

(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
2022年11月10日(10.11.2022)



(10) 国際公開番号

WO 2022/234856 A1

- (51) 国際特許分類:
C12N 5/0783 (2010.01) *A61P 35/00* (2006.01)
A61K 35/17 (2015.01) *A61P 37/02* (2006.01)
A61P 31/00 (2006.01) *C12N 5/0781* (2010.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2022/019563
- (22) 国際出願日: 2022年5月6日(06.05.2022)
- (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 2021-079296 2021年5月7日(07.05.2021) JP
- (72) 発明者; および
- (71) 出願人: 徳元 康人 (TOKUMOTO Yasuhito);
〒1790075 東京都練馬区高松4丁目13-14-202 Tokyo (JP).
- (72) 発明者: 三村 俊英 (MIMURA Toshihide);
〒1670052 東京都杉並区南荻窪2丁目2-7 Tokyo (JP). 荒木 靖人 (ARAKI Yasuto);
〒3500231 埼玉県坂戸市泉町14-23-205 Saitama (JP). 大島 晋 (OHSHIMA Susumu);
〒4190107 静岡県田方郡函南町平井1740-902 Shizuoka (JP).
- (74) 代理人: 松沼 泰史, 外 (MATSUNUMA Yasushi et al.);
〒1006620 東京都千代田区丸の内一丁目9番2号 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, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, 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:

- 国際調査報告 (条約第21条(3))

(54) Title: METHOD FOR PRODUCING MEMORY T CELLS

(54) 発明の名称: メモリーT細胞の製造方法

(57) Abstract: The present invention provides a method for producing memory T cells from naïve T cells, and a memory-T-cell-containing composition produced through the method. The present invention is: a method for producing memory T cells, the method having an activation step for activating naïve T cells using a differentiation inducer, and a memory conversion step for culturing activated T cells in the absence of a differentiation inducer to thereby produce memory T cells after the activation step, the activated T cells being cultured in a hypoxic environment in the memory conversion step; and a memory-T-cell-containing composition in which the total number of viable stem cell memory T cells, central memory T cells, and effector memory T cells is at least 20% of the total number of viable cells contained in the composition.

(57) 要約: 本発明は、ナイーブT細胞からメモリーT細胞を製造する方法、及び当該方法により製造されたメモリーT細胞含有組成物を提供する。本発明は、ナイーブT細胞を、分化誘導因子で活性化させる活性化工程と、前記活性化工程の後、活性化されたT細胞を、分化誘導因子不存在下で培養することにより、メモリーT細胞を製造するメモリー化工程と、を有し、前記メモリー化工程において、前記活性化されたT細胞を、低酸素環境下で培養する、メモリーT細胞の製造方法、並びに、幹細胞性メモリーT細胞、セントラルメモリーT細胞、及びエフェクターメモリーT細胞の合計生細胞数が、組成物中に含有されている全生細胞数の20%以上である、メモリーT細胞含有組成物である。



WO 2022/234856 A1

明 細 書

発明の名称：メモリーT細胞の製造方法

技術分野

[0001] 本発明は、ナイーブT細胞からメモリーT細胞を簡便に製造する方法に関する。

本願は、2021年5月7日に、日本に出願された特願2021-079296号に基づき優先権を主張し、その内容をここに援用する。

背景技術

[0002] T細胞とB細胞は、いずれも免疫に重要な役割を果たす細胞である。T細胞は、骨髄で産生された前駆細胞が胸腺での選択を経て分化成熟したリンパ球であり、末梢に存在するT細胞は主にCD4⁺T細胞とCD8⁺T細胞に分類される。CD4⁺T細胞は、細胞表面抗原としてCD4を発現している細胞であり、抗原刺激に応答して、他のT細胞やB細胞の機能を調節しており、ヘルパーT細胞と呼ばれる。CD4⁺T細胞は、その分泌するサイトカインの種類により、Th1細胞、Th2細胞、Th17細胞等の亜集団に分類される。また、CD8⁺T細胞は、細胞表面抗原としてCD8を発現している細胞であり、ウイルス感染細胞等を殺傷する細胞性免疫を担っており、活性化後のエフェクター細胞はキラーT細胞とも呼ばれる。一方で、B細胞は、骨髄の造血細胞から分化したリンパ球であり、ヘルパーT細胞から刺激され、プラズマ細胞へと分化して抗体を産生する液性免疫を担っている。

[0003] ナイーブT細胞は、抗原提示細胞によって提示される抗原を認識すると活性化され、エフェクター細胞へ分化する。ナイーブCD4⁺T細胞は活性化されると、ヘルパーCD4⁺Th1細胞やヘルパーCD4⁺Th2細胞等に分化し、ナイーブCD8⁺T細胞は活性化されると、キラーT細胞へと分化する。これらのエフェクター細胞が共働して、病原菌等を排除する。これらのエフェクター細胞は寿命が短く、抗原に暴露し続けられない限り、数日～数週間程度で死滅してしまうが、一部がメモリー細胞となって長期間生き残る。このメ

メモリー細胞により、同じ病原体に再度感染した際に迅速な免疫応答が可能になる。

[0004] 近年では、免疫系を利用したがん治療も行われている。これらのがん免疫療法においては、より高い治療効果を得るためには、エフェクター細胞がメモリー化して長期生存することが重要である。例えば、がんワクチン療法は、抗原提示細胞（樹状細胞）にがん細胞表面抗原を提示させ、T細胞を刺激して免疫系を活性化させてがんを排除する療法である。がんワクチン療法には、患者から採取した抗原提示細胞にがん細胞又はがん細胞表面抗原を貪食させることによってがん細胞表面抗原を提示する抗原提示細胞を製造し、これを増殖させて活性化した後に患者の体内へ戻すDCワクチン療法がある。当該方法では、患者の体内に戻す活性化されたがん細胞表面抗原提示細胞と一緒に体内へ戻される活性化された各種リンパ球に、メモリー化された細胞が含まれていることが好ましい。また、CAR-T細胞療法は、患者から採取されたT細胞を、遺伝子組換え技術により、がん細胞表面抗原を認識するキメラ抗原受容体（CAR）を発現させるように改変して増殖させた後、患者の体内に戻す療法である。体内に戻された改変されたT細胞（CAR-T細胞）ががん細胞を認識し、攻撃することでがん細胞が排除される。体内に戻されるCAR-T細胞群に、メモリー化された細胞が含まれていることが好ましい。これらの療法において、患者体内に戻されるリンパ球中にメモリー化された細胞が存在している場合には、このメモリー細胞が長期間生存することにより、がんを長期間排除することが可能であり、がんの再発防止にも有効である。

[0005] しかし、*ex vivo*でT細胞をメモリー化することは、非常に困難である。例えば、DCワクチン療法やCAR-T細胞療法では、活性化させたがん細胞表面抗原提示細胞やCAR-T細胞を培養し、長期間増殖能が衰えない細胞をメモリー化した細胞としている。しかし、当該方法では、長期間の増殖は可能であるものの、数日又は1～2週間に1回は抗原又はサイトカインによる刺激を受けないと増殖が維持できず、死滅してしまう。しかし、

天然のメモリーT細胞は、サイトカインや抗原の刺激が無い状態でも、増殖を停止した状態（Quiescence）で長期間生存することができる。さらに、天然のメモリーT細胞は小型の球形の細胞であるのに対して、*ex vivo*で得たメモリーT細胞は、形状が一定しないブラスト細胞である（非特許文献1）。

先行技術文献

非特許文献

[0006] 非特許文献1：Kaartinen et al., *Cytotherapy*, 2017, vol.19, p.689-702.

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0007] 本発明は、ナイーブT細胞からメモリーT細胞を製造する方法、及び当該方法により製造されたメモリーT細胞含有組成物等を提供することを主たる目的とする。

課題を解決するための手段

[0008] 本発明者らは、鋭意研究した結果、ナイーブT細胞を、分化誘導因子で活性化させた後に、低酸素環境下で、分化誘導因子不含培地で培養することにより、メモリーT細胞が製造されること、及び、ナイーブB細胞を同様に処理することにより、分化誘導因子非依存的に生存可能な細胞が得られることを見出し、本発明を完成させた。

[0009] すなわち、本発明に係るメモリーT細胞の製造方法、メモリーT細胞含有組成物、医薬用組成物、及び分化誘導因子非依存的生存可能な細胞の製造方法は、下記[1]～[12]である。

[1] ナイーブT細胞を、分化誘導因子で活性化させる活性化工程と、

前記活性化工程の後、活性化されたT細胞を、分化誘導因子不存在下で培養することにより、メモリーT細胞を製造するメモリー化工程と、
を有し、

前記メモリー化工程において、前記活性化されたT細胞を、低酸素環境下

で培養する、メモリーT細胞の製造方法。

[2] 前記低酸素環境の酸素濃度が、0.5～5.0体積%である、前記[1]のメモリーT細胞の製造方法。

[3] ナイーブT細胞を、分化誘導因子で活性化させる活性化工程と、前記活性化工程の後、活性化されたT細胞を、分化誘導因子不存在下で培養することにより、メモリーT細胞を製造するメモリー化工程と、を有し、

前記ナイーブT細胞が、ストレス処理がなされた細胞である、又は、前記メモリー化工程の前に、前記活性化されたT細胞にストレス処理を行う、メモリーT細胞の製造方法。

[4] 前記ナイーブT細胞が、0～10℃で1時間以上保持した後の細胞である、前記[3]のメモリーT細胞の製造方法。

[5] 前記ナイーブT細胞が、50歳以上のヒトから採取された細胞である、前記[3]のメモリーT細胞の製造方法。

[6] 前記活性化されたT細胞を、凍結融解させた後に、前記メモリー化工程を行う、前記[3]のメモリーT細胞の製造方法。

[7] 前記ナイーブT細胞が、ナイーブCD4⁺T細胞又はナイーブCD8⁺T細胞である、前記[1]～[6]のいずれかのメモリーT細胞の製造方法。

[8] 前記分化誘導因子が、ナイーブCD4⁺T細胞をCD4⁺Th1細胞へ分化させる、ナイーブCD4⁺T細胞をCD4⁺Th2細胞へ分化させる、又はナイーブCD8⁺T細胞をキラーT細胞へ分化させるための分化誘導因子である、前記[7]のメモリーT細胞の製造方法。

[9] 幹細胞性メモリーT細胞、セントラルメモリーT細胞、及びエフェクターメモリーT細胞の合計生細胞数が、組成物中に含有されている全生細胞数の20%以上である、メモリーT細胞含有組成物。

[10] 前記[9]のメモリーT細胞含有組成物を有効成分とする、医薬

用組成物。

[11] ナイーブB細胞を、分化誘導因子で活性化させる活性化工程と、前記活性化工程の後、活性化されたB細胞を、分化誘導因子不存在下で培養することにより、分化誘導因子非依存的に生存可能な細胞を製造する長期生存能獲得工程と、を有し、

前記長期生存能獲得工程において、前記活性化されたB細胞を、低酸素環境下で培養する、分化誘導因子非依存的に長期生存可能な細胞の製造方法。

[12] 前記分化誘導因子非依存的に長期生存可能な細胞が、プラズマ細胞、胚中心B細胞、及び移行B細胞からなる群より選択される1種以上である、前記[11]の分化誘導因子非依存的に長期生存可能な細胞の製造方法。

発明の効果

[0010] 本発明により、活性化されたT細胞から、メモリーT細胞を、非常に効率よく、簡便に製造することができる。

また、本発明により、活性化されたB細胞から、分化誘導因子非依存的に生存可能なB細胞を、非常に効率よく、簡便に製造することができる。

図面の簡単な説明

[0011] [図1]実施例1において、ナイーブCD4⁺ T細胞をTh1培地で培養した後、分化誘導因子飢餓培地で低酸素培養した細胞のFACS解析の結果を示した図である。図1(A)は、分化誘導前のナイーブCD4⁺ T細胞(刺激前の細胞)のドットプロットであり、図1(B)は、Th1培地で15日間培養した細胞(刺激15日目の細胞)のドットプロットであり、図1(C)及び(D)は、Th1培地で13日間培養した後、分化誘導因子飢餓培地で9日間低酸素培養した細胞(刺激13日+無刺激9日の細胞)のドットプロットである。

[図2]実施例1において、ナイーブCD4⁺ T細胞をTh2培地で培養した後、分化誘導因子飢餓培地で低酸素培養した細胞のFACS解析の結果を示

した図である。図2 (A) は、分化誘導前のナイーブCD4⁺ T細胞 (刺激前の細胞) のドットプロットであり、図2 (B) は、Th2培地で17日間培養した細胞 (刺激17日目の細胞) のドットプロットであり、図2 (C) 及び (D) は、Th2培地で10日間培養した後、分化誘導因子飢餓培地で7日間低酸素培養した細胞 (刺激10日+無刺激7日の細胞) のドットプロットである。

[図3]実施例2において、ナイーブCD8⁺ T細胞をCD8-TA培地で培養した後、分化誘導因子飢餓培地で低酸素培養した細胞のFACS解析の結果を示した図である。図3 (A) 及び (D) は、分化誘導前のナイーブCD8⁺ T細胞 (刺激前の細胞) のドットプロットであり、図3 (B) 及び (E) は、CD8-TA培地で8日間培養した細胞 (刺激8日目の細胞) のドットプロットであり、図3 (C) 及び (F) は、CD8-TA培地で7日間培養した後、分化誘導因子飢餓培地で8日間低酸素培養した細胞 (刺激7日+無刺激8日の細胞) のドットプロットである。

[図4]実施例3において、ナイーブCD4⁺ T細胞をTh2培地で培養した後に凍結保存し、その後分化誘導因子飢餓培地で通常培養した細胞のFACSの結果を示したドットプロットである。

[図5]実施例4において、ナイーブCD8⁺ T細胞をCD8-TA培地で培養した後に凍結保存し、その後分化誘導因子飢餓培地で通常培養した細胞のFACSの結果を示したドットプロットである。

[図6]実施例5において、冷蔵保存後のナイーブCD4⁺ T細胞 (A) 及びナイーブCD8⁺ T細胞 (B) を、分化誘導後に通常培養した細胞のFACS解析の結果を示した図である。

[図7]実施例6において、59歳のヒトから採取されたナイーブCD4⁺ T細胞又はナイーブCD8⁺ T細胞を、分化誘導後に分化誘導因子飢餓培地で低酸素培養又は通常培養した細胞のFACSの結果を示した図である。

[図8]実施例7において、ナイーブB細胞を、分化誘導して活性化した細胞 (活性化B細胞) と、その後分化誘導因子飢餓培地で低酸素培養した細胞 (

無刺激6日目の細胞)のFACSの結果を示した図である。

[図9]実施例8において、ナイーブB細胞を、分化誘導して活性化した細胞(活性化B細胞)と、その後に分化誘導因子飢餓培地で低酸素培養した細胞(無刺激7日目の細胞)のFACSの結果を示した図である。

[図10]実施例9において、ナイーブB細胞を、分化誘導して活性化した細胞(活性化B細胞)と、その後に分化誘導因子飢餓培地で低酸素培養した細胞(無刺激8日目の細胞)のFACSの結果を示した図である。

発明を実施するための形態

[0012] 本発明及び本願明細書において、「通常の酸素環境」とは、酸素濃度が大気圧と同程度、すなわち、19~21体積%程度の環境をいう。また、「低酸素環境」とは、酸素濃度が0.1~10体積%の環境をいう。

[0013] 本発明及び本願明細書において、T細胞やB細胞の「メモリー化」とは、抗原や分化誘導因子による刺激のない環境下で、増殖を停止したうえで、エフェクター細胞への分化能を保持したまま長期生存が可能となる形質(未分化増殖停止長期生存能)を獲得し、かつ細胞表面抗原の発現パターンが天然のメモリー細胞と同じとなることを意味する。未分化増殖停止長期生存能は、具体的には、抗原や分化誘導因子の不存在下で、7日間以上、好ましくは1か月間以上生存可能な形質を意味する。

