明　細　書

発明の名称 ： ＮＫ細胞の増幅方法

技術分野

［0001］　本発明は、高い細胞傷害活性を有するナチュラルキラー細胞（ＮＫ細胞）を、高い純度及び高い増幅倍率で増幅する方法と、該方法によって得られるＮＫ細胞を含む医薬品組成物とに関する。

背景技術

［0002］　ＮＫ細胞は、ＭＨＣクラスＩ分子を発現する正常細胞は攻撃しないで、ＭＨＣクラスＩ分子の発現が低下及び欠損した細胞を主に攻撃する。そこで癌及び感染症の細胞療法に同種ＮＫ細胞を用いると、ＧＶＨ（Ｇｒａｆｔ－ｖｅｒｓｕｓ－ｈｏｓｔ）病の副作用を回避できる利点がある。実際、Ｍｉｌｌｅｒら（非特許文献１）及びＲｕｂｎｉｔｚら（非特許文献２）の報告によると、癌患者をレシピエントとし、その近縁の健常者のドナーの新鮮な末梢血単核球をＮＫ細胞を濃縮したうえで移植したとき、移植されたＮＫ細胞は、レシピエントに副作用を起こすことなく、一時的に生着し、細胞傷害活性を保持した。しかし、ＮＫ細胞の移植療法の有効性を示す臨床治験の報告はまだない。その理由の１つは、ドナーからリンパ球アフェレーシスで回収できる細胞数に限度があるため、癌細胞及び病原体感染細胞のような標的細胞を死滅させるのに十分な数のＮＫ細胞を標的細胞が死滅するまでの期間レシピエント体内に滞留させることができないからである。

［0003］　正常な成人の末梢血の１回のアフェレーシスからは約１×１０^{10}個の単核球が回収でき、末梢血単核球中のＮＫ細胞の構成比率を約７％とすると、７×１０^{8}個のＮＫ細胞が得られる（非特許文献３）。一方、ＮＫ細胞の移植には、１×１０^{5}個／ｋｇないし２×１０^{7}個／ｋｇ（非特許文献１）か、５×１０^{5}個／ｋｇないし８．１×１０^{7}個／ｋｇ（非特許文献２）かのオーダーのＮＫ細胞が用いられる。患者の体重を６０ｋｇとすると、６×１０^{6}個ないし４．８×１０^{9}個のＮＫ細胞が必要となる。これは、正常な成人の末梢血の

１回のアフェレーシスから得られるＮＫ細胞の０．００８６倍ないし６．８６倍に相当する。しかし、例えば非特許文献２によると、ＮＫ細胞の生着期間は投与されたＮＫ細胞の数とは相関がみられず、２日ないし１８９日で、中央値は１０日にすぎなかった。すると、癌細胞及び病原体感染細胞のような標的細胞を死滅させるのに十分な数のＮＫ細胞を、標的細胞が死滅するまでの期間レシピエント体内に滞留させるためには、ＮＫ細胞の移植が頻繁に繰り返される必要があり、これは患者に大きな負担となる。

[0004] そこで、ドナーから得たＮＫ細胞をいったん試験管内で培養増幅して、標的細胞を死滅させるのに十分なＮＫ細胞を得る技術の開発が進められている。Ｔｅｒｕｎｕｍａ，Ｈ．ら（特許文献１）は、ヒトＣＤ３に対するアゴニスト抗体であるＯＫＴ３と、ＩＬ－２と、抗ＣＤ１６抗体との存在下で健常者の末梢血単核球を１３日間培養して、ＮＫ細胞を純度８１．２％、１３０倍に増幅した。また、Ｋ５６２細胞に対する前記ＮＫ細胞の細胞傷害活性（Ｅ：Ｔ＝３：１）は６６％だった。Ｔａｎａｋａ，Ｊ．ら（特許文献２）は、ＩＬ－２、ＩＬ－１５、抗ＣＤ３抗体、５％のヒトＡＢ型血清、タクロリムス及びダルテパリンが添加された培地を用いる方法によって、健常者の末梢血単核球細胞を２１日間培養して、ＮＫ細胞を純度７３．４％、６２６８倍に増幅した。また、Ｋ５６２細胞に対する前記ＮＫ細胞の細胞傷害活性（Ｅ：Ｔ＝１：１）は約５５％だった。Ｃａｒｌｅｎｓ，Ｓ．ら（非特許文献４）は、ヒトＣＤ３に対するアゴニスト抗体であるＯＫＴ３と、ＩＬ－２との存在下で健常者の末梢血単核球を２１日間培養して、ＮＫ細胞を純度５５％、１９３倍に増幅したと報告した。また、Ｋ５６２細胞に対する前記ＮＫ細胞の細胞傷害活性（Ｅ：Ｔ＝１：１）は４５％だった。Ａｌｉｃｉ，Ｅ．ら（非特許文献５）は、同様の条件でミエローマ患者の末梢血単核球を２０日間培養して、ＮＫ細胞を純度６５％、１６２５倍に増幅したと報告した。また、Ｋ５６２細胞に対する前記ＮＫ細胞の細胞傷害活性（Ｅ：Ｔ＝１：１）は約１０％だった。Ｆｕｊｉｓａｋｉ，Ｈ．ら（非特許文献６）は、ＮＫ細胞を活性化する因子を発現するように遺伝的に改変された白血病細胞をフ

ィーダー細胞として用いる培養条件で健常者の末梢血単核球を２１日間培養して、ＮＫ細胞を純度９６．８％、２７７倍に増幅したと報告した。また、Ｋ５６２細胞に対する前記ＮＫ細胞の細胞傷害活性（Ｅ：Ｔ＝１：１）の最大値は約９０％だった。

[0005] Ｔｅｒｕｎｕｍａ，Ｈ．ら（特許文献１）、Ｔａｎａｋａ，Ｊ．ら（特許文献２）、Ｃａｒｌｅｎｓ，Ｓ．ら（非特許文献４）及びＡｌｉｃｉ，Ｅ．ら（非特許文献５）の方法で増幅されたＮＫ細胞の細胞傷害活性（Ｅ：Ｔ＝１：１）は、それぞれ、６６％、約５５％、４５％及び約１０％であった。したがって、従来技術では、ＮＫ細胞の細胞傷害活性が低いため、治療効果が低く、ＮＫ細胞の投与数が増大するので好ましくない。Ｆｕｊｉｓａｋｉ，Ｈ．ら、（非特許文献６）の方法では、増幅されたＮＫ細胞の細胞傷害活性は約９０％（最大値）であった。しかし、遺伝的に改変された腫瘍細胞がフィーダー細胞として用いられるため、該細胞が最終産物に混入するリスクがあるので好ましくない。

先行技術文献

特許文献

[0006] 特許文献1：特開２００７－２９７２９１号公報

特許文献2：特願２０１１－１４０５０４号出願明細書

非特許文献

[0007] 非特許文献1：Ｍｉｌｌｅｒ，Ｊ．Ｓ．ら、Ｂｌｏｏｄ、１０５：３０５１（２００５）

非特許文献2：Ｒｕｂｎｉｔｚ，Ｊ．Ｅ．ら、Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｏｎｃｏｌ．、２８：９５５（２０１０）

非特許文献3：Ｃｈｏ，Ｄ．及びＣａｍｐａｎａ，Ｄ．、Ｋｏｒｅａｎ Ｊ．Ｌａｂ．Ｍｅｄ．、２９：８９（２００９）

非特許文献4：Ｃａｒｌｅｎｓ，Ｓ．ら、Ｈｕｍ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．、６２：１０９２（２００１）

非特許文献5：Ａｌｉｃｉ，Ｅ．ら、Ｂｌｏｏｄ、１１１：３１５５（２００

８）

非特許文献6：Ｆｕｊｉｓａｋｉ，Ｈ．ら、Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ．、６９：４０１０（２００９）

発明の開示

発明が解決しようとする課題

[0008] そこで、フィーダー細胞を用いないで、臍帯血からでも、末梢血からでも、高い細胞傷害活性を有するＮＫ細胞を高純度で増幅できる技術を開発する必要がある。

課題を解決するための手段

[0009] 本発明はＮＫ細胞の増幅方法を提供する。本発明のＮＫ細胞の増幅方法は、ＮＫ細胞を含む細胞集団を調製するステップと、前記ＮＫ細胞を含む細胞集団からＴ細胞を除去するステップと、前記Ｔ細胞が除去された残りの細胞を、２５００ＩＵ／ｍＬないし２８１３ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む培地で培養するステップとを含む。

