

明 細 書

発明の名称：

遺伝子改変多能性幹細胞、それ由来の免疫担当細胞、それらの製造方法及びそれらの用途

技術分野

[0001] 本発明は、遺伝子改変された多能性幹細胞、当該多能性幹細胞由来の免疫担当細胞、それらの製造方法及びそれらの用途等に関する。より詳細には、本発明は、細胞免疫療法のために機能が強化された遺伝子改変多能性幹細胞、当該多能性幹細胞由来のナチュラルキラー（NK）細胞もしくはその前駆細胞、多能性幹細胞に機能強化のための外来性遺伝子を導入することを含むそれらの製造方法、並びにそれらの細胞医薬としての用途等に関する。

背景技術

[0002] がん免疫に関与する細胞としてはT細胞などのリンパ球、NK細胞、ナチュラルキラーT（NKT）細胞などが挙げられるところ、これらの免疫細胞を用いた細胞療法の研究開発には半世紀以上の歴史がある。近年iPS細胞と分化誘導法の開発、iPS細胞の遺伝子改変法等の技術発展により、iPS細胞を遺伝子改変し目的の免疫細胞へ分化誘導することで高い機能を付与した免疫細胞を製造することができるようになった。これにより免疫細胞を用いた様々な治療戦略の構築が可能となった。

[0003] このように遺伝子改変された免疫細胞に係る細胞医薬品として、現時点ではCD19を標的としたCAR-T細胞によるもの（KymriahおよびYescarta）が承認されている。一方、NK細胞はがん細胞に対して前感作を必要とせず、また抗原認識に縛られることなく応答できる。NK細胞は、標的細胞を直接認識し殺傷するとともに、種々のサイトカイン産生を通じてT細胞やマクロファージなどを活性化させ、免疫機能を向上させる働きがある。また、NK細胞はT細胞と異なり、HLAタイプが完全にマッチしないドナー細胞を使用してもGvHDなどの問題を生じにくく、さらにT細胞による副作用であるサイトカイン放出症候群

(CRS)を引き起こしにくい。そこで、昨今のT細胞療法の臨床での良好な結果から、同じく抗腫瘍エフェクター細胞であるNK細胞を用いた免疫細胞療法についても期待が高まっている。

[0004] 実際に、改変NK細胞を用いた細胞医薬品を対象とした様々なclinical trialが存在する（非特許文献1）。例えばFate Therapeutics社は、固形がんを対象としてCD38をロックアウト（KO）しかつIL-15・IL-15受容体融合タンパク質およびCD16を発現させたiPS細胞由来の改変NK細胞を開発している（例えば、特許文献1）。武田薬品工業株式会社はThe University of Texas MD Anderson Cancer Center と共にIL-15を発現するCD19-CAR NK細胞を開発している（例えば、非特許文献2）。しかしながら、当局に承認されたものはまだ存在しない。

[0005] NK細胞において用いられる機能強化因子としては、上記Fate Therapeutics社や武田薬品工業株式会社の開発品に導入されているIL-15や、CD16などが知られている。IL-15は、NK細胞自らを増殖・活性化するとともに、周囲のT細胞も活性化する機能が知られている（非特許文献3－5）。またCD16は、NK細胞表面に発現することでNK細胞が媒介する抗体依存性細胞傷害活性（ADCC）作用に寄与することが知られている（非特許文献6）。そのため、既にNK細胞における機能が良く知られているこれらの因子をNK細胞に発現させ、さらにその機能を強化しようという試みは、上記Fate Therapeutics社や武田薬品工業株式会社の開発品をはじめとした様々な改変NK細胞で既に採用されている。

[0006] 一方、様々なケモカイン・ケモカイン受容体を免疫細胞に発現させ、その遊走能を高めることでがん細胞への攻撃能を高めようとする試みがある。例えば特許文献2には、CCR2などの様々なケモカイン・ケモカイン受容体を発現したT細胞を用いたがん免疫療法が開示されている。また特許文献3にはCCL19を種々のインターロイキンと共に発現させることで、T細胞の抗腫瘍活性が増強され増殖性が向上することが開示されている。さらに特許文献4には免疫活性因子を発現するCAR免疫細胞が開示されており、CAR免疫細胞としてN

K細胞も対象となる旨の記載がある。また、免疫活性因子としてIL-15とCCR2Bが列挙されている。

[0007] しかし、これらの開示はあくまでT細胞等の免疫細胞に当該因子を発現させてそれらの機能を強化する方法に関するもので、遺伝子改変したiPS細胞を利用したものではない。またいずれの文献にも、CCR2BとCCL19を組み合わせるN K細胞に導入することを示唆する記載はない。

先行技術文献

特許文献

- [0008] 特許文献1：WO 2019/126748
特許文献2：WO 2018/152572
特許文献3：WO 2020/045610
特許文献4：WO 2017/133633

非特許文献

- [0009] 非特許文献1：Nat Rev Drug Discov. 2020 Mar;19(3):200-218
非特許文献2：N Engl J Med. 2020 Feb 6; 382(6): 545-553
非特許文献3：J Exp Med. 1994 Oct 1; 180(4): 1395-1403
非特許文献4：Cancer Immunol Immunother. 2012 Sep; 61(9): 1451-1461
非特許文献5：Nat Rev Immunol. 2003 Apr; 3(4): 269-279
非特許文献6：Front Immunol. 2015 Jul 27; 6: 368

発明の概要

発明が解決しようとする課題

- [0010] 更なる治療上の選択肢となる遺伝子改変免疫細胞が求められている。したがって本発明の目的は、高い機能を有する遺伝子改変免疫担当細胞、特にiPS細胞等の多能性幹細胞由来の遺伝子改変NK細胞を提供することである。

課題を解決するための手段

- [0011] 本発明者らは上記の目的を達成すべく、ケモカイン・ケモカイン受容体をN K細胞で高発現させることを発想した。そこで、数多あるケモカイン・ケモカ

イン受容体の中から、ケモカイン受容体としてCCR2B、ケモカインとしてCCL19をそれぞれ選択し、これらを遺伝子改変により外因的にiPS細胞に導入した。該iPS細胞をNK細胞に分化誘導し、その機能を検証したところ、該改変NK細胞が想定した以上の高い機能を発揮することを見出した。免疫細胞において、ケモカインを含むサイトカインはがん免疫に関して二面性を有する場合があることが知られており、例えば、CCL2は免疫抑制細胞の動員を促進し、T細胞の機能を抑制し得る（例えば、Cancer Lett 2007 Jul 8;252(1):86-92.）。即ち、複数のケモカイン・ケモカイン受容体を組み合わせたとしても、期待するようなボーナス効果が得られるか否かは全くの未知数であり、本発明者らが見出したかかる知見は驚くべきものである。

本発明者らは、これらの知見に基づいてさらに研究を重ねた結果、本発明を完成させるに至った。

[0012] すなわち本発明は以下の通りである。

項 [1]

以下の (a) 及び (b) :

(a) CCケモカイン受容体2型B (CCR2B) をコードする外来性遺伝子

(b) CCケモカインリガンド19 (CCL19) をコードする外来性遺伝子

を発現する多能性幹細胞、あるいは当該多能性幹細胞由来のNK細胞又はその前駆細胞。

項 [2]

以下の (c) 及び／又は (d) :

(c) インターロイキン15 (IL-15) をコードする外来性遺伝子

(d) CD16をコードする外来性遺伝子

をさらに発現する、項 [1] に記載の細胞。

項 [3]

以下の (e) :

(e) NKG2D又はNKG2D-CARをコードする外来性遺伝子

をさらに発現する、項 [1] 又は [2] に記載の細胞。

項 [4]

(e) が NKG2D-CAR をコードする外来性遺伝子である、項 [3] に記載の細胞。

項 [5]

(e) が NKG2D をコードする外来性遺伝子であり、さらに

(f) DAP10 をコードする外来性遺伝子を共発現する、項 [3] に記載の細胞。

項 [6]

IL-15 をコードする外来性遺伝子を発現し、該 IL-15 が分泌型 IL-15 である、項 [2] ～ [5] のいずれか一項に記載の細胞。

項 [7]

IL-15 をコードする外来性遺伝子を発現し、IL-15 受容体 α (IL-15R α) をコードする外来性遺伝子を共発現する、項 [2] ～ [5] のいずれか一項に記載の細胞。

項 [8]

CD16 をコードする外来性遺伝子を発現し、該 CD16 が高親和性変異又は非切断変異を有する CD16 である、項 [2] ～ [7] のいずれか一項に記載の細胞。

項 [9]

CD16 が、F176V (F158V) 及び S197P から選ばれる変異を有するものである、項 [8] に記載の細胞。

項 [1 0]

項 [1] ～ [9] のいずれか一項に記載の細胞を含んでなる医薬。

項 [1 1]

がんの治療薬である、項 [1 0] に記載の医薬。

項 [1 2]

がん組織へのホーミング機能及び免疫担当細胞の動員機能が強化された遺

伝子改変細胞を製造する方法であって、以下の（a）及び（b）：

（a）CCR2Bをコードする外来性遺伝子

（b）CCL19をコードする外来性遺伝子

を多能性幹細胞に導入することを含む、方法。

項 [1 3]

