

明 細 書

発明の名称：

サバイバーT細胞、サバイバーT細胞集団および医薬組成物

技術分野

[0001] 本開示は、グルコース取り込み能が強化されたサバイバーT細胞、サバイバーT細胞集団およびそのような細胞または細胞集団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細胞あって、腫瘍環境中でも飢餓・疲弊せずに機能する細胞、それ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。

[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。

〔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、項目1に記載の細胞。

〔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T細胞。

〔項目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T細胞。

〔項目8〕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9〕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あって、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、細胞集団。

〔項目 1 0〕 前記 T 細胞は、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／またはグルコーストランスポーターの発現が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 1 1〕 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 1 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、上記項目のいずれか一項に記載の細胞集団。

〔項目 1 2 A〕 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 1 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 1 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 1 4 A〕 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 1 5〕 前記 CAR または TCR 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 1 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 1 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 1 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 1 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 2 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 20 A〕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 21〕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 21 A〕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医薬組成物。

〔項目 21 B〕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医薬組成物。

〔項目 21 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 21 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 22〕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組成物。

〔項目 23〕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 細胞または上記項目のいずれか一項に記載の細胞集団。

〔項目 24〕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 24 A〕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

記載の細胞または細胞集団。

〔項目 2 5〕 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 2 5 A〕 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細胞または細胞集団。

〔項目 2 5 B〕 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細胞または細胞集団。

〔項目 2 5 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 2 5 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 2 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 2 7〕 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 2 8〕 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 2 8 A〕 前記対象の治療または予防は、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方法。

〔項目 29〕 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を含む、方法。

〔項目 29 A〕 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 29 B〕 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 29 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方法。

〔項目 29 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 30〕 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方法。

〔項目 31〕 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、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 32〕 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 32 A〕 前記医薬は、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使用。

〔項目 33〕 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33A] 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33B] 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33C] 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33D] 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34] 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。

本開示は以下をも提供する。

[項目B0] 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／またはグルコーストランスポーターの発現が増強したエフェクターT細胞であって、前記T細胞は、低グルコース条件[0.5 mM]下で、通常グルコース条件[10 mM]下と少なくとも同等のエフェクター機能を示す、エフェクターT細胞。

[項目B1] キメラ抗原受容体(CAR)を含む、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／またはグルコーストランスポーターの発現が増強したエフェクターT細胞であって、前記T細胞は、低グルコース条件[0.5 mM]下で、通常グルコース条件[10 mM]下と少なく

とも同等のエフェクター機能を示す、エフェクターT細胞。

〔項目B2〕前記CARは前記T細胞に発現されたものである、上記項目に記載のT細胞。

〔項目B3〕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B4〕キメラ抗原受容体〔CAR〕を含む、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／またはグルコーストランスポーターの発現が増強したエフェクターT細胞であって、前記T細胞は、低グルコース条件〔0.5mM〕下で、通常グルコース条件〔10mM〕下と少なくとも同等のエフェクター機能を示し、前記グルコーストランスポーターがGLUT3である、T細胞。

〔項目B5〕GLUT3遺伝子が導入されたエフェクターT細胞。

〔項目B6〕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B7A〕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／またはグルコーストランスポーターの発現が増強したエフェクターT細胞を含む細胞集団であって、前記T細胞は、低グルコース条件〔0.5mM〕下で、通常グルコース条件〔10mM〕下と少なくとも同等のエフェクター機能を示す、細胞集団。

〔項目B8〕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B7〕キメラ抗原受容体〔CAR〕を含む、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／またはグルコーストランスポーターの発現が増強したエフェクターT細胞を含む細胞集団であって、前記T細胞は、低グルコース条件〔0.5mM〕下で、通常グルコース条件〔10mM〕下と少なくとも同等のエフェクター機能を示す、細胞集団。

〔項目B8〕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 B 9〕 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、上記項目のいずれか一項に記載の細胞集団。

〔項目 B 10〕 キメラ抗原受容体〔CAR〕を含む、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／またはグルコーストランスポーターの発現が増強したエフェクター T 細胞を含む細胞集団であって、前記 T 細胞は、低グルコース条件〔0.5 mM〕下で、通常グルコース条件〔10 mM〕下と少なくとも同等のエフェクター機能を示し、前記グルコーストランスポーターが GLUT 3 である、細胞集団。

