明　細　書

発明の名称 ：

免疫機能制御因子を発現する免疫担当細胞及び発現ベクター

技術分野

[0001] 本発明は、がん抗原を特異的に認識する細胞表面分子、インターロイキン７（ＩＬ－７）、及びＣＣＬ１９を発現する免疫担当細胞や、かかる免疫担当細胞を含有する抗がん剤や、かかる免疫担当細胞を作製するための発現ベクターに関する。

背景技術

[0002] がんは世界中で多くの罹患者がいる疾患であり、一般的に化学療法、放射線療法、又は外科療法が広く行われている。しかしながら、副作用が生じることや、一部の機能が失われることや、転移を治療しにくいこと等、様々な問題があった。

[0003] そこで、より患者のＱＯＬを高く維持すべく、近年、免疫療法の開発が進められている。この免疫療法において、免疫細胞療法は、患者から免疫担当細胞を採取し、かかる免疫担当細胞の免疫機能を高めるように処置して増幅し、再度患者に移入する療法である。具体的には、患者からＴ細胞を採取し、かかるＴ細胞にＣＡＲをコードする遺伝子を導入して増幅し、再度患者に移入する療法（非特許文献１参照）が知られている。この療法は、現在世界中で臨床試験が進行しており、白血病やリンパ腫等の造血器悪性腫瘍等において有効性を示す結果が得られている。

[0004] また、Ｔ細胞等の免疫担当細胞の免疫機能制御因子としては、サイトカイン、ケモカイン、シグナル制御タンパク質等、少なくとも数百種類の因子が知られている。その中でインターロイキン７（ＩＬ－７）はＴ細胞の生存に必須のサイトカインであり、骨髄、胸腺、リンパ器官・組織のストローマ細胞等の非造血細胞によって産生されることが知られている。かかるＩＬ－７の機能を利用したＴ細胞として、ＩＬ－７とＩＬ－７Ｒアルファを融合した

キメラサイトカイン受容体を発現するＴ細胞（特許文献１参照）が開示されている。しかしながら、かかるＴ細胞におけるキメラサイトカイン受容体は、一つの融合タンパク質として、導入したＴ細胞の膜表面に限定して発現し、自己の細胞に対してのみリガンド非依存的にＩＬ－７Ｒ等のサイトカインシグナルを伝達するものに過ぎず、上記受容体を導入していないＴ細胞の機能を高めることはできなかった。

[0005] また、ＣＣＬ１９やＣＣＬ２１、ＩＬ－７の発現低下がＳＩＲＰアルファ変異マウスにおける脾臓でのＴ細胞領域の維持欠損の原因となること（非特許文献２参照）や、ＣＣＬ１９やＣＣＬ２１、ＩＬ－７が二次リンパ組織（脾臓やリンパ節）においてＴ細胞の恒常性を維持する働きを有していること（非特許文献３参照）が開示されている。しかしながら、上記非特許文献２、３は二次リンパ組織のＴ細胞領域に恒常的に存在する非活性化Ｔ細胞に対した作用を示したものであり、抗腫瘍免疫応答と直接的な関係性を示すものではなかった。さらに、上記非特許文献２、３におけるＣＣＬ１９やＣＣＬ２１、ＩＬ－７発現細胞はＴ細胞ではなく、二次リンパ組織に存在する細網内皮系の細胞であった。

[0006] 一方、Ｔ細胞受容体（Ｔ ｃｅｌｌ ｒｅｃｅｐｔｏｒ：以下、「ＴＣＲ」ともいう）はＴ細胞の細胞膜上に発現している抗原受容体分子である。アルファ鎖とベータ鎖、又はガンマ鎖とデルタ鎖からなるヘテロ二量体として存在しており、主要組織適合遺伝子複合体（ＭＨＣ）分子に結合した抗原分子を認識することでＴ細胞を活性化することが知られている。

[0007] かかるＴＣＲの機能を応用し、がん細胞に発現する腫瘍抗原を認識できるＴＣＲ遺伝子をがん患者から得られたＴ細胞に導入し、増幅後に再度患者に移入する免疫療法の開発が進められている。具体的には、ＷＴ１発現細胞を特異的に認識するＴＣＲを発現する細胞を含有する髄膜腫治療用医薬組成物（特許文献２参照）が開示されている。

[0008] 上記技術の一部には、造血器悪性腫瘍に対する抗腫瘍効果を認めるものがあるものの、固形がんに対しては未だに顕著な効果が示された例は無い。こ

れは移入した免疫担当細胞の生体内での生存効率が低い、あるいは移入した免疫担当細胞により誘導される内在性免疫担当細胞の活性化や、腫瘍局所への集積が不十分という問題が考えられており、それらを解決する技術の開発が求められていた。

先行技術文献

特許文献

[0009] 特許文献1：国際公開第２０１３／１２３０６１号パンフレット

特許文献2：特開２０１３－１１６８９１号公報

[0010] 非特許文献1：中沢洋三　信州医誌　６１（４）：１９７～２０３（２０１３）

非特許文献2：SATO-HASHIMOTO M. et al., J. Immunol., 2011, vol.187, no. 1,291-7

非特許文献3：SIEGERT S. et al., Front. Immunol., 2012, vol.3, article 285

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0011] 従来の免疫療法に用いる免疫担当細胞においては、内在性免疫担当細胞の免疫誘導効果や、免疫担当細胞の増殖能、生存能、又はＴ細胞の集積能が十分に増強されていなかった。そこで、本発明の課題は、免疫担当細胞において免疫担当細胞の免疫機能制御因子を発現し、増殖能、生存能、及びＴ細胞の集積能を併せ持つ免疫担当細胞や、かかる免疫担当細胞を作製するための免疫機能制御因子発現ベクターを提供することにある。

課題を解決するための手段

[0012] 発明者らは、免疫担当細胞を利用したがん免疫療法において、より優れた免疫誘導効果や抗腫瘍活性を達成することを目的として、免疫機能制御因子を発現する細胞の改良を試みた。その過程で、免疫担当細胞の免疫機能を制御する因子であるサイトカイン、ケモカイン、シグナル制御タンパク質に着

目し、前記免疫担当細胞の免疫機能を制御する因子を発現するベクターを構築した。かかる発現ベクターを免疫担当細胞に導入したところ、従来の免疫担当細胞よりも優れた免疫誘導効果、増殖能、生存能並びにＴ細胞の集積能を有する免疫担当細胞を作製することができることを見いだし、本発明を完成した。

[0013] すなわち、本発明は以下の（１）～（９）に開示されるとおりのものである。

（１）がん抗原を特異的に認識する細胞表面分子、インターロイキン７（ＩＬ－７）、及びＣＣＬ１９を発現する免疫担当細胞。

（２）がん抗原を特異的に認識する細胞表面分子が、がん抗原を特異的に認識するＴ細胞受容体であることを特徴とする上記（１）記載の免疫担当細胞。

（３）免疫担当細胞がＴ細胞であることを特徴とする上記（１）又は（２）記載の免疫担当細胞。

（４）がん抗原が、ＷＴ１、ＭＡＲＴ－１、ＮＹ－ＥＳＯ－１、ＭＡＧＥ－Ａ１、ＭＡＧＥ－Ａ３、ＭＡＧＥ－Ａ４、Ｇｌｙｐｉｃａｎ－３、ＫＩＦ２０Ａ、Ｓｕｒｖｉｖｉｎ、ＡＦＰ－１、ｇｐ１００、ＭＵＣ１、ＰＡＰ－１０、ＰＡＰ－５、ＴＲＰ２－１、ＳＡＲＴ－１、ＶＥＧＦＲ１、ＶＥＧＦＲ２、ＮＥＩＬ３、ＭＰＨＯＳＰＨ１、ＤＥＰＤＣ１、ＦＯＸＭ１、ＣＤＨ３、ＴＴＫ、ＴＯＭＭ３４、ＵＲＬＣ１０、ＫＯＣ１、ＵＢＥ２Ｔ、ＴＯＰＫ、ＥＣＴ２、ＭＥＳＯＴＨＥＬＩＮ、ＮＫＧ２Ｄ、Ｐ１Ａ、ＧＤ２、又はＧＭ２であることを特徴とする上記（１）～（３）のいずれか１つに記載の免疫担当細胞。

