

明 細 書

発明の名称：

人工アジュバント細胞（a A V C）を用いたがんの治療方法

技術分野

[0001] 本発明は、人工アジュバント細胞（a r t i f i c i a l a d j u v a n t c e l l : a A V C）を用いた有効且つ安全ながんの治療又は予防方法に関する。

背景技術

[0002] ナチュラルキラーT（N K T）細胞は、T細胞及びナチュラルキラー（N K）細胞の特徴を有する免疫細胞であり、抗原提示細胞（a n t i g e n p r e s e n t i n g c e l l : A P C）上の主要組織適合遺伝子複合体（m a j o r h i s t o c o m p a t i b i l i t y c o m p l e x : M H C）様分子であるC D 1 dに積載された糖脂質からなるC D 1 dリガンドにより活性化される。活性化されたN K T細胞は、パーフォリン／グランザイムB等を介した直接的な細胞傷害性の増強に加え、インターフェロンガンマ（I F N - γ ）やインターロイキン-4（I L - 4）等のサイトカイン産生を介して、N K T細胞自身の分化及び増殖を誘導し、T細胞、N K細胞及びB細胞を活性化することが知られている。

[0003] N K T細胞を活性化し得るC D 1 dリガンドとしては、例えば、 α -ガラクトシルセラミド（ α -G a l C e r）、 α -C-ガラクトシルセラミド（ α -C-G a l C e r）、7 D W 8 - 5、イソグロボトリヘキソシルセラミド（i G b 3）等が存在する。C D 1 dを発現するA P Cとしては、例えば、マクロファージ、樹状細胞（d e n d r i t i c c e l l : D C）、B細胞、B細胞リンパ性白血病（B c e l l l y m p h o c y t i c l e u k e m i a : B - C L L）細胞等が知られている。

[0004] α -G a l C e rをパルスしたD Cによって活性化されたN K T細胞は、各種がん細胞に対して細胞傷害性を示す。また、 α -G a l C e rをパルス

したDCは、遊離 α -GalCerを投与した場合と比べてIFN- γ 産生NK T細胞をより強く誘導し、高い抗腫瘍効果を示すことが報告されており（非特許文献1及び2）、肺がん患者を対象とした臨床試験も行われた（非特許文献3及び4）。

[0005] マウスモデルにおいて、 α -GalCer投与によって、NK T細胞活性化を介した自然免疫の活性化による抗腫瘍効果が誘導される一方で、NK T細胞の活性化に伴う炎症性サイトカインの産生等による肝細胞壊死等の副作用の発現が報告されている（非特許文献5）。さらに、 α -GalCerの臨床試験においては、 α -GalCer投与により抗腫瘍効果につながる免疫反応が誘導される一方で、頭痛、嘔吐、悪寒、倦怠感等の全身状態悪化を示す有害事象が認められており、種々の副作用を誘発する可能性が示されている（非特許文献6）。

[0006] 藤井らは、ヒト由来細胞に外来的にCD1d及びがん抗原を発現させ、さらに該細胞に α -GalCerをパルスしたaAVCを作製した（特許文献1～3）。当該aAVCは、CD1d/ α -GalCer複合体を介してNK T細胞を活性化し、活性化されたNK T細胞はIFN- γ 等のサイトカインを産生してNK細胞等を活性化する。マウスモデルにおいて、aAVC投与によるNK細胞依存的な抗腫瘍効果が示されている（特許文献1～3、非特許文献7及び8）。また、マウスに投与されたaAVCは生体内において活性化されたNK T細胞により速やかに殺傷され、該細胞断片は樹状細胞に取り込まれる。当該aAVC断片を取り込んだ樹状細胞は、該細胞表面上のMHCに取り込んだがん抗原を抗原提示し、がん抗原特異的なT細胞を誘導する。マウスモデルにおいて、aAVC投与によるがん抗原特異的T細胞の誘導を介した抗腫瘍効果も示されている（特許文献1～3、非特許文献7及び8）。このように、aAVCはNK T細胞活性化を介したNK細胞活性化による自然免疫活性化及び抗原特異的T細胞誘導による獲得免疫誘導の二つの免疫機構を強力に誘導し得ることが示されている。しかしながら、現在までに、自然免疫活性化による抗腫瘍効果を発揮し且つ安全に使用し得る、a

A V C の適切な臨床用量については検討がなされていない。

先行技術文献

特許文献

[0007] 特許文献1：国際公開番号2007/097370

特許文献2：国際公開番号2010/061930

特許文献3：国際公開番号2013/018778

非特許文献

[0008] 非特許文献1：「ザ ジャーナル オブ イムノロジー (The Journal of Immunology)」、(米国)、1999;163(5):2387-2391

非特許文献2：「ネイチャー イムノロジー (Nature Immunology)」、(米国)、2002;3(9):867-874

非特許文献3：「ザ ジャーナル オブ イムノロジー (The Journal of Immunology)」、(米国)、2009;182(4):2492-2501

非特許文献4：「クリニカル キャンサー リサーチ (Clinical Cancer Research)」、(米国)、2005;11(5):1910-1917

非特許文献5：「アンチキャンサー リサーチ (Anticancer Research)」、2016;36(7):3667-3672

非特許文献6：「クリニカル キャンサー リサーチ (Clinical Cancer Research)」、(米国)、2002;8(12):3702-3709

非特許文献7：「キャンサー リサーチ (Cancer Research)」、(米国)、2013;73(1):62-73

非特許文献8：「キャンサー リサーチ (Cancer Research)」、(米国)、2016;76(13):3756-3766

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0009] 本発明の課題は、aAVCを用いた有効且つ安全ながんの治療又は予防方法を提供することにある。

課題を解決するための手段

[0010] 本発明者らは、aAVCの臨床応用について鋭意検討を行った。本発明者らは、aAVCの製造過程において、aAVCに積載される α -GalCerの量が、細胞の種類及び α -GalCerを細胞にパルスする条件等によって変動することを見出した。これにより、aAVCを医薬品として製造するために、aAVCに積載された α -GalCerの量を規格化する必要性が見出された。よって、本発明者らは、aAVCの α -GalCerの積載量を定量するため、該細胞表面に積載される α -GalCer量の測定法を確立した。そして、aAVCに α -GalCerをパルスする際に、培地中に種々の濃度の α -GalCerを添加することにより、細胞への α -GalCer積載量に変動が生じることを確認した（実施例2）。さらに、本発明者らは、aAVCに積載された α -GalCerの投与量がNK細胞を介した自然免疫活性化による抗腫瘍効果及び副作用の誘導に関連することを見出した（実施例3～5）。かくして、本発明者らは、aAVCを用いたがんの治療及び予防における有効性及び安全性の観点から好ましいaAVCに積載された α -GalCerの投与量、及びaAVCを含む医薬組成物に含まれるaAVCに積載される α -GalCerの好ましい量を見出すことに成功した。即ち、本発明は、aAVCを用いる有効且つ安全ながんの治療又は予防方法、有効且つ安全ながんの治療又は予防のためのaAVC及びそれを含む医薬組成物等を提供する。

[0011] すなわち、本発明は、医学上又は産業上有用な物質又は方法として以下の発明を含んでもよい。

[0012] [1] ヒト由来細胞をヒトに投与する工程を含むがんを治療又は予防する方法であって、

該細胞は、外来性CD1dを発現し、該細胞表面に α -GalCerを積載しており、且つ

該細胞表面に積載されている α -GalCerの1回用量がヒト体重1kg当たり1.7ng~275ngの範囲となるようにヒトに投与される、方法。

[2] ヒト由来細胞が外来性がん抗原を発現する、[1]に記載の方法。

[3] CD1dがヒトCD1dである、[1]又は[2]に記載の方法。

[4] ヒト由来細胞がヒト胎児腎細胞293 (HEK293) 由来細胞である、[1]~[3]のいずれかに記載の方法。

[5] 細胞表面に積載されている α -GalCer量が、 1×10^6 細胞当たり3.9~275ngの範囲である、[1]~[4]のいずれかに記載の方法。

[6] ヒト由来細胞を含むがんの治療又は予防のための医薬組成物であって、

該細胞は、外来性CD1dを発現し、該細胞表面に α -GalCerを積載しており、且つ

該組成物は、該細胞表面に積載されている α -GalCerの1回用量がヒト体重1kg当たり1.7ng~275ngの範囲となるようにヒトに投与される、

医薬組成物。

[7] ヒト由来細胞が外来性がん抗原を発現する、[6]に記載の医薬組成物。

[8] CD1dがヒトCD1dである、[6]又は[7]に記載の医薬組成物。

[9] ヒト由来細胞がヒト胎児腎細胞293 (HEK293) 由来細胞である、[6]~[8]のいずれかに記載の医薬組成物。

[10] 細胞表面に積載されている α -GalCer量が、 1×10^6 細胞当たり3.9~275ngの範囲である、[6]~[9]のいずれかに記載の

医薬組成物。

〔11〕がんの治療又は予防のための医薬組成物を製造するためのヒト由来細胞の使用であって、

該細胞は、外来性CD1dを発現し、該細胞表面に α -GalCerを積載しており、且つ

該組成物は、該細胞表面に積載されている α -GalCerの1回用量がヒト体重1kg当たり1.7ng~275ngの範囲となるようにヒトに投与される、

使用。

〔12〕ヒト由来細胞が外来性がん抗原を発現する、〔11〕に記載の使用。

〔13〕CD1dがヒトCD1dである、〔11〕又は〔12〕に記載の使用。

〔14〕ヒト由来細胞がヒト胎児腎細胞293（HEK293）由来細胞である、〔11〕~〔13〕のいずれかに記載の使用。

〔15〕細胞表面に積載されている α -GalCer量が、 1×10^6 細胞当たり3.9~275ngの範囲である、〔11〕~〔14〕のいずれかに記載の使用。

〔16〕がんの治療又は予防に使用するためのヒト由来細胞であって、該細胞は、外来性CD1dを発現し、該細胞表面に α -GalCerを積載しており、且つ

該細胞は、該細胞表面に積載されている α -GalCerの1回用量がヒト体重1kg当たり1.7ng~275ngの範囲となるようにヒトに投与される、

ヒト由来細胞。

〔17〕ヒト由来細胞が外来性がん抗原を発現する、〔16〕に記載のヒト由来細胞。

〔18〕CD1dがヒトCD1dである、〔16〕又は〔17〕に記載のヒ

ト由来細胞。

[19] ヒト由来細胞がヒト胎児腎細胞293 (HEK293) 由来細胞である、[16] ~ [18] のいずれかに記載のヒト由来細胞。

[20] 細胞表面に積載されている α -GalCer量が、 1×10^6 個の細胞当たり3.9 ~ 275 ngの範囲である、[16] ~ [19] のいずれかに記載のヒト由来細胞。

