

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

W02017/159736

発行日 平成31年1月31日 (2019. 1. 31)

(43) 国際公開日 平成29年9月21日 (2017. 9. 21)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/00 (2006. 01)	C 1 2 N 15/00 Z N A	4 B 0 6 5
C 1 2 N 5/10 (2006. 01)	C 1 2 N 5/10	4 C 0 7 6
C 1 2 N 15/09 (2006. 01)	C 1 2 N 15/09 Z	4 C 0 8 4
C 1 2 N 15/12 (2006. 01)	C 1 2 N 15/12	4 C 0 8 7
C 1 2 N 15/24 (2006. 01)	C 1 2 N 15/24	

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 27 頁) 最終頁に続く

出願番号 特願2018-505978 (P2018-505978)	(71) 出願人 304020177 国立大学法人山口大学 山口県山口市吉田 1 6 7 7 - 1
(21) 国際出願番号 PCT/JP2017/010437	
(22) 国際出願日 平成29年3月15日 (2017. 3. 15)	
(31) 優先権主張番号 特願2016-53913 (P2016-53913)	(74) 代理人 100107984 弁理士 廣田 雅紀
(32) 優先日 平成28年3月17日 (2016. 3. 17)	(74) 代理人 100102255 弁理士 小澤 誠次
(33) 優先権主張国 日本国 (JP)	(74) 代理人 100096482 弁理士 東海 裕作
	(74) 代理人 100188352 弁理士 松田 一弘
	(74) 代理人 100113860 弁理士 松橋 泰典
	(74) 代理人 100131093 弁理士 堀内 真

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 免疫機能制御因子を発現する免疫担当細胞及び発現ベクター

(57) 【要約】

本発明は、免疫担当細胞において免疫担当細胞の免疫機能制御因子を発現し、増殖能、生存能、及びT細胞の集積能を併せ持つ免疫担当細胞や、かかる免疫担当細胞を作製するための免疫機能制御因子発現ベクターを提供することを課題とする。

がん抗原を特異的に認識する細胞表面分子、インターロイキン7 (I L - 7)、及びC C L 1 9 を発現する免疫担当細胞を作製する。がん抗原を特異的に認識する細胞表面分子が、がん抗原を特異的に認識するT細胞受容体であることや、免疫担当細胞がT細胞であることが好ましい。

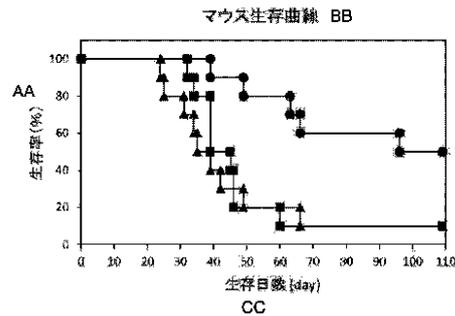


FIG. 7:
AA Survival rate
BB Mouse survival curve
CC Survival time (day)

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

がん抗原を特異的に認識する細胞表面分子、インターロイキン 7 (I L - 7)、及び C C L 1 9 を発現する免疫担当細胞。

【請求項 2】

がん抗原を特異的に認識する細胞表面分子が、がん抗原を特異的に認識する T 細胞受容体であることを特徴とする請求項 1 記載の免疫担当細胞。

【請求項 3】

免疫担当細胞が T 細胞であることを特徴とする請求項 1 又は 2 記載の免疫担当細胞。

【請求項 4】

がん抗原が、 W T 1、 M A R T - 1、 N Y - E S O - 1、 M A G E - A 1、 M A G E - A 3、 M A G E - A 4、 G l y p i c a n - 3、 K I F 2 0 A、 S u r v i v i n、 A F P - 1、 g p 1 0 0、 M U C 1、 P A P - 1 0、 P A P - 5、 T R P 2 - 1、 S A R T - 1、 V E G F R 1、 V E G F R 2、 N E I L 3、 M P H O S P H 1、 D E P D C 1、 F O X M 1、 C D H 3、 T T K、 T O M M 3 4、 U R L C 1 0、 K O C 1、 U B E 2 T、 T O P K、 E C T 2、 M E S O T H E L I N、 N K G 2 D、 P 1 A、 G D 2、又は G M 2 であることを特徴とする請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の免疫担当細胞。

【請求項 5】

請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の免疫担当細胞を作製するための以下の (a) ~ (e) のいずれかの発現ベクター。

(a) がん抗原を特異的に認識する細胞表面分子をコードする核酸、 I L - 7 をコードする核酸、及び C C L 1 9 をコードする核酸を含有する発現ベクター；

(b) 以下の (b - 1) 及び (b - 2) の 2 つの発現ベクター；

(b - 1) がん抗原を特異的に認識する細胞表面分子をコードする核酸を含有する発現ベクター；

(b - 2) I L - 7 をコードする核酸、及び C C L 1 9 をコードする核酸を含有する発現ベクター；

(c) 以下の (c - 1) 及び (c - 2) の 2 つの発現ベクター；

(c - 1) がん抗原を特異的に認識する細胞表面分子をコードする核酸、及び I L - 7 をコードする核酸を含有する発現ベクター；

(c - 2) C C L 1 9 をコードする核酸を含有する発現ベクター；

(d) 以下の (d - 1) 及び (d - 2) の 2 つの発現ベクター；

(d - 1) I L - 7 をコードする核酸を含有する発現ベクター；

(d - 2) がん抗原を特異的に認識する細胞表面分子をコードする核酸、及び C C L 1 9 をコードする核酸を含有する発現ベクター；

(e) 以下の (e - 1)、(e - 2) 及び (e - 3) の 3 つの発現ベクター；

(e - 1) がん抗原を特異的に認識する細胞表面分子をコードする核酸を含有する発現ベクター；

(e - 2) I L - 7 をコードする核酸を含有する発現ベクター；

(e - 3) C C L 1 9 をコードする核酸を含有する発現ベクター；

【請求項 6】

がん抗原を特異的に認識する細胞表面分子が、がん抗原を特異的に認識する T 細胞受容体であることを特徴とする請求項 5 記載の発現ベクター。

【請求項 7】

(a) の発現ベクターにおける、がん抗原を特異的に認識する細胞表面分子をコードする核酸、 I L - 7 をコードする核酸、及び、 C C L 1 9 をコードする核酸、

(b - 2) の発現ベクターにおける、 I L - 7 をコードする核酸、及び C C L 1 9 をコードする核酸、

(c - 1) の発現ベクターにおける、がん抗原を特異的に認識する細胞表面分子をコードする核酸、及び I L - 7 をコードする核酸、又は

10

20

30

40

50

(d-2)の発現ベクターにおける、がん抗原を特異的に認識する細胞表面分子をコードする核酸、及びCCCL19をコードする核酸、
が自己切断型ペプチドを介して連結されていることを特徴とする請求項5又は6記載の発現ベクター。

【請求項8】

自殺遺伝子をコードする核酸を含有することを特徴とする請求項5～7のいずれか1項に記載の発現ベクター。

【請求項9】

請求項1～4のいずれか1項に記載の免疫担当細胞と、薬学的に許容される添加剤とを含有する抗がん剤。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、がん抗原を特異的に認識する細胞表面分子、インターロイキン7(IL-7)、及びCCCL19を発現する免疫担当細胞や、かかる免疫担当細胞を含有する抗がん剤や、かかる免疫担当細胞を作製するための発現ベクターに関する。

【背景技術】

【0002】

がんは世界中で多くの罹患者がいる疾患であり、一般的に化学療法、放射線療法、又は外科療法が広く行われている。しかしながら、副作用が生じることや、一部の機能が失われることや、転移を治療しにくいこと等、様々な問題があった。

20

【0003】

そこで、より患者のQOLを高く維持すべく、近年、免疫療法の開発が進められている。この免疫療法において、免疫細胞療法は、患者から免疫担当細胞を採取し、かかる免疫担当細胞の免疫機能を高めるように処置して増幅し、再度患者に移入する療法である。具体的には、患者からT細胞を採取し、かかるT細胞にCARをコードする遺伝子を導入して増幅し、再度患者に移入する療法(非特許文献1参照)が知られている。この療法は、現在世界中で臨床試験が進行しており、白血病やリンパ腫等の造血器悪性腫瘍等において有効性を示す結果が得られている。

30

【0004】

また、T細胞等の免疫担当細胞の免疫機能制御因子としては、サイトカイン、ケモカイン、シグナル制御タンパク質等、少なくとも数百種類の因子が知られている。その中でインターロイキン7(IL-7)はT細胞の生存に必須のサイトカインであり、骨髄、胸腺、リンパ器官・組織のストローマ細胞等の非造血細胞によって産生されることが知られている。かかるIL-7の機能を利用したT細胞として、IL-7とIL-7Rアルファを融合したキメラサイトカイン受容体を発現するT細胞(特許文献1参照)が開示されている。しかしながら、かかるT細胞におけるキメラサイトカイン受容体は、一つの融合タンパク質として、導入したT細胞の膜表面に限定して発現し、自己の細胞に対してのみリガンド非依存的にIL-7R等のサイトカインシグナルを伝達するものに過ぎず、上記受容体を導入していないT細胞の機能を高めることはできなかった。

40

【0005】

また、CCCL19やCCCL21、IL-7の発現低下がSIRPアルファ変異マウスにおける脾臓でのT細胞領域の維持欠損の原因となること(非特許文献2参照)や、CCCL19やCCCL21、IL-7が二次リンパ組織(脾臓やリンパ節)においてT細胞の恒常性を維持する働きを有していること(非特許文献3参照)が開示されている。しかしながら、上記非特許文献2、3は二次リンパ組織のT細胞領域に恒常的に存在する非活性化T細胞に対する作用を示したものであり、抗腫瘍免疫応答と直接的な関係性を示すものではなかった。さらに、上記非特許文献2、3におけるCCCL19やCCCL21、IL-7発現細胞はT細胞ではなく、二次リンパ組織に存在する細網内皮系の細胞であった。

50

【0006】

一方、T細胞受容体(T cell receptor:以下、「TCR」ともいう)はT細胞の細胞膜上に発現している抗原受容体分子である。アルファ鎖とベータ鎖、又はガンマ鎖とデルタ鎖からなるヘテロ二量体として存在しており、主要組織適合遺伝子複合体(MHC)分子に結合した抗原分子を認識することでT細胞を活性化することが知られている。

【0007】

かかるTCRの機能を応用し、がん細胞に発現する腫瘍抗原を認識できるTCR遺伝子のがん患者から得られたT細胞に導入し、増幅後に再度患者に移入する免疫療法の開発が進められている。具体的には、WT1発現細胞を特異的に認識するTCRを発現する細胞を含有する髄膜腫治療用医薬組成物(特許文献2参照)が開示されている。

10

【0008】

上記技術の一部には、造血器悪性腫瘍に対する抗腫瘍効果を認めるものがあるものの、固形がんに対しては未だに顕著な効果が示された例は無い。これは移入した免疫担当細胞の生体内での生存効率が低い、あるいは移入した免疫担当細胞により誘導される内在性免疫担当細胞の活性化や、腫瘍局所への集積が不十分という問題が考えられており、それらを解決する技術の開発が求められていた。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0009】