（５）上記（１）～（４）のいずれか１つに記載の免疫担当細胞を作製するための以下の（ａ）～（ｅ）のいずれかの発現ベクター。

（ａ）がん抗原を特異的に認識する細胞表面分子をコードする核酸、ＩＬ－７をコードする核酸、及びＣＣＬ１９をコードする核酸を含有する発現ベクター：

（ｂ）以下の（ｂ－１）及び（ｂ－２）の２つの発現ベクター：

（ｂ－１）がん抗原を特異的に認識する細胞表面分子をコードする核酸を含有する発現ベクター；

（ｂ－２）ＩＬ－７をコードする核酸、及びＣＣＬ１９をコードする核酸を含有する発現ベクター；

（ｃ）以下の（ｃ－１）及び（ｃ－２）の２つの発現ベクター：

（ｃ－１）がん抗原を特異的に認識する細胞表面分子をコードする核酸、及びＩＬ－７をコードする核酸を含有する発現ベクター；

（ｃ－２）ＣＣＬ１９をコードする核酸を含有する発現ベクター；

（ｄ）以下の（ｄ－１）及び（ｄ－２）の２つの発現ベクター：

（ｄ－１）ＩＬ－７をコードする核酸を含有する発現ベクター；

（ｄ－２）がん抗原を特異的に認識する細胞表面分子をコードする核酸、及びＣＣＬ１９をコードする核酸を含有する発現ベクター；

（ｅ）以下の（ｅ－１）、（ｅ－２）及び（ｅ－３）の３つの発現ベクター：

（ｅ－１）がん抗原を特異的に認識する細胞表面分子をコードする核酸を含有する発現ベクター；

（ｅ－２）ＩＬ－７をコードする核酸を含有する発現ベクター；

（ｅ－３）ＣＣＬ１９をコードする核酸を含有する発現ベクター；

（６）がん抗原を特異的に認識する細胞表面分子が、がん抗原を特異的に認識するＴ細胞受容体であることを特徴とする上記（５）記載の発現ベクター。

（７）（ａ）の発現ベクターにおける、がん抗原を特異的に認識する細胞表面分子をコードする核酸、ＩＬ－７をコードする核酸、及び、ＣＣＬ１９をコードする核酸、

（ｂ－２）の発現ベクターにおける、ＩＬ－７をコードする核酸、及びＣＣＬ１９をコードする核酸、

（ｃ－１）の発現ベクターにおける、がん抗原を特異的に認識する細胞表面

分子をコードする核酸、及びＩＬ－７をコードする核酸、又は
（ｄ－２）の発現ベクターにおける、がん抗原を特異的に認識する細胞表面分子をコードする核酸、及びＣＣＬ１９をコードする核酸、
が自己切断型ペプチドを介して連結されていることを特徴とする上記（５）又は（６）記載の発現ベクター。
（８）自殺遺伝子をコードする核酸を含有することを特徴とする上記（５）～（７）のいずれか１つに記載の発現ベクター。
（９）上記（１）～（４）のいずれか１つに記載の免疫担当細胞と、薬学的に許容される添加剤とを含有する抗がん剤。

発明の効果

[0014] 本発明のがん抗原を特異的に認識する細胞表面分子、ＩＬ－７、及びＣＣＬ１９を発現する免疫担当細胞（以下、「ＩＬ－７×ＣＣＬ１９発現免疫担当細胞」ともいう）を用いれば、抗腫瘍活性を有し、細胞表面分子が特異的に認識する抗原を有するがん細胞によって形成された腫瘍による生存率低下を抑制することが可能となる。また、本発明の発現ベクターを用いれば、増殖能、生存能及びＴ細胞集積能を併せ持つ免疫担当細胞を作製することが可能となる。

図面の簡単な説明

[0015] [図1]ＩＬ－７×ＣＣＬ１９発現ベクターのマップを示す図である。
[図2A]ＩＬ－７／ＣＣＬ１９発現Ｔ細胞の細胞数を調べた結果を示す図である。
[図2B]ＩＬ－７／ＣＣＬ１９発現Ｔ細胞の生存率を調べた結果を示す図である。
[図3]ＩＬ－７／ＣＣＬ１９発現Ｔ細胞によるＴ細胞遊走試験の結果を示す図である。
[図4]ＩＬ－７×ＣＣＬ１９×ＨＳＶ－ＴＫ発現ベクターのマップを示す図である。
[図5]ＴＣＲ×ＩＬ－７×ＣＣＬ１９発現ベクターのマップを示す図である。

[図6]ＩＬ－７×ＣＣＬ１９×ｅＧＦＰ発現ベクターのマップを示す図である。

[図7]未処理マウス、Ｐ１Ａ特異的ＴＣＲ／ｅＧＦＰ発現Ｔ細胞を投与したマウス、及びＰ１Ａ特異的ＴＣＲ／ＩＬ－７／ＣＣＬ１９／ｅＧＦＰ発現Ｔ細胞を投与したマウスの生存率を示す図である。

[図8]未処理マウス、Ｐ１Ａ特異的ＴＣＲ／ｅＧＦＰ発現Ｔ細胞を投与したマウス、及びＰ１Ａ特異的ＴＣＲ／ＩＬ－７／ＣＣＬ１９／ｅＧＦＰ発現Ｔ細胞を投与したマウスの腫瘍体積を調べた結果を示す図である。

発明を実施するための形態

[0016] 本発明のＩＬ－７×ＣＣＬ１９発現免疫担当細胞は、がん抗原を特異的に認識する細胞表面分子、インターロイキン７（ＩＬ－７）、及びＣＣＬ１９を発現していれば特に制限されず、さらに、ＩＬ－１５、ＣＣＬ２１、ＩＬ－２、ＩＬ－４、ＩＬ－１２、ＩＬ－１３、ＩＬ－１７、ＩＬ－１８、ＩＰ－１０、ＣＣＬ４、ＦＩｔ３Ｌ、ｎｔｅｒｆｅｒｏｎ－ｇａｍｍａ、ＭＩＰ－１ａｌｐｈａ、ＧＭ－ＣＳＦ、Ｍ－ＣＳＦ、ＴＧＦ－ｂｅｔａ、ＴＮＦ－ａｌｐｈａ等の他の免疫機能制御因子を発現していてもよい。

[0017] がん抗原とは、がん細胞において正常細胞よりも高く発現する、あるいはがん細胞に特異的に発現するタンパク質、糖脂質等の物質を意味し、かかるがん抗原としては、腫瘍関連抗原や癌精巣抗原、血管新生関連抗原、遺伝子変異によるがん新生抗原（ネオアンチゲン）のエピトープペプチドを挙げることができ、具体的には、ＷＴ１、ＭＡＲＴ－１、ＮＹ－ＥＳＯ－１、ＭＡＧＥ－Ａ１、ＭＡＧＥ－Ａ３、ＭＡＧＥ－Ａ４、Ｇｌｙｐｉｃａｎ－３、ＫＩＦ２０Ａ、Ｓｕｒｖｉｖｉｎ、ＡＦＰ－１、ｇｐ１００、ＭＵＣ１、ＰＡＰ－１０、ＰＡＰ－５、ＴＲＰ２－１、ＳＡＲＴ－１、ＶＥＧＦＲ１、ＶＥＧＦＲ２、ＮＥＩＬ３、ＭＰＨＯＳＰＨ１、ＤＥＰＤＣ１、ＦＯＸＭ１、ＣＤＨ３、ＴＴＫ、ＴＯＭＭ３４、ＵＲＬＣ１０、ＫＯＣ１、ＵＢＥ２Ｔ、ＴＯＰＫ、ＥＣＴ２、ＭＥＳＯＴＨＥＬＩＮ、ＮＫＧ２Ｄ、Ｐ１Ａ等のタンパク質や、ＧＤ２、ＧＭ２等の糖脂質を挙げることができるが、これに限定さ

れない。

[0018] がん抗原を特異的に認識する細胞表面分子としては、がん抗原を特異的に認識する細胞表面受容体、人工受容体、接着因子を挙げることができ、がん抗原を特異的に認識するＴ細胞受容体やがん抗原を特異的に認識するキメラ抗原受容体（ｃｏｎｓｔｉｔｕｔｉｖｅ ａｎｄｒｏｓｔａｎｅ ｒｅｃｅｐｔｏｒ：ＣＡＲ）等の、細胞表面に発現することよってがんに対して特異的な識別能を付与する分子を好適に挙げることができ、ＴＣＲをより好適に挙げることができる。ＴＣＲとしては、がん抗原を特異的に認識するかぎりアルファ鎖及びベータ鎖からなるヘテロ二量体（アルファ・ベータＴＣＲ）でもガンマ鎖及びデルタ鎖からなるヘテロ二量体（ガンマ・デルタＴＣＲ）でもよい。なお、がん抗原を特異的に認識する細胞表面分子は、がん抗原の認識が特異的であれば、間接的に認識するものであってもよい。例えば、がん抗原を特異的に認識する抗体等の分子を本発明の免疫担当細胞と同時又は連続して対象に投与し、当該抗体等の分子を認識するか、又は抗体等の分子に標識されたタグを認識することで、本発明の免疫担当細胞は間接的にがん抗原を特異的に認識し得る。抗体を認識する場合の例としては、細胞表面分子としてＣＤ１６等が挙げられ、抗体等の分子に標識するタグの例としては、ＦＩＴＣ等が挙げられる。

[0019] 本発明のＩＬ－７×ＣＣＬ１９発現免疫担当細胞における免疫担当細胞の種類としては、免疫応答に関与する細胞であればよく、Ｔ細胞、ナチュラルキラー細胞（ＮＫ細胞）、Ｂ細胞等のリンパ球系細胞や、単球、マクロファージ、樹状細胞等の抗原提示細胞や、好中球、好酸球、好塩基球、肥満細胞等の顆粒球を挙げることができ、ヒト、イヌ、ネコ、ブタ、マウス等の哺乳動物由来のＴ細胞、好ましくはヒト由来のＴ細胞を好適に挙げることができる。また、Ｔ細胞は、血液、骨髄液等の体液や、脾臓、胸腺、リンパ節等の組織、もしくは原発腫瘍、転移性腫瘍、がん性腹水等のがん組織に浸潤する免疫細胞から単離、精製して得ることができ、またＥＳ細胞やｉＰＳ細胞から作製されたものを利用してもよい。かかるＴ細胞としては、アルファ・ベ