[0014] <メモリーT細胞の製造方法>

本発明に係るメモリーT細胞の製造方法は、ナイーブT細胞を、分化誘導因子で活性化させる活性化工程と、前記活性化工程の後、活性化されたT細胞を、分化誘導因子不存在下で培養することにより、メモリーT細胞を製造するメモリー化工程と、を有し、前記メモリー化工程において、前記活性化されたT細胞を、低酸素環境下で培養することを特徴とする。分化誘導因子で活性化されたT細胞を、分化誘導因子不存在下で培養する際に、通常の酸素環境下ではなく、低酸素環境下とするだけで、細胞休眠(Quiescent)誘導されてメモリー化できることは、本発明者らにより初めて見出された知見である。

- [0015] 本発明において供されるナイーブT細胞は、動物から採取されたナイーブT細胞であってもよく、動物から採取されたナイーブT細胞を初代培養又は継代培養して増殖させた細胞であってもよい。また、ES（胚性幹）細胞やiPS（人工多能性幹）細胞から分化させたナイーブT細胞も、本発明において用いることができる。
- [0016] 生体からのナイーブT細胞の採取は、常法により行うことができる。例えば、ナイーブT細胞は、他のリンパ球と同様に末梢血中に存在している。このため、動物から採取した末梢血から末梢血単核細胞（PBMC）を分画し、PBMCからナイーブT細胞を精製することによって、ナイーブT細胞を採取することができる。
- [0017] 末梢血からのPBMC画分の分取は、Ficoll（登録商標）を用いた密度勾配遠心分離法等の常法により実施することができる。また、市販のPBMC調製用キットを用いることもできる。
- [0018] ナイーブT細胞は、エフェクター細胞と細胞表面抗原が異なる。例えば、ナイーブT細胞は、細胞表面抗原のうち、CD45RAとCD62LとCD127を有している。このため、PBMCをこれらの細胞表面抗原に対する蛍光標識抗体で標識した後、蛍光活性化セルソーター（FACS）を利用することにより、CD45RAとCD62LとCD127を有するナイーブT細胞群のみ精製することができる。同様に、FACSにより、CD45RAとCD62LとCD127とCD4を有する細胞群のみを分取することにより、ナイーブCD4⁺T細胞群を精製でき、CD45RAとCD62LとCD127とCD8を有する細胞群のみを分取することにより、ナイーブCD8⁺T細胞群を精製できる。FACS装置及び各種表面抗原に対する蛍光標識抗体は、一般的に用いられるものの中から適宜選択して用いることができ、市販のものを用いることもできる。また、FACSを用いる代わりに、前記の細胞表面抗原に対する抗体を磁気ビーズに結合させた免疫磁気ビーズを用いて、マグネットによりナイーブT細胞をPBMCから精製することもできる。

[0019] 本発明においては、まず、活性化工程として、ナイーブT細胞を、分化誘導因子で活性化させる。具体的には、ナイーブT細胞を、分化誘導因子を含む培養培地で培養する。分化誘導因子としては、T細胞受容体(TCR)へ活性化シグナルを与えるための抗ヒトCD3抗体又は抗ヒトCD3抗体/抗ヒトCD28抗体を基本因子とし、それに加えてナイーブT細胞をエフェクター細胞に分化誘導する際に必要とされるサイトカインの中から適宜選択して用いることができる。当該サイトカインとしては、インターロイキン(IL)、インターフェロン(IFN)、トランスフォーミング増殖因子(TGF)などの各種増殖因子等が挙げられる。例えば、ナイーブCD4⁺T細胞をIL-12、IFN γ で刺激することにより、CD4⁺Th1細胞へ分化させるように活性化できる。ナイーブCD4⁺T細胞をIL-2、IL-4、IL-7、TSLP(thymic stromal lymphopoietin)で刺激することにより、CD4⁺Th2細胞へ分化させるように活性化でき、ナイーブCD4⁺T細胞をIL-21、IL-6で刺激することにより、CD4⁺T_{FH}細胞へ分化させるように活性化でき、ナイーブCD4⁺T細胞をTGF β 、IL-6で刺激することにより、CD4⁺Th17細胞へ分化させるように活性化できる。また、ナイーブCD8⁺T細胞をIL-2で刺激することにより、CD8⁺キラーT細胞へ分化させるように活性化できる。これらの分化誘導因子は、組換えタンパク質であってもよく、動物細胞から分泌された天然物であってもよく、化学合成品であってもよい。

[0020] 分化誘導因子を含有させてナイーブT細胞を培養する培養培地は、リンパ球の培養が可能な培地であれば特に限定されるものではない。例えば、RPMI(Roswell Park Memorial Institute)1640培地、IMDM(Iscove's Modified Dulbecco's Medium)培地等の培地を用いることができる。これらの培地は、非働化血清を含有する培地であってもよく、無血清培地であってもよい。血清を含有させる場合、血清の濃度は、特に限定されるものではなく、例えば、5~15容量%とすることができる。血清としては、ウシ胎児血清、ウシ血清、ウマ血清、ヤギ血清、ヒト血清等のいずれを用いるこ

ともできる。これらの培養培地には、血清の他にも、2-メルカプトエタノール、インシュリン、トランスフェリン、亜セレン酸ナトリウム、エタノールアミン、アルブミン等の培養培地への添加剤として汎用されている添加剤を適宜含有させてもよい。

[0021] 活性化工程における培養は、リンパ球の培養が可能な培地に分化誘導因子を含有させた培地で培養する以外は、通常の培養細胞株の培養と同様にして行うことができる。培養温度は、30～41℃で行うことが好ましく、36～38℃で行うことがより好ましい。また、大気中で培養することもできるが、二酸化炭素濃度が4～10体積%に制御された通常酸素濃度環境で培養することが好ましい。培養時間は、ナイーブT細胞が活性化するために十分な時間であれば特に限定されるものではなく、例えば、3日間～28日間、好ましくは6～21日間、より好ましくは6～14日間、さらに好ましくは6～10日間培養することにより、ナイーブT細胞を活性化させることができる。

[0022] 活性化工程の後、メモリー化工程として、活性化されたT細胞を、分化誘導因子を含有していない培養培地中で、低酸素環境下で培養する。分化誘導因子を含有していない培養培地としては、特に限定されるものではなく、リンパ球の培養が可能な培地を分化誘導因子を含有させずに使用することができる。リンパ球の培養が可能な培地としては、RPMI 1640培地、IMDM培地等を用いることができ、これらの基礎培地に、血清や各種添加剤を添加してもよい。当該添加剤としては、前記で列挙されたものと同様のものを用いることができる。メモリー化工程で用いる培養培地は、活性化工程で用いた培養培地から分化誘導因子を除いた培地を用いてもよく、活性化工程で用いた培養培地とは異なる基礎培地を用いてもよい。

[0023] メモリー化工程における培養時における酸素濃度は、0.1～10体積%であり、0.5～5.0体積%であることが好ましく、0.5～1.5体積%であることがより好ましい。例えば、活性化されたT細胞を、二酸化炭素濃度が4～10体積%に制御された低酸素濃度環境下で、30～41℃、好ま

しくは36～38℃で、5日間～21日間、好ましくは6～14日間、より好ましくは7～10日間培養する。活性化されたT細胞に、酸素濃度を低下させてストレスをかけることによって、簡便にメモリー化させることができる。

[0024] メモリー化工程により、活性化されたT細胞は、幹細胞性メモリーT細胞、セントラルメモリーT細胞、又はエフェクターメモリーT細胞へ分化する。幹細胞性メモリーT細胞は、長期生存能に加えて、自己複製能と幹細胞性を有し、抗原刺激によってセントラルメモリーT細胞やエフェクターメモリーT細胞へ分化する。セントラルメモリーT細胞は、長期生存能と自己複製能を有しており、一般的にリンパ節と末梢循環に局在する。エフェクターメモリーT細胞は、長期生存能を有しており、一般的に末梢循環や組織に局在する。幹細胞性メモリーT細胞、セントラルメモリーT細胞、及びエフェクターメモリーT細胞は、細胞表面抗原の発現パターンの違いにより識別することができる。

[0025] 従来の*ex vivo*で形成されたメモリーT細胞は、形状が不均一なブラスト細胞であり、かつ自己複製を継続しているのに対して、本発明におけるメモリー化工程により得られたメモリーT細胞は、天然のメモリーT細胞と同様に、小型の球形であり、比較的形状が一定の増殖を停止している細胞である。この形態と細胞増殖停止・休眠の特徴から、本発明に係るメモリーT細胞の製造方法は、天然のメモリーT細胞に近い形質を有するメモリーT細胞を簡便に獲得できる方法であるといえる。

[0026] メモリー化工程により、生細胞全体に占めるメモリー細胞の割合が、20%以上、好ましくは50%以上、より好ましくは70%以上、さらに好ましくは80%以上である細胞集団が得られる。すなわち、メモリー化工程の培養後の培養物は、幹細胞性メモリーT細胞、セントラルメモリーT細胞、及びエフェクターメモリーT細胞の合計生細胞数が、組成物中に含有されている全生細胞数の20%以上、好ましくは50%以上、より好ましくは70%以上、さらに好ましくは80%以上であるメモリーT細胞含有組成物である

- 。
- [0027] メモリー化工程において、低酸素ストレスをかけることに代えて、予めストレス処理がなされたナイーブ細胞を用いたり、メモリー化工程の前に、前記活性化されたT細胞にストレス処理を行うことによっても、細胞休眠誘導を引き起こすことができ、ナイーブT細胞をメモリー化させることができる。ストレス処理としては、温度ストレスや老化が挙げられる。
- [0028] 具体的には、メモリー化工程前に、ナイーブT細胞に温度ストレスをかけることによっても、メモリー化することができる。温度ストレスとしては、0～10℃、好ましくは1～5℃の低温ストレスや、凍結ストレスが挙げられる。
- [0029] 例えば、分化誘導因子で活性化させる活性化工程に供される前のナイーブT細胞を、0～10℃で1時間以上、好ましくは1～7日間、より好ましくは2～4日間保持する冷蔵保存処理を行って低温ストレスをかける。低温ストレス後のナイーブT細胞を分化誘導因子で活性化させた後、活性化されたT細胞を、分化誘導因子不存在下で培養することにより、メモリーT細胞を製造することができる。活性化されたT細胞の培養は、分化誘導因子を含有していない培養培地で培養すればよく、通常酸素環境下で行ってもよく、低酸素環境下で行ってもよい。
- [0030] また、例えば、分化誘導因子で活性化させる活性化工程に供される前のナイーブT細胞を、凍結融解処理した後に、分化誘導因子で活性化させ、その後活性化されたT細胞を、分化誘導因子不存在下で培養することにより、メモリーT細胞を製造することもできる。凍結融解は、一般的な細胞の凍結融解と同様にして行うことができる。例えば、細胞を凍結保存液に懸濁させ、得られた懸濁液を-70～-150℃の冷凍庫内で静置することにより、ナイーブT細胞を凍結させることができる。凍結保存液は、細胞培養に用いる培地自体や、リン酸生理食塩水（PBS）等のバッファーに血清を添加した溶液や、DMSOやセリシン等の細胞保護剤を添加した溶液であってもよい。何らかの細胞保護剤の添加は不可欠であるが、血清は添加してもしなくて

もよい。凍結させた細胞は、水浴等を用いて融解させることができる。

[0031] 温度ストレスは、活性化されたT細胞をメモリー化する前にかけてもよい。例えば、前記活性化工程の後、活性化されたT細胞を凍結融解させた後に、メモリー化工程として分化誘導因子不存在下で培養することにより、メモリーT細胞を製造することができる。凍結融解後のT細胞の培養は、分化誘導因子を含有していない培養培地で培養すればよく、通常酸素環境下で行ってもよく、低酸素環境下で行ってもよい。

[0032] その他、老化ストレスにさらされたナイーブT細胞を用いた場合には、低酸素ストレスや温度ストレスをかけなくても、メモリーT細胞を製造することができる。例えば、50歳以上のヒトから採取されたナイーブT細胞は、分化誘導因子で活性化させた後、通常酸素環境下で分化誘導因子を含まない培養培地中で培養することにより、メモリー化させることができる。

[0033] メモリー化により得られたメモリーT細胞やそれを含有する組成物は、他のメモリーT細胞と同様に、医薬用組成物の有効成分として用いることができる。また、メモリーT細胞自体を、細胞医療等において医薬品として患者に投与される細胞の原料として用いることができる。例えば、メモリー化により得られたメモリーT細胞を遺伝子組換えし、CAR-T療法で使用されるCAR-T細胞を製造することができる。

[0034] また、DCワクチン療法において、メモリー化により得られたメモリーT細胞を、活性化されたがん細胞表面抗原提示細胞と共に患者の体内に戻すことにより、より高い治療効果が期待できる。例えば、DCワクチン製造時に同時に採取した活性化リンパ球を含む画分の一部を、凍結処理してから解凍した後、低酸素環境下、分化誘導因子不含培地中で培養する。メモリー化されて生き残った細胞を、活性化されたがん細胞表面抗原提示細胞と混合して得られたがん抗原特異的メモリー化リンパ球集団を、患者の体内に戻す。

[0035] ナイーブT細胞以外のT細胞に対しても、分化誘導因子を含まない培養培地中で、低酸素環境下で培養することにより、メモリー化させることができる。例えば、CAR-T療法に使用されるために作製されたCAR-T細胞

を、低酸素環境下で分化誘導因子を含まない培養培地中で培養することにより、メモリー化CAR-T細胞、すなわち、未分化増殖停止長期生存能を備えたCAR-T細胞が得られる。

[0036] その他、がん免疫療法の課題であるT細胞の疲弊化の解消にも、本発明に係るメモリーT細胞の製造方法を利用できる。T細胞の疲弊化は、がん細胞を攻撃するT細胞が、あまりにも長期にがん抗原に暴露され続けることによって、がん細胞を攻撃する能力が弱まる現象である。疲弊化には、TOX、TOX2、NR4A等の複数の転写因子や、ゲノム修飾、メタボリック変化等が関わっていることが分かっている。がん抗原への長期暴露による過剰な活性化刺激によって疲弊したT細胞を、分化誘導因子を含まない培養培地中で、低酸素環境下で培養することにより、T細胞疲弊の原因となっていた因子がダウンレギュレーションされて、T細胞内部の状態をリセットできる可能性がある。こうして得られたメモリー化T細胞を患者の体内に戻すことにより、がん免疫療法においてより長期間治療効果が得られる。

[0037] <ナイーブB細胞からの分化誘導因子非依存的に未分化増殖停止長期生存可能な細胞の製造方法>

ナイーブB細胞についても、活性化した後、低酸素ストレス下で培養することにより、分化誘導因子非依存的に未分化増殖停止長期生存可能な形質を獲得させることができる。具体的には、ナイーブB細胞を、分化誘導因子で活性化させる活性化工程と、前記活性化工程の後、活性化されたB細胞を、分化誘導因子不存在下で培養することにより、分化誘導因子非依存的に生存可能な細胞を製造する長期生存能獲得工程と、を有し、前記長期生存能獲得工程において、前記活性化されたB細胞を、低酸素環境下で培養する。

[0038] 本発明において供されるナイーブB細胞は、動物から採取されたナイーブB細胞であってもよく、動物から採取されたナイーブB細胞を初代培養又は継代培養して増殖させた細胞であってもよい。また、ES（胚性幹）細胞やiPS（人工多能性幹）細胞から分化させたナイーブB細胞も、本発明において用いることができる。

