

(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
2017年12月28日(28.12.2017)



(10) 国際公開番号

WO 2017/221975 A1

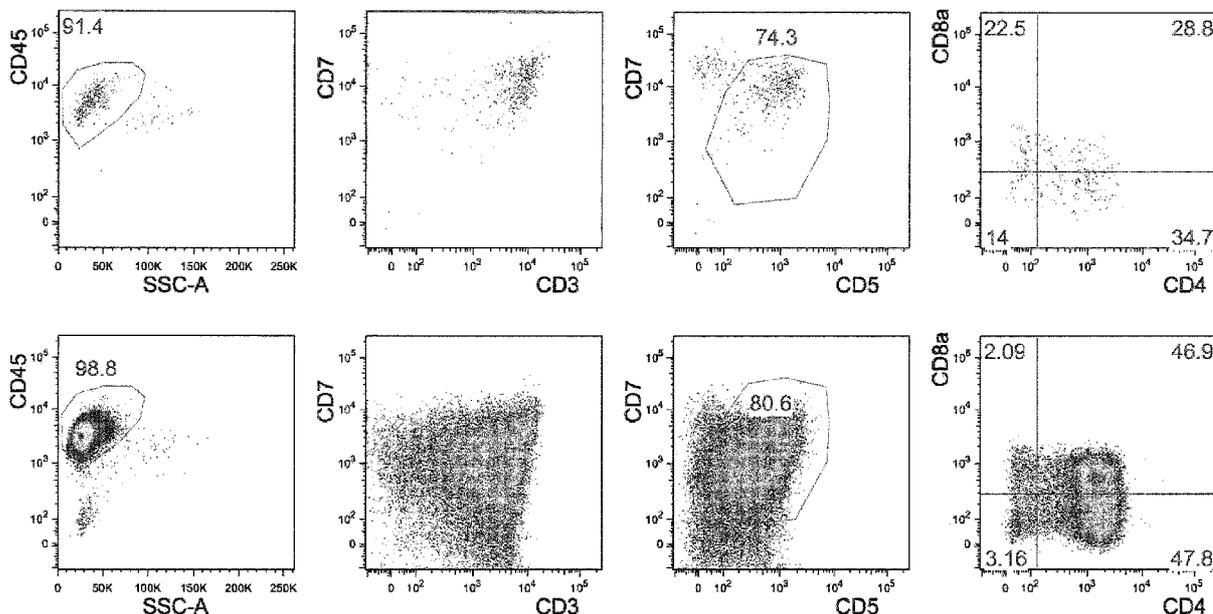
- (51) 国際特許分類:
C12N 5/0783 (2010.01) C12N 5/074 (2010.01)
C12N 5/0735 (2010.01) C12N 5/10 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2017/022840
- (22) 国際出願日: 2017年6月21日(21.06.2017)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2016-124924 2016年6月23日(23.06.2016) JP
- (71) 出願人: 国立大学法人京都大学 (KYOTO UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒6068501 京都府京都市左京区吉田本町3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3番地1 国

立大学法人京都大学内 Kyoto (JP). 安井 裕 (YASUI, Yutaka); 〒6068501 京都府京都市左京区吉田本町3番地1 国立大学法人京都大学内 Kyoto (JP). 入口 翔一 (IRIGUCHI, Shoichi); 〒6068501 京都府京都市左京区吉田本町3番地1 国立大学法人京都大学内 Kyoto (JP). 上田 樹 (UEDA, Tatsuki); 〒6068501 京都府京都市左京区吉田本町3番地1 国立大学法人京都大学内 Kyoto (JP).

- (74) 代理人: 佐貴 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,

(54) Title: METHOD FOR PRODUCING CD4/CD8 DOUBLE-POSITIVE T CELLS

(54) 発明の名称: CD4CD8両陽性T細胞の製造方法



(57) Abstract: A method for producing CD4/CD8 double-positive T cells including the following steps: (1) a step that cultures pluripotent stem cells in culture fluid and induces hematopoietic progenitor cells and (2) a step that cultures the hematopoietic progenitor cells obtained in step (1) in culture fluid containing a p38 inhibitor and/or SDF-1 and induces CD4/CD8 double-positive T cells.

(57) 要約: 以下の工程を含む、CD4CD8両陽性T細胞の製造方法; (1) 多能性幹細胞を培養液中で培養し、造血前駆細胞を誘導する工程、(2) 前記工程(1)で得られた造血前駆細胞を、p38阻害剤および/またはSDF-1を含有する培養液中で培養し、CD4CD8両陽性T細胞を誘導する工程。



WO 2017/221975 A1

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,
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).

添付公開書類:

- 一 国際調査報告 (条約第21条(3))

明 細 書

発明の名称：CD4CD8両陽性T細胞の製造方法

技術分野

[0001] 本発明は、造血前駆細胞からCD4CD8両陽性T細胞を製造する方法、多能性幹細胞からCD4CD8両陽性T細胞を製造する方法、および当該CD4CD8両陽性T細胞からCD8陽性T細胞を製造する方法に関する。

背景技術

[0002] T細胞は、細菌やウイルスなどの外来の病原体や癌細胞などの異常な細胞に対する免疫システムにおいて中心的な役割を果たしているが、様々な原因によりT細胞の機能が低下し、易感染性やがん等に罹患すると考えられている。このような疾患に対して、免疫細胞等の補充や再生をすることができれば、疾患の病態改善や治療効果の向上などに極めて有効な手段となる。このような免疫細胞の補充療法において、細胞性免疫を担うTリンパ球の機能補充や再生が強く求められているが、現在有効な治療方法は確立されていない。

このようなTリンパ球の補充療法として、抗原特異的なT細胞受容体（TCR）遺伝子を各種リンパ球系細胞に遺伝子導入し、特異的免疫反応を補充や賦活させることが提案されている（非特許文献1または2）。これらの試みでは遺伝子導入細胞として骨髓前駆細胞であるCD34陽性細胞や、ナイーブTリンパ球などが用いられているが、これらは、Ex vivoでの自己再生能が低い、遺伝子導入の効率が低い、遺伝子導入による分化の調節が困難である、など多くの課題を有している。

また、iPS細胞などの多能性幹細胞から誘導したTリンパ球を用いた補充療法も提案されている（非特許文献3または特許文献1）。多能性幹細胞からTリンパ球の誘導方法においては、（1）多能性幹細胞から造血前駆細胞を誘導する工程、（2）造血前駆細胞からCD4CD8両陰性細胞を誘導する工程、（3）CD4CD8両陰性細胞からCD4CD8両陽性細胞を誘導する工程、および（4）CD4CD8両陽性細胞からTリンパ球を誘導す

る工程が提案されている。

(1) の工程では、多能性幹細胞からネット様構造物サック (E S - s a c) を形成させ造血前駆細胞を製造する方法が知られている (非特許文献4)。また、(2) および (3) の工程は、O P 9 - D L 1 細胞層上で I L - 7 および F l t - 3 L を添加した培地で培養する方法が知られている (非特許文献5 または 6)。さらに、(4) の工程は、抗CD3抗体 (O K T - 3) および I L - 2 を添加した培地で培養する方法が知られている。

また、特許文献2には、ビタミンC類を添加した培養液を利用して多能性幹細胞からCD4CD8両陽性T細胞を製造する方法が開示されている。

しかし、これらの方法によって多能性幹細胞からTリンパ球を製造する効率は十分ではなく、改良が望まれている。

先行技術文献

特許文献

[0003] 特許文献1 : WO 2011/096482

特許文献2 : WO 2016/076415

非特許文献

[0004] 非特許文献1 : Gattinoni L, et al., Nat Rev Immunol. 6(5):383-393, 2006

非特許文献2 : Morgan RA, et al., Science. 314(5796):126-129, 2006

非特許文献3 : Nishimura T, et al., Cell Stem Cell. 12(1):114-126, 2013

非特許文献4 : Takayama N, et al., Blood. 111(11):5298-5306, 2008

非特許文献5 : Timmermans F, et al., J Immunol. 182(11):6879-6888, 2009

非特許文献6 : Ikawa T, et al., Science. 329(5987):93-96, 2010

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0005] 本発明の目的は、造血前駆細胞からCD4CD8両陽性T細胞を効率良く製造すること、および多能性幹細胞からCD4CD8両陽性T細胞を効率良く製造することに

ある。

課題を解決するための手段

[0006] 本発明者らは、上記目的を達成すべく、造血前駆細胞からCD4CD8両陽性T細胞を効率よく誘導するために有効な物質の探索を行った。その結果、p38阻害剤および／またはSDF-1を培養液へ添加して造血前駆細胞を培養することで、効率よくCD4CD8両陽性T細胞が誘導されることを見出し、本発明を完成するに至った。

[0007] すなわち、本発明は、以下の発明を提供するものである。

[1] 造血前駆細胞を、p38阻害剤および／またはSDF-1を含有する培養液中で培養し、CD4CD8両陽性T細胞を誘導する工程を含む、CD4CD8両陽性T細胞の製造方法。

[2] 前記培養液はp38阻害剤およびSDF-1を含む、[1]に記載の方法。

[3] 前記p38阻害剤は、SB203580である、[1]または[2]に記載の方法。

[4] 前記工程において、培養液はビタミンC類を含有する、[1]～[3]のいずれかに記載の方法。

[5] 前記工程は、接着培養で行われる、[1]～[4]のいずれかに記載の方法。

[6] 前記造血前駆細胞はフィーダー細胞を用いることなく培養される、[1]～[5]のいずれかに記載の方法。

[7] 前記造血前駆細胞は多能性幹細胞から分化誘導された造血前駆細胞である、[1]～[6]のいずれかに記載の方法。

[8] 多能性幹細胞が人工多能性幹細胞である、[7]に記載の方法。

[9] 人工多能性幹細胞がT細胞以外の体細胞に由来する、[8]に記載の方法。

[10] 人工多能性幹細胞がキメラ抗原受容体が導入された人工多能性幹細胞である、[8]または[9]に記載の方法。

[11] 以下の工程を含む、CD4CD8両陽性T細胞の製造方法；

(1) 多能性幹細胞を培養液中で培養し、造血前駆細胞を誘導する工程、
(2) 前記工程(1)で得られた造血前駆細胞を、p38阻害剤および／またはSDF-1を含有する培養液中で培養し、CD4CD8両陽性T細胞を誘導する工程。

[12] 前記工程(2)において、培養液はp38阻害剤およびSDF-1を含む、
[11]に記載の方法。

[13] 前記p38阻害剤は、SB203580である、[11]または[12]に記載の方法。

[14] 前記工程(1)は、浮遊培養で行われる、[11]～[13]のいずれかに記載の方法。

[15] 前記工程(2)は、接着培養で行われる、[11]～[14]のいずれかに記載の方法。

[16] 前記工程(1)および(2)において、培養液はビタミンC類を含有する、[11]～[15]のいずれかに記載の方法。

[17] 前記工程(1)および(2)において、培養はフィーダー細胞を用いることなく行われる、[11]～[16]のいずれかに記載の方法。

[18] 多能性幹細胞が人工多能性幹細胞である、[11]～[17]のいずれかに記載の方法。

[19] 人工多能性幹細胞がT細胞以外の体細胞に由来する、[18]に記載の方法。

[20] 人工多能性幹細胞がキメラ抗原受容体が導入された人工多能性幹細胞である、[18]または[19]に記載の方法。

[21] [1]～[20]のいずれかに記載の方法によりCD4CD8両陽性T細胞を製造する工程、および得られたCD4CD8両陽性T細胞を副腎皮質ホルモン剤を添加した培養液中で培養してCD8陽性T細胞を得る工程を含む、CD8陽性T細胞の製造方法。

