明　細　書

発明の名称 ： ＣＡＲ発現Ｔ細胞及びＣＡＲ発現ベクター

技術分野

[0001] 本発明は、がん免疫治療に用いることのできる、キメラ抗原受容体（本明細書において「ＣＡＲ」と表記する。）を発現している免疫細胞（本明細書において「ＣＡＲ発現免疫細胞」と表記する。）、代表的にはＣＡＲを発現しているＴ細胞（本明細書において「ＣＡＲ－Ｔ細胞」と表記する。）、およびＣＡＲ発現免疫細胞（ＣＡＲ－Ｔ細胞等）を作製するための発現ベクターに関する。より詳しくは、本発明は、所定のサイトカインおよびケモカインを発現しているＣＡＲ発現免疫細胞（ＣＡＲ－Ｔ細胞等）およびその作製のための発現ベクターに関する。

[0002] ［発明の背景］

ＣＡＲ－Ｔ細胞の投与によるがん免疫療法は、白血病やリンパ腫などの造血器悪性腫瘍において有効性が示されているが、特に固形がんにおいては、ＣＡＲ－Ｔ細胞の生体内での生存効率の低さ、がん細胞が有する腫瘍免疫回避機構によるがん微小環境におけるＣＡＲ－Ｔ細胞の活性阻害等の課題により、治療効果が認められないがん種や症例が存在する。そのため、特に固形がんにおいて治療効果を示す、より抗腫瘍活性の高いＣＡＲ－Ｔ細胞が求められている。

[0003] 特許文献１および非特許文献１には、従来のＣＡＲ－Ｔ細胞よりも抗腫瘍活性に優れている、ＩＬ－７およびＣＣＬ１９を発現しているＣＡＲ－Ｔ細胞が記載されている。しかしながら特許文献１および非特許文献１には、それ以外のサイトカインおよびケモカインの組み合わせについての具体的な記載は含まれていない。

[0004] 非特許文献２には、ＣＡＲのシグナリングから独立して持続性が向上した、膜結合型キメラＩＬ－１５（ｍｂＩＬ－１５）を発現しているＣＡＲ－Ｔ細胞が記載されている。しかしながら非特許文献２には、ｍｂＩＬ－１５とＣＣＬ１９等のケモカインとの組み合わせについての具体的な記載は含まれ

ていない。

[0005] 非特許文献３には、ＩＬ－１５とＩＬ－１５Ｒαｓｕｓｈｉドメインとがフレキシブルなリンカーを介して連結している融合タンパク質を用いることにより、従来のＩＬ－１５とＩＬ－１５Ｒαｓｕｓｈｉドメインとを併用するよりも、リンパ球（ＮＫ細胞、ＮＫ－Ｔ細胞、メモリーＣＤ８陽性細胞）の増殖や樹状細胞の活性化などにおける活性を強力にすることができることが記載されている。しかしながら非特許文献３には、ＩＬ－１５およびＩＬ－１５ＲαｓｕｓｈｉドメインとＣＣＬ１９等のケモカインとの組み合わせについての具体的な記載は含まれていない。

[0006] 非特許文献４には、マウスのＩＬ－１５とＩＬ－１５Ｒαとの、分泌型の融合タンパク質をトランスフェクションすることにより、ＣＤ８陽性Ｔ細胞の生存能および増殖能が向上することが記載されている。しかしながら非特許文献４には、ＩＬ－１５とＣＣＬ１９等のケモカインとの組み合わせについての具体的な記載は含まれていない。

[0007] 非特許文献５には、一本鎖ＩＬ－２７（ｐ２８とＥＢＩ３をフレキシブルなリンカーで連結したもの）およびその炎症性腸疾患（ＩＢＤ）の治療に対する効果を記載している。しかしながら非特許文献５には、ＣＡＲ－Ｔ細胞について、また一本鎖ＩＬ－２７とＣＣＬ１９等のケモカインとの組み合わせについての具体的な記載は含まれていない。

[0008] 特許文献２には、組換えＩＬ－７、組換えＩＬ－１５、またはこれらの組み合わせを発現しているＴ細胞が開示されており、そのようなサイトカインの発現がＴ細胞の生存を向上させることが記載されている。しかしながら特許文献２には、ＣＡＲ－Ｔ細胞について、また上記特定のサイトカインとＣＣＬ１９等のケモカインとの組み合わせについての具体的な記載は含まれてない。

[0009] 特許文献３には、ＩＬ－２、ＩＬ－４、ＩＬ－７、ＩＬ－１５またはこれらの組み合わせをコードする発現コンストラクトと、ＣＡＲコンストラクトとを含有する、改変されたナチュラルキラーＴ細胞が記載されている。しか

しながら特許文献３には、上記特定のサイトカインとＣＣＬ１９等のケモカインとの組み合わせについての具体的な記載は含まれていない。

[0010] 特許文献４には、ＩＬ－7、ＩＬ－１５（ＩＬ－１５／ＩＬ－１５Ｒα融合タンパク質）、ＩＬ－２１といった、膜結合型のサイトカインを発現するＣＡＲ－Ｔ細胞が記載されている。しかしながら特許文献４には、上記特定のサイトカインとＣＣＬ１９等のケモカインとの組み合わせについての具体的な記載は含まれていない。

[0011] 特許文献５には、ＩＬ－１５を発現している、ＣＤ１９を標的とするＣＡＲ－Ｔ細胞が記載されている。しかしながら特許文献５には、ＩＬ－１５とＣＣＬ１９等のケモカインとの組み合わせについての具体的な記載は含まれていない。

[0012] 非特許文献６には、ＩＬ－１５および／またはＩＬ－２１を発現している、ＧＰＣ３を標的とするＣＡＲ－Ｔ細胞が記載されている。しかしながら特許文献６には、上記特定のサイトカインとＣＣＬ１９等のケモカインとの組み合わせについての具体的な記載は含まれていない。

先行技術文献

特許文献

[0013] 特許文献1：WO2016/056228

特許文献2：WO2007/037780

特許文献3：WO2013/040371

特許文献4：WO2014/186469

特許文献5：US2013/0071414

非特許文献

[0014] 非特許文献1：Adachi et al., Nature Biotechnology, VOL 36, No 4, 346-353

非特許文献2：Hurton etal., Proc Natl Acad Sci., 113(48), E7788-97, 2016

非特許文献3：Mortieret al., J Biol Chem. 281(3), 1612-9, 2006

非特許文献4：Rowley etal., Eur J Immunol. 39(2), 491-506, 2009

非特許文献5：Sasaokaet al., Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 300: G568-576

非特許文献6：Barta etal., Armored Glypican-3-Specific CAR T cells for the Immunotherapy ofHepatocellular Carcinoma, ASGCT 2018, May 2018, abstract

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0015] 本発明は、ＣＡＲを単独で発現する（サイトカインおよび／またはケモカインを発現しない）免疫細胞（ＣＡＲ－Ｔ細胞等）よりも、抗腫瘍活性の高い免疫細胞（ＣＡＲ－Ｔ細胞等）を提供することを課題とする。

課題を解決するための手段

[0016] Ｔ細胞等の免疫細胞の機能を制御しうる分子は生体内に少なくとも数百種類も存在する。本発明者らは、ＣＡＲ－Ｔ細胞において、ＣＡＲとともに、サイトカインであるインターロイキン－１５（ＩＬ－１５）、インターロイキン－１８（ＩＬ－１８）、インターロイキン－２１（ＩＬ－２１）およびインターロイキン－２７（ＩＬ－２７）からなる群より選ばれる少なくとも１種を、ケモカインであるＣＣケモカインリガンド１９（ＣＣＬ１９）と組み合わせて発現させることにより、ＣＡＲを単独で発現させた場合と比較して、抗腫瘍活性が増強されること、特にＣＡＲ－Ｔ細胞の持続性および増殖性が向上することを見出し、本発明を成し遂げた。

[0017] なお、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２７およびＣＣＬ１９は、生体内に存在する天然の（外因性の遺伝子が導入されていない）Ｔ細胞は発現していないサイトカインおよびケモカインである。ＩＬ－２１は、生体内に存在する天然のＴ細胞（例えば、ＮＫＴ細胞、ＣＤ４陽性Ｔ細胞）が発現しているサイトカインである。本発明において、上記所定のサイトカインおよびケモカインを発現させることは、Ｔ細胞に外因性の上記所定のサイトカインおよびケモカインを発現させるための遺伝子を導入することにより、生体内に

存在する天然のＴ細胞よりも高いレベルで上記所定のサイトカインおよびケモカインを発現させることを意味する。

[0018] また、上記所定のインターロイキンおよびケモカインをＣＡＲとともにＴ細胞に遺伝子導入して発現させる実施形態は、それらをＴ細胞以外の免疫細胞、例えばＮＫ細胞、単球、マクロファージ、樹状細胞等に遺伝子導入して発現させる実施形態へと拡張することが可能である。

[0019] 本発明は、少なくとも下記の発明を包含する。

［１］

（１）キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）、

（２）インターロイキン－１５（ＩＬ－１５）、インターロイキン－１８（ＩＬ－１８）、インターロイキン－２１（ＩＬ－２１）およびインターロイキン－２７（ＩＬ－２７）からなる群より選ばれる少なくとも１種、ならびに

（３）ＣＣケモカインリガンド１９（ＣＣＬ１９）

を発現するＴ細胞。

［２］

前記（２）がＩＬ－１５である、項１に記載のＴ細胞。

［３］

前記ＩＬ－１５が、ＩＬ－１５Ｒαと連結して融合タンパク質を形成した状態にあるＩＬ－１５である、項２に記載のＴ細胞。

［４］

前記融合タンパク質が、ＩＬ－１５ＬＳＰとＩＬ－１５が連結した融合タンパク質（$IL15_{LSP}$）、ＩＬ－１５Ｒα細胞外ドメインとＩＬ－１５が連結した融合タンパク質（$_{s}IL15_{RA}$）、ＩＬ－１５と全長のＩＬ－１５Ｒαが連結した融合タンパク質（$_{mb}IL15_{RA}$）、または、シグナルペプチドおよびｓｕｓｈｉドメインを含むＩＬ－１５Ｒαとｌｌ－１５が連結した融合タンパク質（$_{sushi}$ＩＬ１５）である、項３に記載のＴ細胞。

［５］

前記融合タンパク質が、ＩＬ－１５と全長のＩＬ－１５Ｒαが連結した融合タンパク質（$_{mb}$ＩＬ１５$_{RA}$）、または、シグナルペプチドおよびｓｕｓｈｉドメインを含むＩＬ－１５Ｒαとｌｌ－１５が連結した融合タンパク質（$_{sushi}$ＩＬ１５）である、項３に記載のＴ細胞。

［６］

項１に記載のＴ細胞を含有する医薬。

［７］

がんの治療剤である、項６に記載の医薬。

［８］

前記がんが、メラノーマ、メルケル細胞がん、大腸がん、腎臓がん、乳がん、卵巣がん、卵管がん、子宮頸がん、肝臓がん、肺がん、非小細胞肺がん、頭頚部がん、小腸がん、前立腺がん、膀胱がん、直腸がん、膵臓がん、ユーイング肉腫、横紋筋肉腫、上咽頭がん、食道がん、胆道がん、神経芽腫、骨肉腫、急性骨髄性白血病、多発性骨髄腫、リンパ腫または白血病である、項７に記載の医薬。

［９］

（１）ＣＡＲをコードする核酸、

（２）ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１およびＩＬ－２７からなる群より選ばれる少なくとも１種をコードする核酸、ならびに

（３）ＣＣＬ１９をコードする核酸

を含む、発現ベクター。

［１０］

前記（２）がＩＬ－１５である、項９に記載の発現ベクター。

［１１］

前記ＩＬ－１５が、ＩＬ－１５Ｒαと連結して融合タンパク質を形成した状態にあるＩＬ－１５である、項１０に記載の発現ベクター。

［１２］

前記融合タンパク質が、ＩＬ－１５ＬＳＰとＩＬ－１５が連結した融合タ

ンパク質（ＩＬ１５$_{LSP}$）、ＩＬ－１５Ｒα細胞外ドメインとＩＬ－１５が連結した融合タンパク質（$_{s}$ＩＬ１５$_{RA}$）、ＩＬ－１５と全長のＩＬ－１５Ｒαが連結した融合タンパク質（$_{mb}$ＩＬ１５$_{RA}$）、または、シグナルペプチドおよびｓｕｓｈｉドメインを含むＩＬ－１５Ｒαとｌｌ－１５が連結した融合タンパク質（$_{sushi}$ＩＬ１５）である、項１１に記載の発現ベクター。

［１３］

前記融合タンパク質が、ＩＬ－１５と全長のＩＬ－１５Ｒαが連結した融合タンパク質（$_{mb}$ＩＬ１５$_{RA}$）、または、シグナルペプチドおよびｓｕｓｈｉドメインを含むＩＬ－１５Ｒαとｌｌ－１５が連結した融合タンパク質（$_{sushi}$ＩＬ１５）である、項１１に記載の発現ベクター。

［１４］

項９に記載の発現ベクターをＴ細胞に導入する工程を含む、ＣＡＲ－Ｔ細胞の製造方法。

［１５］

項１に記載のＴ細胞を、がんの治療を必要とする対象に投与する工程を含む、がんの治療方法。

［１６］

前記がんが、メラノーマ、メルケル細胞がん、大腸がん、腎臓がん、乳がん、卵巣がん、卵管がん、子宮頸がん、肝臓がん、肺がん、非小細胞肺がん、頭頚部がん、小腸がん、前立腺がん、膀胱がん、直腸がん、膵臓がん、ユーイング肉腫、横紋筋肉腫、上咽頭がん、食道がん、胆道がん、神経芽腫、骨肉腫、急性骨髄性白血病、多発性骨髄腫、リンパ腫または白血病である、項１５に記載の治療方法。

［１７］

がんの治療の有効成分として使用するための、項１に記載のＴ細胞。

［１８］

前記がんが、メラノーマ、メルケル細胞がん、大腸がん、腎臓がん、乳がん、卵巣がん、卵管がん、子宮頸がん、肝臓がん、肺がん、非小細胞肺がん

、頭頚部がん、小腸がん、前立腺がん、膀胱がん、直腸がん、膵臓がん、ユーイング肉腫、横紋筋肉腫、上咽頭がん、食道がん、胆道がん、神経芽腫、骨肉腫、急性骨髄性白血病、多発性骨髄腫、リンパ腫または白血病である、項１７に記載のT細胞。

[0020] 本明細書において、上記［１］のＴ細胞を「本発明のＴ細胞」、上記［６］の医薬を「本発明の医薬」、上記［９］の発現ベクターを「本発明の発現ベクター」、上記［１４］のＣＡＲ－Ｔ細胞の製造方法を「本発明の製造方法」と呼ぶことがある。

[0021] 当業者であれば、本明細書に開示されている内容を全体的に勘案して、上記の発明の形態（カテゴリー）を適宜変換することが可能である。上記［６］に係る本発明の医薬は、例えば、「（１）ＣＡＲ、（２）ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１およびＩＬ－２７からなる群より選ばれる少なくとも１種、ならびに（３）ＣＣＬ１９を発現するＴ細胞を、がんの治療を必要とする対象に投与する工程を含む、がんの治療方法」、「がんの治療の有効成分として使用するための、（１）ＣＡＲ、（２）ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１およびＩＬ－２７からなる群より選ばれる少なくとも１種、ならびに（３）ＣＣＬ１９を発現するＴ細胞」、「（１）ＣＡＲ、（２）ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１およびＩＬ－２７からなる群より選ばれる少なくとも１種、ならびに（３）ＣＣＬ１９を発現するＴ細胞の、がんを治療するための医薬の製造における使用」などに変換することができる。

[0022] 当業者であれば、本明細書に開示されている内容を全体的に勘案して、ＣＡＲと共に所定のサイトカインおよびケモカインをＴ細胞に発現させることにより得られる本発明のＴ細胞ならびにそれに関連する実施形態としての本発明の医薬、本発明の発現ベクター、本発明の製造方法などの各発明を、ＣＡＲと共に所定のサイトカインおよびケモカインをＴ細胞以外の免疫細胞（ＮＫ細胞、単球、マクロファージ、樹状細胞等）ならびにそれに関連する実施形態としての医薬、発現ベクター、製造方法などの各発明に適宜変換することが可能である。

発明の効果

[0023] 本発明のＴ細胞は、所定のサイトカイン（ＩＬ－１５等）およびケモカイン（ＣＣＬ１９）が発現することにより、Ｔ細胞の持続性および増殖性が向上しているため、ＣＡＲによる抗腫瘍活性を増強する（残存腫瘍細胞数を低減する、ＩＦＮγの産生量を向上させる、腫瘍局所への宿主免疫細胞（Ｔ細胞、樹状細胞、ＮＫ細胞等）の遊走と蓄積を向上させる）ことができる。また、そのような本発明のＴ細胞を含有する医薬により、がんの治療効果を向上させることができる。特に、本発明のＴ細胞は、ＮＫ細胞の活性化に関与している可能性があり、それによりＮＫ細胞に感受性がある癌腫（メラノーマ、メルケル細胞がん、大腸がん、腎臓がん、乳がん、卵巣がん、卵管がん、子宮頸がん、肝臓がん、肺がん、非小細胞肺がん、頭頚部がん、小腸がん、前立腺がん、膀胱がん、直腸がん、膵臓がん、ユーイング肉腫、横紋筋肉腫、上咽頭がん、食道がん、胆道がん、神経芽腫、骨肉腫、急性骨髄性白血病、多発性骨髄腫、リンパ腫、白血病等）の治療に有用である可能性がある。さらに、抗腫瘍活性の増強により投与細胞数が減少することで、ＣＲＳ（Cytokine Release Syndorome）等の副作用の低減や、製造コストの低減といった効果が期待される。

[0024] 本発明の所定のサイトカインおよびケモカインの組み合わせは、免疫細胞全般に対して、すなわち上述したようなＴ細胞のみならず、ＮＫ細胞、単球、マクロファージ、樹状細胞等に対して、ＣＡＲ遺伝子とともに遺伝子導入し、発現させる場合であっても、抗腫瘍活性の高い各種のＣＡＲ発現免疫細胞が得られるという作用効果が奏される。

図面の簡単な説明

[0025] [図1]図１は、実施例（試験例１）において、下記の各Ｔ細胞について、ＣＡＲ（横軸）およびＣＤ８（縦軸）の発現レベルをフローサイトメトリーにより解析した結果を示す。図中の数値（％）は、全細胞に対する各区画の細胞集団のパーセンテージを表す。「transduction (-)」は比較例１のｔｒａｎｓｄｕｃｔｉｏｎ（－）Ｔ細胞（形質導入なしのT細胞）、「conv. CAR-T」

は比較例２のｃｏｎｖ．ＣＡＲ－Ｔ細胞（抗ヒトCD20 CAR-T細胞）、「15_{LSP} x 19 CAR-T」は実施例１－１のＩＬ１５$_{LSP}$×ＣＣＬ１９　ＣＡＲ－Ｔ細胞（IL15$_{LSP}$_CCL19_抗ヒトCD20 CAR-T細胞）、「$_{s}15_{RA}$ x 19 CAR-T」は実施例１－２の$_{s}$ＩＬ１５$_{RA}$×ＣＣＬ１９　ＣＡＲ－Ｔ細胞（$_{s}$IL15$_{RA}$_CCL19_抗ヒトCD20 CAR-T細胞）、「$_{mb}15_{RA}$ x 19 CAR-T」は実施例１－３の$_{mb}$ＩＬ１５$_{RA}$×ＣＣＬ１９　ＣＡＲ－Ｔ細胞（$_{mb}$IL15$_{RA}$_CCL19_抗ヒトCD20 CAR-T細胞）、「$_{sushi}$15 x 19 CAR-T」は実施例１－４の$_{sushi}$ＩＬ１５×ＣＣＬ１９　ＣＡＲ－Ｔ細胞（$_{sushi}$IL15_CCL19_抗ヒトCD20 CAR-T細胞）、「18 x 19 CAR-T」は実施例２のＩＬ－１８×ＣＣＬ１９　ＣＡＲ－Ｔ細胞（IL18_CCL19_抗ヒトCD20 CAR-T細胞）、「21 x 19 CAR-T」は実施例３のＩＬ－２１×ＣＣＬ１９　ＣＡＲ－Ｔ細胞（IL21_CCL19_抗ヒトCD20 CAR-T細胞）、「$_{sc}$27 x 19 CAR-T」は実施例４の$_{sc}$ＩＬ２７×ＣＣＬ１９　ＣＡＲ－Ｔ細胞（$_{sc}$IL27_CCL19_抗ヒトCD20 CAR-T細胞）についての結果である。（下記図２～６においても同様である。）

[図2]図２は、実施例（試験例１）において、前記各Ｔ細胞について、（Ａ）ＩＬ－１５、（Ｂ）ＩＬ－１８、（Ｃ）ＩＬ－２１、（Ｄ）ＩＬ－２７および（Ｅ）ＣＣＬ１９の培養上清への分泌量をＥＬＩＳＡにより測定した結果を示す。

[図3]図３は、実施例（試験例２）において、ヒトＣＤ２０発現Ｐ８１５マストサイトーマ（hCD20/P815）との共培養による活性化刺激から３日後、５日後および７日後の、前記各Ｔ細胞の生細胞数を測定した結果を示す。