- [0039] 生体からのナイーブB細胞の採取は、ナイーブT細胞と同様に、PBMCからFACSを利用して精製することができる。例えば、ナイーブB細胞は、細胞表面抗原のうち、CD20とCD27を有しており、CD38は有していない。このため、PBMCをこれらの細胞表面抗原に対する蛍光標識抗体で標識した後、FACSを利用することにより、CD20とCD27を発現しており、CD38が発現していないナイーブB細胞群のみ精製することができる。FACS装置及び各種表面抗原に対する蛍光標識抗体は、一般的に用いられるものの中から適宜選択して用いることができ、市販のものを用いることもできる。また、FACSを用いる代わりに、前記の細胞表面抗原に対する抗体を磁気ビーズに結合させた免疫磁気ビーズを用いて、マグネットによりナイーブT細胞をPBMCから精製することもできる。
- [0040] ナイーブB細胞を活性化させる活性化工程において、分化誘導因子としては、ナイーブB細胞をエフェクター細胞に分化誘導する際に必要とされるサイトカインの中から適宜選択して用いることができる。例えば、ナイーブB細胞を、IL-2、IL-4、IL-6、IL-10、IL-15、IL-21を用いることにより、プラズマ細胞へ分化させるように活性化できる。
- [0041] ナイーブB細胞を分化誘導因子で活性化させる活性化工程において、培養培地としては、リンパ球の培養が可能な培地に分化誘導因子を含有させた培地を用いる。リンパ球の培養が可能な培地としては、RPMI 1640培地、IMDM培地等を用いることができ、これらの基礎培地に、血清や各種添加剤を添加してもよい。当該添加剤としては、前記で列挙されたものと同様のものを用いることができる。
- [0042] 活性化工程における培養は、リンパ球の培養が可能な培地に分化誘導因子を含有させた培地で培養する以外は、通常の培養細胞株の培養と同様に行うことができる。培養温度は、30～41℃で行うことが好ましく、36～38℃で行うことがより好ましい。また、大気中で培養することもできるが、二酸化炭素濃度が4～10体積%に制御された通常酸素濃度環境で培養することが好ましい。培養時間は、ナイーブB細胞が活性化するために十分

な時間であれば特に限定されるものではなく、例えば、2日間～28日間、好ましくは3～21日間、より好ましくは3～14日間、さらに好ましくは3～10日間培養することにより、ナイーブB細胞を活性化させることができる。

[0043] 活性化工程の後、長期生存能獲得工程として、活性化されたB細胞を、分化誘導因子を含有していない培養培地中で、低酸素環境下で培養する。分化誘導因子を含有していない培養培地としては、特に限定されるものではなく、リンパ球の培養が可能な培地を分化誘導因子を含有させずに使用することができる。リンパ球の培養が可能な培地としては、RPMI 1640培地、IMDM培地等を用いることができ、これらの基礎培地に、血清や各種添加剤を添加してもよい。当該添加剤としては、前記で列挙されたものと同様のものを用いることができる。長期生存能獲得工程で用いる培養培地は、活性化工程で用いた培養培地から分化誘導因子を除いた培地を用いてもよく、活性化工程で用いた培養培地とは異なる基礎培地を用いてもよい。

[0044] 長期生存能獲得工程における培養時における酸素濃度は、0.1～10体積%であり、0.5～5体積%であることが好ましく、0.5～1.5体積%であることがより好ましい。例えば、活性化されたB細胞を、二酸化炭素濃度が4～10体積%に制御された低酸素濃度環境下で、30～41℃、好ましくは36～38℃で、5日間～21日間、好ましくは6～14日間、より好ましくは6～10日間培養する。活性化されたB細胞に、酸素濃度を低下させてストレスをかけることによって、簡便に分化誘導因子非依存的な長期生存能を獲得させることができる。

[0045] 長期生存能獲得工程により、活性化されたB細胞は、プラズマ細胞のまま分化誘導因子非依存的な長期生存能を獲得したり、胚中心B細胞又は移行B細胞等に分化する。胚中心B細胞及び移行B細胞は、いずれも分化誘導因子非依存的な長期生存能を有する。

[0046] 分化誘導因子非依存的な長期生存能を獲得したB細胞やそれを含有する組成物は、他のB細胞と同様に、医薬用組成物の有効成分として用いることが

できる。また、分化誘導因子非依存的な長期生存能を獲得したB細胞自体を、細胞医療等において医薬品として患者に投与される細胞の原料として用いることができる。

[0047] 動物の体内において、天然の長期生存型プラズマ細胞は、低酸素環境である骨髄に局在しており、抗原刺激やサイトカインの有無に関わらず、生涯にわたって抗体を血中に分泌し続ける。このため、特定の抗原に対する抗体を作る長期生存型プラズマ細胞を移植することにより、ワクチンを接種せずとも、動物個体に液性免疫を与えることができる。本発明により作製された分化誘導因子非依存的な長期生存能を獲得したプラズマ細胞（長期生存プラズマ細胞）は、天然の長期生存型プラズマ細胞と同様に、動物個体に抗体産生能力を付与して液性免疫を与えることができる。例えば、特定の抗原によって刺激されたナイーブB細胞から作製された長期生存プラズマ細胞の移植により、当該抗原に対する免疫を惹起することができるため、本発明は、HIVウイルスや腸管出血性大腸菌（O157など）、COVID-19の原因であるSARS-CoV-2等の効果的なワクチンが開発されていない感染症の予防や治療に対しても有効であることが期待される。

実施例

[0048] 次に、実施例等により本発明をさらに詳細に説明するが、本発明はこれらの例によって限定されるものではない。

[0049] [培地等]

以降の実験で用いた培地の組成は、以下の通りである。

PBS/2% FBS： 49 mLのPBS（リン酸生理食塩水）に1 mLのFBS（ウシ胎児血清）を混合した溶液。

PBS/2% FBS/1 mM EDTA： 49 mLのPBSに1 mLのFBSと0.1 mLの0.5 M EDTAを混合した溶液。

RPMI 1640/10% FBS/2-ME： 45 mLのRPMI 1640（#12633-012、Invitrogen社製）に、5 mLのFBSと0.5 mLの100×PSG（「100×penicillin-streptomycin-glutamine」、#10378-016

、Invitrogen社製)と50 μ Lの50mM 2-メルカプトエタノール(2-ME)を混合した培地。

IMDM/10% FBS/2-ME: 45mLのIMDM(「IMDM(\times 1)+GlutaMAX-1 medium」、#31980-030、Invitrogen社製)に、5mLのFBSと0.5mLの100 \times PSGと50 μ Lの50mM 2-MEを混合した培地。

[0050] Th1培地: 10mLのRPMI 1640/10% FBS/2-MEに、50 μ Lの「200 \times Human Th1 reagent 1(IL-12)」と、50 μ Lの「200 \times Human Th1 reagent 2(IFN- γ)」と、を混合した培地。200 \times Human Th1 reagent 1(IL-12)と200 \times Human Th1 reagent 2(IFN- γ)は、Th1分化誘導キット(「CellXVivo human Th1 cell differentiation kit」、#CDK001、R&D Systems社製)の付属物を用いた。

Th2培地: 10mLのRPMI 1640/10% FBS/2-MEに、10 μ Lの「1000 \times Human Th2 reagent 1(IL-2)」と、10 μ Lの「1000 \times Human Th2 reagent 2(IL-4)」と、10 μ Lの「1000 \times Human Th2 reagent 3(IL-7)」と、10 μ Lの「1000 \times Human Th2 reagent 4(TSLP)」と、を混合した培地。1000 \times Human Th2 reagent 1(IL-2)、1000 \times Human Th2 reagent 2(IL-4)、1000 \times Human Th2 reagent 3(IL-7)、及び1000 \times Human Th2 reagent 4(TSLP)は、Th2分化誘導キット(「CellXVivo human Th2 cell differentiation kit」、#CDK002、R&D Systems社製)の付属物を用いた。

CD8-TA培地: 10mLのRPMI 1640/10% FBS/2-MEに、10 μ LのT細胞活性化磁気ビーズ(「Dynabeads human T-activator CD3/CD28」、#11131D、Gibco社製)と、10 μ LのIL-2(ヒト組換えIL-2、#202-IL、R&D Systems社製)溶液(10 μ g/mL)と、を混合した培地。

[0051] ステップ1培地: 10mLのRPMI 1640/10% FBS/2-MEに、20 μ Lの「500 \times B cell Expander 1(CD40L)」と、20 μ Lの「500 \times B cell Expander 2(IL-4)」と、20 μ Lの「500 \times B cell Expander 3(a

nti-CD40L)」と、 $10\ \mu\text{L}$ のIL-2（ヒト組換えIL-2、#202-IL、R&D Systems社製）溶液（ $10\ \mu\text{g}/\text{mL}$ ）と、 $50\ \mu\text{L}$ のIL-10（ヒト組換えIL-10、#217-IL-005、R&D Systems社製）溶液（ $10\ \mu\text{g}/\text{mL}$ ）と、 $50\ \mu\text{L}$ のIL-21（ヒト組換えIL-21、#200-21-10UG、PeproTech社製）溶液（ $10\ \mu\text{g}/\text{mL}$ ）と、を混合した培地。500×B cell Expander 1（CD40L）と500×B cell Expander 2（IL-4）と500×B cell Expander 3（anti-CD40L）は、B細胞増殖キット（「CellXVivo human B cell expansion kit」、#CDK005、R&D Systems社製）の付属物を用いた。

ステップ2培地： $10\ \text{mL}$ のIMDM/10% FBS/2-MEに、 $10\ \mu\text{L}$ のIL-2溶液（ $10\ \mu\text{g}/\text{mL}$ ）と、 $5\ \mu\text{L}$ のIL-6（ヒト組換えIL-6、#200-06-20UG、PeproTech社製）溶液（ $20\ \mu\text{g}/\text{mL}$ ）と、 $50\ \mu\text{L}$ のIL-21溶液（ $10\ \mu\text{g}/\text{mL}$ ）と、を混合した培地。

[0052] B27培地： $48.5\ \text{mL}$ のRPMI 1640に、 $1\ \text{mL}$ の「50× B27 supplement」（serum free、#17504044、Gibco社製）と、 $0.5\ \text{mL}$ の100×PSGと、 $50\ \mu\text{L}$ の50 mM 2-MEを混合した溶液。

N2培地： $49\ \text{mL}$ のRPMI 1640に、 $0.5\ \text{mL}$ の「100× N2 supplement」（#17502001、Gibco社製）と、 $0.5\ \text{mL}$ の100×PSGと、 $50\ \mu\text{L}$ の50 mM 2-MEを混合した溶液。

BSA培地： $49\ \text{mL}$ のRPMI 1640に、 $0.5\ \text{mL}$ の100×BSA（ $200\ \text{mg}/\text{mL}$ 、#A4161、Sigma-Aldrich社製）と、 $0.5\ \text{mL}$ の100×PSGと、 $50\ \mu\text{L}$ の50 mM 2-MEを混合した溶液。

[0053] LPS/IL-4培地： $10\ \text{mL}$ のRPMI 1640/10% FBS/2-MEに、 $50\ \mu\text{L}$ のリポポリサッカライド（LPS）（E. coli 0III:B4、L4391-1MG、Sigma社製）溶液（ $1\ \text{mg}/\text{mL}$ ）と、 $10\ \mu\text{L}$ のIL-4（ヒト組換えIL-4、AF-200-04、PeproTech社製）溶液（ $10\ \mu\text{g}/\text{mL}$ ）と、を混合した培地。

ODN2006培地： $10\ \text{mL}$ のRPMI 1640/10% FBS/2-MEに、 $10\ \mu\text{L}$ のIL-2溶液（ $10\ \mu\text{g}/\text{mL}$ ）と、 $5\ \mu\text{L}$ のIL-6

(ヒト組換え IL-6、#200-06-20UG、PeproTech社製) 溶液 (20 μ g/mL) と、20 μ L のオリゴヌクレオチド 2006 (ODN 2006) (tlrl-2006、Invivogen社製) 溶液 (2.5 mg/mL) と、を混合した培地。

[0054] [FACSに用いた抗体等]

FACSで用いた抗体等は、以下の通りである。

抗CD45RA抗体： FITC標識マウス抗ヒトCD45RAモノクローナル抗体 (HI100、#11-0458-42、Invitrogen社製)

抗CD62L抗体： PE標識マウス抗ヒトCD62Lモノクローナル抗体 (DREG-56、#12-0629-42、Invitrogen社製)

抗CD127抗体： PE-Cyanine 7標識マウス抗ヒトCD127モノクローナル抗体 (eBioRDR5、#25-1278-42、Invitrogen社製)

抗CD20抗体： FITC標識マウス抗ヒトCD20モノクローナル抗体 (2H7、#11-0209-42、Invitrogen社製)

抗CD27抗体： PE標識マウス抗ヒトCD27モノクローナル抗体 (0323、#12-0279-42、Invitrogen社製)

抗CD38抗体： PE-Cyanine 7標識マウス抗ヒトCD38モノクローナル抗体 (HIT2、#25-0389-42、Invitrogen社製)

7-AAD： 7-Amino-Actinomycin D (#559925、BD Biosciences社製)

[0055] [実施例1]

21歳のヒトから採取された末梢血から回収したナイーブCD4⁺ T細胞を分化誘導させた後、低酸素環境下、分化誘導因子飢餓培地で培養することにより、メモリーリンパ球を製造した。

[0056] (1) ヒト末梢血単核細胞 (PBMC) の採取

ヘパリン含有採血管2本分 (約20 mL) に採取した血液を50 mL容プラスチックチューブに入れ、20 mLのPBS/2% FBSを加えて2倍希釈し、10 mL容ピペットを用いて泡立てないように注意しながら10回ほどピペティングして混合した。

この希釈済血液を、20 mLずつ、予め15 mLのFicollを入れて

おいたPBMC回収用チューブ（「SepMate（登録商標）-50」、#86450、STEMCELL Technologies社製）2本にそれぞれ、Fico11層を乱さないように重層した。次いで、当該PBMC回収用チューブを、遠心分離処理（2,600rpm、10分間、室温）した後、当該PBMC回収用チューブの内容物を、予め25mLのPBS/2% FBSを入れておいた50mL容プラスチックチューブにデカンテーションで移した後、遠心分離処理（1,300rpm、8分間、室温）した。当該プラスチックチューブの上清を除去し、沈殿した細胞ペレットをタッピングでほぐした後、50mLのPBS/2% FBSをデカンテーションで加えて3回転倒混和させた後、再び遠心分離処理（1,300rpm、8分間、室温）して上清を除去した。当該プラスチックチューブ内に沈殿した細胞ペレットに、10mLのPBS/2% FBS/1mM EDTAを加えて10回ほどピペティングして細胞を懸濁させた。

[0057] 得られた細胞懸濁液は、10 μ Lを細胞数カウント用として別のチューブに分取しておいた。この10 μ Lの細胞懸濁液に、等量のチュルク液（核染色液：#109277、Sigma-Aldrich社製）を加えて、有核細胞の数を計算した。

当該細胞懸濁液の残りの全量に、40mLのPBS/2% FBS/1mM EDTAを添加して総量50mLに調整し、3回転倒混和させた後、遠心分離処理（1,300rpm、8分間、室温）して上清を除去した。当該プラスチックチューブ内に沈殿した細胞ペレットに、細胞分離用バッファー（「RoboSep（登録商標） Buffer」、#20104、STEMCELL Technologies社製）を加えて、 5×10^7 cells/mLの細胞懸濁液を調製した。

[0058] (2) PBMCからのナイーブCD4⁺ T細胞の回収

前記(1)で調整した細胞懸濁液から、ナイーブCD4⁺ T細胞を回収した。ナイーブCD4⁺ T細胞の回収は、市販のナイーブCD4⁺ T細胞単離用キット（「EasySep human naive CD4⁺ T cell isolation kit II」、#17555、STEMCELL Technologies社製）を用いて、当該キット付属のマニュアルの通りに行った。

精製したナイーブCD4⁺ T細胞の懸濁液のうちの10 μ Lを、細胞数カ

ウント用として別のチューブに分取した。この10 μ Lの細胞懸濁液に、等量のトリパンブルー液（#29853-34, Nacalai Tesque社製）を加えて、生細胞の数を計算した。

[0059] (3) ナイーブCD4⁺ T細胞からCD4⁺ Th1細胞への分化誘導

ナイーブCD4⁺ T細胞からCD4⁺ Th1細胞への分化誘導は、市販のTh1分化誘導キット（「CellXVivo human Th1 cell differentiation kit」、#CDK001、R&D Systems社製）を用いて、当該キット付属のマニュアルの通りに行った。

まず、前記（2）で調製した精製したナイーブCD4⁺ T細胞の懸濁液を15mL容プラスチックチューブに移した後、遠心分離処理（1,000rpm、5分間、室温）して上清を除去した。当該プラスチックチューブ内に沈殿した細胞ペレットに、 2×10^5 cells/mLとなるようにTh1培地を加えて細胞を懸濁させた。

