

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第5997296号
(P5997296)

(45) 発行日 平成28年9月28日 (2016. 9. 28)

(24) 登録日 平成28年9月2日 (2016. 9. 2)

(51) Int. Cl.

F 1

C 1 2 N 5/0783 (2010. 01)

C 1 2 N 5/0783

C 1 2 N 5/078 (2010. 01)

C 1 2 N 5/078

A 6 1 P 35/00 (2006. 01)

A 6 1 P 35/00

A 6 1 K 35/17 (2015. 01)

A 6 1 K 35/17

A

請求項の数 3 (全 15 頁)

(21) 出願番号 特願2014-557465 (P2014-557465)
 (86) (22) 出願日 平成26年1月14日 (2014. 1. 14)
 (86) 国際出願番号 PCT/JP2014/050484
 (87) 国際公開番号 W02014/112491
 (87) 国際公開日 平成26年7月24日 (2014. 7. 24)
 審査請求日 平成27年3月18日 (2015. 3. 18)
 (31) 優先権主張番号 特願2013-4495 (P2013-4495)
 (32) 優先日 平成25年1月15日 (2013. 1. 15)
 (33) 優先権主張国 日本国 (JP)

(73) 特許権者 506147571
 阿部 博幸
 東京都府中市多磨町 1 - 1 4 - 5
 (73) 特許権者 513010712
 遊佐 精一
 東京都中野区中央 2 - 1 2 - 5
 (74) 代理人 100106002
 弁理士 正林 真之
 (72) 発明者 阿部 博幸
 東京都府中市多磨町 1 - 1 4 - 5
 (72) 発明者 遊佐 精一
 東京都中野区中央 2 - 1 2 - 5
 審査官 太田 雄三

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 免疫細胞含有組成物の製造方法及び癌治療用組成物

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

IL - 2 及び / 又は IL - 1 5 と、抗 CD 1 6 モノクローナル抗体とを含む培地中で単核球を培養する第 1 の工程と、

前記第 1 の工程後に、単核球を優先的に細胞傷害性 T 細胞に分化させる条件下で培養を行う第 2 の工程と、を含む免疫細胞含有組成物の製造方法。

【請求項 2】

前記第 2 の工程後に、IL - 2 及び / 又は IL - 1 5 と、抗 CD 1 6 モノクローナル抗体とを含む培地中で培養を行う第 3 の工程を含む請求項 1 に記載の免疫細胞含有組成物の製造方法。

【請求項 3】

請求項 1 又は 2 に記載の製造方法で製造された免疫細胞含有組成物を含む癌治療用組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、免疫細胞含有組成物の製造方法及び癌治療用組成物に関する。

【背景技術】

【0002】

近年、癌の治療において、様々な方法が開発されており、特に、患者の体内の免疫力を

強化する免疫療法が着目されている。免疫療法としては、例えば、細胞免疫療法等が挙げられる。

【 0 0 0 3 】

細胞免疫療法は、患者由来の免疫細胞を、生体外で活性化及び増殖等させた後に、再びその患者の体内に戻すことで当該患者の免疫力を高めるものであり、養子免疫療法等とも呼ばれる。例えば、細胞免疫療法のひとつである L A K 療法は、患者から採取した血液から単核球を分離し、これを主に細胞傷害性 T 細胞等に分化させて患者の体内に戻すものである。また、その他の細胞免疫療法として、N K 細胞等の細胞を使用する方法が知られていた（例えば、特許文献 1）。

【先行技術文献】

10

【特許文献】

【 0 0 0 4 】

【特許文献 1】特表 2 0 1 1 - 5 2 9 3 4 1 号公報

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【 0 0 0 5 】

他方、本発明者らは、従来の細胞免疫療法のように、単核球を細胞傷害性 T 細胞等の単一の免疫細胞へ分化させ、これを増殖させて得られた培養物を生体内に戻しても、生体内の免疫力を必ずしも強化できない点を見出した。従って、本発明は、単核球を複数の免疫細胞（特に N K 細胞、N K T 細胞及び T 細胞）へバランス良く分化させ、これらの細胞を増殖させることを目的とする。

20

【課題を解決するための手段】

【 0 0 0 6 】

本発明者は、免疫細胞の製造方法において、所定の細胞培養工程を組み合わせることで上記課題を解決できる点を見出し、本発明を完成するに至った。本発明は、具体的には、以下のようなものを提供する。

【 0 0 0 7 】

（ 1 ） I L - 2 及び / 又は I L - 1 5 と、抗 C D 1 6 モノクローナル抗体とを含む培地中で単核球を培養する第 1 の工程と、

上記第 1 の工程後に、単核球を優先的に細胞傷害性 T 細胞に分化させる条件下で培養を行う第 2 の工程と、を含む免疫細胞含有組成物の製造方法。

30

【 0 0 0 8 】

（ 2 ） 上記第 2 の工程後に、I L - 2 及び / 又は I L - 1 5 と、抗 C D 1 6 モノクローナル抗体とを含む培地中で培養を行う第 3 の工程を含む（ 1 ）に記載の免疫細胞含有組成物の製造方法。

【 0 0 0 9 】

（ 3 ） （ 1 ）又は（ 2 ）に記載の製造方法で製造された免疫細胞含有組成物を含む癌治療用組成物。

【発明の効果】

【 0 0 1 0 】

40

本発明によれば、単核球を N K 細胞、N K T 細胞及び T 細胞へバランス良く分化させ、これらの細胞を増殖させる方法が提供される。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 1 1 】

【図 1】（ A ）は、6 人の健常人から回収した P B M C の細胞数を示す。（ B - 1 ）及び（ B - 2 ）は、得られた P B M C についての F A C S 分析の代表的な結果を示す。