[22] [1]～[20]のいずれかに記載の方法により得られたCD4CD8両陽性T細胞および／または[21]の方法で得られたCD8陽性T細胞を含む細胞製剤。

発明の効果

[0008] 本発明によれば、造血前駆細胞から効率よくCD4CD8陽性T細胞を製造することが可能である。また、多能性幹細胞から効率よくCD4CD8陽性T細胞を製造することが可能である。さらに、副腎皮質ホルモン剤を培養液へ添加することで、CD4CD8両陽性T細胞から効率よくCD8陽性T細胞を製造することが可能である。

図面の簡単な説明

[0009] [図1]図1は、iPS細胞 (TkT3V1-7) から分化誘導された細胞のフローサイトメトリーの結果を示す。左から、CD45とSSCの染色強度で展開した図、CD7とCD3の染色強度で展開した図、CD7とCD5の染色強度で展開した図、CD8とCD4の染色強度で展開した図を示す。上段がSB203580とSDF-1 α を添加しない場合、下段がSB203580とSDF-1 α を添加した場合の結果を示す。

[図2]図2は、iPS細胞 (Ffl-01) から分化誘導された細胞のフローサイトメトリーの結果を示す。左から、CD45とSSCの染色強度で展開した図、CD7とCD3の染色強度で展開した図、CD7とCD5の染色強度で展開した図、CD8とCD4の染色強度で展開した図を示す。上段がSB203580とSDF-1 α を添加しない場合、下段がSB203580とSDF-1 α を添加した場合の結果を示す。

[図3]図3は、iPS細胞 (Ffl-14) から分化誘導された細胞のフローサイトメトリーの結果を示す。左から、CD45とSSCの染色強度で展開した図、CD7とCD3の染色強度で展開した図、CD7とCD5の染色強度で展開した図、CD8とCD4の染色強度で展開した図を示す。上段がSB203580とSDF-1 α を添加しない場合、下段がSB203580とSDF-1 α を添加した場合の結果を示す。

[図4]図4は、ES細胞 (KhES-3) から分化誘導された細胞のフローサイトメトリーの結果を示す。左から、CD45とSSCの染色強度で展開した図、TCRabとCD3の染色強度で展開した図、CD7とCD5の染色強度で展開した図、CD8とCD4の染色強度で展開した図を示す。上段がSB203580とSDF-1 α を添加しない場合、下段がSB203580とSDF-1 α を添加した場合の結果を示す。

[図5]図5は、iPS細胞 (TkT3V1-7) から分化誘導された細胞のフローサイト

メトリーの結果（CD8とCD4の染色強度で展開した図）を示す。左から、SB203580とSDF-1 α を添加しない場合、SB203580を添加した場合、SDF-1 α を添加した場合、SB203580とSDF-1 α を添加した場合の結果を示す。

[図6]図6は、臍帯血由来CD34陽性細胞（CBCD34+）から分化誘導された細胞のフローサイトメトリーの結果を示す。上段がSB203580とSDF-1 α を添加しない場合、下段がSB203580とSDF-1 α を添加した場合の結果を示す。

[図7]図7は、iPS細胞（TkT3V1-7）及び臍帯血由来CD34陽性細胞（CBCD34+）から分化誘導された細胞数を示す。各細胞ごとに左側がSB203580とSDF-1 α を添加しない場合（-）、右側がSB203580とSDF-1 α を添加した場合の結果を示す。

[図8]図8は、iPS細胞（H25-4、H25-31、GPC3#16）から分化誘導されたCD4CD8両陽性T細胞を、CD8陽性T細胞へと分化させたフローサイトメトリーの結果を示す。

[図9]図9は、図8で分化したCD8陽性T細胞が特異的な抗原として認識するテトラマー（H25-4、H25-31）あるいはデキストラマー（GPC3 #16）で染色した細胞のフローサイトメトリーの結果を示す。

[図10]図10は、図8で得られたCD8陽性T細胞の抗原特異的な細胞傷害性試験の結果を示す。特異的抗原の非存在下（no peptide、SK-Hep Vector）、陰性コントロール抗原の存在下（GAG peptide）、特異的抗原の存在下（Nef peptide、SK-Hep GPC3）での細胞傷害（killing）の結果を示す。

[図11]図11は、iPS細胞（Ff-I01株に人工抗原受容体（CAR）を導入したFf-I01 GC33株）から分化誘導された細胞のフローサイトメトリーの結果を示す。

発明を実施するための形態

[0010] 本発明は、造血前駆細胞からCD4CD8両陽性T細胞を製造する方法を提供する。

[0011] 造血前駆細胞からCD4CD8両陽性T細胞を誘導する工程

本発明において、造血前駆細胞（Hematopoietic Progenitor Cells（HPC））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る。本発明において、造血前駆細胞と造血幹細胞は、区別されるものではなく、特に断りがなければ同一の細胞を示す。造血幹細胞／前駆細胞は、例えば、表面抗原であるCD34および／またはCD43が陽性であることによって認識できる。

なお、造血前駆細胞は後述のようにして多能性幹細胞から誘導した造血前駆細胞を用いることもできるし、臍帯血由来のCD34陽性細胞のように、別の方法で入手した造血前駆細胞を用いることもできる。

[0012] 本発明において、CD4CD8両陽性T細胞とは、T細胞のうち、表面抗原のCD4およびCD8が共に陽性である細胞（CD8⁺CD4⁺）を意味し、T細胞は、表面抗原であるCD3およびCD45が陽性であることによって認識することができることから、CD4CD8両陽性T細胞は、CD4、CD8、CD3およびCD45が陽性である細胞として同定することができる。CD4CD8両陽性T細胞は、誘導によってCD4陽性細胞またはCD8陽性細胞へと分化させることができる。

[0013] 本発明において、CD4CD8両陽性T細胞は、p38阻害剤および／またはSDF-1を添加した培養液中で造血前駆細胞を培養する工程を含む方法によって製造することができる。

[0014] <p38阻害剤>

本明細書に係る「p38阻害剤」とは、p38タンパク質（p38MAPキナーゼ）の機能を阻害する物質として定義され、例えば、p38の化学的阻害剤、p38のドミナントネガティブ変異体もしくはそれをコードする核酸などが挙げられるが、これらに限定されない。

本発明における、p38の化学的阻害剤としては、SB203580(4-(4-フルオロフェニル)-2-(4-メチルスルホニルフェニル)-5-(4-ピリジル)-1H-イミダゾール)、及びその誘導体、SB202190(4-(4-フルオロフェニル)-2-(4-ヒドロキシフェニル)-5-(4-ピリジル)-1H-イミダゾール)及びその誘導体、SB239063(trans-4-[4-(4-フルオロフェニル)-5-(2-メトキシ-4-ピリミジニル)-1H-イミダゾール-1-イル]シクロヘキサノール)及びその誘導体、SB220025及びその誘導体、PD169316、RPR200765A、AMG-548、BIRB-796、SCI0-469、SCI0-323、VX

-702、FR167653が例示されるが、これらに限定されない。これらの化合物は市販されており、例えばSB203580、SB202190、SC239063、SB220025およびPD169316についてはCalbiochem社、SC10-469およびSCI0-323についてはScios社などから入手可能である。

また、p38のドミナントネガティブ変異体は、p38のDNA結合領域に位置する180位のスレオニンをアラニンに点変異させたp38T180A、ヒトおよびマウスにおけるp38の182位のチロシンをフェニルアラニンに点変異させたp38Y182Fなどが挙げられる。

p38阻害剤は、例えば、約1 μ M～約50 μ Mの範囲で培地に含有される。

[0015] <SDF-1>

本発明において、SDF-1 (Stromal cell-derived factor 1) は、SDF-1 α またはその成熟型だけでなく、SDF-1 β 、SDF-1 γ 、SDF-1 δ 、SDF-1 ϵ もしくはSDF-1 ϕ 等のアイソフォームまたはそれらの成熟型であってもよく、またこれらの任意の割合の混合物等であってもよい。好ましくは、SDF-1 α が使用される。なお、SDF-1は、CXCL-12またはPBSFと称される場合もある。

[0016] 本発明において、SDF-1は、そのケモカインとしての活性を有する限り、そのアミノ酸配列中の1もしくは数個のアミノ酸が置換、欠失および／または付加されていてもよく、また同様に糖鎖が置換、欠失および／または付加されていてもよい。少なくとも4つのシステイン残基（ヒトSDF-1 α の場合、C y s 3 0、C y s 3 2、C y s 5 5およびC y s 7 1）が保持されており、かつ天然体のアミノ酸配列に対して90%以上の同一性を有する範囲であれば、アミノ酸変異が許容される。SDF-1は、哺乳動物、例えば、ヒトや、例えば、サル、ヒツジ、ウシ、ウマ、ブタ、イヌ、ネコ、ウサギ、ラット、マウス等の非ヒト哺乳動物のものであってもよい。例えば、ヒトのSDF-1 α として、GenBank登録番号：NP_954637で登録されているタンパク質が使用でき、SDF-1 β として、GenBank登録番号：NP_000600で登録されているタンパク質が使用できる。

[0017] SDF-1は、市販のものを使用してもよいし、天然から精製されたものを使用

してもよいし、あるいはペプチド合成や遺伝子工学的手法によって製造されたものを使用してもよい。

SDF-1は、例えば、約10 ng/mlから約100 ng/mlの範囲で培地に含有される。

[0018] なお、SDF-1にはSDF-1様の活性を有するSDF-1代替物を使用することもできる。このようなSDF-1代替物としてはCXCR4アゴニストが例示され、CXCR4アゴニスト活性を有する低分子化合物などをSDF-1の代わりに培地に添加してもよい。

[0019] 本発明においてCD4CD8両陽性T細胞の製造に用いる培養液は、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とし、これにp38阻害剤および／またはSDF-1、さらに好ましくはビタミンC類を添加して調製することができる。なお、CD4CD8両陽性T細胞製造工程で使用されるビタミンC類の種類は上述のとおりであるが、ビタミンC類の濃度は、例えば、5 μg/mlから200 μg/mlである。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、OP9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。

[0020] 本発明のCD4CD8両陽性T細胞の製造に用いる培養液は、SCF、TPO（トロンボポエチン）、FLT-3LおよびIL-7から成る群より選択されるサイトカインをさらに培養液に添加してもよい。これらの濃度は、例えば、SCFは10 ng/mlから100 ng/mlであり、TPOは10 ng/mlから200 ng/mlであり、IL-7は1 ng/mlから1

