

明 細 書

発明の名称： 所望の特異性を有するエフェクター細胞の製造方法 技術分野

[0001] 本願は、所望の特異性部位を発現するエフェクター細胞を製造する方法に関する。特に本発明は、Recombinase-mediated Cassette Exchange (RMCE) 法やゲノム編集法により、所望の特異性を有するT細胞受容体(TCR) またはキメラ抗原受容体(CAR) を発現する成熟T細胞もしくは成熟CAR-T細胞、あるいはこれらの前駆細胞を効率よく製造する方法に関する。

背景技術

[0002] 体内の腫瘍組織を異物として認識している特異性の高いTリンパ球が腫瘍内に浸潤する腫瘍浸潤Tリンパ球(TIL) の存在は、多くのがんで50-80%の例で報告されており、がんに対して免疫が反応している証拠とされる。このTILには特異性の異なる複数種類のTリンパ球が含まれており、TILを大量に増幅して患者に投与することができれば、治療効果が期待できる。しかし、各患者よりTILそのものを取り出して増幅することは難しく、また、可能となったとしても時間とコストがかかり、これまでに限られた有効性しか示されていなかった。

[0003] TCRやCARのような抗原レセプターの遺伝子を成熟T細胞に導入する方法が臨床で用いられており、特にCARについてはすでに承認されている。かかる方法では、成熟T細胞へレトロウイルスやレンチウイルスでランダムに抗原レセプター遺伝子を導入している。しかし、TCR遺伝子やCAR遺伝子は本来のTCR遺伝子座にノックインした方が生理的な発現パターンが期待できる。ランダムな遺伝子導入に際しては挿入箇所が制御できず、ゲノムが損傷されるリスク、発現レベルが制御困難であるとの問題がある。また、腫瘍浸潤Tリンパ球群のような、種々のTCRを発現する成熟T細胞を同時に投与する療法への応用は、成熟T細胞へ一種類ずつTCRやCARを

導入していく必要があり、現実的ではない。

[0004] 本発明者らの一部は多能性幹細胞のレベルでTCRを導入し、これを成熟T細胞へ分化誘導して細胞免疫療法に用いることを提案している（特許文献1～4）。また、CAR遺伝子を多能性幹細胞のレベルで導入することは別のグループによっても提案されている（特許文献5）。いずれも実施可能として開示されているのは、iPS細胞段階でTCRあるいはCAR遺伝子を導入した後に、機能を発揮するエフェクター細胞へと分化誘導して用いる方法である。

[0005] 本発明者らはまた、ES細胞やiPS細胞のTCR遺伝子座にプロモーターと内因性エンハンサー支配下になるようTCR遺伝子を導入するカセットを設け、所望のTCRを導入する方法を提案している（特許文献6）。この方法は、カセットデッキのように細胞の遺伝子上の特定の部分を外来の配列（カセットテープ）に組換えられる構造を対象細胞にあらかじめ入れておいて、CreやFlippase（FLP）といった組換え酵素を使ってカセットテープを交換するように導入するRecombinase-mediated Cassette Exchange（RMCE）法等を利用するものである。具体的には多能性幹細胞の発現制御機構下に発現するよう、薬剤耐性遺伝子を含む空のカセットテープ遺伝子を装着したカセットデッキ構造を含む多能性幹細胞を構築する。空のカセットテープ遺伝子を所望のTCR遺伝子をコードするカセットテープと交換することによって、内因性のTCR遺伝子座の発現制御機構下で発現する外来TCR遺伝子を発現する多能性幹細胞を製造することができる。得られた多能性幹細胞は、必要に応じて増殖し、成熟T細胞へと分化誘導して細胞免疫療法に用いることができる。

[0006] かかる方法によって、所望のTCR遺伝子もしくはCAR遺伝子を安定的に発現する細胞療法用の細胞を効率よく製造することが可能となった。しかしながら、成熟T細胞やT前駆細胞にTCRを導入する手法は広く行われている一方、多能性幹細胞からの成熟T細胞への分化誘導は一般的な手技ではなく、臨床において広く用いることができる状況にはない。WT1抗原のよ

うな多くのがんに共通して発現する抗原であれば、一種類のTCR遺伝子を有する成熟T細胞を大量に製造することで、細胞免疫療法に有用であるが、TILを再生するためには、TILのTCRを単離した後にiPS細胞に導入して複数のTCR-iPS細胞を作製し、さらにT細胞へ分化誘導するという方法を取る必要があり、手間と時間がかかるという課題があった。

先行技術文献

特許文献

[0007] 特許文献1：国際公開公報WO2016/010153

特許文献2：国際公開公報WO2016/010154

特許文献3：国際公開公報WO2016/010155

特許文献4：国際公開公報WO2017/179720

特許文献5：国際公開公報WO2014/165707

特許文献6：国際公開公報WO2020/022512

非特許文献

[0008] 非特許文献1：Themeli et al., Nat Biotechnol. (2013) 928-33

非特許文献2：Gong Ying et al., Journal of Cell Biology (2015) 1481-1489

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0009] 本願発明は、所望の特異性決定部位を有するエフェクター細胞を容易に製造する方法を提供することを目的とする。

本発明はさらに、特異性決定部位を容易に交換できるいわゆるカセットデッキ構造を有するエフェクター細胞を提供することを目的とする。

本発明はまた、異なる種類の特異性決定部位を有する同一種のエフェクター細胞を同時に製造する方法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

[0010] 本願は、(1) エフェクター細胞への分化能を有する材料細胞であって、

当該材料細胞のゲノム内にマーカートンパク質をコードする遺伝子を含むカセットテープ遺伝子を、材料細胞をエフェクター細胞あるいはエフェクター細胞の前駆細胞に分化誘導した細胞においてマーカートンパク質が発現可能なように有しているカセットデッキ構造を有する材料細胞を提供する工程、

(2) 該材料細胞を増殖する工程、

(3) 該材料細胞をエフェクター細胞あるいはその前駆細胞へ分化誘導する工程、および

(4) 該エフェクター細胞あるいはその前駆細胞のマーカートンパク質遺伝子を、所望のタンパク質をコードする遺伝子に置き換える工程を有する、所望のタンパク質を発現するエフェクター細胞の製造方法を提供する。

[0011] 工程(4)としては、RMCE法やゲノム編集法を用いることができる。

工程(4)の一態様としてRMCE法を用いる場合は、工程(1)においてマーカートンパク質をコードする遺伝子の上流及び下流に、一組の組み換え酵素標的配列を設ける。(3)で得られるエフェクター細胞あるいはその前駆細胞には、一組の組み換え酵素標的配列で挟まれたマーカートンパク質をコードする遺伝子が含まれる。該エフェクター細胞あるいはその前駆細胞を、該組み換え酵素標的配列と同一の一組の組換え酵素標的配列および該一組の組み換え酵素標的配列の間に所望のタンパク質をコードする遺伝子を含むカセットテープ交換用ベクターと共に組換え酵素の存在下で培養して、マーカートンパク質遺伝子を所望のタンパク質をコードする遺伝子と交換する工程が例示される。

[0012] 工程(4)の別の態様として、ゲノム編集により、該エフェクター細胞またはその前駆細胞に含まれるマーカートンパク質遺伝子を破壊し、あるいはこれと入れ替えるように所望のタンパク質をコードする遺伝子を材料細胞で発現するよう導入する工程が例示される。

[0013] 本願の別の態様として、(i)ゲノム内に、マーカートンパク質をコードする遺伝子を含むカセットテープ遺伝子をマーカートンパク質が発現可能なように含むカセットデッキ構造を有しており、外因性の薬剤耐性遺伝子を含

まないエフェクター細胞またはその前駆細胞を提供する工程、および

(i i) 該エフェクター細胞あるいはその前駆細胞のマーカートンパク質遺伝子を、所望のタンパク質をコードする遺伝子に置き換える工程を有する、所望のタンパク質を発現するエフェクター細胞の製造方法を提供する。

[0014] 本願の更に別の態様として、(a) 上流から順に、第 1 のプロモーター配列、第 1 の組換え酵素の標的配列、第 1 のプロモーター配列下で発現するよう連結されたマーカートンパク質をコードする遺伝子、第 1 の組換え酵素の標的配列、第 2 の組換え酵素の標的配列、材料細胞で発現可能な第 2 のプロモーター配列、第 2 のプロモーター下で発現するよう連結された薬剤耐性遺伝子、および第 2 の組換え酵素の標的配列を含むカセットデッキ導入用ベクターを準備する工程、

(b) 材料細胞ゲノムの発現制御機構下に (a) で準備したカセットデッキ導入用ベクターをノックインする工程、

(c) (b) で得られた細胞を薬剤耐性遺伝子が耐性を有する薬剤の存在下で培養する工程を含む、マーカートンパク質をコードする遺伝子を含むカセットデッキ導入用ベクターのノックインに成功した細胞を選択する工程、および

(d) 得られた細胞を第 2 の組換え酵素の存在下で培養し、薬剤耐性遺伝子を除去する工程を含む、カセットテープ遺伝子含有カセットデッキ構造を含む材料細胞の製造方法を提供する。本態様のカセットテープ遺伝子含有カセットデッキ構造を含む材料細胞は、RMCE法によるカセットテープ交換に好適に用いられる。

[0015] 本願の方法において、「材料細胞」とは、マーカートンパク質をコードする遺伝子を導入するために用いられる細胞であり、マーカートンパク質をコードするカセットテープ遺伝子を含む、カセットデッキ構造を含む細胞であって、エフェクター細胞へと分化誘導する前の細胞についても「材料細胞」という。材料細胞としては、多能性幹細胞が好適に用いられ、特に好適には E S 細胞および i P S 細胞が用いられる。

[0016] エフェクター細胞としては、特に成熟T細胞又はその前駆細胞が挙げられる。この場合、マーカータンパク質および所望のタンパク質としては、T細胞レセプター（TCR）またはキメラ抗原受容体（CAR）が例示される。または、マーカータンパク質として蛍光タンパク質を用いてもよい。

[0017] 本願の方法において、1つの材料細胞のゲノム内に、マーカータンパク質をコードする遺伝子を含むカセットテープ遺伝子を発現制御機構下に含むカセットデッキ構造を1つのみ有している材料細胞が好適に作成される。

かかる材料細胞より作成される、カセットデッキ構造を1つの細胞に1つ含有するエフェクター細胞あるいはその前駆細胞のクローンの各細胞に含まれるカセットテープ遺伝子を、複数種のカセットテープ遺伝子と同時に交換することによって、別個のタンパク質を発現する複数種類のエフェクター細胞を同時に製造することが可能である。

[0018] 本願はまた、本願発明の方法にて製造される、別個のタンパク質を発現する複数種類のエフェクター細胞を含む、免疫細胞療法用細胞製剤を提供する。

図面の簡単な説明

[0019] [図1A]本願の方法を用いて提供されるRMCE法を用いる場合のTILカクテル法の概略を示す図である。なお、ゲノム編集法を用いる場合は、図中既知のTCRに隣接する組換え酵素標的配列であるlox2272、loxPは不要で、組換え酵素Creの代わりにゲノム編集用ベクターを適用する。

[図1B]本願の方法を用いて提供されるTILカクテル法の概略を示す。

[図2]実施例1の手順の概略を示す図である。

[図3]実施例1にてJurkat細胞へカセットデッキ導入用ベクターをノックインした後、FLPおよびガンシクロビルを作用させて薬剤耐性因子を除去した結果を示す。

[図4]図3の細胞をさらにFACS AriaによりTCR発現細胞を取得した。

[図5A]図4のTCR発現細胞、すなわち、WT1特異的TCRのカセットテ

ープ含有カセットデッキK I - J u r k a t 細胞へ、N Y - E S O 1 特異的 T C R 遺伝子のカセットテープ交換用プラスミドベクターとC r e リコンビナーゼ発現ベクターを作用させる操作の模式図。