[図4]図４は、実施例（試験例２）において、前記各Ｔ細胞のＣｙｔｏＴｅｌｌ試薬による染色強度のヒストグラム解析を行った結果を示す。ヒストグラムのピークは細胞分裂による世代数を示し、ドーナツグラフ中の数値（％）はＴｈｙ１．２陽性Ｔ細胞集団におけるゲーティングしたフラクション（１は未分裂の第一世代、２は１回分裂後の第二世代、３は２回分裂後の第三世代、４は３回分裂後の第四世代、＞５は４回以上分裂した第五世代以降を示す。）のパーセンテージを示す。

[図5]図５は、実施例（試験例３）において、（Ａ）ターゲット腫瘍細胞（hC

D20/P815）および（Ｂ）コントロール腫瘍細胞（P815）に対する、前記各Ｔ細胞の腫瘍細胞傷害活性を、フローサイトメトリーにより測定した結果を示す。

[図6]図６は、実施例（試験例３）において、（Ａ）ターゲット腫瘍細胞（hCD20/P815）、および（Ｂ）コントロール腫瘍細胞（P815）と共培養したときの、前記各Ｔ細胞の培養上清中のＩＦＮγの濃度を測定した結果を示す。

[図7]図７は、配列番号１（抗ヒトCD20 CAR DNA断片）の塩基配列に含まれる遺伝子等の配置を表す。

[図8]図８は、配列番号３（MCS DNA断片）の塩基配列に含まれる遺伝子等の配置を表す。

[図9]図９は、配列番号４（$IL15_{LSP}$_F2A_CCL19　DNA断片）の塩基配列に含まれる遺伝子等の配置を表す。

[図10]図１０は、配列番号６（$_{s}IL15_{RA}$_F2A_CCL19 DNA断片）の塩基配列に含まれる遺伝子等の配置を表す。

[図11]図１１は、配列番号８（$_{mb}IL15_{RA}$_F2A_CCL19 DNA断片）の塩基配列に含まれる遺伝子等の配置を表す。

[図12]図１２は、配列番号１０（$_{sushi}$IL15_F2A_CCL19 DNA断片）の塩基配列に含まれる遺伝子等の配置を表す。

[図13]図１３は、配列番号１２（IL-18_F2A_CCL19 DNA断片）の塩基配列に含まれる遺伝子等の配置を表す。

[図14]図１４は、配列番号１４（IL-21_F2A_CCL19 DNA断片）の塩基配列に含まれる遺伝子等の配置を表す。

[図15]図１５は、配列番号１６（$_{sc}$IL27_F2A_CCL19 DNA断片）の塩基配列に含まれる遺伝子等の配置を表す。

[図16]図１６は、実施例（試験例４）において、マウスメラノーマ腫瘍移植モデルに対する抗腫瘍活性（腫瘍体積の変化）を測定した結果を示す。

[図17]図１７は、実施例（試験例４）において、マウス大腸がん腫瘍モデルに対する抗腫瘍活性（腫瘍体積の変化）を測定した結果を示す。

発明を実施するための形態

[0026] 本明細書において、「トランスフェクション」とは、任意の物質を細胞の内部に導入することを意味する。細胞の内部には、少なくとも、細胞質内及び核内が包含される。

[0027] 「培養（Culture)」又は「培養する」とは、組織外又は体外で、例えば、ディッシュ、シャーレ、フラスコ、あるいは培養槽（タンク）中で細胞を維持し、増殖させ、かつ／又は分化させることを意味する。

[0028] 「多能性（pluripotency）」とは、種々の異なった形態や機能を持つ組織や細胞に分化でき、３胚葉のどの系統の細胞にも分化し得る能力を意味する。「多能性（pluripotency）」は、胚盤には分化できず、したがって個体を形成する能力はないという点で、胚盤を含めて、生体のあらゆる組織に分化しうる「全能性（totipotency）」とは区別される。

[0029] 「多能性（multipotency）」とは、複数の限定的な数の系統の細胞へと分化できる能力を意味する。例えば、間葉系幹細胞、造血幹細胞、神経幹細胞はmultipotentだが、pluripotentではない。

[0030] 「幹細胞（stem cell）」としては、例えば、多能性幹細胞（pluripotent stem cell）が挙げられる。

[0031] 本発明において使用可能な「多能性幹細胞（pluripotent stem cell）」とは、生体の種々の異なった形態や機能を持つ組織や細胞に分化でき、３胚葉（内胚葉、中胚葉、外胚葉）のどの系統の細胞にも分化し得る能力を有する幹細胞を指す。それには、特に限定されないが、例えば、胚性幹細胞（ESC）、核移植により得られるクローン胚由来の胚性幹細胞、精子幹細胞、胚性生殖細胞、人工多能性幹細胞（本明細書中、「iPSC」と称することもある）などが挙げられる。

[0032] また、本発明において使用可能な「多能性幹細胞（multipotent stem cell）」とは、複数の限定的な数の系統の細胞へと分化できる能力を有する幹細胞を指す。本発明において使用可能な「多能性幹細胞（multipotent stem cell）」としては、例えば、歯髄幹細胞、口腔粘膜由来幹細胞、毛包幹細胞、

培養線維芽細胞や骨髄幹細胞由来の体性幹細胞などが挙げられる。好ましい多能性幹細胞（pluripotent stem cell）は、ESC及びiPSCである。

[0033] 「人工多能性幹細胞（iPSC）」とは、哺乳動物体細胞又は未分化幹細胞に、特定の因子（核初期化因子）を導入して再プログラミングすることにより得られる細胞を指す。現在、「人工多能性幹細胞」にはさまざまなものがあり、山中らにより、マウス線維芽細胞にOct3/4・Sox2・Klf4・c-Mycの４因子を導入することにより、樹立されたiPSC（Takahashi K, Yamanaka S., Cell, (2006) 126: 663-676）のほか、同様の４因子をヒト線維芽細胞に導入して樹立されたヒト細胞由来のiPSC（Takahashi K, Yamanaka S., et al. Cell, (2007) 131: 861-872.）、上記４因子導入後、Nanogの発現を指標として選別し、樹立したNanog-iPS細胞（Okita, K., Ichisaka, T., and Yamanaka, S. (2007). Nature 448, 313-317.）、c-Mycを含まない方法で作製されたiPS細胞（Nakagawa M, Yamanaka S., et al. Nature Biotechnology, (2008) 26, 101 - 106）、ウイルスフリー法で6因子を導入して樹立されたiPS細胞（Okita K et al. Nat. Methods 2011 May;8(5):409-12, Okita K et al. Stem Cells. 31(3):458-66.）も用いることができる。また、Thomsonらにより作製されたOCT3/4・SOX2・NANOG・LIN28の４因子を導入して樹立された人工多能性幹細胞（Yu J., Thomson JA. et al., Science (2007) 318: 1917-1920.）、Daleyらにより作製された人工多能性幹細胞（Park IH, Daley GQ. et al., Nature (2007) 451: 141-146）、桜田らにより作製された人工多能性幹細胞（特開2008-307007号）等も用いることができる。このほか、公開されているすべての論文（例えば、Shi Y., Ding S., et al., Cell Stem Cell, (2008) Vol3, Issue 5,568-574；、Kim JB., Scholer HR., et al., Nature, (2008) 454, 646-650；Huangfu D., Melton, DA., et al., Nature Biotechnology, (2008) 26, No 7, 795-797）、あるいは特許（例えば、特開2008-307007号、特開2008-283972号、US2008-2336610、US2009-047263、WO2007-069666、WO2008-118220、WO2008-124133、WO2008-151058、WO2009-006930、WO2009-006997、WO2009-007852）に記載されている当該分野で公知の人工多能性幹細胞のい

ずれも用いることができる。

[0034] 「人工多能性幹細胞」としては、NIH、理研（理化学研究所）、京都大学等が樹立した各種iPSC株が利用可能である。例えば、ヒトiPSC株であれば、理研のHiPS-RIKEN-1A株、HiPS-RIKEN-2A株、HiPS-RIKEN-12A株、Nips-B2株、京都大学の253G1株、201B7株、409B2株、454E2株、606A1株、610B1株、648A1株等が挙げられる。あるいは、京都大学やCellular Dynamics International等から提供される臨床グレードの細胞株並びにそれらの細胞株を用いて作製された研究用および臨床用の細胞株等を用いてもよい。

[0035] 「胚性幹細胞（ESC）」としては、マウスESCであれば、inGenious targeting laboratory社、理研（理化学研究所）等が樹立した各種マウスESC株が利用可能であり、ヒトESCであれば、NIH、理研、京都大学、Cellartis社が樹立した各種ヒトESC株が利用可能である。たとえば、ヒトESC株としては、NIHのCHB-1～CHB-12株、RUES1株、RUES2株、HUES1～HUES28株等、WisCell ResearchのH1株、H9株、理研のKhES-1株、KhES-2株、KhES-3株、KhES-4株、KhES-5株、SSES1株、SSES2株、SSES3株等を利用することができる。あるいは、臨床グレードの細胞株並びにそれらの細胞株を用いて作製された研究用および臨床用の細胞株等を用いてもよい。

[0036] 「～を含む（comprise(s)又はcomprising）」とは、その語句に続く要素の包含を示すがこれに限定されないことを意味する。したがって、その語句に続く要素の包含は示唆するが、他の任意の要素の除外は示唆しない。

「～からなる（consist(s) of又はconsisting of）」とは、その語句に続くあらゆる要素を包含し、かつ、これに限定されることを意味する。したがって、「～からなる」という語句は、列挙された要素が要求されるか又は必須であり、他の要素は実質的に存在しないことを示す。「～から本質的になる」とは、その語句に続く任意の要素を包含し、かつ、その要素について本開示で特定された活性又は作用に影響しない他の要素に限定されることを意味する。したがって、「～から本質的になる」という語句は、列挙された要素が要求されるか又は必須であるが、他の要素は任意選択であり、それらが

列挙された要素の活性又は作用に影響を及ぼすかどうかに応じて、存在させる場合もあり、存在させない場合もあることを示す。

[0037] 本発明の所定のサイトカインおよびケモカインの組み合わせは、免疫細胞、特に獲得免疫のうち細胞性免疫を担うＴ細胞や、自然免疫を担うＮＫ細胞、単球、マクロファージ、樹状細胞等に、ＣＡＲ遺伝子とともに遺伝子導入し、発現させることにより、抗腫瘍活性の高いＣＡＲ発現免疫細胞を提供することができる。言い換えれば、本発明の所定のサイトカインおよびケモカインの組み合わせの遺伝子導入および発現は、それぞれＣＡＲの遺伝子導入および発現がなされるＴ細胞（ＣＡＲ－Ｔ細胞）、ＮＫ細胞（ＣＡＲ－ＮＫ細胞）、単球（ＣＡＲ－単球）、マクロファージ（ＣＡＲ－マクロファージ）、樹状細胞（ＣＡＲ－樹状細胞）などに対して、さらなる技術的特徴して賦与することができる。

[0038] 「免疫細胞」は、がん細胞等の標的細胞（病原細胞）を、何らかの作用機序により障害し得る能力を有する細胞（いわゆる免疫エフェクター細胞）であれば特に制限はないが、例えば、獲得免疫のうち細胞性免疫を担うＴ細胞や、自然免疫を担うＮＫ細胞、単球、マクロファージ、樹状細胞等が挙げられる。好ましい一実施形態においては、免疫細胞はＴ細胞であり得る。一方、別の好ましい実施形態においては、免疫細胞は、ＮＫ細胞、マクロファージ、樹状細胞等の自然免疫を担う細胞であり得る。Ｔ細胞はＨＬＡタイプが一致する場合でも、同種異系（アロ）移植によりＧＶＨＤを引き起こすリスクが相当程度あるのに対し、アロＮＫ細胞等はＧＶＨＤを引き起こさないと考えられている。従って、種々のＨＬＡタイプのアロ免疫細胞を準備しておけば、off-the-shelfでの使用が可能となる。ＣＡＲ－ＮＫ細胞については、例えば、US2016/0096892、Mol Ther. 25(8): 1769-1781 (2017)等に、ＣＡＲ－樹状細胞、ＣＡＲ－マクロファージ等については、例えば、WO2017/019848、eLIFE. 2018 e36688等に記載されている。

[0039] 以下、免疫細胞の代表例としてＴ細胞を採用した場合の実施形態に準じた記載により、本発明を説明する。しかしながら、本発明は免疫細胞がＴ細胞

である実施形態だけに限定されるものではなく、免疫細胞がＮＫ細胞、単球、マクロファージ、樹状細胞等である実施形態も本発明に包含される。以下の記載において、「（ＣＡＲ－）Ｔ細胞」は適宜、「（ＣＡＲ－）ＮＫ細胞」、「（ＣＡＲ－）単球」、「（ＣＡＲ－）マクロファージ」、「（ＣＡＲ－）樹状細胞」などに読み替えることができる。

[0040] 以下、本発明のＴ細胞について詳細に説明する。

[0041] 本発明のＴ細胞は、（１）ＣＡＲ、（２）ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１およびＩＬ－２７からなる群より選ばれる少なくとも１種、ならびに（３）ＣＣＬ１９を発現する。

[0042] 本発明におけるＴ細胞は、一般的ないし公知のＣＡＲを発現しているＴ細胞と同様に、αβＴ細胞、γδＴ細胞、ＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞、ＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞、腫瘍浸潤Ｔ細胞、メモリーＴ細胞、ナイーブＴ細胞、ＮＫＴ細胞などのいずれのＴ細胞であってもよい。

[0043] Ｔ細胞は、血液、骨髄液などの体液、脾臓、胸腺、リンパ節などの組織、または原発腫瘍、転移性腫瘍、がん性腹水などのがん組織に浸潤する免疫細胞から単離、精製したものであってもよい。また、Ｔ細胞は、人工多能性幹細胞（ｉＰＳ細胞）、胚性幹細胞（ＥＳ細胞）、またはその他の幹細胞、前駆細胞などを、適切な条件下で培養することにより、Ｔ細胞へ分化誘導させたものであってもよい。

[0044] Ｔ細胞は、ヒト由来であってもよいし、ヒト以外の哺乳類（非ヒト哺乳類）由来の細胞であってもよい。非ヒト哺乳類としては、例えば、マウス、ラット、ハムスター、モルモット、ウサギ、イヌ、ネコ、ブタ、ウシ、ウマ、ヒツジ、サルが挙げられる。

[0045] （１）ＣＡＲ

本発明のＴ細胞が発現するＣＡＲは基本的に、一般的ないし公知のＣＡＲと同様に、（ｉ）がん細胞の細胞表面抗原を認識する一本鎖抗体、（ｉｉ）細胞膜貫通領域、および（ｉｉｉ）Ｔ細胞の活性化を誘導するシグナル伝達領域、の各部位のペプチドが、必要応じてスペーサーを介して連結することによって

構成されている。

[0046] （i）がん細胞の細胞表面抗原を認識する一本鎖抗体は、典型的には、当該抗原に特異的に結合するモノクローナル抗体の抗原結合部位に由来する軽鎖可変領域および重鎖可変領域と、それらを連結するリンカーペプチドとによって構成される単鎖可変領域フラグメント（ｓｃＦｖ）である。

[0047] ＣＡＲが標的とする「がん細胞の細胞表面抗原」は、がん細胞及びその前駆細胞に特異的に発現する生体分子、細胞のがん化によって新たに発現が認められるようになった生体分子、またはがん細胞において正常細胞に比べて発現レベルが増加している生体分子であればよい。そのような抗原は、一般的に「腫瘍関連抗原」（ＴＡＡ）と呼ばれており、例えば、ＢＣＭＡ、Ｂ７－Ｈ３、Ｂ７－Ｈ６、ＣＤ７、ＣＤ１０、ＣＤ１９、ＣＤ２０、ＣＤ２２、ＣＤ２３、ＣＤ２４，ＣＤ３０、ＣＤ３３、ＣＤ３４、ＣＤ３８、ＣＤ４１、ＣＤ４４、ＣＤ５６、ＣＤ７０、ＣＤ７４、ＣＤ９７、ＣＤ１２３、ＣＤ１３３、ＣＤ１３８、ＣＤ１７１、ＣＤ２４８、ＣＡＩＸ、ＣＥＡ、ｃ－Ｍｅｔ、ＣＳ１（ＣＤ３１９）、ＣＳＰＧ４、ＣＬＤＮ６、ＣＬＤ１８Ａ２、ＣＹＰ１Ｂ１、ＤＮＡＭ－１、ＧＤ２、ＧＤ３、ＧＭ２、ＧＦＲα４、ＧＰＣ３、ＧＰＲ２０、ＧＰＲＣ５Ｄ、ｇｌｏｂｏＨ、Ｇｐ１００、ＧＰＲ２０、ＧＰＲＣ５Ｄ、ＥＧＦＲ、ＥＧＦＲｖａｒｉａｎｔ、ＥｐＣＡＭ、ＥＧＰ２、ＥＧＰ４０、ＦＡＰ、ＦＩＴＣ、ＨＥＲ２、ＨＥＲ３、ＨＰＶ Ｅ６、ＨＰＶ Ｅ７、ｈＴＥＲＴ、ＩｇＧ κ鎖、ＩＬ－１１Ｒａ、ＩＬ－１３Ｒａ２、ＫＩＴ、Ｌｅｗｉｓ Ａ、Ｌｅｗｉｓ Ｙ、Ｌｅｇｕｍａｉｎ、ＬＭＰ１、ＬＭＰ２、Ｌｙ６ｋ、ＬＩＣＡＭ、ＭＡＤ－ＣＴ－１、ＭＡＤ－ＣＴ－２、ＭＡＧＥ－Ａ１、Ｍｅｌａｎｏｍａ－ａｓｓｏｃｉａｔｅｄ ａｎｔｉｇｅｎ １、ＭＵＣ１、ＭＵＣ１６、ＮＡ－１７、ＮＹ－ＢＲ－１、ＮＹ－ＥＳＯ－１、Ｏ－ａｃｅｔｙｌ－ＧＤ２、ｈ５Ｔ４、ＰＡＮＸ３、ＰＤＧＲＦｂ、ＰＬＡＣ１、Ｐｏｌｙｓｉａｌｉｃ ａｃｉｄ、ＰＳＣＡ、ＰＳＭＡ、ＲＡＧＥ１、ＲＯＲ１、ｓＬｅ、ＳＳＥＡ－４、ＴＡＲＰ、ＴＡＧ－７２、ＴＥＭ７Ｒ、Ｔｎ ａｎｔｉｇｅｎ、ＴＲＡＩＬ受容体、ＴＲＰ２、Ｔ

ＳＨＲ、αフェトプロテイン、メソテリン、葉酸受容体α（ＦＲα）、葉酸受容体β（ＦＲβ）、ＦＢＰ、ＵＰＫ２、ＶＥＧＦ－Ｒ２、ＷＴ－１を挙げることができるが、これらに限定されるものではない。

[0048] （ii）細胞膜貫通領域は、ＣＡＲをＴ細胞の細胞膜に固定するための領域となるポリペプチドである。そのような細胞膜貫通領域としては、例えば、ＢＴＬＡ、ＣＤ３ε、ＣＤ４、ＣＤ５、ＣＤ８、ＣＤ９、ＣＤ１６、ＣＤ２２、ＣＤ２８、ＣＤ３３、ＣＤ３７、ＣＤ４５、ＣＤ６４、ＣＤ８０、ＣＤ８６、ＣＤ１３４、ＣＤ１３７、ＣＤ１５４、４－１ＢＢ（ＣＤ１３７）、ＣＴＬＡ－４、ＧＩＴＲ、ＩＣＯＳ、ＬＡＧ３、ＯＸ４０、ＳＬＡＭＦ４（ＣＤ２４４、２Ｂ４）、またはＴ細胞受容体のαもしくはβ鎖に由来する細胞膜貫通領域を挙げることができる。あるいは、上記の細胞膜貫通領域の天然のアミノ酸配列に対して、８０％以上、８５％以上、９０％以上、９１％以上、９２％以上、９３％以上、９４％以上、９５％以上、９６％以上、９７％以上、９８％以上または９９％以上の相同性のアミノ酸配列を有する変異型の細胞膜貫通領域を用いることも可能である。本発明の一実施形態において、細胞膜貫通領域としては、ＣＤ８の細胞膜貫通領域が好ましい。

[0049] 細胞膜貫通領域には、任意のアミノ酸配列からなる、長さが１～１００アミノ酸、好ましくは１０～７０アミノ酸のペプチド（オリゴペプチドまたはポリペプチド）である、ヒンジ領域が連結していてもよい。そのようなヒンジ領域としては、例えば、ＣＤ３、ＣＤ８、ＫＩＲ２ＤＳ２、またはＩｇＧ４、ＩｇＤもしくはその他の免疫グロブリンに由来するヒンジ領域を挙げることができる。あるいは、上記のヒンジ領域の天然のアミノ酸配列に対して、８０％以上、８５％以上、９０％以上、９１％以上、９２％以上、９３％以上、９４％以上、９５％以上、９６％以上、９７％以上、９８％以上または９９％以上の相同性のアミノ酸配列を有する変異型のヒンジ領域を用いることも可能である。本発明の一実施形態において、ヒンジ領域としては、ＣＤ８のヒンジ領域が好ましい。