[0010] 本発明のＮＫ細胞の増幅方法において、前記ＮＫ細胞を含む細胞集団から前記Ｔ細胞を除去するステップは、ＣＤ３陽性細胞を除去するステップによって達成される場合がある。

[0011] 本発明のＮＫ細胞の増幅方法は、前記ＮＫ細胞を含む細胞集団から造血前駆細胞を除去するステップを含む場合がある。

[0012] 本発明のＮＫ細胞の増幅方法において、前記ＮＫ細胞を含む細胞集団から前記造血前駆細胞を除去するステップは、ＣＤ３４陽性細胞を除去するステップによって達成される場合がある。

[0013] 本発明のＮＫ細胞の増幅方法において、前記培地は、自家血清、ＡＢ型血清、及び／又は、血清アルブミンを含む場合がある。

[0014] 本発明のＮＫ細胞の増幅方法において、前記ＮＫ細胞を含む細胞集団を調製するステップは、被験者から採取された血球細胞から単核球を分離するステップによって達成される場合がある。

[0015] 本発明のＮＫ細胞の増幅方法において、前記血球細胞は、末梢血、臍帯血

、骨髄及び／又はリンパ節から採取される場合がある。

[0016] 本発明のＮＫ細胞の増幅方法において、前記血球細胞は末梢血からアフェレーシス法により採取される場合がある。

[0017] 本発明のＮＫ細胞の増幅方法において、前記ＮＫ細胞を含む細胞集団は、胚性幹細胞、成体幹細胞及び人工多能性幹（ｉＰＳ）細胞からなるグループから選択されるいずれかの幹細胞由来の造血幹細胞と、臍帯血由来の造血幹細胞と、末梢血由来の造血幹細胞と、骨髄血由来の造血幹細胞と、臍帯血単核球と、末梢血単核球とからなる群から選択される少なくとも１種類の細胞から調製される場合がある。前記ＮＫ細胞を含む細胞集団のドナーは、レシピエントである患者自身か、該患者の近縁者か、患者とは血縁関係のない者かに由来する場合がある。前記ＮＫ細胞は、レシピエントの主要組織適合性抗原（ＭＨＣ）と、キラー免疫グロブリン様受容体（Ｋｉｌｌｅｒ Ｉｍｍｕｎｏｇｌｏｂｕｌｉｎ－ｌｉｋｅ Ｒｅｃｅｐｔｏｒ：ＫＩＲ）とが不一致であるドナーに由来する場合がある。

[0018] 本発明は、本発明の増幅方法によって調製されるＮＫ細胞を含む、細胞療法のための医薬品組成物を提供する。本発明の医薬品組成物は、増幅されたＮＫ細胞の他に、ＮＫ細胞前駆体、Ｔ細胞、ＮＫＴ細胞、造血前駆細胞等を含む場合がある。

[0019] 本発明の医薬品組成物は、感染症及び／又は癌を治療するために用いられる場合がある。

[0020] 本発明の医薬品組成物は、本発明の増幅方法によって調製されるＮＫ細胞と異なるＨＬＡ遺伝子型を有する、患者に投与される場合がある。

[0021] 本発明は、前記ＮＫ細胞を含む細胞集団を調製するステップと、前記ＮＫ細胞を含む細胞集団からＴ細胞を除去するステップと、前記Ｔ細胞が除去された残りの細胞を、２５００ＩＵ／ｍＬないし２８１３ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む培地で培養するステップと、前記残りの細胞から増幅されたＮＫ細胞を患者に移植するステップとを含む、細胞療法を提供する。前記細胞療法は、前記ＮＫ細胞を含む細胞集団から造血前駆細胞を除去するステップを含

む場合がある。前記ＮＫ細胞を患者に移植するステップにおいて、増幅されたＮＫ細胞は、ＮＫ細胞前駆体、Ｔ細胞、ＮＫＴ細胞、造血前駆細胞等とともに移植される場合がある。本発明の細胞療法は、感染症及び／又は癌を治療及び／又は予防するために用いられる場合がある。本発明の細胞療法は、本発明の増幅方法によって調製されるＮＫ細胞と異なるＨＬＡ遺伝子型を有する患者に移植するステップを含む場合がある。本発明の細胞療法において、前記ＮＫ細胞を患者に移植するステップは、本発明の医薬品組成物を患者に投与するステップによって達成される場合がある。

[0022] 本発明の細胞療法において、前記ＮＫ細胞を含む細胞集団は、胚性幹細胞、成体幹細胞及び人工多能性幹（ｉＰＳ）細胞からなるグループから選択されるいずれかの幹細胞由来の造血幹細胞と、臍帯血由来の造血幹細胞と、末梢血由来の造血幹細胞と、骨髄血由来の造血幹細胞と、臍帯血単核球と、末梢血単核球とからなる群から選択される少なくとも１種類の細胞から調製される場合がある。前記ＮＫ細胞を含む細胞集団のドナーは、レシピエントである患者自身か、該患者の近縁者か、患者とは血縁関係のない者かに由来する場合がある。前記ＮＫ細胞は、レシピエントの主要組織適合性抗原（ＭＨＣ）と、キラー免疫グロブリン様受容体（Ｋｉｌｌｅｒ Ｉｍｍｕｎｏｇｌｏｂｕｌｉｎ－ｌｉｋｅ Ｒｅｃｅｐｔｏｒ：ＫＩＲ）とが不一致であるドナーに由来する場合がある。

[0023] 本明細書において「ＮＫ細胞」とは、ＣＤ３陰性ＣＤ５６陽性の単核球をいい、特にＭＨＣクラスＩ分子の発現が少ないか、該発現が消失している細胞に対する細胞傷害活性を有する。

[0024] 本発明の増幅方法において、前記ＮＫ細胞を含む細胞集団は、当業者に知られたさまざまな手順を用いて調製することができる。例えば、臍帯血及び末梢血のような血液から単核球を回収する際には、比重遠心法を用いることができる。またＮＫ細胞は、免疫磁気ビーズを用いて採取することができる。さらに前記ＮＫ細胞は、細胞表面マーカーに対する特異的抗体で免疫蛍光染色を行い、ＦＡＣＳ（Ｆｌｕｏｒｅｓｃｅｎｃｅ ａｃｔｉｖａｔｅｄ

ｃｅｌｌ　ｓｏｒｔｅｒ）又はフローサイトメーターを用いて単離・同定できる。また、前記ＮＫ細胞は、Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ社から販売されるＤｙｎａｌ社製Ｄｙｎａｂｅａｄｓ（商標）や、ミルテニーバイオテック社のＣｌｉｎｉＭＡＣＳ（商標）を含むがこれらに限定されない免疫磁気ビーズを用いて、細胞表面抗原ＣＤ３及び／又はＣＤ３４を発現する細胞を分離除去して調製されてもかまわない。また、Ｔ細胞及び／又は造血前駆細胞に対する特異的結合パートナーを利用して、Ｔ細胞及び／又は造血前駆細胞を選択的に傷害又は死滅させる場合がある。なお、前記Ｔ細胞を前記単核球から除去するステップは、他の細胞タイプ、例えば、造血前駆細胞、Ｂ細胞及び／又はＮＫＴ細胞をＴ細胞とともに除去するステップであってもかまわない。造血前駆細胞を前記単核球から除去するステップは、他の細胞タイプ、例えば、Ｔ細胞、Ｂ細胞及び／又はＮＫＴ細胞を造血前駆細胞とともに除去するステップであってもかまわない。

[0025] 本発明の増幅方法において、臍帯血及び末梢血から分離された単核球は凍結保存され、患者への移植時期に応じて解凍され、ＮＫ細胞の増幅に供される場合がある。あるいは、前記単核球は、本発明のＮＫ細胞の増幅方法によって増幅される途中か、増幅が終わった後かに凍結され、患者への移植時期に応じて解凍され、患者への移植に供される場合がある。血球細胞の凍結及び解凍は当業者に周知のいかなる方法を用いてもかまわない。前記細胞の凍結には、いずれかの市販の細胞凍結保存液が用いられる場合がある。

