

明 細 書

発明の名称：

腫瘍性濾胞制御性T細胞及び腫瘍性濾胞殺細胞性T細胞を定量する方法、
腫瘍性濾胞制御性T細胞及び腫瘍性濾胞殺細胞性T細胞をスクリーニング
する方法、治療用組成物、及びキット

技術分野

[0001] 本発明は、対象から採取されたT細胞中の腫瘍性濾胞制御性T細胞及び腫瘍性濾胞殺細胞性T細胞を定量する方法、対象から採取されたT細胞から腫瘍性濾胞制御性T細胞及び腫瘍性濾胞殺細胞性T細胞をスクリーニングする方法、治療用組成物、キット、濾胞性リンパ腫の予後の予測を補助するための方法、及び対象における濾胞性リンパ腫の予後の予測をする方法に関する。

本願は、2023年8月31日に、日本に出願された特願2023-141172号に基づき優先権を主張し、その内容をここに援用する。

背景技術

[0002] 濾胞性リンパ腫（follicular lymphoma：FL）は、非ホジキンリンパ腫全体の10～20%を占める、代表的なインドレント（低悪性度）B細胞リンパ腫である。日本でのFLの罹患数は、最近増加しつつある。FLは、病理組織学的にグレード1、2、3A、3Bに分類されるが、グレード3Bは、通常、アグレッシブ（中・高悪性度）リンパ腫として治療される。ほとんどの患者がリンパ節（lymph node：LN）腫大をきたして診断に至るが、診断時70～85%の患者が臨床病期III・IVの進行期であり、骨髄浸潤を高率に認める。

FLでは、一般的に経過が緩徐であり、かつ当初は化学療法感受性が良好である。しかし、FLの患者では再発を繰り返すのが一般的で、その傾向は進行期において顕著である。リツキシマブ（R）導入後の解析では、5年間で10%程度の患者がアグレッシブリンパ腫への組織学的形質転換（his

t o l o g i c t r a n s f o r m a t i o n) をきたす。R 導入以前のデータではFLの患者の50%生存期間は7～10年とされていたが、最近の報告では診断時40歳以下の患者においては50%生存期間が20年を超えるとされている。

FLにおける病期分類はAnn Arbor分類が用いられる。FLに特化した予後予測モデルとして、濾胞性リンパ腫国際予後指標 (F o l l i c u l a r L y m p h o m a I n t e r n a t i o n a l P r o g n o s t i c I n d e x : F L I P I) (非特許文献1) 及びFLIP12 (非特許文献2) がある。

診断から2年以内に病勢進行又は再発を認める症例 (P O D 2 4、非特許文献3) は予後不良と報告されるが、これを事前に予測する方法は確立していない。FLと診断されたうち、低腫瘍量の場合は「注意深い経過観察 (w a t c h a n d w a i t)」が積極的に選択される。極めて興味深いことに、「注意深い経過観察」を選択した場合、約20%の症例では自然消退を認めることが知られ、周囲の微小環境から外的な持続的刺激を受けていることが示唆される。

先行技術文献

非特許文献

[0003] 非特許文献1: Philippe Solal-Celigny, 外34名、Follicular Lymphoma International Prognostic Index、Blood、2004年9月1日、第104巻、第5号、p.1258-1265

非特許文献2: Massimo Federico, 外19名、Follicular Lymphoma International Prognostic Index 2: A New Prognostic Index for Follicular Lymphoma Developed by the International Follicular Lymphoma、Journal of Clinical Oncology、2009年9月20日、第27巻、第27号、p.4555-4562Prognostic Factor Project

非特許文献3: Carla Casulo, 外11名、Early Relapse of Follicular Lymphoma After Rituximab Plus Cyclophosphamide, Doxorubicin, Vincristine,

and Prednisone Defines Patients at High Risk for Death: An Analysis From the National LymphoCare Study, Journal of Clinical Oncology, 2015年8月10日、第23巻、第23号、p.2516-2522

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0004] 上述のFLIP1やFLIP2は、その因子として年齢を含み、全生存率を主に反映するが、抗がん剤治療の改善により現在は再発率（特に2年以内の早期再発率）が重要視されており、時代に即した新たな予後予測システムの開発が望まれている。

また、上述のPOD24は、全生存率を的確に予測はするが、この指標自体が早期再発のことであり、この因子が決定するのに24か月もかかるため診断時のリスクが不明であり初期治療の改善にも繋がられない。

[0005] 本発明は上記事情に鑑みて為されたものであり、濾胞性リンパ種の患者における予後の予測のために有用な技術を提供することを課題とする。

課題を解決するための手段

[0006] 本発明者らは、上記課題を解決すべく鋭意検討を重ねた結果、特定の抗体の組合せを用いた抗体免疫反応により、対象から採取されたT細胞中の腫瘍性濾胞制御性T細胞（T neoplastic follicular regulatory cell : Tnfr）及び腫瘍性濾胞殺細胞性T細胞（T neoplastic follicular cytotoxic cell : Tnfc）を検出できることを知得し、本発明を完成させた。

本発明の態様は以下である。

[0007] [1] 濾胞性リンパ腫の予後を予測するための、対象から採取されたT細胞中の腫瘍性濾胞制御性T細胞（Tnfr）及び腫瘍性濾胞殺細胞性T細胞（Tnfc）を定量する方法であって、

抗CD4抗体、抗CD8a抗体、抗PD-1抗体、抗CD25抗体、及び抗TIM-3抗体を用いて、フローサイトメトリー法により、対象から採取

されたT細胞中の腫瘍性濾胞制御性T細胞（T n f r）及び腫瘍性濾胞殺細胞性T細胞（T n f c）を検出及び計数するフローサイトメトリー工程、又は

抗CD4抗体、抗CD8抗体、抗PD-1抗体、抗FOXP3抗体、抗TCF-1抗体、及び抗Granzyme K抗体を用いて、多重免疫測定法により、対象から採取されたT細胞中の腫瘍性濾胞制御性T細胞（T n f r）及び腫瘍性濾胞殺細胞性T細胞（T n f c）を検出及び計数する多重免疫染色工程

を備える、方法。

[2] 前記フローサイトメトリー工程において、CD4+PD-1+CD25+細胞を腫瘍性濾胞制御性T細胞（T n f r）として検出及び計数し、CD8a+PD-1+TIM-3-細胞をCD8陽性腫瘍性濾胞殺細胞性T細胞（T n f c 8）として検出及び計数する、[1]に記載の方法。

[3] 前記多重免疫染色工程において、CD4+PD-1+FOXP3+細胞を腫瘍性濾胞制御性T細胞（T n f r）として検出及び計数し、CD8+Granzyme K+PD-1+TCF-1+細胞をCD8陽性腫瘍性濾胞殺細胞性T細胞（T n f c 8）として検出及び計数し、CD4+Granzyme K+PD-1+TCF-1+細胞をCD4陽性腫瘍性濾胞殺細胞性T細胞（T n f c 4）として検出及び計数する、[1]に記載の方法。

[0008] [4] 濾胞性リンパ腫の予後を予測するための、対象から採取されたT細胞から腫瘍性濾胞制御性T細胞（T n f r）及び腫瘍性濾胞殺細胞性T細胞（T n f c）をスクリーニングする方法であって、

抗CD4抗体、抗CD8a抗体、抗PD-1抗体、抗CD25抗体、及び抗TIM-3抗体を用いて、フローサイトメトリー法により、対象から採取されたT細胞中の腫瘍性濾胞制御性T細胞（T n f r）及び腫瘍性濾胞殺細胞性T細胞（T n f c）を検出及び計数するフローサイトメトリー工程、又は

抗CD4抗体、抗CD8抗体、抗PD-1抗体、抗FOXP3抗体、抗T

CF-1抗体、及び抗Granzyme K抗体を用いて、多重免疫測定法により、対象から採取されたT細胞中の腫瘍性濾胞制御性T細胞（Tnf r）及び腫瘍性濾胞殺細胞性T細胞（Tnf c）を検出及び計数する多重免疫染色工程を備える、方法。

[5] 前記フローサイトメトリー工程において、CD4+PD-1+CD25+細胞を腫瘍性濾胞制御性T細胞（Tnf r）として検出及び計数し、CD8a+PD-1+TIM-3-細胞をCD8陽性腫瘍性濾胞殺細胞性T細胞（Tnf c8）として検出及び計数する、[4]に記載の方法。

