

明 細 書

発明の名称： T細胞マスターセルバンク

技術分野

[0001] 本発明は、T細胞マスターセルバンクおよびT細胞ワーキングセルバンク、ならびに該バンクを含むT細胞製品の提供システムなどに関する。

[0002] (発明の背景)

近年、がんに対する治療法として免疫細胞治療が注目されている。免疫細胞治療とは、患者の体外で増殖および活性化させた免疫細胞を患者に投与し、その免疫細胞ががん細胞を攻撃させる治療法である。免疫細胞治療は、従来の外科治療、放射線治療、化学治療の三大療法に比べて副作用がほとんどないという利点を有している。免疫細胞治療には様々な種類の治療法があるが、その中でも、off-the-shelfの同種異系の (Allogenic) T細胞製品に期待が寄せられている。

[0003] 上記同種異系のT細胞製品を提供するシステムとして、iPS細胞のバンキング技術 (例えば、特許文献1 など) やiPS細胞へのCAR遺伝子の導入技術 (例えば、特許文献2 など) を利用して、あらかじめiPS細胞にCAR遺伝子を導入して作製したiPS細胞を拡大培養した後、該細胞をストックすることでCAR遺伝子を有するiPS細胞のマスターセルバンクを構築し、該セルバンク由来のiPS細胞をT細胞に分化させることで得たT細胞を、同種異系のT細胞製品として用いるシステムが報告されている (例えば、非特許文献1)。

[0004] 上記システムでは、iPS細胞のような多能性幹細胞にCAR遺伝子などの外因性の遺伝子を導入し、該細胞をT細胞へと分化させるプロセスが必要となる。そのため、各国当局の定めるGMP (Good Manufacturing Practice) 基準を満たしながら当該プロセス中の各段階における細胞 (例えば、iPS細胞、T細胞、CAR-T細胞) の維持管理工程、分化工程および培養工程を行うことが必要となる。例えば、iPS細胞のマスターセルバンクを用いていることから、T細胞製品を調製するためにはiPS細胞をT細胞に分化させる必要があるが、iPS細胞は多分化能を有することから、ロット毎に均一な分化細胞を誘導するために毎

回高いレベルでの工程・品質管理が求められ、人的、時間的および金銭的コストが極めて高い。かかるコストが、T細胞製品の安定的な提供に甚大な影響を与えている。特に複数種類のT細胞製品を提供しようとする場合には、それぞれのコストや時間が累積されることとなり、その影響はより深刻なものとなる。従って、GMP基準を満たしながらもコストを抑えた製品を供給するためのシステム、さらには、複数種類のT細胞製品を用いた場合でも、高品質で低コストに該製品を提供できるシステムが望まれている。

先行技術文献

特許文献

[0005] 特許文献1：米国公開第2009-0299763号

特許文献2：国際公開第2017/088012号

非特許文献

[0006] 非特許文献1：Bob Valamehr (Vice President of Fate Therapeutics) “Generation of off-the-shelf TCR-less CAR T cells from renewable pluripotent cells”, April 14-18, 2018 (AACR Annual Meeting 2018 Press Program)

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0007] 従って本発明は、人的、時間的および金銭的コストを低減でき、かつロット間差が小さく高品質なoff-the-shelfの同種異系の (Allogenic) T細胞製品の提供システムを提供することを課題とする。また、前記システムの提供に用いることができるT細胞マスターセルバンクおよびT細胞ワーキングセルバンク、ならびにこれらのコレクションを提供することも課題とする。

課題を解決するための手段

[0008] 本発明者らは、上記課題を解決すべく鋭意検討を行った結果、非特許文献1などの記載の従来の技術では、もっぱらiPS細胞のマスターセルバンクの構築方法に着目しているが、これは、T細胞と比較してiPS細胞は増殖能に優れ

ているためであると推測した。そこで、T細胞を拡大培養により十分に増殖できれば、T細胞または該増殖させたT細胞をマスターセルバンクとして用いることができるのではないかとこの着想を得た。即ち、本発明者らは、CAR遺伝子などの外因性の遺伝子を有するiPS細胞のマスターセルバンクを構築するのではなく、該外因性の遺伝子を含むT細胞のマスターセルバンクを構築することで、該セルバンクから高品質なT細胞製品を迅速に提供することができるのではないかとこの着想を得た。本発明者らが知る限りにおいて、T細胞のマスターセルバンクを構築するという発想は全く知られていない全く新規なものであった。本発明者らは、これらの知見に基づいてさらに研究を重ねた結果、本発明を完成させるに至った。

[0009] すなわち、本発明は以下を提供する。

[1] T細胞マスターセルバンクおよび／またはT細胞ワーキングセルバンクを含む、T細胞製品の提供システム。

[2] 前記T細胞マスターセルバンクおよび／またはT細胞ワーキングセルバンクが人工多能性幹細胞由来のT細胞を含む、[1]に記載のシステム。

[3] 前記T細胞マスターセルバンクおよび／またはT細胞ワーキングセルバンクが、少なくとも1種類のHLA遺伝子の発現が抑制されたT細胞を含む、[1]または[2]に記載のシステム。

[3 a] 前記T細胞マスターセルバンクおよび／またはT細胞ワーキングセルバンクが、外因性遺伝子が導入されたT細胞を含む、[1]～[3]のいずれか1つに記載のシステム。

[3 b] さらに、T細胞マスターセルバンクおよび／またはT細胞ワーキングセルバンクを収集して、2種類以上のT細胞マスターセルバンクおよび／またはT細胞ワーキングセルバンクを含むT細胞マスターセルバンクコレクションおよび／またはT細胞ワーキングセルバンクコレクションを構築するステップを含む、[1]～[3 a]のいずれか1つに記載のシステム。

[3 c] 前記T細胞マスターセルバンクおよび／またはT細胞ワーキングセルバンクの種類が2種類以上である、[1]～[3 b]のいずれか1つに記載の

システム。

〔3 d〕さらに、T細胞マスターセルバンクおよび／またはT細胞ワーキングセルバンクを選択するステップを含む、〔1〕～〔3 c〕のいずれか1つに記載のシステム。

〔4〕前記T細胞マスターセルバンクおよび／またはT細胞ワーキングセルバンクから準備したT細胞に、外因性遺伝子を含む核酸を導入するステップを含む、〔1〕～〔3 d〕のいずれか1つに記載のシステム。

〔5〕前記外因性遺伝子がCAR遺伝子又は外因性のTCR遺伝子である、〔4〕に記載のシステム。

〔6〕前記T細胞製品の種類が2種類以上である、〔1〕～〔5〕のいずれか1つに記載のシステム。

〔6 a〕さらにT細胞製品を選択するステップを含む、〔1〕～〔6〕のいずれか1つに記載のシステム。

〔7〕さらに、前記T細胞マスターセルバンクおよび／またはT細胞ワーキングセルバンクから準備したT細胞を拡大培養するステップを含む、〔1〕～〔6 a〕のいずれか1つに記載のシステム。

〔8〕前記T細胞を拡大培養するステップが、CD30アゴニストによって該細胞を刺激する工程を含む、〔7〕に記載のシステム。

〔8 a〕前記T細胞を拡大培養するステップにおいて、CD30アゴニストの存在下で該細胞を培養する工程を含む、〔7〕に記載のシステム。

〔9〕さらに、前記拡大培養されたT細胞を含む凍結T細胞製品を製造するステップを含む、〔7〕～〔8 a〕のいずれか1つに記載のシステム。

〔10〕さらに、T細胞製品を収集して、2種類以上のT細胞製品を含むT細胞製品コレクションを構築するステップを含む、〔6〕～〔9〕のいずれか1つに記載のシステム。

〔10 a〕さらに、被験者の情報を取得するステップを含む、〔1〕～〔10〕のいずれか1つに記載のシステム。

〔10 b〕さらに、被験者の情報に基づいて、適切なT細胞マスターセルバン

クおよび／または適切なT細胞ワーキングセルバンクを選択するステップを含む、[10a]に記載のシステム。

[10c] さらに、被験者の情報に基づいて、適切なT細胞製品を選択するステップを含む、[10a]に記載のシステム。

[11] さらに、被験者の腫瘍に発現している腫瘍特異的抗原又は腫瘍関連抗原を同定するステップを含む、[1]～[10c]のいずれか1つに記載のシステム。

[12] さらに、同定された抗原を認識し結合するCAR又は外因性のTCRを発現するT細胞製品を、2種類以上のT細胞製品を含むT細胞製品コレクションから選択するステップを含む、[11]に記載のシステム。

[13] T細胞マスターセルバンクおよび／またはT細胞ワーキングセルバンクを構築する工程を含む、T細胞製品の製造方法。

[14] 前記T細胞マスターセルバンクおよび／またはT細胞ワーキングセルバンクが人工多能性幹細胞由来のT細胞を含む、[13]に記載のT細胞製品の製造方法。

[15] 前記T細胞マスターセルバンクおよび／またはT細胞ワーキングセルバンクが、少なくとも1種類のHLA遺伝子の発現が抑制されたT細胞を含む、[13]または[14]に記載のT細胞製品の製造方法。

[15a] 前記T細胞マスターセルバンクおよび／またはT細胞ワーキングセルバンクが、外因性遺伝子が導入されたT細胞を含む、[13]～[15]のいずれか1つに記載のT細胞製品の製造方法。

[16] さらに、前記T細胞マスターセルバンクおよび／またはT細胞ワーキングセルバンクから準備したT細胞に外因性遺伝子を含む核酸を導入する工程を含む、[13]～[15a]のいずれか1つに記載のT細胞製品の製造方法。

[17] 前記外因性遺伝子がCAR遺伝子又は外因性のTCR遺伝子である、[16]に記載のT細胞製品の製造方法。

[18] さらに、T細胞を拡大培養する工程を含む、[13]～[17]のい

ずれか1つに記載のT細胞製品の製造方法。

[19] 前記T細胞を拡大培養する工程において、CD30アゴニストによって該細胞を刺激する工程を含む、[18]に記載のT細胞製品の製造方法。

[19a] 前記T細胞を拡大培養する工程において、CD30アゴニストの存在下で該細胞を培養する工程を含む、[18]に記載のT細胞製品の製造方法。

[20] T細胞マスターセルバンクおよび／またはT細胞ワーキングセルバンク。

[21] 人工多能性幹細胞由来のT細胞を含む、[20]に記載のT細胞マスターセルバンクおよび／またはT細胞ワーキングセルバンク。

[22] 少なくとも1種類のHLA遺伝子の発現が抑制されたT細胞を含む、[20]または[21]に記載のT細胞マスターセルバンクおよび／またはT細胞ワーキングセルバンク。

[22a] 外因性遺伝子が導入されたT細胞を含む、[20]～[22]のいずれか1つに記載のT細胞マスターセルバンクおよび／またはT細胞ワーキングセルバンク。

[23] [20]～[22a]のいずれか1つに記載された2以上の種類のT細胞マスターセルバンクおよび／またはT細胞ワーキングセルバンクを含む、T細胞マスターセルバンクコレクションおよび／またはT細胞ワーキングセルバンクコレクション。

[24] 以下の工程を含む、T細胞マスターセルバンクおよび／またはT細胞ワーキングセルバンクを構築する方法。

(I) キメラ抗原受容体(CAR)遺伝子を有さない人工多能性幹細胞を、CAR-T療法用のT細胞に分化させる工程、

(II) 該分化させたT細胞をストックする工程、及び

(III) 該分化させたT細胞の特性解析を行う工程

[25] 以下の工程を含む、T細胞マスターセルバンクおよび／またはT細胞ワーキングセルバンクを構築する方法。

(i) 外因性のT細胞受容体(TCR)遺伝子を有さない人工多能性幹細胞を

、TCR-T療法用のT細胞に分化させる工程、

(i i) 該分化させたT細胞をストックする工程、及び

(i i i) 該分化させたT細胞の特性解析を行う工程

[2 5 a] 前記人工多能性幹細胞が外因性遺伝子を有する、[2 4] または [2 5] に記載の方法。

[2 6] 前記人工多能性幹細胞が外因性のT細胞受容体 (TCR) 遺伝子を有する、[2 4] または [2 5 a] に記載の方法。

[2 7] 前記人工多能性幹細胞が少なくとも1種類のHLA遺伝子を欠失している、[2 4] ~ [2 6] のいずれか1つに記載の方法。

[2 7 a] 前記人工多能性幹細胞が少なくとも1種類のHLA遺伝子の発現が抑制されたものである、[2 4] ~ [2 6] のいずれか1つに記載の方法。

[2 8] 前記T細胞がCD8 α β を発現する、[2 4] ~ [2 7 a] のいずれか1つに記載の方法。

[2 9] [2 4] ~ [2 8 a] のいずれか1つに記載の方法により構築されたT細胞マスターセルバンクおよび／またはT細胞ワーキングセルバンク。

[3 0] 以下の工程を含む、CAR又は外因性のTCRを発現するT細胞製品を製造する方法。

(A) [2 9] に記載のT細胞マスターセルバンクおよび／またはT細胞ワーキングセルバンクから、T細胞を準備する工程、

(B) 該準備したT細胞にCAR遺伝子又は外因性のTCR遺伝子を導入する工程、および

(C) 該CAR遺伝子又は外因性のTCR遺伝子が導入されたT細胞を拡大培養する工程

[3 0 a] さらに、(D) 拡大培養されたT細胞を凍結する工程を含む [3 0] に記載の方法。

[3 1] 前記CAR又は外因性のTCRが、腫瘍特異的抗原又は腫瘍関連抗原を認識し結合することを特徴とする、[3 0] または [3 0 a] に記載の方法。

[3 2] 前記工程 (C) が、T細胞を、CD30アゴニストによって該細胞を刺激

する工程を含む、[30]～[31]のいずれか1つに記載の方法。

[32a] 前記工程(C)が、T細胞を、CD30アゴニストの存在下で該細胞を培養する工程を含む、[30]～[31]のいずれか1つに記載のT細胞製品の製造方法。

[33] [30]～[32a]のいずれか1つに記載の方法により製造されたT細胞製品。

[34] [33]に記載のT細胞製品を収集する工程を含む、2種類以上のT細胞製品を含むT細胞製品コレクションの構築方法。

[35] [34]に記載の方法により構築されたT細胞製品コレクション。

[36] 以下の工程を含む、被験者に適したT細胞製品を提供する方法。

(x) 被験者の腫瘍に発現している腫瘍特異的抗原又は腫瘍関連抗原を同定する工程、および

(y) 該同定された抗原を認識し結合するCAR又は外因性のTCRを発現するT細胞製品を、[35]に記載のT細胞製品コレクションから選択する工程

[37] 以下の工程を含む、被験者に適したT細胞製品を提供する方法。

(p) 被験者の情報を取得する工程、および

(q) 該取得した被験者の情報に基づいて適切なT細胞マスターセルバンクおよび／または適切なT細胞ワーキングセルバンクを選択する工程

発明の効果

[0010] 本発明によれば、人的、時間的および金銭的成本を低減でき、かつロット間差が小さく高品質なoff-the-shelfの同種異系のT細胞製品の提供システムおよび提供方法が提供される。かかるシステムおよび提供方法は、複数種類のT細胞製品を提供する場合に特に優れている。また、前記システムまたは方法の提供に用いることができる、T細胞のマスターセルバンクおよびT細胞ワーキングセルバンク、ならびにこれらのコレクションも提供される。

[0011] 本明細書において使用するさまざまな細胞をそれぞれ以下の通り称することがある。それぞれの細胞の概要を合わせて記載する。

<人工多能性幹細胞(iPSC)>

$\alpha\beta$ -iPSC : TCR- α 鎖遺伝子 (TRA遺伝子) およびTCR- β 鎖遺伝子 (TRB遺伝子) が導入されたiPS細胞

V γ 9V δ 2-iPSC : V γ 9V δ 2TCR G115をコードするTCR- γ 鎖遺伝子 (TRG遺伝子) およびTCR- δ 鎖遺伝子 (TRD遺伝子) が導入されたiPS細胞

<造血前駆細胞 (HPC) >

V γ 9V δ 2-iHPC : V γ 9V δ 2TCR G115をコードするTCR- γ 鎖遺伝子 (TRG遺伝子) およびTCR- δ 鎖遺伝子 (TRD遺伝子) が導入されたHPC

<T細胞>

i $\gamma\delta$ TC : 外因性TCRが導入されていないiPS細胞から分化させたT細胞

i $\alpha\beta$ TC : $\alpha\beta$ -iPSCから分化させたT細胞

V γ 9V δ 2-iTC : V γ 9V δ 2-iPSCから分化させたT細胞

V γ 9V δ 2-iHTC : V γ 9V δ 2-iHPCから分化させたT細胞

<CAR遺伝子を導入したT細胞>

CD19i $\alpha\beta$ CARTC : i $\alpha\beta$ TCに抗CD19-CARをコードする遺伝子を導入して作製したT細胞

BCMAi $\alpha\beta$ CARTC : i $\alpha\beta$ TCに抗BCMA-CARをコードする遺伝子を導入して作製したT細胞

CD19-CD30-i $\alpha\beta$ CARTC : i $\alpha\beta$ TCにCD30由来細胞内ドメインを含む抗CD19-CARをコードする遺伝子を導入して作製したT細胞

<CAR遺伝子およびIL-15R α /IL-15遺伝子を導入したT細胞>

CD19/IL15i $\alpha\beta$ CARTC : i $\alpha\beta$ TCに抗CD19-CARをコードする遺伝子およびIL-15R α /IL-15キメラタンパク質をコードする遺伝子を導入して作製したT細胞

CD19/IL15iV γ 9V δ 2CARTC : V γ 9V δ 2-iTCに抗CD19-CARをコードする遺伝子およびIL-15R α /IL-15キメラタンパク質をコードする遺伝子を導入して作製したT細胞

CD19/IL15i $\gamma\delta$ CARTC : i $\gamma\delta$ TCに抗CD19-CARをコードする遺伝子およびIL-15R α /IL-15キメラタンパク質をコードする遺伝子を導入して作製したT細胞

図面の簡単な説明

[0012] [図1]T細胞セルバンクを含むT細胞製品の提供システムの一例を示す。

[図2]T細胞セルバンクコレクションから、複数のT細胞製品が提供されるシステムの一例を示す。図2中の「Armored」は、サイトカインおよび／またはケモカインの分泌に関連する外因性遺伝子が導入されていることを意味する。

[図3]i γ δ TCの細胞膜表面上におけるCD3、 γ δ TCRおよび α β TCRの発現を示す。塗りつぶしのピークは、非抗体染色群の結果を示し、ブランクのピークは各抗原特異的な抗体を用いた染色結果をそれぞれ示す。

[図4]i γ δ TCの細胞膜表面上におけるTCR-V δ 1鎖およびTCR-V2 δ 鎖の発現を示す。横軸と縦軸はそれぞれTCR-V δ 1鎖 (Vdelta1) とTCR-V δ 2鎖 (Vdelta2) の発現を示す。

[図5]V γ 9V δ 2-iTCの細胞膜表面上でのCD3および γ δ TCR分子の発現を示す。左図の横軸と縦軸はそれぞれCD3とpan- γ δ TCRの発現を示す。右図の横軸と縦軸はそれぞれTCR-V δ 2鎖とTCR-V γ 9鎖の発現を示す。

[図6]V γ 9V δ 2-iHTCの細胞膜表面上でのCD3および γ δ TCR分子の発現を示す。左図の横軸と縦軸はそれぞれCD3とpan- γ δ TCRの発現を示す。右図の横軸と縦軸はそれぞれCD3とTCR-V γ 9鎖の発現を示す。

[図7]i γ δ TCの細胞増殖を示す図である。縦軸は細胞数を示し、横軸は増殖培養開始からの経過日数を示す。矢印は固相化抗CD3アゴニスト抗体/レトロネクチン(登録商標)および抗CD30アゴニスト抗体による刺激を開始した日を示す。

[図8]V γ 9V δ 2-iTCの細胞増殖を示す図である。縦軸は細胞数を示し、横軸は増殖培養開始からの経過日数を示す。矢印は固相化抗CD3アゴニスト抗体/レトロネクチン(登録商標)による刺激を開始した日を示す。

[図9]固相化抗CD3アゴニスト抗体/レトロネクチン(登録商標)によって刺激されたCD19-i α β CARTCの増殖曲線を示す図である。縦軸は細胞数を示し、横軸は上記の刺激を開始した日からの経過日数を示す。矢印は固相化抗CD3アゴニスト抗体/レトロネクチン(登録商標)による刺激を開始した日を示す。

[図10]i α β TCに、抗CD19-CARをコードする遺伝子または抗BCMA-CARをコード

する遺伝子を導入して作製したCART細胞（それぞれCD19 $\alpha\beta$ CARTC（A）およびBCMA $\alpha\beta$ CARTC（B））および $\alpha\beta$ TCの、CD19陽性Raji細胞（A）もしくはBCMA陽性H929細胞（B）に対する抗原特異的細胞傷害活性を示す図である。

[図11]CD19-CD30- $\alpha\beta$ CARTCのCD19陽性Rajiがん細胞に対する細胞傷害活性を示す図である。縦軸は2時間後の殺傷された細胞数の割合を、横軸はエフェクター細胞（CD19 $\alpha\beta$ CARTC）と標的細胞（CD19陽性Rajiがん細胞）の混合割合を示す。

[図12]CD19/IL15 $\gamma\delta$ CARTCの抗原特異的細胞傷害活性を示す図である。黒丸および白丸はそれぞれCD19陽性Rajiがん細胞およびCD19陰性CCRF-CEMがん細胞に対する細胞傷害活性を示す。縦軸は2時間後の残存細胞数の割合を、横軸はエフェクター細胞（CD19/IL15 $\gamma\delta$ CARTC）と標的細胞（CD19陽性Rajiがん細胞またはCD19陰性CCRF-CEMがん細胞）の混合割合を示す。

[図13]CD19/IL15 $\gamma\delta$ 2CARTCの細胞増殖を示す図である。縦軸は細胞数を示し、横軸は増殖培養開始からの経過日数を示す。矢印は固相化抗CD3アゴニスト抗体/レトロネクチン（登録商標）による刺激を開始した日を示す。

[図14]CD19/IL15 $\gamma\delta$ CARTCによる、ヒトCD19発現Nalm6腫瘍ゼノグラフトマウスの生存日数延長効果を示す図である。

[図15]CD19/IL15 $\gamma\delta$ 2CARTCによるヒトCD19発現Nalm6ゼノグラフトマウスにおける生存日数延長効果を示す図である。

[図16]T細胞セルバンクを含むT細胞製品の提供システムの一例を示す。

[図17]T細胞製品選択部に含まれるハードウェア構成の一例を示す図である。

[0013]（発明の詳細な説明）

1. T細胞マスターセルバンク、T細胞ワーキングセルバンク、およびT細胞製品の提供システム

本発明は、T細胞マスターセルバンクおよび／またはT細胞ワーキングセルバンクを提供する。以下では、T細胞マスターセルバンクとT細胞ワーキングセルバンクとを包含するものとして、「T細胞セルバンク」との用語を用いることがある。また、別の態様において、本発明は、T細胞マスターセルバンク

および／またはT細胞ワーキングセルバンクを含む、T細胞製品の提供システム（以下、「本発明の提供システム」と称することがある。）を提供する。

[0014] 本明細書において、「セルバンク」とは、ICH (International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use) のガイドラインに沿って、世界各国の医薬品当局が設ける品質基準等を満たす、特性解析された同一の出発素材を意味する（ICHガイドライン Q5D (ICH guideline Q5D) ）。一般に、セルバンクは適切な容器に充填した細胞を凍結させることによって構築されるが、上記の点で、単に細胞を凍結させることによって得られる凍結ストックとは区別される。必要に応じて、セルバンクに対しては特性解析に加えて品質評価のための試験も実施される。セルバンクの構築方法および構築されたセルバンクの特性解析および品質評価の試験項目は、セルバンクの対象となる細胞の生物学的性質（例えば、栄養要求性）、培養履歴および試験の実施可能性によって変わるが、当業者によって、または当業者と規制当局との協議内容等に基づいて適宜設定される。それらの構築方法ならびに特性解析および品質評価結果に関する情報は各国の製造販売承認申請において医薬品当局に提示される。「マスターセルバンク」とは、すべての製造用細胞シードの元になる種株を一定の培養条件下で最低限の継代数を経て増殖させ、複数のアンプルに分注したものを意味し、該細胞がT細胞であるものを「T細胞マスターセルバンク」という。また、「ワーキングセルバンク」とは、マスターセルバンクの一個または複数個をプールして得た細胞を十分に安定であることを確認した条件下でさらに培養させ、複数のアンプルに分注したものを意味し、該細胞がT細胞であるものを「T細胞ワーキングセルバンク」という（本明細書において、T細胞マスターセルバンクおよびT細胞ワーキングセルバンクを「T細胞セルバンク」と称することがある。）。ICH Q5Dによれば、一般に、特性解析の試験はマスターセルバンクについて実施し、通常、各ワーキングセルバンクにおいても一部の特性解析の試験を実施することとされている。

