

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2007年12月13日 (13.12.2007)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2007/142300 A1

- (51) 国際特許分類:
C12N 5/00 (2006.01) C12N 5/10 (2006.01)
A61K 35/12 (2006.01) C12N 15/09 (2006.01)
C07K 19/00 (2006.01) A61P 37/02 (2006.01)
C12N 5/06 (2006.01) C07K 14/78 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2007/061555
- (22) 国際出願日: 2007年6月7日 (07.06.2007)
- (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2006-161386 2006年6月9日 (09.06.2006) JP
特願2007-036963 2007年2月16日 (16.02.2007) 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): 村木 信子 (MURAKI, Nobuko). 出野 美津子 (IDENO, Mitsuko). 長嶺 衣子 (NAGAMINE, Kinuko). 高島 扶有子 (TAKASHIMA, Fuyuko). 小林 英二 (KOBAYASHI, Eiji). 加藤 彰子 (KATO, Akiko). 円居 隆宏 (MARUI, Takahiro). 佐川 裕章 (SAGAWA, Hiroaki). 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).
- (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, 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, 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, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, 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
- 2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: METHOD OF PRODUCING LYMPHOCYTES

(54) 発明の名称: リンパ球の製造方法

(57) Abstract: A method of producing lymphocytes characterized by comprising the step of culturing lymphocytes in the presence of a modified recombinant fibronectin fragment which has overlapping parts of the heparin-binding domain of fibronectin. This method makes it possible to achieve a high cell proliferation rate. The lymphocytes obtained thereby are appropriately usable in, for example, adoptive immunotherapy and, therefore, expected as highly useful in the clinical field. Moreover, a novel modified recombinant fibronectin fragment is provided.

(57) 要約: フィブロネクチンのヘパリン結合ドメインの一部を重複して有する改変型組換えフィブロネクチンフラグメントの存在下にリンパ球を培養する工程を包含することを特徴とするリンパ球の製造方法。本発明の方法は細胞増殖率が高く、本発明により得られるリンパ球は、例えば、養子免疫療法に好適に使用されることから、医療分野への多大な貢献が期待される。また、本発明により、新規な改変型組換えフィブロネクチンフラグメントが提供される。

WO 2007/142300 A1

明 細 書

リンパ球の製造方法

技術分野

[0001] 本発明は、医療分野において有用なリンパ球を取得する方法に関する。

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細胞と記載することがある)とTリンパ球(以下、T細胞と記載することがある)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、CD(Cluster of Differentiation)4マーカを有し、主に抗体産生の補助や種々の免疫応答の誘導に関与するヘルパーT細胞(以下、 T_H と記載する)、CD8マーカを有し、主に細胞傷害活性を示す細胞傷害性T細胞(T_C ;細胞傷害性Tリンパ球(cytotoxic T lymphocyte)、キラーT細胞とも呼ばれる。以下、CTLと記載することがある)に亜分類される。腫瘍細胞やウイルス感染細胞等を認識して破壊、除去するのに最も重要な役割を果たしているCTLは、B細胞のように抗原に対して特異的に反応する抗体を産生するのではなく、標的細胞膜表面上に存在する主要組織適合複合体[MHC:ヒトにおいてはヒト白血球抗原(HLA)と称することもある]クラスI分子に会合した標的細胞由来の抗原(抗原ペプチド)を直接認識して作用する。この時、CTL膜表面のT細胞レセプター(以下、TCRと称す)が前述した抗原ペプチドおよびMHCクラスI分子を特異的に認識して、抗原ペプチドが自己由来のものなのか、あるいは、非自己由来のものなのかを判断する。そして、非自己由来と判断された標的細胞はCTLによって特異的に破壊、除去される。

[0004] 近年、薬剤治療法や放射線治療法のように患者に重い肉体的負担がある治療法が見直され、患者の肉体的負担が軽い免疫治療法への関心が高まっている。特にヒト由来のリンパ球から目的とする抗原に対して特異的に反応するCTLを生体外(ex

vivo)で誘導した後、もしくは誘導を行わず、リンパ球を拡大培養し、患者へ移入する養子免疫療法の有効性が注目されている。例えば、動物モデルにおいて養子免疫療法がウイルス感染および腫瘍に対して有効な治療法であることが示唆されている(例えば、非特許文献1および2)。この治療法ではCTLの抗原特異的細胞傷害活性を維持もしくは増強させた状態でその細胞数を維持あるいは増加させることが重要である。

[0005] 上記のような養子免疫療法において、治療効果を得るためには一定量以上の細胞数の細胞傷害性リンパ球を投与する必要がある。すなわち、ex vivoでこれらの細胞数を短時間に得ることが最大の問題であるといえる。

[0006] CTLの抗原特異的傷害活性を維持および増強するためには、CTLについて抗原に特異的な応答を誘導する際に、目的とする抗原を用いた刺激を繰り返す方法が一般的である。しかし、通常、この方法では最終的に得られるCTL数が減少し、十分な細胞数が得られない。

[0007] 次に、抗原特異的なCTLの調製に関しては、自己CMV感染線維芽細胞とIL-2(例えば、非特許文献3)、あるいは抗CD3モノクローナル抗体(抗CD3mAb)とIL-2を用いて、それぞれCMV特異的CTLクローンを単離ならびに大量培養する方法(例えば、非特許文献4)が報告されている。

[0008] さらに、特許文献1にはREM法(rapid expansion method)が開示されている。このREM法は、抗原特異的CTLおよび T_H を含むT細胞の初期集団を短期間で増殖(Expand)させる方法である。つまり、個々のT細胞クローンを増殖させて大量のT細胞を提供可能であり、抗CD3抗体、IL-2、並びに放射線照射により増殖性をなくしたPBMC(peripheral blood mononuclear cell、末梢血単核細胞)とエプスタインバーウイルス(Epstein-Barr virus、以下EBVと略す)感染細胞とを用いて抗原特異的CTL数を増加させることが特徴である。

[0009] また、特許文献2には改変REM法が開示されており、当該方法はPBMCとは区別されるT細胞刺激成分を発現する分裂していない哺乳動物細胞株をフィーダ細胞として使用し、PBMCの使用量を低減させる方法である。

[0010] CTL以外の疾病の治療に有効なリンパ球としては、例えば、リンフォカイン活性化

細胞(例えば、非特許文献5、6)、高濃度のインターロイキン-2(IL-2)を用いて誘導した腫瘍浸潤リンパ球(TIL)(例えば、非特許文献7)が知られている。

[0011] リンフォカイン活性化細胞は、リンパ球を含む末梢血液(末梢血白血球)や臍帯血、組織液等にIL-2を加えて、数日間試験管内で培養することにより得られる細胞傷害活性を持つ機能的細胞集団である。リンフォカイン活性化細胞の培養工程において、抗CD3抗体を加えることにより、さらにリンフォカイン活性化細胞の増殖は加速する。このようにして得られたリンフォカイン活性化細胞は非特異的にさまざまながん細胞やその他のターゲットに対して傷害活性を有する。

[0012] フィブロネクチンは動物の血液中、培養細胞表面、組織の細胞外マトリックスに存在する分子量25万の巨大な糖タンパク質であり、多彩な機能を持つことが知られている。そのドメイン構造は7つに分けられており(以下、第1図参照)、またそのアミノ酸配列中には3種類の類似の配列が含まれており、これら各配列の繰返しで全体が構成されている。3種類の類似の配列はI型、II型、III型と呼ばれ、このうち、III型はアミノ酸残基71~96個のアミノ酸残基で構成されており、これらのアミノ酸残基の一致率は17~40%である。フィブロネクチン中には14のIII型の配列が存在するが、そのうち、8番目、9番目、10番目(以下、それぞれIII-8、III-9、III-10と称する)は細胞結合ドメインに、また12番目、13番目、14番目(以下、それぞれIII-12、III-13、III-14と称する)はヘパリン結合ドメインに含有されている。また、III-10にはVLA(A very late activation antigen)-5結合領域が含まれており、このコア配列はRGDSである。また、ヘパリン結合ドメインのC末端側にはIIICSと呼ばれる領域が存在する。IIICSには25アミノ酸からなるVLA-4に対して結合活性を有するCS-1と呼ばれる領域が存在する(例えば、非特許文献8~10)。

[0013] リンフォカイン活性化細胞や細胞傷害性リンパ球の製造において、フィブロネクチンやそのフラグメントを使用することで、細胞増殖率の向上作用、細胞傷害活性の維持作用することについては、既に本発明者らにより検討されてきた(例えば、特許文献3、4および5)。しかしながら、養子免疫療法への適用を考えた場合、上記文献の方法では決して満足できるものではなく、さらなる細胞増殖率の向上や、安全性の観点からフィーダ細胞を使用しない拡大培養方法が求められていた。

非特許文献1:Greenberg, P. D. 著, 1992年発行, Advances in Immunology

非特許文献2:Reusser P. 他3名, Blood, 1991年, Vol. 78, No. 5, P1373～1380

非特許文献3:Riddell S. R. 他4名, J. Immunol., 1991年, Vol. 146, No. 8, P2795～2804

非特許文献4:Riddell S. R. 他1名, J. Immunol. Methods, 1990年, Vol. 128, No. 2, P189～201

非特許文献5:Ho M. 他9名, Blood, 1993年, Vol. 81, No. 8, P2093～2101

非特許文献6:Rosenberg S. A. 他, N. Engl. J. Med. 1987年, Vol. 316, No. 15, P889～897

非特許文献7:Rosenberg S. A. 他, N. Engl. J. Med. 1988年, Vol. 319, No. 25, P1676～1680

非特許文献8:Deane F. Momer著, 1988年発行, FIBRONECTIN, ACADEMIC PRESS INC., P1～8

非特許文献9:Kimizuka F. 他8名, J. Biochem., 1991年, Vol. 110, No. 2, p284～291

非特許文献10:Hanenbergh H. 他5名, Human Gene Therapy, 1997年, Vol. 8, No. 18, p2193～2206

特許文献1:国際公開第96/06929号パンフレット

特許文献2:国際公開第97/32970号パンフレット

特許文献3:国際公開第03/016511号パンフレット

特許文献4:国際公開第03/080817号パンフレット

特許文献5:国際公開第2005/019450号パンフレット

発明の要約

[0014] 本発明の第1の発明は、後述するポリペプチド(X)及び／又はポリペプチド(Y)の存在下での培養工程を包含することを特徴とする、リンパ球の製造方法に関する。前

記ポリペプチド(X)は配列中にアミノ酸配列(m)を2個以上、かつアミノ酸配列(n)を1個以上含有し、該アミノ酸配列(m)は、配列表の配列番号1～3から選択される1個のアミノ酸配列、もしくは配列表の配列番号1～3から選択される数個のアミノ酸配列が直接又は間接的に連結したアミノ酸配列からなり、該アミノ酸配列(n)は、配列表の配列番号4で表されるアミノ酸配列からなるものである。ただし、前記アミノ酸配列(m)は配列表の配列番号1～3で表される配列のうち、同じ配列を2個以上含まず、またポリペプチド(X)中の2個以上のアミノ酸配列(m)のそれぞれは同じである。また、前記ポリペプチド(Y)は、前記ポリペプチド(X)において、前記ポリペプチド(X)に含まれる配列表の配列番号1～3から選択されるいずれかのアミノ酸配列及び配列表の配列番号4で表されるアミノ酸配列の少なくとも1つに、1もしくは数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入もしくは付加したアミノ酸配列を有するポリペプチドであって、前記ポリペプチド(X)と同等な機能を有するものである。本発明の第1の発明において、ポリペプチド(X)としては、アミノ酸配列(m)を2もしくは3個含む配列を有するポリペプチド、及びアミノ酸配列(n)を2もしくは3個含む配列を有するポリペプチドが例示される。かかる具体的な例としては、配列表の配列番号5、16、19、22、25、27、29、32、36、39、41、47及び49に示すアミノ酸配列を有するポリペプチドが挙げられる。また、本発明の第1の発明において、リンパ球としては、抗原特異的細胞傷害性Tリンパ球、リンフォカイン活性化細胞が例示される。

[0015] また、本発明の第1の発明においては、リンパ球に外来遺伝子を導入する工程をさらに包含する、リンパ球の製造方法も提供される。外来遺伝子の導入方法としてはレトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、レンチウイルスベクターまたはシミアンウイルスベクターを用いて導入する方法が例示される。本発明の第1の発明において、CD3リガンドとは抗CD3抗体が、CD28リガンドとは抗CD28抗体が例示される。

[0016] 本発明の第2の発明は、本発明の第1の発明により得られるリンパ球に関する。また、本発明の第3の発明は本発明の第2の発明を有効成分として含有する医薬に関する。

[0017] 本発明の第4の発明は、後述の(a)および(b)から選択されるポリペプチドに関する

。(a)で表されるポリペプチドは、配列表の配列番号5、16、19、22、25、27、29、32、36、39、41、47及び49からなる群より選択されるアミノ酸配列を有し、(b)で表されるポリペプチドは、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有するものである。

[0018] 本発明の第5の発明は、後述の(c)～(g)から選択される核酸に関する。(c)で表される核酸は、配列表の配列番号5、16、19、22、25、27、29、32、36、39、41、47及び49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コードし、(d)で表される核酸は、配列表の配列番号5、16、19、22、25、27、29、32、36、39、41、47及び49からなる群より選択される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有するポリペプチドであって、配列表の配列番号5、16、19、22、25、27、29、32、36、39、41、47及び49から選択されるアミノ酸配列を有する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し、(e)で表される核酸は、配列表の配列番号6、17、20、23、26、28、30、33、37、40、42、48及び50から選択される塩基配列からなり、(f)で表される核酸は、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し、(g)で表される核酸は、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ものである。

図面の簡単な説明

[0019] [図1]フィブロネクチンのドメイン構造を示す模式図である。

[図2]H296-H296の作製法を示す図である。

発明の詳細な説明

[0020] 本発明は、医療への使用に適した、効率的なリンパ球の製造方法に関する。

[0021] 本発明は、フィブロネクチンのヘパリン結合ドメインの一部を重複して有する改変型組換えフィブロネクチンフラグメントの存在下にリンパ球を培養することにより、拡大培養率が高く、細胞傷害活性も高いリンパ球が得られることを見出し、本発明を完成す

るに至ったものである。

[0022] 本発明により、リンパ球の製造方法が提供される。当該方法は細胞増殖率が高く、本発明により得られるリンパ球は、例えば、養子免疫療法に好適に使用される。従って、本発明の方法は、医療分野への多大な貢献が期待される。また、本発明により、新規な改変型組換えフィブロネクチンフラグメントが提供される。

[0023] 以下、本発明を具体的に説明する。

[0024] (1) 本発明に使用されるポリペプチド(X)またはポリペプチド(Y)

本願明細書中に記載のポリペプチド(X)は、2個以上のアミノ酸配列(m)、1個以上のアミノ酸配列(n)を必須領域として含むポリペプチドである。

[0025] アミノ酸配列(m)は、フィブロネクチンのヘパリン結合ドメインの一部である配列番号1～3から選択される1もしくは複数個のアミノ酸配列からなるアミノ酸配列である。ただし、アミノ酸配列(m)は配列表の配列番号1～3で表されるそれぞれの同じ配列を2個以上含まないアミノ酸配列であり、配列表の配列番号1～3で表されるアミノ酸配列の組み合わせで構成されるアミノ酸配列である。例えば、アミノ酸配列(m)は、配列表の配列番号1で表されるアミノ酸配列を2個以上含まず、また配列表の配列番号2もしくは3で表されるアミノ酸配列についても同様である。また、ポリペプチド(X)に存在する2個以上のアミノ酸配列(m)はそれぞれ同一のアミノ酸配列を示す。なお、配列表の配列番号1～3で表されるアミノ酸配列はフィブロネクチンのヘパリン結合ドメインの部分アミノ酸配列を示し、それぞれIII-12、III-13、III-14のアミノ酸配列である(第1図参照)。

[0026] 当該アミノ酸配列(m)としては、そのアミノ酸配列からなるポリペプチドがヘパリン結合活性を有するものが好適に使用できる。ヘパリン結合活性は、アミノ酸配列(m)からなるポリペプチドとヘパリンとの結合を公知の方法を使用してアッセイすることにより調べることができる。例えば、ウィリアムズ D. A. らの方法[Williams D. A., et al., ネイチャー(Nature)、第352巻、第438～441頁(1991)]の細胞接着活性の測定法を利用し、細胞に換えてヘパリン、例えば標識ヘパリンを使用することによりアミノ酸配列(m)からなるポリペプチドとヘパリンとの結合の評価を行うことができる。

[0027] アミノ酸配列(m)はポリペプチド(X)中に、例えば2～5個、好適には2～4個、より

好適には2～3個含有されていることが好ましい。

[0028] アミノ酸配列(n)は、フィブロネクチンのCS-1ドメインである配列表の配列番号4で表されるアミノ酸配列である。アミノ酸配列(n)はポリペプチド(X)中に、例えば1～5個、好適には1～4個、より好適には1～3個含有されていることが好ましく、好適にはポリペプチド(X)中に含まれるアミノ酸配列(m)と同じ個数含有されていることが好ましい。

[0029] 前述したように、ポリペプチド(X)は2個以上のアミノ酸配列(m)、1個以上のアミノ酸配列(n)を含有し、かつポリペプチド(X)中の2個以上のアミノ酸配列(m)はいずれも同じ配列であるポリペプチドであるが、本発明の所望の効果が得られるものであれば、その他のアミノ酸残基を含んでいてもよい。例えば、メチオニンやHisタグ配列、リンカー等に由来するアミノ酸残基が含まれていても良い。

[0030] ポリペプチド(X)中の2個以上のアミノ酸配列(m)と1個以上のアミノ酸配列(n)の位置関係については、本発明の所望の効果が得られるものであれば、特に限定はないが、例えば少なくとも1つのアミノ酸配列(m)に対してC末端側にアミノ酸配列(n)が連結されているものが好ましい。また、ポリペプチド(X)中のN末端側にはアミノ酸配列(m)が位置しており、C末端側にはアミノ酸配列(n)が位置していることが好ましい。より好適には、ポリペプチド(X)中において、アミノ酸配列(m)とアミノ酸配列(n)が交互に位置していることが好ましい。

[0031] 本発明において、ポリペプチド(X)としては、例えば配列表の配列番号5で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド(H296-H296)、配列表の配列番号16で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド(H296-H296-H296-HT)、配列表の配列番号19で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド(CH296-CH296-HT)、配列表の配列番号22で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド(H105-H105-HT)、配列表の配列番号25で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド(H296-H296-HT)、配列表の配列番号27で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド(H296-H296-H296)、配列表の配列番号29で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド(H105-H105)、配列表の配列番号32で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド(H271-H296)、配列表の配列番号36で表されるアミノ酸配列からなる

るポリペプチド(H296-H271)、配列表の配列番号39で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド(15aaH105-H105-HT)、配列表の配列番号41で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド(15aaH105-H105)、配列表の配列番号47で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド(H105-H105Nc-HT)、配列表の配列番号49で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド(H105-H105Nc)が例示される。

- [0032] H296-H296は、N末端側から順にIII-12、III-13、III-14、CS-1、アラニン、メチオニン、III-12、III-13、III-14、CS-1で構成されるポリペプチドである。
- [0033] H296-H296-H296-HTは、N末端側から順にHisタグ配列(MNHKVVHHHHHHHIEGRH)、メチオニン、III-12、III-13、III-14、CS-1、ヒスチジン、メチオニン、III-12、III-13、III-14、CS-1、ヒスチジン、メチオニン、III-12、II I-13、III-14、CS-1で構成されるポリペプチドである。
- [0034] CH296-CH296-HTは、N末端側から順にHisタグ配列(MNHKVVHHHHHHHIEGRH)、メチオニン、III-8、III-9、III-10、アスパラギン酸、リジン、プロリン、セリン、メチオニン、III-12、III-13、III-14、CS-1、ヒスチジン、メチオニン、I II-8、III-9、III-10、アスパラギン酸、リジン、プロリン、セリン、メチオニン、III-12、III-13、III-14、CS-1で構成されるポリペプチドである。
- [0035] H105-H105-HTは、N末端側から順にHisタグ配列(MNHKVVHHHHHHHIEGRH)、メチオニン、III-14、CS-1、ヒスチジン、メチオニン、III-14、CS-1で構成されるポリペプチドである。
- [0036] H296-H296-HTは、N末端側から順にHisタグ配列(MNHKVVHHHHHHHIEGRH)、メチオニン、III-12、III-13、III-14、CS-1、ヒスチジン、メチオニン、III-12、III-13、III-14、CS-1で構成されるポリペプチドである。
- [0037] H296-H296-H296は、H296-H296-H296-HTのN末端側のHisタグ配列を除いたポリペプチドであり、H296-H296-H296-HTから公知の方法でHisタグ配列を切断して製造することができる
- [0038] H105-H105は、H105-H105-HTのN末端側のHisタグ配列を除いたポリ

ペプチドであり、H105-H105-HTから公知の方法でHisタグ配列を切断して製造することができる。

[0039] H271-H296は、N末端側から順にIII-12、III-13、III-14、アラニン、メチオニン、III-12、III-13、III-14、CS-1で構成されるポリペプチドである。

[0040] H296-H271は、N末端側から順に、III-12、III-13、III-14、CS-1、アラニン、メチオニン、III-12、III-13、III-14で構成されるポリペプチドである。

[0041] 15aaH105-H105-HTは、N末端側から順にHisタグ配列(MNHKVHHHHH HHIEGRH)、メチオニン、III-13のC末端側の15アミノ酸、II-14、CS-1、アラニン、メチオニン、アラニン、III-14、CS-1で構成されるポリペプチドである。

[0042] 15aaH105-H105は、15aaH105-H105-HTのN末端側のHisタグ配列を除いたポリペプチドであり、15aaH105-H105-HTから公知の方法でHisタグ配列を切断して製造することができる。

[0043] H105-H105Nc-HTは、N末端側から順にHisタグ配列(MNHKVHHHHHH HIEGRH)、メチオニン、III-14、CS-1、アラニン、メチオニン、アラニン、III-14、CS-1で構成されるポリペプチドである。なお、当該ポリペプチドは、前述のH105-H105-HTと比較して、CS-1とIII-14の間に含まれるリンカー部分の2アミノ酸が異なるのみである。

[0044] H105-H105Ncは、H105-H105Nc-HTのN末端側のHisタグ配列を除いたポリペプチドであり、H105-H105Nc-HTから公知の方法でHisタグ配列を切断して製造することができる。なお、当該ポリペプチドは、前述のH105-H105と比較して、CS-1とIII-14の間に含まれるリンカー部分の2アミノ酸が異なるのみである。

[0045] なお、これらのポリペプチドは本発明において初めて製造された新規なポリペプチドである。これらのポリペプチドの製造方法等、詳細については、後述の「(4) 改変型フィブロネクチンポリペプチド」に記載する。

[0046] ポリペプチド(X)の調製に関する有用な情報として、フィブロネクチンに関する情報は、キミヅカ F. ら[Kimiduka 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[Ko

rnabrihtt A. R. , et al. ,EMBO ジャーナル(EMBO J.)、第4巻、第7号、1755～1759(1985)]、およびセキグチ 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)]等を参照することができる。また、フィブロネクチンをコードする核酸配列又はフィブロネクチン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。

[0047] 本明細書中に記載のポリペプチド(Y)は、前記ポリペプチド(X)において、前記ポリペプチド(X)に含まれる配列表の配列番号1～3から選択されるいずれかのアミノ酸配列及び配列表の配列番号4で表されるアミノ酸配列の少なくとも1つに、1もしくは複数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入もしくは付加したアミノ酸配列を有するポリペプチド(Y)であって、前記ポリペプチド(X)と同等な機能を有するポリペプチドである。すなわち、ポリペプチド(Y)は、前記ポリペプチド(X)の必須成分であるアミノ酸配列(m)もしくはアミノ酸配列(n)中にアミノ酸の置換、欠失、挿入もしくは付加を有するポリペプチドであり、これらのアミノ酸配列(m)および(n)以外の任意のアミノ酸配列にアミノ酸の置換、欠失、挿入もしくは付加を有するものではない。当該置換、欠失、挿入もしくは付加としては、例えば1～20個のアミノ酸の置換、欠失、挿入もしくは付加のいずれか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、挿入もしくは付加のいずれか1つ以上が生じたものが例示される。

[0048] アミノ酸の置換等は、本来のポリペプチド(X)の機能が維持され得る範囲内で該ポリペプチド(X)の物理化学的性状等を変化させ得る程度のものであるのが好ましい。例えば、アミノ酸の置換等は、本来のポリペプチド(X)の持つ性質(例えば、疎水性、親水性、電荷、pK等)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。具体的には、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(X)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。

- [0049] アミノ酸の置換等は種間や個体差に起因して天然に生ずるものであってもよく、また、人工的に誘発されたものであってもよい。人工的な誘発は公知の方法により行えばよく、特に限定はないが、例えば、公知の手法により、前述のポリペプチド(X)をコードする核酸において1もしくは複数個の塩基が置換、欠失、付加もしくは挿入された所定の核酸を作製し、当該ポリペプチド(X)のアミノ酸配列に置換等を有するアミノ酸配列を含むポリペプチド(Y)を製造することができる。また、前述のポリペプチド(X)を遺伝子工学的に取得する場合、例えば大腸菌などを宿主として製造する場合は、大腸菌由来のメチオニンペプチダーゼ等の影響により、N末端側のメチオニンが存在しない場合があるが、このようなポリペプチドも本発明のポリペプチド(Y)の好適な例として示される。
- [0050] 本発明のポリペプチド(Y)としては、好適には、前述のH296-H296、H296-H296-H296-HT、CH296-CH296-HT、H105-H105-HT、H296-H296-HT、H296-H296-H296、H105-H105、H271-H296、H296-H271、15aaH105-H105-HT、15aaH105-H105、H105-H105Nc-HT、又はH105-H105Ncに含まれる配列表の配列番号1~3から選択されるいずれかのアミノ酸配列及び配列表の配列番号4で表されるアミノ酸配列の少なくとも1つに、1もしくは複数個のアミノ酸配列が置換、欠失、挿入もしくは付加したアミノ酸配列からなるポリペプチドであって、前記H296-H296、H296-H296-H296-HT、CH296-CH296-HT、H105-H105-HT、H296-H296-HT、H296-H296-H296、H105-H105、H271-H296、H296-H271、15aaH105-H105-HT、15aaH105-H105、H105-H105Nc-HT、又はH105-H105Ncと同等な機能を有するポリペプチドが例示され、好適には、1~20個、さらに好適には1~5個のアミノ酸の置換、欠失、挿入もしくは付加のいずれか1以上が生じたものが例示される。
- [0051] また、本明細書において「同等な機能を有する」とは、比較対照であるポリペプチド(X)を使用して後述のリンパ球の製造を実施した場合、同等の細胞増殖率が得られること、又は同等の細胞傷害活性が維持されていることをいう。すなわち、後述のリンパ球の製造方法、特に後述の実施例2~21、25~33、42~44、47~51、54~60

、64～66に記載の方法に沿って実施することにより、その機能を適宜確認することができる。また、ポリペプチド(Y)としては、ヘパリン結合活性を有するものが好適である。ヘパリン結合活性は、前記活性測定方法に準じて評価することができる。当該ポリペプチド(X)及び当該ポリペプチド(Y)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後述のリンパ球の製造方法に使用することができる。

