

明 細 書

発明の名称：

オンデマンドにグルコース取り込み能が強化されたT細胞、細胞集団およびそれを含む医薬組成物

技術分野

[0001] 本開示は、オンデマンドにグルコース取り込み能が強化されたT細胞、細胞集団およびそのような細胞を含む医薬組成物に関する。

背景技術

[0002] がん細胞は、自らの細胞増殖に有利になるよう代謝系をリプログラミングして、酸素の存在下でもATPの産生の効率の低い解糖系を積極的に利用し、グルコースの取り込みと乳酸産生を高めている（Warburg効果）。

[0003] 腫瘍内微小環境では、抗腫瘍T細胞の代謝活性や機能を抑制する因子が多く存在し、免疫抑制性の因子に加えて、腫瘍とT細胞の代謝面の競合が免疫抑制性環境の形成に関与している。T細胞はTCRに刺激を受けると、 Ca^{2+} の細胞内濃度が上昇し、カルシニューリンが活性化される。カルシニューリンの活性化により脱リン酸化された転写因子NFATが核内への移行し、他の転写因子との相互作用によりIL-2遺伝子などの転写を促進して活性化する。

[0004] 一方で、がん細胞が大量にグルコースを消費して枯渇させるため、グルコースをエネルギー源として必要とする T_{eff} 型の腫瘍特異的T細胞は、腫瘍に浸潤するとTCRにシグナルを受けても、細胞の Ca^{2+} 濃度が低下し、NFATの核内への移行が減少する。このためT細胞は、機能不全に陥り、細胞増殖とサイトカイン産生が抑制される。

[0005] またグルコースに加えて、アミノ酸や脂肪酸などの栄養素もがん細胞に大量に消費されると、それを競合するT細胞が機能不全に陥る。このように、腫瘍内微小環境では、がん細胞の活発な増殖を支える代謝の仕組みにより、腫瘍特異的T細胞の抗腫瘍エフェクター作用を阻害している。

[0006] そのため、そのような環境下においても飢餓・疲弊せずに、がん細胞に対して競合性を有する細胞が望まれている。

発明の概要

課題を解決するための手段

[0007] 本開示は、グルコース取り込み能が強化されたT細胞であって、腫瘍環境中でも飢餓・疲弊せずに機能する細胞、そのような細胞を含む細胞集団、およびそのような細胞を含む医薬組成物を提供する。特に本開示では、これらのグルコース取り込み能の強化が需要に応じて（オンデマンドで）行われることが代表的な特徴である。

[0008] したがって、本開示は以下を提供する。

[項目1] グルコース取り込み能が強化されたT細胞であって、該T細胞が、グルコーストランスポーターを需要に応じて（オンデマンド）発現するように改変され、および／またはグルコーストランスポーターの発現が需要に応じて（オンデマンド）増強した、T細胞。

[項目2] 前記T細胞がキメラ抗原受容体（CAR）またはT細胞受容体（TCR）を含む、上記項目に記載のT細胞。

[項目2A] 前記T細胞がキメラ抗原受容体（CAR）を含む、上記項目のいずれか一項に記載のT細胞。

[項目3] 前記T細胞はエフェクター機能を有する、上記項目のいずれか一項に記載のT細胞。

[項目4] 前記T細胞はエフェクターT細胞（ T_{eff} ）の前駆細胞である、上記項目のいずれか一項に記載のT細胞。

[項目5] 前記オンデマンドの発現および／または増強が、腫瘍環境特異的に達成される、上記項目のいずれか一項に記載のT細胞。

[項目6] 前記CARは前記T細胞に発現されたものである、上記項目のいずれか一項に記載のT細胞。

[項目7] 前記グルコーストランスポーターが、GLUT1、GLUT2、GLUT3、およびGLUT4を含む、上記項目のいずれか一項に記載の

T細胞。

〔項目 8〕 前記グルコーストランスポーターがGLUT3である、上記項目のいずれか一項に記載のT細胞。

〔項目 9〕 ヒトT細胞である、上記項目のいずれか一項に記載のT細胞。

〔項目 10〕 需要に応じて（オンデマンドで）グルコース取り込み能が強化されたT細胞を含む細胞集団。

〔項目 11〕 前記T細胞は、体内に導入されたときに、エフェクター機能を有する性質を有する細胞を含む、上記項目のいずれか一項に記載の細胞集団。

〔項目 12〕 前記T細胞がキメラ抗原受容体（CAR）またはT細胞受容体（TCR）を含む、上記項目のいずれか一項に記載の細胞集団。

〔項目 12A〕 前記T細胞がキメラ抗原受容体（CAR）を含む、上記項目のいずれか一項に記載の細胞集団。

〔項目 13〕 前記T細胞は、グルコーストランスポーターを需要に応じて（オンデマンドで）発現するように改変され、および／またはグルコーストランスポーターの発現が需要に応じて（オンデマンドで）増強したものである、上記項目のいずれか一項に記載の細胞集団。

〔項目 14〕 前記T細胞はエフェクター機能を有する、上記項目のいずれか一項に記載の細胞集団。

〔項目 15〕 前記細胞集団は、 T_{eff} を含む、上記項目のいずれか一項に記載の細胞集団。

〔項目 16〕 前記細胞集団は、 T_{eff} の前駆細胞を含む、上記項目のいずれか一項に記載の細胞集団。

〔項目 16A〕 前記細胞集団（または T_{eff} の前駆細胞）は、 T_{nv} 、 T_{scm} 、 T_{cm} および T_{emra} からなる群より選択される少なくとも1種の細胞を含む、上記項目のいずれか一項に記載の細胞集団。

〔項目 17〕 前記CARは前記T細胞に発現されたものである、上記項目のいずれか一項に記載の細胞集団。

〔項目 18〕 前記グルコーストランスポーターが、GLUT1、GLUT2、GLUT3、およびGLUT4を含む、上記項目のいずれか一項に記載の細胞集団。

〔項目 19〕 前記グルコーストランスポーターがGLUT3である、上記項目のいずれか一項に記載の細胞集団。

〔項目 20〕 前記T細胞はヒトT細胞である、上記項目のいずれか一項に記載の細胞集団。

〔項目 21〕 上記項目のいずれか一項に記載のT細胞または上記項目のいずれか一項に記載の細胞集団を含む、医薬組成物。

〔項目 22〕 がん、自己免疫疾患、アレルギーまたは感染症の処置または予防のためのものである、上記項目のいずれか一項に記載の医薬組成物。

〔項目 22A〕 がんの予防または治療のためのものである、上記項目のいずれか一項に記載の医薬組成物。

〔項目 23〕 がんの治療のためのものである、上記項目のいずれか一項に記載の医薬組成物。

〔項目 24〕 がんの転移予防または再発予防のためのものである、上記項目のいずれか一項に記載の医薬組成物。

〔項目 25〕 再発しないようにがんを予防または治療するためのものである、上記項目のいずれか一項に記載の医薬組成物。

〔項目 26〕 対象における疾患の予防または治療のための医薬組成物であって、前記医薬組成物は、

(A) 前記対象におけるグルコース取り込み能またはそれに関連する指標の値を採取することと、

(B) 前記指標に応じて適切な発現特性を有する、グルコース取り込み能が強化されたT細胞または前記T細胞を含む細胞集団を選択することと、

(C) 前記グルコース取り込み能が強化されたT細胞または前記T細胞を含む細胞集団を適切な用法および用量で、前記対象に投与することとを特徴とする、医薬組成物。

〔項目 2 6 A〕 前記 T 細胞は、キメラ抗原受容体（C A R）または T 細胞受容体（T C R）を含む上記項目のいずれか一項に記載の医薬組成物。

〔項目 2 6 B〕 前記 T 細胞は、キメラ抗原受容体（C A R）を含む上記項目のいずれか一項に記載の医薬組成物。

〔項目 2 6 C〕 前記疾患は、がん、自己免疫疾患、アレルギーまたは感染症を含む、上記項目のいずれか一項に記載の医薬組成物。

〔項目 2 6 D〕 前記疾患は、がんを含む、上記項目のいずれか一項に記載の医薬組成物。

〔項目 2 7〕 前記グルコース取り込み能が強化された T 細胞は、グルコーストランスポーターを需要に応じて（オンデマンド）発現するように改変されておらず、グルコーストランスポーターの発現が需要に応じて（オンデマンド）増強していない T_{eff} と、グルコーストランスポーターを需要に応じて（オンデマンド）発現するように改変され、および／またはグルコーストランスポーターの発現が需要に応じて（オンデマンド）増強したものを含む、上記項目のいずれか一項に記載の医薬組成物。

〔項目 2 8〕 前記グルコーストランスポーターが G L U T 3 である、上記項目のいずれか一項に記載の組成物。

〔項目 2 9〕 医薬として使用するための上記項目のいずれか一項に記載の T 細胞または細胞集団。

〔項目 3 0〕 がん、自己免疫疾患、アレルギーまたは感染症の処置または予防のためのものである、上記項目のいずれか一項に記載の細胞または細胞集団。

〔項目 3 0 A〕 がんの予防または治療のためのものである、上記項目のいずれか一項に記載の細胞または細胞集団。

〔項目 3 1〕 がんの治癒のためのものである、上記項目のいずれか一項に記載の細胞または細胞集団。

〔項目 3 2〕 がんの転移予防または再発予防のためのものである、上記項目のいずれか一項に記載の細胞または細胞集団。

〔項目 3 3〕 再発しないようにがんを予防または治療するためのものである、上記項目のいずれか一項に記載の細胞または細胞集団。

〔項目 3 4〕 対象における疾患の予防または治療のための細胞または細胞集団であって、前記細胞または細胞集団は、

(A) 前記対象におけるグルコース取り込み能またはそれに関連する指標の値を採取することと、

(B) 前記指標に応じて適切な発現特性を有する、グルコース取り込み能が強化された T 細胞または前記 T 細胞を含む細胞集団を選択することと、

(C) 前記グルコース取り込み能が強化された T 細胞または前記 T 細胞を含む細胞集団を適切な用法および用量で、前記対象に投与することとを特徴とする、細胞または細胞集団。

〔項目 3 4 A〕 前記 T 細胞は、キメラ抗原受容体 (C A R) または T 細胞受容体 (T C R) を含む上記項目のいずれか一項に記載の細胞または細胞集団。

〔項目 3 4 B〕 前記 T 細胞は、キメラ抗原受容体 (C A R) を含む上記項目のいずれか一項に記載の細胞または細胞集団。

〔項目 3 4 C〕 前記疾患は、がん、自己免疫疾患、アレルギーまたは感染症を含む、上記項目のいずれか一項に記載の細胞または細胞集団。

〔項目 3 4 D〕 前記疾患は、がんを含む、上記項目のいずれか一項に記載の細胞または細胞集団。

〔項目 3 5〕 前記グルコース取り込み能が強化された T 細胞は、グルコーストランスポーターを需要に応じて (オンデマンド) 発現するように改変されておらず、グルコーストランスポーターの発現が需要に応じて (オンデマンド) 増強していない T_{eff} と、グルコーストランスポーターを需要に応じて (オンデマンド) 発現するように改変され、および／またはグルコーストランスポーターの発現が需要に応じて (オンデマンド) 増強したものを含む、上記項目のいずれか一項に記載の細胞または細胞集団。

〔項目 3 6〕 前記グルコーストランスポーターが GLUT 3 である、上記

項目のいずれか一項に記載の細胞または細胞集団。

〔項目 37〕 上記項目のいずれか一項に記載の T 細胞または上記項目のいずれか一項に記載の細胞集団の有効量をそれを必要とする対象に投与する工程を含む、前記対象を治療または予防する方法。

〔項目 38〕 前記対象の治療または予防は、がん、自己免疫疾患、アレルギーまたは感染症の処置または予防のためのものである、上記項目のいずれか一項に記載の方法。

〔項目 38A〕 前記対象の治療または予防は、がんの予防または治療を含む、上記項目のいずれか一項に記載の方法。

〔項目 39〕 前記対象の治療または予防は、がんの治療を含む、上記項目のいずれか一項に記載の方法。

〔項目 40〕 前記対象の治療または予防は、がんの転移予防または再発予防を含む、上記項目のいずれか一項に記載の方法。

〔項目 41〕 前記対象の治療または予防は、再発しないようにがんを予防または治療することを含む、上記項目のいずれか一項に記載の方法。

〔項目 42〕 対象における疾患の予防または治療のための方法であって、前記方法は、（A）前記対象におけるグルコース取り込み能またはそれに関連する指標の値を採取することと、

（B）前記指標に応じて適切な発現特性を有する、グルコース取り込み能が強化された T 細胞または前記 T 細胞を含む細胞集団を選択することと、

（C）前記グルコース取り込み能が強化された T 細胞または前記 T 細胞を含む細胞集団を適切な用法および用量で、前記対象に投与することとを特徴とする、方法。

〔項目 42A〕 前記 T 細胞は、キメラ抗原受容体（CAR）または T 細胞受容体（TCR）を含む上記項目のいずれか一項に記載の方法。

〔項目 42B〕 前記 T 細胞は、キメラ抗原受容体（CAR）を含む上記項目のいずれか一項に記載の方法。

〔項目 42C〕 前記疾患は、がん、自己免疫疾患、アレルギーまたは感染

症を含む、上記項目のいずれか一項に記載の方法。

〔項目 4 2 D〕 前記疾患は、がんを含む、上記項目のいずれか一項に記載の方法。

〔項目 4 3〕 前記グルコース取り込み能が強化された T 細胞は、グルコーストランスポーターを需要に応じて（オンデマンド）発現するように改変されておらず、グルコーストランスポーターの発現が需要に応じて（オンデマンド）増強していない T_{eff} と、グルコーストランスポーターを需要に応じて（オンデマンド）発現するように改変され、および／またはグルコーストランスポーターの発現が需要に応じて（オンデマンド）増強したものを含むとを含む、上記項目のいずれか一項に記載の方法。

〔項目 4 4〕 前記グルコーストランスポーターが GLUT 3 である、上記項目のいずれか一項に記載の方法。

〔項目 4 5〕 上記項目のいずれか一項に記載の T 細胞または上記項目のいずれか一項に記載の細胞集団の、前記細胞または細胞集団を含む医薬を製造するための使用。

〔項目 4 6〕 前記医薬は、がん、自己免疫疾患、アレルギーまたは感染症の処置または予防のためのものである、上記項目のいずれか一項に記載の使用。

〔項目 4 6 A〕 前記医薬は、がんの予防または治療のためのものである、上記項目のいずれか一項に記載の使用。

〔項目 4 7〕 前記医薬は、がんの治癒のためのものである、上記項目のいずれか一項に記載の使用。

〔項目 4 8〕 前記医薬は、がんの転移予防または再発予防のためのものである、上記項目のいずれか一項に記載の使用。

〔項目 4 9〕 前記医薬は、再発しないようにがんを予防または治療するためのものである、上記項目のいずれか一項に記載の使用。

〔項目 5 0〕 前記医薬は、対象における疾患の予防または治療のための、上記項目のいずれか一項に記載の使用であって、前記医薬は、

(A) 前記対象におけるグルコース取り込み能またはそれに関連する指標の値を採取することと、

(B) 前記指標に応じて適切な発現特性を有する、グルコース取り込み能が強化されたT細胞または前記T細胞を含む細胞集団を選択することと、

(C) 前記グルコース取り込み能が強化されたT細胞または前記T細胞を含む細胞集団を適切な用法および用量で、前記対象に投与することとを特徴とする、使用。

[項目50A] 前記T細胞は、キメラ抗原受容体(CAR)またはT細胞受容体(TCR)を含む上記項目のいずれか一項に記載の使用。

[項目50B] 前記T細胞は、キメラ抗原受容体(CAR)を含む上記項目のいずれか一項に記載の使用。

[項目50C] 前記疾患は、がん、自己免疫疾患、アレルギーまたは感染症を含む、上記項目のいずれか一項に記載の使用。

[項目50D] 前記疾患は、がんを含む、上記項目のいずれか一項に記載の使用。

[項目51] 前記グルコース取り込み能が強化されたT細胞は、グルコーストランスポーターを需要に応じて(オンデマンド)発現するように改変されておらず、グルコーストランスポーターの発現が需要に応じて(オンデマンド)増強していない T_{eff} と、グルコーストランスポーターを需要に応じて(オンデマンド)発現するように改変され、および／またはグルコーストランスポーターの発現が需要に応じて(オンデマンド)増強したものを含む、上記項目のいずれか一項に記載の使用。

[項目52] 前記グルコーストランスポーターがGLUT3である、上記項目のいずれか一項に記載の使用。

[0009] 本開示は以下をも提供する。

[項目A1] グルコース取り込み能が強化されたT細胞であって、腫瘍微小環境条件の変化に応じて、前記T細胞においてグルコーストランスポーターの発現が調節される、T細胞。

〔項目 A 1 A〕 グルコース取り込み能が強化された T 細胞であって、腫瘍微小環境条件の変化に応じて、前記 T 細胞においてグルコーストランスポーターの発現が調節されるように改変された T 細胞。

〔項目 A 2〕 前記腫瘍微小環境条件は、T C R 関連シグナルの伝達の度合いを含む、上記項目のいずれかに記載の T 細胞。

〔項目 A 3〕 前記 T C R 関連シグナルは、T C R シグナルまたはその一部、および T C R シグナルと他の抗原のキメラのシグナル（C A R シグナルともいう）からなる群より選択される分子によって媒介される、上記項目 A のいずれか一項に記載の T 細胞。

〔項目 A 4〕 前記 T C R 関連シグナルは、T C R シグナルドメイン含む分子によって媒介される、上記項目のいずれか一項に記載の T 細胞。

〔項目 A 5〕 前記腫瘍微小環境条件の変化は、腫瘍抗原および／または共刺激リガンドの提示、ならびに／またはサイトカイン条件の変化を含む、上記項目 A のいずれか一項に記載の T 細胞。

〔項目 A 6〕 前記 T C R 関連シグナルの伝達の度合いは、T C R 刺激の度合いを含む、上記項目のいずれか一項に記載の T 細胞。

〔項目 A 7〕 前記 T C R 関連シグナルの伝達の度合いは、T C R 刺激の度合い、T C R 共刺激および液性因子からなる群より選択される少なくとも 1 つを含む、上記項目のいずれか一項に記載の T 細胞。

〔項目 A 8〕 前記 T C R 関連シグナルの伝達の度合いは、T C R 刺激の度合いと、T C R 共刺激および液性因子からなる群より選択される少なくとも 1 つとを含む、上記項目のいずれか一項に記載の T 細胞。

〔項目 A 9〕 前記 T C R 関連シグナルの伝達の度合いは、T C R 刺激の度合い、T C R 共刺激および液性因子を含む、上記項目のいずれか一項に記載の T 細胞。

〔項目 A 1 0〕 前記 T C R 刺激は、T 細胞の活性化に伴い、核内移行する、N F A T、N F - κ B、および S T A T 転写因子ファミリーからなる群より選択される、上記項目 A のいずれか一項に記載の T 細胞。

〔項目 A 1 1〕 前記腫瘍微小環境条件は、酸素濃度の度合いを含む、上記項目のいずれか一項に記載の T 細胞。

〔項目 A 1 2〕 腫瘍微小環境条件の変化を感知する腫瘍微小環境感知エレメントが作動可能に連結されたグルコーストランスポーターをコードする核酸配列を含む T 細胞。

〔項目 A 1 3〕 前記腫瘍微小環境感知エレメントは、
(i) 腫瘍微小環境条件の変化に応じて活性化する誘導活性化モチーフ
(i i) 前記腫瘍微小環境条件の変化に応じて不活性化する前記グルコーストランスポーターの分解因子をコードする核酸配列
を含む、上記請求項のいずれか一項に記載の T 細胞。

〔項目 A 1 4〕 前記腫瘍微小環境感知エレメントは、
(i) T 細胞の活性化に反応して核内に移行する核内移行因子が結合する誘導活性化モチーフ、
(i i) 酸素濃度の低下に反応して核内に移行する核内移行因子が結合する核内移行結合誘導活性化モチーフ、
(i i i) 前記酸素濃度の低下に反応してグルコーストランスポーターを分解する活性が不活性化されるグルコーストランスポーター分解酵素をコードする核酸配列

を含む、上記請求項のいずれか一項に記載の T 細胞。

〔項目 A 1 5〕 前記グルコーストランスポーターをコードする核酸配列が、腫瘍微小環境条件の変化に応じて活性化する誘導活性化モチーフおよび／または前記腫瘍微小環境条件の変化に応じて不活性化する前記グルコーストランスポーターの分解因子をコードする核酸配列に作動可能に連結されたコンストラクトを含む、上記項目のいずれか一項に記載の T 細胞。

〔項目 A 1 6〕 前記グルコーストランスポーターをコードする核酸配列が、T 細胞の活性化に反応して核内に移行する核内移行因子が結合する核内移行結合誘導活性化モチーフに作動可能に連結されたコンストラクトを含む、上記項目のいずれか一項に記載の T 細胞。

〔項目 A 1 7〕 前記核内移行因子は、N F A T、N F - κ B、および S T A T 転写因子ファミリーからなる群より選択される、上記項目のいずれか一項に記載の T 細胞。

〔項目 A 1 8〕 前記核内移行結合誘導活性化モチーフは、N F A T 結合ドメイン、 κ B モチーフ (G G G A C T T T C C) (配列番号 1) および S T A T 結合配列 (T T C N N N G A A)、またはそれらの改変配列からなる群より選択される、上記項目のいずれか一項に記載の T 細胞。

〔項目 A 1 9〕 前記核内移行因子と前記核内移行結合誘導活性化モチーフの組合せは、

(1) N F A T と N F A T 結合ドメインとの組合せ

(2) N F - κ B と κ B モチーフ (G G G A C T T T C C (配列番号 1) の組合せ、または

(3) S T A T 転写因子ファミリーと S T A T 結合配列 (T T C N N N G A A) の組合せを含む、上記項目のいずれか一項に記載の T 細胞。

〔項目 A 2 0〕 前記グルコーストランスポーターをコードする核酸配列が、酸素濃度の低下に反応して核内に移行する核内移行因子が結合する核内移行結合誘導活性化モチーフに作動可能に連結されたコンストラクトを含む、上記項目のいずれか一項に記載の T 細胞。

〔項目 A 2 1〕 前記核内移行因子は、H I F - 1 からなる群より選択される、上記項目のいずれか一項に記載の T 細胞。

〔項目 A 2 2〕 前記核内移行結合誘導活性化モチーフは、H I F - R E からなる群より選択される、上記項目のいずれか一項に記載の T 細胞。

〔項目 A 2 3〕 前記核内移行因子と核内移行結合誘導活性化モチーフの組合せは、

(1) H I F - 1 と H I F - R E の組合せ、

からなる群より選択される、上記項目のいずれか一項に記載の T 細胞。

〔項目 A 2 4〕 前記グルコーストランスポーターをコードする核酸配列が、酸素濃度の低下に反応して前記グルコーストランスポーターを分解する活

性が不活性化される因子をコードする核酸配列に作動可能に連結されたコンストラクトを含む、上記項目のいずれか一項に記載のT細胞。

〔項目A25〕 前記不活性化される因子は、酸素依存的分解因子（ODD）からなる群より選択される、上記項目のいずれか一項に記載のT細胞。

〔項目A26〕 前記T細胞がキメラ抗原受容体（CAR）を含む、上記項目のいずれか一項に記載のT細胞。

〔項目A27〕 前記T細胞はエフェクター機能を有する、上記項目のいずれか一項に記載のT細胞。

〔項目A28〕 前記T細胞はエフェクターT細胞（ T_{eff} ）の前駆細胞である、上記項目のいずれか一項に記載のT細胞。

〔項目A29〕 前記エフェクターT細胞の前駆細胞は、メモリー機能が延長される、上記項目のいずれか一項に記載のT細胞。

〔項目A30〕 前記エフェクターT細胞の前駆細胞は、メモリーT細胞の表現型が維持される、上記項目のいずれか一項に記載のT細胞。

〔項目A31〕 前記エフェクターT細胞が活性化されまたは活性が維持され、および前記エフェクターT細胞の前駆細胞は、メモリー機能が延長されまたはメモリーT細胞の表現型が維持される、上記項目のいずれか一項に記載のT細胞。

〔項目A32〕 前記発現および／または増強が、腫瘍環境特異的に達成される、上記項目のいずれか一項に記載のT細胞。

〔項目A33〕 前記CARは前記T細胞に発現されたものである、上記項目のいずれか一項に記載のT細胞。

〔項目A34〕 前記グルコーストランスポーターが、GLUT1、GLUT2、GLUT3、およびGLUT4を含む、上記項目のいずれか一項に記載のT細胞。

〔項目A35〕 前記グルコーストランスポーターがGLUT3である、上記項目のいずれか一項に記載のT細胞。

〔項目A36〕 ヒトT細胞である、上記項目のいずれか一項に記載のT細胞。

胞。

〔項目 A 3 7〕 需要に応じて（オンデマンドで）グルコース取り込み能が強化された T 細胞を含む細胞集団。

〔項目 A 3 8〕 上記項目のいずれか一項に記載の T 細胞を含む、細胞集団。

〔項目 A 3 9〕 前記 T 細胞は、体内に導入されたときに、エフェクター機能を有する性質を有する細胞を含む、上記項目のいずれか一項に記載の細胞集団。

〔項目 A 4 0〕 前記 T 細胞がキメラ抗原受容体（CAR）を含む、上記項目のいずれか一項に記載の細胞集団。

〔項目 A 4 1〕 前記 T 細胞は、腫瘍微小環境条件の変化に応じて、前記 T 細胞においてグルコーストランスポーターの発現が調節されるように改変され、および／または腫瘍微小環境条件の変化を感知する腫瘍微小環境感知エレメントが作動可能に連結されたグルコーストランスポーターをコードする核酸配列を含む、上記項目のいずれか一項に記載の細胞集団。

〔項目 A 4 2〕 前記 T 細胞はエフェクター機能を有する、上記項目のいずれか一項に記載の細胞集団。

〔項目 A 4 3〕 前記細胞集団は、 T_{eff} を含む、上記項目のいずれか一項に記載の細胞集団。

〔項目 A 4 4〕 前記細胞集団は、 T_{eff} の前駆細胞を含む、上記項目のいずれか一項に記載の細胞集団。

〔項目 A 4 5〕 前記 CAR は前記 T 細胞に発現されたものである、上記項目のいずれか一項に記載の細胞集団。

〔項目 A 4 6〕 前記グルコーストランスポーターが、GLUT1、GLUT2、GLUT3、および GLUT4 を含む、上記項目のいずれか一項に記載の細胞集団。

〔項目 A 4 7〕 前記グルコーストランスポーターが GLUT3 である、上記項目のいずれか一項に記載の細胞集団。

〔項目 A 4 8〕 前記 T 細胞はヒト T 細胞である、上記項目のいずれか一項に記載の細胞集団。

〔項目 A 4 9〕 上記項目のいずれか一項に記載の T 細胞または上記項目のいずれか一項に記載の細胞集団を含む、医薬組成物。

〔項目 A 5 0〕 がん、自己免疫疾患、アレルギーまたは感染症の処置または予防のためのものである、上記項目のいずれか一項に記載の医薬組成物。

〔項目 A 5 1〕 がんの予防または治療のためのものである、上記項目のいずれか一項に記載の医薬組成物。

〔項目 A 5 2〕 がんの治癒のためのものである、上記項目のいずれか一項に記載の医薬組成物。

〔項目 A 5 3〕 がんの転移予防または再発予防のためのものである、上記項目のいずれか一項に記載の医薬組成物。

〔項目 A 5 4〕 再発しないようにがんを予防または治療するためのものである、上記項目のいずれか一項に記載の医薬組成物。

〔項目 A 5 5〕 対象における疾患の予防または治療のための医薬組成物であって、前記医薬組成物は、

(A) 前記対象におけるグルコース取り込み能またはそれに関連する指標の値を採取することと、

(B) 前記指標に応じて適切な発現特性を有する、グルコース取り込み能が強化された T 細胞または前記 T 細胞を含む細胞集団を選択することと、

(C) 前記グルコース取り込み能が強化された T 細胞または前記 T 細胞を含む細胞集団を適切な用法および用量で、前記対象に投与することとを特徴とする、医薬組成物。

〔項目 A 5 6〕 前記 T 細胞は、キメラ抗原受容体 (C A R) または T 細胞受容体 (T C R) を含む上記項目のいずれか一項に記載の医薬組成物。

〔項目 A 5 7〕 前記 T 細胞は、キメラ抗原受容体 (C A R) を含む上記項目のいずれか一項に記載の医薬組成物。

〔項目 A 5 8〕 前記疾患は、がん、自己免疫疾患、アレルギーまたは感染

症を含む、上記項目のいずれか一項に記載の医薬組成物。

〔項目 A 5 9〕 前記疾患は、がんを含む、上記項目のいずれか一項に記載の医薬組成物。

〔項目 A 6 0〕 前記グルコース取り込み能が強化された T 細胞は、グルコーストランスポーターを腫瘍微小環境条件の変化に応じて発現が調節されるように改変されておらず、グルコーストランスポーターの発現が腫瘍微小環境条件の変化に応じて調節されるようにはされていない T_{eff} と、グルコーストランスポーターを腫瘍微小環境条件の変化に応じて発現が調節されるように改変され、および／またはグルコーストランスポーターの発現が腫瘍微小環境条件の変化に応じて調節されるようにしたものを含む、上記項目のいずれか一項に記載の医薬組成物。

〔項目 A 6 0 A〕 前記グルコース取り込み能が強化された T 細胞は、腫瘍微小環境条件の変化を感知する腫瘍微小環境感知エレメントが作動可能に連結されたグルコーストランスポーターをコードする核酸配列を含むように改変されておらず、腫瘍微小環境条件の変化を感知する腫瘍微小環境感知エレメントが作動可能に連結されたグルコーストランスポーターをコードする核酸配列を含まない T_{eff} と、腫瘍微小環境条件の変化を感知する腫瘍微小環境感知エレメントが作動可能に連結されたグルコーストランスポーターをコードする核酸配列を含むように改変され、および／または腫瘍微小環境条件の変化を感知する腫瘍微小環境感知エレメントが作動可能に連結されたグルコーストランスポーターをコードする核酸配列を含むものを含む、上記項目のいずれか一項に記載の医薬組成物。

〔項目 A 6 1〕 前記グルコーストランスポーターが GLUT 3 である、上記項目のいずれか一項に記載の組成物。

〔項目 A 6 2〕 医薬として使用するための上記項目のいずれか一項に記載の T 細胞または細胞集団。

〔項目 A 6 3〕 がん、自己免疫疾患、アレルギーまたは感染症の処置または予防のためのものである、上記項目のいずれか一項に記載の細胞または細

胞集団。

〔項目 A 6 4〕 がんの予防または治療のためのものである、上記項目のいずれか一項に記載の細胞または細胞集団。

〔項目 A 6 5〕 がんの治癒のためのものである、上記項目のいずれか一項に記載の細胞または細胞集団。

〔項目 A 6 6〕 がんの転移予防または再発予防のためのものである、上記項目のいずれか一項に記載の細胞または細胞集団。

〔項目 A 6 7〕 再発しないようにがんを予防または治療するためのものである、上記項目のいずれか一項に記載の細胞または細胞集団。

〔項目 A 6 8〕 対象における疾患の予防または治療のための細胞または細胞集団であって、前記細胞または細胞集団は、

(A) 前記対象におけるグルコース取り込み能またはそれに関連する指標の値を採取することと、

(B) 前記指標に応じて適切な発現特性を有する、グルコース取り込み能が強化された T 細胞または前記 T 細胞を含む細胞集団を選択することと、

(C) 前記グルコース取り込み能が強化された T 細胞または前記 T 細胞を含む細胞集団を適切な用法および用量で、前記対象に投与することとを特徴とする、細胞または細胞集団。

〔項目 A 6 9〕 前記 T 細胞は、キメラ抗原受容体 (C A R) または T 細胞受容体 (T C R) を含む上記項目のいずれか一項に記載の細胞または細胞集団。

〔項目 A 7 0〕 前記 T 細胞は、キメラ抗原受容体 (C A R) を含む上記項目のいずれか一項に記載の細胞または細胞集団。

〔項目 A 7 1〕 前記疾患は、がん、自己免疫疾患、アレルギーまたは感染症を含む、上記項目のいずれか一項に記載の細胞または細胞集団。

〔項目 A 7 2〕 前記疾患は、がんを含む、上記項目のいずれか一項に記載の細胞または細胞集団。

〔項目 A 7 3〕 前記グルコース取り込み能が強化された T 細胞は、グルコ

ーストランスポーターを腫瘍微小環境条件の変化に応じて発現が調節されるように改変されておらず、グルコーストランスポーターの発現が腫瘍微小環境条件の変化に応じて調節されるようにはされていない T_{eff} と、グルコーストランスポーターを腫瘍微小環境条件の変化に応じて発現が調節されるように改変され、および／またはグルコーストランスポーターの発現が腫瘍微小環境条件の変化に応じて調節されるようにしたものを含む、上記項目のいずれか一項に記載の細胞または細胞集団。

〔項目 A 7 3 A〕 前記グルコース取り込み能が強化された T 細胞は、腫瘍微小環境条件の変化を感知する腫瘍微小環境感知エレメントが作動可能に連結されたグルコーストランスポーターをコードする核酸配列を含んでおらず、腫瘍微小環境条件の変化を感知する腫瘍微小環境感知エレメントが作動可能に連結されたグルコーストランスポーターをコードする核酸配列を含んでいない T_{eff} と、腫瘍微小環境条件の変化を感知する腫瘍微小環境感知エレメントが作動可能に連結されたグルコーストランスポーターをコードする核酸配列を含むように改変され、および／または腫瘍微小環境条件の変化を感知する腫瘍微小環境感知エレメントが作動可能に連結されたグルコーストランスポーターをコードする核酸配列を含むものを含む、上記項目のいずれか一項に記載の細胞または細胞集団。

〔項目 A 7 4〕 前記グルコーストランスポーターが GLUT 3 である、上記項目のいずれか一項に記載の細胞または細胞集団。

〔項目 A 7 5〕 上記項目のいずれか一項に記載の T 細胞または上記項目のいずれか一項に記載の細胞集団の有効量をそれを必要とする対象に投与する工程を含む、前記対象を治療または予防する方法。

〔項目 A 7 6〕 前記対象の治療または予防は、がん、自己免疫疾患、アレルギーまたは感染症の処置または予防のためのものである、上記項目のいずれか一項に記載の方法。

〔項目 A 7 7〕 前記対象の治療または予防は、がんの予防または治療を含む、上記項目のいずれか一項に記載の方法。

〔項目 A 7 8〕 前記対象の治療または予防は、がんの治療を含む、上記項目のいずれか一項に記載の方法。

〔項目 A 7 9〕 前記対象の治療または予防は、がんの転移予防または再発予防を含む、上記項目のいずれか一項に記載の方法。

〔項目 A 8 0〕 前記対象の治療または予防は、再発しないようにがんを予防または治療することを含む、上記項目のいずれか一項に記載の方法。

〔項目 A 8 1〕 対象における疾患の予防または治療のための方法であって、前記方法は、（A）前記対象におけるグルコース取り込み能またはそれに関連する指標の値を採取することと、

（B）前記指標に応じて適切な発現特性を有する、グルコース取り込み能が強化された T 細胞または前記 T 細胞を含む細胞集団を選択することと、

（C）前記グルコース取り込み能が強化された T 細胞または前記 T 細胞を含む細胞集団を適切な用法および用量で、前記対象に投与することとを特徴とする、方法。

〔項目 A 8 2〕 前記 T 細胞は、キメラ抗原受容体（CAR）または T 細胞受容体（TCR）を含む上記項目のいずれか一項に記載の方法。

〔項目 A 8 3〕 前記 T 細胞は、キメラ抗原受容体（CAR）を含む上記項目のいずれか一項に記載の方法。

〔項目 A 8 4〕 前記疾患は、がん、自己免疫疾患、アレルギーまたは感染症を含む、上記項目のいずれか一項に記載の方法。

〔項目 A 8 5〕 前記疾患は、がんを含む、上記項目のいずれか一項に記載の方法。

〔項目 A 8 6〕 前記グルコース取り込み能が強化された T 細胞は、グルコーストランスポーターを腫瘍微小環境条件の変化に応じて発現が調節されるように改変されておらず、グルコーストランスポーターの発現が腫瘍微小環境条件の変化に応じて調節されるようにはされていない T_{eff} と、グルコーストランスポーターを腫瘍微小環境条件の変化に応じて発現が調節されるように改変され、および／またはグルコーストランスポーターの発現が腫瘍微小

環境条件の変化に応じて調節されるようにしたものを含む、上記項目のいずれか一項に記載の方法。

〔項目 A 8 6 A〕 前記グルコース取り込み能が強化された T 細胞は、腫瘍微小環境条件の変化を感知する腫瘍微小環境感知エレメントが作動可能に連結されたグルコーストランスポーターをコードする核酸配列を含んでおらず、腫瘍微小環境条件の変化を感知する腫瘍微小環境感知エレメントが作動可能に連結されたグルコーストランスポーターをコードする核酸配列を含んでいない T_{eff} と、腫瘍微小環境条件の変化を感知する腫瘍微小環境感知エレメントが作動可能に連結されたグルコーストランスポーターをコードする核酸配列を含むように改変され、および／または腫瘍微小環境条件の変化を感知する腫瘍微小環境感知エレメントが作動可能に連結されたグルコーストランスポーターをコードする核酸配列を含むものを含む、上記項目のいずれか一項に記載の方法。

〔項目 A 8 7〕 前記グルコーストランスポーターが GLUT 3 である、上記項目のいずれか一項に記載の方法。

〔項目 A 8 8〕 上記項目のいずれか一項に記載の T 細胞または上記項目のいずれか一項に記載の細胞集団の、前記細胞または細胞集団を含む医薬を製造するための使用。

〔項目 A 8 9〕 前記医薬は、がん、自己免疫疾患、アレルギーまたは感染症の処置または予防のためのものである、上記項目のいずれか一項に記載の使用。

〔項目 A 9 0〕 前記医薬は、がんの予防または治療のためのものである、上記項目のいずれか一項に記載の使用。

〔項目 A 9 1〕 前記医薬は、がんの治癒のためのものである、上記項目のいずれか一項に記載の使用。

〔項目 A 9 2〕 前記医薬は、がんの転移予防または再発予防のためのものである、上記項目のいずれか一項に記載の使用。

〔項目 A 9 3〕 前記医薬は、再発ないようにがんを予防または治療する

ためのものである、上記項目のいずれか一項に記載の使用。

〔項目 A 9 4〕 前記医薬は、対象における疾患の予防または治療のための、上記項目のいずれか一項に記載の使用であって、前記医薬は、

(A) 前記対象におけるグルコース取り込み能またはそれに関連する指標の値を採取することと、

(B) 前記指標に応じて適切な発現特性を有する、グルコース取り込み能が強化された T 細胞または前記 T 細胞を含む細胞集団を選択することと、

(C) 前記グルコース取り込み能が強化された T 細胞または前記 T 細胞を含む細胞集団を適切な用法および用量で、前記対象に投与することとを特徴とする、使用。

〔項目 A 9 5〕 前記 T 細胞は、キメラ抗原受容体 (C A R) または T 細胞受容体 (T C R) を含む上記項目のいずれか一項に記載の使用。

〔項目 A 9 6〕 前記 T 細胞は、キメラ抗原受容体 (C A R) を含む上記項目のいずれか一項に記載の使用。

〔項目 A 9 7〕 前記疾患は、がん、自己免疫疾患、アレルギーまたは感染症を含む、上記項目のいずれか一項に記載の使用。

〔項目 A 9 8〕 前記疾患は、がんを含む、上記項目のいずれか一項に記載の使用。

〔項目 A 9 9〕 前記グルコース取り込み能が強化された T 細胞は、グルコーストランスポーターを腫瘍微小環境条件の変化に応じて発現が調節されるように改変されておらず、グルコーストランスポーターの発現が腫瘍微小環境条件の変化に応じて調節されるようにはされていない T_{eff} と、グルコーストランスポーターを腫瘍微小環境条件の変化に応じて発現が調節されるように改変され、および／またはグルコーストランスポーターの発現が腫瘍微小環境条件の変化に応じて調節されるようにしたものを含む、上記項目のいずれか一項に記載の使用。

〔項目 A 9 9 A〕 前記グルコース取り込み能が強化された T 細胞は、腫瘍微小環境条件の変化を感知する腫瘍微小環境感知エレメントが作動可能に連

結されたグルコーストランスポーターをコードする核酸配列を含んでおらず、腫瘍微小環境条件の変化を感知する腫瘍微小環境感知エレメントが作動可能に連結されたグルコーストランスポーターをコードする核酸配列を含んでいない T_{eff} と、腫瘍微小環境条件の変化を感知する腫瘍微小環境感知エレメントが作動可能に連結されたグルコーストランスポーターをコードする核酸配列を含むように改変され、および／または腫瘍微小環境条件の変化を感知する腫瘍微小環境感知エレメントが作動可能に連結されたグルコーストランスポーターをコードする核酸配列を含むものを含む、上記項目のいずれか一項に記載の使用。