前記外来性遺伝子が導入された多能性幹細胞をNK細胞もしくはその前駆細胞に分化誘導することをさらに含む、項 [1 2] に記載の方法。

項 [1 4]

以下の（a）及び（b）：

（a）CCR2Bをコードする外来性遺伝子

（b）CCL19をコードする外来性遺伝子

を含む、遺伝子改変細胞製造用コンストラクト。

項 [1 5]

外来性遺伝子が個別のコンストラクトに含まれる、項 [1 4] に記載のコンストラクト。

項 [1 6]

遺伝子発現制御領域と、該制御領域の制御下にある項 [1 4] 又は [1 5] に記載のコンストラクトを含む発現カセット。

項 [1 7]

項 [1 6] に記載の発現カセットを含むベクター。

項 [1 8]

発現カセットが一对のトランスポゾン逆向き反復配列に挟まれた構造を備える、項 [1 7] に記載のベクター。

項 [1 9]

項 [1 8] に記載のベクターと、トランスポゼース発現ベクターを含み、以下の（a）及び（b）：

（a）CCR2Bをコードする外来性遺伝子

（b）CCL19をコードする外来性遺伝子

を発現する遺伝子改変細胞の作製キット。

項〔20〕

トランスポゼースが、PiggyBacトランスポゼースである、項〔19〕に記載のキット。

項〔21〕

項〔1〕～〔9〕のいずれか一項に記載の細胞をがん患者に投与することを含む、がんの治療方法。

項〔22〕

がんを治療するための方法における使用のための、項〔1〕～〔9〕のいずれか一項に記載の細胞。

項〔23〕

がん治療用の医薬の製造における、項〔1〕～〔9〕のいずれか一項に記載の細胞の使用。

発明の効果

[0013] 本発明の改変NK細胞又はその前駆細胞は、特にがん免疫を目的とした機能を強化するための遺伝子を導入した多能性幹細胞に由来するものであり、CCR2B及びCCL19を発現することにより従来の細胞よりも優れたがん組織へのホーミング機能やT細胞などの免疫担当細胞を動員する機能を有し、高い抗腫瘍活性を有する。また、CD16を高発現させることで抗体依存性細胞傷害活性が増強され、あるいはIL-15、さらにはIL-15受容体 α を発現させることで持続性や増殖性なども向上している。また、NKG2D（-CAR）、さらにはDAP10を高発現させることにより、NKG2Dリガンド刺激による活性化シグナルの増強がもたらされる。

よって、本発明の改変NK細胞又はその前駆細胞を用いることで、免疫療法の治療効果を向上させることができる。さらに本発明の改変NK細胞又はその前駆細胞は、NK細胞それ自身だけでなく周囲のT細胞等の免疫細胞の活性化にも関与している可能性があり、それにより既存の治療法では効果が限定的であった疾患の治療に有用である可能性がある。

また、本発明の改変NK細胞又はその前駆細胞は遺伝子改変多能性幹細胞を分化誘導することで得られるので、NK細胞を遺伝子改変して得られる細胞よりも容易に大量の改変NK細胞又はその前駆細胞を製造することができる。

[0014] 本発明の所定の因子の組合せによれば、免疫細胞全般に対して、上述したようなNK細胞のみならず、T細胞、単球／マクロファージ、樹状細胞等に遺伝子導入し発現させる場合であっても、抗腫瘍活性の高い各種の改変免疫細胞が得られる。

図面の簡単な説明

[0015] [図1]CCR2B発現iNK細胞がCCL2に対する高い遊走活性を有することを示す図である。

[図2]CCL19発現iNK細胞がPBMCに対して遊走活性の亢進能を有することを示す図である。

[図3]CD16発現iNK細胞が、抗EGFR抗体（Cetuximab）存在下で増強された細胞傷害活性を有することを示す図である。

[図4]IL-15発現iNK細胞は、IL-15非存在下で培養しても細胞数が減少しないことを示す図である。

[図5]NKG2D発現iNK細胞は、A549細胞との共培養刺激によりIFN- γ 分泌活性が増強されることを示す図である。

[図6]CCR2B/CCL19共発現iNK細胞が、CCL2に対して高い遊走能を有することを示す図である。

[図7]CCR2B/CCL19共発現iNK細胞が、DCに対して高い誘因活性を有することを示す図である。

[図8]IL2sp/IL-15発現が、iNK細胞の増殖・生存を高めること、及び、全長あるいは可溶性IL-15R α を共発現させることによりその効果がさらに亢進することを示す図である。

発明を実施するための形態

[0016] (1) 本発明の遺伝子改変多能性幹細胞

本発明は、免疫担当細胞としての機能が強化された遺伝子改変NK細胞又は

その前駆細胞へと分化誘導されるのに適した遺伝子改変多能性幹細胞（以下、「本発明の改変多能性幹細胞」ともいう。）を提供する。当該多能性幹細胞は、以下の（a）及び（b）：

（a）CCケモカイン受容体2型B（CCR2B）をコードする外来性遺伝子

（b）CCケモカインリガンド19（CCL19）をコードする外来性遺伝子

を発現する多能性幹細胞である。

[0017] がん細胞等の標的細胞はCCケモカインリガンド2（CCL2）を発現しているので、その受容体であるCCR2Bを多能性幹細胞に導入・発現させることにより、該多能性幹細胞から分化誘導されたNK細胞をがん組織等の標的組織へとホーミングさせることができる。

[0018] 一方、CCL19はCCケモカイン受容体7（CCR7）のリガンドであり、CCR7はT細胞や樹状細胞で発現しているので、CCL19を多能性幹細胞に導入・発現させることにより、該多能性幹細胞から分化誘導されたNK細胞は、該細胞周囲のT細胞や樹状細胞等の免疫担当細胞の遊走を刺激し、NK細胞の効果を高めることができる。

[0019] 本明細書で使用する「多能性幹細胞」とは、分化多能性（pluripotency）を有する細胞のことをいい、ES細胞、iPS細胞などが例示されるが、好ましくはiPS細胞である。なお本明細書中、iPS細胞から分化誘導されたNK細胞を「iNK細胞」と呼称する。

[0020] ES細胞は自体公知の方法で作製することができる。ES細胞の作製方法としては、例えば、ヒトの胚盤胞ステージにおける内部細胞塊を培養する方法（例えば、Manipulating the Mouse Embryo : A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1994) を参照）、体細胞核移植によって作製された初期胚を培養する方法（Wilmut et al., Nature, 385, 810 (1997) ; Cibelli et al., Science, 280, 1256 (1998) ; 入谷明ら, 蛋白質核酸酵素, 44, 892 (1999) ; Baguisi et al., Nature Biotechnology, 17, 456 (1999) ; Wakayama et al., Nature, 394, 369 (1998) ; Wakayama et al., Nature Genetics, 22, 127 (1999) ; Wakayama et al., Proc.N

atl. Acad. Sci. USA, 96, 14984 (1999) ; Rideout III et al., Nature Genetics, 24, 109 (2000)) などが挙げられるが、これらに限定されない。また、ES細胞は、所定の機関より入手でき、さらには市販品を購入することもできる。例えば、ヒトES細胞株は、H1、H7、H9、H13およびH14については米国のWiCell Research Institute、HES1～6についてはオーストラリアのES Cell International、SA002、SA181およびSA611についてはスウェーデンのCellartis AB、HUES1～17については米国のHUES Cell Facility、KhES-1～KhES-5については京都大学再生医科学研究所、SEES1～SEES7については国立成育医療研究センターより、それぞれ入手可能である。ES細胞を体細胞核移植により作製する場合、体細胞の種類や体細胞を採取するソースは下記iPS細胞作製の場合に準ずる。

[0021] iPS細胞は、特定の初期化因子を、核酸（DNAもしくはRNA）またはタンパク質の形態で体細胞に導入することによって製造することができる、ES細胞とほぼ同等の特性、例えば分化多能性と自己複製による増殖能、を有する体細胞由来の人工の幹細胞である（Takahashi, K. 及び S. Yamanaka (2006) Cell, 126: 663-676; Takahashi, K. et al. (2007) Cell, 131: 861-872; Yu, J. et al. (2007) Science, 318: 1917-1920; Nakagawa, M. et al. (2008) Nat. Biotechnol. 26: 101-106; WO2007/069666)。

[0022] 本明細書中で使用する「体細胞」なる用語は、卵子、卵母細胞、ES細胞などの生殖系列細胞及び分化全能性細胞を除くあらゆるヒト細胞をいう。体細胞には、非限定的に、胎児の体細胞、新生児の体細胞、および成熟した健全なもしくは疾患性の体細胞のいずれも包含されるし、また、初代培養細胞、継代細胞、および株化細胞のいずれも包含される。具体的には、体細胞は、例えば（１）神経幹細胞、造血幹細胞、間葉系幹細胞、歯髄幹細胞等の組織幹細胞（体性幹細胞）、（２）組織前駆細胞、（３）リンパ球、上皮細胞、内皮細胞、筋肉細胞、線維芽細胞（皮膚細胞等）、毛細胞、肝細胞、胃粘膜細胞、腸細胞、脾細胞、膵細胞（膵外分泌細胞等）、脳細胞、肺細胞、腎細胞および脂肪細胞等の分化した細胞などが例示される。