ータＴ細胞、ガンマ・デルタＴ細胞、ＣＤ８⁺Ｔ細胞、ＣＤ４⁺Ｔ細胞、腫瘍浸潤Ｔ細胞、メモリーＴ細胞、ナイーブＴ細胞、ＮＫＴ細胞を挙げることができる。

[0020] 本発明のＩＬ－７×ＣＣＬ１９発現免疫担当細胞の作製方法としては、後述する本発明の発現ベクターを免疫担当細胞に導入して作製する方法を挙げることができる。若しくは、受精卵、ＥＳ細胞、又はｉＰＳ細胞に対して、がん抗原を特異的に認識する細胞表面分子、インターロイキン７（ＩＬ－７）、及び／又はＣＣＬ１９を発現するベクターを導入してから誘導して作製する方法や、がん抗原を特異的に認識する細胞表面分子を遺伝子導入により発現したトランスジェニック哺乳動物から分離して得た免疫担当細胞に、さらに必要に応じてがん抗原を特異的に認識する細胞表面分子、インターロイキン７（ＩＬ－７）、及び／又はＣＣＬ１９を発現するベクターを導入して作製する方法も挙げることができる。

[0021] 後述する本発明の発現ベクターを上記免疫担当細胞に導入して作製する方法としては特に制限されないが、ウイルス感染法、カルシウムリン酸法、リポフェクション法、マイクロインジェクション法、エレクトロポレーション法等の公知の方法により導入する方法を挙げることができ、ウイルス感染法により導入する方法を好適に挙げることができる。

[0022] ウイルス感染法としては、本発明の発現ベクターとパッケージングプラスミドをＧＰ２－２９３細胞（タカラバイオ社製）、ＰＩａｔ－ＧＰ細胞（コスモ・バイオ社製）、ＰＧ１３細胞（ATCC CRL-10686）、ＰＡ３１７細胞（ATCC CRL-9078）等のパッケージング細胞にトランスフェクションして組換えウイルスを作製し、かかる組換えウイルスを免疫担当細胞に感染させる方法を挙げることができ、Retrovirus packagin Kit Eco（タカラバイオ社製）等の市販のキットを用いて行ってもよい。

[0023] また、本発明の免疫担当細胞は、がん抗原を特異的に認識する細胞表面分子、ＩＬ－７、及びＣＣＬ１９をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドを、公知の遺伝子編集技術を用いて、適切なプロポーターの制御下で発現

可能なように、細胞のゲノムに組み込むことによって作製してもよい。公知の遺伝子編集技術としては、ジンクフィンガーヌクレアーゼ、ＴＡＬＥＮ（転写活性化様エフェクターヌクレアーゼ）、ＣＲＩＳＰＲ（Ｃｌｕｓｔｅｒｅｄ Ｒｅｇｕｌａｒｌｙ Ｉｎｔｅｒｓｐａｃｅｄ Ｓｈｏｒｔ Ｐａｌｉｎｄｒｏｍｉｃ Ｒｅｐｅａｔ）－Ｃａｓシステム等のエンドヌクレアーゼを用いる技術が挙げられる。本発明の免疫担当細胞に他の外来タンパク質を発現させる場合も同様に、遺伝子編集技術を用いて、他の外来タンパク質をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドを、適切なプロポーターの制御下で発現可能なように、細胞のゲノムに組み込んでもよい。適切なプロポーターの制御下で発現可能なようポリヌクレオチドを細胞ゲノムに組み込む方法としては、がん抗原を特異的に認識する細胞表面分子、ＩＬ－７、及びＣＣＬ１９（又は他のタンパク質）をコードする塩基配列を、適切なプロモーターの下流に機能的に連結したポリヌクレオチド（即ち、当該プロモーターの制御下で発現可能なようにコード配列を連結したポリヌクレオチド）を、細胞ゲノムの非コード領域等に組み込む方法；がん抗原を特異的に認識する細胞表面分子、ＩＬ－７、及びＣＣＬ１９（又は他のタンパク質）をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドを、細胞ゲノムの内在性プロモーターの下流に組み込む方法等が挙げられる。内在性プロモーターとしては、例えば、ＴＣＲα、ＴＣＲβのプロモーター等が挙げられる。

[0024] また、本発明のＩＬ－７×ＣＣＬ１９発現免疫担当細胞に、後述する単純ヘルペスウイルスのチミジンキナーゼ（HSV-TK）や誘導性カスパーゼ９（inducible caspase 9）が発現するようにしてもよい。

[0025] 本発明のＩＬ－７×ＣＣＬ１９発現免疫担当細胞はがん抗原を特異的に認識する細胞表面分子、ＩＬ－７、及びＣＣＬ１９を発現することから、増殖能、生存能、及び内因性Ｔ細胞の集積能が高く、種々の免疫担当細胞を用いた養子免疫療法に応用することが可能である。養子免疫療法の例としては、樹状細胞療法、ＮＫ細胞療法、ガンマ・デルタＴ細胞療法、アルファ・ベータＴ細胞療法、ＣＴＬ療法、ＴＩＬ療法等が挙げられるがこれに限定されな

い。患者から採取した免疫担当細胞に後述する本発明の発現ベクターを導入して増幅し、患者に投与する方法を挙げることができる。以下に具体的な例を挙げるが、これに限定するものではない。樹状細胞療法では、患者から採取した単球から分化した樹状細胞に、手術で摘出したがん組織又はそのライセートを取り込ませ、患者の体内へ投与する工程を含むが、本発明の発現ベクターを、樹状細胞に導入する工程を含んでもよい。ここで、上記がん組織やライセートに替えてがん抗原分子のエピトープペプチドを人工的に合成して利用することもできる。ＮＫ細胞療法は、患者から採取したリンパ球をＩＬ－２等の複数の刺激物質でＮＫ細胞を活性化し増殖させ、患者へ投与する工程を含むが、本発明のベクターをＮＫ細胞に導入する工程を含んでもよい。なお、がんに対する抗体医薬を活性化したＮＫ細胞と併用することでがん細胞を効率よく攻撃する効果を期待できる。ガンマ・デルタＴ細胞療法は、患者から採取したリンパ球をＩＬ－２やゾレドロン酸を利用して培養刺激し、ガンマ・デルタＴ細胞を増殖させ、患者へ投与する工程を含むが、本発明の発現ベクターをガンマ・デルタＴ細胞に導入する工程を含んでもよい。アルファ・ベータＴ細胞療法は、患者から採集したリンパ球を抗ＣＤ３抗体やＩＬ－２で培養し、活性化したアルファ・ベータＴ細胞を患者へ投与する工程を含むが、本発明の発現ベクターをアルファ・ベータＴ細胞に導入する工程を含んでもよい。ＣＴＬ療法は、患者から採集したリンパ球を、患者から採取したがん細胞により刺激し、抗ＣＤ３抗体やＩＬ－２を添加して培養し、がん細胞に特異的なＣＴＬを増殖させ患者へ投与する工程を含むが、本発明の発現ベクターをＣＴＬに導入する工程を含んでもよい。また、上記のがん細胞に代えて、がん抗原エピトープペプチドを提示する抗原提示細胞を利用することもできる。ＴＩＬ療法は、患者から採取したがん組織からリンパ球を採集し、ＩＬ－２等で刺激・培養し、患者に投与する工程を含むが、本発明の発現ベクターをリンパ球に導入する工程を含んでもよい。

[0026] 本発明の発現ベクターは、上記本発明のＩＬ－７×ＣＣＬ１９発現免疫担当細胞を作製するための以下の（ａ）～（ｅ）のいずれかである。

（ａ）がん抗原を特異的に認識する細胞表面分子をコードする核酸、ＩＬ－７をコードする核酸、及びＣＣＬ１９をコードする核酸を含有する発現ベクター：

（ｂ）以下の（ｂ－１）及び（ｂ－２）の２つの発現ベクター：

（ｂ－１）がん抗原を特異的に認識する細胞表面分子をコードする核酸を含有する発現ベクター；

（ｂ－２）ＩＬ－７をコードする核酸、及びＣＣＬ１９をコードする核酸を含有する発現ベクター；

（ｃ）以下の（ｃ－１）及び（ｃ－２）の２つの発現ベクター：

（ｃ－１）がん抗原を特異的に認識する細胞表面分子をコードする核酸、及びＩＬ－７をコードする核酸を含有する発現ベクター；

（ｃ－２）ＣＣＬ１９をコードする核酸を含有する発現ベクター；

（ｄ）以下の（ｄ－１）及び（ｄ－２）の２つの発現ベクター：

（ｄ－１）ＩＬ－７をコードする核酸を含有する発現ベクター；

（ｄ－２）がん抗原を特異的に認識する細胞表面分子をコードする核酸、及びＣＣＬ１９をコードする核酸を含有する発現ベクター；

（ｅ）以下の（ｅ－１）、（ｅ－２）及び（ｅ－３）の３つの発現ベクター：

（ｅ－１）がん抗原を特異的に認識する細胞表面分子をコードする核酸を含有する発現ベクター；

（ｅ－２）ＩＬ－７をコードする核酸を含有する発現ベクター；

（ｅ－３）ＣＣＬ１９をコードする核酸を含有する発現ベクター；

[0027] 本発明の発現ベクターは、さらに、ＩＬ－１５、ＣＣＬ２１、ＩＬ－２、ＩＬ－４、ＩＬ－１２、ＩＬ－１３、ＩＬ－１７、ＩＬ－１８、ＩＰ－１０、ＣＣＬ４、ＦＩｔ３Ｌ、Ｉｎｔｅｒｆｅｒｏｎ－ｇａｍｍａ、ＭＩＰ－１ａｌｐｈａ、ＧＭ－ＣＳＦ、Ｍ－ＣＳＦ、ＴＧＦ－ｂｅｔａ、ＴＮＦ－ａｌｐｈａ等の他の免疫機能制御因子をコードする核酸を含有してもよい。