[0026] 本発明の細胞療法において、生きているＮＫ細胞を懸濁するための溶液は、例えば、生理食塩水、リン酸緩衝生理食塩水（ＰＢＳ）、培地、血清等が一般的である。前記溶液は、医薬品及び医薬部外品として薬学的に許容される担体を含む場合がある。本発明のＮＫ細胞療法は、ＮＫ細胞に感受性を有するさまざまな疾患の治療及び／又は予防に適用することができる。前記疾患は、例えば、口腔癌、胆嚢癌、胆管癌、肺癌、肝臓癌、大腸癌、腎臓癌、膀胱癌、白血病や、ウイルス、細菌等による感染症を含むが、これらに限定されない。本発明の細胞療法は、単独か、あるいは外科療法、化学療法、放

射線療法等と組み合わせて実施される場合がある。本発明の細胞療法において、ＮＫ細胞は、例えば、静脈、動脈、皮下、腹腔内等への投与によって移植される場合がある。

[0027] 本発明のＮＫ細胞を調製するための細胞培養用培地は、ＫＢＭ５０１培地（コージンバイオ株式会社）、ＣｅｌｌＧｒｏ　ＳＣＧＭ培地（セルジェニックス、岩井化学薬品株式会社）、Ｘ－ＶＩＶＯ１５培地（ロンザ、タカラバイオ株式会社）、ＩＭＤＭ、ＭＥＭ、ＤＭＥＭ、ＲＰＭＩ－１６４０等を含むが、これらに限定されない。

[0028] 前記培地には、インターロイキン－２（ＩＬ－２）が、本発明の目的を達成できる濃度で添加される場合がある。前記ＩＬ－２の濃度は、２５００ＩＵ／ｍＬないし２８１３ＩＵ／ｍＬの場合がある。前記ＩＬ－２は、ヒトのアミノ酸配列を有することが好ましく、安全上、組換えＤＮＡ技術で生産されることが好ましい。

[0029] 本明細書において、ＩＬ－２の濃度は、国内標準単位（ＪＲＵ）及び国際単位（ＩＵ）で示される場合がある。１ＩＵが約０．６２２ＪＲＵであるから、１７５０ＪＲＵ／ｍＬは約２８１３ＩＵ／ｍＬである。

[0030] 前記培地には、被験者の自家血清、ＢｉｏＷｈｉｔｔａｋｅｒ社その他から入手可能なヒトＡＢ型血清や、日本赤十字社から入手可能な献血ヒト血清アルブミンが添加される場合がある。前記自家血清及び前記ヒトＡＢ型血清は１ないし１０％の濃度で添加されることが好ましく、前記献血ヒト血清アルブミンは１ないし１０％の濃度で添加されることが好ましい。前記被験者は、健常者と、前記疾患に罹患した患者との場合がある。

[0031] 前記培地には、ＮＫ細胞の増幅効果を損なわないことを条件として、適切なタンパク質、サイトカイン、抗体、化合物その他の成分が含まれる場合がある。前記サイトカインは、インターロイキン３（ＩＬ－３）、インターロイキン７（ＩＬ－７）、インターロイキン１２（ＩＬ－１２）、インターロイキン－１５（ＩＬ－１５）、インターロイキン－２１（ＩＬ－２１）、幹細胞因子（ＳＣＦ）、及び／又は、ＦＭＳ様チロシンキナーゼ３リガンド（

ＦＩｔ３Ｌ）の場合がある。前記ＩＬ－３、ＩＬ－７、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－２１、ＳＣＦ及びＦＩｔ３Ｌは、ヒトのアミノ酸配列を有することが好ましく、安全上、組換えＤＮＡ技術で生産されることが好ましい。前記培地の交換は、所望のＮＫ細胞の細胞数が得られることを条件として、培養開始後いつ行われてもかまわないが、３－５日毎が好ましい。

[0032] 本発明の増幅方法において、培養容器は、商業的に入手可能なディッシュ、フラスコ、プレート、マルチウェルプレートを含むが、これらに限定されない。培養条件は、ＮＫ細胞の増幅効果を損なわないことを条件として特に限定されないが、３７°Ｃ、５％CO_2及び飽和水蒸気雰囲気下の培養条件が一般的である。本発明の目的はＮＫ細胞を大量に調製することであるため、前記培地で培養する期間が長いほどより多くのＮＫ細胞が得られるので有利である。培養期間は、ＮＫ細胞を所望の細胞数まで増幅することを条件として、特に限定されない。

[0033] 本発明の増幅方法において、前記ＮＫ細胞を含む細胞集団は、ＮＫ細胞に加えて、ＮＫ細胞前駆体、Ｔ細胞、ＮＫＴ細胞、造血前駆細胞等を含む場合がある。所望のＮＫ細胞が、増幅後、例えば、比重遠心法、免疫磁気ビーズ、ＦＡＣＳ、フロー・サイトメトリー等を用いて選択される場合がある。例えば、前記ＮＫ細胞は、抗ＣＤ３抗体、抗ＣＤ１６抗体、抗ＣＤ３４抗体、抗ＣＤ５６抗体、抗ＣＤ６９抗体、抗ＣＤ９４抗体、抗ＣＤ１０７ａ抗体、抗ＫＩＲ３ＤＬ１抗体、抗ＫＩＲ３ＤＬ２抗体、抗ＫＩＲ２ＤＬ３抗体、抗ＫＩＲ２ＤＬ１抗体、抗ＫＩＲ２ＤＳ１抗体、抗ＫＩＲ２ＤＬ５抗体、抗ＮＫｐ４６抗体、抗ＮＫｐ３０抗体、抗ＮＫＧ２Ｄ抗体等を用いて、前記細胞集団から選択的に分離される場合がある。前記抗体は、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体等の場合がある。ＮＫ細胞の選択は、Ｔ細胞、ＮＫＴ細胞、造血前駆細胞その他の細胞を選択的に除去して行われる場合がある。

[0034] 本発明の方法及び医薬品組成物の製造は、医薬品及び医薬部外品の製造管理及び品質管理規則に適合した条件（ｇｏｏｄ　ｍａｎｕｆａｃｔｕｒｉｎｇ　ｐｒａｃｔｉｃｅ、ＧＭＰ）で実施されることが好ましい。

[0035] 増幅されたＮＫ細胞の細胞傷害活性は、当業者に周知の方法によって評価できる。前記細胞傷害活性は、前記ＮＫ細胞（エフェクター細胞）と、放射性物質、蛍光色素等で標識した標的細胞とをインキュベーションした後、放射線量又は蛍光強度を測定することによって定量することが一般的である。前記標的細胞は、Ｋ５６２細胞、急性骨髄性白血病細胞、慢性骨髄性白血病細胞の場合があるが、これらに限定されない。増幅されたＮＫ細胞の性質は、ＲＴ?ＰＣＲ法、固相雑種形成法、ＥＬＩＳＡ法、ウエスタンブロット法、免疫沈降法、免疫比濁法、ＦＡＣＳ、フロー・サイトメトリー法等を用いて調べられる場合がある。

[0036] 本発明において、臍帯血及び末梢血の全血の採取と、自家血清の調製と、前記全血からの単核球の調製と、該単核球の培養前後の細胞数の測定と、培養前後の前記単核球中のＮＫ細胞、Ｔ細胞、造血前駆細胞その他の細胞タイプの構成比率の測定と、ＮＫ細胞の増幅倍率の算出と、測定誤差や有意性についての統計解析とは、当業者に周知のいかなる方法を使用して実施されてもかまわない。