得られた細胞懸濁液を、マウス抗ヒトCD3抗体（前記キットの付属品）でコーティングした24ウェルプレートに、1ウェル当たり1mLずつ分注した。当該プレートを、37 $^{\circ}$ C、5% CO₂、20% O₂の環境下で7日間以上培養した。培養期間中、細胞数の増加により生じた乳酸により培地のpHが下がって黄変した場合は、培養液の半量を別のマウス抗ヒトCD3抗体コーティングウェルに移し、新鮮なTh1培地で2倍希釈して培養を続けた。

[0060] (4) ナイーブCD4⁺ T細胞からCD4⁺ Th2細胞への分化誘導

ナイーブCD4⁺ T細胞からCD4⁺ Th2細胞への分化誘導は、市販のTh2分化誘導キット（「CellXVivo human Th2 cell differentiation kit」、#CDK002、R&D Systems社製）を用いて、当該キット付属のマニュアルの通りに行った。

まず、前記（2）で調製した精製したナイーブCD4⁺ T細胞の懸濁液を15mL容プラスチックチューブに移した後、遠心分離処理（1,000rpm、5分間、室温）して上清を除去した。当該プラスチックチューブ内に

沈殿した細胞ペレットに、 2×10^5 cells/mLとなるようにTh2培地を加えて細胞を懸濁させた。

得られた細胞懸濁液を、マウス抗ヒトCD3抗体（前記キットの付属品）でコーティングした24ウェルプレートに、1ウェル当たり1mLずつ分注した。当該プレートを、37℃、5% CO₂、20% O₂の環境下で7日間以上培養した。培養期間中、細胞数の増加により生じた乳酸により培地のpHが下がって黄変した場合は、培養液の半量を別のマウス抗ヒトCD3抗体コーティングウェルに移し、新鮮なTh2培地で2倍希釈して培養を続けた。

[0061] (5) 分化誘導因子飢餓培地での培養

前記(3)の培養終了後、各ウェル中の細胞を培養液ごと15mL容プラスチックチューブに移した。当該プラスチックチューブに移した培養液のうちの10μLを、細胞数カウント用として別のチューブに分取した。この10μLの細胞懸濁液に、等量のトリパンブルー液を加えて、生細胞の数を計算した。

残りの細胞培養液が収容されているプラスチックチューブを遠心分離処理（1,000rpm、5分間、室温）して上清を除去した後、沈殿した細胞ペレットに、 4×10^5 cells/mLとなるようにRPMI 1640/10% FBS/2-MEを加えて細胞を懸濁させて、細胞懸濁液を調製した。

[0062] 調製された細胞懸濁液を、T25フラスコに5mLずつ分注した。これらのT25フラスコを、37℃、5% CO₂、1% O₂の環境下で7日間以上培養（低酸素培養）した。コントロールの細胞は、37℃、5% CO₂、20% O₂の環境下で7日間以上培養（通常培養）した。

培養後の細胞を、FACS解析に供した。

[0063] 前記(4)の培養終了後の細胞についても、同様に低酸素培養を行い、培養後の細胞を、FACS解析に供した。

[0064] (6) FACS

前記（５）の培養後の細胞を、培養液ごと 15 mL 容プラスチックチューブに移した。当該プラスチックチューブを遠心分離処理（1,000 rpm、5 分間、室温）して上清を除去した後、沈殿した細胞ペレットに 5 mL の PBS/2% FBS を加えて細胞を懸濁させた後、再び当該プラスチックチューブを遠心分離処理（1,000 rpm、5 分間、室温）して上清を除去した。沈殿した細胞ペレットに、0.1 mL の PBS/2% FBS を加えて細胞を懸濁させた。

[0065] 調製された細胞懸濁液に、22 μ L の T 細胞用抗体カクテル（5 μ L の抗 CD45RA 抗体、5 μ L の抗 CD62L 抗体、5 μ L の抗 CD127 抗体、及び 7 μ L の 7-AAD）を加えてピペティングで混和した後、氷中、暗所で 20 分間静置した。次いで、当該細胞懸濁液に、5 mL の PBS/2% FBS を加えて細胞を懸濁させた後、当該プラスチックチューブを遠心分離処理（1,000 rpm、5 分間、室温）して上清を除去した。沈殿した細胞ペレットに、0.5 mL の PBS/2% FBS を加えて細胞を懸濁させ、得られた細胞懸濁液を 5 mL 容 FACS チューブに移した。

当該 FACS チューブを、FACS 装置（「FACSCanto II」、Becton Dickinson 社製）にかけて計測し、得られたデータを解析用ソフトウェア（「FACS Diva ver. 6.1」、Becton Dickinson 社製）を用いて解析した。

[0066] ナイーブ T 細胞（ナイーブ CD4⁺ T 細胞、ナイーブ CD8⁺ T 細胞）、エフェクター T 細胞（CD4⁺ Th1 細胞、CD4⁺ Th2 細胞、CD8⁺ キラー T 細胞）、幹細胞性メモリー T 細胞（Stem Cell Memory T cell）、セントラルメモリー T 細胞、及びエフェクターメモリー T 細胞は、それぞれ表 1 に示す細胞表面抗原を有する。

[0067] [表1]

細胞	表面抗原
ナイーブ T 細胞	CD45RA ⁺ / CD62L ⁺ / CD127 ⁺
幹細胞性メモリー T 細胞	CD45RA ⁺ / CD62L ⁺ / CD127 ⁺
セントラルメモリー T 細胞	CD45RA ⁻ / CD62L ⁺ / CD127 ⁺
エフェクターメモリー T 細胞	CD45RA ⁻ / CD62L ⁻ / CD127 ⁺
エフェクター T 細胞	CD45RA ⁻ / CD62L ⁻ / CD127 ⁻

[0068] 図1 (A) は、分化誘導前のナイーブCD4⁺ T細胞 (刺激前の細胞) のFACSの結果を示したドットプロットであり、図1 (B) は、Th1培地で15日間培養した細胞 (刺激15日目の細胞) のFACSの結果を示したドットプロットであり、図1 (C) 及び (D) は、Th1培地で13日間培養した後、RPMI 1640/10% FBS/2-ME (分化誘導因子飢餓培地) で9日間低酸素培養した細胞 (刺激13日+無刺激9日目の細胞) のFACSの結果を示したドットプロットである。なお、ナイーブCD4⁺ T細胞をTh1培地で13日間培養した後、分化誘導因子飢餓培地で9日間通常培養した場合には、全ての細胞が死滅することをFACS解析で確認した。

[0069] ナイーブCD4⁺ T細胞をTh1培地で15日間培養した場合には、ほとんどがCD45RA⁻細胞であり、成熟したエフェクター細胞 (CD4⁺ Th1細胞) と未成熟なエフェクター細胞の混合集団を形成していることが確認された (図1 (B))。これに対して、ナイーブCD4⁺ T細胞をTh1培地で13日間培養した後、分化誘導因子飢餓培地で9日間低酸素培養した場合には、通常培養とは異なり、52.0%の細胞が生存していた。また、当該細胞集団は、幹細胞性メモリーT細胞、セントラルメモリーT細胞、及びエフェクターメモリーT細胞からなる細胞集団であることが確認された (図1 (C) 及び (D))。

[0070] 図2 (A) は、分化誘導前のナイーブCD4⁺ T細胞 (刺激前の細胞) のFACSの結果を示したドットプロットであり、図2 (B) は、Th2培地で17日間培養した細胞 (刺激17日目の細胞) のFACSの結果を示したドットプロットであり、図2 (C) 及び (D) は、Th2培地で10日間培養した後、RPMI 1640/10% FBS/2-ME (分化誘導因子飢餓培地) で7日間低酸素培養した細胞 (刺激10日+無刺激7日目の細胞) のFACSの結果を示したドットプロットである。なお、ナイーブCD4⁺ T細胞をTh2培地で10日間培養した後、分化誘導因子飢餓培地で7日間通常培養した場合には、全ての細胞が死滅することをFACS解析で確認した。

。

[0071] ナイーブCD4⁺ T細胞をTh2培地で17日間培養した場合にも、ほとんどがCD45RA⁻細胞であり、成熟したエフェクター細胞（CD4⁺ Th2細胞）と未成熟なエフェクター細胞の混合集団を形成していることが確認された（図2（B））。これに対して、ナイーブCD4⁺ T細胞をTh2培地で10日間培養した後、分化誘導因子飢餓培地で7日間低酸素培養した場合には、通常培養とは異なり、32.6%の細胞が生存していた。また、当該細胞集団は、幹細胞性メモリーT細胞、セントラルメモリーT細胞、及びエフェクターメモリーT細胞からなる細胞集団であることが確認された（図2（C）及び（D））。ただし、Th1培地で培養した場合と異なり、エフェクターメモリーT細胞は非常に少なく、幹細胞性メモリーT細胞の方が多く生成されていた。

[0072] 図1及び図2に示すこれらの結果から、ナイーブCD4⁺ T細胞を分化誘導により活性化した後、低酸素環境下で培養することにより、長期生存能を獲得してメモリー細胞化されること、セントラルメモリーT細胞とエフェクターメモリーT細胞のみならず、自己複製能と幹細胞性を有している幹細胞性メモリーT細胞も生成できることが確認された。

[0073] （7）無血清培地での低酸素培養

前記（5）の培養を、RPMI 1640/10% FBS/2-MEに代えて、B27培地、N2培地、及びBSA培地の3種の無血清培地を用いて行った。培養後の細胞に対して、前記（6）と同様にしてFACS解析を行った。

[0074] この結果、Th1培地又はTh2培地で10日間培養した後、B27培地、N2培地、又はBSA培地で7日間培養した場合には、幹細胞性メモリーT細胞、セントラルメモリーT細胞、及びエフェクターメモリーT細胞からなる細胞集団が得られた。すなわち、いずれの無血清培地を用いた場合でも、RPMI 1640/10% FBS/2-MEを用いた場合と同様に、長期生存能が獲得されてメモリー細胞を製造できた。

[0075] [実施例 2]

20歳のヒトから採取された末梢血から回収したナイーブCD8⁺ T細胞を分化誘導させた後、低酸素環境下、分化誘導因子飢餓培地で培養することにより、メモリーリンパ球を製造した。

[0076] (1) PBMCからのナイーブCD8⁺ T細胞の回収

実施例1の(1)と同様にして調整した細胞懸濁液から、ナイーブCD8⁺ T細胞を回収した。ナイーブCD8⁺ T細胞の回収は、市販のナイーブCD8⁺ T細胞単離用キット(「EasySep human naive CD8⁺ T cell isolation kit II」、#17928、STEMCELL Technologies社製)を用いて、当該キット付属のマニュアルの通りに行った。

精製したナイーブCD8⁺ T細胞の懸濁液のうちの10 μ Lを、細胞数カウント用として別のチューブに分取した。この10 μ Lの細胞懸濁液に、等量のトリパンブルー液を加えて、生細胞の数を計算した。

[0077] (2) ナイーブCD8⁺ T細胞からCD8⁺ キラーT細胞への分化誘導

まず、前記(1)で調製した精製したナイーブCD8⁺ T細胞の懸濁液を15mL容プラスチックチューブに移した後、遠心分離処理(1,000rpm、5分間、室温)して上清を除去した。当該プラスチックチューブ内に沈殿した細胞ペレットに、 2×10^5 cells/mLとなるようにCD8-TA培地を加えて細胞を懸濁させた。

得られた細胞懸濁液を、コーティングしていない24ウェルプレートに、1ウェル当たり1mLずつ分注した。当該プレートを、37 $^{\circ}$ C、5% CO₂、20% O₂の環境下で7日間以上培養した。培養期間中、細胞数の増加により生じた乳酸により培地のpHが下がって黄変した場合は、培養液の半量を別のマウス抗ヒトCD3抗体コーティングウェルに移し、新鮮なTh2培地で2倍希釈して培養を続けた。

[0078] (3) 磁気ビーズの除去

前記(2)の培養終了後、各ウェル中の細胞を培養液ごと15mL容プラスチックチューブに移した。当該プラスチックチューブを遠心分離処理(1

, 000 rpm、5分間、室温)して上清を除去した後、沈殿した細胞ペレットに、0.8 mLの細胞分離用バッファー「RoboSep Buffer」を加えて細胞を懸濁させた後に激しくピペティングしてT細胞活性化磁気ビーズ剥離処理を行い、さらに1.7 mLの細胞分離用バッファーを加えて2.5 mLの細胞懸濁液を調製した。

当該細胞懸濁液を5 mL容FACSチューブ(#720028、Corning社製)に移した後、当該FACSチューブを磁気スタンドにセットし、室温で3分間静置した。次いで、磁気スタンドにセットした状態のまま、当該FACSチューブ内の細胞懸濁液をデカンテーションにより新しい5 mL容FACSチューブに移した。この新たなFACSチューブに対して、再び、磁気スタンドにセットして室温で3分間静置した後、当該FACSチューブ内の細胞懸濁液をデカンテーションにより新しい5 mL容FACSチューブに移した。

[0079] (4) 分化誘導因子飢餓培地での培養

前記(3)でFACSチューブに回収した細胞懸濁液のうちの10 μ Lを、細胞数カウント用として別のチューブに分取した。この10 μ Lの細胞懸濁液に、等量のトリパンブルー液を加えて、生細胞の数を計算した。

当該FACSチューブ内の残りの細胞培養液の全量を15 mL容プラスチックチューブに移した後、遠心分離処理(1,000 rpm、5分間、室温)して上清を除去した。当該プラスチックチューブ内に沈殿した細胞ペレットに、 4×10^5 cells/mLとなるようにRPMI 1640/10% FBS/2-MEを加えて細胞を懸濁させて、細胞懸濁液を調製した。

[0080] 調製された細胞懸濁液を、T25フラスコに5 mLずつ分注した。これらのT25フラスコを、37°C、5% CO₂、1% O₂の環境下で7日間培養(低酸素培養)した。コントロールの細胞は、37°C、5% CO₂、20% O₂の環境下で7日間培養(通常培養)した。

培養後の細胞を、FACS解析に供した。

[0081] (5) FACS

前記（４）の培養後の細胞に対して、実施例１の（６）と同様にして、FACS解析を行った。

[0082] 図３は、ナイーブCD8⁺ T細胞をCD8-TA培地で培養した後、分化誘導因子飢餓培地で低酸素培養した細胞のFACS解析の結果を示した図である。図３中、（Ａ）及び（Ｄ）は、分化誘導前のナイーブCD8⁺ T細胞（刺激前の細胞）のFACSの結果を示したドットプロットであり、（Ｂ）及び（Ｅ）は、CD8-TA培地で８日間培養した細胞（刺激８日目の細胞）のFACSの結果を示したドットプロットであり、（Ｃ）及び（Ｆ）は、CD8-TA培地で７日間培養した後、RPMI 1640/10% FBS/2-ME（分化誘導因子飢餓培地）で８日間低酸素培養した細胞（刺激７日＋無刺激８日目の細胞）のFACSの結果を示したドットプロットである。図３中、上段の（Ａ）～（Ｃ）は、縦軸を側方散乱光シグナル（SSC）、横軸を前方散乱光シグナル（FSC）としてプロットした図であり、下段の（Ｄ）～（Ｆ）は、縦軸を抗CD62L抗体から発される蛍光強度、横軸を抗CD45RA抗体から発される蛍光強度としてプロットした図である。また、上段のプロット図中、ゲーティングされた領域内の細胞が、生細胞である。

[0083] ナイーブCD8⁺ T細胞をCD8-TA培地で７日間培養した後、分化誘導因子飢餓培地で８日間通常培養した場合には、全ての細胞が死滅することをFACS解析で確認した。これに対して、ナイーブCD8⁺ T細胞をCD8-TA培地で７日間培養した後、分化誘導因子飢餓培地で８日間低酸素培養した場合には、通常培養とは異なり、20.0%の細胞が生存していた。また、表面抗原の発現パターンによれば、分化誘導因子飢餓培地での低酸素培養後の細胞集団は、その大部分が幹細胞性メモリーT細胞であり、次いで、セントラルメモリーT細胞が多く含まれており、エフェクターメモリーT細胞は極少数であった（図３（Ｆ））。