[図5B]図5 Aと同様だが、N Y - E S O 1 特異的 T C R 発現カセットテープ交換用直鎖状D N Aを用いる操作の模式図。

[図6]図4の T C R 発現細胞、すなわち、W T 1 特異的 T C R カセットテープK I - J u r k a t 細胞へ、N Y - E S O 1 特異的 T C R 発現カセットテープ交換プラスミドベクター、あるいはN Y - E S O 1 特異的 T C R のカセットテープ交換用直鎖状D N AとC r e リコンビナーゼ発現ベクターを作用させ得られた細胞のF A C S 解析図。

[図7A]実施例2の操作の概略を示す図。カセットデッキ導入用ベクターをノックインする工程。

[図7B]実施例2の操作の概略を示す図。カセットデッキ導入用ベクターに含まれている薬剤耐性因子を除去する工程。

[図8]実施例2の結果を示す図。

[図9]実施例3の結果を示す図

[図10]実施例4のゲノム編集においてマーカートンパク質遺伝子であるW T 1 特異的 T C R (W T 1 - T C R) 遺伝子を切断するためのガイドR N A、並びに切断部位に所望の配列を導入するノックインベクター用5' および3' アームの設計コンセプトを示す図。

[図11]実施例4に用いるN Y E S O 1 特異的 T C R (N Y E S O 1 - T C R) 遺伝子ノックインベクターの模式図。

[図12]実施例4に用いるC R I S P R - C a s 9 用ベクターの模式図。それぞれU 6 プロモーターに作動可能に連結されたT C R 切断用ガイドR N A (g R N A # 1) およびK I ベクター切断用ガイドR N A (g R N A # 5)、並びにC B h プロモーターに作動可能に連結されたC a s 9 をコードする遺伝子を含むプラスミドベクターである。

[図13]実施例4のノックインプロセスを示す模式図。

[図14A]実施例4の結果（gRNA#1を利用）を示す図。上段：マウスC β をもつTCR β の発現とNYESO1の発現（NYESO1テトラマー：NYESO1）の解析。上の数字は右上の区画内（mTCR β +NYESO1+）細胞の全体におけるパーセンテージを示す。中段：マウスC β をもつTCR β の発現とヒトTCRの発現の解析。下段：上段で確認したマウスTCR β とNYESO1テトラマー両陽性細胞における、マウスTCR β の発現と、ヒトTCR $\alpha\beta$ の発現の解析。左上区画、マウスTCR β 陽性、NYESO1テトラマー陽性、ヒトTCR $\alpha\beta$ 陰性細胞の数を最下行に記載した。

[図14B]実施例4の結果（gRNA#4を利用）を示す図。上段：マウスC β をもつTCR β の発現とNYESO1の発現（NYESO1テトラマー：NYESO1）の解析。上の数字は右上の区画内（mTCR β +NYESO1+）細胞の全体におけるパーセンテージを示す。中段：マウスC β をもつTCR β の発現とヒトTCRの発現の解析。下段：上段で確認したマウスTCR β とNYESO1テトラマー両陽性細胞における、マウスTCR β の発現と、ヒトTCR $\alpha\beta$ の発現の解析。左上区画、マウスTCR β 陽性、NYESO1テトラマー陽性、ヒトTCR $\alpha\beta$ 陰性細胞の数を最下行に記載した。

発明を実施するための形態

[0020] 本願明細書および特許請求の範囲において、「エフェクター細胞」とは、投与された後に体内で特殊な働きをする細胞を言う。エフェクター細胞としては、ヘルパーT細胞、制御性T細胞、細胞傷害性T細胞などの種々の成熟T細胞、ナチュラルキラー（NK）細胞、NKT細胞、マクロファージ、樹状細胞などの免疫細胞の他、血小板、ホルモン産生細胞、間葉系幹細胞に代表される免疫抑制細胞、神経細胞などのような懸濁状態で投与される細胞、さらに細胞が二次元的な構造を取る網膜、網膜色素上皮、皮膚、腸管上皮などの各種組織、三次元的な構造をとる心臓、肝臓、腎臓などの各種臓器などが例示される。

[0021] 本願の方法は、エフェクター細胞として、免疫細胞、例えば成熟T細胞、ナチュラルキラー（NK）細胞、NKT細胞、マクロファージ、樹状細胞に

特に好適に用いられる。特に所望のT細胞受容体(TCR)もしくはキメラ抗原受容体(CAR)などの特異性決定部位を有する成熟T細胞、またはその前駆細胞、並びにCAR-T細胞もしくはその前駆細胞の製造に好適に用いられる。

[0022] 本願において、エフェクター細胞へ導入する所望のタンパク質をコードする遺伝子としてのTCR遺伝子は特に限定されず、再構成されたTCR遺伝子として公知のものであっても、細胞療法のターゲットとする抗原に対して特異的なT細胞からTCR遺伝子を公知の方法で増幅させたものを用いてもよい。例えばがん抗原に特異的なTCRが例示される。また、TIL治療に際して、患者のがん組織からTILを採取し、TILをシングルセル解析することにより、頻度の高いキラーT細胞クローンのTCRを取得して用いてもよい。

[0023] 「キメラ抗原受容体」あるいは「CAR」という語は、抗原結合ドメイン、膜貫通ドメインおよび抗原に結合したときT細胞を刺激するのに十分なCD3ζ配列の細胞質配列を含む細胞質シグナル伝達ドメインおよび、所望により、抗原結合ドメインが抗原に結合したとき、T細胞の共刺激を提供する1以上(例えば、2、3または4)の共刺激性タンパク質の細胞質配列(例えば、CD27、CD28、4-1BB、OX40、CD30、CD40L、CD40、PD-1、PD-L1、ICOS、LFA-1、CD2、CD7、CD160、LIGHT、BTLA、TIM3、CD244、CD80、LAG3、NKG2C、B7-H3およびCD83に特異的に結合するリガンドの1以上の細胞質配列)を含む。

[0024] 「前駆細胞」とは、分化の途上であるが当該細胞に分化する能力を有する細胞をいう。「エフェクター細胞への分化能を有する材料細胞」とは、インビトロでエフェクター細胞またはその前駆細胞へと分化させることが可能な細胞である。材料細胞としては、エフェクター細胞への分化能と共に、インビトロで増殖可能な細胞であることが好ましい。

[0025] エフェクター細胞への分化能を有する材料細胞としては多能性幹細胞、組

織幹細胞が例示される。

- [0026] 組織幹細胞あるいは体性幹細胞としては、神経幹細胞、造血幹細胞、間葉系幹細胞、歯髄幹細胞等が例示される。
- [0027] 多能性幹細胞は、生体に存在する多くの細胞に分化可能である多能性を有し、かつ、自己増殖能を併せもつ幹細胞である。多能性幹細胞には、例えば胚性幹（E S）細胞、核移植により得られるクローン胚由来の胚性幹（n t E S）細胞、精子幹細胞（「G S細胞」）、胚性生殖細胞（「E G細胞」）、人工多能性幹（i P S）細胞、培養線維芽細胞や骨髓幹細胞由来の多能性細胞（M u s e細胞）などが含まれる。多能性幹細胞は、好ましくは、哺乳動物の多能性幹細胞であり、より好ましくはヒト多能性幹細胞である。材料細胞としては、E S細胞またはi P S細胞が好適に用いられる。
- [0028] E S細胞、i P S細胞は公知の方法で製造しても、あるいは市販のものを入手して用いてもよい。i P S細胞を用いる場合には、治療対象となる患者から取得した体細胞から製造したものをを用いても良い。またゲノム編集技術によってE S細胞やi P S細胞のH L Aを操作し、多能性幹細胞を汎用化する方法が提案されており(文献)、本願の材料細胞としては、かかる汎用化した多能性幹細胞を用いてもよい。
- [0029] 上記のように、本願の方法はエフェクター細胞として所望のT C RまたはC A Rを有する成熟T細胞を得る場合に特に好適に用いられる。以下所望のタンパク質を発現するエフェクター細胞として、R M C E法により所望のT C Rを発現する成熟T細胞を得る方法を例として説明する。
- [0030] まず、材料細胞である多能性幹細胞のゲノム内に一組の組換え酵素標的配列および該標的配列の間にマーカータンパク質をコードする遺伝子を含むカセットテープ遺伝子を、材料細胞をT細胞またはT前駆細胞に分化誘導した場合にマーカータンパク質が発現可能なように有しているカセットデッキ構造を含む材料細胞を提供する。
- [0031] マーカータンパク質としては、エフェクター細胞またはその前駆細胞の表面に発現する既知リガンドまたはレセプターが例示される。所望のT C Rを

発現する成熟T細胞を製造するためには、マーカートンパク質としては、トラマーが入手可能な既知のTCRまたはCARが好適に用いられる。または、マーカートンパク質としては、既知の蛍光タンパク質が例示される。遺伝子操作に用いられる蛍光タンパク質は数多く知られており、またさまざまなものが市販されている。これら公知の蛍光タンパク質から適宜選択すればよい。

[0032] 本明細書および請求の範囲において「組換え酵素」とは部位特異的組換えを誘導する酵素であり、組換え酵素の標的配列とは組換え酵素によって認識され、二つの標的配列間で削除、組み込み、反転を誘導することができる配列をいう。組換え酵素とその標的配列の組み合わせとしては、CreリコンビナーゼとloxPおよびその誘導体、Flippase (FLP) とfrt、クロナーゼとattB/attP/attL/attRなどが例示される。本願のカセットテープ遺伝子に含まれる組換え酵素標的配列および組換え酵素の組み合わせとしては、組換え酵素の一組の標的配列で挟まれる所望のタンパク質遺伝子を含むカセットテープ遺伝子を、同一の標的配列で挟まれるマーカートンパク質を含むカセットテープ遺伝子を同じ向きで置き換えることのできる組換え酵素系を用いることが好ましい。

[0033] 例えば組換え酵素としてCreリコンビナーゼを用いる場合は、標的配列としてloxP、lox2272、lox511、lox Fasなどが例示される。Creリコンビナーゼの存在下で、それぞれ同一の標的配列間の組換えが促進される。かかる組換えによって、例えば材料細胞ゲノムにおいてlox2272とloxPに挟まれている配列を、ベクター上のlox2272とloxPに挟まれている配列と交換することができる。

[0034] 本願の方法で用いる材料細胞は、材料細胞のゲノム内にマーカートンパク質をコードする遺伝子を含むカセットテープ遺伝子を、材料細胞をエフェクター細胞あるいはエフェクター細胞の前駆細胞に分化誘導した細胞においてマーカートンパク質が発現可能なように有している。エフェクター細胞として所望のTCRまたはCARを有する成熟T細胞を得る場合、カセットテー

プ遺伝子は当該TCRをコードする遺伝子が材料細胞のTCRの発現制御機構の制御下で発現されるように導入するか、あるいはTCR発現制御にかかわるプロモーターおよび／またはエンハンサーを含む発現制御機能とともに材料細胞へ導入すればよい。好ましくは、材料細胞のTCR発現制御機構の制御下で発現されるよう、カセットテープ遺伝子を導入すればよい。

[0035] 以下、上流からプロモーター、マーカートンパク質をコードする遺伝子、およびエンハンサーを含む構造を「カセットデッキ構造」とし、マーカートンパク質をコードする遺伝子を含む構造を、「カセットテープ遺伝子」として、まずカセットテープ遺伝子を含むカセットデッキ構造を有する材料細胞を提供する工程（１）について説明する。