[0028] 上記がん抗原を特異的に認識する細胞表面分子をコードする核酸、インタ

ーロイキン７（ＩＬ－７）をコードする核酸、及びＣＣＬ１９をコードする核酸はそれぞれ哺乳動物由来の核酸を挙げることができ、ヒト由来の核酸を好適に挙げることができる。上記それぞれの核酸は、本発明の発現ベクターを導入する細胞の種類に応じて適宜選択でき、かかるそれぞれの核酸の配列情報は、公知の文献やＮＣＢＩ（http://www.ncbi.nlm.nih.gov/guide/）等のデータベースを検索して適宜入手することができる。

[0029] 上記がん抗原を特異的に認識する細胞表面分子をコードする核酸としては、ヒト由来の核酸を好適に挙げることができ。かかるがん抗原を特異的に認識する細胞表面分子をコードする核酸は、Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）をコードする核酸又はキメラ抗原受容体（ＣＡＲ）をコードする核酸を挙げることができ、天然由来の核酸でも人工合成の核酸でもよく、本発明の発現ベクターを導入する細胞の種類に応じて適宜選択でき、配列情報は、公知の文献やＮＣＢＩ（http://www.ncbi.nlm.nih.gov/guide/）等のデータベースを検索して適宜入手することができる。

[0030] がん抗原を特異的に認識する細胞表面分子をコードする核酸、ＩＬ－７をコードする核酸及びＣＣＬ１９をコードする核酸は、それぞれをコードする核酸の塩基配列の情報に基づき、化学合成する方法や、ＰＣＲによって増幅する方法等の公知の技術によって作製することができる。なお、アミノ酸をコードするための選択されるコドンは、目的の宿主細胞における核酸の発現を最適化するために改変されてもよい。

[0031] 上記ＴＣＲをコードする核酸におけるＴＣＲとしては、アルファ鎖及びベータ鎖からなるヘテロ二量体（アルファ・ベータＴＣＲ）でもガンマ鎖及びデルタ鎖からなるヘテロ二量体（ガンマ・デルタＴＣＲ）でもよい。なお、アルファ・ベータＴＣＲをコードする核酸には、ＴＣＲのアルファ鎖をコードする核酸とベータ鎖をコードする核酸の両方が含まれ、ガンマ・デルタＴＣＲをコードする核酸には、ＴＣＲのガンマ鎖をコードする核酸とデルタ鎖をコードする核酸の両方が含まれる。

[0032] 上記ＴＣＲをコードする核酸の配列情報は、当技術分野における公知の方

法を用いることにより、特定の抗原ペプチドを用いて誘導されたＣＴＬのＴＣＲサブユニットとしてのアルファ鎖及びベータ鎖の核酸から同定することができる（国際公開第２００７／０３２２５５号パンフレット、及びMorgan et al., J Immunol, 171, 3288 (2003)）。例えば、ＴＣＲを解析するためにはＰＣＲ法が好ましい。解析のためのＰＣＲプライマーは、例えば、５’側プライマーとしての５’－Ｒプライマー（５’－ｇｔｃｔａｃｃａｇｇｃａｔｔｃｇｃｔｔｃａｔ－３’：配列番号３）、及び３’側プライマーとしての、ＴＣＲアルファ鎖Ｃ領域に特異的な３－ＴＲａ－Ｃプライマー（５’－ｔｃａｇｃｔｇｇａｃｃａｃａｇｃｃｇｃａｇｃｇｔ－３’：配列番号４）、ＴＣＲベータ鎖Ｃ１領域に特異的な３－ＴＲｂ－Ｃ１プライマー（５’－ｔｃａｇａａａｔｃｃｔｔｔｃｔｃｔｔｇａｃ－３’：配列番号５）、又はＴＣＲベータ鎖Ｃ２領域に特異的な３－ＴＲｂｅｔａ－Ｃ２プライマー（５’－ｃｔａｇｃｃｔｃｔｇｇａａｔｃｃｔｔｔｃｔｃｔｔ－３’：配列番号６）であり得るが、これらに限定されない。ＴＣＲ誘導体は、抗原ペプチドを提示する標的細胞と高い結合力で結合することができ、かつ任意で、抗原ペプチドを提示する標的細胞の効率的な殺傷をインビボ及びインビトロで媒介することができる。

[0033] 上記ＴＣＲをコードする核酸としては、例えばＭＡＲＴ１特異的ＴＣＲ（Cancer Res.54,5265-5268(1994)）、ＭＡＧＥ－Ａ３特異的ＴＣＲ（Anticancer Res.,20,1793-1799(2000)）、ｇｐ１００特異的ＴＣＲ（J.Immunol.170,2186-2194(2003)）、ＮＹ－ＥＳＯ－１特異的ＴＣＲ（J.Immunol.,174、4415-4423(2005)）、ＷＴ１特異的ＴＣＲ（Blood,106,470-476(2005)）、ＭＡＧＥ－Ａ１特異的ＴＣＲ（Int.Immunol.,8,1463-1466(1996)）、Ｐ１Ａ特異的ＴＣＲ（Sarma, S., Y. Guo, Y. Guilloux, C. Lee, X.-F. Bai, Y. Liu. 1999. Cytotoxic T lymphocytes to an unmutated tumor antigen P1A: normal development but restrained effector function. J. Exp. Med. 189:811.）等のＴＣＲをコードする核酸や、ＭＨＣ分子に結合した抗原分子を認識し、かつＴ細胞を活性化することができるかぎり、上記文献に記載のＴＣＲをコ

ードする塩基配列と８０％以上、好ましくは８５％以上、より好ましくは９０％以上、さらに好ましくは９５％以上、最も好ましくは９８％以上の同一性を有する塩基配列でもよい。さらに、上記文献に記載されたＴＣＲをコードする塩基配列の中でＣＤＲをコードする配列を特定し、かかるＣＤＲをコードする配列を維持し、かつＣＤＲをコードする配列以外の配列において、上記文献に記載のＴＣＲをコードする塩基配列と６０％以上、好ましくは７０％以上、より好ましくは８０％以上、さらに好ましくは９０％以上、最も好ましくは９５％以上の同一性を有する塩基配列でもよい。

[0034] ＩＬ－７をコードする核酸としては、配列番号１に示すアミノ酸配列をコードする塩基配列を挙げることができ、ＩＬ－７における細胞増殖率又は細胞生存率の亢進作用を有する限り、配列番号１に示すアミノ酸配列をコードする塩基配列と８０％以上、好ましくは８５％以上、より好ましくは９０％以上、さらに好ましくは９５％以上、最も好ましくは９８％以上の同一性を有する塩基配列でもよい。ＣＣＬ１９をコードする核酸としては、配列番号２に示すアミノ酸配列をコードする塩基配列を挙げることができ、ＣＣＬ１９における細胞の遊走作用を有する限り、配列番号２に示すアミノ酸配列をコードする塩基配列と８０％以上、好ましくは８５％以上、より好ましくは９０％以上、さらに好ましくは９５％以上、最も好ましくは９８％以上の同一性を有する塩基配列を用いてもよい。

[0035] また、本発明の発現ベクターには、自殺遺伝子をコードする核酸を含んでいてもよい。自殺遺伝子とは、発現することによって直接的に、あるいは二次的に細胞毒性を有する物質を誘導し、自らの細胞を死に至らしめる機能を有する遺伝子を意味する。本発明の発現ベクターに自殺遺伝子をコードする核酸を含ませることによって、がんの治療経過に応じて、たとえば腫瘍が消失した場合に自殺遺伝子の機能を活性化する薬剤を投与し、生体内の免疫担当細胞を制御することができる。また、ＩＬ－７又はＣＣＬ１９は他のサイトカインとは異なり、副作用としてサイトカイン放出症候群や遺伝子導入細胞の腫瘍化を引き起こす可能性は低い。しかしながら、本発明の発現ベクタ

ーを導入した免疫担当細胞の機能が高まることで、標的のがん組織を攻撃する際に放出するサイトカイン等が予想外にも周辺組織へ影響することがあり得る。かかる場合には、本発明の発現ベクターに自殺遺伝子をコードする核酸を含ませることによって、サイトカイン放出症候群になるリスクを確実に低減させることが可能となる。