〔項目A100〕 前記グルコーストランスポーターがGLUT3である、上記項目のいずれか一項に記載の使用。

[0010] 本開示において、上記の1つまたは複数の特徴は、明示された組み合わせに加え、さらに組み合わせて提供され得ることが意図される。なお、本開示のさらなる実施形態および利点は、必要に応じて以下の詳細な説明を読んで理解すれば、当業者に認識される。

[0011] なお、上記した以外の本開示の特徴及び顕著な作用・効果は、以下の発明の実施形態の項及び図面を参照することで、当業者にとって明確となる。

発明の効果

[0012] 本開示により、グルコース取り込み能が強化されたエフェクターT細胞（ T_{eff} ）を提供することができ、このような細胞を用いることで、腫瘍環境中でも飢餓・疲弊せずに機能するキメラ抗原受容体（CAR）T細胞を提供することができる。

[0013] 本開示の細胞は、腫瘍細胞が腫瘍環境内で生き延びる機序をT細胞に応用した、代謝強化型T細胞とすることができる。本開示の細胞によれば、従来の免疫チェックポイント阻害療法では達成し得なかった、腫瘍微小環境など低グルコース環境下にて効果的な細胞傷害活性、サイトカイン産生能を維持することが可能であり、体内での高い抗腫瘍効果が発揮され得る。また、グルコース需要の高まりに合わせグルコース輸送体が発現するオンデマンド型の

グルコース輸送体発現システムを用いることで、過度な活性化によるT細胞の過分化、疲弊を回避し、効果の長期維持が可能で、再発予防にも顕著な効果を発揮するメモリーフェノタイプ型T細胞が誘導され得る。そのようなオンデマンド型は、腫瘍微小環境条件の変化に応じて、前記T細胞においてグルコーストランスポーターの発現が調節される性質によって達成され、あるいは、腫瘍微小環境条件の変化を感知する腫瘍微小環境感知エレメントが作動可能に連結されたグルコーストランスポーターをコードする核酸配列を含むことによって達成される。

図面の簡単な説明

[0014] [図1]図1は、代謝改変抗EGFRvIII CAR (3C10 CAR_GLUT3) レンチウイルスベクタープラスミドの構造例を示す。膠芽腫 (GBM) 等に発現するEGFRvIIIを標的とするマウス由来抗体 (クローン3C10) 由来の単鎖抗体 (scFv) を構築、CD8 hinge、CD28膜貫通部分 (CD28 TM)、CD28細胞内ドメイン (CD28 ICD)、4-1BB ICD、CD3ζと結合しCARを構築した。CAR下にP2A配列を介し高親和性グルコース輸送体 (GLUT3) をコードした。図は、同3C10 CAR_GLUT3をEF-1α promoterを有する第三世代レンチウイルスベクタープラスミドに組み込んだ際の例を示す。

[図2]図2は、T細胞表面GLUT3発現とグルコース取り込みの強化を示す。上パネルに、通常型CAR (3C10 CAR) と代謝改変CAR (GLUT3 CAR) の構造を示す。左下に3C10 CARとGLUT3 CARの蛍光顕微鏡におけるT細胞上のCAR、GLUT3発現像を示す。中下に蛍光強度にて定量したGLUT3発現を示す。右下に、2-NBDG法による細胞内へのグルコース取り込み量の定量結果を示す。通常型CAR (3C10 CAR) と代謝改変CAR (GLUT3 CAR) を健常ドナー由来T細胞に遺伝子導入しCAR-T細胞を得た。蛍光顕微鏡にて、GLUT3 CAR-T細胞膜への均質なGLUT3発現を認めた。また、GLUT3 CAR-T細胞では、T細胞、通常型CAR-T細胞 (3C10 C

AR-T細胞)に比しグルコース取り込みが亢進していた。

[図3]図3は、通常CAR-T細胞と同等のT細胞増幅効率を示す結果である。X軸に導入後の日数、Y軸に $\text{LOG}_2(\text{FC})$ を示す。T細胞を含む末梢血単核球(PBMC)を抗CD3/28ビーズ刺激後CARを遺伝子導入しT細胞増殖効率を解析した。通常グルコース条件下(10mM)、低グルコース条件下(0.5mM)下いずれにおいても、GLUT3 CAR-T細胞は通常型CAR-T細胞(3C10 CAR-T細胞)と同等の樹立効率を有していた。

[図4]図4は、GLUT3発現によるT細胞解糖能の強化を示す結果である。左のグラフは、3C10 CAR-T細胞とGLUT3 CAR-T細胞の、通常グルコース条件下(Glu conc 10mM)および低グルコース条件下(Glu conc 0.5mM)での解糖能を示す。下は3C10 CAR-T細胞とGLUT3 CAR-T細胞の、通常グルコース条件下(Glu conc 10mM)での解糖能を示す。右パネルの左はグルコース添加後に観察される解糖(Glycolysis)値を、右は、Oligomycin添加後に観察される解糖能(Glycolytic capacity)値を示す。GLUT3 CAR-T細胞と3C10 CAR-T細胞の代謝をFlux analyzerにて解析した。低グルコース環境、通常グルコース環境いずれにおいてもGLUT3 CARは3C10 CARより解糖能が強化されていた。

[図5]図5は、GLUT3 CAR-T細胞は、低グルコース下の競合優位性をもつことを示す結果である。左パネルに実験手順を示す。中のパネルには、0日目および3日目の3C10 CAR-T細胞とGLUT3 CAR-T細胞の細胞数割合を示す。右パネルには、3日目における、3C10 CAR-T細胞とGLUT3 CAR-T細胞の比を示す。3C10 CAR-T細胞(無標識)とGLUT3 CAR-T細胞(CSFE標識)を通常グルコース下、および、低グルコース下にて共培養した。通常グルコース下では両者同程度の生存を認めたが、低グルコース下では、GLUT3 CA

R-T細胞の有意な生存を認めた。

[図6]図6は、GLUT3 CAR-T細胞の強化されたサイトカイン産生能を示す結果である。左パネルには上にCD8陽性細胞についての細胞内IFN γ およびIL-2解析を、下にCD4陽性細胞についての細胞内IFN γ およびIL-2量を示す。右パネルには、IFN γ 、IL-2およびTNF- α のそれぞれの陽性細胞割合を示す。3C10 CAR-T細胞、GLUT3 CAR-T細胞を抗原刺激後、サイトカイン産生細胞割合をFCMにて解析した。T細胞維持・活性化と抗腫瘍活性発揮に重要であるサイトカイン群（IFN- γ 、IL-2、TNF- α ）の有意な発現上昇を認めた。

[図7]図7は、低グルコース下でも保たれるGLUT3 CAR-T細胞の機能を示す結果である。左パネルから順に、IFN γ 、IL-2およびTNF- α のそれぞれの通常グルコース条件下（10mM）と低グルコース条件下（0.5mM）での産生細胞割合を示す。通常グルコース下、低グルコース下でのサイトカイン産生能を比較した。通常型CAR-T細胞（3C10 CAR-T細胞）においては、低グルコース下での極端な機能低下が認められた。一方、GLUT3 CAR-T細胞では、通常グルコース下で高いサイトカイン産生能を認め、また、低グルコース下においても、3C10 CAR-T細胞の通常グルコース下サイトカイン産生能と遜色ない機能を発揮した。

[図8]図8は、GLUT3 CAR-T細胞の強化された細胞傷害活性を示す結果である。左パネルに、グルコース濃度10mMでのU87d細胞株に対する3C10 CAR-T細胞とGLUT3 CAR-T細胞の細胞傷害活性の結果を、右パネルには、グルコース濃度0.5mMでのU87d細胞株に対する3C10 CAR-T細胞とGLUT3 CAR-T細胞の細胞傷害活性の結果を示す。EGFRvIII発現細胞株を標的とし細胞傷害活性を解析した。低グルコース下、通常グルコース下にて細胞傷害活性を解析し、両環境下にてGLUT3 CAR-T細胞は3C10 CAR-T細胞に比し高い細胞傷害活性を示した。

[図9]図9は、GLUT3 CARのT細胞メモリーフェノタイプへ与える特性を示す結果である。左パネルには、U87d腫瘍細胞株と共培養前（Preco-culture）と共培養後（co-culture）のCD45とCD27の発現を、右パネルには左から共培養前および共培養後のCD45RA陽性、CD27陰性分画割合を示す。3C10 CAR-T細胞、GLUT3 CAR-T細胞のメモリーフェノタイプを比較した。GLUT3 CAR-T細胞において、3C10 CARと比し強いエフェクターT細胞への分化傾向を認めた。

[図10]図10は、GLUT3 CAR-T細胞の抑制分子発現の抑制を示す。左から、PD-1、LAG3、TIM3のデータを示す。EGFRvIII抗原陽性細胞刺激下の抑制分子の発現を比較した。GLUT3 CAR-T細胞において、PD-1、LAG3、TIM3の発現抑制を認めた。

[図11]図11は、GLUT3 CAR-T細胞のmRNA解析（代謝、疲弊、活性化、分化の評価）を示す。上段左パネルは、左から順にPDCD1発現、LAG3発現、TIM3発現を示し、上段右パネルは、左から乳酸代謝に関連するエンリッチメントプロット、糖代謝に関連するエンリッチメントプロットを示す。下段は、遺伝オントロジーを基にした発現上昇因子を示す。3C10 CAR-T、GLUT3 CAR-T細胞の詳細をmRNA発現にて解析した。GLUT3 CAR-T細胞にて、FCMと同じく疲弊関連分子の低下、乳酸代謝、解糖関連因子の上昇を認めた。これらの因子は、活性化、サイトカイン産生等T細胞エフェクター機能の高まりに関連する因子である。

[図12]図12は、普遍性の証明、すなわち、3C10 CARのみでなく、CD19 CARに搭載しても同様の効果が得られることを示す。左パネルには、3C10 CARを用いた実験を、右パネルにはCD19 CARを用いた実験を示す。各パネルにおいて左上はMock導入T細胞、3C10 CAR-T細胞、GLUT3 CAR-T細胞の細胞内IL-2、IFN γ 、TNF- α 解析を、右上は通常グルコース条件（10mM）下での3C

10 CAR-T細胞とGLUT3 CAR-T細胞の左からIFN γ 、IL-2、TNF α の陽性細胞割合を、左下は、低グルコース条件（0.5 mM）下での3C10 CAR-T細胞とGLUT3 CAR-T細胞の左からIFN γ 、IL-2、TNF α の陽性細胞割合を示す。右下は左からU87d細胞株、U251MGd細胞株に対する、低グルコース条件下（0.5 mM）での3C10 CAR-T細胞とGLUT3 CAR-T細胞の細胞傷害活性を示す。GLUT3をCD19 CARに搭載した場合にも、3C10 CARと同様の効果が得られることを確認した。また、膵臓がん細胞株にCD19を発現させた膵臓がん細胞に対しても効果があることが示された。

[図13]図13は、頭蓋内ゼノグラフトモデルですみやかな腫瘍根絶を実現することを示す。左上パネルに実験の簡単なスキームを示す。簡単には免疫不全マウスであるNSGマウスの頭蓋内に 2.5×10^4 細胞のU87d腫瘍細胞株を移植、5日後に 1×10^6 細胞のCAR-T細胞を経尾静脈投与し、生体発光イメージング（BLI）にて経時的に腫瘍量を定量するモデルである。左中には0日目及び11日目の腫瘍イメージング像を示す。左下のグラフは経時的な発光強度（腫瘍量を反映）を示す。中～中パネルには各治療群のカプランマイヤー曲線を示す。中パネルの下には、腫瘍リチャレンジマウスにおける、34日目、38日目および42日目の腫瘍イメージング像を示す。右欄には、経時的な末梢血CD3 $^{+}$ T細胞数を示す。U87 Δ 頭蓋内ゼノグラフトモデルにて抗腫瘍活性を観察した。GLUT3 CAR-T細胞治療群において、3C10 CAR-T細胞治療群より速やかな腫瘍根絶と生存の改善、優位なT細胞増幅を認めた。また、GLUT3 CAR-T細胞群治癒マウスにおける腫瘍 *rechallenge* にて、腫瘍拒絶を確認した。

[図14]図14は、On-demand GLUT3発現CAR-T細胞の概要を示す。定常状態ではCARのみ発現、GLUT3は発現せず、CAR-T細胞の活性化、腫瘍環境など、グルコース需要が高まった際にGLUT3

を発現するシステムの概略図が示される。

[図15]図15は、誘導型GLUT3発現システムのデザインを示す。Pは恒常発現型を示し、Aは、NFATi-GLUT3を示し、BはHIF1i-GLUT3を示し、B'はHIF1i-GLUT3のHypoxia感知型の代替バージョンを示す。模式図中の記号はそれぞれEF-1プロモーター(EF-1a)、抗EGFRvIII CAR(EGFRvIII CAR=3C10 CAR)、P2Aシーケンス(P2A)、NFAT反応エレメント(NFAT-RE)、HIF1a反応エレメント(HIF-RE)、高親和性グルコース輸送体(GLUT3)、oxygen-dependent degradationドメイン(ODD)、アスタリスク(*)はストップコドンを示す。腫瘍環境特異的、または、活性化特異的にGLUT3を発現するCARコンストラクトをデザインした。活性化によるNFAT上昇(A.)、腫瘍の低酸素(B. およびB')を感知したGLUT3の発現を可能とする。腫瘍環境特異的、または、活性化特異的にGLUT3を発現するCARコンストラクトをデザインした。活性化によるNFAT上昇(A.)、腫瘍の低酸素(B.)を感知したGLUT3の発現を可能にする。A.においては、EF-1aプロモーターによってドライブされ恒常的に発現するCAR(例としてEGFRvIII CAR)とは独立して、T細胞活性化にて核内に移行するNFATが結合し転写を誘導する8回繰り返しNFAT-RE下にminimal promoter(MP)を介しGLUT3がコードされる。B.においては、同じくCARとは独立して、T細胞の低酸素状態にて核内移行するHIF-1aが結合し転写を誘導する8回繰り返しHIF-RE下にminimal promoterを介しGLUT3がコードされる。B'では、酸素存在下でGLUT3が分解されるGLUT3-ODDエレメントがEF-1aプロモーターにてドライブされるCARの直下にP2Aシーケンスを介してコードされる。

[図16]図16は、上記NFATi-GLUT3 CARを例としてレンチウイルスベクタープラスミドに組み込んだ際の構造を示す。構造詳細は実施例

欄に記載する。一つのプラスミドに、EF-1 α プロモーターにて恒常的にドライブされる3C10 CARと、8回繰り返しNFAT binding siteとminimum promoterにてNFAT核内移行依存性にドライブされるGLUT3が組み込まれたオールインワンレンチウイルスベクタープラスミドである。

[図17]図17は、Inducible GLUT3 CAR systemの作動と基本的機能を示す。左上にNFAT誘導性GLUT3 CARの構造を示す。左中パネルに非刺激下（Pre stimulation）と刺激下（Post stimulation）における、T細胞のCAR、GLUT3発現の蛍光顕微鏡像を示す。左下パネルにU87d細胞株刺激後の右からIFN- γ 、TNF α 、およびIL-2を示す。右中パネルにU87d細胞株刺激下の各CAR-T細胞内のIFN- γ 、IL-2、TNF α の細胞内発現強度をフロープロットにて示す。右下パネルにグルコース条件下（0.5 mM）にて、3C10 CAR-T細胞より強く、GLUT3 CAR-T細胞と同等の細胞傷害活性を発揮することを示すグラフを示す。NFAT核内移行にともなってGLUT3を発現するシステムを構築し（NFAT i GLUT3 CAR-T）作動を確認した。NFAT i GLUT3 CAR-T細胞（NFAT i GLUT3 CAR-T）の細胞傷害活性は、恒常発現GLUT3 CAR-T細胞（GLUT3 CAR-T）と同等、サイトカイン産生は、3C10 CAR-T（GLUT3なし）と恒常発現CAR-T細胞（GLUT3 CAR-T）の中間程度であった。

[図18]図18は、図15と同様のマウスモデルでMock T細胞、3C10 CAR-T細胞、GLUT3 CAR-T細胞NFAT i GLUT3 CAR-T細胞の抗腫瘍効果の評価を示す。左上に実験模式図を示す。右上に Kaplan-Meier 生存曲線を示す。下に、生体発光イメージング（BLI）にて定量された腫瘍量の経時的变化を示す。GLUT3 CAR-Tで4頭、NFAT i GLUT3 CAR-tで2頭のCRが得られた。

[図19]図19は、腫瘍チャレンジおよび腫瘍Rechallenge実験（GLUT3 CAR-T細胞群でのマウス頓死）を示す。左パネルは3C10 CAR-Tでの治療、順番にGLUT3 CAR-T、およびNFAT CAR-Tの生存を示す1日目（チャレンジ後）、リチャレンジ5日目、リチャレンジ12日目の生体発光イメージングによる腫瘍量を示す。BLI像欠如部分はマウスの死亡を示す。前図実験の治癒マウスに腫瘍（U87d）を再移植し拒絶能を評価（“メモリー化のサロゲート”）。 1×10^5 細胞の腫瘍細胞を再移植、3C10 CAR-Tでは腫瘍の拒絶は達成されず、GLUT3 CAR-T、NFAT CAR-Tにて拒絶が達成された。しかし、GLUT3 CAR-T群にて、4匹中3匹のマウスが死亡した（非腫瘍増幅死）。

[図20]図20は、NFAT GLUT3の刺激後apoptosisの抑制を示す。左パネルは、Mock T細胞、3C10 CAR-T細胞、GLUT3 CAR-T細胞、NFAT CAR-T細胞の非刺激状態（左パネル上段）、初回U87d細胞株刺激7日後（同中段）、2回目のU87d細胞株刺激7日後（同下段）における細胞死およびアポトーシスマーカーとしての7-AAD、Annexin Vの染色を示す。右パネルのグラフは上から初回刺激7日後および、2回目刺激7日後の、各CAR-T細胞における、Late apoptotic細胞、pre apoptotic細胞、生細胞割合を示す。U87dにてCAR-T細胞を繰り返し刺激、Annexin V、7-AADにてCAR-T細胞アポトーシスを観察した。GLUT3にアポトーシス（Activation induced cell deathと終末分化の結果としての細胞死の合算と考える）抑制効果あり。NFAT CAR-Tでは、GLUT3 CAR-Tよりアポトーシス抑制効果が高いことが示唆される。

[図21]図21は、刺激後長期生存の増強を示す。各CAR-T細胞を上記条件にて経時観察する。この図ではin vitro (CAR) T細胞刺激・培養試験計画が示される。非CAR導入T細胞（UTD）、3C10 CA

R-T細胞、GLUT3 CAR-T細胞、NFAT_i CAR-T細胞を評価対象とし、刺激なし群と刺激あり群（U87d細胞株による刺激、もしくは、EGFRvIII 磁気ビーズによる刺激）を設ける。さらに、各群無グルコース条件（0mM）、低グルコース条件（0.5mM）、通常グルコース条件（10mM）を設け培養を行う（計36群）。各群に対し、右スケジュールに示した解析を経時的に行う。低glucose下において通常CAR-T（3C10）は有効なサイトカイン産生が示されない一方、GLUT3 CAR-T、NFAT_i GLUT3 CAR-Tは有効なサイトカイン産生能を発揮する。ただし、GLUT3 CAR-Tはグルコース過剰取り込みによりにより経時的に（day3やday7）にCCR7陰性のTemやTemraへと分化終末分化、stemnessの消失、アポトーシスに陥る。一方、on-demand型であるNFAT_i GLUT3 CAR-T細胞は、アポトーシスが抑制され、かつ、CCR7陽性のTcmやTscm（メモリー細胞、stemnessをもった細胞）が維持される。CAR-T細胞（通常グルコースで樹立）が急激（day0）に0mMや0.5mMの低グルコース下に置かれた場合、Glucose依存性の高いGLUT3 CAR-Tはアポトーシスに陥りやすい（⇔NFAT_i GLUT3 CAR-T細胞は低glucoseに耐性を示す）。

[図22]図22は、刺激後長期生存の増強を示す。前述マウスと同様の系で上記抗腫瘍効果、生存、有害事象を検討する。この図では体内での長期生存の増強が示される。前述マウスと同様の系で上記抗腫瘍効果、生存、有害事象を検討する。免疫不全マウスであるNSGマウスの頭蓋内にU87d腫瘍細胞株を移植、5日後にMock導入T細胞（UTD）、3C10 CAR-T細胞、GLUT3 CAR-T細胞、もしくは、経尾NFAT_i CAR-T細胞を静脈投与し、生体発光イメージングによる抗腫瘍効果定量と生存を解析する。実験1においては、GLUT3 CAR-T、NFAT_i GLUT3 CAR-T同等の抗腫瘍活性を示す。実験2においては、糖暴露によるGLUT3 CAR-T過活性化からアポトーシス、過分化がおこり

抗腫瘍活性が消失する。一方、NFAT i CAR-T細胞では過剰な活性化が抑制されるため、有効な抗腫瘍効果を発揮する。Rechallengeにおいても、NFAT i CAR-T細胞は腫瘍を拒絶する。実験4においては、腫瘍効果に比例し、NFAT i GLUT3において優位なCAR-T細胞生着と腫瘍T細胞浸潤が観察される。実験3は、低glucose 高乳酸環境による免疫抑制が示唆されている肝腫瘍モデルでの実験で、実験2と同様の結果が得られること期待する探索的実験である。

[図23]図23は、刺激後長期生存の増強を示すデータ (in vitro data) を示す。左3パネルは1日目、中3パネルは3日目、右3パネルは7日目の結果であり、各々のパネルで左から0 mM、0.5 mMおよび10 mMを示し、上段からMock、3C10 CAR-T、GLUT3 CAR-Tの結果を示す。各タイムポイントにて、細胞死およびアポトーシスを反映する7-AAD、Annexin Vの染色データを示す。各CAR-T細胞における細胞死を、Annexin V、7-AADで検討した。非刺激状態において、グルコース濃度での差は認めたが各CAR-T細胞で大きな差は認めなかった。

[図24]図24は、刺激後長期生存の増強を示すin vitro dataを示す。左3パネルは1日目、中3パネルは3日目、右3パネルは7日目の結果であり、各々のパネルで左から0 mM、0.5 mMおよび10 mMを示し、上段からMock、3C10 CAR-T、GLUT3 CAR-Tの結果を示す。各タイムポイントにて、細胞死およびアポトーシスを反映する7-AAD、Annexin Vの染色データを示す。刺激後の各CAR-T細胞の生存・細胞死を前図と同様に評価した。3C10 CAR-TおよびGLUT3 CAR-T細胞に比し、NFAT i GLUT3 CAR-T細胞では生存が強化（細胞死が抑制）されていた。

[図25]図25は、刺激後長期生存の増強in vitro dataを示す。左3パネルは1日目、中3パネルは3日目、右3パネルは7日目の結果であり、各々のパネルで左からグルコース濃度0 mM、0.5 mMおよび10

mMを示し、上段からMock、3C10 CAR-T、GLUT3 CAR-Tの結果を示す。各タイムポイントにおける、CAR発現細胞割合を示す。刺激後の各CAR-T細胞のCAR陽性割合を解析した。刺激後、特に恒常発現GLUT3 CAR CAR-TでCAR陽性細胞割合が減少しており、同分画が細胞死に陥ったと考えられた。

[図26]図26は、刺激後長期生存の増強を示す。7日目におけるT細胞数を示す。患者体内での投与後動態（投与後、十分なグルコース濃度の血中から低～無グルコース環境である腫瘍環境へ浸潤する動態）を反映するモデルとして、通常グルコース条件下（グルコース10mM）にて樹立、培養した後EGFRvIII結合ピーズにて刺激、その後、無グルコース（0mM）、低グルコース（0.5mM）、もしくは、通常グルコース（10mM）条件とし培養、7日後の生細胞数を評価した。グラフは、Mock T細胞数を1とした相対細胞数を示す。GLUT3 CAR-Tは0mM下にてほとんどの細胞が死んでいた。一方、NFAT1 CAR-Tは多くの細胞は保たれていた。GLUT3恒常発現による過活性化による細胞死、糖に高度に依存した代謝が細胞死につながった可能性が示唆された。

[図27]図27は、抑制分子（PD-1）発現を示す。左3パネルは無グルコース（0mM）、低グルコース（0.5mM）、もしくは、通常グルコース（10mM）条件培養1日目の、右3パネルは培養3日目のPD-1発現の結果であり、各々のパネルで左から0mM、0.5mMおよび10mMを示し、上段からMock、3C10 CAR-T、GLUT3 CAR-Tの結果を示す。NFAT1 GLUT3 CAR-T細胞では、GLUT3 CAR-T細胞に比し抑制分子（PD-1）の発現が低値であった。

[図28]図28は、抑制分子（TIM3）の発現抑制発現を示す。左3パネルは無グルコース（0mM）、低グルコース（0.5mM）、もしくは、通常グルコース（10mM）条件培養1日目の、右3パネルは培養3日目のTIM3発現の結果であり、各々のパネルで左から0mM、0.5mMおよび10mMを示し、上段からMock、3C10 CAR-T、GLUT3 C

AR-Tの結果を示す。NFAT i GLUT3 CAR-T細胞では、GLUT3 CAR-T細胞に比し抑制分子 (TIM3) の発現が低値であった。

[図29]図29は、低グルコース状態はCAR-T細胞の機能を損なうことを示す図である。(a-c) 膠芽腫 (GBM)、非小細胞肺癌 (Lung cancer)、大腸癌 (Colon cancer) の患者 (n=5 ずつ) の手術検体または生検検体から間質液を低速遠心法により採取し、グルコース濃度を調べた。(a) 実験スキーム。(b) GBM検体の間質液および対になった血清検体中のグルコース濃度。データは平均値±SEMで示す。Studentのt検定による統計解析; ***, $P < 0.001$ 。(c) GBM、非小細胞肺癌 (肺がん)、大腸がん (大腸がん) 検体の間質液中のグルコース濃度。データは平均値±SEMで示した。一元配置分散分析による統計解析; *, $P < 0.05$ 。(d, e) 健常人 (n=5) のPBMCからモック導入T細胞 (Mock T cells) と従来型EGFRvIII CAR-T細胞 (conventional EGFRvIII CAR-T cells) を調製した。(d) 低グルコース (0.5 mM) または高グルコース (10 mM) 条件下で、EGFRvIII 発現腫瘍細胞 (U-87mGΔ) で刺激した際の、模擬形質転換T細胞 (Mock T) およびconv EGFRvIII CAR-T細胞 (conv CAR-T) のサイトカイン産生を、細胞内サイトカイン染色により調べた。代表的な等高線図 (左) とサイトカイン (IFN- γ 、IL-2、TNF α) 産生細胞の頻度の要約 (右) を示す。データは平均値±SEMで示した。スチューデントのt検定による統計解析; *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$ 。(e) 低グルコース (0.5 mM) または高グルコース (10 mM) 条件下でU-87mGΔ細胞と16時間共培養したconv EGFRvIII CAR-T細胞によるサイトカイン (IFN- γ 、IL-2、TNF α) 産生をELISAで測定した。データは平均値±SEMで示した。スチューデントのt検定による統計解析; ***, $P < 0.001$; ****, $P < 0$

. 0001. (f) 低グルコース (0.5 mM) または高グルコース (10 mM) 条件下での EGFRvIII ビーズ刺激後 24 時間の EGFRvIII CAR-T 細胞の遺伝子発現。Molecular Signatures Database に従って、高グルコース条件下と比較して低グルコース条件下で濃縮された経路を示す。(g) 選択した遺伝子の遺伝子発現をヒートマップで示す。遺伝子発現は row で正規化した。すべての実験は少なくとも 2 回行った。

[図30] 図30は、GLUT3の過剰発現は、CAR-T細胞の代謝適性を高め、低グルコース条件下での細胞毒性とサイトカイン産生を増加させることを示す図である。(a) 従来の EGFRvIII CAR (conv CAR、上) と GLUT3 を安定発現させた EGFRvIII CAR (GLUT3 CAR、下) の構築物。(b) conv EGFRvIII CAR-T細胞 (conv CAR-T) と GLUT3 EGFRvIII CAR-T細胞 (GLUT3 CAR-T) の免疫蛍光染色。白点線のは、CARで形質導入されなかったT細胞を示す。カチューシャ (赤)、4, 6-ジアミノ-2-フェニルインドール (DAPI: 青)、GLUT3 (緑)。(c) CAR-T細胞におけるGLUT1 (左) とGLUT3 (右) の発現レベル。平均蛍光強度 (MFI) のサマリーを示す。データは平均値±SEMで示す。Studentのt検定による統計解析; ns, 有意ではない; ****, $P < 0.0001$ 。(d) グルコースアナログ2-NBDG取り込みアッセイで測定したCAR-T細胞によるグルコース取り込み。代表的なヒストグラム (左) と平均蛍光強度 (MFI) サマリー (右) を示す。データは平均値±SEMで示した。統計解析はStudentのt検定による; **, $P < 0.01$ 。(e, f) フラックスアナライザーによる低グルコース (0.5 mM) 条件下でのCAR-T細胞の解糖能 (e) と代謝表現型 (f)。データは平均値±SDで示す。(g, h) CAR-T細胞は健常人 ($n = 5$) のPBMCから調製した。(g) 低グルコース (0.5 mM) 条件下でEGFRvIII発現腫瘍細胞 (U-87 MGΔ) を刺激し

た際のサイトカイン産生を細胞内サイトカイン染色で調べた。代表的な等高線図（左）とサイトカイン（ $\text{IFN-}\gamma$ 、 IL-2 、 $\text{TNF}\alpha$ ）産生細胞の頻度の要約（右）を示す。データは平均値 $\pm$ SEMで示した。統計解析はStudentのt検定による；*， $P<0.05$ ；**， $P<0.01$ ；***， $P<0.0001$ 。（h）低グルコース（ 0.5 mM ）条件下で16時間U-87mG Δ 細胞と共培養したCAR-T細胞によるサイトカイン（ $\text{IFN-}\gamma$ 、 IL-2 、 $\text{TNF}\alpha$ ）産生をELISAで測定した。データは平均値 $\pm$ SEMで示した。統計解析はStudentのt検定による；***， $P<0.0001$ 。（i）低グルコース（ 0.5 mM ）条件下でのCAR-T細胞の細胞傷害性を、ルシフェラーゼベースのアッセイで測定。CAR-T細胞とルシフェラーゼ発現標的細胞（U-87mG Δ -Luc）を、指示したエフェクター対標的（E:T）比で24時間共培養し、ルシフェラーゼ活性に基づいて特異的溶解を算出した。データは平均値 $\pm$ SEMで示した。スチューデントのt検定による統計解析；**， $P<0.01$ 。（j，k）CAR-T細胞による消耗マーカー（PD-1とTim-3）の発現。PD-1+CAR-T細胞（j）およびPD-1+Tim-3+CAR-T細胞（k）集団の頻度の要約を示す。データは平均値 $\pm$ SEMで示した。スチューデントのt検定による統計解析；****， $P<0.0001$ 。

[図31]図31は、頭蓋内ヒトGBM細胞異種移植モデルにおける実験結果を示す図である。このモデルにおいて、CAR-T細胞における安定したGLUT3発現は、重篤な毒性のため生存率を改善しなかった。（a）実験スキーマ。U-87mG Δ -Luc細胞を頭蓋内に接種したNSGマウス（ $n=6$ ）に、腫瘍接種後5日目にモックT細胞（Mock T）、conv EGFRvIII CAR-T細胞（conv CAR-T）、またはGLUT3 EGFRvIII CAR-T細胞（GLUT3 CAR-T）のいずれかを静脈内投与した。conv EGFRvIII CAR-T細胞またはGLUT3 EGFRvIII CAR-T細胞による処理によってU-87mG Δ -Luc腫瘍が根絶されたマウスを、35日目に同じ腫瘍で再

チャレンジした。腫瘍負荷はBLIでモニターした。(b) BLIで測定した腫瘍負担。各線は、示したCAR-T細胞で処置した個々のマウスを示す。十字は死因を示す。右上のパネルの数字は、35日目まで完全奏効(CR)を達成したマウスの数と死亡したマウスの数を示す。横の点線は、腫瘍を接種していないマウスから得られたバックグラウンドBLIシグナルレベルを示す。(c) Kaplan-Meier曲線。Kaplan-Meier曲線に対するlog-rank検定による統計解析。(d) CAR-T細胞治療中の各マウスの体重変化。十字はあらゆる死因を示し、着色した点線は治療関連死亡(TRM)をもたらしたマウスを示す。(e) 観察期間終了時の結果を示す積み上げ棒グラフ。TRM; 治療関連死亡率。(f, g) 14日目に重度の体重減少が観察されたマウスの脳および肺組織の病理学的解析。(f) 脳組織におけるヒトCD3⁺細胞のIHC染色。(g) 肺組織におけるヘマトキシリン・エオジン(HE)染色(左: 低倍率、中: 高倍率)とヒトCD3染色(右)。矢印はヒアリン膜を示す。(h) CAR-T細胞投与後14日目の循環ヒトT細胞(CAR-T細胞)の表現型。代表的な等高線図(左)とエフェクターメモリー(CD45RA⁺CCR7⁺)T細胞の頻度の要約(右)を示す。データは平均値±SEMで示す。スチューデントのt検定による統計解析; *, P<0.05。(i) 低(0.5mM)グルコース条件下でのEGFRvIIIビーズによる刺激後7日目のconv EGFRvIII CAR-T細胞とGLUT3 EGFRvIII CAR-T細胞との遺伝子発現の比較。Molecular Signatures Databaseに従って、conv EGFRvIII CAR-T細胞と比較してGLUT3 EGFRvIII CAR-T細胞に濃縮された経路を示す。

[図32] 図32は、GLUT3のオンデマンド発現は、CAR-T細胞に優れたエフェクター活性を付与することを示す図である。(a) GLUT3発現がNFAT結合ドメイン(NFAT-BD)へのNFAT結合によって駆動され、CAR-T細胞上でのオンデマンドGLUT3発現を可能にするコン

ストラクト（オンデマンドGLUT3 CAR）。BD；結合ドメイン（b）オンデマンドGLUT3 EGFRvIII CAR-T細胞の、CAR導入マーカーであるカチューシャ（赤）、4, 6-ジアミノ-2-フェニルインドール（DAPI：青）、GLUT3（緑）に対する免疫蛍光イメージング。（c）conv EGFRvIII CAR-T細胞（conv CAR-T）とオンデマンドGLUT3 EGFRvIII CAR-T細胞（オンデマンドGLUT3 CAR-T）におけるGLUT3発現の時間経過。データは平均値±SEMで示した。Studentのt検定による統計解析；ns，有意ではない；*， $P < 0.05$ ；t****， $P < 0.0001$ 。MFI、平均蛍光強度。（d）グルコースアナログ2-NBDG取り込みアッセイで測定したグルコース取り込み能。代表的なヒストグラム（左）とMFIサマリー（右）を示す。データは平均値±SEMで示す。チューデントのt検定による統計解析；***， $P < 0.001$ 。（e，f）低（0.5 mM）グルコース条件下で培養したCAR-T細胞の解糖能（e）および代謝表現型（f）を、EGFRvIIIビーズで刺激後、フラックスアナライザーにより、指示通り3日目および7日目に調べた。データは平均値±SDで示した。（g，h）CAR-T細胞は健常人（ $n = 5$ ）のPBMCから調製した。（g）細胞内サイトカイン染色による低グルコース（0.5 mM）条件下でのEGFRvIII発現腫瘍細胞（U-87mGΔ）での刺激に伴うサイトカイン産生。代表的な等高線図（左）とサイトカイン（IFN- γ 、IL-2、TNF α ）産生細胞の頻度の要約（右）を示す。データは平均値±SEMで示した。Studentのt検定による統計解析；***， $P < 0.001$ ；****， $P < 0.0001$ 。（h）低グルコース（0.5 mM）条件下でU-87mGΔ細胞と16時間共培養したCAR-T細胞によるサイトカイン（IFN- γ 、IL-2、TNF α ）産生をELISAで測定した。データは平均値±SEMで示した。統計解析はStudentのt検定による；****， $P < 0.0001$ 。（i）低（0.5 mM）グルコース条件下でのU-87mGΔおよびU-251mGΔ細胞に

対するCAR-T細胞の細胞毒性を、ルシフェラーゼベースのアッセイによって測定した。CAR-T細胞およびルシフェラーゼ発現標的細胞（U-87mGΔ-LucまたはU-251mGΔ-Luc）を、低（0.5 mM）グルコース条件下で、指示されたエフェクター対標的（E:T）比で24時間共培養し、特異的溶解をルシフェラーゼ活性に基づいて算出した。データは平均値±SEMで示した。スチューデントのt検定による統計解析；*， $P < 0.05$ ；**， $P < 0.01$ ；***， $P < 0.001$ ；****， $P < 0.0001$ 。

[図33]図33は、GLUT3のオンデマンド発現は、分化T細胞の減少をもたらし、過剰活性化を回避することでT細胞の生存を改善することを示す図である。（a）示したCAR-T細胞集団[モックT細胞（Mock T）、conv EGFRvIII CAR-T細胞（conv CAR-T）、GLUT3 EGFRvIII CAR-T細胞（GLUT3 CAR-T）、またはオンデマンドGLUT3 EGFRvIII CAR-T細胞（オンデマンドGLUT3 CAR-T）]のアネキシンVおよび7-AAD染色により測定したアポトーシス状態。低グルコース（0.5 mM）条件下での抗原刺激から72時間後。代表的な等高線プロット（左）と、生細胞（Live）（Annexin V⁻7-AAD⁻）、プレアポトーシス（Pre-apoptosis）（Annexin V⁺7-AAD⁻）、アポトーシス（Apoptosis）（Annexin V⁺7-AAD⁺）細胞集団の頻度の要約（右）を示す。（b）低（0.5 mM）グルコース条件下でEGFRvIIIビーズで刺激した72時間後のCAR-T細胞におけるアポトーシスとT細胞活性化に関連する遺伝子発現のヒートマップ。遺伝子発現はrowで正規化した。（c）低（0.5 mM）グルコース条件下でEGFRvIIIビーズで刺激した72時間後のconv EGFRvIII CAR-T細胞（conv CAR-T）とGLUT3 EGFRvIII CAR-T細胞（GLUT3 CAR-T）の遺伝子発現の比較。GLUT3 EGFRvIII CAR-T細胞で濃縮されたパスウェイをc

onv EGFRvIII CAR-T細胞と比較し、それらの相互関係を示す。(d, e) 健常人 (n=5) のPBMCからCAR-T細胞を調製し、低 (0.5 mM) グルコース条件下でEGFRvIII発現腫瘍細胞 (U-87mGΔ) で刺激した。(d) 示したCAR-T細胞集団のT細胞表現型 (CD62L⁺ CD45RA⁺: naive/stem cell memory; CD62L⁺ CD45RA⁻: central memory; CD62L⁻ CD45RA⁻: effector memory; and CD62L⁻ CD45RA⁺: terminally differentiated effector memory)。代表的な等高線プロット (左) とナイーブ/幹細胞メモリーT細胞 (CD62L⁺ CD45RA⁺) 集団の頻度の要約 (右) を示す。データは平均値±SEMで示す。スチューデントのt検定による統計解析; ***, P<0.01; ****, P<0.0001。(e) CAR-T細胞による消耗マーカー (PD-1とTim-3) の発現。PD-1⁺ Tim-3⁺ CAR-T細胞集団の頻度の要約を示す。データは平均値±SEMで示す。Studentのt検定による統計解析; *, P<0.05; ****, P<0.0001。(f) 低 (0.5 mM) グルコース条件下でEGFRvIIIビーズで刺激した後の、GLUT3 EGFRvIII CAR-T細胞 (GLUT3 CAR-T) とオンデマンドGLUT3 EGFRvIII CAR-T細胞 (オンデマンドGLUT3 CAR-T) の遺伝子発現の比較。刺激後3日目または7日目のGLUT3 EGFRvIII CAR-T細胞およびオンデマンドGLUT3 EGFRvIII CAR-T細胞のRNA-seqトランスクリプトームプロファイルの主成分分析。(g) METAFIuxによる刺激後7日目のRNA-seqで解析したCAR-T細胞の代謝スコアのヒートマップ。遺伝子発現はrowで正規化した。FA; 脂肪酸。

[図34] 図34は、CAR-T細胞によるオンデマンドGLUT3発現を示す図である。CAR-T細胞によるオンデマンドGLUT3発現は、頭蓋内ヒトGBM細胞異種移植モデルにおいて、優れた生存利益を伴う持続的抗腫瘍