[0036] 材料細胞が、TCRの遺伝子再構成後の細胞である場合、例えばT細胞から誘導したiPS細胞である場合には、再構成後のTCR遺伝子座の生理的発現制御下にマーカートンパク質を含むカセットテープ遺伝子を挿入すればよい。すなわち、再構成後のTCR遺伝子座のプロモーターおよびエンハンサーの間にカセットテープ遺伝子を含むカセットデッキ構造を構築すればよい。

[0037] 材料細胞が、再構成済みのTCR遺伝子座を有していない場合、特許文献6（国際公開公報WO2020/022512）に開示されるように、カセットデッキ構造を構築する方法としては以下の3種類の方法が挙げられる：
（A）材料細胞のTCR遺伝子のC領域のエンハンサーと、V領域のプロモーターの間に、両者の距離を縮めるように、カセットテープ遺伝子を導入する。

[0038] （B）材料細胞TCR遺伝子座のC領域のエンハンサーの上流へ、上流から順にTCR遺伝子座のV領域のプロモーター、カセットテープ遺伝子を、V領域のプロモーターとC領域のエンハンサーがその間に挟まれる遺伝子の発現制御機能を発揮するために十分近くなるよう導入する。

[0039] （C）材料細胞TCR遺伝子座のV領域のプロモーターの下流へ、上流から順にカセットテープ遺伝子、およびTCR遺伝子座のC領域のエンハンサ

ーを含む遺伝子を、V領域のプロモーターとC領域のエンハンサーがその間に挟まれる遺伝子の発現制御機能を発揮するために十分近くなるよう導入する。

[0040] 本願において、「V領域のプロモーターとC領域のエンハンサーがその間に挟まれる遺伝子の発現制御機能を発揮するために十分近くなる」とは、V領域のプロモーターがC領域のエンハンサーの制御を受けさえすれば、両者の距離は特に制限されるものではない。カセットテープ遺伝子を導入した後のV領域のプロモーターとC領域のエンハンサーの間の距離は例えば約8～50 k b p、約10～40 k b p、約12～32 k b p、または約14～22 k b pであることが例示される。

[0041] 「TCR遺伝子座のC領域のエンハンサー」および「TCR遺伝子座のV領域のプロモーター」は、材料細胞由来の配列であっても、材料細胞と同種の動物の他の個体由来の細胞より取得した配列であっても、あるいは他種の動物由来の細胞より取得した配列であってもよい。

[0042] 材料細胞へのカセットデッキ構造の導入は1回の操作で行っても、多段階で進めても良い。従来公知の組換え技術、例えば相同組換え技術、ゲノム編集技術、CreやFlippaseなどのリコンビナーゼを組み合わせる技術によって行うこともできる。

[0043] カセットテープ遺伝子に含まれるマーカートンパク質として再構成済みTCRを用いる場合、TCR α と β のヘテロダイマーであることが好ましい。再構成済みTCR α およびTCR β のヘテロダイマーを発現させる場合、マーカートンパク質をコードする遺伝子は、再構成済のTCR α 遺伝子とTCR β 遺伝子を自己開裂型の2Aペプチドにてつないだ配列であることが好ましい。自己開裂型の2Aペプチドを α 鎖と β 鎖の間に置くことによって、ひとつの遺伝子の発現制御系下で2つの遺伝子両方を発現させることができる。

[0044] 2Aペプチドとしてはp2A、T2A、E2A、F2Aなどを用いることができ、切断効率がよいと言われているp2Aペプチドが好適に用いられる。

。また、TCR α 遺伝子、TCR β 遺伝子の特にどちらを上流に導入しても良いが、下流側に導入したTCR遺伝子には好適にはポリA配列を連結する。

- [0045] TCR遺伝子上流には、イントロンが含まれていることが好ましい。イントロン配列は、スプライシングされて除去される配列に加え、スプライスドナー配列とスプライスアクセプター配列を含むものであればよく、例えばヒトポリペプチド鎖伸長因子 α (EF1 α) 遺伝子のイントロン、あるいはニワトリ β -アクチン (CAG) 遺伝子プロモーターのイントロン部分が挙げられる。
- [0046] 材料細胞から分化誘導した後のエフェクター細胞において、ひとつの遺伝子の発現制御機構下となるよう、再構成済のTCR α 遺伝子とTCR β 遺伝子の両方を導入するのが好ましい。材料細胞ゲノム上のカセットテープ遺伝子を含むカセットデッキ構造を導入するTCR遺伝子座はTCR α であっても良いし、TCR β であってもよい。遺伝子導入に用いないTCR α および β 遺伝子座は欠損させることが好ましい。特定遺伝子座の欠損は、公知の方法を適宜用いて行えば良く、公知のゲノム編集の技術、例えばCRISPR/Cas9やTALENを用いて行えば良い。
- [0047] 再構成済みTCR α と β のヘテロダイマーを発現させるためのベクターの作成法、材料細胞への導入法は、特許文献6 (WO2020/022512) に記載の手法を用いれば良い。
- [0048] 上記の(B)の態様、すなわち、材料細胞TCR遺伝子座のC領域のエンハンサーの上流へ、上流から順にTCR遺伝子座のV領域のプロモーター、カセットテープ遺伝子を、V領域のプロモーターとC領域のエンハンサーがその間に挟まれる遺伝子の発現制御機能を発揮するために十分近くなるよう導入してRMCE法に用いるための材料細胞を得る方法について説明する。なお、材料細胞としては、TCR遺伝子座再構成済みの細胞であっても、TCR遺伝子座が再構成されていない細胞であってもよい。
- [0049] RMCE法を用いる場合、カセットテープ遺伝子にはマーカートンパク質

をコードする遺伝子上流と下流に隣接して組換え酵素標的配列が挿入される。本態様において（a）上流から順に、材料細胞をエフェクター細胞へと分化した後のエフェクター細胞で発現可能な第1のプロモーター配列、および第1の組換え酵素の標的配列、第1のプロモーター配列下で発現するよう連結されたマーカータンパク質をコードする遺伝子および第1の組換え酵素の標的配列を含むカセットテープ遺伝子、ならびに第2の組換え酵素の標的配列、材料細胞で発現可能な第2のプロモーター配列、材料細胞で発現可能な第2のプロモーター下で発現するよう連結された薬剤耐性遺伝子、および第2の組換え酵素の標的配列をこの順で含むカセットデッキ導入ベクターを準備する工程、

（b）材料細胞へ（a）で準備したカセットデッキ導入ベクターをノックインする工程、

（c）（b）で得られた細胞を薬剤耐性遺伝子が耐性を有する薬剤の存在下で培養してマーカータンパク質をコードする遺伝子を含むカセットデッキ導入ベクターのノックインに成功した細胞を選択する工程、および

（d）得られた細胞に第2の組換え酵素を作用させ、薬剤耐性遺伝子を除去する工程を含む、カセットデッキ構造を有する材料細胞の製造方法を提供する。

[0050] 本態様において第1の組換え酵素は上記で説明した、カセットデッキ構造を有するエフェクター細胞に含まれる組換え酵素の標的配列に特異的なものである。第2の組換え酵素とその標的配列の組み合わせとしては、第1の組換え酵素との交差反応性を有していないものであれば特に限定されない。例えば第1の組換え酵素としてCre／loxPの系を用いる場合は、第2の組換え酵素としては例えばFLP／fRTの系が例示される。第2の組換え酵素と標的配列の組み合わせは、第2の組換え酵素を作用させることによってその標的配列で挟まれた部位がされるものである。

[0051] 第1のプロモーターはエフェクター細胞へと分化誘導した細胞においてマーカータンパク質の発現を誘導できるプロモーターである。マーカータンパ

ク質として既知TCRを用いる場合には、材料細胞のTCR遺伝子座のプロモーターであることが好ましく、例えば材料細胞のTCR遺伝子座V領域のプロモーターが例示される。

[0052] TCR遺伝子座のV領域には、各V遺伝子につき1つのプロモーターが存在する。TCR遺伝子座のV領域プロモーターとしては、特に限定されず適宜選択すればよい。例えばTCR β 遺伝子座を用いる場合には、V β 20-1プロモーターを用いることが例示される。プロモーター配列は、V遺伝子の第1エクソン内の翻訳開始点直前から上流のプロモーター配列のDNA断片が得られるよう、プライマーを設計してPCRで増幅することにより得ることができる。

[0053] 材料細胞で発現可能なプロモーターとしては、当該細胞において連結された薬剤耐性遺伝子の発現を誘導可能なプロモーターであれば特に限定されない。例えば、サイトメガロウイルス(CMV)プロモーター、シミアンウイルス40(SV40)プロモーター、ホスホグリセリン酸キナーゼ(PGK)プロモーターなどが例示されるが、これらに限定されない。マウスホスホグリセリン酸キナーゼ(PGK)遺伝子のプロモーター(pPGK)が例示される。

[0054] 薬剤耐性遺伝子としては、材料細胞でマーカーとして機能しうる公知の薬剤耐性遺伝子を用いればよく、例えばハイグロマイシン、ピューロマイシン、ネオマイシンなどに対する耐性遺伝子が例示される。

[0055] 薬剤耐性遺伝子は好ましくはその下流に薬剤感受性遺伝子を有する融合遺伝子としたものが用いられる。薬剤感受性遺伝子とは、発現した場合に外から加える物質と反応して細胞のアポトーシスを誘導することができる遺伝子を意味する。かかる薬剤感受性遺伝子としては、公知のものを適宜選択して用いれば良く、特に限定されない。例えば単純ヘルペスウイルスや水痘帯状疱疹ウイルスのチミジンキナーゼ遺伝子が例示される。かかる遺伝子を組み込んだ細胞へアポトーシスを誘導する薬剤としてはガンシクロビルが例示される。薬剤耐性遺伝子の下流には、好ましくはポリA配列をつなげる

- [0056] 本願において用いられるベクターとしては、遺伝子組換えに用いられるベクターを適宜選択して用いればよく、例えばウイルス、プラスミド、人工染色体などのベクターが例示される。ウイルスベクターとしては、レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、センダイウイルスベクターなどが例示される。また、人工染色体ベクターとしては、例えばヒト人工染色体（HAC）、酵母人工染色体（YAC）、細菌人工染色体（BAC、PAC）などが含まれる。プラスミドとしては、哺乳動物細胞用プラスミドを使用する。目的に応じて市販のベクターを適宜選択して用いれば良い。
- [0057] 材料細胞ゲノムTCR遺伝子座における、カセットデッキ構造を導入する位置を決めて、カセットデッキ導入用ターゲティングベクターを構築する。導入する位置としては、上流から順にVプロモーターおよびカセットテープ遺伝子を含む配列を導入した場合に、材料細胞由来のCエンハンサーがVプロモーターを活性化できる位置であればよい。
- [0058] 例えば材料細胞のTCR β 遺伝子座にカセットデッキ構造を導入する場合は、TCR β 遺伝子座の再構成が起こっていない状態で導入可能であり、かつエンハンサーに近い領域が好ましく、D β 2の上流かつC β 1の下流に導入することが例示される。材料細胞のTCR α 遺伝子座にカセットデッキ構造を導入する場合は、TCR α 遺伝子座の再構成が起こっていない状態で導入可能であり、かつエンハンサーに近い領域が好ましく、最上流のJ α 遺伝子の上流かつ最下流のV α 遺伝子の下流に導入することが例示される。
- [0059] 材料細胞ゲノムのTCR遺伝子座における導入する部位が決まれば、相同組換えができるように、導入部位の上流および下流の配列と相同な配列をそれぞれ5'アーム、3'アームとして導入する。この文脈において「相同な配列」としては、5'アーム、3'アームの配列がそれぞれ、相同組換えが生じる程度の相同性を有していれば良い。
- [0060] 例えば、材料細胞のゲノムの再構成されていないTCR β 遺伝子座にカセットデッキ構造を導入する場合には、D β 2遺伝子の約110bp上流から