[6] 前記多重免疫染色工程において、CD4+PD-1+FOXP3+細胞を腫瘍性濾胞制御性T細胞（Tnf r）として検出及び計数し、CD8+Granzyme K+PD-1+TCF-1+細胞をCD8陽性腫瘍性濾胞殺細胞性T細胞（Tnf c8）として検出及び計数し、CD4+Granzyme K+PD-1+TCF-1+細胞をCD4陽性腫瘍性濾胞殺細胞性T細胞（Tnf c4）として検出及び計数する、[4]に記載の方法。

[0009] [7] 濾胞性リンパ腫を治療するための治療用組成物であって、

抗CD4抗体、抗CD8a抗体、抗PD-1抗体、抗CD25抗体、及び抗TIM-3抗体を用いて、フローサイトメトリー法により、対象から採取されたT細胞中の腫瘍性濾胞制御性T細胞（Tnf r）及び腫瘍性濾胞殺細胞性T細胞（Tnf c）を検出及び計数するフローサイトメトリー工程において、

CD4+PD-1+CD25+細胞又はCD8a+PD-1+TIM-3-細胞として検出されるT細胞を含む、治療用組成物。

[0010] [8] 濾胞性リンパ腫を治療するための治療用組成物であって、

抗CD4抗体、抗CD8抗体、抗PD-1抗体、抗FOXP3抗体、抗TCF-1抗体、及び抗Granzyme K抗体を用いて、多重免疫測定法により、対象から採取されたT細胞中の腫瘍性濾胞制御性T細胞及び腫瘍性濾胞殺細胞性T細胞を検出及び計数する多重免疫染色工程において、

CD4⁺PD-1⁺FOXP3⁺、CD8⁺Granzyme K⁺PD-1⁺TCF-1⁺細胞又はCD4⁺Granzyme K⁺PD-1⁺TCF-1⁺細胞として検出されるT細胞を含む、治療用組成物。

[9] 前記T細胞が、IL-21で前培養されたT細胞である、[7]又は[8]に記載の治療用組成物。

[10] 前記T細胞が、人為的な遺伝子改変がなされたT細胞である、[7]又は[8]に記載の治療用組成物。

[0011] [11] 抗CD4抗体、抗CD8a抗体、抗PD-1抗体、抗CD25抗体、及び抗TIM-3抗体を含む抗体セット、又は

抗CD4抗体、抗CD8抗体、抗PD-1抗体、抗FOXP3抗体、抗TCF-1抗体、及び抗Granzyme K抗体を含む抗体セットを含む、濾胞性リンパ腫の予後を予測するための、キット。

[12] 対象から採取されたT細胞の集団から腫瘍性濾胞制御性T細胞(Tnfr)及び腫瘍性濾胞殺細胞性T細胞(Tnfc)を同定、検出又はスクリーニングするための、[11]に記載のキット。

[0012] [13] 対象における濾胞性リンパ腫の予後の予測を補助するための方法であって、

抗CD4抗体、抗CD8a抗体、抗PD-1抗体、抗CD25抗体、及び抗TIM-3抗体を用いて、フローサイトメトリー法により、対象から採取されたT細胞中の腫瘍性濾胞制御性T細胞(Tnfr)及び腫瘍性濾胞殺細胞性T細胞(Tnfc)を検出及び計数するフローサイトメトリー工程、並びに

前記対象から採取されたT細胞中の腫瘍性濾胞制御性T細胞(Tnfr)、CD4陽性腫瘍性濾胞殺細胞性T細胞(Tnfc4)及びCD8陽性腫瘍性濾胞殺細胞性T細胞(Tnfc8)の割合を算出する、割合算出工程とを備える、方法。

[14] 前記割合算出工程において、CD4陽性腫瘍性濾胞殺細胞性T細胞(Tnfc4)を検出及び計数した結果に基づいて、CD8陽性腫瘍性濾

胞殺細胞性T細胞（Tnf α ）の割合を算出する、[13]に記載の方法。

[15] 対象における濾胞性リンパ腫の予後の予測を補助するための方法であって、

抗CD4抗体、抗CD8抗体、抗PD-1抗体、抗FOXP3抗体、抗TCF-1抗体、及び抗Granzyme K抗体を用いて、多重免疫測定法により、対象から採取されたT細胞中の腫瘍性濾胞制御性T細胞（Tnf γ ）及び腫瘍性濾胞殺細胞性T細胞（Tnf α ）を検出及び計数する多重免疫染色工程、並びに

前記対象から採取されたT細胞中の腫瘍性濾胞制御性T細胞（Tnf γ ）、CD4陽性腫瘍性濾胞殺細胞性T細胞（Tnf α 4）及びCD8陽性腫瘍性濾胞殺細胞性T細胞（Tnf α 8）の割合を算出する、割合算出工程とを備える、方法。

[0013] [16] 対象における濾胞性リンパ腫の予後の予測をする方法であって、

[1]～[6]のいずれか一項に記載の方法により、前記対象から採取されたT細胞中の腫瘍性濾胞制御性T細胞（Tnf γ ）及び腫瘍性濾胞殺細胞性T細胞（Tnf α ）を定量する、定量工程と、

前記定量工程で得られた定量結果に基づいて前記対象から採取されたT細胞中の腫瘍性濾胞制御性T細胞、CD4陽性腫瘍性濾胞殺細胞性T細胞（Tnf α 4）及びCD8陽性腫瘍性濾胞殺細胞性T細胞（Tnf α 8）の割合を算出する、割合算出工程と、

前記割合算出工程で算出された割合に基づいて、前記対象の予後を評価する予後評価工程と、を備え、

前記予後評価工程において、前記割合算出工程で算出された割合が、前記腫瘍性濾胞制御性T細胞（Tnf γ ）は2.0%未満であり、かつ前記CD4陽性腫瘍性濾胞殺細胞性T細胞と前記CD8陽性腫瘍性濾胞殺細胞性T細胞との合計は2.5%未満であった場合に、予後不良と評価する、方法。

発明の効果

[0014] 本発明によれば、濾胞性リンパ種の患者予後予測のために有用な技術を提供することができる。

図面の簡単な説明

[0015] [図1]図1は、実験例1の結果を示す。グラフは、フローサイトメトリーの結果を示す。

[図2]図2は、実験例2の結果を示す。画像は、多重免疫染色の結果を示す。

a. 多重免疫染色、b. T n f rの検出、c. T n f cの検出。

[図3A]図3Aは、実験例3の結果を示す。グラフは、腫瘍性濾胞制御性T細胞（T n f r）及び腫瘍性濾胞殺細胞性T細胞（T n f c）の細胞割合による濾胞性リンパ腫患者コホート（オリジナルコホートとバリデーションコホート1）の再発率（縦軸）と期間（横軸）との関係を示す。

[図3B]図3Bは、実験例3の結果を示す。グラフは、腫瘍性濾胞制御性T細胞（T n f r）及び腫瘍性濾胞殺細胞性T細胞（T n f c）の細胞割合による濾胞性リンパ腫患者コホート（バリデーションコホート2と全コホート）の再発率（縦軸）と期間（横軸）との関係を示す。

[図4]図4は、実験例3の結果を示す。グラフは、F L I P Iによるリスク分類で低リスクと判断された濾胞性リンパ腫患者コホート及び高リスクと判断された濾胞性リンパ腫患者コホート（オリジナルコホートとバリデーションコホート1）の再発率（縦軸）と期間（横軸）との関係を示す。

[図5]図5は、実験例4の結果を示す。a. T n f r及び正常リンパ節の濾胞制御性T細胞の抑制性因子遺伝子発現のバイオリンプロット；b. T n f rのT f h細胞に対する活性化抑制効果；c. T n f rのT f h細胞に対する分化抑制効果；d. T n f rの腫瘍性B細胞に対する活性化抑制効果；e. T n f rの腫瘍性B細胞に対する細胞生存抑制効果。

[図6]図6は、実験例5の結果を示す。a. T n f c 8とエフェクターC D 8細胞の遺伝子発現の比較；b. T n f c 8と疲弊C D 8細胞の遺伝子発現の比較；c. 細胞分裂能；d. インターフェロンガンマ産生能；e. T N F アルファの産生能；f. T n f c 8の腫瘍性B細胞に対する活性化抑制効果；

g. T n f c 8 の腫瘍性 B 細胞に対する殺細胞効果。

[図7]図7は、実験例6において、各細胞を T 細胞受容体 (T C R) 刺激下、 T G F (t r a n s f o r m i n g g r o w t h f a c t o r) β 1 存在下で I L - 2 1 の添加の有無を分けて培養した結果を示す。 a . I L - 2 1 による T n f r の表現系の誘導 ; b . I L - 2 1 による T n f c 8 の表現系の誘導。