効果を誘導する。(a) 実験スキーマ。U-87mGΔ-Luc細胞を頭蓋内に接種したNSGマウス(n=10、モックT細胞群を除く;n=5)に、腫瘍接種後5日目に、モックT細胞(Mock T)、conv EGFRvIII CAR-T細胞(conv CAR-T)、GLUT3 EGFRvIII CAR-T細胞(GLUT3 CAR-T)、又はオンデマンドGLUT3 EGFRvIII CAR-T細胞(オンデマンドGLUT3 CAR-T)のいずれかを静脈内投与した。conv EGFRvIII CAR-T細胞、GLUT3 EGFRvIII CAR-T細胞、又はオンデマンドGLUT3 EGFRvIII CAR-T細胞による処理によってU-87mGΔ-Luc腫瘍が根絶されたマウスに、21日目に同じ腫瘍を再チャレンジさせた。腫瘍負荷はBLIでモニターした。(b) BLIで測定した腫瘍負荷。各線は指示したCAR-T細胞で処置した個々のマウスを示す。十字は死因を示す。右上のパネルの数字は、21日目まで完全奏効(CR)を達成したマウスの数と死亡したマウスの数を示す。横の点線は、腫瘍を接種していないマウスから得られたバックグラウンドBLIシグナルレベルを示す。(c) CAR-T細胞治療中の各マウスの体重変化。十字はあらゆる死因を示し、色のついた点線は治療関連死亡(TRM)をもたらしたマウスを示す。(d) CAR-T細胞注入後42日目のマウスの体重。データは平均値±SEMで示す。Studentのt検定による統計解析; ns、有意ではない; *, $P < 0.05$ 。(e) 示したCAR-T細胞で処置したU-87mGΔマウスの担がんマウスの生存期間のカプラン・マイヤー曲線。(n=10、モックT細胞群を除く;n=5)。Kaplan-Meier曲線のlog-rank検定による統計解析; ns、有意ではない; *, $P < 0.05$ 。(f) CAR-T細胞投与後14日目の循環ヒトT細胞の表現型。代表的な等高線図(左)と各T細胞集団[CD45RA⁺CCR7⁺⁺:naive/stem cell memory(SCM)、CD45RA⁺CCR7⁺:central memory(CM)、CD45RA⁺CCR7⁻:effectormemory(EM)、およびCD45R

A CCR7⁺: terminally differentiated effector memory (EMRA)] の頻度の概要を示す。(g) 示したCAR-T細胞で処置したU-251mGΔ細胞を保有するマウスの生存率に関する Kaplan-Meier 曲線 (n=10、モックT細胞群を除く; n=5)。Kaplan-Meier 曲線の log-rank 検定による統計解析; ns, 有意ではない; *, P<0.05。(h) CAR-T細胞投与後14日目の血清中のサイトカイン (TNFαおよびGM-CSF) 濃度。データは平均値±SEMで示した。Studentのt検定による統計解析; ns, 有意ではない; *, P<0.05。(i) CAR-T細胞投与後7日目に対する14日目の血清中のTNFαとGM-CSFの減少率。データは平均値±SEMで示した。Studentのt検定による統計解析; ns, 有意ではない; *, P<0.05。図34の結果から、定常発現GLUT3はEGFRvIII CAR-T細胞の抗腫効果 (すなわちエフェクター機能) を増強するといえる。オンデマンド型GLUT3発現は、EGFRvIII CAR-T細胞のエフェクター機能を増強するばかりでなく、メモリー機能の延長、メモリーT細胞の表現型の維持が強化したことも証明されたといえる。さらに、定常発現GLUT3にて誘導される体重減少、治療関連死亡等の有害事象を防止し、結果として、治癒を含めた著明な生存率の改善を達成したと結論付けることができる。

[図35] 図35は、低グルコース状態はCAR-T細胞の機能を損なうことを示す図である。(a) 低グルコース (0.5 mM) 条件下で培養したconv EGFRvIII CAR-T細胞において、高グルコース (10 mM) 条件下と比較して差次的に発現した遺伝子を示すボルケーノプロット。X軸は $\log_2(\text{fold change})$ ($\log_2 \text{FC}$) を表し、Y軸は $-\log_{10}(\text{adjusted p value})$ [$-\log_{10}(\text{padj})$] を表す。点線は $\log_2(\text{fold change})$ のカットオフ値、 $x=\pm 1.4$ と $-\log_{10}(\text{adjusted p value})$ のカットオフ値、 $y=0.1$ を表す。上位5遺伝子と下位5遺伝子はそれぞれ緑

と紫でハイライトされている。

[図36]図36は、GLUT3の過剰発現は、CAR-T細胞の代謝適性を高めることを示す図である。(a) conv EGFRvIII CAR-T細胞 (conv CAR-T)、GLUT3 EGFRvIII CAR-T細胞 (GLUT3 CAR-T)、U-87mGΔ細胞、U-251mGΔ細胞におけるGLUT1 (左) とGLUT3 (右) の発現。代表的なヒストグラムを示す。(b) 低グルコース (0.5 mM) 条件下で培養したCAR-T細胞の解糖パラメータを解糖ストレス試験で測定。データは平均値±SDで示す。統計解析はStudentのt検定による; ns, 有意ではない; ***, $P < 0.001$ 。(c, d) 低グルコース (0.5 mM) または高グルコース (10 mM) 条件下でのCAR-T細胞の競合アッセイ (72時間培養)。(c) 実験スキーマ ($n=3$)。(d) 代表的な等高線図 (左) と各CAR-T細胞集団の割合の要約 (右)。データは平均値±SEMで示す。Studentのt検定による統計解析; ***, $P < 0.001$ 。

[図37]図37は、GLUT3の安定発現は、低グルコース条件下でのCAR-T細胞の機能を改善することを示す図である。(a-c) 高グルコース (10 mM) 条件下でEGFRvIII発現腫瘍細胞 (U-87mGΔ) で刺激した際の、モックT細胞 (Mock T)、conv EGFRvIII CAR-T細胞 (conv CAR-T)、GLUT3 EGFRvIII CAR-T細胞 (GLUT3 CAR-T) ($n=5$) によるサイトカイン産生を細胞内染色で調べた。(a) $CD3^+$ CAR-T細胞を産生するサイトカイン (IFN- γ 、IL-2、TNF α) の頻度の要約。データは平均値±SEMで示す。スチューデントのt検定による統計解析; *, $P < 0.05$; ***, $P < 0.001$ 。(b) 代表的な等高線図 (左) およびサイトカイン (IFN- γ 、IL-2、TNF α) 産生 $CD8^+$ CAR-T細胞の頻度の要約 (右)。データは平均値±SEMで示した。Studentのt検定による統計解析; ns, 有意ではない; ***, $P < 0.001$ 。

。(c) 代表的な等高線図 (左) とサイトカイン (IFN- γ 、IL-2、TNF α) 産生CD4⁺ CAR-T細胞の頻度の要約 (右)。データは平均値 $\pm$ SEMで示した。統計解析はStudentのt検定による；**， $P < 0.01$ 。(d, e) 低グルコース (0.5 mM) または高グルコース (10 mM) 条件下での、U-87mG Δ 細胞およびU-251mG Δ 細胞に対するCAR-T細胞の細胞傷害性を、ルシフェラーゼベースのアッセイにより決定した。CAR-T細胞とルシフェラーゼ発現標的細胞 (U-87mG Δ -LucおよびU-251mG Δ -Luc) を、指示したエフェクター対標的 (E:T) 比で24時間共培養し、特異的溶解をルシフェラーゼ活性に基づいて算出した。(d) 低グルコース (0.5 mM) 条件下でのU-251mG Δ -Luc細胞に対するCAR-T細胞の細胞傷害性。データは平均値 $\pm$ SEMで示した。スチューデントのt検定による統計解析；*， $P < 0.05$ ；**， $P < 0.01$ 。(e) 高グルコース (10 mM) 条件下でのU-87mG Δ -Luc細胞またはU-251mG Δ -Luc細胞に対するCAR-T細胞の細胞傷害性。データは平均値 $\pm$ SEMで示した。Studentのt検定による統計解析；ns，有意でない；*， $P < 0.05$ ；**， $P < 0.01$ ；***， $P < 0.001$ 。(F, G) 示したCAR-T細胞集団による消耗マーカー (PD-1、f、PD-1とTim-3、g) の発現。代表的な等高線プロットを示す。

[図38] 図38は、GLUT3の安定発現によるCAR-T細胞の機能向上は、scFvの種類に依存しないことを示す図である。(a, b) モックT細胞 (Mock T)、conv CD19 CAR-T細胞 (conv CD19 CAR-T)、およびGLUT3 CD19 CAR-T細胞 (GLUT3 CD19 CAR-T) は、健常人 ($n=5$) のPBMCから調製した。(a) 低グルコース (0.5 mM) 条件下でCD19発現腫瘍細胞 (NALM6) と刺激した際の、細胞内サイトカイン染色による、標記CAR-T細胞によるサイトカイン産生。代表的な等高線図 (左) とサイトカイン (IFN- γ 、IL-2、TNF α) 産生細胞の頻度の要約 (右) を示す

。データは平均値±SEMで示した。Studentのt検定による統計解析；＊， $P<0.05$ ；＊＊＊， $P<0.001$ ；＊＊＊＊， $P<0.0001$ 。（b）低グルコース（0.5 mM）条件下でNALM6と16時間共培養したconv CD19 CAR-T細胞およびGLUT3 CD19 CAR-T細胞によるサイトカイン（IFN- γ 、IL-2、TNF α ）産生をELISAで測定した。データは平均値±SEMで示した。Studentのt検定による統計解析；＊， $P<0.05$ ；＊＊＊， $P<0.001$ ；＊＊＊＊， $P<0.0001$ 。（c）低グルコース（0.5 mM）条件下でのNALM6およびCD19発現AsPC-1細胞に対するconv CD19 CAR-T細胞およびGLUT3 CD19 CAR-T細胞の細胞傷害性を、ルシフェラーゼベースのアッセイにより決定した。CAR-T細胞とルシフェラーゼ発現標的細胞（NALM6-LucおよびCD19発現AsPC-1-Luc）を、指示したエフェクター対標的（E:T）比で24時間共培養し、特異的溶解率をルシフェラーゼ活性に基づいて評価した。データは平均値±SEMで示した。統計解析はStudentのt検定による；ns，有意でない；＊， $P<0.05$ ；＊＊， $P<0.01$ 。

[図39]図39はオンデマンドGLUT3発現は、代謝体力を増強し、サイトカイン産生とCAR-T細胞の細胞毒性を改善することを示す図である。（a）低グルコース（0.5 mM）条件下で培養したconv EGFRvIII CAR-T細胞（conv CAR-T）とオンデマンドGLUT3 EGFRvIII CAR-T細胞（オンデマンドGLUT3 CAR-T）の解糖パラメーター（解糖ストレス試験で測定）を示す。データは平均値±SDで示した。統計解析はStudentのt検定による；＊＊， $P<0.01$ ；＊＊＊， $P<0.001$ ；＊＊＊＊， $P<0.0001$ 。（b，c）Conv EGFRvIII CAR-T細胞（conv CAR-T）とオンデマンドGLUT3 EGFRvIII CAR-T細胞（オンデマンドGLUT3 CAR-T）は健常人（ $n=5$ ）のPBMCから調製した。（b）高グルコース（10 mM）条件下でEGFRvIII発現腫瘍細

胞 (U-87mGΔ) を刺激した際の、細胞内サイトカイン染色による、標記CAR-T細胞によるサイトカイン産生を調べた。サイトカイン (IFN- γ 、IL-2、TNF α) 産生細胞の頻度の要約を示す。データは平均値 $\pm$ SEMで示した。統計解析はStudentのt検定による；***, $P < 0.001$ 。(c) 高グルコース (10mM) 条件下での、U-87mGΔ細胞およびU-251mGΔ細胞に対するCAR-T細胞の細胞傷害性を、ルシフェラーゼに基づくアッセイで決定した。CAR-T細胞およびルシフェラーゼ発現標的細胞 (U-87mGΔ-LucまたはU-251mGΔ-Luc) を、高グルコース (10mM) 条件下で24時間、指示したエフェクター対標的 (E:T) 比で共培養し、特異的溶解をルシフェラーゼ活性に基づいて算出した。データは平均値 $\pm$ SEMで示した。Studentのt検定による統計解析；ns, 有意ではない；*, $P < 0.05$ ；**, $P < 0.01$ ；****, $P < 0.0001$ 。

[図40] 図40は、GLUT3のオンデマンド発現はCAR-T細胞の生存率を向上させることを示す図である。(a, b) 低グルコース (0.5mM) 条件下、抗EGFRvIIIビーズで刺激後24時間におけるCD3⁺細胞中のT細胞増殖とCAR⁺T細胞の頻度。モックT細胞 (Mock T)、conv EGFRvIII CAR-T細胞 (conv CAR-T)、GLUT3 EGFRvIII CAR-T細胞 (GLUT3 CAR-T)、オンデマンドGLUT3 EGFRvIII CAR-T細胞 (オンデマンドGLUT3 CAR-T) は、健常人 (n=3) のPBMCから調製した。(c) U-87mGΔ細胞による刺激後7日目のCAR-T細胞の表現型。代表的な等高線図 (左) とセントラルメモリー (CD45RA⁺CCR7⁺) T細胞の頻度の要約 (右) を示す。データは平均値 $\pm$ SEMで示す。統計解析はStudentのt検定による；ns, 有意でない；****, $P < 0.0001$ 。(d) EGFRvIII発現腫瘍細胞 (U-87mGΔ) での刺激後72時間における、示したCAR-T細胞集団による排菌マーカー (PD-1およびTim-3) の発現。代表的な等高線プロット

を示す。

[図41]図41は、CAR-T細胞によるオンデマンドGLUT3発現を示す図である。CAR-T細胞によるオンデマンドGLUT3発現は、頭蓋内ヒトGBM細胞異種移植モデルにおいて、持続的な抗腫瘍効果を維持しながら生存率を高める。(a) U-87mGΔ-Luc腫瘍を有するマウスのBLI。(b, c) NSGマウス(n=10、モックCAR-T細胞群を除く；U-251mGΔ-Luc細胞を頭蓋内に接種したNSGマウス(n=5)に、腫瘍接種後5日目に、モックT細胞(Mock T)、conv EGFRvIII CAR-T細胞(conv CAR-T)、GLUT3 EGFRvIII CAR-T細胞(GLUT3 CAR-T)、またはオンデマンドGLUT3 EGFRvIII CAR-T細胞(オンデマンドGLUT3 CAR-T)のいずれかを静脈内投与した。U-87mGΔ-Luc腫瘍がEGFRvIII CAR-T細胞、GLUT3 EGFRvIII CAR-T細胞、またはオンデマンドGLUT3 EGFRvIII CAR-T細胞によって根絶されたマウスを、21日目に同じ腫瘍で再チャレンジした。腫瘍負荷はBLIでモニターした。(b) BLIで測定した腫瘍負荷。各色の線は個々のマウスを示す。十字は死因を示す。右上の数字は21日目まで完全奏効(CR)を示したマウスの数と死亡したマウスの数を示す。横の点線は、腫瘍を接種していないマウスから得られた基準線のBLIシグナルレベルを示す(c) CAR-T細胞治療中のマウスの体重変化。十字はあらゆる死因を示し、色のついた点線は治療関連死(TRM)に至ったマウスを示す。(d) CAR-T細胞投与後14日目の血清中のサイトカインおよびケモカイン濃度(IL-5、IP-10、MDC)をELISA法で調べた。データは平均値±SEMで示した。Studentのt検定による統計解析；ns、有意でない；*、 $P<0.05$ ；**、 $P<0.01$ 。

発明を実施するための形態

[0015] 以下、本開示を最良の形態を示しながら説明する。本明細書の全体にわた

り、単数形の表現は、特に言及しない限り、その複数形の概念をも含むことが理解されるべきである。従って、単数形の冠詞（例えば、英語の場合は「a」、「an」、「the」など）は、特に言及しない限り、その複数形の概念をも含むことが理解されるべきである。また、本明細書において使用される用語は、特に言及しない限り、当該分野で通常用いられる意味で用いられることが理解されるべきである。したがって、他に定義されない限り、本明細書中で使用される全ての専門用語および科学技術用語は、本開示の属する分野の当業者によって一般的に理解されるのと同じ意味を有する。矛盾する場合、本明細書（定義を含めて）が優先する。

[0016] 以下に本明細書において特に使用される用語の定義および／または基本的技術内容を適宜説明する。

[0017] 本明細書において、「約」とは、後に続く数値の $\pm 10\%$ を意味する。例えば、「約20」は、「18～22」を含むものとする。数値の範囲は、両端点の間の全ての数値および両端点の数値を含む。範囲に関する「約」は、その範囲の両端点に適用される。したがって、例えば、「約20～30」は、「18～33」を含むものとする。

[0018] 本明細書において「T細胞」は、当該分野で用いられる広義の意味で用いられ、骨髄で生成されたリンパ球が胸腺に移動し成熟したものをいう。T細胞は、末梢血および骨髄由来単核球の正常分画のうち、CD45陽性かつCD3陽性細胞であり得る。使用されるT細胞は、ドナー、特にヒトドナーから単離されたT細胞が利用され得るがこれに限定されない。T細胞及びそれに由来する細胞としては、培養で継代されていない単離されたT細胞、不死化せずに細胞培養条件下で継代及び維持されたT細胞、並びに不死化されて無期限に細胞培養条件下で維持され得るT細胞が挙げられる。T細胞は、その機能により複数

種類存在することが知られており、エフェクターメモリーT細胞（ T_{eff} ）、ナイーブT細胞（ T_{nv} ）、ステムセルメモリーT細胞（ T_{scm} ）、セントラルメモリーT細胞（ T_{cm} ）、終末分化RA陽性T細胞（ T_{emra} ）、

などを挙げることができる。本明細書において、「末梢T細胞」とは、胸腺外に存在するT細胞をいい、末梢血液、リンパ節、その他組織から取得することができる。本明細書において「末梢T細胞」というとき、細胞群に末梢T細胞が含まれていればよく、T細胞が単離されている必要はない。末梢血単核球（P B M C）などT細胞の他にも種々のリンパ球を含む細胞画分を用いてもよい。

[0019] 本明細書において、「細胞集団」とは、2以上の細胞を含む集団であり、例えば、平面的に細胞同士が集まった状態のものであってもよく、3次元的に細胞同士が接着して構成された細胞塊であってもよい。また、「細胞集団」は、単一種の細胞により形成されていてもよいし、複数種の細胞が含まれていてもよい。本開示のT細胞の細胞集団をいう場合は、T n v、T s c m、T c m、T e m r aなどの、機能すべき場所（代表的に体内）において、エフェクター機能を有し得る細胞が少なくとも1つ含まれていればよい。

本明細書において「フローサイトメトリー」とは、液体中に懸濁する細胞、個体およびその他の生物粒子の粒子数、個々の物理的・化学的・生物学的性状を計測する技術をいう。この技術を用いた装置は、「フローサイトメーター」という。本開示において、細胞マーカー（例えば、F o x P 3、C T L A 4、H e l i o s、C D 1 0 3など）の「陽性」「陰性」は、当該分野において通常使用されるように、フローサイトメトリーによって定められる。より詳細には、フローサイトメトリーでは、細胞を一列に並べて流し、分光学的手法により細胞の数をカウントする。例えば、蛍光や発光酵素によって標識された細胞にレーザー光を照射し、これによって細胞から発せられる蛍光又は発光信号をフォトダイオード等の検出器で検出することで、標的細胞の数をカウントする。また、検出器での検出結果をコンピュータに取り込んで、二次元プロットを生成して表示することもできる。これにより、標的細胞の有無、及びその数等を容易に把握できる。

[0020] 本明細書において、「エフェクター機能」とは、T細胞においては、T C RやC A Rを介したシグナルに起因する、細胞傷害活性、サイトカイン産生

、分裂・増殖など生物学的活性を差し、他の免疫細胞においては、抗体のFc領域に起因する生物学的活性を指し、エフェクター機能としては、例えば、C1q結合及び補体依存性細胞傷害(CDC)、Fc受容体結合、抗体依存性細胞傷害(ADCC)、貪食、細胞表面受容体(例えば、B細胞受容体)の下方制御、およびB細胞の活性化などが含まれる。本開示においてT細胞がエフェクター機能を有するかどうかは、実施例などに例示される手法を用いて細胞傷害活性、サイトカイン産生および分裂・増殖を有することを確認して判定することができる。

[0021] 本明細書において、「エフェクター細胞」または「エフェクターT細胞」とは、エフェクター機能を有するT細胞であって、標的細胞に対して細胞傷害作用を及ぼす免疫細胞を意味し、 T_{eff} と呼称することもある。本明細書で「エフェクター」(細胞)であるかどうかは、細胞傷害アッセイ、フローサイトメトリーによる表面抗原解析、細胞内サイトカイン染色などの判定方法で判断することができる。エフェクター細胞はエフェクター機能を実行する免疫細胞であり、抗体依存性細胞傷害(ADCC)などを媒介する。エフェクター細胞は、例えば、末梢血液単核細胞(PBMC)、ナチュラルキラー(NK)細胞、単球、マクロファージ、細胞障害性T細胞、および好中球などを含み、例えば血液などの天然の組織から単離することができる。

[0022] 本明細書において「エフェクターT細胞(T_{eff})の前駆細胞」((Effector T cell precursors)ともいう)とは、エフェクター細胞ではないが、機能すべき場所(例えば体内)に移動されあるいは他の刺激によって、エフェクター機能を備えるものをいう。そのような細胞としてリンパ球系前駆細胞、 T_{nv} 、 T_{scm} 、 T_{cm} 、 T_{emra} などが含まれる。エフェクターT細胞の前駆細胞は、免疫応答の初期段階で活性化され、増殖や分化を経てエフェクターT細胞に成熟するが、一部の前駆細胞はメモリーT細胞へと分化する能力を持つ。これらの前駆細胞には、特定の遺伝子発現パターンや代謝状態があり、それがメモリー機能の延長に寄与する。このメモリー機能の延長には、いくつかの分子的小および代謝的な特性が関与している。まず、エフ

エフェクターT細胞の前駆細胞は、代謝プログラムにおいて特異的な特徴を持つ。これらの細胞では、エフェクターT細胞に特徴的な解糖系（グリコリシス）ではなく、酸化リン酸化（Oxidative Phosphorylation）が優勢であり、この代謝経路はエネルギー効率が高く、細胞の長期生存を可能にする。この代謝的特性は、メモリーT細胞としての長期間の機能維持を支える重要な要素である。次に、転写因子の役割も重要である。エフェクターT細胞の前駆細胞では、T-betやEomesといった転写因子が発現しており、これらがメモリーT細胞への分化を促進すると同時に、その長期的な生存と機能を可能にする。また、CD62LやCCR7などの表面マーカーを発現するこれらの前駆細胞は、二次リンパ組織への移動能力を持つ。このホーミング機能により、前駆細胞は二次リンパ組織で必要な生存シグナルを受け取り、メモリー機能の維持に寄与する。さらに、抗原刺激の抑制もメモリー機能の延長に関与している。一部の前駆細胞は、抗原刺激から解放されることでエフェクターT細胞への完全な分化が抑制され、代わりにメモリーT細胞としての性質を保持する。このメカニズムにより、過剰なエフェクター応答が抑制されると同時に、メモリー機能が保持される。加えて、細胞周囲のサイトカイン環境も重要な役割を果たす。特に、IL-7やIL-15などのサイトカインは、メモリーT細胞の維持に必要な生存シグナルを提供し、これがメモリー機能の延長に大きく寄与している。これらの要因により、エフェクターT細胞の前駆細胞は、通常のエフェクターT細胞と比較して長期間生存し、迅速かつ強力な二次免疫応答を可能にするメモリー機能を保持する。この特性は、感染症に対する免疫防御だけでなく、がん免疫療法やワクチン開発においても重要な役割を果たすと考えられる。このように、エフェクターT細胞の前駆細胞の特性を理解することは、免疫学の基礎研究および臨床応用の両方において大きな意義を持つ。

[0023] エフェクターT細胞の前駆細胞において、メモリーT細胞の表現型が維持されるとは、エフェクターT細胞へと分化する過程において、一部の前駆細胞がメモリーT細胞特有の表現型（例：表面マーカー、代謝状態、転写因子

の発現など)を保持しながら存在する現象を指す。このような前駆細胞は、免疫応答の終了後も生存し、長期間にわたって免疫記憶を提供する能力を持つ。この現象は、T細胞がエフェクター機能を発揮する過程と、長期間生存して迅速な二次免疫応答を可能にするメモリー機能の両方を両立させるための重要なメカニズムと考えられている。この現象が持つ特性について説明する。まず、エフェクターT細胞の前駆細胞は、メモリーT細胞特有の表面マーカーを維持している。これには、CD62LやCCR7といったホーミング分子が含まれ、これらの分子の発現により、前駆細胞は二次リンパ組織への移動能力を保持している。次に、これらの前駆細胞は、代謝状態の維持も特徴的である。具体的には、解糖系よりも酸化的リン酸化が優勢であり、エネルギー効率が高い代謝プログラムを維持することで、長期間にわたる生存が可能となる。この代謝特性は、メモリーT細胞としての機能を維持するために重要な要素である。また、前駆細胞は、転写因子の発現においても特徴的なバランスを保持している。TbetやEomesといった転写因子の適切な発現が、エフェクターT細胞への分化とメモリーT細胞の表現型維持を両立させる役割を果たしている。さらに、前駆細胞は、サイトカインシグナルへの応答性を持ち、IL-7やIL-15などの生存シグナルを受け取ることができる。この応答性により、前駆細胞はメモリーT細胞の特性を保持しつつ、長期間の生存が可能となる。最後に、これらの前駆細胞は、抗原非依存的な維持が可能である。つまり、メモリーT細胞の前駆細胞は、抗原の存在がなくてもその表現型を保持し、迅速な免疫応答の準備状態を維持する能力を持つ。以上の特性により、エフェクターT細胞の前駆細胞がメモリーT細胞の表現型を維持することは、免疫システムの柔軟性と長期的な記憶免疫の確立において極めて重要な役割を果たしている。これらの特性は、感染症防御やがん免疫療法、さらにはワクチン設計において大きな意義を持つと考えられる。

[0024] 本明細書において、「抗原受容体」とは、標的とする抗原に特異的に結合し、当該受容体を発現する細胞内にシグナルを伝達する任意の分子を指す。

本開示において、抗原受容体は、T細胞に導入され得るものであり、天然のものであっても、人工的な分子であってよく、例えば、T細胞受容体（TCR）・B細胞受容体（BCR）に加えて、キメラ抗原受容体（CAR）も包含される。

[0025] 本明細書において、「キメラ抗原受容体（CAR）」とは、抗原特異性を細胞（例えば免疫細胞）に付与できる改変された受容体をいう。CARはまた、人工T細胞受容体、キメラT細胞受容体、またはキメラ免疫受容体として知られている。抗原特異性を免疫系細胞（例えば、ナイーブT細胞、セントラルメモリーT細胞、エフェクターメモリーT細胞、またはそれらの組み合わせ等のT細胞、NK細胞、マクロファージなど）に移植する改変受容体であり、CARは、例えば、抗原特異的標的指向領域、細胞外ドメイン、膜貫通ドメイン、共刺激ドメイン、および／または細胞内シグナル伝達ドメインを含み得る。また、複数（多くは2種類）の抗原特異標的指向領域を用いるもの（bispecific CAR）も含み得る。好ましくは、本開示のCARは、抗原に結合することが可能な少なくとも1つの細胞外ドメイン、少なくとも1つの膜貫通ドメイン、および少なくとも1つの細胞内ドメインを含む。

[0026] 本明細書において「T細胞レセプター（TCR）」とは、T細胞に存在するレセプターをいう。TCRは、2つのTCRポリペプチド鎖からなるヘテロダイマー受容体分子であり、通常のT細胞が発現する $\alpha\beta$ 型TCRと特殊な機能をもつ $\gamma\delta$ 型TCRが存在する。 α および β 鎖TCR分子は複数のCD3分子（CD3 ζ 鎖、CD3 ϵ 鎖、CD3 γ 鎖、CD3 δ 鎖）と複合体を形成し、抗原認識後の細胞内シグナルを伝達し、様々な免疫応答を開始させる。ウイルス感染に伴い細胞内で増殖したウイルス抗原やがん細胞由来のがん抗原などの内因性抗原は、MHCクラスI分子上に抗原ペプチドとして提示される。また、外来微生物由来の抗原はエンドサイトーシスにより抗原提示細胞に取り込まれ、プロセッシングを受けたのちにMHCクラスII分子上に提示される。これらの抗原は、それぞれCD8⁺ T細胞あるいはCD4

+ T細胞の発現するTCRにより認識される。TCR分子を介した刺激には、CD28、ICOS、OX40分子などの共刺激分子が重要であることも知られている。本明細書において主要な目的の一つとされる $\alpha\beta$ 型TCRについてみると、 α および β の各々の遺伝子産物は、ユニークな組み合わせにより、特異性を発現するとされる。

[0027] 本明細書において、「グルコース取り込み能」とは、単位時間あたりの細胞へのグルコースを取り込む能力をいう。グルコースの細胞への取り込みは、例えば2-NBDG uptakeアッセイなどの手法によって評価することができる。

[0028] 本明細書において、「グルコース取り込み能の強化」とは、任意の手法によってグルコース取り込み能が向上することをいい、グルコース取り込み能の向上は、免疫細胞（例えば、T細胞）において、1種または複数種のグルコーストランスポーターなどを発現するように改変し、および／またはグルコーストランスポーターの発現が増強するように改変することによって達成され得る。このような遺伝子改変免疫細胞は、例えば、低グルコース環境において（例えば、腫瘍微小環境において）、高いグルコース取り込みを示すと予測される。それゆえ、1種または複数種のグルコーストランスポーター及びキメラ受容体ポリペプチドを共発現する免疫細胞は、優れた生理活性（例えば、任意選択的に治療抗体の存在下、低グルコース条件などの腫瘍微小環境下で）、例えば、細胞増殖、活性化（例えば、サイトカイン産生、例えば、IL-2またはIFN γ の産生の増加）、細胞傷害性、及び／またはin vivo抗腫瘍活性などを示し得る。

[0029] 本明細書において、「グルコーストランスポーター」（GLUT）とは、グルコース（ブドウ糖）の促進拡散型輸送を行うトランスポーターをいう。GLUTには、GLUT1～GLUT14の分子種が報告されており、その中で例えば、GLUT1は広範組織に発現し、恒常的なベースラインのグルコース輸送を担い、GLUT2は糖濃度が高まった際に作動し、グルコース取り込みを亢進し、GLUT3は中枢神経で中心的な役割を果たし、グルコ

ース低濃度下でも輸送機能を発揮し、GLUT4はインスリン刺激を受けて作動するなどの特徴がある。

[0030] 本明細書において「腫瘍微小環境」は、「腫瘍環境」とも交換可能に用いられ、腫瘍微小環境 (Tumor Microenvironment, TME) とは、腫瘍組織を取り囲む局所的な生物学的環境を指し、腫瘍の進展、増殖、転移、薬剤耐性などに関与する多様な要因を含む概念である。この環境には、腫瘍細胞のみならず、免疫細胞（例えば、T細胞やマクロファージ）、線維芽細胞、血管内皮細胞、脂肪細胞などの非腫瘍性細胞が含まれる。また、細胞外マトリックス (ECM)、サイトカイン、ケモカイン、成長因子などの液性因子も重要な構成要素である。さらに、腫瘍微小環境は酸素濃度、pH、栄養状態などの物理的要因の影響も受ける。腫瘍微小環境における細胞間相互作用や物理的要因の変化は、腫瘍の悪性化や治療反応性に重要な役割を果たすとされている。特に、免疫抑制的な微小環境は、免疫療法の効果を減少させる要因として注目されている。本発明において「腫瘍微小環境」とは、これらの要素およびその相互作用を含む生物学的・物理的要因の集合体を指し、腫瘍治療や診断における重要な対象である。

[0031] 本明細書において「腫瘍微小環境条件」とは、腫瘍微小環境またはそれと同等の条件を意味する。したがって、「腫瘍微小環境条件」は、腫瘍微小環境を構成する条件に加え、腫瘍が体内において置かれる類似または同等の環境条件を含む広義の概念を意味する。具体的には、腫瘍組織を取り囲む局所的な生物学的環境のみならず、腫瘍が体内に存在する際に影響を受ける内因性および外因性の要素を含むものである。この環境には、腫瘍細胞と非腫瘍性細胞（例えば、免疫細胞、線維芽細胞、血管内皮細胞など）間の相互作用、細胞外マトリックス (ECM) やサイトカイン、ケモカイン、成長因子などの液性因子、および酸素濃度、pH、栄養状態、物理的圧力などの物理的要因が含まれる。また、「腫瘍微小環境条件」には、腫瘍が体内の広範囲な生理学的環境と相互作用する状況も含まれるため、腫瘍周辺の局所環境に限定されない。本発明において「腫瘍微小環境条件」とは、腫瘍が体内で遭遇する広

範な環境条件を包括的に表し、これには腫瘍進展や治療反応性に影響を与える要因全般が含まれる。従って、腫瘍微小環境条件には、腫瘍の内部、T C R 関連シグナルの伝達、マトリックスおよび周辺（外部）、ならびにそれと同様の条件が含まれる。

[0032] 本明細書において「改変」とは、遺伝子（核酸やそれに対応するタンパク質を含む）に対して行われる構造的、機能的、または発現に関連するあらゆる変更を広く指し、自然発生的または人工的な変更が含まれる。具体的には、塩基配列の置換、欠失、挿入、付加、またはその組み合わせによる配列の変化、コードされるタンパク質のアミノ酸配列や特性の変更、または機能性の付加や向上を目的とした化学修飾（例：糖鎖付加、リン酸化、アセチル化など）を含む。また、「改変」には、外部からの遺伝子導入（例：トランスフェクションやウイルスベクターを介した遺伝子導入）、形質転換（トランスフォーメーション）、あるいはゲノム編集技術を用いた特定遺伝子のノックアウトやノックイン、遺伝子発現の抑制（例：RNA干渉やCRISPR技術による抑制）なども含まれる。さらに、エピジェネティックな修飾（例：DNAメチル化、ヒストン修飾など）や発現調節要素の改変も対象となる。本明細書における「改変」とは、遺伝子の構造、発現、機能、または生物学的挙動に影響を及ぼす、あらゆる形態の変更を包括的に指すものであり、これには内因的な変更だけでなく、外的な導入または操作による変更も含まれる。

[0033] 本明細書において、「需要に応じて（オンデマンド）」の発現とは、対象となる遺伝子が、必要となった時期に発現されることをいう。需要とは、例えば、グルコースが枯渇しかかったとき等（例えば、T細胞が腫瘍環境や骨髄など低グルコース環境に浸潤した際、また、T細胞の活性化による細胞傷害活性の発揮、サイトカイン産生、分裂増殖など、これらを支持するための代謝変化によりグルコース消費が高まった際、もしくは、その両方など）をいい、その時間は、任意であり、例えば、数時間、数日間、または数週間だけ発現することもあるが、それに限定されず、需要がある時期が数日以上になる場合はそのような場合もオンデマンド定義に含まれ得る。「需要に応じ

て（オンデマンド）」とは、腫瘍微小環境条件の変化に応じて、前記T細胞においてグルコーストランスポーターの発現が調節される性質であり得、あるいは、腫瘍微小環境条件の変化を感知する腫瘍微小環境感知エレメントが作動可能に連結されたグルコーストランスポーターをコードする核酸配列を含むものであり得る。ある場合、対象となる遺伝子が宿主のゲノムに組み込まれることなく細胞内で発現される。別の場合、対象となる遺伝子が宿主のゲノムに組み込まれて細胞内で発現される。オンデマンドの発現に用いる方法は当業者に公知の方法を利用することができ、業者から提供されるキットを用いてトランスフェクトまたはトランスダクションすることができる。オンデマンドの発現を達成できる細胞を選択するためにセレクションを行ってもよく、例えば当業者に周知の薬剤セレクションや磁気ビーズセレクションを用いてもよい。なお、構成したコンストラクトが、すでにオンデマンドの性質を有している場合は、そのまま使用することもできる。オンデマンドは、一例として、腫瘍微小環境条件の変化に応じて、前記T細胞においてグルコーストランスポーターが発現が調節されるように改変されることによって達成される。

[0034] 本明細書において、「腫瘍微小環境条件」とは、腫瘍に関連する任意の条件を言い、腫瘍の内部、マトリックスおよび周辺（外部）、ならびにそれと同様の条件をいう。

[0035] 本明細書において、「腫瘍微小環境条件の変化に応じて、（T細胞などの細胞において）グルコーストランスポーターが発現が調節される」とは、腫瘍微小環境条件が悪化する（がんの状態が悪くなる）と、グルコーストランスポーターの発現もしくはレベルが減少ないし分解が促進され、腫瘍微小環境条件が良好になる（健常な状態が良くなる）と、グルコーストランスポーターの発現もしくはレベルが増強少ないし分解が低減されることをいう。腫瘍微小環境条件の変化に応じて、（T細胞などの細胞において）グルコーストランスポーターの発現が調節されることは、そのような遺伝子コンストラクトを導入することなどによって細胞を改変することなどによって入手する

ことができる。

[0036] ここで、「腫瘍微小環境条件が悪化する」とは、腫瘍の成長や進行を助長する腫瘍微小環境（TME： Tumor Microenvironment）が、腫瘍にとってさらに有利な状態へ変化することおよびそれと同等の条件とを指す。この腫瘍微小環境は、腫瘍細胞のみならず、その周囲を取り巻く血管、免疫細胞、線維芽細胞、細胞外マトリックス（ECM）、シグナル分子などから構成されている。この環境が「悪化」することでは、以下のような具体的な変化を包含する。

1) 低酸素状態の進行

腫瘍の成長に伴い、血管が不十分となり酸素供給が不足することで、腫瘍周囲が低酸素状態に陥る。この状態は腫瘍細胞の増殖や転移を促進する要因となる。したがって、酸素状態を調べることで、腫瘍微小環境条件の悪化を検出することができる。

2) 異常な血管新生の活性化

腫瘍の成長により血管新生（新たな血管の形成）が促進されるが、これらの新生血管はしばしば構造的に異常であり、酸素や栄養素の供給が不均衡となることで腫瘍の進行を助長する。従って、血管新生の状態を調べることで、腫瘍微小環境条件の悪化を検出することができる。

3) 免疫抑制環境の形成

腫瘍は免疫抑制性細胞（制御性T細胞や骨髄由来抑制細胞など）を増加させることで、抗腫瘍免疫を抑制し、免疫系による腫瘍排除の能力を低下させる。したがって、免疫抑制環境の状態を調べることで、腫瘍微小環境条件の悪化を検出することができる。

4) 線維化の進行

腫瘍周囲における線維芽細胞の活性化や細胞外マトリックスの異常な蓄積により、腫瘍細胞の移動性や薬剤耐性が高まる。したがって、線維化の状態を調べることで、腫瘍微小環境条件の悪化を検出することができる。

5) 慢性的な炎症の活性化

腫瘍微小環境における慢性的な炎症反応が持続することで、腫瘍細胞の増殖、血管新生、転移を助長する。したがって、（慢性的な）炎症の状態を調べることで、腫瘍微小環境条件の悪化を検出することができる。

6) 代謝異常の進行

腫瘍細胞はグルコースを過剰に消費し、嫌氣的代謝（ワールブルグ効果）を活性化させる。これにより乳酸が蓄積し、微小環境が酸性化して免疫細胞の機能が低下する。したがって、代謝の状態（例えば、グルコース消費量、乳酸の蓄積量など）を調べることで、腫瘍微小環境条件の悪化を検出することができる。

[0037] 腫瘍微小環境条件の悪化が及ぼす影響は多岐にわたり、腫瘍微小環境の悪化は、以下のような、非限定的な例である、腫瘍の特性に影響を及ぼす：1）腫瘍の成長促進（腫瘍細胞が活性化し、分裂や増殖が加速する。）、2）転移の促進（腫瘍細胞が血管やリンパ管を介して他の臓器へ拡散しやすくなる。）、3）治療抵抗性の増加（腫瘍微小環境の変化により、化学療法や免疫療法が効きにくくなる場合がある。）等。

[0038] 本明細書において、「腫瘍微小環境条件の変化に応じて、（T細胞などの細胞において）グルコーストランスポーターの発現が調節されるように改変する」とは、細胞において、グルコーストランスポーターを新たに導入するか既存のグルコーストランスポーターに変更を加えることで、当該グルコーストランスポーターが、当該細胞において、腫瘍微小環境条件の変化に応じて、グルコーストランスポーターの発現が調節されるようになることをいう。このような改変は、グルコーストランスポーターに、当該細胞において、腫瘍微小環境条件の変化に応じて、グルコーストランスポーターの発現や分解が調節されるようになるエレメントを、当該グルコーストランスポーターをコードする核酸配列に作動可能に連結すること等により実現することができる。あるいは、既存のグルコーストランスポーターまたはそれを直接もしくは間接的に調節するエレメントに、遺伝子操作やゲノム編集などの遺伝子工学上の技術を用いることで変更を加えてそのようなグルコーストランスポ