【図 2】健常人から回収した P B M C についての F A C S 分析の代表的な結果を示す。

【図 3】本発明の実施例において得られた免疫細胞含有組成物についての F A C S 分析の代表的な結果を示す。

【図 4】本発明の実施例において得られた免疫細胞含有組成物についての F A C S 分析の

50

結果を示す。

【図5】本発明の実施例において得られた免疫細胞含有組成物についての細胞傷害活性の測定結果を示す。

【発明を実施するための形態】

【0012】

以下、本発明の実施形態について説明するが、本発明を限定することを意図するものではない。

【0013】

本発明の免疫細胞含有組成物の製造方法は、所定の条件下で培養を行う第1の工程と、第2の工程とを含む。以下、各工程について説明する。なお、本発明において「免疫細胞含有組成物」とは、少なくともNK細胞、NKT細胞及びT細胞を含む組成物を指す。

【0014】

<第1の工程（NK細胞増殖工程）>

本発明における第1の工程は、後述する培地中で単核球を培養し、単核球をNK細胞及びNKT細胞等に分化させ、かつNK細胞及びNKT細胞等を増殖させる工程である。この工程においては、単核球を、NK細胞及びNKT細胞のみならず、 $\gamma\delta$ T細胞等に選択的に分化させて、増幅させ得る。NK細胞（ナチュラルキラー細胞）、NKT細胞（ナチュラルキラーT細胞）、 $\gamma\delta$ T細胞とは、それぞれリンパ球の一種であり、癌細胞を攻撃する作用を有することが知られる。なお、本発明において「NK細胞等」とは、少なくともNK細胞及びNKT細胞を指す。

【0015】

（単核球）

単核球とは、リンパ球及び単球の総称である。単核球は、体液（末梢血、骨髓、臍帯血等の血液等）から、遠心分離、磁気ビーズ、フローサイトメトリー等の公知の方法を使用して得られる。単核球としては、iPS細胞、ES細胞及び体細胞幹細胞等の幹細胞から誘導されたものであってもよい。本発明においては、末梢血単核球（PBMC）等を単核球として好ましく使用できる。

【0016】

細胞免疫療法において必要な単核球を採取するための従来方法としては、成分採血装置を使用して血液中の白血球を分離する方法（この方法を「アフエーシス」と言う）が知られている。しかし、アフエーシスは、装置の運用に費用がかかる上に、装置の操作のために高度な技術が要求される。

【0017】

さらに、細胞免疫療法によって所望の治療効果を得るためには、患者の体内に戻す全免疫細胞数は、例えば、リンパ球を用いる場合、10億個以上であることが望ましい。しかし、血液中に存在する単核球の割合は少ないため、10億個以上もの細胞数を確保するためには、通常、同一の対象から間隔をあけて複数回のアフエーシスが行うことが必要となる。しかし、複数回のアフエーシスは、体力的また時間的に非常に大きい負担を患者に与える。また、アフエーシスで採取可能な単核球の数は患者の血液状態等によって変動する。

【0018】

他方、本発明の製造方法においては、単核球を効率的に免疫細胞に分化させ、免疫細胞を増殖させることができるため、単核球を得るための血液の量が少なく済み（例えば、1～100mL、好ましくは1～50mL）、かつ、1回の採血で十分であり得る。従って、本発明は、従来使用されてきたアフエーシス等の方法と比較して、単核球を得るための患者に対する負担（費用、時間等）を著しく低減できる。ただし、本発明における単核球は、アフエーシスによって得られたものであってもよい。

【0019】

（培地）

第1の工程における培地はIL-2（インターロイキン-2）及び/又はIL-15（

10

20

30

40

50

インターロイキン - 15) と、抗 CD 16 モノクローナル抗体とを含む。IL - 2、IL - 15 及び抗 CD 16 モノクローナル抗体を含む培地は、単核球を特に選択的に NK 細胞、NK T 細胞、 $\gamma\delta$ T 細胞等に分化させることができる点で好ましい。該培地により、単核球を NK 細胞、NK T 細胞、 $\gamma\delta$ T 細胞等に分化させ、これらの免疫細胞を増殖させることができる。

【0020】

単核球から NK 細胞等への分化及び増殖のために好適な培地中の IL - 2 の濃度は特に限定されないが、1 ~ 200000 IU/mL、好ましくは 100 ~ 200000 IU/mL、最も好ましくは 1000 ~ 200000 IU/mL であってもよい。また、単核球から NK 細胞等への分化及び増殖のために好適な培地中の IL - 15 の濃度は特に限定されないが、1 ~ 100 ng/mL、好ましくは 1 ~ 50 ng/mL、最も好ましくは 1 ~ 30 ng/mL であってもよい。また、単核球から NK 細胞等への分化及び増殖のために好適な培地中の抗 CD 16 モノクローナル抗体の濃度は特に限定されないが、1 ~ 100000 ng/mL、好ましくは 10 ~ 100000 ng/mL、最も好ましくは 100 ~ 100000 ng/mL であってもよい。IL - 2、IL - 15 及び抗 CD 16 モノクローナル抗体は、上記濃度範囲で第 1 の工程における培地中に配合できる。

10

【0021】

本発明における培地には、IL - 2 及び / 又は IL - 15、ならびに、抗 CD 16 モノクローナル抗体に加えて、公知の NK 細胞刺激剤 (抗 NK p 46 抗体等)、NK T 細胞刺激剤 (抗 TCR V α 24 抗体、抗 TCR V β 11 抗体、アルファガラクトシルセラミド等)、 $\gamma\delta$ T 細胞刺激剤 (抗 TCR γ/δ 抗体、ゾレドロン酸等) 等が含まれていてもよい。これらの成分の培地中の配合量は、得ようとする細胞量等に応じて適宜調整できる。

