

明 細 書

発明の名称：効率的なNK細胞活性化技術

技術分野

[0001] 本発明は、効率的なNK細胞活性化技術に関する。より具体的には、本発明は、優れたNK細胞活性化活性を有するNK細胞リガンドパルス細胞の製造方法、該方法により得られる細胞、該細胞の医薬用途等に関する。

背景技術

[0002] ナチュラルキラー（以下NK）T細胞は、他のリンパ球系列（T，B，NK細胞）と異なる特徴を示す、新規リンパ球系列に属する免疫細胞である。NK細胞内には細胞傷害性パーフォリン顆粒が存在することからNK細胞と類縁である（非特許文献1）。しかしNK細胞は、NK細胞マーカーのみならずT細胞受容体（TCR）をも発現していることから、決定的に異なる新たな細胞群である（非特許文献2）。NK細胞は、Th-1型サイトカイン（主にIFN- γ ）とTh-2型サイトカイン（主にIL-4）の両方を産生する能力を有している（非特許文献3）ことから、免疫系のバランス調節役を担っている可能性が示唆されている（非特許文献4）。従ってNK細胞の働きを制御することができれば、免疫系のバランス異常によって引き起こされる様々な疾患、特に癌、感染症を治療することが可能となる。

[0003] NK細胞の特性として最も着目されているのは、NK細胞に発現しているTCRの α 鎖が、ある1つの種の間では全個体で同一であるという点である。これは即ち、同種間の生物が持つNK細胞は全て同一の物質を認識して活性化されるということを示している。この α 鎖はヒトではV α 24、マウスではV α 14であり、両種間で非常に高い相同性を持っている。また、 α 鎖と対をなす β 鎖もごく限られた種類しか知られていない。このため、このTCRは「インバリアントTCR」とも呼ばれている。また、通常のT細胞のTCRが蛋白断片を認識するのに対して、NK細胞のTCRは糖脂質を認識することも特徴的である。

[0004] α -ガラクトシルセラミド（ α -GalCer）は、海綿の一種であるAgelas maur

itianusの抽出液より単離された糖脂質であり、NKT細胞を強く活性化することが報告された（非特許文献5）。 α -ガラクトシルセラミドは、樹状細胞（DC）などに代表される抗原提示細胞（APC）に取り込まれた後、主要組織適合遺伝子複合体（MHC）クラスI分子に類似したCD1dタンパク質によって細胞膜上に提示される。このCD1d分子も種属にただ1種類しかなく全ての人に共通であることから、 α -GalCerはあらゆるヒトに共通の薬剤となる。NKT細胞は、こうして提示されたCD1dタンパク質と α -ガラクトシルセラミドとの複合体を、NKT細胞唯一のTCR α 鎖を用いて認識することにより活性化され、様々な免疫反応を開始する。

[0005] 近年、上述のようなNKT細胞の機能に着目し、 α -GalCerを有効成分として含有する癌の治療薬が開発されている。しかしながら、 α -GalCerの投与によって活性化されたNKT細胞は、癌、感染症治療のために有用であり細胞性免疫を賦活するサイトカインであるIFN- γ を産生すると同時に、細胞性免疫に対して抑制的なIL-4も同時に産生してしまう。その結果、両者の働きが相殺されてしまい、癌、感染症治療に対する効果が必ずしも十分とは言えない可能性が指摘されていた。

[0006] そこで、NKT細胞を強力に活性化し、IL-4よりもIFN- γ を優先的に産生させる α -GalCer誘導体が多数開発されている（特許文献1～5）。

[0007] α -GalCerによって活性化されたNKT細胞は、パーフォリンなど様々な殺細胞誘導因子を発現することで、標的細胞に対して直接細胞傷害活性を示す（非特許文献1、6）。また活性化したNKT細胞が急速にかつ大量に産生するインターフェロン- γ などのTh1タイプのサイトカインや、樹状細胞（DC）の成熟化などを介して、NK細胞やCD8+T細胞の細胞傷害活性の増強効果を発揮する点で非常にユニークな細胞である（非特許文献7）。さらにマウス癌転移モデルにおいて、 α -GalCerを単独で投与するよりも樹状細胞（DC）に提示させて投与する細胞治療の方が、より強力な抗腫瘍効果を発揮することが明らかとなった（非特許文献8）。これらの研究を踏まえて、 α -GalCer等のNKT細胞リガンドをパルスしたDCを投与することにより、生体内のNKT細胞を活性化し、

その抗腫瘍効果を利用して癌、感染症を治療・予防する、NKT細胞を標的とした免疫細胞治療の臨床開発が行われている。

[0008] 例えば、非特許文献9において、非小細胞肺癌に対する α -GalCerパルスDC療法において、 α -GalCerパルスDC投与により末梢血細胞中のIFN- γ 産生細胞の増加を認めた症例群は、非増加症例群と比較し有意に全生存期間の延長が認められたことが報告されている。 α -GalCer反応性IFN- γ 産生細胞は通常NK細胞であるが、 α -GalCerパルスDC投与後にはNK細胞が加わってくることが判明しており（非特許文献10、11）、 α -GalCerパルスDC療法により活性化したNKT細胞の他の免疫細胞へのadjuvant効果が示唆される。また、IFN- γ 産生細胞の増加と、生存期間延長効果とが密接に関連することから、IFN- γ 産生を如何に増強するかが、 α -GalCer等のNKT細胞リガンドをパルスした抗原提示細胞を用いた免疫細胞療法による癌、感染症治療・予防成績を向上させる上で重要であると考えられる。

[0009] 非特許文献9の α -GalCerパルスDC療法においては、成分採血にて採取した患者末梢血細胞すべてをGM-CSFおよびIL-2の存在下で1~2週間培養することにより、樹状細胞を取得している。更に患者への投与前日に樹状細胞へ α -GalCerをパルスして、1日培養し、得られた α -GalCerパルスDCを静脈内に点滴投与する。この培養系においては、培養細胞に含まれるT細胞が産生するIL-4、TNF- α により単球由来DCの成熟化が進み、 α -GalCer提示能が増強する。

[0010] また、一般的には、末梢血中の単球を、GM-CSF及びIL-4の存在下の存在下で6日間程度培養することにより、未熟樹状細胞を取得し、更に、未熟樹状細胞を炎症性サイトカイン（TNF- α 、IL-1 β 、IL-6）とともに2日間程度培養することにより、成熟樹状細胞を得た上で、成熟樹状細胞上に、 α -GalCer等のNKT細胞リガンドをパルスして、NKT細胞を活性化する手法がとられている（非特許文献5、12）。

[0011] このように、NKT細胞に対する抗原提示細胞としては、成熟樹状細胞が専ら用いられており、単球や未熟樹状細胞では、NKT細胞に対して適切に抗原を提示して、これを効率的に活性化することができないと考えられていた。一方

、成熟樹状細胞の調製には、長期間の培養を要する。

先行技術文献

特許文献

[0012] 特許文献1 : WO 2008/102888 A1

特許文献2 : WO 2009/119692 A1

特許文献3 : WO 2010/030012 A1

特許文献4 : WO 2011/552842 A1

特許文献5 : WO 2013/162016 A1

非特許文献

[0013] 非特許文献1 : Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1998, 95, 5690-5693

非特許文献2 : J. Immunol. 1995, 155, 2972-2983

非特許文献3 : J. Immunol. 1998, 161, 3271-3281

非特許文献4 : Science, 1997, 278, 1623-1626

非特許文献5 : Science, 1997, 278, 1626-1629

非特許文献6 : Cancer Res 1999; 59: 5102-5105

非特許文献7 : Nat Immunol 2003; 4: 1164-1165

非特許文献8 : J Immunol 1999; 163: 2387-2391

非特許文献9 : J Immunol 2009; 182: 2492-2501

非特許文献10 : Clin Cancer Res 2006; 12: 6079-6086

非特許文献11 : Cancer Sci 2008; 99: 638-645.

非特許文献12 : Nat Immunol, 2002, 3(9): 867-874

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0014] 本発明は、強力なNKT細胞活性化能を有するNKT細胞リガンドパルス細胞を比較的短期間で製造する技術を提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0015] 本発明者らは、上記課題を解決すべく鋭意検討の結果、「樹状細胞による

抗原提示とそれによるT細胞活性化」という常識を覆し、NKT細胞を活性化する場合には、樹状細胞よりもむしろ発生学的に未分化段階にある単球、すなわちCD14陽性細胞、が抗原提示細胞・パルス細胞として優れていることを見出した。そして、このCD14陽性細胞を、IL-4不在下で、NKT細胞リガンド及びGM-CSFだけを含む培地中で培養することにより、NKT細胞の活性化に必要なCD40の発現が上昇し、NKT細胞を強力に活性化することのできるNKT細胞リガンドパルス細胞を取得し得ることを示した。一方、単球、CD14陽性細胞を株化したCD14陽性細胞株の場合は、GM-CSFおよびIL-4不在下で、NKT細胞リガンドだけを含む培地中で培養することにより、NKT細胞リガンドパルスCD14陽性細胞株を取得し得る。いずれの製造工程も培養期間は2日程度で十分であった。このことは、CD14陽性細胞から樹状細胞への分化工程は不要であり、単離されたCD14陽性細胞あるいはCD14陽性細胞株のままでNKT細胞リガンドパルス細胞を取得していることを示している。取得したNKT細胞リガンドパルス細胞（NKT細胞リガンドパルスCD14陽性細胞又はNKT細胞リガンドパルスCD14陽性細胞株）は、NKT細胞の増殖、NKT細胞によるIFN- γ 産生及び細胞傷害活性を強力に誘導した。

[0016] 発明者らは、上記知見に基づき更に検討を加え、本発明を完成するに至った。

即ち、本発明は下記の通りである：

[0017] [1] ヒト末梢血液から単離されたCD14陽性細胞を、NKT細胞リガンド及びGM-CSFを含有し、IL-4を実質的に含有しない培地中で培養する工程（製造方法1）又は単離されたCD14陽性細胞株を、NKT細胞リガンドを含有し、GM-CSF及びIL-4を実質的に含有しない培地中で培養する工程（製造方法2）を含む、NKT細胞リガンドパルス細胞（すなわち、NKT細胞リガンドパルスCD14陽性細胞又はNKT細胞リガンドパルスCD14陽性細胞株）の製造方法。

[2] 培地が、SCF及び／又はFlt3Lを実質的に含有しない、[1]に記載の方法。

[3] 単離されたCD14陽性細胞の純度が70%以上である、[1]又は[2]に記

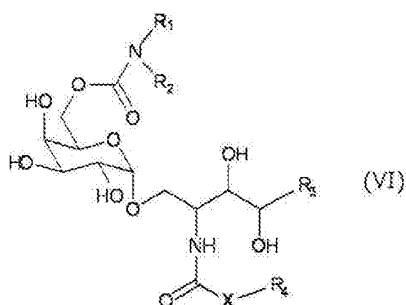
載の方法。

[4] NKT細胞リガンド添加後、少なくとも16時間、細胞を培養する、[1]～[3]のいずれかに記載の方法。

[5] NKT細胞リガンド添加後、16～72時間細胞を培養する、[4]に記載の方法。

[6] NKT細胞リガンドが、下記式(VI)：

[0018] [化1]



[0019] (式中、

Xはアルキレン基あるいは-NH-を示し；

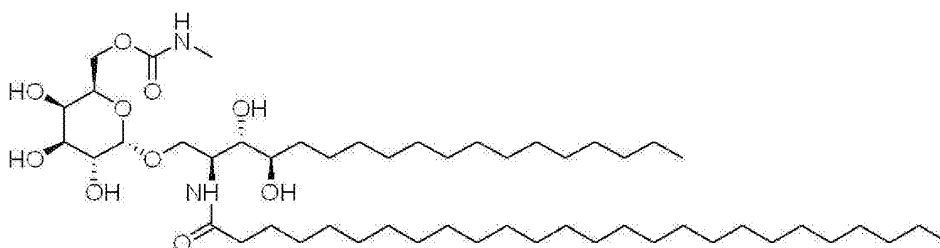
R₁及びR₂は同一又は異なって、水素原子、アルキル基、水酸基、アルコキシ基、又は置換基を有していても良いアリール基を示し、R₁及びR₂は、隣接する窒素原子と一緒になって5～6員環を形成してもよく；

R₃は炭素数1～20の炭化水素基を示し；

R₄は炭素数1～30の炭化水素基を示す)で表される化合物、又はその塩である、[1]～[5]のいずれかに記載の方法。

[7] NKT細胞リガンドが、下記式

[0020] [化2]



[0021] で表される化合物、又はその塩である、[6] に記載の方法。

[8] 培地中のNKT細胞リガンド濃度が、少なくとも30ng/mlである、[1] ～ [7] のいずれかに記載の方法。

[9] CD14陽性細胞を、NKT細胞リガンドおよびGM-CSFを含有し、IL-4を実質的に含有しない培地中で培養する工程（製造方法1）、又はCD14陽性細胞株を、NKT細胞リガンドを含有し、GM-CSF及びIL-4を実質的に含有しない培地中で培養する工程（製造方法2）を含む、NKT細胞リガンドパルス細胞（NKT細胞リガンドパルスCD14陽性細胞又はNKT細胞リガンドパルスCD14陽性細胞株）の製造方法。

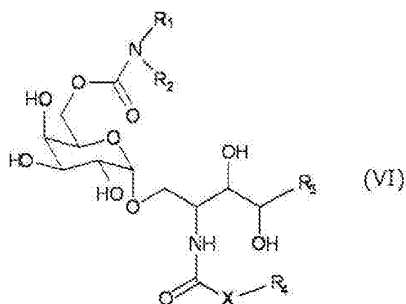
[10] 培地が、SCF及び／又はFlt3Lを実質的に含有しない、[9] に記載の方法。

[11] NKT細胞リガンド添加後、少なくとも16時間、細胞を培養する、[9] 又は [10] に記載の方法。

[12] NKT細胞リガンド添加後、40～72時間細胞を培養する、[11] に記載の方法。

[13] NKT細胞リガンドが、下記式（VI）：

[0022] [化3]



[0023] （式中、

Xはアルキレン基あるいは-NH-を示し；

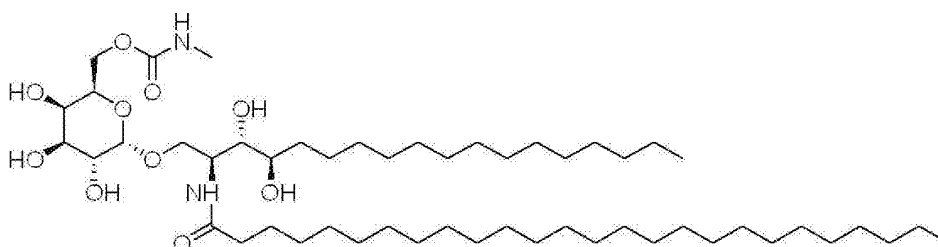
R₁及びR₂は同一又は異なって、水素原子、アルキル基、水酸基、アルコキシ基、又は置換基を有していても良いアリール基を示し、R₁及びR₂は、隣接する窒素原子と一緒になって5～6員環を形成してもよく；

