の除去に対して応答し、かつ皮膚ストロマ細胞、特に線維芽細胞による接触依存的メカニズムを介して抑制されることを示す図である。図4B：器官型培養から取得される混合型リンパ球を、自家線維芽細胞の単層上に播種するか（明灰色ヒストグラム）、または空のウェルに播種し（濃灰色ヒストグラム）、IL-2を添加して、7日間培養した。皮膚常在性 $V\delta 1^+$ T細胞（左側パネル）ならびに汎 $\gamma\delta$ TCR⁺のDN T細胞（右側パネル）は、線維芽細胞の直接的存在下では静止状態にとどまったが、CD25、Th-1関連転写因子T-bet、および細胞周期マーカーKi-67のアップレギュレーションされた発現（MFI）により示される通り、皮膚器官型培養から分離され、かつ線維芽細胞が存在しない場合には、強い活性化を示した（破線の白色ヒストグラムは対応するアイソタイプ対照を表す）。

【図5A】増幅中の皮膚 $\gamma\delta$ T細胞が脱抑制および強力な細胞傷害能の獲得の兆候を提示することを示す図である。図5A：皮膚常在性 $\gamma\delta$ T細胞を、器官型細胞培養からの分離後に14日間増幅させた。次に、 $\gamma\delta$ T細胞を、汎 $\alpha\beta$ TCRモノクローナル抗体を用いて染色されるすべての従来型T細胞を排除することにより、フローサイトメトリーで負にソーティングした。150,000個のソーティングされた $\gamma\delta$ T細胞を、続いて、96ウェル平底培養プレートへと二重反復で播種し、サイトカイン添加およびいかなる活性化リガンドの添加も用いずに、24時間培養した。上清を回収し、Affymetrix LUMINEX(登録商標)に基づくサイトカインアレイを用いて、産生されたサイトカインについて分析した。

【図5B】増幅中の皮膚 $\gamma\delta$ T細胞が脱抑制および強力な細胞傷害能の獲得の兆候を提示することを示す図である。図5B：負にソーティングされた $\gamma\delta$ T細胞を、10,000細胞/ウェルの濃度で1日前に播種された癌細胞株の上にも播種した。対照として、負にソーティングされた従来の皮膚 $\alpha\beta$ T細胞を用いた。T細胞を、100U/mLのIL-2の存在下で、ブロッキングNKG2D抗体の存在下および非存在下にて、記載されるエフェクター：ターゲット比で播種した。皮膚常在性 $\gamma\delta$ T細胞は、従来の $\alpha\beta$ T細胞と比較して、カスパーゼ切断型上皮特異的サイトケラチン18（CK18）放出（ELISAを介して測定される）により示される通りに、悪性細胞株の優れた殺傷性を示した。細胞傷害性は、NKG2D受容体をブロックする抗体を含有する培養物でのその減少により示される通り、少なくとも部分的にはNKG2D

受容体を介していた。

【図6A】ヒト消化管内の組織常在性 $\gamma\delta$ T細胞の分析を示す図である。図6A：Clarkプロトコールを適応させることにより、消化管常在性リンパ球の単離が可能になった。混合型消化管リンパ球は、通常は主にV δ 1 T細胞を含むが、V δ 2細胞およびダブルネガティブ $\gamma\delta$ T細胞もまた含有する組織常在性 $\gamma\delta$ T細胞の大きな集団を含む。

【図6B】ヒト消化管内の組織常在性 $\gamma\delta$ T細胞の分析を示す図である。図6B：消化管器官型培養から単離された $\gamma\delta$ T細胞は、それらが消化管間質から分離されれば時間と共にKi-67をアップレギュレーションするので、皮膚由来 $\gamma\delta$ T細胞と類似の応答を示す。

【図6C】ヒト消化管内の組織常在性 $\gamma\delta$ T細胞の分析を示す図である。図6C：消化管由来 $\gamma\delta$ T細胞は、CD107aアップレギュレーションにより測定される場合に、IFN- γ を産生することにより、および脱顆粒により、組み換えMICAなどの生来様刺激に対して応答する。

【図6D】ヒト消化管内の組織常在性 $\gamma\delta$ T細胞の分析を示す図である。図6D：消化管器官型培養から単離された $\gamma\delta$ T細胞は、皮膚由来 $\gamma\delta$ T細胞と類似の応答を示し、かつ、消化管間質との接触を有しないリンパ球培養での全体的な富化により分かる通り、細胞培養物中で時間と共に増幅する。

【図7A】増幅された皮膚由来 $\gamma\delta$ T細胞の組織表現型を示す図である。図7A：皮膚由来 $\gamma\delta$ T細胞は、皮膚ホーミングケモカイン受容体 (skin homing chemokine receptor) CC R4およびCCR8について陽性に染色される。

【図7B】増幅された皮膚由来 $\gamma\delta$ T細胞の組織表現型を示す図である。図7B：皮膚または血液からそれぞれ誘導された、増幅された $\gamma\delta$ T細胞についての発現レベルは異なる。

【図8】TCRのいかなる刺激も用いない皮膚由来 $\gamma\delta$ T細胞の脱抑制は、自発的Th1サイトカイン産生、ならびに、興味深いことに、新鮮なTCR活性化 $\gamma\delta$ T細胞とは対照的に、アトピー性サイトカインIL-13の産生をもたらすことを示す図である。新鮮に誘導された $\gamma\delta$ T細胞と合致して、脱抑制されかつ増幅中の $\gamma\delta$ T細胞は、無視できる程度の量のTh2関連サイトカイン（例えば、IL-4およびIL-5）を産生する。皮膚由来 $\gamma\delta$ T細胞を、14日間増幅させ、従来の $\alpha\beta$ T細胞を排除することにより負にソーティングした。150,000個の混合型 $\gamma\delta$ T細胞を、いかなる刺激またはサイトカイン添加も伴わずに、4名のドナーについて、1百万個の細胞/mLの密度で96ウェル平底プレート中にて二重反復で培養した。上清を24時間後に回収し、Affymetrix社製のLUMINEX(登録商標)に基づくサイトカインアレイを用いて分析した。

【図9A】増幅されかつ負にソーティングされた皮膚由来 $\gamma\delta$ T細胞は、ELISAを用いて標的細胞からのカスパーゼ切断型サイトケラチン18の放出により測定される場合に、それらと共培養されている種々のヒト腫瘍細胞株に対して強い細胞傷害性を提示することを示す図である。

【図9B】増幅されかつ負にソーティングされた皮膚由来 $\gamma\delta$ T細胞は、ELISAを用いて標的細胞からのカスパーゼ切断型サイトケラチン18の放出により測定される場合に、それらと共培養されている種々のヒト腫瘍細胞株に対して強い細胞傷害性を提示することを示す図である。

【図9C】増幅されかつ負にソーティングされた皮膚由来 $\gamma\delta$ T細胞は、ELISAを用いて標的細胞からのカスパーゼ切断型サイトケラチン18の放出により測定される場合に、それらと共培養されている種々のヒト腫瘍細胞株に対して強い細胞傷害性を提示することを示す図である。

【図10A】新鮮な増幅されていない皮膚由来V δ 1 T細胞は、以前のT細胞活性化のマーカーを示すことを表す図である。図10A：皮膚由来V δ 1 T細胞は、CD69およびTIM3を高発現し、かつCD28を低発現する。さらに、それらは、活性化マーカーNKG2Dの高発現を示す。この表現型は、in vitroでの増幅中に皮膚由来V δ 1 T細胞により維持される。対照的に、ヒト血液から誘導されたV δ 1 T細胞は、これらの活性化の兆候を有さず、CD69もTIM3も発現しない。皮膚由来V δ 1 T細胞と比較して、血液由来V δ 1 T細胞でのNKG2D発現ははるかに低く、一方で血液由来V δ 1 T細胞は共刺激性分子CD28を発現する。

【図10B】新鮮な増幅されていない皮膚由来V δ 1 T細胞は、以前のT細胞活性化のマーカを示すことを表す図である。図10B：皮膚由来V δ 1 T細胞のみが、T細胞受容体に対するリガンドなどのいかなる他の刺激も存在しない中で、組み換えMICAなどの NKG2Dリガンドに対して反応性である。血液由来V δ 1またはV δ 2 T細胞は、生来様刺激に対するそのような応答性は示さなかった。細胞を、記載される通りに、組み換えMICAもしくは抗CD3抗体またはその両方と共に、96ウェルプレート中に播種した。細胞を、6時間にわたって、最後の4時間はIL-2 100U/mLおよびBFA中で培養し、その後に、表面抗原染色、透過化およびIFN- γ に対する細胞内染色を行なった。

【図11】皮膚由来V δ 1 T細胞が、わずかなレベルのCD16を発現するが、高親和性IgG受容体CD64の実質的な表面発現を示すことを表す図である。したがって、直接的な細胞傷害活性に加えて、組織由来V δ 1 T細胞は、それらが悪性腫瘍および転移の部位へと抗体により導かれ、オプソニン化された腫瘍細胞を認識し、かつ抗体依存性細胞傷害（ADCC）を介してそれらを細胞死させるであろうから、CD20療法またはHer2療法などのモノクローナル抗体療法の有効性を増大させるために用いることもできるであろう。示される結果は、1名の代表的ドナー（4名中）からのものである。

【図12】IL-2（左側パネル）、IL-15（中央パネル）およびIL-2+IL-15（右側パネル）中でのV δ 1 T細胞の増幅を示す図である。新鮮に単離された皮膚由来リンパ球を、10% FCSおよび1% Pen/Strepを含有するRPMI培地中、96ウェル平底プレートで培養し、IL-2、IL-15またはIL-2+IL-15のいずれかをそれぞれ7日間添加した。IL-2およびIL-15の両方ならびに2種類のサイトカインの組み合わせが、ストロマ細胞の非存在下でのアイソタイプ（真の陰性）染色と比較したKi-67染色でのシフトにより示される通り、V δ 1 T細胞の増幅を誘導した。Ki-67は、細胞周期のG0期を去った細胞を特異的に染色し、一般的に増幅と関連付けられている。

【図13】21日目の増幅されたV δ 1 T細胞の表面での、CD9、CCR3およびCD39の発現を示すフローサイトメトリー結果である。増幅された皮膚由来V δ 1 T細胞は、（濃色ヒストグラム）により、対応するアイソタイプ染色（真の陰性、白色ヒストグラム）と比較して示される通り、高レベルの細胞表面マーカーCCR3、CD39およびCD9を維持した。

【図14】皮膚由来V δ 1 T細胞（濃色バー）および血液由来V δ 1 T細胞（明色バー）でのCCR3およびCD9のmRNA発現を示す図である。皮膚由来V δ 1 T細胞は、本明細書中に開示される通りに増幅させ、血液由来V δ 1 T細胞は、プレートに結合したV δ T細胞受容体に対する抗体（20 μ g/mL）を用いて増幅させた。増幅後、V δ 1 T細胞を、蛍光活性化細胞ソーティング（FACS）を用いて単離し、RNAを、両方の群（血液＝灰色、皮膚＝黒色）について3名のドナーから単離した。全mRNAを配列決定し、記載されたmRNAの発現レベルを正規化およびlog₂変換した。すべての発現レベルを、直接比較、およびGAPDH（ほとんどのヒト細胞中で高レベルに発現される一般的なハウスキーピング遺伝子）に対する比率として示す。

【図15】皮膚由来V δ 1 T細胞（濃色バー）および血液由来V δ 1 T細胞（明色バー）でのIL-13のmRNA発現を示す図である。皮膚由来V δ 1 T細胞は、本明細書中に開示される通りに増幅させ、血液由来V δ 1 T細胞は、プレートに結合した高用量のV δ T細胞受容体に対する抗体（20 μ g/mL）を用いて増幅させた。増幅後、V δ 1 T細胞を、FACSを用いて単離し、RNAを、両方の群（血液＝灰色、皮膚＝黒色）について3名のドナーから単離した。全mRNAを配列決定し、IL-13に対するmRNAの発現レベルを正規化およびlog₂変換した。発現レベルを、直接比較、およびGAPDHに対する比率として示す。

【図16A】PMA/イオノマイシン（図16A）または抗CD3（図16B）を用いたTCR刺激後の皮膚由来V δ 1 T細胞でのサイトカイン産生を示す図である。単離および増幅に続いて、皮膚由来V δ 1 T細胞を、蛍光活性化細胞ソーティング（FACS）を用いて精製した。150,000個のV δ 1 T細胞を、3名のドナーに関して二重反復で96ウェル平底プレート中へと播種し、プレートに結合させたCD3（5 μ g/mL）またはPMA/イオノマイシンのいずれかを用いて24時間刺激した。LUMINEX(登録商標)プラットフォームを用いて、記載されたサイトカインの絶対量に関して、上清を分析した。

10

20

30

40

50

【図16B】PMA/イオノマイシン（図16A）または抗CD3（図16B）を用いたTCR刺激後の皮膚由来V δ 1 T細胞でのサイトカイン産生を示す図である。単離および増幅に続いて、皮膚由来V δ 1 T細胞を、蛍光活性化細胞ソーティング（FACS）を用いて精製した。150,000個のV δ 1 T細胞を、3名のドナーに関して二重反復で96ウェル平底プレート中へと播種し、プレートに結合させたCD3（5 μ g/mL）またはPMA/イオノマイシンのいずれかを用いて24時間刺激した。LUMINEX（登録商標）プラットフォームを用いて、記載されたサイトカインの絶対量に関して、上清を分析した。

【図17A】各増幅条件の結果を示す図である。分離されたリンパ球（分離培養21日後）（図17A）およびIL-2、IL-4、IL-15およびIL-21の存在下で20日間増幅させたリンパ球（図17B）のフローサイトメトリープロットとゲーティング機構の代表図を示す。

【図17B】各増幅条件の結果を示す図である。分離されたリンパ球（分離培養21日後）（図17A）およびIL-2、IL-4、IL-15およびIL-21の存在下で20日間増幅させたリンパ球（図17B）のフローサイトメトリープロットとゲーティング機構の代表図を示す。

【図17C】各増幅条件の結果を示す図である。図17C：IL-2（100U/mL）とIL-15（10ng/mL）の条件における結果を標準とした、多様な条件下でのV δ 1 T細胞の増幅倍率の補正値を示す。

【図17D】各増幅条件の結果を示す図である。図17D：IL-2+IL-15、IL2+IL-15+IL-4、IL-2+IL-15+IL-21およびIL-2+IL-15+IL-4+IL-21の処理の結果としての増幅倍率を、分離された集団を基準として示す。

【図17E】各増幅条件の結果を示す図である。図17E：21日目（増幅前）および42日目（増幅後）における、V δ 1⁺細胞の総数を示す。増幅は、図中に示す通り、100 U/mL IL-2、100 U/mL IL-2 + 10ng/mL IL-15、または100U/mL IL-2 + 5ng/mL IL-4 + 10ng/mL IL-15 + 100ng/mL IL-21 の条件で実施された（n=8-17）

【図17F】各増幅条件の結果を示す図である。図17F：両時点での各条件におけるV δ 1⁺ T細胞の平均数（プラス標準誤差（SEM））を示す。** p=0.001. スチューデントの独立2群検定tテスト（n=8-17）。

【図17G】各増幅条件の結果を示す図である。図17G：複数の異なる濃度のIL-21を使用したV δ 1⁺ T細胞の増幅を、100U/mL IL-2、5ng/mL IL-4および10 ng/mL IL-15のみを使用した増幅を基準とした補正値で示す（n=3）。

【図17H】各増幅条件の結果を示す図である。図17H：100 U/ mL IL-2 + 5 ng/ mL IL-4 + 10 ng/ mL IL-15 + 10 ng/ mL IL-21を用いたV δ 1⁺ T細胞の増幅をIL-2単独での増幅を基準として示す。

【図18A】増幅されたV δ 1 T細胞によるCD27の発現の特徴を示す図である。図18A：IL-2（100 U/mL）およびIL-15（10 ng/mL）の結果としてのCD27の発現を標準とした、CD27の発現（平均蛍光強度（MFI））の補正値を示す。

【図18B】増幅されたV δ 1 T細胞によるCD27の発現の特徴を示す図である。図18B：IL-2+IL-15、IL2+IL-15+IL-4、IL-2+IL-15+IL-21およびIL-2+IL-15+IL-4+IL-21の処理の結果としての、CD27のMFIを、分離された集団を基準として示す。

【図18C】増幅されたV δ 1 T細胞によるCD27の発現の特徴を示す図である。図18C：フローサイトメトリーで評価した、複数の異なる濃度のIL-21を用いたV δ 1⁺ CD27の発現を、100 U/mL IL-2、5ng/mL IL-4および10ng/mL IL-15のみを用いた発現を標準として示す（n=3）。

【図18D】増幅されたV δ 1 T細胞によるCD27の発現の特徴を示す図である。図18D：フローサイトメトリーで評価した、100 U/mL IL-2 + 5 ng/mL IL-4 + 10 ng/mL IL-15 + 10 ng/mL IL-21を用いたV δ 1⁺ CD27の発現を、IL-2単独での増幅を標準とした補正値で示す（n=4）。

【図19】増幅されたV δ 1 T細胞によるTIGITの表面発現の特徴を示す図である。IL-2とIL-15の処理によるTIGIT発現を標準とした、多様な条件下でのTIGITの発現倍率の補正値（MFI）を示す。

【図20】CD27発現の関数としての、個別の細胞のTIGITの表面発現のプロットを示す図

10

20

30

40

50

である。

【図 2 1】血液由来の血清または血漿分画の有無における、サイトカインの使用により支持される、組織由来 $\gamma \delta$ T細胞の増幅および富化を示すグラフである。2%の $\gamma \delta$ T細胞を含む組織から分離された混合リンパ球の集団は、IL-2、IL-4、IL-15およびIL-21を含み、10%のヒトAB血清を含む、または含まない培地で増幅された。データは、ヒト血清を含む条件での結果（295倍の増幅倍率と、2%から75%への富化）に対して、ヒト血清を含まない条件で、成功した同等の増幅（432倍）および富化（2%から77%）を示すものである。

【図 2 2】混合リンパ球集団から分離された組織由来の $\gamma \delta$ 細胞の富化の実施例を示すグラフである。細胞は、ヒト組織の単一の試料から単離され、IL-2、IL-4、IL-15およびIL-21を含み、10%血清（左手のカラム）または5%の細胞療法システム血清（CTSTM）（右手のカラム）を含むTexMACS培地中で、複製され、その後に増幅された。分離され、増幅された細胞培養のプロファイルは、図中に表示されている通りである。図22Aは、初期の分離された培養物は、相対的に低い数（<10%）の所望の組織由来の $\gamma \delta$ T細胞を含むことを示す。反対に、図22B-22Dは、増幅後に、得られた細胞の集団は、組織由来の $\gamma \delta$ T細胞が高度に富化されることを示す。

【図 2 3】消化管常在性の $V \delta 1$ 細胞上の構造的なTIGITの発現を示すグラフである。データは、結腸上皮細胞内のリンパ球の放出のための通常の単離プロトコルを用いて、消化管上皮から単離された $V \delta 1$ 細胞を使用して作成された。

【図 2 4 A】ポリオウイルス受容体（PVR）が、TCRシグナル伝達を特異的に阻害することを、IFN γ （図24A）およびTNF α （図24B）の発現で測定して示したグラフである。細胞は、IL-2およびIL-15とともに培養され、抗CD3抗体で活性化された。

【図 2 4 B】ポリオウイルス受容体（PVR）が、TCRシグナル伝達を特異的に阻害することを、IFN γ （図24A）およびTNF α （図24B）の発現により測定して示したグラフである。細胞は、IL-2およびIL-15とともに培養され、抗CD3抗体で活性化された。

【図 2 5 A】PVRの阻害効果が、TIGITネガティブ $V \delta 1^+ / V \delta 3^+$ 細胞上では失われることを、IFN γ （図25B）およびTNF α （図25B）の発現により測定して示したグラフである。細胞は、IL-2、IL-15、IL-4及びIL-21とともに培養され、抗CD3抗体で活性化された。

【図 2 5 B】PVRの阻害効果が、TIGITネガティブ $V \delta 1^+ / V \delta 3^+$ 細胞上では失われることを、IFN γ （図25A）およびTNF α （図25B）の発現により測定して示したグラフである。細胞は、IL-2、IL-15、IL-4及びIL-21とともに培養され、抗CD3抗体で活性化された。

【図 2 6 A】皮膚由来の $\gamma \delta$ T細胞の増幅において、IL-9がIL-2の機能に代わり得ることを示すグラフである。3人のドナー（TS052、TS056およびSK073）からの皮膚組織は、9mmグリッド上に置かれて、IL-2およびIL-15を加えた培地で3週間培養された。次に、単離されたリンパ球は、IL-2、IL-4、IL-15およびIL-21（左のバー）またはIL-4、IL-9、IL-15およびIL-21（右のバー）を加えた培地内で増幅された。3週間の増幅後に、最終的な $\gamma \delta$ T細胞数/グリッド（図26A）および $V \delta 1$ 細胞数/グリッド（図26B）が算出された。皮膚由来の $\gamma \delta$ T細胞の増幅において、IL-2をIL-9に置き換えた結果、同等の増幅効果が得られた。ヒストグラムは平均 $\pm$ SEMを示す。

【図 2 6 B】皮膚由来の $\gamma \delta$ T細胞の増幅において、IL-9がIL-2の機能に代わり得ることを示すグラフである。3人のドナー（TS052、TS056およびSK073）からの皮膚組織は、9mmグリッド上に置かれて、IL-2およびIL-15を加えた培地で3週間培養された。次に、単離されたリンパ球は、IL-2、IL-4、IL-15およびIL-21（左のバー）またはIL-4、IL-9、IL-15およびIL-21（右のバー）を加えた培地内で増幅された。3週間の増幅後に、最終的な $\gamma \delta$ T細胞数/グリッド（図26A）および $V \delta 1$ 細胞数/グリッド（図26B）が算出された。皮膚由来の $\gamma \delta$ T細胞の増幅において、IL-2をIL-9に置き換えた結果、同等の増幅効果が得られた。ヒストグラムは平均 $\pm$ SEMを示す。

【図 2 7 A】皮膚由来の $\gamma \delta$ T細胞の増幅において、IL-9がIL-2の機能に代わり得ることを、増幅倍率の変化（図27A）、 $\gamma \delta$ TCR $^+$ T細胞の%（図27B）、および $V \delta 1^+$ T細胞の%（図27C）の測定により示すグラフである。皮膚組織は6人のドナー（SK073、SK075、SK077

、TS052、TS053およびTS056）由来である。2CK = 2サイトカイン（IL-2 + IL-15）；4CK = 4サイトカイン（IL-2 + IL-15 + IL-21 + IL-4）。

【図27B】皮膚由来の $\gamma\delta$ T細胞の増幅において、IL-9がIL-2の機能に代わり得ることを、増幅倍率の変化（図27A）、 $\gamma\delta$ TCR⁺T細胞の%（図27B）、およびV δ 1⁺T細胞の%（図27C）の測定により示すグラフである。皮膚組織は6人のドナー（SK073、SK075、SK077、TS052、TS053およびTS056）由来である。2CK = 2サイトカイン（IL-2 + IL-15）；4CK = 4サイトカイン（IL-2 + IL-15 + IL-21 + IL-4）。

【図27C】皮膚由来の $\gamma\delta$ T細胞の増幅において、IL-9がIL-2の機能に代わり得ることを、増幅倍率の変化（図27A）、 $\gamma\delta$ TCR⁺T細胞の%（図27B）、およびV δ 1⁺T細胞の%（図）の測定により示すグラフである。皮膚組織は6人のドナー（SK073、SK075、SK077、TS052、TS053およびTS056）由来である。2CK = 2サイトカイン（IL-2 + IL-15）；4CK = 4サイトカイン（IL-2 + IL-15 + IL-21 + IL-4）。 10

【発明を実施するための形態】

【0044】

I. 導入

本明細書において、非造血組織を細胞源として（例えば、非造血組織由来 $\gamma\delta$ T細胞、例えば、非造血組織由来V δ 1 T細胞）、 $\gamma\delta$ T細胞（例えば、皮膚由来 $\gamma\delta$ T細胞および/または非V δ 2 T細胞、例えば、V δ 1 T細胞、および/またはダブルネガティブT細胞）を増幅する方法が提供される。増幅方法は、実質的にTCRの刺激のない条件、および/または、インターロイキン-4（IL-4）、インターロイキン-15（IL-15）、インターロイキン-21（IL-21）および/若しくはインターロイキン-2（IL-2）が存在する条件下での、 $\gamma\delta$ T細胞（例えば、非造血組織のストロマ細胞から分離された $\gamma\delta$ T細胞）の培養を含む。さらに、増幅された $\gamma\delta$ T細胞（例えば、皮膚由来 $\gamma\delta$ T細胞および/または非V δ 2 T細胞、例えば、V δ 1 T細胞、および/またはDN T細胞）の組成物、および増幅された $\gamma\delta$ T細胞を用いる方法（例えば、養子T細胞療法、例えば、癌の治療用）を提供する。 20

【0045】

II. 定義

本明細書に記載される本発明の態様および実施形態は、「含む（comprising）」、「なる（consisting）」および「基本的になる（consisting essentially of）」態様および実施形態を含む。本明細書で使用される場合、「a」「an」および「the」の単数形は、特に別途の指示がない限り、複数形への適用も含む。 30

【0046】

本明細書で使用される用語「約（about）」は、この技術分野の当業者に容易に知られる、各値における通常の誤差範囲を示す。本明細書で、「約」の値またはパラメータに言及する場合、その値またはパラメータ自体を対象とする実施形態を含む（および開示する）。一部の実施例では、「約」は、指定値から+20%、一部の実施例では+10%、一部の実施例では+5%、一部の実施例では+1%、または、一部の実施例では指定値から+0.1%の変動を含み、このような変動は、開示された方法を実行するために適している。

【0047】

本明細書に使用される場合、用語「実質的な（substantial）」および「実質的に（substantially）」は、関心のある特徴または特性の、全体またはほぼ全体の範囲または程度を示す定性的な条件を示す。生物学分野の当業者は、生物学および化学的な現象は、完成すること、および/若しくは、完成に向かって進むこと、または、絶対的な結果を達成若しくは回避することは、稀有であることを理解するであろう。したがって、本明細書では、「実質的に」という用語は、多くの生物学および化学的な現象における、潜在的に内在する完全性の欠如を捉えるために使用される。受容体/リガンドの相互作用、または、細胞間の接触などの物理的なシナリオについて説明するとき、方法の実施者に利用可能な従来の手段で、その機能的な結果を検出可能であれば、前記のシナリオは実質的（substantial）である。例えば、「実質的なTCRの活性化」とは、細胞の集合の中で、TCRの活性化が検出可能なレベルであること（例えば、統計的に有意な程度のTCRの活性化）を指 40 50

す。一部の実施形態では、TCRは、各細胞集団上で、EC₅₀の0.1%まで、0.5%まで、1%まで、5%まで、10%まで、20%まで、30%まで、または40%までのTCR経路アゴニスト（例えば、抗体、例えば、抗CD3、またはレクチン）に曝されることで、実質的に活性化される。同様に、「実質的な細胞の接触」（例えば、実質的な支持細胞の接触、実質的なストロマ細胞の接触、または実質的な腫瘍細胞の接触）は、増幅された細胞に検出可能な変化（例えば、増幅を減少させる）をもたらすことができる、細胞間接触の程度を示す。一部の例において、実質的な細胞の接触は、培養物中に、増幅細胞の集団に対して、0.1%まで、0.5%まで、1%まで、5%まで、10%まで、または20%までの濃度の汚染的な細胞型（例えば、支持細胞、ストロマ細胞または腫瘍細胞）が存在する場合に生じる。細胞の「実質的な数」または薬剤の「実質的な量」は、同様に、上記に定義した通り、実質的な効果をもたらすために必要な数または量を示す。

10

【0048】

本明細書で使用される場合、「非造血細胞」は、ストロマ細胞および上皮細胞を含む。ストロマ細胞は、あらゆる臓器の非造血性結合組織細胞であり、その器官の実質細胞の機能を支持する。ストロマ細胞の例としては、線維芽細胞、周皮細胞、間葉細胞、ケラチノサイト、内皮細胞、および非血液学的腫瘍細胞が挙げられる。上皮細胞は、体全体の血管や臓器の空洞や表面を覆う非造血細胞である。それらは、通常は、扁平、円柱、または立方体の形状をとっており、単層の細胞層、または2つ以上の細胞層として配置され得る。

【0049】

本明細書で使用される場合、「非造血組織常在性 $\gamma\delta$ T細胞」、「非造血組織由来」および「生来型の(native)非造血組織 $\gamma\delta$ T細胞」は、組織が取り出された時点の非造血組織に存在した $\gamma\delta$ T細胞を示す。非造血組織常在性 $\gamma\delta$ T細胞は、ヒトまたは非ヒト動物のあらゆる適切な非造血組織から得ることができる。非造血組織は、血液または骨髄とは異なる組織である。一部の実施形態において、 $\gamma\delta$ T細胞は、血液または滑液などの、特定の種類の生体液のサンプルから得られたものではない。ヒトまたは非ヒト動物の非造血組織の適切な例としては、皮膚またはその一部（例えば、真皮または表皮）、消化管（例えば、消化管上皮、結腸、小腸、胃、虫垂、盲腸、または直腸）、乳腺組織、肺（気管支肺胞洗浄によって得られた組織でないことが好ましい）、前立腺、肝臓、および脾臓が挙げられる。一部の実施形態において、非造血組織常在性 $\gamma\delta$ T細胞は、胸腺、脾臓、または扁桃などのリンパ組織に由来し得る。 $\gamma\delta$ T細胞は、例えば、乳房および前立腺などのヒト癌組織に常在してもよい。一部の実施形態において、 $\gamma\delta$ T細胞は、ヒト癌組織からは取得されない。非造血組織のサンプルは、例えば、外植（例えば、生検）等の標準的な技術により取得され得る。非造血組織常在性 $\gamma\delta$ T細胞は、例えば、V δ 1 T細胞、ダブルネガティブ(DN) T細胞、V δ 3 T細胞およびV δ 5 T細胞のような、非V δ 2 T細胞を含む。

20

30

【0050】

本明細書で使用される場合、「IL-2」は、生来型の若しくは組み換えのIL-2またはその変異体(variant)であって、1以上のIL-2受容体(IL-2R)サブユニットへのアゴニストとして作用するもの（例えば、その突然変異体、変異タンパク質(mutein)、類似体、サブユニット、受容体複合体、フラグメント、アイソフォーム、およびペプチド模倣体)を示す。これらの薬剤は、IL-2依存性細胞株CTLL-2(33; American Type Culture Collection(ATCC(登録商標))TIB 214)の増殖を支持し得る。成熟したヒトIL-2は、Fujita, et al. Cell 1986. 46.3:401-407に記載されているように、133アミノ酸配列（追加のN末端の20アミノ酸からなるシグナルペプチドを欠損）として生じる。IL-2変異タンパク質は、米国特許出願公開第2014/0046026号に記載されているように、IL-2R β への結合能を保持しながら、インターロイキン-2タンパク質への特定の置換が行われたポリペプチドである。IL-2変異タンパク質は、生来型のIL-2ポリペプチド鎖の1以上の箇所または他の残基における、アミノ酸の挿入、欠失、置換、および修飾によって特徴付けられ得る。本開示にしたがって、上記の挿入、欠失、置換、および修飾のいずれも、IL-2R β 結合活性を保持したままのIL-2変異タンパク質に帰結する。変異タンパク質の例としては、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10またはそれ以上のアミノ酸の置換を含むものが挙げられる。