ーターの発現や分解の調節がされるようにすることでもよい。

[0039] 本明細書において、「TCR関連シグナル」とは、T細胞受容体（TCR）に関連する任意のシグナルを言い、TCRに直接関連するシグナル（例えば、自然に発現する非改変T細胞受容体）の他、TCRの一部と共刺激因子の複合体であるキメラ抗原受容体（CAR）関連シグナル、腫瘍抗原（TCRやCARが認識する抗原をさす）や共刺激リガンドの発現、サイトカイン条件の変動等も含まれる。例えば、TCR関連シグナルは、TCRのシグナル伝達に関与する何らかのエレメントによって、媒介されることができ、TCRシグナルまたはその一部、TCRシグナルと他の抗原のキメラのシグナル（CARシグナルともいう）等を含み得る。

[0040] 本明細書において、「TCRシグナルドメイン」とは、TCRシグナルに関与する任意のドメインを指し、代表的に、CR複合体を構成するCD3分子（CD3 ϵ 、CD3 δ 、CD3 γ ）および ζ 鎖（CD247、 ζ chain）に存在する免疫受容体チロシンベース活性化モチーフ（ITAM: Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif）が代表例として挙げられる。ITAMは、チロシン残基の存在（ITAMには2つのチロシン残基が含まれており、これがリン酸化されることでシグナル伝達を開始する）、キナーゼのリクルート（チロシン残基のリン酸化は、シグナル伝達キナーゼ（主にLckやZAP-70）をリクルートし、それによりシグナルカスケードが活性化される）、シグナル伝達カスケードの起動（ITAMのリン酸化に続いて、カルシウムシグナル、MAPK経路、NF- κ B経路などが活性化され、T細胞の増殖、分化、サイトカイン分泌などの免疫応答が誘導される）等の特徴を有する。TCRシグナルドメインの例としては、CD3 ζ 鎖（ ζ chain；CD3 ζ 鎖はTCR複合体の主要なシグナル伝達分子であり、3つのITAMを持つ。これにより、TCRシグナルの増幅が可能となる）、CD3 ϵ ドメイン（epsilonドメイン、CD3 ϵ は1つのITAMを持ち、抗原認識後にLckを介した初期シグナル伝達に寄与する）、改変

型TCRシグナルドメイン（CAR-T細胞における応用）、キメラ抗原受容体（CAR: Chimeric Antigen Receptor）療法では、TCRシグナルドメインを人工的に設計し、CD3と鎖のITAMに加えてCD28や4-1BBなどの共刺激分子ドメインを組み合わせることで、より強力なシグナル伝達を実現している）などを例示列挙することができる。

[0041] 本明細書において、「腫瘍抗原（tumor antigen）」とは、「がん抗原」ともいわれ、腫瘍細胞が発現する抗原であり、免疫系によって認識される分子のことを指す。腫瘍抗原は、主に腫瘍細胞に特異的に発現するものや、正常細胞にも発現するが腫瘍細胞で異常に高発現しているものに分類される。この抗原は、腫瘍免疫における重要な標的となり、がん免疫療法（例：ワクチン療法、T細胞療法、CAR-T療法）において利用されている。腫瘍抗原は主に以下の2つのカテゴリーに分類される：腫瘍特異抗原（tumor-specific antigen, TSA）および腫瘍関連抗原（tumor-associated antigen, TAA）。TSAは、腫瘍細胞に特異的に発現し、正常細胞ではほとんど発現しない抗原。これらは通常、以下のような原因で発生する：遺伝子変異（RAS、p53などの遺伝子変異により生じる変異型ペプチド（ネオアンチゲン））、およびウイルス由来抗原（ウイルス感染による腫瘍（例：ヒトパピローマウイルス（HPV）由来のE6/E7抗原）。TAAは、正常細胞にも発現するが、腫瘍細胞で異常に高発現する抗原。主な特徴は以下の通りである：胚性抗原（胎児期に発現するが、成人組織ではほとんど発現しない抗原（例：CEA、AFP））および過剰発現抗原（正常組織では低レベルに発現しているが、腫瘍細胞で高レベルに発現する抗原（例：HER2、EGFR））。腫瘍抗原の例としては以下が挙げられる。ネオアンチゲン（ネオ抗原、腫瘍細胞における突然変異により生じる抗原）の例：KRAS変異ペプチド；腫瘍ウイルス由来抗原（ウイルス感染腫瘍で発現する抗原）の例：HPV由来E6/E7（子宮頸がん）；胚性抗原（正常細胞では胎児期にのみ発現し

、成人では沈黙している）の例：がん胎児性抗原（CEA）、 α フェトプロテイン（AFP）；過剰発現抗原の例：HER2（乳がん）、EGFR（肺がん）など。

[0042] 本明細書において、「共刺激リガンド（co-stimulatory ligand）」とは、T細胞や他の免疫細胞の活性化において、主要なシグナルである抗原提示（T細胞受容体（TCR）やB細胞受容体（BCR）による認識）を補完するための共刺激分子に結合するリガンドを指す。共刺激リガンドは、抗原提示細胞（APC：Antigen-Presenting Cells）や腫瘍細胞、その他の細胞の表面に発現しており、免疫応答を強化または調整する役割を果たす。これらのリガンドと共刺激分子との相互作用は、T細胞の活性化、増殖、サイトカイン分泌、免疫記憶の形成に重要であり、免疫応答の適切な制御に寄与している。共刺激リガンドは、免疫応答において重要な役割を果たす分子であり、T細胞をはじめとする免疫細胞の活性化や制御に関与している。その特徴として、まず、共刺激リガンドはT細胞受容体（TCR）を介した抗原認識（第1シグナル）に続く第2シグナルを提供し、T細胞の完全な活性化を可能にすることが挙げられる。また、共刺激リガンドの発現やその相互作用は、免疫応答の強度や性質を調整する役割を持ち、免疫系の適切な機能を維持している。さらに、共刺激リガンドが欠如している場合、T細胞は無反応（アナジー）となり、免疫寛容が誘導される可能性があることから、免疫応答と免疫寛容とのバランスを保つ上でも重要である。

[0043] 共刺激リガンドの具体例として、活性化を促進するものと抑制的な役割を持つものが挙げられる。活性化を促進する共刺激リガンドには、B7-1（CD80）およびB7-2（CD86）があり、これらはT細胞上のCD28受容体と結合してT細胞の初期活性化を促進する。さらに、OX40L（CD252）はOX40（CD134）と結合し、T細胞の増殖と生存をサポートすることで免疫記憶の形成を促進する。4-1BBL（CD137L）は4-1BB（CD137）と結合して活性化T細胞の増殖と持続的活性

化を支援し、ICOSL (CD275) はICOS受容体と結合して助けるT細胞 (Tfh細胞) の活性化およびB細胞のヘルプに関与している。一方、抑制性の共刺激リガンドには、PD-L1 (Programmed Death-Ligand 1) およびPD-L2があり、これらはT細胞のPD-1受容体と結合することでT細胞の機能を抑制し、免疫寛容を誘導する。また、B7-H3 (CD276) やB7-H4も抑制的な機能を持つと考えられており、これらは免疫抑制や抑制性T細胞の誘導に関与するとされている。共刺激リガンドの応用は、免疫療法や疾患治療の分野で大きな可能性を秘めている。がん免疫療法では、4-1BBLやOX40Lなどを利用してT細胞の活性化を増強する治療が開発されており、また、PD-L1/PD-1などの抑制性リガンドを標的とした免疫チェックポイント阻害薬は、がん治療において重要な戦略となっている。さらに、ワクチン開発においては、共刺激リガンドを発現するアジュバントを使用して免疫応答を強化する設計が進められている。加えて、自己免疫疾患の治療においては、抑制性共刺激リガンドを利用して過剰な免疫応答を制御する研究が進んでいる。

[0044] 本明細書において「TCR関連シグナルの伝達の度合い」とは、T細胞受容体 (TCR) が抗原提示細胞 (APC) のペプチド-MHC複合体を認識した際に発生するシグナル伝達の強度や質を指す。この度合いは、T細胞の活性化、増殖、サイトカイン産生、分化、またはアポトーシスのような免疫応答の結果に大きな影響を与える。TCR関連シグナルの伝達の度合いは、T細胞の活性化や免疫応答を決定する上で重要な要素であり、さまざまな要因によって調節されている。具体的には、ペプチド-MHC複合体とTCRの結合強度 (親和性とアフィニティ) が高いほど、シグナル伝達の度合いが強化される。また、抗原提示細胞の表面に存在するペプチド-MHC複合体の密度が高い場合、TCRを介したシグナル伝達はさらに増強される。加えて、CD28やICOSなどの共刺激分子のリガンド (B7ファミリー分子など) が存在すると、TCRシグナルは増幅されるが、PD-1やCTLA-4などの免疫抑制分子が関与する場合にはシグナル伝達が抑制される。さ

らに、TCR下流のシグナル分子（L c k、Z A P-70、L A T、S L P-76など）のリン酸化状態や発現量も、シグナルの強度に影響を与える重要な要素である。加えて、サイトカインや酸素濃度、グルコース濃度などの代謝環境もシグナルの増強または抑制に寄与する。TCR関連シグナルの伝達の度合いは、免疫応答の質を決定する上で極めて重要である。例えば、シグナルが強い場合にはエフェクターT細胞の活性化や細胞傷害性が引き起こされる一方、弱いシグナルは免疫寛容や制御性T細胞（T r e g）の誘導に関与する。このような特性を利用し、TCR関連シグナルの伝達の調節は免疫療法や疾患治療に応用されている。がん免疫療法では、TCRシグナル強度を高めることで、がん細胞を効果的に攻撃するT細胞応答を誘導することが試みられている。また、自己免疫疾患治療では、TCRシグナルを抑制することで過剰な免疫応答を制御するアプローチが研究されている。さらに、T細胞エンジニアリングでは、キメラ抗原受容体（C A R）や人工TCRを設計する際に、適切なシグナル伝達の度合いを確保することが治療効果と安全性を高める鍵となる。

[0045] 本明細書において「TCR刺激の度合い」とは、T細胞受容体（TCR）が抗原提示細胞（A P C）や標的細胞上のペプチド-M H C複合体を認識した際に生じる刺激の強さや質を指す。この刺激の度合いは、T細胞の活性化や免疫応答の結果を決定する重要な要素であり、シグナルの強度、持続時間、頻度によって規定される。

本明細書において「TCR共刺激（T C R C o-s t i m u l a t i o n）」とは、T細胞が抗原提示細胞（A P C）上のペプチド-M H C複合体をT細胞受容体（T C R）で認識した際に、完全なT細胞活性化を引き起こすために必要な追加のシグナル伝達を指す。TCRによる抗原認識（第1シグナル）のみでは、T細胞は不完全に活性化されるか、あるいは無反応（アナジー）状態に陥ることが多い。そのため、TCR共刺激は、T細胞の増殖、サイトカイン産生、エフェクター機能、免疫記憶の形成を含む適応免疫応答を効果的に誘導するために重要である。TCR共刺激は、T細胞表面の共

刺激分子と抗原提示細胞上の共刺激リガンドとの相互作用によって提供される。これにより、TCRシグナルが増幅され、免疫応答が調整される。

[0046] 本明細書において「液性因子 (humoral factor(s))」とは、体液中に存在し、細胞間のコミュニケーションや生体の恒常性維持に関与する可溶性の分子を指す。これらの因子は、免疫応答、炎症反応、組織の修復、代謝調節など、さまざまな生理的プロセスに関与しており、主に血液、リンパ液、組織液などの体液中で作用する。液性因子は、主に免疫系において重要な役割を果たし、サイトカインや補体などの分子が代表例である。これらの分子は、細胞表面の受容体に結合してシグナル伝達を開始し、標的細胞の応答を調整する。

[0047] 本明細書において「T細胞の活性化に伴い、核内移行する転写因子」とは、T細胞が抗原提示細胞 (APC) から提示されたペプチド-MHC複合体をT細胞受容体 (TCR) で認識すると、一連のシグナル伝達カスケードが開始され、その結果として転写因子が活性化され核内に移行する。この転写因子は、T細胞の活性化、増殖、分化、およびエフェクター機能の発現に重要な役割を果たす。例えば、T細胞の活性化に伴い核内に移行する主要な転写因子としてNFAT、NF- κ B、AP-1、およびSTATファミリーが挙げられる。NFAT (Nuclear Factor of Activated T-cells) は、カルシウムシグナルによって活性化され、カルシニューリンによる脱リン酸化を経て核内に移行し、インターロイキン-2 (IL-2) や他のサイトカイン遺伝子の発現を促進する。一方、NF- κ B (Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) は、TCRシグナルによるI κ B分解を介して活性化され、炎症性サイトカインや細胞増殖に関連する遺伝子の転写を制御する。また、AP-1 (Activator Protein-1) は、ERKやJNKなどのMAPKシグナル経路により活性化され、IL-2やインターフェロン γ (IFN- γ) の発現に寄与する。さらに、STATファミリー (Signal Tr

ansducer and Activator of Transcription) (STAT1-4、STAT5A、STAT5BおよびSTAT5Cの7種類が最低限含まれる)は、サイトカイン受容体を介したシグナル伝達によって活性化される。例えば、STAT3はIL-6やIL-10のシグナルを介して活性化し、炎症応答や免疫抑制に関連する遺伝子の発現を調節する。STAT5はIL-2やIL-7によるシグナルを受けて活性化され、T細胞の増殖やサバイバルに重要な役割を果たす。このように、NFAT、NF- κ B、AP-1、STATファミリーは、それぞれ異なる経路を介して核内に移行し、T細胞応答の調節において協調的に機能している。

- [0048] 本明細書において「酸素濃度の度合い」とは、特定の環境や組織内における酸素の存在量を示す指標であり、通常は酸素分圧(単位: mmHg)または酸素飽和度(%)として測定される。生体内では、酸素濃度は細胞や組織の代謝活動に直接影響を与える重要な要因であり、正常酸素状態(ノルモキシア)、低酸素状態(ヒポキシア)、高酸素状態(ハイパーオキシア)を含む、大きく4つの主要な状態に分類される。それぞれの状態について、以下に説明する。まず、正常酸素状態(ノルモキシア)とは、酸素分圧が正常な生理的範囲内にある状態を指し、一般的には酸素濃度が約21%、大気圧下で酸素分圧が約100 mmHg程度である。この状態は、健康な組織や臓器で見られる典型的な酸素濃度であり、たとえば動脈血中の酸素分圧は通常80~100 mmHgである。この範囲内では、細胞が効率的にエネルギーを産生し、生理的機能が正常に維持される。一方、低酸素状態(ヒポキシア)は、酸素分圧が正常範囲を下回る状態を指す。たとえば、腫瘍微小環境では酸素供給が不足し、酸素分圧が20 mmHg以下に低下することがある。このような低酸素状態は、腫瘍の増殖や転移を促進し、さらに放射線療法に対する耐性を引き起こす原因ともなる。また、高地(標高3,000メートル以上)においても低酸素状態が生じ、急性高山病を引き起こすことが知られている。次に、高酸素状態(ハイパーオキシア)は、酸素分圧が正常範囲を

超える状態である。高圧酸素療法では、この高酸素状態を利用し、酸素分圧を高めることで組織の酸素供給を増加させる。この手法は、創傷治癒や感染症の治療に用いられることがあり、具体例として糖尿病性足潰瘍の治療において効果が期待される。最後に、極端な低酸素状態（無酸素状態、アノキシア）とは、酸素がほとんど、または全く存在しない状態を指す。たとえば、心停止や重度の虚血（血流不足）の場合、酸素供給が完全に途絶えるため、組織が酸素欠乏に陥り、最終的に壊死が進行する。このような極端な酸素欠乏状態は、生命に重大な影響を及ぼす。以上のように、酸素濃度の度合いは生理的および病理的なプロセスに深く関与し、それぞれの状態が体内の機能や疾患の進行にどのように影響するかを理解することが、効果的な治療や管理のために重要である。

[0049] 一つの実施形態では、「腫瘍微小環境条件感知エレメント (Tumor Microenvironment Condition-Sensing Elements)」とは、腫瘍微小環境条件の変化を感知するエレメントであり、腫瘍微小環境 (TME: Tumor Microenvironment) 内の特定の条件や刺激（例：低酸素状態、酸性化、栄養不足、炎症性サイトカイン、代謝産物の変化など）を感知し、その情報を細胞に伝達する分子や構造を指す。これらのエレメントは、腫瘍細胞や周囲の免疫細胞、線維芽細胞、血管内皮細胞などが腫瘍微小環境に適応し、腫瘍の進行や転移、さらには治療抵抗性に寄与するための分子機構として機能する。腫瘍微小環境における条件感知エレメントは、特定の環境条件を感知し、それに応じた腫瘍細胞の適応応答を引き起こす役割を果たす。以下に、主要な条件とそれに対応する感知エレメントの例を示す。

[0050] まず、酸素状態（ヒポキシア）では、HIF (Hypoxia-Inducible Factor) が感知エレメントとして機能する。このエレメントは低酸素環境を感知し、腫瘍細胞の代謝や血管新生因子 (VEGF) の発現を誘導する。特にHIF-1 α は、腫瘍細胞が低酸素状態に適応するための中心的な役割を果たしている。次に、酸性化 (pHの低下) においては

、プロトン感受性イオンチャネルやカーボニックアンヒドラーゼIX (CAIX) といったpHセンサーが感知エレメントとして働く。これらは腫瘍内の酸性環境を感知し、細胞内外のpHバランスを調整することで、腫瘍細胞の生存を促進する。栄養不足（グルコースやアミノ酸の欠乏）の条件下では、mTOR経路やAMPK（AMP活性化プロテインキナーゼ）が感知エレメントとして機能する。これらは栄養不足を感知し、エネルギー代謝を調整することで、細胞の生存を維持する役割を果たす。炎症性サイトカイン（例：IL-6、TNF- α ）に対しては、サイトカイン受容体（例：IL-6R、TNF受容体）およびNF- κ Bシグナル経路が感知エレメントとして作用する。これらは炎症環境を感知し、腫瘍細胞の増殖を促進し、免疫抑制因子の発現を誘導する。また、代謝産物の変化（例：乳酸の蓄積）では、モノカルボン酸輸送体(MCT)が感知エレメントとして機能する。これにより、乳酸などの代謝産物を感知し、腫瘍細胞の生存や拡散を促進する。また、酸化ストレス（ROSの増加）に対しては、NRF2 (Nuclear factor erythroid 2-related factor 2) が感知エレメントとして機能する。NRF2は活性酸素種(ROS)を感知し、抗酸化応答を活性化して腫瘍細胞を保護する役割を担っている。これらの条件感知エレメントは、腫瘍細胞が微小環境に適応するために重要なメカニズムを提供し、腫瘍の進行や治療抵抗性に深く関与している。

[0051] 本明細書において、このような構成を持つ腫瘍微小環境条件の変化を感知する腫瘍微小環境条件感知エレメントが作動可能に連結されたグルコーストランスポーターをコードする核酸配列は、以下のような重要な構成要素を含むことで、腫瘍微小環境条件の変化に応答し、グルコース輸送を調節する役割を果たす。まず、感知エレメントの配列は、腫瘍微小環境の特定条件（例：低酸素、酸性化、栄養欠乏）に応答する機能を持つ。具体的には、低酸素状態に応答するHIF結合ドメインをコードする部分や、酸性化を感知するpHセンサーとして機能するタンパク質領域を含む。この配列によって、腫瘍微小環境の特異的な変化を検出することが可能となる。次に、グルコース

トランスポーターの配列は、細胞膜を介してグルコースを輸送する役割を担うグルコーストランスポーター（例：GLUT1、GLUT3）をコードしている。この配列によって、細胞内外のグルコース輸送が効率的に行われ、腫瘍細胞の代謝需要を満たす。さらに、連結領域の配列は、感知エレメントとグルコーストランスポーターを機能的に結合させるリンカー領域をコードする。このリンカー領域は柔軟性と安定性を提供し、感知エレメントとグルコーストランスポーターが協調して作動することを可能にする。しかし、この核酸配列によりコードされたタンパク質の機能を標的とすることで、腫瘍細胞の代謝適応を遮断することが可能となる。具体的には、腫瘍適応の阻害として、低酸素状態や酸性化などの腫瘍微小環境の変化を感知し、それに基づくグルコース輸送を抑制することで、腫瘍細胞へのエネルギー供給を断つ。また、環境応答性の遮断として、感知エレメントを介した腫瘍微小環境の変化検出を妨げることで、腫瘍細胞が厳しい環境条件下での適応を行えないようにする。このような機能阻害により、腫瘍細胞の生存と成長を効果的に抑制する治療戦略が実現可能となる。

[0052] 前記腫瘍微小環境感知エレメントとしては、（i）腫瘍微小環境条件の変動（悪化等）に応じて活性化する誘導活性化モチーフ（HIH-RE、NFAT-REなど）（ii）前記腫瘍微小環境条件の変動（悪化等）に応じて不活性化する前記グルコーストランスポーターの分解因子（ODDなど）をコードする核酸配列を例示することができるがこれに限定されない。

[0053] 本明細書において、「腫瘍微小環境条件の変化に応じて活性化する誘導活性化モチーフ（Inducible Activation Motif Responsive to Tumor Microenvironmental Changes）」とは、腫瘍微小環境（TME：Tumor Microenvironment）の特定の条件の変動（例：低酸素状態、酸性化、栄養不足、炎症性シグナル、酸化ストレスの増加など）に応じて選択的に活性化されるシグナル伝達を制御する分子モチーフを指す。このモチーフは、腫瘍細胞や腫瘍周囲の細胞における代謝、成長、免疫応答の調

節に関与し、腫瘍の進行、転移、治療抵抗性に影響を及ぼす。誘導活性化モチーフは、細胞内シグナル伝達経路の特定のプロセスにおいて機能し、腫瘍微小環境条件の悪化（例：低酸素化や栄養不足の進行）に応答して遺伝子発現や代謝経路を変化させる。これにより、腫瘍細胞が厳しい環境条件に適応する能力を高める。

[0054] 本明細書において「酸素濃度の低下に反応して核内に移行する核内移行因子が結合する核内移行結合誘導活性化モチーフ（Hypoxia-Responsive Nuclear Translocation and Activation Motif）」とは、酸素濃度の低下（低酸素状態、ヒポキシア）に応答して活性化され、核内に移行する特定の因子（例：HIF-1 α ）が結合するDNA配列またはタンパク質モチーフを指す。このモチーフは、低酸素状態で遺伝子発現を調節する分子スイッチとして機能し、腫瘍細胞や正常細胞が低酸素環境に適応するための重要な役割を果たす。この誘導活性化モチーフは、低酸素応答遺伝子（例：血管新生因子、代謝酵素、酸化ストレス耐性因子）の転写を制御し、細胞の適応能力を高める一方で、がんの進行や治療抵抗性にも深く関与している。

[0055] 本明細書において「T細胞の活性化に反応して核内に移行する核内移行因子が結合する誘導活性化モチーフ（Inducible Activation Motif Bound by Nuclear Translocation Factors in Response to T Cell Activation）」とは、T細胞受容体（TCR）刺激や共刺激分子のシグナル伝達を受けて活性化された核内移行因子（例：NFAT、NF- κ B、AP-1など）が特異的に結合するDNA配列やタンパク質ドメインを指す。このモチーフは、T細胞活性化時のシグナル伝達を核内で受け取り、遺伝子発現や転写制御を誘導する役割を持つ。誘導活性化モチーフは、T細胞の増殖、分化、サイトカイン産生、エフェクター機能の発現を制御する中心的な分子機構として機能する。

[0056] 本明細書において、腫瘍微小環境条件の変化に応じて不活性化する前記グ

グルコーストランスポーターの分解因子 (Degradation Factors of the Glucose Transporter Responsive to Tumor Microenvironmental Changes) とは、腫瘍微小環境 (TME: Tumor Microenvironment) における特定の条件の変動 (例: 低酸素、酸性化、栄養欠乏、酸化ストレスなど) に応答して、グルコーストランスポーター (GLUT) を不活性化または分解する役割を担う分子またはモチーフを指す。これらの分解因子は、腫瘍細胞の代謝活性を抑制し、特に過剰なグルコース輸送や代謝適応を制御することで、腫瘍の増殖や進行を阻害する役割を果たす。具体例として、酸素依存性分解領域 (ODD: Oxygen-Dependent Degradation Domain) などがあり、これらは環境条件に依存して標的タンパク質の安定性を調節する。

本明細書において、T細胞の活性化に反応して核内に移行する核内移行因子が結合する核内移行結合誘導活性化モチーフ (Inducible Activation Motif Bound by Nuclear Translocation Factors in Response to T Cell Activation) とは、T細胞受容体 (TCR) 刺激や共刺激分子によるシグナル伝達に応答して活性化され、核内に移行した特定の転写因子 (例: NFAT、NF- κ B、AP-1 など) が結合するDNA配列やタンパク質モチーフを指す。このモチーフは、T細胞活性化に関連する遺伝子発現を制御し、T細胞の増殖、分化、サイトカイン産生、エフェクター機能の発現を調節する役割を果たす。この誘導活性化モチーフは、免疫応答を調整する中心的な分子機構であり、T細胞応答において重要な転写調節エレメントである。主に次の構成要素を持つ。第一に、核内移行因子結合サイトである。このサイトには、T細胞の活性化により核内に移行する転写因子 (例: NFAT、NF- κ B、AP-1) が特異的に結合し、シグナルを遺伝子転写に反映させる。第二に、環境応答性領域であり、TCR刺激や共刺激分子のシグナルに応答して動的に活性化される領域である。この

領域は静止状態では活性化しない特性を持つ。第三に、転写調節機能である。核内移行因子の結合を通じて標的遺伝子の転写を促進または抑制する。このモチーフの機能は多岐にわたる。まず、遺伝子発現の誘導である。IL-2、IFN- γ 、TNF- α などのサイトカインやエフェクター分子の遺伝子発現を制御する。次に、免疫応答の調節であり、T細胞の増殖や分化、エフェクター機能を制御して適応免疫応答の質と強度を決定する。また、炎症応答の促進または抑制、免疫記憶の形成にも関与し、免疫系全体の機能を調整する。具体例として、IL-2プロモーター領域に存在するNFAT結合モチーフ、TNF- α プロモーター領域のNF- κ B応答エレメント、MAPK経路を介して活性化されたAP-1が結合する領域が挙げられる。これらのモチーフは、それぞれT細胞活性化に伴う重要な遺伝子発現を制御する。本モチーフは、さまざまな応用が考えられる。がん免疫療法や自己免疫疾患治療において、この誘導活性化モチーフを標的とした薬剤の開発が期待されている。また、遺伝子治療や合成生物学において、このモチーフを利用してT細胞特有の条件下で遺伝子発現を制御する人工システムの設計も可能である。さらに、モチーフの活性化状態を解析することで、免疫応答のモニタリングや治療効果の評価にも役立つ。このようなモチーフの例として、NFAT結合ドメイン、 κ Bモチーフ（GGGACTTTCC（配列番号1））およびSTAT結合配列（TTCNNGAA）、またはそれらの改変配列を挙げるができるがこれらに限定されない。

[0057] 本明細書において「核内移行因子（Nuclear Translocation Factor）」とは、細胞外からの刺激や細胞内シグナルに応答して活性化され、細胞質から核内へ移行することで標的遺伝子の転写を調節する機能を持つ分子の総称である。これらの因子は、特定のシグナル伝達経路によって活性化され、核内移行シグナル（NLS：Nuclear Localization Signal）を介して核膜を通過し、DNA配列や他の転写因子と結合して遺伝子発現を調節する役割を果たす。本明細書で使用され得る核内移行因子としては、NFAT、NF- κ B（nuc l

ear factor- κ B)、STAT転写因子ファミリー (STAT1-4、STAT5A、STAT5BおよびSTAT5Cの7種類) などが例示される。

[0058] 本明細書において、核内移行因子と核内移行結合誘導活性化モチーフの組合せ (Combination of Nuclear Translocation Factors and Nuclear Translocation-Inducible Activation Motifs) とは、細胞外または細胞内の刺激 (例: T細胞の活性化、低酸素状態、炎症シグナルなど) に応答して活性化され、核内に移行する転写因子 (核内移行因子) が特異的に結合するDNA配列またはタンパク質モチーフ (核内移行結合誘導活性化モチーフ) の組合せを指す。この組合せは、特定の刺激に応答した遺伝子発現を精密に調節し、細胞の機能や適応を制御する役割を果たす。

[0059] 本明細書において、この組合せは、シグナル伝達経路と遺伝子発現制御の連携を担い、免疫応答、炎症、代謝調節、細胞分化などの生物学的プロセスにおいて重要である。また、がんや自己免疫疾患を含むさまざまな病態において、病理学的な役割を果たすことが知られている。以下に主な組合せの例を挙げる。

・NFATとIL-2プロモーターのNFAT結合モチーフ

核内移行因子: NFAT (Nuclear Factor of Activated T-cells)

結合モチーフ: IL-2プロモーター内のNFAT応答エレメント

機能: T細胞の活性化に応答してNFATが核内へ移行し、IL-2遺伝子の転写を誘導し、T細胞増殖と免疫応答を促進する。

・NF- κ BとTNF- α プロモーターのNF- κ B応答モチーフ

核内移行因子: NF- κ B (Nuclear Factor κ B-light-chain-enhancer of activated B cells)

結合モチーフ： $\text{TNF-}\alpha$ プロモーター内の $\text{NF-}\kappa\text{B}$ 応答エレメント（例えば、 κB モチーフ（GGGACTTTCC））

機能： 炎症性シグナル（例：サイトカイン刺激）に応答して $\text{NF-}\kappa\text{B}$ が核内に移行し、 $\text{TNF-}\alpha$ の発現を誘導して炎症応答を調整する。

・ $\text{HIF-1}\alpha$ と HRE（低酸素応答エレメント）

核内移行因子： $\text{HIF-1}\alpha$ （Hypoxia-Inducible Factor-1 α ）

結合モチーフ： HRE（Hypoxia-Responsive Element）

機能： 低酸素状態に応答して $\text{HIF-1}\alpha$ が核内に移行し、血管新生因子（例：VEGF）の転写を誘導する。

・ STATファミリーとサイトカイン応答エレメント

核内移行因子： STAT3（Signal Transducer and Activator of Transcription 3）

結合モチーフ： サイトカイン応答遺伝子内の STAT 結合部位（例えば、STAT 結合配列（TTCNNGAA））

機能： サイトカイン（例：IL-6）刺激に応答して STAT3 が核内に移行し、免疫調節や炎症応答を誘導する。

・ AP-1 と増殖因子応答モチーフ

核内移行因子： AP-1（Activator Protein-1）

結合モチーフ： 細胞増殖や分化関連遺伝子のプロモーター内の AP-1 応答エレメント

機能： MAPK 経路を介して活性化された AP-1 が核内に移行し、細胞増殖や分化を促進する。

[0060] 本明細書において、「酸素濃度の低下に反応してグルコーストランスポーターを分解する活性が不活性化される因子（Factors That Inactivate the Degradation Activity of Glucose Transporters in Respon

se to Hypoxia)」とは、酸素濃度の低下（低酸素状態、ヒポキシア）に応答して、グルコーストランスポーター（例：GLUT1、GLUT3）の分解を誘導するシステムの活性を抑制し、グルコーストランスポーターの安定性を高める役割を持つ因子を指す。この因子は、酸素依存的な分解調節領域（ODD：Oxygen-Dependent Degradation domain）などの構造を介して、低酸素状態でグルコーストランスポーターの分解を抑制し、細胞が必要なエネルギー供給を維持できるように働く。また、腫瘍微小環境においては、腫瘍細胞の代謝適応を促進し、生存と増殖に寄与する重要な役割を果たす。以下は、酸素濃度の低下に反応してグルコーストランスポーターを分解する活性が不活性化される因子の構成要素と特性についての説明である。まず、低酸素応答センサー領域を挙げることができる。この領域は酸素濃度の低下を感知する役割を持ち、低酸素状態で分解抑制のシグナルを発する。代表例として、HIF-1 α （Hypoxia-Inducible Factor-1 α ）があり、低酸素状態で安定化して分解因子の活性を調節する役割を果たす。次に、分解調節領域（ODD：Oxygen-Dependent Degradation domain）が挙げられる。この領域は酸素濃度に依存して分解を調節する特性を持つ。通常、酸素濃度が高い場合には、この領域を介してユビキチン化が誘導され、分解が進行する。一方で、低酸素状態では分解活性が不活性化され、グルコーストランスポーターの安定性が高まる。また、分解抑制因子も重要な構成要素である。この因子は、ユビキチン化やプロテアソーム系による分解活性を抑制し、グルコーストランスポーターの安定化を助ける役割を担う。具体的な例として、pVHL（von Hippel-Lindau protein）の活性調節が挙げられる。また、転写および翻訳調節機能も含まれる。この因子は、低酸素条件下でグルコーストランスポーターの転写や翻訳を調節することで、その分解を防ぎ、細胞膜での安定性を確保する役割を果たす。これらの構成要素は相互に連携しながら、酸素濃度の変化に応じた分解活性の抑制を可能にし、細胞が低酸素環境

下でもエネルギー供給を維持できるようにする重要な役割を担っている。

このように、オンデマンドの発現および／または増強が、腫瘍環境特異的に達成される (On-demand Expression and/or Enhancement Specifically Achieved in the Tumor Microenvironment) とは、特定の遺伝子やタンパク質の発現および／またはその機能の増強が、腫瘍微小環境 (TME: Tumor Microenvironment) の特徴的な条件 (例: 低酸素、酸性化、栄養不足、炎症性サイトカインの存在など) に応じて誘導され、腫瘍以外の正常組織では最小限または発現しないように制御される現象を指す。この現象は、腫瘍特異的な治療標的の開発や、副作用を抑えた治療戦略を設計する上で重要である。腫瘍環境特異的な調節機構により、治療効果を高めつつ正常組織への影響を最小限に抑えることが可能となる。以下に、オンデマンドの発現および／または増強が腫瘍環境特異的に達成される現象の主な特徴について説明する。まず、この現象の特性として挙げられるのが環境依存的な調節である。腫瘍微小環境の特定の条件、たとえば低酸素状態、酸性 pH、栄養欠乏、炎症性シグナルなどに応じて、遺伝子やタンパク質の発現が誘導または増強される仕組みを指す。具体例としては、HIF-1 (低酸素応答因子) によって低酸素環境下で遺伝子発現が誘導されるケースが挙げられる。次に、この現象の特徴として腫瘍特異性がある。これは、腫瘍以外の正常組織ではこれらの遺伝子やタンパク質の発現がほとんど見られないか、非常に低いレベルでしか発現しない一方で、腫瘍微小環境では特異的に発現や機能が活性化されるという性質を示している。さらに、オンデマンド性も重要な特徴である。腫瘍環境の変化、たとえば酸素濃度の低下や炎症性サイトカインの増加といった特定の条件が揃ったタイミングで、必要に応じて発現や増強が調節される。この性質により、腫瘍環境でのみ効率的に機能が発揮される仕組みが可能となる。最後に、この現象は治療標的としての適性を持つ。腫瘍特異的に発現・増強される遺伝子やタンパク質は、がん治療の標的として利用可能である。この特性を活用す

ることで、腫瘍に対する治療効果を高める一方で、正常組織への副作用を最小限に抑える治療戦略が設計可能である。以上の特徴により、オンデマンドの発現および／または増強が腫瘍環境特異的に達成される仕組みは、がん治療の新しいアプローチにおいて非常に有望な要素となっている。これらの特性を活用することで、より効果的で安全性の高い治療法の開発が期待されている。

[0061] 本明細書において、遺伝子（核酸、タンパク質など）に関して「改変」とは、細胞内の核酸の塩基配列を挿入すること、核酸の塩基配列を変更すること、または細胞内の核酸の塩基配列を一部欠失すること、またはそれらの組み合わせをいう。

[0062] 本明細書において「疾患」は、再広義に解釈され、人間や動物の心や体に不調または不都合が生じた状態をいい、病気、障害、種々の症状等、具体的に定義されていない健康な状態とは言えない任意の状態を指す。本開示が対象としうる疾患には、免疫応答が関連し得る疾患、例えば、がん、自己免疫疾患、アレルギー、感染症などが含まれるが、これらに限定されるものではない。

[0063] 本明細書において、ある成分または物質について、ある被験者が「免疫応答」を有するとは、当該成分または物質に対して、何らかの免疫反応が生じることをいう。その被験者または当該被験者由来の生体成分（例えば、細胞など）において、その成分または物質が、種々の免疫細胞の変化、または免疫に関連する物質（例えば、サイトカイン等）の増減をみることによって特定することができ、客観的な指標で判断することもでき、医師などの経験による主観的な判断を行うこともできる。

[0064] 本明細書において、ある成分または物質について、ある被験者が「免疫記憶を有する」かどうかは、その被験者または当該被験者由来の生体成分（例えば、細胞など）において、その成分または物質が、（i）メモリーCD4陽性T細胞に対し抗原依存的にサイトカイン産生を亢進させるかどうか、または増殖促進作用を有するかどうか、（ii）メモリー型制御性T細胞の表

面抗原の発現を変動させるか、(i i i) T r e g と T h 1 の比率を変化させるかどうか、(i v) T - b e t 陽性 T h 1 細胞からの I F N - γ 産生を誘導するかどうか、(v) I F N - γ 産生能を変動させるか、(v i) I L - 2 産生能を変動させるかおよび (v i i) T N F - α 産生能を変動させるか、(v i i i) 血液中にある成分または物質に対して特異的な抗体を有しているかどうかを測定し、これらの少なくとも一つが陽性である結果を生じることを確認することで、評価することができる。

[0065] 本明細書において「感染症」は任意の感染症であり得、ウイルス感染症（一本鎖又は二本鎖の D N A ウイルス、R N A ウイルス等任意のウイルス形態を含む）、細菌感染症、原虫感染症、マイコプラズマ感染症など任意の感染症の種類が包含され、例えば、結核、コロナウイルス、マラリア、黄熱ウイルス、天然痘ウイルス、種痘、麻疹／風疹、ポリオ、流行性耳下腺炎（おたふく）／M U M P S、ロタウイルス感染、水痘（みずぼうそう）、黄熱病、エボラ、西ナイル熱、ヒブ感染症、肺炎球菌感染症、百日せき、日本脳炎、髄膜炎菌感染症、サルモネラ感染症、病原性大腸菌、トキソプラズマ、ジカウイルス、ヘルペスウイルス 1 型、E B V／エプスタイン－バーウイルス（ヘルペスウイルス 4 型）、C M V／サイトメガロウイルス（ヘルペスウイルス 5 型）、インフルエンザ、M A R S、狂犬病およびジフテリアなどであり得る。

[0066] 本明細書において「免疫異常」とは、少なくとも部分的に免疫系の異常によって生じるまたは生じることが疑われる任意の疾患、障害または状態をさす。免疫に何らかの原因によって異常が起こり、感染症にかかりやすくなったりアレルギー反応を起こしたりする状態をいう。免疫異常には、アレルギー、自己免疫疾患等が挙げられるがそれらに限定されない。自己の抗原に対する場合は概して自己免疫疾患といい、外的な抗原に対してはアレルギーという。免疫応答が強い場合は、自己の抗原に対しては自己免疫疾患状態となり、非自己の抗原に対してはアレルギー状態となる一方で、免疫応答が弱い場合は、自己の抗原に対してはがん状態となり、非自己の抗原に対しては感

染症となるということができる。

[0067] 本明細書において「自己免疫疾患」とは、免疫反応が特定の自己の抗原に対して過剰に起こることをいう。自己免疫疾患は、異物を認識し排除するための役割を持つ免疫系が、自分自身の正常な細胞や組織に対してまで過剰に反応し攻撃を加えてしまうことで症状を起こす、免疫寛容の破綻による疾患といえる。自己免疫疾患または障害の例は、これらに限定されるものではないが、以下のものを含む：乾癬および皮膚炎（例えば、アトピー性皮膚炎）を含む炎症性皮膚疾患などの炎症性反応；全身性強皮症および硬化症；炎症性腸疾患に関連する反応（例えば、クローン病および潰瘍性大腸炎）；呼吸窮迫症候群（成人呼吸窮迫症候群；adult respiratory distress syndrome：ARDSを含む）；皮膚炎；髄膜炎；脳炎；ブドウ膜炎；大腸炎；糸球体腎炎；例えば湿疹および喘息ならびにT細胞の浸潤および慢性炎症反応を伴う他の状態などのアレルギー性状態；アテローム硬化；白血球接着不全症；関節リウマチ；全身性エリテマトーデス（systemic lupus erythematosus：SLE）（ループス腎炎、皮膚ループスを含むがこれらに限定されない）；糖尿病（例えば、Ⅰ型糖尿病またはインスリン依存性糖尿病）；多発性硬化症；レイノー症候群；自己免疫性甲状腺炎；橋本甲状腺炎；アレルギー性脳脊髄炎；シェーグレン症候群；若年発症糖尿病；ならびに典型的に結核、サルコイドーシス、多発性筋炎、肉芽腫症、および血管炎において見られるサイトカインおよびTリンパ球によって媒介される急性および遅延型過敏症に関連する免疫反応；悪性貧血（アジソン病）；白血球の漏出を伴う疾患；中枢神経系（central nervous system：CNS）炎症性障害；多臓器損傷症候群；溶血性貧血（クリオグロブリン血症またはクームス陽性貧血を含むがこれらに限定されない）；重症筋無力症；抗原－抗体複合体介在性疾患；抗糸球体基底膜疾患；抗リン脂質症候群；アレルギー性神経炎；グレーブス病；ランバート－イートン筋無力症候群；水疱性類天疱瘡；天疱瘡；自己免疫性多腺性内分泌障害；ライター病；スティフマン症候群；