[0052] 本発明に使用されるポリペプチド(X)および(Y)は、後述の実施例9～15、36～38にも記載のとおり、後述の本発明のリンパ球の製造方法において、公知のフィブロネクチンフラグメントであるCH-296(フィブロネクチンの細胞結合ドメイン、ヘパリン結合ドメイン、CS-1ドメインからなるポリペプチド)やH-296(フィブロネクチンのヘパリン結合ドメインおよびCS-1ドメインからなるポリペプチド)と比較しても、明らかに細胞増殖率が高いこと、本発明の抗原特異的CTLの製造に使用した場合、細胞傷害活性を高く維持できることから、これらのポリペプチドを用いた場合、公知のフィブロネクチンフラグメントを使用するのと比較してきわめて有用な利点がある。なお、本発明に使用されるポリペプチドが、これらの極めて有用な効果を発揮する要因の1つとしては、後述の実施例35や実施例61に示すとおり、これらのポリペプチドは細胞培養器材等の固相への固定化効率が極めて高いことが挙げられる。しかしながら、後述の実施例36～38にも示すとおり、細胞培養器材への固定化量を合わせた場合でも、本発明に使用されるポリペプチドは、公知のフィブロネクチンフラグメントと比較して、きわめて高い効果を発揮する。例えば、H296-H296と、モル換算でその2倍量のH-296を用いて本発明の方法でリンパ球を製造した場合でも、H296-H296の方が明らかに高い効果を発揮する。このことから、本発明に使用されるポリペプチド(X)又は(Y)のリンパ球の製造に及ぼす効果は、固定化効率が高いことやフィブロネクチンフラグメントのドメインが重複することによる単純な相加効果だけでないことが示される。さらに、後述の(2)-1-3でも示すようにポリペプチド(X)又は(Y)を抗原特異的CTLの拡大培養に使用することにより、フィーダ細胞を使用しなくとも高い細胞増殖率、細胞傷害活性の維持が実現できる。抗原特異的CTLの拡大培養にフィーダ細胞を使用しないことは、安全面、細胞培養の操作やそのコスト、フィーダ細胞の提供者もしくは患者への負担の面において、極めて有意義であるにもかかわらず、

従来の抗原特異的CTLの拡大培養では実現できなかったことである。この点においても、本発明の製造方法は、従来のフィブロネクチンフラグメントを使用したリンパ球の製造からは予想することができない、極めて有用な方法である。

[0053] これらのポリペプチド(X)又は(Y)を構成するアミノ酸数としては、特に限定はないが、好適には100～3000アミノ酸、より好適には150～2800アミノ酸、さらに好適には200～2600アミノ酸である。

[0054] (2)リンパ球の製造方法

以下、本発明のリンパ球の製造方法について具体的に説明する。本発明の方法は、前述のポリペプチド(X)及び／又はポリペプチド(Y)の存在下での培養工程(以下、本発明の培養工程と称することがある)を包含することを特徴とする、リンパ球の製造方法である。なお、本願明細書において、ポリペプチド(X)及び／又はポリペプチド(Y)を本発明の有効成分と称することがある。

[0055] 本発明のリンパ球の製造方法は、リンパ球製造における培養の全期間、もしくは任意の一部の期間において本発明の培養工程を実施することにより行われる。すなわち、リンパ球の製造工程の一部に前記培養工程を含むものであれば本発明に包含される。リンパ球の製造工程の一部に前記培養工程を含む場合、好適には培養初期に前記培養工程を含むことが好ましく、より好適には培養開始時に前記培養工程を含むことが好ましい。

[0056] 本発明の製造方法により得られるリンパ球としては、特に限定するものではないが、例えば細胞傷害性Tリンパ球(CTL)、ヘルパーT細胞、リンフォカイン活性化細胞、腫瘍浸潤リンパ球(TIL)、NK細胞、ナイーブ細胞、メモリー細胞、 γ δ T細胞、NK T細胞、これらのうちの少なくとも1種の細胞を含む細胞集団等が挙げられる。これらのうち、本発明は、抗原特異的CTLおよびリンフォカイン活性化細胞の製造により適している。これらの製造方法については後述の(2)－1および(2)－2において具体的に説明する。なお、本明細書においてリンフォカイン活性化細胞とは、リンパ球を含む末梢血液(末梢血白血球)や臍帯血、組織液等にIL－2を加えて、数日間培養することにより得られる機能的細胞集団を示す。このような細胞集団のことを一般的にリンフォカイン活性化キラー細胞(LAK細胞)と称することがあるが、当該細胞集団に

は細胞傷害性を有さない細胞(例えば、ナイーブ細胞等)も含まれていることから、本願明細書においては当該細胞集団をリンフォカイン活性化細胞と称することとする。

[0057] なお、本発明の製造方法により得られるリンパ球の細胞傷害活性を評価する場合は公知の方法により評価でき、例えば、放射性物質、蛍光物質等で標識した標的細胞に対する細胞傷害性リンパ球の細胞傷害活性を、細胞傷害性リンパ球により破壊された標的細胞に由来する放射活性や蛍光強度を測定することによって評価できる。また、細胞傷害性リンパ球や標的細胞より特異的に遊離されるGM-CSF、IFN- γ 等のサイトカイン量を測定することにより検出することもできる。その他蛍光色素等によって標識された抗原ペプチド-MHC複合体の使用によって直接確認することもできる。この場合、例えば細胞傷害性リンパ球を細胞傷害性リンパ球特異性抗体とカップリングさせた第1蛍光マーカーと接触させた後に第2蛍光マーカーとカップリングさせた抗原ペプチド-MHC複合体を接触させ、そして二重標識細胞の存在をフローサイトメーターで分析することにより細胞傷害性リンパ球の細胞傷害活性を評価することができる

[0058] 本発明の培養工程は、CTLになり得る細胞からの抗原特異的CTLへの誘導、抗原特異的CTLの維持、もしくは抗原特異的CTLやナイーブ細胞等の上記のリンパ球の拡大培養を目的とするものである。本発明のリンパ球の製造方法においては、該方法に供する細胞の種類や、培養の条件等を適宜調整してリンパ球の培養を行うことにより、養子免疫療法等に有用なリンパ球を製造することができる。なお、本明細書においてリンパ球とはリンパ球を含有する細胞群をも包含し、CTLとはCTLを含有する細胞群をも包含するものとする。培養に使用される細胞は製造するリンパ球の種類に応じて適宜設定できるが、当該細胞は生体から採取されたものをそのまま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。

[0059] 本発明の培養工程において使用される細胞培養器材としては、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、バイオリアクター等を使用することができる。なお、バッグとしては、例えば、細胞培養用CO₂ガス透過性バッグを使用することができる。また、工業的に大量のリンパ球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、好適には得られるリンパ球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。

[0060] 本発明において前記有効成分の存在下とは、リンパ球の培養を行なう際に、前記有効成分がその機能を発揮し得る状態で存在することをいい、その存在状態は特に限定されるものではない。例えば、有効成分を使用する培地に溶解させる場合、培養を行う培地中における、本発明の有効成分の含有量は所望の効果が得られれば特に限定するものではないが、例えば、好ましくは $0.0001 \sim 10000 \mu\text{g}/\text{mL}$ 、より好ましくは $0.001 \sim 10000 \mu\text{g}/\text{mL}$ 、さらに好ましくは $0.005 \sim 5000 \mu\text{g}/\text{mL}$ 、さらに好ましくは $0.01 \sim 1000 \mu\text{g}/\text{mL}$ である。

[0061] 本発明の有効成分を含め、培地中に使用される成分(例えば後述の抗CD3抗体、抗CD28抗体、インターロイキン-2等)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、バッグ等の細胞培養器材(開放系のもの、および閉鎖系のもののいずれをも含む)、またはビーズ、メンブレン、スライドガラス等の細胞培養用担体に固定化して使用してもよい。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。該成分を、例えば、前記器材に固定化する場合、培地を該器材に入れた際に、該成分を培地中に溶解して用いる場合の所望の濃度と同様の割合となるように、器材に入れる培地量に対して各成分の一定量を固定化するのが好適であるが、当該成分の固定化量は所望の効果が得られれば特に限定されるものではない。前記担体は、細胞培養時に細胞培養器材中の培養液に浸漬して使用される。前記成分を前記担体に固定化する場合、該担体を培地に入れた際に、該成分を培地中に溶解して用いる場合の所望の濃度と同様の割合となるように、器材に入れる培地量に対して各成分の一定量を固定化するのが好適であるが、当該成分の固定化量は所望の効果が得られれば特に限定されるものではない。

[0062] 例えば、ポリペプチド(X)及び/又はポリペプチド(Y)の固定化は、国際公開第97/18318号パンフレット、ならびに国際公開第00/09168号パンフレットに記載のフィブロネクチンのフラグメントの固定化と同様の方法により実施することができる。前記の種々の成分や、本発明の有効成分を固相に固定化しておけば、本発明の方法

によりリンパ球を得た後、該リンパ球と固相とを分離するのみで、該リンパ球と本発明の有効成分とを容易に分離することができ、該リンパ球への有効成分等の混入を防ぐことができる。

[0063] 培養条件は、リンパ球の公知の培養条件で行なえばよく、通常の細胞培養に使用される条件を適用することができる。例えば、37°C、5%CO₂等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に新鮮な培地を加えて希釈したり、培地を新鮮なものに交換したり、細胞培養器材を交換することができる。使用される培地や、同時に使用されるその他の成分等は後述のとおり、製造するリンパ球の種類によって、適宜設定することができる。

[0064] また、国際公開第03/080817号パンフレットに記載されたフィブロネクチンや公知のフィブロネクチンのフラグメントを前記成分と共に用いて培養してもよい。ここで公知のフィブロネクチンのフラグメントとして、好適には、後述の調製例1及び2に記載されているH-296およびCH-296を使用することができる。

[0065] さらに、国際公開第02/14481号パンフレットに記載された、抗原特異的な細胞傷害活性を有する細胞傷害性T細胞の誘導に有効な酸性多糖、酸性オリゴ糖、酸性単糖およびそれらの塩からなる群より選択される化合物や、国際公開第03/016511号パンフレット下記(A)～(D)から選択される物質を前記成分と共に用いて培養してもよい。

(A) CD44に結合活性を有する物質

(B) CD44リガンドがCD44に結合することにより発せられるシグナルを制御し得る物質

(C) 成長因子の成長因子レセプターへの結合を阻害し得る物質

(D) 成長因子が成長因子レセプターに結合することにより発せられるシグナルを制御し得る物質

[0066] 前記CD44に結合活性を有する物質としては、例えばCD44リガンドおよび/または抗CD44抗体が例示される。CD44リガンドがCD44に結合することにより発せられるシグナルを制御し得る物質としては、例えば各種リン酸化酵素および脱リン酸化酵素の阻害剤又は活性化剤が挙げられる。成長因子の成長因子レセプターへの結合

を阻害し得る物質としては、例えば成長因子に結合活性を有し、成長因子と複合体を形成することにより成長因子が成長因子レセプターに結合するのを阻害する物質、もしくは成長因子レセプターに結合活性を有し、成長因子が成長因子レセプターに結合するのを阻害する物質が挙げられる。さらに、成長因子が成長因子レセプターに結合することにより発せられるシグナルを制御し得る物質としては、例えば各種リン酸化酵素および脱リン酸化酵素の阻害剤又は活性化剤が挙げられる。これらの成分の培地中の濃度は、所望の効果が得られれば特に限定されるものではない。また、これらの成分は培地中に溶解して共存させる他、前記のような適切な固相に固定化して使用してもよい。なお、上記の各種物質は単独で、もしくは2種以上混合して用いることができる。

[0067] 本発明のリンパ球の培養工程に使用される培地としては、細胞培養に使用される公知の培地を使用すればよく、さらに後述するとおり製造するリンパ球の種類に応じて各種サイトカイン等を添加すれば良い。

[0068] 本発明のリンパ球の培養工程においては、培地中に血清や血漿を添加することもできる。これらの培地中への添加量は特に限定はないが、0～20容量%、特に自己由来の血清または血漿を用いる場合、患者への負担を考慮して、0～5容量%とするのが好ましい。また、リンパ球の培養工程において、培地中の血清や血漿濃度は段階的に低減させることができる。例えば、リンパ球の培養工程において培地の交換や添加を行う際に、新たな培地中の血清や血漿濃度を低く調整することにより、使用する血漿や血清を低減させてリンパ球の培養を実施することができる。このように、培地中の血清や血漿の添加量を低減させることができることは、本発明の有効な効果の1つである。なお、血清又は血漿の由来としては、自己(培養するリンパ球と由来が同じであることを意味する)もしくは非自己(培養するリンパ球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できる。

[0069] 例えば、本発明の方法において、リンパ球の拡大培養を行う場合、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1 cell/mL～ 1×10^8 cells/mL、好適には1 cell/mL～ 5×10^7 cells/mL、さらに好適には1 cell/mL～ 2×10^7 cells/mLが例示される。

[0070] (2) - 1 抗原特異的CTLの製造方法

以下、本発明の製造方法により抗原特異的CTLを製造する例(以下、本発明の抗原特異的CTLの製造方法と称することがある)について詳細に記載する。

[0071] 本発明の製造方法によって抗原特異的CTLを製造する場合は、CTLになり得る能力を有する細胞を抗原特異的CTLに誘導するための培養(本発明の抗原特異的CTLの誘導方法)、抗原特異的CTLを維持するための培養(本発明の抗原特異的CTLの維持方法)、又は抗原特異的CTLを拡大培養するための培養(本発明の抗原特異的CTLの拡大培養方法)において、本発明の培養工程を実施することができる。

[0072] (2) - 1 - 1 本発明の抗原特異的CTLの誘導方法

抗原特異的CTLの誘導のために本発明のリンパ球の培養工程を実施することについて説明する。抗原特異的CTLの誘導はCTLになり得る細胞に所望の抗原に対する認識能力を付与するために、適切な抗原提示細胞や抗原とともにCTLになり得る細胞を培養することにより実施される。

[0073] CTLになり得る能力を有する細胞としては、末梢血単核球(PBMC)、ナイーブ細胞、メモリー細胞、臍帯血単核球、造血幹細胞、もしくはリンフォカイン活性化細胞等が例示される。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。抗原提示細胞は、T細胞に対して認識すべき抗原を提示する能力を有する細胞であれば特に限定はなく、例えば単球、B細胞、T細胞、マクロファージ、樹状細胞、線維芽細胞等に所望の抗原を提示させ、必要に応じてX線照射等を施すことにより増殖性を喪失させて本発明に使用することができる。抗原としては、特に限定されるものではなく、例えば、細菌、ウイルス等の外来性抗原や腫瘍関連抗原(癌抗原)等の内在性抗原等が挙げられる。また、抗原提示細胞による刺激は、培養期間中、数回に分けて実施することができる。

[0074] また、抗原特異的CTLの誘導においては、好適には培地に本発明の有効成分以外に適当なタンパク質、サイトカイン類、その他の成分を含んでもよい。好適には、インターロイキン-2(以下、IL-2と称することがある)を含有する培地が本発明に

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 $0.01\sim 1\times 10^5\text{U/mL}$ 、より好適には $0.1\sim 1\times 10^4\text{U/mL}$ である。

[0075] その他、抗原特異的CTLの誘導の一般的な条件としては、公知の条件(Bednarek M. A. et al., J. Immunol., Vol. 147, No. 12, P4047-4053, 1991)に従えば良い。培養条件は特に限定はなく、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、例えば、 37°C 、 $5\%\text{CO}_2$ 等の条件下で培養することができる。この培養は通常、2~15日程度実施される。また、適当な時間間隔で細胞培養液を希釈する工程、培地を交換する工程もしくは細胞培養器材を交換する工程を行っても良い。

[0076] このように本発明の培養工程を実施して抗原特異的CTLの誘導を行なうことにより、抗原特異的CTL誘導後の細胞増殖率が高く、さらに誘導された抗原特異的CTLを拡大培養に供した際に極めて高い細胞増殖率を実現することができる。さらに、このようにして誘導された抗原特異的CTLは、長期間にわたって維持培養、あるいは拡大培養させても、誘導直後に観察されたような高い細胞傷害活性を維持されているという特徴を有している。この維持培養や拡大培養については、好ましくは後述する抗原特異的CTLの維持培養方法や拡大培養方法により行うことができるが、それ以外の公知の方法、すなわち前述のポリペプチド(X)及び／又はポリペプチド(Y)の非存在下に抗原特異的CTLの維持培養や拡大培養が実施されても、得られた細胞は前述のような細胞傷害活性を高く維持し、かつ高い細胞増殖率が認められる。これらの効果については、例えばフィブロネクチンの既知のフラグメントであるH-296(後述の実施例9~14参照)の存在下に抗原特異的CTLの誘導を行なった結果と比較しても有意に高い効果を発揮する。さらに本発明の抗原特異的CTLの誘導方法により得られた抗原特異的CTLを用いて拡大培養を実施した場合、フィーダ細胞を用いなくとも、高い細胞増殖率を実現できる。また、例えば誘導された抗原特異的CTLをクローン化することにより、安定した抗原特異的CTLを維持することもできる。

[0077] (2)-1-2 本発明の抗原特異的CTLの維持方法

本発明の抗原特異的CTLの維持方法は、抗原特異的CTLの細胞傷害活性を保ったままで維持する方法である。該方法は前述の本発明の培養工程を抗原特異的C

TLの維持培養の際に実施することを特徴としており、これにより抗原特異的CTLの細胞傷害活性を維持させることができる。

[0078] 該方法を適用可能な抗原特異的CTLは特に限定はなく、公知の方法により得られた抗原特異的CTLや、前述の本発明の抗原特異的CTLの誘導方法により得られた抗原特異的CTL、もしくは後述の抗原特異的CTLの拡大培養方法により得られた抗原特異的CTLの維持に使用される。また、ここで抗原特異的CTLとは抗原特異的CTLを含む細胞集団を意味する。

[0079] 使用される培地については特に限定はなく、公知の培地を使用することができ、また前述の抗原特異的CTLの誘導と同様に適当なタンパク質、サイトカイン類(例えば、IL-2)、その他の成分を含んでいてもよい。

[0080] 抗原特異的CTLの維持培養の一般的な条件については公知の方法(例えばCarter J. et al., Immunology, Vol. 57, No. 1, P123-129, 1996)に従えば良い。培養条件は特に限定はなく、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、例えば、37°C、5%CO₂等の条件下で培養することができる。この培養日数については、特に限定はない。また、適当な時間間隔で細胞培養液を希釈する工程、培地を交換する工程もしくは細胞培養器材を交換する工程を行っても良い。

[0081] (2)-1-3 本発明の抗原特異的CTLの拡大培養方法

本発明の抗原特異的CTLの拡大培養方法は、抗原特異的CTLの細胞傷害活性を保ったままで細胞数を急速に拡大培養させる方法である。該方法は前述の本発明の培養工程を抗原特異的CTLの拡大培養の際に実施することを特徴とする。ここで本発明の培養工程の実施は、拡大培養の全期間であっても一部の期間であってもよく、好適には培養開始時に本発明の培養工程を実施することが好ましい。本発明の培養工程の培養期間については、例えば1~8日、好適には2~7日、より好適には3~7日が好ましく、より高い拡大培養率を実現する観点からは3日以上が好ましい。

[0082] 該方法を適用可能な抗原特異的CTLは、特に限定はなく、例えば公知の方法で得られた抗原特異的CTLや、前述の本発明の抗原特異的CTLの誘導方法により得られた抗原特異的CTL、もしくは前述の抗原特異的CTLの維持方法により維持培養された抗原特異的CTLが使用される。

- [0083] 使用される培地については特に限定はなく、公知の培地を使用することができ、また前述の抗原特異的CTLの誘導と同様に適当なタンパク質、サイトカイン類、その他の成分、例えばIL-2等を含んでいてもよい。
- [0084] 抗原特異的CTLの拡大培養の一般的な条件については公知の方法(例えばCarter J. et al., Immunology, Vol. 57, No. 1, P123-129, 1996)に従えば良い。
- [0085] 本発明の抗原特異的CTLの拡大培養方法においては、高い拡大培養率を実現する観点から、前記有効成分に加え、抗CD3抗体、好適には抗ヒトCD3モノクローナル抗体、より好適にはOKT3と共培養することが好ましい。抗CD3抗体の培養中の濃度としては、特に限定はないが、例えば0.001~100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、0.01~100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ がより好適である。また、さらに副刺激として抗CD28抗体、より好適には抗ヒトCD28モノクローナル抗体と共培養することもできる。また、レクチン等のリンパ球刺激因子を共培養することもできる。また、これらの成分は前述のとおり、適当な固相に固定化して使用することもできる。
- [0086] また、本発明の抗原特異的CTLの拡大培養方法においては、必要に応じて適当なフィーダ細胞と共培養することもできる。抗原特異的CTLの拡大培養方法において、フィーダ細胞は前記抗CD3抗体と共同してCTLを刺激し、T細胞レセプター又は各刺激受容体を活性化するものであれば特に限定はない。本発明においてフィーダ細胞としては、特に限定はないが、例えば自己もしくは非自己由来のPBMCやEBV-B細胞が使用されるが、安全性の観点からはEBV-B以外の細胞を使用することが好ましい。通常、フィーダ細胞はX線等の放射線照射またはマイトマイシン(mitomycin)等の薬剤による処理を行うことにより増殖能を奪ったうえで使用される。なお、フィーダ細胞の培地中における含有量は、公知の方法に従って決定すればよく、特に限定はないが、例えば $1\sim 1\times 10^7\text{ cells}/\text{mL}$ が好適である。
- [0087] しかしながら、前述したように、養子免疫療法においてフィーダ細胞は、安全性の観点、コスト、フィーダ細胞の患者または患者への負担の観点からは使用しないことが好ましい。本発明の抗原特異的CTLの拡大培養方法は、フィーダ細胞を使用しない場合でも高い拡大培養率を実現することも一つの大きな特徴である。すなわち、本発

明により、フィーダ細胞を使用しない抗原特異的CTLの拡大培養方法が提供される。なお、フィーダ細胞を使用せずに抗原特異的CTLの製造を行なう場合、本発明の拡大培養方法に供する抗原特異的CTLは、高い拡大培養率を実現するという観点から、前述の本発明の抗原特異的CTLの誘導方法により得られた抗原特異的CTLを使用することが望ましい。

[0088] (2) - 2 リンフォカイン活性化細胞の製造方法

以下、本発明の製造方法によりリンフォカイン活性化細胞を製造する例(以下、本発明のリンフォカイン活性化細胞の製造方法と称することがある)について詳細に記載する。

[0089] 本発明のリンフォカイン活性化細胞の製造方法は、リンフォカイン活性化細胞になり得る能力を有する細胞を用いて、IL-2の存在下で本発明の培養工程を実施することを特徴とする。ここで本発明の培養工程の実施は、培養の全期間であっても一部の期間であってもよく、好適には培養開始時に本発明の培養工程を実施することが好ましい。本発明の培養工程の培養期間については、例えば1~8日、好適には2~7日、より好適には3~7日が好ましく、より高い拡大培養率を実現する観点からは3日以上が好ましい。

[0090] リンフォカイン活性化細胞になり得る能力を有する細胞としては、特に限定されるものではなく、例えば末梢血単核球(PBMC)、NK細胞、臍帯血単核球、造血幹細胞、これらの細胞を含有する血液成分等が挙げられ、血球系細胞であれば使用できる。また、前記細胞を含有する材料、例えば末梢血液、臍帯血等の血液や、血液から赤血球や血漿等の成分を除去したもの、骨髓液等を使用することができる。

[0091] また、リンフォカイン活性化細胞を培養するための一般的な条件は、公知の条件〔例えば、細胞工学、Vol. 14、No. 2、p223~227、(1995年);細胞培養、17、(6)、p192~195、(1991年);THE LANCET、Vol. 356、p802~807、(2000); Current Protocols in Immunology, supplement 17, UNIT7. 7を参照〕に従えばよい。培養条件は特に限定はなく、通常の細胞培養に使用される条件を適用することができ、例えば、37°C、5%CO₂等の条件下で培養することができる。この培養は通常、2~15日程度実施され、培養初期に本発明の培養工程を実施する

ことが好ましいことは前述のとおりである。また、適当な時間間隔で細胞培養液を希釈する工程、培地を交換する工程もしくは細胞培養器材を交換する工程を行っても良い。

[0092] 使用される培地については特に限定はなく、公知の培地を使用することができ、また前述の抗原特異的CTLの誘導や拡大培養と同様に適当なタンパク質、サイトカイン類、その他の成分を含んでもよい。

[0093] 本発明のリンフォカイン活性化細胞の製造方法においては、高い拡大培養率を実現する観点から、前記有効成分に加え、抗CD3抗体、特に好適には抗ヒトCD3モノクローナル抗体、より好適にはOKT3と共培養することが好ましい。抗CD3抗体の培地中の濃度としては、特に限定はないが、例えば0.001~100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、特に0.01~100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ が好適である。また、さらに副刺激として抗CD28抗体、特に好適には抗ヒトCD28モノクローナル抗体と共培養することもできる。また、レクチン等のリンパ球刺激因子と共培養することもできる。また、これらの成分は前述のとおり、適当な固相に固定化して使用することもできる。

[0094] 本発明のリンフォカイン活性化細胞の製造方法により得られた細胞は、実施例33、43、44、47、54~56に記載のとおり、CD45RA陽性CCR7陽性細胞や、CD45RA陽性CD62L陽性、CD45RA陽性CCR7陽性CD62L陽性細胞、CD27陽性細胞、CD28陽性細胞の比率が高い。すなわち、当該方法により得られるリンフォカイン活性化細胞はナイーブT様細胞を高比率に含んでいる細胞であり、養子免疫療法への利用に極めて適している。

[0095] (2) - 3 外来遺伝子の導入工程を包含する本発明のリンパ球の製造方法

本発明は、前述したリンパ球の製造方法において、さらに外来遺伝子を導入する工程を包含するリンパ球の製造方法も提供する。すなわち、本発明は、その一態様として、リンパ球に外来遺伝子を導入する工程をさらに含むリンパ球の製造方法を提供する。なお、「外来」とは、遺伝子導入対象のリンパ球に対して外来であることをいう。

[0096] 本発明のリンパ球の製造方法、なかでもリンパ球の拡大培養方法を行うことにより、培養されるリンパ球の増殖能が増強される。よって、本発明のリンパ球の製造方法を、遺伝子の導入工程と組み合わせることにより、遺伝子の導入効率の上昇が期待さ

れる。

- [0097] 外来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。遺伝子導入の工程は、リンパ球の製造の際、任意の時点で実施することができる。例えば、前記本発明のCTLの拡大培養方法やリンフォカイン活性化細胞の製造方法中の細胞増殖時に実施するのが好適である。
- [0098] 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。
- [0099] 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、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、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またはセンダイウイルスベクター等が使用される。特に好適には、ウイルスベクターとしては、レトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、レンチウイルスベクターまたはシミアン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、遺伝子導入の際に導入効率を向上させる物質を使用してもよく、例えばレトロネクチン(登録商標、タカラバイオ社製)やその他のフィブロネクチンフラグメントを使用することもできる。
- [0100] レトロウイルスベクターなら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、遺伝子治療等の目的に使用されている。当該ベクターは分裂、増殖中の細胞に対する感染効率が高いことから、本発明における、リンパ球の製造工程、例えば、拡大培養の工程において遺伝子導入を行なうのに好適である。
- [0101] 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や直鎖状DNAに組み込まれた外来遺伝子が導入される。

