(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
2018年9月20日(20.09.2018)

WIPO | PCT

(10) 国際公開番号
WO 2018/168829 A1

(51) 国際特許分類:
C12N 5/10 (2006.01)
A61K 35/15 (2015.01)
A61K 35/17 (2015.01)
A61K 35/76 (2015.01)
A61K 39/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 35/02 (2006.01)
A61P 37/04 (2006.01)
A61P 43/00 (2006.01)
C12N 5/0783 (2010.01)
C12N 5/0784 (2010.01)
A61K 35/545 (2015.01)
C12N 15/00 (2006.01)

(21) 国際出願番号： PCT/JP2018/009661

(22) 国際出願日： 2018年3月13日(13.03.2018)

(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 2017-049244 2017年3月14日(14.03.2017) JP

(71) 出願人: 国立大学法人京都大学 (KYOTO UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒6068501 京都府京都市左京区吉田本町３６番地１ Kyoto (JP).

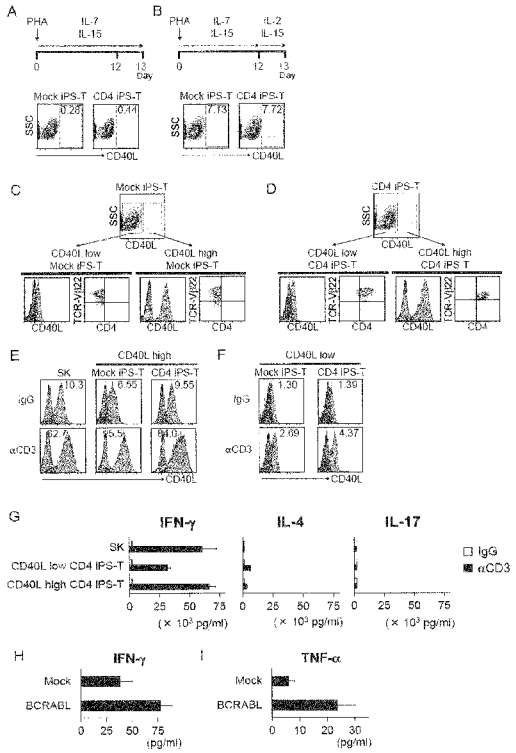
(72) 発明者: 金子 新 (KANEKO, Shin); 〒6068501 京都府京都市左京区吉田本町３６番地１ 国立大学法人京都大学内 Kyoto (JP). 上田 格弘 (UEDA, Norihiro); 〒6068501 京都府京都市左京区吉田本町３６番地１ 国立大学法人京都大学内 Kyoto (JP). 植村 靖史 (UEMURA, Yasushi); 〒2770871 千葉県柏市若柴２２７番地６ Ｄ－０２８ Chiba (JP). 張 ▲エイ▼ (ZHANG, Rong); 〒2778577 千葉県柏市柏の葉六丁目５番地１号 Ｃ－１０３ Chiba (JP).

(74) 代理人: 佐貫 伸一, 外 (SANUKI, Shinichi et al.); 〒1030004 東京都中央区東日本橋三丁目４番１０号 アクロポリス２１ビル８階 Tokyo (JP).

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY,

(54) **Title:** METHOD FOR PRODUCING HELPER T CELLS FROM PLURIPOTENT STEM CELLS

(54) 発明の名称： 多能性幹細胞からヘルパーＴ細胞を製造する方法



(57) **Abstract:** A production method for helper T cells, the method including: (i) a step in which T cells that have been induced from pluripotent stem cells and have had the CD4 gene or the product of said gene introduced thereinto are cultured in a culture liquid that includes IL-2 and IL-15; and (ii) a step in which T cells that have high CD40L expression are selected from the cells obtained in (i).

(57) 要約：ヘルパーT細胞の製造方法であって、下記の工程を含む方法； (i) 多能性幹細胞から誘導され、かつ、CD4遺伝子またはその遺伝子産物が導入されたT細胞をIL-2およびIL-15を含む培養液中で培養する工程、および (ii) (i) で得られた細胞からCD40L高発現T細胞を選別する工程。

WO 2018/168829 A1

[続葉有]

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, 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, 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).

規則4.17に規定する申立て:

— 不利にならない開示又は新規性喪失の例外に関する申立て (規則4.17(v))

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))

明　細　書

発明の名称 ： 多能性幹細胞からヘルパーＴ細胞を製造する方法

技術分野

[0001] 本発明は多能性幹細胞からヘルパーＴ細胞を製造する方法、および多能性幹細胞から製造されたヘルパーＴ細胞を含む医薬に関する。

背景技術

[0002] 腫瘍に対する免疫監視機能は、主に直接的に腫瘍を傷害するCD8陽性T細胞からなる細胞傷害性T細胞(CTL)と、主にCD4陽性T細胞からなるCTLの機能を増強するヘルパーT細胞(Th細胞)によって成り立っている。一方で、樹状細胞(DC)は他の免疫細胞の動態を調整する司令塔的な役割を持つ。Th細胞はDCの活性化を介してCTLを活性化して抗腫瘍効果を発揮することができると考えられている。

[0003] 人工多能性幹（iPS）細胞などの多能性幹細胞から腫瘍抗原特異的Th細胞の誘導が可能となれば、これを生体内に投与して強い抗腫瘍免疫応答を惹起するような新規細胞免疫療法の開発につながると考えられ、これまでに抗原特異的なCD8陽性CTLからiPS細胞（iPSC）を作り、再びCD8陽性CTLに分化誘導する方法が報告されている（非特許文献１および特許文献１）。この方法ではCD8陽性CTLのT細胞受容体（TCR）が一貫して受け継がれるため、iPS細胞から誘導されたCD8陽性CTLも由来となった細胞と同じ抗原特異性を示す。

[0004] T細胞共受容体(CD8陽性CTLにおいてはCD8分子、CD4陽性Th細胞においてはCD4分子)は、TCRが抗原を認識した際に細胞内に入力するシグナルを効果的に増強し、その結果、T細胞の抗原特異的な免疫反応が効果的に誘導される。しかし、非特許文献１に記載の方法ではCD8分子を発現した細胞の誘導は可能であるが、CD4分子を発現した細胞の作製は難しい。従って、CD4陽性Th細胞由来のiPS細胞から誘導した細胞ではCD4分子を欠くため十分なヘルパー機能を発揮できない。

先行技術文献

特許文献

[0005] 特許文献1：WO 2011/096482

非特許文献

[0006] 非特許文献1：Nishimura T, et al., Cell Stem Cell. 12(1):114-126, 2013.

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0007] 本発明の目的は、多能性幹細胞からCD4陽性Th細胞を効率よく製造することにある。さらなる本発明の目的は、当該方法で得られたCD4陽性Th細胞を用いて抗癌剤などの医薬を提供することにある。

課題を解決するための手段

[0008] 本発明者らは、上記目的を達成すべく、多能性幹細胞から誘導されたＴ細胞にCD4遺伝子を導入し、得られたCD4陽性T細胞をIL-2およびIL-15を含む培養液で培養するとCD40L発現が上昇する細胞集団を見出した。さらに、CD40L陽性の細胞集団を選別・分離したところ、効率よく樹状細胞を活性化するTh細胞が得られることを見出し、本発明を完成するに至った。

[0009] すなわち、本発明は、以下の発明を提供するものである。

［１］ヘルパーT細胞の製造方法であって、下記の工程を含む方法；

（i）多能性幹細胞から誘導され、かつ、CD4遺伝子またはその遺伝子産物が導入されたT細胞をIL-2およびIL-15を含む培養液中で培養する工程、および

（ii）（i）で得られた細胞からCD40L高発現T細胞を選別する工程。

［２］IL-2の濃度が10～500 IU/mLであり、IL-15の濃度が1～50 ng/mLである、［１］に記載の方法。

［３］前記多能性幹細胞からのT細胞の誘導は、次の（１）及び（２）の工程を含む方法により行われた、［１］または［２］に記載の方法；

（１）多能性幹細胞からCD34陽性造血前駆細胞を誘導する工程、

（２）前記工程（１）で得られたCD34陽性造血前駆細胞をＦＬＴ３Ｌ（Flt3

Ligand）およびＩＬ－７の存在下で培養する工程。

［４］前記工程（１）が多能性幹細胞をC3H10T1/2と共培養した後、ＶＥＧＦ、ＦＬＴ３ＬおよびＳＣＦの存在下でC3H10T1/2と共培養する工程である、［３］に記載の方法。

［５］前記工程（２）が、前記CD34陽性造血前駆細胞をストローマ細胞と共培養する工程である、［３］または［４］に記載の方法。

［６］前記多能性幹細胞からのT細胞の誘導は、下記（３）の工程をさらに含む方法により行われた、［３］～［５］のいずれかに記載の方法；

（３）前記工程（２）で得られた細胞をＩＬ－７およびＩＬ－１５の存在下で末梢血単核球と共培養する工程。

［７］前記多能性幹細胞からのT細胞の誘導は、前記工程（２）で得られた細胞をマイトジェンと接触させる工程および/または前記工程（３）で得られた細胞をマイトジェンと接触させる工程をさらに含む方法により行われた、［３］～［６］のいずれかに記載の方法。

［８］前記CD4遺伝子の導入はレトロウイルスベクターを用いて行われた、［１］～［７］のいずれかに記載の方法。

［９］前記多能性幹細胞は再構成された所望のＴＣＲ配列を有する多能性幹細胞である、［１］から［８］のいずれかに記載の方法。

［１０］前記多能性幹細胞は所望の抗原を認識するリンパ球から誘導されたヒトiPS細胞である、［９］に記載の方法。

［１１］前記所望の抗原を認識するリンパ球がBCR/ABLを認識するリンパ球である、［１０］に記載の方法。

［１２］in vitroで、［１］から［１１］のいずれかに記載の方法で製造されたCD4陽性かつCD40L高発現T細胞を含むヘルパーT細胞と単離された樹状細胞とを抗原の存在下で接触させる工程を含む、樹状細胞を活性化する方法。

［１３］多能性幹細胞から誘導されたヘルパーT細胞であって、CD4陽性かつCD40L高発現T細胞を含むヘルパーT細胞。

［１４］［１３］に記載のヘルパーT細胞を含む医薬。

［１５］樹状細胞をさらに含む、［１４］に記載の医薬。

［１６］抗原をさらに含む、［１４］または［１５］に記載の医薬。

［１７］前記抗原が、BCR/ABLの断片である、［１６］に記載の医薬。

［１８］がん治療剤である、［１４］～［１７］のいずれかに記載の医薬。

発明の効果

[0010] 本発明によれば、多能性幹細胞から誘導したT細胞へCD4遺伝子または遺伝子産物を導入し、IL-2およびIL-15を含む培養液で培養したのち、CD40L高発現細胞を選別することで、機能的なCD4陽性ヘルパーT細胞を製造することが可能である。さらに、本発明によれば、当該CD4陽性ヘルパーT細胞を用いて樹状細胞を活性化することが可能である。従って、本発明によれば、多能性幹細胞からCD4陽性ヘルパーT細胞を生産することが可能であり、また、多能性幹細胞由来のCD4陽性ヘルパーT細胞を含む免疫機能を賦活するがん治療薬等の医薬を提供することができる。

図面の簡単な説明

[0011] [図1]ＣＤ４$^{+}$Ｔｈ１クローン由来ｉＰＳＣからのＴ系列細胞の再分化についての実験スキームおよび実験結果を示す図。（Ａ）ＣＤ４$^{+}$Ｔｈクローン由来ｉＰＳＣからのＴ系列細胞の再分化のための培養プロトコル。（Ｂ）元のＣＤ４$^{+}$Ｔｈクローン（ＳＫ）とフィトヘマグルチニン（ＰＨＡ）－Ｐ刺激から１４日後の再生Ｔ細胞（ｉＰＳ－Ｔ細胞）における表示されている分子の代表的なフローサイトメトリープロファイル。（Ｃ）元のＣＤ４$^{+}$Ｔｈ１クローン（ＳＫ）およびｉＰＳ－Ｔ細胞のＴＣＲ遺伝子使用とＶ－（Ｄ）－Ｊ接合部領域の配列。（Ｄ）１４６種類の選択されたＴ細胞／ＩＬＣ関連遺伝子の発現プロファイルの主成分分析。（Ｅ）ＩＬＣサブセットに関連する２２種類の選択された遺伝子の発現の階層的クラスタリング（中間調画像）。（Ｆ）サイトカイン産生。プレートに結合した対照ＩｇＧまたは抗ＣＤ３モノクローナル抗体（１０μｇ／ｍｌ）で元のＣＤ４$^{+}$Ｔｈ１クローン（ＳＫ）およびｉＰＳ－Ｔ細胞が２４時間にわたって刺激された。培養上清中の表示されているサイトカインがＥＬＩＳＡにより測定された。示されているデータは３

つの培養物の平均値±ＳＤであり、且つ、３回の独立した３組からなる実験を表している。

[図2]ｉＰＳ－Ｔ細胞におけるＣＤ４導入の効果を示す図。（Ａ）元のＣＤ４$^{+}$Ｔｈ１クローン（ＳＫ）、モック形質導入ｉＰＳ－Ｔ細胞（モックｉＰＳ－Ｔ細胞）、およびＣＤ４形質導入ｉＰＳ－Ｔ細胞（ＣＤ４$^{+}$ｉＰＳ－Ｔ細胞）におけるＣＤ４とＴＣＲ－Ｖｂ２２の発現の代表的なフローサイトメトリープロファイル。（Ｂ）抗原ペプチドに対するモックｉＰＳ－Ｔ細胞とＣＤ４$^{+}$ｉＰＳ－Ｔ細胞の増殖応答。ｂ３ａ２ペプチド（１０μＭ）の存在下でＴ細胞が自家ＰＢＭＣと共培養された。［^{3}Ｈ］－チミジン取込みアッセイを用いて増殖が測定された。示されているデータは平均値であり、且つ、３回の独立した３組からなる実験を表している。（Ｃ）モックｉＰＳ－Ｔ細胞とＣＤ４$^{+}$ｉＰＳ－Ｔ細胞によるｂ３ａ２ペプチド特異的ＩＦＮ－γ産生。モックｉＰＳ－Ｔ細胞およびＣＤ４$^{+}$ｉＰＳ－Ｔ細胞（１×１０^{5}細胞）がｂ３ａ２ペプチド（１０μＭ）で予備パルス処理された自家ＤＣ（５×１０^{4}細胞）と共に２４時間にわたって共培養された。（Ｄ）ＣＤ４$^{+}$ｉＰＳ－Ｔ細胞によるＨＬＡ－ＤＲ拘束性ＩＦＮ－γ産生。ｂ３ａ２ペプチド（１０μＭ）で予備パルス処理され、放射線照射された各ＨＬＡ－ＤＲを発現するＬ細胞形質移入体（４×１０^{4}細胞）とＣＤ４$^{+}$ｉＰＳ－Ｔ細胞（５×１０^{4}細胞）が共培養された。（Ｃ、Ｄ）培養上清（２４時間）中のＩＦＮ－γがＥＬＩＳＡにより測定された。示されているデータは３つの培養物の平均値±ＳＤであり、且つ、３回の独立した３組からなる実験を表している。（Ｅ）全遺伝子発現プロファイルを示す二元クラスタリング（中間調画像）。モックｉＰＳ－Ｔ細胞とＣＤ４$^{+}$ｉＰＳ－Ｔ細胞をベヒクルまたはｂ３ａ２ペプチドで刺激した。ＴＨＰ－１発現性ＨＬＡ－ＤＲ９を抗原提示細胞（ＡＰＣ）として使用した。

[図3]ＴＣＲ刺激に対する高い応答性を示すｉＰＳ－Ｔ細胞におけるＣＤ４０Ｌ^{high}集団の特定についての結果を示す図。（Ａ、Ｂ）ＰＨＡ－Ｐ刺激から１３日後におけるｉＰＳ－Ｔ細胞のＣＤ４０Ｌ発現。モックｉＰＳ－Ｔ細胞またはＣＤ４$^{+}$ｉＰＳ－Ｔ細胞がＰＨＡ－Ｐで刺激され、各サイトカインの存在

下で培養された。ＣＤ４０Ｌ陽性細胞の頻度が各パネルの上の右隅に示されている。（Ｃ、Ｄ）それらの亜集団におけるＣＤ４０Ｌ、ＣＤ４、およびＴＣＲ－Ｖｂ２２の発現が示されている。ＩＬ－２およびＩＬ－１５を含む培地で培養したときのＣＤ４０Ｌ^{high}集団およびＣＤ４０Ｌ^{low}集団がモックｉＰＳ－Ｔ細胞およびＣＤ４$^{+}$ｉＰＳ－Ｔ細胞からフローサイトメトリー選別によって分離され、ＰＨＡ－Ｐ刺激によって増殖した。（Ｅ、Ｆ）プレートに結合した対照ＩｇＧまたは抗ＣＤ３モノクローナル抗体（１０μｇ／ｍｌ）で刺激された様々な亜集団におけるＣＤ４０Ｌの表面発現。元のＣＤ４$^{+}$Ｔｈ１クローン（ＳＫ）が対照として使用された。相対蛍光強度（ＲＦＩ）が各パネルの右上に示されている。（Ｃ～Ｆ）ＣＤ４０Ｌ（赤色）およびアイソタイプ適合対照（灰色）が示されている。（Ｇ）プレートに結合した対照ＩｇＧまたは抗ＣＤ３モノクローナル抗体（１０μｇ／ｍｌ）で刺激された表示されている集団によるサイトカイン産生。元のＣＤ４$^{+}$Ｔｈ１クローン（ＳＫ）が対照として使用された。（Ｈ、Ｉ）ＨＬＡ－ＤＲ９遺伝子とＢＣＲ－ＡＢＬ　ｐ２１０遺伝子を発現するＴＨＰ１細胞（５×１０^{4}細胞）と共培養されたＣＤ４０Ｌ^{high}ＣＤ４$^{+}$ｉＰＳ－Ｔ細胞（１×１０^{5}細胞）によるサイトカイン産生。（Ｇ～Ｉ）培養上清中の表示されているサイトカイン（２４時間）がビーズベースマルチプレックス免疫アッセイによって測定された。示されているデータは３つの培養物の平均値±ＳＤであり、且つ、３回の独立した３組からなる実験を表している。