20

【特許文献1】国際公開第2013/123061号パンフレット

【特許文献2】特開2013-116891号公報

【0010】

【非特許文献1】中沢洋三 信州医誌 61(4):197~203(2013)

【非特許文献2】SATO-HASHIMOTO M. et al., J. Immunol., 2011, vol.187, no. 1,291-7

【非特許文献3】SIEGERT S. et al., Front. Immunol., 2012, vol.3, article 285

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0011】

30

従来の免疫療法に用いる免疫担当細胞においては、内在性免疫担当細胞の免疫誘導効果や、免疫担当細胞の増殖能、生存能、又はT細胞の集積能が十分に増強されていなかった。そこで、本発明の課題は、免疫担当細胞において免疫担当細胞の免疫機能制御因子を発現し、増殖能、生存能、及びT細胞の集積能を併せ持つ免疫担当細胞や、かかる免疫担当細胞を作製するための免疫機能制御因子発現ベクターを提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0012】

発明者らは、免疫担当細胞を利用したがん免疫療法において、より優れた免疫誘導効果や抗腫瘍活性を達成することを目的として、免疫機能制御因子を発現する細胞の改良を試みた。その過程で、免疫担当細胞の免疫機能を制御する因子であるサイトカイン、ケモカイン、シグナル制御タンパク質に着目し、前記免疫担当細胞の免疫機能を制御する因子を発現するベクターを構築した。かかる発現ベクターを免疫担当細胞に導入したところ、従来の免疫担当細胞よりも優れた免疫誘導効果、増殖能、生存能並びにT細胞の集積能を有する免疫担当細胞を作製することができることを見だし、本発明を完成した。

40

【0013】

すなわち、本発明は以下の(1)~(9)に開示されるとおりのものである。

(1)がん抗原を特異的に認識する細胞表面分子、インターロイキン7(IL-7)、及びCCL19を発現する免疫担当細胞。

(2)がん抗原を特異的に認識する細胞表面分子が、がん抗原を特異的に認識するT細胞受容体であることを特徴とする上記(1)記載の免疫担当細胞。

50

(3) 免疫担当細胞がT細胞であることを特徴とする上記(1)又は(2)記載の免疫担当細胞。

(4) がん抗原が、WT1、MART-1、NY-ESO-1、MAGE-A1、MAGE-A3、MAGE-A4、Glypican-3、KIF20A、Survivin、AFP-1、gp100、MUC1、PAP-10、PAP-5、TRP2-1、SART-1、VEGFR1、VEGFR2、NEIL3、MPHOSPH1、DEPDC1、FOX M1、CDH3、TTK、TOMM34、URLC10、KOC1、UBE2T、TOPK、ECT2、MESOTHELIN、NKG2D、P1A、GD2、又はGM2であることを特徴とする上記(1)～(3)のいずれか1つに記載の免疫担当細胞。

(5) 上記(1)～(4)のいずれか1つに記載の免疫担当細胞を作製するための以下の(a)～(e)のいずれかの発現ベクター。

(a) がん抗原を特異的に認識する細胞表面分子をコードする核酸、IL-7をコードする核酸、及びCCL19をコードする核酸を含有する発現ベクター；

(b) 以下の(b-1)及び(b-2)の2つの発現ベクター；

(b-1) がん抗原を特異的に認識する細胞表面分子をコードする核酸を含有する発現ベクター；

(b-2) IL-7をコードする核酸、及びCCL19をコードする核酸を含有する発現ベクター；

(c) 以下の(c-1)及び(c-2)の2つの発現ベクター；

(c-1) がん抗原を特異的に認識する細胞表面分子をコードする核酸、及びIL-7をコードする核酸を含有する発現ベクター；

(c-2) CCL19をコードする核酸を含有する発現ベクター；

(d) 以下の(d-1)及び(d-2)の2つの発現ベクター；

(d-1) IL-7をコードする核酸を含有する発現ベクター；

(d-2) がん抗原を特異的に認識する細胞表面分子をコードする核酸、及びCCL19をコードする核酸を含有する発現ベクター；

(e) 以下の(e-1)、(e-2)及び(e-3)の3つの発現ベクター；

(e-1) がん抗原を特異的に認識する細胞表面分子をコードする核酸を含有する発現ベクター；

(e-2) IL-7をコードする核酸を含有する発現ベクター；

(e-3) CCL19をコードする核酸を含有する発現ベクター；

(6) がん抗原を特異的に認識する細胞表面分子が、がん抗原を特異的に認識するT細胞受容体であることを特徴とする上記(5)記載の発現ベクター。

(7) (a)の発現ベクターにおける、がん抗原を特異的に認識する細胞表面分子をコードする核酸、IL-7をコードする核酸、及び、CCL19をコードする核酸、

(b-2)の発現ベクターにおける、IL-7をコードする核酸、及びCCL19をコードする核酸、

(c-1)の発現ベクターにおける、がん抗原を特異的に認識する細胞表面分子をコードする核酸、及びIL-7をコードする核酸、又は

(d-2)の発現ベクターにおける、がん抗原を特異的に認識する細胞表面分子をコードする核酸、及びCCL19をコードする核酸、

が自己切断型ペプチドを介して連結されていることを特徴とする上記(5)又は(6)記載の発現ベクター。

(8) 自殺遺伝子をコードする核酸を含有することを特徴とする上記(5)～(7)のいずれか1つに記載の発現ベクター。

(9) 上記(1)～(4)のいずれか1つに記載の免疫担当細胞と、薬学的に許容される添加剤とを含有する抗がん剤。

【発明の効果】

【0014】

本発明のがん抗原を特異的に認識する細胞表面分子、IL-7、及びCCL19を発現

10

20

30

40

50

する免疫担当細胞（以下、「IL-7×CCL19発現免疫担当細胞」ともいう）を用いれば、抗腫瘍活性を有し、細胞表面分子が特異的に認識する抗原を有するがん細胞によって形成された腫瘍による生存率低下を抑制することが可能となる。また、本発明の発現ベクターを用いれば、増殖能、生存能及びT細胞集積能を併せ持つ免疫担当細胞を作製することが可能となる。

【図面の簡単な説明】

【0015】

【図1】IL-7×CCL19発現ベクターのマップを示す図である。

【図2A】IL-7/CCL19発現T細胞の細胞数を調べた結果を示す図である。

【図2B】IL-7/CCL19発現T細胞の生存率を調べた結果を示す図である。

【図3】IL-7/CCL19発現T細胞によるT細胞遊走試験の結果を示す図である。

【図4】IL-7×CCL19×HSV-TK発現ベクターのマップを示す図である。

【図5】TCR×IL-7×CCL19発現ベクターのマップを示す図である。

【図6】IL-7×CCL19×eGFP発現ベクターのマップを示す図である。

【図7】未処理マウス、P1A特異的TCR/eGFP発現T細胞を投与したマウス、及びP1A特異的TCR/IL-7/CCL19/eGFP発現T細胞を投与したマウスの生存率を示す図である。

【図8】未処理マウス、P1A特異的TCR/eGFP発現T細胞を投与したマウス、及びP1A特異的TCR/IL-7/CCL19/eGFP発現T細胞を投与したマウスの腫瘍体積を調べた結果を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0016】

本発明のIL-7×CCL19発現免疫担当細胞は、がん抗原を特異的に認識する細胞表面分子、インターロイキン7（IL-7）、及びCCL19を発現していれば特に制限されず、さらに、IL-15、CCL21、IL-2、IL-4、IL-12、IL-13、IL-17、IL-18、IP-10、CCL4、Flt3L、interferon-gamma、MIP-1alpha、GM-CSF、M-CSF、TGF-beta、TNF-alpha等の他の免疫機能制御因子を発現していてもよい。

【0017】

がん抗原とは、がん細胞において正常細胞よりも高く発現する、あるいはがん細胞に特異的に発現するタンパク質、糖脂質等の物質を意味し、かかるがん抗原としては、腫瘍関連抗原や癌精巢抗原、血管新生関連抗原、遺伝子変異によるがん新生抗原（ネオアンチゲン）のエピトープペプチドを挙げることができ、具体的には、WT1、MART-1、NY-ESO-1、MAGE-A1、MAGE-A3、MAGE-A4、Glypican-3、KIF20A、Survivin、AFP-1、gp100、MUC1、PAP-10、PAP-5、TRP2-1、SART-1、VEGFR1、VEGFR2、NEIL3、MPHOSPH1、DEPDC1、FOX M1、CDH3、TTK、TOMM34、URLC10、KOC1、UBE2T、TOPK、ECT2、MESOTHELIN、NKG2D、P1A等のタンパク質や、GD2、GM2等の糖脂質を挙げることができるが、これに限定されない。

【0018】

がん抗原を特異的に認識する細胞表面分子としては、がん抗原を特異的に認識する細胞表面受容体、人工受容体、接着因子を挙げることができ、がん抗原を特異的に認識するT細胞受容体やがん抗原を特異的に認識するキメラ抗原受容体（constitutive androstane receptor：CAR）等の、細胞表面に発現することによってがんに対して特異的な識別能を付与する分子を好適に挙げることができ、TCRをより好適に挙げることができる。TCRとしては、がん抗原を特異的に認識するかぎりアルファ鎖及びベータ鎖からなるヘテロ二量体（アルファ・ベータTCR）でもガンマ鎖及びデルタ鎖からなるヘテロ二量体（ガンマ・デルタTCR）でもよい。なお、がん抗原を特異的に認識する細胞表面分子は、がん抗原の認識が特異的であれば、間接的に認識するも

10

20

30

40

50

のであってもよい。例えば、がん抗原を特異的に認識する抗体等の分子を本発明の免疫担当細胞と同時又は連続して対象に投与し、当該抗体等の分子を認識するか、又は抗体等の分子に標識されたタグを認識することで、本発明の免疫担当細胞は間接的にがん抗原を特異的に認識し得る。抗体を認識する場合の例としては、細胞表面分子としてCD16等が挙げられ、抗体等の分子に標識するタグの例としては、FITC等が挙げられる。

【0019】

本発明のIL-7×CCL19発現免疫担当細胞における免疫担当細胞の種類としては、免疫応答に関与する細胞であればよく、T細胞、ナチュラルキラー細胞(NK細胞)、B細胞等のリンパ球系細胞や、単球、マクロファージ、樹状細胞等の抗原提示細胞や、好中球、好酸球、好塩基球、肥満細胞等の顆粒球を挙げることができ、ヒト、イヌ、ネコ、ブタ、マウス等の哺乳動物由来のT細胞、好ましくはヒト由来のT細胞を好適に挙げることができる。また、T細胞は、血液、骨髄液等の体液や、脾臓、胸腺、リンパ節等の組織、もしくは原発腫瘍、転移性腫瘍、がん性腹水等のがん組織に浸潤する免疫細胞から単離、精製して得ることができ、またES細胞やiPS細胞から作製されたものを利用してよい。かかるT細胞としては、アルファ・ベータT細胞、ガンマ・デルタT細胞、CD8⁺T細胞、CD4⁺T細胞、腫瘍浸潤T細胞、メモリーT細胞、ナイーブT細胞、NK細胞を挙げることができる。