[0015] 特性解析の試験では主に外来性の感染性因子の混入がないことを評価する

。特に、外来性ウイルスによる汚染は臨床的使用において深刻な事態を招く可能性があることから、ICH Q5A(R1)に従って評価される。その他の試験としては他の細胞株による交叉汚染を検出するための同一性試験がある。また、核型分析や造腫瘍性試験が実施される場合もある。

品質評価の試験項目としては、T細胞としての適切な細胞表現型を用いた確認試験、純度試験、製造工程由来不純物試験、および細胞数や細胞生存率などの含量試験などが挙げられる。

T細胞セルバンクはT細胞製品を製造および／または提供する者が自ら構築することもできるし、他者によって構築されたものを導入してT細胞製品の製造に用いることもできる。

ICH Q5Dによれば、マスターセルバンクからワーキングセルバンクを構築するという2段階方式のセルバンクの考え方は、医薬品製造を継続的に行う上で、細胞基材を供給するためのもっとも実地的な方法として、一般的に受け入れられている。

[0016] ワーキングセルバンクは、一容器またはそれ以上の数のマスターセルバンクに由来するものである。ワーキングセルバンクの更新は必要に応じてマスターセルバンクから行うことができる。新たに構築されたワーキングセルバンクについては、特性解析等を行うことによって、その適格性を適切に確認する必要があることがICH Q5Dに記載されている。

[0017] 本発明の一態様として、T細胞を複数の保存容器（無菌バイアルなど）に分注し、凍結させてストックすることでT細胞マスターセルバンクを構築することができる。このT細胞マスターセルバンク中の一容器分のT細胞を融解し、適宜特性解析の試験に供することができる。また、同一の容器からまたは別の融解した一容器からT細胞を複数の適切な容器に分注し、凍結してストックすることでT細胞ワーキングセルバンクを構築することができる。

本発明の一態様として、T細胞セルバンクの一または複数容器分のT細胞を融解し、T細胞に外因性遺伝子を含む核酸を導入し、拡大培養することによってT細胞製品を製造することができる。

- [0018] 本発明において、「ストックする」とは、T細胞等の細胞が分注 (allocate) された複数の容器をまとめて適切に保管し、温度等の保管条件、出納等を管理することを意味する。それらの容器を保管する場所は一箇所であってもよいし、複数箇所であってもよい。
- [0019] 本発明において、「T細胞」とは、CD3陽性細胞を意味し、本発明に用いることができるT細胞としては、例えば、CD8陽性細胞である細胞傷害性T細胞 (CTL)、CD4陽性細胞であるヘルパーT細胞、制御性T細胞、エフェクターT細胞、T細胞受容体 (TCR) γ 鎖およびTCR δ 鎖陽性細胞である γ δ T細胞などが挙げられる。また、CD4/CD8両陽性細胞も、T細胞に包含される。T細胞におけるTCRは、内在性TCR遺伝子の発現によるTCRであってもよく、外因性TCR遺伝子の発現によるTCRであってもよい。外因性TCRは後述するTCRの改変体であってもよい。本発明で提供されるT細胞セルバンク中のT細胞は、好ましくは細胞傷害性T細胞、より好ましくはCD8 α β を発現するCD8 α β 陽性細胞傷害性T細胞である。また、本明細書において、「T細胞製品」とは、T細胞を保存容器 (無菌バイアルや輸血用バッグなど) に充填したもの、または、これに外包装やラベリングなどを適宜施したものを意味する。T細胞製品は凍結されていてもよいし、凍結されていないこともよいが、T細胞の安定性の観点から長期間保存する場合には凍結されていることが好ましい。本明細書において、凍結したT細胞製品を特に「凍結T細胞製品」ということがある。本明細書において、特に断りのない限り、「T細胞製品」には、凍結していないT細胞製品および凍結したT細胞製品 (凍結T細胞製品) の両方が包含される。本明細書において、「T細胞製品」には、ヒトを含む哺乳動物の対象に投与される臨床試験用の製品と市販用の製品の両方が包含される。
- [0020] 上述の通り、従来のiPS細胞のマスターセルバンクまたはワーキングセルバンクを用いたT細胞製品の提供方法は、人的、時間的および金銭的成本が極めて高い。特に、2種以上のT細胞製品を提供しようとする場合には、それぞれのコストや時間が累積されることとなり、その影響はより深刻なものとなる。一方で本発明の提供システムによれば、T細胞のマスターセルバンクまた

はワーキングセルバンクを用いるため、特に2種以上のT細胞製品を提供する際に、従来の技術と比較して、人的、時間的および金銭的成本を極めて低減することが可能となる。従って、本発明の提供システムで提供されるT細胞製品の種類は1種類でもよいが、2種類以上である場合に特に優れている。

[0021] 本明細書において、「陽性」とは、タンパク質または遺伝子が当該分野で公知の手法による検出可能量で発現していることを意味する。タンパク質の検出は、抗体を用いた免疫学的アッセイ、例えば、ELISA、免疫染色、フローサイトメトリーを利用して行うことができる。また、細胞内に発現し、細胞表面には現れないタンパク質（例えば転写因子またはそのサブユニットなど）の場合は、当該タンパク質とともにレポータータンパク質を発現させ、当該レポータータンパク質を検出することによって対象とするタンパク質を検出できる。遺伝子の検出は、例えば、RT-PCR、バイオチップ（例：マイクロアレイ）、RNAseq等の核酸増幅方法および／または核酸検出方法を利用して行うことができる。

[0022] 本明細書において、「陰性」とは、タンパク質または遺伝子の発現量が、上記のような公知手法の全てあるいはいずれかによる検出下限値未満であることを意味する。タンパク質または遺伝子の発現の検出下限値は、各手法により異なり得る。

[0023] 本明細書において、「遺伝子の発現」には、該遺伝子の特定のヌクレオチド配列からmRNAが合成されること（転写またはmRNAの発現ともいう）および該mRNAの情報に基づきタンパク質が合成されること（翻訳またはタンパク質の発現ともいう）の両方が包含されるものであるが、特に断らない限り、「遺伝子の発現」または単なる「発現」はタンパク質の発現を意味するものとする。

[0024] 本明細書において、「培養」とは、細胞をインビトロ環境において維持し、増殖させ（成長させ）、かつ／または分化させることを指す。「培養する」とは、組織外または体外で、例えば、細胞培養プレート、ディッシュまたはフラスコ中で細胞を維持し、増殖させ（成長させ）、かつ／または分化さ

せることを意味する。

[0025] T細胞セルバンクを構成するT細胞は、T細胞への分化能を有する幹細胞を分化誘導することにより製造することができる。かかる幹細胞としては、例えば、多能性幹細胞 (pluripotent stem cell)、多能性幹細胞 (multipotent stem cell) などが挙げられる。本明細書において、「多能性幹細胞 (pluripotent stem cell)」とは、生体の種々の異なった形態や機能を持つ組織や細胞に分化でき、三胚葉（内胚葉、中胚葉、外胚葉）のどの系統の細胞にも分化し得る能力を有する幹細胞を指す。多能性幹細胞としては、特に限定されないが、例えば、人工多能性幹細胞（本明細書中、「iPS細胞」と称することもある）、胚性幹細胞（ES細胞）、核移植により得られるクローン胚由来の胚性幹細胞 (nuclear transfer Embryonic stem cell: ntES細胞)、多能性生殖幹細胞、胚性生殖幹細胞 (EG細胞) などが挙げられる。本明細書において、「多能性幹細胞 (multipotent stem cell)」とは、複数の限定的な数の系統の細胞へと分化できる能力を有する幹細胞を指す。また、「多能性幹細胞 (multipotent stem cell)」としては、例えば、造血幹細胞、歯髄幹細胞、口腔粘膜由来幹細胞、毛包幹細胞、培養線維芽細胞や骨髓幹細胞由来の体性幹細胞などが挙げられる。好ましい多能性幹細胞 (pluripotent stem cell) は、ES細胞およびiPS細胞であり、特に好ましくはiPS細胞である。上記多能性幹細胞がES細胞またはヒト胚に由来する任意の細胞である場合、その細胞は胚を破壊して作製された細胞であっても、胚を破壊することなく作製された細胞であってもよいが、好ましくは、胚を破壊することなく作製された細胞である。上記幹細胞は哺乳動物（例：マウス、ラット、ハムスター、モルモット、イヌ、サル、オランウータン、チンパンジー、ヒト）由来であることが好ましく、ヒト由来であることがより好ましい。従って、本発明で用いる幹細胞として最も好ましくは、ヒトiPS細胞である。

[0026] 「人工多能性幹細胞 (iPS細胞)」とは、哺乳動物体細胞または未分化幹細胞に、特定の因子（核初期化因子）を導入して再プログラミングすることにより得られる細胞を指す。現在、「人工多能性幹細胞 (iPS細胞)」にはさま

ざまなものがあり、山中らにより、マウス線維芽細胞にOct3/4・Sox2・Klf4・c-Mycの4因子を導入することにより、樹立されたiPS細胞（Takahashi K, Yamanaka S., Cell, (2006) 126: 663-676）のほか、同様の4因子をヒト線維芽細胞に導入して樹立されたヒト細胞由来のiPS細胞（Takahashi K, Yamanaka S., et al., Cell, (2007) 131: 861-872.）、上記4因子導入後、Nanogの発現を指標として選別し、樹立したNanog-iPS細胞（Okita, K., Ichisaka, T., and Yamanaka, S. (2007). Nature 448, 313-317.）、c-Mycを含まない方法で作製されたiPS細胞（Nakagawa M, Yamanaka S., et al., Nature Biotechnology, (2008) 26, 101 - 106）、ウイルスフリー法で6因子を導入して樹立されたiPS細胞（Okita K et al., Nat. Methods 2011 May;8(5):409-12, Okita K et al., Stem Cells. 31(3):458-66.）も用いることができる。また、Thomsonらにより作製されたOCT3/4・SOX2・NANOG・LIN28の4因子を導入して樹立された人工多能性幹細胞（Yu J., Thomson JA. et al., Science (2007) 318: 1917-1920.）、Daleyらにより作製された人工多能性幹細胞（Park IH, Daley GQ. et al., Nature (2007) 451: 141-146）、桜田らにより作製された人工多能性幹細胞（特開2008-307007号）等も用いることができる。

このほか、公開されているすべての論文（例えば、Shi Y., Ding S., et al., Cell Stem Cell, (2008) Vol3, Issue 5, 568-574; Kim JB., Scholer HR., et al., Nature, (2008) 454, 646-650; Huangfu D., Melton, DA., et al., Nature Biotechnology, (2008) 26, No 7, 795-797）、あるいは特許（例えば、特開2008-307007号、特開2008-283972号、US2008-2336610、US2009-047263、W02007/069666、W02008/118220、W02008/124133、W02008/151058、W02009/006930、W02009/006997、W02009/007852）に記載されている当該分野で公知の人工多能性幹細胞のいずれも用いることができる。人工多能性幹細胞株としては、NIH、理研、京都大学等が樹立した各種iPS細胞株が利用可能である。例えば、ヒトiPS細胞株であれば、理研のHiPS-RIKEN-1A株、HiPS-RIKEN-2A株、HiPS-RIKEN-12A株、Nips-B2株、京都大学の253G1株、201B7株、409B2株、454E2株、606A1株、610B1株、648A1株、再生医療用iPS細胞ストック

(例えば、Ff-I01s04株、QHJI株等)等が挙げられる。

[0027] ES細胞は、ヒトやマウスなどの哺乳動物の初期胚(例えば胚盤胞)の内部細胞塊から樹立された、多能性と自己複製による増殖能を有する幹細胞である。ES細胞は、マウスで1981年に発見され(M. J. Evans and M. H. Kaufman (1981), *Nature* 292:154-156)、その後、ヒト、サルなどの霊長類でもES細胞株が樹立された(J. A. Thomson et al., (1998), *Science* 282:1145-1147; J. A. Thomson et al., (1995), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92:7844-7848; J. A. Thomson et al., (1996), *Biol. Reprod.*, 55:254-259; J. A. Thomson and V. S. Marshall (1998), *Curr. Top. Dev. Biol.*, 38:133-165)。ES細胞は、対象動物の受精卵の胚盤胞から内部細胞塊を取出し、内部細胞塊を線維芽細胞のフィーダー上で培養することによって樹立することができる。ヒトおよびサルのES細胞の樹立と維持の方法については、例えば、USP5, 843, 780; Thomson JA, et al., (1995), *Proc Natl. Acad. Sci. U S A*. 92:7844-7848; Thomson JA, et al., (1998), *Science*. 282:1145-1147; Suemori H. et al., (2006), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 345:926-932; Ueno M. et al., (2006), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103:9554-9559; Suemori H. et al., (2001), *Dev. Dyn.*, 222:273-279; Kawasaki H. et al., (2002), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99:1580-1585; Klimanskaya I. et al., (2006), *Nature*. 444:481-485などに記載されている。或いは、ES細胞は、胚盤胞期以前の卵割期の胚の単一割球のみを用いて樹立することもできるし(Chung Y. et al., (2008), *Cell Stem Cell* 2: 113-117)、発生停止した胚を用いて樹立することもできる(Zhang X. et al., (2006), *Stem Cells* 24: 2669-2676.)。「ES細胞」としては、マウスES細胞であれば、inGenious targeting laboratory社、理研(理化学研究所)等が樹立した各種マウスES細胞株が利用可能であり、ヒトES細胞であれば、ウィスコンシン大学、NIH、理研、京都大学、国立成育医療研究センターおよびCellartis社などが樹立した各種ヒトES細胞株が利用可能である。たとえば、ヒトES細胞株としては、ESI Bio社が分譲するCHB-1~CHB-12株、RUES1株、RUES2株、HUE

S1～HUES28株等、WiCell Researchが分譲するH1株、H9株等、理研が分譲するKhES-1株、KhES-2株、KhES-3株、KhES-4株、KhES-5株、SSES1株、SSES2株、SSES3株等を利用することができる。

[0028] nt ES細胞は、核移植技術によって作製されたクローン胚由来のES細胞であり、受精卵由来のES細胞とほぼ同じ特性を有している（Wakayama T. et al., (2001), *Science*, 292:740-743; S. Wakayama et al., (2005), *Biol. Reprod.*, 72:932-936; Byrne J. et al., (2007), *Nature*, 450:497-502）。すなわち、未受精卵の核を体細胞の核と置換することによって得られたクローン胚由来の胚盤胞の内部細胞塊から樹立されたES細胞がnt ES (nuclear transfer ES) 細胞である。nt ES細胞の作製のためには、核移植技術（Cibelli J.B. et al., (1998), *Nature Biotechnol.*, 16:642-646）とES細胞作製技術（上記）との組み合わせが利用される（若山清香ら（2008）, *実験医学*, 26巻, 5号（増刊）, 47～52頁）。核移植においては、哺乳動物の除核した未受精卵に、体細胞の核を注入し、数時間培養することで初期化することができる。

[0029] 多能性生殖幹細胞は、生殖幹細胞(GS細胞)由来の多能性幹細胞である。この細胞は、ES細胞と同様に、種々の系列の細胞に分化誘導可能であり、例えばマウス胚盤胞に移植するとキメラマウスを作出できるなどの性質をもつ（Kanatsu-Shinohara M. et al., (2003) *Biol. Reprod.*, 69:612-616; Shinohara K. et al., (2004), *Cell*, 119:1001-1012）。神経膠細胞系由来神経栄養因子 (glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF)) を含む培養液で自己複製可能であるし、またES細胞と同様の培養条件下で継代を繰り返すことによって、生殖幹細胞を得ることができる（竹林正則ら（2008）, *実験医学*, 26巻, 5号（増刊）, 41～46頁, 羊土社（東京、日本））。

[0030] EG細胞は、胎生期の始原生殖細胞から樹立される、ES細胞と同様な多能性をもつ細胞である。LIF、bFGF、幹細胞因子 (stem cell factor) などの物質の存在下で始原生殖細胞を培養することによって樹立し得る（Matsui Y. et al., (1992), *Cell*, 70:841-847; J.L. Resnick et al., (1992), *Nature*,

359:550-551)。

[0031] 1-1. T細胞への分化誘導

幹細胞のT細胞への分化誘導は、T細胞へ分化できる限り特に制限されずに公知の方法を用いることができる。幹細胞として多能性幹細胞を用いる場合には、上記T細胞への分化誘導は、例えば、(1) 多能性幹細胞を造血前駆細胞に分化させる工程 (process)、および(2) 該造血前駆細胞をT細胞に分化させる工程を含み得る。

[0032] (1) 多能性幹細胞を造血前駆細胞に分化させる工程

本明細書において、「造血前駆細胞 (Hematopoietic Progenitor Cells (HPC))」とは、CD34陽性細胞を意味し、好ましくは、CD34/CD43両陽性 (DP) 細胞である。本発明において、造血前駆細胞と造血幹細胞は、区別されるものではなく、特に断りがなければ同一の細胞を示す。

[0033] 多能性幹細胞から造血前駆細胞への分化方法としては、造血前駆細胞へ分化できる限り特に制限されないが、例えば、国際公開第2013/075222号、国際公開第2016/076415号およびLiu S. et al., Cytotherapy, 17 (2015);344-358などに記載されているように、造血前駆細胞への誘導培地中で多能性幹細胞を培養する方法が挙げられる。

[0034] 本発明において、造血前駆細胞への誘導培地は、特に制限されないが、動物細胞の培養に用いられる培地を基礎培地として調製することができる。基礎培地としては、例えば、ダルベッコ培地 (例: IMDM)、イーグル培地 (例: DMEM、EMEM、BME、MEM、 α MEM)、ハム培地 (例: F10培地、F12培地)、RPMI培地 (例: RPMI-1640培地、RPMI-1630培地)、MCDB培地 (例: MCDB104、107、131、151、153培地)、フィッシャー培地、199培地、霊長類ES細胞用培地 (霊長類ES/iPS細胞用培養液、リプロセル社)、マウスES細胞用培地 (TX-WES培養液、トロンボX社)、無血清培地 (mTeSR、Stemcell Technology社)、ReproFF、StemSpan (登録商標) SFEM、StemSpan (登録商標) H3000、StemlineII、ESF-B培地、ESF-C培地、CSTI-7培地、Neurobasal培地 (Thermo Fisher Scientific社)、StemPro-34培地、StemFit (登録商標) (例: StemFit AK03

N, StemFit AK02N) などが挙げられるがこれに限定されるものではない。さらに、これらの培地は、必要に応じて、混合等して使用することもでき、例えば、DMEM/F12培地等が挙げられる。

[0035] 必要に応じて、基礎培地には、培地添加物などが含まれていてもよく、該培地添加物としては、例えば、血清、ビタミンC類（例：アスコルビン酸）、アルブミン、インスリン、トランスフェリン、セレン化合物（例：亜セレン酸ナトリウム）、脂肪酸、微量元素、2-メルカプトエタノール、チオグリセロール（例： α -モノチオグリセロール（MTG））、脂質、アミノ酸、L-グルタミン、L-アラニル-L-グルタミン（例：Glutamax（登録商標））、非必須アミノ酸、ビタミン、増殖因子、低分子化合物、抗生物質（例：ペニシリン、ストレプトマイシン）、抗酸化剤、ピルビン酸、緩衝剤、無機塩類、サイトカインなどが挙げられる。

[0036] 本発明においてビタミンC類とは、L-アスコルビン酸およびその誘導体を意味し、L-アスコルビン酸誘導体とは、生体内で酵素反応によりビタミンCとなるものを意味する。本発明に用いるアスコルビン酸の誘導体として、リン酸ビタミンC（例：Ascorbic acid 2-phosphate）、アスコルビン酸グルコシド、アスコルビルエチル、ビタミンCエステル、テトラヘキシルデカン酸アスコビル、ステアリン酸アスコビルおよびアスコルビン酸-2リン酸-6パルミチン酸が例示される。好ましくは、リン酸ビタミンC（例：Ascorbic acid 2-phosphate）であり、例えば、リン酸-L-アスコルビン酸Naまたはリン酸-L-アスコルビン酸Mgなどのリン酸-L-アスコルビン酸塩が挙げられる。

[0037] ビタミンC類を用いる場合、ビタミンC類は、4日毎、3日毎、2日毎、または1日毎に、別途添加（補充）することが好ましく、1日毎に添加することがより好ましい。ある実施形態では、当該ビタミンC類は、培養液において、5 ng/ml～500 ng/mlに相当する量（例：5ng/ml、10 ng/ml、25 ng/ml、50 ng/ml、100 ng/ml、200 ng/ml、300 ng/ml、400 ng/ml、500 ng/mlに相当する量）が添加される。別の実施形態では、当該ビタミンC類は、培養液において、5 μ g/ml～500 μ g/mlに相当する量（例：5 μ g/ml、10 μ g/ml、25 μ g/ml、5

0 $\mu\text{g/ml}$ 、100 $\mu\text{g/ml}$ 、200 $\mu\text{g/ml}$ 、300 $\mu\text{g/ml}$ 、400 $\mu\text{g/ml}$ 、500 $\mu\text{g/ml}$ に相当する量)が添加される。

[0038] 工程(1)で用いる培地は、BMP4 (Bone morphogenetic protein 4)、VEGF (vascular endothelial growth factor)、SCF (Stem cell factor)、TPO (トロンボポエチン)、FLT-3L (Flt3 Ligand)、bFGF (basic fibroblast growth factor) からなる群より選択される少なくとも1種類のサイトカインがさらに添加されていてもよい。より好ましくは、BMP4、VEGFおよびbFGFが添加された培養であり、さらに好ましくは、BMP4、VEGF、SCFおよびbFGFが添加された培養である。

[0039] サイトカインを用いる場合、培地中の濃度としては、例えば、BMP4は5 ng/ml~500 ng/mlであり、VEGFは5 ng/ml~500 ng/mlであり、SCFは5 ng/ml~100 ng/mlであり、TPOは1 ng/ml~100 ng/mlであり、FLT-3Lは1 ng/ml~100 ng/mlであり、bFGFは5 ng/ml~500 ng/mlであり得る。

[0040] また、前記培地には、TGF β 阻害剤が添加されてもよい。TGF β 阻害剤とは、TGF β ファミリーのシグナル伝達に干渉する低分子阻害剤であり、例えばSB431542、SB202190(以上、R.K. Lindemann et al., Mol. Cancer 2:20(2003))、SB505124 (GlaxoSmithKline)、NPC30345、SD093、SD908、SD208 (Scios)、LY2109761、LY364947、LY580276 (Lilly Research Laboratories)などが包含される。例えば、TGF β 阻害剤がSB431542である場合、培地中の濃度は、0.5 μM ~100 μM であることが好ましい。

[0041] 多能性幹細胞の培養は、接着培養または浮遊培養であってもよい。接着培養の場合、細胞外基質成分でコーティングした培養容器を用いて行ってもよく、またフィーダー細胞と共培養してもよい。フィーダー細胞としては、特に限定されないが、例えば、線維芽細胞(マウス胎仔線維芽細胞(MEF)、マウス線維芽細胞(ST0)など)が挙げられる。フィーダー細胞は自体公知の方法、例えば放射線(ガンマ線など)照射や抗癌剤(マイトマイシンCなど)処理などで不活化されていることが好ましい。細胞外基質成分としては、マトリゲル(Niwa A, et al., PLoS One.6(7):e22261, 2011)、ゼラチン、コ

ラーゲン、エラスチンなどの繊維性タンパク質、ヒアルロン酸、コンドロイチン硫酸などのグルコサミノグリカンやプロテオグリカン、フィブロネクチン、ビトロネクチン、ラミニンなどの細胞接着性タンパク質などが挙げられる。

[0042] 浮遊培養とは、細胞を培養容器へ非接着の状態で培養することであり、特に限定はされないが、細胞との接着性を向上させる目的で人工的に処理（例えば、細胞外マトリックス等によるコーティング処理）されていない培養容器、若しくは、人工的に接着を抑制する処理（例えば、ポリヒドロキシエチルメタクリル酸（poly-HEMA）または非イオン性の界面活性ポリオール（Pluronic F-127等）によるコーティング処理）した培養容器を使用して行うことができる。浮遊培養の際には、胚様体（EB）を形成させて培養することが好ましい。

