

## 明 細 書

発明の名称：

がんの処置に用いるNY-ESO-1含有人工アジュバントベクター細胞

技術分野

[0001] 本発明は、がんの処置に用いるNY-ESO-1含有人工アジュバントベクター細胞 (artificial adjuvant vector cell: aAVC-NY-ESO-1細胞) に関する。

背景技術

[0002] ニューヨーク食道扁平上皮がん1 (New York esophageal squamous cell carcinoma 1、NY-ESO-1) はがん/精巢抗原の一つであり、前立腺がん、膀胱がん等の広範囲な腫瘍で発現が認められる。一方で成人の正常細胞においては精巢を除き発現がみられないため、がん治療の好適な標的分子と考えられており、ワクチンをはじめとする薬剤の開発がすすめられている (非特許文献1~3)。

[0003] NY-ESO-1タンパク質とグルコピラノシル脂質 A (glucopyranosyl lipid A、GLA) アジュバントを混合したワクチンであるG305は、NY-ESO-1発現がんを有する患者を対象に臨床試験が実施されており、ワクチン投与後にNY-ESO-1特異的T細胞の誘導が確認されている (非特許文献4)。

[0004] 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 $\alpha$ -ガラクトシルセラミド ( $\alpha$ -Galactosylceramide、 $\alpha$ -GalCer) をパルスした人工アジュバントベクター細胞 (artificial adjuvant vector cell: aAVC) を作製した (特許文献1~3)。当該aAVCは、CD1d/ $\alpha$ -GalCer複合体を介してナチュラルキラーT (NKT) 細胞を活性化し、活性化されたNKT細胞はインターフェロン $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) 等のサイトカインを産生してナチュラルキラー (NK) 細胞等を活性化する。マウス

モデルにおいて、a A V C 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）。また、マウスに投与されたa A V C 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a A V C の断片は樹状細胞に取り込まれる。当該a A V C 断片を取り込んだ樹状細胞は、該細胞表面上の主要組織適合遺伝子複合体（major histocompatibility complex、MHC）に取り込んだがん抗原の断片を抗原提示し、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、a A V C 投与によるがん抗原特異的なT細胞の誘導を介した抗腫瘍効果が示されている（特許文献1～3、非特許文献5及び6）。このように、a A V C 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がん抗原特異的な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。

## 先行技術文献

### 特許文献

[0005] 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

[0006] 非特許文献1：Thomas R. et al., 「フロンティアーズ イン イムノロジー (Frontiers in Immunology)」、(スイス)、2018; 9: 947

非特許文献2：Gasser O. et al., 「キャンサー イムノロジー、イムノセラピー (Cancer Immunology, Immunotherapy)」、(ドイツ)、2018; 67 (2): 285-298

非特許文献3：Robbins P. F. et al., 「クリニカル キャンサー リサーチ (Clinical Cancer Research)」、(米国)、2015; 21 (5): 1019-1027

非特許文献4: Mahipal A. et al., 「がん イムノロジー、免疫療法 (Cancer Immunology, Immunotherapy)」, (ドイツ)、2019; 68 (7): 1211-1222

非特許文献5: Shimizu K. et al., 「がん リサーチ (Cancer Research)」, (米国)、2013; 73 (1): 62-73

非特許文献6: Shimizu K. et al., 「がん 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

[0007] 本発明の課題は、NY-ESO-1 又はその断片を安定的に発現する aAVC を提供することにある。

### 課題を解決するための手段

[0008] 本発明者らは、がん抗原として NY-ESO-1 を発現する aAVC の作製において相当の創意検討を重ねた結果、NY-ESO-1 を安定的に発現する aAVC を取得することに成功した。具体的には、本発明者らは、恒常的に NY-ESO-1 を発現させた場合、培養日数を経るに従い発現量及び陽性率の低下が認められるという課題を見出し、鋭意検討してその課題を解決した。詳細には、誘導型プロモーター（特に、薬剤誘導型プロモーター）にて誘導的に NY-ESO-1 を発現させた細胞は、恒常的に NY-ESO-1 を発現させた場合よりも高い NY-ESO-1 の発現量を示すことを見出し、誘導型プロモーター支配下にて NY-ESO-1 を安定的に高発現させた aAVC を取得することに成功した（実施例 2-2）。すなわち、本発明は、がんの処置に使用し得る aAVC、該 aAVC の製造方法、該 aAVC を含む医薬組成物、該 aAVC によるがんの処置方法等を提供する。

[0009] 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。

[0010] [1] CD1dをコードするポリヌクレオチド及び誘導型プロモーターに作動可能に連結されたNY-ESO-1又はその断片をコードするポリヌクレオチドを含む、ヒト由来細胞。

[2] NY-ESO-1がヒトNY-ESO-1である、[1]に記載の細胞。

[3] CD1dがヒトCD1dである、[1]又は[2]に記載の細胞。

[4] 誘導型プロモーターが薬剤誘導型プロモーターである、[1]～[3]のいずれか一項に記載の細胞。

[5] 薬剤誘導型プロモーターがテトラサイクリン系誘導型プロモーターである、[4]に記載の細胞。

[6] テトラサイクリン系誘導型プロモーターがTRE3Gプロモーターである、[5]に記載の細胞。

[7] ヒト由来細胞が正常細胞である、[1]～[6]のいずれか一項に記載の細胞。

[8] ヒト由来細胞がヒト胎児腎細胞293 (HEK293)細胞に由来する細胞である、[7]に記載の細胞。

[9] CD1d及びNY-ESO-1又はその断片を発現している、[1]～[8]のいずれか一項に記載の細胞。

[10] NY-ESO-1又はその断片の発現量が $10^6$ 細胞当たり245 ng～45000 ngである、[9]に記載の細胞。

[11] 細胞の表面にCD1dリガンドを積載している、[9]又は[10]に記載の細胞。

[12] CD1dリガンドが $\alpha$ -GalCerである、[11]に記載の細胞。

[13] [11]又は[12]に記載の細胞を含む医薬組成物。

[14] がんの処置に用いるための、[13]に記載の医薬組成物。

[15] がんを処置する方法であって、[11]又は[12]に記載の細胞

を対象に投与する工程を含む、方法。

[16] がんを処置するための、[11] 又は [12] に記載の細胞。

[17] がんの処置に用いる医薬組成物を製造するための、[11] 又は [12] に記載の細胞の使用。

[18] がんの処置に用いる細胞を製造する方法であって、[1] ～ [8] のいずれか一項に記載の細胞を誘導型プロモーターの誘導因子の存在下で培養することによりNY-ESO-1 又はその断片の発現を誘導させる工程を含む、方法。

[19] 細胞の表面に $\alpha$ -GalCerを積載する工程をさらに含む、[18] に記載の方法。

[20] がんの処置に用いる細胞を製造する方法であって、

ヒト由来細胞にCD1dをコードするポリヌクレオチド及び誘導型プロモーターに作動可能に連結されたNY-ESO-1 又はその断片をコードするポリヌクレオチドを導入する工程、又は

内在的にCD1dを発現するヒト由来細胞に誘導型プロモーターに作動可能に連結されたNY-ESO-1 又はその断片をコードするポリヌクレオチドを導入する工程、

を含む、方法。

[21] 前記工程で得られた細胞を誘導型プロモーターの誘導因子の存在下で培養することによりNY-ESO-1 又はその断片の発現を誘導させる工程をさらに含む、[20] に記載の方法。

[22] 細胞の表面に $\alpha$ -GalCerを積載する工程をさらに含む、[21] に記載の方法。

[23] がんを処置する方法であって、[11] 又は [12] に記載の細胞と免疫チェックポイント阻害剤を対象に投与する工程を含む、方法。

[24] 免疫チェックポイント阻害剤がPD-1系免疫チェックポイント阻害剤、又はCTLA-4系免疫チェックポイント阻害剤である、[23] に記載の方法。

[25] がんの処置に用いる医薬組成物を製造する方法であって、

CD1dをコードするポリヌクレオチド及び誘導型プロモーターに作動可能に連結されたNY-ESO-1又はその断片をコードするポリヌクレオチドを含み、かつ、クローニングされたヒト由来の細胞を含む凍結物を解凍する工程、

凍結物中に含まれていた前記ヒト細胞を増殖させて、NY-ESO-1又はその断片の発現を誘導させる工程、

及び、その細胞の表面に $\alpha$ -GalCerを積載する工程を含む、方法。

### 発明の効果

[0011] 本発明のaAVC-NY-ESO-1細胞及び本発明の医薬組成物は、がんの処置に使用できる。

### 図面の簡単な説明

[0012] [図1-1]図1-1はaAVC(3T3)-NY-ESO-1細胞による抗原特異的T細胞誘導作用を、aAVC(3T3)-NY-ESO-1細胞投与マウスにおけるNY-ESO-1特異的T細胞の数により示している。縦軸はELISPOTリーダーにてカウントした際の $4 \times 10^5$ 脾臓細胞中のスポット数を示す。横軸の溶媒はBICANATEを投与したコントロール群を、aAVC-NYはaAVC(3T3)-NY-ESO-1投与群をそれぞれ示す。PAP及びNYは、それぞれ刺激に用いたPAPペプチド及びNY-ESO-1ペプチドを示す。「-」は、ペプチド添加無しを示す。個体ごとのスポット数とスポット数の平均値±平均の標準誤差を示す。

[図1-2]図1-2はNY-ESO-1発現B16担癌マウス及びB16-F10担癌マウスにおけるaAVC(3T3)-NY-ESO-1細胞の抗腫瘍効果を示す。縦軸は腫瘍体積を、横軸はがん細胞接種後日数を示す。縦線は平均値±平均の標準誤差を示し、括弧内は計測時のマウスの匹数を示す。有意確率P値(\*\*:  $P < 0.01$ )は、スチューデントのt検定により溶媒投与群とaAVC(3T3)-NY-ESO-1細胞投与群の20日目の腫瘍

体積を比較することにより算出した。

[図1-3]図1-3はNY-ESO-1発現B16担癌マウスにおけるaAVC(3T3)-NY-ESO-1細胞の抗腫瘍効果を示す。縦軸は腫瘍体積を、横軸はaAVC(3T3)-NY-ESO-1細胞投与後日数を示す。縦線は平均値±平均の標準誤差を示す。有意確率P値(\*\*:  $P < 0.01$ )は、ダネットの多重比較検定により溶媒投与群とaAVC(3T3)-NY-ESO-1細胞投与群の10日目の腫瘍体積を比較することにより算出した。

[図2-1]図2-1～図2-4はFreeStyle 293F\_CMV\_NY-ESO-1\_CD1d細胞プール(図中のCMV)及びFreeStyle 293F\_Tet-on\_NY-ESO-1\_CD1d細胞プール(図中のTet-on)の各種指標に対する経時変化を示す。図2-1はCMV及びTet-onの $1 \times 10^6$ 細胞あたりのNY-ESO-1発現量を示す。縦軸はNY-ESO-1の発現量を示し、横軸は感染後培養日数を示す。

[図2-2]図2-2はCMV及びTet-onのNY-ESO-1陽性率を示す。縦軸はNY-ESO-1陽性率を示し、横軸は感染後培養日数を示す。

[図2-3]図2-3はCMV及びTet-onの生存率を示す。縦軸は各プールの細胞生存率を示し、横軸は感染後培養日数を示す。

[図2-4]図2-4はCMV及びTet-onの細胞の倍加時間を示す。縦軸は倍加時間を示し、横軸は感染後培養日数を示す。

[図3]図3はFreeStyle 293F\_CMV\_NY-ESO-1\_CD1d細胞プール(図中のCMV)とFreeStyle 293F\_Tet-on\_NY-ESO-1\_CD1d細胞プール(図中のTet-on)から単離した各種クローンにおけるNY-ESO-1発現量を示す。No.はクローンの番号を示し、数値は $1 \times 10^6$ 細胞あたりのNY-ESO-1発現量を示す。