[0023] 初期化因子は、ES細胞に特異的に発現している遺伝子、その遺伝子産物もしくはノンコーディング（non-coding）RNA、またはES細胞の未分化維持に重要な役割を果たす遺伝子、その遺伝子産物もしくはノンコーディングRNA、あるいは低分子化合物によって構成されてもよい。初期化因子に含まれる遺伝子として、例えば、Oct3/4、Sox2、Sox1、Sox3、Sox15、Sox17、Klf4、Klf2、c-Myc、N-Myc、L-Myc、Nanog、Lin28、Fbx15、ERas、ECAT15-2、Tcl1、beta-catenin、Lin28b、Sall1、Sall4、Esrrb、Nr5a2、Tbx3、Glis1等が例示される。これらの初期化因子は、単独で用いても良く、組み合わせて用いても良い。初期化因子の組み合わせとしては、W02007/069666、W02008/118820、W02009/007852、W02009/032194、W02009/058413、W02009/057831、W02009/075119、W02009/079007、W02009/091659、W02009/101084、W02009/101407、W02009/102983、W02009/114949、W02009/117439、W02009/126250、W02009/126251、W02009/126655、W02009/157593、W02010/009015、W02010/033906、W02010/033920、W02010/042800、W02010/050626、W02010/056831、W02010/068955、W02010/098419、W02010/102267、W02010/111409、W02010/111422、W02010/115050、W02010/124290、W02010/147395、W02010/147612、Huangfu, D. et al. (2008) Nat. Biotechnol., 26: 795-797、Shi, Y. et al. (2008) Cell Stem cell, 2: 525-528、Eminli, S. et al. (2008) Stem Cells, 26: 2467-2474、Huangfu, D. et al. (2008) Nat. Biotechnol., 26: 1269-1275、Shi, Y. et al. (2008) Cell Stem Cell, 3: 568-574、Zhao, Y. et al. (2008) Cell Stem Cell, 3: 475-479、Marson, A. (2008) Cell Stem Cell, 3: 132-135、Feng, B. et al. (2009) Nat. Cell Biol., 11: 197-203、Judson, R.L. et al. (2009) Nat. Biotechnol., 27: 459-461、Lyssiotis, C.A. et al. (2009) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 106: 8912-8917、Kim, J.B. et al. (2009) Nature, 461: 649-643、Ichida, J.K. et al. (2009) Cell Stem Cell, 5: 491-503、Heng, J.C. et al. (2010) Cell Stem Cell, 6: 167-74、Han, J. et al. (2010) Nature, 463: 1096-100、Mali, P. et al. (2010) Stem Cells, 28: 713-720及びMaekawa, M. et al. (2011) Nature, 474: 225-9に記載

載の組み合わせが例示される。

- [0024] iPS細胞コロニーの選択は、薬剤耐性とレポーター活性を指標とする方法（Cell, 126, 663-676 (2006)、Nature, 448, 313-317 (2007)）や目視による形態観察による方法（Cell, 131, 861-872 (2007)）により行うことができる。iPS細胞であることの確認は、各種ES細胞特異的遺伝子の発現やテラトーマ形成を指標として行うことができる。
- [0025] また、iPS細胞として、所定の機関、例えば、米国国立衛生研究所（NIH）、理化学研究所（理研）、京都大学等が樹立した各種ヒトiPS細胞株のいずれもが利用可能である。例えば、理研のHiPS-RIKEN-1A株、HiPS-RIKEN-2A株、HiPS-RIKEN-12A株、Nips-B2株等、京都大学の253G1株、253G4株、1201C1株、1205D1株、1210B2株、1383D2株、1383D6株、201B7株、409B2株、454E2株、606A1株、610B1株、648A1株、1231A31株、FfI-01s04株等が挙げられる。
- [0026] 本明細書において外来性遺伝子を導入するとは、外来性遺伝子をゲノムの標的部位に導入することにより外来性遺伝子を対象細胞において発現可能な状態にすることを意味する。外来性遺伝子を導入する具体的な手段としては、外来性遺伝子のDNAを常法に従って単離し、例えば、対象細胞の標的部位に外来性遺伝子のDNA断片を挿入することによって、結果的に外来性遺伝子が対象細胞内で発現するように構築したDNA配列を有するDNA鎖（以下、遺伝子導入用ターゲティングベクターと略記する）を、相同組換えにより対象細胞の標的部位に組み込ませる方法などが好ましく用いられ得る。相同組換え法によれば遺伝子挿入位置が固定されるので、ランダムインテグレーションが無ければ、クローン間での発現量の差、および、他遺伝子への影響が少ないことが期待される。
- [0027] 該相同組換え細胞は、例えば、対象細胞への上記ターゲティングベクターの導入により取得することができる。
- [0028] 例えば、遺伝子導入用ターゲティングベクターが、標的部位に外来性遺伝子のDNA断片（ヒトCCR2B遺伝子のcDNA（例えば、Refseq NM_001123396を参照）及びヒトCCL19遺伝子のcDNA（例えば、Refseq NM_006274を参照）の配列

情報に基づいて、常法によりクローニングすることができる)を挿入することにより、該外来性遺伝子が対象細胞内で発現すべく設計されたものである場合、当該ベクターは、例えば、以下のような構成をとることができる。

- [0029] まず、相同組換えにより、標的部位に外来性遺伝子のDNA断片が挿入されるために、遺伝子導入用ターゲティングベクターは、当該外来性遺伝子のDNA断片の5' 上流および3' 下流に、それぞれ標的部位と相同な配列 (5' アームおよび3' アーム) を含む必要がある。
- [0030] 遺伝子導入用ターゲティングベクターが染色体へ組み込まれた対象細胞を選択するためには、挿入される外来性遺伝子の他に、薬剤耐性遺伝子やレポーター遺伝子が遺伝子導入用ターゲティングベクターに含まれていることが好ましい。ここで薬剤耐性遺伝子としては、例えば、ネオマイシンホスホトランスフェラーゼII (nptII) 遺伝子、ハイグロマイシンBホスホトランスフェラーゼ (hph) 遺伝子などが、レポーター遺伝子としては、例えば、 β -ガラクトシダーゼ (lacZ) 遺伝子、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ (cat) 遺伝子などがそれぞれ挙げられるが、それらに限定されない。
- [0031] 薬剤耐性もしくはレポーター遺伝子は、対象細胞内で機能し得る任意の遺伝子発現制御領域の制御下にあることが好ましい。ここで遺伝子発現制御領域としては、例えば、SV40由来初期プロモーター、サイトメガロウイルス (CMV) ロングターミナルリピート (LTR)、ラウス肉腫ウイルス (RSV) LTR、マウス白血病ウイルス (MoMuLV) LTR、アデノウイルス (AdV) 由来初期プロモーター等のウイルスプロモーター、並びに β -アクチン遺伝子プロモーター、PGK遺伝子プロモーター、トランスフェリン遺伝子プロモーター等が挙げられるが、それらに限定されない。
- [0032] また、遺伝子導入用ターゲティングベクターは、薬剤耐性もしくはレポーター遺伝子の下流にpolyAシグナルを有していることが好ましく、例えば、ウイルス遺伝子由来、あるいは各種哺乳動物または鳥類の遺伝子由来のターミネーター配列を用いることができる。好ましくは、SV40由来のターミネー

ター配列などが用いられる。

[0033] 通常、細胞における遺伝子組換えは大部分が非相動的であり、導入されたDNAは染色体の任意の位置にランダムに挿入される。したがって、薬剤耐性やレポーター遺伝子の発現を検出するなどの選択（ポジティブ選択）によっては標的部位に相同組換えが生じたクローンのみを効率よく選択することができず、選択されたすべてのクローンについてサザンハイブリダイゼーション法もしくはPCR法による組込み部位の確認が必要となる。そこで、遺伝子欠損用ターゲティングベクターの標的部位と相同な配列の外側に、例えば、ガンシクロビル感受性を付与する単純ヘルペスウイルス由来チミジンキナーゼ（HSV-tk）遺伝子を連結しておけば、該ベクターがランダムに挿入された細胞はHSV-tk遺伝子を有するため、ガンシクロビル含有培地では生育できないが、相同組換えにより内在性遺伝子座にターゲティングされた細胞はHSV-tk遺伝子を有しないので、ガンシクロビル耐性となり選択される（ネガティブ選択）。あるいは、HSV-tk遺伝子の代わりに、例えばジフテリア毒素遺伝子を連結すれば、該ベクターがランダムに挿入された細胞は自身の産生する該毒素によって死滅するので（ポジティブ選択）、薬剤非存在下で相同組換え体を選択することもできる。

[0034] 対象細胞への遺伝子欠損用ターゲティングベクターの導入には、リン酸カルシウム共沈殿法、電気穿孔（エレクトロポレーション）法、リポフェクション法、レトロウイルス感染法、凝集法、顕微注入（マイクロインジェクション）法、遺伝子銃（パーティクルガン）法、DEAE-デキストラン法などのいずれも用いることができるが、上述のように、細胞における遺伝子組換えは大部分が非相動的であり、相同組換え体が得られる頻度は低いので、簡便に多数の細胞を処理できること等の点からエレクトロポレーション法が一般的に選択される。エレクトロポレーションには通常の動物細胞への遺伝子導入に使用されている条件をそのまま用いればよく、例えば、対数増殖期にある対象細胞をトリプシン処理して単一細胞に分散させた後、 $10^6 \sim 10^8$ 細胞/mlとなるように培地に懸濁してキュベットに移し、遺伝子欠損用ターゲッティ