[0043] 本発明では、造血前駆細胞は、多能性幹細胞を培養することで得られるネット様構造物（ES-sacまたはiPS-sacとも称する）から調製することもできる。ここで、「ネット様構造物」とは、多能性幹細胞由来の立体的な嚢状（内部に空間を伴うもの）構造体で、内皮細胞集団などで形成され、内部に造血前駆細胞を含む構造体である。

[0044] 培養温度の条件は、特に制限されないが、例えば、37℃～42℃程度、37℃～39℃程度が好ましい。また、培養期間については、当業者であれば造血前駆細胞の数などをモニターしながら、適宜決定することが可能である。造血前駆細胞が得られる限り、日数は特に限定されないが、例えば、少なくとも6日間以上、7日以上、8日以上、9日以上、10日以上、11日以上、12日以上、13日以上、14日以上であり、好ましくは14日である。培養期間が長いことについては、造血前駆細胞の製造においては通常問題とされないが、例えば35日以下が好ましく、21日以下がより好ましい。また、低酸素条件で培養してもよく、本発明において低酸素条件とは、15%、10%、9%、8%、7%、6%、5%またはそれら以下の酸素濃度が例示される。

[0045] （2）造血前駆細胞をT細胞に分化させる工程

造血前駆細胞からT細胞への分化方法としては、造血前駆細胞をT細胞へ分化できる限り特に制限されないが、例えば、国際公開第2016/076415号または国際公開第2017/221975号などに記載されているような、造血前駆細胞からT細胞を誘導する方法と同様の培養条件で、造血前駆細胞を培養する方法が挙げられる。

- [0046] 本発明において、T細胞への分化誘導培地としては、特に制限されないが、動物細胞の培養に用いられる培地を基礎培地として調製することができる。また、必要に応じて、基礎培地には、培地添加物などが含まれていてもよい。基礎培地および培地添加物としては、上記工程（１）で用いたものと同一のものが挙げられる。
- [0047] 工程（２）でビタミンC類を用いる場合、ビタミンC類は、工程（１）で記載したものと同一のものが挙げられ、同様に添加することができる。ある実施形態では、培地中または培養液におけるビタミンC類の濃度は、5 $\mu\text{g/ml}$ ～200 $\mu\text{g/ml}$ であることが好ましい。別の実施形態では、当該ビタミンC類は、培養液において、5 $\mu\text{g/ml}$ ～500 $\mu\text{g/ml}$ に相当する量（例：5 $\mu\text{g/ml}$ 、10 $\mu\text{g/ml}$ 、25 $\mu\text{g/ml}$ 、50 $\mu\text{g/ml}$ 、100 $\mu\text{g/ml}$ 、200 $\mu\text{g/ml}$ 、300 $\mu\text{g/ml}$ 、400 $\mu\text{g/ml}$ 、500 $\mu\text{g/ml}$ に相当する量）が添加される。
- [0048] 工程（２）において、p38阻害剤および／またはSDF-1（Stromal cell-derived factor 1）を用いることが好ましい。本発明において「p38阻害剤」とは、p38タンパク質（p38MAPキナーゼ）の機能を阻害する物質を意味し、例えば、p38の化学的阻害剤、p38のドミナントネガティブ変異体若しくはそれをコードする核酸などが挙げられるが、これらに限定されない。
- [0049] 本発明に用いるp38の化学的阻害剤としては、SB203580（4-（4-フルオロフェニル）-2-（4-メチルスルホニルフェニル）-5-（4-ピリジル）-1H-イミダゾール）、およびその誘導体、SB202190（4-（4-フルオロフェニル）-2-（4-ヒドロキシフェニル）-5-（4-ピリジル）-1H-イミダゾール）およびその誘導体、SB239063（trans-4-[4-（4-フルオロフェニル）-5-（2-メトキシ-4-ピリミジニル）-1H-イミダゾール-1-イル]シクロヘキサノール）およびその誘導体、SB220025およ

びその誘導体、PD169316、RPR200765A、AMG-548、BIRB-796、SC10-469、SC10-323、VX-702、FR167653が例示されるが、これらに限定されない。これらの化合物は市販されており、例えばSB203580、SB202190、SC239063、SB220025およびPD169316についてはCalbiochem社、SC10-469およびSC10-323についてはScios社などから入手可能である。P38の化学的阻害剤としては、SB203580(4-(4-フルオロフェニル)-2-(4-メチルスルホニルフェニル)-5-(4-ピリジル)-1H-イミダゾール)、およびその誘導体が好ましい。

[0050] 本発明に用いるp38のドミナントネガティブ変異体は、p38のDNA結合領域に位置する180位のスレオニンをアラニンに点変異させたp38T180A、ヒトおよびマウスにおけるp38の182位のチロシンをフェニルアラニンに点変異させたp38Y182Fなどが挙げられる。p38阻害剤は、約1 μ M～約50 μ Mの範囲で培地に含有される。P38阻害剤としてSB203580を用いる場合には、1 μ M～50 μ M、5 μ M～30 μ M、10 μ M～20 μ Mの範囲で培地に含有され得る。

[0051] 本発明に用いるSDF-1は、SDF-1 α またはその成熟型だけでなく、SDF-1 β 、SDF-1 γ 、SDF-1 δ 、SDF-1 ϵ 若しくはSDF-1 ϕ 等のアイソフォームまたはそれらの成熟型であってもよく、またこれらの任意の割合の混合物等であってもよい。好ましくは、SDF-1 α が使用される。なお、SDF-1は、CXCL-12またはPB-SFと称される場合もある。

[0052] 本発明において、SDF-1は、そのケモカインとしての活性を有する限り、そのアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入および／または付加されていてもよい（このようなアミノ酸の欠失、置換、挿入および／または付加されたSDF-1を、「SDF-1変異体」ともいう）。また同様に、SDF-1またはSDF-1変異体において、糖鎖が欠失、置換、挿入および／または付加されていてもよい。上記SDF-1の変異体としては、例えば、少なくとも4つのシステイン残基（ヒトSDF-1 α の場合、Cys30、Cys32、Cys55およびCys71）が保持されており、かつ天然体のアミノ酸配列に対して90%以上の同一性を有するものなどが挙げられるが、このアミノ酸変異に限定されるものではない。SDF-1は、哺乳動物、例えば、ヒトや、例えば、サル、ヒツジ、ウシ

、ウマ、ブタ、イヌ、ネコ、ウサギ、ラット、マウス等の非ヒト哺乳動物のものであってもよい。例えば、ヒトのSDF-1 α として、GenBank登録番号：NP_954637で登録されているタンパク質が使用でき、SDF-1 β として、GenBank登録番号：NP_000600で登録されているタンパク質が使用できる。

[0053] SDF-1は、市販のものを使用してもよいし、天然から精製されたものを使用してもよいし、あるいはペプチド合成や遺伝子工学的手法によって製造されたものを使用してもよい。SDF-1は、例えば、約10 ng/ml～約100 ng/mlの範囲で培地に含有される。また、SDF-1に代えて、SDF-1様の活性を有するSDF-1代替物を使用することもできる。このようなSDF-1代替物としてはCXCR4アゴニストが例示され、CXCR4アゴニスト活性を有する低分子化合物などをSDF-1の代わりに培地に添加してもよい。

[0054] 工程（2）で用いる培地には、SCF、TPO（トロンボポエチン）、FLT-3LおよびIL-7から成る群より選択されるサイトカインの少なくとも1種、好ましくは全てをさらに培養液に添加してもよい。これらの濃度は、例えば、SCFは10 ng/ml～100 ng/mlであり、TPOは10 ng/ml～200 ng/mlであり、IL-7は1 ng/ml～100 ng/mlであり、FLT-3Lは1 ng/ml～100 ng/mlである。

[0055] 工程（2）において、造血前駆細胞を接着培養または浮遊培養してもよく、接着培養の場合、培養容器をコーティングして用いてもよく、またフィーダー細胞等と共培養してもよい。共培養するフィーダー細胞として、骨髓間質細胞株OP9細胞（理研BioResource Centerより入手可能）が例示される。当該OP9細胞は、好ましくは、DLL4またはDLL1を恒常的に発現するOP9-DL4細胞またはOP9-DL1細胞である（例えば、Holmes R1 and Zuniga-Pflucker JC. Cold Spring Harb Protoc. 2009(2)）。本発明において、フィーダー細胞としてOP9細胞を用いる場合、別途用意したDLL4若しくはDLL1、あるいはDLL4若しくはDLL1とFc等との融合タンパク質を適宜培地に添加することにより行ってもよい。フィーダー細胞を用いる場合、当該フィーダー細胞を適宜交換して培養を行うことが好ましい。フィーダー細胞の交換は、予め播種したフィーダー細胞上へ培養中の対象細胞を移すことによって行い得る。当該交換は、5

日毎、4日毎、3日毎、または2日毎にて行い得る。また、胚様体を浮遊培養して造血前駆細胞を得た場合は、これを単細胞に解離させたのちに、接着培養を行うことが好ましい。フィーダー細胞と共培養してもよいが、好ましくはフィーダー細胞を用いずに培養を行う。

接着培養の場合であって、培養容器をコーティングする場合のコーティング剤としては、例えば、マトリゲル (Niwa A, et al., PLoS One, 6(7):e22261, 2011))、コラーゲン、ゼラチン、ラミニン、ヘパラン硫酸プロテオグリカン、レトロネクチン (登録商標)、DLL4若しくはDLL1、あるいはDLL4若しくはDLL1と抗体のFc領域 (以下、Fcと称することがある。) 等との融合タンパク質 (例: DLL4/Fc chimera)、エンタクチン、および／またはこれらの組み合わせが挙げられ、レトロネクチンおよびDLL4とFc等との融合タンパク質の組み合わせが好ましい。

[0056] 工程 (2) において、培養温度条件は、特に限定されないが、例えば、約37℃～約42℃程度、約37℃～約39℃程度が好ましい。また、培養期間については、当業者であればT細胞の数などをモニターしながら、適宜決定することが可能である。T細胞が得られる限り、日数は特に限定されないが、例えば、典型的には少なくとも10日間以上、12日以上、14日以上、16日以上、18日以上、または20日以上であり、好ましくは21日である。また、90日以下が好ましく、42日以下がより好ましい。

[0057] 以上の工程によって得られる細胞集団には、T細胞が含まれるが、工程 (2) はさらに、以下の工程 (3) を含んでいてもよい。

[0058] (3) T細胞を濃縮させる工程

T細胞を濃縮させる方法としては、T細胞が濃縮される限り特に制限されないが、例えば、国際公開第2016/076415号および国際公開第2017/221975号などに記載されているような、CD4CD8両陽性T細胞からCD8陽性T細胞を誘導する工程と同様の培養条件で、T細胞を培養する方法が挙げられる。

[0059] 本明細書において、「濃縮させる」とは、細胞の組成物などの組成物中の特定の構成成分の割合を増加させることを指し、「濃縮された」とは、細胞

の組成物、例えば、細胞集団を説明するために使用される場合、特定の構成成分の量が、濃縮される前の細胞集団におけるそのような構成成分の割合と比較して増加している細胞集団を指す。例えば、細胞集団などの組成物を、標的細胞型に関して濃縮することができ、したがって、標的細胞型の割合は、濃縮される前の細胞集団内に存在する標的細胞の割合と比較して増加する。細胞集団は、当技術分野で公知の細胞選択および選別方法によって、標的細胞型について濃縮することもできる。細胞集団は、本明細書に記載した特定の培養方法、選別または選択プロセスによって濃縮することもできる。本発明の特定の実施形態では、標的細胞集団を濃縮する方法により、細胞集団が標的細胞集団に関して少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%、97%、98%または99%濃縮される。

- [0060] 本明細書において、「細胞集団」とは、同じ種類または異なる種類の2以上の細胞を意味する。「細胞集団」は、同じ種類または異なる種類の細胞の一塊 (mass) をも意味する。
- [0061] 本発明において、T細胞の濃縮に用いる培地としては、特に制限されないが、動物細胞の培養に用いられる培地を基礎培地として調製することができる。必要に応じて、基礎培地には、培地添加物などが含まれていてもよい。基礎培地および培地添加物としては、上記工程(1)で用いたものと同一のものが挙げられる。
- [0062] 工程(3)でビタミンC類を用いる場合、ビタミンC類は、工程(1)で記載したものと同一のものが挙げられ、同様に添加することができる。ある実施形態では、培地中または培養液におけるビタミンC類の濃度は、5 $\mu\text{g/ml}$ ~ 200 $\mu\text{g/ml}$ であることが好ましい。別の実施形態では、当該ビタミンC類は、培養液において、5 $\mu\text{g/ml}$ ~ 500 $\mu\text{g/ml}$ に相当する量 (例: 5 $\mu\text{g/ml}$ 、10 $\mu\text{g/ml}$ 、25 $\mu\text{g/ml}$ 、50 $\mu\text{g/ml}$ 、100 $\mu\text{g/ml}$ 、200 $\mu\text{g/ml}$ 、300 $\mu\text{g/ml}$ 、400 $\mu\text{g/ml}$ 、500 $\mu\text{g/ml}$ に相当する量) が添加される。
- [0063] 工程(3)でホルモンを用いる場合、ホルモンとしては、副腎皮質ホルモンが挙げられる。副腎皮質ホルモンは、糖質コルチコイドあるいはその誘導

体であり、酢酸コルチゾン、ヒドロコルチゾン、酢酸フルドロコルチゾン、プレドニゾン、トリアムシノロン、メチルプレドニゾン、デキサメタゾン、ベタメタゾン、プロピオン酸ベクロメタゾンが例示される。好ましくは、デキサメタゾンである。副腎皮質ホルモンが、デキサメタゾンである場合、培地中におけるその濃度は、1 nM～100 nMである。

[0064] 工程（3）では、培地中にCD3/TCR複合体アゴニストが含まれ得る。CD3/TCR複合体アゴニストは、CD3/TCR複合体に特異的に結合することによって、CD3/TCR複合体からT細胞内にシグナルを伝達することができる分子であれば特に制限されない。CD3/TCR複合体アゴニストとしては、例えば、CD3アゴニストおよび／またはTCRアゴニストが挙げられる。CD3アゴニストとしては抗CD3アゴニスト抗体（単に「抗CD3抗体」ともいう）またはその結合断片、TCRアゴニストとしては抗TCRアゴニスト抗体（単に「抗TCR抗体」ともいう）またはその結合断片、MHC/抗原ペプチド複合体またはその多量体およびMHC/スーパー抗原複合体またはその多量体からなる群より選択される少なくとも一つが挙げられる。抗CD3抗体を用いる場合、抗CD3抗体はポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体をともに包含するが、好ましくはモノクローナル抗体である。また、当該抗体は、IgG、IgA、IgM、IgDまたはIgEのいずれの免疫グロブリンクラスに属するものであってもよいが、好ましくはIgGである。抗CD3抗体としては、例えばOKT3クローンから産生される抗体（OKT3）およびUCHT1クローンから産生される抗体（UCHT1）などが挙げられ、好ましくはUCHT1である。抗CD3抗体の培地中における濃度は、例えば、10 ng/ml～1000 ng/mlであり、好ましくは50 ng/ml～800 ng/mlであり、より好ましくは250 ng/ml～600 ng/mlである。上記CD3/TCR複合体アゴニストは、市販のものを使用してもよいし、天然から精製されたものを使用してもよいし、あるいはペプチド合成、遺伝子工学的手法または化学的合成法によって製造されたものを使用してもよい。例えば、OKT3およびUCHT1は、ThermoFisher社やGeneTex社などから購入できる。

[0065] 工程（3）でサイトカインを用いる場合、サイトカインとしては、IL-2お

よびIL-7等が挙げられる。サイトカインが、IL-2である場合、培地中におけるその濃度は、10 U/ml～1000 U/mLであり、IL-7である場合、培地中におけるその濃度は、1 ng/ml～1000 ng/mLである。

[0066] 工程（3）において、培養温度条件は、特に限定されないが、例えば、約37℃～約42℃程度、約37℃～約39℃程度が好ましい。また、培養期間については、当業者であればT細胞の数などをモニターしながら、適宜決定することが可能である。細胞が濃縮される限り、日数は特に限定されないが、例えば、少なくとも1日以上、2日以上、3日以上、4日以上、5日以上であり、好ましくは6日である。また、28日以下が好ましく、14日以下がより好ましい。

[0067] T細胞セルバンクを構成するT細胞は、内因性の遺伝子の発現が適宜調整されていてもよい。具体的には、T細胞セルバンクを構成するT細胞は、他家移植での拒絶反応を低減させる観点から、少なくとも1種（例：1種、2種、3種、6種、9種）のHLA（ヒト白血球型抗原遺伝子）遺伝子の発現が抑制、あるいは該HLA遺伝子を欠失されていることが好ましい。従って、本発明の一態様において、本発明の提供システムは、少なくとも1種類のHLA遺伝子の発現が抑制されたT細胞を含む。本明細書において、HLA遺伝子の発現の抑制には、該遺伝子の欠失も包含されるものとする。

[0068] 上記HLA遺伝子としては、具体的には、クラスIのHLA（即ち、HLA-A、HLA-B、HLA-C、HLA-E、HLA-FおよびHLA-G）遺伝子およびクラスIIのHLA（即ち、HLA-A-DR、HLA-DQおよびHLA-DP）遺伝子からなる群から選択される1種以上のHLA遺伝子が挙げられる。あるいは、上記HLA遺伝子の発現や細胞表面への提示に重要な遺伝子の発現を抑制させてもよい。かかる遺伝子としては、例えば、HLAクラスIのHLAを細胞表面に提示するのに重要なタンパク質であるB2MをコードするB2M遺伝子、クラスIIのHLA遺伝子の発現に重要なタンパク質であるCIITAをコードするCIITA遺伝子などが挙げられる。一方で、HLA遺伝子の発現抑制により、HLA遺伝子発現が抑制された細胞はナチュラルキラー（NK）細胞の標的となり易いことから、該NK細胞の標的となるのを避けるため、CD47遺伝子を過剰発現させることや、HLA-A遺伝子およびHLA-B遺伝子の2遺伝子だけの

発現を抑制させ、NK細胞の攻撃回避に重要なHLA-C遺伝子と、HLA-E遺伝子、HLA-F遺伝子およびHLA-G遺伝子の発現は維持させる（この際、クラスIIのHLA遺伝子の発現を抑制させてもさせなくてもよいが、免疫適合性の観点からは、該遺伝子の発現を抑制することが好ましい）ことも好ましい。よって、好ましい態様において、発現の抑制の対象となるHLA遺伝子の組み合わせとしては、(i)HLA-A遺伝子およびHLA-B遺伝子の組み合わせ、(ii)HLA-A遺伝子、HLA-B遺伝子、HLA-DR遺伝子、HLA-DQ遺伝子およびHLA-DP遺伝子の組み合わせ、ならびに(iii)HLA-A遺伝子、HLA-B遺伝子、HLA-C遺伝子、HLA-E遺伝子、HLA-F遺伝子、HLA-G遺伝子、HLA-DR遺伝子、HLA-DQ遺伝子およびHLA-DP遺伝子の組み合わせが挙げられる。上記では、ヒトの主要組織適合遺伝子複合体（MHC）であるHLAを例にして説明したが、ヒト以外のMHCを用いる場合でも、同様に少なくとも1種のMHC遺伝子の発現を抑制させることが好ましい。

[0069] HLA遺伝子の発現を抑制する方法としては、公知の方法を適宜用いることができるが、例えば、HLA mRNA、B2M mRNA、および／またはCIITA mRNAを標的とするsiRNA、shRNA、miRNA、アンチセンスオリゴ核酸、リボザイムを多能性細胞からT細胞への分化段階の細胞（例：多能性幹細胞、造血前駆細胞(CD34+/CD43+)、ProT細胞(CD4-/CD8-)、CD3+/CD4+/CD8+T細胞、CD3+/CD4-/CD8+T細胞、あるいはその他の細胞（例：CD3-/CD4+/CD8+細胞等）等）に導入するか、該分子をコードする核酸を、下述の方法により該細胞に導入することにより、HLA遺伝子の発現をノックダウンすることができる。あるいは、ゲノム編集（例えば、CRISPRシステム、TALEN、ZFNなど）により、細胞内のHLA遺伝子、B2M遺伝子、および／またはCIITA遺伝子をノックアウトしてもよい。

[0070] また、T細胞セルバンクを構成するT細胞は、該TCR鎖の発現をsiRNAによって、あるいはT細胞を投与する被験者にとって無害であることが公知である外因性のTCRを導入することなどにより、該T細胞に内在するTCRの発現を抑制することが好ましい。前記のsiRNAによる方法を適用する場合には、外因性のTCRに対するsiRNAの効果を避けるため、該TCRをコードする核酸の塩基配列を、内在性のTCR鎖の発現を抑えるsiRNAが作用するRNAに対応する塩基配列とは異

なる配列（コドン変換型配列）とすることが好ましい。これらの方法は、例えば国際公開第2008/153029号に記載されている。前記の塩基配列は、天然から取得されたTCRをコードする核酸へのサイレント変異の導入や、人為的に設計した核酸を化学的に合成することで作製することができる。あるいは、内在性のTCR鎖とのミスペアを避けるため、導入したTCRをコードする核酸の定常領域の一部または全部を、被検者以外の動物由来の定常領域に置換してもよい。

- [0071] また、T細胞セルバンクを構成するT細胞は、外因性遺伝子を含む核酸が導入されていてもよく、該外因性遺伝子産物が発現していてもよい。
- [0072] 上記外因性遺伝子としては、特に限定されず、T細胞の機能の制御に寄与し得るタンパク、サイトカイン、ケモカイン等をコードする外因性遺伝子を用いることができる。上記外因性遺伝子としては、例えば、キメラ抗原受容体（CAR）をコードする遺伝子（以下、「CAR遺伝子」ともいう。）、外因性のT細胞受容体（TCR）をコードする遺伝子（以下、「TCR遺伝子」ともいう。）などが挙げられる。細胞に導入された遺伝子から発現した上記CARおよびTCRは、抗原および／または該抗原-HLA複合体を認識し結合し得る。本明細書において、TCRをコードする核酸とは、TCRを形成する片方の鎖をコードする塩基配列と、他方の鎖をコードする塩基配列を含む核酸を意味する。
- [0073] 本明細書で用いる「結合し得る(capable of binding)」という用語は、「結合する能力を有すること(having an ability to bind)」を意味し、1つまたはそれ以上の他の分子と非共有結合複合体を形成する能力を指す。結合能を決定するための様々な方法およびアッセイは、当技術分野で公知である。結合は、通常、高親和性を有する結合であり、KD値で測定される結合親和性(binding affinity)は、好ましくは1 μ M未満、より好ましくは100 nM未満、さらにより好ましくは10 nM未満、さらにより好ましくは1 nM未満、さらにより好ましくは100 pM未満、さらにより好ましくは10 pM未満、さらにより好ましくは1 pM未満である。「KD」または「KD値」という用語は、当技術分野で公知の平衡解離定数に関連し、分子間の結合親和性を表す。KD値が小さい

ほど、結合親和性が高いことを示す。

- [0074] 本発明で用いるTCRには、TCRの α 鎖と β 鎖とがヘテロダイマーを構成するもの（即ち、 $\alpha\beta$ TCR）、あるいはTCRの γ 鎖と δ 鎖とがヘテロダイマーを構成するもの（即ち、 $\gamma\delta$ TCR）だけでなく、ホモダイマーを構成するものも包含される。さらに、定常領域の一部若しくは全部を欠損したものや、アミノ酸配列を組み換えたものを用いてもよい。
- [0075] また、上記のTCR鎖の定常領域は、その由来の細胞傷害性T細胞（CTL）クローンのTCR鎖の定常領域において、所定の改変が施されていてもよい。この改変としては、例えば、CTLクローンのTCRの定常領域の特定のアミノ酸残基をシステイン残基に置換することで、TCR鎖間のジスルフィド結合によるダイマー発現効率を亢進することなどが挙げられるが、これらに限定されない。
- [0076] また、上記TCRは改変体であってもよく、以下では、特に断らない限り、TCRにはその改変体が包含されるものとする。かかる改変体としては、例えば、本発明者らが開発した、 α 鎖、 β 鎖、 γ 鎖および δ 鎖からなる群から選択されるTCR鎖の定常領域を含むポリペプチドを2つ組み合わせてなる、T細胞受容体の改変体などが挙げられる。TCRの改変体は、TCR α 鎖および β 鎖の相補性決定領域（CDR）、または同一種類の鎖の相補性決定領域（CDR）（好ましくは該CDRを含む可変領域の一部または全部）をいずれも含まないこと、および、定常領域が由来するT細胞受容体鎖の相補性決定領域（CDR）、または同一種類の鎖の相補性決定領域（CDR）（好ましくは該CDRを含む可変領域の一部または全部）を含まないことを特徴とする。よって、上記改変体には、天然型または人工型（例えば、定常領域と可変領域の由来となる動物種が異なる）の $\alpha\beta$ TCR、 $\gamma\delta$ TCR、あるいはこれらのTCRにアミノ酸がさらに付加されたTCR改変体は包含されない。例えば、本発明の改変体の少なくとも一方の鎖に該当するポリペプチドが、T細胞受容体 α 鎖の定常領域を含む場合には、該ポリペプチドには、T細胞受容体 α 鎖の相補性決定領域、好ましくは該相補性決定領域を含む可変領域の一部または全部、を含まないが、 α 鎖および β 鎖以外、の異なるTCR鎖、例えば γ 鎖、 δ 鎖のCDRや可変領域は含んでいて