〔項目 B 11〕 GLUT 3 遺伝子が導入されたエフェクター T 細胞を含む細胞集団。

〔項目 B 12〕 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 B 13〕 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 B 14〕 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 B 15〕 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 B 16〕 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 B 1 7〕 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 B 1 8〕 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 B 1 9〕 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 B 2 0〕 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 B 2 1〕 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 B 2 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 細胞または上記項目のいずれか一項に記載の細胞集団。

〔項目 B 2 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 B 2 4〕 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細胞または細胞集団。

〔項目 B 2 5〕 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 B 2 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細胞または細胞集団

。

〔項目 B 2 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細胞または細胞集団。

〔項目 B 2 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細胞または細胞集団。

〔項目 B 2 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細胞または細胞集団。

〔項目 B 3 0〕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細胞または細胞集団。

〔項目 B 3 1〕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 B 3 2〕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 B 3 3〕前記対象の治療または予防は、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方法。

〔項目 B 3 4〕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含む、方法。

〔項目 B 3 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方法。

〔項目 B 3 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方法。

〔項目 B 3 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方法。

〔項目 B 3 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方法。

〔項目 B 3 9〕 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方法。

〔項目 B 4 0〕 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 B 4 1〕 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 B 4 2〕 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 B 4 3〕 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ものである、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 B 4 4〕 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 B 4 5〕 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 B 4 6〕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 B 4 7〕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 B 4 8〕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使用。

[0009] 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。

[0010] 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

[0011] 本開示により、グルコース取り込み能が強化された T 細胞および／または関連する細胞集団を提供することができ、このような細胞および／または関連する細胞集団を用いることで、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 細胞および／または関連する細胞集団を提供することができる。

[0012] 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（サバイバー T 細胞）または関連する細胞集団といえることができる。本開示の細胞および関連する細胞集団によれば、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い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一過性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なメモリーフェノタイプ型 T 細胞が誘

導され得る。

図面の簡単な説明

[0013] [図1]図1は、代謝改変抗EGFRvIII CAR (3C10CAR__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 IC D)、4-1BB IC D、CD3 z 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3C10CAR__GLUT3をEF-1a 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 CAR-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LOG2 (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 (10 mM)、低グルコース条件下 (0.5 mM) 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 CAR-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（ $\text{IFN-}\gamma$ 、 IL-2 、 $\text{TNF-}\alpha$ ）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、 $\text{IFN-}\gamma$ 、 IL-2 および $\text{TNF-}\alpha$ のそれぞれの通常グルコース条件下（10 mM）と低グルコース条件下（0.5 mM）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10 mM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0.5 mM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（Pre-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CD45 RA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

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（10 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、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、3C

10 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。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細胞群治療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、GLUT3発現システムのデザインを示す。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)、P2Aシーケンス(P2A)、高親和性グルコース輸送体(GLUT3)を示す。Stb1-GLUT3はGLUT3 CARと同一のものである。

[図15]図15は、マウスモデルでMock T細胞とGLUT3 CAR-T細胞の抗腫瘍効果を評価を示す。上に実験模式図を示す。左上に治療後の Kaplan-Meier 曲線を示す。下に、生体発光イメージング(BLI)にて定量した経時的な腫瘍量の推移を示す。Mock T細胞では腫瘍は抑制せれず、GLUT3 CAR-Tでは4頭の完全寛解(CR)が得られた。

[図16]図16は、腫瘍Rechallenge実験(GLUT3 CAR-

T細胞群でのマウス頓死)を示す。GLUT3 CAR-T細胞治療後の腫瘍量、および、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日目の腫瘍イメージング像を示す)。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”)。1×10⁵細胞の腫瘍細胞を再移植、GLUT3 CAR-T群において4匹中1匹のマウスがCRとなった。しかし、4匹中3匹のマウスが死亡した(非腫瘍増幅死)。

[図17]図17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 CAR-T細胞、GLUT3 CAR-T細胞評価対象とし、刺激なし群と刺激あり(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27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。低グルコース条件下において通常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陰性のエフェクターメモリーT細胞(Tem)や終末分化RA陽性T細胞(Temra)へと終末分化、stemnessの消失、アポトーシスに陥る。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、グルコース依存性の高いGLUT3 CAR-Tはアポトーシスに陥りやすい。