ングベクターを10~100 μ g添加し、200~600V/cmの電気パルスを印加することにより行なうことができる。

[0035] 遺伝子欠損用ターゲティングベクターが組み込まれた対象細胞は、単一細胞を培養して得られるコロニーから分離抽出した染色体DNAをサザンハイブリダイゼーションまたはPCR法によりスクリーニングすることによっても検定することができるが、他のDNA断片として薬剤耐性遺伝子やレポーター遺伝子を使用した場合は、それらの発現を指標として細胞段階で形質転換体を選択することができる。例えば、ポジティブ選択用マーカー遺伝子としてnptII遺伝子を含むベクターを用いた場合、遺伝子導入処理後の対象細胞をG418などのネオマイシン系抗生物質を含有する培地中で培養し、出現した耐性コロニーをトランスフォーマントの候補として選択する。また、ネガティブ選択用マーカー遺伝子として、HSV-tk遺伝子を含むベクターを用いた場合、ガンシクロビルを含有する培地中で培養し、出現した耐性コロニーを相同組換え細胞の候補として選択する。得られたコロニーをそれぞれ培養プレートに移してトリプシン処理、培地交換を繰り返した後、一部を培養用として残し、残りをPCRもしくはサザンハイブリダイゼーションにかけて導入DNAの存在を確認する。

[0036] また、遺伝子導入用ターゲティングベクターとしてウイルスを用いる場合、外来性遺伝子およびポジティブ選択用マーカー遺伝子が5' および3' アームの間に挿入され、該アームの外側にネガティブ選択用マーカー遺伝子を含むDNAを含むウイルスで、対象細胞を感染させる方法が挙げられる。ウイルス、細胞の感染方法、ベクターが組み込まれた細胞の選択方法等は、遺伝子欠損用ターゲティングベクターで使用されるウイルス、方法と同一であってよい。

[0037] 遺伝子導入用ターゲティングベクターの標的部位は、外来性遺伝子を対象細胞において発現可能な状態にすることができる限り特に制限されないが、そのような部位としてゲノム内のセーフハーバー領域を挙げることができる。ここでセーフハーバー領域とは、外来性遺伝子が組み込まれても表現型

の変化が生じない部位であり、かつ多くの分化細胞においてその遺伝子座が開いており導入因子の発現が比較的安定であって、医薬品として用いられる細胞に外来性遺伝子を組み込むための標的部位として選択されるものである。このようなセーフハーバー領域としては、AAVS1 (Adeno-associated virus integration site 1) 領域、CCR5(C-C chemokine receptor5)領域、ROSA26領域などが挙げられる。セーフハーバー領域以外の部位に外来性遺伝子を導入した場合、導入された部位の遺伝子が破壊されることにより期待しない表現型が導出される、あるいは導入した外来性遺伝子の発現が抑制される、といった場合があるため、その細胞をどのような細胞に分化させて医薬品として用いるかに応じて、当該領域を慎重に選択する必要がある。セーフハーバー領域に外来性遺伝子を導入した場合、外来性遺伝子の組み込み位置が固定されるので、取得される相同組み換え体間での外来性遺伝子の発現量の差および他遺伝子への影響が少ないことが期待される。

[0038] 外来性遺伝子を導入するための別の一実施態様として、PiggyBac法が挙げられる。PiggyBac法では外来性遺伝子を含むDNA断片が組み込まれたトランスポゾンベクターおよびトランスポゼースを発現するトランスポゼース発現ベクターが用いられる。トランスポゾンベクターおよびトランスポゼース発現ベクターに含まれる遺伝子等は、上記の別々のベクターに分けて存在してもよいし、単一のベクターに含まれていてもよい。トランスポゾンベクターおよびトランスポゼース発現ベクターは、例えば、以下のような構成をとることができる。

[0039] トランスポゼースにより外来性遺伝子を含むDNA断片をトランスポゾンベクターから切り出すために、トランスポゾンベクターは、当該外来性遺伝子を含むDNA断片の5' 上流および3' 下流に、逆向き末端反復配列 (Inverted Terminal Repeat) を含む。トランスポゼースは、トランスポゾンベクターに含まれる末端逆位反復配列を認識し、末端逆位反復配列に挟まれた外来性遺伝子を含むDNA断片をトランスポゾンベクターから切り出す。

[0040] 外来性遺伝子が標的部位へ組み込まれた対象細胞を選択するためには、外

来性遺伝子を含むDNA断片に、薬剤耐性遺伝子やレポーター遺伝子がトランスポゾンベクターに含まれていることが好ましい。ここで薬剤耐性遺伝子およびレポーター遺伝子としては、遺伝子導入用ターゲティングベクターに使用されるものと同一であってよい。

[0041] 薬剤耐性およびレポーター遺伝子は、対象細胞内で機能し得る任意の遺伝子発現制御領域の制御下にあることが好ましい。ここで遺伝子発現制御領域としては、遺伝子導入用ターゲティングベクターに使用されるものと同一であってよい。

[0042] また、トランスポゾンベクターは、薬剤耐性もしくはレポーター遺伝子の下流にpolyAシグナルを有していることが好ましく、遺伝子導入用ターゲティングベクターに使用されるものと同一であってよい。

[0043] また、トランスポゼース発現ベクターは、トランスポゼースをコードする遺伝子の他に、薬剤耐性遺伝子、レポーター遺伝子、遺伝子発現制御領域、polyAシグナルなどを含んでよい。薬剤耐性遺伝子、レポーター遺伝子、遺伝子発現制御領域、polyAシグナルはトランスポゾンベクターに含まれるものと同一であってよい。

[0044] 対象細胞へのトランスポゾンベクターおよびトランスポゼース発現ベクターの導入には、遺伝子導入用ターゲティングベクターに使用される方法と同一の方法が使用されてよい。

[0045] 外来性遺伝子が標的部位へ組み込まれた細胞は、遺伝子導入用ターゲティングベクターが組み込まれた相同組換え細胞を選抜する方法と同一の方法で選抜されてよい。

[0046] 以上の通りに導入された外来性遺伝子のDNA断片を組み込んだトランスポゾンベクターとトランスポゼース発現ベクターによって、対象細胞のゲノムのトランスポゼース標的配列TTAAに該外来性遺伝子のDNA断片を組み込ませることができる。この方法では上記の遺伝子導入用ターゲティングベクターを用いた相同組換え法と異なり標的配列はTTAAであるため外来性遺伝子を組み込む部位を限定できないが、事後的にトランスポゼースを発現させることで

ゲノムに組み込んだ外来性遺伝子を痕跡を残すことなく除去することも可能である。

[0047] 本発明の改変多能性幹細胞は、以下の（c）及び／又は（d）：

（c）インターロイキン15（IL-15）をコードする外来性遺伝子

（d）CD16をコードする外来性遺伝子

をさらに発現するものであってもよい。

[0048] IL-15は、単球、マクロファージ、樹状細胞等により産生され、CTLやNK細胞といった殺腫瘍作用を示す細胞の増殖・活性化を引き起こす。したがって、IL-15遺伝子を多能性幹細胞に導入・発現させることにより、該多能性幹細胞から分化誘導されたNK細胞自体が活性化されるとともに、周囲のT細胞も活性化することができ、NK細胞の免疫機能をさらに増強させることができる。

[0049] 導入される外来性IL-15遺伝子としては特に制限はなく、例えば、W02020/045610に記載される種々の形態のものが挙げられるが、分泌型のIL-15をコードするものであることが好ましい。分泌型のIL-15としては、ネイティブなシグナルペプチドを含む天然の分泌型IL-15であってもよいが、例えばIL-2シグナルペプチド等の異種シグナルペプチドに置換された改変IL-15もまた好ましく使用され得る。

[0050] 本発明の改変多能性幹細胞の別の好ましい一実施態様においては、IL-15遺伝子とともにIL-15受容体 α （以下、「IL-15R α 」と記載する場合がある）をコードする外来性遺伝子が導入され、共発現している。当該遺伝子は、全長（膜結合型）IL-15R α をコードするものであってもよいし、可溶性（分泌型）IL-15R α をコードするものであってもよい。ここで、IL-15R α 遺伝子は、IL-15遺伝子とは別個の発現コンストラクトとして多能性幹細胞に導入されてもよいし、IL-15との融合タンパク質として発現するように構築された発現コンストラクトとして導入されてもよい。このようなIL-15の例としては、例えば、W02020/045610の記載を参照することができる。

[0051] CD16は、凝集したIgGのFc部分に対する低親和性の受容体で、標的細胞に特異的な抗体のFc部分に結合して、抗体依存性細胞傷害活性を誘導することが

できる。したがって、CD16遺伝子を多能性幹細胞に導入・発現させることにより、該多能性幹細胞から分化誘導されたNK細胞は、抗体依存性細胞傷害活性が増強され、より強力な殺腫瘍活性を発揮し得る。

