明　細　書

発明の名称 ：

多能性幹細胞から免疫細胞療法用Ｔ細胞を誘導する方法

技術分野

[0001] 本発明は免疫細胞療法に用い得るＴ細胞の誘導方法に関する。特に、多能性幹細胞、例えばｉＰＳ細胞から所望の抗原特異性Ｔ細胞受容体遺伝子を有するＴ細胞を効率良く確実に誘導する方法に関する。

本願はまた、ｉＰＳ細胞を利用した免疫細胞療法に有用な細胞バンクの製法に関する。

背景技術

[0002] 個々のＴ細胞は異なる特異性のＴ細胞受容体（ＴＣＲ）を発現している。感染症が生じた時、特定の特異性の細胞が増殖し、細胞集団（クローン）を形成して病原体の対処にあたる。これが獲得免疫系の基本型である。特定の特異性のＴＣＲを有するＴ細胞を人為的に増殖（クローニングという）できれば治療に用いることができることが期待される。実際に、特定の特異性を示すＴ細胞を患者から採取し、増やして患者に戻す（自家移植）方法は臨床応用されている。ただしこのような試みの殆どはクローニングというほど純化された細胞群を用いていない。また、in vitroで何代も継代培養するうちに、がん細胞を殺す活性が低下するという問題もあった。

[0003] Ｔ細胞を不死化することにより無限に増やす方法も提案されている。１の細胞を不死化して増殖させ、クローニングする。細胞の不死化はがん細胞との融合による方法と、ＴＣＲ刺激とサイトカインの刺激による長期間培養などの方法が挙げられる。しかしながら、こうして不死化したＴ細胞は、患者本人に戻す自家移植は危険である。また、クローニング工程において機能が低下するという問題もあった。

[0004] ヒトＴ細胞からｉＰＳ細胞を誘導し、得られたｉＰＳ細胞から元のヒトＴ細胞のＴＣＲ遺伝子の組み替え構造を保ったまま再度Ｔ細胞へ分化誘導して

これを免疫細胞療法に使用することが提案されている （WO 2013176197 A1、Vizcardo et al., Cell Stem Cell 12,31-36 2013および Nishimura T et al, Cell Stem Cell, 2013)。

[0005] これらの文献記載の方法にてＴ細胞由来のｉＰＳ細胞を得、これを再度成熟Ｔ細胞へ分化誘導する際、成熟Ｔ細胞への分化に伴い、ＴＣＲα鎖が追加の再構成を受けることが報告されている（Nishimura T et al, Cell Stem Cell, 2013）。この追加α鎖再構成によりＴＣＲの抗原特異性が失われるのみならず、意図しないα鎖とのミスペアリングにより、自己反応性のＴ細胞を生み出す可能性がある。自己反応性Ｔ細胞が生じると、正常な組織を傷害する反応が起こりかねず、非常に危険である（Bendle GM et al, Nat Med. 2010 May;16(5):565-70）。

ＴＣＲ遺伝子の再構成にはＲａｇ１およびＲａｇ２遺伝子によりコードされるＲＡＧタンパクが関与していることが知られいる。

[0006] 一方、日本人に頻度の高いＨＬＡハプロタイプをホモで有するヒトをドナーとして用いることにより、汎用性の高いｉＰＳ細胞バンクを構築するプロジェクトが行われている（CYRANOSKI, Nature vol. 488, 139(2012)および金子新、最新医学 69:724-733, 2014）。しかしながらＴ細胞に関してはハプロタイプホモからヘテロへの移植（他家移植）は絶対的な禁忌とされてきたため、ｉＰＳ細胞バンクに保存されたｉＰＳ細胞から所望ＴＣＲを有する成熟Ｔ細胞を得て免疫細胞療法に用いるという構想については、これまで否定的であった。ハプロタイプホモのドナー由来のＴ細胞をヘテロのレシピエントへ輸注した場合（他家移植）、レシピエントの免疫系からみるとドナーのＴ細胞は自己（自家移植）とみなされるが、ドナーＴ細胞からみるとレシピエントの体細胞は非自己（他家移植）とみなされる。このために、とりわけ重度の移植片対宿主反応が起こり、レシピエントを死に至らしめる危険が報告されている（Ito et al Lancet, 331: 413, 1988）。

先行技術文献

特許文献

[0007] 特許文献1：WO 2013176197 A1

特許文献2：WO 2011096482 A1

非特許文献

[0008] 非特許文献1：Vizcardo et al., Cell Stem Cell 12, 31-36 2013

非特許文献2：Nishimura T et al, Cell Stem Cell 12, 114-226 20013

非特許文献3：Ito et al Lancet, 331: 413, 1988

非特許文献4：Bendle GM et al, Nat Med. 2010 May;16(5):565-70

非特許文献5：CYRANOSKI, Nature vol. 488, 139(2012)

非特許文献6：金子新、最新医学 69:724-733, 2014

非特許文献7：Le Cong et al, Science 39; 819, 2013

非特許文献8：Prashant Mali et al, Science 39; 823,2013 上記先行技術文献は引用により本願明細書の一部を構成する。

発明の概要

[0009] 本願は、多能性幹細胞から所望のＴＣＲを有するＴ細胞のクローンを誘導する方法を提供することを目的とする。本願はまた、ｉＰＳ細胞から免疫細胞療法用細胞バンクを製造する方法、ならびに免疫細胞療法用細胞バンクを提供する。

[0010] １の態様において本願は、（１）所望の抗原特異性Ｔ細胞受容体遺伝子(以下ＴＣＲ)を有し、Ｒａｇ１および／またはＲａｇ２遺伝子がノックアウトされたヒト多能性幹細胞を提供する工程、および

（２）工程（１）の多能性幹細胞からＴ細胞を誘導する工程

を含む、免疫細胞療法用Ｔ細胞を誘導する方法を提供する。

[0011] 本態様において「所望の抗原特異性Ｔ細胞受容体（以下ＴＣＲ)遺伝子を有し、Ｒａｇ１および／またはＲａｇ２遺伝子がノックアウトされたヒト多能性幹細胞」は、（a）所望の抗原特異性Ｔ細胞受容体遺伝子を有する多能性幹細胞を誘導する工程、および（ｂ）工程（ａ）で得られた多能性細胞のＲａｇ１および／またはＲａｇ２遺伝子をゲノム編集によりノックアウトする工程を含む方法にて得てもよい。ここで、所望の抗原特異性ＴＣＲ遺伝子を有

する多能性幹細胞は、所望の抗原特異性ＴＣＲを有するＴ細胞から多能性幹細胞を誘導することによって得てもよい。または、所望の抗原特異性ＴＣＲ遺伝子を、多能性幹細胞に導入することによって得てもよい。

[0012] または、「所望の抗原特異性ＴＣＲ遺伝子を有し、Ｒａｇ１および／またはＲａｇ２遺伝子がノックアウトされたヒト多能性幹細胞」は、多能性幹細胞のＲａｇ１および／またはＲａｇ２遺伝子をゲノム編集によりノックアウトし、次いでＲａｇ１および／またはＲａｇ２遺伝子をノックアウトした多能性幹細胞へ所望のＴＣＲ遺伝子を導入することによって得てもよい。

[0013] 本願においてはＲａｇ１および／またはＲａｇ２遺伝子のノックアウトはゲノム編集、特にＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ９システムやＴＡＬＥＮなどを用いるゲノム編集によって両アレルのフレームシフト変異を誘導することによって行うことが例示される。また、相同組換えによりノックアウトでも構わない。

[0014] Ｒａｇ１および／またはＲａｇ２遺伝子をノックアウトすることによって、所望のＴＣＲを有する多能性幹細胞をＴ細胞へ分化誘導する過程で、ＴＣＲの再構成が生じることが少ない、または全く無くなる。従って本態様によって得られる免疫細胞療法用Ｔ細胞は、所望のＴＣＲを有する単一クローンとして提供され、安全かつ有効な治療に用いることができる。

[0015] 本願の他の態様においては、ＨＬＡハプロタイプホモのドナー由来のｉＰＳ細胞であって、Ｒａｇ１および／またはＲａｇ２遺伝子がノックアウトされているｉＰＳ細胞群が各ドナーのＨＬＡ情報とひも付けて保存されている、細胞免疫療法用ｉＰＳ細胞バンクが提供される。

[0016] 拒絶反応が起きにくいＨＬＡ型の組み合わせ（ＨＬＡホモ接合体）を持つ健常人ボランティア由来の細胞からｉＰＳ細胞を作製し、保存するｉＰＳストック事業が既に開始されているが（金子新、最新医学 69:724-733, 2014）、本態様において用いられるｉＰＳ細胞は、例えばかかるｉＰＳストック事業において健常人ボランティアのＨＬＡ型情報にひも付けてバンク化されたｉＰＳ細胞であってよい。