[図18]図18は、体内での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

ーT細胞を経尾静脈投与し、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では樹立CAR-T細胞をそのまま使用、実験2では、高グルコース環境に暴露後投与、実験3では低グルコース高乳酸環境が報告されている肝臓に腫瘍を移植し実験、実験4にて、T細胞の生着、腫瘍への浸潤を評価する。実験1においては、GLUT3 CAR-T細胞が優位な抗腫瘍活性を示す。実験2においては、グルコース暴露によるGLUT3 CAR-T過活性化からアポトーシス、過分化がおり抗腫瘍活性が減弱する。Rechallengeにおいては、GLUT3 CAR-T細胞にて腫瘍を拒絶する。実験4においては、GLUT3 CAR-T細胞において優位なCAR-T細胞生着と腫瘍T細胞浸潤が観察される。実験3は、低グルコース 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19]図19は、刺激後長期生存の増強を示すデータ (in vitro data) を示す。左からGLUT3 CAR-T細胞の0mM、0.5mMおよび10mM条件下での細胞死の結果を示す。各CAR-T細胞における細胞死を、Annexin V、7-AADで検討した。GLUT3 CAR-T細胞では、非刺激状態において、無および低グルコース条件下 (0mM, 0.5mM) においても、通常グルコース条件下 (10mM) と同等のアポトーシス、および、細胞死率であった。

[図20]図20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) 実験スキーマ。(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、非小細胞肺がん (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-87 MGΔ）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 $\pm$ 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）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-87 MGΔ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 $\pm$ SEMで示した。スチューデントのt検定による統計解析；＊＊， $P < 0.01$ ；＊＊＊＊， $P < 0.0001$ 。（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21]図21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 CA

R-T細胞 (conv CAR-T) と GLUT3 EGFRvIII CAR-T細胞 (GLUT3 CAR-T) の免疫蛍光染色。白点線の円は、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細胞は健康人 ($n = 5$) 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 (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。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-87 MGΔ細胞と共培養した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-87 MGΔ-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

エ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22]図22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 $\log_2(\text{fold change})$ （ $\log_2 FC$ ）を表し、Y軸は $-\log_{10}(\text{adjusted p value})$ [$-\log_{10}(padj)$]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23]図23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-87 MGΔ細胞、U-251 MGΔ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 $\pm$ 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 $\pm$ S

EMで示す。Studentのt検定による統計解析；***, $P < 0.001$ 。

[図24]図24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-87 MGΔ) 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±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-87 MGΔ細胞およびU-251 MGΔ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-87 MGΔ-LucおよびU-251 MGΔ-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-251 MGΔ-Luc細胞に対するCAR-T細胞の細胞傷害性。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) 高グルコース (10 mM)

条件下でのU-87 MGΔ-Luc細胞またはU-251 MGΔ-Luc細胞に対するCAR-T細胞の細胞傷害性。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；*， $P < 0.05$ ；**， $P < 0.01$ ；***， $P < 0.001$ 。（F，G）示したCAR-T細胞集団による消耗マーカー（PD-1、 α 、PD-1とTim-3、 α ）の発現。代表的な等高線プロットを示す。

[図25]図25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、健康人（ $n=5$ ）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；*， $P < 0.05$ ；**， $P < 0.01$ 。

発明を実施するための形態

- [0014] 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。
- [0015] 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。
- [0016] 本明細書において、「約」とは、後に続く数値の±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。
- [0017] 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(PBMC)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。

[0018] 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_{nv} 、 T_{scm} 、 T_{cm} 、 T_{emra} 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。

[0019] 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、FoxP3、CTLA4、Helios、CD103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、細胞を一行に並べて流し、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、TCRやCAR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T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T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」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

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、いくつかの分子のおよび代謝的な特性が関与している。まず、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

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。 $\alpha\beta$ 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、GLUT 1 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、GLUT 2 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、GLUT 3 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、GLUT 4 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。

[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「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。

[0034] 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。

[0035] 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、（iii）TregとTh1の比率を変化させるかどうか、（iv）Tbet陽性Th1細胞からのIFN- γ 産生を誘導するかどうか、（v）IFN- γ 産生能を変動させるか、（vi）IL-2産生能を変動させるかおよび（vii）TNF- α 産生能を変動させるか、（viii）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。

[0036] 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DNAウイルス、RNA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）／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、MAR S、狂犬病およびジフテリアなどであり

得る。

[0037] 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。

[0038] 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。

[0039] 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）、草本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、ヤマヨモギ、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。

[0040] (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。

[0041] 一つの局面において、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。

[0042] 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、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功することが示された(図16参照)。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。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、 T_{eff} の前駆細胞、例えば、リンパ球系前駆細胞、 Tnv 、 $Tscm$ 、 $Temra$ などでもよい。