[0037] 本明細書において言及される全ての文献はその全体が引用により本明細書に取り込まれる。

図面の簡単な説明

[0038] [図1A]ＣＤ３陽性細胞の除去前に、ＣＤ３及びＣＤ５６に対する抗体で２重染色しフロー・サイトメトリー法で測定した結果図。

[図1B]ＣＤ３陽性細胞の除去後に、ＣＤ３及びＣＤ５６に対する抗体で２重染色しフロー・サイトメトリー法で測定した結果図。

[図2A]健常者５人の末梢血中の単核球から分離されたＣＤ３陰性細胞の細胞数それぞれの増殖曲線。

[図2B]健常者５人の末梢血中の単核球から分離されたＣＤ３陰性細胞の細胞数の平均増殖曲線。

[図3A]健常者５人の末梢血中の単核球から分離されたＣＤ３陰性細胞の増幅倍率それぞれの増殖曲線。

[図3B]健常者５人の末梢血中の単核球から分離されたＣＤ３陰性細胞の増幅倍率の平均増殖曲線。

[図4A]健常者５人の末梢血中の単核球から分離されたＮＫ細胞（ＣＤ３陰性／ＣＤ５６陽性）の増幅倍率それぞれの増殖曲線。

[図4B]健常者５人の末梢血中の単核球から分離されたＮＫ細胞（ＣＤ３陰性／ＣＤ５６陽性）の増幅倍率の平均増殖曲線。

[図5A]健常者５人から分離されたＮＫ細胞（ＣＤ３陰性／ＣＤ５６陽性）の培養細胞全体に対する構成比率の経時的な変化をフロー・サイトメトリー法で測定した結果図。

[図5B]健常者５人から分離されたＮＫ細胞（ＣＤ３陰性／ＣＤ５６陽性）の培養細胞全体に対する構成比率の経時的な変化をフロー・サイトメトリー法で測定し、平均化した結果図。

[図6A]進行癌（口腔癌、胆嚢癌及び胆管癌）の患者３人から分離されたＮＫ細胞（ＣＤ３陰性／ＣＤ５６陽性）の培養細胞全体に対する構成比率の経時的な変化をフロー・サイトメトリー法で測定した結果図。

[図6B]進行癌（口腔癌、胆嚢癌及び胆管癌）の患者３人から分離されたＮＫ細胞（ＣＤ３陰性／ＣＤ５６陽性）の増幅倍率の平均増殖曲線。

[図7]ＣＤ６９のフロー・サイトメトリー解析結果を比較したグラフ。

[図8]ＣＤ６９のフロー・サイトメトリー解析結果を比較した平均蛍光強度（ＭＦＩ）の測定値のグラフ。

[図9]ＣＤ１６のフロー・サイトメトリー解析結果を比較したグラフ。

[図10]ＣＤ１６のフロー・サイトメトリー解析結果を比較した平均蛍光強度（ＭＦＩ）の測定値のグラフ。

[図11]さまざまな細胞表面マーカーのフロー・サイトメトリー解析結果を比較したグラフ。

[図12]ＫＢＭ培地と、ＣｅｌｌＧｒｏ培地とで培養されたＮＫ細胞の増幅倍率の増殖曲線。

[図13]本発明の方法で増幅された末梢血由来ＮＫ細胞のＫ５６２に対する細

胞傷害活性を調べた実験結果を示すグラフ。

[図14]健常者から分離されたＣＤ１０７ａ陽性細胞の培養細胞全体に対する構成比率の経時的な変化をフロー・サイトメトリー法で測定した結果図。

[図15]ＣＤ３陽性細胞の１回除去及び２回除去後のＮＫ細胞（ＣＤ３陰性／ＣＤ５６陽性）の培養細胞全体に対する構成比率を示す棒グラフ。

[図16A]増幅前のＣＤ３陰性細胞と、ＣＤ３及びＣＤ３４陰性細胞とにおけるＣＤ３４陽性細胞の構成比率を示す棒グラフ。

[図16B]増幅前のＣＤ３陰性細胞と、ＣＤ３及びＣＤ３４陰性細胞とにおけるＣＤ３陽性細胞の構成比率を示す棒グラフ。

[図17]増幅後のＣＤ３陰性細胞と、ＣＤ３及びＣＤ３４陰性細胞とにおけるＮＫ細胞（ＣＤ３陰性／ＣＤ５６陽性）の培養細胞全体に対する構成比率を示す棒グラフ。

発明を実施するための形態

[0039] 以下に説明する本発明の実施例は例示のみを目的とし、本発明の技術的範囲を限定するものではない。本発明の技術的範囲は特許請求の範囲の記載によってのみ限定される。本発明の趣旨を逸脱しないことを条件として、本発明の変更、例えば、本発明の構成要件の追加、削除及び置換を行うことができる。

実施例 1

[0040] ＮＫ細胞の増幅（１）

１．材料及び方法

（１）末梢血からの採血

末梢血が、健常者と、進行癌（口腔癌、胆嚢癌及び胆管癌）の患者とから採取された。本実験は、九州大学医系地区部局臨床研究倫理審査委員会の承認（承認番号２２?１７６、承認日：平成２３年３月３１日）を得て実施された。書面による同意が、前記健常者及び前記患者から得られている。採血、凍結保存、及び、解凍は当業者に周知の方法で行われた。

[0041] （２）末梢血からの単核球の分離

得られた血液は、常温に保たれた希釈液（１ｍＭ　ＥＤＴＡ及び２％ウシ胎仔血清が添加されたＰＢＳ）で２倍希釈され、各遠心管に、希釈血２０ないし３５ｍＬが、１０ないし１５ｍＬのＦｉｃｏｌｌ　Ｐａｑｕｅ（比重１．０７７）に重層された。遠心は、５００×ｇ、室温で２０分間行われ、ブレーキをかけずに停止された。遠心上清（血漿部分）は数ｍＬを残して除去され、中間層が回収された。遠心管１ないし２本から回収された前記中間層が１本の新たな遠心管に集められ、前記希釈液により体積が５０ｍＬに調整された。２回目の遠心は、５００×ｇ、室温、５分間又は１５分間の条件で行われた。上清は除去され、ペレットが、前記希釈液３０ｍＬに懸濁された。３回目の遠心は、２８０×ｇ、室温１０分間の条件で行われた。上清は除去され、ペレットは、細胞濃度が１×１０^{7}個／ｍＬになるように、２ｍＭＥＤＴＡと、０．１％ＢＳＡとが添加されたＰＢＳに懸濁された（以下、「単核球懸濁液」という。）。

[0042]　（３）ＣＤ３陽性細胞の除去

抗ＣＤ３抗体が固定化された磁気ビーズ（Ｄｙｎａｂｅａｄｓ　ＣＤ３）は、０．１％ＢＳＡが添加されたＰＢＳで１回洗浄された後、前記単核球懸濁液に細胞１０^{7}個あたり５０μＬが添加された。前記ビーズを含む単核球懸濁液は、４°Ｃで３０分間ローテーターにて攪拌された。その後、前記磁気ビーズは磁石によって前記懸濁液から分離され、ＣＤ３を細胞表面に発現する細胞（ＣＤ３陽性細胞）が除去された。

[0043]　（４）ＣＤ３陽性細胞が除去された細胞集団の培養

前記懸濁液中の残りの細胞（以下、「ＣＤ３陰性細胞」という。）は、５％自家血清が添加された細胞培養用培地（ＫＢＭ５０１、１６０２５０１５、コージンバイオ株式会社；１７５０ＪＲＵ／ｍＬのＩＬ－２含有）（以下、「ＫＢＭ培地」という。）で５×１０^{5}個／ｍＬになるように希釈され、６ウェルの培養プレート（１４０６７５、ｎｕｎｃ、サーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社）に播種された。細胞培養は、３７°Ｃ、５％CO_2及び飽和水蒸気雰囲気下で２１日間行われた。培地交換が、培養５日目、