[21] 外来性CD1dを発現し、該細胞表面に α -GalCerを積載しているヒト由来細胞であり、該細胞表面に積載されている α -GalCerの1回用量がヒト体重1 kg当たり1.7 ng ~ 275 ngの範囲となるようにヒトに投与される細胞を製造する方法であって、外来性CD1dを発現するヒト由来細胞を56 ng/mL ~ 3000 ng/mLの α -GalCerを含む培養培地で培養する工程を含む、方法。

[22] 前記培養工程により得られた細胞に積載されている α -GalCer量を測定し、細胞表面に積載されている α -GalCer量が 1×10^6 個の細胞当たり3.9 ~ 275 ngの範囲である細胞を選択する工程をさらに含む、[21]に記載の方法。

発明の効果

[0013] 本発明の方法は、aAVCを用いて有効且つ安全にがんの予防又は治療を行うために使用できる。

図面の簡単な説明

[0014] [図1] B16メラノーマ細胞静注肺転移モデルにおけるaAVC (3T3) - WT1投与後の生存率の推移を示す。7週齢C57BL/6J雌性マウスの尾静脈に 2×10^4 cellsのB16-F10細胞を投与し、投与3時間後に該マウスの尾静脈にBICANATE又は各用量のaAVC (3T3) - WT1を投与した (各群16例)。マウスの生存を投与後61日間観察した。ログランク検定を用いてaAVC (3T3) - WT1投与群の生存期間をBICANATE投与群の生存期間と比較し有意確率P値を求めた。図中の*及び**は、P値がそれぞれ、ボンフェローニの方法にて補正した有意水

準0.05/3より小さい群と0.01/3より小さい群を示す。

[図2]表2に記載のaAVC(3T3)-WT1及び各種aAVC-WT1を投与した後の脾臓細胞中のNK細胞の割合(%)を示す。5週齢C57BL/6J雌性マウスの尾静脈に、BICANATE、各用量のaAVC(3T3)-WT1又はaAVC-WT1を投与した(各群3例)。投与3日後に脾臓を採取しフローサイトメトリーにてNK細胞を検出した。NK細胞割合は前方散乱光と側方散乱光のサイトグラムのリンパ球画分細胞におけるCD1d/Gal-dimer陽性且つCD19陰性の細胞の割合とし、平均値±標準誤差をグラフに示した。X軸の数値はaAVCの α -GalCer積載量($\text{ng}/10^6\text{cells}$)を示す。

[図3]aAVC-WT1のマウス単回静脈内投与毒性試験における雄マウス又は雌マウスの体重測定結果を示す。8週齢のC57BL/6J雌雄マウスの尾静脈に、BICANATE又は各用量のaAVC-WT1を単回投与した(各群5例)。投与前日(-1日)、投与日(0日)、投与翌日(1日)、投与3日後(3日)及び投与7日後(7日)に体重を測定し、グラフに示した。

[図4]マウス単回静脈内投与毒性試験における雄マウス又は雌マウスの摂餌量測定結果を示す。8週齢のC57BL/6J雌雄マウスの尾静脈に、BICANATE又は各用量のaAVC-WT1を単回投与した(各群5例)。投与3日前～投与前日(-3～-1日)、投与日～投与翌日(0～1日)、投与翌日～投与3日後(1～3日)、投与3日後～投与7日後(3～7日)における1日当たりの摂餌量(g/day)を測定し、グラフに示した。

発明を実施するための形態

[0015] 以下に、本発明について詳述するが、本発明はこれらに限定されるものではない。本明細書で特段に定義されない限り、本発明に関連して用いられる科学用語及び技術用語は、当業者によって一般に理解される意味を有するものとする。

[0016] <本発明のがんの治療又は予防方法>

本発明は、以下に示すがんの治療又は予防する方法を提供する：

ヒト由来細胞をヒトに投与する工程を含むがんを治療又は予防する方法であって、

該細胞は、外来性又は内在性のCD1dを発現し、該細胞表面に α -GalCerを積載しており、且つ

該細胞表面に積載されている α -GalCerの1回用量がヒト体重1kg当たり1.7ng~275ngの範囲となるようにヒトに投与される、方法。

[0017] 1. aAVC

本発明の方法は、外来性又は内在性CD1dを発現し、該細胞表面に α -GalCerを積載しているヒト由来細胞（本明細書中、aAVCとも称する）を使用しうる。aAVCはさらに1以上の任意の外来性又は内在性のがん抗原を発現していてもよい。がん抗原を発現していないaAVCは、NK細胞の活性化によりある程度の抗腫瘍効果をもたらすが、がん抗原を発現するaAVCは、がんに対する獲得免疫も誘導するため、より多くの利点がある。aAVCは、当該分野で公知の方法を使用して当業者に容易に作製され得る（例えば、非特許文献7及び8、特許文献1~3）。

[0018] 本発明で使用されるヒト由来細胞は、例えば、胃、小腸、大腸、肺、脾臓、腎臓、肝臓、胸腺、脾臓、前立腺、卵巣、子宮、骨髓、皮膚、筋肉、末梢血等の任意のヒト組織由来の細胞であってよい。1つの実施形態において、本発明で使用されるヒト由来細胞は、非血球細胞である。本発明で使用されるヒト由来細胞は、増殖能を有し得る。本発明で使用されるヒト由来細胞は、ヒト組織における特定の細胞種（例えば、上皮細胞、内皮細胞、表皮細胞、間質細胞、線維芽細胞、脂肪組織、乳腺細胞、メサングウム細胞、膵 β 細胞、神経細胞、グリア細胞、外分泌上皮細胞、内分泌細胞、骨格筋細胞、平滑筋細胞、心筋細胞、骨芽細胞、胚細胞、免疫細胞等）由来の細胞であってよい。本発明で使用されるヒト由来細胞は、正常細胞又はがん細胞であってもよい。1つの実施形態において、本発明で使用されるヒト由来細胞は、正

常細胞である。1つの実施形態において、本発明で使用されるヒト由来細胞は、ヒト胎児腎細胞293（HEK293）細胞（J. Gen. Virol. ; 1977 ; 36 : 59-74）、WI-38細胞、SC-01MFP細胞、若しくはMRC-5細胞、又はそれらの細胞に由来する細胞であってよい。1つの実施形態において、本発明で使用されるヒト由来細胞は、HEK293由来細胞である。1つの実施形態において、本発明において使用されるヒト由来細胞は、FreeStyle™ 293-F細胞である。

[0019] 1つの実施形態において、本発明で使用されるヒト由来細胞は、ヒト組織由来の不死化細胞又は株化細胞である。不死化細胞及び株化細胞は当業者により公知の方法を用いて作製することができる。

[0020] 1つの実施形態において、本発明で使用されるヒト由来細胞は、ヒト由来人工多能性幹細胞（iPS細胞）又は胚性幹細胞（ES細胞）である。iPS細胞又はES細胞は当業者により公知の方法を用いて作製することができる。1つの実施形態において、本発明で使用されるヒト由来細胞は、ヒト由来人工多能性幹細胞（iPS細胞）又は胚性幹細胞（ES細胞）由来の細胞である。

[0021] 本発明で使用されるCD1dは、天然に存在するCD1d又はその改変体であってよい。CD1dは、使用するヒト由来細胞に内在的に発現するCD1dであってもよく、使用するヒト由来細胞に外来的に発現させたCD1dであっても良い。1つの実施形態において、発現とは、細胞のいずれかの場所に発現していることを意味し、1つの実施形態において、細胞表面に発現していることを意味する。1つの実施形態において、aAVCは外来性CD1dを発現する。1つの実施形態において、本発明で使用されるCD1dは哺乳類（例えば、ヒト、サル、マウス、ラット、イヌ、チンパンジー等）由来のCD1dである。1つの実施形態において、本発明で使用されるCD1dはヒトCD1dである。

[0022] 本明細書中、「外来性」又は「外来的」とは、遺伝子又は核酸を遺伝子操作又は遺伝子導入等の操作により目的の細胞内に人為的に導入すること、及

び目的の細胞内に人為的に導入された遺伝子又は核酸、並びにそれら発現タンパク質を指す用語として交換可能に使用される。外来性の遺伝子は、遺伝子の発現を駆動するプロモーター配列に作動可能に連結されうる。

[0023] 本明細書中、「内在性」又は「内在的」とは、細胞に元々備わったもの、例えば、元々備わっている遺伝子、核酸、又はタンパク質であることを意味する。

[0024] 本明細書中、「由来」とは、細胞が得られた動物種を示すために用いられる。例えば、ヒト由来細胞は、当該細胞がヒトから得られた細胞であること、又は当該細胞を継代培養して得られた細胞株であることを意味する。例えば、ヒト由来細胞はヒト細胞であることを意味する。

[0025] 本明細書における「同一性」とは、EMBOSS Needle (Nucleic Acids Res. ; 2015 ; 43 : W580-W584) を用いて、デフォルトで用意されているパラメータによって得られた Identity の値を意味する。前記のパラメータは以下のとおりである。

Gap Open Penalty = 10

Gap Extend Penalty = 0.5

Matrix = EBLOSUM62

End Gap Penalty = false

[0026] 1つの実施形態において、ヒトCD1dは、配列番号4に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質である。1つの実施形態において、ヒトCD1dは、配列番号4に示されるアミノ酸配列において1又は数個、ある実施形態では1～10個、1～7個、1～5個、1～3個、又は1～2個のアミノ酸の欠失、置換、挿入、及び／又は付加されたアミノ酸配列からなり、且つ、CD1dの機能を有するタンパク質である。1つの実施形態において、ヒトCD1dは、配列番号4に示されるアミノ酸配列と少なくとも90%以上、95%以上、96%以上、97%以上、98%以上、又は99%以上の同一性を有するアミノ酸配列からなり、且つ、CD1dの機能を有するタンパク質である。さらに1つ実施形態において、ヒトCD1dは、配列番号3に示

される塩基配列にコードされるアミノ酸配列からなるタンパク質である。

[0027] CD1dの機能としては、CD1dリガンド（例えば、 α -GalCer）に結合する能力が挙げられる。CD1dのCD1dリガンドへの結合能は公知の方法を用いて当業者に容易に評価され得る。また、CD1dの機能は、aAVCによるヒトNK細胞を活性化する能力を指標に評価することもできる。このヒトNK細胞の活性化能は、特許文献1又は本願実施例4に記載の方法で評価することができる。

[0028] 1つの実施形態において、本発明で使用されるaAVCは、がん抗原を発現する。本発明で使用されるがん抗原として、がん細胞において発現がみられる任意のタンパク質が使用できる。がん抗原の例としては、Wilms Tumor 1 (WT-1)、Human Carbohydrate Antigen 125 (CA-125)、Carcinoembryonic Antigen (CEA)、Human Telomerase Reverse Transcriptase (hTERT)、Mucin-1 (Muc-1)、Mucin-2 (Muc-2)、Cancer/Testis antigen 1B (CTAG1B/NY-ESO-1)、Prostatic Acid Phosphatase (PAP)、Prostate Specific Antigen (PSA)、Prostate Specific Membrane Antigen (PSMA)、Survivin b、変異ras、変異p53等が挙げられる。1つの実施形態において、本発明で使用されるがん抗原として、Wilms Tumor 1 (WT-1) が挙げられる。1つの実施形態において、WT-1はヒトWT-1である。1つの実施形態において、ヒトWT-1は、配列番号2に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質である。1つの実施形態において、ヒトWT-1は、配列番号2に示されるアミノ酸配列において1又は数個、ある実施形態では1～10個、1～7個、1～5個、1～3個、又は1～2個のアミノ酸の欠失、置換、挿入、及び／又は付加されたアミノ酸配列からなるタンパク質である。1つの実施形態において、ヒトWT-1は、配