- [0102] 本発明においてリンパ球に導入される外来遺伝子には特に限定はなく、前記細胞に導入することが望まれる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、レセプター類等)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よい。
- [0103] 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等に挿入して使用することができる。また、効率のよ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よい。また、外来遺伝子を相同組換えにより導入対象のリンパ球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よい。導入される外来遺伝子は天然のものでも、または人工的に作製されたものでもよく、あるいは起源を異にするDNA分子がライゲーション等の公知の手段によって結合されたものであってもよい。さらに、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よい。
- [0104] 本発明の方法によれば、例えば、癌等の患者の治療に使用される薬剤に対する耐性に関連する酵素をコードする遺伝子をリンパ球に導入して該リンパ球に薬剤耐性を付与することができる。そのようなリンパ球を用いれば、養子免疫療法と薬剤療法とを組み合わせることができ、従って、より高い治療効果を得ることが可能となる。薬剤耐性遺伝子としては、例えば、多剤耐性遺伝子(multidrug resistance gene)が例示される。
- [0105] 一方、前記の態様とは逆に、特定の薬剤に対する感受性を付与するような遺伝子をリンパ球に導入して、該薬剤に対する感受性を付与することもできる。かかる場合、生体に移植した後のリンパ球を当該薬剤の投与によって除去することが可能となる。薬剤に対する感受性を付与する遺伝子としては、例えば、チミジンキナーゼ遺伝子が例示される。

- [0106] その他、導入する遺伝子としては、標的細胞の表面抗原を認識するTCRをコードする遺伝子や、標的細胞の表面抗原に対する抗体の抗原認識部位を有し、かつTCRの細胞内領域(CD3等)を含むキメラレセプターをコードする遺伝子が例示される。
- [0107] (3)本発明の製造方法により得られるリンパ球、当該リンパ球を含有する医薬、当該医薬を用いた疾患の治療方法、本発明の有効成分を含有するリンパ球培養用培地
- さらに本発明は、上記の本発明の製造方法で得られたリンパ球を提供する。また、本発明は当該リンパ球を有効成分として含有する医薬(治療剤)を提供する。なかでも、当該リンパ球を含有する前記治療剤は養子免疫療法への使用に適している。養子免疫療法においては、患者の治療に適したリンパ球が、例えば静脈への投与によって患者に投与される。当該治療剤は前述の疾患やドナーリンパ球輸注での使用において非常に有用である。当該治療剤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リンパ球を有効成分として、たとえば、公知の非経口投与に適した有機または無機の担体、賦形剤、安定剤等と混合することにより調製できる。なお、治療剤における本発明のリンパ球の含有量、治療剤の投与量、当該治療剤に関する諸条件は公知の養子免疫療法に従って適宜、決定でき、特に限定はないが、例えば、成人一日あたり、好適には $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^{12}$ cells/日、より好ましくは、 $1 \times 10^6 \sim 5 \times 10^{11}$ cells/日、さらに好ましくは $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^{11}$ cells/日が例示される。通常、リンパ球は注射や点滴により静脈、動脈、皮下、腹腔内等へ投与される。本発明の医薬の投与においては、特に限定はないが、例えば、治療しようとするがんに対してワクチンとして機能しうる成分、すなわちがんワクチンを投与することもできる。例えば、腫瘍抗原、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、人為的操作により増殖能を失った腫瘍組織由来の細胞や、腫瘍組織からの抽出物などを投与することもできる。また、当該医薬の投与においては、リンパ球刺激因子、例えば、抗CD3抗体、抗CD28抗体、サイトカイン(IL-2、IL-15、IL-7、IL-12、IFN- γ 、IFN- α 、IFN- β 等)、ケモカイン等を適宜投与することもできる。なお、本願明細書において、リンパ球刺激因子とはリンパ球増殖因子を包含するものである。
- [0108] 本発明の方法により製造されるリンパ球を投与される疾患としては、特に限定はな

いが、例えば、癌、白血病、悪性腫瘍、肝炎や、インフルエンザ、HIV等のウイルス、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。また、前述のようにさらに外来遺伝子を導入した場合は、各種遺伝子疾患に対しても効果が期待される。また、本発明の方法により製造されるリンパ球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等にも利用できる。

[0109] また、本発明の別の態様として、前記医薬を用いた疾患の治療方法が提供される。当該疾患の治療方法は、前述のリンパ球の製造方法により製造されたリンパ球を用いることを特徴とし、当該医薬の投与の諸条件については、公知の養子免疫療法や前述の医薬の投与の開示に従って実施できる。

[0110] 本発明の別の態様として、本発明の有効成分を含有する培地が提供される。当該培地は、さらにその他の任意の成分、たとえば、公知の細胞培養に用いられる培地成分、タンパク質、サイトカイン類(好適にはIL-2)、所望のその他の成分とからなる。当該培地中の本発明の有効成分等の含有量は、本発明の所望の効果が得られれば特に限定されるものではなく、例えば、本発明の方法に使用される前記培地中の有効成分等の含有量に準じて、所望により、適宜、決定することができる。本発明の培地の一態様としては、本発明の有効成分が固定化された細胞培養用担体を含有する培地、本発明の有効成分が固定化された細胞培養器材に封入して提供される培地が包含される。

[0111] (4) 改変型フィブロネクチンポリペプチド

本発明においては、前述のリンパ球の製造方法においての使用に非常に有用な、下記(a)および(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5(H296-H296)、配列番号16(H296-H296-H296-HT)、配列番号19(CH296-CH296-HT)、配列番号22(H105-H105-HT)、配列番号25(H296-H296-HT)、配列番号27(H296-H296-H296)配列番号29(H105-H105)、配列番号32(H271-H296)、配列番号36(H296-H271)、配列番号39(15aaH105-H105-HT)、配列番号41(15aaH105-H105)、配列番号47(H105-H105Nc-HT)及び配列番号49(H105-H

105Nc)からなる群より選択されるアミノ酸配列を有する新規なポリペプチド、

(b)前記(a)のポリペプチドのアミノ酸配列において1もしくは複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有する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。

[0112] 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5、16、19、22、25、27、29、32、36、39、41、47及び49から選択されるアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードする核酸、

(d)配列表の配列番号5、16、19、22、25、27、29、32、36、39、41、47及び49から選択されるアミノ酸配列において1もしくは複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有するポリペプチドであって、配列表の配列番号5、16、19、22、25、27、29、32、36、39、41、47及び49から選択されるアミノ酸配列を有する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6(H296－H296をコードする核酸の塩基配列)、配列番号17(H296－H296－H296－HTをコードする核酸の塩基配列)、配列番号20(CH296－CH296－HTをコードする核酸の塩基配列)、配列番号23(H105－H105－HTをコードする核酸の塩基配列)、配列番号26(H296－H296－HTをコードする核酸の塩基配列)、配列番号28(H296－H296－H296をコードする核酸の塩基配列)、配列番号30(H105－H105をコードする核酸の塩基配列)、配列番号33(H271－H296をコードする核酸)、配列番号37(H296－H271をコードする核酸)、配列番号40(15aaH105－H105－HTをコードする核酸)、配列番号42(15aaH105－H105をコードする核酸)、配列番号48(H105－H105Nc－HTをコードする核酸)及び配列番号50(H105－H105Ncをコードする核酸)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)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もしくは複数個の塩基の置換、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。

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。

[0113] 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称し、前記新規な核酸を本発明の核酸と称することがある。

[0114] 以下、本発明のポリペプチド、本発明の核酸、該ポリペプチドおよび該核酸の製造方法について説明する。

[0115] 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5、16、19、22、25、27、29、32、36、39、41、47及び49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。また、配列番号16、19、22、25、39又は47に記載のアミノ酸配列を有するポリペプチドから、Hisタグ配列(配列表の配列番号16における1~15番目のアミノ酸配列、配列表の配列番号19における1~15番目のアミノ酸配列、配列表の配列番号22における1~15番目のアミノ酸配列、配列表の配列番号25における1~15番目のアミノ酸配列、配列表の配列番号39における1~15番目のアミノ酸配列、配列表の配列番号47における1~15番目のアミノ酸配列)を欠失させたポリペプチドや、配列番号5記載のアミノ酸配列にHisタグ配列を付加したポリペプチドも、本発明の前記(b)のポリペプチドに包含される。また、配列番号5に記載のアミノ酸配列を有するポリペプチドはそのN末端のメチオニン残基は除去されており、発現の際にメチオニンアミノペプチダーゼにより除去されたことが予想される。本発明において、(b)のポリペプチドのアミノ酸の欠失、挿入としては、このようなN末端のメチオニン残基の挿入、欠失を包含するものである。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「(1)本発明に使用されるポリペプチド(X)またはポリペプチド(Y)」の記載と同様に行なうことができる。

[0116] 本発明のポリペプチドをコードする配列表の配列番号6、17、20、23、26、28、30、33、37、40、42、48及び50からなる群より選択される核酸は、天然型のフィブロネクチンをコードする核酸、もしくは組み替え型のフィブロネクチンフラグメント、例えば前述の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により取得することができる。例えば、後述の実施例1、22~24、39~41、45、46、52、53に記載のとおり、CH-296をコードする核酸からヘパリン結合ドメインの一部もしくは全部、およびCS-1ドメインをコードする核酸を取得し、これを重複してつなぎ合わせるにより取得することができる。

[0117] 配列番号6、17、20、23、26、28、30、33、37、40、42、48及び50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ェント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、すなわち前述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「ストリンジェントな条件」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およ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。

[0118] 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°C、好ましくは65°C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等の条件および／またはより高温、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なう、という条件等を追加してもよい。

[0119] 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およ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、また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℃での一晚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。

[0120] 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および／また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、BLOTTING、ヘパリン、変性サケ精子DNA、およ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。

[0121] また、本発明の核酸としては、配列表の配列番号6、17、20、23、26、28、30、33、37、40、42、48及び50からなる群より選択される核酸の塩基配列において、1ないし複数個の置換、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6、17、20、23、26、28、30、33、37、40、42、48又

は50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。

- [0122] 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、特に配列表の配列番号5、16、19、22、25、27、29、33、37、40、42、47及び49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。

実施例

- [0123] 以下、実施例を挙げて、本発明を更に具体的に説明するが、本発明はこれらの記載に何ら限定されるものではない。

[0124] 調製例1 H-296の調製

H-296(フィブロネクチンのヘパリン結合ドメインおよびCS-1ドメインからなるポリペプチド)は*Escherichia coli* HB101/pHD102(FERM BP-7420)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。

[0125] 調製例2 CH-296の調製

CH-296(フィブロネクチンの細胞結合ドメイン、ヘパリン結合ドメインおよびCS-1ドメインからなるポリペプチド)は*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。

[0126] 実施例1 H296-H296の作製

本明細書に記載の操作のうち、プラスミドの調製、制限酵素消化などの基本的な操作については2001年、コールド スプリング ハーバー ラボラトリー発行、T. マニア

ティス(T. Maniatis)ら編集、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(Molecular Cloning : A Laboratory Manual 3rd ed.)に記載の方法によった。

[0127] (1)発現ベクターの構築

(i) H-296発現ベクターの構築

配列表の配列番号7記載のCH-296のアミノ酸配列のN末端側よりアミノ酸278～574(塩基番号835～1725)よりなるポリペプチドをH-296とし、このH-296が2つ連結した改変型フィブロネクチンフラグメント(H296-H296)を発現させるため、以下のようにして発現ベクターを構築した。以下、図2を参照。

[0128] まず、配列表の配列番号8記載のCH-296の塩基配列(国際公開第03/080817パンフレット参照)より、配列表の配列番号9及び10に記載の塩基配列を有する合成プライマーH296-NcoF及び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7)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。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7)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。

[0129] 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H296-NcoF、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なった。

[0130] 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なった。エタノール沈殿後の回収DNAを1

0 μ Lの滅菌水に懸濁し、制限酵素NcoI(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、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。

[0131] 次に国際公開第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(これ以降、このpCold04NC2ベクターをpCold14ベクターとする)。

[0132] 次に上記pCold14ベクターを上記NcoI-HindIII消化DNA断片を調製した時に用いたのと同じ制限酵素で切断し、末端を脱リン酸処理したものを調製し、上記NcoI-HindIII消化DNA断片と混合し、DNAライゲーションキット(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。

[0133] 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、この組み換えプラスミドを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。

[0134] (ii) H296-H296発現ベクターの構築

次に、国際公開第03/080817パンフレットで公開されている塩基配列より、配列表の配列番号11記載の塩基配列を有する合成プライマーH296-NcoR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-NcoR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7)のアミノ酸番号574~569に相当する塩基配列を塩基番号17~34にもつ合成DNAである。上記合成プライマーと配列表の配列番号12記載のpCold14ベクターの5' UTR部分にアニーリングするプライマーNC2-5' UTRを用いてPCRを行った。PCRの反応条件を以下に示す。

[0135] すなわち、鋳型DNAとしてpCold14-H296 約0.1 μ g、10 μ Lの10 \times 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NC2-5' UTR、20pmolの合成プライマーH296-NcoR、5UのPyrobest DN

A 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、96°C 1分、68°C 4分を1サイクルとする30サイクルの反応を行なった。

[0136] 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Bio-Radカラムにより回収・精製し、エタノール沈殿を行なった。エタノール沈殿後の回収DNAを39 μ Lの滅菌水に懸濁、全量50 μ Lとした反応液を制限酵素NcoIで消化し、1.0%アガロースゲル電気泳動によりそのNcoI、NcoI消化物を抽出精製し、NcoI-NcoI消化DNA断片を得た。

[0137] 次に、(i)で調製したpCold14-H296を制限酵素NcoIで消化し、末端を脱リン酸処理したものを調製し、上記NcoI-NcoI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。

[0138] 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、この組み換えプラスミドをpCold14-H296-H296とした。このpCold14-H296-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が、間にアミノ酸“A”を挟んで2つ連結した形で含むプラスミドである。当該プラスミドにより発現されるタンパク質のアミノ酸配列を配列表の配列番号5に、塩基配列を配列表の配列番号6に示す。

[0139] (2) 発現、精製

上記(1)で調製したpCold14-H296-H296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容ミニジャーフェーマンター(Biott社製)を使用し、120r/min、Air=1.0L/minの条件で行なった。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°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、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なった。

[0140] 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なった。5mLずつ分画を行い、10%SDS-PAGEにより、分子量約65kDaの目的タンパク質を多く含む画分、約100mLを回収し、2LのbufferAで透析を行なった。

[0141] 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なった。5mLずつ分画を行い、10%SDS-PAGEにより、分子量約65kDaの目的タンパク質を多く含む画分、約100mLを回収し、2Lのbuffer D[50mM 炭酸ナトリウム緩衝液(pH9.5)]で透析を行なった。

[0142] その後、セントリコン-10(ミリポア社製)で約20倍の5mL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65kDa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-H296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、2.16mg/mLであった(分子量から計算して、約33μM)。また、N末端解析を行なったところ、メチオニンは消化されており、N末端はAlaであった。

[0143] 実施例2 H296-H296を用いた特異的細胞傷害活性保持CTLの誘導

(1) PBMCの分離および保存

HLA-A2.1保有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(PBS)で2倍希釈し、Ficoll-paque〔アマシヤムバイオサイエンス(Amersham Biosciences)社製〕上に重層後、600×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(Sigma)社製〕に懸濁した後、CP-1(極東製薬工業社製)と25%ヒト血清アルブミン〔ブミネート:バクスター(Baxter)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。CTL誘導時にはこれら保存PBMCを37°C水浴中にて急速融解し、10 μg/mL DNase〔カルビオケム(Calbiochem)社製〕を含むRPMI1640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。

[0144] (2) H296-H296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H296-H296を固定化した。すなわち、H296-H296(終濃度25 μg/mL)を含むPBSを24穴細胞培養プレート〔ベクトンディッキンソン(Becton, Dickinson and Company)社製〕に1mL/ウェルずつ添加し、4°Cで一晩インキュベートした。また、上記のプレートは使用前にPBSで2回洗浄したのちRPMI1640培地で1回洗浄した。

[0145] (3) 抗インフルエンザウイルス メモリーCTLの誘導

抗インフルエンザウイルス メモリーCTLの誘導は、ベドナレク(Bednarek)らの方法〔Bednarek M. A. et al., J. Immunology., 第147巻、第4047~4053頁(1991)〕を一部改変して実施した。すなわち、5%ヒトAB型血清、1mM ピルビン酸ナトリウム、2mM L-グルタミン、1×NEAA Mixture〔全てキャンプレックス(Cambrex)社製〕、1%ストレプトマイシン-ペニシリン(ナカライテスク社製)を含むRPMI1640培地(以下5HRPMIと略す)に 4×10^6 cells/mLとなるように実施例2-(1)で調製したPBMCを懸濁後、実施例2-(2)で作製した24穴細胞培養プレートに1mL/ウェルずつ添加し、5%CO₂ 湿式インキュベーター内にて、37°Cで1.5時間インキュベートし、プラスチック接着性の単球を分離した(対照にはH296-H296固定化処理を行っていないプレートを使用)。その後、非接着性の細胞をRPMI164

0培地を用いて回収し、レスポンドー細胞として氷上保存した。分離した単球には、抗原ペプチドとして5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のインフルエンザウイルスタンパク質由来エピトープペプチド(配列表の配列番号13に記載のマトリックスプロテイン由来-HLA-A2.1結合性ペプチド)および1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の β 2マイクログロブリン[スクリプス(Scrips)社製]を含む5HRPMIを0.5mLずつ添加し、2時間室温にてインキュベート後、X線照射(1.42C/kg)して抗原提示細胞とした。各ウェルからペプチド液を吸引除去し、ウェルをRPMI1640培地を用いて洗浄後、氷上保存しておいたレスポンドー細胞を 1×10^6 cells/mLとなるよう5HRPMIに懸濁し、1mL/ウェルずつ抗原提示細胞上に添加したのち、プレートを5%CO₂中、37°Cで培養した。培養開始後1日目に、60U/mLのIL-2(プロロイキン:CHIRON社製)を含む5HRPMI 1mLを各ウェルに添加、また5日目には培養上清を半分除去後、同様のIL-2含有培地を1mLずつ添加した。7日目に上記と同様にして抗原提示細胞を調製したあと、1週間培養したレスポンドー細胞を回収し、440×gで10分間遠心した。遠心後、レスポンドー細胞を1mLの5HRPMIに懸濁し、調製した抗原提示細胞上に1mL/ウェルずつ添加し、再刺激した。このとき、プレートはH296-H296を固定化したものを使用した(対照には固定化していないプレートを使用)。再刺激後1日目に、60U/mLのIL-2を含む5HRPMI 1mLを各ウェルに添加、また4日目あるいは5日目には培養上清を半分除去後、除去前と同じ内容の培地を1mLずつ添加し、さらに培養を続け、CTLを誘導した。14日間培養後の細胞増殖率を表1に示す。細胞増殖率はCTL誘導開始時のレスポンドー細胞数に対する誘導終了時点での細胞数の比を増殖率として求めた。

[0146] [表1]

サンプル	細胞増殖率(倍)
対照	2.3
H296-H296	4.9

[0147] その結果、H296-H296を固定化した群では固定化していない対照群と比較して

高い増殖率を示した。つまり、CTL誘導時にH296-H296を使用することで、細胞の増殖率を高めることが明らかとなった。

[0148] 実施例3 実施例2のCTLのフィーダ細胞を用いた拡大培養

(1) H296-H296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H296-H296を固定化した。すなわち、H296-H296(終濃度 $25\mu\text{g}/\text{mL}$)を含むPBSを 12.5cm^2 フラスコ(Becton, Dickinson and Company社製)を立てて 2.7mL ずつ添加し、 4°C で一晩インキュベートした。また、上記のフラスコは使用前にPBSで2回洗浄したのちRPMI1640培地で1回洗浄した。

[0149] (2) 実施例2のCTLのフィーダ細胞を用いた拡大培養

実施例2-(3)で調製したH296-H296存在下で誘導したCTL(対照はH296-H296非存在下で誘導したCTL)を $3\times 10^4\text{cells}/\text{mL}$ に調整した。一方、実施例2-(1)と同様の方法により採取したHLA-A2.1非保持allogenic PBMCを2ドナー混合したのちX線照射($0.851\text{C}/\text{kg}$)し、培地で洗浄後、 $4\times 10^6\text{cells}/\text{mL}$ に調整した(フィーダ細胞とする)。これら $3\times 10^4\text{cells}$ のCTLおよび $4\times 10^6\text{cells}$ のフィーダ細胞を 5mL の10%Hyclone FBS(HyClone社製)、 1mM ピルビン酸ナトリウム、 2mM L-グルタミン、 $1\times\text{NEAA Mixture}$ 、1%ストレプトマイシン-ペニシリンを含むRPMI1640培地(以下10HycloneRPMIと略す)に懸濁し、さらに終濃度 $50\text{ng}/\text{mL}$ の抗CD3抗体(抗ヒトCD3モノクローナル抗体(OKT3):ヤンセンファーマ社製)を加えて 12.5cm^2 のフラスコを立てたものに入れ、 37°C 湿式 CO_2 インキュベーター中で14日間培養した。この際、実施例3-(1)のH296-H296固定化フラスコを使用した(対照については非固定化フラスコを使用)。この間ペプチドによる刺激はまったく付加せず、培養開始1日目に10HycloneRPMI 5mL と終濃度 $120\text{U}/\text{mL}$ のIL-2を添加、さらに培養開始後5日目以降は2~3日ごとに培養上清を半分除去後、 $60\text{U}/\text{mL}$ のIL-2を含む10HycloneRPMI 5mL を各フラスコに添加し、14日間拡大培養を行った。結果を表2に示す。拡大培養時の増殖率は拡大培養開始時の細胞数に対する拡大培養終了時点の細胞数の比を増殖率として求め、誘導からの増殖率は誘導開始時のレスポンドー細胞数に対する拡大培養終了時

点の細胞数の比として求めた。

[0150] [表2]

表 2

サンプル	細胞増殖率 (倍)	
	拡大培養時	誘導から
対照	45.5	104.6
H296-H296	193.1	954.6

[0151] その結果、CTL誘導時および拡大培養時にH296-H296を固定化した群のCTLは、H296-H296を固定化しなかった対照群より高い増殖率を示した。つまり、CTL誘導時および拡大培養時にH296-H296を使用することで、細胞の増殖率を高めることが明らかとなった。

[0152] 実施例4 実施例3のCTLの細胞傷害活性の測定

実施例3で調製した拡大培養開始後14日目のCTLの細胞傷害活性は、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。一晚エピトープペプチド存在下、もしくは非存在下で培養したHLA-A2.1保持EBVトランスフォームB細胞(細胞名 221A2.1)を 1×10^6 cells/mLとなるよう5%FBS(fetal bovine serum、ウシ胎児血清、Cambrex社製)を含むRPMI1640培地に懸濁後、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1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。Calcein標識標的細胞は、30倍量のK562細胞(ATCC CCL-243)と混合し、細胞傷害活性測定用細胞とした。なお、K562細胞はレスポonder細胞中に混入するNK細胞による非特異的傷害活性を排除するために用いた。

[0153] 実施例3で調製した抗インフルエンザウイルス メモリーCTLをエフェクター細胞として $1 \times 10^5 \sim 3 \times 10^6$ 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(Becton, Dickinson and Company社製)の各ウェルに $100 \mu\text{L}$ /

ウェルずつ分注しておき、これらにCalcein標識標的細胞濃度が 1×10^5 / mLとなるように調整した細胞傷害活性測定用細胞を100 μ L / ウェルずつ添加した。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、10、3、1について測定を行った。上記細胞懸濁液の入ったプレートを400 \times gで1分間遠心後、37°Cの湿式CO₂ インキュベーター内で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 μ Lを採取し、蛍光プレートリーダー〔ベルトールド (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。「特異的細胞傷害活性 (%)」は以下の式1にしたがって算出した。

式1: 特異的細胞傷害活性 (%) =

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

上式において最小放出量は細胞傷害活性測定用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、最大放出量は細胞傷害活性測定用細胞に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。また、E / T比3において、拡大培養前の細胞傷害活性をどれだけ維持しているかを「細胞傷害活性維持 (%)」として以下の式2にしたがって算出した。

式2: 細胞傷害活性維持 (%) =

$$[\text{拡大培養後の細胞傷害活性} (\%) / \text{拡大培養前の細胞傷害活性} (\%)] \times 100$$

測定結果を表3に示す。

[0154] [表3]

表3

サンプル	CTL拡大培養後細胞傷害活性 (%)				活性維持効果 (%)
	E / T比				E / T = 3
	30	10	3	1	
対照	n. t.	72.7	36.6	12.1	73.9
H296-H296	89.6	83.9	62.4	28.9	123.3

n. t. : not tested

[0155] ペプチド非存在下で培養したCalcein標識標的細胞に対する細胞傷害活性はほ

ば0%であり、非特異的な活性はないことを確認した。ペプチド存在下で培養したCalcein標識標的細胞に対する細胞傷害活性において、CTL誘導時および拡大培養時にH296-H296フラグメントを固定化した群については、14日間の拡大培養後においても特異的で高い細胞傷害活性を保持していた。一方、CTL誘導時および拡大培養時のどちらにもH296-H296を固定化しなかった対照群では、その活性は、明らかに低下していた。つまり、H296-H296をCTL誘導時および拡大培養時に使用することにより、特異的で高い細胞傷害活性を長期的に保持した状態で、CTLの拡大培養が可能になることが明らかになった。

[0156] 実施例5 実施例3のCTL細胞集団中におけるTCR Vβ17陽性細胞含有比率の測定

今回、CTL誘導に用いたHLA-A2.1結合性インフルエンザウイルススタンパク質由来ペプチドはTCR Vβ17陽性T細胞により認識されることがLehnerらによって示されている[Lehner P. J. et al., J. Exp. Med., 第181巻、第79~91頁(1995)]。したがって、TCR Vβ17の陽性細胞含有比率を測定することにより、抗インフルエンザウイルス メモリーCTLの指標となり得る。

[0157] 実施例3で調製した 2×10^5 cellsのCTLをPBSで洗浄し、1%牛血清アルブミン(BSA) (Sigma社製)を含む15 μLのPBS中に懸濁し、FITC標識マウスIgG1もしくはFITC標識マウス抗ヒトTCR Vβ17抗体[ともにベックマンコールター (BECKMAN COULTER) 社製]を添加後、氷上で30分間インキュベートした。インキュベート後、細胞を0.1%BSAを含むPBSで2回洗浄し、1%BSAを含むPBSに懸濁した。この細胞をCytomics FC500 (BECKMAN COULTER社製)を用いたフローサイトメトリーに供し、TCR Vβ17陽性細胞の含有率を測定した。測定結果を表4に示す。

[0158] [表4]

表4

サンプル	TCR Vβ17陽性細胞含有比率 (%)
対照	24.9
H296-H296	85.3

[0159] CTL誘導時および拡大培養時にH296-H296を固定化した群のCTLは、固定化しなかった対照群と比較して明らかに高い陽性細胞含有率を示した。なお、誘導後のCTL、すなわち拡大培養前のTCR V β 17陽性細胞含有率は、H296-H296を固定化した群については78.0%、固定化していない対照群については73.0%であった。つまり、CTL誘導時および拡大培養時にH296-H296を使用することで、抗インフルエンザウイルス メモリーCTLの含有率を高く保持したまま拡大培養が可能であることが認められた。

[0160] 実施例6 実施例2のCTLのフィーダ細胞を用いない拡大培養

(1) 抗CD3抗体とH296-H296フラグメントの固定化

以下のフィーダ細胞を用いないCTL拡大培養実験で使用する培養器材にH296-H296を固定化した。すなわち、抗CD3抗体(終濃度5 μ g/mL)とH296-H296(終濃度25 μ g/mL)を含むPBSを96穴細胞培養プレートに160 μ L/ウェルずつ添加し、4 $^{\circ}$ Cで一晩インキュベートした(対照には抗CD3抗体のみを固定化)。また、上記のプレートは使用前にPBSで2回洗浄したのちRPMI1640で1回洗浄した。