[図8]図8は、実験例6において、各細胞を T C R 刺激下で、 T G F β 1 及び I L - 2 1 の添加の有無を分けて培養した結果を示す。 a . I L - 2 1 による T n f r の表現系の誘導 ; b . I L - 2 1 による T n f c 8 の表現系の誘導。

発明を実施するための形態

[0016] 本発明において、「～」を用いて数値範囲を表す場合、その数値範囲には「～」の前後の数値が含まれるものとする。

本発明において、「対象」とは、 T 細胞の採取対象のヒトであり、濾胞性リンパ腫に罹患しているヒトが好ましい。

[0017] 以下では本発明の実施形態について詳細に説明する。ただし、本発明は後述する実施形態に限定されるものではなく、本発明の要旨を逸脱しない限り、種々の変形が可能である。

[0018] [定量方法]

本発明の対象から採取された T 細胞中の腫瘍性濾胞制御性 T 細胞及び腫瘍性濾胞殺細胞性 T 細胞を定量する方法（以下、単に「定量方法」ともいう。

）は、フローサイトメトリー工程又は多重免疫染色工程を備える。

上記フローサイトメトリー工程及び多重免疫染色工程は、 i n v i t r o で行われる工程である。

[0019] <フローサイトメトリー工程>

前記フローサイトメトリー工程は、抗 C D 4 (c l u s t e r o f d i f f e r e n t i a t i o n 4) 抗体、抗 C D 8 a 抗体、抗 P D - 1 (P r o g r a m m e d C e l l D e a t h P r o t e i n 1) 抗体

、抗CD25抗体、及び抗TIM-3 (T cell immunoglobulin domain and mucin domain 3) 抗体を含む抗体セットを用いて、フローサイトメトリー法により、対象から採取されたT細胞中の腫瘍性濾胞制御性T細胞 (Tnf r) 及び腫瘍性濾胞殺細胞性T細胞 (Tnf c) を検出及び計数する工程である。

[0020] フローサイトメトリーの方法は、細胞を検出するための抗体として上述した抗体セットを用いる点を除いて、本技術分野において従来行われている方法を採用することができる。

[0021] 前述した抗体は、それ自体が蛍光標識、金属標識又はDNAバーコード標識がされた一次抗体であってもよいし、蛍光標識、金属標識又はDNAバーコード標識がされた二次抗体が特異的に結合する抗体であってもよい。

[0022] 骨髄由来の共通前駆細胞は胸腺において機能の異なる3種類のT細胞へと分化する。1つは、MHC (Major Histocompatibility Complex、主要組織適合遺伝子複合体) 分子によって提示されたペプチド抗原を認識しない $\gamma\delta$ 型受容体を発現するT細胞であり、残りの2つは $\alpha\beta$ 型受容体を発現するT細胞である。 $\alpha\beta$ 型に分化したT細胞は、胸腺で正の選択と負の選択を受ける間に、受容体のMHCに対する特異性によって、CD4又はCD8シングルポジティブ細胞へと分化する。CD4とCD8はT細胞の表面に発現する補助受容体であり、それぞれMHCクラスII分子、MHCクラスI分子の保存された領域に結合する。

[0023] 活性化T細胞上に発現しているPD-1が、がん細胞や抗原提示細胞に発現したPD-L1やPD-L2と結合すると、T細胞活性化は抑制され、がん細胞の免疫逃避を引き起こす。抗PD-1抗体は、T細胞上のPD-1に結合してPD-1とPD-L1/PD-L2の結合を阻害することにより、抑制シグナルの伝達をブロックしてT細胞の活性化を維持し、抗腫瘍効果を回復させる。

[0024] CD25 (IL-2R α 鎖、Tac又はp55) 抗原は、55 kDaの単糖鎖タンパク質で、IL-2 (IL-2R α 又はIL-2R1) の低親和性

レセプターである。CD12 (IL-2R β 鎖、p75) 及びCD132 (IL-2R γ 鎖、p64) と共に、高親和性IL-2R複合体を形成する。活性化した制御性CD4陽性T細胞に強く発現しているが、休止期のCD8陽性リンパ球には発現しない。しかし、すべての活性化T細胞はCD25タンパク質を発現している。CD25は、B細胞のサブセット (CD20陽性)、活性化した単球、マクロファージ、T細胞クローンにもみられる。遺伝子組換えによるヒト/マウスキメラ型抗CD25モノクローナル抗体 (IgG1) は、バシリキシマブ (遺伝子組換え) として知られている。

[0025] TIM-3 (別名: HAVCR2) は、近年見出されたT細胞免疫グロブリン-チンドメイン含有分子スーパーファミリー (T cell ligand and mucin domain containing molecule superfamily) のメンバーである。TIM-3は、T細胞トレランス (T cell tolerance) で重要な調節分子であり、慢性のウイルス感染時の自己免疫とT細胞の疲弊 (T cell exhaustion) に極めて重要な役割を担っている。TIM-3は、Th1細胞 (1型Tヘルパー細胞)、マクロファージ、単球、樹状細胞、CD8陽性T細胞及び他のリンパ球サブセットで発現される。TIM-3のリガンドは、ガレクチン-9 (Galectin-9) である。TIM-3-ガレクチン-9経路は、Th1細胞 (1型Tヘルパー細胞) 免疫を負に調節する。TIM3は、280残基からなる計算分子量33kDaの膜タンパク質である。

[0026] 前述した抗体セットには、さらに抗CD3抗体を含んでもよい。抗CD3抗体は、ヒトCD3分子を認識する。CD3は、T細胞レセプターの構成成分であり、T細胞のマーカーとして最も汎用される。抗CD3抗体としては、例えばヒトCD3分子の ϵ 鎖を認識する抗CD3 ϵ 抗体を用いてもよい。

[0027] 前記フローサイトメトリー工程において、腫瘍性濾胞制御性T細胞 (Tnfr) は、CD4+PD-1+CD25+細胞として検出及び計数される。

[0028] 前記フローサイトメトリー工程において、CD8陽性腫瘍性濾胞殺細胞性

T細胞（T n f c 8）は、C D 8 a + P D - 1 + T I M - 3 -細胞として検出及び計数される。

[0029] 前記フローサイトメトリー工程において、C D 4 陽性腫瘍性濾胞殺細胞性 T細胞（T n f c 4）は、直接的には検出及び計数されないが、C D 8 陽性腫瘍性濾胞殺細胞性 T細胞とC D 4 陽性腫瘍性濾胞殺細胞性 T細胞の割合は強力な相関関係があり、C D 4 陽性腫瘍性濾胞殺細胞性 T細胞の割合を算出することが可能である。具体的には、後述する実験例において示すように、169名の患者間での検討において相関係数（スピアマン）0.93の強力な正の相関関係を示した。

[0030] <多重免疫染色工程>

前記多重免疫染色工程は、抗C D 4抗体、抗C D 8抗体、抗P D - 1抗体、抗F O X P 3（f o r k h e a d b o x P 3）抗体、抗T C F - 1（T c e l l f a c t o r 1）抗体、及び抗G r a n z y m e K抗体を用いて、多重免疫測定法により、対象から採取されたT細胞中の腫瘍性濾胞制御性T細胞（T n f r）及び腫瘍性濾胞殺細胞性T細胞（T n f c）を検出及び計数する工程である。

[0031] 多重免疫染色の方法は、細胞を検出するための抗体として上述した抗体セットを用いる点を除いて、本技術分野において従来行われている方法を採用することができる。

[0032] 抗C D 4抗体及び抗P D - 1抗体は、上述したとおりである。

[0033] 前述した抗体は、それ自体が蛍光標識、金属標識又はDNAバーコード標識がされた一次抗体であってもよいし、蛍光標識、金属標識又はDNAバーコード標識がされた二次抗体が特異的に結合する抗体であってもよい。

[0034] 転写因子T細胞因子1（T C F - 1）は、W N T／－カテニンシグナリングの下流エフェクターと同様に、胸腺におけるT細胞発生に不可欠である。

[0035] F O X P 3分子は、50～55 k Dの転写因子で、I P E X、J M 2、F o r k h e a d b o x P 3、S c u r f i n としても知られている。