[0036] 自殺遺伝子としては、以下の文献に記載された単純ヘルペスウイルスのチミジンキナーゼ（HSV-TK）や誘導性カスパーゼ９（inducible caspase 9）をコードする遺伝子等を挙げることができ、かかる遺伝子の機能を活性化する薬剤としては、前者に対してはガンシクロビル、後者に対しては二量体誘導化合物（chemical induction of dimerization:CID）であるＡＰ１９０３を挙げることができる（Cooper LJ.,et. al. Cytotherapy. 2006;8(2):105-17.,Jensen M. C. et. al. Biol Blood Marrow Transplant. 2010 Sep;16(9):1245-56., Jones BS. Front Pharmacol.2014 Nov 27;5:254., Minagawa K., Pharmaceuticals (Basel). 2015 May 8;8(2):230-49., Bole-Richard E., Front Pharmacol. 2015 Aug 25;6:174）。

[0037] 本発明のベクターにおける、（ａ）がん抗原を特異的に認識する細胞表面分子をコードする核酸、ＩＬ－７をコードする核酸、及びＣＣＬ１９をコードする核酸を含有する発現ベクターは、いずれの核酸がいずれの上流又は下流に配置されてもよい。具体的には、がん抗原を特異的に認識する細胞表面分子をコードする核酸としてＴＣＲをコードする核酸を含有する場合を例にすると、上流から順にＴＣＲをコードする核酸、ＩＬ－７をコードする核酸及びＣＣＬ１９をコードする核酸であっても、ＴＣＲをコードする核酸、ＣＣＬ１９をコードする核酸及びＩＬ－７をコードする核酸であっても、ＩＬ－７をコードする核酸、ＣＣＬ１９をコードする核酸及びＴＣＲをコードする核酸であっても、ＩＬ－７をコードする核酸、ＴＣＲをコードする核酸及びＣＣＬ１９をコードする核酸であっても、ＣＣＬ１９をコードする核酸、ＴＣＲをコードする核酸、及びＩＬ－７をコードする核酸であっても、ＣＣＬ１９をコードする核酸、ＩＬ－７をコードする核酸及びＴＣＲをコードす

る核酸であってもよい。

[0038] 本発明のベクターにおける、（ｂ－２）ＩＬ－７をコードする核酸、及びＣＣＬ１９をコードする核酸を含有する発現ベクターにおいて、ＩＬ－７をコードする核酸及びＣＣＬ１９をコードする核酸の配置は特に制限されず、ＩＬ－７をコードする核酸に対してＣＣＬ１９をコードする核酸が上流に配置されても下流に配置されてもよい。

[0039] 本発明のベクターにおける、（ｃ－１）がん抗原を特異的に認識する細胞表面分子をコードする核酸、及びＩＬ－７をコードする核酸を含有する発現ベクターにおいて、がん抗原を特異的に認識する細胞表面分子をコードする核酸及びＩＬ－７をコードする核酸の配置は特に制限されず、がん抗原を特異的に認識する細胞表面分子をコードする核酸に対してＩＬ－７をコードする核酸が上流に配置されても下流に配置されてもよい。

[0040] 本発明のベクターにおける、（ｄ－２）がん抗原を特異的に認識する細胞表面分子をコードする核酸、及びＣＣＬ１９をコードする核酸を含有する発現ベクターにおいて、がん抗原を特異的に認識する細胞表面分子をコードする核酸及びＣＣＬ１９をコードする核酸の配置は特に制限されず、がん抗原を特異的に認識する細胞表面分子をコードする核酸に対してＣＣＬ１９をコードする核酸が上流に配置されても下流に配置されてもよい。

[0041] なお、がん抗原を特異的に認識する細胞表面分子をコードする核酸、ＩＬ－７をコードする核酸及びＣＣＬ１９をコードする核酸はそれぞれ別のプロモーターにより転写されてもよく、内部リボソームエントリー部位（ＩＲＥＳ：ｉｎｔｅｒｎａｌ ｒｉｂｏｚｙｍｅ ｅｎｔｒｙ ｓｉｔｅ）又は自己切断型２Ａペプチドを使用して一つのプロモーターで転写されてもよい。

[0042] 内部リボソームエントリー部位（ＩＲＥＳ）又は自己切断型２Ａペプチドを使用して一つのプロモーターでＩＬ－７をコードする核酸及びＣＣＬ１９をコードする核酸を転写させる場合における上記各核酸の間や、上記がん抗原を特異的に認識する細胞表面分子をコードする核酸を含む場合における当該核酸とＩＬ－７をコードする核酸及びＣＣＬ１９をコードする核酸との間

や、アルファ・ベータＴＣＲをコードする核酸を含む場合におけるアルファ鎖をコードする核酸とベータ鎖をコードする核酸の間や、ガンマ・デルタＴＣＲをコードする核酸を含む場合におけるデルタ鎖をコードする核酸とデルタ鎖をコードする核酸の間には、それぞれの核酸を発現し得る限り、任意の核酸を含んでもよいが、自己切断型ペプチド（２Ａペプチド）、又はＩＲＥＳをコードする配列、好ましくは２Ａペプチドをコードする配列を介して連結されていることが好ましい。かかる配列を用いて連結することにより、それぞれの核酸を効率よく発現させることが可能となる。

[0043] また、自殺遺伝子をコードする核酸を含有する場合には、自殺遺伝子の位置は特に制限されず、例えば、がん抗原を特異的に認識する細胞表面分子をコードする核酸、ＩＬ－７をコードする核酸、又はＣＣＬ１９をコードする核酸を発現させるためのプロモーターの下流に２Ａペプチド又はＩＲＥＳをコードする配列を介して上記それぞれの核酸の上流又は下流に配置してもよく、他のプロモーターの下流に配置してもよい。

[0044] ２Ａペプチドとは、ウイルス由来の自己切断型ペプチドであり、配列番号７で示されるアミノ酸配列中のＧ－Ｐ間（Ｃ末端から１残基の位置）が小胞体で切断される特徴を有する（Szymczak et al., Expert Opin. Biol. Ther. 5(5):627-638(2005)）。そのため、２Ａペプチドを介してその前後に組み込まれた核酸は、細胞内で互いに独立して発現することとなる。

[0045] 前記２Ａペプチドとしては、ピコルナウイルス、ロタウイルス、昆虫ウイルス、アフトウイルス又はトリパノソーマウイルス由来の２Ａペプチドであることが好ましく、配列番号８に示すピコルナウイルス由来の２Ａペプチド（Ｆ２Ａ）であることがより好ましい。

[0046] 本発明の発現ベクターにおけるベクターとしては直鎖状でも環状でもよく、プラスミド等の非ウイルスベクターでも、ウイルスベクターでも、トランスポゾンによるベクターでもよい。また、かかるベクターには、プロモーターやターミネーター等の制御配列や、薬剤耐性遺伝子、レポーター遺伝子等の選択マーカー配列を含有していてもよい。プロモーター配列の下流に作動

可能にＩＬ－７をコードする核酸及びＣＣＬ１９をコードする核酸を配置することで、それぞれの核酸を効率よく転写することが可能となる。

[0047] 上記プロモーターとしては、レトロウイルスのＬＴＲプロモーター、ＳＶ４０初期プロモーター、サイトメガロウイルスプロモーター、単純ヘルペスウイルスのチミジンキナーゼプロモーター等のウイルス由来プロモーター、ホスホグリセリン酸キナーゼ（ＰＧＫ）プロモーター、Ｘｉｓｔプロモーター、β－アクチンプロモーター、ＲＮＡポリメラーゼＩＩプロモーター等の哺乳類由来プロモーターを挙げることができる。また、テトラサイクリンによって誘導されるテトラサイクリン応答型プロモーター、インターフェロンによって誘導されるＭｘ１プロモーター等を用いてもよい。本発明の発現ベクターにおいて上記特定の物質によって誘導されるプロモーターを用いることによって、がんの治療経過に応じてＩＬ－７及びＣＣＬ１９の発現の誘導を制御することが可能となる。

[0048] 前記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、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクターを挙げることができ、レトロウイルスベクターを好適に挙げることができ、ｐＭＳＧＶベクター（Tamada k et al., Clin Cancer Res 18:6436-6445(2002)）やｐＭＳＣＶベクター（タカラバイオ社製）をより好適に挙げることができる。レトロウイルスベクターを用いれば、導入遺伝子はホスト細胞のゲノムへ取り込まれるため、長期間かつ安定に発現することが可能となる。

[0049] 免疫担当細胞における本発明の発現ベクター含有の確認は、例えばＴＣＲをコードする核酸を含有する場合には、フローサイトメトリー、ノザンブロッティング、サザンブロッティング、ＲＴ－ＰＣＲ等のＰＣＲ、ＥＬＩＳＡ、ウェスタンブロッティングによってＴＣＲの発現を調べることができ、本発明の発現ベクターにマーカー遺伝子を含有する場合には、当該発現ベクターに挿入されたマーカー遺伝子の発現を調べることによって確認することができる。

[0050] 本発明のＩＬ－７×ＣＣＬ１９発現免疫担当細胞に含有する発現ベクター

にＴＣＲをコードする核酸を含有する場合には、発現するＴＣＲの可変領域は細胞外に位置し、かかるＴＣＲの可変領域を備えることによって、ＴＣＲ発現免疫担当細胞はＭＨＣ分子に結合した抗原分子を認識することが可能となる。