[0017] 本態様において得られる免疫細胞療法用ｉＰＳ細胞バンクは、種々の免疫療法に用いることができる。免疫療法に用いる場合は、治療対象者のＨＬＡハプロタイプの少なくとも一方が同一であるドナー由来の細胞を免疫療法用ｉＰＳ細胞バンクより選択し、治療のためのＴＣＲ遺伝子を導入する。ＴＣＲ遺伝子が導入されたｉＰＳ細胞を次いでＴ細胞へ分化誘導することによって、当該治療対象者に適した免疫細胞療法用Ｔ細胞を得ることができる。

[0018] さらに他の態様においては、（１）ＨＬＡハプロタイプホモのドナーから得た細胞由来のｉＰＳ細胞を提供する工程、（２）該ｉＰＳ細胞のＲａｇ１および／またはＲａｇ２遺伝子をゲノム編集によりノックアウトする工程、（３）工程（２）で得たＲａｇ１および／またはＲａｇ２遺伝子ノックアウトｉＰＳ細胞に所望の抗原特異性Ｔ細胞受容体遺伝子を導入する工程および（４）工程（３）で得られたｉＰＳ細胞を、各ドナーのＨＬＡ情報および抗原特異性Ｔ細胞受容体遺伝子情報とひも付けて保存する工程を含む、免疫細胞療法用ｉＰＳ細胞バンクを製造する方法が提供される。かかる方法においては、予め治療に有用なＴＣＲ遺伝子を導入したｉＰＳ細胞をバンク化することにより、より迅速に免疫療法用Ｔ細胞を提供することが可能となる。

[0019] さらに他の態様においては、（１）ＨＬＡハプロタイプホモのドナー由来のｉＰＳ細胞群が、ドナーのＨＬＡ情報にひも付けて保存されているｉＰＳ細胞バンクより、治療対象者のＨＬＡハプロタイプの少なくとも一方と合致するＨＬＡを有するドナー由来のｉＰＳ細胞を選択する工程、（２）選択した細胞のＲａｇ１および／またはＲａｇ２遺伝子をゲノム編集にてノックアウトする工程、（３）（２）で得たＲａｇ１および／またはＲａｇ２遺伝子ノックアウトｉＰＳ細胞へ、治療のための抗原特異性Ｔ細胞受容体遺伝子を導入する工程、および（４）当該抗原特異性Ｔ細胞受容体遺伝子を導入したＲａｇ１および／またはＲａｇ２ノックアウトｉＰＳ細胞をＴ細胞へ分化誘導する工程を含む、免疫療法用Ｔ細胞誘導方法が提供される。

[0020] さらに他の態様においては、本願の免疫療法用Ｔ細胞誘導方法により得られた所望のＴＣＲを有するＴ細胞を、治療対象者へ投与することを含む、免

疫細胞治療方法を提供する。

[0021] 所望のＴＣＲ遺伝子を有する多能性幹細胞のＲａｇ１および／またはＲａｇ２遺伝子をノックアウトすることにより、多能性幹細胞からＴ細胞への分化誘導の過程でＴＣＲの再構成が生じない、あるいはその頻度を低く抑えることが可能となった。かかる方法にて誘導したＴ細胞は、所望のＴＣＲを有するクローンとして提供される。

[0022] 他の態様において、本願はＨＬＡハプロタイプホモのドナーから得た細胞由来の多能性幹細胞であって、所望の抗原特異性Ｔ細胞受容体遺伝子を有する多能性幹細胞からＴ前駆細胞あるいは成熟Ｔ細胞を誘導し、当該Ｔ前駆細胞あるいは成熟Ｔ細胞をドナーのＨＬＡハプロタイプのいずれか一方または両方と同一のハプロタイプを有するレシピエントに投与することを含む、免疫細胞療法を提供する。さらに、本願はＨＬＡハプロタイプホモのドナーから得た細胞由来のｉＰＳ細胞であって、所望の抗原特異性Ｔ細胞受容体遺伝子を有するｉＰＳ細胞を、それぞれのドナーのＨＬＡならびにＴＣＲの情報にひも付けして保存したｉＰＳ細胞バンクを提供する。

[0023] 他家移植の場合、ドナーとレシピエントのＨＬＡを完全に一致させることはほぼ不可能である。Ｔ細胞が他家移植されると、ドナーＴ細胞はＨＬＡの不一致を攻撃対象と認識し得る。その結果、移植したドナーＴ細胞の一部がレシピエントの体の細胞を攻撃する反応であるいわゆる移植片対宿主反応が生じる。

[0024] しかしながら、本願の方法によって誘導されるＴ細胞は単一のＴＣＲを有するクローンであり、Ｔ細胞反応性は単一となる。よってＨＬＡホモドナーから、一方のＨＬＡのみが同一であるＨＬＡヘテロレシピエントへ移植（他家移植）しても移植片対宿主反応を起こす可能性が格段に低い。

図面の簡単な説明

[0025] [図1]実施例１で得たｉＰＳ細胞コロニーの写真。

[図2]ＨＬＡハプロタイプホモドナー末梢血Ｔ細胞から得たＴ－ｉＰＳ細胞から、ＣＤ４ＣＤ８ダブルポジティブ細胞が誘導されたことを示すＦＡＣＳ解

析結果。

[図3]実施例２においてＨＬＡハプロタイプホモドナー末梢血Ｔ細胞から得たＴ－ｉＰＳ細胞から誘導したCD8陽性T細胞をstimulatorとし、ドナーA、Bそれぞれの末梢血単核珠から単離したCD8陽性T細胞をeffectorとして共培養開始6日後にフローサイトメトリーにより細胞分裂を評価した。

[図4]ハプロタイプホモ接合型iPS細胞より誘導したCD8陽性T細胞は、ハプロタイプの片方の一致するドナーAのT細胞とMLR反応を起こさなかった。一方、ハプロタイプの全く一致しない ドナーBのT細胞とはMLR反応を起こした。

[図5]ハプロタイプホモ接合型iPS細胞より誘導したCD8陽性T細胞は、ハプロタイプの片方一致するヘテロ接合型のNK細胞を活性化した。

[図6]実施例４において健常人ボランティア由来Ｔ細胞からLMP2テトラマー陽性、CD8陽性Ｔ細胞が誘導されたことを示すＦＡＣＳ解析結果。

[図7]実施例４においてHLA-A2402を有しかつEBウイルス既感染者でもある健常人ボランティアの末梢血よりＬＭＰ２ペプチドを用いて誘導されたＴ細胞が、ペプチド特異的キラー活性を有することを示す図。

[図8]ＬＭＰ２ペプチド特異的Ｔ細胞から誘導されたｉＰＳ細胞コロニーの写真。

[図9]ＬＭＰ２ペプチド特異的Ｔ細胞から誘導されたＴ－ｉＰＳ細胞のＴ細胞への分化誘導過程（Ｄａｙ１３）の細胞のＦＡＣＳ解析結果。

[図10]ＬＭＰ２ペプチド特異的Ｔ細胞から誘導されたＴ－ｉＰＳ細胞のＴ細胞への分化誘導過程（Ｄａｙ３６）の細胞のＦＡＣＳ解析結果。

[図11]ＬＭＰ２ペプチド特異的Ｔ細胞から誘導されたＴ－ｉＰＳ細胞のＴ細胞への分化誘導過程（Ｄａｙ４１）の細胞のＦＡＣＳ解析結果。ＬＭＰ２特異的成熟Ｔ細胞（ＣＴＬ）が得られたことが確認された。

[図12]ＬＭＰ２ペプチド特異的Ｔ細胞から誘導されたＴ－ｉＰＳ細胞から再生した成熟Ｔ細胞（ＣＴＬ）のＬＭＰ２抗原特異的キラー活性を示す図。標的細胞としてＬＣＬを用い、ＬＭＰ２ペプチド存在（ｐ＋）、非存在（ｐ－）下でのＴ細胞のキラー活性を観察した。

