

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2020年9月10日(10.09.2020)



(10) 国際公開番号

WO 2020/179829 A1

- (51) 国際特許分類:
C07C 53/128 (2006.01) C12N 5/0783 (2010.01)
C07K 14/495 (2006.01) C12N 1/00 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2020/009214
- (22) 国際出願日: 2020年3月4日(04.03.2020)
- (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 2019-040414 2019年3月6日(06.03.2019) JP
- (71) 出願人: 国立研究開発法人理化学研究所 (RIKEN) [JP/JP]; 〒3510198 埼玉県和光市広沢2番1号 Saitama (JP).
- (72) 発明者: 西岡 憲一 (NISHIOKA Kenichi); 〒3510198 埼玉県和光市広沢2番1号 国立研究開発法人理化学研究所内 Saitama (JP).
古関 明彦 (KOSEKI Haruhiko); 〒3510198 埼玉県和光市広沢2番1号 国立研究開発法人理化学研究所内 Saitama (JP).
- (74) 代理人: 特許業務法人 津国, 外 (TSUKUNI & ASSOCIATES et al.); 〒1020083 東京都千代田区麹町5-3-1 麹町ビジネスセンター Tokyo (JP).
- (81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, 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, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

一 国際調査報告(条約第21条(3))

(54) Title: ACTIVIN A AND/OR VPA-CONTAINING ADDITIVE FOR CULTURING NKT CELLS, AND METHOD FOR CULTURING NKT CELLS

(54) 発明の名称: アクチビン A 及び / 又は V P A を含む、N K T 細胞培養のための添加剤、及び N K T 細胞の培養方法

(57) Abstract: The present invention provides an additive for culturing NKT cells, said additive containing activin A and/or VPA. The present invention also provides a method for culturing NKT cells, said method comprising a step for culturing the NKT cells in a medium which contains activin A and/or VPA added thereto.

(57) 要約: 本発明は、アクチビン A 及び / 又は V P A を含む、N K T 細胞培養のための添加剤を提供する。本発明は、アクチビン A 及び / 又は V P A を添加した培地で培養する工程を含む、N K T 細胞の培養方法も提供する。



WO 2020/179829 A1

明 細 書

発明の名称：

アクチビンA及び／又はVPAを含む、NK T細胞培養のための添加剤、及びNK T細胞の培養方法

技術分野

[0001] 本発明は、アクチビンA及び／又はVPAを含む、NK T細胞培養のための添加剤、及びNK T細胞の培養方法に関する。

背景技術

[0002] ナチュラルキラーT細胞（NK T）細胞は、ヒト末梢血T細胞のうち0.01～0.1%しか存在せず、採取・培養が極めて困難な細胞である。

[0003] アクチビンAをT細胞の培養のために添加することは知られている（非特許文献1及び2）。アクチビンAを脂肪前駆細胞や心筋線維芽細胞といった間葉系細胞の培養のために添加することは知られている（非特許文献3及び4）。ES細胞又はiPS細胞から血球系前駆細胞を分化誘導するためにアクチビンAを添加することは知られている（非特許文献5および6）。その他、ES細胞から内胚葉系へ分化誘導する際に使用することや（非特許文献7）、ES細胞を維持培養する際に使用することが知られている（非特許文献8）。

[0004] バルプロ酸ナトリウム（VPA）については、一般的には、抗てんかん薬として知られる。また、最近iPS細胞樹立効率の向上のために使用できることが報告されている（非特許文献9）。