ベーチェット病；巨細胞性動脈炎；免疫複合体性腎炎；IgA腎症；IgM多発性ニューロパシー；免疫性血小板減少性紫斑病（immune thrombocytopenic purpura：ITP）、自己免疫性ぶどう膜炎または自己免疫性血小板減少症。

- [0068] 本明細書において「アレルギー」とは、免疫反応が特定の非自己の抗原に対して過剰に起こることをいい、「アレルゲン」に対して免疫反応が生じる疾患である。「アレルゲン」は、アレルギー疾患を有する被験者の抗体と反応し得る抗原をいい、樹木類の花粉に由来するアレルゲン（アカシア、ハンノキ、ビロードアオダイモ、セイヨウブナ、白樺、カエデ、山スギ、赤スギ、ハコヤナギ、ヒノキ、アメリカニレ、アキニレ、トガサワラ、ゴムの木、ユーカリの木、エノキ、ヒッコリー、アメリカシナノキ、サトウカエデ、メスキート、カジノキ、コナラ属、オリーブ、ペカン、コショウ、マツ、イボタツキ、ロシアオリーブ、アメリカスズカケ、ニワウルシ、クロクルミ、クロヤナギ等）、草木類の花粉に由来するアレルゲン（ワタ、ギョウギシバ、ナガハグサ、スズメノチャヒキ、トウモロコシ、ヒロハウシノケグサ、セイバンモロコシ、カラスムギ、カモガヤ、コヌカグサ、ホソムギ、コメ、ハルガヤ、オオアワガエリ、ヒユ、アカザ、オナモミ、ギシギシ、セイタカアワダチソウ、イソホウキ、シロザ、キンセンカ、イラクサ、アオビエ、ヘラオオバコ、オオブタクサ、ブタクサ、ブタクサモドキ、ノハラヒジキ、ヤマモモギ、エニシダ、ヒメスイバ等）、虫由来のアレルゲン（カイコ、ダニ、ミツバチ、スズメバチ、アリ、ゴキブリ等）、菌由来のアレルゲン（アルテルナリア、アスペルギルス、ボツリヌス、カンジダ、セファロスポリウム、カーブラリア属、エピコッカム菌、表皮菌、フザリウム属、ヘルミントスポリウム属、連鎖クラドスポリウム、ケカビ、ペニシユリウム、ファーマ属、ブルラリアプルランス、クモノスカビ等）、動物の体毛由来のアレルゲン（犬、猫、鳥等）、ハウスダスト由来のアレルゲンタンパク質、食物由来のアレルゲン（OVA等）等が例として挙げられるが、これらに限定されない。「アレルギー」の代表的な疾患としては、アトピー性皮膚炎、アレルギー性鼻

炎（花粉症等）、アレルギー性結膜炎、アレルギー性胃腸炎、気管支喘息、小児喘息、食物アレルギー、薬物アレルギー又は蕁麻疹などが挙げられる。

[0069] （好ましい実施形態）

以下に本開示の好ましい実施形態を説明する。以下に提供される実施形態は、本開示のよりよい理解のために提供されるものであり、本開示の範囲は以下の記載に限定されるべきでない。したがって、当業者は、本明細書中の記載を参酌して、本開示の範囲内で適宜改変を行うことができることは明らかである。また、本開示の以下の実施形態は単独でも使用されあるいはそれらを組み合わせて使用することができる。

[0070] 一つの局面において、本開示は、オンデマンドでグルコース取り込み能が強化されたT細胞などの免疫細胞、そのような細胞を含む細胞集団、ならびにそのような細胞または細胞集団を含む医薬組成物、およびその他関連技術を提供する。このようなオンデマンドでグルコース取り込み能が強化されたT細胞などの免疫細胞、そのような細胞を含む細胞集団は、グルコース取り込み能が強化されたT細胞であって、腫瘍微小環境条件の変化に応じて、前記T細胞においてグルコーストランスポーターの発現が調節される性質を有しあるいはそのように改変され、あるいは腫瘍微小環境条件の変化を感知する腫瘍微小環境感知エレメントが作動可能に連結されたグルコーストランスポーターをコードする核酸配列を含むものが代表的に使用される。

[0071] 別の局面において、本開示は、グルコース取り込み能が強化されたT細胞であって、腫瘍微小環境条件の変化に応じて、前記T細胞においてグルコーストランスポーターの発現が調節されるT細胞などの免疫細胞、そのような細胞を含む細胞集団、ならびにそのような細胞または細胞集団を含む医薬組成物、およびその他関連技術を提供する。

[0072] さらに別の局面において、本開示は、腫瘍微小環境条件の変化を感知する腫瘍微小環境感知エレメントが作動可能に連結されたグルコーストランスポーターをコードする核酸配列を含むT細胞を提供する。

[0073] 本開示の一つの局面において、グルコース取り込み能が強化されたT細胞

(T_{eff})であって、該T細胞が、グルコーストランスポーターをオンデマンドで発現するように改変され、および／またはグルコーストランスポーターの発現がオンデマンドで増強した、T細胞が提供される。T細胞において、グルコーストランスポーターをオンデマンドで発現するように改変され、および／またはオンデマンドで増強した、あるいは、腫瘍微小環境条件の変化に応じて、前記T細胞においてグルコーストランスポーターの発現が調節され、または腫瘍微小環境条件の変化を感知する腫瘍微小環境感知エレメントが作動可能に連結されたグルコーストランスポーターをコードする核酸配列を含むものは、従来では想定されるものではない。恒常的にグルコース取り込み能が強化されたT細胞では、エフェクターメモリータイプのT細胞への分化と疲弊が認められ、無～低グルコース条件下で活性化した際には顕著なT細胞死が誘導されたが、グルコーストランスポーターの発現がオンデマンドで増強したものは、同等の細胞傷害活性はたもたれる一方、無～低グルコース条件下でのT細胞死を回避し、より長期の作用維持が期待されるメモリーフェノタイプの維持と疲弊耐性を誘導したという点で顕著である。本開示の細胞は、グルコース取り込み能が強化されたものであることが有利である。このようなオンデマンドでグルコース取り込み能がオンデマンドで強化された細胞は、CAR-T細胞、TCR-T細胞などに応用される際にがん、自己免疫疾患、アレルギー、感染症などの疾患に対する効果が顕著に奏される。

[0074] また、本開示の細胞は、CAR-T療法などで使用した場合に、再発防止効果が顕著に高い効果が示された。加えて、恒常的にグルコースが増強されたT細胞において認められた、非腫瘍要因の毒性によるマウスの頓死が、オンデマンドでグルコーストランスポーターが発現または増強され、あるいは腫瘍微小環境条件の変化に応じて、前記T細胞においてグルコーストランスポーターの発現が調節され、または腫瘍微小環境条件の変化を感知する腫瘍微小環境感知エレメントが作動可能に連結されたグルコーストランスポーターをコードする核酸配列を含むものでは回避されていた。これらことは予想

外のことであり、理論に束縛されないが、その原因として過度なT細胞活性化や過度なグルコース取り込みに起因する宿主毒性の回避、疲弊の顕著な低下、栄養需要にみあった栄養供給、適度な活性化に起因する細胞死の抑制やメモリー化の誘導などの説明がされ得る。また、本開示の細胞は、好ましくは、機能すべき場所、特に体内に導入されたのち、エフェクター機能を有するものであることが好ましい。そのような細胞としては、 T_{eff} が挙げられるがそれに限定されず、リンパ球系前駆細胞、 T_{nv} 、 T_{scm} 、 T_{emra} などでもよい。

[0075] 一つの実施形態において、本開示の細胞の局面において、腫瘍微小環境条件は、TCR関連シグナルの伝達の度合いを含む。このましい実施形態では、TCR関連シグナルは、TCRシグナルまたはその一部、TCRシグナルと他の抗原のキメラのシグナル（CARシグナルともいう）などを挙げることができる。

[0076] 好ましい実施形態では、本開示の細胞の局面において、TCR関連シグナルは、TCRシグナルドメイン含む分子によって媒介される。このような分子は、核酸分子であり得る。

[0077] 好ましい実施形態では、腫瘍微小環境条件の変化は、腫瘍抗原および／または共刺激リガンドの提示、ならびに／またはサイトカイン条件の変化を含む。

[0078] ある実施形態では、本開示において使用されるTCR関連シグナルの伝達の度合いは、TCR刺激の度合い、TCR共刺激および液性因子からなる群より選択される少なくとも1つを含む。特定の実施形態では、TCR関連シグナルの伝達の度合いは、TCR刺激の度合いと、TCR共刺激および液性因子からなる群より選択される少なくとも1つとを含む。別の実施形態では、TCR関連シグナルの伝達の度合いは、TCR刺激の度合いを含む。別の実施形態では、TCR関連シグナルの伝達の度合いは、TCR刺激の度合い、TCR共刺激および液性因子を含む。TCR刺激の強さ、共刺激分子の影響、および液性因子の作用は一つまたは複数が組み合わせられてもよい。TC

R 刺激は、抗原提示細胞（A P C）上の主要組織適合遺伝子複合体（M H C）に結合した抗原ペプチドを T 細胞受容体が認識することで開始される。この認識の強度や持続時間がシグナル伝達の度合いに大きな影響を与える。強い T C R 刺激は、T 細胞の活性化や増殖、さらにはエフェクター機能の発揮を促進する一方、弱い T C R 刺激は部分的な活性化や無反応（アナジー）を引き起こすことがある。また、T C R によるシグナルには共刺激分子の関与が不可欠である。共刺激分子は、T 細胞活性化に必要な第二のシグナルを提供し、T C R シグナルを増幅する役割を果たす。たとえば、C D 2 8 は刺激性の共刺激分子であり、完全な T 細胞活性化を可能にするが、抑制性の C T L A - 4 は逆に免疫応答を抑える方向に働く。適切な共刺激信号が存在することで、免疫応答は増強されるとともに、記憶 T 細胞の形成や持続的な免疫応答が可能となる。一方で、共刺激が欠如すると、T 細胞は免疫寛容に陥り、自己抗原への過剰な免疫応答が抑えられる仕組みになっている。さらに、液性因子、特にサイトカインは、T 細胞の活性化や分化の方向性を調整する重要な役割を担っている。たとえば、I L - 2 は T 細胞の増殖を促進し、I L - 1 0 や T G F - β は免疫応答を抑制する働きを持つ。また、炎症環境において分泌される特定のサイトカイン、たとえば I L - 1 2 や I L - 4 は、それぞれ T h 1 細胞や T h 2 細胞への分化を誘導し、免疫応答の性質を決定づける。このように、液性因子は免疫応答の微調整を行い、病原体に適応した効果的な応答を可能にする。T C R 刺激、共刺激、液性因子単独またはそれらの複数の相互作用によって、免疫応答は適応的かつ柔軟に調整される。これにより、病原体に対しては迅速かつ特異的な免疫防御が可能となり、同時に自己免疫疾患の防止や免疫寛容の維持といった免疫系の全体的なバランスが保たれている。この仕組みは、T 細胞が環境や刺激に応じて最適な応答を示すために欠かせない要素であり、免疫系の多様性と機能性を支えている。

[0079] 特定の実施形態では、T C R 刺激は、T 細胞の活性化に伴い、核内移行する、N F A T、N F - κ B (n u c l e a r f a c t o r - k a p p a B

）、STAT転写因子ファミリー（STAT1-4、STAT5A、STAT5BおよびSTAT6の7種類が挙げられるがこれらに限定されない。）などが想定され得る。

[0080] 別の実施形態では、腫瘍微小環境条件は、酸素濃度の度合いを含む。腫瘍微小環境における酸素濃度の度合いは、腫瘍の進展や治療応答に大きく影響を与える重要な要因である。腫瘍組織内では血管の異常な形成や構造的な不均一性により、正常組織に比べて酸素供給が不足することが多く、この状態は「低酸素状態（ヒポキシア）」と呼ばれる。低酸素状態は、腫瘍細胞の代謝、増殖、免疫回避、および治療抵抗性に多岐にわたる影響を及ぼす。まず、腫瘍細胞は低酸素状態に適応するため、低酸素誘導因子（HIF：Hypoxia-Inducible Factor）の活性化を引き起こす。HIFは腫瘍細胞において血管新生因子（VEGFなど）の発現を促進し、新たな血管の形成を誘導するが、この新生血管は異常な構造を持ち、さらなる低酸素状態を引き起こす一因となる。また、HIFは腫瘍細胞の代謝経路を変化させ、酸素を必要としない解糖系を優先する「ワールブルグ効果」を促進する。この代謝の変化は、腫瘍細胞の増殖を維持するだけでなく、酸性環境を形成し、免疫細胞の活性を抑制する役割も果たす。

[0081] 腫瘍微小環境条件の変化を感知する腫瘍微小環境感知エレメントが作動可能に連結されたグルコーストランスポーターを用いる局面において、一つの実施形態では、腫瘍微小環境における酸素濃度やpH、酸化還元状態、炎症性サイトカインなどの特性を感知する腫瘍微小環境感知エレメントを連結したグルコーストランスポーターは、腫瘍特異的な代謝特性を利用した革新的な研究対象となっている。このようなトランスポーターは、腫瘍微小環境の変化に応答し、腫瘍細胞のエネルギー供給や代謝経路に特異的に関与することで、治療や診断に活用できる可能性がある。たとえば、低酸素環境で特異的に活性化される低酸素誘導因子（HIF-1）の応答エレメントをグルコーストランスポーターに連結することで、低酸素環境下でグルコース取り込みが増加する仕組みが設計される。このようなトランスポーターは、低酸素状態をタ

ーゲットにした薬剤送達や診断用プローブの開発に応用できる。また、腫瘍環境ではpHが低下する特徴があるため、酸性環境を感知するエレメントをグルコーストランスポーターに組み込むことで、腫瘍細胞が存在する酸性環境で特異的に活性化するトランスポーターを構築することが可能である。この仕組みは、酸性環境に特化した治療法の設計に寄与する。さらに、腫瘍微小環境の酸化還元状態に対応するため、酸化還元感知エレメントをグルコーストランスポーターに連結する設計も考えられる。腫瘍細胞は通常より高い酸化ストレスにさらされていることが多いため、こうしたトランスポーターは酸化ストレスの高い環境で特異的に機能し、腫瘍細胞をターゲットとした治療や診断ツールとして有用である。また、炎症性サイトカイン（例：IL-6やTNF- α ）応答エレメントを組み込むことで、腫瘍微小環境における炎症状態を感知し、それに応答してグルコース輸送を調整するトランスポーターの開発も可能である。これにより、炎症性腫瘍の特定や治療効果の向上が期待される。このように、腫瘍微小環境感知エレメントを連結したグルコーストランスポーターは、腫瘍の特異的な代謝環境を利用して、診断や治療をより効果的かつ特異的に実施するための基盤となり得る技術である。

[0082] ある実施形態では、腫瘍微小環境感知エレメントは、（i）腫瘍微小環境条件の変動（悪化等）に応じて活性化する誘導活性化モチーフ（例えば、HIH-RE、NFAT-RE）（ii）前記腫瘍微小環境条件の変動（悪化等）に応じて不活性化する前記グルコーストランスポーターの分解因子（例えば、ODD）をコードする核酸配列を含む。

[0083] ある実施形態では、前記腫瘍微小環境感知エレメントは、（i）T細胞の活性化に反応して核内に移行する核内移行因子が結合する誘導活性化モチーフ（例えば、NFAT-RE）、（ii）酸素濃度の低下に反応して核内に移行する核内移行因子が結合する核内移行結合誘導活性化モチーフ、（iii）前記酸素濃度の低下に反応してグルコーストランスポーターを分解する活性が不活性化されるグルコーストランスポーター分解酵素をコードする核酸配列を含む。

- [0084] 別の実施形態では、グルコーストランスポーターをコードする核酸配列が、腫瘍微小環境条件の変化に応じて活性化する誘導活性化モチーフおよび／または前記腫瘍微小環境条件の変化に応じて不活性化する前記グルコーストランスポーターの分解因子をコードする核酸配列に作動可能に連結されたコンストラクトを含む。
- [0085] 別の実施形態では、グルコーストランスポーターをコードする核酸配列が、T細胞の活性化に反応して核内に移行する核内移行因子が結合する核内移行結合誘導活性化モチーフに作動可能に連結されたコンストラクトを含む。
- [0086] さらに別の実施形態では、使用され得る核内移行因子は、NFAT、NF- κ B (nuclear factor- κ B)、STAT転写因子ファミリー (STAT1-4、STAT5A、STAT5BおよびSTAT56等) 等を含み得る。
- [0087] 特定の実施形態では、核内移行結合誘導活性化モチーフは、NFAT結合ドメイン、 κ Bモチーフ (GGGACTTTCC) (配列番号1) およびSTAT結合配列 (TTCNNNGAA)、またはそれらの改変配列であってもよい。改変配列は改変元の配列に比較して、1、2、または3あるいはそれ以上の置換 (ATGCの相互の交換) を含み得る。
- [0088] 特定の実施形態では、核内移行因子と前記核内移行結合誘導活性化モチーフの組合せは、
(1) NFATとNFAT結合ドメインとの組合せ；(2) NF- κ B (nuclear factor- κ B) と κ Bモチーフ (GGGACTTTCC (配列番号1)) の組合せ；または(3) STAT転写因子ファミリー (STAT1-4、STAT5A、STAT5BおよびSTAT56の7種類) とSTAT結合配列 (TTCNNNGAA) の組合せを含む。
- [0089] 特定の実施形態では、グルコーストランスポーターをコードする核酸配列が、酸素濃度の低下に反応して核内に移行する核内移行因子が結合する核内移行結合誘導活性化モチーフに作動可能に連結されたコンストラクトを含む。この実施形態では、核内移行因子は、HIF-1 などであり得る。またこ

の実施形態では、核内移行結合誘導活性化モチーフは、H I F - R E などであってもよい。

[0090] 特定の実施形態では、核内移行因子と核内移行結合誘導活性化モチーフの組合せは、(1) H I F - 1 と H I F - R E の組合せなどであり得る。

[0091] 別の実施形態では、グルコーストランスポーターをコードする核酸配列が、酸素濃度の低下に反応して前記グルコーストランスポーターを分解する活性が不活性化される因子をコードする核酸配列に作動可能に連結されたコンストラクトを含む。この実施形態では、不活性化される因子は、酸素依存的分解因子 (O D D) などであり得る。

[0092] 特定の実施形態では、本開示のT細胞はキメラ抗原受容体 (C A R) を含む。

[0093] 別の実施形態では、T細胞はエフェクター機能を有する。あるいは、細胞はエフェクターT細胞 (T_{eff}) の前駆細胞である。

[0094] 特定の実施形態では、本開示のエフェクターT細胞の前駆細胞は、メモリー機能が延長される。エフェクターT細胞の前駆細胞 (メモリー機能を延長する特性は、免疫応答の持続性や効果を向上させる点で大きな有利性を持つ。この特性について、以下に説明する。エフェクターT細胞の前駆細胞は、抗原刺激に応答してエフェクター機能を発揮する能力を持つ一方で、メモリーT細胞 (Memory T cells) へ分化する可能性を秘めている。これにより、初期の免疫応答が終息した後でも、長期間にわたって抗原に対する免疫記憶を維持することができる。特に、メモリー機能の延長は、再感染時に迅速で強力な免疫応答を引き起こす能力を高める点で有利である。まず、メモリー機能が延長されることで、腫瘍などに対する免疫防御が強化される。長期的なメモリー細胞の存在により、再び同じ抗原が侵入した際には、迅速かつ効果的な二次免疫応答が可能となる。これにより、腫瘍などが体内で拡散する前に排除される確率が高まり、重症化を防ぐことができる。さらに、メモリー機能の延長は、ワクチンの効果を高める要因にもなる。ワクチン接種後に形成されたエフェクターT細胞の前駆細胞が長期間メモリー

機能を保持することで、免疫記憶の持続期間が延び、追加接種（ブースター接種）の頻度を減らすことが可能となる。この点は、ワクチン戦略の効率化や患者の負担軽減にも寄与する。腫瘍免疫の分野において、エフェクターT細胞の前駆細胞のメモリー機能は重要である。腫瘍細胞は抗原を隠蔽したり、免疫抑制環境を作り出したりすることが多いが、長期間メモリー機能を持つT細胞が存在することで、腫瘍細胞に対する免疫監視が持続し、再発のリスクを低減することが期待される。特に、免疫チェックポイント阻害剤やCAR-T細胞療法と組み合わせることで、より持続的かつ強力な抗腫瘍効果が得られる可能性がある。さらに、慢性感染症や自己免疫疾患などの状況下でも、メモリー機能を持つエフェクターT細胞の前駆細胞は、適切な免疫応答の維持と病態制御に寄与する。特定の病原体や異常細胞に対する長期的な監視と制御が可能となる一方で、不必要な炎症や組織破壊を抑えることも期待される。総じて、エフェクターT細胞の前駆細胞がメモリー機能を延長する特性は、感染症や腫瘍治療、さらにはワクチン開発における大きな利点を提供する。この特性を活用することで、より持続的かつ効果的な免疫応答の誘導が可能となり、医療やバイオテクノロジーの発展に寄与することが期待される。

[0095] 別の実施形態では、エフェクターT細胞の前駆細胞は、メモリーT細胞の表現型が維持される。エフェクターT細胞の前駆細胞がメモリーT細胞の表現型を維持することには、多くの利点がある。この特性は、長期的な免疫記憶と適応免疫応答の効率を向上させる上で極めて重要である。まず、エフェクターT細胞の前駆細胞がメモリーT細胞の表現型を保持することで、再感染時に迅速かつ効率的な免疫応答が可能になる。メモリーT細胞は、抗原特異的な記憶を保持しており、抗原が再び体内に侵入した際に速やかに活性化され、エフェクター機能を発揮する。これにより、腫瘍などが広がる前に効果的に排除されるため、重症化を防ぐことができる。メモリーT細胞の表現型が維持されることで、免疫応答の持続性が向上する。エフェクターT細胞が短命であるのに対し、メモリーT細胞は長期間にわたって体内に存在

し続けるため、ワクチン接種や自然感染後に形成された免疫記憶が長く保持される。この特性は、追加接種（ブースター接種）の頻度を減らし、持続的な免疫防御を提供するという観点から、特に有利である。腫瘍免疫において、メモリーT細胞の表現型を維持することは重要である。腫瘍細胞は抗原の変異や免疫抑制環境を利用して免疫系の監視を回避することが多いが、長期的な免疫記憶を持つT細胞は、腫瘍細胞の再発や転移に対して継続的に監視機能を発揮する。これにより、治療後の再発リスクを低減し、患者の予後を改善する可能性が高まる。さらに、慢性感染症の制御にも貢献する。例えば、結核やHIVのような病原体に対しては、持続的な免疫記憶が感染の進行を抑制し、病態を管理するうえで重要である。メモリーT細胞の表現型が維持されることで、病原体に対する長期的な監視と制御が可能となる。また、自己免疫疾患の制御や免疫治療にも応用が期待される。メモリーT細胞の表現型を保持しつつ、免疫応答を適切に調整することができれば、過剰な免疫反応を抑えながら、病原体や異常細胞に対する選択的な免疫応答を誘導することが可能である。総じて、エフェクターT細胞の前駆細胞がメモリーT細胞の表現型を維持することは、感染症、腫瘍、慢性疾患の治療や予防において、多大な利点をもたらす。この特性を理解し活用することで、より効果的で持続的な免疫治療やワクチン戦略の開発が期待される。

[0096] 特定の実施形態では、エフェクターT細胞が活性化されまたは活性が維持され、および前記エフェクターT細胞の前駆細胞は、メモリー機能が延長されまたはメモリーT細胞の表現型が維持される。メモリー機能が延長されおよびメモリーT細胞の表現型が維持の両者が達成されてもよい。その場合相乗的に効果が強まり得る。

[0097] 本開示は、固形がんを含むあらゆる腫瘍において有効である。固形がんに対するCAR-T細胞の臨床試験は、これまで有効性を示すことができなかったが、本発明者らは、固形がん等におけるCAR-T細胞の機能不全が腫瘍微小環境（TME）またはそれと等価な腫瘍微小条件（TMECとも）においてグルコース欠乏に起因すること、および継続的ではなくオンデマンド

の代謝補充がC A R－T細胞の抗腫瘍効果を有意に改善することを示すことを見出した。がん細胞によるグルコースの大量消費は、固形がん等のT M Eにおけるグルコースレベルを低下させ、結果としてC A R－T細胞を障害する。高親和性グルコーストランスポーターであるグルコーストランスポーター（G L U T、例えば、G L U T 3）をC A R－T細胞に安定発現させると、サイトカイン産生と殺傷活性が回復することを見出した。しかしながら、G L U Tを安定発現させたC A R－T細胞は、固形がんモデルにおいて腫瘍縮小を誘導する一方で、その過剰活性化は有害事象とマウスの死亡につながった。オンデマンド型でG L U Tを導入したC A R－T細胞は、例示として使用した標的抗原刺激による活性化T細胞核因子（N F A T）が核内移行によって腫瘍微小環境感知エレメントに結合し、G L U Tの転写が誘導され、あるいはG L U Tの分解が抑制され、代謝適性の向上と抗腫瘍効果の増大を示し、有害事象を予防しながら、頭蓋内ヒトG B M細胞異種移植モデルにおいて長期にわたる腫瘍制御をもたらした。本発明者らは、腫瘍抗原への曝露時など、オンデマンドではあるが安定した代謝適性は、固形がんに対するC A R－T細胞の抗腫瘍効果を最大化するための新しい概念である。

[0098] 特定の実施形態では、本開示は、G B MにおけるC A R－T細胞の機能不全が腫瘍微小環境（T M E）におけるグルコース欠乏に起因すること、および継続的ではなくオンデマンドの代謝補充がC A R－T細胞の抗腫瘍効果を有意に改善することを示す。がん細胞によるグルコースの大量消費は、G B MのT M Eにおけるグルコースレベルを低下させ、結果としてC A R－T細胞を障害する。高親和性グルコーストランスポーターであるG L U T 3をC A R－T細胞に安定発現させると、サイトカイン産生と殺傷活性が回復した。しかしながら、G L U T 3を安定発現させたC A R－T細胞は、G B Mモデルにおいて腫瘍縮小を誘導する一方で、その過剰活性化は有害事象とマウスの死亡につながった。オンデマンドG L U T 3 C A R－T細胞は、標的抗原刺激による活性化T細胞核因子（N F A T）の核内転位によってG L U T 3転写が誘導され、代謝適性の向上と抗腫瘍効果の増大を示し、有害事象

を予防しながら、頭蓋内ヒトGBM細胞異種移植モデルにおいて長期にわたる腫瘍制御をもたらした。本発明者らは、腫瘍抗原への曝露時など、オンデマンドではあるが安定した代謝適性は、固形腫瘍に対するCAR-T細胞の抗腫瘍効果を最大化するための新しい概念であることを提案する。

[0099] 一つの側面において、本開示が標的とする膠芽腫（GBM）は壊滅的な悪性脳腫瘍であり、年間発生率は10万人当たり3.19人である。2005年にテモゾロミドと放射線からなる併用療法が登場したことで、原発性GBMに対する腫瘍治療野療法（Novo TTF）が開発され、臨床現場におけるGBM患者の予後が改善された。しかし、GBMの5年全生存率は依然として20%を下回っている〔文献1, 2〕。血液悪性腫瘍におけるキメラ抗原受容体T細胞（CAR-T細胞）療法の臨床的成功を踏まえ、GBMに対するCAR-T細胞療法のいくつかの前臨床試験および臨床試験が熱心に検討されている〔文献3-10〕。臨床試験で治療された患者の中には、腫瘍微小環境（TME）へのCAR-T細胞の浸潤や腫瘍量の減少など、有望な結果を示す者もいるが、ほとんどの患者はCAR-T細胞療法に反応しない〔文献3〕。

[0100] GBMは代謝的に過酷なTMEを保有しており、CD8+ T細胞を含むエフェクターT細胞の機能を損ない、CAR-T細胞をTMEに養子移入する。脳では、神経細胞やグリア細胞などの神経系細胞がエネルギー源としてグルコースを必要とし、脳は全身のグルコース由来エネルギーの25%を消費する〔文献11〕。さらに、侵襲性のGBM細胞は、がん細胞の特徴的な代謝である好氣的解糖（ワールブルグ効果として知られる）のために、正常な神経細胞よりも3倍多くのグルコースを消費する〔文献12〕。これは、GBMのTMEにおけるグルコースの枯渇につながる〔文献13-16〕。一方、ナイーブT細胞は、エネルギー需要の増加を確保するため、活性化時にエネルギー産生を酸化的リン酸化や脂肪酸酸化から好気性解糖系に移行させる。したがって、活性化T細胞とがん細胞との間では、グルコースを介した激しい代謝競争がGBMのTMEで起こっている。SLC2A3によって

コードされ、神経細胞やグリア細胞で生理的に発現するGLUT3は、グルコースに対する親和性が、T細胞で発現する主要なグルコーストランスポーターであるGLUT1よりも5倍高い〔文献16-18〕。その結果、GLUT3を発現するGBM細胞は、TME内で十分なグルコースを取り込みながら生存し、継続的に増殖することができるが、活性化されたT細胞は、代謝競争の失敗によりその機能を損なう〔文献19, 20〕。

[0101] GBM細胞による高親和性GLUT3を介したかなりのグルコース取り込みを考えると、CAR-T細胞によるGLUT3の同等以上の発現は、GBM細胞との完全な競合を可能にする可能性がある。本開示では、CAR-T細胞でGLUT3の発現を誘導するために、SLC2A3をCARに連結したコンストラクトを開発した。しかし、安定したGLUT3の発現はCAR-T細胞の過剰活性化を誘導し、エフェクターT細胞には繊細なエネルギー補給が必要であることを示した。そこでGLUT3の発現を、TMEでの標的抗原曝露に伴うCAR-T細胞の活性化を用いて、グルコース要求量によって駆動されるように変更した（オンデマンド発現）。オンデマンドGLUT3発現を有するCAR-T細胞は、標的抗原刺激時の活性化T細胞核因子（NFAT）の核内転位によってGLUT3転写が駆動され、代謝適性を回復し、その結果、低グルコースレベルのGBMモデルの過酷なTMEにおいて、持続的抗腫瘍効果の増強と生存期間の延長をもたらした。まとめると、代謝適性を高めることによってTMEにおけるT細胞機能を回復させるという概念は、安定的な補充ではなく、オンデマンド方式で検討する必要がある。

[0102] （細胞集団）

本開示の一つの局面において、オンデマンドでグルコース取り込み能が強化されたT細胞などの免疫細胞を含む細胞集団が提供される。あるいは、グルコース取り込み能が強化されたT細胞であって、腫瘍微小環境条件の変化に応じて、前記T細胞においてグルコーストランスポーターの発現が調節される、T細胞を含む細胞集団が提供される。あるいは、グルコース取り込み

能が強化されたT細胞であって、腫瘍微小環境条件の変化に応じて、前記T細胞においてグルコーストランスポーターの発現が調節されるように改変されたT細胞を含む細胞集団が提供される。あるいは、腫瘍微小環境条件の変化を感知する腫瘍微小環境感知エレメントが作動可能に連結されたグルコーストランスポーターをコードする核酸配列を含むT細胞を含む細胞集団が提供される。このような細胞集団に含まれるT細胞の少なくとも一部において、グルコーストランスポーターを発現するように改変され、および／または増強したものにより、予想外に、CAR-T細胞などに応用される際にがんなどの疾患に対する効果が顕著に奏功することが示された（図19）。本開示の細胞集団は、グルコース取り込み能が強化されたものであることが有利である。また、本開示の細胞集団は、好ましくは、機能すべき場所、特に体内に導入されたのち、エフェクター機能を有するものである細胞を含むことが好ましい。そのような細胞としては、 T_{eff} が挙げられるがそれに限定されず、リンパ球系前駆細胞、 T_{nv} 、 T_{scm} 、 T_{emra} などでもよい。

[0103] 恒常的にグルコース取り込み能が強化されたT細胞を含む細胞集団では、エフェクターメモリータイプのT細胞への分化と疲弊が認められたが、グルコーストランスポーターの発現がオンデマンドで増強したものを含む細胞集団は、同等の細胞傷害活性はたもたれる一方、より長期の作用維持が期待されるメモリーフェノタイプの維持と疲弊耐性を誘導したという点で顕著である。本開示の細胞集団は、グルコース取り込み能が強化されたものを含む細胞集団であることが有利である。このようなオンデマンドでグルコース取り込み能がオンデマンドで強化された細胞を含む細胞集団は、CAR-T細胞、TCR-T細胞などに応用される際にがん、自己免疫疾患、アレルギー、感染症などの疾患に対する効果が顕著に奏される。

[0104] また、本開示の細胞集団は、CAR-T細胞などで使用した場合に、再発防止効果が顕著に高い効果が示された。加えて、恒常的にグルコースが増強されたT細胞において認められた、非腫瘍要因の毒性によるマウスの頓死が、オンデマンドでグルコーストランスポーターが発現または増強され、あるい

は腫瘍微小環境条件の変化に応じて、前記T細胞においてグルコーストランスポーターの発現が調節され、腫瘍微小環境条件の変化を感知する腫瘍微小環境感知エレメントが作動可能に連結されたグルコーストランスポーターをコードする核酸配列を含むものでは回避されていた。これらのことは予想外のことであり、理論に束縛されないが、その原因として過度なT細胞活性化や過度なグルコース取り込みに起因する宿主毒性の回避、疲弊の顕著な低下、栄養需要にみあった栄養供給、適度な活性化に起因する細胞死の抑制やメモリー化の誘導などの説明がされ得る。また、本開示の細胞を含む細胞集団は、好ましくは、機能すべき場所、特に体内に導入されたのち、エフェクター機能を有するものであることが好ましい。そのような細胞としては、 T_{eff} が挙げられるがそれに限定されず、 T_{eff} の前駆細胞、例えば、リンパ球系前駆細胞、 T_{nv} 、 T_{cm} 、 T_{emra} などでもよい。

[0105] 本開示の一実施形態において、上記のようなT細胞などの免疫細胞を含む細胞集団を含む細胞集団であって、該細胞集団は、本開示の特徴（例えば、オンデマンドでのGLUTの強化または発現、エフェクター機能、それらの両方を有するT細胞が細胞集団中約10%以上であることが有利である。一実施形態において、本開示の細胞集団は、本開示の特徴を有するT細胞の割合が、約5%以上、約10%以上、約15%以上、約20%以上、約25%以上、約30%以上、約35%以上、約40%以上、約45%以上、約50%以上、約55%以上、約60%以上、約65%以上、約70%以上、約75%以上、約80%以上、約85%以上、約90%以上、約95%以上、約97%以上、または約99%以上とすることができる。

[0106] 一つの実施形態では、本開示の細胞集団は、体内に導入されたときに、エフェクター機能を有する性質を有するT細胞を含む。

[0107] 一つの実施形態では、本開示の細胞集団は、前記T細胞がキメラ抗原受容体（CAR）を含む。

[0108] 一つの実施形態では、本開示の細胞集団において、T細胞は、グルコーストランスポーターを需要に応じて（オンデマンドで）発現するように改変さ

れ、および／またはグルコーストランスポーターの発現が需要に応じて（オンデマンドで）増強したものである。あるいは、本開示の細胞集団における細胞は、グルコース取り込み能が強化されたT細胞であって、腫瘍微小環境条件の変化に応じて、前記T細胞においてグルコーストランスポーターの発現が調節され、グルコース取り込み能が強化されたT細胞であって、腫瘍微小環境条件の変化に応じて、前記T細胞においてグルコーストランスポーターの発現が調節されるように改変され、腫瘍微小環境条件の変化を感知する腫瘍微小環境感知エレメントが作動可能に連結されたグルコーストランスポーターをコードする核酸配列を含むものであり得る。

[0109] 一つの実施形態では、本開示の細胞集団において、T細胞はエフェクター機能を有する。

あるいは、本開示の細胞集団におけるT細胞において、腫瘍微小環境条件は、TCR関連シグナルの伝達の度合いを含み、ある実施形態では、TCR関連シグナルは、TCRシグナルまたはその一部、およびTCRシグナルと他の抗原のキメラのシグナル（CARシグナルともいう）からなる群より選択される分子によって媒介される、好ましくは、TCR関連シグナルは、TCRシグナルドメイン含む分子によって媒介される。

[0110] あるいは、腫瘍微小環境条件の変化は、腫瘍抗原および／または共刺激リガンドの提示、ならびに／またはサイトカイン条件の変化を含み、好ましくは、TCR関連シグナルの伝達の度合いは、TCR刺激の度合いを含む。あるいは、別の実施形態では、TCR関連シグナルの伝達の度合いは、TCR刺激の度合い、TCR共刺激および液性因子からなる群より選択される少なくとも1つを含む。

[0111] 別の実施形態では、本開示の細胞集団における細胞において、TCR関連シグナルの伝達の度合いは、TCR刺激の度合いと、TCR共刺激および液性因子からなる群より選択される少なくとも1つとを含む。一つの実施形態では、TCR関連シグナルの伝達の度合いは、TCR刺激の度合い、TCR共刺激および液性因子を含む。好ましくは、TCR刺激は、T細胞の活性化

に伴い、核内移行する、NFAT、NF- κ B、およびSTAT転写因子ファミリーからなる群より選択される。あるいは、腫瘍微小環境条件は、酸素濃度の度合いを含む。

[0112] 別の実施形態では、本開示の腫瘍微小環境条件の変化を感知する腫瘍微小環境感知エレメントが作動可能に連結されたグルコーストランスポーターをコードする核酸配列を含むT細胞を含む細胞集団において、各々のT細胞に関して腫瘍微小環境感知エレメントは、(i) 腫瘍微小環境条件の変化に応じて活性化する誘導活性化モチーフ、(ii) 前記腫瘍微小環境条件の変化に応じて不活性化する前記グルコーストランスポーターの分解因子をコードする核酸配列を含む。ここで腫瘍微小環境感知エレメントは、好ましくは、(i) T細胞の活性化に反応して核内に移行する核内移行因子が結合する誘導活性化モチーフ、(ii) 酸素濃度の低下に反応して核内に移行する核内移行因子が結合する核内移行結合誘導活性化モチーフ、(iii) 前記酸素濃度の低下に反応してグルコーストランスポーターを分解する活性が不活性化されるグルコーストランスポーター分解酵素をコードする核酸配列を含む。

[0113] 別の実施形態では、本開示の細胞集団におけるT細胞に関して、グルコーストランスポーターをコードする核酸配列は、腫瘍微小環境条件の変化に応じて活性化する誘導活性化モチーフおよび／または前記腫瘍微小環境条件の変化に応じて不活性化する前記グルコーストランスポーターの分解因子をコードする核酸配列に作動可能に連結されたコンストラクトを含む。ある実施形態では、グルコーストランスポーターをコードする核酸配列は、T細胞の活性化に反応して核内に移行する核内移行因子が結合する核内移行結合誘導活性化モチーフに作動可能に連結されたコンストラクトを含む。好ましい実施形態では、核内移行因子は、NFAT、NF- κ B、およびSTAT転写因子ファミリー（例えば、TAT1-4、STAT5A、STAT5BおよびSTAT5等）からなる群より選択され、核内移行結合誘導活性化モチーフは、NFAT結合ドメイン、 κ Bモチーフ（GGGACTTTCC）（配

列番号1) およびSTAT結合配列(TTCNNNGAA)、またはそれらの改変配列からなる群より選択される。好ましい実施形態では、核内移行因子と前記核内移行結合誘導活性化モチーフの組合せは、(1) NFATとNFAT結合ドメインとの組合せ、(2) NF- κ Bと κ Bモチーフ(GGGACTTTCC(配列番号1)の組合せ、または(3) STAT転写因子ファミリーとSTAT結合配列(TTCNNNGAA)の組合せを含む。