[図13]ＬＭＰ２ペプチド特異的Ｔ細胞から誘導されたＴ－ｉＰＳ細胞から再生した成熟Ｔ細胞（ＣＴＬ）のナチュラルキラー細胞様キラー活性を観察した結果を示す図。

[図14]実施例５において健常人ボランティア由来Ｔ細胞からＷＴ１テトラマー陽性、ＣＤ８陽性Ｔ細胞が誘導されたことを示すＦＡＣＳ解析結果。

[図15]ＷＴ１ペプチド特異的Ｔ細胞から誘導されたＴ－ｉＰＳ細胞コロニーの写真。

[図16]ＷＴ１ペプチド特異的Ｔ細胞から誘導されたＴ－ｉＰＳ細胞のＴ細胞への分化誘導過程（Ｄａｙ１３）の細胞のＦＡＣＳ解析結果。

[図17]ＷＴ１ペプチド特異的Ｔ細胞から誘導されたＴ－ｉＰＳ細胞のＴ細胞への分化誘導過程（Ｄａｙ３６）の細胞のＦＡＣＳ解析結果。

[図18]実施例６において、ＴＣＲを導入したｉＰＳ細胞から誘導されたＴ細胞のＦＡＣＳ解析結果。

[図19]実施例７において、Ｔ－ｉＰＳ細胞のＲａｇ２遺伝子ノックアウト後のゲノムのＴ７Ｅアッセイの結果。

[図20]実施例７において、Ｔ－ｉＰＳ細胞（ＴＫＴ３ｖ）およびＲａｇ２をノックアウトしたＴ-ｉＰＳ細胞（Ｒａｇ２ＫＯ）をＴ細胞へと分化誘導させた細胞のＦＡＣＳ解析結果。

[図21]実施例７において、Ｔ－ｉＰＳ細胞（ＴＫＴ３ｖ）のＴＣＲα鎖の各Ｖ領域プライマーとＣ領域プライマーをもちいてＲＴ－ＰＣＲを行った結果を示す図。

[図22]Ｔ－ｉＰＳ細胞（ＴＫＴ３ｖ）をＣＤ４ＣＤ８ダブルネガティブ細胞からＣＤ４Ｄ８ダブルポジティブＴ細胞へ誘導する過程でＲａｇ２が活性化されたことを示す図。

[図23]Ｔ－ｉＰＳ細胞（ＴＫＴ３ｖ）をＣＤ４ＣＤ８ダブルネガティブＴ細胞まで誘導した際のＴＣＲα鎖の各Ｖ領域プライマーとＣ領域プライマーをもちいてＲＴ－ＰＣＲを行った結果を示す図。

[図24]Ｔ－ｉＰＳ細胞（ＴＫＴ３ｖ）をＣＤ４ＣＤ８ダブルポジティブＴ細

胞まで誘導した際のＴＣＲα鎖の各Ｖ領域プライマーとＣ領域プライマーをもちいてＲＴ－ＰＣＲを行った結果を示す図。

[図25]ＲＡＧ２遺伝子をノックアウトしたＴＫＴ３ｖ／Ｒａｇ２ＫＯ株から誘導したＤＰ細胞のＴＣＲα再構成を示す図。

[図26]ＴＫＴ３Ｖ／ＲＡＧ２ＫＯ株由来のＣＤ４ＣＤ８ダブルポジティブ細胞からＣＤ８シングルポジティブ成熟Ｔ細胞が得られたことを示す図。

[図27]ＴＫＴ３Ｖ／ＲＡＧ２ＫＯ株由来のＣＤ８シングルポジティブ細胞のＴＣＲ再構成を確認した図。

[図28]実施例８において、Ｒａｇ２遺伝子がノックアウトされたことを示す図。

[図29]実施例９において、Ｔ－ｉＰＳ細胞（ＷＴ）およびＲａｇ２をノックアウトしたＴ-ｉＰＳ細胞（Ｒａｇ２ＫＯ）をＴ細胞へと比較的長期間かけて分化誘導させた細胞のＦＡＣＳ解析結果。

[図30]実施例９において、Ｒａｇ２をノックアウトしたＴ-ｉＰＳ細胞（Ｒａｇ２ＫＯ）では分化誘導されたＣＤ８陽性細胞においてＴＣＲが維持されていた。

発明を実施するための形態

[0026] 本願は（１）所望の抗原特異性Ｔ細胞受容体遺伝子を有し、Ｒａｇ１および／またはＲａｇ２遺伝子がノックアウトされたヒト多能性幹細胞を提供する工程、および

（２）工程（１）の多能性幹細胞からＴ細胞を誘導する工程

を含む、免疫細胞療法用Ｔ細胞を誘導する方法を提供する。

[0027] 本明細書および請求の範囲において、多能性幹細胞とは、生体に存在する多くの細胞に分化可能である多能性を有し、かつ、自己増殖能を併せもつ幹細胞である。多能性幹細胞には、例えば胚性幹(ES)細胞、核移植により得られるクローン胚由来の胚性幹(ntES)細胞、精子幹細胞（「GS細胞」）、胚性生殖細胞（「EG細胞」）、人工多能性幹(iPS)細胞、培養線維芽細胞や骨髄幹細胞由来の多能性細胞（Muse細胞）などが含まれる。多能性幹細胞として胚

の破壊を行わずに得られるという観点から、iPS細胞またはMuse細胞を用いることが好ましい。多能性幹細胞は、好ましくは、哺乳動物の多能性幹細胞であり、より好ましくはヒト多能性幹細胞である。iPS細胞が好適に用いられる。

[0028] 本願の一の態様において、所望の抗原特異性ＴＣＲ遺伝子を有し、Ｒａｇ１および／またはＲａｇ２遺伝子がノックアウトされたヒト多能性幹細胞は、所望のＴＣＲを有するヒトＴ細胞からｉＰＳ細胞を誘導し、次いで誘導されたｉＰＳ細胞(以下Ｔ－ｉＰＳ細胞という)のＲａｇ１および／またはＲａｇ２遺伝子をノックアウトすることによって得ることができる。

[0029] 本願明細書および請求の範囲において、「Ｔ細胞」とは表面にＴ細胞受容体（ＴＣＲ）と称される抗原受容体を発現している細胞を意味する。Ｔ細胞からｉＰＳ細胞を誘導してもＴＣＲが維持されることは、例えばWO 2013176197 A1、Vizcardo et al., Cell Stem Cell 12, 31-36 2013および Nishimura Ｔ et al, Cell Stem Cell, 114-126, 2013 に報告されている。

[0030] ｉＰＳ細胞へと誘導されるＴ細胞としては、好ましくはＣＤ３を発現しており、且つＣＤ４及びＣＤ８からなる群から選択される少なくとも一の分子が発現しているＴ細胞である。このようなヒトＴ細胞としては、例えば、ＣＤ４陽性細胞であるヘルパー／制御性Ｔ細胞、ＣＤ８陽性細胞である細胞傷害性Ｔ細胞、ナイーブＴ細胞（ＣＤ４５ＲＡ$^{+}$ＣＤ６２Ｌ$^{+}$細胞）、セントラルメモリーＴ細胞（ＣＤ４５ＲＡ$^{-}$ＣＤ６２Ｌ$^{+}$細胞）、エフェクターメモリーＴ細胞（ＣＤ４５ＲＡ$^{-}$ＣＤ６２Ｌ$^{-}$細胞）、及びターミナルエフェクターＴ細胞（ＣＤ４５ＲＡ$^{+}$ＣＤ６２Ｌ$^{-}$細胞）が挙げられる。

[0031] ヒトＴ細胞は、ヒトの組織から公知の手法により単離することができる。ヒトの組織としては、前記Ｔ細胞を含む組織であれば特に制限はないが、例えば、末梢血、リンパ節、骨髄、胸腺、脾臓、臍帯血、病変部組織が挙げられる。これらの中では、ヒトに対する侵襲性が低く、調製が容易であるという観点から、末梢血、臍帯血が好ましい。ヒトＴ細胞を単離するための公知の手法としては、例えば、後述の実施例に示すようなＣＤ４、ＣＤ８等の細

胞表面マーカーに対する抗体と、セルソーターとを用いたフローサイトメトリーが挙げられる。また、サイトカインの分泌や機能性分子の発現を指標に、所望のＴ細胞を単離することも出来る。かかる場合、例えば、Ｔ細胞は、Ｔｈ１タイプかＴｈ２タイプかで分泌されるサイトカインが異なるので、そのようなサイトカインを指標に選別して、所望のＴｈタイプを有するＴ細胞を単離することができる。また、グランザイムやパーフォリンなどの分泌又は産生を指標として、細胞傷害性（キラー）Ｔ細胞を単離することが出来る。

[0032] 「所望の抗原特異性ＴＣＲを有するＴ細胞」は、例えばドナー細胞から当該ＴＣＲを有する細胞傷害性Ｔ細胞を取得もしくは誘導することによって得ることができる。例えばがん抗原特異的な細胞障害性Ｔ細胞は、ドナーより常法により取得したリンパ球を、治療対象とするがんに特異的ながん抗原と共に培養して得ることができる。種々のがんについてがん抗原が特定されており、がん抗原あるいはそのエピトープペプチドを用いて細胞障害性Ｔ細胞を誘導する方法も良く知られている。または、治療対象とするがん細胞とリンパ球を共に培養してもよい。