[図4-1]図4-1はNY-ESO-1発現B16担癌マウスにおけるaAVC(3T3)-NY-ESO-1細胞、抗PD-1抗体及びそれらを併用した

場合の抗腫瘍効果を示す。縦軸は腫瘍体積を、横軸は a A V C ( 3 T 3 ) - N Y - E S O - 1 細胞投与後日数を示す。縦線は平均値±平均の標準誤差を示し、括弧内は計測時のマウスの匹数を示す。

[図4-2]図4-2はNY-ESO-1発現CT26担癌マウスにおけるaAVC(3T3)-NY-ESO-1細胞、抗PD-1抗体及びそれらを併用した場合の抗腫瘍効果を示す。縦軸は腫瘍体積を、横軸はaAVC(3T3)-NY-ESO-1細胞投与後日数を示す。縦線は平均値±平均の標準誤差を示す。

[図5]図5はNY-ESO-1発現CT26担癌マウスにおけるaAVC(3T3)-NY-ESO-1細胞、抗CTLA-4抗体及びそれらを併用した場合の抗腫瘍効果を示す。縦軸は腫瘍体積を、横軸はがん細胞接種後日数を示す。縦線は平均値±平均の標準誤差を示す。aAVC(3T3)-NY-ESO-1細胞、抗CTLA-4抗体の併用群の18日目以降の例数は9とする。

### 発明を実施するための形態

[0013] 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。

#### [0014] <人工アジュバントベクター細胞>

本明細書において、「人工アジュバントベクター細胞」と「aAVC」は、同義であり、相互互換的に用いられ、CD1dポリペプチド（以下、「CD1d」とも称する）をコードするポリヌクレオチド及び1又は2以上の任意のがん抗原又はその断片をコードするポリヌクレオチドを含む細胞を意味する。

本明細書において、「ポリヌクレオチドを含む」とは、細胞が内在的に該ポリペプチドを有している、又は外来的な方法により該ポリヌクレオチドが導入された状態を表す。ここで「内在」又は「内在的」とは、単離された細

胞が特定の遺伝子又はポリヌクレオチドを含んでいる、又はタンパク質を発現している等の当業者により通常使用される意味で使用されうる。また、「外来性」又は「外来的」とは、人工的に作製された遺伝子又はポリヌクレオチド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ポリヌクレオチドによりそれらがコードするタンパク質を人為的に発現させることを指す用語として相互互換的に使用される。

[0015] <本発明の a A V C - N Y - E S O - 1 細胞>

本発明は、

C D 1 d をコードするポリヌクレオチド、及び

誘導型プロモーターに作動可能に連結された N Y - E S O - 1 又はその断片をコードするポリヌクレオチド

を含む、ヒト由来細胞（本明細書において、「a A V C - N Y - E S O - 1 細胞」とも称する）を提供する。

[0016] 1. ヒト由来細胞

本発明で使用されるヒト由来細胞は、正常細胞又はがん組織由来の細胞であり、C D 1 d を内在的に発現していてもよい。

正常細胞としては、任意のヒト組織より単離及び／又は精製された細胞、特定の細胞種由来の細胞、ヒト組織由来の株化細胞、幹細胞より分化させた細胞等のヒト由来の細胞を用いることができる。また、がん組織由来の細胞としては、患者のがん組織より単離及び／又は精製された細胞、又はヒトがん組織由来の株化細胞を用いることができる。ここで、「単離」とは、生体組織からの分離を意味する。また、「精製」とは、ヒト由来の細胞を、細胞が由来する組織に含まれるその他の成分の 1 以上からの分離を意味する。細胞の単離及び精製は、公知の方法により行うことができる。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、正常細胞である。

[0017] 任意のヒト組織より単離及び／又は精製された細胞は、例えば、胃、小腸、大腸、肺、膵臓、腎臓、肝臓、胸腺、脾臓、前立腺、卵巣、子宮、骨髄、

皮膚、筋肉、又は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、本発明で使用するヒト由来細胞は、非血球細胞である。

[0018] 特定の細胞種由来の細胞は、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、又は免疫細胞（例えば、樹状細胞、マクロファージ、B細胞等）等）由来の細胞である。

[0019] ヒト組織由来の株化細胞は、当業者により公知の方法を用いて作製することができ、又は商業的に入手することができる。当該株化細胞としては、例えば、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、又はそれら細胞に由来する細胞が挙げられる。1つの実施形態において、本発明で使用するヒト由来細胞は、HEK293細胞に由来する細胞である。1つの実施形態において、HEK293細胞に由来する細胞は、FreeStyle™ 293-F細胞である。

[0020] 幹細胞より分化させた細胞は、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）から分化させた細胞である。iPS細胞又はES細胞の作製及び該細胞から分化させた細胞は、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。

[0021] がん組織由来の細胞は、当業者に公知の方法により、患者のがん組織より単離及び／又は精製により取得することができる。また、当業者がAmerican Type Culture Collection（ATCC（登録商標））等の機関より一般的に入手可能なヒトがん組織由来の株化細胞を用いることもできる。

[0022] 2. NY-ESO-1

本発明のaAVC-NY-ESO-1細胞は、がん抗原として、ニューヨ

ーク食道扁平上皮がん1 (New York esophageal squamous cell carcinoma 1; NY-ESO-1) 又はその断片をコードするポリヌクレオチドを含んでいる。NY-ESO-1 は、がん／精巣抗原1 (cancer/testis antigen 1; CTAG1) ととも呼ばれるタンパク質であり、様々ながんにおいて発現が認められるが、成体の正常組織では精巣のみに発現することが知られている。

[0023] 本発明で使用されるNY-ESO-1は、天然に存在するNY-ESO-1であってもよく、又は、aAVCとして投与した場合にNY-ESO-1特異的T細胞を誘導する限り、その改変体であってもよい。1つの実施形態において、本発明で使用されるNY-ESO-1は、哺乳動物（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NY-ESO-1である。1つの実施形態において、NY-ESO-1は、ヒトNY-ESO-1である。1つの実施形態において、ヒトNY-ESO-1は、配列番号2に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドである。1つの実施形態において、ヒトNY-ESO-1は、配列番号2に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドと少なくとも90%、95%、96%、97%、98%、又は99%以上の同一性を有するアミノ酸配列からなるポリペプチドである。1つの実施形態において、ヒトNY-ESO-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、好ましくは1～10個、より好ましくは1～7個、さらにより好ましくは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ポリペプチドである。また、本発明で使用されるNY-ESO-1は、aAVCとして投与した場合にNY-ESO-1特異的T細胞を誘導する限り、NY-ESO-1の断片であってもよい。1つの実施形態において、NY-ESO-1の断片は、ヒトNY-ESO-1の断片である。1つの実施形態において、ヒトNY-ESO-1の断片は、配列番号2に示されるアミノ酸配列の、20%以上、30%以上、40%以上、50%以上、55%以上、6

0%以上、65%以上、70%以上、75%以上、80%以上、85%以上、90%以上、又は95%以上の長さを有するポリペプチドである。aAVCとして投与することによるNY-ESO-1特異的T細胞の誘導は、例えば、後記実施例1-2に記載の方法により評価できる。本発明で使用されるNY-ESO-1又はその断片をコードするポリヌクレオチドは、当該分野で公知の方法を用いて、使用されるNY-ESO-1又はその断片のアミノ酸配列から塩基配列を設計し、作製することができる。1つの実施形態において、NY-ESO-1をコードするポリヌクレオチドは、配列番号1に示される塩基配列からなるポリヌクレオチドである。

[0024] 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

[0025] 3. CD1d

本発明のaAVC-NY-ESO-1細胞は、CD1dをコードするポリヌクレオチドを含んでいる。CD1dは、細胞表面に発現するMHCクラスI様糖タンパク質である。本発明で使用されるCD1dは、ヒト由来細胞において発現させた場合にCD1dの機能を有する限りにおいて、天然に存在するCD1d又はその改変体であってよい。CD1dの機能としては、CD1dリガンド（例えば、 $\alpha$ -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、例えば、非特許文献5のFig. 1に記載のin vitroの

評価系において評価することができる。簡単には、 $\alpha$ -GalCer存在下で培養したCD1d発現細胞をNK細胞と共培養し、培養液中のIFN- $\gamma$ の量を測定することにより、NK細胞の活性化を評価することができる。

[0026] 1つの実施形態において、本発明で使用されるCD1dは哺乳動物（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、CD1dはヒトCD1d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からなるポリペプチドである。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1～10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の機能を有するポリペプチドである。1つの実施形態において、ヒトCD1dは、配列番号4に示されるポリペプチドと少なくとも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の機能を有するポリペプチドである。

[0027] 本発明で使用されるCD1dをコードするポリヌクレオチドは、使用されるヒト由来細胞に内在するポリヌクレオチドであってもよく、又は、外来的に導入されたポリヌクレオチドであってもよい。CD1dをコードするポリヌクレオチドをヒト由来細胞に外来的に導入する場合、該ポリヌクレオチドは、当該分野で公知の方法を用いて、使用されるCD1dのアミノ酸配列から塩基配列を設計し、作製することができる。1つ実施形態において、CD1dをコードするポリヌクレオチドは、配列番号3に示される塩基配列からなるポリヌクレオチドである。

[0028] 4. プロモーター

本発明のaAVC-NY-ESO-1細胞において、NY-ESO-1又はその断片をコードするポリヌクレオチドは、誘導型プロモーターに作動可能に連結されている。本明細書において、「作動可能に連結された」とは、

宿主細胞におけるポリペプチドの発現をプロモーターによって制御するために当該プロモーターがポリヌクレオチドに連結されている状態を意味する。

また、本発明の a A V C - N Y - E S O - 1 細胞において、C D 1 d をコードするポリヌクレオチドをヒト由来細胞に外来的に導入する場合、該ポリヌクレオチドをプロモーターに作動可能に連結させてもよい。この場合、C D 1 d を発現させるための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誘導型プロモーターのいずれも用いることができる。

[0029] 「誘導型プロモーター」とは、誘導的に発現を促進するプロモーターであり、当該プロモーターを駆動する誘導因子（本明細書において、「誘導型プロモーターの誘導因子」又は単に「誘導因子」とも称する）の存在下において、該プロモーターに作動可能に連結されたポリヌクレオチドの発現を誘導することができるプロモーターをいう。誘導型プロモーターとしては、例えば、温熱誘導型プロモーター（例えば、ヒートショックプロモーター）、薬剤誘導型プロモーターが挙げられる。1つの実施形態において、誘導型プロモーターは、薬剤誘導型プロモーターである。本明細書において、「薬剤誘導型プロモーター」とは、誘導因子である薬剤により該プロモーターに作動可能に連結されたポリヌクレオチドの発現が調節されるプロモーターを意味する。薬剤誘導型プロモーターとしては、例えば、C u m a t e オペレーター配列、λオペレーター配列（例えば、1 2 × λ O p）、テトラサイクリン遺伝子発現誘導系の誘導型プロモーター（以下、「テトラサイクリン系誘導型プロモーター」という）等が挙げられる。C u m a t e オペレーター配列は、C y m R リプレッサー存在下において不活性であるが、誘導因子である C u m a t e の存在下において、C y m R リプレッサーと解離して、該プロモーターに作動可能に連結されたポリヌクレオチドの発現を誘導する。λオペレーター配列は、二量体化により転写活性化能を有するアクチベーター（λ R e p - G y r B - A D）を二量体化する誘導因子（例えば、クメルマイシン）の存在下において、該プロモーターに作動可能に連結されたポリヌクレオチドの発現を誘導する。テトラサイクリン系誘導型プロモーターは、誘

導因子であるテトラサイクリン又はその誘導体（例えば、ドキシサイクリン等）及びリバーステトラサイクリン制御性トランス活性化因子（rtTA）（例えば、Tet-On 3G）の存在下において、該プロモーターに作動可能に連結されたポリヌクレオチドの発現を誘導する。テトラサイクリン系誘導型プロモーターとしては、例えば、TRE3Gプロモーターが挙げられる。1つの実施形態において、薬剤誘導型プロモーターは、テトラサイクリン系誘導型プロモーターであり、1つの実施形態において、テトラサイクリン系誘導型プロモーターは、TRE3Gプロモーターである。