[0114] 別の実施形態では、本開示の細胞集団におけるT細胞に関して、グルコーストランスポーターをコードする核酸配列が、酸素濃度の低下に反応して核内に移行する核内移行因子が結合する核内移行結合誘導活性化モチーフに作動可能に連結されたコンストラクトを含む。好ましくは、核内移行因子は、HIF-1からなる群より選択され、核内移行結合誘導活性化モチーフは、HIF-REからなる群より選択され、あるいは、核内移行因子と核内移行結合誘導活性化モチーフの組合せは、(1) HIF-1とHIF-REの組合せ、からなる群より選択される。

[0115] 別の実施形態では、本開示の細胞集団におけるT細胞に関して、グルコーストランスポーターをコードする核酸配列が、酸素濃度の低下に反応して前記グルコーストランスポーターを分解する活性が不活性化される因子をコードする核酸配列に作動可能に連結されたコンストラクトを含み、好ましくは、不活性化される因子は、酸素依存的分解因子(ODD)からなる群より選択される。

[0116] 別の実施形態では、本開示の細胞集団におけるT細胞に関して、T細胞はエフェクター機能を有し、T細胞はエフェクターT細胞(T_{eff})の前駆細胞を含み、あるいはからなり得る。ここで、エフェクターT細胞の前駆細胞は、メモリー機能が延長され、および／またはメモリーT細胞の表現型が維持される。あるいは、エフェクターT細胞が活性化されまたは活性が維持され、および前記エフェクターT細胞の前駆細胞は、メモリー機能が延長されまたはメモリーT細胞の表現型が維持される。

[0117] 別の実施形態では、本開示の細胞集団におけるT細胞に関して、発現およ

び／または増強は、腫瘍環境特異的に達成される。

[0118] 一つの実施形態では、本開示の細前記細胞集団は、 T_{eff} 、および／または T_{eff} の前駆細胞を含む。好ましくは、前記細胞集団（または T_{eff} の前駆細胞）は、リンパ球系前駆細胞、 T_{nv} 、 T_{scm} 、 T_{cm} 、 T_{emr} などの少なくとも1種の細胞を含む。

[0119] 一つの実施形態では、本開示の細胞集団において、前記CARは前記T細胞に発現されたものである。

[0120] 一つの実施形態では、本開示の細胞集団において、グルコーストランスポーターが、GLUT1、GLUT2、GLUT3、およびGLUT4を含み、好ましくは、GLUT3である。

[0121] 一つの実施形態では、本開示の細胞集団において、T細胞はヒトT細胞である。

[0122] 一つの実施形態では、本開示の細胞集団は、医薬または医薬組成物として提供される。その用途は、がんの予防または治療のため、がんの治癒のため、がんの転移予防または再発予防のためのものであり得る。特定の実施形態では、本開示の細胞集団は、再発しないようにがんを予防または治療するためのものであり得る。

[0123] <グルコーストランスポーター>

がん細胞は、自らの細胞増殖に有利になるよう代謝系をリプログラミングして、酸素の存在下でもATPの産生の効率の低い解糖系を積極的に利用し、グルコースの取り込みと乳酸産生を高めている（Warburg効果）。そのため、がん細胞が大量にグルコースを消費して枯渇させるため、グルコースをエネルギー源として必要とする T_{eff} 型の腫瘍特異的T細胞は、腫瘍に浸潤するとTCRにシグナルを受けても、細胞の Ca^{2+} 濃度が低下し、飢餓・疲弊してしまう。

[0124] したがって、本開示の一実施形態において、好気性解糖を促進し、グルコースが枯渇した腫瘍微小環境（TME）における免疫細胞の競合性および／または適合性を高めるために、グルコーストランスポーターを発現するよう

に遺伝子工学的に操作されたT細胞および細胞集団が提供される。

[0125] 一実施形態において、グルコーストランスポーターとしては、GLUT1、GLUT2、GLUT3、およびGLUT4を挙げることができ、中でもグルコースに高親和性のグルコーストランスポーターは、GLUT3である。したがって、好ましい実施形態において、本開示の細胞において利用されるグルコーストランスポーターはGLUT3である。

[0126] GLUT3は、ネズミの脳で最初に同定され、当初は神経グルコーストランスポーターとして定義されていた。その後、GLUT3は、運動するために必要なエネルギーを確保するネズミの精子や、着床後の発達に重要な胚盤胞など、グルコースを必要とする他の細胞でも発現することが示された。さらに、GLUT3はリンパ球、単球、マクロファージ、血小板などの免疫細胞で発現しており、通常は細胞内小胞に貯蔵され、活性化すると細胞表面に移動して代謝のスイッチを維持する。さらに最近では、T細胞、特にCD8⁺T細胞は、GLUT3が分化および活性化時に高発現するため、グルコースの取り込みにGLUT1だけでなく、GLUT3にも依存していることが示唆されている。

[0127] 一実施形態において、本開示のT細胞および細胞集団に含まれるT細胞は、グルコーストランスポーターをオンデマンドで発現するように改変され、および／またはグルコーストランスポーターの発現がオンデマンドで増強したものとすることができる。恒常的にグルコース取り込み能が強化されたT細胞では、エフェクターメモリータイプのT細胞への分化と疲弊が認められ、無～低グルコース条件下で活性化した際には顕著なT細胞死が誘導されたが、グルコーストランスポーターの発現がオンデマンドで増強したものは、同等の細胞傷害活性はたもたれる一方、無～低グルコース条件下でのT細胞死を回避し、より長期の作用維持が期待されるメモリーフェノタイプの維持と疲弊耐性を誘導したという点で顕著である。

[0128] T細胞においてGLUT3などのグルコーストランスポーターを活性化させると、グルコースの取り込みにより、細胞傷害活性、サイトカイン産生能

などエフェクター機能の強化を認めるが、それと同時に、長期間活性化させると、短期作用型のエフェクターメモリータイプへの分化やT細胞疲弊が顕著に誘導される。そこで、本開示の一実施形態において、T細胞のグルコースの需要が高まる活性化や低酸素環境である腫瘍環境への侵入を機にグルコース誘導体誘導される、NFAT誘導グルコース誘導発現システムやHIF1αの機序を応用した低酸素誘導グルコース誘導発現システム（例えば、図12）を用いることができる。これにより、腫瘍環境特異的に、需要の高まりに合わせた一過性の発現を実現することができる。したがって、本開示の細胞は、細胞傷害活性が保たれたまま、メモリーフェノタイプT細胞の維持や、疲弊の回避が可能となる。

[0129] 本開示の一実施形態において、本開示のT細胞または細胞集団に含まれるT細胞は、エフェクター細胞を含み得る。

[0130] 本開示の一実施形態において、本開示のT細胞および細胞集団に含まれるT細胞は、ヒトT細胞であることが有利であり得る。

[0131] <キメラ抗原受容体（CAR）>

本開示の他の局面において、グルコース取り込み能が強化されたT細胞またはこのような細胞を含む細胞集団であって、該T細胞がキメラ抗原受容体（CAR）を含み、該T細胞が、グルコーストランスポーターをオンデマンドで発現するように改変され、および／またはグルコーストランスポーターの発現がオンデマンドで増強した、T細胞、または細胞集団が提供される。本開示のT細胞または細胞集団に含まれるT細胞が含むCARは、CARとしての機能を発揮し得る限り、タンパク質として含んでいてもよく、あるいはCARを発現する核酸分子を含むこともできる。1つの実施形態において、本開示のCARは、T細胞に発現されたものとすることができる。

[0132] 本明細書に開示されるCARは、抗原に結合することが可能な少なくとも1つの細胞外ドメイン、少なくとも1つの膜貫通ドメイン、および少なくとも1つの細胞内ドメインを含む。

[0133] キメラ抗原受容体（CAR）は、膜貫通ドメインを介してT細胞シグナル

伝達ドメインに連結された抗体の抗原結合性ドメイン（例えば、単鎖可変フラグメント（s c F v））を含有する、人工的に構築されたハイブリッドタンパク質またはポリペプチドである。CARの特徴として、MHCによらず、モノクローナル抗体の抗原結合特性を活用して、選択された標的に向かってT細胞の特異性および反応性を再指向させることが挙げられる。MHCによらない抗原認識は、CARを発現するT細胞または細胞集団におけるT細胞に、抗原プロセッシングと無関係に抗原を認識する能力を与えることができ、腫瘍の免疫エスケープを回避することができる。

[0134] CARの細胞内T細胞シグナル伝達ドメインには、例えば、T細胞受容体シグナル伝達ドメイン、T細胞共刺激シグナル伝達ドメイン、またはその両方が含まれ得る。T細胞受容体シグナル伝達ドメインとは、T細胞受容体の細胞内ドメイン、例えば、CD3ゼータタンパク質の細胞内部分などを含む、CARの一部を指す。共刺激シグナル伝達ドメインとは、抗原に対するリンパ球の効率的な応答に必要とされる、抗原受容体またはそれらのリガンド以外の細胞表面分子である共刺激分子の細胞内ドメインを含む、CARの一部を指す。

[0135] <T細胞レセプター（TCR）>

本開示の他の局面において、グルコース取り込み能が強化されたT細胞またはこのような細胞を含む細胞集団であって、該T細胞がT細胞レセプター（TCR）を含み、該T細胞が、オンデマンドでグルコーストランスポーターを発現するように改変され、および／またはオンデマンドでグルコーストランスポーターの発現が増強した、T細胞、または細胞集団が提供される。本開示のT細胞または細胞集団に含まれるT細胞が含むTCRは、TCRとしての機能を発揮し得る限り、タンパク質として含んでいてもよく、あるいはTCRを発現する核酸分子を含むこともできる。代表的な実施形態において、本開示のTCRは、T細胞に発現されたものとすることができる。

[0136] 本明細書においてTCRは、2つのTCRポリペプチド鎖からなるヘテロダイマー受容体分子であり、通常のT細胞が発現する $\alpha\beta$ 型TCRと特殊な

機能をもつ $\gamma\delta$ 型TCRが存在する。 α および β 鎖TCR分子は複数のCD3分子(CD3 ζ 鎖、CD3 ϵ 鎖、CD3 γ 鎖、CD3 δ 鎖)と複合体を形成し、抗原認識後の細胞内シグナルを伝達し、様々な免疫応答を開始させる。ウイルス感染に伴い細胞内で増殖したウイルス抗原やがん細胞由来のがん抗原などの内因性抗原は、MHCクラスI分子上に抗原ペプチドとして提示される。また、外来微生物由来の抗原はエンドサイトーシスにより抗原提示細胞に取り込まれ、プロセッシングを受けたのちにMHCクラスII分子上に提示される。これらの抗原は、それぞれCD8+ T細胞あるいはCD4+ T細胞の発現するTCRにより認識される。TCR分子を介した刺激には、CD28、ICOS、OX40分子などの共刺激分子が重要であることも知られている。 $\alpha\beta$ 型TCRについてみると、 α および β の各々の遺伝子産物は、ユニークな組み合わせにより、特異性を発現させることができる。TCRは適宜改変することができ、T細胞受容体シグナル伝達ドメイン、T細胞共刺激シグナル伝達ドメイン、またはその両方が含まれ得る。T細胞受容体シグナル伝達ドメインとは、T細胞受容体の細胞内ドメイン、例えば、CD3ゼータタンパク質の細胞内部分などを含む。共刺激シグナル伝達ドメインとは、抗原に対するリンパ球の効率的な応答に必要とされる、抗原受容体またはそれらのリガンド以外の細胞表面分子である共刺激分子の細胞内ドメインを含む。

[0137] (細胞外ドメイン)

一実施形態では、本明細書に開示されるT細胞または細胞集団に含まれるT細胞において使用されるCARは、抗原結合性ドメインまたはその部分を含む。抗原結合性ドメインまたはその部分は、標的細胞の表面のリガンドの型および数に応じて適宜選択することができ、例えば、抗原結合性ドメインは、特定の疾患状態と関連する標的細胞上の細胞表面マーカーとして作用するリガンドを認識するように選択され得る。したがって、本開示のCAR中の抗原結合性ドメインに対するリガンドとして作用し得る細胞表面マーカーの例として、組織特異的マーカー、細胞腫特異的マーカー、ウイルス、細菌

および寄生生物感染、自己免疫疾患、ならびに癌細胞と関連するものを挙げることができる。

[0138] CARの細胞外結合ドメインは、マウスまたはヒト化モノクローナル抗体の可変重および軽領域を融合して得られる単鎖可変フラグメント (s c F v) で構成され得る。あるいは、(抗体からではなく、例えばF a bライブラリから得られた) F a bに由来するs c F vが使用されてもよい。s c F vは、膜貫通ドメインに、次いで細胞内シグナル伝達ドメインに融合させることができる。

[0139] 一実施形態において、本開示のCARの抗原結合性ドメイン部分は、(1) MHC c l a s s I、およびMHC c l a s s IIなどを含むアロ抗原；(2) TSHR (t h y r o i d s t i m u l a t i n g h o r m o n e r e c e p t o r)、DSG3 (d e s m o g l e i n 3)、およびCytokeratin 8などを含む細胞外自己抗原；(3) Gliadin、およびAra h 2などを含む外来抗原；(4) CD4、CD8、CD19、BCMA、CD68、MSLN (m e s o t h e l i n)、およびMadCam1 (m u c o s a l v a s c u l a r a d d r e s s i n c e l l a d h e s i o n m o l e c u l e 1) などを含むターゲティング分子を含む抗原を標的化することができるが、本開示のCARの抗原結合性ドメイン部分が標的化し得る抗原はこれらに限定されない。

[0140] 一実施形態において、標的化される所望の抗原に応じて、本開示のCARは、所望の抗原標的に対して特異的な抗原結合ドメインを含むように改変することができる。例えば、CD19が標的抗原である場合、CD19などのがん抗原に対する抗体が、CAR中への抗原結合ドメインとして使用され得る。がん抗原の限定的ではない例としては、CD19、CD20、CD30、CD33、CD38、CD133、BCMA、TEM8、EpCAM、ROR1、葉酸レセプター、CD70、MAGE-1、MAGE-2、MAGE-3、MAGE-A-10、MAGE-C2、MAGE-A12、CEA、チロシナーゼ、ミドキン・BAGE、CASP-8、Pカテニン、CA-

125、CDK-1、ESO-1、gp75、MART-1、MUC-1、MUM-1、p53、PAP、PSA、PSMA、ras、trp-1、HER-2、TRP-1、TRP-2、IL13Ralpha、IL13Ralpha2、AIM-2、AIM-3、NY-ESO-1、C9orf112、SART1、SART2、SART3、BRAP、RTN4、GLEA2、TNKS2、KIAA0376、ING4、HSPH1、C13orf24、RBPSUH、C6orf153、NKTR、NSEP1、U2AF1L、CYNL2、TPR、GOLGA、BMI1、COX-2、EGFRvIII、EZH2、LICAM、Livin、LivinP、MRP-3、Nestin、OLIG2、ART1、ART4、Bサイクリング、Grill、Cav-1、カテプシンB、CD74、E-Cadherin、EphA2/Eck、Fra-1/Fosl1、GAGE-1、ガングリオシド/GD2、GnT-V、p1、6-N、Ki67、Ku70/80、PROX1、PSCA、SOX10、SOX11、Survivin、phCG、WT1、メソセリン、メランA、NY-BR-1、NY-CO-58、MN(gp250)、テロメラーゼ、SSX-2、PRAME、PLK1、VEGF-A、VEGFR2、およびTie-2などを挙げることができる。いくつかの実施形態において、本明細書に開示されるエフェクター細胞は、1つ以上の抗原を認識するために、1つ以上のCARを発現するように操作される。

[0141] (膜貫通ドメイン)

本明細書に開示されるT細胞または細胞集団に含まれるT細胞において使用されるCARは、細胞外ドメインに融合された1または複数の膜貫通ドメインを含むことができる。

[0142] 一実施形態では、細胞外ドメインに由来するリンカードメインが膜貫通ドメインに連結していてもよい。膜貫通ドメインは、天然または合成のものであってもよく、天然の膜貫通ドメインとしては、任意の膜結合型または膜貫通タンパク質に由来し得る。本開示において特に使用される膜貫通領域は、

T細胞受容体のアルファ、ベータまたはゼータ鎖、CD28、CD3イプシロン、CD45、CD4、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137、CD154、CD271、TNFRSF19などに由来し得る。

[0143] 一実施形態において、本明細書に開示されるエフェクターT細胞において使用されるCARは、細胞外ドメインと膜貫通ドメインとの間、または細胞内ドメインと膜貫通ドメインとの間に、スペーサドメインを配置することもできる。スペーサドメインは、好ましくは、抗原とのCARの結合を促進し、細胞中へのシグナル伝達を増強する配列を有することができる。

[0144] (細胞内ドメイン)

CARの細胞質シグナル伝達ドメイン（または細胞内シグナル伝達ドメイン）は、CARが発現している免疫細胞の正常なエフェクター機能の少なくとも1つの活性化に関与する。細胞内シグナル伝達ドメインは、エフェクター機能シグナルを伝達し、そして、CARを発現する細胞に、特殊化された機能を実施するように指示する、タンパク質の部分を目指す。細胞内シグナル伝達ドメインは、免疫細胞エフェクター機能を惹起または遮断するシグナルを伝達するのに十分な所定のタンパク質の細胞内シグナル伝達ドメインの任意の完全な、変異型の、または切断型の部分を含み得る。

[0145] 一実施形態において、CARに用いられる細胞内シグナル伝達ドメインの例としては、抗原受容体結合後のシグナル伝達を惹起する、T細胞受容体（TCR）および共受容体の細胞質シグナル伝達配列が挙げられる。

[0146] (拒絶反応に関連するアロ抗原、アレルゲンおよびハプテン)

本明細書に開示されるT細胞または細胞集団に含まれるT細胞において使用されるCARは、拒絶反応に関連するアロ抗原、アレルゲンおよびハプテンに関連するものを挙げることができる。

[0147] <T細胞または細胞集団に含まれるT細胞の医薬用途>

本開示の一局面において、グルコース取り込み能が強化されたT細胞またはそのようなT細胞を含む細胞集団を含む医薬組成物であって、該T細胞が

、グルコーストランスポーターをオンデマンドで発現するように改変され、および／またはグルコーストランスポーターの発現がオンデマンドで増強した、組成物が提供される。本開示の他の局面において、グルコース取り込み能が強化されたT細胞またはそのようなT細胞を含む細胞集団を含む医薬組成物であって、該T細胞がキメラ抗原受容体（CAR）またはT細胞受容体（TCR）等を含み、該T細胞が、グルコーストランスポーターをオンデマンドで発現するように改変され、および／またはグルコーストランスポーターの発現がオンデマンドで増強した、組成物が提供される。本開示の一実施形態において、本開示におけるT細胞または細胞集団に含まれるT細胞は、上述したエフェクターT細胞の1または複数の特徴を備えることができる。

[0148] 本開示の細胞、細胞集団等は、免疫療法において使用可能である。免疫療法は、抗原性を有する病変が生じる疾患（例えば、がん、自己免疫疾患、アレルギー、感染症など）や、特定の抗原への異常な免疫応答が発症や病態の進展に関与する疾患に対して有効と考えられる。例えば、本開示の細胞等は、自己免疫疾患、アレルギー疾患、または移植の際の移植片対宿主病（GVHD）、拒絶反応もしくは生着不全の処置、治療または予防に用いることができる。自己免疫疾患としては、例えば、関節リウマチ（RA）、シェーグレン症候群、全身性エリテマトーデス（SLE）、抗リン脂質症候群、多発性筋炎・皮膚筋炎、全身性硬化症、混合結合組織病、血管炎症候群、1型糖尿病、グレーブス病、橋本病、特発性アジソン病、自己免疫性肝炎、グッドパスチャー症候群、糸球体腎炎、自己免疫性溶血性貧血（AIHA）、自己免疫性血小板減少性紫斑病、自己免疫性好中球減少症、重症筋無力症、天疱瘡、白斑、特発性無精子症、などが挙げられるが、これらに限定されない。アレルギー疾患としては、花粉症、アレルギー性鼻炎、気管支喘息、アトピー性皮膚炎などが挙げられるが、これらに限定されない。その他、特定の抗原への異常な免疫応答が発症や病態の進展に関与する疾患に対して、本開示の細胞、細胞集団等による処置や予防を用いることが可能である。

- [0149] 特定の実施形態では、本開示は、このような免疫療法を提供し、この免疫療法は、TCR-T療法またはCAR-T療法を含む。本明細書において、「TCR-T療法」とは、T細胞受容体（TCR）を改変することを利用した細胞療法であって、例えば、がん治療に用いられるものを指す。本明細書において、「CAR-T療法」とは、キメラ抗原受容体（CAR）（例えば、腫瘍免疫回避機構を克服するための遺伝子操作を加えたもの）を患者T細胞に遺伝子導入し、そのT細胞を体外で増幅培養した後に患者に輸注するという遺伝子・細胞治療法をいう。
- [0150] 本開示の細胞、細胞集団等は、適宜他のがん治療と組み合わせ得、併用療法として用いられ得る。代表的には、1または複数のさらなる薬剤と組み合わせて投与され得る。あるいは、併用療法は、放射線治療との組み合わせであってもよい。1または複数のさらなる薬剤は、任意の化学療法薬であってもよく、または、免疫チェックポイント阻害剤を含んでもよい。あるいは、併用療法において使用される他のがん治療としては、他のがん免疫療法（例えば、免疫チェックポイント阻害剤）、温熱療法、外科的手順などが挙げられるが、これらに限定されるものではない。
- [0151] また一局面において、本開示のT細胞または細胞集団を含む治療薬であって、対象の疾患に関して診断を行い、該診断に基づいて前記T細胞または前記細胞集団に含まれる適切なCARまたはTCR等を選択する、治療薬が提供される。
- [0152] 別の態様では、本開示は、本明細書に記載の免疫細胞（例えばエフェクターT細胞などのT細胞）またはそのような細胞を含む細胞集団のいずれか及び薬学的に許容される担体を含む医薬組成物を提供する。免疫細胞がCARまたはTCR等のポリペプチドを発現する場合、医薬組成物は、治療抗体やFc融合タンパク質などのFc含有治療薬を更に含んでもよい。Fc含有治療薬は、腫瘍抗原、病原体抗原、または自己抗原に特異的な免疫細胞などの標的抗原に結合することができる。病原体抗原は、細菌抗原、ウイルス抗原、または真菌抗原であってもよい。

- [0153] 一実施形態において、Fc含有治療薬は、アダリムマブ、アドトラスツズマブエムタンシン、アレムツズマブ、バシリキシマブ、ベバシズマブ、ベリムマブ、ブレンツキシマブ、カナキヌマブ、セツキシマブ、セルトリズマブ、ダクリズマブ、デノスマブ、ジヌツキシマブ、エクリズマブ、エファリズマブ、エプラツズマブ、ゲムツズマブ、ゴリムマブ、hu14.18K322A、イブリツモマブ、インフリキシマブ、イピリムマブ、ラベツズマブ、ムロモナブ、ナタリズマブ、オビヌツズマブ、オフアツムマブ、オマリズマブ、パリビズマブ、パニツムマブ、ペルツズマブ、ラムシルマブ、ラニビズマブ、リツキシマブ、トシリズマブ、トラスツズマブ、トシツモマブ、ウスデキヌマブ、モガムリズマブ、及びベドリズマブ、を含むがこれらに限定されない治療抗体であってもよい。
- [0154] さらに、本開示は、(i) 本明細書に記載のいずれかのT細胞またはそのようなT細胞を含む細胞集団および薬学的に許容される担体を含む第1の医薬組成物、ならびに(ii) 本明細書に記載のFc含有治療薬及び薬学的に許容される担体、を含むキットを提供する。
- [0155] 本開示の他の局面において、対象における標的抗原を発現する細胞を阻害する（例えば、このような細胞の数を減少させる、細胞増殖を阻害する、及び／または細胞の活性を抑制する）ための方法を提供し、本開示の細胞、細胞集団、および／または医薬組成物を、対象にそれを投与することを含む。一実施形態において、標的抗原を発現する細胞のうちの少なくとも一部は、低グルコース環境に置かれていてもよい。
- [0156] 一実施形態において、本開示の方法によって治療される対象は、がん、例えば、癌腫、リンパ腫、肉腫、芽細胞腫、及び白血病を患うヒト患者であってもよい。例示的な標的となるがんとしては、B細胞由来の癌、乳癌、胃癌、神経芽細胞腫、骨肉腫、肺癌、皮膚癌、前立腺癌、結腸癌、腎細胞癌、卵巣癌、横紋筋肉腫、白血病、中皮腫、膵臓癌、頭頸部癌、網膜芽細胞腫、神経膠腫、膠芽細胞腫、肝臓癌、及び甲状腺癌などが挙げられるがこれらに限定されない。例示的なB細胞由来の癌は、B細胞系急性リンパ芽球性白血病

、B細胞性慢性リンパ性白血病、及びB細胞性非ホジキンリンパ腫などを挙げることができる。

[0157] 癌または感染性障害などの標的疾患または障害を治療することに加えて、目的の医学的治療用の医薬品を製造するための、本開示のT細胞または細胞集団の使用もまた本開示の範囲内である。

[0158] 一実施形態において、本開示のキメラ抗原受容体（CAR）またはT細胞受容体（TCR）等を含むT細胞またはそのようなT細胞を含む細胞集団を含む医薬組成物は細胞治療に用いることができる。細胞治療において、本開示のキメラ抗原受容体（CAR）またはT細胞受容体（TCR）等を含むT細胞は、医薬組成物として、または本開示のCARを発現する治療的に有効な細胞集団の製剤として、それを必要としている対象に注入され得る。対象における注入されたT細胞またはそのようなT細胞を含む細胞集団は、その対象の癌または感染性障害などの標的疾患または障害を治療することができ得る。対象は、その細胞が取得された同じ対象であってもよい（自家細胞治療）、またはその細胞が、同じ種の別の対象由来であってもよい（同種細胞治療）。

[0159] 一実施形態において、本開示のCARまたはTCR等を含むT細胞またはそのようなT細胞を含む細胞集団は、当業者に公知の技術を用いて、対象への投与のために製剤化され得る。一実施形態において、本開示のCARまたはTCR等を含む治療的に有効なT細胞またはそのようなT細胞を含む細胞集団を含む製剤は、薬学的に許容される賦形剤（担体または希釈剤）を含み得る。製剤に含まれる賦形剤は、例えば、本開示のCARの抗原結合ドメインの性質に依存して、異なる目的をもつ。一般的に用いられる賦形剤の例には、非限定的に、以下：食塩水、緩衝食塩水、デキストロース、注射用水、グリセロール、エタノール、およびそれらの組合せ、安定化剤、可溶化剤および界面活性剤、緩衝剤および保存剤、等張化剤、増量剤、ならびに潤滑剤が挙げられる。

[0160] 本明細書において、遺伝子名およびその産物を表記する際には、通常の用

法とは異なり、すべて大文字で表記する場合には、遺伝子とタンパク質の両方を指すことがある。例えば、FOX P 3 遺伝子、FOX P 3 タンパク質と使い分けすることもあり、Fox P 3 と表記する場合には、当該遺伝子またはタンパク質の概念と実体の両方（全体）を指す。

[0161] 本開示のCARまたはTCR等を含む治療的に有効なT細胞またはそのようなT細胞を含む細胞集団を含む製剤は、当業者に公知の様式および技術を用いて、対象に投与され得る。例示的には、静脈内注射が挙げられるが、それに限定されない。他の様式には、非限定的に、腫瘍内、皮内、皮下、筋肉内、腹腔内、動脈内、髄内、心臓内、関節内（関節）、滑液嚢内（関節液区域）、頭蓋内、脊髄内、および髄腔内（髄液）などが挙げられる。

一つの実施形態では、本開示は、対象におけるがんの予防または治療のための医薬組成物として提供され、医薬組成物は、（A）前記対象におけるグルコース取り込み能またはそれに関連する指標の値を採取することと、（B）前記指標に応じて適切な発現特性を有する、グルコース取り込み能が強化されたT細胞または前記T細胞を含む細胞集団を選択することと、（C）前記グルコース取り込み能が強化されたT細胞または前記T細胞を含む細胞集団を適切な用法および用量で、前記対象に投与することとを特徴とし、前記T細胞がキメラ抗原受容体（CAR）を含む、医薬組成物として提供される。

[0162] 一つの実施形態では、グルコース取り込み能が強化されたT細胞は、グルコーストランスポーターを需要に応じて（オンデマンド）発現するように改変されておらず、グルコーストランスポーターの発現が需要に応じて（オンデマンド）増強していない T_{eff} と、グルコーストランスポーターを需要に応じて（オンデマンド）発現するように改変され、および／またはグルコーストランスポーターの発現が需要に応じて（オンデマンド）増強したものを含むとを含む。

[0163] 一つの実施形態ではグルコーストランスポーターがGLUT3である。

[0164] （一般技術）

本明細書において用いられる分子生物学的手法、生化学的手法、微生物学的手法は、当該分野において周知であり慣用されるものであり、例えば、Sambrook J. et al. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harborおよびその3rd Ed. (2001); Ausubel, F. M. (1987). *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Pub. Associates and Wiley-Interscience; Ausubel, F. M. (1989). *Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Pub. Associates and Wiley-Interscience; Innis, M. A. (1990). *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, Academic Press; Ausubel, F. M. (1992). *Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Pub. Associates; Ausubel, F. M. (1995). *Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Pub. Associates; Innis, M. A. et al. (1995). *PCR Strategies*, Academic Press; Ausubel, F. M. (1999). *Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of*

Methods from Current Protocols in Molecular Biology, Wiley, and annual updates; Sninsky, J. J. et al. (1999). PCR Applications: Protocols for Functional Genomics, Academic Press、別冊実験医学「遺伝子導入&発現解析実験法」羊土社、1997などに記載されており、これらは本明細書において関連する部分（全部であり得る）が参考として援用される。

- [0165] 人工的に合成した遺伝子を作製するためのDNA合成技術および核酸化学については、例えばGeneArt、GenScript、Integrated DNA Technologies (IDT)などの遺伝子合成やフラグメント合成サービスを用いることもでき、その他、例えば、Gait, M. J. (1985). Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach, IRL Press; Gait, M. J. (1990). Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach, IRL Press; Eckstein, F. (1991). Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach, IRL Press; Adams, R. L. et al. (1992). The Biochemistry of the Nucleic Acids, Chapman & Hall; Shabarova, Z. et al. (1994). Advanced Organic Chemistry of Nucleic Acids, Weinheim; Blackburn, G. M. et al. (1996). Nucleic Acids in Chemistry and Biology, Oxford University Press; Hermanson, G. T. (1996). Bioconjugate Techniques, Academic Pressなどに記

載されており、これらは本明細書において関連する部分が参考として援用される。

- [0166] 本明細書において「または」は、文章中に列挙されている事項の「少なくとも1つ以上」を採用できるときに使用される。「もしくは」も同様である。本明細書において「2つの値」の「範囲内」と明記した場合、その範囲には2つの値自体も含む。

本明細書において引用された、科学文献、特許、特許出願などの参考文献は、その全体が、各々具体的に記載されたのと同じ程度に本明細書において参考として援用される。

- [0167] 以上、本開示を、理解の容易のために好ましい実施形態を示して説明してきた。以下に、実施例に基づいて本開示を説明するが、上述の説明および以下の実施例は、例示の目的のみに提供され、本開示を限定する目的で提供したのではない。従って、本開示の範囲は、本明細書に具体的に記載された実施形態にも実施例にも限定されず、特許請求の範囲によってのみ限定される。

実施例

- [0168] 本実施例では、グルコース取り込み能が強化されたT細胞の各種機能を調べた。試薬類は具体的には実施例中に記載した製品を使用した。他メーカー（Sigma-Aldrich、和光純薬、ナカライ、R&D Systems、USCN Life Science INC等）の同等品でも代用可能である。

- [0169] （実施例1；GLUT3を発現したT細胞）

（方法および材料）

GLUT3 3C10-CARコンストラクトの作成とウイルスベクター作成 CD8 leader sequence-抗EGFRvIII単鎖可変領域（scFv）-CD8ヒンジ-CD8膜貫通部（TM）-CD28 intracellular domain（ICD）-4-1BB ICD-CD3ζ-P2A-Katushka2S構造をもつ、抗EGFR

v l l l CARバックボーンプラスミド (3C10 CAR-Katushka2S) へ、P2A sequenceを直上に配したSLC2A3配列 (GLUT3) を挿入し、3C10 CAR-GLUT3-Katushka2Sレンチウイルスベクターを構築した (図1)。レンチウイルスベクターを、パッケージングベクターであるpsPAX2 (Addgene #12260)、pMD2.G (Addgene #12259) とともに293T細胞にトランスフェクトし、その上清よりレンチウイルスを得た。これをT細胞を含むPBMCに遺伝子導入しCARとGLUT3を発現したT細胞を得た。

[0170] On-demand GLUT3発現3CAR コンストラクトの構築
NFAT誘導型 GLUT3-CAR

上記GLUT3 3C10-CARプラスミドに、8回繰り返しNFAT binding site、minimal promoter (minP)、SLC2A3 (GLUT3) 配列からなるNFAT inducible GLUT3コンストラクトを挿入し、NFAT誘導型GLUT3 CARプラスミドを構築した (NFAT i GLUT3 CAR: 図15、同レンチウイルスプラスミド; 図16参照)。このシステムでは、CARはEF1aプロモーターでdriveされ恒常的に発現し、GLUT3はCAR-T細胞の活性化に伴うNFATの核内移行を感知し発現する。

[0171] 低酸素誘導型 GLUT3-CAR

上記GLUT3 3C10-CARプラスミドに、xx回繰り返しHIF1a binding site、minP、SLC2A3 (GLUT3) 配列からなるHIF inducible GLUT3 コンストラクトを挿入し、低酸素誘導型GLUT3 CARプラスミドを構築する (図15)。また、別の方法として、3C10-CAR下に2Aシーケンスを配し、GLUT3とHIF-1 α 酸素依存的分解ドメイン (oxygen-dependent degradation domain: ODD) の結合体を挿入する。両者ともCARはEF1aプロモーターでdriveされ恒常的

に発現し、GLUT3は、前者では、CAR-T細胞の活性化に伴うNFATの核内移行を感知し、後者では、通常酸素下ではGLUT3は分解され続けるが、低酸素下では、ODDによるGLUT3の分解が抑制し、結果として発現が誘導される。

[0172] 遺伝子導入

健常者末梢血単核球をヘパリン加全血よりフィコール法にて分離（Ficoll-Paque PLUS、GE Healthcare）後、抗CD3／28ビーズ（Dynabeads T-Activator CD3／CD28、Veritas）にて刺激し、刺激後day1にMOI＝4にて、CAR遺伝子導入を行った。IL-2 30U／mlの存在下に培養を行い、day8～12に冷凍保存、もしくは直接各評価に供した。

[0173] 免疫染色

1×10^6 細胞数のGLUT3⁺ CAR-T細胞を、4％ PFAで固定処理しメタノールで透過処理をおこなった。3％ BSAで1時間のブロッキングを行い、抗GLUT3抗体（ab15311）で2時間インキュベートした。0.05％ PBSTで洗浄し、抗ウサギIgG抗体（Alexa fluor 488）と1時間インキュベートした。0.05％ PBSTで洗浄し、DAPIで核染色を行いた。染色後の細胞をCytospin（Thermo fisher scientific）でスライドグラス上に接着させVECTASHIELD（VECTOR LABORATORIES）封入し、Keyence XZ-800で観察をおこなった。

[0174] フェノタイプ解析（FCM）

FCM解析に用いた抗体を表1に示す。

[0175]

[表1]

抗体	企業	製品番号
Anti-human CD3-BV786(SK7)	BD Biosciences	563800
Anti-human CD4-AF700(SK3)	BD Biosciences	566909
Anti-human CD4-BUV805(SK3)	BD Biosciences	612888
Anti-human CD45RA-PerCP-Cy5.5(HI100)	BD Biosciences	563429
Anti-human CD27-BV711(O323)	Biolegend	302834
Anti-human CCR7-R718(2-L1-A)	BD Biosciences	751859
Anti-human CD279(PD-1)-BV421(NIH4)	BD Biosciences	564323
Anti-human LAG3-FITC(17B4)	Enzo	ALX-804-806F-C100
Anti-human TIM3-BV605(F38-2E2)	Biolegend	345018
Anti-human CD25-PE(M-A251)	BD Biosciences	560989
Anti-human CCR4-PeCy7(L291H4)	Biolegend	359410
Anti-human CD183(CXCR3)-APC(G025H7)	Biolegend	353708
Anti-human IFN γ -AF488(4S.B3)	Biolegend	502515
Anti-human TNF α -APC(MAb11)	Invitrogen	17-7349-82
Anti-human IL2-PE/Cy7(MQ1-17H12)	Invitrogen	25-7029-42
Fixable Viability Dye eFluor 780	Invitrogen	65-0865-14

[0176] 細胞の洗浄は4% FBS-PBSを用いた。死細胞染色と表面染色を行い、洗浄後、FACS Symphony A3を用いてデータを取得し、FACS Diva (v8.0.1、BD Biosciences) および FlowJo (TreeStar) ソフトウェアを用いて解析した。

[0177] In vitro CAR-T細胞生存・機能解析 (図21)

各CAR-T細胞の長期生存・メモリー化、機能の維持を評価する。CAR-T細胞と刺激因子（陰性コントロールとしてのメディウム、EGFRvIII刺激ピーズ、U87d細胞株）を1:1にて刺激する。24時間後刺激因子を磁器ピーズ、もしくは、ソーティングで除去し、CAR-T細胞を0 mM、0.5 mM、10 mMに分け継続培養する。刺激前、刺激後 day 1、day 3、day 7において細胞数カウントともに、細胞生存・細胞死を評価するAnnexin V/7AAD、CD27、CCR4、CD45RA等のメモリーフェノタイプ、PD-1、TIM3、LAG3等の抑制因子（まで図23-28）、その他（転写因子、活性化・セネッセンスマーカー）

を解析した。また、各検体からRNAを抽出し、RNA sequence など詳細解析も行う。一連の解析後、day 7 細胞の一部を再度同じ群にて刺激し、繰り返し刺激後の細胞生存・機能解析を同様に行う。

[0178] サイトカイン解析 (FCM) CAR-T細胞 1×10^5 細胞と EGFRvIII 発現 U87 細胞株 (U87Δ) 5×10^5 細胞を 1 ml の培地で 12 時間共培養を行った後、 $5 \mu\text{g/ml}$ Monensin (BD 554724 BD Bioscience) 存在下で 6 時間培養し、CAR-T細胞に刺激をおこなった。培地はグルコース不含 RPMI 1640 (Wako) に 10% 透析済 FBS (Cytiva) を添加し、グルコース溶液 (Gibco) でグルコース濃度が 10 mM と 0.5 mM に調整したものを使用した。Fixation/Permeabilization Diluent (Invitrogen) で固定処理を行い、細胞内サイトカインを表 1 に示す抗体で染色し、LSR Fortessa X20 を用いてデータを取得し、FACS Diva (v8.0.1, BD Biosciences) および FlowJo (TreeStar) ソフトウェアを用いて解析した。

[0179] 細胞傷害活性解析

96 ウェルプレートに、1 ウェルあたり 2×10^5 細胞の標的細胞 (Luciferase 発現 U87Δ 細胞) を播種し、CAR-T細胞と、E:T 比として 3:1、1:1、0.3:1、および 0.1:1 にて共培養を行った。16 時間後、VivoGlo Luciferin (Promega) で生細胞を発光させ、Cytation (Promega) を用いて、ルシフェラーゼ活性を測定し、細胞傷害活性を算出した。

[0180] 代謝解析

細胞の代謝能を、XF24 細胞フラックスアナライザー (Bioscience) および XF 解糖ストレスキット (Agilent Technologies) を用いて、製品プロトコルに従い測定した。解析日の前日に、解析用 24 ウェル平底プレートのポリDリジン (0.1 mg/ml) によるコーティングと、センサーカートリッジの水和を CO_2 free インキュ

ベーター内で行った。解析日に、解析培地（Seahorse XF RPMI 培地、L-グルタミン 2 mM）を用いて解析用の細胞を洗浄後、ポリ D リジンでコーティングした解析用プレートに 2×10^5 細胞数ずつ播種し、 CO_2 free 37°C で 60 分間静置した。オリゴマイシンを最終濃度 20 μM 、FCCP を最終濃度 10 μM となるように、センサーカートリッジポートへグルコースを終濃度 10 mM または 0.5 mM、オリゴマイシンを最終濃度 1 μM 、2-DG を終濃度 50 mM 充填した後、フラックスアナライザーにて解析を行い、OCR・ECAR から代謝機能を評価した。