00 ng/mlであり、FLT-3Lは1 ng/mlから100 ng/mlである。

[0021] CD4CD8両陽性T細胞の製造において、造血前駆細胞はフィーダー細胞を用いて培養してもよいが、好ましくはフィーダー細胞を用いずに培養を行う。

造血前駆細胞は接着培養または浮遊培養してもよいが、本工程は接着培養が好ましい。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、例えば、コーティング剤としては、マトリゲル (Niwa A, et al. PLoS One.6 (7):e22261, 2011)、コラーゲン、ゼラチン、ラミニン、ヘパラン硫酸プロテオグリカン、レトロネクチン、Fc-DLL4またはエンタクチン、およびこれらの組み合わせが挙げられる。

なお、胚様体を浮遊培養して造血前駆細胞を得た場合は、これを単細胞に解離させたのちに、接着培養を行うことが好ましい。

[0022] 本発明において、CD4CD8両陽性T細胞を製造するために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°C～約42°C程度、約37～約39°C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CD4CD8両陽性T細胞の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。造血前駆細胞が得られる限り、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、22日以上、23日以上であり、好ましくは23日である。

[0023] 本発明において、得られたCD4CD8両陽性T細胞は、単離して用いても良く、他の細胞種が含有される細胞集団としても良い。単離する場合、CD4、CD8、CD3およびCD45から成るいずれか一つの指標を用いて単離することができ、当該単離の方法は、当業者に周知の方法を用いることができ、例えば、CD4、CD8、CD3およびCD45の抗体により標識し、フローサイトメーターを用いて単離する方法、また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する方法が挙げられる。

[0024] 多能性幹細胞から造血前駆細胞を誘導する工程

本発明は、多能性幹細胞からCD4CD8両陽性T細胞を製造する方法を提供する。当該製造方法は、(1)多能性幹細胞から造血前駆細胞を誘導する工程、

および（２）当該造血前駆細胞からCD4CD8両陽性T細胞を誘導する工程を含む。

工程（２）の造血前駆細胞からCD4CD8両陽性T細胞を誘導する工程は前述したとおりであり、工程（１）の多能性幹細胞から造血前駆細胞を誘導する工程について以下に説明する。

[0025] 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。多能性幹細胞は哺乳動物由来であることが好ましく、ヒト由来であることがより好ましい。

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、培養線維芽細胞や臍帯血由来の多能性幹細胞、骨髓幹細胞由来の多能性細胞（Muse細胞）などが含まれる。好ましい多能性幹細胞は、製造工程において胚、卵子等の破壊をしないで入手可能であるという観点から、iPS細胞であり、より好ましくはヒトiPS細胞である。

[0026] 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、Oct 3/4、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良い。初期化因子の組み合わせとしては、W02007/069666、W02008/118820、W02009/007852、W02009/032194、W02009/058413、W02009/057831、W02009/075119、W02009/079007、W02009/091659、W02009/101084、W02009/101407、W02009/102983、W02009/114949、W02009/117439、W02009/126250、W02009/12

6251、W02009/126655、W02009/157593、W02010/009015、W02010/033906、W02010/033920、W02010/042800、W02010/050626、W02010/056831、W02010/068955、W02010/098419、W02010/102267、W02010/111409、W02010/111422、W02010/115050、W02010/124290、W02010/147395、W02010/147612、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。

[0027] 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。

[0028] なお、CD4CD8陽性T細胞を製造する目的に使用するためには体細胞としてT細胞を使用することが好ましいと考えられていたが、本発明では、体細胞と

して非T細胞を用いて得られたiPS細胞からもCD4CD8陽性T細胞を製造することも可能である。

[0029] 本発明において、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。本発明によって調製されたCD4CD8陽性T細胞またはCD8陽性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、輸血される対象から単離されることが好ましい。

[0030] 本発明において、造血前駆細胞の誘導に使用されるiPS細胞は、キメラ抗原受容体（Chimeric antigen receptor：CAR）が導入されたiPS細胞であってもよい。ここで、キメラ抗原受容体（CAR）とは、抗原に結合する細胞外ドメインと、前記細胞外ドメインとは異なるポリペプチドに由来する細胞内ドメインを含む融合タンパク質を意味し、特定の抗原に対する抗体の抗原認識部位（可変領域のL鎖とH鎖）を、CD3などのT細胞受容体の細胞内ドメイン、およびCD28や4-1BBなどの共刺激分子の細胞内ドメインと結合させた融合タンパク質が挙げられる（例えば、特表2015-509716）。

CARの抗原認識部位は目的とする抗原に応じて選択でき、それにより目的の抗原に対して特異的なT細胞を作製することが可能である。例えば、CD19を抗原とする場合、抗CD19抗体の抗原認識部位をクローニングし、CD3分子の細胞内ドメインと結合させることにより、CARとすることができる（例えば、Cancer Res 2006;66:10995-11004.）。また、結合させる共刺激分子の種類や数を選択することにより、活性化の強さや持続時間をコントロールすることができる（例えば、Mol Ther. 2009;17:1453-1464.）。

CARを導入することにより、T細胞を由来とするiPS細胞およびT細胞を由来としないiPS細胞から分化誘導したT細胞のいずれにおいても、目的の抗原に対する特異性を付与することが可能となる。また、抗原分子を直接認識することができ、HLAクラスI遺伝子の発現が低下した腫瘍に対しても高い免疫反応を起こすことが可能である。

[0031] 多能性幹細胞から造血前駆細胞を誘導する工程

造血前駆細胞は、好ましくは、ビタミンC類を添加した培養液中で多能性幹細胞を培養することによって製造される。ここで、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ルビル、ステアリン酸アスコル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などのリン酸-L-アスコルビン酸塩が挙げられる。ビタミンC類は、例えば、培養液において、5 $\mu\text{g/ml}$ から500 $\mu\text{g/ml}$ の濃度で含有される。

[0032] 造血前駆細胞の製造に用いる培養液は、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ビタミンC類等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、 α MEM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) 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。

[0033] 本発明において造血前駆細胞の製造に用いる培養液は、BMP4 (Bone morphogenetic protein 4)、VEGF (vascular endothelial growth factor)、bFGF (basic fibroblast growth factor)、SCF (Stem cell factor)、TPO (トロンボポエチン)、およびFLT-3L (Flt3 Ligand)から成る群より選択されるサイ

トカインがさらに添加されていてもよい。

[0034] これらの濃度は、例えば、BMP4は1 ng/mlから100 ng/mlであり、VEGFは1 ng/mlから100ng/mlであり、SCFは10 ng/mlから100 ng/mlであり、TPOは1 ng/mlから100 ng/mlであり、FLT-3Lは1 ng/mlから100 ng/mlであり、bFGFは1 ng/mlから100 ng/mlである。

[0035] また、TGF β 阻害剤が添加されてもよい。TGF β 阻害剤とは、TGF β ファミリーのシグナル伝達に干渉する低分子阻害剤であり、例えばSB431542、SB202190(以上、R.K.Lindemann et al., Mol. Cancer 2:20(2003))、SB505124 (Glaxo SmithKline)、NPC30345、SD093、SD908、SD208 (Scios)、LY2109761、LY364947、LY580276 (Lilly Research Laboratories)などが包含され、例えば、TGF β 阻害剤がSB431542である場合、培地中の濃度は、好ましくは0.5 μ M~100 μ Mである。

[0036] 多能性幹細胞は、C3H10T1/2 (Takayama N., et al. J Exp Med. 2817-2830, 2010)、異種由来のストローマ細胞 (Niwa A et al. J Cell Physiol. 2009 Nov;221(2):367-77.) などのフィーダー細胞と共培養されてもよいが、本発明においては、好ましくは、フィーダー細胞を使用せずに培養が行われる。

[0037] 本発明の造血前駆細胞の製造において、多能性幹細胞の培養方法は、接着培養または浮遊培養であってもよいが、浮遊培養が好ましい。例えば、多能性幹細胞は、使用したディッシュに対して80%コンフルエントになるまで培養されたコロニーを分離し、単細胞に解離させたのちに、浮遊培養に供することができる。多能性幹細胞の分離方法としては、例えば、力学的に分離する方法、プロテアーゼ活性とコラゲナーゼ活性を有する分離溶液（例えば、Accutase(商標)およびAccumax(商標)など）またはコラゲナーゼ活性のみを有する分離溶液を用いた分離方法が挙げられる。

[0038] 浮遊培養とは、細胞を培養容器へ非接着の状態でも培養することであり、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）または非イオン性の界面活性ポリオール（Pluronic F-127等）によるコーティング処理）した培養容器を使用して行うことができる。浮遊培養の際には、胚様体（EB）を形成させて培養することが好ましい。

[0039] 本発明では、造血前駆細胞は、多能性幹細胞を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）から調製することもできる。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。

[0040] 本発明において、造血前駆細胞を製造するための培養する際の温度条件は、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、当業者であれば造血前駆細胞の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。造血前駆細胞が得られる限り、日数は特に限定されないが、例えば、少なくとも6日間以上、7日以上、8日以上、9日以上、10日以上、11日以上、12日以上、13日以上、14日以上であり、好ましくは14日である。培養期間が長いことについては、造血前駆細胞の製造においては問題とされない。また、低酸素条件で培養してもよく、本発明において低酸素条件とは、15%、10%、9%、8%、7%、6%、5%またはそれら以下の酸素濃度が例示される。

[0041] CD4CD8両陽性T細胞からCD8陽性T細胞を誘導する工程

本発明においては、上記のようにして得られたCD4CD8陽性T細胞からCD8陽性T細胞を誘導することができる。

CD8陽性T細胞とは、T細胞のうち、表面抗原のCD8が陽性である細胞（CD8⁺CD4⁻）を意味し、細胞傷害性T細胞とも呼ばれる。T細胞は、表面抗原であるCD3およびCD45が陽性であることによって認識することができることから、CD8陽性T細胞は、CD8、CD3およびCD45が陽性であり、CD4が陰性である細胞として同定することができる。

[0042] 本発明において、CD8陽性T細胞は、副腎皮質ホルモン剤を添加した培養液中でCD4CD8両陽性T細胞を培養する工程を含む方法によって製造することができる。

[0043] 副腎皮質ホルモン剤は、糖質コルチコイドあるいはその誘導体であり、酢酸コルチゾン、ヒドロコルチゾン、酢酸フルドロコルチゾン、プレドニゾン、トリアムシノロン、メチルプレドニゾン、デキサメタゾン、ベタメタゾン、プロピオン酸ベクロメタゾンが例示される。好ましくは、デキサメタゾンである。副腎皮質ホルモン剤が、デキサメタゾンである場合、培養液中におけるその濃度は、例えば、1nMから100nMである。

[0044] CD8陽性T細胞の製造に用いる培養液は、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副腎皮質ホルモン剤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、 α MEM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) 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。

[0045] 本発明においてCD8陽性T細胞の製造に用いる培養液は、抗CD3抗体、ビタミンC類、サイトカインをさらに含有することが好ましい。当該サイトカインは、IL-2およびIL-7等が例示される。

抗CD3抗体とは、CD3を特異的に認識する抗体であれば特に限定されないが、例えば、OKT3クローンから産生される抗体が挙げられる。抗CD3抗体の培養液中における濃度は、例えば、10ng/mlから1000ng/mlである。