９日目、１３日目及び１７日目に行われた。前記細胞は、フィーダー細胞なしで培養された。

[0044] （５）細胞数及び細胞表面マーカーの解析

前記末梢血単核球の細胞数は、培養開始時から２１日目までの間に血球計算盤を用いて生細胞数を計測することにより決定された。前記細胞の細胞表面マーカーは、抗ＣＤ３抗体（３１７３０８、ＢｉｏＬｅｇｅｎｄ Ｊａｐａｎ 株式会社）、抗ＣＤ１６抗体（５５６６１８、ＢＤ Ｐｈａｒｍｉｎｇｅｎ、日本ベクトン・ディッキンソン株式会社）、抗ＣＤ５６抗体（３０４６０７、３１８３２１、ＢｉｏＬｅｇｅｎｄ Ｊａｐａｎ 株式会社）、抗ＣＤ６９抗体（３１０９０５、ＢｉｏＬｅｇｅｎｄ Ｊａｐａｎ 株式会社）、抗ＫＩＲ３ＤＬ１／ＫＩＲ３ＤＬ２抗体（１３０－０９５－２０５、ミルテニーバイオテク株式会社）、抗ＫＩＲ２ＤＬ３抗体（ＦＡＢ２０１４Ｐ、Ｒ＆Ｄ ＳＹＳＴＥＭＳ社、コスモ・バイオ株式会社）、抗ＫＩＲ２ＤＬ１／ＫＩＲ２ＤＳ１抗体（３３９５０５、ＢｉｏＬｅｇｅｎｄ Ｊａｐａｎ 株式会社）、抗ＫＩＲ２ＤＬ５抗体（３４１３０３、ＢｉｏＬｅｇｅｎｄ Ｊａｐａｎ 株式会社）、抗ＮＫｐ４６抗体（３３１９０７、ＢｉｏＬｅｇｅｎｄ Ｊａｐａｎ 株式会社）、抗ＮＫｐ３０抗体（３２５２０７、ＢｉｏＬｅｇｅｎｄ Ｊａｐａｎ 株式会社）、及び、抗ＮＫＧ２Ｄ抗体（３２０８０５、ＢｉｏＬｅｇｅｎｄ Ｊａｐａｎ 株式会社）を用いて、フロー・サイトメトリー法で解析された。

[0045] ２．結果

（１）健常者のＮＫ細胞の増幅

図１Ａは、ＣＤ３陽性細胞の除去前に、ＣＤ３及びＣＤ５６に対する抗体で２重染色し、フロー・サイトメトリー法で測定した実験結果である。図１Ｂは、ＣＤ３陽性細胞の除去後に、ＣＤ３及びＣＤ５６に対する抗体で２重染色しフロー・サイトメトリー法で測定した実験結果である。「ＣＤ３陽性細胞の構成比率」では、フロー・サイトメトリー法により計測された、各実験群の全培養細胞中のＣＤ３陽性細胞の割合が百分率で表される。ＣＤ３陽

性細胞の構成比率（％）は、ＣＤ３陽性細胞の除去前には６９．３７％であり、ＣＤ３陽性細胞の除去後には０．６８％であった。これらの結果から明らかなとおり、ＣＤ３陽性細胞は単核球懸濁液から顕著に除去された。

[0046] 図２Ａは、健常者５人の末梢血中の単核球から分離されたＣＤ３陰性細胞の細胞数それぞれの増殖曲線である。図２Ｂは、健常者５人の末梢血中の単核球から分離されたＣＤ３陰性細胞の細胞数の平均増殖曲線である。５人の健常者から採取された末梢血１ｍＬあたりのＣＤ３陰性細胞の細胞数が、培養開始時、５日間培養後、９日間培養後、１３日間培養後、１７日間培養後及び２１日間培養後に測定された。各実験条件の標準偏差は、同一条件で５回繰り返した実験結果の測定値から算出された。ＣＤ３陰性細胞は、培養開始時から２１日目後まで増加し続けた。増加速度が１３日目までは上昇し続け、１３日目後には低下した。ＣＤ３陰性細胞は、培養開始時の約５×10^5個から２１日間培養後の約７００×10^5個に増加した。

[0047] 図３Ａは、健常者５人の末梢血中の単核球から分離されたＣＤ３陰性細胞の増幅倍率それぞれの増殖曲線である。図３Ｂは、健常者５人の末梢血中の単核球から分離されたＣＤ３陰性細胞の増幅倍率の平均増殖曲線である。前記増幅倍率は、５日間培養後、９日間培養後、１３日間培養後、１７日間培養後及び２１日間培養後のＣＤ３陰性細胞の細胞数を、培養開始時のＣＤ３陰性細胞の細胞数で除算した商として算出された。各実験条件の標準偏差は、同一条件で５回繰り返した実験結果の測定値から算出された。ＣＤ３陰性細胞の増幅倍率は、培養開始時から２１日目まで増大し続けた。前記増幅倍率は１３日目までは顕著に増大し続け、２１日間培養後には約１５０倍に増大した。

[0048] 図４Ａは、健常者５人の末梢血中の単核球から分離されたＮＫ細胞（ＣＤ３陰性／ＣＤ５６陽性）の増幅倍率それぞれの増殖曲線である。図４Ｂは、健常者５人の末梢血中の単核球から分離されたＮＫ細胞（ＣＤ３陰性／ＣＤ５６陽性）の増幅倍率の平均増殖曲線である。図４Ａ及び図４Ｂでは、ＣＤ３陰性細胞が、ＣＤ３及びＣＤ５６に対する抗体で２重染色しフロー・サイ

トメトリー法で解析された。前記増幅倍率は、７日間培養後、１４日間培養後及び２１日間培養後のＮＫ細胞の細胞数を、培養開始時のＮＫ細胞の細胞数で除算した商として算出された。各実験条件の標準偏差は、同一条件で５回繰り返した実験結果の測定値から算出された。ＮＫ細胞の増幅倍率は、培養開始時から２１日目まで増大し続けた。前記増幅倍率は１４日目までは顕著に増大し続け、２１日間培養後には約４００倍に増大した。

[0049] 図５Ａは、健常者５人から分離されたＮＫ細胞（ＣＤ３陰性／ＣＤ５６陽性）の培養細胞全体に対する構成比率の経時的な変化をフロー・サイトメトリー法で測定した実験結果である。図５Ｂは、健常者５人から分離されたＮＫ細胞（ＣＤ３陰性／ＣＤ５６陽性）の培養細胞全体に対する構成比率の平均値の経時的な変化をフロー・サイトメトリー法で測定し、平均化した実験結果である。図５Ａ及び図５Ｂでは、ＣＤ３陰性細胞が、ＣＤ３及びＣＤ５６に対する抗体で２重染色しフロー・サイトメトリー法で解析された。「ＮＫ細胞の構成比率」では、フロー・サイトメトリー法により計測された、各実験群の全培養細胞中のＮＫ細胞の割合が百分率で表される。グラフの縦軸は培養細胞全体に対するＮＫ細胞（ＣＤ３陰性／ＣＤ５６陽性）の構成比率（％）で、横軸は培養日数である。各実験条件の標準偏差は、同一条件で５回繰り返した実験結果の測定値から算出された。ＮＫ細胞の構成比率は、培養開始時から２１日目まで増大し続けた。前記ＮＫ細胞の構成比率は１４日目までは顕著に増大し続け、１４日間培養後には約９０％に増大した。本発明は、ＮＫ細胞を選択的かつ経時的に増幅することが示された。

[0050] （２）患者のＮＫ細胞の増幅

図６Ａは、進行癌（口腔癌、胆嚢癌及び胆管癌）の患者３人から分離されたＮＫ細胞（ＣＤ３陰性／ＣＤ５６陽性）の培養細胞全体に対する構成比率の経時的な変化をフロー・サイトメトリー法で測定した実験結果である。図６Ｂは、進行癌（口腔癌、胆嚢癌及び胆管癌）の患者３人から分離されたＮＫ細胞（ＣＤ３陰性／ＣＤ５６陽性）の増幅倍率の平均増殖曲線である。「ＮＫ細胞の構成比率」では、フロー・サイトメトリー法により計測された、