[0161] (2) フィーダ細胞を用いないCTLの拡大培養

実施例2-(3)で調製したH296-H296存在下で誘導したCTL(対照はH296-H296非存在下で誘導したCTL)を5HRPMIで洗浄したのち、 1×10^5 cellsを5HRPMI 300 μ Lに懸濁し、実施例6-(1)で作製した96穴培養プレートを用いて37 $^{\circ}$ C 湿式CO₂インキュベーター中で培養を開始した。培養開始1日目に終濃度120U/mLとなるようにIL-2を添加、さらに培養開始後5日目以降は2~3日ごとに固定化を行っていないプレートに継代を行い、終濃度100U/mLのIL-2を添加した。この間ペプチドによる刺激はまったく付加せず、13日間拡大培養を行った。細胞増殖率を表5に示す。

[0162] [表5]

表 5

サンプル	細胞増殖率 (倍)	
	拡大培養時	誘導から
対照	9. 2	2 1. 1
H 2 9 6 - H 2 9 6	3 0. 6	1 4 9. 8

[0163] 誘導時および拡大培養時にH296-H296を固定化した群については、固定化していない対照群と比較して高い増殖率を示した。つまり、誘導時および拡大培養時にH296-H296を使用することで、フィーダ細胞を用いずにCTLの拡大培養が可能となった。

[0164] 実施例7 実施例6のCTLの細胞傷害活性の測定

実施例6-(2)で得られたCTLを実施例4と同様の方法にてCTLの特異的細胞傷害活性を測定した。その結果を表6に示す。

[0165] [表6]

表 6

サンプル	CTL 拡大培養後細胞傷害活性 (%)				活性維持効果 (%)
	E/T比				E/T=3
	3 0	1 0	3	1	
対照	n. t.	53. 3	20. 8	8. 2	42. 2
H 2 9 6 - H 2 9 6	84. 8	80. 0	53. 0	25. 8	104. 8

n. t. : not tested

[0166] ペプチド非存在下で培養したCalcein標識標的細胞に対する細胞傷害活性はほぼ0%であり、非特異的な活性はないことを確認した。ペプチド存在下で培養したCalcein標識標的細胞に対する細胞傷害活性について、誘導時および拡大培養時にH296-H296を添加した群のCTLは、対照群と比較して、13日間の拡大培養後においても特異的で高い細胞傷害活性を保持していた。つまり、H296-H296をCTL誘導時および拡大培養時に使用することにより、特異的で高い細胞傷害活性を長期的に保持した状態で、フィーダ細胞を用いない方法で拡大培養が可能になることが明らかになった。

[0167] 実施例8 実施例6のCTL細胞集団中におけるTCR V β 17陽性細胞含有比率の測定

実施例6-(2)で調製した 2×10^5 cellsのCTLを実施例5と同様の方法にてTCR V β 17陽性細胞含有比率の測定を行った。なお、H296-H296の非存在下で拡大培養したCTLを用いた対照群については拡大培養後に得られた細胞数が少なかったため、試験を実施しなかった。結果を表7に示す。

[0168] [表7]

表7

サンプル	TCR V β 17陽性細胞含有比率 (%)
H296-H296	81.5

[0169] H296-H296を誘導時および拡大培養時に使用した群において、高い陽性細胞含有比率を示した。なお、誘導後のCTL、すなわち拡大培養前のTCR V β 17陽性細胞含有率は、H296-H296を固定化した群については78.0%であった。つまり、H296-H296を誘導時および拡大培養時に使用することにより、フィーダ細胞を用いない系で、抗インフルエンザウイルス メモリーCTL含有比率を高く保持したまま拡大培養が可能であることが認められた。

[0170] 実施例9 H296-H296およびH-296を用いた特異的細胞傷害活性保持CTLの誘導

(1) H296-H296およびH-296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H296-H296およびH-296を固定化した。すなわち、H296-H296およびH-296(終濃度 $25 \mu\text{g}/\text{mL}$)それぞれを含むPBSを24穴細胞培養プレートに1mLずつ添加し、 4°C で一晩インキュベートした。また、上記のプレートは使用前にPBSで2回洗浄したのちRPMI1640培地で1回洗浄した。

[0171] (2) 抗インフルエンザウイルス メモリーCTLの誘導

実施例2-(1)に記載の方法で分離、保存したPBMCを用い、実施例2-(3)と同様の方法で、抗インフルエンザウイルス メモリーCTLの誘導を行った。このとき使用

した培養プレートは、実施例9-(1)で作製したものをを用いた(対照にはH296-H296およびH-296を固定化していないプレートを使用)。誘導開始後14日目の細胞増殖率を表8に示す。

[0172] [表8]

表8

サンプル	細胞増殖率 (倍)
対照	1. 1
H296-H296	4. 3
H-296	3. 2

[0173] この結果、H296-H296を固定化した群が最も高い増殖率を示し、ついでH-296を固定化した群で、固定化していない対照群はこれらと比較して低い増殖率であった。つまり、CTL誘導時にH296-H296あるいはH-296を使用することで、細胞の増殖率を高めることが明らかとなり、H296-H296を使用した方がより高い効果が得られた。

[0174] 実施例10 実施例9のCTLの細胞傷害活性の測定

実施例9で得られたCTLを実施例4と同様の方法にてCTLの特異的細胞傷害活性を測定した。その結果を表9に示す。

[0175] [表9]

表9

サンプル	CTL誘導後細胞傷害活性 (%)			
	E/T比			
	30	10	3	1
対照	n. t.	54. 4	24. 4	5. 8
H296-H296	66. 9	59. 2	32. 8	9. 9
H-296	62. 9	57. 4	32. 6	8. 6

n. t. : not tested

[0176] ペプチド非存在下で培養したCalcein標識標的細胞に対する細胞傷害活性はほぼ0%であり、非特異的な活性はないことを確認した。ペプチド存在下で培養したCal

cein標識標的細胞に対する細胞傷害活性において、誘導時にH296-H296あるいはH-296を固定化した群のCTLは、対照群のCTLに比べて特異的で高い細胞傷害活性を保持していた。つまり、H296-H296あるいはH-296をCTL誘導時に使用することにより、高い細胞傷害活性を持ったCTLを誘導することが可能となった。

[0177] 実施例11 実施例9のCTL細胞集団中におけるTCR V β 17陽性細胞含有比率の測定

実施例9で調製した 2×10^5 cellsのCTLを実施例5と同様の方法にてTCR V β 17陽性細胞含有比率の測定を行った。結果を表10に示す。なお、CTL誘導前のレスポンダー細胞のV β 17陽性細胞含有率は2.5%であった。

[0178] [表10]

表10

サンプル	TCR V β 17陽性細胞含有比率 (%)
対照	50.6
H296-H296	73.5
H-296	73.2

[0179] H296-H296あるいはH-296を誘導時に使用した群において、使用していない対照群に比べて高い陽性細胞含有比率を示した。すなわち、H296-H296あるいはH-296を誘導時に使用することにより、抗インフルエンザウイルス メモリーCTLを効率よく誘導出来ることが明らかとなった。

[0180] 実施例12 実施例9のCTLのフィーダ細胞を用いない拡大培養

(1) 抗CD3抗体とH296-H296あるいはH-296の固定化

以下のフィーダ細胞を用いないCTL拡大培養実験で使用する培養器材にH296-H296あるいはH-296を固定化した。すなわち、抗CD3抗体(終濃度 $5 \mu\text{g}/\text{mL}$)と、H296-H296あるいはH-296(終濃度 $25 \mu\text{g}/\text{mL}$)を含むPBSを96穴細胞培養プレートに $160 \mu\text{L}/\text{ウェル}$ ずつ添加し、 4°C で一晩インキュベートした(対照には抗CD3抗体のみを固定化)。また、上記のプレートは使用前にPBSで2回洗浄したのちRPMI1640で1回洗浄した。

[0181] (2)フィーダ細胞を用いないCTLの拡大培養

実施例9で調製したH296-H296あるいはH-296の存在下で誘導したCTL(対照は非存在下で誘導したCTL)を5HRPMIで洗浄したのち、 1×10^5 cellsを5HRPMI 300 μ Lに懸濁し、実施例12-(1)で作製した96穴培養プレートを用いて37°C 湿式CO₂ インキュベーター中で培養を開始した。培養開始1日目に終濃度500 U/mLとなるようにIL-2を添加、5日目以降は5HRPMIを用いて固定化を行っていないプレートに継代を行い、終濃度500U/mLのIL-2を添加した。すなわち、培養開始後5日目には 1×10^5 cells/mL、8日目には 1.5×10^5 cells/mL、12日目には 3.2×10^5 cells/mLで継代を行った。この間ペプチドによる刺激はまったく付加せず、15日間拡大培養を行った。細胞増殖率を表11に示す。

[0182] [表11]

表 1 1

サンプル	細胞増殖率 (倍)	
	拡大培養時	誘導から
対照	1. 2	1. 3
H 2 9 6 - H 2 9 6	5 6. 0	2 4 0. 8
H - 2 9 6	3 4. 0	1 0 9. 1

[0183] 誘導時および拡大培養時にH296-H296を固定化した群が最も高い増殖率を示し、ついで誘導時および拡大培養時にH-296を固定化した群で、固定化していない対照群は最も低い増殖率を示した。つまり、誘導時および拡大培養時にH296-H296あるいはH-296を使用することで、フィーダ細胞を用いずにCTLの拡大培養が可能となり、その効果はH296-H296を使用した方が高いことが示された。

[0184] 実施例13 実施例12のCTLの細胞傷害活性の測定

実施例12-(2)で得られたCTLを実施例4と同様の方法にてCTLの特異的細胞傷害活性を測定した。その結果を表12に示す。なお、E/T比30については、試験を行わなかった。

[0185] [表12]

表 1 2

サンプル	CTL 拡大培養後細胞傷害活性 (%)			活性維持効果 (%)
	E/T 比			E/T=3
	10	3	1	
対照	n. t.	n. t.	-0.4	n. t.
H296-H296	65.5	41.5	16.8	126.4
H-296	34.6	12.4	3.7	38.1

n. t. : not tested

[0186] ペプチド非存在下で培養したCalcein標識標的細胞に対する細胞傷害活性はほぼ0%であり、非特異的な活性はないことを確認した。ペプチド存在下で培養したCalcein標識標的細胞に対する細胞傷害活性について、誘導時および拡大培養時にH296-H296を添加した群のCTLは、15日間の拡大培養後においても特異的で高い細胞傷害活性を保持していた。また、誘導時および拡大培養時にH-296を添加した群のCTLは、H296-H296を添加した群より低いが、特異的な細胞傷害活性を保持していた。つまり、H296-H296あるいはH-296をCTL誘導時および拡大培養時に使用することにより、特異的な細胞傷害活性を長期的に保持した状態で、フィーダ細胞を用いない方法で拡大培養が可能になることが明らかになり、H296-H296の方が高い効果が得られた。

[0187] 実施例14 実施例12のCTL細胞集団中におけるTCR V β 17陽性細胞含有比率の測定

実施例12-(2)で調製した 2×10^5 cellsのCTLを実施例5と同様の方法にてTCR V β 17陽性細胞含有比率の測定を行った。結果を表13に示す。

[0188] [表13]

表 1 3

サンプル	TCR V β 17陽性細胞含有比率 (%)
対照	13.2
H296-H296	83.1
H-296	16.4

[0189] H296-H296を誘導時および拡大培養時に使用した群が最も高い陽性細胞含有比率を示し、次いでH-296を誘導時および拡大培養時に使用した群が高く、固定化していない対照群は最も低い陽性細胞含有比率を示した。なお、誘導後のCTL、すなわち拡大培養前のTCR V β 17陽性細胞含有率は、対照群については50.6%、H296-H296を固定化した群については73.5%、H-296を固定化した群については73.2%であった。つまり、H296-H296を誘導時および拡大培養時に使用することにより、フィーダ細胞を用いない系で、抗インフルエンザウイルスメモリーCTL含有比率を高く保持したまま拡大培養が可能であることが認められた。

[0190] 実施例15 30mL採血を想定した実施例9のCTLのフィーダ細胞を用いない拡大培養

(1) 抗CD3抗体とH296-H296あるいはCH-296フラグメントの固定化

以下のフィーダを用いないCTL拡大培養実験で使用する培養器材にH296-H296あるいはCH-296を固定化した。すなわち、抗CD3抗体(終濃度5 μ g/mL)と、H296-H296あるいはCH-296(終濃度25 μ g/mL)を含むPBSを96穴細胞培養プレートに160 μ L/ウェルずつ添加し、4°Cで一晩インキュベートした(対照には抗CD3抗体のみ固定化)。また、上記のプレートは使用前にPBSで2回洗浄したのちRPMI培地で1回洗浄した。

[0191] (2) フィーダ細胞を用いないCTLの拡大培養

実施例9でH296-H296を用いて誘導したCTLを3%ヒトAB型血清、1mM ビルビン酸ナトリウム、2mM L-グルタミン、1 \times NEAA Mixture、1%ストレプトマイシン-ペニシリンを含むRPMI1640培地(以下3HRPMIと略す)で洗浄したのち、1 \times 10⁵ cellsを300 μ Lの3HRPMIに懸濁し、実施例15-(1)で作製した96穴培養プレートに入れ、37°C 湿式CO₂インキュベーター中で培養を開始した。この際、30mL採血から得られると予想されるPBMC 3 \times 10⁷ cellsを用いた培養スケールにおいて、誘導から拡大培養までのヒトAB型血清の使用量を最大15mL、RPMI培地使用量を最大10Lに制限して拡大培養をおこなった。培養開始1日目に終濃度500U/mLのIL-2を添加、5日目には1%ヒトAB型血清RPMI培地を用いて固定化を行っていないプレートに1 \times 10⁵ cells/mLで継代を行い、終濃度500U/mLのIL-

2を添加した。培養開始後8日目には0.2%ヒトAB型血清RPMI培地を用いて固定化を行っていないプレートに 1.5×10^5 cells/mLで継代を行い、終濃度500U/mLのIL-2を添加し、12日目には終濃度500U/mLのIL-2のみ添加した。この間ペプチドによる刺激はまったく付加せずに15日間拡大培養を行った。細胞増殖率を表14に示す。

[0192] [表14]

表14

サンプル	細胞増殖率 (倍)	
	拡大培養時	誘導から
対照	35.3	151.7
H296-H296	56.7	243.6
CH-296	50.8	218.9

[0193] 拡大培養時にH296-H296あるいはCH-296を固定化した群のCTLは、拡大培養時にH296-H296あるいはCH-296を固定化しなかった群より高い増殖率を示した。つまり、H296-H296を誘導時に用いて得られたCTLについて、拡大培養時にH296-H296あるいはCH-296を使用することにより高い細胞増殖効果が見られた。

[0194] 実施例16 H296-H296を用いた特異的細胞傷害活性保持CTLの誘導(自己血漿)

実施例2-(1)に記載の方法で分離、保存したPBMCを用い、実施例2-(3)と同様の方法で、抗インフルエンザウイルス メモリーCTLの誘導を行った。その際、5%自己血漿、1mM ピルビン酸ナトリウム、2mM L-グルタミン、1×NEAA Mixture、1%ストレプトマイシン-ペニシリンを含むRPMI培地(以下5PlasmaRPMIと略す)を用いた。こうして調製した誘導開始後14日目の細胞増殖率を表15に示す。

[0195] [表15]

表15

サンプル	細胞増殖率 (倍)
対照	1.7
H296-H296	4.1

[0196] 誘導時にH296-H296を固定化した群において、H296-H296を固定化していない対照群よりも高い増殖率が得られた。つまり、自己血漿を含む培地において、CTL誘導時にH296-H296を使用することで、細胞の増殖率を高めることが明らかとなった。

[0197] 実施例17 実施例16のCTL細胞集団中におけるTCR Vβ17陽性細胞含有比率の測定

実施例16で調製した 2×10^5 cellsのCTLを実施例5と同様の方法にてTCR Vβ17陽性細胞含有比率の測定を行った。結果を表16に示す。なお、CTL誘導前のレスポンダー細胞のVβ17陽性細胞含有率は2.5%であった。

[0198] [表16]

表16

サンプル	TCR Vβ17陽性細胞含有比率 (%)
対照	72.1
H296-H296	80.1

[0199] 誘導時にH296-H296を固定化した群について、H296-H296を固定化していない対照群と比較して高い陽性細胞含有比率を示した。すなわち、誘導時にH296-H296を用いることで、抗インフルエンザウイルス メモリーCTLを効率よく誘導できることが明らかとなった。

[0200] 実施例18 実施例16のCTLのフィーダ細胞を用いた拡大培養

実施例16で調製したH296-H296存在下で誘導したCTL(対照はH296-H296非存在下で誘導したCTL)を用い、実施例3と同様の方法で、CTLの拡大培養を行った。この際、5PlasmaRPMI培地を用いて培養し、14日間拡大培養を行った。1

4日後の細胞増殖率を表17に示す。

[0201] [表17]

表17

サンプル	細胞増殖率 (倍)	
	拡大培養時	誘導から
対照	276.5	468.7
H296-H296	337.8	1380.7

[0202] 誘導時及び拡大培養時にH296-H296を固定化した群については、H296-H296を固定化しなかった群より高い増殖率を示した。つまり、H296-H296を誘導時あるいは拡大培養時に使用することで、細胞の増殖率を高めることが明らかとなった。

[0203] 実施例19 実施例18のCTL細胞傷害活性の測定

実施例18で得られたCTLを実施例4と同様の方法にてCTLの特異的細胞傷害活性を測定した。その結果を表18に示す。

[0204] [表18]

表18

サンプル	CTL拡大培養後細胞傷害活性 (%)				活性維持効果 (%)
	E/T比				E/T=3
	30	10	3	1	
対照	52.6	24.1	9.5	5.2	18.0
H296-H296	88.6	83.2	57.7	26.9	117.0

[0205] ペプチド非存在下で培養したCalcein標識標的細胞に対する細胞傷害活性はほぼ0%であり、非特異的な活性はないことを確認した。ペプチド存在下で培養したCalcein標識標的細胞に対する細胞傷害活性について、誘導時および拡大培養時にH296-H296を固定化した群は14日間の拡大培養後においても特異的で高い細胞傷害活性を保持していた。一方、誘導時および拡大培養時にH296-H296を固定化しない対照群については、その活性は明らかに低下していた。つまり、自己血漿を

用いた拡大培養で、H296-H296をCTL誘導時および拡大培養時に使用することにより、特異的で高い細胞傷害活性を長期的に保持した状態で、CTLの拡大培養が可能になることが明らかになった。

[0206] 実施例20 実施例18のCTL細胞集団中におけるTCR V β 17陽性細胞含有比率の測定

実施例18で調製した 2×10^5 cellsのCTLを実施例5と同様の方法にてTCR V β 17陽性細胞含有比率の測定を行った。結果を表19に示す。

[0207] [表19]

表 1 9

サンプル	TCR V β 17陽性細胞含有比率 (%)
対照	8. 6
H296-H296	62. 0

[0208] 誘導時および拡大培養時にH296-H296を固定化した群について、固定化していない対照群と比較して、明らかに高い陽性細胞含有比率を示した。なお、誘導後すなわち拡大培養前のCTLについてのTCR V β 17陽性細胞含有率は、表16に示したように、H296-H296を固定化した群については80. 1%であり、固定化していない群については72. 1%であった。つまり、自己血漿を用いた拡大培養で、H296-H296をCTL誘導時および拡大培養時に使用することで、抗インフルエンザウイルス メモリーCTLの含有比率を高く保持したまま拡大培養が可能であることが明らかとなった。

[0209] 実施例21 H296-H296を用いたリンパ球(リンフォカイン活性化細胞)の拡大培養

(1) PBMCの分離および保存

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(PBS)で2倍希釈し、Ficoll-paque上に重層して500 \times gで20分間遠心した。中間層の末梢血単核球細胞(PBMC)をピペットで回収、洗浄した。採取したPBMCは90%FBS/10%DMSO(SIGMA社製)からなる保存液に懸濁し、液体窒素中にて保存した。リンパ球拡大培養時にはこれら保存PBMC

を37°C水浴中にて急速融解し、10 μ g/mL DNaseを含むRPMI1640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。

[0210] (2) 抗ヒトCD3抗体およびH296-H296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抗体およびH296-H296を固定化した。すなわち12穴細胞培養プレート(Becton, Dickinson and Company社製)に抗ヒトCD3抗体(終濃度5 μ g/mL)を含むPBSを1.9mL/ウェルずつ添加した。この時、H296-H296添加群には実施例1で調製したH296-H296を終濃度(25 μ g/mL)となるように添加した。

[0211] これらの培養器材を室温で5時間インキュベート後、使用時まで4°Cに保存した。使用直前にはこれらの培養器材から抗体およびH296-H296を含むPBSを吸引除去後、各ウェルをPBSで2回、RPMI培地で1回洗浄し各実験に供した。

[0212] (3) リンパ球の拡大培養

3%humanAB血清を含むAIM-V (Invitrogen社製、以下3%AIM-Vと略す)に 1×10^6 cells/mLとなるように実施例21-(1)で調製したPBMCを懸濁後、実施例21-(2)で作製した抗ヒトCD3抗体固定化プレート、または抗ヒトCD3抗体およびH296-H296固定化プレートに3%AIM-Vを2mL/ウェルで添加しておき、細胞液を1mL/ウェルずつ添加した。終濃度1000U/mLとなるようにIL-2を添加し、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4日目に、各群とも 0.075×10^6 cells/mLとなるように1%humanAB血清を含むAIM-Vにより希釈し(液量6mL)、培養液を何も固定化していない12.5cm²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。血清濃度は、30mL採血より得られたPBMCを培地10Lで培養することを想定して決定した。培養を継続し、7日目には各群とも 0.25×10^6 cells/mLとなるように、対照群(H296-H296非固定化)では0.1%humanAB血清を含むAIM-Vを用いて、およびH296-H296固定化群では0.09%humanAB血清を含むAIM-Vを用いて希釈した培養液(液量12.6mL)を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移した。いずれも終濃度500U/mLとなるようにIL-2を添加した。培養開始後10日目には、7日目と同じ血清濃度のhumanAB血清を含むAIM-Vを用いて0.

413×10⁶/mLとなるように細胞液を希釈し(液量12.6mL)、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それぞれ移した。各群において終濃度500U/mLとなるようにIL-2を添加した。培養開始後15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。結果を表20に示す。

[0213] [表20]

表20

血清濃度 (%)	培養日数	サンプル	拡大培養率 (倍率)
3→1→0.1	15日間	対照 (H296-H296非固定化)	343
3→1→0.09	15日間	H296-H296	498

[0214] 表20に示されるように、リンパ球拡大培養初期にH296-H296を固定化した培養器材を使用した群においては、対照群に比較してリンパ球の拡大培養率が高かった。このことから、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。

[0215] 実施例22 H296-H296-H296-HTの作成

(1)H296-H296-H296-HT発現ベクターの構築

H-296が3つ連結した改変型フィブロネクチンフラグメント(H296-H296-H296-HT)を発現させるため、以下のようにして発現ベクターを構築した。

[0216] (i)H296-HT発現ベクターの構築

CH-296の塩基配列(配列表の配列番号8)より、配列表の配列番号14に記載の塩基配列を有する合成プライマーH296-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278~285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。

[0217] 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0.1μg、5μLの10×Ex Taq Buffer、5μLのdNTP混合液、10pmolの合成プライマーH296-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°C 1分、55°C 1分、72°C 3分を1サイクルとする30サイクルの反応を行なった。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なった。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で2重消化し、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。

[0218] 次にpColdIベクター(タカラバイオ社製)をNdeI、HindIIIで切断したものを調製し、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み換えプラスミドを、pColdI-H296とした。

[0219] (ii) H296-H296-H296-HT発現ベクターの構築

次に、CH-296の塩基配列(配列表の配列番号8)より、配列表の配列番号15に記載の塩基配列を有する合成プライマーH296-NdeR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-NdeRは、制限酵素NdeIの認識配列を塩基番号4~9に、さらにCH-296のアミノ酸配列(配列表の配列番号7)のアミノ酸番号574~569に相当する塩基配列を塩基番号10~27にもつ合成DNAである。

[0220] 上記合成プライマーと、合成プライマーH296-NdeF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-NdeF、10pmolの合成プライマーH296-NdeR、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°C 1分、55°C 1分、72°C 3分を1サイクルとする

30サイクルの反応を行なった。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なった。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で消化し、DNAライゲーションキットを用いて連結した後、得られた1.8kbp以上のDNA断片を1.0%アガロースゲル電気泳動により抽出精製した。

[0221] 次に、上記pColdI-H296をNdeI消化し、末端を脱リン酸化処理したものを調製し、上記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。

[0222] 目的のH-296が3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、この組み換えプラスミドをpColdI-H296-3とした。このpColdI-H296-3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が、間にアミノ酸“H”を挟んで3つ連結しそのN末端にHisタグ配列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H296-H296-H296-HTと命名し、そのアミノ酸配列を配列表の配列番号16に、塩基配列を配列表の配列番号17に示す。

[0223] (2) H296-H296-H296-HT発現、精製

上記(1)で調製したpColdI-H296-3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200mLのLB液体培地(アンピシリン50 μ g/mL含む)に植菌し、OD=0.4~0.6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、約10mLのBinding Buffer[50mM Tris-HCl(pH8.5)、150mM NaCl、1mM MgCl₂]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。得られた上清の抽出液を、2mLのNi-

NTA樹脂に添加し、4°C、1時間攪拌した後、樹脂をBinding Buffer 10mL、Washing BufferA[20mM Tris-HCl(pH8.5)、100mM NaCl、1mM MgCl₂、10% glycerol、20mM Imidazole]10mL、Washing BufferB[20mM Tris-HCl(pH8.5)、800mM NaCl、1mM MgCl₂、10% glycerol、20mM Imidazole]10mL、Washing BufferA 10mLで順次処理した後、樹脂に結合していた目的タンパク質を3mLのElution Buffer[20mM Tris-HCl(pH8.5)、100mM NaCl、1mM MgCl₂、10% glycerol、200mM Imidazole]で溶出した。得られた溶出液を、Vivaカラム(ザルトリウス社製)を用いて0.3mLに濃縮した。得られた濃縮液をSDS-PAGEで解析したところ、分子量約99kDaの目的タンパク質がほぼ単一バンドとして検出された。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、2.5mg/mLであった(分子量から計算して、約25μM)。

[0224] 実施例23 CH296-CH296-HTの作成

CH-296が2つ連結した改変型フィブロネクチンフラグメント(CH296-CH296-HT)を発現させるため、以下のようにして発現ベクターを構築した。

[0225] (1)CH296-CH296-HT発現ベクターの構築

(i)CH296-HT発現ベクターの構築

CH-296の塩基配列より、配列表の配列番号18記載の塩基配列を有する合成プライマーCH296-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CH296-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。

[0226] 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0.1μg、5μLの10×Ex Taq Buffer、5μL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50μLとした。前記反応液をTaKaRa PCR Thermal Cycler SPにセットし、94°C 1分、55°C 1分、72°C 3分を1サイクルとする30サイクルの反応を行なった。反応終了後、該反応液5μL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なった。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、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。

[0227] 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み換えプラスミドを、pColdI-CH296とした。

[0228] (ii) CH296-CH296-HT発現ベクターの構築

合成プライマーCH296-NdeF、合成プライマーH296-NdeR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-NdeR、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なった。

[0229] 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なった。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で消化し、目的の1.7kbpのDNA断片を1.0%アガロースゲル電気泳動により抽出精製した。

[0230] 次に、pColdI-CH296をNdeI消化し、末端を脱リン酸処理したものを調製し、上記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。