10

【0020】

本発明のIL-7×CCL19発現免疫担当細胞の作製方法としては、後述する本発明の発現ベクターを免疫担当細胞に導入して作製する方法を挙げることができる。若しくは、受精卵、ES細胞、又はiPS細胞に対して、がん抗原を特異的に認識する細胞表面分子、インターロイキン7(IL-7)、及び/又はCCL19を発現するベクターを導入してから誘導して作製する方法や、がん抗原を特異的に認識する細胞表面分子を遺伝子導入により発現したトランスジェニック哺乳動物から分離して得た免疫担当細胞に、さらに必要に応じてがん抗原を特異的に認識する細胞表面分子、インターロイキン7(IL-7)、及び/又はCCL19を発現するベクターを導入して作製する方法も挙げることができる。

20

【0021】

後述する本発明の発現ベクターを上記免疫担当細胞に導入して作製する方法としては特に制限されないが、ウイルス感染法、カルシウムリン酸法、リポフェクション法、マイクロインジェクション法、エレクトロポレーション法等の公知の方法により導入する方法を挙げることができ、ウイルス感染法により導入する方法を好適に挙げることができる。

30

【0022】

ウイルス感染法としては、本発明の発現ベクターとパッケージングプラスミドをGP2-293細胞(タカラバイオ社製)、Plat-GP細胞(コスモ・バイオ社製)、PG13細胞(ATCC CRL-10686)、PA317細胞(ATCC CRL-9078)等のパッケージング細胞にトランスフェクションして組換えウイルスを作製し、かかる組換えウイルスを免疫担当細胞に感染させる方法を挙げることができ、Retrovirus packagin Kit Eco(タカラバイオ社製)等の市販のキットを用いてもよい。

【0023】

また、本発明の免疫担当細胞は、がん抗原を特異的に認識する細胞表面分子、IL-7、及びCCL19をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドを、公知の遺伝子編集技術を用いて、適切なプロポーターの制御下で発現可能なように、細胞のゲノムに組み込むことによって作製してもよい。公知の遺伝子編集技術としては、ジンクフィンガーヌクレアーゼ、TALEN(転写活性化様エフェクターヌクレアーゼ)、CRISPR(Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat)-Casシステム等のエンドヌクレアーゼを用いる技術が挙げられる。本発明の免疫担当細胞に他の外来タンパク質を発現させる場合も同様に、遺伝子編集技術を用いて、他の外来タンパク質をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドを、適切なプロポーターの制御下で発現可能なように、細胞のゲノムに組み込んでよい。

40

50

い。適切なプロポーターの制御下で発現可能なようポリヌクレオチドを細胞ゲノムに組み込む方法としては、がん抗原を特異的に認識する細胞表面分子、IL-7、及びCCCL19（又は他のタンパク質）をコードする塩基配列を、適切なプロモーターの下流に機能的に連結したポリヌクレオチド（即ち、当該プロモーターの制御下で発現可能なようにコード配列を連結したポリヌクレオチド）を、細胞ゲノムの非コード領域等に組み込む方法；がん抗原を特異的に認識する細胞表面分子、IL-7、及びCCCL19（又は他のタンパク質）をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドを、細胞ゲノムの内在性プロモーターの下流に組み込む方法等が挙げられる。内在性プロモーターとしては、例えば、TCR、TCRのプロモーター等が挙げられる。

【0024】

また、本発明のIL-7×CCCL19発現免疫担当細胞に、後述する単純ヘルペスウイルスのチミジンキナーゼ（HSV-TK）や誘導性カスパーゼ9（inducible caspase 9）が発現するようにしてもよい。

【0025】

本発明のIL-7×CCCL19発現免疫担当細胞はがん抗原を特異的に認識する細胞表面分子、IL-7、及びCCCL19を発現することから、増殖能、生存能、及び内因性T細胞の集積能が高く、種々の免疫担当細胞を用いた養子免疫療法に応用することが可能である。養子免疫療法の例としては、樹状細胞療法、NK細胞療法、ガンマ・デルタT細胞療法、アルファ・ベータT細胞療法、CTL療法、TIL療法等が挙げられるがこれに限定されない。患者から採取した免疫担当細胞に後述する本発明の発現ベクターを導入して増幅し、患者に投与する方法を挙げることができる。以下に具体的な例を挙げるが、これに限定するものではない。樹状細胞療法では、患者から採取した単球から分化した樹状細胞に、手術で摘出したがん組織又はそのライセートを取り込ませ、患者の体内へ投与する工程を含むが、本発明の発現ベクターを、樹状細胞に導入する工程を含んでもよい。ここで、上記がん組織やライセートに替えてがん抗原分子のエピトープペプチドを人工的に合成して利用することもできる。NK細胞療法は、患者から採取したリンパ球をIL-2等の複数の刺激物質でNK細胞を活性化し増殖させ、患者へ投与する工程を含むが、本発明のベクターをNK細胞に導入する工程を含んでもよい。なお、がんに対する抗体医薬を活性化したNK細胞と併用することでがん細胞を効率よく攻撃する効果を期待できる。ガンマ・デルタT細胞療法は、患者から採取したリンパ球をIL-2やゾレドロン酸を利用して培養刺激し、ガンマ・デルタT細胞を増殖させ、患者へ投与する工程を含むが、本発明の発現ベクターをガンマ・デルタT細胞に導入する工程を含んでもよい。アルファ・ベータT細胞療法は、患者から採集したリンパ球を抗CD3抗体やIL-2で培養し、活性化したアルファ・ベータT細胞を患者へ投与する工程を含むが、本発明の発現ベクターをアルファ・ベータT細胞に導入する工程を含んでもよい。CTL療法は、患者から採集したリンパ球を、患者から採取したがん細胞により刺激し、抗CD3抗体やIL-2を添加して培養し、がん細胞に特異的なCTLを増殖させ患者へ投与する工程を含むが、本発明の発現ベクターをCTLに導入する工程を含んでもよい。また、上記のがん細胞に代えて、がん抗原エピトープペプチドを提示する抗原提示細胞を利用することもできる。TIL療法は、患者から採取したがん組織からリンパ球を採集し、IL-2等で刺激・培養し、患者に投与する工程を含むが、本発明の発現ベクターをリンパ球に導入する工程を含んでもよい。

【0026】

本発明の発現ベクターは、上記本発明のIL-7×CCCL19発現免疫担当細胞を作製するための以下の(a)～(e)のいずれかである。

(a) がん抗原を特異的に認識する細胞表面分子をコードする核酸、IL-7をコードする核酸、及びCCCL19をコードする核酸を含有する発現ベクター；

(b) 以下の(b-1)及び(b-2)の2つの発現ベクター；

(b-1) がん抗原を特異的に認識する細胞表面分子をコードする核酸を含有する発現ベクター；

10

20

30

40

50

(b - 2) I L - 7 をコードする核酸、及び C C L 1 9 をコードする核酸を含有する発現ベクター；

(c) 以下の (c - 1) 及び (c - 2) の 2 つの発現ベクター；

(c - 1) がん抗原を特異的に認識する細胞表面分子をコードする核酸、及び I L - 7 をコードする核酸を含有する発現ベクター；

(c - 2) C C L 1 9 をコードする核酸を含有する発現ベクター；

(d) 以下の (d - 1) 及び (d - 2) の 2 つの発現ベクター；

(d - 1) I L - 7 をコードする核酸を含有する発現ベクター；

(d - 2) がん抗原を特異的に認識する細胞表面分子をコードする核酸、及び C C L 1 9 をコードする核酸を含有する発現ベクター；

10

(e) 以下の (e - 1)、(e - 2) 及び (e - 3) の 3 つの発現ベクター；

(e - 1) がん抗原を特異的に認識する細胞表面分子をコードする核酸を含有する発現ベクター；

(e - 2) I L - 7 をコードする核酸を含有する発現ベクター；

(e - 3) C C L 1 9 をコードする核酸を含有する発現ベクター；

【 0 0 2 7 】

本発明の発現ベクターは、さらに、I L - 1 5、C C L 2 1、I L - 2、I L - 4、I L - 1 2、I L - 1 3、I L - 1 7、I L - 1 8、I P - 1 0、C C L 4、F l t 3 L、I n t e r f e r o n - g a m m a、M I P - 1 a l p h a、G M - C S F、M - C S F、T G F - b e t a、T N F - a l p h a 等の他の免疫機能制御因子をコードする核酸を含有してもよい。

20

【 0 0 2 8 】

上記がん抗原を特異的に認識する細胞表面分子をコードする核酸、インターロイキン 7 (I L - 7) をコードする核酸、及び C C L 1 9 をコードする核酸はそれぞれ哺乳動物由来の核酸を挙げることができ、ヒト由来の核酸を好適に挙げることができる。上記それぞれの核酸は、本発明の発現ベクターを導入する細胞の種類に応じて適宜選択でき、かかるそれぞれの核酸の配列情報は、公知の文献や N C B I (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/guide/>) 等のデータベースを検索して適宜入手することができる。

【 0 0 2 9 】

上記がん抗原を特異的に認識する細胞表面分子をコードする核酸としては、ヒト由来の核酸を好適に挙げることができ、かかるがん抗原を特異的に認識する細胞表面分子をコードする核酸は、T細胞受容体 (T C R) をコードする核酸又はキメラ抗原受容体 (C A R) をコードする核酸を挙げることができ、天然由来の核酸でも人工合成の核酸でもよく、本発明の発現ベクターを導入する細胞の種類に応じて適宜選択でき、配列情報は、公知の文献や N C B I (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/guide/>) 等のデータベースを検索して適宜入手することができる。

30

【 0 0 3 0 】

がん抗原を特異的に認識する細胞表面分子をコードする核酸、I L - 7 をコードする核酸及び C C L 1 9 をコードする核酸は、それぞれをコードする核酸の塩基配列の情報に基づき、化学合成する方法や、P C R によって増幅する方法等の公知の技術によって作製することができる。なお、アミノ酸をコードするための選択されるコドンは、目的の宿主細胞における核酸の発現を最適化するために改変されてもよい。

40

【 0 0 3 1 】

上記 T C R をコードする核酸における T C R としては、アルファ鎖及びベータ鎖からなるヘテロ二量体 (アルファ・ベータ T C R) でもガンマ鎖及びデルタ鎖からなるヘテロ二量体 (ガンマ・デルタ T C R) でもよい。なお、アルファ・ベータ T C R をコードする核酸には、T C R のアルファ鎖をコードする核酸とベータ鎖をコードする核酸の両方が含まれ、ガンマ・デルタ T C R をコードする核酸には、T C R のガンマ鎖をコードする核酸とデルタ鎖をコードする核酸の両方が含まれる。