もよい。同様に、上記改変体の少なくとも一方の鎖に該当するポリペプチドが、T細胞受容体 β 鎖の定常領域を含む場合には、該ポリペプチドには、T細胞受容体 β 鎖の相補性決定領域、好ましくは該相補性決定領域を含む可変領域の一部または全部、を含まないが、 α 鎖および β 鎖以外、の異なるTCR鎖、例えば γ 鎖、 δ 鎖のCDRや可変領域は含んでいてもよい。 γ 鎖および δ 鎖についても同様である。

[0077] 上記のTCRは、膜移行シグナルペプチド（以下、「シグナルペプチド」と称する）が付加されていてもよい。シグナルペプチドとしては、CD8、Immunoglobulin-H (IGH)、CD4の他、膜貫通ドメインを有する各種ペプチドをコードする遺伝子に由来する膜移行シグナルペプチドおよび／または、当該シグナルペプチドのアミノ酸配列中において1若しくは数個（例えば、2個、3個、4個、5個）のアミノ酸が欠失、置換、挿入および／または付加されたアミノ酸配列、若しくは当該シグナルペプチドのアミノ酸配列と同一性を有するアミノ酸配列からなるシグナルペプチドを使用することができる。シグナルペプチドが付加する場合の結合位置およびシグナルペプチドの数は特に限定されない。

[0078] 本発明において「キメラ抗原受容体（CAR）」とは、抗原結合ドメインと、膜貫通ドメインと、細胞内シグナル伝達ドメインとを含む融合タンパク質を意味する。CARの抗原結合ドメインは、抗体の可変領域の軽鎖（VL）と重鎖（VH）を、リンカー（例：GとSからなるリンカー（GSリンカー））などのスペーサーを介して直列に結合させた短鎖抗体（scFv）を含む。CARを発現させたT細胞は、scFv領域で抗原を認識した後、その認識シグナルを細胞内シグナル伝達ドメインを通じてT細胞内に伝達する。T細胞にCARを導入することにより、目的の抗原に対する特異性を付与することが可能となる。また、CARはHLAクラスIまたはクラスIIに依存せずに抗原分子を直接認識することができるため、HLAクラスIまたはクラスII遺伝子の発現が低下した細胞に対しても高い免疫反応を起こすことが可能である。前記CARが標的とする抗原としては、前記TCRが標的とする上記の抗原と同じ抗原が挙げられる。

- [0079] CARの膜貫通ドメインとしては、例えば、TCRの α 鎖、 β 鎖若しくは δ 鎖、CD28、CD3 ϵ 鎖、CD45、CD4、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、4-1BB (CD137) およびCD154からなる群から選択される1種以上のタンパク質に由来する膜貫通ドメインなどが挙げられるが、これらに限定されない。抗原結合ドメインに連結される最初の細胞内シグナル伝達ドメインが由来する分子の膜貫通ドメインを使用してもよく、例えば、抗原結合ドメインに連結される最初の細胞内シグナル伝達ドメインが由来する分子がCD28である場合、膜貫通ドメインもまたCD28に由来してもよい。あるいは、人為的に設計した膜貫通ドメインを用いてもよい。
- [0080] CARの細胞内シグナル伝達ドメインとしては、例えば、CD3 ζ 鎖 (TCR ζ 鎖)、FcR γ 鎖、FcR β 鎖、CD3 γ 鎖、CD3 δ 鎖、CD3 ϵ 鎖、CD5、CD22、CD79a、CD79bおよびCD66dからなる群から選択される1種以上のタンパク質に由来する細胞内ドメインが挙げられるが、これらに限定されない。これらの中でも、CD3 ζ 鎖に由来する細胞内シグナル伝達ドメインが好ましい。また、細胞内シグナル伝達ドメインには、さらに共刺激分子の細胞内ドメインが含まれていてもよく、かかる共刺激分子としては、例えば、CD27、CD28、4-1BB (CD137)、OX40、CD30、CD40、PD-1、ICOS、リンパ球機能関連抗原-1 (LFA-1)、CD2、CD7、LIGHT、NKG2C、B7-H3およびCD83からなる群から選択される1種以上のタンパク質の細胞内ドメインが挙げられる。結合させる共刺激分子の種類や数を選択することにより、CARの活性の強さや持続時間をコントロールすることができる (例えば、Mol Ther. 2009;17:1453-1464.)。
- [0081] CARの抗原結合ドメインと膜貫通ドメインとの間、またはCARの細胞内シグナル伝達ドメインと膜貫通ドメインとの間に、スペーサーを組み入れてもよく、該スペーサーとしては、通常300アミノ酸以下、好ましくは10~100アミノ酸、最も好ましくは25~50アミノ酸からなるペプチドを用いることができる。具体的には、IgG1由来のヒンジ領域や、免疫グロブリンのCH2CH3領域とCD3の一部を含むペプチドなどが挙げられるが、これらに限定されない。
- [0082] 具体的なCARとしては、scFVと、CD3 ζ 鎖とをスペーサーを介して結合した

第1世代のCAR、T細胞に対する活性化能を増強するため、第1世代のCARのscFVとCD3ζ鎖との間に、CD28に由来する膜貫通ドメインと細胞内ドメインが組み込まれた第2世代のCAR、ならびに、第2世代のCARのCD28の細胞内ドメインとCD3ζ鎖との間に、CD28とは異なる共刺激分子（4-1BBまたはOX40）の細胞内ドメインが組み込まれた第3世代のCARが挙げられるが、これらに限定されない。

[0083] 本発明で用いるCARとしては、より具体的には、抗原結合ドメインとしてCD19を認識するscFv、膜貫通ドメインとしてCD8の膜貫通ドメイン、細胞内シグナル伝達ドメインとしてCD28に由来する細胞内ドメイン、CD30に由来する細胞内ドメイン、4-1BBに由来する細胞内ドメイン、CD3ζ鎖に由来する細胞内ドメインを含むキメラ抗原受容体が挙げられる。細胞内シグナル伝達ドメインに含まれる上記の各細胞内ドメインの順番は特に制限されないが、例えば、CD28に由来する細胞内ドメイン、CD30に由来する細胞内ドメインまたは4-1BBに由来する細胞内ドメイン、CD3ζ鎖に由来する細胞内ドメインの順番に含まれる。より具体的には、本発明のキメラ抗原受容体は、例えば、配列番号4または5によって表されるアミノ酸配列、または配列番号4または5で表されるアミノ酸配列のうち1または2個以上（好ましくは、1～100個程度、好ましくは1～50個程度、さらに好ましくは1～10個程度、特に好ましくは1～数（2、3、4若しくは5）個）のアミノ酸が欠失、置換、挿入および／または付加したアミノ酸配列からなる。

[0084] また、CD30に由来する細胞内ドメインとしては、例えば、配列番号7で表されるアミノ酸配列のうち1または2個以上（好ましくは、1～100個程度、好ましくは1～50個程度、さらに好ましくは1～10個程度、特に好ましくは1～数（2、3、4若しくは5）個）のアミノ酸が欠失、置換、挿入および／または付加したアミノ酸配列などが挙げられる。上記のようにアミノ酸配列が欠失、置換、挿入および／または付加されている場合、その欠失、置換、挿入および／または付加の位置は、CD30の細胞内ドメインの機能が保持される限り特に限定されない。

- [0085] 上記TCRやCARが標的とする抗原としては、例えば腫瘍抗原が挙げられるが、これに限定されない。腫瘍抗原は、腫瘍特異的抗原（TSA）であっても、腫瘍関連抗原（TAA）であってもよい。かかる腫瘍抗原としては、具体的には、MART-1/MelanA（MART-I）、gp100（Pmel 17）、チロシナーゼ、TRP-1、TRP-2などの分化抗原、WT1、Glypican-3、MAGE-1、MAGE-3、BAGE、GAGE-1、GAGE-2、p15などの腫瘍特異的多系列抗原、CEAなどの胎児抗原、p53、Ras、HER-2/neuなどの過剰発現される腫瘍遺伝子または突然変異した腫瘍抑制遺伝子、BCR-ABL、E2A-PRL、H4-RET、IGH-IGK、MYL-RARなどの染色体転座に起因する固有の腫瘍抗原、ならびに、エプスタイン・バーウイルス抗原EBVAならびにヒトパピローマウイルス（HPV）抗原E6およびE7などのウイルス抗原からなる群から選択される1種以上の抗原が挙げられる。その他の腫瘍抗原としては、TSP-180、MAGE-4、MAGE-5、MAGE-6、RAGE、NY-ESO、p185erbB2、p180erbB-3、c-met、nm-23H1、PSA、TAG-72、CA 19-9、CA 72-4、CAM 17.1、NuMa、K-ras、 β -カテニン、CDK4、Mum-1、p 15、p 16、43-9F、5T4、791Tgp72、 α -フェトプロテイン、 β -HCG、BCA225、BTAA、CA 125、CA 15-3\CA 27.29\BCAA、CA 195、CA 242、CA-50、CAM43、CD68\PI、CO-029、FGF-5、G250、Ga733\EpCAM、HTgp-175、M344、MA-50、MG7-Ag、MOV18、NB/70K、NY-CO-1、RCAS 1、SDCCAG16、TA-90\Mac-2結合タンパク質\シクロフィリンC関連タンパク質、TAAL6、TAG72、TLPおよびTPSが挙げられるが、これらに限定されない。
- [0086] 上記のTCRまたはCAR（以下、「TCR等」と省略する場合がある。）が抗原を特異的に認識し、結合し得ることは公知の方法によって確認することができ、好適な方法としては、例えばデキストラマーアッセイまたはELISPOTアッセイなどが挙げられる。ELISPOTアッセイを行うことにより、TCR等を細胞表面に発現しているT細胞が、該TCR等より標的抗原を認識し、そのシグナルが細胞内に伝達されたことを確認することができる。
- [0087] さらに、本発明者らは以前、上記CARと共にIL-15およびIL-15R α を含む融合タンパク質（以下、「IL-15/IL-15R α 」と省略する場合がある。）を発現する細胞では、CARのみを発現する細胞と比較して、細胞傷害活性が上昇する

ことを見出している。従って、細胞傷害活性の観点からは、T細胞セルバンクを構成するT細胞は、IL-15/IL-15R α を発現していることが好ましく、さらに上記CARを発現していることがより好ましい。IL-15/IL-15R α を発現するT細胞を得るため、該IL-15/IL-15R α 遺伝子は、多能性細胞からT細胞への分化段階の細胞（例：多能性幹細胞、造血前駆細胞(CD34⁺/CD43⁺)、ProT細胞(CD4⁻/CD8⁻)、CD3⁺/CD4⁺/CD8⁺T細胞、CD3⁺/CD4⁻/CD8⁺T細胞、あるいはその他の細胞（例：CD3⁻/CD4⁺/CD8⁺細胞等）等）に導入される。IL-15/IL-15R α の導入は、それらをコードする核酸の形態で細胞に導入することが好ましく、かかる導入は、上記核酸導入ステップを行う場合と同様に行うことができる。

[0088] IL-15によるシグナル伝達系では、通常、抗原提示細胞上に発現しているIL-15R α がIL-15と結合し、CD8陽性CD4陰性細胞上のIL-15R β と共通 γ 鎖(γc)からなるIL-15受容体にIL-15を提示すること(trans-presentation)により、CD8陽性CD4陰性細胞の細胞傷害活性が維持される。従って、IL-15/IL-15R α を発現するT細胞は、該細胞がCD8陽性CD4陰性である場合、IL-15受容体を介して自己の細胞内にIL-15シグナルを伝えることができる。あるいは、IL-15/IL-15R α を発現するT細胞は、IL-15受容体を介して他のCD8陽性CD4陰性細胞内にIL-15シグナルを伝えることができる。以上の通り、IL-15/IL-15R α は、CD8陽性CD4陰性細胞の細胞傷害活性を維持可能であるため、CARの標的となる細胞に対する継続的な細胞傷害効果を期待できる。

[0089] IL-15/IL-15R α は、膜貫通型タンパク質であっても分泌型タンパク質であってもよい。IL-15R α は、成熟型タンパク質のN末端から1-65アミノ酸のIL-15結合ドメインが、IL-15と結合するための責任領域であることが知られている(Wei X. et al., J. Immunol., 167: 277-282, 2001)。従って、膜貫通型タンパク質は、IL-15結合ドメインを保持し、かつIL-15R α の膜貫通ドメインを保持するタンパク質であればよい。一方、分泌型タンパク質としては、IL-15結合ドメインを保持し、かつIL-15R α の膜貫通ドメインを欠失したタンパク質（例えば、IL-15R α の1-65アミノ酸残基、1-85アミノ酸残基、または1-182アミノ酸残基からなるタンパク質や、該アミノ酸配列と85%以上（例:90%、9

5%、97%、98%、99%) 同一なアミノ酸配列を含むペプチドなど) であればよい。

[0090] IL-15/IL-15R α は、IL-15とIL-15R α との間にスペーサーを組み入れてもよく、該スペーサーとしては、通常300アミノ酸以下、好ましくは10~100アミノ酸、最も好ましくは20~50アミノ酸からなるペプチドを用いることができる。具体的には、上述のGSリンカーなどが挙げられるが、これらに限定されない。

[0091] IL-15/IL-15R α としては、IL-15とIL-15R α とを融合したタンパク質であれば特に制限されないが、具体的には配列番号7からなるペプチドが挙げられる。あるいは、IL-15/IL-15Rとしては、IL-15受容体と結合し、IL-15シグナルを細胞内に伝達できる限り制限されないが、例えば、配列番号7に示されるアミノ酸配列と約90%以上、好ましくは約95%以上、より好ましくは約97%以上、特に好ましくは約98%以上、最も好ましくは約99%以上の相同性または同一性を有するアミノ酸配列を含むペプチドが挙げられる。ここで「相同性」または「同一性」とは、当該技術分野において公知の数学的アルゴリズムを用いて2つのアミノ酸配列をアラインさせた場合の、最適なアラインメント（好ましくは、該アルゴリズムは最適なアラインメントのために配列の一方若しくは両方へのギャップの導入を考慮し得るものである）における、オーバーラップする全アミノ酸残基に対する同一アミノ酸および類似アミノ酸残基（同一性の場合は、同一アミノ酸残基）の割合（%）を意味する。「類似アミノ酸」とは物理化学的性質において類似したアミノ酸を意味し、例えば、芳香族アミノ酸（Phe、Trp、Tyr）、脂肪族アミノ酸（Ala、Leu、Ile、Val）、極性アミノ酸（Gln、Asn）、塩基性アミノ酸（Lys、Arg、His）、酸性アミノ酸（Glu、Asp）、水酸基を有するアミノ酸（Ser、Thr）、側鎖の小さいアミノ酸（Gly、Ala、Ser、Thr、Met）などの同じグループに分類されるアミノ酸が挙げられる。このような類似アミノ酸による置換はタンパク質の表現型に変化をもたらさない（即ち、保存的アミノ酸置換である）ことが予測される。保存的アミノ酸置換の具体例は当該技術分野で周知であり、種々の文

献に記載されている（例えば、Bowieら、Science, 247:1306-1310 (1990)を参照）。本明細書におけるアミノ酸配列の相同性または同一性は、相同性計算アルゴリズムNCBI BLAST (National Center for Biotechnology Information Basic Local Alignment Search Tool) を用い、以下の条件（期待値=10；ギャップを許す；マトリクス=BLOSUM62；フィルタリング=OFF）にて計算することができる。

[0092] 外因性遺伝子の導入は、公知の方法により行うことができ、導入核酸がDNAの形態の場合、例えば、リン酸カルシウム共沈殿法、PEG法、エレクトロポレーション法、マイクロインジェクション法、リポフェクション法などにより行うことができる。例えば、細胞工学別冊8 新細胞工学実験プロトコル、263-267 (1995) (秀潤社発行)、ヴィロロジー (Virology), 52巻, 456 (1973)、日薬理誌 (Folia Pharmacol. Jpn.), 第119巻 (第6号), 345-351 (2002)などに記載の方法を用いることができる。ウイルスベクターを用いる場合には、核酸を、必要に応じてパッケージングベクターと共に、適当なパッケージング細胞（例、Plat-E細胞）や相補細胞株（例、293細胞）に導入して、培養上清中に産生されるウイルスベクターを回収し、各ウイルスベクターに応じた適切な方法により、該ベクターを細胞に感染させることで、細胞に導入することができる。かかるウイルスベクターとしては、レトロウイルスベクター（レンチウイルスベクターやシュードタイプベクターを含む）、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、ヘルペスウイルスベクター、センダイウイルスベクター、エピソーマルベクターなどが挙げられる。また、トランスポゾン発現システム（PiggyBacシステム）を用いてもよい。プラスミドベクターとしては、動物細胞発現プラスミド（例えば、pa1-11、pXT1、pRc/CMV、pRc/RSV、pcDNAI/Neo）などが挙げられる。具体的には、ベクターとしてレトロウイルスベクターを用いる具体的手段が国際公開第2007/69666号、Cell, 126, 663-676 (2006) および Cell, 131, 861-872 (2007)などに開示されている。特に、レトロウイルスベクターを用いる場合には、組換えフィブロネクチンフラグメントであるCH-296（タカラバイオ社製）を

用いることにより、各種細胞に対して、高効率な遺伝子導入が可能となる。導入核酸がDNAの形態の場合であって、ウイルスベクターを用いる場合、導入対象の細胞の種類によってウイルスベクターの種類が適宜選択され得る。対象細胞がT細胞である場合には、レトロウイルスベクターを用いることが好ましく、ガンマレトロウイルスベクターを用いることがより好ましい。対象細胞がiPS細胞である場合には、レンチウイルスベクターを用いることが好ましい。

[0093] 導入核酸をRNAの形態で直接細胞に導入し、細胞内で導入した遺伝子を発現させてもよい。RNAの導入方法としては、公知の方法を用いることができ、例えば、リポフェクション法やエレクトロポレーション法などが好適に使用できる。また、初期化因子がタンパク質の形態の場合、例えば、リポフェクション、細胞膜透過性ペプチド（例えば、HIV由来のTATおよびポリアルギニン）との融合、マイクロインジェクションなどの手法等により細胞に導入することができる。

[0094] 上記のTCR等は、TCR等をコードする核酸の形態で、細胞に導入される。また、IL-15およびIL-15R α を含む融合タンパク質も、該融合タンパク質をコードする核酸の形態で、細胞に導入される。該核酸および上記のHLA遺伝子の発現を抑制するための核酸はDNAであってもRNAであってもよく、あるいはDNA/RNAキメラであってもよいが、好ましくはDNAである。また、該核酸は二本鎖であっても、一本鎖であってもよい。二本鎖の場合は、二本鎖DNA、二本鎖RNAまたはDNA:RNAのハイブリッドでもよい。核酸がRNAである場合は、RNAの配列については、TをUと読み替えることとする。また、該核酸は、in vitroまたは細胞中で、ポリペプチドを発現できる限り、天然ヌクレオチド、修飾ヌクレオチド、ヌクレオチド類似体、またはこれらの混合物を含んでもよい。

[0095] 上記の核酸は、自体公知の方法により構築することができる。例えば、公知のTCRまたはCARのアミノ酸配列または核酸配列に基づき、化学的にDNA鎖を合成するか、若しくは合成した一部オーバーラップするオリゴDNA短鎖を、PCR法やGibson Assembly法を利用して接続することにより、TCRまたはCARの全

長または一部をコードするDNAを構築することが可能である。HLA遺伝子の発現を抑制するための核酸、ならびにIL-15およびIL-15R α を含む融合タンパク質をコードする核酸も、同様にして構築することができる。

[0096] 上記の核酸は、発現ベクターに組み込むことができる。該ベクターは、標的細胞のゲノムに組み込まれるベクターでもよいし、組み込まれないベクターでもよい。一実施態様において、ゲノムに組み込まれないベクターは、標的細胞のゲノムの外側で複製し得る。ベクターは、標的細胞のゲノムの外側に複数のコピーで存在してもよい。本発明の別の実施態様において、ベクターは標的細胞のゲノムに組み込まれる。あるいは、導入した核酸は、ゲノム編集（例えば、CRISPRシステム、TALEN、ZFN等）を用いた相同組み換えなどにより、ゲノムに組み込むこともできる。好ましい実施態様において、ベクターなどの核酸は、標的細胞のゲノムのあらかじめ決められた位置に組み込まれる。

[0097] 上記のベクターに使用されるプロモーターとしては、例えば、EF1 α プロモーター、CAGプロモーター、SR α プロモーター、SV40プロモーター、LTRプロモーター、CMV（サイトメガロウイルス）プロモーター、RSV（ラウス肉腫ウイルス）プロモーター、MoMuLV（モロニーマウス白血病ウイルス）LTR、HSV-TK（単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ）プロモーター、TCR V α 遺伝子プロモーター、TCR V β 遺伝子プロモーターなどが用いられる。なかでも、EF1 α プロモーター、CAGプロモーター、MoMuLV LTR、CMVプロモーター、SR α プロモーター等が好ましい。

[0098] 上記のベクターは、上記プロモーターの他に、所望により、転写および翻訳調節配列、リボソーム結合部位、エンハンサー、複製起点、ポリA付加シグナル、選択マーカー遺伝子などを含んでいてもよい。選択マーカー遺伝子としては、例えば、ジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子、ネオマイシン耐性遺伝子、ピューロマイシン耐性遺伝子などが挙げられる。

[0099] 本発明の一実施態様において、TCRの α 鎖をコードする核酸と、 β 鎖をコードする核酸とを含む発現ベクターを標的細胞内に導入し、標的細胞内や細胞

表面にTCRの α 鎖と β 鎖のヘテロダイマーを構成することができる。この場合において、TCRの α 鎖をコードする核酸と、 β 鎖をコードする核酸は、別々の発現ベクターに組み込んでもよいし、1つの発現ベクターに組み込んでもよい。1つの発現ベクターに組み込む場合には、これら2種類の核酸は、ポリシストロニック発現を可能にする配列を介して組み込むことが好ましい。ポリシストロニック発現を可能にする配列を用いることにより、1種類の発現ベクターに組み込まれている複数の遺伝子をより効率的に発現させることが可能になる。ポリシストロニック発現を可能にする配列としては、例えば、2A配列（例：口蹄疫ウイルス（FMDV）由来の2A配列（F2A）、ウマ鼻炎Aウイルス（ERAV）由来の2A配列（E2A）、Porcine teschovirus（PTV-1）由来の2A配列（P2A）、Thosea asigna virus（TaV）由来の2A配列（T2A配列）（PLoS ONE 3, e2532, 2008、Stem Cells 25, 1707, 2007）、内部リボソームエン트리一部（IRES）（U.S. Patent No. 4,937,190）などが挙げられるが、均一な発現量の観点からは、P2A配列およびT2A配列が好ましい。TCRの γ 鎖をコードする核酸と、 δ 鎖をコードする核酸を含む発現ベクターを用いる場合も、同様である。

[0100] T細胞セルバンクを構成するT細胞に導入される外因性遺伝子は、幹細胞（例えば、iPS細胞またはES細胞）からT細胞へ分化させる過程で生じる細胞に対して導入され得る。ここで、幹細胞（例えば、iPS細胞またはES細胞）からT細胞へ分化させる過程で生じる細胞には、幹細胞（例えば、iPS細胞またはES細胞）およびT細胞も含まれる。

[0101] 本発明の一形態において、T細胞セルバンクを構成するT細胞に導入される外因性遺伝子は、iPS細胞、造血前駆細胞および／またはT細胞に対して導入される。

また、本発明の一形態において、T細胞セルバンクを構成する前に、必要に応じて後述の「1-5. 拡大培養」に示す方法によって、上記で得られたT細胞を拡大培養することができる。