20

【0022】

本発明における培地には、単核球を培養可能とするための栄養成分や、pH 調整剤等が含まれていてもよい。かかる成分を含む培地としては、特に限定されないが、リンパ球用無血清合成培地 (KB 550、KB 570 等)、AIM - V、DC Medium、DMEM、RPMI - 1640、X - VIVO 培地等が挙げられる。また、本発明における培地の形態は特に限定されず、調製前の成分混合物 (粉体であるもの等)、調製済みの形態 (液体であるもの等) 等であってもよい。

【0023】

本発明における培地には、細胞培養において通常使用される試薬が含まれていてもよい。このような試薬として、抗生物質 (ゲンタマイシン、カナマイシン等)、アルブミン、血清 (ヒト血清、ウシ胎仔血清等)、2 - メルカプトエタノール、ビルビン酸ナトリウム、インスリン等の増殖因子、L - グルタミン、トランスフェリン等が挙げられる。

30

【0024】

IL - 2 及び / 又は IL - 15 と、抗 CD 16 モノクローナル抗体とを含む培地は、公知の培地の製造方法によって調製でき、例えば、上記の培地成分に IL - 2 及び / 又は IL - 15 と、抗 CD 16 モノクローナル抗体とを添加することによって調製できる。また、抗 CD 16 モノクローナル抗体を含む培地は、フラスコに抗 CD 16 モノクローナル抗体を予めプレコートしておき、該フラスコに抗 CD 16 モノクローナル抗体以外の培地成分を添加することによって、抗 CD 16 モノクローナル抗体を含む培地を調製することもできる。

40

【0025】

第 1 の工程における培養条件は特に限定されず、通常の細胞培養において使用する条件を使用できる。例えば、30 ~ 38 °C、5 ~ 10 % CO₂ で培養してもよい。培養期間は単核球が活性化及び増殖し、NK 細胞及び NK T 細胞等に分化及び増殖するために十分な期間でよく、3 日間以上、好ましくは 5 日間であってもよい。また、長期間にわたって培養すると、単核球や NK 細胞等の活性が低減する可能性があるため、培養期間は 14 日間以下であってもよい。しかし、14 日間以上の培養を行っても、NK 細胞及び NK T 細胞等の増殖は進み得るため、例えば、21 日間の培養で、50 億以上もの細胞数を得ること

50

も可能である。培養期間中、公知の方法で適宜培地交換を行うことで、長期間（例えば21日間）の培養を行っても、細胞の活性を維持し得る。

【0026】

<第2の工程（T細胞増殖工程）>

本発明における第2の工程は、上記の第1の工程の後に行われる。第2の工程においては、単核球を優先的に細胞傷害性T細胞に分化させる条件下で培養が行われ、第1の工程において刺激されにくかった（又は刺激されなかった）単核球が選択的にT細胞に分化し、さらには増殖する。また、第2の工程においては、第1の工程において分化し、さらには活性化及び増殖したNK細胞、NK T細胞、 $\gamma\delta$ T細胞等が、第2の工程において活性化されたT細胞によって、直接又は間接的に刺激される。その結果、第2の工程は、T細胞を選択的に刺激する培養条件下で行われるものの、NK細胞、NK T細胞、 $\gamma\delta$ T細胞も増幅され得る。なお、本発明において「単核球を優先的にT細胞に分化させる条件」とは、単核球からT細胞に分化させるために一般的に使用される培養条件（例えば、抗CD3抗体の存在下での培養、抗CD3抗体及びIL-2の存在下での培養、抗CD3抗体、IL-2及びIL-15の存在下での培養、抗TCR抗体の存在下での培養等）を指す。

【0027】

単核球を優先的に細胞傷害性T細胞に分化させる条件で培養した後に、NK細胞等への分化を行おうとすると（つまり、第2の工程を第1の工程よりも先に行うと）、T細胞が多く増幅されるために、NK細胞等の割合が減少し、T細胞の割合が過多である免疫細胞含有組成物しか得られないため、単核球を複数の免疫細胞へバランス良く分化させ、これらの免疫細胞を増殖させることが難しい。

【0028】

第2の工程においては、第1の工程後に培地交換等を行い、単核球からT細胞への分化及びT細胞の増殖が可能な培地中で細胞を培養する。このような培地としては、単核球からT細胞に分化させ、T細胞を増殖させることができる培地として公知のものを使用できる。具体的には、第1の工程において使用可能な培地（リンパ球用無血清合成培地等）中に1~100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の抗CD3抗体（例えば、抗CD3 ϵ モノクローナル抗体）を添加した培地を使用できる。

【0029】

第2の工程における培養条件は特に限定されず、通常の細胞培養において使用する条件を使用できる。例えば、30~38℃、5~10% CO_2 で培養してもよい。培養期間は単核球がT細胞に分化するために十分な期間でよく、48時間以上、好ましくは3日間であってもよい。また、長期間にわたって培養すると、T細胞の増殖が過多となり、NK細胞、NK T細胞及びT細胞をバランス良く含む免疫細胞含有組成物が得られにくくなる可能性があるため、培養期間は7日間以下、好ましくは5日間以下、より好ましくは3日間以下であってもよい。また、培養中、従来公知の方法で適宜培地交換を行ってもよい。

【0030】

第2の工程の後には、さらに、IL-2及び/又はIL-15と、抗CD16モノクローナル抗体とを含む培地中で培養を行う第3の工程を設けてもよい。これにより、第1の工程で得られたNK細胞等を増殖させることができ、免疫細胞含有組成物中のNK細胞、NK T細胞及びT細胞の割合を調整できるため、より効率的に複数の免疫細胞をバランス良く含む免疫細胞含有組成物が得られる。第3の工程の条件としては、上記の第1の工程における条件を使用できる。