列番号2に示されるアミノ酸配列と少なくとも90%以上、95%以上、96%以上、97%以上、98%以上、又は99%以上の同一性を有するアミノ酸配列からなるタンパク質である。1つの実施形態において、aAVCは、1種のがん抗原を発現する。1つの実施形態において、aAVCは、複数種のがん抗原を発現する。がん抗原としては、それを発現するaAVCが該がん抗原に対する免疫作用により抗腫瘍効果を示すものである限り、天然に存在するがん抗原又はその改変体であってもよい。がん抗原は、使用するヒト由来細胞に内在的に発現する抗原であってもよく、又、使用するヒト由来細胞に外来的に発現させた抗原であってもよい。1つの実施形態において、aAVCは、外来性がん抗原を発現する。1つの実施形態において、aAVCは、複数種の外来性がん抗原を発現する。

[0029] α -GalCerはCD1dリガンドの1つであり、CAS RN: 158021-47-7、分子式: $C_{50}H_{99}NO_9$ 及び分子量: 858.34で表される物質である。 α -GalCerは、当該分野で公知の技術に従って合成してもよく、商業的に入手可能なもの（例えば、 α -Galactosylceramide（フナコシ、Cat. KRN7000））を使用してもよい。細胞への α -GalCerの積載は、「2. aAVCの作製方法」の項に記載のように、CD1dを発現する細胞を α -GalCerを含有する培地において培養することによって行いうる。

[0030] 2. aAVCの作製方法

本発明は、 α -GalCerを積載する前の段階の細胞（本明細書中、aAVC前駆細胞とも称する）を作製すること、及びaAVC前駆細胞に α -GalCerを積載させることを含む。また、本発明は、外来性CD1dを発現し、該細胞表面に α -GalCerを積載しているヒト由来細胞であり、該細胞表面に積載されている α -GalCerの1回用量がヒト体重1kg当たり1.7ng~275ngの範囲となるようにヒトに投与される細胞を製造する方法であって、外来性CD1dを発現するヒト由来細胞を56ng/mL~3000ng/mLの α -GalCerを含む培養培地で培

養する工程を含む、方法を提供する。また、本発明は、外来性CD1dを発現し、該細胞表面に α -GalCerを積載しているヒト由来細胞であり、該細胞表面に積載されている α -GalCerの1回用量がヒト体重1kg当たり1.7ng~275ngの範囲となるようにヒトに投与される細胞を製造する方法であって、外来性CD1dを発現するヒト由来細胞を56ng/mL~3000ng/mLの α -GalCerを含む培養培地で培養する工程と、細胞表面に積載されている α -GalCer量が 1×10^6 個の細胞当たり3.9~275ngの範囲である細胞を選択する工程を含む、ヒト由来細胞の製造方法を提供する。

[0031] 2-1. aAVC前駆細胞の作製

aAVC前駆細胞は、ヒト由来細胞にCD1d遺伝子若しくはがん抗原をコードする遺伝子のいずれか、又はCD1d遺伝子及びがん抗原をコードする遺伝子を導入することによって作製することができる。CD1d遺伝子及びがん抗原をコードする遺伝子は、NCBI RegSeq IDやGenBankのAccession番号からアミノ酸配列をコードする塩基配列を取得し、標準的な分子生物学及び／又は化学的手法を用いて設計及び作製することができる。例えば、前記遺伝子は、塩基配列をもとにホスホロアミダイト法を用いて合成することができ、又cDNAライブラリーよりポリメラーゼ連鎖反応（PCR）を使用して得られるDNA断片を組み合わせで作製することができる。ヒト由来細胞への目的の遺伝子の導入はcDNAやmRNA等の形態にて導入する遺伝子を含む発現ベクターを用いて行うことができる。又ヒト由来細胞へエレクトロポレーション、リポフェクション等の方法によって目的遺伝子を直接細胞に導入してもよい。さらに、ヒト由来細胞に目的の遺伝子を導入してaAVC前駆細胞を作製した後、該細胞を培養して増殖させてもよい。

[0032] 本発明で使用する発現ベクターは、ヒト由来細胞中でCD1d若しくは目的のがん抗原又はCD1d及び目的のがん抗原を発現できるものであれば特に制限されない。当該発現ベクターは、例えば、プラスミドベクター（例

例えば、p cDNAシリーズ (Thermo Fisher Scientific社)、pALTER (登録商標) -MAX (プロメガ)、pHEK293 Ultra Expression Vector (タカラバイオ社) 等)、ウイルスベクター (例えば、レンチウイルス、アデノウイルス、レトロウイルス、アデノ随伴ウイルス等) であってもよい。ウイルスベクターの産生には、例えば、レンチウイルスの作製に用いる pLVSI-N-CMV /EF1 α ベクター (タカラバイオ社)、pLentiベクター (Thermo Fisher Scientific社) 等を用いることができる。ヒト由来細胞においてCD1d及びがん抗原を外来的に発現させる場合、CD1dとがん抗原を1つのベクターを用いて発現させてもよく、別々のベクターを用いて発現させてもよい。

[0033] 発現ベクターは、CD1d又はがん抗原をコードする遺伝子に機能可能に連結されたプロモーターを含み得る。プロモーターとしては、恒常的に発現を促進するプロモーター又は薬剤等 (例えば、テトラサイクリン又はドキシサイクリン等) により誘導されるプロモーターのいずれも用いることができる。恒常的に発現を促進するプロモーターとしては、例えば、CMV (cytomegalovirus)、RSV (respiratory syncytial virus)、SV40 (simian virus 40) 等のウイルス由来プロモーター、アクチンプロモーター、EF (elongation factor) 1 α プロモーター等が挙げられる。誘導型プロモーターとしては、例えば、テトラサイクリン応答因子 (TRE3Gプロモーター)、Cumateオペレーター配列、 λ オペレーター配列 (12 $\times$ λ Op)、ヒートショックプロモーター等が挙げられる。

[0034] 発現ベクターは、開始コドン及び終止コドンを含み得る。この場合、エンハンサー配列、非翻訳領域、スプライシング接合部、ポリアデニレーション部位、又は複製可能単位等を含んでいてもよい。また、発現ベクターには、目的の遺伝子の発現を確認するためのマーカーとなり得る遺伝子 (例えば、薬剤耐性遺伝子、レポーター酵素をコードする遺伝子、又は蛍光タンパク質

をコードする遺伝子等)を含んでいてもよい。

[0035] 1つの実施形態において、a A V C前駆細胞は、ウイルスベクターを用いてヒト由来細胞にC D 1 d遺伝子を導入することにより作製される。1つの実施形態において、本発明で使用されるa A V C前駆細胞は、ウイルスベクターを用いてC D 1 dを外来的に発現させた細胞である。この態様において、a A V C前駆細胞は、プロモーターに作動可能に連結されたC D 1 dをコードする遺伝子を含みうる。1つの実施形態において、a A V C前駆細胞は、ウイルスベクターを用いてヒト由来細胞にC D 1 d遺伝子及びがん抗原をコードする遺伝子を導入することにより作製される。1つの実施形態において、本発明で使用されるa A V C前駆細胞は、ウイルスベクターを用いてC D 1 d及びがん抗原を外来的に発現させた細胞である。この態様において、a A V C前駆細胞は、プロモーターに作動可能に連結されたC D 1 d遺伝子及びがん抗原をコードする遺伝子を含みうる。

[0036] 1つの実施形態において、a A V C前駆細胞は、レンチウイルスベクターを用いてヒト由来細胞にC D 1 d遺伝子を導入することにより作製される。1つの実施形態において、本発明で使用されるa A V C前駆細胞は、レンチウイルスベクターを用いてC D 1 dを外来的に発現させた細胞である。1つの実施形態において、a A V C前駆細胞は、レンチウイルスベクターを用いてヒト由来細胞にC D 1 d遺伝子及びがん抗原をコードする遺伝子を導入することにより作製される。1つの実施形態において、本発明で使用されるa A V C前駆細胞は、レンチウイルスベクターを用いてC D 1 d及びがん抗原を外来的に発現させた細胞である。

[0037] a A V C前駆細胞の培養は、公知の方法により行われる。基礎培地としては、例えば、MEM培地 (S c i e n c e ; 1 9 5 2 ; 1 2 2 : 5 0 1)、DMEM培地 (V i r o l o g y ; 1 9 5 9 ; 8 : 3 9 6 - 3 9 7)、R P M I 1 6 4 0培地 (J. A m. M e d. A s s o c. ; 1 9 6 7 ; 1 9 9 : 5 1 9 - 5 2 4)、1 9 9培地 (P r o c. S o c. E x p. B i o l. M e d. ; 1 9 5 0 ; 7 3 : 1 - 8)、F r e e S t y l e TM 2 9 3 E x p

ression Medium (Thermo Fisher Scientific社、Cat. 12338022)、CD 293 Medium (Thermo Fisher Scientific社、Cat. 11913019)、Expi293™ Expression Medium (Thermo Fisher Scientific社、Cat. A1435101)を使用することができる。培養培地は、例えば、血清（例えば、ウシ胎児血清）、血清代替物（例えば、KnockOut Serum Replacement: KSR）、脂肪酸又は脂質、アミノ酸、ビタミン、増殖因子、サイトカイン、抗酸化剤、2-メルカプトエタノール、ピルビン酸、緩衝剤、無機塩類、抗生物質等を含むことができる。培養条件（例えば、培養時間、温度、培地のpH、CO₂濃度等の培養条件）は当業者により適宜選択されうる。培地のpHは約6～8であるのが好ましい。培養温度は、特に限定されるものではないが、例えば約30～40℃、好ましくは約37℃である。また、CO₂濃度は約1～10%、好ましくは約5%である。培養時間は、特に限定されるものではないが、約15～336時間行われる。必要により通気や攪拌を行うこともできる。テトラサイクリン又はドキシサイクリン等の薬剤により誘導されるプロモーターを使用する場合、当該薬剤を加えた培地にてaAVC前駆細胞を培養し、CD1d及びがん抗原の発現を誘導させる工程を含んでもよい。当該工程は、一般的な遺伝子誘導システムを用いた遺伝子誘導方法に準拠して行うことができる。