上記の方法によって得られたT細胞を複数の保存容器（無菌バイアルなど）

に分注し、ストックすることでT細胞マスターセルバンクを構築することができる。該ストックされたT細胞は凍結されていることが好ましい。このT細胞マスターセルバンク中の一容器分のT細胞を必要に応じて融解し、適宜特性解析の試験に供することができる。また、同一の容器からまたは別の容器から準備したT細胞を、必要に応じて後述の「1-5. 拡大培養」に示す方法によって拡大培養し、得られたT細胞を拡大培養別の複数の容器に分注し、ストックすることでT細胞ワーキングセルバンクを構築することができる。該ストックされたT細胞は凍結されていることが好ましい。

従って、本発明の提供システムは、T細胞マスターセルバンクおよび／またはT細胞ワーキングセルバンクを構築するステップ（以下、「T細胞セルバンク構築ステップ」ともいう。）を含んでいてもよい。以下では、T細胞セルバンク構築ステップを実行する様に構成された部分のことを、「T細胞セルバンク構築部」ということがある。

[0102] 1-2. T細胞の凍結

上記の通り、T細胞セルバンクのT細胞は凍結されていることが好ましい。T細胞の凍結は、公知の方法により行うこともできる。かかる方法としては、例えば、T細胞を含む容器を、フリーザー（例：超低温フリーザー）内に静置すること、または該細胞を低温の媒体（例：液体窒素等）と接触させ、フリーザーまたは凍結保存システム（例：ローケーター等）に保存することにより達成されるが、これに限定されない。凍結温度は、典型的には0℃以下、好ましくは-20℃以下、より好ましくは-40℃以下、さらに好ましくは-80℃以下である。また、凍結操作における冷却速度としては、典型的には4℃から冷却を始めて-80℃に達するまで1～5時間、好ましくは2～4時間、特に約3時間かける程度の冷却速度が挙げられる。かかる冷却速度は、所望の温度に設定した凍結手段に、T細胞を含む容器を直接、または、凍結処理容器に収容して供することにより達成することができる。凍結処理容器は、容器内の温度の下降速度を所定の速度に制御する機能を有していてもよい。かかる凍結処理容器としては、例えば、BICELL（登録商標）（日本フリーザー）などを用

いることができる。また、上記冷却速度は、プログラム設定などにより冷却速度を制御することができるフリーザーを用いることにより達成することができる。かかるフリーザーとしては、既知の任意のもの、例えば、プログラムフリーザー（例えば、CryoMed (Thermo Fisher)、PDF-2000G（ストレックス）、KRYO-560-16（朝日ライフサイエンス））などを用いることができる。

[0103] 凍結操作は、コロニーを浸漬させた培養液や生理緩衝液などを凍結保存液として用い、これに凍結保護剤を添加したり、培養液を、凍結保護剤を含む凍結保存液と置換するなどの処理を施したうえで行ってもよい。培養液を凍結保存液に置換する場合、培養液を実質的に全て除去してから凍結保存液を添加しても、培養液を一部残したまま凍結保存液を添加してもよい。凍結保存液は、市販のものを用いてもよく、例えば、CryoStor（登録商標）CS10、STEM-CELLBANKER（登録商標）（ZENOAQ）が挙げられる。

[0104] 凍結保護剤としては、特に限定されず、例えば、ジメチルスルホキシド（DMSO）、エチレングリコール（EG）、プロピレングリコール（PG）、1, 2-プロパンジオール（1,2-PD）、1, 3-プロパンジオール（1,3-PD）、ブチレングリコール（BG）、イソプレングリコール（IPG）、ジプロピレングリコール（DPG）、グリセリンなどが挙げられる。凍結保護剤は、単独で用いても、2種または3種以上を組み合わせ用いてもよい。また、凍結保護剤は、細胞外凍結保護剤と組み合わせ用いてもよい。細胞外凍結保護剤としては、例えば、ポリエチレングリコール、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ポリビニルピロリドン、ヒドロキシエチルスターチ（HES）、デキストラン、アルブミンなどが挙げられる。

[0105] 培養液への凍結保護剤の添加濃度、または凍結保存液中の凍結保護剤の濃度は、典型的には、培養液または凍結保存液全体に対して2~20%（v/v）、好ましくは5~15%、より好ましくは8~13%である。上記濃度は、凍結保護剤の種類により適宜調節することができ、例えば、凍結保護剤としてDMSOを用いた場合、DMSOの濃度は、典型的には、培養液または凍結保存液全体に対して2~20%（v/v）、好ましくは2.5~12.5%、より好ましくは5~10%であ

る。

凍結保存剤、フリーザーの具体例は、上述の通りである。また、T細胞を含む容器としては凍結保存容器を用いることができ、凍結保存容器の具体例としては、無菌バイアル（例：ガラスアンプル、ポリマー製バイアル（AT-closed vial）等）などが挙げられる。

[0106] 1－3. T細胞の準備

本発明において、通常T細胞セルバンクには、T細胞が分注されて凍結された一または複数の容器が含まれることから、T細胞の準備には、T細胞セルバンクから一または複数の容器を採取し、該T細胞を融解する工程、必要に応じて、融解した細胞を洗浄する工程、前培養して細胞を起眠させる工程、該細胞を維持培養する工程なども含まれる。上記の各工程は、同一主体が行ってもよいし、異なる主体が行ってもよい。

[0107] 前記T細胞を融解する方法は、公知の方法により行うことができ、例えば、T細胞セルバンクから採取した、凍結されたT細胞を含む容器を、ウォーターバス、インキュベーターなどを用いて、凍結温度より高い温度の固形、液状若しくはガス状の媒体（例：水、培養液）と接触させることにより達成されるが、これに限定されない。媒体の温度は、典型的には4℃～50℃、好ましくは30℃～40℃、より好ましくは36℃～38℃である。また、融解時間は、典型的には2分以内であり、特に20秒以内とすることで細胞の生存率の低下を大幅に抑制することができる。融解時間は、例えば、融解手段または浸漬媒体の温度、凍結時の培養液または凍結保存液の容量若しくは組成などを変化させて調節することができる。

[0108] 細胞の洗浄は、公知の方法により行うことができ、例えば、細胞を細胞洗浄液（例：血清や血清成分（血清アルブミンなど）を含んでもよい培養液または生理緩衝液等）に懸濁し、遠心分離し、上清を廃棄し、沈殿した細胞を回収することにより達成されるが、これに限定されない。細胞を洗浄する工程において、かかる懸濁、遠心分離、回収のサイクルを1回または複数回（例：2、3、4、5回またはそれ以上）行ってもよい。本発明の一態様において、

細胞を洗浄する工程は、T細胞セルバンクから採取したT細胞を融解する工程の直後に行われる。本発明において用いることができる市販の細胞洗浄液の例としては、セルローション（日本全薬工業株式会社）などが挙げられる。

[0109] 本発明において、前記前培養および維持培養の培地としては、特に制限されないが、動物細胞の培養に用いられる培地を基礎培地として調製することができる。必要に応じて、基礎培地には、培地添加物などが含まれていてもよい。基礎培地および培地添加物としては、上記1-1.の工程(1)で列挙したものと同一のものが挙げられる。

[0110] 前培養および維持培養の培養期間としては、目的に応じて適宜行うことができるが、1日間以上（例：5、6、7日間）行うことが好ましく、また、10日間以下（例：7、8、9、10日間）であることが好ましい。培養温度は、特に限定されないが、30℃～40℃、好ましくは37℃であり、CO₂含有空気の下で培養が行われ、CO₂濃度は、好ましくは2～5%である。

[0111] 1-4. T細胞セルバンクから準備したT細胞への核酸の導入

本発明の提供システムは、T細胞セルバンクから準備したT細胞に、外因性遺伝子を含む核酸を導入するステップ(step)（以下、「核酸導入ステップ」ともいう。）を含んでいてもよい。本明細書において、「ステップを含む」または「工程を含む」とは、ステップまたは工程を実行する様に構成された部分を含むことを意味する。また、以下では、核酸導入ステップを実行する様に構成された部分のことを、「核酸導入部」ということがある。

核酸導入ステップにおける核酸を導入する方法、ならびに外因性遺伝子およびこれを含む核酸は上記と同様である。

核酸導入ステップにおいて導入する外因性遺伝子は、T細胞セルバンクを構成するT細胞にすでに導入された外因性遺伝子と同じものであってもよく、異なるものであってもよい。

[0112] 核酸導入部は、基礎培地と、培養容器と、無菌空間とを備え、上記準備したT細胞に、外因性遺伝子を含む核酸を導入することができるよう構成されたものであればよい。本明細書において、無菌空間とは、クリーンチャンバ

一、クリーンベンチ、無菌室などによって定められる無菌の内部空間を意味し、核酸導入部全体によって定められる無菌の内部空間、及び核酸導入部の内部空間の一部の無菌の空間も、該無菌空間に包含されるものとする。核酸導入部に備えられる装置、培地等は、当該装置の特性、核酸導入の方法等に応じて適宜選択される。また、核酸導入部は、必要に応じて、培地添加物、クリーンベンチ、インキュベーター、細胞培養用バイオリアクター、顕微鏡、遠心分離機、アスピレーター、導入用の核酸、ゲノム編集用のタンパク質等をコードする核酸、ピペット、チューブ、緩衝剤（例：酢酸緩衝液、リン酸緩衝液、クエン酸緩衝液、クエン酸リン酸緩衝液、ホウ酸緩衝液、酒石酸緩衝液、トリス緩衝液、リン酸緩衝生理食塩水、マッギルベイン緩衝液等）、遺伝子導入補助剤などを1種以上備えてもよく、さらには、核酸導入方法の種類に応じて、さらに別の試薬や装置などを備えていてもよい。

[0113] 核酸導入部が備える上記基礎培地や培地添加物の具体例は、上述の通りである。また、培養容器としては、細胞の培養に一般的に用いられるシャーレ、フラスコ、プラスチックバック、テフロン（登録商標）バック、ディッシュ、ペトリディッシュ、組織培養用ディッシュ、マルチディッシュ、マイクロプレート、マイクロウエルプレート、マルチプレート、マルチウエルプレート、チャンバースライド、細胞培養フラスコ、スピナーフラスコ、チューブ、トレイ、培養バック、ローラーボトル等が挙げられる。これらの培養容器の材質は特に制限されないが、例えば、ガラス、ポリ塩化ビニル、エチルセルロースやアセチルセルロース等のセルロース系ポリマー、ポリスチレン、ポリメチルメタクリレート、ポリカーボネート、ポリスルホン、ポリウレタン、ポリエステル、ポリアミド、ポリスチレン、ポリプロピレン、ポリエチレン、ポリブタジエン、ポリ（エチレンービニルアセテート）コポリマー、ポリ（ブタジエンスチレン）コポリマー、ポリ（ブタジエンーアクリロニトリル）コポリマー、ポリ（エチレンーエチルアクリレート）コポリマー、ポリ（エチレンーメタアクリレート）コポリマー、ポリクロロプレン、スチロール樹脂、クロロスルホン化ポリエチレン、エチレン酢酸ビニル、アク

リル系ブロックコポリマー等のプラスチック等が挙げられる。

- [0114] 上記別の試薬や装置として、例えば、核酸導入をリン酸カルシウム共沈殿法により行う場合には、核酸導入部は、各種試薬や溶液（例：CaCl₂およびその溶液、HClおよびその溶液、NaClおよびその溶液、MgCl₂およびその溶液、Na₂HPO₄およびその溶液、KH₂PO₄およびその溶液、NP-40およびその溶液、HEPESおよびその溶液、DMSOおよびその溶液等）などを1種以上備えていてもよい。例えば、エレクトロポレーション法を用いる場合には、核酸導入部は、エレクトロポレーター、電極（例：白金電極、キューベット電極、シャーレ白金プレート電極等）、エレクトロポレーションプレート、チャンバー（例：電極用チャンバー、プレートチャンバー等）、などを1種以上備えていてもよい。例えば、リポフェクション法を用いる場合には、トランスフェクション用試薬（例：Lipofectamine (invitrogen)、jetPEI (Polyplus-transfection)、XfectTM (Clontech TaKaRa cellartis)、GenomONETM（石原産業株式会社）、Trans IT (Mirus Bio LLC)、RmesFect/RmesFect Stem (OZ BIOSCIENCES) 等）などを1種以上備えていてもよい。例えば、核酸導入をウイルスベクターにより行う場合には、核酸導入部は、上記で列挙した各種ウイルスベクター、パッケージングベクタープラスミド、パッケージング細胞（例、Plat-E細胞）、相補細胞株、バイオセーフティーレベル2の実験室などを1種以上備えていてもよい。

[0115] 1-5. 拡大培養

本発明の提供システムは、T細胞マスターセルバンクから準備したT細胞または該T細胞に外因性遺伝子を含む核酸を導入したT細胞を拡大培養するステップ（以下、「拡大培養ステップ」ともいう。）を含んでいてもよい。以下では、拡大培養ステップを実行する様に構成された部分のことを、「拡大培養部」ということがある。

- [0116] 本明細書において、「拡大培養」とは、所望の細胞集団を増殖させ、細胞数を増加させることを目的として培養することを意味する。細胞数の増加は、細胞の増殖による増数が死滅による減数を超えることによって達成される

ものであればよく、細胞集団の全ての細胞が増殖することを要さない。細胞数の増加は、拡大培養の開始前に比して1.1倍、1.2倍、1.5倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、15倍、20倍、30倍、40倍、50倍、100倍、300倍、500倍、1,000倍、3,000倍、5,000倍、10,000倍、100,000倍、1,000,000倍以上でありうる。

[0117] 拡大培養ステップは、公知の方法により行うこともできるが、細胞の増殖効率の観点からは、本発明者らが見出した、CD30アゴニストによりT細胞を刺激する工程を含む方法により行うことが好ましい。CD30アゴニストの存在下でT細胞を培養することにより、CD30アゴニストによるT細胞の刺激が可能であることから、CD30アゴニストの存在下でT細胞を培養する工程を含む方法により行うことが好ましい。従って、本発明の一態様において、拡大培養ステップは、CD30アゴニストの存在下でT細胞を培養する工程を含み得る。また、拡大培養をCD30アゴニストの存在下で行う場合には、該培養培地中には、CD3/TCR複合体アゴニスト、およびフィブロネクチンまたはその改変体も存在していることが好ましい。CD3/TCR複合体アゴニストおよびCD30アゴニストにより、それぞれCD3/TCR複合体およびCD30を刺激することができる。

iPS細胞の増殖能に比べて、iPS細胞から分化したT細胞の増殖能は低いことから、T細胞段階でマスターセルバンクおよび／またはワーキングセルバンクを構築することは、ヒトあるいは複数のヒトに投与して期待される治療効果を得られる程度の量のT細胞およびT細胞製品を供給することが困難であった。本発明はかかる困難性を克服するものである。さらに、拡大培養ステップにおいて、上記のCD30アゴニストによりT細胞を刺激する工程を含む方法を用いることにより、T細胞段階でマスターセルバンクおよび／またはワーキングセルバンクを構築し、より安定的にT細胞製品を供給することが可能となる。

[0118] 本明細書において、「刺激」とは、ある物質が種々の受容体等に結合してその下流のシグナル経路を活性化することを意味する。

[0119] 本発明において、T細胞の拡大培養ステップに用いる培地としては、特に制限されないが、動物細胞の培養に用いられる培地を基礎培地として調製する

ことができる。必要に応じて、基礎培地には、培地添加物などが含まれていてもよい。基礎培地および培地添加物としては、上記 1-1. の工程 (1) で列挙したものと同一のものが挙げられる。培養は、例えば、CO₂インキュベーター中、約1～約10%、好ましくは約2～約5%のCO₂濃度の雰囲気下、約30～約40℃、好ましくは約37℃で行うことができる。また、培養期間については、当業者であればT細胞の数などをモニターしながら、適宜決定することが可能である。T細胞が得られる限り、日数は特に限定されないが、例えば少なくとも3日以上、5日以上、7日以上、10日以上、14日以上、21日以上であり、好ましくは7日以上15日以下である。また30日以下が好ましく、21日以下がより好ましい。培養期間は、例えば、3～30日、5～30日、7～30日、10～30日、14～30日、21～30日、3～21日、5～21日、7～21日、10～21日、14～21日、3～15日、5～15日、7～15日、10～15日、14～15日、等である。

[0120] 拡大培養ステップでビタミンC類を用いる場合、ビタミンC類は、工程(2-1)で記載したものと同一のものが挙げられ、同様に添加することができる。ある実施形態では、培地中または培養液におけるビタミンC類の濃度は、5 $\mu\text{g/ml}$ ～200 $\mu\text{g/ml}$ であることが好ましい。別の実施形態では、当該ビタミンC類は、培養液において、5 $\mu\text{g/ml}$ ～500 $\mu\text{g/ml}$ に相当する量（例：5 $\mu\text{g/ml}$ 、10 $\mu\text{g/ml}$ 、25 $\mu\text{g/ml}$ 、50 $\mu\text{g/ml}$ 、100 $\mu\text{g/ml}$ 、200 $\mu\text{g/ml}$ 、300 $\mu\text{g/ml}$ 、400 $\mu\text{g/ml}$ 、500 $\mu\text{g/ml}$ に相当する量）が添加される。

[0121] 拡大培養ステップでCD3/TCR複合体アゴニストを用いる場合には、該ステップで用いるCD3/TCR複合体アゴニストとしては、上記 1-1. の工程 (3) で記載したものと同一のものが挙げられる。また、CD3/TCR複合体アゴニストの培地中での濃度も、上記 1-1. の工程 (3) に記載の濃度と同様である。

[0122] 拡大培養ステップでは、培地中にフィブロネクチンまたはその改変体が存在することが好ましい。かかるフィブロネクチンは、T細胞に結合することができる分子であれば特に制限されない。フィブロネクチンの改変体は、T細胞表面のVLA-5およびVLA-4に結合することができる分子であれば特に制限されず、例えば、レトロネクチンが挙げられる。フィブロネクチンまたはその改

変体は、培地中でのその存在の態様を問わない。例えば、培養の際に培地に含有されていてもよいし、培養容器に固相化されていてもよいが、好ましくは、培養容器に固相化されている。

[0123] フィブロネクチンまたはその改変体が培地に含有される場合、培地は、CD3/TCR複合体アゴニストが含有される培地と同様であってよい。また、血清、添加物等の有無もCD3/TCR複合体アゴニストが含有される培地と同様であってよい。フィブロネクチンまたはその改変体が培地に含有される場合、フィブロネクチンまたはその改変体の濃度は、下限としては、10 ng/ml以上、好ましくは100 ng/ml以上であり、上限としては、10000 µg/ml以下、好ましくは1000 µg/ml以下であり得る。

[0124] 拡大培養ステップでは、培地中にCD30アゴニストが存在することも好ましい。かかるCD30アゴニストは、CD30に特異的に結合することによって、CD30から細胞内にシグナルを伝達することができる分子であれば特に制限されない。CD30アゴニストとしては、例えば、抗CD30アゴニスト抗体（単に「抗CD30抗体」ともいう）またはその結合断片およびCD30リガンドまたはその結合断片からなる群より選択される少なくとも一つが挙げられる。

[0125] 拡大培養ステップで用いるCD30アゴニストは、CD3/TCR複合体アゴニストと同様、培養の際にCD30に接触できるように存在できれば、その存在の態様を問わない。例えば、培養の際に培地に含有されていてもよいし、培養容器に固相化されていてもよいが、好ましくは、培地に含有されている。

[0126] CD30アゴニストが培地に含有される場合、培地は、CD3/TCR複合体アゴニストが含有される培地と同様であってよい。また、血清、添加物等の有無もCD3/TCR複合体アゴニストが含有される培地と同様であってよい。CD30アゴニストが培地に含有される場合、培地におけるCD30アゴニストの濃度は、CD30アゴニストに応じて当業者が適宜決定してよい。例えば、CD30アゴニストが抗CD30アゴニスト抗体またはその結合断片である場合は、培地における抗CD30アゴニスト抗体またはその結合断片の濃度は、通常、1 ng/ml～10000 ng/mlであり、好ましくは30 ng/ml～300 ng/mlである。

- [0127] また、CD30アゴニストが培養容器に固相化される場合、培養容器は、CD3/TCR複合体アゴニストが固相化される培養容器と同一であってよい。また、CD30アゴニストを培養容器へ固相化する方法も、CD3/TCR複合体アゴニストの固相化方法と同様であってよい。CD30アゴニストを培養容器へ固相化させる際のCD30アゴニストの溶液の濃度は、下限としては、0.1 ng/ml以上、好ましくは1 ng/ml以上であり、上限としては、10000 ng/ml以下、好ましくは1000 ng/ml以下であり得る。かかる濃度は、例えば、0.1~10000 ng/ml、1~10000 ng/ml、0.1~1000 ng/ml、1~1000 ng/ml、30 ng/ml~300 ng/ml、等である。
- [0128] 拡大培養ステップでサイトカインを用いる場合、サイトカインとしては、IL-2、IL-7、IL-12、IL-15、IL-18、IL-21等が挙げられ、これらは1種類のみを用いてもよく、または複数種類（好ましくは全種類）用いてもよい。サイトカインが、IL-2である場合、培地中におけるその濃度は、10 U/ml~1000 U/mlもしくは0.01 ng/ml~1000000 ng/mlであってもよく、IL-7である場合、培地中におけるその濃度は、0.1 ng/ml~1000 ng/ml、1 ng/ml~500 ng/ml、5 ng/ml~100 ng/ml（例えば、10 ng/ml）であってもよい。また、IL-12の培地中の濃度は、0.1 ng/ml~1000 ng/ml、1 ng/ml~500 ng/ml、5 ng/ml~100 ng/ml（例えば、50 ng/ml）であってもよく、IL-15の培地中の濃度は、0.1 ng/ml~1000 ng/ml、1 ng/ml~500 ng/ml、5 ng/ml~100 ng/ml（例えば、10 ng/ml）であってもよく、IL-18の培地中の濃度は、0.1 ng/ml~1000 ng/ml、1 ng/ml~500 ng/ml、5 ng/ml~100 ng/ml（例えば、50 ng/ml）であってもよく、IL-21の培地中の濃度は、0.1 ng/ml~1000 ng/ml、1 ng/ml~500 ng/ml、5 ng/ml~100 ng/ml（例えば、20 ng/ml）であってもよい。
- [0129] 拡大培養ステップではさらに、サイトカインとしてTNFファミリーサイトカインが培地に含まれていてもよい。TNFファミリーサイトカインとしては、例えば、TNF- α 、TNF- β 、リンフォトキシン α 、Fasリガンド、TRAIL、TWEAK、TL1A、RANKリガンド、OX40リガンド、APRIL、AITRL、BAFF、4-1BBLおよびCD40リガンドなどが挙げられ、TL1Aが好ましい。TL1Aを用いる場合、その培地中の濃度としては、5 ng/ml~500 ng/mlであり得、10 ng/ml~300 ng/mlが好ま

しく、20 ng/ml～200 ng/ml（例えば、50 ng/ml）がより好ましい。

[0130] また、拡大培養ステップではさらに、アポトーシス阻害剤が培地に含まれていてもよい。アポトーシス阻害剤としては、プロテアーゼ阻害剤が挙げられ、例えば、カスパーゼ阻害剤が挙げられる。カスパーゼ阻害剤としては、Pan Caspase FMK inhibitor Z-VAD（N-ベンジルオキシカルボニル-Val-Ala-Asp(0-Me)フルオロメチルケトン）（以下、「Z-VAD-FMK」と称することがある。）が好ましく、その培地中の濃度としては、1 μ M～1000 μ Mであり得、1 μ M～500 μ Mが好ましく、1 μ M～200 μ Mがより好ましく、1 μ M～50 μ M（例えば、10 μ M）が特に好ましい。

[0131] 本発明において、得られたT細胞は、単離して用いても良く、そのまま（即ち、他の細胞種が含有され得る細胞集団として）用いても良い。単離する場合、 α TCR、 β TCRおよびCD3から成る群から選択される少なくとも一つの分子を指標として用いて単離することができ、当該単離の方法は、当業者に周知の方法を用いることができる。例えば、（必要に応じて磁気ビーズ等が結合させた） α TCR、 β TCRおよびCD3の抗体を使用し、フローサイトメトリーにより、あるいは磁気細胞分離法により単離する方法、所望の抗原を固定化したアフィニティカラム等を用いて精製する方法が挙げられるが、これらに限定されない。

またそのまま用いる場合、当業者に周知の方法を用いて、T細胞が細胞集団に占める割合を増やしても良い。細胞集団に占めるT細胞の割合を増やす方法としては、Front. Immunol., 5: 636 (2014)、特表2017-537625、特表2003-529363などの方法が挙げられるがこれに限定されない。