[0036] 前記多重免疫染色工程において、腫瘍性濾胞制御性T細胞（T n f r）は

、 $CD4+PD-1+FOXP3$ 細胞として検出及び計数される。

[0037] 前記多重免疫染色工程において、 $CD8$ 陽性腫瘍性濾胞殺細胞性T細胞（ $Tnf\alpha$ ）は、 $CD8+Granzyme\ K+PD-1+TCF-1$ 細胞として検出及び計数される。

[0038] 前記多重免疫染色工程において、 $CD4$ 陽性腫瘍性濾胞殺細胞性T細胞（ $Tnf\alpha$ ）は、 $CD4+Granzyme\ K+PD-1+TCF-1$ 細胞として検出及び計数される。

[0039] [スクリーニング方法]

本発明の対象から採取されたT細胞から腫瘍性濾胞制御性T細胞（ $Tnf\alpha$ ）及び腫瘍性濾胞殺細胞性T細胞（ $Tnf\alpha$ ）をスクリーニングする方法（以下、単に「スクリーニング方法」ともいう。）は、フローサイトメトリー工程又は多重免疫染色工程を含む。

前記フローサイトメトリー工程及び多重免疫染色工程は、上述した定量方法と同様である。

[0040] 前記フローサイトメトリー工程において、腫瘍性濾胞制御性T細胞（ $Tnf\alpha$ ）は、 $CD4+PD-1+CD25$ 細胞としてスクリーニングされ、 $CD8$ 陽性腫瘍性濾胞殺細胞性T細胞（ $Tnf\alpha$ ）は、 $CD8a+PD-1+TIM-3$ 細胞としてスクリーニングされる。

[0041] 前記多重免疫染色工程において、腫瘍性濾胞制御性T細胞（ $Tnf\alpha$ ）は、 $CD4+PD-1+FOXP3$ 細胞としてスクリーニングされ、 $CD8$ 陽性腫瘍性濾胞殺細胞性T細胞（ $Tnf\alpha$ ）は、 $CD8+Granzyme\ K+PD-1+TCF-1$ 細胞としてスクリーニングされ、 $CD4$ 陽性腫瘍性濾胞殺細胞性T細胞（ $Tnf\alpha$ ）は、 $CD4+Granzyme\ K+PD-1+TCF-1$ 細胞としてスクリーニングされる。

[0042] [T細胞]

本発明のT細胞の一実施形態は、対象から採取されたT細胞であって、抗 $CD4$ 抗体、抗 $CD8$ 抗体、抗 $PD-1$ 抗体、抗 $CD25$ 抗体、及び抗 $TIM-3$ 抗体を用いて、フローサイトメトリー法により、対象から採取された

T細胞中の腫瘍性濾胞制御性T細胞（T n f r）及び腫瘍性濾胞殺細胞性T細胞（T n f c）を検出及び計数するフローサイトメトリー工程において、CD4+PD-1+CD25+細胞又はCD8a+PD-1+TIM-3-細胞として検出されるT細胞である。

前記フローサイトメトリー工程は、前述したフローサイトメトリー工程と同様である。

[0043] 本発明のT細胞の別の一実施形態は、対象から採取されたT細胞であって、抗CD4抗体、抗CD8抗体、抗PD-1抗体、抗FOXP3抗体、抗TCF-1抗体、及び抗Granzyme K抗体を用いて、多重免疫測定法により、対象から採取されたT細胞中の腫瘍性濾胞制御性T細胞（T n f r）及び腫瘍性濾胞殺細胞性T細胞（T n f c）を検出及び計数する多重免疫染色工程において、CD4+PD-1+FOXP3+、CD8+Granzyme K+PD-1+TCF-1+細胞又はCD4+Granzyme K+PD-1+TCF-1+細胞として検出されるT細胞である。

前記多重免疫染色工程は、前述した多重免疫染色工程と同様である。

[0044] 本実施形態のT細胞は、濾胞性リンパ腫を治療するために用いることができる。

後述する実験例5～7によって示されるように、T n f rは正常リンパ節内の濾胞ヘルパーT細胞（T f h）に対する活性化抑制効果及び分化抑制効果を有している。また、T n f cは、濾胞性リンパ腫におけるがん細胞である腫瘍性B細胞に対する活性化抑制効果及び殺細胞効果を有している。

さらに、T n f rは、IL2RA、LAG3及びIL10等の抑制性遺伝子発現が亢進しており、T n f cは、濾胞構造への移動や定住を促す因子であるCXCL13やCXCR5、BCL6遺伝子を高発現し、かつ細胞の幼若性を維持するTCF7遺伝子も高発現している。

さらに、サイトカインIL-21により、制御性T細胞からT n f rを誘導でき（CXCR5及びBCL6の高発現）、かつナイーブCD8細胞からT n f c8細胞を誘導できる（CXCR5、CCR7、Granzyme

M及びTCF1の高発現)。すなわち、本実施形態のT細胞は、IL-21で前培養されたT細胞であることが好ましい。こうした細胞誘導法から、T細胞遺伝子改変治療に修飾を加え、TnfrやTnf細胞の特徴を付加することで治療効果の向上が期待される。

[0045] 患者のT細胞から抽出した腫瘍性濾胞制御性T細胞(Tnfr)及び腫瘍性濾胞殺細胞性T細胞(Tnf細胞)を用いて、直接的な知慮として使用する治療法の開発に利用することができる。

[0046] 本発明のT細胞の一実施形態は、上述の一実施形態のT細胞又は上述の別の一実施形態のT細胞が、さらに人為的な遺伝子改変がなされたものであってもよい。

[0047] 本発明において、「人為的な遺伝子改変」とは、T細胞への遺伝子導入又はT細胞の遺伝子編集によりT細胞の機能を改変することを意味する。本発明における「人為的な遺伝子改変」としては、T細胞が有する遺伝子そのものの改変であっても、T細胞が有する遺伝子そのものの欠損であっても、外来性遺伝子が導入された改変であっても、これらのうちの2種以上を組み合わせたものであってもよく、外来性遺伝子が導入された改変であることが好ましい。

[0048] 人為的な遺伝子改変の方法としては、従来公知の方法やそれに準じた方法が挙げられ、特に限定されない。例えば、ウイルスベクターを用いた方法、アグロインフェクション法、リン酸カルシウム法、マイクロインジェクション法、パーティクルガン法、DEAE-デキストラン法、電気穿孔法、カチオン性脂質法、部位特異的ヌクレアーゼ(メガヌクレアーゼ、ジンクフィンガーヌクレアーゼ、TALEN、PPR、CRISPR-Cas等)を用いたT細胞の遺伝子の編集(ゲノム編集)等が挙げられる。

人為的な遺伝子改変の方法としては、これらのうちの1種を単独であっても2種以上を組み合わせたものであってもよい。

[0049] T細胞の機能を改変させる遺伝子、すなわち、人為的な遺伝子改変により改変する目的の遺伝子としては、T細胞表面に発現するタンパク質及び少な

くとも1つの細胞内シグナリングドメインを含む融合タンパク質をコードする遺伝子、並びに、T細胞表面に発現するタンパク質、少なくとも1つの同時刺激ドメイン、及び少なくとも1つの細胞内シグナリングドメインを含む融合タンパク質をコードする遺伝子からなる群から選択される少なくとも1種であることが好ましく、抗原受容体をコードする遺伝子であることがより好ましく、T細胞受容体(TCR)をコードする遺伝子、及びキメラ抗原受容体(CAR)をコードする遺伝子からなる群から選択される少なくとも1種であることがさらに好ましく、キメラ抗原受容体(CAR)をコードする遺伝子であることが特に好ましい。

[0050] すなわち、本発明のT細胞の一実施形態としては、その表面に、人為的な遺伝子改変により改変された目的の遺伝子にコードされる表面タンパク質を発現するものであることが好ましく、このような遺伝子改変T細胞としては、例えば、人為的な遺伝子改変により改変された遺伝子にコードされるT細胞受容体(TCR)を発現するTCR-T細胞、及びキメラ抗原受容体(CAR)を発現するCAR-T細胞からなる群から選択される少なくとも1種であることがより好ましく、CAR-T細胞であることがさらに好ましい。

[0051] [治療用組成物]