[0038] 2-2. 細胞への α -GalCerの積載

aAVC前駆細胞に α -GalCerをパルスすることによって、細胞表面に α -GalCerを積載したaAVCを作製する。本明細書において、「細胞表面に α -GalCerを積載した」とは、aAVC細胞の表面に α -GalCerが結合している状態を指す。その結合量は「2-3. aAVCに積載されている α -GalCer量の測定」の項に記載の方法を用いて測定することができる。本明細書において、 α -GalCerを「パルスする」とは、aAVC前駆細胞を α -GalCerと接触させて、CD1dを

発現する a A V C 前駆細胞の細胞表面に α -G a l C e r を結合させることを指す。パルスは、細胞の培養培地中で行うことができる。

[0039] a A V C 前駆細胞のパルス条件（例えば、細胞の培養培地に α -G a l C e r を添加するタイミング、培養培地中の α -G a l C e r の濃度及び培養時間等）は、使用する a A V C 前駆細胞及び培養時の諸条件を考慮して当業者にて適宜調整されうる。a A V C 前駆細胞の培養培地に添加する α -G a l C e r の濃度は、特に限定されないが、例えば、56 ng/mL ~ 3000 ng/mL の範囲で適宜選択されうる。

[0040] α -G a l C e r 存在下でヒト由来細胞への C D 1 d 若しくはがん抗原又は C D 1 d 及びがん抗原の遺伝子導入を行うことによって、a A V C 前駆細胞の作製と細胞への α -G a l C e r のパルスを同時に行ってもよい。

[0041] 細胞表面に α -G a l C e r を積載した後は、細胞表面に積載されていない α -G a l C e r（培地中の過剰な α -G a l C e r）を除去することができる。

[0042] a A V C 前駆細胞を α -G a l C e r でパルスした後、人為的な方法を用いて a A V C の増殖を停止させてもよい。a A V C の増殖を停止させる方法は、特に限定されないが、例えば、放射線（例えば、X線又は γ 線）等の粒子線の照射にて細胞増殖を停止させる方法、マイトマイシン C 等の薬剤を添加する方法等を使用し得る。

[0043] 2-3. a A V C に積載されている α -G a l C e r 量の測定

本発明者らは、a A V C 細胞表面に積載されている α -G a l C e r 量の測定方法を確立した。a A V C 細胞表面に積載されている α -G a l C e r の量の測定は、a A V C の細胞抽出液を調製し、質量分析（MS）を用いる方法（例えば、液体クロマトグラフィータンデム質量分析（LC-MS/MS））にて当該抽出液中の α -G a l C e r を定量することにより行うことができる。

[0044] LC-MS/MS を用いた一般的な定量分析において、以下のようなステップにて試料中の α -G a l C e r の定量分析が行われる。

ステップ1：数種の濃度に調製した α -GalCerの標準物質の分析を行う。

ステップ2：標準物質由来のイオンの m/z （質量／電荷比）に対し、イオン強度の時間変化（マスクロマトグラム）を取得し、マスクロマトグラムのピーク面積を求める。

ステップ3：ステップ2において求めた各標準物質のピーク面積と物質濃度との関係より、検量線を作成する。

ステップ4：定量する試料を分析し、試料中の α -GalCerのマスクロマトグラムのピーク面積を求める。

ステップ5：ステップ3にて作成した検量線に基づき、ステップ4のマスクロマトグラムのピーク面積に対応する試料の α -GalCerの濃度を決定する。

[0045] α -GalCerのLC-MS/MSによる測定は、例えば、 α -GalCerをエレクトロスプレーイオン化法により前駆イオン及びプロダクトイオンにイオン化する方法によって検出して行うことができる。LC-MS/MSにおける液体クロマトグラフィーに用いるカラム及び移動相の組成は、細胞由来の成分と α -GalCerを分離可能であり、且つ、MS/MSにて細胞由来の成分と α -GalCerを識別可能な限りにおいて、いかなるカラム及び移動相の組み合わせを使用してもよい。

[0046] 1つの実施形態において、aAVC細胞表面に積載された α -GalCer量は、 1×10^6 個の細胞当たり3.9 ng～275 ngの範囲である。1つの実施形態において、aAVC細胞表面に積載された α -GalCerの量は、 1×10^6 個の細胞当たり10～275 ng、10～140 ng又は10～100 ngの範囲内であり得る。

[0047] 3. aAVCによるがんの治療又は予防

本発明の治療又は予防方法は、ヒトに投与されるaAVC細胞表面に積載された α -GalCerの1回用量が所定の用量となるように対象に投与されうる。

[0048] 1つの実施態様において、本発明の治療又は予防方法は、ヒトに投与されるaAVC細胞表面に積載された α -GalCerの1回用量がヒト体重1kg当たり1.7ng~275ngの範囲となるように対象に投与されることを特徴とする。

[0049] 1つの実施態様において、ヒトに投与されるaAVC細胞表面に積載された α -GalCerの1回用量は、特定の数値範囲でありうる。当該特定の数値範囲は、ヒト体重1kg当たり1.7ng~275ngの範囲に含まれる数値範囲（すなわち、上限値が275ng以下であり、下限値が1.7ng以上である数値範囲）でありうる。当該数値範囲は、例えば、その上限値が275ng以下、270ng以下、260ng以下、250ng以下、240ng以下、238ng以下、230ng以下、220ng以下、210ng以下、200ng以下、190ng以下、180ng以下、170ng以下、160ng以下、150ng以下、140ng以下、130ng以下、120ng以下、110ng以下、100ng以下、90ng以下、80ng以下、70ng以下、66ng以下、60ng以下、50ng以下、47ng以下、40ng以下、36ng以下、30ng以下、24ng以下、20ng以下、19ng以下、18ng以下、17ng以下、16ng以下、15ng以下、14ng以下、13ng以下、12ng以下、11ng以下、10ng以下、9ng以下、8ng以下、7ng以下、6.6ng以下、5ng以下、4.7ng以下、4ng以下、3.6ng以下、3ng以下、又は2ng以下の数値であり、その下限値が270ng以上、260ng以上、250ng以上、240ng以上、238ng以上、230ng以上、220ng以上、210ng以上、200ng以上、190ng以上、180ng以上、170ng以上、160ng以上、150ng以上、140ng以上、130ng以上、120ng以上、110ng以上、100ng以上、90ng以上、80ng以上、70ng以上、66ng以上、60ng以上、50ng以上、47ng以上、40ng以上、36ng以上、30ng以上、24ng以上、20ng以上、19ng以上、18ng以上、1

7 ng 以上、16 ng 以上、15 ng 以上、14 ng 以上、13 ng 以上、12 ng 以上、11 ng 以上、10 ng 以上、9 ng 以上、8 ng 以上、7 ng 以上、6.6 ng 以上、6 ng 以上、5 ng 以上、4.7 ng 以上、4 ng 以上、3.6 ng 以上、3 ng 以上、2.4 ng 以上、2 ng 以上、又は1.7 ng 以上である数値である。例えば、当該特定の数値範囲は、1.7 ng ~ 50 ng の範囲、50 ng ~ 100 ng の範囲、100 ng ~ 150 ng の範囲、150 ng ~ 200 ng の範囲、200 ng ~ 275 ng、1.7 ng ~ 238 ng、1.7 ng ~ 170 ng、6.6 ng ~ 238 ng、又は6.6 ng ~ 170 ng の範囲からなる群から選択される1以上の範囲に含まれる数値範囲でありうる。

[0050] 1つの実施形態において、ヒトに投与されるaAVC細胞表面に積載された α -GalCerの量は、投与後の対象における脾臓細胞中のNK細胞の割合を指標として決定し得る。脾臓細胞中のNK細胞の割合が高まると、投与の効果が高まると考えられる。

[0051] 1つの実施形態において、ヒトに投与されるaAVC細胞表面に積載された α -GalCerの量は、 1×10^6 個の細胞当たり3.9 ng ~ 275 ng の範囲である。1つの実施形態において、ヒトに投与されるaAVC細胞表面に積載された α -GalCerの量は、 1×10^6 個の細胞当たり10 ~ 275 ng、10 ~ 140 ng 又は10 ~ 100 ng の範囲内であり得る。

[0052] aAVCは、当業者に公知の方法を用いてがんの治療又は予防を必要とする対象に投与され得る。aAVCを対象へ投与する場合、aAVC及び薬学的に許容される賦形剤を含む医薬組成物の形態で対象に投与することができる。aAVCを含む医薬組成物は、当該分野において通常用いられる賦形剤、即ち、薬剤用賦形剤や薬剤用担体等を用いて、通常使用される方法によって調製することができる。医薬組成物の製剤化にあたっては、薬学的に許容される範囲で、これら剤型に応じた賦形剤、担体、添加剤等を使用することができる。これら医薬組成物の剤型の例としては、例えば、注射剤、点滴剤等の非経口剤が挙げられる。

[0053] 本発明の治療又は予防の対象となるがんとしては、特に限定はされないが、急性リンパ芽球性白血病（ALL）、急性骨髄性白血病（AML）、ホジキンリンパ腫、ノンホジキンリンパ腫、B細胞リンパ腫、多発性骨髄腫、T細胞リンパ腫等の血液がん、骨髄異形成症候群、腺がん、扁平上皮がん、腺扁平上皮がん、未分化がん、大細胞がん、非小細胞肺がん、小細胞肺がん、中皮腫、皮膚がん、乳がん、前立腺がん、膀胱がん、膣がん、頸部がん、頭頸部がん、子宮がん、子宮頸がん、肝臓がん、胆のうがん、胆管がん、腎臓がん、膵臓がん、肺がん、結腸がん、大腸がん、直腸がん、小腸がん、胃がん、食道がん、精巣がん、卵巣がん、膀胱がん、脳腫瘍等の固形がん、及び骨組織、軟骨組織、脂肪組織、筋組織、血管組織及び造血組織のがんの他、軟骨肉腫、ユーイング肉腫、悪性血管内皮腫、悪性シュワン腫、骨肉腫、軟部組織肉腫などの肉腫や、肝芽腫、髄芽腫、腎芽腫、神経芽腫、膵芽腫、胸膜肺芽腫、網膜芽腫などの芽腫等が挙げられる。

[0054] ヒトへのaAVCの投与量及び投与回数は、がんの種類、位置、重症度、治療を受ける対象の年齢、体重及び状態などに応じて適宜調節できる。aAVCの投与量は、例えば、対象への一回の投与において $1 \times 10^3 \text{ cells} / \text{kg} \sim 1 \times 10^8 \text{ cells} / \text{kg}$ の範囲内の任意の量で設定できる。1つの実施形態において、aAVCの投与量は $1.7 \times 10^3 \text{ cells} / \text{kg}$ 、 $1.7 \times 10^4 \text{ cells} / \text{kg}$ 、 $1.7 \times 10^5 \text{ cells} / \text{kg}$ 、又は $1.7 \times 10^6 \text{ cells} / \text{kg}$ である。1つの実施形態において、aAVCの投与量は $6.2 \times 10^3 \text{ cells} / \text{kg} \sim 7.0 \times 10^7 \text{ cells} / \text{kg}$ の範囲内の任意の量で設定できる。ここで、下限値は、 α -GalCer積載量が $275 \text{ ng} / 10^6 \text{ cells}$ の細胞を、細胞表面に積載されている α -GalCerの1回用量が $1.7 \text{ ng} / \text{kg}$ となるように投与するときのヒト体重 1 kg 当たりの細胞数である。上限値は、 α -GalCer積載量が $3.9 \text{ ng} / 10^6 \text{ cells}$ の細胞を、細胞表面に積載されている α -GalCerの1回用量が $275 \text{ ng} / \text{kg}$ となるように投与するときのヒト体重 1 kg 当たりの細胞数である。1つの実施態様において、aAVCの投与