[図4]ＣＤ４０Ｌ^{high}ＣＤ４$^{+}$ｉＰＳ－Ｔ細胞によるＤＣ活性化についての結果を示す図。（Ａ）ＤＣにおける各分子の代表的なフローサイトメトリープロファイル。ベヒクルまたはｂ３ａ２ペプチドでパルス処理されたＤＣが５：１のＤＣ／ＣＤ４$^{+}$ｉＰＳ－Ｔ細胞比率で各ＣＤ４$^{+}$ｉＰＳ－Ｔ細胞と共に２４時間にわたって培養された。ＯＫ４３２（１０μｇ／ｍｌ）成熟処理ＤＣと培地対照ＤＣが対照として使用された。各表面分子（赤色）とアイソタイプ適合対照（灰色）が示されている。（Ｂ）各ＣＤ４$^{+}$ｉＰＳ－Ｔ細胞と共培養されたＤＣによるサイトカイン産生。培養上清中のサイトカインがビーズベー

スマルチプレックス免疫アッセイによって測定された。各ＣＤ４$^{+}$ｉＰＳ－Ｔ細胞（１×１０^{4}細胞）がｂ３ａ２ペプチド（１０μＭ）で予備パルス処理された自家ＤＣ（２．５×１０^{4}細胞）と２４時間にわたって共培養された。元のＣＤ４$^{+}$Ｔｈ１クローン（ＳＫ）が対照として使用された。示されているデータは３つの培養物の平均値±ＳＤであり、且つ、３回の独立した３組からなる実験を表している。

[図5]ＣＤ４０Ｌ^{high}ＣＤ４$^{+}$ｉＰＳ－Ｔ細胞の細胞傷害性についての解析結果を示す図。（Ａ）ＴＨＰ－１細胞に対するｉＰＳ－Ｔ細胞の細胞傷害活性。（Ｂ、Ｃ）２．５：１のエフェクター／ターゲット（Ｅ：Ｔ）比率でのｉＰＳ－Ｔ細胞のＴＨＰ－１細胞に対する細胞傷害性。（Ｂ）モックｉＰＳ－Ｔ細胞が、パーフォリンを阻害する１０ｎＭのコンカナマイシンＡ（ＣＭＡ）で処理された。（Ｃ）受容体／リガンド相互作用を阻害する各抗体が添加された。（Ｄ）各ＣＤ４$^{+}$ｉＰＳ－Ｔ細胞におけるＴＣＲ－Ｖｂ２２、ＣＤ４、ＣＤ４０Ｌ、ＤＮＡＭ－１、およびＮＫＧ２Ｄの代表的なフローサイトメトリープロファイル。（Ｅ）ベヒクルまたはｂ３ａ２ペプチド（５μＭ）を負荷されたＨＬＡ－ＤＲ９発現性ＴＨＰ－１細胞に対する各ＣＤ４$^{+}$ｉＰＳ－Ｔ細胞の細胞傷害活性。（Ａ～Ｃ、Ｅ）表示されているＥ：Ｔ比率で細胞傷害性が^{51}Ｃｒ放出アッセイにより４時間にわたって測定された。データは３回の独立した３組からなる実験を表している。

[図6]ＣＤ４０Ｌ^{high}ＣＤ４$^{+}$ｉＰＳ－Ｔ細胞による白血病抗原特異的ＣＴＬの誘導についてのメカニズムと解析結果を示す図。（Ａ）ＷＴ１特異的ＣＴＬ感作のメカニズム。ｐＷＴ１はＷＴ１ペプチドであり、ｂ３ａ２はｂ３ａ２ペプチドである。ｉＰＳ－Ｔ細胞がＤＣによって提示されるｂ３ａ２ペプチドを認識すると、活性化されたｉＰＳ－Ｔ細胞がＣＤ４０Ｌの発現を上昇させる。ＣＤ４０ＬによるＣＤ４０ライゲーションによってＤＣ成熟が誘導される。ＤＣによる共刺激分子の発現上昇とサイトカイン産生の増加によってＷＴ１ペプチド特異的ＣＴＬの活性化が促進される。（Ｂ～Ｄ）ＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞の増殖応答。各ｉＰＳ－Ｔ細胞（５×１０^{3}細胞）とＤＣ（１×１０^{4}細胞）を

ｂ３ａ２ペプチド（５μＭ）と共に、またはｂ３ａ２ペプチド無しで最初に５時間にわたって共培養してそれらのＤＣを成熟させ、その後でそれらのＤＣとｉＰＳ－Ｔ細胞を放射線照射し、ＷＴ１ペプチド（５μＭ）の存在下で自家ＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞（５×１０^{4}細胞）と共に培養した。増殖応答（７日目）が［^{3}Ｈ］－チミジンの取込みとして測定された。示されているデータは３つの培養物の平均値±ＳＤであり、且つ、３回の独立した３組からなる実験を表している。（Ｅ）ＣＤ４０Ｌ^{high}ＣＤ４$^{+}$ｉＰＳ－Ｔ細胞順化ＤＣで感作されたＷＴ１／ＨＬＡ－Ａ２４四量体陽性ＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞の頻度。ＣＤ４０Ｌ^{high}ＣＤ４$^{+}$ｉＰＳ－Ｔ細胞（５×１０^{3}細胞）とｂ３ａ２ペプチド（５μＭ）で予備パルス処理されたＤＣ（１×１０^{4}細胞）を最初に５時間にわたって共培養してそれらのＤＣを成熟させ、その後それらのＤＣとＣＤ４$^{+}$ｉＰＳ－Ｔ細胞を放射線照射し、ＷＴ１ペプチド（５μＭ）の存在下で自家ＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞（５×１０^{4}細胞）と共に培養した。刺激後１０日目における四量体染色が示されている。（Ｆ）ＷＴ１ペプチドで３回目の刺激の後のＷＴ１／ＨＬＡ－Ａ２４四量体陽性ＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞の頻度。（Ｅ、Ｆ）３回の独立した実験の代表的なフローサイトメトリープロファイル。ＨＩＶ－ｅｎｖ／ＨＬＡ－Ａ２４四量体が対照として使用された。（Ｇ）ベヒクルまたはＷＴ１ペプチドが負荷されたＫ５６２－Ａ２４細胞に対する増殖したＷＴ１特異的ＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞の細胞傷害活性。表示されているエフェクター／ターゲット（Ｅ：Ｔ）比率で細胞傷害性が^{51}Ｃｒ放出アッセイにより４時間にわたって測定された。データは３回の独立した３組からなる実験を表している。

[図7]ＣＤ４０Ｌ^{high}ＣＤ４$^{+}$ｉＰＳ－Ｔ細胞順化ＤＣによって感作されたＣＴＬ（ＷＴ１特異的ＣＴＬ）の抗白血病活性を示す図。（Ａ）インビボ抗白血病作用（写真）。ＮＳＧマウスにＫ５６２－Ａ２４－Ｌｕｃ－ＷＴ１ミニ遺伝子細胞と生理食塩水またはＷＴ１特異的ＣＴＬの混合物を皮下注入した。腫瘍担持量が生物発光イメージングにより毎週測定された。（Ｂ）０日目から４２日目までの各群の平均腫瘍サイズが示されている。エラーバーは±ＳＤを表している。＊はスチューデントの独立ｔ検定（両側型）による０．０５

未満のＰ値である。（Ｃ）処理マウスおよび対照マウスのカプランマイヤー生存曲線。＊はログランク（マンテル・コックス）検定による０．０５未満のＰ値である。（ＷＴ１－ＣＴＬ処理、ｎ＝１０；無処理、ｎ＝５）。

発明を実施するための形態

[0012] 本発明のCD4陽性ヘルパーT細胞の製造方法は、（i）多能性幹細胞から誘導され、かつ、CD4遺伝子または遺伝子産物が導入されたT細胞をIL-2およびIL-15を含む培養液中で培養する工程、および（ii）（i）で得られた細胞からCD40L高発現T細胞を選別する工程を含む。

[0013] まず、多能性幹細胞から誘導され、かつ、CD4遺伝子または遺伝子産物が導入されたT細胞について説明する。

[0014] 多能性幹細胞

本発明において多能性幹細胞とは、生体に存在する多くの細胞に分化可能である多能性を有し、かつ、増殖能をも併せもつ幹細胞であり、少なくとも本発明で使用される造血前駆細胞に誘導される任意の細胞が包含される。多能性幹細胞には、特に限定されないが、例えば、胚性幹（ES）細胞、核移植により得られるクローン胚由来の胚性幹（ntES）細胞、精子幹細胞（「GS細胞」）、胚性生殖細胞（「EG細胞」）、人工多能性幹（iPS）細胞、培養線維芽細胞や骨髄幹細胞由来の多能性細胞（Muse細胞）などが含まれる。

[0015] iPS細胞の製造方法は当該分野で公知であり、任意の体細胞へ初期化因子を導入することによって製造され得る。ここで、初期化因子とは、例えば、Oct3/4、Sox2、Sox1、Sox3、Sox15、Sox17、Klf4、Klf2、c-Myc、N-Myc、L-Myc、Nanog、Lin28、Fbx15、ERas、ECAT15-2、Tcl1、beta-catenin、Lin28b、Sall1、Sall4、Esrrb、Nr5a2、Tbx3またはGlis1等の遺伝子または遺伝子産物が例示され、これらの初期化因子は、単独で用いても良く、組み合わせて用いてもよい。初期化因子の組み合わせとしては、WO2007/069666、WO2008/118820、WO2009/007852、WO2009/032194、WO2009/058413、WO2009/057831、WO2009/075119、WO2009/079007、WO2009/091659、WO2009/101084、WO2009/101407、WO2009/102983、WO2009/114949、WO2009/117439、WO2009/126250、WO2009/12

6251、WO2009/126655、WO2009/157593、WO2010/009015、WO2010/033906、WO2010/033920、WO2010/042800、WO2010/050626、WO 2010/056831、WO2010/068955、WO2010/098419、WO2010/102267、WO 2010/111409、WO2010/111422、WO2010/115050、WO2010/124290、WO2010/147395、WO2010/147612、Huangfu D, et al. (2008), Nat. Biotechnol., 26: 795-797、Shi Y, et al. (2008), Cell Stem Cell, 2: 525-528、Eminli S, et al. (2008), Stem Cells. 26:2467-2474、Huangfu D, et al. (2008), Nat. Biotechnol. 26:1269-1275、Shi Y, et al. (2008), Cell Stem Cell, 3, 568-574、Zhao Y, et al. (2008), Cell Stem Cell, 3:475-479、Marson A, (2008), Cell Stem Cell, 3, 132-135、Feng B, et al. (2009), Nat. Cell Biol. 11:197-203、R.L. Judson et al., (2009), Nat. Biotechnol., 27:459-461、Lyssiotis CA, et al. (2009), Proc Natl Acad Sci U S A. 106:8912-8917、Kim JB, et al. (2009), Nature. 461:649-643、Ichida JK, et al. (2009), Cell Stem Cell. 5:491-503、Heng JC, et al. (2010), Cell Stem Cell. 6:167-74、Han J, et al. (2010), Nature. 463:1096-100、Mali P, et al. (2010), Stem Cells. 28:713-720、Maekawa M, et al. (2011), Nature. 474:225-9.に記載の組み合わせが例示される。

[0016] 体細胞には、非限定的に、胎児(仔)の体細胞、新生児(仔)の体細胞、および成熟した健全なもしくは疾患性の体細胞のいずれも包含されるし、また、初代培養細胞、継代細胞、および株化細胞のいずれも包含される。具体的には、体細胞は、例えば（1）神経幹細胞、造血幹細胞、間葉系幹細胞、歯髄幹細胞等の組織幹細胞（体性幹細胞）、（2）組織前駆細胞、（3）血液細胞（末梢血細胞、臍帯血細胞等）、リンパ球、上皮細胞、内皮細胞、筋肉細胞、線維芽細胞（皮膚細胞等）、毛細胞、肝細胞、胃粘膜細胞、腸細胞、脾細胞、膵細胞(膵外分泌細胞等)、脳細胞、肺細胞、腎細胞および脂肪細胞等の分化した細胞などが例示される。

[0017] CD4陽性T細胞を製造する目的に使用するためには、Ｔ細胞受容体（Ｔ　ｃｅｌｌ　ｒｅｃｅｐｔｏｒ、ＴＣＲ）の遺伝子再編成が行われたリンパ球（

好ましくは、T細胞）を体細胞として用いてiPS細胞を製造することが好ましい。リンパ球を体細胞として用いる場合、初期化の工程に先立ち当該リンパ球をインターロイキン－２（ＩＬ－２）の存在下にて抗ＣＤ３抗体及び抗ＣＤ２８抗体によって刺激、または、所望の抗原ペプチドで刺激して活性化することが好ましい。かかる刺激は、例えば、培地中に、ＩＬ－２、抗ＣＤ３抗体及び抗ＣＤ２８抗体を添加して前記リンパ球を一定期間培養することによって行うことができる。抗ＣＤ３抗体及び抗ＣＤ２８抗体は磁性ビーズ等が結合されているものであってもよく、さらにこれらの抗体を培地中に添加する代わりに、抗ＣＤ３抗体及び抗ＣＤ２８抗体を表面に結合させた培養ディッシュ上で前記Ｔ細胞を一定期間培養することによって刺激を与えてもよい。また、ヒトＴ細胞が認識する抗原ペプチドを培地中に添加することによって刺激を与えてもよい。抗原ペプチドとは、所望の抗原タンパク質を構成する少なくとも９個以上のアミノ酸配列から成るペプチドである。このようなペプチドとして、例えば、BCR/ABLキメラ遺伝子のp210のb3a2サブタイプ（単にb3a2ともいう）を構成する９個以上のアミノ酸配列から成るペプチドが例示される。このように、抗原ペプチドを添加した培地中でリンパ細胞を培養することで、当該抗原ペプチドを認識するリンパ細胞が選択的に増殖させることが可能である。

[0018] 本発明において使用されるCD4陽性T細胞は、所望の抗原特異性を有することが好ましい。従って、iPS細胞の元となるリンパ球は、所望の抗原特異性を有することが望ましく、当該リンパ球は、所望の抗原を固定化したアフィニティカラム等を用いて精製により特異的に単離されてもよい。この精製では、所望の抗原を結合させたＭＨＣ（主要組織適合遺伝子複合体）を４量体化させたもの（いわゆる「ＭＨＣテトラマー」）を用いて、ヒトの組織より所望の抗原特異性を有するリンパ球を精製する方法も採用することができる。

[0019] 体細胞を採取する由来となる哺乳動物個体は特に制限されないが、好ましくはヒトである。本発明の方法によって調製されたCD4陽性ヘルパーT細胞を輸血に使用する場合、輸血される患者とヒト白血球型抗原（ＨＬＡ）の型を

適合させ易いという観点から、iPS細胞の元となる体細胞は、CD4陽性ヘルパーT細胞を輸血される対象から単離されることが好ましい。

[0020] 多能性幹細胞からT細胞の誘導方法

多能性幹細胞からT細胞の誘導方法は、公知の方法を用いて行うことができる。例えば、次の（１）および（２）、好ましくは（１）から（３）の工程を含む方法が挙げられる；

（工程１）多能性幹細胞からＣＤ３４陽性造血前駆細胞を誘導する工程、

（工程２）前記工程（１）で得られたＣＤ３４陽性造血前駆細胞をＦＬＴ３ＬおよびＩＬ－７の存在下で培養する工程、および

（工程３）前記工程（２）で得られた細胞をＩＬ－７およびＩＬ－１５の存在下で末梢血単核球と共培養する工程。

[0021] T細胞とはTCRを細胞表面に有している細胞を意味し、さらにＣＤ４およびＣＤ８を細胞表面に有していてもよい。従って、Ｔ細胞を誘導するという観点からは、上記（工程１）および（工程２）を行えばよいが、Ｔ細胞の含有効率を上昇させるためにはさらに、上記（工程３）を含むことが望ましい。

[0022] （工程１）多能性幹細胞から造血前駆細胞を誘導する工程

造血前駆細胞とは、リンパ球、好酸球、好中球、好塩基球、赤血球、巨核球等の血球系細胞に分化可能な細胞であり、例えば、表面抗原であるCD34陽性、またはCD34およびCD43が陽性であることによって認識できる。