[0181] グルコース取り込み能力評価

2×10^4 細胞の GLUT3 CAR-T 細胞を 96 ウェルプレートに播種し、グルコース不含 RPMI 1640 (Wako) 200 μl で 5 時間培養をおこなった。解析の 5 分前に各ウェルに 2-NDBG (abcam) を 1 μl 添加し、洗浄した後に LSRTessa X20 を用いてデータを取得し、FACS Diva (v8.0.1、BD Biosciences) および FlowJo (TreeStar) ソフトウェアを用いて解析した。

[0182] 頭蓋腫瘍ゼノグラフトモデル

NSG マウス頭蓋内（右大脳基底部）にルシフェラーゼ発現 U87 Δ 腫瘍細胞株（U87 Δ -Luc） 2.5×10^4 を輸注し、生着後、Mock、3C10 CAR-T 細胞、GLUT3 CAR-T 細胞 2×10^6 細胞を尾静脈から投与した。経時的に生体イメージングで腫瘍量をモニタリングし、生存を観察した。CAR-T 細胞の長期生存、メモリー化および、再発防止効果を検証する腫瘍 challenge 試験では、上記治療後 CR が達成されたマウスに対し、同腫瘍細胞（U87 Δ -Luc）を 2.5×10^4 細胞（図 13）もしくは 1.0×10^5 細胞（図 19）を再度頭蓋内投与し、BLI、生存をモニタリングした。

[0183] （方法）

図 1 に代謝改変した CAR (EGFRvIII__CAR__GLUT3) の

構造を示す。膠芽腫（GBM）に発現するEGFRvIIIを標的とするマウス由来抗体（クローン3C10）由来の単鎖抗体（asFv）を構築、CD8 hinge、CD28膜貫通部分（CD28TM）、CD28細胞内ドメイン（CD28ICD）、4-1BB ICD、CD3ζと結合しCARを構築した。CAR下にP2A配列を介し高親和性グルコース輸送体（GLUT3）をコードした。

[0184] （結果）

結果を図2以下に示す。図2に示すように、T細胞表面GLUT3発現とグルコース取り込みの強化が示される。通常型CAR（3C10 CAR）と代謝改変CAR（GLUT3 CAR）を健常ドナー由来T細胞に遺伝子導入しCAR-T細胞を得た。蛍光顕微鏡にて、GLUT3 CAR-T細胞膜への均質なGLUT3発現を認めた。また、GLUT3 CAR-T細胞では、T細胞、通常型CAR-T細胞（3C10 CAR-T細胞）に比しグルコース取り込みが亢進していた。

[0185] 次に、通常CAR-T細胞と同等のT細胞増幅効率を図3に示す。図3に示されるように、抗CD3／28ビーズ刺激後CARを遺伝子導入しT細胞増殖効率を解析した。GLUT3 CAR-T細胞は、通常型CAR-T細胞（3C10 CAR-T細胞）と遜色ない樹立効率を有していた。

[0186] 次に、GLUT3発現によるT細胞解糖能の強化を図4に示す。示されるように、GLUT3 CAR-T細胞と3C10 CAR-T細胞の代謝をFlux analyzerにて解析した。低グルコース環境、通常グルコース環境いずれにおいてもGLUT3 CARは解糖能を強化していた。

[0187] 次に、GLUT3 CAR-T細胞は、低グルコース下の競合優位性をもつことが示された（図5）。図5に示されているように、3C10 CAR-T細胞とGLUT3 CAR-T細胞を通常グルコース下、および、低グルコース下にて共培養した。通常グルコース下では両者同程度の生存を認めたが、低いグルコース下では、GLUT3 CAR-T細胞の有意な生存を認め、有利にグルコースの取り込みが可能であることが示唆された。

[0188] 次に、GLUT3 CAR-T細胞のサイトカイン産生能が強化されていることを図6に示す。図6に示されるように、3C10 CAR-T細胞、GLUT3 CAR-T細胞を抗原刺激後、サイトカイン産生細胞割合をFCMにて解析した。T細胞維持・活性化と抗腫瘍活性発揮に重要であるサイトカイン群（IFN- γ 、IL-2、TNF- α ）の有意な発現上昇を認めた。

[0189] 次に、低グルコース下でも保たれるGLUT3 CAR-T細胞の機能を図7に示す。示されるように、通常グルコース下、低グルコース下でのサイトカイン産生能を比較した。通常型CAR-T細胞（3C10 CAR-T細胞）においては、低グルコース下での極端な機能低下が認められた。一方、GLUT3 CAR-T細胞では、通常グルコース下で高いサイトカイン産生能を認め、また、低グルコース下においても、3C10 CAR-T細胞の通常グルコース下サイトカイン産生能と遜色ない機能を発揮した。

[0190] 次に、GLUT3 CAR-T細胞の強化された細胞傷害活性を図8に示す。示されるように、EGFRvIII発現細胞株を標的とし細胞傷害活性を解析した。低グルコース下、高グルコース下にて細胞傷害活性を解析し、両環境下にてGLUT3 CAR-T細胞は3C10 CAR-T細胞に比し高い細胞傷害活性を示した。

[0191] 次に、GLUT3 CARのメモリーフェノタイプへ与える特性を図9に示す。示されるように、3C10 CAR-T細胞、GLUT3 CAR-T細胞のメモリーフェノタイプを比較した。GLUT3 CAR-T細胞において、エフェクターT細胞への分化傾向を認めた。

[0192] 次に、GLUT3 CAR-T細胞の抑制分子発現の抑制を図10に示す。非刺激下、EGFRvIII抗原陽性細胞刺激下の抑制分子の発現を比較した。GLUT3 CAR-T細胞において、PD-1、LAG3、Tim3の発現抑制を認めた。

[0193] 次に、GLUT3 CAR-T細胞のmRNA解析（代謝、疲弊、活性化、分化の評価）を図11に示す。3C10 CAR-T、GLUT3 CA

R-T細胞の詳細をmRNA発現にて解析した。GLUT3 CAR-T細胞にて、FCMと同じく疲弊関連分子の低下、乳酸代謝、解糖関連因子の上昇を認めた。全体として、活性化、サイトカイン産生等T細胞エフェクター機能の高まりを示すデータである。

[0194] 次に、3C10 CARのみでなく、CD19 CARに搭載しても同様の効果が得られること、すなわち、普遍性が証明されることを図12に示す。GLUT3をCD19 CARに搭載、3C10 CARと同様の効果が得られることを確認した。また、膵臓がん細胞株にCD19を発現させ、膵臓がんに対しても効果があること示した。

図13に示すように、頭蓋内ゼノグラフトモデルですみやかな腫瘍根絶を実現することが示された。U87Δ頭蓋内ゼノグラフトモデルにて抗腫瘍活性を観察した。GLUT3 CAR-T細胞において、3C10 CAR-T細胞より速やかな腫瘍根絶を認めた。また、腫瘍challengeにて拒絶を確認した。

[0195] (実施例2：オンデマンド発現)

オンデマンドGLUT3発現CARについて、実施した。その概要を図14に示す。

図14には、On-demand GLUT3発現CARの概要を示す。これは、定常状態ではCARのみ発現、GLUT3は発現せず、CAR-T細胞の活性化、腫瘍環境など、グルコース需要が高まった際にGLUT3を発現するシステムである。GLUT3のオンデマンド発現を実現するため、腫瘍環境特異的、または活性化特異的にGLUT3を発現するCARコンストラクトをデザインした(図15)。活性化によるNFAT上昇(A.)、腫瘍の低酸素(B.)を感知したGLUT3の発現を可能にする。

[0196] 図15のCARを導入した細胞を用いて、その機能、抗腫瘍効果について解析する。

[0197] (実施例3：グルコーストランスポーターの発現増強)

グルコーストランスポーターの発現増強を実現するため、恒常的にGLU

T3を発現するCARコンストラクトをデザインした(図15のstb1-GLUT3=GLUT3 CARと同じ)。

[0198] 図15のCARを導入した細胞を用いて、その機能、抗腫瘍効果について解析する。

[0199] 図16に、NFAT1-GLUT3 CARプラスミドの構造を示す。構造の詳細は以下のとおりである。図16において、CARと誘導型GLUT3はレンチウイルスベクターに組み込まれる。膠芽腫(GBM)等に発現するEGFRvIIIを標的とするマウス由来抗体(クローン3C10)由来の単鎖抗体(3C10VH-linker-3C10VL)から順に、CD8 hinge、CD28膜貫通部分、CD28細胞内ドメイン(CD28I)、4-1BB、CD3ζからなるCARがコードされる。CAR下にP2A配列を介し遺伝子導入マーカーであるKatushkaがコードされる。また、8回繰り返しNFAT binding siteとminimum promoter下にヒトGLUT3(hGLUT3)がコードされる。

[0200] 図17に本開示のOn Demand(Inducible) GLUT3 CAR systemの作動と基本的機能を示す。NFAT核内移行に伴ってGLUT3を発現するシステムを構築(NFAT1-GLUT3 CAR-T)作動を確認した。NFAT1-GLUT3 CAR-T細胞(NFAT1-GLUT3 CAR-T)の細胞傷害活性は、恒常発現GLUT3 CAR-T細胞(GLUT3 CAR-T)と同等、サイトカイン産生は、3C10 CAR-T(GLUT3なし)と恒常発現CAR-T細胞(GLUT3 CAR-T)の中間程度であった。

[0201] 図18に、同様のマウスモデルでNFAT1-GLUT3 CAR-T細胞の抗腫瘍効果を評価した結果を示す。GLUT3 CAR-Tで4頭、NFAT1-GLUT3 CAR-Tで2頭のCRが得られた。

[0202] 図19に、腫瘍チャレンジおよび腫瘍Rechallenge実験の結果を示す。すなわち、GLUT3 CAR-T細胞群でのマウス頓死の状況を

示す。前図実験の治癒マウスに腫瘍（U87d）を再移植し拒絶能を評価（“メモリー化のサロゲート”）。 1×10^5 細胞（前回実験の4倍量）の腫瘍細胞を再移植、3C10 CAR-Tでは腫瘍の拒絶は達成されず、GLUT3 CAR-T、NFATi CAR-Tにて拒絶が達成された。しかし、GLUT3 CAR-T群にて、4匹中3匹のマウスが死亡した（非腫瘍増幅死）。

[0203] 図20に、NFATi GLUT3の刺激後apoptosisが抑制されたことを示す。U87dにてCAR-T細胞を繰り返し刺激、Annexin V、7-ADDにてCAR-T細胞アポトーシスを観察した。

[0204] 図21に、各種刺激後長期生存が増強されることを示す。各CAR-T細胞を上記条件にて経時観察する。その結果、低glucose下において通常CAR-T（3C10）は有効なサイトカイン産生が示されない一方、GLUT3 CAR-T、NFATi GLUT3 CAR-Tは有効なサイトカイン産生能を発揮する。ただし、GLUT3 CAR-Tはグルコース過剰取り込みによりにより経時的に（day3やday7）にCCR7陰性のTemやTemraへと分化（終末分化、stemnessの消失、アポトーシスに陥る。一方、on-demand型であるNFATi GLUT3 CAR-T細胞は、アポトーシスが抑制され、かつ、CCR7陽性のTcmやTscm（メモリー細胞、stemnessをもった細胞）が維持される。

[0205] また、CAR-T細胞（通常グルコースで樹立）が急激（day0）に0mMや0.5mMの低グルコース下に置かれた場合、Glucose依存性の高いGLUT3 CAR-Tはアポトーシスに陥りやすい（逆に言えば、NFATi GLUT3 CAR-T細胞は低glucoseに耐性を示す）。

[0206] 図22に、刺激後長期生存が増強されることを示す。前述マウスと同様の系で上記抗腫瘍効果、生存、有害事象を検討する。実験1においては、GLUT3 CAR-T、NFATi GLUT3 CAR-T同等の抗腫瘍活

性を示す。実験2においては、糖暴露によるGLUT3 CAR-T過活性化からアポトーシス、過分化がおこり抗腫瘍活性が消失する。一方、NFAT i CAR-T細胞では過剰な活性化が抑制されるため、有効な抗腫瘍効果を発揮する。Rechallengeにおいても、NFAT i CAR-T細胞は腫瘍を拒絶する。実験4においては、腫瘍効果に比例し、NFAT i GLUT3において優位なCAR-T細胞生着と腫瘍T細胞浸潤が観察される。また、実験3は、低glucose 高乳酸環境による免疫抑制が示唆されている肝腫瘍モデルでの実験で、実験2と同様の結果が得られることが期待される。

[0207] 図23に、刺激後長期生存の増強を示すデータ (in vitro data) を示す。左各タイムポイントにて、細胞死およびアポトーシスを反映する7-AAD、Annexin Vの染色データを示す。各CAR-T細胞における細胞死を、Annexin V、7-AADで検討した。非刺激状態において、グルコース濃度での差は認めたが各CAR-T細胞で大きな差は認めなかった。

[0208] 図24には、刺激後長期生存の増強を示すin vitro dataが提示される。示されるように、刺激後の各CAR-T細胞の生存・細胞死を前図と同様に評価した。3C10 CARおよびGLUT3 CAR-T細胞に比し、NFAT i GLUT3 CAR-T細胞では生存が強化（細胞死が抑制）されていた。

[0209] 図25に、刺激後長期生存の増強を示すin vitro dataを示す。刺激後の各CAR-T細胞のCAR陽性割合を解析した。刺激後、特に恒常発現GLUT3 CAR CAR-TでCAR陽性細胞割合が減少しており、同分画が細胞死に陥ったと考えられえた。

[0210] 図26に、刺激後長期生存の増強を示すin vitro データを示す。7日目におけるT細胞数を示す。患者体内での投与後動態（投与後、十分なグルコース濃度の血中から低～無グルコース環境である腫瘍環境へ浸潤する動態）を反映するモデルとして、通常グルコース条件下（グルコース10m

M) にて樹立、培養した後EGFRvIII結合ビーズにて刺激、その後、無グルコース(0 mM)、低グルコース(0.5 mM)、もしくは、通常グルコース(10 mM)条件とし培養、7日後の生細胞数を評価した。グラフは、Mock T細胞数を1とした相対細胞数を示す。GLUT3 CAR-Tは0 mM下にてほとんどの細胞が死んでいた。一方、NFATi CAR-Tは多くの細胞は保たれていた。GLUT3 恒常発現による過活性化による細胞死、糖に高度に依存した代謝が細胞死につながった可能性が示唆された。

[0211] 図27に、抑制分子(PD-1)発現を示す。NFATi GLUT3 CAR-T細胞では、GLUT3 CAR-T細胞に比し抑制分子(PD-1)の発現が低値であった。

[0212] 図28に、抑制分子(TIM3)の発現抑制発現を示す。NFATi GLUT3 CAR-T細胞では、GLUT3 CAR-T細胞に比し抑制分子(TIM3)の発現が低値であった。

[0213] (実施例4：他のエフェクターT細胞の前駆細胞での例)

同様の実験を他のT細胞で実施する。例えば、純化しない抹消T細胞には、T_{nv}、T_{cm}、T_{em}、T_{emra}などが含まれており、いずれの分画にもCAR(CAR、恒常発現GLUT3 CARまたはon-demand GLUT3 CAR)をすることができる。

[0214] 本実施例では、純化・濃縮された任意のT細胞メモリー分画に、CAR(CAR、恒常発現GLUT3 CAR、on-demand GLUT3 CAR)を導入する。別の実験において、培養条件にて、任意のT細胞メモリー分画が濃縮されたCAR-T細胞を誘導する。

[0215] 実験手順：・末梢血、骨髓、臍帯血等のT細胞源より、より長期の生存とステムネスの維持が期待できるT_{eff}の前駆細胞であるT_{nv}やT_{scm}、T_{cm}または既に分化し主にエフェクター機能を発揮するT_{eff}やT_{emra}分画を、それぞれ、T細胞メモリー関連表面抗原発現パターンであるCD45RA⁺CCR7⁺CD95⁻、CD45RA⁺CCR7⁺CD95⁺、CD45R

A-CCR7⁺、CD45RA-CCR7、および、CD45RA⁺CCR7⁻を基にFACSソーティング、もしくは、磁気ビーズで純化・濃縮する。

- ・各分画をCD3／28ビーズ等で刺激、レンチウイルスベクターを用いてCARを導入する。

- ・また、別の方法として、バルクT細胞に遺伝子導入した後、サイトカインの種類や添加量を調整し（IL-7やIL-15の使用やplatelet lysateの使用）にて、T_{eff}分化の抑制とT_{nv}、T_{scm}、T_{cm}の優位な増殖を誘導し、前駆細胞優位なCAR-T細胞とする。

- ・In vitro評価；これらの細胞がU87d腫瘍細胞株もしくはEGFRvIIIビーズと共培養され、1日後、3日後、7日後に、CFSE染色、および、細胞カウントによる分裂増殖、フローサイトメトリーによる活性化・疲弊状態を評価する。

- ・In vivo評価：これらの細胞が前述のU87d頭蓋内製薬マウスに投与、BLIによる抗腫瘍活性と生存にて抗腫瘍効果が評価される。また、治癒が認められたマウスにおいては、再度腫瘍が投与（rechallenge）され、腫瘍拒絶を評価する。

[0216] 結果：

- ・バルクT細胞に導入された場合や分化の進んだT_{eff}、T_{emra}に導入場合に比し、前駆細胞であるT_{nv}、T_{scm}、T_{cm}などT_{eff}の前駆細胞に導入された、もしくは、T_{nv}、T_{scm}、T_{cm}が優位に増幅されたCAR-T細胞では、分裂・増殖能が高く、長期の分裂が観察されると期待される。また、PD1、TIM3、LAG3発現が低く、疲弊に耐性であると期待される。

- ・また、これらのCAR-T細胞では、マウスモデルにおいて、優位な抗腫瘍活性と生存の改善が示される。また、腫瘍rechallengeにおいて効率に腫瘍拒絶が観察されると期待される（長期効果や再発防止のサロゲート）。

[0217] （実施例5：実証例）

本実施例では、より大規模に実証した例を提供する。

[0218] 材料と方法

[0219] 細胞株

U-87 MGおよびU-251 MG GBM細胞株は、それぞれAmerican Type Culture Collection (ATCC) およびJapanese Collection of Research Bioresources Cell Bankから購入し、10%ウシ胎児血清 (FBS) および1%ペニシリン/ストレプトマイシンを添加したD-MEM (富士フイルム和光純薬株式会社、大阪、日本) 中で培養した。EGFRvIIIパッケージ化レンチウイルスベクターをU-87 MGおよびU-251 MG細胞に誘導し、形質導入細胞株をそれぞれU-87 MGΔおよびU-251 MGΔと命名した。SUP-T1、NALM6およびAsPC-1細胞はATCCから購入し、10%FBSおよび1%ペニシリン/ストレプトマイシンを添加したRPMI 1640 (富士フイルム和光純薬株式会社) で培養した。NALM6細胞にCD19切断型ベクターを導入し、CD19発現AsPC1細胞株を得た。

[0220] フローサイトメトリーアッセイ

フローサイトメトリーアッセイは、以前に記載されたとおりに行った [文献40-43]。簡単に説明すると、細胞をFACSバッファーで2回洗浄し、Fcレセプターブロッキング溶液 (BioLegend、カリフォルニア州サンディエゴ) を用いて、暗所4℃で10分間Fcブロッキングを行った。細胞をFACSバッファーで2回洗浄し、細胞表面分子を標的とする抗体を加え、暗所4℃で20分間インキュベートした。その後、細胞をFACSバッファーで2回洗浄した。細胞内抗原染色では、細胞を固定/透過液 (BD Biosciences, San Jose, CA) 中で室温で1時間インキュベートした後、製造元の指示に従って洗浄バッファー (BD Biosciences) で2回洗浄した。細胞内抗原をターゲットとする抗体を加え、暗所4℃で20分間インキュベートした後、2回洗浄した。アポ

トーススアッセイのために、細胞をFACSバッファーで1回、Annexin結合バッファーで1回洗浄した。その後、細胞をアネキシンVと7-AADで室温で15分間染色した。洗浄後、LSRFortessa X-20 サイトメーター (BD Biosciences) を用いてフローサイトメトリー (FCM) 解析を行い、FlowJo ver. 10 software (BD Biosciences) で解析した。染色液の調製はメーカーの説明書に従って行った。

[0221] サイトカイン染色

細胞内サイトカイン染色は、以前に記載されたとおりに行った [文献40-43]。6時間のT細胞刺激の最後の5時間は、細胞内にサイトカインを保持するため、培地にモネンシンを添加した。細胞表面マーカーを染色した後、Cytofix/Cytoperm試薬 (BD Biosciences) を加え、暗所4℃で20分間インキュベートした。その後、細胞を洗浄液で2回洗浄し、サイトカインを標的とする抗体を加えた。暗所、4℃で20分間インキュベートした。洗浄後、LSRFortessa X-20 サイトメーター (BD Biosciences社製) を用いてFCM解析を行い、FlowJo ver. 10 software (BD Biosciences) で解析した。細胞染色に用いた抗体を表にまとめた。染色用抗体の調製は、メーカーの説明書に従って行った。

[0222]

[表2]

試薬 (抗体)	クローン	発売元	カタログ番号
Anti-Glucose Transporter GLUT3 + GLUT14	EPR3915	Abcam	cat# ab315168
Anti-Glucose Transporter GLUT1	SPM498	Abcam	cat#ab40084
Goat Anti-Rabbit IgG H&L Alexa Fluor 488	Not available	Abcam	cat#ab150077
Goat Anti-Mouse IgG H&L Alexa Fluor 647	Not available	Abcam	cat#ab150115
Anti-human CD197 (CCR7) PE/Cyanine7	G043H7	BioLegend	cat#353226
anti-human CD45RA Alexa Fluor 488	HI100	BioLegend	cat#304114
anti-human CD366 (Tim-3) Brilliant Violet 605	F38-2E2	BioLegend	cat#345018
Anti-human IFN- γ Alexa Fluor 488	4S.B3	BioLegend	cat#502515
Anti-human CD279 (PD-1) Brilliant Violet 421	MIH4	BD	cat#564324
Anti-human CD3 Brilliant Violet 786	SK7	BD	cat#563800
Anti-human CD4 APC-R700	SK3	BD	cat#566909
Anti-human CD8 Brilliant Violet 521	SK1	BD	cat#563919
Anti-human TNF alpha APC	Mab11	Invitrogen	cat#17-7349-82
Anti-human IL-2 PE/Cy7	MQ1-17H12	Invitrogen	cat#25-7029-82

[0223] 殺傷アッセイ

合計 1×10^5 のルシフェラーゼ発現細胞 (U-87 MG Δ 、U-251 MG Δ 、AsPC-1、およびNALM6) を、低グルコース (0.5 mM) または高グルコース (10 mM) を添加した RPMI 1640 培地 (富士フイルム和光純薬株式会社製) 200 μ L 中、平底96ウェルホワイトプレートでCAR-T細胞と指示された比率で共培養した。培養24時間後、Bio-Glo (Promega, Madison, WI) を各ウェルに添加し、マルチプレートリーダーCytation 5 (Agilent

Technologies, Santa Clara, CA) で発光を測定した。% specific lysis は以下の式で計算した: % specific lysis = $\frac{(\text{experimental lysis} - \text{spontaneous lysis})}{(\text{maximum lysis} - \text{spontaneous lysis})} \times 100$ 。

[0224] 免疫蛍光染色

洗浄後、細胞を 4 % パラホルムアルデヒドで 20 分間室温で固定し、 -20°C で 10 分間クールメタノールで透過処理した。細胞を 3 % BSA / PBS で 60 分間室温でブロッキングした。ブロッキング後、細胞を一次抗体と 4°C で 2 時間、二次抗体と 4°C で 1 時間インキュベートした。次に DAPI を加え、室温で 5 分間インキュベートした。洗浄後、染色した細胞を Cytospin でスライドに固定し、BZ-X710 (KEYENCE、大阪、日本) で解析した。

[0225] 免疫組織化学的 (IHC) 染色

IHC 染色は、ホルマリン固定パラフィン包埋標本の $5\ \mu\text{m}$ 厚切片に対して行った。抗原除去はクエン酸緩衝液 (pH 6.0) を用いて蒸し器で行い、続いて脱パラフィン、再水和を行った。スライドを一次抗体で 16 時間、HRP 標識二次抗体で 1 時間インキュベートした後、ジアミノベンジジン基質で発色させた。一次染色には抗 CD3 ϵ 抗体 (クローン: SP7、カタログ番号: ab16669) (Abcam, Waltham, MA) を用いた。染色したスライドをヘマトキシリンで対比染色した。ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色は標準プロトコールに従って行った。脱パラフィンし、水和したスライドをヘマトキシリン溶液に加え、4 分間インキュベートした。洗浄後、スライドをエオシン溶液で 2 分間インキュベートした。染色したスライドを BZ-X710 (Keyence 社製) を用いて 40 倍および 400 倍の倍率でスキャンした。2 人の病理医が独立して染色スライドを評価した。

[0226] ELISA法

合計 2.0×10^5 U-87 MGΔ細胞と 2.0×10^5 CAR-T細胞を24ウェルプレートで共培養した。24時間培養後、上清を回収し、サイトカイン濃度を測定するためにELISAに供した。IFN- γ 、IL-2、およびTNF α のELISAキット (R&D Systems, Minneapolis, MN) を、製造業者の説明書に従って使用した。マウス血清中のサイトカインは、製造業者の説明書に従って、高感度LUMINEXアッセイにより分析した (Merck Millipore, Burlington, MA)。

[0227] CAR-T細胞製造

末梢血は健常人から採取し、末梢血単核球 (PBMC) はFicoll-Paque (GE Healthcare, Chicago, IL) を用いた密度勾配遠心分離により単離した。T細胞は、MojoSort (BioLegend) によるネガティブセレクションによってPBMCから分離した。単離したT細胞を抗CD3/28ビーズ (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) でT細胞:ビーズ=1:1で刺激した (0日目)。刺激24時間後 (1日目)、T細胞はCARレンチウイルスをMOI 3で導入し、30U/ml IL-2中で培養した。培地の半分は24時間後に交換した。5日後、CD3/28ビーズを除去した。培養中、4日目と10日目に培地の半分を交換し、T細胞の濃度を 0.7×10^6 cells/mLに調整した。開発されたCAR-T細胞は10日目に採取され、その後の解析に供された。

[0228] 動物モデル

雌のNSGマウス (6週齢) をJackson Laboratoryから購入した。痛みを伴う処置の前には、痛みを防ぐために麻酔薬を腹腔内に注射した。定位フレームを用い、腫瘍細胞を脳の表面からブレグマの右2mm、後3mm、深さ3mmの位置に接種した。5mLのPBSに合計 2.0×10^4 個の細胞を1分間かけて注入した後、1mmの針を抜き、さらに1

分間放置してから針を抜いた。腫瘍植え付け4日後、腫瘍の成長を生物発光イメージング（BLI）で確認し、各治療群への無作為割付けを行った。5日目に 1.0×10^6 CAR-T細胞を尾静脈から注入した。CAR-T細胞注入後の腫瘍増殖は、週2回BLIでモニターした。動物の飼育および実験は、国立がん研究センター動物実験倫理審査委員会の承認後、国立がん研究センター動物委員会のガイドラインに従って行われた。

[0229] グルコース濃度測定

組織サンプル（ 5×5 mm）を洗浄し、付着血液を除去した。サンプルをミンチにして4℃で10分間遠心し、腫瘍の間質液を回収した。間質液のグルコース濃度は、Multiskan GO（Thermo Fisher Scientific）を用いて、製造元のプロトコールに従って測定した。

[0230] 代謝分析

OCR（単位：pmol／分）およびECAR（単位：mpH／分）は、 Seahorse XF-24代謝細胞外フラックスアナライザー（Agilent Technologies）によって評価した。EGFRvIII ビーズ（ACRO Biosystems、中国・北京）で24時間刺激した CAR-T細胞（conv EGFRvIII CAR-T細胞、GLUT3 EGFRvIII CAR-T細胞、オンデマンドGLUT3 EGFRvIII CAR-T細胞）を、グルコースを含まない非緩衝 RPMI-1640 培地（Agilent Technologies）に再懸濁し、ポリ-L-リジン（BD Bioscience）でコートした Seahorse 細胞プレート（1 ウェルあたり 2.0×10^5 細胞）にプレーティングした。CAR-T細胞による代謝経路の利用による摂動プロファイリングは、グルコース（10 mMまたは0.5 mM）、オリゴマイシン（1 μ M）、2-デオキシ-D-グルコース（50 mM）（すべて Agilent Technologies 製）の添加によって達成された。 Seahorse システムを用いた実験は、以下のアッセイ条件で行った：

3分間の混合、2分間の待機、3分間の測定。その後、代謝パラメータの値を算出した。

[0231] RNA配列決定とその後の分析

BD FACSymphony S6 (BD Biosciences) で選別したCAR-T細胞 (conv EGFRvIII CAR-T細胞、GLUT3 EGFRvIII CAR-T細胞、オンデマンドGLUT3 EGFRvIII CAR-T細胞) を、低グルコース (0.5 mM) または高グルコース (10 mM) 条件下、30 U/ml IL-2 補充で、EGFRvIII ビーズで1:1の割合で刺激した。CAR-T細胞は3日目と7日目に回収し、RNAは RNeasy kit (QIAGEN社、ドイツ、ヒルデン) を用いて製造者の指示に従って抽出した。単離したRNAから、NEBNext Ultra Directional RNA Library Prep Kit (New England Biolabs, Ipswich, MA) を用いて相補的DNA (cDNA) を調製した。RNA-seqライブラリーは、Novaseq X plus (Illumina, San Diego, CA) を用いて、両端から150bpの次世代シーケンシング (ペアエンドリード) を行った。RNA-seqデータによる発現プロファイリングのために、ペアエンドリードはSTARによってhg38ヒトゲノムアセンブリにアライメントされた [文献44]。RNAseqChefは、系統的なトランスクリプトーム解析、遺伝子発現解析、主成分解析、パスウェイ解析のためのウェブベースのプラットフォームである [文献45]。

[0232] 統計分析

統計解析にはGraphPad Prism 9 (GraphPad Software, San Diego, CA) を用いた。群間の関係はt検定または一元配置分散分析により比較した。生存率はKaplan-Meier法で解析し、log-rank検定で統計学的に比較した。P値<0.05を統計的に有意とみなした。

[0233] 結果

GBMはTME内のグルコース濃度が低く、CAR-T細胞の機能を損なう。

TME内の低グルコースレベルが固形がんにおけるCAR-T細胞治療の潜在的な障壁であることを示すエビデンスが蓄積されているが、TME内の実際のグルコース濃度や低グルコース状態がCAR-T細胞の機能にどのような影響を与えるかは、まだ明らかにされていない〔文献21〕。本発明者らは、手術検体および血清の間質液中のグルコース濃度を調べた（図1a）。GBM検体の間質液中のグルコース濃度は、血清中のそれよりも約10倍低い〔0.5mM未満（平均0.217mM）〕（図1b）。非小細胞肺がんや大腸がんなど、さまざまな種類のがんでは一般にグルコース濃度が低い、GBMではTME中のグルコース濃度が最も低い。このことは、TME中のグルコース濃度の低さがGBMの特徴であることを示している（図1c）。

[0234] 次に、低グルコース環境がサイトカイン産生などのCAR-T細胞の機能にどのような影響を与えるかを検討した。GBM関連抗原であるEGFRvIIIを標的とするCAR-T細胞（conv EGFRvIII CAR-T細胞）を、GBMのTMEを再現した低グルコース条件下（0.5mM）で、EGFRvIIIを発現するヒトGBM細胞株（U-87 MGΔ）と共培養した。U-87 MGΔで刺激すると、サイトカイン（IFN-γ、IL-2、TNFα）の産生は、短期間（16時間）曝露した後でも、低グルコース環境下で有意に低下した（図29d、e）。低グルコース条件下でのCAR-T細胞の機能的変化をさらに調べるため、CAR-T細胞を低グルコース（0.5mM）または高グルコース（10mM）条件下で16時間刺激し、遺伝子発現プロファイルを解析した。遺伝子発現プロファイルは、低グルコース条件への曝露によって有意に変化した（図35a）。細胞周期、分化、サイトカイン産生に関連する遺伝子セットは有意に減少したが、グルコース飢餓に対する細胞応答や内在性アポトーシスに関連する遺伝子セ

ットは低グルコース条件下で増加した（図29f, g）。このように、CAR-T細胞のエフェクター機能は、GBMのTMEのような低グルコース条件にさらされると、直ちに損なわれる。

[0235] GLUT3の過剰発現はCAR-T細胞の代謝適性を高める。

グルコーストランスポーター（GLUT）のSLC2ファミリーの中で、SLC2A3によってコードされるGLUT3は、最も親和性が高く、グルコースに対する要求が高い神経細胞やグリア細胞で優位に発現するという特徴を持つ[文献16]。そこで本発明者らは、CAR-T細胞によるGLUT3の発現が、GBMの低グルコースTMEにおけるグルコース取り込みを促進することで、CAR-T細胞の活性を促進できるかどうかを検討した。

SLC2A3を、自己切断型P2A配列を介して従来の抗EGFRvIII

CARコンストラクトに融合させ、CARとGLUT3の同時安定発現を

可能にした（GLUT3 EGFRvIII CAR）（図30a）。GL

UT3 EGFRvIII CARを導入したT細胞（GLUT3 EGF

RvIII CAR-T細胞）の膜（図30b）にはGLUT3が発現して

おり、その発現量は親株の抗EGFRvIII CAR-T細胞（conv

EGFRvIII CAR-T細胞）の約2倍で、GBM細胞株であるU

87 MGΔの発現量と同程度であったが、GLUT1の発現量には変化

が認められなかった（図30cおよび図36a）。グルコースアナログであ

る2-NBDGを用いたグルコース取り込みアッセイで測定したグルコース

取り込み量は、GLUT3 EGFRvIII CAR-T細胞で、conv

EGFRvIII CAR-T細胞よりも大きかった（図30d）。従

って、GLUT3 EGFRvIII CAR-T細胞の解糖および解糖能

は有意に改善された（図30eおよび図36b）。代謝解析ではさらに、G

LUT3 EGFRvIII CAR-T細胞はconv EGFRvIII

I CAR-T細胞よりも酸素消費速度（OCR）^{high}、細胞外酸性化速度

（ECAR）^{high}状態でよりエネルギーシフトすることが確認された

（図30f）。カルボキシフルオレセインスクシンイミジルエステル（CF

SE)で標識したGLUT3 EGFRvIII CAR-T細胞をconv EGFRvIII CAR-T細胞と1:1の割合で共培養したグルコース競合アッセイでは、従来のものに対するGLUT3 EGFRvIII CAR-T細胞の数は、低グルコースレベル(0.5 mM)グルコースレベルでは増加したが、高グルコース(10 mM)条件下では同程度であったことから、GLUT3 EGFRvIII CAR-T細胞は、特に低グルコース環境において、グルコース取り込みの点で実質的に競合的であることが示唆された(図36c, d)。したがって、CAR-T細胞による安定したGLUT3発現は、グルコース取り込みを促進し、グルコース取り込みの点でCAR-T細胞を競争的にし、限られたグルコース環境におけるCAR-T細胞の代謝適性を高める。

[0236] GLUT3の発現によりCAR-T細胞の代謝適性が向上することから、そのエフェクター機能と安全性プロファイルを検討することになった。そこで本発明者らは、GLUT3 EGFRvIII CAR-T細胞のエフェクター機能を*in vitro*と*in vivo*の両方のアッセイで調べた。コンボEGFRvIII CAR-T細胞と比較して、GLUT3 EGFRvIII CAR-T細胞は、低グルコースレベル(0.5 mM)と高グルコースレベル(10 mM)の両方で、サイトカイン産生(IFN- γ 、IL-2、TNF α)を有意に増加させた(図30g、Hおよび図37a)。サイトカイン産生は、CD8⁺ T細胞サブセットとCD4⁺ T細胞サブセットの両方で増強された(図37b, c)。GLUT3 EGFRvIII CAR-T細胞はまた、低グルコースおよび高グルコースの両条件下で、U-87 MG Δ 細胞および別のEGFRvIII発現GBM細胞株であるU-251 MG Δ 細胞に対する細胞傷害性の増大を示した(図30i、図37d, e)。抗原刺激後のPD-1やTim-3を含む排出関連分子の発現は、GLUT3 EGFRvIII CAR-T細胞ではconv EGFRvIII CAR-T細胞よりも高かった(図30j, kおよび図37f, g)。加えて、安定したGLUT3発現によるエフェクター機能の

増強は、異なる抗原であるCD19を標的とするCAR-T細胞（GLUT3-CD19-CAR-T細胞）でも同様に観察された。このことは、GLUT3発現による代謝適性の増強が、使用する一本鎖可変フラグメント（scFv）や標的とする抗原に関わらず、全てのCARで普遍的であることを示している（図38a-c）。したがって、安定したGLUT3発現により、CAR-T細胞は、疲弊した表現型は存在するものの、低グルコースレベルのTMEで活性化することができる。

[0237] 安定したGLUT3発現はCAR-T細胞を過剰活性化し、重篤な副作用を引き起こす。

頭蓋内U-87-MG△異種移植モデルを用いて、CAR-T細胞における安定したGLUT3発現が抗腫瘍効果と安全性プロファイルに及ぼす影響をさらに検討した（図31a）。GLUT3-EGFRvIII-CAR-T細胞は、頭蓋内腫瘍接種の5日後に静脈内投与された。予想通り、GLUT3-EGFRvIII-CAR-T細胞治療は、conv-EGFRvIII-CAR-T細胞治療（CR：2／6）と比較して、増強された抗腫瘍効果を示した（CR：4／6）（図31b）。それにもかかわらず、GLUT3-EGFRvIII-CAR-T細胞療法は、全身状態の悪化や重篤な体重減少に伴う治療関連死亡（TRM）の発生率が高かったため、生存率を改善できなかった（図31c-e）。これらの所見と一致して、病理学的解析ではGLUT3-EGFRvIII-CAR-T細胞で治療したマウスの脳組織でT細胞の過剰活性化が認められ、脳実質、特に脳室壁にびまん性に浸潤していた（図31f）。さらに肺組織では、T細胞の浸潤を伴う肺胞壁の肥厚によって示される、びまん性の肺胞障害が検出された（図31g）。実際、エフェクターメモリーT細胞（CD45RA⁺CCR7⁻）の頻度は、GLUT3-EGFRvIII-CAR-T細胞を投与したマウスの方が、conv-EGFRvIII-CAR-T細胞を投与したマウスよりも有意に高かった（図31h）。さらに、遺伝子発現アッセイにより、GLUT3-EGFRvIII-CAR-T細胞では、刺激後7日目でもサイトカ

イン産生、T細胞分化、T細胞活性化に関連する遺伝子セットが顕著にアップレギュレートされていることが明らかになった（図31i）。このように、CAR-T細胞によるGLUT3の安定発現は、グルコースの過剰摂取によるT細胞の活性化状態を損ない、代謝体力の繊細な制御の必要性を示している。

[0238] 抗原刺激によるGLUT3のオンデマンド発現は、CAR-NFAT-GLUT3コンストラクトによって達成される。

GLUT3 EGFRvIII CAR-T細胞の過剰活性化によって引き起こされる重篤な毒性を考慮し、グルコースの需要に応じて、すなわち、TMEにおける標的抗原認識時のT細胞刺激時にGLUT3を発現させることで、GLUT3発現の利点を最大化し、毒性を最小化できるかを検討した。SLC2A3をNFAT結合ドメインの下流に配置したコンストラクトを開発し、オンデマンドGLUT3発現を可能にした（オンデマンドGLUT3 CAR）（図32a）。抗原認識によるT細胞の活性化は、NFATの核内転座を誘導し、GLUT3の発現を促した。オンデマンドGLUT3 CARコンストラクトを持つT細胞（オンデマンドGLUT3 EGFRvIII CAR-T細胞）による標的抗原認識は、GLUT3の発現を誘導した。GLUT3発現は、最後の抗原刺激から7日後に初期レベルに戻った（図32b, c）。実際、グルコースの取り込みと解糖は、オンデマンドGLUT3 EGFRvIII CAR-T細胞の方が、conv EGFRvIII CAR-T細胞よりも高かった（図32d, eおよび図39a）。オンデマンドGLUT3 EGFRvIII CAR-T細胞では、3日目に代謝がよりエネルギーな状態（OCR^{high}ECAR^{high}）に移行し、最後の抗原刺激から7日目にはconv EGFRvIII CAR-T細胞に匹敵するレベルまで回復した（図33f）。サイトカイン産生は、低グルコース（0.5mM）および高グルコース（10mM）レベルのいずれにおいても、オンデマンドGLUT3 EGFRvIII CAR-T細胞においてconv EGFRvIII CAR-T細胞よりも有意に高かった（

