

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2008年11月27日 (27.11.2008)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2008/143255 A1

(51) 国際特許分類:

C12N 5/06 (2006.01) A61P 31/16 (2006.01)
A61K 35/24 (2006.01) A61P 31/18 (2006.01)
A61P 1/16 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01) A61P 35/02 (2006.01)
A61P 31/06 (2006.01) C12N 5/02 (2006.01)
A61P 31/10 (2006.01) C12N 5/10 (2006.01)
A61P 31/12 (2006.01) C12N 15/09 (2006.01)

代 (SAKAI, Fumiyo). 蘆田 尚子 (ASHIDA, Naoko). 加藤 彰子 (KATO, Akiko). 榎 竜嗣 (ENOKI, Tatsuji). 加藤 郁之進 (KATO, Ikunoshin).

(74) 代理人: 細田 芳徳 (HOSODA, Yoshinori); 〒5406591 大阪府大阪市中央区大手前一丁目7番31号 OMMビル5階 私書箱26号 細田国際特許事務所内 Osaka (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP2008/059238

(22) 国際出願日: 2008年5月20日 (20.05.2008)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:

特願2007-135266 2007年5月22日 (22.05.2007) JP
特願 2007-272535
2007年10月19日 (19.10.2007) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): タカラバイオ株式会社 (TAKARA BIO INC.) [JP/JP]; 〒5202193 滋賀県大津市瀬田三丁目4番1号 Shiga (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 出野 美津子 (IDENO, Mitsuko). 山下 周作 (YAMASHITA, Shusaku). 富田 啓祐 (TOMITA, Keisuke). 村木 信子 (MURAKI, Nobuko). 高島 扶有子 (TAKASHIMA, Fuyuko). 長嶺 衣子 (NAGAMINE, Kinuko). 酒井 文

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

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

添付公開書類:

— 国際調査報告書
— 電子形式により別個に公開された明細書の配列表部分、請求に基づき国際事務局から入手可能

(54) Title: METHOD FOR PRODUCTION OF CELL POPULATION

(54) 発明の名称: 細胞集団の製造方法

(57) Abstract: Disclosed is a method for producing a cell population, which involves the following steps (1) and (2): (1) removing a CD8-positive T cell from a cell population containing T cells or collecting a CD4-positive T cell from the cell population to prepare a cell population to be cultured; and (2) culturing the cell population produced in the step (1) in the presence of the following components (A) and (B) [(A): at least one component selected from the group consisting of a fibronectin, a fragment of the fibronectin and a mixture of the fragment of the fibronectin; and (B): a CD3 ligand]. A cell population produced by the method is extremely useful for the treatment of a disease by a cell therapy.

(57) 要約: 工程(1): T細胞を含有する細胞集団からCD8陽性T細胞を除去、もしくはCD4陽性T細胞を採取することにより培養に供する細胞集団を調製する工程、及び工程(2): 前記工程(1)で得られた細胞集団を、下記(A)及び(B)の存在下で培養する工程[(A)フィブロネクチン、フィブロネクチンのフラグメント及びフィブロネクチンのフラグメントの混合物からなる群より選択される少なくとも1つ(B)CD3リガンド]を包含することの特徴とする細胞集団の製造方法。当該製造方法により得られる細胞集団は、細胞医療による疾患の治療に極めて有用である。

WO 2008/143255 A1

明 細 書

細胞集団の製造方法

技術分野

[0001] 本発明は、医療分野において有用な細胞集団を製造する方法に関する。

背景技術

[0002] 生体は主として免疫応答により異物から守られており、免疫システムはさまざまな細胞とそれが作り出す可溶性の因子によって成り立っている。なかでも中心的な役割を果たしているのが白血球、特にリンパ球である。このリンパ球はBリンパ球(以下、B細胞と記載する)とTリンパ球(以下、T細胞と記載する)という2種類の主要なタイプに分けられ、いずれも抗原を特異的に認識し、これに作用して生体を防御する。

[0003] T細胞は、末梢ではCD(Cluster of Differentiation)4マーカを有するCD4陽性T細胞とCD8マーカを有するCD8陽性T細胞が大部分を占める。CD4陽性T細胞の大部分は、ヘルパーT細胞(以下、Th細胞と記載する)と呼ばれ、抗体産生の補助や種々の免疫応答の誘導に関与し、抗原刺激により産生するサイトカインの種類が異なるTh1型(1型ヘルパーT細胞)あるいはTh2型(2型ヘルパーT細胞)に分化する。CD8陽性T細胞の大部分は、抗原刺激により細胞傷害活性を示す細胞傷害性T細胞[(cytotoxic T lymphocyte)、以下、CTLと記載する]に分化する。

[0004] 外科手術、化学療法、放射線療法に次ぐ第4のがんの治療法として、免疫療法が近年関心を集めている。免疫療法は本来ヒトが有する免疫力を利用するため、患者への肉体的負担が他の治療法と比べて軽いと言われている。免疫療法には体外で誘導したCTLや末梢血単核球などから種々の方法で拡大培養して得られるリンフォカイン活性化細胞、NKT細胞、 γ δ T細胞などを移入する療法、体内での抗原特異的CTLの誘導を期待する樹状細胞移入療法やペプチドワクチン療法、Th1細胞療法、更にこれら細胞に種々の効果を期待できる遺伝子を体外で導入して体内に移入する免疫遺伝子療法などが知られている。

[0005] 従来、免疫療法において、細胞傷害活性を示すCTLを利用した細胞医療が進め

られているが、最近、前記CTLの活性を補助するTh細胞を利用したTh細胞医療が注目されている(例えば、非特許文献1、特許文献1)。前記のとおり、Th細胞は、Th1型とTh2型に分けられる。Th1型は、インターフェロン γ (IFN- γ)、インターロイキン(IL)-2などのサイトカインを産生し、細胞性免疫のエフェクターとして働く。一方、Th2型は、IL-4、IL-5、IL-13などのサイトカインを産生し、液性免疫の調節を担っている。細胞医療においては、細胞性免疫のエフェクターであるTh1型が重要であると考えられている。

[0006] 近年、免疫療法において、すでに終末分化したエフェクターT細胞よりも、より未分化な状態のナイーブT細胞やセントラルメモリーT細胞が注目されている。ナイーブT細胞は、抗原により一度も活性化されていない細胞であり、CD4陽性のナイーブT細胞に対し、抗原とサイトカイン存在下で培養することにより、Th1型及びTh2型サブセットが誘導できることが明らかとなっている。ナイーブT細胞は、CD45RA、CD62L、CCR7などのリンパ球の細胞表面抗原マーカーを発現することが知られている。

[0007] 前記のとおり、Th1型CD4陽性T細胞やナイーブT細胞を初めとするCD4陽性T細胞は、細胞医療や遺伝子治療の分野において重要であり、細胞集団の製造においては、細胞増殖効率が高く、治療に適した細胞が多く得られる工程を含む方法の開発が望まれている。

非特許文献1:Chamoto K. 他9名、Cancer Research、2006年、Vol. 66(3)、P1809~1817

特許文献1:特開2005-179299号公報

発明の開示

発明が解決しようとする課題

[0008] 本発明の目的は、細胞治療に有効な細胞集団の製造方法を提供することにある。

課題を解決するための手段

[0009] 本発明の第1の発明は、下記工程を包含することを特徴とする細胞集団の製造方法に関する。

工程(1):T細胞を含有する細胞集団からCD8陽性T細胞を除去、もしくはCD4陽性T細胞を採取することにより培養に供する細胞集団を調製する工程、及び

工程(2):前記工程(1)で得られた細胞集団を、下記(A)及び(B)の存在下で培養する工程

(A)フィブロネクチン、フィブロネクチンのフラグメント及びフィブロネクチンのフラグメントの混合物からなる群より選択される少なくとも1つ

(B)CD3リガンド

[0010] 本発明の第1の発明は、工程(1)又は工程(2)の実施前に細胞亜集団を採取又は除去する工程を包含しても良く、工程(2)で得られる細胞集団を(A)及び／又は(B)の非存在下で更に培養する工程を包含しても良い。また、工程(1)又は工程(2)で得られた細胞集団に遺伝子を導入する工程を包含しても良い。

[0011] 本発明の第2の発明は、製造方法が本発明の第1の発明の製造方法による、下記より選択される細胞集団の製造方法に関する。

細胞集団(a):Th1型CD4陽性T細胞を含有する細胞集団

細胞集団(b):CD4陽性CD45RA陽性CCR7陽性T細胞を含有する細胞集団

細胞集団(c):CD4陽性CD45RA陽性CD62L陽性T細胞を含有する細胞集団

[0012] 本発明の第3の発明は、本発明の第1の発明の製造方法により得られる細胞集団に関する。

[0013] 本発明の第4の発明は、本発明の第1の発明の製造方法により得られる細胞集団を含有する医薬に関する。

[0014] また、本発明の別の態様では、本発明の第1の発明により得られる細胞集団に、CD8陽性CD45RA陽性CCR7陽性T細胞を含有する細胞集団を添加して培養することによりCD8陽性CD45RA陽性CCR7陽性T細胞を高効率に得ることができる。すなわち、本発明は、下記工程を包含することを特徴とする細胞集団の製造方法も提供する。

工程(2-1):T細胞を含有する細胞集団からCD8陽性T細胞を除去する、もしくはCD4陽性T細胞を採取する工程

工程(2-2):前記工程(2-1)で得られた細胞集団を、下記(A)及び(B)の存在下で培養する工程

(A)フィブロネクチン、フィブロネクチンのフラグメント及びフィブロネクチンのフラグ

メントの混合物からなる群より選択される少なくとも1つ

(B) CD3リガンド

工程(2-3): 前記工程(2-2)で得られた細胞集団と、CD8陽性CD45RA陽性CCR7陽性T細胞を含有する細胞集団を混合し培養する工程

なお、工程(2-3)の培養は、工程(2-2)の条件、すなわち(A)フィブロネクチン、フィブロネクチンのフラグメント及びフィブロネクチンのフラグメントの混合物からなる群より選択される少なくとも1つ、及び(B)CD3リガンドの存在下で実施することが好ましい。

[0015] また、本発明者らは、T細胞を含有する細胞集団の培養において、CD8陽性T細胞とCD4陽性T細胞の比率として、CD8陽性T細胞数を2とした場合CD4陽性T細胞数を1以上、好適にはCD8陽性T細胞数を1とした場合CD4陽性T細胞数を1以上である細胞集団を用いて培養を実施することにより、CD8陽性CD45RA陽性CCR7陽性T細胞を高効率に得ることができることを見出した。すなわち、本発明の別の態様としては、下記工程を包含することを特徴とする細胞集団の製造方法を提供する。

工程(3-1): CD8陽性T細胞とCD4陽性T細胞の比率が2:1以上である細胞集団を得る工程

工程(3-2): 前記工程(3-1)にて得られた細胞集団をCD3リガンドの存在下で培養する工程

なお、当該工程(3-2)の培養は、CD3リガンドの存在下に加えて、好適には、フィブロネクチン、フィブロネクチンのフラグメント及びフィブロネクチンのフラグメントの混合物からなる群より選択される少なくとも1つの存在下で実施することが望ましい。

[0016] また、本発明者らは、フィブロネクチン、フィブロネクチンのフラグメント及びフィブロネクチンのフラグメントの混合物からなる群より選択される少なくとも1つの存在下でT細胞を含有する細胞集団を培養することにより、得られる細胞集団からのIL-5及びIL-9の産生が抑制されていることを見出した。すなわち、本発明の別の態様としては、フィブロネクチン、フィブロネクチンのフラグメント及びフィブロネクチンのフラグメントの混合物からなる群より選択される少なくとも1つを有効成分として含有することを

特徴とするIL-5産生抑制剤又はIL-9産生抑制剤、当該有効成分を投与する工程を含むIL-5又はIL-9の産生抑制方法を提供する。さらには、本発明により、フィブロネクチン、フィブロネクチンのフラグメント及びフィブロネクチンのフラグメントの混合物からなる群より選択される少なくとも1つの存在下でT細胞を含有する細胞集団を培養する工程を実施して得られる、IL-5又はIL-9産生量の低い細胞集団、及びその製造方法が提供される。

[0017] また、本発明者らは、VLA-4結合性オリゴペプチド及び／又はフィブロネクチンのヘパリン結合ドメインの一部を含有するオリゴペプチドにT細胞集団の増殖抑制作用があることを見出した。すなわち、本発明の別の態様は、VLA-4結合性オリゴペプチド及び／又はフィブロネクチンのヘパリン結合ドメインの一部を含有するオリゴペプチドを有効成分とする、T細胞集団の増殖調節剤を提供する。VLA-4結合性オリゴペプチドとしては、LDFPもしくはLDVPで表されるアミノ酸配列を含むオリゴペプチドが例示される。また、ヘパリン結合ドメイン由来オリゴペプチドとしては、LIGRKKで表されるアミノ酸配列を含むオリゴペプチドが例示される。

[0018] また、本発明者らは、本発明の別の態様として新規な改変型フィブロネクチンフラグメントとそれをコードする核酸、及び当該フラグメントを用いたリンパ球の製造方法を提供する。すなわち、本発明により、下記(a)及び(b)から選択されるポリペプチドが提供される。

(a)配列表の配列番号29、36、38、44、46、51、53、58、60、66、68、71、73、75、79、83及び85で表されるアミノ酸配列からなる群より選択される少なくとも1つのアミノ酸配列を含むポリペプチド

(b)前記(a)のポリペプチドのアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、挿入、付加もしくは置換したアミノ酸配列を含むポリペプチドであって、前記(a)のポリペプチドと同等な機能を有する新規なポリペプチド

[0019] また本発明により、下記の(c)～(g)から選択される核酸が提供される。

(c)配列表の配列番号29、36、38、44、46、51、53、58、60、66、68、71、73、75、79、83及び85で表されるアミノ酸配列からなる群より選択される少なくとも1つのアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする核酸

(d)配列表の配列番号29、36、38、44、46、51、53、58、60、66、68、71、73、75、79、83及び85で表されるアミノ酸配列からなる群より選択される少なくとも1つのアミノ酸配列において、1もしくは数個のアミノ酸が欠失、挿入、付加もしくは置換したアミノ酸配列を含むポリペプチドであって、配列表の配列番号29、36、38、44、46、51、53、58、60、66、68、71、73、75、79、83及び85で表されるアミノ酸配列から選択されるアミノ酸配列を含むポリペプチドと同等な機能を有するポリペプチドをコードする核酸

(e)配列表の配列番号30、37、39、45、47、52、54、59、61、67、69、72、74、76、80、84及び86で表される塩基配列からなる群より選択される塩基配列からなる核酸

(f)前記(e)の核酸とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする核酸であって、当該核酸によってコードされるポリペプチドが、前記(e)の核酸によってコードされるポリペプチドと同等な機能を有する核酸

(g)前記(e)の核酸の塩基配列において、1もしくは数個の塩基の置換、欠失、挿入あるいは付加のいずれか1以上が生じた核酸であって、当該核酸によってコードされるポリペプチドが、前記(e)の核酸によってコードされるポリペプチドと同等な機能を有する核酸

[0020] また、本発明の別の態様として、前記(a)及び(b)から選択されるポリペプチドの存在下でT細胞を含有する細胞集団を培養する工程を含有するリンパ球の製造方法も提供される。当該培養工程は、好適にはCD3リガンドの存在下で実施される。

[0021] 更に本発明の別の態様として、少なくとも前記(A)及び(B)の存在下でT細胞を含有する細胞集団を培養する工程を包含する培養リンパ球の製造方法が提供され、細胞医療の目的に応じた能力の細胞集団の提供が可能になる。特に本発明で提供される細胞集団は細胞医療において障害となる制御性T細胞含有比率が低いことにおいて臨床上、高い優位性をもつ。

[0022] また当該方法により下記より選択される細胞集団が提供される。

細胞集団(1):CD4陽性ナイーブT細胞含有率が高い細胞集団

細胞集団(2):Th1型CD4陽性T細胞含有率が高い細胞集団

細胞集団(3):Th2型CD4陽性T細胞含有率が低い細胞集団

細胞集団(4):CD4陽性制御性T細胞含有率が低い細胞集団

細胞集団(5):癌抗原、ウイルス抗原、非自己抗原などの存在下で細胞傷害活性が上昇する細胞集団

発明の効果

- [0023] 本発明により、CD4陽性T細胞を高含有する細胞集団の製造方法が提供される。当該製造方法は細胞増殖率が高く、また当該製造方法により得られる細胞集団は、Th1型CD4陽性T細胞、CD4陽性CD45RA陽性CCR7陽性T細胞、CD4陽性CD45RA陽性CD62L陽性T細胞、CD4陽性CD45RA陽性CCR7陽性CD62L陽性T細胞の比率が高く、Th2型CD4陽性T細胞、CD4陽性制御性T細胞の比率が低く、細胞免疫療法による疾患の治療に極めて有用である。

発明を実施するための最良の形態

- [0024] 本発明において、「T細胞」はTリンパ球とも呼ばれ、免疫応答に関与するリンパ球のうち胸腺に由来する細胞を意味する。T細胞には、ヘルパーT細胞(Th1型及びTh2型)、サプレッサーT細胞、制御性T細胞、CTL、ナイーブT細胞、メモリーT細胞、 α 鎖と β 鎖のTCRを発現する $\alpha\beta$ T細胞、 γ 鎖と δ 鎖のTCRを発現する $\gamma\delta$ T細胞が含まれる。本発明の原料として用いられる「T細胞を含有する細胞集団」としては、血液(末梢血、臍帯血など)、骨髓液の他、これらより採取、単離、精製又は誘導された末梢血単核細胞(PBMC)、血球系細胞、造血幹細胞、臍帯血単核細胞などを含む細胞集団などが例示される。これらの細胞はIL-2などのサイトカインにより生体内(イン・ビボ)や生体外(エクス・ビボ)で活性化されていても良い。これらの細胞は生体から採取されたもの、あるいは生体外での培養を経て得られたもの、例えば本発明の方法により得られた細胞集団をそのままもしくは凍結保存したもののいずれも使用することができる。

- [0025] 本発明において、「フィブロネクチン(以下、FNと記載)」、「FNのフラグメント」及び「FNのフラグメントの混合物」は、天然から得られたもの、又は人為的に合成されたもの、すなわち非天然のもののものであっても良い。FN及びそのフラグメントは、例えば、ルオスラーティ E. ら[Ruoslahti E., et al.、ジャーナル・オブ・バイオロジカル

・ケミストリー(J. Biol. Chem.), 第256巻、第14号、第7277～7281頁(1981)]の開示に基づき、天然起源の物質から実質的に純粋な形態で製造することができる。ここで、本明細書に記載された実質的に純粋なFN又はFNのフラグメントとは、これらが天然においてFNと一緒に存在する他のタンパク質を本質的に含有していないことを意味する。上記のFN及びFNのフラグメントは、それぞれ単独で、もしくは複数の種類のものを混合して本発明に使用することができる。

[0026] なお、FNは多くのスプライシングバリエーションの存在が知られているが、本発明に使用されるFNとしては、本発明の所望の効果を発現するものであれば、いずれのバリエーションも使用することができる。例えば、血漿由来のFNの場合、細胞結合ドメインの上流に存在するED-Bと呼ばれる領域、細胞結合ドメインとヘパリン結合ドメインの間に存在するED-Aと呼ばれる領域が欠失していることが知られているが、このような血漿由来のFNも本発明に使用することができる。

[0027] なお、FNは分子量25万の巨大なタンパク質であり、操作上や所望の効果の発現の観点からはFNのフラグメントを使用することが好ましい。本発明に使用できるFNフラグメント、並びに該フラグメントの調製に関する有用な情報は、キミヅカ F. ら[Kimizuka F. , et al. , ジャーナル・オブ・バイオケミストリー(J. Biochem.), 第110巻、284～291頁(1991)]、コーンブリット A. R. ら[Kornblihtt A. R. , et al. , EMBO ジャーナル(EMBO J.), 第4巻、第7号、1755～1759(1985)]、及びセキグチ K. ら[Sekiguchi K. , et al. , バイオケミストリー(Biochemistry), 第25巻、第17号、4936～4941(1986)]などより得ることができる。また、FNをコードする核酸配列又はFNのアミノ酸配列については、Genbank Accession No. NM_002026、NP_002017に開示されている。

[0028] 本発明に使用できるFNフラグメントは、III-8、9、10、11、12、13、14もしくはCS-1のいずれかのドメインを含むフラグメントが好ましく、更に複数のドメインが繰り返し連結されたフラグメントであっても良い。例えば、VLA-5へのリガンドを含む細胞結合ドメイン(Cドメイン)、ヘパリン結合ドメイン(Hドメイン)、VLA-4へのリガンドであるCS-1ドメインなどを含有するフラグメントが本発明に使用される。前記フラグメントとしては、例えば前記のJ. Biochem. , 第110巻、284～291頁(1991)に

記載されたCH-271、CH-296、H-271、H-296、並びにこれらの誘導体や改変物が例示される。前記のCH-296はレトロネクチン(登録商標)の名称で市販されている。

[0029] 前記FNのフラグメントとしては、配列表の配列番号1～8で表されるアミノ酸配列(FNのIII-8、III-9、III-10、III-11、III-12、III-13、III-14、CS-1ドメイン)を含有するフラグメントが例示され、好適にはFNの細胞結合ドメイン(III-8～III-10までの領域)、ヘパリン結合ドメイン(III-12～III-14までの領域)、CS-1ドメインのいずれかを含有するフラグメントが例示される。ここで、FNのフラグメントとは、上記の配列表の配列番号1～8で表されるアミノ酸配列を重複して含むフラグメントも包含される。本発明に使用されるFNのフラグメントとして、より好適には、配列表の配列番号9～23、29、36、38、44、46、51、53、58、60、66、68、71、73、75、79、83及び85で表されるアミノ酸配列を含むフラグメント、もしくは上記に例示したFNのフラグメントと同等な機能を有する、当該フラグメントを構成するポリペプチドのアミノ酸配列において、1もしくは数個、例えば1～20個、好適には1～10個、より好適には1～5個のアミノ酸の置換、欠失、挿入もしくは付加を有するアミノ酸配列を含むポリペプチドからなるものであっても良い。なお、ここで同等な機能を有するとは、後述の「<3>本発明の細胞集団の製造方法」において配列表の配列番号9～23、29、36、38、44、46、51、53、58、60、66、68、71、73、75、79、83及び85で表されるアミノ酸配列を含むフラグメントと同等の拡大培養率を有すること、もしくは得られるT細胞中のナイーブT様細胞含有率が同等であることを示す。

[0030] アミノ酸の置換などは、本来のポリペプチドの機能が維持され得る範囲内で該ポリペプチドの物理化学的性状などを変化させ得る程度のものであるのが好ましい。例えば、アミノ酸の置換などは、本来のポリペプチドの持つ性質(例えば、疎水性、親水性、電荷、pKなど)を実質的に変化させない範囲の保存的なものが好ましい。例えば、アミノ酸の置換は、1. グリシン、アラニン; 2. バリン、イソロイシン、ロイシン; 3. アスパラギン酸、グルタミン酸、アスパラギン、グルタミン; 4. セリン、スレオニン; 5. リジン、アルギニン; 6. フェニルアラニン、チロシンの各グループ内での置換であり、アミノ酸の欠失、付加、挿入は、ポリペプチドにおけるそれらの対象部位周辺の性質に類

似した性質を有するアミノ酸の、対象部位周辺の性質を実質的に変化させない範囲での欠失、付加、挿入が好ましい。

[0031] 以下、本発明の製造工程について具体的に説明する。

本発明は下記工程を包含することを特徴とする、細胞集団の製造方法である。

工程(1): T細胞を含有する細胞集団からCD8陽性T細胞を除去、もしくはCD4陽性T細胞を採取することにより培養に供する細胞集団を調製する工程、及び

工程(2): 前記工程(1)で得られた細胞集団を、下記(A)及び(B)の存在下で培養する工程

(A) フィブロネクチン、フィブロネクチンのフラグメント及びフィブロネクチンのフラグメントの混合物からなる群より選択される少なくとも1つ

(B) CD3リガンド

なお、本明細書において、前記(A)及び(B)を本発明における培養成分と記載することがある。

[0032] <1> 本発明の工程(1)

本発明の製造方法の工程(1)においては、T細胞を含有する細胞集団からCD8陽性T細胞を除去、もしくはCD4陽性T細胞を採取することにより培養に供する細胞集団を調製することが行われる。CD8陽性T細胞の除去は、細胞表面に発現しているCD8を指標として実施することができ、例えば抗CD8抗体が固定化されたビーズや培養容器などの担体とT細胞を含有する細胞集団とを混合し、前記担体に結合したCD8陽性T細胞を除去する、又は、前記担体と結合しない細胞集団を回収することにより実施される。抗CD8抗体が固定化されたビーズとしては、例えば、Dynabeads

M-450 CD8(インビトロジェン社製)、Eligix anti-CD8 mAb coated nickel particles(バイオトランスプラント社製)などが好適に使用できる。以下、本明細書において、T細胞を含有する細胞集団からCD8陽性T細胞を除去した細胞集団を「CD8除去細胞」と称する。

[0033] CD4陽性T細胞の採取は、細胞表面に発現しているCD4を指標として実施することができ、例えば抗CD4抗体が固定化されたビーズや培養容器などの担体とT細胞を含有する細胞集団とを混合し、前記担体に結合したCD4陽性T細胞を回収するこ

とにより実施される。抗CD4抗体が固定化された前記担体は、例えば、CD4 Micro Beads (Miltenyi Biotec社製)、Dynabeads M-450 CD4 (インビトロジェン社製)などが好適に使用できる。

[0034] 本発明において、T細胞を含有する細胞集団からCD8陽性T細胞を除去することにより調製された細胞集団は、具体的にはT細胞を含有する細胞集団としてPBMCを使用した場合、CD4陽性T細胞とともに単球やマクロファージなどを含有する。したがって、T細胞を含有する細胞集団からCD8陽性T細胞を除去することにより調製された細胞集団は、細胞表面に発現しているCD4を指標として選別したCD4陽性T細胞のみからなる細胞集団とは異なる。

[0035] 本発明の工程(1)又は工程(2)の実施前に、例えば特定の細胞表現型を有する任意の細胞重集団を採取又は除去することもできる。当該操作については、特に限定はないが、細胞表面上の適当なマーカー、例えばCDマーカーを指標として実施することができる。例えば抗CD3抗体や後述の実施例3-(2)に記載のとおり、抗CD3抗体及び抗CD28抗体を用いて、前記抗体の認識するマーカーを有する細胞重集団を採取し、本発明に供することができる。しかしながら、操作性、細胞増殖性、Th1型CD4陽性T細胞の比率向上の観点からは、CD3陽性CD28陽性T細胞の採取は実施しないことが好ましいが、製造される細胞集団の用途に応じて適宜実施することもできる。

[0036] <2>本発明の工程(2)

本発明の製造方法の工程(2)により、工程(1)で得られた細胞集団の、下記(A)及び(B)の存在下での培養が実施される。

(A)FN、FNのフラグメント及びFNのフラグメントの混合物からなる群より選択される少なくとも1つ

(B)CD3リガンド

なお、「(A)及び(B)の存在下での培養」とは、(A)及び(B)が共存している状態下での培養のことを意味し、(A)の存在下での培養と(B)の存在下での培養とを組み合わせた培養を意味するものではない。

[0037] 本発明における工程(2)は、培養開始時から少なくとも1日以上、好ましくは2～14

日、より好ましくは2～7日、更に好ましくは3～7日実施される。なお、当該工程(2)は、免疫療法への使用のために製造される細胞集団の培養工程の全期間であっても良く、また一部の期間であっても良い。一部の期間である場合は、当該工程(2)は培養初期に実施されることが好適であり、培養開始時に実施されることがより好適である。

[0038] なお、本願明細書において以下、「(A)FN、FNのフラグメント及びFNのフラグメントの混合物からなる群より選択される少なくとも1つ」を単に「(A)成分」、「(B)CD3リガンド」を単に「(B)成分」と記載することがある。

[0039] 本発明において、(A)成分の培養中の総濃度としては、特に限定はなく、例えば0.001～500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ が好適、0.01～500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ がより好適である。なお、ここで培養中の濃度とは、培地中に当該成分を含有して使用する態様、及び後述の適当な固相に固定化して使用する態様のいずれにも適用される。

[0040] 本発明において、CD3リガンドとしては、CD3に結合活性を有する物質であれば特に限定はないが、例えば抗CD3抗体が例示され、好適には抗CD3モノクローナル抗体が例示され、例えばOKT3[サイエンス(Science)、第206巻、第347～349頁(1979)]が例示される。CD3リガンドの培養中の濃度としては、特に限定はなく、例えば抗CD3モノクローナル抗体を使用する場合は、例えば0.001～100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ が好適、0.01～100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ がより好適である。なお、ここで培養中の濃度とは、培地中に当該成分を含有して使用する態様、及び後述の適当な固相に固定化して使用する態様のいずれにも適用される。

[0041] 本発明の細胞集団の製造方法において使用される培地は、特に限定はなく、T細胞の拡大培養に必要な成分を混合して作製された公知の培地を使用することができ、例えば市販の培地を適宜選択して使用することができる。これらの培地はその本来の構成成分以外にサイトカイン類、適当なタンパク質、その他の成分を含んでいても良い。サイトカイン類としては、例えばIL-2、IL-7、IL-12、IL-15、IFN- γ などが例示され、好適には、IL-2を含有する培地が使用される。IL-2の培地中の濃度としては、特に限定はないが、例えば、好適には0.01～ $1 \times 10^5 \text{U}/\text{mL}$ 、より好適には $1 \sim 1 \times 10^4 \text{U}/\text{mL}$ である。また、適当なタンパク質としては、例えば抗IL-4

抗体やCD28リガンドが例示される。また、この他、レクチンなどのリンパ球刺激因子を添加することもできる。

[0042] 更に、培地中に血清や血漿を添加しても良い。これらの培地中への添加量は特に限定はないが、0容量%超～20容量%が例示され、また培養段階に応じて使用する血清や血漿の量を変更することができる。例えば、血清又は血漿濃度を段階的に減らして使用することもできる。なお、血清又は血漿の由来としては、自己(培養する細胞と由来が同じであることを意味する)もしくは非自己(培養する細胞と由来が異なることを意味する)のいずれでも良いが、好適には安全性の観点から自己由来のものが使用される。

[0043] 本発明において使用される培養開始時の細胞数としては、特に限定はないが、例えば好適には $10\text{ cells/mL} \sim 1 \times 10^8\text{ cells/mL}$ 、より好適には $1 \times 10^2\text{ cells/mL} \sim 5 \times 10^7\text{ cells/mL}$ 、更に好適には $1 \times 10^3\text{ cells/mL} \sim 2 \times 10^7\text{ cells/mL}$ が例示される。また、培養条件に特に限定はなく、通常の細胞培養に使用される条件を使用することができる。例えば、 37°C 、 $5\%\text{CO}_2$ などの条件で培養することができる。また、適当な時間間隔で細胞培養液を新鮮な培地を加えて希釈するか、培地を交換するか、もしくは細胞培養用器材を交換することができる。

[0044] 本発明の細胞集団の製造方法において使用される細胞培養用器材としては、特に限定はないが、例えば、シャーレ、フラスコ、バッグ、大型培養槽、バイオリアクターなどを使用することができる。なお、バッグとしては、細胞培養用 CO_2 ガス透過性バッグを使用することができる。また、工業的に大量の細胞集団を製造する場合には、大型培養槽を使用することができる。また、培養は開放系、閉鎖系のいずれでも実施することができるが、好適には得られる細胞集団の安全性の観点から閉鎖系で培養を行うことが好ましい。

[0045] なお、(A)成分や(B)成分、刺激因子、上記培地中に含まれる適当なタンパク質、その他の成分は培地中に溶解して共存させる他、適切な固相、例えばシャーレ、フラスコ、バッグなどの細胞培養用器材(開放系のもの、及び閉鎖系のもののいずれをも含む)、又はビーズ、メンブレン、スライドガラスなどの細胞培養用担体に固定化して使用しても良い。なお、本明細書において刺激因子とは、抗原を提示しうる能力を有

する細胞、抗原の提示された細胞、抗原、CD28リガンド、サイトカイン、ケモカイン及びサイトカインを産生する能力を有する細胞からなる群より選択される。例えば、ビーズに固定化する場合、1つのビーズに複数種類の成分を混合して固定化して調製しても良く、1つのビーズに1種類の成分を固定化して複数の種類のビーズを調製しても良い。それらの固相の材質は細胞培養に使用可能なものであれば特に限定されるものではない。前記の各種成分を細胞培養用器材や細胞培養用担体に固定化する場合、好適には、培養時の使用培地量に対する当該成分の量の割合が前記成分を培地中に溶解して用いる際の濃度と同様の割合となるように調整されるが、所望の効果が得られればこの割合に限定されるものではない。

[0046] (A)成分や(B)成分、その他の成分の固相への固定化方法としては、特に限定はないが、例えば、適当な緩衝液の中でこれらの物質を固相と接触させることにより固定化することができる。また、(A)成分の固相への固定化については、国際公開第97/18318号パンフレット、並びに国際公開第00/09168号パンフレットに記載の方法によっても固定化を実施することができる。

[0047] 前記の種々の成分や、本発明に使用される培養成分を固相に固定化しておけば、本発明の方法により細胞集団を培養した後、該細胞集団と固相とを分離するのみで、前記の有効成分などを除去することができ、該細胞集団への有効成分などの混入を防ぐことができる。

[0048] 本発明の方法の工程(2)において、培養を実施する前に、工程(1)で得られた細胞に遺伝子を導入しても良い。なお、遺伝子の導入手段には特に限定はなく、公知の遺伝子導入方法により適切なものを選択して使用することができる。前記の遺伝子導入方法としては、ウイルスベクターを使用する方法、該ベクターを使用しない方法のいずれもが本発明に使用できる。それらの方法の詳細についてはすでに多くの文献が公表されている。なお、工程(2)の培養後に、遺伝子を導入する工程を更に包含しても良いのは当然である。

[0049] 前記ウイルスベクターには特に限定はなく、通常、遺伝子導入方法に使用される公知のウイルスベクター、例えば、レトロウイルスベクター(レンチウイルスベクター、シェードタイプベクターを包含する)、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクタ

一、シミアンウイルスベクター、ワクシニアウイルスベクター又はセンダイウイルスベクターなどが使用される。好適には、レトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター又はレンチウイルスベクターが使用される。上記ウイルスベクターとしては、感染した細胞中で自己複製できないように複製能を欠損させたものが好適である。また、遺伝子導入の際にレトロネクチン(登録商標、タカラバイオ社製)などの遺伝子導入効率を向上させる物質を用いることもできる。

[0050] ウイルスベクターを使用しない遺伝子導入方法としては、本発明を限定するものではないが、例えば、リポソーム、リガンドーポリリジンなどの担体を使用する方法やリン酸カルシウム法、エレクトロポレーション法、パーティクルガン法などを使用することができる。この場合にはプラスミドDNA、直鎖状DNAやRNAに組み込まれた外来遺伝子が導入される。

[0051] レトロウイルスベクター並びにレンチウイルスベクターは、当該ベクターが導入される細胞の染色体DNA中に該ベクターに挿入されている外来遺伝子を安定に組み込むことができ、遺伝子治療などの目的に使用されている。

[0052] 導入される外来遺伝子には特に限定はなく、本発明の製造方法により得られる細胞集団を使用する免疫療法や対象疾患に応じて、任意の遺伝子を選ぶことができる。このような遺伝子としては、例えば、タンパク質(例えば、酵素、サイトカイン類、レセプター類など)をコードするものの他、アンチセンス核酸やsiRNA (small interfering RNA)、リボザイムをコードするものが使用できる。また、遺伝子導入された細胞の選択を可能にする適当なマーカー遺伝子を同時に導入しても良い。

[0053] 前記の外来遺伝子は、例えば、適当なプロモーターの制御下に発現されるようにベクターやプラスミドなどに挿入して使用することができる。また、効率の良い遺伝子の転写を達成するために、プロモーターや転写開始部位と協同する他の調節要素、例えば、エンハンサー配列やターミネーター配列がベクター内に存在していても良い。また、外来遺伝子を相同組換えにより導入対象の細胞の染色体へ挿入することを目的として、例えば、該染色体における該遺伝子の所望の標的挿入部位の両側にある塩基配列に各々相同性を有する塩基配列からなるフランキング配列の間に外来遺伝子を配置させても良い。導入される外来遺伝子は天然のものでも、又は人工的に

作製されたものでも良く、あるいは起源を異にするDNA分子がライゲーションなどの公知の手段によって結合されたものであっても良い。更に、その目的に応じて天然の配列に変異が導入された配列を有するものであっても良い。

[0054] 細胞集団の製造方法のその他条件については、公知の方法により実施することができ、例えば上記(A)成分の存在下での培養を実施することにより得られる細胞集団の製造方法については、例えば国際公開第03/016511号パンフレット、国際公開第03/080817号パンフレット、国際公開第2005/019450号パンフレット、特開2007-061020、国際公開第2007/020880号パンフレット、もしくは国際公開第2007/040105号パンフレットに記載の方法を参考に実施することができる。

[0055] <3>本発明の細胞集団の製造方法

本発明の製造方法は、その製造の過程において細胞集団の細胞増殖率が高いことを1つの特徴とする。本明細書において、細胞増殖率は拡大培養率とも記載する。細胞増殖率は、ある一定の培養期間において、培養開始時の細胞数が培養後に何倍に増殖したのかを示す数値である。ここで、細胞増殖率が高いとは、前記の工程(2)において前記の(A)成分及び(B)成分の存在下で培養した時の細胞集団の細胞増殖率が、前記の(A)成分の非存在下での培養における細胞集団の細胞増殖率と比較して高いことを意味する。好適には本発明の培養条件ではない場合と比較して5%以上、より好ましくは10%以上高い細胞増殖率で細胞集団を得ることができる。

[0056] 本発明の製造方法において、工程(2)における細胞集団の培養をCD28リガンド(例えば抗CD28抗体)存在下で実施しても良く、CD28リガンド非存在下で実施しても良い。以下の実施例で示すとおり、細胞増殖率、操作性、コスト、Th1型CD4陽性T細胞の含有率の向上、CD4陽性ナイーブT様細胞の含有率の向上の観点から、抗CD28抗体非存在下で実施することが好ましい。

[0057] 本発明の製造方法において、前記の工程(2)を抗CD28抗体の非存在下で実施することにより、Th1型CD4陽性T細胞の含有率を上げることができる。すなわち、本発明の製造方法により、細胞集団中のTh1型CD4陽性T細胞の含有率が高い細胞集団を製造することができる。得られた細胞集団中のTh1型CD4陽性T細胞の含有率は、後述の実施例1-(6)、2-(2)、3-(3)、24-(4)、28-(5)及び29-(3)

に記載のとおり、IL-4陰性、IFN- γ 陽性を指標として測定することができる。Th1型CD4陽性T細胞は、細胞性免疫のエフェクターであり、Th1型CD4陽性T細胞の含有率が高い細胞集団は細胞免疫療法において極めて有用である(例えば、前記の非特許文献1)。ここで、Th1型CD4陽性T細胞の含有率が高い細胞集団とは、本発明の製造方法において、前記の工程(2)を抗CD28抗体の非存在下で実施した細胞集団のTh1型CD4陽性T細胞の含有率が、抗CD28抗体の存在下で実施した場合と比較して高い細胞集団を意味し、好適には3%以上、より好適には6%以上高いことを意味する。細胞集団に対するTh1型CD4陽性T細胞の含有率については、個人差やドナーの体調によって変動するものであり特に限定はないが、10%以上、好ましくは12%以上、より好ましくは14%以上である。

[0058] また、本発明の製造方法において、前記の工程(2)を抗CD28抗体の非存在下で実施することにより、Th2型CD4陽性T細胞の含有率を下げるができる。すなわち、本発明の製造方法により、細胞集団中のTh2型CD4陽性T細胞の含有率が低い細胞集団を製造することができる。得られた細胞集団中のTh2型CD4陽性T細胞の含有率は、後述の実施例28-(5)、(6)、29-(3)及び(4)に記載のとおり、IL-4陽性、IFN- γ 陰性、CD4陽性CCR4陽性を指標として測定することができる。Th2型CD4陽性T細胞は、液性免疫のエフェクターであり、Th2型CD4陽性T細胞の含有率が低い細胞集団は細胞免疫療法において極めて有用である。ここで、Th2型CD4陽性T細胞の含有率が低い細胞集団とは、本発明の製造方法において前記の工程(2)を抗CD28抗体の非存在下で実施した細胞集団のTh2型CD4陽性T細胞の含有率が、抗CD28抗体の存在下で実施した場合と比較して低い細胞集団を意味し、好適には3%以上、より好適には6%以上低いことを意味する。細胞集団に対するTh2型CD4陽性T細胞の含有率については、個人差やドナーの体調によって変動するものであり特に限定はないが、40%以下、好ましくは30%以下、より好ましくは20%以下である。

[0059] すなわち、本発明の製造方法において、前記の工程(2)を抗CD28抗体の非存在下で実施することにより、細胞集団におけるTh1型CD4陽性T細胞/Th2型CD4陽性T細胞の比を上昇させる方法が提供される。

[0060] また、本発明の製造方法において、前記の工程(2)を抗CD28抗体の非存在下で実施することにより、CD4陽性制御性T細胞の含有率を下げるができる。すなわち、本発明の製造方法により、細胞集団中のCD4陽性制御性T細胞の含有率が低い細胞集団を製造することができる。得られた細胞集団中のCD4陽性制御性T細胞の含有率は、後述の実施例28-(7)に記載のとおり、CD4陽性CD25陽性Foxp3陽性を指標として測定することができる。制御性T細胞は種々の免疫応答反応を抑制する働きをもつことが知られており、制御性T細胞の含有率が低い細胞集団は細胞免疫療法において極めて有用である。ここで、CD4陽性制御性T細胞の含有率が低い細胞集団とは、本発明の製造方法において前記の工程(2)を抗CD28抗体の非存在下で実施した細胞集団のCD4陽性制御性T細胞の含有率が、抗CD28抗体の存在下で実施した場合と比較して低い細胞集団を意味し、好適には3%以上、より好適には6%以上低いことを意味する。細胞集団に対するCD4陽性制御性T細胞の含有率については、個人差やドナーの体調によって変動するものであり特に限定はないが、20%以下、好ましくは15%以下、より好ましくは10%以下である。

[0061] 本発明の製造方法において、前記の工程(2)を抗CD28抗体の非存在下で実施することにより、CD4陽性CD45RA陽性CCR7陽性T細胞を含有する細胞集団及び／又はCD4陽性CD45RA陽性CD62L陽性T細胞を含有する細胞集団を製造することができる。すなわち、本発明の製造方法により、細胞集団中のCD4陽性CD45RA陽性CCR7陽性T細胞及び／又はCD4陽性CD45RA陽性CD62L陽性T細胞の含有率が高い細胞集団を製造することができる。CD45RA、CCR7、CD62Lはいずれもリンパ球の細胞表面抗原マーカーであり、ナイーブT細胞のような未分化な細胞において発現することが知られている。すなわち、本発明の製造方法により得られる細胞集団に高比率に含まれる細胞は、メモリーT細胞に分化する前の未分化の細胞、すなわちナイーブT細胞として分類できる。以下、本明細書において、CD4陽性CD45RA陽性CCR7陽性T細胞又はCD4陽性CD45RA陽性CD62L陽性T細胞のことを「CD4陽性ナイーブT様細胞」と称することがある。ナイーブT細胞は生体に投与した際の生体内での生存率、細胞増殖効果、腫瘍への集積効果が高く、細胞医療分野において有用であることが報告されている。ここで、CD4陽性CD4

5RA陽性CCR7陽性T細胞及び／又はCD4陽性CD45RA陽性CD62L陽性T細胞の含有率が高い細胞集団とは、本発明の製造方法において使用される培養条件で培養を実施して得られる当該細胞の含有率が、本発明の培養条件以外は同等の条件で培養を実施して得られた含有率と比較して高い細胞集団を意味する。具体的には、本発明の製造方法において工程(2)を抗CD28抗体の非存在下で実施した細胞集団の前記細胞の含有率が、抗CD28抗体の存在下で実施した場合と比較して好ましくは5%以上、より好ましくは10%以上高い細胞集団を得ることができる。

[0062] 本発明の製造方法において、前記(A)及び(B)の存在下で培養を実施することにより、細胞傷害活性が向上した細胞集団を製造することができる。得られた細胞集団の細胞傷害活性は、後述の実施例27-(4)に記載のとおり測定することができる。ここで、細胞傷害活性が向上した細胞集団とは、本発明の製造方法において前記(A)及び(B)の存在下で培養を実施した細胞集団の細胞傷害活性が、(A)成分非存在下で実施した場合と比較して高い細胞集団を意味し、好適には2.5%以上、より好適には5%以上高いことを意味する。

[0063] 更に、本発明の製造方法は、各工程の前又は後に、細胞集団を任意の細胞亜集団に分離する工程、細胞亜集団を採取する工程又は細胞亜集団を除去する工程を包含することもできる。例えば、前記のとおり本発明の培養条件下で培養して得られた細胞集団は、Th1型CD4陽性T細胞及びCD4陽性ナイーブT様細胞の含有率が高く、Th2型CD4陽性T細胞及びCD4陽性制御性T細胞の含有率が低い細胞集団なので、更に所望の表面抗原マーカーを発現する細胞を分離、採取又は除去することにより、Th1型CD4陽性T細胞、CD4陽性ナイーブT様細胞、Th2型CD4陽性T細胞及びCD4陽性制御性T細胞を細胞亜集団として分離、採取又は除去してもよい。この工程により、Th1型CD4陽性T細胞及び／又はCD4陽性ナイーブT様細胞を更に高含有するT細胞集団を取得することが出来る。また、Th2型CD4陽性T細胞及び／又はCD4陽性制御性T細胞の少ない細胞集団を取得することができる。また、本発明が、工程(1)で得られた細胞に遺伝子を導入する工程を更に包含する場合、当該遺伝子を発現する細胞を分離、取得しても良い。分離操作としては、特に限定はないが、例えばセルソーター、磁気ビーズ、カラムなどを用いて公知の手法で分離

することが出来る。

[0064] また、本発明の方法により製造された細胞集団からT細胞をクローン化することにより、安定したT細胞株として維持することもできる。また、本発明の方法により得られた細胞集団を用いて、更に公知の方法により培養することで新たに細胞集団を得ることもできる。

[0065] 本発明の製造方法において、細胞集団の培養をCD28リガンド(例えば抗CD28抗体)存在下で実施しても良く、CD28リガンド非存在下で実施しても良い。以下の実施例で示すとおり、抗CD28抗体非存在下で実施することは、細胞増殖率及び操作性の向上、コスト削減、Th1型CD4陽性T細胞の含有率の向上、Th2型CD4陽性T細胞の含有率の低下、CD4陽性ナイーブT様細胞の含有率の向上、CD4陽性制御性T細胞含有率の低下などの特徴を有するので、CD28リガンドの添加は、目的に応じて選択すれば良い。(A)成分及び(B)成分に共存させる他のリガンドを組み合わせることで、目的に応じた任意の細胞集団を製造できる点で、本発明は極めて有用である。

[0066] 本願発明の製造方法において、前記の工程(2)で得られた細胞集団を前記(A)成分及び／又は前記(B)成分の非存在下で更に培養する工程を実施しても良い。この工程は、通常の細胞培養の方法、例えば公知のT細胞の培養方法により実施すれば良く、前記(A)成分及び(B)成分を共存させない以外は、前記工程(2)と同一の条件であっても良い。培地には、前記の工程(2)と同様に、サイトカイン類、適当なタンパク質、その他の成分を含んでいても良い。サイトカイン類としては、例えばIL-2、IL-7、IL-12、IFN- γ などが例示される。

[0067] 本発明の細胞集団の製造方法において、総培養日数は4～14日間とすることが得られる細胞の質及び培養効率上、好ましい。すなわち、総培養日数が4～14日間である場合、得られる細胞集団は、Th1型CD4陽性T細胞及びCD4陽性ナイーブT様細胞の含有率が高い細胞集団であり、細胞医療分野への使用に極めて適している。なお、総培養日数が4日未満の場合は、一般的な免疫療法に使用するには満足のできる細胞数を得ることができない。本発明において、総培養日数としては、より好適には5～14日間、更に好適には6～14日間が望ましい。

[0068] <4> 本発明により製造される細胞集団の使用

本発明は、細胞集団の製造方法であり、特に、CD4陽性T細胞、Th1型CD4陽性T細胞、CD4陽性ナイーブT様細胞の製造方法に関する。すなわち、本発明の方法により製造される細胞集団は、CD4陽性T細胞の含有率、Th1型CD4陽性T細胞の含有率、CD4陽性ナイーブT様細胞の含有率が高く、Th2型CD4陽性T細胞の含有率が低い。したがって、種々の疾患の治療や予防に有用である。前記の細胞集団の投与が有効である疾患としては、特に限定はないが、例えば、がん(白血病、固形腫瘍など)、肝炎や、インフルエンザ、ウイルス、細菌、真菌が原因となる感染性疾患、例えば結核、MRSA、VRE、深在性真菌症が例示される。特に、CD4陽性T細胞に感染するHIV(Human Immunodeficiency Virus、ヒト免疫不全ウイルス)が原因となるエイズ(AIDS、後天性免疫不全症候群)の治療に有用である。また、本発明の方法により製造される細胞集団は、骨髄移植や放射線照射後の感染症予防、再発白血病の寛解を目的としたドナーリンパ球輸注などにも利用できる。

[0069] 更に本発明は、Th1型CD4陽性T細胞の含有率及び／又はCD4陽性ナイーブT様細胞の含有率が高く、Th2型CD4陽性T細胞の含有率が低い細胞集団を提供する。また、本発明は、当該細胞集団を有効成分として含有する医薬を提供する。当該細胞集団を含有する前記医薬は免疫療法への使用に適している。免疫療法においては、患者の治療に適したT細胞が、例えば注射や点滴により患者の静脈、動脈、皮下、腹腔内などに投与される。当該医薬は前記の疾患への使用において非常に有用である。当該医薬は製薬分野で公知の方法に従い、例えば、本発明の方法により調製された当該T細胞集団を有効成分として、公知の非経口投与に適した有機又は無機の担体、賦形剤、安定剤などと混合し、点滴剤、注射剤として調製できる。なお、治療剤における本発明の細胞集団の含有量、治療剤の投与量、当該治療剤に関する諸条件は公知の免疫療法に従って適宜、決定できる。例えば、医薬における本発明の細胞集団の含有量としては、特に限定はないが、例えば、好適には $1 \times 10^3 \sim 1 \times 10^{11}$ cells/mL、より好適には $1 \times 10^4 \sim 1 \times 10^{10}$ cells/mL、更に好適には $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^9$ cells/mLが例示される。また、本発明の医薬の投与量としては、特に限定はないが、例えば、成人一日あたり、好適には $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^{12}$ cells/日

、より好ましくは、 $1 \times 10^7 \sim 5 \times 10^{11}$ cells/日、更に好ましくは $1 \times 10^8 \sim 2 \times 10^{11}$ cells/日が例示される。更に、当該治療剤による免疫療法と、公知の薬剤投与による薬剤治療や放射線治療、外科的手術による治療との併用を行うこともできる。

[0070] 更に、本発明は当該細胞集団を有効成分として含有する診断薬を提供する。例えば、患者から得られた細胞を本発明の診断薬により解析、スクリーニングすることにより治療効果の推測、有効な導入遺伝子の選択などが可能である。

[0071] また本発明は、被験体に有効量の前記の方法により得られる細胞集団を投与することを含む疾患の治療方法又は予防方法を提供する。本明細書中において被験体とは、特に限定はないが、好ましくは本発明の方法により製造される細胞集団を投与される前記に記載するような疾患に罹患した生体(例えばヒト患者、非ヒト動物)を示す。

[0072] また、本明細書中において有効量とは、前記細胞集団を上記被験体に投与した場合に、該細胞集団を投与していない被験体と比較して、治療もしくは予防効果を発揮する該T細胞集団の量である。具体的な有効量としては、投与形態、投与方法、使用目的及び被験体の年齢、体重、症状などによって適宜設定され一定ではないが、好ましくは、上記の医薬と同様にすれば良い。投与方法にも限定はなく、例えば、上記の医薬と同様に、点滴や注射などにより投与すれば良い。

[0073] また、本発明は、前記の本発明の製造方法により得られるCD4陽性T細胞集団に対して、少なくとも1つの刺激因子により刺激を与えることにより、活性化されたCD4陽性T細胞を含む細胞集団を製造する方法を提供する。更に本発明は、前記の製造方法で得られた細胞集団を提供する。このようにして得られる活性化されたCD4陽性T細胞を含む細胞集団は、前記の製造方法により得られるCD4陽性T細胞集団と同様に医薬の有効成分として使用できる。ここで刺激因子による刺激とは、刺激因子により前記の本発明の製造方法により得られる細胞集団が活性化されるものであれば特に限定はなく、例えば、本発明の製造方法により得られるCD4陽性T細胞集団と刺激因子の共存下での培養により実施することができる。

[0074] 本明細書において、前記の刺激因子としてのサイトカインとは、CD4陽性T細胞に作用し活性化できるものであれば特に限定はないが、例えばIL-2、IFN- γ 、TG

F- β 、IL-15、IL-7、IFN- α 、IL-12、CD40L、IL-27などが例示され、細胞性免疫を増強させる観点から好適には、IL-2、IFN- γ 、IL-12が例示される。

[0075] 本明細書において、ケモカインとは、T細胞に作用し遊走活性を示すものであれば特に限定はないが、例えばRANTES、CCL21、MIP1 α 、MIP1 β 、CCL19、CXCL12、IP-10、MIGが例示される。

[0076] また、本発明の方法により製造される細胞集団はTh1型CD4陽性T細胞の含有率が高いことから、当該細胞集団をさらにCD8陽性CD45RA陽性CCR7陽性T細胞(CD8陽性ナイーブT様細胞)を含有する細胞集団と混合して培養することにより、CD8陽性CD45RA陽性CCR7陽性T細胞を高含有率で培養することができる。すなわち、本発明により、下記(2-1)～(2-3)の工程を含有する細胞集団の製造方法が提供される。

工程(2-1): T細胞を含有する細胞集団からCD8陽性T細胞を除去する、もしくはCD4陽性T細胞を採取する工程

工程(2-2): 前記工程(2-1)で得られた細胞集団を、下記(A)及び(B)の存在下で培養する工程

(A) FN、FNのフラグメント及びFNのフラグメントの混合物からなる群より選択される少なくとも1つ

(B) CD3リガンド

工程(2-3): 前記工程(2-2)で得られた細胞集団と、CD8陽性CD45RA陽性CCR7陽性T細胞を含有する細胞集団を混合して培養する工程

[0077] 前記工程(2-3)の培養は、好適には工程(2-2)の条件、すなわち(A)成分及び(B)成分の存在下で実施することが好ましい。また、CD8陽性CD45RA陽性CCR7陽性T細胞を含有する細胞集団としては、特に限定はないが、例えばPBMC、臍帯血単核球もしくはこれらより分離したCD8陽性細胞等を使用することができる。またその他の培養条件等については前記の「<3>本発明の細胞集団の製造方法」に記載の方法で実施することができる。なお、上記方法により得られる細胞集団は、CD8陽性のナイーブT様細胞を高比率に含有していることから、細胞医療への用途に極

めて適している。

[0078] 本発明者らは、T細胞を含有する細胞集団の拡大培養において、安定して高い拡大培養率を実現し、かつ得られる細胞集団中のCD8陽性CD45RA陽性CCR7陽性T細胞の含有率が安定して高く維持される方法について種々検討した結果、培養開始時のCD4陽性T細胞とCD8陽性T細胞の比率が極めて重要であることを見出した。すなわち、本発明の別の態様として、下記工程を包含することを特徴とする細胞集団の製造方法が提供される。

工程(3-1):CD8陽性T細胞とCD4陽性T細胞の比率が2:1以上である細胞集団を得る工程

工程(3-2):前記工程(3-1)にて得られた細胞集団をCD3リガンドの存在下で培養する工程

[0079] ここで、上記工程(3-1)におけるCD8陽性T細胞とCD4陽性T細胞の比率として、「CD8陽性T細胞とCD4陽性T細胞の比率が2:1以上」とは、CD8陽性T細胞数を2とした場合のCD4陽性T細胞数が1以上であることを意味し、好適には1:1以上、より好適には1:2以上、さらに好適には1:4以上であることが例示される。当該比率の細胞集団を得る工程としては、特に限定はないが、前記の方法により得られたCD8陽性T細胞を高含有する細胞集団からのCD8陽性T細胞の分離、分離されたCD8陽性T細胞の添加、前記の方法により得られたCD4陽性T細胞を高含有する細胞集団からのCD4陽性T細胞の分離、分離されたCD4陽性T細胞の添加等を単独又は適宜組み合わせて実施することにより、特定のCD8陽性T細胞とCD4陽性T細胞比率の細胞集団を得ることができる。また、上記工程(3-1)の前に、前記のT細胞を含有する細胞集団中のCD8陽性T細胞とCD4陽性T細胞の含有量を測定する工程、すなわち、培養に供されるT細胞集団もしくはその由来となるドナーの血液中におけるCD4陽性T細胞とCD8陽性T細胞の比率を測定する工程を加えることもできる。また、さらに高い拡大培養率を実現する観点からは、上記工程(3-2)において、工程(3-1)で得られたT細胞の他、同じ由来の血球系細胞、例えば単球、樹状細胞、NK細胞等が培養に供される細胞集団に含有されていることが好ましく、好適には後述の実施例4に示すとおり、培養する細胞集団と同じドナー由来の単球を予め分離して

において前記比率となるT細胞を含有する細胞集団を工程(3-2)に供する際に単球を混合することが好ましい。また、当該工程(3-2)の培養は、CD3リガンドの存在下に加えて、好適には、FN、FNのフラグメント及びFNのフラグメントの混合物からなる群より選択される少なくとも1つの存在下で実施することが好ましい。また、その他の培養条件等については、前記の「<3>本発明の細胞集団の製造方法」に記載の方法で実施することができる。

[0080] また、本発明の別の態様として、FN、FNのフラグメント及びFNのフラグメントの混合物からなる群より選択される少なくとも1つを有効成分として含有することを特徴とするIL-5産生抑制剤、又はIL-9産生抑制剤が提供される。当該IL-5産生抑制剤及びIL-9産生抑制剤は、IL-5又はIL-9産生抑制作用を要する疾患を対象とした医薬、機能性食品素材として有用である。当該疾患としては、特に限定はないが、例えば喘息、アレルギー性疾患、アナフィラキシー、蕁麻疹、アトピー性皮膚炎等の治療又は予防に極めて有用である。当該IL-5産生抑制剤及びIL-9産生抑制剤、それを含有する医薬又は食品の製造については、FN、FNのフラグメント及びFNのフラグメントの混合物からなる群より選択される少なくとも1つを含有していれば特に限定はなく、公知の医薬、食品の製法に準じて製造することができる。また、本発明によりFN、FNのフラグメント及びFNのフラグメントの混合物からなる群より選択される少なくとも1つを投与することを特徴とするIL-5又はIL-9産生抑制方法が提供される。ここで投与対象としては、ヒト、家畜もしくはペット用動物のほか、血球系細胞等の各種細胞が例示される。当該抑制方法は上記疾患の治療や予防のほか、研究用試薬として使用することもできる。

[0081] さらに、本発明により、FN、FNのフラグメント及びFNのフラグメントの混合物からなる群より選択される少なくとも1つの存在下でT細胞を含有する細胞集団を培養する工程を実施して得られる、IL-5又はIL-9産生量の低い細胞集団、及びその製造方法が提供される。当該細胞集団は、IL-5及びIL-9の産生量が低下していることから、細胞医療分野において当該サイトカインの上昇を抑制しながらの患者への投与が可能となる。当該製造方法は、FN、FNのフラグメント及びFNのフラグメントの混合物からなる群より選択される少なくとも1つの存在下でT細胞を含有する細胞集団

を培養する工程以外の条件については、特に限定はなく、例えば前記の「＜3＞本発明の細胞集団の製造方法」に記載の方法で実施することができる。

[0082] 本発明の別の態様として、VLA-4結合性オリゴペプチド及び／又はFNのヘパリン結合ドメインの一部を含有するオリゴペプチドを有効成分とする、T細胞集団の増殖調節剤を提供する。VLA-4結合性オリゴペプチドとしては、LDFPもしくはLDVPで表されるアミノ酸配列を含むオリゴペプチドが例示される。また、FNのヘパリン結合ドメインの一部を含有するオリゴペプチドとしては、LIGRKKで表されるアミノ酸配列を含むオリゴペプチドが例示される。また、ここで「オリゴペプチド」とは20アミノ酸以下のペプチドと定義する。当該オリゴペプチドをT細胞集団の拡大培養、特にFN、FNのフラグメント及びFNのフラグメントの混合物からなる群より選択される少なくとも1つを使用したT細胞集団の拡大培養に使用することにより、細胞増殖率が低下することから、T細胞集団の拡大培養における細胞増殖性のコントロールに使用できる。さらに当該増殖調節剤と拡大培養促進物質を組み合わせる使用することにより、任意の細胞集団を特異的に拡大培養することもできる。また、当該剤はリンパ球の増殖のメカニズム研究においても有用である。

[0083] また、後述の実施例20～22に示されるとおり、FNやそのフラグメントを用いた細胞集団の拡大培養において、FNのVLA-4結合ドメインは、培養に供される細胞の表面上のVLA-4を刺激してシグナルを誘起させることでリンパ球の拡大培養を実施すること、及び得られた細胞集団中のナイーブT様細胞含有率が高く維持させることが本発明により示された。すなわち、本発明により、本発明により得られるCD4陽性T細胞を高含有する細胞集団に対して、VLA-4を刺激しシグナルを誘起させることを特徴とするリンパ球の拡大培養方法、CD45RA陽性CCD7陽性細胞及び／又はCD45RA陽性CD62L陽性細胞比率向上方法が提供される。このVLA-4へのシグナルの誘起方法としては、特に限定はないが、例えばLDFPを含有するポリペプチドであって、VLA-4へのシグナルを誘起する能力のあるポリペプチド、例えば前記のCS-1ドメイン(配列表の配列番号8で表されるポリペプチド)を有するポリペプチドが例示され、本発明により当該能力を有するポリペプチドが提供される。当該ポリペプチドはリンパ球の拡大培養に使用でき、目的に応じて使い分け、任意の細胞集団

を製造することができる。

[0084] また、本発明の別の態様として、T細胞の拡大培養への使用に非常に有用な下記(a)及び(b)から選択される新規なポリペプチドも提供される。

(a)配列表の配列番号29(H204)、36(H296-CS1)、38(H296-CS2)、44(H114-HT)、46(H114)、51(H117-HT)、53(H117)、58(H206-HT)、60(H206)、66(H296R-HT)、68(H296R)、71(H105-HT)、73(H105)、75(CH105-HT)、79(CH296mut2)、83(CH296mut3)及び85(CH296mut4)からなる群より選択される少なくとも1つのアミノ酸配列を含むポリペプチド

(b)前記(a)のポリペプチドのアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、挿入、付加もしくは置換したアミノ酸配列を含むポリペプチドであって、前記(a)のポリペプチドと同等な機能を有する新規なポリペプチド

[0085] 以下に、個々のポリペプチドについて説明する。

配列表の配列番号29で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチドは、後述の実施例6にH204として記載されたポリペプチドであり、N末端から順にFNのIII-13、III-14、及びCS-1ドメインを有するポリペプチドである。

[0086] 配列表の配列番号36で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチドは、後述の実施例7にH296-CS1として記載されたポリペプチドであり、N末端から順にFNのIII-12、III-13、III-14、CS-1ドメイン、及びCS-1ドメインを有するポリペプチドである。

[0087] 配列表の配列番号38で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチドは、後述の実施例8にH296-CS2として記載されたポリペプチドであり、N末端から順にFNのIII-12、III-13、III-14、CS-1ドメイン、CS-1ドメイン、及びCS-1ドメインを有するポリペプチドである。

[0088] 配列表の配列番号44で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチドは、後述の実施例9にH114-HTとして記載されたポリペプチドであり、N末端から順にHisタグ配列、FNのIII-13及びCS-1ドメインを有するポリペプチドである。

[0089] 配列表の配列番号46で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチドは、後述の実施例9にH114として記載されたポリペプチドであり、上記のH114-HTのN末端から

Hisタグ配列を除いたポリペプチドである。

- [0090] 配列表の配列番号51で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチドは、後述の実施例10にH117-HTとして記載されたポリペプチドであり、N末端から順にHisタグ配列、FNのIII-12及びCS-1ドメインを有するポリペプチドである。
- [0091] 配列表の配列番号53で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチドは、後述の実施例9にH117として記載されたポリペプチドであり、上記のH117-HTのN末端からHisタグ配列を除いたポリペプチドである。
- [0092] 配列表の配列番号58で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチドは、後述の実施例11にH206-HTとして記載されたポリペプチドであり、N末端から順にHisタグ配列、FNのIII-12、III-13及びCS-1ドメインを有するポリペプチドである。
- [0093] 配列表の配列番号60で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチドは、後述の実施例11にH206として記載されたポリペプチドであり、上記のH206-HTのN末端からHisタグ配列を除いたポリペプチドである。
- [0094] 配列表の配列番号66で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチドは、後述の実施例12にH296R-HTとして記載されたポリペプチドであり、N末端から順にHisタグ配列、FNのCS-1ドメイン、III-12、III-13及びIII-14を有するポリペプチドである。
- [0095] 配列表の配列番号68で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチドは、後述の実施例12にH296Rとして記載されたポリペプチドであり、上記のH296R-HTのN末端からHisタグ配列を除いたポリペプチドである。
- [0096] 配列表の配列番号71で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチドは、後述の実施例13にH105-HTとして記載されたポリペプチドであり、N末端から順にHisタグ配列、FNのIII-14及びCS-1ドメインを有するポリペプチドである。
- [0097] 配列表の配列番号73で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチドは、後述の実施例13にH105として記載されたポリペプチドであり、上記のH105-HTのN末端からHisタグ配列を除いたポリペプチドである。
- [0098] 配列表の配列番号75で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチドは、後述の実施例14にCH105-HTとして記載されたポリペプチドであり、N末端から順にHisタグ

配列、FNのIII-8、III-9、III-10、アミノ酸配列“EIDKPSMA”、III-14及びCS-1ドメインを有するポリペプチドである。

[0099] 配列表の配列番号79で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチドは、後述の実施例15にCH296mut2として記載されたポリペプチドであり、前記の配列表の配列番号13で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチドであるCH-296のアミノ酸番号543～548に相当する領域が“LIGRKK”から“VLAKRR”に変換されたポリペプチドである。

[0100] 配列表の配列番号83で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチドは、後述の実施例16にCH296mut3として記載されたポリペプチドであり、前記CH-296のアミノ酸番号569～572に相当する領域が“LDVP”から“LELP”に変換されたポリペプチドである。

[0101] 配列表の配列番号85で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチドは、後述の実施例17にCH296mut4として記載されたポリペプチドであり、前記のCH-296のアミノ酸番号543～548に相当する領域が“LIGRKK”から“VLAKRR”に、CH-296のアミノ酸番号569～572に相当する領域が“LDVP”から“LELP”に変換されたポリペプチドである。

[0102] また、本発明においては、下記(c)～(g)から選択される新規な核酸も提供される。

(c)配列表の配列番号29、36、38、44、46、51、53、58、60、66、68、71、73、75、79、83及び85で表されるアミノ酸配列からなる群より選択される少なくとも1つのアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする核酸

(d)配列表の配列番号29、36、38、44、46、51、53、58、60、66、68、71、73、75、79、83及び85で表されるアミノ酸配列からなる群より選択される少なくとも1つのアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、挿入、付加もしくは置換したアミノ酸配列を含むポリペプチドであって、配列表の配列番号29、36、38、44、46、51、53、58、60、66、68、71、73、75、79、83及び85で表されるアミノ酸配列から選択されるアミノ酸配列を含むポリペプチドと同等な機能を有するポリペプチドをコードする核酸