[0005] よって、アクチビンAについても、VPAについても、NK T細胞の機能修飾のために細胞培養培地へ添加することは知られていない。

先行技術文献

非特許文献

[0006] 非特許文献1：Huber et al., The Journal of Immunology, 182: 4633-4640, 2009

非特許文献2: Locci et al., Nature Immunology, 17: 976-986, 2016

非特許文献3: Zagarosi et al., Diabetes, 59: 2513-2521, 2010

非特許文献4: Hu et al., European Journal of Pharmacology, 789: 319-327, 2016

非特許文献5: Kennedy et al., Cell Reports, 2: 1722-1735, 2012

非特許文献6: Cerdan et al., Stem Cells and development, 21: 2866-2877, 2012

非特許文献7: Wang et al., Biotechnol Lett, 37: 1711-1717, 2015

非特許文献8: Beattie et al., Stem Cell, 23: 489-195, 2005

非特許文献9: Huangfu et al., Nature Biotechnology, 26: 1269-1275, 2008

非特許文献10: Fujii et al., Front Immunol, 4: 409, 2013

非特許文献11: Yamada et al., Stem cell, 34: 2852-2860, 2016

発明の概要

発明が解決しようとする課題

- [0007] 本発明は、従来、培養が困難であると認識されていた、NK T細胞を培養するための方法であって、好ましくは長期間、増殖させることができ、活性を維持又は増強することができる方法を探求することを課題とする。

課題を解決するための手段

- [0008] 本発明者らは鋭意研究の末、アクチビンA及び／又はVPAを、NK T細胞培養のための添加剤として使用することができることを見出し、本発明を完成させるに至った。

- [0009] すなわち、本発明の要旨は、以下である。

[1] アクチビンA及び／又はVPAを含む、NK T細胞培養のための添加剤。

[2] NK T細胞が、末梢血から分離されるか、幹細胞又は前駆細胞から分化誘導されたNK T細胞である、上記[1]記載の添加剤。

[3] アクチビンA及び／又はVPAを添加した培地で培養する工程を含む

、NK T細胞の培養方法。

[4] NK T細胞が、末梢血から分離されるか、幹細胞又は前駆細胞から分化誘導されたNK T細胞である、上記[3]記載の培養方法。

[5] 培地におけるアクチビンAの濃度が、 $5 \sim 100 \text{ ng/ml}$ である、上記[4]記載の培養方法。

[6] 培地におけるVPAの濃度が、 $3.9 \sim 250 \mu\text{M}$ である、上記[4]記載の培養方法。

発明の効果

[0010] 本発明により、従来には知られていなかった、アクチビンA及び／又はVPAの新たな用途が提供される。本発明による培養添加剤は、NK T細胞を、長期間、生存させることができ、また増殖させ、活性を維持又は増強させるという、優れた効果を有する。特に、VPAはNK T細胞のインターフェロン γ (IFN γ) 産生も増強することから、本発明により培養されたNK T細胞を投与されたガン患者の生存期間を延長することが期待できる（非特許文献10）。

図面の簡単な説明

[0011] [図1]図1は、iPS細胞の樹立から、iPS-NK T細胞の純化培養までのスキームの一実施態様を示す。

[図2]図2は、本発明の一実施態様であるNK T細胞の培養方法により得られた、細胞数の変化の結果を示す図である。

[図3]図3は、本発明の一実施態様であるNK T細胞の培養方法により得られた、細胞数の変化とIFN γ の産生能の結果を示す図である。

発明を実施するための形態

[0012] 本発明は、アクチビンA及び／又はVPAを含む、NK T細胞培養のための添加剤、及びNK T細胞の培養方法を提供する。

[0013] 本発明におけるアクチビンAとは、TGF- β ファミリーに分類されるサイトカインであって、116～117のアミノ酸鎖が2本結合したホモダイマーをいう。