40

50

【0051】

ヒトIL-2をコードする核酸は、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）などの従来の手順で取得可能である。ヒトIL-2（Gene ID 3558）のアミノ酸配列は、Genbankの登録ローケータ-NP_000577.2 GI: 28178861で参照できる。マウス（*Mus musculus*）IL-2アミノ酸配列（Gene ID 16183）は、Genbankの登録ローケータ-NP_032392.1 GI: 7110653で参照できる。

【0052】

IL-2は、例えば、ヒト、サル、ウシ、ブタ、ウマ、およびネズミを含む、多様な哺乳動物種に由来するIL-2を示し得る。変異体は、配列の保存的な置換を含む場合があり、これは、所定のアミノ酸残基が、同様の生理化学的特性を有する残基によって置き換えられることを意味する。保存的な置換の例としては、Ile、Val、Leu、またはAlaの相互間など、1つの脂肪族残基の他の脂肪族残基との置換、または、LysとArgの間；GluとAspの間；GlnとAsnの間など、1つの極性残基の他の極性残基との置換が挙げられる。このような保存的な置換の他の例として、同様の疎水性特性を持つ領域全体の置換がよく知られている。自然に生じたIL-2変異体も、本発明に含まれる。そのような変異体の例としては、選択的mRNAスプライシング事象またはIL-2タンパク質のタンパク質分解的切断により生じるタンパク質であって、IL-2の結合特性が保持されているものが挙げられる。mRNAの選択的スプライシングにより、切断されても生物学的活性を有するIL-2タンパク質を生じ得る。タンパク質分解に起因する変化としては、例えば、IL-2タンパク質からの1以上の末端アミノ酸（通常1-10 アミノ酸）のタンパク質分解除去に起因する、異なるタイプの宿主細胞での発現時のNまたはC末端の違いが挙げられる。一部の実施形態において、タンパク質の末端または内側を、例えばポリエチレングリコールなどの化学基を用いて修飾して、その物理的特性を変化させることができる（Yang, et al. Cancer 1995. 76: 687-694）。一部の実施形態において、タンパク質の末端または内側は、追加のアミノ酸で修飾されてもよい（Clark-Lewis, et al. PNAS 1993. 90:3574-3577）。

【0053】

本明細書で使用される場合、「IL-15」は、生来型の若しくは組み換えのIL-15またはその変異体（variant）であって、1以上のIL-15受容体（IL-15R）サブユニットへのアゴニストとして作用するもの（例えば、その突然変異体、変異タンパク質（mutein）、類似体、サブユニット、受容体複合体、フラグメント、アイソフォーム、およびペプチド模倣体）を示す。IL-15は、IL-2と同様に、IL-2依存性細胞株CTLL-2の増殖を支持し得る、既知のT細胞成長因子である。IL-15は、114アミノ酸の成熟タンパク質として、Grabsteinらによって最初に報告された（Grabstein, et al. Science 1994. 264.5161: 965-969）。本明細書で使用される「IL-15」という用語は、生来型のまたは組み換えIL-15およびその変異タンパク質、類似体、サブユニット、または複合体（WO 2007/046006に記載されているように、例えば、受容体複合体、例えば、sushiペプチド）を意味し、これらのそれぞれがCTLL-2細胞の増殖を刺激することができる。CTLL-2の増殖のアッセイにおいて、組み換え発現した前駆体および成熟型IL-15のインフレーション融合体を導入した細胞上清は、CTLL-2細胞の増殖を誘導できる。

【0054】

ヒトIL-15は、Grabsteinら（Grabstein, et al. Science 1994. 264.5161: 965-969）に記載された手順、または、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）などの従来の手順によって取得できる。ヒトIL-15 cDNAの寄託は、1993年2月19日にATCC（登録商標）で行われ、登録番号69245が割り当てられた。

【0055】

ヒトIL-15（Gene ID 3600）のアミノ酸配列は、Genbankの登録ローケータ-NP000576.1 GI: 10835153（アイソフォーム 1）およびNP_751915.1 GI: 26787986（アイソフォーム 2）で参照できる。マウス（*Mus musculus*）IL-15アミノ酸配列（Gene ID 16168）は、Genbankの登録ローケータ-NP_001241676.1 GI: 363000984で参照できる。

【0056】

IL-15はまた、例えば、ヒト、サル、ウシ、ブタ、ウマ、およびネズミを含む、多様な

哺乳動物種に由来するIL-15を示し得る。本明細書において、IL-15「変異型タンパク質 (mutein)」または「変異体 (variant)」は、生来型の哺乳動物のIL-15の配列と実質的に相同であるが、アミノ酸の欠失、挿入および置換により、生来型の哺乳動物のIL-15とは異なるアミノ酸配列を有するポリペプチドである。変異体は、配列の保存的な置換を含む場合があり、これは、所定のアミノ酸残基が、同様の生理化学的特性を有する残基によって置き換えられることを意味する。保存的な置換の例としては、Ile、Val、Leu、またはAlaの相互間など、1つの脂肪族残基の他の脂肪族残基との置換、または、LysとArgの間；GluとAspの間；GlnとAsnの間など、1つの極性残基の他の極性残基との置換が挙げられる。このような保存的な置換の他の例として、同様の疎水性特性を持つ領域全体の置換がよく知られている。自然に生じたIL-15変異体も、本発明に含まれる。そのような変異体の例としては、選択的mRNAスプライシング事象またはIL-15タンパク質のタンパク質分解的切断により生じるタンパク質であって、IL-15の結合特性が保持されているものが挙げられる。mRNAの選択的スプライシングにより、切断されても生物学的活性を有するIL-15タンパク質を生じ得る。タンパク質分解に起因する変化としては、例えば、IL-15タンパク質からの1以上の末端アミノ酸（通常1-10アミノ酸）のタンパク質分解除去に起因する、異なるタイプの宿主細胞での発現時のNまたはC末端の違いが挙げられる。一部の実施形態において、タンパク質の末端を、例えばポリエチレングリコールなどの化学基を用いて修飾して、その物理的特性を変化させることができる (Yang, et al. Cancer 1995. 76:687-694)。一部の実施形態において、タンパク質の末端または内側は、追加のアミノ酸で修飾されてもよい (Clark-Lewis, et al. PNAS 1993. 90:3574-3577)。

10

20

【0057】

本明細書で使用される場合、「IL-4」は、生来型の若しくは組み換えのIL-4またはその変異体 (variant) であって、1以上のIL-4受容体 (IL-4R) サブユニットへのアゴニストとして作用するもの (例えば、その突然変異体、変異タンパク質 (mutein)、類似体、サブユニット、受容体複合体、フラグメント、アイソフォーム、およびペプチド模倣体) を示す。このような薬剤は、ナイーブヘルパーT細胞 (Th0細胞) のTh2細胞への分化を支持する。成熟したヒトIL-4は、129アミノ酸配列 (追加のN末端の24アミノ酸からなるシグナルペプチドの分、短い) として生じる。IL-4変異タンパク質は、米国特許第6,313,272号に記載されているように、IL-4R α への結合能を保持しながら、インターロイキン-4タンパク質への特定の置換が行われたポリペプチドである。IL-4変異タンパク質は、生来型のIL-4ポリペプチド鎖の1以上の箇所または他の残基における、アミノ酸の挿入、欠失、置換、および修飾によって特徴付けられ得る。本開示にしたがって、上記の挿入、欠失、置換、および修飾のいずれも、IL-2R α 結合活性を保持したままのIL-4変異タンパク質を生成する。変異タンパク質の例としては、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10またはそれ以上のアミノ酸の置換を含むものが挙げられる。

30

【0058】

ヒトIL-4をコードする核酸は、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) などの従来の手順で取得可能である。ヒトIL-4 (Gene ID 3565) のアミノ酸配列は、Genbankの登録ロケータ-NG_023252で参照できる。マウス (Mus musculus) IL-4アミノ酸配列 (Gene ID 16189) は、Genbankの登録ロケータ-NC_000077.6で参照できる。

40

【0059】

IL-4はまた、例えば、ヒト、サル、ウシ、ブタ、ウマ、およびネズミを含む、多様な哺乳動物種に由来するIL-4を示し得る。変異体は、配列の保存的な置換を含む場合があり、これは、所定のアミノ酸残基が、同様の生理化学的特性を有する残基によって置き換えられることを意味する。保存的な置換の例としては、Ile、Val、Leu、またはAlaの相互間など、1つの脂肪族残基の他の脂肪族残基との置換、または、LysとArgの間；GluとAspの間；GlnとAsnの間など、1つの極性残基の他の極性残基との置換が挙げられる。このような保存的な置換の他の例として、同様の疎水性特性を持つ領域全体の置換がよく知られている。天然のIL-4変異体も、本発明に含まれる。そのような変異体の例としては、選択的mRNAスプライシング事象またはIL-4タンパク質のタンパク質分解的切断により生じるタンパ

50

ク質であって、IL-4の結合特性が保持されているものが挙げられる。mRNAの選択的スプライシングにより、切断されても生物学的活性を有するIL-4タンパク質を生じ得る。タンパク質分解に起因する変化としては、例えば、IL-4タンパク質からの1以上の末端アミノ酸（通常1-10アミノ酸）のタンパク質分解除去に起因する、異なるタイプの宿主細胞での発現時のNまたはC末端の違いが挙げられる。一部の実施形態において、タンパク質の末端を、例えばポリエチレングリコールなどの化学基を用いて修飾して、その物理的特性を変化させることができる（Yang, et al. Cancer 1995. 76: 687-694）。一部の実施形態において、タンパク質の末端または内側は、追加のアミノ酸で修飾されてもよい（Clark-Lewis, et al. PNAS 1993. 90:3574-3577）。

【0060】

本明細書で使用される場合、「IL-21」は、生来型の若しくは組み換えのIL-21またはその変異体（variant）であって、1以上のIL-21受容体（IL-21R）サブユニットへのアゴニストとして作用するもの（例えば、その突然変異体、変異タンパク質（mutein）、類似体、サブユニット、受容体複合体、フラグメント、アイソフォーム、およびペプチド模倣体）を示す。このような薬剤は、ナチュラルキラー（NK）および細胞傷害性（CD8⁺）T細胞の増殖を支持することができる。成熟したヒトIL-21は、133アミノ酸配列（追加のN末端の22アミノ酸からなるシグナルペプチドを欠損）として生じる。IL-21変異タンパク質は、米国特許第9,388,241号に記載されているように、IL-21R α への結合能を保持しながら、インターロイキン-21タンパク質への特定の置換が行われたポリペプチドである。IL-21変異タンパク質は、生来型のIL-21ポリペプチド鎖の1以上の箇所または他の残基における、アミノ酸の挿入、欠失、置換、および修飾によって特徴付けられ得る。本開示にしたがって、上記の挿入、欠失、置換、および修飾のいずれも、IL-21R α 結合活性を保持したままのIL-21変異タンパク質を生成する。変異タンパク質の例としては、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10またはそれ以上のアミノ酸の置換を含むものが挙げられる。

【0061】

ヒトIL-21をコードする核酸は、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）などの従来の手順で取得可能である。ヒトIL-21（Gene ID 59067）のアミノ酸配列は、Genbankの登録ロケータNC_000004.12で参照できる。マウス（*Mus musculus*）IL-21アミノ酸配列（Gene ID 60505）は、Genbankの登録ロケータNC_000069.6で参照できる。

【0062】

IL-21はまた、例えば、ヒト、サル、ウシ、ブタ、ウマ、およびネズミを含む、多様な哺乳動物種に由来するIL-21を示し得る。変異体は、配列の保存的な置換を含む場合があり、これは、所定のアミノ酸残基が、同様の生理化学的特性を有する残基によって置き換えられることを意味する。保存的な置換の例としては、Ile、Val、Leu、またはAlaの相互間など、1つの脂肪族残基の他の脂肪族残基との置換、または、LysとArgの間；GluとAspの間；GlnとAsnの間など、1つの極性残基の他の極性残基との置換が挙げられる。このような保存的な置換の他の例として、同様の疎水性特性を持つ領域全体の置換がよく知られている。自然に生じたIL-21変異体も、本発明に含まれる。そのような変異体の例としては、選択的mRNAスプライシング事象またはIL-21タンパク質のタンパク質分解的切断により生じるタンパク質であって、IL-21の結合特性が保持されているものが挙げられる。mRNAの選択的スプライシングにより、切断されても生物学的活性を有するIL-21タンパク質を生じ得る。タンパク質分解に起因する変化としては、例えば、IL-21タンパク質からの1以上の末端アミノ酸（通常1-10アミノ酸）のタンパク質分解除去に起因する、異なるタイプの宿主細胞での発現時のNまたはC末端の違いが挙げられる。一部の実施形態において、タンパク質の末端を、例えばポリエチレングリコールなどの化学基を用いて修飾して、その物理的特性を変化させることができる（Yang, et al. Cancer 1995. 76: 687-694）。一部の実施形態において、タンパク質の末端または内側は、追加のアミノ酸で修飾されてもよい（Clark-Lewis, et al. PNAS 1993. 90:3574-3577）。

【0063】

本明細書で使用される場合、「IL-9」は、生来型の若しくは組み換えのIL-9またはその

変異体 (variant) であって、1以上のIL-9受容体 (IL-9R) サブユニットへのアゴニストとして作用するもの (例えば、その突然変異体、変異タンパク質 (mutein)、類似体、サブユニット、受容体複合体、フラグメント、アイソフォーム、およびペプチド模倣体) を示す。成熟したヒトIL-9は、144アミノ酸配列として生じる。IL-9変異タンパク質は、IL-9Rへの結合能を保持しながら、インターロイキン-9タンパク質への特定の置換が行われたポリペプチドである。IL-9変異タンパク質は、生来型のIL-9ポリペプチド鎖の1以上の箇所または他の残基における、アミノ酸の挿入、欠失、置換、および修飾によって特徴付けられ得る。本開示にしたがって、上記の挿入、欠失、置換、および修飾のいずれも、IL-9R結合活性を保持したままのIL-9変異タンパク質を生成する。変異タンパク質の例としては、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10またはそれ以上のアミノ酸の置換を含むものが挙げられる。

【0064】

ヒトIL-9をコードする核酸は、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) などの従来の手順で取得可能である。ヒトIL-9のアミノ酸配列は、UniProtKB P15248によって提供される。

【0065】

IL-9はまた、例えば、ヒト、サル、ウシ、ブタ、ウマ、およびネズミを含む、多様な哺乳動物種に由来するIL-9を示し得る。変異体は、配列の保存的な置換を含む場合があり、これは、所定のアミノ酸残基が、同様の生理化学的特性を有する残基によって置き換えられることを意味する。保存的な置換の例としては、Ile、Val、Leu、またはAlaの相互間など、1つの脂肪族残基の他の脂肪族残基との置換、または、LysとArgの間；GluとAspの間；GlnとAsnの間など、1つの極性残基の他の極性残基との置換が挙げられる。このような保存的な置換の他の例として、同様の疎水性特性を持つ領域全体の置換がよく知られている。自然に生じたIL-9変異体も、本発明に含まれる。そのような変異体の例としては、選択的mRNAスプライシング事象またはIL-9タンパク質のタンパク質分解的切断により生じるタンパク質であって、IL-9の結合特性が保持されているものが挙げられる。mRNAの選択的スプライシングにより、切断されても生物学的活性を有するIL-9タンパク質を生じ得る。タンパク質分解に起因する変化としては、例えば、IL-9タンパク質からの1以上の末端アミノ酸 (通常1-10アミノ酸) のタンパク質分解除去に起因する、異なるタイプの宿主細胞での発現時のNまたはC末端の違いが挙げられる。一部の実施形態において、タンパク質の末端を、例えばポリエチレングリコールなどの化学基を用いて修飾して、その物理的特性を変化させることができる (Yang, et al. Cancer 1995. 76: 687-694)。一部の実施形態において、タンパク質の末端または内側は、追加のアミノ酸で修飾されてもよい (Clark-Lewis, et al. PNAS 1993. 90:3574-3577)。

【0066】

上記の因子のうち1つ以上は、増幅された $\gamma\delta$ T細胞の生成に十分な量で、増幅のプロトコールに組み入れられ得る。本明細書で使用される場合、「に有効な量で (in an amount effective to)」という語句は、検出可能な結果を誘導する量を示す (例えば、開始時の集団と比較して、統計的に有意に増加した細胞の数、例えば、 $p < 0.05$)。複数の因子が一度に存在する場合、有効量とは、すべての因子の複合的效果 (例えば、IL-2とIL-15の複合的效果、または、IL-2若しくはIL-9、IL-4、IL-15およびIL-21の複合的效果) を示す。

【0067】

「T細胞受容体 (TCR) 経路アゴニスト」または「TCR経路を活性化する薬剤」とは、TCRシグナル伝達を通して、 $\alpha\beta$ T細胞および/または血液常在性 $\gamma\delta$ T細胞などのT細胞の増殖、または他の活性化の結果を誘導する化合物を示す。T細胞シグナル伝達モジュレーターは、Src関連タンパク質チロシンキナーゼ (PTK)、LckおよびFyn、および70 kDaのゼータ鎖 (TCR) 関連プロテインキナーゼ (ZAP70) の連続的な活性化によって機能する。これらのPTKは、細胞外シグナル制御キナーゼ (ERK)、c-Jun N末端キナーゼ (JNK)、および活性化T細胞の核因子 (NFAT) を介した下流への刺激をもたらす、T細胞のリンカー活性化因子 (LAT) を含むポリペプチドのリン酸化をもたらす。例えばCD28およびCD45を介した

共刺激は、リン酸化を促進し、TCRシグナル伝達経路を促進する。したがって、TCRまたは共刺激経路の一部を標的とする物質は、T細胞シグナル伝達を活性化し得る。TCR経路アゴニストには、抗体（例えば、モノクローナル抗体、例えば、抗TCRV δ 1、抗TCR δ TCS-1、抗TCR PAN γ δ 、および抗CD3抗体）、レクチン（例えば、植物レクチン、例えば、コンカナバリンA；*Phaseolus vulgaris* (PHA-P)、*Phytolacca Americana*、*Triticum vulgare*、*Lens culinaris*、*Glycine max*、*Maackia amurensis*、*Pisum sativum*および*Sambucus nigra*由来のレクチン）、合成リン酸化抗原（例、BrHPP（プロモヒドリニピロリン酸）、2M3B1PP（2-メチル-3-ブテニル-1-ピロリン酸）、HMBPP（（E）-4-ヒドロキシ-3-メチル-ブタ-2-エニルピロリン酸）、またはIPP（イソペンテニルピロリン酸））、およびN-ビスホスホネート（例、ゾレドロネート）が含まれる。TCR経路アゴニストには、共受容体アゴニストが含まれ、抗体（例えば、モノクローナル抗体、例えば、抗CD2、抗CD6、抗CD9、抗CD28、抗CD43、抗CD94、抗CD160、抗SLAM、抗NKGD2、抗2B4、抗HLA-A、抗HLA-b、抗HLA-C、および抗ICAM-3抗体）およびタンパク質（例えば、組み換えタンパク質、たとえば組み換えヒトタンパク質、たとえばCD7L、CD26、CD27L、CD30L、CD40L、OX40L、4-1BBL、ICAM-1、フィブロネクチン、ヒドロコルチゾン、およびその変異体、例えばFc融合タンパク質、例えばCD27L-Fc）が含まれる。TCR経路アゴニストは、可溶性または膜結合性であり、例えば、MHCまたはHLA複合体の場合と同様に、人工抗原提示細胞（aAPC）などの細胞上に提示され得る。T細胞シグナル伝達の活性化に適したaAPCは、当技術分野で既知である。TCR経路アゴニストを外因的に加えることにより、T細胞を活性化する適切な方法は、当技術分野で周知であり、Denigerらの図1に要約されている（Deniger, et al. *Frontiers in Immunology*, 2014. 5 (636) :1-10）。 10 20

【0068】

「外因性TCR経路アゴニスト」は、非造血組織またはそのドナーに由来しない（すなわち、外因的に添加される）、TCR経路アゴニストを示す。したがって、本発明のいくつかの実施形態では、培養物中に非造血組織からの残留物質として、TCR経路アゴニスト（例えば、可溶性フィブロネクチンまたは細胞結合ICAM-1）が存在し得ることが理解されよう。一部の実施形態では、残留するTCR経路アゴニストは無視できる濃度であり、実質的にT細胞を活性化するものではない。

【0069】

本明細書で使用される場合、「合成スキャホールド」、「スキャホールド」および「グリッド」は互換的に使用され、細胞成長を支持するのに適した、非生来型の三次元構造を示す。外植片を合成スキャホールドに付着させて、リンパ球の外植片からスキャホールドへの移動を促進してもよい。合成スキャホールドは、天然および合成の材料で構築され、例えば、ポリマー（例えば、天然または合成ポリマー、例えば、ポリビニルピロリドン、ポリメチルメタクリレート、メチルセルロース、ポリスチレン、ポリプロピレン、ポリウレタン）、セラミック（例えば、リン酸三カルシウム、アルミン酸カルシウム、カルシウムヒドロキシアパタイト）、または金属（タンタル、チタン、白金、および白金、ニオブ、ハフニウム、タングステン、およびこれらの合金の組み合わせと同じ元素グループの金属）で構築される。生物学的因子（例えば、コラーゲン（例えば、コラーゲンIまたはコラーゲンII）、フィブロネクチン、ラミニン、インテグリン、血管新生因子、抗炎症因子、グリコサミノグリカン、ビトロゲン（vitrogen）、抗体およびその断片、サイトカイン（例、IL-2またはIL-15、およびそれらの組み合わせ）は、当該分野で公知の方法に従って、細胞接着、移動、生存、または増殖を増強するために、スキャホールド表面上にコーティングするか、スキャホールドの材料内にカプセル封入することができる。この方法および他の方法を使用して、例えば、消化管、前立腺および乳房等の、他の多くのタイプの非造血組織からリンパ球を分離できる。本発明の一部としての使用が想定される合成スキャホールド例としては、Clarkプロトコールで使用されるものが含まれる。 30 40

【0070】

本明細書で使用される場合、「分離」、「分離された」、または「分離する」の用語は、異なる細胞集団の間の物理的な接触を断絶または阻害することをいう（例えば、非造血 50

細胞からの造血細胞（例えば、リンパ球）の分離）。分離は、例えば、混合された細胞集団をピペッティングして強制的に膜間結合を断絶することにより、または、Carrascoらに記載されるように、例えば、細胞集団をケモカインまたはサイトカインとともに培養することにより、例えば、組織マトリックスからの細胞集団の「クロールアウト（crawl out）」を誘発することにより実施できる（Carrasco A. et al Journal of Immunological Methods 2013. 389（1-2）：29-37）。異なる細胞集団間の物理的な接触を阻害する、トランスウェル（transwell）培養システム、または同様の培養方法によって、分離は維持され得る。

【0071】

本明細書で使用される場合、「分離された $\gamma\delta$ 細胞の集団」は、非造血細胞と実質的に接触しないように（例えば、本明細書に記載の分離プロトコールに従って）、元の非造血組織から分離された $\gamma\delta$ 細胞を含む、造血細胞の集団を示す。同様に、「分離された $V\delta 1$ T細胞の集団」は、非造血細胞と実質的に接触しないように（例えば、本明細書に記載の分離プロトコールに従って）、元の非造血組織から分離された $V\delta 1$ T細胞を含む、造血細胞の集団を示す。したがって、これらの例において、分離は非造血細胞（例えば、ストロマ細胞および/または上皮細胞）からの造血細胞（例えば、リンパ球）の分離を示す。

【0072】

用語「抗体」は、最も広い意味で使用され、所望の生物学的活性を奏する限り、特に、モノクローナル抗体（全長のモノクローナル抗体を含む）、ポリクローナル抗体、多重特異性抗体（例えば、二重特異性抗体）、および、抗体断片をカバーする。

【0073】

本明細書で使用される場合、「増幅ステップ」とは、分離後の培養の段階を示し、このステップでは、一定数の $\gamma\delta$ T細胞が、細胞分裂によって増加する。 $\gamma\delta$ T細胞がストロマ細胞と接触している間は、細胞分裂は分離段階にも起こり得るが、増幅ステップは、分離が完了するまで開始しないことが理解されよう。したがって、分離された細胞の集団が、「増幅ステップの前」の時点のものと特徴づけられた場合、これは、分離培養後かつ増幅培養前の時点であることを意味する。

【0074】

本明細書で使用される場合、「増幅された $\gamma\delta$ 細胞の集団」は、 $\gamma\delta$ 細胞の増幅、すなわち $\gamma\delta$ 細胞数の増加を誘発する条件で、かつ継続して培養された $\gamma\delta$ T細胞を含む造血細胞の集団を示す。同様に、本明細書で使用される「増幅された $V\delta 1$ T細胞の集団」は、 $V\delta 1$ T細胞の増幅、すなわち $V\delta 1$ 細胞数の増加を誘発する条件で、継続して培養された $V\delta 1$ T細胞を含む造血細胞の集団を示す。

【0075】

本明細書で使用される場合、「支持細胞」は、非造血組織由来細胞に細胞間の表面接触を提供するために、培養物に加えられる外因性細胞を示す。支持細胞は、プライマリ細胞（例えば、組織由来）であっても、細胞株由来の細胞であってもよい。支持細胞は、生細胞でも照射された細胞でもよく、腫瘍細胞、線維芽細胞、B細胞、およびその他の抗原提示細胞を含む。

【0076】

本明細書において、用語「マーカー」は、DNA、RNA、タンパク質、炭水化物、糖脂質、または細胞ベースの分子マーカーを示し、患者サンプルにおけるその発現または存在は、標準的な方法（または本明細書に開示される方法）によって検出することができる。

【0077】

目的のマーカーを「発現する」単一の細胞または細胞の集団は、タンパク質をコードするmRNA、またはその断片を含むタンパク質自体が、前記の細胞または集団に存在することが決定づけられたものである。マーカーの発現は、多様な手法で検出され得る。例えば、一部の実施形態において、マーカーの発現は、細胞上のマーカーの表面密度で示される。例えば、フローサイトメリーの読み出しとして使用される平均蛍光強度（MFI）は、集団細胞上のマーカーの密度を表す。当業者は、MFIの値が染色パラメータ（例えば、濃度

10

20

30

40

50

、持続時間、および温度) および蛍光色素の組成に依存することを理解するであろう。ただし、MFIは、適切なコントロールを有する状況で検討すると、定量的となり得る。例えば、マーカーに対する抗体のMFIが、同等の条件下で染色された同じ細胞の集団上の適切なアイソタイプコントロール抗体のMFIよりも有意に高い場合、細胞の集団は、そのマーカーを発現していると言える。これに加えて、またはこれに代えて、細胞の集団は、従来のフローサイトメトリー分析法に従って正および負のゲートを使用して(例えば、アイソタイプまたは「蛍光マイナス1」(FMO) コントロールに関するゲートをセットして)、細胞ごとにマーカーの発現を検出できる。この測定基準により、マーカーについて陽性であると検出された細胞の数がバックグラウンドよりも有意に多い場合(例えば、アイソタイプコントロールでゲーティングすることにより)、集団はマーカーを「発現」と言うことができる。

10

【0078】

本明細書で使用される場合、集団の発現は陽性細胞の割合(パーセンテージ)として記載され、その割合が参照集団の陽性細胞の対応する割合と比較される場合、割合の差は、それぞれの集団の親集団の割合を示す。例えば、マーカーが集団Aの10%の細胞に発現され、同じマーカーが集団Bの1%の細胞に発現される場合、集団Aは9%高い頻度でマーカー陽性細胞を有すると言える(例えば、 $10\% - 1\%$ 、 $10\% \div 1\%$ ではない)。頻度に親集団の細胞数を掛けると、細胞の絶対数の差が計算される。上記の例において、集団Aには100細胞があり、集団Bには10細胞があるとすれば、集団Aは集団Bと比較して100倍の数の細胞が存在する; 例えば、 $(10\% \times 100) \div (1\% \times 10)$ 。

20

【0079】

発現レベルは、核酸発現レベル(例えば、DNA発現レベルまたはRNA発現レベル、例えばmRNA発現レベル)であってもよい。いずれの適切な核酸発現測定方法を用いてもよい。一部の実施形態において、核酸発現レベルは、qPCR、rtPCR、RNA-seq、マルチプレックスqPCR若しくはRT-qPCR、マイクロアレイ解析、遺伝子発現連鎖解析(SAGE)、MassARRAY技術、in situハイブリダイゼーション(例えば、FISH)またはこれらの組み合わせを用いて測定される。

【0080】

本明細書で使用される場合、細胞の「参照となる集団(参照集団)」は、対象となる細胞に対応する細胞の集団であり、対象となる細胞の表現型に対して測定される。例えば、非造血組織由来の $\gamma\delta$ 細胞の分離された集団上のマーカーの発現レベルは、造血組織由来の $\gamma\delta$ T細胞(例えば、血液常在性 $\gamma\delta$ 細胞、例えば、同じドナーまたは他のドナー由来の血液常在性 $\gamma\delta$ 細胞)、または、異なる条件下(例えば、実質的なTCRの活性化のある条件下、外因性TCR活性化剤(例えば、抗CD3)の存在下、または、実質的にストロマ細胞(例えば、フィibroプラスト)との接触のある条件下)で増幅された非造血組織由来の $\gamma\delta$ T細胞の発現レベルと比較される。同じ集団のより早期の状態とも比較され得る。例えば、参照となる集団は、増幅前の分離された細胞の集団であってもよい。この場合、増幅された集団は、増幅ステップの前の同集団の組成と比較される; つまり、この場合、過去の組成が参照となる集団となる。

30

【0081】

「癌」とは、悪性癌細胞の異常増殖を示し、急性骨髄性白血病(AML)、慢性骨髄性白血病(CML)、急性リンパ芽球性白血病(ALL)および慢性リンパ球性白血病(CLL)などの白血病、ホジキンリンパ腫、非ホジキンリンパ腫および多発性骨髄腫などのリンパ腫、ならびに、肉腫、皮膚がん、黒色腫、膀胱癌、脳癌、乳癌、子宮体癌、卵巣癌、前立腺癌、肺癌、結腸直腸癌、子宮頸癌、肝臓癌、頭頸部癌、食道癌、膵臓癌、腎癌、副腎癌、胃癌、精巣癌、胆嚢癌および胆道癌、甲状腺癌、胸腺癌、骨腫瘍および脳腫瘍などの固形癌が含まれる。