【 0 0 3 2 】

50

上記 T C R をコードする核酸の配列情報は、当技術分野における公知の方法を用いることにより、特定の抗原ペプチドを用いて誘導された C T L の T C R サブユニットとしてのアルファ鎖及びベータ鎖の核酸から同定することができる（国際公開第 2 0 0 7 / 0 3 2 2 5 5 号パンフレット、及び Morgan et al., J Immunol, 171, 3288 (2003)）。例えば、T C R を解析するためには P C R 法が好ましい。解析のための P C R プライマーは、例えば、5'側プライマーとしての 5' - R プライマー（5' - g t c t a c c a g g c a t t c g c t t c a t - 3' : 配列番号 3）、及び 3'側プライマーとしての、T C R アルファ鎖 C 領域に特異的な 3 - T R a - C プライマー（5' - t c a g c t g g a c c a c a g c c g c a g c g t - 3' : 配列番号 4）、T C R ベータ鎖 C 1 領域に特異的な 3 - T R b - C 1 プライマー（5' - t c a g a a a t c c t t t c t c t t g a c - 3' : 配列番号 5）、又は T C R ベータ鎖 C 2 領域に特異的な 3 - T R b e t a - C 2 プライマー（5' - c t a g c c t c t g g a a t c c t t t c t c t t - 3' : 配列番号 6）であり得るが、これらに限定されない。T C R 誘導体は、抗原ペプチドを提示する標的細胞と高い結合力で結合することができ、かつ任意で、抗原ペプチドを提示する標的細胞の効率的な殺傷をインビボ及びインビトロで媒介することができる。

【 0 0 3 3 】

上記 T C R をコードする核酸としては、例えば M A R T 1 特異的 T C R (Cancer Res. 54, 5265-5268 (1994))、M A G E - A 3 特異的 T C R (Anticancer Res., 20, 1793-1799 (2000))、g p 1 0 0 特異的 T C R (J. Immunol. 170, 2186-2194 (2003))、N Y - E S O - 1 特異的 T C R (J. Immunol., 174, 4415-4423 (2005))、W T 1 特異的 T C R (Blood, 106, 470-476 (2005))、M A G E - A 1 特異的 T C R (Int. Immunol., 8, 1463-1466 (1996))、P 1 A 特異的 T C R (Sarma, S., Y. Guo, Y. Guilloux, C. Lee, X.-F. Bai, Y. Liu. 1999. Cytotoxic T lymphocytes to an unmutated tumor antigen P1A: normal development but restrained effector function. J. Exp. Med. 189:811.) 等の T C R をコードする核酸や、M H C 分子に結合した抗原分子を認識し、かつ T 細胞を活性化することができるかぎり、上記文献に記載の T C R をコードする塩基配列と 8 0 % 以上、好ましくは 8 5 % 以上、より好ましくは 9 0 % 以上、さらに好ましくは 9 5 % 以上、最も好ましくは 9 8 % 以上の同一性を有する塩基配列でもよい。さらに、上記文献に記載された T C R をコードする塩基配列の中で C D R をコードする配列を特定し、かかる C D R をコードする配列を維持し、かつ C D R をコードする配列以外の配列において、上記文献に記載の T C R をコードする塩基配列と 6 0 % 以上、好ましくは 7 0 % 以上、より好ましくは 8 0 % 以上、さらに好ましくは 9 0 % 以上、最も好ましくは 9 5 % 以上の同一性を有する塩基配列でもよい。

【 0 0 3 4 】

I L - 7 をコードする核酸としては、配列番号 1 に示すアミノ酸配列をコードする塩基配列を挙げることができ、I L - 7 における細胞増殖率又は細胞生存率の亢進作用を有する限り、配列番号 1 に示すアミノ酸配列をコードする塩基配列と 8 0 % 以上、好ましくは 8 5 % 以上、より好ましくは 9 0 % 以上、さらに好ましくは 9 5 % 以上、最も好ましくは 9 8 % 以上の同一性を有する塩基配列でもよい。C C L 1 9 をコードする核酸としては、配列番号 2 に示すアミノ酸配列をコードする塩基配列を挙げることができ、C C L 1 9 における細胞の遊走作用を有する限り、配列番号 2 に示すアミノ酸配列をコードする塩基配列と 8 0 % 以上、好ましくは 8 5 % 以上、より好ましくは 9 0 % 以上、さらに好ましくは 9 5 % 以上、最も好ましくは 9 8 % 以上の同一性を有する塩基配列を用いてもよい。

【 0 0 3 5 】

また、本発明の発現ベクターには、自殺遺伝子をコードする核酸を含んでもよい。自殺遺伝子とは、発現することによって直接的に、あるいは二次的に細胞毒性を有する物質を誘導し、自らの細胞を死に至らしめる機能を有する遺伝子を意味する。本発明の発現ベクターに自殺遺伝子をコードする核酸を含ませることによって、がんの治療経過に応じて、たとえば腫瘍が消失した場合に自殺遺伝子の機能を活性化する薬剤を投与し、生体内の免疫担当細胞を制御することができる。また、I L - 7 又は C C L 1 9 は他のサイトカ

インとは異なり、副作用としてサイトカイン放出症候群や遺伝子導入細胞の腫瘍化を引き起こす可能性は低い。しかしながら、本発明の発現ベクターを導入した免疫担当細胞の機能が高まることで、標的のがん組織を攻撃する際に放出するサイトカイン等が予想外にも周辺組織へ影響することがあり得る。かかる場合には、本発明の発現ベクターに自殺遺伝子をコードする核酸を含ませることによって、サイトカイン放出症候群になるリスクを確実に低減させることが可能となる。

【0036】

自殺遺伝子としては、以下の文献に記載された単純ヘルペスウイルスのチミジンキナーゼ (HSV-TK) や誘導性カスパーゼ 9 (inducible caspase 9) をコードする遺伝子等を挙げることができ、かかる遺伝子の機能を活性化する薬剤としては、前者に対してはガンシクロビル、後者に対しては二量体誘導化合物 (chemical induction of dimerization: CID) である AP1903 を挙げることができる (Cooper L.J., et. al. *Cytotherapy*. 2006;8(2):105-17., Jensen M. C. et. al. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2010 Sep;16(9):1245-56., Jones BS. *Front Pharmacol*. 2014 Nov 27;5:254., Minagawa K., *Pharmaceuticals (Basel)*. 2015 May 8;8(2):230-49., Bole-Richard E., *Front Pharmacol*. 2015 Aug 25;6:174)。

10

【0037】

本発明のベクターにおける、(a) がん抗原を特異的に認識する細胞表面分子をコードする核酸、IL-7 をコードする核酸、及び CCL19 をコードする核酸を含有する発現ベクターは、いずれの核酸がいずれの上流又は下流に配置されてもよい。具体的には、がん抗原を特異的に認識する細胞表面分子をコードする核酸として TCR をコードする核酸を含有する場合を例にすると、上流から順に TCR をコードする核酸、IL-7 をコードする核酸及び CCL19 をコードする核酸であっても、TCR をコードする核酸、CCL19 をコードする核酸及び IL-7 をコードする核酸であっても、IL-7 をコードする核酸、CCL19 をコードする核酸及び TCR をコードする核酸であっても、IL-7 をコードする核酸、TCR をコードする核酸及び CCL19 をコードする核酸であっても、CCL19 をコードする核酸、TCR をコードする核酸、及び IL-7 をコードする核酸であっても、CCL19 をコードする核酸、IL-7 をコードする核酸及び TCR をコードする核酸であってもよい。

20

【0038】

本発明のベクターにおける、(b-2) IL-7 をコードする核酸、及び CCL19 をコードする核酸を含有する発現ベクターにおいて、IL-7 をコードする核酸及び CCL19 をコードする核酸の配置は特に制限されず、IL-7 をコードする核酸に対して CCL19 をコードする核酸が上流に配置されても下流に配置されてもよい。

30

【0039】

本発明のベクターにおける、(c-1) がん抗原を特異的に認識する細胞表面分子をコードする核酸、及び IL-7 をコードする核酸を含有する発現ベクターにおいて、がん抗原を特異的に認識する細胞表面分子をコードする核酸及び IL-7 をコードする核酸の配置は特に制限されず、がん抗原を特異的に認識する細胞表面分子をコードする核酸に対して IL-7 をコードする核酸が上流に配置されても下流に配置されてもよい。

40

【0040】

本発明のベクターにおける、(d-2) がん抗原を特異的に認識する細胞表面分子をコードする核酸、及び CCL19 をコードする核酸を含有する発現ベクターにおいて、がん抗原を特異的に認識する細胞表面分子をコードする核酸及び CCL19 をコードする核酸の配置は特に制限されず、がん抗原を特異的に認識する細胞表面分子をコードする核酸に対して CCL19 をコードする核酸が上流に配置されても下流に配置されてもよい。

【0041】

なお、がん抗原を特異的に認識する細胞表面分子をコードする核酸、IL-7 をコードする核酸及び CCL19 をコードする核酸はそれぞれ別のプロモーターにより転写されてもよく、内部リボソームエンター部位 (IRES: internal ribozym

50

e entry site)又は自己切断型2Aペプチドを使用して一つのプロモーターで転写されてもよい。

【0042】

内部リボソームエントリー部位(IRES)又は自己切断型2Aペプチドを使用して一つのプロモーターでIL-7をコードする核酸及びCCL19をコードする核酸を転写させる場合における上記各核酸の間や、上記がん抗原を特異的に認識する細胞表面分子をコードする核酸を含む場合における当該核酸とIL-7をコードする核酸及びCCL19をコードする核酸との間や、アルファ・ベータTCRをコードする核酸を含む場合におけるアルファ鎖をコードする核酸とベータ鎖をコードする核酸の間や、ガンマ・デルタTCRをコードする核酸を含む場合におけるデルタ鎖をコードする核酸とデルタ鎖をコードする核酸の間には、それぞれの核酸を発現し得る限り、任意の核酸を含んでもよいが、自己切断型ペプチド(2Aペプチド)、又はIRESをコードする配列、好ましくは2Aペプチドをコードする配列を介して連結されていることが好ましい。かかる配列を用いて連結することにより、それぞれの核酸を効率よく発現させることが可能となる。

10

【0043】

また、自殺遺伝子をコードする核酸を含有する場合には、自殺遺伝子の位置は特に制限されず、例えば、がん抗原を特異的に認識する細胞表面分子をコードする核酸、IL-7をコードする核酸、又はCCL19をコードする核酸を発現させるためのプロモーターの下流に2Aペプチド又はIRESをコードする配列を介して上記それぞれの核酸の上流又は下流に配置してもよく、他のプロモーターの下流に配置してもよい。

20

【0044】

2Aペプチドとは、ウイルス由来の自己切断型ペプチドであり、配列番号7で示されるアミノ酸配列中のG-P間(C末端から1残基の位置)が小胞体で切断される特徴を有する(Szymczak et al., Expert Opin. Biol. Ther.5(5):627-638(2005))。そのため、2Aペプチドを介してその前後に組み込まれた核酸は、細胞内で互いに独立して発現することとなる。