- [0014] 本発明におけるVPAとは、バルプロ酸ナトリウムをいうが、遊離体及びその他の塩であってもよい。
- [0015] 本発明におけるNK T細胞とは、ナチュラルキラーT細胞をいい、特に末梢血から分離されるか、幹細胞又は前駆細胞から分化誘導されたNK T細胞をいう。幹細胞から分化誘導されたNK T細胞としては、ES細胞又はiPS細胞から分化誘導されたNK T細胞が挙げられる。
- [0016] 本発明は、アクチビンA及び／又はVPAを添加した培地で培養する工程を含む、NK T細胞の培養方法を提供する。
- [0017] 典型的には、iPS-NK T細胞は、iPS細胞から造血幹細胞へ1次誘導させたのち、iPS-NK T細胞へ2次誘導させ、そののちiPS-NK T細胞を純化培養することにより、得られる。
- [0018] アクチビンAを培地に添加する濃度は、5 ng～100 ng/ml、好ましくは10 ng～50 ng/mlであればよい。
- [0019] VPAを培地に添加する濃度は、3.9～250 μM、好ましくは15.6～250 μMであればよい。
- [0020] 本発明によるNK T細胞の培養方法では、アクチビンAはiPS-NK T細胞の純化培養の初日～純化培養終了まで培地に継続的に存在すればよい。
- [0021] 本発明によるNK T細胞の培養方法では、アクチビンAをiPS-NK T細胞への2次誘導の培養初日～純化培養終了まで継続的に培地に存在させてもよい。
- [0022] 本発明によるNK T細胞の培養方法では、VPAをiPS-NK T細胞の純化培養の初日～純化培養終了まで、好ましくは純化培養の7日目～純化培養終了まで培地に存在させればよい。
- [0023] 本発明によるNK T細胞の培養方法では、VPAをiPS-NK T細胞への2次誘導の培養初日～純化培養終了まで培地に存在させてもよい。
- [0024] 本発明によるNK T細胞の培養方法では、アクチビンA又はVPAを単独で添加してもよく、両者を同時に添加してもよく、アクチビンAを先に添加したのちにVPAを添加してもよく、またVPAを添加したのちにアクチビ

ンAを添加してもよい。VPAはIFN γ の産生を増強することから、アクチビンAを先に添加したのちにVPAを添加することが、好ましい。

- [0025] 本発明によれば、VPAでNK T細胞を前処理又は培養することにより、NK T細胞を活性化することを必要とする患者、例えばガン患者の体内においてNK T細胞を活性化できる。

実施例

[0026] 実施例1 iPS-NK T細胞の樹立

iPS-NK T細胞は文献（非特許文献11：Yamada et al., Stem cell, 34: 2852-2860, 2016）に記載される方法により樹立した。iPS細胞の樹立からiPS-NK T細胞の純化培養までのスキームを、図1に示す。

具体的には、図1に示されるように、iPS細胞にコロニーを形成させ（-8~-5日目）、造血幹細胞への1次誘導をし（0~13日目）、iPS-NK T細胞への2次誘導をし（13~33日目）、そしてiPS-NK T細胞の純化培養をした（33~40又は54日目）。

[0027] （基本培地の組成）

12ウェルの培養プレートを用い、初期播種量 $2.5 \times 10^5 / 1 \text{ ml}$ / ウェルで培養開始（0日目）した。培養開始から3日目および5日目に培地0.5 mlを追加し、7日目および10日目に1 mlを追加した。12日目からは培地1 mlを2日ごとに交換し、21日目まで培養を継続した。20%ウシ血清添加 α MEMにヒトIL7（最終 5 ng/ml ）およびIL15（最終 10 ng/ml ）を添加したものを基本培地とした。

[0028] 実施例2 様々な濃度のアクチビンAを添加した培養液におけるiPS-NK T細胞の純化培養（1~100 ng/ml）

実施例1で調製した基本培地に対して、1~100 ngのアクチビンAを添加し、実施例1で調製したiPS-NK T細胞を純化培養した。

アクチビンAは、純化培養の初日（造血幹細胞の誘導から33日目）に加え、その後2週間（造血幹細胞の誘導から54日目まで）培養し（37℃・5%炭酸ガス）、細胞数の変化を経時的に記録した。結果を、図2に示す。

結果から、アクチビンAの添加により、純化培養の初日から2週間を超えるまで、iPS-NKT細胞の数は増大し続けることが確認された。

また、アクチビンAの添加量が、培養液に対して5 ng/ml以上である場合に、特には10 ng~50 ng/mlである場合に、細胞増殖の効果は、格別に優れていることが確認された。

本実施例で増殖したiPS-NKT細胞は、その標的細胞傷害活性を維持していた。

[0029] 実施例3 様々な濃度のVPAを添加した培養液におけるiPS-NKT細胞の純化培養(3.9~1000 μM)

実施例1で調整した基本培地に対して、3.9~1000 μMのVPAを添加し、実施例1で調製したiPS-NKT細胞を純化培養した。

VPAは、純化培養の初日(造血幹細胞の誘導から33日目)に加え、その後1週間(造血幹細胞の誘導から40日目まで)培養し(37℃・5%炭酸ガス)、細胞数の変化とIFNγの産生能を記録した。結果を、図3に示す。