[0050] （iii）Ｔ細胞の活性化を誘導するシグナル伝達領域は、前記一本鎖抗体が

がん細胞の細胞表面抗原を認識して結合した際に、Ｔ細胞内にシグナル伝達するための領域となるポリペプチドである。そのようなシグナル伝達領域としては、例えば、ＭＨＣクラスＩ分子、ＴＮＦ受容体タンパク質、免疫グロブリン様タンパク質、サイトカイン受容体、インテグリン、活性化ＮＫ細胞受容体、ＴｏｌＩ様受容体、Ｂ７－Ｈ３、ＢＡＦＦＲ、ＢＴＬＡ、ＢＹ５５（ＣＤ１６０）、ＣＤ２、ＣＤ３ζ、ＣＤ４、ＣＤ７、ＣＤ８α、ＣＤ８β、ＣＤ１１ａ、ＣＤ１１ｂ、ＣＤ１１ｃ、ＣＤ１１ｄ、ＣＤ１８、ＣＤ１９、ＣＤ１９ａ、ＣＤ２７、ＣＤ２８、ＣＤ２９、ＣＤ３０、ＣＤ４０、ＣＤ４９ａ、ＣＤ４９Ｄ、ＣＤ４９ｆ、ＣＤ６９、ＣＤ８４、ＣＤ９６（Ｔａｃｔｉｌｅ）、ＣＤ１０３、４－１ＢＢ（ＣＤ１３７）、ＣＤＳ、ＣＥＡＣＡＭ１、ＣＲＴＡＭ、ＣＮＡＭ１（ＣＤ２２６）、ＤＡＰ１０、Ｆｃ　Ｒｅｃｅｐｔｏｒ－ａｓｓｏｃｉａｔｅｄ　γｃｈａｉｎ、ＧＡＤＳ、ＧＩＴＲ、ＨＶＥＭ（ＬＩＧＨＴＲ）、ＩＡ４、ＩＣＡＭ－１、ＩＣＯＳ（ＣＤ２７８）、ＩＬ２Ｒβ、ＩＬ２Ｒγ、ＩＬ７Ｒα、ＩＴＧＡ４、ＩＴＧＡ６、ＩＴＧＡＤ、ＩＴＧＡＥ、ＩＴＧＡＬ、ＩＴＧＡＭ、ＩＴＧＡＸ、ＩＴＧＢ１、ＩＴＧＢ２、ＩＴＧＢ７、ＫＩＲＤＳ２、Ｌｙ９（ＣＤ２２９）、ＬＡＴ、ＬＦＡ－１（ＣＤ１１ａ／ＣＤ１８）、ＬＩＧＨＴ、ＬＴＢＲ、ＮＫＧ２Ｃ、ＮＫＧ２Ｄ、ＮＫｐ３０、ＮＫｐ４４、ＮＫｐ４６、ＮＫｐ８０（ＫＬＲＦ１）、ＯＸ４０、ＰＡＧ／Ｃｂｐ、ＰＳＧＬ１、ＳＥＬＰＬＧ（ＣＤ１６２）、ＳＥＭＡ４Ｄ（ＣＤ１００）、ＳＬＡＭ（ＳＬＡＭＦ１、ＣＤ１５０、ＩＰＯ－３）、ＳＬＡＭＦ４（ＣＤ２４４、２Ｂ４）、ＳＬＡＭＦ６（ＮＴＢ－Ａ、Ｌｙ１０８）、ＳＬＡＭＦ７、ＳＬＡＭＦ８（ＢＬＡＭＥ）、ＳＬＰ－７６、ＴＮＦＲ２、ＴＲＡＮＣＥ／ＲＡＮＫＬ、ＶＬＡ１およびＶＬＡ－６からなる群より選ばれる１種または２種以上の細胞内領域を挙げることができる。あるいは、上記のシグナル伝達領域（細胞内領域）の天然のアミノ酸配列に対して、８０％以上、８５％以上、９０％以上、９１％以上、９２％以上、９３％以上、９４％以上、９５％以上、９６％以上、９７％以上、９８％以上または９９％以上の相同性のアミノ酸配列を有する変異型の

シグナル伝達領域（細胞内領域）を用いることも可能である。本発明の一実施形態において、シグナル伝達領域は、ＣＤ２８、４－１ＢＢ、及びＣＤ３ζの３種の細胞内領域を含むことが好ましい。

[0051] シグナル伝達領域が複数の細胞内領域を含む場合、各細胞内領域同士は、２～１０アミノ酸からなるリンカーペプチド（オリゴペプチドリまたはポリペプチド）を介して連結されていてもよい。そのようなリンカーペプチドとしては、例えば、グリシン－セリン連続配列からなるペプチドを挙げることができる。

[0052] 一本鎖抗体と細胞膜貫通領域、および細胞膜貫通領域とシグナル伝達領域はそれぞれ、任意のアミノ酸配列からなる長さが１～１００アミノ酸、好ましくは１０～５０アミノ酸のペプチド（オリゴペプチドまたはポリペプチド）である、スペーサー領域を含んでもよい。スペーサー領域としては、例えば、グリシン－セリン連続配列からなるペプチドを挙げることができる。

[0053] 本発明のＴ細胞が発現する上述したようなＣＡＲのアミノ酸配列は、Ｔ細胞の用途、典型的にはがんを治療するための医薬の有効成分としての機能に応じて、適切なものとすればよい。がん細胞の細胞表面抗原に対する一本鎖抗体（i）のアミノ酸配列としては様々なものが公知であり、それらのアミノ酸配列の情報を本発明でも利用することができる。あるいは、常法に従って、所望のがん細胞の細胞表面抗原に対する抗体を新たに作製し、その新規の抗体（好ましくは重鎖及び軽鎖可変領域、特にＣＤＲ）のアミノ酸配列を決定して、その情報を本発明において利用するようにしてもよい。また、細胞膜貫通領域（ii）およびＴ細胞活性化シグナル伝達領域（iii）それぞれのアミノ酸配列としても、ヒト由来およびヒト以外の哺乳動物由来のさまざまなものが公知であり、ＮＣＢＩ（National Center for Biotechnology Information; http://www.ncbi.nlm.nih.gov/guide/）、ＵｎｉＰｒｏｔ（The Universal Protein Resource; https://www.uniprot.org）などのデータベースにも登録されているので、それらの情報を本発明でも利用することができる。

[0054] （２）サイトカイン

本発明のＴ細胞が発現するサイトカインは、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１およびＩＬ－２７からなる群より選ばれる少なくとも１種である。本発明のＴ細胞は、上記４種のサイトカインのうち、いずれか１種を発現していてもよいし、２種以上を発現していてもよい。

[0055] ＩＬ－１５は、Ｔ細胞の生存、活性化およびメモリーＴ細胞への分化、ならびにＮＫ細胞の活性化などに関係する機能を有しているサイトカインである。本発明における「ＩＬ－１５」という用語は、天然の完全長のＩＬ－１５タンパク質だけでなく、本発明の作用効果におけるＩＬ－１５の機能を保持する範囲で種々の実施形態を包含する。すなわち、本発明における「ＩＬ－１５」は、天然のＩＬ－１５のアミノ酸配列からなるタンパク質（ポリペプチド）の全体のみならず、その一部（機能的な部分ポリペプチド）や、天然のアミノ酸配列に対して一または複数のアミノ酸配列が（好ましくは後述するような相同性を有する範囲で）欠失、置換または付加された、天然のＩＬ－１５の全体またはその一部のバリアントも包含し、さらに天然のＩＬ－１５の全体またはその一部あるいはそれらのバリアントが、他のタンパク質と連結して融合タンパク質の形態をとっている（例、ＩＬ－１５Ｒαの全体またはその一部と連結して融合タンパク質を形成した状態にある）場合も包含する。本発明において、Ｔ細胞が「ＩＬ－１５を発現する」とは、本発明の作用効果が失われない範囲で上記のような種々の形態のＩＬ－１５（天然のアミノ酸配列を有するタンパク質の全体もしくはその一部またはそれらのバリアントであって、融合タンパク質の形態をとっていてもとっていなくてもよいもの）を発現することを包含する。

[0056] ＩＬ－１５としては、例えば次のような４つの実施形態が挙げられる。これらはいずれも公知である（前掲非特許文献２、非特許文献３、非特許文献４、および特許文献４などを参照）。しかしながら本発明で用いることのできるＩＬ－１５はこれらの具体例に限定されるものではなく、配列中のシグナルペプチドおよびリンカーの有無および種類、各要素の順序、その他の観点から改変された様々なＩＬ－１５（本明細書において「改変型」のＩＬ－

１５と呼ぶことがある。）を用いることも可能である。

[0057] ＩＬ－１５の第１実施形態：ＩＬ－１５ＬＳＰ／ＩＬ－１５（本明細書において「ＩＬ１５$_{LSP}$」と表記することがある。）

「ＩＬ－１５ＬＳＰ」は、２９アミノ酸からなる長鎖シグナルペプチドであり、第１実施形態においてＩＬ－１５のＮ末端側に結合している。第１実施形態のＩＬ－１５を発現することにより、ＣＡＲ－Ｔ細胞の抗腫瘍活性が増強される。「ＩＬ－１５ＬＳＰ」という用語も、天然のＩＬ－１５ＬＳＰのアミノ酸配列からなるポリペプチドの全体のみならず、その一部（機能的な部分ポリペプチド）や、天然のアミノ酸配列に対して一または複数のアミノ酸配列が（好ましくは後述するような相同性を有する範囲で）欠失、置換または付加された、天然のＩＬ－１５ＬＳＰの全体またはその一部のバリアントも包含する。なお、第１実施形態の改変型の一例としては、「ＩＬ－１５ＬＳＰ」を「ＩＬ－２ＳＰ」（ＩＬ－２のシグナルペプチドであって、ＩＬ－１５ＬＳＰと同様、天然のタンパク質の全体もしくはその一部またはそれらのバリアントであってもよいもの）に置き換えたものが挙げられる。

[0058] ＩＬ－１５の第２実施形態：ＩＬ－１５／ＩＬ－１５Ｒα細胞外ドメイン（本明細書において「$_{s}$ＩＬ１５$_{RA}$」と表記することがある。）

「ＩＬ－１５Ｒα細胞外ドメイン」は、ＩＬ－１５Ｒα（インターロイキン１５受容体α鎖）のうち、細胞膜貫通ドメインおよび細胞内ドメインを除く部分を指す。ＩＬ－１５Ｒα細胞外ドメインにはｓｕｓｈｉドメイン（様々な結合性タンパク質に共通して見られるモチーフ）が含まれている。「ＩＬ－１５Ｒα細胞外ドメイン」という用語も、天然のＩＬ－１５Ｒα細胞外ドメインのアミノ酸配列からなるポリペプチドの全体のみならず、その一部（機能的な部分ポリペプチド）や、天然のアミノ酸配列に対して一または複数のアミノ酸配列が（好ましくは後述するような相同性を有する範囲で）欠失、置換または付加された、天然のＩＬ－１５Ｒα細胞外ドメインの全体またはその一部のバリアントも包含する。ＩＬ－１５Ｒα細胞外ドメインは、第２実施形態においては、通常はリンカー（例えば２６アミノ酸からなるグ

リシン－セリンリンカー）を介して、ＩＬ－１５のＣ末端側に結合している。また、第２実施形態においては通常、ＩＬ－１５のＮ末端側にはＩＬ－１５ＬＳＰに代えて、ＩＬ－２ＳＰ（ＩＬ－２シグナルペプチドであって、天然のタンパク質の全体もしくはその一部またはそれらのバリアントであってもよいもの）が結合している。第２実施形態は分泌型であり、ＩＬ－１５Ｒβ（インターロイキン２受容体と共有される、インターロイキン１５受容体β鎖）およびγｃ（インターロイキン２、４、７、９、１５、２１等の受容体として共有される共通γ鎖）に対して強く結合するアゴニストとなる。

[0059] ＩＬ－１５の第３実施形態：ＩＬ－１５／ＩＬ－１５Ｒα全長（本明細書において「$_{mb}$ＩＬ１５$_{RA}$」と表記することがある。）

「ＩＬ－１５Ｒα全長」は、ＩＬ－１５Ｒαの細胞外ドメイン、細胞膜貫通ドメインおよび細胞内ドメインの両方を含んでおり、第３実施形態においては、通常はリンカー（例えば２０アミノ酸からなるグリシン－セリンリンカー）を介して、ＩＬ－１５のＣ末端側に結合している。「ＩＬ－１５Ｒα全長」という用語も、天然のＩＬ－１５Ｒα全長のアミノ酸配列からなるタンパク質（ポリペプチド）の全体のみならず、天然のアミノ酸配列に対して一または複数のアミノ酸配列が（好ましくは後述するような相同性を有する範囲で）欠失、置換または付加された、天然のＩＬ－１５Ｒα全長のバリアントも包含する。また、第３実施形態においても通常、ＩＬ－１５のＮ末端側にはＩＬ－１５ＬＳＰに代えてＩＬ－２ＳＰ（天然のタンパク質の全体もしくはその一部またはそれらのバリアントであってもよいもの）が結合している。第３実施形態は膜結合型であり、これを発現することによりＣＡＲ－Ｔ細胞の抗腫瘍活性が増強される。

[0060] ＩＬ－１５の第４実施形態：ＩＬ－１５Ｒαｓｕｓｈｉ／ＩＬ－１５（本明細書において「$_{sushi}$ＩＬ１５」と表記することがある。）

第４実施形態では、シグナルペプチドおよびｓｕｓｈｉドメインを含むＩＬ－１５Ｒαが、通常はリンカー（例えば２０アミノ酸からなるリンカー）を介して、ＩＬ－１５のＮ末端側に結合している。「ＩＬ－１５Ｒαｓｕｓ

ｈｉ」という用語も、天然のＩＬ－１５Ｒαｓｕｓｈｉのアミノ酸配列からなるポリペプチドの全体のみならず、その一部（機能的な部分ポリペプチド）や、天然のアミノ酸配列に対して一または複数のアミノ酸配列が（好ましくは後述するような相同性を有する範囲で）欠失、置換または付加された、天然のＩＬ－１５Ｒαｓｕｓｈｉの全体またはその一部のバリアントも包含する。第４実施形態は分泌型である。

[0061] 本発明において、後記実施例（試験例）に示されているような細胞の持続性および増殖性の観点からは、ＩＬ－１５としては、ＩＬ－１５Ｒα（天然のアミノ酸配列を有するタンパク質の全体もしくはその一部またはそれらのバリアント）との融合タンパク質の形態にあるＩＬ－１５（天然のアミノ酸配列を有するタンパク質の全体もしくはその一部またはそれらのバリアント）が好ましい。例えば、上記第２、第３または第４の実施形態あるいはそれらの改変型が好ましく、上記第３および第４の実施形態あるいはそれらの改変型がより好ましい。

[0062] ＩＬ－１８は、Ｔ細胞の活性化、ＮＫ細胞の活性化、および樹状細胞の活性化などに関係する機能を有しているサイトカインである。本発明における「ＩＬ－１８」という用語は、天然の完全長のＩＬ－１８タンパク質だけでなく、本発明の作用効果におけるＩＬ－１８の機能を保持する範囲で種々の実施形態を包含する。すなわち、本発明における「ＩＬ－１８」は、天然のＩＬ－１８のアミノ酸配列からなるタンパク質（ポリペプチド）の全長のみならず、その一部（機能的な部分ポリペプチド）や、天然のアミノ酸配列に対して一または複数のアミノ酸配列が（好ましくは後述するような相同性を有する範囲で）欠失、置換または付加された、天然のＩＬ－１８の全体またはその一部のバリアントも包含し、さらに天然のＩＬ－１８の全体またはその一部が、他のタンパク質と連結して融合タンパク質の形態をとっている場合も包含する。本発明において、Ｔ細胞が「ＩＬ－１８を発現する」とは、本発明の作用効果が失われない範囲で上記のような種々の形態のＩＬ－１８（天然のアミノ酸配列を有するタンパク質の全体もしくはその一部またはそ

れらのバリアントであって、融合タンパク質の形態をとっていてもとっていなくてもよいもの）を発現することを包含する。

[0063] ＩＬ－２１は、ＣＤ８⁺Ｔ細胞の機能およびメモリーＴ細胞への分化、ならびにＮＫ細胞の生存などに関係する機能を有しているサイトカインである。本発明における「ＩＬ－２１」という用語は、天然の完全長のＩＬ－２１タンパク質だけでなく、本発明の作用効果におけるＩＬ－２１の機能を保持する範囲で種々の実施形態を包含する。すなわち、本発明における「ＩＬ－２１」は、天然のＩＬ－２１のアミノ酸配列からなるタンパク質（ポリペプチド）の全長のみならず、その一部（機能的な部分ポリペプチド）や、天然のアミノ酸配列に対して一または複数のアミノ酸配列が（好ましくは後述するような相同性を有する範囲で）欠失、置換または付加された、天然のＩＬ－２１の全体またはその一部のバリアントも包含し、さらに天然のＩＬ－２１の全体またはその一部が、他のタンパク質と連結して融合タンパク質の形態をとっている場合も包含する。本発明において、Ｔ細胞が「ＩＬ－２１を発現する」とは、本発明の作用効果が失われない範囲で上記のような種々の形態のＩＬ－２１（天然のアミノ酸配列を有するタンパク質の全体もしくはその一部またはそれらのバリアントであって、融合タンパク質の形態をとっていてもとっていなくてもよいもの）を発現することを包含する。

[0064] ＩＬ－２７は、Ｔ細胞の生存、ＮＫ細胞の活性化、腫瘍の増殖と血管新生の阻害などに関係する機能を有しているサイトカインである。本発明における「ＩＬ－２７」という用語は、天然の完全長のＩＬ－２７タンパク質だけでなく、本発明の作用効果におけるＩＬ－２７の機能を保持する範囲で種々の実施形態を包含する。すなわち、本発明における「ＩＬ－２７」は、天然のＩＬ－２７のアミノ酸配列からなるタンパク質（ポリペプチド）の全長のみならず、その一部（機能的な部分ポリペプチド）や、天然のアミノ酸配列に対して一または複数のアミノ酸配列が（好ましくは後述するような相同性を有する範囲で）欠失、置換または付加された、天然のＩＬ－２７の全体またはその一部のバリアントも包含し、さらに天然のＩＬ－２７の全体または

その一部が、他のタンパク質と連結して融合タンパク質の形態をとっている場合も包含する。本発明において、Ｔ細胞が「ＩＬ－２７を発現する」とは、本発明の作用効果が失われない範囲で上記のような種々の形態のＩＬ－２７（天然のアミノ酸配列を有するタンパク質の全体もしくはその一部またはそれらのバリアントであって、融合タンパク質の形態をとっていてもとっていなくてもよいもの）を発現することを包含する。

[0065] ＩＬ－２７としては、例えば、ＩＬ－２７を構成する２つのサブユニット、ｐ２８およびＥＢＩ３（エプスタイン・バーウイルス誘導遺伝子３）が、リンカー、例えば$(G_4S)_3$のような２０～３０アミノ酸からなるリンカー（前掲非特許文献５などを参照）、GSTSGSGKPGSGEGSTKGからなるリンカー（J Immunol. 183, 6217-26 (2009)）で連結されている融合タンパク質（一本鎖タンパク質）が挙げられる。「ｐ２８」および「ＥＢＩ３」という用語も、それぞれ、天然のアミノ酸配列を有するポリペプチドの全体もしくはその一部またはそれらのバリアントを包含する。

[0066] 本発明のＴ細胞が発現する上述したようなサイトカインのアミノ酸配列は、本発明のＴ細胞（ＣＡＲ－Ｔ細胞）の用途、典型的にはがんを治療するための医薬の有効成分としての機能に応じて、ＣＡＲ－Ｔ細胞の持続性および増殖性の向上を含む、ＣＡＲ－Ｔ細胞による抗腫瘍活性の増強に対する効果を考慮しながら、適切なものとすればよい。ヒト由来およびヒト以外の哺乳動物（例えばマウス）由来の天然のＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１およびＩＬ－２７ならびにＩＬ－１５Ｒαのアミノ酸配列は公知であり、ＮＣＢＩ、ＵｎｉＰｒｏｔなどのデータベースにも登録されているので、その情報を本発明でも利用することができる。一例として、ＵｎｉＰｒｏｔＫＢ－Ｐ４０９３３として登録されている、ヒトの天然のＩＬ－１５（シグナルペプチドおよびプロペプチド部分を含む全長）のアミノ酸配列を配列番号１８として示し、ＵｎｉＰｒｏｔＫＢ－Ｑ１３２６１として登録されているヒトの天然のＩＬ－１５Ｒα（シグナルペプチド、ｓｕｓｈｉドメイン、細胞外ドメイン等を含む全長）のアミノ酸配列を配列番号１９として、それぞれ示

す。後述するような、所定の配列番号のアミノ酸配列においてマウスの天然のアミノ酸配列をヒトの天然のアミノ酸配列に置き換える実施形態においては、配列番号１８および１９に含まれている対応する部分のアミノ酸配列を参照することができる。また、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１およびＩＬ－２７ならびにＩＬ－１５Ｒαそれぞれのバリアント、他のタンパク質との融合タンパク質およびそれらの改変型として様々なものが公知であり、それらのアミノ酸配列の情報を本発明でも利用することができる。