(e)配列表の配列番号30(H204をコードする核酸の塩基配列)、配列番号37(H2

96-CS1をコードする核酸の塩基配列)、配列番号39(H296-CS2をコードする核酸の塩基配列)、配列番号45(H114-HTをコードする核酸の塩基配列)、配列番号47(H114をコードする核酸の塩基配列)、配列番号52(H117-HTをコードする核酸の塩基配列)、配列番号54(H117をコードする核酸の塩基配列)、配列番号59(H206-HTをコードする核酸の塩基配列)、配列番号61(H206をコードする核酸の塩基配列)、配列番号67(H296R-HTをコードする核酸の塩基配列)、配列番号69(H296Rをコードする核酸の塩基配列)、配列番号72(H105-HTをコードする核酸の塩基配列)、配列番号74(H105をコードする核酸の塩基配列)、配列番号76(CH105-HTをコードする核酸の塩基配列)、配列番号80(CH296mut2をコードする核酸の塩基配列)、配列番号84(CH296mut3をコードする核酸の塩基配列)及び配列番号86(CH296mut4をコードする核酸の塩基配列)で表される塩基配列からなる群より選択される少なくとも1つの塩基配列を有する核酸

(f)前記(e)の核酸とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする核酸であって、当該核酸によってコードされるポリペプチドが、前記(e)の核酸によってコードされるポリペプチドと同等な機能を有する核酸

(g)前記(e)の核酸の塩基配列において、1もしくは数個の塩基の置換、欠失、挿入あるいは付加のいずれか1以上が生じた核酸であって、当該核酸によってコードされるポリペプチドが、前記(e)の核酸によってコードされるポリペプチドと同等な機能を有する核酸

[0103] なお、上記(c)の核酸は、前記(a)のポリペプチドをコードする核酸であり、前記(d)の核酸は、前記(b)のポリペプチドをコードする核酸である。また、前記(a)のポリペプチドは、上記(c)の核酸を用いてタンパク発現に供する場合、N末端のメチオニン残基が消化されている場合がある。

[0104] なお、本明細書において、前記新規なポリペプチドを本発明のポリペプチドと記載し、前記新規な核酸を本発明の核酸と記載することがある。

[0105] 以下、本発明のポリペプチド、本発明の核酸(ポリヌクレオチド)、及びこれらの製造方法について説明する。

[0106] 本発明の前記(b)のポリペプチドとしては、好適には配列表の配列番号29、36、3

8、44、46、51、53、58、60、66、68、71、73、75、79、83及び85で表されるアミノ酸配列からなる群より選択される少なくとも1つのアミノ酸配列に1～20個のアミノ酸の置換、欠失、挿入あるいは付加のいずれか1以上が生じたもの、より好適には1～10個のアミノ酸の置換、欠失、挿入あるいは付加のいずれか1以上が生じたもの、さらに好適には1～5個のアミノ酸の置換、欠失、挿入あるいは付加のいずれか1以上が生じたものが例示される。ここで、付加とは、例えばポリペプチドN末端にHisタグ配列等のペプチド精製におけるタグ配列の付加、タンパク精製におけるリンカー配列の付加等が例示される。また、欠失とは、前記タグ配列を有するポリペプチドからのタグ配列の除去や、ポリペプチドのN末端におけるメチオニン残基の除去等が例示される。なお、アミノ酸の置換等は、本来のポリペプチドの機能が維持され得る範囲内で該ポリペプチドの物理化学的性状等を変化させ得る程度のものであってもよい。その際のアミノ酸の置換等は、好適には前記の、本来のポリペプチドの機能が維持され得る範囲内で該ポリペプチドの物理化学的性状などを変化させ得る程度のもものが例示される。

[0107] 本発明のポリペプチドをコードする配列表の配列番号30、37、39、45、47、52、54、59、61、67、69、72、74、76、80、84及び86で表される塩基配列からなる群より選択される核酸は、天然型のFNをコードする核酸、もしくは組換え型のFNフラグメント、例えば前記のCH-296やH-296等をコードする核酸を用いて、本発明のポリペプチドを構成する各ドメインをコードする核酸を取得し公知の方法によりこれらをつなぎ合わせる、もしくはPCR法により適当な箇所に範囲を導入することにより取得することができる。例えば、後述の実施例6～17に記載の方法により取得することができる。

[0108] 配列番号30、37、39、45、47、52、54、59、61、67、69、72、74、76、80、84及び86で表される塩基配列からなる群より選択される塩基配列からなる核酸とストリンジентな条件下でハイブリダイズし、本発明のポリペプチドと同等な機能、すなわち前記のリンパ球の製造において所望の効果を有するポリペプチドをコードする核酸も本発明の核酸に含まれる。上記「ストリンジентな条件」とは特に限定されず、例えば、これらの塩基配列からなるDNAにハイブリダイズさせるDNAに応じて、ハイブリ

ダイゼーション時の、好ましくはさらに洗浄時の温度及び塩濃度を適宜決定することにより設定し得るが、ストリンジェントな条件としては、例えば、モレキュラー クローニング ア ラボラトリー マニュアル 第3版[サンブルーク(sambrook)ら、Molecular cloning, A laboratory manual 3rd edition、2001年、コールド スプリング ハーバー ラボラトリー プレス(Cold Spring Harbor Laboratory Press)社発行]等の文献に記載の条件が挙げられる。

[0109] 具体的には、例えば、6×SSC(1×SSCは、0.15M NaCl、0.015M クエン酸ナトリウム、pH7.0)と0.5%SDSと5×デンハルト[Denhardt's、0.1%ウシ血清アルブミン(BSA)、0.1%ポリビニルピロリドン、0.1%フィコール400]と100 μg/mLサケ精子DNAとを含む溶液中、50℃、好ましくは65℃で保温する条件が例示される。前記の温度は用いるDNAのT_m値が既知である場合は、その値より5～12℃低い温度としてもよい。さらに、非特異的にハイブリダイズしたDNAを洗浄により除去するステップ、ここで、より精度を高める観点から、より低イオン強度、例えば、2×SSC、よりストリンジェントには、0.1×SSC等の条件及び／又はより高温、例えば、用いられる核酸のT_m値により異なるが、25℃以上、よりストリンジェントには、37℃以上、さらにストリンジェントには、42℃以上、よりさらにストリンジェントには、50℃以上等の条件下で洗浄を行う、という条件等を追加してもよい。

[0110] より低いストリンジェンシーのハイブリダイゼーション条件で本発明のポリヌクレオチドにハイブリダイズする核酸分子もまた本発明に包含される。ハイブリダイゼーションのストリンジェンシー及びシグナル検出の変化は、主として、ホルムアミド濃度(より低い百分率のホルムアミドが、低下したストリンジェンシーを生じる)、塩濃度、又は温度の操作によって行われる。例えば、より低いストリンジェンシー条件は、6×SSPE(20×SSPE=3M NaCl;0.2M NaH₂PO₄;0.02M EDTA、pH7.4)、0.5%SDS、30%ホルムアミド、100 μg/mLサケ精子ブロッキングDNAを含む溶液中での37℃での一晩インキュベーション;次いで1×SSPE、0.1%SDSを用いた50℃での洗浄を含む。さらに、より低いストリンジェンシーを達成するために、ストリンジェントなハイブリダイゼーション後に行われる洗浄は、より高い塩濃度(例えば、5×SSC)で行うことができる。

- [0111] 上記の条件は、ハイブリダイゼーション実験においてバックグラウンドを抑制するために使用される代替的なブロッキング試薬を添加及び／又は置換することによって改変することができる。代表的なブロッキング試薬としては、デンハルト試薬、BLOT TO、ヘパリン、変性サケ精子DNA、及び市販の製品処方物が挙げられる。また、この改変に応じて、上記のハイブリダイゼーション条件の他の要素の改変が必要な場合もある。
- [0112] また、本発明の核酸としては、配列表の配列番号30、37、39、45、47、52、54、59、61、67、69、72、74、76、80、84及び86で表される塩基配列からなる群より選択される核酸の塩基配列において、1ないし数個の塩基の置換、欠失、挿入あるいは付加のいずれか1以上が生じたものも含まれる。例えば配列表の配列番号30、37、39、45、47、52、54、59、61、67、69、72、74、76、80、84又は86に記載の塩基配列から1～60塩基の置換、欠失、挿入あるいは付加のいずれか1以上が生じたもの、より好適には1～30塩基の置換、欠失、挿入あるいは付加のいずれか1以上が生じたもの、さらに好適には1～15塩基の置換、欠失、挿入あるいは付加のいずれか1以上が生じたものが例示される。なお、塩基の置換等は、核酸にコードされるポリペプチドの機能が維持され得る範囲内で該ポリペプチドの物理化学的性状等を変化させ得る程度のものであってもよい。その詳細、塩基の置換等の方法については前記のアミノ酸の置換等に関する記載に準ずる。
- [0113] 一方、このようにして得られた核酸を用いて、本発明のポリペプチド、好適には配列表の配列番号29、36、38、44、46、51、53、58、60、66、68、71、73、75、79、83及び85で表されるアミノ酸配列からなる群より選択されるアミノ酸配列を有するポリペプチドを遺伝子工学的に取得することができる。すなわち、当該核酸を適切な発現用ベクター、特に限定はないが、例えばpETベクターやpColdベクター等に挿入し、公知の方法により、当該ポリペプチドを、例えば、大腸菌等で発現させることにより取得することができる。
- [0114] 本発明のポリペプチドの存在下で、T細胞を含有する細胞集団の拡大培養を実施することにより高い拡大培養率が実現されることから、当該ポリペプチドは極めて有用である。さらに、前記ポリペプチドのうち、配列表の配列番号79、83及び85で表され

るアミノ酸配列については、CH-296のヘパリン結合ドメイン及び／又はVLA-4結合ドメインに変異を含むポリペプチドであり、FNやFNのヘパリン結合ドメイン又はVLA-4結合ドメインの機能研究においても極めて有用である。当該ポリペプチドの製造方法については、特に限定はないが、前記の(c)～(g)から選択される核酸を用いて公知の方法により製造することができ、例えば実施例6～17の方法により製造することができる。

[0115] また、本発明により、前記(a)及び(b)から選択されるポリペプチドの存在下でT細胞を含有する細胞集団を培養する工程を含有する細胞集団の製造方法も提供される。当該培養工程は、好適にはCD3リガンドの存在下で実施される。また、その他の培養条件としては特に限定はなく、例えば前記の<3>本発明の細胞集団の製造方法に記載の方法で実施することができる。さらに上記(a)及び(b)で表されるポリペプチドは、ウイルスベクターを利用した細胞への遺伝子導入に使用することも可能である。すなわち、当該ポリペプチドの存在下でウイルスベクターを利用した細胞への遺伝子導入を実施することにより、高効率に遺伝子を細胞に導入することが可能となる。ここでウイルスベクターとしては、特に限定はないが、前記の各種ウイルスベクターが例示される。

[0116] なお、本明細書において細胞又は細胞集団の製造は、当該細胞又は細胞集団の誘導(活性化)、維持、拡大培養の各工程、もしくはこれらを組み合わせた工程を包含する工程を指す。

実施例

[0117] 以下に実施例を挙げて本発明を更に具体的に説明するが、本発明は以下の実施例のみに限定されるものではない。なお以下の実施例で、細胞を各実施例中で用いる刺激因子を固定化した培養器材を用いて培養すること、刺激因子が可溶性の状態で培養液中に添加された培養液により培養すること及び刺激因子を固定化した磁気ビーズ等を用いて培養することを「刺激」と記載することがある。

[0118] 実施例1 FNフラグメントCH-296を用いたCD4陽性T細胞の拡大培養-1

(1)PBMCの分離及び保存

インフォームド・コンセントの得られたヒト健常人ドナーより成分採血を実施後、採血

液をリン酸緩衝生理食塩水(バクスター社製、以下PBSと記載)又はダルベッコリン酸緩衝生理食塩水(インビトロジェン社製又はシグマ社製、以下DPBSと記載)で2倍に希釈し、Ficoll-paque(アマシャムバイオサイエンス社製又はGEヘルスケア バイオサイエンス社製)上に重層後、 $700 \times g$ で20分間遠心した。遠心後、中間層の末梢血単核細胞(PBMC)をピペットで回収、洗浄した。採取したPBMCは 5×10^7 cells/mLになるようにRPMI1640培地(シグマ社製、以下RPMI1640と記載)に懸濁した後、CP-1(極東製薬社製)と25%ヒト血清アルブミン(ブミネート:バクスター社製)を17:8の割合で混合した保存液を等量加えて懸濁し、液体窒素中にて保存した。リンパ球の拡大培養にはこれら保存PBMCを 37°C 水浴中にて急速融解し、 $10 \mu\text{g/mL}$ のDNase(カルビオケム社製)を含む試験用培地で洗浄後、トリパンブルー染色法にて生細胞数を算出して各実験に供した。

[0119] (2) 抗ヒトCD3抗体及びCH-296の固定化

以下の実験で使用する培養器材に抗ヒトCD3抗体(OKT3、ヤンセンファーマ社製)及び配列表の配列番号13で表されるアミノ酸配列を有するFNフラグメント[商品名:レトロネクチン(登録商標)、タカラバイオ社製、以下CH-296と記載]を固定化した。すなわち24穴細胞培養プレート(コーニング社製)に終濃度 $5 \mu\text{g/mL}$ の抗ヒトCD3抗体と終濃度 $25 \mu\text{g/mL}$ のCH-296を含むACD-A液あるいは終濃度 $25 \mu\text{g/mL}$ のCH-296のみを含むACD-A液を 0.45mL/ウェル ずつ添加したのち培養器材を室温で5時間インキュベート後、使用時まで 4°C に保存した。使用直前にはこの培養器材から抗体、CH-296を含むACD-A液を吸引除去後、各ウェルをPBSで2回、RPMI1640で1回洗浄し各実験に供した。

[0120] (3) CD8除去細胞の調製

実施例1-(1)で調製したPBMCを、1%ヒトAB血清(Cambrex社製)を含むPBS(以下1%HS/PBSと記載)を用いて 1×10^7 cells/mLになるように懸濁後、1%HS/PBSで洗浄したCD8ポジティブセレクションビーズ(Dynabeads M-450 CD8:インビトロジェン社製)をPBMC 1×10^7 cellsあたり 2×10^7 ビーズとなるように添加し、ローテーターを用いて 4°C で1時間緩やかに攪拌したのち、磁気分離装置MP C-1(Dynal社製)上に2~3分静置してビーズ非結合細胞を回収した(以下、CD8

除去細胞と記載)。回収したCD8除去細胞を $500 \times g$ で5分間遠心したのち、2%ヒトAB血清と0.2%ヒト血清アルブミンを含むGT-T503(タカラバイオ社製、以下2%GT-T503と記載)あるいは5%ヒトAB血清、2mM L-Glutamine(Cambrex社製)、20mM Hepesを含むX-VIVO15(Cambrex社製、以下5%X-VIVO15と記載)を用いて 2×10^6 cells/mLになるように懸濁した。

[0121] (4)実施例1-(3)で調製した細胞の拡大培養

実施例1-(2)で調製した抗ヒトCD3抗体及びCH-296固定化プレート、又はCH-296固定化プレートに、2%GT-T503あるいは5%X-VIVO15を0.5mL/ウェルで添加したのち、実施例1-(3)で調製した細胞懸濁液を0.5mL/ウェルずつ添加した。CH-296のみ固定化したウェルには、1%HS/PBSで洗浄した抗CD3抗体/抗CD28抗体ビーズ(Dynabeads CD3/CD28 T cell Expander:インビトロジェン社製:以下、T cell Expanderと記載)を細胞数に対して3倍量添加した。続いてIL-2(プロロイキン:Chiron社製)を、2%GT-T503培養群については終濃度200U/mL、5%X-VIVO15培養群については終濃度100U/mLとなるように添加し、これらのプレートを37°C、5%CO₂インキュベータ内で培養した(培養0日目)。培養開始3日目には、2%GT-T503培養群については2%GT-T503を用いて約6倍希釈し、希釈液4mLを何も固定化していない12穴細胞培養プレート(コーニング社製)に移し、5%X-VIVO培養群については、培養液0.8mLを何も固定化していない12穴細胞培養プレートに移した。培養6日目には、2%GT-T503培養群については約2倍希釈した後、希釈液6mLを何も固定化していないT25細胞培養フラスコ(コーニング社製)を立てたものに移し、5%X-VIVO15培養群については、 0.5×10^6 cells/mLとなるように希釈したのち、希釈液1.5mLを何も固定化していない12穴細胞培養プレートに移した。培養10日目には、2%GT-T503培養群については約2倍希釈した後、希釈液10mLを何も固定化していないT25細胞培養フラスコを立てたものに移し、5%X-VIVO15培養群については、 0.5×10^6 cells/mLとなるように希釈したのち希釈液3mLを何も固定化していないT25細胞培養フラスコを立てたものに移した。いずれの培養日においても、2%GT-T503培養群は終濃度200U/mL、5%X-VIVO15培養群は終濃度100U/mLとなるよ

うにIL-2を添加した。培養開始後6日目の拡大培養率を表1に示す。なお、拡大培養率はトリパンブルー染色法にて生細胞数を計測し、培養開始時の細胞数と比較して算出した。また、表中において「+」は「及び」を意味し、以降の表においても同様である。

[0122] [表1]

表1		
培地	初期刺激	拡大培養率 (倍率)
2%GT-T503	抗CD3抗体 + CH-296	16.0
	T cell Expander + CH-296	8.0
5%X VIVO15	抗CD3抗体 + CH-296	2.4
	T cell Expander + CH-296	1.3

[0123] 表1に示されるように、CD8除去細胞拡大培養初期に抗CD3抗体とCH-296を固定化した群は、T cell ExpanderとCH-296で刺激した群と比較して高い拡大培養率が得られた。すなわち、初期刺激において、抗CD3抗体とCH-296の組み合わせはCD8除去細胞培養時に好適に使用されることが明らかとなった。

[0124] (5)CD45RA陽性CCR7陽性T細胞の解析

実施例1-(4)で得られた培養12日目の細胞をPBS、1%牛血清アルブミン(BSA)(シグマ社製)を含むPBS(以下1%BSA/PBSと記載)で洗浄した。1%BSA/PBSに細胞を懸濁し、ネガティブコントロールにはFITC標識マウスIgG₁/RD1標識マウスIgG₁/PC5標識マウスIgG₁(ベックマンコールター社製)を添加した。発現検出用細胞には同様に、RD1標識マウス抗ヒトCD45RA抗体(ベックマンコールター社製)/FITC標識マウス抗ヒトCCR7抗体(R&D Systems社製)を添加した後、氷上で30分間インキュベートした。インキュベート後、0.1%BSAを含むPBSで細胞を洗浄し、再度PBSに懸濁した。この細胞をフローサイトメトリー(Cytomics FC500;ベックマンコールター社製)に供し、各々の細胞集団について、CD45RA陽性CCR7陽性T細胞の含有率を算出した。結果を表2に示す。

[0125] [表2]

表2

培地	初期刺激	CD45RA陽性
		CCR7陽性 (%)
2%GT-T503	抗CD3抗体 + CH-296	34.0
	T cell Expander + CH-296	29.8
5%X-VIVO15	抗CD3抗体 + CH-296	14.6
	T cell Expander + CH-296	12.9

[0126] 表2に示されるように、CD8除去細胞拡大培養初期に抗CD3抗体とCH-296を固定化した群は、T cell ExpanderとCH-296で刺激した群と比較して、CD45RA陽性CCR7陽性T細胞含有率が高い値を示した。CD45RA陽性CCR7陽性T細胞はナイーブT細胞にみられる表現型であり、拡大培養後のリンパ球を体内に戻したときの効果が期待できる。したがって、抗CD3抗体とCH-296の組み合わせはナイーブT様細胞を高効率で増殖できることが明らかとなった。

[0127] (6)IL-4陰性IFN- γ 陽性T細胞の解析

実施例1-(4)で得られた培養12日目の細胞を、10%ウシ胎児血清(fetal bovine serum:MPバイオメディカルズ社製)を含むRPMI1640(以下10FRPMIと記載)に 2×10^6 cells/mLになるように懸濁後、あらかじめ10FRPMIを0.4mL/ウェルずつ添加した48穴細胞培養プレート(コーニング社製)に0.2mL/ウェルずつまき込んだ。PMA(Phorbol 12-myristate 13-acetate:BIOMOL社製)を終濃度50ng/mL、Ionomycin(シグマ社製)を終濃度1 μ g/mL、BrefeldinA(シグマ社製)を終濃度10 μ g/mLとなるように各ウェルに添加した後、37°C、5%CO₂インキュベータ内で4時間培養した。培養終了後の細胞を回収し、PBS、1%BSA/PBSで洗浄した。細胞を1%BSA/PBSに懸濁し、ECD標識マウスIgG₁もしくはECD標識マウス抗ヒトCD4抗体(ともにベックマンコールター社製)を添加後、氷上で30分間インキュベートしたのち、IntraPrep Regent(ベックマンコールター社製)の方法に従って、FITC標識マウス抗ヒトIL-4抗体(eBioscience社製)、RD1標識マウス抗ヒトIFN- γ 抗体(ベックマンコールター社製)で細胞内染色を行った。なお、ネガティブコントロールにはFITC標識マウスIgG₁(ベックマンコールター社製)、PE標識マウスIgG₁(ダコ社製)を使用した。この細胞をフローサイトメトリーに供し、各々の

細胞集団について、IL-4陰性IFN- γ 陽性T細胞の含有率を測定した。結果を表3に示す。なお、全ての条件において、CD4陽性T細胞の含有率は85%以上であることを確認した。

[0128] [表3]

培地	初期刺激	IL-4陰性
		IFN- γ 陽性 (%)
2%GT-T503	抗CD3抗体 + CH-296	14.5
	T cell Expander + CH-296	5.6
5%X-VIVO15	抗CD3抗体 + CH-296	20.0
	T cell Expander + CH-296	7.1

[0129] 表3より、抗CD3抗体とCH-296で刺激した細胞は、T cell ExpanderとCH-296で刺激したものと比較してIL-4陰性IFN- γ 陽性の含有率が高い結果が得られた。Th1タイプの活性化CD4陽性T細胞はIFN- γ を産生することが知られており、初期刺激を抗CD3抗体とCH-296で行うことにより細胞性免疫で有用なTh1タイプのCD4陽性T細胞含有率が高くなることが示された。

[0130] 実施例2 CH-296を用いたCD4陽性T細胞の拡大培養-2

(1)CD8除去細胞の拡大培養

実施例1-(1)に記載した方法で分離、保存したPBMCから実施例1-(3)に記載した方法でCD8除去細胞を調製し、実施例1-(2)の方法で固定化したプレートを用いて実施例1-(4)と同様に拡大培養を行った。ただし、培養器材は12穴細胞培養プレートを使用し、培養開始時は、あらかじめ2%GT-T503あるいは5%X-VIVO15を3mL/ウェルで添加したプレートに細胞懸濁液を1mL/ウェルずつ添加した。また、抗CD3抗体/抗CD28抗体ビーズにはDynabeads CD3/CD28(インビトロジェン社製:以下CD3/CD28ビーズと記載)を使用した。培養開始3日目には、2%GT-T503培養群については2%GT-T503を用いて約3倍希釈し、希釈液6mLを何も固定化していないT25細胞培養フラスコ(コーニング社製)を立てたものに移し、5%X-VIVO培養群については、培養液3.4mLを何も固定化していないT25細胞培養フラスコを立てたものに移した。培養6日目には、2%GT-T503培

養群については約2.2倍希釈した後、希釈液10.5mLを何も固定化していないT25細胞培養フラスコを立てたものに移し、5%X-VIVO15培養群については、培養液1.6mLを 0.5×10^6 cells/mLとなるように5%X-VIVO15を用いて希釈したのちT25細胞培養フラスコを立てたものに移した。培養10日目には、2%GT-T503培養群については2%GT-T503培地9.5mLを添加し、5%X-VIVO15培養群については、CD3抗体とCH-296での条件は約8.5mL、CD3/CD28ビーズとCH-296での条件は約11.5mLの培地を添加した。培養開始後6日目の拡大培養率を表4に示す。

[0131] [表4]

表4

培地	初期刺激	拡大培養率 (倍率)
2%GT-T503	抗CD3抗体 + CH-296	27.8
	CD3/CD28ビーズ + CH-296	22.3
5%X-VIVO15	抗CD3抗体 + CH-296	14.1
	CD3/CD28ビーズ + CH-296	10.5

[0132] 表4に示されるように、CD8除去細胞拡大培養初期に抗CD3抗体とCH-296を固定化した群は、CD3/CD28ビーズとCH-296の刺激群と比較して高い拡大培養率が得られた。すなわち、初期刺激において、抗CD3抗体とCH-296の組み合わせはCD8除去細胞の拡大培養時に好適に使用されることが明らかとなった。

[0133] (2)IL-4陰性IFN- γ 陽性T細胞の解析

実施例2-(1)で得られた培養12日目の細胞について、実施例1-(6)に記載した方法でIL-4陰性IFN- γ 陽性T細胞を測定した。結果を表5に示す。なお、全ての条件において、CD4陽性T細胞の含有率は85%以上であることを確認した。

[0134] [表5]

表 5

培地	初期刺激	IL-4 陰性
		IFN- γ 陽性 (%)
2% GT-T503	抗CD3抗体 + CH-296	17.6
	CD3/CD28ビーズ + CH-296	10.7
5% X-VIVO15	抗CD3抗体 + CH-296	25.2
	CD3/CD28ビーズ + CH-296	8.0

[0135] 表5に示されるように、抗CD3抗体とCH-296で初期刺激した細胞は、異なるCD3/CD28ビーズ製品を用いて刺激した細胞と比較した場合においても、IL-4陰性IFN- γ 陽性T細胞の含有率が高い結果が得られ、Th1タイプのCD4陽性T細胞が優先的に増殖することが示された。

[0136] 実施例3 CH-296を用いたCD4陽性T細胞の拡大培養-3

(1) CD3/CD28ビーズセレクション細胞の調製

実施例1-(1)に記載した方法で分離、保存したPBMCを用いて実施例1-(3)と同様の方法でCD8除去細胞を調製した。ただし、調製後の細胞濃度は 4×10^6 cells/mLとした。必要量のCD8除去細胞を1.5mLねじ式チューブ(アシスト社製)にとり、 $500 \times g$ で5分間遠心したのち上清を除去し、1%HS/PBSを用いて 5×10^7 cells/mLとなるように調製した。1%HS/PBSで洗浄したCD3/CD28ビーズを細胞数に対して3倍量添加し、ローテーターを用いて4°Cで30分間穏やかに攪拌した。反応終了後1%HS/PBSを適量加えて穏やかに攪拌したのち、MPCに2~3分静置してビーズ非結合細胞を取り除いた。ビーズ結合細胞は、はじめに1.5mLねじ式チューブに採取した細胞数換算で 4×10^6 cells/mLとなるように5%X-VIVO15に懸濁した。以下この細胞をT細胞セレクション細胞と記載する。

[0137] (2) CD4陽性T細胞の拡大培養

(i) T細胞セレクションなし群の調製

実施例1-(2)と同様の方法で抗CD3抗体及びCH-296、又はCH-296のみを固定化した12穴細胞培養プレートに、実施例3-(1)で調製したCD8除去細胞を0.5mL/ウェルずつ添加した。このうちCH-296のみ固定化したウェルには、1%

HS／PBSで洗浄したCD3／CD28ビーズを細胞数に対して3倍量添加したのち、それぞれを5％X－VIVO15を用いて4mLに調製し、これらの条件で処理した細胞をT細胞セレクションなし群とした。

(ii) T細胞セレクションあり群の調製

実施例3－(1)で調製したT細胞セレクション細胞を実施例1－(2)と同様の方法でCH－296のみ固定化したウェルに0.5mL／ウェルずつ添加し、5％X－VIVO15を用いて4mLに調製した。これらの条件で処理した細胞をT細胞セレクションあり群とした。

(iii) 上記(i)，(ii)ののプレートについて、37℃、5％CO₂ インキュベータ内で培養を開始した(培養0日目)。培養開始3日目には、T細胞セレクションなし群については5％X－VIVO15を用いて約6.3倍希釈し、希釈液20mLを何も固定化していないT25細胞培養フラスコを立てたものに移し、T細胞セレクションあり群については細胞培養液3.2mLを0.05×10⁶ cells／mLとなるように希釈し、希釈液を何も固定化していないT25細胞培養フラスコを立てたものに移した。培養6日目には、T細胞セレクションなし群については、5％X－VIVO15を用いて2倍希釈した希釈液20mLを、T細胞セレクションあり群については約4.7倍希釈した希釈液20mLをそれぞれ何も固定化していないT25細胞培養フラスコに移し、10日間培養を継続した。なお、IL－2はいずれも終濃度100U／mLとなるように添加した。培養開始後6日目の拡大培養率を表6に示す。

[0138] [表6]

表 6

初期刺激	T細胞セレクション	拡大培養率 (倍率)
抗CD3抗体 + CH－296	なし群	28.9
CD3／CD28ビーズ + CH－296	なし群	20.0
CD3／CD28ビーズ + CH－296	あり群	7.4

[0139] 表6に示されるように、抗CD3抗体とCH－296のみの初期刺激がもっとも高い拡

大培養率を示した。つまり、抗CD3抗体とCH-296の組み合わせが、好適であることが明確になった。

[0140] (3) IL-4陰性IFN- γ 陽性T細胞の解析

実施例3-(2)で得られた培養10日目の細胞について、実施例1-(6)に記載した方法でIL-4陰性IFN- γ 陽性T細胞の含有率を測定した。結果を表7に示す。なお、全ての条件において、CD4陽性T細胞の含有率は85%以上であることを確認した。

[0141] [表7]

表7

初期刺激	T細胞セレクション	IL-4陰性
		IFN- γ 陽性 (%)
抗CD3抗体 + CH-296	なし群	21.5
CD3/CD28ビーズ + CH-296	なし群	14.6
CD3/CD28ビーズ + CH-296	あり群	13.8

[0142] 表7に示されるように、抗CD3抗体とCH-296で初期刺激した細胞は、CD3/CD28ビーズを用いて刺激した細胞と比較して、IL-4陰性IFN- γ 陽性T細胞の含有率が高かった。つまり、初期刺激において抗CD3抗体とCH-296の組み合わせはTh1タイプのCD4陽性T細胞が優先的に増殖することが明らかとなった。

[0143] 実施例4 CD8陽性CD45RA陽性CCR7陽性T細胞の拡大培養における培養開始時のCD4陽性T細胞とCD8陽性T細胞の比率の影響

(1) 抗ヒトCD3抗体及びCH-296の固定化

実施例1-(2)と同様にして行った。ただし、固定化に使用する培養器材は12穴細胞培養プレートとし、抗CD3抗体のみを固定化する群も設定した。

[0144] (2) CD8陽性T細胞の調製

実施例1-(1)で調製したPBMCから、実施例1-(3)と同様の方法でCD8陽性T細胞の分離を行うが、ここではビーズ非結合細胞を除去して、ビーズ結合細胞を得た。回収したビーズ結合細胞を、1%HS/PBSを用いて 1×10^8 cells/mLになるように懸濁後、デタッチャビーズ(DETACHaBEAD CD4/CD8:インビトロジェン社

製)を細胞 1×10^7 cellsに対し、 $10 \mu\text{L}$ 添加して、ローテーターを用いて室温で1時間緩やかに攪拌したのち、MPCに2～3分静置してビーズ非結合細胞を回収した(以下、CD8陽性T細胞と記載)。回収したCD8陽性T細胞を $500 \times g$ で5分間遠心したのち、0.5%ヒトAB血清と0.2%ヒト血清アルブミンを含むGT-503(以下0.5%GT-T503と記載)を用いて、 0.25×10^6 cells/mLなるように懸濁した。

[0145] (3) CD4陽性T細胞の調製

実施例1-(1)で調製したPBMCを、1%HS/PBSを用いて 1×10^7 cells/mLになるように懸濁後、1%HS/PBSで洗浄したCD4ポジティブセレクションビーズ(CD4 Positive Isolation Kit:インビトロジェン社製、以下、本工程で使用する試薬は当該Kit付属品を使用)をPBMC 1×10^7 cellsあたり 1×10^7 ビーズとなるように添加して、ローテーターを用いて 4°C で1時間緩やかに攪拌したのち、MPCに2～3分静置してビーズ非結合細胞を除去し、ビーズ結合細胞を回収した(ビーズ結合状態で回収)。その後、実施例4-(2)と同様にしてデタッチャビーズを用いてビーズ非結合細胞を回収(以下、CD4陽性T細胞と記載)し、 $500 \times g$ で5分間遠心したのち、0.5%GT-T503を用いて、 0.25×10^6 cells/mLとなるように懸濁した。

[0146] (4) モノサイトの調製

実施例1-(1)で調製したPBMCを、1%HS/PBSを用いて 1×10^8 cells/mLになるように懸濁後、PBMC 1×10^7 cellsあたり $20 \mu\text{L}$ のBlocking Reagent (Monocyte Negative Isolation Kit:インビトロジェン社製、以下、本工程で使用する試薬は当該Kit付属品を使用)、及び $20 \mu\text{L}$ のAntibody Mixを添加後、懸濁して 4°C で20分間インキュベートした。その後、 $500 \times g$ で5分間遠心して上清を除去して、1%HS/PBSに懸濁したPBMCを洗浄したモノサイトネガティブセレクションビーズをPBMC 1×10^7 cellsあたり 1×10^7 ビーズとなるように添加して、ローテーターを用いて 4°C で15分間緩やかに攪拌したのち、MPCに2～3分静置してビーズ非結合細胞(以下、モノサイトと記載)を回収した。回収したモノサイトを $500 \times g$ で5分間遠心したのち、0.5%GT-T503を用いて 1×10^5 cells/mLなるように懸濁した。

[0147] (5) 実施例4-(2)、(3)、及び(4)で調製した細胞の拡大培養

実施例4-(1)で抗CD3抗体のみ、もしくは抗CD3抗体及びCH-296を固定化

したプレートに、0.5%GT-T503を0.25mL/ウェルで添加したのち、実施例4-(4)で調製したモノサイト懸濁液を0.25mL/ウェルを添加した。CD4陽性T細胞：CD8陽性T細胞の比として、CD4陽性T細胞：CD8陽性T細胞＝0：1、0.5：1、1：1、2：1、4：1の5条件を設定し、当該個々の条件の比に合うように、また各ウェルの総細胞数が 0.25×10^6 cellsとなるように(実施例4-(4)で調製した細胞を除く)実施例4-(2)、及び(3)で調製したCD8陽性T細胞懸濁液及びCD4陽性T細胞懸濁液を添加した。その後、IL-2を終濃度200U/mLとなるように各ウェルに添加し、これらのプレートを37°C、5%CO₂インキュベータ内で培養した(培養0日目)。培養開始4日目には、0.5%GT-T503を用いて約14倍希釈し、希釈液10mLを何も固定化していないT-25細胞培養フラスコ(コーニング社製)を立てたものに移した。培養7日目には、0.5%GT-T503を用いて約2倍希釈して、希釈液10mLを何も固定化していないT-25細胞培養フラスコを立てたものに移した。培養11日目には、0.2%ヒト血清アルブミンを含むGT-T503(以下、0%GT-T503と記載)を用いて約2倍希釈して全量を20mLとした。培養14日目を実験終了日とした。いずれの培養日においても、終濃度200U/mLとなるようにIL-2を添加した。