さらに上流約 1.6 kbp までの DNA 断片を 5' アーム配列とし、D β 2 遺伝子上流約 50 bp から下流に約 1.6 kbp 位置までの DNA 断片を 3' アーム配列として用いることが例示される。各 5' アームおよび 3' アームの DNA 断片は、それぞれの配列を特異的に増幅可能なプライマーを用い、材料細胞のゲノム DNA を鋳型として PCR で増幅することにより得ることができる。

[0061] すなわち、カセットデッキ導入用のターゲティングベクターとしては、上流から順に、材料細胞ゲノムの TCR 遺伝子座内導入箇所の 5' 側と相同な配列（5' アーム）、TCR 遺伝子座 V 領域のプロモーター配列、第 1 の組換え酵素の標的配列、第 1 のプロモーター配列下で発現するよう連結されたマーカータンパク質をコードする遺伝子および第 1 の組換え酵素の標的配列を含むカセットテープ遺伝子、ならびに第 2 の組換え酵素の標的配列、材料細胞で発現可能な第 2 のプロモーター配列、材料細胞で発現可能な第 2 のプロモーター下で発現するよう連結された薬剤耐性遺伝子、および第 2 の組換え酵素の標的配列、材料細胞導入箇所の 3' 側と相同な配列（3' アーム）を含むベクターが例示される。各配列を PCR により増幅する際には、得られた PCR 産物を薬剤耐性ベクターに導入するための DNA 配列が付加されるようにプライマーを設計する。得られた PCR 産物を用い、例えば Gibson assembly 法など公知の方法や市販のキットを用いてベクターの構築を行えばよい。

[0062] カセットデッキ導入用ターゲティングベクターはさらに、3' アームの下流側に材料細胞で発現可能なプロモーターとマーカーとなる遺伝子を含むものであってよい。かかるプロモーターとマーカーの組み合わせとしては、例えば MC1 プロモーターとジフテリア菌毒素遺伝子（DTA）の組み合わせが例示される。

[0063] 工程（b）

カセットデッキ導入用ターゲティングベクターを、材料細胞の TCR 遺伝子座へ相同組換えによりノックインする。ノックインは公知の方法にて行え

ば良く、例えばエレクトロポレーション法により行うことができる。

- [0064] 相同組換えによるノックイン効率を高めるために、カセットデッキ導入用ターゲティングベクターのノックインの前に、ノックイン箇所、例えば3'アームの開始部位(上流)近傍にニカ所の一本鎖切断(ニック)を導入することが好ましい。ニックの導入は公知の方法にて行えば良く、CRISPR/Cas9nシステムを採用することが例示される。

[0065] 工程(c)

相同組換えに成功した材料細胞は、導入されたプロモーターの働きにより薬剤耐性遺伝子が発現する。このため、相同組換えに成功した材料細胞を、薬剤耐性遺伝子が耐性を有する薬剤の存在下で選択することができる。また、カセットデッキ導入用ターゲティングベクターの3'アームの下流にマーカー遺伝子を組み込んだ場合、5'アーム配列と3'アーム配列のカセットテープ遺伝子と薬剤耐性遺伝子を含まない、いわゆる外側の部分が導入された材料細胞においては、マーカーとなる例えば細胞毒素が発現し、細胞は生存できない。よって、生存細胞を選択することによって、カセットデッキ導入ベクターのノックインに成功した細胞を選択することができる。選択された材料細胞をさらにPCR法にて確認して、V領域プロモーターとカセットテープ遺伝子がノックインされている細胞のみを選択してもよい。

[0066] 工程(d)

カセットデッキ導入用ベクターがノックインされた細胞に、第2の組換え酵素を作用させる。第2の組換え酵素を作用させるには、例えば第2の組換え酵素発現ベクターを細胞へ導入する。第2の組換え酵素発現ベクターの発現によって、薬剤耐性遺伝子が除去され、材料細胞のゲノム内にプロモーター、一組の組換え酵素標的配列および該標的配列の間にマーカータンパク質をコードする遺伝子を含むカセットテープ遺伝子、並びにエンハンサーを有するカセットデッキ構造を含む、材料細胞をエフェクター細胞あるいはエフェクター細胞の前駆細胞に分化誘導した細胞においてマーカータンパク質が発現可能なように有している材料細胞を得ることができる。

- [0067] 薬剤耐性遺伝子がその下流に薬剤感受性遺伝子を有する融合遺伝子である場合、工程（d）の後、さらに薬剤感受性遺伝子によりアポトーシスを誘導できる物質の存在下で培養することによって、薬剤耐性遺伝子の除去に失敗した細胞を除去してもよい。
- [0068] 上記はRMCE法を用いる場合の本願の方法の工程（1）：エフェクター細胞への分化能を有する材料細胞であって、当該材料細胞のゲノム内に一組の組換え酵素標的配列および該標的配列の間にマーカータンパク質をコードする遺伝子を含むカセットテープ遺伝子を、材料細胞をエフェクター細胞あるいはエフェクター細胞の前駆細胞に分化誘導した細胞においてマーカータンパク質が発現可能なように有している材料細胞を提供する工程、の一態様である。
- [0069] 例えば上記「（A）材料細胞のTCR遺伝子のC領域のエンハンサーと、V領域のプロモーターの間に、両者の距離を縮めるように、カセットテープ遺伝子を導入する」場合には、工程（a）において第1のプロモーター配列を有していないカセットデッキ導入ベクターを準備すればよい。また、「（C）材料細胞TCR遺伝子座のV領域のプロモーターの下流へ、上流から順にカセットテープ遺伝子、およびTCR遺伝子座のC領域のエンハンサーを含む遺伝子を、V領域のプロモーターとC領域のエンハンサーがその間に挟まれる遺伝子の発現制御機能を発揮するために十分近くなるよう導入する」の場合は、第1のプロモーター配列を有さず、材料細胞TCR遺伝子座のC領域のエンハンサーを、薬剤耐性遺伝子、第2の組換え酵素の標的配列の下流に含むカセットデッキ導入ベクターを用いればよい。
- [0070] 工程（2）：
提供された材料細胞を増殖させる。材料細胞の増殖方法は、材料細胞の種類に応じて適宜選択すればよい。
- [0071] 工程（3）：
増殖された材料細胞を、エフェクター細胞へ分化させる。材料細胞が多能性幹細胞であり、エフェクター細胞がT細胞である場合、多能性幹細胞のT

細胞への分化誘導方法としては公知の方法を用いればよく、例えば非特許文献 1、2、特許文献 1～5 などに記載の方法が例示される。かかる方法を用いれば、材料細胞が多能性幹細胞である場合、TCR 遺伝子座に構築したカセットデッキ構造が壊されることなく、成熟 T 細胞へ分化誘導が可能である。Rag1 遺伝子あるいは Rag2 遺伝子を欠失させることにより、TCR の再構成を抑制してもよい。Rag1 遺伝子と Rag2 遺伝子については、どちらか一方を欠失させるだけでよい。

[0072] T 細胞としては、CD3 を発現し、CD4 および CD8 のいずれか 1 つを少なくとも発現する細胞である。治療目的により、CD8 を発現するキラー T 細胞、CD4 を発現するヘルパー T 細胞のいずれへ分化させてもよい。またその前駆細胞としてもよい。

[0073] 得られる T 細胞は、ゲノム内に、上流から順にプロモーター、一組の組換え酵素標的配列および該標的配列の間にマーカータンパク質である既知の TCR をコードする遺伝子を含むカセットテープ遺伝子、およびエンハンサーを有するカセットデッキ構造を有しており、マーカータンパク質である既知 TCR を発現する。

[0074] 得られた T 細胞を、マーカータンパク質である既知 TCR の存在を特異的な抗体またはテトラマーを用いて確認することによって、カセットデッキ構造を有している細胞を選択することができる。

[0075] 本願の方法によって、同一のマーカータンパク質を含むカセットテープ遺伝子を含有するカセットデッキ構造を有し、該マーカータンパク質を発現する成熟 T 細胞を大量に作成することができる。

[0076] 工程（4）：

該エフェクター細胞あるいはその前駆細胞のマーカータンパク質遺伝子を、所望のタンパク質をコードする遺伝子に置き換える。RMCE 法を用いる場合の本工程の具体例を説明する。

該エフェクター細胞あるいはその前駆細胞を、該組換え酵素標的配列と同一の一对の組換え酵素標的配列および該一对の組換え酵素標的配列の間に所

望のタンパク質をコードする遺伝子を含むカセットテープ交換用ベクターと共に組換え酵素の存在下で培養して、マーカートンパク質遺伝子を含むカセットテープ遺伝子を所望のタンパク質をコードする遺伝子を含むカセットテープ遺伝子と交換する。

[0077] 上記の一組の組換え酵素の標的配列の間に既知TCRをコードする遺伝子を含むカセットテープ遺伝子を、同じ組換え酵素の標的配列の間に所望の再構成済みTCR遺伝子を含むカセットテープ遺伝子と交換する。

[0078] T細胞へ導入すべき再構成済みTCR遺伝子は、細胞療法のターゲットとする抗原に対して特異的なT細胞からTCR遺伝子を公知の方法で増幅、単離して用いることができる。例えばがん抗原に特異的なTCRが例示される。また、TIL治療に際して、患者のがん組織からTILを採取し、TILをシングルセル解析することにより、頻度の高いキラーT細胞クローンのTCRを取得して用いてもよい。

[0079] TCRを導入するためのカセットテープ交換用ベクターを作成する。TCRとしては、マーカートンパク質としてのTCRと同様、TCR α と β のヘテロダイマーであることが好ましい。再構成済みTCR α およびTCR β のヘテロダイマーを発現させる場合、マーカートンパク質をコードする遺伝子は、再構成済のTCR α 遺伝子とTCR β 遺伝子を自己開裂型の2Aペプチドにてつないだ配列であることが好ましい。また、組換え酵素標的配列に挟まれ、間に2Aペプチドを含むTCR α およびTCR β の上流にイントロン、下流にポリAを有する構造とすることが好ましい。

[0080] カセットテープ交換用のベクターとしては、上で説明した遺伝子組換えに用いられるベクターを適宜選択して用いればよく、例えばウイルス、プラスミド、人工染色体などのベクターが例示される。あるいは、直鎖DNAベクターを用いても良い。

[0081] カセットデッキ構造を有する成熟T細胞へ、組換え酵素の存在下、カセットテープ交換用ベクターを導入することによって、カセットテープ交換用ベクターに含まれるTCR遺伝子と、マーカートンパク質として含まれるTC

R 遺伝子を交換することができる。

[0082] 具体的には、カセットテープ交換用ベクターと、組換え酵素発現ベクターと共に成熟 T 細胞へノックインすればよい。ノックインは公知の方法にて行えば良く、例えばエレクトロポレーション法により行うことができる。

[0083] 得られる細胞につき、マーカートンパク質として用いた T C R の存在を確認することによって、カセットテープ交換を確認することができる。既知 T C R の確認は、テトラマーや特異抗体により行うことができる。

[0084] 本願の方法によって、同一種のエフェクター細胞に各一つの同一カセットテープ遺伝子を含有するカセットデッキ構造を有するエフェクター細胞を大量に作成することが可能であり、カセットテープ遺伝子を交換することによって、所望のタンパク質を発現させることができる。

[0085] 本願の方法は、また、ゲノム編集法を用いて行うこともできる。ゲノム編集法を用いる場合、工程（１）で提供されるカセットデッキ構造を有する材料細胞は、材料細胞のゲノム内にマーカートンパク質をコードする遺伝子を含むカセットテープ遺伝子を、材料細胞をエフェクター細胞あるいはエフェクター細胞の前駆細胞に分化誘導した細胞においてマーカートンパク質が発現可能なように有する細胞である。ここで「カセットデッキ構造」とは、上流からプロモーター、マーカートンパク質をコードする遺伝子、およびエンハンサーを含む構造となり、マーカートンパク質をコードする遺伝子がカセットテープとなる。ゲノム編集法を用いる場合、マーカートンパク質を組換え酵素の標的遺伝子で挟む必要は無い。