[0023] 多能性幹細胞から造血前駆細胞を誘導する方法として、多能性幹細胞をC3H10T1/2と共培養した後、ＶＥＧＦ、ＦＬＴ３ＬおよびＳＣＦの存在下でC3H10T1/2と共培養することで得られるネット様構造物（ES－sac又はiPS－sacとも称する）から造血前駆細胞を調製する方法が挙げられる。このとき、さらにビタミンＣ類を添加して培養してもよい。ここで、「ネット様構造物」とは、多能性幹細胞由来の立体的な嚢状（内部に空間を伴うもの）構造体で、内皮細胞集団などで形成され、内部に造血前駆細胞を含む構造体である。この他にも、Takayama N., et al. J Exp Med. 2817-2830 (2010)に記載の方法にしたがって、多能性幹細胞をVEGFの存在下でC3H10T1/2上で培養することで得

られるネット様構造物から造血前駆細胞を調製することができる。 また、多能性幹細胞からの造血前駆細胞の製造方法として、胚様体の形成とサイトカインの添加による方法（Chadwick et al. Blood 2003, 102: 906-15、Vijayaragavan et al. Cell Stem Cell 2009, 4: 248-62、Saeki et al. Stem Cells 2009, 27: 59-67）または異種由来のストローマ細胞との共培養法（Niwa A et al. J Cell Physiol. 2009 Nov;221(2):367-77.）、サイトカインの添加とコーティング剤（マトリゲルまたはラミニン断片）の組み合わせによる方法（WO2011/115308）等が例示される。

[0024] （工程２）造血前駆細胞をＦＬＴ３Ｌおよびｌｌ－７の存在下で培養する工程

工程２において用いる培養液は、特に限定されないが、動物細胞の培養に用いられる培地を基礎培地へＦＬＴ３ＬおよびｌＬ－７を添加して調製することができる。基礎培地には、例えばIscove's Modified Dulbecco's Medium（IMDM）培地、Medium 199培地、Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM)培地、αMEM培地、Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM)培地、Ham's F12培地、RPMI 1640培地、Fischer's培地、Neurobasal Medium（ライフテクノロジーズ）およびこれらの混合培地などが包含される。培地には、血清が含有されていてもよいし、あるいは無血清を使用してもよい。必要に応じて、基礎培地は、例えば、アルブミン、インスリン、トランスフェリン、セレン、脂肪酸、微量元素、2-メルカプトエタノール、チオールグリセロール、脂質、アミノ酸、L-グルタミン、非必須アミノ酸、ビタミン、増殖因子、低分子化合物、抗生物質、抗酸化剤、ピルビン酸、緩衝剤、無機塩類、サイトカインなどの1つ以上の物質も含有し得る。本工程２において、好ましい基礎培地は、血清、L-グルタミン、トランスフェリン、セレンを添加したαMEM培地である。

[0025] 工程２において用いる培養液中におけるIL-7の濃度は、通常0.1 ng/mlから50 ng/mlであり、例えば、0.1 ng/ml、0.2 ng/ml、0.3 ng/ml、0.4 ng/ml、0.5 ng/ml、0.6 ng/ml、0.7 ng/ml、0.8 ng/ml、0.9 ng/ml、1 ng/ml、2 ng/m

l、3 ng/ml、4 ng/ml、5 ng/ml、10ng/ml、20 ng/ml、30 ng/ml、40 ng/mlまたは50 ng/mlである。好ましくは、1 ng/mlである。

[0026] 工程２において用いる培養液中におけるＦＬＴ３Ｌの濃度は、通常1 ng/mlから100 ng/mlであり、例えば、1 ng/ml、2 ng/ml、3 ng/ml、4 ng/ml、5 ng/ml、6 ng/ml、7 ng/ml、8ng/ml、9 ng/ml、10 ng/ml、20 ng/ml、50 ng/mlまたは100 ng/mlである。好ましくは、10 ng/mlである。

[0027] 工程２に用いる培養液へ、ビタミンＣ類、ＳＣＦ、ＴＰＯ（トロンボポエチン）からなる添加物をさらに添加して調製してもよい。

ビタミンC類とは、L-アスコルビン酸およびその誘導体を意味し、L-アスコルビン酸誘導体とは、生体内で酵素反応によりビタミンCとなるものを意味する。L-アスコルビン酸の誘導体として、リン酸ビタミンC、アスコルビン酸グルコシド、アスコルビルエチル、ビタミンCエステル、テトラヘキシルデカン酸アスコビル、ステアリン酸アスコビルおよびアスコルビン酸-2リン酸-6パルミチン酸が例示される。好ましくは、リン酸ビタミンCであり、例えば、リン酸-Lアスコルビン酸Naまたはリン酸-L-アスコルビン酸Mgが挙げられる。ビタミンC類は、培養期間中、４日毎、３日毎、2日毎、または毎日、別途添加することが好ましく、より好ましくは毎日である。当該ビタミンC類は、培養液において、通常5ng/mlから500ng/mlに相当する量を添加する。好ましくは、5ng/ml、10ng/ml、25ng/ml、50ng/ml、100ng/ml、200ng/ml、300ng/ml、400ng/ml、または500ng/mlに相当する量である。

造血前駆細胞の製造に用いるSCFの培養液中における濃度は、10 ng/mlから100 ng/mlであり、例えば、10 ng/ml、20 ng/ml、30 ng/ml、40 ng/ml、50 ng/ml、60 ng/ml、70 ng/ml、80 ng/ml、90 ng/ml、100 ng/ml、150 ng/ml、200 ng/ml、または500 ng/mlである。

造血前駆細胞の製造に用いるＴＰＯの培養液中における濃度は、10 ng/mlから100 ng/mlであり、例えば、10 ng/ml、20 ng/ml、30 ng/ml、40 ng/ml、50 ng/ml、60 ng/ml、70 ng/ml、80 ng/ml、90 ng/ml、100 ng/ml、150 ng/ml、200 ng/ml、または500 ng/mlである。

[0028] 工程２において、造血前駆細胞を接着培養または浮遊培養してもよく、接着培養の場合、培養容器をコーティングして用いてもよく、またフィーダー細胞等と共培養してもよい。共培養するフィーダー細胞として、ストローマ細胞が好ましく、具体的には骨髄間質細胞株OP9細胞（理研BioResource Centerより入手可能）が例示される。当該OP9細胞は、好ましくは、Delta-like 1（Dll1）を恒常的に発現するOP9-DL1細胞であってもよい（Holmes R1 and Zuniga-Pflucker JC. Cold Spring Harb Protoc. 2009(2)）。フィーダー細胞としてOP9細胞を用いる場合、別途用意したDll1またはDll1とFc等の融合タンパク質を適宜培養液に添加することによっても行い得る。Dll1には、NCBIのアクセッション番号として、ヒトの場合、NM_005618、マウスの場合、NM_007865に記載されたヌクレオチド配列を有する遺伝子にコードされるタンパク質、ならびにこれらと高い配列同一性（例えば９０％以上）を有し、同等の機能を有する天然に存在する変異体が包含される。当該フィーダー細胞は培養中適宜交換することが好ましい。フィーダー細胞の交換は、予め播種したフィーダー細胞上へ培養中の対象細胞を移すことによって行い得る。当該交換は、５日毎、４日毎、３日毎、または２日毎にて行い得る。

[0029] 工程２において、浮遊培養によって培養が行われる場合、細胞を培養容器へ非接着の状態で凝集体（スフェアとも言う）を形成させて培養することが望ましく、このような培養は、特に限定はされないが、細胞との接着性を向上させる目的で人工的に処理（例えば、細胞外マトリックス等によるコーティング処理）されていない培養容器、若しくは、人工的に接着を抑制する処理（例えば、ポリヒドロキシエチルメタクリル酸（poly-HEMA）、非イオン性の界面活性ポリオール（Pluronic F-127等）またはリン脂質類似構造物（例えば、2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリンを構成単位とする水溶性ポリマー（Lipidure））によるコーティング処理した培養容器を使用することによって行うことができる。工程２を浮遊培養で行う場合、Huijskens MJ et al, J Leukoc Biol. 96: 1165-1175, 2014を参照して行うことができる。

[0030] 工程２において、接着培養が行われる場合、細胞外基質をコーティング処理された培養容器を用いて培養することによって行うことができる。コーティング処理は、細胞外基質を含有する溶液を培養容器に入れた後、当該溶液を適宜除くことによって行い得る。ここで、細胞外基質とは、細胞の外に存在する超分子構造体であり、天然由来であっても、人工物（組換え体）であってもよい。例えば、ポリリジン、ポリオルニチン、コラーゲン、プロテオグリカン、フィブロネクチン、ヒアルロン酸、テネイシン、エンタクチン、エラスチン、フィブリリン、ラミニンといった物質およびこれらの断片が挙げられる。これらの細胞外基質は、組み合わせて用いられてもよく、例えば、BD Matrigel(商標)などの細胞からの調製物であってもよい。

[0031] 工程２における、造血前駆細胞を培養する際の培養温度条件は、特に限定されないが、例えば、約37℃～約42℃程度、約37～約39℃程度が好ましい。また、培養期間については、当業者であれば細胞数などをモニターしながら、適宜決定することが可能である。日数は特に限定されないが、例えば、少なくとも10日間以上、12日以上、14日以上、16日以上、18日以上、20日以上、21日以上であり、好ましくは14日である。

[0032] 工程２にて得られた細胞を、マイトジェンで刺激してもよい。マイトジェンとは、Ｔ細胞の細胞分裂を促進する物質を意味し、このような物質として、例えば、pokeweed mitogen、抗CD3抗体、抗CD28抗体、フィトヘマグルチニン（PHA）、コンカナバリンA （ConA）、スーパー抗原、フォールボールエステル（例えば、ホルボール-12-ミリスタート-13-アセタート（ＰＭＡ））が挙げられる。

[0033] （工程３）ＩＬ－７およびＩＬ－１５の存在下で末梢血単核球と共培養する工程

工程３は、上述の工程２で得られた細胞を単離し、末梢血単核球と共培養する工程である。

[0034] 工程３で用いる末梢血単核球は、工程１で用いた多能性幹細胞とアロジェニック（同種）であることが望ましく、従って、ヒト多能性幹細胞を用いた

場合、当該末梢血単核球もヒト末梢血単核球であることが望ましい。また、当該末梢血単核球は、自己増殖を防止する措置を取ることが望ましく、このような措置として、放射線照射やマイトマイシン処理が例示される。

[0035] 工程３において用いる培養液は、特に限定されないが、動物細胞の培養に用いられる培地を基礎培地へＩＬ－７およびＩＬ－１５を添加して調製することができる。基礎培地には、例えばIscove's Modified Dulbecco's Medium（IMDM）培地、Medium 199培地、Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM)培地、αMEM培地、Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM)培地、Ham's F12培地、RPMI 1640培地、Fischer's培地、Neurobasal Medium（ライフテクノロジーズ）およびこれらの混合培地などが包含される。培地には、血清が含有されていてもよいし、あるいは無血清を使用してもよい。必要に応じて、基礎培地は、例えば、アルブミン、インスリン、トランスフェリン、セレン、脂肪酸、微量元素、2-メルカプトエタノール、チオールグリセロール、脂質、アミノ酸、L-グルタミン、非必須アミノ酸、ビタミン、増殖因子、低分子化合物、抗生物質、抗酸化剤、ピルビン酸、緩衝剤、無機塩類、サイトカインなどの1つ以上の物質も含有し得る。工程２において、好ましい基礎培地は、血清、L-グルタミン、を添加したRPMI 1640培地である。

[0036] 工程３において用いる培養液中におけるＩＬ－７の濃度は、1 ng/mlから100 ng/mlであり、例えば、1 ng/ml、2 ng/ml、3 ng/ml、4 ng/ml、5 ng/ml、6 ng/ml、7 ng/ml、8 ng/ml、9 ng/ml、10 ng/ml、20 ng/ml、50 ng/ml、100 ng/mlである。好ましくは、10 ng/mlである。

[0037] 工程３において用いる培養液中におけるＩＬ－１５の濃度は、1 ng/mlから100 ng/mlであり、例えば、1 ng/ml、2 ng/ml、3 ng/ml、4 ng/ml、5 ng/ml、6 ng/ml、7 ng/ml、8 ng/ml、9 ng/ml、10 ng/ml、20 ng/ml、50 ng/ml、100 ng/mlである。好ましくは、10 ng～20 ng /mlである。

[0038] Ｔ細胞の細胞分裂を促進する目的で、培養液へマイトジェンをさらに添加して調製してもよい。マイトジェンは、上述したものと同様のものを用いることができる。

[0039] 本工程３における、培養温度条件は、特に限定されないが、例えば、約37℃～約42℃程度、約37～約39℃程度が好ましい。また、培養期間については、当業者であれば細胞数などをモニターしながら、適宜決定することが可能である。日数は特に限定されないが、例えば、少なくとも10日間以上、12日以上、14日以上、16日以上、18日以上、20日以上、21日以上であり、好ましくは14日である。

[0040] CD4遺伝子または遺伝子産物を導入する方法

CD4遺伝子または遺伝子産物を多能性幹細胞から誘導されたT細胞に導入する方法は特に限定されないが、例えば、以下の方法を用いることができる。本発明において、遺伝子産物とは、ＲＮＡまたはタンパク質が例示される。CD4遺伝子はヒトの遺伝子が好ましく、例えば、GenBank Accession No. AAH25782のアミノ酸配列（配列番号３）またはそれと８０％以上、好ましくは９０％以上、より好ましくは９５％以上同一なアミノ酸配列を有し、Ｔ細胞に導入されたときに樹状細胞を活性化可能なタンパク質をコードする遺伝子が例示される。

[0041] 遺伝子（DNA）の形態で導入する場合、例えば、ウイルス、プラスミド、人工染色体などのベクターをリポフェクション、リポソーム、マイクロインジェクションなどの手法によって多能性幹細胞内に導入することができる。ウイルスベクターとしては、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、センダイウイルスベクターなどが例示される。また、人工染色体ベクターとしては、例えばヒト人工染色体(HAC)、酵母人工染色体(YAC)、細菌人工染色体(BAC、PAC)などが含まれる。プラスミドとしては、哺乳動物細胞用プラスミドを使用しうる。ベクターには、CD4遺伝子が発現可能なように、プロモーター、エンハンサー、リボゾーム結合配列、ターミネーター、ポリアデニル化サイトなどの制御配列を含むことができるし、さらに、必要に応じて、薬剤耐性遺伝子(例えばカナマイシン耐性遺伝子、アンピシリン耐性遺伝子、ピューロマイシン耐性遺伝子など）、チミジンキナーゼ遺伝子、ジフテリアトキシン遺伝子

などの選択マーカー配列、蛍光タンパク質、βグルクロニダーゼ(GUS)、FLAGなどのレポーター遺伝子配列などを含むことができる。プロモーターとして、SV40プロモーター、 LTRプロモーター、CMV (cytomegalovirus)プロモーター、RSV (Rous sarcoma virus)プロモーター、MoMuLV (Moloney mouse leukemia virus) LTR、HSV-TK (herpes simplex virus thymidine kinase)プロモーター、EF-αプロモーター、CAGプロモーターおよびTREプロモーター（tetO 配列が7回連続したTet応答配列をもつCMV 最小プロモーター）が例示される。TREプロモーターを用いた場合、同一の細胞において、tetRおよびVP16ADとの融合タンパク質またはreverse tetR (rtetR)およびVP16ADとの融合タンパク質を同時に発現させることが望ましい。ここで、TREプロモーターを有しreverse tetR (rtetR)およびVP16ADとの融合タンパク質を発現させることが可能なベクターを薬剤応答性誘導ベクターと称する。また、上記ベクターには、多能性細胞の染色体へプロモーターとそれに結合するCD4遺伝子からなる発現カセットを取り込み、さらに必要に応じて切除するために、この発現カセットの前後にトランスポゾン配列を有していでもよい。トランスポゾン配列として特に限定されないが、piggyBacが例示される。他の態様として、発現カセットを除去する目的のため、発現カセットの前後にLoxP配列を有してもよい。

[0042] 薬剤応答性誘導ベクターを用いる場合、CD4遺伝子の導入は、多能性幹細胞において導入してもよく、この場合、対応する薬剤を培地中へ添加することでCD4遺伝子を発現することができる。従って、当該薬剤応答性誘導ベクターを用いる場合、対応する薬剤を培地中へ添加することをもって、CD4遺伝子の導入と言い換えることができる。対応する薬剤としては、ドキシサイクリンなどが例示される。LoxP配列を有するベクターを用いる場合、所望の期間経過後、Creを細胞内に導入することで発現を停止する方法などが例示される。

[0043] RNAの形態で導入する場合、例えばエレクトロポレーション、リポフェクション、マイクロインジェクションなどの手法によって多能性幹細胞内に導入してもよい。

タンパク質の形態で導入する場合、例えばリポフェクション、細胞膜透過性ペプチド（例えば、HIV由来のTATおよびポリアルギニン）との融合、マイクロインジェクションなどの手法によって多能性幹細胞内に導入してもよい。

[0044] このような遺伝子産物の形態で導入する場合、遺伝子産物の半減期が短いことから、当該導入を複数回にわたって行ってもよい、導入回数は、CD4遺伝子の発現が必要な期間から半減期を参照し、適宜算出することができる。導入回数として、３回、４回、５回、６回またはそれ以上が例示される。