量は、特定の数値範囲でありうる。当該特定の数値範囲は、 $6.2 \times 10^3 \text{ cells/kg} \sim 7.0 \times 10^7 \text{ cells/kg}$ の範囲に含まれる数値範囲（すなわち、上限値が $7.0 \times 10^7 \text{ cells/kg}$ 以下であり、下限値が $6.2 \times 10^3 \text{ cells/kg}$ 以上である数値範囲）でありうる。当該数値範囲は、例えば、その上限値が $7.0 \times 10^7 \text{ cells/kg}$ 以下、 $6.0 \times 10^7 \text{ cells/kg}$ 以下、 $5.0 \times 10^7 \text{ cells/kg}$ 以下、 $4.0 \times 10^7 \text{ cells/kg}$ 以下、 $3.0 \times 10^7 \text{ cells/kg}$ 以下、 $2.0 \times 10^7 \text{ cells/kg}$ 以下、 $1.7 \times 10^7 \text{ cells/kg}$ 以下、 $1.3 \times 10^7 \text{ cells/kg}$ 以下、 $1.0 \times 10^7 \text{ cells/kg}$ 以下、 $9.0 \times 10^6 \text{ cells/kg}$ 以下、 $8.0 \times 10^6 \text{ cells/kg}$ 以下、 $7.0 \times 10^6 \text{ cells/kg}$ 以下、 $6.0 \times 10^6 \text{ cells/kg}$ 以下、 $5.0 \times 10^6 \text{ cells/kg}$ 以下、 $4.3 \times 10^6 \text{ cells/kg}$ 以下、 $4.0 \times 10^6 \text{ cells/kg}$ 以下、 $3.0 \times 10^6 \text{ cells/kg}$ 以下、 $2.7 \times 10^6 \text{ cells/kg}$ 以下、 $2.0 \times 10^6 \text{ cells/kg}$ 以下、 $1.7 \times 10^6 \text{ cells/kg}$ 以下、又は $1.0 \times 10^6 \text{ cells/kg}$ 以下の数値であり、その下限値が $1.0 \times 10^4 \text{ cells/kg}$ 以上、 $1.7 \times 10^4 \text{ cells/kg}$ 以上、 $2.0 \times 10^4 \text{ cells/kg}$ 以上、 $3.0 \times 10^4 \text{ cells/kg}$ 以上、 $4.0 \times 10^4 \text{ cells/kg}$ 以上、 $4.4 \times 10^4 \text{ cells/kg}$ 以上、 $5.0 \times 10^4 \text{ cells/kg}$ 以上、 $6.0 \times 10^4 \text{ cells/kg}$ 以上、 $6.6 \times 10^4 \text{ cells/kg}$ 以上、 $7.0 \times 10^4 \text{ cells/kg}$ 以上、 $8.1 \times 10^4 \text{ cells/kg}$ 以上、 $9.0 \times 10^4 \text{ cells/kg}$ 以上、 $1.0 \times 10^5 \text{ cells/kg}$ 以上、 $1.7 \times 10^5 \text{ cells/kg}$ 以上、 $2.0 \times 10^5 \text{ cells/kg}$ 以上、 $3.0 \times 10^5 \text{ cells/kg}$ 以上、 $3.2 \times 10^5 \text{ cells/kg}$ 以上、 $4.0 \times 10^5 \text{ cells/kg}$ 以上、 $5.0 \times 10^5 \text{ cells/kg}$ 以上、 $6.0 \times 10^5 \text{ cells/kg}$ 以上、 $6.6 \times 10^5 \text{ cells/kg}$ 以上、 $7.0 \times 10^5 \text{ cells/kg}$ 以上、 $8.0 \times 10^5 \text{ cells/kg}$ 以上、又は $9.0 \times 10^5 \text{ cells/kg}$ 以上の数値であり、例

例えば、当該特定の数値範囲は、 $1.7 \times 10^3 \text{ cells/kg} \sim 1.7 \times 10^6 \text{ cells/kg}$ 、 $1.7 \times 10^3 \text{ cells/kg} \sim 1.7 \times 10^5 \text{ cells/kg}$ 、 $1.7 \times 10^3 \text{ cells/kg} \sim 1.7 \times 10^4 \text{ cells/kg}$ 、 $1.7 \times 10^4 \text{ cells/kg} \sim 1.7 \times 10^6 \text{ cells/kg}$ 、 $1.7 \times 10^4 \text{ cells/kg} \sim 1.7 \times 10^5 \text{ cells/kg}$ 、 $1.7 \times 10^5 \text{ cells/kg} \sim 1.7 \times 10^6 \text{ cells/kg}$ 、 $6.6 \times 10^4 \text{ cells/kg} \sim 1.7 \times 10^7 \text{ cells/kg}$ 、 $1.7 \times 10^5 \text{ cells/kg} \sim 2.7 \times 10^7 \text{ cells/kg}$ 、 $6.6 \times 10^5 \text{ cells/kg} \sim 1.7 \times 10^7 \text{ cells/kg}$ 、 $8.1 \times 10^4 \text{ cells/kg} \sim 1.3 \times 10^7 \text{ cells/kg}$ 、 $3.2 \times 10^5 \text{ cells/kg} \sim 8.0 \times 10^6 \text{ cells/kg}$ 、 $4.4 \times 10^4 \text{ cells/kg} \sim 7.0 \times 10^6 \text{ cells/kg}$ 、 $4.4 \times 10^4 \text{ cells/kg} \sim 7.0 \times 10^6 \text{ cells/kg}$ 、 $2.6 \times 10^5 \text{ cells/kg} \sim 4.3 \times 10^6 \text{ cells/kg}$ 、 $1.7 \times 10^4 \text{ cells/kg} \sim 2.7 \times 10^6 \text{ cells/kg}$ 、 $6.6 \times 10^4 \text{ cells/kg} \sim 1.7 \times 10^6 \text{ cells/kg}$ の範囲、からなる群から選択される1以上の範囲に含まれる数値範囲でありうる。

[0055] ヒトへのaAVCの投与方法としては、例えば、静脈内、腫瘍内、皮内、皮下、筋肉内、腹腔内、動脈内等への注射又は点滴により投与することができる。

[0056] 本発明の治療又は予防方法は、他のがん治療方法と併用して用いることができる。他のがん治療方法としては、手術、放射線治療、造血幹細胞移植、又は、他の抗がん剤による治療が挙げられる。

[0057] <本発明の医薬組成物等>

本発明はまた、ヒト由来細胞を含むがんの治療又は予防のための医薬組成物を提供する。当該医薬組成物は、外来性又は内在性のCD1dを発現し、細胞表面に $\alpha\text{-GalCer}$ を積載しているヒト由来細胞を含み、且つ、ヒトに投与される該細胞表面に積載されている $\alpha\text{-GalCer}$ の1回用量がヒト体重1kg当たり $1.7 \text{ ng} \sim 275 \text{ ng}$ の範囲となるようにヒトに投

与される。当該ヒト由来細胞は、1以上の外来性又は内在性のがん抗原をさらに発現していてもよい。本発明はまた、がんの治療又は予防のための医薬組成物を製造するためのヒト由来細胞の使用であって、該細胞は、外来性又は内在性のCD1dを発現し、該細胞表面に α -GalCerを積載しており、且つ、該組成物は、ヒトに投与される該細胞表面に積載されている α -GalCerの1回用量がヒト体重1kg当たり1.7ng~275ngの範囲となるようにヒトに投与される、使用を提供する。当該ヒト由来細胞は、1以上の外来性又は内在性のがん抗原をさらに発現していてもよい。本発明はまた、がんの治療又は予防のためのヒト由来細胞であって、該細胞は、外来性又は内在性のCD1dを発現し、該細胞表面に α -GalCerを積載しており、且つ、該細胞は、ヒトに投与される該細胞表面に積載されている α -GalCerの1回用量がヒト体重1kg当たり1.7ng~275ngの範囲となるようにヒトに投与される、細胞を提供する。当該ヒト由来細胞は、1以上の外来性又は内在性のがん抗原をさらに発現していてもよい。

[0058] 前述の本発明の医薬組成物、使用、及び細胞において、使用する細胞（aAVC）、並びにその製法及びがんの治療又は予防における使用等に関する実施形態については「本発明のがんの治療又は予防方法」の項に記載のとおりである。

[0059] <本発明の医薬組成物等の製造方法>

本発明はまた、ヒト由来細胞を含むがんの治療又は予防のための医薬組成物の製造方法を提供する。本発明の医薬組成物の製造方法は、外来性又は内在性CD1dを発現し、細胞表面に α -GalCerを積載しているヒト由来細胞を提供することと、該細胞表面に積載されている α -GalCerの1回用量がヒト体重1kg当たり1.7ng~275ngの範囲でヒトに投与されうるように該細胞を医薬組成物としてパッケージングすることを含む、方法でありうる。当該方法は、さらに、ヒト由来細胞の増殖を放射線照射等の方法により停止させる工程を含んでいてもよい。1つの実施形態におい

て、本発明の医薬組成物の製造方法は、外来性又は内在性CD1dを発現し、細胞表面に α -GalCerを積載しているヒト由来細胞を提供することと、該細胞表面に積載されている α -GalCer量を指標として医薬組成物としてパッケージングする該細胞を選択するまたは該細胞の数を決定すること、及び、選択または決定された該細胞をパッケージングして医薬組成物を得ることを含む、方法であり得る。この実施形態において、医薬組成物に含まれる細胞表面に積載された α -GalCerの総量は、 $1.7\text{ ng} \sim 275\text{ ng}$ の任意の数値に平均的なヒトの体重を乗じて算出された一定の数値範囲となり得る。本発明の医薬組成物の製造方法は、＜細胞に積載されている α -GalCer量の測定法＞の項に記載の、細胞表面に積載されている α -GalCerの量を測定する方法をさらに含む。本発明の医薬組成物の製造方法は、細胞当たりの α -GalCerの積載量が一定の数値範囲である細胞集団を選択することと、当該選択された細胞集団を医薬組成物としてパッケージングすることをさらに含む。細胞当たりの α -GalCerの積載量は、例えば、 1×10^6 個の細胞当たり $3.9\text{ ng} \sim 275\text{ ng}$ 、 $10 \sim 275\text{ ng}$ 、 $10 \sim 140\text{ ng}$ 又は $10 \sim 100\text{ ng}$ の範囲内であり得る。製造される当該医薬組成物は、上記の用量でヒトに投与される。