[0132] 従って、拡大培養部は、基礎培地と、培養容器と、無菌空間とを備え、好ましくはCD3アゴニストも備え、T細胞を拡大培養できるように構成されたものであればよい。核酸導入部に備えられる装置、培地等は、当該装置の特性、拡大培養の方法等に応じて適宜選択される。CD3アゴニストを用いる場合には、拡大培養部が備える培養容器とCD30アゴニストとは、CD30が培養容器に固相化されている形態であってもよい。また、拡大培養部は、必要に応じて

、CD3/TCR複合体アゴニスト、フィブロネクチンまたはその改変体、アポトーシス阻害剤、培地添加物、クリーンベンチ、インキュベーター、細胞培養用バイオリアクター、顕微鏡、遠心分離機、アスピレーター、ピペット、チューブ、緩衝剤（例：酢酸緩衝液、リン酸緩衝液、クエン酸緩衝液、クエン酸リン酸緩衝液、ホウ酸緩衝液、酒石酸緩衝液、トリス緩衝液、リン酸緩衝生理食塩水、マッギルペイン緩衝液等）などを1種以上備えてもよく、さらには、培養方法の種類に応じて、さらに別の試薬や装置などを備えていてもよい。とくに培地添加物としてサイトカインを用いる場合、好適なサイトカインとして、例えば、IL-2、IL-7、IL-12、IL-15、IL-18、IL-21、TNFファミリーサイトカインなどが挙げられる。

[0133] 拡大培養部が備える上記基礎培地、培地添加物、CD3アゴニスト、CD3/TCR複合体アゴニスト、フィブロネクチンまたはその改変体およびアポトーシス阻害剤の具体例は、上述の通りである。また、培養容器の具体例としては、1-4. で記載したものと同一のものが挙げられる。拡大培養されたT細胞を適切な保存容器（無菌バイアルや輸血用バッグなど）に充填し、必要に応じて、該容器にラベルを貼付し、該容器を包装することでT細胞製品を製造することができる。

[0134] 1-6. 凍結T細胞製品の製造

本発明の提供システムは、前記拡大培養されたT細胞から凍結T細胞製品を製造するステップ（以下、「凍結T細胞製品製造ステップ」ともいう。）を含んでいてもよい。以下では、凍結T細胞製品製造ステップを実行する様に構成された部分のことを、「凍結T細胞製品製造部」ということがある。

[0135] 凍結T細胞製品製造ステップは、1-2. と同様の方法により行うことができる。

[0136] 従って、凍結T細胞製品製造部は、凍結保存剤と、凍結保存容器と、フリーザーおよび／または凍結保存システム（例：ローケーター等）とを少なくとも備え、拡大培養されたT細胞の凍結ストックを製造できるように構成されたものであればよい。また、凍結ストック製造部は、必要に応じて、低温の媒

体（例：液体窒素等）、ピペット、チューブ、緩衝剤（例：酢酸緩衝液、リン酸緩衝液、クエン酸緩衝液、クエン酸リン酸緩衝液、ホウ酸緩衝液、酒石酸緩衝液、トリス緩衝液、リン酸緩衝生理食塩水、マッギルベイン緩衝液等）などを1種以上備えてもよい。

[0137] 凍結T細胞製品製造部が備える凍結保存剤、フリーザーの具体例は、上述の通りである。また、凍結保存容器の具体例としては、クライオバイアル（例：ガラスアンプル、プラスチックチューブ等）などが挙げられる。

[0138] 1-7. T細胞製品コレクションの構築

本発明の提供システムは、T細胞製品を収集して、2種類以上のT細胞製品を含むT細胞製品コレクションを構築するステップ（以下、「T細胞製品コレクション構築ステップ」ともいう。）を含んでいてもよい。以下では、T細胞製品コレクション構築ステップを実行する様に構成された部分のことを、「T細胞製品コレクション構築部」ということがある。

[0139] T細胞製品コレクションを構成するT細胞製品は凍結T細胞製品であってもよく、T細胞の安定性の観点から長期間保存する場合には凍結T細胞製品であることが好ましい。

[0140] T細胞製品コレクション構築ステップは、公知の方法により行うこともできる。かかる方法としては、例えば、上記の方法により、2種以上のT細胞製品製造し、T細胞製品の種類が区別できるようにラベル等を付して、保管することで構築することができる。該構築されたT細胞製品コレクションに、さらに異なる種類のT細胞製品を追加することで、コレクションの種類を追加することもできる。保管の容易性からは、同一の空間（例：同一フリーザー内、同一部屋内、同一建物内、同一敷地等）に保管することが好ましいが、物理的に離れた空間に保管されていてもよい。T細胞製品の種類の区別は、種類を区別することができればいかなる方法を用いてもよく、例えば、容器にラベル等を付すること、別々のフリーザーや凍結保存システムに保存している場合には、これらフリーザーや凍結保存システムにラベル等を付すこと、あるいは管理ソフトウェアなどを用いて区別することなど行うことができる。

[0141] 従って、T細胞製品コレクション構築部は、収集対象のT細胞製品を少なくとも備え、上述のように構築したT細胞製品を収集して、2種類以上のT細胞製品を含むT細胞製品コレクションを構築できるように構成されたものであればよい。また、T細胞製品コレクション構築部は、必要に応じて、ラベル、フリーザー、凍結保存システム、管理ソフトウェアなどを1種以上備えてもよい。フリーザーの具体例は、上述の通りである。

[0142] 1－8. 抗原の同定

本発明の提供システムは、被験者の腫瘍に発現している腫瘍特異的抗原または腫瘍関連抗原（以下、単に「抗原」ともいう。）を同定するステップ（以下、「抗原同定ステップ」ともいう。）を含んでいてもよい。以下では、抗原同定ステップを実行する様に構成された部分のことを、「抗原同定部」ということがある。

[0143] 抗原同定ステップは、公知の方法により行うこともできる。かかる方法としては、例えば、腫瘍組織片や、腫瘍細胞が含まれ得る体液（例：血液、血清、血漿等）などの生体サンプルを被験者より採取し、該サンプル中からmRNAを抽出し、必要に応じて該mRNAからcDNAを合成し、該核酸を用いて、デジタルPCR（例：ddPCR）、RT-PCR、バイオチップ（例：マイクロアレイ）、RNAseq等の核酸増幅方法および／または核酸検出方法を利用して同定することができる。PCRは、例えば、腫瘍特異的抗原または腫瘍関連抗原のmRNAを増幅可能なプライマーセットと、PCR装置とを用いて行うことができる。また、RNAseqを用いる場合には、次世代シーケンサーを用いて行うことができる。

[0144] 従って、抗原同定部は、被験者の腫瘍に発現している腫瘍特異的抗原または腫瘍関連抗原を同定できるように構成されたものであればよい。例えば、抗原同定部は、上記プライマーセットとPCR装置とを少なくとも備えるか、上記バイオチップを少なくとも備えるか、または上記次世代シーケンサーを少なくとも備える。

[0145] 上記次世代シーケンサーとしては、イルミナ（illumina）社製の装置（例：MiSeq、HiSeq2500）、Thermo Fisher Scientific社製の装置（例：Ion Pro

ton、Ion PGM)、ロッシュ ダイアグノスティックス (Roche Diagnostic) 社製の装置 (例: GS FLX+, GS Junior) などを挙げることができるが、これらの装置に限定されない。

[0146] 1-9. T細胞製品の選択

本発明の提供システムでは、被験者の情報を取得し、当該情報に基づいて適切なT細胞製品を選択することができる。従って、本発明の提供システムは、被験者情報取得ステップおよび／または被験者に適したT細胞製品を選択するステップを含んでいてもよい。以下では、被験者情報取得ステップを実行する様に構成された部分のことを、「被験者情報取得部」ということがある。

被験者の情報としては、特に限定されず、例えば、被験者の遺伝子情報 (例えば、HLA遺伝子関連情報、異常遺伝子情報等)、診断結果、既往歴、薬剤服用歴、年齢、性別、血液型、身長、体重、被験者が腫瘍を有する場合はその腫瘍に発現している腫瘍特異的抗原または腫瘍関連抗原に関する情報等が挙げられる。

[0147] 本発明の一態様において、被験者の情報から同定された抗原を認識し結合するCARまたは外因性のTCRを発現するT細胞製品を、T細胞製品を含むT細胞製品コレクションから選択するステップ (以下、「T細胞製品選択ステップ」ともいう。)を含んでいてもよい。以下では、T細胞製品選択ステップを実行する様に構成された部分のことを、「T細胞製品選択部」ということがある。T細胞製品選択ステップにおけるT細胞製品は凍結T細胞製品であってもよく、T細胞の安定性の観点からは凍結T細胞製品であることが好ましい。

[0148] 同定された抗原を認識し結合するCARまたは外因性のTCRを発現するT細胞製品を、T細胞製品を含むT細胞製品コレクションから選択するステップは、取得された被験者の情報に基づいて被験者に適したT細胞製品を選択するステップに概念上包含される。被験者情報取得部は、抗原同定部を含み得る。本発明の一態様においては、T細胞製品選択ステップは、例えば、提供するT細胞製品の製造計画書の記載内容等に基づいて、適切なCAR、外因性のTCR、サ

イトカイン、ケモカイン等を発現するT細胞を含むT細胞セルバンクを選択することができる。

[0149] T細胞製品選択ステップは、公知の方法により行うことができる。かかる方法としては、例えば、上記抗原同定ステップによる同定結果が示された資料（紙媒体または電子データ媒体）に基づき、同定された抗原を認識し結合するCARまたは外因性のTCRを発現するT細胞を含むT細胞製品を、あらかじめ作成されたT細胞製品のリストなどから選択することにより行うことができる。抗原同定ステップにより複数種類の腫瘍特異的抗原または腫瘍関連抗原の発現が認められた場合には、最も発現量が高いもの、あるいはT細胞製品により最も効果が期待できるものなどの評価基準に基づき、T細胞を含むT細胞製品を選択することができる。選択されるT細胞製品の種類は1種類のみでもよいし、あるいは2種類以上であってもよい。これらのステップは、上記のT細胞製品選択のために設計されたソフトウェアを用いてもよい。T細胞製品は、医師または医療機関等の指示（処方箋等）に従って選択され得る。

[0150] 従って、T細胞製品選択部は、抗原同定ステップによる同定結果が示された資料を少なくとも備え、同定された抗原を認識し結合するCARまたは外因性のTCRを発現するT細胞製品を、T細胞製品を含むT細胞製品コレクションから選択できるように構成されたものであればよい。また、T細胞製品選択部は、必要に応じて、T細胞製品のリスト、上記のT細胞製品選択のために設計されたソフトウェアなどを1種以上備えてもよい。

[0151] T細胞セルバンク構築部、T細胞セルバンクコレクション構築部（後述）、T細胞セルバンク選択部（後述）、凍結T細胞製品製造部、T細胞製品コレクション構築部およびT細胞製品選択部においては、T細胞セルバンクおよびT細胞製品を構成するT細胞に関する情報（以下、「T細胞関連情報」という。）が管理される。T細胞関連情報としては、当該T細胞に関する製造記録、特性解析結果、品質評価結果、保存温度管理記録、製造計画などが含まれる。また、当該T細胞がiPS細胞由来T細胞である場合、当該iPS細胞に関する製造記録、特性解析結果、品質評価結果、保存温度記録、特定の遺伝子情報などが含

まれる。また、当該T細胞が、外因性遺伝子をコードする核酸が導入されたT細胞である場合には、当該外因性遺伝子の情報（例えば、当該外因性遺伝子がコードするタンパクおよびサイトカインなどの種類など）などが含まれる。T細胞セルバンク選択部およびT細胞製品選択部においては、提供対象であるT細胞製品の製造計画書の記載内容等に基づいて、それぞれT細胞セルバンクおよびT細胞製品が選択され得る。T細胞セルバンク選択部およびT細胞製品選択部では、さらに、被験者情報取得部で取得された被験者の情報に基づいてそれぞれ適切なT細胞セルバンクおよびT細胞製品が選択されてもよい。従って、T細胞セルバンク選択部およびT細胞製品選択部は、T細胞セルバンクおよび／またはT細胞製品が1種類のみである場合であっても用いることができる。

[0152] 本発明の一態様を、図16を参照しながら説明する。なお、本明細書及び図面において、実質的に同一の機能構成を有する構成要素については、同一の符号を付することにより重複した説明を省略する。

図16に示すように、T細胞製品提供システム100は、T細胞製品131を提供するために、T細胞セルバンク102からT細胞を準備する。T細胞セルバンク102はT細胞セルバンク構築部101によって構築されていてもよい。また、2種類以上のT細胞セルバンクが構築された場合には、T細胞セルバンクコレクション構築部111によってこれらを収集してT細胞セルバンクコレクション112を構築してもよい。

準備されたT細胞は必要に応じて核酸導入部103において所望の外因性遺伝子が導入されてもよい。さらに当該T細胞は必要に応じて拡大培養部104において拡大培養されてもよい。さらに当該T細胞は必要に応じて凍結T細胞製品製造部105において凍結され、凍結T細胞製品106とされていてもよい。2種類以上の凍結T細胞製品が製造された場合には、T細胞製品コレクション構築部121によってこれらを収集してT細胞製品コレクション122を構築してもよい。

また、T細胞セルバンク選択部154およびT細胞製品選択部155におい

ては、T細胞関連情報 1 7 1 に基づいて、それぞれ提供するT細胞製品 1 3 1 として適切なT細胞セルバンクおよびT細胞製品が選択され得る。かかるT細胞関連情報は、T細胞セルバンク構築部 1 0 1、T細胞セルバンクコレクション構築部 1 1 1、T細胞セルバンク選択部 1 5 4、T細胞製品コレクション構築部 1 2 1 およびT細胞製品選択部 1 5 5 において管理される。

また、被験者の治療および／または予防により適したT細胞製品を提供するために、被験者の情報 1 5 1 を被験者情報取得部 1 5 2 で取得し、当該被験者の情報に基づいてT細胞製品選択部 1 5 5 によって適切なT細胞製品 1 3 1 を選択することができる。T細胞製品 1 3 1 は、T細胞製品が 1 種類の場合はT細胞製品 1 0 6 と同一であり、T細胞製品コレクション 1 2 2 から選択される場合には、当該T細胞製品コレクション 1 2 2 に含まれる 1 種類または複数種類のT細胞製品であってもよい。被験者情報取得部は、抗原同定部 1 5 3 を含み得る。被験者情報取得部 1 5 2 で取得された情報に基づいて、T細胞セルバンク選択部 1 5 4 によって適切なT細胞セルバンク 1 6 1 が選択されてもよい。T細胞セルバンク 1 6 1 は、T細胞セルバンクが 1 種類の場合はT細胞セルバンク 1 0 2 と同一であり、T細胞セルバンクコレクション 1 1 2 から選択される場合には、当該T細胞セルバンクコレクション 1 1 2 に含まれる 1 種類または複数種類のT細胞セルバンクであってもよい。T細胞セルバンク 1 6 1 からT細胞を準備し、上記と同様にしてT細胞製品を提供することができる。

[0153] 次に、被験者情報取得部、T細胞セルバンク構築部、T細胞セルバンク選択部および／またはT細胞製品選択部に含まれ得るハードウェアの構成について説明する。T細胞セルバンク選択部とT細胞製品選択部とは、同様のハードウェア構成を有することから、ここでは、T細胞製品選択部に含まれ得るハードウェア構成について説明する。

図 1 7 は、T細胞製品選択部 2 0 0 に含まれ得るハードウェア構成の一例を示す図である。図 1 7 に示すように、T細胞製品選択部 2 0 0 は、プロセッサ 2 0 1、メモリ 2 0 2、補助記憶装置 2 0 3、I/F (Interface) 装置 2 0 4、通信装置 2 0 5、ドライブ装置 2 0 6 を有する。なお、T細胞製品選択部

200の各ハードウェアは、バス207を介して相互に接続されている。

プロセッサ201は、CPU (Central Processing Unit)、GPU (Graphics Processing Unit) 等の各種演算デバイスを有する。プロセッサ201は、補助記憶装置203にインストールされた各種ソフトウェア等のプログラムをメモリ202上に読み出して実行する。

メモリ202は、ROM (Read Only Memory)、RAM (Random Access Memory) 等の主記憶デバイスを有する。プロセッサ201とメモリ202とは、いわゆるコンピュータを形成し、プロセッサ201が、メモリ202上に読み出した各種ソフトウェア等のプログラムを実行することで、当該コンピュータは各種機能を実現する。

補助記憶装置203は、各種ソフトウェア等のプログラムや、各種ソフトウェア等のプログラムがプロセッサ201によって実行される際に用いられる各種情報（例えば、T細胞関連情報、被験者の情報等）およびデータを格納する。

I/F装置204は、操作装置210及び表示装置211と、T細胞製品選択部200とを接続する接続デバイスである。I/F装置204は、T細胞製品選択部200に対する各種指示を、操作装置210を介して受け付ける。また、I/F装置204は、T細胞製品選択部200による処理結果を、表示装置211を介して出力する。

通信装置205は、ネットワークを介して他の装置と通信するための通信デバイスである。

ドライブ装置206は記録媒体212をセットするためのデバイスである。ここでいう記録媒体212には、CD-ROM、フレキシブルディスク、光磁気ディスク等のように情報を光学的、電気的あるいは磁氣的に記録する媒体が含まれる。また、記録媒体212には、ROM、フラッシュメモリ等のように情報を電氣的に記録する半導体メモリ等が含まれていてもよい。

なお、補助記憶装置203にインストールされる各種ソフトウェア等のプログラムは、例えば、配布された記録媒体212がドライブ装置206にセ

ットされ、該記録媒体 212 に記録された各種ソフトウェア等のプログラムがドライブ装置 206 により読み出されることでインストールされる。あるいは、補助記憶装置 203 にインストールされる各種ソフトウェア等のプログラムは、通信装置 205 を介してネットワークからダウンロードされることで、インストールされてもよい。

[0154] 1-10. T細胞製品の用途

本発明の提供システムにより提供される T細胞製品は、例えば、がん細胞、がん幹細胞、腫瘍細胞等に対して細胞傷害活性を示し得るため、がんや腫瘍の予防または治療のために用いることができ、被験者に投与することができる。本明細書において、被験者は、治験等において T細胞製品を投与される哺乳動物（例：マウス、ラット、ハムスター、ウサギ、ネコ、イヌ、ウシ、ヒツジ、サル、ヒト）等を意味するが、好ましい被験者はヒトである。

[0155] 上記 T細胞製品により予防または治療されるがんや腫瘍は、例えば、“Daniel Baumhoer et al., Am J. Clin Pathol, 2008, 129, 899-906”などに記載されている。具体的には、肝臓癌（例：肝細胞癌）、卵巣癌（例：卵巣明細胞腺癌）、小児癌、肺癌（例：扁平上皮癌、肺小細胞癌）、精巣癌（例：非セミノーマ胚細胞腫瘍）、軟部腫瘍（例：脂肪肉腫、悪性線維性組織球腫）、子宮癌（例：子宮頸部上皮内腫瘍、子宮頸部扁平上皮癌）、メラノーマ、副腎腫瘍（例：副腎の腺腫）、神経性腫瘍（例：シュワン腫）、胃癌（例：胃の腺癌）、腎臓癌（例：グラヴィッツ腫瘍）、乳癌（例：浸潤性小葉性癌、粘液性癌）、甲状腺癌（例：髄様癌）、喉頭癌（例：扁平上皮癌）、膀胱癌（例：浸潤性移行上皮癌）などが挙げられるが、これらに限定されない。

[0156] 上記 T細胞製品に含まれる T細胞は、対象に投与する前に適切な培地および／または刺激分子を使用して培養および／または刺激を行ってもよい。刺激分子としては、サイトカイン類、適当なタンパク質、その他の成分などが挙げられるが、これらに限定されない。サイトカイン類としては、例えば IL-2、IL-7、IL-12、IL-15、IFN- γ 等が例示され、好ましくは、IL-2を

用いることができる。IL-2の培地中の濃度としては、特に限定はないが、例えば、好適には $0.01 \sim 1 \times 10^5$ U/mL、より好適には $1 \sim 1 \times 10^4$ U/mLである。また、適当なタンパク質としては、例えばCD3リガンド、CD28リガンド、抗CD3抗体、抗CD30抗体、抗IL-4抗体が例示される。また、この他、レクチン等のリンパ球刺激因子を添加することもできる。さらに、培地中に血清や血漿を添加してもよい。これらの培地中への添加量は特に限定はないが、0体積%～20体積%が例示され、また培養段階に応じて使用する血清や血漿の量を変更することができる。例えば、血清または血漿濃度を段階的に減らして使用することもできる。血清または血漿の由来としては、自己または非自己のいずれでも良いが、安全性の観点からは、自己由来のものが好ましい。

[0157] 上記T細胞は、非経口的に対象に投与して用いることが好ましい。非経口的な投与方法としては、静脈内、動脈内、筋肉内、腹腔内、および皮下投与などの方法が挙げられる。投与量は、対象の状態、体重、年齢等に応じて適宜選択されるが、通常、細胞数として、体重60 kgの対象に対し、1回当たり、通常 $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^{10}$ 個となるように、好ましくは $1 \times 10^7 \sim 1 \times 10^9$ 個となるように、より好ましくは $5 \times 10^7 \sim 5 \times 10^8$ 個となるように投与される。また、1回で投与してもよく、複数回にわたって投与してもよい。

[0158] 2. T細胞マスターセルバンクおよび／またはT細胞ワーキングセルバンクの構築方法

本発明はまた、上記のT細胞マスターセルバンクおよび／またはT細胞ワーキングセルバンクを構築する方法を提供する（以下、「本発明のセルバンク構築方法」と称することがある。）。本発明の一態様において、上記外因性遺伝子がCAR遺伝子の場合には、本発明のセルバンク構築方法は、（Ⅰ）CAR遺伝子を有さない人工多能性幹細胞を、CAR-T療法用のT細胞に分化させる工程、（ⅠⅠ）該分化させたT細胞をストックする工程、および（ⅠⅠⅠ）該分化させたT細胞の特性解析を行う工程を含む。上記工程（ⅠⅠ）と（ⅠⅠⅠ）は、通常この順で行うが、工程（ⅠⅠⅠ）の後に工程（ⅠⅠ）を行ってもよい。また、別の態様において、上記外因性遺伝子がTCR遺伝子の場合には、本

発明のセルバンク構築方法は、(i) 外因性のTCR遺伝子を有さない人工多能性幹細胞を、TCR-T療法用のT細胞に分化させる工程、(ii) 該分化させたT細胞をストックする工程、および(iii) 該分化させたT細胞の特性解析を行う工程を含む。上記工程(ii)と(iii)は、通常この順で行うが、工程(iii)の後に工程(ii)を行ってもよい。上記の各工程は、同一主体が行ってもよいし、異なる主体が行ってもよい。

[0159] また、本発明の別の態様において、本発明のセルバンク構築方法により構築されたT細胞マスターセルバンクおよび／またはT細胞ワーキングセルバンク（以下、「本発明のT細胞セルバンク」と称することがある。）を提供する。

[0160] 2－1. CAR遺伝子または外因性のTCR遺伝子を有さない人工多能性幹細胞からT細胞への分化誘導

上記2. の工程(i)および(ii)は、CAR遺伝子および／または外因性のTCR遺伝子を有さない人工多能性幹細胞を用いて、上記1－1. の工程(1)および(2)に記載の方法により行うことができる。工程(i)におけるCAR-T療法用とは、T細胞で発現させたCARによる治療または予防用途を意味し、T細胞で発現させた外因性のTCRおよび内在性のTCRによって治療または予防を行うことは排除されるが、該T細胞には、治療または予防目的ではない他の目的、例えば、上記1－1. で記載したような、内在性のTCR遺伝子の発現を抑える目的および均一なT細胞を効率よく製造する目的により導入された外因性のTCR遺伝子などを含んでいてもよい。同様に、工程(ii)におけるTCR-T療法用とは、T細胞で発現させた外因性のTCRによる治療または予防用途を意味し、T細胞で発現させたCARおよび内在性のTCRによって治療または予防を行うことは排除されるが、該T細胞には、治療または予防目的ではない他の目的、例えば、上記1－1. で記載したような、内在性のTCR遺伝子の発現を抑える目的などにより導入された外因性のTCR遺伝子などを含んでいてもよい。

[0161] 上記工程(i)および(ii)におけるCARおよびTCRの説明、TCRやCARが標的とする抗原の具体例、T細胞等の各用語の定義などについては、上記1. お