【0045】

前記2Aペプチドとしては、ピコルナウイルス、ロタウイルス、昆虫ウイルス、アフトウイルス又はトリパノソーマウイルス由来の2Aペプチドであることが好ましく、配列番号8に示すピコルナウイルス由来の2Aペプチド(F2A)であることがより好ましい。

30

【0046】

本発明の発現ベクターにおけるベクターとしては直鎖状でも環状でもよく、プラスミド等の非ウイルスベクターでも、ウイルスベクターでも、トランスポゾンによるベクターでもよい。また、かかるベクターには、プロモーターやターミネーター等の制御配列や、薬剤耐性遺伝子、レポーター遺伝子等の選択マーカー配列を含有していてもよい。プロモーター配列の下流に作動可能にIL-7をコードする核酸及びCCL19をコードする核酸を配置することで、それぞれの核酸を効率よく転写することが可能となる。

【0047】

上記プロモーターとしては、レトロウイルスのLTRプロモーター、SV40初期プロモーター、サイトメガロウイルスプロモーター、単純ヘルペスウイルスのチミジンキナーゼプロモーター等のウイルス由来プロモーター、ホスホグリセリン酸キナーゼ(PGK)プロモーター、Xistプロモーター、 α -アクチンプロモーター、RNAポリメラーゼIIプロモーター等の哺乳類由来プロモーターを挙げることができる。また、テトラサイクリンによって誘導されるテトラサイクリン応答型プロモーター、インターフェロンによって誘導されるMx1プロモーター等を用いてもよい。本発明の発現ベクターにおいて上記特定の物質によって誘導されるプロモーターを用いることによって、がんの治療経過に応じてIL-7及びCCL19の発現の誘導を制御することが可能となる。

40

【0048】

前記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を挙げることができ、レトロウイ

50

ルスベクターを好適に挙げることができ、pMSGVベクター (Tamada k et al., Clin Cancer Res 18:6436-6445(2002)) や pMSCVベクター (タカラバイオ社製) をより好適に挙げることができる。レトロウイルスベクターを用いれば、導入遺伝子は宿主細胞のゲノムへ取り込まれるため、長期間かつ安定に発現することが可能となる。

【0049】

免疫担当細胞における本発明の発現ベクター含有の確認は、例えばTCRをコードする核酸を含有する場合には、フローサイトメトリー、ノザンプロットティング、サザンプロットティング、RT-PCR等のPCR、ELISA、ウェスタンプロットティングによってTCRの発現を調べることができ、本発明の発現ベクターにマーカー遺伝子を含有する場合には、当該発現ベクターに挿入されたマーカー遺伝子の発現を調べることによって確認することができる。

10

【0050】

本発明のIL-7×CCCL19発現免疫担当細胞に含有する発現ベクターにTCRをコードする核酸を含有する場合には、発現するTCRの可変領域は細胞外に位置し、かかるTCRの可変領域を備えることによって、TCR発現免疫担当細胞はMHC分子に結合した抗原分子を認識することが可能となる。

【0051】

本発明の抗がん剤は、本発明のIL-7×CCCL19発現免疫担当細胞と薬学的に許容される添加剤を含有していれば特に制限されず、前記添加剤としては、生理食塩水、緩衝生理食塩水、細胞培養培地、デキストロース、注射用水、グリセロール、エタノール及びこれらの組合せ、安定剤、可溶化剤及び界面活性剤、緩衝剤及び防腐剤、等張化剤、充填剤、並びに潤滑剤を挙げることができる。

20

【0052】

本発明の抗がん剤は、当業者に既知の方法を用いて、がんの治療を必要とする被験体に投与することができ、投与方法としては、静脈内、腫瘍内、皮内、皮下、筋肉内、腹腔内、動脈内、髄内、心臓内、関節内、滑液嚢内、頭蓋内、髄腔内、及びくも膜下(髄液)への注射を挙げることができる。

【0053】

投与する抗がん剤に含まれる本発明のIL-7×CCCL19発現免疫担当細胞の量は、がんの種類、位置、重症度、治療を受ける被験体の年齢、体重及び状態等に応じて適宜調整できるが、好ましくは、一回の投与において $1 \times 10^4 \sim 1 \times 10^{10}$ 個、好ましくは $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^9$ 個、より好ましくは $5 \times 10^6 \sim 5 \times 10^8$ 個を挙げることができる。

30

【0054】

投与する抗がん剤は、1日4回、3回、2回又は1回、1日おき、2日おき、3日おき、4日おき、5日おき、週1回、7日おき、8日おき、9日おき、週2回、月1回又は月2回独立して投与する方法を挙げることができる。

【0055】

本発明の抗がん剤や、後述するがんの治療方法におけるがんとしては、固形がんでも血液がんでもよく、腺がん、扁平上皮がん、腺扁平上皮がん、未分化がん、大細胞がん、小細胞がん、皮膚がん、乳がん、前立腺がん、膀胱がん、膣がん、頸部がん、子宮がん、肝臓がん、腎臓がん、膵臓がん、脾臓がん、肺がん、気管がん、気管支がん、結腸がん、小腸がん、胃がん、食道がん、胆嚢がん、精巣がん、卵巣がん等のがんや、骨組織、軟骨組織、脂肪組織、筋組織、血管組織及び造血組織のがんのほか、軟骨肉腫、ユーイング肉腫、悪性血管内皮腫、悪性シュワン腫、骨肉腫、軟部組織肉腫等の肉腫や、肝芽腫、髄芽腫、腎芽腫、神経芽腫、膵芽腫、胸膜肺芽腫、網膜芽腫等の芽腫や、胚細胞腫瘍や、リンパ腫や、白血病を挙げることができる。

40

【0056】

本発明の抗がん剤は、他の抗がん剤と併用して用いることができる。他の抗がん剤としては、シクロホスファミド、ベンダムスチン、イオスファミド、ダカルバジン等のアルキ

50

ル化薬、ペントスタチン、フルダラビン、クラドリピン、メソトレキセート、5 - フルオロウラシル、6 - メルカプトプリン、エノシタピン等の代謝拮抗薬、リツキシマブ、セツキシマブ、トラスツズマブ等の分子標的薬、イマチニブ、ゲフェチニブ、エルロチニブ、アファチニブ、ダサチニブ、スニチニブ、トラメチニブ等のキナーゼ阻害剤、ボルテゾミブ等のプロテアソーム阻害剤、シクロスポリン、タクロリムス等のカルシニューリン阻害薬、イダルビジン、ドキシソルピシンマイトマイシンC等の抗がん性抗生物質、イリノテカン、エトポシド等の植物アルカロイド、シスプラチン、オキサリプラチン、カルボプラチン等のプラチナ製剤、タモキシフェン、ピカルダミド等のホルモン療法薬、インターフェロン、ニボルマブ、ペンプロリズマブ等の免疫制御薬を挙げることができ、アルキル化薬又は代謝拮抗薬を好適に挙げることができる。

10

【0057】

上記「本発明の抗がん剤と他の抗がん剤と併用して用いる」方法としては、他の抗がん剤を用いて処理し、その後本発明の抗がん剤を用いる方法や、本発明の抗がん剤と他の抗がん剤を同時に用いる方法や、本発明の抗がん剤を用いて処理し、その後他の抗がん剤を用いる方法を挙げることができ、他の抗がん剤を用いて処理し、その後本発明の抗がん剤を用いる方法を好適に挙げることができる。また、本発明の抗がん剤と他の抗がん剤と併用した場合には、がんの治療効果がより向上するとともに、それぞれの抗がん剤の投与回数又は投与量を減らすことで、それぞれの抗がん剤による副作用を低減させることが可能となる。また、本発明の抗がん剤に上記他の抗がん剤を含めてもよい。

20

【0058】

本発明の別の態様1として、1) がん抗原を特異的に認識する細胞表面分子、インターロイキン7 (IL-7)、及びCCCL19を発現する免疫担当細胞を、がんの治療を必要とする患者に投与することを特徴とするがんの治療方法や、2) 抗がん剤として使用するための、がん抗原を特異的に認識する細胞表面分子、インターロイキン7 (IL-7)、及びCCCL19を発現する免疫担当細胞や、3) がん抗原を特異的に認識する細胞表面分子、インターロイキン7 (IL-7)、及びCCCL19を発現する免疫担当細胞の、抗がん剤の調製における使用を挙げることができる。

【0059】

さらに、本発明の別の態様2として、上記本発明の発現ベクターを備えている、がん抗原を特異的に認識する細胞表面分子、インターロイキン7 (IL-7)、及びCCCL19を発現する免疫担当細胞を作製するためのキットを挙げることができ、かかるキットとしては、本発明の発現ベクターを備えていれば特に制限されず、本発明のIL-7 x CCCL19発現免疫担当細胞を作製するための説明書や、本発明の発現ベクターを免疫担当細胞に導入するために用いる試薬を含んでいてもよい。

30

【実施例1】

【0060】

(免疫機能制御因子の選択)

T細胞の機能を制御できる分子は少なくとも生体内に数百種類も存在する。発明者らは、免疫担当細胞における更なる免疫機能制御効果を高めるための制御分子として、これまでの知見や経験に基づき、膨大な組み合わせの中からまずはIL-7とCCCL19を選択し、かつ、それぞれ単独ではなく2つの組み合わせ、すなわちIL-7とCCCL19との組み合わせを選択し、かかる免疫担当細胞の免疫機能制御因子を発現するベクターを作製した。

40

【0061】

(IL-7及びCCCL19を発現するベクターの作製 - 1)

抗FITC scFv、マウスCD8膜貫通領域、マウスCD28-4-1BB-CD3細胞内シグナルモチーフからなる抗FITC CARをコードする抗FITC CAR DNA断片(配列番号9)、配列番号8に示す2Aペプチド(F2A)と、該ペプチドに続く制限酵素サイト(MCS)をコードするF2A-MCS DNA断片(配列番号10)、マウスIL-7(ストップコドン無し)と、それに続くF2AとマウスCCCL1

50

9をコードするIL-7-F2A-CCL19 DNA断片(配列番号11)を人工合成した(ライフテクノロジー社製)。

【0062】

IL-7及びCCL19を発現するベクターを作製するために、上記抗FITC CAR DNA断片と上記F2A-MCS DNA断片を連結して抗FITC CAR-F2A-MCSコンストラクトを作製した。次に、作製したコンストラクトをpMSGVレトロウイルス発現ベクター(Tamada *et al.*, Clin Cancer Res 18:6436-6445(2002))にクローニングして抗FITC CAR-F2A-MCSを含むpMSGVベクターを作製した。かかるpMSGVベクターのMCSに、上記IL-7-F2A-CCL19 DNA断片を、制限酵素(Nsi I及びSal I)処理及びライゲーションにより挿入し、抗FITC CAR-F2A-IL-7-F2A-CCL19を含むpMSGVベクター(IL-7×CCL19発現ベクター(1))を得た。得られたベクターのマップを図1に示す。また、コントロールとして上記抗FITC CAR DNA断片を上記pMSGVレトロウイルス発現ベクターにクローニングし、IL-7及びCCL19を含まないpMSGVベクター(コントロールベクター(1))を作製した。