[0067] ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１およびＩＬ－２７それぞれのバリアントとしては、例えば、全体としてまたは部分的な領域（ドメイン）として、例えば下記のようにシグナルペプチドを置き換えた場合はそのシグナルペプチドを除く領域の相同性として、それぞれのヒトまたはヒト以外の哺乳動物由来の天然のアミノ酸配列に対して、８０％以上、８５％以上、９０％以上、９１％以上、９２％以上、９３％以上、９４％以上、９５％以上、９６％以上、９７％以上、９８％以上または９９％以上の相同性のアミノ酸配列を有するものが挙げられる。ある生物種由来の天然のアミノ酸配列に対して上記のような範囲の相同性を有するバリアントとして、他の生物種由来の天然のアミノ酸配列が該当する（実質的に包含される）こともある。またＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１およびＩＬ－２７は、配列中のシグナルペプチドを公知のシグナルペプチドに置き換えたものであってもよい。本発明の一側面において、配列番号４：ＩＬ１５$_{LSP}$＿Ｆ２Ａ＿ＣＣＬ１９　ＤＮＡ断片（ＤＮＡ断片＃３）、配列番号６：$_{s}$ＩＬ１５$_{RA}$＿Ｆ２Ａ＿ＣＣＬ１９　ＤＮＡ断片（ＤＮＡ断片＃４）、配列番号８：$_{mb}$ＩＬ１５$_{RA}$＿Ｆ２Ａ＿ＣＣＬ１９　ＤＮＡ断片（ＤＮＡ断片＃５）、配列番号１０：$_{sushi}$ＩＬ１５＿Ｆ２Ａ＿ＣＣＬ１９　ＤＮＡ断片（ＤＮＡ断片＃６）、配列番号１２：ＩＬ－１８＿Ｆ２Ａ＿ＣＣＬ１９　ＤＮＡ断片（ＤＮＡ断片＃７）、配列番号１４：ＩＬ－２１＿Ｆ２Ａ＿ＣＣＬ１９　ＤＮＡ断片（ＤＮＡ断片＃８）、配列番号１６：$_{sc}$ＩＬ２７＿Ｆ２Ａ＿ＣＣＬ１９　ＤＮＡ断片（ＤＮＡ断片＃９）、それぞれの塩基配列から発現するタンパク質（ポリペプチド）のアミノ

酸配列において、あるいは配列番号５：ＩＬ１５$_{LSP}$を含む融合タンパク質、配列番号７：$_{s}$ＩＬ１５$_{RA}$を含む融合タンパク質、配列番号９：$_{mb}$ＩＬ１５$_{RA}$を含む融合タンパク質、配列番号１１：$_{sushi}$ＩＬ１５を含む融合タンパク質、配列番号１３：ＩＬ－１８を含む融合タンパク質、配列番号１５：ＩＬ－２１を含む融合タンパク質、配列番号１７：$_{sc}$ＩＬ２７を含む融合タンパク質、それぞれのアミノ酸配列において、マウスの天然のＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１またはＩＬ－２７のアミノ酸配列は、上記のような相同性を有するバリアントのアミノ酸配列、あるいはそのようなバリアントに実質的に該当する、ヒトの天然のＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１もしくはＩＬ－２７のアミノ酸配列またはそれらのさらなるバリアントに、置き換えることができる。

[0068] ＩＬ－１５Ｒα細胞外ドメイン、ＩＬ－１５Ｒα全長およびＩＬ－１５Ｒαｓｕｓｈｉそれぞれのバリアントとしては、それぞれのヒトまたはヒト以外の哺乳動物由来の天然のアミノ酸配列に対して、８０％以上、８５％以上、９０％以上、９１％以上、９２％以上、９３％以上、９４％以上、９５％以上、９６％以上、９７％以上、９８％以上または９９％以上の相同性のアミノ酸配列を有するものが挙げられる。本発明の一側面において、配列番号４：ＩＬ１５$_{LSP}$__Ｆ２Ａ__ＣＣＬ１９　ＤＮＡ断片（ＤＮＡ断片＃３）、配列番号６：$_{s}$ＩＬ１５$_{RA}$__Ｆ２Ａ__ＣＣＬ１９　ＤＮＡ断片（ＤＮＡ断片＃４）、配列番号８：$_{mb}$ＩＬ１５$_{RA}$__Ｆ２Ａ__ＣＣＬ１９　ＤＮＡ断片（ＤＮＡ断片＃５）、配列番号１０：$_{sushi}$ＩＬ１５__Ｆ２Ａ__ＣＣＬ１９　ＤＮＡ断片（ＤＮＡ断片＃６）、それぞれの塩基配列から発現するタンパク質（ポリペプチド）のアミノ酸配列において、あるいは配列番号５：ＩＬ１５$_{LSP}$を含む融合タンパク質、配列番号７：$_{s}$ＩＬ１５$_{RA}$を含む融合タンパク質、配列番号９：$_{mb}$ＩＬ１５$_{RA}$を含む融合タンパク質、配列番号１１：$_{sushi}$ＩＬ１５を含む融合タンパク質、それぞれのアミノ酸配列において、マウスの天然のＩＬ－１５Ｒα細胞外ドメイン、ＩＬ－１５Ｒα全長またはＩＬ－１５Ｒαｓｕｓｈｉのアミノ酸配列は、上記のような相同性を有するバリアントのア

ミノ酸配列、あるいはそのようなバリアントに実質的に該当する、ヒトの天然のＩＬ－１５Ｒα細胞外ドメイン、ＩＬ－１５Ｒα全長もしくはＩＬ－１５Ｒαｓｕｓｈｉのアミノ酸配列またはそれらのさらなるバリアントに、置き換えることができる。

[0069] ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１およびＩＬ－２７は、本発明のＴ細胞の作製に用いるＴ細胞（そのＴ細胞が有するＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１およびＩＬ－２７の受容体）と同じ種類の、ヒトまたはヒト以外の哺乳動物（例えばマウス）に由来するものが好ましい。ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１およびＩＬ－２７それぞれの融合タンパク質に含まれる、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１およびＩＬ－２７以外の部位（例えばＩＬ－１５Ｒα）についても、本発明のＴ細胞の作製に用いるＴ細胞と同じ種類の、ヒトまたはヒト以外の哺乳動物に由来するものが好ましい。本発明の一側面において、配列番号４：$IL15_{LSP}$__Ｆ２Ａ__ＣＣＬ１９　ＤＮＡ断片（ＤＮＡ断片＃３）、配列番号６：$_{s}$ＩＬ１５$_{RA}$__Ｆ２Ａ__ＣＣＬ１９　ＤＮＡ断片（ＤＮＡ断片＃４）、配列番号８：$_{mb}$ＩＬ１５$_{RA}$__Ｆ２Ａ__ＣＣＬ１９　ＤＮＡ断片（ＤＮＡ断片＃５）、配列番号１０：$_{sushi}$ＩＬ１５__Ｆ２Ａ__ＣＣＬ１９　ＤＮＡ断片（ＤＮＡ断片＃６）、配列番号１２：ＩＬ－１８__Ｆ２Ａ__ＣＣＬ１９　ＤＮＡ断片（ＤＮＡ断片＃７）、配列番号１４：ＩＬ－２１__Ｆ２Ａ__ＣＣＬ１９　ＤＮＡ断片（ＤＮＡ断片＃８）、配列番号１６：$_{sc}$ＩＬ２７__Ｆ２Ａ__ＣＣＬ１９　ＤＮＡ断片（ＤＮＡ断片＃９）、それぞれの塩基配列から発現するタンパク質（ポリペプチド）のアミノ酸配列において、あるいは配列番号５：$IL15_{LSP}$を含む融合タンパク質、配列番号７：$_{s}$ＩＬ１５$_{RA}$を含む融合タンパク質、配列番号９：$_{mb}$ＩＬ１５$_{RA}$を含む融合タンパク質、配列番号１１：$_{sushi}$ＩＬ１５を含む融合タンパク質、配列番号１３：ＩＬ－１８を含む融合タンパク質、配列番号１５：ＩＬ－２１を含む融合タンパク質、配列番号１７：$_{sc}$ＩＬ２７を含む融合タンパク質、それぞれのアミノ酸配列において、マウスの天然のＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１またはＩＬ－２７のアミノ酸配列あるいはＩＬ－１５Ｒ

α細胞外ドメイン、ＩＬ－１５Ｒα全長またはＩＬ－１５Ｒαｓｕｓｈｉのアミノ酸配列は、それぞれのヒトの天然のアミノ酸配列に置き換えることができる。

[0070] （３）ケモカイン

本発明のＴ細胞が発現するケモカインはＣＣＬ１９である。ＣＣＬ１９は、主にリンパ節の樹状細胞やマクロファージから産生され、その受容体であるＣＣＲ７を介して、Ｔ細胞、Ｂ細胞および成熟した樹状細胞の郵送を惹起する機能を有している。本発明における「ＣＣＬ１９」は、天然のＣＣＬ１９のアミノ酸配列からなるタンパク質（ポリペプチド）の全長のみならず、その一部（機能的な部分ポリペプチド）や、天然のアミノ酸配列に対して一または複数のアミノ酸配列が（好ましくは後述するような相同性を有する範囲で）欠失、置換または付加された、天然のＣＣＬ１９の全長またはその一部のバリアントも包含する。

[0071] 本発明のＴ細胞が発現する上述したようなケモカインのアミノ酸配列は、本発明のＴ細胞（ＣＡＲ）の用途、典型的にはがんを治療するための医薬の有効成分としての機能に応じて、ＣＡＲ－Ｔ細胞の持続性および増殖性の向上を含む、ＣＡＲ－Ｔ細胞による抗腫瘍活性の増強に対する効果を考慮しながら、適切なものとすればよい。ヒト由来およびヒト以外の哺乳動物（例えばマウス）由来の天然のＣＣＬ１９のアミノ酸配列は公知であり、ＮＣＢＩ、ＵｎｉＰｒｏｔなどのデータベースにも登録されているので、その情報を本発明でも利用することができる。また、ＣＣＬ１９のバリアントとして公知になっているもののアミノ酸配列の情報を本発明でも利用することができる。

[0072] ＣＣＬ１９のバリアントとしては、例えば、全体としてまたは部分的な領域として、ヒトまたはヒト以外の哺乳動物由来の天然のＣＣＬ１９のアミノ酸配列に対して、８０％以上、８５％以上、９０％以上、９１％以上、９２％以上、９３％以上、９４％以上、９５％以上、９６％以上、９７％以上、９８％以上または９９％以上の相同性のアミノ酸配列を有するものが挙げら

れる。本発明の一側面において、配列番号４：ＩＬ１５$_{LSP}$__Ｆ２Ａ__ＣＣＬ１９　ＤＮＡ断片（ＤＮＡ断片＃３）、配列番号６：$_{s}$ＩＬ１５$_{RA}$__Ｆ２Ａ__ＣＣＬ１９　ＤＮＡ断片（ＤＮＡ断片＃４）、配列番号８：$_{mb}$ＩＬ１５$_{RA}$__Ｆ２Ａ__ＣＣＬ１９　ＤＮＡ断片（ＤＮＡ断片＃５）、配列番号１０：$_{sushi}$ＩＬ１５__Ｆ２Ａ__ＣＣＬ１９　ＤＮＡ断片（ＤＮＡ断片＃６）、配列番号１２：ＩＬ－１８__Ｆ２Ａ__ＣＣＬ１９　ＤＮＡ断片（ＤＮＡ断片＃７）、配列番号１４：ＩＬ－２１__Ｆ２Ａ__ＣＣＬ１９　ＤＮＡ断片（ＤＮＡ断片＃８）、配列番号１６：$_{sc}$ＩＬ２７__Ｆ２Ａ__ＣＣＬ１９　ＤＮＡ断片（ＤＮＡ断片＃９）、それぞれの塩基配列から発現するタンパク質（ポリペプチド）のアミノ酸配列において、マウスの天然のＣＣＬ１９のアミノ酸配列は、上記のような相同性を有するバリアントのアミノ酸配列、あるいはそのようなバリアントに実質的に該当する、ヒトの天然のＣＣＬ１９のアミノ酸配列またはそのさらなるバリアントに、置き換えることができる。

[0073] ＣＣＬ１９は、本発明のＴ細胞の作製に用いるＴ細胞（そのＴ細胞が有するＣＣＬ１９の受容体）と同じ種類の、ヒトまたはヒト以外の哺乳動物（例えばマウス）に由来するものまたはそのバリアントが好ましい。

[0074] 以下、本発明の医薬について詳細に説明する。

[0075] 本発明の医薬は、上述したような本発明のＴ細胞を含有し、必要に応じてその他の成分をさらに含有してもよい。当業者であれば、本発明の医薬を、用途（治療対象）や剤型を考慮しながら、本発明のＴ細胞を使用して適切に調製することができる。

[0076] 本発明の医薬は、主として、本発明のＴ細胞が発現しているＣＡＲが標的としている、がん細胞の細胞表面抗原（がん特異抗原）に対応しているがんを治療の対象とする医薬（抗がん剤）である。したがって、ＣＡＲが標的とする抗原を発現しているがん細胞をがん組織内に含んでおり、本発明のＴ細胞によって一定水準の治療効果が認められる限り、本発明の医薬が対象とするがんの種類は特に限定されるものではない。本発明の医薬が対象とし得るがんとしては、例えば、腺がん、扁平上皮がん、腺扁平上皮がん、未分化が

ん、大細胞がん、小細胞がん、皮膚がん（例、メラノーマ、メルケル細胞がん）、乳がん、前立腺がん、膀胱がん、膣がん、頸部がん、頭頸部がん、子宮がん、子宮頸がん、肝臓がん、腎臓がん、膵臓がん、脾臓がん、肺がん、非小細胞肺がん、気管がん、気管支がん、結腸がん、直腸がん、小腸がん、大腸がん、胃がん、食道がん、胆嚢がん、精巣がん、卵巣がん、卵管がん、上咽頭がんなどのがん；骨組織、軟骨組織、脂肪組織、筋組織、血管組織及び造血組織のがん；軟骨肉腫、ユーイング肉腫、横紋筋肉腫、悪性血管内皮腫、悪性シュン腫、骨肉腫、軟部組織肉腫などの肉腫；肝芽腫、髄芽腫、腎芽腫、神経芽腫、膵芽腫、胸膜肺芽腫、網膜芽腫などの芽腫；胚細胞腫瘍；リンパ腫；白血病、急性骨髄性白血病、多発性骨髄腫、を挙げることができる。好ましくは、ＮＫ細胞に感受性がある癌腫（メラノーマ、メルケル細胞がん、大腸がん、腎臓がん、乳がん、卵巣がん、卵管がん、子宮頸がん、肝臓がん、肺がん、非小細胞肺がん、頭頸部がん、小腸がん、前立腺がん、膀胱がん、直腸がん、膵臓がん、ユーイング肉腫、横紋筋肉腫、上咽頭がん、食道がん、胆道がん、神経芽腫、骨肉腫、急性骨髄性白血病、多発性骨髄腫、リンパ腫、白血病等）が挙げられる。より好ましくは、メラノーマ、大腸がん、腎臓がん、多発性骨髄腫、リンパ腫、白血病が挙げられる。

[0077] 本発明の医薬が含有することができるＴ細胞以外の成分としては、例えば、薬学的に許容される添加剤、より具体的には、生理食塩水、緩衝生理食塩水、細胞培養培地、デキストロース、注射用水、グリセロール、エタノール、安定剤、可溶化剤、界面活性剤、緩衝剤、防腐剤、等張化剤、充填剤、潤滑剤などが挙げられる。

[0078] 本発明の医薬は、公知のＣＡＲを発現しているＴ細胞と同様の手法で、がんの治療を必要とする対象（がん患者、担癌動物等）に投与して使用することができる。投与方法としては、例えば、腫瘍内、静脈内、動脈内、筋肉内、皮下、腹腔内などへの注射が挙げられる。

[0079] 本発明の医薬に含まれる本発明のＴ細胞の量は、用途、剤型および目的とする治療効果などに応じて、例えばがんの種類、位置、重症度、治療を受け

る対象の年齢、体重及び状態などを考慮しながら、適切に調節することができる。例えば、本発明の医薬は、１回の投与において、本発明のＴ細胞が通常１×１０^{4}～１×１０^{10}個、好ましくは１×１０^{5}～１×１０^{9}個、より好ましくは５×１０^{6}～５×１０^{8}個投与されるよう、製剤化することができる。

[0080] 本発明の医薬の投与間隔は特に限定されるものではなく、１回あたりに投与される本発明のＴ細胞の量などを考慮しながら適宜調整することができるが、例えば、１日４回、３回、２回もしくは１回、１日おき、２日おき、３日おき、４日おき、５日おき、週１回、７日おき、８日おき、９日おき、週２回、月１回または月２回、独立して投与することができる。

[0081] 本発明の医薬（抗がん剤）は、公知の抗がん剤と併用することができる。抗がん剤としては、例えば、シクロホスファミド、ベンダムスチン、イオスファミド、ダカルバジンなどのアルキル化薬；ペントスタチン、フルダラビン、クラドリビン、メソトレキセート、５－フルオロウラシル、６－メルカプトプリン、エノシタビンなどの代謝拮抗薬；リツキシマブ、セツキシマブ、トラスツズマブなどの分子標的薬；イマチニブ、ゲフェチニブ、エルロチニブ、アファチニブ、ダサチニブ、スニチニブ、トラメチニブなどのキナーゼ阻害剤；ボルテゾミブなどのプロテアソーム阻害剤；シクロスポリン、タクロリムスなどのカルシニューリン阻害薬；イダルビジン、ドキソルビシンマイトマイシンＣなどの抗がん性抗生物質；イリノテカン、エトポシドなどの植物アルカロイド；シスプラチン、オキサリプラチン、カルボプラチンなどのプラチナ製剤；タモキシフェン、ビカルダミドなどのホルモン療法薬；インターフェロン、ニボルマブ、ペンブロリズマブなどの免疫制御薬；を挙げることができる。

[0082] 本発明の医薬と他の抗がん剤とを併用する場合、（ａ）他の抗がん剤を使用した後に本発明の医薬を使用する、（ｂ）本発明の医薬と他の抗がん剤とを同時に使用する、（ｃ）本発明の医薬を使用した後に他の抗がん剤を使用する、のいずれの形態であってもよい。本発明の医薬と他の抗がん剤と併用した場合、がんの治療効果がより向上するとともに、本発明の医薬および／

または他の抗がん剤それぞれの投与回数または投与量を減らすことで、それぞれの抗がん剤による副作用を低減させることが可能になるものと期待される。

[0083] 以下、本発明の発現ベクターについて詳細に説明する。

[0084] 本発明の発現ベクターは、（１）ＣＡＲをコードする核酸、（２）ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１およびＩＬ－２７からなる群より選ばれる少なくとも１種をコードする核酸、ならびに（３）ＣＣＬ１９をコードする核酸、を含む。

[0085] 本発明において、発現ベクターが「ＩＬ－１５をコードする核酸を含む」とは、天然の完全長のＩＬ－１５タンパク質をコードする核酸を含むことだけでなく、前述したような種々の実施形態をとっているＩＬ－１５を包含する。発現ベクターが「ＩＬ－１８をコードする核酸を含む」、「ＩＬ－２１をコードする核酸を含む」、「ＩＬ－２７をコードする核酸を含む」、「ＣＣＬ１９をコードする核酸を含む」についても同様である。

[0086] 「核酸」とは、ヌクレオチドおよび該ヌクレオチドと同等の機能を有する分子が重合した分子であればいかなるものでもよく、例えば、リボヌクレオチドの重合体であるＲＮＡ、デオキシリボヌクレオチドの重合体であるＤＮＡ、リボヌクレオチドおよびデオキシリボヌクレオチドが混合した重合体、および、ヌクレオチド類似体を含むヌクレオチド重合体を挙げることができ、さらに、核酸誘導体を含むヌクレオチド重合体であってもよい。また、核酸は、一本鎖核酸または二本鎖核酸であってもよい。また二本鎖核酸には、一方の鎖に対し、他方の鎖がストリンジェントな条件でハイブリダイズする二本鎖核酸も含まれる。

[0087] ヌクレオチド類似体としては、ＲＮＡまたはＤＮＡと比較して、ヌクレアーゼ耐性の向上または、安定化させるため、相補鎖核酸とのアフィニティーを上げるため、あるいは細胞透過性を上げるため、あるいは可視化させるために、リボヌクレオチド、デオキシリボヌクレオチド、ＲＮＡまたはＤＮＡに修飾を施した分子であればいかなる分子でもよい。ヌクレオチド類似体と

しては、天然に存在する分子でも非天然の分子でもよく、例えば、糖部修飾ヌクレオチド類似体やリン酸ジエステル結合修飾ヌクレオチド類似体等が挙げられる。

[0088] 糖部修飾ヌクレオチド類似体としては、ヌクレオチドの糖の化学構造の一部あるいは全てに対し、任意の化学構造物質を付加あるいは置換したものであればいかなるものでもよく、その具体例としては、２’－Ｏ－メチルリボースで置換されたヌクレオチド類似体、２’－Ｏ－プロピルリボースで置換されたヌクレオチド類似体、２’－メトキシエトキシリボースで置換されたヌクレオチド類似体、２’－Ｏ－メトキシエチルリボースで置換されたヌクレオチド類似体、２’－Ｏ－[２－(グアニジウム)エチル]リボースで置換されたヌクレオチド類似体、２’－フルオロリボースで置換されたヌクレオチド類似体、糖部に架橋構造を導入することにより２つの環状構造を有する架橋構造型人工核酸（Bridged Nucleic Acid）（ＢＮＡ）、より具体的には、２’位の酸素原子と４’位の炭素原子がメチレンを介して架橋したロックド人工核酸（Locked Nucleic Acid）（ＬＮＡ）、およびエチレン架橋構造型人工核酸（Ethylene bridged nucleic acid）（ＥＮＡ）［Nucleic Acid Research, 32, e175(2004)］が挙げられ、さらにペプチド核酸（ＰＮＡ）［Acc. Chem. Res., 32, 624(1999)］、オキシペプチド核酸（ＯＰＮＡ）［J. Am. Chem. Soc., 123, 4653 (2001)］、およびペプチドリボ核酸（ＰＲＮＡ）［J. Am. Chem. Soc., 122, 6900 (2000)］等を挙げることができる。