R₃は炭素数1～20の炭化水素基を示し；

R₄は炭素数1～30の炭化水素基を示す）で表される化合物、又はその塩である、
 [9] ～ [12] のいずれかに記載の方法。

[14] NKT細胞リガンドが、下記式

[0024] [化4]



[0025] で表される化合物、又はその塩である、[13] に記載の方法。

[15] 培地中のNKT細胞リガンド濃度が、少なくとも30ng/mlである、[9] ～
 [14] のいずれかに記載の方法。

[16] [1] ～ [15] のいずれかに記載の方法によって得られる、NKT細胞リ
 ガンドパルス細胞。

[17] [16] に記載の細胞を含む、細胞製剤。

[18] [16] に記載の細胞を含む、NKT細胞活性化剤。

[19] [16] に記載の細胞を含む、癌又は感染症の治療又は予防剤。

[20] [16] に記載の細胞、又は[17] に記載の細胞製剤を被験体に投与す
 ることを含む、該被験体におけるNKT細胞の活性化方法。

[21] 被験体が、癌又は感染症を罹患している、或いは癌又は感染症の罹患
 歴を有する、[20] に記載の方法。

[22] [16] に記載の細胞、又は[17] に記載の細胞製剤を被験体に投与す
 ることを含む、該被験体における癌又は感染症の治療又は予防方法。

[23] NKT細胞活性化において使用するための、[16] に記載の細胞。

[24] 癌又は感染症の治療又は予防において使用するための、[16] に記載
 の細胞。

[25] NKT細胞活性化において使用するための、[17] に記載の細胞製剤。

[26] 癌又は感染症の治療又は予防において使用するための、[17]に記載の細胞製剤。

[27] NKT細胞活性化用医薬の製造における、[16]に記載の細胞の使用。

[28] 癌又は感染症の治療又は予防用医薬の製造における、[16]に記載の細胞の使用。

発明の効果

[0026] 本発明によれば、強力なNKT細胞活性化能を有するNKT細胞リガンドパルス細胞を比較的短期間で製造することが期待できる。本発明の方法により得られるNKT細胞リガンドパルス細胞は、NKT細胞の増殖、NKT細胞のIFN- γ 産生及び細胞傷害活性を強力に誘導するので、癌又は感染症等の疾患の治療又は予防；癌の転移又は再発の治療又は予防のための細胞製剤として有用であり得る。

図面の簡単な説明

[0027] [図1]ヒト末梢血CD14陽性細胞（RK-163パルス前）、CD14陽性細胞をNKT細胞リガンドRK-163とGM-CSF存在下で2日間培養することにより得られた「RK-163パルスヒトCD14陽性細胞」及びNKT細胞リガンドRK-163とGM-CSF及びIL-4存在下で6日培養した「RK-163パルスヒト樹状細胞」の表面抗原発現パターンの比較を示す。網掛けは陰性コントロール抗体を示す。また、ヒト末梢血のアフェレーシス液から自動細胞分離機を用いるエルトリエーション法によって得られるCD14陽性細胞を、NKT細胞リガンドRK-163とGM-CSF存在下で2日間培養することにより得られた「RK-163パルスヒトElu-CD14陽性細胞」の表面抗原発現パターンを併せて示す。「RK-163パルスヒトElu-CD14陽性細胞」は、他の分離法で得られたRK-163パルスCD14陽性細胞と同じ結果（CD14陽性、CD1d陽性、CD40陽性）を示した。

[図2]ヒト末梢血CD14陽性細胞から作製した「RK-163パルスヒトCD14陽性細胞」、CD14陰性細胞から作製した「RK-163パルスヒトCD14陰性細胞」、及び「RK-163パルスヒト樹状細胞」のIFN- γ 産生誘導能（NKT細胞活性化作用）を比較した結果を示す。

[図3]ヒト末梢血CD14陽性細胞を様々なRK-163パルス濃度で培養して作製した「RK-163パルスヒトCD14陽性細胞」のIFN- γ 産生誘導能（NKT細胞活性化作用）を示す。

[図4]ヒト末梢血CD14陽性細胞をNKT細胞リガンドであるRK-163と、様々な時間パルス培養して作製した「RK-163パルスヒトCD14陽性細胞」のNKT細胞に対するIFN- γ 産生誘導能（NKT細胞活性化作用）、回収率及び生存率を示す。 α -GalCerでパルスしたヒトCD14陽性細胞のNKT細胞活性化能（IFN- γ 産生誘導能）、回収率、及び生存率を比較した。

[図5]ヒト末梢血CD14陽性細胞をRK-163と、種々の播種密度で、GM-CSF含有培地中で48時間パルス培養して得られたRK-163パルスヒトCD14陽性細胞の、生細胞数、生存率及び回収率を示す。

[図6]「 α -GalCer又はRK-163パルスヒトCD14陽性細胞」と「 α -GalCer又はRK-163パルスヒト樹状細胞」のNKT細胞の増殖を誘導する能力を比較した結果を示す。

[図7]ヒト末梢血CD14陽性細胞から作製した「RK-163パルスヒトCD14陽性細胞」と「RK-163パルスヒト樹状細胞」のNKT細胞の細胞傷害活性を誘導する能力を比較した結果を示す。

[図8]種々のNKT細胞リガンド（RCAI-85、RCAI-137、RK-163）で、ヒト末梢血CD14陽性細胞をGM-CSF存在下で48時間培養して得られた「NKT細胞リガンドパルスヒトCD14陽性細胞」のNKT細胞活性化（IFN- γ 産生誘導）能力を示す。

[図9]ヒト末梢血由来「RK-163パルスヒトCD14陽性細胞」の抗腫瘍効果

[図10-1]ヒトCD14陽性細胞株THP-1細胞の表面抗原発現パターンを示す。

[図10-2]ヒトCD14陽性細胞株U937細胞の表面抗原発現パターンを示す。

[図10-3]ヒトiPS-CD14陽性細胞株の表面抗原発現パターンを示す。

[図11]RK-163をパルスしたヒトTHP-1、U937及びヒトiPS-CD14陽性細胞株ヒトNKT細胞株に対するIFN- γ 産生誘導効果を示す。

[図12]RK-163パルスヒトCD14陽性細胞株作製時におけるRK-163パルス時間とヒトNKT細胞株に対するIFN- γ 産生誘導効果との相関を示す。

[図13]RK-163パルスヒトCD14陽性細胞株(THP-1, iPS-CD14陽性細胞株)によるNKT細胞の細胞傷害活性の誘導を示す。

[図14A]RK-163又は α -GalCerをパルスしたマウス樹状細胞により誘導された抗腫瘍効果を示す。

[図14B]RK-163パルスヒトCD14陽性細胞株(THP-1細胞、U937細胞)により誘導された抗腫瘍効果を示す。

[図15A]RK-163パルスマウス樹状細胞投与により誘導されるNKT細胞のアジュバント作用によるNK細胞の活性化を示す。

[図15B]RK-163をパルスしたヒトCD14陽性細胞株投与により誘導されるNKT細胞のアジュバント作用によるNK細胞の活性化を示す。

[図16A]投与したRK-163パルスマウス樹状細胞の体内動態で、速やかに体内から消失する様子を示す。

[図16B]投与したRK-163パルスヒトCD14陽性細胞株の体内動態で、速やかに体内から排除される様子を示す。

[図17A]RK-163パルスヒトCD14陽性細胞株を投与した際の、血中急性毒性マーカー(AST及びALT)レベルの経時的変化を示す。

[図17B]RK-163パルスヒトCD14陽性細胞株を投与した際の、肝臓と脾臓の重量の経時的変化を示す。

[図18]軟寒天コロニー形成法による、放射線を照射したRK-163パルスヒトCD14陽性細胞株の造腫瘍性試験の結果を示す。

[図19A]RK-163パルスマウス樹状細胞によるメモリーT細胞の誘導を示す。

[図19B]RK-163パルスヒトCD14陽性細胞株によるメモリーT細胞の誘導を示す。

発明を実施するための形態

[0028] <NKT細胞リガンドパルス細胞> :

本発明は、NKT細胞リガンドパルス細胞を提供する。本発明のNKT細胞リガンドパルス細胞、すなわちNKT細胞リガンドパルスCD14陽性細胞およびNKT細胞リガンドパルスCD14陽性細胞株は、NKT細胞を活性化し、NKT細胞の増殖、I

FN- γ 産生、アジュバント作用、長期免疫記憶誘導及び／又は腫瘍細胞に対する細胞傷害活性を誘導する活性を有する。

[0029] 「NKT細胞リガンドパルス」とは、NKT細胞リガンドが細胞に取り込まれた後、CD1dタンパク質によって細胞膜上に提示されることを意味する。「NKT細胞」及び「NKT細胞リガンド」「CD14陽性細胞」「CD14陽性細胞株」の定義は下で詳述する。NKT細胞リガンドは、CD1dに結合し、CD1d分子上に提示されたときに、NKT細胞上のNKT細胞固有のT細胞受容体（NKT細胞受容体）により特異的に認識され、NKT細胞を特異的に活性化させ得る化合物であれば特に制限されないが、例えば前記活性を有する糖脂質であり、好ましくは α -GalCer又はそのアナログであり、強力にNKT細胞のIFN- γ 産生を誘導する観点から、下に記載したNKT細胞リガンドの中でも、III又はVIに記載された化合物が好ましく、中でも、RCAI-85、RCAI-137又はRK-163(RCAI-124)が好ましい。NKT細胞リガンドは、最も好ましくはRK-163(RCAI-124)である。

[0030] 本発明のNKT細胞リガンドパルス細胞は、哺乳動物細胞であり得る。哺乳動物としては、例えば、マウス、ラット、ハムスター、モルモット等のげっ歯類やウサギ等の実験動物；ブタ、ウシ、ヤギ、ウマ、ヒツジ、ミンク等の家畜；イヌ、ネコ等のペット；ヒト、サル、アカゲザル、マーモセット、オランウータン、チンパンジーなどの霊長類を挙げることが出来る。哺乳動物は、好ましくは霊長類であり、より好ましくはヒトである。

[0031] 本発明のNKT細胞リガンドパルス細胞を用いた治療を行う場合、本発明のNKT細胞リガンドパルス細胞は被験体（患者）と同種であることが好ましい。例えば、NKT細胞リガンドパルスヒト細胞をヒトに投与する。本発明のNKT細胞リガンドパルス細胞は、自家由来の細胞（遺伝的に同種・同系）、または他家由来の細胞（遺伝的に同種・異系）である。

[0032] 本発明のNKT細胞リガンドパルス細胞は、好ましくはCD14陽性である。本発明のNKT細胞リガンドパルス細胞におけるCD14陽性細胞の割合は、例えば50%以上、好ましくは、60%以上、70%以上、80%以上又は90%以上である。

[0033] 本発明のNKT細胞リガンドパルス細胞は、好ましくはCD1d陽性である。本発

明のNKT細胞リガンドパルス細胞におけるCD1d陽性細胞の割合は、例えば50%以上、好ましくは、60%以上、70%以上、80%以上又は90%以上である。

[0034] 本発明のNKT細胞リガンドパルス細胞は、好ましくはCD40陽性である。本発明のNKT細胞リガンドパルス細胞におけるCD40陽性細胞の割合は、例えば50%以上、好ましくは、60%以上、70%以上、80%以上又は90%以上である。

[0035] 好ましい態様において、本発明のNKT細胞リガンドパルス細胞は、CD14陽性CD1d陽性CD40陽性である。本発明のNKT細胞リガンドパルス細胞におけるCD14陽性CD1d陽性CD40陽性細胞の割合は、例えば50%以上、好ましくは、60%以上、70%以上、80%以上又は90%以上である。

[0036] 一態様において、本発明のNKT細胞リガンドパルス細胞は、単球又は単球から樹立された細胞株である。細胞株の樹立は、当業者であれば公知の方法を任意に選択して行うことができる。CD14は周知の単球マーカーである。

[0037] 本発明のNKT細胞リガンドパルス細胞は、樹状細胞ではない。従って、本発明のNKT細胞リガンドパルス細胞における樹状細胞マーカーの発現は限定的であるか、本発明のNKT細胞リガンドパルス細胞は樹状細胞マーカーを発現していない。本発明のNKT細胞リガンドパルス細胞におけるCD209（樹状細胞マーカー）陽性細胞の割合は、例えば40%以下、好ましくは、30%以下、20%以下、10%以下、5%以下又は1%以下（例えば0%）である。樹状細胞は、通常CD14陰性である。

[0038] 本発明のNKT細胞リガンドパルス細胞は単離されている。「単離」とは、目的とする細胞や成分以外の因子を除去する操作がなされ、天然に存在する状態を脱していることを意味する。「単離されたNKT細胞リガンドパルス細胞」の純度（総細胞数に占めるNKT細胞リガンドパルス細胞数の百分率）は、通常70%以上、好ましくは80%以上、90%以上、95%以上、98%以上、99%以上又は99.5%以上、最も好ましくは100%である。

[0039] 本発明のNKT細胞リガンドパルス細胞は、例えば以下に記載の方法により製造することが出来る。

[0040] <NKT細胞リガンドパルス細胞の製造方法>

(製造方法 1)

本発明は、単離されたCD14陽性細胞を、NKT細胞リガンド及びGM-CSFを含有し、IL-4を実質的に含有しない培地中で培養する工程を含む、NKT細胞リガンドパルス細胞の製造方法（本発明の製造方法 1）を提供する。

- [0041] CD14は、分子量53-55kDaのグリコシル-ホスファチジルイノシトール（GPI）結合型単鎖膜糖タンパク質で、単球のマーカー細胞表面抗原として知られている。当該CD14陽性細胞に相当する細胞は、好ましくは全ての哺乳動物において造血幹細胞から分化し、マクロファージや樹状細胞に分化する前の前駆細胞で、より好ましくは単球である。
- [0042] 本明細書において、細胞の表現型をマーカー分子（抗原）発現の有無で表す場合、特に断りのない限り、当該マーカー分子に対する抗体による特異的結合の有無で細胞の表現型が表記される。マーカー分子の発現の有無による細胞の表現型の決定は、通常、当該マーカー分子に対する特異的抗体等を用いたフローサイトメトリー解析により行われる。マーカー分子の発現が「陽性」とは、該マーカー分子が細胞表面上に発現しており、当該マーカー分子に対する抗体による特異的結合が確認できることをいう。
- [0043] 製造方法 1 において使用するCD14陽性細胞は、哺乳動物由来であり得る。哺乳動物としては、製造方法 1 によりNKT細胞リガンドパルス細胞が製造され得る範囲において特に限られないが、例えば、マウス、ラット、ハムスター、モルモット等のげっ歯類やウサギ等の実験動物；ブタ、ウシ、ヤギ、ウマ、ヒツジ、ミンク等の家畜；イヌ、ネコ等のペット；ヒト、サル、アカゲザル、マーモセット、オランウータン、チンパンジーなどの霊長類を挙げることが出来る。哺乳動物は、好ましくは霊長類であり、より好ましくはヒトである。
- [0044] 本明細書において、CD14のノーメンクレチャーは、ヒトCD14のノーメンクレチャーに従うものとする。
- [0045] 尚、ヒト以外の哺乳動物において、ヒトCD14に対応する抗原遺伝子を有していない場合があり得る。本発明においては、このような哺乳動物について