工程（２）および工程（３）は、R M C E 法を用いる場合と同じである。

工程（３）にて得られたマーカートンパク質を含むカセットテープ遺伝子を含有するエフェクター細胞において、ゲノム編集により、該エフェクター細胞またはその前駆細胞に含まれるマーカートンパク質遺伝子を破壊し、あるいはマーカートンパク質と置き換えて、所望のタンパク質をコードする遺伝子を材料細胞で発現するよう導入する。

以下ゲノム編集法である C R I S P R / C a s 9 システムを利用して、マ

ーカータンパク質として再構成済みTCRを含むカセットテープ遺伝子を含むエフェクター細胞において、マーカータンパク質を破壊し、別の再構成済みTCRを導入する方法について説明する。

[0086] i) マーカータンパク質遺伝子切断用ガイドRNAの設計 (図10参照)

ガイドRNAは、マーカータンパク質遺伝子の特異性に関与する部分が切断されるよう設計する。例えばマーカータンパク質が図5Aに示されるTCR α およびTCR β をp2AでつないだTCR遺伝子である場合、どちらかのTCR鎖の特異性に寄与するCDR1~3のいずれか、例えばCDR3を切断するよう設計すればよい。以下、TCR β 鎖可変領域内のCDR3を切断する場合について説明する。

ii) 再構成済みTCR遺伝子ノックインベクター用アームの設計 (図10参照)

CDR3領域内に、マーカータンパク質切断用ガイドRNA認識部位を決め、CRISPR/Cas9による切断部位から上流約20bpを5'アームの、下流約20bpを3'アームの相同配列とする。

iii) 再構成済みTCR遺伝子ノックインベクターの設計 (図11参照)

TCRを導入するためのノックインベクターを作成する。再構成済みTCR α およびTCR β のヘテロダイマーをノックインする場合、再構成済のTCR α 遺伝子とTCR β 遺伝子を自己開裂型の2Aペプチドにてつなげたアミノ酸配列をコードする遺伝子が好ましい。ノックインする配列を工程ii)で決定した5'アーム、3'アームの相同配列で挟み、両端にKIベクター切断用ガイドRNAの認識配列を設置する。

5'アーム、3'アームで挟んだノックインされる配列の最上流に自己開裂型の2Aペプチドをコードする遺伝子を、所望のタンパク質をコードする遺伝子の最下流に終止コドン配置する。具体的に再構成済みTCR遺伝子KIベクターとしては、上流から順に、KIベクター切断用ガイドRNA認識配列、5'アーム配列、2Aペプチドをコードする遺伝子、TCR β をコ

ードする遺伝子、2 Aペプチドをコードする遺伝子、TCR α をコードする遺伝子、終止コドン、3' アーム配列、KIベクター切断用ガイドRNA認識配列を有するものが例示される。

i v) CRISPR/Cas9用ベクターの作成

マーカー遺伝子切断用ガイドRNA配列および再構成済みTCR遺伝子ノックインベクター切断用ガイドRNA配列がそれぞれ個別に、あるいは2つ同時にCas9遺伝子と同時に発現するベクターを作成する。ベクターは市販のCRISPR/Cas9用ベクターへ、2つのガイドRNA配列をそれぞれプロモーターの下流に操作可能なように挿入して作成すればよい。2つのガイドRNAを挿入したベクターの模式図を図12に示す。市販のCas9遺伝子発現ベクターとしては、例えばpX330、pCAS-Guide、pGuide-itが知られている。

v) 材料細胞へ、再構成済みTCR遺伝子ノックインベクターおよびCRISPR/Cas9用ベクターのノックイン

ベクターの材料細胞へのノックインは公知の方法にて行えば良く、例えばエレクトロポレーション法により行うことができる。

ノックインによって、マーカーTCR遺伝子の特異性部分に割り込む形で、再構成済みTCR遺伝子が組み込まれる(図13)。図13において、材料細胞のマーカータンパク質をコードする遺伝子の開始コドンから、ノックインされた再構成済みTCR遺伝子の終止コドンまでの配列が翻訳される。マーカーTCR β 鎖の5'側断片はp2Aペプチドの自己開裂により切り離され、特異性を失う。マーカーTCRの残りの部分は、ノックインされた再構成済みTCR遺伝子の末端の終止コドンより3'側となり、翻訳されない。翻訳された再構成済みTCR α 鎖および β 鎖はその間にあるp2Aペプチドの自己開裂により2つのタンパク質として生成する。かくして、マーカーとして用いたTCRタンパク質が、所望の再構成済みTCRタンパク質に置き換わる。

[0087] 本願の方法により、マーカータンパク質である既知再構成済みTCRを含

むカセットテープ遺伝子を含むカセットデッキ構造を有する成熟T細胞またはその前駆細胞を大量に製造し、該カセットテープ遺伝子を、所望のTCR遺伝子を含むカセットテープ遺伝子に交換することによって、所望のTCRを発現する成熟T細胞またはその前駆細胞を大量に製造することが可能である。1つの細胞につきカセットデッキ構造を1つのみ導入した成熟T細胞またはその前駆細胞とすることにより、複数の成熟T細胞またはその前駆細胞について、複数種類のTCRのカセットテープ遺伝子を同時に交換することが可能である（図1A）。例えばマーカートンパク質を含まないTCR発現機構を破壊することによって、1つの細胞につきカセットデッキ構造を1つのみ導入したエフェクター細胞を得ることができる。1つのカセットデッキ構造を1つのみ有する細胞のクローンに対して複数種類のTCRのカセットテープを交換する方法は、TIL療法に好適に用いることができる。

[0088] 本願の方法をTIL療法に用いる場合、1つのカセットデッキ構造を1つのみ有する細胞のクローンに対して複数種類のTCRのカセットテープを交換するTILカクテル法が例示される。まず患者のがん組織からTILを採取し、TILをシングルセル解析することにより、複数の頻度の高いキラーT細胞クローンのTCRの情報を得ることができる。得られた複数のTCRを、カセットテープ交換用ベクターに挿入する（図1B）。一方でHLAの操作により汎用化した多能性幹細胞を材料細胞として、本願の方法によりカセットデッキ構造を有する再生T細胞のクローンを作製し、その再生T細胞にTCRを導入する。このカセットデッキ構造を有する再生T細胞にTCRを導入するステップで、本発明を用いる。この戦略は原理的には、TILが採取できる患者全てに適用できる。T細胞自体は汎用性、TCR遺伝子は個別化医療なので、個別化医療と汎用化医療を組み合わせた戦略と言える。

[0089] ゲノム編集技術によってES細胞やiPS細胞のHLAを操作し、多能性幹細胞を汎用化する方法が提案されており、本願の材料細胞としては、かかる汎用化した多能性幹細胞を用いてもよい。

[0090] RMCE法を用いる場合、TILカクテル法は、1) 土台となるES/i

P S細胞のTCR遺伝子座に、内因性のエンハンサーの影響下に発現が制御されるような配置で再構成済TCR遺伝子を挿入する（図1A）。2）この時に挿入するTCR遺伝子の上流と下流にそれぞれ10x2272と10xpを配置しておくことによってカセットデッキにカセットテープが入った構造になる。3）導入するTCR遺伝子としては、染色に用いるテトラマーが入手可能な既知のTCRを用いる。4）細胞中に発現するTCR遺伝子座が1つとなるよう、再構成済TCR遺伝子を挿入していないTCR遺伝子座を破壊しておく。5）こうして作られたES/iPS細胞からT細胞を再生する。6）一方で導入するTCR遺伝子の上流と下流にそれぞれ10x2272と10xpを配置しておく（カセットテープ交換用ベクター）。7）複数種類のTCR遺伝子を混ぜたままで、Creと共に細胞に導入する。

[0091] ゲノム編集法を用いる場合、TILカクテル法は、1）土台となるES/iPS細胞のTCR遺伝子座に、内因性のエンハンサーの影響下に発現が制御されるような配置で再構成済TCR遺伝子を挿入する。2）その際、細胞中に発現するTCR遺伝子座が1つとなるよう、再構成済TCR遺伝子を挿入していないTCR遺伝子座を破壊しておく。3）導入するTCR遺伝子としては、染色に用いるテトラマーが入手可能な既知のTCRを用いる。4）こうして作られたES/iPS細胞からT細胞を再生する。5）一方で導入したTCR遺伝子に特異的な配列部位に所望の配列を導入するためのゲノム編集用ベクターと、再構成済TCR遺伝子を導入するためのノックインベクター（カセットテープ交換用ベクター）を準備する。6）複数種類の再構成済TCR遺伝子導入のためのノックインベクターと共に、ゲノム編集用ベクターを細胞へ作用させる。

[0092] この方法により、1）TCRベクター複数種を混ぜたままでミスペアリングのリスクなく遺伝子導入できる、2）入れ替わった細胞をテトラマー陰性細胞として分取することができる、という効果が生じる。結果として、TILと同じTCRを発現するT細胞を大量に作製できる。

一方で本発明は、TIL由来TCR遺伝子だけでなく、がん共通抗原に対

するTCR遺伝子やCAR遺伝子の一個あるいは複数個を再生T細胞に入れる場合にも、応用可能である。

実施例 1

[0093] 以下、実施例により本願をさらに詳細に説明する。なお、以下特定の遺伝子を含むカセットテープ遺伝子を、「該特定の遺伝子のカセットテープ」と称する。

本実施例では、成熟T細胞であるJurkat細胞のTCR発現制御機構下にWT1特異的TCR遺伝子のカセットテープを含有するカセットデッキを含む細胞を調製した。得られたカセットデッキのカセットテープをNY-ESO1特異的TCR遺伝子のカセットテープ交換用ベクターを作用させることによって、WT1特異的TCR遺伝子のカセットテープを、NY-ESO1特異的TCR遺伝子のカセットテープに交換することに成功した。一連の手順を図2に示す。

1) 相同組換えによるJurkat細胞のTCR β 遺伝子座D β 2領域（以下、「TCRD β 2遺伝子領域」とも言う。）へのTCR遺伝子のカセットテープを含有するカセットデッキのノックイン：

[0094] 使用した試薬・抗体等：

KOD-FX (Toyobo, KFX-101),
Amaxa[®] Cell Line Nucleofector[®] Kit V (Lonza, VACA-1003),
ピューロマイシン二塩酸塩 (Wako, 160-23151),
ガンシクロビル (Wako, 078-04481),
PE/Cy7 anti-human TCR α/β monoclonal antibody (BioLegend, 306719),
APC Anti-Human CD3 monoclonal antibody (BioLegend, 300439),
APC/Cyanine7 anti-human CD3 Antibody (BioLegend, 300426)
APC mouse IgG2b κ isotype control antibody (BioLegend, 400322),
HLA-A*24:02 modified WT1 Tetramer-CYTWNQMNL-PE (MBL, TS-M014-1),
HLA-A*02:01 NY-ESO-1 Tetramer-SLLMWITQC-PE (MBL, TB-M011-1)

[0095] すべての実験において細胞培養には以下の組成の培養液を用いた。薬剤で

選択する場合には、以下の組成に、各薬剤を加えて培養した。

[表1]

細胞培養用培地	(最終濃度)
R P M I 1 6 4 0	5 0 0 m L
F C S	5 0 m L (9 %)
*ペニシリン/ストレプトマイシン/L-グルタミン溶液	5 . 5 5 m L (1 %)
2-メルカプトエタノール	2 μ L (5 0 μ M)
T o t a l	5 5 5 m L