[0231] 目的のCH-296が2つ連結したタンパク質をコードするDNA断片が挿入されたプラスミドは、シーケンシングにより確認し、この組み換えプラスミドをpColdI-CH296-2とした。このpColdI-CH296-2は、CH-296のアミノ酸番号1~574のアミノ酸配列のN末端にメチオニンを付加したアミノ酸配列をコードする塩基配列が、間にアミノ酸“H”を挟んで2つ連結しそのN末端にHisタグ配列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CH296-CH296-HTと命名し、そのアミノ酸配列を配列表の配列番号19に、塩基配列を配列表の配列番号20に示す。

[0232] (2)CH296-CH296-HTの発現、精製

上記(1)で調製したpColdI-CH296-2を用いて大腸菌BL21を形質転換し、実施例22-(2)と同様にCH296-CH296-HTの発現、精製を行なった。得られた濃縮液をSDS-PAGEで解析したところ、分子量約128kDaの目的タンパク質がほぼ単一バンドとして検出された。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、3.1mg/mLであった(分子量から計算して、約24 μ M)。

[0233] 実施例24 H105-H105-HTの作成

(1)H105-H105-HT発現ベクターの構築

CH-296のアミノ酸配列のN末端側よりアミノ酸460~574(塩基番号1381~1725)よりなるポリペプチドをH-105とし、このH-105が2つ連結した改変型フィブロネクチンフラグメント(H105-H105-HT)を発現させるため、以下のようにして発現ベクターを構築した。

[0234] (i)H105-HT発現ベクターの構築

CH-296の塩基配列より、配列表の配列番号21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。

[0235] 上記合成プライマーと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(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H105-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なった。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なった。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、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。

[0236] 次にpColdIベクター(タカラバイオ社製)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み換えプラスミドは、シーケンシングにより確認し、この組み換えプラスミドをpColdI-H105とした。このpColdI-H105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。

[0237] (ii) H105-H105-HT発現ベクターの構築

H105-NdeF、H296-NdeR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H105-NdeF、10pmolの合成プライマーH296-NdeR、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°C 1分、55°C 1分、72°C 3分を1サイクルとする30サイクルの反応を行なった。

[0238] 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なった。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)で消化し、目的の0.35kbpのDNA断片を1.0%アガロースゲル電気泳動により抽出精製した。

[0239] 次に、pColdI-H105をNdeI消化し、末端を脱リン酸処理したものを調製し、上記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。

[0240] 目的のH-105が2つ重複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、シーケンシングにより確認し、この組み換えプラスミドをpColdI-H105-2とした。このpColdI-H105-2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が、間にアミノ酸“HM”を挟んで2つ連結しその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H105-H105-HTと命名し、そのアミノ酸配列を配列表の配列番号22に、塩基配列を配列表の配列番号23に示す。

[0241] (2)H105-H105-HTの発現、精製

上記(1)で調製したpColdI-H105-2を用いて大腸菌BL21を形質転換し、実施例22-(2)と同様にH105-H105-HTの発現、精製を行なった。なお、培養液、Binding Buffer、Washing BufferA、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SDS-PAGEで解析したところ、分子量約28kDaの目的タンパク質がほぼ単一バンドとして検出された。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、5.1mg/mLであった(分子量から計算して、約180 μ M)。

[0242] 実施例25 FNフラグメントを用いた特異的細胞傷害活性保持CTLの誘導

(1) 各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3種類のFNフラグメント(H296-H296、H296-H296-H296-HT、CH296-CH296-HT)をそれぞれ固定化した。すなわち、終濃度4~25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のFNフラグメントを含むPBSを24穴細胞培養プレートに1mL/ウェルずつ添加し、4°Cで一晩インキュベートした。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合わせるために使用するFNフラグメントの濃度を調整した。培養器材は使用前にPBSで2回洗浄したのちRPMI1640培地で1回洗浄し各実験に供した。

[0243] (2) 抗インフルエンザウイルス メモリーCTLの誘導

実施例2-(1)に記載した方法で分離、保存したPBMCを用い、実施例2-(3)と同様の方法で抗インフルエンザウイルス メモリーCTLの誘導を行なった。その際、プレートは実施例25-(1)で作製したものを使用した。H105-H105-HTについては、対照と同様に調製したウェルに終濃度0.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ になるように添加し、培養した(対照にはFNフラグメントを固定化していないプレートを使用)。14日間培養後の細胞増殖率を表21に示す。

[0244] [表21]

表 2 1

FNフラグメント	細胞増殖率 (倍)
対照 (FNフラグメント非固定化)	0.8
H296-H296	2.3
H296-H296-H296-HT	1.5
CH296-CH296-HT	2.3
H105-H105-HT	1.8

[0245] 細胞増殖率はCTL誘導開始時のレスポンドー細胞数に対する誘導終了時点での細胞数の比を増殖率として求めた。その結果、FNフラグメントを使用した群では使用していない対照群と比較して高い増殖率を示した。つまり、CTL誘導時にFNフラグメントを使用することで、細胞の増殖率を高めることが明らかとなった。

[0246] 実施例26 実施例25で得られたCTLのフィーダ細胞を用いた拡大培養

(1) 各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3種類のFNフラグメントを固定化した。すなわち、終濃度4~25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のFNフラグメントを含むPBSを12.5 cm^2 フラスコを立てたものに2.7mLずつ添加し、4°Cで一晩インキュベートした。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合わせるために使用するFNフラグメントの濃度を調整した。また、上記のフラスコは使用前にPBSで2回洗浄したのちRPMI1640培地で1回洗浄し各実験に供した。

[0247] (2) 実施例25で得られたCTLのフィーダ細胞を用いた拡大培養

実施例25-(2)で調製したCTLを実施例3-(2)に記載の方法で拡大培養を行った。その際、5HRPMI培地で培養し、フィーダ細胞には3ドナーを混合したものをを用いた。また、培養器材は実施例26-(1)の各FNフラグメント固定化フラスコを使用し、H105-H105-HTについては対照と同様に調製したフラスコに終濃度0.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ となるように添加し、培養した(対照については非固定化フラスコを使用)。結果を表22に示す。

[0248] [表22]

表22

FNフラグメント	細胞増殖率 (倍)	
	拡大培養時	誘導から
対照 (FNフラグメント非固定化)	258.0	197.2
H296-H296	313.3	712.5
H296-H296-H296-HT	250.0	363.1
CH296-CH296-HT	344.7	795.7
H105-H105-HT	254.7	464.3

[0249] 拡大培養時の増殖率は拡大培養開始時の細胞数に対する拡大培養終了時点の細胞数の比を増殖率として求め、誘導からの増殖率は誘導開始時のレスポンド細胞数に対する拡大培養終了時点の細胞数の比として求めた。その結果、CTL誘導時および拡大培養時にFNフラグメントを固定化あるいは溶液添加した群のCTLは、

FNフラグメントを使用しなかった対照群より高い増殖率を示した。つまり、CTL誘導時および拡大培養時にFNフラグメントを使用することで、細胞の増殖率を高めることが明らかとなった。

[0250] 実施例27 実施例26で得られたCTLの細胞傷害活性の測定

実施例26-(2)で得られたCTLを実施例4と同様の方法にてCTLの特異的細胞傷害活性を測定した。その際、HLA-A2保持Lymphoblast(細胞名 T2:ATCC CRL-1992)を用いてCalcein標識標的細胞を調製した。CTL拡大培養後細胞傷害活性結果を表23、活性維持効果を表24に示す。なお、細胞傷害活性維持効果については、E/T比3および1の2点について算出した。

[0251] [表23]

表23

	CTL拡大培養後細胞傷害活性 (%)			
	E/T比			
FNフラグメント	30	10	3	1
対照 (FNフラグメント非固定化)	77.8	75.7	39.0	12.2
H296-H296	90.6	85.5	62.7	34.0
H296-H296-H296-HT	83.4	80.3	56.7	22.5
CH296-CH296-HT	81.3	80.9	63.1	27.6
H105-H105-HT	86.0	84.0	65.3	36.5

[0252] [表24]

表24

	活性維持効果 (%)	
	E/T比	
FNフラグメント	3	1
対照 (FNフラグメント非固定化)	49.2	29.7
H296-H296	79.8	94.7
H296-H296-H296-HT	70.3	56.7
CH296-CH296-HT	87.3	92.1
H105-H105-HT	90.9	116.8

[0253] ペプチド非存在下で培養したCalcein標識標的細胞に対する細胞傷害活性はほぼ0%であり、非特異的な活性はないことを確認した。ペプチド存在下で培養したCalcein標識標的細胞に対する細胞傷害活性において、CTL誘導時および拡大培養時にFNフラグメントを使用した群については、14日間の拡大培養後においても特異的で高い細胞傷害活性を保持していた。一方、CTL誘導時および拡大培養時のどちらにもFNフラグメントを使用しなかった対照群では、その活性は、明らかに低下していた。つまり、FNフラグメントをCTL誘導時および拡大培養時に使用することにより、特異的で高い細胞傷害活性を長期的に保持した状態で、CTLの拡大培養が可能になることが明らかになった。

[0254] 実施例28 実施例26で得られたCTL細胞集団中におけるTCR Vβ17陽性CD8陽性細胞含有比率の測定

実施例26-(2)で調製した 2×10^5 cellsのCTLをPBSで洗浄し、1%BSAを含む15 μLのPBS中に懸濁し、ネガティブコントロールとしてFITC標識マウスIgG1/RD1標識マウスIgG1/PC5標識マウスIgG1あるいはFITC標識マウス抗ヒトTCR Vβ17抗体とRD1標識マウス抗ヒトCD8 (BECKMAN COULTER社製)を添加後、氷上で30分間インキュベートした。インキュベート後、細胞を0.1%BSAを含むPBSで2回洗浄し、0.1%BSAを含むPBSに懸濁した。この細胞をCytomics FC500を用いたフローサイトメトリーに供し、TCR Vβ17陽性CD8陽性細胞の含有率を測定した。測定結果を表25に示す。

[0255] [表25]

表 2 5

FNフラグメント	TCR Vβ17 ⁺ CD8 ⁺ (%)
対照 (FNフラグメント非固定化)	43.9
H296-H296	77.3
H296-H296-H296-HT	55.3
CH296-CH296-HT	71.7
H105-H105-HT	74.4

[0256] CTL誘導時および拡大培養時にFNフラグメントを使用したCTLは、使用しなかつ

た対照群と比較して高い陽性細胞含有率を示した。なお、誘導後のCTL、すなわち拡大培養前のTCR V β 17陽性CD8陽性細胞含有率は、FNフラグメントを使用した群については47.9%~63.8%、使用していない対照群については67.8%であった。つまり、CTL誘導時および拡大培養時にFNフラグメントを使用することで、抗インフルエンザウイルス メモリーCTLの含有率を高く保持したまま拡大培養が可能であることが認められた。

[0257] 実施例29 60mL採血を想定した実施例25で得られたCTLのフィーダ細胞を用いない拡大培養

(1) 抗CD3抗体と各FNフラグメントの固定化

以下のフィーダ細胞を用いないCTL拡大培養実験で使用する培養器材に抗CD3抗体と3種類のFNフラグメントを固定化した。すなわち、抗CD3抗体(終濃度5 μ g/mL)と、終濃度4~25 μ g/mLのFNフラグメントを含むPBSを48穴細胞培養プレート(Becton, Dickinson and Company社製)に375 μ L/ウェルずつ添加し、4°Cで一晩インキュベートした(対照には抗CD3抗体のみを固定化)。また、上記のプレートは使用前にPBSで2回洗浄したのちRPMI1640で1回洗浄した。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合わせるために使用するFNフラグメントの濃度を調整した。

[0258] (2) フィーダ細胞を用いないCTLの拡大培養

実施例25-(2)で調製したCTL 1×10^5 cellsを5HRPMI 600 μ Lに懸濁し、実施例29-(1)で作製した48穴培養プレートに入れ、37°C 湿式CO₂ インキュベーター中で培養を開始した。なお、H105-H105-HTについては対照と同様に調製したウェルに終濃度0.4 μ g/mLとなるように添加し、培養を開始した。この際、60mL採血から得られると予想されるPBMC 5×10^7 cellsを用いた培養スケールにおいて、誘導から拡大培養までのヒトAB型血清の使用量を最大30mL、RPMI培地使用量を最大12Lに制限して拡大培養を行なった。培養開始1日目に終濃度500U/mLとなるようにIL-2を添加、5日目以降は5HRPMIを0HRPMI(0%ヒトAB型血清、1mM ピルビン酸ナトリウム、2mM L-グルタミン、10mM HEPES、1%ストレプトマイシン-ペニシリンを含むRPMI1640培地)で適宜希釈した血清濃度の培地を

用いて固定化を行っていないプレートに継代し、終濃度500U/mLのIL-2を添加した。すなわち、培養開始後5日目には 1×10^5 cells/mL、8日目には 1.5×10^5 cells/mL、12日目には 3×10^5 cells/mLで継代を行った。この間ペプチドによる刺激はまったく付加せず、15日間拡大培養を行った。細胞増殖率を表26に示す。

[0259] [表26]

表 2 6

FNフラグメント	細胞増殖率 (倍)	
	拡大培養時	誘導から
対照 (FNフラグメント非固定化)	3. 2	2. 5
H 2 9 6 - H 2 9 6	1 2 8. 1	2 9 1. 5
H 2 9 6 - H 2 9 6 - H 2 9 6 - HT	1 0 5. 2	1 5 2. 8
CH 2 9 6 - CH 2 9 6 - HT	7 2. 1	1 6 6. 1
H 1 0 5 - H 1 0 5 - HT	3 6. 3	6 5. 5

[0260] 誘導時および拡大培養時にFNフラグメントを使用した群については、使用していない対照群と比較して高い増殖率を示した。つまり、誘導時および拡大培養時にFNフラグメントを使用することで、フィーダ細胞を用いずにCTLの拡大培養が可能となり、その効果が最も高いFNフラグメントはH296-H296であることが示された。

[0261] 実施例30 実施例29のCTLの細胞傷害活性の測定

実施例29-(2)で得られたCTLを実施例27と同様の方法にてCTLの特異的細胞傷害活性を測定した。CTL拡大培養後細胞傷害活性結果を表27、活性維持効果を表28に示す。なお、細胞傷害活性結果についてはE/T比30について試験を行わず、細胞傷害活性維持効果については、E/T比3および1の2点について算出した。

[0262] [表27]

表27

FNフラグメント	CTL拡大培養後細胞傷害活性 (%)		
	E/T比		
	10	3	1
対照 (FNフラグメント非固定化)	n. t.	n. t.	10.6
H296-H296	83.1	57.3	27.1
H296-H296-H296-HT	67.6	34.4	15.7
CH296-CH296-HT	60.7	32.8	14.1
H105-H105-HT	83.5	66.0	36.9

n. t. = not tested

[0263] [表28]

表28

FNフラグメント	活性維持効果 (%)	
	E/T比	
	3	1
対照 (FNフラグメント非固定化)	n. t.	25.8
H296-H296	73.0	75.3
H296-H296-H296-HT	42.7	39.5
CH296-CH296-HT	45.3	47.2
H105-H105-HT	91.9	118.3

n. t. = not tested

[0264] ペプチド非存在下で培養したCalcein標識標的細胞に対する細胞傷害活性はほぼ0%であり、非特異的な活性はないことを確認した。ペプチド存在下で培養したCalcein標識標的細胞に対する細胞傷害活性について、誘導時および拡大培養時にFNフラグメントを使用した群のCTLは、対照群と比較して、15日間の拡大培養後においても特異的で高い細胞傷害活性を保持していた。つまり、FNフラグメントをCTL誘導時および拡大培養時に使用することにより、特異的で高い細胞傷害活性を長期的に保持した状態で、フィーダ細胞を用いない方法で拡大培養が可能であり、その効果が高いFNフラグメントはH296-H296、H105-H105-HTであることが明らか

になった。

[0265] 実施例31 実施例29で得られたCTL細胞集団中におけるTCR V β 17陽性細胞含有比率の測定

実施例29-(2)で調製した 2×10^5 cellsのCTLを実施例28と同様の方法にてTCR V β 17陽性CD8陽性細胞含有比率の測定を行った。結果を表29に示す。

[0266] [表29]

表29

FNフラグメント	TCR V β 17+CD8+ (%)
対照 (FNフラグメント非固定化)	19.9
H296-H296	81.9
H296-H296-H296-HT	25.4
CH296-CH296-HT	22.9
H105-H105-HT	80.9

[0267] FNフラグメントを誘導時および拡大培養時に使用した群において、高い陽性細胞含有比率を示した。なお、誘導後のCTL、すなわち拡大培養前のTCR V β 17陽性CD8陽性細胞含有率は、FNフラグメントを使用した群については47.9%~63.8%、使用していない対照群については67.8%であった。つまり、FNフラグメントを誘導時および拡大培養時に使用することにより、フィーダ細胞を用いない系で、抗インフルエンザウイルスメモリーCTL含有比率を高く保持したまま拡大培養が可能であることが認められ、特にH296-H296とH105-H105-HTが有効であることが示された。

[0268] 実施例32 各FNフラグメントを用いたリンパ球(リンフォカイン活性化細胞)拡大培養(1)抗ヒトCD3抗体および3種のFN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抗体および3種類のFNフラグメント(H296-H296、H296-H296-H296-HT、CH296-CH296-HT)をそれぞれ固定化した。すなわち12穴細胞培養プレートに抗ヒトCD3抗体(終濃度 $5 \mu\text{g}/\text{mL}$)と終濃度 $2 \sim 4 \mu\text{g}/\text{mL}$ のFNフラグメントを含むPBSを $1.9 \text{mL}/\text{ウェル}$ ずつ

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合わせるために使用するFNフラグメントの濃度を調整した。これらの培養器材を室温で5時間インキュベート後、使用時まで4°Cに保存した。使用直前にはこれらの培養器材から抗体・FNフラグメントを含むPBSを吸引除去後、各ウェルをPBSで2回、RPMI培地で1回洗浄し各実験に供した。

[0269] (2)リンパ球の拡大培養

0.5% human 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0.5% GT-T503と略す) に 0.25×10^6 cells/mL となるように実施例21-(1)で調製したPBMCを懸濁後、実施例32-(1)で調製した抗ヒトCD3抗体固定化プレート、または抗ヒトCD3抗体およびFNフラグメント固定化プレートに0.5% GT-T503を0.5 mL/ウェルで添加しておき、細胞液を1 mL/ウェルずつ添加した。H105-H105-HTは、対照と同様に調製したウェルに終濃度 $0.67 \mu\text{g/mL}$ になるように直接添加した。続いて終濃度 1000U/mL となるようにIL-2を添加し、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4日目に、各群の培養液を0.5% GT-T503を用いて8倍希釈し、希釈液6 mLを何も固定化していない12.5 cm²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。培養を継続し、7日目には各群の培養液を0.5% GT-T503を用いて4.2倍希釈し、希釈液12.6 mLを何も固定化していない新しい25 cm²細胞培養フラスコを立てたものに移し、いずれも終濃度 500U/mL となるようにIL-2を添加した。培養開始後11日目には、0.2% ヒト血清アルブミンを含む無血清GT-T503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25 cm²細胞培養フラスコを立てたものに希釈量12.6 mLをそれぞれ移した。各群において終濃度 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。結果を表30に示す。

[0270] [表30]

表30

FNフラグメント	拡大培養率 (倍率)
対照 (FNフラグメント非固定化)	172
H296-H296	514
H296-H296-H296-HT	477
CH296-CH296-HT	437
H105-H105-HT	408

[0271] 表30に示されるように、リンパ球拡大培養初期にFNフラグメントを固定化した培養器材を使用した群、もしくは培養液に直接溶液添加した群は、対照群と比較して高い拡大培養率が得られた。つまり、4種のFNフラグメント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。

[0272] 実施例33 CD45RA陽性CCR7陽性細胞、CD27陽性細胞、CD28陽性細胞の解析

実施例32-(2)で調製した細胞をPBS、1%BSA/PBSで洗浄した。1%BSAを含むPBS中に細胞を懸濁し、ネガティブコントロールとしてFITC標識マウスIgG1/RD1標識マウスIgG1/PC5標識マウスIgG1 (BECKMAN COULTER社製)を添加した。同様に、RD1標識マウス抗ヒトCD45RA抗体 (BECKMAN COULTER社製)/FITC標識マウス抗ヒトCCR7抗体 (R&D Systems社製)を添加した細胞、RD1標識マウス抗ヒトCD27抗体 (BECKMAN COULTER社製)/FITC標識マウス抗ヒトCD28抗体 (eBioscience社製)を添加した細胞を用意した。各々の抗体を添加後、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に供し、各々の細胞集団について、CD45RA陽性CCR7陽性細胞、CD27陽性細胞、CD28陽性細胞の割合を算出した。結果を表31、表32、表33に示す。

[0273] [表31]

表31

FNフラグメント	CD45RA ⁺ CCR7 ⁺ (%)
対照(FNフラグメント非固定化)	21.2
H296-H296	71.9
H296-H296-H296-HT	70.8
CH296-CH296-HT	68.3
H105-H105-HT	73.5

[0274] [表32]

表32

FNフラグメント	CD27 ⁺ (%)
対照(FNフラグメント非固定化)	54.1
H296-H296	88.5
H296-H296-H296-HT	90.0
CH296-CH296-HT	89.3
H105-H105-HT	87.8

[0275] [表33]

表33

FNフラグメント	CD28 ⁺ (%)
対照(FNフラグメント非固定化)	80.1
H296-H296	96.0
H296-H296-H296-HT	96.5
CH296-CH296-HT	96.4
H105-H105-HT	94.2

[0276] 表31、表32、表33に示されるように、リンパ球拡大培養初期にFNフラグメントを固定化した培養器材を使用した群、もしくは培養液に直接溶液添加した群においては、対照群と比較して、CD45RA⁺CCR7⁺細胞集団、CD27⁺細胞集団、CD28⁺細胞集団が高い結果が得られた。これらは、いずれもナイーブT細胞で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。当該実施例

より、4種のFNフラグメント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。

[0277] 実施例34 H-296の固定化緩衝液の検討

pH3.8から0.6毎にpH8.0までの0.2M リン酸緩衝液または0.2M 酢酸緩衝液を25および50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ に調製したH-296を96穴細胞培養プレートの各ウェルにそれぞれ添加し、5時間室温で固定化した。PBSで3回洗浄後、PBSを用いて4倍希釈したBlock Ace(大日本製薬社製)を各ウェルに添加し、1時間室温で静置した。PBSで3回洗浄し、HRP標識したFNH3-8抗体(タカラバイオ社製)を各ウェルに添加して、1時間室温で静置したのち、PBSで3回洗浄した。このプレートをABTS(SIGMA社製)を用いて発色し、405nmの吸光度を測定することで固定化率を評価した。なお、FNH3-8抗体はフィブロネクチンの部分領域であるIII-12を特異的に認識する抗体である(図1参照)。結果を表34に示す。

[0278] [表34]

表34

pH	緩衝液	405nm	
		25 $\mu\text{g}/\text{mL}$	50 $\mu\text{g}/\text{mL}$
8.0	リン酸緩衝液	0.104	0.174
7.4	リン酸緩衝液	0.080	0.169
6.8	リン酸緩衝液	0.075	0.167
6.2	リン酸緩衝液	0.131	0.244
5.6	酢酸緩衝液	0.475	0.567
5.0	酢酸緩衝液	0.392	0.451
4.4	酢酸緩衝液	0.428	0.379
3.8	酢酸緩衝液	0.243	0.213

[0279] 表34より、H-296はリン酸緩衝液よりもpHの低い酢酸緩衝液を使用した方が培養プレートへの固定化効率が高く、pH5.6酢酸緩衝液を用いて固定化した場合に高い固定化率を示すことが明らかとなった。

[0280] 実施例35 H-296、H296-H296の固定化量の比較

0. 2M 酢酸緩衝液 (pH5. 6) (以下、pH5. 6酢酸緩衝液と記載)を用いて段階希釈したH-296と、PBS (pH7. 4)を用いて段階希釈したH296-H296を96穴細胞培養プレートにそれぞれ固定化し、5時間静置した。このプレートのFNフラグメント固定化量を実施例34と同様の方法で測定した。結果を表35に示す。

[0281] [表35]

表 3 5

FN f r 濃度 (μ g / mL)	4 0 5 n m	
	H - 2 9 6 (pH 5 . 6 酢酸緩衝液)	H 2 9 6 - H 2 9 6 (P B S)
2 0 0	0 . 9 6 4	
1 0 0	0 . 4 9 9	
5 0	0 . 3 0 4	
2 5	0 . 2 2 4	2 . 0 2 2
1 2 . 5	0 . 2 7 7	1 . 7 3 1
6 . 2 5	0 . 2 2 1	1 . 2 9 1
3 . 1 2 5		1 . 0 1 0
1 . 5 6 3		0 . 7 3 2

[0282] その結果、H296-H296はH-296と比べて培養プレートへの固定化効率が極めて高く、また、pH5. 6酢酸緩衝液を用いたH-296 200 μ g/mLの固定化量と、PBSを用いたH296-H296 約3 μ g/mLの固定化量は、重量比ではほぼ一致することが示された。

[0283] 実施例36 培養器材への固定化量を合わせたH-296、H296-H296を用いた特異的細胞傷害活性保持CTLの誘導

(1) 各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2種類のFNフラグメント(H-296、H296-H296)をそれぞれ固定化した。すなわち、表36に示した終濃度のFNフラグメントを含むpH5. 6酢酸緩衝液あるいはPBSを24穴細胞培養プレートに1mL/ウェルずつ添加し、4°Cで一晩インキュベートした。培養器材は使用前にPBSで2回洗浄したのちRPMI1640培地で1回洗浄し各実験に供した。

[0284] [表36]

表36

FNフラグメント	固定化緩衝液	終濃度
H-296	pH5.6酢酸緩衝液	200 μ g/mL
H296-H296	PBS	3 μ g/mL

[0285] なお、前述の実施例35より、上記の終濃度200 μ g/mL H-296を用いた培養プレートへの固定化量は、終濃度3 μ g/mL H296-H296を用いたものと同等である。

[0286] (2)抗インフルエンザウイルス メモリーCTLの誘導

実施例2-(1)に記載した方法で分離、保存したPBMCを用い、実施例2-(3)と同様の方法で抗インフルエンザウイルス メモリーCTLの誘導を行った。その際、プレートは実施例36-(1)で作製したものを使用した(対照にはFNフラグメントを固定化していないプレートを使用)。14日間培養後の細胞増殖率を表37に示す。

[0287] [表37]

表37

FNフラグメント	細胞増殖率(倍)
対照(FNフラグメント非固定化)	1.2
H-296(200 μ g/mL)	1.5
H296-H296(3 μ g/mL固定化)	2.1

[0288] 細胞増殖率はCTL誘導開始時のレスポンドー細胞数に対する誘導終了時点での細胞数の比を増殖率として求めた。その結果、FNフラグメントを使用した群では使用していない対照群と比較して高い増殖率を示した。つまり、CTL誘導時にFNフラグメントを使用することで、細胞の増殖率を高めることが明らかとなった。また、H-296(200 μ g/mL)とH296-H296(3 μ g/mL)では、プレートへの固定化量は同量であるにもかかわらず、H296-H296(3 μ g/mL)の方が細胞増殖率が高かった。

[0289] 実施例37 30mL採血を想定した実施例36のCTLのフィーダ細胞を用いないCTL

の拡大培養

(1) 抗CD3抗体と各FNフラグメントの固定化

以下のフィーダ細胞を用いないCTL拡大培養実験で使用する培養器材に抗CD3抗体と2種類のFNフラグメントを固定化した。すなわち、抗CD3抗体(終濃度 $5 \mu\text{g}/\text{mL}$)と表36に示した濃度のFNフラグメントを含むpH5.6酢酸緩衝液またはPBSを96穴細胞培養プレートに $160 \mu\text{L}/\text{ウェル}$ ずつ添加し、 4°C で一晩インキュベートした(対照には抗CD3抗体のみを固定化)。また、上記のプレートは使用前にPBSで2回洗浄したのちRPMI1640で1回洗浄した。