各実験群の全培養細胞中のＮＫ細胞の割合が百分率で表される。図６Ａのグラフでは、縦軸は培養細胞全体に対するＮＫ細胞（ＣＤ３陰性／ＣＤ５６陽性）の構成比率（％）で、横軸は培養日数である。「ＮＫ細胞の増幅倍率」では、増幅後のＮＫ細胞の細胞数を増幅前に末梢血単核球中に存在したＮＫ細胞の細胞数で除算した結果が表される。図６Ｂのグラフでは、縦軸はＮＫ細胞の増幅倍率で、横軸は培養日数である。各実験条件の標準偏差は、同一条件で３回繰り返した実験結果の測定値から算出された。図６Ａに示されるとおり、ＮＫ細胞の構成比率は、培養開始時から１４日目まで顕著に増大し続け、１４日間培養後には約８５％に増大した。また、図６Ｂに示されるとおり、ＮＫ細胞の増幅倍率は、培養開始時から１４日目まで顕著に増大し続け、１４日間培養後には約１４０倍に増大した。２１日間培養後には、ＣＤ３陽性細胞が増殖したために、ＮＫ細胞の構成比率が低下した。しかし、前記ＣＤ３陽性細胞の増殖は、ＮＫ細胞の増幅にはほとんど影響しなかった。以上の結果から、進行癌（口腔癌、胆嚢癌及び胆管癌）の患者から分離されたＮＫ細胞は、経時的に増幅することが示された。また、本発明は、癌、感染症等に罹患した患者から分離されたＮＫ細胞を経時的に増幅できることが示唆された。

[0051] （３）ＮＫ細胞の分化マーカーの発現

図７、９及び１１に、各細胞表面マーカーのフロー・サイトメトリー解析結果を比較したグラフを示す。また、図８及び１０に、ＣＤ６９及びＣＤ１６のフロー・サイトメトリー解析結果を比較した平均蛍光強度（ＭＦＩ）の測定値のグラフを示す。各実験条件の標準偏差は、同一条件で３回繰り返した実験結果の測定値から算出された。図７ないし１１から明らかなとおり、本発明の方法で増幅された細胞は、増幅前の細胞と比較して、ＣＤ６９、ＫＩＲ２ＤＬ３、ＫＩＲ２ＤＬ１／ＫＩＲ２ＤＳ１、ＫＩＲ２ＤＬ５、ＮＫｐ３０、及び、ＮＫＧ２Ｄを強く発現していた。特に、前記増幅された細胞では、ＣＤ６９の発現は、約１００％であった。これらの図から明らかなとおり、本発明の方法で調製された細胞は、ＮＫ細胞としての分化マーカーを発

現することが示された。また、前記ＮＫ細胞は、高い細胞傷害活性を備えていることが示唆された。

[0052] 本実施例の実験結果から、ＣＤ３陽性細胞、すなわちＴ細胞を除去したうえで前記ＫＢＭ培地で培養することにより、ほぼＮＫ細胞だけを選択的かつ効率的に増幅できることが示された。大量のＮＫ細胞が、健常者だけでなく、癌、感染症等に罹患した患者から調製できることが示唆された。また、本発明の方法は、末梢血由来のＮＫ細胞だけでなく、他の組織・器官由来の細胞、特に臍帯血由来のＮＫ細胞を顕著に増幅できることが示唆された。

実施例 2

[0053] ＮＫ細胞の増幅（２）

１．材料及び方法

ＮＫ細胞は実施例１で説明された方法に従って健常者から調製された。２５００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２（ＡＦ－２００－０２－２、ＰｅｐｒｏＴｅｃｈ、東洋紡績株式会社）と、５％自家血清とを添加したＣｅｌｌＧｒｏ ＳＣＧＭ（２００１、セルジェニックス、岩井化学薬品株式会社）（以下、「ＣｅｌｌＧｒｏ培地」という。）が細胞培養用培地として調製された。前記ＮＫ細胞は、実施例１で説明された方法に従って前記ＫＢＭ培地及び前記ＣｅｌｌＧｒｏ培地で増幅された。

[0054] ２．結果

図１２は、ＫＢＭ培地と、ＣｅｌｌＧｒｏ培地とで培養されたＮＫ細胞の増幅倍率の増殖曲線である。前記増幅倍率は、７日間培養後、１４日間培養後及び２１日間培養後のＮＫ細胞の細胞数を、培養開始時のＮＫ細胞の細胞数で除算した商として算出された。各実験条件の標準偏差は、同一条件で２回繰り返した実験結果の測定値から算出された。ＮＫ細胞の増幅倍率は、ＫＢＭ培地及びＣｅｌｌＧｒｏ培地で、培養開始時から２１日目まで増大し続けた。２１日間培養後、前記増幅倍率は、ＫＢＭ培地では約６７０倍であり、ＣｅｌｌＧｒｏ培地では約１４０倍であった。

[0055] 本実施例の実験結果から、ＮＫ細胞は、前記ＫＢＭ培地と、前記ＣｅｌｌＧｒｏ培地とで培養されたＮＫ細胞の増幅倍率の増殖曲線である。前記増幅倍率は、７日間培養後、１４日間培養後及び２１日間培養後のＮＫ細胞の細胞数を、培養開始時のＮＫ細胞の細胞数で除算した商として算出された。各実験条件の標準偏差は、同一条件で２回繰り返した実験結果の測定値から算出された。ＮＫ細胞の増幅倍率は、ＫＢＭ培地及びＣｅｌｌＧｒｏ培地で、培養開始時から２１日目まで増大し続けた。２１日間培養後、前記増幅倍率は、ＫＢＭ培地では約６７０倍であり、ＣｅｌｌＧｒｏ培地では約１４０倍であった。

[0055] 本実施例の実験結果から、ＮＫ細胞は、前記ＫＢＭ培地と、前記ＣｅｌｌＧｒｏ

Ｇｒｏ培地とで十分に増幅することが示された。したがって、ＮＫ細胞は、細胞培養用培地のタイプにかかわらず、２５００ＩＵ／ｍＬないし２８１３ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む培地で増幅できることが示唆された。

実施例 3

[0056] 増幅されたＮＫ細胞の細胞傷害活性

１．材料及び方法

（１）細胞傷害活性の定量

ＮＫ細胞が、実施例１で説明された方法に従って調製され、エフェクター細胞として用いられた。Ｋ５６２細胞（慢性骨髄性白血病細胞）が当業者に周知の方法で調製され、標的細胞として用いられた。増幅されたＮＫ細胞と、増幅されていないＮＫ細胞（以下、「非増幅ＮＫ細胞」という。）との細胞傷害活性が、当業者に周知の方法で定量された。簡潔には、前記標的細胞は、３－３’－ジオクタデシロキサカルボシアニン（Ｄ４２９２、シグマアルドリッチ　ジャパン株式会社）（終濃度：０．０１ｍＭ）を添加したＲＰＭＩ－１６４０培地で１０分間培養することによって標識された。前記標的細胞は、標識後、ＰＢＳ（－）及び無血清ＩＭＤＭ培地を用いて３回洗浄された。前記エフェクター細胞と、前記標的細胞とは、丸底の９６ウェルの培養プレートに播種され、無血清ＩＭＤＭ培地で２時間共培養された。エフェクター細胞と標的細胞との比（Ｅ：Ｔ比）は、３対１、２対１、１対１、１対５、及び、１対１０に調製された。細胞傷害活性（％）は、抗ＭＨＣクラスＩ抗体（３１１４０９、ＢｉｏＬｅｇｅｎｄ　Ｊａｐａｎ　株式会社）及び７－アミノ－アクチノマイシンＤ（Ａ９４００、シグマ　アルドリッチ　ジャパン株式会社）を用いてフロー・サイトメトリー法によって定量された。

[0057] （２）ＮＫ細胞の分化マーカーの発現

ＮＫ細胞は、実施例１で説明された方法に従って増幅された。培養開始時、３日間培養後、７日間培養後、１４日間培養後及び２１日間培養後に、前記ＮＫ細胞と、前記Ｋ５６２細胞とは、２対１のＥ：Ｔ比で２時間共培養さ

れた。その後、前記ＮＫ細胞におけるＣＤ１０７ａ陽性細胞の構成比率が、抗ＣＤ１０７ａ抗体（３２８６０６、ＢｉｏＬｅｇｅｎｄ　Ｊａｐａｎ　株式会社）を用いてフロー・サイトメトリー法で解析された。