[0045] CD4陽性T細胞をIL-2およびIL-15を含む培養液中で培養する工程

この工程において用いられる培養液は、特に限定されないが、動物細胞の培養に用いられる培地を基礎培地へIL-2およびIL-15を添加して調製することができる。基礎培地には、例えばIscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM) 培地、Medium 199培地、Eagle'sMinimum Essential Medium (EMEM)培地、αMEM培地、Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM)培地、Ham's F12培地、RPMI 1640培地、Fischer's培地、Neurobasal Medium（ライフテクノロジーズ）およびこれらの混合培地などが包含される。培地には、血清が含有されていてもよいし、あるいは無血清を使用してもよい。必要に応じて、基礎培地は、例えば、アルブミン、インスリン、トランスフェリン、セレン、脂肪酸、微量元素、2-メルカプトエタノール、チオールグリセロール、脂質、アミノ酸、L-グルタミン、非必須アミノ酸、ビタミン、増殖因子、低分子化合物、抗生物質、抗酸化剤、ピルビン酸、緩衝剤、無機塩類、サイトカインなどの1つ以上の物質も含有し得る。本工程において、好ましい基礎培地は、血清、L-グルタミン、トランスフェリン、セレンを添加したαMEM培地である。

[0046] 培養液中におけるIL-2の濃度は、通常10 IU/mlから500 IU/mlであり、例えば、10 IU/ml、20 IU/ml、30 IU/ml、40 IU/ml、50 IU/ml、60 IU/ml、70 IU/ml、80 IU/ml、90 IU/ml、100 IU/ml、150 IU/ml、200 IU/ml、250 IU/ml、300 IU/ml、350 IU/ml、400 IU/ml、450 IU/mlまたは500 IU/mlである。好ま

しくは、100 IU/mlである。

[0047] 培養液中におけるIL-15の濃度は、通常1 ng/mlから50 ng/mlであり、例えば、1 ng/ml、2 ng/ml、3 ng/ml、4 ng/ml、5 ng/ml、6 ng/ml、7 ng/ml、8ng/ml、9 ng/ml、10 ng/ml、20 ng/ml、25 ng/mlまたは50 ng/mlである。好ましくは、5 ng/mlである。

[0048] この工程においては、CD4陽性T細胞を接着培養または浮遊培養してもよいが、浮遊培養が好ましい。

[0049] CD4陽性T細胞を培養する際の培養温度条件は、特に限定されないが、例えば、約37℃～約42℃程度、約37～約39℃程度が好ましい。また、培養期間については、当業者であれば細胞数などをモニターしながら、適宜決定することが可能である。日数は特に限定されないが、例えば、少なくとも1日間以上、2日以上、3日以上、5日以下程度である。

[0050] CD40L高発現T細胞を選別する工程

CD4陽性T細胞をIL-2およびIL-15を含む培養液中で培養して得られたT細胞について、CD40Lの発現量に基づいて選別（sorting）を行い、CD40L高発現T細胞（ＣＤ４０ＬｈｉｇｈＣＤ４$^{+}$ｉＰＳ－Ｔ細胞）を得る。ここでCD40L高発現T細胞とはCD40Lを所定のレベル以上発現するT細胞を意味し、例えば、抗CD40L抗体で検出し得るレベル以上の発現レベルでCD40Lを発現するT細胞、又は陰性コントロール細胞（例えば、Fluorescence Minus One (FMO) Control）における発現レベルよりも高いレベル、陰性コントロール細胞での発現レベルに幅があるときはその上限よりも高いレベルでCD40Lを発現するT細胞が挙げられ、抗CD40L抗体を用いて選別（精製）することができる。

CD40L陽性細胞の精製は、当業者に周知の方法で行うことができ、特に限定されないが、CD40L抗体を担持した磁気ビーズやCD40L抗体を用いたフローサイトメトリーにより行うことができる。

なお、得られたCD40L高発現T細胞を、マイトジェン等で刺激してもよい。マイトジェンとしては、例えば、pokeweed mitogen、抗CD3抗体、抗CD28抗体、フィトヘマグルチニン（PHA）が挙げられる。

[0051] 樹状細胞を活性化する方法

上述した方法で製造されたCD4陽性ヘルパーT細胞をin vitroで抗原の存在下で樹状細胞と接触させることにより、樹状細胞を活性化することができる。

[0052] 樹状細胞とは、抗原を取り込み、MHC分子と結合して当該抗原を提示することができる機能を有する細胞である。本発明の方法で製造されたCD4陽性ヘルパーT細胞と接触させることで活性化できることから、未熟樹状細胞であってもよい。

[0053] 樹状細胞を活性化するとは、抗原に特異的なT細胞を活性化できる機能を獲得することを意味し、より好ましくは、抗原に特異的なCD8陽性T細胞を活性化できる機能を獲得することである。当該活性化は、CD83、またはCD86の発現を確認することによっても行い得る。さらに、樹状細胞を活性化するとは、未熟樹状細胞を成熟樹状細胞へと成熟させると言い換えることもできる。

[0054] 使用される樹状細胞は、ドナーから血液成分分離装置および密度勾配遠心分離法にて単離された樹状細胞であり、CD4陽性ヘルパーT細胞と同一のMHC分子を所有していることが好ましい。

[0055] 樹状細胞の活性化において用いる抗原は、本発明の方法で製造されたCD4陽性ヘルパーT細胞によって特異的に認識されるタンパク質の少なくとも連続する９アミノ酸配列を有するペプチドである。このような抗原として、例えば、CD4陽性T細胞がb3a2ペプチドを特異的に認識するTCRを保有する場合、当該b3a2ペプチドを抗原として用いる。

[0056] b3a2ペプチドとは、b3a2型のBCR/ABLキメラ遺伝子によってコードされるタンパク質の一部であり、HLA-クラスII分子のペプチド収容溝に収まる少なくとも連続する９アミノ酸配列を有するペプチドである。b3a2型のBCR/ABLキメラ遺伝子とは、BCRのM-BCR部位よりのB3エクソンと、ABLよりのA2エクソンを含むBCRとABLの融合遺伝子を意味する。

[0057] 樹状細胞を活性化するために用いる培地は、動物細胞の培養に用いられる培地を用いることができる。当該基礎培地には、例えばIscove's Modified D

ulbecco's Medium (IMDM) 培地、Medium 199培地、Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM)培地、αMEM培地、Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM)培地、Ham's F12培地、RPMI 1640培地、Fischer's培地、Neurobasal Medium（ライフテクノロジーズ）およびこれらの混合培地などが包含される。培地には、血清が含有されていてもよいし、あるいは無血清を使用してもよい。必要に応じて、基礎培地は、例えば、アルブミン、インスリン、トランスフェリン、セレン、脂肪酸、微量元素、2-メルカプトエタノール、チオールグリセロール、脂質、アミノ酸、L-グルタミン、非必須アミノ酸、ビタミン、増殖因子、低分子化合物、抗生物質、抗酸化剤、ピルビン酸、緩衝剤、無機塩類、サイトカインなどの1つ以上の物質も含有し得る。

樹状細胞の活性に要する時間は特に限定されないが、数時間でよく、例えば、２時間、３時間、４時間、５時間、６時間、12時間、24時間などが例示される。好ましくは、５時間である。

[0058] 医薬

本発明は、上述の方法によって製造されたCD4陽性ヘルパーT細胞（多能性幹細胞から誘導されたヘルパーT細胞であって、CD4陽性かつCD40L高発現T細胞からなるヘルパーT細胞）、および／または上述の方法によって活性化された樹状細胞、さらには抗原ペプチドを含むがん治療剤などの医薬を提供する。

[0059] 医薬がCD4陽性ヘルパーT細胞を含むがん治療剤である場合、治療対象となるがんは、がん細胞において、CD4陽性T細胞に特異的に認識される抗原を発現するがん細胞であることが望ましい。例えば、CD4陽性ヘルパーT細胞がb3a2を特異的に認識するTCRを保有する場合、治療対象は、b3a2を発現するがん細胞であり、BCR/ABLキメラ遺伝子を有する染色体（フィラデルフィア染色体）を原因とする白血病である。

[0060] CD4陽性ヘルパーT細胞により活性化された樹状細胞は、当該CD4陽性ヘルパーT細胞によって認識される抗原以外であっても、提示することによって当該抗原を認識するリンパ球（例えば、CD8陽性T細胞）を活性化することが可能

である。従って、樹状細胞を含むがん治療剤の対象となるがんは特に限定されない。

[0061] 樹状細胞を含む治療剤である場合、活性化された樹状細胞をそのまま治療剤としてもよいが、がん治療に関しては、樹状細胞に腫瘍抗原を提示させるために、がん細胞のcell lysate（細胞溶解物）と混合、ペプチドで接触、または腫瘍抗原遺伝子を導入する方法などにより抗原を提示させた樹状細胞をがん治療剤として用いてもよい。

[0062] 当該がん治療剤の患者への投与方法としては、例えば、製造されたCD4陽性ヘルパーT細胞、および／または上述の方法によって活性化された樹状細胞を生理食塩水等に懸濁させ、患者の筋組織に直接移植する方法、または、樹状細胞を生理食塩水等に懸濁させ、静脈注射する方法などが挙げられる。

実施例

[0063] 本発明を以下の実施例でさらに具体的に説明するが、本発明の範囲はそれら実施例に限定されないものとする。

[0064] 材料と方法

ペプチド、サイトカイン、および化合物

ＨＬＡ－ＤＲ９（ＤＲＢ１＊０９：０１）拘束性ｂ３ａ２タイプＢＣＲ－ＡＢＬ接合部ペプチド（ＡＴＧＦＫＱＳＳＫＡＬＱＲＰＶＡＳ：配列番号１）

ＨＬＡ－Ａ２４（Ａ＊２４：０２）拘束性改変型Ｗｉｌｍｓ　ｔｕｍｏｒ（ウィルムス腫瘍）１（ＷＴ１）$_{235}$～$_{243}$エピトープペプチド（ＣＹＴＷＮＱＭＮＬ：配列番号２）

ＨＬＡ－ＤＲ５３（ＤＲＢ４＊０１：０３）拘束性グルタミン酸デカルボキシラーゼ６５（ＧＡＤ６５）$_{113}$～$_{131}$ペプチド（ＤＶＭＮＩＬＬＱＹＶＶＫＳＦＤＲＳＴＫ：配列番号４）

改変型ＷＴ１$_{235}$～$_{243}$ペプチドでは天然型ＷＴ１$_{235}$～$_{243}$ペプチドのアミノ酸位置２のＭにＹが置換された（ＣＹＴＷＮＱＭＮＬ：配列番号２）

組換えヒト（ｒｈ）型ＩＬ－２、ｒｈ型ＩＬ－４、およびｒｈ型顆粒球マ

クロファージコロニー刺激因子（ＧＭ－ＣＳＦ）（プライミューン）

ｒｈ型ＩＬ－７、ｒｈ型ＩＬ－１５、およびｒｈ型ＦＭＳ様チロシンキナーゼ３リガンド（ＦＬＴ３Ｌ）（Ｐｅｐｒｏｔｅｃ）

ｒｈ型塩基性線維芽細胞増殖因子（ｂＦＧＦ）およびフィトヘマグルチニン－Ｐ（ＰＨＡ－Ｐ）（和光純薬工業）

ｒｈ型血管内皮細胞増殖因子（ＶＥＧＦ）およびｒｈ型幹細胞因子（ＳＣＦ）（Ｒ＆Ｄ　ｓｙｓｔｅｍｓ）

ペニシリン殺滅ストレプトコッカス・ピオゲネス（Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｕｓ　ｐｙｏｇｅｎｅｓ）（ＯＫ４３２）（中外製薬）

[0065] 細胞

末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）は健康なドナーから単離されたものを用いた（Eur J Immunol 38:1012-1023., 2008）。ヒト単球由来樹状細胞（ＤＣ）をJ Immunol 183:201-208., 2009の記載に従って誘導した。ヒトＣＭＬ細胞株Ｋ５６２、ヒト骨髄性白血病細胞株ＴＨＰ－１、およびヒト肺ガン細胞株ＰＣ９を商業的に入手可能なものを用いた。ＨＬＡクラスＩＩ遺伝子が形質移入されたマウスＬ線維芽細胞を使用した（Hum Immunol 59:549-560.1998）。健康な成人から単離された細胞を使用するために全てのドナーからインフォームドコンセントを得た。ヘルシンキ宣言に従い、且つ、適切な各施設の倫理委員会の承認を得て全研究を実施した。

[0066] ＨＬＡクラスＩＩ拘束性抗原特異的ＣＤ４$^{\pm}$Ｔ細胞クローンに由来するｉＰＳＣの作製

Cell Stem Cell 12:114-126.2013の記載に従ってｐＳｅＶ［ＫＯＳＭ３０２Ｌ］（産業技術総合研究所（ＡＩＳＴ）の中西博士より入手）を使用するセンダイウイルスシステムによるリプログラミング因子の形質導入によってＨＬＡ－ＤＲ９拘束性ｂ３ａ２特異的ＣＤ４$^{+}$Ｔｈ１クローン（ＳＫ）（Ueda N, Cell Mol Immunol.2016）およびＨＬＡ－ＤＲ５３拘束性ＧＡＤ６５$_{113}$～$_{131}$ペプチド特異的ＣＤ４$^{+}$Ｔｈクローン（ＳＡ３２．５）（Hum Immunol 59:549-560.1998）をｉＰＳＣに再プログラム化した。なお、これらのｉＰＳＣクロ

ーンは残留性導入遺伝子に関して陰性であり、免疫不全マウスにおける多能性関連分子の発現とテラトーマ形成を特徴とする多能性を示し、且つ、正常な核型を有することが確認された（図は示さず）。

[0067] ｉＰＳＣからのＴ細胞分化

ｉＰＳＣをCell Stem Cell. 12(1):114-126, 2013に記載の方法によってＴ細胞に分化させた。具体的には、ｉＰＳＣ塊をＣ３Ｈ１０Ｔ１／２フィーダー細胞上に移し、ｒｈ型ＶＥＧＦを含むＥＢ（胚様体）培地中で培養した。７日目にｒｈ型ＳＣＦとｒｈ型ＦＬＴ３Ｌを添加した。１４日目に造血前駆細胞を回収し、ＯＰ９－ＤＬ１細胞上に移し、ｒｈ型ＩＬ－７とｒｈ型ＦＬＴ３Ｌが存在するＯＰ９培地中で共培養した。３５日目に同種ＰＢＭＣを抗原提示細胞（ＡＰＣ）として使用してｒｈ型ＩＬ－７（10ng/ml）とｒｈ型ＩＬ－１５（10ng/ml）の存在下で、Ｔ細胞をＰＨＡ－Ｐによって１４日間隔で刺激した。

[0068] フローサイトメトリーと機能アッセイに使用された抗体

ＨＬＡ－Ａ＊２４：０２／ＷＴ１$_{235}$～$_{243}$四量体がＷＴ１ペプチド特異的細胞傷害性Ｔリンパ球（ＣＴＬ）の検出のために使用され、ＨＬＡ－Ａ＊２４：０２／ＨＩＶＥｎｖ$_{584}$～$_{592}$四量体が陰性対照として使用された。ＦＡＣＳＣａｌｉｂｕｒフローサイトメーターとＦＡＣＳＡｒｉａ　ＩＩフローサイトメーター（ＢＤ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ）を使用して染色済みの細胞試料を分析し、ＦｌｏｗＪｏソフトウェアプログラム（Ｔｒｅｅ　Ｓｔａｒ、アシュランド、オレゴン州、米国）を使用してデータを処理した。アイソタイプ対照の平均蛍光強度（ＭＦＩ）に対する特定のマーカーのＭＦＩの比率として相対蛍光強度（ＲＦＩ）を算出した。

[0069] 形質移入体

ＨＬＡ－ＤＲ９（ＤＲＢ１＊０９：０１）をコードするｃＤＮＡがこれまでに記載されている（Ueda N, Cell Mol Immunol.2016）。ＢＣＲ－ＡＢＬｐ２１０をコードするｃＤＮＡをＡｄｄｇｅｎｅ（ケンブリッジ、マサチューセッツ州、米国）から購入した。ＢＣＲ－ＡＢＬ　ｐ２１０、ＨＬＡ－Ａ

２４（Ａ＊２４：０２）、ＨＬＡ－ＤＲＡ、またはＨＬＡ－ＤＲ９をコードするｃＤＮＡ、またはＨＬＡ－Ａ２４拘束性改変型ＷＴ１$_{235}$～$_{243}$エピトープをコードするミニ遺伝子をレンチウイルスベクターＣＳＩＩ－ＥＦ－ＭＣＳ（理研バイオリソースセンター、筑波、日本）に挿入した。レンチウイルス形質導入をZhang, R., Cancer Immunol Res 2015の記載にしたがって実施した。ＨＬＡ－Ａ＊２４：０２を発現させるためのレンチウイルスベクター、および改変型ＷＴ１$_{235}$～$_{243}$エピトープをコードするミニ遺伝子を発現させるためのレンチウイルスベクターをルシフェラーゼ遺伝子発現性Ｋ５６２株（Ｋ５６２－Ｌｕｃ）に形質導入した（Ｋ５６２－Ｌｕｃ－Ａ２４－ＷＴ１ミニ遺伝子細胞）。ＨＬＡ－ＤＲＡ＊０１：０１とＨＬＡ－ＤＲＢ１＊０９：０１および／またはＢＣＲ－ＡＢＬ　ｐ２００を発現させるためのレンチウイルスベクターをＴＨＰ－１株に形質導入した（ＴＨＰ－１－ＤＲ９細胞、ＴＨＰ１－ＤＲ９－ＢＣＲＡＢＬ細胞）。