[0052] CD16には、NK細胞の大部分や単球の一部などに発現する膜貫通型のCD16aと好中球に発現するGPIアンカー型のCD16bの2種類のアイソフォームが存在する。本発明において外来性遺伝子として用いられるCD16は抗体依存性傷害活性を誘導し得る限りいずれのアイソフォームをコードするものであってもよいが、好ましくはCD16aである。また、CD16遺伝子は野生型遺伝子であってもよいが、好ましい一実施態様においては、IgGのFc部分に対する親和性が向上した高親和性変異体であってもよいし、あるいは、ADAM17による分解に対して抵抗性を有する非切断変異体であってもよい。例えば、高親和性変異体として、176番目のフェニルアラニンがバリンで置換されたF176V（成熟型の158番目のフェニルアラニンがバリンで置換されたF158V）等が、非切断変異体として、197番目のセリンがプロリンで置換されたS197P等を挙げることができる。

[0053] 本発明の改変多能性幹細胞は、以下の（e）：

（e）NKG2D又はNKG2D-CARをコードする外来性遺伝子をさらに発現してもよい。

NKG2Dは、NK細胞に発現する活性化受容体であり、標的細胞のNKG2Dリガンドの刺激により活性化シグナルを伝達し、NK細胞の細胞傷害活性を増強し、またNK細胞におけるIFN- γ やTNF α 等のサイトカイン産生を増強する。したがって、NKG2D遺伝子を多能性幹細胞に導入・発現させることにより、該多能性幹細胞から分化誘導されたNK細胞の免疫担当細胞としての機能をさらに増強させることができる。

[0054] 導入されるNKG2D遺伝子としては、NK細胞に内因性のNKG2D遺伝子や機能が強化された改変型遺伝子を用いることができる。NKG2D遺伝子に加えて共役因子であるDAP10をコードする外来遺伝子を共発現させることで、NKG2Dの効果をさらに増大させることができる。あるいは、NKG2Dの細胞内ドメインにDAP1

0を繋いだ融合タンパク質をコードする遺伝子として導入してもよい。

[0055] あるいはまた、NKG2Dの細胞外ドメインとキメラ抗原受容体（CAR）の膜貫通ドメイン、共刺激ドメイン、シグナル伝達ドメインとを融合させたNKG2D-CARをコードする遺伝子を導入することもできる。ここで用いられるCARとしては、従来のCAR-T細胞に使用される膜貫通ドメイン、共刺激ドメイン、シグナル伝達ドメインの組み合わせを同様に用いることができるが、好ましくは、膜貫通ドメインがCD8a、共刺激ドメインが2B4、シグナル伝達ドメインがCD3zである。

[0056] 上記のIL-15（及びIL-15R α ）、CD16、NKG2Dをコードする外来性遺伝子は、CCR2BやCCL19をコードする外来性遺伝子と同様に発現コンストラクトを構築し、同様の方法を用いて多能性幹細胞に導入することができる。

[0057] （ⅠⅠ）本発明の改変NK細胞

このようにして得られた改変多能性幹細胞は、自体公知の方法、例えば、Matsubara et al. Biochem Biophys Res Commun. 2019 Jul 12;515(1):1-8.に記載の方法等により、NK細胞に分化誘導することができる。したがって、本発明はまた、本発明の改変多能性幹細胞から分化誘導されたNK細胞又はその前駆細胞（以下、前駆細胞も包括的に「本発明の改変NK細胞」ともいう。）を提供するものである。

[0058] 本発明の改変NK細胞は、少なくとも外来性のCCR2B及びCCL19を高発現しているので、CCL2を発現する標的組織（例、がん組織）に効率よくホーミングし、該標的細胞を殺傷することができ、また、周囲のCCR7を発現するT細胞や樹状細胞を遊走させて、相乗的な抗腫瘍活性を発揮し得る。また、一実施態様において、IL-15（及びIL-15R α ）、CD16、NKG2D（NKG2D/DAP10複合体、NKG2D-CARを含む）から選ばれる1以上の外来性遺伝子をさらに発現するので、これらの機能増強因子によりもたらされるさらなる機能強化が達成され得る。したがって、本発明の改変NK細胞は、例えばCCL2を発現する細胞を殺傷することにより治療効果を奏し得る任意の疾患に対する医薬として使用することができる。

[0059] 本発明の改変NK細胞を活性成分とする医薬は、該NK細胞を、対象に投与する前に適切な培地を使用して培養を行ってもよい。また、培地に刺激分子を添加して、NK細胞の活性化及び／又は増殖を維持増幅することもできる。さらに、培地中に血清や血漿を添加してもよい。これらの培地中への添加量は特に限定はないが、0体積%～20体積%が例示され、また培養段階に応じて使用する血清や血漿の量を変更することができる。例えば、血清又は血漿濃度を段階的に減らして使用することもできる。血清又は血漿の由来としては、自己又は非自己のいずれでも良いが、安全性の観点からは、自己由来のものが好ましい。

[0060] 本発明の改変NK細胞を活性成分とする医薬は、非経口的に対象に投与して用いることが好ましい。非経口的な投与方法としては、静脈内、動脈内、筋肉内、腹腔内、及び皮下投与などの方法が挙げられる。投与量は、対象の状態、体重、年齢等に応じて適宜選択されるが、通常、細胞数として、体重60kgの対象に対し、1回当たり、 $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^{10}$ 個となるように、好ましくは $1 \times 10^7 \sim 1 \times 10^9$ 個となるように、より好ましくは $5 \times 10^7 \sim 5 \times 10^8$ 個となるように投与される。また1回で投与してもよく、複数回にわたって投与してもよい。該医薬は、非経口投与に適した公知の形態、例えば注射又は注入剤とすることができる。該医薬は適宜薬理学的に許容できる賦形剤を含んでいてもよい。該医薬は細胞を安定に維持するために生理食塩水、リン酸緩衝生理食塩水（PBS）、培地等を含んでもよい。培地としては、RPMI、AIM-V、X-VIVO10などの培地が挙げられるがこれらに限定されない。また該医薬には医薬的に許容される担体（例：ヒト血清アルブミン）、保存剤等が安定化の目的で添加されていてもよい。

[0061] 本発明の改変NK細胞を活性成分とする医薬はがんの治療薬であり得る。該医薬の適用対象となるがんは特に制限されず、例えば、急性リンパ球性癌、胞巣状横紋筋肉腫、膀胱癌、骨癌、脳癌（例、髄芽細胞腫）、乳癌、肛門、肛門管若しくは肛門直腸の癌、眼の癌、肝内胆管の癌、関節の癌、頸部、胆嚢若しくは胸膜の癌、鼻、鼻腔若しくは中耳の癌、口腔の癌、外陰部の癌、

慢性骨髓性癌、結腸癌、食道癌、子宮頸癌、線維肉腫、消化管カルチノイド腫瘍、頭頸部癌（例、頭頸部扁平上皮癌）、下咽頭癌、腎臓癌、喉頭癌、白血病（例、急性リンパ芽球性白血病、急性リンパ球性白血病、慢性リンパ球性白血病、急性骨髄性白血病）、液性腫瘍、肝臓癌、肺癌（例、非小細胞肺癌）、リンパ腫（例、ホジキンリンパ腫、非ホジキンリンパ腫、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫、濾胞性リンパ腫）、悪性中皮腫、肥満細胞腫、黒色腫、多発性骨髄腫、上咽頭癌、卵巣癌、膵臓癌；腹膜、網及び腸間膜の癌；咽頭癌、前立腺癌、直腸癌、皮膚癌、小腸癌、軟組織癌、固形腫瘍、胃癌、精巣癌、甲状腺癌、尿管癌などが挙げられるが、それらに限定されない。

[0062] (I I I) CAR-NK細胞

また、本発明の改変NK細胞に抗原特異的なCARを導入することにより（CAR-NK細胞）、該抗原を発現する細胞に特異的な細胞免疫療法剤とすることができる。

[0063] 本発明の改変NK細胞からのCAR-NK細胞の作製には、自体公知の方法を適宜選択して用いることができる。

[0064] CARは、T細胞シグナル伝達ドメインに連結された抗体の抗原結合ドメイン（例、scFv）を含む、人工的に構築されたハイブリッドタンパク質である。CARの特徴には、モノクローナル抗体の抗原結合特性を利用して、非MHC拘束的様式でT細胞の特異性及び反応性を、選択された標的に対して転換する能力が挙げられる。非MHC拘束的抗原認識は、CARを発現するNK細胞に、抗原プロセッシングと無関係に抗原を認識する能力を与え、それにより、腫瘍エスケープの主要な機構を迂回する。

[0065] 本発明の改変NK細胞に導入されるCARは、改変NK細胞が認識すべき表面抗原（例、がん抗原ペプチド、がん細胞で発現が亢進している表面受容体等）を特異的に認識し得る抗体の抗原結合ドメイン、細胞外ヒンジドメイン、膜貫通ドメイン及び細胞内T細胞シグナル伝達ドメインを含む。