[0051] 本発明の抗がん剤は、本発明のＩＬ－７×ＣＣＬ１９発現免疫担当細胞と薬学的に許容される添加剤を含有していれば特に制限されず、前記添加剤としては、生理食塩水、緩衝生理食塩水、細胞培養培地、デキストロース、注射用水、グリセロール、エタノール及びこれらの組合せ、安定剤、可溶化剤及び界面活性剤、緩衝剤及び防腐剤、等張化剤、充填剤、並びに潤滑剤を挙げることができる。

[0052] 本発明の抗がん剤は、当業者に既知の方法を用いて、がんの治療を必要とする被験体に投与することができ、投与方法としては、静脈内、腫瘍内、皮内、皮下、筋肉内、腹腔内、動脈内、髄内、心臓内、関節内、滑液嚢内、頭蓋内、髄腔内、及びくも膜下（髄液）への注射を挙げることができる。

[0053] 投与する抗がん剤に含まれる本発明のＩＬ－７×ＣＣＬ１９発現免疫担当細胞の量は、がんの種類、位置、重症度、治療を受ける被験体の年齢、体重及び状態等に応じて適宜調整できるが、好ましくは、一回の投与において１×１０^{4}～１×１０^{10}個、好ましくは１×１０^{5}～１×１０^{9}個、より好ましくは５×１０^{6}～５×１０^{8}個を挙げることができる。

[0054] 投与する抗がん剤は、１日４回、３回、２回又は１回、１日おき、２日おき、３日おき、４日おき、５日おき、週１回、７日おき、８日おき、９日おき、週２回、月１回又は月２回独立して投与する方法を挙げることができる。

[0055] 本発明の抗がん剤や、後述するがんの治療方法におけるがんとしては、固形がんでも血液がんでもよく、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、小細胞がん、皮膚がん、乳がん、前立腺がん、膀胱がん、膣がん、頸部がん、子宮がん、肝臓がん、腎臓がん、膵臓がん、脾臓がん、肺がん、気管がん、気管支がん、結腸がん、小腸がん、胃がん、食道

がん、胆嚢がん、精巣がん、卵巣がん等のがんや、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ほか、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、軟部組織肉腫等の肉腫や、肝芽腫、髄芽腫、腎芽腫、神経芽腫、膵芽腫、胸膜肺芽腫、網膜芽腫等の芽腫や、胚細胞腫瘍や、リンパ腫や、白血病を挙げることができる。

[0056] 本発明の抗がん剤は、他の抗がん剤と併用して用いることができる。他の抗がん剤としては、シクロホスファミド、ベンダムスチン、イオスファミド、ダカルバジン等のアルキル化薬、ペントスタチン、フルダラビン、クラドリビン、メソトレキセート、５－フルオロウラシル、６－メルカプトプリン、エノシタビン等の代謝拮抗薬、リツキシマブ、セツキシマブ、トラスツズマブ等の分子標的薬、イマチニブ、ゲフェチニブ、エルロチニブ、アファチニブ、ダサチニブ、スニチニブ、トラメチニブ等のキナーゼ阻害剤、ボルテゾミブ等のプロテアソーム阻害剤、シクロスポリン、タクロリムス等のカルシニューリン阻害薬、イダルビジン、ドキソルビシンマイトマイシンＣ等の抗がん性抗生物質、イリノテカン、エトポシド等の植物アルカロイド、シスプラチン、オキサリプラチン、カルボプラチン等のプラチナ製剤、タモキシフェン、ビカルダミド等のホルモン療法薬、インターフェロン、ニボルマブ、ペンブロリズマブ等の免疫制御薬を挙げることができ、アルキル化薬又は代謝拮抗薬を好適に挙げることができる。

[0057] 上記「本発明の抗がん剤と他の抗がん剤と併用して用いる」方法としては、他の抗がん剤を用いて処理し、その後本発明の抗がん剤を用いる方法や、本発明の抗がん剤と他の抗がん剤を同時に用いる方法や、本発明の抗がん剤を用いて処理し、その後他の抗がん剤を用いる方法を挙げることができ、他の抗がん剤を用いて処理し、その後本発明の抗がん剤を用いる方法を好適に挙げることができる。また、本発明の抗がん剤と他の抗がん剤と併用した場合には、がんの治療効果がより向上するとともに、それぞれの抗がん剤の投与回数又は投与量を減らすことで、それぞれの抗がん剤による副作用を低減させることが可能となる。また、本発明の抗がん剤に上記他の抗がん剤を含

めてもよい。

[0058] 本発明の別の態様１として、１）がん抗原を特異的に認識する細胞表面分子、インターロイキン７（ＩＬ－７）、及びＣＣＬ１９を発現する免疫担当細胞を、がんの治療を必要とする患者に投与することを特徴とするがんの治療方法や、２）抗がん剤として使用するための、がん抗原を特異的に認識する細胞表面分子、インターロイキン７（ＩＬ－７）、及びＣＣＬ１９を発現する免疫担当細胞や、３）がん抗原を特異的に認識する細胞表面分子、インターロイキン７（ＩＬ－７）、及びＣＣＬ１９を発現する免疫担当細胞の、抗がん剤の調製における使用を挙げることができる。

[0059] さらに、本発明の別の態様２として、上記本発明の発現ベクターを備えている、がん抗原を特異的に認識する細胞表面分子、インターロイキン７（ＩＬ－７）、及びＣＣＬ１９を発現する免疫担当細胞を作製するためのキットを挙げることができ、かかるキットとしては、本発明の発現ベクターを備えていれば特に制限されず、本発明のＩＬ－７×ＣＣＬ１９発現免疫担当細胞を作製するための説明書や、本発明の発現ベクターを免疫担当細胞に導入するために用いる試薬を含んでいてもよい。

実施例 1

[0060]（免疫機能制御因子の選択）

Ｔ細胞の機能を制御できる分子は少なくとも生体内に数百種類も存在する。発明者らは、免疫担当細胞における更なる免疫機能制御効果を高めるための制御分子として、これまでの知見や経験に基づき、膨大な組み合わせの中からまずはＩＬ－７とＣＣＬ１９を選択し、かつ、それぞれ単独ではなく２つの組み合わせ、すなわちＩＬ－７とＣＣＬ１９との組み合わせを選択し、かかる免疫担当細胞の免疫機能制御因子を発現するベクターを作製した。

[0061]（ＩＬ－７及びＣＣＬ１９を発現するベクターの作製－１）

抗ＦＩＴＣ ｓｃＦｖ、マウスＣＤ８膜貫通領域、マウスＣＤ２８－４－１ＢＢ－ＣＤ３ζ細胞内シグナルモチーフからなる抗ＦＩＴＣ ＣＡＲをコードする抗ＦＩＴＣ ＣＡＲ ＤＮＡ断片（配列番号９）、配列番号８に示

す２Ａペプチド（Ｆ２Ａ）と、該ペプチドに続く制限酵素サイト（ＭＣＳ）をコードするＦ２Ａ－ＭＣＳ　ＤＮＡ断片（配列番号１０）、マウスＩＬ－７（ストップコドン無し）と、それに続くＦ２ＡとマウスＣＣＬ１９をコードするＩＬ－７－Ｆ２Ａ－ＣＣＬ１９　ＤＮＡ断片（配列番号１１）を人工合成した（ライフテクノロジー社製）。

[0062] ＩＬ－７及びＣＣＬ１９を発現するベクターを作製するために、上記抗ＦＩＴＣ　ＣＡＲ　ＤＮＡ断片と上記Ｆ２Ａ－ＭＣＳ　ＤＮＡ断片を連結して抗ＦＩＴＣ　ＣＡＲ－Ｆ２Ａ－ＭＣＳコンストラクトを作製した。次に、作製したコンストラクトをｐＭＳＧＶレトロウイルス発現ベクター（Tamada k et al., Clin Cancer Res 18:6436-6445(2002)）にクローニングして抗ＦＩＴＣ　ＣＡＲ－Ｆ２Ａ－ＭＣＳを含むｐＭＳＧＶベクターを作製した。かかるｐＭＳＧＶベクターのＭＣＳに、上記ＩＬ－７－Ｆ２Ａ－ＣＣＬ１９　ＤＮＡ断片を、制限酵素（Ｎｓｉ Ⅰ及びＳａｌ Ⅰ）処理及びライゲーションにより挿入し、抗ＦＩＴＣ　ＣＡＲ－Ｆ２Ａ－ＩＬ－７－Ｆ２Ａ－ＣＣＬ１９を含むｐＭＳＧＶベクター（ＩＬ－７×ＣＣＬ１９発現ベクター（１））を得た。得られたベクターのマップを図１に示す。また、コントロールとして上記抗ＦＩＴＣ　ＣＡＲ　ＤＮＡ断片を上記ｐＭＳＧＶレトロウイルス発現ベクターにクローニングし、ＩＬ－７及びＣＣＬ１９を含まないｐＭＳＧＶベクター（コントロールベクター（１））を作製した。

[0063] （ＩＬ－７×ＣＣＬ１９発現ベクターを導入したレトロウイルスの作製）

マウスＴ細胞の形質導入のために、レトロウイルスを作製した。リポフェクタミン２０００又は３０００（ライフテクノロジー社製）を用い、上述のＩＬ－７×ＣＣＬ１９発現ベクター（１）又はコントロールベクター（１）と、ｐＣＬ－Ｅｃｏプラスミド（Ｉｍｇｅｎｅｘ社製）をＧＰ２－２９３パッケージング細胞株（タカラバイオ社製）にトランスフェクションすることで、ＩＬ－７×ＣＣＬ１９発現ベクター（１）又はコントロールベクター（１）を導入したレトロウイルスを作製した。