[0060] ＜細胞に積載されている α -GalCer量の測定法＞

本発明はまた、以下のような、細胞に積載された α -GalCer量を測定する方法を提供する：

細胞に積載された α -GalCer量を測定する方法であって、該細胞は、CD1dを発現し、細胞表面に α -GalCerが積載されている細胞であり、該方法は、

該細胞の細胞抽出液を調製する工程、及び

細胞抽出液を質量分析（MS）に供し、該液中の α -GalCer量を測定する工程

を包含する、方法。

[0061] 1つの実施形態において、質量分析（MS）は、液体クロマトグラフィー

タンデム質量分析（LC-MS/MS）である。

[0062] 1つの実施形態において、本方法で使用される細胞は、外来性又は内在性のCD1dを発現し、細胞表面に α -GalCerを積載しているヒト由来細胞（aAVC）である。1つの実施形態において、本方法で使用される細胞は、1以上の外来性又は内在性のCD1d及び外来性又は内在性のがん抗原を発現し、細胞表面に α -GalCerを積載しているヒト由来細胞（aAVC）である。1つの実施形態において、本方法で使用される細胞は、1以上の外来性のCD1d及び外来性がん抗原を発現し、細胞表面に α -GalCerを積載しているヒト由来細胞（aAVC）である。

[0063] 本発明についてさらに理解を得るために参照する特定の実施例をここに提供するが、これらは例示目的とするものであって、本発明を限定するものではない。

実施例

[0064] [実施例1-1：aAVC-WT1の作製及び調製]

WT1、CD1d、及びTet3G（リバーステトラサイクリン制御性トランス活性化因子）遺伝子をそれぞれ搭載したプラスミドを用いてレンチウイルスを作製した。当該レンチウイルスを用いてFreeStyle™ 293-F細胞（Thermo Fisher Scientific社、Cat. R79007）に該遺伝子を導入することにより、CD1d及びWT1を発現し、細胞表面に α -GalCerを積載しているaAVCを構築した。

[0065] (1) レンチウイルス作製用プラスミドの構築

WT1遺伝子（配列番号1）の5'末側にXhoI認識配列、3'末側にNotI認識配列を付加した遺伝子を、pLVSLN-CMV Purプラスミド（タカラバイオ社、Cat. 6183）のXhoI-NotIサイトに挿入することによりpLVSLN-CMV-WT1プラスミドを構築した。配列番号1の遺伝子は、Wilms tumor protein isoform D（NCBI Reference Sequence：NP

__077744. 3) のアミノ酸配列を基に、Thermo Fisher Scientific社の人工遺伝子合成サービスにてヒトのコドンへ最適化して作製した。pLV SIN-CMV-WT1 プラスミドのCMVプロモーターを制限酵素ClaI及びEcoRIにて切断した後に、T4 DNA Polymerase (TOYOBO社、Cat. TPL-101) にて切断面を平滑化し、DNA Ligation Kit (タカラバイオ社、Cat. 6023) にてライゲーション反応を行い、pLV SIN-Δ-WT1 プラスミドを構築した。pLV SIN-Δ-WT1 プラスミドのEcoRI-XhoIサイトに、pTRE3G (タカラバイオ社、Cat. 631173) から制限酵素EcoRI及びSalIで切り出したTRE3Gプロモーターを挿入し、pLV SIN-TRE3G-WT1 プラスミドを構築した。pLV SIN-TRE3G-WT1 プラスミドを制限酵素BamHI及びMluIで切断し、PGKプロモーターとピューロマイシン耐性遺伝子を除去した後に、当該プラスミドの切断面をT4 DNA Polymeraseにて平滑化し、DNA Ligation Kitにてライゲーション反応を行い、pLV SIN-TRE3G-WT1 Δpur プラスミドを構築した。

[0066] pLV SIN-CMV Pur プラスミドを制限酵素XhoI及びMluIで切断し、PGKプロモーターとピューロマイシン耐性遺伝子を除去した。当該プラスミドのXhoI-MluIサイトの両側15塩基とそれぞれ相補的な配列を付加したプライマーを用いてCD1d遺伝子(配列番号3)をPCR法にて増幅した。切断した前記プラスミドに増幅したCD1d遺伝子をIn-Fusion (登録商標) HD Cloning Kit (タカラバイオ社、Cat. 639648) を用いて挿入し、pLV SIN-CMV-CD1d Δpur プラスミドを構築した。配列番号3の遺伝子は、antigen-presenting glycoprotein CD1d isoform 1 precursor (NCBI Reference Sequence: NP__001757. 1) のアミノ酸配列(配列番号

4) を基に Thermo Fisher Scientific 社の人工遺伝子合成サービスにてヒトのコドンへの最適化を行い作製した。

[0067] PCR法を用いて pCMV-Tet-On 3Gプラスミド (タカラバイオ社、Cat. 631335) より Tet 3G 遺伝子を増幅した。増幅した遺伝子を In-Fusion (登録商標) HD Cloning Kit を用いて pLV SIN-CMV Pur プラスミドの XhoI-MluI サイトに挿入し、pLV SIN-CMV-Tet 3G Δpur プラスミドを構築した。

[0068] (2) レンチウイルス作製

(1) で作製した pLV SIN-TRE 3G-WT1 Δpur プラスミド、pLV SIN-CMV-CD1d Δpur プラスミド、pLV SIN-CMV-Tet 3G Δpur プラスミドを用いて、WT1 搭載レンチウイルス、CD1d 搭載レンチウイルス及び Tet 3G 搭載レンチウイルスを作製した。

[0069] pLV SIN-TRE 3G-WT1 Δpur プラスミド 30 μg と Virapower Lentiviral Packaging Mix (Thermo Fisher Scientific 社、Cat. K497500) 30 μL を混合し、1 mL になるように Opti-MEM™ 1 Reduced Serum Medium (Thermo Fisher Scientific 社、Cat. 31985-070) を加えて混合して 5 分静置した (A)。PEIpro (登録商標) in vitro DNA transfection reagent (polyplus-transfection 社、Cat. 115-010) 60 μL と Opti-MEM™ 1 Reduced Serum Medium 940 μL を混合して 5 分静置した (B)。(A) と (B) を混合して室温で 15 分静置後、Falcon (登録商標) ベントキャップタイプ フラスコ 800 mL スラントネック (Corning 社、Cat. 353138) に播種した 293 T 細胞 (ATCC、Cat. CRL-3216) に全量を添加して遺伝子導

入を行った。293T細胞の播種は、遺伝子導入の前日に行い、10%量のウシ胎児血清(SAFC Biosciences社、Cat. 12007C (γ線照射品))と0.1%量のゲンタマイシン(Thermo Fisher Scientific社、Cat. 15750-060)を含むDME M培地(Thermo Fisher Scientific社、Cat. 10569-010)にて37℃、5%CO₂条件下で培養を行った。遺伝子導入後2日間培養し、培養液を室温にて230×gで5分間遠心して、WT1遺伝子を搭載したレンチウイルスを含む培養上清を回収した。上清を0.22μmのフィルター(Merck社、Cat. SLGV033RS)でろ過し、4×PEG溶液(32% Poly(ethylene glycol) BioUltra、6000(Merck社、Cat. 81253-250G)、0.4M NaCl(関東化学株式会社 Cat. 37144-02)、0.04M HEPES(Thermo Fisher Scientific社、Cat. 15630-080))を上清液量の1/3量添加して混合し、4℃で終夜静置した。2500×g、4℃、30分間遠心して上清を除去し、再度2500×g、4℃、30分間遠心して上清を完全に除去した。沈殿物を適量のOpti-MEM™ 1 Reduced Serum Mediumに懸濁し、回収した培養上清に対して30倍濃縮とし、WT1搭載レンチウイルスを得た。

[0070] Tet3G搭載レンチウイルスはpLV5IN-CMV-Tet3GΔpurプラスミドを用いて、上記と同様の方法にて作製した。遺伝子導入後の培養期間は2日又は3日間とした。4×PEG溶液と混合後の静置は4℃で終夜又は4日間で実施した。また最終懸濁液はFreeStyle 293 Expression Medium(Thermo Fisher Scientific社、Cat. 12338018)を使用した。

[0071] pLV5IN-CMV-CD1dΔpurプラスミド12μgとViraPower Lentiviral Packaging Mix 36μLを混合し、6mLになるようにOptiPro™ SFM(Thermo

Fisher Scientific社、Cat. 12309-019)を加えて混合して5分静置した(A-2)。Lipofectamine 2000 CD Transfection Reagent (Thermo Fisher Scientific社、Cat. 12566-014) 144 μ LとOptiPro™SFM 6mLを混合して5分静置(B-2)した。A-2とB-2を混合して室温で20分間静置後、Falcon (登録商標) ペントキャップタイプフラスコ800mLスラントネックに播種した293FT細胞(Thermo Fisher Scientific社、Cat. R70007)に全量を添加して遺伝子導入を行った。293FT細胞の培養培地は、10%量のウシ胎児血清(SAFC Biosciences社、Cat. 12007C (γ線照射品))と0.1%量のゲンタマイシンを含むDMEM培地にG418 (Thermo Fisher Scientific社、Cat. 10131-027)とMEM Non-Essential Amino Acids Solution (100X) (Thermo Fisher Scientific社、Cat. 11140050)をそれぞれ終濃度500 μ g/mL、0.1mMになるように添加して使用した。遺伝子導入後2日間培養し、培養液を540×g、4℃で10分間遠心して、CD1d遺伝子を搭載したレンチウイルスを含む培養上清を回収した。上清を0.44 μ mのフィルター(Merck社、Cat. SLHV033RS)でろ過し、PEG-it™ Virus Precipitation Solution (5x) (System Biosciences社、Cat. LV825A-1)を上清液量の1/5量添加して混合し、4℃で終夜静置した。1500×g、4℃で30分間遠心し、上清を除去し、再度1500×g、4℃で5分間遠心して上清を完全に除去した。ペレットを適量のFreeStyle 293 Expression Mediumに懸濁し、回収した培養上清に対して75倍濃縮とし、CD1d搭載レンチウイルスを得た。