40

【0082】

癌患者中の癌細胞は、個体の正常な体細胞とは、免疫学的に区別され得る(例えば、癌性腫瘍は免疫原性の場合がある)。例えば、癌細胞は、癌患者の体内で、癌細胞によって

50

発現される1以上の抗原に対する全身性の免疫応答を誘発し得る。免疫応答を誘発し得る抗原は、腫瘍抗原である場合も、正常細胞と共有される場合もある。癌を有する患者は、当技術分野で知られている臨床的な基準に従って癌の診断を行うのに十分な、少なくとも1つの認識可能な兆候、症状、または検査所見を示し得る。このような臨床的な基準の例は、Harrison's Principles of Internal Medicine (Longo DL, Fauci AS, Kasper DL, Hauser SL, Jameson J, Loscalzo J. eds. 18e. New York, NY: McGraw-Hill; 2012) 等の医学書を参照できる。例えば、個体の癌の診断は、個体から取得された体液または組織のサンプル中の特徴的な細胞型（例えば、癌細胞）の同定を含み得る。

【0083】

本明細書で使用される場合、「固形癌」は、血液、骨髄またはリンパ系以外のあらゆる体組織の癌である。固形癌は、さらに上皮細胞由来の癌と非上皮細胞由来の癌に分けることができる。上皮細胞の固形腫瘍の例としては、消化管、結腸、乳房、前立腺、肺、腎臓、肝臓、膵臓、卵巣、頭頸部、口腔、胃、十二指腸、小腸、大腸、肛門、胆嚢、陰唇、鼻咽頭、皮膚、子宮、男性生殖器、泌尿器、膀胱、および皮膚の腫瘍が挙げられる。非上皮細胞の固形腫瘍の例としては、陰唇、鼻咽頭、皮膚、子宮、男性生殖器、泌尿器、膀胱、および皮膚の腫瘍が挙げられる。非上皮細胞の固形腫瘍の例としては、肉腫、脳腫瘍、骨腫瘍が挙げられる。

【0084】

上記の治療に適した患者、対象、または個体は、げっ歯類（例えば、モルモット、ハムスター、ラット、マウス）、ネズミ科（例えば、マウス）、イヌ科（例えば、イヌ）、ネコ科（例えば、ネコ）、ウマ科（例えば、ウマ）、霊長類、サル（simian）（例えば、小型サル（monkey）または類人猿（ape））、小型サル（monkey）（例えば、マーモセットまたはヒヒ）、類人猿（ape）（例えば、ゴリラ、チンパンジー、オランウータンまたはテナガザル）、またはヒトなどの哺乳動物であり得る。

【0085】

一部の実施形態において、前記の患者、対象または個体はヒトである。他の好適な実施形態においては、非ヒト哺乳動物、特にヒトでの治療効果を実証するモデルとして従来使用されている哺乳動物を使用できる。

【0086】

本明細書で使用される場合、「治療」（および、「治療する」または「治療すること」など、文法的な変形）は、ヒトまたは動物（例えば、獣医学への適用）への、例えば、病状の進行の抑制または遅延といった、所望の治療的効果が奏される臨床的な介入を示し、進行速度の低下、進行速度の停止、病状の改善、病状の治癒または寛解（部分的若しくは全体的）、状態の1以上の症状および/若しくは兆候の予防、遅延、軽減または停止、または治療のない条件下で予想される生存期間を超える対象または患者の生存期間の延長を含む。

【0087】

予防処置としての治療（例えば、予防）も含まれる。例えば、癌の発症若しくは再発が起りやすい、またはそのリスクのある患者、対象、または個体は、本明細書に記載されるように治療され得る。このような治療は、患者、対象、または個体における癌の発症または再発を抑制、または遅延し得る。

【0088】

特に、治療は、癌の完全寛解および/または癌転移の抑制を含む、癌の成長の抑制を含む。癌の成長は、一般的に、癌内部のより発達した形態への変化を示す、いくつかの指標のうちのいずれか1つを示す。したがって、癌の成長の抑制を測定する指標は、癌細胞の生存率の低下、腫瘍サイズまたは形態の減少（例えば、コンピューター断層撮影（CT）、超音波検査、または他のイメージング法を使用して決定される）、腫瘍の成長の遅延、腫瘍血管の破壊、遅延型過敏症皮膚試験の性能の向上、細胞傷害性Tリンパ球の活性亢進、および腫瘍特異的抗原のレベルの低下が含まれる。個体の癌性腫瘍中の免疫抑制を低減することは、癌の成長、特に、既に対象に存在する癌の成長に抵抗する、および/または、

10

20

30

40

50

個体の癌の成長傾向を減少するための個体の能力を改善し得る。

【0089】

一部の実施形態において、増幅された $\gamma\delta$ T細胞（例えば、非造血組織由来の $\gamma\delta$ T細胞、例えば、非造血組織由来の $V\delta 1$ T細胞）は、病気の発達を遅らせる、または病気若しくは障害の進行を遅くするために投与される。

【0090】

本明細書で使用される場合、「投与」は、患者に対して、一用量の療法（例えば、非造血組織由来の $\gamma\delta$ T細胞等を含む、養子T細胞療法）または組成物（例えば、医薬組成物、例えば、非造血細胞由来の $\gamma\delta$ T細胞を含む医薬組成物）を与えることを意味する。本明細書に記載される方法で利用される組成物は、例えば、筋肉内、静脈内、皮内、経皮的、動脈内、腹腔内、病変内、頭蓋内、関節内、前立腺内、胸腔内、気管内、くも膜下、鼻腔内、腔内、直腸内、局所、腫瘍内、腹膜、皮下、結膜下、膀胱内、粘膜、心膜内、臍内、眼内、眼窩内、硝子体内（例えば、硝子体内注射による）、点眼、経口、局所、経皮、吸入、注射、移植、注入、連続注入、標的細胞を直接浸す局所灌流、標的細胞を直接浸す局所灌流、カテーテル、洗浄、クリーム、または脂質組成物によって投与することができる。本明細書に記載される方法に利用される組成物の投与は、全身投与であっても、局所投与であってもよい。投与方法は、多様な要因（例えば、投与する治療剤または組成物、および治療すべき病状、病気または障害の深刻さ）によって変更されてもよい。

【0091】

「治療に効果的な量（治療上有効な量）」は、哺乳動物の病気または障害を治療または抑制するための治療剤の量を示す。癌の場合、治療剤（例えば、非造血組織由来の $\gamma\delta$ T）の治療に効果的な量は、癌細胞の数を減らす、原発性腫瘍のサイズを縮小する、末梢組織への癌細胞の浸潤を抑制する（すなわち、ある程度遅らせ、好適には停止させる）、腫瘍の転移を抑制する（すなわち、ある程度遅らせ、好適には停止させる）、ある程度の期間腫瘍の成長を抑制する、および/または、障害に関連する1以上の症状をある程度緩和し得る。薬物が癌細胞の成長を妨げる、および/または、既存の癌細胞を殺すことができる範囲で、それは細胞増殖抑制性および/または細胞毒性である可能性がある。癌治療の場合、*in vivo*での有効性は、たとえば、生存期間、疾患進行の時間（TTP）、応答率（たとえば、完全奏効（CR）および部分奏効（PR））、奏効期間および/または生活の質を評価することで測ることができる。

【0092】

用語「同時に」は、本明細書においては、少なくとも部分的に投与時間が重複する、2以上の治療剤の投与を示す。したがって、同時投与は、1以上の他の薬剤の投与を中止した後、1以上の薬剤の投与が継続する場合の投与計画を含む。例えば、一部の実施形態において、非造血組織由来の $\gamma\delta$ T細胞とIL-2は同時に投与され得る。

【0093】

用語「医薬組成物」は、含まれる1以上の活性成分の生物学的活性を有効にする形態をとり、かつ、その製剤を投与される患者にとって受忍できない毒性を有する追加の成分を含まない、製剤を示す。

【0094】

III. $\gamma\delta$ T細胞を分離および増幅する方法

本発明は、患者から取り出せる、または取り出された、ヒトまたは非ヒト動物の非造血組織からの $\gamma\delta$ T細胞（例えば、皮膚由来の $\gamma\delta$ T細胞および/または非 $V\delta 2$ T細胞、例えば $V\delta 1$ T細胞および/またはDN T細胞）を単離および増幅する方法を提供する。一部の実施形態において、 $\gamma\delta$ T細胞が取り出され、増幅される元となる非造血組織は皮膚（例えば、ヒトの皮膚）であり、当技術分野で知られる方法により取得される。一部の実施形態において、皮膚はパンチ生検により取得される。あるいは、本明細書で提供される、 $\gamma\delta$ T細胞を単離および増幅する方法は、消化管（例えば、結腸）、乳腺、肺、前立腺、肝臓、脾臓、膵臓に適用することができる。 $\gamma\delta$ T細胞は、ヒト癌組織、例えば、乳房または前立腺の腫瘍に常在するものでもよい。一部の実施形態において、 $\gamma\delta$ T細胞は、ヒト

癌組織（例えば、固形腫瘍組織）由来であってもよい。他の実施形態において、 $\gamma\delta$ T細胞は、ヒト癌組織以外の非造血組織（例えば、実質的な数の腫瘍細胞を有しない組織）であってもよい。例えば、 $\gamma\delta$ T細胞は、癌の周辺または癌の隣接部位から離間した、皮膚領域（例えば、健康な皮膚）由来であってもよい。

【0095】

血液中の $\gamma\delta$ T細胞の大部分を占める $\gamma\delta$ T細胞は、主にV δ 2 T細胞であるが、非造血組織の $\gamma\delta$ T細胞の大部分を占めるのは、主にV δ 1 T細胞であり、V δ 1 T細胞は非造血組織常在性の $\gamma\delta$ T細胞の集団の70-80%を含む。しかしながら、一部のV δ 2 T細胞は非造血組織、例えば消化管にも見られ、消化管では、 $\gamma\delta$ T細胞の10-20%を含む（図6）。非造血組織に常在する $\gamma\delta$ T細胞の一部は、V δ 1もV δ 2 TCRも発現しない。このような細胞を、本明細書ではダブルネガティブ（DN）と名付ける。DN $\gamma\delta$ T細胞は、多数がV δ 3発現T細胞であり、少数がV δ 5発現T細胞である可能性が高い。したがって、非造血組織に常在し、本発明の方法によって増幅される $\gamma\delta$ T細胞は、好適にはV δ 2 T細胞ではなく、例えば、少量のDN $\gamma\delta$ T細胞を含むV δ 1 T細胞である。

【0096】

特定の非造血組織は、高度に血管新生が生じ得るため、実際に、非造血組織のサンプルに末梢の血液常在性細胞がコンタミネーションを起こしやすいことを当業者は理解するであろう。このようなコンタミネーションを回避または最小化するため、適切な緩衝液で組織を完全に洗浄して細胞を除去するなど、当技術分野で知られている方法に従って、分離および増幅培養液から末梢血が除去されるように留意することができる。例えば、いくつかの実施形態では、肺組織から単離された $\gamma\delta$ T細胞の集団は、気管支肺胞洗浄によって得られたものではない。

【0097】

非造血組織からの非造血組織常在性 $\gamma\delta$ T細胞の分離

一部の実施形態において、重要なステップは、例えば、培養数日または数週間後の、非造血組織常在性T細胞（例えば、 $\alpha\beta$ 細胞、ナチュラルキラー（NK）細胞、B細胞および $\gamma\delta$ 2T細胞、および非 $\gamma\delta$ 2T細胞等を含む混合リンパ球の集団の内部）を、T細胞を取得した組織の非造血細胞（例えば、ストロマ細胞、特に線維芽細胞）から、目的に沿って分離することである。これにより、非造血組織由来のV δ 1 T細胞およびDN $\gamma\delta$ T細胞の数日および数週間の優先的かつ迅速な増幅が可能になる。

【0098】

本発明は、非造血組織（例えば、皮膚、例えば、パンチ生検により得られた皮膚）からの、 $\gamma\delta$ T細胞（例えば、非V δ 2 T細胞、例えば、V δ 1 T細胞および/またはDN T細胞）の分離を含む方法を提供する。ある実施形態では、非造血細胞からの $\gamma\delta$ T細胞の分離は、非造血組織からの細胞の放出を促進するように構成された合成スキャホールド上での $\gamma\delta$ T細胞と非造血細胞との培養を含む。固形組織からのリンパ球の分離に適した、あらゆるスキャホールドを使用することができる。合成スキャホールドは、天然および/または合成の材料（例えば、天然または自然のポリマー、例えば、ポリビニルピロリドン、ポリメチルメタクリレート、メチルセルロース、ポリスチレン、ポリプロピレン、ポリウレタン）、セラミック（例えば、リン酸三カルシウム、アルミン酸カルシウム、カルシウムヒドロキシアパタイト）または金属（タンタル、チタン、白金、および白金、ニオブ、ハフニウム、タングステン、およびこれらの合金の組み合わせと同じ元素グループの金属）によって構成され得る。生物学的因子（例えば、コラーゲン（例えば、コラーゲンIまたはコラーゲンII）、フィブロネクチン、ラミニン、インテグリン、血管新生因子、抗炎症因子、グリコサミノグリカン、ビトロジェン、抗体およびその断片、サイトカイン（例えば、IL-2またはIL-15）およびこれらの組み合わせ）、ケモカイン、および/または化学誘引物質をスキャホールド表面にコーティングするか、スキャホールド材料内にカプセル化して、当技術分野で知られている方法に従って、細胞の接着、移動、生存、または増殖を促進することができる。一部の実施形態において、合成スキャホールドは、Clerkプロトコールに記載されるCellfoamスキャホールドである。あるいは、他の方法、例えば、細胞外

マトリックス成分（例えば、コラゲナーゼ）の酵素ベースの分解を使用して、他の多くの非造血組織型からリンパ球を分離することができる。

【0099】

分離培養は、1時間（例えば、単純な消化の場合）から42日間（例えば、スキャホールドでの培養の場合）の間で、いずれの期間実施してもよい。例えば、分離ステップがスキャホールド上で行われる場合、培養は、少なくとも5日間（例えば、少なくとも6日間、少なくとも7日間、少なくとも8日間、少なくとも9日間、少なくとも10日間、少なくとも12日間、少なくとも14日間、少なくとも16日間、少なくとも18日間、少なくとも20日間、少なくとも21日間、少なくとも24日間、少なくとも28日間、少なくとも30日間、少なくとも35日間、または、少なくとも40日間、例えば、7日と14日の間、14日と21日の間、または、21日と35日の間、例えば、約14日間、または約21日間）実施され得る。

10

【0100】

$\gamma\delta$ T細胞（例えば、皮膚由来の $\gamma\delta$ T細胞および/または非V δ 2 T細胞、例えば、V δ 1 T細胞および/またはDN T細胞）の分離中、非造血組織およびそれに由来する細胞は、組織からの脱出を促進するための、または、1以上の細胞の垂集団の生存を促進するための、生物学的因子の存在下で培養され得る。一部の実施形態において、分離培養はIL-2、例えば、少なくとも10IU/mLの濃度のIL-2（例えば、10IU/mL～1,000IU/mL、20IU/mL～800IU/mL、25IU/mL～750IU/mL、30IU/mL～700IU/mL、40IU/mL～600IU/mL、50IU/mL～500IU/mL、75IU/mL～250IU/mLまたは100IU/mL～200IU/mL、例えば、10IU/mL～20IU/mL、20IU/mL～30IU/mL、30IU/mL～40IU/mL、40IU/mL～50IU/mL、50IU/mL～75IU/mL、75IU/mL～100IU/mL、100IU/mL～150IU/mL、150IU/mL～200IU/mL、200IU/mL～500IU/mLまたは500IU/mL～1,000IU/mL）を含む。一部の実施形態において、分離培養は、約100IU/mLのIL-2を含む。これに加えて、または、これに代えて、分離培養はIL-15、例えば、少なくとも0.1ng/mLのIL-15（例えば、0.1ng/mL～10,000ng/mL、1.0ng/mL～1,000ng/mL、5ng/mL～800ng/mL、10ng/mL～750ng/mL、20ng/mL～500ng/mL、50ng/mL～400ng/mLまたは100ng/mL～250ng/mL、例えば、0.1ng/mL～1.0ng/mL、1.0ng/mL～5.0ng/mL、5.0ng/mL～10ng/mL、10ng/mL～20ng/mL、20ng/mL～50ng/mL、50ng/mL～100ng/mL、100ng/mL～200ng/mL、200ng/mL～500ng/mLまたは500ng/mL～1,000ng/mL）を含む。一部の実施形態において、分離培養は、約20ng/mLのIL-15を含む。

20

【0101】

一部の実施形態において、非造血組織からの $\gamma\delta$ T細胞の分離は、IL-2とIL-15（それぞれ、上記にリスト化したいずれかの濃度）の両方が存在する条件下での培養を含む。一部のケースにおいて、IL-2の濃度は約100IU/mLであり、IL-15の濃度は20ng/mLである。

30

【0102】

$\gamma\delta$ T細胞（例えば、皮膚由来の $\gamma\delta$ T細胞および/または非V δ 2 T細胞、例えば、V δ 1 T細胞および/またはDN T細胞）は、IL-6、IL-23およびIL-1 β が存在しないか、これらのサイトカインが低濃度（例えば、20ng/mL未満）で存在する条件下で培養され得る；なぜならば、このサイトカインの組み合わせの追加は、非造血細胞由来の $\gamma\delta$ T細胞（例えば、皮膚由来の $\gamma\delta$ T細胞および/または非V δ 2 T細胞、例えば、V δ 1 T細胞および/またはDN T細胞）の増殖を減少させるように作用し得るからである。

40

【0103】

非造血組織（例えば、皮膚）からの分離において、一般的に、 $\gamma\delta$ T細胞は、例えば、 $\alpha\beta$ T細胞、B細胞およびナチュラルキラー（NK）細胞を含むより大きなリンパ球の集団の一部である。一部の実施形態において、リンパ球の分離された集団の1%～10%が、増幅前の $\gamma\delta$ T細胞である（例えば、皮膚由来のリンパ球の分離された集団の1%～10%が、増幅前の $\gamma\delta$ T細胞である）。ほとんどの場合、 $\gamma\delta$ T細胞の集団（例えば、皮膚由来の $\gamma\delta$ T細胞の集団）は、V δ 1 T細胞の大きな集団を含む。一部の実施形態において、リンパ球（例えば、皮膚由来のリンパ球）の分離された集団の1%～10%が、増幅前のV δ 1 T細胞である（例えば、増幅前の $\gamma\delta$ T細胞の分離された集団のうち、V δ 1 T細胞は、集団の50%超、60%超、70%超、80%超、または90%超で存在し得る）。一部の例において、

50

$\gamma\delta$ T細胞の分離された集団の10%未満が増幅前の $V\delta 2$ T細胞である（例えば、皮膚由来の $\gamma\delta$ T細胞の分離された集団の10%未満が増幅前の $V\delta 2$ T細胞である）。

【0104】

$V\delta 2$ T細胞、 $\alpha\beta$ T細胞、B細胞またはNK細胞のような、非 $V\delta 1$ T細胞または非DN T細胞は、 $\gamma\delta$ T細胞の分離された集団から除去され得る（例えば、増幅の前、間、または後）。

【0105】

増幅前において、分離された $\gamma\delta$ T細胞（例えば、皮膚から分離された $\gamma\delta$ T細胞、例えば、皮膚から分離された $V\delta 1$ T細胞）は、対応する造血組織由来の細胞（例えば、血液由来の $\gamma\delta$ T細胞。例えば、血液由来の $V\delta 2$ T細胞）とは異なる表現型を有する。例えば、 $\gamma\delta$ T細胞の分離された集団は、参照となる集団、例えば、非造血組織常在性のTCR活性化 $\gamma\delta$ T細胞の集団、または、対応する造血組織由来の細胞集団（例えば、血液由来の $\gamma\delta$ T細胞、例えば、血液由来の $V\delta 2$ T細胞）よりも高レベルのCCR3、CCR4、CCR7、CCR8またはCD103を発現し得る。一部の実施形態において、分離された $\gamma\delta$ T細胞の集団は、少なくとも5%、10%、15%、20%、25%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%またはそれを超えるCCR3⁺細胞；少なくとも5%、10%、15%、20%、25%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%またはそれを超えるCCR4⁺細胞；少なくとも5%、10%、15%、20%、25%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%またはそれを超えるCCR7⁺細胞；5%、10%、15%、20%、25%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%またはそれを超えるCCR8⁺細胞；および/または5%、10%、15%、20%、25%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%またはそれを超えるCD103⁺細胞を含む。分離された $\gamma\delta$ T細胞の集団は、CCR3、CCR4、CCR7、CCR8またはCD103のうち、1以上、2以上、3以上、4以上、5以上または6つすべてを発現し得る。

【0106】

一部の実施形態において、 $\gamma\delta$ T細胞の分離された集団は、参照となる集団、例えば、非造血組織常在性のTCR活性化 $\gamma\delta$ T細胞の集団、または、対応する造血組織由来の細胞集団（例えば、血液由来の $\gamma\delta$ T細胞、例えば、血液由来の $V\delta 2$ T細胞）よりも高レベルのNKGD2、CD56、CD69および/またはTIM3を発現する。一部の実施形態において、分離された $\gamma\delta$ T細胞の集団は、少なくとも5%、10%、15%、20%、25%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%またはそれを超えるNKGD2⁺細胞；少なくとも5%、10%、15%、20%、25%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%またはそれを超えるCD56⁺細胞、少なくとも5%、10%、15%、20%、25%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%またはそれを超えるCD69⁺細胞；少なくとも5%、10%、15%、20%、25%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%またはそれを超えるTIM3⁺細胞を含む。分離された $\gamma\delta$ T細胞の集団は、NKGD2、CD56、CD69および/またはTIM3のうち、1以上、2以上、3以上、4以上または5つすべてを発現し得る。

【0107】

非造血組織由来の $\gamma\delta$ T細胞（例えば、皮膚由来の $\gamma\delta$ T細胞、例えば、皮膚由来の $V\delta 1$ T細胞）の分離された集団は、その機能により特徴づけることができる。当技術分野で知られる、実施例3に例示する機能アッセイは、本発明の非造血組織由来の細胞（例えば、分離された $\gamma\delta$ T細胞の集団、例えば、皮膚由来の $V\delta 1$ T細胞の集団、または増幅された $\gamma\delta$ T細胞の集団、例えば、皮膚由来の $V\delta 1$ T細胞）と参照となる細胞（例えば、TCR活性化非造血組織常在性 $\gamma\delta$ T細胞の集団。または対応する造血組織由来の細胞の集団、例えば、血液由来の $\gamma\delta$ T細胞、例えば、血液由来の $V\delta 2$ T細胞）との間の機能的な差異を測定できる。一部の実施形態において、分離された非造血組織由来の $\gamma\delta$ T細胞の集団（例えば、実質的にTCR経路活性化の接触なしで分離された $\gamma\delta$ T細胞の集団）は、参照となる集団（例えば、TCR活性化非造血組織常在性 $\gamma\delta$ T細胞の集団、例えば、抗CD3活性化非造血組織由来の $\gamma\delta$ T細胞の集団）よりも高いレベルのIL-13を分泌する。例えば、分離された非造血組織由来の $\gamma\delta$ T細胞（例えば、皮膚由来の $\gamma\delta$ T細胞および/または非 $V\delta 2$ T細胞、例えば $V\delta 1$ T細胞および/またはDN T細胞）の集団は、参照となる細胞の集団（例えば、TCR活性化非造血組織常在性 $\gamma\delta$ T細胞の集団、例えば、抗CD3活性化非造血組織常在性 $\gamma\delta$ T細胞の集団）よりも、1.1倍、1.2倍、1.3倍、1.4倍、1.5倍、2倍、

3倍、4倍、5倍、10倍、15倍、20倍、30倍、40倍、50倍、60倍、70倍、80倍、90倍、100倍、200倍、300倍、400倍、500倍、1,000倍またはより高濃度のIL-13を分泌し得る。同様に、分離された細胞の集団に含まれる、IL-13を分泌する非造血組織由来の $\gamma\delta$ T細胞の数または頻度は、参照となる細胞の集団（例えば、TCR活性化非造血組織常在性 $\gamma\delta$ T細胞の集団、例えば、抗CD3活性化非造血組織常在性 $\gamma\delta$ T細胞の集団）よりも多くなり得る。例えば、分離された $\gamma\delta$ T細胞の集団中のIL-13分泌細胞の頻度（例えば、分離されたV δ 1 T細胞の集団中のIL-13分泌細胞の頻度）は、参照となる細胞の集団（例えば、TCR活性化非造血組織常在性 $\gamma\delta$ T細胞の集団、例えば、抗CD3活性化非造血組織常在性 $\gamma\delta$ T細胞の集団）よりも高くなり得る。一部の実施形態において、分離された $\gamma\delta$ T細胞の集団中のIL-13分泌細胞の頻度（例えば、分離されたDN T細胞または本発明のV δ 1 T細胞の集団中のIL-13分泌細胞の頻度）は、参照となる細胞の集団（例えば、TCR活性化非造血組織常在性 $\gamma\delta$ T細胞の集団、例えば、抗CD3活性化非造血組織常在性 $\gamma\delta$ T細胞の集団）よりも、少なくとも1%、少なくとも2%、少なくとも3%、少なくとも4%、少なくとも5%、少なくとも6%、少なくとも7%、少なくとも8%、少なくとも9%、少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、最大で100%大きい。

【0108】

非造血組織常在性 $\gamma\delta$ T細胞の増幅

本発明は、非造血組織常在性 $\gamma\delta$ T細胞（例えば、皮膚由来の $\gamma\delta$ T細胞および/または非V δ 2 T細胞、例えばV δ 1 T細胞および/またはDN T細胞）を増幅する方法を特徴とする。これらの方法は、*in vitro* で実行され得る。一部の実施形態において、非造血組織常在性の $\gamma\delta$ T細胞は、上記の方法によって分離された非造血組織から分離された $\gamma\delta$ T細胞の集団から増幅される。一般的に、非造血組織常在性 $\gamma\delta$ T細胞は、ストロマ細胞（例えば、皮膚線維芽細胞）との物理的な接触を除去すれば、自動的に増幅可能である。したがって、上記のスクキャホールドをベースとした培養方法を使用して、このような分離を誘導し、 $\gamma\delta$ T細胞の抑制を解除して、増幅を引き起こすことができる。したがって、一部の実施形態においては、増幅ステップにおいて、実質的にTCR経路の活性化は存在しない（例えば、外因性TCR経路活性化剤は、培養液中に含まれない）。さらに、本発明は、非造血由来常在性 $\gamma\delta$ TCR細胞を増幅する方法であって、支持細胞、腫瘍細胞および/または抗原提示細胞との接触を含まない方法を提供する。

【0109】

本発明の発明者らは、非造血組織常在性 $\gamma\delta$ T細胞を、 $\gamma\delta$ T細胞の効率的な増幅を支持するために効果的な生物学的因子のカクテルの存在下で培養することを含む、増幅プロトコルを開発した。ある実施形態において、本発明は、非造血組織より得られた $\gamma\delta$ T細胞の集団（例えば、分離された非造血組織由来の $\gamma\delta$ T細胞の集団、例えば、本明細書に記載された方法で分離された非造血組織由来の $\gamma\delta$ T細胞の集団）を提供し、前記 $\gamma\delta$ T細胞を、IL-2、IL-4、IL-15および/またはIL-21の存在下で培養することによって、 $\gamma\delta$ T細胞を増幅する方法を提供する。これらのサイトカインまたはその類似物（アナログ）は、ある期間（例えば、少なくとも5日間、少なくとも6日間、少なくとも7日間、少なくとも8日間、少なくとも9日間、少なくとも10日間、少なくとも11日間、少なくとも12日間、少なくとも13日間、少なくとも14日間、少なくとも21日間、少なくとも28日間 またはより長く、例えば5日間～40日間、7日間～35日間、14～28日間、または約21日間）、増幅された $\gamma\delta$ T細胞の集団を生成するために効果的な量で、細胞とともに培養され得る。

【0110】

一部の実施形態においては、増幅された $\gamma\delta$ T細胞の集団を生成するために効果的なIL-2の量は、1IU/mL～2,000IU/mL（例えば、5IU/mL～1,000IU/mL、10IU/mL～500IU/mL、20IU/mL～400 IU/mL、50IU/mL～250IU/mLまたは約100IU/mL、例えば、5IU/mL～10 IU/mL、10 IU/mL～20IU/mL、20IU/mL～30IU/mL、30IU/mL～40IU/mL、40IU/mL～50IU/mL、50IU/mL～60IU/mL、60IU/mL～70IU/mL、70IU/mL～80IU/mL、80IU/mL～90IU/mL、90IU/mL～100IU/mL、100IU/mL～120IU/mL、120IU/mL～140IU/mL、140IU/mL～150IU/mL、150IU/mL～175IU/mL

、175IU/mL～200IU/mL、200IU/mL～300IU/mL、300IU/mL～400IU/mL、400IU/mL～500IU/mL、500IU/mL～1,000IU/mL、1,000IU/mL～1,500IU/mL、1,500IU/mL～2,000IU/mLまたはより高濃度）である。一部の実施形態において、増幅された $\gamma\delta$ T細胞の集団の生成に効果的なIL-2の量は、約100IU/mLである。

【0111】

一部の実施形態において、増幅された $\gamma\delta$ T細胞の集団（例えば、皮膚由来の $\gamma\delta$ T細胞および/または非V δ 2 T細胞、例えば、V δ 1 T細胞および/またはDN T細胞）を生成するために効果的なIL-4の量は、少なくとも0.1ng/mL（例えば、0.1ng/mL～10,000ng/mL、1.0ng/mL～1,000ng/mL、5ng/mL～800ng/mL、10ng/mL～750ng/mL、20ng/mL～500ng/mL、50ng/mL～400ng/mL、100ng/mL～250ng/mL、0.1ng/mL～1.0ng/mL、1.0ng/mL～5.0ng/mL、5.0ng/mL～10ng/mL、10ng/mL～20ng/mL、20ng/mL～50ng/mL、50ng/mL～100ng/mL、100ng/mL～200ng/mL、200ng/mL～500ng/mL、500ng/mL～1,000ng/mL）である。一部の実施形態において、増幅された $\gamma\delta$ T細胞の生成に効果的なIL-4の量は、約5ng/mLである。

【0112】

一部の実施形態において、増幅された $\gamma\delta$ T細胞の集団（例えば、皮膚由来の $\gamma\delta$ T細胞および/または非V δ 2 T細胞、例えば、V δ 1 T細胞および/またはDN T細胞）を生成するために効果的なIL-15の量は、少なくとも0.1ng/mL（例えば、0.1ng/mL～10,000ng/mL、1.0ng/mL～1,000ng/mL、5ng/mL～800ng/mL、10ng/mL～750ng/mL、20ng/mL～500ng/mL、50ng/mL～400ng/mL、100ng/mL～250ng/mL、例えば、0.1ng/mL～1.0ng/mL、1.0ng/mL～5.0ng/mL、5.0ng/mL～10ng/mL、10ng/mL～20ng/mL、20ng/mL～50ng/mL、50ng/mL～100ng/mL、100ng/mL～200ng/mL、200ng/mL～500ng/mL、または500ng/mL～1,000ng/mL）である。一部の実施形態において、増幅された $\gamma\delta$ T細胞の生成に効果的なIL-15の量は、約10ng/mLである。