[0089] リン酸ジエステル結合修飾ヌクレオチド類似体としては、ヌクレオチドのリン酸ジエステル結合の化学構造の一部あるいは全てに対し、任意の化学物質を付加あるいは置換したものであればいかなるものでもよく、その具体例としては、ホスフォロチオエート結合に置換されたヌクレオチド類似体、Ｎ３’－Ｐ５’ホスフォアミデート結合に置換されたヌクレオチド類似体等を挙げることができる［細胞工学, 16, 1463-1473 (1997)］［RNAi法とアンチセンス法、講談社(2005)］。

[0090] 核酸誘導体としては、核酸に比べ、ヌクレアーゼ耐性を向上させるため、

安定化させるため、相補鎖核酸とのアフィニティーを上げるため、細胞透過性を上げるため、あるいは可視化させるために、該核酸に別の化学物質を付加した分子であればいかなる分子でもよく、その具体例としては、５’－ポリアミン付加誘導体、コレステロール付加誘導体、ステロイド付加誘導体、胆汁酸付加誘導体、ビタミン付加誘導体、Ｃｙ５付加誘導体、Ｃｙ３付加誘導体、６－ＦＡＭ付加誘導体、およびビオチン付加誘導体等を挙げることができる。

[0091] 本発明の発現ベクターは、Ｔ細胞またはその前駆体と接触させて細胞内に導入し、そこにコードされた所定のタンパク質（ポリペプチド）をＴ細胞において発現させることにより、本発明のＴ細胞を作製することができるものであればよく、どのような実施形態であるかは特に限定されるものではない。当業者であれば、所望のタンパク質（ポリペプチド）をＴ細胞において発現させることのできる発現ベクターを設計し、作製することが可能である。

[0092] 本発明の発現ベクターは、直鎖状でも環状でもよく、プラスミドなどの非ウイルスベクターでも、ウイルスベクターでも、トランスポゾンによるベクターでもよい。

[0093] ウイルスベクターとしては、例えば、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を挙げることができる。好ましいレトロウイルスベクターとしては、例えば、ｐＭＳＧＶベクター（Tamada k et al., ClinCancer Res 18:6436-6445(2002)）およびｐＭＳＣＶベクター（タカラバイオ社製）を挙げることができる。レトロウイルスベクターを用いた場合、そのベクターに含まれる遺伝子はホスト細胞（本発明ではＴ細胞）のゲノムへ取り込まれるため、長期間、安定的に遺伝子を発現させることが可能である。

[0094] 本発明の一実施形態では、１つの発現ベクターに、（１）ＣＡＲをコードする核酸、（２）ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１およびＩＬ－２７からなる群より選ばれる少なくとも１種をコードする核酸、ならびに（３）ＣＣＬ１９をコードする核酸、の全ての要素が含まれている。本発明の他の一

実施形態では、第１の発現ベクターに上記（１）～（３）のうちの１つまたは２つの要素が含まれ、第２の発現ベクターに残りの要素が含まれる。本発明の他の一実施形態では、第１の発現ベクターに上記（１）が含まれ、第２の発現ベクターに上記（２）が含まれ、第３の発現ベクターに上記（３）が含まれる。したがって、本発明の発現ベクターは、実施形態によって、複数の発現ベクターの組み合わせ（セット）、すなわち上記第１および第２の発現ベクターの組み合わせ、または上記第１、第２および第３の発現ベクターの組み合わせ、を意味する場合がある。１つの発現ベクターに複数の要素が含まれる場合、上流側から下流側に向けてどの順序でそれらの要素が配置されるかは特に限定されるものではない。

[0095] 本発明の発現ベクターが含む所定の３要素（ＣＡＲ、サイトカインおよびケモカイン）の塩基配列は、各要素としてどのようなタンパク質（ポリペプチド）を選択するかに応じて、そのタンパク質（ポリペプチド）のアミノ酸配列をコードするよう設計すればよい。発現ベクターが含む核酸（オリゴヌクレオチド）は、化学的なオリゴＤＮＡ合成反応により作製してもよいし、ｃＤＮＡとして作製（クローニング）してもよい。

[0096] 本発明の発現ベクターは、上記所定の要素をコードする配列（遺伝子）に加えて、必要に応じて（上述したように複数の発現ベクターの組み合わせについては、それぞれの発現ベクターが独立して）、各遺伝子の発現に関与する、プロモーター、ターミネーター、エンハンサー、開始コドン、終止コドン、ポリアデニル化シグナル、核局在化シグナル（ＮＬＳ）、マルチクローニングサイト（ＭＣＳ）等の配列を含んでいてもよい。

[0097] 本発明の一実施形態において、上記３つの要素のうち２つ以上が１つの発現ベクターに含まれている場合、各要素の間に、自己切断型ペプチド（２Ａペプチド）またはＩＲＥＳ（Internal Ribozyme Entry Site）をコードする遺伝子が挿入されていてもよい。

[0098] ２Ａペプチドは、ウイルス由来の自己切断型ペプチドであり、アミノ酸配列中の所定の位置（Ｃ末端から１残基の位置）が小胞体で切断されるという

特徴を有する（Szymczak et al., Expert Opin. Biol. Ther. 5(5):627-638(2005)）。そのため、２Ａペプチドを介してその前後に組み込まれた遺伝子は、細胞内で互いに独立して発現することとなる。２Ａペプチドとしては、例えば、ピコルナウイルス、ロタウイルス、昆虫ウイルス、アフトウイルス又はトリパノソーマウイルスに由来するものが挙げられる。

[0099] 本発明の発現ベクターはさらに、レポーター遺伝子（代表的には蛍光タンパク質をコードする遺伝子）、薬剤選択遺伝子、自殺遺伝子などの“機能的遺伝子”をコードする核酸（塩基配列）を含んでいてもよい。

[0100] 機能的遺伝子として「薬剤耐性遺伝子」を用いた場合、本発明のＣＡＲ－Ｔ細胞の製造方法において、所定の薬剤を培地に添加することにより、薬剤耐性遺伝子を含む本発明の発現ベクターが導入された細胞を選別することが可能となる。薬剤耐性遺伝子としては、例えば、カナマイシン耐性遺伝子、アンピシリン耐性遺伝子、ピューロマイシン耐性遺伝子が挙げられる。これらの遺伝子は、いずれか１種を用いてもよいし、２種以上を用いてもよい。

[0101] 機能的遺伝子として「蛍光タンパク質をコードする遺伝子」を用いた場合、本発明のＣＡＲ－Ｔ細胞の製造方法において、蛍光顕微鏡を用いて本発明の発現ベクターが導入されたＴ細胞を観察したり、フローサイトメーター（セルソーター）によって本発明の発現ベクターが導入された細胞を選別したりすることが可能となる。レポーター遺伝子の代表例としては蛍光タンパク質をコードする遺伝子が挙げられる。「蛍光タンパク質をコードする遺伝子」としては、例えば、Sirius、BFP、EBFPなどの青色蛍光タンパク質；mTurquoise、TagCFP、AmCyan、mTFP1、MidoriishiCyan、CFPなどのシアン蛍光タンパク質；TurboGFP、AcGFP、TagGFP、Azami-Green（例えば、hmAG1）、ZsGreen、EmGFP、EGFP、GFP2、HyPerなどの緑色蛍光タンパク質；TagYFP、EYFP、Venus、YFP、PhiYFP、PhiYFP-m、TurboYFP、ZsYellow、mBananaなどの黄色蛍光タンパク質；KusabiraOrange（例えば、hmKO2）、mOrangeなどの橙色蛍光タンパク質；TurboRFP、DsRed-Express、DsRed2、TagRFP、DsRed-Monomer、AsRed2、mStrawberryなどの赤色蛍光タンパク質；TurboFP602、mRFP1、JRed、Kill

erRed、mCherry、HcRed、KeimaRed（例えば、hdKeimaRed）、mRasberry、mPlumなどの近赤外蛍光タンパク質が挙げられる。これらの遺伝子は、いずれか１種を用いてもよいし、２種以上を用いてもよい。２種以上の蛍光タンパク質をコードする遺伝子を利用する場合、その蛍光タンパク質の発光波長を異なるものとすれば、互いの視認性を妨げないため好ましい。

[0102] 機能的遺伝子として「自殺遺伝子」を用いた場合、がんの治療経過に応じて、例えば腫瘍が消失した段階で、自殺遺伝子の機能を活性化する薬剤を投与することにより、生体内の本発明のＴ細胞の数を制御することが可能となる。自殺遺伝子としては、例えば、ジフテリアＡ毒素、単純ヘルペスチミジンキナーゼ（HSV-TK）、カルボキシペプチダーゼG2（CPG2）、カルボキシルエステラーゼ（CA）、シトシンデアミナーゼ（CD）、チトクロームP450（cyt-450）、デオキシシチジンキナーゼ（dCK）、ニトロレダクターゼ（NR）、プリンヌクレオシドホスホリラーゼ（PNP）、チミジンホスホリラーゼ（TP）、水痘帯状疱疹ウイルスチミジンキナーゼ（VZV-TK）、キサンチン－グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ（XGPRT）、または誘導性カスパーゼ９（inducible caspase 9）をコードする遺伝子が挙げられる。これらの遺伝子は、いずれか１種を用いてもよいし、２種以上を用いてもよい。それぞれの自殺遺伝子の機能を活性化する薬剤は公知であり、例えば単純ヘルペスチミジンキナーゼ（HSV-TK）に対してはガンシクロビル、誘導性カスパーゼ９（inducible caspase 9）に対しては二量体誘導化合物であるＡＰ１９０３が挙げられる。

[0103] 以下、本発明のＣＡＲ－Ｔ細胞の製造方法について詳細に説明する。

本発明のＣＡＲ－Ｔ細胞の製造方法は、上述したような本発明の発現ベクターをＴ細胞に導入する工程（以下「発現ベクター導入工程」と呼ぶ。）を含む。

[0104] 発現ベクターをＴ細胞に導入するための手法は、発現ベクターに実施形態に応じた適切なものとすることができる。例えば、ウイルス感染法、カルシウムリン酸法、リポフェクション法、マイクロインジェクション法、エレク

トロポレーション法などの公知の方法により、発現ベクターをＴ細胞に導入することができる。本発明の発現ベクターは、公知の手段によって、また適宜市販のキットを用いて（その指示書に従って）、各手法における使用に適した形態に調製することができる。発現ベクター導入工程では、そのような調製物をＴ細胞に接触させる、一般的には発現ベクターを含む調製物を添加した培地中でＴ細胞を培養するようにすればよい。

[0105] 本発明の好ましい一実施形態において、本発明の発現ベクターは、ウイルス感染法によりＴ細胞に導入される。例えば、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の各ウイルスベクターに対応した市販のキットを用いて、本発明のベクターおよび各ウイルスのパッケージングベクター（プラスミド）を宿主細胞、にトランスフェクションして組換えウイルスを作製した後、得られた組換えウイルスをＴ細胞に感染させる方法を挙げることができる。市販のウイルスベクター用キットとしては、例えばRetrovirus packagin Kit Eco（タカラバイオ社製）が挙げられる。宿主細胞としては、例えばＧＰ２－２９３細胞（タカラバイオ社製）、Ｐｌａｔ－ＧＰ細胞（コスモ・バイオ社製）、ＰＧ１３細胞（ATCC CRL-10686）、ＰＡ３１７細胞（ATCC CRL-9078）などが挙げられる。

[0106] 本発明のＣＡＲ－Ｔ細胞の製造方法では、発現ベクター導入工程の前後に、その他の工程をさらに含んでいてもよい。その他の工程としては、例えば、Ｔ細胞の培養工程や、発現ベクターに含めた機能的遺伝子を機能させる処理を含む工程が挙げられる。

[0107] 本発明の発現ベクターを導入する対象となるＴ細胞は、通常はin vitroの環境下で、公知の手法によりあらかじめ培養しておくことができる。例えば、ヒトまたは非ヒト動物から採取された、血液、骨髄液などの体液；脾臓、胸腺、リンパ節などの組織；または原発腫瘍、転移性腫瘍、がん性腹水などのがん組織から、常法に従ってＴ細胞を単離、精製した後、適切な培地でＴ細胞を培養しておき、その培地に本発明の発現ベクター（を含有する調製物

）を添加するようにしてもよい。あるいは、あらかじめｉＰＳ細胞、ＥＳ細胞その他の多能性幹細胞から適切な分化誘導工程を経てＴ細胞（またはその前駆体）を作製しておき、その培地に本発明の発現ベクター（を含有する調製物）を添加するようにしてもよい。

[0108] また、本発明の発現ベクターが機能的遺伝子として薬剤耐性遺伝子を含むものである場合、その発現ベクターが導入されたＴ細胞を選別するために、発現ベクター導入工程の後に、用いた薬剤耐性遺伝子に対応する薬剤を培地に添加してＴ細胞を培養する工程を行うことができる。薬剤耐性遺伝子に対応した薬剤の使用条件、例えば培地中の濃度や培養期間などは、当業者であれば適切に調整することができる。

[0109] 本発明の発現ベクターが機能的遺伝子として蛍光タンパク質をコードする遺伝子（レポーター遺伝子）を含むものである場合、発現ベクター導入工程の後に、発現ベクターが導入されたＴ細胞を蛍光顕微鏡によって観察する工程や、発現ベクターが導入されたＴ細胞をセルソーターで選別する工程を行うことができる。蛍光顕微鏡による観察やセルソーターによる選別の際の条件、例えば蛍光タンパク質に対応した励起波長の光の照射や発光波長の光の検出などは、当業者であれば適切に調整することができる。

実施例

[0110] 以下の実施例におけるＣＡＲは、ヒトＣＤ２０を標的とするＣＡＲ、具体的には抗ヒトＣＤ２０ｓｃＦｖ、マウスＣＤ８細胞膜貫通領域およびマウスＣＤ２８＿４－１ＢＢ＿ＣＤ３ζ細胞内シグナルモチーフからなる抗ヒトＣＤ２０ＣＡＲである。また、以下の実施例におけるサイトカインは、マウスＩＬ－１５（「ＩＬ１５$_{LSP}$」、「$_{s}$ＩＬ１５ＲＡ」、「$_{mb}$ＩＬ１５$_{RA}$」または「$_{sushi}$ＩＬ１５」）；マウスＩＬ－１８；マウスＩＬ－２１；マウスＩＬ－２７（ｐ２８およびＥＢＩ３）を含む一本鎖タンパク質「$_{sc}$ＩＬ２７」のいずれかである。以下の実施例におけるケモカインは、マウスＣＣＬ１９である。これらのＣＡＲ、サイトカインおよびケモカインを発現するマウス由来のＴ細胞を下記のようにして作製した後、試験を行った。

[0111] [表1]

実施例／比較例	CAR	サイトカイン	ケモカイン
実施例1-1	抗ヒトCD20scFv	$IL15_{LSP}$（マウス）	CCL19（マウス）
実施例1-2	抗ヒトCD20scFv	$_{s}IL15_{RA}$（マウス）	CCL19（マウス）
実施例1-3	抗ヒトCD20scFv	$_{mb}IL15_{RA}$（マウス）	CCL19（マウス）
実施例1-4	抗ヒトCD20scFv	$_{sushi}$IL15（マウス）	CCL19（マウス）
実施例2	抗ヒトCD20scFv	IL-18（マウス）	CCL19（マウス）
実施例3	抗ヒトCD20scFv	IL-21（マウス）	CCL19（マウス）
実施例4	抗ヒトCD20scFv	$_{sc}$IL27（マウス）	CCL19（マウス）
比較例1	-	-	-
比較例2	抗ヒトCD20scFv	-	-

[0112] ［実施例１－１］ＩＬ１５$_{ＬＳＰ}$×ＣＣＬ１９　ＣＡＲ－Ｔ細胞

ベクター作製工程では、まずステップ１により、３種類のＤＮＡ断片（ＤＮＡ断片１～３）を人工的に合成し、その後ステップ２により、上記３種類のＤＮＡ断片を用いて、所定のＣＡＲ、サイトカインおよびケモカインをコードする遺伝子を全て含む１つの発現ベクターを作製した。続いて、ＣＡＲ－Ｔ細胞製造工程では、まずステップ１により上記発現ベクターを用いてレトロウイルスベクターを調製し、その後ステップ２によりそのレトロウイルスベクター調製物を用いてマウスＴ細胞に上記所定の遺伝子を形質導入した。

[0113] ［Ａ：ベクター作製工程］$IL15_{LSP}$_CCL19_抗ヒトCD20 CAR発現ベクターの作製

ステップ１：ＤＮＡ断片の合成

ＤＮＡ断片＃１：抗ヒトＣＤ２０　ＣＡＲを含むＤＮＡ断片

抗ヒトＣＤ２０ｓｃＦｖ、マウスＣＤ８貫通領域、およびマウスＣＤ２８__４－１ＢＢ__ＣＤ３ζ細胞内シグナルモチーフからなる抗ヒトＣＤ２０　ＣＡＲをコードする塩基配列を含むＤＮＡ断片（ＤＮＡ断片＃１）を人工合成した。ＤＮＡ断片＃１全体の塩基配列を配列番号１（図７）に示す。配列番号１において、３～７８５番目の塩基が抗ヒトＣＤ２０ｓｃＦｖをコードする配列、７９５～１０４０番目の塩基がマウスＣＤ８細胞膜貫通領域をコー

ドする配列、１０４１～１６３７番目の塩基がマウスＣＤ２８＿４－１ＢＢ＿ＣＤ３ζ細胞内シグナルモチーフをコードする配列（そのうち１０４１～１１６３番目の塩基がマウスＣＤ２８の細胞内領域をコードし、１１６４～１２９８番目の塩基がマウス４－１ＢＢの細胞内領域をコードし、１２９９～１６３７番目の塩基がマウスＣＤ３ζの細胞内領域のポリペプチドをコードする）である。ＤＮＡ断片＃１の３～１６３７番目の塩基配列によって発現する融合タンパク質のアミノ酸配列を配列番号２に示す。

[0114] ＤＮＡ断片＃２：終止コドンおよびマルチクローニングサイトを含むＤＮＡ断片

終止コドンの塩基配列およびマルチクローニングサイト（ＭＣＳ）の塩基配列を含むＤＮＡ断片（ＤＮＡ断片＃２）を人工合成した。ＤＮＡ断片＃２全体の塩基配列を配列番号３（図８）に示す。

[0115] ＤＮＡ断片＃３：ＩＬ１５$_{LSP}$およびＣＣＬ１９用ＤＮＡ断片

自己切断型ペプチドである２Ａペプチド（Ｆ２Ａ）、マウスＩＬ－２シグナルペプチド（ＩＬ－２ＳＰ）、マウスＩＬ－１５コンストラクト「ＩＬ１５$_{LSP}$」（ＩＬ－１５ＬＳＰおよびＩＬ－１５からなる融合ペプチド）、Ｆ２Ａ、ならびにマウスＣＣＬ１９をコードする塩基配列を含むＤＮＡ断片（ＤＮＡ断片＃３）を人工合成した。ＤＮＡ断片＃３全体の塩基配列を配列番号４（図９）に示す。配列番号４において、７～８１番目の塩基が第１のＦ２Ａをコードする配列、８２～１６８番目の塩基がマウスＩＬ－１５$_{LSP}$をコードする配列、１６９～５６７番目の塩基がマウスＩＬ－１５（終止コドンを除く）をコードする配列、５６８～６４２番目の塩基が第２のＦ２Ａをコードする配列、６４６～９６９番目の塩基がマウスＣＣＬ１９をコードする配列である。ＤＮＡ断片＃３の７～９６９番目の塩基配列によって発現し、２箇所のＦ２Ａで自己切断する、ＩＬ１５$_{LSP}$を含む融合タンパク質全体のアミノ酸配列を配列番号５に示す。

[0116] ステップ２：レトロウイルス発現ベクターの作製

ＤＮＡ断片＃１およびＤＮＡ断片＃２を連結してコンストラクト（抗ヒト

ＣＤ２０　ＣＡＲ＿ＭＣＳ）を作製した。得られたコンストラクトを、制限酵素（Ｎｃｏ　ＩおよびＳａｌ　Ｉ）処理によりｐＭＳＧＶレトロウイルス発現ベクター（Tamada k et al., Clin Cancer Res 18:6436-6445(2002)）に組み込んで、抗ヒトＣＤ２０　ＣＡＲ＿ＭＣＳ含有ｐＭＳＧＶレトロウイルス発現ベクターを作製した。

[0117] 次に、ＤＮＡ断片＃１の１３３７～１６３７番目の塩基配列およびＤＮＡ断片＃３を連結したコンストラクトを作製した。得られたコンストラクトを、制限酵素（Ｓｂｆ　ＩおよびＳａｌ　Ｉ）処理により抗ヒトＣＤ２０　ＣＡＲ＿ＭＣＳ含有ｐＭＳＧＶレトロウイルスベクターに組み込み、抗ヒトＣＤ２０　ＣＡＲ＿Ｆ２Ａ＿ＩＬ１５$_{LSP}$＿Ｆ２Ａ＿ＣＣＬ１９含有ｐＭＳＧＶレトロウイルス発現ベクター（IL15$_{LSP}$_CCL19_抗ヒトCD20 CAR発現ベクター）を作製した。