本発明の治療用組成物の一実施形態は、濾胞性リンパ腫を治療するための治療用組成物であって、抗CD4抗体、抗CD8α抗体、抗PD-1抗体、抗CD25抗体、及び抗TIM-3抗体を用いて、フローサイトメトリー法により、対象から採取されたT細胞中の腫瘍性濾胞制御性T細胞及び腫瘍性濾胞殺細胞性T細胞を検出及び計数するフローサイトメトリー工程において、CD4+PD-1+CD25+細胞又はCD8α+PD-1+TIM-3-細胞として検出されるT細胞を含む、治療用組成物である。

前記T細胞としては、本実施形態のT細胞と同様である。

[0052] 或いは、本発明の治療用組成物の別の一実施形態は、濾胞性リンパ腫を治療するための治療用組成物であって、抗CD4抗体、抗CD8抗体、抗PD-1抗体、抗FOXP3抗体、抗TCF-1抗体、及び抗Granzyme

K抗体を用いて、多重免疫測定法により、対象から採取されたT細胞中の腫瘍性濾胞制御性T細胞及び腫瘍性濾胞殺細胞性T細胞を検出及び計数する多重免疫染色工程において、CD4+PD-1+FOXP3⁺、CD8+Granzyme K+PD-1+TCF-1⁺細胞又はCD4+Granzyme K+PD-1+TCF-1⁺細胞として検出されるT細胞を含む、治療用組成物である。

前記T細胞としては、本実施形態のT細胞と同様である。

[0053] 本実施形態の治療用組成物としては、本実施形態のT細胞をさらに培養して増殖させ、若しくは、遠心分離等によって濃縮して、又はこれらの方法を適宜組み合わせて得られたT細胞を含んでもよく、本実施形態のT細胞の他に公知の培地、細胞洗浄液、腑形剤及び添加剤等を含んでもよい。

[0054] 本実施形態のT細胞は、濾胞性リンパ腫を治療するための治療用組成物を製造するために使用することができる。

本実施形態の治療用組成物は、各種添加剤と共に常法により注射剤等に製剤化し、濾胞性リンパ腫の治療薬を製造するために使用することができる。

[0055] 一実施形態において、本発明は、本実施形態のT細胞又は治療用組成物を用いた濾胞性リンパ腫の患者に対する治療方法であってもよい。治療方法としては、本実施形態のT細胞又は治療用組成物を用いる点を除いて、本技術分野において従来行われている方法を採用することができる。例えば、本実施形態のT細胞又は治療用組成物を用いたキメラ抗原受容体-T細胞療法（CAR-T細胞療法）であってもよいし、本実施形態のT細胞又は治療用組成物を用いたT細胞受容体（TCR）-T細胞療法（TCR-T細胞療法）であってもよいし、本実施形態のT細胞又は治療用組成物を用いた腫瘍浸潤T細胞療法（TIL療法）であってもよい。

[0056] 本実施形態のT細胞又は治療用組成物を用いたCAR-T細胞療法は、B細胞性急性リンパ芽球性白血病、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫、多発性骨髄腫、慢性リンパ性白血病、及び急性骨髄性白血病等の患者に対する治療方法であってもよい。

[0057] 本実施形態のT細胞又は治療用組成物を用いたTCR-T細胞療法は、悪性黒色腫、卵巣がん、非小細胞肺癌、食道がん、大腸がん、滑膜肉腫、骨髄腫、骨肉腫、悪性中皮腫、成人T細胞白血病リンパ腫、骨髄異形成症候群、急性骨髄性白血病等の患者に対する治療方法であってもよい。

[0058] 本実施形態のT細胞又は治療用組成物を用いたTIL療法は、悪性黒色腫、及び子宮頸がん等の患者に対する治療方法であってもよい。

[0059] すなわち、本発明は、以下の態様を含み得る。

濾胞性リンパ腫の患者に対する治療方法であって、

抗CD4抗体、抗CD8抗体、抗PD-1抗体、抗CD25抗体、及び抗TIM-3抗体を用いて、フローサイトメトリー法により、対象から採取されたT細胞中の腫瘍性濾胞制御性T細胞(Tnf α r)及び腫瘍性濾胞殺細胞性T細胞(Tnf α c)を検出及び計数するフローサイトメトリー工程において、CD4+PD-1+CD25+細胞又はCD8 α +PD-1+TIM-3-細胞として検出されるT細胞を用いる、方法。

[0060] 或いは、

濾胞性リンパ腫の患者に対する治療方法であって、

抗CD4抗体、抗CD8抗体、抗PD-1抗体、抗FOXP3抗体、抗TCF-1抗体、及び抗Granzyme K抗体を用いて、多重免疫測定法により、対象から採取されたT細胞中の腫瘍性濾胞制御性T細胞(Tnf α r)及び腫瘍性濾胞殺細胞性T細胞(Tnf α c)を検出及び計数する多重免疫染色工程において、CD4+PD-1+FOXP3+、CD8+Granzyme K+PD-1+TCF-1+細胞又はCD4+Granzyme K+PD-1+TCF-1+細胞として検出されるT細胞を用いる、方法。

[0061] 或いは、

濾胞性リンパ腫の患者に対する治療方法であって、

抗CD4抗体、抗CD8抗体、抗PD-1抗体、抗CD25抗体、及び抗TIM-3抗体を用いて、フローサイトメトリー法により、対象から採取されたT細胞中の腫瘍性濾胞制御性T細胞(Tnf α r)及び腫瘍性濾胞殺細胞

性T細胞（T n f c）を検出及び計数するフローサイトメトリー工程において、CD4+PD-1+CD25+細胞又はCD8a+PD-1+TIM-3-細胞として検出されるT細胞を含む、治療用組成物を用いる、方法。

[0062] 或いは、

濾胞性リンパ腫の患者に対する治療方法であって、

抗CD4抗体、抗CD8抗体、抗PD-1抗体、抗FOXP3抗体、抗TCF-1抗体、及び抗Granzyme K抗体を用いて、多重免疫測定法により、対象から採取されたT細胞中の腫瘍性濾胞制御性T細胞（T n f r）及び腫瘍性濾胞殺細胞性T細胞（T n f c）を検出及び計数する多重免疫染色工程において、CD4+PD-1+FOXP3+、CD8+Granzyme K+PD-1+TCF-1+細胞又はCD4+Granzyme K+PD-1+TCF-1+細胞として検出されるT細胞を含む、治療用組成物を用いる、方法。

[0063] [キット]

本発明のキットは、抗CD4抗体、抗CD8a抗体、抗PD-1抗体、抗CD25抗体、及び抗TIM-3抗体を含む抗体セット（第1の抗体セット）、又は抗CD4抗体、抗CD8抗体、抗PD-1抗体、抗FOXP3抗体、抗TCF-1抗体、及び抗Granzyme K抗体を含む抗体セット（第2の抗体セット）を含む。

前述した第1の抗体セット及び第2の抗体セットには、いずれも、さらに抗CD3抗体又は抗CD3e抗体を含んでもよい。

[0064] 本発明のキットは、前記第1の抗体セットを用いて、フローサイトメトリー法によって、腫瘍性濾胞制御性T細胞（T n f r）及び腫瘍性濾胞殺細胞性T細胞（T n f c）を検出及び計数することができる。

[0065] 本発明のキットは、前記第2の抗体セットを用いて、多重免疫染色法によって、腫瘍性濾胞制御性T細胞（T n f r）及び腫瘍性濾胞殺細胞性T細胞（T n f c）を検出及び計数することができる。

[0066] 本発明のキットは、さらに別の構成要素を含んでもよい。例えば、実験ブ

ロトコール等を含んでもよい。

[0067] 本発明のキットは、濾胞性リンパ腫の予後を診断又は予測するために使用することができる。

[0068] 本発明のキットは、対象から採取されたT細胞の集団から腫瘍性濾胞制御性T細胞（T_nf_r）及び腫瘍性濾胞殺細胞性T細胞（T_nf_c）を同定、検出又はスクリーニングするために使用することができる。

[0069] 一実施形態において、本発明は、濾胞性リンパ腫の予後を予測するための、前記第1の抗体セット及び前記第2の抗体セットを提供する。

[0070] 一実施形態において、本発明は、濾胞性リンパ腫の予後を予測するキットを製造するための、前記第1の抗体セット及び前記第2の抗体セットの使用を提供する。

[0071] [予後予測を補助する方法]