【0031】

<本発明の製造方法から得られる免疫細胞含有組成物>

本発明の製造方法から得られる免疫細胞含有組成物には、従来の方法のように、特定の細胞の割合が過度とならずに、複数の免疫細胞がバランス良く含まれる。本発明において「複数の免疫細胞のバランスが良い」とは、免疫細胞含有組成物中の各免疫細胞の割合が生体内における割合に近いことを指す。ただし、免疫力を効率的に強化できるという観点から、免疫細胞含有組成物中のNK細胞の割合が生体内における通常の割合よりも高く

10

20

30

40

50

も、「複数の免疫細胞のバランスが良い」状態であると言える。複数の免疫細胞のバランスが良い状態としては、例えば、全細胞中、NK細胞40～60%、NKT細胞15～25%、 $\gamma\delta$ T細胞2～5%、T細胞20～30%、Treg細胞0.01～0.2%である状態が挙げられる。免疫細胞含有組成物中の各免疫細胞の割合はフローサイトメトリーによって特定できる。しかし、上記に例示した細胞のバランスは、患者の治療方針に応じて、培養条件の調整等によって適宜変更され得る。培養条件の調整の内容としては、例えば、培地中のNK細胞刺激剤の量よりもNKT細胞刺激剤の量を増やすこと等が挙げられる。

【0032】

本発明の製造方法によって得られた細胞がNK細胞等であるかどうかは、フローサイトメトリーによって、得られた細胞の細胞表面マーカーを解析することで確認する。例えば、NK細胞、T細胞、NKT細胞、 $\gamma\delta$ T細胞及びTreg細胞は、 $CD3^+CD56^+$ 細胞、 $CD3^-CD19^+$ 細胞、 $CD3^+CD19^-$ 細胞、 $CD3^-CD56^+$ 細胞、及び $CD3^+\gamma\delta TCR^+$ 細胞として特定される。また、T細胞及びNKT細胞は、それぞれ、抗TCR α 1 α 抗体、抗TCR γ α 24抗体等によって特定できる。

10

【0033】

また、本発明によれば、少ない血液（例えば、1～100mL、好ましくは1～50mL）から十分量の免疫細胞（例えば、 $10^6 \sim 10^8$ cells/mL以上）が得られるため、生体に負担をかけずに、細胞免疫療法において必要な量の免疫細胞を簡便に得ることができる。ここで、本発明において「免疫細胞の量」とは、少なくともNK細胞、NKT細胞、及びT細胞の合計量（合計細胞数）を指す。さらに、本発明によれば、第1の工程及び第2の工程を合わせて、例えば合計14日間という短い培養時間で、上記の十分量の免疫細胞を得られる。

20

【0034】

本発明の製造方法から得られる免疫細胞含有組成物は、そのまま患者の治療に使用してもよく、従来公知の方法を使用して、凍結保存等で保存してもよい。本発明の製造方法から得られる免疫細胞含有組成物中の免疫細胞（NK細胞、NKT細胞、T細胞等）は、生理食塩水中等で維持しても、活性状態を維持している。免疫細胞の活性状態は、得られた細胞の細胞表面マーカー（CD69等）をフローサイトメトリーによって解析することで確認できる。また、本発明の製造方法から得られる免疫細胞含有組成物に生理食塩水、ヒト血清アルブミン等を添加して癌治療用組成物を調製できる。この癌治療用組成物は、注射剤等として患者の体内に投与できる。

30

【0035】

本発明の製造方法から得られる免疫細胞含有組成物中の免疫細胞（NK細胞、NKT細胞、T細胞等）は、細胞傷害活性を有するため、癌治療等に有効に使用できる。免疫細胞の細胞傷害活性は、 ^{51}Cr リリース法等で判断できる。また、本発明の製造方法から得られる免疫細胞含有組成物中の免疫細胞は、抗腫瘍活性を有するIFN- γ も産生し得る。IFN- γ は公知のELISA法等で測定できる。

40

【実施例】

【0036】

以下、本発明を実施例に基づき説明するが、本発明は下記の実施例に限定されるものではない。

【0037】

< 参考試験1：健常人の血液中に含まれる各免疫細胞の割合 >

採血器具（商品名「BD Vacutainer CPT cell preparation tube」、ベクトン・ディッキンソン社製）によって、6人の健常人の腕から血液を24mL採血した。各血液からヒト末梢血単核球（PBMC）を回収し、得られたPBMCから、ヒトNK細胞を得た。

【0038】

50

図 1 (A) は、6 人の各健常人についての、回収した P B M C の細胞数を示す。図 1 (B - 1) は、得られた P B M C 中の代表的な細胞分布を示す。図 1 (B - 2) は、得られた P B M C についての、F I T C 標識抗 C D 1 9 抗体及び P E 標識抗 C D 3 抗体を使用した F A C S 分析の代表的な結果を示す。図 1 (B - 1) 中、「F S C」とは、前方散乱 (F o r w a r d s c a t t e r) を指し、「S S C」とは側方散乱 (S i d e s c a t t e r) を指す。

【 0 0 3 9 】

また、表 1 及び 2 に、得られた P B M C 中の各細胞の割合を示す。なお、以下、B 細胞、T 細胞、N K T 細胞、N K 細胞、及び $\gamma \delta$ T 細胞は、それぞれ、 $C D 3^{-} C D 1 9^{+}$ 細胞、 $C D 3^{+} C D 1 9^{-}$ 細胞、 $C D 3^{+} C D 5 6^{+}$ 細胞、 $C D 3^{-} C D 5 6^{+}$ 細胞、及び