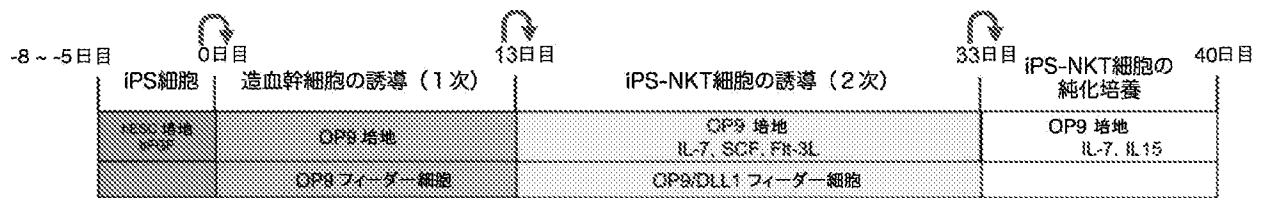
結果から、VPAの添加により、純化培養の初日から1週間を超えるまで、iPS-NKT細胞の数を増大させることが確認された。また、比較的高濃度のVPAの添加により、IFNγの産生能が上昇することが確認された。

VPAの添加量が、培養液に対して3.9 μM~250 μMである場合に、細胞増殖の効果は格別に優れていることが確認され、培養液に対して15.6 μM~250 μMである場合に、IFNγの産生能が格別に優れていることが確認された。

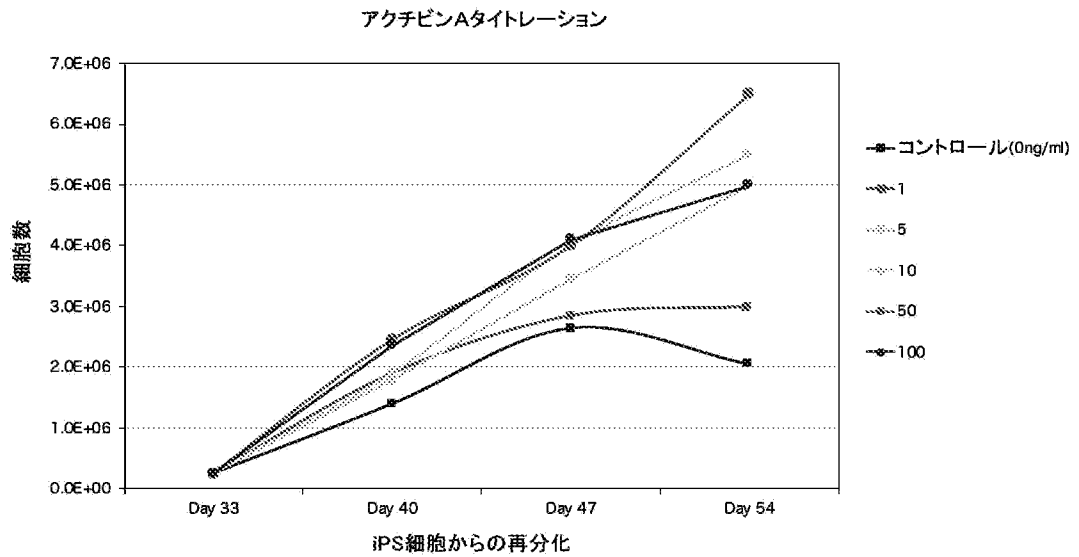
請求の範囲

- [請求項1] アクチビン A 及び／又は V P A を含む、N K T 細胞培養のための添加剤。
- [請求項2] N K T 細胞が、末梢血から分離されるか、幹細胞又は前駆細胞から分化誘導された N K T 細胞である、請求項 1 記載の添加剤。
- [請求項3] アクチビン A 及び／又は V P A を添加した培地で培養する工程を含む、N K T 細胞の培養方法。
- [請求項4] N K T 細胞が、末梢血から分離されるか、幹細胞又は前駆細胞から分化誘導された N K T 細胞である、請求項 3 記載の培養方法。
- [請求項5] 培地におけるアクチビン A の濃度が、5 ～ 1 0 0 n g ／ m l である、請求項 4 記載の培養方法。
- [請求項6] 培地における V P A の濃度が、3 . 9 ～ 2 5 0 μ M である、請求項 4 記載の培養方法。