本発明の対象における濾胞性リンパ腫の予後の予測を補助するための方法（以下、単に「予後予測を補助する方法」ともいう。）の一実施形態は、抗CD4抗体、抗CD8α抗体、抗PD-1抗体、抗CD25抗体、及び抗TIM-3抗体を用いて、フローサイトメトリー法により、対象から採取されたT細胞中の腫瘍性濾胞制御性T細胞（T_nf_r）及び腫瘍性濾胞殺細胞性T細胞（T_nf_c）を検出及び計数するフローサイトメトリー工程、並びに前記対象から採取されたT細胞中の腫瘍性濾胞制御性T細胞（T_nf_r）、CD4陽性腫瘍性濾胞殺細胞性T細胞（T_nf_c4）及びCD8陽性腫瘍性濾胞殺細胞性T細胞（T_nf_c8）の割合を算出する、割合算出工程と、を備える。

上記フローサイトメトリー工程及び割合算出工程は、*in vitro*で行われる工程である。

[0072] 前記割合算出工程において、CD4陽性腫瘍性濾胞殺細胞性T細胞（T_nf_c4）を検出及び計数した結果に基づいて、CD8陽性腫瘍性濾胞殺細胞性T細胞（T_nf_c8）の割合を算出することが好ましい。

[0073] 本発明の予後予測を補助する方法の別の一実施形態は、対象における濾胞

性リンパ腫の予後の予測を補助するための方法であって、抗CD4抗体、抗CD8抗体、抗PD-1抗体、抗FOXP3抗体、抗TCF-1抗体、及び抗Granzyme K抗体を用いて、多重免疫測定法により、対象から採取されたT細胞中の腫瘍性濾胞制御性T細胞（Tnfr）及び腫瘍性濾胞殺細胞性T細胞（Tnfc）を検出及び計数する多重免疫染色工程、並びに前記対象から採取されたT細胞中の腫瘍性濾胞制御性T細胞（Tnfr）、CD4陽性腫瘍性濾胞殺細胞性T細胞（Tnfc4）及びCD8陽性腫瘍性濾胞殺細胞性T細胞（Tnfc8）の割合を算出する、割合算出工程と、を備える。

[0074] [予後予測をする方法]

本発明の対象における濾胞性リンパ腫の予後の予測をする方法は、前述した予後予測を補助する方法の後に、前記対象から採取されたT細胞中の腫瘍性濾胞制御性T細胞（Tnfr）、CD4陽性腫瘍性濾胞殺細胞性T細胞（Tnfc4）及びCD8陽性腫瘍性濾胞殺細胞性T細胞（Tnfc8）の割合に基づいて、前記対象の予後を評価する予後評価工程を備える。

予後評価工程では、対象から採取したT細胞中の腫瘍性濾胞制御性T細胞（Tnfr）、CD4陽性腫瘍性濾胞殺細胞性T細胞（Tnfc4）及びCD8陽性腫瘍性濾胞殺細胞性T細胞（Tnfc8）の割合がTnfrは2.0%未満、Tnfc（Tnfc4とTnfc8の合計）は2.5%未満であれば、患者リスク高（予後不良）と評価し、Tnfrは2.0%以上、Tnfcは2.5%以上であれば、患者リスク低（予後不良とはいえない）と評価する。

上記予後評価工程は、*in vitro*で行われる工程である。

[0075] 或いは、本発明の対象における濾胞性リンパ腫の予後の予測をする方法は、

前述した定量方法により、前記対象から採取されたT細胞中の腫瘍性濾胞制御性T細胞（Tnfr）及び腫瘍性濾胞殺細胞性T細胞（Tnfc）を定量する、定量工程と、

前記定量工程で得られた定量結果に基づいて、前記対象から採取された T 細胞中の腫瘍性濾胞制御性 T 細胞 (T n f r)、C D 4 陽性腫瘍性濾胞殺細胞性 T 細胞 (T n f c 4) 及び C D 8 陽性腫瘍性濾胞殺細胞性 T 細胞 (T n f c 8) の割合を算出する、割合算出工程と、

前記割合算出工程で算出された割合に基づいて、前記対象の予後を評価する予後評価工程と、を備え、

前記予後評価工程において、前記割合算出工程で算出された割合が、前記腫瘍性濾胞制御性 T 細胞は 2. 0 % 未満であり、かつ前記 C D 4 陽性腫瘍性濾胞殺細胞性 T 細胞と前記 C D 8 陽性腫瘍性濾胞殺細胞性 T 細胞との合計は 2. 5 % 未満であれば、予後不良と評価し、T n f r は 2. 0 % 以上、T n f c は 2. 5 % 以上であれば、患者リスク低 (予後不良とはいえない) と評価する。

[0076] さらに、従来の F L I P I 又は F L I P I 2 等の既存の指標と組み合わせることにより、より正確な予後予測をすることができ、さらに極端に予後の良い対象 (患者) 又は極端に予後の悪い対象 (患者) を抽出することもできる。

[0077] 一実施形態において、本発明は、さらに、本実施形態の予後の予測をする方法の予後評価工程の後に他の工程を備えてもよい。他の工程としては、予後の予測の結果に基づいて、濾胞性リンパ腫の患者に対して治療する工程等が挙げられる。予後評価工程に加えて、さらに治療する工程を含む場合、本実施形態の予後の予測をする方法は、濾胞性リンパ腫の患者に対する治療方法であってもよい。

[0078] 治療する工程においては、本実施形態の予後の予測をする方法の評価結果に基づいて濾胞性リンパ腫の治療方針を決定することができる。予後不良と評価された濾胞性リンパ腫の患者に対しての治療方法としては、前述の濾胞性リンパ腫の患者に対する治療方法と同様のものが挙げられる。

実施例

[0079] 以下では実験例によって本発明をより具体的に説明する。ただし、本発明

は後述する実施例に限定されるものではない。

[0080] [実験例 1] フローサイトメトリー法による実験

通常臨床検査として行われているフローサイトメトリー法と同様の手法を用いた。

臨床リンパ腫サンプルを単一細胞に処理した後、抗CD3抗体、抗CD4抗体、抗CD8a抗体、抗PD-1抗体、抗CD25抗体、及び抗TIM-3抗体を用いてフローサイトメトリーを行った。

[0081] 患者から採取したT細胞から、CD4陽性細胞及びCD8陽性細胞が検出及び計数された(図1)。

CD4⁺(CD3⁺)PD-1⁺CD25⁺集団として、腫瘍性濾胞制御性T細胞(Tnfr)が検出できた。また、CD8⁺PD-1⁺TIM-3⁻集団として、CD8陽性腫瘍性濾胞殺細胞性T細胞(Tnfc8)が検出できた。これらの細胞のT細胞全体(CD3陽性細胞又はCD4陽性細胞とCD8陽性細胞)での割合が算出可能である。

[0082] [実験例 2] 多重免疫染色法による実験

通常臨床検査として行われている多重免疫染色法と同様の手法を用いた。

臨床リンパ腫ホルマリン固定パラフィン包埋サンプルに対して、抗CD3e抗体、抗CD4抗体、抗CD8抗体、抗PD-1抗体、抗FOXP3抗体、抗TCF-1抗体、及び抗Granzyme K抗体を用いて、Phenocycler-Fusionシステム(AKOYA社)による多重免疫染色を行った。

[0083] AKOYA社推奨のプロトコール通りに抗体を調製し実験を行った(図2 : a. 多重免疫染色)。CD4⁺PD-1⁺FOXP3⁺集団として、腫瘍性濾胞制御性T細胞(Tnfr)が検出できた(図2 : b. Tnfrの検出)。また、CD8⁺Granzyme K⁺PD-1⁺TCF-1⁺又はCD4⁺Granzyme K⁺PD-1⁺TCF-1⁺集団として、腫瘍性濾胞殺細胞性T細胞(Tnfc)が検出できた(図2 : c. Tnfcの検出)。

[0084] [実験例 3] 予後予想の具体例

PhenoCycler-Fusionシステム（AKOYA社）による多重免疫染色で算出された腫瘍性濾胞制御性T細胞（T_{nfr}）及び腫瘍性濾胞殺細胞性T細胞（T_{nf c}）の細胞割合による濾胞性リンパ腫患者の再発までの期間の層別化の具体例を示す（図3A、図3B）。