10

【 0 0 4 0 】

【表 1】

	全細胞数 ($\times 10^7$)	1mL あたりの 細胞数 ($\times 10^6$)	PBM C 中における割合 (%)					
			単球	B 細胞	T 細胞	NKT 細胞	NK 細胞	$\gamma \delta$ T 細胞
健常人 1-1	4.6	1.9	3.93	7.38	50.07	4.7	7.38	3.22
健常人 1-2	5.3	2.2	7	7.96	51.25	6.87	17.76	3.04
健常人 1-3	4.9	2	17.84	8.84	45.33	5.84	11.97	2.8
健常人 1-4	6.1	2.5	23.89	7.8	41.3	5.72	13.65	2.37
健常人 1-5	5.5	2.3	9.46	9.13	41.03	5.17	12.7	2.83
健常人 1-6	7.1	2.9	8.12	4.99	26.27	3.36	7.6	1.44

20

【 0 0 4 1 】

【表 2】

	全細胞数 ($\times 10^7$)	1mL あたりの 細胞数 ($\times 10^6$)	細胞の絶対数 ($\times 10^7$)					
			単球	B 細胞	T 細胞	NKT 細胞	NK 細胞	$\gamma \delta$ T 細胞
健常人 1-1	4.6	1.9	0.18	0.34	2.3	0.22	0.34	0.15
健常人 1-2	5.3	2.2	0.37	0.42	2.7	0.36	0.94	0.16
健常人 1-3	4.9	2	0.87	0.43	2.22	0.29	0.59	0.14
健常人 1-4	6.1	2.5	1.46	0.48	2.5	0.35	0.83	0.14
健常人 1-5	5.5	2.3	0.52	0.5	2.25	0.28	0.7	0.16
健常人 1-6	7.1	2.9	0.58	0.35	1.9	0.24	0.54	0.1

30

【 0 0 4 2 】

< 実施例 1 : 免疫細胞含有組成物の製造 - 1 >

(P B M C の回収)

2 4 m L の血液を 4 人の健常人から採取し (この時点 を 「 D a y 0 」 とする) 、 P B M C を回収した。

【 0 0 4 3 】

図 2 は、得られた P B M C についての、下記の抗体の組み合わせのいずれかを使用した F A C S 分析の代表的な結果を示す。

40

抗 C D 3 抗体及び抗 C D 1 9 抗体
 抗 C D 3 抗体及び抗 C D 5 6 抗体
 抗 C D 3 抗体及び抗 $\gamma \delta$ T C R 抗体
 C D 5 6 抗体及び $\gamma \delta$ T C R 抗体
 C D 4 抗体及び C D 2 5 抗体

【 0 0 4 4 】

図 2 (A) は、得られた P B M C におけるリンパ球サブセットのパターンを示し、図 2 (B) は、得られた P B M C における単球のパターンを示す。

【 0 0 4 5 】

50

(第1の工程)

次いで、得られたPBM Cを、175IU/mLのヒトIL-2及び25ng/mLのヒトIL-15を添加した50mLの培地(KBM550、コージンバイオ株式会社製)中で懸濁させ、抗CD16モノクローナル抗体でプレコートされた75cm²フラスコ中で5日間培養した(この工程は「第1の工程」に相当し、最終培養日を「Day5」とする)。なお、以下、175IU/mLのヒトIL-2及び25ng/mLのヒトIL-15を添加し、プレコートされた抗CD16モノクローナル抗体に接触させた培地を、「NK細胞増殖培地」と言う。該NK細胞増殖培地には、IL-2、IL-15及び抗CD16モノクローナル抗体が含まれる。

【0046】

10

(第2の工程)

Day5において、細胞をフラスコから回収し、NK細胞増殖培地中で懸濁させ、NK細胞増殖培地(150mL)を入れ、抗CD3εモノクローナル抗体でプレコートされた、滅菌済みのガス透過性の細胞培養バッグ(250mL、コージンバイオ株式会社製)中で2日間培養した(この工程は「第2の工程」に相当し、最終培養日を「Day7」とする)。この培養物は、本発明の製造方法から得られる免疫細胞含有組成物に相当する。

【0047】

(第3の工程)

Day7において、培養後の細胞培養バッグを、NK細胞増殖培地(1000mL)を入れた滅菌済みガス透過性の細胞培養バッグ(1L、コージンバイオ株式会社製)に連結し、さらに37℃、5%CO₂での湿度環境下で7日間培養して(この工程は「第3の工程」に相当する)培養物を得た。この培養物は、本発明の製造方法から得られる免疫細胞含有組成物に相当する。

20

【0048】

図3は、上記の第1乃至3の工程を経て得られた免疫細胞含有組成物中の免疫細胞についてのFACS分析の代表的な結果を示す。図3の通り、培養後の各細胞の割合は、NK細胞=75.1%、NKT細胞=7.7%、γδT細胞=4.9%、T細胞=16.7%、CD56陰性γδT細胞=1.1%、細胞傷害性γδT細胞=3.8%、制御性T細胞(Treg)=0.05%、ヘルパーT細胞=4.2%であった。つまり、本発明によれば、T細胞の割合が過度となることなく、NK細胞等をバランス良く増殖させることができる。

30

【0049】

<実施例2：免疫細胞含有組成物の製造-2>

実施例1と同様に「第1の工程」及び「第2の工程」を行い、培養前(「第1の工程」の前)及び培養後(「第1の工程」及び「第2の工程」の後)の各免疫細胞の割合を検討した。その結果を表3~5に示す。

【0050】

【表 3】

	採血量 (mL)	全細胞数 ($\times 10^7$)	1mLあたりの細胞数 ($\times 10^6$)
健常人 2-1 (培養前)	24	6.75	2.8
健常人 2-1 (培養後)	-	268	-
健常人 2-2 (培養前)	24	3.28	1.4
健常人 2-2 (培養後)	-	246	-
健常人 2-3 (培養前)	24	3.35	1.4
健常人 2-3 (培養後)	-	479	-
健常人 2-4 (培養前)	24	6.71	2.8
健常人 2-4 (培養後)	-	344	-