[0118] ［Ｂ：ＣＡＲ－Ｔ細胞製造工程］IL15$_{LSP}$_CCL19_抗ヒトCD20 CAR-T細胞の製造

ステップ１：レトロウイルスの調製

リポフェクタミン３０００（サーモフィッシャーサイエンティフィック社）を用いて、前記ベクター作製工程により得られたIL15$_{LSP}$_CCL19_抗ヒトCD20 CAR発現ベクターを、ｐＣＬ－Ｅｃｏプラスミド（Novus biologicals社）と共に、ＧＰ２－２９３パッケージング細胞株（タカラバイオ社）にトランスフェクションした。なお、ＧＰ２－２９３パッケージング細胞株の培養液としては、１０％の非働化済ＦＢＳおよび抗生物質を加えたＤＭＥＭを用いた。トランスフェクションから４８時間後、ＧＰ２－２９３パッケージング細胞株の培養液の上清を回収し、IL15$_{LSP}$_CCL19_抗ヒトCD20 CAR発現ベクター調製物とした。

[0119] ステップ２：マウスＴ細胞の形質導入

マウスの脾臓及びリンパ節由来の３×１０^{6}個の精製したマウスＴ細胞を、固相化した抗マウスＣＤ３モノクローナル抗体（３μｇ／ｍＬ）、抗マウスＣＤ２８モノクローナル抗体（１μｇ／ｍＬ）およびＩＬ－２の存在下で４

８時間活性化した。続いて、２５μｇ／ｍＬのレトロネクチン（登録商標：タカラバイオ社）を固相化したプレートのウェル内で、ステップ１で得られたIL15$_{LSP}$_CCL19_抗ヒトCD20 CAR発現ベクター含有調製物（ＧＰ２－２９３細胞培養液上清）と、上記のように活性化させたマウスＴ細胞とを混合し、１５００ｒｐｍで２時間遠心後、ＩＬ－２の存在下で６時間培養した。培養液からレトロウイルスを除去するため、マウスＴ細胞を回収し、ＩＬ－２を含有する新しいｃｏｍｐｌｅｔｅ　ＲＰＭＩ培地に移し、さらに４２時間培養することで、IL15$_{LSP}$_CCL19_抗ヒトCD20 CAR発現ベクターが導入された、すなわち抗ヒトＣＤ２０　ＣＡＲ、ＩＬ１５$_{LSP}$およびＣＣＬ１９を発現するマウスＴ細胞（IL15$_{LSP}$_CCL19_抗ヒトCD20 CAR-T細胞、本明細書において「ＩＬ１５$_{LSP}$×ＣＣＬ１９　ＣＡＲ－Ｔ細胞」と呼ぶ。）を得た。

[0120] なお、上記Ｔ細胞の培養に用いた「ｃｏｍｐｌｅｔｅ　ＲＰＭＩ培地」は、非働化済１０％ＦＢＳ、抗生物質、５０ｍＭの２－メルカプトエタノール、２５ｍＭのＨＥＰＥＳ緩衝液を加えたＲＰＭＩ－１６４０培地である。以下、Ｔ細胞の培養液としては、必要に応じて別途記載した成分をさらに添加した、ｃｏｍｐｌｅｔｅ　ＲＰＭＩ培地を用いた。

[0121] ［実施例１－２］$_{s}$ＩＬ１５$_{RA}$（分泌型IL-15/IL-15RA融合タンパク）×ＣＣＬ１９　ＣＡＲ－Ｔ細胞

［Ａ：ベクター作製工程］$_{s}$IL15$_{RA}$_CCL19_抗ヒトCD20 CAR発現ベクターの作製

実施例１－１のステップ１と同様のＤＮＡ断片＃１およびＤＮＡ断片＃２と、ＤＮＡ断片＃３に代えて下記のようなＤＮＡ断片＃４とを用いて、実施例１－１のステップ２と同様にしてコンストラクトを作製した後、抗ヒトＣＤ２０　ＣＡＲ__Ｆ２Ａ__$_{s}$ＩＬ１５$_{RA}$__Ｆ２Ａ__ＣＣＬ１９含有ｐＭＳＧＶレトロウイルス発現ベクター（$_{s}$IL15$_{RA}$_CCL19_抗ヒトCD20 CAR発現ベクター）を得た。

[0122] ＤＮＡ断片＃４：$_{s}$ＩＬ１５$_{RA}$およびＣＣＬ１９用ＤＮＡ断片

Ｆ２Ａ、マウスＩＬ－２ＳＰ、マウスＩＬ－１５コンストラクト「$_{s}$ＩＬ１

５$_{RA}$」（ＩＬ－１５、リンカーおよびＩＬ－１５Ｒα細胞外ドメインからなる融合ペプチド）、Ｆ２Ａ、ならびにマウスＣＣＬ１９をコードする塩基配列を含むＤＮＡ断片（ＤＮＡ断片＃４）を合成した。ＤＮＡ断片＃４全体の塩基配列を配列番号６（図１０）に示す。配列番号６において、７～８１番目の塩基が第１のＦ２Ａをコードする配列、８２～１４１番目の塩基がマウスＩＬ－２ＳＰをコードする配列、１４２～１１３７番目の塩基が$_{s}$ＩＬ１５$_{RA}$をコードする配列（そのうち１４２～５４０番目の塩基がマウスＩＬ－１５（シグナル配列および終止コドンを除く）をコードし、５４１～６１８番目の塩基がリンカーであり、６１９～１１３７番目の塩基がマウスＩＬ－１５Ｒα細胞外ドメインをコードする）、１１３８～１２１２番目の塩基が第２のＦ２Ａをコードする配列、１２１６～１５３９番目の塩基がマウスＣＣＬ１９をコードする配列である。ＤＮＡ断片＃４の７～１５３９番目の塩基配列によって発現し、２箇所のＦ２Ａで自己切断する、$_{s}$ＩＬ１５$_{RA}$を含む融合タンパク質全体のアミノ酸配列を配列番号７に示す。

[0123] ［Ｂ：ＣＡＲ－Ｔ細胞製造工程］$_{s}$IL15$_{RA}$_CCL19_抗ヒトCD20 CAR-T細胞の製造

レトロウイルス発現ベクターとして、IL15$_{LSP}$_CCL19_抗ヒトCD20 CAR発現ベクターの代わりに上記ベクター作製工程により得られた$_{s}$IL15$_{RA}$_CCL19_抗ヒトCD20 CAR発現ベクターを用いたこと以外は実施例１－１のＣＡＲ－Ｔ細胞製造工程と同様にして、ステップ１においてレトロウイルス含有調製物を得て、ステップ２においてそのレトロウイルスに含まれる抗ヒトＣＤ２０　ＣＡＲ、$_{s}$ＩＬ１５$_{RA}$およびＣＣＬ１９の各遺伝子が発現したマウスＴ細胞（$_{s}$IL15$_{RA}$_CCL19_抗ヒトCD20 CAR-T細胞、本明細書において$_{s}$ＩＬ１５$_{RA}$×ＣＣＬ１９ＣＡＲ－Ｔ細胞）を得た。

[0124] ［実施例１－３］$_{mb}$ＩＬ１５$_{RA}$（膜結合型IL-15/IL-15RA融合タンパク）×ＣＣＬ１９　ＣＡＲ－Ｔ細胞

［Ａ：ベクター作製工程］$_{mb}$IL15$_{RA}$_CCL19_抗ヒトCD20 CAR発現ベクターの作製

実施例１－１のステップ１と同様のＤＮＡ断片＃１およびＤＮＡ断片＃２と、ＤＮＡ断片＃３に代えて下記のようなＤＮＡ断片＃５とを用いて、実施例１－１のステップ２と同様にしてコンストラクトを作製した後、抗ヒトＣＤ２０　ＣＡＲ＿Ｆ２Ａ＿$_{mb}$ＩＬ１５$_{RA}$＿Ｆ２Ａ＿ＣＣＬ１９含有ｐＭＳＧＶレトロウイルス発現ベクター（$_{mb}$IL15$_{RA}$_CCL19_抗ヒトCD20 CAR発現ベクター）を得た。

[0125] ＤＮＡ断片＃５：$_{mb}$ＩＬ１５$_{RA}$およびＣＣＬ１９用ＤＮＡ断片

Ｆ２Ａ、マウスＩＬ－２ＳＰ、マウスＩＬ－１５のコンストラクト「$_{mb}$ＩＬ１５$_{RA}$」（ＩＬ－１５、リンカーおよび全長のＩＬ－１５Ｒαからなる融合ペプチド）、Ｆ２Ａ、ならびにマウスＣＣＬ１９をコードする塩基配列を含むＤＮＡ断片を合成した。このＤＮＡ断片＃５全体の塩基配列を配列番号８（図１１）に示す。配列番号８において、７～８１番目の塩基が第１のＦ２Ａをコードする配列、８２～１４１番目の塩基がマウスＩＬ－２ＳＰをコードする配列、１４２～１３１１番目の塩基が$_{mb}$ＩＬ１５$_{RA}$をコードする配列（そのうち１４２～５４０番目の塩基がマウスＩＬ－１５（シグナル配列および終止コドンを除く）をコードし、５４１～６１８番目の塩基がリンカーであり、６１９～１３１１番目の塩基がマウスＩＬ－１５Ｒα（全長）をコードする）、１３１２～１３８６番目の塩基が第２のＦ２Ａをコードする配列、１３９０～１７１３番目の塩基がマウスＣＣＬ１９をコードする配列である。ＤＮＡ断片＃５の７～１７１３番目の塩基配列によって発現し、２箇所のＦ２Ａで自己切断する、$_{mb}$ＩＬ１５$_{RA}$を含む融合タンパク質全体のアミノ酸配列を配列番号９に示す。

[0126] ［Ｂ：ＣＡＲ－Ｔ細胞製造工程］$_{mb}$IL15$_{RA}$_CCL19_抗ヒトCD20 CAR-T細胞の製造

レトロウイルス発現ベクターとして、IL15$_{LSP}$_CCL19_抗ヒトCD20 CAR発現ベクターの代わりに上記ベクター作製工程により得られた$_{mb}$IL15$_{RA}$_CCL19_抗ヒトCD20 CAR発現ベクターを用いたこと以外は実施例１－１のＣＡＲ－Ｔ細胞製造工程と同様にして、ステップ１においてレトロウイルス含有調製物を得て

、ステップ２においてそのレトロウイルスに含まれる抗ヒトＣＤ２０　ＣＡＲ、$_{mb}$ＩＬ１５$_{RA}$およびＣＣＬ１９の各遺伝子が発現したマウスＴ細胞（$_{mb}$IL15$_{RA}$_CCL19_抗ヒトCD20 CAR-T細胞、本明細書において「$_{mb}$ＩＬ１５×ＣＣＬ１９　ＣＡＲ－Ｔ細胞」と呼ぶ。）を製造した。

[0127] ［実施例１－４］$_{sushi}$ＩＬ１５（分泌型IL-15RA/IL-15融合タンパク）×ＣＣＬ１９　ＣＡＲ－Ｔ細胞

［Ａ：ベクター作製工程］$_{sushi}$IL15_CCL19_抗ヒトCD20 CAR発現ベクターの作製

実施例１－１のステップ１と同様のＤＮＡ断片１およびＤＮＡ断片２と、ＤＮＡ断片＃３に代えて下記のようなＤＮＡ断片＃６とを用いて、実施例１－１のステップ２と同様にしてコンストラクトを作製した後、抗ヒトＣＤ２０　ＣＡＲ__Ｆ２Ａ__$_{sushi}$ＩＬ１５__Ｆ２Ａ__ＣＣＬ１９含有ｐＭＳＧＶレトロウイルス発現ベクター（$_{sushi}$IL15_CCL19_抗ヒトCD20 CAR発現ベクター）を得た。

[0128] ＤＮＡ断片＃６：$_{sushi}$ＩＬ１５およびＣＣＬ１９用ＤＮＡ断片

Ｆ２Ａ、マウスＩＬ－１５コンストラクト「$_{sushi}$ＩＬ１５」（ＩＬ－１５Ｒαのｓｕｓｈｉドメイン、リンカーおよびＩＬ－１５からなる融合ペプチド）、Ｆ２Ａ、ならびにマウスＣＣＬ１９をコードする塩基配列を含むＤＮＡ断片を合成した。このＤＮＡ断片＃６全体の塩基配列を配列番号１０（図１２）に示す。配列番号１０において、７～８１番目の塩基が第１のＦ２Ａをコードする配列、８２～７７７番目の塩基が$_{sushi}$ＩＬ１５をコードする配列（そのうち８２～３７５番目の塩基がマウスＩＬ－１５ＲαのＳＰおよびｓｕｓｈｉドメインをコードし、３７６～４３５番目の塩基がリンカーであり、４３６～７７７番目の塩基がマウスＩＬ－１５（シグナル配列およびプロペプチドを除く）をコードする）、７７８～８５２番目の塩基が第２のＦ２Ａをコードする配列、８５６～１１７９番目の塩基がマウスＣＣＬ１９をコードする配列である。ＤＮＡ断片＃６の７～１１７９番目の塩基配列によって発現し、２箇所のＦ２Ａで自己切断する、$_{sushi}$ＩＬ１５を含む融合タン

パク質全体のアミノ酸配列を配列番号１１に示す。

[0129] ［Ｂ：ＣＡＲ－Ｔ細胞製造工程］$_{sushi}$IL15_CCL19_抗ヒトCD20 CAR-T細胞の製造

レトロウイルス発現ベクターとして、IL15$_{LSP}$_CCL19_抗ヒトCD20 CAR発現ベクターの代わりに上記ベクター作製工程により得られた$_{sushi}$IL15_CCL19_抗ヒトCD20 CAR発現ベクター用いたこと以外は実施例１－１のＣＡＲ－Ｔ細胞製造工程と同様にして、ステップ１においてレトロウイルス含有調製物を得て、ステップ２においてそのレトロウイルスに含まれる抗ヒトＣＤ２０　ＣＡＲ、$_{sushi}$ＩＬ１５およびＣＣＬ１９の各遺伝子が発現したマウスＴ細胞（$_{sushi}$IL15_CCL19_抗ヒトCD20 CAR-T細胞、本明細書において「$_{sushi}$ＩＬ１５×ＣＣＬ１９　ＣＡＲ－Ｔ細胞」と呼ぶ。）を得た。

[0130] ［実施例２］ＩＬ－１８×ＣＣＬ１９　ＣＡＲ－Ｔ細胞

［Ａ：ベクター作製工程］IL18_CCL19_抗ヒトCD20 CAR発現ベクターの作製

実施例１－１のステップ１と同様のＤＮＡ断片１およびＤＮＡ断片２と、ＤＮＡ断片＃３に代えて下記のようなＤＮＡ断片＃７とを用いて、実施例１－１のステップ２と同様にしてコンストラクトを作製した後、抗ヒトＣＤ２０　ＣＡＲ__Ｆ２Ａ__ＩＬ－１８__Ｆ２Ａ__ＣＣＬ１９含有ｐＭＳＧＶレトロウイルス発現ベクター（IL18_CCL19_抗ヒトCD20 CAR発現ベクター）を得た。

[0131] ＤＮＡ断片＃７：ＩＬ－１８およびＣＣＬ１９用ＤＮＡ断片

第１のＦ２Ａ、マウスＩＬ－１８、第２のＦ２Ａ、およびマウスＣＣＬ１９をコードする塩基配列を含むＤＮＡ断片を人工合成した。このＤＮＡ断片＃７全体の塩基配列を配列番号１２（図１３）に示す。配列番号１２において、７～８１番目の塩基が第１のＦ２Ａをコードする配列、８２～６５７番目の塩基がマウスＩＬ－１８をコードする配列、６５８～７３２番目の塩基が第２のＦ２Ａをコードする配列、７３６～１０５９番目の塩基がマウスＣＣＬ１９をコードする配列である。ＤＮＡ断片＃７の７～１０５９番目の塩基配列によって発現し、２箇所のＦ２Ａで自己切断する融合タンパク質全体

のアミノ酸配列を配列番号１３に示す。

[0132] ［Ｂ：ＣＡＲ－Ｔ細胞製造工程］IL18_CCL19_抗ヒトCD20 CAR-T細胞の製造

レトロウイルス発現ベクターとして、$IL15_{LSP}$_CCL19_抗ヒトCD20 CAR発現ベクターの代わりに上記ベクター作製工程により得られたIL18_CCL19_抗ヒトCD20 CAR発現ベクターを用いたこと以外は実施例１－１のＣＡＲ－Ｔ細胞製造工程と同様にして、ステップ１においてレトロウイルス含有調製物を得て、ステップ２においてそのレトロウイルスに含まれる抗ヒトＣＤ２０　ＣＡＲ、ＩＬ－１８およびＣＣＬ１９の各遺伝子が発現したマウスＴ細胞（IL18_CCL19_抗ヒトCD20 CAR-T細胞、本明細書において「ＩＬ１８×ＣＣＬ１９　ＣＡＲ－Ｔ細胞」と呼ぶ。）を得た。

[0133] ［実施例３］ＩＬ－２１×ＣＣＬ１９　ＣＡＲ－Ｔ細胞

［Ａ：ベクター作製工程］IL21_CCL19_抗ヒトCD20 CAR発現ベクターの作製

実施例１－１のステップ１と同様のＤＮＡ断片１およびＤＮＡ断片２と、ＤＮＡ断片＃３に代えて下記のようなＤＮＡ断片＃８とを用いて、実施例１－１のステップ２と同様にしてコンストラクトを作製した後、抗ヒトＣＤ２０　ＣＡＲ__Ｆ２Ａ__ＩＬ－２１__Ｆ２Ａ__ＣＣＬ１９含有ｐＭＳＧＶレトロウイルス発現ベクター（IL21_CCL19_抗ヒトCD20 CAR発現ベクター）を得た。

[0134] ＤＮＡ断片＃８：ＩＬ－２１およびＣＣＬ１９用ＤＮＡ断片

第１のＦ２Ａ、マウスＩＬ－２１、第２のＦ２Ａ、およびマウスＣＣＬ１９をコードする塩基配列を含むＤＮＡ断片を人工合成した。このＤＮＡ断片＃８全体の塩基配列を配列番号１４（図１４）に示す。配列番号１４において、７～８１番目の塩基が第１のＦ２Ａをコードする配列、８２～５６７番目の塩基がマウスＩＬ－２１をコードする配列、５６８～６４２番目の塩基が第２のＦ２Ａをコードする配列、６４６～９６９番目の塩基がマウスＣＣＬ１９をコードする配列である。ＤＮＡ断片＃８の７～９６９番目の塩基配列によって発現し、２箇所のＦ２Ａで自己切断する融合タンパク質全体のアミノ酸配列を配列番号１５に示す。

[0135] ［Ｂ：ＣＡＲ－Ｔ細胞製造工程］IL21_CCL19_抗ヒトCD20 CAR-T細胞の製造

レトロウイルス発現ベクターとして、$IL15_{LSP}$_CCL19_抗ヒトCD20 CAR発現ベクターの代わりに上記ベクター作製工程により得られたIL21_CCL19_抗ヒトCD20 CAR発現ベクターを用いたこと以外は実施例１－１のＣＡＲ－Ｔ細胞製造工程と同様にして、ステップ１においてレトロウイルス含有調製物を得て、ステップ２においてそのレトロウイルスに含まれる抗ヒトＣＤ２０　ＣＡＲ、ＩＬ－２１およびＣＣＬ１９の各遺伝子が発現したマウスＴ細胞（IL21_CCL19_抗ヒトCD20 CAR-T細胞、本明細書において「ＩＬ２１×ＣＣＬ１９　ＣＡＲ－Ｔ細胞」と呼ぶ。）を得た。

[0136] ［実施例４］$_{sc}$ＩＬ２７×ＣＣＬ１９　ＣＡＲ－Ｔ細胞

［Ａ：ベクター作製工程］$_{sc}$IL27_CCL19_抗ヒトCD20 CAR発現ベクターの作製

実施例１－１のステップ１と同様のＤＮＡ断片１およびＤＮＡ断片２と、ＤＮＡ断片＃３に代えて下記のようなＤＮＡ断片＃９とを用いて、実施例１－１のステップ２と同様にしてコンストラクトを作製した後、抗ヒトＣＤ２０　ＣＡＲ__Ｆ２Ａ__ｓｃＩＬ－２７__Ｆ２Ａ__ＣＣＬ１９含有ｐＭＳＧＶレトロウイルス発現ベクター（$_{sc}$IL27_CCL19_抗ヒトCD20 CAR発現ベクター）を得た。

[0137] ＤＮＡ断片＃９：$_{sc}$ＩＬ２７およびＣＣＬ１９用ＤＮＡ断片

第１のＦ２Ａ、マウスＩＬ－２７コンストラクト「ｓｃＩＬ２７」（ｐ２８、リンカーおよびＥＢＩ３からなる融合ペプチド）、第２のＦ２Ａ、ならびにＣＣＬ１９をコードする塩基配列を含むＤＮＡ断片を人工合成した。このＤＮＡ断片＃９全体の塩基配列を配列番号１６（図１５）に示す。配列番号１６おいて、７～８１番目の塩基が第１のＦ２Ａをコードする配列、８２～１４３７番目の塩基が$_{sc}$ＩＬ２７をコードする配列（そのうち８２～７６５番目の塩基がマウスＥＢＩ３をコードし、７６６～８１９番目の塩基がリンカーであり、８２０～１４３７番目の塩基がマウスｐ２８をコードする）、１４３８～１５１２番目の塩基が第２のＦ２Ａをコードする配列、１５１

６～１８３９番目の塩基がマウスＣＣＬ１９をコードする配列である。ＤＮＡ断片＃９の７～１８３９番目の塩基配列によって発現し、２箇所のＦ２Ａで自己切断する、$_{sc}$ＩＬ２７を含む融合タンパク質全体のアミノ酸配列を配列番号１７に示す。