[0148] (6)CD8陽性CD45RA陽性CCR7陽性T細胞の解析

培養0日目で調製したPBMC及び実施例4-(5)で得られた培養14日目の各細胞を実施例1-(5)と同様の方法で抗体染色を行い、CD8陽性CD45RA陽性CCR7陽性T細胞の含有率を算出した。ここで、ネガティブコントロールには実施例1-(5)のネガティブコントロールを使用し、発現検出用細胞には同様にRD1標識マウス抗ヒトCD45RA抗体/FITC標識マウス抗ヒトCCR7抗体にPC5標識マウス抗ヒトCD8抗体(ベックマンコールター社製)を添加した。培養14日目のCD8陽性CD45RA陽性CCR7陽性T細胞の拡大培養率を表8に示す。なお、当該表におけるCD8陽性CD45RA陽性CCR7陽性T細胞拡大培養率は、培養14日目の細胞集団中に含まれるCD8陽性CD45RA陽性CCR7陽性T細胞数と培養開始時の細胞集団中に含まれるCD8陽性CD45RA陽性CCR7陽性T細胞数とを比較して算出した。なお、CD8陽性CD45RA陽性CCR7陽性T細胞数とは得られた総細胞数にCD8陽性CD45RA陽性CCR7陽性T細胞比率を乗じたものとした。

[0149] [表8]

表 8

初期刺激	培養開始時	CD 8 陽性 CD 4 5 RA 陽性
	CD 4 陽性 T 細胞 :	CCR 7 陽性
	CD 8 陽性 T 細胞	T 細胞拡大培養率 (倍率)
	含有率比	
抗 CD 3 抗体	0 : 1	2. 0
	0. 5 : 1	2 7. 9
	1 : 1	1 2 0. 8
	2 : 1	2 2 5. 7
	4 : 1	3 3 7. 5
抗 CD 3 抗体 + CH-296	0 : 1	5 5. 0
	0. 5 : 1	7 2 2. 4
	1 : 1	1 9 2 4. 0
	2 : 1	2 4 2 8. 8
	4 : 1	4 1 4 5. 1

[0150] 表8に示されるように、培養開始時の細胞集団中のCD8陽性T細胞に対するCD4陽性T細胞の比が大きくなるにしたがって、CD8陽性CD45RA陽性CCR7陽性T細胞の拡大培養率は高くなり、この効果は抗CD3抗体に加えCH-296を用いて拡大培養を行った場合に、より顕著であることが示された。

[0151] 実施例5 抗ヒトCD3抗体及びCH-296の組み合わせ刺激により得られたT細胞のIL-5及びIL-9の産生抑制効果

(1) 抗ヒトCD3抗体、抗ヒトCD28抗体、及びCH-296の固定化

抗ヒトCD3抗体のみ、もしくは抗ヒトCD3抗体とCH-296を組み合わせたプレートの固定化を、実施例4-(1)と同様に行った。また、抗ヒトCD3抗体と抗ヒトCD28抗体を組み合わせた固定化を、それぞれ終濃度5 μ g/mLとなるようにACD-A液で調製して実施例4-(1)と同様に行った。

[0152] (2) CD4陽性T細胞の調製

実施例4－(3)と同様の方法で、CD4陽性T細胞を調製した。

[0153] (3)CD4陽性T細胞の拡大培養

実施例5－(1)で調製した各固定化プレートに、0.5%GT-T503を0.5mL／ウェルで添加したのち、実施例5－(2)で調製したCD4陽性T細胞懸濁液を1.0mL／ウェルで添加した。その後、IL-2を終濃度500U／mLとなるように各ウェルに添加し、これらのプレートを37℃、5%CO₂インキュベータ内で培養した(培養0日目)。培養開始4日目には、0.5%GT-T503を用いて約14倍希釈し、希釈液2.0mLを何も固定化していない12穴細胞培養プレートに移した。培養7日目には、0.5%GT-T503を用いて約2倍希釈して、希釈液2.0mLを何も固定化していない12穴細胞培養プレートに移した。培養11日目には、0%GT-T503を用いて約2倍希釈して全量を4.0mLとし、培養14日目まで培養を継続した。いずれの継代日においても、終濃度500U／mLとなるようにIL-2を添加した。培養開始後14日目の拡大培養率を表9に示す。

[0154] [表9]

表9

刺激条件	拡大培養率 (倍率)
抗CD3抗体 (対照群)	368.3
抗CD3抗体+CH-296	1590.8
抗CD3抗体+抗CD28抗体	1177.1

[0155] 表9に示されるように、抗CD3抗体とCH-296を組み合わせた群は対照群と比較して高い拡大培養率が得られることがわかった。さらには抗CD3抗体と抗CD28抗体を組み合わせるよりも抗CD3抗体とCH-296と組み合わせた方が高い拡大培養率が得られた。

[0156] (4)培養上清中のIL-5の検出

実施例5－(3)での拡大培養における培養2日目、4日目、7日目、11日目の培養上清中のIL-5濃度をhuman IL-5 ELISA KIT(PIERCE社製)を用いて測定した。測定の際は、キット付属の説明書に従った。ただし、使用した培養上清は、培養2日目以外は継代操作前に分取し、測定日まで－80℃で凍結保存しておいた。

ものを室温で融解して使用した。

[0157] (5)培養上清中のIL-9の検出

0.5mg/mL Purified anti-human IL-9(BioLegend社製, MH9A4)(以下、Capture抗体とする)を、20mM glycine, 30mM NaCl, pH9.2の溶液(以下、Coating bufferと記載)で2.5 μ g/mLに希釈して、ELISA用プレート(Nunc社製)に100 μ L/ウェル添加して、4°Cで遮光して保存した。翌日保存しておいたプレートを取り出し、Tween20(シグマ社製)を0.05%含むPBS(以下、Wash bufferと記載)を200 μ L/ウェルずつ添加し、アスピレーターで上清を除去した。この作業を3回繰り返す、ウェル内を洗浄した。次にBSAを1%含むPBS(以下、Blocking Bufferと記載)を300 μ L/ウェルで添加し、37°C CO₂ インキュベータ内にて2時間放置した。その後、Wash bufferを200 μ L/ウェル添加し、アスピレーターで上清を除去した。この作業を3回繰り返す、ウェル内を洗浄した。次に実施例5-(3)で拡大培養中において培養2日目、4日目、7日目、11日目に培養上清を分取(培養2日目以外は継代操作前に分取)し、測定日まで-80°Cで凍結保存しておいたものを室温で融解して100 μ L/ウェル添加し、StandardのIL-9(500pg/mLから5pg/mLまで10倍に段階希釈したもの)を100 μ L/ウェル添加し、室温で2時間静置した。Wash bufferを200 μ L/ウェル添加し、アスピレーターで上清を除去した。この作業を3回繰り返す、ウェル内をよく洗った。Biotin anti-human IL-9(MH9A3)(以下、検出用抗体とする)をPBSで10倍に希釈したBlocking bufferで2000倍に希釈したものを100 μ L/ウェル添加し、CO₂ インキュベータ内にて2時間放置した。Wash bufferを200 μ L/ウェル添加し、アスピレーターで上清を除去した。この作業を3回繰り返すのち、SA-HRP(Hts社製、HE101)をPBSで10倍に希釈したBlocking bufferで500倍に希釈したものを100 μ L/ウェル添加して室温で30分静置したのち、Wash bufferを200 μ L/ウェル添加し、アスピレーターで上清を除去した。この作業を3回繰り返す。ABTS Peroxidase Substrate(KPL社製、50-66-01)(以下、基質と記載)を100 μ L/ウェル添加し、10分室温で遮光(様子を見ながら必要に応じて短縮)した。150mMのシュウ酸(以下、stop solutionと記載)を50 μ L/ウェル添加して、プレートリーダー(波長405nm)で

測定した。

[0158] 各刺激条件で培養した上清に含まれるIL-5、及びIL-9の濃度(pg/mL)を培養日数ごとに、表10、及び表11に示す。当該表においては、抗CD3抗体とCH-296を組み合わせた刺激条件における各サイトカインの濃度を1とした時の各刺激条件のサイトカイン産生比率を示した。なお表中N. T. はNot Testを意味する。

[0159] [表10]

刺激条件	IL-5産生比率 (培養日数)			
	2日目	4日目	7日目	11日目
抗CD3抗体	2.0	2.0	1.8	1.9
抗CD3抗体+CH-296	1.0	1.0	1.0	1.0
抗CD3抗体+抗CD28抗体	5.0	2.5	1.3	0.9

[0160] [表11]

刺激条件	IL-9産生比率 (培養日数)			
	2日目	4日目	7日目	11日目
抗CD3抗体	N. T.	1.3	3.2	5.4
抗CD3抗体+CH-296	1.0	1.0	1.0	1.0
抗CD3抗体+抗CD28抗体	0.5	6.0	9.1	11.3

[0161] 表10及び表11に示されるように、培養期間を通して培養上清中に含まれるIL-5、及びIL-9の濃度は、抗CD3抗体とCH-296を組み合わせた刺激条件下が、抗CD3抗体のみの刺激条件下、及び抗CD3抗体と抗CD28抗体を組み合わせた刺激条件下よりも低いことが判明した。以上より、抗CD3抗体にCH-296を組み合わせた刺激の方が抗CD3抗体と抗CD28抗体と組み合わせた刺激よりも高い拡大培養率が得られ、かつT細胞の増殖時においてIL-5及びIL-9の産生が少ないことが示された。

[0162] 実施例6 H204の作成

(1) H204発現ベクターの構築

III-13(配列表の配列番号6で表されるアミノ酸配列)、III-14(配列表の配列番号7で表されるアミノ酸配列)及びCS-1(配列表の配列番号8で表されるアミノ酸配列)がN末端から順に連結した改変型FNフラグメント(H204)を得るため、以下のようにして発現ベクターを構築した。

[0163] (i) CH-296発現ベクターの構築

CH-296(FNの細胞結合ドメイン、ヘパリン結合ドメイン及びCS-1ドメインからなるポリペプチド)発現ベクター(pCH102)を、*Escherichia coli* HB101/pCH102(FERM BP-2800)を用い、これを米国特許第5,198,423号明細書の記載に基づいて調製した。

[0164] 配列表の配列番号24記載のCH-296の塩基配列(国際公開第03/080817号パンフレット参照)より、配列表の配列番号25及び26記載の塩基配列を有する合成プライマーCH296-NdeF及び合成プライマーH296-HindRをDNA合成機で合成し、常法により精製した。上記合成プライマーCH-296-NdeFは、制限酵素NdeIの認識配列を塩基番号9~14に、さらにCH-296のアミノ酸配列のアミノ酸番号1~6に相当する塩基配列を塩基番号15~32にもつ合成DNAである。また、合成プライマーH296-HindRは、制限酵素HindIIIの認識配列を塩基番号11~16に、さらにCH-296のアミノ酸配列(配列番号13)のアミノ酸番号570~574に相当する塩基配列を塩基番号20~34にもつ合成DNAである。

[0165] 上記合成プライマーを用いて、PCRを行った。PCRの反応条件を以下に示す。すなわち、鋳型DNAとしてpCH102 約0.1 μ g、5 μ Lの10 $\times$ Ex Taq Buffer(タカラバイオ社製)、5 μ LのdNTP混合液(タカラバイオ社製)、10pmolの合成プライマーCH296-NdeF、10pmolの合成プライマーH296-HindR、0.5UのTaKaRa Ex Taq(タカラバイオ社製)を加え、滅菌水を加えて全量を50 μ Lとした。前記反応液をTaKaRa PCR Thermal Cycler SP(タカラバイオ社製)にセットし、94 $^{\circ}$ C 1分、55 $^{\circ}$ C 1分、72 $^{\circ}$ C 3分を1サイクルとする30サイクルの反応を行った。反応終了後、該反応液5 μ Lを1.0%アガロースゲル電気泳動に供し、目的の約1.7kbpのDNAフラグメントを確認した。残りのPCR反応液を電気泳動し、そのフラグメント

を回収・精製し、エタノール沈殿を行った。エタノール沈殿後の回収DNAを10 μ Lの滅菌水に懸濁し、制限酵素NdeI(タカラバイオ社製)及び制限酵素HindIII(タカラバイオ社製)で2重消化した。1.0%アガロースゲル電気泳動によりそのNdeI、HindIII消化物を抽出精製し、NdeI-HindIII消化DNA断片を得た。

[0166] 次に後述のpCold14NDベクターをNdeI、HindIIIで消化したものを調製し、上記NdeI-HindIII消化DNA断片と混合し、DNAライゲーションキット(タカラバイオ社製)を用いて連結した。その後、ライゲーション反応液10 μ Lを用いて大腸菌JM109を形質転換し、その形質転換体を1.5%(w/v)濃度の寒天を含むLB培地(アンピシリン50 μ g/mL含む)上で生育させた。目的のタンパク質をコードするDNA断片が挿入された組換えプラスミドは、シーケンシングすることにより確認し、pCold14NDCH-296とした。

[0167] (ii) H204発現ベクターの構築

配列表の配列番号24記載のCH-296の塩基配列より、配列表の配列番号27及び28記載の塩基配列を有する合成プライマーNVS-F-Nco及びpC-TERをDNA合成機で合成し、常法により精製した。上記合成プライマーNVS-F-Ncoは、制限酵素NcoIの認識配列を塩基番号10~15に、さらにCH-296のアミノ酸配列(配列番号13)のアミノ酸番号371~377に相当する塩基配列を塩基番号18~38にもつ合成DNAである。また、合成プライマーpC-TERは、配列表の配列番号28記載のpCold14ベクターの3' TER部分にアニーリングする配列をもつ合成DNAである。

[0168] 国際公開第99/27117号パンフレットの実施例1~6記載の方法に従いpCold04NC2ベクターを調製した。このpCold04NC2ベクターを、本明細書ではpCold14ベクターと呼ぶ。また、pCold14ベクターのNcoIサイトを常法によりNdeIサイトに変換したベクターを調製した。当該ベクターを本明細書ではpCold14NDベクターと呼ぶ。

[0169] 上記合成プライマーを用いてPCRを行った。PCRの反応条件を以下に示す。すなわち、鋳型DNAとして実施例6-(1)-(i)で構築したpCold14NDCH-296 約0.1 μ g、10 μ Lの10×Pyrobest BufferII(タカラバイオ社製)、8 μ LのdNTP混

合液、20pmolの合成プライマーNVS-F-Nco、20pmolの合成プライマーpC-TER、2.5UのPyrobest DNA Polymerase(タカラバイオ社製)を加え、滅菌水を加えて全量を100 μ Lとした。前記反応液をTaKaRa PCR Thermal Cycler SPにセットし、95°C 30秒、68°C 2分を1サイクルとする30サイクルの反応を行った。反応終了後、該反応液5 μ Lを1.0%アガロースゲル電気泳動に供し、目的の約0.6kbpのDNAフラグメントを確認した。残りのPCR反応液はエタノール沈殿を行ない、回収DNAを滅菌水に懸濁して、制限酵素NcoI(タカラバイオ社製)及び制限酵素XbaI(タカラバイオ社製)で2重消化した。1.0%アガロースゲル電気泳動によりそのNcoI、XbaI消化物を抽出精製し、NcoI-XbaI消化DNA断片を得た。

[0170] 次にpCold14ベクターをNcoI、XbaIで消化したものを調製し、上記NcoI-XbaI消化DNA断片と混合し、DNAライゲーションキットを用いて連結した。その後、ライゲーション反応液10 μ Lを用いて大腸菌JM109を形質転換し、その形質転換体を1.5% (w/v)濃度の寒天を含むLB培地(アンピシリン50 μ g/mL含む)上で生育させた。

[0171] III-13、III-14及びCS-1が順に連結したタンパク質をコードするDNA断片が挿入されたプラスミドは、シーケンシングすることにより確認し、この組換えプラスミドをpCold14-H204とした。このpCold14-H204は、CH-296のアミノ酸番号371~574のアミノ酸配列をコードする塩基配列を含むプラスミドである。当該タンパク質をH204と命名し、そのアミノ酸配列を配列表の29に、塩基配列を配列表の配列番号30に示す。

[0172] (2)H204の発現、精製

上記(1)で調製したpCold14-H204を用いて大腸菌BL21を形質転換し、その形質転換体を1.5% (w/v)濃度の寒天を含むLB培地(アンピシリン50 μ g/mL含む)上で生育させた。生育したコロニーを30mLのLB液体培地(アンピシリン50 μ g/mL含む)に植菌し、37°Cで一晩培養した。全量を3Lの同LB培地に植菌し、37°Cで対数増殖期まで培養した。なお、この培養の際には、5L容ミニジャーファーマンター(Biott社製)を使用し、120r/min、Air=1.0L/minの条件で行った。前記培養後、15°Cまで冷却した後、IPTGを終濃度1.0mMになるように添加し、そのま

ま15℃で24時間培養して発現誘導させた。その後菌体を遠心分離により集め、約40mLの細胞破碎溶液[50mM Tris-HCl(pH7.5), 1mM EDTA, 1mM DTT, 1mM PMSF, 50mM NaCl]に再懸濁した。超音波破碎により菌体を破碎し、遠心分離(11,000r/min、20分)により上清の抽出液と沈殿とに分離した。得られた上清の抽出液を2LのbufferA[50mM Tris-HCl(pH7.5), 50mM NaCl]で透析を行い、その約40mLを用いてさらにイオン交換クロマトによる精製を以下のように行った。すなわち、樹脂容積にして100mL分のSP-Sepharose(アマシャムファルマシア社製)をbufferAで飽和させたカラム(Φ4cm×20cm)を準備し、これに透析後のサンプルをアプライした。その後、250mLのbufferAと250mLのbufferB[50mM Tris-HCl(pH7.5), 1M NaCl]で50mMから1Mの塩化ナトリウムの濃度勾配により目的タンパク質の溶出を行った。5mLずつ分画を行い、10%SDS-PAGEにより、分子量約23kDaの目的タンパク質を多く含む画分、約100mLを回収し、2LのbufferAで透析を行った。次に、樹脂容積にして50mL分のQ-Sepharose(アマシャムファルマシア社製)をbufferAで飽和させたカラム(Φ3cm×16cm)を準備し、これに透析後のサンプルをアプライした。その後、250mLのbufferAと250mLのbufferBで50mMから1Mの塩化ナトリウムの濃度勾配により目的タンパク質の溶出を行った。5mLずつ分画を行い、10%SDS-PAGEにより確認し、分子量約23kDaの目的タンパク質を多く含む画分、約100mLを回収し、2LのbufferD[50mM 炭酸ナトリウム緩衝液(pH9.5)]で透析を行った。その後、セントリコン-10(ミリポア社製)で10mLまで濃縮を行い、さらに10%SDS-PAGEで確認したところ、分子量約23kDaの目的タンパク質がほぼ単一バンドで検出され、これをH204とした。その後、MicroBCAキット(ピアース社製)を使用して、タンパク質濃度を測定したところ、2.2mg/mLであった(分子量から計算して、約96μM)。

[0173] 実施例7 H296-CS1の作成

(1) H296-CS1発現ベクターの構築

H-296(配列表の配列番号11で表されるアミノ酸配列)のC末端にCS-1(配列表の配列番号8で表されるアミノ酸配列)が連結した改変型FNフラグメント(H296-CS1)を得るため、以下のようにして発現ベクターを構築した。

[0174] (i) H-296発現ベクターの構築

CH-296のアミノ酸配列(配列表の配列番号13記載)のアミノ酸番号278~574よりなるポリペプチドであるH-296の発現ベクターを、以下のようにして構築した。

[0175] まず、配列表の配列番号24記載のCH-296の塩基配列より、配列表の配列番号31記載の塩基配列を有する合成プライマーH296-NcoFをDNA合成機で合成し、常法により精製した。上記合成プライマーH296-NcoFは、制限酵素NcoIの認識配列を塩基番号11~16に、さらにCH-296のアミノ酸配列(配列番号13)のアミノ酸番号278~283に相当する塩基配列を塩基番号13~30にもつ合成DNAである。

[0176] 上記合成プライマーH296-NcoF及び合成プライマーH296-HindRを用いて、PCRを行った。PCRの反応条件を以下に示す。すなわち、鋳型DNAとしてpCH102 約0.1 μ g、5 μ Lの10 $\times$ Ex Taq Buffer、5 μ LのdNTP混合液、10pmolの合成プライマーH296-NcoF、10pmolの合成プライマーH296-HindR、0.5UのTaKaRa Ex Taqを加え、滅菌水を加えて全量を50 μ Lとした。前記反応液をTaKaRa PCR Thermal Cycler SPにセットし、94 $^{\circ}$ C 1分、55 $^{\circ}$ C 1分、72 $^{\circ}$ C 3分を1サイクルとする30サイクルの反応を行った。

[0177] 反応終了後、該反応液5 μ Lを1.0%アガロースゲル電気泳動に供し、目的の約0.9kbpのDNAフラグメントを確認した。残りのPCR反応液を電気泳動し、そのフラグメントを回収・精製し、エタノール沈殿を行った。エタノール沈殿後の回収DNAを10 μ Lの滅菌水に懸濁し、制限酵素NcoI及び制限酵素HindIIIで2重消化した。1.0%アガロースゲル電気泳動によりそのNcoI、HindIII消化物を抽出精製し、NcoI-HindIII消化DNA断片を得た。

[0178] 次にpCold14ベクターをNcoI、HindIIIで消化したものを調製し、上記NcoI-HindIII消化DNA断片と混合し、DNAライゲーションキットを用いて連結した。その後、ライゲーション反応液20 μ Lを用いて大腸菌JM109を形質転換し、その形質転換体を1.5% (w/v)濃度の寒天を含むLB培地(アンピシリン50 μ g/mL含む)上で生育させた。

[0179] 目的のDNA断片が挿入されたプラスミドは、シーケンシングすることにより確認し

、この組換えプラスミドをpCold14-H296とした。このpCold14-H296は、CH-296のアミノ酸番号278～574のアミノ酸配列をコードする塩基配列を含むプラスミドである。

[0180] (ii) H296-CS1発現ベクターの構築

配列表の配列番号24記載のCH-296の塩基配列より、配列表の配列番号32記載の塩基配列を有する合成プライマーNC2-5'UTR、配列番号33記載の塩基配列を有する合成プライマーCS1-no. st-CS1-R、配列番号34記載の塩基配列を有する合成プライマーCS1-no. st-CS1-F、及び配列番号35記載の塩基配列を有する合成プライマーFN-5630FをDNA合成機で合成し、常法により精製した。上記合成プライマーNC2-5'UTRは、pCold14ベクターの5'UTR部分にアニーリングする合成DNAである。また、合成プライマーCS1-no. st-CS1-Rは、CH-296のアミノ酸配列(配列番号13)のアミノ酸番号554～550に相当する塩基配列を塩基番号1～15に、さらにCH-296のアミノ酸配列(配列番号13)のアミノ酸番号574～569に相当する塩基配列を塩基番号16～33にもつ合成DNAである。また、合成プライマーCS1-no. st-CS1-Fは、CH-296のアミノ酸配列(配列番号13)のアミノ酸番号570～574に相当する塩基配列を塩基番号1～15に、さらにCH-296のアミノ酸配列(配列番号13)のアミノ酸番号550～555に相当する塩基配列を塩基番号16～33にもつ合成DNAである。また、合成プライマーFN-5630Fは、CH-296のアミノ酸配列(配列番号13)のアミノ酸番号426～434に相当する塩基配列を塩基番号2～28にもつ合成DNAである。

[0181] 上記合成プライマーを用いてPCRを行った。PCRの反応条件を以下に示す。すなわち、鋳型DNAとして実施例6-(1)-(i)で構築したpCold14NDCH-296 約0.1 μ g、10 μ Lの10 $\times$ Pyrobest BufferII、8 μ LのdNTP混合液、20pmolの合成プライマーNC2-5'UTR、20pmolの合成プライマーCS1-no. st-CS1-R、2.5UのPyrobest DNA Polymeraseを加え、滅菌水を加えて全量を100 μ Lとした。前記反応液をTaKaRa PCR Thermal Cycler SPにセットし、98 $^{\circ}$ C 1分、58 $^{\circ}$ C 1分、72 $^{\circ}$ C 4分を1サイクルとする30サイクルと72 $^{\circ}$ C 10分の反応を行った。反応終了後、該反応液5 μ Lを1.0%アガロースゲル電気泳動に供し、目的の約1

．8kbpのDNAフラグメントを確認した。残りのPCR反応液を1．0%アガロースゲル電気泳動により抽出精製し、回収DNAを10 μ Lの滅菌水に懸濁した。このDNAフラグメントを1Lとした。

[0182] さらに、上記合成プライマーを用いてPCRを行った。PCRの反応条件を以下に示す。すなわち、鋳型DNAとして実施例6－(1)－(i)で構築したpCold14NDCH－296 約0．1 μ g、10 μ Lの10×Pyrobest BufferII、8 μ LのdNTP混合液、20pmolの合成プライマーCS1－no．st－CS1－F、20pmolの合成プライマーpC－TER、2．5UのPyrobest DNA Polymeraseを加え、滅菌水を加えて全量を100 μ Lとした。前記反応液をTaKaRa PCR Thermal Cycler SPにセットし、98℃ 1分、58℃ 1分、72℃ 4分を1サイクルとする30サイクルと72℃ 10分の反応を行った。反応終了後、該反応液5 μ Lを1．0%アガロースゲル電気泳動に供し、目的の約0．3kbpのDNAフラグメントを確認した。残りのPCR反応液を1．0%アガロースゲル電気泳動により抽出精製し、回収DNAを10 μ Lの滅菌水に懸濁した。このDNAフラグメントを3Lとした。

[0183] 次に上記1L及び3Lを鋳型DNAとしてPCRを行った。PCRの反応条件を以下に示す。鋳型DNAとして1L及び3Lを滅菌水で100倍希釈したもの各々1 μ L、10 μ Lの10×Pyrobest BufferII、8 μ LのdNTP混合液、20pmolの合成プライマーFN－5630F、20pmolの合成プライマーpC－TER、2．5UのPyrobest DNA Polymeraseを加え、滅菌水を加えて全量を100 μ Lとした。前記反応液をTaKaRa PCR Thermal Cycler SPにセットし、96℃ 1分、58℃ 1分、72℃ 2分を1サイクルとする30サイクルと72℃ 5分の反応を行った。反応終了後、該反応液5 μ Lを1．0%アガロースゲル電気泳動に供し、目的の約0．7kbpのDNAフラグメントを確認した。残りのPCR反応液を1．0%アガロースゲル電気泳動により回収、DNAを滅菌水に懸濁して、制限酵素SacI(タカラバイオ社製)及び制限酵素XbaIで2重消化した。そのSacI、XbaI消化物を1．0%アガロースゲル電気泳動により抽出精製し、約0．5kbpのSacI－XbaI消化DNA断片を得た。

[0184] 次に実施例7－(1)－(i)で構築したpCold14－H296をSacI、XbaIで消化したものを調製し、上記SacI－XbaI消化DNA断片と混合し、DNAライゲーションキットを

用いて連結した。その後、ライゲーション反応液10 μ Lを用いて大腸菌JM109を形質転換し、その形質転換体を1.5% (w/v) 濃度の寒天を含むLB培地 (アンピシリン50 μ g/mL含む) 上で生育させた。目的のH-296にCS-1が連結したタンパク質をコードするDNA断片が挿入された組換えプラスミドは、シーケンシングすることにより確認し、この組換えプラスミドをpCold14-H296-CS1とした。

[0185] このpCold14-H296-CS1は、CH-296のアミノ酸番号279-574のアミノ酸配列をコードする塩基配列にCH-296のアミノ酸番号550-574のアミノ酸配列をコードする塩基配列が連結した塩基配列を含むプラスミドである。当該タンパク質をH296-CS1と命名し、そのアミノ酸配列を配列表の配列番号36に、塩基配列を配列表の配列番号37に示す。

[0186] (2) H296-CS1の発現、精製

上記(1)で調製したpCold14-H296-CS1を用いて大腸菌BL21を形質転換し、実施例6-(2)と同様にH296-CS1の発現、精製を行った。なお、培養液、細胞破碎溶液、樹脂容積、bufferA、bufferB、bufferD、分画液、濃縮液の液量は必要に応じて適宜変更した。得られた濃縮液を10% SDS-PAGEで確認したところ、分子量約35kDaの目的タンパク質がほぼ単一バンドで検出され、これをH296-CS1とした。その後、MicroBCAキットを使用して、タンパク質濃度を測定したところ、2.1mg/mLであった(分子量から計算して、約60 μ M)。

[0187] 実施例8 H296-CS2の作成

(1) H296-CS2発現ベクターの構築

前記H296-CS1のC末端にCS-1がもう一つ連結した改変型FNフラグメント(H296-CS2)を得るため、以下のようにして発現ベクターを構築した。

[0188] (i) H296-CS2発現ベクターの構築

合成プライマーFN-5630F及び合成プライマーCS1-no. st-CS1-Rを用いてPCRを行った。PCRの反応条件を以下に示す。すなわち、鋳型DNAとして実施例7-(1)-(ii)で構築したpCold14-H296-CS1 約2ng、10 μ Lの10×Pyrobest BufferII、8 μ LのdNTP混合液、20pmolの合成プライマーFN-5630F、20pmolの合成プライマーCS1-no. st-CS1-R、2.5UのPyrobest DNA Pol

ymeraseを加え、滅菌水を加えて全量を100 μ Lとした。前記反応液をTaKaRa PCR Thermal Cycler SPにセットし、96°C 1分、68°C 2分を1サイクルとする30サイクルの反応を行った。反応終了後、該反応液5 μ Lを1.0%アガロースゲル電気泳動に供し、目的の約0.5kbpのDNAフラグメントを確認した。残りのPCR反応液を3.0%アガロースゲル電気泳動により抽出精製し、回収DNAを10 μ Lの滅菌水に懸濁した。このDNAフラグメントをH296-CS1DNA断片とした。

[0189] さらに、上記DNAフラグメントを用いてPCRを行った。PCRの反応条件を以下に示す。すなわち、鋳型DNAとして実施例7-(1)-(ii)で調製したDNAフラグメント3Lを100倍希釈したもの、及び上記DNAフラグメントH296-CS1DNA断片 0.5 μ L、2 μ Lの10×Pyrobest BufferII、1.6 μ LのdNTP混合液、2.5UのPyrobest DNA Polymeraseを加え、滅菌水を加えて全量を20 μ Lとした。前記反応液をTaKaRa PCR Thermal Cycler SPにセットし、96°C 1分、68°C 2分を1サイクルとする3サイクルの反応を行った。反応終了後、20pmolの合成プライマーFN-5630F、20pmolの合成プライマーpC-TER、3 μ Lの10×Pyrobest BufferII、2.4 μ LのdNTP混合液、2.5UのPyrobest DNA Polymeraseを追加し、滅菌水を加えて全量を50 μ Lとした。前記反応液をTaKaRa PCR Thermal Cycler SPにセットし、96°C 1分、68°C 2分を1サイクルとする30サイクルの反応を行った。該反応液5 μ Lを1.0%アガロースゲル電気泳動に供し、目的の約0.8kbpのDNAフラグメントを確認した。残りのPCR反応液を1.0%アガロースゲル電気泳動により抽出精製、回収し、制限酵素SacI及び制限酵素XbaIで2重消化した。そのSacI、XbaI消化物を1.0%アガロースゲル電気泳動により抽出精製し、約0.6kbpのSacI-XbaI消化DNA断片を得た。

[0190] 次に実施例7-(1)-(i)で構築したpCold14-H296をSacI、XbaIで消化したものを調製し、上記SacI-XbaI消化DNA断片と混合し、DNAライゲーションキットを用いて連結した。その後、ライゲーション反応液10 μ Lを用いて大腸菌JM109を形質転換し、その形質転換体を1.5% (w/v)濃度の寒天を含むLB培地(アンピシリン50 μ g/mL含む)上で生育させた。目的のH296-CS1にCS-1がもう一つ連結したタンパク質をコードするDNA断片が挿入された組換えプラスミドは、シークエ

ンシングすることにより確認し、この組換えプラスミドをpCold14-H296-CS2とした。

[0191] このpCold14-H296-CS2は、CH-296のアミノ酸番号279-574のアミノ酸配列をコードする塩基配列に、CH-296のアミノ酸番号550-574のアミノ酸配列をコードする塩基配列が2つ連結した塩基配列を含むプラスミドである。当該タンパク質をH296-CS2と命名し、そのアミノ酸配列を配列表の配列番号38に、塩基配列を配列表の配列番号39に示す。

[0192] (2)H296-CS2の発現、精製

上記(1)で調製したpCold14-H296-CS2を用いて大腸菌BL21を形質転換し、実施例6-(2)と同様にH296-CS2の発現、精製を行った。なお、培養液、細胞破碎溶液、樹脂容積、bufferA、bufferB、bufferD、分画液、濃縮液の液量は必要に応じて適宜変更した。得られた濃縮液を10%SDS-PAGEで確認したところ、分子量約38kDaの目的タンパク質がほぼ単一バンドで検出され、これをH296-CS2とした。その後、MicroBCAキットを使用して、タンパク質濃度を測定したところ、0.9mg/mLであった(分子量から計算して、約24 μ M)。

[0193] 実施例9 H114-HT及びH114の作成

(1)H114-HT発現ベクターの構築

N末端から順にHisタグ配列、III-13(配列表の配列番号6で表されるアミノ酸配列)及びCS-1(配列表の配列番号8で表されるアミノ酸配列)が連結した改変型FNフラグメント(H114-HT)を得るため、以下のようにして発現ベクターを構築した。

