

(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
2012 年 2 月 16 日(16.02.2012)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2012/020757 A1

- (51) 国際特許分類:
C12N 5/10 (2006.01) A61P 31/16 (2006.01)
A61K 35/26 (2006.01) A61P 31/18 (2006.01)
A61P 1/16 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)
A61P 31/00 (2006.01) A61P 35/02 (2006.01)
A61P 31/06 (2006.01) C12N 5/00 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2011/068153
- (22) 国際出願日: 2011 年 8 月 9 日(09.08.2011)
- (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 2010-179702 2010 年 8 月 10 日(10.08.2010) 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): 百々 克行 (DODO, Katsuyuki) [JP/JP]; 〒5202193 滋賀県大津市瀬田三丁目 4 番 1 号 タカラバイオ株式会社内 Shiga (JP). 蝶野 英人 (CHONO, Hideto) [JP/JP]; 〒5202193 滋賀県大津市瀬田三丁目 4 番 1 号 タカラバイオ株式会社内 Shiga (JP). 峰野 純一 (MINENO, Junichi) [JP/JP]; 〒5202193 滋賀県大津市瀬田三丁目 4 番 1 号 タカラバイオ株式会社内 Shiga (JP).
- (74) 代理人: 田中 光雄, 外(TANAKA, Mitsuo et al.); 〒5400001 大阪府大阪市中央区城見 1 丁目 3 番 7 号 I M P ビル青山特許事務所 Osaka (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (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, 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 (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, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告 (条約第 21 条(3))
— 明細書の別個の部分として表した配列リスト (規則 5.2(a))

(54) Title: PRODUCTION METHOD FOR CELL POPULATIONS

(54) 発明の名称: 細胞集団の製造方法

(57) Abstract: The present invention addresses the problem of providing cell populations having a high proportion of CD4-positive naïve T cells and/or CD4-positive central memory T cells, and a production method thereof. The present invention provides a production method for CD4-positive T cell populations which is characterized by using anti-CD3 antibodies, fibronectin fragments, and Interleukin-4. The method is characterized not only by the attainment of a cell group with a high proportion of CD4-positive naïve T cells and/or CD4-positive central memory T cells, but also by a high bulk yield.

(57) 要約: 本発明は、細胞集団の製造方法において、CD4 陽性ナイーブ T 細胞及び/又は CD4 陽性セントラルメモリー T 細胞を高含有する細胞集団、及びその製造方法を提供することを課題とする。本発明は、抗 CD3 抗体、フィブロネクチンフラグメント及びインターロイキン-4 を用いることを特徴とする CD4 陽性 T 細胞集団の製造方法を提供する。当該方法は CD4 陽性ナイーブ T 細胞及び/又は CD4 陽性セントラルメモリー T 細胞を高含有する細胞集団が得られるだけでなく、拡大培養率が高いという特徴を有する。

WO 2012/020757 A1

明 細 書

発明の名称：細胞集団の製造方法

技術分野

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

背景技術

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

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

[0004] 外科手術、化学療法、放射線療法に次ぐ第4のがんの治療法として、免疫療法が近年関心を集めている。免疫療法は本来ヒトが有する免疫力を利用するため、患者への肉体的負担が他の治療法と比べて軽いと言われている。免疫療法としては、体外で誘導したCTLや末梢血単核球などから種々の方法で拡大培養して得られるリンフォカイン活性化細胞、CD4陽性T細胞、NK細胞、 $\gamma\delta$ T細胞などを移入する療法、体内での抗原特異的CTLの誘

導を期待する樹状細胞移入療法やペプチドワクチン療法、T_h1型細胞療法、更にこれら細胞に種々の効果が期待できる遺伝子を体外で導入して体内に移入する免疫遺伝子療法などが知られている。

[0005] 従来、免疫療法において、細胞傷害活性を示すCTLを利用した細胞医療が進められているが、最近、前記CTLの活性を補助するT_h細胞を利用したT_h細胞医療が注目されている（例えば、非特許文献1、特許文献1）。前記のとおり、T_h細胞は、T_h1型細胞とT_h2型細胞に分けられる。T_h1型細胞は、インターフェロン γ （IFN- γ ）、インターロイキン（IL）-2などのサイトカインを産生し、細胞性免疫のエフェクターとして働く。一方、T_h2型細胞は、IL-4、IL-5、IL-13などのサイトカインを産生し、液性免疫の調節を担っている。

[0006] 後天性免疫不全症（AIDS）を対象とした細胞療法として、HIVウイルスの標的細胞であるCD4陽性T細胞に遺伝子導入等の改変を行い、患者に移入する療法が近年注目されている（例えば、非特許文献2）。例えば、HIVの構造タンパクの一つであるgp120をコードするRNAに対するアンチセンスRNAを発現する遺伝子をHIV患者のCD4陽性T細胞に導入し、抗HIV効果を付加したCD4陽性T細胞を患者に移入する臨床試験が米国で実施されている。

[0007] 近年、免疫療法において、すでに終末分化したエフェクターであるT_h細胞よりも、より未分化な状態のナイーブT細胞やセントラルメモリーT細胞が注目されている。ナイーブT細胞は、抗原により一度も活性化されておらず、T_h1型細胞もしくはT_h2型細胞への分化方向付けがされていない細胞（T_h0）であり、CD4陽性ナイーブT細胞を抗原とサイトカイン存在下で培養することにより、T_h1型細胞又はT_h2型細胞へ分化誘導できることが明らかとなっている。ナイーブT細胞は、CD45RA、CD62L、CCR7などのリンパ球の細胞表面抗原マーカーを発現することが知られている。

[0008] 前記のとおり、未分化な状態のナイーブT細胞は、細胞医療や遺伝子治療

の分野において重要であり、細胞集団の製造においては、細胞増殖効率が高く、治療に適した細胞が多く得られる工程を含む方法の開発が望まれており、T h 1 型細胞の製造方法が開発されている（例えば、特許文献2）。

先行技術文献

特許文献

[0009] 特許文献1：特開2005-179299号公報

特許文献2：国際公開第2008/143255号パンフレット

非特許文献

[0010] 非特許文献1：がん・リサーチ（Cancer Research）、第66巻、第3号、第1809～1817頁（2006）

非特許文献2：ネイチャー・バイオテクノロジー（Nature Biotechnology）、第25巻、第12号、第1444～1454頁（2007）

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0011] 本発明の目的は、細胞医療に有効な細胞集団の製造方法を提供することにある。

課題を解決するための手段

[0012] 本発明者らは、上記課題を解決すべく鋭意研究を行った結果、CD4陽性T細胞を拡大培養する際、通常、Th2型細胞への分化誘導に用いられているインターロイキン-4をCD3リガンド、及びフィブロネクチンフラグメントと共に用いて培養を行ったところ、驚くべきことに、Th2型細胞への分化誘導ではなく、CD62L及び／又はCCR7を発現する細胞集団、すなわち、より未分化なCD4陽性ナイーブT細胞及び／又はCD4陽性セントラルメモリーT細胞の含有率が高い細胞集団が得られることを見出し、本発明を完成させた。

[0013] すなわち、本発明を概説すれば、本発明は、

[1] 下記工程を包含することを特徴とする、CD62L及び／又はCCR7を発現する細胞集団の製造方法、

工程(1) : T細胞を含有する細胞集団からCD8陽性T細胞を除去、又はCD4陽性T細胞を採取する工程、及び

工程(2) : 工程(1)で得られた細胞集団を、下記(A)及び(B)の存在下で培養し、かつ当該培養中及び／又は当該培養後の拡大培養中、全部もしくは一部の期間において、下記(C)の存在下で培養する工程、

(A) フィブロネクチン、フィブロネクチンフラグメント及びそれらの混合物からなる群より選択される少なくとも1つのポリペプチド

(B) CD3リガンド、又はCD3リガンド及びCD28リガンド

(C) インターロイキン-4

[2] 工程(2)が、[1]記載の(A)及び(B)の存在下で、かつ(C)の存在下で培養し、得られた細胞集団を(C)の存在下で拡大培養する工程である、[1]記載の製造方法、

[3] 工程(2)が、[1]記載の(A)及び(B)の存在下で、かつ(C)の非存在下で培養し、得られた細胞集団を(C)の存在下で拡大培養する工程である、[1]記載の製造方法、

[4] 工程(2)が、[1]記載の(A)及び(B)の存在下で、かつ(C)の存在下で培養し、得られた細胞集団を(C)の非存在下で拡大培養する工程である、[1]記載の製造方法、

[5] 更に外来遺伝子を導入する工程を包含する、[1]～[4]のいずれか1つに記載の製造方法、

[6] [1]記載の(A)及び(B)の、又は(B)の存在下で、かつ(C)の非存在下での培養により得られた細胞集団と比較して、下記(1)～(5)からなる群より選択される少なくとも1つの細胞が高比率に含有されている、[1]～[5]のいずれか1つに記載の製造方法で得られる細胞集団、

(1) : CD4陽性CD45RA陽性CCR7陽性T細胞

(2) : CD4陽性CD45RA陽性CD62L陽性T細胞

(3) : CD4陽性CD45RA陰性CCR7陽性T細胞

(4) : CD4陽性CD45RA陰性CD62L陽性T細胞

(5) : CD4陽性CXCR4陽性細胞

[7] 医薬に使用するための[6]記載の細胞集団、

[8] 医薬の製造に用いる、[6]記載の細胞集団、

[9] [6]記載の細胞集団を有効成分として含有する医薬、及び

[10] 対象に有効量の[6]記載の細胞集団を投与する工程を含む、疾患の治療方法又は予防方法、に関する。

なお本発明において、拡大培養とは所望の細胞を増殖させる培養（細胞数を増加させる培養）を意味する。

発明の効果

[0014] 本発明により、CD62L及び／又はCCR7を発現する細胞集団、すなわちCD4陽性ナイーブT細胞及び／又はCD4陽性セントラルメモリーT細胞を高含有する細胞集団の製造方法が提供される。当該製造方法は細胞増殖率が高い。また当該製造方法により得られる細胞集団は、CD4陽性CD45RA陽性CCR7陽性T細胞、CD4陽性CD45RA陽性CD62L陽性T細胞、CD4陽性CD45RA陰性CCR7陽性T細胞、CD4陽性CD45RA陰性CD62L陽性T細胞、CD4陽性CXCR4陽性細胞の比率が高く、細胞免疫療法による疾患の治療に極めて有用である。