[0084] また、図３の上段のプロット図が示すように、ナイーブCD8⁺ T細胞は、比較的形状が一定であり、大きさも小さい（図３（Ａ））が、分化誘導に

より活性化されたCD8⁺ T細胞は、形状のばらつきが大きく、大部分の細胞はナイーブCD8⁺ T細胞より大きい（図3（B））。これに対して、活性化後に分化誘導因子飢餓培地で低酸素培養した細胞集団は、比較的形状が一定であり、活性化細胞よりも大きさが小さかった（図3（C））。つまり、分化誘導因子飢餓培地での低酸素培養後の細胞は、細胞表面抗原の発現パターンのみならず、形状や大きさも、エフェクターT細胞よりも、天然のメモリーT細胞に近かった。

[0085] これらの結果から、ナイーブCD8⁺ T細胞を分化誘導により活性化した後、低酸素環境下の分化誘導因子飢餓培地中で培養することにより、長期生存能を獲得してメモリー細胞化されること、しかも、自己複製能と幹細胞性を有している幹細胞性メモリーT細胞を非常に効率よく製造できることが確認された。

[0086] [実施例3]

21歳のヒトから採取された末梢血から回収したナイーブCD4⁺ T細胞をCD4⁺ Th2細胞へ分化誘導させた後、凍結融解することにより、メモリーリンパ球を製造した。ヒト末梢血からのナイーブCD4⁺ T細胞の回収、ナイーブCD4⁺ T細胞からCD4⁺ Th2細胞への分化誘導は、実施例1と同様にして行った。

[0087] (1) 凍結保存

実施例1の(4)の培養終了後、各ウェル中の細胞を培養液ごと15mL容プラスチックチューブに移した。当該プラスチックチューブに移した培養液のうちの10 μ Lを、細胞数カウント用として別のチューブに分取した。この10 μ Lの細胞懸濁液に、等量のトリパンブルー液を加えて、生細胞の数を計算した。

[0088] 残りの細胞培養液が収容されているプラスチックチューブを遠心分離処理（1,000rpm、5分間、室温）して上清を除去した後、沈殿した細胞ペレットに、 4×10^6 cells/mLとなるように凍結保存液を加えて細胞を懸濁させた。凍結保存液としては、血清とDMSOを含有している凍

結保存液A（90% FBS/10% DMSO）、血清は含有していないが、DMSOは含有している凍結保存液B（「BAMBANKER」、#CS-04-001、Nippon Genetics社製）、又は血清とDMSOのどちらも含有していない凍結保存液C（「Cell Reservoir One」、#07579-24、Nacalai Tesque社製）を用いた。

調製された細胞懸濁液を、1 mLずつクライオチューブへ分注した後、これらのチューブを細胞凍結保存容器（「BICELL」、Nippon Freezer社製）に入れて、 -80°C で保存した。

[0089] （2）解凍及び培養

-80°C で保存後、当該クライオチューブを室温の水浴に浸してチューブ内部の細胞懸濁液を解凍した。当該チューブ内の細胞懸濁液全量を、15 mL容プラスチックチューブに移し、当該プラスチックチューブを遠心分離処理（1,000 rpm、5分間、室温）して上清を除去した後、沈殿した細胞ペレットに、 4×10^5 cells/mLとなるようにRPMI 1640/10% FBS/2-MEを加えて細胞を懸濁させて、細胞懸濁液を調製した。

[0090] 調製された細胞懸濁液を、T25フラスコに5 mLずつ分注した。これらのT25フラスコを、 37°C 、5% CO_2 、20% O_2 の環境下で8日間培養（通常培養）した。

[0091] （3）FACS

前記（2）の培養後の細胞を、FACS解析に供した。FACS解析は、実施例1の（6）と同様にして行った。

[0092] 図4は、Th2培地で培養した後に凍結保存液Aで凍結保存した細胞を、RPMI 1640/10% FBS/2-ME（分化誘導因子飢餓培地）で通常培養した細胞のFACSの結果を示したドットプロットである。（A）は、縦軸をSSC、横軸をFSCとしたプロットである。（B）は、縦軸を抗CD62L抗体から発される蛍光強度、横軸を抗CD45RA抗体から発される蛍光強度としたプロットである。（C）は、縦軸を抗CD127抗体から発される蛍光強度、横軸を抗CD62L抗体から発される蛍光強度とした

プロットである。

[0093] 図4 (A) 中、ゲーティングされた領域内の細胞が、生細胞である。低酸素培養後の細胞生存率は、27.1%であり、実施例2と同程度であった。一方で、通常培養後の細胞生存率は2.3%であり、実施例2ではほぼ全ての細胞が死滅していたのに対して、生き残った細胞があった。この生き残った細胞集団は、低酸素培養した細胞集団と同様に、幹細胞性メモリーT細胞、セントラルメモリーT細胞、及びエフェクターメモリーT細胞からなる細胞集団であることが確認された(図4 (B) 及び (C))。凍結保存液B及び凍結保存液Cを用いて凍結保存した場合でも、同様に、幹細胞性メモリーT細胞、セントラルメモリーT細胞、及びエフェクターメモリーT細胞からなる細胞集団が得られた。

[0094] これらの結果から、ナイーブCD4⁺ T細胞を分化誘導により活性化した後、凍結処理した後、解凍して分化誘導因子飢餓培地中で通常培養することにより、使用する凍結保存液の血清の有無やDMSOの有無にかかわらず、低酸素培養を行った場合と同様に、長期生存能を獲得してメモリーT細胞化されることが確認された。

[0095] [実施例4]

21歳のヒトから採取された末梢血から回収したナイーブCD8⁺ T細胞を分化誘導させた後、凍結保存することにより、メモリーリンパ球を製造した。ヒト末梢血からのナイーブCD8⁺ T細胞の回収、その後の分化誘導、及び磁気ビーズの除去は、実施例2の(1)～(3)と同様にして行った。

[0096] (1) 凍結保存

磁気ビーズ除去後のFACSチューブに回収した細胞懸濁液のうちの10 μ Lを、細胞数カウント用として別のチューブに分取した。この10 μ Lの細胞懸濁液に、等量のトリパンブルー液を加えて、生細胞の数を計算した。

当該FACSチューブ内の残りの細胞培養液の全量を15mL容プラスチックチューブに移した後、遠心分離処理(1,000rpm、5分間、室温)して上清を除去した。当該プラスチックチューブ内に沈殿した細胞ペレッ

トに、 4×10^5 cells/mLとなるように凍結保存液を加えて細胞を懸濁させた。凍結保存液は、実施例4で用いた3種を使用した。

調製された細胞懸濁液を、1 mLずつクライオチューブへ分注した後、これらのチューブを細胞凍結保存容器（「BICELL」、Nippon Freezer社製）に入れて、 -80°C で保存した。

[0097] (2) 解凍及び培養

-80°C で保存後、当該クライオチューブ内の細胞を解凍した後、 37°C 、5% CO_2 、20% O_2 の環境下で8日間培養（通常培養）した。細胞の回復と培養は、実施例4の(2)と同様にして行った。

[0098] (3) FACS

前記(2)の培養後の細胞を、FACS解析に供した。FACS解析は、実施例1の(6)と同様にして行った。

[0099] 図5は、CD8-TA培地で培養した後に凍結保存液Aで凍結保存した細胞を、RPMI 1640/10% FBS/2-ME（分化誘導因子飢餓培地）で通常培養した細胞のFACSの結果を示したドットプロットである。図5(A)中、ゲーティングされた領域内の細胞が、生細胞である。低酸素培養後の細胞生存率は、36.0%であり、実施例3と同程度であった。一方で、通常培養後の細胞生存率は20.4%であり、実施例3ではほぼ全ての細胞が死滅していたのに対して、非常に多くの細胞が生き残っていた。この生き残った細胞集団は、低酸素培養した細胞集団と同様に、その大部分が幹細胞性メモリーT細胞とセントラルメモリーT細胞であり、エフェクターメモリーT細胞も含まれていた（図5(B)及び(C)）。凍結保存液B及び凍結保存液Cを用いて凍結保存した場合でも、同様に、その大部分が幹細胞性メモリーT細胞とセントラルメモリーT細胞であり、エフェクターメモリーT細胞も含まれている細胞集団が得られた。

[0100] これらの結果から、ナイーブCD8⁺ T細胞を分化誘導により活性化した後、凍結処理した後、解凍して分化誘導因子飢餓培地中で通常培養することにより、使用する凍結保存液の血清の有無やDMSOの有無にかかわらず、

低酸素培養を行った場合と同様に、長期生存能を獲得してメモリーT細胞化されることが確認された。

[0101] [実施例5]

冷蔵保存後のヒト末梢血から回収したナイーブCD4⁺ T細胞及びナイーブCD8⁺ T細胞を、それぞれ分化誘導させた後、通常濃度の酸素環境下、分化誘導因子飢餓培地で培養することにより、メモリーTリンパ球を製造した。

[0102] (1) ナイーブCD4⁺ T細胞の回収及びCD4⁺ Th2細胞への分化誘導

血液製剤に対しては、輸血前に白血球除去フィルターによる処理が行われる。フィルター処理に使用した後、4℃で3日間保存した白血球除去フィルターからナイーブCD4⁺ T細胞を回収した後、CD4⁺ Th2細胞への分化誘導を行った。白血球除去フィルターからのナイーブCD4⁺ T細胞の回収及び分化誘導は、実施例1の(2)及び(4)と同様にして行った。

[0103] (2) ナイーブCD8⁺ T細胞の回収及びCD8⁺ キラーT細胞への分化誘導

前記(1)で用いた白血球除去フィルターとは別の、使用後に4℃で3日間保存した白血球除去フィルターからナイーブCD8⁺ T細胞を回収した後、CD8⁺ キラーT細胞への分化誘導を行った。分化誘導後の細胞から、磁気ビーズを除去した。白血球除去フィルターからのナイーブCD8⁺ T細胞の回収、その後の分化誘導、及び磁気ビーズの除去は、実施例2の(1)～(3)と同様にして行った。

[0104] (3) 分化誘導因子飢餓培地での培養

分化誘導終了後の細胞を培養液ごと15mL容プラスチックチューブに移した。当該プラスチックチューブに移した培養液のうちの10μLを、細胞数カウント用として別のチューブに分取した。この10μLの細胞懸濁液に、等量のトリパンブルー液を加えて、生細胞の数を計算した。

残りの細胞培養液が収容されているプラスチックチューブを遠心分離処理

(1, 000 rpm、5分間、室温)して上清を除去した後、沈殿した細胞ペレットに、 4×10^5 cells/mLとなるようにRPMI 1640/10% FBS/2-MEを加えて細胞を懸濁させて、細胞懸濁液を調製した。

調製された細胞懸濁液を、T25フラスコに5 mLずつ分注した。これらのT25フラスコを、37°C、5% CO₂、20% O₂の環境下で8日間培養(通常培養)した。

[0105] (4) FACS

前記(3)の培養後の細胞を、FACS解析に供した。FACS解析は、実施例1の(6)と同様にして行った。

[0106] 図6(A)は、冷蔵保存後のナイーブCD4⁺ T細胞をTh2培地で培養した後、RPMI 1640/10% FBS/2-ME(分化誘導因子飢餓培地)で8日間通常培養した細胞のFACSの結果を示したドットプロットである。図6(B)は、冷蔵保存後のナイーブCD8⁺ T細胞をCD8-TA培地で培養した後、RPMI 1640/10% FBS/2-ME(分化誘導因子飢餓培地)で8日間通常培養した細胞のFACSの結果を示したドットプロットである。図中、ゲーティングされた領域内の細胞が、生細胞である。

[0107] 冷蔵保存していないナイーブCD4⁺ T細胞を分化誘導した後、通常培養した場合には、ほぼ全ての細胞が死滅してしまう(実施例2)のに対して、冷蔵保存後のナイーブCD4⁺ T細胞の場合には、分化誘導後に通常培養した場合の細胞生存率は12.1%と高かった(図6(A))。生き残った細胞集団は、その表面抗原から、分化誘導後に低酸素培養した場合と同様に、幹細胞性メモリーT細胞、セントラルメモリーT細胞、及びエフェクターメモリーT細胞からなる細胞集団であることが確認された。

[0108] 同様に、冷蔵保存していないナイーブCD8⁺ T細胞を分化誘導した後、通常培養した場合には、ほぼ全ての細胞が死滅してしまう(実施例3)のに対して、冷蔵保存後のナイーブCD8⁺ T細胞の場合には、分化誘導後に通

常培養した場合の細胞生存率は1.7%であり、生き残った細胞があった（図6（B））。生き残った細胞集団は、その表面抗原から、分化誘導後に低酸素培養した場合と同様に、その大部分が幹細胞性メモリーT細胞とセントラルメモリーT細胞であり、エフェクターメモリーT細胞も含まれている細胞集団であった。

[0109] [実施例6]

59歳のヒトから採取された末梢血から回収したナイーブCD4⁺ T細胞及びナイーブCD8⁺ T細胞を、それぞれ分化誘導させた後、分化誘導因子飢餓培地で培養することにより、メモリーリンパ球を製造した。

[0110] (1) PBMCの採取

末梢血からのPBMCの採取は、実施例1の(1)と同様にして行った。

[0111] (2) ナイーブCD4⁺ T細胞の回収及びCD4⁺ Th2細胞への分化誘導

前記(1)で採取したPBMCからナイーブCD4⁺ T細胞を回収した後、CD4⁺ Th2細胞へ分化誘導させた。PBMCからのナイーブCD4⁺ T細胞の回収及びCD4⁺ Th2細胞への分化誘導は、実施例1の(2)及び(4)と同様にして行った。

[0112] (3) ナイーブCD8⁺ T細胞の回収及びCD8⁺ キラーT細胞への分化誘導

前記(1)で採取したPBMCからナイーブCD8⁺ T細胞を回収した後、CD8⁺ キラーT細胞への分化誘導を行った。分化誘導後の細胞から、磁気ビーズを除去した。PBMCからのナイーブCD8⁺ T細胞の回収、その後の分化誘導、及び磁気ビーズの除去は、実施例2の(1)～(3)と同様にして行った。

[0113] (4) 分化誘導因子飢餓培地での培養

分化誘導終了後の細胞を培養液ごと15mL容プラスチックチューブに移した。当該プラスチックチューブに移した培養液のうちの10 μ Lを、細胞数カウント用として別のチューブに分取した。この10 μ Lの細胞懸濁液に

、等量のトリパンブルー液を加えて、生細胞の数を計算した。

残りの細胞培養液が収容されているプラスチックチューブを遠心分離処理（1,000 rpm、5分間、室温）して上清を除去した後、沈殿した細胞ペレットに、 4×10^5 cells/mLとなるようにRPMI 1640/10% FBS/2-MEを加えて細胞を懸濁させて、細胞懸濁液を調製した。

調製された細胞懸濁液を、T25フラスコに5 mLずつ分注した。これらのT25フラスコを、37°C、5% CO₂、4%又は20% O₂の環境下で8日間培養した。

[0114] (5) FACS

前記(4)の培養後の細胞を、FACS解析に供した。FACS解析は、実施例1の(6)と同様にして行った。

[0115] 図7(A)及び(C)は、ナイーブCD4⁺ T細胞をTh2培地で培養した後、RPMI 1640/10% FBS/2-ME（分化誘導因子飢餓培地）で培養した細胞のFACSの結果を示したドットプロットである。図7(B)及び(D)は、ナイーブCD4⁺ T細胞をTh2培地で培養した後、RPMI 1640/10% FBS/2-MEで培養した細胞のFACSの結果を示したドットプロットである。上段の(A)及び(B)は、RPMI 1640/10% FBS/2-MEによる培養を低酸素培養（4% O₂）で行った細胞のドットプロットであり、下段の(C)及び(D)は、RPMI 1640/10% FBS/2-MEによる培養を通常培養（20% O₂）で行った細胞のドットプロットである。図中、ゲーティングされた領域内の細胞が、生細胞である。

[0116] 20歳のヒトから採取されたナイーブCD4⁺ T細胞を分化誘導した後、通常培養した場合には、ほぼ全ての細胞が死滅してしまう（実施例2）のに対して、59歳のヒトから採取されたナイーブCD4⁺ T細胞の場合には、分化誘導後に通常培養した場合の細胞生存率は51.4%であり、低酸素培養の場合の細胞生存率60.9%には及ばないものの、非常に高かった（図