*ペニシリン/ストレプトマイシン/L-グルタミン溶液の組成は、ペニシリン10,000 U/mL, ストレプトマイシン10,000 μ g/mL, L-グルタミン29.2 mg/mLであるため、最終濃度はそれぞれ100 U/mL, 100 μ g/mL, 292 μ g/mLとなる。

[0096] 本実施例では、細胞へのベクター導入はエレクトロポレーション法を用いた。エレクトロポレーションでは、Amaxa[®]Cell Line Nucleofector[®] Kit V キットのマニュアルにしたがった。キット付属の試薬に細胞とベクターを懸濁後、キット付属のキュベットに移し、Amaxa Nucleofector II (Lonza) にセットして、機器内臓のプログラムX001を用いてベクターを細胞に導入した。

[0097] 材料細胞としてJurkat細胞株の亜種で、再構成したT C R β 遺伝子に変異によって発現しなくなったJ. RT3-T3.5 Jurkat 細胞株 (以下Jurkat β mutant) (Ohashi et al, Science 316, 606-609, 1985) を用いた。

[0098] カセットデッキ導入用ターゲティングベクターとして、図2 Aに示す再構成済みT C R (マーカートンパク質に相当する) を10x2272と10xPで挟んだカセットテープ遺伝子を含むターゲティングベクターを調製した。図2 Aには示していないが、ベクターには3' アーム相同領域の下流にD C T 遺伝子とその発現のためのプロモーターを有している。

[0099] T細胞株であるJurkat細胞の、T C R β 遺伝子座のD β 2 遺伝子の約50 bp上流部位に (図2 B)、カセットデッキ導入用ターゲティングベクター (K Iターゲティングベクター) (図2 A) を用いてV β 2 0-1 プロモーターおよびT C R 遺伝子のカセットテープを挿入した。挿入後の模式図

を示す（図2C）。

[0100] 相同組換えによるノックインの効率を高めるために、CRISPR/Cas9nシステムによりDβ2遺伝子の約50bp上流部位に2カ所の一本鎖切断（ニック）を導入した。カセットデッキ導入用ターゲティングベクターを以下に示す2つのCRISPR/Cas9nベクターと共に、Jurkat β mutantに導入した。

[0101] 相同組換えによりカセットデッキ導入用ターゲティングベクターをゲノムDNAに取り込んだ細胞では、EF1αプロモーターの作用によりピューロマイシン耐性遺伝子とヘルペスウイルスチミジンキナーゼのキナーゼドメイン（ΔTK）との融合遺伝子（Puro rΔTK）が発現する（図2C）。そのため、まず、0.25 μg/mLピューロマイシン／培養液を用いて、カセットデッキ導入用ターゲティングベクター中の薬剤耐性遺伝子をゲノム中に取り込んだクローンを選択した（ポジティブセクション）。一方、カセットデッキ導入用ターゲティングベクターの5'アーム配列と3'アーム配列の外側のベクター部分がランダムインテグレーションによりゲノムDNA内に取り込まれた細胞は、ジフテリア毒素（DTA）が細胞内で生成されるため生存できず、取り除かれる（ネガティブセクション）。

[0102] 次に、そのようにして選択された細胞（クローン）の中から、Vβ20-1プロモーターからf r tまでのTCR遺伝子と薬剤耐性遺伝子部分をTCRDβ2遺伝子領域に取り込んだクローンをPCR法で同定した。その中からTCRDβ2遺伝子領域にTCR遺伝子のカセットテープが片アレルのみに挿入され、ベクターがランダムインテグレーションによりゲノムDNA内の他の領域に取り込まれていない細胞をPCR法により選出した。

[表2]

材料		
細胞	Jurkat β mutant	2 x 10 ⁶ cells
ベクター	1. カセットデッキ導入用ターゲティングベクター	1.0 μg
	2. CRISPR/Cas9nベクター1	0.5 μg
	3. CRISPR/Cas9nベクター2	0.5 μg
試薬	Amaya [®] Cell Line Nucleofector [®] Kit V	100 μL

[0103] 用いたCRISPR/Cas9ベクターは、以下

A: 5' -CACCGAGGTTAGTCTGACTGTGTG-3' (SEQ ID NO: 1)

B: 5' -AAACCACACAGTCAGACTAACCTC-3' (SEQ ID NO: 2)

C: 5' -CACCTGCCGCTGCCAGTGGTTG-3' (SEQ ID NO: 3)

D: 5' -AAACCAACCACTGGGCAGCGGCAG-3' (SEQ ID NO: 4)

のオリゴヌクレオチドをAとB（ベクター1）、CとD（ベクター2）の組み合わせでアニールしたものを、制限酵素BbsIで切断したプラスミドpX460に挿入し、作製した。

[0104] TCR遺伝子がTCRD β 2遺伝子領域に組み込まれていることを、以下のプライマーおよびPCR法を用いて5' アーム領域と3' アーム領域を増幅して確認した。

[0105] 5' アーム領域

Primer1, 5' -ACGGCTGAAATCTCCCTAACCC-3' (SEQ ID NO: 5)

Primer2, 5' -ATACGAAGTTATAGCTAGTCTTCCGTGATGGCCTCACACCA-3' (SEQ ID NO: 6)

PCRは、KOD-FX (Toyobo, KFX-101) を用いて、94℃, 2min→98℃, 10sec, 68℃, 4minを35サイクルで行った

[0106] 3' アーム領域

Primer3, 5' -GTCCAGACCCACGTCACC-3' (SEQ ID NO: 7)

Primer4, 5' -GGGGACCGAGGGGCTGGAAG-3' (SEQ ID NO: 8)

PCRは、KOD-FX (Toyobo, KFX-101) を用いて、94℃, 2min→98℃, 10sec, 68℃, 2min30secを35サイクルで行った

[0107] TCR遺伝子がTCRD β 2遺伝子領域の片アレルのみに組み込まれていることを以下のプライマーおよびPCR反応条件を用いて確認した。

Primer5, 5' -CCTCCTGTCATAAGGTGCCAT-3' (SEQ ID NO: 9)

Primer6, 5' - CCACTTTGCTGTCTTGGCCTT-3' (SEQ ID NO: 10)

PCRは、KOD-FX (Toyobo, KFX-101) を用いて、94℃, 2min→98℃, 10sec, 60℃, 30sec, 68℃, 8minを35サイクルで行った。

[0108] ベクターがランダムインテグレーションによりゲノムDNA内に取り込まれているかを、以下のプライマーおよびPCR反応条件を用いてジフテリア毒素 (DTA) 遺伝子を増幅して確認した。

ジフテリア毒素 (DTA) 遺伝子

Primer7, 5' -AGCCAAATCTGGTACACAAGG-3' (SEQ ID NO: 11)

Primer8, 5' -CTGAGCACTACACGCGAAGCA-3' (SEQ ID NO: 12)

PCRは、KOD-FX (Toyobo, KFX-101) を用いて、94℃, 2min→98℃, 10sec, 58℃30sec, 68℃, 25secを35サイクルで行った。

[0109] ジフテリア毒素を含まない細胞を「カセットデッキ導入用ターゲティングベクターK1-Jurkat細胞」として、以下に用いた。

[0110] 2) カセットデッキ導入用ターゲティングベクターK1-Jurkat細胞へのFLPベクターの導入 (外来性TCR発現Jurkat細胞の作製)

材料

[表3]

細胞	カセットデッキ導入用ターゲティングベクターK1-Jurkat細胞	2 x 10 ⁶ cells
ベクター	FLP発現ベクター (pCAGGS-FLPe)	5.0 μg
試薬	Amara [®] Cell Line Nucleofector [®] Kit V	100 μL

[0111] Flipperse発現ベクター (pCAGGS-FLPe) を、カセットデッキ導入用ターゲティングベクターK1-Jurkat細胞にエレクトロポレーション法で導入した。FLPはf r t配列を認識し、それらによって挟まれる領域を欠失させる。図2C、Dに、ノックイン後のTCRβ遺伝子座Dβ2領域 (図2C) と、f r t配列で挟まれた部分の欠失が起きたTCRβ遺伝子座 (図2D) を示す。

[0112] エレクトロポレーションによる一過性のFLP発現ではf r tで挟まれる

領域が欠失した細胞と、欠失が起こらなかった細胞が混在する。そこでガンシクロビルを用いて、欠失し損ねた細胞（FLPによる組換えが失敗した細胞）の除去を行った。通常、Jurkat細胞のようなヒトの細胞にはガンシクロビルは作用しない。それに対し、Puro Δ TKが存在する細胞内ではガンシクロビルは、 Δ TKによってリン酸化されると核酸のアナログとなって、その結果、DNA複製を阻害して細胞増殖の停止、あるいは細胞死を引き起こす。

[0113] 12 μ Mガンシクロビル／培養液で9日間培養した後、TCRおよびCD3の細胞膜上での発現をFACSで解析した。結果を図3に示す。ガンシクロビル選択によりTCRを発現している細胞が増加した。しかしながら依然としてTCRを発現していない細胞も多く存在していたため、FACSAria（BD）を用いてTCRを発現している細胞を単離して以下に用いた（図4）。

[0114] 単離した細胞を培養した後、f r t 配列で挟まれた領域が欠失していることをPCR法で確認し、FACSによる再解析を行った。単離した細胞はf r t 配列で挟まれた領域が欠失し、TCRの発現を維持していることを確認した（図4）。得られた細胞を、「TCR発現カセットデッキKI-Jurkat細胞」として、以下の実験に用いた。

3) プラスミドDNAを用いたTCR発現カセットデッキKI-Jurkat細胞におけるTCRカセットテープ交換

[表4]

材料		
細胞	TCR発現カセットデッキKI-Jurkat細胞	2 x 10 ⁶ cells
ベクター	1. TCRカセットテープ交換用ベクター（NY-ESO1）	1.0 μ g
	2. Cre発現ベクター（pCAG-nls-Cre）	4.0 μ g
試薬	Amaza [®] Cell Line Nucleofector [®] Kit V	100 μ L

[0115] 図2のうち、図2DおよびEに示す工程である。改めて図5Aに、概略を示す。上からTCR発現カセットKI-Jurkat細胞のTCR β 遺伝子座D β 2領域、TCRカセットテープ交換用ベクター（プラスミドベクター）

、カセットテープ交換後のTCR β 遺伝子座を模式的に示す。TCR β 遺伝子座D β 2領域のV β 20-1プロモーターの下流に、Lox2272とLoxPに挟まれたイントロン-TCR β -p2A-TCR α -ポリAが存在する。

[0116] TCRカセットテープ交換用ベクターとしては、Lox2272とLoxPに挟まれたイントロン-TCR β -p2A-TCR α -ポリAを有するプラスミドベクターを用いた。TCR α および β としてはNY-ESO1抗原に対するTCRを用いた。

[0117] カセットテープ交換のために、TCR発現カセットデッキK1-Jurkat細胞にTCRカセットテープ交換用ベクターおよびCre発現ベクター(pCAG-nls-Cre)をエレクトロポレーション法により導入した。エレクトロポレーション後、7日間培養した。Lox2272とLoxPで挟まれた領域がカセット交換法により置き換わっていることを確認するため、FACSを用いてNY-ESO1テトラマー陽性細胞の有無を確認した。結果を図6に示す。カセットテープ交換をしていない細胞ではNY-ESO1テトラマー陽性細胞は検出できないが、TCRカセットテープ交換用ベクターとCre発現ベクターを遺伝子導入した細胞ではNY-ESO1テトラマー陽性細胞が検出された。