は、CD14発現の有無に関わらず、単球を、「CD14陽性細胞」に相当する細胞として、扱うものとする。

[0046] 製造方法1により得られる細胞を用いた治療を行う場合、製造方法1において使用するCD14陽性細胞（例えば、単球）は被験体と同種であることが好ましい。本発明に用いられるCD14陽性細胞（例えば、単球）は、自家由来の細胞（遺伝的に同種・同系）、または他家由来の細胞（遺伝的に同種・異系）である。

[0047] 製造方法1において使用するCD14陽性細胞（例えば、単球）は、CD14陽性細胞を含む組織から単離される。該組織としては、末梢血、臍帯血、骨髓、脾臓、胸腺、リンパ節、肝臓、腫瘍組織、等を挙げることが出来るが、これらに限定されない。製造方法1において使用するCD14陽性細胞（例えば、単球）は、好適には、末梢血又は臍帯血から単離される。単離されたCD14陽性細胞は、CD14陽性細胞を含む組織から単離されたCD14陽性細胞から細胞株として樹立されたCD14陽性細胞株であってもよい。細胞株の樹立は、当業者であれば公知の方法を任意に選択して行うことができる。さらに、単離されたCD14陽性細胞は、任意の細胞を初期化した後、再度、分化誘導によって樹立されたCD14陽性細胞であってもよい。任意の細胞を初期化する方法として、米国特許8048999号、米国特許8058065号、米国特許8129187号、米国特許8278104号、米国特許8791248号、米国特許9145547号に記載の方法が例として挙げられるが、これらに限定されない。初期化された細胞からCD14陽性細胞を得る方法は、例えばGrigoriadis et al., Blood, 2010 Apr 8;115(14):2769-76やStem Cells, 2016 Dec;34(12):2852-2860を参照して行ってよく、当業者であれば任意に方法を最適化することができるため、これに限定されない。

[0048] 製造方法1において使用するCD14陽性細胞（例えば、単球）は単離されている。「単離」とは、目的とする細胞や成分以外の因子を除去する操作がなされ、天然に存在する状態を脱していることを意味する。「単離されたCD14陽性細胞」の純度（総細胞数に占めるCD14陽性細胞数の百分率）は、通常70%以上、好ましくは80%以上、90%以上、95%以上、98%以上、99%以上又は9

9.5%以上、最も好ましくは100%である。他の種類の細胞についても同様に定義する。

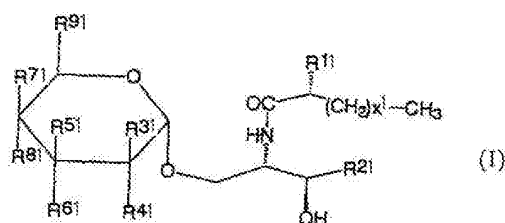
- [0049] CD14陽性細胞（例えば、単球）は、CD14に対して特異的に結合する抗体を用いて、抗体結合磁気ビーズ、セルソーター、パニング等の方法により、上述のCD14陽性細胞（例えば、単球）が含まれる組織から単離することができる。また、ヒト末梢血のアフェレーシス液から自動細胞分離機を用いるエルトリエーション法によってCD14陽性細胞（例えば、単球）を単離できる。
- [0050] 例えば、まず末梢血や臍帯血等より、単核球分画が調製される。単核球分画の調製は、例えば、Ficoll-Paque PLUS（GE ヘルスケア・ジャパン）を用いた密度勾配遠心や、アフェレーシス等により行われる。次に、蛍光色素や磁気ビーズ等により標識された、CD14に対して特異的に結合する抗体により単核球分画を染色し、セルソーターや磁性カラム等を用いて、CD14陽性細胞（例えば、単球）を単離する。シャーレに付着させる単なるパニング法により、単核球分画からCD14陽性細胞（例えば、単球）を単離してもよい。また、ヒト末梢血のアフェレーシス液から自動細胞分離機（テルモ社製など）を用いるエルトリエーション法で得られたCD14陽性細胞（例えば、単球）濃縮分画を用いる事ができる。
- [0051] CD14に対して特異的に結合する抗体に換えて、単球及びマクロファージの他のマーカー（例、MHC Class I様分子（CD1d等）、CD11b、CD15、CD86等）に対して特異的に結合する抗体を用いてもよい。
- [0052] 培養開始時において、製造方法1において使用する単離されたCD14陽性細胞に占める、CD1d陽性細胞の割合は、通常70%以上、好ましくは80%以上、90%以上、95%以上、98%以上、99%以上又は99.5%以上、最も好ましくは100%である。
- [0053] 次に、単離されたCD14陽性細胞を、NKT細胞リガンド及びGM-CSFを含有し、IL-4を実質的に含有しない培地中で培養する。好適には、上述の生体組織から単離されたCD14陽性細胞の初代培養を、NKT細胞リガンド及びGM-CSFを含有し、IL-4を実質的に含有しない培地中で行う。

[0054] NKT細胞は、NKT細胞固有のT細胞受容体（インバリエントTCR）とNK受容体の2つの抗原レセプターを発現しているリンパ球である。通常のT細胞とは異なり、NKT細胞上のT細胞受容体のレパートリーは非常に限られている。例えばマウスNKT細胞（V α 14 NKT細胞という場合がある）上のT細胞受容体の α 鎖は、インバリエントなV α 14及びJ α 18遺伝子セグメントによりコードされており（Proc Natl Acad Sci USA, 83, p.8708-8712, 1986; Proc Natl Acad Sci USA, 88, p.7518-7522, 1991; J Exp Med, 180, p.1097-1106, 1994）、ヒトNKT細胞上のT細胞受容体の α 鎖は、マウスのV α 14と相同性の高いインバリエントなV α 24及びJ α 18遺伝子セグメントによりコードされている。NKT細胞は、当該細胞上のT細胞受容体（これを、NKT細胞受容体と称する。）で、CD1d分子上に提示された「NKT細胞リガンド」を認識する。

[0055] NKT細胞リガンドとは、CD1d分子上に提示されたときに、NKT細胞上のNKT細胞固有のT細胞受容体（NKT細胞受容体）により特異的に認識され、NKT細胞を特異的に活性化させ得る化合物をいう。本発明において使用することのできるNKT細胞リガンドは、例えば、CD1dに結合し、前記活性を有する糖脂質であり、好ましくは α -GalCer又はそのアナログである。例えば、以下の化合物を挙げることができる。

[0056] I. 式 (I) の化合物またはその塩もしくは溶媒和物。

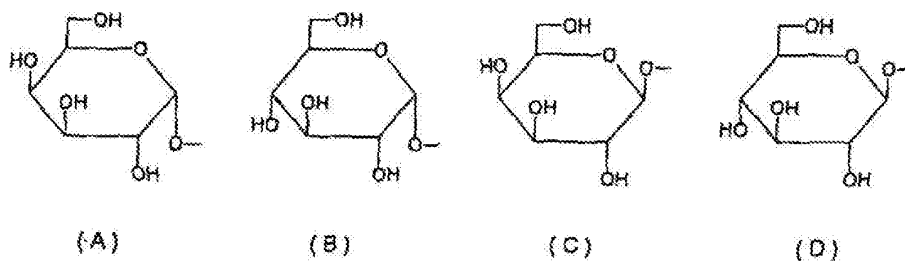
[0057] [化5]



[0058] (上記式中、R¹¹はHまたはOHであり、X¹は7～27のいずれかの整数であり、R²¹は下記(a)～(e)からなる群から選択される置換基であり(ここで、Y¹は5～17のいずれかの整数である)、(a) -CH₂(CH₂)_{Y¹}CH₃、(b) -CH(OH)(CH₂)_{Y¹}CH₃、(c) -CH(OH)(CH₂)_{Y¹}CH(CH₃)₂、(d) -CH=CH(CH₂)_{Y¹}CH₃、(e) -CH(OH)(CH₂)_{Y¹}CH(CH₃)CH₂CH₃、そしてR³¹～R⁹¹は下記のi)またはii)で定義

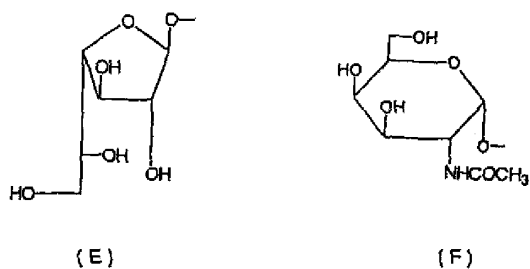
される置換基である：i) R^{31} 、 R^{61} 、および R^{81} がHのとき R^{41} はH、OH、 NH_2 、 $NHCOC$
 H_3 、または下記基 (A) ~ (D)：

[0059] [化6]



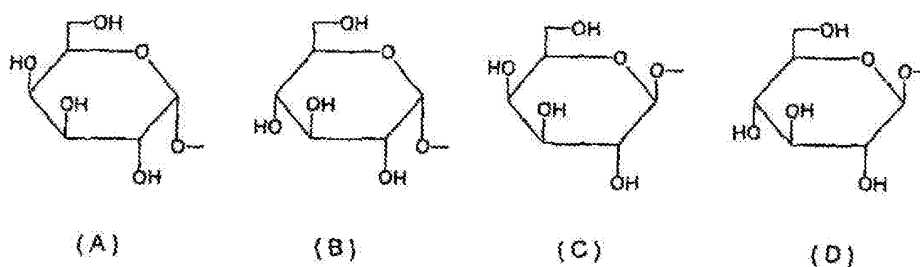
[0060] からなる群から選択される置換基であり、 R^{51} はOH、または下記基 (E) および
 (F)：

[0061] [化7]



[0062] からなる群から選択される置換基であり、 R^{71} は、OHまたは下記基 (A) ~ (D)
)：

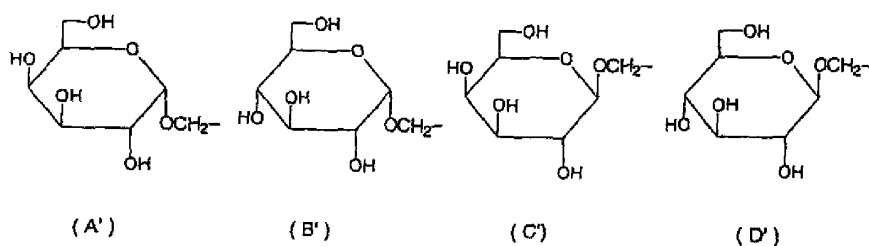
[化8]



[0063] からなる群から選択される置換基であり、 R^{91} はH、 CH_3 、 CH_2OH 、または下記基
 (A') ~ (D')：

[0064]

[化9]

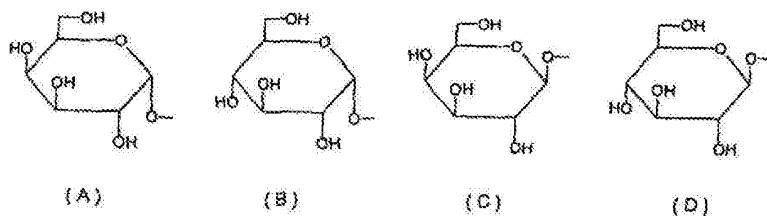


[0065] からなる群から選択される置換基である；

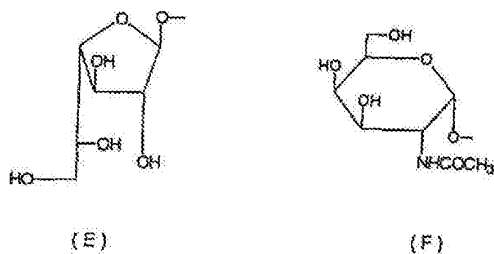
ii) R^{31} 、 R^{61} および R^{71} がHのとき R^{41} はH、OH、 NH_2 、 NHCOCH_3 、または下記基 (A)

～ (D)：

[0066] [化10]

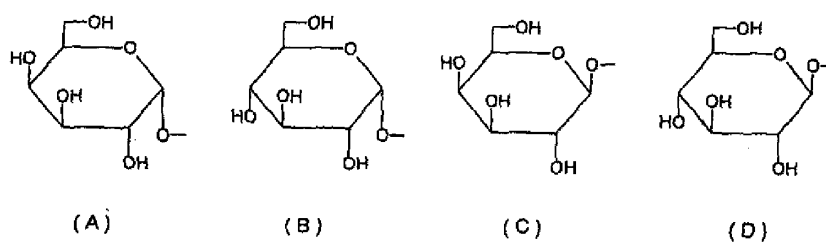
[0067] からなる群から選択される置換基であり、 R^{51} はOH、または下記基 (E) および (F)：

[0068] [化11]

[0069] からなる群から選択される置換基であり、 R^{81} はOH、または下記基 (A) ～ (D)：

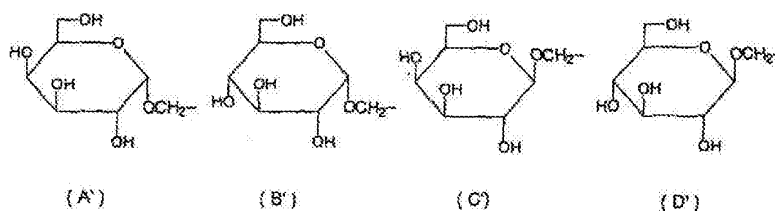
[0070]

[化12]



[0071] からなる群から選択される置換基であり、 R^{91} はH、 CH_3 、 CH_2OH または下記基 (A') ~ (D') :

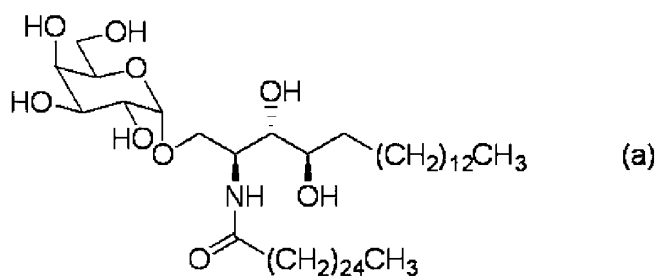
[0072] [化13]



[0073] からなる群から選択される置換基である。)

[0074] 中でも、(2S, 3S, 4R) -1-O- (α -D-ガラクトピラノシル) -2-ヘキサコサノイルアミノ-1, 3, 4-オクタデカントリオール (本明細書中、 α -ガラクトシルセラミド、 α -GalCerとも称する) が好ましい。下記式 (a) に α -GalCerの構造式を示す。