【0113】

一部の実施形態において、増幅された $\gamma\delta$ T細胞の集団（例えば、皮膚由来の $\gamma\delta$ T細胞および/または非V δ 2 T細胞、例えば、V δ 1 T細胞および/またはDN T細胞）を生成するために効果的なIL-21の量は、少なくとも0.1ng/mL（例えば、0.1ng/mL～10,000ng/mL、1.0ng/mL～1,000ng/mL、5ng/mL～800ng/mL、10ng/mL～750ng/mL、20ng/mL～500ng/mL、50ng/mL～400ng/mL、100ng/mL～250ng/mL、例えば、0.1ng/mL～1.0ng/mL、1.0ng/mL～5.0ng/mL、5.0ng/mL～10ng/mL、10ng/mL～20ng/mL、20ng/mL～50ng/mL、50ng/mL～100ng/mL、100ng/mL～200ng/mL、200ng/mL～500ng/mL、または500ng/mL～1,000ng/mL）である。一部の実施形態において、増幅された $\gamma\delta$ T細胞の生成に効果的なIL-21の量は、約10ng/mLである。

【0114】

非造血組織常在性 $\gamma\delta$ T細胞の増幅培養における他の因子の置換または追加も、本明細書では提供される。例えば、一部の実施形態において、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-12、IL-18、IL-33、IGF-1、IL-1 β 、ヒト血小板溶解物（HPL）およびストロマ細胞由来因子-1（SDF-1）からなる群から選択される1以上の因子が、IL-2、IL-4、IL-15およびIL-21のいずれかに追加または置換される形で含まれる。各因子の適切な濃度は、実施例3の表2に提供される。

【0115】

増幅された $\gamma\delta$ T細胞の集団の生成に必要とされる上記の各サイトカインの量は、1以上の他のサイトカインの濃度に依存することは理解されるであろう。例えば、IL-2の濃度が増加または減少すれば、IL-15の濃度は、それに応じて減少または増加する。上記のとおり、本明細書において、増幅された集団を生成するための効果的な量は、細胞の増幅におけるすべての因子の効果の複合的な効果を参照する。

【0116】

一部の実施形態において、 $\gamma\delta$ T細胞は、各因子に同時に曝される（例えば、 $\gamma\delta$ T細胞は、IL-2、IL-4、IL-15およびIL-21に同時に、例えば、5日間曝される）。他の例においては、 $\gamma\delta$ T細胞は、他の因子での培養の前に、特定の因子に曝される。例えば、増幅

培養は、増幅コースを通して、徐々に追加の因子が与えられてもよいし、あるいは、 $\gamma \delta$ T細胞は、1つの因子またはグループの因子を含む培養液から、他の培養液に移植されてもよい。

【0117】

一部の実施形態において、 $\gamma \delta$ T細胞は、数時間（例えば、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、18または21時間）から約35日間（例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34または35日間）の期間の培養で増幅される。ある実施形態において、 $\gamma \delta$ T細胞の集団を細胞は、14~21日間で増幅される。したがって、分離培養期間（例えば1~40日、例えば、14~21日間）を含めて、分離および増幅のステップについて、一部の実施形態では、28日から56日の間、または約41日間が必要とされ得る。 10

【0118】

増幅方法は、参照となる集団よりも多数の、増幅された $\gamma \delta$ T細胞の集団を提供する。一部の実施形態において、増幅された $\gamma \delta$ T細胞の集団は、増幅ステップ前の分離された $\gamma \delta$ T細胞の集団よりも多数である（例えば、増幅ステップ前の分離された $\gamma \delta$ T細胞の集団と比較して、少なくとも2倍の数、少なくとも3倍の数、少なくとも4倍の数、少なくとも5倍の数、少なくとも6倍の数、少なくとも7倍の数、少なくとも8倍の数、少なくとも9倍の数、少なくとも10倍の数、少なくとも15倍の数、少なくとも20倍の数、少なくとも25倍の数、少なくとも30倍の数、少なくとも35倍の数、少なくとも40倍の数、少なくとも50倍の数、少なくとも60倍の数、少なくとも70倍の数、少なくとも80倍の数、少なくとも90倍の数、少なくとも100倍の数、少なくとも200倍の数、少なくとも300倍の数、少なくとも400倍の数、少なくとも500倍の数、少なくとも600倍の数、少なくとも700倍の数、少なくとも800倍の数、少なくとも900倍の数、少なくとも1,000倍の数、少なくとも5,000倍の数、少なくとも10,000倍の数、またはより多く）。 20

【0119】

したがって、本発明は、非造血組織由来の $\gamma \delta$ T細胞（例えば、皮膚由来の $\gamma \delta$ T細胞および/または非V δ 2 T細胞、例えば、V δ 1 T細胞および/またはDN T細胞）の多数の集団を、高い効率で（例えば、ストロマ細胞の接触および/またTCR刺激の除外による、または効果的な量の因子の存在下での培養による）生成する手段を提供する。一部の実施形態において、本明細書に記載の増幅ステップは、短い細胞数の倍增時間で $\gamma \delta$ T細胞を増幅するが、倍增時間は下記式で得られる： 30

[数1]

$$\text{倍增時間} = \text{期間} \times \log(2) / (\log(\text{最終濃度}) - \log(\text{初期濃度}))$$

本明細書、例えば後述の実施例3の情報によって、当業者は、本発明が、細胞数の倍增時間が5日間未満（例えば、4.5日未満、4.0日未満、3.9日未満、3.8日未満、3.7日未満、3.6日未満、3.5日未満、3.4日未満、3.3日未満、3.2日未満、3.1日未満、3.0日未満、2.9日未満、2.8日未満、2.7日未満、2.6日未満、2.5日未満、2.4日未満、2.3日未満、2.2日未満、2.1日未満、2.0日未満、46時間未満、42時間未満、38時間未満、35時間未満、32時間未満）の非造血組織由来の $\gamma \delta$ T細胞（例えば、皮膚由来の $\gamma \delta$ T細胞および/または非V δ 2 T細胞、例えば、V δ 1 T細胞および/またはDN T細胞）の増幅方法を提供することを認識するであろう。 40

【0120】

一部の実施形態において、7日以内の培養で、増幅された $\gamma \delta$ T細胞の集団（例えば、V δ 1 T細胞および/またはDN T細胞の増幅された集団）は、増幅前の分離された $\gamma \delta$ T細胞の集団と比較して、少なくとも10倍の数の $\gamma \delta$ T細胞を含む（例えば、増幅前の分離された $\gamma \delta$ T細胞の集団と比較して、少なくとも20倍、少なくとも30倍、少なくとも40倍、少なくとも50倍、少なくとも60倍、少なくとも70倍、少なくとも80倍、少なくとも90倍、少なくとも100倍、少なくとも150倍、少なくとも200倍、少なくとも300倍、少なくとも400倍、少なくとも500倍、少なくとも600倍、少なくとも700倍、少なくとも800倍、少なくとも900倍、少なくとも1,000倍、少なくとも2,000倍、少なくとも3,000倍、少なくとも4,00 50

0倍、少なくとも5,000倍、少なくとも6,000倍、少なくとも7,000倍、または少なくとも8,000倍の数)。一部の実施形態において、14日以内の培養で、増幅された $\gamma\delta$ T細胞の集団（例えば、 $V\delta 1$ T細胞および/またはDN T細胞の増幅された集団）は、増幅前の分離された $\gamma\delta$ T細胞の集団と比較して、少なくとも20倍の数の $\gamma\delta$ T細胞を含む（例えば、増幅前の分離された $\gamma\delta$ T細胞の集団と比較して、少なくとも30倍、少なくとも40倍、少なくとも50倍、少なくとも60倍、少なくとも70倍、少なくとも80倍、少なくとも90倍、少なくとも100倍、少なくとも150倍、少なくとも200倍、少なくとも300倍、少なくとも400倍、少なくとも500倍、少なくとも600倍、少なくとも700倍、少なくとも800倍、少なくとも900倍、少なくとも1,000倍、少なくとも2,000倍、少なくとも3,000倍、少なくとも4,000倍、少なくとも5,000倍、少なくとも6,000倍、少なくとも7,000倍、少なくとも8,000倍、少なくとも9,000倍、または、少なくとも10,000倍の数）。一部の実施形態において、21日以内の培養で、増幅された $\gamma\delta$ T細胞の集団（例えば、 $V\delta 1$ T細胞および/またはDN T細胞の増幅された集団）は、増幅前の分離された $\gamma\delta$ T細胞の集団と比較して、少なくとも50倍の数の $\gamma\delta$ T細胞を含む（例えば、増幅前の分離された $\gamma\delta$ T細胞の集団と比較して、少なくとも60倍、少なくとも70倍、少なくとも80倍、少なくとも90倍、少なくとも100倍、少なくとも150倍、少なくとも200倍、少なくとも300倍、少なくとも400倍、少なくとも500倍、少なくとも600倍、少なくとも700倍、少なくとも800倍、少なくとも900倍、少なくとも1,000倍、少なくとも2,000倍、少なくとも3,000倍、少なくとも4,000倍、少なくとも5,000倍、少なくとも6,000倍、少なくとも7,000倍、少なくとも8,000倍、少なくとも9,000倍、または、少なくとも10,000倍の数）。一部の実施形態において、28日以内の培養で、増幅された $\gamma\delta$ T細胞の集団（例えば、 $V\delta 1$ T細胞および/またはDN T細胞の増幅された集団）は、増幅前の分離された $\gamma\delta$ T細胞の集団と比較して、少なくとも100倍の数の $\gamma\delta$ T細胞を含む（例えば、増幅前の分離された $\gamma\delta$ T細胞と比較して、少なくとも110倍、少なくとも120倍、少なくとも130倍、少なくとも140倍、少なくとも150倍、少なくとも200倍、少なくとも300倍、少なくとも400倍、少なくとも500倍、少なくとも600倍、少なくとも700倍、少なくとも800倍、少なくとも900倍、少なくとも1,000倍、少なくとも2,000倍、少なくとも3,000倍、少なくとも4,000倍、少なくとも5,000倍、少なくとも6,000倍、少なくとも7,000倍、少なくとも8,000倍、少なくとも9,000倍、少なくとも10,000倍、少なくとも12,000倍、または少なくとも15,000倍の数）。

【0121】

本明細書に記載の方法で増幅された、非造血組織由来の $\gamma\delta$ T細胞（例えば、皮膚由来の $\gamma\delta$ T細胞および/または非 $V\delta 2$ T細胞、例えば、 $V\delta 1$ T細胞および/またはDN T細胞）は、抗腫瘍能に適した表現型を有していてもよい。一部の実施形態において、増幅された $\gamma\delta$ T細胞（例えば、皮膚由来の $V\delta 1$ T細胞）の集団は、参照となる集団（例えば、増幅ステップ前の分離された $\gamma\delta$ T細胞の集団）よりも高いCD27平均発現量を示す。一部の実施形態において、増幅された $\gamma\delta$ T細胞の集団のCD27平均発現量は、分離された $\gamma\delta$ T細胞の集団と比較して、少なくとも2倍である（例えば、分離された $\gamma\delta$ T細胞の集団と比較して、少なくとも3倍、少なくとも4倍、少なくとも5倍、少なくとも6倍、少なくとも7倍、少なくとも8倍、少なくとも9倍、少なくとも10倍、少なくとも15倍、少なくとも20倍、少なくとも25倍、少なくとも30倍、少なくとも40倍、少なくとも50倍、少なくとも60倍、少なくとも70倍、少なくとも80倍、少なくとも90倍、少なくとも100倍、少なくとも150倍、少なくとも200倍、少なくとも300倍、少なくとも400倍、少なくとも500倍、少なくとも600倍、少なくとも700倍、少なくとも800倍、少なくとも900倍、少なくとも1,000倍、少なくとも5,000倍、少なくとも10,000倍、少なくとも20,000倍、またはより多く）。

【0122】

増幅された $\gamma\delta$ T細胞（皮膚由来の $\gamma\delta$ T細胞および/または非 $V\delta 2$ T細胞、例えば、 $V\delta 1$ T細胞および/またはDN T細胞）の集団の明確な部分は、CD27量がアップレギュレートされているが、他の部分はCD27が低値か、CD27⁻である、ことがあり得る。この場合、分離された $\gamma\delta$ T細胞の集団と比較して、増幅された集団のCD27⁺細胞の頻度が高くなり得

る。例えば、増幅された $\gamma\delta$ T細胞の集団は、増幅前の分離された $\gamma\delta$ T細胞の集団と比較して、CD27⁺細胞を少なくとも5%高い頻度で有し得る（例えば、増幅前の分離された $\gamma\delta$ T細胞の集団と比較して、少なくとも10%、少なくとも15%、少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも35%、少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、または最大で100%、CD27⁺細胞の頻度が高い）。一部の実施形態において、分離された $\gamma\delta$ T細胞の集団と比較した、増幅された集団中のCD27⁺細胞の数は、増大していてもよい。例えば、増幅された $\gamma\delta$ T細胞の集団は、増幅前の分離された $\gamma\delta$ T細胞の集団と比較して、少なくとも2倍の数のCD27⁺細胞を有し得る（例えば、増幅前の分離された $\gamma\delta$ T細胞の集団と比較して、少なくとも10%、少なくとも15%、少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも35%、少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、または最大で100%、CD27⁺細胞の頻度が高い）。

10

【0123】

本明細書で提供される増幅方法は、一部の実施形態において、参照となる集団（例えば、増幅ステップ前の分離された $\gamma\delta$ T細胞の集団）と比較して、TIGIT発現が低い、非造血組織由来 $\gamma\delta$ T細胞（例えば、皮膚由来の $\gamma\delta$ T細胞および/または非V δ 2 T細胞、例えば、V δ 1 T細胞および/またはDN T細胞）の集団をもたらす。一部の実施形態において、増幅された $\gamma\delta$ T細胞の集団は、参照となる集団（例えば、増幅ステップ前の分離された $\gamma\delta$ T細胞の集団）よりも低いTIGIT平均発現量を示す。一部の実施形態において、増幅された $\gamma\delta$ T細胞の集団は、分離された $\gamma\delta$ T細胞の集団と比較して、少なくとも10%低いTIGIT平均発現量を示す（例えば、分離された $\gamma\delta$ T細胞の集団と比較して、少なくとも20%低い、少なくとも30%低い、少なくとも40%低い、少なくとも50%低い、少なくとも60%低い、少なくとも70%低い、少なくとも80%低い、少なくとも90%低い、または最大で100%低い）。

20

【0124】

増幅された $\gamma\delta$ T細胞（例えば、皮膚由来の $\gamma\delta$ T細胞および/または非V δ 2 T細胞、例えば、V δ 1 T細胞および/またはDN T細胞）の集団の明確な部分はTIGIT、例えば、高レベルのTIGITを発現するが、他の部分においては、低いレベルのTIGITか、TIGIT⁻である、ことがあり得る。この場合、分離された $\gamma\delta$ T細胞の集団と比較して、増幅された集団におけるTIGIT⁺細胞の頻度は、低くなり得る。例えば、増幅された $\gamma\delta$ T細胞の集団は、増幅前の分離された $\gamma\delta$ T細胞の集団と比較してTIGIT⁺細胞の頻度が、少なくとも5%低くなり得る（例えば、増幅前の分離された $\gamma\delta$ T細胞の集団と比較して、少なくとも10%、少なくとも15%、少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも35%、少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、または最大で100% TIGIT⁺細胞の頻度が低い）。一部の実施形態において、増幅前の分離された $\gamma\delta$ T細胞の集団と比較した、増幅された集団のTIGIT⁺細胞の数は、少ないことがある。例えば、増幅前の分離された $\gamma\delta$ T細胞の集団におけるTIGIT⁺細胞の数と比較して、増幅された $\gamma\delta$ T細胞の集団のTIGIT⁺細胞の数は、少なくとも10%少ない（例えば、増幅前の分離された $\gamma\delta$ T細胞の集団のTIGIT⁺細胞の数と比較して、少なくとも10%、少なくとも15%、少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも35%、少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、または最大で100% TIGIT⁺細胞の数が少ない）。

30

40

【0125】

一部の実施形態において、増幅された $\gamma\delta$ T細胞（例えば、皮膚由来の $\gamma\delta$ T細胞または非V δ 2 T細胞、例えば、V δ 1 T細胞および/またはDN T細胞）の集団は、高頻度のCD27⁺細胞と低頻度のTIGIT⁺細胞を有する。一部の実施形態において、増幅された $\gamma\delta$ T細胞の集団は、参照となる集団と比較して（例えば、増幅前の分離された $\gamma\delta$ T細胞の集団と比較して）、高頻度のCD27⁺TIGIT⁺細胞を有する。例えば、増幅された $\gamma\delta$ T細胞の集団は

50

、増幅前の分離された $\gamma\delta$ T細胞の集団と比較して、少なくとも5%高頻度の $CD27^+TIGIT^-$ 細胞を有し得る（例えば、増幅前の分離された $\gamma\delta$ T細胞の集団と比較して、少なくとも10%、少なくとも15%、少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも35%、少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、または100%まで高頻度の $CD27^+TIGIT^-$ 細胞）。一部の実施形態において、分離された $\gamma\delta$ T細胞と比較して、増幅された集団での $CD27^+TIGIT^-$ 細胞の数は増大していてもよい。例えば、増幅前の分離された $\gamma\delta$ T細胞の集団と比較して、増幅された $\gamma\delta$ T細胞の集団は、少なくとも2倍の数の $CD27^+TIGIT^-$ 細胞を有し得る（例えば、増幅前の分離された $\gamma\delta$ T細胞の集団と比較して、少なくとも10%、少なくとも15%、少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも35%、少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、または100%まで高頻度の $CD27^+TIGIT^-$ 細胞）。

10

【0126】

一部の実施形態において、増幅された $\gamma\delta$ T細胞（例えば、皮膚由来の $\gamma\delta$ T細胞または非 $V\delta 2$ T細胞、例えば、 $V\delta 1$ T細胞および/またはDNT細胞）の集団中の $CD27^+\gamma\delta$ T細胞の集団でのTIGIT平均発現量は、参照となる集団と比較して低い。一部の実施形態において、増幅された $CD27^+\gamma\delta$ T細胞の集団は、参照となる集団（例えば、増幅前の分離された $CD27^+\gamma\delta$ T細胞の集団）と比較して、TIGIT平均発現量が低い。一部の実施形態において、増幅された $CD27^+\gamma\delta$ T細胞の集団は、分離された $CD27^+\gamma\delta$ T細胞の集団と比較して、TIGIT発現量が少なくとも10%低い（例えば、分離された $CD27^+\gamma\delta$ T細胞の集団と比較して、少なくとも20%低い、少なくとも30%低い、少なくとも40%低い、少なくとも50%低い、少なくとも60%低い、少なくとも70%低い、少なくとも80%低い、少なくとも90%低い、または最大で100%低い）。

20

【0127】

これに加えて、または、これに代えて、増幅された $\gamma\delta$ T細胞（例えば、皮膚由来の $\gamma\delta$ T細胞または非 $V\delta 2$ T細胞、例えば、 $V\delta 1$ T細胞および/またはDNT細胞）の集団中のTIGIT $^-\gamma\delta$ T細胞の集団における $CD27$ 発現量の中央値は、参照となる集団と比較して高い。例えば、増幅されたTIGIT $^-\gamma\delta$ T細胞の集団は、増幅前の分離されたTIGIT $^-\gamma\delta$ T細胞の集団と比較して、 $CD27^+$ 細胞の頻度が少なくとも5%高い（例えば、分離されたTIGIT $^-\gamma\delta$ T細胞の集団と比較して、少なくとも10%、少なくとも15%、少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも35%、少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、または最大で100%高い $CD27^+$ 細胞の頻度）。一部の実施形態において、分離されたTIGIT $^-\gamma\delta$ T細胞の集団と比較して、増幅された集団における $CD27^+$ 細胞の数は増大していてもよい。例えば、増幅前の分離されたTIGIT $^-\gamma\delta$ T細胞の集団と比較して、増幅されたTIGIT $^-\gamma\delta$ T細胞の集団は、少なくとも2倍の数の $CD27^+$ 細胞を有し得る（例えば、増幅前の分離されたTIGIT $^-\gamma\delta$ T細胞の集団と比較して、少なくとも10%、少なくとも15%、少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも35%、少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、または最大で100%高い $CD27^+$ 細胞の頻度）。

30

40

【0128】

$CD124$ 、 $CD215$ 、 $CD360$ 、 $CTLA4$ 、 $CD1b$ 、 $BTLA$ 、 $CD39$ 、 $CD45RA$ 、Fasリガンド、 $CD25$ 、 $ICAM-1$ 、 $CD31$ 、 $KLRG1$ 、 $CD30$ 、 $CD2$ 、 $NKp44$ 、 $NKp46$ 、 $ICAM-2$ 、 $CD70$ 、 $CD28$ 、 $CD103$ 、 $NKp30$ 、 $LAG3$ 、 $CCR4$ 、 $CD69$ 、 $PD-1$ および $CD64$ を含めた、他のマーカーの発現の増加または減少は、1以上の非造血組織由来の増幅された $\gamma\delta$ T細胞（例えば、皮膚由来の $\gamma\delta$ T細胞または非 $V\delta 2$ T細胞、例えば、 $V\delta 1$ T細胞および/またはDN T細胞）の集団を特徴づけるために、追加で、または代替的に使用され得る。一部の例において、増幅された $\gamma\delta$ T細胞（例えば、皮膚由来の $\gamma\delta$ T細胞または非 $V\delta 2$ T細胞、例えば、 $V\delta 1$ T細胞および/またはDNT細胞）の集団は、例えば、増幅前の分離された $\gamma\delta$ T細胞の集団と比較して、 $CD124$ 、 $CD215$ 、 $CD360$ 、 $CTLA4$ 、 $CD1b$ 、 $BTLA$ 、 $CD39$ 、 $CD45RA$ 、Fasリガンド、 $CD25$ 、 $ICAM-1$ 、 $CD31$ 、 $KLRG1$ 、

50

CD30およびCD2からなる群から選択される1以上のマーカーの平均発現量が高い。これに加えて、または、これに代えて、増幅された $\gamma\delta$ T細胞（例えば、皮膚由来の $\gamma\delta$ T細胞または非V δ 2 T細胞、例えば、V δ 1 T細胞および/またはDNT細胞）の集団は、分離された $\gamma\delta$ T細胞の集団と比較して、CD124、CD215、CD360、CTLA4、CD1b、BTLA、CD39、CD45RA、Fasリガンド、CD25、ICAM-1、CD31、KLRG1、CD30およびCD2からなる群から選択される1以上のマーカーを発現する細胞の頻度が高い。一部の実施形態において、増幅された $\gamma\delta$ T細胞（例えば、皮膚由来の $\gamma\delta$ T細胞または非V δ 2 T細胞、例えば、V δ 1 T細胞および/またはDNT細胞）の集団は、分離された $\gamma\delta$ T細胞の集団と比較して、NKp44、NKp46、ICAM-2、CD70、CD28、CD103、NKp30、LAG3、CCR4、CD69、PD-1およびCD64からなる群より選択される1以上のマーカーの平均発現量が高い。同様に、分離された $\gamma\delta$ T細胞の集団と比較して、増幅された集団は、NKp44、NKp46、ICAM-2、CD70、CD28、CD103、NKp30、LAG3、CCR4、CD69、PD-1およびCD64からなる群より選択される1以上のマーカーを発現する細胞の数が少ない。

【0129】

したがって、本発明の方法によって生成された非造血組織常在性の $\gamma\delta$ T細胞は、以下の性質の1以上を有し得る：(i)高いCD69、高いTIM3および低い/無いCD28という表現型を提示する；(ii) CCR3、CD39、CD11bおよびCD9のうち1以上をアップレギュレートする；(iii) TCRアゴニストのない条件下でNKG2Dリガンドに応答してIFN- γ を生成する；(iv) TCRアゴニストのない条件下でIL-13を生成する；(v) TCR活性化に応答して、IFN- γ 、TNF- α およびGM-CSFのうち1以上を生成する；(vi) TCR活性化に応答してIL-17を生成しない、または実質的に生成しない；(vii)追加の成長因子がない条件下でIL-2を含む培地で成長する；(viii) TCRアゴニストのない条件下で細胞傷害性TCR細胞の応答を提示する；および/または(ix)正常細胞よりも腫瘍細胞に対して選択的な細胞傷害性を提示する。

【0130】

一部の例において、本発明の方法により生成された非造血組織常在性の $\gamma\delta$ T細胞は、TCRアゴニストのない条件下でIL-13を生成する、および/または、TCRアゴニストのない条件下でNKG2Dに応答してIFN- γ を生成する。

【0131】

$\gamma\delta$ T細胞の増殖への使用に適した多数の基礎培地、特にAIM-V、Iscoves培地、RPMI-1640（Life Technologies社）等の完全培地が入手可能である。前記培地には、血清、血清タンパク質および抗生物質等の選択剤など、他の培地成分を追加してもよい。例えば、一部の実施形態では、2 mMグルタミン、10%FBS、10 mM HEPES、pH 7.2、1%ペニシリン-ストレプトマイシン、ピルビン酸ナトリウム（1 mM；Life Technologies社）、非必須アミノ酸（例えば、100 μ MのGly、Ala、Asn、Asp、Glu、Pro、およびSer、1 $\times$ MEM非必須アミノ酸、Life Technologies社）、および10 μ L/L β -メルカプトエタノールを含むRPMI-1640培地。便宜上、細胞は、適切な培地、5%CO₂を含む加湿雰囲気下、37°Cで培養される。

【0132】

$\gamma\delta$ T細胞は、攪拌タンク発酵槽、エアリフト発酵槽、ローラーボトル、培養バッグまたは培養ディッシュ、および他のバイオリアクター、特に中空繊維バイオリアクター、を含む任意の適切なシステムで本明細書に記載のように培養することができる。このようなシステムの使用は、当技術分野で周知である。リンパ球の培養のための一般的な方法および技術は、当技術分野で周知である。

【0133】

本明細書に記載の方法は、複数の選択ステップ、例えば複数の枯渇ステップを含むことができる。負の選択によるT細胞集団の富化は、例えば、負の選択をされる細胞に特有の表面マーカーに対する抗体を組み合わせることで達成することができる。ある方法では、負の選択をされる細胞に存在する細胞表面マーカーに対するモノクローナル抗体のカクテルを使用して、負の磁気免疫付着またはフローサイトメトリーによって、細胞の選別および/または選択を行う。

【0134】

IV. 医薬組成物および治療方法

本発明の方法により得られた $\gamma\delta$ T細胞は、薬剤として、例えば養子T細胞療法のために使用され得る。これは、本発明の方法で得られた $\gamma\delta$ T細胞を患者へ移植することを含む。前記治療は、自己移植、つまり、 $\gamma\delta$ T細胞を、それを取り出した同じ患者に戻す移植を行ってもよく、同種異系移植、つまり、あるヒトからの $\gamma\delta$ T細胞を異なる患者に移植してもよい。同種異系移植を含む例において、 $\gamma\delta$ T細胞は、実質的に $\alpha\beta$ T細胞を含まない可能性がある。例えば、 $\alpha\beta$ T細胞は、例えば増幅後に、当技術分野で周知の任意の適した手段（例えば、負の選択による、例えば、磁性ビーズの使用）を用いて、 $\gamma\delta$ T細胞の集団から枯渇させることができる。治療方法は、ドナーから得られた非造血細胞のサンプルを提供すること、前記サンプルからの $\gamma\delta$ T細胞を培養して増幅された集団を生成すること、増幅された $\gamma\delta$ T細胞の集団を個別のレシピエントに投与すること、を含み得る。

10

【0135】

患者または治療される対象は、好適にはヒト癌患者（例えば、固形腫瘍の治療を受けているヒト癌患者）またはウイルス感染患者（例えば、CMV感染またはHIV感染患者）である。一部の例において、患者は、固形癌の治療を受けていた、および/または、受けている。

【0136】

組織常在性 $\gamma\delta$ TおよびDN $\gamma\delta$ T細胞は、通常は非造血組織に常在するため、全身血液常在性と比較して、腫瘍塊にホーミングし、保持される可能性が高く、これらの細胞の養子移入は、固形腫瘍および他に生じ得る非造血組織に関連する免疫疾患を標的とするのに、より効果的である。

20

【0137】

$\gamma\delta$ T細胞はMHCの制限がないため、外来として移植を受ける宿主を認識せず、これは、移植片対宿主病を生じにくいことを意味する。これは、これらが「既製品（off the shelf）」として使用され、任意のレシピエントに対して、例えば同種異系移植の養子T細胞療法のために移植できることを意味する。

【0138】

本発明の方法で得られる非造血組織常在性の $\gamma\delta$ T細胞は、NKG2Dを発現し、悪性腫瘍に強く関連するNKG2Dリガンド（例えばMICA）に応答する。それらは、また、活性化のない条件下でも細胞傷害性を示すため、腫瘍細胞の殺傷に効果的である。例えば、本明細書に記載の、取得された非造血組織常在性の $\gamma\delta$ T細胞は、活性化のない条件下で、IFN- γ 、TNF- α 、GM-CSF、CCL4、IL-13、グラニューライシン、グランザイムAとB、および、パーフォリンの1以上、好適にはすべてを発現する。IL-17Aは、発現されない可能性がある。

30

【0139】

したがって、本明細書で報告される知見は、本発明の方法で得られた非造血組織常在性の $\gamma\delta$ T細胞の、「既製品」の免疫療法薬としての、臨床適用への実用性および適合性に関する説得力のある根拠を提供する。それらの細胞は生来的な殺傷能力を有し、MHCの制限がなく、腫瘍内で、他のT細胞よりも良好なホーミング性および/または保持性を示す。

【0140】

一部の実施形態において、非造血組織に腫瘍を有する個体の治療方法は、以下のステップを含み得る；ドナー個体からの前記非造血組織のサンプルを提供するステップ、前記サンプルから $\gamma\delta$ T細胞を培養して増幅した集団を生成するステップ、および；増幅された $\gamma\delta$ T細胞の集団を、腫瘍を有する前記個体に投与するステップ。

40

【0141】

医薬組成物は、本明細書に記載の非造血組織常在性の増幅された $\gamma\delta$ T細胞を、1以上の薬学的または生理学的に許容される担体、希釈剤、または賦形剤と組み合わせて含んでもよい。このような組成物は、中性の緩衝生理食塩水、リン酸緩衝生理食塩水などの緩衝液、グルコース、マンノース、スクロースまたはデキストラン、マンニトールなどの炭水化物；タンパク質；ポリペプチドまたはグリシンなどのアミノ酸；抗酸化剤；EDTAやグル

50

タチオンなどのキレート剤；アジュバント（例えば、水酸化アルミニウム）；および防腐剤を含み得る。本発明の医薬組成物に使用できる凍結保存溶液には、例えば、DMSOが含まれ得る。組成物は、例えば静脈内投与用に製剤化できる。