発明を実施するための形態

[0015] 本発明において、「T細胞」はTリンパ球とも呼ばれ、免疫応答に関与するリンパ球のうち胸腺に由来する細胞を意味する。T細胞には、ヘルパーT細胞（Th1型細胞及びTh2型細胞）、サプレッサーT細胞、制御性T細胞、CTL、ナイーブT細胞、メモリーT細胞、 α 鎖と β 鎖のTCRを発現する $\alpha\beta$ T細胞、 γ 鎖と δ 鎖のTCRを発現する $\gamma\delta$ T細胞が含まれる。本発明の原料として用いられる「T細胞を含有する細胞集団」としては、血液

(末梢血、臍帯血など)、骨髓液の他、これらより採取、単離、精製又は誘導された末梢血単核細胞(PBMC)、血球系細胞、造血幹細胞、臍帯血単核細胞などを含む細胞集団が例示される。これらの細胞はIL-2などのサイトカインにより生体内(イン・ビボ)や生体外(エクス・ビボ)で活性化されていてもよい。これらの細胞は生体から採取されたもの、あるいは生体外での培養を経て得られたもの、もしくはそれらを凍結保存したもののいずれも使用することができる。

[0016] 本発明において、「フィブロネクチン(以下、FNと記載)」及び「FNフラグメント」は、天然から得られたもの(天然のFNや天然のFNを酵素消化により断片化したFNフラグメント等)、又は組換えDNA技術により製造されたもののいずれでもよい。FN及びFNフラグメントは、例えば、ルオスラーティ E. ら[Ruoslahti E., et al., ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー(J. Biol. Chem.), 第256巻、第14号、第7277~7281頁(1981)]の開示に基づき、天然起源の物質から実質的に純粋な形態で製造することができる。ここで、本明細書に記載された実質的に純粋なFN及びFNフラグメントとは、これらが天然においてFNと一緒に存在する他のタンパク質を本質的に含有していないことを意味する。本発明において、FN及びFNフラグメントは、単一の分子種を使用してもよく、複数の分子種を混合して使用してもよい。

[0017] 本発明に使用できるFNフラグメント、及び該フラグメントの調製に関する有用な情報は、キミヅカ F. ら[Kimizuka F., et al., ジャーナル・オブ・バイオケミストリー(J. Biochem.), 第110巻、第284~291頁(1991)]、コーンブリット A. R. ら[Kornblihtt A. R., et al., EMBO ジャーナル(EMBO J.), 第4巻、第7号、第1755~1759頁(1985)]、及びセキグチ K. ら[Sekiguchi K., et al., バイオケミストリー(Biochemistry), 第25巻

、第17号、第4936～4941頁（1986）]等より得ることができる。また、FNをコードする核酸配列又はFNのアミノ酸配列は、NCBI Reference Sequence ID (RefSeqID) : NM_002026、NP_002017に開示されている。

[0018] 本発明には、細胞接着活性及び／又はヘパリン結合活性を有するFNフラグメントが好適に使用できる。FN中には、細胞表面のインテグリンと結合する活性を有する領域が存在する。当該領域として、VLA (very late antigen) -4又はVLA-5結合領域が例示される。FNのC末端側寄りの部位にはIII CSと呼ばれる領域が存在する。ここはCS-1と呼ばれる25アミノ酸からなる領域（配列番号1）が含まれており、当該領域はVLA-4に対して結合活性を示す。

[0019] また、FNにはIII型と呼ばれる繰り返し配列が存在しており、N末端側から10番目のIII型の繰り返し配列（配列番号2）には細胞への結合領域が存在している。前記配列中のVLA-5との結合に中心的な役割を果たす配列は、Arg-Gly-Asp-Ser (RGDS: 配列番号3)の4アミノ酸である。C-274（配列番号4）は前記III型の繰り返し配列（配列番号2）を含むポリペプチドであり、強い細胞接着活性を有する組換えFNフラグメントの1つである。

[0020] 更に、FNはヘパリンと結合する活性を有している。FNのヘパリン結合領域は、前記III型の繰り返し配列のN末端から12～14番目に相当する。H-271（配列番号5）はこのヘパリン結合領域からなる組換えFNフラグメントの1つである。

[0021] 本発明には、各領域を単独で含有するFNフラグメントのほか、これら領域の2つ以上が直接、あるいは適切なリンカーを介して結合されたFNフラグメントを使用することができる。これらFNフラグメントに含まれるFN由来の領域は同一のものであっても、異なるものであってもよい。複数の結合領域を分子内に有するFNフラグメントとしては、VLA-4結合領域とヘパリン結合領域を含有するH-296（配列番号6）、VLA-5結合領

域とヘパリン結合領域を含有するCH-271（配列番号7）、VLA-4結合領域、VLA-5結合領域及びヘパリン結合領域を含有するCH-296（配列番号8）、VLA-4結合領域及びVLA-5結合領域を含有するC-CS1（配列番号9）等のポリペプチドが例示される。これら各種ポリペプチドは、J. Biochem.、第110巻、第284～291頁（1991）に記載されており、その開示に従って作製することができる。CH-296は、レトロネクチン（Retronectin：登録商標）の名称でタカラバイオ社より販売されている。

[0022] 更に、本発明に使用するFNフラグメントとしては、FNフラグメントにより所望の効果が得られる限り、上記に例示した天然のFNのアミノ酸配列の少なくとも一部を含むフラグメントと同等な機能を有する、当該フラグメントを構成するポリペプチドのアミノ酸配列に1又は数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入又は付加を有するアミノ酸配列からなるポリペプチドである改変型FNフラグメントであってもよい。例えば、C-274やH-271より1つ又は2つのIII型の繰り返し配列を欠失させたものであってもよい。当該FNフラグメントとしては、国際公開第2008/143255号パンフレットの記載のFNフラグメントが例示される。ここで同等の機能を有するとは、当該改変型FNフラグメントの細胞接着活性及び／又はヘパリン結合活性を調べることにより判断することができる。また、後述の「＜3＞本発明の細胞集団の製造方法」において同等の拡大培養率を有すること、もしくは本発明で得られる細胞集団中のCD4陽性ナイーブT細胞及び／又はCD4陽性セントラルメモリーT細胞の含有率が同等であることにより判断できる。

[0023] 細胞接着活性は、本発明で使用されるFNフラグメント（その細胞接着ドメイン）と細胞の接着を公知の方法でアッセイして調べることができる。例えば、このような方法には、ウィリアムズ D. A. らの方法〔ネイチャー（Nature）、第352巻、第438～441頁（1991）〕が含まれる。当該方法は、培養プレートに固定化したフラグメントに対する細胞の

接着を測定する方法である。また、ヘパリン結合活性は、本発明に使用されるF Nフラグメント（そのヘパリン結合ドメイン）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、上記のウィリアムズ D. A. らの方法において、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、同様の方法でフラグメントとヘパリンとの結合の評価を行うことができる。

[0024] 組換えF Nフラグメントの本発明への使用は、入手、取り扱いの容易さの他、その品質の均一性、ウイルス等の混入の危険性が低いという安全面からも好ましい。本発明に使用されるF Nフラグメントの分子量には特に制限はないが、好適には1～200kDa、より好適には5～190kDa、更に好適には10～180kDaである。当該分子量は、例えば、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動により測定することができる。本発明に使用されるF Nフラグメントは、上記に記載の複数の異なるF Nフラグメントを混合して（A）成分として使用することもできる。

[0025] 以下、本発明の製造工程について具体的に説明する。

本発明は下記工程を包含することを特徴とする、CD62L及び／又はCCR7を発現する細胞集団の製造方法である。

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

工程（2）：工程（1）で得られた細胞集団を、下記（A）及び（B）の存在下で培養し、かつ当該培養中及び／又は当該培養後の拡大培養中、全部もしくは一部の期間において下記（C）の存在下で培養する工程。

（A）F N、F Nフラグメント及びそれらの混合物からなる群より選択される少なくとも1つのポリペプチド

（B）CD3リガンド、又はCD3リガンド及びCD28リガンド

（C）インターロイキン-4

[0026] なお、本願明細書において、前記（A）、（B）及び（C）を本発明にお

ける培養成分と記載することがある。また、「(A) FN、FNフラグメント及びそれらの混合物からなる群より選択される少なくとも1つのポリペプチド」を単に「(A) 成分」、「(B) CD3リガンド、又はCD3リガンド及びCD28リガンド」を単に「(B) 成分」、「(C) インターロイキン-4」を単に「(C) 成分」と記載することがある。

[0027] <1>本発明の工程(1)

本発明の製造方法の工程(1)では、T細胞を含有する細胞集団からCD8陽性T細胞を除去、又はCD4陽性T細胞を採取することにより、培養に供する細胞集団を調製することが行われる。CD8陽性T細胞の除去は、細胞表面に発現しているCD8を指標として実施することができ、例えば抗CD8抗体が固定化されたビーズや培養容器などの担体とT細胞を含有する細胞集団とを混合し、前記担体に結合したCD8陽性T細胞を除去する、又は、前記担体と結合しない細胞集団を回収することにより実施される。抗CD8抗体が固定化されたビーズとしては、例えば、Dynabeads M-450 CD8 (インビトロジェン社製)、Eligix anti-CD8 mAb coated nickel particles (バイオトランスプラント社製)、CliniMACS System (Miltenyi Biotec社製)などが好適に使用できる。以下、本明細書において、T細胞を含有する細胞集団からCD8陽性T細胞を除去した細胞集団を「CD8除去細胞集団」と称する場合がある。