[0290] (2) フィーダ細胞を用いないCTLの拡大培養

実施例36-(2)で調製したCTL 1×10^5 cellsを実施例15-(2)と同様の方法で拡大培養を行なった。この際、実施例37-(1)で作製した96穴培養プレートを使用し、5HRPMIを用いて培養を開始した。培養開始1日目に終濃度 $500 \text{U}/\text{mL}$ となるようにIL-2を添加、5日目以降は5HRPMIを0HRPMIで適宜希釈した血清濃度の培地を用いて固定化を行っていないプレートに継代し、終濃度 $500 \text{U}/\text{mL}$ のIL-2を添加した。すなわち、培養開始後5日目には 0.75×10^5 cells/ mL 、8日目には 1.5×10^5 cells/ mL 、12日目には 3×10^5 cells/ mL で継代を行った。この間ペプチドによる刺激はまったく付加せず、15日間拡大培養を行った。細胞増殖率を表38に示す。

[0291] [表38]

表38

FNフラグメント	細胞増殖率 (倍)	
	拡大培養時	誘導から
対照 (FNフラグメント非固定化)	3.8	4.7
H-296 ($200 \mu\text{g}/\text{mL}$)	27.6	41.9
II296-H296 ($3 \mu\text{g}/\text{mL}$)	73.2	150.4

[0292] 誘導時および拡大培養時にFNフラグメントを使用した群については、使用していない対照群と比較して高い増殖率を示した。つまり、誘導時および拡大培養時にFNフラグメントを使用することで、フィーダ細胞を用いずにCTLの拡大培養が可能とな

った。また、H-296 (200 μg/mL)とH296-H296 (3 μg/mL)では、プレートへの固定化量は同量であるにもかかわらず、H296-H296 (3 μg/mL)の方が極めて高い細胞増殖率を示した。

[0293] 実施例38 実施例37のCTLの細胞傷害活性の測定

実施例37-(2)で得られたCTLを実施例27と同様の方法にてCTLの特異的細胞傷害活性を測定した。CTL拡大培養後細胞傷害活性結果を表39、活性維持効果を表40に示す。なお、細胞傷害活性結果のE/T比30については試験を行わず、細胞傷害活性維持効果については、E/T比3および1の2点について算出した。

[0294] [表39]

表39

	CTL拡大培養後細胞傷害活性 (%)		
	E/T比		
FNフラグメント	10	3	1
対照 (FNフラグメント非固定化)	n. t.	n. t.	2.9
H-296	18.5	7.8	6.0
H296-H296 (3 μg/mL)	55.7	24.0	9.9

n. t. =not tested

[0295] [表40]

表40

	活性維持効果 (%)	
	E/T比	
FNフラグメント	3	1
対照 (FNフラグメント非固定化)	n. t.	9.6
H-296	12.5	20.1
H296-H296 (3 μg/mL)	41.2	34.4

n. t. =not tested

[0296] ペプチド非存在下で培養したCalcein標識標的細胞に対する細胞傷害活性はほぼ0%であり、非特異的な活性はないことを確認した。ペプチド存在下で培養したCalcein標識標的細胞に対する細胞傷害活性について、誘導時および拡大培養時にF

Nフラグメントを使用した群のCTLは、対照群と比較して、15日間の拡大培養後においても特異的で高い細胞傷害活性を保持していた。つまり、FNフラグメントをCTL誘導時および拡大培養時に使用することにより、特異的で高い細胞傷害活性を長期的に保持した状態で、フィーダ細胞を用いない方法で拡大培養が可能であり、その効果が高いFNフラグメントはH296-H296であることが明らかになった。

[0297] 実施例39 H296-H296-HTの作成

(1) H296-H296-HT発現ベクターの構築

H-296が2つ連結した改変型フィブロネクチンフラグメント(H296-H296-HT)を発現させるため、以下のようにして発現ベクターを構築した。

[0298] (i) pT7-H296ベクターの構築

CH-296の塩基配列(配列表の配列番号8)より、配列表の配列番号24記載の塩基配列を有する合成プライマーCS1-NdeRをDNA合成機で合成し、常法により精製した。合成プライマーCS1-NdeRは、制限酵素NdeIの認識配列を塩基番号4~9に、さらにCH-296のアミノ酸配列(配列表の配列番号7)のアミノ酸番号574~569に相当する塩基配列を塩基番号10~27にもつ合成DNAである。

[0299] 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22-(1)-(i)で構築したpColdI-H296 約0.1 μ g、10 μ Lの10 \times Ex Taq 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-NdeR、1UのTaKaRa Ex Taq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、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なった。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反応液を電気泳動し、そのフラグメントを回収・精製した。

[0300] 次にpT7Blue T-vector(Novagen(メルク社)、タカラバイオ社製)と、上記DNA断片を混合し、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み換えプラスミドを、pT7-H296とした。

[0301] (ii) H296-H296-HT発現ベクターの構築

pT7-H296をNdeI消化して、約0.9kbpのDNAフラグメントを1.0%アガロースゲル電気泳動により回収、精製した。次に、実施例22-(1)-(i)で構築したpColdI-H296をNdeI消化し、末端を脱リン酸化処理したものを調製し、上記約0.9kbpのDNAフラグメントと混合、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。

[0302] 目的のH-296が2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、この組み換えプラスミドをpColdI-H296-2とした。このpColdI-H296-2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が、間にアミノ酸“H”を挟んで2つ連結しそのN末端にHisタグ配列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H296-H296-HTと命名し、そのアミノ酸配列を配列表の配列番号25に、塩基配列を配列表の配列番号26に示す。

[0303] (2) H296-H296-HT発現、精製

実施例39-(1)-(ii)で調製したpColdI-H296-2を用いて大腸菌BL21を形質転換し、実施例22-(2)と同様にH296-H296-HTの発現、精製を行なった。なお、培養液、Binding Buffer、Washing BufferA、Washing BufferB、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(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67kDa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、1.3mg/mLであった(分子量から計算して、約19 μ M)。

[0304] 実施例40 H296-H296-H296の作成

(1) H296-H296-H296-HT発現、精製

実施例22-(1)-(ii)で調製したpColdI-H296-3を用いて大腸菌BL21を形質転換し、実施例22-(2)と同様にH296-H296-H296-HTの発現、精製を

行なった。なお、培養液、Binding Buffer、Washing BufferA、Washing BufferB、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99kDa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、3.7mg/mLであった(分子量から計算して、約37 μ M)。

[0305] (2)H296-H296-H296の精製

次に、Factor Xa Cleavage Capture Kit(メルク社製)を用いて、実施例40- (1)で精製したH296-H296-H296-HT精製タンパク質3mg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タグの切断およ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2100 Bioanalyzerで解析したところ、分子量約97kDa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、0.65mg/mLであった(分子量から計算して、約6.7 μ M)。H296-H296-H296のアミノ酸配列を配列表の配列番号27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28に示す。

[0306] 実施例41 H105-H105の作成

(1)H105-H105-HTの発現、精製

実施例24-(2)と同様の方法でH105-H105-HTの発現、精製を行なった。得られた濃縮液を2100 Bioanalyzerで解析したところ、分子量約28kDa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、1.25mg/mLであった(分子量から計算して、約45 μ M)。

[0307] (2)H105-H105の精製

Factor Xa Cleavage Capture Kitを用いて、実施例40-(2)と同様に上記のH105-H105-HT精製タンパク質3mg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タグの切断およ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2100 Bioanalyzerで解析したところ、分子量約26kDa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、0.42mg/mLであった(分子量から計算し

て、約 $16 \mu\text{M}$)。H105-H105のアミノ酸配列を配列表の配列番号29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30に示す。

[0308] 実施例42 抗CD3抗体、抗CD28抗体およびFNフラグメント(H296-H296-HT、H296-H296-H296-HT、H105-H105-HT、H296-H296、H296-H296-H296、H105-H105)を用いたリンパ球(リンフォカイン活性化細胞)の拡大培養

(1)抗ヒトCD3抗体、抗ヒトCD28抗体、および6種の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、抗ヒトCD28抗体および6種のFNフラグメント(H296-H296-HT、H296-H296-H296-HT、H105-H105-HT、H296-H296、H296-H296-H296、H105-H105)を固定化した。すなわち12穴細胞培養プレート(コーニング社製)に抗ヒトCD3抗体(終濃度 $5 \mu\text{g}/\text{mL}$)抗ヒトCD28抗体(ダコ・ジャパン社製、終濃度 $5 \mu\text{g}/\text{mL}$)および終濃度 $1 \sim 25 \mu\text{g}/\text{mL}$ のFNフラグメントを含むACD-A液(pH5.0)を $0.45\text{mL}/\text{ウェル}$ ずつ添加した。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合わせるために調整した。この時、FNフラグメントとして実施例39で調製したH296-H296-HT、実施例22で調製したH296-H296-H296-HT、実施例24で調製したH105-H105-HT、実施例1で調製したH296-H296、実施例40で調製したH296-H296-H296、実施例41で調製したH105-H105を使用した。これらの培養器材を室温で5時間インキュベートした。使用直前にはこれらの培養器材から抗体およびFNフラグメントを含むACD-A液(pH5.0)を吸引除去後、各ウェルをPBSで2回、RPMI培地で1回洗浄し各実験に供した。

[0309] (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2-(1)で調製したPBMCを懸濁後、実施例42-(1)で調製した抗ヒトCD3抗体・抗ヒトCD28抗体固定化プレート、または抗ヒトCD3抗体・抗ヒトCD28抗体およびFNフラグメント固定化プレートに 0.5% GT-T503を $1.0\text{mL}/\text{ウェル}$ で添加しておき、細胞液を $0.5\text{mL}/\text{ウェル}$ 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25cm²細胞培養フラスコを立てたものに移し、終濃度500U/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500U/mLとなるようにIL-2を添加した。培養開始後11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41に示す。

[0310] [表41]

表41

FNフラグメント	拡大培養率 (倍率)
対照(FNフラグメント非固定化)	367
H296-H296-HT	402
H296-H296	434
H296-H296-H296-HT	463
H296-H296-H296	392
H105-H105-HT	490
H105-H105	496

[0311] 表41に示されるように、リンパ球拡大培養初期にFNフラグメントを固定化した培養器材を使用した群は、対照群と比較して高い拡大培養率が得られた。つまり、6種のFNフラグメントは抗CD3抗体、抗CD28抗体刺激と組み合わせたリンパ球拡大培養時においても好適に使用されることが明らかとなった。

[0312] 実施例43 各FNフラグメント(H296-H296-HT、H296-H296)を用いて培養したリンパ球(リンフォカイン活性化細胞)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
(1)抗ヒトCD3抗体および2種の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実施例42-(1)と同様の方法で抗ヒトCD3抗体および2種のFNフラグメント(H296-H296-HT、H296-H296)を固定化した。この際、抗ヒトCD28抗体は添加しなかった。ただし、FNフラグメントは終濃度1

～3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ となるようにACD-A液(pH5.0)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。この時、FNフラグメントとして実施例39で調製したH296-H296-HT、実施例1で調製したH296-H296を使用した。

[0313] (2)リンパ球の拡大培養

実施例42-(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0日目には、実施例43-(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・FNフラグメント固定化プレートを使用し、ただし、培養開始11日目には0.2%ヒト血清アルブミンを含む無血清GT-T503を用いて、各群の細胞培養液を2倍希釈後、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。結果を表42に示す。

[0314] [表42]

表42

FNフラグメント	拡大培養率 (倍率)
対照 (FNフラグメント非固定化)	1.29
H296-H296-HT	3.42
H296-H296	2.01

[0315] 表42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(H296-H296-HT、H296-H296)を固定化した培養器材を使用した群は、対照群と比較して高い拡大培養率が得られた。

[0316] (3)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43-(2)で調製した細胞について実施例33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った。ただし、解析時にはRD1標識マウス抗ヒトCD45RA抗体/FITC標識マウス抗ヒトCCR7抗体/PC5標識マウス抗ヒトCD62L抗体(いずれもBECKMAN COULTER社製)を添加した。この細胞をフローサイトメトリ

一に供し、各々の細胞集団について、CD45RA陽性CCR7陽性細胞、CD45RA陽性CD62L陽性細胞、CD45RA陽性CCR7陽性CD62L陽性細胞の割合を算出した。結果を表43に示す。

[0317] [表43]

表43

FNフラグメント	CD45RA ⁺	CD45RA ⁺	CD45RA ⁺
	CCR7 ⁺	CD62L ⁺	CCR7 ⁺
	(%)	(%)	CD62L ⁺
			(%)
対照	27.8	53.9	24.2
(FNフラグメント非固定化)			
H296-H296-HT	58.5	80.1	56.9
H296-H296	57.8	80.9	57.1

[0318] 表43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(H296-H296-HT、H296-H296)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。当該実施例より、2種のFNフラグメント(H296-H296-HT、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。

[0319] 実施例44 抗CD3抗体およびFNフラグメント(H296-H296-HT、H296-H296、H296-H296-H296-HT、H296-H296-H296)を用いたリンパ球(リンフォカイン活性化細胞)の拡大培養

(1) 抗ヒトCD3抗体および4種の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抗体および4種のFNフラグメント(H296-H296-HT、H296-H296、H296-H296-H296-HT、H296-H296-H296)を実施例43-(1)と同様の方法で固定化した。ただし、固定化の際の緩衝液はACD-A液(pH5.0)を使用し、FNフラグメントは終濃度1~25 μg/mLとなるように添加した。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。この時、FNフラグメントとして実施例

39で調製したH296-H296-HT、実施例1で調製したH296-H296、実施例22で調製したH296-H296-H296-HT、実施例40で調製したH296-H296-H296を使用した。

[0320] (2)リンパ球の拡大培養

実施例43-(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0日目には、実施例44-(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・FNフラグメント固定化プレートを使用し、H296-H296-HT、H296-H296については、対照と同様に調製したウェルに終濃度0.67 μg/mLとなるように直接添加する群も設定した。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。結果を表44に示す。

[0321] [表44]

表44

FNフラグメント	固定化または直接添加	拡大培養率 (倍率)
対照 (FNフラグメント非固定化または無添加)		395
H296-H296-HT	固定化	603
H296-H296	固定化	641
H296-H296-H296-HT	固定化	528
H296-H296-H296	固定化	420
H296-H296-HT	直接添加	545
H296-H296	直接添加	441

[0322] 表44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(H296-H296-HT、H296-H296、H296-H296-H296-HT、H296-H296-H296)を固定化した培養器材を使用した群は、対照群と比較して高い拡大培養率が得られた。またFNフラグメント(H296-H296-HT、H296-H296)を培地中に直接添加した群においても対照群と比較して高い拡大培養率が得られた。つまり、4種のFNフラグメント(H296-H296-HT、H296-H296、H296-H296-H296-HT、H296-H296-H296)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。

[0323] (3)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44-(2)で調製した細胞について実施例43-(3)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った。結果を表45に示す。

[0324] [表45]

表 4 5

FNフラグメント	固定化	CD45RA ⁺	CD45RA ⁺	CD45R ⁺
	または 直接添加	CCR7 ⁺ (%)	CD62L ⁺ (%)	CCR7 ⁺ CD62L ⁺ (%)
対照 (FNフラグメント非固定化または無添加)		29.1	63.8	27.2
H296-H296-HT	固定化	76.2	92.5	75.4
H296-H296	固定化	81.2	95.9	80.9
H296-H296-H296-HT	固定化	76.8	95.4	76.5
H296-H296-H296	固定化	79.1	95.5	79.0
H296-H296-HT	直接添加	61.9	93.6	61.1
H296-H296	直接添加	62.2	92.6	61.4

[0325] 表45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(H296-H296-HT、H296-H296、H296-H296-H296-HT、H296-H296-H296)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。またFNフラグメント(H296-H296-HT、H296-H296)を培地中に直接添加した群においても同様に高い比率が得られた。当該実施例より、4種のFNフラグメント(H296-H296-HT、H296-H296、H296-H296-H296-HT、H296-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。

[0326] 実施例45 H271-H296の作成

(1)H271-H296発現ベクターの構築

H-271とH-296が連結した改変型フィブロネクチンフラグメント(H271-H296)を発現させるため、以下のようにして発現ベクターを構築した。

[0327] (i) pCold14-H271-H296ベクターの構築

CH-296の塩基配列(配列表の配列番号8)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H271-NcoR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H271-NcoR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7)のアミノ酸番号549~544に相当する塩基配列を塩基番号17~34にもつ合成DNAである。上記合成プライマーと配列表の配列番号12記載の合成プライマーNC2-5' UTRを用いてPCRを行った。PCRの反応条件を以下に示す。

[0328] すなわち、鋳型DNAとして実施例1-(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NC2-5' UTR、20pmolの合成プライマーH271-NcoR、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 $^{\circ}$ C 1分、68 $^{\circ}$ C 4分を1サイクルとする30サイクルの反応を行なった。

[0329] 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反応液を回収・精製し、エタノール沈殿を行なった。エタノール沈殿後の回収DNAを滅菌水に懸濁、全量50 μ Lとした反応液で制限酵素NcoI消化し、1.0%アガロースゲル電気泳動によりそのNcoI、NcoI消化物を抽出精製し、約0.8kbpのNcoI-NcoI消化DNA断片を得た。

[0330] 次に、pCold14-H296をNcoI消化し、末端を脱リン酸化処理したものを調製し、上記約0.8kbpのDNAフラグメントと混合、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。

[0331] 目的のH-271と、H-296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、この組み換えプラスミドをpCold14-H271-H296とした。このpCold14-H271-H296は、CH-296のアミノ酸番号278-549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278-574のアミノ酸配列をコードする塩基配列が間にアミノ酸“A”を挟んで連結したプラスミドである。当該タンパク質をH271-H296と命名し、そのアミノ酸配列を配列表の配列番号32に、塩基配列を配列表の配列番号33に示す。

[0332] (2)H271-H296発現、精製

上記(1)で調製したpCold14-H271-H296を用いて大腸菌BL21を形質転換し、実施例1-(2)と同様にH271-H296の発現、精製を行なった。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62kDaの目的タンパク質がほぼ単一バンドで検出され、これをH271-H296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、1.6mg/mLであった(分子量から計算して、約25.8 μ M)。なお、N末端はメチオニン消化されてAlaとなることが予想される。

[0333] 実施例46 H296-H271の作成

(1)H296-H271発現ベクターの構築

H-296とH-271が連結した改変型フィブロネクチンフラグメント(H296-H271)を発現させるため、以下のようにして発現ベクターを構築した。

[0334] (i) pCold14-H271ベクターの構築

CH-296の塩基配列(配列表の配列番号8)より、配列表の配列番号34及び35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7)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。

[0335] 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pCold14-H296 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°C 10秒、68°C 1分を1サイクルとする30サイクルの反応を行なった。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反応液を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。

[0336] 次にpCold14ベクターをNcoI、BamHIで消化したものを調製し、上記NcoI-BamHI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み換えプラスミドを、pCold14-H271とした。

[0337] (ii) H296-H271発現ベクターの構築

次に、配列表の配列番号11記載の塩基配列を有する合成プライマーH296-NcoRと配列表の配列番号12記載の合成プライマーNC2-5' UTRを用いてPCRを行った。PCRの反応条件を以下に示す。

[0338] すなわち、鋳型DNAとして実施例1-(1)-(i)で構築したpCold14-H296 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NC2-5' UTR、20pmolの合成プライマーH296-NcoR、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°C 1分、68°C 4分を1サイクルとする30サイクルの反応を行なった。

- [0339] 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反応液を回収し、エタノール沈殿を行なった。エタノール沈殿後の回収DNAを滅菌水に懸濁、全量50 μ Lとした反応液で制限酵素NcoI消化し、1.0%アガロースゲル電気泳動によりそのNcoI、NcoI消化物を抽出精製し、NcoI-NcoI消化DNA断片を得た。
- [0340] 次に、実施例46-(1)-(i)で構築したpCold14-H271をNcoI消化し、末端を脱リン酸化処理したものを調製し、上記約0.9kbpのDNAフラグメントと混合、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。
- [0341] H-296とH-271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、この組み換えプラスミドをpCold14-H296-H271とした。このpCold14-H296-H271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とCH-296のアミノ酸番号278-549のアミノ酸配列をコードする塩基配列の間にアミノ酸“A”を挟んで連結したプラスミドである。当該タンパク質をH296-H271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。
- [0342] (2)H296-H271発現、精製
- 上記(1)で調製したpCold14-H296-H271を用いて大腸菌BL21を形質転換し、実施例1-(2)と同様にH296-H271の発現、精製を行なった。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62kDa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-H271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、1.1mg/mLであった(分子量から計算して、約17.7 μ M)。なお、N末端はメチオニン消化されてAlaとなることが予想される。
- [0343] 実施例47 抗CD3抗体およびFNフラグメント(H271-H296、H296-H271)を用いたリンパ球(リンフォカイン活性化細胞)の拡大培養

(1) 抗ヒトCD3抗体および2種の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抗体および2種のFNフラグメント(H271-H296、H296-H271)を実施例43-(1)と同様の方法で固定化した。ただし、固定化の際の緩衝液はACD-A液(pH5.0)またはPBSを使用し、FNフラグメントは終濃度11~16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ となるように添加した。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。この時、FNフラグメントとして実施例45で調製したH271-H296、実施例46で調製したH296-H271を使用した。

[0344] (2) リンパ球の拡大培養

実施例43-(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0日目には、実施例47-(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・FNフラグメント固定化プレートを使用し、培養は15日間とした。培養開始後15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。結果を表46に示す。

[0345] [表46]

FNフラグメント	拡大培養率 (倍率)
対照 (FNフラグメント非固定化)	3 6 8
H 2 7 1 - H 2 9 6	6 7 7
H 2 9 6 - H 2 7 1	6 9 0

[0346] 表46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(H271-H296、H296-H271)を固定化した培養器材を使用した群は、対照群と比較して高い拡大培養率が得られた。つまり、2種のFNフラグメント(H271-H296、H296-H271)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。

[0347] (3) 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47-(2)で調製した細胞について実施例43-(3)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った。結果を表47に示す。

[0348] [表47]

表47

FNフラグメント	CD45RA ⁺	CD45RA ⁺	CD45RA ⁺
	CCR7 ⁺	CD62L ⁺	CCR7 ⁺
	(%)	(%)	CD62L ⁺
			(%)
対照	27.6	66.2	24.0
(FNフラグメント非固定化)			
H271-H296	81.4	88.9	79.7
H296-H271	76.5	82.4	73.2

[0349] 表47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(H271-H296、H296-H271)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。当該実施例より、2種のFNフラグメント(H271-H296、H296-H271)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。

[0350] 実施例48 FNフラグメントを用いた特異的細胞傷害活性保持CTLの誘導

(1) 各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3種類のFNフラグメント(H296-H296、H271-H296、H296-H271)を固定化した。すなわち、終濃度5~10 μ g/mLのFNフラグメントを含むACD-A液(pH5.0)を24穴細胞培養プレートには0.24mL/ウェルずつ、48穴細胞培養プレートには0.09mL/ウェルずつ添加し、4 $^{\circ}$ Cで一晩インキュベートした。培養器材は使用前にPBSで2回洗浄したのちRPMI1640培地で1回洗浄し各実験に供した。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合わせるために使用するFNフラグメントの濃度を調整した。このとき、FNフラグメントとして実施例1で調製したH296-H296、実施例45で調製したH271-H296、実施例46で調製したH296-H271を使用した。

[0351] (2) 抗インフルエンザウイルス メモリーCTLの誘導

実施例2-(1)に記載した方法で分離、保存したPBMCを用い、実施例2-(3)と同様の方法で抗インフルエンザウイルス メモリーCTLの誘導を行なった。その際、培養開始時は実施例48-(1)で作製した48穴細胞培養プレートを用い(対照にはFNフラグメントを固定化していないプレートを使用)、レスポンド細胞は0.4mL/ウェルずつ添加した。培養7日目には実施例48-(1)で作製した24穴細胞培養プレートを使用した(対照にはFNフラグメントを固定化していないプレートを使用)。14日間培養後の細胞増殖率を表48に示す。

[0352] [表48]

FNフラグメント	細胞増殖率 (倍)
対照 (FNフラグメント非固定化)	0.8
H296-H296	3.1
H271-H296	3.1
H296-H271	2.1

[0353] 表48に示されるように、FNフラグメントを使用した群では使用していない対照群と比較して高い増殖率を示した。つまり、CTL誘導時にFNフラグメントを使用することで、細胞の増殖率を高めることが明らかとなった。

[0354] 実施例49 60mL採血を想定した実施例48のCTLのフィーダ細胞を用いない拡大培養

(1) 抗CD3抗体と各FNフラグメントの固定化

以下のフィーダ細胞を用いないCTL拡大培養実験で使用する培養器材に抗CD3抗体と3種類のFNフラグメントを固定化した。すなわち、抗CD3抗体(終濃度5 μ g/mL)と実施例48-(1)と同濃度のFNフラグメントを含むACD-A液(pH5.0)を48穴細胞培養プレートに0.09mL/ウェルずつ添加し、4°Cで一晩インキュベートした(対照には抗CD3抗体のみを固定化)。また、上記のプレートは使用前にPBSで2回洗浄したのちRPMI1640で1回洗浄した。

[0355] (2) フィーダ細胞を用いないCTLの拡大培養

実施例48－(2)で調製したCTL 1×10^5 cellsを実施例29－(2)と同様の方法で拡大培養を行なった。この際、実施例49－(1)で作製した48穴培養プレートを使用した。15日間培養後の細胞増殖率を表49に示す。

[0356] [表49]

表49

FNフラグメント	細胞増殖率 (倍)	
	拡大培養時	誘導から
対照 (FNフラグメント非固定化)	29.1	23.3
H296-H296	59.8	178.2
H271-H296	41.7	128.7
H296-H271	89.3	197.5

[0357] 表49に示されるように、誘導時および拡大培養時にFNフラグメントを使用した群については、使用していない対照群と比較して高い増殖率を示した。つまり、誘導時および拡大培養時にFNフラグメントを使用することで、フィーダ細胞を用いずにCTLの拡大培養が可能となった。

[0358] 実施例50 実施例49のCTLの細胞傷害活性の測定

実施例49－(2)で得られたCTLを実施例27と同様の方法にてCTLの特異的細胞傷害活性を測定した。CTL拡大培養後の細胞傷害活性の結果を表50、活性維持効果を表51に示す。なお、細胞傷害活性効果のE/T比30については試験を行わず、細胞傷害活性維持効果については、E/T比3および1の2点について算出した。

[0359] [表50]

表50

FNフラグメント	CTL拡大培養後細胞傷害活性 (%)		
	E/T比		
	10	3	1
対照 (FNフラグメント非固定化)	44.4	15.2	2.8
H296-H296	66.1	46.8	18.3
H271-H296	76.6	46.7	20.9
H296-H271	80.2	50.7	25.9

[0360] [表51]

表51

FNフラグメント	活性維持効果 (%)	
	E/T比	
	3	1
対照 (FNフラグメント非固定化)	35.2	8.8
H296-H296	86.2	52.3
H271-H296	64.8	44.1
H296-H271	66.7	45.2