[0033] あるいは、治療対象とするがんに罹患したドナーから得られた末梢血より、当該がんに特異的ながん抗原に特異的な細胞傷害性Ｔ細胞を誘導して用いてもよい。

[0034] 「所望の抗原特異性を有するヒトＴ細胞」の単離においては、「所望の抗原特異性を有するＴ細胞」を含むヒト培養細胞またはヒトの組織より、所望の抗原を結合させたＭＨＣ（主要組織適合遺伝子複合体）を４量体化させたもの（いわゆる「ＭＨＣテトラマー」）を用いて、ヒトの組織より「所望の抗原特異性を有するＴ細胞」を精製する方法を用いることができる。

[0035] 人工多能性幹(iPS)細胞は、特定の初期化因子を、体細胞に作用させることによって作製することができる、ES細胞とほぼ同等の特性を有する体細胞由来の人工の幹細胞である（K. Takahashi and S. Yamanaka (2006) Cell, 126:663-676; K. Takahashi et al. (2007), Cell, 131:861-872; J. Yu et al.

(2007), Science, 318:1917-1920; Nakagawa, M.ら,Nat. Biotechnol. 26:101-106 (2008)；国際公開WO 2007/069666) 。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non-cording 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non-coding 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またはGlis1等が例示され、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、WO2007/069666、WO2008/118820、WO2009/007852、WO2009/032194、WO2009/058413、WO2009/057831、WO2009/075119、WO2009/079007、WO2009/091659、WO2009/101084、WO2009/101407、WO2009/102983、WO2009/114949、WO2009/117439、WO2009/126250、WO2009/126251、WO2009/126655、WO2009/157593、WO2010/009015、WO2010/033906、WO2010/033920、WO2010/042800、WO2010/050626、WO 2010/056831、WO2010/068955、WO2010/098419、WO2010/102267、WO 2010/111409、WO 2010/111422、WO2010/115050、WO2010/124290、WO2010/147395、WO2010/147612、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、R.L. Judson et al., (2009), Nat. Biotechnol., 27:459-461、Lyssiotis CA, et al. (2009), Proc Natl Acad Sci U S A. 106:8912-8917、Kim JB, et al. (2009), Nature. 461:649-643、Ichida JK, et al. (2009), Cell Stem Cell. 5:491-503、Heng JC, 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、Maekawa M, et al. (2011), Nature. 474:225-9.に記載の組み合わせが例示される。（本段落に記載の文献は引用により本願の一部を構成する）

[0036] 初期化因子は、その形態に応じた公知の方法にて体細胞へ接触、または体細胞内へ導入すればよい。

[0037] タンパク質の形態の場合、例えばリポフェクション、細胞膜透過性ペプチド（例えば、HIV由来のTATおよびポリアルギニン）との融合、マイクロインジェクションなどの手法によって体細胞内に導入してもよい。

[0038] DNAの形態の場合、例えば、ウイルス、プラスミド、人工染色体などのベクター、リポフェクション、リポソーム、マイクロインジェクションなどの手法によって体細胞内に導入することができる。ウイルスベクターとしては、レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクター（以上、Cell, 126, pp.663-676, 2006; Cell, 131, pp.861-872, 2007; Science, 318, pp.1917-1920, 2007）、アデノウイルスベクター(Science, 322, 945-949, 2008)、アデノ随伴ウイルスベクター、センダイウイルスベクター（WO 2010/008054）などが例示される。また、人工染色体ベクターとしては、例えばヒト人工染色体(HAC)、酵母人工染色体(YAC)、細菌人工染色体(BAC、PAC)などが含まれる。プラスミドとしては、哺乳動物細胞用プラスミドを使用しうる(Science, 322:949-953, 2008)。ベクターには、核初期化物質が発現可能なように、プロモーター、エンハンサー、リボゾーム結合配列、ターミネーター、ポリアデニル化サイトなどの制御配列を含むことができるし、さらに、必要に応じて、薬剤耐性遺伝子(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など）、チミジンキナーゼ遺伝子、ジフテリアトキシン遺伝子などの選択マーカー配列、緑色蛍光タンパク質(GFP)、βグルクロニダーゼ(GUS)、FLAGなどのレポーター遺伝子配列などを含むことができる。また、上記ベクターには、体細胞へ一旦導入して作用させた後、初期化因子をコードする遺伝子もしくはプロモーターとそれに結合する初期化因子をコードする遺伝子を共に切除するために、それらの前後にLoxP配列を有して

も良い。（本段落に記載の文献は引用により本願の一部を構成する）

[0039] 初期化因子がRNAの形態の場合、例えばリポフェクション、マイクロインジェクションなどの手法によって体細胞内に導入しても良い。分解を抑制するため、5-メチルシチジンおよびpseudouridine (TriLink Biotechnologies)を取り込ませたRNAを初期化因子として用いても良い（Warren L, (2010) Cell Stem Cell. 7:618-630）。（本段落に記載の文献は引用により本願の一部を構成する）

[0040] iPS細胞誘導のための培養液は、例えば、10～15%FBSを含有するDMEM、DMEM/F12又はDME培養液（これらの培養液にはさらに、LIF、penicillin/streptomycin、puromycin、L-グルタミン、非必須アミノ酸類、β-メルカプトエタノールなどを適宜含むことができる。）または市販の培養液[例えば、マウスES細胞培養用培養液(TX-WES培養液、トロンボＸ社)、霊長類ES細胞培養用培養液（霊長類ES/iPS細胞用培養液、リプロセル社）、無血清培地（mTeSR、Stem cell Technology社）]などが例示される。

[0041] iPS細胞誘導の例としては、たとえば、37℃、5%CO_2存在下にて、10%FBS含有DMEM又はDMEM/F12培養液上で体細胞と初期化因子とを接触させ約4～7日間培養し、その後、細胞をフィーダー細胞(たとえば、マイトマイシンC処理STO細胞、SNL細胞等)上にまきなおし、体細胞と初期化因子の接触から約10日後からbFGF含有霊長類ES細胞培養用培養液で培養することによって、該接触から約30～約45日又はそれ以上の後にES様コロニーを生じさせることができる。

[0042] あるいは、37℃、5% CO_2存在下にて、フィーダー細胞(たとえば、マイトマイシンC処理STO細胞、SNL細胞等)上で10%FBS含有DMEM培養液（これにはさらに、LIF、ペニシリン/ストレプトマイシン、ピューロマイシン、L-グルタミン、非必須アミノ酸類、β-メルカプトエタノールなどを適宜含むことができる。）で体細胞と初期化因子を接触させて培養し、約25～約30日又はそれ以上ののちにES様コロニーを生じさせることができる。望ましくは、フィーダー細胞の代わりに、初期化される体細胞そのものを用いる（Takahashi K, et

al. (2009), PLoS One. 4:e8067またはWO2010/137746）、もしくは細胞外基質（例えば、Laminin-5（WO2009/123349）、Laminin-10（US2008/0213885）、その断片（WO2011/043405）およびマトリゲル（BD社））を用いる方法が例示される。（本段落に記載の文献は引用により本願の一部を構成する）

[0043] この他にも、血清を含有しない培地を用いてiPS細胞を樹立する方法も例示される（Sun N, et al. (2009), Proc Natl Acad Sci U S A. 106:15720-15725）。さらに、樹立効率を上げるため、低酸素条件（0.1%以上、15%以下の酸素濃度）によりiPS細胞を樹立しても良い（Yoshida Y, et al. (2009), Cell Stem Cell. 5:237-241またはWO2010/013845）。（本段落に記載の文献は引用により本願の一部を構成する）