【0142】

ある実施形態において、医薬組成物は、例えば、エンドトキシンまたはマイコプラズマ等の汚染物質が検出可能なレベルでは存在せず、実質的に汚染物質を含まない。

【0143】

一部の例において、治療に効果的な量の、上記の方法のいずれかで得られた増幅されたT細胞が、対象に対して、治療に効果的な量で投与され得る（例えば、癌の治療、例えば、固形腫瘍の治療）。一部の例、増幅された $\gamma\delta$ T細胞（例えば、皮膚由来の $\gamma\delta$ T細胞または非V δ 2 T細胞、例えば、V δ 1 T細胞および/またはDN T細胞）の治療に効果的な量は、1投与あたり 10×10^{12} 細胞未満である（例えば、1投与あたり 9×10^{12} 細胞未満、1投与あたり 8×10^{12} 細胞未満、1投与あたり 7×10^{12} 細胞未満、1投与あたり 6×10^{12} 細胞未満、1投与あたり 5×10^{12} 細胞未満、1投与あたり 4×10^{12} 細胞未満、1投与あたり 3×10^{12} 細胞未満、1投与あたり 2×10^{12} 細胞未満、1投与あたり 1×10^{12} 細胞未満、1投与あたり 9×10^{11} 細胞未満、1投与あたり 8×10^{11} 細胞未満、1投与あたり 7×10^{11} 細胞未満、1投与あたり 6×10^{11} 細胞未満、1投与あたり 5×10^{11} 細胞未満、1投与あたり 4×10^{11} 細胞未満、1投与あたり 3×10^{11} 細胞未満、1投与あたり 2×10^{11} 細胞未満、1投与あたり 1×10^{11} 細胞未満、1投与あたり 9×10^{10} 細胞未満、1投与あたり 7.5×10^{10} 細胞未満、1投与あたり 5×10^{10} 細胞未満、1投与あたり 2.5×10^{10} 細胞未満、1投与あたり 1×10^{10} 細胞未満、1投与あたり 7.5×10^9 細胞未満、1投与あたり 5×10^9 細胞未満、1投与あたり 2.5×10^9 細胞未満、1投与あたり 1×10^9 細胞未満、1投与あたり 7.5×10^8 細胞未満、1投与あたり 5×10^8 細胞未満、1投与あたり 2.5×10^8 細胞未満、1投与あたり 1×10^8 細胞未満、1投与あたり 7.5×10^7 細胞未満、1投与あたり 5×10^7 細胞未満、1投与あたり 2.5×10^7 細胞未満、1投与あたり 1×10^7 細胞未満、1投与あたり 7.5×10^6 細胞未満、1投与あたり 5×10^6 細胞未満、1投与あたり 2.5×10^6 細胞未満、1投与あたり 1×10^6 細胞未満、1投与あたり 7.5×10^5 細胞未満、1投与あたり 5×10^5 細胞未満、1投与あたり 2.5×10^5 細胞未満または1投与あたり 1×10^5 細胞未満）。

【0144】

一部の実施形態において、増幅された $\gamma\delta$ T細胞（例えば、皮膚由来の $\gamma\delta$ T細胞または非V δ 2 T細胞、例えば、V δ 1 T細胞および/またはDN T細胞）の治療に効果的な量は、治療コースを通して 10×10^{12} 細胞未満である（例えば、治療コースを通して、 9×10^{12} 細胞未満、 8×10^{12} 細胞未満、1投与あたり 7×10^{12} 細胞未満、 6×10^{12} 細胞未満、1投与あたり 5×10^{12} 細胞未満、 4×10^{12} 細胞未満、 3×10^{12} 細胞未満、 2×10^{12} 細胞未満、 1×10^{12} 細胞未満、 9×10^{11} 細胞未満、 8×10^{11} 細胞未満、 7×10^{11} 細胞未満、 6×10^{11} 細胞未満、 5×10^{11} 細胞未満、 4×10^{11} 細胞未満、 3×10^{11} 細胞未満、 2×10^{11} 細胞未満、 1×10^{11} 細胞未満、 9×10^{10} 細胞未満、 7.5×10^{10} 細胞未満、 5×10^{10} 細胞未満、 2.5×10^{10} 細胞未満、 1×10^{10} 細胞未満、 7.5×10^9 細胞未満、 5×10^9 細胞未満、 2.5×10^9 細胞未満、 1×10^9 細胞未満、 7.5×10^8 細胞未満、 5×10^8 細胞未満、 2.5×10^8 細胞未満、 1×10^8 細胞未満、 7.5×10^7 細胞未満、 5×10^7 細胞未満、 2.5×10^7 細胞未満、 1×10^7 細胞未満、 7.5×10^6 細胞未満、 5×10^6 細胞未満、 2.5×10^6 細胞未満、 1×10^6 細胞未満、 7.5×10^5 細胞未満、 5×10^5 細胞未満、 2.5×10^5 細胞未満または 1×10^5 細胞未満）。

【0145】

一部の実施形態において、本明細書に記載の増幅された非造血組織常在性の $\gamma\delta$ T細胞の1投与量は、約 1×10^6 、 1.1×10^6 、 2×10^6 、 3.6×10^6 、 5×10^6 、 1×10^7 、 1.8×10^7 、 2×10^7 、 5×10^7 、 1×10^8 、 2×10^8 または 5×10^8 細胞/kgを含む。一部の実施形態において、増幅された非造血組織常在性の $\gamma\delta$ T細胞（例えば、皮膚由来の $\gamma\delta$ T細胞または非V δ 2 T細胞、例えば、V δ 1 T細胞および/またはDN T細胞）の1投与量は、少なくとも約 1×10^6 、 1.1×10^6 、 2×10^6 、 3.6×10^6 、 5×10^6 、 1×10^7 、 1.8×10^7 、 2×10^7 、 5×10^7 、 1×10^8 、 2×10^8 または 5×10^8 細胞/kgを含む。一部の実施形態において、増幅された非造血組織常在性の $\gamma\delta$ T細胞（例えば、皮膚由来の $\gamma\delta$ T細胞または非V δ 2 T細胞、例えば、V δ 1 T細胞

胞および/またはDN T細胞)の1投与量は、最大で約 1×10^6 、 1.1×10^6 、 2×10^6 、 3.6×10^6 、 5×10^6 、 1×10^7 、 1.8×10^7 、 2×10^7 、 5×10^7 、 1×10^8 、 2×10^8 または 5×10^8 細胞/kgを含む。一部の実施形態において、増幅された非造血組織常在性の $\gamma \delta$ T細胞(例えば、皮膚由来の $\gamma \delta$ T細胞または非V δ 2 T細胞、例えば、V δ 1 T細胞および/またはDN T細胞)の1投与量は、約 $1.1 \times 10^6 \sim 1.8 \times 10^7$ 細胞/kgを含む。一部の実施形態において、増幅された非造血組織常在性の $\gamma \delta$ T細胞(例えば、皮膚由来の $\gamma \delta$ T細胞または非V δ 2 T細胞、例えば、V δ 1 T細胞および/またはDN T細胞)の1投与量は、約 1×10^7 、 2×10^7 、 5×10^7 、 1×10^8 、 2×10^8 、 5×10^8 、 1×10^9 、 2×10^9 、または 5×10^9 細胞を含む。一部の実施形態において、増幅された非造血組織常在性の $\gamma \delta$ T細胞(例えば、皮膚由来の $\gamma \delta$ T細胞または非V δ 2 T細胞、例えば、V δ 1 T細胞および/またはDN T細胞)の1投与量は、少なくとも、約 1×10^7 、 2×10^7 、 5×10^7 、 1×10^8 、 2×10^8 、 5×10^8 、 1×10^9 、 2×10^9 、または 5×10^9 細胞を含む。一部の実施形態において、増幅された非造血組織常在性の $\gamma \delta$ T細胞(例えば、皮膚由来の $\gamma \delta$ T細胞または非V δ 2 T細胞、例えば、V δ 1 T細胞および/またはDN T細胞)の1投与量は、最大で約 1×10^7 、 2×10^7 、 5×10^7 、 1×10^8 、 2×10^8 、 5×10^8 、 1×10^9 、 2×10^9 、または 5×10^9 細胞を含む。

【0146】

ある実施形態において、対象は、対象の体重1kgあたり $10^4 \sim 10^6$ の増幅された非造血組織常在性の $\gamma \delta$ T細胞(例えば、皮膚由来の $\gamma \delta$ T細胞または非V δ 2 T細胞、例えば、V δ 1 T細胞および/またはDN T細胞)を投与される。ある実施形態において、対象は、非造血組織常在性の $\gamma \delta$ T細胞の集団の初回の投与(例えば、対象の体重1kgあたり $10^4 \sim 10^6$ の $\gamma \delta$ T細胞の初回の投与、例えば、対象の体重1kgあたり $10^4 \sim 10^5$ の $\gamma \delta$ T細胞)と、後続の1回または複数回(例えば2、3、4または5回)の増幅された非造血組織常在性 $\gamma \delta$ T細胞の投与(例えば、後続の1回または複数回の対象の体重1kgあたり $10^4 \sim 10^6$ の $\gamma \delta$ T細胞の投与、例えば、対象の体重1kgあたり $10^4 \sim 10^5$ の $\gamma \delta$ T細胞)を受ける。ある実施形態において、後続の1回または複数回の投与は、前回投与後15日未満、例えば、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3または2日未満、例えば、前回投与後4、3または2日未満に投与される。ある実施形態において、対象は、少なくとも3回の $\gamma \delta$ T細胞の集団の投与のコースを通して、全体で対象の体重1kgあたり 10^6 細胞の $\gamma \delta$ T細胞の投与を受ける。例えば、対象は、 1×10^5 $\gamma \delta$ T細胞の初回投与、 3×10^5 $\gamma \delta$ T細胞の2回目投与、および 6×10^5 $\gamma \delta$ T細胞の3回目投与を受け、かつ、例えば、各投与は前回投与の後、4、3または2日未満で投与される。

【0147】

本発明の方法で得られる非造血組織常在性の $\gamma \delta$ T細胞は、CAR-T療法にも使用され得る。これは、新たな特異性、例えばモノクローナル抗体の特異性、を備えるようT細胞を再プログラムするための、改変T細胞受容体(TCR)の生成を含む。改変TCRは、T細胞を悪性細胞に特異的なものにすることができ、癌の免疫療法に有用である。例えば、T細胞は、腫瘍抗原、例えば、対象の組織からの正常な体細胞では発現されない腫瘍関連抗原、を発現する癌細胞を認識し得る。したがって、CAR改変T細胞は、例えば、癌患者の養子T細胞療法に使用され得る。

【0148】

血液常在性 $\gamma \delta$ T細胞のCARへの使用については、既報である。しかし、本発明の方法によって得られた非造血組織常在性 $\gamma \delta$ T細胞は、形質転換された細胞を認識する固有の機能を保持しながら、キメラ抗原特異的TCRとともに形質導入できるため、CAR-Tのアプローチに特に良好なビヒクルである可能性が高く、また、血液常在性 $\gamma \delta$ T細胞または従来の全身性 $\alpha \beta$ T細胞よりも、優れた腫瘍浸透能力および保持能力を有する可能性が高い。さらに、それらはMHC依存性の抗原提示がないため、対移植片宿主の可能性を低減し、低レベルのMHCを発現する腫瘍を標的とすることができる。同様に、それらは従来の共刺激(例えばCD28の関与による共刺激)に依存しないため、共刺激受容体のリガンドの発現レベルが低い腫瘍についても、標的とすることができる。

【0149】

一部の実施形態において、1以上の追加の治療剤を対象に投与することができる。追加の治療剤は、免疫療法剤、細胞傷害剤、成長阻害剤、放射線治療剤、血管新生阻害剤またはこれらの2以上の組み合わせからなる群から選択できる。追加の治療剤は、増幅された $\gamma\delta$ T細胞の投与と同時に、前に、または後に投与され得る。追加の治療剤は、対象の体内（例えば、対象自身の免疫系）の標的、および/または、移植された $\gamma\delta$ T細胞に作用する、免疫療法剤であってもよい。

【0150】

組成物の投与は、任意の便利な方法で実行され得る。本明細書に記載の組成物は、経動脈的、皮下、皮内、腫瘍内、結節内、髄内、筋肉内、静脈内注射、または腹腔内、例えば皮内もしくは皮下注射により患者に投与することができる。非造血細胞常在性 $\gamma\delta$ T細胞の組成物は、腫瘍、リンパ節、または感染箇所 directly 注射されてもよい。

【実施例】

【0151】

大部分の成人では、 $V\delta 2$ 細胞は、静止期には、血中T細胞のうちの少数の非常に多様な成分（0.01～5%）しか構成しないが、多数の細菌および寄生生物をはじめとする広範囲の物質による感作後には、該細胞は迅速に増幅し、一時的には最大で $CD3^+$ 細胞のうちの約25%に達する。この応答の主要な基礎は、タンパク質を修飾（例えば、ガラニル化またはファルネシル化により）するために用いられるコレステロールおよび他の脂質の重要な微生物による合成経路中での中間体である、ヒドロキシル-メチルブタ-2-エニルピロリン酸（HMBPP）をはじめとする、低分子量「ホスホ部分」の $V\delta 2$ TCR媒介認識である。霊長類では、この合成は、メバロン酸経路を介して起こり、その1つの中間体であるイソペンテニルピロリン酸（IPP）は、ウイルス感染細胞および形質転換細胞で非常に高レベルに発現され、これもまた $V\delta 2$ TCR媒介認識の標的である。

【0152】

加えて、大部分の $V\delta 2$ T細胞は、高レベルのNKG2D受容体を発現し、この受容体は、NKG2Dリガンド（例えば、MICA、MICB、およびULBP）にかみ合わさった際に、細胞の細胞溶解能を活性化または共刺激（T細胞受容体（TCR）と共に）することができる。それらのリガンドは、細胞が、酸化ストレスもしくは浸透圧ストレスまたは紫外光などの因子に曝露されるとアップレギュレートされる宿主タンパク質である。これらの因子は、上皮増殖因子受容体（EGFR）経路の高活性（hyper-active）シグナル伝達を促進し、この経路はまた、一般的には、ヒトの固形腫瘍では調節異常となる。

【0153】

TCRおよび/またはNKG2Dを用いて形質転換細胞を検出する $V\delta 2$ T細胞の能力は、それらの強力な細胞溶解能、および $CD8^+$ T細胞に対して抗原を提示する明白な能力と一緒にあって、総合的に、 $V\delta 2$ T細胞が、癌免疫療法を送達するために臨床的に活用することができるという見解を引き起こしてきた。これは細胞の養子移入により達成することができ、これに関して、 $\gamma\delta$ T細胞がMHCにより拘束されないことが、顕著かつ有益に、移植片対宿主病（GvHD）を制限する。これを達成するために、サイトカイン（インターロイキン-2（IL-2）など）を添加することにより、外因性TCR活性化因子（ホスホ部分（例えば、BrHPP）など）と一緒に、または臨床的に承認されたビスホスホネート（例えば、ゾレドロン酸）（メバロン酸経路でのファルネシルピロリン酸シンターゼを阻害し、それによりTCR活性化部分であるIPPの蓄積を誘導する）と一緒に、血液常在性 $V\gamma 9V\delta 2$ $\gamma\delta$ T細胞をex vivoで増幅することができる。しかしながら、BrHPPなどの因子を介した $V\gamma 9V\delta 2$ $\gamma\delta$ T細胞の慢性的活性化は、次第に、細胞の疲弊および細胞傷害能の低下へとつながり得る。

【0154】

あるいは、患者自身の $\gamma\delta$ T細胞を、薬理学的に修飾された形態のHMBPP、または臨床的に承認されたアミノビスホスホネートを用いて、in situで活性化することができる。これらのアプローチによって、250名超の患者が処置されてきており、これらのアプローチは安全であるように見えるが、完全寛解は稀にしか生じなかった。細胞の限定的な臨床的有効性に関する1つの主要な懸念は、慢性的な抗原曝露により、回復不可能に疲弊する

それらの傾向である。第2の主要な懸念は、固形腫瘍およびそれらの腫瘍を保持する組織へとホーミングする効率が低いように思われることである。

【0155】

キメラ型抗原受容体T細胞（CAR-T）療法は、B細胞悪性腫瘍に関して臨床的に期待が持てることが示されてきている。しかしながら、固形腫瘍の治療に関しては、CAR-T細胞の性能は、現在のところ予測よりも低く、完全な腫瘍応答を生じる効率は低いことおよび腫瘍以外での細胞傷害性の高い発生率が示されている。末梢血 $\gamma\delta$ T細胞に関して、固形腫瘍に対するCAR-Tアプローチの成功への主な障害は、悪性腫瘍の部位まで移動して、機能的に有効な状態でそこに常在するために、全身性CAR-T細胞がおそらくは効率的でないことである。加えて、従来の $\alpha\beta$ T細胞に基づけば、CAR-T細胞は、腫瘍微小環境での免疫抑制シグナル（例えば、PD1受容体を介して伝達されるもの）を克服しなければならない。

10

【0156】

$\gamma\delta$ T細胞は、NKG2Dなどの受容体を用いて形質転換細胞を認識するそれらの生来的能力を保持しながら、腫瘍反応性キメラ型抗原特異的TCRを用いて形質導入することができるので、CAR-Tアプローチに $\gamma\delta$ T細胞を用いることに伴う利点がある可能性がある。つまり、 $\gamma\delta$ T細胞は、腫瘍適合性（TCR）媒介作用と生来的な（NKG2D）媒介作用とを同時に有するようにすることができる。しかしながら、ヒト血液 $\gamma\delta$ T細胞が、固形組織内の腫瘍にホーミングし、かつその中で活性型として維持される効率が不十分となる可能性があるという問題が残っている。この考察は、通常、非造血組織中に常在している、 $\gamma\delta$ T細胞のより詳細な検討を招来する。

20

【0157】

そのようなT細胞は、それらの発達の一部分として非造血組織に移動し、それにより、全身性プライミング後に組織に浸潤するT細胞（例えば、組織常在性TCR $\alpha\beta$ メモリーT細胞（いわゆるTRM細胞））とは異なる。組織常在性 $\gamma\delta$ T細胞はマウスで最もよく研究されており、その中では、当該細胞は、他の部位の中でも、皮膚、消化管、および生殖系組織中で一般的であることが示されている。多数のそのような細胞が、それによりNKG2D受容体の活性化を通じた感作に応答できる、生来様の機能的能力を保持することが示されている。本発明者らは、近年、ヒト皮膚および腸が、同様に、生来様活性を有する非造血組織常在性 $\gamma\delta$ T細胞を大きな割合で保持することを実証するデータを取得した。悪性腫瘍、炎症、アトピー、アレルギー、および非造血組織内に形成される他の病的状態の研究では、病変が発生する組織内に常在するこれらの生来様ヒトT細胞の潜在的な影響を十分に検討できていなかった。

30

【0158】

非造血組織に常在するヒト $\gamma\delta$ T細胞は、それらの局在が細胞の採取を困難にするので、かつそれらを培養する確立された手段がないので、ほとんど研究されていない。このサブタイプは、それらがV δ 2含有TCRを発現しないので、低分子量ホスホ部分に全く反応しない、非MHC拘束性細胞溶解性を有する多様な細胞を含む。そのような細胞については精密なTCR特異性はほとんど知られていないが、利用可能なデータは、細胞が、サイトメガロウイルス（CMV）感染細胞および多数の固形腫瘍により過剰発現される内皮タンパク質C受容体（EPCR）などの自己抗原に対して反応性であることを示唆する。非造血組織関連 $\gamma\delta$ T細胞はまた、一般的に、NKG2Dを発現する。これらの特性、ならびに皮膚および消化管などの非造血組織内での細胞の生理的常在を考慮すると、癌患者へのそのような細胞の養子移入は、固形腫瘍および潜在的には他の免疫病理を標的化する上で、相当に、より有効であり得る。

40

【0159】

免疫療法に関して非V δ 2細胞を活用するために、該細胞をin situで増幅するための手段、またはそれらを回収し、かつ再注入前にex vivoでそれらを増幅するための手段のいずれかが必要である。多数の非V δ 2細胞をin situで増幅させる能力が証明されている既知のTCR活性化因子がないので、後者のアプローチが採用されている。非造血組織の限定

50

された入手可能性という困難を克服するために、一部の研究者は、これらの細胞が組織常在性非V δ 2 T細胞と同等であると想定して、V δ 2発現細胞が優勢なサブセットである血液由来の非常に少数の非V δ 2 T細胞を増幅させようと試みてきた。血中に見出される少数の非V δ 2 γ δ T細胞は、活動性CMV感染中にはかなり増幅し、V δ 2 T細胞と比較してCMVに対して優れた反応性を示し、かつ、子宮内CMV感染の症例ではヒト胎児を保護し得るようである。加えて、CMV反応性非V δ 2 γ δ T細胞は、免疫抑制中に、形質転換された細胞との交差反応性を介して、CMV再活性化から移植患者を保護し、二次的な悪性腫瘍のリスクを低下させるようである。同様に、 γ δ T細胞は、HIV感染の制御で有益に作用することを示唆するデータがあり、この例では、非V δ 2 γ δ T細胞は、V δ 2 T細胞と比較して血中で増幅される。

10

【0160】

血液常在性非V δ 2細胞は、直接的にTCRシグナル伝達を活性化させる外因的因子を添加することによるか（例えば、抗CD3抗体、汎 γ δ TCR特異的抗体またはフィトヘマグルチニン（PHA）などの物質を用いることにより）、または人工的抗原提示細胞（aAPC）と共に、刺激された非V δ 2 T細胞を共培養することにより（この場合、 γ δ T細胞とaAPCとの直接的な接触が、*ex vivo*での非V δ 2 T細胞増幅に対して必要とされる）、*ex vivo*で増幅されてきた。あるいは、例えば、上皮癌浸潤性リンパ球（TIL）由来の*ex vivo*での γ δ T細胞培養物の増殖を維持するために用いられるのと同様に、固定化された組み換えMICA（NKG2Dリガンド）を使用してNKG2D受容体シグナル伝達を促進することにより、細胞が増幅されてきた。総合すると、現行でのV δ 2発現型血液 γ δ T細胞または非V δ 2血液 γ δ T細胞の*ex vivo*増幅方法は、常に、TCRおよび/またはNKG2D受容体の活性化を促進する物質を、IL-2などの補助的サイトカインと一緒に添加することを必要とする。受容体活性化シグナルおよびサイトカインのこの組み合わせは、社会によって広く採用されている、T細胞を培養および増幅するための標準的アプローチを反映する。現在までに、非造血組織中に常在する γ δ T細胞を相当に増幅するための方法は記載されていない。そのような方法が、本明細書中に記載される。

20

【0161】

ヒト非造血組織常在性 γ δ T細胞（例えば、皮膚 γ δ T細胞）の表現型および機能的特性決定の一部として、本発明者らは、非造血組織内で正常に常在し、かつ α β T細胞および血液常在性 γ δ T細胞と比較して固有の特性を有する、異なる大きな集団の γ δ T細胞を単離した。本発明者らは、細胞が、NKG2Dリガンドに対して、およびサイトカインに対して、強力なTCR非依存的生来様応答を示すことを見出した。初代 α β T細胞の増幅での努力が、有益な増殖因子の供給源として他の支持細胞との共培養を一般的に用いてきた一方で、本発明者らは、予期せぬことに、皮膚および他の非造血組織に常在する γ δ T細胞が、自家皮膚線維芽細胞および潜在的には他の間質成分（ケラチン生成細胞および内皮細胞など）と接触させてこれらの細胞を共培養することにより、大いにかつ特異的に抑制されることを示した。そのような相互作用の除去は、潜在的な臨床応用のために、該細胞を、大量に、迅速に増幅することを可能にする。

30

【0162】

さらに、血液由来および腫瘍由来 γ δ T細胞を増幅するための現在までの努力と比較して、本発明者らは、それらのTCRまたはNKG2Dシグナル伝達経路を活性化するいかなる外因的物質の意図的添加も用いずに、そのような非造血組織常在性 γ δ T細胞を増幅することができることを示した。

40

【0163】

本明細書中には、皮膚および腸などの、ヒトまたは非ヒト動物非造血組織から、 γ δ T細胞を効率的かつ再現可能に単離および増幅するための新規の手段が開示される。増幅は、非造血組織由来非V δ 2 T細胞と、自家線維芽細胞および潜在的には他の間質成分との接触を分断することにより促進され、かつIL-2、IL-15、IL-4および/またはIL-21中での培養により維持される。

【0164】

50

以下の実施例は、当業者に、本明細書で特許請求される方法および化合物がどのように実施、作成、および評価されるかについての完全な開示および説明を提供するために提示され、本発明の単なる例示であることを意図しており、発明者が彼らの発明とみなすものの範囲を制限することは意図されていない。

【0165】

実施例1 分析方法

特に他の指定がない限り、以下の実施例の結果を得るために、下記の方法が利用された。

【0166】

フローサイトメトリー

フローサイトメトリーは、以下の抗体-蛍光色素コンジュゲートを用いて行った：Ki-67-BV421、CD3-BV510、V δ 1-PeVio770、TIM-3-PE、CD9-PE、CCR3-BV421、およびCD39-BV421。サンプルを、eFluor770NIRを用いて生存率に関しても染色した。市販の抗体は、Biolegend社またはMiltenyi社から購入した。生存率色素（近赤外）は、eBioscience社から入手した。Ki-67染色は、Foxp3染色バッファーセット（eBioscience社）を用いて固定および透過化した細胞に対して行った。各実験が完了した時点で、細胞集団をPBS中で洗浄し、半分に分けた。細胞を、生存率に関してeFluor770 NIRを用いて染色し、洗浄し、染色抗体の非特異的結合を避けるために続けてTrueStain（Biolegend社）での染色を行った。サンプルの半分を、記載された表面マーカーについて染色し、一方で、他方の半分は細胞系統マーカーのみ（CD3、V δ 1）について、および用いた表面マーカーに相当するアイソタイプ対照と共に染色した。同じ蛍光色素にコンジュゲート化した適合するマウスアイソタイプ抗体を、同じ濃度で用いた。アイソタイプ対照は、既知のヒト抗原には結合せず、したがって非特異的結合または偽陽性を示す。ヒストグラムは、その対応するアイソタイプ対照と比較して示されるか、または、FMOで示される（図1D、2A、3B、4B、6B、7A、および11-13）。データのまとめは、比較された記載のマーカーについて陽性で、つまりアイソタイプよりも高いレベルで染色された細胞の割合（%）を示す。フローサイトメトリーデータ分析は、FlowJo（バージョン10.1）を用いて行なった。

【0167】

RNA配列決定

ヒト皮膚由来のV δ 1 T細胞およびヒト血液V δ 1 T細胞（T細胞受容体誘導型増幅後）をソーティングし（FACS）、遠心分離し、細胞ペレットをRLTバッファー中に再懸濁した。RNAは、RNA-Micro-plus kit（QIAGEN社）を用いて調製した。RNAライブラリーを、KAPA Stranded RNA-seq Kit with RiboErase（HMR）（KAPA BIOSYSTEMS社）を用いて作製した。HiSeq 2500（illumina社）でのペアエンドシーケンシングには、迅速ラン化学（リード長：100bp）を用いた。101塩基対のペアエンドリードをアライメントし、RSEM（v1.2.11）をBowtie2と共に用いて定量化した。リードを、ヒトトランスクリプトームに対してアライメントし、カウント値はlog2変換および分位数（quantile）正規化されている。

【0168】

サイトカイン定量

ヒト皮膚由来のV δ 1 T細胞を、PMAおよびイオノマイシンまたはプレート結合型抗CD3 mAb（OKT3、5 μ g/mL）を用いて24時間刺激した。その後、上清を取得し、ProcartaPlex Human Cytokine & Chemokine Panel 1A（34 plex）（eBioscience社）を用いて分析した。アッセイは、Luminex FlexMap3D（Luminex社）を用いて分析した。データを、Microsoft Excelで分析し、3名のドナー（二重反復実験）の平均を示す。エラーバーは、標準偏差を示す。

【0169】

線維芽細胞との共培養

各グリッド培養設定に関して、本発明者らは、外科用メスを用いて数箇所を擦った2枚のペトリ皿（100 $\times$ 25mm、Corning社）を準備した。切り刻んだ皮膚片を、擦り跡に配置した。空気中で5～10分間乾燥させた後、皮膚片をディッシュに正常に貼り付け、10mL

のSkin-T培地を加えた。培地を週1回交換し、3週間の生育後に、ACCUTASE(登録商標)(Life Technologies社)を用いた処理に続いて、初代線維芽細胞を回収した。線維芽細胞を 1×10^4 で48ウェルプレートに、またはトランスウェル実験の場合には 2×10^4 で24ウェルプレートのボトムチャンバー中に播種した。2~3日間後、線維芽細胞はコンフルエンスに達し、RPMIおよび記載されたサイトカインを用いて、48ウェルプレートの場合には 2×10^5 個の混合型皮膚リンパ球、または24ウェルプレート、ボトムウェルならびにトランスウェルの場合には 3×10^5 個のリンパ球を加えて、共培養実験を開始させた。

【0170】

血液由来 $\gamma \delta$ T細胞の増幅

PBMC内の血液由来 $\gamma \delta$ T細胞は、TCRリガンド ($V\delta 2$ の場合、例えば、IPP、HMBPP、ビスホスホネート) またはTCR受容体 (mAb) もしくはTCR関連キナーゼCD3を架橋するための抗体添加を用いて刺激された場合にのみ、増幅することができる。TCR架橋の同じ効果は、PHAなどのレクチンを用いても達成することができる。そのようなTCR刺激物質の添加の非存在下では、PBMC中の $\gamma \delta$ T細胞は、数日間生存するが、増幅できず、わずかな多様性を有するT細胞サブセットの当初の組成にとどまる。

【0171】

PBMCを単離するために、健康なボランティア由来の血液を用い、全血をFicoll上に積層し、続いて、赤血球、血漿および白血リンパ球 (white lymphocyte) /単球を分離するために400gで20分間遠心分離した。ストリペット (stripett) を通して白血球を慎重に回収し、冷PBS中で4回洗浄した。細胞を、10%加熱不活性化胎児ウシ血清 (Life Technologies社)、L-グルタミン ($292 \mu\text{g/mL}$; Life Technologies社)、ペニシリン (100単位/mL ; Life Technologies社)、ストレプトマイシン ($100 \mu\text{g/mL}$; Life Technologies社)、N-2-ヒドロキシエチルピペラジン-N-2-エタンスルホン酸 (HEPES; 0.01M ; Life Technologies社)、ピルビン酸ナトリウム (1mM ; Life Technologies社)、最小必須培地 (MEM) 非必須アミノ酸 ($1\times$; Life Technologies社) を含有するRPMI-1640培地 (Life Technologies社) 中に、 $1 \times 10^6/\text{mL}$ の密度で再懸濁し、IL-2 (100IU/mL) を添加した。細胞移動の90分間前に汎 $\gamma \delta$ TCRモノクローナル抗体 ($20 \mu\text{g/mL}$ 、クローンB1、Biolegend社) を用いてコーティングされた24ウェルプレートへと、細胞を移した。細胞を14日間生育させ、2~3日間毎に培地を交換し、新鮮なサイトカインを加えた。コンフルエンスに達した時点で、細胞を1:1に分けた。これらの条件下で、14日間後に、 $\gamma \delta$ T細胞の元々の少数集団は、正常にはそれらのTCRを通じて高度に活性化され (CD69およびCD25のアップレギュレーションにより示される通り)、かつ主に $V\delta 2$ T細胞からなるが、 $V\delta 1$ T細胞も含んで (すべての $\gamma \delta$ T細胞のうちの最大30%)、大幅に富化される。 $V\delta 1$ T細胞は、機能性分析または表現型分析 (例えば、遺伝学的分析) のために、FACSを用いてその後に単離することができる。

【0172】

実施例2 皮膚および消化管からの非造血組織常在性 $\gamma \delta$ T細胞の分離

三次元皮膚外植片プロトコルを、Clarkプロトコルを利用して構築した。 $9\text{mm} \times 9\text{mm} \times 1.5\text{mm}$ の寸法のCellfoamマトリックス (Cytomatrix Pty Ltd, Victoria, Australia) または同等品をオートクレーブし、続いて 100mg/mL ラット尾I型コラーゲン (BD Biosciences社) 溶液 (PBS中) 中で室温にて30分間インキュベートし、その後、PBS中で1回リンスした。成人ヒト皮膚のサンプルは、皮膚手術から3~6時間以内に取得した。皮下脂肪を除去し、残りの皮膚組織を、約 $1\text{mm} \times 1\text{mm}$ の大きさの断片へと切り刻んだ。約5個の皮膚断片/外植片を配置し、各マトリックスの表面へと押し当てた。各マトリックスを、 2mL の「Skin-T」培地 (10% 加熱不活性化胎児ウシ血清 (Life Technologies社)、L-グルタミン ($292 \mu\text{g/mL}$; Life Technologies社)、ペニシリン (100単位/mL ; Life Technologies社)、ストレプトマイシン ($100 \mu\text{g/mL}$; Life Technologies社)、N-2-ヒドロキシエチルピペラジン-N-2-エタンスルホン酸 (HEPES; 0.01M ; Life Technologies社)、ピルビン酸ナトリウム (1mM ; Life Technologies社)、最小必須培地 (MEM) 非必須アミノ酸 ($1\times$; Life Technologies社) および $3.5 \mu\text{L/L}$ 2-メルカプトエタノール (Life Technologies社) を

含むイスコフ改変ダルベッコ培地 (IMDM; Life Technologies社) が入った24ウェルプレート (Corning社) の別々のウェル中に配置した。培養の最初の7日間、アンホテリシン (2.5 μ g/mL; Life Technologies社) を培地に加えた。上部の1mLの培地を各ウェルから吸引除去し、新鮮な培地と置き換えることにより、培地を週3回交換した。ヒト組み換えIL-2 (PROLEUKIN(登録商標); Novartis Pharmaceutical UK Ltd) 100IU/mLと、ヒト組み換えIL-15 (Biolegend社) 20ng/mLとを、培養初期に加え、表1に示す通り、21~35日後にリンパ球を単離するまでの間、培地に追加した。最大で96ウェル (4枚の24ウェルプレート) を、各ドナーについて培養中に設置した。

【0173】

リンパ球を単離するために、マトリックスを、0.01mM HEPES含有10mLハンクス平衡塩溶液 (HBSS; Life Technologies社) が入った50mL遠沈管 (Corning社) へと移した (最大12個のマトリックス/遠沈管)。マトリックスを、10mLピペットを用いて細胞懸濁液で洗浄し、細胞懸濁液を70 μ mフィルター (BD Biosciences社) を通して新しい50mL遠沈管 (Corning社) へと入れた。このマトリックスの洗浄をさらに2回繰り返した。培養ウェルからの培地も吸引し、70 μ mフィルター (BD Biosciences社) を通して新しい50mL遠沈管 (Corning社) へと入れた。ウェルを、1mLの0.01mM HEPES/HBSSを用いてさらに2回洗浄し、70 μ mフィルター (BD Biosciences社) に通した。続いて、遠心分離 (1600rpm、15分間) により細胞を単離した。ペレットを、「Skin-T」培地中に再懸濁した。最終的な細胞ペレットを、引き続くフローサイトメトリー分析または機能性研究のために、「Skin-T」培地中に再懸濁した。細胞カウント数が必要な場合には、以下のいずれかにより、この段階で白血球を係数した：(1)トリパンブルー染色 (0.4%) (Life Technologies社) および血球計算盤、または(2)CASY(登録商標)Model TTセルカウンターおよびアナライザー (Roche社)。例示的な研究結果を下記の表1に示す。

【0174】

10

20

【表 1】

表 1. 各ドナーから分離されたリンパ球の数.