[0072] (3) FreeStyle 293F__WT1__CD1d__Tet3G細胞

の作製

FreeStyle™ 293-F細胞に(2)で作製した3種のレンチウイルスを順次感染させ、FreeStyle 293F_WT1_CD1d_Tet3G細胞を得た。FreeStyle™ 293-F細胞の培養は、0.1%量のゲンタマイシンを含むFreeStyle 293 Expression Mediumにて行った。FreeStyle™ 293-F細胞を 1×10^6 cells/mLの濃度に調製し、1 mL/ウェル量でFalcon (登録商標) セルカルチャー 12ウェル 細胞培養用マルチウェルプレート 平底 フタ付き (Corning社、Cat. 353043、以後12ウェルプレートという。) に播種し、(2)で作製したWT1搭載レンチウイルス50 μ LとTet3G搭載レンチウイルス100 μ Lを添加した。540 $\times$ g、室温で30分間遠心した後、ピペティングで優しく細胞を懸濁して振盪培養を行った。3日後に12ウェルプレートからCorning (登録商標) ポリカーボネート製三角フラスコベントキャップ125 mL (Corning社、Cat. 431143、以後125 mL三角フラスコという。) に継代し、さらに3日又は4日間隔で継代して11日間培養した。この細胞を再度12ウェルプレートに播種して、(2)で作製したCD1d搭載レンチウイルス100 μ Lを添加し、1回目と同様の手順で2回目のレンチウイルス感染を行った。1日後に12ウェルプレートから125 mL三角フラスコに継代し、さらに3日又は4日間隔で継代して10日間培養した。これをFreeStyle 293F_WT1_CD1d_Tet3G細胞とした。

[0073] (4) クローニング

(3)で作製したFreeStyle 293F_WT1_CD1d_Tet3G細胞から限外希釈法によるシングルセルクローニングを行い、全ての遺伝子が安定的に発現するクローンを選抜した。96ウェルプレートに1 cell/ウェルとなるように細胞を播種し、細胞の増殖に合わせて継代を行った。増殖した細胞のWT1タンパク質及びCD1dタンパク質の発現量

を、WT1はELISAにて、CD1dはフローサイトメトリーにて測定し、WT1及びCD1dタンパク質を安定的に発現するクローンを選抜した。WT1は、培地に終濃度100ng/mLのドキシサイクリン（タカラバイオ社、Cat. 631311）を添加し、Tet-On Systemを介して発現を誘導して評価を行った。ELISAには固相化用抗体としてAnti-Wilms' tumor Antibody, NT clone 6F-H2（Merck社、Cat. MAB4234-C）、一次抗体としてAnti-WT1抗体（Wuxi AppTec社、Cat. AP11964c）、二次抗体としてRabbit IgG Horseradish Peroxidase-conjugated Antibody（R&D Systems社、Cat. HAF008）を使用し、サンドイッチELISA法の一般的な測定方法に準拠して測定を行った。フローサイトメトリーには、APC Mouse Anti-Human CD1d抗体（BD Biosciences社、Cat. 563505）を使用し、FACS Verse™（BD Biosciences社）を用いて測定を行った。選抜されたクローンを、aAVC-WT1前駆細胞とした。

[0074] (5) α -GalCer積載量が異なるaAVC-WT1の作製

aAVC-WT1前駆細胞に種々の濃度の α -GalCer（十全化学株式会社）に合成を委託）を添加して培養することによりパルスを行い、 α -GalCer積載量が異なるaAVC（aAVC-WT1とも称する）を作製した。

[0075] aAVC-WT1前駆細胞を培養し、培地に終濃度100ng/mLのドキシサイクリンと、終濃度がそれぞれ56ng/mL、167ng/mL、500ng/mL、1500ng/mL又は3000ng/mLの α -GalCer溶液を添加して α -GalCerのパルスを行った。1500ng/mLの α -GalCer溶液を添加したaAVC-WT1前駆細胞の培養は、3つの異なる培養量にて独立して行った。 α -GalCer溶液は後段の実施例2（1）に準拠した方法にて作製した。添加2日後に細胞を遠心法

により回収し、洗浄と濃縮を行い、X線照射装置MBR-1520R-3又はMBR-1520R-4（株式会社 日立パワーソリューションズ）を用いて30、40又は100Gy量のX線を照射し、aAVC-WT1を作製した。

[0076] [実施例1-2：マウス型aAVC(3T3)-WT1の作製]

マウスNIH/3T3細胞(ATCC、Cat. CRL-1658)にWT1遺伝子及びCD1d遺伝子のmRNAを導入し、 α -GalCer（十全化学株式会社に合成を委託）を添加することによりマウス型aAVC(aAVC(3T3)-WT1とも称する)を作製した。

[0077] pGEM-4Zプラスミド（プロメガ社、Cat. P2161）のHindIII-EcoRIサイトに、WO2013/018778に記載のpcDNA3-ATG-WT1から制限酵素HindIII及びEcoRIにて切り出したWT1遺伝子を挿入したpGEM-4Z-WT1プラスミドを作製した。pGEM-4ZプラスミドのHindIII-BamHIサイトに配列番号5に示す塩基配列からなるマウスCD1d遺伝子（Antigen-presenting glycoprotein CD1d1、UniProt:P11609-1のアミノ酸配列（配列番号6）を基にThermo Fisher Scientific社の人工遺伝子合成サービスにてヒトのコドンへの最適化を行い、遺伝子を合成）を挿入しpGEM-4Z-mCD1dプラスミドを構築した。pGEM-4Z-WT1プラスミドとpGEM-4Z-mCD1dプラスミドをそれぞれEcoRIとBamHIで切断して直鎖にし、これらをテンプレートにmMESSAGE mMAC HINE™ T7 ULTRA Transcription Kit（Thermo Fisher Scientific社、Cat. AMB13455）を用いて、WT1 mRNAとCD1d mRNAを作製した。 α -GalCer（十全化学株式会社に合成を委託）を500ng/mL添加した10%量のウシ胎児血清を含むDulbecco's Modified Eagle培地（Thermo Fisher Scientific

社、Cat. 10569)にて2日間培養したNIH/3T3細胞を回収し、細胞懸濁液にWT1 mRNAとCD1d mRNAを添加し、NEPA 21エレクトロポレーター(ネッパジーン株式会社)を用いてエレクトロポレーション(ポアリングパルス:電圧150V、パルス幅8ms、パルス間隔50ms、回数2回、減衰率10%、極性+、トランスファーパルス:電圧20V、パルス幅50ms、パルス間隔50ms、回数±5回、減衰率40%、極性+/-)を行った。細胞を回収し、X線照射装置MBR-1520R-3(株式会社日立パワーソリューションズ)を用いて30Gy量のX線を照射し、aAVC(3T3)-WT1を作製した。

[0078] [実施例2:aAVC-WT1及びaAVC(3T3)-WT1に積載されている α -GalCer濃度の測定]

(1) α -GalCer Standard solution調製

400mLの注射用水(Thermo Fisher Scientific社 Cat. A12873-02)にSucrose(Merck社、Cat. S7903)28g及びL-histidine(Merck社、Cat. H8000)3.75gを加え、80℃の恒温水槽で加熱して溶解した。上記溶液に α -GalCer 100mg、10%ポリソルベート20(MP Biomedical社、Cat. 194724)25gを加え、80℃の恒温槽で1時間以上加熱した。溶液中の固形物が溶解していることを確認した後、注射用水を加えて500gとし、この溶液を200 μ g/mLの α -GalCer溶液とした。200 μ g/mLの α -GalCer溶液を希釈液(10%水及び90%移動相B(70%エタノール、29.5%メタノール、0.5%ギ酸))で希釈し、1000ng/mL、500ng/mL、100ng/mL、50ng/mL、10ng/mL、5ng/mL、2.5ng/mLの濃度の α -GalCer溶液をそれぞれ調製し、 α -GalCer Standard solutionとした。

[0079] (2) 細胞抽出液の調製

実施例1にて作製した、種々の濃度の α -GalCerでパルスした1×

10⁶ cellsのaAVCに1 mL又は0.25 mLのMilli-Q水を加え、超音波ホモジナイザー（SMT社、Cat. UH-50）を用いて、細胞を20秒間ホモジナイズした。ホモジナイズした細胞破碎液100 μ Lに900 μ Lの移動相Bを加え、10分以上攪拌した。10000 $\times$ gで5分間遠心し、上清250 μ Lをポリプロピレン型スクリーバイアル（GL Science社、Cat. 1030-61024）に回収し細胞抽出液を調製した。

[0080] (3) LC-MS/MS測定

(1)で調製した α -GalCer Standard solutionと、(2)で調製した細胞抽出液をLC-MS/MSの多重反応モニタリングによって測定した。 α -GalCer Standard solutionは測定回数1、細胞抽出液は(5)の表1の通り測定回数6回、3回、又は1回で測定を実施した。LCは1200 series (Agilent Technologies社)を使用し、MSは6410 Triple Quad LC-MS (Agilent Technologies社、Cat. G6410B)を使用した。LCでサンプルの分離を行った。10 μ Lの α -GalCer Standard solution及び細胞抽出液を、Accucore-150-C4 (Thermo Fisher Scientific社、Cat. 16526-103030)カラムに供し、移動相A (0.1%ギ酸)および移動相B (70%エタノール、29.5%メタノール、0.5%ギ酸)で移動相Bが60%~100%のグラジエント勾配にてサンプルを分離した。カラムへの流速は0.4 mL/分、カラム温度は40°Cで実施した。分離した溶液を順次MSに導入し、溶液中の化合物をエレクトロスプレーイオン化法によりイオン化した。発生したイオンの中から、 α -GalCerの前駆イオンとして858.7 [m/z]を選択した。さらにこの前駆イオンを分解し、696.7 [m/z]を α -GalCerのプロダクトイオンとして検出した。前駆イオンとプロダクトイオンは、 α -GalCer Standard solutionを上記L

C-MS/MSで分析して予め求めた値を使用した。

[0081] (4) 解析

解析ソフト (Agilent Technologies 社、Agilent MassHunter Quantitative Analysis) を使用して α -GalCer 濃度の定量を行った。 α -GalCer Standard solution の測定結果から α -GalCer の保持時間を判断し、測定サンプルが同様の保持時間を示すことを確認し、各測定サンプルの α -GalCer 量をピーク面積法で解析を行った。(1) で調製した α -GalCer Standard solution の解析結果から検量線を作成し、目的サンプルの定量を行った。検量線の作成には測定した 1000 ng/mL、500 ng/mL、100 ng/mL、50 ng/mL、10 ng/mL、5 ng/mL の 6 点又は 500 ng/mL、100 ng/mL、50 ng/mL、10 ng/mL、5 ng/mL、2.5 ng/mL の 6 点の中から 4 点又は 5 点の測定結果を用いた。

[0082] (5) α -GalCer 含量の測定結果

aAVC (3T3) -WT1 又は aAVC-WT1 に積載された α -GalCer 量を LC-MS/MS にて測定した結果を下表に示す。表 1 において、 α -GalCer 添加濃度 1500 ng/mL に示す 3 つの値は、培養スケールが異なる独立した 3 回の実験にて得られた細胞に積載された α -GalCer 量を示す。

[表1]

種類	α -GalCer添加濃度 (ng/mL)	積載量 (ng/10 ⁶ cells)	測定回数
aAVC(3T3) -WT1	500	2.4 [*]	1
aAVC-WT1	56	3.9 [*]	3
	167	10	3
	500	21	3
	1500	39	3
	1500	140	6
	1500	275	6
	3000	100	3