[0064] 前記ＧＰ２－２９３細胞の培養液としては、１０％ＦＣＳ、１００Ｕ／ｍ

ｌのペニシリン、１００ｍｇ／ｍｌのストレプトマイシンを加えたＤＭＥＭを用いた。また、後述の実施例で用いるＴ細胞の培養液としては、１０％ＦＣＳ、１００Ｕ／ｍｌのペニシリン、１００ｍｇ／ｍｌのストレプトマイシン、５０ｍＭの２－メルカプトエタノール、２ｍＭのＬ－グルタミンを加えたＲＰＭＩ－１６４０を用いた。

[0065]（マウスＴ細胞の形質導入）

マウスＴ細胞の形質導入のため、脾臓及びリンパ節由来の３×１０^{6}個の精製したマウスＴ細胞を、固層化した抗ＣＤ３ｍＡｂ（３μｇ／ｍｌ）及びＩＬ－２（１００ＩＵ／ｍｌ）で４８時間活性化した。次に、上述で作製したＩＬ－７×ＣＣＬ１９発現ベクター（１）又はコントロールベクター（１）を導入したレトロウイルスを含有する上清を、２５μｇ／ｍｌのレトロネクチン（登録商標：タカラバイオ社製）でコートしたプレートで活性化させた上述のマウスＴ細胞（１×１０^{6}ｃｅｌｌｓ／ｍｌ）と混合し、１５００ｒｐｍで２時間遠心後、ＩＬ－２（１００ＩＵ／ｍｌ）の存在下で６時間培養した。培養液からレトロウイルスを除去するため、マウスＴ細胞を回収し、ＩＬ－２（１００ＩＵ／ｍｌ）を含有する新しい増殖培養液（ＲＰＭＩ）に移し、さらに４２時間培養し、ＩＬ－７×ＣＣＬ１９発現ベクター（１）を導入したマウスＴ細胞（ＩＬ－７／ＣＣＬ１９発現Ｔ細胞（１））又はコントロールベクター（１）を導入したマウスＴ細胞（コントロールＴ細胞（１））を得た。

[0066]（ＩＬ－７及びＣＣＬ１９を発現する発現ベクターの作製－２）

上記におけるＩＬ－７×ＣＣＬ１９発現ベクター（１）の作製において、配列番号９に示す配列に含まれる抗ＦＩＴＣ　ｓｃＦｖ領域の配列を、リツキシマブの配列に基づきライフテクノロジー社が合成した抗ヒトＣＤ２０　ｓｃＦｖ（配列番号１２）の配列に置換した以外は上記「ＩＬ－７及びＣＣＬ１９を発現する発現ベクターの作製－１」と同様の方法で、抗ヒトＣＤ２０　ＣＡＲ－Ｆ２Ａ－ＩＬ－７－Ｆ２Ａ－ＣＣＬ１９を含むｐＭＳＧＶベクター（ＩＬ－７×ＣＣＬ１９発現ベクター（２））を作製した。同様に、上

記におけるにおけるコントロールベクター（１）の作製において、配列番号９に示す配列に含まれる抗ＦＩＴＣ　ｓｃＦｖ領域の配列を、上記抗ヒトＣＤ２０　ｓｃＦｖ（配列番号１２）の配列に置換した以外は上記「ＩＬ－７及びＣＣＬ１９を発現する発現ベクターの作製－１」と同様の方法で、ＩＬ－７及びＣＣＬ１９を含まないｐＭＳＧＶベクター（コントロールベクター（２））を作製した。かかるＩＬ－７×ＣＣＬ１９発現ベクター（２）又はコントロールベクター（２）を、上記と同様の方法でレトロウイルスを用いてマウスＴ細胞へ導入して、ＩＬ－７／ＣＣＬ１９発現Ｔ細胞（２）又はコントロールＴ細胞（２）を作製した。

実施例 2

[0067]（ＩＬ－７／ＣＣＬ１９発現Ｔ細胞の細胞数及び生存率）

ＩＬ－７／ＣＣＬ１９発現Ｔ細胞により産生されるＩＬ－７やＣＣＬ１９が生物的な機能を発揮し、免疫誘導効果を示すか否かについて検討した。作製したＩＬ－７／ＣＣＬ１９発現Ｔ細胞（２）（4×10^5個）又はコントロールＴ細胞（２）を含有するサンプルを５日間培養した。上記培養は、ＩＬ－７及びＣＣＬ１９の発現においてヒトＣＤ２０　ＣＡＲによる影響を排除するため、ＣＤ２０による抗原刺激なしで行った。次に、トリパンブルーによって細胞数と生存率を調べた。結果を図２Ａ，図２Ｂに示す。図２Ａは細胞数、図２Ｂは生存率であり、黒カラムＩＬ－７／ＣＣＬ１９発現Ｔ細胞、白カラムはコントロールＴ細胞を示す。

[0068]（結果）

図２Ａ，図２Ｂに示すように、ＩＬ－７／ＣＣＬ１９発現Ｔ細胞（２）においてはコントロールＴ細胞（２）と比較して細胞数がおよそ５倍、生存率はおよそ２倍高くなっていた。したがって、本発明の発現ベクターをＴ細胞に導入したＩＬ－７／ＣＣＬ１９発現Ｔ細胞を用いることで、ＩＬ－７やＣＣＬ１９が生物的な機能を発揮し、免疫誘導効果を示すことが明らかとなった。

実施例 3

[0069] ［Ｔ細胞遊走試験］

（ＩＬ－７／ＣＣＬ１９発現Ｔ細胞によるＴ細胞遊走試験）

トランスウェルを用いた細胞遊走試験により、ＣＣＬ１９の遊走惹起効果を検討した。応答側Ｔ細胞の遊走性は９６ウェルのトランスウェル（登録商標）チャンバー（Ｃｏｒｎｉｇ　Ｃｏｓｔａｒ社製）を用い、孔径５μｍのポリカーボネートフィルターを通して遊走させることによって測定した。具体的には、チャンバーの下層でＩＬ－７／ＣＣＬ１９発現Ｔ細胞（１）又はコントロールＴ細胞（１）を培養した。上記培養は、ＩＬ－７及びＣＣＬ１９の発現においてＦＩＴＣ　ＣＡＲによる影響を排除するため、ＦＩＴＣによる抗体刺激なしで行った。応答側Ｔ細胞は、ＭＡＣＳ（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ　Ｂｉｏｔｅｃ社製）のネガティブ選択によって、脾臓やリンパ節から調製した。応答側Ｔ細胞はＣｙｔｏＴｅｌｌ　ｂｌｕｅ（ＡＡＴ　Ｂｉｏｑｕｅｓｔ社製）でラベルし、上層で３時間培養した。チャンバーの上層から下層への遊走はフローサイトメトリー（ＥＣ８００：ソニー社製）で調べ、データ解析はＦｌｏｗＪｏソフトウェア（Ｔｒｅｅ　Ｓｔａｒ社製）を用いた。結果を図３に示す。図３中、黒カラムはＩＬ－７／ＣＣＬ１９発現Ｔ細胞（１）、白カラムはコントロールＴ細胞（１）を示し、縦軸は下層のチャンバーに遊走した応答側Ｔ細胞の絶対数を示す。また、統計学的有意差はStudent’s t-testにて検討した。

[0070] （結果）

図３に示すように、ＩＬ－７／ＣＣＬ１９発現Ｔ細胞（１）は、コントロールＴ細胞（１）と比較しておよそ１．８倍ものＴ細胞を下層に遊走させた。Ｔ細胞等のリンパ球移入療法では、投与したＴ細胞によるがん細胞傷害はもちろん重要であるが、それに加えて、がん患者に元々存在する内在性Ｔ細胞（＝宿主側免疫細胞）を活性化し、がん細胞を攻撃する細胞として動員することが重要である。このためには抗腫瘍活性を有するリンパ球を単に外部から移入するだけでなく、何らかの手法で、移入したＴ細胞と内在性Ｔ細胞の能動的な相互作用を惹起し、内在性Ｔ細胞をがん局所に集積するようにさ

せることが免疫治療効果を高める点で好ましい。図３の結果より、ＩＬ－７／ＣＣＬ１９発現Ｔ細胞（１）は、内因性Ｔ細胞を集積させる能力を有することから、移入したＴ細胞と内在性Ｔ細胞の能動的な相互作用を誘導することが可能であることが明らかとなった。

[0071] また、図２Ａ、図２Ｂ、図３の結果からＩＬ－７及びＣＣＬ１９発現するＴ細胞は、ＩＬ－７により効果的に増殖し、生存率も高く、かつＣＣＬ１９によりＴ細胞を集積するという、免疫誘導に欠かせない重要な効果を備えており、優れた免疫誘導効果を有することが明らかとなった。すなわち、免疫担当細胞において、「ＩＬ－７」と「ＣＣＬ１９」の２つの制御分子を発現させることで、かかる免疫担当細胞の増殖能力、生存率、免疫誘導効果を向上させることが可能であることが明らかとなった。さらに、上述のようにＩＬ－７及びＣＣＬ１９を発現するＴ細胞は、増殖能、生存能、及びＴ細胞集積能を兼ね備えていることから、がん組織でのＴ細胞や樹状細胞の浸透効果や、腫瘍増殖抑制効果を有する可能性が示唆された。