7 (A) 及び (C))。生き残った細胞集団は、その表面抗原から、分化誘導後に低酸素培養した場合と同様に、幹細胞性メモリーT細胞、セントラルメモリーT細胞、及びエフェクターメモリーT細胞からなる細胞集団であることが確認された。

[0117] 同様に、21歳のヒトから採取されたナイーブCD8⁺ T細胞を分化誘導した後、通常培養した場合には、ほぼ全ての細胞が死滅してしまう（実施例3）のに対して、59歳のヒトから採取されたナイーブCD8⁺ T細胞の場合には、分化誘導後に通常培養した場合の細胞生存率は19.0%であり、低酸素培養の場合の細胞生存率24.9%には及ばないものの、十分に高かった（図7 (B) 及び (D))。生き残った細胞集団は、その表面抗原から、分化誘導後に低酸素培養した場合と同様に、その大部分が幹細胞性メモリーT細胞とセントラルメモリーT細胞であり、エフェクターメモリーT細胞も含まれている細胞集団であった。

[0118] [実施例7]

ヒト末梢血から回収したナイーブB細胞を分化誘導させた後、低酸素環境下、分化誘導因子飢餓培地で培養することにより、細胞休眠を誘導して、分化誘導因子による刺激無しで増殖を停止した状態で長期生存が可能な細胞を製造した。

[0119] (1) PBMCからのナイーブB細胞の回収

実施例1の(1)と同様にして調整した細胞懸濁液から、ナイーブB細胞を回収した。ナイーブB細胞の回収は、市販のナイーブB細胞単離用キット（「EasySep human naive B cell isolation kit」、#17254、STEMCELL Technologies社製）を用いて、当該キット付属のマニュアルの通りに行った。

精製したナイーブB細胞の懸濁液のうちの10 μ Lを、細胞数カウント用として別のチューブに分取した。この10 μ Lの細胞懸濁液に、等量のトリパンプルー液を加えて、生細胞の数を計算した。

[0120] (2) ナイーブB細胞の分化誘導

まず、前記(1)で調製した精製したナイーブB細胞の懸濁液を15 mL

容プラスチックチューブに移した後、遠心分離処理（1,000 rpm、5分間、室温）して上清を除去した。当該プラスチックチューブ内に沈殿した細胞ペレットに、 2×10^5 cells/mLとなるようにステップ1培地を加えて細胞を懸濁させた。

得られた細胞懸濁液を、ヤギ抗ヒトIgミックス二次抗体（#H17000、Invitrogen社製）でコーティングした24ウェルプレートに、1ウェル当たり1 mLずつ分注した。当該プレートを、37°C、5% CO₂、20% O₂の環境下で5日間培養した。

[0121] 培養終了後、各ウェル中の培養液を、15 mL容プラスチックチューブに回収した後、遠心分離処理（1,000 rpm、5分間、室温）して上清を除去した。当該プラスチックチューブ内に沈殿した細胞ペレットに、5 mLのIMDM/10% FBS/2-MEを加えて細胞を懸濁させた後、再び遠心分離処理（1,000 rpm、5分間、室温）して上清を除去した。当該プラスチックチューブ内に沈殿した細胞ペレットに、 4×10^5 cells/mLとなるようにステップ2培地を加えて細胞を懸濁させた。

得られた細胞懸濁液を、コーティングしていない24ウェルプレートに、1ウェル当たり1 mLずつ分注した。当該プレートを、37°C、5% CO₂、1% O₂の環境下で4日間培養（低酸素培養）した。

[0122] (3) 分化誘導因子飢餓培地での培養

前記(2)の低酸素培養終了後、各ウェル中の細胞を培養液ごと15 mL容プラスチックチューブに移した。当該プラスチックチューブに移した培養液のうちの10 μLを、細胞数カウント用として別のチューブに分取した。この10 μLの細胞懸濁液に、等量のトリパンブルー液を加えて、生細胞の数を計算した。

残りの細胞培養液が収容されているプラスチックチューブを遠心分離処理（1,000 rpm、5分間、室温）して上清を除去した後、沈殿した1ウェル分の細胞ペレットに、IMDM/10% FBS/2-MEを1 mL加えて細胞を懸濁させて、細胞懸濁液を調製した。

[0123] 調製された細胞懸濁液を、コーティングしていない24ウェルプレートに、1ウェル当たり1 mLずつ分注した。当該プレートを、37°C、5% CO₂、1% O₂の環境下で6日間培養した。コントロールの細胞は、37°C、5% CO₂、20% O₂の環境下で6日間培養（通常培養）した。

[0124] (4) FACS

前記(3)の培養後の細胞に対して、T細胞用抗体カクテルに代えてB細胞用抗体カクテル（5 μLの抗CD20抗体、5 μLの抗CD27抗体、5 μLの抗CD38抗体、及び7 μLの7-AAD）を用いた以外は実施例1の(6)と同様にして、FACS解析を行った。

[0125] ナイーブB細胞、エフェクターB細胞（プラズマ細胞）、メモリーB細胞、胚中心B細胞、移行B細胞は、それぞれ表2に示す細胞表面抗原を有する。

[0126] [表2]

細胞	表面抗原
ナイーブB細胞	CD20+ / CD27- / CD38-
プラズマ細胞	CD20- / CD27+ / CD38+
メモリーB細胞	CD20+ / CD27+ / CD38-
胚中心B細胞	CD20+ / CD27+ / CD38+
移行B細胞	CD20+ / CD27- / CD38+

[0127] ナイーブB細胞を分化誘導して得られた活性化B細胞（前記(2)の低酸素培養終了後の細胞）の細胞集団と、当該活性化B細胞を分化誘導因子飢餓培地で6日間低酸素培養した細胞集団（無刺激6日目の細胞）のドットプロットを図8に示す。図8(A)及び(B)は、縦軸をSSC、横軸をFSCとしてプロットした図であり、図8(C)は、縦軸を抗CD27抗体から発される蛍光強度、横軸を抗CD20抗体から発される蛍光強度としてプロットした図であり、図8(D)は、縦軸を抗CD38抗体から発される蛍光強度、横軸を抗CD27抗体から発される蛍光強度としてプロットした図である。また、図8(A)及び(B)のプロット図中、ゲーティングされた領域内の細胞が、生細胞である。

[0128] この結果、分化誘導因子飢餓培地での低酸素培養後の細胞生存率は0.3

%であり、その大部分（92.4%）は、表面抗原の結果からプラズマ細胞であることが確認された。本来、プラズマ細胞は2～3日間しか生きられないのに対して、本実験では、分化誘導因子飢餓培地で6日間も増殖可能な長期生存型プラズマ細胞が得られた。

[0129] [実施例8]

ナイーブB細胞の分化誘導を、グラム陰性細菌の外膜成分であるLPSとIL-4で行い、ナイーブB細胞からの分化誘導因子非依存的な未分化増殖停止長期生存能を獲得したB細胞を製造した。

[0130] (1) PBMCからのナイーブB細胞の回収

21歳のヒトから採取された血液から、実施例7と同様にして、精製したナイーブB細胞の懸濁液を調製し、生細胞の数を計算した。

[0131] (2) ナイーブB細胞の分化誘導

まず、前記(1)で調製した精製したナイーブB細胞の懸濁液を、15 mL容プラスチックチューブに移した後、遠心分離処理（1,000 rpm、5分間、室温）して上清を除去した。当該プラスチックチューブ内に沈殿した細胞ペレットに、 1×10^5 cells/mLとなるようにLPS/IL-4培地を加えて細胞を懸濁させた。

得られた細胞懸濁液を、コーティングしていない24ウェルプレートに、1ウェル当たり1 mLずつ分注した。当該プレートを、37°C、5% CO₂、1% O₂の環境下で7日間培養（低酸素培養）した。

[0132] (3) 分化誘導因子飢餓培地での培養

培養終了後、当該プレートを遠心分離処理（1,000 rpm、5分間、室温）して、各ウェルから上清を除去した。次いで、各ウェルに1 mLのRPMI 1640/10% FBS/2-MEを加えて細胞を懸濁させた後、当該プレートを、37°C、5% CO₂、1% O₂の環境下で7日間培養（低酸素培養）した。

[0133] (4) FACS

前記(3)の培養後の細胞に対して、実施例7の(4)と同様にして、F

ACS解析を行った。

[0134] ナイーブB細胞を分化誘導して得られた活性化B細胞（前記（2）の低酸素培養終了後の細胞）の細胞集団と、当該活性化B細胞を分化誘導因子飢餓培地で7日間低酸素培養した細胞集団（無刺激7日目の細胞）のドットプロットを図9に示す。図9（A）及び（B）は、縦軸をSSC、横軸をFSCとしてプロットした図であり、図9（C）は、縦軸を抗CD27抗体から発せられる蛍光強度、横軸を抗CD20抗体から発せられる蛍光強度としてプロットした図であり、図9（D）は、縦軸を抗CD38抗体から発せられる蛍光強度、横軸を抗CD27抗体から発せられる蛍光強度としてプロットした図である。また、図9（A）及び（B）のプロット図中、ゲーティングされた領域内の細胞が、生細胞である。

[0135] この結果、分化誘導因子飢餓培地での低酸素培養後の細胞生存率は、12.4%であり、その大部分は、表面抗原の結果から、長期生存型移行B細胞であることが確認された。

[0136] なお、前記（2）のB細胞の活性化培養を、LPS/IL-4培地中で20% O₂条件下で行った場合には、培養4日目までは75%の細胞が生存していたが、7日目ではほぼ全ての細胞が死滅した（生存率0.6%）。

[0137] [実施例9]

ナイーブB細胞の分化誘導を、IL-2、IL-6、及びODN2006で行い、ナイーブB細胞からの分化誘導因子非依存的な未分化増殖停止長期生存能を獲得したB細胞を製造した。

[0138] （1）PBMCからのナイーブB細胞の回収

59歳のヒトから採取された血液から、実施例7と同様にして、精製したナイーブB細胞の懸濁液を調製し、生細胞の数を計算した。

[0139] （2）ナイーブB細胞の分化誘導

まず、前記（1）で調製した精製したナイーブB細胞の懸濁液を、15 mL容プラスチックチューブに移した後、遠心分離処理（1,000 rpm、5分間、室温）して上清を除去した。当該プラスチックチューブ内に沈殿し

た細胞ペレットに、 1×10^5 cells/mLとなるようにODN2006培地を加えて細胞を懸濁させた。

得られた細胞懸濁液を、ヤギ抗ヒトIgDポリクローナル抗体（NBP2-50086、Novus biologicals社製）でコーティングした24ウェルプレートに、1ウェル当たり1mLずつ分注した。当該プレートを、37℃、5% CO₂、1% O₂の環境下で6日間培養（低酸素培養）した。

[0140] (3) 分化誘導因子飢餓培地での培養

培養終了後、当該プレートを遠心分離処理（1,000rpm、5分間、室温）して、各ウェルから上清を除去した。次いで、各ウェルに1mLのRPMI 1640/10% FBS/2-MEを加えて細胞を懸濁させた後、当該プレートを、37℃、5% CO₂、1% O₂の環境下で8日間培養（低酸素培養）した。

[0141] (4) FACS

前記(3)の培養後の細胞に対して、実施例7の(4)と同様にして、FACS解析を行った。

[0142] ナイーブB細胞を分化誘導して得られた活性化B細胞（前記(2)の低酸素培養終了後の細胞）の細胞集団と、当該活性化B細胞を分化誘導因子飢餓培地で8日間低酸素培養した細胞集団（無刺激8日目の細胞）のドットプロットを図10に示す。図10(A)及び(B)は、縦軸をSSC、横軸をFSCとしてプロットした図であり、図10(C)は、縦軸を抗CD27抗体から発される蛍光強度、横軸を抗CD20抗体から発される蛍光強度としてプロットした図であり、図10(D)は、縦軸を抗CD38抗体から発される蛍光強度、横軸を抗CD27抗体から発される蛍光強度としてプロットした図である。また、図10(A)及び(B)のプロット図中、ゲーティングされた領域内の細胞が、生細胞である。

[0143] この結果、分化誘導因子飢餓培地での低酸素培養後の細胞生存率は、0.2%であり、このうちの55.1%が長期生存型胚中心B細胞であり、34.4%が長期生存型移行B細胞であることが確認された。分化誘導因子飢餓

培地での低酸素培養後の細胞生存率は、実施例 7 と同程度であったことから、T 細胞では、50 歳以上のヒトから採取されたナイーブ細胞は、20 歳代のヒトから採取されたナイーブ細胞よりもメモリー化しやすかったが、B 細胞では加齢によるメモリー化促進効果は見られなかった。

請求の範囲

- [請求項1] ナイーブT細胞を、分化誘導因子で活性化させる活性化工程と、前記活性化工程の後、活性化されたT細胞を、分化誘導因子不存在下で培養することにより、メモリーT細胞を製造するメモリー化工程と、
を有し、
前記メモリー化工程において、前記活性化されたT細胞を、低酸素環境下で培養する、メモリーT細胞の製造方法。
- [請求項2] 前記低酸素環境の酸素濃度が、0.5～5.0体積%である、請求項1に記載のメモリーT細胞の製造方法。
- [請求項3] ナイーブT細胞を、分化誘導因子で活性化させる活性化工程と、前記活性化工程の後、活性化されたT細胞を、分化誘導因子不存在下で培養することにより、メモリーT細胞を製造するメモリー化工程と、
を有し、
前記ナイーブT細胞が、ストレス処理がなされた細胞である、又は、前記メモリー化工程の前に、前記活性化されたT細胞にストレス処理を行う、メモリーT細胞の製造方法。
- [請求項4] 前記ナイーブT細胞が、0～10℃で1時間以上保持した後の細胞である、請求項3に記載のメモリーT細胞の製造方法。
- [請求項5] 前記ナイーブT細胞が、50歳以上のヒトから採取された細胞である、請求項3に記載のメモリーT細胞の製造方法。
- [請求項6] 前記活性化されたT細胞を、凍結融解させた後に、前記メモリー化工程を行う、請求項3に記載のメモリーT細胞の製造方法。
- [請求項7] 前記ナイーブT細胞が、ナイーブCD4⁺T細胞又はナイーブCD8⁺T細胞である、請求項1～6のいずれか一項に記載のメモリーT細胞の製造方法。
- [請求項8] 前記分化誘導因子が、

ナイーブCD4⁺ T細胞をCD4⁺ Th1細胞へ分化させる、
ナイーブCD4⁺ T細胞をCD4⁺ Th2細胞へ分化させる、又
は
ナイーブCD8⁺ T細胞をキラーT細胞へ分化させるための分化誘
導因子である、請求項7に記載のメモリーT細胞の製造方法。