※は、測定細胞数が 10^6 細胞のときには定量下限値未満であることを示す。

[0083] [実施例 3：薬理学的に有効性を示す a A V C (3 T 3) - W T 1 の投与細胞数の設定]

aAVC(3T3)-WT1を用い、マウスB16メラノーマ細胞静注肺転移モデルにおける、aAVCに積載された α -GalCerを介したNK細胞の活性化による抗腫瘍活性を評価した。各群16例の7週齢C57BL/6J雌性マウス(日本チャールス・リバー)の尾静脈から、PBSに懸濁したB16-F10メラノーマ細胞(ATCC、Cat. CRL-6475)を 2×10^4 cells投与して、マウスB16メラノーマ細胞静注肺転移モデルを作製した。投与3時間後、前記マウスの尾静脈から、BICANATE Injection(株式会社大塚製薬工場)に懸濁したaAVC(3T3)-WT1(実施例2 表1最上段、 α -GalCer積載量は $2.4 \text{ ng}/10^6 \text{ cells}$)を、それぞれ $1.7 \times 10^4 \text{ cells/kg}$ 、 $1.7 \times 10^5 \text{ cells/kg}$ 、 $1.7 \times 10^6 \text{ cells/kg}$ となるように投与した。コントロール群には $200 \mu\text{L}$ のBICANATE Injectionを投与した。B16-F10投与から61日にわたり生存を観察した結果、コントロール群の生存期間中央値が29.5日であったのに対し、aAVC(3T3)-WT1投与群の生存期間中央値はそれぞれ、 $1.7 \times 10^4 \text{ cells/kg}$ 投与群が31.5日、 $1.7 \times 10^5 \text{ cells/kg}$ 投与群が32.5日、 $1.7 \times 10^6 \text{ cells/kg}$ 投与群が33.5日であった。

s/kg投与群が42.0日、 1.7×10^6 cells/kg投与群が37.0日であった。ログランク検定により生存期間を比較したところ、aAVC(3T3)-WT1を 1.7×10^5 cells/kg、 1.7×10^6 cells/kg投与した群は、コントロール群と比較して有意に生存期間が延長された(図1)。よって、本モデルにおいてaAVC(3T3)-WT1は 1.7×10^5 cells/kgで有効であると判定した。 α -GalCerを積載した細胞の本モデルにおける抗腫瘍効果はNK細胞欠損マウスやNK細胞の除去により減弱することが報告されている(J. Immunol.; 2007; 178: 2853-2861)。従って、本モデルにおけるaAVC(3T3)-WT1の抗腫瘍効果は、積載された α -GalCerによるNK細胞の活性化を介したものと考えられる。

[0084] [実施例4: α -GalCer積載量とNK細胞活性化]

マウス型aAVC(3T3)-WT1を用いてヒト型aAVC-WT1の薬効用量を推定するために、実施例2の表1に記載のaAVC(3T3)-WT1及び各種aAVC-WT1について、マウスにおけるNK細胞活性化能を測定し、比較を行った。この結果を用いて、ヒトにおけるaAVC-WT1投与によるNK細胞活性化を介した薬効発現に必要な α -GalCer投与量を設定した。NK細胞活性化能の指標として、aAVC(3T3)-WT1投与後の脾臓細胞中NK細胞割合を測定した。

[0085] 各群3例の5週齢C57BL/6J雌性マウス(日本チャールスリバー)の尾静脈に、BICANATE Injectionに懸濁したaAVC(3T3)-WT1と実施例2の表1に記載の α -GalCer積載量を有する各種aAVC-WT1をそれぞれ 1.7×10^4 cells/kg、 1.7×10^5 cells/kg、 1.7×10^6 cells/kg投与した。コントロール群にはBICANATE Injectionを200 μ L投与した。投与3日後にマウスを屠殺し、脾臓を摘出した。摘出した脾臓から一般的な方法に従い脾臓細胞を調製した。脾臓細胞に含まれるNK細胞を α -GalCerを結合させたrecombinant soluble di

meric mouse CD1d:lg fusion (CD1d/Gal-dimer、BD社、Cat. 557599)、APC-conjugated anti-mouse IgG1 (BD社、Cat. 560089) 及び FITC-conjugated anti-mouse CD19 (Biolegend、Cat. 115506) にて染色し、フローサイトメトリーにて測定した。NK T細胞の割合は、前方散乱光と側方散乱光のサイトグラムのリンパ球画分細胞におけるCD1d/Gal-dimer陽性且つCD19陰性の細胞の割合をFlowJo ver. 10.2 software (FlowJo, LLC) にて解析することにより算出した。結果、aAVC-WT1への α -GalCer積載量が多くなるほど、また投与細胞数が多くなるほど、脾臓細胞中NK T細胞割合が高くなる傾向となった(図2)。この結果は、投与された細胞数よりも、投与された α -GalCerの総量がNK T細胞活性化と顕著に強く相関することを示唆している。

[0086] aAVC (3T3)-WT1を 1.7×10^5 cells/kg投与した時(実施例3でコントロール群と比較して有意に生存期間が延長された投与量)の脾臓細胞中NK T細胞割合は1.1%であった(図2、aAVC (3T3)-WT1の斜線の棒グラフ)。aAVC-WT1を投与したマウスにおいて1.1%以上のNK T細胞割合を示した α -GalCerの投与量の最小値は 1.7 ng/kg (図2、 α -GalCer積載量が $10 \text{ ng}/10^6$ cellsであるaAVC-WT1 10の斜線の棒グラフ、表2、 $10 \text{ ng}/10^6$ cellsの α -GalCerを 1.7×10^5 cells/kg投与時= α -GalCer量として 1.7 ng/kg)であった。従って、 α -GalCer投与量は 1.7 ng/kg 以上であれば脾臓細胞中のNK T細胞の割合を有意に高めることができると考えられる。

また、aAVC細胞表面の α -GalCer積載量は、最小値である $3.9 \text{ ng}/10^6$ cellsの濃度であっても、 α -GalCer投与量が 1.7 ng/kg を超える投与量であれば、1.1%以上のNK T細胞割合を示し

た（図2、 α -GalCer積載量が $3.9 \text{ ng} / 10^6 \text{ cells}$ であるaAVC-WT1 3.9の黒の棒グラフ）。従って、 α -GalCer積載量が $3.9 \text{ ng} / 10^6 \text{ cells}$ 以上の濃度である細胞を用いることが望ましいと考えられる。

[0087] 表2に、実施例3及び実施例4にて使用した細胞の種類、 α -GalCer積載量、投与細胞数、及び該投与細胞数をマウスに投与した際の α -GalCer投与量をまとめた。

[表2]

種類	α -GalCer 積載量 ($\text{ng} / 10^6 \text{ cells}$)	投与細胞数 (cells / kg)	α -GalCer 投与量 (ng / kg)
aAVC (3T3) -WT1	2.4 [※]	1.7×10^4	0.041
		1.7×10^5	0.41
		1.7×10^6	4.1
aAVC-WT1	3.9 [※]	1.7×10^4	0.066
		1.7×10^5	0.66
		1.7×10^6	6.6
	10	1.7×10^4	0.17
		1.7×10^5	1.7
		1.7×10^6	17
	21	1.7×10^4	0.36
		1.7×10^5	3.6
		1.7×10^6	36
	39	1.7×10^4	0.66
		1.7×10^5	6.6
		1.7×10^6	66
	100	1.7×10^4	1.7
		1.7×10^5	17
		1.7×10^6	170
	140	1.7×10^4	2.4
		1.7×10^5	24
		1.7×10^6	238
	275	1.7×10^4	4.7
		1.7×10^5	47
		1.7×10^6	468

※は、測定細胞数が 10^6 細胞のときには定量下限値未満であることを示す。

[0088] [実施例5：マウス単回静脈内投与毒性試験]

aAVC-WT1 (α -GalCer積載量は $275\text{ ng}/10^6\text{ cells}$)をマウスに単回静脈内投与した後の毒性を評価した。動物は各群5例ずつ、8週齢C57BL/6Jの雌雄マウス(日本チャールスリバー)を使用した。投与群として、溶媒対照群、低用量群($1 \times 10^6\text{ cells/kg}$)、中用量群($1 \times 10^7\text{ cells/kg}$)及び高用量群($1 \times 10^8\text{ cells/kg}$)の4群を設定した。溶媒として細胞投与液作製にはBICANATE Injection(大塚製薬)を用い、aAVC-WT1をBICANATE Injectionに懸濁して、低用量群用投与液 $1 \times 10^5\text{ cells/mL}$ 、中用量群用投与液 $1 \times 10^6\text{ cells/mL}$ 、高用量群用投与液 $1 \times 10^7\text{ cells/mL}$ をそれぞれ調製した。マウスへの投与容量は 10 mL/kg とし、投与日に測定した体重をもとにマウスごとに投与量を算出し、溶媒又は細胞投与液をマウスの尾静脈内に単回投与した。投与後のマウスは、投与後7日間にわたり一般状態の観察、体重測定を行い、投与7日後に屠殺して剖検に供した。一般状態の観察(投与日は投与前、投与1時間後、投与4時間後の計3回、投与翌日～剖検までは1日1回の観察)において、溶媒又は各細胞投与による影響(死亡、瀕死、その他自発運動低下など)は認められなかった。体重測定は投与前日、投与日、投与翌日、3日後及び7日後に行なった。高用量群の雌雄で投与3日後に体重減少が認められた(図3)。摂餌量測定(投与3日前～投与前日、投与日～投与翌日、投与翌日～投与3日後、投与3日後～投与7日後における1日当たりの摂餌量を測定)において、中用量群の雌及び高用量群の雌雄で、投与日～投与翌日、及び投与翌日～投与3日後における摂餌量の減少が認められた(図4)。本試験結果より、低用量群においては体重及び摂餌量に影響は認められないことから、 $1 \times 10^6\text{ cells/kg}$ が体重と摂餌量に影響を及ぼさない投与量の上限(α -GalCer積載量から換算して、 α -GalCer投与量は 275 ng/kg に相当)であると考えられた。

産業上の利用可能性

[0089] 本発明は、a A V Cを用いて有効且つ安全ながんの治療又は予防に有用であることが期待される。

配列表フリーテキスト

[0090] 以下の配列表の数字見出し<223>には、「Artificial Sequence」の説明を記載する。

配列表の配列番号1で示される塩基配列は、ヒトWT1タンパク質をコードする塩基配列であり、配列表の配列番号2で示されるアミノ酸配列は、配列番号1によりコードされるアミノ酸配列である。配列番号3で示される塩基配列は、ヒトCD1dタンパク質をコードする塩基配列であり、配列表の配列番号4で示されるアミノ酸配列は、配列番号3によりコードされるアミノ酸配列である。配列番号5で示される塩基配列は、マウスCD1dタンパク質をコードする塩基配列であり、配列表の配列番号6で示されるアミノ酸配列は、配列番号5によりコードされるアミノ酸配列である。