[0194] (i)H114-HT発現ベクターの構築

配列表の配列番号24記載のCH-296の塩基配列より、配列表の配列番号40記載の塩基配列を有する合成プライマー13-Nde-F、配列番号41記載の塩基配列を有する合成プライマー13-CS1-R、配列番号42記載の塩基配列を有する合成プライマー13-CS1-F、配列番号43記載の塩基配列を有する合成プライマーCS1-R-XbaをDNA合成機で合成し、常法により精製した。上記合成プライマー13-Nde-Fは、制限酵素NdeIの認識配列を塩基番号6~11に、さらにCH-296のアミノ酸配列(配列番号13)のアミノ酸番号371~377に相当する塩基配列を塩基番

号12～32にもつ合成DNAである。また、合成プライマー13-CS1-Rは、CH-296のアミノ酸配列(配列番号13)のアミノ酸番号555～550に相当する塩基配列を塩基番号1～18に、さらにCH-296のアミノ酸配列(配列番号13)のアミノ酸番号459～454に相当する塩基配列を塩基番号19～36にもつ合成DNAである。また、合成プライマー13-CS1-Fは、CH-296のアミノ酸配列(配列番号13)のアミノ酸番号454～459に相当する塩基配列を塩基番号2～19に、さらにCH-296のアミノ酸配列(配列番号13)のアミノ酸番号550～555に相当する塩基配列を塩基番号20～37にもつ合成DNAである。また、合成プライマーCS1-R-Xbaは、制限酵素XbaIの認識配列を塩基番号10～15に、さらにCH-296のアミノ酸配列(配列番号13)のアミノ酸番号574～569に相当する塩基配列を塩基番号19～36にもつ合成DNAである。

[0195] 上記合成プライマーを用いてPCRを行った。PCRの反応条件を以下に示す。すなわち、鋳型DNAとして実施例6-(1)-(ii)で構築したpCold14-H204 約0.1 μ g、20 μ Lの5 $\times$ PrimeSTAR Buffer(タカラバイオ社製)、8 μ LのdNTP混合液、20pmolの合成プライマー13-Nde-F、20pmolの合成プライマー13-CS1-R、2.5UのPrimeSTAR HS DNA Polymerase(タカラバイオ社製)を加え、滅菌水を加えて全量を100 μ Lとした。前記反応液をTaKaRa PCR Thermal Cycler PERSONAL(タカラバイオ社製)にセットし、NORMモードで98 $^{\circ}$ C 10秒、60 $^{\circ}$ C 45秒を1サイクルとする30サイクルの反応を行った。反応終了後、該反応液5 μ Lを3.0%アガロースゲル電気泳動に供し、目的の約0.28kbpのDNAフラグメントを確認し、これをH114-1とした。

[0196] さらに、上記合成プライマーを用いてPCRを行った。PCRの反応条件を以下に示す。すなわち、鋳型DNAとして実施例6-(1)-(ii)で構築したpCold14-H204 約0.1 μ g、20 μ Lの5 $\times$ PrimeSTAR Buffer、8 μ LのdNTP混合液、20pmolの合成プライマー13-CS1-F、20pmolの合成プライマーCS1-R-Xba、2.5UのPrimeSTAR HS DNA Polymeraseを加え、滅菌水を加えて全量を100 μ Lとした。前記反応液をTaKaRa PCR Thermal Cycler PERSONALにセットし、NORMモードで96 $^{\circ}$ C 30秒、58 $^{\circ}$ C 1分、72 $^{\circ}$ C 1分を1サイクルとする30サイク

ルと72℃ 3分の反応を行った。反応終了後、該反応液5 μ Lを3.0%アガロースゲル電気泳動に供し、目的の約0.09kbpのDNAフラグメントを確認し、これをH114-2とした。

[0197] 次に上記H114-1及びH114-2を鋳型DNAとしてPCRを行った。PCRの反応条件を以下に示す。鋳型DNAとしてH114-1及びH114-2を各々0.5 μ L、20 μ Lの5×PrimeSTAR Buffer、8 μ LのdNTP混合液、20pmolの合成プライマー13-Nde-F、20pmolの合成プライマーCS1-R-Xba、2.5UのPrimeSTAR HS DNA Polymeraseを加え、滅菌水を加えて全量を100 μ Lとした。前記反応液をTaKaRa PCR Thermal Cycler PERSONALにセットし、NORMモードで98℃ 10秒、58℃ 15秒、72℃ 30秒を1サイクルとする30サイクルの反応を行った。反応終了後、該反応液5 μ Lを3.0%アガロースゲル電気泳動に供し、目的の約0.36kbpのDNAフラグメントを確認した。残りのPCR反応液はエタノール沈殿を行ない、回収DNAを滅菌水に懸濁して、制限酵素NdeI及び制限酵素XbaIで2重消化した。3.0%アガロースゲル電気泳動によりそのNdeI、XbaI消化物を抽出精製し、NdeI-XbaI消化DNA断片を得た。

[0198] 次にpColdIベクター(タカラバイオ社製)をNdeI、XbaIで消化したものを調製し、上記NdeI-XbaI消化DNA断片と混合し、DNAライゲーションキットを用いて連結した。その後、ライゲーション反応液10 μ Lを用いて大腸菌JM109を形質転換し、その形質転換体を1.5% (w/v)濃度の寒天を含むLB培地(アンピシリン50 μ g/mL含む)上で生育させた。目的のIII-13とCS-1が連結したタンパク質をコードするDNA断片が挿入された組換えプラスミドはシーケンシングすることにより確認し、この組換えプラスミドをpColdI-H114-HTとした。

[0199] このpColdI-H114-HTは、CH-296のアミノ酸番号371-459のアミノ酸配列をコードする塩基配列と、CH-296のアミノ酸番号550-574のアミノ酸配列をコードする塩基配列が連結し、そのN末端にHisタグ配列とメチオニンを有するポリペプチドをコードするDNA配列を含むプラスミドである。当該タンパク質をH114-HTと命名し、そのアミノ酸配列を配列表の配列番号44に、塩基配列を配列表の配列番号45に示す。

[0200] (2) H114-HTの発現、精製

上記(1)で調製したpColdI-H114-HTを用いて大腸菌BL21を形質転換し、その形質転換体を1.5% (w/v)濃度の寒天を含むLB培地(アンピシリン $50\mu\text{g}/\text{mL}$ 含む)上で生育させた。生育したコロニーを500mLのLB液体培地(アンピシリン $50\mu\text{g}/\text{mL}$ 含む)に植菌し、 $\text{OD}=0.4\sim0.6$ になるまで(約5~8時間)37°Cで培養した。その後、15°Cまで冷却した後、IPTGを終濃度1.0mMになるように添加し、そのまま15°Cで24時間培養して発現誘導させた。その後菌体を遠心分離により集め、その一部である約2.5gを12.5mLのEquilibration/Wash Buffer[50mM Tris-HCl(pH8.0)、300mM NaCl]に懸濁した後、超音波破碎により菌体を破碎し、遠心分離(11,000r/min 20分)により上清の抽出液を得た。次に、樹脂容積にして4mLのTALON His-タグ精製樹脂(クロンテック社製)をEquilibration/Wash Bufferで飽和させ、上清の抽出液をアプライした。4°C、1時間攪拌した後、樹脂を50mlのEquilibration/Wash Bufferで2回洗浄し、樹脂に結合していた目的タンパク質を20mLのElution Buffer[50mM Tris-HCl(pH8.0)、300mM NaCl、0.1% CHAPS、150mM Imidazole]で溶出した。得られた溶出液をVIVASPIN(ザルトリウス社製)で10mlに濃縮し、2100 Bioanalyzer(アジレントテクノロジー社製)で解析したところ、分子量約15kDaの目的タンパク質がほぼ単一バンドとして検出され、タンパク質濃度は、 $0.5\text{mg}/\text{mL}$ であった(分子量から計算して、約 $33\mu\text{M}$)。

[0201] (3) H114の精製

次に、Factor Xa Cleavage Capture Kit(メルク社製)を用いて、上記(2)で精製したH114-HT精製タンパク質5mg分のHisタグ配列の切断を4°Cにて一晩行った後、Hisタグなしの目的タンパク質の精製を行った。Hisタグの切断及び目的タンパク質の精製は上記Kitに付属の操作書に従って行った。切断後の溶液をStock Buffer[25mM クエン酸ナトリウム緩衝液(pH6.0)]にて100倍以上希釈し、VIVASPINを用いて1mLまで濃縮した。得られた濃縮液を、2100 Bioanalyzerで解析したところ、分子量約13kDaの目的タンパク質がほぼ単一バンドとして検出され、タンパク質濃度は、 $0.86\text{mg}/\text{mL}$ であった(分子量から計算して、約 $66\mu\text{M}$)。H1

14のアミノ酸配列を配列表の配列番号46に、また当該タンパク質をコードすると予想される塩基配列を配列表の配列番号47に示す。

[0202] 実施例10 H117-HT及びH117の作成

(1) H117-HT発現ベクターの構築

N末端から順にHisタグ配列、III-12(配列表の配列番号5で表されるアミノ酸配列)及びCS-1(配列表の配列番号8で表されるアミノ酸配列)が連結した改変型FNフラグメント(H117-HT)を得るため、以下のようにして発現ベクターを構築した。

[0203] (i) H117-HT発現ベクターの構築

配列表の配列番号24記載のCH-296の塩基配列より、配列表の配列番号48記載の塩基配列を有する合成プライマーH296-NdeF、配列番号49記載の塩基配列を有する合成プライマー12-CS1-R、配列番号50記載の塩基配列を有する合成プライマー12-CS1-FをDNA合成機で合成し、常法により精製した。上記合成プライマーH296-NdeFは、制限酵素NdeIの認識配列を塩基番号9～14に、さらにCH-296のアミノ酸配列のアミノ酸番号279～285に相当する塩基配列を塩基番号15～35にもつ合成DNAである。また、合成プライマー12-CS1-Rは、CH-296のアミノ酸配列(配列番号13)のアミノ酸番号555～550に相当する塩基配列を塩基番号1～18に、さらにCH-296のアミノ酸配列(配列番号13)のアミノ酸番号370～366に相当する塩基配列を塩基番号19～33にもつ合成DNAである。また、合成プライマー12-CS1-Fは、CH-296のアミノ酸配列(配列番号13)のアミノ酸番号366～370に相当する塩基配列を塩基番号1～15に、さらにCH-296のアミノ酸配列(配列番号13)のアミノ酸番号550～555に相当する塩基配列を塩基番号16～33にもつ合成DNAである。

[0204] 上記合成プライマーを用いてPCRを行った。PCRの反応条件を以下に示す。すなわち、鋳型DNAとして実施例7-(1)-(i)で構築したpCold14-H296 約0.1 μ g、20 μ Lの5×PrimeSTAR Buffer、8 μ LのdNTP混合液、20 pmolの合成プライマーH296-NdeF、20 pmolの合成プライマー12-CS1-R、2.5 UのPrimeSTAR HS DNA Polymeraseを加え、滅菌水を加えて全量を100 μ Lとした。前記反応液をTaKaRa PCR Thermal Cycler PERSONALにセットし、NORM

モードで98°C 10秒、68°C 30秒を1サイクルとする30サイクルの反応を行った。反応終了後、該反応液5 μ Lを3.0%アガロースゲル電気泳動に供し、目的の約0.3kbpのDNAフラグメントを確認し、これをH117-1とした。

- [0205] さらに、上記合成プライマーと合成プライマーCS1-R-Xbaを用いてPCRを行った。PCRの反応条件を以下に示す。すなわち、鋳型DNAとして実施例7-(1)-(i)で構築したpCold14-H296 約0.1 μ g、20 μ Lの5×PrimeSTAR Buffer、8 μ LのdNTP混合液、20pmolの合成プライマー12-CS1-F、20pmolの合成プライマーCS1-R-Xba、2.5UのPrimeSTAR HS DNA Polymeraseを加え、滅菌水を加えて全量を100 μ Lとした。前記反応液をTaKaRa PCR Thermal Cycler PERSONALにセットし、NORMモードで98°C 10秒、58°C 15秒、72°C 30秒を1サイクルとする30サイクルの反応を行った。反応終了後、該反応液5 μ Lを3.0%アガロースゲル電気泳動に供し、目的の約0.09kbpのDNAフラグメントを確認し、これをH117-2とした。

- [0206] 次に上記H117-1及びH117-2を鋳型DNAとしてPCRを行った。PCRの反応条件を以下に示す。鋳型DNAとしてH117-1及びH117-2を各々0.5 μ L、20 μ Lの5×PrimeSTAR Buffer、8 μ LのdNTP混合液、20pmolの合成プライマーH296-NdeF、20pmolの合成プライマーCS1-R-Xba、2.5UのPrimeSTAR HS DNA Polymeraseを加え、滅菌水を加えて全量を100 μ Lとした。前記反応液をTaKaRa PCR Thermal Cycler PERSONALにセットし、NORMモードで98°C 10秒、58°C 15秒、72°C 30秒を1サイクルとする30サイクルの反応を行った。反応終了後、該反応液5 μ Lを1.0%アガロースゲル電気泳動に供し、目的の約0.4kbpのDNAフラグメントを確認した。残りのPCR反応液はエタノール沈殿を行ない、回収DNAを滅菌水に懸濁して、制限酵素NdeI及び制限酵素XbaIで2重消化した。1.0%アガロースゲル電気泳動によりそのNdeI、XbaI消化物を抽出精製し、NdeI-XbaI消化DNA断片を得た。

- [0207] 次にpColdIベクターをNdeI、XbaIで消化したものを調製し、上記NdeI-XbaI消化DNA断片と混合し、DNAライゲーションキットを用いて連結した。その後、ライゲーション反応液10 μ Lを用いて大腸菌JM109を形質転換し、その形質転換体を1.

5% (w/v)濃度の寒天を含むLB培地(アンピシリン $50\mu\text{g}/\text{mL}$ 含む)上で生育させた。目的のIII-12とCS-1が連結したタンパク質をコードするDNA断片が挿入された組換えプラスミドはシーケンシングすることにより確認し、この組換えプラスミドをpColdI-H117-HTとした。

[0208] このpColdI-H117-HTは、CH-296のアミノ酸番号279-370のアミノ酸配列をコードする塩基配列と、CH-296のアミノ酸番号550-574のアミノ酸配列をコードする塩基配列が連結し、そのN末端にHisタグ配列とメチオニンを有するポリペプチドをコードするDNA配列を含むプラスミドである。当該タンパク質をH117-HTと命名し、そのアミノ酸配列を配列表の配列番号51に、塩基配列を配列表の配列番号52に示す。

[0209] (2)H117-HTの発現、精製

上記(1)で調製したpColdI-H117-HTを用いて大腸菌BL21を形質転換し、実施例9-(2)と同様にH117-HTの発現、精製を行った。なお、培養液、使用菌体量、樹脂容積、Equilibration/Wash Buffer、Elution Buffer、濃縮液の液量は必要に応じて適宜変更した。得られた濃縮液を2100 Bioanalyzerで解析したところ、分子量約15kDaの目的タンパク質がほぼ単一バンドとして検出され、タンパク質濃度は、 $1.2\text{mg}/\text{mL}$ であった(分子量から計算して、約 $80\mu\text{M}$)。

[0210] (3)H117の精製

次に、Factor Xa Cleavage Capture Kitを用いて、上記(2)で精製したH117-HT精製タンパク質5mg分のHisタグ配列の切断を 4°C にて一晩行った後、Hisタグなしの目的タンパク質の精製を行った。Hisタグの切断及び目的タンパク質の精製は上記Kitに付属の操作書に従って行った。切断後の溶液をStock Bufferにて100倍以上希釈し、VIVASPINを用いて2mLまで濃縮した。この濃縮液を2100 Bioanalyzerで解析したところ、分子量約13kDaの目的タンパク質がほぼ単一バンドとして検出され、タンパク質濃度は、 $0.36\text{mg}/\text{mL}$ であった(分子量から計算して、約 $28\mu\text{M}$)。H117のアミノ酸配列を配列表の配列番号53にまた当該タンパク質をコードすると予想される塩基配列を配列表の配列番号54に示す。

[0211] 実施例11 H206-HT及びH206の作成

(1) H206-HT発現ベクターの構築

N末端から順にHisタグ配列、III-12(配列表の配列番号5で表されるアミノ酸配列)、III-13(配列表の配列番号6で表されるアミノ酸配列)及びCS-1(配列表の配列番号8で表されるアミノ酸配列)が順に連結した改変型FNフラグメント(H206-HT)を得るため、以下のようにして発現ベクターを構築した。

[0212] (i) pCold14-H271ベクターの構築

配列表の配列番号24記載のCH-296の塩基配列より、配列表の配列番号55及び56記載の塩基配列を有する合成プライマー12-Nco-F2及びH271-BamRをDNA合成機で合成し、常法により精製した。上記合成プライマー12-Nco-F2は、制限酵素NcoIの認識配列を塩基番号7~12に、さらにCH-296のアミノ酸配列(配列表の配列番号13)のアミノ酸番号279~285に相当する塩基配列を塩基番号12~32にもつ合成DNAである。また、合成プライマーH271-BamRは、制限酵素BamHIの認識配列を塩基番号8~13に、さらにCH-296のアミノ酸配列(配列表の配列番号13)のアミノ酸番号549~544に相当する塩基配列を塩基番号19~36にもつ合成DNAである。

[0213] 上記合成プライマーを用いて、PCRを行った。PCRの反応条件を以下に示す。すなわち、鋳型DNAとして実施例7-(1)-(i)で構築したpCold14-H296 約0.1 μ g、10 μ Lの10 $\times$ Pyrobest BufferII、8 μ LのdNTP混合液、20pmolの合成プライマー12-Nco-F2、20pmolの合成プライマーH271-BamR、2.5UのPyrobest DNA Polymeraseを加え、滅菌水を加えて全量を100 μ Lとした。前記反応液をTaKaRa PCR Thermal Cycler SPにセットし、98 $^{\circ}$ C 10秒、68 $^{\circ}$ C 1分を1サイクルとする30サイクルの反応を行った。反応終了後、該反応液5 μ Lを1.0%アガロースゲル電気泳動に供し、目的の約0.8kbpのDNAフラグメントを確認した。残りのPCR反応液はエタノール沈殿を行ない、回収DNAを滅菌水に懸濁して、制限酵素NcoI及び制限酵素BamHI(タカラバイオ社製)で2重消化した。1.0%アガロースゲル電気泳動によりそのNcoI、BamHI消化物を抽出精製し、NcoI-BamHI消化DNA断片を得た。

[0214] 次にpCold14ベクターをNcoI、BamHIで消化したものを調製し、上記NcoI-Ba

mHI消化DNA断片と混合し、DNAライゲーションキットを用いて連結した。その後、ライゲーション反応液10 μ Lを用いて大腸菌JM109を形質転換し、その形質転換体を1.5% (w/v)濃度の寒天を含むLB培地(アンピシリン50 μ g/mL含む)上で生育させた。目的のDNA断片が挿入された組換えプラスミドを、pCold14-H271とした。

[0215] (ii) pCold14-H105ベクターの構築

配列表の配列番号24記載のCH-296の塩基配列より、配列表の配列番号57記載の塩基配列を有する合成プライマーAID-F-NcoをDNA合成機で合成し、常法により精製した。上記合成プライマーAID-F-Ncoは、制限酵素NcoIの認識配列を塩基番号10~15に、さらにCH-296のアミノ酸配列(配列番号13)のアミノ酸番号460~466に相当する塩基配列を塩基番号18~38にもつ合成DNAである。

[0216] 上記合成プライマーと合成プライマーCS1-R-Xbaを用いてPCRを行った。PCRの反応条件を以下に示す。すなわち、鋳型DNAとして実施例7-(1)-(i)で構築したpCold14-H296 約0.1 μ g、10 μ Lの10 $\times$ Pyrobest BufferII、8 μ LのdNTP混合液、20pmolの合成プライマーAID-F-Nco、20pmolの合成プライマーCS1-R-Xba、2.5UのPyrobest DNA Polymeraseを加え、滅菌水を加えて全量を100 μ Lとした。前記反応液をTaKaRa PCR Thermal Cycler SPにセットし、98 $^{\circ}$ C 10秒、68 $^{\circ}$ C 1分を1サイクルとする30サイクルの反応を行った。反応終了後、該反応液5 μ Lを1.0%アガロースゲル電気泳動に供し、目的の約0.35 kbpのDNAフラグメントを確認した。残りのPCR反応液はエタノール沈殿を行ない、回収DNAを滅菌水に懸濁して、制限酵素NcoI及び制限酵素XbaIで2重消化した。1.0%アガロースゲル電気泳動によりそのNcoI、XbaI消化物を抽出精製し、NcoI-XbaI消化DNA断片を得た。

[0217] 次にpCold14ベクターをNcoI、XbaIで消化したものを調製し、上記NcoI-XbaI消化DNA断片と混合し、DNAライゲーションキットを用いて連結した。その後、ライゲーション反応液10 μ Lを用いて大腸菌JM109を形質転換し、その形質転換体を1.5% (w/v)濃度の寒天を含むLB培地(アンピシリン50 μ g/mL含む)上で生育させた。目的のDNA断片が挿入された組換えプラスミドを、pCold14-H105とした。

[0218] (iii) H206-HT発現ベクターの構築

上記組換えプラスミドを用いてPCRを行った。PCRの反応条件を以下に示す。すなわち、鋳型DNAとして実施例11-(1)-(i)で構築したpCold14-H271 約0.1 μ g、20 μ Lの5 $\times$ PrimeSTAR Buffer、8 μ LのdNTP混合液、20pmolの合成プライマーH296-NdeF、20pmolの合成プライマー13-CS1-R、2.5UのPrimeSTAR HS DNA Polymeraseを加え、滅菌水を加えて全量を100 μ Lとした。前記反応液をTaKaRa PCR Thermal Cycler PERSONALにセットし、NORMモードで98 $^{\circ}$ C 10秒、60 $^{\circ}$ C 1分を1サイクルとする30サイクルの反応を行った。反応終了後、該反応液5 μ Lを1.0%アガロースゲル電気泳動に供し、目的の約0.6kbpのDNAフラグメントを確認し、これをH206-1とした。

[0219] さらに、PCRを行った。PCRの反応条件を以下に示す。すなわち、鋳型DNAとして実施例11-(1)-(ii)で構築したpCold14-H105 約0.1 μ g、20 μ Lの5 $\times$ PrimeSTAR Buffer、8 μ LのdNTP混合液、20pmolの合成プライマー13-CS1-F、20pmolの合成プライマーCS1-R-Xba、2.5UのPrimeSTAR HS DNA Polymeraseを加え、滅菌水を加えて全量を100 μ Lとした。前記反応液をTaKaRa PCR Thermal Cycler PERSONALにセットし、NORMモードで96 $^{\circ}$ C 30秒、58 $^{\circ}$ C 1分、72 $^{\circ}$ C 1分を1サイクルとする30サイクルと72 $^{\circ}$ C 3分の反応を行った。反応終了後、該反応液5 μ Lを2.0%アガロースゲル電気泳動に供し、目的の約0.08kbpのDNAフラグメントを確認し、これをH206-2とした。

[0220] 次に上記H206-1及びH206-2を鋳型DNAとしてPCRを行った。PCRの反応条件を以下に示す。鋳型DNAとしてH206-1及びH206-2を各々0.5 μ L、20 μ Lの5 $\times$ PrimeSTAR Buffer、8 μ LのdNTP混合液、20pmolの合成プライマーH296-NdeF、20pmolの合成プライマーCS1-R-Xba、2.5UのPrimeSTAR HS DNA Polymeraseを加え、滅菌水を加えて全量を100 μ Lとした。前記反応液をTaKaRa PCR Thermal Cycler PERSONALにセットし、NORMモードで96 $^{\circ}$ C 15秒、58 $^{\circ}$ C 15秒、72 $^{\circ}$ C 90秒を1サイクルとする30サイクルの反応を行った。反応終了後、該反応液5 μ Lを1.0%アガロースゲル電気泳動に供し、目的の約0.63kbpのDNAフラグメントを確認した。残りのPCR反応液はエタノール沈

殿を行ない、回収DNAを滅菌水に懸濁して、制限酵素NdeI及び制限酵素XbaIで2重消化した。1. 0%アガロースゲル電気泳動によりそのNdeI、XbaI消化物を抽出精製し、NdeI-XbaI消化DNA断片を得た。

[0221] 次にpColdIベクターをNdeI、XbaIで消化したものを調製し、上記NdeI-XbaI消化DNA断片と混合し、DNAライゲーションキットを用いて連結した。その後、ライゲーション反応液10 μ Lを用いて大腸菌JM109を形質転換し、その形質転換体を1. 5% (w/v)濃度の寒天を含むLB培地(アンピシリン50 μ g/mL含む)上で生育させた。目的のIII-12及びIII-13及びCS-1が順に連結したタンパク質をコードするDNA断片が挿入された組換えプラスミドはシーケンシングすることにより確認し、この組換えプラスミドをpColdI-H206-HTとした。

[0222] このpColdI-H206-HTは、CH-296のアミノ酸番号279-459のアミノ酸配列をコードする塩基配列と、CH-296のアミノ酸番号550-574のアミノ酸配列をコードする塩基配列が連結し、そのN末端にHisタグ配列とメチオニンを有するポリペプチドをコードするDNA配列を含むプラスミドである。当該タンパク質をH206-HTと命名し、そのアミノ酸配列を配列表の配列番号58に、塩基配列を配列表の配列番号59に示す。

[0223] (2)H206-HTの発現、精製

上記(1)で調製したpColdI-H206-HTを用いて大腸菌BL21を形質転換し、実施例9-(2)と同様にH206-HTの発現、精製を行った。なお、培養液、使用菌体量、樹脂容積、Equilibration/Wash Buffer、Elution Buffer、濃縮液の液量は必要に応じて適宜変更した。得られた濃縮液を2100 Bioanalyzerで解析したところ、分子量約25kDaの目的タンパク質がほぼ単一バンドとして検出され、タンパク質濃度は、1. 5mg/mLであった(分子量から計算して、約60 μ M)。

[0224] (3)H206の精製

次に、Factor Xa Cleavage Capture Kitを用いて、上記(2)で精製したH206-HT精製タンパク質5mg分のHisタグ配列の切断を4°Cにて一晩行った後、Hisタグなしの目的タンパク質の精製を行った。Hisタグの切断及び目的タンパク質の精製は上記Kitに付属の操作書に従って行った。切断後の溶液をStock Bufferにて

100倍以上希釈し、VIVASPINを用いて1mLまで濃縮した。この濃縮液を2100 Bioanalyzerで解析したところ、分子量約23kDaの目的タンパク質がほぼ単一バンドとして検出され、タンパク質濃度は、0.72mg/mLであった(分子量から計算して、約31 μ M)。H206のアミノ酸配列を配列表の配列番号60にまた当該タンパク質をコードすると予想される塩基配列を配列表の配列番号61に示す。

[0225] 実施例12 H296R-HT及びH296Rの作成

(1) H296R-HT発現ベクターの構築

N末端から順に、Hisタグ配列、CS-1 (配列表の配列番号8で表されるアミノ酸配列)、III-12 (配列表の配列番号5で表されるアミノ酸配列)、III-13 (配列表の配列番号6で表されるアミノ酸配列) 及びIII-14 (配列表の配列番号7で表されるアミノ酸配列) が連結した改変型FNフラグメント(H296R-HT)を得るため、以下のようにして発現ベクターを構築した。

[0226] (i) H296R-HT発現ベクターの構築

配列表の配列番号24記載のCH-296の塩基配列より、配列表の配列番号62記載の塩基配列を有する合成プライマーCS1-Nde-F及び配列番号63記載の塩基配列を有する合成プライマーCS1-12-R、配列番号64記載の塩基配列を有する合成プライマーCS1-12-F、及び配列番号65記載の塩基配列を有する合成プライマーH271-R-XbaをDNA合成機で合成し、常法により精製した。上記合成プライマーCS1-Nde-Fは、制限酵素NdeIの認識配列を塩基番号6~11に、さらにCH-296のアミノ酸配列(配列番号13)のアミノ酸番号550~557に相当する塩基配列を塩基番号12~35にもつ合成DNAである。また、合成プライマーCS1-12-Rは、CH-296のアミノ酸配列(配列番号13)のアミノ酸番号283~279に相当する塩基配列を塩基番号3~17に、さらにCH-296のアミノ酸配列(配列番号13)のアミノ酸番号574~570に相当する塩基配列を塩基番号18~32にもつ合成DNAである。また、合成プライマーCS1-12-Fは、CH-296のアミノ酸配列(配列番号13)のアミノ酸番号570~574に相当する塩基配列を塩基番号2~16に、さらにCH-296のアミノ酸配列(配列番号13)のアミノ酸番号279~283に相当する塩基配列を塩基番号17~31にもつ合成DNAである。また、合成プライマーH271-R-Xba

は、制限酵素XbaIの認識配列を塩基番号10～15に、さらにCH-296のアミノ酸配列(配列番号13)のアミノ酸番号549～544に相当する塩基配列を塩基番号19～36にもつ合成DNAである。

[0227] 上記合成プライマーを用いてPCRを行った。PCRの反応条件を以下に示す。すなわち、鋳型DNAとして実施例11-(1)-(ii)で構築したpCold14-H105 約0.1 μ g、20 μ Lの5×PrimeSTAR Buffer、8 μ LのdNTP混合液、20pmolの合成プライマーCS1-Nde-F、20pmolの合成プライマーCS1-12-R、2.5UのPrimeSTAR HS DNA Polymeraseを加え、滅菌水を加えて全量を100 μ Lとした。前記反応液をTaKaRa PCR Thermal Cycler PERSONALにセットし、NORMモードで96°C 10秒、58°C 15秒、72°C 1分を1サイクルとする30サイクルの反応を行った。反応終了後、該反応液5 μ Lを3.0%アガロースゲル電気泳動に供し、目的の約0.1kbpのDNAフラグメントを確認し、これをH296R-1とした。

[0228] さらに、PCRを行った。PCRの反応条件を以下に示す。すなわち、鋳型DNAとして実施例11-(1)-(i)で構築したpCold14-H271 約0.1 μ g、20 μ Lの5×PrimeSTAR Buffer、8 μ LのdNTP混合液、20pmolの合成プライマーCS1-12-F、20pmolの合成プライマーH271-R-Xba、2.5UのPrimeSTAR HS DNA Polymeraseを加え、滅菌水を加えて全量を100 μ Lとした。前記反応液をTaKaRa PCR Thermal Cycler PERSONALにセットし、NORMモードで96°C 10秒、58°C 15秒、72°C 1分を1サイクルとする30サイクルの反応を行った。反応終了後、該反応液5 μ Lを1.0%アガロースゲル電気泳動に供し、目的の約0.8kbpのDNAフラグメントを確認し、これをH296R-2とした。

[0229] 次に上記H296R-1及びH296R-2を鋳型DNAとしてPCRを行った。PCRの反応条件を以下に示す。鋳型DNAとしてH296R-1及びH296R-2を各々0.5 μ L、20 μ Lの5×PrimeSTAR Buffer、8 μ LのdNTP混合液、20pmolの合成プライマーCS1-Nde-F、20pmolの合成プライマーH271-R-Xba、2.5UのPrimeSTAR HS DNA Polymeraseを加え、滅菌水を加えて全量を100 μ Lとした。前記反応液をTaKaRa PCR Thermal Cycler PERSONALにセットし、NORMモードで96°C 10秒、58°C 15秒、72°C 1分を1サイクルとする30サイク

ルの反応を行った。反応終了後、該反応液5 μ Lを1.0%アガロースゲル電気泳動に供し、目的の約0.9kbpのDNAフラグメントを確認した。残りのPCR反応液はエタノール沈殿を行ない、回収DNAを滅菌水に懸濁して、制限酵素NdeI及び制限酵素XbaIで2重消化した。1.0%アガロースゲル電気泳動によりそのNdeI、XbaI消化物を抽出精製し、NdeI-XbaI消化DNA断片を得た。

[0230] 次にpColdIベクターをNdeI、XbaIで消化したものを調製し、上記NdeI-XbaI消化DNA断片と混合し、DNAライゲーションキットを用いて連結した。その後、ライゲーション反応液10 μ Lを用いて大腸菌JM109を形質転換し、その形質転換体を1.5% (w/v)濃度の寒天を含むLB培地(アンピシリン50 μ g/mL含む)上で生育させた。目的の、N末端から順にCS-1、III-12、III-13及びIII-14が連結したタンパク質をコードするDNA断片が挿入された組換えプラスミドはシーケンシングすることにより確認し、この組換えプラスミドをpColdI-H296R-HTとした。

[0231] このpColdI-H296R-HTは、CH-296のアミノ酸番号550-574のアミノ酸配列をコードする塩基配列と、CH-296のアミノ酸番号279-549のアミノ酸配列をコードする塩基配列が連結し、そのN末端にHisタグ配列とメチオニンを有するポリペプチドをコードするDNA配列を含むプラスミドである。当該タンパク質をH296R-HTと命名し、そのアミノ酸配列を配列表の配列番号66に、塩基配列を配列表の配列番号67に示す。

[0232] (2) H296R-HTの発現、精製

上記(1)で調製したpColdI-H296R-HTを用いて大腸菌BL21を形質転換し、実施例9-(2)と同様にH296R-HTの発現、精製を行った。なお、培養液、使用菌体量、樹脂容積、Equilibration/Wash Buffer、Elution Buffer、濃縮液の液量は必要に応じて適宜変更した。得られた濃縮液を2100 Bioanalyzerで解析したところ、分子量約34kDaの目的タンパク質がほぼ単一バンドとして検出され、タンパク質濃度は、0.71mg/mLであった(分子量から計算して、約21 μ M)。

[0233] (3) H296Rの精製

次に、Factor Xa Cleavage Capture Kitを用いて、上記(2)で精製したH296R-HT精製タンパク質5mg分のHisタグ配列の切断を4°Cにて一晩行った後、His

タグなしの目的タンパク質の精製を行った。Hisタグの切断及び目的タンパク質の精製は上記Kitに付属の操作書に従って行った。切断後の溶液をStock Bufferにて100倍以上希釈し、VIVASPINを用いて1.5mLまで濃縮した。この濃縮液を2100 Bioanalyzerで解析したところ、分子量約32kDaの目的タンパク質がほぼ単一バンドとして検出され、タンパク質濃度は、0.55mg/mLであった(分子量から計算して、約17 μ M)。H296Rのアミノ酸配列を配列表の配列番号68にまた当該タンパク質をコードすると予想される塩基配列を配列表の配列番号69に示す。