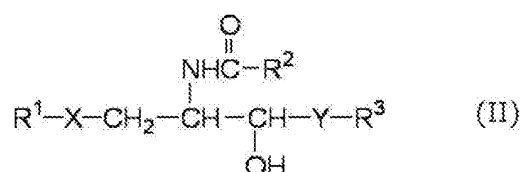
[0075] [化14]



[0076] 式 (I) の化合物は、W094/09020、W094/02168、W094/24142、W098/44928、Science, 278, p. 1626-1629, 1997等に記載された方法により製造することができる。

[0077] II. 式 (II) で表される化合物又はその塩。

[0078] [化15]



[0079] [式中、R¹はα-カルバ糖残基を示し、R²及びR³はそれぞれ独立に炭素数1～28の置換又は非置換の炭化水素基を示し、Xは酸素原子、硫黄原子、-CH₂-又は-NH-を示し、Yは-CH₂-, -CH(OH)-又は-CH=CH-を示す。]

[0080] 中でも、以下の化合物が好ましい。

[1] (2S, 3S, 4R) -1- (5a-カルバ-α-D-ガラクトピラノシルオキシ) -2-(ヘキサコサノイルアミノ)-3, 4-オクタデカンジオール

[2] (2S, 3S, 4R) -1- (5a-カルバ-α-D-ガラクトピラノシルチオ) -2-(ヘキサコサノイルアミノ)-3, 4-オクタデカンジオール

[3] (2S, 3S, 4R) -1- (5a-カルバ-α-D-グルコピラノシルオキシ) -2-(ヘキサコサノイルアミノ)-3, 4-オクタデカンジオール

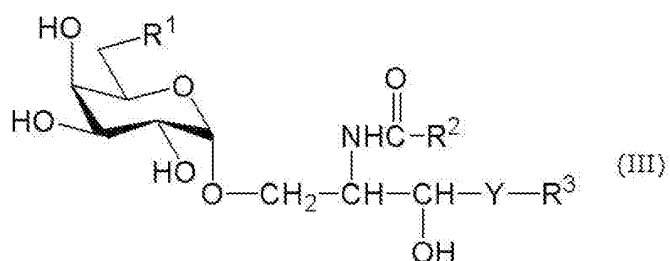
[4] (2S, 3S, 4R) -1- (5a-カルバ-α-D-グルコピラノシルチオ) -2-(ヘキサコサノイルアミノ)-3, 4-オクタデカンジオール

[5] (2S, 3S, 4R) -1- (5a-カルバ-α-D-フコピラノシルオキシ) -2-(ヘキサコサノイルアミノ)-3, 4-オクタデカンジオール

[0081] 式(II)の化合物またはその塩は、W02008/102888、US patent No. 829922 3等の開示された方法により製造することができる。

[0082] III. 式(III)で表される化合物又はその塩。

[0083] [化16]

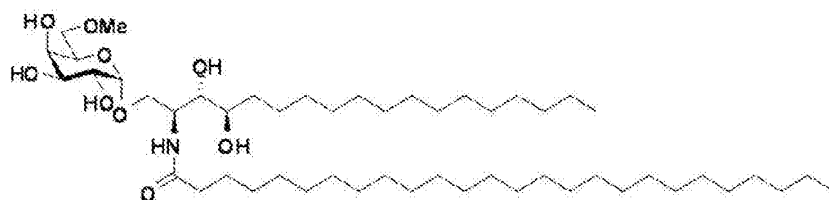


[0084] [式中、 R^1 は、水素原子、炭素数1～7のアルキル基、炭素数1～6のアルコキシ基又はハロゲン原子を示し、 R^2 及び R^3 はそれぞれ独立に炭素数1～28の置換又は非置換の炭化水素基を示し、 Y は $-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}(\text{OH})-$ 又は $-\text{CH}=\text{CH}-$ を示す。但し、 R^1 が水素原子であるときは、 R^2 は炭素数24～28の置換又は非置換の炭化水素基を示す。]

[0085] 中でも、以下の化合物が好ましい。

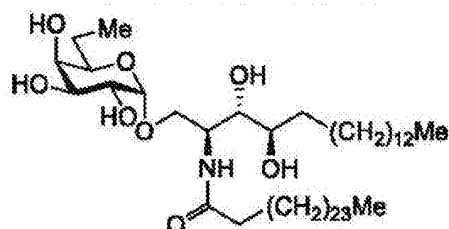
RCAI-61

[0086] [化17]



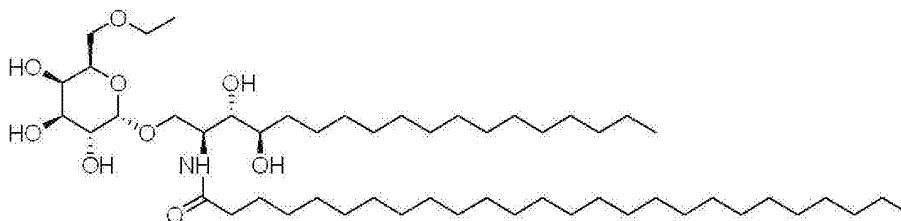
[0087] RCAI-64

[0088] [化18]



[0089] RCAI-85

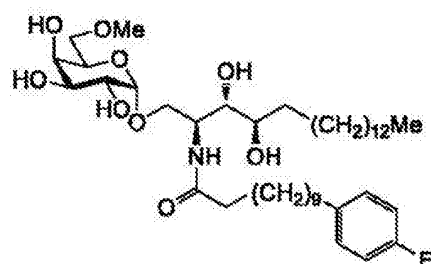
[0090] [化19]



[0091] RCAI-165

[0092]

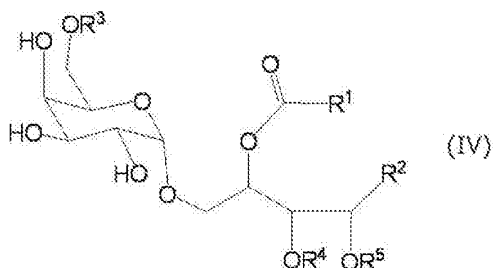
[化20]



[0093] 式 (III) の化合物またはその塩は、W02009/119692、US patent No. 8551959等を開示された方法により製造することができる。

[0094] IV. 式 (IV) で表される化合物又はその塩。

[0095] [化21]

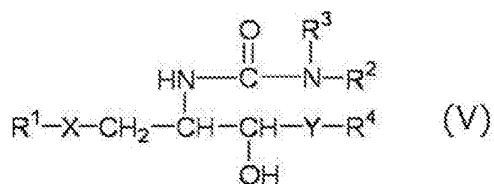


[0096] (式中、R¹は、炭素数1～30の炭化水素基を示し、R²は、炭素数1～20の炭化水素基を示し、R³は、水素原子又は炭素数1～5の炭化水素基を示し、R⁴及びR⁵は、同一又は異なって水素原子又は炭素数1～5の炭化水素基を示すか、又は、R⁴とR⁵が一緒になって炭素数1～5の2価の炭化水素基となり、隣接するエチレンジオキシと共に環構造を形成していても良い。)

[0097] 式 (IV) で表される化合物又はその塩は、W02010/030012、US patent No. 8580751等を開示された方法により製造することができる。

[0098] V. 式 (V) で表される化合物又はその塩。

[0099] [化22]



[0100] [式中、 R^1 は6位水酸基がアルキル化されていてもよいアルドピラノース残基を示し、 R^2 は置換基を有していてもよい炭素数1～26の炭化水素基を示し、 R^3 は水素原子又は置換基を有していてもよい炭素数1～26の炭化水素基を示し、 R^4 は置換基を有していてもよい炭素数1～21の炭化水素基を示し、 X は酸素原子又は $-\text{CH}_2-$ を示し、 Y は $-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}(\text{OH})-$ 又は $-\text{CH}=\text{CH}-$ を示す。]

[0101] 中でも、以下の化合物又はその塩が好ましい。

[1] (2S, 3S, 4R) -1- (α -D-ガラクトピラノシルオキシ) -2- (テトラコサニルウレイド) -3, 4-オクタデカンジオール

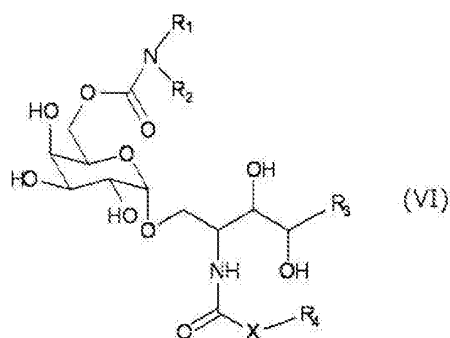
[2] (2S, 3S, 4R) -1- (α -D-ガラクトピラノシルオキシ) -2- (ヘキサデカニルウレイド) -3, 4-オクタデカンジオール

[3] (2S, 3S, 4R) -1- (6-O-メチル- α -D-ガラクトピラノシルオキシ) -2- (テトラコサニルウレイド) -3, 4-オクタデカンジオール

[0102] 式(V)で表される化合物又はその塩は、W02011/552842、US patent No. 8 853173等を開示された方法により製造することができる。

[0103] VI. 式(VI)で表される化合物、又はその塩。

[0104] [化23]



[0105] (式中、

X はアルキレン基あるいは $-\text{NH}-$ を示し；

R_1 及び R_2 は同一又は異なって、水素原子、アルキル基、水酸基、アルコキシ基、又は置換基を有していても良いアリール基を示し、 R_1 及び R_2 は、隣接する窒素原子と一緒になって5～6員環を形成してもよく；

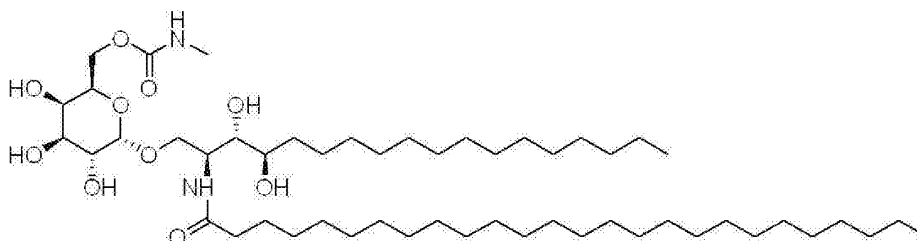
R₃は炭素数1～20の炭化水素基を示し；

R₄は炭素数1～30の炭化水素基を示す）で表される化合物、又はその塩。

[0106] 中でも、以下の化合物が好ましい。

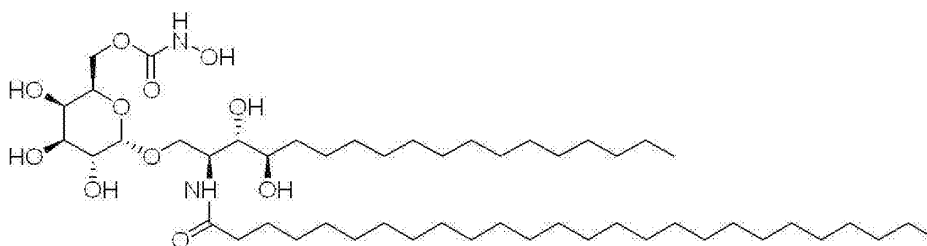
RK-163(RCAI-124)

[0107] [化24]



[0108] RCAI-137

[0109] [化25]



[0110] 式 (VI) の化合物またはその塩は、WO 2013/162016 A1、US 2015/152128 A 1等を開示された方法により製造することができる。

[0111] 強力にNKT細胞のIFN- γ 産生を誘導する観点から、上述に記載したNKT細胞リガンドの中でも、上記III又はVIに記載された化合物が好ましく、中でも、
RCAI-85

RCAI-137

RK-163(RCAI-124)

が好ましい。

[0112] 製造方法1において使用するNKT細胞リガンドは、最も好ましくは
RK-163(RCAI-124)である。

[0113] CD14陽性細胞（例えば、単球）の培養に用いる培地中のNKT細胞リガンドの濃度は、製造方法1により得られるNKT細胞リガンドパルス細胞が、NKT細胞

を活性化し得る限り、特に限定されないが、通常1 ng/mL以上、好ましくは10 ng/mL以上、より好ましくは30 ng/mL以上である。理論的には、培地中のNKT細胞リガンドの濃度の上限値は、その溶解度であるが、必要以上に高濃度としても、NKT細胞リガンドパルス細胞がNKT細胞を活性化する作用がプラトーに達してしまうので、培養コストの観点から、通常10000ng/mL以下、好ましくは1000 ng/mL以下、より好ましくは300ng/mL以下である。従って、培地中に添加するNKT細胞リガンドの濃度範囲は、通常1~10000 ng/mL、好ましくは10~1000 ng/mL、より好ましくは30~300 ng/mLである。

- [0114] CD14陽性細胞（例えば、単球）の培養に用いる培地にはGM-CSFが添加される。該培地中のGM-CSF濃度は、培養後に得られるNKT細胞リガンドパルス細胞におけるCD40の発現が誘導される限り、特に限定されないが、通常6.7ng/mL以上、好ましくは33.3ng/mL以上、より好ましくは53.3ng/mL以上である。理論的には、培地中のGM-CSF濃度の上限値は、その溶解度であるが、必要以上に高濃度としても、その活性がプラトーに達してしまうので、培養コストの観点から、通常666.7ng/mL以下、好ましくは133.3ng/mL以下、より好ましくは66.7ng/mL以下である。従って、培地中のGM-CSF濃度は、通常6.7~666.7ng/mL、好ましくは33.3~133.3ng/mL、より好ましくは53.3~66.6ng/mLである。尚、GM-CSF濃度をその生物学的活性（IU）で表す場合には、上述の濃度に、以下の換算式をあてはめる。

$$\text{GM-CSF } 1\text{mg} = 1.5 \times 10^7 \text{ IU}$$

- [0115] 重要なことに、CD14陽性細胞（例えば、単球）の培養に用いる培地は、IL-4を実質的に含有しない。単離されたCD14陽性細胞（例えば、単球）を、GM-CSF及びIL-4を含有する培地中で培養すると、未成熟な樹状細胞が誘導され得るが、該樹状細胞においては、CD1dの発現がほとんど認められず、NKT細胞に対してNKT細胞リガンドを提示して、NKT細胞を活性化する能力が低い。これに対して、製造方法1においては、単離されたCD14陽性細胞（例えば、単球）を、GM-CSFを含有し、IL-4を実質的に含有しない培地中で培養することにより、CD1dの発現を維持しつつNKT細胞を活性化する能力が高い細胞を得るこ

とが出来る。「IL-4を実質的に含有しない」とは、培地中のIL-4濃度が、単離されたCD14陽性細胞（例えば、単球）を未成熟な樹状細胞に誘導する濃度を下回ることを意味する。CD14陽性細胞の培養に用いる培地中のIL-4濃度は、通常0.01 ng/mL未満、好ましくは0.001 ng/mL未満、より好ましくは0.0001 ng/mL未満（例えば、0 ng/mL）である。従って、好ましい態様において、単離されたCD14陽性細胞（例えば、単球）の培養において、外因性のIL-4を培養物中に添加しない。