[0028] CD4陽性T細胞の採取は、細胞表面に発現しているCD4を指標として実施することができ、例えば抗CD4抗体が固定化されたビーズや培養容器などの担体とT細胞を含有する細胞集団とを混合し、前記担体に結合したCD4陽性T細胞を回収することにより実施される。抗CD4抗体が固定化された前記担体は、例えば、CD4 MicroBeads、CliniMACS System (以上、Miltenyi Biotec社製)、Dynabeads M-450 CD4 (インビトロジェン社製)などが好適に使用できる。

[0029] 本発明において、T細胞を含有する細胞集団から調製したCD8除去細胞集団、具体的にはT細胞を含有する細胞集団としてPBMCを使用して得られたCD8除去細胞集団は、CD4陽性T細胞とともに単球やマクロファージなどを含有する。従って、CD8除去細胞集団は、細胞表面に発現しているCD4を指標として選別したCD4陽性T細胞のみからなる細胞集団とは異なる。

[0030] 本発明の工程（１）又は工程（２）の実施前に、特定の細胞表現型を有する任意の細胞亜集団を採取又は除去することもできる。例えば、PBMCからT細胞を採取した後に前記工程（１）に供することもでき、またPBMCからT細胞以外の血球成分、例えば単球やマクロファージを除去した後に前記工程（１）に供することもできる。当該操作については、特に限定はないが、細胞表面上の適当なマーカー、例えばCDマーカーを指標とすることができる。また、PBMCから単球を除去する場合は、単球のプラスチック素材への接着能を利用して、プラスチック製の培養担体で一時的に培養を実施した後に、非接着細胞を回収することで実施することもできる。その他、製造される細胞集団の用途に応じて適宜、任意の細胞亜集団を採取又は除去することができる。

[0031] <2>本発明の工程（２）

本発明の製造方法の工程（２）では、工程（１）で得られた細胞集団を、前記（Ａ）成分及び（Ｂ）成分の存在下で培養し、かつ当該培養中及び／又は当該培養後の拡大培養中、全部もしくは一部の期間において前記（Ｃ）成分の存在下で培養することにより実施される。

[0032] 当該工程（２）は、工程（１）で得られた細胞集団を、前記（Ａ）成分及び（Ｂ）成分の存在下で刺激し、次いで刺激された細胞集団を拡大培養することにより実施される。さらに当該刺激中及び／又は当該刺激後の拡大培養中の全部もしくは一部の期間において、前記（Ｃ）成分の存在下での培養が行われる。

[0033] 当該工程（２）としては、以下のような態様が例示される。

態様１：工程（１）で得られた細胞集団を、前記（Ａ）成分及び（Ｂ）成分の存在下で培養し、かつ当該培養期間中の全部もしくは一部の期間において（Ｃ）成分を共存させる。当該培養により得られた細胞集団を、更に拡大培養し、かつ当該拡大培養中の全部もしくは一部の培養を（Ｃ）成分の存在下で実施する。

態様２：工程（１）で得られた細胞集団を、前記（Ａ）成分及び（Ｂ）成分の存在下、かつ（Ｃ）成分の非存在下で培養する。当該培養により得られた細胞集団を、更に拡大培養し、かつ当該拡大培養中の全部又は一部の期間の培養を（Ｃ）成分存在下で実施する。

態様３：工程（１）で得られた細胞集団を、前記（Ａ）成分及び（Ｂ）成分存在下で培養し、かつ当該培養中の全部又は一部の期間において（Ｃ）成分を共存させる。当該培養により得られた細胞集団を、更に前記（Ｃ）成分非存在下で拡大培養する。

[0034] 当該工程（２）中の拡大培養は、前記（Ａ）成分及び（Ｂ）成分の存在下による培養後、培養細胞を当該培養容器中で実施することもでき、もしくは、新たな培養容器に移し、新たな培地を添加し希釈して、実施することもできる。当該拡大培養において、前記（Ａ）成分及び（Ｂ）成分の存在の有無については特に限定はなく、前記（Ａ）成分及び（Ｂ）成分が存在したまま拡大培養を行うこともでき、また前記（Ａ）成分及び（Ｂ）成分のいずれか、もしくは両方を除去した後に拡大培養を行うこともできる。好適には、前記（Ａ）成分及び（Ｂ）成分の非存在下で行うことが望ましい。

[0035] なお、当該工程（２）は、（Ａ）成分の存在下のみでの培養、（Ｂ）成分の存在下のみでの培養、及び（Ｃ）成分の存在下のみでの培養を個別に実施し、それらを組合せた培養を意味するものではない。

[0036] 本発明の細胞集団の製造方法において、総培養日数は４～２０日間とすることが、得られる細胞の質及び培養効率上、好ましい。すなわち、総培養日数が４～２０日間である場合、得られる細胞集団は、ＣＤ４陽性ナイーブＴ細胞及び／又はＣＤ４陽性セントラルメモリーＴ細胞の含有率が高い細胞集

団であり、細胞医療分野への使用に極めて適している。なお、総培養日数が4日未満の場合は、一般的な免疫療法に使用するには満足のできる細胞数を得ることができない。本発明において、総培養日数としては、より好適には5～18日間、更に好適には6～16日間が望ましく、高い拡大培養率を実現し、より多くの細胞を取得するという本発明の所望の効果を実現する観点からは、10～14日間が特に望ましい。

[0037] 従って、本発明における工程（2）は、培養開始時から4日間以上、好ましくは5～18日間、更に好適には6～16日間実施される。また工程（2）における前記（A）成分及び（B）成分の存在下での培養は、培養開始時から1日間以上、好ましくは2～5日間、より好ましくは2～4日間実施される。工程（2）における拡大培養は、（A）成分及び（B）成分の存在下の培養後、得られた細胞集団を用いて1日間以上、好ましくは2～12日間、より好ましくは2～10日間実施される。なお、当該工程（2）における、「一部の期間」とは、（A）成分及び（B）成分の存在下で培養し、かつ当該培養中及び／又は当該培養後の拡大培養中の（C）成分の存在下での培養期間であって、培養開始から培養途中までの期間、培養中のみの期間、又は培養途中から培養終了までの期間を示す。また、当該一部の期間を複数回としてもよい。

[0038] 当該工程（2）は、免疫療法への使用のために製造される細胞集団の培養工程の全期間としてもよく、また一部の期間としてもよい。当該培養工程の一部の期間である場合、特に限定はないが、工程（2）の前に、工程（1）で得られた細胞集団を（A）成分、（B）成分及び（C）成分を含まない公知の培地で培養を行ってもよい。この場合、当該培養で得られた細胞集団は、工程（1）で得られた細胞集団と実質的に同じ性質を有する細胞集団になるようにすることは言うまでもない。本願発明の工程（2）は培養初期に実施されることが好ましく、培養開始時に実施されることがより好適である。

[0039] 本発明において、（A）成分の培養中の総濃度としては、特に限定はなく、例えば0.001～500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、特に0.01～500 $\mu\text{g}/\text{mL}$

がより好適である。

[0040] 本発明において、(B)成分中のCD3リガンドとしては、CD3に結合活性を有する物質であれば特に限定はないが、例えば抗CD3抗体が例示され、特に好適には抗CD3モノクローナル抗体が例示され、例えばOKT3〔ジャーナル・オブ・イムノロジー (J. Immunol.)、第124巻、第6号、第2708～2713頁(1980)〕が例示される。(B)成分としてCD3リガンドのみを使用する場合、CD3リガンドの培養中の濃度としては特に限定はなく、例えば抗CD3モノクローナル抗体を使用する場合、 $0.001 \sim 100 \mu\text{g}/\text{mL}$ 、特に $0.01 \sim 100 \mu\text{g}/\text{mL}$ が好適である。

[0041] 本発明において、(B)成分中のCD28リガンドとしては、CD28に結合活性を有する物質であれば特に限定はないが、例えば抗CD28抗体、B7-1、B7-2、CD80が例示され、好適には抗CD28モノクローナル抗体が例示される。(B)成分としてCD3リガンド及びCD28リガンドを使用する場合、CD3リガンド及びCD28リガンドの培養中の濃度としては、特に限定はない。例えば抗CD3モノクローナル抗体及び抗CD28モノクローナル抗体を使用する場合、両抗体の総濃度が $0.001 \sim 100 \mu\text{g}/\text{mL}$ 、特に $0.01 \sim 100 \mu\text{g}/\text{mL}$ がより好適である。

[0042] 上記(A)成分及び／又は(B)成分は、培地中に溶解して共存させる他、適当な固相、例えばシャーレ、フラスコ又はバック等の細胞培養用器材(培養用容器：開放系のもの、及び閉鎖系のもののいずれをも含む)、又はビーズ、メンブレン、スライドガラス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。上記(A)成分の固相への固定化は、例えば、適当な緩衝液に溶解した(A)成分を固相と接触させることにより実施でき、国際公開第97/18318号パンフレット、及び国際公開第00/09168号パンフレットに記載の方法によっても実施できる。上記(B)成分で抗CD3抗体及び抗CD28抗体を使用する場合は、これらの抗体が固定化さ

れたビーズ（例えば、Dynabeads Human T-Activator CD3/CD28、Dynabeads CD3/CD28、Dynabeads CliniqueX Vivo CD3/CD28（いずれも invitrogen社製）を使用することもできる。