培養期間	総リンパ球数	スキャホールド数	リンパ球の数／ スキャホールド
35 日	23.5×10^6	72	3.26×10^5
32 日	38.87×10^6	96	4.04×10^5
21 日	29.9×10^6	96	3.11×10^5
21 日	18.0×10^6	72	2.50×10^5
23 日	16.0×10^6	72	2.22×10^5
28 日	10.7×10^6	23	4.65×10^5
25 日	88.0×10^6	120	7.33×10^5
22 日	20.0×10^6	39	5.12×10^5
21 日	4.1×10^6	42	0.97×10^5
23 日	31.4×10^6	96	3.27×10^5
23 日	15.21×10^6	72	2.11×10^5
26 日	43.0×10^6	144	2.99×10^5
32 日	44.5×10^6	96	4.64×10^5
24 日	72.4×10^6	96	7.54×10^5
22 日	46.0×10^6	96	4.79×10^5
平均			
25 日	33.4×10^6	82	3.91×10^5

【0175】

未処理の消化管サンプルはコンタミネーションを生じやすいため、得られた生検サンプルは、まず、10%FCS、ペニシリン（500単位/mL）、ストレプトマイシン（500 μ g/mL）、ゲンタマイシン（100 μ g/mL）、アムホテリシンB（12.5 μ g/mL）、メトロニダゾール（5 μ g/mL）を含むIMDMで2回洗浄してから、細かく刻んでスキャホールド上に配置した。消化管のスキャホールド培養は、「Gut-T」培地（IMDM、10%FCS、ペニシリン 100単位/mL、ストレプトマイシン 100 μ g/mL、ゲンタマイシン 20 μ g/mL、メトロニダゾール 1 μ g/mL）中で生育させた。皮膚の場合と同様に、培養の最初の1週間は、アムホテリシンB 2.5 μ g/mLも使用した。培地には、IL-2（100 IU/mL）およびIL-15（20ng/mL）も加え、週3回交換した。消化管の構造は皮膚よりも緩いため、1週間後にリンパ球を取り出した。

【0176】

実施例3 非造血組織常在性 $\gamma \delta$ T細胞の特徴付け

ヒト $\gamma \delta$ T細胞は皮膚に豊富に存在し、大部分がV δ 2⁻であり、ヒトリンパ系ストレス監視応答に従事する

図1A~1Dは、ヒトの皮膚が常在性 $\gamma \delta$ T細胞の顕著な集団を含むことを示す。Clarkプロトコールを用いて、本発明者らは、IL-2およびIL-15を添加したヒト余剰皮膚サンプルを用いることで、3週間の期間にわたって、組織常在性リンパ球を増殖した。平均収量は、1スキャホールド当たり240,000リンパ球であった。以前の報告と合致して、本発明者らは、大部分が組織常在性「TRM」タイプの、従来の $\alpha \beta$ TCRを発現する大多数の細胞と共に、明らかに異なる皮膚常在性リンパ球サブセットを特定することができた。全体では、CD45⁺細胞のうちの59.9%（ $\pm 8.6\%$ ）はCD4⁺であり、かつ18.3%（ $\pm 2.8\%$ ）がCD8⁺ $\alpha \beta$ T細胞であり、8.7%（ $\pm 3.6\%$ ）のNK細胞画分が含まれた。加えて、本発明者らは、 $\gamma \delta$ T細胞の相当な集団（CD45⁺細胞のうちの平均8.513%、 $\pm 6.564\%$ ）を、本発明者らのドナ

ーで見出した（図1Aおよび図3D）。このリンパ球の特性は、器官型培養後、約100名のドナーで高度に再現可能であり、かつ新鮮消化皮膚サンプルと同等であり、 $\gamma\delta$ 集団のわずかな増大でのみ異なったが、実用的に有用であり、標準的な組織消化プロトコールと比較して、はるかに大きくかつ純粋なリンパ球集団を提供した。それらのTCRデルタ鎖に基づくヒト $\gamma\delta$ T細胞の組織限局化に関する文献と合致して、大多数のヒト皮膚 $\gamma\delta$ T細胞は、フローサイトメトリーにより特定される、種々の γ 鎖と対になったV δ 1 TCR鎖を発現した。このことは、V γ 9に連結されたV δ 2鎖の単一特異的TCRヘテロ二量体を示し、ヒト皮膚サンプル中にはほとんど存在しなかった、末梢血 $\gamma\delta$ T細胞のうちの大部分とは対照的であった。しかしながら、V δ 1 TCRまたはV δ 2 TCRのいずれも発現しなかったサブセット（本発明では「ダブルネガティブ」 $\gamma\delta$ T細胞（DN $\gamma\delta$ T細胞）として示す）に留意することが重要である（図1C）。 10

【0177】

この様式で生育された皮膚常在性 $\gamma\delta$ T細胞は、非最終分化型メモリー表現型を示し、CD45RAを発現せず、かつ様々なレベルの共刺激分子CCR7を発現した。従来の全身性T細胞と比較して、皮膚常在性 $\gamma\delta$ T細胞は、高度な表面マーカーCD69の発現、およびそれと一緒の、プログラムされた細胞死受容体1（PD-1）の発現；低レベル～非存在レベルのIL-2受容体 α （CD25）；および共刺激分子CD28の欠如を奏し、これは以前のまたは慢性的な活性化を示唆する（図1D）。それらの組織局在と合致して、V δ 1細胞およびDN細胞は、CCR4、CCR8およびインテグリン α E（CD103）などの皮膚および組織ホーミングマーカーの発現を示す（図7）。この組織ホーミングマーカーの組み合わせは、免疫療法設定で有益であることを実証すると考えられた。加えて、皮膚常在性 $\gamma\delta$ T細胞は、活性化受容体であるNKG2Dに関する高レベルの発現を示し（図2A）、このことは、これらの細胞のリンパ系ストレス監視応答での役割の可能性を暗示する。MICA、MICBおよびULBPなどのNKG2Dリガンドはそれぞれ、DNA損傷、EGF受容体活性化および酸化ストレスに応答して細胞によりアップレギュレーションされ、かつ、したがって、NKG2Dを発現するT細胞が、ストレスを受けたかまたは形質転換された細胞を特定および全滅させ、それにより組織ホメオスタシスを維持することを可能にし得る。この原理に沿って、本発明者らは、本発明の方法により増幅された皮膚常在性 $\gamma\delta$ T細胞が、NKG2D受容体に対する組み換えリガンド（MICA、ULBP2）への曝露に際して活性化されることを見出し、このことは、リソソーム関連膜タンパク質CD107aのアップレギュレーションにより測定される脱顆粒を実証した（図2A）。この生来様の特徴は、他の組織常在性T細胞（図2C）および全身性 $\gamma\delta$ T細胞はこの応答を欠損していたので、V δ 1⁺T細胞およびDN $\gamma\delta$ T細胞だけに限定されていた（図10B）。 20 30

【0178】

全体として、活性化された皮膚常在性V δ 1⁺ T細胞およびDN $\gamma\delta$ T細胞は、PMA/イオノマイシンまたはNKG2Dリガンド（例えば、組み換えMICAタンパク質）により活性化された場合に、炎症促進性Th1偏向性サイトカインプログラムを実行し（IFN- γ 、TNF- α およびGM-CSFに関して陽性に染色される）（図2Aおよび図2B）、それにより、細胞の生来様応答が明らかになった。実際に、MICAに対する応答は、抗体を用いてNKG2D受容体をブロックすることによりほぼ完全に無効化された（図2Bおよび図2C）。 40

【0179】

$\gamma\delta$ T細胞は、乾癬などの特定の疾患状況および一部のタイプの腫瘍内でIL-17を分泌することが知られている。本発明の方法により増幅された $\gamma\delta$ T細胞は、徹底的な活性化に際してさえも、低レベルのIL-17を産生するかまたはIL-17を産生しない（図2Bおよび図8）。逆に、組織常在性CD4発現 $\alpha\beta$ T細胞は、TCR活性化に際してIL-17を産生した（図2B）。全体的には、 $\alpha\beta$ T細胞は、V δ 1⁺T細胞およびDN $\gamma\delta$ T細胞（宿主保護に関連するTh1偏向性プログラムに限定されていた）と比較して、PMA/イオノマイシンに対して応答して、はるかに多様なサイトカインのレパートリーを示した。 50

【0180】

組織からの分離は、ヒト組織 $\gamma\delta$ T細胞の活性化および大幅な増殖を引き起こす
ヒト組織 $\gamma\delta$ T細胞をさらに研究するために、混合型皮膚リンパ球を細胞培養ウェルへ

と移し、長時間の生存率を維持するために、IL-2を添加した。興味深いことに、器官型培養中に存在するストロマ細胞および上皮細胞から分離することにより、V δ 1 T細胞が独特に、いかなる刺激も加えることなく、活性化および増殖の兆候を示した。7日間の間に、V δ 1⁺ T細胞およびDN γ δ T細胞は独特かつ大幅に、核因子Ki-67をアップレギュレーションし、かつIL-2受容体 α (CD25)の表面発現を増加させた(図3Bおよび図4B)。際立ったことに、3週間の期間にわたって、およびIL-2のみの存在下で、組織由来V δ 1⁺ T細胞およびDN γ δ T細胞は、すべての他のT細胞サブセットよりも増殖し、それにより全皮膚リンパ球のうちの最大65%となり、個数は平均で127.18倍まで増加したが、一方で、 α β T細胞は、細胞絶対数により測定した場合に、5.21倍(p= 0.0124)しか増えなかった(図3A)。細胞周期関連核因子Ki-67のMFIは、V δ 1⁺ T細胞およびDN γ δ T細胞では14日間 10
で2,664.5(±1,876.1)から8,457.7(±4,574.2)まで増加し、一方で、 α β T細胞では、MFIは592.8(±390.5)から284.7(±140.1)へと同じ期間で減少した(図3C)。選択的な皮膚常在性 γ δ T細胞増殖のこの現象はさらに、追加の組み換えIL-15を用いて補助することができ、組み換えIL-15は、リンパ球の生存率および総数を増加させた。

【0181】

皮膚 γ δ T細胞は、接触依存的様式で、線維芽細胞により著しく抑制される

上記のV δ 1⁺ T細胞およびDN γ δ T細胞の際立った増幅は、多量の線維芽細胞増殖が存在する器官型培養システム中では一切生じなかった。V δ 1⁺ T細胞およびDN γ δ T細胞とのそれらの共培養がT細胞の増幅を阻害するか否かを直接的に調べるために、自家線維芽細胞を生育させた。3週間のスキャホールド培養後、空であるかまたは事前に達成され 20
た線維芽細胞のコンフルエントな単層を含有したウェルへと混合型皮膚リンパ球を播種し、それぞれの場合で、培地に外因的にIL-2を添加して、T細胞生育を維持させた。加えて、同じウェル中でTリンパ球が線維芽細胞と直接的に接触することを防止するが、線維芽細胞により分泌される可溶性因子によりT細胞が影響を受けることを可能にする、トランスウェル(transwell)を用いた。14日間の共培養中に、線維芽細胞がないウェル中およびT細胞が線維芽細胞と直接的に接触することを妨げられたウェル中では、V δ 1⁺ T細胞 30
およびDN γ δ T細胞は増殖し始めた。以前の通り、 α β T細胞増殖は、すべての条件下で低かった。T細胞が線維芽細胞と直接接点させられた場合、V δ 1⁺ T細胞およびDN γ δ T細胞の2週間にわたる生育率は、線維芽細胞接触のないウェルの22.6(±8.07)倍から3.3(±0.17)倍へと著しく低下した(図4A)。この接触媒介型阻害は、単独で生育させた 30
リンパ球と比較した場合の、7日間の期間にわたるV δ 1 T細胞でのCD25、Ki-67および転写因子T-betのアップレギュレーションの非存在によりさらに確認された(図4B)。免疫系の組織媒介型制御の一部の形態が、組織ホメオスタシスの維持に対して基本的なものであることが明らかであろうが、これは、この制御なしでは、永続的な炎症の可能性が生じるであろうからである。間質線維芽細胞によるV δ 1⁺ T細胞およびDN γ δ T細胞の抑制的調節は、そのような制御の一例であると思われる。

【0182】

総合すると、皮膚常在性V δ 1⁺ T細胞およびDN γ δ T細胞の表現型ならびにそれらの際立った機能的潜在能力は、接触依存性メカニズムを介して、隣接する皮膚線維芽細胞により通常は抑制されている、活性化前のT細胞を反映している。T細胞を線維芽細胞との接 40
触から解放することによりこのメカニズムを不活性化することによって、V δ 1⁺ T細胞およびDN γ δ T細胞の増幅が選択的に可能になり、一方で、皮膚中の他のT細胞は影響されない。

【0183】

接触媒介型阻害の解除は、皮膚V δ 1 T細胞による細胞傷害性TH1偏向性サイトカイン応答を促進する

混合型皮膚由来リンパ球を14日間増幅させ、 γ δ T細胞から α β T細胞を除去するために、蛍光結合物細胞ソーティング(fluorescence associated cell sorting)を用い、最大90%の純度を可能とした。それらの非常に富化された細胞を、10% FCSを含有するRP 50
MI培地中に150,000細胞/ウェルの濃度で細胞培養ウェルへと配置した。24時間後に上清を

回収し、LUMINEX(登録商標)に基づくアレイを用いて、広範囲のエフェクターサイトカインに関して評価した。完全に予期せぬことに、増幅中の $\gamma\delta$ T細胞(線維芽細胞からのその分離のみによって誘発された)は、多量のIFN- γ ($12,383.46 \pm 16,618.90 \text{ pg/mL}$)、GM-CSF ($4,316.73 \pm 4,534.96 \text{ pg/mL}$)などのTH1関連サイトカインならびに炎症促進性ケモカインCCL4 ($14,877.34 \pm 10,935.64 \text{ pg/mL}$) およびCCL3 ($1,303.07 \pm 757.23 \text{ pg/mL}$)を自発的に産生した(図5A)。

【0184】

さらに、細胞は、増幅中に、かつ新鮮に単離された皮膚由来TCR活性化型 $\gamma\delta$ T細胞とは対照的に、アトピー性応答に関連するIL-13を自発的に多量に産生した。IL-17等の他のサイトカインは、はるかに低いレベルで産生されるか、または全く産生されなかった(図8)。該細胞の高いエフェクター能は、組み換えMICA(NKG2Dリガンド)、抗CD3、またはPMA/イオノマイシンを用いる刺激後に、さらに増大させることができた。悪性標的細胞に対する増幅された $\gamma\delta$ T細胞の細胞傷害能を評価するために、本発明者らは、24時間の共培養実験中で、確立された形質転換細胞株を用いた。 $V\delta 1^+$ T細胞およびDN $\gamma\delta$ T細胞は、Hela細胞(子宮頸癌)およびCaco2細胞(結腸癌)に対して、用量依存的な様式で、従来の組織 $\alpha\beta$ T細胞よりもはるかに上回って、非常に高い細胞傷害活性を示した(図5B)。さらに、 $\gamma\delta$ 細胞媒介性細胞傷害は、可溶性モノクローナル抗体を用いNKG2D受容体をブロックすることにより強く阻害することができ、このことは、この受容体が、ヒト皮膚由来 $\gamma\delta$ T細胞を脱抑制することによる腫瘍監視に、少なくとも部分的に関与することを示した。さらに、他の標的:HCT1954細胞(乳癌)、MDAMB231細胞(乳癌)およびHCT116細胞(結腸)を用いてこれらの細胞の細胞傷害能を確認した(図9)。

【0185】

本発明の方法で生成された非造血組織常在性の $\gamma\delta$ T細胞は、さらに、NKG2Dリガンド(MICA)に応答するという点において、他の血液由来 $\gamma\delta$ T細胞と区別され得る。非造血組織常在性の $\gamma\delta$ T細胞は、例えば、TNF α 、IFN γ およびCD107aの生成量増加によるT細胞受容体のリガンド刺激のない条件下で、悪性腫瘍と強い関連性を示す(図2および図10)。また、それらは、外部から投与した薬剤による、またはリガンドの介在によるT細胞受容体の活性化のない状態で、T細胞の細胞傷害性の応答を実行する、つまり、刺激の存在しない条件下で細胞傷害性である(図3および図5)。これは、他の $\gamma\delta$ T細胞、 $\alpha\beta$ T細胞、またはNK細胞と比較して、本発明の方法によって生成された非造血組織常在性 $\gamma\delta$ T細胞は、T細胞受容体シグナル伝達を活性化する外因性薬剤の追加のない条件下での、応答および増殖能において独特である(図3)。また、本発明の方法で生成された非造血組織常在性 $\gamma\delta$ T細胞は、CD69およびPD-1で陽性に染色され、CD28の発現はなく、かつ、低レベルのCD25しか発現しなかった(図1D参照)。このマーカーの組み合わせは、血液由来の $\gamma\delta$ T細胞では発現しない。さらに、それらは、血液由来の増幅された $V\delta 2 \gamma\delta$ T細胞と比較して、CCR4およびCCR8等の組織ホーミング性受容体の高い発現を示した。(図7B)。

【0186】

ヒト消化管内の組織常在性 $\gamma\delta$ T細胞

$V\delta 1$ T細胞受容体を発現する、ヒト結腸由来の非造血組織常在性 $\gamma\delta$ T細胞の集団も同定された(図6)。3名のドナーで、4~5週間の期間にわたって、皮膚細胞に関して用いたのと同じ方法を用いて、これらの細胞を増幅することができた。増幅中、結腸由来 $V\delta 1^+$ T細胞およびDN $\gamma\delta$ T細胞は、線維芽細胞豊富な器官型細胞培養からのそれらの単離後に、類似のKi-67アップレギュレーションパターンを示した。同様に、結腸常在性 $V\delta 1^+$ T細胞およびDN $\gamma\delta$ T細胞は、NKG2D受容体に対するリガンドの供給により、強く刺激された。血液由来 $\gamma\delta$ T細胞は、CD16発現を介して抗体依存性細胞媒介性細胞傷害を実行する能力を十分に備えており、このことは、リツキシマブと組み合わせた場合の、CD20陽性B細胞系統リンパ腫に対して標的化された強化された細胞傷害性を証明する。同様に、慢性リンパ性白血病(CLL)およびHER2陽性乳癌細胞が、モノクローナル抗体を用いて標的化された場合に、より効果的に殺傷される。皮膚由来 $V\delta 1$ T細胞が抗体オプソニン化型

標的細胞を標的化する能力を評価するために、3種類のIgG1関連Fc受容体CD16、CD32およびCD64の発現レベルを定量した。皮膚由来V δ 1 T細胞は、わずかなレベルのFc受容体CD16を発現するが、高親和性IgG受容体CD64に関して良好な発現レベルを示す。したがって、組織由来V δ 1 T細胞は、それらが抗体により悪性腫瘍および転移の側に誘導され、オプソニン化された腫瘍細胞を認識し、かつADCCを介して標的を殺傷するであろうから、CD20療法またはHer2療法などのモノクローナル抗体療法に対するアジュバントとして用いられる能力を十分に備えている可能性がある。

【0187】

実施例4 非造血組織常在性 $\gamma\delta$ T細胞の増幅条件の最適化

皮膚由来 $\gamma\delta$ T細胞の増幅

3~4週間のスキャホールド培養の後、混合リンパ球を取り出し、PBSで洗浄し、遠心分離し、ろ過済みの熱で不活性化したウシ胎児血清（Life Technologies社）10%、L-グルタミン（292 μ g/mL; Life Technologies社）、ペニシリン（100単位/mL; Life Technologies社）、ストレプトマイシン（100 μ g/mL; Life Technologies社）、N-2-ヒドロキシエチルピペラジンN-2-エタン硫酸（HEPES; 0.01M; Life Technologies社）、ピルビン酸ナトリウム（1 mM; Life Technologies社）、最小必須培地（MEM）非必須アミノ酸溶液（1 $\times$; Life Technologies社）、および50 μ M 2-メルカプトエタノール（Life Technologies社）を有するRoswell Park Memorial Institute 1640培地（RPMI-1640; Life Technologies社）で細胞濃度が1 $\times$ 10⁶細胞/mLとなるように再懸濁した。当初の集団のV δ 1⁺細胞は、リンパ球の1.12%であった。96ウェル平底プレート（Corning社）に2 $\times$ 10⁵細胞/ウェル、または24ウェルプレートに2 $\times$ 10⁶細胞/ウェルを播種し、表2に示す濃度の因子を追加して、増幅させた。

【0188】

【表2】

表2 増幅培養液に含まれる各因子の濃度

因子	濃度
IL-1 β	10 ng/mL
IL-2	100 U/mL
IL-4	5 ng/mL
IL-6	10 ng/mL
IL-7	25 ng/mL
IL-8	5 ng/mL
IL-9	10 ng/mL
IL-12	2.5 ng/mL
IL-15	10 ng/mL
IL-18	50 ng/mL
IL-21	10 ng/mL
IL-23	10 ng/mL
IL-33	500 ng/mL
SDF1 α	10 ng/mL
IGF-1	100 ng/mL

【0189】

細胞を毎日顕微鏡でモニタリングし、1週間あたり3回、新鮮な培地とサイトカインを与えた。完全なコンフルエント化と細胞凝集が生じた場合は、必要に応じて、細胞を追加のウェルおよびプレートに1:1に分割した。21日後、ACCUTASE(登録商標)（eBioscience社

）を用いて細胞を取り出し、フローサイトメトリーを用いて計数および分析を行った。図17Aおよび図17Bは、増幅前後の代表的なフローサイトメトリーのプロットを示す。表3は、各治療群の増幅された細胞での相対的なCD27およびTIGITの発現量に加えて、図17Cに対応する増幅倍率を示す。最終的なV δ 1の増幅倍率は、増幅前および増幅後のV δ 1の総数から計算した（%CD3⁺ 汎 γ δ ⁺ V δ 1⁺ 細胞 ÷ 100）×（総細胞数）。

【0190】

【表3】

表3 多様な因子の存在下での皮膚常在性 V δ 1 T 細胞の増幅

増幅因子 (IL-2 + IL-15) +	V δ 1 の増幅 IL-2 + IL-15 補正值	V δ 1 上の CD27 MFI IL-2+IL-15 補正值	V δ 1 上の TIGIT MFI IL-2+IL-15 補正值
IL-4	1.5 ± 0.5	1.4 ± 0.5	NT
IL-6	1.9 ± 0.3	0.9 ± 0.4	1.0 ± 0.1
IL-7	1.6 ± 0.3	0.5 ± 0.7	1.1 ± 0.2
IL-8	1.6 ± 0.2	1.0 ± 0.3	NT
IL-21	2.9 ± 1.6	2.8 ± 0.8	NT
IL-23	1.3 ± 0.5	0.7 ± 0.5	NT
SDF-1	3.9 ± 1.9	0.9 ± 0.4	NT
IL-4 + IL-21	7.4 ± 5.0	7.3 ± 2.5	0.4 ± 0.1
IL1b	3.0 ± 1.4	1.0 ± 0.4	1.1 ± 0.3
IL-12	6.8 ± 4.3	0.7 ± 0.8	NT
IL-18	3.3 ± 1.0	0.8 ± 0.5	0.9 ± 0.2
IL-33	2.5 ± 1.3	1.1 ± 0.4	0.9 ± 0.2
IL-33 + IL-4 + IL-21	2.0 ± 1.3	0.7 ± 3.5	0.4 ± 0.2
IGF-1	1.1 ± 0.1	0.9 ± 0.1	1.2 ± 0.1
IL-9	0.9 ± 0.4	1.2 ± 0.0	1.3 ± 0.2
IL-9 + IL-4 + IL-21	1.8 ± 1.3	7.4 ± 3.9	0.3 ± 0.1
IL-4 + IL-21 + 1% HPL	5.3 ± 0.5	5.4 ± 1.0	0.3 ± 0.1
IL-4 + IL-21 + 5% HPL	4.7 ± 0.9	4.8 ± 2.9	0.4 ± 0.1

【0191】

図17Cに示すように、IL-2およびIL-15のみの場合と比べ、他の因子を加えることでV δ 1 T細胞の増幅は増加した。IL-2、IL-15、IL-4およびIL-21への応答でV δ 1 T細胞の収量が高かったことから、図17D～17Hに示すように、これらの因子の組み合わせについて、さらに検討した。

【0192】

初期および最終のV δ 1⁺T細胞の各集団の表現型は、CD27およびTIGITの発現も含めて、平均蛍光強度（MFI）を用いて測定し、各グループのサンプルはMFIの中央値をとって平均化した。各増幅条件下でのV δ 1⁺ T細胞によるCD27およびTIGITの発現量を表4に示す。

【0193】

【表 4】

表 4 多様な因子の存在下での皮膚常在性 V δ 1 T 細胞の表現型

増幅因子	CD27 MFI	TIGIT MFI
IL-2	113 $\pm$ 5	7919 $\pm$ 179
IL-2, IL-15	226 $\pm$ 33	4788 $\pm$ 679
IL-2, IL-15, IL-6	140 $\pm$ 91	6663 $\pm$ 767
IL-2, IL-15, IL-7	128 $\pm$ 115	6083 $\pm$ 1813
IL-1, IL-15, IL-4, IL-21	1284 $\pm$ 1048	1721 $\pm$ 308
IL-2, IL-15, IL1 β	-136 $\pm$ 3.5	9453 $\pm$ 390
IL-2, IL-15, IL-18	121 $\pm$ 75	4396 $\pm$ 2782
IL-2, IL-15, IL-9	260 $\pm$ 21	5247 $\pm$ 2333
IL-2, IL-15, IGF-1	193 $\pm$ 94	6584 $\pm$ 1127
IL-2, IL-15, IL-4, IL-21, IL-9	790 $\pm$ 61	1389 $\pm$ 803
IL-2, IL-15, IL-4, IL-21, 1% HPL	990 $\pm$ 258	1203 $\pm$ 222
IL-2, IL-15, IL-4, IL-21, 5% HPL	421 $\pm$ 76	1045 $\pm$ 798

10

20

【0194】

図18Aに示すように、IL-2およびIL-15のみの場合と比較して、他の因子の追加によって平均蛍光強度により測定されるCD27の発現に増加がみられた。注目すべきことに、IL-4およびIL-21の添加により、CD27 MFIがIL-2およびIL-15のみと比較して約8倍に上昇した。また、IL-2、IL-15、IL-4およびIL-21の4種を組み合わせることで、それらの他の組み合わせと比較して、最も高いCD27の発現がみられた（図18Bおよび18D）。注目すべきことに、T細胞上のCD27発現が低い場合、多くは、さらなる長期的な増殖の可能性がほとんどない、消耗した、最終分化した表現型と関連する。

【0195】

増幅されたV δ 1⁺T細胞によるTIGITの発現については、異なる傾向がみられた（図19）。特に、IL-2およびIL-15と併用されたIL-4およびIL-21への応答で、TIGITの発現が減少した。この傾向をさらに探究するため、TIGITの発現量をCD27の発現量に対してプロットした（図20）。TIGITとCD27の間に負の相関がみられた。TIGITの発現量が高いと、T細胞は腫瘍微小環境による阻害を受けやすくなる。腫瘍微小環境では、T細胞リガンドであるポリオウイルス受容体（PVR; CD155）の発現が高くなる。