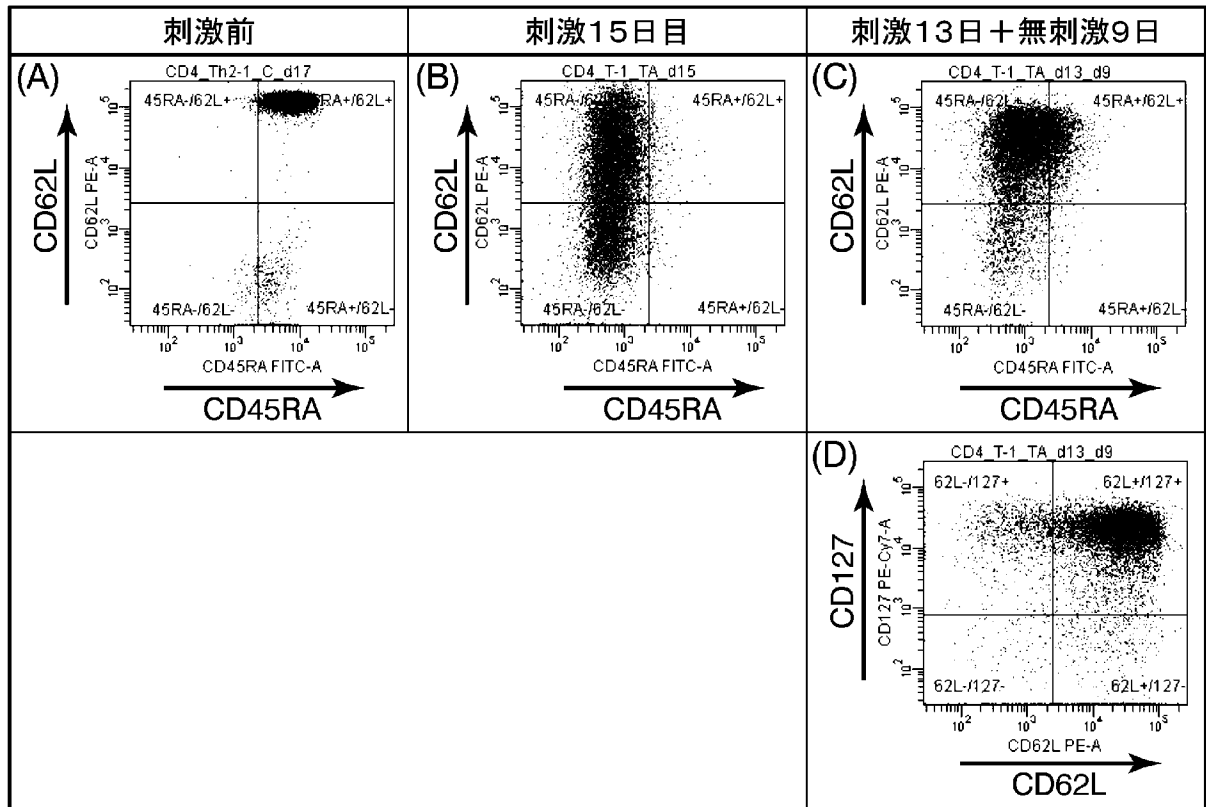
[請求項9] 幹細胞性メモリーT細胞、セントラルメモリーT細胞、及びエフェ
クターメモリーT細胞の合計生細胞数が、組成物中に含有されている
全生細胞数の20%以上である、メモリーT細胞含有組成物。

[請求項10] 請求項9に記載のメモリーT細胞含有組成物を有効成分とする、医
薬用組成物。

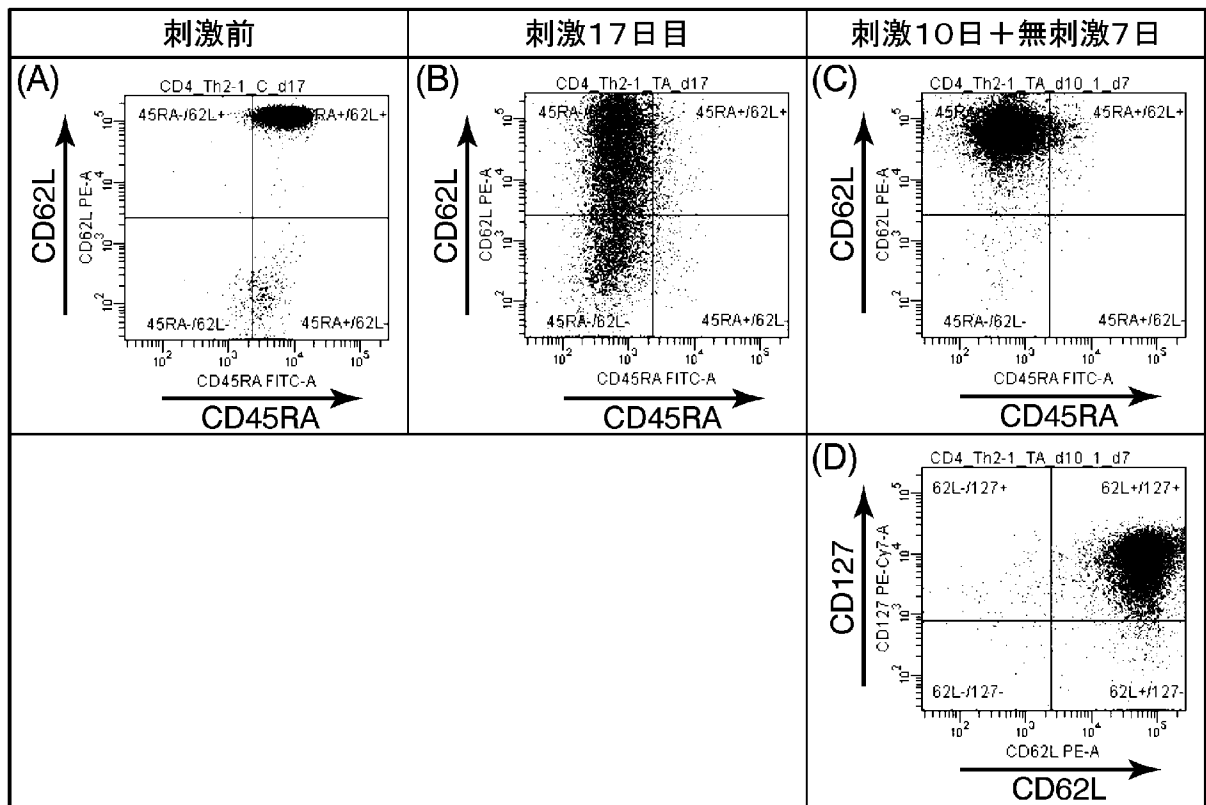
[請求項11] ナイーブB細胞を、分化誘導因子で活性化させる活性化工程と、
前記活性化工程の後、活性化されたB細胞を、分化誘導因子不存在
下で培養することにより、分化誘導因子非依存的に生存可能な細胞を
製造する長期生存能獲得工程と、
を有し、
前記長期生存能獲得工程において、前記活性化されたB細胞を、低
酸素環境下で培養する、分化誘導因子非依存的に長期生存可能な細胞
の製造方法。

[請求項12] 前記分化誘導因子非依存的に長期生存可能な細胞が、プラズマ細胞
、胚中心B細胞、及び移行B細胞からなる群より選択される1種以上
である、請求項11に記載の分化誘導因子非依存的に長期生存可能な
細胞の製造方法。

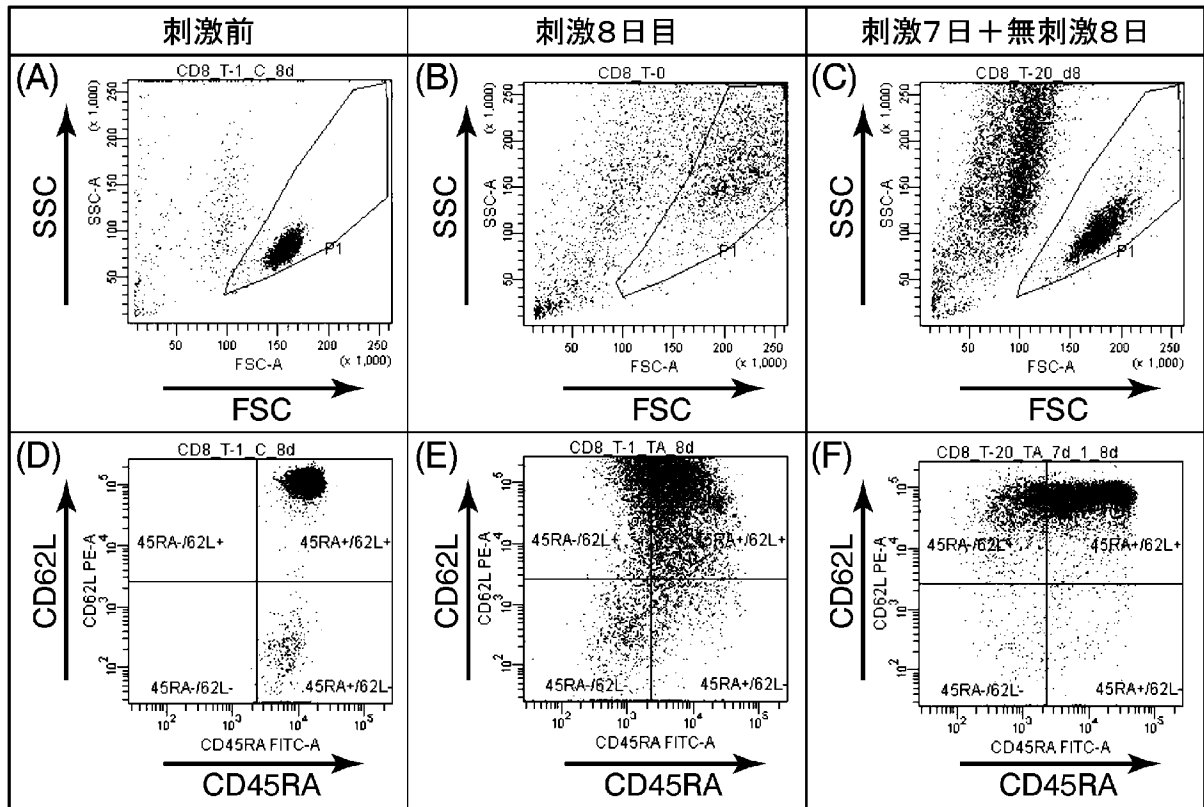
[図1]



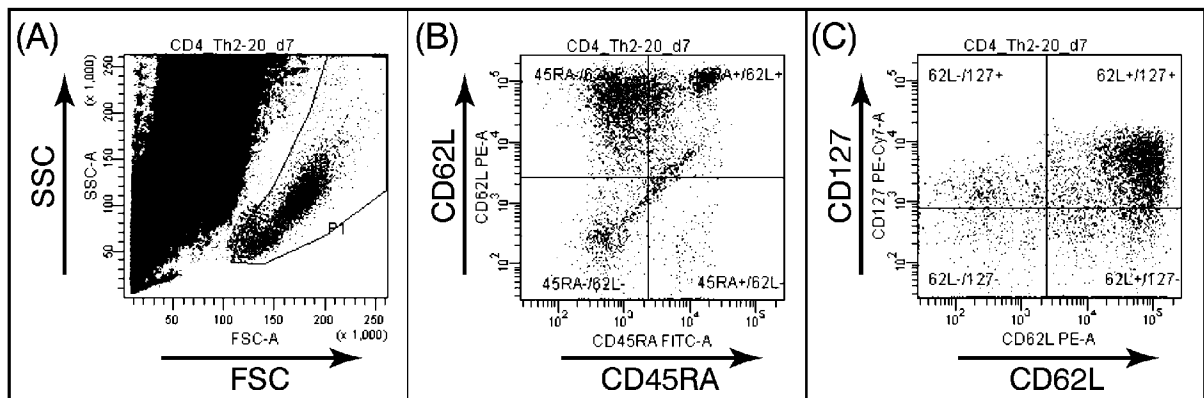
[図2]



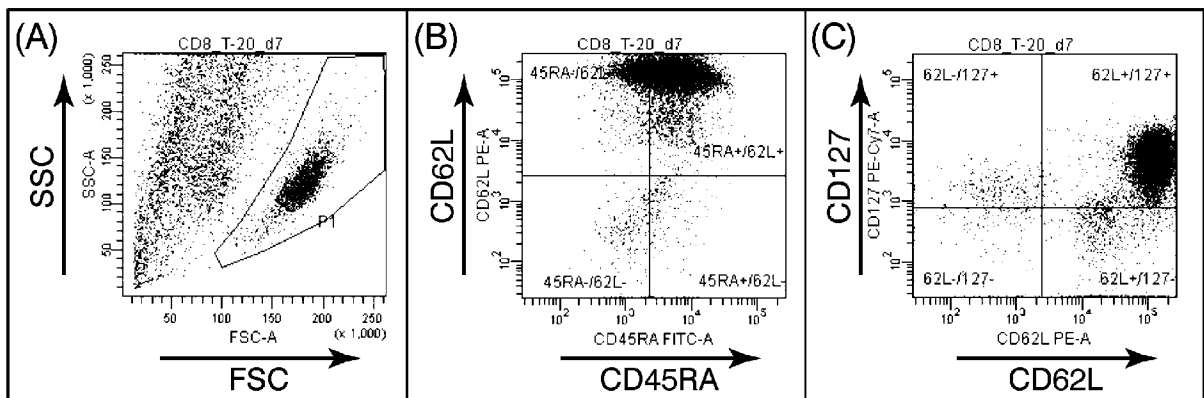
[図3]



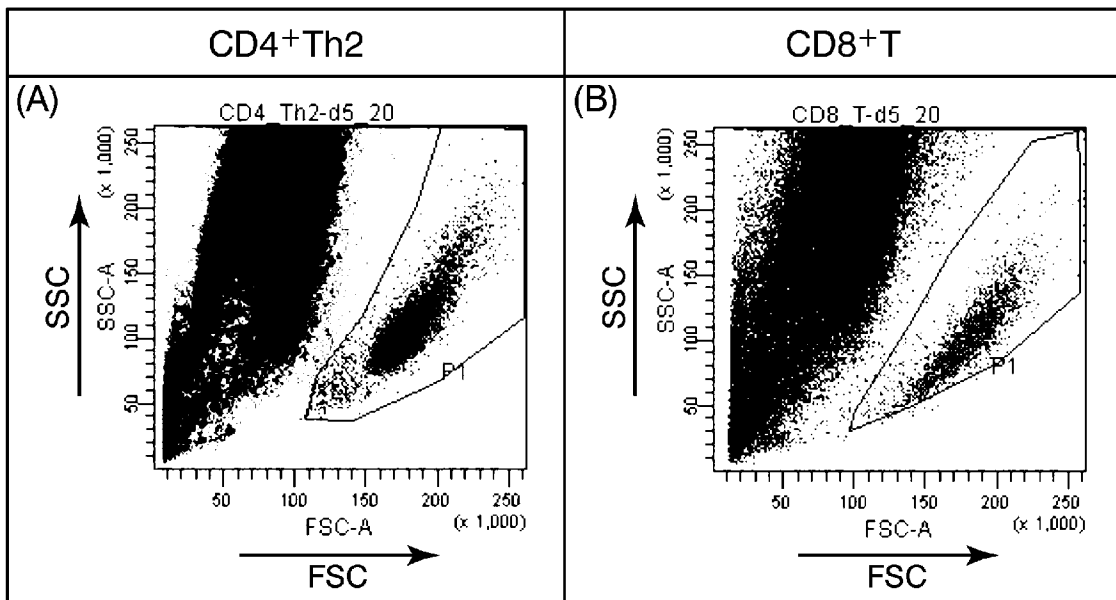
[図4]



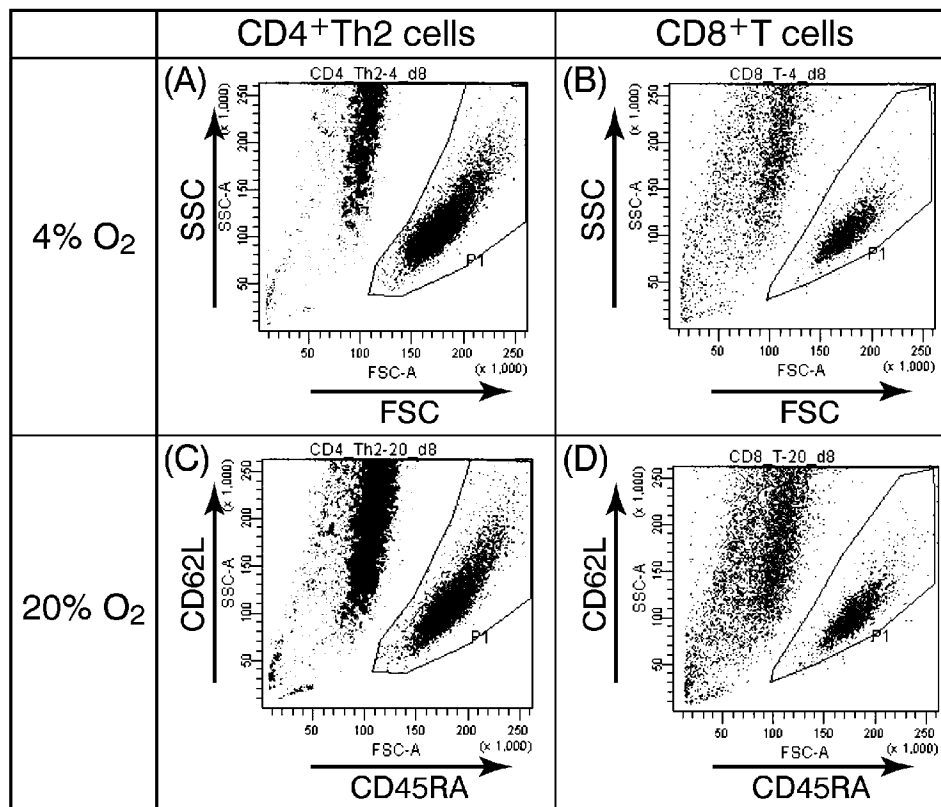
[図5]