[0361] ペプチド非存在下で培養したCalcein標識標的細胞に対する細胞傷害活性はほぼ0%であり、非特異的な活性はないことを確認した。ペプチド存在下で培養したCalcein標識標的細胞に対する細胞傷害活性について、誘導時および拡大培養時にFNフラグメントを使用した群のCTLは、対照群と比較して、15日間の拡大培養後においても特異的で高い細胞傷害活性を保持していた。つまり、FNフラグメントをCTL誘導時および拡大培養時に使用することにより、特異的で高い細胞傷害活性を長期的に保持した状態で、フィーダ細胞を用いない方法で拡大培養が可能であることが明らかになった。

[0362] 実施例51 実施例49のCTL細胞集団中におけるTCR Vβ17陽性CD8陽性細胞含有比率の測定

実施例49-(2)で調製した 2×10^5 cellsのCTLを実施例28と同様の方法にてTC

R Vβ17陽性CD8陽性細胞の含有率を測定した。測定結果を表52に示す。

[0363] [表52]

表52

FNフラグメント	TCR Vβ17 ⁺ CD8 ⁺ (%)
対照 (FNフラグメント非固定化)	15.8
H296-H296	70.5
H271-H296	45.0
H296-H271	45.3

[0364] 表52に示されるように、CTL誘導時および拡大培養時にFNフラグメントを使用したCTLは、使用しなかった対照群と比較して高い陽性細胞含有率を示した。なお、誘導後のCTL、すなわち拡大培養前のTCR Vβ17陽性CD8陽性細胞含有率は、FNフラグメントを使用した群については67.5%~71.8%、使用していない対照群については68.0%であった。つまり、CTL誘導時および拡大培養時にFNフラグメントを使用することで、抗インフルエンザウイルス メモリーCTLの含有率を高く保持したまま拡大培養が可能であることが認められた。

[0365] 実施例52 H105-H105Nc-HT及びH105-H105Ncの作成

(1)H105-H105Nc-HT発現ベクターの構築

H-105が2つ連結した改変型フィブロネクチンフラグメント(H105-H105Nc-HT)を発現させるため、以下のようにして発現ベクターを構築した。

[0366] (i) pCold14-H105ベクターの構築

配列表の配列番号45及び46記載の塩基配列を有する合成プライマーAID-F-Nco及び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7)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。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7)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。

[0367] 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1-(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なった。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。

[0368] 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み換えプラスミドを、pCold14-H105とした。

[0369] (ii) pCold14-H105-2ベクターの構築

配列表の配列番号45及び11記載の塩基配列を有する合成プライマーAID-F-Nco及びH296-NcoR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H296-NcoR、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なった。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消化した

。1. 0%アガロースゲル電気泳動によりそのNcoI、NcoI消化物を抽出精製し、NcoI—NcoI消化DNA断片を得た。

[0370] 次に、実施例52—(1)—(i)で構築したpCold14—H105をNcoI消化し、末端を脱リン酸化処理したものを調製し、上記約0.35kbpのDNAフラグメントと混合、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み換えプラスミドを、pCold14—H105—2とした。

[0371] (iii) pColdI—H105—2Ncベクターの構築

配列表の配列番号21記載の合成プライマーH105—NdeFと配列表の配列番号10記載の合成プライマー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として実施例52—(1)—(ii)で構築したpCold14—H105—2 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H105—NdeF、20pmolの合成プライマーH296—HindR、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なった。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。

[0372] 次に、pColdIベクターを制限酵素NdeI及び制限酵素HindIIIで2重消化したものを調製し、上記約0.7kbpのDNAフラグメントと混合、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。

[0373] H—105が2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、この組み換えプラスミドをpColdI-H105-2Ncとした。このpColdI-H105-2Nc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がアミノ酸“AMA”を挟んで2つ連結しその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H105-H105Nc-HTと命名し、そのアミノ酸配列を配列表の配列番号47に、塩基配列を配列表の配列番号48に示す。

[0374] (2) H105-H105Nc-HTの発現、精製

上記(1)で調製したpColdI-H105-2Ncを用いて大腸菌BL21を形質転換し、実施例22-(2)と同様にH105-H105Nc-HTの発現、精製を行なった。なお、培養液、Binding Buffer、Washing BufferA、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SDS-PAGEで解析したところ、分子量約28kDaの目的タンパク質がほぼ単一バンドとして検出された。その後、MicroBCAキットを使用して、タンパク質濃度を測定した。タンパク質濃度は、1.25mg/mLであった(分子量から計算して、約44 μ M)。

[0375] (3) H105-H105Ncの精製

Factor Xa Cleavage Capture Kitを用いて、実施例40-(2)と同様に上記のH105-H105Nc-HT精製タンパク質3mg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タグの切断およ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2100 Bioanalyzerで解析したところ、分子量約26kDaの目的タンパク質がほぼ単一バンドとして検出された。H105-H105Ncのアミノ酸配列を配列表の配列番号49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50に示す。

[0376] 実施例53 15aaH105-H105及び15aaH105-H105-HTの作成

(1) 15aaH105-H105-HT発現ベクターの構築

CH-296のアミノ酸配列番号445~459にH-105が2つ連結した改変型フィブロネクチンフラグメント(15aaH105-H105-HT)を発現させるため、以下のようにして発現ベクターを構築した。

[0377] (i) pColdI-15aaH105-H105ベクターの構築

配列表の配列番号38記載の塩基配列を有する合成プライマーNde-15aa-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Nde-15aa-Fは、制限酵素NdeI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(配列番号7)のアミノ酸番号445~451に相当する塩基配列を塩基番号13~33にもつ合成DNAである。上記合成プライマーと配列表の配列番号11記載のH296-NcoRを用いてPCRを行った。PCRの反応条件を以下に示す。

[0378] すなわち、鋳型DNAとして実施例22-(1)-(i)で構築したpColdI-H296 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Nde-15aa-F、20pmolの合成プライマーH296-NcoR、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96 $^{\circ}$ C 10秒、58 $^{\circ}$ 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なった。

[0379] 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反応液を回収し、エタノール沈殿を行なった。エタノール沈殿後の回収DNAを滅菌水に懸濁、全量120 μ Lとした反応液で制限酵素NdeI及び制限酵素NcoIで二重消化し、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、NdeI-NcoI消化DNA断片を得た。

[0380] 次に、実施例52-(1)-(iii)で構築したpColdI-H105-2Ncを制限酵素NdeI及び制限酵素NcoIで二重消化し、上記約0.4kbpのDNAフラグメントと混合、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。

[0381] 目的のCH-296のアミノ酸配列番号445~459にH-105が2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、この組み換えプラスミドをpColdI-15aaH105-H105とした。このpCold

I-15aaH105-H105は、CH-296の塩基配列445～459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460～574のアミノ酸配列をコードする塩基配列が間にアミノ酸“AMA”を挟んで2つ連結しその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15aaH105-H105-HTと命名し、そのアミノ酸配列を配列表の配列番号39に、塩基配列を配列表の配列番号40に示す。

[0382] (2) 15aaH105-H105-HT発現、精製

上記(1)で調製したpColdI-15aaH105-H105を用いて大腸菌BL21を形質転換し、実施例22-(2)と同様に15aaH105-H105-HTの発現、精製を行なった。なお、培養液、Binding Buffer、Washing BufferA、Washing BufferB、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29kDa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51.7 μ M)。

[0383] (3) 15aaH105-H105精製

次に、Factor Xa Cleavage Capture Kitを用いて、実施例40-(2)と同様に上記の15aaH105-H105-HT精製タンパク質3mg分のHisタグ配列の切断を4℃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タグの切断およ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2100 Bioanalyzerで解析したところ、分子量約27kDa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、1mg/mLであった(分子量から計算して、約37 μ M)。15aaH105-H105のアミノ酸配列を配列表の配列番号41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42に示す。

[0384] 実施例54 各FNフラグメント(H105-H105Nc-HT、H296-H296-HT、H296-H296)を用いて培養したリンパ球(リンフォカイン活性化細胞)のCD45RA陽性細胞CCR7陽性細胞、CD45RA陽性細胞CD62L陽性細胞、CD45RA陽性細胞CCR7陽性細胞CD62L陽性細胞の解析(FNフラグメントの直接添加)

(1) 抗ヒトCD3抗体の固定化

以下の実験で使用する培養器材に実施例42-(1)と同様の方法で抗ヒトCD3抗体を固定化した。ただし、この際抗ヒトCD28抗体および各種FNフラグメントは固定化しなかった。

[0385] (2) リンパ球の拡大培養

実施例42-(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0日目には実施例52で作成したH105-H105Nc-HT、実施例39で作成したH296-H296-HT、実施例1で作成したH296-H296を終濃度0.67 $\mu\text{g}/\text{mL}$ または0.34 $\mu\text{g}/\text{mL}$ になるように直接添加した。培養開始11日目に0.2%ヒト血清アルブミンを含む無血清GT-T503を用いて、各群の細胞培養液を2倍希釈後、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。結果を表53、54に示す。

[0386] [表53]

表53

FNフラグメント	添加量 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	拡大培養率 (倍率)
対照 (FNフラグメント無添加)		130
H105-H105Nc-HT	0.67	339
H105-H105Nc-HT	0.34	302

[0387] [表54]

表54

FNフラグメント	添加量 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	拡大培養率 (倍率)
対照 (FNフラグメント無添加)		395
H296-H296-HT	0.67	545
H296-H296	0.67	441

[0388] 表53、54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(H105-H1

05Nc-HT、H296-H296-HT、H296-H296)を培養液に直接培地に添加した群は、対照群と比較して高い拡大培養率が得られた。

[0389] (3)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54-(2)で調製した細胞について実施例43-(3)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った。結果を表55、表56に示す。

[0390] [表55]

表55

FNフラグメント	添加量 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	CD45RA ⁺	CD45RA ⁺	CD45RA ⁺
		CCR7 ⁺ (%)	CD62L ⁺ (%)	CCR7 ⁺ CD62L ⁺ (%)
対照 (FNフラグメント無添加)		27.8	53.9	24.2
H105-H105Nc-HT	0.67	61.6	88.6	60.9
H105-H105Nc-HT	0.34	59.6	82.4	57.8

[0391] [表56]

表56

FNフラグメント	添加量 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	CD45RA ⁺	CD45RA ⁺	CD45RA ⁺
		CCR7 ⁺ (%)	CD62L ⁺ (%)	CCR7 ⁺ CD62L ⁺ (%)
対照 (FNフラグメント無添加)		29.1	63.8	27.2
H296-H296-HT	0.67	61.9	93.6	61.1
H296-H296	0.67	62.2	92.6	61.4

[0392] 表55、56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(H105-H105Nc-HT、H296-H296-HT、H296-H296)を培養液に直接溶液添加し

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。当該実施例より、3種のFNフラグメントを直接添加で用いても、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。

[0393] 実施例55 抗CD3抗体、抗CD28抗体およびFNフラグメント(H296-H296、H296-H296-H296、H105-H105Nc)を用いたリンパ球(リンフォカイン活性化細胞)の拡大培養

(1)抗ヒトCD3抗体、抗ヒトCD28抗体、および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、抗ヒトCD28抗体、FNフラグメント(H296-H296、H296-H296-H296、H105-H105Nc)を実施例42-(1)と同様の方法で固定化した。ただし、FNフラグメントは終濃度3~25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ となるように添加した。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。この時、FNフラグメントとして実施例1で調製したH296-H296、実施例40で調製したH296-H296-H296、実施例52で調製したH105-H105Ncを使用した。

[0394] (2)リンパ球の拡大培養

実施例42-(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0日目には、実施例55-(1)で調製した抗ヒトCD3抗体・抗ヒトCD28抗体固定化プレート又は抗ヒトCD3抗体・抗ヒトCD28抗体・FNフラグメント固定化プレートを使用し、培養開始4日目には各群の細胞濃度を $0.02 \times 10^6 \text{ cells}/\text{mL}$ となるように0.5%GT-T503を用いて希釈後、希釈液6mLを 12.5 cm^2 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。培養を継続し、7日目には $0.1 \times 10^6 \text{ cells}/\text{mL}$ となるように0.5%GT-T503を用いて希釈後、希釈液6mLを 12.5 cm^2 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10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。結果を表57に示す。

[0395] [表57]

表57

FNフラグメント	拡大培養率 (倍率)
対照 (FNフラグメント非固定化)	319
H296-H296	376
H105-H105Nc	409
H296-H296-H296	505

[0396] 表57に示されるように、リンパ球拡大培養初期に抗CD3抗体、抗CD28抗体およびFNフラグメント(H296-H296、H105-H105Nc、H296-H296-H296)を固定化した培養器材を使用した群についても、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(H296-H296、H105-H105Nc、H296-H296-H296)は抗CD3抗体、抗CD28抗体を用いた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。

[0397] (3)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55-(2)で調製した細胞について実施例43-(3)と同様の方法で培養開始10日目にCD45RA陽性細胞CCR7陽性細胞、CD45RA陽性細胞CD62L陽性細胞、CD45RA陽性CCR7陽性CD62L陽性細胞の解析を行った。結果を表58に示す。

[0398] [表58]

表58

FNフラグメント	CD45RA ⁺	CD45RA ⁺	CD45RA ⁺
	CCR7 ⁺	CD62L ⁺	CCR7 ⁺
	(%)	(%)	CD62L ⁺ (%)
対照 (FNフラグメント非固定化)	41.2	75.0	19.6
H296-H296	54.6	89.6	53.5
H105-H105Nc	53.1	77.4	50.3
H296-H296-H296	44.3	81.0	41.1

[0399] 表58に示されるように、リンパ球拡大培養初期に抗CD3抗体、抗CD28抗体およびFNフラグメント(H296-H296、H105-H105Nc、H296-H296-H296)を固定化した培養器材を使用した群については、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。当該実施例より、FNフラグメント(H296-H296、H105-H105Nc、H296-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。

[0400] 実施例56 抗CD3抗体およびFNフラグメント(15aaH105-H105)を用いたリンパ球(リンフォカイン活性化細胞)の拡大培養

(1) 抗ヒトCD3抗体および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抗体およびFNフラグメント(15aaH105-H105)を実施例43-(1)と同様の方法で固定化した。ただし、固定化の際の緩衝液はPBSを使用し、FNフラグメントは終濃度10 μ g/mLとなるように添加した。この時、FNフラグメントとして実施例53で調製した15aaH105-H105を使用した。

[0401] (2) リンパ球の拡大培養

実施例43-(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0日目には、実施例56-(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・FNフラグメント固定化プレートを使用し、実施例43-(2)における培養開始8日目の操作を当該実施例では7日目に行った。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。結果を表59に示す。

[0402] [表59]

表59

FNフラグメント	拡大培養率 (倍率)
対照 (FNフラグメント非固定化)	313
15aaH105-H105	643

[0403] 表59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(15aaH105-H105)

05)を固定化した培養器材を使用した群は、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(15aaH105-H105)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。

[0404] (3)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56-(2)で調製した細胞について実施例43-(3)と同様の方法でCD45RA陽性細胞CCR7陽性細胞、CD45RA陽性細胞CD62L陽性細胞、CD45RA陽性細胞CCR7陽性細胞CD62L陽性細胞の解析を行った。結果を表60に示す。

[0405] [表60]

表60

FNフラグメント	CD45RA ⁺	CD45RA ⁺	CD45RA ⁺
	CCR7 ⁺	CD62L ⁺	CCR7 ⁺
	(%)	(%)	CD62L ⁺
			(%)
対照	25.8	64.2	24.0
(FNフラグメント非固定化)			
15aaH105-H105	76.3	88.4	76.1

[0406] 表60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(15aaH105-H105)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。当該実施例より、FNフラグメント(15aaH105-H105)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。

[0407] 実施例57 FNフラグメントを用いた特異的細胞傷害活性保持CTLの誘導

(1) 各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3種類のFNフラグメント(H296-H296、H105-H105Nc、15aaH105-H105)を固定化した。すなわち、終濃度5~10 μg/mLのFNフラグメントを含むACD-A液(pH5.0)あるいはPBSを24穴細胞培養プ

レートに0.24mL/ウェルずつ添加し、4°Cで一晩インキュベートした。培養器材は使用前にPBSで2回洗浄したのちRPMI1640培地で1回洗浄し各実験に供した。なお、FNフラグメントの濃度と固定化液については、培養器材への各FNフラグメントの固定化量を一定に合わせるために使用するFNフラグメントの濃度と固定化液を調整した。このとき、FNフラグメントとして実施例1で調製したH296-H296、実施例52で調製したH105-H105Nc、実施例53で調製した15aaH105-H105を使用した。

[0408] (2) 抗インフルエンザウイルス メモリーCTLの誘導

抗インフルエンザウイルス メモリーCTLの誘導は、実施例2-(3)の方法を一部改変して実施した。培養開始時に実施例57-(1)で調製した24穴細胞培養プレートを使用し、直接添加のH296-H296については対照と同様に調製したウェルに終濃度1 μ g/mLになるように添加した。また、CpG (CpG-C DNA:配列表の配列番号43記載のDNA:Hycult biotechnology社製)を添加した試験区も設定した。CpGは、免疫細胞を活性化する働きを有することが知られる公知のオリゴヌクレオチドである。CpGについては終濃度1 μ g/mLあるいは5 μ g/mLとなるように添加した。培養7日目にはペプチドパルスした抗原提示細胞による再刺激を行わず、5日目と同様に培養上清を半分除去後、IL-2含有培地を1mLずつ添加し、9日間培養を継続した。細胞増殖率を表61に示す。

[0409] [表61]

表61

FNフラグメント	固定化または直接添加	細胞増殖率 (倍)
対照 (FNフラグメント非固定化)		1.1
H296-H296	固定化	2.9
H105-H105Nc	固定化	3.0
15aaH105-H105	固定化	2.7
H296-H296	直接添加 (1 μ g/mL)	3.3
CpG	直接添加 (1 μ g/mL)	1.5
CpG	直接添加 (5 μ g/mL)	2.1

[0410] 表61に示されるように、FNフラグメントを使用した群では使用していない対照群と比較して高い増殖率を示した。また、CpGについては、対照と比較して高い増殖率を示したが、FNフラグメントの増殖率には及ばなかった。つまり、CTL誘導時にFNフラグメントを使用することで、細胞の増殖率を高めることが明らかとなり、その増殖率はCpGを超えることが示された。

[0411] 実施例58 60mL採血を想定した実施例57のCTLのフィーダ細胞を用いない拡大培養

(1) 抗CD3抗体と各FNフラグメントの固定化

以下のフィーダ細胞を用いないCTL拡大培養実験で使用する培養器材に抗CD3抗体と3種類のFNフラグメントを固定化した。すなわち、抗CD3抗体(終濃度 $1\mu\text{g}/\text{mL}$)と実施例57-(1)と同濃度のFNフラグメントを含むACD-A液(pH5.0)あるいはPBSを48穴細胞培養プレートに0.1mL/ウェル添加し、4°Cで一晩インキュベートした(対照には抗CD3抗体のみを固定化)。また、上記のプレートは使用前にPBSで2回洗浄したのちRPMI1640で1回洗浄した。

[0412] (2) フィーダ細胞を用いないCTLの拡大培養

実施例57-(2)で調製したCTL 2×10^5 cellsを実施例29-(2)と同様の方法で拡大培養を行なった。この際、実施例58-(1)で作製した48穴培養プレートを使用し、直接添加する群については実施例57-(2)の濃度に従って添加した。また細胞継代日を4日目、7日目、10日目に変更し、14日間培養を継続した。14日後の細胞増殖率を表62に示す。

[0413] [表62]

表62

FNフラグメント	固定化または直接添加	細胞増殖率 (倍)	
		拡大培養時	誘導から
対照		19.7	21.4
(FNフラグメント非固定化)			
H296-H296	固定化	68.4	196.4
H105-H105Nc	固定化	73.2	214.4
15aaH105-H105	固定化	76.9	209.7
H296-H296	直接添加 (1 μ g/mL)	29.5	98.0
CpG	直接添加 (1 μ g/mL)	1.2	1.8
CpG	直接添加 (5 μ g/mL)	16.2	33.9

[0414] 表62に示されるように、誘導時および拡大培養時にFNフラグメントを使用した群は、対照群またはCpGを使用した群と比較して高い増殖率を示した。つまり、誘導時および拡大培養時にFNフラグメントを使用することで、フィーダ細胞を用いずにCTLの拡大培養が可能となった。

[0415] 実施例59 実施例58のCTLの細胞傷害活性の測定

実施例58-(2)で得られたCTLを実施例27と同様の方法にてCTLの特異的細胞傷害活性を測定した。CTL拡大培養後細胞傷害活性結果を表63に示す。なお、E/T比30については、試験を行わなかった。

[0416] [表63]

表63

FNフラグメント	固定化または 直接添加	CTL拡大培養後細胞傷害活性 (%)		
		E/T比		
		10	3	1
対照		31.7	12.1	1.2
(FNフラグメント非固定化)				
H296-H296	固定化	66.1	35.9	13.5
H105-H105Nc	固定化	65.4	35.0	12.3
15aaH105-II105	固定化	58.4	24.3	6.3
II296-H296	直接添加	77.1	63.3	27.7
	(1 μ g/mL)			
CpG	直接添加	n. t.	25.0	8.5
	(1 μ g/mL)			
CpG	直接添加	41.5	14.5	6.5
	(5 μ g/mL)			

n. t. : not tested

[0417] ペプチド非存在下で培養したCalcein標識標的細胞に対する細胞傷害活性はほぼ0%であり、非特異的な活性はないことを確認した。ペプチド存在下で培養したCalcein標識標的細胞に対する細胞傷害活性について、誘導時および拡大培養時にFNフラグメントを使用した群のCTLは、対照群またはCpGを使用した群と比較して、14日間の拡大培養後においても特異的で高い細胞傷害活性を保持していた。つまり、FNフラグメントをCTL誘導時および拡大培養時に使用することにより、特異的で高い細胞傷害活性を長期的に保持した状態で、フィーダ細胞を用いない方法で拡大培養が可能であることが明らかになった。

[0418] 実施例60 実施例58のCTL細胞集団中におけるTCR V β 17陽性CD8陽性細胞含有比率の測定

実施例58-(2)で調製した 2×10^5 cellsのCTLを実施例28と同様の方法にてTCR V β 17陽性CD8陽性細胞の含有率を測定した。測定結果を表64に示す。

[0419] [表64]

表64

FNフラグメント	固定化または直接添加	TCR V β 17 ⁺ CD8 ⁺ (%)
対照		6.8
(FNフラグメント非固定化)		
H296-H296	固定化	30.4
H105-H105Nc	固定化	29.8
15aaH105-H105	固定化	25.0
H296-H296	直接添加	77.7
	(1 μ g/mL)	
CpG	直接添加	7.9
	(1 μ g/mL)	
CpG	直接添加	10.4
	(5 μ g/mL)	

[0420] CTL誘導時および拡大培養時にFNフラグメントを使用したCTLは、対照群またはCpGを使用した群と比較して高い陽性細胞含有率を示した。なお、誘導後のCTL、すなわち拡大培養前のTCR V β 17陽性CD8陽性細胞含有率は、FNフラグメントを使用した群については54.0%~64.4%、使用していない対照群については43.7%、CpGを使用した群については42.0%~45.8%であった。つまり、CTL誘導時および拡大培養時にFNフラグメントを使用することで、抗インフルエンザウイルスメモリーCTLの含有率を高く保持したまま拡大培養が可能であることが認められた。

[0421] 実施例61 各種FNフラグメントの固定化率の比較

各種FNフラグメント0~25 μ g/mLを含むACD-A液(pH5.0)またはPBSを96穴細胞培養プレートの各ウェルに40 μ Lずつ添加し、5時間室温で固定化した。0.05%Tween20(SIGMA社製)を含むPBSで3回洗浄後、PBSを用いて4倍希釈したBlock Aceを各ウェルに300 μ Lずつ添加し、1時間室温で静置した。0.05%Tween20を含むPBSで3回洗浄後、1次抗体として適宜希釈したHRP標識FNH3-8またはマウス抗ヒトフィブロネクチンCS-1抗体(CHEMICON社製)を各ウェル

に40 μ Lずつ添加し、1時間室温で静置した後0.05%Tween20を含むPBSで3回洗浄した。1次抗体としてマウス抗ヒトフィブロネクチンCS-1抗体使用時には、さらに2次抗体として適宜希釈したHRP標識ウサギ抗マウスIgM抗体(Zymed Laboratories社製)を各ウェルに40 μ Lずつ添加し、1時間室温で静置した後0.05%Tween20を含むPBSで3回洗浄した。抗体反応後、ABTS(KPL社製)を各ウェルに40 μ Lずつ添加し、室温で約10~25分静置した後、150mMシュウ酸(ナカライテスク社製)20 μ Lを加え反応停止後、405nmの吸光度を測定することで固定化率を評価した。なお、マウス抗ヒトフィブロネクチンCS-1抗体はフィブロネクチンの部分領域であるCS-1を特異的に認識する抗体である(図1参照)。結果を表65、表66、表67に示す。なお、下記表における「405nm(測定値-ブランク)」とは各FNフラグメント濃度における吸光値から各FNフラグメント濃度0 μ g/mLにおける吸光値を引いた値である。

[0422] [表65]

表65

FNフラグメント濃度 (μ g/mL)	405nm (測定値-ブランク)		
	1次抗体 FNH3-8使用		
	CH-296	H296-H296-HT	H296-H296-H296-HT
25	0.859	0.965	0.991
10		0.976	0.924
5		0.878	0.870
4		0.843	0.810
3		0.742	0.743
2		0.540	0.545
1		0.186	0.261
0.5		0.033	n. t.

n. t. = not tested

[0423] [表66]

表66

FNfr濃度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	405nm (測定値-ブランク)		
	1次抗体 マウス抗ヒトフィブロネクチンCS-1抗体		
	CH-296	H105-H105Nc	H105-H105Nc-HT
25	0.571	0.559	1.064
20		0.610	1.076
15		0.628	1.211
10		0.566	1.076
5		0.194	1.016
2.5		0.063	0.606

[0424] [表67]

表67

FNfr濃度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	405nm (測定値-ブランク)		
	1次抗体 FNH3-8使用		
	CH-296	H271-H296	H296-H271
25	0.564	n. t.	n. t.
20		0.603	n. t.
18		0.610	n. t.
16		0.594	n. t.
15		n. t.	0.635
14		0.605	n. t.
13		n. t.	0.609
12		0.639	n. t.
11		n. t.	0.561
10		0.600	n. t.
9		n. t.	0.560
7		n. t.	0.518
5		n. t.	0.448

n. t. =not tested

[0425] その結果、H296-H296-HT、H296-H296-H296-HT、H105-H105

Nc、H105-H105Nc-HT、H271-H296、H296-H271はCH-296と比べて培養プレートへの固定化効率が高いことが明らかとなった。

[0426] 実施例62 H105-HTの作成

(1)H105-HTの発現、精製

実施例24-(1)-(i)で調製したpColdI-H105を用いて大腸菌BL21を形質転換し、実施例22-(2)と同様にH105-HTの発現、精製を行なった。なお、培養液、Binding Buffer、Washing BufferA、Washing BufferB、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14.8kDa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15.5 μ M)。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51に、塩基配列を配列表の配列番号52に示す。

[0427] 実施例63 抗CD3抗体およびFNフラグメント(H105-H105Nc-HT、H105-HT)を用いたリンパ球(リンフォカイン活性化細胞)の拡大培養

(1)抗ヒトCD3抗体および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抗体を実施例54-(1)と同様の方法で固定化した。

[0428] (2)リンパ球の拡大培養

実施例54-(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0日目には、実施例63-(1)で作成したプレートを使用し、実施例52で作成したH105-H105Nc-HT、実施例62で作成したH105-HTを終濃度0.67または0.78 μ g/mLになるように培地に直接添加した。なお、FNフラグメントの濃度は培養液中における各FNフラグメントのモル比を一定にあわせるために調整した。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。結果を表68に示す。