[0030] 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 $\alpha$ プロモーター等が挙げられる。

[0031] 本発明のaAVC-NY-ESO-1細胞において、当該細胞を誘導型プロモーターの誘導因子の存在下で培養することによりNY-ESO-1又はその断片の発現が誘導され得る。1つの実施形態において、本発明のaAVC-NY-ESO-1細胞は、NY-ESO-1又はその断片を発現している。1つの実施形態において、本発明のaAVC-NY-ESO-1細胞は、CD1d及びNY-ESO-1又はその断片を発現している。1つの実施形態において、本発明のaAVC-NY-ESO-1細胞におけるNY-ESO-1又はその断片の発現量の下限値は、10<sup>6</sup>細胞当たり88ngを超える、90ng以上、100ng以上、150ng以上、200ng以上、245ng以上、250ng以上、300ng以上、400ng以上、500ng以上、600ng以上、700ng以上、800ng以上、900ng以上、1000ng以上、1500ng以上、2000ng以上、2500ng以上、3000ng以上、4000ng以上、5000ng以上、6000ng以上、7000ng以上、8000ng以上、9000ng以上、又は10000ng以上であり、上限値は30000ng以下、35000

ng 以下、40000ng 以下、43890ng 以下、45000ng 以下、50000ng 以下、55000ng 以下、60000ng 以下である。

1つの実施形態において、本発明のaAVC-NY-ESO-1細胞におけるNY-ESO-1又はその断片の発現量は、89ng~50000ngである。1つの実施形態において、本発明のaAVC-NY-ESO-1細胞におけるNY-ESO-1又はその断片の発現量は、89ng~45000ngである。1つの実施形態において、本発明のaAVC-NY-ESO-1細胞におけるNY-ESO-1又はその断片の発現量は、89ng~43890ngである。1つの実施形態において、本発明のaAVC-NY-ESO-1細胞におけるNY-ESO-1又はその断片の発現量は、89ng~40000ngである。1つの実施形態において、本発明のaAVC-NY-ESO-1細胞におけるNY-ESO-1又はその断片の発現量は、89ng~35000ngである。1つの実施形態において、本発明のaAVC-NY-ESO-1細胞におけるNY-ESO-1又はその断片の発現量は、106ng~45000ngである。1つの実施形態において、本発明のaAVC-NY-ESO-1細胞におけるNY-ESO-1又はその断片の発現量は、106ng~43890ngである。1つの実施形態において、本発明のaAVC-NY-ESO-1細胞におけるNY-ESO-1又はその断片の発現量は、106ng~40000ngである。1つの実施形態において、本発明のaAVC-NY-ESO-1細胞におけるNY-ESO-1又はその断片の発現量は、106ng~35000ngである。1つの実施形態において、本発明のaAVC-NY-ESO-1細胞におけるNY-ESO-1又はその断片の発現量は、245ng~45000ngである。1つの実施形態において、本発明のaAVC-NY-ESO-1細胞におけるNY-ESO-1又はその断片の発現量は、245ng~43890ngである。1つの実施形態において、本発明のaAVC-NY-ESO-1細胞におけるNY-ESO-1又はその断片の発現量は、245ng~40000ngである。1つの実施形態において、本発明のaAVC-NY-E

SO-1細胞におけるNY-ESO-1又はその断片の発現量は、245 ng～35000 ngである。1つの実施形態において、本発明のaAVC-NY-ESO-1細胞におけるNY-ESO-1又はその断片の発現量は、1000 ng～45000 ngである。1つの実施形態において、本発明のaAVC-NY-ESO-1細胞におけるNY-ESO-1又はその断片の発現量は、1000 ng～43890 ngである。1つの実施形態において、本発明のaAVC-NY-ESO-1細胞におけるNY-ESO-1又はその断片の発現量は、1000 ng～40000 ngである。1つの実施形態において、本発明のaAVC-NY-ESO-1細胞におけるNY-ESO-1又はその断片の発現量は、1000 ng～35000 ngである。

[0032] 5. CD1dリガンド

1つの実施形態において、本発明のaAVC-NY-ESO-1細胞は、細胞表面にCD1dリガンドを積載していてもよい。本明細書において、「細胞表面にCD1dリガンドを積載した」とは、aAVC細胞の表面にCD1dリガンドが結合している状態を指す。

細胞表面へのCD1dリガンドの積載は、＜本発明のaAVC-NY-ESO-1細胞の作製方法＞の項に記載のように、CD1dを発現する細胞にCD1dリガンド（例えば、 $\alpha$ -GalCer）をパルスすることによって行い得る。本明細書において、「CD1dリガンドをパルスする」とは、培養培地中にて細胞をCD1dリガンドと接触させることを指す。CD1dリガンドをパルスされたaAVCにおいては、すべての、又は少なくとも一部のCD1dにCD1dリガンドが積載されている。

[0033] 本発明で使用されるCD1dリガンドとしては、例えば、 $\alpha$ -ガラクトシルセラミド（ $\alpha$ -GalCer）、 $\alpha$ -C-ガラクトシルセラミド（ $\alpha$ -C-GalCer）、7DW8-5、イソグロボトリヘキソシルセラミド（iGb3）等が存在する。1つの実施形態において、CD1dリガンドは、 $\alpha$ -GalCerである。 $\alpha$ -GalCerは、化学名は（2S, 3S, 4R）-1-O-（ $\alpha$ -D-ガラクトシル）-N-ヘキサコサノイル-2-アミ

ノ-1, 3, 4-オクタデカントリオールであり、CAS RN: 158021-47-7で登録され、分子式:  $C_{50}H_{99}NO_9$ で表される物質（分子量: 858.34）である。 $\alpha$ -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、 $\alpha$ -Galactosylceramide（フナコシ、Cat. KRN7000））を使用してもよい。

[0034] <本発明のaAVC-NY-ESO-1細胞の作製方法>

本発明のaAVC-NY-ESO-1細胞は、ヒト由来細胞に、誘導型プロモーターに作動可能に連結されたNY-ESO-1又はその断片をコードするポリヌクレオチド、及び、必要に応じて、CD1dをコードするポリヌクレオチドを導入することにより作製することができる。本発明のaAVC-NY-ESO-1細胞の作製方法は、さらに、aAVC-NY-ESO-1細胞を培養する工程、細胞をクローニングする工程、及び細胞表面にCD1dリガンドを積載させる工程を含んでもよい。

[0035] 1. ヒト由来細胞へのポリヌクレオチドの導入

本発明のaAVC-NY-ESO-1細胞は、ヒト由来細胞にCD1dをコードするポリヌクレオチド及び誘導型プロモーターに作動可能に連結されたNY-ESO-1又はその断片をコードするポリヌクレオチドを導入することにより作製することができる（以下、導入されるポリヌクレオチドを「目的ポリヌクレオチド」とも称する）。或いは、ヒト由来細胞としてCD1dを内在的に発現する細胞を用いる場合には、本発明のaAVC-NY-ESO-1細胞は、CD1dを内在的に発現するヒト由来細胞に誘導型プロモーターに作動可能に連結されたNY-ESO-1又はその断片をコードするポリヌクレオチドを導入することにより作製することができる。

[0036] CD1dをコードするポリヌクレオチド及びNY-ESO-1又はその断片をコードするポリヌクレオチドは、例えば、NCBI RefSeq 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、前記ポリヌクレオチドは、その塩基配列に基づいてホスホロアミダイト法等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断片を組み合わせることで作製することができる。

[0037] ヒト由来細胞への目的ポリヌクレオチドの導入は、エレクトロポレーション、リポフェクション、マイクロインジェクション等の非ウイルスベクター系の方法又はウイルスベクター系のいずれかの方法を用いて行うことができる。非ウイルスベクター系の方法を用いる場合は、目的ポリヌクレオチドは、プラスミドベクター、cDNA等の形態又はmRNAの形態であってよい。

[0038] プラスミドベクター又はウイルスベクターは、ヒト由来細胞中でCD1d又はNY-ESO-1若しくはその断片を外来的に発現させるための発現ベクターとして使用しうる。発現ベクターは、目的とするポリペプチドを発現できるものであれば特に制限されず、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。発現ベクターは、プラスミドベクターとしては、例えば、pcDNAシリーズ（Thermo Fisher Scientific社）、pALTER（登録商標）-MAX（プロメガ）、又はpHEK293 Ultra Expression Vector（タカラバイオ社）等）を使用することができ、ウイルスベクターとしては、例えば、レンチウイルス、アデノウイルス、レトロウイルス、又はアデノ随伴ウイルスを使用することができる。例えば、ヒト由来細胞への目的ポリヌクレオチドの導入にレンチウイルスを使用する場合、該レンチウイルスは、pLVSI-N-CMV/EF1 $\alpha$ ベクター（タカラバイオ社）、pLentiベクター（Thermo Fisher Scientific社）を用いて作製できる。ヒト由来細胞においてCD1dとNY-ESO-1又はその断片を外来的に発現させる場合、CD1dをコードするポリヌクレオチドとNY-ESO-1又はその断片をコードするポリヌクレオチドを、1つの発現ベクターを用いてヒト由来細胞に導入してもよく、別々の発現ベクターを用いて導入し

てもよい。また、発現ベクターには、目的とする遺伝子又はポリヌクレオチド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。発現ベクターは、さらに、開始コドン及び終止コドン、エンハンサー配列、非翻訳領域、スプライシング接合部、ポリアダニレーション部位、又は複製可能単位等を含んでいてもよい。

[0039] 1つの実施形態において、本発明の a A V C - N Y - E S O - 1 細胞の作製方法は、ヒト由来細胞に C D 1 d をコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクター及び誘導型プロモーターに作動可能に連結された N Y - E S O - 1 又はその断片をコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターを導入する工程を含む。1つの実施形態において、本発明の a A V C - N Y - E S O - 1 細胞の作製方法は、ヒト由来細胞に C D 1 d をコードするポリヌクレオチド及び誘導型プロモーターに作動可能に連結された N Y - E S O - 1 又はその断片をコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターを導入する工程を含む。1つの実施形態において、本発明の a A V C - N Y - E S O - 1 細胞の作製方法は、内在的に C D 1 d を発現するヒト由来細胞に、誘導型プロモーターに作動可能に連結された N Y - E S O - 1 又はその断片をコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターを導入する工程を含む。これらの方法について、1つの実施形態において、発現ベクターは、プラスミドベクター又はウイルスベクターであり、1つの実施形態において、発現ベクターは、ウイルスベクターであり、1つの実施形態において、ウイルスベクターは、レンチウイルスベクターである。

[0040] 1つの実施形態において、本発明の a A V C - N Y - E S O - 1 細胞は、ヒト由来細胞に C D 1 d をコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクター及び誘導型プロモーターに作動可能に連結された N Y - E S O - 1 又はその断片をコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターを導入することにより作製された細胞である。1つの実施形態において、本発明の a A V C - N Y - E S O - 1 細胞は、ヒト由来細胞に C D 1 d をコードするポリヌクレオ

チド及び誘導型プロモーターに作動可能に連結されたNY-ESO-1又はその断片をコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターを導入することにより作製された細胞である。1つの実施形態において、本発明のaAVC-NY-ESO-1細胞は、内在的にCD1dを発現するヒト由来細胞に、誘導型プロモーターに作動可能に連結されたNY-ESO-1又はその断片をコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターを導入することにより作製された細胞である。これらの細胞について、1つの実施形態において、発現ベクターは、プラスミドベクター又はウイルスベクターであり、1つの実施形態において、発現ベクターは、ウイルスベクターであり、1つの実施形態において、ウイルスベクターは、レンチウイルスベクターである。1つの実施形態において、作製されたaAVC-NY-ESO-1細胞は、染色体外又は細胞核のゲノムDNA上に、CD1dをコードするポリヌクレオチドと誘導型プロモーターに作動可能に連結されたNY-ESO-1又はその断片をコードするポリヌクレオチドを有する。1つの実施形態において、作製された細胞は、その細胞核のゲノムDNA上にCD1dをコードするポリヌクレオチド及び誘導型プロモーターに作動可能に連結されたNY-ESO-1又はその断片をコードするポリヌクレオチドを有する。