30

【0196】

実施例 5 4種のサイトカインの培養は細胞培養血清への代替となる

従来、組織または腫瘍に由来するT細胞を製造する際に、複数の血液由来の血清および血漿を培地に添加することは一般的である。しかし、これらの血清または血漿成分の使用は、これらの成分のバッチ毎の差異、これらの成分の高いコスト、先進療法医薬品（advanced therapy medicinal products (ATMP)）業界全体の高い需要を考慮した供給の制限、および、これらの成分からの外来性の物質による二次汚染のリスクの増加により、好ましくない状況を生じ得る。そのため、本明細書に記載するように、所望の $\gamma\delta$ T細胞の増殖と富化を支持するサイトカインを首尾よく特定した後、そのようなサイトカインの使用により、組織由来 $\gamma\delta$ T細胞の増殖に通常使用される複数の血清/血漿成分の必要性をなくせるかどうかを試験した。これをさらに試験するため、免疫細胞を皮膚サンプルから放出させ、 $\gamma\delta$ T細胞+/-血清の増殖と富化を支持するために、血漿/血清が依然として必要かどうかを試験した。そのため、放出された細胞を取り出し、2つの培地に「0日目」に播種した。第一の培地は、10%のヒト由来血清およびサイトカインを加えた、動物由来因子非含有（animal derived component free (ADCF)）培地（TexMACS, Miltenyi社）を含

40

50

むものとした。第二の培地は、同様のADCF培地/サイトカインの混合物、標準定義追加成分 (standard defined supplement、CTS(商標)、精製されたヒト血清アルブミン、組み換えインスリンおよびトランスフェリンを含む) を含むが、血清を含まないものとした。この研究の結果を図21に示す。驚くべきことに、血清の有無にかかわらず、同等の富化と同等の増幅倍率がみられた。これは、動物由来の因子またはヒト血清なしで、組織由来の $\gamma\delta$ T細胞の増幅および富化が可能であることを示す。

【0197】

次に、標準的な器官型培養液から取り出された混合リンパ系の集団からの、 $\gamma\delta$ T細胞の優先的な増幅に関して、このアプローチが評価された。もし達成可能であれば、特に、このプロトコールにより、最終的に増幅されたリンパ球の集団が50%超の $\gamma\delta$ T細胞を含むようになれば、このような優先的な増幅は、高度に望ましいものとなろう。実際、これまでの従来の富化プロトコールでは、少数の $\gamma\delta$ 細胞を物理的に分離したり、物理的に大多数の $\alpha\beta$ 細胞を枯渇させたりするために、磁気免疫枯渇技術 (例えば、Miltenyi社またはDynal社から) またはフローサイトメトリーソーティング技術 (例えば、BD Biosciences社から) 等の枯渇または富化の技術の使用が求められた。その代り、本研究では、本発明の方法が、このような物理的な分離または枯渇のプロトコールを必要とせず、混合リンパ球集団の中に存在する $\gamma\delta$ T細胞を富化することができるかどうかを評価した。驚くべきことに、当初の集団に存在する他の細胞型を超えて $\gamma\delta$ 細胞を増幅させるためのプロトコールの選択性によって、これらの増幅方法を用いてこのような富化が達成された。これは、培養液中に存在するすべての細胞の50%をしめる、より富化され、より純度の高い $\gamma\delta$ T細胞をもたらした。さらに、図21および図22A~22Dに示されるように、この富化は、血清の有無にかかわらず達成され、 $\gamma\delta$ T細胞は100倍超に増幅され、この組織サンプルのすべての部位において、 $\gamma\delta$ T細胞の純度は、50%未満から50%超に上がった。

【0198】

単離および増幅方法

3週間のスキャホールド培養後、上記のClarkプロトコールおよび実施例2で説明した同等の手法を使用して、混合リンパ球を組織から取得した。取得した細胞の特性は、実施例3に記載されたものと同様であった。これらの取得した細胞は、HBSS + HEPESで洗浄し、遠心分離し、(i) IL-2 (100IU/L)、IL-4 (Biolegend社、5ng/mL)、IL-15 (Biolegend社、20ng/ml) およびIL-21 (Biolegend社、5ng/ml) に加えて10% ヒト AB 血清 (Life Science Production社) を含む、または (ii) IL-2 (100IU/L)、IL4 (Biolegend社、5ng/mL)、IL-15 (Biolegend社、20ng/ml) およびIL-21 (Biolegend社、5ng/ml) に加えて5% CTS(商標) (Thermo Fisher Scientific社) を含む、TexMACS培地 (Miltenyi社) に再懸濁した。血清を含む培地および血清を含まない培地の両方に、ペニシリン/ストレプトマイシン抗生物質 (それぞれ100単位/mL、100 μ g/mL、Life Technologies)、も加えた。次いで、細胞を、24ウェルプレート (Corning社) に2百万細胞/ウェルとなるように播種した。細胞がコンフルエント化したら、同じ培地を含む新しいウェルに1/2~1/4の間で分割して、増幅/継代した。21日目に、ACCUTASE(登録商標)細胞分離手段 (Thermo-Fisher社) を用いて細胞を取り出し、フローサイトメトリーで分析して、図21および図22A~22Dに示されるように最終的な細胞特性を決定した。

【0199】

実施例6 TIGIT発現の機能的な関連性

図23に示す通り、TIGITは構成的に消化管常在性 $V\delta 1$ 細胞上に発現する。従来の細胞消化により消化管から単離した、 $V\delta 1$ 細胞を使用してデータを構築した。組織常在性 $\gamma\delta$ T細胞の構成的なTIGITの発現は、皮膚由来の $V\delta 1$ 細胞にのみ関連するわけではなく、TIGITの発現は、Clarkプロトコールのアーティファクト (合成物) ではない (グリッドに基づいた単離手順)。

【0200】

さらに、IL-2およびIL-15のみで培養した細胞において、IFN γ (図24A) およびTNF α (図24B) の発現を測定したところ、ポリオウイルス受容体 (PVR) が特にTCRシグナル伝達

を阻害した。IL-2、IL-15、IL-4およびIL-21の存在下で培養した細胞において、IFN γ （図25A）またはTNF α （図25B）を測定したところ、PVR阻害効果はTIGIT陰性V δ 1⁺/V δ 3⁺では失われていた。これは、4つの混合サイトカインに起因するTIGIT陰性により、TIGITが介在するV δ 1⁺/V δ 3⁺ T細胞の活性化の阻害が優先的に防がれることを示す。

【0201】

実施例7 増幅培養におけるIL-2のIL-9への置換

3人のドナー（TS052、TS056およびSK073）からの皮膚組織を9mmグリッドに配置し、IL-2およびIL-15を加えた培地で3週間培養した。単離されたリンパ球を、IL-2、IL-4、IL-15およびIL-21（図26Aおよび26B、左のバー）またはIL-4、IL-9、IL-15およびIL-21（図26Aおよび26B、右のバー）を加えた培地で培養した。3週間の増幅後の $\gamma\delta$ T細胞/グリッド（図26A）およびV δ 1細胞/グリッド（図26B）の最終収量を計算した。 10

【0202】

図27A～図27Cに示す通り、IL-9は、皮膚 $\gamma\delta$ T細胞の増幅において、増幅倍率の変化（図27A）、 $\gamma\delta$ TCR⁺T細胞の割合（%）（図27B）およびV δ 1⁺T細胞の割合（%）（図27C）の測定で示される通り、IL-2の機能を代替するのに十分であった。皮膚組織は6人のドナー（SK073、SK075、SK077、TS052、TS053およびTS056）由来であった。2つのサイトカインカクテルは、IL-2およびIL-15を含み、4つのサイトカインカクテルは、IL-2、IL-15、IL-21およびIL-4を含んだ。

【0203】

図28Aおよび28Bに示す通り、IL-9は、皮膚 $\gamma\delta$ T細胞の増幅において、V δ 1⁺T細胞上のCD27発現の平均蛍光強度（MFI）（図28A）およびV δ 1⁺T細胞のCD27発現のMFI補正值（図28B）の測定で示される通り、IL-2の機能を代替するのに十分であった。標準培養条件と比較して、CD27の発現に差異は見られなかった。皮膚組織は、4人のドナー（SK073、TS052、TS053およびTS056）由来であった。2つのサイトカインカクテルは、IL-2およびIL-15を含み、4つのサイトカインカクテルは、IL-2、IL-15、IL-21およびIL-4を含んだ。 20

【0204】

皮膚由来 $\gamma\delta$ T細胞の増幅

3週間のスキャホールド培養の後、混合リンパ球を取り出し、リン酸バッファー生理食塩水（PBS）で洗浄し、遠心分離し、ろ過済みの熱で不活性化したウシ胎児血清（Life Technologies社）10%、L-グルタミン（292 μ g/mL；Life Technologies社）、ペニシリン（100単位/mL；Life Technologies社）、ストレプトマイシン（100 μ g/mL；Life Technologies社）、N-2-ヒドロキシエチルピペラジンN-2-エタン硫酸（HEPES；0.01M；Life Technologies社）、ピルビン酸ナトリウム（1mM；Life Technologies社）、最小必須培地（MEM）非必須アミノ酸溶液（1 $\times$ ；Life Technologies社）、および50mM 2-メルカプトエタノール（Life Technologies社）を有するRPMI-1640で細胞濃度が1 $\times$ 10⁶細胞/mLとなるように再懸濁した。24ウェルプレート（Corning社）に2 $\times$ 10⁶細胞/ウェルを播種し、サイトカインを下記の最終濃度となるように加えて増幅させた：IL-2：100 U/mL、IL-4：5 ng/mL、IL-9：10 ng/mL、IL-15：20 ng/mLおよびIL-21：10 ng/mL。 30

【0205】

細胞を毎日顕微鏡でモニタリングし、週3回、1mLの培地を2倍の強度を有するサイトカイン（つまり、IL-2：200 U/mL、IL-4：10 ng/mL、IL-9：20 ng/mL、IL-15：40 ng/mLおよびIL-21：20 ng/mL）を含む1mLの新鮮な培地と取り換えることで、新鮮な培地とサイトカインを与えた。 40

【0206】

完全なコンフルエント化と細胞凝集が生じた場合は、必要に応じて、細胞を追加のウェルおよびプレートに1：1に分割した。21日後、ACCUTASE（登録商標）（eBioscience社）を用いて細胞を取り出し、フローサイトメトリーを用いて計数および分析を行った。最終的な $\gamma\delta$ T細胞とV δ 1細胞の数は、増幅前および増幅後の数を用いて計算し、増幅後のグリッドあたりの最終的な細胞収量が示された。

【0207】

他の実施形態

本明細書で言及されるすべての刊行物、特許、および特許出願は、それぞれの独立した刊行物または特許出願が参照により組み込まれることが具体的かつ個別に示されるのと同じ程度に、参照により組み込まれる。

【0208】

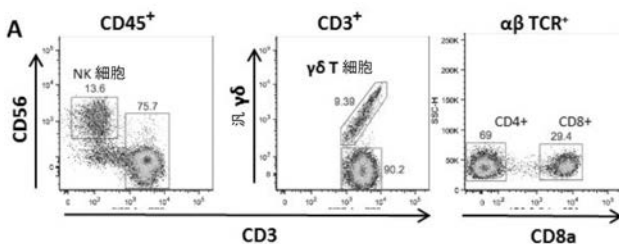
本発明は、その特定の実施形態に関連して説明したが、さらなる修正が可能であり、本出願は、一般に、本発明の原理に従って、本発明のあらゆる変形、使用、または適応を網羅し、本発明に関連し、特許請求の範囲に記載された本質的な特徴に適用され得る、当技術分野内の公知または慣例の範囲内にある本開示からの逸脱を含むことは、理解されるであろう。

【0209】

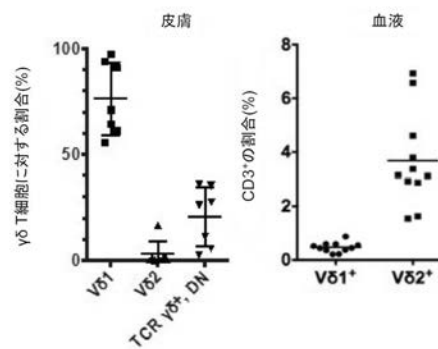
他の実施形態は特許請求の範囲内にある。

10

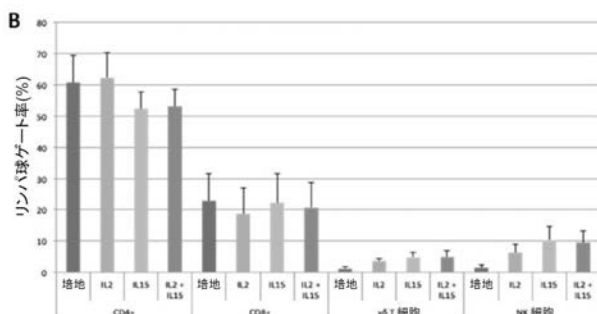
【図1A】



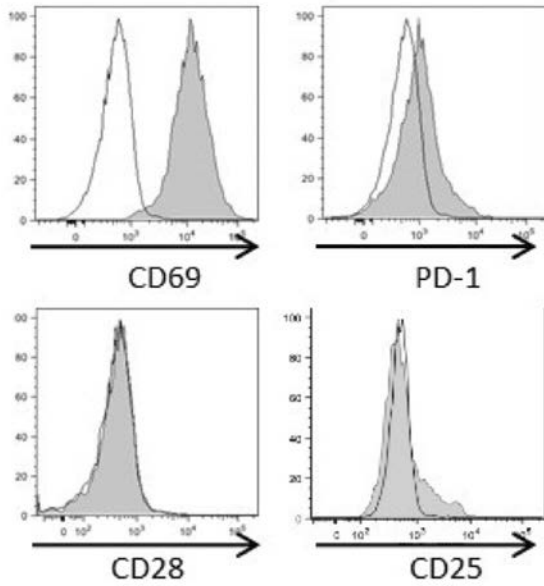
【図1C】



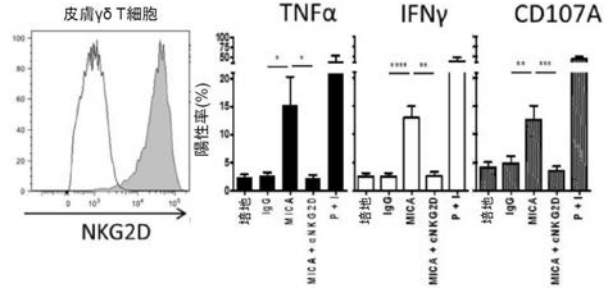
【図1B】



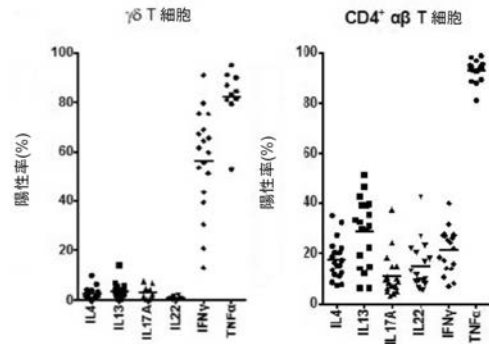
【図 1 D】



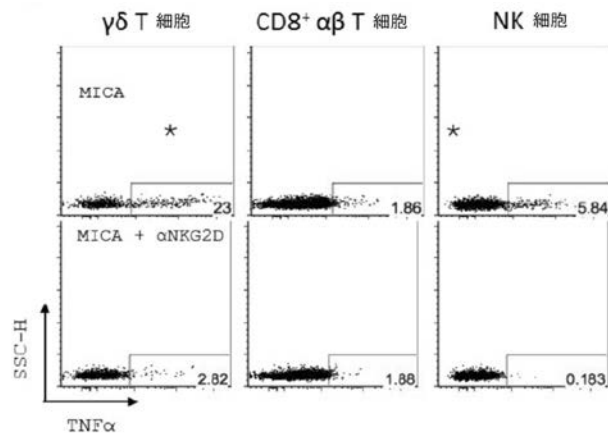
【図 2 A】



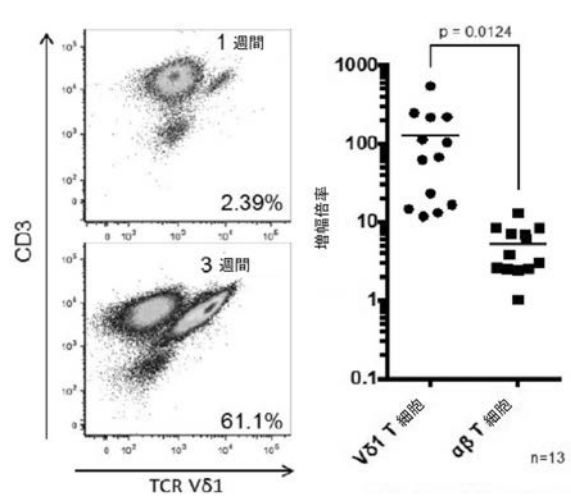
【図 2 B】



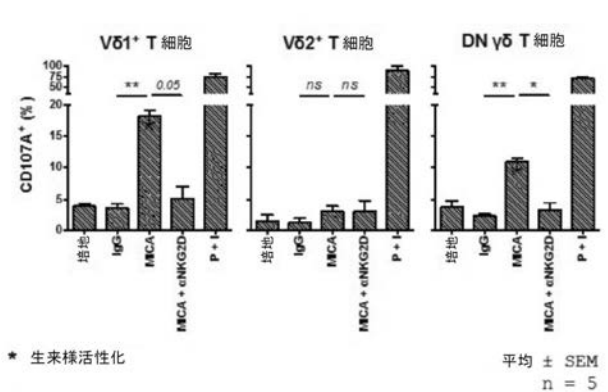
【図 2 C】



【図 3 A】

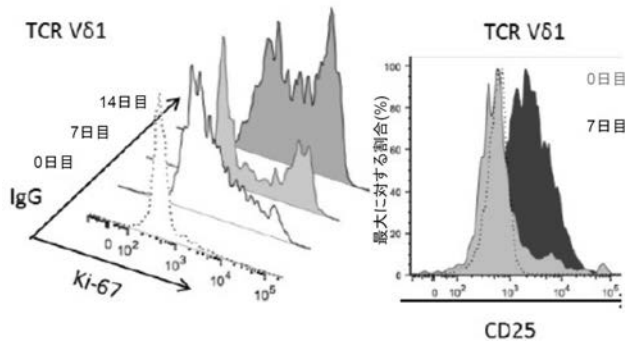


【図 2 D】

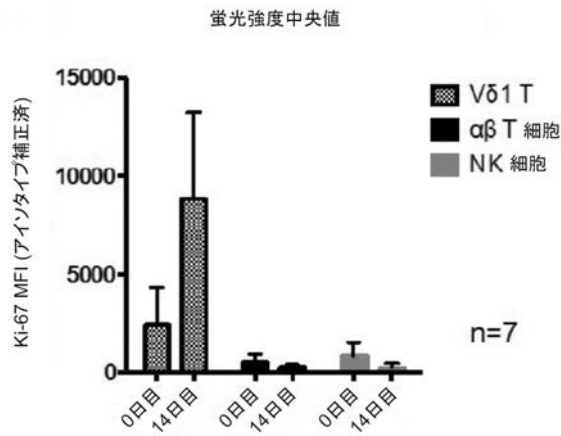


* 生来様活性化

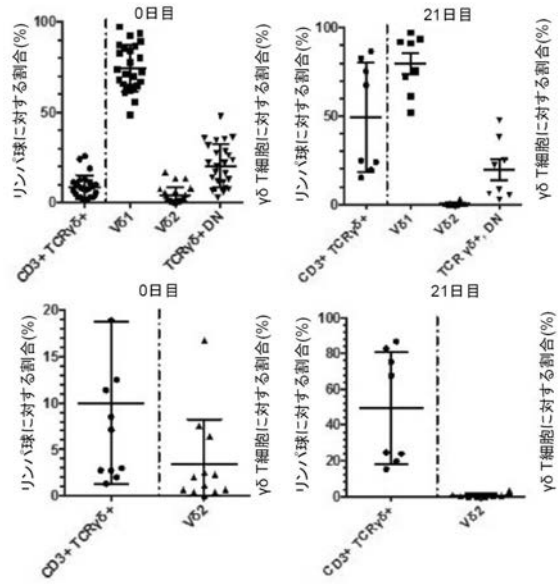
【図 3 B】



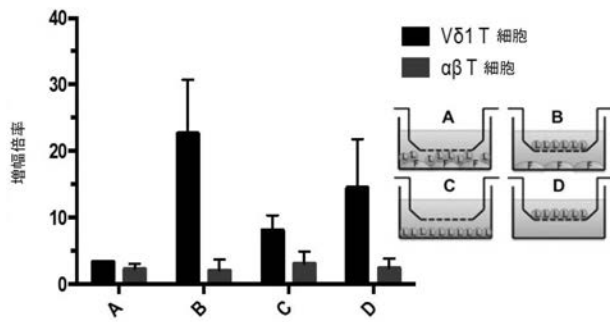
【図 3 C】



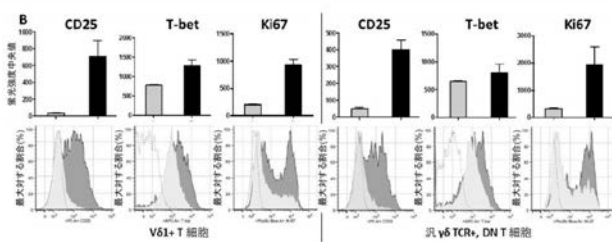
【図 3 D】



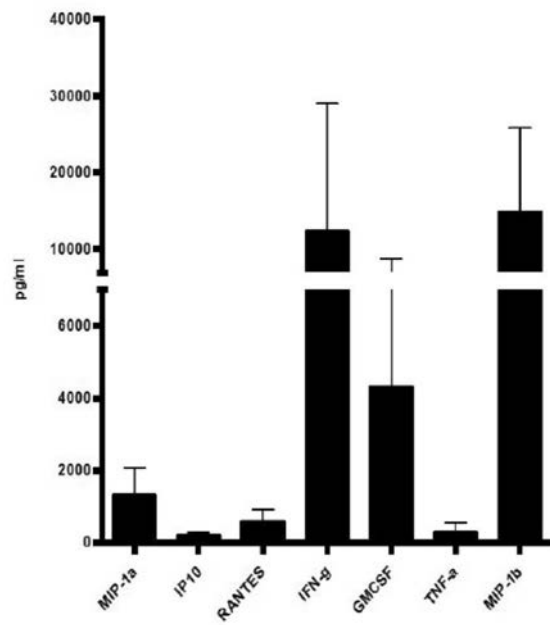
【図 4 A】



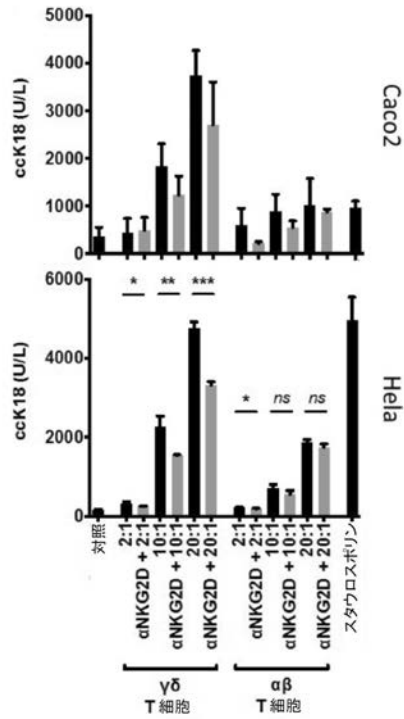
【図 4 B】



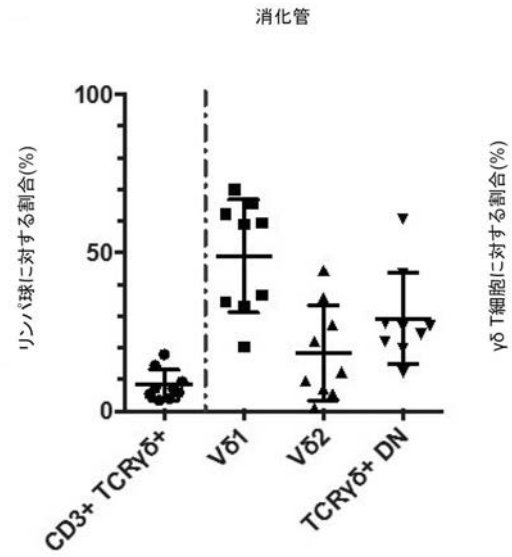
【図 5 A】



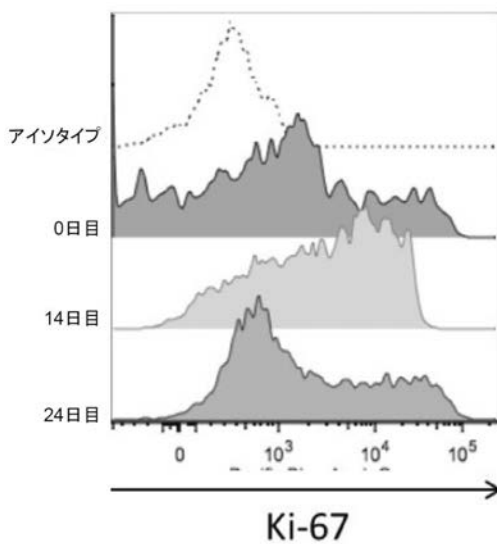
【図 5 B】



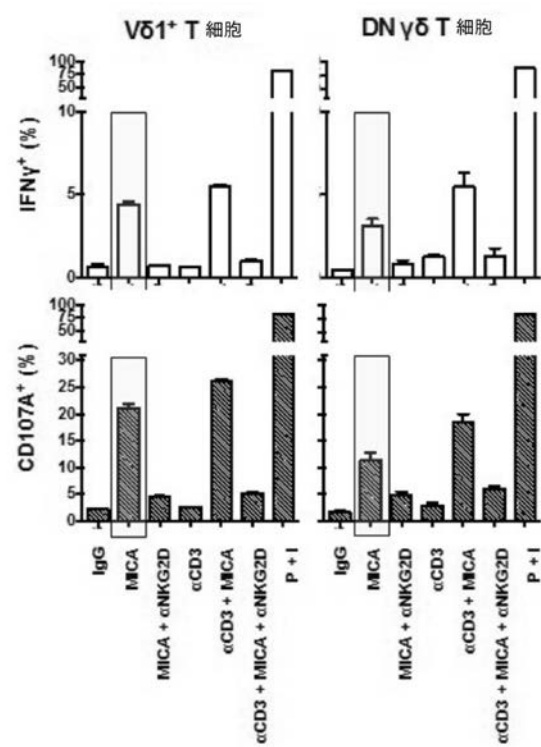
【図 6 A】



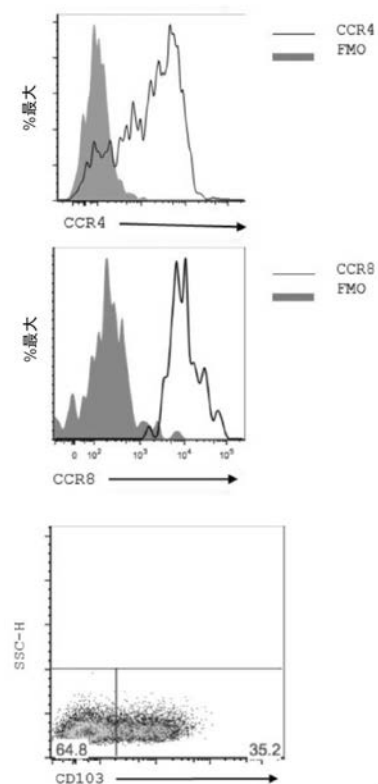
【図 6 B】



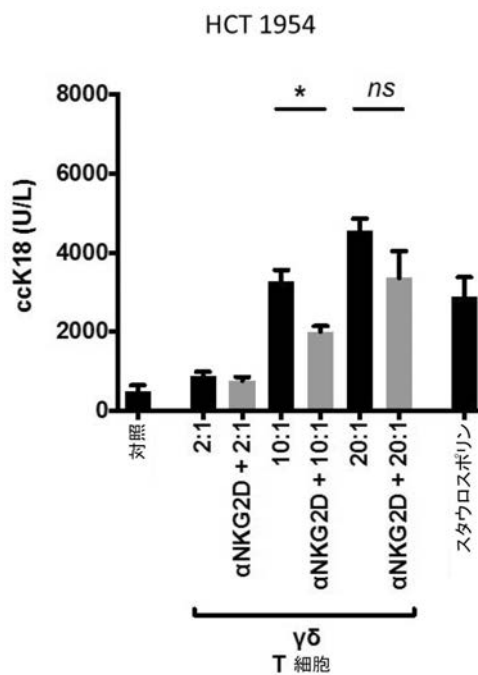
【図 6 C】



【図 7 A】

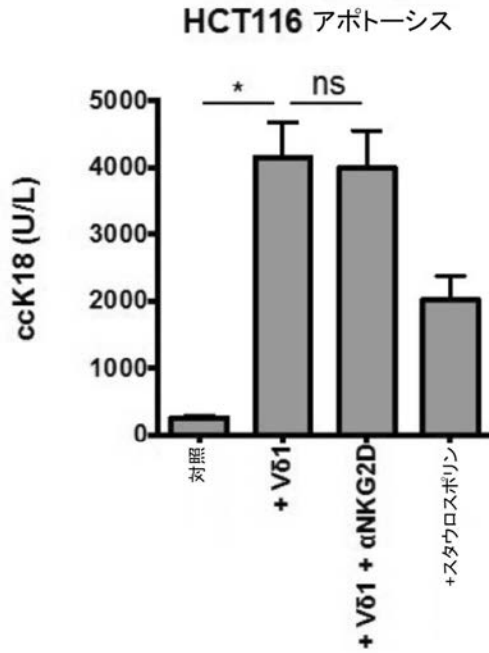


【図 9 A】

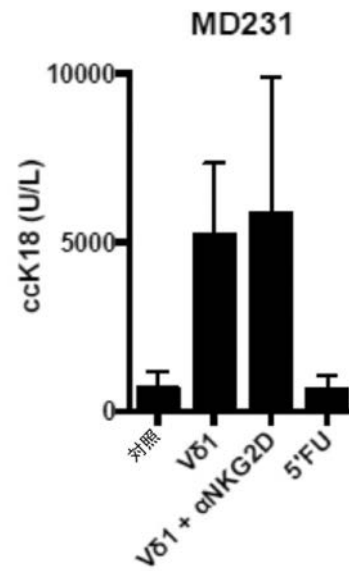


Cytokine/Chemokine	Mean Concentration (pg/ml)
MIP-1a	~1200
SDF-1	~1000
IL-1a	~200
IL-1b	~600
IL-1c	~200
IL-1d	~200
IL-1e	~200
IL-2	~100
IL-3	~1300
IL-4	~800
IL-5	~100
IL-6	~100
IL-7	~100
IL-8	~100
IL-9	~1300
IL-10	~800
IL-11	~100
IL-12	~100
IL-13	~100
IL-14	~100
IL-15	~100
IL-16	~100
IL-17a	~20000
IL-17b	~10000
IL-17c	~10000
IL-17d	~100
IL-17e	~100
IL-18	~100
IL-19	~100
IL-20	~100
IL-21	~100
IL-22	~100
IL-23	~100
IL-24	~100
IL-25	~100
IL-26	~100
IL-27	~100
IL-28	~100
IL-29	~100
IL-30	~100
IL-31	~100
IL-32	~100
IL-33	~100
IL-34	~100
IL-35	~100
IL-36	~100
IL-37	~100
IL-38	~100
IL-39	~100
IL-40	~100
IL-41	~100
IL-42	~100
IL-43	~100
IL-44	~100
IL-45	~100
IL-46	~100
IL-47	~100
IL-48	~100
IL-49	~100
IL-50	~100
IL-51	~100
IL-52	~100
IL-53	~100
IL-54	~100
IL-55	~100
IL-56	~100
IL-57	~100
IL-58	~100
IL-59	~100
IL-60	~100
IL-61	~100
IL-62	~100
IL-63	~100
IL-64	~100
IL-65	~100
IL-66	~100
IL-67	~100
IL-68	~100
IL-69	~100
IL-70	~100
IL-71	~100
IL-72	~100
IL-73	~100
IL-74	~100
IL-75	~100
IL-76	~100
IL-77	~100
IL-78	~100
IL-79	~100
IL-80	~100
IL-81	~100
IL-82	~100
IL-83	~100
IL-84	~100
IL-85	~100
IL-86	~100
IL-87	~100
IL-88	~100
IL-89	~100
IL-90	~100
IL-91	~100
IL-92	~100
IL-93	~100
IL-94	~100
IL-95	~100
IL-96	~100
IL-97	~100
IL-98	~100
IL-99	~100
IL-100	~100
IL-101	~100
IL-102	~100
IL-103	~100
IL-104	~100
IL-105	~100
IL-106	~100
IL-107	~100
IL-108	~100
IL-109	~100
IL-110	~100
IL-111	~100
IL-112	~100
IL-113	~100
IL-114	~100
IL-115	~100
IL-116	~100
IL-117	~100
IL-118	~100
IL-119	~100
IL-120	~100
IL-121	~100
IL-122	~100