10

【0063】

(IL-7×CCL19発現ベクターを導入したレトロウイルスの作製)

マウスT細胞の形質導入のために、レトロウイルスを作製した。リポフェクタミン2000又は3000(ライフテクノロジー社製)を用い、上述のIL-7×CCL19発現ベクター(1)又はコントロールベクター(1)と、pCL-Ecoプラスミド(Imgenex社製)をGP2-293パッケージング細胞株(タカラバイオ社製)にトランスフェクションすることで、IL-7×CCL19発現ベクター(1)又はコントロールベクター(1)を導入したレトロウイルスを作製した。

20

【0064】

前記GP2-293細胞の培養液としては、10%FCS、100U/mlのペニシリン、100mg/mlのストレプトマイシンを加えたDMEMを用いた。また、後述の実施例で用いるT細胞の培養液としては、10%FCS、100U/mlのペニシリン、100mg/mlのストレプトマイシン、50mMの2-メルカプトエタノール、2mMのL-グルタミンを加えたRPMI-1640を用いた。

【0065】

(マウスT細胞の形質導入)

マウスT細胞の形質導入のため、脾臓及びリンパ節由来の 3×10^6 個の精製したマウスT細胞を、固層化した抗CD3mAb($3 \mu\text{g}/\text{ml}$)及びIL-2($100 \text{ IU}/\text{ml}$)で48時間活性化した。次に、上述で作製したIL-7×CCL19発現ベクター(1)又はコントロールベクター(1)を導入したレトロウイルスを含有する上清を、 $25 \mu\text{g}/\text{ml}$ のレトロネクチン(登録商標:タカラバイオ社製)でコートしたプレートで活性化させた上述のマウスT細胞($1 \times 10^6 \text{ cells}/\text{ml}$)と混合し、 1500 rpm で2時間遠心後、IL-2($100 \text{ IU}/\text{ml}$)の存在下で6時間培養した。培養液からレトロウイルスを除去するため、マウスT細胞を回収し、IL-2($100 \text{ IU}/\text{ml}$)を含有する新しい増殖培養液(RPMI)に移し、さらに42時間培養し、IL-7×CCL19発現ベクター(1)を導入したマウスT細胞(IL-7/CCL19発現T細胞(1))又はコントロールベクター(1)を導入したマウスT細胞(コントロールT細胞(1))を得た。

30

40

【0066】

(IL-7及びCCL19を発現する発現ベクターの作製-2)

上記におけるIL-7×CCL19発現ベクター(1)の作製において、配列番号9に示す配列に含まれる抗FITC scFv領域の配列を、リツキシマブの配列に基づきライフテクノロジー社が合成した抗ヒトCD20 scFv(配列番号12)の配列に置換した以外は上記「IL-7及びCCL19を発現する発現ベクターの作製-1」と同様の方法で、抗ヒトCD20 CAR-F2A-IL-7-F2A-CCL19を含むpMS

50

G Vベクター (I L - 7 x C C L 1 9 発現ベクター (2)) を作製した。同様に、上記におけるにおけるコントロールベクター (1) の作製において、配列番号 9 に示す配列に含まれる抗 F I T C s c F v 領域の配列を、上記抗ヒト C D 2 0 s c F v (配列番号 1 2) の配列に置換した以外は上記「 I L - 7 及び C C L 1 9 を発現する発現ベクターの作製 - 1 」と同様の方法で、 I L - 7 及び C C L 1 9 を含まない p M S G V ベクター (コントロールベクター (2)) を作製した。かかる I L - 7 x C C L 1 9 発現ベクター (2) 又はコントロールベクター (2) を、上記と同様の方法でレトロウイルスを用いてマウス T 細胞へ導入して、 I L - 7 / C C L 1 9 発現 T 細胞 (2) 又はコントロール T 細胞 (2) を作製した。

【実施例 2】

【 0 0 6 7 】

(I L - 7 / C C L 1 9 発現 T 細胞の細胞数及び生存率)

I L - 7 / C C L 1 9 発現 T 細胞により産生される I L - 7 や C C L 1 9 が生物的な機能を発揮し、免疫誘導効果を示すか否かについて検討した。作製した I L - 7 / C C L 1 9 発現 T 細胞 (2) (4×10^5 個) 又はコントロール T 細胞 (2) を含有するサンプルを 5 日間培養した。上記培養は、 I L - 7 及び C C L 1 9 の発現においてヒト C D 2 0 C A R による影響を排除するため、 C D 2 0 による抗原刺激なしで行った。次に、トリパンプルーによって細胞数と生存率を調べた。結果を図 2 A , 図 2 B に示す。図 2 A は細胞数、図 2 B は生存率であり、黒カラム I L - 7 / C C L 1 9 発現 T 細胞、白カラムはコントロール T 細胞を示す。

【 0 0 6 8 】

(結果)

図 2 A , 図 2 B に示すように、 I L - 7 / C C L 1 9 発現 T 細胞 (2) においてはコントロール T 細胞 (2) と比較して細胞数がおよそ 5 倍、生存率はおよそ 2 倍高くなっていた。したがって、本発明の発現ベクターを T 細胞に導入した I L - 7 / C C L 1 9 発現 T 細胞を用いることで、 I L - 7 や C C L 1 9 が生物的な機能を発揮し、免疫誘導効果を示すことが明らかとなった。

【実施例 3】

【 0 0 6 9 】

[T 細胞遊走試験]

(I L - 7 / C C L 1 9 発現 T 細胞による T 細胞遊走試験)

トランスウェルを用いた細胞遊走試験により、 C C L 1 9 の遊走惹起効果を検討した。応答側 T 細胞の遊走性は 9 6 ウェルのトランスウェル (登録商標) チャンバー (C o r n i g C o s t a r 社製) を使い、孔径 $5 \mu m$ のポリカーボネートフィルターを通して遊走させることによって測定した。具体的には、チャンバーの下層で I L - 7 / C C L 1 9 発現 T 細胞 (1) 又はコントロール T 細胞 (1) を培養した。上記培養は、 I L - 7 及び C C L 1 9 の発現において F I T C C A R による影響を排除するため、 F I T C による抗体刺激なしで行った。応答側 T 細胞は、 M A C S (M i l t e n y i B i o t e c 社製) のネガティブ選択によって、脾臓やリンパ節から調製した。応答側 T 細胞は C y t o T e l l b l u e (A A T B i o q u e s t 社製) でラベルし、上層で 3 時間培養した。チャンバーの上層から下層への遊走はフローサイトメトリー (E C 8 0 0 : ソニー社製) で調べ、データ解析は F l o w J o ソフトウェア (T r e e S t a r 社製) を用いた。結果を図 3 に示す。図 3 中、黒カラムは I L - 7 / C C L 1 9 発現 T 細胞 (1) 、白カラムはコントロール T 細胞 (1) を示し、縦軸は下層のチャンバーに遊走した応答側 T 細胞の絶対数を示す。また、統計学的有意差は Student ' s t - t e s t にて検討した。

【 0 0 7 0 】

(結果)

図 3 に示すように、 I L - 7 / C C L 1 9 発現 T 細胞 (1) は、コントロール T 細胞 (1) と比較しておよそ 1 . 8 倍もの T 細胞を下層に遊走させた。 T 細胞等のリンパ球移行療法では、投与した T 細胞によるがん細胞傷害はもちろん重要であるが、それに加えて、

10

20

30

40

50

がん患者に元々存在する内在性T細胞(=宿主側免疫細胞)を活性化し、がん細胞を攻撃する細胞として動員することが重要である。このためには抗腫瘍活性を有するリンパ球を単に外部から移入するだけでなく、何らかの手法で、移入したT細胞と内在性T細胞の能動的な相互作用を惹起し、内在性T細胞をがん局所に集積するようにさせることが免疫治療効果を高める点で好ましい。図3の結果より、IL-7/CCL19発現T細胞(1)は、内因性T細胞を集積させる能力を有することから、移入したT細胞と内在性T細胞の能動的な相互作用を誘導することが可能であることが明らかとなった。

【0071】

また、図2A、図2B、図3の結果からIL-7及びCCL19発現するT細胞は、IL-7により効果的に増殖し、生存率も高く、かつCCL19によりT細胞を集積するという、免疫誘導に欠かせない重要な効果を備えており、優れた免疫誘導効果を有することが明らかとなった。すなわち、免疫担当細胞において、「IL-7」と「CCL19」の2つの制御分子を発現させることで、かかる免疫担当細胞の増殖能力、生存率、免疫誘導効果を向上させることが可能であることが明らかとなった。さらに、上述のようにIL-7及びCCL19を発現するT細胞は、増殖能、生存能、及びT細胞集積能を兼ね備えていることから、がん組織でのT細胞や樹状細胞の浸透効果や、腫瘍増殖抑制効果を有する可能性が示唆された。

10

【実施例4】

【0072】

[IL-7×CCL19×HSV-TK発現ベクターの作製]

pMSGV1ベクターのマルチクローニングサイトにIL-7、CCL19及び自殺遺伝子であるHSV-TKの各遺伝子をコードする塩基配列を、自己切断型ペプチドである2Aペプチドをコードする塩基配列を挟んでタンデムに並べた塩基配列をクローニングすることでIL-7、CCL19、及びHSV-TKを発現するベクターを作製することができる。かかるベクターのマップを図4に示す。

20

【0073】

上記のようにして作製したIL-7×CCL19×HSV-TK発現ベクターを導入した免疫担当細胞は、上記免疫担当細胞を投与した被験体にガンシクロビルを投与することで被験体内の免疫担当細胞を制御することが可能となる。

【実施例5】

【0074】

[TCR×IL-7×CCL19発現ベクターの作製]

pMSGV1ベクターのマルチクローニングサイトにTCR、IL-7及びCCL19の各遺伝子をコードする塩基配列を、自己切断型ペプチドである2Aペプチドをコードする塩基配列を挟んでタンデムに並べた塩基配列をクローニングすることでTCR、IL-7及びCCL19を発現するベクターを作製することができる。かかるベクターのマップを図5に示す。

30

【0075】

上記のようにして作製したTCR×IL-7×CCL19発現ベクターを導入した免疫担当細胞は、がん細胞の表面に存在するがん抗原のみならず、がん細胞内のがん抗原に由来するペプチドがMHCに提示された複合体に対しても特異的に結合することが可能となり、より広範囲の腫瘍関連標的分子に対する特異的T細胞の誘導が可能となる。

40

【実施例6】

【0076】

[IL-7、CCL19及びeGFPを発現する発現ベクターの作製]

マウスIL-7(ストップコドン無し)と、それに続くF2A、マウスCCL19をコードするIL-7-F2A-CCL19 DNA断片を人工合成した(ライフテクノロジー社製)。