本発明においてCD8陽性T細胞の製造に用いるビタミンC類は上述と同じ条件で用いることができる。

本発明においてCD8陽性T細胞の製造に用いる各成分の培養液中における濃度は、例えば、IL-2は10 U/mlから1000 U/mlであり、IL-7は1ng/mlから100ng/mlである。

[0046] 本発明において、CD8陽性T細胞を製造するためにCD4CD8両陽性T細胞を培養する際の温度条件は、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CD8陽性T細胞の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。造血前駆細胞が得られる限り、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、4日以上、5日以上であり、好ましくは3日である。

[0047] 細胞製剤

本発明は、上述の方法によって製造されたCD4CD8両陽性T細胞および／またはCD8陽性T細胞を含む細胞製剤を提供する。

本発明の細胞製剤は抗原特異的に細胞傷害活性を発揮することができるので、癌治療や免疫補充療法などに好適に使用できる。

本発明の細胞製剤の患者への投与方法としては、例えば、製造されたCD4CD8両陽性T細胞および／またはCD8陽性T細胞を生理食塩水等に懸濁させ、患者の患部に直接移植する方法、または、静脈注射する方法などが挙げられる。

[0048] 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。

実施例

[0049] iPS細胞(TKT3v 1-7株、H25-4株およびH25-31株)は、Nishimura T, et al., Cell Stem Cell. 12(1):114-126, 2013に記載の方法を用いて、告知後に同意を得て単離されたヒトCD3陽性T細胞より樹立した。

iPS細胞(Ffl-01株およびFfl-14株)は、Nakagawa M, et al., Sci Rep. 4:3594(2014)に記載の方法で樹立されたものを用いた(末梢血の単核球由来(た

だしT細胞及びB細胞以外))。なお、Ffl-14株は、Ffl-01株と同じドナーから樹立された別クローンである。

iPS細胞(GPC3#16株)は、末梢血単核球から分離された抗原特異的Tリンパ球から、Nishimura T, et al., Cell Stem Cell, 12(1) : 114-126, 2013に記載の方法を用いて樹立されたものを用いた。

iPS細胞 (Ff-I01 GC33株)は、Ff-I01株にウイルスベクターを用いてキメラ抗原受容体(Chimeric Antigen Receptor : CAR)を導入したものを用いた。CARは、抗CD19抗体の抗原認識部位をクローニングし、CD3分子の細胞内ドメインと結合させることにより、作製したものを用いた。

ES細胞(KhES-3株)は、京都大学再生医科学研究所から入手した。

[0050] <実施例1>

超低接着処理された6well plate(CORNING社 : #3471)にTkt3V1-7、FfI-01、Ffl-14またはKhES-3を $3 \times 10^5 \sim 6 \times 10^5$ 個/ウェルで播種し(Day0)、EB培地(StemPro34に10 μ g/ml ヒトインスリン、5.5 μ g/ml ヒトトランスフェリン、5ng/ml 亜セレン酸ナトリウム、2mM L-グルタミン、45mM α -モノチオグリセロール、および50 μ g/ml アスコルビン酸を添加)に10 ng/ml BMP4、5ng/ml bFGF、15ng/ml VEGF、2 μ M SB431542、を加えて、低酸素条件下(5% O_2)にて5日間培養を行った(Day5)。

続いて、50ng/ml SCF、30ng/ml TP0、10ng/ml Flt3Lを添加し、さらに5~9日間培養を行った(~Day14)。

得られた造血前駆細胞は、Fc-DLL4(5 μ g/ml) (Sino Biological Inc.) およびRetronectin(5 μ g/ml) (タカラバイオ株式会社) でコーティングした48 well plate上で、50ng/ml SCF、50ng/ml IL-7、50ng/ml Flt3L、100ng/ml TP0、15 μ M SB203580 (Tocris Bioscience) 、30 ng/ml SDF-1 α (PeproTech) を添加したOP9培地(15% FBS、2mM L-グルタミン、100U/ml ペニシリン、100ng/ml ストレプトマイシン、55 μ M 2-メルカプトエタノール、50 μ g/ml アスコルビン酸、10 μ g/ml ヒトインスリン、5.5 μ g/ml ヒトトランスフェリン、5ng/ml 亜セレン酸ナトリウム)中で21日間培養を行った(Day35)。

Day35にて、CD45(+)、CD3(+)、CD4(+)、CD8(+)分画をFACSを用いて単離し、CD4CD8両陽性(Double positive)細胞(DP細胞という)を得た。

結果を図1 (TKT3v 1-7)、図2 (Ffl-01)、図3 (Ffl-14)、図4 (KhES-3)に示す。なお、それぞれの図の上段は、造血前駆細胞を培養する際にSB203580とSDF-1 α を加えずに培養を行った結果を示す。これらの結果より、iPS細胞やES細胞などの多能性幹細胞から造血前駆細胞を誘導し、これをp38阻害剤とSDF-1を含む培地で培養することにより、効率よくCD4CD8両陽性T細胞が得られることが分かった。

なお、上記と同様の手順でTKT3v 1-7株の培養をSB203580とSDF-1 α を含まない培地、SB203580を含む培地、SDF-1 α を含む培地、SB203580とSDF-1 α を含む培地のそれぞれで行ったところ、p38阻害剤とSDF-1の効果はそれら単独でも発揮されることが分かった(図5)。

[0051] <実施例2>

臍帯血由来のCD34陽性造血前駆細胞(HemaCare社 #CBCD34C-1)を、実施例1のiPS細胞由来の造血前駆細胞と同様に、Fc-DLL4(5 μ g/ml)およびRetronectin(5 μ g/ml)でコーティングした48well plate上で、50ng/ml SCF、50ng/ml IL-7、50ng/ml Flt3L、100ng/ml TPO、15 μ M SB203580、30 ng/ml SDF-1 α を添加したOP9培地中で21日間培養を行った(Day35)。Day35にて、CD45(+)、CD3(+)、CD4(+)、CD8(+)分画をFACSを用いて単離し、CD4CD8両陽性(Double positive)細胞(DP細胞という)を得た。結果を図6に示す。なお、図6の上段は、造血前駆細胞を培養する際にSB203580とSDF-1 α を加えずに培養を行った結果を示す。これらの結果より、臍帯血由来のCD34陽性造血前駆細胞を用いた場合でも、p38阻害剤とSDF-1を含む培地で培養することにより、効率よくCD4CD8両陽性T細胞が得られることが分かった。

[0052] 実施例1および実施例2において、FACS解析の際に、血球計算盤(ワケンテービック株式会社:#WC2-100)を用いて総細胞数を計測した(この数値には、CD4CD8両陽性細胞以外の集団も含まれる)。その結果、図7に示すように、SB203580とSDF-1 α を加えて培養を行うことにより、顕著に細胞数が増加

することが分かった。

[0053] <実施例 3>

iPS細胞としてH25-4、H25-31、またはGPC3#16を用い、実施例 1 と同様の方法で培養を行うことによりCD4CD8両陽性細胞を得た。得られたCD4CD8両陽性細胞を副腎皮質ホルモン剤(富士製薬工業株式会社 : 10171-H02H)を添加した培養液中で抗CD3抗体(eBioscience : 16-0037-85)を用いて刺激することにより、図 8 に示すように、CD8陽性T細胞 (CD8陽性Tリンパ球) を得ることができた。

[0054] 得られたCD8陽性Tリンパ球を、それぞれのT細胞受容体が特異的に認識して結合するテトラマー(H25-4、H25-31)あるいはデキストラマー(GPC3#16)で染色しFACS解析を行った。その結果、図 9 に示すように、上記で得られたCD8陽性T細胞は、特異的な抗原に対する反応性を有していることがわかった。

[0055] また、上記で得られたCD8陽性Tリンパ球を、それぞれが特異的に認識する抗原を発現するがん細胞株と共培養し、⁵¹Crリリースアッセイにより免疫反応性を評価した。その結果、図 10 に示すように、H25-4株およびH25-31株は、特異的に認識するペプチド (NefあるいはGAG) を提示したがん細胞株に対して、特異的かつ高い効率で細胞傷害免疫反応を示していることが分かった。また、GPC3#16株は、遺伝子導入によりGPC3抗原を発現させたがん細胞株に対して高い細胞傷害免疫反応を示していることが分かった。

[0056] <実施例 4>

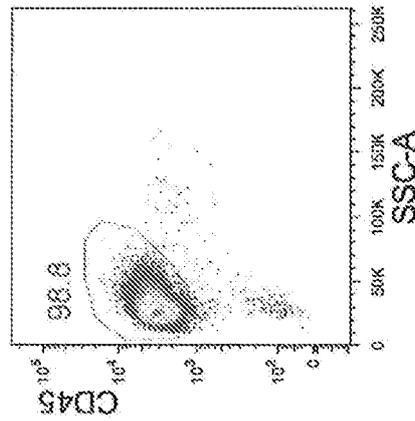
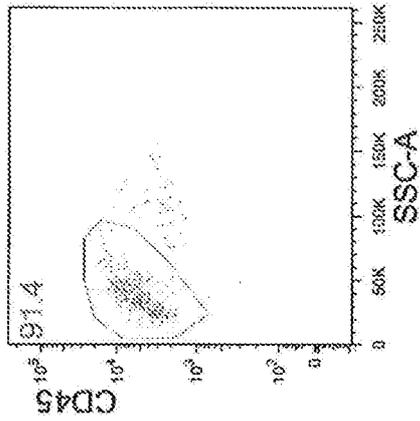
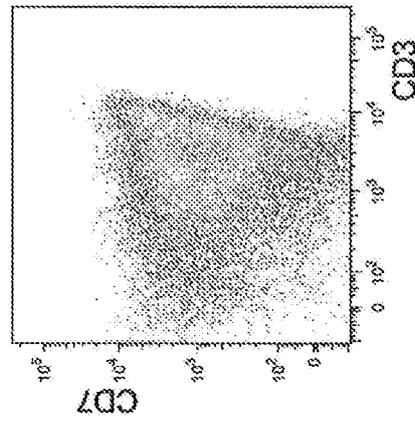
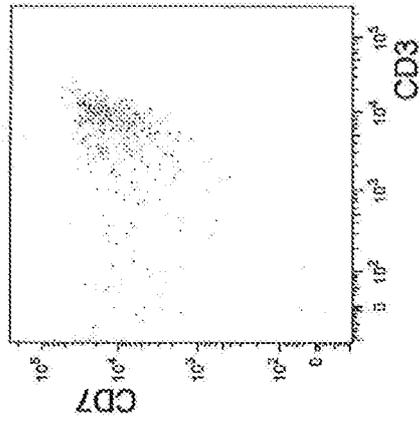
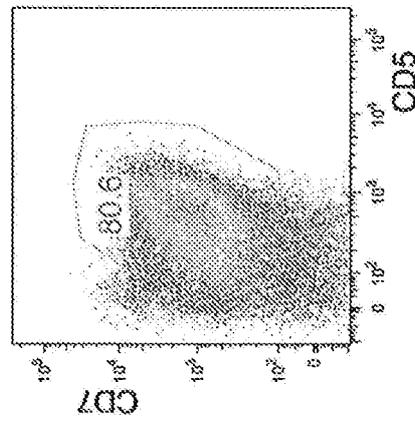
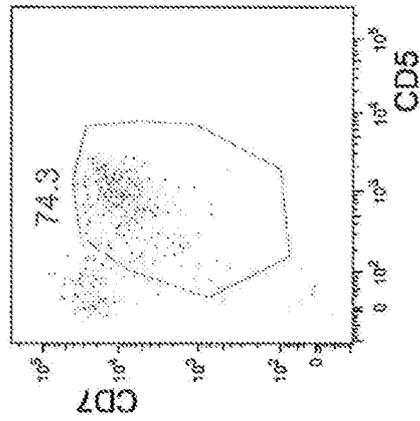
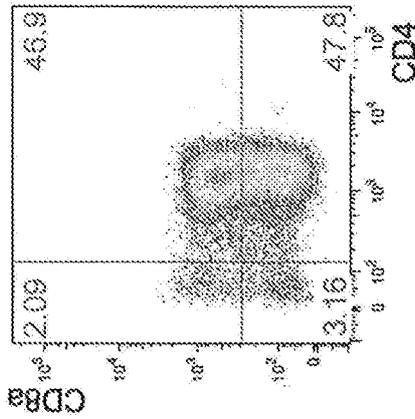
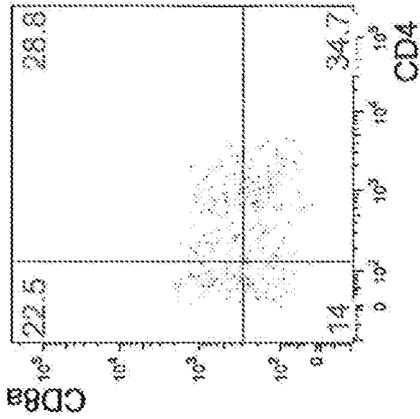
iPS細胞としてFf-I01株に人工抗原受容体(CAR)を導入したFf-I01 GC33株を用い、実施例 1 と同様の方法で培養を行うことによりCD4CD8両陽性細胞を得た。その結果、図 11 に示すように、CARを導入したiPS細胞でも、SB203580 とSDF-1を含む培地で培養することにより、効率よくCD4CD8両陽性細胞が得られることが分かった。