[0138] ［Ｂ：ＣＡＲ－Ｔ細胞製造工程］$_{sc}$IL27_CCL19_抗ヒトCD20 CAR-T細胞の製造工程

レトロウイルス発現ベクターとして、IL15$_{LSP}$_CCL19_抗ヒトCD20 CAR発現ベクターの代わりに上記ベクター作製工程により得られた$_{sc}$IL27_CCL19_抗ヒトCD20 CAR発現ベクターを用いたこと以外は実施例１－１のＣＡＲ－Ｔ細胞製造工程と同様にして、ステップ１においてレトロウイルス含有調製物を得て、ステップ２においてそのレトロウイルスに含まれる抗ヒトＣＤ２０　ＣＡＲ、ｓｃＩＬ２７およびＣＣＬ１９の各遺伝子が発現したマウスＴ細胞（$_{sc}$IL27_CCL19_抗ヒトCD20 CAR-T細胞、本明細書において「$_{sc}$ＩＬ２７×ＣＣＬ１９ＣＡＲ－Ｔ細胞」と呼ぶ。）を得た。

[0139] ［比較例１］ｔｒａｎｓｄｕｃｔｉｏｎ（－）Ｔ細胞

レトロウイルスベクターの作製およびそれを用いたＴ細胞へのトランスフェクションを行わず、実施例１－１の工程Ｂステップ２において、IL15$_{LSP}$_CCL19_抗ヒトCD20 CAR発現ベクター調製物を用いるかわりにGP2-293細胞培養に用いるDMEM培地を等量加えたこと以外は同様の手順で、活性化のみ行ったマウスＴ細胞（本明細書において「ｔｒａｎｓｄｕｃｔｉｏｎ（－）Ｔ細胞」と呼ぶ。）を製造した。

[0140] ［比較例２］ｃｏｎｖ．ＣＡＲ－Ｔ細胞

［Ａ：ベクター作製工程］抗ヒトＣＤ２０　ＣＡＲ発現ベクターの作製

実施例１－１の工程Ａステップ２の途中までと同様の手順で、ＤＮＡ断片１、ＤＮＡ断片２およびｐＭＳＧＶレトロウイルスベクターを用いて、抗ヒトＣＤ２０　ＣＡＲ＿ＭＣＳ含有ｐＭＳＧＶレトロウイルス発現ベクターを作製した。これを、サイトカインおよびケモカインを共発現させない、コントロール用のレトロウイルス発現ベクター（抗ヒトCD20 CAR発現ベクター）

として用いた。

[0141] ［Ｂ：ＣＡＲ－Ｔ細胞製造工程］抗ヒトCD20 CAR-T細胞の製造

レトロウイルス発現ベクターとして、$IL15_{LSP}$_CCL19_抗ヒトCD20 CAR発現ベクターの代わりに抗ヒトCD20 CAR発現ベクターを用いたこと以外は実施例１－１のＣＡＲ－Ｔ細胞製造工程と同様にして、ステップ１においてレトロウイルス含有調製物を得て、ステップ２においてそのレトロウイルスに含まれる抗ヒトＣＤ２０　ＣＡＲのみを発現する（サイトカインおよびケモカインを発現しない）マウスＴ細胞（抗ヒトCD20 CAR-T細胞、本明細書において「ｃｏｎｖ．ＣＡＲ－Ｔ細胞」と呼ぶ。）を得た。

[0142] ［試験例１］導入したＣＡＲ、サイトカインおよびケモカインの発現レベルの確認

［Ａ：フローサイトメトリーによるＣＡＲの発現測定］

上記実施例および比較例で製造したＴ細胞を用いて、細胞表面における抗ヒトＣＤ２０　ＣＡＲの発現レベルを、下記のようなフローサイトメトリーによって解析した。

[0143] なお、フローサイトメトリーにはフローサイトメーター「ＢＤ　ＦＡＣＳ Ｃａｎｔｏ™ ＩＩ」（ＢＤ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ社）を用い、データ解析にはＦｌｏｗＪｏ　ｓｏｆｔｗａｒｅ（ＢＤ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ社）を用いた。

[0144] ビオチン標識したプロテインＬ（抗ヒトＣＤ２０ｓｃＦｖのκ軽鎖と特異的に結合する）およびBrilliant Violet™ 421（ＢＶ４２１）結合ストレプトアビジンを用いて各Ｔ細胞を処理し、ＣＡＲの発現を検出した。同時に、アロフィコシアニン（ＡＰＣ）結合抗マウスＣＤ８モノクローナル抗体（BioLegend社）を用いて各Ｔ細胞集団中のＣＤ８陽性率を測定した。一般的にＣＤ８陽性Ｔ細胞が直接の細胞傷害活性を有すると考えられるため、ＣＤ８陽性Ｔ細胞の存在（陽性率）を示すことにより効力（potency）の裏付けとすることができる。

[0145] 結果を図１に示す。全ての実施例（および比較例２）のＣＡＲ－Ｔ細胞に

ついて、細胞集団中の６０％以上の細胞で抗ヒトＣＤ２０　ＣＡＲが発現している（陽性である）ことが確認された。

[0146] ［Ｂ：サイトカインおよびケモカインの分泌量の測定］

形質導入から４２時間後の各Ｔ細胞の培養上清を回収し、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、ＩＬ－２７およびＣＣＬ１９の濃度を市販のＥＬＩＳＡキット（ＩＬ－１８のみＭＢＬ社、それ以外はＲ＆Ｄ　ｓｙｓｔｅｍｓ社）を用いて測定した。

[0147] 結果を図２に示す。ＩＬ－１５に関して（図２Ａ）、実施例１－１のＣＡＲ－Ｔ細胞（15LSPx19 CAR-T）の培養上清からは、ＩＬ－１５が２５０ｐｇ／ｍＬの濃度で検出された。一方、実施例１－２（s15RAx19 CAR-T）、実施例１－３（mb15RAx19 CAR-T）および実施例１－４（sushi15x19 CAR-T）のＣＡＲ－Ｔ細胞の培養上清中のＩＬ－１５の濃度は、形質導入していない活性化Ｔ細胞（transduction (-)：比較例１）およびコントロールの抗ヒトＣＤ２０　ＣＡＲ発現Ｔ細胞（conv. CAR-T：比較例２）と同程度であり、試験例１で用いた上記ＥＬＩＳＡキットではＩＬ－１５の分泌は認められなかった。ただし、後述する試験例２において実施例１－２、実施例１－３および実施例１－４は顕著な細胞増殖効果を示していることから、これらの実施例においても実施例１－１と同様にＩＬ－１５が発現・分泌されていると解される。

[0148] ＩＬ－１８に関して（図２Ｂ）、実施例２のＣＡＲ－Ｔ細胞（18x19 CAR-T）の培養上清からは、ＩＬ－１８が１５０ｐｇ／ｍＬ以上の濃度で検出された。一方、コントロールの抗ヒトＣＤ２０　ＣＡＲ発現Ｔ細胞（conv. CAR-T：比較例２）からの培養上清中への分泌量は、形質導入していない活性化Ｔ細胞（transduction (-)：比較例１）と同程度の微量であった。

[0149] ＩＬ－２１に関して（図２Ｃ）、実施例３のＣＡＲ－Ｔ細胞（21x19 CAR-T）の培養上清からは、ＩＬ－１８が４００ｐｇ／ｍＬ以上の濃度で検出された。一方、コントロールの抗ヒトＣＤ２０　ＣＡＲ発現Ｔ細胞（conv. CAR-T：比較例２）からの分泌量は、形質導入していない活性化Ｔ細胞（transduct

ion（-）：比較例１）とともに、検出限界以下（Not Detected）であった。

[0150] ＩＬ－２７に関して（図２Ｄ）、実施例４のＣＡＲ－Ｔ細胞（sc27x19 CAR-T）の培養上清からは、ＩＬ－２７のサブユニットであるｐ２８が２５０ｐｇ／ｍＬ以上の濃度で検出された。一方、コントロールの抗ヒトＣＤ２０ＣＡＲ－Ｔ細胞（conv. CAR-T：比較例２）からの分泌量は、形質導入していない活性化Ｔ細胞（transduction（-）：比較例１）と同程度（培養上清中の濃度５０ｐｇ／ｍＬ前後）であった。

[0151] ＣＣＬ１９に関して（図２Ｅ）、コントロールの抗ヒトＣＤ２０ ＣＡＲ－Ｔ細胞（conv. CAR-T：比較例２）および形質導入していない活性化Ｔ細胞（transduction（-）：比較例１）の培養上清中の濃度は検出限界以下であったのに対し、各実施例のＣＡＲ－Ｔ細胞の培養上清中の濃度は１５０～５００ｐｇ／ｍＬであった。

[0152] ［試験例２］ＣＡＲ－Ｔ細胞のｉｎ ｖｉｔｒｏ増殖能力の評価

上記実施例および比較例で製造したＴ細胞を用いて、各Ｔ細胞から産生されるサイトカイン（ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１およびＩＬ－２７）が生物的な機能を発揮し、免疫誘導効果を示すか否かを、下記のようにしてＣＡＲ－Ｔ細胞の細胞数および増殖能力を測定することにより検討した。

[0153] 各Ｔ細胞をＣｙｔｏＴｅｌｌ™ UltraGreen（ＡＡＴ Ｂｉｏｑｕｅｓｔ社）で染色した後、マイトマイシンＣで処理した、ヒトＣＤ２０を発現するよう遺伝子組換えを行ったＰ８１５マストサイトーマ（hCD20/P815）と同じウェル内で共培養し、刺激を行った。刺激開始から３日間、５日間または７日間培養したのち、細胞を回収し、フローサイトメトリー分析を行った。ＡＰＣ結合抗Ｔｈｙ１．２モノクローナル抗体（eBioscience社）で染色し、各Ｔ細胞（リンパ球）集団におけるＴｈｙ１．２陽性細胞を生存するＴ細胞とみなして、細胞数を測定した。

[0154] 結果を図３に示す。ｔｒａｎｓｄｕｃｔｉｏｎ（－）Ｔ細胞（比較例１）は、hCD20/P815細胞と共培養しても活性化刺激が起こらず、生細胞数は培養３日目には１／１０以下となった。一方、hCD20/P815細胞と共培養したＩＬ

１５$_{LSP}$×ＣＣＬ１９　ＣＡＲ－Ｔ細胞（実施例１－１）、$_{s}$ＩＬ１５$_{RA}$×ＣＣＬ１９　ＣＡＲ－Ｔ細胞（実施例１－２）、$_{mb}$ＩＬ１５$_{RA}$×ＣＣＬ１９　ＣＡＲ－Ｔ細胞（実施例１－３）、$_{sushi}$ＩＬ１５×ＣＣＬ１９　ＣＡＲ－Ｔ細胞（実施例１－４）、ＩＬ－１８×ＣＣＬ１９　ＣＡＲ－Ｔ細胞（実施例２）、ＩＬ－２１×ＣＣＬ１９　ＣＡＲ－Ｔ細胞（実施例３）およびｓｃＩＬ２７×ＣＣＬ１９　ＣＡＲ－Ｔ細胞（実施例４）はいずれも、培養３日目において、コントロールであるｃｏｎｖ．ＣＡＲ－Ｔ細胞（比較例２）と同等、あるいは同等以上の生細胞数の増殖維持が確認された。さらに、７日まで培養を続けると、特に$_{s}$ＩＬ１５$_{RA}$×ＣＣＬ１９　ＣＡＲ－Ｔ細胞（実施例１－２）、$_{mb}$ＩＬ１５$_{RA}$×ＣＣＬ１９　ＣＡＲ－Ｔ細胞（実施例１－３）、$_{sushi}$ＩＬ１５×ＣＣＬ１９　ＣＡＲ－Ｔ細胞（実施例１－４）は顕著な細胞増殖を示した。ＩＬ１５$_{LSP}$×ＣＣＬ１９　ＣＡＲ－Ｔ細胞（実施例１－１）、ＩＬ－１８×ＣＣＬ１９　ＣＡＲ－Ｔ細胞（実施例２）、ＩＬ－２１×ＣＣＬ１９　ＣＡＲ－Ｔ細胞（実施例３）およびｓｃＩＬ２７×ＣＣＬ１９　ＣＡＲ－Ｔ細胞（実施例４）は、培養３日目から７日目にかけてコントロールであるｃｏｎｖ．ＣＡＲ－Ｔ細胞（比較例２）と同等の細胞数を維持した。

[0155]　あわせて、Ｔｈｙ１．２陽性細胞集団中のＣｙｔｏＴｅｌｌ試薬による染色強度のヒストグラム解析を行った。刺激開始５日後の細胞集団についての結果を図４に示す。ＩＬ１５$_{LSP}$×ＣＣＬ１９　ＣＡＲ－Ｔ細胞（実施例１－１）、$_{s}$ＩＬ１５$_{RA}$×ＣＣＬ１９　ＣＡＲ－Ｔ細胞（実施例１－２）、$_{mb}$ＩＬ１５$_{RA}$×ＣＣＬ１９　ＣＡＲ－Ｔ細胞（実施例１－３）、$_{sushi}$ＩＬ１５×ＣＣＬ１９　ＣＡＲ－Ｔ細胞（実施例１－４）、ＩＬ－１８×ＣＣＬ１９　ＣＡＲ－Ｔ細胞（実施例２）およびＩＬ－２１×ＣＣＬ１９　ＣＡＲ－Ｔ細胞（実施例３）は、コントロールであるｃｏｎｖ．ＣＡＲ－Ｔ細胞（比較例２）と比較して、第二世代（１回分裂後）の細胞集団の割合がとくに減少し、また第五世代以降（４回以上の分裂後）の細胞集団の割合が増加していた。

[0156] 図３および図４の結果より、特に$_{s}$ＩＬ１５$_{RA}$×ＣＣＬ１９　ＣＡＲ－Ｔ細胞（実施例１－２）、$_{mb}$ＩＬ１５$_{RA}$×ＣＣＬ１９　ＣＡＲ－Ｔ細胞（実施例１－３）および$_{sushi}$ＩＬ１５×ＣＣＬ１９　ＣＡＲ－Ｔ細胞（実施例１－４）において産生される、IL-15/IL-15Rα融合タンパク質およびCCL-19の組み合わせが、ＣＡＲ－Ｔ細胞の生存と増殖を亢進し生物学的な機能を発揮する上で好ましいことが明らかとなった。

[0157] ［試験例３］ＣＡＲ－Ｔ細胞の腫瘍細胞傷害活性の評価

上記実施例および比較例で製造したＴ細胞を用いて、ターゲット抗原特異的な腫瘍細胞傷害活性を検討した。

[0158] ［Ａ：フローサイトメトリーによる腫瘍細胞傷害活性の測定］

ヒトＣＤ２０を発現するよう遺伝子組換えを行ったＰ８１５マストサイトーマ（hCD20/P815）をターゲット腫瘍細胞とし、そのような遺伝子組換えを行っていないＰ８１５マストサイトーマ（P815）をコントロール腫瘍細胞として用いた。

[0159] 前記ターゲット腫瘍細胞またはコントロール腫瘍細胞を採取し、培養プレートに播種したのち、エフェクターＴ細胞として、各実施例のＣＡＲ－Ｔ細胞（ＩＬ１５$_{LSP}$×ＣＣＬ１９　ＣＡＲ－Ｔ細胞（実施例１－１）、$_{s}$ＩＬ１５$_{RA}$×ＣＣＬ１９　ＣＡＲ－Ｔ細胞（実施例１－２）、$_{mb}$ＩＬ１５$_{RA}$×ＣＣＬ１９　ＣＡＲ－Ｔ細胞（実施例１－３）、$_{sushi}$ＩＬ１５×ＣＣＬ１９　ＣＡＲ－Ｔ細胞（実施例１－４）、ＩＬ－１８×ＣＣＬ１９　ＣＡＲ－Ｔ細胞（実施例２）、ＩＬ－２１×ＣＣＬ１９　ＣＡＲ－Ｔ細胞（実施例３）およびｓｃＩＬ２７×ＣＣＬ１９　ＣＡＲ－Ｔ細胞（実施例４））または比較例２のＣＡＲ－Ｔ細胞（ｃｏｎｖ．ＣＡＲ－Ｔ細胞）を加え、７２時間共培養を行った。エフェクターＴ細胞はＣＡＲ陽性細胞数がターゲット腫瘍細胞の１／３量となるように加え（Ｅ：Ｔ比＝１：３）、ＣＡＲ発現率が最も低いＴ細胞の播種数に合わせて、その他のＴ細胞群には形質導入をしていないＴ細胞を添加することで、播種した全Ｔ細胞数が各群で同数となるようにした。７２時間の共培養ののち、全細胞を回収し、フローサイトメトリー解析お

よび生細胞数の測定を行った。ＡＰＣ結合抗Ｔｈｙ１．２モノクローナル抗体（eBioscience社)およびZombie Green Fixable Viability Kit (BioLegend社）で染色し、生細胞集団中のＴ細胞および腫瘍細胞の割合をＴｈｙ１．２陽性率から算出した。生細胞数は、NucleoCounter NC-200（chemometec社）を用いて測定した。

[0160] 結果を図５に示す。図５Ａに示すように、共培養７２時間後のhCD20/P815腫瘍細胞数を生細胞中のThy1.2陰性率から算出したところ、ＩＬ１５$_{LSP}$×ＣＣＬ１９　ＣＡＲ－Ｔ細胞（実施例１－１）、$_{s}$ＩＬ１５$_{RA}$×ＣＣＬ１９　ＣＡＲ－Ｔ細胞（実施例１－２）、$_{mb}$ＩＬ１５$_{RA}$×ＣＣＬ１９　ＣＡＲ－Ｔ細胞（実施例１－３）、$_{sushi}$ＩＬ１５×ＣＣＬ１９　ＣＡＲ－Ｔ細胞（実施例１－４）、ＩＬ－１８×ＣＣＬ１９　ＣＡＲ－Ｔ細胞（実施例２）、ＩＬ－２１×ＣＣＬ１９　ＣＡＲ－Ｔ細胞（実施例３）またはｓｃＩＬ２７×ＣＣＬ１９　ＣＡＲ－Ｔ細胞（実施例４）と共培養したhCD20/P815腫瘍細胞数はいずれも、ｔｒａｎｓｄｕｃｔｉｏｎ（－）Ｔ細胞（比較例１）と比較して著しく減少しており、ｃｏｎｖ．ＣＡＲ－Ｔ細胞（比較例２）と比較してもより減少しており、生存した腫瘍細胞は１％以下であった。一方、図５Ｂに示すように、ヒトCD20を発現していないP815細胞については、いずれの群でも腫瘍細胞の減少は見られず、ヒトCD20を発現していない腫瘍細胞に対する非特異的な細胞傷害は確認されなかった。

[0161] ［Ｂ：ＥＬＩＳＡアッセイによるＩＦＮγ産生測定］

ターゲット抗原特異的な細胞傷害能力の活性化の指標として、CAR-T細胞から産生されるインターフェロンγ（ＩＦＮγ）を市販のＥＬＩＳＡアッセイキット（R&D社）によって測定した。前述のP815細胞（コントロール腫瘍細胞）またはhCD20-P815細胞（ターゲット腫瘍細胞）と共培養した、各実施例のＣＡＲ－Ｔ細胞（ＩＬ１５$_{LSP}$×ＣＣＬ１９　ＣＡＲ－Ｔ細胞（実施例１－１）、$_{s}$ＩＬ１５$_{RA}$×ＣＣＬ１９　ＣＡＲ－Ｔ細胞（実施例１－２）、$_{mb}$ＩＬ１５$_{RA}$×ＣＣＬ１９　ＣＡＲ－Ｔ細胞（実施例１－３）、$_{sushi}$ＩＬ１５×ＣＣＬ１９　ＣＡＲ－Ｔ細胞（実施例１－４）、ＩＬ－１８×ＣＣＬ１９　Ｃ

ＡＲ－Ｔ細胞（実施例２）、ＩＬ－２１×ＣＣＬ１９　ＣＡＲ－Ｔ細胞（実施例３）およびｓｃＩＬ２７×ＣＣＬ１９　ＣＡＲ－Ｔ細胞（実施例４））または比較例２のＣＡＲ－Ｔ細胞（ｃｏｎｖ．ＣＡＲ－Ｔ細胞）の、共培養４日後の培養上清中のＩＦＮγの量を測定した。

[0162] 結果を図６に示す。図６Ａに示すように、hCD20-P815細胞と共培養したＩＬ１５$_{LSP}$×ＣＣＬ１９　ＣＡＲ－Ｔ細胞（実施例１－１）、$_{s}$ＩＬ１５$_{RA}$×ＣＣＬ１９　ＣＡＲ－Ｔ細胞（実施例１－２）、$_{mb}$ＩＬ１５$_{RA}$×ＣＣＬ１９　ＣＡＲ－Ｔ細胞（実施例１－３）、$_{sushi}$ＩＬ１５×ＣＣＬ１９　ＣＡＲ－Ｔ細胞（実施例１－４）、ＩＬ－１８×ＣＣＬ１９　ＣＡＲ－Ｔ細胞（実施例２）、ＩＬ－２１×ＣＣＬ１９　ＣＡＲ－Ｔ細胞（実施例３）またはｓｃＩＬ２７×ＣＣＬ１９　ＣＡＲ－Ｔ細胞（実施例４）のいずれの培養上清においても、ｃｏｎｖ．ＣＡＲ－Ｔ細胞（比較例２）より高く、約１５ｎｇ／ｍＬ以上のＩＦＮγが検出された。ｔｒａｎｓｄｕｃｔｉｏｎ（－）Ｔ細胞（比較例１）と共培養した群におけるＩＦＮγ産生量は検出限界限界以下であった。一方、図６Ｂに示すように、P815細胞と共培養した各ＣＡＲ発現細胞培養上清中のＩＦＮγの濃度は１０ｐｇ／ｍＬ以下であった。