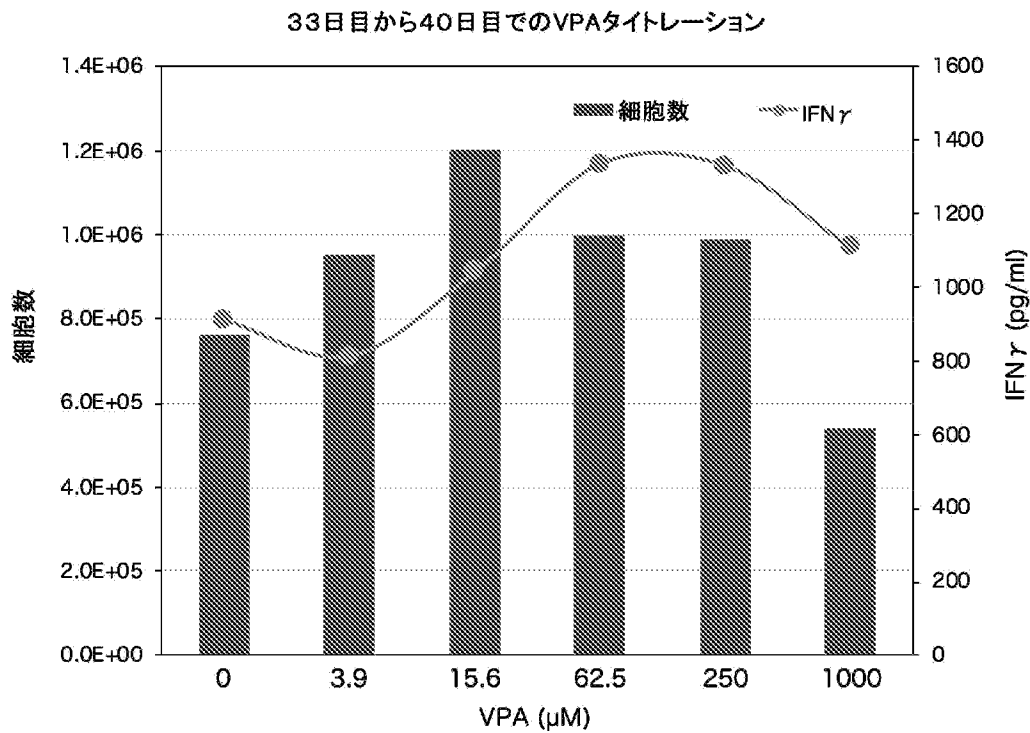
[図1]



[図2]



[図3]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2020/009214

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07C 53/128 (2006.01)n; C07K 14/495 (2006.01)n; C12N 5/0783 (2010.01)i; C12N 1/00 (2006.01)i

FI: C12N5/0783; C12N1/00 G; C07K14/495; C07C53/128

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)

C07C53/128; C07K14/495; C12N5/0783; C12N1/00

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

Published examined utility model applications of Japan	1922-1996
Published unexamined utility model applications of Japan	1971-2020
Registered utility model specifications of Japan	1996-2020
Published registered utility model applications of Japan	1994-2020

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

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	WO 2010/027094 A1 (INST OF PHYSICAL & CHEMICAL RES) 11.03.2010 (2010-03-11) claims, paragraphs [0010], [0018], [0031]	1-4 5-6
A	MA, C. et al., "Activin A regulates activities of peripheral blood natural killer cells of mouse in an autocrine and paracrine manner", Experimental Cell Research (2019) vol. 374, pp. 114-121 (Available online 17 November 2018), ISSN:0014-4827 page 114, abstract	1-6
A	ROBSON, N. C. et al., "Activin-A attenuates several human natural killer cell functions", Blood (2009) vol. 113, no. 14, pp. 3218-3225, ISSN:0006-4971 page 3218, abstract	1-6