図33g, hおよび図39b)。オンデマンドGLUT3 EGFRvIII CAR-T細胞はまた、低グルコースおよび高グルコースの両条件下で、U-87 MGΔ細胞およびU-251 MGΔ細胞に対する細胞傷害性の増加を示した(図33iおよび図39c)。以上のことから、オンデマンドGLUT3 CARコンストラクトはオンデマンド方式で代謝適性を改善することに成功し、オンデマンドGLUT3 EGFRvIII CAR-T細胞は低グルコースおよび高グルコースの両条件下でサイトカイン産生および細胞毒性を増強した。

[0239] オンデマンドGLUT3発現がCAR-T細胞の持続的エフェクター機能を可能にする。

サイトカイン産生と細胞傷害性が増強されたオンデマンドGLUT3 EGFRvIII CAR-T細胞の開発に成功したことから、その持続性、機能、分子発現に焦点を当て、総合的な免疫学的プロファイルを調べることにした。まず抗原刺激後の細胞増殖を調べた。オンデマンドGLUT3 EGFRvIII CAR-T細胞は、抗原刺激後も継続的に拡大したが、GLUT3 EGFRvIII CAR-T細胞は拡大しなかった(図40a, b)。GLUT3 EGFRvIII CAR-T細胞によるこの拡大失敗は、主にアポトーシスの誘導に起因しており、このアポトーシスは活性化誘導性細胞死(AICD)として知られる過剰活性化によるもので、T細胞の恒常性にとって重要な現象である[文献22](図34a)。遺伝子発現解析の結果、低グルコース条件下でGLUT3 EGFRvIII CAR-T細胞では、オンデマンドGLUT3 EGFRvIII CAR-T細胞やconv EGFRvIII CAR-T細胞と比較して、アポトーシスに関連する遺伝子の発現が増加していることがさらに確認された(図34b)。さらに、アポトーシス関連遺伝子の発現はTNF α シグナル遺伝子の発現と密接に相関しており、GLUT3 EGFRvIII CAR-T細胞のアポトーシスにおけるTNF α の役割が示唆された(図34c)。一方、オンデマンドGLUT3 EGFRvIII CAR-T細胞およびGL

UT3 EGFRvIII CAR-T細胞では、Conv EGFRvIII CAR-T細胞と比較して、T細胞活性化関連遺伝子群の発現が上昇した（図34b）。これに従い、オンデマンドGLUT3 EGFRvIII CAR-T細胞はセントラルメモリー（CD62L CCR7⁺⁺CD45RA⁻）とナイーブ表現型（CD62L CCR7⁺⁺ CD45RA⁺）を維持したが、GLUT3 EGFRvIII CAR-T細胞は終末分化表現型（CD62L CCR7⁻⁻CD45RA⁺）を示した（図34d、図40c）。さらに、PD-1やTim-3を含む疲弊関連分子の発現は、オンデマンドGLUT3 EGFRvIII CAR-T細胞では、GLUT3 EGFRvIII CAR-T細胞やconv EGFRvIII CAR-T細胞よりも低かった（図34eおよび図40d）。さらに、GLUT3 EGFRvIII CAR-T細胞とオンデマンドGLUT3 EGFRvIII CAR-T細胞の包括的な遺伝子発現プロファイルは、刺激後3日目には同等であったが、刺激後7日目には有意に異なっていた（図34f）。刺激後7日目の各CAR-T細胞集団のRNA-seq解析により、GLUT3 EGFRvIII CAR-T細胞が解糖に依存していることがさらに確認されたが、オンデマンドGLUT3 EGFRvIII CAR-T細胞は酸化的リン酸化と脂肪酸酸化を維持しており、これは活性化状態、すなわちナイーブ／幹細胞メモリーおよびセントラルメモリー表現型を反映していた（図34g）。これらの所見は、オンデマンドGLUT3発現がCAR-T細胞の過剰活性化を防ぎ、機能的CAR-T細胞を長期間維持することを示している。以上から、特に図34の結果から、定常発現GLUT3はEGFRvIIICAR-T細胞の抗腫効果（すなわちエフェクター機能）を増強するといえる。オンデマンド型GLUT3発現は、EGFRvIIICAR-T細胞のエフェクター能を増強するばかりでなく、メモリー機能の延長、メモリーT細胞の表現型の維持が強化したことも証明されたといえる。さらに、定常発現GLUT3にて誘導される体重減少、治療関連死亡等の有害事象を防止し、結果として、治癒を含めた著明な生存率の改善を

達成したと結論付けることができる。

[0240] オンデマンドGLUT3 EGFRvIII CAR-T細胞は、頭蓋内ヒトGBM細胞異種移植モデルにおいて、重篤な毒性を示すことなく抗腫瘍効果の増大を示した。

オンデマンドGLUT3 EGFRvIII CAR-T細胞の優れた表現型に基づき、頭蓋内ヒトGBM細胞異種移植モデルにおける抗腫瘍効果と安全性プロファイルを検討した（図35a）。conv EGFRvIII CAR-T細胞と比較して、オンデマンドGLUT3 EGFRvIII CAR-T細胞およびGLUT3 EGFRvIII CAR-T細胞は優れた抗腫瘍効果を示し、大半のマウスがCRを達成した（conv EGFRvIII CAR-T細胞では5/10 CR、GLUT3 EGFRvIII細胞では9/10 CR、オンデマンドGLUT3 EGFRvIII CAR-T細胞では9/10 CR）（図35bおよび図41a）。しかしながら、以前の実験（図32a-e）で観察されたように、GLUT3 EGFRvIII CAR-T細胞は著しい体重減少を伴う重篤な毒性を誘発し、生存率を改善することができなかった。対照的に、オンデマンドGLUT3 EGFRvIII CAR-T細胞は、重篤な毒性や体重減少を引き起こすことなく、有意な生存率改善効果を示した（図35c-e）。したがって、オンデマンドGLUT3 EGFRvIII CAR-T細胞を投与したマウスでのみ、腫瘍の再チャレンジも抑制された（図35b）。これに伴い、CAR-T細胞注射後14日目には、オンデマンドGLUT3 EGFRvIII CAR-T細胞で治療したマウスの末梢血において、ナイーブ/幹細胞メモリーサブセットおよびセントラルメモリーサブセットの高い頻度が検出され、一方、エフェクターメモリーサブセットは、GLUT3 EGFRvIII CAR-T細胞で治療したマウスにおいてより豊富であった（図35f）。オンデマンドGLUT3 EGFRvIII CAR-T細胞によって誘導された抗腫瘍効果のこの増加は、別の異種移植モデル（U-251 MGΔ）でも同様に観察された；他の治療群のマウスと比

較して、オンデマンドGLUT3 EGFRvIII CAR-T細胞で治療したマウスは、重篤な毒性を伴わずに優れた生存率を示した（図35gおよび図41b, c）。サイトカインレベル（TNF α および GM-CSF）は、腫瘍が既に拒絶された14日目でもGLUT3 EGFRvIII CAR-T細胞を投与したマウスの血清で継続的に高く、GLUT3 EGFRvIII CAR-T細胞を投与したマウスでは、conv EGFRvIII CAR-T細胞またはオンデマンドEGFRvIII CAR-T細胞を投与したマウスよりもサイトカイン減少率が有意に低かった（図35h, i）。さらに、サイトカイン放出症候群（CRS）の発症に關与すると報告されているサイトカイン（IL-5、IP-10、MDC）のレベルは、オンデマンドGLUT3 EGFRvIII CAR-T細胞で治療したマウスの血清よりも、GLUT3 EGFRvIII CAR-T細胞で治療したマウスの血清の方が高かった（図41d）。全体として、CAR-T細胞によるオンデマンドGLUT3発現は、GBMにおいて重篤な毒性を伴わずに持続的な抗腫瘍効果を達成する有望な戦略である。

[0241] 考察

TMEにおけるCAR-T細胞の代謝適性を高めることによって抗腫瘍効果を増強することは、難治性固形がんに対するCAR-T細胞療法の臨床応用を加速するための新たな概念である。GBMに対するCAR-T細胞の臨床試験の中には、臨床的有用性を示せなかったものもあるが、これらの臨床試験の免疫学的モニタリングにより、TMEにおいて豊富なCAR-T細胞が検出されることが明らかになった〔文献3-5〕。TMEにおけるCAR-T細胞の存在を考慮すると、失敗の原因から抗原の消失や遊走障害が除外され、GBMのTMEにおける特異的な条件がCAR-T細胞の機能不全の誘発に關与していることが想定できる。エフェクターT細胞は生存と活性化のために解糖を行うため、グルコースは不可欠な栄養素である〔文献19〕。したがって、著しい低グルコース環境がGBMのTMEで検出されることを考えると、GBMのTMEにおける低グルコースレベルは、CAR-T細胞

胞にとって主要な代謝ストレスであるに違いない。実際、conv EGFRvIII CAR-T細胞は機能不全状態にある（サイトカイン産生が少なく、疲弊マーカーの発現が高い）。さらに、PD-1シグナルはPI3K/Akt/mTORシグナルを破壊し、解糖経路はさらに障害されるため、エフェクターT細胞は負の代謝サイクルに入る可能性がある〔文献20〕。

[0242] 神経細胞やグリア細胞などの神経系細胞、およびGBM、特にEGFRvIIIを発現するGBMは、高親和性グルコーストランスポーターであるGLUT3を用いて高いグルコース要求量を満たしていることを考えると〔文献17, 18, 23〕、CAR-T細胞にGLUT3を高発現させれば、栄養競合を圧倒できる可能性が高い。実際、我々が開発したGLUT3 EGFRvIII CARコンストラクトは、GLUT3 EGFRvIII CAR-T細胞においてグルコースの取り込みと、サイトカイン産生や細胞毒性などのエフェクター機能を増強した。しかし予期せぬことに、GLUT3 EGFRvIII CAR-T細胞は抗原刺激後約24時間でアポトーシスを起こし、さらにGLUT3 EGFRvIII CAR-T細胞を投与したマウスはTRMで死亡した。包括的な遺伝子発現アッセイにより、GLUT3 EGFRvIII CAR-T細胞はTNF α シグナル伝達経路の遺伝子セットがアップレギュレートされた明確な遺伝子発現プロファイルを示したが、これはTNF α がFAS-FASL経路と同様にAICDの重要なメディエーターであることから、GLUT3を介した継続的なグルコース流入によるGLUT3 EGFRvIII CAR-T細胞の過剰活性化によって引き起こされたAICDと一致した〔文献24, 25〕。肺や脳の組織で重度の炎症が起こり、体重が減少するTRMは、TNF α を含む炎症性サイトカインの増加とも関連しており、CAR-T細胞で治療したがん患者で観察されるCRSを模倣している。CRSは、活性化CAR-T細胞によって産生されるIFN- γ 、TNF α 、GM-CSFによって誘発されると報告されている〔文献26〕。したがって、GLUT3 EGFRvIII CAR-T細胞を投与したマウスでは、CRSの重症度に関連するサイ

トカイン産生（IL-5、IL-10、MDC）の増加も観察された。本発明者らは *in vivo* 動物モデルとして、マクロファージを含む自然免疫細胞および獲得免疫細胞を欠失した NOD.Cg-Prkdc^{scid} Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ (NSG) マウスを用いたため、マクロファージが産生する炎症性サイトカインを評価することができなかった。

[0243] CAR-T細胞による安定的な GLUT3 発現の複雑さを克服するため、本発明者らは、CAR-T細胞がグルコース要求量に応じてオンデマンドで GLUT3 を発現し、グルコースを取り込むことができるオンデマンド GLUT3 発現系を開発した。この誘導性 GLUT3 発現は、抗原刺激の下流シグナルである NFAT の核内転位によって達成された。NFAT の核内転移は、TCR/CAR シグナル伝達直後に起こり、30 分でピークに達する [文献 29]。NFAT は、保存された DNA 結合ドメイン (NFAT 結合ドメイン) に結合し、T 細胞の活性化に必要な遺伝子のパネルを促進する。その中には、増大するエネルギー需要を満たすために、酸化的リン酸化から好氣的解糖系へのエネルギーシフトを誘導する遺伝子も含まれる [文献 30, 31]。このように、GLUT3 の発現は TME で抗原に遭遇すると誘導され、GLUT3 の発現動態は NFAT の発現動態に匹敵する。加えて、抗 CD19 CAR-T細胞における安定した GLUT3 の過剰発現は、血液悪性腫瘍モデルにおいて有益ではない [文献 32]。CAR-T細胞は、代謝的に過酷で低グルコースな GBM の TME に到達する前に、末梢血中の高グルコース環境など様々なグルコース条件を通過するため、抗原曝露時にオンデマンドで GLUT3 を発現させることが望ましく、必要である。

[0244] さらに、CAR-T細胞によるオンデマンド GLUT3 発現は、代謝適性の向上を通じてメモリー細胞の形成に有利な効果をもたらし、前臨床モデルにおいて顕著な生存利益を伴う持続的な抗腫瘍効果をもたらす。さらに、オンデマンド GLUT3 発現は、TNF α のような炎症性サイトカインの持続的産生を、安定した GLUT3 発現によって調節し、TRM を有意に減少させた。EGFR とインターロイキン 13 受容体サブユニット $\alpha 2$ (IL-1

3R α 2)を標的とするバイシストロニックCAR-T細胞をGBMに髄腔内導入した臨床試験において、全患者(n=6)にTRMが認められた、全患者(n=6)が免疫エフェクター細胞関連神経毒性症候群(ICANS)の早期発症を経験し、高用量のデキサメタゾンとアナキンラ(抗IL-1R抗体)の投与を必要とした。このことは、CRSやICANSのようなCAR-T細胞の毒性が大きな懸念事項であることを示している。加えて、高用量のステロイドはCAR-T細胞の抗腫瘍効果を低下させる可能性がある[文献33, 34]。従って、オンデマンドGLUT3発現は、持続的な抗腫瘍効果と安全性プロファイルの両方を達成する理想的な戦略となりうる。これらの知見は、免疫細胞浸潤のタイミングと持続性の重要性に光を当てている。

[0245] 本発明者らは、抗原刺激時に作用するオンデマンドシステムを用いて、CAR-T細胞治療による全身性の有害事象を伴わない抗腫瘍活性の増強と持続性の達成に成功した。TMEにおける抗原認識時に標的分子が理想的に誘導されることを考えると、このオンデマンド・システムを他の分子、例えば他の代謝関連分子(グルタミン・トランスポーター、脂肪酸代謝酵素などを含む)、サイトカイン、ケモカインなどに拡張することが推測できる。例えばIL-12は、臨床研究における動物実験に基づいて、有望な抗腫瘍サイトカインとして紹介された[文献35-37]。しかし、重篤な副作用がその臨床応用を妨げている[文献38, 39]。TMEにオンデマンドでIL-12を供給することで、副作用を克服し、抗腫瘍効果を最大化できる可能性がある。

[0246] 要約すると、抗原刺激によりオンデマンドGLUT3発現が誘導され、新規CAR-T細胞コンストラクトが開発された。オンデマンドGLUT3 CAR-T細胞は、重篤な毒性を示すことなく、理想的な代謝適性により持続的な抗腫瘍効果を示した。代謝供給には繊細な制御が必要であるため、オンデマンドアプローチは有望な戦略である。総じて、この研究は、GBMおよび他の固形癌における免疫療法に代謝適性を用いることに深い示唆を与え

るものである。

[0247] (実施例6：TCRの例)

同様の実験をCARに代えてTCRを導入する例で実施する。例えば、 T_{ff} 、 T_{nv} 、 T_{cm} 、 T_{em} 、 T_{emra} などの分画にもTCRを導入することができる。

[0248] 本実施例では、純化・濃縮された任意のT細胞メモリー分画に、TCR (CAR、恒常発現GLUT3 CARまたはon-demand GLUT3 CAR)を導入する。別の実験において、培養条件にて、任意のT細胞メモリー分画が濃縮されたTCR-T細胞を誘導する。

[0249] 実施例1～5で示した各種*in vitro*および*in vivo*での評価を行う。

[0250] (実施例7：細菌感染症の予防、再感染予防、および治療)

本実施例では、細菌感染症の予防、再感染予防、および／または治療を検証する。

[0251] (方法)

細菌感染症 (例えば、細菌性結膜炎など) に対する予防においては、細菌感染症を有さない被験者に対し、細菌感染症の感染原因抗原で改変された本開示のT細胞を投与する。

[0252] 細菌感染症 (例えば、細菌性結膜炎など) に対する再発予防および／または治療においては、細菌感染症を有していた、および／または細菌感染症を有している被験者に対し、本開示のT細胞を投与する。

[0253] 投与後に、本技術分野で慣用される技術によって、被験者における細菌感染症の予後観察を実施する。

[0254] (実施例8：寄生虫感染症の予防、再感染予防、および治療)

本実施例では、寄生虫感染症の予防、再感染予防、および／または治療を検証する。

[0255] (方法)

寄生虫感染症 (例えば、アカントアメーバ角膜炎など) に対する予防にお

いては、寄生虫感染症を有さない被験者に対し、寄生虫感染症の感染原因抗原で改変された本開示のT細胞を投与する。

[0256] 寄生虫感染症（例えば、アカントアメーバ角膜炎など）に対する再発予防および／または治療においては、寄生虫感染症を有していた、および／または寄生虫感染症を有している被験者に対し、本開示のT細胞を投与する。

[0257] 投与後に、本技術分野で慣用される技術によって、被験者における寄生虫感染症の予後観察を実施する。

[0258] （実施例9：ウイルス感染症の感染予防、発症予防、再感染予防、および治療）

本実施例では、ウイルス感染症の感染予防、発症予防、再感染予防、および／または治療の検証を行う。

[0259] （方法）

ウイルス感染症（例えば、結核、マラリア、黄熱ウイルス、天然痘ウイルス、種痘、麻疹／風疹、ポリオ、流行性耳下腺炎（おたふく）／MUMPS、ロタウイルス感染、水痘（みずぼうそう）、黄熱病、エボラ、西ナイル熱、ヒブ感染症、肺炎球菌感染症、百日せき、日本脳炎、髄膜炎菌感染症、サルモネラ感染症、病原性大腸菌、トキソプラズマ、ジカウイルス、ヘルペスウイルス1型、EBV／エプスタインバーウイルス（ヘルペスウイルス4型）、CMV／サイトメガロウイルス（ヘルペスウイルス5型）、インフルエンザ（ウイルス）、MARS、狂犬病、ジフテリア、等を含みうるがこれに限定されないなど）に対する予防においては、ウイルス感染症を有さない被験者に対し、ウイルス感染症の感染原因抗原で改変された本開示のT細胞を投与する。

[0260] 上記ウイルス感染症に対する再発予防および／または治療においては、ウイルス感染症を有していた、および／またはウイルス感染症を有している被験者に対し、本開示のT細胞を投与する。

[0261] 投与後に、本技術分野で慣用される技術によって、被験者におけるウイルス感染症の予後観察を実施する。

[0262] (実施例 10 : アレルギーの予防、再発予防、および治療)

本実施例では、アレルギーの予防、再発予防、および／または治療を検証する。

[0263] (方法)

アレルギー（例えば、アレルギー性結膜炎）に対する予防においては、アレルギーの原因因子抗原を有さない被験者に対し、アレルギー感染原因抗原で改変された本開示の T 細胞を投与する。

[0264] アレルギー（例えば、アレルギー性結膜炎）に対する再発予防および／または治療においては、アレルギーの原因因子抗原を有していた、および／またはアレルギーの原因因子抗原を有している被験者に対し、本開示の T 細胞を投与する。

[0265] 投与後に、本技術分野で慣用される技術によって、被験者におけるアレルギーの予後観察を実施する。

[0266] (実施例 11 : 自己免疫疾患の予防、再発予防、および治療)

本実施例では、自己免疫疾患の予防、再発予防、および／または治療を検証する。

[0267] (方法)

自己免疫疾患（例えば、自己免疫性ぶどう膜炎）に対する予防においては、アレルギーの原因因子抗原を有さない被験者に対し、自己免疫疾患感染原因抗原で改変された本開示の T 細胞を投与する。

[0268] 自己免疫疾患（例えば、自己免疫性ぶどう膜炎）に対する再発予防および／または治療においては、自己免疫疾患の原因因子抗原を有していた、および／または自己免疫疾患の原因因子抗原を有している被験者に対し、本開示の T 細胞を投与する。

[0269] 投与後に、本技術分野で慣用される技術によって、被験者における自己免疫疾患の予後観察を実施する。

[0270] 参考文献

1. Stupp R, Taillibert S, Kanner A, et al (2017) Effect of

Tumor-Treating Fields Plus Maintenance Temozolomide vs Maintenance Temozolomide Alone on Survival in Patients With Glioblastoma: A Randomized Clinical Trial. *Jama*;318(23):2306-16.

2. Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, et al (2005) Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med*;352(10):987-96.

3. O'Rourke DM, Nasrallah MP, Desai A, et al (2017) A single dose of peripherally infused EGFRvIII-directed CAR T cells mediates antigen loss and induces adaptive resistance in patients with recurrent glioblastoma. *Sci Transl Med*;9(399).

4. Bagley SJ, Logun M, Fraietta JA, et al (2024) Intrathecal bivalent CAR T cells targeting EGFR and IL13R α 2 in recurrent glioblastoma: phase 1 trial interim results. *Nat Med*;30(5):1320-9.

5. Brown CE, Hibbard JC, Alizadeh D, et al (2024) Locoregional delivery of IL-13R α 2-targeting CAR-T cells in recurrent high-grade glioma: a phase 1 trial. *Nat Med*;30(4):1001-12.

6. Bagley SJ, Binder ZA, Lamrani L, et al (2024) Repeated peripheral infusions of anti-EGFRvIII CAR T cells in combination with pembrolizumab show no efficacy in glioblastoma: a phase 1 trial. *Nat Cancer*;5(3):517-31.

7. Choi BD, Gerstner ER, Frigault MJ, et al (2024) Intraventricular CARv3-TEAM-E T Cells in Recurrent Glioblastoma. *N Engl J Med*;390(14):1290-8.

8. Maude SL, Frey N, Shaw PA, et al (2014) Chimeric antigen receptor T cells for sustained remissions in leukemia. *N Engl J Med*;371(16):1507-17.

9. Grupp SA, Kalos M, Barrett D, et al (2013) Chimeric ant

- igen receptor-modified T cells for acute lymphoid leukemia. *N Engl J Med*;368(16):1509-18.
10. Porter DL, Levine BL, Kalos M, et al (2011) Chimeric antigen receptor-modified T cells in chronic lymphoid leukemia. *N Engl J Med*;365(8):725-33.
11. Mergenthaler P, Lindauer U, Dienel GA, Meisel A (2013) Sugar for the brain: the role of glucose in physiological and pathological brain function. *Trends Neurosci*;36(10):587-97.
12. Sheraj I, Guray NT, Banerjee S (2021) A pan-cancer transcriptomic study showing tumor specific alterations in central metabolism. *Sci Rep*;11(1):13637.
13. Oudard S, Arvelo F, Miccoli L, et al (1996) High glycolysis in gliomas despite low hexokinase transcription and activity correlated to chromosome 10 loss. *Br J Cancer*;74(6):839-45.
14. Santra A, Kumar R, Sharma P, et al (2012) F-18 FDG PET-CT in patients with recurrent glioma: comparison with contrast enhanced MRI. *Eur J Radiol*;81(3):508-13.
15. Maher EA, Marin-Valencia I, Bachoo RM, et al (2012) Metabolism of [U-13 C]glucose in human brain tumors in vivo. *NMR Biomed*;25(11):1234-44.
16. Flavahan WA, Wu Q, Hitomi M, et al (2013) Brain tumor initiating cells adapt to restricted nutrition through preferential glucose uptake. *Nat Neurosci*;16(10):1373-82.
17. Vannucci SJ, Maher F, Simpson IA (1997) Glucose transporter proteins in brain: delivery of glucose to neurons and glia. *Glia*;21(1):2-21.
18. Chen S, Yang L, Li Z, et al (2021) EGFR/EGFRvIII part I

y regulates the tumorigenesis of glioblastoma through the S0X9-GLUT3 axis. *Am J Transl Res*;13(6):6055-65.

19. Ho PC, Bihuniak JD, Macintyre AN, et al (2015) Phosphoenolpyruvate Is a Metabolic Checkpoint of Anti-tumor T Cell Responses. *Cell*;162(6):1217-28.

20. Chang CH, Qiu J, O'Sullivan D, et al (2015) Metabolic Competition in the Tumor Microenvironment Is a Driver of Cancer Progression. *Cell*;162(6):1229-41.

21. Peng JJ, Wang L, Li Z, et al (2023) Metabolic challenges and interventions in CAR T cell therapy. *Sci Immunol*;8(82):eabq3016.

22. Green DR, Droin N, Pinkoski M (2003) Activation-induced cell death in T cells. *Immunol Rev*;193:70-81.

23. Schmidt S, Hommel A, Gawlik V, et al (2009) Essential role of glucose transporter GLUT3 for post-implantation embryonic development. *J Endocrinol*;200(1):23-33.

24. Otano I, Alvarez M, Minute L, et al (2020) Human CD8 T cells are susceptible to TNF-mediated activation-induced cell death. *Theranostics*;10(10):4481-9.

25. Zhang M, Wang J, Jia L, et al (2017) Transmembrane TNF- α promotes activation-induced cell death by forward and reverse signaling. *Oncotarget*;8(38):63799-812.

26. Morris EC, Neelapu SS, Giavridis T, Sadelain M (2022) Cytokine release syndrome and associated neurotoxicity in cancer immunotherapy. *Nat Rev Immunol*;22(2):85-96.

27. Guo XJ, Thomas PG (2017) New fronts emerge in the influenza cytokine storm. *Semin Immunopathol*;39(5):541-50.

28. Mehta P, McAuley DF, Brown M, et al (2020) COVID-19: c

onsider cytokine storm syndromes and immunosuppression. *Lancet*; 395(10229):1033-4.

29. Maguire O, Tornatore KM, O'Loughlin KL, et al (2013) Nuclear translocation of nuclear factor of activated T cells (NFAT) as a quantitative pharmacodynamic parameter for tacrolimus. *Cytometry A*;83(12):1096-104.

30. Mognol GP, de Araujo-Souza PS, Robbs BK, et al (2012) Transcriptional regulation of the c-Myc promoter by NFAT1 involves negative and positive NFAT-responsive elements. *Cell Cycle*;11(5):1014-28.

31. Siska PJ, Rathmell JC (2015) T cell metabolic fitness in antitumor immunity. *Trends Immunol*;36(4):257-64.

32. Shi Y, Kotchetkov IS, Dobrin A, et al (2024) GLUT1 overexpression enhances CAR T cell metabolic fitness and anti-tumor efficacy. *Mol Ther*;32(7):2393-405.

33. Liu S, Deng B, Yin Z, et al (2020) Corticosteroids do not influence the efficacy and kinetics of CAR-T cells for B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood Cancer J*;10(2):15.

34. Strati P, Ahmed S, Furqan F, et al (2021) Prognostic impact of corticosteroids on efficacy of chimeric antigen receptor T-cell therapy in large B-cell lymphoma. *Blood*;137(23):3272-6.

35. Brunda MJ, Luistro L, Warriar RR, et al (1993) Antitumor and antimetastatic activity of interleukin 12 against murine tumors. *J Exp Med*;178(4):1223-30.

36. Nguyen KG, Vrabel MR, Mantooth SM, et al (2020) Localized Interleukin-12 for Cancer Immunotherapy. *Front Immunol*;11:575597.

37. Noguchi Y, Jungbluth A, Richards EC, Old LJ (1996) Effect of interleukin 12 on tumor induction by 3-methylcholanthrene. *Proc Natl Acad Sci U S A*;93(21):11798-801.
38. Hurteau JA, Blessing JA, DeCesare SL, Creasman WT (2001) Evaluation of recombinant human interleukin-12 in patients with recurrent or refractory ovarian cancer: a gynecologic oncology group study. *Gynecol Oncol*;82(1):7-10.
39. Motzer RJ, Rakhit A, Thompson JA, et al (2001) Randomized multicenter phase II trial of subcutaneous recombinant human interleukin-12 versus interferon-alpha 2a for patients with advanced renal cell carcinoma. *J Interferon Cytokine Res*;21(4):257-63.
40. Kumagai S, Togashi Y, Kamada T, et al (2020) The PD-1 expression balance between effector and regulatory T cells predicts the clinical efficacy of PD-1 blockade therapies. *Nat Immunol*;21(11):1346-58.
41. Kumagai S, Koyama S, Itahashi K, et al (2022) Lactic acid promotes PD-1 expression in regulatory T cells in highly glycolytic tumor microenvironments. *Cancer Cell*;40(2):201-18.e9.
42. Tada Y, Togashi Y, Kotani D, et al (2018) Targeting VEGFR2 with Ramucirumab strongly impacts effector/activated regulatory T cells and CD8+ T cells in the tumor microenvironment. *J Immunother Cancer*;6(1):106.
43. Tanegashima T, Togashi Y, Azuma K, et al (2019) Immune Suppression by PD-L2 against Spontaneous and Treatment-Related Antitumor Immunity. *Clin Cancer Res*;25(15):4808-19.
44. Dobin A, Gingeras TR (2015) Mapping RNA-seq Reads with

STAR. Curr Protoc Bioinformatics;51:11.4.1-.4.9.

45. Etoh K, Nakao M (2023) A web-based integrative transcriptome analysis, RNAseqChef, uncovers the cell/tissue type-dependent action of sulforaphane. J Biol Chem;299(6):104810.

[0271] (注記)

以上のように、本開示の好ましい実施形態を用いて本開示を例示してきたが、本開示は、特許請求の範囲によってのみその範囲が解釈されるべきであることが理解される。本明細書において引用した特許、特許出願及び他の文献は、その内容自体が具体的に本明細書に記載されているのと同様にその内容が本明細書に対する参考として援用されるべきであることが理解される。本願は日本国特許庁に2024年1月9日出願した特願2024-001533に対して優先権を主張するものであり、その内容はその全体が本明細書において参考として援用される。

産業上の利用可能性

[0272] 本開示によれば、腫瘍微小環境（TME）条件などのグルコースが枯渇した環境においても、飢餓・疲弊せずに、がん細胞に対して競合性を有する細胞を提供することができ、そのため、細胞ベース免疫療法の効果を向上させるための戦略を開発することができ、医療分野において応用が期待される。

請求の範囲

- [請求項1] グルコース取り込み能が強化されたT細胞であって、腫瘍微小環境条件の変化に応じて、前記T細胞においてグルコーストランスポーターの発現が調節される、T細胞。
- [請求項2] 前記腫瘍微小環境条件は、TCR関連シグナルの伝達の度合いを含む、請求項1に記載のT細胞。
- [請求項3] 前記TCR関連シグナルは、TCRシグナルまたはその一部、およびTCRシグナルと他の抗原のキメラのシグナル(CARシグナルともいう)からなる群より選択される分子によって媒介される、請求項2に記載のT細胞。
- [請求項4] 前記TCR関連シグナルは、TCRシグナルドメイン含む分子によって媒介される、請求項2または3項に記載のT細胞。
- [請求項5] 前記腫瘍微小環境条件の変化は、腫瘍抗原および／または共刺激リガンドの提示、ならびに／またはサイトカイン条件の変化を含む、請求項1～4のいずれか一項に記載のT細胞。
- [請求項6] 前記TCR関連シグナルの伝達の度合いは、TCR刺激の度合いを含む、請求項2～5のいずれか一項に記載のT細胞。
- [請求項7] 前記TCR関連シグナルの伝達の度合いは、TCR刺激の度合い、TCR共刺激および液性因子からなる群より選択される少なくとも1つを含む、請求項2～6のいずれか一項に記載のT細胞。
- [請求項8] 前記TCR関連シグナルの伝達の度合いは、TCR刺激の度合いと、TCR共刺激および液性因子からなる群より選択される少なくとも1つとを含む、請求項2～7のいずれか一項に記載のT細胞。
- [請求項9] 前記TCR関連シグナルの伝達の度合いは、TCR刺激の度合い、TCR共刺激および液性因子を含む、請求項2～8のいずれか一項に記載のT細胞。
- [請求項10] 前記TCR刺激は、T細胞の活性化に伴い、核内移行する、NFAT、NF- κ B、およびSTAT転写因子ファミリーからなる群より

選択される、請求項 6 ～ 9 のいずれか一項に記載の T 細胞。

[請求項11] 前記腫瘍微小環境条件は、酸素濃度の度合いを含む、請求項 1 ～ 10 のいずれか一項に記載の T 細胞。

[請求項12] 腫瘍微小環境条件の変化を感知する腫瘍微小環境感知エレメントが作動可能に連結されたグルコーストランスポーターをコードする核酸配列を含む T 細胞。

[請求項13] 前記腫瘍微小環境感知エレメントは、
(i) 腫瘍微小環境条件の変化に応じて活性化する誘導活性化モチーフ
(i i) 前記腫瘍微小環境条件の変化に応じて不活性化する前記グルコーストランスポーターの分解因子をコードする核酸配列
を含む、請求項 1 2 に記載の T 細胞。

[請求項14] 前記腫瘍微小環境感知エレメントは、
(i) T 細胞の活性化に反応して核内に移行する核内移行因子が結合する誘導活性化モチーフ、
(i i) 酸素濃度の低下に反応して核内に移行する核内移行因子が結合する核内移行結合誘導活性化モチーフ、
(i i i) 前記酸素濃度の低下に反応してグルコーストランスポーターを分解する活性が不活性化されるグルコーストランスポーター分解酵素をコードする核酸配列
を含む、請求項 1 2 または 1 3 に記載の T 細胞。

[請求項15] 前記グルコーストランスポーターをコードする核酸配列が、腫瘍微小環境条件の変化に応じて活性化する誘導活性化モチーフおよび／または前記腫瘍微小環境条件の変化に応じて不活性化する前記グルコーストランスポーターの分解因子をコードする核酸配列に作動可能に連結されたコンストラクトを含む、請求項 1 ～ 1 4 のいずれか一項に記載の T 細胞。

[請求項16] 前記グルコーストランスポーターをコードする核酸配列が、 T 細胞

の活性化に反応して核内に移行する核内移行因子が結合する核内移行結合誘導活性化モチーフに作動可能に連結されたコンストラクトを含む、請求項1～15のいずれか一項に記載のT細胞。

[請求項17] 前記核内移行因子は、NFAT、NF- κ B、およびSTAT転写因子ファミリーからなる群より選択される、請求項1～16のいずれか一項に記載のT細胞。

[請求項18] 前記核内移行結合誘導活性化モチーフは、NFAT結合ドメイン、 κ Bモチーフ(GGGACTTTCC)(配列番号1)およびSTAT結合配列(TTCNNNGAA)、またはそれらの改変配列からなる群より選択される、請求項16または17に記載のT細胞。

[請求項19] 前記核内移行因子と前記核内移行結合誘導活性化モチーフの組合せは、
(1) NFATとNFAT結合ドメインとの組合せ
(2) NF- κ Bと κ Bモチーフ(GGGACTTTCC)(配列番号1)の組合せ、または
(3) STAT転写因子ファミリーとSTAT結合配列(TTCNNNGAA)の組合せを含む、請求項16～18のいずれか一項に記載のT細胞。

[請求項20] 前記グルコーストランスポーターをコードする核酸配列が、酸素濃度の低下に反応して核内に移行する核内移行因子が結合する核内移行結合誘導活性化モチーフに作動可能に連結されたコンストラクトを含む、請求項1～19のいずれか一項に記載のT細胞。

[請求項21] 前記核内移行因子は、HIF-1からなる群より選択される、請求項16～20のいずれか一項に記載のT細胞。

[請求項22] 前記核内移行結合誘導活性化モチーフは、HIF-REからなる群より選択される、請求項13～21のいずれか一項に記載のT細胞。

[請求項23] 前記核内移行因子と核内移行結合誘導活性化モチーフの組合せは、
(1) HIF-1とHIF-REの組合せ、

からなる群より選択される、請求項 13～22 のいずれか一項に記載の T 細胞。

[請求項24] 前記グルコーストランスポーターをコードする核酸配列が、酸素濃度の低下に反応して前記グルコーストランスポーターを分解する活性が不活性化される因子をコードする核酸配列に作動可能に連結されたコンストラクトを含む、請求項 1～23 のいずれか一項に記載の T 細胞。

[請求項25] 前記不活性化される因子は、酸素依存的分解因子（ODD）からなる群より選択される、請求項 15～24 のいずれか一項に記載の T 細胞。

[請求項26] 前記 T 細胞がキメラ抗原受容体（CAR）を含む、請求項 1～25 のいずれか一項に記載の T 細胞。

[請求項27] 前記 T 細胞はエフェクター機能を有する、請求項 1～26 のいずれか一項に記載の T 細胞。

[請求項28] 前記 T 細胞はエフェクター T 細胞（ T_{eff} ）の前駆細胞である、請求項 1～26 のいずれか一項に記載の T 細胞。

[請求項29] 前記エフェクター T 細胞の前駆細胞は、メモリー機能が延長される、請求項 28 に記載の T 細胞。

[請求項30] 前記エフェクター T 細胞の前駆細胞は、メモリー T 細胞の表現型が維持される、請求項 28 または 29 に記載の T 細胞。

[請求項31] 前記エフェクター T 細胞が活性化されまたは活性が維持され、および前記エフェクター T 細胞の前駆細胞は、メモリー機能が延長されまたはメモリー T 細胞の表現型が維持される、請求項 28～30 のいずれか一項に記載の T 細胞。

[請求項32] 前記発現および／または増強が、腫瘍環境特異的に達成される、請求項 1 または 26～31 のいずれか一項に記載の T 細胞。

[請求項33] 前記 CAR は前記 T 細胞に発現されたものである、請求項 26～32 のいずれか一項に記載の T 細胞。

- [請求項34] 前記グルコーストランスポーターが、GLUT 1、GLUT 2、GLUT 3、およびGLUT 4を含む、請求項1～33のいずれか一項に記載のT細胞。
- [請求項35] 前記グルコーストランスポーターがGLUT 3である、請求項1～34のいずれか一項に記載のT細胞。
- [請求項36] ヒトT細胞である、請求項1～35のいずれか一項に記載のT細胞。
- [請求項37] 需要に応じて（オンデマンドで）グルコース取り込み能が強化されたT細胞を含む細胞集団。
- [請求項38] 請求項1～36のいずれか一項に記載のT細胞を含む、細胞集団。
- [請求項39] 前記T細胞は、体内に導入されたときに、エフェクター機能を有する性質を有する細胞を含む、請求項37または38に記載の細胞集団。
- [請求項40] 前記T細胞がキメラ抗原受容体（CAR）を含む、請求項37～39のいずれか一項に記載の細胞集団。
- [請求項41] 前記T細胞は、腫瘍微小環境条件の変化に応じて、前記T細胞においてグルコーストランスポーターの発現が調節されるように改変され、および／または腫瘍微小環境条件の変化を感知する腫瘍微小環境感知エレメントが作動可能に連結されたグルコーストランスポーターをコードする核酸配列を含む、請求項37～40のいずれか一項に記載の細胞集団。
- [請求項42] 前記T細胞はエフェクター機能を有する、請求項37～41のいずれか一項に記載の細胞集団。
- [請求項43] 前記細胞集団は、 T_{eff} を含む、請求項37～42のいずれか一項に記載の細胞集団。
- [請求項44] 前記細胞集団は、 T_{eff} の前駆細胞を含む、請求項37～43のいずれか一項に記載の細胞集団。
- [請求項45] 前記CARは前記T細胞に発現されたものである、請求項38～44

のいずれか一項に記載の細胞集団。

- [請求項46] 前記グルコーストランスポーターが、GLUT 1、GLUT 2、GLUT 3、およびGLUT 4を含む、請求項37～45のいずれか一項に記載の細胞集団。
- [請求項47] 前記グルコーストランスポーターがGLUT 3である、請求項37～46のいずれか一項に記載の細胞集団。
- [請求項48] 前記T細胞はヒトT細胞である、請求37～47のいずれか一項に記載の細胞集団。
- [請求項49] 請求項1～36のいずれか一項に記載のT細胞または請求項37～48のいずれか一項に記載の細胞集団を含む、医薬組成物。
- [請求項50] がんの予防または治療のためのものである、請求項49に記載の医薬組成物。
- [請求項51] がんの治癒のためのものである、請求項49または50に記載の医薬組成物。
- [請求項52] がんの転移予防または再発予防のためのものである、請求項49～51のいずれか一項に記載の医薬組成物。
- [請求項53] 再発しないようにがんを予防または治療するためのものである、請求項49～52のいずれか一項に記載の医薬組成物。
- [請求項54] 医薬として使用するための、請求項1～36のいずれか一項に記載のT細胞または請求項37～48のいずれか一項に記載の細胞集団。
- [請求項55] 有効量の請求項1～36のいずれか一項に記載のT細胞または請求項37～48のいずれか一項に記載の細胞集団を対象に投与することを含む、対象における疾患を予防または治療するための方法。
- [請求項56] 医薬を製造するための、請求項1～36のいずれか一項に記載のT細胞または請求項37～48のいずれか一項に記載の細胞集団の使用。