[0163] 以上の試験例３（図５および図６）の結果から、上記各実施例および比較例２のＴ細胞はいずれも、ヒトCD20発現細胞に対する、つまりターゲット抗原特異的な、細胞傷害活性を示すことが確認された。

[0164] ［試験例４］マウス腫瘍モデルでの治療効果

上記実施例１－３および実施例１－４、比較例２で製造したＴ細胞を用いて、マウスメラノーマ腫瘍移植モデル又はマウス大腸がん腫瘍モデルに対する治療効果を下記のような担癌マウスを用いて検討した。

[0165] （マウスメラノーマ腫瘍移植モデルでの治療効果）

ヒトＣＤ２０を発現するように遺伝子組換えを行ったマウスメラノーマＢ１６Ｆ１０（Ｂ１６Ｆ１０－ｈＣＤ２０）５×１０^{5}個をＣ５７ＢＬ／６Ｎマウスの皮下に接種した。接種後７日目に抗がん剤であるシクロホスファミド（ＣＰＡ、５０ｍｇ／ｋｇ）を腹腔内に投与し、１０日目に１×１０^{6}個の実

施例１－３のＣＡＲ－Ｔ細胞（$_{mb}$ＩＬ１５$_{RA}$×ＣＣＬ１９　ＣＡＲ－Ｔ）又は、実施例１－４のＣＡＲ－Ｔ細胞（$_{sushi}$ＩＬ１５×ＣＣＬ１９　ＣＡＲ－Ｔ）又は、比較例２（Ｃｏｎｖ．ＣＡＲ－Ｔ）を静脈内に投与した。対照群として、ＣＰＡ投与のみを行ったＣＡＲ－Ｔ未治療群、Ｂ１６Ｆ１０－ｈＣＤ２０マウスメラノーマを接種後無処置の非治療群を設定した。マウスの腫瘍体積は１週間に２回測定した。

[0166] マウスメラノーマ腫瘍移植モデルの腫瘍体積の結果を図１６に示す。横軸はマウスにＢ１６Ｆ１０－ｈＣＤ２０を皮下接種した日を０日とした接種後の日数、縦軸は腫瘍体積（腫瘍の長径×（腫瘍の短径）^{2}／２（ｍｍ^{3}））である。標準偏差はそれぞれの実験グループにおいて算出した。「ｎｏ　ｔｒｅａｔｍｅｎｔ」は無処置、「ＣＰＡ」はＣＰＡ投与のみ、「ＣＰＡ＋Ｃｏｎｖ．」はＣＰＡ投与後に比較例２（Ｃｏｎｖ．ＣＡＲ－Ｔ）を投与、「ＣＰＡ＋$_{mb}$ＩＬ１５$_{RA}$×１９」はＣＰＡ投与後に実施例１－３のＣＡＲ－Ｔ細胞（$_{mb}$ＩＬ１５$_{RA}$×ＣＣＬ１９　ＣＡＲ－Ｔ）を投与、「ＣＰＡ＋$_{sushi}$ＩＬ１５$_{RA}$×１９」はＣＰＡ投与後に実施例１－４のＣＡＲ－Ｔ細胞（$_{sushi}$ＩＬ１５×ＣＣＬ１９　ＣＡＲ－Ｔ）を投与したグループである。

[0167] 図１６に示すように、実施例１－３のＣＡＲ－Ｔ細胞（$_{mb}$ＩＬ１５$_{RA}$×ＣＣＬ１９　ＣＡＲ－Ｔ）及び、実施例１－４のＣＡＲ－Ｔ細胞（$_{sushi}$ＩＬ１５$_{RA}$×ＣＣＬ１９　ＣＡＲ－Ｔ）を投与した場合には、比較例２（Ｃｏｎｖ．ＣＡＲ－Ｔ）を投与した場合や無処置群（ｎｏ　ｔｒｅａｔｍｅｎｔ）およびＣＰＡ投与のみの場合と比較して腫瘍体積の減少効果が確認された。したがって、実施例１－３のＣＡＲ－Ｔ細胞（$_{mb}$ＩＬ１５$_{RA}$×ＣＣＬ１９　ＣＡＲ－Ｔ）及び、実施例１－４のＣＡＲ－Ｔ細胞（$_{sushi}$ＩＬ１５×ＣＣＬ１９　ＣＡＲ－Ｔ）はマウスメラノーマ腫瘍モデルにおいて優れた抗腫瘍活性を有することが明らかとなった。

[0168] （マウス大腸がん腫瘍移植モデルでの治療効果）

ヒトＣＤ２０を発現するように遺伝子組換えを行ったマウス大腸がんＭＣ３８（ＭＣ３８－ｈＣＤ２０）５×１０^{5}個をＣ５７ＢＬ／６Ｎマウスの皮下

に接種した。接種後７日目に抗がん剤であるシクロホスファミド（ＣＰＡ、５０ｍｇ／ｋｇ）を腹腔内に投与し、１０日目に１×１０^{6}個の実施例１－３のＣＡＲ－Ｔ細胞（$_{mb}$ＩＬ１５$_{RA}$ｘＣＣＬ１９　ＣＡＲ－Ｔ）又は、実施例１－４のＣＡＲ－Ｔ細胞（$_{sushi}$ＩＬ１５ｘＣＣＬ１９　ＣＡＲ－Ｔ）又は、比較例２（Ｃｏｎｖ．ＣＡＲ－Ｔ）を静脈内に投与した。対照群として、ＣＰＡ投与のみを行ったＣＡＲ－Ｔ未治療群、ＭＣ３８－ｈＣＤ２０マウス大腸がんを接種後無処置の非治療群を設定した。マウスの腫瘍体積は１週間に２回測定した。

[0169] マウス大腸がん腫瘍移植モデルの腫瘍体積の結果を図１７に示す。横軸はマウスにＭＣ３８－ｈＣＤ２０を皮下接種した日を０日とした接種後の日数、縦軸は腫瘍体積（腫瘍の長径×（腫瘍の短径）^{2}／２（ｍｍ^{3}））である。標準偏差はそれぞれの実験グループにおいて算出した。「ｎｏ　ｔｒｅａｔｍｅｎｔ」は無処置、「ＣＰＡ」はＣＰＡ投与のみ、「ＣＰＡ＋Ｃｏｎｖ．」はＣＰＡ投与後に比較例２（Ｃｏｎｖ．ＣＡＲ－Ｔ）を投与、「ＣＰＡ＋$_{mb}$ＩＬ１５$_{RA}$ｘ１９」はＣＰＡ投与後に実施例１－３のＣＡＲ－Ｔ細胞（$_{mb}$ＩＬ１５$_{RA}$ｘＣＣＬ１９　ＣＡＲ－Ｔ）を投与、「ＣＰＡ＋$_{sushi}$ＩＬ１５$_{RA}$ｘ１９」はＣＰＡ投与後に実施例１－４のＣＡＲ－Ｔ細胞（$_{sushi}$ＩＬ１５ｘＣＣＬ１９　ＣＡＲ－Ｔ）を投与したグループである。

[0170] 図１７に示すように、実施例１－３のＣＡＲ－Ｔ細胞（$_{mb}$ＩＬ１５$_{RA}$ｘＣＣＬ１９　ＣＡＲ－Ｔ）及び、実施例１－４のＣＡＲ－Ｔ細胞（$_{sushi}$ＩＬ１５ｘＣＣＬ１９　ＣＡＲ－Ｔ）を投与した場合には、比較例２（Ｃｏｎｖ．ＣＡＲ－Ｔ）を投与した場合や無処置群（ｎｏ　ｔｒｅａｔｍｅｎｔ）およびＣＰＡ投与のみの場合と比較して腫瘍体積の減少効果が確認された。したがって、実施例１－３のＣＡＲ－Ｔ細胞（$_{mb}$ＩＬ１５$_{RA}$ｘＣＣＬ１９　ＣＡＲ－Ｔ）及び、実施例１－４のＣＡＲ－Ｔ細胞（$_{sushi}$ＩＬ１５ｘＣＣＬ１９　ＣＡＲ－Ｔ）はマウス大腸がんモデルにおいても優れた抗腫瘍活性を有することが明らかとなった。

[0171] 上記の実施例および試験例では、マウス由来のＴ細胞やマウスの天然のア

ミノ酸配列を含むサイトカイン（ＩＬ－１５Ｒα等にＩＬ－１５が連結している融合タンパク質等）およびケモカイン（ＣＣＬ１９）を用いており、またマウスにおけるin vivo試験を行っている。しかしながら当業者であれば、マウス以外の哺乳動物、好ましくはヒトに関係する実施形態においても、すなわちヒト由来のＴ細胞やヒトの天然のアミノ酸配列を含むサイトカイン（ＩＬ－１５Ｒα等にＩＬ－１５が連結している融合タンパク質等）およびケモカイン（ＣＣＬ１９）を用いる場合であっても、またヒトにおけるin vivo試験を行う場合であっても、同様にして本発明を実施することができ、かつ本発明の作用効果が奏されることを理解することができる。

[0172] 例えば、配列番号５に示されているマウスの天然のアミノ酸配列を利用して実施（作製および使用）されている$IL15_{LSP}$を含む融合タンパク質は、配列番号１８に示されているＩＬ－１５に関するヒトの天然のアミノ酸配列のうちの、１～２９番目（シグナルペプチド部分）および４９～１６２番目（ＩＬ－１５部分）のアミノ酸配列を利用して、またそのようなアミノ酸配列をコードする塩基配列を有する核酸を利用して、実施することができる。

[0173] 配列番号７に示されているマウスの天然のアミノ酸配列を利用して実施されている$_{s}IL15_{RA}$を含む融合タンパク質は、配列番号１８に示されているＩＬ－１５に関するヒトの天然のアミノ酸配列のうちの、４９～１６２番目（ＩＬ－１５部分）のアミノ酸配列、ならびに配列番号１９に示されているＩＬ－１５Ｒαに関するヒトの天然のアミノ酸配列のうちの、３１～２０５番目（ＩＬ－１５Ｒα細胞外ドメイン）のアミノ酸配列を利用して、またそのようなアミノ酸配列をコードする塩基配列を有する核酸を利用して、実施することができる。

[0174] 配列番号９に示されているマウスの天然のアミノ酸配列を利用して実施されている$_{mb}IL15_{RA}$を含む融合タンパク質は、配列番号１８に示されているＩＬ－１５に関するヒトの天然のアミノ酸配列のうちの、４９～１６２番目（ＩＬ－１５部分）のアミノ酸配列、ならびに配列番号１９に示されているＩＬ－１５Ｒαに関するヒトの天然のアミノ酸配列のうちの、１～２６７

番目（ＩＬ－１５Ｒαの全長）のアミノ酸配列を利用して、またそのようなアミノ酸配列をコードする塩基配列を有する核酸を利用して、実施することができる。

[0175] 配列番号１１に示されているマウスの天然のアミノ酸配列を利用して実施されている$_{sushi}$ＩＬ１５を含む融合タンパク質は、配列番号１８に示されているＩＬ－１５に関するヒトの天然のアミノ酸配列のうちの、４９～１６２番目（ＩＬ－１５部分）のアミノ酸配列、ならびに配列番号１９に示されているＩＬ－１５Ｒαに関するヒトの天然のアミノ酸配列のうちの、３１～９５番目（ｓｕｓｈｉドメイン）のアミノ酸配列を利用して、またそのようなアミノ酸配列をコードする塩基配列を有する核酸を利用して、実施することができる。

産業上の利用可能性

[0176] 本発明による持続性および増殖性に優れたＣＡＲ－Ｔ細胞は、がん等の治療用の医薬を製造するための使用に好適である。また、本発明による発現ベクターは、そのようなＣＡＲ－Ｔ細胞を製造するための使用に好適である。

配列表フリーテキスト

[0177] 配列番号１：抗ヒトＣＤ２０　ＣＡＲを含むＤＮＡ断片（ＤＮＡ断片＃１）の塩基配列

配列番号２：ＤＮＡ断片＃１の３～１６３７番目の塩基配列によって発現する融合タンパク質のアミノ酸配列

配列番号３：終止コドンおよび制限酵素サイトをコードするＭＣＳ　ＤＮＡ断片（ＤＮＡ断片＃２）の塩基配列

配列番号４：ＩＬ１５$_{LSP}$＿Ｆ２Ａ＿ＣＣＬ１９　ＤＮＡ断片（ＤＮＡ断片＃３）の塩基配列

配列番号５：ＤＮＡ断片＃３の７～９６９番目の塩基配列によって発現し、２箇所のＦ２Ａで自己切断する、ＩＬ１５$_{LSP}$を含む融合タンパク質全体のアミノ酸配列

配列番号６：$_{s}$ＩＬ１５$_{RA}$＿Ｆ２Ａ＿ＣＣＬ１９　ＤＮＡ断片（ＤＮＡ断片

＃４）のアミノ酸配列

配列番号７：ＤＮＡ断片＃４の７～１５３９番目の塩基配列によって発現し、２箇所のＦ２Ａで自己切断する、$_{s}$ＩＬ１５$_{RA}$を含む融合タンパク質全体のアミノ酸配列

配列番号８：$_{mb}$ＩＬ１５$_{RA}$＿Ｆ２Ａ＿ＣＣＬ１９　ＤＮＡ断片（ＤＮＡ断片＃５）の塩基配列

配列番号９：ＤＮＡ断片＃５の７～１７１３番目の塩基配列によって発現し、２箇所のＦ２Ａで自己切断する、$_{mb}$ＩＬ１５$_{RA}$を含む融合タンパク質全体のアミノ酸配列

配列番号１０：$_{sushi}$ＩＬ１５＿Ｆ２Ａ＿ＣＣＬ１９　ＤＮＡ断片（ＤＮＡ断片＃６）の塩基配列

配列番号１１：ＤＮＡ断片＃６の７～１１７９番目の塩基配列によって発現し、２箇所のＦ２Ａで自己切断する、$_{sushi}$ＩＬ１５を含む融合タンパク質全体のアミノ酸配列

配列番号１２：ＩＬ－１８＿Ｆ２Ａ＿ＣＣＬ１９　ＤＮＡ断片（ＤＮＡ断片＃７）の塩基配列

配列番号１３：ＤＮＡ断片＃７の７～１０５９番目の塩基配列によって発現し、２箇所のＦ２Ａで自己切断する融合タンパク質全体のアミノ酸配列

配列番号１４：ＩＬ－２１＿Ｆ２Ａ＿ＣＣＬ１９　ＤＮＡ断片（ＤＮＡ断片＃８）の塩基配列

配列番号１５：ＤＮＡ断片＃８の７～９６９番目の塩基配列によって発現し、２箇所のＦ２Ａで自己切断する融合タンパク質全体のアミノ酸配列

配列番号１６：$_{sc}$ＩＬ２７＿Ｆ２Ａ＿ＣＣＬ１９　ＤＮＡ断片（ＤＮＡ断片＃９）

配列番号１７：ＤＮＡ断片＃９の７～１８３９番目の塩基配列によって発現し、２箇所のＦ２Ａで自己切断する、$_{sc}$ＩＬ２７を含む融合タンパク質全体のアミノ酸配列

配列番号１８：ＵｎｉＰｒｏｔＫＢ－Ｐ４０９３３として登録されている

、ヒトの天然のＩＬ－１５（シグナルペプチドおよびプロペプチド部分を含む全長）のアミノ酸配列

配列番号１９：ＵｎｉＰｒｏｔＫＢ－Ｑ１３２６１として登録されているヒトの天然のＩＬ－１５Ｒα（シグナルペプチド、ｓｕｓｈｉドメイン、細胞外ドメイン等を含む全長）のアミノ酸配列

請求の範囲

[請求項1] （１）キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）、

（２）インターロイキン－１５（ＩＬ－１５）、インターロイキン－１８（ＩＬ－１８）、インターロイキン－２１（ＩＬ－２１）およびインターロイキン－２７（ＩＬ－２７）からなる群より選ばれる少なくとも１種、ならびに

（３）ＣＣケモカインリガンド１９（ＣＣＬ１９）

を発現するＴ細胞。

[請求項2] 前記（２）がＩＬ－１５である、請求項１に記載のＴ細胞。

[請求項3] 前記ＩＬ－１５が、ＩＬ－１５Ｒαと連結して融合タンパク質を形成した状態にあるＩＬ－１５である、請求項２に記載のＴ細胞。

[請求項4] 前記融合タンパク質が、ＩＬ－１５ＬＳＰとＩＬ－１５とが連結した融合タンパク質（$IL15_{LSP}$）、ＩＬ－１５Ｒα細胞外ドメインとＩＬ－１５が連結した融合タンパク質（$_{s}IL15_{RA}$）、ＩＬ－１５と全長のＩＬ－１５Ｒαが連結した融合タンパク質（$_{mb}IL15_{RA}$）、または、シグナルペプチドおよびｓｕｓｈｉドメインを含むＩＬ－１５Ｒαと ＩＬ－１５が連結した融合タンパク質（$_{sushi}$ＩＬ１５）である、請求項３に記載のＴ細胞。

[請求項5] 前記融合タンパク質が、ＩＬ－１５と全長のＩＬ－１５Ｒαが連結した融合タンパク質（$_{mb}IL15_{RA}$）、または、シグナルペプチドおよびｓｕｓｈｉドメインを含むＩＬ－１５Ｒαと ＩＬ－１５が連結した融合タンパク質（$_{sushi}$ＩＬ１５）である、請求項３に記載のＴ細胞。

[請求項6] 請求項１に記載のＴ細胞を含有する医薬。

[請求項7] がんの治療剤である、請求項６に記載の医薬。

[請求項8] 前記がんが、メラノーマ、メルケル細胞がん、大腸がん、腎臓がん、乳がん、卵巣がん、卵管がん、子宮頸がん、肝臓がん、肺がん、非小細胞肺がん、頭頸部がん、小腸がん、前立腺がん、膀胱がん、直腸

がん、膵臓がん、ユーイング肉腫、横紋筋肉腫、上咽頭がん、食道がん、胆道がん、神経芽腫、骨肉腫、急性骨髄性白血病、多発性骨髄腫、リンパ腫または白血病である、請求項７に記載の医薬。

[請求項9] （１）ＣＡＲをコードする核酸、

（２）ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１およびＩＬ－２７からなる群より選ばれる少なくとも１種をコードする核酸、ならびに

（３）ＣＣＬ１９をコードする核酸

を含む、発現ベクター。

[請求項10] 前記（２）がＩＬ－１５である、請求項９に記載の発現ベクター。

[請求項11] 前記ＩＬ－１５が、ＩＬ－１５Ｒαと連結して融合タンパク質を形成した状態にあるＩＬ－１５である、請求項１０に記載の発現ベクター。

[請求項12] 前記融合タンパク質が、ＩＬ－１５ＬＳＰとＩＬ－１５が連結した融合タンパク質（$_{LSP}$ＩＬ１５）、ＩＬ－１５Ｒα細胞外ドメインとＩＬ－１５が連結した融合タンパク質（$_{s}$ＩＬ１５$_{RA}$）、ＩＬ－１５と全長のＩＬ－１５Ｒαが連結した融合タンパク質（$_{mb}$ＩＬ１５$_{RA}$）、または、シグナルペプチドおよびｓｕｓｈｉドメインを含むＩＬ－１５Ｒαと ＩＬ－１５が連結した融合タンパク質（$_{sushi}$ＩＬ１５）である、請求項１１に記載の発現ベクター。

[請求項13] 前記融合タンパク質が、ＩＬ－１５と全長のＩＬ－１５Ｒαが連結した融合タンパク質（$_{mb}$ＩＬ１５$_{RA}$）、または、シグナルペプチドおよびｓｕｓｈｉドメインを含むＩＬ－１５Ｒαと ＩＬ－１５が連結した融合タンパク質（$_{sushi}$ＩＬ１５）である、請求項１１に記載の発現ベクター。

[請求項14] 請求項９に記載の発現ベクターをＴ細胞に導入する工程を含む、ＣＡＲ－Ｔ細胞の製造方法。

[請求項15] 請求項１に記載のＴ細胞を、がんの治療を必要とする対象に投与する工程を含む、がんの治療方法。

[請求項16] 前記がんが、メラノーマ、メルケル細胞がん、大腸がん、腎臓がん、乳がん、卵巣がん、卵管がん、子宮頸がん、肝臓がん、肺がん、非小細胞肺がん、頭頚部がん、小腸がん、前立腺がん、膀胱がん、直腸がん、膵臓がん、ユーイング肉腫、横紋筋肉腫、上咽頭がん、食道がん、胆道がん、神経芽腫、骨肉腫、急性骨髄性白血病、多発性骨髄腫、リンパ腫または白血病である、請求項１５に記載の治療方法。

[請求項17] がんの治療の有効成分として使用するための、請求項１に記載のＴ細胞。

[請求項18] 前記がんが、メラノーマ、メルケル細胞がん、大腸がん、腎臓がん、乳がん、卵巣がん、卵管がん、子宮頸がん、肝臓がん、肺がん、非小細胞肺がん、頭頚部がん、小腸がん、前立腺がん、膀胱がん、直腸がん、膵臓がん、ユーイング肉腫、横紋筋肉腫、上咽頭がん、食道がん、胆道がん、神経芽腫、骨肉腫、急性骨髄性白血病、多発性骨髄腫、リンパ腫または白血病である、請求項１７に記載のＴ細胞。