[0118] 4) 直鎖状DNAを用いたTCR発現カセットデッキK1-Jurkat細胞におけるTCRカセットテープの交換

TCRカセット交換法の効率を改善するため、プラスミドDNAよりもサイズが小さい直鎖状DNAを用いてTCRカセット交換法を試みた。概略を図5Bに示す。直鎖状DNAはPCR法を用いて上記TCRカセットテープ交換用ベクター(プラスミドベクター)のLox2272とLoxPで挟まれた領域を増幅することで作製した(下の材料参照)。TCR発現カセットK1-Jurkat細胞にTCRカセットテープ交換用直鎖状DNAおよびCre発現ベクター(pCAG-nls-Cre)をエレクトロポレーション法により導入した。本実施例でも導入したのはNY-ESO1抗原に対するT

CRである。14日間培養後、 1.0×10^6 と 1.0×10^5 で挟まれた領域がカセットテープ交換により置き換わっていることを確認するため、FACSを用いてNY-ESO1テトラマー陽性細胞の有無を確認した。結果を図6に示す。プラスミドDNAを用いたTCRカセットテープ交換と同様にNY-ESO1テトラマー陽性細胞が検出できた。

[0119] 材料

TCRカセットテープ交換用直鎖状DNA

Primer9, 5' -TGTAACACGACGGCCAGT-3' (SEQ ID NO: 13)

Primer10, 5' -CAGGAAACAGCTATGACCATG-3' (SEQ ID NO: 14)

PCRは、KOD-FX (Toyobo, KFX-101) を用いて、94℃, 2min→98℃, 10sec, 59.1℃, 30sec, 68℃, 4minを35サイクルで行った。

[0120] [表5]

材料		
細胞	TCR発現カセットデッキKI-Jurkat細胞	2×10^6 cells
ベクター	1. TCRカセットテープ交換用直鎖上DNA (NYES O1)	1.0 μ g
	2. Cre発現ベクター (pCAG-nls-Cre)	4.0 μ g
試薬	Amaya [®] Cell Line Nucleofector [®] Kit V	100 μ L

実施例 2

[0121] 1) ヒトiPS細胞のTCR β 遺伝子座D β 2領域への 1.0×10^6 サイトで挟まれたWT-1特異的TCR遺伝子(カセットテープ遺伝子)を含むカセットデッキのノックイン

[表6]

材料		
細胞	iPS細胞 (HKM1株, I14s04株)	1 x 10 ⁶ cells
ベクター	1. pX330-hTCRD β 2-gRNA#1 (Crispr-CAS9およびガイドRNA発現ベクター)	3.3 μ g
	2. KM3-3Db2K (TCR カセットデッキKI用ターゲティングベクター、図7A)	4.0 μ g
	3. pCAGGS-FLP	10 μ g
試薬:	Opti-MEM (Thermo Fisher) iMatrix-511 (nippi) Puromycin (Gibco) Ganciclovir (Wako)	
培地:	AK03N (Ajinomoto)	
機器:	NEPA21 (NEPAGENE)	

以下の i P S 細胞株を用いた：

HKM1株：ヒト単球由来（国立大学法人 京都大学ウイルス・再生医科学研究所、河本宏研究室にて樹立）

I14s04株：ヒト単球由来（国立大学法人 京都大学 i P S 細胞研究所にて樹立）

[0122] 2) T C R ノックイン (C R I S P R / C a s 9 を用いた遺伝子編集)

実施例 1 と同様にしてカセットデッキ導入用ターゲティングベクターを作成した。該ベクターの構造を図 7 A に示す。なお、T C R 遺伝子としては、W T 1 特異的 T C R から取得した T C R (K M # 3 - 3) を用いた。上記記載の割合で混合した C R I S P R / C a s 9 およびガイド R N A の発現ベクター 1. とカセットデッキ導入用ターゲティングベクター 2. とのプラスミドを、エレクトロポレーションを用いて i P S 細胞へ形質移入した。2 日後に細胞を回収し、5×10⁴/well (6-well plate) の割合で再播種を行い、その翌日よりピューロマイシンを下記の最終濃度で用いて薬剤選択を行った。

[0123] なお、エレクトロポレーションは、1 回につき i P S 細胞 1 × 1 0 ⁶ 個、プラスミド D N A は計 1 0 μ g を用い、N E P A 2 1 を下記の条件で使用した。

D a y 0 : エレクトロポレーション

Day 2 : 細胞再播種 5×10^4 cells / well

Day 3 : ピューロマイシン 180 ng / ml

Day 4 : ピューロマイシン 150 ng / ml

Day 5-9 : 通常培養

Day 12 : iPSCコロニーピックアップ

[0124] 樹立したiPS細胞クローンの各ゲノムDNAのPCRを行うことで、目的のノックインがなされた株を確認、選択した。

[0125] 3) 薬剤選択機構の除去 (FLPを用いた部位特異的組換え) について

図7Aに示すカセットデッキ導入用ターゲティングベクターの下流には、チミジンキナーゼが発現しており、ガンシクロビル (GCV) を細胞内で有毒化するため、GCVとの共培養で細胞は死滅する。この機構を用いて、FLP発現ベクター3. をエレクトロポレーションし、FLPを一時的に発現後にGCV薬剤を下記の最終濃度で使用し薬剤選択を行なった。概略を図7Bに示す。

[0126] Day 0 : エレクトロポレーション

Day 2 : 細胞再播種 $2-4 \times 10^3$ cells / well

Day 3-6 : GCV 5 ug / ml

Day 7-12 : 通常培養

Day 12 : iPSCコロニーピックアップ

[0127] 樹立したiPS細胞クローンの各genomic DNAのPCRを行うことで、目的のPuro Δ TK部位が欠損した株かを識別した。

[0128] 得られたWT1特異的TCRを含む 1×2272 -TCR- $1 \times P$ 構造を有するTCR遺伝子のカセットテープ含むカセットデッキ構造を有するiPS細胞から分化誘導してCD8シングルポジティブT細胞 (CTL) を得た。

[0129] CTLの誘導は、特許文献4 (WO2017/179720) に記載の方法にて行った。すなわち、iPS細胞をCD4CD8ダブルポジティブ細胞であるT細胞前駆体へと誘導し、次いでCD4CD8ダブルポジティブ細胞

を単離した。単離されたCD4CD8ダブルポジティブ細胞をさらにCD8シングルポジティブ細胞へと誘導した。結果を図8に示す。WT1特異的かつ、CD8抗原がCD8 α 鎖とCD8 β 鎖のヘテロ接合型であるCD8シングルポジティブT細胞が得られた。すなわち得られた細胞は、WT1特異的TCR遺伝子のカセットテープを含むカセットデッキを有する、CD8シングルポジティブT細胞である。

実施例 3

[0130] 実施例2で得たWT1特異的TCR遺伝子のカセットテープ含むカセットデッキを有する、CD8シングルポジティブT細胞のカセットテープ交換を行った。

1) プラスミドDNAを用いた、CD8SP T細胞のTCRカセットテープ交換

[表7]

		条件1	条件2
細胞	再生CTL (WT1特異的TCR遺伝子のカセットテープを含むカセットデッキ含有CD8SP細胞)	1×10^6 cells	
プラスミド	TCRカセットテープ交換用ベクター (NY-ESO1)	0.8 μ g	0.5 μ g
	Cre発現ベクター (pCAG-nls-Cre)	0.2 μ g	0.5 μ g
試薬	20%FBS α MEM培地 (Gibco)		
	抗CD3抗体 (Invitrogen)	1ug/ml	
	抗CD28抗体 (Invitrogen)	1ug/ml	
	レトロネクチン (タカラバイオ)	5ug/ml	
	hIL-2 (Peprotech)	10ng/ μ l	
	hIL-7 (Peprotech)	5ng/ μ l	
	hIL-15 (Peprotech)	10ng/ μ l	
	hIL-21 (Peprotech)	10ng/ μ l	
機器	P3初代細胞96ウェルNucleofectorキット (Lonza)		
	4D-Nucleofector (Lonza)		

[0131] 図5Aに示す概略に沿ってカセットテープ交換を行った。カセットテープ交換用ベクターは、Lox2272とLoxに挟まれたイントロン-TCR β -p2A-TCR α -ポリAを有する環状プラスミドベクターである。T

CR α および β としてはNY-ESO1抗原に対するTCRを用いた。MOC KベクターとしてLox2272とLoxに挟まれたGFP遺伝子を発現可能にコードするプラスミドベクターを用いた。

[0132] カセットテープの交換のために、WT1特異的TCR遺伝子のカセットテープを含むカセットデッキ含有CD8SPT細胞にTCRカセットテープ交換用ベクターまたはMockベクターと、Cre発現ベクター（pCAG-nls-Cre）をエレクトロポレーション法により導入した。エレクトロポレーション後、13日間培養した。カセットテープ交換法により置き換わっていることを確認するため、FACSを用いてNY-ESO1テトラマー陽性細胞の有無を確認した。カセットテープ交換によりTCRが置き換わった細胞は、NY-ESO1テトラマー陽性細胞として検出される。結果を図9に示す。また、ネガティブコントロールとしてTCRカセットテープ交換用ベクター（NY-ES01）に代えてMockベクターを10 μ g用いた。

[0133] Mockベクターを導入した場合、NY-ESO1テトラマー陽性細胞は全く生成されなかった。エレクトロポレーションの条件を変えて2回NY-ESO1のTCRを含むカセットベクターによるカセットテープ交換を行った。いずれも効率は低いながらNY-ESO1テトラマー発現細胞が生成し、カセットテープ交換が達成されたことを確認した。

実施例 4

[0134] ゲノム編集法によってマーカートンパク質であるTCRを別のTCRに切り替えた。

実施例1で作成した再構成済みWT1特異的TCRがJurkat細胞のTCR β 遺伝子座D β 2領域にノックインされた細胞（TCR発現カセットデッキKI-Jurkat細胞）を用いた。該細胞のTCR β 遺伝子座は、図5AのWT1-TCR KI Human TCR β locusに示す構造を有する。実施例4では同細胞を「Jurkat WT1-TCR細胞」と称する。本実施例では、ゲノム編集を用いて、Jurkat WT1-TCR細胞のWT1-TCRに替えてNYESO1-TCRを発現させた。

[0135] WT1-TCRのTCR β 鎖上のCDR3領域をコードする遺伝子部分をターゲットとするガイドRNAを2種類作成した(gRNA#1およびgRNA#4)。各ガイドRNAの切断部位から5'側に20bpを5'アーム、3'側20bpを3'アーム部分とした。2種類のガイドRNAの相同配列部分および5'アーム、3'アームの設計の概念図を図10に示す。図中、塩基配列を区切る縦線はタンパク質への翻訳の読み枠に相当する。また、NYESO1-TCRノックインベクターの切断用として、別のガイドRNA(gRNA#5)を用いた。gRNA#5の認識配列は下記下線部である。

5'-GCATCGTACGCGTACGTGTTGG-3' (SEQ ID NO: 15)

gRNA#5ベクターのgRNA部分のDNA配列にはすでに報告されている配列を用いた(Nature Protocol 11, 118-133, 2016)。

[0136] WT1-TCRと交換するNYESO1-TCR遺伝子としては、NYESO1抗原を認識する既知ヒトTCRのTCR β 鎖の可変領域(V β)をマウスTCR定常領域(mC β)と繋げたキメラTCR β 鎖および、同様の構造からなるキメラTCR α 鎖をp2Aペプチド遺伝子で繋いだキメラ遺伝子(図11)を用いた。

[0137] NYESO1-TCR遺伝子ノックインベクターの概略図を図11に示す。NYESO1-TCRノックインベクターは上流からgRNA#5の認識配列、5'アーム配列、p2A配列、p2A配列でTCR β 鎖とTCR β 鎖が連結されたNYESO1-TCR遺伝子、3'アーム配列、およびgRNA#5の認識配列を有するプラスミドDNAベクターである。NYESO1-TCR遺伝子の3'末端に終止コドンを含む。