[0041] 2. aAVC-NY-ESO-1細胞の培養

前記の方法にて作製されたaAVC-NY-ESO-1細胞は、さらに培養により増殖させることができる。aAVC-NY-ESO-1細胞を維持するため、又は増殖させるための細胞の培養は、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 (Science; 1952; 122: 501)、DMEM培地 (Virology; 1959; 8: 396-397)、RPMI 1640培地 (J. Am. Med. Assoc.; 1967; 199: 519-524)、199培地 (Proc. Soc. Exp. Biol. Med.; 1950; 73: 1-8)、FreeStyle<sup>™</sup> 293 Expression 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、Knock Out 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。1つの実施形態において、培養に使用される培地は、無血清培地又は化学的に定義された培地である。

[0042] 培養条件（例えば、培養時間、温度、培地のpH、CO<sub>2</sub>濃度等の培養条件）は当業者により適宜選択され得る。培地のpHは約6～8であるのが好ましく、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、CO<sub>2</sub>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時間行なわれる。必要により通気や攪拌を行うこともできる。

[0043] aAVC-NY-ESO-1細胞の培養時にaAVC-NY-ESO-1細胞を誘導型プロモーターの誘導因子に接触させて、NY-ESO-1又はその断片の発現を誘導させてもよい。1つの実施形態において、aAVC-NY-ESO-1細胞の作製方法は、aAVC-NY-ESO-1細胞を誘導型プロモーターの誘導因子の存在下で培養することによりNY-ESO-1又はその断片の発現を誘導させる工程を含む。1つの実施形態において、当該誘導型プロモーターは薬剤誘導型プロモーターであり、当該作製方法は、aAVC-NY-ESO-1細胞を薬剤誘導型プロモーターの誘導因子の存在下で培養する工程を含む。薬剤誘導型プロモーターを使用する場合、誘導因子であるテトラサイクリン、ドキシサイクリン、Cumate、クメルマイシン等の薬剤を加えた培地にて細胞を培養し、薬剤誘導型プロモーターに作動可能に連結された遺伝子又はポリヌクレオチドの発現を誘導させても

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。1つの実施形態において、当該薬剤誘導型プロモーターはテトラサイクリン系誘導型プロモーターであり、当該作製方法は、aAVC-NY-ESO-1細胞をテトラサイクリン又はその誘導体及びrtTAの存在下で培養する工程を含む。1つの実施形態において、テトラサイクリン系誘導型プロモーターはTRE3Gプロモーターであり、当該作製方法は、aAVC-NY-ESO-1細胞をテトラサイクリン又はその誘導体及びTet-On 3Gの存在下で培養する工程を含む。得られたaAVC-NY-ESO-1細胞におけるCD1d及びNY-ESO-1又はその断片の発現量は、抗CD1d抗体又は抗NY-ESO-1抗体を用いたWestern Blot法、ELISA法、フローサイトメトリー法等の当業者によって公知の方法にて測定することができる。

[0044] 3. aAVC-NY-ESO-1細胞のクローニング

細胞にポリヌクレオチドを導入する場合、目的ポリヌクレオチドが導入された細胞及び導入されていない細胞が混在しているため、さらに、目的ポリヌクレオチドを細胞核のゲノムDNA上に組み込む場合には、その組み込まれている場所も細胞により異なるため、不均質(heterogeneous)な細胞の集団となっている場合がある。本明細書において、前記の不均質な細胞の集団を「細胞プール」と称す。該細胞プールから単一の遺伝子型を有する細胞を取得する方法(本明細書にて、「クローニング」という)により、CD1dをコードするポリヌクレオチド及び誘導型プロモーターに作動可能に連結されたNY-ESO-1又はその断片をコードするポリヌクレオチドが導入された1細胞(以下、「クローン化された細胞」という。)を取得し増殖させることにより、単一の遺伝子型を有する細胞集団(以下、「クローン化された細胞の集団」という。)を取得することができる。aAVC-NY-ESO-1細胞のクローニングは、当業者によく知られている方法を用いて実施することができ、例えば、限外希釈法、シングルセルソーティング法、又はコロニーピックアップ法を用いることができる。1つの実施

形態において、aAVC-NY-ESO-1細胞のクローニング方法は限外希釈法、シングルセルソーティング法、又はコロニーピッキング法の1又は2以上の方法を組み合わせて用いることもできる。1つの実施形態において、aAVC-NY-ESO-1細胞のクローニング方法は限外希釈法である。

[0045] 前記方法にて取得された各クローン化されたaAVC-NY-ESO-1細胞について、その一部を誘導型プロモーターの誘導因子に接触させて、得られた細胞におけるCD1d及びNY-ESO-1又はその断片の発現量を測定することによって、誘導因子の存在下においてCD1d及びNY-ESO-1又はその断片について目的の発現量を示す、クローン化されたaAVC-NY-ESO-1細胞の集団を選択することができる。選択したクローン化された細胞の集団を凍結状態で保存したもの（又は「凍結物」ともいう）を、リサーチセルバンク（RCB）として使用しうる。RCBの細胞を培養して増殖させ、凍結させたものをマスターセルバンク（MCB）として使用しうる。MCBの細胞を培養して増殖させ、凍結させたものをワーキングセルバンク（WCB）として使用しうる。WCBの細胞を培養したものを医薬品の原料として使用しうる。各セルバンクは、凍結保護剤を含んでもよい。各セルバンクは、複数の容器（例えば、2～10000の容器、例えば、10～1000の容器、例えば、100～500の容器）に分注され、凍結状態で保管してもよい。クローン化されたaAVC-NY-ESO-1細胞の解凍、培養、及び誘導因子との接触、並びにCD1d及びNY-ESO-1又はその断片の発現量の測定はそれぞれ、当業者に公知の方法で行うことができ、培養、誘導因子との接触、及び発現量の測定は、例えば、「2. aAVC-NY-ESO-1細胞の培養」に記載の方法等を使用して行うことができる。1つの実施形態において、クローン化されたaAVC-NY-ESO-1細胞の培養、及び誘導因子との接触、並びにCD1d及びNY-ESO-1又はその断片の発現量の測定は、RCB及びWCBの解凍後に行うことができる。

[0046] 1つの実施形態において、得られるaAVC-NY-ESO-1細胞におけるNY-ESO-1又はその断片の発現量の下限値は、 $10^6$ 細胞当たり88ngを超える、90ng以上、100ng以上、150ng以上、200ng以上、245ng以上、250ng以上、300ng以上、400ng以上、500ng以上、600ng以上、700ng以上、800ng以上、900ng以上、1000ng以上、1500ng以上、2000ng以上、2500ng以上、3000ng以上、4000ng以上、5000ng以上、6000ng以上、7000ng以上、8000ng以上、9000ng以上、又は10000ng以上であり、上限値は30000ng以下、35000ng以下、40000ng以下、43890ng以下、45000ng以下、50000ng以下、55000ng以下、60000ng以下である。1つの実施形態において、得られるaAVC-NY-ESO-1細胞におけるNY-ESO-1又はその断片の発現量は、89ng~50000ngである。1つの実施形態において、得られるaAVC-NY-ESO-1細胞におけるNY-ESO-1又はその断片の発現量は、89ng~45000ngである。1つの実施形態において、得られるaAVC-NY-ESO-1細胞におけるNY-ESO-1又はその断片の発現量は、89ng~43890ngである。1つの実施形態において、得られるaAVC-NY-ESO-1細胞におけるNY-ESO-1又はその断片の発現量は、89ng~40000ngである。1つの実施形態において、得られるaAVC-NY-ESO-1細胞におけるNY-ESO-1又はその断片の発現量は、89ng~35000ngである。1つの実施形態において、得られるaAVC-NY-ESO-1細胞におけるNY-ESO-1又はその断片の発現量は、106ng~45000ngである。1つの実施形態において、得られるaAVC-NY-ESO-1細胞におけるNY-ESO-1又はその断片の発現量は、106ng~43890ngである。1つの実施形態において、得られるaAVC-NY-ESO-1細胞におけるNY-ESO-1又はその断片の発現量は、106ng~40000ngである。1

つの実施形態において、得られる aAVC-NY-ESO-1 細胞における NY-ESO-1 又はその断片の発現量は、106 ng～35000 ng である。1つの実施形態において、得られる aAVC-NY-ESO-1 細胞における NY-ESO-1 又はその断片の発現量は、245 ng～45000 ng である。1つの実施形態において、得られる aAVC-NY-ESO-1 細胞における NY-ESO-1 又はその断片の発現量は、245 ng～43890 ng である。1つの実施形態において、得られる aAVC-NY-ESO-1 細胞における NY-ESO-1 又はその断片の発現量は、245 ng～40000 ng である。1つの実施形態において、得られる aAVC-NY-ESO-1 細胞における NY-ESO-1 又はその断片の発現量は、245 ng～35000 ng である。1つの実施形態において、得られる aAVC-NY-ESO-1 細胞における NY-ESO-1 又はその断片の発現量は、1000 ng～45000 ng である。1つの実施形態において、得られる aAVC-NY-ESO-1 細胞における NY-ESO-1 又はその断片の発現量は、1000 ng～43890 ng である。1つの実施形態において、得られる aAVC-NY-ESO-1 細胞における NY-ESO-1 又はその断片の発現量は、1000 ng～40000 ng である。1つの実施形態において、得られる aAVC-NY-ESO-1 細胞における NY-ESO-1 又はその断片の発現量は、1000 ng～35000 ng である。

[0047] 4. aAVC-NY-ESO-1 細胞への CD1d リガンドの積載

aAVC-NY-ESO-1 細胞に CD1d リガンドをパルスすることによって、CD1d リガンドを積載した aAVC-NY-ESO-1 細胞を作製することができる。CD1d リガンドをパルスする条件（例えば、細胞の培養培地に CD1d リガンドを添加するタイミング、培養培地中の CD1d リガンドの濃度及び培養時間等）は、使用する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得る。aAVC-NY-ESO-1 細胞の培養培地に添加する CD1d リガンドの濃度は、特に限定されないが、例えば

、 $1\text{ ng/mL} \sim 10000\text{ ng/mL}$ の範囲で適宜選択され得る。1つの実施形態において、CD1dリガンドは、 $\alpha\text{-GalCer}$ である。1つの実施形態において、aAVC-NY-ESO-1細胞へのCD1dリガンドの積載は、該細胞と誘導因子との接触の前に行われ得る。1つの実施形態において、aAVC-NY-ESO-1細胞へのCD1dリガンドの積載は、該細胞と誘導因子との接触の後に行われ得る。1つの実施形態において、aAVC-NY-ESO-1細胞へのCD1dリガンドの積載は、該細胞と誘導因子との接触と同時にわれ得る。これらの実施形態において、aAVC-NY-ESO-1細胞は、好ましくは、クローン化されている。

[0048] 上記で作製したCD1d及びNY-ESO-1又はその断片を発現し、CD1dリガンドを積載しているaAVC-NY-ESO-1細胞において、該細胞の増殖を人為的な方法を用いて停止させてもよい。当該細胞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）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。1つの実施形態において、本発明のaAVC-NY-ESO-1細胞は、CD1d及びNY-ESO-1又はその断片を発現し、増殖を停止させた細胞であり得る。1つの実施形態において、本発明のaAVC-NY-ESO-1細胞は、CD1d及びNY-ESO-1又はその断片を発現し、CD1dリガンドを積載し、増殖を停止させた細胞であり得る。