請求の範囲

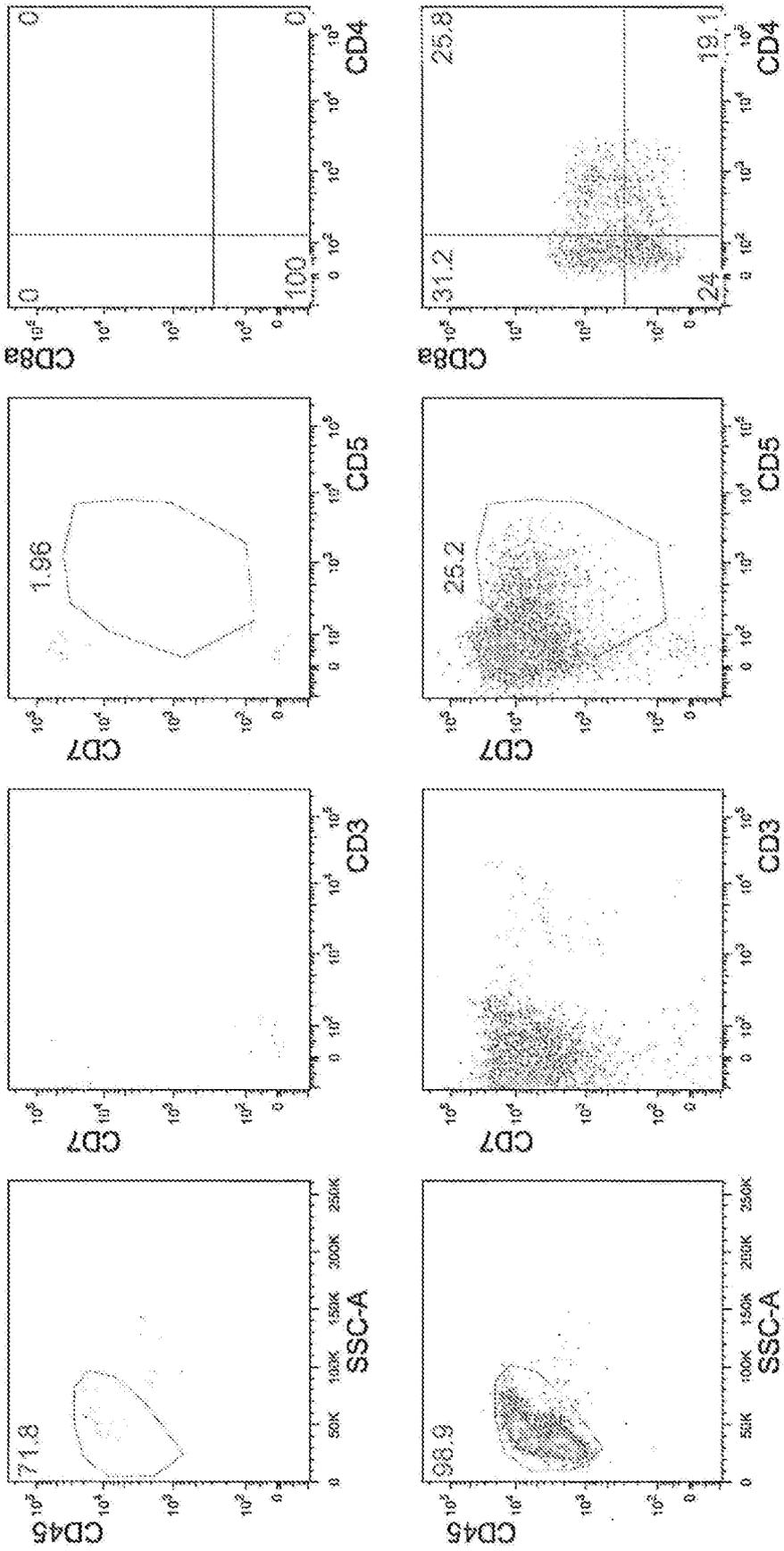
- [請求項1] 造血前駆細胞を、p38阻害剤および／またはSDF-1を含有する培養液中で培養し、CD4CD8両陽性T細胞を誘導する工程を含む、CD4CD8両陽性T細胞の製造方法。
- [請求項2] 前記培養液はp38阻害剤およびSDF-1を含む、請求項1に記載の方法。
- [請求項3] 前記p38阻害剤は、SB203580である、請求項1または2に記載の方法。
- [請求項4] 前記工程において、培養液はビタミンC類を含有する、請求項1～3のいずれか一項に記載の方法。
- [請求項5] 前記工程は、接着培養で行われる、請求項1～4のいずれか一項に記載の方法。
- [請求項6] 前記造血前駆細胞はフィーダー細胞を用いることなく培養される、請求項1～5のいずれか一項に記載の方法。
- [請求項7] 前記造血前駆細胞は多能性幹細胞から分化誘導された造血前駆細胞である、請求項1～6のいずれか一項に記載の方法。
- [請求項8] 多能性幹細胞が人工多能性幹細胞である、請求項7に記載の方法。
- [請求項9] 人工多能性幹細胞がT細胞以外の体細胞に由来する、請求項8に記載の方法。
- [請求項10] 人工多能性幹細胞がキメラ抗原受容体が導入された人工多能性幹細胞である、請求項8または9に記載の方法。
- [請求項11] 以下の工程を含む、CD4CD8両陽性T細胞の製造方法；
- (1) 多能性幹細胞を培養液中で培養し、造血前駆細胞を誘導する工程、
 - (2) 前記工程(1)で得られた造血前駆細胞を、p38阻害剤および／またはSDF-1を含有する培養液中で培養し、CD4CD8両陽性T細胞を誘導する工程。
- [請求項12] 前記工程(2)において、培養液はp38阻害剤およびSDF-1を含む、請求項11に記載の方法。

- [請求項13] 前記p38阻害剤は、SB203580である、請求項11または12に記載の方法。
- [請求項14] 前記工程（1）は、浮遊培養で行われる、請求項11～13のいずれか一項に記載の方法。
- [請求項15] 前記工程（2）は、接着培養で行われる、請求項11～14のいずれか一項に記載の方法。
- [請求項16] 前記工程（1）および（2）において、培養液はビタミンC類を含有する、請求項11～15のいずれか一項に記載の方法。
- [請求項17] 前記工程（1）および（2）において、培養はフィーダー細胞を用いることなく行われる、請求項11～16のいずれか一項に記載の方法。
- [請求項18] 多能性幹細胞が人工多能性幹細胞である、請求項11～17のいずれか一項に記載の方法。
- [請求項19] 人工多能性幹細胞がT細胞以外の体細胞に由来する、請求項18に記載の方法。
- [請求項20] 人工多能性幹細胞がキメラ抗原受容体が導入された人工多能性幹細胞である、請求項18または19に記載の方法。
- [請求項21] 請求項1～20のいずれか一項に記載の方法によりCD4CD8両陽性T細胞を製造する工程、および得られたCD4CD8両陽性T細胞を副腎皮質ホルモン剤を添加した培養液中で培養してCD8陽性T細胞を得る工程を含む、CD8陽性T細胞の製造方法。
- [請求項22] 請求項1～20のいずれか一項に記載の方法により得られたCD4CD8両陽性T細胞および／または請求項21の方法で得られたCD8陽性T細胞を含む細胞製剤。