[0116] CD14陽性細胞（例えば、単球）の培養に用いる培地は、好ましくは、Flt-3Lを実質的に含まない。Flt-3Lは、CD14陽性細胞の樹状細胞への分化を促進し得るが、製造方法1においては、樹状細胞への分化は望ましくない。また、Flt-3Lの添加により、CD14陽性細胞培養後の細胞の生存率、生細胞数、及び細胞回収率が低下する可能性がある。「Flt-3Lを実質的に含有しない」とは、培地中のFlt-3L濃度が、単離されたCD14陽性細胞を未成熟な樹状細胞に誘導する濃度を下回ることを意味する。一態様において、CD14陽性細胞（例えば、単球）の培養に用いる培地中のFlt-3L濃度は、通常0.01 ng/mL未満、好ましくは0.001 ng/mL未満、より好ましくは0.0001 ng/mL未満（例えば、0 ng/mL）である。従って、好ましい態様において、単離されたCD14陽性細胞（例えば、単球）の培養において、外因性のFlt-3Lを培養物中に添加しない。

[0117] CD14陽性細胞（例えば、単球）の培養に用いる培地は、好ましくは、SCFを実質的に含まない。SCFは、樹状細胞への分化への関与が報告されているが、製造方法1においては、樹状細胞への分化は望ましくない。また、SCFの添加により、CD14陽性細胞培養後の細胞の生存率、生細胞数、及び細胞回収率が低下する可能性がある。「SCFを実質的に含有しない」とは、培地中のFlt-3L濃度が、樹状細胞への分化促進濃度を下回ることを意味する。一態様において、CD14陽性細胞（例えば、単球）の培養に用いる培地中のSCF濃度は、通常0.01 ng/mL未満、好ましくは0.001 ng/mL未満、より好ましくは0.0001 ng/mL未満（例えば、0 ng/mL）である。従って、好ましい態様において、単離されたCD14陽性細胞（例えば、単球）の培養において、外因性のSCFを培養物中に

添加しない。

- [0118] CD14陽性細胞（例えば、単球）の培養に用いる培地は、好ましくは、IL-2を実質的に含まない。IL-2は、培養物中に混入したT細胞を活性化してIL-4の産生を誘導し、このIL-4がCD14陽性細胞の樹状細胞への分化を促進する可能性があるからである。「IL-2を実質的に含有しない」とは、培地中のIL-2濃度が、T細胞を活性化する濃度を下回ることを意味する。一態様において、CD14陽性細胞（例えば、単球）の培養に用いる培地中のIL-2濃度は、通常0.01 ng/mL未満、好ましくは0.001 ng/mL未満、より好ましくは0.0001 ng/mL未満（例えば、0 ng/mL）である。従って、好ましい態様において、単離されたCD14陽性細胞（例えば、単球）の培養において、外因性のIL-2を培養物中に添加しない。
- [0119] 製造方法1により、NKT細胞を効率的に活性化する、NKT細胞リガンドパルス細胞を製造することが可能な限り、CD14陽性細胞（例えば、単球）の培養に用いる培地には、GM-CSFに加えて、上記以外の1種又は複数種のサイトカイン（インターロイキン、ケモカイン、インターフェロン、造血因子、細胞増殖因子、細胞傷害因子、アディポカイン、神経栄養因子等）を含んでいてもよい。
- [0120] 一態様において、CD14陽性細胞（例えば、単球）の培養に用いる培地には、GM-CSF以外のサイトカイン（インターロイキン、ケモカイン、インターフェロン、造血因子、細胞増殖因子、細胞傷害因子、アディポカイン、神経栄養因子等）を実質的に含まない。該態様において、GM-CSF以外の各サイトカインの培地中の濃度は、例えば、0.01 ng/mL未満、好ましくは0.001 ng/mL未満、より好ましくは0.0001 ng/mL未満（例えば、0 ng/mL）である。好ましい態様において、単離されたCD14陽性細胞（例えば、単球）の培養において、GM-CSF以外の外因性のサイトカインを培養物中に添加しない。
- [0121] 製造方法1において培地中に添加されるタンパク質性の因子は、培養するCD14陽性細胞（例えば、単球）と同一の動物種由来であってもよいし、異なる動物種由来であってもよいが、好ましくは同一の動物種由来である。例えば

、ヒトCD14陽性細胞（例えば、ヒト単球）を培養する場合には、ヒト由来のタンパク質性の因子（例、ヒトGM-CSF等）を添加する。ここで、タンパク質性の因子について「ヒト由来」とは、その因子のアミノ酸配列が、ヒトが天然に発現する当該因子のアミノ酸配列と同一であることを意味する。

[0122] CD14陽性細胞（例えば、単球）の培養に用いられる培地の基礎培地は、自体公知のものを用いることができ、製造方法1によりNKT細胞リガンドパルス細胞を製造し得る範囲において特に限定されないが、例えばRPMI-1640、DMEM、EMEM、 α -MEM、F-12、F-10、M-199、HAM等を挙げることができる。また、リンパ球培養用等に改変された培地（例、AIM-V）を用いてもよく、上記基礎培地の混合物を用いてもよい。

[0123] 当該培地は、自体公知の添加物を含むことができる。添加物としては、製造方法1によりNKT細胞リガンドパルス細胞を製造し得る範囲において特に限定されないが、例えば、有機酸（例えばピルビン酸ナトリウム等）、アミノ酸（例えば、非必須アミノ酸、L-グルタミン等）、還元剤（例えば2-メルカプトエタノール等）、緩衝剤（例えばHEPES等）、抗生物質（例えばストレプトマイシン、ペニシリン、ゲンタマイシン等）等が挙げられる。当該添加物は、それぞれ自体公知の濃度範囲内で含まれることが好ましい。

[0124] また、当該培地は、血清を含んでいてもいなくてもよい。血清としては、哺乳動物由来の血清であれば、製造方法1によりNKT細胞リガンドパルス細胞を製造し得る範囲において特に限定されないが、好ましくは上記哺乳動物由来の血清（例えばウシ胎仔血清、ヒト血清等）である。培養するCD14陽性細胞（例えば、単球）を採取した被験体の自家血清を用いてもよい。血清に換えて、血清の代替添加物（例えばKnockout Serum Replacement (KSR) (Invitrogen社製)等）を用いてもよい。血清の濃度は、製造方法1によりNKT細胞リガンドパルス細胞を製造し得る範囲において特に限定されないが、通常、0.1~30 (v/v) %の範囲である。

[0125] 化学的に未決定な成分の混入を回避する観点から、CD14陽性細胞（例えば、単球）の培養に用いられる培地は、好適には、無血清培地であり得る。無

血清培地とは、無調製又は未精製の血清を含まない培地を意味し、精製された血液由来成分や動物組織由来成分（例えば、増殖因子）が混入している培地は無血清培地に該当するものとする。

[0126] 単離されたCD14陽性細胞（例えば、単球）の培養は、例えば、上述の生体試料から単離したCD14陽性細胞（例えば、単球）を遠心分離等して細胞を回収し、上清の培地を除去し、上述のNKT細胞リガンド及びGM-CSFを含有し、IL-4を実質的に含有しない培地中に懸濁し、培養皿に播種して所定時間培養することにより実施することができる。単離したCD14陽性細胞（例えば、単球）を、NKT細胞リガンド及び／又はGM-CSFを含有せず、IL-4を実質的に含有しない培地中に懸濁し、培養皿に播種した後、NKT細胞リガンド及び／又はGM-CSFを所定濃度となるように培地に添加してもよい。培養のスケールアップは、所望する目的に応じて、培養皿等を調節することにより適宜実施することができる。

[0127] 培養開始時における、CD14陽性細胞（例えば、単球）の播種密度は、製造方法1によりNKT細胞リガンドパルス細胞を製造し得る範囲において特に限定されないが、比較的高い生存率、回収率、及び生存細胞数を達成することが期待されることから、通常、 $0.42 \times 10^6 \sim 3.42 \times 10^6$ (cells/cm²)、好ましくは、 $1.68 \times 10^6 \sim 3.42 \times 10^6$ (cells/cm²)である。尚、分母の面積は、培養容器の底面積を示す。

[0128] NKT細胞リガンドを含有する培地中での単離したCD14陽性細胞（例えば、単球）の培養時間（即ち、NKT細胞リガンドによるパルス時間）は、製造方法1によりNKT細胞リガンドパルス細胞を製造し得る範囲において特に限定されないが、NKT細胞リガンドを確実に提示して、NKT細胞を活性化する能力を高める観点から、通常16時間以上、好ましくは16～72時間、より好ましくは20～72時間である。

[0129] その他の培養条件は、リンパ球培養技術において通常用いられている培養条件を用いることができる。例えば、培養温度は通常約30～40℃の範囲であり、好ましくは約37℃が例示される。CO₂濃度は通常約1～10%の範囲であり、

好ましくは約5%が例示される。湿度は通常約70～100%の範囲であり、好ましくは約95～100%が例示される。

[0130] このような培養操作により、NKT細胞リガンドがCD14陽性細胞（例えば、単球）に取り込まれた後、CD1dタンパク質によって細胞膜上に提示されることにより、NKT細胞リガンドパルス細胞を得ることができる。

[0131] 製造方法1により得られるNKT細胞リガンドパルス細胞は、NKT細胞を活性化し、NKT細胞の増殖、IFN- γ 産生、及び／又は腫瘍細胞に対する細胞傷害活性を誘導する活性を有する。

[0132] NKT細胞リガンドパルス細胞が得られたことは、培養後の細胞を、単離されたNKT細胞と共培養し、IFN- γ 産生を評価することにより確認することが出来る。NKT細胞リガンドパルス細胞を単離されたNKT細胞と共培養すると、NKT細胞が活性化され、IFN- γ の産生が誘導される。

[0133] 製造方法1により得られる、NKT細胞リガンドパルス細胞は、好ましくはCD14陽性である。製造方法1により得られる、NKT細胞リガンドパルス細胞におけるCD14陽性細胞の割合は、例えば50%以上、好ましくは、60%以上、70%以上、80%以上又は90%以上である。

[0134] 製造方法1により得られる、NKT細胞リガンドパルス細胞は、好ましくはCD1d陽性である。上記培養より得られる細胞集団におけるCD1d陽性細胞の割合は、例えば50%以上、好ましくは、60%以上、70%以上、80%以上又は90%以上である。

[0135] 製造方法1により得られる、NKT細胞リガンドパルス細胞は、好ましくはCD40陽性である。上記培養より得られる細胞集団におけるCD40陽性細胞の割合は、例えば50%以上、好ましくは、60%以上、70%以上、80%以上又は90%以上である。

[0136] 好ましい態様において、製造方法1により得られる、NKT細胞リガンドパルス細胞は、CD14陽性CD1d陽性CD40陽性である。上記培養より得られる細胞集団におけるCD14陽性CD1d陽性CD40陽性細胞の割合は、例えば50%以上、好ましくは、60%以上、70%以上、80%以上又は90%以上である。単離されたCD14陽

性細胞（例えば、単球）を、NKT細胞リガンド及びGM-CSFを含有し、IL-4を実質的に含有しない培地中で培養することにより、CD1dの発現を維持しつつ、NKT細胞の活性化に重要なCD40の発現が誘導され、NKT細胞を活性化する能力が高い細胞を得ることが期待できる。

[0137] 製造方法1は、単離されたCD14陽性細胞（例えば、単球）を、NKT細胞リガンド及びGM-CSFを含有し、IL-4を実質的に含有しない培地中で培養し、NKT細胞リガンドパルス細胞を回収した後、培地中に遊離した過剰量のNKT細胞リガンドを除去するために洗浄工程を含むことができる。洗浄には、適切な培地、生理食塩水、リン酸緩衝生理食塩水、リンゲル液等を用いることができる。

[0138] （製造方法2）

本発明は、単球などCD14陽性細胞を株化（不死化）して得られたCD14陽性細胞株を、NKT細胞リガンドを含有し、GM-CSFおよびIL-4を実質的に含有しない培地中で培養する工程を含む、NKT細胞リガンドパルスCD14陽性細胞株の製造方法（本発明の製造方法2）を提供する。

[0139] CD14陽性細胞株は、単球などのCD14陽性細胞から樹立された細胞株であり得る。CD14陽性細胞株は、例えば、GM-CSFおよびIL-4を実質的に含有しない培地中で培養することにより調製することができる。このCD14陽性細胞株の調製は、培養に用いる培地がNKTリガンドを含有していなくてもよい点を除き、上記製造方法1に準じて行うことができる。

[0140] また、単球などから樹立された細胞株の中から、CD14陽性CD1d陽性の発現パターンを満足する細胞株を選択することによっても、目的に叶ったCD14陽性細胞株を獲得することができる。そのような細胞株としては、例えば、THP-1やU937を挙げることができる。

[0141] また、iPS細胞等の初期化細胞（多能性幹細胞）から分化誘導され、樹立されたCD14陽性細胞株を使用することもできる。初期化された細胞からCD14陽性細胞株を得る方法は、例えばGrigoriadis et al., Blood. 2010 Apr 8;115(14):2769-76やStem Cells. 2016 Dec;34(12):2852-2860を参照して行ってもよい。

く、当業者であれば任意に方法を最適化することができるため、これに限定されない。

[0142] 製造方法2に供するCD14陽性細胞株は、好ましくは、単離されている。

[0143] 製造方法2に供するCD14陽性細胞株は、好ましくは、CD14陽性である。培養開始時において、製造方法2において使用する単離されたCD14陽性細胞株に占める、CD14陽性細胞の割合は、通常70%以上、好ましくは80%以上、90%以上、95%以上、98%以上、99%以上又は99.5%以上、最も好ましくは100%である。

[0144] CD14陽性細胞株の、NKT細胞リガンドを含有する培地中での培養は、培養に用いる培地がGM-CSFを実質的に含有しない点を除き、上記製造方法1に準じて行うことができる。

[0145] CD14陽性細胞株の培養に用いる培地中のGM-CSF濃度は、通常0.01 ng/mL未満、好ましくは0.001 ng/mL未満、より好ましくは0.0001 ng/mL未満（例えば、0 ng/mL）である。従って、好ましい態様において、CD14陽性細胞株の培養において、外因性のGM-CSFを培養物中に添加しない。

[0146] 尚、NKT細胞リガンドを含有する培地中での単離したCD14陽性細胞株の培養時間（即ち、NKT細胞リガンドによるパルス時間）は、製造方法2によりNKT細胞リガンドパルスCD14陽性細胞株を製造し得る範囲において特に限定されないが、通常2時間以上、好ましくは2～72時間である。製造方法2においては、製造方法1と比較して短時間でよく、例えば、2時間程度のパルス時間でも、NKT細胞を活性化する能力が獲得され得る。従って、製造方法2におけるパルス時間は、例えば、32時間以下、24時間以下、8時間以下、7時間以下、4時間以下であり得る。