[0049] <本発明の医薬組成物等>

本発明はまた、本発明のaAVC-NY-ESO-1細胞を含む医薬組成物を提供する。当該医薬組成物において、aAVC-NY-ESO-1細胞は、CD1d及びNY-ESO-1又はその断片を発現し、該細胞の表面にCD1dリガンドを積載している。1つの実施形態において、当該医薬組成物は、がんの処置に用いるための医薬組成物である。1つの実施形態において、CD1dリガンドは、 $\alpha\text{-GalCer}$ である。当該医薬組成物は、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、点滴用剤等の非経口剤が挙げられる。1つの実施形態において、本発明の医薬組成物は、aAVC-NY-ESO-1細胞の凍結物を含み得る。1つの実施形態において、本発明の医薬組成物は、aAVC-NY-ESO-1細胞の凍結物及び凍結保護剤を含み得る。1つの実施形態において、本発明の医薬組成物は、aAVC-NY-ESO-1細胞の懸濁液を含み得る。1つの実施形態において、本発明の医薬組成物は、aAVC-NY-ESO-1細胞の懸濁液及び凍結保護剤を含み得る。本発明はまた、がんの処置に用いるための医薬組成物を製造するための本発明のaAVC-NY-ESO-1細胞の使用であって、該細胞は、CD1d及びNY-ESO-1又はその断片を発現し、該細胞の表面にCD1dリガンドを積載している、使用を提供する。1つの実施形態において、CD1dリガンドは、 $\alpha$ -GalCerである。本発明はまた、がんを処置するための本発明のaAVC-NY-ESO-1細胞であって、CD1d及びNY-ESO-1又はその断片を発現し、該細胞の表面にCD1dリガンドを積載している、細胞を提供する。1つの実施形態において、CD1dリガンドは、 $\alpha$ -GalCerである。

[0050] 本発明はまた、本発明のaAVC-NY-ESO-1細胞を対象に投与する工程を含む、がんを処置する方法を提供する。当該方法において、aAVC-NY-ESO-1細胞は、CD1d及びNY-ESO-1又はその断片を発現し、該細胞の表面にCD1dリガンドを積載している。1つの実施形態において、CD1dリガンドは、 $\alpha$ -GalCerである。本明細書において、「対象」とは、哺乳動物（例えば、ヒト、サル、マウス、ラット、イヌ、チンパンジー等）であり、1つの実施形態において、対象はヒトである。本明細書において、「処置」とは、治療的処置及び予防的処置を含む意味で用いられる。aAVC-NY-ESO-1細胞を対象へ投与する場合、a

AVC-NY-ESO-1細胞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。対象へのaAVC-NY-ESO-1細胞の投与量及び投与回数は、がんの種類、位置、重症度、処置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-NY-ESO-1細胞の投与量は、例えば、対象への一回の投与において $1 \times 10^3 \text{ cells/kg} \sim 1 \times 10^9 \text{ cells/kg}$ を用いることができる。対象へのaAVC-NY-ESO-1細胞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、又は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。本発明の処置方法は、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。

[0051] 本発明の処置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、非小細胞肺癌、小細胞肺癌、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、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、及び網膜芽腫などの芽腫等が挙げられる。1つの実施形態において、本発明の処置の対象となるがんは、NY-ESO-1陽性のがんである。

[0052] 本発明の医薬組成物、使用、細胞、及びがんの処置方法において、aAVC-NY-ESO-1細胞におけるNY-ESO-1又はその断片の $10^6$ 細胞当たりの発現量は、例えば、下限値は88ngを超える、90ng以上、

100 ng 以上、150 ng 以上、200 ng 以上、245 ng 以上、250 ng 以上、300 ng 以上、400 ng 以上、500 ng 以上、600 ng 以上、700 ng 以上、800 ng 以上、900 ng 以上、1000 ng 以上、1500 ng 以上、2000 ng 以上、2500 ng 以上、3000 ng 以上、4000 ng 以上、5000 ng 以上、6000 ng 以上、7000 ng 以上、8000 ng 以上、9000 ng 以上、又は10000 ng 以上であり、上限値は30000 ng 以下、35000 ng 以下、40000 ng 以下、43890 ng 以下、45000 ng 以下、50000 ng 以下、55000 ng 以下、60000 ng 以下である。1つの実施形態において、aAVC-NY-ESO-1細胞におけるNY-ESO-1又はその断片の発現量の下限値は、 $10^6$ 細胞当たり88 ngを超える、90 ng 以上、100 ng 以上、150 ng 以上、200 ng 以上、245 ng 以上、250 ng 以上、300 ng 以上、400 ng 以上、500 ng 以上、600 ng 以上、700 ng 以上、800 ng 以上、900 ng 以上、1000 ng 以上、1500 ng 以上、2000 ng 以上、2500 ng 以上、3000 ng 以上、4000 ng 以上、5000 ng 以上、6000 ng 以上、7000 ng 以上、8000 ng 以上、9000 ng 以上、又は10000 ng 以上であり、上限値は30000 ng 以下、35000 ng 以下、40000 ng 以下、43890 ng 以下、45000 ng 以下、50000 ng 以下、55000 ng 以下、60000 ng 以下である。1つの実施形態において、aAVC-NY-ESO-1細胞におけるNY-ESO-1又はその断片の発現量は、89 ng～50000 ngである。1つの実施形態において、aAVC-NY-ESO-1細胞におけるNY-ESO-1又はその断片の発現量は、89 ng～45000 ngである。1つの実施形態において、aAVC-NY-ESO-1細胞におけるNY-ESO-1又はその断片の発現量は、89 ng～43890 ngである。1つの実施形態において、aAVC-NY-ESO-1細胞におけるNY-ESO-1又はその断片の発現量は、89 ng～40000 ngである。1つの実施形態において、

a AVC-NY-ESO-1 細胞における NY-ESO-1 又はその断片の発現量は、89 ng～35000 ng である。1つの実施形態において、a AVC-NY-ESO-1 細胞における NY-ESO-1 又はその断片の発現量は、106 ng～45000 ng である。1つの実施形態において、a AVC-NY-ESO-1 細胞における NY-ESO-1 又はその断片の発現量は、106 ng～43890 ng である。1つの実施形態において、a AVC-NY-ESO-1 細胞における NY-ESO-1 又はその断片の発現量は、106 ng～40000 ng である。1つの実施形態において、a AVC-NY-ESO-1 細胞における NY-ESO-1 又はその断片の発現量は、106 ng～35000 ng である。1つの実施形態において、a AVC-NY-ESO-1 細胞における NY-ESO-1 又はその断片の発現量は、245 ng～45000 ng である。1つの実施形態において、a AVC-NY-ESO-1 細胞における NY-ESO-1 又はその断片の発現量は、245 ng～43890 ng である。1つの実施形態において、a AVC-NY-ESO-1 細胞における NY-ESO-1 又はその断片の発現量は、245 ng～40000 ng である。1つの実施形態において、a AVC-NY-ESO-1 細胞における NY-ESO-1 又はその断片の発現量は、245 ng～35000 ng である。1つの実施形態において、a AVC-NY-ESO-1 細胞における NY-ESO-1 又はその断片の発現量は、1000 ng～45000 ng である。1つの実施形態において、a AVC-NY-ESO-1 細胞における NY-ESO-1 又はその断片の発現量は、1000 ng～43890 ng である。1つの実施形態において、a AVC-NY-ESO-1 細胞における NY-ESO-1 又はその断片の発現量は、1000 ng～40000 ng である。1つの実施形態において、a AVC-NY-ESO-1 細胞における NY-ESO-1 又はその断片の発現量は、1000 ng～35000 ng である。

[0053] <がんの処置に用いる細胞又は医薬組成物の製造方法>

本発明はまた、本発明の a AVC-NY-ESO-1 細胞を誘導型プロモ

ーターの誘導因子に接触させてNY-ESO-1又はその断片の発現を誘導させる工程を含む、がんの処置に用いる細胞又は医薬組成物の製造方法を提供する。1つの実施形態において、当該製造方法は、当該aAVC-NY-ESO-1細胞を誘導型プロモーターの誘導因子の存在下で培養することによりNY-ESO-1又はその断片の発現を誘導させる工程を含む。1つの実施形態において、当該製造方法は、細胞表面に $\alpha$ -GalCerを積載する工程をさらに含む。細胞表面へのCD1dリガンドの積載は、aAVC-NY-ESO-1細胞と誘導因子との接触の前でも後でも同時でもよい。本発明はまた、がんの処置に用いる医薬組成物の製造における本発明のaAVC-NY-ESO-1細胞の使用を提供する。

[0054] 本発明はまた、以下の工程を含む、がんの処置に用いる細胞又は医薬組成物の製造方法を提供する：

ヒト由来細胞にCD1dをコードするポリヌクレオチド及び誘導型プロモーターに作動可能に連結されたNY-ESO-1又はその断片をコードするポリヌクレオチドを導入する工程、又は

内在的にCD1dを発現するヒト由来細胞に誘導型プロモーターに作動可能に連結されたNY-ESO-1又はその断片をコードするポリヌクレオチドを導入する工程。

[0055] 1つの実施形態において、当該製造方法は、前記工程で得られた細胞（aAVC-NY-ESO-1細胞）を誘導型プロモーターの誘導因子に接触させてNY-ESO-1又はその断片の発現を誘導させる工程をさらに含む。1つの実施形態において、当該製造方法は、当該aAVC-NY-ESO-1細胞を誘導型プロモーターの誘導因子の存在下で培養することによりNY-ESO-1又はその断片の発現を誘導させる工程を含む。1つの実施形態において、当該製造方法は、細胞表面に $\alpha$ -GalCerを積載する工程をさらに含む。細胞表面へのCD1dリガンドの積載は、aAVC-NY-ESO-1細胞と誘導因子との接触の前でも後でも同時でもよい。

[0056] 本項に記載の製造方法に用いる細胞及び工程等に関する具体的な実施形態

については、前記の＜本発明の a A V C - N Y - E S O - 1 細胞＞及び＜本発明の a A V C - N Y - E S O - 1 細胞の作製方法＞の項に記載のとおりである。

[0057] ＜本発明の a A V C - N Y - E S O - 1 細胞と免疫チェックポイント阻害剤との併用＞

本発明はまた、本発明の a A V C - N Y - E S O - 1 細胞と免疫チェックポイント阻害剤を対象に投与する工程を含む、がんを処置する方法を提供する。本発明はまた、免疫チェックポイント阻害剤と併用される、本発明の a A V C - N Y - E S O - 1 細胞を含むがんを処置するための医薬組成物を提供する。本発明はまた、免疫チェックポイント阻害剤と併用される、がんを処置するための本発明の a A V C - N Y - E S O - 1 細胞を提供する。本発明はまた、免疫チェックポイント阻害剤と併用される、がんの処置に用いるための医薬組成物を製造するための本発明の a A V C - N Y - E S O - 1 細胞の使用を提供する。当該方法、医薬組成物、細胞又は使用において、本発明の a A V C - N Y - E S O - 1 細胞は、CD1d 及び NY-ESO-1 又はその断片を発現し、該細胞の表面に CD1d リガンドを積載している。