[0043] 一つの実施形態では、本開示はキメラ抗原受容体（CAR）を含む、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／またはグルコーストランスポーターの発現が増強したエフェクターT細胞であり得る。別の実施形態では、本開示は、キメラ抗原受容体（CAR）を含む、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／またはグルコーストランスポーターの発現が増強したエフェクターT細胞を含む細胞集団であり得る。本開示は、従来技術では提供できていなかった「エフェクターT細胞」を提供するものである。この実施形態で言うエフェクターT細胞は、標的細胞に対して細胞傷害作用を及ぼす免疫細胞（例えば、T細胞）を意味する（本明細書の他の個所に記載される。）。本明細書の他の個所に記載されるように、エフェクター機能とは、TCRやCARを介したシグナルに起因する、細胞傷害活性、サイトカイン産生および分裂・増殖を具備するが、エフェクターT細胞として重要な機能の一つは標的細胞に対して細胞傷害作用を及ぼすことである。

[0044] 他方、従来エフェクターT細胞として標的細胞に対して細胞傷害作用を及ぼすことができることは提供されていない。示唆がされていないというより、むしろ、従来技術ではリチャレンジ等の実験により治癒を確認した例がなく、例えば、結節が残存している例もあり、治癒していないことが示される例も多い。ここで、がんの治療薬としては種々知られているが、従来ほとんどの治療薬は、腫瘍を減らすだけで、根絶することができなかった。本開示のように標的細胞に対して細胞傷害作用を及ぼす機能がないからである。従来技術では腫瘍の抑制効果はサイトカイン等の効果により観察されることがあり、ほとんどの抗がん剤はこのような間接的な効果に過ぎない。従来技術

では、*In vivo*のモデルで、本開示とは異なり、腫瘍が抑制されたとはいっても標的細胞に対して細胞傷害作用を及ぼすものではなく、むしろ、腫瘍が残存しており、標的細胞に対して細胞傷害作用を及ぼす機能がないと言えるものであり、本開示はこの点でこれらの従来技術とは異なる効果を発揮するというものである。

[0045] 詳細に説明すると、本開示の実施形態において、キメラ抗原受容体T（CAR-T）細胞療法では固形がんに対しては、有効性を示すことができないでいたが、本開示はこの課題も解決するものである。ここで本発明者らは、固形がんにおいてCAR-T細胞の機能不全が腫瘍微小環境（TME）におけるグルコース欠乏に起因すること、およびその代謝補充がCAR-T細胞の抗腫瘍効果を有意に改善することを見出した。がん細胞によるグルコースの大量消費は、固形がんのTMEにおけるグルコースレベルを低下させ、結果としてCAR-T細胞を障害する。本開示では特定の実施形態において、グルコーストランスポーターであるGLUT類をCAR-T細胞に発現させると、サイトカイン産生と殺傷活性が回復すること、またはエフェクター機能が改善されることを見出した。化学療法剤および放射線などを駆使した併用療法などでも根治できなかった各種固形がんに対する治療法を提供するものである。ある種の固形がんでは代謝的に過酷な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。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するような例では、本開示では特に有効である。さらに、ある種の侵攻性のがん細胞は、がん細胞の特徴的な代謝である好氣的解糖（Warburg効果として知られる）のために、正常な細胞よりも多くのグルコースを消費しTMEにおけるグルコースの枯渇につながる。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TMEで起こっている。がん細胞は、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。GLUTを外的に発現するあるいは内的な発現を強化したCAR-T細胞によるGLUTの同等以上の発現は、がん細胞との完全な競合を可能にし得る。

[0046] 詳細に説明すると、本開示の好ましい非限定的な実施形態として以下が観察される。すなわち、血液悪性腫瘍におけるキメラ抗原受容体T（CAR-T）細胞療法の臨床的成功があるにもかかわらず、膠芽腫（GBM）を含む難治性固形腫瘍への応用はまだ成功しておらず、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いでいたが、本開示はこの課題も解決するものである。ここで本発明者らは、GBMにおけるCAR-T細胞の機能不全が腫瘍微小環境（TME）におけるグルコース欠乏に起因すること、その代謝補充がCAR-T細胞の抗腫瘍効果を有意に改善することを見出した。がん細胞によるグルコースの大量消費は、GBMのTMEにおけるグルコースレベルを低下させ、結果としてCAR-T細胞を障害する。本開示では好ましい実施形態において、高親和性グルコーストランスポーターであるGLUT3をCAR-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。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。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。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。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、CA

R-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。さらに、侵攻性の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。これは、GBMのTMEにおけるグルコースの枯渇につながる。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。好ましい実施形態において、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。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。この好ましい実施形態では、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。本開示の一つの好ましい実施形態では、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提供する。