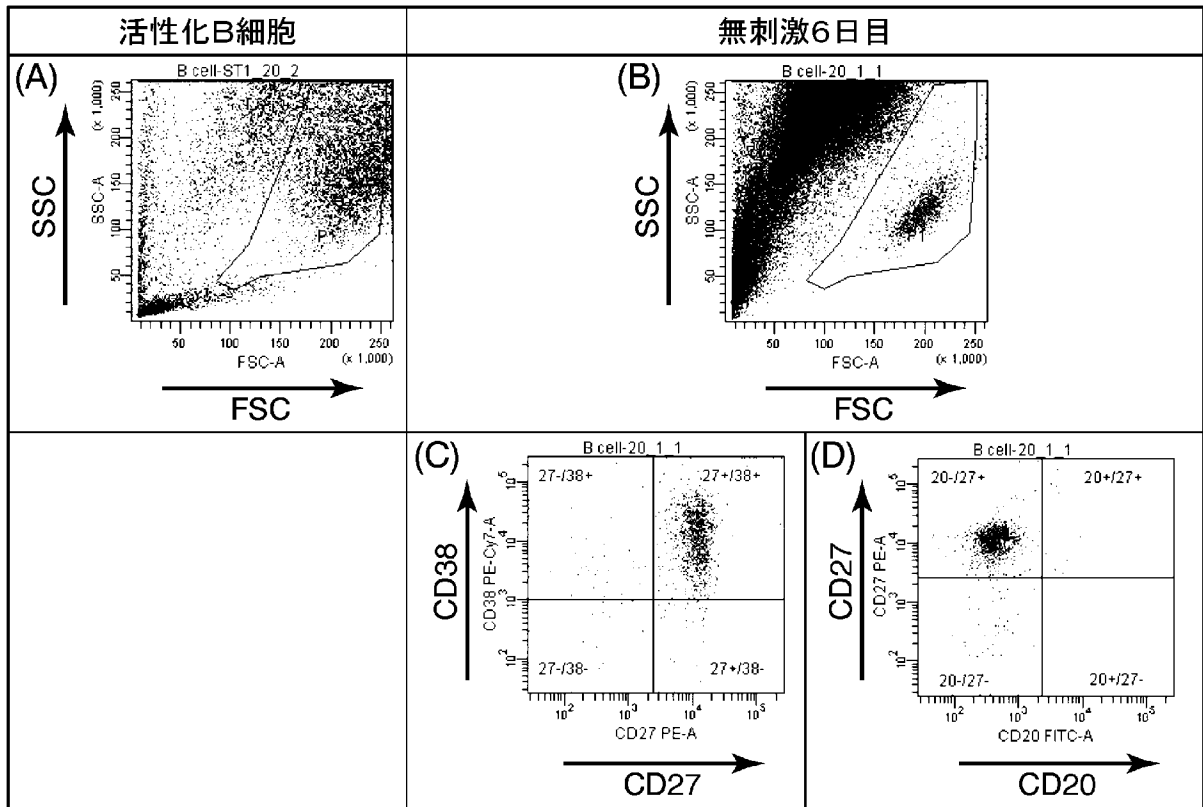
[図6]



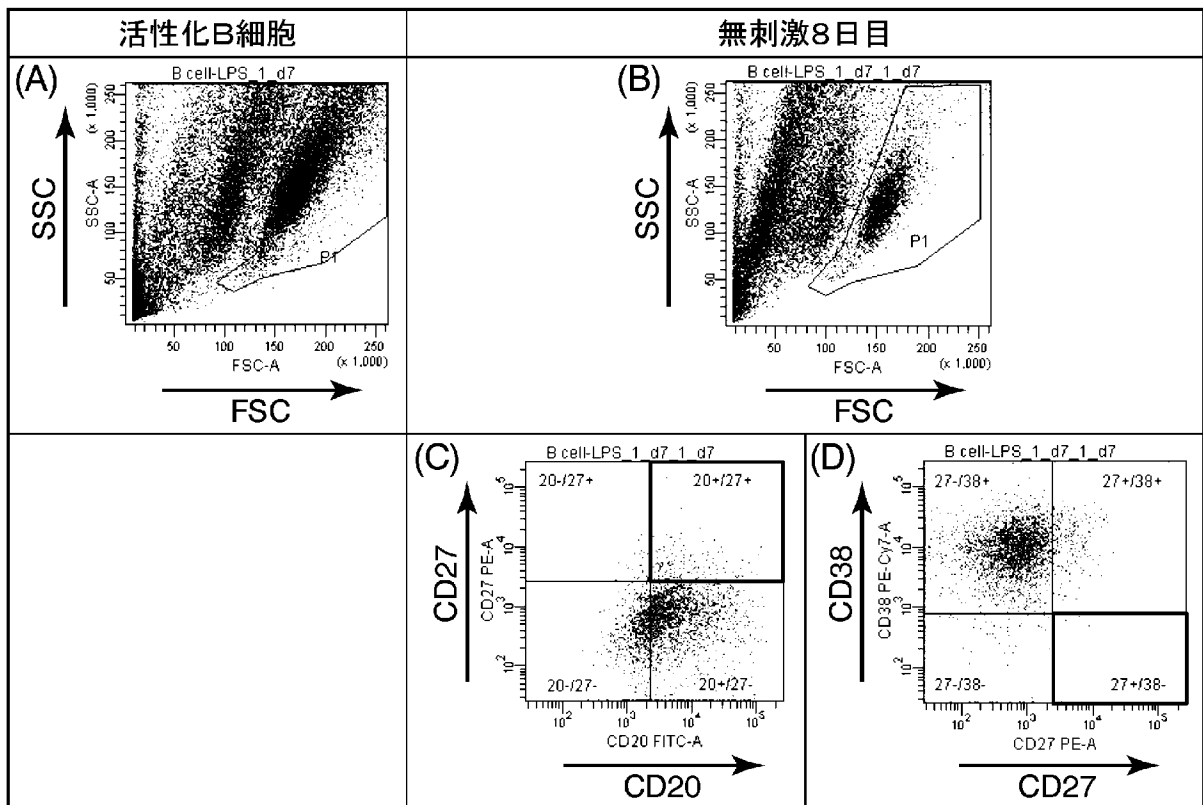
[図7]



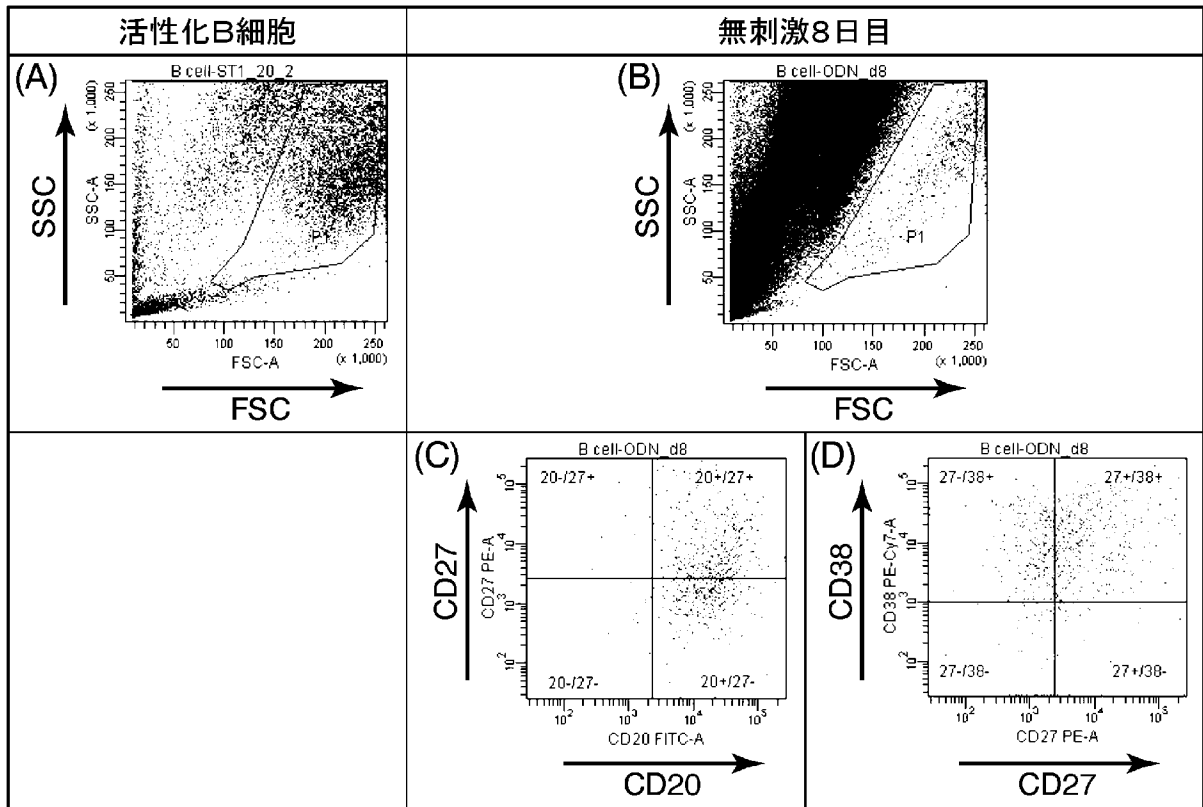
[図8]



[図9]



[図10]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2022/019563

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
<i>C12N 5/0783</i> (2010.01)i; <i>A61K 35/17</i> (2015.01)i; <i>A61P 31/00</i> (2006.01)i; <i>A61P 35/00</i> (2006.01)i; <i>A61P 37/02</i> (2006.01)i; <i>C12N 5/0781</i> (2010.01)i FI: C12N5/0783; C12N5/0781; A61K35/17 Z; A61P37/02; A61P31/00; A61P35/00		
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) C12N5/0783; A61K35/17; A61P31/00; A61P35/00; A61P37/02; C12N5/0781		
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 1971-2022 Registered utility model specifications of Japan 1996-2022 Published registered utility model applications of Japan 1994-2022		
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 (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	JP 2020-534313 A (NEXLMMUNE, INC.) 26 November 2020 (2020-11-26) claims, examples	9, 10 1-8, 11, 12
X A	US 2020/0188435 A1 (NEXLMMUNE, INC.) 18 June 2020 (2020-06-18) claims, examples, fig. 4A, 4B	9, 10 1-8, 11, 12
X A	WO 2020/081987 A1 (BOARD OF REGENTS THE UNIVERSITY OF TEXAS SYSTEM) 23 April 2020 (2020-04-23) claims, examples [0009], [0010], fig. 4	1-8 9-12
A	NGUYEN, DC. et al. Factors of the bone marrow microniche that support human plasma cell survival and immunoglobulin secretion. Nat Commun. 2018, 9:3698, pp. 1-12, doi:10.1038/s41467-018-05853-7 whole document	1-12
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" 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 15 June 2022		Date of mailing of the international search report 12 July 2022
Name and mailing address of the ISA/JP Japan Patent Office (ISA/JP) 3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915 Japan		Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2022/019563

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2016/0250248 A1 (NORTHEASTERN UNIVERSITY) 01 September 2016 (2016-09-01) whole document, especially claim 19, example 9	1-12
A	池尻藍 他, 生体の酸素濃度を反映した低酸素濃度下でのTh17細胞分化について, 日本獣医学会学術集会講演要旨集, 31 August 2011, vol. 152, p. 225 entire text, (IKEJIRI, Ai et al.), non-official translation (About Th17 cell differentiation under low oxygen concentration that reflects the oxygen concentration of living body. Lecture abstracts of the Meeting of the Japanese Society of Veterinary Science.)	1-12
P, X	TOKUMOTO, Y. et al. Induction of memory-like CD8+Tcells and CD4+Tcells from human naive T cells in culture. Clin Exp Immunol. 18 November 2021, vol. 207, pp. 95-103, https://doi.org/10.1093/cei/uxab012 whole document	1-10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/JP2022/019563

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
JP	2020-534313	A	26 November 2020	US 2019/0119639 A1 claims, examples	
				WO 2019/060558 A1	
				EP 3684402 A1	
				KR 10-2020-0104283 A	
				CN 111629748 A	
<hr/>					
US	2020/0188435	A1	18 June 2020	WO 2020/097466 A1	
				EP 3876979 A1	
				KR 10-2021-0095157 A	
<hr/>					
WO	2020/081987	A1	23 April 2020	US 2021/0355443 A1	
				JP 2022-505194 A claims, examples, paragraphs [0009], [0010]	
				EP 3866814 A1	
				KR 10-2021-0078518 A	
<hr/>					
US	2016/0250248	A1	01 September 2016	WO 2014/153363 A1	
<hr/>					

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC）） C12N 5/0783(2010.01)i; A61K 35/17(2015.01)i; A61P 31/00(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i; A61P 37/02(2006.01)i; C12N 5/0781(2010.01)i FI: C12N5/0783; C12N5/0781; A61K35/17 Z; A61P37/02; A61P31/00; A61P35/00		
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）） C12N5/0783; A61K35/17; A61P31/00; A61P35/00; A61P37/02; C12N5/0781 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 1922-1996年 日本国公開実用新案公報 1971-2022年 日本国実用新案登録公報 1996-2022年 日本国登録実用新案公報 1994-2022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 (JDreamIII); CPlus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (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 A	JP 2020-534313 A (ネクシミュン インコーポレイテッド) 26.11.2020 (2020-11-26) 特許請求の範囲、実施例	9,10 1-8,11,12
X A	US 2020/0188435 A1 (NEXLMMUNE, INC.) 18.06.2020 (2020-06-18) CLAIMS, EXAMPLES, Fig.4A, Fig.4B	9,10 1-8,11,12
X A	WO 2020/081987 A1 (BOARD OF REGENTS THE UNIVERSITY OF TEXAS SYSTEM) 23.04.2020 (2020-04-23) CLAIMS, EXAMPLES, [0009], [0010], Fig.4	1-8 9-12
A	NGUYEN DC. et al., Factors of the bone marrow microniche that support human plasma cell survival and immunoglobulin secretion, Nat Commun., 2018, 9:3698, pp.1-12, doi:10.1038/s41467-018-05853-7 whole document	1-12
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input checked="" type="checkbox"/> 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	15.06.2022	国際調査報告の発送日 12.07.2022
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） 山本 匡子 4N 3038 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	US 2016/0250248 A1 (NORTHEASTERN UNIVERSITY) 01.09.2016 (2016 - 09 - 01) whole document, especially claim9, Example 9	1-12
A	池尻藍 他, 生体の酸素濃度を反映した低酸素濃度下でのTh17細胞分化について, 日本獣医学会学術集会講演要旨集, 2011.08.31, 第152巻, 第225頁 全文	1-12
P, X	TOKUMOTO Y. et al., Induction of memory-like CD8+Tcells and CD4+Tcells from human naive T cells in culture, Clin Exp Immunol., 2021.11.18, Vol.207, pp.95-103, https://doi.org/10.1093/cei/uxab012 whole document	1-10

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/JP2022/019563

引用文献			公表日	パテントファミリー文献			公表日
JP	2020-534313	A	26.11.2020	US	2019/0119639	A1	
					CLAIMS, EXAMPLES		
				WO	2019/060558	A1	
				EP	3684402	A1	
				KR	10-2020-0104283	A	
				CN	111629748	A	
US	2020/0188435	A1	18.06.2020	WO	2020/097466	A1	
				EP	3876979	A1	
				KR	10-2021-0095157	A	
WO	2020/081987	A1	23.04.2020	US	2021/0355443	A1	
				JP	2022-505194	A	
					特許請求の範囲、実施例、 [0009]、[0010]		
				EP	3866814	A1	
				KR	10-2021-0078518	A	
US	2016/0250248	A1	01.09.2016	WO	2014/153363	A1	