[0234] 実施例13 H105-HT及びH105の作成

(1)H105-HT発現ベクターの構築

N末端から順にHisタグ配列、III-14(配列表の配列番号7で表されるアミノ酸配列)及びCS-1(配列表の配列番号8で表されるアミノ酸配列)が連結した改変型FNフラグメント(H105-HT)を得るため、以下のようにして発現ベクターを構築した。

[0235] (i) H105-HT発現ベクターの構築

配列表の配列番号24記載のCH-296の塩基配列より、配列表の配列番号70記載の塩基配列を有する合成プライマーH105-NdeFをDNA合成機で合成し、常法により精製した。上記合成プライマーH105-NdeFは、制限酵素NdeIの認識配列を塩基番号9~14に、さらにCH-296のアミノ酸配列のアミノ酸番号460~466に相当する塩基配列を塩基番号15~35にもつ合成DNAである。

[0236] 上記合成プライマーと合成プライマーH296-HindRを用いて、PCRを行った。PCRの反応条件を以下に示す。すなわち、鋳型DNAとしてpCH102 約0.1 μ g、5 μ Lの10 $\times$ Ex Taq Buffer、5 μ LのdNTP混合液、10pmolの合成プライマーH105-NdeF、10pmolの合成プライマーH296-HindR、0.5UのTaKaRa Ex Taqを加え、滅菌水を加えて全量を50 μ Lとした。前記反応液をTaKaRa PCR Thermal Cycler SPにセットし、94 $^{\circ}$ C 1分、55 $^{\circ}$ C 1分、72 $^{\circ}$ C 3分を1サイクルとする30サイクルの反応を行った。反応終了後、該反応液5 μ Lを1.0%アガロースゲル電気泳動に供し、目的の約0.35kbpのDNAフラグメントを確認した。残りのPCR反応液を電気泳動し、そのフラグメントを回収・精製し、エタノール沈殿を行った。エタノール沈殿後の回収DNAを10 μ Lの滅菌水に懸濁し、制限酵素NdeI及び制限

酵素HindIIIで2重消化した。1. 0%アガロースゲル電気泳動によりそのNdeI、HindIII消化物を抽出精製し、NdeI-HindIII消化DNA断片を得た。

- [0237] 次にpColdIベクターをNdeI、HindIIIで消化したものを調製し、上記NdeI-HindIII消化DNA断片と混合し、DNAライゲーションキットを用いて連結した。その後、ライゲーション反応液20 μ Lを用いて大腸菌JM109を形質転換し、その形質転換体を1. 5% (w/v)濃度の寒天を含むLB培地(アンピシリン50 μ g/mL含む)上で生育させた。目的のDNA断片が挿入された組換えプラスミドは、シーケンシングにより確認し、この組換えプラスミドをpColdI-H105-HTとした。このpColdI-H105-HTは、CH-296のアミノ酸番号460~574のアミノ酸配列をコードする塩基配列のN末端にHisタグ配列とメチオニンを有するポリペプチドをコードするDNA配列を含むプラスミドである。当該タンパク質をH105-HTと命名し、そのアミノ酸配列を配列表の配列番号71に、塩基配列を配列表の配列番号72に示す。

- [0238] (2)H105-HTの発現、精製

上記(1)で調製したpColdI-H105-HTを用いて大腸菌BL21を形質転換し、実施例9-(2)と同様にH105-HTの発現、精製を行った。なお、培養液、使用菌体量、樹脂容積、Equilibration/Wash Buffer、Elution Bufferの液量は必要に応じて適宜変更した。得られた溶出液をStock Bufferにて100倍以上希釈し、VIVASPINを用いて1mLまで濃縮した。この濃縮液を2100 Bioanalyzerで解析したところ、分子量約15kDaの目的タンパク質がほぼ単一バンドとして検出され、タンパク質濃度は、0. 23mg/mLであった(分子量から計算して、約15 μ M)。

- [0239] (3)H105の精製

次に、Factor Xa Cleavage Capture Kitを用いて、上記(2)で精製したH105-HT精製タンパク質1mg分のHisタグ配列の切断を4°Cにて一晩行った後、Hisタグなしの目的タンパク質の精製を行った。Hisタグの切断及び目的タンパク質の精製は上記Kitに付属の操作書に従って行った。切断後の溶液をStock Bufferにて100倍以上希釈し、VIVASPINを用いて0. 3mLまで濃縮した。この濃縮液を2100 Bioanalyzerで解析したところ、分子量約13kDaの目的タンパク質がほぼ単一バンドとして検出され、タンパク質濃度は、0. 4mg/mLであった(分子量から計算して

、約31 μ M)。H105のアミノ酸配列を配列表の配列番号73にまた当該タンパク質をコードすると予想される塩基配列を配列表の配列番号74に示す。

[0240] 実施例14 CH105-HTの作成

(1) CH105-HT発現ベクターの構築

N末端から順にHisタグ配列、FNのCドメイン(III-8からIII-10までの領域)、アミノ酸配列“EIDKPSMA”、III-14、及びCS-1が連結した改変型FNフラグメント(CH105-HT)を得るため、以下のようにして発現ベクターを構築した。

[0241] (i) CH105-HT発現ベクターの構築

実施例11-(1)-(ii)で構築したpCold14-H105をNcoI、XbaIで消化し、1.0%アガロースゲル電気泳動によりそのNcoI、XbaI消化物を抽出精製し、約0.35kb pのNcoI-XbaI消化DNA断片を得、これをH105DNA断片とした。

[0242] 実施例6-(1)-(i)で構築したpCold14NDCH-296をNdeI、NcoIで消化し、1.0%アガロースゲル電気泳動によりそのNdeI、NcoI消化物を抽出精製し、約0.8 kbpのNdeI-NcoI消化DNA断片を得、これをCドメインDNA断片とした。

[0243] 次にpColdIベクターをNdeI、XbaIで消化したものを調製し、上記H105DNA断片及びCドメインDNA断片と混合し、DNAライゲーションキットを用いて連結した。その後、ライゲーション反応液10 μ Lを用いて大腸菌JM109を形質転換し、その形質転換体を1.5% (w/v)濃度の寒天を含むLB培地(アンピシリン50 μ g/mL含む)上で生育させた。目的のCドメインにH105が連結したタンパク質をコードするDNA断片が挿入された組換えプラスミドはシーケンシングすることにより確認し、この組換えプラスミドをpColdI-CH105-HTとした。

[0244] このpColdI-CH105-HTは、CH-296のアミノ酸番号1-278のアミノ酸配列をコードする塩基配列と、CH-296のアミノ酸番号460-574のアミノ酸配列をコードする塩基配列が“A”を挟んで連結し、そのN末端にHisタグ配列とメチオニンを有するポリペプチドをコードするDNA配列を含むプラスミドである。当該タンパク質をCH105-HTと命名し、そのアミノ酸配列を配列表の配列番号75に、塩基配列を配列表の配列番号76に示す。

[0245] (2) CH105-HTの発現、精製

上記(1)で調製したpColdI-CH105-HTを用いて大腸菌BL21を形質転換し、実施例9-(2)と同様にCH105-HTの発現、精製を行った。なお、培養液、使用菌体量、樹脂容積、Equilibration/Wash Buffer、Elution Bufferの液量は必要に応じて適宜変更した。得られた溶出液をStock Bufferにて100倍以上希釈し、VIVASPINを用いて1mLまで濃縮した。この濃縮液を2100 Bioanalyzerで解析したところ、分子量約45kDaの目的タンパク質がほぼ単一バンドで検出され、タンパク質濃度は、5.9mg/mLであった(分子量から計算して、約131 μ M)。

[0246] 実施例15CH-296mut2の作成

(1)CH296mut2発現ベクターの構築

CH-296のアミノ酸配列(配列番号13)のアミノ酸番号543~548に相当するアミノ酸を変換した改変型FNフラグメント(CH296mut2)を得るため、以下のようにして発現ベクターを構築した。

[0247] (i) pColdI-CH-296-HT発現ベクターの構築

合成プライマーCH296-NdeFと合成プライマーH296-HindRを用いて、PCRを行った。PCRの反応条件を以下に示す。すなわち、鋳型DNAとしてpCH102 約0.1 μ g、5 μ Lの10 $\times$ Ex Taq Buffer、5 μ LのdNTP混合液、10pmolの合成プライマーCH296-NdeF、10pmolの合成プライマーH296-HindR、0.5UのTaKaRa Ex Taqを加え、滅菌水を加えて全量を50 μ Lとした。前記反応液をTaKaRa PCR Thermal Cycler SPにセットし、94 $^{\circ}$ C 1分、55 $^{\circ}$ C 1分、72 $^{\circ}$ C 3分を1サイクルとする30サイクルの反応を行った。反応終了後、該反応液5 μ Lを1.0%アガロースゲル電気泳動に供し、目的の約1.7kbpのDNAフラグメントを確認した。残りのPCR反応液を電気泳動し、そのフラグメントを回収・精製し、エタノール沈殿を行った。エタノール沈殿後の回収DNAを10 μ Lの滅菌水に懸濁し、制限酵素NdeI及び制限酵素HindIIIで2重消化した。1.0%アガロースゲル電気泳動によりそのNdeI、HindIII消化物を抽出精製し、NdeI-HindIII消化DNA断片を得た。

[0248] 次にpColdIベクターをNdeI、HindIIIで消化したものを調製し、上記NdeI-HindIII消化DNA断片と混合し、DNAライゲーションキットを用いて連結した。その後、ライゲーション反応液20 μ Lを用いて大腸菌JM109を形質転換し、その形質転換体を

1. 5% (w/v)濃度の寒天を含むLB培地(アンピシリン50 μ g/mL含む)上で生育させた。目的のDNA断片が挿入された組換えプラスミドを、pColdICH-296-HTとした。

[0249] (ii) pColdICH-296mut2-HTベクターの構築

配列表の配列番号77及び78記載の塩基配列を有する合成プライマーHBD2mutF及びHBD2mutRをDNA合成機で合成し、常法により精製した。上記合成プライマーHBD2mutF及びHBD2mutRは、CH-296のアミノ酸配列(配列番号13)のアミノ酸番号537～554に相当する塩基配列のうち543～548に相当するアミノ酸配列に相当する塩基配列を変換するよう設計された合成DNAである。

[0250] 上記合成プライマーを用いてPCRを行った。PCRの反応条件を以下に示す。すなわち、鋳型DNAとして実施例15-(1)-(i)で構築したpColdICH-296-HT 100pg、25 μ Lの2 $\times$ PrimeSTAR Max Premix(タカラバイオ社製)、10pmolの合成プライマーHBD2mutF、10pmolの合成プライマーHBD2mutRに加え、滅菌水を加えて全量を50 μ Lとした。前記反応液をTaKaRa PCR Thermal Cycler PERSONALにセットし、NORMモードで98 $^{\circ}$ C 10秒、55 $^{\circ}$ C 15秒、72 $^{\circ}$ C 30秒を1サイクルとする30サイクルの反応を行った。反応終了後、該反応液2.5 μ Lを1.0%アガロースゲル電気泳動に供し、目的の約6.2kbpのDNAフラグメントを確認した。残りのPCR反応液2 μ Lを用いて大腸菌JM109を形質転換し、その形質転換体を1.5% (w/v)濃度の寒天を含むLB培地(アンピシリン50 μ g/mL含む)上で生育させた。目的のDNA断片が挿入された組換えプラスミドを、pColdICH-296mut2-HTとした。

[0251] このpColdICH-296mut2-HTをNdeI、XbaIで消化し、1.0%アガロースゲル電気泳動によりそのNdeI、XbaI消化物を抽出精製し、約1.7kbpのNdeI-XbaI消化DNA断片を得た。

[0252] 次にpCold14NDベクターをNdeI、XbaIで消化したものを調製し、上記NdeI-XbaI消化DNA断片と混合し、DNAライゲーションキットを用いて連結した。その後、ライゲーション反応液10 μ Lを用いて大腸菌JM109を形質転換し、その形質転換体を1.5% (w/v)濃度の寒天を含むLB培地(アンピシリン50 μ g/mL含む)上で生育

させた。目的のDNA断片が挿入された組換えプラスミドは、シーケンシングすることにより確認し、この組換えプラスミドをpCold14ND-CH296mut2とした。

[0253] このpCold14NDCH-296mut2は、CH-296のIII-14に含まれるアミノ酸番号543～548のアミノ酸配列が“LIGRKK”から“VLAKRR”に変換されたアミノ酸配列をコードする塩基配列を含むプラスミドである。当該タンパク質をCH296mut2と命名し、そのアミノ酸配列を配列表の配列番号79に、塩基配列を配列表の配列番号80に示す。

[0254] (2)CH296mut2の発現、精製

上記(1)で調製したpCold14NDCH-296mut2を用いて大腸菌BL21を形質転換し、実施例9-(2)と同様にCH296mut2の発現誘導を行った。その後菌体を遠心分離により集め、その一部である約2gを10mLの細胞破碎溶液に再懸濁した。超音波破碎により菌体を破碎し、遠心分離(11,000r/min、20分)により上清の抽出液と沈殿とに分離した。得られた上清の抽出液に約20mLの50mM Tris-HCl(pH7.5)を加え、塩濃度を調整した。クロマトグラフィーシステムを用いて、樹脂容積にして5mlのHiTrap SP カラムをbufferAで飽和させた後、抽出液約30mLをアプライシ、25mLのbufferC[50mM Tris-HCl(pH7.5), 300mM NaCl]で目的タンパク質の溶出を行った。溶出液25mLをStock Bufferにて100倍以上希釈し、VIVASPINを用いて5mLに濃縮した。この濃縮液を2100 Bioanalyzerで解析したところ、分子量約63kDaの目的タンパク質がほぼ単一バンドで検出され、タンパク質濃度は、2.2mg/mLであった(分子量から計算して、約35 μ M)。

[0255] 実施例16 CH296mut3の作成

(1)CH296mut3発現ベクターの構築

CH-296のアミノ酸配列(配列番号13)のアミノ酸番号569～572に相当するアミノ酸を変換した改変型FNフラグメント(CH296mut3)を得るため、以下のようにして発現ベクターを構築した。

[0256] (i) pColdICH-296mut3-HTベクターの構築

配列表の配列番号24記載のCH-296の塩基配列より、配列表の配列番号81及び82記載の塩基配列を有する合成プライマーHBD3mutF及びHBD3mutRをD

NA合成機で合成し、常法により精製した。上記合成プライマーHBD3mutF及びHBD3mutRは、CH-296のアミノ酸配列(配列番号13)のアミノ酸番号563～574に相当する塩基配列のうち569～572に相当するアミノ酸配列に相当する塩基配列を変換するよう設計された合成DNAである。

[0257] 上記合成プライマーを用いてPCRを行った。PCRの反応条件を以下に示す。すなわち、鋳型DNAとして実施例15-(1)-(i)で構築したpColdI-CH296-HT 100pg、25 μ Lの2×PrimeSTAR Max Premix、10pmolの合成プライマーHBD3mutF、10pmolの合成プライマーHBD3mutR加え、滅菌水を加えて全量を50 μ Lとした。前記反応液をTaKaRa PCR Thermal Cycler PERSONALにセットし、NORMモードで98℃ 10秒、55℃ 15秒、72℃ 30秒を1サイクルとする30サイクルの反応を行った。反応終了後、該反応液2.5 μ Lを1.0%アガロースゲル電気泳動に供し、目的の約6.2kbpのDNAフラグメントを確認した。残りのPCR反応液2 μ Lを用いて大腸菌JM109を形質転換し、その形質転換体を1.5% (w/v)濃度の寒天を含むLB培地(アンピシリン50 μ g/mL含む)上で生育させた。目的のDNA断片が挿入された組換えプラスミドを、pColdICH-296mut3-HTとした。

[0258] このpColdICH-296mut3-HTをNdeI、XbaIで消化し、1.0%アガロースゲル電気泳動によりそのNdeI、XbaI消化物を抽出精製し、約1.7kbpのNdeI-XbaI消化DNA断片を得た。

[0259] 次にpCold14NDベクターをNdeI、XbaIで消化したものを調製し、上記NdeI-XbaI消化DNA断片と混合し、DNAライゲーションキットを用いて連結した。その後、ライゲーション反応液10 μ Lを用いて大腸菌JM109を形質転換し、その形質転換体を1.5% (w/v)濃度の寒天を含むLB培地(アンピシリン50 μ g/mL含む)上で生育させた。目的のDNA断片が挿入された組換えプラスミドは、シーケンシングすることにより確認し、この組換えプラスミドをpCold14ND-CH296mut3とした。

[0260] このpCold14NDCH-296mut3は、CH-296のCS-1に含まれるアミノ酸番号569～572のアミノ酸配列が“LDVP”から“LELP”に変換されたアミノ酸配列をコードする塩基配列を含むプラスミドである。なお、当該領域はVLA4結合ドメインとして知られている。当該タンパク質をCH296mut3と命名し、そのアミノ酸配列を配列表

の配列番号83に、塩基配列を配列表の配列番号84に示す。

[0261] (2) CH296mut3の発現、精製

上記(1)で調製したpCold14NDCH-296mut3を用いて大腸菌BL21を形質転換し、実施例15-(2)と同様にCH296mut3の発現、精製を行った。なお、培養液、細胞破碎溶液、50mM Tris-HCl(pH7.5)、bufferA、bufferC、Stock Buffer、濃縮液の液量は必要に応じて適宜変更した。得られた濃縮液を2100 Bioanalyzerで解析したところ、分子量約63kDaの目的タンパク質がほぼ単一バンドとして検出され、タンパク質濃度は、2.5mg/mLであった(分子量から計算して、約40 μ M)。

[0262] 実施例17CH-296mut4の作成

(1) CH296mut4発現ベクターの構築

CH-296のアミノ酸配列(配列番号13)のアミノ酸番号543~548及びアミノ酸番号569~572に相当するアミノ酸を変換した改変型FNフラグメント(CH296mut4)を得るため、以下のようにして発現ベクターを構築した。

[0263] (i) pColdICH-296mut4-HTベクターの構築

合成プライマーHBD3mutF及び合成プライマーHBD3mutRを用いてPCRを行った。PCRの反応条件を以下に示す。すなわち、鋳型DNAとして実施例15-(1)-(iii)で構築したpColdICH-296mut2-HT 100pg、25 μ Lの2×PrimeSTAR Max Premix、10pmolの合成プライマーHBD3mutF、10pmolの合成プライマーHBD3mutR加え、滅菌水を加えて全量を50 μ Lとした。前記反応液をTaKaRa PCR Thermal Cycler SPにセットし、NORMモードで98°C 10秒、55°C 15秒、72°C 30秒を1サイクルとする30サイクルの反応を行った。反応終了後、該反応液5 μ Lを1.0%アガロースゲル電気泳動に供し、目的の約6.2kbpのDNAフラグメントを確認した。残りのPCR反応液2 μ Lを用いて大腸菌JM109を形質転換し、その形質転換体を1.5%(w/v)濃度の寒天を含むLB培地(アンピシリン50 μ g/mL含む)上で生育させた。目的のDNA断片が挿入された組換えプラスミドを、pColdICH-296mut4-HTとした。

[0264] このpColdICH-296mut4-HTをNdeI、XbaIで消化し、1.0%アガロースゲル

電気泳動によりそのNdeI、XbaI消化物を抽出精製し、約1.7kbpのNdeI-XbaI消化DNA断片を得た。

[0265] 次にpCold14NDベクターをNdeI、XbaIで消化したものを調製し、上記NdeI-XbaI消化DNA断片と混合し、DNAライゲーションキットを用いて連結した。その後、ライゲーション反応液10 μ Lを用いて大腸菌JM109を形質転換し、その形質転換体を1.5% (w/v) 濃度の寒天を含むLB培地(アンピシリン50 μ g/mL含む)上で生育させた。目的のDNA断片が挿入された組換えプラスミドは、シーケンシングすることにより確認し、この組換えプラスミドをpCold14ND-CH296mut4とした。

[0266] このpCold14NDCH-296mut4は、CH-296のIII-14に含まれるアミノ酸番号543～548のアミノ酸配列が“LIGRKK”から“VLAKRR”に、さらにCH-296のCS-1に含まれるアミノ酸番号569～572のアミノ酸配列が“LDVP”から“LELP”に変換されたアミノ酸配列をコードする塩基配列を含むプラスミドである。当該タンパク質をCH296mut4と命名し、そのアミノ酸配列を配列表の配列番号85に、塩基配列を配列表の配列番号86に示す。

[0267] (2)CH296mut4の発現、精製

上記(1)で調製したpCold14NDCH-296mut4を用いて大腸菌BL21を形質転換し、実施例15-(2)と同様にCH296mut4の発現、精製を行った。なお、培養液、細胞破碎溶液、50mM Tris-HCl(pH7.5)、bufferA、bufferC、Stock Buffer、濃縮液の液量は必要に応じて適宜変更した。得られた濃縮液を2100 Bioanalyzerで解析したところ、分子量約63kDaの目的タンパク質がほぼ単一バンドとして検出され、タンパク質濃度は、1.6mg/mLであった(分子量から計算して、約25 μ M)。

[0268] 実施例18 FNフラグメント(H204、H296-CS1、H296-CS2、H206、H114、H117、H296R、H105-HT、H105、CH105-HT)を用いたリンパ球の拡大培養

(1)抗ヒトCD3抗体及びFNフラグメントの固定化

以下の実験で使用する培養器材に抗ヒトCD3抗体及びFNフラグメント(H296-CS1、H296-CS2、H206、H114、H117、H296R、CH105-HT)を実施例4-

(1)と同様の方法で固定化した。ただし、FNフラグメント固定化の際にはFNフラグメントを終濃度 $25\sim 100\mu\text{g}/\text{mL}$ となるようにACD-A液(pH5.0)又はPBSに添加した。なお、FNフラグメントの濃度は、培養器材への各FNフラグメントの固定化量を一定にあわせるために調整した。また、FNフラグメント(H204、H105-HT、H105)については、培養器材への固定化をせず、培養開始時に培養液に終濃度 $0.33\sim 0.73\mu\text{g}/\text{mL}$ となるように直接添加した。また、固定化時の温度を室温又は 37°C ($5\%\text{CO}_2$ 存在下)とした。当該実施例では、FNフラグメントとして実施例6で調製したH204、実施例7で調製したH296-CS1、実施例8で調製したH296-CS2、実施例11で調製したH206、実施例9で調製したH114、実施例10で調製したH117、実施例12で調製したH296R、実施例13で調製したH105-HT、実施例13で調製したH105、実施例14で調製したCH105-HTを使用した。

[0269] (2)リンパ球の拡大培養

0.5%GT-T503に $0.5\times 10^6\text{cells}/\text{mL}$ となるように実施例1-(1)で調製したPBMCを懸濁後、実施例18-(1)で調製した抗ヒトCD3抗体固定化プレート、又は抗ヒトCD3抗体及びFNフラグメント固定化プレートに0.5%GT-T503を1.0mL/ウェルで添加しておき、細胞懸濁液を0.5mL/ウェルずつ添加した。続いて終濃度 $1000\text{U}/\text{mL}$ となるようにIL-2を添加し、これらのプレートを $5\%\text{CO}_2$ 中 37°C で培養した(培養0日目)。培養開始4日目に、各群の培養液を0.5%GT-T503を用いて14.3倍希釈し、希釈液10mLを何も固定化していない 25cm^2 細胞培養フラスコを立てたものに移し、終濃度 $500\text{U}/\text{mL}$ となるようにIL-2を添加した。培養を継続し、8日目には各群の培養液を0.5%GT-T503を用いて2倍希釈し、希釈液10mLを何も固定化していない新しい 25cm^2 細胞培養フラスコを立てたものに移し、いずれも終濃度 $500\text{U}/\text{mL}$ となるようにIL-2を添加した。培養11日目には0%GT-T503を用いて約2倍希釈して全量を20mLとした。培養開始後14日目にトリパンブルー染色法にて生細胞数を計測し、培養開始時の細胞数と比較して拡大培養率を算出した。算出した拡大培養率を元に、抗CD3抗体のみで刺激した際の拡大培養率を1としたときの細胞増殖比率を算出した。結果を表12に示す。

[0270] [表12]

表 12

初期刺激	細胞増殖比率（倍率）
抗CD3抗体（対照群）	1. 0 0
抗CD3抗体 + H204	1. 1 3
抗CD3抗体 + H296-CS1	1. 8 9
抗CD3抗体 + H296-CS2	1. 5 8
抗CD3抗体 + H206	1. 5 8
抗CD3抗体 + H114	1. 4 5
抗CD3抗体 + H117	1. 4 3
抗CD3抗体 + H296R	1. 1 5
抗CD3抗体 + H105-HT	1. 7 3
抗CD3抗体 + H105	1. 5 7
抗CD3抗体 + CH105-HT	1. 2 9

[0271] 表12に示されるように、リンパ球拡大培養初期にFNフラグメント(H204、H296-CS1、H296-CS2、H206、H114、H117、H296R、H105-HT、H105、CH105-HT)を固定化した培養器材を使用又は培地中に直接添加した群においては、対照群と比較して高い細胞増殖比率が得られた。つまり、FNフラグメント(H204、H296-CS1、H296-CS2、H206、H114、H117、H296R、H105-HT、H105、CH105-HT)はリンパ球拡大培養時において好適に使用されることが明らかとなった。

[0272] 実施例19 実施例18で得られたリンパ球のCD45RA陽性CCR7陽性細胞、CD45RA陽性CD62L陽性細胞、CD45RA陽性CCR7陽性CD62L陽性細胞の解析

実施例18-(2)で調製した培養開始14日目の細胞について実施例1-(5)と同様の方法でCD45RA陽性CCR7陽性細胞、CD45RA陽性CD62L陽性細胞、CD45RA陽性CCR7陽性CD62L陽性細胞の解析を行い、含有比率を測定した。ただし、染色用抗体としてRD1標識マウス抗ヒトCD45RA抗体/FITC標識マウス抗ヒトCCR7抗体に加え、PC5標識マウス抗ヒトCD62L抗体(eBioscience社製)を使用した。各陽性細胞の含有比率を元に、抗CD3抗体のみで刺激した際の各含有比率

を1としたときの陽性細胞比率を算出した。結果を表13に示す。

[0273] [表13]

表 1 3

	CD 4 5 RA陽性 CCR 7 陽性細胞 比率	CD 4 5 RA陽性 CD 6 2 L 陽性細胞 比率	CD 4 5 RA陽性 CCR 7 陽性 CD 6 2 L 陽性細胞 比率
初期刺激			
抗 CD3 抗体 (対照群)	1. 0 0	1. 0 0	1. 0 0
抗 CD3 抗体 + H296-CS1	2. 4 3	1. 1 4	2. 6 4
抗 CD3 抗体 + H296-CS2	2. 6 1	1. 2 8	2. 9 0
抗 CD3 抗体 + H206	1. 5 8	1. 0 8	1. 6 2
抗 CD3 抗体 + H114	1. 6 4	1. 1 6	1. 7 0
抗 CD3 抗体 + H117	1. 7 6	1. 1 9	1. 7 9
抗 CD3 抗体 + H296R	1. 7 2	1. 1 4	1. 8 1
抗 CD3 抗体 + CH105-HT	1. 3 6	N. T.	1. 1 1

[0274] 表13に示されるように、FNフラグメント(H296-CS1、H296-CS2、H206、H114、H117、H296R、CH105-HT)を固定化した培養器材を使用した群においては、対照群と比較してCD45RA陽性CCR7陽性細胞集団、CD45RA陽性CD62L陽性細胞集団、CD45RA陽性CCR7陽性CD62L陽性細胞集団の比率が高い結果が得られた。FNフラグメント(H296-CS1、H296-CS2、H206、H114、H117、H296R、CH105-HT)を用いることにより、生体内で高い細胞傷害活性を示す細胞への分化能の高いナイーブT様細胞を高効率で増殖できることが明らかとなった。

[0275] 実施例20 CH-296変異体(CH296mut2、CH296mut3、CH296mut4)を用いたリンパ球の拡大培養

(1)抗ヒトCD3抗体、CH-296及び3種のCH-296変異体の固定化

以下の実験で使用する培養器材に抗ヒトCD3抗体、CH-296及び3種のCH-2

96変異体(CH296mut2、CH296mut3、CH296mut4)を実施例4-(1)と同様の方法で固定化した。ただし、各FNフラグメント固定化の際にはFNフラグメントが終濃度4~50 μ g/mLとなるようにACD-A液(pH5.0)又はPBSに添加した。なお、FNフラグメントの濃度は、培養器材への各FNフラグメントの固定化量を一定にあわせるために調整した。当該実施例では、FNフラグメントとしてCH-296、実施例15で調製したCH296mut2、実施例16で調製したCH296mut3、実施例17で調製したCH296mut4を使用した。なお、CH296mut2はCH-296のヘパリン結合ドメインに、CH296mut3はCH-296のVLA4結合ドメインに、CH296mut4はCH-296のヘパリン結合ドメイン及びVLA4結合ドメインの両方にアミノ酸置換により変異を導入したCH-296変異体である。また、抗CD3抗体のみを固定化する群も設定した。

[0276] (2)リンパ球の拡大培養

実施例18-(2)と同様の方法で、リンパ球の拡大培養を行った。培養開始後14日目にトリパンブルー染色法にて生細胞数を計測し、培養開始時の細胞数と比較して拡大培養率を算出した。算出した拡大培養率を元に、抗CD3抗体のみで刺激した際の拡大培養率を1としたときの細胞増殖比率を算出した。結果を表14に示す。

[0277] [表14]

表14

初期刺激	細胞増殖比率
抗CD3抗体(対照群)	1.00
抗CD3抗体 + CH-296	2.36
抗CD3抗体 + CH296mut2	1.81
抗CD3抗体 + CH-296mut3	1.61
抗CD3抗体 + CH-296mut4	1.13

[0278] 表14に示されるように、CH-296もしくはその変異体を用いた場合は抗CD3抗体のみを使用したときと比較して細胞増殖比率は高くなった。また、リンパ球拡大培養初期にCH-296変異体を固定化した培養器材を使用した群は、CH-296を固定

化した培養器材を使用した群と比較して細胞増殖比率は低下した。またその抑制効果は、CH296mut4で最も強い結果となった。つまり、リンパ球拡大培養時におけるCH-296の細胞増殖作用にはヘパリン結合ドメイン及びVLA4結合ドメインが重要であることが明らかとなった。

[0279] 実施例21 実施例20で得られたリンパ球のCD45RA陽性CCR7陽性細胞、CD45RA陽性CD62L陽性細胞、CD45RA陽性CCR7陽性CD62L陽性細胞の解析

実施例20-(2)で調製した培養開始14日目の細胞について実施例19と同様の方法でCD45RA陽性CCR7陽性細胞、CD45RA陽性CD62L陽性細胞、CD45RA陽性CCR7陽性CD62L陽性細胞の解析を行い、含有比率を計測した。各陽性細胞の含有比率を元に、抗CD3抗体のみで刺激した際の含有比率を1としたときの陽性細胞比率を算出した。結果を表15に示す。

[0280] [表15]

表 1 5

	CD 4 5 RA陽性 CCR 7 陽性細胞 比率	CD 4 5 RA陽性 CD 6 2 L陽性細胞 比率	CD 4 5 RA陽性 CCR 7 陽性 CD 6 2 L陽性細胞 比率
初期刺激			
抗 CD3 抗体 (対照群)	1. 0 0	1. 0 0	1. 0 0
抗 CD3 抗体 + CH-2 9 6	3. 1 2	1. 4 6	3. 3 3
抗 CD3 抗体 + CH-2 9 6 mut2	2. 7 9	1. 4 2	2. 9 6
抗 CD3 抗体 + CH296mut3	2. 8 0	1. 3 8	2. 9 4
抗 CD3 抗体 + CH296mut4	2. 3 1	1. 3 8	2. 4 4

[0281] 表15に示されるように、CH-296もしくはその変異体を用いた場合は抗CD3抗体のみを使用したときと比較して、CD45RA陽性CCR7陽性細胞比率、CD45RA陽性CD62L陽性細胞比率、及びCD45RA陽性CCR7陽性CD62L陽性細胞比率は高くなった。また、CH-296変異体を固定化した培養器材を使用した群は、CH-296を固定化した培養器材を使用した群と比較して、CD45RA陽性CCR7陽性細胞集団、CD45RA陽性CD62L陽性細胞集団、CD45RA陽性CCR7陽性CD62L陽

性細胞集団の比率が低い結果が得られた。またその抑制効果は、CH296mut4で最も強い結果となった。つまり、リンパ球拡大培養時におけるCH-296のナイーブT様細胞増殖作用にはVLA-4結合ドメイン及びヘパリン結合ドメインが重要であることが明らかとなった。

[0282] 実施例22 阻害ペプチド(VLA4-Inhibitor及びHBD2)を用いたリンパ球の拡大培養

(1)抗ヒトCD3抗体及びCH-296の固定化

以下の実験で使用する培養器材に抗ヒトCD3抗体及びCH-296を実施例1-(2)と同様の方法で固定化した。ただし、0.24mL/ウェルずつ固定化液を添加し、室温又は37°C (5%CO₂ 存在下)で5時間固定化した。

[0283] (2)ペプチドとの反応

当該実施例で使用するペプチド(細胞表面上のVLA-4結合ドメインもしくはヘパリン結合ドメインの機能部位に特異的に結合するペプチド)を初期刺激に先立ち、細胞と反応させることにより、目的とする効果を阻害するかどうかを検証するため、以下のペプチド反応を行った。

[0284] 実施例1-(1)と同様の方法で調製したPBMCを、GT-T503を用いて 0.5×10^6 cells/mLになるように懸濁した。その後、VLA4-Inhibitor(アミノ酸配列: Phenylac-Leu-Asp-Phe-Pro-NH₂, BACHEM社製)又はFN フラグメント(FNのアミノ酸配列の1954~1959番: 配列番号7のアミノ酸配列のアミノ酸番号84~89: H-Leu-Ile-Gly-Arg-Lys-Lys-OH, BACHEM社製、以下HBD2と記載)を含むGT-T503を添加し、PBMCが最終 0.15×10^6 cells/mLになるように調製した(この溶液を以下細胞懸濁液と記載)。その際、細胞懸濁液中における各ペプチドの終濃度は100及び50 µg/mLとなるように調整した。対照群には各ペプチドと同量のDMSO(Hybrimax: シグマ社製)を添加した。室温で30分静置することによりペプチドとの反応を行った。