[0085] T_{nfr}及びT_{nf c}ともに、細胞割合が高い症例で、再発までの期間が有意に長く、2つの細胞の割合が両方高い症例が再発までの期間が特に長く、両方低い症例が特に短い。この結果は3つの独立した患者コホート（図3Aの「オリジナルコホート」、「バリデーションコホート1」、及び図3Bの「バリデーションコホート2」）で確認された。また、この予後予測は、FLIPIとも独立しており、FLIPIによるリスク分類で低リスク（FLIPI低リスク）と判断された患者コホートと高リスク（FLIPI高リスク）と判断された患者コホートにおいてその効果が確認された（図4）。

[0086] [実験例4]

（1）T_{nfr}及び正常リンパ節の濾胞制御性T細胞の抑制性因子遺伝子発現を、一細胞RNAシーケンスデータにより比較した。

図5のaにT_{nfr}及び正常リンパ節の濾胞制御性T細胞の抑制性因子遺伝子発現のバイオリンプロットを示す。T_{nfr}において抑制性遺伝子発現が亢進していることが示された。

[0087] （2）T_{nfr}細胞のT_{fh}細胞に対する活性化抑制効果及び分化抑制効果を検証した。

T_{fh}細胞は濾胞性リンパ腫におけるがん細胞である腫瘍性B細胞と活発に相互作用を起こすことでリンパ腫の進展を促す。そのT_{fh}とT_{nfr}をT細胞受容体（TCR）刺激下で共培養したところ、T_{fh}単独培養の場合と比較してCD25陽性の活性化T_{fh}細胞の割合が低下すること（図5：b、T_{nfr}のT_{fh}細胞に対する活性化抑制効果）、及び細胞トラッキング試薬で捉えられるT_{fh}の分裂活動が低下していること（図5：c、T_{nfr}のT_{fh}細胞に対する分化抑制効果）が示された。

[0088] （3）T_{nfr}の腫瘍性B細胞に対する活性化抑制効果及びT_{nfr}の腫瘍

性B細胞に対する細胞生存抑制効果を検証した。

腫瘍性B細胞のみ、腫瘍性B細胞及びTfh細胞の共培養、並びに腫瘍性B細胞、Tfh細胞及びTnfrの共培養を行ったところ、腫瘍性B細胞のみの培養時に比べ、腫瘍性B細胞及びTfh細胞の共培養では腫瘍性B細胞の活性化効果（図5：d、Tnfrの腫瘍性B細胞に対する活性化抑制効果）及び腫瘍性B細胞の細胞生存促進効果（図5：e、Tnfrの腫瘍性B細胞に対する細胞生存抑制効果）が確認された。さらに腫瘍性B細胞、Tfh細胞及びTnfrの共培養を行ったところ、腫瘍性B細胞の活性化マーカーCD86陽性細胞割合の低下、すなわちTfh細胞の腫瘍性B細胞に対する活性化効果の減弱（図5：d）、及び腫瘍性B細胞の細胞死マーカーAnnexinV陽性細胞割合の増加、すなわち、Tfh細胞の腫瘍性B細胞に対する細胞生存促進効果の減弱（図5：e）が示された。

[0089] [実験例5]

(1) Tnfc8とエフェクターCD8⁺T細胞（エフェクターCD8細胞）、又はTnfc8と疲弊CD8⁺T細胞（疲弊CD8細胞）の遺伝子発現を比較解析した。Tnfc8とエフェクターCD8細胞の遺伝子発現情報、又はTnfc8と疲弊CD8細胞の遺伝子発現情報を抽出し、比較解析を行い発現に差がみられた遺伝子をボルケイノプロットに示した（図6：a、Tnfc8とエフェクターCD8細胞の遺伝子発現の比較；b、Tnfc8と疲弊CD8細胞の遺伝子発現の比較）。Tnfc8は濾胞構造への移動や定住を促す因子であるCXCL13やCXCR5、BCL6遺伝子を高発現し、かつ細胞の幼若性を維持するTCF7遺伝子も高発現している。疲弊CD8細胞と比べ、疲弊マーカーであるLAG3やHAVCR2の発現が低下しており、このことから幼若性を有していることがわかった。

[0090] (2) 細胞分裂能測定実験により細胞幼若性を検証した。

細胞分裂をトレースする細胞トラッキング試薬を用い、T細胞受容体（TCR）を刺激して分裂を促したところ、疲弊CD8細胞と比べてTnfc8が高い細胞分裂能を保っていることがわかった（図6：c、細胞分裂能）。

[0091] (3) 殺細胞性の指標となるサイトカイン産生能を測定した。

細胞をPMA (phorbol myristate acetate) / ionomycinにて刺激してインターフェロンガンマ (図6 : d) 及びTNF (tumor necrosis factor : 腫瘍壊死因子) アルファ (図6 : e) の産生能を評価したところ、ナイーブCD8細胞に比べて高い産生能が保たれていることがわかった。

[0092] (4) Tnf α の腫瘍性B細胞に対する活性化抑制効果及び殺細胞効果を検証した。

濾胞性リンパ腫におけるがん細胞である腫瘍性B細胞のみ、腫瘍性B細胞及びTnf α の共培養、腫瘍性B細胞及びエフェクターCD8細胞、並びに腫瘍性B細胞及び疲弊CD8細胞の共培養を行ったところ、エフェクターCD8細胞ほどではないものの、Tnf α との共培養によって腫瘍性B細胞の活性化が有意に抑制されること (図6 : f. Tnf α の腫瘍性B細胞に対する活性化抑制効果)、及び細胞死が促進されること (図6 : g. Tnf α の腫瘍性B細胞に対する殺細胞効果) が示された。

[0093] [実験例6]

(1) a、サイトカインIL-21による制御性T細胞からのTnf α 誘導実験。

ヒトのリンパ節内の制御性T細胞をTCR刺激下、TGF β 1 (transforming growth factor) β 1存在下でIL-21の添加の有無を分けて培養したところ、IL-21の存在下でTnf α の特徴であるCXCR5の高発現が誘導された (図7 : a. IL-21によるTnf α の表現系の誘導)。また、ヒトのリンパ節内の制御性T細胞をTCR刺激下で、TGF β 1及びIL-21の添加の有無を分けて培養したところ、IL-21の存在下でTnf α の特徴であるCXCR5及びBCL6の高発現が誘導された (図8 : a. IL-21によるTnf α の表現系の誘導)。

[0094] (2) サイトカインIL-21によるナイーブCD8細胞からのTnf α 誘導実験。

ヒトのリンパ節内のナイーブCD8細胞をTCR刺激下、TGFβ1存在下でIL-21の添加の有無を分けて培養したところ、IL-21の存在下でTnfαの特徴であるCXCR5（上）とCCR7（下）の高発現が誘導された（図7：b. IL-21によるTnfαの表現系の誘導）。また、ヒトのリンパ節内のナイーブCD8細胞をTCR刺激下で、TGFβ1及びIL-21の添加の有無を分けて培養したところ、IL-21の存在下でTnfαの特徴であるGranzyme M及びTCF1の高発現が誘導された（図8：b. IL-21によるTnfαの表現系の誘導）。

[0095] こうした細胞誘導法から、現在研究が進んでいるT細胞遺伝子改変治療に修飾を加え、TnfαやTnfα細胞の特徴を付加することで治療効果の向上が期待される。

[0096] 以上、本発明の好ましい実施形態を説明及び図示してきたが、これらは本発明を例示するものであり、限定的なものとみなされるべきではないことを理解すべきである。本発明の精神又は範囲から逸脱することなく、追加、省略、置換、及びその他の変更を行うことができる。したがって、本発明は、前述の説明によって限定されるものとはみなされず、添付の請求の範囲によってのみ限定される。