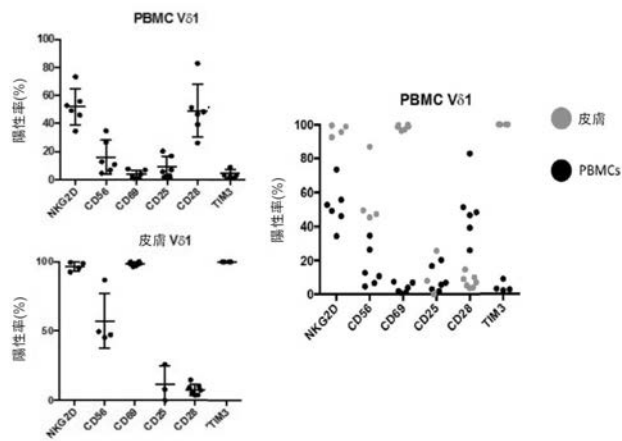
【図 9 B】



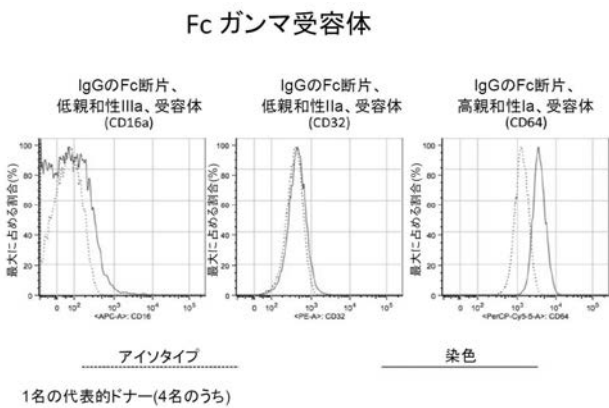
【図 9 C】



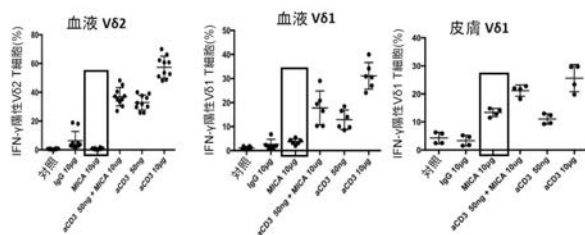
【図 10 A】



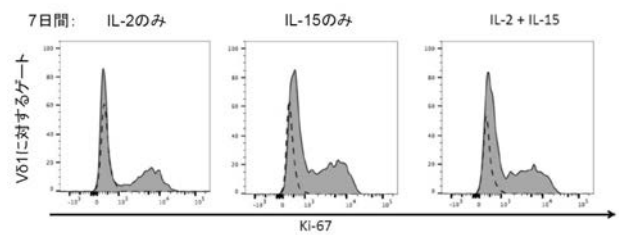
【図 11】



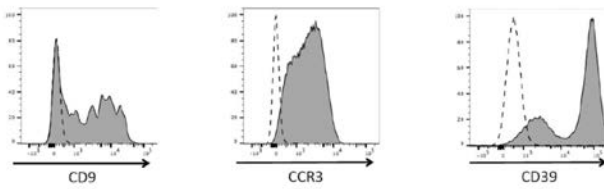
【図 10 B】



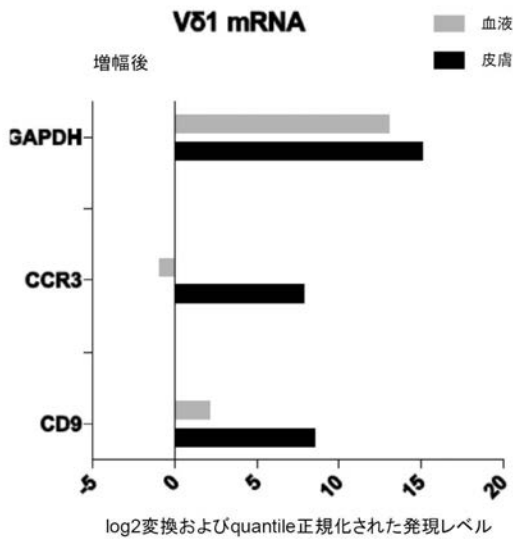
【図 12】



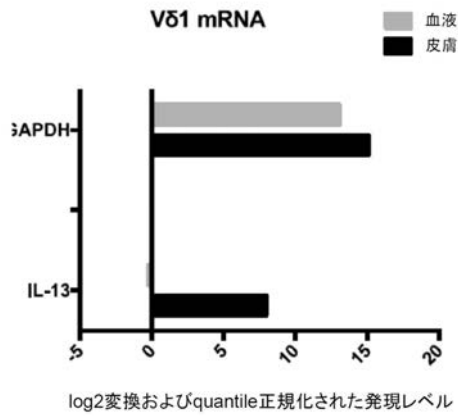
【図 1 3】



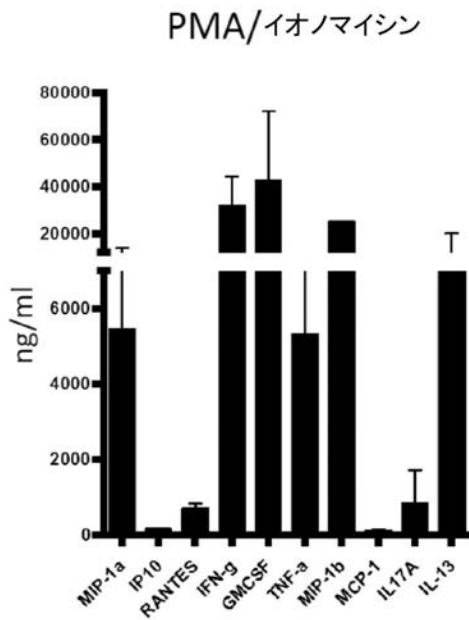
【図 1 4】



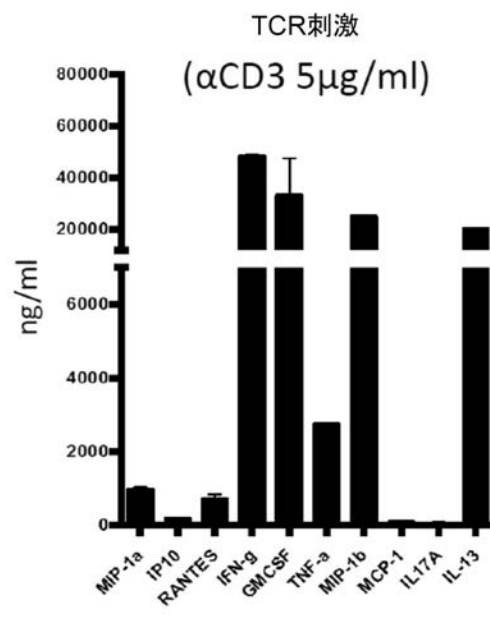
【図 1 5】



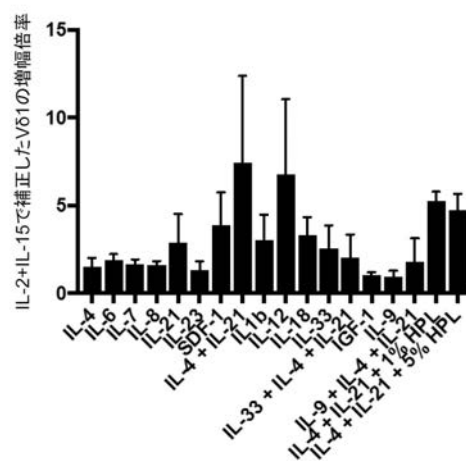
【図 1 6 A】



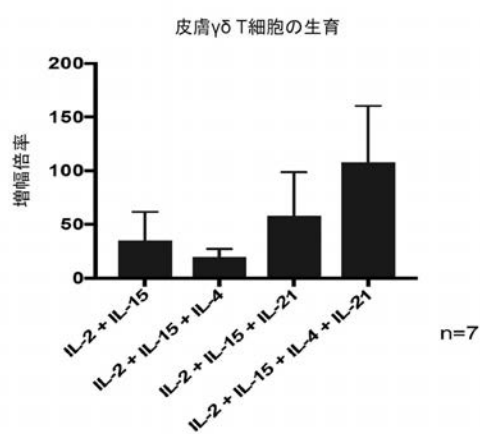
【図 1 6 B】



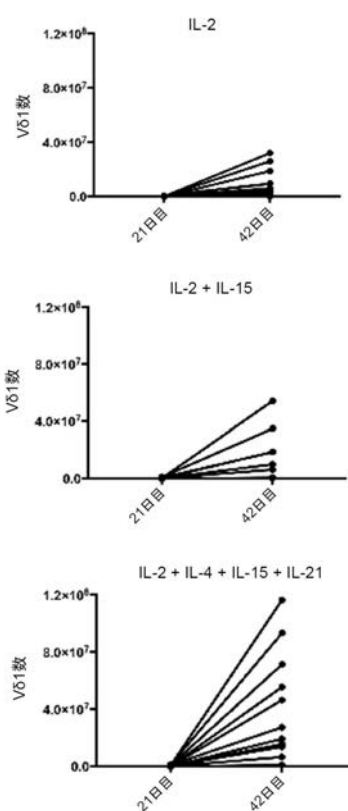
【図 17 C】



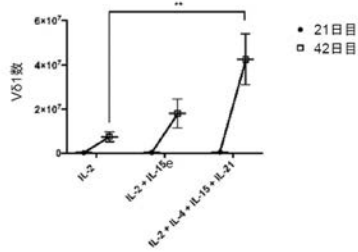
【図 17 E】



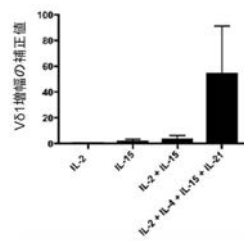
【図 17 D】



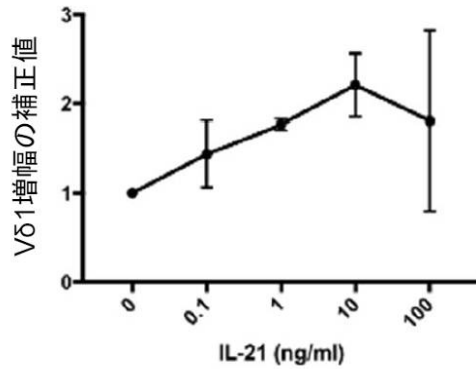
【図 17 F】



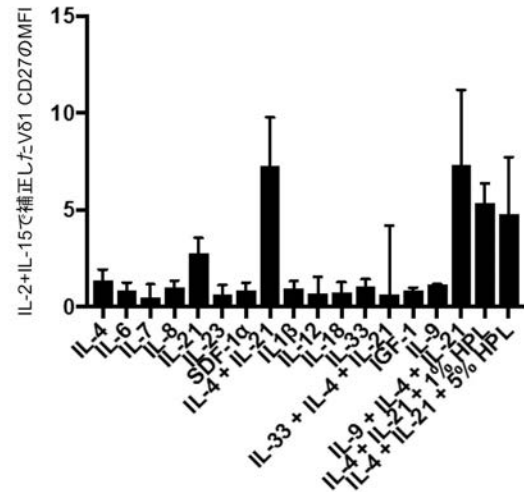
【図 17 H】



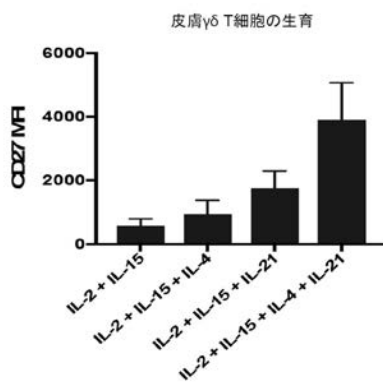
【図 17 G】



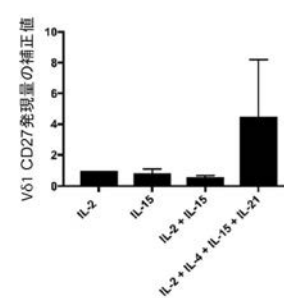
【図 18 A】



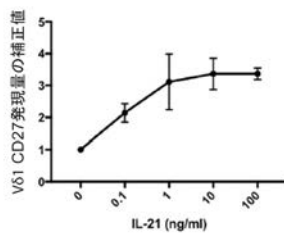
【図 18 B】



【図 18 D】

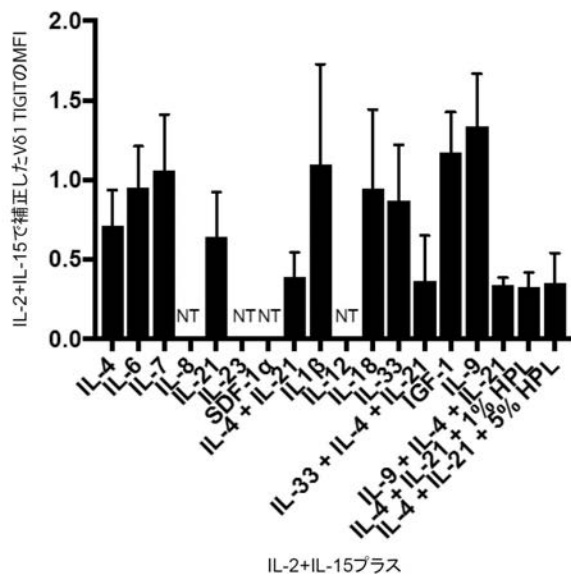


【図 18 C】

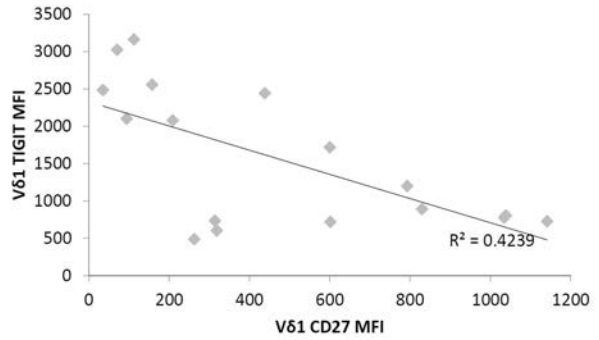


n=7

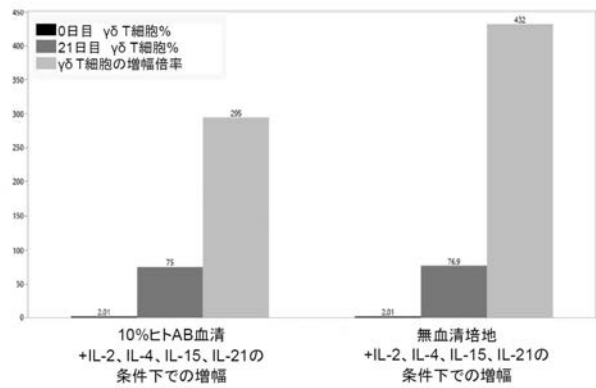
【図 19】



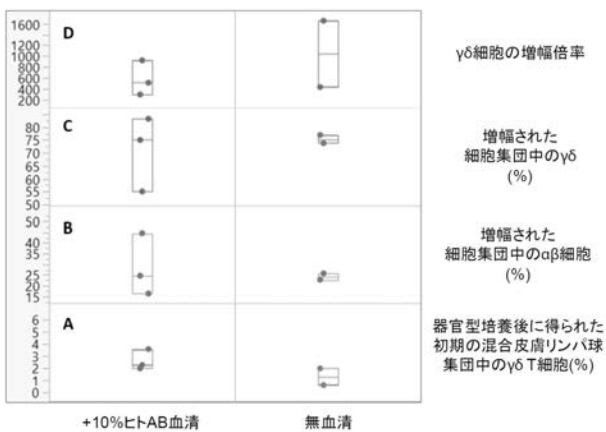
【図 20】



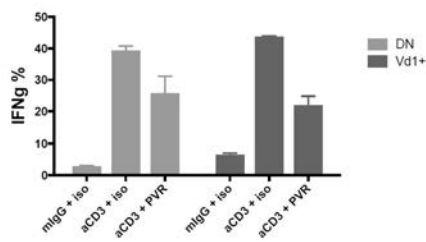
【図 21】



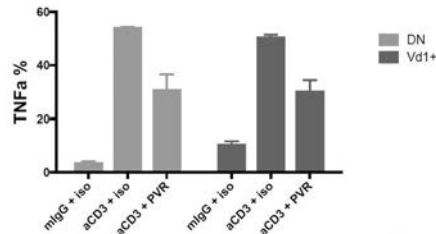
【図 22】



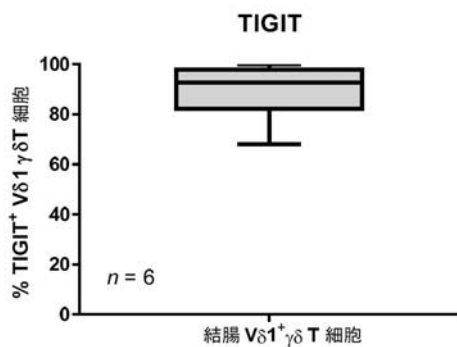
【図 24 A】



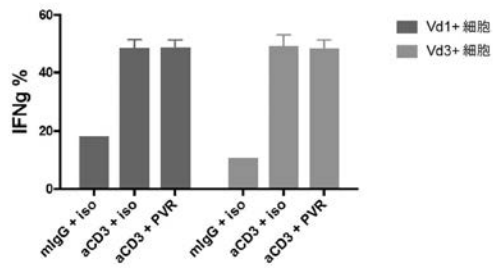
【図 24 B】



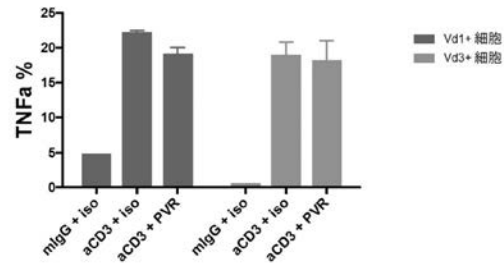
【図 23】



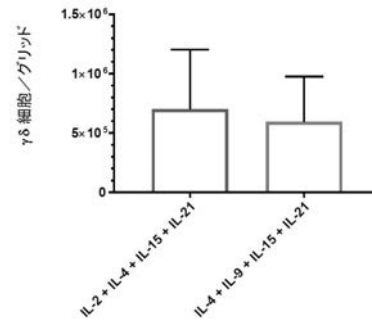
【図 2 5 A】



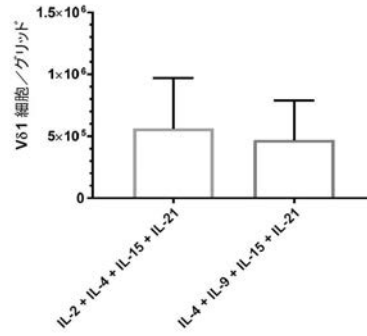
【図 2 5 B】



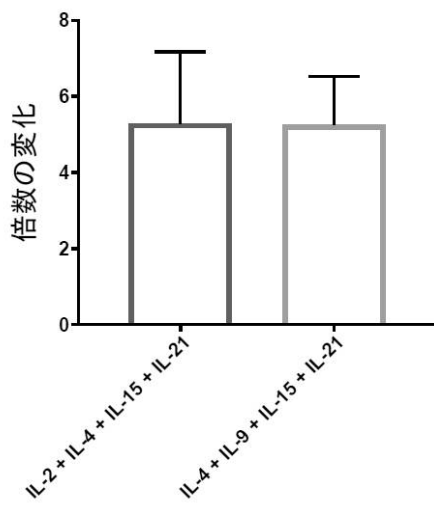
【図 2 6 A】



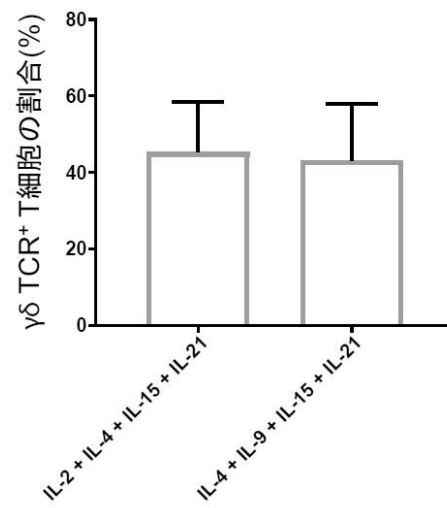
【図 2 6 B】



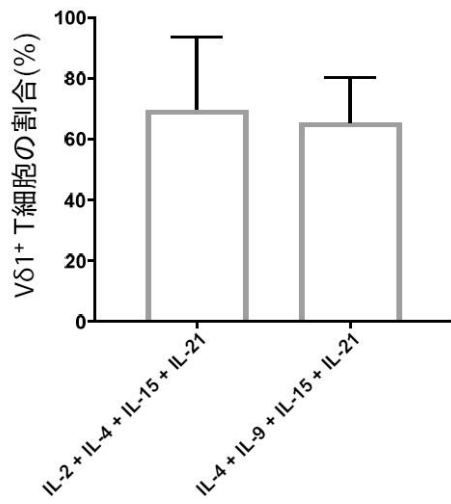
【図 2 7 A】



【図 2 7 B】



【図 27 C】



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2018/061413

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. C12N5/0783 A61K35/17
ADD.

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)

C12N A61K

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

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

EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2015/189356 A1 (POLYBIOCEPT AB [SE]) 17 December 2015 (2015-12-17)	1,3,6-9, 14-19, 21-55, 57,60-77
Y	page 5 - page 7 page 18 - page 19 page 40; claim 31; example 4 ----- -/--	2,4,5, 10-13, 20,56, 58,59

☒ 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

26 June 2018

Date of mailing of the international search report

20/11/2018

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Heiduschat, Carola

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2018/061413

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2016/198480 A1 (LYMPHACT - LYMPHOCYTE ACTIVATION TECH S A [PT]) 15 December 2016 (2016-12-15)	60-77
Y	page 35 - page 40 tables 5, 11, 12 claims 41-62; figures 6, 8; table 11	2,5, 10-12, 20,56, 58,59
A		1,3,4, 7-9, 13-19, 21-55,57
Y	----- WOOLF RICHARD ET AL: "Potential for innate-like responsiveness of resident T cells in human skin: a new perspective on tissue immune-surveillance", THE LANCET (LETTERS TO THE EDITOR), vol. 387, 25 February 2016 (2016-02-25), pages 108-108, XP029434019, ISSN: 0140-6736, DOI: 10.1016/S0140-6736(16)00495-5 page 108	4,13,58, 59
A		1-3, 5-12, 14-57, 60-77
Y	----- Ching-Liang Chu ET AL: "Differential Effects of IL-2 and IL-15 on the Death and Survival of Activated TCRgd1 Intestinal Intraepithelial Lymphocytes1", The Journal of Immunology, 15 February 1999 (1999-02-15), pages 1896-1903, XP055486285, Retrieved from the Internet: URL:http://www.jimmunol.org/content/jimmunol/162/4/1896.full.pdf [retrieved on 2018-06-20] page 1889	58,59
A		1-57, 60-77
	----- -/--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2018/061413

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	V. CHENNUPATI ET AL: "Intra- and Intercompartmental Movement of T Cells: Intestinal Intraepithelial and Peripheral T Cells Represent Exclusive Nonoverlapping Populations with Distinct Migration Characteristics", THE JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 185, no. 9, 24 September 2010 (2010-09-24), pages 5160-5168, XP055486266, US ISSN: 0022-1767, DOI: 10.4049/jimmunol.1001652	58,59
A	page 5161, right-hand column, last paragraph - page 162, left-hand column, paragraph 1 page 5165, right-hand column - page 5166, left-hand column	1-57, 60-77
A	----- M. VON LILIENFELD-TOAL ET AL: "Activated gammadelta T cells express the natural cytotoxicity receptor natural killer p44 and show cytotoxic activity against myeloma cells", CLINICAL & EXPERIMENTAL IMMUNOLOGY, vol. 144, no. 3, 1 June 2006 (2006-06-01), pages 528-533, XP055040686, ISSN: 0009-9104, DOI: 10.1111/j.1365-2249.2006.03078.x page 529, left-hand column page 531	1-77
A	----- Matthias Eberl ET AL: "Accumulation of a potent gammadelta T-cell stimulator after deletion of the lytB gene in Escherichia coli", Immunology, 1 June 2002 (2002-06-01), pages 200-211, XP055425566, England DOI: 10.1046/j.1365-2567.2002.01414.x Retrieved from the Internet: URL: http://onlinelibrary.wiley.com/store/10.1046/j.1365-2567.2002.01414.x/asset/j.1365-2567.2002.01414.x.pdf?v=1&t=ja26nistr&s=e20bb925ff58687e34adb73a5cc06b8c97de538e [retrieved on 2018-06-20] page 201, right-hand column - page 202, left-hand column page 208 - page 209; figure 7 ----- -/--	1-77

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2018/061413

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2012/156958 A2 (INST DE MEDICINA MOLECULAR [PT]; DE CARVALHO E SILVA SANTOS BRUNO MIGU) 22 November 2012 (2012-11-22) page 17 page 19 - page 21; claims 1, 16, 21 -----	1-77
A	WO 2016/081518 A2 (ADICET BIO INC [US]) 26 May 2016 (2016-05-26) page 51 - page 55; examples 4-15 claims 1-8 -----	1-77
A	GLEN M. CHEW ET AL: "TIGIT Marks Exhausted T Cells, Correlates with Disease Progression, and Serves as a Target for Immune Restoration in HIV and SIV Infection", PLOS PATHOGENS, vol. 12, no. 1, 7 January 2016 (2016-01-07), page e1005349, XP055447824, DOI: 10.1371/journal.ppat.1005349 the whole document -----	39,61-65
A	JOHNSTON ROBERT J ET AL: "The Immunoreceptor TIGIT Regulates Antitumor and Antiviral CD8+T Cell Effector Function", CANCER CELL, CELL PRESS, US, vol. 26, no. 6, 26 November 2014 (2014-11-26), pages 923-937, XP029111576, ISSN: 1535-6108, DOI: 10.1016/J.CCELL.2014.10.018 the whole document -----	39,61-65

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2018/061413

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2015189356 A1	17-12-2015	AU 2015273501 A1 CA 2951749 A1 CN 106574244 A EP 3154567 A1 JP 2017525754 A KR 20170031139 A SG 11201610350S A US 2017107490 A1 WO 2015189356 A1 WO 2015189357 A1	12-01-2017 17-12-2015 19-04-2017 19-04-2017 07-09-2017 20-03-2017 27-01-2017 20-04-2017 17-12-2015 17-12-2015
WO 2016198480 A1	15-12-2016	AU 2016274633 A1 CA 2988050 A1 EP 3307875 A1 KR 20180026726 A US 2018169147 A1 WO 2016198480 A1	01-02-2018 15-12-2016 18-04-2018 13-03-2018 21-06-2018 15-12-2016
WO 2012156958 A2	22-11-2012	CN 103635573 A EP 2710123 A2 ES 2643387 T3 JP 6086904 B2 JP 2014515259 A PT 2710123 T US 2014141513 A1 WO 2012156958 A2	12-03-2014 26-03-2014 22-11-2017 01-03-2017 30-06-2014 13-10-2017 22-05-2014 22-11-2012
WO 2016081518 A2	26-05-2016	AU 2015350103 A1 CA 2966634 A1 CN 107249605 A EP 3220926 A2 JP 2017535292 A KR 20170101206 A US 2016175358 A1 WO 2016081518 A2	29-06-2017 26-05-2016 13-10-2017 27-09-2017 30-11-2017 05-09-2017 23-06-2016 26-05-2016

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I テーマコード (参考)
A 6 1 K 45/00 (2006.01) A 6 1 K 45/00

(81)指定国・地域 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(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),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT

(72)発明者 ビートソン, リチャード
 イギリス国 ダブリュシー２アール ２エル ロンドン, ストランド, キングス カレッジ ロンドン

(72)発明者 ハイデイ, エイドリアン
 イギリス国 ダブリュシー２アール ２エル ロンドン, ストランド, キングス カレッジ ロンドン

(72)発明者 ヌスバウマー, オリバー
 イギリス国 ダブリュシー２アール ２エル ロンドン, ストランド, キングス カレッジ ロンドン

(72)発明者 ウルフ, リチャード
 イギリス国 ダブリュシー２アール ２エル ロンドン, ストランド, キングス カレッジ ロンドン

(72)発明者 イアンニット, マリア ルイサ
 イギリス国 ダブリュシー２アール ２エル ロンドン, ストランド, キングス カレッジ ロンドン

(72)発明者 マウント, ナタリー
 イギリス国 ダブリュ 1 2 7エフキュー, ロンドン, ホワイト シティ プレイス, ウッド レーン 195, ウェストワークス, ガンマデルタ セラピューティクス リミティッド

Fターム(参考) 4B065 AA90X BB19 BB32 BD39 CA44
 4C084 AA19 NA05 ZA362 ZB072 ZB212
 4C087 AA01 AA02 AA03 BB37 CA04 NA14 ZB21 ZB26 ZB32