本明細書において、「免疫チェックポイント阻害剤」とは、免疫チェックポイント分子によって引き起こされる免疫細胞の抑制を解除することによって免疫を賦活する薬剤を意味する。免疫チェックポイント分子としては、プログラム細胞死-1 ( P r o g r a m m e d   c e l l   d e a t h   1 ; P D - 1 )、細胞傷害性Tリンパ球関連タンパク質4 ( c y t o t o x i c   T - l y m p h o c y t e - a s s o c i a t e d   p r o t e i n   4 ; C T L A - 4 )、T細胞免疫グロブリンドメイン及びムチンドメイン-3 ( T - c e l l   i m m u n o g l o b u l i n   d o m a i n   a n d   m u c i n   d o m a i n - 3 ; T I M - 3 )、リンパ球活性化遺伝子3 ( l y m p h o c y t e   a c t i v a t i o n   g e n e   3 ; L A G - 3 )、及びV型免疫グロブリンドメイン含有T細胞活性化抑制因子 ( V - t y p e   i m m u n o g l o b u l i n   d o m a i n - c o n t a i n i n

g suppressor of T-cell activation; VISTA) 等が挙げられる。これらの分子が担う免疫チェックポイントはPD-1系免疫チェックポイント、CTLA-4系免疫チェックポイント、TIM-3系免疫チェックポイント、LAG-3系免疫チェックポイント、及びVISTA系免疫チェックポイントと呼ばれる。免疫チェックポイント阻害剤は、例えば免疫チェックポイント分子又はそのリガンドに結合して、免疫チェックポイントの機能を阻害し得る。例えば、PD-1系免疫チェックポイント阻害剤は、PD-1とPD-L1又はPD-L2との結合を阻害することによりPD-1系免疫チェックポイントを阻害することができる。また、CTLA-4系免疫チェックポイント阻害剤は、CTLA-4とCD80又はCD86との結合を阻害することによりCTLA-4系免疫チェックポイントを阻害することができる。また、TIM-3系免疫チェックポイント阻害剤は、TIM-3とガレクチン-9との結合を阻害することによりTIM-3系免疫チェックポイントを阻害することができる。また、LAG-3系免疫チェックポイント阻害剤は、LAG-3とMHCクラスII分子との結合を阻害することによりLAG-3系免疫チェックポイントを阻害することができる。また、VISTA系免疫チェックポイント阻害剤は、VISTAとVSG-3/IGSF11との結合を阻害することにより、VISTA系免疫チェックポイントを阻害することができる。免疫チェックポイント阻害剤とは、PD-1系免疫チェックポイント、CTLA-4系免疫チェックポイント、TIM-3系免疫チェックポイント、LAG3系免疫チェックポイント、及びVISTA系免疫チェックポイント等の1以上の免疫チェックポイントを阻害することができる物質を指し、抗体、抗原結合性タンパク質、及び低分子化合物等が挙げられる。抗体には受容体又はリガンドのいずれかに結合するものが存在する。例えば、PD-1系免疫チェックポイントを阻害する抗体としては、抗PD-1抗体、抗PD-L1抗体、又は抗PD-L2抗体が挙げられ、例えば、ニボルマブ、ペムプロリズマブ、MK-3475、AMP-224、ビジリズマブ、AMP-514、ANB-0

11、BGB-A317、REGN-2810、HR301210、PF-06801591、JS-001、IBI-308、CBT-501、アベルマブ、アテゾリズマブ、BMS-936559、LY-3300054、JNJ-61610588、及びデュルバルマブが使用され得る。また、CTLA-4系免疫チェックポイントを阻害する抗体としては、抗CTLA-4抗体、抗CD80抗体、又は抗CD86抗体が挙げられ、例えば、イピリムマブ、及びトレメリムマブが使用され得る。また、TIM-3系免疫チェックポイントを阻害する抗体は、抗TIM-3抗体又は抗ガレクチン-9抗体が挙げられ、例えば、MGB453が使用され得る。また、VISTA系免疫チェックポイントを阻害する抗体は、抗VISTA抗体又は抗VSIg-3/IGSF11抗体からなる群から選択される抗体が挙げられ、例えば、JNJ-61610588が使用され得る。また、低分子化合物としてAUPM-170も用いられ得る。

[0058] 本発明のaAVC-NY-ESO-1細胞と免疫チェックポイント阻害剤との併用は、aAVC-NY-ESO-1細胞の抗腫瘍作用を増強し得る。1つの実施形態において、本発明のaAVC-NY-ESO-1細胞と併用され得る免疫チェックポイント阻害剤はPD-1系免疫チェックポイント阻害剤である。1つの実施形態において、本発明のaAVC-NY-ESO-1細胞と併用される免疫チェックポイント阻害剤は抗PD-1抗体、抗PD-L1抗体、又は抗PD-L2抗体である。1つの実施形態において、本発明のaAVC-NY-ESO-1細胞と併用される免疫チェックポイント阻害剤はニボルマブ、ペムプロリズマブ、アベルマブ、アテゾリズマブ、又はデュルバルマブである。1つの実施形態において、本発明のaAVC-NY-ESO-1細胞と併用される免疫チェックポイント阻害剤はニボルマブ又はペムプロリズマブである。1つの実施形態において、本発明のaAVC-NY-ESO-1細胞と併用される免疫チェックポイント阻害剤はペムプロリズマブである。また別の実施形態において、本発明のaAVC-NY-ESO-1細胞と併用され得る免疫チェックポイント阻害剤はCTLA-4系

免疫チェックポイント阻害剤である。1つの実施形態において、本発明の a A V C - N Y - E S O - 1 細胞と併用される免疫チェックポイント阻害剤は抗 C T L A - 4 抗体、抗 C D 8 0 抗体、又は抗 C D 8 6 抗体である。1つの実施形態において、本発明の a A V C - N Y - E S O - 1 細胞と併用される免疫チェックポイント阻害剤はイピリムマブ又はトレメリムマブである。1つの実施形態において、本発明の a A V C - N Y - E S O - 1 細胞と併用される免疫チェックポイント阻害剤はニボルマブ又はペムプロリズマブである。1つの実施形態において、本発明の a A V C - N Y - E S O - 1 細胞と併用される免疫チェックポイント阻害剤はイピリムマブである。

[0059] 例えば、対象に本発明の a A V C - N Y - E S O - 1 細胞と免疫チェックポイント阻害剤とを投与することを含む、がんを処置する方法について、1つの実施形態において、対象に投与される免疫チェックポイント阻害剤は P D - 1 系免疫チェックポイント阻害剤又は C T L A - 4 系免疫チェックポイント阻害剤である。1つの実施形態において、対象に投与される免疫チェックポイント阻害剤は P D - 1 系免疫チェックポイント阻害剤である。1つの実施形態において、対象に投与される免疫チェックポイント阻害剤は抗 P D - 1 抗体、抗 P D - L 1 抗体、又は抗 P D - L 2 抗体である。1つの実施形態において、対象に投与される免疫チェックポイント阻害剤はニボルマブ、ペムプロリズマブ、アベルマブ、アテゾリズマブ、又はデュルバルマブである。1つの実施形態において、対象に投与される免疫チェックポイント阻害剤はニボルマブ又はペムプロリズマブである。1つの実施形態において、本発明の a A V C - N Y - E S O - 1 細胞と併用される免疫チェックポイント阻害剤はペムプロリズマブである。また別の実施形態において、本発明の a A V C - N Y - E S O - 1 細胞と併用され得る免疫チェックポイント阻害剤は C T L A - 4 系免疫チェックポイント阻害剤である。1つの実施形態において、対象に投与される免疫チェックポイント阻害剤は抗 C T L A - 4 抗体、抗 C D 8 0 抗体、又は抗 C D 8 6 抗体である。1つの実施形態において、対象に投与される免疫チェックポイント阻害剤はイピリムマブ又はトレメリ

ムマブである。1つの実施形態において、対象に投与される免疫チェックポイント阻害剤はニボルマブ又はペムプロリズマブである。1つの実施形態において、対象に投与される免疫チェックポイント阻害剤はイピリムマブである。

[0060] 本発明の a A V C - N Y - E S O - 1 細胞と免疫チェックポイント阻害剤は、同時に、逐次的に、連続的に、又は重複的に投与され得る。本発明の a A V C - N Y - E S O - 1 細胞と免疫チェックポイント阻害剤は、いずれを先に投与してもよい。1つの実施形態では、本発明の a A V C - N Y - E S O - 1 細胞の投与を免疫チェックポイント阻害剤の投与よりも先に開始することができる。1つの実施形態では、免疫チェックポイント阻害剤の投与を本発明の a A V C - N Y - E S O - 1 細胞の投与よりも先に開始することができる。本発明の a A V C - N Y - E S O - 1 細胞と免疫チェックポイント阻害剤は、それぞれ独立して単回投与又は複数回投与され得る。1つの実施形態において、本発明の a A V C - N Y - E S O - 1 細胞と免疫チェックポイント阻害剤による単剤療法の併用療法において、さらなる追加の化学療法剤などの抗がん剤を併用してもよい。

[0061] 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

[0062] [実施例 1 : マウス型 a A V C ( 3 T 3 ) - N Y - E S O - 1 細胞の抗腫瘍作用]

[0063] [実施例 1 - 1 : マウス型 a A V C ( 3 T 3 ) - N Y - E S O - 1 の作製]  
がん抗原である N Y - E S O - 1 を搭載した a A V C のがんワクチンとしての効果を i n v i v o 評価系にて確認するため、マウス N I H / 3 T 3 細胞 ( A T C C 、 C a t . C R L - 1 6 5 8 ) に N Y - E S O - 1 遺伝子及び C D 1 d 遺伝子の m R N A を導入したマウス型 a A V C ( a A V C ( 3 T 3 ) - N Y - E S O - 1 と称する) を作製した。

[0064] NY-ESO-1 遺伝子（配列番号 1）は、配列番号 2 に示されるヒト NY-ESO-1 のアミノ酸配列を基に、人工遺伝子合成にて作製した。pGEM（登録商標）-4Z プラスミド（プロメガ社、Cat. P2161）の HindIII 又は EcoRI 認識配列を含む 15 塩基と相補的な配列を付加したプライマーを用い、NY-ESO-1 遺伝子を PCR 法にて増幅した。増幅した NY-ESO-1 遺伝子を pGEM（登録商標）-4Z の HindIII-EcoRI サイトに In-Fusion（登録商標）HD Cloning Kit（タカラバイオ社、Cat. 639648）を用いて挿入した。得られたプラスミドを、pGEM-4Z-NY-ESO-1 プラスミドと称する。pGEM（登録商標）-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（UniProt: P11609-1 のアミノ酸配列（配列番号 6））を基に人工遺伝子合成にて遺伝子を合成）を挿入した。得られたプラスミドを pGEM-4Z-mCD1d プラスミドと称する。pGEM-4Z-NY-ESO-1 プラスミド及び 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たものをテンプレートとして用い、mMESSAGE mMACHINE™ T7 ULTRA Transcription Kit（Thermo Fisher Scientific 社、Cat. AMB13455）を用いて NY-ESO-1 mRNA 及び CD1d mRNA を作製した。 $\alpha$ -GalCer を 500 ng/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 NY-ESO-1 mRNA と CD1d mRNA を添加し、NEPA21 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 150 V、パルス幅 8 ms、パルス間隔 50 ms、回数 2 回、減衰率 10%、極性+、トランスファーパルス：電圧 20 V、パルス幅 50 ms、パルス間隔 50 ms、

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線を照射した。前記の方法により得られた細胞をaAVC(3T3)-NY-ESO-1と称する。

[0065] [実施例1-2:マウスにおけるaAVC(3T3)-NY-ESO-1のNY-ESO-1特異的T細胞誘導能]

各群5例の6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(株式会社大塚製薬工業)に懸濁した $5 \times 10^5$  cellsのaAVC(3T3)-NY-ESO-1を投与した。コントロール群には200 $\mu$ LのBICANATE Injectionを投与した。投与7日後にマウスから脾臓細胞を回収し、mouse IFN- $\gamma$  single-color enzymatic ELISPOT assay kit(Cellular Technology Limited社、Cat. mIFNgp-2M/5)のプレートに $4 \times 10^5$  cells/ウェルで播種した。さらに、NY-ESO-1特異的T細胞を刺激するために、NY-ESO-1タンパク配列の全長をカバーするオーバーラッピングペプチドであるNY-ESO-1ペプチド(Peptide NY-ESO-1 - premium grade, human(ミルテニオバイオテック社、Cat. 130-095-381))、又は、抗原非特異的ペプチドとしてPAPペプチド(Peptide PAP - research grade, human(ミルテニオバイオテック社、Cat. 130-096-767))を添加し、37℃、5%CO<sub>2</sub>条件下で1日間培養した。ウェル底のスポット数をカウントすることにより、IFN- $\gamma$ 産生細胞数を計測した。aAVC(3T3)-NY-ESO-1投与マウスでは、NY-ESO-1ペプチド刺激によりIFN- $\gamma$ を産生する細胞が増加した(図1-1)。抗原非特異的であるPAPペプチド刺激によるスポット数との差が、NY-ESO-1特異的T細胞数を示す。この結果より、aAVC(3T3)-NY-ESO-1投与によりNY

—ESO—1 特異的 T 細胞が誘導されることが示唆された。

[0066] [実施例 1-3 : NY—ESO—1 発現 B16 メラノーマ細胞担癌マウスにおける aAVC (3T3) —NY—ESO—1 の抗原特異的抗腫瘍効果]