[0047] （細胞集団）

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細胞などの免疫細胞を含む細胞集団が提供される。この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、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功することが示された（図16

等参照)。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、 T_{eff} の前駆細胞、例えば、リンパ球系前駆細胞、 T_{nv} 、 T_{scm} 、 T_{emra} などでもよい。

[0048] 本開示の一実施形態において、上記のようなT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、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。

[0049] 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。

[0050] 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)またはT細胞受容体(TCR)と含み、好ましくはキメラ抗原受容体(CAR)を含む。

[0051] 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増強したものである。

[0052] 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。

[0053] 一つの実施形態では、本開示の細胞集団は、 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

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。

[0054] 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。

[0055] 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。

[0056] 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。

[0057] 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、がんの治療のため、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。

[0058] <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。

[0059] 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。

[0060] 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、本開示の細胞および細胞集団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。

[0061] 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。

[0062] T_{eff}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。

[0063] 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。

[0064] 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。

[0065] <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增強した、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。代表的な実施形態において、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。

[0066] 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。

[0067] 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（scFv））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。

[0068] 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。

<T細胞レセプター（TCR）>

[0069] 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、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／またはグルコーストランスポーターの発現が強化した、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。

[0070] 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細胞が発現する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。

[0071] (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。

[0072] 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。

[0073] 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 class I、およびMHC class IIなどを含むアロ抗原；(2) TSHR (thyroid stimulating hormone receptor)、DSG3 (desmoglein 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 (mesothelin)、およびMadCam1 (mucosal vascular addressin cell adhesion molecule 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。

[0074] 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、MAGEA-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、IL13Ra1pha、IL13Ra1pha2、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、TPRGOLGA、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、pl、6-N、Ki67、Ku70/80、PROX1、PSCA、SOX10、SOX11、Survivin、phCG、WT1、メソセリン、メラナ、NY-BR-1、NY-CO-58、MN(gp250)、テロメラゼ、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T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。

[0075] (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。

[0076] 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。

[0077] 一実施形態において、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。

[0078] (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。

[0079] 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。

[0080] (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 C A R 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。

[0081] < 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 (C A R) または T 細胞受容体 (T C R) 等を含み、該 T 細胞が、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／またはグルコーストランスポーターの発現が増強した、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 T 細胞の 1 または複数の特徴を備えることができる。

[0082] 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 (G V H D)、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 (R A)、シェーグレン症候群、全身性エリテマトーデス (S L E)、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、I 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 (A I H A)、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。

[0083] 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。

[0084] 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。

[0085] 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。

[0086] 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T C R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F c融合タンパク質などのF c含有治療薬を更に含んでもよい。F c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。

[0087] 一実施形態において、F c含有治療薬は、アダリムマブ、アドトラスト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、h u 1 4 . 1 8 K 3 2 2 A、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、トラストズマブ、トシツモマブ、ウステキヌマブ、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。

[0088] 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(i i) 本明細書に記載のF c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。

[0089] 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。

[0090] 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。

[0091] 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。

[0092] 一実施形態において、本開示のキメラ抗原受容体（CAR）を含むエフェクターT細胞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細胞またはそのようなT細胞を含む細胞集団は、医薬組成物として、または本開示のCARまたはT細胞受容体（TCR）等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し（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）。

[0093] 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。

[0094] 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、通常の方法とは異なり、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。

[0095] 本開示のCARを含む治療的に有効なT細胞またはまたはそのような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。

[0096] （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. As

sociates 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。

[0097] 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。

[0098] 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。

[0099] 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

[0100] 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。

[0101] （実施例1）

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EGFRv111単鎖可変領域（scFv）-CD8ヒンジ-CD8膜貫通部（TM）-CD28 intracellular domain（ICD）-4-1BB ICD-CD3z-P2A-Katushka2S構造をもつ、抗EGFRv111 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。

[0102] 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、day 8～12に冷凍保存、もしくは直接各評価に供した。

[0103] 免疫染色

1×10⁶細胞数のGLUT3⁺3C10 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)でスライドガラス上に接着させVECTASHIELD(VECTOR LABORATORIES)封入し、Keyence XZ-800で観察をおこなった。

[0104] フェノタイプ解析 (FCM)

FCM解析に用いた抗体を表1に示す。

[0105]

[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-PerCP-Cy7(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

[0106] 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。

[0107] In vitro CAR-T細胞生存・機能解析 (図17)