[0043] 上記（A）成分及び／又は（B）成分を固相に固定化しておけば、培養終了後、細胞と固相とを分離するのみで前記成分と得られた細胞集団とを容易に分離することができ、細胞集団への前記成分の混入を防ぐことができる。前記成分の固定化量は、前記器材又は担体を培養に供した際に、当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選択されるが、所望の効果が得られれば特に限定されるものではない。

[0044] 本発明において、（C）成分であるインターロイキン-4は、天然から得られたもの、又は人為的に合成されたもの、すなわち非天然のものいずれでもよい。人為的に合成されたものの場合、本発明の所望の効果を有するものであれば、そのフラグメント、例えばN末端側の1～30アミノ酸が欠損したフラグメントであってもよい。また、工程（1）で得られた細胞集団に発現ベクターを用いてインターロイキン-4遺伝子を導入してインターロイキン-4を産生させても良い。（C）成分の培養中の総濃度としては、特に限定はなく、例えば0.001～1000 ng/mL、特に0.01～100 ng/mLがより好適である。

[0045] 本発明の細胞集団の製造方法において使用される培地は、特に限定はなく、T細胞の拡大培養に必要な成分を混合して作製された公知の培地を使用することができ、例えば市販の培地を適宜選択して使用することができる。これらの培地はその本来の構成成分以外にサイトカイン類、ケモカイン類、適当なタンパク質、又はその他の成分を含んでいてもよい。ここでサイトカイン類とは、インターロイキン-4以外のサイトカイン類を示し、例えばIL-2、IL-7、IL-12、IL-15、IFN- γ などが例示され、好適には、IL-2を含有する培地が使用される。IL-2の培地中の濃度には特に限定はないが、例えば、好適には0.01～ 1×10^5 U/mL、特に

1 ~ 1×10^4 U/mL が好適である。また、ケモカイン類とは、T細胞に作用し遊走活性を示すものであれば特に限定はないが、例えば RANTES、CCL21、MIP1 α 、MIP1 β 、CCL19、CXCL12、IP-10、MIG が例示される。この他、レクチンなどのリンパ球刺激因子を添加することもできる。

[0046] 更に、培地中に血清又は血漿を添加してもよい。これらの培地中への添加量は特に限定はないが、0容量%超~20容量%が例示され、また培養段階に応じて使用する血清又は血漿の量を変更することができる。例えば、血清又は血漿濃度を段階的に減らして使用することもできる。なお、血清又は血漿の由来としては、自己（培養する細胞と由来が同じであることを意味する）もしくは非自己（培養する細胞と由来が異なることを意味する）のいずれでもよい。また、ヒト血清アルブミンのような、単離された血清成分を添加してもよい。

[0047] 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 $10 \sim 1 \times 10^8$ cells/mL、好適には $1 \times 10^2 \sim 5 \times 10^7$ cells/mL、更に好適には $1 \times 10^3 \sim 2 \times 10^7$ cells/mL が例示される。また、培養条件に特に限定はなく、通常の細胞培養に使用される条件を使用することができる。例えば、37℃、5%CO₂などの条件で培養することができる。また、適当な時間間隔で細胞培養液を新鮮な培地を加えて希釈するか、培地を交換するか、もしくは細胞培養用器材を交換することができる。

[0048] 本発明の細胞集団の製造方法には、培養器材としてシャーレ、フラスコ、バッグ、大型培養槽又はバイオリアクター等の細胞培養用器材（容器）を使用することができる。なお、バッグとしては、細胞培養用CO₂ガス透過性バッグが好適である。大量の細胞を必要とする場合には大型培養槽を使用してもよい。培養は開放系、閉鎖系のどちらでも実施することができるが、好適には得られる細胞集団の安全性の観点から閉鎖系で実施される。

[0049] 本発明の製造方法において、外来遺伝子を導入する工程を更に包含するこ

とができる。なお、「外来遺伝子」とは、遺伝子導入対象の細胞集団に人為的に導入される遺伝子のことを意味し、遺伝子導入対象の細胞集団と同種由来のものも包含される。

[0050] 上記外来遺伝子を導入する工程は、本発明の任意の時点で実施することができる。例えば、前記工程（１）を実施する前の細胞集団、前記工程（１）で得られた細胞集団、又は前記工程（２）で得られた細胞集団へ実施してもよい。また、前記工程（２）と同時もしくは途中で行ってもよい。

[0051] 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実施することができる。例えば、ウイルスベクターを用いて、又はウイルスベクターを用いずに実施することができる。それらの方法の詳細については、既に多くの文献が公表されている。

[0052] 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又はセンダイウイルスベクター等が使用される。導入される細胞の染色体DNA中に当該ベクターに外来遺伝子を安定に組込むことができるレトロウイルスベクター又はレンチウイルスベクターが特に好適である。上記ウイルスベクターとしては、感染した細胞中で自己複製できないように複製能を欠損させたものが好適である。また、遺伝子導入の際にレトロネクチン（登録商標、タカラバイオ社製）などの遺伝子導入効率を向上させる物質を用いることもできる。

[0053] 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、リポソーム、又はリガンドーポリリジンなどの担体を使用する方法、あるいはリン酸カルシウム法、エレクトロポレーション法、又はパーティクルガン法などを使用することができる。この場合にはプラスミドDNA、直鎖状DNA又はRNAに組込まれた外来遺伝子が導入される。

[0054] 導入される外来遺伝子には特に限定はなく、本発明の製造方法により得られる細胞集団を使用する免疫療法や対象疾患に応じて、任意の遺伝子〔酵素

、サイトカイン類、又はレセプター類等のタンパク質をコードするものの他、細胞内抗体、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] ができる。これら外来遺伝子としては、例えば、配列特異的 RNA 分解酵素である MazF を発現する遺伝子を外来遺伝子として CD4 陽性 T 細胞に導入することにより抗 HIV 効果を示す CD4 陽性 T 細胞を取得することができる (例えば、国際公開第 2007/020873 号パンフレット及び国際公開第 2008/133137 号パンフレット)。また、Low affinity Nerve Growth Factor Receptor の細胞外ドメイン遺伝子 (Δ LNNGFR) 等の、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。

[0055] 前記外来遺伝子は、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又はプラスミド等に挿入して使用することができる。また、エンハンサー配列、ターミネーター配列、又はイントロン配列がベクター内に存在していてもよい。

[0056] <3> 本発明の細胞集団の製造方法

本発明の製造方法は、その製造の過程において細胞集団の細胞増殖率が高いことを 1 つの特徴とする。本明細書において、細胞増殖率は拡大培養率とも記載する。細胞増殖率は、ある一定の培養期間において、培養開始時の細胞数が培養後に何倍に増殖したのかを示す数値である。ここで、細胞増殖率が高いとは、本発明の細胞集団の製造方法の培養条件 (以下、本発明の培養条件と記載する) における細胞集団の細胞増殖率が、(A) 成分及び (B) 成分の存在下で、かつ (C) 成分の非存在下での培養、又は (B) 成分のみの存在下で、かつ (C) 成分の非存在下での培養条件 (以下、本発明の培養条件でない場合と記載する) における細胞集団の細胞増殖率と比較して高いことを意味する。好適には本発明の培養条件は、本発明の培養条件ではない場合と比較して、培養開始から 7 日目以降において、5% 以上、より好ましくは 10% 以上高い細胞増殖率で細胞集団を得ることができる。

[0057] 本発明の製造方法により、CD62L及び／又はCCR7を発現する細胞の含有率が高い細胞集団、すなわちCD4陽性ナイーブT細胞及び／又はCD4陽性セントラルメモリーT細胞の含有率の高い細胞集団が得られる。得られた細胞集団中のCD4陽性ナイーブT細胞比率やCD4陽性セントラルメモリーT細胞比率を調べるには、細胞表面抗原マーカーを測定することにより実施できる。例えば、CD4陽性ナイーブT細胞は、CD45RA陽性CCR7陽性、CD45RA陽性CD62L陽性、CXCR4陽性を示す細胞である。CD4陽性セントラルメモリーT細胞は、CD45RA陰性CCR7陽性、CD45RA陰性CD62L陽性、CXCR4陽性を示す細胞である。これら細胞表面抗原マーカーの陽性率を測定することにより、本発明の製造方法により得られた細胞集団がCD4陽性ナイーブT細胞及び／又はCD4陽性セントラルメモリーT細胞の含有率が高い細胞集団であることを確認できる。

[0058] 更に、本発明の製造方法は、前記の方法で得られた細胞集団より、更に、CD4陽性ナイーブT細胞及び／又はCD4陽性セントラルメモリーT細胞を分離する工程を包含してもよい。分離は、例えばセルソーター、磁気ビーズ、又はアフィニティーカラム等による公知の手法で行うことができる。

[0059] また、本発明の方法により製造された細胞集団から、必要に応じてT細胞をクローン化することにより、安定したT細胞株として維持することもできる。本発明の方法により得られた細胞集団を用いて、公知の方法により更に培養することで新たに細胞集団を得ることもできる。

[0060] 当該工程を実施することにより、更にCD4陽性ナイーブT細胞及び／又はCD4陽性セントラルメモリーT細胞の含有率が高い細胞集団を得ることが可能である。

[0061] <4>本発明により製造される細胞集団、およびその使用

本発明は、前記方法により製造される細胞集団も提供する。当該細胞集団は、前述のとおりCD4陽性ナイーブT細胞及び／又はCD4陽性セントラルメモリーT細胞の含有率が高い細胞集団である。すなわち、当該細胞集団

は、(A)成分及び(B)成分の、又は(B)成分の存在下で、かつ(C)成分の非存在下での培養により得られた細胞集団と比較して、下記(1)～(5)からなる群より少なくとも1つが高比率に含有されている細胞集団である。

- (1) : CD4陽性CD45RA陽性CCR7陽性T細胞
- (2) : CD4陽性CD45RA陽性CD62L陽性T細胞
- (3) : CD4陽性CD45RA陰性CCR7陽性T細胞
- (4) : CD4陽性CD45RA陰性CD62L陽性T細胞
- (5) : CD4陽性CXCR4陽性細胞