各群 10 例の 8 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  $5 \times 10^5$  cells の aAVC (3T3) —NY—ESO—1 を投与した。コントロール群には  $200 \mu\text{L}$  の BICANATE Injection を投与した。投与 14 日後、前記マウスの皮下に、D—PBS (—) (富士フィルム和光純薬株式会社、Cat. 045-29795) に懸濁した  $3 \times 10^5$  cells の B16—F10 メラノーマ細胞 (ATCC、Cat. CRL-6475)、又は、D—PBS (—) に懸濁した  $3 \times 10^5$  cells の NY—ESO—1 遺伝子を導入して作製した NY—ESO—1 タンパク質を発現する B16—F10 メラノーマ細胞 (以下、B16—NY—ESO—1 又は B16—NY—ESO—1 細胞と称する) をそれぞれ接種した。がん細胞を接種した日を 0 日目と設定し、20 日間の腫瘍体積の変化を計測した。aAVC (3T3) —NY—ESO—1 投与により、B16—NY—ESO—1 腫瘍の増大が有意に抑制されたのに対し、NY—ESO—1 を発現していない B16—F10 腫瘍の増大は抑制されなかった (図 1-2)。この結果より、aAVC (3T3) —NY—ESO—1 は、NY—ESO—1 特異的免疫の誘導に基づく NY—ESO—1 特異的抗腫瘍効果を有することが示唆された。

[0067] [実施例 1-4 : NY—ESO—1 発現 B16 メラノーマ細胞担癌マウスにおいて抗腫瘍効果を示す aAVC (3T3) —NY—ESO—1 の細胞数の検討]

8 週齢 C57BL/6J 雌性マウス (日本チャールス・リバー) の皮下に、D—PBS (—) に懸濁した  $3 \times 10^5$  cells の B16—NY—ESO—1 細胞を接種した。細胞接種 7 日後、前記マウスを腫瘍体積に基づき各群 10 例の 5 つの群に分け、尾静脈から、溶媒である BICANATE In

jectionに懸濁したaAVC(3T3)-NY-ESO-1を、それぞれ $5 \times 10^2$  cells/マウス、 $5 \times 10^3$  cells/マウス、 $5 \times 10^4$  cells/マウス、 $5 \times 10^5$  cells/マウスとなるように投与した。コントロール群には200  $\mu$ LのBICANATE Injectionを投与した。aAVC(3T3)-NY-ESO-1を投与した日を0日目と設定し、10日間の腫瘍体積の変化を計測した。なお、 $5 \times 10^5$  cells/マウス投与群ではaAVC(3T3)-NY-ESO-1投与後に2個体の死亡が発生したため、0日目以降の例数は8匹とする。 $5 \times 10^3$  cells/マウス以上の投与群でB16-NY-ESO-1腫瘍の増大が有意に抑制された(図1-3)。本実験に用いたaAVC(3T3)-NY-ESO-1のNY-ESO-1の発現量は、 $245 \text{ ng} / 1 \times 10^6 \text{ cells}$ であった。

[0068] 実施例1の結果より、マウス型aAVC(3T3)-NY-ESO-1細胞は、マウスin vivo評価系において、NY-ESO-1特異的T細胞を誘導することによりNY-ESO-1特異的抗腫瘍効果を示すことが確認された。ヒトにおいても、ヒト型aAVC-NY-ESO-1細胞は、自然免疫を惹起して抗腫瘍効果を奏すると共に、抗原特異的な獲得免疫を誘導し、獲得免疫に基づく抗腫瘍効果を奏することを期待し得るため、ヒトのNY-ESO-1発現がんに対してNY-ESO-1特異的抗腫瘍効果を示す治療薬の創製を目的とし、以下にヒト型aAVC-NY-ESO-1細胞の作製検討を行った。

[0069] [実施例2：ヒト型aAVC-NY-ESO-1細胞の作製及び調製]

ヒト型aAVC-NY-ESO-1細胞を以下の方法で作製した。NY-ESO-1、CD1d、及びTet3G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、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、NY-ESO-1、CD1d、及びTet3Gを発現するaAVC細胞を構築し

た。

[0070] [実施例 2-1 : レンチウイルス作製]

(1) レンチウイルス作製用プラスミドの構築

レンチウイルスプラスミド pLVsyn-CMV (配列番号 7) を作製した。NY-ESO-1 遺伝子 (配列番号 1) の 5' 末側に EcoRI 認識配列、3' 末側に BamHI 認識配列を付加した NY-ESO-1 遺伝子を人工遺伝子合成にて作製した。制限酵素 EcoRI 及び BamHI で切り出した NY-ESO-1 遺伝子を、pLVsyn-CMV プラスミドの EcoRI-BamHI サイトに挿入した。得られたプラスミドを pLVsyn-CMV-NY-ESO-1 プラスミドと称する。pTRE3G (タカラバイオ社、Cat. 631173) の配列に基づき、人工遺伝子合成サービスにて作製した TRE3G プラスミドから制限酵素 ClaI 及び EcoRI で切り出した TRE3G プロモーターを、制限酵素 ClaI 及び EcoRI にて CMV プロモーターを除去した pLVsyn-CMV-NY-ESO-1 プラスミドに挿入した。得られたプラスミドを pLVsyn-TRE3G-NY-ESO-1 プラスミドと称する。

[0071] CD1d 遺伝子 (配列番号 3) は、配列番号 4 に示されるヒト CD1d のアミノ酸配列を基に設計し、遺伝子の 5' 末側に XhoI 認識配列、3' 末側に NotI 認識配列を付加し人工遺伝子合成にて作製した。制限酵素 XhoI 及び NotI で切り出した CD1d 遺伝子を、pLVsyn-CMV プラスミドの XhoI-NotI サイトに挿入した。得られたプラスミドを pLVsyn-CMV-CD1d プラスミドと称する。

[0072] Tet-On 3G 遺伝子は、pCMV-Tet3G プラスミド (タカラバイオ社、Cat. 631335) の Tet-On 3G 遺伝子配列の 5' 末側に XhoI 認識配列、3' 末側に NotI 認識配列を付加し、人工遺伝子合成にて作製した。制限酵素 XhoI 及び NotI で切り出した Tet-On 3G 遺伝子を、pLVsyn-CMV プラスミドの XhoI-NotI サイトに挿入した。得られたプラスミドを pLVsyn-CMV-Tet

3 Gプラスミドと称する。

[0073] (2) レンチウイルス作製

(1) で作製した pLVsyn-CMV-NY-ESO-1 プラスミド、pLVsyn-TRE3G-NY-ESO-1 プラスミド、pLVsyn-CMV-CD1d プラスミド、pLVsyn-CMV-Tet3G プラスミドを用いて、NY-ESO-1、CD1d 及び Tet3G 遺伝子を搭載したレンチウイルスを作製した。得られたレンチウイルスを、それぞれ、CMV-NY-ESO-1 搭載レンチウイルス、TRE3G-NY-ESO-1 搭載レンチウイルス、CD1d 搭載レンチウイルス及び Tet3G 搭載レンチウイルスと称する。

[0074] pLVsyn-CMV-NY-ESO-1 プラスミド、pLVsyn-TRE3G-NY-ESO-1 プラスミド、pLVsyn-CMV-CD1d プラスミド、又は pLVsyn-CMV-Tet3G プラスミドのいずれかのプラスミドを 6  $\mu$ g と ViraPower Lentiviral Packaging Mix (Thermo Fisher Scientific 社、Cat. K497500) 18  $\mu$ L を混合し、3 mL の OptiPRO™ SFM (Thermo Fisher Scientific 社、Cat. 12309019) を加えて混合した (A)。Lipofectamine 2000 CD Transfection Reagent (Thermo Fisher Scientific 社、Cat. 12566-014) 288  $\mu$ L と OptiPro™ SFM 12 mL を混合して 5 分静置した (B)。(A) と 3 mL の (B) を混合して室温で 20 分静置後、前日に Falcon (登録商標) 100 mm TC-treated Cell Culture Dish (Corning 社、Cat. 353003) に  $5 \times 10^6$  cells / plate で播種した Lenti-X™ 293T 細胞 (タカラバイオ社、Cat. 632180) に (A) と (B) の混合液 3 mL / plate で添加して遺伝子導入を行った。Lenti-X™ 293T 細胞は、10% 量のウシ胎児血清 (SAFC Biosciences

ces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. 15750060)を含むDMEM培地 (Thermo Fisher Scientific社、Cat. 10569010)にて37℃、5%CO<sub>2</sub>条件下で培養を行った。遺伝子導入後、同条件にて2日間培養し、各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。培養上清を4℃にて840×gで10分間遠心した。上清を0.45 μmのフィルター (Merck社、Cat. SLHV033RS)でろ過し、PEG-it™ Virus Precipitation Solution (5x) (System Biosciences社、Cat. LV810A-1)を上清液量の1/4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500 μLのDPBS (Thermo Fisher Scientific社、Cat. 14190144)に懸濁し、CMV-NY-ESO-1搭載レンチウイルス、TRE3G-NY-ESO-1搭載レンチウイルス、CD1d搭載レンチウイルス、及びTet3G搭載レンチウイルスを得た。

[0075] [実施例2-2: Lenti virus 感染細胞の作製とクローニング]

FreeStyle 293-F細胞に実施例2-1で作製した各レンチウイルスを感染させた。CMV-NY-ESO-1搭載レンチウイルス及びCD1d搭載レンチウイルスを感染させた細胞集団をFreeStyle 293F\_\_CMV\_\_NY-ESO-1\_\_CD1d細胞プール、TRE3G-NY-ESO-1搭載レンチウイルス、CD1d搭載レンチウイルス、及びTet3G搭載レンチウイルスを感染させた細胞集団をFreeStyle 293F\_\_Tet-on\_\_NY-ESO-1\_\_CD1d細胞プールと称する。これらの細胞プールから細胞のクローニングを実施し、各細胞プール由来のクローンを複数取得した。

[0076] (1) FreeStyle 293F\_\_CMV\_\_NY-ESO-1\_\_CD1

#### d 細胞プールの作製

FreeStyle 293-F細胞にCD1d搭載レンチウイルス及びCMV-NY-ESO-1搭載レンチウイルスを感染させ、FreeStyle 293F\_CMV\_NY-ESO-1細胞を得た。感染方法として、CD1d搭載レンチウイルス及びCMV-NY-ESO-1搭載レンチウイルスを同時に感染させる方法（細胞プールA作製方法）と、CD1d搭載レンチウイルス及びCMV-NY-ESO-1搭載レンチウイルスを順次感染させる方法（細胞プールC作製方法）の2つの異なる方法を用いた。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 (Thermo Fisher Scientific社、Cat. 12338018) にて行った。

[0077] 細胞プールA作製を以下の方法で行った。FreeStyle 293-F細胞を $1 \times 10^6$  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、実施例2-1で得た、CD1d搭載レンチウイルスとCMV-NY-ESO-1搭載レンチウイルスを各50  $\mu$ L、又は各100  $\mu$ L添加した。540×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。数日培養後に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、さらに適当な間隔で継代して細胞プールAを得た。

[0078] 細胞プールC作製を以下の方法で行った。FreeStyle 293-F細胞を $1 \times 10^6$  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 フタ付きに播種し、実施例2-1で得たCD1d搭載

レンチウイルスを100 $\mu$ L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。数日培養後に12ウェルプレートから125mLフラスコに継代し、さらに適当な間隔で継代し、FreeStyle 293F\_\_CD1d細胞プール（細胞プールBと称する）を得た。細胞プールBを再度12ウェルプレートに播種して、CMV-NY-ESO-1搭載レンチウイルス50 $\mu$ L又は200 $\mu$ L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。数日培養後に12ウェルプレートから125mL三角フラスコに継代し、さらに適当な間隔で継代して細胞プールCを得た。細胞プールAと細胞プールCを、FreeStyle 293F\_\_CMV\_\_NY-ESO-1\_\_CD1d細胞プールとした。