[0066] 抗原結合ドメインが特異的に認識する表面抗原としては、例えば、各種がん（例、急性リンパ球性癌、胞巣状横紋筋肉腫、膀胱癌、骨癌、脳癌（例、

髄芽細胞腫)、乳癌、肛門、肛門管若しくは肛門直腸の癌、眼の癌、肝内胆管の癌、関節の癌、頸部、胆嚢若しくは胸膜の癌、鼻、鼻腔若しくは中耳の癌、口腔の癌、外陰部の癌、慢性骨髄性癌、結腸癌、食道癌、子宮頸癌、線維肉腫、消化管カルチノイド腫瘍、頭頸部癌(例、頭頸部扁平上皮癌)、下咽頭癌、腎臓癌、喉頭癌、白血病(例、急性リンパ芽球性白血病、急性リンパ球性白血病、慢性リンパ球性白血病、急性骨髄性白血病)、液性腫瘍、肝臓癌、肺癌(例、非小細胞肺癌)、リンパ腫(例、ホジキンリンパ腫、非ホジキンリンパ腫、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫、濾胞性リンパ腫)、悪性中皮腫、肥満細胞腫、黒色腫、多発性骨髄腫、上咽頭癌、卵巣癌、膵臓癌;腹膜、網及び腸間膜の癌;咽頭癌、前立腺癌、直腸癌、皮膚癌、小腸癌、軟組織癌、固形腫瘍、胃癌、精巣癌、甲状腺癌、尿管癌など)で発現が亢進している表面受容体、例えば、CD19、EGF受容体、BCMA、CD30、Her2、ROR1、MUC16、CD20、mesothelin、B-cell mutation antigen、CD123、CD3、prostate specific membrane antigen (PSMA)、CD33、MUC-1、CD138、CD22、GD2、PD-L1、CEA、chondroitin sulfate proteoglycan-4、IL-13受容体 α 鎖、IgG κ 軽鎖等や、がん抗原ペプチド(例、WT1、GPC3、MART-1、gp100、NY-ESO-1、MAGE-A4等由来のペプチド)等が挙げられるが、それらに限定されない。

[0067] 本発明において使用される抗原結合ドメインとしては、標的抗原を特異的に認識し得る抗体フラグメントであれば、特に制限はないが、CAR作製の容易さを考慮すれば、軽鎖可変領域と重鎖可変領域とをリンカーペプチドを介して連結した一本鎖抗体(scFv)であることが望ましい。一本鎖抗体における軽鎖可変領域と重鎖可変領域の配置は、両者が機能的な抗原結合ドメインを再構成できる限り特に限定されないが、通常N末端側から軽鎖可変領域ーリンカーペプチドー重鎖可変領域の順序で設計され得る。リンカーペプチドとしては、一本鎖抗体の作製に通常使用されている自体公知のリンカーペプチドを用いることができる。軽鎖可変領域をコードするDNA、重鎖可変領域をコードするDNAは、例えば、それぞれ抗体産生細胞から軽鎖遺伝子、重鎖遺伝子をクローニングし、それらを鋳型としてPCRを行う等して調製するか、あるいは

既存の抗体の配列情報から化学的に合成することができる。得られた各DNA断片とリンカーペプチドをコードするDNAとを、適当な方法によりライゲーションすることにより一本鎖抗体をコードするDNAを取得することができる。抗原結合ドメインのN末端側には、CARを改変NK細胞の細胞表面に提示させるために、リーダー配列がさらに付加されていることが好ましい。

[0068] 細胞外ヒンジドメイン及び膜貫通ドメインとしては、当該技術分野で通常使用されるT細胞表面分子由来のドメインを適宜使用することができ、例えば、CD8 α やCD28由来の各ドメインが挙げられるが、それらに限定されない。

[0069] 細胞内シグナル伝達ドメインとしては、例えば、CD3 ζ 鎖を有するもの、膜貫通ドメインとCD3 ζ 鎖との間に、CD28、CD134、CD137、LCK、DAP10、ICOS、4-1BBなどの共刺激伝達モチーフをさらに有するもの、2つ以上の共刺激伝達モチーフを有するもの等が挙げられるが、それらに限定されず、当該技術分野で通常使用される任意のドメインを組み合わせ使用することができる。

[0070] 細胞外ヒンジドメイン、膜貫通ドメイン及び細胞内シグナル伝達ドメインをコードする核酸配列情報は、当該技術分野で周知であり、当業者であれば、それらの情報に基づいて、T細胞から容易に各ドメインをコードするDNA断片を取得することができる。

そのようにして得られた、抗原結合ドメイン、細胞外ヒンジドメイン、膜貫通ドメイン及び細胞内シグナル伝達ドメインをそれぞれコードするDNA断片を、常法により連結することにより、CARをコードするDNAを取得することができる。

[0071] 得られたCARをコードするDNAは、そのまま、あるいは、適当なリンカー及び／又は核移行シグナル等を付加した後に、NK細胞内で機能的な遺伝子発現制御領域を含む発現ベクター、好ましくはプラスミドベクターに挿入することができる。NK細胞で機能的な遺伝子発現制御領域としては、哺乳動物細胞で構成的なSR α プロモーター、SV40プロモーター、LTRプロモーター、CMV（サイトメガロウイルス）プロモーター、RSV（ラウス肉腫ウイルス）プロモーター、MoMuLV（モロニーマウス白血病ウイルス）LTR、HSV-TK（単純ヘルペス

ウイルスチミジンキナーゼ) プロモーターなどを用いることができるが、それらに限定されない。また、NK細胞特異的に発現するCD16、CD56、NKG2D等の遺伝子プロモーターを用いることもできる。

[0072] (I V) 改変多能性幹細胞及び改変NK細胞の製造方法及びそのための試薬・キット

本発明はまた、がん組織へのホーミング機能及び免疫担当細胞の動員機能が強化された遺伝子改変細胞を製造する方法であって、以下の (a) 及び (b) :

(a) CCR2Bをコードする外来性遺伝子

(b) CCL19をコードする外来性遺伝子

を多能性幹細胞に導入することを含む、方法を提供する。

[0073] 上記製造方法において、外来性遺伝子の調製、遺伝子導入、遺伝子改変多能性幹細胞の選択等は上記と同様にして行うことができる。また、IL-15 (及びIL-15R α)、CD16、NKG2D (NKG2D/DAP10複合体、NKG2D-CARを含む) から選ばれる1以上の外来遺伝子をさらに導入してもよい。

[0074] 得られた改変多能性幹細胞は、自体公知の方法により、NK細胞もしくはその前駆細胞に分化誘導することができる。

[0075] 本発明はまた、以下の (a) 及び (b) :

(a) CCR2Bをコードする外来性遺伝子

(b) CCL19をコードする外来性遺伝子

を含む、遺伝子改変細胞製造用コンストラクトを提供する。

[0076] ここで、2つの外来性遺伝子は2AペプチドやIRESを介してポリシストニックな発現を可能にするように構築してもよいが、好ましくは個別のコンストラクトに含まれるように設計される。

[0077] これらのコンストラクトは、機能的な遺伝子発現制御領域 (例、プロモーター、エンハンサー、ポリアデニレーションシグナル等) の制御下におかれ、発現カセットを形成する。2つの外来性遺伝子が個別のコンストラクトに含まれる場合、これらのコンストラクトを含む発現カセットは、単一のベクタ

一上に担持されてもよいし、別個のベクター上に担持されてもよい。

[0078] 好ましい一実施態様において、発現カセットは一对のトランスポゾン逆向き反復配列に挟まれた構造を備えるベクター上に担持される。該トランスポゾンベクターは、トランスポゼース発現ベクター、好ましくはPiggyBacトランスポゼース (PBase) 発現ベクターと組み合わせることにより、細胞の染色体上に目的の外来性遺伝子を組み込むことができる。したがって、本発明はまた、上記発現カセットを含むトランスポゾンベクターとトランスポゼース発現ベクターとを含み、以下の (a) 及び (b) :

(a) CCR2Bをコードする外来性遺伝子

(b) CCL19をコードする外来性遺伝子

を発現する遺伝子改変細胞の作製キットを提供する。

[0079] 以下に実施例を挙げて本発明をさらに具体的に説明するが、それらは単なる例示であって、本発明を何ら限定するものではない。

実施例

[0080] 製造例 1 : 遺伝子改変 iPS 細胞の製造

iPS細胞の親株としては、iPS細胞クローン06E(TC-1133HKK_06E_MCB)を用いた。この親株を以下、“未編集iPS細胞”とする。この未編集iPS細胞に下記目的遺伝子を強制発現させた。遺伝子導入法としては、PiggyBac法を用いた。また、各因子のcDNA強制発現には、常時活性型のEF1 alpha (EF1A) プロモーター領域を用いた。

[0081] 各目的遺伝子を発現するプラスミドDNAとして、以下を準備した。

#CCR2B発現PiggyBacプラスミド

#CCL19発現PiggyBacプラスミド

#IL-15発現PiggyBacプラスミド

#IL-15受容体 α 発現PiggyBacプラスミド

#分泌型IL-15受容体 α 発現PiggyBacプラスミド

#シグナルペプチド改変IL-15発現PiggyBacプラスミド

#CD16a発現PiggyBacプラスミド

#NKG2D発現PiggyBacプラスミド

#NKG2D-CAR発現PiggyBacプラスミド

#DAP10発現PiggyBacプラスミド

[0082] またPiggyBac転移酵素を発現するプラスミドDNAとして、以下を準備した。

#hPBase発現プラスミド

[0083] PiggyBac法による遺伝子導入に用いた各プラスミドDNAは以下の方法で構築した。PiggyBacの3' ITR配列（配列番号1）-制限酵素のマルチクローニングサイト（MCS）-PiggyBacの5' ITR配列（配列番号2）からなるコンストラクトを人工合成し、それをpHSG298プラスミド（タカラバイオ社）の制限酵素サイトに入れた。作製したPiggyBac ITRプラスミドのMCSに、EF1Aプロモーター（PCR増幅）、各目的遺伝子（配列は後述）、IRES（人工合成：配列番号3）、薬剤耐性遺伝子（配列は後述）、およびhuman Growth Hormone poly A（人工合成：配列番号4）を入れることで、各目的遺伝子を発現するプラスミドDNAを構築した。なおEF1AプロモーターPCR増幅のPCRテンプレートとして、pBApo-EF1a Pur DNAプラスミド（タカラバイオ社）を用いた。