当該細胞集団としては、CD4陽性ナイーブT細胞及びCD4陽性セントラルメモリーT細胞をより高含有することが望ましいという観点から、好ましくは前記(1)～(5)のうち少なくとも2つ以上、より好ましくは3つ以上、さらに好ましくは4つ以上、さらにより好ましくはすべてが高比率に含有されている細胞集団であることが例示される。

[0062] 本発明は医薬に使用するための細胞集団、医薬の製造に使用するための細胞集団を提供する。当該細胞集団は、本発明により製造される細胞集団である。当該細胞集団を含有する医薬は免疫療法への使用に適している。例えば、本発明により製造された細胞集団を有効成分として、公知の非経口投与に適した有機又は無機の担体、賦活剤又は安定剤と混合し、点滴剤又は注射剤とすることができる。なお、これら治療剤における本発明の細胞集団の含有量、治療剤の投与量、及び当該治療剤に関する諸条件は公知の免疫療法に従って適宜決定できる。例えば、医薬における本発明の細胞集団の含有量としては、特に限定はないが、例えば、好適には $1 \times 10^3 \sim 1 \times 10^{11}$ cells/mL、より好適には $1 \times 10^4 \sim 1 \times 10^{10}$ cells/mL、更に好適には $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^9$ cells/mLが例示される。また、本発明の医薬の投与量としては、特に限定はないが、例えば、成人一日あたり、好適には $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^{12}$ cells/日、より好ましくは、 $5 \times 10^6 \sim 5 \times 10^{11}$ cells/日、更に好ましくは $1 \times 10^7 \sim 2 \times 10^{11}$ cells/日

s / 日が例示される。更に、当該治療剤による免疫療法と、公知の薬剤投与による薬剤療法治療や放射線治療、又は外科的手術による治療との併用を行うこともできる。

[0063] 前記の細胞集団の投与が有効である疾患としては、特に限定はないが、例えば、がん、白血病、悪性腫瘍、肝炎、又は感染症疾患（例えばインフルエンザ、結核、HIV（Human Immunodeficiency Virus、ヒト免疫不全ウイルス）感染症、AIDS、MRSA感染症、VRE感染症、もしくは深在性真菌症）等が例示される。特に、CD4陽性T細胞に感染するHIVが原因となるHIV感染症、AIDS（後天性免疫不全症候群）の治療に有用である。また、本発明の方法により製造される細胞集団は、骨髄移植、放射線照射後等の免疫不全状態での感染症予防又は再発白血病的寛解を目的としたドナーリンパ球輸注、抗がん剤治療、放射線治療、抗体治療、温熱治療、他の免疫療法等、従来の治療法と組み合わせて利用できる。また、所望の外来遺伝子を導入する工程を包含することにより、得られた細胞集団は所望の外来遺伝子の発現により効果を示すさまざまな疾患の治療又は予防に有用である。

[0064] また本発明は、対象に有効量の前述の方法により得られる細胞集団を投与することを含む疾患の治療方法又は予防方法を提供する。当該対象とは、前述のような疾患に罹患した患者を示す。当該対象としては、ヒトのほか、非ヒト対象などが挙げられる。

[0065] 本明細書中において有効量とは、前記細胞集団を上記対象に投与した場合に、該細胞集団を投与していない対象と比較して、治療もしくは予防効果を発揮する当該細胞集団の量である。具体的な有効量は、投与形態、投与方法、使用目的及び対象の年齢、体重、症状などによって適宜設定され一定ではないが、好ましくは、上記の医薬と同様にすればよい。投与方法にも限定はなく、例えば、上記の医薬と同様に、点滴や注射などにより投与すればよい。

[0066] また、本発明は、前記の本発明の製造方法により得られる細胞集団に対し

て、少なくとも1つの刺激因子により刺激を与えることにより、活性化されたCD4陽性T細胞を含む細胞集団を製造することが可能である。従って、本発明は、更にこうして得られた細胞集団をも提供する。このようにして得られる活性化されたCD4陽性T細胞を含む細胞集団は、前記の製造方法により得られるCD4陽性ナイーブT細胞及び／又はCD4陽性セントラルメモリーT細胞を含有する細胞集団と同様に医薬の有効成分として使用できる。ここで刺激因子による刺激とは、刺激因子により前記の本発明の製造方法により得られる細胞集団が活性化されるものであれば特に限定はなく、例えば、本発明の製造方法により得られるCD4陽性ナイーブT細胞及び／又はCD4陽性セントラルメモリーT細胞を含有する細胞集団と刺激因子の共存下での培養により実施することができる。

[0067] 本明細書において、前記の刺激因子としてのサイトカインとは、(C)成分以外のCD4陽性ナイーブT細胞及び／又はCD4陽性セントラルメモリーT細胞に作用し活性化できるものであれば特に限定はないが、例えばIL-2、IFN- γ 、TGF- β 、IL-15、IL-7、IFN- α 、IL-12、CD4OL、IL-27などが例示され、細胞性免疫を増強させる観点からは、IL-2、IFN- γ 、IL-12が例示される。

[0068] なお、本明細書において細胞集団の製造は、当該細胞集団の誘導（活性化）、維持、拡大培養の各工程、又はこれらを組み合わせた工程を包含する工程を指す。

実施例

[0069] 以下に実施例を挙げて本発明を更に具体的に説明するが、本発明は以下の実施例のみに限定されるものではない。なお、以下の実施例で、各実施例中で用いる刺激因子を固定化した培養器材を用いて細胞を培養することを「刺激」と記載することがある。

[0070] 実施例1 インターロイキン-4（IL-4）及びFNフラグメントCH-296を用いたCD8除去細胞集団の拡大培養

[0071] (1) 抗ヒトCD3抗体及びCH-296の固定化

以下の実験で使用する培養器材に抗ヒトCD3抗体（OKT3、ヤンセンファーマ社製）及び配列表の配列番号8で表されるアミノ酸配列を有するFNフラグメント〔商品名：レトロネクチン（登録商標）、タカラバイオ社製、以下、CH-296と記載〕を固定化した。すなわち12穴細胞培養プレート（ファルコン社製）に終濃度 $5\mu\text{g}/\text{mL}$ の抗ヒトCD3抗体と終濃度 $25\mu\text{g}/\text{mL}$ のCH-296を含むACD-A液（テルモ社製）を $0.4\text{mL}/\text{ウェル}$ ずつ添加した後、 37°C で5時間インキュベートした。その後、各ウェルからCH-296を含むACD-A液を吸引除去後、各ウェルを 0.5mL GT-T503培地（タカラバイオ社製）で2回洗浄し各実験に供した（以下、抗ヒトCD3抗体／CH-296固定化プレートと記載）。

[0072] (2) CD8除去細胞集団の調製

インフォームド・コンセントの得られた健常人ドナーから常法に従い調製したヒト末梢血単核細胞（PBMC）を、 2mM EDTA、 0.1% BSAを含むPBS（以下、Buffer 1と称す）を用いて $1\times 10^7\text{cells}/\text{mL}$ になるように懸濁した。その後、Buffer 1で洗浄したCD8ポジティブセレクションビーズ（Dynabeads M-450 CD8：インビトロジェン社製）をPBMC $1\times 10^7\text{cells}$ あたり 2×10^7 ビーズとなるように添加し、ローテーターを用いて 4°C で30分間緩やかに攪拌した後、磁気分離装置MPC-15（Dyna1社製）上に2～3分静置してビーズ非結合細胞を回収した（以下、CD8除去細胞集団と記載）。回収したCD8除去細胞集団を $500\times g$ で5分間遠心したのち、 1% ヒト自己血清、 $100\text{IU}/\text{mL}$ IL-2（Proleukin、ニプロ社製）、 0.2% ヒト血清アルブミン（バクスター社製）、 $2.5\mu\text{g}/\text{mL}$ fungizone（ブリストルマイヤーズ社製）、及び $50\text{U}/\text{mL}$ ペニシリン／ストレプトマイシン（インビトロジェン社製）を含むGT-T503培地（タカラバイオ社製、以下、GT-T503CMと称す）を用いて $4\times 10^5\text{cells}/\text{mL}$ になるように懸濁した。

[0073] (3) 細胞集団の拡大培養

実施例 1 - (2) で調製した CD8 除去細胞集団の培養を行った。なお、培養は 10 ng/mL の IL-4 を含む GT-T503 CM で全期間培養する区 (D0-12 区) 及び培養開始 4 日目以降に上記濃度の IL-4 を含む GT-T503 CM で培養する区 (D4-12 区) を設定した。ネガティブコントロールとして、IL-4 を添加しない区を設定した (無添加区)。

[0074] まず、実施例 1 - (1) で調製した抗ヒト CD3 抗体 / CH-296 固定化プレートに、実施例 1 - (2) で調製した CD8 除去細胞集団を 1.3 mL / ウェルで添加した。更に human recombinant IL-4 (R&D systems 社製、 0.1% HSA を含む PBS で $10 \mu\text{g/mL}$ となるように溶解したもの) を GT-T503 CM に 20 ng/mL となるように希釈し、上記各ウェルに 1.3 mL ずつ添加した (IL-4 終濃度: 10 ng/mL)。D4-12 区及び無添加区には 1.3 mL の GT-T503 CM を添加し、これらのプレートを 37°C 、 $5\% \text{ CO}_2$ インキュベータ内で培養した (培養 0 日目)。