[0058] ２．結果

（１）細胞傷害活性の定量

図１３は、本発明の方法で増幅された末梢血由来ＮＫ細胞のＫ５６２に対する細胞傷害活性を調べた実験結果を示すグラフである。縦軸は細胞傷害活性（単位：％）である。白色棒は非増幅ＮＫ細胞の細胞傷害活性を示し、黒色棒は増幅されたＮＫ細胞の細胞傷害活性を示す。横軸は、増幅されたＮＫ細胞又は非増幅ＮＫ細胞と、Ｋ５６２細胞とのＥ：Ｔ比である。Ｅ：Ｔ比が３対１であるとき、前記細胞傷害活性は、非増幅ＮＫ細胞では約３０％であり、増幅されたＮＫ細胞では約１１０％であった。Ｅ：Ｔ比が２対１であるとき、前記細胞傷害活性は、非増幅ＮＫ細胞では約２０％であり、増幅されたＮＫ細胞では約１０７％であった。Ｅ：Ｔ比が１対１であるとき、前記細胞傷害活性は、非増幅ＮＫ細胞では約１０％であり、増幅されたＮＫ細胞では約１００％であった。Ｅ：Ｔ比が、１対５及び１対１０であるとき、増幅されたＮＫ細胞の前記細胞傷害活性は、それぞれ、約２５％及び約１５％であった。

[0059] （２）ＮＫ細胞の分化マーカーの発現

図１４は、健常者から分離されたＣＤ１０７ａ陽性細胞の培養細胞全体に対する構成比率の経時的な変化をフロー・サイトメトリー法で測定した実験結果である。各実験条件の標準偏差は、同一条件で５回繰り返した実験結果の測定値から算出された。「ＣＤ１０７ａ陽性細胞の構成比率」では、フロー・サイトメトリー法により計測された、各実験群の全培養細胞中のＣＤ１０７ａ陽性細胞の割合が百分率で表される。図１４のグラフでは、縦軸は培養細胞全体に対するＣＤ１０７ａ陽性細胞の構成比率（％）で、横軸は培養日数である。ＣＤ１０７ａ陽性細胞の構成比率は、培養開始時から３日目までに約３５％まで増大され、前記構成比率は、２１日目でも維持された。

[0060] 本実施例の実験結果から、本発明によって増幅されたＮＫ細胞は、高い細胞傷害活性を有していることが示された。したがって、本発明は、フィーダー細胞、外来分子をトランスフェクションしたＮＫ細胞等を用いることなく、細胞傷害活性が高いＮＫ細胞を選択的かつ効率的に増幅できることが示された。また、ＮＫ細胞が、末梢血由来の細胞だけでなく、他の組織・器官由来の細胞、特に臍帯血由来の細胞から増幅されたときにも、細胞傷害活性が高いことが示唆された。

実施例 4

[0061] ＮＫ細胞の増幅（３）（ＣＤ３陽性細胞の繰り返し除去）

実施例１ないし３の実験後、さらにＮＫ細胞の増幅実験を重ねるなかで、ＣＤ３陽性細胞が非選択的に増大し、ＣＤ３陽性細胞の培養細胞全体に対する構成比率が本実施例の結果のように３０％を超える場合があるとの知見が得られた。このＣＤ３陽性細胞の非選択的な増大の頻度は、進行癌の患者よりアフェレーシス法で採取された末梢血単核球細胞を利用してＮＫ細胞を増幅した実験のうち約３０％であった（データは示されない。）。そこで、ＮＫ細胞を選択的に増幅するために、ＣＤ３陽性細胞を除去するステップを繰り返すことが試みられた。

[0062] １．材料及び方法

実施例１で説明された方法に従って、ＮＫ細胞は増幅され、細胞数及び細胞表面マーカーが解析された。単核球懸濁液は進行癌（口腔癌、胆嚢癌及び胆管癌）の患者から調製された。ＣＤ３陽性細胞の除去が、１回又は２回実施された。ＣＤ３陰性細胞は前記ＫＢＭ培地で１４日間培養された。

[0063] ２．結果

図１５は、ＣＤ３陽性細胞の１回除去及び２回除去後のＮＫ細胞（ＣＤ３陰性／ＣＤ５６陽性）の培養細胞全体に対する構成比率を示す棒グラフである。各実験条件の誤差棒は同一条件で３回繰り返した実験結果の測定値の標準誤差を示す。ＮＫ細胞、ＣＤ３陽性細胞及び他の細胞の構成比率では、フロー・サイトメトリー法により計測された、各実験群の全培養細胞中のＮＫ

細胞、ＣＤ３陽性細胞及び他の細胞の割合それぞれが百分率で表される。グラフの縦軸は培養細胞全体に対するＮＫ細胞、ＣＤ３陽性細胞及び他の細胞の構成比率（％）であり、横軸はＣＤ３陽性細胞の除去回数である。ＮＫ細胞の培養細胞全体に対する構成比率（％）は、ＣＤ３陽性細胞の１回除去では約５０％であり、ＣＤ３陽性細胞の２回除去では約６５％であった。

[0064] 本実施例の実験結果から、ＣＤ３陽性細胞の繰り返し除去はＣＤ３陽性細胞の培養細胞全体に対する構成比率を低下させ、ＮＫ細胞の培養細胞全体に対する構成比率を増大できることが示された。しかし、前記ＣＤ３陽性細胞の繰り返し除去はＮＫ細胞を選択的に増幅するのに十分とはいえない。そこで、前記ＣＤ３陽性細胞の繰り返し除去以外の他の処理を併用することが試みられた。

実施例 5

[0065] ＮＫ細胞の増幅（４）（ＣＤ３陽性細胞及びＣＤ３４陽性細胞の除去）

１．材料及び方法

実施例１で説明された方法に従って、ＮＫ細胞は増幅され、細胞数及び細胞表面マーカーが解析された。単核球懸濁液は進行癌（口腔癌、胆嚢癌及び胆管癌）の患者から調製された。ＣＤ３陽性細胞の除去後、造血前駆細胞が除去された。前記造血前駆細胞の除去は、ＣＤ３４を細胞表面に発現する細胞（ＣＤ３４陽性細胞）を、ビオチン化抗ＣＤ３４抗体（３４３５２３、ＢｉｏＬｅｇｅｎｄ　Ｊａｐａｎ　株式会社）と、磁気ビーズ（Ｄｙｎａｂｅａｄｓ　ｂｉｏｔｉｎ　ｂｉｎｄｅｒ、１１０－４７、ライフテクノロジーズジャパン株式会社）とを用いて行われた。簡潔には、前記ＣＤ３４陽性細胞と、前記ビオチン化抗ＣＤ３４抗体とが反応された。その後、遠心分離が行われ、上清が除去され、前記抗体が結合した細胞の懸濁液が調製された。前記磁気ビーズは、０．１％ＢＳＡが添加されたＰＢＳで１回洗浄後、細胞10^7個あたり５０μＬが前記懸濁液に添加された。前記磁気ビーズを含む懸濁液は、４°Ｃで３０分間ローテーターにて攪拌された。前記磁気ビーズは磁石によって前記懸濁液から分離され、ＣＤ３４陽性細胞が除去された。前

記懸濁液中の残りの細胞（以下、「ＣＤ３及びＣＤ３４陰性細胞」という。）は前記ＫＢＭ培地で１４日間培養された。フロー・サイトメトリー法での計測では、抗ＣＤ３４抗体（３４３５０５、ＢｉｏＬｅｇｅｎｄ　Ｊａｐａｎ　株式会社）が追加的に用いられた。

[0066] ２．結果

図１６Ａは、増幅前のＣＤ３陰性細胞と、ＣＤ３及びＣＤ３４陰性細胞におけるＣＤ３４陽性細胞の構成比率を示す棒グラフである。図１６Ｂは、増幅前のＣＤ３陰性細胞と、ＣＤ３及びＣＤ３４陰性細胞とにおけるＣＤ３陽性細胞の構成比率を示す棒グラフである。各実験条件の誤差棒は同一条件で３回繰り返した実験結果の測定値の標準誤差を示す。ＣＤ３４陽性細胞及びＣＤ３陽性細胞の構成比率では、フロー・サイトメトリー法により計測された、各実験群の全細胞中のＣＤ３４陽性細胞及びＣＤ３陽性細胞の割合が百分率で表される。グラフの縦軸は細胞全体に対する増幅前のＣＤ３４陽性細胞及びＣＤ３陽性細胞の構成比率（％）である。グラフの横軸は、増幅用の各実験群の細胞タイプを示す。増幅前のＣＤ３４陽性細胞の構成比率（％）は、ＣＤ３陰性細胞では約０．１５％であり、ＣＤ３及びＣＤ３４陰性細胞では約０．０２％であった。増幅前のＣＤ３陽性細胞の構成比率（％）は、ＣＤ３陰性細胞では約０．１５％であり、ＣＤ３及びＣＤ３４陰性細胞では約０．２５％であった。