よび 1-1. に記載の通りである。また、上記工程で分化誘導されて得られる T 細胞の具体例は、上記 1. で記載した通りである。かかる T 細胞は、好ましくは細胞傷害性 T 細胞、より好ましくは CD8 α β を発現する CD8 α β 陽性細胞傷害性 T 細胞である。

[0162] 2-2. 分化させた T 細胞のストック

上記 2. の工程 (111) および (iii) は、上記 2-1. で得た T 細胞を用いて、上記 1-1. および 1-2. で記載した方法により行うことができる。

[0163] 本発明のセルバンク構築方法および本発明の T 細胞セルバンクで用いる人工多能性幹細胞については、上記 1-1. で記載した方法により樹立することができる。また、前記人工多能性幹細胞または上記 2. の工程 (11) および (ii) で用いる T 細胞は、上記 1-1. で記載した細胞と同様に、少なくとも 1 種の HLA 遺伝子の発現が抑制されたものが好ましい。具体的な HLA 遺伝子や組み合わせ、該遺伝子の発現の抑制の定義や抑制方法などは、上記 1-1. で記載した通りである。

[0164] 2-3. T 細胞の特性解析

上記 2. の工程 (111) および (iii) における特性解析の試験項目は、セルバンクの対象となる細胞の生物学的性質（例えば、栄養要求性）、培養履歴および試験の実施可能性によって変わるが、当業者によって、または当業者と規制当局との協議内容等に基づいて適宜設定される。それらの構築方法ならびに特性解析および品質評価結果に関する情報は各国の製造販売承認申請において医薬品当局に提示される。T 細胞セルバンクの特性解析では、主に外来性の感染性因子の混入がないことを評価する。特に、外来性ウイルスによる汚染は臨床的使用において深刻な事態を招く可能性があることから、ICH Q5A(R1)に従って徹底的に評価される。その他の試験としては他の細胞株による交叉汚染を検出するための同一性試験がある。また、核型分析や造腫瘍性試験が実施される場合もある。

品質評価の試験項目としては、T 細胞としての適切な細胞表現型を用いた確

認試験、純度試験、製造工程由来不純物試験、および細胞数や細胞生存率などの含量試験などが挙げられる。

[0165] 2-4. T細胞セルバンクコレクションの構築

本発明の提供システムは、T細胞マスターセルバンクおよび／またはT細胞ワーキングセルバンクを収集して、2種類以上のT細胞マスターセルバンクおよび／またはT細胞ワーキングセルバンクを含むT細胞マスターセルバンクコレクションおよび／またはT細胞ワーキングセルバンクコレクション（以下、「T細胞セルバンクコレクション」ともいう。）を構築するステップ（以下、「T細胞セルバンクコレクション構築ステップ」ともいう。）を含んでいてもよい。本明細書では、T細胞セルバンクコレクション構築ステップを実行する様に構成された部分のことを、「T細胞セルバンクコレクション構築部」ということがある。

[0166] 1または2以上のT細胞製品を提供するためのT細胞セルバンクが不足する可能性がある場合や、投与対象の特性に応じて別の種類のT細胞セルバンクからT細胞製品を用いることが適切と考えられる場合に、既存のT細胞セルバンクに別途構築したT細胞セルバンクを追加することができる。このように、複数のT細胞セルバンクを収集してT細胞セルバンクコレクションを構築することにより、より安定で堅牢なT細胞製品の提供システムを提供することができる。

[0167] T細胞セルバンクコレクション構築ステップは、公知の方法により行うこともできる。かかる方法としては、例えば、上記の本発明のセルバンク構築方法により、2種以上のT細胞セルバンクを製造し、T細胞セルバンクの種類が区別できるようにラベル等を付して、保管することで構築することができる。該構築されたT細胞セルバンクコレクションに、さらに異なる種類のT細胞セルバンクを追加することで、コレクションの種類を追加することもできる。保管の容易性からは、同一の空間（例：同一フリーザー内、同一部屋内、同一建物内、同一敷地等）に保管することが好ましいが、物理的に離れた空間に保管されていてもよい。T細胞セルバンクの種類の区別は、種類を区別する

ことができればいかなる方法を用いてもよく、例えば、凍結保存容器にラベル等を付すること、別々のフリーザーや凍結保存システムに保存している場合には、これらフリーザーや凍結保存システムにラベル等を付すこと、あるいは管理ソフトウェアなどを用いて区別することなど行うことができる。

[0168] 従って、T細胞セルバンクコレクション構築部は、収集対象のT細胞セルバンクを少なくとも備え、上述のように構築したT細胞セルバンクを収集して、2種類以上のT細胞セルバンクを含むT細胞セルバンクコレクションを構築できるように構成されたものであればよい。また、T細胞セルバンクコレクション構築部は、必要に応じて、ラベル、フリーザー、凍結保存システム、管理ソフトウェアなどを1種以上備えてもよい。フリーザーの具体例は、上述の通りである。T細胞セルバンクコレクションの構築は、T細胞セルバンクを構築する主体と同一主体が行ってもよいし、異なる主体が行ってもよい。T細胞セルバンクコレクションには、異なる主体が構築したT細胞セルバンクが含まれ得る。

[0169] 2-4-1. T細胞セルバンクの選択

本発明の提供システムは、提供するT細胞製品を製造するためのT細胞セルバンクを、T細胞セルバンクを含むT細胞セルバンクコレクションから選択するステップ（以下、「T細胞セルバンク選択ステップ」ともいう。）を含んでもよい。本明細書では、T細胞セルバンク選択ステップを実行する様に構成された部分のことを、「T細胞セルバンク選択部」ということがある。

T細胞セルバンク選択ステップは、公知の方法により行うことができる。かかる方法としては、例えば、提供するT細胞製品の製造計画書の記載内容等に基づいて、適切なT細胞受容体を発現するT細胞を含むT細胞セルバンクを選択することができる。

また、本発明の一態様においては、被験者の情報を取得し、当該情報に基づいて適切なT細胞セルバンクを選択することができる。従って、本発明の提供システムは、被験者の情報を取得するステップ（以下、「被験者情報取得ステップ」ともいう。）および／または被験者に適したT細胞セルバンクを

選択するステップを含んでいてもよい。以下では、被験者の情報を取得するステップを実行する様に構成された部分のことを、「被験者情報取得部」ということがある。

被験者の情報としては、特に限定されず、例えば、被験者の遺伝子情報（例えば、HLA遺伝子関連情報、異常遺伝子情報等）、診断結果、既往歴、薬剤服用歴、年齢、性別、血液型、身長、体重、被験者が腫瘍を有する場合はその腫瘍に発現している腫瘍特異的抗原または腫瘍関連抗原に関する情報等が挙げられる。

[0170] 3. T細胞製品を製造する方法

また、別の態様において、本発明は、T細胞製品を製造する方法（以下、「本発明のT細胞製品の製法」と称することがある。）を提供し、該方法は、（A）本発明のT細胞セルバンクから、T細胞を準備する工程、（B）該準備したT細胞にCAR遺伝子または外因性のTCR遺伝子を導入する工程、および（C）該CAR遺伝子または外因性のTCR遺伝子が導入されたT細胞を拡大培養する工程を含む。本発明のT細胞製品の製法はさらに、（D）該拡大培養されたT細胞を凍結する工程を含んでいてもよい。また、本発明のT細胞製品の製法により製造されたT細胞製品（以下、「本発明のT細胞製品」と称することがある。）も提供される。上記の各工程は、同一主体が行ってもよいし、異なる主体が行ってもよい。

[0171] 3-1. T細胞の準備

上記3. の工程（A）は、本発明のT細胞セルバンクを用いて、上記1-3. に記載の方法により行うことができる。

[0172] 3-2. 核酸の導入

上記3. の工程（B）は、上記3-1. の方法で準備したT細胞を用いて、上記1-4. に記載の方法により行うことができる。また、工程（B）で用いるT細胞は、IL-15/IL-15R α を発現していることが好ましい。核酸の種類、CAR、TCRおよびIL-15/IL-15R α の説明、各用語の定義、TCRやCARが標的とする抗原の具体例などについては、上記1-1. に記載の通りである。よって

、一態様において、本発明の凍結ストックの製法に用いるT細胞、または本発明のT細胞凍結ストックに含まれるT細胞は、前記CARまたは外因性のTCRが、上記1-1.の腫瘍特異的抗原または腫瘍関連抗原を認識し結合することを特徴とし得る。

[0173] 3-3. 拡大培養

上記3.の工程(C)は、上記3-2.の方法で核酸が導入されたT細胞を用いて、上記1-5.に記載の方法により行うことができる。拡大培養の方法、拡大培養に用いる化合物の具体例、該化合物の培地中での濃度、各用語の定義などは、上記1-5.に記載した通りである。よって、一態様において、本発明の凍結ストックの製法は、前記T細胞を、CD30アゴニストの存在下で該細胞を培養する工程を含み得る。

[0174] 3-4. T細胞の凍結

上記3.の工程(D)は、上記3-3.の方法で拡大培養されたT細胞を用いて、上記1-2.に記載の方法により行うことができる。

[0175] 4. T細胞製品コレクションの構築方法

さらに、別の態様において、本発明は、2種類以上のT細胞製品を含むT細胞製品コレクションの構築方法（以下、「本発明のT細胞製品コレクション構築方法」と称することがある。）を提供し、該方法は、本発明のT細胞製品を収集する工程を含み得る。また、本発明のT細胞製品コレクション構築方法により構築されたT細胞製品コレクション（以下、「本発明のT細胞製品コレクション」と称することがある。）も提供される。本発明のT細胞製品コレクションを構成するT細胞製品は凍結T細胞製品であってもよく、T細胞の安定性の観点からは凍結T細胞製品であることが好ましい。

[0176] 本発明のT細胞製品を収集する工程は、本発明のT細胞製品を用いて、上記1-7.に記載の方法により行うことができる。T細胞製品コレクションに含まれるT細胞製品は、T細胞製品コレクションを構築する主体と同一主体が製造してもよいし、異なる主体が製造してもよい。従って、T細胞製品コレクションには、異なる主体が製造したT細胞製品が含まれ得る。

[0177] 5. T細胞製品の製造方法

本発明はまた、T細胞製品の製造方法（以下、「本発明のT細胞製品の製法」と称することがある。）を提供し、該方法は、T細胞マスターセルバンクおよび／またはT細胞ワーキングセルバンクを構築する工程を含み得る。

[0178] T細胞、T細胞製品、マスターセルバンク、ワーキングセルバンクなど具体例や用語の定義は、上記1-1.に記載の通りである。また、上記多能性幹細胞、T細胞、T細胞製品、マスターセルバンクおよびワーキングセルバンクは、例えば、上記1. および2. に記載の方法などにより製造・構築することができる。また、本発明のT細胞製品の製法は、（a）多能性幹細胞をT細胞に分化させる工程、（b）該分化させたT細胞をストックする工程、（c）該分化させたT細胞の特性解析を行う工程、（d）該細胞のストックから、T細胞を準備する工程、（e）T細胞に外因性遺伝子を含む核酸を導入する工程、および／または（f）T細胞を拡大培養する工程を含み得る。また、本発明のT細胞製品の製法で用いるT細胞は、少なくとも1種類のHLA遺伝子の発現が抑制されたT細胞であり得る。具体的なHLA遺伝子や組み合わせ、該遺伝子の発現の抑制の定義や抑制方法などは、上記1-1. で記載した通りである。上記の各工程は、同一主体が行ってもよいし、異なる主体が行ってもよい。

[0179] 上記5. の工程（a）は、上記1-1. に記載の多能性幹細胞を用いて、上記1-1. の工程（1）および（2）に記載の方法により行うことができる。上記多能性幹細胞は、好ましくは人工多能性幹細胞であり、より好ましくは、ヒト人工多能性幹細胞である。本発明のセルバンク構築方法および本発明のT細胞セルバンクで用いる人工多能性幹細胞については、上記1-1. で記載した方法により樹立することができる。上記5. の工程（b）は、上記工程（1）により分化させたT細胞を用いて、上記1-1. および1-2. に記載の方法により行うことができる。上記5. の工程（c）は、上記工程（1）により分化させたT細胞を用いて、上記2-2. に記載の方法により行うことができる。上記工程（d）は、上記工程（c）により製造した細胞のストックを用いて、上記1-3. に記載の方法により行うことができる。

[0180] 上記5. の工程 (e) は、前記工程 (a) により分化させたT細胞、前記工程 (b) によりストックした細胞、前記工程 (c) により特性解析を行ったT細胞、または前記工程 (d) により準備したT細胞を用いて、上記1-4. に記載の方法により行うことができる。また、工程 (e) で用いるT細胞は、IL-15/IL-15R α を発現していることが好ましい。核酸の種類、CAR、TCRおよびIL-15/IL-15R α の説明、各用語の定義、TCRやCARが標的とする抗原の具体例などについては、上記1-1. に記載の通りである。よって、一態様において、本発明の凍結ストックの製法に用いるT細胞、または本発明のT細胞凍結ストックに含まれるT細胞は、前記CARまたは外因性のTCRが、上記1-1. の腫瘍特異的抗原または腫瘍関連抗原を認識し結合することを特徴とし得る。

[0181] 上記5. の工程 (f) は、前記工程 (e) により核酸が導入されたT細胞を用いて、上記1-5. に記載の方法により行うことができる。拡大培養の方法、拡大培養に用いる化合物の具体例、該化合物の培地中での濃度、各用語の定義などは、上記1-5. で記載した通りである。よって、一態様において、本発明のT細胞製品の製法は、前記T細胞を、CD30アゴニストの存在下で該細胞を培養することで、T細胞を刺激する工程を含み得る。

[0182] 6. T細胞製品の提供方法

さらに、本発明は、被験者に適したT細胞製品を提供する方法（以下、「本発明の提供方法」と称することがある。）を提供する。被験者に適したT細胞製品を提供するために、被験者の情報を取得し、当該情報に基づいて適切なT細胞セルバンクおよび／または適切なT細胞製品を選択することができる。従って、本発明の提供方法は、(p) 被験者の情報を取得する工程、および (q) 該取得した被験者の情報に基づいて適切なT細胞セルバンクおよび／または適切なT細胞製品を選択する工程を含む。選択されたT細胞セルバンクを用いて、上記5. における工程 (e) および／または工程 (f) に供し、T細胞製品を製造して被験者に提供することができる。また、本発明の提供方法は、被験者が腫瘍を有する場合、その腫瘍に発現している腫瘍特異的抗原または腫瘍関連抗原に関する情報を取得し、これに基づいて適切なT細胞製品

を選択することができる。従って、本発明の提供方法は、(x) 被験者の腫瘍に発現している腫瘍特異的抗原または腫瘍関連抗原を同定する工程、および(y) 該同定された抗原を認識し結合するCARまたは外因性のTCRを発現するT細胞製品を、本発明のT細胞製品コレクションから選択する工程を含む。

(x) 被験者の腫瘍に発現している腫瘍特異的抗原または腫瘍関連抗原を同定する工程、および(y) 該同定された抗原を認識し結合するCARまたは外因性のTCRを発現するT細胞製品を、本発明のT細胞製品コレクションから選択する工程は、(p) 被験者の情報を取得する工程、および(q) 該取得した被験者の情報に基づいて適切なT細胞製品を選択する工程に概念上包含される。T細胞、T細胞製品、被験者などの用語の種類や定義は、上記1-1. ~ 1-10. に記載の通りである。上記の各工程は、同一主体が行ってもよいし、異なる主体が行ってもよい。

[0183] 上記6. の工程(x) は、被験者由来の生体サンプルを用いて、上記1-8. に記載の方法により行うことができる。被験者由来の生体サンプルの具体例は、上記1-8. で記載した通りである。

[0184] 上記6. の工程(y) は、前記工程(x) の同定結果に基づき、上記1-9. に記載の方法により行うことができる。CARおよびTCRの説明や定義、腫瘍特異的抗原および腫瘍関連抗原の具体例、評価基準の具体例などについては、上記1-1. 、1-9. に記載の通りである。

[0185] 本発明の提供方法により提供されるT細胞製品により予防または治療されるがんや腫瘍の具体例は、上記1-10. に記載の通りである。また、上記T細胞製品に含まれるT細胞の培養および／または刺激方法、投与経路、投与量、被験者の種類なども、上記1-1-10. に記載の通りである。

[0186] 本発明を以下の実施例でさらに具体的に説明するが、本発明の範囲はそれら実施例に限定されない。

実施例

[0187] [実施例1]

1. iPS細胞の準備

iPS細胞には、京都大学iPS細胞研究所（CiRA）から供与されたiPS細胞（Ff-I01s04株：健常人末梢血単核球由来）を使用した。iPS細胞培養は、CiRAが配布するプロトコール「フィーダーフリーでのヒトiPS細胞の培養」に準じて行った。

[0188] 2. iPS細胞へのT細胞受容体（TCR）遺伝子の導入

2-1. WT1-TCR遺伝子の導入

愛媛大学大学院医学研究科安川正貴教授から供与されたTAK1由来、HLA-A*24:02拘束性WT1特異的TCRをコードするTRB遺伝子とTRA遺伝子を、P2A配列で繋いだ遺伝子（WT1-TCR）をiPS細胞へ導入した。iPS細胞への遺伝子導入は、理化学研究所から供与されたCS-UbC-RfA-IRES2-hK01レンチウイルスベクターに組み込み、iPS細胞に感染させることで行った。以下、WT1-TCR遺伝子が導入されたiPS細胞を「WT1 $\alpha\beta$ -iPSC」ということがある。

[0189] 2-2. V γ 9V δ 2-TCR遺伝子の導入

G115 $\gamma\delta$ T細胞クローン由来のV γ 9V δ 2 T細胞受容体をコードするTRG遺伝子とTRD遺伝子を、P2A配列で繋いだ遺伝子（V γ 9V δ 2TCR G115）をiPS細胞へ導入した。V γ 9V δ 2TCR G115は、N末から表1の順番で並ぶように設計したポリペプチド（配列番号1）をコードする、人工合成したオリゴDNAである。

[0190] [表1]

N末からの順番	遺伝子	アミノ酸数
1	TRG (G115 由来)	315
2	P2A	22
3	TRD (G115 由来)	292

[0191] pLV SIN-CMV Neo（クロンテック社）からネオマイシン耐性遺伝子をコードする配列を除去し、CMVプロモーターをヒトユビキチンプロモーターに置換したpLV SIN-Ubを用いたレンチウイルスベクターを作製した。上記で合成したV γ 9V δ 2TCR G115をコードする人工オリゴDNAをpLV SIN-Ubレンチウイルスベクターのマルチクロニングサイトに組込んだ。このプラスミドとクロンテック社のLenti-X™ 293T細胞株およびLenti-X™Packaging Single Shots (VSV-G)を用いてレンチウイルスベクターを作製した。作製したレンチウイルスベ

クターを、[実施例1]の1.で準備したiPS細胞に感染させることにより、 $V\gamma 9V\delta 2$ -TCR遺伝子をiPS細胞に導入した。以下、 $V\gamma 9V\delta 2$ TCR G115遺伝子が導入されたiPS細胞を「 $V\gamma 9V\delta 2$ -iPSC」ということがある。

[0192] [実施例2]

1. iPS細胞の造血前駆細胞(HPC)への分化

iPS細胞の造血前駆細胞(HPC)への分化は、公知の方法(例えば、Cell Reports 2(2012)1722-1735や国際公開第2017/221975号に記載された方法)に準じて分化させた浮遊細胞集団を用いた。具体的には、[実施例1]の1.、[実施例1]の2-1.および[実施例1]の2-2.で得られたiPS細胞、WT $1\alpha\beta$ -iPSCおよび $V\gamma 9V\delta 2$ -iPSCを、それぞれ超低接着処理された6 well plateに 3×10^5 cells/wellで播種し、EB培地(StemPro34に10 μ g/mlヒトインスリン、5.5 μ g/mlヒトトランスフェリン、5 ng/ml 亜セレン酸ナトリウム、2 mM L-グルタミン、45 mM α -モノチオグリセロール、および50 μ g/ml Ascorbic acid 2-phosphate を添加)に10 ng/ml BMP4、50 ng/ml bFGF、15 ng/ml VEGF、2 μ M SB431542、を加えて、低酸素条件下(5% O_2)にて5日間培養を行った。続いて、50 ng/ml SCF、30 ng/ml TPO、10 ng/ml Flt3Lを添加し、さらに5~9日間培養を行い、浮遊細胞集団を得た。なお、培養期間中は2日または3日ごとに培地交換を行った。HPCを含む上記浮遊細胞集団を、表2の抗体セットを用いて染色した。上記染色を行った細胞集団を、FACS Ariaによるソーティングに供した。

[0193] [表2]

抗CD34抗体	Abcam PE/Cy7
抗CD43抗体	ED APC
抗CD45抗体	BioLegend BV510
抗CD14抗体	BioLegend APC/eFluor780
抗CD235a抗体	BD FITC

[0194] 2. HPCへの $V\gamma 9V\delta 2$ -TCR遺伝子の導入

[実施例2]の1.で得られた細胞分画に対し、G115 $\gamma\delta$ T細胞クローン由来の $V\gamma 9V\delta 2$ T細胞受容体をコードするTRG遺伝子とTRD遺伝子を、P2A配列で

繋いだ遺伝子 (V γ 9V δ 2TCR G115) を導入した。遺伝子の導入は、[実施例 1] の 2-2. と同様の方法により行った。以下、HPCにV γ 9V δ 2TCR G115遺伝子が導入されたHPCを「V γ 9V δ 2-iHPC」ということがある。

[0195] [実施例 3]

1. HPCのT細胞への分化

[実施例 2] の 1. で得られた細胞分画および [実施例 2] の 2. で得られたV γ 9V δ 2-iHPCを、公知の方法 (例えば、Journal of Leukocyte Biology 96(2016)1165-1175や国際公開第2017/221975号に記載された方法) に準じて、リンパ球系細胞へ分化させた。具体的には、造血前駆細胞集団を、2000 cells/wellで、Recombinant h-DLL4/Fc chimera (SinoBiological) とRetronection (タカラバイオ) をコートした48-well-plateに2000cells/wellで播種し、5%CO₂、37°C条件下に培養した。培養期間中は2日または3日ごとに培地交換を行った。なお、培地には、15% FBSと2 mM L-グルタミン、100 U/mlペニシリン、100 ng/mlストレプトマイシン、55 μ M 2-メルカプトエタノール、50 μ g/ml Ascorbic acid 2-phosphate、10 μ g/mlヒトインスリン、5.5 μ g/mlヒトトランスフェリン、5 ng/ml亜セレン酸ナトリウム、50 ng/ml SCF、50 ng/ml IL-7、50 ng/ml Flt3L、100 ng/ml TP0、15 μ M SB203580、30 ng/ml SDF-1 α を添加した α MEM培地を用いた。培養開始から7日目および14日目に同様のコートをした48-well-plateに継代した。培養開始21日目にすべての細胞を回収し、CD45(+)、CD3(+)分画が存在することをフローサイトメーターにより確認した。得られた細胞を24-well-plateに播種し、5%CO₂、37°C条件下に培養した。培地としては、15% FBSと2mM L-グルタミン、100 U/ml ペニシリン、100ng/ml ストレプトマイシン、50 ng/ml Ascorbic acid 2-phosphate、10 μ g/mlヒトインスリン、5.5 μ g/mlヒトトランスフェリン、5 ng/mL 亜セレン酸ナトリウム、500 ng/mL抗CD3抗体 (UCHT1もしくは0KT3クローン)、10 nM デキサメタゾン (富士製薬工業株式会社: 10171-H02H)、100 U/ml IL-2、10 ng/mL IL-7を含む α MEM培地を用いた。培養開始27日目 (Day41) にすべての細胞を回収した。以下、[実施例 1] の 1. で得られたiPS細胞から

分化させたT細胞を「i $\gamma\delta$ TC」、[実施例1]の2-1. で得られたWT1 $\alpha\beta$ -iPSCから分化させたT細胞を「iWT1 $\alpha\beta$ TC」、[実施例1]の2-2. で得られたV γ 9V δ 2-iPSCから分化させたT細胞を「V γ 9V δ 2-iTC」、[実施例]の2. で得られたV γ 9V δ 2-iHPCから分化させたT細胞を「V γ 9V δ 2-iHTC」とそれぞれいうことがある。

i $\gamma\delta$ TCについては表3の抗体セットを用いて染色した(図3および4)。

[0196] [表3]

V δ 1 Myltenyi FITC
V δ 2 Myltenyi APC
$\gamma\delta$ TCR BD BV510
CD3 BioLegend APC/Cy7
$\alpha\beta$ TCR eBioscience FITC