[0285] (3)リンパ球の拡大培養

実施例22-(2)でペプチド反応させた細胞懸濁液に、終濃度0.5%ヒトAB型血清、0.2%ヒト血清アルブミン、1000U/mL IL-2となるように、それぞれ必要量を

添加した。実施例22-(1)で調製した抗ヒトCD3抗体及びCH-296固定化プレートに 0.12×10^6 cells/ウェルとなるように細胞懸濁液を播種し、これらのプレートを37°C、5%CO₂ インキュベータ内で培養した(培養0日目)。培養開始後4日目の細胞増殖比率を表16及び17に示す。なお、細胞増殖比率はトリパンプルー染色法にて生細胞数を計測し、DMSO添加の対照群、それぞれの細胞数を1として比較した際の時の細胞増殖比率とした。

[0286] [表16]

表16

阻害ペプチド (又は添加物)	初期刺激	細胞増殖比率
DMSO (対照群)	抗CD3抗体	1.00
	抗CD3抗体 + CH-296	1.00
VLA4-Inhibitor 100 µg/mL	抗CD3抗体	0.93
	抗CD3抗体 + CH-296	0.60

[0287] [表17]

表17

添加物	初期刺激	細胞増殖比率
DMSO (対照群)	抗CD3抗体	1.00
	抗CD3抗体 + CH-296	1.00
HBD2 50 µg/mL	抗CD3抗体	1.05
	抗CD3抗体 + CH-296	0.76

[0288] 表16及び17に示されるように、リンパ球拡大培養開始前にVLA4-Inhibitor又はHBD2と反応させることにより対照群と比較して細胞増殖比率は低下した。つまり、リンパ球拡大培養時におけるCH-296の細胞増殖作用にはVLA-4結合ドメイン及びヘパリン結合ドメインが重要であることが明らかとなった。

[0289] 実施例23 FNフラグメント(C274)を用いたリンパ球の拡大培養

(1) 抗ヒトCD3抗体及びFNフラグメントの固定化

以下の実験で使用する培養器材に抗ヒトCD3抗体及び配列番号9に示されるアミノ酸配列を有するFNフラグメント(C274)を実施例4-(1)と同様の方法で固定化し

た。

[0290] (2)リンパ球の拡大培養

実施例23－(1)で調製した抗ヒトCD3抗体固定化プレート、又は抗ヒトCD3抗体及びC274固定化プレートを用いて、実施例18－(2)と同様の方法でリンパ球の拡大培養を行った。結果を表18に示す。

[0291] [表18]

表18	
初期刺激	拡大培養率 (倍率)
抗CD3抗体(対照群)	325
抗CD3抗体＋C274	551

[0292] 表18に示されるように、リンパ球拡大培養初期にFNフラグメント(C274)を固定化した培養器材を使用した群においては、対照群と比較して高い拡大培養率が得られた。つまり、FNフラグメント(C274)はリンパ球拡大培養時において好適に使用されることが明らかとなった。

[0293] (3)CD45RA陽性CCR7陽性T細胞、CD45RA陽性CCR7陽性CD62L陽性T細胞の解析

実施例23－(2)で調製した培養開始14日目の細胞について実施例21と同様の方法でCD45RA陽性CCR7陽性T細胞、CD45RA陽性CCR7陽性CD62L陽性T細胞の解析を行い、含有比率を測定した。結果を表19に示す。

[0294] [表19]

表 19

初期刺激	CD 4 5 R A 陽性	CD 4 5 R A 陽性
	CCR 7 陽性 T 細胞	CCR 7 陽性
	含有比率 (%)	CD 6 2 L 陽性 T 細胞
		含有比率 (%)
抗 CD 3 抗体 (対照群)	39.6	35.8
抗 CD 3 抗体 + C 2 7 4	61.1	60.3

[0295] 表19に示されるように、FNフラグメント(C274)を固定化した培養器材を使用した群においては、対照群と比較してCD45RA陽性CCR7陽性細胞集団、CD45RA陽性CCR7陽性CD62L陽性細胞集団の比率が高い結果が得られた。FNフラグメント(C274)を用いることにより、ナイーブT様細胞を高効率で増殖できることが明らかとなった。

[0296] 実施例24 CH-296を用いたリンパ球の拡大培養におけるTh1タイプ細胞比率の解析

(1)抗ヒトCD3抗体及びCH-296フラグメント固定化

以下の実験で使用する培養器材に抗ヒトCD3抗体及びCH-296を実施例4-(1)と同様の方法で固定化した。

[0297] (2)リンパ球の拡大培養

実施例18-(2)と同様の方法でリンパ球の拡大培養を行った。ただし、培養開始時(培養0日目)には終濃度500U/mLとなるようにIL-2を添加し、培養開始4日目に、各群とも 0.015×10^6 cells/mLとなるように0.5%GT-T503により希釈し(液量10mL)、培養液を何も固定化していない25cm²細胞培養フラスコに移し、終濃度500U/mLとなるようにIL-2を添加した。培養開始後7日目の細胞を回収しトリパンブルー染色法にて生細胞数を計測し、培養開始時の細胞数と比較して拡大培養率を算出した。結果を表20に示す。

[0298] [表20]

表 2 0

初期刺激	拡大培養率
	(倍率)
抗CD3抗体	2.5
抗CD3抗体 + CH-296	4.5

[0299] 表20に示されるように、リンパ球拡大培養初期にCH-296を固定化した培養器材を使用した群においては、対照群に比較して培養後のリンパ球の拡大培養率が高い結果が得られた。

[0300] (3) CD45RA陽性CCR7陽性T細胞の解析

実施例24-(2)で得られた培養7日目の細胞を実施例1-(5)と同様の方法でCD45RA陽性CCR7陽性T細胞の解析を行い、含有比率を測定した。ただし、抗体反応後の細胞洗浄の際は1%BSA/PBSを使用した。結果を表21に示す。

[0301] [表21]

表 2 1

初期刺激	CD45RA陽性CCR7陽性T細胞
	含有比率 (%)
抗CD3抗体 (対照群)	26.9
抗CD3抗体 + CH-296	34.7

[0302] 表21に示されるように、CH-296を固定化した培養容器を使用した群においては、対照群と比較して、培養7日目のリンパ球中におけるCD45RA陽性CCR7陽性細胞含有比率が高い結果が得られた。

[0303] (4) IL-4産生細胞の解析

実施例24-(2)で得られた培養7日目の細胞を、10FRPMIに 4×10^6 cells/mLになるように懸濁後、あらかじめ10FRPMIを0.3mLずつ添加した48穴細胞培養プレートに0.1mL/ウェルずつまき込んだ。PMAを終濃度50ng/mL、Ionomycinを終濃度1 μ g/mL、BrefeldinAを終濃度10 μ g/mLとなるように各ウェルに添加し

た後、37℃、5%CO₂ インキュベータ内で4時間培養した。培養終了後の細胞を回収し、PBS、1%BSA/PBSで洗浄した。細胞を1%BSA/PBSに懸濁し、ECD標識マウスIgG₁ もしくはECD標識マウス抗ヒトCD4抗体(ベックマンコールター社製)を添加後、氷上で30分間インキュベートしたのち、IntraPrep Regentの方法に従って、FITC標識マウス抗ヒトIL-4抗体、RD1標識マウス抗ヒトIFN- γ 抗体で細胞内染色を行った。なお、ネガティブコントロールにはFITC標識マウスIgG₁ (ベックマンコールター社製)、PE標識マウスIgG₁ (ダコ社製又はベックマンコールター社製)を使用した。この細胞をフローサイトメトリーに供し、測定した細胞全体についてのIL-4産生陽性細胞の比率を解析した。結果を表22に示す。また、IL-4陰性IFN- γ 陽性T細胞の解析の結果を表23に、CD4陽性IL-4陰性IFN- γ 陽性T細胞の解析の結果を表24に示す。

[0304] [表22]

表 2 2

初期刺激	IL-4産生細胞比率 (%)
抗CD3抗体 (対照群)	73.6
抗CD3抗体 + CH-296	64.0

[0305] [表23]

表 2 3

初期刺激	IL-4陰性IFN- γ 陽性T細胞 (%)
抗CD3抗体 (対照群)	10.4
抗CD3抗体 + CH-296	17.2

[0306] [表24]

表 2 4

初期刺激	CD4陽性IL-4陰性IFN- γ 陽性T細胞 (%)
抗CD3抗体 (対照群)	5.7
抗CD3抗体 + CH-296	10.0

[0307] 表22に示されるように、CH-296を固定化した培養容器を使用した群においては

、対照群と比較して、培養中のリンパ球全体におけるIL-4産生細胞の陽性率が低い結果が得られた。当該実施例より、リンパ球の拡大培養初期にCH-296を作用させることでIL-4産生細胞すなわちTh2タイプの細胞の含有比率を抑制できることが明らかとなった。また表23、表24に示されるようにCH-296を固定化した培養容器を使用した群においては、対照群と比較して、培養中のIL-4陰性IFN- γ 陽性細胞の比率が高い結果が得られた。当該実施例より、リンパ球の拡大培養初期にCH-296を作用させることでIL-4陰性IFN- γ 陽性細胞すなわちTh1タイプの細胞の含有比率を高くできることが明らかとなった。以上の結果より、抗CD3抗体とCH-296の組み合わせは細胞性免疫に有用なTh1タイプのT細胞を効率的に培養できることが示された。

[0308] 実施例25 FNフラグメント(CH-296、H296-H296)及び抗4-1BB抗体を用いたリンパ球の拡大培養-1

(1)抗ヒトCD3抗体及びFNフラグメント(CH-296、H296-H296)、抗4-1BB抗体の固定化

以下の実験で使用する培養器材に抗CD3抗体及びFNフラグメント(CH-296、H296-H296)、共刺激因子である抗4-1BB抗体(R&D Systems社製)を実施例4-(1)と同様にして固定化した。ただし、H296-H296及び抗4-1BB抗体については終濃度5 μ g/mLとなるように固定化した。

[0309] (2)リンパ球の拡大培養

実施例1-(1)で調製したPBMC 0.53×10^6 cellsを0.6%ヒトAB型血清含有KBM551(以下0.6%KBM551と記載)5.3mLに懸濁し、実施例25-(1)で作製したプレートに添加した後、終濃度200U/mLとなるようにIL-2を添加して5%CO₂中37°Cで培養した(培養0日目)。培養開始4日目に、各ウェル内の細胞を懸濁し、その一部を0.6%KBM551を用いて8.3倍希釈し、希釈液7.8mLを何も固定化していない25cm²細胞培養フラスコを立てたものに移し、いずれも終濃度200U/mLとなるようにIL-2を添加した。培養を継続し、7日目には各群の培養液に等量の無血漿KBM551を添加して2倍希釈し、いずれも終濃度200U/mLとなるようにIL-2を添加した。培養開始後10日目には、無血漿KBM551を用いて各群の細胞培養

液を2倍希釈し、何も固定化していない新しい25cm²細胞培養フラスコを立てたものに希釈液15.6mLをそれぞれ移した。各群において終濃度200U/mLとなるようにIL-2を添加した。培養開始後10日目及び14日目にトリパンプルー染色法にて生細胞数を計測し、培養開始時の細胞数と比較して拡大培養率を算出した。結果を表25に示す。

[0310] [表25]

表 25

初期刺激	拡大培養率 (倍率)	
	培養開始後10日目	培養開始後14日目
抗CD3抗体 (対照群)	128.8	248.8
抗CD3抗体 + CH-296	207.1	472.5
抗CD3抗体 + H296-H296	283.3	655.3
抗CD3抗体 + 抗4-1BB抗体	184.1	361.1

[0311] 表25に示すように、リンパ球拡大培養初期にCH-296あるいはH296-H296を固定化した培養器材を使用することで、抗CD3抗体のみ、あるいは抗CD3抗体と抗4-1BB抗体を固定化した培養器材を使用した群と比較して、培養期間によらず、高いリンパ球の拡大培養率が得られた。このことから、CH-296あるいはH296-H296はリンパ球拡大培養時に好適に使用されることが明らかとなった。

[0312] (3)CCR7陽性CD45RA陽性T細胞、CCR7陽性CD62L陽性CD45RA陽性T細胞の解析

実施例25-(2)で調製した培養10日目又は14日目の細胞を実施例19と同様の方法でCCR7陽性CD45RA陽性T細胞、CCR7陽性CD62L陽性CD45RA陽性T細胞の解析を行った。それぞれの陽性細胞の含有比率を算出した、培養10日目の結果を表26に、培養14日目の結果を表27に示す。

[0313] [表26]

表 2 6

初期刺激	CD 4 5 RA陽性	CD 4 5 RA陽性
	CCR 7 陽性T細胞	CCR 7 陽性
	含有比率 (%)	CD 6 2 L 陽性T細胞 含有比率 (%)
抗CD 3 抗体 (対照群)	1 9 . 2	1 9 . 1
抗CD 3 抗体 + CH-2 9 6	5 3 . 6	5 3 . 4
抗CD 3 抗体 + H 2 9 6-H 2 9 6	4 6 . 4	4 6 . 3
抗CD 3 抗体 + 抗4-1 BB抗体	2 2 . 5	2 2 . 4

[0314] [表27]

表 2 7

初期刺激	CD 4 5 RA陽性	CD 4 5 RA陽性
	CCR 7 陽性T細胞	CCR 7 陽性
	含有比率 (%)	CD 6 2 L 陽性T細胞 含有比率 (%)
抗CD 3 抗体 (対照群)	2 9 . 1	2 8 . 9
抗CD 3 抗体 + CH-2 9 6	7 5 . 4	7 5 . 2
抗CD 3 抗体 + H 2 9 6-H 2 9 6	6 9 . 4	6 9 . 3
抗CD 3 抗体 + 抗4-1 BB抗体	3 8 . 1	3 9 . 2

[0315] 表26及び表27に示されるように、リンパ球拡大培養初期にCH-296あるいはH296-H296を固定化した培養器材を使用することで、抗CD3抗体のみ、あるいは抗CD3抗体と抗4-1BB抗体を固定化した培養器材を使用した群と比較して、培養期間によらず、高い比率でCCR7陽性CD45RA陽性T細胞集団、CCR7陽性CD62L陽性CD45RA陽性T細胞集団が得られた。当該実施例より、リンパ球拡大培養初期にCH-296あるいはH296-H296を用いることにより、ナイーブT様細胞を高効率で増殖できることが明らかとなった。

[0316] 実施例26 CH-296、抗ヒトCD28抗体、抗ヒト4-1BB抗体及びCD3/CD28ビーズを用いたリンパ球の拡大培養

(1) PBMC及び非働化済み血漿の分離

インフォームド・コンセントの得られたヒト健常人ドナーより、抗凝固剤としてヘパリンナトリウムを用いた50mL分の採血を実施後、700×gで20分間遠心した。遠心後の上清である血漿画分とPBMCを含む細胞画分をそれぞれ回収した。血漿画分は、56℃30分非働化処理を行った後、900×gで30分間遠心した。遠心後の上清を非働化済み血漿として回収し、各実験に供した。PBMCを含む細胞画分はDPBSで希釈し、Ficoll-paque上に重層して700×gで20分間遠心した。中間層のPBMCをピペットで回収、洗浄し、チュルク染色液(ナカライテスク社製)を用いて生細胞数を算出し、各実験に供した。

[0317] (2) 抗ヒトCD3抗体及びCH-296、抗ヒトCD28抗体、抗ヒト4-1BB抗体の固定化

以下の実験で使用する培養器材に抗CD3抗体、CH-296、抗CD28抗体、抗4-1BB抗体を固定化した。すなわち、抗CD3抗体(終濃度5 µg/mL)のみ、抗CD3抗体(終濃度5 µg/mL)及びCH-296(終濃度25 µg/mL)、抗CD3抗体(終濃度5 µg/mL)及び抗CD28抗体(終濃度5 µg/mL)、抗CD3抗体(終濃度5 µg/mL)及び抗4-1BB抗体(終濃度5 µg/mL)を含むACD-A液をバッグ面積が86cm²になるようにシールしたガス透過性培養バッグCultiLife215(タカラバイオ社製)に10.4mL/バッグずつ添加し、5%CO₂中37℃で5時間インキュベートした。また、上記のバッグは使用前にRPMI1640で3回洗浄した後各実験に供した。

[0318] (3) リンパ球の拡大培養

実施例26-(1)で分離したPBMC 0.6×10⁷ cellsを0.6%非働化済み血漿含有KBM551(タカラバイオ社製、以下0.6%血漿含有KBM551と記載)120mLに懸濁し、実施例26-(2)で作製した固定化条件の異なるCultiLife215にそれぞれ添加した。CD3/CD28ビーズ条件については、1%HS/PBSで洗浄したCD3/CD28ビーズ(Dynabeads CD3/CD28)を細胞数に対して3倍量添加した。終濃度200U/mLとなるようにIL-2を添加し、5%CO₂中37℃で培養した(培養0日目)。培養開始4日目に、各CultiLife215内の細胞を懸濁し、この懸濁液120mLを380mLの0.6%血漿含有KBM551を用いて希釈して何も固定化していないガス透過性培養バッグCultiLifeEva(タカラバイオ社製)に移した。この際、CD3/CD28

ビーズ刺激群については、細胞懸濁後、磁気ビーズ分離装置MPC-1を用いてCD3/CD28ビーズを除去した。いずれの群についても終濃度200U/mLとなるようにIL-2を添加し、5%CO₂中37°Cで培養した。培養を継続し、培養開始7日目には各CultiLifeEvaに細胞懸濁液と等量の0%血漿含有KBM551(以下、無血漿KBM551と記載)を添加し2倍希釈した後、いずれも終濃度200U/mLとなるようにIL-2を添加した。培養開始10日目にトリパンプルー染色法を用いて生細胞数を計測し、培養開始時の細胞数と比較して拡大培養率を算出した。結果を表28に示す。

[0319] [表28]

表28

刺激条件	拡大培養率(倍率)
抗CD3抗体	6.23
抗CD3抗体 + CH-296	9.73
抗CD3抗体 + 抗CD28抗体	6.35
CD3/CD28ビーズ	5.67
抗CD3抗体 + 抗4-1BB抗体	7.77

[0320] 表28に示されるように、リンパ球拡大培養初期に抗CD3抗体及びCH-296を固定化した培養器材を使用することで、抗CD3抗体のみ、抗CD3抗体及び抗CD28抗体、抗CD3抗体及び抗4-1BB抗体を固定化した培養器材又はCD3/CD28ビーズを使用した群と比較して、高い拡大培養率が得られた。このことから、CH-296はリンパ球拡大培養時に好適に使用されることが明らかとなった。

[0321] (4)CCR7陽性CD45RA陽性T細胞の解析

実施例26-(3)で調製した培養10日目の細胞を実施例1-(5)と同様の方法でCCR7陽性CD45RA陽性T細胞の解析を行った。それぞれの陽性細胞の含有比率を算出した結果を表29に示す。

[0322] [表29]

表 29

刺激条件	CD45RA陽性CCR7陽性T細胞
	含有比率 (%)
抗CD3抗体	52.4
抗CD3抗体 + CH-296	80.4
抗CD3抗体 + 抗CD28抗体	27.0
CD3/CD28ビーズ	46.4
抗CD3抗体 + 抗4-1BB抗体	49.2

[0323] 表29に示されるように、リンパ球拡大培養初期に抗CD3抗体及びCH-296を固定化した培養器材を使用することで、抗CD3抗体のみ、抗CD3抗体及び抗CD28抗体、抗CD3抗体及び抗4-1BB抗体を固定化した培養器材又はCD3/CD28ビーズを使用した群と比較して、高い比率でCCR7陽性CD45RA陽性T細胞集団が得られた。当該実施例より、リンパ球拡大培養初期にCH-296を用いることにより、ナイーブT様細胞を高効率で増殖できることが明らかとなった。

[0324] 実施例27 培養リンパ球を用いたAllogeneic mixed lymphocyte reaction (MLR)

(1) 培養細胞の凍結保存と融解

実施例26-(3)で調製した培養10日目の細胞をRPMI1640に懸濁し、CP-1と25% HSAを17:8の割合で混合した保存液を等量加えて懸濁後、液体窒素中にて保存した。使用時には、これら保存培養細胞を37℃水浴中にて急速融解し、10 μ g/mL DNaseを含むRPMI1640で洗浄後、トリパンブルー染色法にて生細胞数を算出して各実験に供した。

[0325] (2) Allogeneic MLR

実施例27-(1)で調製した細胞を用いてAllogeneic MLRを行った。実施例27-(1)で融解した培養細胞を5%ヒトAB型血清、2mM L-グルタミン、1mM Sodium pyruvate、1×NEAA Mixture(全てCambrex社製)、100 μ g/mL硫酸ストレプトマイシン(明治製菓社製)を含むRPMI1640(以下5HRPMIと記載)を用いて 2×10^6 cells/mLに調整した(以下、Responder細胞と記載)。一方、実施例1

－(1)と同様の方法で調製したAllogeneic donor(非自己ドナー:実施例26－(1)記載のドナーとは異なるドナー)由来のPBMCをX線照射装置(HITEX社製260型)を用いてX線照射(0.88C/kg)し、5HRPMIで洗浄後、 2×10^6 cells/mLに調整した(以下、Stimulator細胞と記載)。24穴細胞培養用プレートに、Responder細胞:Stimulator細胞比が1:1になるように調製した各細胞懸濁液を0.5mL/wellずつ添加した。次にIL-2を終濃度500U/mLになるよう各ウェルに添加し、5%CO₂中37℃で培養した(培養0日目)。培養開始2日目に、各ウェルに1mLずつ5HRPMIを添加し、終濃度500U/mLになるようにIL-2を添加した(最終容量:2mL/well)。培養開始4日目に各ウェル内の細胞を懸濁後、半量ずつ2ウェルに分け、すべてのウェルに5HRPMIを1mL及び終濃度500U/mLになるようにIL-2を添加した(最終容量:2mL/well)。培養開始7日目まで培養を継続し、トリパンブルー染色法にて生細胞数を計測し、培養開始時の細胞数と比較して拡大培養率を算出した。結果を表30に示す。

[0326] [表30]

表 3 0

初期刺激	拡大培養率 (倍率)
抗CD3抗体	5.6
抗CD3抗体 + CH-296	6.5
抗CD3抗体 + 抗CD28抗体	6.4
CD3/CD28ビーズ	5.8
抗CD3抗体 + 4-1BB抗体	5.8

[0327] 表30に示されるように、リンパ球拡大培養初期に抗CD3抗体及びCH-296を固定化した培養器材を使用したリンパ球は、抗CD3抗体のみ、抗CD3抗体及び抗CD28抗体、抗CD3抗体及び抗4-1BB抗体を固定化した培養器材又はCD3/CD28ビーズを使用した群と比較して、Allogeneic MLRにおいて非自己抗原認識細胞がより高い拡大培養率で増殖することが明らかとなった。このことから、CH-296はリンパ球拡大培養時に好適に使用されることが明らかとなった。

[0328] (3) Phytohemagglutinin (PHA) blast細胞の調製

実施例1-(1)と同様の方法で調製したAllogeneic donor由来のPBMCを5HRPMIで 1×10^6 cells/mLに調製し、6穴細胞培養用プレート(コーニング社製)に3 mLずつ播種した。IL-2を終濃度100U/mLとなるように、PHA(シグマ社製)を終濃度 $2 \mu\text{g/mL}$ となるように添加し、5%CO₂中37°Cで培養した。培養4日目には、培養液に5HRPMIを12mL添加し、IL-2を終濃度100U/mLとなるように添加後5mL/wellで6穴細胞培養用プレートに細胞懸濁液を分配した。培養開始7日目まで培養を継続した。

[0329] (4) 非自己特異的細胞傷害活性の測定

実施例27-(2)で調製した培養開始後7日目の細胞の非自己特異的細胞傷害活性は、Calcein-AMを用いた細胞傷害活性測定法[リヒテンフェルズ R. ら(Lichtenfels R. et al.), J. Immunol. Methods, 第172巻、第2号、第227~239頁(1994)]にて評価した。実施例27-(3)で幼若化(ブラスト)させたPHA blast細胞を 1×10^6 cells/mLとなるよう5%FBSを含むRPMI1640に懸濁後、終濃度 $25 \mu\text{M}$ となるようにCalcein-AM(同仁化学研究所社製)を添加し、37°Cで2時間培養した。細胞をCalcein-AMを含まない培地にて洗浄後、Calcein標識標的細胞とした。実施例27-(2)で調製した培養開始後7日目の細胞をエフェクター細胞として 3×10^6 cells/mLとなるように5HRPMIで段階希釈後、96穴細胞培養プレート(ベクトン・ディッキンソン社製又はコーニング社製)の各ウェルに100 μL /ウェルずつ分注した。Calcein標識標的細胞を30倍量のK562細胞と混合し、Calcein標識標的細胞が 1×10^5 /mLとなるように調整し、100 μL /ウェルずつ添加した。なお、K562細胞はresponder細胞中に混入するNK細胞による非特異的細胞傷害活性を排除するために用いた。この際、Calcein標識標的細胞(T)に対するエフェクター細胞(E)の比をE/T比として示し、E/T比30で測定を行った。上記細胞懸濁液の入ったプレートを210×gで1分間遠心後、5%CO₂存在下37°Cで4時間インキュベートした。4時間後、各ウェルから培養上清100 μL を採取し、蛍光プレートリーダー[Berthold technologies社製(励起485nm/測定538nm)]によって培養上清中に放出されたCalcein量を測定した。「細胞傷害活性(%)」は以下の式1にしたがって算出した。

式1:細胞傷害活性(%)＝

$$\{(\text{各ウェルの測定値} - \text{最小放出量}) / (\text{最大放出量} - \text{最小放出量})\} \times 100$$

[0330] 上式において最小放出量はCalcein標識標的細胞のみ含有するウェルのCalcein放出量であり、Calcein標識標的細胞からのCalcein自然放出量を示す。また、最大放出量はCalcein標識標的細胞に0.1%界面活性剤Triton X-100(ナカライテスク社製)を加えて細胞を完全破壊した際のCalcein放出量を示している。測定結果を表31に示す。

[0331] [表31]

表 3 1

初期刺激	E/T比	細胞傷害活性 (%)
抗CD3抗体	30	28.4
抗CD3抗体 + CH-296	30	32.1
抗CD3抗体 + 抗CD28抗体	30	14.4
CD3/CD28ビーズ	30	30.4
抗CD3抗体 + 4-1BB抗体	30	21.6

[0332] 表31に示されるように、リンパ球拡大培養初期に抗CD3抗体及びCH-296を固定化した培養器材を使用したリンパ球は、抗CD3抗体のみ、抗CD3抗体及び抗CD28抗体、抗CD3抗体及び抗4-1BB抗体を固定化した培養器材又はCD3/CD28ビーズを使用した群と比較して、非自己抗原特異的細胞傷害活性が高かった。このことから、CH-296はリンパ球拡大培養時に好適に使用されることが明らかとなった。

[0333] 実施例28 CH-296を用いたCD4陽性T細胞の拡大培養-4

(1)抗ヒトCD3抗体及びH296-H296の固定化

以下の実験で使用する培養器材に抗ヒトCD3抗体及びFNフラグメント(CH-296、H296-H296)を実施例4-(1)と同様の方法で固定化した。ただし、CH-296のみ固定化する条件も設定し、FNフラグメント(H296-H296)については終濃度3 $\mu\text{g/mL}$ となるように固定化した。

[0334] (2)CD8除去細胞の調製、及びCD3/CD28ビーズセレクション細胞(CD3/CD2

8ビーズ結合細胞)の調製

実施例1-(1)に記載した方法で分離、保存したPBMCを用いて、実施例1-(3)と同様の方法でCD8除去細胞を、また実施例3-(1)と同様の方法でCD3/CD28ビーズを用いたT細胞セレクション細胞(CD3/CD28ビーズ結合細胞)を調製した。調製後の細胞は、2%GT-T503、及び5%X-VIVO15にそれぞれ細胞濃度が 1.0×10^6 cells/mLとなるように懸濁した。

[0335] (3)CD4陽性T細胞の拡大培養

実施例28-(1)で作成したプレートに、2%GT-T503、及び5%X-VIVO15をそれぞれ2mL添加しておき、抗CD3抗体及びFNフラグメント(CH-296又はH296-H296)を固定化したプレートには、実施例28-(2)で調製したCD8除去細胞を、CH-296のみを固定化したプレートには、実施例28-(2)で調製したCD3/CD28ビーズ結合細胞(CD3/CD28ビーズで刺激される細胞)をそれぞれ2mL添加した後、5%CO₂中37°Cで培養した(培養0日目)。培養開始後3日目には、培養液2.5mLを何も固定化していないT25細胞培養フラスコを立てたものに移し、さらに培養最終日まで静置して培養する条件(以下、静置培養と記載)と、LABO SHAKE R(RIO CRAFT社製)を用いて振とうしながら培養する条件(以下、振とう培養と記載)を設定した。培養開始後3日目、5日目、7日目、10日目には、細胞濃度が 0.5×10^6 cells/mLとなるように各培地で希釈し、総培養液量が12.5mLとなった次の培養日から培養上清8.75mLを新しい培地と交換して培養開始12日目まで培養を継続した。また、いずれの培養日においても2%GT-T503培養群は終濃度200U/mL、5%X-VIVO15培養群は終濃度100U/mLとなるようにIL-2を添加した。振とう条件での培養開始5日目の拡大培養率を表32に示す。また静置条件での培養開始後5日目、及び12日目の拡大培養率を表33に示す。

[0336] [表32]

表 3 2

			拡大培養率
培養方法	培地	刺激条件	(倍率)
			培養5日目
振とう	2%GT-T503	抗CD3抗体 + CH-296	6.0
		抗CD3抗体 + H296-H296	2.7
		CD3/CD28ビーズ + CH-296	1.9
	5%X VIVO15	抗CD3抗体 - CH-296	4.8
		抗CD3抗体 - H296-H296	2.2
		CD3/CD28ビーズ + CH-296	1.0

[0337] [表33]

表 3 3

培養方法	培地	刺激条件	拡大培養率	
			(倍率)	
			培養 5 日目	培養 12 日目
静置	2%GT-T503	抗CD3抗体 + CH-296	5.7	21.4
		抗CD3抗体 + H296-H296	2.6	23.3
		CD3/CD28ビーズ + CH-296	1.1	17.4
	5%X-VIVO15	抗CD3抗体 + CH-296	4.9	11.3
		抗CD3抗体 + H296-H296	1.9	17.1
		CD3/CD28ビーズ + CH-296	0.6	7.5

[0338] 表32、表33に示されるように、培養条件、培地条件、培養日数によらず抗CD3抗体及びCH-296もしくはH296-H296で刺激した群においては、CD3/CD28ビーズ及びCH-296で刺激した群よりも高い拡大培養率が得られた。すなわちCD4陽性細胞の拡大培養においては、抗CD3抗体とCH-296もしくはH296-H296の組み合わせが好適に使用できることが示された。

[0339] (4)CD45RA陽性CCR7陽性T細胞の解析

実施例28-(3)において振とう培養条件下で得られた培養12日目の細胞を実施

例1－(5)と同様の方法で、CD45RA陽性CCR7陽性T細胞の含有率を算出した。結果を表34に示す。

[0340] [表34]

表34

培養方法	培地	刺激条件	CD45RA陽性
			CCR7陽性T細胞含有率(%)
振とう	2%GT-T503	抗CD3抗体－CH-296	18.9
		抗CD3抗体－H296－H296	20.4
		CD3/CD28ビーズ＋CH-296	13.8
	5%X-VIVO15	抗CD3抗体＋CH-296	25.5
		抗CD3抗体＋H296－H296	15.1
		CD3/CD28ビーズ＋CH-296	7.4

[0341] 表34に示されるように、いずれの培地においても抗CD3抗体及びCH-296もしくはH296－H296で刺激した群は、CD3/CD28ビーズ及びCH-296を用いて刺激した群と比較して、CD45RA陽性CCR7陽性T細胞含有率が高い値を示した。つまり、抗CD3抗体とCH-296もしくはH296－H296の組み合わせはナイーブT様細胞を高効率で増殖できることが明らかとなった。

[0342] (5)IL-4陰性IFN- γ 陽性T細胞、及びIL-4陽性IFN- γ 陰性T細胞の解析
実施例28－(3)で得られた培養12日目の細胞について、実施例24－(4)と同様の方法で、IL-4陰性IFN- γ 陽性T細胞及びIL-4陽性IFN- γ 陰性T細胞の含有比率を測定した。IL-4陰性IFN- γ 陽性T細胞比率の結果を表35に、IL-4陽性IFN- γ 陰性T細胞の含有比率測定の結果を表36に示す。なお、全ての条件においてCD4陽性細胞について解析を行った。

[0343] [表35]

表35

		IL-4 陰性	
		IFN- γ 陽性 T 細胞	
培養条件	培地	刺激条件	含有比率 (%)
振とう	2%GT-T503	抗CD3抗体 + CH-296	24.7
		抗CD3抗体 + H296-H296	13.8
		CD3/CD28ビーズ + CH-296	3.7
	5%X-VIVO15	抗CD3抗体 + CH-296	16.6
		抗CD3抗体 + H296-H296	14.6
		CD3/CD28ビーズ + CH-296	6.1
静置	2%GT-T503	抗CD3抗体 + CH-296	8.4
		抗CD3抗体 + H296-H296	8.1
		CD3/CD28ビーズ + CH-296	3.7
	5%X-VIVO15	抗CD3抗体 + CH-296	10.3
		抗CD3抗体 + H296-H296	18.1
		CD3/CD28ビーズ + CH-296	8.4

[0344] [表36]

表 3 6

培養条件	培地	刺激条件	IL-4 陽性
			IFN- γ 陰性 T細胞 含有比率 (%)
振とう	2%GT-T503	抗CD3抗体 + CH-296	11.2
		抗CD3抗体 + H296-H296	21.5
		CD3/CD28ビーズ + CH-296	50.5
	5%N-VIVO15	抗CD3抗体 + CH-296	16.6
		抗CD3抗体 + H296-H296	21.0
		CD3/CD28ビーズ + CH-296	45.0
静置	2%GT-T503	抗CD3抗体 + CH-296	32.1
		抗CD3抗体 + H296-H296	38.6
		CD3/CD28ビーズ + CH-296	54.1