産業上の利用可能性

[0097] 本発明を実施することにより、濾胞性リンパ腫患者の初診時における患者の予後をより正確に予測できるようになる。

また、腫瘍性濾胞制御性T細胞（Tnfα）及び腫瘍性濾胞殺細胞性T細胞（Tnfα）を抽出し、直接的な治療として使用する治療法の開発に利用することが期待される。

請求の範囲

- [請求項1] 濾胞性リンパ腫の予後を予測するための、対象から採取されたT細胞中の腫瘍性濾胞制御性T細胞及び腫瘍性濾胞殺細胞性T細胞を定量する方法であって、
- 抗CD4抗体、抗CD8a抗体、抗PD-1抗体、抗CD25抗体、及び抗TIM-3抗体を用いて、フローサイトメトリー法により、対象から採取されたT細胞中の腫瘍性濾胞制御性T細胞及び腫瘍性濾胞殺細胞性T細胞を検出及び計数するフローサイトメトリー工程、又は
- 抗CD4抗体、抗CD8抗体、抗PD-1抗体、抗FOXP3抗体、抗TCF-1抗体、及び抗Granzyme K抗体を用いて、多重免疫測定法により、対象から採取されたT細胞中の腫瘍性濾胞制御性T細胞及び腫瘍性濾胞殺細胞性T細胞を検出及び計数する多重免疫染色工程
- を備える、方法。
- [請求項2] 前記フローサイトメトリー工程において、CD4+PD-1+CD25+細胞を腫瘍性濾胞制御性T細胞として検出及び計数し、CD8a+PD-1+TIM-3-細胞をCD8陽性腫瘍性濾胞殺細胞性T細胞として検出及び計数する、請求項1に記載の方法。
- [請求項3] 前記多重免疫染色工程において、CD4+PD-1+FOXP3+細胞を腫瘍性濾胞制御性T細胞として検出及び計数し、CD8+Granzyme K+PD-1+TCF-1+細胞をCD8陽性腫瘍性濾胞殺細胞性T細胞として検出及び計数し、CD4+Granzyme K+PD-1+TCF-1+細胞をCD4陽性腫瘍性濾胞殺細胞性T細胞として検出及び計数する、請求項1に記載の方法。
- [請求項4] 濾胞性リンパ腫の予後を予測するための、対象から採取されたT細胞から腫瘍性濾胞制御性T細胞及び腫瘍性濾胞殺細胞性T細胞をスクリーニングする方法であって、

抗CD4抗体、抗CD8a抗体、抗PD-1抗体、抗CD25抗体、及び抗TIM-3抗体を用いて、フローサイトメトリー法により、対象から採取されたT細胞中の腫瘍性濾胞制御性T細胞及び腫瘍性濾胞殺細胞性T細胞を検出及び計数するフローサイトメトリー工程、又は

抗CD4抗体、抗CD8抗体、抗PD-1抗体、抗FOXP3抗体、抗TCF-1抗体、及び抗Granzyme K抗体を用いて、多重免疫測定法により、対象から採取されたT細胞中の腫瘍性濾胞制御性T細胞及び腫瘍性濾胞殺細胞性T細胞を検出及び計数する多重免疫染色工程を備える、方法。

[請求項5] 前記フローサイトメトリー工程において、CD4+PD-1+CD25+細胞を腫瘍性濾胞制御性T細胞として検出及び計数し、CD8a+PD-1+TIM-3-細胞をCD8陽性腫瘍性濾胞殺細胞性T細胞として検出及び計数する、請求項4に記載の方法。

[請求項6] 前記多重免疫染色工程において、CD4+PD-1+FOXP3+細胞を腫瘍性濾胞制御性T細胞として検出及び計数し、CD8+Granzyme K+PD-1+TCF-1+細胞をCD8陽性腫瘍性濾胞殺細胞性T細胞として検出及び計数し、CD4+Granzyme K+PD-1+TCF-1+細胞をCD4陽性腫瘍性濾胞殺細胞性T細胞として検出及び計数する、請求項4に記載の方法。

[請求項7] 濾胞性リンパ腫を治療するための治療用組成物であって、
抗CD4抗体、抗CD8a抗体、抗PD-1抗体、抗CD25抗体、及び抗TIM-3抗体を用いて、フローサイトメトリー法により、対象から採取されたT細胞中の腫瘍性濾胞制御性T細胞及び腫瘍性濾胞殺細胞性T細胞を検出及び計数するフローサイトメトリー工程において、
CD4+PD-1+CD25+細胞又はCD8a+PD-1+TIM-

3-細胞として検出されるT細胞を含む、治療用組成物。

[請求項8] 濾胞性リンパ腫を治療するための治療用組成物であって、
抗CD4抗体、抗CD8抗体、抗PD-1抗体、抗FOXP3抗体、抗TCF-1抗体、及び抗Granzyme K抗体を用いて、多重免疫測定法により、対象から採取されたT細胞中の腫瘍性濾胞制御性T細胞及び腫瘍性濾胞殺細胞性T細胞を検出及び計数する多重免疫染色工程において、

CD4+PD-1+FOXP3⁺、CD8+Granzyme K+PD-1+TCF-1⁺細胞又はCD4+Granzyme K+PD-1+TCF-1⁺細胞として検出されるT細胞を含む、治療用組成物。

[請求項9] 前記T細胞が、IL-21で前培養されたT細胞である、請求項7又は8に記載の治療用組成物。

[請求項10] 前記T細胞が、人為的な遺伝子改変がなされたT細胞である、請求項7又は8に記載の治療用組成物。

[請求項11] 抗CD4抗体、抗CD8a抗体、抗PD-1抗体、抗CD25抗体、及び抗TIM-3抗体を含む抗体セット、又は
抗CD4抗体、抗CD8抗体、抗PD-1抗体、抗FOXP3抗体、抗TCF-1抗体、及び抗Granzyme K抗体を含む抗体セット
を含む、濾胞性リンパ腫の予後を予測するための、キット。

[請求項12] 対象から採取されたT細胞の集団から腫瘍性濾胞制御性T細胞及び腫瘍性濾胞殺細胞性T細胞を同定、検出又はスクリーニングするための、請求項11に記載のキット。

[請求項13] 対象における濾胞性リンパ腫の予後の予測を補助するための方法であって、

抗CD4抗体、抗CD8a抗体、抗PD-1抗体、抗CD25抗体、及び抗TIM-3抗体を用いて、フローサイトメトリー法により、

対象から採取された T 細胞中の腫瘍性濾胞制御性 T 細胞及び腫瘍性濾胞殺細胞性 T 細胞を検出及び計数するフローサイトメトリー工程、並びに

前記対象から採取された T 細胞中の腫瘍性濾胞制御性 T 細胞、CD 4 陽性腫瘍性濾胞殺細胞性 T 細胞及び CD 8 陽性腫瘍性濾胞殺細胞性 T 細胞の割合を算出する、割合算出工程とを備える、方法。

[請求項14] 前記割合算出工程において、CD 4 陽性腫瘍性濾胞殺細胞性 T 細胞を検出及び計数した結果に基づいて、CD 8 陽性腫瘍性濾胞殺細胞性 T 細胞の割合を算出する、請求項 13 に記載の方法。

[請求項15] 対象における濾胞性リンパ腫の予後の予測を補助するための方法であって、

抗 CD 4 抗体、抗 CD 8 抗体、抗 PD-1 抗体、抗 FOXP 3 抗体、抗 TCF-1 抗体、及び抗 Granzyme K 抗体を用いて、多重免疫測定法により、対象から採取された T 細胞中の腫瘍性濾胞制御性 T 細胞及び腫瘍性濾胞殺細胞性 T 細胞を検出及び計数する多重免疫染色工程、並びに

前記対象から採取された T 細胞中の腫瘍性濾胞制御性 T 細胞、CD 4 陽性腫瘍性濾胞殺細胞性 T 細胞及び CD 8 陽性腫瘍性濾胞殺細胞性 T 細胞の割合を算出する、割合算出工程とを備える、方法。

[請求項16] 対象における濾胞性リンパ腫の予後の予測をする方法であって、請求項 1～6 のいずれか一項に記載の方法により、前記対象から採取された T 細胞中の腫瘍性濾胞制御性 T 細胞及び腫瘍性濾胞殺細胞性 T 細胞を定量する、定量工程と、

前記定量工程で得られた定量結果に基づいて前記対象から採取された T 細胞中の腫瘍性濾胞制御性 T 細胞、CD 4 陽性腫瘍性濾胞殺細胞性 T 細胞及び CD 8 陽性腫瘍性濾胞殺細胞性 T 細胞の割合を算出する

、割合算出工程と、

前記割合算出工程で算出された割合に基づいて、前記対象の予後を評価する予後評価工程と、を備え、

前記予後評価工程において、前記割合算出工程で算出された割合が、前記腫瘍性濾胞制御性T細胞は2.0%未満であり、かつ前記CD4陽性腫瘍性濾胞殺細胞性T細胞と前記CD8陽性腫瘍性濾胞殺細胞性T細胞との合計は2.5%未満であった場合に、予後不良と評価する方法。