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刺激ビーズ、U87d細胞株）を1:1にて刺激する。24時間後刺激因子を磁器ビーズ、もしくは、ソーティングで除去し、CAR-T細胞を0mM、0.5mM、10mM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 (図19)、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。

[0108] サイトカイン解析 (FCM)

CART細胞 1×10^5 細胞とEGFRvIII発現U87細胞株 (U87Δ) 5×10^5 細胞を1mlの培地で12時間共培養を行った後、 $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ Monensin (BD 554724 BD Bioscience) 存在下で6時間培養し、CART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10mMと0.5mM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、LSRFortessa X20を用いてデータを取得し、FACSDiva (v8.0.1, BD Biosciences) およびFlowJo (TreeStar) ソフトウェアを用いて解析した。

[0109] 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。

[0110] 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 ($0.1 \text{ mg}/\text{ml}$) によ

るコーティングと、センサーカートリッジの水和をCO₂ 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2×10⁵細胞数ずつ播種し、CO₂ free 37℃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。

[0111] グルコース取り込み能力評価

2×10⁴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。

[0112] 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U87Δ腫瘍細胞株（U87Δ-luc）2.5×10⁴を輸注し、生着後、Mock、3C10 CAR-T細胞、GLUT3 CAR-T細胞2×10⁶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。

[0113] （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）、4-1BBICD、CD3 ζ 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。

[0114] （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（3C10CAR）と代謝改変CAR（GLUT3CAR）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、GLUT3CAR-T細胞膜への均質なGLUT3発現を認めた。また、GLUT3CAR-T細胞では、T細胞、通常型CAR-T細胞（3C10CAR-T細胞）に比しグルコース取り込みが亢進していた。

[0115] 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。GLUT3CAR-T細胞は、通常型CAR-T細胞（3C10CAR-T細胞）と遜色ない樹立効率を有していた。

[0116] 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、GLUT3CAR-T細胞と3C10CAR-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GLUT3CARは解糖能を強化していた。

[0117] 次に、GLUT3CAR-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、3C10CAR-T細胞とGLUT3CAR-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、GLUT3CAR-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。

[0118] 次に、GLUT3CAR-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、3C10CAR-T細胞、GLUT3CAR-T細胞を抗原刺激後、サイトカイン産生細胞割合をF

CM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。

[0119] 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。

[0120] 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。

[0121] 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。

[0122] 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。

[0123] 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 CART、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。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。

[0124] 次に、3C10CAR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CD19CAR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、膵臓がんに対して効果があること示した。

[0125] 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。

[0126] (実施例2：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GLUT3を発現するCARコンストラクトをデザインした(図12のstb1-GLUT3=GLUT3 CARと同じ)。

[0127] 図12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。

[0128] 図15に、同様のマウスモデルでGLUT3 CAR-T細胞の抗腫瘍効果を評価した結果を示す。Mock T細胞、3C10 CAR-T細胞ではCRが得られなかった一方、GLUT3 CAR-Tで4頭のCRが得られた。

[0129] 図16に、腫瘍チャレンジの結果を示す。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”)。

[0130] 図17に、各種刺激後長期生存が増強されることを示す。各CAR-T細胞を各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は有効なサイトカイン産生能を発揮する。ただし、GL

U T 3 C A R - T はグルコース過剰取り込みによる活性化により経時的に (d a y 3 や d a y 7) に C C R 7 陰性の T e m や T e m r a へと分化 (終末分化、 s t e m n e s s の消失) 、アポトーシスに陥る。

[0131] また、C A R - T 細胞 (通常グルコースで樹立) が急激 (d a y 0) に 0 m M や 0 . 5 m M の低グルコース下に置かれた場合、活性化状態が高く、G l u c o s e 依存性の高い G L U T 3 C A R - T は容易にアポトーシスに陥りやすい。

[0132] 図 1 8 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、G L U T 3 C A R - 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 G L U T 3 C A R - T 過活性化からアポトーシス、過分化がおり抗腫瘍活性が消失する。R e c h a l l e n g e においては、G L U T 3 C A R - 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、G L U T 3 C A R - T において優位な C A R - 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 g l u c o s e 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。

[0133] 図 1 9 に、刺激後長期生存の増強を示すデータ (i n v i t r o d a t a) 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 - A A D 、 A n n e x i n V の染色データを示す。各 C A R - T 細胞における細胞死を、A n n e x i n V 、 7 - A A D 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 C A R - T 細胞で大きな差は認めなかった。

[0134] (実施例 3 : C A R - T の実施例)

以下、C A R - T でのさらなる実証例を示す。

[0135] (材料と方法)

(細胞株)

U - 8 7 M G および U - 2 5 1 M G G B M 細胞株は、それぞれ A m

erican 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。

[0136] (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 (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. (および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.)。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。アポトーシ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。

[0137] (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 (40.