[0070] Ｔ細胞の機能アッセイ

［^{3}Ｈ］－チミジン取込みアッセイによって細胞増殖を評価した。^{51}Ｃｒ放出アッセイを用いて細胞傷害活性を測定した。培養上清中のサイトカインレベルを酵素結合免疫吸着アッセイ（ＥＬＩＳＡ；ｈＩＦＮ－γ：ｅＢｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ）またはビーズベースマルチプレックス免疫アッセイ（ＢＤサイトメトリック・ビーズアレイ；ＢＤ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ）で評価した。

[0071] Ｔ細胞クローンのＴ細胞抗原受容体（ＴＣＲ）遺伝子再構成の分析

Ｔ細胞またはｉＰＳ－Ｔ細胞の再構成されたＴＣＲ－α鎖とＴＣＲ－β鎖のＶセグメント、Ｄセグメント、およびＪセグメントをJ Immunol 170:947-960.2003の記載に従って特定した。使用した遺伝子セグメント命名法はＩｍＭｕｎｏＧｅｎｅＴｉｃｓ（ＩＭＧＴ）慣用法に従っている。それらのＶセグメント、Ｄセグメント、およびＪセグメントは、得られた配列をオンラインツール（ＩＭＧＴ／Ｖ－ＱＵＥＳＴ）でＩＭＧＴデータベース（ｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．ｉｍｇｔ．ｏｒｇ／）に対して比較することにより特定された

。

[0072] リアルタイムＰＣＲ

ＲＮｅａｓｙ　Ｍｉｃｒｏキット（Ｑｉａｇｅｎ、バレンシア、カリフォルニア州）を使用してｉＰＳＣから全ＲＮＡを抽出した。６ｍｅｒのランダムプライマーと共にハイキャパシティーｃＤＮＡリバーストランスクリプションキット（Ａｐｐｌｉｅｄ　Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ、フォスターシティ、カリフォルニア州、米国）を使用してｃＤＮＡを合成し、続いてＥｘＴａｑＨＳ（Ｔａｋａｒａ、滋賀、日本）を使用してＲＴ－ＰＣＲを行い、ＴａｑＭａｎアレイ・ヒューマンステムセル・プルリポテンシーカード（Ａｐｐｌｉｅｄ　Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ）を使用して定量的ＰＣＲを行った。個々のＰＣＲ反応を１８Ｓ　ｒＲＮＡに対して標準化した。

[0073] ＲＮＡシーケンシング

ＩｌｌｕｍｉｎａシーケンシングＨＶ用ＳＭＡＲＴｅｒウルトラローインプットＲＮＡキット（Ｃｌｏｎｔｅｃｈ、マウンテンビュー、カリフォルニア州、米国)を使用してｃＤＮＡを合成し、その後でローインプットライブラリー・プレップキット（Ｃｌｏｎｔｅｃｈ）を使用してＩｌｌｕｍｉｎａライブラリーを調製した。１０１サイクル・シングルリードモードでＨｉＳｅｑ　２５００を使用してそれらのライブラリーをシーケンシングした。ＣＡＳＡＶＡ　１．８．２パイプライン中のＢＣＬ２ＦＡＳＴＱコンバージョンソフトウェア　１．８．４を使用して全ての配列リードをＦＡＳＴＱフォーマットで抽出した。２０１２年１２月１０日にダウンロードされたｈｇ１９基準ゲノムに対してＴｏｐＨａｔ　ｖ２．０．８ｂを使用してそれらの配列リードをマップし、ＲＰＫＭｆｏｒＧｅｎｅｓを使用してそれらの配列リードを定量した。そのデータはＮＣＢＩジーンエクスプレッションオムニバスに預託されている（ｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．ｎｃｂｉ．ｎｌｍ．ｎｉｈ．ｇｏｖ／ｇｅｏ／、受託番号ＧＳＥ９４３３２）。ＣＤ１６１とｃ－Ｋｉｔの発現に基づいてｉＰＳ－Ｔ細胞の亜集団を獲得し、それらの亜集団の遺伝子発現プロファイルをＮＫ細胞、ＩＬＣ１、ＩＬＣ２、ＩＬＣ３、αβ－Ｔ細

胞、およびγδ－Ｔ細胞に対して比較した。ＮＫ細胞、ＩＬＣ１、ＩＬＣ２、ＩＬＣ３、αβ－Ｔ細胞、およびγδ－Ｔ細胞は健康なドナーのＰＢＭＣから分離された。パスウェイ解析のために平均発現レベルの倍率変化を計算することによって差次的に発現する遺伝子を明らかにした（｜ｌｏｇ２ＦＣ｜≧１）。データ解析ソフトＲバージョン３．２．２のｏｒｇ．Ｈｓ．ｅｇ．ｄｂ　３．２．３を使用して超幾何分布検定を実施し、アノテーションパッケージＧＯ．ｄｂ　３．２．２と併せてＧＯｓｔａｔｓ　２．３６．０（ジーンオントロジー解析）を使用し、およびアノテーションパッケージＫＥＧＧ．ｄｂ　３．２．２と併せてＫＥＧＧｐｒｏｆｉｌｅ　１．１２．０（ＫＥＧＧパスウェイ解析）を使用した。

[0074] ＣＴＬ感作アッセイと細胞傷害性アッセイ

ｂ３ａ２特異的Ｔ細胞クローン（ＳＫ）の樹立に使用したドナーと同じドナーから$CD8^+$Ｔ細胞およびＤＣを得た。アロ反応性応答を回避するためにそれらの細胞を使用して抗原特異的ＣＴＬを誘導した。$CD8^+$Ｔ細胞単離キット（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ　Ｂｉｏｔｅｃ）を使用することにより負の磁気細胞選別を介してＰＢＭＣから$CD8^+$Ｔ細胞を単離した。９６ウェル丸底プレート中、ｂ３ａ２ペプチドの存在、非存在下でＤＣを３時間にわたって培養し、その後、元の$CD4^+$Ｔｈ１クローン（ＳＫ）または再分化させたＳＫをその培養物に添加し、５時間にわたって培養した。３０Ｇｙでの放射線照射の後に$WT1_{235\sim243}$ペプチドと共に$CD8^+$Ｔ細胞を添加した。７日目に１μＣｉの［^3H］－チミジンをそれらの培養物に添加し、１６時間の培養の後に［^3H］－チミジン取込みアッセイを用いることにより$CD8^+$Ｔ細胞の増殖応答を評価した。１０日目に同じ様に実験をもう一度実施した。ＨＬＡ－Ａ＊２４０２／$WT1_{235\sim243}$四量体で染色することにより$WT1_{235\sim243}$ペプチド特異的ＣＴＬの頻度を決定した。３５Ｇｙの放射線を照射した自家ＰＢＭＣの存在下で$WT1_{235\sim243}$ペプチドで得られた$CD8^+$Ｔ細胞を再刺激した。後にそれらの細胞を細胞傷害性アッセイとインビボ実験に使用した。

[0075] インビボ実験

全てのインビボ動物実験は京都大学の動物実験委員会により承認された。６週齢のメスのＮＯＤ－ＳＣＩＤ　ＩＬ２Ｒγｃ^{null}（ＮＳＧ）マウスをチャールズリバー（横浜、日本）から購入し、Ｋ５６２－Ｌｕｃ－Ａ２４－ＷＴ１ミニ遺伝子細胞（１．０×１０^{5}細胞）と生理食塩水またはＷＴ１特異的ＣＴＬ（１．０×１０^{6}細胞）のどちらかとの混合物を毛刈りした左の脛に皮下（ｓ．ｃ．）接種した。腫瘍成長と生存についてそれらのマウスをモニターした。腫瘍成長を４週間にわたって生物発光イメージングにより毎週モニターし、且つ、マウスが死ぬか、または腫瘍の直径が２５ｍｍを超えたときに殺処理されるまで外側キャリパー測定により腫瘍成長を毎週モニターした。

[0076] インビボ生物発光イメージング

腫瘍担持マウスに２％吸入イソフルラン麻酔下で２００μｌのＤ－ルシフェリン（１５ｍｇ／ｍｌ、ＶｉｖｏＧｌｏルシフェリン；Ｐｒｏｍｅｇａ、マジソン、ウィスコンシン州、米国）を注入し、Ｌｉｖｉｎｇ　Ｉｍａｇｅソフトウェア　３．２とＩＶＩＳ　Ｌｕｍｉｎａ　ＩＩ（Ｘｅｎｏｇｅｎ、アラメダ、カリフォルニア州、米国)を使用して生物発光画像を得た。

[0077] 統計分析

ＳＴＡＴＡバージョン１３．０（ＳｔａｔａＣｏｒｐ　ＬＰ、カレッジステーション、テキサス州、米国）を全ての統計分析に使用した。複数の実験群を比較するためにボンフェローニのポストホック検定と共に一元配置分散分析を用いて有意性を評価した。２つの実験群を比較するためには独立ｔ検定（両側型）を用いた。カプランマイヤー生存曲線の統計分析のためにログランク（マンテル・コックス）検定を用いてＰ値を算出した。０．０５未満のＰ値を統計学的に有意と考え、図の中で星印によって示している。

[0078] 結果

ＣＤ４$^{±}$Ｔｈ１クローン由来ｉＰＳＣから分化したＴ系列細胞の自然リンパ球（ＩＬＣ）

様特性

Ｔ細胞再生プロトコル（図１Ａ）を使用してＣＤ４$^{+}$Ｔｈ１クローン（ＳＫ

）由来ｉＰＳＣからＣＤ３$^{+}$ＣＤ４５$^{+}$ＣＤ５$^{dim+}$ＣＤ７$^{+}$ＣＤ８α^{dim+}ＣＤ８β^{-}の細胞を得た（図１Ｂ左のパネル）。それらの細胞は細胞処理期間を通してＣＤ４を発現せず、ＣＤ５６、ＣＤ１６１、ＮＫＧ２Ｄ、ｃ－Ｋｉｔ、ＮＫｐ３０、ＮＫｐ４４、ＮＫｐ４６、およびＤＮＡＭ－１を含む幾つかのＩＬＣマーカーを不均一に発現した（図１Ｂ、右のパネル）。それらのＩＬＣマーカーの不均一な発現にもかかわらず、それらの細胞は元のＣＤ４$^{+}$Ｔｈ１クローン（ＳＫ）と同じＴＣＲを一様に発現した（図１Ｃ）。ＣＤ１６１とｃ－Ｋｉｔの発現に基づいてｉＰＳ－Ｔ細胞を４つの亜集団に分け、それらの亜集団の全ＲＮＡ発現を末梢血から単離されたＮＫ細胞、タイプ１ＩＬＣ（ＩＬＣ１）、タイプ２ＩＬＣ（ＩＬＣ２）、タイプ３ＩＬＣ（ＩＬＣ３）、αβ－Ｔ細胞、およびγδ－Ｔ細胞と比較した。その結果、ｉＰＳ－Ｔ細胞は末梢αβ－Ｔ細胞よりもＩＬＣ１、ＮＫ細胞、およびγδ－Ｔ細胞と一致する遺伝的特性を有した（図は示さず）。Ｔ細胞およびｉＰＳ－Ｔ細胞におけるＩＬＣ機能に関連する遺伝子の発現はＮＫ細胞またはＩＬＣ１における発現と同様であった（図１Ｄ）。ジーンオントロジー解析とＫＥＧＧパスウェイ解析によりｉＰＳ－Ｔ細胞、ＮＫ細胞、およびＩＬＣ１における「ＮＫ細胞関連細胞傷害性」関連遺伝子の濃縮が明らかになった（図は示さず）。全ての亜集団のｉＰＳ－Ｔ細胞がαβ－Ｔ細胞と比較して、Ｔ細胞分化の必須転写因子であるＢＣＬ１１Ｂを相対的に低レベルで発現したが、ＩＬＣのための転写因子であるＩＤ２とＰＬＺＦを相対的に高レベルで発現した（図は示さず）。各亜集団はタイプ１、タイプ２、およびタイプ３のＩＬＣの関連遺伝子の統合的発現を示した。全ての亜集団が共通してＮＣＡＭ１、ＮＣＲ１、ＮＣＲ２、ＩＣＯＳ、およびＩＬ１２ＲＢなどのＩＬＣ１関連遺伝子を発現したが、ＮＫ細胞を除く全てのＩＬＣで発現するＩＬ７ＲＡとＩＬ１Ｒを低レベルで発現した（図１Ｅ）。ＴＣＲ非依存性ＮＫ細胞様細胞傷害性が細胞傷害性がｉＰＳ－Ｔ細胞において観察された（図は示さず）。それらのｉＰＳ－Ｔ細胞は元のＣＤ４$^{+}$Ｔｈ１クローン（ＳＫ）と同様に高レベルのＩＦＮ－γを産生し、比較的に低レベルのＩＬ－４を産生し、且つ、ＩＬ－１

７を産生しなかった（図１Ｆ）。さらに、ｉＰＳ－Ｔ細胞は２回のフィトヘマグルチニン（ＰＨＡ）－Ｐ刺激によって数千倍まで増殖し得る（図は示さず）。これらのデータはＣＤ４$^{+}$Ｔｈ１クローンから生成されたｉＰＳ－Ｔ細胞がそれらの細胞のＴＣＲ発現にもかかわらずグループ１ＩＬＣ様特性を有していることを示唆している。

[0079] ＣＤ４導入はｉＰＳＣ由来Ｔ細胞におけるｂ３ａ２特異的応答を拡大する

ＨＬＡクラスＩＩ／ペプチド複合体によるＴ細胞活性化の間にＨＬＡクラスＩＩへのＣＤ４の結合がＴＣＲシグナル伝達を３０～３００倍に促進し、このことによってＣＤ４がＴｈ細胞の完全活性化に重要であると考えられる。我々のｉＰＳ－Ｔ細胞は元のＣＤ４$^{+}$Ｔｈ１クローン（ＳＫ）のときからＨＬＡクラスＩＩ拘束性ＴＣＲを発現したので、ｉＰＳ－Ｔ細胞におけるＣＤ４遺伝子の形質導入によってペプチド刺激によるヘルパーＴ細胞応答が増加するという仮説を立てた。それ故、我々はT細胞をPHA刺激して増殖が最大となった時点でレトロウイルスベクター pDON-AI2（タカラバイオ）によってＣＤ４遺伝子を形質導入した（図２Ａ）。

[0080] ＣＤ４形質導入ｉＰＳ－Ｔ細胞（ＣＤ４$^{+}$ｉＰＳ－Ｔ細胞）は抗原依存性増殖応答とＨＬＡ－ＤＲ９拘束性サイトカイン産生を示した（図２Ｂ～Ｄ）。ＣＤ４$^{+}$ｉＰＳ－Ｔ細胞のその抗原特異性とＨＬＡクラスＩＩ拘束は元のＣＤ４$^{+}$Ｔｈ１クローン（ＳＫ）と一致した（図は示さず）。対照的に、ＣＤ４が形質導入されていないｉＰＳ－Ｔ細胞（モックｉＰＳ－Ｔ細胞）は増殖とＩＦＮ－γ産生の減少を示した（図２Ｂ、Ｃ）。ＣＤ４導入の効果はＨＬＡ－ＤＲ５３拘束性ＧＡＤ６５$_{113}$～$_{131}$ペプチド特異的ＣＤ４$^{+}$Ｔｈクローン（ＳＡ３２．５）に由来するｉＰＳ－Ｔ細胞においても確認された（図は示さず）。次にｂ３ａ２ペプチドまたはベヒクルが負荷されたＴＨＰ－１－ＤＲ９細胞で刺激されたモックｉＰＳ－Ｔ細胞とＣＤ４$^{+}$ｉＰＳ－Ｔ細胞の全遺伝子発現プロファイルを分析した。ｂ３ａ２ペプチドによって刺激されたＣＤ４$^{+}$ｉＰＳ－Ｔ細胞の遺伝子発現プロファイルが、ｂ３ａ２ペプチドによって刺激されておらず、且つ／またはＣＤ４が形質導入されていない細胞の遺伝子発

現プロファイルと区別された（図２Ｅ）。ｂ３ａ２刺激モックｉＰＳ－Ｔ細胞と比較してｂ３ａ２刺激ＣＤ４$^{+}$ｉＰＳ－Ｔ細胞において細胞増殖のカテゴリーが著しく発現上昇することがジーンオントロジー解析により明らかになった（図は示さず）。これらのデータは、ｂ３ａ２ペプチド特異的応答およびＨＬＡクラスＩＩ拘束性応答を発現する拡大された能力がＣＤ４遺伝子導入によってｉＰＳ－Ｔ細胞に与えられることを示している。