[0345] 表35、表36に示されるように、培養条件、培地条件によらず、抗CD3抗体及びCH-296もしくはH296-H296で刺激した群は、CD3/CD28ビーズ及びCH-296を用いて刺激した群と比較して、IL-4陰性IFN- γ 陽性T細胞の比率が高く、IL-4陽性IFN- γ 陰性T細胞の比率が低かった。Th1タイプの活性化CD4陽性T細胞はIFN- γ を産生し、Th2タイプの活性化CD4陽性T細胞はIL-4を産生することが知られている。すなわち、リンパ球培養時の刺激において抗CD3抗体とCH-296もしくはH296-H296の組み合わせはTh1タイプのCD4陽性T細胞が優位に増殖し、Th2タイプのCD4陽性細胞増殖を抑制し、本発明により細胞免疫に好適な細胞集団が製造できることが明らかとなった。

[0346] (6)CCR4陽性T細胞の解析

実施例28-(3)で得られた培養12日目の細胞を、実施例1-(5)と同様の方法で、PE標識抗ヒトCCR4抗体(R&D Systems社製)及び、FITC標識抗ヒトCD4抗体を用いてCCR4陽性T細胞を測定した。ここではネガティブコントロールとしてFITC標識マウスIgG1、及びRD1標識マウスIgG1(ベックマンコールター社製)を使用し

た。各々の細胞集団について、CD4陽性CCR4陽性T細胞の含有比率を算出した。結果を表37に示す。

[0347] [表37]

表37

培養条件	培地	刺激条件	CD4陽性 CCR4陽性 T細胞 含有比率 (%)
振とう	2%GT-T503	抗CD3抗体 + CH-296	65.2
		抗CD3抗体 + H296-H296	71.7
		CD3/CD28ビーズ + CH-296	93.9
	5%X-VIVO15	抗CD3抗体 + CH-296	76.4
		抗CD3抗体 + H296-H296	67.0
		CD3/CD28ビーズ + CH-296	82.0
静置	2%GT-T503	抗CD3抗体 + CH-296	74.9
		抗CD3抗体 + H296-H296	79.4
		CD3/CD28ビーズ + CH-296	91.7
	5%X-VIVO15	抗CD3抗体+CH-296	68.5
		抗CD3抗体+H296-H296	60.2
		CD3/CD28ビーズ+CH-296	71.6

[0348] 表37に示されるように、いずれの培養条件、培地条件においても抗CD3抗体及びCH-296もしくはH296-H296で初期刺激した群は、CD3/CD28ビーズ及びCH-296を用いて刺激した群と比較して、CD4陽性CCR4陽性T細胞の含有比率が低いことが示された。CCR4はTh2タイプのCD4陽性T細胞に選択的に発現することが知られている。すなわち、リンパ球培養時の刺激において抗CD3抗体とCH-296もしくはH296-H296の組み合わせはTh2タイプのCD4陽性細胞の増殖を抑制することが明らかとなった。

[0349] (7)制御性T細胞(CD4陽性CD25陽性Foxp3陽性T細胞)の解析

実施例28-(3)で得られた培養12日目の細胞をPBS、1%BSA/PBSで洗浄した。1%BSA/PBSに細胞を懸濁し、FITC標識マウス抗ヒトCD25抗体(Dako Cy

tomation社製)、ECD標識マウス抗ヒトCD4抗体を添加した後、室温・暗所で15分間インキュベートした。ここでは、ネガティブコントロールとしてFITC標識マウスIgG1、ECD標識マウスIgG1を使用した。PBSで洗浄した後、FIXATION/PERMEABILIZATION WORKING SOLN. (eBioscience社製)を添加して4℃、暗所で30分間反応させた。Pereabilization buffer(eBioscience社製)を添加して、4℃、300g、5分間遠心して上清を除去した。再度、Pereabilization bufferを添加し、PE標識マウス抗ヒトFoxp3抗体(eBioscience社製)を添加し、4℃、暗所で30分間インキュベートした。この時ネガティブコントロールにはPE標識マウスIgG1を添加した。Pereabilization bufferを用いて洗浄し、上清を除去した後再度Pereabilization bufferに懸濁した。この細胞をフローサイトメトリーに供し、各々の細胞集団について、CD4陽性CD25陽性Foxp3陽性T細胞の含有比率を算出した。結果を表38に示す。

[0350] [表38]

表 3 8

培養条件	刺激条件	CD 4 陽性 CD 2 5 陽性 F
		o x p 3 陽性 T 細胞
		含有比率 (%)
振とう	抗 CD 3 抗体 + CH - 2 9 6	1 0 . 4
	抗 CD 3 抗体 + H 2 9 6 - H 2 9 6	1 4 . 0
	CD 3 / CD 2 8 ビーズ + CH - 2 9 6	2 4 . 0
静置	抗 CD 3 抗体 + CH - 2 9 6	1 3 . 3
	抗 CD 3 抗体 + H 2 9 6 - H 2 9 6	1 6 . 3
	CD 3 / CD 2 8 ビーズ + CH - 2 9 6	2 8 . 4

[0351] 表38に示されるように、いずれの培養条件においても抗CD3抗体及びCH-296もしくはH296-H296で刺激した群は、CD3/CD28ビーズ及びCH-296を用いて刺激した群と比較して、CD4陽性CD25陽性Foxp3陽性T細胞の含有率が低いことが明らかとなった。CD4陽性CD25陽性Foxp3陽性T細胞は制御性T細胞として知られており、種々の免疫応答反応を抑制する働きをもつことが知られている。すなわち、抗CD3抗体とCH-296もしくはH296-H296の組み合わせは、CD4陽

性制御性T細胞の増殖を抑制し、本発明により細胞免疫療法において悪影響のあるCD4陽性制御性T細胞細胞含有比率の低い、当該療法に好適な細胞集団が製造できることが明らかとなった。

[0352] 実施例29 CH-296を用いたCD4陽性T細胞の拡大培養-5

(1)CD4陽性T細胞の拡大培養

実施例28-(1)と同様の方法で固定化したプレートに2%GT-T503又は5%X-VIVO15を添加し、抗CD3抗体及びCH-296を固定化したプレートには実施例28-(2)と同様の方法で調製したCD8除去細胞を、CH-296のみを固定化したプレートには実施例28-(2)と同様の方法で調製したCD3/CD28ビーズ結合細胞を添加して、それぞれの刺激条件についてウェルあたりの最終総細胞数 1×10^6 cells又は 2×10^6 cells(いずれも総液量4mL)となるように初期播種細胞数条件を設定し、これらのプレートを5%CO₂中37°Cで培養した(培養0日目)。培養開始3日目には、培養液2mLを何も固定していないT25細胞培養フラスコを立てたものに移し、振とう培養条件にて培養を継続した。ただし、振とう培養時にはMild Mixer(TAITEC社製)を用いて振とうを行った。その後、培養開始6日目、及び7日目には、細胞濃度が 0.5×10^6 cells/mLとなるように各培地で希釈し、総培養液量が10mLになった次の培養日から培養上清7mLを新しい培地と交換した。培養開始10日目まで培養を継続した。また、いずれの培養日においても2%GT-T503培養群は終濃度200U/mL、5%X-VIVO15培養群は終濃度100U/mLとなるようにIL-2を添加した。培養開始6日目の拡大培養率を表39に示す。

[0353] [表39]

表39

培養 条件	培地	初期播種		刺激条件	拡大培養率 (倍率)
		細胞数 ($\times 10^6$ cells)			
振とう	2%GT-T503	1		抗CD3抗体 + CH-296	13.1
				CD3/CD28ビーズ + CH-296	9.2
	5%N-VIVO15	1		抗CD3抗体 + CH-296	5.8
				CD3/CD28ビーズ + CH-296	2.7
	2%GT-T503	2		抗CD3抗体 + CH-296	7.8
				CD3/CD28ビーズ + CH-296	6.3
	5%N-VIVO15	2		抗CD3抗体 + CH-296	5.4
				CD3/CD28ビーズ + CH-296	4.5

[0354] 表39に示されるように、いずれの培地条件、初期播種細胞数においても、抗CD3抗体及びCH-296で刺激した群では、CD3/CD28ビーズ及びCH-296で刺激した群よりも高い拡大培養率が得られた。すなわち、リンパ球の拡大培養時に抗CD3抗体とCH-296の組み合わせが好適に使用されることが示された。

[0355] (2)CD45RA陽性CD62L陽性T細胞の解析

実施例29-(1)で得られた培養10日目の細胞を実施例19と同様の方法で、CD45RA陽性CD62L陽性T細胞の含有比率を解析した。CD45RA陽性CD62L陽性T細胞の含有比率測定の結果を表40に示す。

[0356] [表40]

表 40

培養 条件	培地	初期播種		CD45RA陽性
		細胞数 ($\times 10^6$ cells)	刺激条件	CD62L陽性 T細胞 含有比率 (%)
振とう	2% GTT-T503	1	抗CD3抗体 + CH-296	74.3
			CD3/CD28ビーズ + CH-296	41.9
		2	抗CD3抗体 + CH-296	72.4
			CD3/CD28ビーズ + CH-296	56.3

[0357] 表40に示されるように、いずれの初期播種細胞数においても抗CD3抗体及びCH-296で刺激した群は、CD3/CD28ビーズ及びCH-296を用いて刺激した群と比較して、CD45RA陽性CD62L陽性T細胞含有比率が高い値を示した。つまり、抗CD3抗体とCH-296の組み合わせはナイーブT様細胞を高効率で増殖できることが明らかとなった。

[0358] (3) IL-4陰性IFN- γ 陽性T細胞、及びIL-4陽性IFN- γ 陰性T細胞の解析
実施例29-(1)で得られた培養10日目の細胞について、実施例24-(4)に記載した方法でIL-4陰性IFN- γ 陽性T細胞、及びIL-4陽性IFN- γ 陰性T細胞の含有比率を測定した。IL-4陰性IFN- γ 陽性T細胞についての結果を表41に、またIL-4陽性IFN- γ 陰性T細胞についての結果を表42に示す。なお、全ての条件においてCD4陽性細胞について解析を行った。

[0359] [表41]

表 4-1

培養条件	培地	初期播種 細胞数 ($\times 10^5$ cells)	刺激条件	IL-4 陰性
				IFN- γ 陽性 T細胞 含有比率 (%)
振とう	2 % GT + T 503	1	抗CD3抗体 + CH-296	21.1
			CD3/CD28ビーズ + CH-296	10.0
	5 % X-V1 VO15	1	抗CD3抗体 + CH-296	25.9
			CD3/CD28ビーズ + CH-296	13.1
振とう	2 % GT + T 503	2	抗CD3抗体 + CH-296	16.8
			CD3/CD28ビーズ + CH-296	6.9
	5 % X-V1 VO15	2	抗CD3抗体 + CH-296	17.8
			CD3/CD28ビーズ + CH-296	12.2

[0360] [表42]

表42

培養条件	培地	初期播種細胞数 ($\times 10^5$ cells)	刺激条件	IL-4陽性 IFN- γ 陰性 T細胞 含有比率 (%)
振とう	2% GT-T 503	1	抗CD3抗体+CH-296	15.9
			CD3/CD28ビーズ+CH-296	34.2
	5% X-V1 VO15	1	抗CD3抗体+CH-296	8.5
			CD3/CD28ビーズ+CH-296	23.8
振とう	2% GT-T 503	2	抗CD3抗体+CH-296	21.2
			CD3/CD28ビーズ+CH-296	46.9
	5% X-V1 VO15	2	抗CD3抗体+CH-296	18.3
			CD3/CD28ビーズ+CH-296	30.1

[0361] 表41、表42に示されるように、抗CD3抗体及びCH-296で刺激した群は、CD3／CD28ビーズ及びCH-296を用いて刺激した群と比較して、IL-4陰性IFN- γ 陽性T細胞の含有比率が高く、IL-4陽性IFN- γ 陰性T細胞の含有比率が低かった。つまり、リンパ球拡大培養時に抗CD3抗体とCH-296の組み合わせで刺激することにより、Th1タイプのCD4陽性T細胞が優先的に増殖し、Th2タイプのCD4陽性細胞の増殖を抑制することが明らかとなった。

[0362] (4)CCR4陽性T細胞の解析

実施例29-(1)で得られた培養10日目の細胞を、実施例28-(6)と同様の方法で、CD4陽性CCR4陽性T細胞の含有比率を算出した。結果を表43に示す。

[0363] [表43]

表 4 3

培養条件	培地	初期播種細胞数 ($\times 10^6$ cells)	刺激条件	CD4陽性
				CCR4陽性 T細胞 含有比率 (%)
振とう	2% GT-T5 0.3	1	抗CD3抗体+CH-296	82.9
			CD3/CD28ビーズ+CH-296	93.4
	5% X-VIV 0.15	1	抗CD3抗体+CH-296	71.2
			CD3/CD28ビーズ+CH-296	93.1
振とう	2% GT-T5 0.3	2	抗CD3抗体+CH-296	71.8
			CD3/CD28ビーズ+CH-296	96.5
	5% X-VIV 0.15	2	抗CD3抗体+CH-296	76.0
			CD3/CD28ビーズ+CH-296	92.7

[0364] 表43に示されるように、いずれの培地条件、初期播種細胞数においても抗CD3抗体及びCH-296で刺激した細胞は、CD3/CD28ビーズ及びCH-296を用いて刺激した細胞と比較して、CD4陽性CCR4陽性T細胞の含有比率が低かった。すなわち、リンパ球拡大培養時に抗CD3抗体とCH-296を組み合わせることでTh2タイプのCD4陽性細胞の増殖を抑制することが明らかとなった。

[0365] 実施例30 CH-296を用いたCD4陽性T細胞の拡大培養-6

(1)CD4陽性T細胞の拡大培養

実施例29-(1)と同様の方法で、CD4陽性T細胞の拡大培養を行った。ただし、培地は2%GT-T503を使用し、CH-296による初期刺激期間は4日間とした。また培養開始6日目、7日目及び9日目に、培地の交換と細胞の希釈を行った(以下培養方法Aと記載)。また、培養開始3日目に培養液2mLを何も固定化していないT25細胞培養フラスコに立てたものに移し、それぞれ新しい培地を添加し総培養液量を10mLとした上で、培養開始7日目には、それぞれ新しい培地を10mL添加し、総培

養液量を20mLとした上で静置培養条件にて培養を継続する群も同時に設定した(以下培養方法Bと記載)。いずれの培養日においても終濃度200U/mLとなるようにIL-2を添加し、10日目まで培養を継続した。培養開始6日目の培養方法Aについての拡大培養率を表44に、培養開始7日目の培養方法Bについての拡大培養率を表45に示す。

[0366] [表44]

表44

培養方法	初期播種		拡大培養率 (倍率)
	細胞数 ($\times 10^6$ cells)	刺激条件	
A	1	抗CD3抗体 + CH-296	12.0
		CD3/CD28ビーズ + CH-296	9.4
	2	抗CD3抗体 + CH-296	11.5
		CD3/CD28ビーズ + CH-296	7.1

[0367] [表45]

表45

培養方法	初期播種		拡大培養率 (倍率)
	細胞数 ($\times 10^6$ cells)	刺激条件	
B	1	抗CD3抗体 + CH-296	42.6
		CD3/CD28ビーズ + CH-296	28.3
	2	抗CD3抗体 + CH-296	30.6
		CD3/CD28ビーズ + CH-296	20.6

[0368] 表44、及び表45に示されるように、いずれの初期細胞数条件、培養方法においても、抗CD3抗体及びCH-296で初期刺激した群は、CD3/CD28ビーズ及びCH-296で刺激した群よりも高い拡大培養率が得られた。すなわち、リンパ球拡大培養時においては抗CD3抗体とCH-296の組み合わせを用いて刺激することが好適で

あることが示された。

[0369] (2)CD45RA陽性CCR7陽性T細胞及びCD45RA陽性CD62L陽性T細胞の解析

実施例30－(1)で得られた培養10日目の細胞を実施例19と同様の方法で、CD45RA陽性CCR7陽性T細胞、及びCD45RA陽性CD62L陽性T細胞の含有比率を算出した。結果を表46、表47に示す。

[0370] [表46]

表46

培養方法	初期播種 細胞数 ($\times 10^6$ cells)	刺激条件	CD45RA陽性
			CCR7陽性 T細胞 含有比率(%)
A	1	抗CD3抗体 + CH-296	47.8
		CD3/CD28ビーズ + CH-296	31.6
	2	抗CD3抗体+CH-296	48.0
		CD3/CD28ビーズ + CH-296	42.2
B	1	抗CD3抗体+CH-296	50.7
		CD3/CD28ビーズ + CH-296	32.1
	2	抗CD3抗体+CH-296	50.6
		CD3/CD28ビーズ + CH-296	31.9

[0371] [表47]

表 4 7

培養方法	初期播種 細胞数 ($\times 10^6$ cells)	刺激条件	CD 4 5 RA陽性
			CD 6 2 L陽性 T細胞 含有比率 (%)
A	1	抗CD 3抗体 + CH-2 9 6	6 7. 6
		CD 3 / CD 2 8ビーズ + CH-2 9 6	5 8. 7
	2	抗CD 3抗体 + CH-2 9 6	6 1. 0
		CD 3 / CD 2 8ビーズ + CH-2 9 6	5 9. 0
B	1	抗CD 3抗体 + CH-2 9 6	7 2. 1
		CD 3 / CD 2 8ビーズ + CH-2 9 6	5 9. 3
	2	抗CD 3抗体 + CH-2 9 6	6 5. 1
		CD 3 / CD 2 8ビーズ + CH-2 9 6	5 3. 6

[0372] 表46、表47に示されるように、いずれの初期播種細胞数、培養方法においても抗CD3抗体及びCH-296で刺激した群は、CD3/CD28ビーズ及びCH-296を用いて刺激した群と比較して、CD45RA陽性CCR7陽性T細胞含有比率及びCD45RA陽性CD62L陽性T細胞含有比率が高い値を示した。つまり、抗CD3抗体とCH-296の組み合わせはナイーブT様細胞を高効率で増殖できることが明らかとなった。

産業上の利用可能性

[0373] 本発明により、細胞増殖率、Th1型CD4陽性T細胞、Th2型CD4陽性T細胞、CD4陽性ナイーブT様細胞、CD4陽性制御性T細胞の比率を任意に変化させた細胞集団を製造することができる。当該製造方法により得られる細胞集団は、細胞医療による疾患の治療に極めて有用である。

配列表フリーテキスト

[0374] SEQ ID NO:1 ; Partial region of fibronectin named III-8.
 SEQ ID NO:2 ; Partial region of fibronectin named III-9.
 SEQ ID NO:3 ; Partial region of fibronectin named III-10.
 SEQ ID NO:4 ; Partial region of fibronectin named III-11.

SEQ ID NO:5 ; Partial region of fibronectin named III-12.

SEQ ID NO:6 ; Partial region of fibronectin named III-13.

SEQ ID NO:7 ; Partial region of fibronectin named III-14.

SEQ ID NO:8 ; Partial region of fibronectin named CS-1.

SEQ ID NO:9 ; Fibronectin fragment named C-274.

SEQ ID NO:10 ; Fibronectin fragment named H-271.

SEQ ID NO:11 ; Fibronectin fragment named H-296.

SEQ ID NO:12 ; Fibronectin fragment named CH-271.

SEQ ID NO:13 ; Fibronectin fragment named CH-296.

SEQ ID NO:14 ; Fibronectin fragment named C-CS1.

SEQ ID NO:15 ; Fibronectin fragment named CH-296Na.

SEQ ID NO:16 ; Fibronectin fragment named CHV-89.

SEQ ID NO:17 ; Fibronectin fragment named CHV-90.

SEQ ID NO:18 ; Fibronectin fragment named CHV-92.

SEQ ID NO:19 ; Fibronectin fragment named CHV-179.

SEQ ID NO:20 ; Fibronectin fragment named CHV-181.

SEQ ID NO:21 ; Fibronectin fragment named H-275-Cys.

SEQ ID NO:22 ; Fibronectin fragment named H296-H296.

SEQ ID NO:23 ; Fibronectin fragment named H105-H105.

SEQ ID NO:24; Polynucleotide coding Fibronectin fragment named CH-296.

SEQ ID NO:25; PrimerCH-296-NdeF.

SEQ ID NO:26; Primer H296-HindR.

SEQ ID NO:27; Primer NVS-F-Nco.

SEQ ID NO:28; Primer pC-TER.

SEQ ID NO:29; Fibronectin fragment named H204.

SEQ ID NO:30; Polynucleotide coding Fibronectin fragment named H204.

SEQ ID NO:31; Primer H296-NcoF.

SEQ ID NO:32 ; Primer NC2-5' UTR.

SEQ ID NO:33 ; Primer CS1-no.st-CS1-R.

SEQ ID NO:34 ; Primer CS1-no.st-CS1-F.

SEQ ID NO:35 ; Primer FN-5630F.

SEQ ID NO:36 ; Fibronectin fragment named H296-CS1.

SEQ ID NO:37 ; Polynucleotide coding Fibronectin fragment named H296-CS1.

SEQ ID NO:38 ; Fibronectin fragment named H296-CS2.

SEQ ID NO:39 ; Polynucleotide coding Fibronectin fragment named H296-CS2.

SEQ ID NO:40 ; Primer 13-Nde-F.

SEQ ID NO:41 ; Primer 13-CS1-R.

SEQ ID NO:42 ; Primer 13-CS1-F.

SEQ ID NO:43 ; Primer CS1-R-Xba.

SEQ ID NO:44 ; Fibronectin fragment named H114-HT.

SEQ ID NO:45 ; Polynucleotide coding Fibronectin fragment named H114-HT.

SEQ ID NO:46 ; Fibronectin fragment named H114.

SEQ ID NO:47 ; Polynucleotide coding Fibronectin fragment named H114.

SEQ ID NO:48 ; Primer H296-NdeF.

SEQ ID NO:49 ; Primer 12-CS1-R.

SEQ ID NO:50 ; Primer 12-CS1-F.

SEQ ID NO:51 ; Fibronectin fragment named H117-HT.

SEQ ID NO:52 ; Polynucleotide coding Fibronectin fragment named H117-HT.

SEQ ID NO:53 ; Fibronectin fragment named H117.

SEQ ID NO:54 ; Polynucleotide coding Fibronectin fragment named H117.

SEQ ID NO:55 ; Primer 12-Nco-F2.

SEQ ID NO:56 ; Primer H271-BamR.

SEQ ID NO:57 ; Primer AID-F-Nco.

SEQ ID NO:58 ; Fibronectin fragment named H206-HT.

SEQ ID NO:59 ; Polynucleotide coding Fibronectin fragment named H206-HT.

SEQ ID NO:60 ; Fibronectin fragment named H206.

SEQ ID NO:61 ; Polynucleotide coding Fibronectin fragment named H206.

SEQ ID NO:62 ; Primer CS1-Nde-F.

SEQ ID NO:63 ; Primer CS1-12-R.

SEQ ID NO:64 ; Primer CS1-12-F.

SEQ ID NO:65 ; Primer H271-R-Xba.

SEQ ID NO:66 ; Fibronectin fragment named H296R-HT.

SEQ ID NO:67 ; Polynucleotide coding Fibronectin fragment named H296R-HT.

SEQ ID NO:68 ; Fibronectin fragment named H296R.

SEQ ID NO:69 ; Polynucleotide coding Fibronectin fragment named H296R.

SEQ ID NO:70 ; Primer H105-NdeF.

SEQ ID NO:71 ; Fibronectin fragment named H105-HT.

SEQ ID NO:72 ; Polynucleotide coding Fibronectin fragment named H105-HT.

SEQ ID NO:73 ; Fibronectin fragment named H105.

SEQ ID NO:74 ; Polynucleotide coding Fibronectin fragment named H105.

SEQ ID NO:75 ; Fibronectin fragment named CH105-HT.

SEQ ID NO:76 ; Polynucleotide coding Fibronectin fragment named CH105-HT.

SEQ ID NO:77 ; Primer HBD2mutF.

SEQ ID NO:78 ; Primer HBD2mutR.

SEQ ID NO:79 ; Fibronectin fragment named CH-296mut2.

SEQ ID NO:80 ; Polynucleotide coding Fibronectin fragment named CH-296mut2.

SEQ ID NO:81 ; Primer HBD3mutF.

SEQ ID NO:82 ; Primer HBD3mutR.

SEQ ID NO:83 ; Fibronectin fragment named CH-296mut3.

SEQ ID NO:84 ; Polynucleotide coding Fibronectin fragment named CH-296mut3.

SEQ ID NO:85 ; Fibronectin fragment named CH-296mut4.

SEQ ID NO:86 ; Polynucleotide coding Fibronectin fragment named CH-296mut4.

請求の範囲

- [1] 下記工程を包含することを特徴とする細胞集団の製造方法。
- 工程(1):T細胞を含有する細胞集団からCD8陽性T細胞を除去、もしくはCD4陽性T細胞を採取することにより培養に供する細胞集団を調製する工程、及び
- 工程(2):前記工程(1)で得られた細胞集団を、下記(A)及び(B)の存在下で培養する工程
- (A)フィブロネクチン、フィブロネクチンのフラグメント及びフィブロネクチンのフラグメントの混合物からなる群より選択される少なくとも1つ
- (B)CD3リガンド
- [2] 工程(1)又は工程(2)の実施前に細胞亜集団を採取又は除去する工程を包含する、請求項1記載の方法。
- [3] 工程(2)で得られた細胞集団を請求項1記載の(A)及び／又は(B)の非存在下で更に培養する工程を包含する、請求項1又は2記載の方法。
- [4] さらに、工程(1)又は工程(2)で得られた細胞集団に遺伝子を導入する工程を包含する、請求項1～3いずれか1項記載の方法。
- [5] 得られる細胞集団が下記からなる群より選択される少なくとも1つである、請求項1～4いずれか1項記載の製造方法。
- 細胞集団(a):Th1型CD4陽性T細胞を含有する細胞集団
- 細胞集団(b):CD4陽性CD45RA陽性CCR7陽性T細胞を含有する細胞集団
- 細胞集団(c):CD4陽性CD45RA陽性CD62L陽性T細胞を含有する細胞集団
- [6] 請求項1～5いずれか1項記載の製造方法により得られる細胞集団。
- [7] 細胞集団が下記からなる群より選択される少なくとも1つである、請求項6記載の細胞集団。
- 細胞集団(1):CD4陽性ナイーブT細胞含有率が高い細胞集団
- 細胞集団(2):Th1型CD4陽性T細胞含有率が高い細胞集団
- 細胞集団(3):Th2型CD4陽性T細胞含有率が低い細胞集団
- 細胞集団(4):CD4陽性制御性T細胞含有率が低い細胞集団
- [8] 請求項6又は7記載の細胞集団を含有する医薬。

- [9] 医薬の製造のための、請求項6又は7記載の細胞集団の使用。
- [10] 被験体に、有効量の請求項6又は7記載の細胞集団を投与する工程を含む、疾患の治療方法又は予防方法。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2008/059238

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N5/06(2006.01)i, A61K35/24(2006.01)i, A61P1/16(2006.01)i, A61P31/04(2006.01)i, A61P31/06(2006.01)i, A61P31/10(2006.01)i, A61P31/12(2006.01)i, A61P31/16(2006.01)i, A61P31/18(2006.01)i, A61P35/00(2006.01)i,
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N5/06, A61K35/24, A61P1/16, A61P31/04, A61P31/06, A61P31/10, A61P31/12, A61P31/16, A61P31/18, A61P35/00, A61P35/02, C12N5/02, C12N5/10, C12N15/09

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)

BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, UniProt/GeneSeq, Science Direct, JSTPlus(JDreamII), JMEDPlus(JDreamII), JST7580(JDreamII),

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/Y	WO 2007/040105 A1 (Takara Bio Inc.), 12 April, 2007 (12.04.07), Full text (Family: none)	1-9/1-5
X/Y	Mitsuko IDENO et al., "RetroNectin to Ko-CD3 Kotai no Kumiawase ni yotte Kakudai Baiyo sareta T-saibo Shudan wa NaiveT-saibo Tokuiteki na Hyogengata o Yusuru Saibo o Koritsu de Gan'yu shi, Takai Kogen Ninshikino o Hakki suru", Biotherapy (Tokyo), Vol.20, No.Supplement 1, page 84 (25 September, 2006 (25.09.06))	6-9/1-5

☒ 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
30 June, 2008 (30.06.08)Date of mailing of the international search report
22 July, 2008 (22.07.08)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2008/059238

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/Y	Nobuko MURAKI et al., "RetroNectin o Kumiawaseta T-saibo Kakudai Baiyo (I): Kakudai Baiyo ga Anteika shi, NaiveT-saibo ga Kohiritsu de Zoshoku", Proceedings of the Japanese Cancer Association, Vol.65th, page 330, P-707 (28 August, 2006 (28.08.06))	6-9/1-5
X/Y	JP 2005-179299 A (Hokkaido Technology Licensing Office Co., Ltd.), 07 July, 2005 (07.07.05), Full text & WO 2005/061697 A1 & US 2008/019948 A1	6-9/1-5
X/Y/A	DAVIS, L.S. et al, Fibronectin promotes proliferation of naive and memory T cells by signaling through both the VLA-4 and VLA-5 integrin molecules, J Immunol, 1990, Vol.145, No.3, p.785-93	1-2,5-7/1-5/ 8-9
X/Y/A	MATSUYAMA, T. et al, Activation of CD4 cells by fibronectin and anti-CD3 antibody. A synergistic effect mediated by the VLA-5 fibronectin receptor complex, J Exp Med, 1989, Vol.170, No.4, p.1133-48	1-2,5-7/1-5/ 8-9
X/Y/A	NOJIMA, Y. et al, VLA-4 mediates CD3-dependent CD4+ T cell activation via the CS1 alternatively spliced domain of fibronectin, J Exp Med, 1990, Vol.172, No.4, p.1185-92	1-2,5-7/1-5/ 8-9
A	Mitsuko IDENO et al., "Kumikaetai Hito Fibronectin Fragment Shigeki ni yoru Kasseika CTL no Tairyō Expansion-ho", Proceedings of the Japanese Cancer Association, Vol.62nd, page 175, 2144-OA (25 August, 2003 (25.08.03))	1-9

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2008/059238

Continuation of A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
(International Patent Classification (IPC))

A61P35/02(2006.01)i, C12N5/02(2006.01)i, C12N5/10(2006.01)i,
C12N15/09(2006.01)n

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

Continuation of B. FIELDS SEARCHED

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

Igaku·Yakugaku Yokoshu Zenbun Database, HIGHWIRE JOURNALS
(SCIENCE ONLINE), Wiley Inter Science

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2008/059238

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 10

because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claim 10 pertains to "a method for treatment of a human body by therapy" and thus relates to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of PCT Rule 39.1(iv), to search.

2. ☐ Claims Nos.:

because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:

because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest
the

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, payment of a protest fee.

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（I P C））

Int.Cl. 特別ページ参照

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（I P C））

Int.Cl. C12N5/06, A61K35/24, A61P1/16, A61P31/04, A61P31/06, A61P31/10, A61P31/12, A61P31/16, A61P31/18, A61P35/00, A61P35/02, C12N5/02, C12N5/10, C12N15/09

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

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

BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, UniProt/GeneSeq, Science Direct, JSTPlus(JDreamII), JMEDPlus(JDreamII), JST7580(JDreamII), 医学・薬学予稿集全文データベース, HIGHWIRE JOURNALS (SCIENCE ONLINE), Wiley Inter Science

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X/Y	WO 2007/040105 A1（タカラバイオ株式会社）2007. 04. 12, 全文 （ファミリーなし）	1-9/1-5
X/Y	出野美津子ら、RetroNectin と抗 CD3 抗体の組み合わせによって拡大 培養された T 細胞集団は NaiveT 細胞特異的な表現型を有する細胞を 高率で含有し、高い抗原認識能を発揮する Biotherapy (Tokyo) Vol. 20 No. Supplement 1 Page. 84 (2006. 09. 25)	6-9/1-5

☒ C 欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

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

国際調査を完了した日

3 0 . 0 6 . 2 0 0 8

国際調査報告の発送日

2 2 . 0 7 . 2 0 0 8

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁（I S A / J P）

郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5

東京都千代田区霞が関三丁目 4 番 3 号

特許庁審査官（権限のある職員）

左海 匡子

4 N

3 0 3 8

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

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X/Y	村木信子ら、RetroNectin を組み合わせた T 細胞拡大培養(I) : 拡大培養が安定化し、Naive T 細胞が高比率で増殖 日本癌学会総会記事 Vol.65th Page.330 P-707 (2006.08.28)	6-9/1-5
X/Y	JP 2005-179299 A (北海道ティー・エル・オー株式会社) 2005.07.07, 全文 & WO 2005/061697 A1 & US 2008/019948 A1	6-9/1-5
X/Y/ A	DAVIS, L. S. et al, Fibronectin promotes proliferation of naive and memory T cells by signaling through both the VLA-4 and VLA-5 integrin molecules, J Immunol, 1990, Vol.145, No.3, p.785-93	1-2, 5-7/1-5/ 8-9
X/Y/ A	MATSUYAMA, T. et al, Activation of CD4 cells by fibronectin and anti-CD3 antibody. A synergistic effect mediated by the VLA-5 fibronectin receptor complex, J Exp Med, 1989, Vol.170, No.4, p.1133-48	1-2, 5-7/1-5/ 8-9
X/Y/ A	NOJIMA, Y. et al, VLA-4 mediates CD3-dependent CD4+ T cell activation via the CS1 alternatively spliced domain of fibronectin, J Exp Med, 1990, Vol.172, No.4, p.1185-92	1-2, 5-7/1-5/ 8-9
A	出野美津子ら、組換え体ヒトフィブロネクチンフラグメント刺激による活性化 CTL の大量 Expansion 法 日本癌学会総会記事 Vol.62nd Page.175 2144-OA (2003.08.25)	1-9

第Ⅱ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT 17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 1 0 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
つまり、
請求の範囲 1 0 は[治療による人体の処置方法に関するもの]であって、PCT規則39.1(iv)の規定により、国際調査をすることを要しない対象に係るものである。
2. ☐ 請求の範囲 は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅲ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。
- ☐ 追加調査手数料の納付はあったが、異議申立てはなかった。

発明の属する分野の分類

C12N5/06(2006.01)i, A61K35/24(2006.01)i, A61P1/16(2006.01)i, A61P31/04(2006.01)i, A61P31/06(2006.01)i, A61P31/10(2006.01)i, A61P31/12(2006.01)i, A61P31/16(2006.01)i, A61P31/18(2006.01)i, A61P35/00(2006.01)i, A61P35/02(2006.01)i, C12N5/02(2006.01)i, C12N5/10(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)n