Kumagai S, et al (2020) *at Immunol* ; 21 (11) : 1346-58. ; 41. Kumagai S, et al (2022) *Cancer Cell* ; 40 (2) : 201-18. e9. ; 42. Tada Y, et al (2018) *J Immunother Cancer* ; 6 (1) : 106. Iおよび43. Tanegashima T, et al (2019) *Clin Cancer Res* ; 25 (15) : 4808-19.)。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、Cytifix/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2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。

[0138]

[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

[0139] (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 T

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 = $[(\text{experimental lysis} - \text{spontaneous lysis}) / (\text{maximum lysis} - \text{spontaneous lysis})] \times 100$ 。

[0140] (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℃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℃で2時間、二次抗体と4℃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。

[0141] (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5μm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CD3ε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。

[0142] 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。

[0143] (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)。

[0144] (CAR-T細胞生産)

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。

[0145] (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

メーキング (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。

[0146] (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。

[0147] (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、On-d 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ATING 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 μM)、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。

[0148] (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、On-d 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150 bp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 (Dobin A, Gingeras TR (2015) Mapping RNA-seq Reads with STAR. Curr Protoc Bioinformatics; 51:11.4.1-11.4.9)。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 (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.)。

[0149] (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。

[0150] (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[Peng JJ, Wang L, Li Z, et al (2023) Metabolic challenges and interventions in CAR T cell therapy. Sci Immunol; 8 (82): eabq3016]。我々は、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20a)。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[0.5 mM未満(平均0.217 mM)](図20b)。非小細胞肺癌や大腸がんなど、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20c)。

[0151] 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(0.5 mM)で、EGFRvIIIを発現するヒトGBM細胞株(U-87 MGΔ)

と共培養した。U-87 MG Δで刺激すると、サイトカイン（IFN- γ 、IL-2、TNF α ）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20d、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（0.5 mM）または高グルコース（10 mM）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22a）。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20f、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。

[0152] （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 [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.]。そこで我々は、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21a）。GLUT3 EGFRvIII CARを導入したT細胞（GLUT3 EGFRvIII CAR-T

細胞)の膜(図21b)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21cおよび図23a)。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21d)。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21eおよび図23b)。代謝解析ではさらに、GLUT3 EGFRvIII CAR-T細胞はconv EGFRvIII 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}状態によりエネルギーシフトすることが確認された(図21f)。カルボキシフルオレセインスクシンイミジルエステル(CFSE)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23c, 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。

[0153] 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。そこで我々は、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21g、hおよび図24a）。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24b、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-87MG 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21i、図24d、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21j、kおよび図24f、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25a-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。

[0154] （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。[O' Rourke DM, Nas

rallah 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). ; 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. ; 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.]. 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関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 [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.]。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 [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]。

- [0155] 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 [Vannucci SJ, Maher F, Simpson IA (1997) Glucose transporter proteins in brain: delivery of glucose to neurons and glia. *Glia*; 21 (1) : 2-21. ; Chen S, Yang L, Li Z, et al (2021) EGFR/EGFRvIII partly regulates the tumorigenesis of glioblastoma through the SOX9-GLUT3 axis. *Am J Transl Res*; 13 (6) : 6055-65. ; 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.]、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、本発明者らが開発したGLUT3 EGFRvIII CARコンストラクトは、GLUT3 E

GFRvlll 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ことが実証された。

[0156] (実施例3：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、Tnv、Tcm、Tem、Temraなどが含まれており、いずれの分画にもCAR（例えば、恒常発現GLUT3 CAR）をすることができる。

[0157] 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）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。

[0158] 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Teffの前駆細胞であるTnvやTscm、Tcmまたは既に分化し主にエフェクター機能を発揮するTeffやTemra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⁺、CD45RA⁻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、Teff分化の抑制とTnv、Tscm、Tcm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EGFRvlll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。

[0159] 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。

[0160] (実施例4：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_{eff} 、 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。

[0161] 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（恒常発現GLUT3TCR）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。