[0081] 効率的にＴヘルパー（Ｔｈ）機能を発揮するＣＤ４０Ｌ^{high}集団の特定

活性化ＣＤ４$^{+}$Ｔｈ細胞上でのＣＤ４０Ｌ発現はＤＣの成熟に重要であり、成熟したＤＣは抗原特異的ＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞の効果的な活性化と生存度の上昇のための共刺激シグナルを提供する。我々はリガンド（ＩＬ－２、ＩＬ－４、ＩＬ－７、ＩＬ－９、ＩＬ－１５、ＩＬ－２１）特異的受容体とペアになるＩＬ－２受容体サブユニットγ（共通γ鎖）で刺激されることによりｉＰＳ－Ｔ細胞がＣＤ４０Ｌを発現する可能性があるという仮説を立て、共通γ鎖サイトカインの幾つかの組合せでｉＰＳ－Ｔ細胞を培養した結果、ＩＬ－２（添加濃度100 IU/ml）とＩＬ－１５（添加濃度5ng/ml）の条件がＣＤ４０Ｌ発現を増加させることを発見した（図３Ａ、Ｂ）。

[0082] ＩＬ－２／１５誘導性のＣＤ４０Ｌ^{high}集団とＣＤ４０Ｌ^{low}集団を分離し、フィトヘマグルチニン（ＰＨＡ）－Ｐ刺激によって増殖させた。モックｉＰＳ－Ｔ細胞とＣＤ４$^{+}$ｉＰＳ－Ｔ細胞に由来するＣＤ４０Ｌ^{high}集団とＣＤ４０Ｌ^{low}集団の各々がＩＬ－２とＩＬ－１５の存在下でＴＣＲ－Ｖｂ２２を発現し、且つ、それらの集団のＣＤ４０Ｌ発現レベルを維持した（図３Ｃ、Ｄ）。抗ＣＤ３抗体で刺激されるとＣＤ４０Ｌ^{high}ｉＰＳ－Ｔ細胞だけがＣＤ４０Ｌの発現を上昇させた（図３Ｅ、Ｆ）。ＣＤ４０Ｌ^{high}ＣＤ４$^{+}$ｉＰＳ－Ｔ細胞はＣＤ４０Ｌ^{low}ＣＤ４$^{+}$ｉＰＳ－Ｔ細胞が産生するレベルよりも高いレベルのＩＦＮ－γとＴＮＦ－αを産生したが、それらの２集団のＩＬ－２、ＩＬ－４、ＩＬ－６、ＩＬ－１０、およびＩＬ－１７産生は低レベルであった（図３Ｇ）。

[0083] ｂ３ａ２ペプチド負荷ＤＣで刺激されるとＩＦＮ－γとＴＮＦ－αの産生

がＣＤ４とＣＤ４０Ｌの共発現によって相乗的に増加し、追加的なＴｈ１に偏ったサイトカインプロファイルが示された（図は示さず）。さらに、ＢＣＲ－ＡＢＬ　ｐ２１０タンパク質を発現するＴＨＰ－１－ＤＲ９細胞とＣＤ４０Ｌ^{high}ＣＤ４$^{+}$ｉＰＳ－Ｔ細胞を共培養すると、それらのｉＰＳ－Ｔ細胞はＩＦＮ－γとＴＮＦ－αを産生し、自然界でプロセッシングを受けたＢＣＲ－ＡＢＬ　ｐ２１０エピトープに応答するそれらの細胞の能力が示唆された（図３Ｈ、Ｉ）。また、ＣＤ４０Ｌ^{high}ＣＤ４$^{+}$ｉＰＳ－Ｔ細胞はＣＤ３発現、ＣＤ５^{dim}発現、ＣＤ７発現、およびＣＤ８α発現に影響せずに反復性の刺激に対して増殖する能力を有している（図は示さず）。ＣＤ４０Ｌ発現に関連する同様の発見がＨＬＡ－ＤＲ５３拘束性ＧＡＤ６５$_{113}$～$_{131}$ペプチド特異的ＣＤ４$^{+}$Ｔｈクローン（ＳＡ３２．５）に由来するｉＰＳ－Ｔ細胞においても得られた（図は示さず）。まとめると、ＴＣＲ刺激によってＣＤ４０Ｌ発現を増加させることが可能であり、且つ、抗原ペプチド刺激に応答する優れた能力を有するＣＤ４$^{+}$ｉＰＳ－Ｔ細胞集団が特定された。

[0084] 次にＤＣ成熟を誘導するＣＤ４$^{+}$ｉＰＳ－Ｔ細胞の細胞性アジュバント機能を分析した。ｂ３ａ２ペプチドで予備パルス処理された未成熟ＤＣとＣＤ４０Ｌ^{high}ＣＤ４$^{+}$ｉＰＳ－Ｔ細胞を共培養すると、このｉＰＳ－Ｔ細胞はＯＫ４３２誘導性成熟と同等の完全成熟をＤＣに誘導した（図４Ａ）。対照的に、ＣＤ４０Ｌ^{low}ＣＤ４$^{+}$ｉＰＳ－Ｔ細胞によるＤＣ成熟は機能しなかった（図４Ａ）。さらに、ＣＤ４０Ｌ^{low}モックｉＰＳ－Ｔ細胞は、おそらくはＣＤ４の不在に起因するＨＬＡクラスＩＩ／ペプチド複合体認識不全によってＤＣ成熟の誘導に失敗した（図４Ａ）。ＣＤ４０Ｌ^{high}ＣＤ４$^{+}$ｉＰＳ－Ｔ細胞は、ＮＫ細胞、Ｔｈ細胞、およびＣＴＬの活性化と遊走にとって重要な可溶性因子であるＩＬ－１２ｐ７０、ＣＸＣＬ９、およびＣＸＣＬ１１の産生も増加させた（図４Ｂ）。ＣＤ４０Ｌ^{high}ＣＤ４$^{+}$ｉＰＳ－Ｔ細胞はＤＣ成熟の誘導に優れた能力を有することがこれらのデータによって示されている。

[0085] ＣＤ４０Ｌ^{high}ＣＤ４$^{\pm}$のｉＰＳＣ由来Ｔ細胞はＴＣＲ非依存性細胞傷害性を減少させた

ＣＤ４$^{+}$Ｔｈ１クローン（ＳＫ）由来ｉＰＳ－Ｔ細胞は抗原非依存性細胞傷害性をＴＨＰ－１株に対して示した（図５Ａ）。ＴＨＰ－１株に対するその細胞傷害性はパーフォリンとＤＮＡＭ－１に部分的に依存した（図５Ｂ、５Ｃ）。ＩＬ－２／ＩＬ－１５によって順化されたＣＤ４０Ｌ^{high}ＣＤ４$^{+}$ｉＰＳ－Ｔ細胞はＣＤ４０Ｌ^{low}ＣＤ４$^{+}$ｉＰＳ－Ｔ細胞と比較して低下したＤＮＡＭ－１とＮＫＧ２Ｄの発現を示した（図５Ｄ）。そのＤＮＡＭ－１とＮＫＧ２Ｄの発現低下と一致して、ＣＤ４０Ｌ^{high}ＣＤ４$^{+}$ｉＰＳ－Ｔ細胞はＴＨＰ－１－ＤＲ９細胞に対してｂ３ａ２特異的細胞傷害性を維持する一方でＮＫ細胞様細胞傷害性を低下させた（図５Ｅ）。ＣＤ４０Ｌ^{high}ＣＤ４$^{+}$ｉＰＳ－Ｔ細胞はＤＮＡＭ－１発現を減少させることにより抗原非依存性細胞傷害性を低下させたことがこれらのデータによって示されている。

[0086] ＣＤ４０Ｌ^{high}ＣＤ４$^{\pm}$のｉＰＳＣ由来Ｔ細胞は白血病抗原特異的ＣＴＬの一次増殖を効率的に誘導する

ＣＤ４$^{+}$Ｔｈ細胞はＤＣ活性化を介したＨＬＡクラスＩ拘束性ＣＤ８$^{+}$ＣＴＬの感作を支援する。ＣＤ４０Ｌ^{high}ＣＤ４$^{+}$ｉＰＳ－Ｔ細胞が白血病抗原特異的ＣＴＬ応答を誘導する能力を有するかを決定するため、溶媒のみまたはｂ３ａ２ペプチドが負荷されたＤＣをＣＤ４０Ｌ^{high}ＣＤ４$^{+}$ｉＰＳ－Ｔ細胞と共に培養し、これらの順化されたＤＣにＷＴ１$_{235}$～$_{243}$ペプチドを負荷し、放射線照射し、その後でＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞と共に培養した（図６Ａ）。７日間の培養の後にＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞の増殖を評価した。ＣＤ４０Ｌ^{high}ＣＤ４$^{+}$ｉＰＳ－Ｔ細胞／ｂ３ａ２ペプチド順化ＤＣ共培養物がＡＰＣとして使用されたとき、ＷＴ１$_{235}$～$_{243}$ペプチドで刺激されると顕著に向上したＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞の増殖が観察された（図６Ｂ）。対照的に、ＣＤ４０Ｌ^{low}ＣＤ４$^{+}$ｉＰＳ－Ｔ細胞／ｂ３ａ２順化ＤＣ共培養物もＣＤ４０Ｌ^{low}モックｉＰＳ－Ｔ細胞／ｂ３ａ２順化ＤＣ共培養物もＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞の増殖を誘導しなかった（図６Ｃ、Ｄ）。ＣＤ４０Ｌ^{high}ＣＤ４$^{+}$ｉＰＳ－Ｔ細胞／ｂ３ａ２ペプチド順化ＤＣ共培養物によって刺激されたそれらのＣＴＬはＷＴ１四量体陽性Ｔ細胞を高頻度で含んでいた（図６Ｅ）。ＷＴ１ペプチド特異的ＣＴＬが３回のＷＴ１ペプチドによる反復刺激に

よってさらに増殖した（図６Ｆ）。それらの増殖したＷＴ１特異的ＣＴＬは細胞傷害活性をＷＴ１ペプチド負荷ＨＬＡ－Ａ２４発現性Ｋ５６２細胞に対して示したが、溶媒のみ負荷細胞に対しては示さなかった（図６Ｇ）。これらのデータは細胞性アジュバント特性を発揮するＣＤ４０Ｌ^{high}ＣＤ４$^{+}$ｉＰＳ－Ｔ細胞のｂ３ａ２ペプチドによる活性化によってＤＣ活性化を介して白血病抗原特異的ＣＴＬ応答を増加させることができることを示しており、このことは元のＣＤ４$^{+}$Ｔｈ１クローン（ＳＫ）のＴヘルパー機能と一致する（図は示さず）。

[0087] ＣＤ４０Ｌ^{high}ＣＤ４$^{\pm}$のｉＰＳＣ由来Ｔ細胞とＤＣの相互作用によって刺激されたＷＴ１特異的ＣＴＬは抗白血病作用をインビボで発揮する

感作済みのＷＴ１ペプチド特異的ＣＴＬが抗白血病作用をインビボで発揮するか調べるため、ＷＴ１ペプチド特異的ＣＴＬを伴って、または伴わずにＷＴ１エピトープ発現性Ｋ５６２細胞をＮＳＧマウスに皮下注入した。腫瘍成長を生物発光イメージングと外側キャリパー測定によって毎週モニターした。ＷＴ１ペプチド特異的ＣＴＬの存在下では腫瘍成長が著しく抑制され（図７Ａ、Ｂ）、マウスの生存が著しく延長した（図７Ｃ）。ＣＤ４０Ｌ^{high}ＣＤ４$^{+}$ｉＰＳ－Ｔ細胞とＤＣの相互作用によって刺激された白血病抗原特異的ＣＴＬは効果的な抗白血病作用を発揮することができる。

請求の範囲

[請求項1] ヘルパーT細胞の製造方法であって、下記の工程を含む方法；

（i）多能性幹細胞から誘導され、かつ、CD4遺伝子またはその遺伝子産物が導入されたT細胞をIL-2およびIL-15を含む培養液中で培養する工程、および

（ii）（i）で得られた細胞からCD40L高発現T細胞を選別する工程。

[請求項2] IL-2の濃度が10～500 IU/mLであり、IL-15の濃度が1～50 ng/mLである、請求項１に記載の方法。

[請求項3] 前記多能性幹細胞からのT細胞の誘導は、次の（１）及び（２）の工程を含む方法により行われた、請求項１または２に記載の方法；

（１）多能性幹細胞からCD34陽性造血前駆細胞を誘導する工程、

（２）前記工程（１）で得られたCD34陽性造血前駆細胞をＦＬＴ３Ｌおよびｌｌ－７の存在下で培養する工程。

[請求項4] 前記工程（１）が多能性幹細胞をC3H10T1/2と共培養した後、ＶＥＧＦ、ＦＬＴ３ＬおよびＳＣＦの存在下でC3H10T1/2と共培養する工程である、請求項３に記載の方法。

[請求項5] 前記工程（２）が、前記CD34陽性造血前駆細胞をストローマ細胞と共培養する工程である、請求項３または４に記載の方法。

[請求項6] 前記多能性幹細胞からのT細胞の誘導は、下記（３）の工程をさらに含む方法により行われた、請求項３～５のいずれか一項に記載の方法；

（３）前記工程（２）で得られた細胞をｌＬ－７およびｌＬ－１５の存在下で末梢血単核球と共培養する工程。

[請求項7] 前記多能性幹細胞からのT細胞の誘導は、前記工程（２）で得られた細胞をマイトジェンと接触させる工程および/または前記工程（３）で得られた細胞をマイトジェンと接触させる工程をさらに含む方法により行われた、請求項３～６のいずれか一項に記載の方法。

[請求項8] 前記CD4遺伝子の導入はレトロウイルスベクターを用いて行われた、

請求項１～７のいずれか１項に記載の方法。

[請求項9] 前記多能性幹細胞は再構成された所望のＴＣＲ配列を有する多能性幹細胞である、請求項１から８のいずれか１項に記載の方法。

[請求項10] 前記多能性幹細胞は所望の抗原を認識するリンパ球から誘導されたヒトiPS細胞である、請求項９に記載の方法。

[請求項11] 前記所望の抗原を認識するリンパ球がBCR/ABLを認識するリンパ球である、請求項１０に記載の方法。

[請求項12] in vitroで、請求項１から１１のいずれか１項に記載の方法で製造されたCD4陽性かつCD40L高発現T細胞を含むヘルパーT細胞と単離された樹状細胞とを抗原の存在下で接触させる工程を含む、樹状細胞を活性化する方法。