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
19 May 2020 (19.05.2020)

Date of mailing of the international search report
02 June 2020 (02.06.2020)

Name and mailing address of the ISA/
Japan Patent Office
3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku,
Tokyo 100-8915, Japan

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2020/009214

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	HUBER, S., et al., "Activin A promotes the TGF- β -induced conversion of CD4+CD25-T cells into Foxp3+ induced regulatory T cells", The Journal of Immunology (2009) vol. 182, pp. 4633-4640, ISSN:0022-1767 page 4633, abstract	1-6
A	HUANGFU, D., et al., "Induction of pluripotent stem cells by defined factors is greatly improved by small-molecule compounds", Nature Biotechnology (2008) vol. 26, no. 7, pp. 795-797, ISSN: 1087-0156 page 795 abstract	1-6

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/JP2020/009214

Patent Documents
referred in the
ReportPublication
Date

Patent Family

Publication
Date

WO 2010/027094 A1

11 Mar. 2010

US 2011/0236362 A1
claims, paragraphs
[0026], [0066],
[0090]
EP 2336303 A1

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC）） C07C 53/128(2006.01)n; C07K 14/495(2006.01)n; C12N 5/0783(2010.01)i; C12N 1/00(2006.01)i FI: C12N5/0783; C12N1/00 G; C07K14/495; C07C53/128										
B. 調査を行った分野										
調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC）） C07C53/128; C07K14/495; C12N5/0783; C12N1/00										
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 <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922-1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971-2020年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2020年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2020年</td> </tr> </table>			日本国実用新案公報	1922-1996年	日本国公開実用新案公報	1971-2020年	日本国実用新案登録公報	1996-2020年	日本国登録実用新案公報	1994-2020年
日本国実用新案公報	1922-1996年									
日本国公開実用新案公報	1971-2020年									
日本国実用新案登録公報	1996-2020年									
日本国登録実用新案公報	1994-2020年									
国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語） JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII); Cplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS (STN)										
C. 関連すると認められる文献										
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号								
X	WO 2010/027094 A1 (独立行政法人理化学研究所) 11.03.2010 (2010-03-11) 特許請求の範囲, [0010], [0018], [0031]	1-4								
A		5-6								
A	MA, C., et al., Activin A regulates activities of peripheral blood natural killer cells of mouse in an autocrine and paracrine manner, Experimental Cell Research (2019) Vol.374, pp.114-121 (Available online 17 November 2018), ISSN:0014-4827 第114頁要約	1-6								
A	ROBSON, N.C., et al., Activin-A attenuates several human natural killer cell functions, Blood (2009) Vol.113, No.14, pp.3218-3225, ISSN:0006-4971 第3218頁要約	1-6								
A	HUBER, S., et al., Activin A promotes the TGF- β -induced conversion of CD4+CD25- T cells into Foxp3+ induced regulatory T cells, The Journal of Immunology (2009) Vol.182, pp.4633-4640, ISSN:0022-1767 第4633頁要約	1-6								
☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。 ☒ パテントファミリーに関する別紙を参照。										
* 引用文献のカテゴリー “A” 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの “E” 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの “L” 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す） “O” 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 “P” 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献 “T” 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの “X” 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの “Y” 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの “&” 同一パテントファミリー文献										
国際調査を完了した日 19.05.2020	国際調査報告の発送日 02.06.2020									
名称及びあて先 日本国特許庁(ISA/JP) 〒100-8915 日本国 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	権限のある職員（特許庁審査官） 藤澤 雅樹 4B 5802 電話番号 03-3581-1101 内線 3448									

C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	HUANGFU, D., et al., Induction of pluripotent stem cells by defined factors is greatly improved by small-molecule compounds, Nature Biotechnology (2008) Vol.26, No.7, pp.795-797, ISSN:1087-0156 第 7 9 5 頁要約	1-6

国際調査報告
パテントファミリーに関する情報

国際出願番号

PCT/JP2020/009214

引用文献			公表日	パテントファミリー文献	公表日
WO	2010/027094	A1	11.03.2010	US 2011/0236362 A1 特許請求の範囲, [0026], [0066], [0090] EP 2336303 A1	