[0044] iPS細胞の樹立効率を高めるための成分として、ヒストンデアセチラーゼ（HDAC）阻害剤［例えば、バルプロ酸（VPA)、トリコスタチンA、酪酸ナトリウム、MC 1293、M344等の低分子阻害剤、HDACに対するsiRNAおよびshRNA（例、HDAC1 siRNA Smartpool(登録商標)（Millipore)、HuSH 29mer shRNA Constructs against HDAC1（OriGene)等）等の核酸性発現阻害剤など］、MEK阻害剤（例えば、PD184352、PD98059、U0126、SL327およびPD0325901）、Glycogen synthase kinase-3阻害剤（例えば、BioおよびCHIR99021）、DNAメチルトランスフェラーゼ阻害剤（例えば、5-azacytidine）、ヒストンメチルトランスフェラーゼ阻害剤（例えば、BIX-01294 等の低分子阻害剤、Suv39hl、Suv39h2、SetDBlおよびG9aに対するsiRNAおよびshRNA等の核酸性発現阻害剤など）、L-channel calcium agonist（例えばBayk8644)、酪酸、TGFβ阻害剤またはALK5阻害剤（例えば、LY364947、SB431542、616453およびA-83-01）、p53阻害剤（例えばp53に対するsiRNAおよびshRNA）、ARID3A阻害剤（例えば、ARID3Aに対するsiRNAおよびshRNA）、miR-291-3p、miR-294、miR-295およびmir-302などのmiRNA、Wnt Signaling（例えばsoluble Wnt3a）、神経ペプチドY、プロスタグランジン類（例えば、プロスタグランジンE2およびプロスタグランジンJ2）、hTERT、SV40LT、UTF1、IRX6、GLISl、PITX2、DMRTBl等が知られている。iPS細胞の樹立の際にはかかる樹立効率の改善目的にて用いられる成

分を添加した培養液を用いても良い。

[0045] 上記培養の間には、培養開始2日目以降から毎日1回新鮮な培養液と培養液交換を行う。核初期化に使用する体細胞の細胞数は、限定されないが、培養ディッシュ100cm^{2}あたり約5×10^3～約5×10^{6}細胞の範囲である。

[0046] iPS細胞は、形成したコロニーの形状により選択することが可能である。一方、体細胞が初期化された場合に発現する遺伝子（例えば、Oct3/4、Nanog）と連動して発現する薬剤耐性遺伝子をマーカー遺伝子として導入し、対応する薬剤を含む培養液（選択培養液）で培養を行うことにより樹立したiPS細胞を選択することができる。また、マーカー遺伝子として蛍光タンパク質遺伝子を導入し、蛍光顕微鏡で観察することによって、発光酵素遺伝子の場合は発光基質を加えることによって、iPS細胞を選択することができる。

[0047] Ｔ－ｉＰＳ細胞からＲａｇ１および／またはＲａｇ２遺伝子をノックアウトするためには、Le Cong et al, Science 39; 819, 2013あるいはPrashant Mali et al, Science 39; 823,2013に記載の方法に準じてゲノム編集を行うこと、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ９やＴＡＬＥＮなど公知の系を用いてＲａｇ１および／またはＲａｇ２遺伝子をノックアウトするようゲノム編集をする、あるいは相同組み換えによるＲａｇ１および／またはＲａｇ１のノックアウトを行うことが例示される。

[0048] ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ９はゲノムの特定の部位に機能欠損変異を起こさせるゲノム編集の方法として非常に簡便で優れたものである。ゲノムの特定の部位を標的としたｓｉｎｇｌｅ ｇｕｉｄｅ ＲＮＡ （ｓｇＲＮＡ）を作製し、ｓｇＲＮＡが結合した部位にＣａｓ９ヌクレアーゼを呼び込んでＤＮＡの二本鎖切断を起こし、フレームシフトによる挿入欠失変異（ｉｎｄｅｌ ｍｕｔａｔｉｏｎ）を起こして、標的の遺伝子を不活性化させることができる。Ｒａｇ１および／またはＲａｇ２遺伝子のノックアウトはその他公知ゲノム編集法のいずれを用いて行ってもよい。

[0049] 本願の別の態様において、所望の抗原特異性ＴＣＲを有し、Ｒａｇ１および／またはＲａｇ２遺伝子がノックアウトされたヒト多能性幹細胞は、ヒト

多能性幹細胞のＲａｇ１および／またはＲａｇ２遺伝子をゲノム編集によりノックアウトし、次いで所望の抗原特異性ＴＣＲ遺伝子を導入することによって得てもよい。

[0050] 本態様で用いられるヒト多能性幹細胞としては、治療対象者の体細胞から調製されたｉＰＳ細胞、ＨＬＡが一定以上同一である他人の体細胞から調製されたｉＰＳ細胞などが例示される。または、ｉＰＳ細胞としてはあらかじめドナーの体細胞から作成され、ドナーのＨＬＡ情報とひも付けられてストックされたものを用いてもよい。

[0051] 例えばＨＬＡハプロタイプホモのドナー由来のｉＰＳ細胞群が、ドナーのＨＬＡ情報にひも付けて保存されているｉＰＳ細胞バンクから、治療対象者のＨＬＡの少なくとも一方が同一である細胞を選択して用いることができる。

[0052] 本明細書ならびに請求の範囲で使用する「体細胞」なる用語は、精子、精母細胞、卵子、卵母細胞、ES細胞などの生殖系列細胞または分化多能性細胞を除くあらゆる動物細胞（好ましくは、ヒトを含む哺乳動物細胞）をいう。体細胞には、胎児(仔)の体細胞、新生児(仔)の体細胞、および成熟した健全個体の体細胞もしくは疾患を有する個体の体細胞のいずれも包含される。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、体細胞は分化した細胞、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が例示されるが、特に限定されない。取得に対する侵襲性が低いことから、末梢血、皮膚あるいは臍帯血由来の細胞が好適に用いられる。

[0053] ｉＰＳ細胞のＲａｇ２遺伝子のノックアウトは、上で説明したＴ－ｉＰＳ細胞のＲａｇ１および／またはＲａｇ２遺伝子のノックアウトと同様にして行えばよい。

[0054] Ｒａｇ１および／またはＲａｇ２遺伝子をノックアウトしたｉＰＳ細胞へ、所望の抗原特異性ＴＣＲ遺伝子を導入する。

[0055] 種々のがんについて、抗原特異的ＴＣＲ遺伝子が報告されている。ＴＣＲ遺伝子はまた、所望の抗原特異性を有するＴ細胞をがん患者や感染症患者から単離または誘導し、当該Ｔ細胞からＴＣＲの遺伝子を単離してもよい。本願においては、所望の抗原特異性を有するＴＣＲ遺伝子をドナー細胞から誘導されたｉＰＳへ導入する。ＴＣＲ遺伝子のｉＰＳ細胞への導入は常套の方法で行えばよく、例えばMorgan R.A. et al, Science, 314:126. 2006 (this document is herein incorporated by reference) に記載の方法に準じて行えば良い。具体的にはＴＣＲ遺伝子を適当なベクターに載せてｉＰＳ細胞へ導入すればよい。例えば、ウイルス、プラスミド、人工染色体などのベクター、リポフェクション、リポソーム、マイクロインジェクションなどの手法によって体細胞内に導入することができる。ウイルスベクターとしては、レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、センダイウイルスベクターなどが例示される。また、人工染色体ベクターとしては、例えばヒト人工染色体(HAC)、酵母人工染色体(YAC)、細菌人工染色体(BAC、PAC)などが含まれる。プラスミドとしては、哺乳動物細胞用プラスミドを使用しうる。ベクターには、ＴＣＲが発現可能なように、プロモーター、エンハンサー、リボゾーム結合配列、ターミネーター、ポリアデニル化サイトなどの制御配列を含むことができるし、さらに、必要に応じて、薬剤耐性遺伝子(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など)、チミジンキナーゼ遺伝子、ジフテリアトキシン遺伝子などの選択マーカー配列、緑色蛍光タンパク質(GFP)、βグルクロニダーゼ(GUS)、FLAGなどのレポーター遺伝子配列などを含むことができる。

[0056] 以下、ＴＣＲ遺伝子を導入したｉＰＳ細胞をＴＣＲ－ｉＰＳ細胞という。Ｒａｇ２遺伝子がノックアウトされたＴ－ｉＰＳ細胞またはＴＣＲ－ｉＰＳ細胞からＴ細胞を誘導する。ｉＰＳ細胞からＴ細胞への誘導は、例えばTimme

rmans et al., Journal of Immunology, 2009, 182: 6879-6888、Nishimura T et al, 2013, Cell Stem Cell 114-126、WO 2013176197 A1および WO 2011 096482 A1に記載の方法が例示される。

[0057] Ｔ細胞には大きく分けてαβＴ細胞とγδＴ細胞があり、αβＴ細胞にはキラーＴ細胞とヘルパーＴ細胞が含まれる。本明細書ならびに請求の範囲において「iPS細胞からＴ細胞が誘導された」という場合には、Ｔ前駆細胞および成熟Ｔ細胞のいずれをも対象とするものとする。好ましくはＣＤ３を発現しており、且つＣＤ４及びＣＤ８からなる群から選択される少なくとも一の分子が発現しているＴ細胞を誘導するものとする。