[0138] CRISPR/Cas9用ガイドRNA発現ベクターの作成

ガイドRNAとCas9を共に発現させることができるプラスミドベクター-pX330へ、gRNA#1、gRNA#4、gRNA#5をそれぞれ導入したもの、およびgRNA#1&gRNA#5、gRNA#4&gRNA#5を導入したCRISPR/Cas9用ベクターを作成した。一例として

gRNA # 1、gRNA # 5 および Cas 9 を発現するベクターの模式図を図 12 に示す。

[0139] Jurkat WT1-TCR 細胞への NYESO1-TCR KI ベクターおよび CRISPR/Cas 9 用ベクターの導入

細胞へのベクター導入はエレクトロポレーション法を用いた。エレクトロポレーションでは、Amaza（登録商標）Cell Line Nucleofector（登録商標）Kit V キットのマニュアルにしたがった。キット付属の試薬 100 μ L に細胞 2×10^6 個とベクターを懸濁後、キット付属のキュベットに移し、Amaza Nucleofector II（Lonza）にセットして、機器内臓のプログラム X001 を用いてベクターを細胞に導入した。

[0140] エレクトロポレーションによる遺伝子導入の条件

条件 1 : gRNA # 1 により WT1-TCR 遺伝子を切断

[表8]

条件

1-1

DNA 1	NYESO1-TCR KI ベクター__# 1	1 μ g
DNA 2	CRISPR/Cas9(gRNA#1&5)ベクター	1 μ g

1-2

DNA 1	NYESO1-TCR KI ベクター__# 1	2 μ g
DNA 2	CRISPR/Cas9(gRNA#1&5)ベクター	2 μ g

1-3

DNA 1	NYESO1-TCR KI ベクター__# 1	1 μ g
DNA 2	CRISPR/Cas9(gRNA#1)ベクター	0.5 μ g
DNA 3	CRISPR/Cas9(gRNA5)ベクター	0.5 μ g

1-4

DNA 1	NYESO1-TCR KI ベクター__# 1	2 μ g
DNA 2	CRISPR/Cas9(gRNA#1)ベクター	1 μ g
DNA 3	CRISPR/Cas9(gRNA5)ベクター	1 μ g

[0141] 条件 2 : gRNA # 4 により WT1-TCR 遺伝子を切断

[表9]

条件

2-1

DNA 1	NYESO1-TCR KI ベクター__# 4	1 μ g
DNA 2	CRISPR/Cas9(gRNA#4&5)ベクター	1 μ g

2-2

DNA 1	NYESO1-TCR KI ベクター__# 4	2 μ g
DNA 2	CRISPR/Cas9(gRNA#4&5)ベクター	2 μ g

2-3

DNA 1	NYESO1-TCR KI ベクター__# 4	1 μ g
DNA 2	CRISPR/Cas9(gRNA#4)ベクター	0.5 μ g
DNA 3	CRISPR/Cas9(gRNA#5)ベクター	0.5 μ g

2-4

DNA 1	NYESO1-TCR KI ベクター__# 4	2 μ g
DNA 2	CRISPR/Cas9(gRNA#4)ベクター	1 μ g
DNA 3	CRISPR/Cas9(gRNA#5)ベクター	1 μ g

[0142] 遺伝子導入日から6日後に、条件1-1から条件2-4までの8種類の細胞と、遺伝子導入していないJurkat WT1-TCR細胞について、TCRの発現をフローサイトメーターで解析した。解析には、下に示す2種類の抗体と1種類のテトラマーを用いた。

抗体

Human TCR $\alpha\beta$ antibody-PECy7 (BioLegend, 306720)Mouse TCR β antibody-APC (BioLegend, 109212)

テトラマー

NYESO1-tetramer-PE (MBL, TB-M011-1)

[0143] human TCR $\alpha\beta$ antibodyはヒトのC領域をもつTCRを認識し、マウスのC領域をもつTCRは認識しない。他方、mouse TCR β antibodyはマウスのC領域をもつTCRを認識し、ヒトのC領域をもつTCRは認識しない。また、NYESO1-tetramerはNYESO1-TCRのみ認識する。本実験条件では、human TCR $\alpha\beta$ antibodyはWT1-TCR (KM#3-3) を認識し、mouse TCR β antibodyとNYESO1-tetramerの2種類はNYESO1-TCRを認識すると考えられる。結果を図14A及び図14Bに示す。

[0144] 遺伝子導入していないJurkat WT1-TCR細胞には、human TCR $\alpha\beta$ antibody

で認識されるTCR (KM#3-3) の発現が確認され、mouse TCR β antibodyおよび NYES01-tetramerで認識されるTCRの発現は全く認められなかった (図14AおよびBの右側のJurkat WT1-TCR細胞の列の上段および中段)。それに対し、NYES01-TCRのベクターと、NYES01-TCRのベクターをWT1-TCRのCDR3領域にノックインするためのgRNA/Cas9発現ベクターを共導入した細胞群においては、非常に僅かではあるが、NYES01-TCRを発現する細胞が認められ (図14A, 条件1-1, 1-2, 1-3および1-4の各列の上段と中段) (図14B, 条件2-1, 2-2, 2-3および2-4の各列の上段と中段)、さらに、NYES01-TCRの発現が認められた細胞のほとんどにおいてWT1-TCRの発現は認められなかった (図14A, 条件1-1, 1-2, 1-3および1-4の各列の下段) (図14B, 条件2-1, 2-2および2-4の各列の下段)。これらの結果より、Jurkat WT1-TCR細胞中において、発現するTCRが、WT1-TCRからNYES01-TCRに交代したと考えられた。以上より、外来性に遺伝子導入したT細胞受容体 (TCR) を発現するT細胞において、ゲノム編集を用いることで、すでに発現しているTCRから別のTCRの発現に切り替えることが可能であることが示された。

請求の範囲

- [請求項1] (1) エフェクター細胞への分化能を有する材料細胞であって、当該材料細胞のゲノム内にマーカートンパク質をコードする遺伝子を含むカセットテープ遺伝子を、材料細胞をエフェクター細胞あるいはエフェクター細胞の前駆細胞に分化誘導した細胞においてマーカートンパク質が発現可能なように有しているカセットデッキ構造を有する材料細胞を提供する工程、
- (2) 該材料細胞を増殖する工程、
- (3) 該材料細胞をエフェクター細胞あるいはその前駆細胞へ分化誘導する工程、および
- (4) 該エフェクター細胞あるいはその前駆細胞のマーカートンパク質遺伝子を、所望のタンパク質をコードする遺伝子に置き換える工程を有する、所望のタンパク質を発現するエフェクター細胞の製造方法。
- [請求項2] 工程(1)で提供される材料細胞において、マーカートンパク質をコードする遺伝子の上流と下流に隣接して一組の組換え酵素標的配列が含まれており、
- 工程(4)が、該エフェクター細胞あるいはその前駆細胞を、該組換え酵素標的配列と同一の一組の組換え酵素標的配列および該一組の組換え酵素標的配列の間に所望のタンパク質をコードする遺伝子を含むカセットテープ交換用ベクターと共に組換え酵素の存在下で培養して、マーカートンパク質遺伝子を所望のタンパク質をコードする遺伝子と交換する工程である、請求項1記載の方法。
- [請求項3] 工程(4)が、ゲノム編集により、該エフェクター細胞またはその前駆細胞に含まれるマーカートンパク質遺伝子に代えて、所望のタンパク質をコードする遺伝子を該エフェクター細胞またはその前駆細胞で発現するよう導入する工程である、請求項1記載の方法。
- [請求項4] さらに、マーカートンパク質陰性細胞を選択することによって、所望

のタンパク質を発現するエフェクター細胞あるいはその前駆細胞を選択する工程を有する、請求項 1 ～ 3 いずれかに記載の方法。

[請求項5] マーカートンパク質が、エフェクター細胞あるいはその前駆細胞の表面に発現する既知のリガンドまたはレセプターである、請求項 1 ～ 4 いずれかに記載の方法。

[請求項6] マーカートンパク質が、既知再構成済 T 細胞受容体（TCR）またはキメラ抗原受容体（CAR）をコードする遺伝子である、請求項 5 に記載の方法。

[請求項7] マーカートンパク質が、蛍光タンパク質である、請求項 1 ～ 4 いずれかに記載の方法。

[請求項8] 工程（1）で得られるカセットデッキ構造を有する材料細胞が、1つの材料細胞のゲノム内に、1つのカセットデッキ構造のみ有している、請求項 1 ～ 7 いずれかに記載の方法。

[請求項9] 工程（4）において、カセットデッキ構造を1つの細胞に1つ含有するエフェクター細胞あるいはその前駆細胞のクローンの各細胞に含まれるカセットテープ遺伝子を、複数種の所望のタンパク質をコードする遺伝子を含むカセットテープ遺伝子と同時に交換することによって、別個のタンパク質を発現するエフェクター細胞を複数種類同時に製造する、請求項 8 に記載の方法。

[請求項10] カセットテープ遺伝子とその上流と下流に隣接して組換え酵素標的遺伝子を含み、工程（4）においてエフェクター細胞あるいはその前駆細胞群と、複数種のカセットテープ交換用ベクターを同時に組換え酵素の存在下で培養する、請求項 9 に記載の方法。

[請求項11] 工程（4）において、マーカートンパク質をコードする遺伝子を含むカセットテープ遺伝子と複数種の所望のタンパク質をコードする遺伝子を含むカセットテープ遺伝子の交換をゲノム編集法にて行う、請求項 9 に記載の方法。

[請求項12] 材料細胞が、多能性幹細胞である、請求項 1 ～ 11 何れかに記載の

方法。

[請求項13] 材料細胞が、E S細胞またはi P S細胞である、請求項12記載の方法。

[請求項14] ゲノム内に、マーカートンパク質をコードする遺伝子を含むカセットテープ遺伝子をマーカートンパク質が発現可能なように有しており、外因性の薬剤耐性遺伝子を含まないカセットデッキ構造を1つの細胞につき1つ含有するエフェクター細胞またはその前駆細胞のクローンを提供する工程、および

該エフェクター細胞あるいはその前駆細胞のマーカートンパク質遺伝子を、複数種類の所望のタンパク質をコードする遺伝子に置き換える工程を有する、別個のタンパク質を発現するエフェクター細胞を複数種類同時に製造する方法。

[請求項15] カセットテープ遺伝子とその上流と下流に隣接して組換え酵素標的遺伝子を含み、マーカートンパク質をコードする遺伝子を含むカセットテープ遺伝子含有カセットデッキ構造を含むエフェクター細胞群と、複数種のタンパク質をコードする遺伝子をそれぞれに含む複数種のカセットテープ交換用ベクターとを同時に組換え酵素の存在下で培養し、別個のタンパク質を発現するエフェクター細胞を複数種同時に製造する、請求項14に記載の方法。

[請求項16] 該エフェクター細胞あるいはその前駆細胞のマーカートンパク質遺伝子を、複数種類の所望のタンパク質をコードする遺伝子に置き換える工程をゲノム編集法にて行う、請求項15に記載の方法。

[請求項17] エフェクター細胞が免疫細胞である、請求項1～16何れかに記載の方法。

[請求項18] 免疫細胞がNK細胞あるいはT細胞である、請求項17記載の方法。

[請求項19] マーカートンパク質が、既知再構成済T細胞受容体(TCR)またはキメラ抗原受容体(CAR)をコードする遺伝子である、請求項17または18に記載の方法。

- [請求項20] 所望のタンパク質がT C RまたはC A Rである、請求項17～19
 いずれかに記載の方法。
- [請求項21] 対象の免疫関連疾患の治療に使用する、請求項20に記載の方法に
 て得られるエフェクター細胞を含む組成物。