[0067] 図１７は、増幅後のＣＤ３陰性細胞と、ＣＤ３及びＣＤ３４陰性細胞におけるＮＫ細胞（ＣＤ３陰性／ＣＤ５６陽性）の培養細胞全体に対する構成比率を示す棒グラフである。各実験条件の誤差棒は同一条件で３回繰り返した実験結果の測定値の標準誤差を示す。ＮＫ細胞、ＣＤ３陽性細胞及び他の細胞の構成比率では、フロー・サイトメトリー法により計測された、各実験群の全培養細胞中のＮＫ細胞、ＣＤ３陽性細胞及び他の細胞の割合それぞれが百分率で表される。グラフの縦軸は培養細胞全体に対するＮＫ細胞、ＣＤ３陽性細胞及び他の細胞の構成比率（％）である。グラフの横軸は、増幅に用いた各実験群の細胞タイプを示す。増幅後のＮＫ細胞の培養細胞全体に対

する構成比率（％）は、ＣＤ３陰性細胞では約６０％であり、ＣＤ３及びＣＤ３４陰性細胞では約９０％であった。

[0068] 本実施例の実験結果から、ＮＫ細胞（ＣＤ３陰性／ＣＤ５６陽性）の培養細胞全体に対する構成比率は、ＣＤ３陽性細胞及びＣＤ３４陽性細胞を除去することによって顕著に増大することが示された。また、ＮＫ細胞がアフェレーシス法で採取された末梢血単核球細胞を利用して増幅されるときであっても、ＮＫ細胞は、ＣＤ３陽性細胞及びＣＤ３４陽性細胞を除去することによって高純度で増幅できることが示された。

[0069] 結論

以上の実験結果から明らかなとおり、末梢血由来の単核球からＣＤ３陽性細胞（Ｔ細胞）を除去することによって、ＮＫ細胞を大量に調製することができた。また本発明の方法で増幅された細胞は、本実施例の実験結果で明らかにされたとおり、非常に高い細胞傷害活性を有した。さらに、末梢血由来の単核球からＣＤ３陽性細胞（Ｔ細胞）及びＣＤ３４陽性細胞（造血前駆細胞）を除去することによって、ＮＫ細胞を高純度で調製することができた。

[0070] 現在報告されているＮＫ細胞の増幅方法では、ＮＫ細胞の細胞傷害活性が低いことが知られている。例えば、Ｔｅｒｕｎｕｍａ、Ｈ．らのＮＫ細胞の増幅成績は、健常者の末梢血由来のＮＫ細胞に関して、純度８１．２％、増幅倍率１３０倍、細胞傷害活性６６％（Ｅ：Ｔ＝３：１）だった（特許文献１）。Ｔａｎａｋａ，Ｊ．らのＮＫ細胞の増幅成績は、健常者の末梢血単核球細胞に関して、純度７３．４％、増幅倍率６２６８倍、細胞傷害活性約５５％（Ｅ：Ｔ＝１：１）だった（特許文献２）。Ｃａｒｌｅｎｓ，Ｓ．らのＮＫ細胞の増幅成績は、ミエローマ患者の末梢血由来のＮＫ細胞に関して、純度５５％、増幅倍率１９３倍、細胞傷害活性４５％（Ｅ：Ｔ＝１：１）だった（非特許文献４）。Ａｌｉｃｉ、Ｅ．らのＮＫ細胞の増幅成績は、ミエローマ患者の末梢血由来のＮＫ細胞に関して、純度６５％、増幅倍率１６２５倍、細胞傷害活性約１０％（Ｅ：Ｔ＝１：１）だった（非特許文献５）。Ｆｕｊｉｓａｋｉ，Ｈ．らのＮＫ細胞の増幅成績は、健常者の末梢血由来の

ＮＫ細胞に関して、遺伝的に改変された腫瘍細胞がフィーダー細胞として用いられるとき、純度９６．８％、増幅倍率２７７倍、細胞傷害活性の最大値約９０％（Ｅ：Ｔ＝１：１）だった（非特許文献６）。これに対して、本発明のＮＫ細胞の増幅成績は、健常者の末梢血由来のＮＫ細胞に関して、純度約９０％、増幅倍率４００倍、細胞傷害活性約１００％（Ｅ：Ｔ＝１：１）だった。従来技術では、Ｋ５６２細胞に対するＮＫ細胞の細胞傷害活性は、遺伝的に改変された腫瘍細胞がフィーダー細胞として用いられるとき、最大値で約９０％（Ｅ：Ｔ＝１：１）であり、フィーダー細胞を用いないとき、６６％（Ｅ：Ｔ＝３：１）であった。しかし、本発明のＮＫ細胞はフィーダー細胞なしで増幅され、Ｋ５６２細胞に対する細胞傷害活性がほぼ１００％（Ｅ：Ｔ＝１：１）であった。したがって、本発明は、ＮＫ細胞の細胞傷害活性が高く、フィーダー細胞が最終産物に混入するリスクがないため、従来技術と比較して顕著に優れている。よって、本発明は、高い細胞傷害活性を有するＮＫ細胞を、採取された血球細胞から高純度で大量に調製するのに有用である。

請求の範囲

[請求項1] ＮＫ細胞を含む細胞集団を調製するステップと、

前記ＮＫ細胞を含む細胞集団からＴ細胞を除去するステップと、

前記Ｔ細胞が除去された残りの細胞を、２５００ＩＵ／ｍＬないし２８１３ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む培地で培養するステップとを含むことを特徴とする、ＮＫ細胞の増幅方法。

[請求項2] 前記ＮＫ細胞を含む細胞集団から前記Ｔ細胞を除去するステップは、ＣＤ３陽性細胞を除去するステップによって達成されることを特徴とする、請求項１に記載のＮＫ細胞の増幅方法。

[請求項3] 前記ＮＫ細胞を含む細胞集団から造血前駆細胞を除去するステップを含むことを特徴とする、請求項１又は２に記載のＮＫ細胞の増幅方法。

[請求項4] 前記ＮＫ細胞を含む細胞集団から前記造血前駆細胞を除去するステップは、ＣＤ３４陽性細胞を除去するステップによって達成されることを特徴とする、請求項３に記載のＮＫ細胞の増幅方法。

[請求項5] 前記培地は、自家血清、ＡＢ型血清、及び／又は、血清アルブミンを含むことを特徴とする、請求項１ないし４のいずれか１つに記載のＮＫ細胞の増幅方法。

[請求項6] 前記ＮＫ細胞を含む細胞集団を調製するステップは、被験者から採取された血球細胞から単核球を分離するステップによって達成されることを特徴とする、請求項１ないし５のいずれか１つに記載のＮＫ細胞の増幅方法。

[請求項7] 前記血球細胞は、末梢血、臍帯血、骨髄及び／又はリンパ節から採取されることを特徴とする、請求項６に記載のＮＫ細胞の増幅方法。

[請求項8] 前記血球細胞は末梢血からアフェレーシス法により採取されることを特徴とする、請求項７に記載のＮＫ細胞の増幅方法。

[請求項9] 前記ＮＫ細胞を含む細胞集団は、胚性幹細胞、成体幹細胞及び人工多能性幹（ｉＰＳ）細胞からなるグループから選択されるいずれかの

幹細胞由来の造血幹細胞と、臍帯血由来の造血幹細胞と、末梢血由来の造血幹細胞と、骨髄血由来の造血幹細胞と、臍帯血単核球と、末梢血単核球とからなる群から選択される少なくとも１種類の細胞から調製されることを特徴とする、請求項１ないし５のいずれか１つに記載の方法。

[請求項10] 請求項１ないし９のいずれか１つに記載の増幅方法によって調製されるＮＫ細胞を含むことを特徴とする、細胞療法のための医薬品組成物。

[請求項11] 感染症及び／又は癌を治療するために用いられることを特徴とする、請求項１０に記載の医薬品組成物。