[請求項13] 多能性幹細胞から誘導されたヘルパーT細胞であって、CD4陽性かつCD40L高発現T細胞を含むヘルパーT細胞。

[請求項14] 請求項１３に記載のヘルパーT細胞を含む医薬。

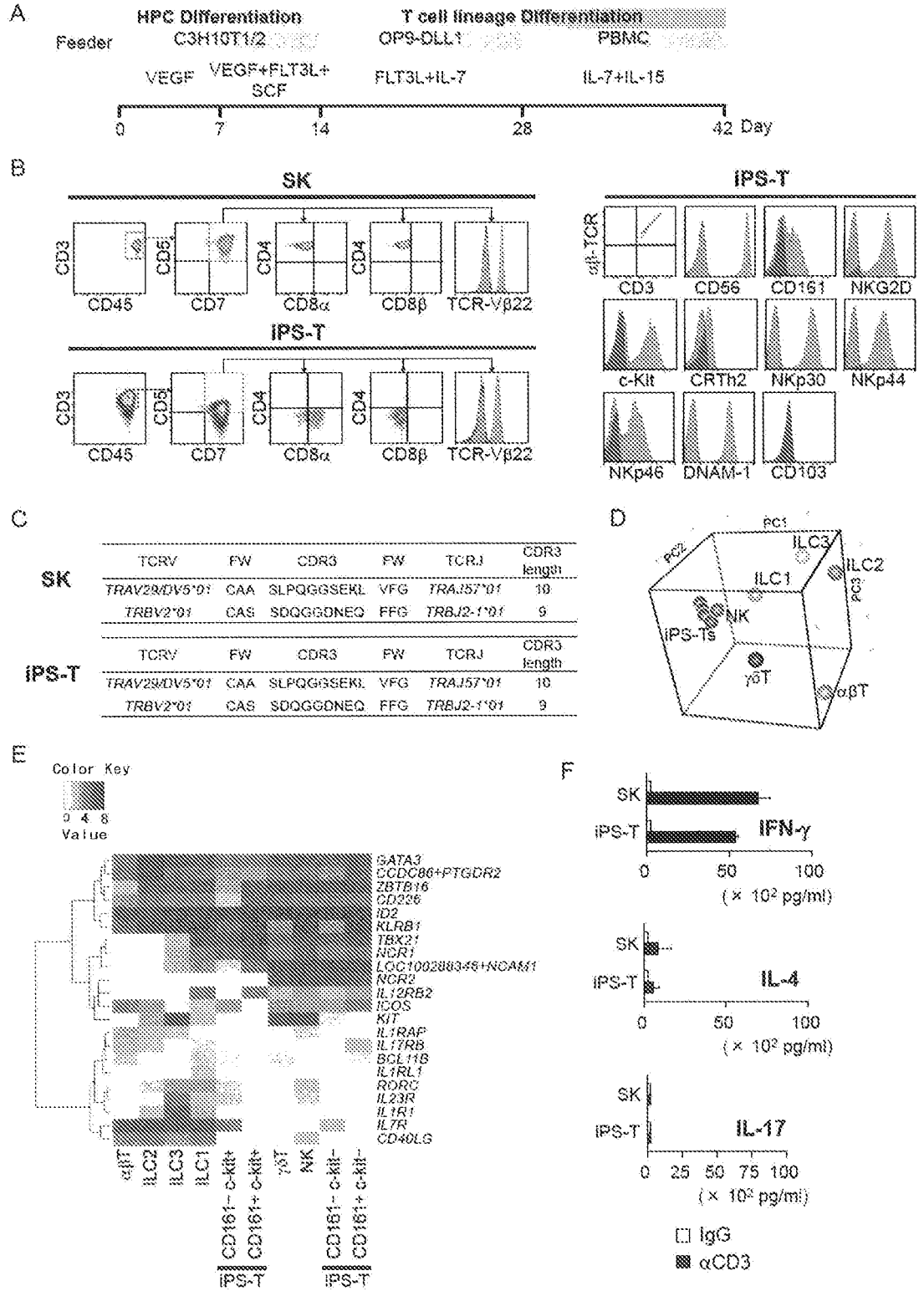
[請求項15] 樹状細胞をさらに含む、請求項１４に記載の医薬。

[請求項16] 抗原をさらに含む、請求項１４または１５に記載の医薬。

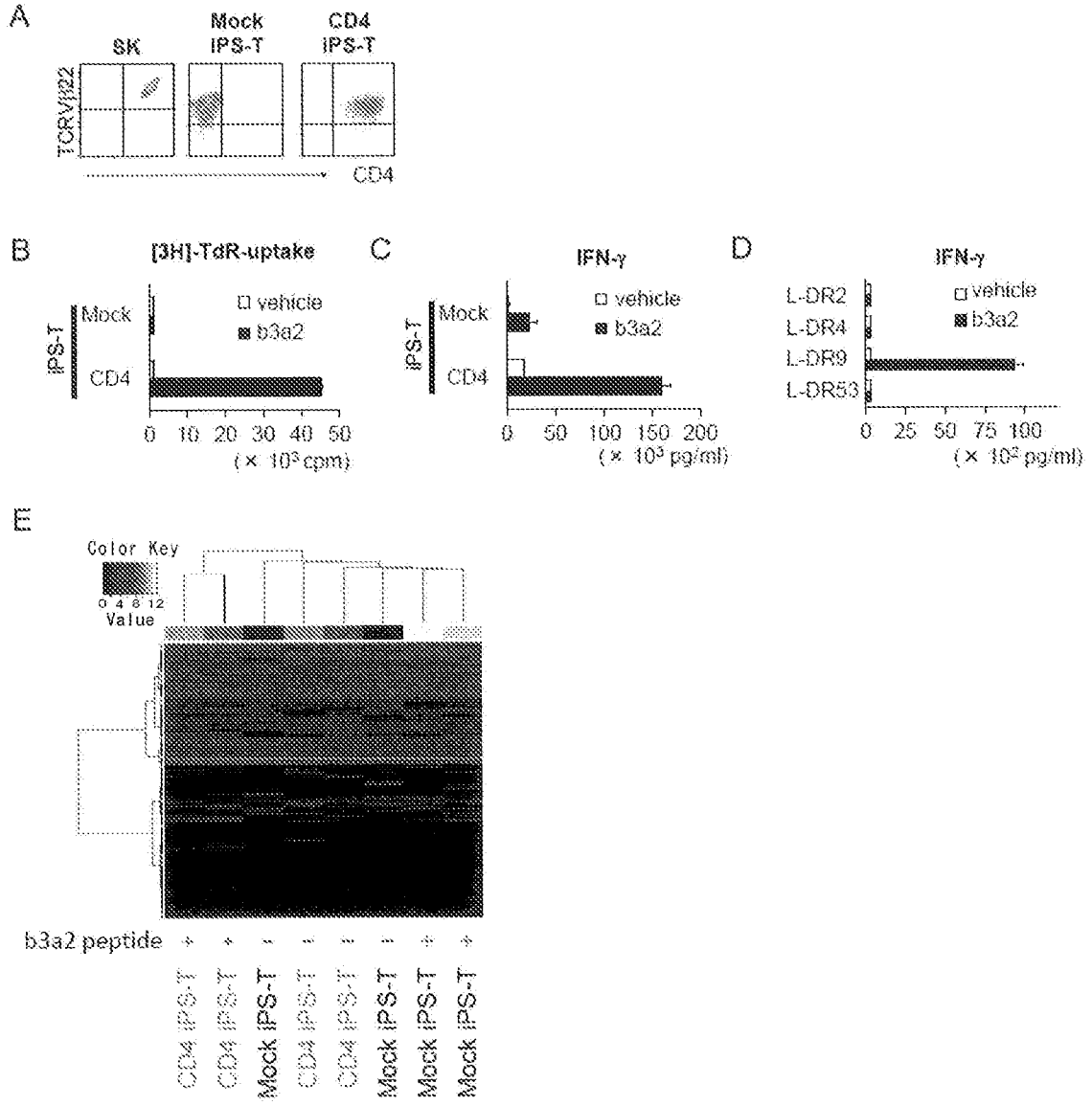
[請求項17] 前記抗原が、BCR/ABLの断片である、請求項１６に記載の医薬。

[請求項18] がん治療剤である、請求項１４～１７のいずれか一項に記載の医薬。

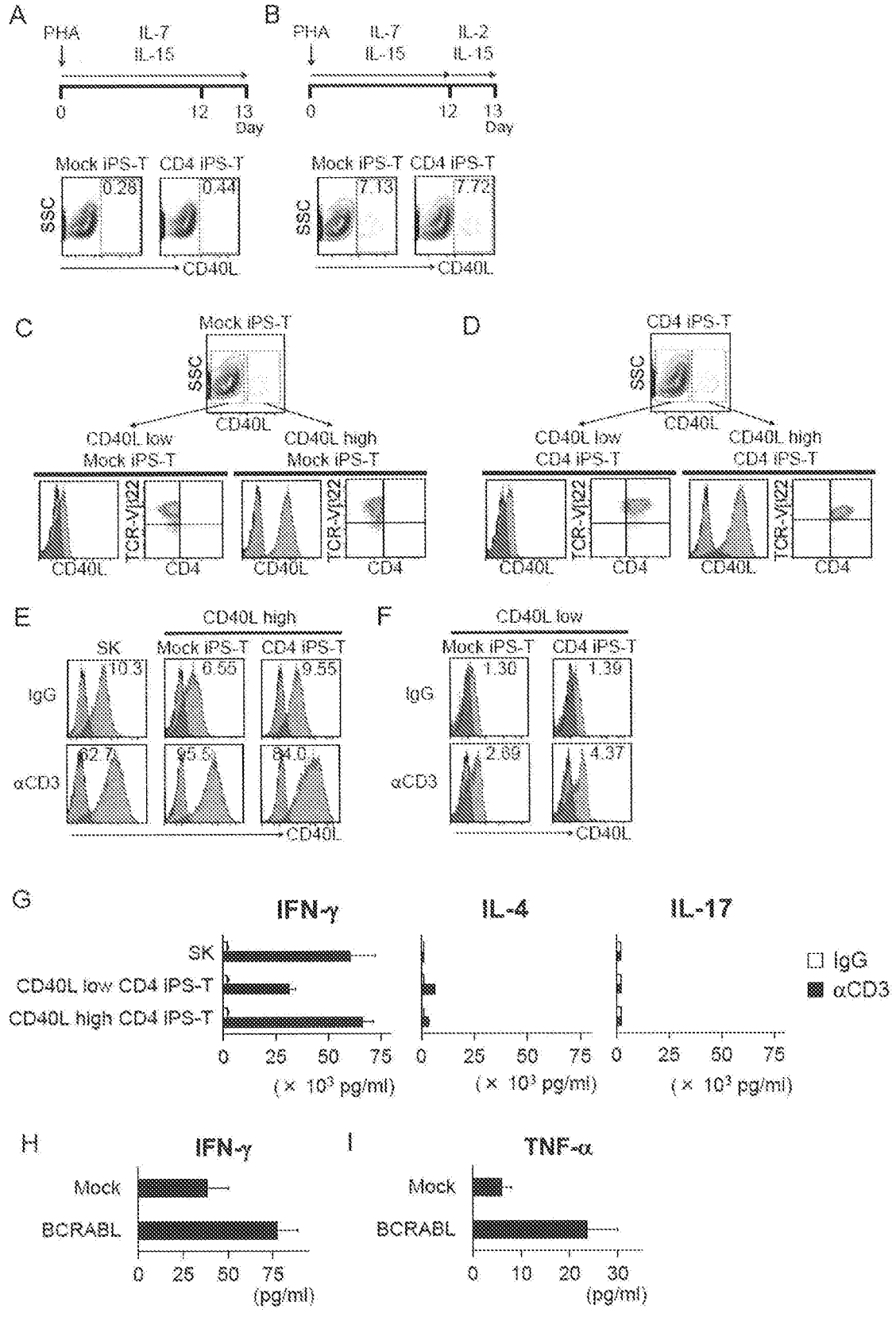
[図1]


A
HPC Differentiation
T cell lineage Differentiation
Feeder
C3H10T1/2
OP9-DLL1
PBMC
VEGF
VEGF+FLT3L+ SCF
FLT3L+IL-7
IL-7+IL-15
0
7
14
28
42 Day
B
SK
iPS-T
CD3
CD5
CD4
CD4
CD45
CD7
CD8α
CD8β
TCR-Vβ22
αβ-TCR
CD3
CD56
CD161
NKG2D
c-Kit
CRTh2
NKp30
NKp44
NKp46
DNAM-1
CD103
C
SK
TCRV FW CDR3 FW TCRJ CDR3 length
TRAV29/DV5*01 CAA SLPQGGSEKL VFG TRAJ57*01 10
TRBV2*01 CAS SDQGGDNEQ FFG TRBJ2-1*01 9
iPS-T
TCRV FW CDR3 FW TCRJ CDR3 length
TRAV29/DV5*01 CAA SLPQGGSEKL VFG TRAJ57*01 10
TRBV2*01 CAS SDQGGDNEQ FFG TRBJ2-1*01 9
D
PC1
PC2
PC3
ILC3
ILC2
ILC1
NK
iPS-Ts
γδT
αβT
E
Color Key
0 4 8
Value
GATA3
CCDC86+PTGDR2
ZBTB16
CD226
ID2
KLRB1
TBX21
NCR1
LOC100288346+NCAM1
NCR2
IL12RB2
ICOS
KIT
IL1RAP
IL17RB
BCL11B
IL1RL1
RORC
IL23R
IL1R1
IL7R
CD40LG
αβT
ILC2
ILC3
ILC1
CD161− c-kit+
CD161+ c-kit+
γδT
NK
CD161− c-kit−
CD161+ c-kit−
iPS-T
iPS-T
F
SK
iPS-T
IFN-γ
0 50 100
(× 10² pg/ml)
SK
iPS-T
IL-4
0 50 100
(× 10² pg/ml)
SK
iPS-T
IL-17
0 25 50 75 100
(× 10² pg/ml)
IgG
αCD3

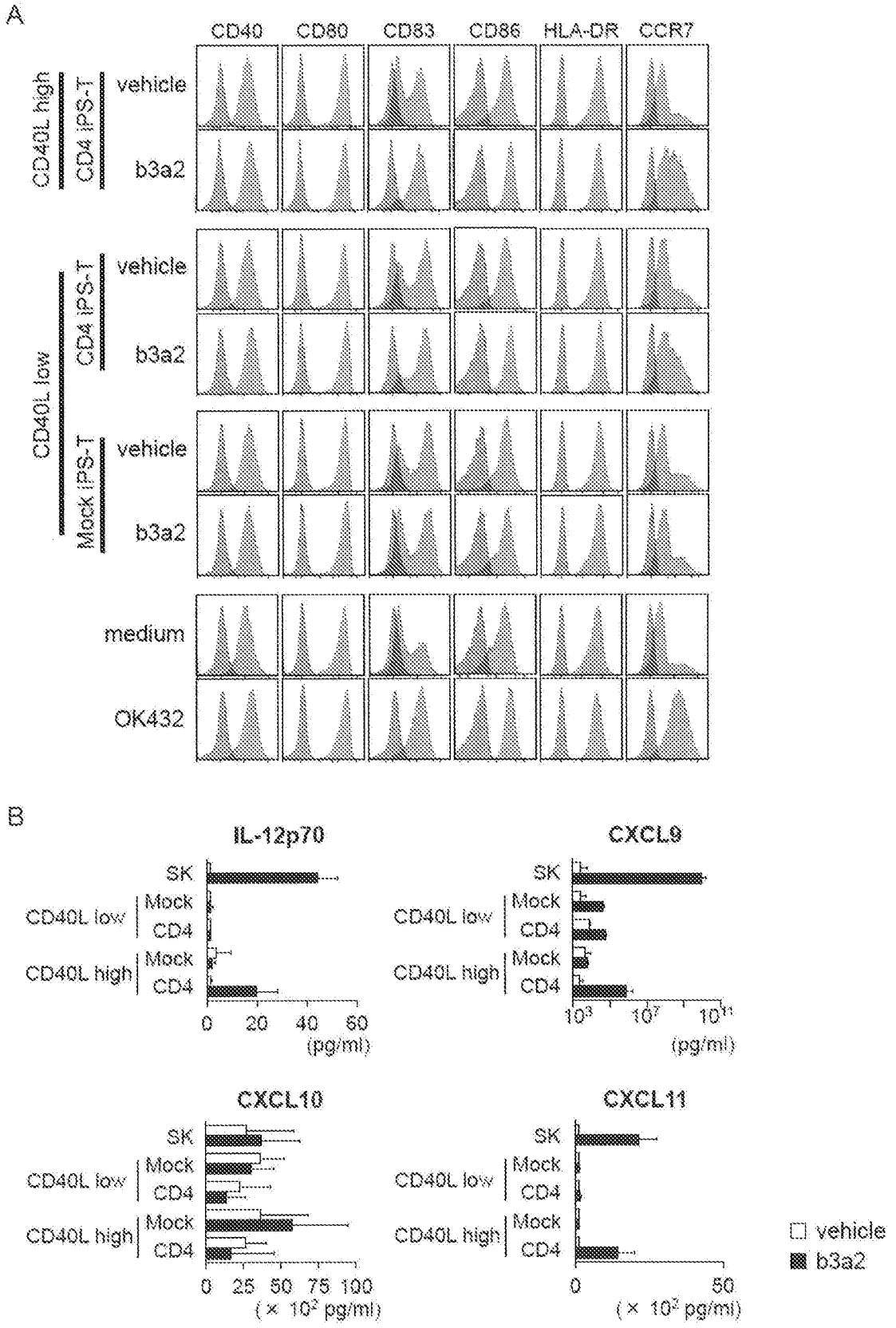
[図2]


A
SK
Mock IPS-T
CD4 IPS-T
TCRVβ22
CD4
B
[3H]-TdR-uptake
iPS-T
Mock
CD4
vehicle
b3a2
0 10 20 30 40 50
(× 10³ cpm)
C
IFN-γ
iPS-T
Mock
CD4
vehicle
b3a2
0 50 100 150 200
(× 10³ pg/ml)
D
IFN-γ
L-DR2
L-DR4
L-DR9
L-DR53
vehicle
b3a2
0 25 50 75 100
(× 10² pg/ml)
E
Color Key
0 4 8 12
Value
b3a2 peptide
CD4 iPS-T
CD4 iPS-T
Mock iPS-T
CD4 iPS-T
CD4 iPS-T
Mock iPS-T
Mock iPS-T
Mock iPS-T

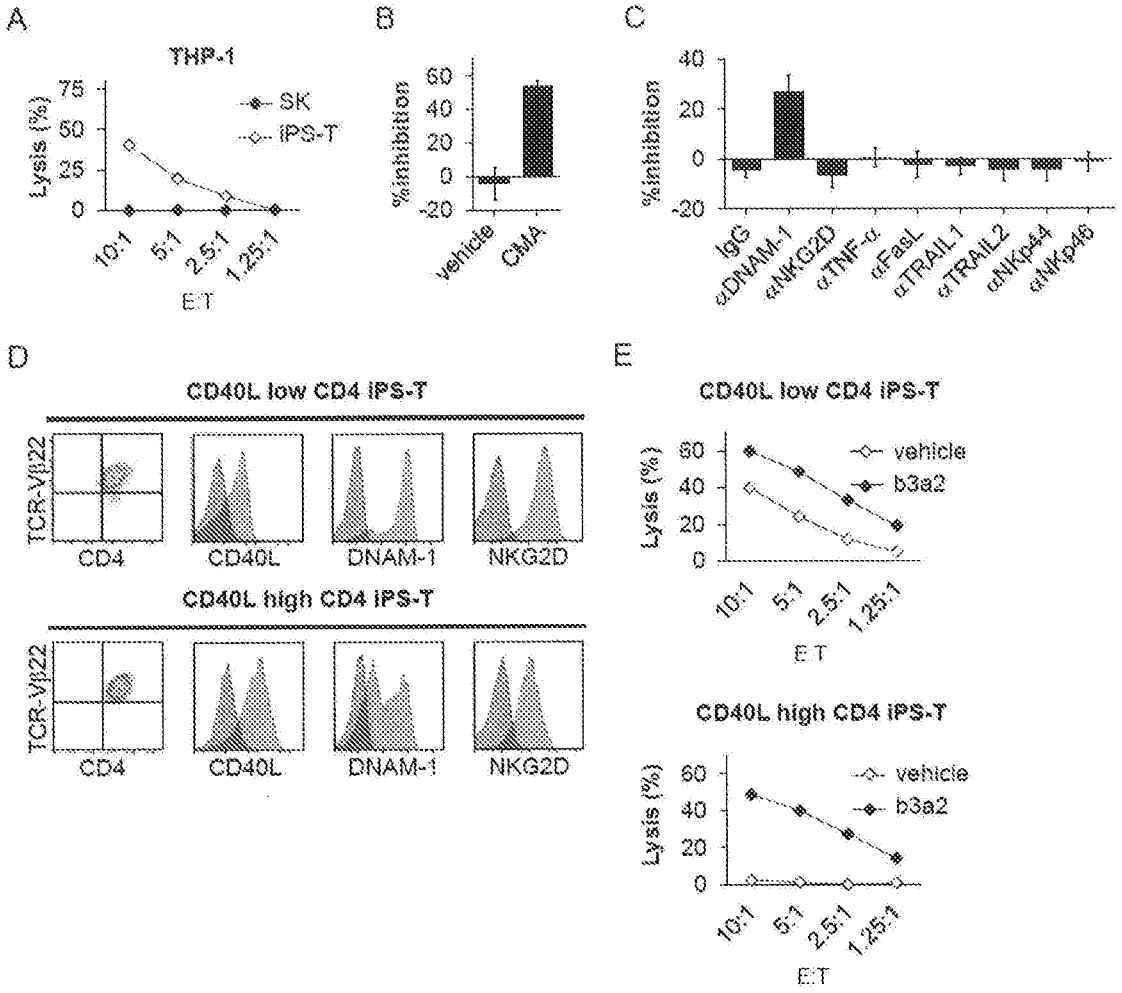
[図3]