[0084] 各目的遺伝子（人工合成）としては、CCR2B（人工合成：配列番号5）、CCL19（人工合成：配列番号6）、IL-15（人工合成：配列番号7）、全長IL-15受容体 α （IL-15R α ）（人工合成：配列番号8）、可溶性IL-15受容体 α （以下、「sIL-15R α 」と記載する場合がある）（人工合成：配列番号9）、シグナルペプチド改変IL-15（以下、「IL-2sp/IL-15」と記載する場合がある）（人工合成：配列番号10）、CD16a（人工合成：配列番号11）、NKG2D（人工合成：配列番号12）、NKG2D-CAR（人工合成：配列番号13）およびDAP10（人工合成：配列番号14）のいずれか、あるいはこれらの組合せを用いた。

薬剤耐性遺伝子としては、Puromycin（人工合成：配列番号15）、Hygromycin（人工合成：配列番号16）、Zeocin（人工合成：配列番号17）、Neomycin（人工合成：配列番号18）のいずれかを用いた。

[0085] またhPBase発現プラスミドDNAは以下の方法で構築した。pHSG298プラスミ

ド（タカラバイオ社）MCS内の制限酵素サイトに、EF1Aプロモーター（PCRにより増幅）、Human codon-optimizeしたPBase（人工合成、配列番号19）、およびhuman Growth Hormone poly A（人工合成：配列番号4）を入れて構築した。

[0086] 未編集iPS細胞06Eに、上記の導入因子発現プラスミドDNA（目的の細胞に合わせ、1個もしくは複数）およびhPBase発現プラスミドDNAを、エレクトロポレーション法（Neon Transfection System、Thermo Fisher Scientific）を用いて導入した。プラスミドDNA導入翌日以降に、Puromycin・Hygromycin・Zeocin・Neomycin薬剤1種類から4種類入りの液体培地で3日間から7日間培養し、薬剤耐性細胞の選別を実施した。この様にして導入因子発現iPS細胞プールを作製した（表1）。

[0087]

[表1]

細胞株名	HGEC-0020	HGEC-0024	HGEC-0025
親株	未編集iPS細胞	HLAクラスI KO iPS細胞	未編集iPS細胞
導入因子	CD16a CCR2B IL-15 NKG2D DAP10 CCL19	CD16a CCR2B IL-15 NKG2D DAP10 CCL19	CD16a CCR2B IL-2sp/IL-15 NKG2D DAP10 CCL19
	実施例 1	実施例 2	実施例 3

親株	未編集iPS細胞	未編集iPS細胞	未編集iPS細胞
導入因子	CCR2B	CCL19	CD16a
	実施例 4	実施例 5	実施例 6

親株	未編集iPS細胞	未編集iPS細胞	未編集iPS細胞
導入因子	IL-15	NKG2D-CAR	NKG2D DAP10
	実施例 7	実施例 8	実施例 9

親株	未編集iPS細胞	未編集iPS細胞	未編集iPS細胞
導入因子	IL-2sp/IL-15 IL-15R α	IL-2sp/IL-15 sIL-15R α	CCR2B CCL19
	実施例 10	実施例 11	実施例 12

親株	未編集iPS細胞
導入因子	IL-2sp/IL-15
	実施例 13

[0088] 必要に応じて上記iPS細胞プールからシングルセルクローニングを実施し、導入因子発現iPS細胞クローンを単離した。

[0089] 製造例 2 : NK細胞への分化誘導

製造例 1 で作製した目的遺伝子を発現させたiPS細胞プールもしくはそのク

ローンを拡大培養後、それぞれNK細胞へと分化誘導した。iPS細胞からNK細胞への分化誘導は文献 (Matsubara et al. Biochem Biophys Res Commun. 2019 Jul 12;515(1):1-8.) に従った。NK細胞への分化能評価のひとつとして、NK細胞特異的タンパク質の細胞表面発現をフローサイトメトリー法により測定した。NK細胞のマーカーとして、抗CD56抗体 (クローンB159、BD Biosciences、Catalogue No. 555518)、抗CD16抗体 (クローン3G8、BD Biosciences、Catalogue No. 555407) を用いた。

その結果、いずれの目的遺伝子発現iPS細胞もNK細胞へと分化させることができた。

[0090] 試験例 1 : CCR2B発現iNK細胞の細胞遊走活性

製造例 2 で得られたCCR2B発現iPS細胞から分化誘導したiNK細胞 (実施例 4) において、CCL2リコンビナントタンパク質含有培地に対する細胞遊走活性を、Boyden chamberを用いて調べた。

各iNK細胞をCFSE (5- or 6-(N-Succinimidylloxycarbonyl)fluorescein 3', 6'-diacetate) でラベルした後、 5×10^5 cellsでupper chamberに播種し、リコンビナントCCL2を100 ng/mL含む培地を入れたlower chamberにupper chamberを浸漬し、37°C、5% CO₂ 下で4時間細胞培養を行った。その後、upper chamberからlower chamberに遊走した各iNK細胞の数を、CFSE蛍光を指標にフローサイトメーターを用いて計測した。その結果を図 1 に示す。

[0091] lower chamberに遊走した細胞数は、CCR2B発現iNK細胞のほうが、空ベクターを導入したiPSCから分化誘導したコントロールiNK細胞と比べて顕著に多かった。これらのことから、CCR2B発現iNK細胞はCCL2に対する高い遊走活性を持つことがわかった。

[0092] 試験例 2 : CCL19発現細胞の細胞遊走活性

製造例 2 でCCL19発現iPS細胞から分化誘導したiNK細胞 (実施例 5) の培養上清に対する末梢血単核細胞 (PBMC) の細胞遊走活性をBoyden chamberを使用して調べた。

解凍・回復培養したPBMCをCFSEでラベルした後、upper chamberに 4×10^5 ce

11s/500 μ L/wellで播種した。これを、CCL19発現iNK細胞の培養上清、あるいは空ベクターが導入されたiPSCから分化誘導したコントロールiNK細胞の培養上清を入れたlower chamberに浸漬し、37℃、5% CO₂ で1.5時間培養した。その後、lower chamberに遊走したPBMCをCFSE蛍光を指標として蛍光顕微鏡で撮影するとともに、フローサイトメーターを用いて細胞数計測を行った。その結果を図2に示す。

[0093] CCL19発現iNK細胞の培養上清では、空ベクターを導入したiPS細胞から分化誘導したコントロールiNK細胞の培養上清と比べ、PBMCに対する高い遊走活性が観察された。以上の結果から、CCL19発現iNK細胞が、PBMCに対して遊走活性の亢進能を有することがわかった。

[0094] 試験例3：CD16発現iNK細胞の細胞傷害活性

製造例2で得られたCD16発現iPS細胞から分化誘導したiNK細胞（実施例6）において、細胞表面にCD16が正しく発現されていることをフローサイトメトリーで確認した（図3左）。

次に、当該CD16発現iNK細胞において、EGFRを発現するA549を標的細胞とした細胞傷害活性を、抗EGFR抗体（Cetuximab）の存在下で、LDHアッセイ（タカラバイオLDH Cytotoxicity Detection Kit）を用いて調べた。具体的には、接着させたA549細胞を、抗EGFR抗体（Cetuximab）存在下で、iNK細胞と4時間共培養し、iNK細胞による細胞傷害によりA549細胞から放出されたLDH量を、その酵素活性を指標に測定した。結果を図3右に示す。空ベクター導入iPS細胞から分化誘導したコントロールiNK細胞と比べ、CD16発現iNK細胞において2倍程度高い細胞傷害活性（ADCC活性）が確認された。

[0095] 試験例4：IL-15発現iNK細胞のサイトカイン分泌活性

製造例2で得られたIL-15発現iPS細胞から分化誘導したiNK細胞（実施例7）を 2×10^6 cells/mLで播種し、IL-15の非存在下で4日間培養を行った後、得られる生細胞数を細胞計数装置NucleoCounter NC-200を用いて計測した。ネガティブコントロールとして空ベクターを導入したiPS細胞より分化誘導したiNK細胞を用いた。結果を図4に示す。

[0096] コントロールiNK細胞と比べ、IL-15発現iNK細胞では2倍以上の数の細胞が観察された。よって、IL-15を発現させることで、iNK細胞の増殖・生存が高まることが分かった。