[0147] 製造方法2により得られるNKT細胞リガンドパルスCD14陽性細胞株は、NKT細胞を活性化し、NKT細胞の増殖、IFN- γ 産生、及び／又は腫瘍細胞に対する細胞傷害活性を誘導する活性を有する。

[0148] 製造方法2により得られる、NKT細胞リガンドパルスCD14陽性細胞株は、好ましくはCD14陽性である。上記培養より得られる細胞集団におけるCD14陽性

細胞の割合は、例えば50%以上、好ましくは、60%以上、70%以上、80%以上又は90%以上である。

[0149] 製造方法2により得られる、NKT細胞リガンドパルスCD14陽性細胞株は、好ましくはCD1d陽性である。上記培養より得られる細胞集団におけるCD1d陽性細胞の割合は、例えば50%以上、60%以上、70%以上、80%以上又は90%以上である。

[0150] 製造方法2により得られる、NKT細胞リガンドパルスCD14陽性細胞株は、好ましくはCD40陽性である。上記培養より得られる細胞集団におけるCD40陽性細胞の割合は、例えば50%以上、好ましくは、60%以上、70%以上、80%以上又は90%以上である。

[0151] 好ましい態様において、製造方法2により得られる、NKT細胞リガンドパルスCD14陽性細胞株は、CD14陽性CD1d陽性CD40陽性となる。上記培養より得られる細胞集団におけるCD14陽性CD1d陽性CD40陽性細胞の割合は、例えば50%以上、好ましくは、60%以上、70%以上、80%以上又は90%以上である。CD14陽性CD1d陽性細胞株を、NKT細胞リガンドを含有し、GM-CSFおよびIL-4を実質的に含有しない培地中で培養することにより、速やかにNKT細胞リガンドがCD1d上に提示され、CD40が発現増強し、NKT細胞を活性化する能力が高い細胞を得ることが期待できる。

[0152] 製造方法2は、CD14陽性細胞株を、NKT細胞リガンドを含有し、GM-CSFおよびIL-4を実質的に含有しない培地中で培養し、NKT細胞リガンドパルスCD14陽性細胞株を回収した後、培地中に遊離した過剰量のNKT細胞リガンドを除去するために洗浄工程を含むことができる。洗浄には、適切な培地、生理食塩水、リン酸緩衝生理食塩水、リンゲル液等を用いることができる。

[0153] <NKT細胞リガンドパルスCD14陽性細胞又はNKT細胞リガンドパルスCD14陽性細胞株を含む細胞製剤>

本発明は、上記本発明のNKT細胞リガンドパルスCD14陽性細胞又はNKT細胞リガンドパルスCD14陽性細胞株を含む細胞製剤をも提供する。該NKT細胞リガンドパルスCD14陽性細胞及びNKT細胞リガンドパルスCD14陽性細胞株は、それ

それ、上記本発明の製造方法 1 及び製造方法 2 により得ることができる。本発明の細胞製剤に含まれるNKT細胞リガンドパルスCD14陽性細胞又はNKT細胞リガンドパルスCD14陽性細胞株は、各細胞が浮遊した状態、凝集して細胞塊となった状態、または浮遊細胞と凝集塊とが混在した状態でもよい。NKT細胞リガンドパルスCD14陽性細胞又はNKT細胞リガンドパルスCD14陽性細胞株は、通常、薬学的に許容される希釈用担体、例えば、生理食塩水、緩衝液等に懸濁される。NKT細胞リガンドパルスCD14陽性細胞又はNKT細胞リガンドパルスCD14陽性細胞株は、必要に応じてアルブミン等のタンパク質や薬理活性成分等の添加剤を加えて、任意にバイアル、バッグ、シリンジ等の容器に入れて細胞製剤とすることができる。1バイアル当たり又は1用量当たりのNKT細胞リガンドパルス細胞の細胞数は、例えば $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^9$ 個に調整することができる。また、このNKT細胞リガンドパルスCD14陽性細胞又はNKT細胞リガンドパルスCD14陽性細胞株を濃縮して用いて細胞製剤としてもよい。希釈用担体やタンパク質、添加剤は、この細胞製剤に含まれる細胞集団に適合するように適宜選択することができる。細胞製剤には、さらにDMSO等の保護剤を加え、凍結して細胞製剤とすることもできる。

[0154] 本発明の細胞製剤は、NKT細胞活性化剤、並びにNKT細胞活性化により誘導された、NKT細胞の増殖（NKT細胞数の増加）、IFN- γ の産生及び／又は細胞傷害活性によって直接的または間接的に予防又は治療的效果が期待される疾患（下記に詳述する）の予防又は治療剤として使用し得る。

[0155] <NKT細胞リガンドパルスCD14陽性細胞又はNKT細胞リガンドパルスCD14陽性細胞株の投与による、NKT細胞活性化により誘導された、NKT細胞の増殖（NKT細胞数の増加）、IFN- γ の産生、及び／又は細胞傷害活性によって直接的または間接的に予防又は治療的效果が期待される疾患の予防又は治療方法>

本発明によれば、上記本発明のNKT細胞リガンドパルスCD14陽性細胞又はNKT細胞リガンドパルスCD14陽性細胞株、或いは該NKT細胞リガンドパルスCD14陽性細胞又はNKT細胞リガンドパルスCD14陽性細胞株を含む細胞製剤を被験体に投与することにより、該被験体におけるNKT細胞を活性化することが出来る

。特に、本発明においては、被験体におけるNKT細胞を活性化し、NKT細胞の増殖（NKT細胞数の増加）、IFN- γ の産生、アジュバント作用、長期免疫記憶、及び／又は細胞傷害活性を誘導することが出来る。このため、上記本発明のNKT細胞リガンドパルスCD14陽性細胞又はNKT細胞リガンドパルスCD14陽性細胞株、或いは該NKT細胞リガンドパルスCD14陽性細胞又はNKT細胞リガンドパルスCD14陽性細胞株を含む細胞製剤を被験体に投与することにより、該被験体における、NKT細胞活性化により誘導された、NKT細胞の増殖（NKT細胞数の増加）、IFN- γ の産生、アジュバント作用、長期免疫記憶及び／又は細胞傷害活性によって直接的または間接的に予防又は治療的效果が期待される疾患を予防又は治療することが期待出来る。

[0156] 本明細書において「被験体」とは、本発明の方法により治療されるべき対象をいい、例えば、ヒト、マウス、ラット、ウサギ、イヌ、ネコ、ウシ、ウマ、サル、ブタ等の哺乳動物を挙げることができる。好ましくはヒトである。

[0157] NKT細胞活性化により誘導された、NKT細胞の増殖（NKT細胞数の増加）、IFN- γ の産生、アジュバント作用、長期免疫記憶及び／又は細胞傷害活性によって直接的または間接的に予防又は治療的效果が期待される疾患としては、各種癌（例えば、乳癌、大腸癌、肺癌、前立腺癌、食道癌、胃癌、肝臓癌、胆道癌、脾臓癌、腎癌、膀胱癌、子宮癌、精巣癌、甲状腺癌、膵臓癌、脳腫瘍、卵巣癌、皮膚癌、血液腫瘍（例、成人T細胞白血病、慢性骨髄性白血病、悪性リンパ腫など）など）；各種感染症、例えば、ウイルス性疾患（例、B型肝炎ウイルス、C型肝炎ウイルス、D型肝炎ウイルスによるウイルス性肝炎、ヘルペス症、後天性免疫不全症候群（AIDS）、流行性インフルエンザなど）、細菌感染症（例、薬剤耐性結核、非定形抗酸菌感染症など）、真菌症（例、カンジダ症など）等が挙げられる。被験体は、好適には、癌を罹患している、又は癌の罹患歴を有する哺乳動物（例、ヒト）、或いは感染症を罹患している、又は感染症の罹患歴を有する哺乳動物（例、ヒト）である。本発明の細胞製剤は、感染症、癌の転移又は再発の治療又は予防への適用も可能で

あり得る。

- [0158] NKT細胞は、体内の癌細胞や病原体感染細胞に直接作用する働きを持つ様々な免疫細胞（例、細胞傷害性T細胞、NK細胞等）を活性化できるため、本発明の細胞製剤は、癌や病原体の種類に関わらず、癌や感染症の予防や治療に適応可能であり得る。
- [0159] 投与方法としては、本発明の細胞製剤を患部又はその周辺に存在するNKT細胞に到達させることができる方法であれば限定されない。例えば、静脈内投与、動脈内投与、粘膜内投与、リンパ節内投与、患部組織内投与等が挙げられる。具体的には、患者の疾患部位に注射針を通して直接細胞製剤を送達することができる。また、静脈や動脈にカテーテルを通して細胞製剤を投与することもできる。
- [0160] 一回に投与する細胞集団の数は、患部又はその周辺に存在するNKT細胞を活性化し、目的とする疾患を予防又は治療するのに十分な数であれば特に限定されず、例えば、 $1 \times 10^4 \sim 1 \times 10^9$ 個/体重kg、好ましくは $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^7$ 個/体重kg、より好ましくは $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$ 個/体重kgである。また、細胞製剤中の細胞濃度は、通常 $1 \times 10^4 \sim 1 \times 10^7$ 個/mL、好ましくは $1 \times 10^5 \sim 5 \times 10^6$ 個/mL、より好ましくは $3 \times 10^5 \sim 3 \times 10^6$ 個/mLである。投与は、被験体の状態や疾患の重篤度等に応じて、複数回行ってもよい。
- [0161] 被験体に投与するNKT細胞リガンドパルスCD14陽性細胞又はNKT細胞リガンドパルスCD14陽性細胞株は、自家由来CD14陽性細胞（例えば、単球）（遺伝的に同種・同系）、または他家由来（遺伝的に同種・異系）CD14陽性細胞（例えば、単球）やCD14陽性細胞株（iPS細胞等の初期化細胞から分化誘導され、樹立されたCD14陽性細胞株を含む）から作製され得る。被験体本人のCD14陽性細胞（例えば、単球）から作製したNKT細胞リガンドパルスCD14陽性細胞を、当該被験体に投与することが好ましいが、投与される他家由来のNKT細胞リガンドパルスCD14陽性細胞又はNKT細胞リガンドパルスCD14陽性細胞株に対して適合性があることが予測される被験体に対して投与することも、また好ましい。

[0162] 本明細書中で挙げられた特許および特許出願明細書を含む全ての刊行物に記載された内容は、本明細書での引用により、その全てが明示されたと同程度に本明細書に組み込まれるものである。

[0163] 以下に実施例を挙げ、本発明を更に詳しく説明するが、本発明は下記実施例等に何ら制約されるものではない。

実施例

[0164] [実施例1]

1. 材料と方法

1) 原材料：臍帯血および健常人末梢血からのCD14陽性細胞（単球）の分離精製

(1) ヒト末梢血からのCD14陽性細胞（単球）の抗CD14抗体を用いた分離精製

ボランティア健常人末梢血300mLからFicoll-Paque PLUS (GE ヘルスケア・ジャパン、コード番号17144002)を用いて単核球層を分取し（回収細胞数： 9.7×10^8 ）、抗CD14抗体結合マイクロビーズ (Miltenyi Biotec, Order no. 130-050-201) を用いてCD14陽性細胞を分離精製した（回収細胞数： 10.7×10^8 、回収率：10.5%、CD14陽性率：99.2%、生存率：98.0%）。一部細胞を樹状細胞の分化培養に供した。抗CD14抗体結合マイクロビーズで分離されなかった細胞画分をCD14陰性細胞として回収した。

[0165] (2) ヒト末梢血アフエレーシス液からのCD14陽性細胞（単球）の細胞分離装置を用いた分離精製

ボランティア健常人末梢血アフエレーシス液99mLから細胞分離装置（テルモ社製：Elutra）を用いて単球細胞分画を分取し（回収細胞数： 1.1×10^9 ）、ヒトCD14陽性細胞（ヒトElu-CD14陽性細胞）を分離した（回収総細胞数： 1.1×10^9 、単球回収率：49.1%、CD14陽性率：75.1%、生存率：98.3%）。本方法による分離精製ではCD14抗体を用いた分離精製に比較して回収率が劇的に改善し、結果として多くのCD14陽性細胞を得ることができた。

[0166] (3) ヒト臍帯血からのCD14陽性細胞（単球）の分離精製

HES (hydroethyl starch)を用いて赤血球の多くを除き、デキストランを含

む凍結剤で凍結したヒト臍帯血（理化学研究所バイオリソースセンター、筑波）（全白血球を含む）、抗CD14抗体結合マイクロビーズ（Miltenyi Biotec h, Order no. 130-050-201）を用いてCD14陽性細胞（単球）を分離精製した（回収細胞数： 10.7×10^6 、回収率：10.5%、CD14陽性率：99.2%、生存率：98.0%）。一部細胞を樹状細胞の分化培養に供した。抗CD14抗体結合マイクロビーズで分離されなかった細胞画分をCD14陰性細胞として回収した。

[0167] 2) CD14陽性細胞（単球）を用いたNKT細胞活性化のための抗原提示細胞の作製

(1) GM-CSF添加2日間培養による“RK-163パルスヒトCD14陽性細胞”および“RK-163パルスヒトElu-CD14陽性細胞”の作製

抗CD14抗体を用いて分離した直後のヒト単球・CD14陽性細胞及びヒト末梢血のアフェレーシス液からエルトリエーション法によって得られた単球・CD14陽性細胞（ヒトElu-CD14陽性細胞）を、それぞれ、サイトカイン[53.3ng/mL Recombinant Human GM-CSF（ミルテニーバイオテク）単独]を添加したAIM-V培地に再懸濁し、 3×10^6 /mLの細胞密度で24-well培養プレート（Falcon）に1mL/wellの細胞密度で播種した。同時に、RK-163（原末をDMSO及び0.5% Tween 20添加PBSに溶解）を最終濃度100ng/mLとなるように添加し、37℃ 5%CO₂下で48時間培養し、“RK-163パルスヒトCD14陽性細胞”及び“RK-163パルスヒトElu-CD14陽性細胞”とした。生存率、回収率、及びNKT活性化作用（IFN- γ 産生、細胞数増大、細胞傷害活性）の測定を下記の要領で行った。

[0168] (2) CD14陽性細胞（単球）から樹状細胞（DC）への分化培養と“RK-163パルスヒト樹状細胞”の作製

新規技術を従来法と比較するために、1) で得られたヒトCD14陽性細胞（単球）をAIM-V（Gibco、code no. 0870112-DK）培地に懸濁し、 1×10^6 /mLの細胞濃度で6-well培養プレート（Falcon）に5mL/wellで播種した。Recombinant Human GM-CSF 53.3ng/mL及びIL-4 34.7ng/mL（いずれもMiltenyi Biotec h）を添加して37℃、5%CO₂下で6日間培養し、樹状細胞に分化誘導し、その後、RK-163（原末をDMSO及び0.5% Tween 20添加PBSに溶解）を最終濃度100ng/mLとな