[0079] (2) FreeStyle 293F\_\_Tet-on\_\_NY-ESO-1\_\_CD1d細胞プールの作製

(1) 細胞プールC作製方法の過程で得られた細胞プールBを再度12ウェルプレートに播種して、実施例2-1で得たTRE3G-NY-ESO-1搭載レンチウイルスとTet3G搭載レンチウイルスを各40 $\mu$ L又は各200 $\mu$ L添加し、(1)に記載した手順に準拠して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125mL三角フラスコに継代し、さらに適当な間隔で継代してFreeStyle 293F\_\_Tet-on\_\_NY-ESO-1\_\_CD1d細胞プールを得た。

[0080] (3) 細胞プールでのNY-ESO-1発現安定性と培養特性

(1)、(2)で取得したFreeStyle 293F\_\_CMV\_\_NY-ESO-1\_\_CD1d細胞プール及びFreeStyle 293F\_\_Tet-on\_\_NY-ESO-1\_\_CD1d細胞プールについて、レンチウイルス感染後のNY-ESO-1発現量（図2-1）及びNY-ESO-1陽性率のタイムコースを取得した（図2-2）。FreeStyle 293F\_\_CMV\_\_NY-ESO-1\_\_CD1d細胞プールについては感染後3、7、10、14日目にNY-ESO-1発現の解析を行った。FreeSty

FreeStyle 293F\_\_Tet-on\_\_NY-ESO-1\_\_CD1d細胞プールについては感染後7、14日目に解析を行った。また、解析の2日前に培地に終濃度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た。NY-ESO-1発現は、ELISA法とフローサイトメトリー法にて測定した。ELISA法による測定には、固相化用抗体としてAnti-NY-ESO-1 Antibody（Millipore社、Cat. MAC1151）、一次抗体としてAnti-CTAG1B 抗体（ABCAM社、Cat. ab183740）、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法による測定には、一次抗体としてAnti-NY-ESO-1 抗体、二次抗体としてAPC Goat anti Mouse IgG（Lifetechnology社、Cat. A10539）を使用し、FACSVerse™（BD Biosciences社）を用いた一般的な測定方法に準拠して測定を行った。また、感染後の継代時に培養特性として生存率の測定（図2-3）と、倍加時間の算出（図2-4）を行った。

[0081] 発現量に関しては図2-1及び陽性率に関しては図2-2に示す通り、FreeStyle 293F\_\_CMV\_\_NY-ESO-1\_\_CD1d細胞プールはレンチウイルス感染直後にはNY-ESO-1発現量、陽性率ともにFreeStyle 293F\_\_Tet-on\_\_NY-ESO-1\_\_CD1d細胞プールと比較して非常に高い値を示していたが、培養日数を経るに従い発現量及び陽性率の低下が認められた。一方でFreeStyle 293F\_\_Tet-on\_\_NY-ESO-1\_\_CD1d細胞プールではこのような発現量と発現率の低下は観察されなかった。

[0082] 生存率に関しては図2-3及び倍加時間に関しては図2-4に示す通り、

FreeStyle 293F\_\_CMV\_\_NY-ESO-1\_\_CD1d細胞プールはレンチウイルス感染後7日目にかけて、生存率の低下と倍加時間の延長が認められた。細胞プールのなかでNY-ESO-1発現量の高い細胞の生存率の低下に伴う倍加時間の延長により、培養日数を経るにしたがって細胞プール全体としてのNY-ESO-1の発現量や発現率が低下していったと推測される。一方でFreeStyle 293F\_\_Tet-on\_\_NY-ESO-1\_\_CD1d細胞プールではこのような培養特性の変動は観察されなかった。

[0083] (4) クローニング

(1) (2) で作製したFreeStyle 293F\_\_CMV\_\_NY-ESO-1\_\_CD1d細胞プールとFreeStyle 293F\_\_Tet-on\_\_NY-ESO-1\_\_CD1d細胞プール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い、細胞を増殖させた。増殖した細胞のNY-ESO-1タンパク質及びCD1dタンパク質の発現量を、NY-ESO-1はELISA法にて、CD1dはフローサイトメトリー法にて測定し、NY-ESO-1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。FreeStyle 293F\_\_Tet-on\_\_NY-ESO-1\_\_CD1d細胞プール由来のクローンのNY-ESO-1は、培地に終濃度100 ng/mLのドキシサイクリンを添加し、Tet-On Systemを介して発現を誘導して評価を行った。ELISA法による測定には固相化用抗体としてAnti-NY-ESO-1 Antibody、一次抗体としてAnti-CTAG1B 抗体、二次抗体としてRabbit IgG Horseradish Peroxidase-conjugated Antibody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法による測定には、APC Mouse Anti-Human CD1d抗体 (BD B

iosciences社、Cat. 563505) を使用し、FACSVerse™ (BD Biosciences社) を用いた一般的な測定方法に準拠して測定を行った。

[0084] (5) 取得クローンのNY-ESO-1 発現量

(4) で取得したFreeStyle 293F\_CMV\_NY-ESO-1\_CD1d細胞プール由来又はFreeStyle 293F\_Tet-on\_NY-ESO-1\_CD1d細胞プール由来のクローンについてNY-ESO-1の発現量を測定した。測定は(4)に記載したELISA法を用いて実施した(図3)。

[0085] 図3に示す通り、FreeStyle 293F\_CMV\_NY-ESO-1\_CD1d細胞プールより単離されたクローンのNY-ESO-1の発現量は最大でも $88\text{ ng}/10^6\text{ cells}$ と非常に低かった。一方で、FreeStyle 293F\_Tet-on\_NY-ESO-1\_CD1d細胞プール由来のクローンは、クローン間の差が大きく、所望の発現量のクローンを選択する余地を与える上に、FreeStyle 293F\_CMV\_NY-ESO-1\_CD1d細胞プール由来のクローンに比べて高発現のクローンが多かった。

[0086] [実施例3: aAVC(3T3)-NY-ESO-1と抗PD-1抗体の併用効果]

(1) NY-ESO-1 発現B16メラノーマ細胞担癌マウスにおける併用効果

9週齢C57BL/6J雌性マウス(日本チャールス・リバー)の皮下に、D-PBS(-)に懸濁した $3 \times 10^5\text{ cells}$ のB16-NY-ESO-1細胞を接種した。細胞接種7日後、前記マウスを腫瘍体積に基づき各群10例の4つの群に分け、0.1mgの抗PD-1抗体(InVivoMAb anti-mouse PD-1(CD279)、Bio X Cell社、Cat. BE0146)、又はアイソタイプ抗体(InVivoMAb rat IgG2a isotype control、anti-t

rinitrophenol、Bio X Cell社、Cat. BE0089)を腹腔内投与した。抗体は3～4日間隔で週に2回、合計5回投与した。抗体投与開始3日後、前記マウスの尾静脈に、溶媒であるBICANATE Injectionに懸濁した $5 \times 10^4$  cellsのaAVC (3T3)-NY-ESO-1を投与した。コントロール群には200  $\mu$ LのBICANATE Injectionを投与した。aAVC (3T3)-NY-ESO-1を投与した日を0日目と設定し、11日目までの腫瘍体積の変化を計測した。aAVC (3T3)-NY-ESO-1+アイソタイプ抗体の投与及び抗PD-1抗体の投与によりB16-NY-ESO-1腫瘍の増大が抑制された。aAVC (3T3)-NY-ESO-1投与と抗PD-1抗体の併用は、aAVC (3T3)-NY-ESO-1+アイソタイプ抗体投与及び抗PD-1抗体投与と比較して、B16-NY-ESO-1腫瘍の増大をより顕著に抑制した(図4-1)。この結果から、抗PD-1抗体の併用はaAVC (3T3)-NY-ESO-1の抗腫瘍効果を増強することが示唆された。

[0087] (2) NY-ESO-1発現CT26大腸がん細胞担癌マウスにおける併用効果

7週齢BALB/c雌性マウス(日本チャールス・リバー)の皮下に、D-PBS(-)に懸濁した $7 \times 10^5$  cellsのNY-ESO-1遺伝子を導入して作製したNY-ESO-1タンパク質を発現するCT26大腸がん細胞(ATCC、Cat. CRL-2638)(以下、CT26-NY-ESO-1細胞と称する)を接種した。細胞接種14日後、前記マウスを腫瘍体積に基づき各群8例の4つの群に分け、0.1mgの抗PD-1抗体を腹腔内投与した。抗体非投与群には投与は行わなかった。抗体は3～4日間隔で週に2回、合計4回投与した。抗体投与開始日に、前記マウスの尾静脈に、溶媒であるBICANATE Injectionに懸濁した $5 \times 10^5$  cellsのaAVC (3T3)-NY-ESO-1を投与した。コントロール群には200  $\mu$ LのBICANATE Injectionを投与した。

a A V C ( 3 T 3 ) - N Y - E S O - 1 を投与した日を0日目と設定し、14日目までの腫瘍体積の変化を計測した。a A V C ( 3 T 3 ) - N Y - E S O - 1 の単剤の投与及び抗 P D - 1 抗体の単剤の投与により C T 2 6 - N Y - E S O - 1 腫瘍の増大が抑制されたのに対し、a A V C ( 3 T 3 ) - N Y - E S O - 1 投与と抗 P D - 1 抗体の併用は各単剤の投与と比較して、C T 2 6 - N Y - E S O - 1 腫瘍の増大をより顕著に抑制した ( 図 4 - 2 ) 。この結果から、抗 P D - 1 抗体の併用は a A V C ( 3 T 3 ) - N Y - E S O - 1 の抗腫瘍効果を増強することが示唆された。

[0088] [実施例4 : a A V C ( 3 T 3 ) - N Y - E S O - 1 と抗 C T L A - 4 抗体の併用効果]

7 週齢 B A L B / c 雌性マウス ( 日本チャールス・リバー ) の皮下に、D - P B S ( - ) に懸濁した  $7 \times 10^5$  c e l l s の C T 2 6 - N Y - E S O - 1 細胞を接種した。細胞接種7日後、前記マウスを腫瘍体積に基づき各群10例の4つの群に分け、群分け7日後、0.15mgの抗 C T L A - 4 抗体 ( I n V i v o M A b a n t i - m o u s e C T L A - 4 ( C D 1 5 2 ) 、 B i o X C e l l 社、C a t . B E 0 1 6 4 ) を腹腔内投与した。抗体非投与群には投与は行わなかった。抗体は3~4日間隔で週に2回、合計5回投与した。抗体投与開始日に、前記マウスの尾静脈に、溶媒である B I C A N A T E I n j e c t i o n に懸濁した  $5 \times 10^5$  c e l l s の a A V C ( 3 T 3 ) - N Y - E S O - 1 を投与した。a A V C ( 3 T 3 ) - N Y - E S O - 1 細胞投与と抗 C T L A - 4 抗体の併用群では a A V C ( 3 T 3 ) - N Y - E S O - 1 投与後に1個体の死亡が発生した。コントロール群には  $200 \mu\text{L}$  の B I C A N A T E I n j e c t i o n を投与した。がん細胞を接種した日を0日目と設定し、32日間の腫瘍体積の変化を計測した。a A V C ( 3 T 3 ) - N Y - E S O - 1 の単剤の投与及び抗 C T L A - 4 抗体の単剤の投与により C T 2 6 - N Y - E S O - 1 腫瘍の増大が抑制されたのに対し、a A V C ( 3 T 3 ) - N Y - E S O - 1 投与と抗 C T L A - 4 抗体の併用は各単剤の投与と比較して、C T 2 6 - N Y - E S O - 1 腫瘍の増大

をより顕著に抑制した（図5）。この結果から、抗CTL A-4抗体の併用はaAVC（3T3）-NY-ESO-1の抗腫瘍効果を増強することが示唆された。

### 産業上の利用可能性

[0089] 本発明のaAVC-NY-ESO-1細胞は、がんの処置に有用であることが期待できる。

### 配列表フリーテキスト

[0090] 配列表の配列番号1で示される塩基配列は、ヒトNY-ESO-1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。配列表の配列番号7で示される塩基配列は、pLVsyn-CMVの塩基配列である。以下の配列表の数字見出し<223>において、「Artificial Sequence」の説明として記載される通りである。