【0077】

IL-7、CCL19及びeGFPを発現するベクターを作製するために、上記で合成

50

した I L - 7 - F 2 A - C C L 1 9 DNA断片を、F 2 A - e G F P 配列を有する p M S G V レトロウイルス発現ベクター (Tamada k et al., Clin Cancer Res 18:6436-6445 (2002)) の M C S に、制限酵素 (N C O I 及び E C O R I) 処理及びライゲーションにより挿入し、I L - 7 - F 2 A - C C L 1 9 - F 2 A - e G F P DNA断片 (配列番号 1 3) を含む p M S G V ベクター (I L - 7 x C C L 1 9 発現ベクター (3)) を得た。得られたベクターのマップを図 6 に示す。また、コントロールとして e G F P を含み、I L - 7 及び C C L 1 9 を含まない p M S G V ベクター (コントロールベクター (3)) を作製した。なお、配列番号 1 3 において、1 ~ 4 6 2 番目の塩基が I L - 7 (1 ~ 7 5 番目の塩基は I L - 7 のシグナル配列)、4 6 3 ~ 5 3 7 番目の塩基が F 2 A、5 3 8 ~ 8 6 1 番目の塩基が C C L 1 9 (5 3 8 ~ 6 1 2 番目の塩基は C C L 1 9 のシグナル配列)、8 6 8 ~ 9 4 2 が F 2 A、9 4 6 ~ 1 6 6 2 番目の塩基が e G F P をコードする核酸、1 6 6 3 ~ 1 6 6 5 番目の塩基がストップコドンである。また、上記塩基配列 1 3 に対応するアミノ酸配列を配列番号 1 4 に示す。なお、制限酵素 N c o I を使用するため、配列番号 1 3 における 4 番目の塩基チミン (t) をグアニン (g) に (配列番号 1 4 における 2 番目のアミノ酸フェニルアラニン (F) をバリン (V) に) 置換した。

10

【 0 0 7 8 】

[P 8 1 5 腫瘍抗原 P 1 A 特異的な T C R、I L - 7、C C L 1 9、及び e G F P を発現する T 細胞の作製]

Y . L i u から入手した、H - 2 L ^d 拘束性の P 8 1 5 腫瘍抗原 P 1 A 特異的な T C R を発現するトランスジェニックマウス (Sarma, S., Y. Guo, Y. Guilloux, C. Lee, X.-F. Bai, Y. Liu. 1999. J. Exp. Med. 189:811.) から脾臓細胞を採取し、脾臓細胞由来の P 8 1 5 腫瘍抗原 P 1 A 特異的な T C R を発現するマウス T 細胞 (P 1 A 特異的 T C R - T 細胞) を得た。次に、実施例 1 と同様の方法で、I L - 7 x C C L 1 9 発現ベクター (3) 及びコントロールベクター (3) を導入したレトロウイルスを作製し、上記 P 1 A 特異的 T C R - T 細胞を含む脾臓細胞 (3 x 1 0 ⁶ 個 / ウェル) を P 1 A ペプチドで 4 8 時間活性化した細胞に形質導入して、P 1 A 特異的 T C R / I L - 7 / C C L 1 9 / e G F P 発現 T 細胞又は P 1 A 特異的 T C R / e G F P 発現 T 細胞を得た。各発現ベクターの形質導入はサロゲートマーカーとして e G F P を検出するフローサイトメトリー解析によって確認した。得られたそれぞれの T 細胞の e G F P の発現レベルは、いずれの実験においても 7 0 ~ 8 0 % であった。

20

30

【 0 0 7 9 】

0 日目に、6 ~ 1 0 週齢の雄 D B A / 2 マウス (n = 3 0) に 0 . 1 m l の H B S S で懸濁した 5 x 1 0 ⁵ 個の P 8 1 5 マストサイトーマを側腹に皮下接種した。6 日目に、マウスをプレコンディショニングのために垂致死量 (3 - 5 G y) の照射を行った。7 日目に、マウス (n = 1 0) を 3 つの群に分けて、P 1 A 特異的 T C R / I L - 7 / C C L 1 9 / e G F P 発現 T 細胞、又は P 1 A 特異的 T C R / e G F P 発現 T 細胞 (いずれの細胞も 7 0 ~ 8 0 % e G F P ポジティブ) をそれぞれ 1 x 1 0 ⁶ 個静脈に投与した。その後、それぞれのマウスの生存率を解析すると共に死亡したマウスの腫瘍体積を測定した。それぞれのマウスの生存率の解析結果を図 7 に、死亡したマウスの腫瘍体積を測定した結果を図 8 に示す。

40

【 0 0 8 0 】

図 7 において、 は未処理マウス、 は P 1 A 特異的 T C R / e G F P 発現 T 細胞を投与したマウス、 は P 1 A 特異的 T C R / I L - 7 / C C L 1 9 / e G F P 発現 T 細胞を投与したマウスの結果であり、横軸が P 8 1 5 マストサイトーマを皮下接種してからの日数 (d a y)、縦軸が生存率 (%) である。P 1 A 特異的 T C R / I L - 7 / C C L 1 9 / e G F P 発現 T 細胞を投与したマウスは 6 0 日目でも 8 0 % が生存し、1 0 0 日を超えても 5 0 % が生存していた。したがって、P 1 A 特異的 T C R、I L - 7 及び C C L 1 9 を発現する免疫担当細胞を用いることにより抗腫瘍効果が発揮され、腫瘍による生存率の低下を抑制することが明らかとなった。

【 0 0 8 1 】

50

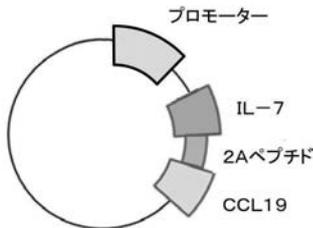
また、図 8 において、横軸が P 8 1 5 マストサイトーマを皮下接種してからの日数 (d a y)、縦軸が腫瘍体積 (m m ³) である。図 8 から明らかなように、P 1 A 特異的 T C R / I L - 7 / C C L 1 9 / e G F P 発現 T 細胞を投与したマウスでは腫瘍体積の増加が著しく抑制されており、P 1 A 特異的 T C R / I L - 7 / C C L 1 9 / e G F P 発現 T 細胞は優れた抗腫瘍活性を有すること、及び固形がんに対する治療効果を発揮することが明らかとなった。

【産業上の利用可能性】

【 0 0 8 2 】

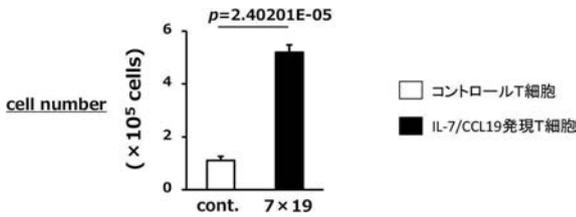
本発明の I L - 7 × C C L 1 9 発現免疫担当細胞は、増殖能、生存能及びリンパ球集積能力を併せ持つことから、免疫療法の分野において利用可能である。

【 図 1 】

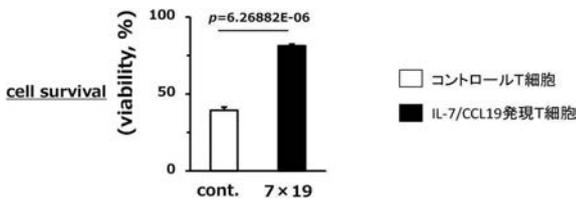


IL-7 × CCL19 発現ベクター

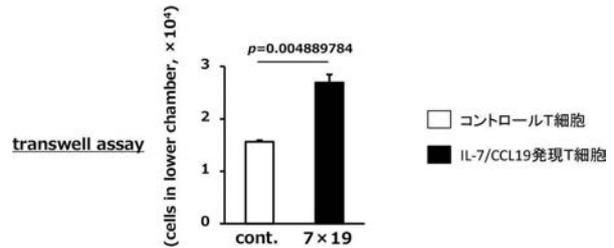
【 図 2 A 】



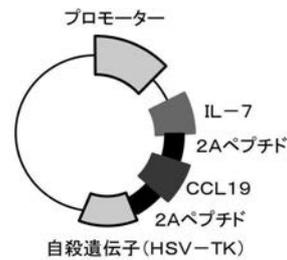
【 図 2 B 】



【 図 3 】

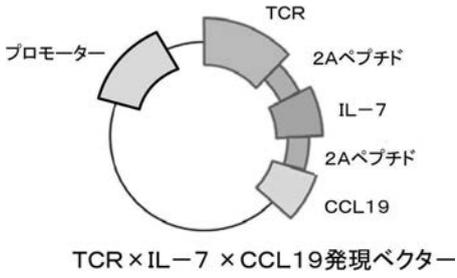


【 図 4 】

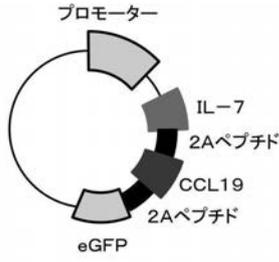


IL-7 × CCL19 × HSV-TK 発現ベクター

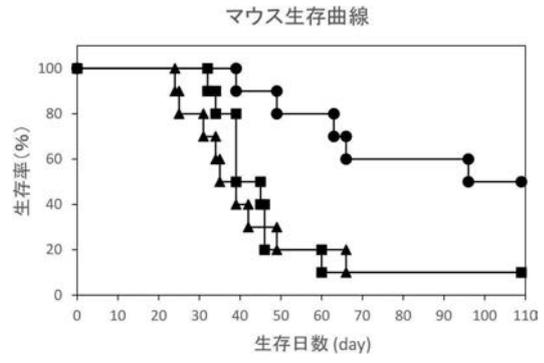
【 図 5 】



【 図 6 】

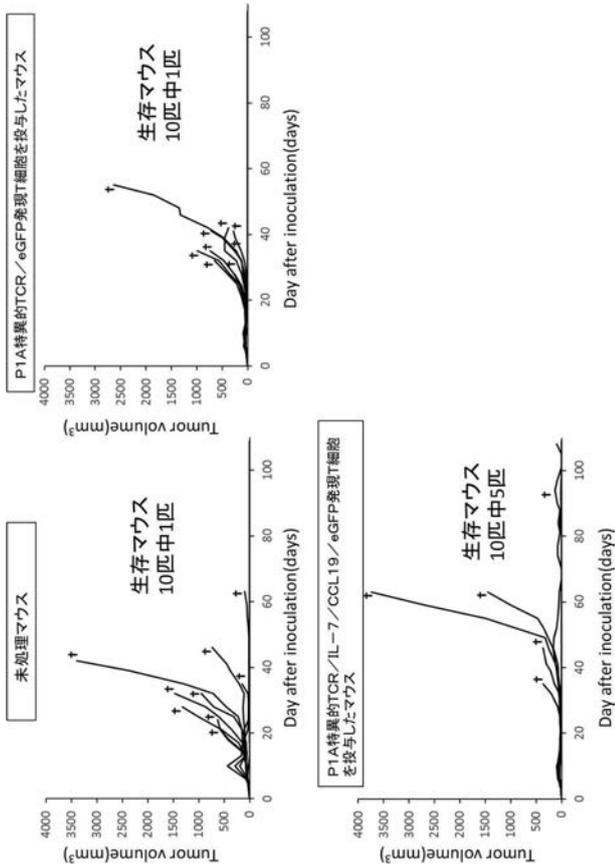


【 図 7 】



IL-7 × CCL19 × eGFP発現ベクター

【 図 8 】



【配列表】

2017159736000001.app

【手続補正書】

【提出日】平成29年9月5日(2017.9.5)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

がん抗原を特異的に認識する細胞表面分子、インターロイキン7 (IL-7)、及びCCL19を発現する免疫担当細胞。

【請求項2】

免疫担当細胞が、細胞外から導入したIL-7をコードする核酸、及びCCL19をコードする核酸を含有することを特徴とする請求項1記載の免疫担当細胞。

【請求項3】

がん抗原を特異的に認識する細胞表面分子が、がん抗原を特異的に認識するT細胞受容体であることを特徴とする請求項1又は2記載の免疫担当細胞。

【請求項4】

免疫担当細胞がT細胞であることを特徴とする請求項1～3のいずれか記載の免疫担当細胞。

【請求項5】

がん抗原が、WT1、MART-1、NY-ESO-1、MAGE-A1、MAGE-A3、MAGE-A4、Glypican-3、KIF20A、Survivin、AFP-1、gp100、MUC1、PAP-10、PAP-5、TRP2-1、SART-1、VEGFR1、VEGFR2、NEIL3、MPHOSPH1、DEPDC1、FOXM1、CDH3、TTK、TOMM34、URLC10、KOC1、UBE2T、TOPK、ECT2、MESOTHELIN、NKG2D、P1A、GD2、又はGM2であることを特徴とする請求項1～4のいずれか1項に記載の免疫担当細胞。