るように添加し、37℃ 5%CO₂下で48時間培養し、“RK-163パルスヒト樹状細胞”とした。

[0169] 3) 解析方法

(1) 生細胞数及び生存率の計算法

0.4%トリパンブルー (Bio-Rad) で染色後、TC20™全自動セルカウンター (Bio-Rad) を用いて染色されていない生細胞、及び青く染色された死細胞を 2回計測し、その平均を計算して、生細胞数及び生存率を算出した。

[0170] (2) Fluorescence activated cell sorting (FACS) 解析

細胞に、以下の各抗原に対するPhycoerythrinラベル化抗ヒト抗体 [CD14 (clone HCD14、Biolegend)、CD11c (clone 3.9、Biolegend)、CD11b (clone ICRF44、BD Biosciences)、CD45 (clone HI30、Biolegend)、HLA-DR (clone L243、Biolegend)、CD1d (clone 51.1、Biolegend)、CD40 (clone 5C3、Biolegend)、CD95(Fas) (clone DX2、Biolegend)、CD80 (clone 2D10、Biolegend)、CD86 (clone IT2.2、Biolegend)、及びCD209 (clone DC-SIGN、Miltenyi Biotech)] を添加し、遮光30分間、4℃にて静置反応させた。遠心、洗浄後、0.5%ヒト血清アルブミン加PBSに細胞を懸濁し、フローサイトメーター (FACSCantoII、BD Biosciences) にてCD14陽性細胞の純度及び各種表面抗原の発現を調べた。

[0171] (3) NKT細胞活性化作用 (IFN- γ 産生) の測定

抗CD14抗体を用いて分離した直後のヒトCD14陽性細胞 (単球) とヒトCD14陰性細胞またはヒトElu-CD14陽性細胞 (単球) を、GM-CSFおよびNKT細胞リガンドRK-163とともに2日間培養した細胞 (それぞれ、“RK-163パルスヒトCD14陽性細胞” “RK-163パルスヒトCD14陰性細胞” “RK-163パルスヒトElu-CD14陽性細胞” と呼ぶ)、および2) - (2) でGM-CSFとIL-4を添加した6日間培養により分化誘導した樹状細胞 (“RK-163パルスヒト樹状細胞” と呼ぶ) の調製においては、それぞれの細胞に、RK-163 (原末をDMSO及び0.5% Tween 20添加PBSに溶解) を最終濃度100ng/mLとなるように添加し、37℃ 5%CO₂下で48時間培養することにより、“RK-163パルス細胞” を作製した。培養後、回収細

胞を2回遠心洗浄し、トリパンブルー染色により生細胞数をTC20™全自動セルカウンターで算出した。RK-163パルス細胞とヒトNKT細胞株をそれぞれ $1 \times 10^6/\text{mL}$ となるように10%牛胎児血清 (Sigma, Lot No.114K525) 添加RPMI-1640 (Invitrogen) に懸濁し、 $1 \times 10^5/0.1 \text{ mL/well}$ の細胞濃度で各々の細胞懸濁液を96-well丸底培養プレートに播種し、 37°C 5% CO_2 下で48時間培養した。培養後、 $200 \mu\text{L}$ の上澄みを回収し、産生分泌されたIFN- γ を市販ELISAキット (BD Biosciences) で測定した。

[0172] 本研究は、理化学研究所「ヒトを対象とする研究に関する倫理規定」に基づき、同研究所倫理審査委員会で研究開始前に承認を得ている。本研究は前項規定、及び「人を対象とする医学的研究に関する倫理指針」(文部科学省、厚生労働省)を遵守して進められた。

[0173] 2. 結果と考察

(1) ヒト末梢血 “CD14陽性細胞 (単球)”、“RK-163パルスヒトCD14陽性細胞” “RK-163パルスヒトElu-CD14陽性細胞” 及び “RK-163パルスヒト樹状細胞” の表面抗原発現パターン

ヒト末梢血から単離した直後のCD14陽性細胞 (単球) では、CD1d及びCD14抗原の発現が、極めて高く、樹状細胞の特徴 (CD14陰性、CD209陽性) はほとんど認められなかった。

一方、NKT細胞リガンドRK-163と2日間GM-CSF存在下で培養した「RK-163パルスヒトCD14陽性細胞」においては、NKT細胞を活性化しINF- γ 産生を惹起するCD40の発現が、急速に亢進したが、樹状細胞の特徴 (CD14陰性、CD209陽性) は認めなかった。「RK-163パルスヒトCD14陽性細胞」および「RK-163パルスヒトElu-CD14陽性細胞」は、依然としてCD14及びCD1dを発現しており、CD14陽性細胞であることから樹状細胞と異なる細胞であることが確認された。

CD14陽性細胞 (単球) をGM-CSF+IL-4存在下で6日間培養した「RK-163パルスヒト樹状細胞」においてはCD40の高い発現が認められたが、CD14抗原の発現はほとんど見られなくなり、CD1dの発現も著しく低下した。(図1)。CD1dはNKTリガンド (RK-163) と結合し、CD40の発現とともにNKT細胞の活性化に

は必須の分子であることから、「RK-163パルスCD14陽性細胞」はその両方の発現が高く、NKT細胞活性化に最適であると考えられた。一方、「RK-163パルスヒト樹状細胞」におけるCD1d発現の低下は、NKT細胞活性化に必要なCD40分子の発現は見られるもののNKT細胞の活性化が低くなる原因の可能性を示唆している。

- [0174] (2) ヒト末梢血CD14陽性細胞（単球）又はCD14陰性細胞から作製した“RK-163パルスヒトCD14陽性細胞”、“RK-163パルスヒトCD14陰性細胞”、“RK-163パルスヒト樹状細胞”のIFN- γ 産生誘導能（NKT細胞活性化作用）の比較

ヒトNKT細胞株を“RK-163パルスヒトCD14陽性細胞”と共培養したときのIFN- γ 産生を調べたところ、“RK-163パルスヒト樹状細胞”と共培養したよりも3倍ほど高かった。CD14抗体結合マイクロビーズによる分離直後の「CD14陰性細胞」にリガンドをパルスした「RK-163パルスヒトCD14陰性細胞」のNKT細胞活性化能（すなわちNKT細胞からのIFN- γ 産生）は低かった（図2）。この結果から、“RK-163パルスヒトCD14陽性細胞”が、“RK-163パルスヒト樹状細胞”及び“RK-163パルスヒトCD14陰性細胞”と比較して、極めて高いNKT細胞活性化作用を示すことが示された。

- [0175] (3) ヒト末梢血から単離したCD14陽性細胞（単球）を、種々の濃度のRK-163の存在下で、GM-CSF含有培地中で48時間培養し、得られたRK-163パルスCD14陽性細胞のNKT細胞活性化効果（IFN- γ 産生誘導）を評価した。その結果、30 ng/mL～300 ng/mLの濃度でのRK-163パルスにより、NKT細胞活性化効果を有するRK-163パルスCD14陽性細胞が得られることが示された（図3）。

- [0176] (4) “RK-163パルスヒトCD14陽性細胞”作製時のRK-163パルス時間のIFN- γ 産生誘導能（NKT細胞活性化作用）への影響

抗CD14抗体結合マイクロビーズ分離直後のCD14陽性細胞を分取し、NKTリガンドであるRK-163および他のNKT細胞リガンドである α -GalCerを100 ng/mLと濃度GM-CSF（53.3 ng/mL）を含有する培地中で種々の時間（0, 16, 48, 64 及び72時間）パルス培養し、NKT細胞のIFN- γ 産生を誘導する活性に対する影響を比較した。その結果、パルス16時間後からIFN- γ 産生誘導活性が認めら

れ、48-72時間後に高い活性が認められた（図4左）。この時の回収率と生存率を調べると、いずれも48時間が最も高いことから（図4右）、抗CD14抗体結合マイクロビーズ分離直後のCD14陽性細胞は、RK-163パルス48時間後が、NKT細胞の活性化能（IFN- γ 産生誘導）、回収率、生存率共に良好な条件であることが示された（図4）。

[0177] (5) ヒト末梢血から単離したCD14陽性細胞（単球）のRecombinant Human GM-CSF（53.3ng/mL）と RK-163（100ng/mL）存在下での2日間の RK-163パルス培養により、最も効率的なRK-163パルスCD14陽性細胞が得られる細胞濃度を検討した。具体的には、ヒト末梢血から単離したCD14陽性細胞を様々な細胞密度（ $0.42\sim 3.42\times 10^6/\text{cm}^2$ ）でAIM-V培地中に懸濁し、24穴プレートに播種し、37℃ 5% CO₂下で48時間培養後、生細胞数、生存率、及び回収率を評価した（図5）。

[0178] (6) α -GalCerあるいはRK-163パルスヒトCD14陽性細胞と α -GalCerあるいはRK-163パルスヒト樹状細胞がNKT細胞の増殖能に及ぼす影響の検討

ヒトNKT細胞を、FCS（5%）（sigma, lot 14K525）、sodium pyruvate、NEAA（非必須アミノ酸）、2-ME、IL-2（100U/mL）（イムネース）を含有するAIM-V（50%）とRPMI-1640（45%）との混合培地中で、上述と同様に作製した“ α -GalCer又はRK-163パルスヒトCD14陽性細胞” 或いは “ α -GalCer又はRK-163パルスヒト樹状細胞” と共に8～10日間培養することにより刺激し、NKT細胞の増殖活性を測定した。NKT細胞とRK-163パルスCD14陽性細胞又はRK-163パルス樹状細胞との混合比は1：1.5～5とした。

[0179] その結果、RK-163あるいは α -GalCerパルスCD14陽性細胞いずれも、RK-163あるいは α -GalCerパルス樹状細胞よりもはるかに強力にNKT細胞の増殖を誘導することが示された。さらに、 α -GalCerパルスCD14陽性細胞とRK-163パルスCD14陽性細胞との間には、NKT細胞増殖誘導活性に特に差は認められなかった（図6）。

[0180] (7) RK-163パルスヒトCD14陽性細胞とRK-163パルスヒト樹状細胞がNKT細胞の細胞傷害活性に及ぼす影響の検討

ヒトNKT細胞を、FCS (5%) (iPS細胞細胞増殖に適したロット)、sodium pyruvate、NEAA、2-ME、IL-2 (100U/mL) (イムネース) を含有するAIM-V (50%) とRPMI-1640 (45%) との混合培地中で、上述と同様に作製した、“RK-163パルスヒトCD14陽性細胞”又は“RK-163パルスヒト樹状細胞”と共に8~10日間培養することにより刺激した。NKT細胞とRK-163パルスCD14陽性細胞又はRK-163パルス樹状細胞との混合比は1:1.5~5とした。得られたヒトNKT細胞を、96穴丸底プレート上、FBS (10%) 含有complete RPMI-1640培地中で、NCI H460細胞 (ヒト肺がん細胞株) と共に4時間培養することにより、NCI H460細胞に対する細胞傷害活性を調べた。ターゲット (NCI H460細胞) の細胞数を 1×10^4 cells/wellとし、エフェクター: ターゲット比を、3:1及び10:1とした。

[0181] その結果、ヒトNKT細胞を“RK-163パルスヒトCD14陽性細胞”と共培養することにより得られるヒトNKT細胞は、“RK-163パルスヒト樹状細胞”と共培養することにより得られるヒトNKT細胞よりも強力な細胞傷害活性を有していることが示された (図7)。またRK-163は、 α -GalCerに比べてヒトNKT細胞に対してより強い細胞傷害活性を誘導することが判明した。

[0182] (8) 種々のNKT細胞リガンド (RCAI-85, RCAI-137, RK-163) パルス培養で得られた「NKT細胞リガンドパルスCD14陽性細胞」のNKT細胞活性化能 (IFN- γ 産生誘導) の検討

RK-163に換えて、RCAI-85 (100 ng/mL)、RCAI-137 (100 ng/mL) を用いることにより、ヒト末梢血から単離したCD14陽性細胞 (単球) を48時間パルスし、それぞれのリガンドパルスCD14陽性細胞を得た。 1×10^5 個のRK-163パルスCD14陽性細胞又はその他のリガンドパルスCD14陽性細胞を96穴丸底プレートに播種し、 1×10^5 個のヒトNKT細胞と10% FBS含有complete RPMI-1640培地中で48時間共培養し、培養液中のIFN- γ 濃度を測定した。その結果、RK-163パルスCD14陽性細胞や、他のリガンドパルスCD14陽性細胞は、RK-163パルスCD14陽性細胞同様、強力にNKT細胞からのIFN- γ 産生を誘導することが示された (図8)。

[0183] (9) “RK-163パルスヒトCD14陽性細胞”のin vivo抗腫瘍作用の検討

“RK-163パルスヒトCD14陽性細胞”が担癌動物で、実際に抗腫瘍効果を示すことを検証した。

C57BL/6雌マウスの脾臓内にB16マウスメラノーマ細胞を移植し、4日後に実施例1の方法に従って調製した“RK-163パルスヒトCD14陽性細胞”を静脈内投与した。10日後に安楽死させ肝臓を摘出し、そのホモジネート作製後、1 N NaOHに溶解して上清を回収した。分光光度計にて上清のメラニン色素の吸光度を測定し、検量線を描くことによって、脾臓から肝臓へ転移した腫瘍細胞数を定量した。

その結果、“RK-163パルスヒトCD14陽性細胞”は強い抗腫瘍効果を示し、メラノーマ腫瘍細胞の転移を顕著に抑制した(図9)。

[0184] [実施例2]

1. 材料と方法

1) 原材料1: ヒト由来CD14陽性細胞株(ここでは、代表例としてTHP-1細胞、U937細胞、ヒトiPS細胞から誘導したCD14陽性細胞株(以下、ヒトiPS-CD14陽性細胞株という。))を用いた。)

THP-1細胞およびU937細胞はECACC、JCRBから入手した。iPS-CD14陽性細胞株は熊本大の千住氏により樹立された細胞を用いた(Senju et al. Stem Cells, 27:1021-1031, 2009)。

[0185] 2) ヒト由来CD14陽性細胞株を用いたNKT細胞活性化のための抗原提示細胞の作製

ヒトCD14陽性細胞株THP-1細胞およびU937細胞をRPMI1640/10%FBS培養液に $1 \sim 3 \times 10^6$ cells/mLとなるように懸濁し、24-well培養プレート(Falcon)に1 mL/wellの細胞密度で播種した。同時にRK-163(原末をDMSO及び0.5% Tween 20添加PBSに溶解)を最終濃度100 ng/mLとなるように添加し、GM-CSF非存在下に、37°C、5% CO₂下で8~48時間培養し“RK-163パルスヒトCD14陽性細胞株”とした。

iPS-CD14陽性細胞は、THP-1およびU937と同様にRK-163存在下で8~48時間

培養し “RK-163パルスヒトiPS-CD14陽性細胞株” とした。

[0186] 3) 解析方法

(1) 生細胞数及び生存率の計算法

0.4% トリパンプルー (Bio-Rad) で染色後、TC20™全自動セルカウンター (Bio-Rad) を用いて染色されていない生細胞、及び青く染色された死細胞を2回計測し、その平均を計算して、生細胞数及び生存率を算出した。