10

【0051】

【表 4】

	PBMC 中における割合 (%)						
	単球	B細胞	T細胞	NKT細胞	NK細胞	$\gamma\delta$ T細胞	Treg
健常人 2-1 (培養前)	13.8	18.8	49.2	2.1	11.5	1.4	2.87
健常人 2-1 (培養後)	0	0	16.7	7.7	75.1	4.9	0.25
健常人 2-2 (培養前)	16.9	12.6	41.7	4.1	15	2.28	0.38
健常人 2-2 (培養後)	0	0	16.8	10.2	65.2	8.26	0.15
健常人 2-3 (培養前)	11.9	12.2	51.4	2.8	14.7	1.6	0.66
健常人 2-3 (培養後)	0	0	32.4	34	17.6	15.6	0.13
健常人 2-4 (培養前)	12	8.4	52.2	2	19	2	1.57
健常人 2-4 (培養後)	0	0	19.3	4.5	71.1	3.86	0.1

20

30

【0052】

【表 5】

	細胞の絶対数($\times 10^7$)						
	単球	B細胞	T細胞	NKT細胞	NK細胞	$\gamma\delta$ T細胞	Treg
健常人 2-1 (培養前)	0.93	1.27	3.32	0.14	0.78	0.095	0.19
健常人 2-1 (培養後)	0	0	44.8	20.6	201.3	13.1	0.67
健常人 2-2 (培養前)	0.55	0.41	1.37	0.13	0.49	0.075	0.012
健常人 2-2 (培養後)	0	0	41.3	25.1	160.4	20.3	0.37
健常人 2-3 (培養前)	0.4	0.41	1.72	0.094	0.49	0.054	0.022
健常人 2-3 (培養後)	0	0	155.3	162.9	84.3	74.7	0.62
健常人 2-4 (培養前)	0.81	0.56	3.5	0.13	1.27	0.13	0.1
健常人 2-4 (培養後)	0	0	66.4	15.5	244.6	13.3	0.34

10

20

【0053】

表3～5に示される通り、本発明によれば、T細胞の割合が過度となることなく、NK細胞等をバランス良く含む免疫細胞含有組成物が得られる。

【0054】

<実施例3：免疫細胞含有組成物中の免疫細胞の活性>

実施例1と同様に得た免疫細胞含有組成物を、1Lの培養培地(KBM550、コージンバイオ株式会社製)で回収し、0.2%ヒト血清アルブミン(日本製薬株式会社製)を添加した100mLの医薬品グレードの生理食塩水(テルモ株式会社製)、又は、医薬品グレードの生理食塩水のみの中で再懸濁した。次いで、細胞を4で24時間維持し、FACSで分析した。その代表的な結果を図4に示す。

30

【0055】

図4(1)及び(2)の通り、本発明の製造方法によって得られた免疫細胞含有組成物中の各免疫細胞は、24時間の生理食塩水中の維持後においても、CD69を発現していることが分かる。CD69は細胞の活性化マーカーであるため、本発明の製造方法によって得られた免疫細胞含有組成物中の各免疫細胞は活性状態を維持できることが分かる。このような免疫細胞は、調製後、遠隔地等に輸送しても、輸送中に生じ得る活性の低減が抑えられていることが期待できる。

【0056】

<実施例4：免疫細胞含有組成物の製造-3>

40

実施例2と同様の試験を、培地を「KBM550」の代わりに表6～8に記載のものを使用して行った。なお、「KBM570」はコージンバイオ株式会社製、「AIM-V」はインビトロジェン社製、「Miltenyi」はミルテニーバイオテク株式会社製である。表6～8に、得られた免疫細胞含有組成物中の各免疫細胞の割合等を示す。なお、表6中、「培養開始時」とは「第1の工程」を行う前を指し、「培養後」とは「第1の工程」及び「第2の工程」を行った後を指す。

【0057】

【表 6】

	培地の種類	採血量(mL)	培養開始時の細胞数 ($\times 10^7$)	培養後の細胞数 ($\times 10^7$)
健常人 3-1	KBM570	12	3.37	138
健常人 3-1	AIM-V	12	2.82	47.8
健常人 3-2	AIM-V	12	2.33	70.9
健常人 3-2	AIM-V	12	1.9	92.2
健常人 3-3	Milteni	12	1.9	45.5

【0058】

10

【表 7】

	免疫細胞含有組成物中の PBMC における割合(%)						
	単球	B細胞	T細胞	NKT細胞	NK細胞	$\gamma\delta$ T細胞	Treg
健常人 3-1	0	0	15.3	7.5	76.8	5.1	0.39
健常人 3-1	0	0	10.2	8.2	80.9	6.3	0.33
健常人 3-2	0	0	29.8	30	38.9	21.2	2.5
健常人 3-2	0	0	21.6	12.6	64.9	7.4	0.24
健常人 3-3	0	0	36.3	19.1	44.1	9.2	0.47

【0059】

20

【表 8】

	免疫細胞含有組成物中の細胞の絶対数($\times 10^7$)						
	単球	B細胞	T細胞	NKT細胞	NK細胞	$\gamma\delta$ T細胞	Treg
健常人 3-1	0	0	21.1	10.4	105.9	7	0.54
健常人 3-1	0	0	4.9	3.9	38.7	3	0.16
健常人 3-2	0	0	21.1	21.3	27.6	15	1.77
健常人 3-2	0	0	19.9	11.6	59.8	6.8	0.22
健常人 3-3	0	0	16.5	8.7	20	4.2	0.21