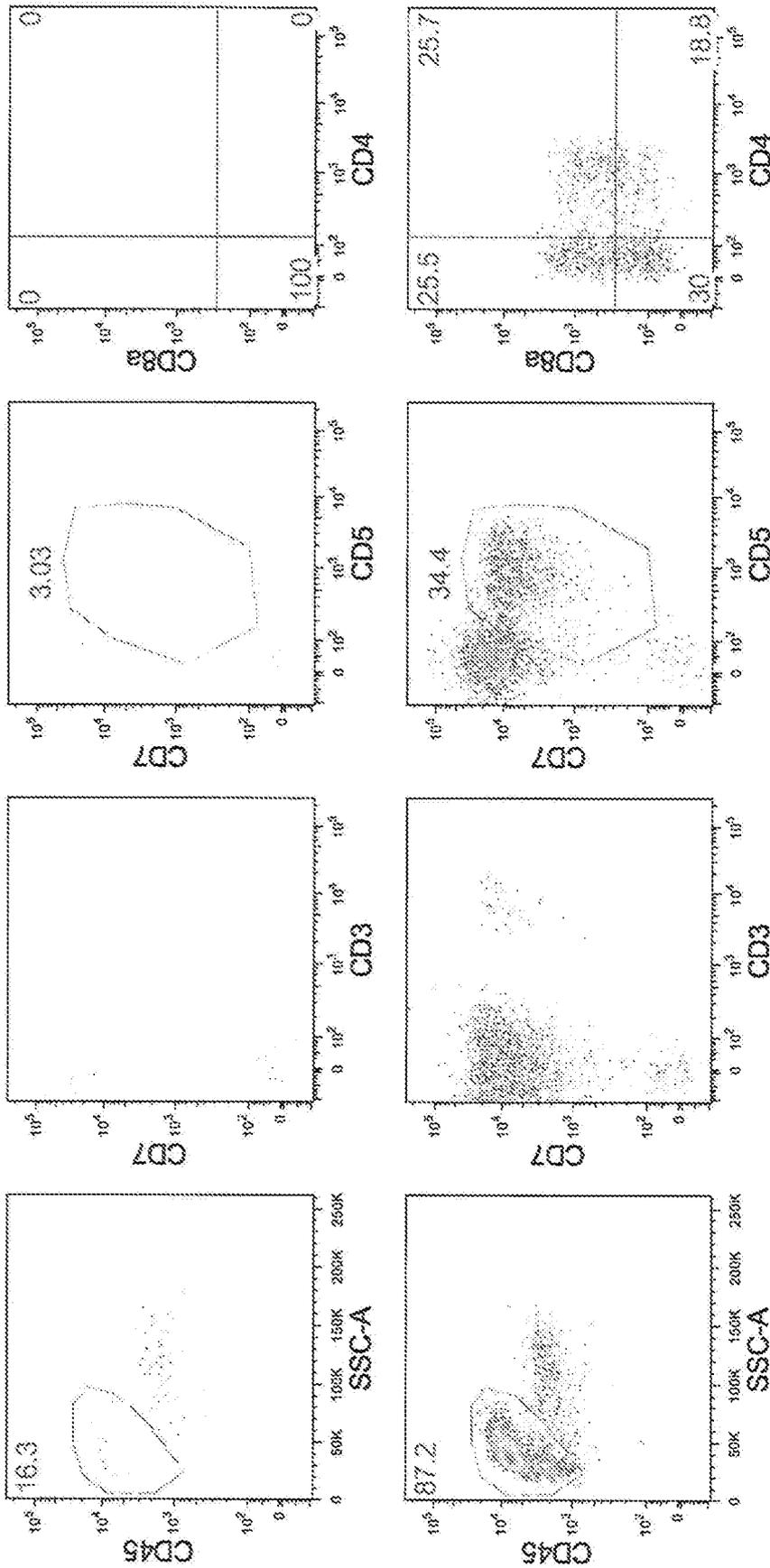
[1]



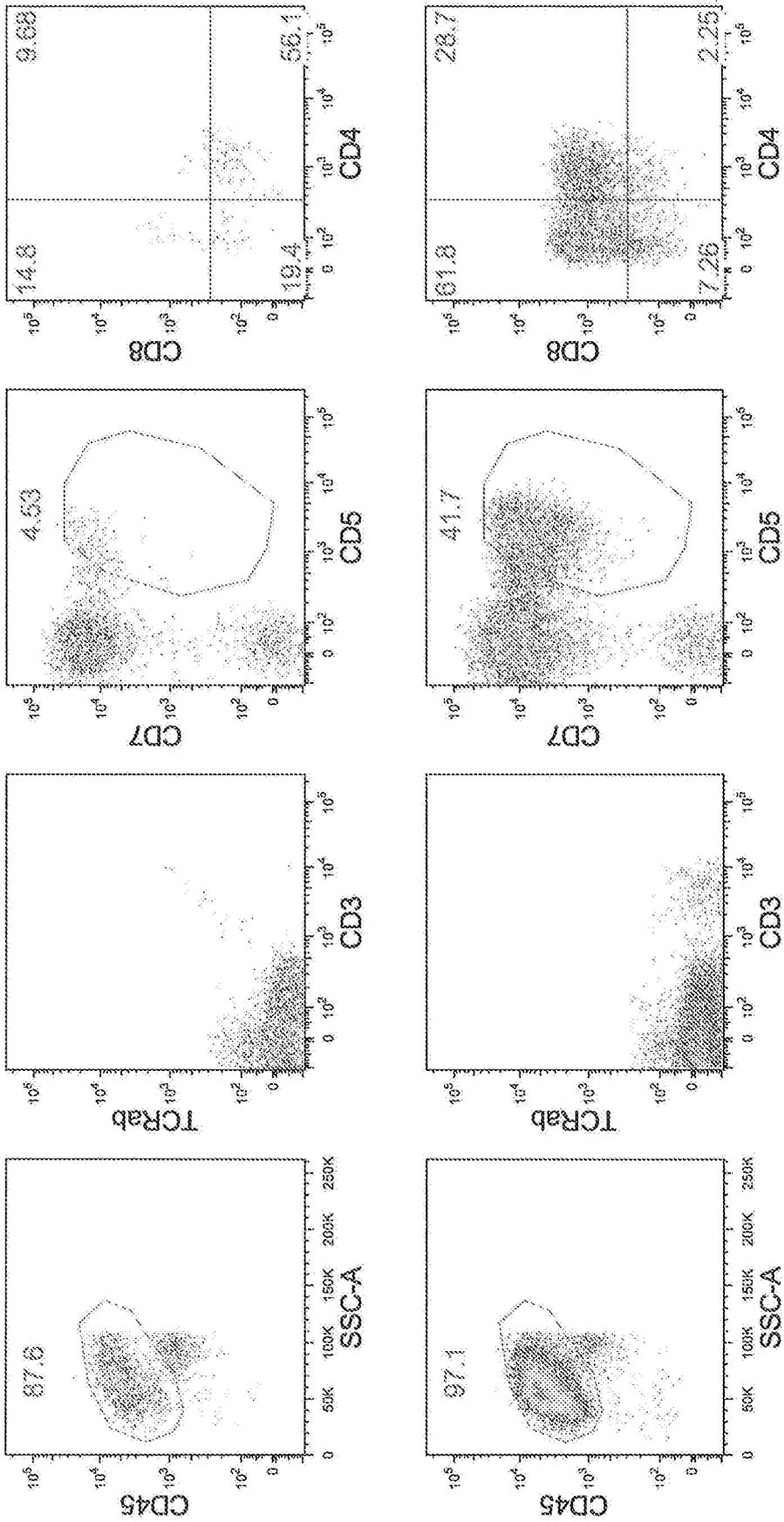
[2]



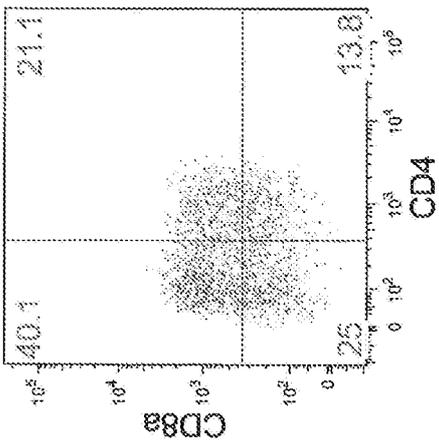
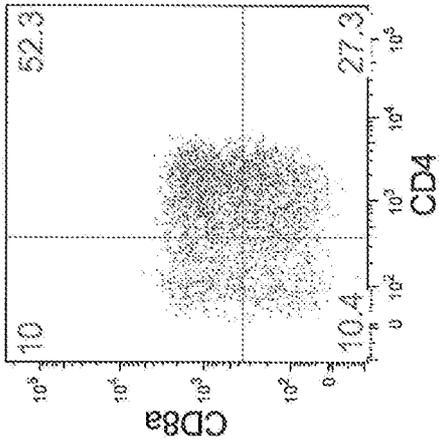
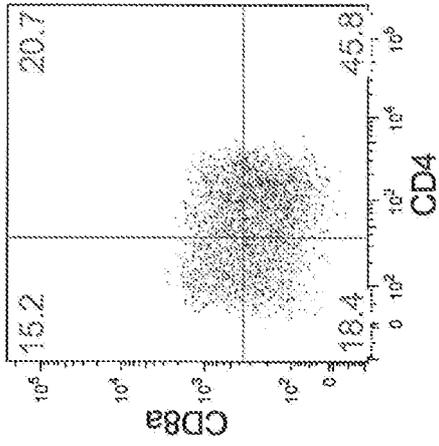
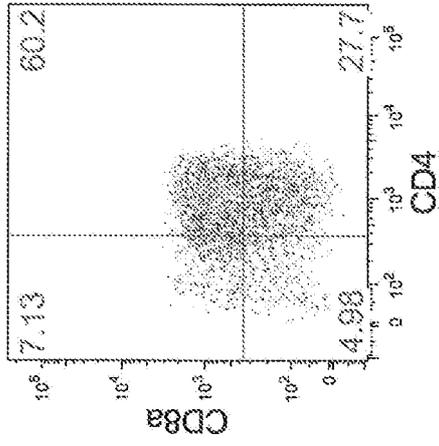
[3]



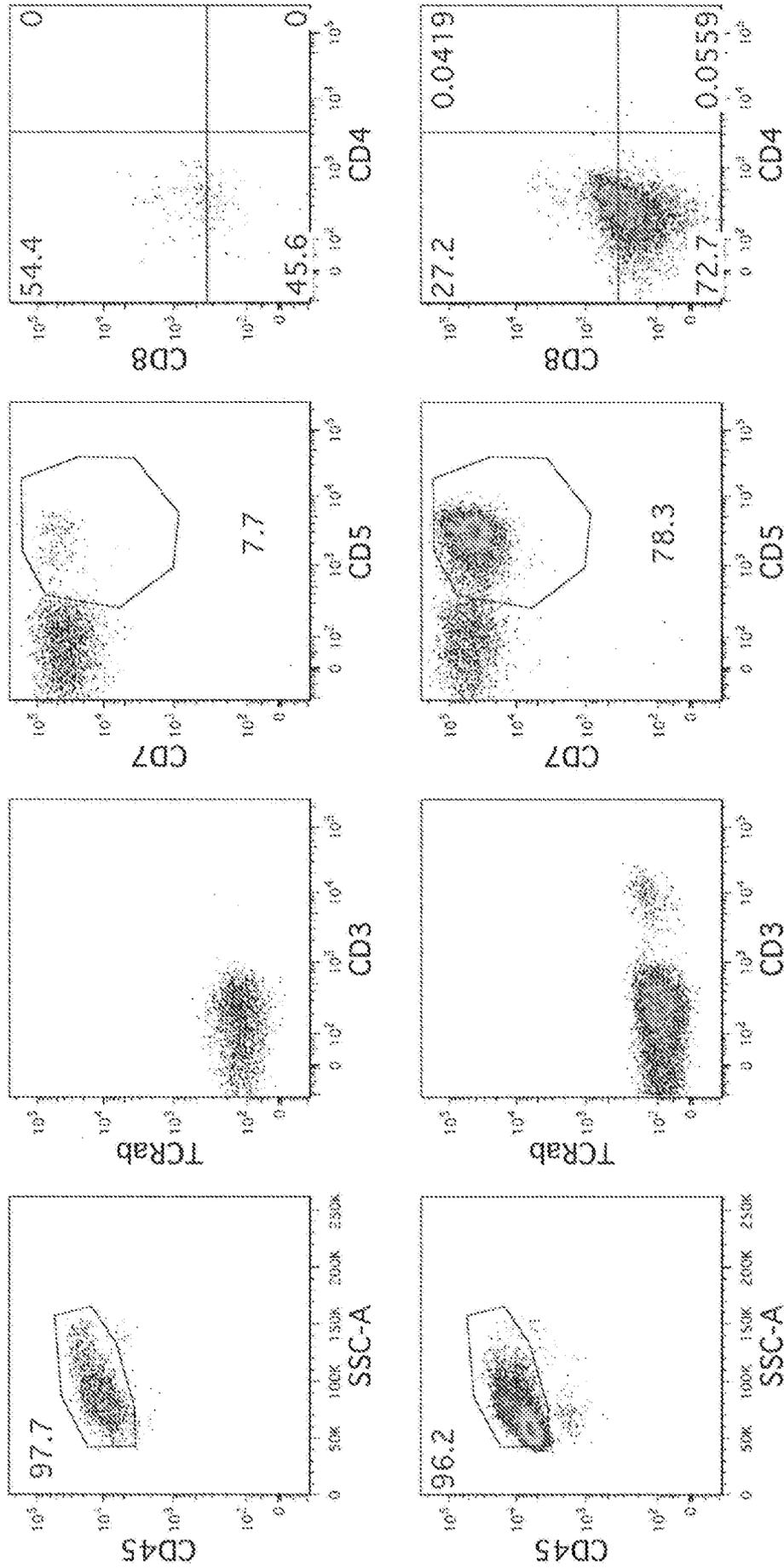
[4]