[0429] [表68]

表68

FNフラグメント	拡大培養率 (倍率)
対照 (FNフラグメント無添加)	138
H105-H105Nc-HT	629
H105-HT	196

[0430] 表68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(H105-H105Nc-HT、H105-HT)を直接培地に添加した群は、対照群と比較して高い拡大培養率が得られた。さらには、改変型FNフラグメント(H105-H105Nc-HT)を用いた場合、H105-HTよりも高い効果が得られた。このことから、改変型FNフラグメント(H105-H105Nc-HT)はH105-HTよりも抗CD3抗体を用いた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。

[0431] (3)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63-(2)で調製した細胞について実施例43-(3)と同様の方法でCD45RA陽性細胞CCR7陽性細胞、CD45RA陽性細胞CD62L陽性細胞、CD45RA陽性細胞CCR7陽性細胞CD62L陽性細胞の解析を行った。結果を表69に示す。

[0432] [表69]

表69

FNフラグメント	CD45RA ⁺	CD45RA ⁺	CD45RA ⁺
	CCR7 ⁺	CD62L ⁺	CCR7 ⁺
	(%)	(%)	CD62L ⁺
			(%)
対照 (FNフラグメント無添加)	10.4	68.7	9.5
H105-H105Nc-HT	52.7	81.0	48.2
H105-HT	22.5	61.9	16.6

[0433] 表69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(H105-H105Nc-HT、H105-HT)を直接培地に添加した群においては、対照群と比較して、C

D45RA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。さらには、改変型FNフラグメント(H105-H105Nc-HT)を用いた場合、H105-HTよりも高い効果が得られた。当該実施例より、改変型FNフラグメント(H105-H105Nc-HT)はH105-HTよりもナイーブT様細胞を高効率で増殖できることが明らかとなった。

[0434] 実施例64 H296-H296フラグメントを用いた特異的細胞傷害活性保持CTLの誘導

(1)H296-H296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H296-H296を固定化した。すなわち、終濃度5 μg/mLのH296-H296を含むACD-A液(pH5.0)を24穴細胞培養プレートに0.24mL/ウェルずつ添加し、4°Cで一晩インキュベートした。また、上記のプレートは使用前にPBSで2回洗浄したのちRPMI1640培地で1回洗浄し実験に供した

[0435] (2)抗サイトメガロウイルス メモリーCTLの誘導

抗サイトメガロウイルス メモリーCTLの誘導は、実施例57-(2)の方法に従って行なった。ただし、抗原ペプチドには40 μg/mLのサイトメガロウイルスタンパク質由来エピトープペプチド(配列表の配列番号44に記載のマトリクスプロテインpp65由来-HLA-A2.1結合性ペプチド)のみを用いた。培養9日後の細胞増殖率を表70に示す。

[0436] [表70]

表70

FNフラグメント	細胞増殖率 (倍)
対照 (FNフラグメント非固定化)	0.9
H296-H296	2.8

[0437] 表70に示されるように、FNフラグメントを使用した群では使用していない対照群と比較して高い増殖率を示した。つまり、CTL誘導時にFNフラグメントを使用すること

で、細胞の増殖率を高めることが明らかとなった。

[0438] 実施例65 60mL採血を想定した実施例64のCTLのフィーダ細胞を用いない拡大培養

(1)抗CD3抗体と各FNフラグメントの固定化

以下のフィーダ細胞を用いないCTL拡大培養実験で使用する培養器材に抗CD3抗体とH296-H296を固定化した。すなわち、抗CD3抗体(終濃度1 μg/mL)とH296-H296(終濃度5 μg/mL)を含むACD-A液(pH5.0)を48穴細胞培養プレートに0.1mL/ウェルずつ添加し、4°Cで一晩インキュベートした(対照には抗CD3抗体のみを固定化)。また、上記のプレートは使用前にPBSで2回洗浄したのちRPMI1640で1回洗浄した。

[0439] (2)フィーダ細胞を用いないCTLの拡大培養

実施例64-(2)で調製したCTL 2×10⁵ cellsを実施例58-(2)と同様の方法で拡大培養を行なった。14日後の細胞増殖率を表71に示す。

[0440] [表71]

表71

FNフラグメント	細胞増殖率(倍)	
	拡大培養時	誘導から
対照(FNフラグメント非固定化)	10.8	10.0
H296-H296	68.8	193.2

[0441] 表71に示されるように、誘導時および拡大培養時にH296-H296を使用した群については、使用していない対照群と比較して高い増殖率を示した。つまり、誘導時および拡大培養時にH296-H296を使用することで、フィーダ細胞を用いずにCTLの拡大培養が可能となった。

[0442] 実施例66 実施例65のCTLの細胞傷害活性の測定

実施例65-(2)で得られたCTLを実施例27と同様の方法にてCTLの特異的細胞傷害活性を測定した。CTL拡大培養後細胞傷害活性結果を表72、活性維持効果を表73に示す。なお、細胞傷害活性維持効果については、E/T比3および1の2点について算出した。

[0443] [表72]

表72

	CTL拡大培養後細胞傷害活性 (%)			
	E/T比			
	30	10	3	1
FNフラグメント				
対照 (FNフラグメント非固定化)	18.5	9.2	0.8	-1.9
H296-H296	52.6	29.7	12.1	6.0

[0444] [表73]

表73

	活性維持効果 (%)	
	E/T比	
	3	1
FNフラグメント		
対照 (FNフラグメント非固定化)	2.3	-9.8
H296-H296	30.0	34.1

[0445] ペプチド非存在下で培養したCalcein標識標的細胞に対する細胞傷害活性はほぼ0%であり、非特異的な活性はないことを確認した。ペプチド存在下で培養したCalcein標識標的細胞に対する細胞傷害活性について、誘導時および拡大培養時にH296-H296を使用した群のCTLは、対照群と比較して、14日間の拡大培養後においても特異的で高い細胞傷害活性を保持していた。つまり、H296-H296をCTL誘導時および拡大培養時に使用することにより、特異的で高い細胞傷害活性を長期的に保持した状態で、フィーダ細胞を用いない方法で拡大培養が可能であることが明らかになった。

[0446] 本発明により、リンパ球の製造方法が提供される。当該方法は細胞増殖率が高く、本発明により得られるリンパ球は、例えば、養子免疫療法に好適に使用される。従って、本発明の方法は、医療分野への多大な貢献が期待される。

配列表フリーテキスト

[0447] SEQ ID NO:1 ; Partial region of fibronectin named III-12.

- SEQ ID NO:2 ; Partial region of fibronectin named III-13.
- SEQ ID NO:3 ; Partial region of fibronectin named III-14.
- SEQ ID NO:4 ; Partial region of fibronectin named CS-1.
- SEQ ID NO:5 ; Fibronectin fragment named H296-H296.
- SEQ ID NO:6 ; Polynucleotide coding Fibronectin fragment named H296-H296.
- SEQ ID NO:7 ; Fibronectin fragment named CH-296.
- SEQ ID NO:8 ; Polynucleotide coding Fibronectin fragment named CH-296.
- SEQ ID NO:9 ; Primer H296-NcoF.
- SEQ ID NO:10 ; Primer H296-HindR.
- SEQ ID NO:11 ; Primer H296-NcoR.
- SEQ ID NO:12 ; Primer NC2-5' UTR.
- SEQ ID NO:13 ; Designed peptide based on matrix-protein derived from influenza virus.
- SEQ ID NO:14 ; Primer H296-NdeF.
- SEQ ID NO:15 ; Primer H296-NdeR.
- SEQ ID NO:16 ; Fibronectin fragment named H296-H296-H296-HT.
- SEQ ID NO:17 ; Polynucleotide coding Fibronectin fragment named H296-H296-H296-HT.
- SEQ ID NO:18 ; Primer CH296-NdeF.
- SEQ ID NO:19 ; Fibronectin fragment named CH296-CH296-HT.
- SEQ ID NO:20 ; Polynucleotide coding Fibronectin fragment named CH296-CH296-HT.
- SEQ ID NO:21 ; Primer H105-NdeF.
- SEQ ID NO:22 ; Fibronectin fragment named H105-H105-HT.
- SEQ ID NO:23 ; Polynucleotide coding Fibronectin fragment named H105-H105-HT.
- SEQ ID NO:24 ; Primer CS1-NdeR.
- SEQ ID NO:25 ; Fibronectin fragment named H296-H296-HT.

SEQ ID NO:26 ; Polynucleotide coding Fibronectin fragment named H296-H296-H
T.

SEQ ID NO:27 ; Fibronectin fragment named H296-H296-H296.

SEQ ID NO:28 ; Polynucleotide coding Fibronectin fragment named H296-H296-H2
96.

SEQ ID NO:29 ; Fibronectin fragment named H105-H105.

SEQ ID NO:30 ; Polynucleotide coding Fibronectin fragment named H105-H105.

SEQ ID NO:31 ; Primer H271-NcoR.

SEQ ID NO:32 ; Fibronectin fragment named H271-H296.

SEQ ID NO:33 ; Polynucleotide coding Fibronectin fragment named H271-H296.

SEQ ID NO:34 ; Primer 12-Nco-F2.

SEQ ID NO:35 ; Primer H271-BamR.

SEQ ID NO:36 ; Fibronectin fragment named H296-H271.

SEQ ID NO:37 ; Polynucleotide coding Fibronectin fragment named H296-H271.

SEQ ID NO:38 ; Primer Nde-15aa-F.

SEQ ID NO:39 ; Fibronectin fragment named 15aaH105-H105-HT.

SEQ ID NO:40 ; Polynucleotide coding Fibronectin fragment named 15aaH105-H10
5-HT.

SEQ ID NO:41 ; Fibronectin fragment named 15aaH105-H105.

SEQ ID NO:42 ; Polynucleotide coding Fibronectin fragment named 15aaH105-H10
5.

SEQ ID NO:43 ; Oligonucleotide CpG-C DNA.

SEQ ID NO:44 ; Designed peptide based on matrix-protein derived from pp65.

SEQ ID NO:45 ; Primer AID-F-Nco

SEQ ID NO:46 ; Primer CS1-R-Xba

SEQ ID NO:47 ; Fibronectin fragment named H105-H105Nc-HT

SEQ ID NO:48 ; Polynucleotide coding Fibronectin fragment named H105-H105Nc-
HT

SEQ ID NO:49 ; Fibronectin fragment named H105-H105Nc

SEQ ID NO:50 ; Polynucleotide coding Fibronectin fragment named H105-H105Nc

SEQ ID No:51 ; Fibronectin fragment named H105-HT

SEQ ID No:52 ; Polynucleotide coding Fibronectin fragment named H105-HT

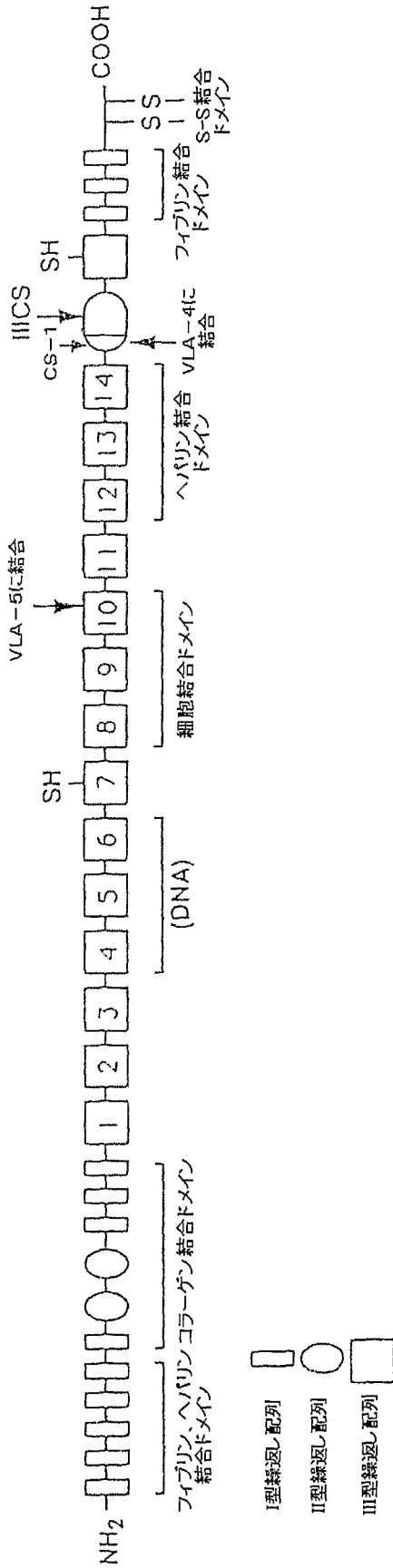
請求の範囲

- [1] 下記ポリペプチド(X)及び／又はポリペプチド(Y)の存在下での培養工程を包含することを特徴とするリンパ球の製造方法。
- ポリペプチド(X):アミノ酸配列(m)を2個以上配列中に含有し、かつアミノ酸配列(n)を1個以上配列中に含有するポリペプチド
- ここでアミノ酸配列(m)は、配列表の配列番号1～3から選択される1個のアミノ酸配列、もしくは配列表の配列番号1～3から選択される数個のアミノ酸配列が直接又は間接的に連結したアミノ酸配列からなり、
- アミノ酸配列(n)は、配列表の配列番号4で表されるアミノ酸配列からなる、
- ただし、アミノ酸配列(m)は配列表の配列番号1～3で表される配列のうち、同じ配列を2個以上含まず、またポリペプチド(X)中の2個以上のアミノ酸配列(m)のそれぞれは同じである、
- ポリペプチド(Y):前記ポリペプチド(X)において、前記ポリペプチド(X)に含まれる配列表の配列番号1～3から選択されるいずれかのアミノ酸配列及び配列表の配列番号4で表されるアミノ酸配列の少なくとも1つに、1もしくは数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入もしくは付加したアミノ酸配列を有するポリペプチドであって、前記ポリペプチド(X)と同等な機能を有するポリペプチド
- [2] ポリペプチド(X)が、アミノ酸配列(m)を2もしくは3個含んでなる請求項1記載の製造方法。
- [3] ポリペプチド(X)が、アミノ酸配列(n)を2もしくは3個含んでなる請求項1記載の製造方法。
- [4] ポリペプチド(X)が、配列表の配列番号5、16、19、22、25、27、29、32、36、39、41、47又は49に示すアミノ酸配列を有するポリペプチドである請求項1記載の製造方法。
- [5] リンパ球が抗原特異的細胞傷害性Tリンパ球又はリンフォカイン活性化細胞である請求項1記載の製造方法。
- [6] リンパ球に外来遺伝子を導入する工程をさらに包含する請求項1記載の製造方法。
- [7] 外来遺伝子をレトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベ

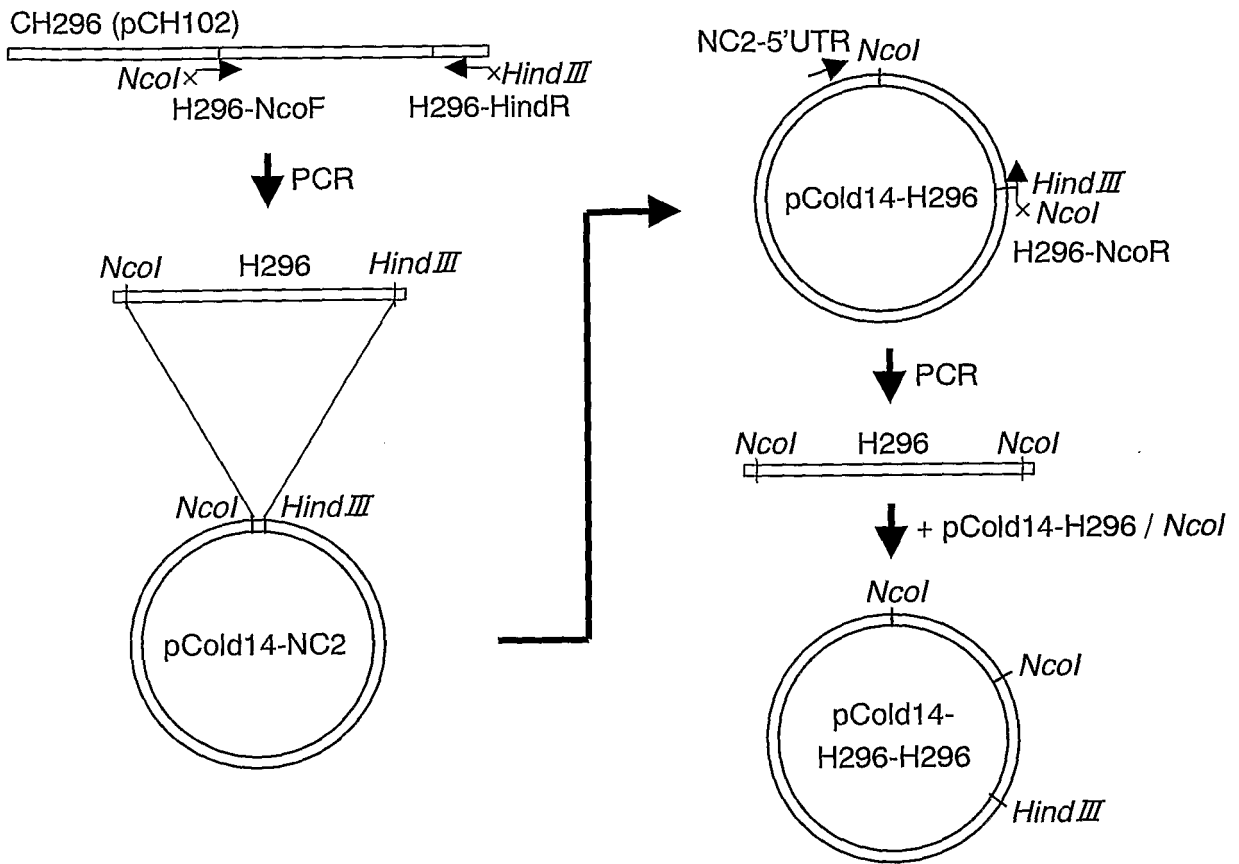
クター、レンチウイルスベクターまたはシミアンウイルスベクターを用いて導入する請求項6記載の製造方法。

- [8] 請求項1～7いずれか1項に記載の方法により得られるリンパ球。
- [9] 請求項1～7いずれか1項に記載の方法により得られるリンパ球を有効成分として含有する医薬。
- [10] 下記(a)および(b)から選択されるポリペプチド。
(a)配列表の配列番号5、16、19、22、25、27、29、32、36、39、41、47及び49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
(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有する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ものであるポリペプチド
- [11] 下記(c)～(g)から選択される核酸。
(c)配列表の配列番号5、16、19、22、25、27、29、32、36、39、41、47及び49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コードする核酸
(d)配列表の配列番号5、16、19、22、25、27、29、32、36、39、41、47及び49からなる群より選択される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有するポリペプチドであって、配列表の配列番号5、16、19、22、25、27、29、32、36、39、41、47及び49から選択されるアミノ酸配列を有する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6、17、20、23、26、28、30、33、37、40、42、48及び50から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ент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

[図 1]



[図 2]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2007/061555

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER <i>C12N5/00(2006.01) i, A61K35/12(2006.01) i, C07K19/00(2006.01) i, C12N5/06(2006.01) i, C12N5/10(2006.01) i, C12N15/09(2006.01) i, A61P37/02(2006.01) n, C07K14/78(2006.01) n</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) <i>C12N5/00, A61K35/12, C07K19/00, C12N5/06, C12N5/10, C12N15/09, A61P37/02, C07K14/78</i> Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched <i>Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2007</i> <i>Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2007 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2007</i> Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) <i>MEDLINE/CAplus/BIOSIS/WPIDS (STN), UniProt/Geneseq, JMEDPlus/JSTPlus (JDream2)</i>		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	JP 2007-61020 A (Takara Bio Inc.), 15 March, 2007 (15.03.07), Full text (particularly, Claims 1, 5, 11, 12; Par. Nos. [0013], [0093]) (Family: none)	4, 8-11
X	WO 1997/18318 A1 (Takara Shuzo Co., Ltd.), 22 May, 1997 (22.05.97), Full text (particularly, page 31, lines 5 to 11, 15 to 23) & EP 870839 A1 & US 6426042 B1	10-11
X	WO 2003/016511 A1 (Takara Bio Inc.), 27 February, 2003 (27.02.03), Full text & EP 1424387 A1 & US 2005/0422208 A1	1-11
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> 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 August, 2007 (30.08.07)		Date of mailing of the international search report 11 September, 2007 (11.09.07)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2007/061555

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2003/080817 A1 (Takara Bio Inc.), 02 October, 2003 (02.10.03), Full text & EP 1496109 A1 & US 2005/227354 A1	1-11
X	WO 2005/019450 A1 (Takara Bio Inc.), 03 March, 2005 (03.03.05), Full text & EP 1666589 A1	1-11
X	IDENO, M. et al., "Novel expansion methods of CTL using recombinant fibronectin fragments", Proceedings of the Japanese Cancer Association, (2003), p.175, full text	1-11
X	SAGAWA, H. et al., "Improvement of LAK cells expansion method with combined use of RetroNectin(TM) and anti-CD3 antibody", Proceedings of the Japanese Cancer Association, (2003), p.438, full text	1-11
P,A	WO 2007/040105 A1 (Takara Bio Inc.), 12 April, 2007 (12.04.07), Full text (Family: none)	1-11
P,A	MURAKI, N. et al., "T cell expansion using RetroNectin (I): Useful method to expand T cells, characterized by high portion of naive T-like cells", Proceedings of the Japanese Cancer Association, (Aug. 2006), p.330, full text	1-11
P,A	IDENO, M. et al., "T cell expansion using RetroNectin (II): RN-T cells contain high portion of naive T-like cells and show high ability of antigen recognition", Proceedings of the Japanese Cancer Association, (Aug. 2006), p.330, full text	1-11
A	JP 02-311498 A (Takara Shuzo Co., Ltd.), 27 December, 1990 (27.12.90), Full text & EP 399806 A & US 5198423 A	1-11
A	LAMERS, C.H. et al., "Protocol for gene transduction and expansion of human T lymphocytes for clinical immunogene therapy of cancer", Cancer Gene Therapy, (2002), Vol.9, pp.613-623, full text	1-11

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2007/061555

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

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:

The inventions as claimed in claims 1 to 11 are classified into the following four invention groups: a general inventive concept relating to "a method of producing lymphocytes characterized by comprising the step of culturing in the presence of a polypeptide (X) and/or a polypeptide (Y)" (claims 1 to 9); a general inventive concept relating to "a polypeptide (X) containing a duplicated amino acid sequence (n): SEQ ID NOS:5, 6, etc." (parts of claims 10 and 11); a general inventive concept relating to "a polypeptide (X) containing a triplicated amino acid sequence (n): SEQ ID NOS:16, 17, etc." (parts of claims 10 and 11); and a general inventive concept relating to "a polypeptide (X) containing a single amino (continued to extra sheet)

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 an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
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.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2007/061555

Continuation of Box No.III of continuation of first sheet (2)

acid sequence (n): SEQ ID NOS:32, 33, etc." (parts of claims 10 and 11) .

<p>A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))</p> <p>Int.Cl. C12N5/00 (2006.01)i, A61K35/12 (2006.01)i, C07K19/00 (2006.01)i, C12N5/06 (2006.01)i, C12N5/10 (2006.01)i, C12N15/09 (2006.01)i, A61P37/02 (2006.01)n, C07K14/78 (2006.01)n</p>			
<p>B. 調査を行った分野</p> <p>調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))</p> <p>Int.Cl. C12N5/00, A61K35/12, C07K19/00, C12N5/06, C12N5/10, C12N15/09, A61P37/02, C07K14/78</p>			
<p>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</p> <p>日本国実用新案公報 1922-1996年 日本国公開実用新案公報 1971-2007年 日本国実用新案登録公報 1996-2007年 日本国登録実用新案公報 1994-2007年</p>			
<p>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)</p> <p>MEDLINE/CAplus/BIOSIS/WPIDS (STN) UniProt/Geneseq JMEDPlus/JSTPlus (JDream2)</p>			
<p>C. 関連すると認められる文献</p>			
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	
P,X	JP 2007-61020 A, (タカラバイオ株式会社), 2007.03.15 全文(特に、請求項 1,5,11,12, 段落【0013】 , 【0093】 参照) (ファミリーなし)	4,8-11	
X	WO 1997/18318 A1, (寶酒造株式会社), 1997.05.22 全文(特に、第 31 頁 第 5-11,15-23 行参照) & EP 870839 A1 & US 6426042 B1	10-11	
<p><input checked="" type="checkbox"/> C 欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。</p>			
<p>* 引用文献のカテゴリー</p> <p>「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</p>		<p>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</p>	
<p>国際調査を完了した日</p> <p>30.08.2007</p>		<p>国際調査報告の発送日</p> <p>11.09.2007</p>	
<p>国際調査機関の名称及びあて先</p> <p>日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目 4 番 3 号</p>		<p>特許庁審査官 (権限のある職員)</p> <p>佐藤 巖</p>	<p>4 B</p> <p>3334</p>
		<p>電話番号 03-3581-1101 内線 3448</p>	

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	WO 2003/016511 A1, (タカラバイオ株式会社), 2003.02.27, 全文 & EP 1424387 A1 & US 2005/0422208 A1	1-11
X	WO 2003/080817 A1, (タカラバイオ株式会社), 2003.10.02, 全文 & EP 1496109 A1 & US 2005/227354 A1	1-11
X	WO 2005/019450 A1, (タカラバイオ株式会社), 2005.03.03, 全文 & EP 1666589 A1	1-11
X	IDENO, M. et al., "Novel expansion methods of CTL using recombinant fibronectin fragments", 日本癌学会総会記事, (2003), p.175, 全文	1-11
X	SAGAWA, H. et al., "Improvement of LAK cells expansion method with combined use of RetroNectin(TM) and anti-CD3 antibody", 日本癌学会総会記事, (2003), p.438, 全文	1-11
P,A	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)	1-11
P,A	MURAKI, N. et al., "T cell expansion using RetroNectin (I): Useful method to expand T cells, characterized by high portion of naive T-like cells", 日本癌学会総会記事, (Aug. 2006), p.330, 全文	1-11
P,A	IDENO, M. et al., "T cell expansion using RetroNectin (II): RN-T cells contain high portion of naive T-like cells and show high ability of antigen recognition", 日本癌学会総会記事, (Aug. 2006), p.330, 全文	1-11
A	JP 02-311498 A, (寶酒造株式会社), 1990.12.27, 全文 & EP 399806 A & US 5198423 A	1-11
A	LAMERS, C.H. et al., "Protocol for gene transduction and expansion of human T lymphocytes for clinical immunogene therapy of cancer", Cancer Gene Therapy, (2002), Vol.9, pp.613-623, 全文	1-11

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 (PCT17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 _____ 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、
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。

請求の範囲 1-11 に記載の発明は、「ポリペプチド(X)及び/又はポリペプチド(Y)の存在下での培養工程を包含することを特徴とするリンパ球の製造方法」に係る一般的発明概念(請求の範囲 1-9)、「アミノ酸配列(n)を2個含んでいる、ポリペプチド(X)：配列番号 5,6等」に係る一般的発明概念(請求の範囲 10,11 の一部)、「アミノ酸配列(n)を3個含んでいる、ポリペプチド(X)：配列番号 16,17等」に係る一般的発明概念(請求の範囲 10,11 の一部)、「アミノ酸配列(n)を1個含んでいる、ポリペプチド(X)：配列番号 32,33等」に係る一般的発明概念(請求の範囲 10,11 の一部)の4つに分類される。

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を伴う異議申立てがなかった。