[0058] 今までに提案されている種々のｉＰＳ細胞から分化誘導させたＴ細胞以外の細胞や組織を移植する治療法では、当該細胞が一生涯生着し続けることが期待されている。従って、他家移植を前提とするｉＰＳ細胞ストック事業においてｉＰＳ細胞から分化誘導される細胞を移植する際には、患者は免疫抑制剤を飲み続ける必要がある。

[0059] 一方で、他家移植したＴ細胞はたとえドナーとレシピエントが同一のＨＬＡハプロタイプを有していたとしても、一定期間後に拒絶される。すなわちＨＬＡが一致するとはいえ、マイナー組織適合抗原が一致せず、移植されたｉＰＳ細胞由来のＴ細胞はいずれは拒絶される。この点で、Ｔ細胞以外に分化誘導したｉＰＳ細胞を用いた他家移植とは全く異なり予想外の優れた効果が示される。

[0060] 本願の一の態様においては、免疫細胞療法用細胞バンクを提供する。本願の細胞バンクは、ＨＬＡハプロタイプホモのドナー由来の細胞を用いて構築するのが好ましい。本願の免疫細胞療法用細胞バンクは、ＨＬＡハプロタイプホモのドナー由来のｉＰＳ細胞のＲａｇ２遺伝子をノックアウトしたｉＰＳ細胞を、ドナーのＨＬＡ情報とひも付けて保存したものであってよい。または、ＨＬＡハプロタイプホモのドナー由来のＴ－ｉＰＳ細胞、もしくはＴＣＲ－ｉＰＳ細胞を、ドナーのＨＬＡ情報並びにＴＣＲの情報とひも付けて保存してもよい。その他、免疫細胞療法用細胞バンクには、ドナーの性別、

年齢、疾患歴、治療歴、などの情報を併せて細胞とひも付けて保存してもよい。

[0061] あるいは、免疫細胞療法用細胞バンクとしてはＴ－ｉＰＳ細胞若しくはＴＣＲ－ｉＰＳ細胞から再生したＴ前駆細胞または成熟Ｔ細胞をストックしておいてもよい。再生したＴ細胞をストックすることによって、治療までの時間が短縮できるだけでなく、移植する前に移植細胞の品質の確認ができるというメリットもある。

[0062] 本願の免疫細胞療法においては、誘導されたＴ細胞を適当な媒体、例えば生理的食塩水やＰＢＳに懸濁してＨＬＡハプロタイプホモドナーと少なくとも一方のＨＬＡハプロタイプが一致する患者へ投与する。患者への投与は経静脈的に行えばよい。

[0063] 投与細胞数は特に限定されず、患者の年齢、性別、身長、体重、対象疾患、症状等に応じて適宜定めればよい。最適な投与細胞数は臨床試験により適宜決定すればよい。

[0064] Ｔ細胞は多様な抗原を攻撃対象とすることができ、本願の方法においてＴＣＲを適宜選択することによりがんや感染症など種々の疾患を対照とした免疫細胞療法への応用が可能である。本願の方法において治療の対象となる疾患としては、がん、感染症、自己免疫疾患、アレルギーなどが例示されるが、これらに限定されない。

[0065] 本願はまた、ＨＬＡハプロタイプホモのドナーから得た細胞由来の多能性幹細胞であって、所望の抗原特異性Ｔ細胞受容体遺伝子を有する多能性幹細胞からＴ前駆細胞あるいは成熟Ｔ細胞を誘導し、当該Ｔ前駆細胞あるいは成熟Ｔ細胞をドナーのＨＬＡハプロタイプのいずれか一方または両方と同一のハプロタイプを有するレシピエントに投与することを含む、免疫細胞療法を提供する。さらに、本願はＨＬＡハプロタイプホモのドナーから得た細胞由来のｉＰＳ細胞であって、所望の抗原特異性Ｔ細胞受容体遺伝子を有するｉＰＳ細胞を、それぞれのドナーのＨＬＡならびにＴＣＲの情報にひも付けして保存したｉＰＳ細胞バンクを提供する。

[0066] 実施例４および５に示すように、Ｔ－ｉＰＳ細胞からT細胞を誘導する際、比較的早期に抗原刺激を行うことにより、Ｒａｇ１および／またはＲａｇ２遺伝子をノックアウトさせずともＴ－ｉＰＳ細胞が由来するＴ細胞の抗原特異性を維持したＴ細胞を得ることが可能である。本願には、かかる場合にＲａｇ１および／またはＲａｇ２遺伝子をノックアウトさせないＴ－ｉＰＳ細胞あるいはＴＣＲ－ｉＰＳ細胞により作成した細胞バンクもまた含まれる。

以下実施例により本願発明をさらに詳細に説明する。

実施例 1

[0067] ＨＬＡハプロタイプホモ由来Ｔ細胞からのｉＰＳ細胞の誘導並びにｉＰＳ細胞からのＴ細胞の誘導

ハプロタイプHLA-A*3303-B*4403-C*1403-ERB1*1302をホモで有する健常人ボランティアの末梢血を用いた。

[0068] 1) Homo-T-iPS細胞の樹立

用いた培地は以下の通りである。

[表1]

Ｔ細胞用培地

	配合量	培地中の最終濃度
RPMI	45ml	
human AB serum	5ml	10%
Total	50ml	

[0069] A. CD8陽性Ｔ細胞の活性化

1.健常人ボランティアの末梢血より単核球をFicollによって精製し、MACS beadsを用いてCD8陽性細胞を濃縮した。

2. 全ての細胞をＴ細胞用培地に浮遊させ、IL-2（最終濃度 30U/mL)、 IL-7（最終濃度5 ng/mL）、IL-15（最終濃度 1ng/mL）を加えた。さらにDynabeads Human T-Activator CD3/CD28をＴ細胞：beadsが1：1となるように添加し、2日間培養することでCD8陽性細胞を活性化した。

[0070] B. センダイウィルスによる山中4因子とSV40の導入

1.活性化させたCD8陽性細胞をＴ細胞用培地に浮遊させ、山中4因子とSV40が

組み込まれたセンダイウィルスを培地中に添加し、そのまま2日間培養した。

2. Ｔ細胞用培地で洗浄し、さらにIL-2（最終濃度　30U/mL)、 IL-7（最終濃度5 ng/mL）、IL-15（最終濃度 1ng/mL）を加えたＴ細胞用培地で2日間培養した。

3.　全ての細胞を回収後、 IL-2（最終濃度　30U/mL)を加えたＴ細胞用培地でＴ細胞を懸濁し、フィーダー細胞上に播種した。

4.　2日目にiPS細胞用培地に半量交換し、翌日から毎日iPS細胞用培地への半量交換を行い続け、培養を続けた。

[0071] C. iPS細胞コロニーのピックアップ

1.3週間後にiPS細胞コロニーを目視により確認した。

2. 200ulチップによりコロニーを物理的に拾い上げた。

3. 各クローンを個別に樹立した。得られたクローンの写真を図１に示す。

[0072] 2) iPS細胞からＴ細胞への分化誘導

各培地の組成を下記に示す。

[表2]

medium A (OP9ストローマ細胞維持用)		最終濃度
αＭＥＭ	500mL	
ＦＣＳ	125mL	（２０％）
ペニシリン／ストレプトマイシン溶液	6.25mL	（１％）
Total	631.25mL	

*ペニシリン/ストレプトマイシン溶液は、ペニシリン10000U/mLおよびストレプトマイシン10000μg/mLからなり、それぞれの最終濃度を100U/mLおよび100μg/mLとした。

[0073] [表3]

medium B（Ｔ細胞分化誘導用）		(最終濃度)
αMEM	500mL	
FCS	125mL	(20%)
ペニシリン/ストレプトマイシン溶液	5mL	(1%)
hrIL-7　(stock: 10μg/ml)	315μL	(5ng/mL)
hrFlt-3L (stock: 10μg/ml)	315μL	(5ng/mL)
hrSCF　(stock: 10μg/ml)	630μL	(10ng/mL)
Total	631.26mL	

*ペニシリン/ストレプトマイシン溶液は、ペニシリン10000U/mLおよびストレプトマイシン10000μg/mLからなり、それぞれの最終濃度を100U/mLおよび 100μg/mLとした。

[0074] OP9細胞の準備

0.1% ゼラチン/PBS溶液6mlを10cm培養ディッシュに入れ、37℃で30分以上静置する。コンフルエントになったOP9細胞をトリプシン/EDTA溶液で剥がし、1/4相当量をゼラチンコートした10cm培養ディッシュに播種した。培地はmedium Aを10mlとなるように加えた。