【0060】

30

表 6～8 の通り、本発明によれば、使用する培地の種類に関わらず、T細胞の割合が過度となることなく、NK細胞等をバランス良く含む免疫細胞含有組成物が得られることが分かる。

【0061】

<実施例 5：免疫細胞含有組成物の製造 - 4>

培地を「KBM550」の代わりに表 9～11 に記載のものを使用して行い、かつ、ヒト IL-2 又はヒト IL-15 のいずれかを添加した培地を使用する以外は、実施例 2 と同様の試験を行った。表 9～11 に、得られた免疫細胞含有組成物中の各免疫細胞の割合等を示す。なお、表中、「培養開始時」又は「培養前」とは「第 1 の工程」を行う前を指し、「培養後」とは「第 1 の工程」及び「第 2 の工程」を行った後を指す。

40

【0062】

【表 9】

	培地の種類	採血量(mL)	培養開始時の細胞数 ($\times 10^7$)	全細胞数 ($\times 10^7$)	1mL あたりの細胞数 ($\times 10^6$)
培養前	-	24	-	4.12	1.7
培養後 (IL-2)	AIM-V	-	2	160	-
培養後 (IL-15)	AIM-V	-	2	188	-

50

【 0 0 6 3 】

【表 1 0】

	PBMC における割合 (%)						
	単球	B 細胞	T 細胞	NKT 細胞	NK 細胞	$\gamma \delta$ T 細胞	Treg
培養前	9.45	11	58.1	0.65	14.2	1.5	0.91
培養後 (IL-2)	0	0	13.4	0.74	68.8	8.67	0.23
培養後 (IL-15)	0	0	0.39	3.9	81.8	6	0.09

10

【 0 0 6 4 】

【表 1 1】

	細胞の絶対数 ($\times 10^7$)						
	単球	B 細胞	T 細胞	NKT 細胞	NK 細胞	$\gamma \delta$ T 細胞	Treg
培養前	0.39	0.45	2.4	0.027	0.59	0.06	0.037
培養後 (IL-2)	0	0	21.4	1.2	110	13.9	0.37
培養後 (IL-15)	0	0	0.73	7.3	154	11.3	0.16

20

【 0 0 6 5 】

表 9 ~ 1 1 の通り、ヒト IL - 2 又はヒト IL - 1 5 のいずれかの存在下においても、本発明によれば、T 細胞の割合が過度となることなく、NK 細胞等をバランス良く含む免疫細胞含有組成物が得られる。

【 0 0 6 6 】

< 実施例 6 : 細胞傷害活性の測定 >

実施例 2 と同様に免疫細胞含有組成物を得た。得られた免疫細胞含有組成物を、15 mL 遠心管に入れ、遠心分離 (1400 rpm、5 分) を行い、上清を除去して細胞を得た。得られた細胞について、ヒト赤芽球様白血病細胞 (K562) を使用して、 ^{51}Cr リリース法 (エフェクター細胞 (免疫細胞含有組成物中の細胞数) 及びターゲット細胞 (K562 の細胞数) の比 (E : T) = 20 : 1) を行い、細胞傷害活性を算出した。その結果を図 5 に示す。

30

【 0 0 6 7 】

なお、細胞傷害活性は、下式に基づいて算出した。式中、「cpm (counts per minutes の略である)」とは 1 分間あたりの放射線の数を示す。

$$\left((\text{mean cpm experimental release} - \text{mean cpm spontaneous release}) / (\text{mean cpm maximal release} - \text{mean cpm spontaneous release}) \right) \times 100$$

【 0 0 6 8 】

40

図 5 の通り、本発明によれば、細胞傷害活性の高い免疫細胞が得られることが分かる。

【 0 0 6 9 】

< 参考試験 2 : 第 1 の工程及び第 2 の工程の順序に関する検討 >

実施例 1 と同様にして PBMC を得た。次いで、10 $\mu\text{g/mL}$ の抗 CD3 モノクローナル抗体をプレコートした 75 cm^2 フラスコに、50 mL の培地 (KBM550、コージンバイオ株式会社製) を添加し、該培地中で 7 日間培養した後 (この工程は「第 2 の工程」に相当する)、抗 CD16 モノクローナル抗体をプレコートした 75 cm^2 フラスコに、IL - 2 及び IL - 15 を含む 50 mL の培地 (KBM550、コージンバイオ株式会社製) を添加し、該培地中で 7 日間培養した (この工程は「第 1 の工程」に相当する)。表 12 ~ 14 は、培養前 (「第 2 の工程」の前) 及び培養後 (「第 2 の工程」及び「第

50

1 の工程」の後) 細胞についての F A C S 分析の結果を示す。

【 0 0 7 0 】

【 表 1 2 】

	培地の種類	採血量 (mL)	全細胞数 ($\times 10^7$)	1mL あたりの細胞数 ($\times 10^6$)
培養前	-	24	4.35	1.8
培養後	KBM550	-	385	-

【 0 0 7 1 】

【 表 1 3 】

	培養物中の PBMC における割合 (%)						
	単球	B 細胞	T 細胞	NKT 細胞	NK 細胞	$\gamma \delta$ T 細胞	Treg
培養前	15.8	8.7	48.1	3.45	15	3.35	1.12
培養後	0	0	53.7	19.5	23.4	3.97	0.16