A
PHA
IL-7
IL-15
0
12
13
Day
Mock iPS-T
CD4 iPS-T
0.26
0.44
SSC
CD40L
B
PHA
IL-7
IL-15
IL-2
IL-15
0
12
13
Day
Mock iPS-T
CD4 iPS-T
7.13
7.72
SSC
CD40L
C
Mock iPS-T
SSC
CD40L
CD40L low
Mock iPS-T
CD40L high
Mock iPS-T
TCR-Vβ22
CD40L
CD4
D
CD4 iPS-T
SSC
CD40L
CD40L low
CD4 iPS-T
CD40L high
CD4 iPS-T
TCR-Vβ22
CD40L
CD4
E
CD40L high
SK
Mock iPS-T
CD4 iPS-T
IgG
10.3
6.55
9.55
αCD3
92.7
85.5
84.0
CD40L
F
CD40L low
Mock iPS-T
CD4 iPS-T
IgG
1.30
1.39
αCD3
2.89
4.37
CD40L
G
IFN-γ
IL-4
IL-17
SK
CD40L low CD4 iPS-T
CD40L high CD4 iPS-T
0
25
50
75
(× 10³ pg/ml)
IgG
αCD3
H
IFN-γ
Mock
BCRABL
0
25
50
75
(pg/ml)
I
TNF-α
Mock
BCRABL
0
10
20
30
(pg/ml)

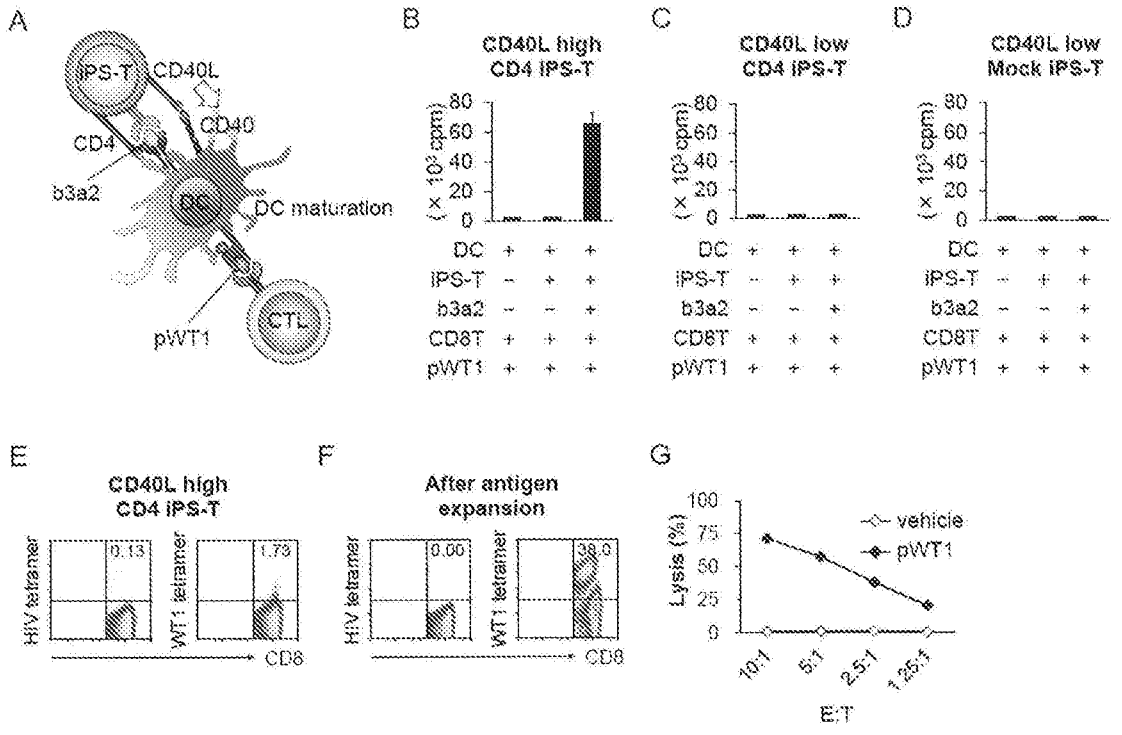
[図4]


A
CD40
CD80
CD83
CD86
HLA-DR
CCR7
CD40L high
CD4 iPS-T
vehicle
b3a2
CD40L low
CD4 iPS-T
vehicle
b3a2
Mock iPS-T
vehicle
b3a2
medium
OK432
B
IL-12p70
SK
CD40L low
Mock
CD4
CD40L high
Mock
CD4
0 20 40 60
(pg/ml)
CXCL9
SK
CD40L low
Mock
CD4
CD40L high
Mock
CD4
10³ 10⁷ 10¹¹
(pg/ml)
CXCL10
SK
CD40L low
Mock
CD4
CD40L high
Mock
CD4
0 25 50 75 100
(× 10² pg/ml)
CXCL11
SK
CD40L low
Mock
CD4
CD40L high
Mock
CD4
0 50
(× 10² pg/ml)
vehicle
b3a2

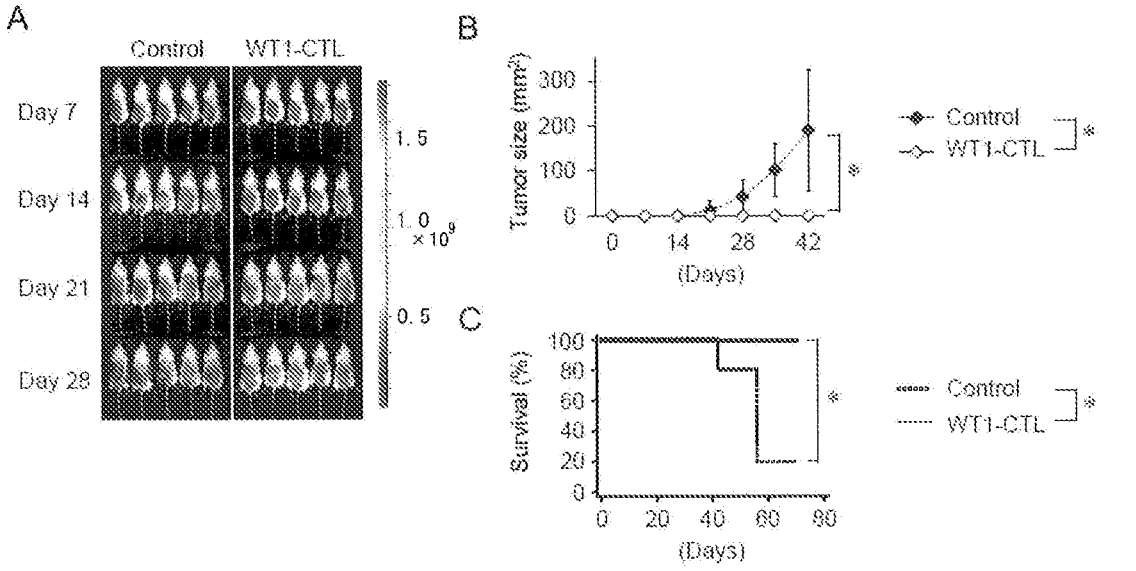
[図5]


A
THP-1
Lysis (%)
SK
iPS-T
10:1
5:1
2.5:1
1.25:1
E:T
B
%inhibition
vehicle
CMA
C
%inhibition
IgG
αDNAM-1
αNKG2D
αTNF-α
αFasL
αTRAIL1
αTRAIL2
αNKp44
αNKp46
D
CD40L low CD4 iPS-T
TCR-Vβ22
CD4
CD40L
DNAM-1
NKG2D
CD40L high CD4 iPS-T
E
CD40L low CD4 iPS-T
Lysis (%)
vehicle
b3a2
E:T
CD40L high CD4 iPS-T

[図6]


A
iPS-T
CD40L
CD40
CD4
b3a2
DC maturation
pWT1
CTL
B
CD40L high CD4 iPS-T
C
CD40L low CD4 iPS-T
D
CD40L low Mock iPS-T
DC
iPS-T
b3a2
CD8T
pWT1
E
CD40L high CD4 iPS-T
HIV tetramer
WT1 tetramer
CD8
F
After antigen expansion
G
Lysis (%)
vehicle
pWT1
E:T

[図7]


A
Control
WT1-CTL
Day 7
Day 14
Day 21
Day 28
1.5
1.0
×10^9
0.5
B
Tumor size (mm²)
300
200
100
0
0
14
28
42
(Days)
Control
WT1-CTL
*
C
Survival (%)
100
80
60
40
20
0
0
20
40
60
80
(Days)
Control
WT1-CTL
*

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2018/009661

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
See extra sheet
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)
Int.Cl. C12N5/10, A61K35/15, A61K35/17, A61K35/76, A61K39/00, A61P35/00, A61P35/02, A61P37/04, A61P43/00 C12N5/0783, C12N5/0784, A61K35/545, C12N15/00

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

Published examined utility model applications of Japan	1922-1996
Published unexamined utility model applications of Japan	1971-2018
Registered utility model specifications of Japan	1996-2018
Published registered utility model applications of Japan	1994-2018

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 Y	JP 2016-136955 A (THE UNIVERSITY OF TOKYO) 04 August 2016, claims, paragraphs [0028], [0038]-[0042], examples & US 2013/0078226 A1, claims, paragraphs [0120], [0130]-[0168], examples & WO 2011/096482 A1	13-15, 18 1-12, 16, 17

☒ 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	Date of mailing of the international search report
15 May 2018 (15.05.2018)	05 June 2018 (05.06.2018)

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
Japan Patent Office 3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915, Japan	Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2018/009661

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y A	BALLHAUSEN W. G. et al., "Acquisition of an additional antigen specificity after mouse CD4 gene transfer into a T helper hybrid", J. Exp. Med, 1988, vol. 167, pp. 1493-8	1-12 13-17
Y A	BULFONE-PAUS Silvia, et al., "DIFFERENTIAL REGULATION OF HUMAN T LYMPHOBLAST FUNCTIONS BY IL-2 AND IL-15", CYTOKINE, 1997, vol. 9, no. 7, pp. 507-513	1-12 13-17
Y A	MIRO, F., "T cell-dependent activation of dendritic cells requires IL-12 and IFN-gamma signaling in T cells", J. Immunol, 2006, vol. 177, pp. 3625-3634	1-12 13-17
Y A	COHEN, B. George, et al., "Isolation of viable antigen-specific CD4 T cells by CD40L surface trapping", Journal of Immunological Methods, 2005, vol. 302, pp. 103-115	1-12 13-17
X Y A	UEDA N. et al., "3424 Generation of BCR-ABL Reactive CD4+ Helper Cells By Reprograming and Redifferentiation", 57th An, Retrieved from the Internet <http://ash.confex.com/ash/2015/webprogramscheduler/Paper78687.html>, 2015, [retrieved on 17 May 2018]	13-18 16, 17 1-12
X Y	上田 格弘ほか, CD4 遺伝子導入した iPS 細胞由来 BCR-ABL 特異的 T 細胞は DC を介した白血病特異的 CTL を誘導する, 第 75 回日本癌学会学術総会要旨集 , 2016, p. 1412, P-3321, (The 75th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association), non-official translation (UEDA, Tatsuki et al., "iPS cell-derived BCR-ABL-specific T-cell in which CD4 gene is introuduced induces leukemia-specific CTL through DC")	13-15, 18 1-12, 16, 17
A	DUSTIN, L. Michael, et al., "Help to go: T cells transfer CD40L to antigen-presenting B cells", European Journal of Immunology, 22 December 2016, vol. 47, pp. 31-34	1-18
P, X P, A	WO 2017/065288 A1 (KYOTO UNIVERSITY) 20 April 2017, entire text (Family: none)	13-18 1-12

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2018/009661

CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
C12N5/10(2006.01)i, A61K35/15(2015.01)i, A61K35/17(2015.01)i, A61K35/76(2015.01)i, A61K39/00(2006.01)i, A61P35/00(2006.01)i, A61P35/02(2006.01)i, A61P37/04(2006.01)i, A61P43/00(2006.01)i, C12N5/0783(2010.01)i, C12N5/0784(2010.01)i, A61K35/545(2015.01)n, C12N15/00(2006.01)n

国際調査報告

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ２０１８／００９６６１

Ａ．　発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　特別ページ参照

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））

Int.Cl.　C12N5/10, A61K35/15, A61K35/17, A61K35/76, A61K39/00, A61P35/00, A61P35/02, A61P37/04, A61P43/00, C12N5/0783, C12N5/0784, A61K35/545, C12N15/00

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	１９２２－１９９６年
日本国公開実用新案公報	１９７１－２０１８年
日本国実用新案登録公報	１９９６－２０１８年
日本国登録実用新案公報	１９９４－２０１８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), CAplus/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 Y	JP 2016-136955 A (国立大学法人　東京大学) 2016.08.04, 特許請求の範囲, 【0028】, 【0038】－【0042】, 実施例 & US 2013/0078226 A1, Claims, [0120], [0130]－[0168], examples & WO 2011/096482 A1	13-15,18 1-12,16,17

☑　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	国際調査報告の発送日
１５．０５．２０１８	０５．０６．２０１８

国際調査機関の名称及びあて先
日本国特許庁（ＩＳＡ／ＪＰ）
郵便番号１００－８９１５
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）　４Ｂ　４８７２
中村　勇介
電話番号　０３－３５８１－１１０１　内線　３４４８

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
Y A	BALLHAUSEN W.G. et al., Acquisition of an additional antigen specificity after mouse CD4 gene transfer into a T helper hybri, J.Exp.Med, 1988, Vol.167, p.1493-8	1-12 13-17
Y A	BULFONE-PAUS Silvia, et al., DIFFERENTIAL REGULATION OF HUMAN T LYMPHOBLAST FUNCTIONS BY IL-2 AND IL-15, CYTOKINE, 1997, Vol.9, No.7, pp.507-513	1-12 13-17
Y A	MIRO F., T cell-dependent activation of dendritic cells requires IL-12 and IFN-gamma signaling in T cells, J.Immunol, 2006, Vol.177, p.3625-3634	1-12 13-17
Y A	COHEN George B., et al., Isolation of viable antigen-specific CD4 T cells by CD40L surface trapping, Journal of Immunological Methods, 2005, Vol.302, pp.103-115	1-12 13-17
X Y A	UEDA N. et al., 3424 Generation of BCR-ABL Reactive CD4+ Helper Cells By Reprograming and Redifferentiation, 57th An, Retrieved from the Internet <http://ash.confex.com/ash/2015/webprogramscheduler/Paper78687.html>, 2015, [retrieved on 2018.05.17]	13-18 16,17 1-12
X Y	上田　格弘ほか, ＣＤ４遺伝子導入したｉＰＳ細胞由来ＢＣＲ－ＡＢＬ特異的Ｔ細胞はＤＣを介した白血病特異的ＣＴＬを誘導する, 第７５回日本癌学会学術総会要旨集, 2016, p.1412, P-3321	13-15,18 1-12,16,17
A	DUSTIN Michael L., et al., Help to go: T cells transfer CD40L to antigen-presenting B cells, European Journal of Immunology, 2016.12.22, Vol.47, pp.31-34	1-18
P,X P,A	WO 2017/065288 A1 (国立大学法人京都大学) 2017.04.20, 全文（ファミリーなし）	13-18 1-12

発明の属する分野の分類
C12N5/10(2006.01)i, A61K35/15(2015.01)i, A61K35/17(2015.01)i, A61K35/76(2015.01)i, A61K39/00(2006.01)i, A61P35/00(2006.01)i, A61P35/02(2006.01)i, A61P37/04(2006.01)i, A61P43/00(2006.01)i, C12N5/0783(2010.01)i, C12N5/0784(2010.01)i, A61K35/545(2015.01)n, C12N15/00(2006.01)n