[0075] 培養開始 4 日目に、各試験区の細胞数をトリパンブルー染色法にてカウントし、 $1 \times 10^5 \text{ cells/mL}$ となるように GT-T503 CM で懸濁し、何も固定化していない 12 穴細胞培養プレート (ファルコン社製) に 4 mL / ウェルで添加して更に希釈培養した。この際、D0-12 区及び D4-12 区は 10 ng/mL IL-4 を含む GT-T503 CM で希釈培養を行った。培養 7 日目に、何も固定化していない 12 穴細胞培養プレート (ファルコン社製) に、D0-12 区及び D4-12 区は上記と同様の濃度の IL-4 を含む GT-T503 CM で 5 倍希釈し、無添加区は IL-4 を含まない GT-T503 CM で 5 倍希釈し、 4 mL / ウェルで添加して培養した。培養開始 11 日目には、2 倍希釈する以外は培養開始 7 日目と同様に希釈培養した。培養開始 12 日目の拡大培養率を表 1 に示す。なお、拡大培養率はトリパンブルー染色法にて生細胞数を計測し、培養開始時の細胞数を 1 とし、培養開始 12 日目の細胞数の倍数を算出した。

[0076] [表1]

試験区	拡大培養率 (倍)
無添加区	283.3
D0-12区	669.5
D4-12区	407.6

[0077] 表1に示されるように、IL-4添加培地で培養した区では、無添加区と比較して高い拡大培養率が得られた。すなわち、抗ヒトCD3抗体及びCH-296を用いたCD4陽性T細胞の培養において、IL-4を用いることにより拡大培養率が増加することが明らかになった。また、培養4日目以降にIL-4添加培地を使用するよりも、培養全期間に使用する方が拡大培養率が高いことが明らかになった。

[0078] (4) 細胞表面マーカーの解析

実施例1-(3)で得られた培養12日目の細胞集団を、0.1%牛血清アルブミン(BSA、シグマ社製)を含むPBS(以下、0.1%BSA/PBSと記載)で洗浄した。0.1%BSA/PBSに細胞集団を懸濁し、抗体反応液1として、FITC標識マウス抗ヒトCD8抗体(ベクトン・ディッキンソン社製)、RD1標識マウス抗ヒトCD45RA抗体(ベクマンコールター社製)、PerCP標識マウス抗ヒトCD3抗体(ベクトン・ディッキンソン社製)、PE-Cy7標識マウス抗ヒトCD62L抗体(eBioscience社製)、及びAPC-Cy7標識マウス抗ヒトCD4抗体(ベクトン・ディッキンソン社製)を含む抗体液を、更に抗体反応液2として、FITC標識マウス抗ヒトCD8抗体、PE標識マウス抗ヒトCXCR4抗体(ベクトン・ディッキンソン社製)、PerCP標識マウス抗ヒトCD3抗体、及びAPC-Cy7標識マウス抗ヒトCD4抗体を含む抗体液をそれぞれ添加し、抗体反応を行った。その後、0.1%BSA/PBSで細胞集団を2回洗浄し、再度0.1%BSA/PBSに懸濁した。この細胞集団をフローサイトメトリー(FACS CantolI:ベクトン・ディッキンソン社製)に供し、各々の細胞集団のCD3陽性CD4陽性細胞中

の各種細胞表面マーカーの含有率を算出した。なお、全細胞中のCD3陽性率はすべての試験区で94%以上であった。結果を表2に示す。

[0079] [表2]

試験区	CD45RA+ CD62L+比率 (%)	CD45RA- CD62L+比率 (%)	CD62L+ 比率 (%)	CXCR4+ 比率 (%)
無添加区	33.4	25.7	59.1	51.3
D0-12	46.4	30.4	76.8	73.7
D4-12	46.3	26.6	72.9	80.1

[0080] 表2に示されるように、IL-4添加培地で培養した区では、無添加区と比較してCD45RA+CD62L+比率、CD45RA-CD62L+比率及びCXCR4+比率の高い細胞集団が得られた。CD45RA+CD62L+はナイーブT細胞の、CD45RA-CD62L+はセントラルメモリーT細胞の、CXCR4はナイーブT細胞及びメモリーT細胞の細胞表面マーカーである。すなわち、抗ヒトCD3抗体及びCH-296を用いたCD4陽性T細胞の培養において、IL-4を添加することにより、CD4陽性ナイーブT細胞及びCD4陽性セントラルメモリーT細胞を高含有する細胞集団を効率的に取得できることが明らかとなった。

[0081] 実施例2 IL-4及びFNフラグメントCH-296を用いたCD4陽性T細胞集団の拡大培養

(1) 抗ヒトCD3抗体及びCH-296の固定化

実施例1-(1)と同様の方法で、抗ヒトCD3抗体のみを12穴細胞培養プレート(ファルコン社製)への固定化、及び洗浄を行い、各実験に供した(以下、抗ヒトCD3抗体固定化プレートと記載)。更に、抗ヒトCD3抗体/CH-296固定化プレートも調製し、各実験に供した。

[0082] (2) CD4陽性T細胞集団の調製

インフォームド・コンセントの得られた健常人ドナーTK19及びTK29から常法に従い調製したPBMCを、 $10\mu\text{g/mL}$ DNaseを含むGT-T503CMに懸濁した。その後、 $500\times g$ で5分間遠心し、上清を除去した。得られた細胞集団をBuffer1で $1\times 10^7\text{ cells}/8$

0 μ Lになるように懸濁後、human CD4 Microbeads (Miltenyi Biotec社製)を 1×10^7 cellsに対して20 μ L添加し、4℃で15分間放置した。その後、 1×10^7 cellsに対して1.8 mLのBuffer 1を添加し、300×g、10分間遠心後、上清を除去し、500 μ LのBuffer 1に懸濁した。VariomACS Separator (Miltenyi Biotec社製)にMACS Separation LS Columns (Miltenyi Biotec社製)をセットし、3 mL Buffer 1を通した後、上記細胞懸濁液を添加した。その後、5 mL Bufferで3回洗浄した後、カラムをセパレーターから取り外し、5 mLのBuffer 1を添加してシリンジにより細胞液を押し出し、CD4陽性T細胞集団を取得した。

[0083] (3) 細胞集団の拡大培養

実施例2-(2)で調製したCD4陽性T細胞集団の培養を行った。培養は、培養全期間10 ng/mL IL-4を含むGT-T503CMを用い、抗ヒトCD3抗体単独刺激を行う区(抗CD3刺激区)及び抗ヒトCD3抗体とCH-296刺激を行う区(抗CD3/CH-296刺激区)を設定した。ネガティブコントロールとしてIL-4を添加しない区を設定した(無添加区)。

[0084] まず、実施例2-(2)で調製したCD4陽性T細胞集団を遠心して上清を除去後、IL-4を含むGT-T503CM又はIL-4を含まないGT-T503CMでそれぞれ懸濁し、 2×10^5 cells/mLに調製した。実施例2-(1)で調製した抗ヒトCD3抗体固定化プレート及び抗ヒトCD3抗体/CH-296固定化プレートに、上記調製した細胞集団をそれぞれ2.6 mL/ウェルで添加した。これらのプレートを37℃、5%CO₂インキュベータ内で培養した(培養0日目)。

[0085] 培養開始4日目に、各試験区の細胞数をトリパンブルー染色法にてカウントした。すべての試験区の細胞を 1×10^5 cells/mLとなるように、IL-4を含むGT-T503CM又はIL-4を含まないGT-T503

CMでそれぞれ懸濁し、なにも固定化していない12穴細胞培養プレート（ファルコン社製）に4 mL／ウェルで添加し希釈培養した。培養7日目に、それぞれの培養用培地で4倍希釈し、なにも固定化していない12穴細胞培養プレート（ファルコン社製）に4 mL／ウェルで培養した。培養開始10日目には、2倍希釈する以外は培養開始7日目と同様に希釈培養した。培養開始12日目の拡大培養率を表3に示す。なお、拡大培養率は、トリパンブルー染色法にて生細胞数を計測し、培養開始時の細胞数を1として、培養開始12日目の細胞数の倍数を算出した。表中、+はIL-4を含むGT-T503CMを用いた試験区を示し、-は無添加区を示す。

[0086] [表3]

ドナー	試験区	IL-4	拡大培養率 (倍)
TK19	抗CD3刺激区	-	282.7
		+	425.1
	抗CD3／CH-296刺激区	-	437.0
		+	1336.1
TK29	抗CD3刺激区	-	120.1
		+	114.0
	抗CD3／CH-296刺激区	-	186.8
		+	487.4

[0087] 表3に示されるように、抗CD3／CH-296刺激区ではIL-4添加培地で培養することにより、無添加区と比較して顕著に高い拡大培養率が得られた。また、抗CD3刺激区ではドナーによっては増殖促進効果が見られなかった。すなわち、IL-4によるCD4陽性T細胞集団の拡大培養率は、抗ヒトCD3抗体及びCH-296を用いた刺激により特に顕著に高くなることが明らかになった。

[0088] (4) 細胞表面マーカーの解析

実施例2-(3)で得られた培養12日目の細胞集団を0.1%BSA／PBSで洗浄した。0.1%BSA／PBSに細胞を懸濁し、FITC標識マウス抗ヒトCD8抗体、RD1標識マウス抗ヒトCD45RA抗体、Pe

r C P 標識マウス抗ヒト C D 3 抗体、P E - C y 7 標識マウス抗ヒト C D 6 2 L 抗体、及び A P C - C y 7 標識マウス抗ヒト C D 4 抗体を含む抗体液を添加し、抗体反応を行った。その後、0.1% B S A / P B S で細胞を2回洗浄し、再度0.1% B S A / P B S に懸濁した。この細胞をフローサイトメトリーに供し、各々の細胞集団の C D 3 陽性 C D 4 陽性細胞中の各種細胞表面マーカーの含有率を算出した。結果を表4及び表5に示す。なお、表中、+は I L - 4 を含む G T - T 5 0 3 C M を用いた試験区を示し、-は無添加区を示す。

[0089] [表4]