[0097] 試験例 5 : NKG2D発現iNK細胞のIFN γ 分泌活性

製造例 2 で得られた様々な態様のNKG2D発現iNK細胞における、IFN γ 産生について調べた。各NKG2D-iNK細胞 (NKG2D-CAR iNK細胞 (実施例 8)、NKG2D/DAP10共発現iNK細胞 (実施例 9)) を、ULBP2等のNKG2Dリガンドを発現するA549細胞と24時間、共培養した後に培養上清を回収し、ELISAによりIFN γ の発現量を確認した。

[0098] A549細胞との共培養の結果、いずれのNKG2D-iNK細胞においても、空ベクターを導入したiPS細胞から分化誘導したコントロールiNK細胞と比べ、IFN γ の産生量増加が顕著に認められた (図 5)。以上の結果から、いずれのNKG2D発現iNK細胞においても、NKG2D特異的なIFN γ 産生の亢進が見られることがわかった。

[0099] 試験例 6 : CCR2B/CCL19共発現iNK細胞の細胞遊走活性

製造例 2 で得られたCCR2B/CCL19共発現iPS細胞から分化誘導したiNK細胞 (実施例 12) において、CCL2リコンビナントタンパク質を含む培地に対する細胞遊走活性を、Incucyte Clearview 96-well plate for chemotaxis (Sartorius)を用いて調べた。このプレートもupper chamberとlower chamberに分かれており、Boyden chamberの時と同様の原理で細胞遊走を評価できる。

[0100] 各iNK細胞をDiO (3,3'-Diocadecyloxycarbocyanine perchlorate) でラベルした後、 1×10^4 cellsをupper chamberに播種し、 $1 \mu\text{g/mL}$ のリコンビナントCCL2添加あるいは無添加の培地が入ったlower chamberに浸漬した。その後、 37°C 、5% CO_2 下で培養し、2時間ごとに30時間、upper chamberに残っている細胞を、DiOの蛍光を指標に定量した。その結果を図 6 に示す。

[0101] CCR2B/CCL19共発現iNK細胞においては、lower chamberへのCCL2添加によりupper chamber内での蛍光減少が、CCL2非添加時と比べ顕著に観察された。この結果は、CCR2B/CCL19共発現iNK細胞が、CCL2依存的にupper chamberからlo

wer chamberに遊走したことを示している。一方、空ベクターを導入したiPSCから分化誘導したコントロールiNK細胞では、CCL2依存的なupper chamberでの蛍光減少は見られなかった。これらのことから、CCR2B/CCL19共発現iNK細胞はCCL2に対して高い遊走能を示すことがわかった。

[0102] 試験例 7 : CCR2B/CCL19共発現細胞の細胞遊走活性

製造例 2 で得られたCCR2B/CCL19共発現iPS細胞から分化誘導したiNK細胞（実施例 1 2）の培養上清に対する樹状細胞（DC）の細胞遊走活性をIncucyte Clearview 96-well plate for chemotaxis (Sartorius)を用いて調べた。

[0103] 末梢血単核細胞より分離したCD14陽性細胞（単球）から分化誘導したDCをDiOでラベルした後、upper chamberに 8.4×10^3 cellsを播種した。これを、 $10 \mu\text{g/mL}$ の抗CCL19抗体（クローンA15093C、BioLegend、Catalogue No. 612803）存在下あるいは非存在下で、CCR2B/CCL19共発現iNK細胞の培養上清、あるいは空ベクターが導入されたiPSCから分化誘導したコントロールiNK細胞の培養上清を入れたlower chamberに浸漬した。その後、 37°C 、5% CO_2 で培養し、2時間間隔で72時間、upper chamberに残っているDCを、DiOの蛍光を指標に定量した。その結果を図 7 に示す。

[0104] CCR2B/CCL19共発現iNK細胞の培養上清をlower chamberに入れた場合、コントロールiNK細胞の培養上清を入れた時と比べ、upper chamber内の蛍光の減少が明瞭に観察された。また、この蛍光の減少は、抗CCL19抗体の添加により抑制された。このことは、CCR2B/CCL19共発現iNK細胞の培養上清に対して、DCがCCL19依存的に遊走したことを示している。以上の結果から、CCR2B/CCL19共発現iNK細胞が、DCに対して高い誘因活性を持つことがわかった。

[0105] 試験例 8 : IL2sp/IL-15、全長IL-15R α および可溶性IL-15R α 発現の効果

製造例 2 で得られたIL2sp/IL-15発現iPS細胞から分化誘導したiNK細胞（実施例 1 3）、IL2sp/IL-15・全長IL-15R α 共発現iNK細胞（実施例 1 0）、IL2sp/IL-15・可溶性IL-15R α 共発現iNK細胞（実施例 1 1）およびコントロールとして空ベクターを導入したiPSCから分化誘導したiNK細胞を、IL-15非存在下で7日間培養した。培養4日目と7日目に、生細胞数を細胞計数装置NucleoCo

unter NC-200を用いて計測した。その結果を図8に示す。測定値は播種時の細胞数に対する％で示した。

- [0106] コントロールiNK細胞と比べ、IL2sp/IL-15発現iNK細胞、IL2sp/IL-15・全長IL-15R α 共発現iNK細胞、IL2sp/IL-15・可溶性IL-15R α 共発現iNK細胞では、非常に多くの数の生細胞が観察された。また、IL2sp/IL15単独発現iNKと比べ、全長IL-15R α および可溶性IL-15R α 共発現iNK細胞において、より多くの生細胞が計測された。以上の結果から、IL2sp/IL-15発現が、iNK細胞の増殖・生存を高めること、さらには、全長あるいは可溶性IL-15R α を共発現させることで、その効果がさらに亢進することがわかった。

産業上の利用可能性

- [0107] 本発明の改変多能性幹細胞及び改変NK細胞は、細胞免疫療法、特にがん免疫療法のための活性成分及びその供給原料として有用である。
- [0108] 本出願は、日本で出願された特願2021-184197（出願日：2021年11月11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。

請求の範囲

- [請求項1] 以下の（a）及び（b）：
- （a）CCケモカイン受容体2型B（CCR2B）をコードする外来性遺伝子
- （b）CCケモカインリガンド19（CCL19）をコードする外来性遺伝子
- を発現する多能性幹細胞、あるいは当該多能性幹細胞由来のNK細胞又はその前駆細胞。
- [請求項2] 以下の（c）及び／又は（d）：
- （c）インターロイキン15（IL-15）をコードする外来性遺伝子
- （d）CD16をコードする外来性遺伝子
- をさらに発現する、請求項1に記載の細胞。
- [請求項3] 以下の（e）：
- （e）NKG2D又はNKG2D-CARをコードする外来性遺伝子
- をさらに発現する、請求項1又は2に記載の細胞。
- [請求項4] （e）がNKG2D-CARである、請求項3に記載の細胞。
- [請求項5] （e）がNKG2Dであり、さらに
- （f）DAP10をコードする外来性遺伝子
- を共発現する、請求項3に記載の細胞。
- [請求項6] IL-15をコードする外来性遺伝子を発現し、該IL-15が分泌型IL-15である、請求項2～5のいずれか一項に記載の細胞。
- [請求項7] IL-15をコードする外来性遺伝子を発現し、IL-15受容体 α （IL-15R α ）をコードする外来性遺伝子を共発現する、請求項2～5のいずれか一項に記載の細胞。
- [請求項8] CD16をコードする外来性遺伝子を発現し、該CD16が高親和性変異又は非切断変異を有するCD16である、請求項2～7のいずれか一項に記載の細胞。
- [請求項9] CD16が、F176V（F158V）及びS197Pから選ばれる変異を有するものである、請求項8に記載の細胞。
- [請求項10] 請求項1～9のいずれか一項に記載の細胞を含んでなる医薬。

- [請求項11] がんの治療薬である、請求項10に記載の医薬。
- [請求項12] がん組織へのホーミング機能及び免疫担当細胞の動員機能が強化された遺伝子改変細胞を製造する方法であって、以下の（a）及び（b）：
- （a）CCR2Bをコードする外来性遺伝子
 - （b）CCL19をコードする外来性遺伝子
- を多能性幹細胞に導入することを含む、方法。
- [請求項13] 前記外来性遺伝子が導入された多能性幹細胞をNK細胞もしくはその前駆細胞に分化誘導することをさらに含む、請求項12に記載の方法。
- [請求項14] 以下の（a）及び（b）：
- （a）CCR2Bをコードする外来性遺伝子
 - （b）CCL19をコードする外来性遺伝子を含む、
- 遺伝子改変細胞製造用コンストラクト。
- [請求項15] 外来性遺伝子が個別のコンストラクトに含まれる、請求項14に記載のコンストラクト。
- [請求項16] 遺伝子発現制御領域と、該制御領域の制御下にある請求項14又は15に記載のコンストラクトを含む発現カセット。
- [請求項17] 請求項16に記載の発現カセットを含むベクター。
- [請求項18] 発現カセットが一对のトランスポゾン逆向き反復配列に挟まれた構造を備える、請求項17に記載のベクター。
- [請求項19] 請求項18に記載のベクターと、トランスポゼース発現ベクターを含み、以下の（a）及び（b）：
- （a）CCR2Bをコードする外来性遺伝子
 - （b）CCL19をコードする外来性遺伝子
- を発現する遺伝子改変細胞の作製キット。
- [請求項20] トランスポゼースが、PiggyBacトランスポゼースである、請求項19に記載のキット。