4日後に播種したOP9細胞培養ディッシュに新たにmedium Aを10ml加え、全量が20mlとなるようにした。

[0075] iPS細胞からの血球前駆細胞誘導

共培養に使用するOP9細胞の培地を吸引し、新しいmedium Aに交換した。またヒトiPS細胞培養ディッシュの培地も同様に吸引し、新しいmedium Aを10ml加えた。EZ-passageローラーでヒトiPS細胞を切った。カットしたiPS細胞塊を200ulピペットマンでピペッティングすることで浮遊させ、目視でおおよそ600個のiPS細胞塊をOP9細胞上に播種した。

ヒトiPS細胞1クローンあたり3枚以上のディッシュを用い、継代するときには細胞を一度一つに合わせてから同じ枚数に再分配することでディッシュ間のばらつきを減らした。

[0076] Day 1（培地交換）

iPS細胞塊が接着し分化し始めているかどうかを確認し、培地を新しいmedium A 20mlに交換した。

Day 5 （培地半量交換）

半量分の培地を新しいmedium A 10mlに交換した。

Day 9 （培地交換）

半量分の培地を新しいmedium A 10mlに交換した。

Day 13（誘導した中胚葉細胞をOP9細胞上からOP9/DLL1細胞上への移しかえる）

培地を吸引し、HBSS(+Mg+Ca)で細胞表面上の培地を洗い流した。その後250U collagenase IV/HBSS(+Mg+Ca) 溶液10mlを加え、37℃で45分間培養する。Collagenase溶液を吸引し、PBS(-)10mlで洗い流した。その後5mlの0.05%トリプシン/EDTA溶液を加え、37℃で20分培養した。培養後、細胞が膜状に剥がれてくるのでピペッティングにより物理的に細かくした(接着細胞同士を離すため)。ここに新しいmedium Aを20ml加え、さらに37℃で45分間培養した。培養後、浮遊細胞を含む上清を、100μmのメッシュを通して回収した。4℃、1200rpmで7分間遠心し、ペレットを10mlのmedium Bに懸濁させた。このうち1/10をFACS解析用にとりわけ、残りの細胞を新たに用意したOP9/DLL1細胞上に播種した。複数枚のディッシュから得た細胞をプールした場合、元々の枚数と同じ枚数になるように再分配して細胞を播き直した。

[0077] 得られた細胞に造血前駆細胞が含まれているかどうかを確かめるために抗ＣＤ３４抗体、抗ＣＤ４３抗体を用いてＦＡＣＳ解析した。ＣＤ３４^{low}ＣＤ４３$^{+}$細胞分画に十分な細胞数が確認できると、造血前駆細胞が誘導されていることを確認した。

[0078] C. 血球前駆細胞からのＴ細胞分化誘導

次いで細胞をOP9/DLL1細胞上に播種した。この工程において、ＣＤ３４^{low}ＣＤ４３$^{+}$細胞分画の細胞のソーティングは行わない。この分画をソーティングした場合、得られる細胞数が減少してしまうことやソーティングによる細胞へのダメージから、ソーティングしなかった場合に比べてＴ細胞への分化誘導効率が落ちることがある。

[0079] 培養期間中に分化段階を確認するためにFACS解析を行うが、全ての期間において培養中に死細胞が多くみられる。そのためFACS解析時にはPI (Propidium Iodide)、7-AADなどを用い、死細胞除去したうえで解析を行うことが望ましい。

[0080] Day 16 (細胞の継代)

OP9/DLL1細胞に緩く接着している細胞を、穏やかに複数回ピペッティングし、100μmのメッシュを通して50mlコニカルチューブに回収した。4℃、120

0rpmで7分間遠心し、ペレットを10mlのmedium Bに懸濁させた。これらの細胞を新たに用意したOP9/DLL1細胞上に播種した。

[0081] Day 23（細胞の継代）: 血液細胞コロニーが見え始める。

OP9/DLL1細胞に緩く接着している細胞を、穏やかに複数回ピペッティングし、100μｍのメッシュを通して50mlコニカルチューブに回収する。4℃、1200rpmで7分間遠心し、ペレットを10mlのmedium Bに懸濁させた。これらの細胞を新たに用意したOP9/DLL1細胞上に播種した。

[0082] Day 30（細胞の継代）

OP9/DLL1細胞に緩く接着している細胞を、穏やかに複数回ピペッティングし、100μｍのメッシュを通して50mlコニカルチューブに回収した。4℃、1200rpmで7分間遠心し、ペレットを10mlのmedium Bに懸濁させた。これらの細胞を新たに用意したOP9/DLL1細胞上に播種した。

[0083] Day 37（細胞の継代）

OP9/DLL1細胞に緩く接着している細胞を、穏やかに複数回ピペッティングし、100μｍのメッシュを通して50mlコニカルチューブに回収した。4℃、1200rpmで7分間遠心し、ペレットを10mlのmedium Bに懸濁させた。これらの細胞を新たに用意したOP9/DLL1細胞上に播種した。

[0084] Day 44: ＣＤ４$^{+}$ＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞の確認。

Ｔ細胞が誘導されているかどうかを確かめるために抗ＣＤ４抗体、抗ＣＤ８抗体を用いてＦＡＣＳ解析した。結果を図２に示す。ＣＤ４ＣＤ８ダブルポジティブ細胞が誘導されていることを確認した。

[0085] 上記のとおり、ＨＬＡハプロタイプホモのドナーの末梢血より得たＴ細胞からｉＰＳ細胞を誘導し、ｉＰＳ細胞からＴ細胞を誘導することに成功した。

実施例 2

[0086] 1. 実施例１で得たＴ－ｉＰＳ細胞から常法によりＣＤ８陽性Ｔ細胞を誘導した。

[0087] ２．上記ハプロタイプホモ接合型ヒトＣＤ８陽性Ｔ細胞由来ｉＰＳ細胞株と

一方のハプロタイプを共有するドナーＡならびにハプロタイプが全く一致しないドナーＢを選定した。

ドナーＡ　HLA-A*31:01/33:03；B*44:03/48:01; C*04:01/14:03; DRB1*04:03/13:02

ドナーＢ　HLA-A*24:02/24:02；B*07:02/52:01; C*07:02/12:02; DRB1*01:01/15:02

[0088] 3．ドナーＡおよびＢの末梢血より単核球をＦｉｃｏｌｌによって精製した。末梢血単核球よりＣＤ８マイクロビーズを用いてＣＤ８陽性Ｔ細胞を単離した。

[0089] ４．Ｔ－ｉＰＳ細胞から誘導したＣＤ８陽性Ｔ細胞をStimulatorとし、ドナー由来のＣＤ８陽性Ｔ細胞をEffectorとしてＭＬＲ（Mixed Lymphocyte Reaction）を行った。エフェクター細胞はCellTrace Violet Cell Proliferation Kit を用いて蛍光標識した。Stimulator細胞はCell Trace CFSF Cell Proliferation Kitを用いて蛍光標識した。

[0090] 5．EffectorとStimulatorを1：1（1×10^5 each）で混合し、６日間共培養を行った。培養３日目にＩＬ－２（１２．５Ｕ／ｍｌ）、ＩＬ－７（５ｎｇ／ｍｌ）、ＩＬ－２１（１０ｎｇ／ｍｌ）、抗ＣＤ２８抗体（２ｎｇ／ｍｌ）を培地に加えた。

[0091] 6．共培養開始６日後にフローサイトメトリーにより細胞分裂の評価を行った。結果を図３に示す。図３の上がエフェクターとしてドナーＡ由来のＴ細胞を用いた場合、下がエフェクターとしてドナーＢ由来のＴ細胞を用いた場合の結果を示す。

[0092] ７．図４に特異的なＭＬＲにより増殖した割合を示す。ハプロタイプホモ接合型ｉＰＳ細胞より誘導したＣＤ８陽性Ｔ細胞は、ハプロタイプの片方の一致するドナーＡのＴ細胞とＭＬＲ反応を起こさなかった。一方、ハプロタイプの全く一致しないドナーＢのＴ細胞とはＭＬＲ反応を起こした。

[0093] 以上の結果からハプロタイプホモ接合型ｉＰＳ細胞より誘導したＣＤ８陽性Ｔ細胞は、ハプロタイプの片方が一致するヘテロ接合型のＴ細胞を活性化

させない。よって、ハプロタイプホモ接合型ｉＰＳ細胞から再生される抗原特異的ＣＴＬ細胞をハプロタイプの片方が一致するヘテロ接合型のＨＬＡを有する対象へ投与する場合に、宿主対移植片拒絶反応が生じず有効な治療を行うことができる。