ドナー	試験区	I L - 4	CD 4 5 R A + C C R 7 + 比率 (%)	CD 4 5 R A - C C R 7 + 比率 (%)	C C R 7 + 比率 (%)
T K 1 9	抗 C D 3 刺激区	-	3. 1	7. 9	1 1. 0
		+	5. 5	6. 4	1 1. 9
	抗 C D 3 / C H - 2 9 6 刺激区	-	1 4. 7	7. 7	2 2. 4
		+	1 7. 2	9. 7	2 6. 9
T K 2 9	抗 C D 3 刺激区	-	1. 1	7. 8	8. 9
		+	2. 6	1 4. 5	1 7. 1
	抗 C D 3 / C H - 2 9 6 刺激区	-	4. 9	8. 5	1 3. 4
		+	1 2. 6	9. 8	2 2. 4

[0090] [表5]

ドナー	試験区	I L - 4	CD 4 5 R A + CD 6 2 L + 比率 (%)	CD 4 5 R A - CD 6 2 L + 比率 (%)	CD 6 2 L + 比率 (%)
T K 1 9	抗 C D 3 刺激区	-	1 5. 8	1 9. 8	3 5. 6
		+	2 5. 7	3 0. 5	5 6. 2
	抗 C D 3 / C H - 2 9 6 刺激区	-	3 5. 6	1 8. 3	5 3. 9
		+	3 7. 8	3 4. 8	7 2. 6
T K 2 9	抗 C D 3 刺激区	-	9. 7	3 9. 4	4 9. 1
		+	1 1. 9	4 1. 1	5 3. 0
	抗 C D 3 / C H - 2 9 6 刺激区	-	1 4. 0	3 1. 5	4 5. 5
		+	3 0. 8	3 8. 9	6 9. 7

[0091] 表4及び表5に示されるように、I L - 4 添加培地で培養した区では、無添加区と比較して C C R 7 + 比率、C D 4 5 R A + C C R 7 + 比率、C D 4 5 R A - C C R 7 +、C D 6 2 L + 比率、C D 4 5 R A + C D 6 2 L + 比率、及び C D 4 5 R A - C D 6 2 L + 比率の高い細胞集団が得られた。これら

の陽性細胞率は、抗CD3刺激区と比較して抗CD3／CH-296刺激区でいずれも高く、IL-4添加培地で培養した場合、更にそれらの陽性率の向上が示された。CD45RA＋CCR7＋はナイーブT細胞の、CD45RA－CCR7＋はセントラルメモリーT細胞の細胞表面マーカーである。すなわち、抗ヒトCD3抗体及びCH-296を用いたCD4陽性T細胞集団の培養において、IL-4を添加することにより、CD4陽性ナイーブT細胞及びCD4陽性セントラルメモリーT細胞を含む細胞集団を高効率に取得できることが明らかとなった。

[0092] 実施例3 IL-4及びFNフラグメントCH-296を用いたΔLNGFR及びMazF遺伝子導入CD4陽性T細胞集団の拡大培養

(1) ΔLNGFR及びMazF遺伝子搭載レトロウイルスベクターの調製

ΔLNGFR及びMazF遺伝子搭載レトロウイルスベクターの調製は国際公開第2008/133137号パンフレットの実施例1及び2と同様の方法で行った。すなわち、HIV-LTR-MazFカセットがレトロウイルスベクターゲノムの転写とは逆方向に挿入され、かつヒトΔLNGFRがヒトPGKプロモーターの下流に順方向に挿入された組換えレトロウイルスベクタープラスミドpMT-MFR-PL2を取得し、当該プラスミドを用いてエコトロピックMT-MFR-PL2ウイルスを作製した後、これをGaLVレトロウイルスパッケージング細胞PG13に感染させ、高力価のウイルス産生細胞をクローニングしてレトロウイルスベクター産生細胞株PG13／MT-MFR-PL2を樹立した。更に当該産生細胞を用いて、常法によりGaLV／MT-MFR-PL2ウイルス液を取得した。

[0093] (2) 抗ヒトCD3抗体及びCH-296の固定化

実施例1-(1)と同様の方法で、抗ヒトCD3抗体／CH-296固定化プレートを調製し、各実験に供した。

[0094] (3) CD4陽性T細胞集団の調製

実施例2-(2)と同様の方法で、インフォームド・コンセントの得られた健常人ドナーからCD4陽性T細胞集団を取得した。

[0095] (4) 遺伝子導入及び拡大培養

実施例3-(3)で調製した細胞集団を遠心して上清を除去後、IL-4を含むGT-T503CM又はIL-4を含まないGT-T503CMでそれぞれ懸濁し、 2×10^5 cells/mLに調製した。実施例3-(2)で調製した抗ヒトCD3抗体/CH-296固定化プレートに、上記調製した細胞を2.6 mL/ウェルで添加した。これらのプレートを37℃、5%CO₂インキュベータ内で培養した(培養0日目)。

[0096] 培養開始4日目に、各試験区の細胞数をトリパンブルー染色法にてカウントし、細胞を 1×10^5 cells/mLとなるように、IL-4を含むGT-T503CM又はIL-4を含まないGT-T503CMでそれぞれ調製した。次に、あらかじめ24穴細胞培養プレート(ファルコン社製)にCH-296を固定化したプレート(以下、CH-296固定化プレートと記載する)に実施例3-(1)で調製したGalV/MT-MFR-PL2ウイルス液をGT-T503で2倍希釈した後、0.5 mL/ウェルで添加し、32℃、2000×g、2時間の条件で遠心操作を行い、プレートへのレトロウイルスベクターの結合を行った。次に上清を除き、ウェルを1 mL 1.5% HSAを含むPBSで2回洗浄し、 1×10^5 cells/mLとなるように調製した培養開始4日目の細胞液を1 mL添加して37℃、5%CO₂インキュベータ内で培養し、レトロウイルスベクターによる感染を行った。培養開始6日目に、なにも固定化していない12穴細胞培養プレートに4 mL/ウェルで5倍希釈培養した。培養開始8日目に、4倍希釈する以外は培養開始6日目と同様に希釈培養した。培養開始12日目の拡大培養率を表6に示す。なお、拡大培養率はトリパンブルー染色法にて生細胞数を計測し、培養開始時の細胞数を1として、培養開始12日目の細胞数の倍数を算出した。表中、+はIL-4を含むGT-T503CMを用いた場合を示し、-は無添加の場合を示す。

[0097]

[表6]

IL-4	遺伝子導入	拡大培養率 (倍)
—	なし	156.4
+	なし	364.7
—	あり	128.0
+	あり	330.1

[0098] 表6に示されるように、レトロウイルスベクターによる遺伝子導入を行った場合においても、IL-4添加培地を使用することにより、無添加区と比較して高い拡大培養率が得られることが明らかになった。

[0099] (5) 遺伝子導入効率及び細胞表面マーカーの解析

実施例3-(4)で得られた培養開始12日目の細胞集団を0.1%BSA/PBSで洗浄した。0.1%BSA/PBSに細胞を懸濁し、抗体反応液1として、FITC標識マウス抗ヒトCCR7 (R&D systems社)、RD1標識マウス抗ヒトCD45RA抗体、PerCP標識マウス抗ヒトCD3抗体、PE-Cy7標識マウス抗ヒトCD62L抗体、APC標識マウス抗ヒトLNGFR抗体 (Miltenyi Biotec社製)、及びAPC-Cy7標識マウス抗ヒトCD4抗体を含む抗体液1、更に抗体反応液2として、PE標識マウス抗ヒトCXCR4抗体 (PerCP標識マウス抗ヒトCD3抗体、及びAPC-Cy7標識マウス抗ヒトCD4抗体を含む抗体液を添加し、抗体反応を行った。その後、0.1%BSA/PBSで細胞を2回洗浄し、再度0.1%BSA/PBSに懸濁した。この細胞をフローサイトメトリーに供し、各々の細胞集団のCD3陽性CD4陽性細胞中の各種細胞表面マーカーの含有率を算出した。結果を表7~10に示す。表中、+はIL-4を含むGT-T503CMを用いた場合を示し、-は無添加の場合を示す。

[0100]

[表7]

I L - 4	遺伝子導入	Δ L N G F R 陽性率 (%)
—	なし	0. 6
+	なし	0. 7
—	あり	1 4. 5
+	あり	1 4. 7

[0101] [表8]

I L - 4	遺伝子導入	CD 4 5 R A + C C R 7 + 比率 (%)	CD 4 5 R A - C C R 7 + 比率 (%)	C C R 7 + 比率 (%)
—	なし	2 3. 5	6. 7	3 0. 2
+	なし	3 0. 3	9. 5	3 9. 8
—	あり	2 4. 3	7. 9	3 2. 2
+	あり	3 2. 7	9. 7	4 2. 4

[0102] [表9]

I L - 4	遺伝子導入	CD 4 5 R A + CD 6 2 L + 比率 (%)	CD 4 5 R A - CD 6 2 L + 比率 (%)	CD 6 2 L + 比率 (%)
—	なし	3 5. 1	3 3. 4	6 8. 5
+	なし	4 7. 3	4 2. 0	8 9. 3
—	あり	3 4. 4	3 0. 5	6 4. 9
+	あり	5 1. 4	3 7. 6	8 9. 0

[0103] [表10]

I L - 4	遺伝子導入	C X C R 4 陽性率 (%)
—	なし	6 0. 2
+	なし	7 0. 7
—	あり	6 2. 9
+	あり	7 7. 9

[0104] 表 7 ～ 1 0 に示されるように、レトロウイルスベクターを用いた遺伝子導入細胞調製法において、I L - 4 添加培養区では、遺伝子導入効率への負の影響はなく、更に C C R 7 + 比率、C D 4 5 R A + C C R 7 + 比率、C D 4