[0162] 実施例1～3で示した各種 *in vitro* および *in vivo* での評価を行う。

[0163] (実施例5：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。

[0164] (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。

[0165] 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。

[0166] 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。

[0167] (実施例6：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。

[0168] (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。

[0169] 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。

[0170] 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。

[0171] (実施例7：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。

[0172] (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。

[0173] 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。

[0174] 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。

[0175] （実施例8：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。

[0176] （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。

[0177] 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。

[0178] 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。

[0179] （実施例9：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。

[0180] （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。

[0181] 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。

[0182] 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。

[0183] （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日に出願した特願2024-001532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

[0184] 本開示によれば、腫瘍微小環境（TME）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。
- [請求項2] 前記T細胞がキメラ抗原受容体（CAR）を含む、請求項1に記載のT細胞。
- [請求項3] 前記T細胞はエフェクター機能を有する、請求項1または2に記載のT細胞。
- [請求項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、請求項1または2に記載のT細胞。
- [請求項5] 前記CARは前記T細胞に発現されたものである、請求項2～4のいずれか一項に記載のT細胞。
- [請求項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、請求項1～5のいずれか一項に記載のT細胞。
- [請求項7] 前記グルコーストランスポーターがGLUT3である、請求項1～6のいずれか一項に記載のT細胞。
- [請求項8] ヒトT細胞である、請求項1～7のいずれか一項に記載のT細胞。
- [請求項9] キメラ抗原受容体（CAR）を含む、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／またはグルコーストランスポーターの発現が増強したエフェクターT細胞であって、前記T細胞は、低グルコース条件（0.5mM）下で、通常グルコース条件（10mM）下と少なくとも同等のエフェクター機能を示す、エフェクターT細胞。
- [請求項10] 前記CARは前記T細胞に発現されたものである、請求項9に記載のT細胞。
- [請求項11] 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、請求項9または10に記載のT細胞。
- [請求項12] GLUT3遺伝子が導入されたエフェクターT細胞。

- [請求項13] ヒトT細胞である、請求項9～12のいずれか一項に記載のT細胞。
- [請求項14] 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あって、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、細胞集団。
- [請求項15] 前記T細胞は、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／またはグルコーストランスポーターの発現が増強したものである、請求項14に記載の細胞集団。
- [請求項16] 前記T細胞はエフェクター機能を有する、請求項14または15に記載の細胞集団。
- [請求項17] 前記T細胞がキメラ抗原受容体（CAR）を含む、請求項14～16のいずれか一項に記載の細胞集団。
- [請求項18] 前記細胞集団は、 T_{eff} を含む、請求項14～17のいずれか一項に記載の細胞集団。
- [請求項19] 前記細胞集団は、 T_{eff} の前駆細胞を含む、請求項14～18のいずれか一項に記載の細胞集団。
- [請求項20] 前記CARは前記T細胞に発現されたものである、請求項17～19のいずれか一項に記載の細胞集団。
- [請求項21] 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、請求項14～20のいずれか一項に記載の細胞集団。
- [請求項22] 前記グルコーストランスポーターがGLUT3である、請求項14～21のいずれか一項に記載の細胞集団。
- [請求項23] 前記T細胞はヒトT細胞である、請求項14～22のいずれか一項に記載の細胞集団。
- [請求項24] キメラ抗原受容体（CAR）を含む、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／またはグルコーストランスポーターの発現が増強したエフェクターT細胞を含む細胞集団であって、

前記T細胞は、低グルコース条件（0.5 mM）下で、通常グルコース条件（10 mM）下と少なくとも同等のエフェクター機能を示す、細胞集団。

[請求項25] 前記CARは前記T細胞に発現されたものである、請求項24に記載の細胞集団。

[請求項26] 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、請求項24または25に記載の細胞集団。

[請求項27] GLUT3遺伝子が導入されたエフェクターT細胞を含む細胞集団。

[請求項28] 前記T細胞はヒトT細胞である、請求項24～27のいずれか一項に記載の細胞集団。

[請求項29] 請求項1～13のいずれか一項に記載のT細胞または請求項14～28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30] がんを処置または予防するためのものである、請求項29に記載の医薬組成物。

[請求項31] がんの治療のためのものである、請求項29または30に記載の医薬組成物。

[請求項32] 前記がんの治療は、腫瘍根絶により確認される、請求項29～31のいずれか一項に記載の医薬組成物。

[請求項33] がんに対して長期作用させるためのものである、請求項29～32のいずれか一項に記載の医薬組成物。

[請求項34] 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29～33のいずれか一項に記載の医薬組成物。

[請求項35] がんの再発予防のためのものである、請求項29～34のいずれか一項に記載の医薬組成物。