[0197] i $\gamma\delta$ TCについて、細胞膜表面上のCD3、V δ TCR、 $\alpha\beta$ TCR、TCR-V δ 1鎖、およびTCR-V δ 2鎖の発現をフローサイトメーターで測定した(図3および4)。

。

[0198] V γ 9V δ 2-iTC(図5)およびV γ 9V δ 2-iHTC(図6)について、細胞膜表面上のCD3、V δ TCR、TCR-V δ 1鎖およびTCR-V δ 2鎖の発現をフローサイトメーターで測定した。

[0199] [実施例4]

T細胞の拡大培養

1. i $\gamma\delta$ TCの拡大培養

1-1. 拡大培養

[実施例3]で得られたi $\gamma\delta$ TCを、15% FBSを含む α -MEM培地に表4のサイトカインを加えた培地で2,000,000 cells/mLで懸濁し、抗CD3抗体(UCHT1)とレトロネクチンが固相化されたプレートに播種して、5% CO₂/37℃下で3日間培養した。培養3日目にプレートから細胞を回収し、NucleoCounter(登録商標) NC-200 (ChemoMetec) を用いて細胞数を計測すると共に、15% FBSを含む α -MEM培地に表5のサイトカインを加えた培地で適量に懸濁し、固相化さ

れていないG-Rex（登録商標）6 穴プレート（WILSONWOLF）に添加し、5%CO₂/37℃下で培養した。その後培養5、6、7、8、9、10、11、14日目のいずれか4～6回、一部の細胞をプレートから回収して細胞数をNucleoCounter（登録商標）NC-200を用いて計測した。抗CD3抗体およびレトロネクチンの培養プレートへの固相化は、以下の方法で行った。必要な濃度でPBSに溶解した抗CD3抗体（UCHT1、最終濃度3000 ng/mL）およびレトロネクチン（最終濃度150 μg/mL）をプレートに添加した後、4℃下一晩静置した。

[0200] 1－2. 増殖率

〔実施例4〕の1－1. の拡大培養を5回繰り返した時の、iγδTCの細胞数の増殖率を図7に示す。iγδTCは少なくとも10¹¹倍以上に拡大培養することが可能であり、T細胞マスターセルバンクおよび／またはT細胞ワーキングセルバンクを構成するT細胞として用いることができる。

[0201] [表4]

品名	メーカー	Final conc
Insulin-Transferrin-Selenium Supplements	Invitrogen	1 x
Ascorbic acid 2-phosphate	sigma	50 μg/ml
IL-2	Peptotech	15ng/ml
IL-7	Peptotech	10 ng/ml
IL-15	Peptotech	10 ng/ml
IL-21	Peptotech	20 ng/ml
IL-12	Merck	50 ng/ml
IL-18	MBL	50 ng/ml
TL-1A	Peptotech	50 ng/ml
Z-VAD-FMK	R&D	10 μM
Human CD30 Antibody	R&D	300 ng/ml

[0202]

[表5]

品名	メーカー	Final conc
Insulin-Transferrin-Selenium Supplements	Invitrogen	1 x
Ascorbic acid 2-phosphate	sigma	50 µg/ml
IL-2	Peptotech	15ng/ml
IL-7	Peptotech	10 ng/ml
IL-15	Peptotech	10 ng/ml

[0203] 2. $V\gamma 9V\delta 2$ -iTcの拡大培養

2-1. 拡大培養

[実施例3] で得られた $V\gamma 9V\delta 2$ -iTcを、15% FBSを含む α -MEM培地に表6のサイトカインを加えた培地で2,000,000 cells/mLで懸濁し、抗CD3抗体 (OK T3) とレトロネクチンが固相化されたプレートに播種して、5% CO₂/37°C下で3日間培養した。培養3日目にプレートから細胞を回収し、NucleoCounter(登録商標) NC-200 (ChemoMetec) を用いて細胞数を計測すると共に、15% FBSを含む α -MEM培地に表5のサイトカインを加えた培地で適量に懸濁し、固相化されていないG-Rex (登録商標) 6 穴プレート (WILSONWOLF) に添加し、5% CO₂/37°C下で培養した。その後培養5、6、7、8、9、10、11、14日目のいずれか4~6回、一部の細胞をプレートから回収して細胞数をNucleoCounter(登録商標) NC-200を用いて計測した。抗CD3抗体およびレトロネクチンの培養プレートへの固相化は、[実施例4] の1-1. の方法で実施した。

[0204] 2-2. 増殖率

[実施例4] の2-1. を5回繰り返した時の、 $V\gamma 9V\delta 2$ -iTcの細胞数の増殖率を図8に示す。 $V\gamma 9V\delta 2$ -iTc は少なくとも10¹²倍以上に拡大培養することが可能であり、T細胞マスターセルバンクおよび／またはT細胞ワーキングセルバンクを構成するT細胞として用いることができる。

[0205]

[表6]

品名	メーカー	Final conc
Insulin-Transferrin-Selenium Supplements	Invitrogen	1 x
Ascorbic acid 2-phosphate	sigma	50 µg/ml
IL-2	Peprtech	15ng/ml
IL-7	Peprtech	10 ng/ml
IL-15	Peprtech	10 ng/ml
IL-21	Peprtech	20 ng/ml
IL-12	Merck	50 ng/ml
IL-18	MBL	50 ng/ml
TL-1A	Peprtech	50 ng/ml
Z-VAD-FMK	R&D	10 µM

[0206] 3. WT1 α β -iTCの拡大培養

3-1. 拡大培養

[実施例3] で得られた iWT1 α β TC を、15% FBS を含む α -MEM 培地に表6のサイトカインを加えた培地で2,000,000 cells/mLで懸濁し、抗CD3抗体 (OKT3) とレトロネクチンが固相化されたプレートに播種して、5% CO₂/37℃下で3日間培養した。培養3日目にプレートから細胞を回収し、NucleoCounter (登録商標) NC-200 (ChemoMetec) を用いて細胞数を計測すると共に、15% FBS を含む α -MEM 培地に表5のサイトカインを加えた培地で適量に懸濁し、固相化されていないG-Rex (登録商標) 6 穴プレート (WILSONWOLF) に添加し、5%CO₂/37℃下で培養した。その後培養5、6、7、8、9、10、11、14、17日目のいずれか4~6回、一部の細胞をプレートから回収して細胞数をNucleoCounter (登録商標) NC-200を用いて計測した。抗CD3抗体およびレトロネクチンの培養プレートへの固相化は、以下の方法で行った。必要な濃度でPBSに溶解した抗CD3抗体 (OKT3、最終濃度3000 ng/mL) およびレトロネクチン (最終濃度150 µg/mL) をプレートに添加した後、4℃下一晩静置した。

[0207] 3-2. 増殖率

〔実施例4〕の3-1.の拡大培養を4回繰り返した時の、iWT1 α β TCの細胞数の増殖率を図9に示す。iWT1 α β TCは少なくとも 10^{10} 倍以上に拡大培養することが可能であり、T細胞マスターセルバンクおよび／またはT細胞ワーキングセルバンクを構成するT細胞として用いることができる。

[0208] 〔実施例5〕

1. T細胞マスターセルバンクの構築

〔実施例4〕で得られたT細胞の培養液を、凍結保護剤を含む凍結保存液（CryoStor CS10）と置換し、複数の保存容器（無菌バイアル（ポリマー製バイアル（AT-closed vial）））に分注する。該T細胞を含む容器を、フリーザー内に静置することによりT細胞を凍結させる。フリーザーとして、プログラムフリーザーであるCryoMed（Thermo Fisher）を用いる。これをストックすることで凍結したT細胞マスターセルバンクを構築する。

[0209] 2. T細胞ワーキングセルバンクの構築

〔実施例5〕の1.の凍結したT細胞マスターセルバンクからT細胞を含む容器を採取する。該容器を約37℃のウォーターバスに約15秒浸してT細胞を融解する。融解して得られたT細胞を表5のサイトカインを加えた培地で適量に懸濁し、6穴プレートに添加し、5%CO₂/37℃下で培養する。1日から3日間培養した後、〔実施例4〕の方法で、T細胞を拡大培養した後、上記と同様に凍結し、ストックすることでT細胞ワーキングセルバンクを構築する。

[0210] 3. 特性解析と品質評価

〔実施例5〕の2.と同様にしてT細胞マスターセルバンクおよび／またはT細胞ワーキングセルバンクから一容器を採取し、T細胞を融解する。得られたT細胞について、特性解析と品質評価を行う。

[0211] 4. T細胞セルバンクコレクションの構築

〔実施例5〕の1.で得られた複数種類のT細胞のマスターセルバンクを収集し、T細胞マスターセルバンクの種類が区別できるようにラベル等を付して、保管することで、T細胞マスターセルバンクコレクションを構築する。

[0212] 〔実施例6〕

1. T細胞の準備

〔実施例5〕の2.と同様にしてT細胞マスターセルバンクおよび／またはT細胞ワーキングセルバンクから一容器を採取し、T細胞を融解した。融解して得られたT細胞を表5のサイトカインを加えた培地で適量に懸濁し、6 穴プレートに添加し、5%CO₂/37℃下で培養した。1日から3日間培養した後、15% FBSを含むα-MEM培地に表4もしくは表6のサイトカインを加えた培地で2,000,000 cells/mLで懸濁し、抗CD3抗体 (UCHT1もしくはOKT3) とレトロネクチンが固相化されたプレートに播種して、5% CO₂/37℃下で3日間培養した。培養3日目にプレートから細胞を回収し、NucleoCounter(登録商標) NC-200 (Chemo Metec) を用いて細胞数を計測すると共に、15% FBSを含むα-MEM培地に表5のサイトカインを加えた培地で適量に懸濁し、固相化されていない細胞培養フラスコ (25cm²または75 cm²) に添加し、5%CO₂/37℃下で1日間培養してT細胞を準備した。

[0213] 2. T細胞への核酸の導入

2-1. 抗CD19-CAR遺伝子の導入

抗CD19-CARをコードする遺伝子として、N末から表7の順番で並ぶように設計したポリペプチド (配列番号2) をコードするオリゴDNAを人工合成した。

[0214] [表7]

N末からの順番	遺伝子	アミノ酸数
1	イムノグロブリン重鎖のリード配列	22
2	抗 CD19 抗体 (FMC63) 軽鎖の可変領域	104
3	GGGGS リンカー	15
4	抗 CD19 抗体 (FMC63) 重鎖の可変領域	120
5	CD8 由来配列 (膜貫通領域を含む)	83
6	CD28 の細胞内ドメイン領域	41
7	4-1BB の細胞内ドメイン領域	47
8	CD3ζ の細胞内ドメイン領域	112

[0215] 上記で合成した人工オリゴDNAをpMEI-5レトロウイルスベクターのマルチクローニングサイトに組込んだ。ウイルスベクター作製は、ユニテック社に委託した。作製した抗CD19-CARをコードする遺伝子を搭載したレトロウイルスベクターを、〔実施例3〕で作製したiWT1αβTCに感染させて、iPS細胞由

来抗CD19-CART細胞（以下、「CD19iWT1 α β CARTC」ということがある。）を作製した。

[0216] 2-2. 抗BCMA-CAR遺伝子の導入

抗BCMA-CARをコードする遺伝子として、N末から表8の順番で並ぶように設計したポリペプチド（配列番号3）をコードするオリゴDNAを人工合成した。

[0217] [表8]

N末からの順番	遺伝子	アミノ酸数
1	イムノグロブリン重鎖のリード配列	19
2	抗BCMA抗体軽鎖の可変領域	111
3	リンカー	18
4	抗BCMA抗体重鎖の可変領域	117
5	CD8由来配列（膜貫通領域を含む）	86
6	CD28の細胞内ドメイン領域	41
7	4-1BBの細胞内ドメイン領域	47
8	CD3 ζ の細胞内ドメイン領域	112

[0218] 上記で合成した人工オリゴDNAをpMEI-5レトロウイルスベクターのマルチクロニングサイトに組込んだ。ウイルスベクター作製は、ユニテック社に委託した。作製した抗BCMA-CARをコードする遺伝子を搭載したレトロウイルスベクターを、[実施例3]で作製したiWT1 α β TCに感染させて、iPS細胞由来抗BCMA-CART細胞（以下、「BMCAiWT1 α β CARTC」ということがある。）を作製した。

[0219] 2-3. CD30由来細胞内ドメインを含む抗CD19-CAR遺伝子の導入

CD30由来細胞内ドメインを含む抗CD19-CAR遺伝子として、N末から表9の順番で並ぶように設計したポリペプチド（配列番号4）をコードするオリゴDNAを人工合成した。

[0220]

[表9]

N 末からの順番	遺伝子	アミノ酸数
1	イムノグロブリン重鎖のリード配列	22
2	抗 CD19 抗体 (FMC60) 軽鎖の可変領域	104
3	GGGGS リンカー	15
4	抗 CD19 抗体 (FMC60) 重鎖の可変領域	120
5	CD8 由来配列 (膜貫通領域を含む)	83
6	CD28 の細胞内ドメイン領域	41
7	CD30 の細胞内ドメイン領域 (配列番号 6)	87
8	CD3 ζ の細胞内ドメイン領域	112

[0221] 上記で合成した人工オリゴDNAをpMYレトロウイルスベクターのマルチクローニングサイトに組込んだ。レトロウイルスベクター産生用のFLYRD18細胞を用いてウイルスベクターを作製した。作製したCD30由来細胞内ドメインを含む抗CD19-CAR遺伝子を搭載したレトロウイルスベクターを、[実施例1]の3. で作製したWT1 α β -iTCに感染させて、CD30由来細胞内ドメインを含むiPS細胞由来抗CD19-CART細胞（以下、「CD19-CD30-iWT1 α β CARTC」ということがある）を作製した。

[0222] 2-4. 抗CD19-CAR遺伝子の導入

抗CD19-CARをコードする遺伝子として、N末から表10の順番で並ぶように設計したポリペプチド（配列番号5）をコードするオリゴDNAを人工合成した。

[0223] [表10]

N 末からの順番	遺伝子	アミノ酸数
1	イムノグロブリン重鎖のリード配列	22
2	抗 CD19 抗体 (FMC63) 軽鎖の可変領域	104
3	GGGGS リンカー	15
4	抗 CD19 抗体 (FMC63) 重鎖の可変領域	120
5	CD8 由来配列 (膜貫通領域を含む)	83
6	4-1BB の細胞内ドメイン領域	47
7	CD3 ζ の細胞内ドメイン領域	112

[0224] 上記で合成した人工オリゴDNAをpMYレトロウイルスベクターのマルチクローニングサイトに組込んだ。レトロウイルスベクター産生用のFLYRD18細胞を

用いてウイルスベクターを作製した。作製した抗CD19-CARをコードする遺伝子を搭載したレトロウイルスベクターを、[実施例3]で作製した $i\gamma\delta$ TCに感染させて、iPS細胞由来抗CD19-CART細胞（以下、「CD19 $i\gamma\delta$ CARTC」ということがある。）を作製した。

[0225] [実施例7]

1. T細胞の細胞傷害活性等

1-1. CD19iWT1 $\alpha\beta$ CARTCおよびBMCAiWT1 $\alpha\beta$ CARTCの細胞傷害活性

[実施例6]の2-1. および2-2. で得られたCD19iWT1 $\alpha\beta$ CARTCおよびBMCAiWT1 $\alpha\beta$ CARTCの、それぞれCD19陽性Rajiがん細胞およびBCMA陽性H929がん細胞に対する細胞傷害活性を評価した。CD19iWT1 $\alpha\beta$ CARTCもしくはiWT1 $\alpha\beta$ TCをRaji細胞に対して16倍の割合で混和して、2時間後における標的細胞死をもとに、CD19iWT1 $\alpha\beta$ CARTCの細胞傷害活性を評価した。またBCMAiWT1 $\alpha\beta$ CARTCもしくはiWT1 $\alpha\beta$ TCをH929細胞に対して16倍の割合で混和して、2時間後における標的細胞死をもとに、BCMAiWT1 $\alpha\beta$ CARTCの細胞傷害活性を評価した。CD19iWT1 $\alpha\beta$ CARTCおよびBMCAiWT1 $\alpha\beta$ CARTCはそれぞれCD19陽性Rajiがん細胞およびBCMA陽性H929がん細胞に対する細胞傷害活性を有し、同じiWT1 $\alpha\beta$ TCから2種類のCARTを製造できることが示された（図10）。

[0226] 1-2. CD19-CD30-iWT1 $\alpha\beta$ CARTCの細胞傷害活性

[実施例6]の2-3. で得られたCD19-CD30-iWT1 $\alpha\beta$ CARTCの、CD19陽性Rajiがん細胞に対する細胞傷害活性を評価した。CD19-CD30-iWT1 $\alpha\beta$ CARTCをRaji細胞に対して0.5, 1, 2, 4, 8, 16倍の割合で混和して、2時間後における標的細胞死をもとに、CD19-CD30-iWT1 $\alpha\beta$ CARTCの細胞傷害活性を評価した。CD19-CD30-iWT1 $\alpha\beta$ CARTCはCD19陽性Rajiがん細胞に対する細胞傷害活性を有し、同じiWT1 $\alpha\beta$ TCから異なるCARTを製造できることが示された（図11）。

[0227] 1-3. CD19 $i\gamma\delta$ CARTCの細胞傷害活性

[実施例6]の2-4. で得られたCD19 $i\gamma\delta$ CARTCの細胞傷害活性を評価した。CD19陽性Raji細胞およびCD19陰性CCRF-CEN細胞を標的細胞として、CD1

9i γ δ CARTCを、標的細胞に対して0.5, 1, 2, 4, 8, 16倍の割合で混和して、2時間後における標的細胞死をもとに、CD19i γ δ CARTCの細胞傷害活性を評価した。CD19i γ δ CARTCは、CD19陽性Raji細胞に対して細胞傷害活性を有し、CD19陰性CCRF-CEN細胞に対しては有さず、抗原特異的な細胞傷害活性を有することが示された（図12）。

[0228] [実施例8]

1. 抗CD19-CAR遺伝子およびIL-15R α /IL-15遺伝子の導入

IL-15R α /IL-15遺伝子として、N末から表11の順番で並ぶように設計したポリペプチド（配列番号7）をコードするオリゴDNAを人工合成した。

[0229] [表11]

N末からの順番	遺伝子	アミノ酸数
1	ヒトIL-2のリード配列	23
2	ヒトIL-15のC末配列	114
3	GGGS リンカー	24
4	ヒトIL-15RAのC末配列	239

[0230] 上記で合成した人工オリゴDNAをpMYレトロウイルスベクターのマルチクロニングサイトに組込んだ。レトロウイルスベクター産生用のFLYRD18細胞を用いてウイルスベクターを作製した。作製したIL-15R α /IL-15遺伝子を搭載したレトロウイルスベクターおよび[実施例6]の2-4. で作製した抗CD19-CAR遺伝子を搭載したレトロウイルスベクターを、[実施例3]で作製したi γ δ TC およびV γ 9V δ 2-iTCに感染させて、それぞれCD19/IL15i γ δ CARTC およびCD19/IL15iV γ 9V δ 2CARTC を作製した。

[0231] [実施例9] 1. T細胞製品

1-1. T細胞の拡大培養（CD19/IL15iV γ 9V δ 2CARTC）

[実施例8]で得られたCD19/IL15iV γ 9V δ 2CARTCを、15% FBSを含む α -MEM培地に表6のサイトカインを加えた培地で2,000,000 cells/mLで懸濁し、抗CD3抗体（UCHT1）とレトロネクチンが固相化されたプレートに播種して、5% CO₂/37℃下で3日間培養した。培養3日目にプレートから細胞を回収し、Nucle

oCounter(登録商標) NC-200 (ChemoMetec) を用いて細胞数を計測すると共に、15% FBSを含む α -MEM培地に表5のサイトカインを加えた培地で適量に懸濁し、固相化されていないG-Rex(登録商標) 6 穴プレート(WILSONWOLF) に添加し、5%CO₂/37°C下で培養した。その後培養5、6、7、8、9、10、11、14、17日目のいずれか4~6回、一部の細胞をプレートから回収して細胞数を血球計数板を用いて計測した。抗CD3抗体およびレトロネクチンの培養プレートへの固相化は、以下の方法で行った。必要な濃度でPBSに溶解した抗CD3抗体(UCH T1、最終濃度3000 ng/mL) およびレトロネクチン(最終濃度150 μ g/mL) をプレートに添加した後、4°C下一晩静置した。

[0232] 1-2. 増殖率

[実施例9]の1-1.の拡大培養を3回繰り返した時の、CD19/IL15iV γ 9V δ 2CARTCの細胞数の増殖率を図13に示す。CD19/IL15iV γ 9V δ 2CARTCは少なくとも10⁹倍以上に拡大培養することが可能であった。

[0233] このように、T細胞マスターセルバンクおよび/またはT細胞ワーキングセルバンクから、CAR-T細胞を拡大培養してT細胞製品(例えば、CAR-T細胞製品)を大量製造し、提供することができる。拡大培養した各種のT細胞を適切な保存容器(無菌バイアルや輸血用バッグなど)に充填し、該容器にラベルを貼付し、該容器を包装し、T細胞製品を製造する。

[0234] 1-3. T細胞製品の凍結

拡大培養された各種のT細胞を含む容器を[実施例5]の1.と同様にして凍結し、凍結T細胞製品を製造する。

[0235] 1-4. T細胞製品コレクションの構築

上記で得られる凍結T細胞製品をそれらの種類が区別できるようにラベルを付して保管することにより、T細胞製品コレクションを構築する。

[0236] [実施例10]

1. 抗原の同定

腫瘍組織片や、腫瘍細胞が含まれ得る体液(例:血液、血清、血漿等)などの生体サンプルを被験者より採取し、該サンプル中からmRNAを抽出し、必

要に応じて該mRNAからcDNAを合成し、該cDNAを用いて、デジタルPCR（例：dd PCR）、RT-PCR、バイオチップ（例：マイクロアレイ）、RNAseq等の核酸増幅方法および／または核酸検出方法を利用して同定する。

[0237] 2. T細胞製品の選択

〔実施例10〕の1. による同定結果が示された資料（紙媒体または電子データ媒体）に基づき、同定された抗原を認識し結合するCARまたは外因性のTCRを発現するT細胞を含むT細胞製品を、あらかじめ作成されたT細胞製品のリストなどから選択する。

[0238] 〔実施例11〕

1. CD19/IL15i γ δ CARTCによる生存日数延長効果

NOD/Shi-scid, IL-2R γ K0 (NOG) マウス（実験動物中央研究所、雌性、7-8週齢）に 5×10^5 個のNaIm6細胞（ATCC）を尾静脈移植してNaIm6ゼノグラフトマウスを作製した。移植後4日目に、CD19/IL15i γ δ CARTC（ 5×10^6 個（cells））を0.1 mLのHBSS-緩衝液に懸濁した懸濁液または等量のHBSS-緩衝液を尾静脈投与した後、生存日数を確認した。CD19陽性NaIm6がん細胞を経尾静脈移植したマウスは、コントロール投与群では3週間以内に全例死亡したのに対して、CD19/IL15i γ δ CARTC投与群では、少なくとも6週間後まで全例において生存していた（図14）。

[0239] 2. CD19/IL15iV γ 9V δ 2CARTCの抗腫瘍効果

NOD/Shi-scid, IL-2R γ K0 (NOG) マウス（実験動物中央研究所、雌性、7-8週齢）に 5×10^5 個のルシフェラーゼ発現NaIm6細胞（ATCC）を尾静脈移植してルシフェラーゼ発現NaIm6ゼノグラフトマウスを作製した。移植後4日目に、〔実施例6〕の1-2. で得られたCD19/IL15iV γ 9V δ 2CARTC（ 10^7 個（cells））を0.2 mLのHBSS-緩衝液に懸濁した懸濁液または等量のHBSS-緩衝液を尾静脈投与した後、生存日数を確認した。CD19陽性NaIm6がん細胞を経尾静脈移植したマウスは、コントロール投与群では3週間以内に全例死亡したのに対して、CD19/IL15i γ δ CARTC投与群では、少なくとも6週間後まで全例において生存していた（図15）。

産業上の利用可能性

[0240] 本発明により、人的、時間的および金銭的成本を低減でき、かつロット間差が小さく高品質なoff-the-shelfの同種異系のT細胞製品（特に複数種類のCAR-T細胞製品）の提供システムが提供され、このようにして提供されるT細胞製品は、がんや腫瘍等の疾患の予防または治療に有用である。

[0241] 本出願は、日本国で出願された特願2019-212718（出願日：2019年11月25日）を基礎としており、ここで言及することにより、それらの内容は本明細書に全て包含される。