【 0 0 7 2 】

【 表 1 4 】

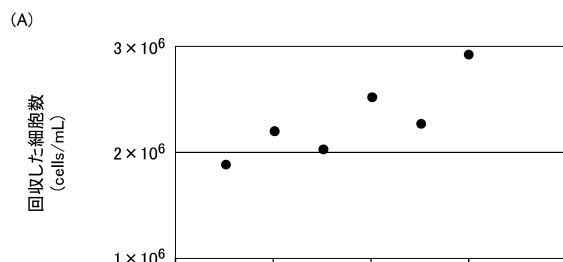
	培養後の細胞の絶対数 ($\times 10^7$)						
	単球	B 細胞	T 細胞	NKT 細胞	NK 細胞	$\gamma \delta$ T 細胞	Treg
培養前	6.87	3.78	20.9	0.15	0.65	0.15	0.048
培養後	0	0	206.7	75	90.1	15.3	0.6

【 0 0 7 3 】

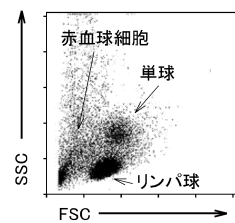
表 1 2 ~ 1 4 の通り、抗 C D 3 モノクローナル抗体の存在下での培養工程 (つまり、第 2 の工程) が、I L - 2、I L - 1 5 及び抗 C D 1 6 モノクローナル抗体の存在下での培養工程 (つまり、第 1 の工程) の前に設けられると、T 細胞の割合が過度となり、NK 細胞等をバランス良く含む免疫細胞含有組成物が得られないことが分かる。

【 図 1 】

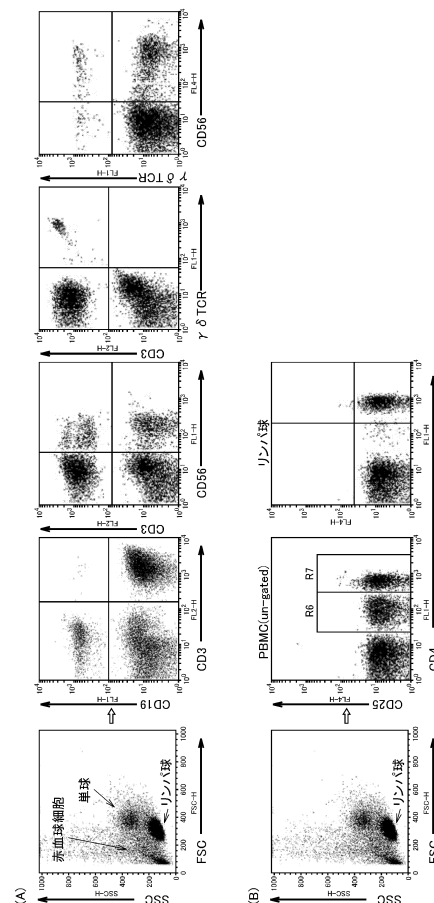
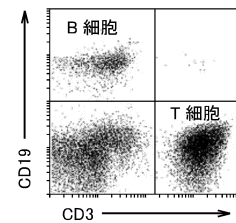
【 図 2 】



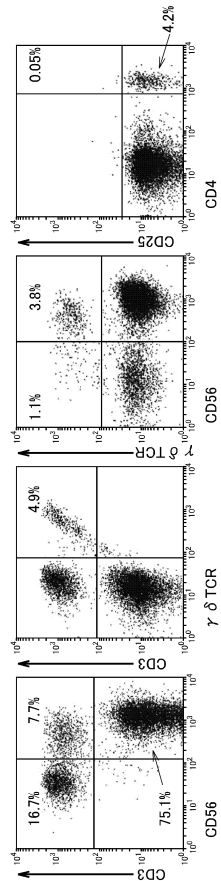
(B-1)



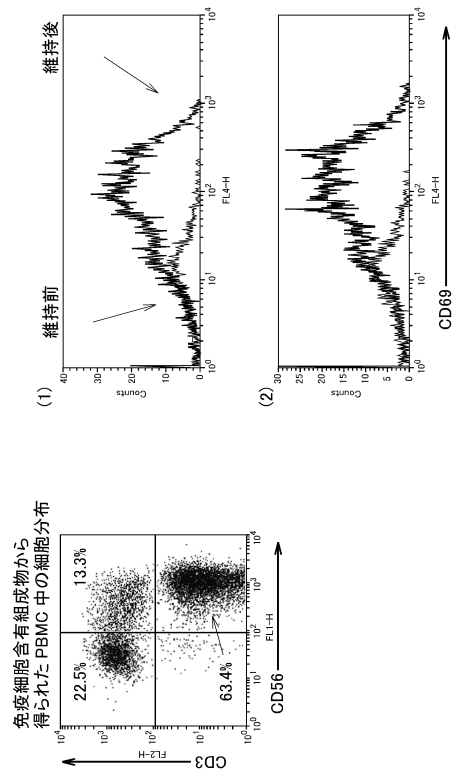
(B-2)



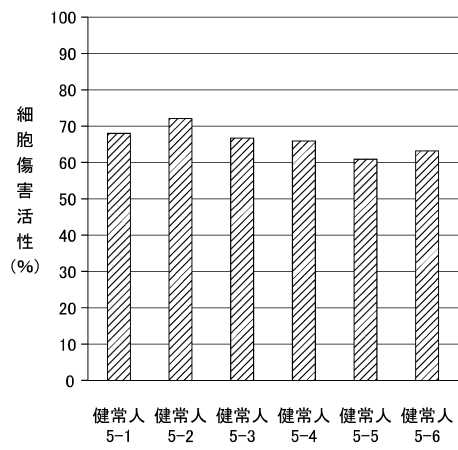
【図 3】



【図 4】



【図 5】



フロントページの続き

(56)参考文献 特開2007-297291(JP,A)
国際公開第2011/030851(WO,A1)
特開2014-30375(JP,A)
特開2013-71915(JP,A)
特開2013-81428(JP,A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 5/00
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)
CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)
PubMed
CiNii
WPIDS/WPIX(STN)