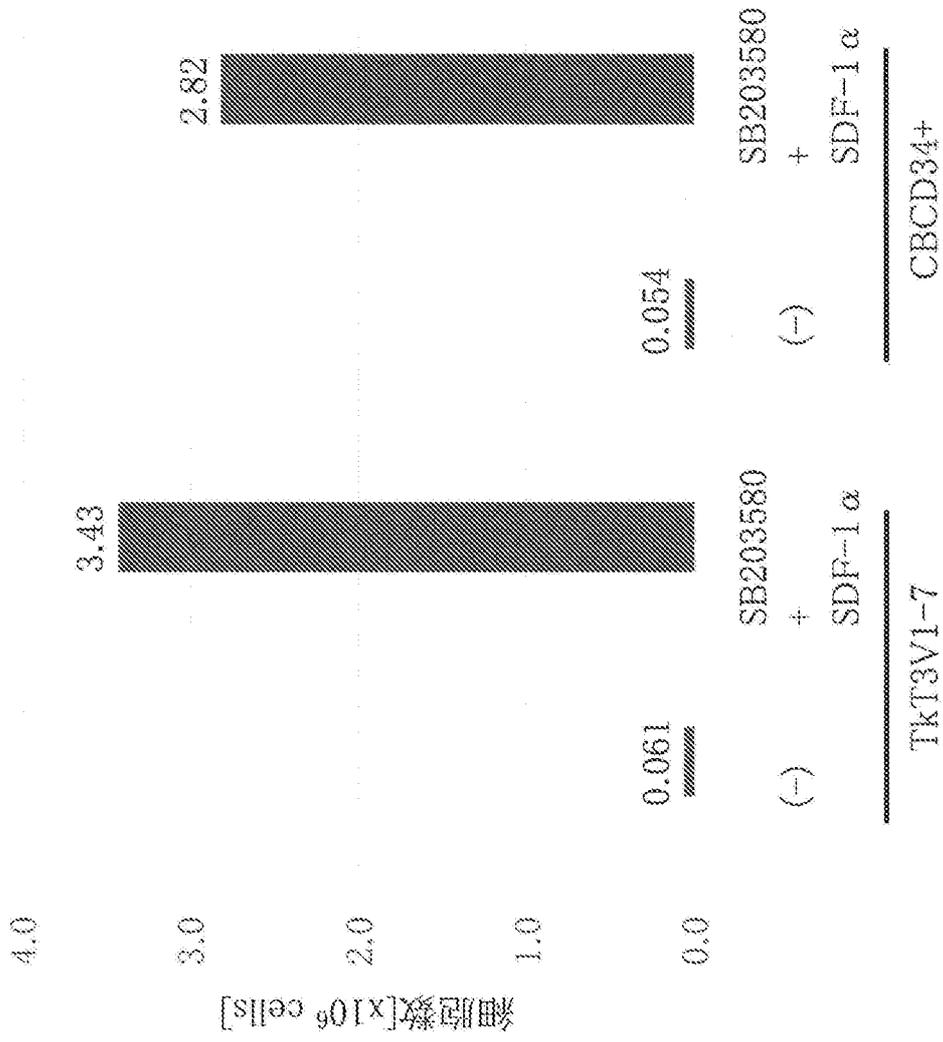
[5]



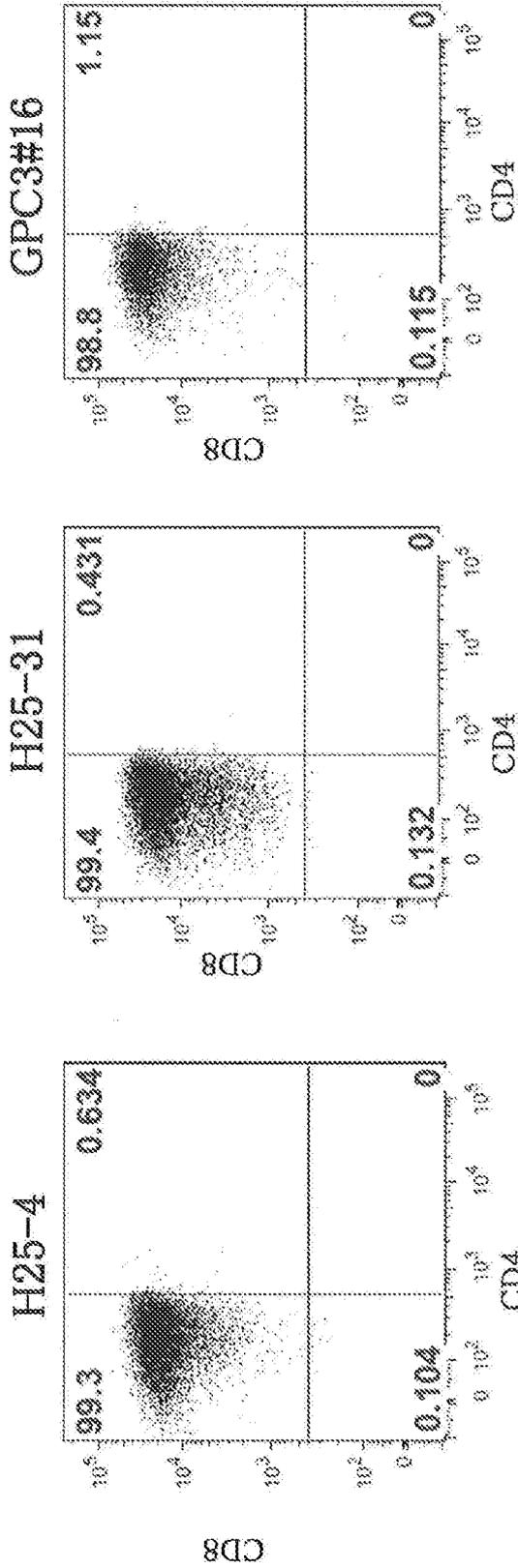
[9]



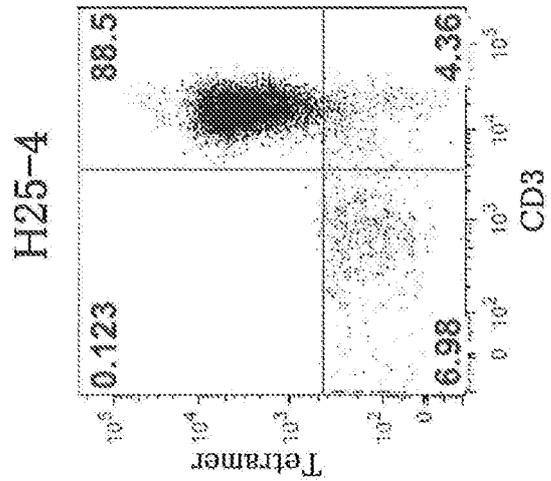
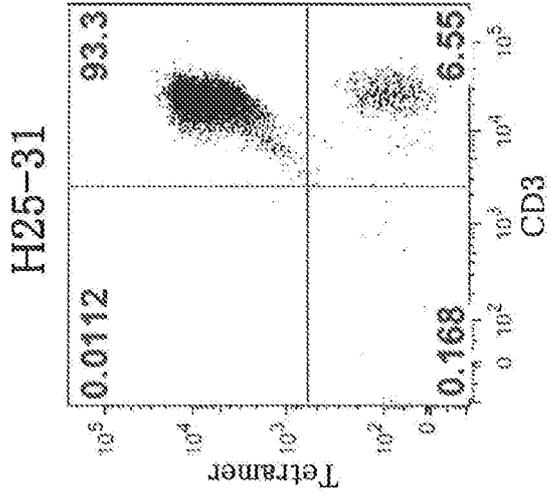
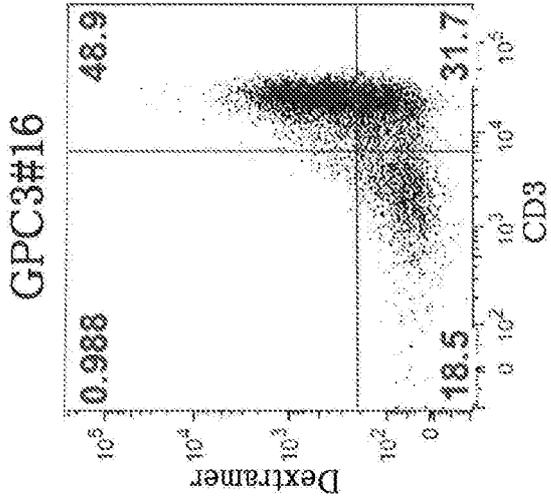
[図7]