【請求項6】

請求項1～5のいずれか1項に記載の免疫担当細胞を作製するための以下の(a)～(e)のいずれかの発現ベクター。

(a) がん抗原を特異的に認識する細胞表面分子をコードする核酸、IL-7をコードする核酸、及びCCL19をコードする核酸を含有する発現ベクター；

(b) 以下の(b-1)及び(b-2)の2つの発現ベクター；

(b-1) がん抗原を特異的に認識する細胞表面分子をコードする核酸を含有する発現ベクター；

(b-2) IL-7をコードする核酸、及びCCL19をコードする核酸を含有する発現ベクター；

(c) 以下の(c-1)及び(c-2)の2つの発現ベクター；

(c-1) がん抗原を特異的に認識する細胞表面分子をコードする核酸、及びIL-7をコードする核酸を含有する発現ベクター；

(c-2) CCL19をコードする核酸を含有する発現ベクター；

(d) 以下の(d-1)及び(d-2)の2つの発現ベクター；

(d-1) IL-7をコードする核酸を含有する発現ベクター；

(d-2) がん抗原を特異的に認識する細胞表面分子をコードする核酸、及びCCL19をコードする核酸を含有する発現ベクター；

(e) 以下の(e-1)、(e-2)及び(e-3)の3つの発現ベクター；

(e-1) がん抗原を特異的に認識する細胞表面分子をコードする核酸を含有する発現

ベクター；

(e - 2) I L - 7 をコードする核酸を含有する発現ベクター；

(e - 3) C C L 1 9 をコードする核酸を含有する発現ベクター；

【請求項 7】

がん抗原を特異的に認識する細胞表面分子が、がん抗原を特異的に認識する T 細胞受容体であることを特徴とする請求項 6 記載の発現ベクター。

【請求項 8】

(a) の発現ベクターにおける、がん抗原を特異的に認識する細胞表面分子をコードする核酸、I L - 7 をコードする核酸、及び、C C L 1 9 をコードする核酸、

(b - 2) の発現ベクターにおける、I L - 7 をコードする核酸、及び C C L 1 9 をコードする核酸、

(c - 1) の発現ベクターにおける、がん抗原を特異的に認識する細胞表面分子をコードする核酸、及び I L - 7 をコードする核酸、又は

(d - 2) の発現ベクターにおける、がん抗原を特異的に認識する細胞表面分子をコードする核酸、及び C C L 1 9 をコードする核酸、

が自己切断型ペプチドを介して連結されていることを特徴とする請求項 6 又は 7 記載の発現ベクター。

【請求項 9】

自殺遺伝子をコードする核酸を含有することを特徴とする請求項 6 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の発現ベクター。

【請求項 10】

請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の免疫担当細胞と、薬学的に許容される添加剤とを含有する抗がん剤。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP2017/010437
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C12N15/09(2006.01)i, A61K35/17(2015.01)i, A61P35/00(2006.01)i, A61P35/02(2006.01)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) C12N15/09, A61K35/17, A61P35/00, A61P35/02, 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), Wiley Online Library, WPIDS/WPIX (STN), Japio-GPG/FX		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	Yozo NAKAZAWA, "Gene-modified T-cell Therapy Using Chimeric Antigen Receptor", The Shinshu Medical Journal, 2013.08, vol.61, no.4, pages 197-2013, 199-201	1-4, 9 5-8
X A	Yukimi SAKODA, Koji TAMADA, "CAR-T Saibo Ryoho no Kaihatsu to Saishin Kenkyu no Doko", Molecular Targeted Therapy for Cancer, 24 July 2015 (24.07.2015), vol.13, no.2, pages 90-98, 91-96	1-4, 9 5-8
X A	Koji TAMADA, "Adoptive immunotherapy against cancer using CAR-expressing T cells", Journal of Clinical and Experimental Medicine, 13 February 2016 (13.02.2016), vol.256, no.7, pages 805-809, 806-809	1-4, 9 5-8
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 02 June 2017 (02.06.17)		Date of mailing of the international search report 13 June 2017 (13.06.17)
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/JP2017/010437

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
<u>X</u> A	JP 2014-504294 A (University of Maryland, Baltimore), 20 February 2014 (20.02.2014), claims; paragraph [0007] & US 2013/0287752 A1 & WO 2012/082841 A2 claims; paragraph [0006] & EP 2651442 A2	<u>1-4, 9</u> 5-8
<u>X</u> A	JP 2014-507118 A (The Trustees of the University of Pennsylvania), 27 March 2014 (27.03.2014), claims & US 2013/0287748 A1 & US 2013/0288368 A1 & WO 2012/079000 A1 claims & EP 2649086 A2	<u>1-4, 9</u> 5-8
A	Miho HASHIMOTO(SATO) et al., "Hizo T-saibo no Kojosei Chosetsu eno SIRPα no Kan'yo", Dai 85 Kai Annual Meeting of the Japanese Biochemical Society Yoshishu, 2012, 3T29-06	1-9
P,X	WO 2016/056228 A1 (Yamaguchi University), 14 April 2016 (14.04.2016), & CA 2962375 A & AU 2015329444 A & TW 201619377 A	1-9

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 7 / 0 1 0 4 3 7	
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C12N15/09(2006.01)i, A61K35/17(2015.01)i, A61P35/00(2006.01)i, A61P35/02(2006.01)i, C12N5/10(2006.01)i			
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C12N15/09, A61K35/17, A61P35/00, A61P35/02, C12N5/10			
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 1971-2017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			
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), Wiley Online Library, WPIDS/WPIIX (STN), Japio-GPG/FX			
C. 関連すると認められる文献			
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号	
X A	中沢洋三, キメラ抗原受容体 (CAR) を用いた遺伝子改変T細胞療法, 信州医学雑誌, 2013.08, Vol. 61, No. 4, p. 197-2013, p. 199-201	1-4, 9 5-8	
X A	佐古田幸美, 玉田耕治, CAR-T細胞療法の開発と最新研究の動向, がん分子標的治療, 2015.07.24, Vol. 13, No. 2, p. 90-98, p. 91-96	1-4, 9 5-8	
<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。			
* 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 02.06.2017		国際調査報告の発送日 13.06.2017	
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		特許庁審査官 (権限のある職員) 太田 雄三 電話番号 03-3581-1101 内線 3448	4B 3959

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2017/010437
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
X A	玉田耕治, C A R 遺伝子導入 T 細胞によるがん免疫細胞療法, 医学 のあゆみ, 2016. 02. 13, Vol. 256, No. 7, p. 805-809, p. 806-809	1-4, 9 5-8
X A	JP 2014-504294 A (ユニバーシティ オブ メリーランド, ボルチ モア) 2014. 02. 20, 【特許請求の範囲】【0007】 & US 2013/0287752 A1 & WO 2012/082841 A2, Claims, [0006] & EP 2651442 A2	1-4, 9 5-8
X A	JP 2014-507118 A (ザ トラスティーズ オブ ザ ユニバーシテ ィ オブ ペンシルバニア) 2014. 03. 27, 【特許請求の範囲】 & US 2013/0287748 A1 & US 2013/0288368 A1 & WO 2012/079000 A1, Claims & EP 2649086 A2	1-4, 9 5-8
A	橋本 (佐藤) 美穂, 他, 脾臓 T 細胞の恒常性調節への S I R P α の 関与, 第 8 5 回日本生化学会大会要旨集, 2012, 3T29-06	1-9
P, X	WO 2016/056228 A1 (国立大学法人山口大学) 2016. 04. 14, & CA 2962375 A & AU 2015329444 A & TW 201619377 A	1-9

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
C 1 2 N 15/63 (2006.01)	C 1 2 N 15/63	Z
A 6 1 K 35/17 (2015.01)	A 6 1 K 35/17	A
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 37/04 (2006.01)	A 6 1 P 37/04	
A 6 1 K 38/20 (2006.01)	A 6 1 K 38/20	
A 6 1 K 38/19 (2006.01)	A 6 1 K 38/19	
A 6 1 K 9/10 (2006.01)	A 6 1 K 9/10	

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, T J, TM), EP(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, R O, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), 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, G T, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, 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

(74) 代理人 100150902
弁理士 山内 正子

(74) 代理人 100141391
弁理士 園元 修一

(74) 代理人 100198074
弁理士 山村 昭裕

(74) 代理人 100096013
弁理士 富田 博行

(72) 発明者 玉田 耕治
山口県宇部市南小串 1 丁目 1 - 1 国立大学法人山口大学医学部内

(72) 発明者 佐古田 幸美
山口県宇部市南小串 1 丁目 1 - 1 国立大学法人山口大学医学部内

(72) 発明者 安達 圭志
山口県宇部市南小串 1 丁目 1 - 1 国立大学法人山口大学医学部内

F ターム(参考) 4B065 AA90X AA90Y AA91X AA91Y AA93X AA93Y AB01 AC14 BA01 BA02
CA24 CA25 CA44
4C076 BB11 BB13 BB14 BB15 BB16 CC07 CC27 FF11 FF68
4C084 AA02 AA03 BA44 CA53 DA01 DA12 MA21 MA55 MA66 NA14
ZB09 ZB26
4C087 AA01 AA02 AA03 BB65 CA16 MA21 MA55 MA66 NA14 ZB09
ZB26

(注) この公表は、国際事務局(WIPO)により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願(日本語実用新案登録出願)の国際公開の効果は、特許法第184条の10第1項(実用新案法第48条の13第2項)により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。