[0187] (2) Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS) 解析方法

細胞に、以下の各抗原に対するPhycoerythrinラベル化抗ヒト抗体[CD14 (clone HCD14, Biolegend)、CD11c (clone 3.9, Biolegend)、CD11b (clone IC RF44, BD Biosciences)、CD45 (clone HI30, Biolegend)、HLA-DR (clone L2 43, Biolegend)、CD1d (clone 51.1, Biolegend)、CD40 (clone 5C3, Biolegend)、CD95 (Fas) (clone DX2, Biolegend)、20、CD80 (clone 2D10, Biolegend)、CD86 (clone IT2.2, Biolegend)、及びCD209 (clone DC-SIGN, Miltenyi Biotec)] を添加し、遮光30分間、4℃にて静置反応させた。遠心、洗浄後、0.5% ヒト血清アルブミン添加PBSに細胞を懸濁し、フローサイトメーター (FACSCantoII, BD Biosciences) にてCD14陽性細胞の純度及び各種表面抗原の発現を調べた。

[0188] (3) NKT細胞活性化作用 (IFN- γ 産生) の測定

ヒト由来CD14陽性細胞株 (ここでは、THP-1、U937、およびヒト由来iPS-CD14陽性細胞を使用) のいずれかとGM-CSF存在下または非存在下にてNKT細胞リガンドRK-163とともに8~48時間培養し、“RK-163パルスヒトCD14陽性細胞株” を作製した。培養後、回収細胞を2回遠心洗浄し、トリパンプルー染色により生細胞数をTC20™ 全自動セルカウンターで算出した。各RK-163パルス細胞とヒトNKT細胞株を、それぞれ 1×10^6 /mLとなるように10%牛胎仔血清 (Sigma, Lot No. 114K525) 添加RMPI-1640 (Invitrogen) に懸濁し、 1×10^5 /0.1mL/wellの細胞濃度で各々の細胞懸濁液を96-well丸底培養プレートに播種し、37℃ 5% CO₂下で48時間培養した。培養後、200 μ Lの上澄みを回収し、産生分泌されたIFN- γ を市販ELISAキット (BD Biosciences) で測定した。

[0189] 2. 結果と考察

(1) ヒト由来CD14陽性細胞株 (THP-1、U937、およびヒト由来iPS-CD14陽性細胞を使用) の表面抗原発現パターン

THP-1、U937、およびヒト由来iPS-CD14陽性細胞の表面抗原発現パターンを、それぞれ図10-1、10-2及び10-3に示した。NKT細胞リガンドパルスTHP-1細胞、iPS-CD14陽性細胞ではNKTリガンドの抗原提示に必須となるCD1d分子の発現とNKT細胞活性化に必須なCD40分子の発現がFACS解析で認められた。またU937細胞でもCD1dの発現がFACS解析で認められ、RK-163パルス後にCD40 mRNA発現が上昇した。従って、実施例1に記載したヒト末梢血由来のCD14陽性細胞だけでなく、CD14陽性細胞株によっても効率的にNKT細胞を活性化できることを示している。

[0190] (2) “RK-163パルスヒトCD14陽性細胞株” (ここでは、THP-1、U937、およびヒト由来iPS-CD14陽性細胞を使用) のIFN- γ 産生誘導能 (NKT細胞活性化作用) の比較

ヒトNKT細胞株を各 “RK-163パルスヒトCD14陽性細胞株” と共培養し、ヒトNKT細胞株のIFN- γ 産生を調べた。ヒト末梢血CD14陽性細胞から作製した “RK-163パルスヒトCD14陽性細胞” と同様に、 “RK-163パルスヒトCD14陽性細胞株” も高いNKT細胞活性化作用を持つことが示された (図11)。

[0191] (3) “RK-163パルスヒト由来CD14陽性細胞株” 作製時におけるRK-163パルス時間のIFN- γ 産生誘導能 (NKT細胞活性化作用) への影響

ヒト由来CD14陽性細胞株 (U937細胞) をNKTリガンドであるRK-163 (100 ng/mL) とGM-CSF存在下または非存在下において種々の時間 (2~48時間) パルス培養し、NKT細胞のIFN- γ 産生を誘導する活性に対する影響を比較したところ、パルス2時間後からIFN- γ 産生誘導活性が認められた (図12左)。

またTHP-1をRK-163 (100 ng/mL) とGM-CSF非存在下において8~24時間パルス培養後、 3×10^5 個の “RK-163パルスTHP-1細胞株” をC57BL/6マウスに静脈注射し、24時間後に採血して血中IFN- γ 量を定量したところ、パルス7時間後から血中IFN- γ 濃度の上昇が認められた (図12右)。

以上の結果から、THP-1、U937のように、CD14及びCD1dを発現している細胞株は、GM-CSF非存在下でも、非常に短時間のパルス処理で、NKT細胞のIFN- γ 産生を誘導できることが明らかとなった。

[0192] (4) RK-163パルスヒト由来CD14陽性細胞株（ここでは、THP-1およびヒト由来iPS-CD14陽性細胞株を使用）がNKT細胞の細胞傷害活性に及ぼす影響

実施例 1（7）と同様に、ヒトNKT細胞の細胞障害活性に及ぼす影響を検討した。すなわち、ヒトNKT細胞を“RK-163パルスヒト由来CD14陽性細胞株”と、混合比「1：1.5～5」で、16～24時間培養することにより刺激した。得られたヒトNKT細胞株を、96穴丸底プレート上、FBS（10%）含有complete RPMI-1640培地中で、NCI H460細胞（ヒト肺がん細胞株）、またはYAC-1細胞（マウスリンパ腫由来細胞）と共に4時間培養することにより、NCI H460細胞またはYAC-1細胞に対する細胞傷害活性を調べた。ターゲット（NCI H460細胞またはYAC-1）の細胞数を 1×10^4 cells/wellとし、エフェクター：ターゲット比を、3：1及び10：1とした。

その結果、“RK-163パルスヒト由来CD14陽性細胞株”を用いた場合でも、NKT細胞の細胞傷害活性が誘導された（図13）。

[0193] (5) “RK-163または α -GalCerパルスマウス樹状細胞”及び“RK-163パルスヒトCD14陽性細胞株”のin vivo抗腫瘍作用の検討

“RK-163または α -GalCerパルスマウス樹状細胞”及び“RK-163パルスヒトCD14陽性細胞株”が担癌動物で、実際に抗腫瘍効果を示すことを検証した。

C57BL/6雌マウスの脾臓内にB16マウスメラノーマ細胞を移植し、4日後に実施例 1の方法に従って調製したRK-163または α -GalCerパルスマウス樹状細胞（C57BL/6由来）を静脈内投与した。10日後に安楽死させ肝臓を摘出し、そのホモジネート作製後、1 N NaOHに溶解して上清を回収した。分光光度計にて上清のメラニン色素の吸光度を測定し、検量線を描くことによって、脾臓から肝臓へ転移した腫瘍細胞数を定量した。

その結果、“RK-163パルスマウス樹状細胞”は“ α -GalCerパルスマウス樹状細胞”に比較し、強い抗腫瘍効果を示し、メラノーマ腫瘍細胞の転移を顕

著に抑制した（図14A）。

同様に、“RK-163パルスヒトCD14陽性細胞株”（THP-1細胞、U937細胞）でも強力な抗腫瘍効果が示された（図14B）。

[0194] (6)RK-163パルスマウス樹状細胞およびRK-163パルスヒトCD14陽性細胞株（ここでは、THP-1、U937を使用）によるアジュバント作用

NKT細胞の抗腫瘍効果は、腫瘍に対する直接作用のみならず、むしろ、他の免疫担当細胞を活性化するアジュバント作用により誘導される。そこで、RK-163パルスマウス樹状細胞およびRK-163パルスヒトCD14陽性細胞株が、体内のNKT細胞を活性化して、そのアジュバント作用により自然免疫系NK細胞を活性化するかどうかを評価した。

RK-163パルスマウス樹状細胞（C57BL/6 由来）をC57BL/6マウスに静脈内投与し、14 日後に安楽死させ、脾臓細胞の FACS 解析を行い、NK細胞分画（NK 1.1 陽性、TCR β 陰性）における活性化マーカー（CD69）の発現を調べた。その結果、ほぼすべて（100%）の NK 細胞が活性化され（活性化マーカーCD69 分子の発現亢進）、生体内で NKT 細胞が強いアジュバント効果を惹起していることが確認された（図15A）。

[0195] また、OVA（卵白アルブミン）抗原を人工腫瘍抗原と見立てて、OVAパルスした脾細胞とRK-163パルスヒトCD14陽性細胞株（THP-1またはU937）をC57BL/6マウスに静脈内投与し、生体内のOVA反応性T細胞とNKT細胞を同時に活性化させた。再度4日後にRK-163パルスヒトCD14陽性細胞株を投与し投与1週後にFACS解析を行った。

その結果、RK-163パルスヒトCD14/CD1 d 陽性細胞株の投与によっても、NK細胞分画におけるCD69の発現が亢進し、NKT細胞のアジュバント効果によってNK細胞が活性化していることが明らかとなった（図15B）。

[0196] (7)RK-163パルスマウス樹状細胞およびRK-163パルスヒトCD14陽性細胞株の細胞動態

B6. CD45.1（Ly. 5.1）コンジェニックマウスを用いて、このマウスをレシピエントとし、RK-163パルスマウス樹状細胞を静脈内投与して体内におけるRK-

163パルス樹状細胞の動態を調べた。その結果、投与1時間後には主に肺、次いで肝臓に分布するが、24時間後には減少し、肺のみに観察された。72時間以降、いずれの臓器においても分布は認められず、体内から急速に消失することが明らかとなった（図16A）。

また、RK-163パルスヒトCD14陽性細胞株（ここではU937細胞）をC57BL/6マウスに静脈投与し体内動態を観察したところ、速やかに体内から排除され、24時間以降は腫瘍臓器にほとんど観察されず、速やかに体内から排除されることが明らかとなった（図16B）。

これらの結果は、RK-163パルスヒトCD14陽性細胞株が安全性の高いがん免疫細胞治療薬となりうることを示唆している。

[0197] (8)RK-163パルスヒトCD14陽性細胞株の毒性

RK-163パルスヒトCD14陽性細胞株の急性毒性を評価するために、RK-163パルスヒトCD14陽性細胞株（ここではU937細胞）を、C57BL/6マウスに単回静脈注射し14日目までの急性毒性を観察した。その結果、投与後5日目にAST、ALTの上昇が認められたが、14日後には投与前の状態にまで回復していた（図17A）。また投与後5日目に肝臓と脾臓の重量増加が認められたが、14日後には投与前の状態に回復していた（図17B）。

このことから本発明の方法は、安全性の高いがん治療法となりうることを示唆している。

[0198] (9)RK-163パルスヒトCD14陽性細胞株の造腫瘍性

RK-163パルスヒトCD14陽性細胞株（ここではTHP-1またはU937）は不死化処理されており、通常の培養条件下では際限なく増殖することが出来る。すなわち動物体内で増殖が起こった場合には、腫瘍を形成する恐れがある。そこで、RK-163パルスヒトCD14陽性細胞株に放射線を照射し、増殖性を失わせたサンプルを用いて、軟寒天コロニー形成法による造腫瘍性試験を実施した。

軟寒天コロニー形成アッセイキット（CytoSelect 96 Well Cell Transformation Assay Kit、Cell Biolabs社）を用いて、キットの実験手順書に従って実験を実施した。RK-163パルスヒトCD14陽性細胞株（U937またはTHP-1）にX

線を照射後、軟寒天に播種し、8日間培養後に増殖性を測定した。その結果、増殖性は認められず、ヒト体内においても腫瘍を形成することなく、がん免疫治療に有用であることが示された（図18）。

[0199] (10)RK-163パルスマウス樹状細胞およびRK-163パルスヒトCD14陽性細胞株による長期免疫記憶の誘導

NKT細胞の抗腫瘍効果は、NKT細胞による直接作用によるものだけではなく、他の免疫担当細胞を活性化するアジュバント作用によっても発揮される。また、活性化された免疫担当細胞の一部は体内に長期間残存し、免疫記憶を形成する。RK-163パルスマウス樹状細胞によって活性化されたNKT細胞によるアジュバント作用によって、抗原特異的CTLが活性化されると共に、長期記憶が形成されることを検証した。

[0200] 方法：

卵白アルブミン（OVA）を人工腫瘍抗原と見立てて、OVAパルスした脾細胞とRK-163パルスマウス樹状細胞（いずれもC57BL/6由来）をC57BL/6マウスに静脈内投与し、生体内のOVA反応性T細胞とNKT細胞を同時に活性化させた。4日後にRK-163パルスマウス樹状細胞を再投与した。投与1週間後より経時的に安楽死させ脾臓細胞を採取し、OVA反応性CTLの存在についてFACS解析を行った。

[0201] 結果：

RK-163パルスマウス樹状細胞の同時投与によって、OVAに反応しIFN- γ を産生するエフェクターCTLを効率よく誘導することができた。このOVA反応性CTLの細胞表面分子（CD44及びCD62L）を解析したところ、RK-163パルスマウス樹状細胞の同時投与によって、CD44+ CD62L+のEffector Memory CTL数及びCD44+ CD62L-のCentral Memory CTL数ともに4週まで増加しており、いずれも6ヵ月まで免疫記憶を形成するメモリーT細胞が効率よく誘導、維持されていることが明らかとなった（図19A）。その後、9ヶ月まで長期記憶が維持できていることを確認している。

同様に、“RK-163パルスヒト由来CD14陽性細胞株”（THP-1細胞、U937細胞

）でも、免疫記憶を形成するCD8メモリーT細胞が誘導されて、維持されていることが示された（図19B）。

[0202] 本発明を好ましい態様を強調して説明してきたが、好ましい態様が変更され得ることは当業者にとって自明であろう。本発明は、本発明が本明細書に詳細に記載された以外の方法で実施され得ることを意図する。したがって、本発明は「請求の範囲」の精神および範囲に包含されるすべての変更を含むものである。

[0203] ここで述べられた特許および特許出願明細書を含む全ての刊行物に記載された内容は、ここに引用されたことによって、その全てが明示されたと同程度に本明細書に組み込まれるものである。

産業上の利用可能性

[0204] 本発明によれば、強力なNKT細胞活性化能を有するNKT細胞リガンドパルスCD14陽性細胞及びNKT細胞リガンドパルスCD14陽性細胞株を比較的短期間で製造することが期待できる。本発明の方法により得られるNKT細胞リガンドパルスCD14陽性細胞及びNKT細胞リガンドパルスCD14陽性細胞株は、NKT細胞の増殖、NKT細胞のIFN- γ 産生及び細胞傷害活性を強力に誘導するので、癌、感染症等の疾患の予防や治療のための細胞製剤として有用であり得る。

[0205] 本出願は、日本で出願された特願2016-091674（出願日：2016年4月28日）を基礎としており、その内容は本明細書に全て包含されるものである。