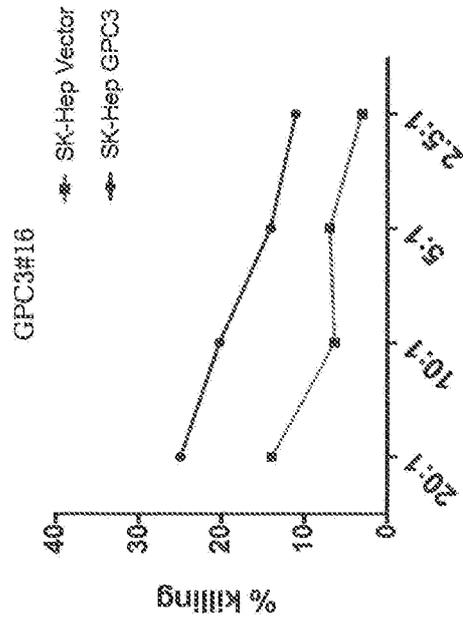
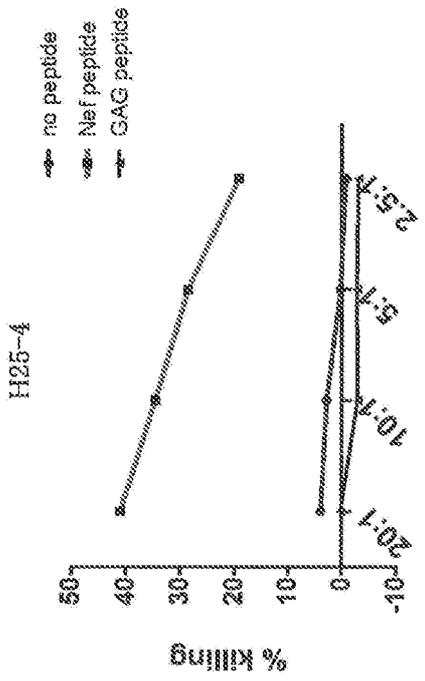
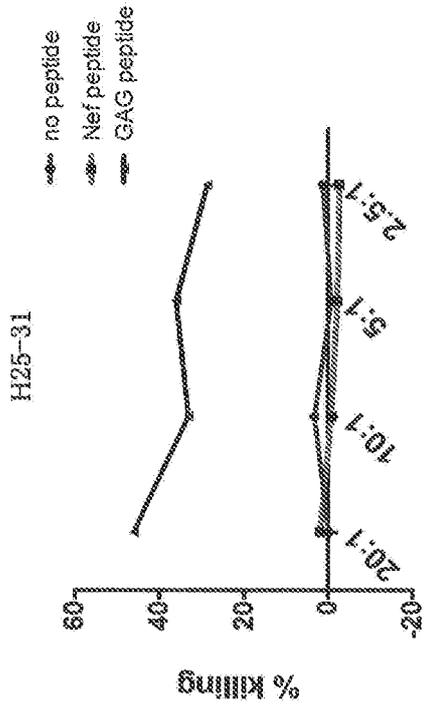
[]8



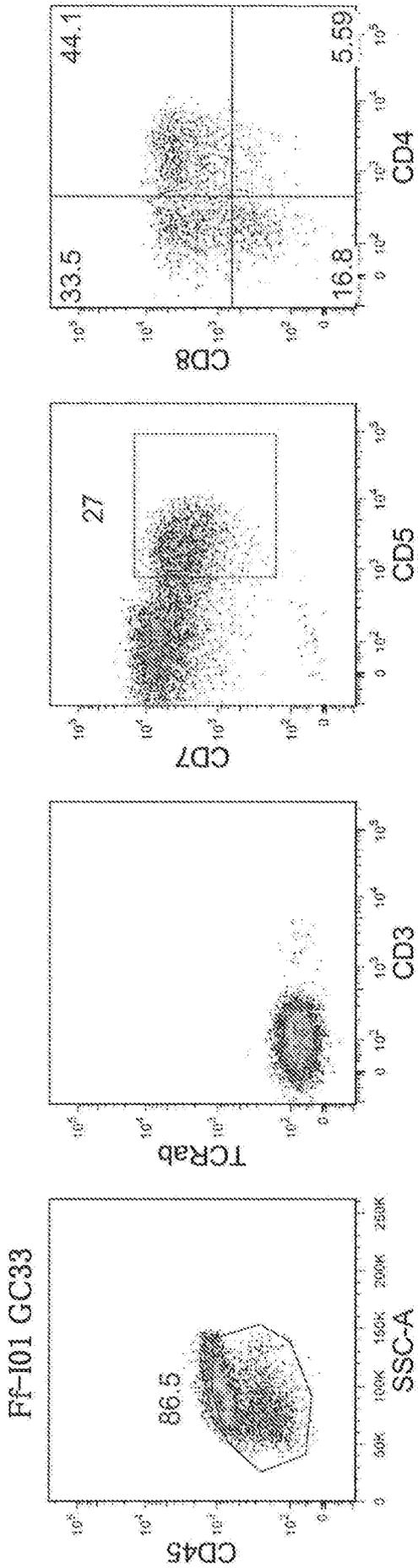
[9]



[10]



[11]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2017/022840

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
C12N5/0783(2010.01)i, C12N5/0735(2010.01)i, C12N5/074(2010.01)i, C12N5/10(2006.01)i

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C12N5/0783, C12N5/0735, C12N5/074, C12N5/10

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

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2017
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2017	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2017

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	WO 2016/076415 A1 (Kyoto University), 19 May 2016 (19.05.2016), entire text; particularly, claims; examples; fig. 1, 2 (Family:none)	22/1-21
Y	WANG Y. et al., Inhibition of p38 Mitogen- Activated Protein Kinase Promotes Ex Vivo Hematopoietic Stem Cell Expansion. Stem Cells and Development, 2011, Vol.20, No.7, pp.1143- 1152 entire text, particularly, abstract, fig. 3	1-21

Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"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
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"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
"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)	"&" document member of the same patent family
"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	

Date of the actual completion of the international search 07 September 2017 (07.09.17)	Date of mailing of the international search report 19 September 2017 (19.09.17)
---	--

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2017/022840

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	ZOU J. et al., Inhibition of p38 MAPK activity promotes ex vivo expansion of human cord blood hematopoietic stem cells. <i>Annals of Hematology</i> , 2012, Vol.91, No.6, pp.813-823 entire text, particularly, abstract, page 3, fig. 3, 5	1-21
Y	YANAGAWA Y. et al., Enhancement of stromal cell-derived factor-1 α -induced chemotaxis for CD4/8 double-positive thymocytes by fibronectin and laminin in mice. <i>Immunology</i> , 2001, Vol.104, pp.43-49 entire text, particularly, abstract, page 43, right column, 2nd paragraph, fig. 2, 3	1-21
A	RINCON M. et al., JNK and p38 MAP kinases in CD4+ and CD8+ T cells. <i>Immunological Reviews</i> , 2003, Vol.192, pp.131-142	1-22
A	MULROY T. et al., p38 MAP kinase activity modulates alpha beta T cell development. <i>European Journal of Immunology</i> , 2001, Vol.31, pp.3056-3063	1-22
A	FERNANDEZ E. Thymocyte development past the CD4+CD8+stage requires an active p38 mitogen-activated protein kinase. <i>Blood</i> , 2000, Vol.95, pp.1356-1361	1-22
A	ARA T. et al., A Role of CXC Chemokine Ligand 12/Stromal Cell-Derived Factor-1/Pre-B Cell Growth Stimulating Factor and Its Receptor CXCR4 in Fetal and Adult T Cell Development in Vivo. <i>The Journal of Immunology</i> , 2003, Vol.170, pp.4649-4655	1-22

<p>A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC）） Int.Cl. C12N5/0783(2010.01)i, C12N5/0735(2010.01)i, C12N5/074(2010.01)i, C12N5/10(2006.01)i</p>											
<p>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. C12N5/0783, C12N5/0735, C12N5/074, C12N5/10</p>											
<p>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</p> <table style="width:100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width:30%;">日本国実用新案公報</td> <td>1922-1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971-2017年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2017年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2017年</td> </tr> </table>				日本国実用新案公報	1922-1996年	日本国公開実用新案公報	1971-2017年	日本国実用新案登録公報	1996-2017年	日本国登録実用新案公報	1994-2017年
日本国実用新案公報	1922-1996年										
日本国公開実用新案公報	1971-2017年										
日本国実用新案登録公報	1996-2017年										
日本国登録実用新案公報	1994-2017年										
<p>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)</p>											
<p>C. 関連すると認められる文献</p> <table border="1" style="width:100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="width:15%;">引用文献の カテゴリー*</th> <th style="width:65%;">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</th> <th style="width:20%;">関連する 請求項の番号</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="vertical-align: top;">X / Y</td> <td style="vertical-align: top;"> WO 2016/076415 A1 (国立大学法人京都大学) 2016.05.19 全文、特に、請求項、実施例、図1、図2 ファミリーなし </td> <td style="vertical-align: top;">22 / 1-21</td> </tr> </tbody> </table>				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	WO 2016/076415 A1 (国立大学法人京都大学) 2016.05.19 全文、特に、請求項、実施例、図1、図2 ファミリーなし	22 / 1-21		
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	WO 2016/076415 A1 (国立大学法人京都大学) 2016.05.19 全文、特に、請求項、実施例、図1、図2 ファミリーなし	22 / 1-21									
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。		<input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。									
<p>* 引用文献のカテゴリー</p> <p>「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</p> <p>「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</p> <p>「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）</p> <p>「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献</p> <p>「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願</p>		<p>の日の後に公表された文献</p> <p>「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</p> <p>「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</p> <p>「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</p> <p>「&」同一パテントファミリー文献</p>									
国際調査を完了した日 07.09.2017		国際調査報告の発送日 19.09.2017									
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁（ISA/J P） 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		<table border="1" style="width:100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width:70%;"> 特許庁審査官（権限のある職員） 伊達 利奈 電話番号 03-3581-1101 内線 3448 </td> <td style="width:30%; text-align: center;"> <table border="1" style="width:100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width:20%;">4B</td> <td style="width:80%;">3960</td> </tr> </table> </td> </tr> </table>		特許庁審査官（権限のある職員） 伊達 利奈 電話番号 03-3581-1101 内線 3448	<table border="1" style="width:100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width:20%;">4B</td> <td style="width:80%;">3960</td> </tr> </table>	4B	3960				
特許庁審査官（権限のある職員） 伊達 利奈 電話番号 03-3581-1101 内線 3448	<table border="1" style="width:100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width:20%;">4B</td> <td style="width:80%;">3960</td> </tr> </table>	4B	3960								
4B	3960										

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	<p>WANG Y. et al., Inhibition of p38 Mitogen-Activated Protein Kinase Promotes Ex Vivo Hematopoietic Stem Cell Expansion. Stem Cells and Development, 2011, Vol.20, No.7, pp.1143-1152 全文、特に、要約、図3</p>	1-21
Y	<p>ZOU J. et al., Inhibition of p38 MAPK activity promotes ex vivo expansion of human cord blood hematopoietic stem cells. Annals of Hematology, 2012, Vol.91, No.6, pp.813-823 全文、特に、要約、第3頁、図3、図5</p>	1-21
Y	<p>YANAGAWA Y. et al., Enhancement of stromal cell-derived factor-1α-induced chemotaxis for CD4/8 double-positive thymocytes by fibronectin and laminin in mice. Immunology, 2001, Vol.104, pp.43-49 全文、特に、要約、第43頁右欄第2段落、図2、図3</p>	1-21
A	<p>RINCON M. et al., JNK and p38 MAP kinases in CD4+ and CD8+ T cells. Immunological Reviews, 2003, Vol.192, pp.131-142</p>	1-22
A	<p>MULROY T. et al., p38 MAP kinase activity modulates alpha beta T cell development. European Journal of Immunology, 2001, Vol.31, pp.3056-3063</p>	1-22
A	<p>FERNANDEZ E. Thymocyte development past the CD4+CD8+stage requires an active p38 mitogen-activated protein kinase. Blood, 2000, Vol.95, pp.1356-1361</p>	1-22
A	<p>ARA T. et al., A Role of CXC Chemokine Ligand 12/Stromal Cell-Derived Factor-1/Pre-B Cell Growth Stimulating Factor and Its Receptor CXCR4 in Fetal and Adult T Cell Development in Vivo. The Journal of Immunology, 2003, Vol.170, pp.4649-4655</p>	1-22