実施例 4

[0072] ［ＩＬ－７×ＣＣＬ１９×ＨＳＶ－ＴＫ発現ベクターの作製］

ｐＭＳＧＶ１ベクターのマルチクローニングサイトにＩＬ－７、ＣＣＬ１９及び自殺遺伝子であるＨＳＶ－ＴＫの各遺伝子をコードする塩基配列を、自己切断型ペプチドである２Ａペプチドをコードする塩基配列を挟んでタンデムに並べた塩基配列をクローニングすることでＩＬ－７、ＣＣＬ１９、及びＨＳＶ－ＴＫを発現するベクターを作製することができる。かかるベクターのマップを図４に示す。

[0073] 上記のようにして作製したＩＬ－７×ＣＣＬ１９×ＨＳＶ－ＴＫ発現ベクターを導入した免疫担当細胞は、上記免疫担当細胞を投与した被験体にガンシクロビルを投与することで被験体内の免疫担当細胞を制御することが可能となる。

実施例 5

[0074] ［ＴＣＲ×ＩＬ－７×ＣＣＬ１９発現ベクターの作製］

ｐＭＳＧＶ１ベクターのマルチクローニングサイトにＴＣＲ、ＩＬ－７及びＣＣＬ１９の各遺伝子をコードする塩基配列を、自己切断型ペプチドである２Ａペプチドをコードする塩基配列を挟んでタンデムに並べた塩基配列をクローニングすることでＴＣＲ、ＩＬ－７及びＣＣＬ１９を発現するベクターを作製することができる。かかるベクターのマップを図５に示す。

[0075] 上記のようにして作製したＴＣＲ×ＩＬ－７×ＣＣＬ１９発現ベクターを導入した免疫担当細胞は、がん細胞の表面に存在するがん抗原のみならず、がん細胞内のがん抗原に由来するペプチドがＭＨＣに提示された複合体に対しても特異的に結合することが可能となり、より広範囲の腫瘍関連標的分子に対する特異的Ｔ細胞の誘導が可能となる。

実施例 6

[0076] ［ＩＬ－７、ＣＣＬ１９及びｅＧＦＰを発現する発現ベクターの作製］

マウスＩＬ－７（ストップコドン無し）と、それに続くＦ２Ａ、マウスＣＣＬ１９をコードするＩＬ－７－Ｆ２Ａ－ＣＣＬ１９　ＤＮＡ断片を人工合成した（ライフテクノロジー社製）。

[0077] ＩＬ－７、ＣＣＬ１９及びｅＧＦＰを発現するベクターを作製するために、上記で合成したＩＬ－７－Ｆ２Ａ－ＣＣＬ１９　ＤＮＡ断片を、Ｆ２Ａ－ｅＧＦＰ配列を有するｐＭＳＧＶレトロウイルス発現ベクター（Tamada k et al., Clin Cancer Res 18:6436-6445(2002)）のＭＣＳに、制限酵素（ＮＣＯＩ及びＥＣＯＲＩ）処理及びライゲーションにより挿入し、ＩＬ－７－Ｆ２Ａ－ＣＣＬ１９－Ｆ２Ａ－ｅＧＦＰ　ＤＮＡ断片（配列番号１３）を含むｐＭＳＧＶベクター（ＩＬ－７×ＣＣＬ１９発現ベクター（３））を得た。得られたベクターのマップを図６に示す。また、コントロールとしてｅＧＦＰを含み、ＩＬ－７及びＣＣＬ１９を含まないｐＭＳＧＶベクター（コントロールベクター（３））を作製した。なお、配列番号１３において、１～４６２番目の塩基がＩＬ－７（１～７５番目の塩基はＩＬ－７のシグナル配列）、４６３～５３７番目の塩基がＦ２Ａ、５３８～８６１番目の塩基がＣＣＬ１９（５３８～６１２番目の塩基はＣＣＬ１９のシグナル配列）、８６８

～９４２がＦ２Ａ、９４６～１６６２番目の塩基がｅＧＦＰをコードする核酸、１６６３～１６６５番目の塩基がストップコドンである。また、上記塩基配列１３に対応するアミノ酸配列を配列番号１４に示す。なお、制限酵素Ｎｃｏｌを使用するため、配列番号１３における４番目の塩基チミン（ｔ）をグアニン（ｇ）に（配列番号１４における２番目のアミノ酸フェニルアラニン（Ｆ）をバリン（Ｖ）に）置換した。

[0078] ［Ｐ８１５腫瘍抗原Ｐ１Ａ特異的なＴＣＲ、ＩＬ－７、ＣＣＬ１９、及びｅＧＦＰを発現するＴ細胞の作製］

Ｙ．Ｌｉｕから入手した、Ｈ－２Ｌ^{d}拘束性のＰ８１５腫瘍抗原Ｐ１Ａ特異的なＴＣＲを発現するトランスジェニックマウス（Sarma, S., Y. Guo, Y. Guilloux, C. Lee, X.-F. Bai, Y. Liu. 1999. J. Exp. Med. 189:811.）から脾臓細胞を採取し、脾臓細胞由来のＰ８１５腫瘍抗原Ｐ１Ａ特異的なＴＣＲを発現するマウスＴ細胞（Ｐ１Ａ特異的ＴＣＲ－Ｔ細胞）を得た。次に、実施例１と同様の方法で、ＩＬ－７×ＣＣＬ１９発現ベクター（３）及びコントロールベクター（３）を導入したレトロウイルスを作製し、上記Ｐ１Ａ特異的ＴＣＲ－Ｔ細胞を含む脾臓細胞（３×１０^{6}個／ウェル）をＰ１Ａペプチドで４８時間活性化した細胞に形質導入して、Ｐ１Ａ特異的ＴＣＲ／ＩＬ－７／ＣＣＬ１９／ｅＧＦＰ発現Ｔ細胞又はＰ１Ａ特異的ＴＣＲ／ｅＧＦＰ発現Ｔ細胞を得た。各発現ベクターの形質導入はサロゲートマーカーとしてｅＧＦＰを検出するフローサイトメトリー解析によって確認した。得られたそれぞれのＴ細胞のｅＧＦＰの発現レベルは、いずれの実験においても７０～８０％であった。

[0079] ０日目に、６～１０週齢の雄ＤＢＡ／２マウス（ｎ＝３０）に０．１ｍｌのＨＢＳＳで懸濁した５×１０^{5}個のＰ８１５マストサイトーマを側腹に皮下接種した。６日目に、マウスをプレコンディショニングのために亜致死量（３－５Ｇｙ）の照射を行った。７日目に、マウス（ｎ＝１０）を３つの群に分けて、Ｐ１Ａ特異的ＴＣＲ／ＩＬ－７／ＣＣＬ１９／ｅＧＦＰ発現Ｔ細胞、又はＰ１Ａ特異的ＴＣＲ／ｅＧＦＰ発現Ｔ細胞（いずれの細胞も７０～８

０％ｅＧＦＰポジティブ）をそれぞれ１×１０^{6}個静脈に投与した。その後、それぞれのマウスの生存率を解析すると共に死亡したマウスの腫瘍体積を測定した。それぞれのマウスの生存率の解析結果を図７に、死亡したマウスの腫瘍体積を測定した結果を図８に示す。

[0080] 図７において、▲は未処理マウス、■はＰ１Ａ特異的ＴＣＲ／ｅＧＦＰ発現Ｔ細胞を投与したマウス、●はＰ１Ａ特異的ＴＣＲ／ＩＬ－７／ＣＣＬ１９／ｅＧＦＰ発現Ｔ細胞を投与したマウスの結果であり、横軸がＰ８１５マストサイトーマを皮下接種してからの日数（ｄａｙ）、縦軸が生存率（％）である。Ｐ１Ａ特異的ＴＣＲ／ＩＬ－７／ＣＣＬ１９／ｅＧＦＰ発現Ｔ細胞を投与したマウスは６０日目でも８０％が生存し、１００日を超えても５０％が生存していた。したがって、Ｐ１Ａ特異的ＴＣＲ、ＩＬ－７及びＣＣＬ１９を発現する免疫担当細胞を用いることにより抗腫瘍効果が発揮され、腫瘍による生存率の低下を抑制することが明らかとなった。

[0081] また、図８において、横軸がＰ８１５マストサイトーマを皮下接種してからの日数（ｄａｙ）、縦軸が腫瘍体積（ｍｍ^{3}）である。図８から明らかなように、Ｐ１Ａ特異的ＴＣＲ／ＩＬ－７／ＣＣＬ１９／ｅＧＦＰ発現Ｔ細胞を投与したマウスでは腫瘍体積の増加が著しく抑制されており、Ｐ１Ａ特異的ＴＣＲ／ＩＬ－７／ＣＣＬ１９／ｅＧＦＰ発現Ｔ細胞は優れた抗腫瘍活性を有すること、及び固形がんに対する治療効果を発揮することが明らかとなった。

産業上の利用可能性

[0082] 本発明のＩＬ－７×ＣＣＬ１９発現免疫担当細胞は、増殖能、生存能及びリンパ球集積能力を併せ持つことから、免疫療法の分野において利用可能である。