5 R A - C C R 7 +、C D 6 2 L + 比率、C D 4 5 R A + C D 6 2 L + 比率、C D 4 5 R A - C D 6 2 L + 比率、及び C X C R 4 + 比率の高い細胞集団が得られることが明らかになった。すなわち、抗ヒト C D 3 抗体及び C H - 2 9 6 を用いた遺伝子導入 C D 4 陽性 T 細胞の培養においても、I L - 4 を用いることにより、遺伝子導入 C D 4 陽性 ナイーブ T 細胞及び遺伝子導入 C D 4 陽性 セントラルメモリー T 細胞を含む細胞集団を高効率で増殖できることが明らかとなった。

産業上の利用可能性

[0105] 本発明により、拡大培養率が高く、C D 6 2 L 及び／又は C C R 7 を発現する細胞集団、すなわち C D 4 陽性 ナイーブ T 細胞及び／又は C D 4 陽性 セントラルメモリー T 細胞を高含有する細胞集団の製造方法が提供される。当該製造方法により得られる細胞集団は、細胞医療及び遺伝子治療による疾患の治療に極めて有用である。

配列表フリーテキスト

[0106] SEQ ID NO:1 ; Partial region of fibronectin named CS-1.
SEQ ID NO:2 ; Partial region of fibronectin named III-10.
SEQ ID NO:3 ; Partial region of fibronectin named RGDS
SEQ ID NO:4 ; Fibronectin fragment named C-274.
SEQ ID NO:5 ; Fibronectin fragment named H-271.
SEQ ID NO:6 ; Fibronectin fragment named H-296.
SEQ ID NO:7 ; Fibronectin fragment named CH-271.
SEQ ID NO:8 ; Fibronectin fragment named CH-296.
SEQ ID NO:9 ; Fibronectin fragment named C-CS1.

請求の範囲

- [請求項1] 下記工程を包含することを特徴とする、C D 6 2 L 及び／又はC C R 7 を発現する細胞集団の製造方法。
- 工程（１）：T細胞を含有する細胞集団からC D 8 陽性T細胞を除去、又はC D 4 陽性T細胞を採取する工程、及び
- 工程（２）：工程（１）で得られた細胞集団を、下記（Ａ）及び（Ｂ）の存在下で培養し、かつ当該培養中及び／又は当該培養後の拡大培養中、全部又は一部の期間において、下記（Ｃ）の存在下で培養する工程。
- （Ａ）フィブロネクチン、フィブロネクチンフラグメント及びそれらの混合物からなる群より選択される少なくとも１つのポリペプチド
- （Ｂ）C D 3 リガンド、又はC D 3 リガンド及びC D 2 8 リガンド
- （Ｃ）インターロイキン－４
- [請求項2] 工程（２）が、請求項１記載の（Ａ）及び（Ｂ）の存在下で、かつ（Ｃ）の存在下で培養し、得られた細胞集団を（Ｃ）の存在下で拡大培養する工程である、請求項１記載の製造方法。
- [請求項3] 工程（２）が、請求項１記載の（Ａ）及び（Ｂ）の存在下で、かつ（Ｃ）の非存在下で培養し、得られた細胞集団を（Ｃ）の存在下で拡大培養する工程である、請求項１記載の製造方法。
- [請求項4] 工程（２）が、請求項１記載の（Ａ）及び（Ｂ）の存在下で、かつ（Ｃ）の存在下で培養し、得られた細胞集団を（Ｃ）の非存在下で拡大培養する工程である、請求項１記載の製造方法。
- [請求項5] 更に外来遺伝子を導入する工程を包含する、請求項１～４のいずれか１項に記載の製造方法。
- [請求項6] 請求項１記載の（Ａ）及び（Ｂ）の、又は（Ｂ）の存在下で、かつ（Ｃ）の非存在下での培養により得られた細胞集団と比較して、下記（１）～（５）からなる群より選択される少なくとも１つの細胞が高比率に含有されている、請求項１～５のいずれか１項に記載の製造方

法で得られる細胞集団。

- (1) : CD4陽性CD45RA陽性CCR7陽性T細胞
- (2) : CD4陽性CD45RA陽性CD62L陽性T細胞
- (3) : CD4陽性CD45RA陰性CCR7陽性T細胞
- (4) : CD4陽性CD45RA陰性CD62L陽性T細胞
- (5) : CD4陽性CXCR4陽性細胞

[請求項7] 医薬に使用するための請求項6記載の細胞集団。

[請求項8] 医薬の製造に用いる、請求項6記載の細胞集団。

[請求項9] 請求項6記載の細胞集団を有効成分として含有する医薬。

[請求項10] 対象に有効量の請求項6記載の細胞集団を投与する工程を含む、疾患の治療方法又は予防方法。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2011/068153

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N5/10(2006.01)i, A61K35/26(2006.01)i, A61P1/16(2006.01)i, A61P31/00(2006.01)i, A61P31/06(2006.01)i, A61P31/16(2006.01)i, A61P31/18(2006.01)i, A61P35/00(2006.01)i, A61P35/02(2006.01)i, C12N5/00(2006.01)i

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N5/10, A61K35/26, A61P1/16, A61P31/00, A61P31/06, A61P31/16, A61P31/18, A61P35/00, A61P35/02, C12N5/00

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

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2011
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2011	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2011

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

CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN), JSTplus/JMEDplus/JST7580 (JDreamII), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, PubMed, CiNii

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	OYOSHI, MK., et al, TRAF1 controls the Th2 differentiation of T cells by limiting NIP45 nuclear translocation., FASEB Journal, 2005. 03.07, Vol. 19, No. 5, Suppl. S, Part 2, pp. A1448, 827.3	1-9
A	WEI, Lai., et al., IL-21 Is Produced by Th17 Cells and Drives IL-17 Production in a STAT3-dependent Manner, The Journal of Biological Chemistry, 2007.11.30, Vol. 282, No. 48, p.34605-34610	1-9
A	FERRARI-LACRAZ, S., et al., IL-21 promotes survival and maintains a naive phenotype in human CD4+ T lymphocytes, International Immunology, 2008.08, Vol. 20, No. 8, p. 1009-1018	1-9



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
05 September, 2011 (05.09.11)

Date of mailing of the international search report
13 September, 2011 (13.09.11)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2011/068153

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	OLIVEIRA, V., et al., Anti-CD4-mediated selection of Treg in vitro -- in vitro suppression does not predict in vivo capacity to prevent graft rejection, European Journal of Immunology, 2008, Vol. 38, No. 6, p. 1677-1688	1-9
A	Atsushi ARUGA et al., "Ju-jo Saibo o Mochiita CTL no Ko-Shuyo Koka Zokyo", Biotherapy, 1998. 05, vol.12, no.5, pages 875 to 877	1-9
A	KEMP, RA., et al., The phenotype of type 1 and type 2 CD8+ T cells activated in vitro is affected by culture conditions and correlates with effector activity, Immunology, 2005.07, Vol. 115, No. 3, p. 315-324	1-9

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2011/068153

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

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

1. ☒ Claims Nos.: 10
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claim 10 pertains to a method for treatment of a disease by therapy or a method for prevention thereof and thus relates to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of PCT Rule 39.1(iv), to search.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the 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.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. C12N5/10(2006.01)i, A61K35/26(2006.01)i, A61P1/16(2006.01)i, A61P31/00(2006.01)i, A61P31/06(2006.01)i, A61P31/16(2006.01)i, A61P31/18(2006.01)i, A61P35/00(2006.01)i, A61P35/02(2006.01)i, C12N5/00(2006.01)i

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. C12N5/10, A61K35/26, A61P1/16, A61P31/00, A61P31/06, A61P31/16, A61P31/18, A61P35/00, A61P35/02, C12N5/00

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

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

CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII), GenBank/EMBL/DBJ/GeneSeq, PubMed, CiNii

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	OYOSHI, MK., et al, TRAF1 controls the Th2 differentiation of T cells by limiting NIP45 nuclear translocation., FASEB Journal, 2005.03.07, Vol. 19, No. 5, Suppl. S, Part 2, pp. A1448, 827.3	1-9
A	WEI, Lai., et al., IL-21 Is Produced by Th17 Cells and Drives IL-17 Production in a STAT3-dependent Manner, The Journal of Biological Chemistry, 2007.11.30, Vol. 282, No. 48, p. 34605-34610	1-9

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

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

の日の後に公表された文献

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

国際調査を完了した日

0 5 . 0 9 . 2 0 1 1

国際調査報告の発送日

1 3 . 0 9 . 2 0 1 1

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (I S A / J P)
郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5
東京都千代田区霞が関三丁目 4 番 3 号

特許庁審査官 (権限のある職員)

太田 雄三

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

4 B

3 9 5 9

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	FERRARI-LACRAZ, S., et al., IL-21 promotes survival and maintains a naive phenotype in human CD4+ T lymphocytes, International Immunology, 2008.08, Vol. 20, No. 8, p. 1009-1018	1-9
A	OLIVEIRA, V., et al., Anti-CD4-mediated selection of Treg in vitro -- in vitro suppression does not predict in vivo capacity to prevent graft rejection, European Journal of Immunology, 2008, Vol. 38, No. 6, p. 1677-1688	1-9
A	有賀淳 他, 樹状細胞を用いた CTL の抗腫瘍効果増強, Biotherapy, 1998.05, Vol. 12, No. 5, p. 875-877	1-9
A	KEMP, RA., et al., The phenotype of type 1 and type 2 CD8+ T cells activated in vitro is affected by culture conditions and correlates with effector activity, Immunology, 2005.07, Vol. 115, No. 3, p. 315-324	1-9

第Ⅱ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

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

1. ☒ 請求項 10 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
つまり、
請求項 10 は、疾患の治療方法又は予防方法であって、PCT規則39.1 (vi) の規定により、国際調査をすることを要しない対象に係るものである。
2. ☐ 請求項 _____ 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. ☐ 請求項 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅲ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

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

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求項について作成した。
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項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項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項について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

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