実施例 3

[0094] 実施例１のＨＬＡハプロタイプホモ接合型Ｔ－ｉＰＳ細胞を常法によりＣＤ８陽性Ｔ細胞へ分化誘導した。Ｔ－ｉＰＳ細胞とハプロタイプの片方が一致するヘテロ接合型のＨＬＡを有する対象の末梢血から誘導されるＮＫ細胞が、この再生ＣＴＬ細胞により活性化されるかどうかを調べた。

[0095] １．実施例１で得たＨＬＡハプロタイプホモ接合型Ｔ－ｉＰＳ細胞から分化誘導したＣＤ８陽性Ｔ細胞をstimulatorとして用いた。

[0096] ２．ＨＬＡハプロタイプの片方が一致するヘテロ接合型ＨＬＡを有するドナーＡ由来の細胞より常法によりｉＰＳ細胞を誘導し、常法によりこれをＣＤ８陽性Ｔ細胞へ分化誘導した細胞を得た。かかるＣＤ８陽性Ｔ細胞もまた、stimulatorとして用いた。

[0097] ３．ドナーＡより、末梢血を採取し、フィコールにより末梢血単核球を単離した。末梢血単核球よりＣＤ３，ＣＤ４，ＣＤ８，ＣＤ１４，ＣＤ１９マイクロビーズを用いてネガティブセレクションを行い、ＮＫ細胞を濃縮した。このＮＫ細胞をEffectorとして使用した。

[0098] 4. Stimulatorである再生ＣＤ８陽性Ｔ細胞とEffectorであるＮＫ細胞を1：1（1×10^5 each）で混合し、６時間培養を行った。培養中にはＩＬ－２（1000 U/ml)、抗ＣＤ１０７ａ抗体を加えた。

[0099] 5. 共培養開始６時間後にフローサイトメトリーによりＮＫ細胞活性化の評価を行った。図５に結果を示す。

[0100] 6. ドナーＡ由来ＣＤ８陽性Ｔ細胞より樹立したｉＰＳ細胞から再生したＣＤ８陽性Ｔ細胞は、ドナーＡのＮＫ細胞を活性化させなかった。一方、ハプロタイプホモ接合型ｉＰＳ細胞より誘導したＣＤ８陽性Ｔ細胞は、ハプロタイプの片方のみが一致するドナーＡのＮＫ細胞を活性化させた。

[0101] 7. 以上の結果から以下のように結論づけた。

ハプロタイプホモ接合型ｉＰＳ細胞より誘導したＣＤ８陽性Ｔ細胞は、ハプロタイプの片方が一致するヘテロ接合型のＮＫ細胞による拒絶反応を惹起させる。よって、ハプロタイプホモ接合型ｉＰＳ細胞より再生した成熟Ｔ細胞（ＣＴＬ細胞）は、ハプロタイプの片方が一致するヘテロ接合型対象へ投与した場合に、ＮＫ細胞の働きによって徐々に排除され、投与した細胞ががん化する等の恐れが格段に少なく、安全に使用することが可能である。

[0102] 実施例２よりＨＬＡハプロタイプホモからヘテロへの再生細胞を移植した場合移植細胞に対してレシピエントのT細胞が反応しないことがわかる。ＨＬＡホモドナーから、一方のＨＬＡのみが同一であるＨＬＡヘテロレシピエントへ移植（他家移植）の移植は、再生細胞がリンパ球である場合、他の有核体細胞の再生医療の場合とことなり、利点が生じる。実施例３からは、ＨＬＡホモドナーからＨＬＡヘテロレシピエントへの移植では、NK細胞がドナー細胞を拒絶するという仕組みが働くことが示される。これにより、移植されたリンパ球はやがては拒絶されるので、移植しリンパ球ががん化するという危険性を回避することができる。

実施例 4

[0103] ＥＢウイルス感染患者より得た末梢血単核球由来のＬＭＰ２抗原に特異性を有するＴ細胞よりＴ－ｉＰＳ細胞を誘導し、当該Ｔ－ｉＰＳ細胞よりＬＭＰ２抗原特異的ＣＴＬを誘導した。

[0104] ＥＢウイルスは急性期には伝染性単核球症の原因となり、また時にバーキットリンパ腫などのがんの原因ともなるウイルスである。実施例でＴ細胞を提供しているのは、ＥＢウイルスに感染歴のある健常人である。このウイルスは、感染後リンパ球内に生涯にわたってとどまるので、この提供者はいわゆるＥＢウイルスキャリアーである。従ってこの提供者は、発症はしてないが、慢性ウイルス感染者とみなすことができる。

[0105] 1）LMP2抗原特異的細胞傷害性Tリンパ球（CTL）の増幅

i)以下の培地を用いた。

樹状細胞用培地: CellGro (CellGenix)

[表4]

T細胞用培地

	配合量	培地中の最終濃度
RPMI	45ml	
human AB serum	5ml	10%
Total	50ml	

ii) 以下のLMP2ペプチドを用いた。

LMP2: IYVLVMLVL(配列番号１)

LMP2テトラマーはMBLより購入した。

iii)以下のLCL(Lymphoblastoid cell line)を用いた。

京都大学病院血液腫瘍内科（日本国京都府京都市）にて健常人ボランティアから採取されたHLA-A2402を有するLCLを用いた。

[0106] A.ヒト末梢血より単球由来樹状細胞の誘導

1. HLA-A2402を有しかつEBウイルス既感染者でもある健常人ボランティアの末梢血よりCD14 microbeadsを用いて単球を単離した。洗浄後、樹状細胞用培地を加え、5 x 10^5/mLに調整した。

2. 最終濃度GM-CSF 800 U/mL (or 50 ng/mL)、IL-4 200 U/mL (or 40 ng/mL)になるようサイトカインを加えた。6-well plateに5 mL/wellでまく。37℃、5% CO_2でインキュベートした。

3. インキュベートを3日間（以下”Day 3”様に記載する）した後に、培養上清を2.5 mL/wellずつ、静かに取って捨てた。新しい樹状細胞用培地にGM-CSFを800 U/mL、IL-4を200 U/mLの濃度になるように加えた。

4. 各wellに3 mLずつ、新しい樹状細胞用培地を加えた。

5. Day 6に未成熟MoDCをプレートから回収し、少量の新しい樹状細胞用培地に浮遊させた。

6. 5 X 10^5/mLになるように細胞濃度を調整した。

7. GM-CSF (以下、最終濃度: 800 U/mL)、IL-4 (200 U/mL)、TNF-α (10 ng/mL)、PGE2 (1 μg/mL)を加え、24穴プレートに約5 X 10^5/1 mL/well

で細胞を播種した。

8. 37℃、5% CO2で24時間培養した。

9. 上記培養の最後の2時間にペプチドを加えた。ペプチドの最終濃度は10μMとした。

DCを回収し、Ｔ細胞用培地で2回洗浄した。

10. DCの細胞数を数え、Ｔ細胞用培地で2 X 10^5/mLに調製した。

[0107] B. ヒト末梢血よりＴ細胞の単離と樹状細胞との共培養

1. Aと同一の健常人ボランティアの末梢血より、CD3 microbeadsを用いてMACSにてＴ細胞を単離した。洗浄後、Ｔ細胞用培地を加え、2 x 10^6/mLに調整した。この時一部の細胞をフローサイトメトリー解析のために取り分けた。

2. 24穴プレートに、DC浮遊液（2 X 10^5/mL）を0.5mL/well、Ｔ細胞浮遊液（2 X 10^5/mL）を0.5mL/wellとなるように加えた。（DC: T = 1 X 10^5/well: 1 X 10^6/well = 1:10)

3. 3日目にIL-7（最終濃度5 ng/mL）、IL-15（最終濃度 10 ng/mL）を加えた。

4. 14日目に細胞を回収した。

[0108] C. LCLへのペプチド添加

1. LCLを培養中から回収し、35Gyの放射線照射を行った。

2. Ｔ細胞用培地に浮遊させ、5 X 10^5/mLとなるように調整した。

3. ペプチドを100nMで添加し2時間培養した。

4. LCLを回収し、Ｔ細胞用培地で洗浄後、2 X 10^5/mLとなるように調整した。

[0109] D. LCLと樹状細胞で刺激したＴ細胞の共培養

1. 樹状細胞で刺激したＴ細胞をＴ細胞用培地に浮遊させ、2X10^6 cells/mLの濃度に懸濁した。

2. 24穴プレートに、ペプチドを加えて培養したLCL浮遊液（2X10^5/mL）を0.5mL/well、Ｔ細胞浮遊液（2 X 10^5/mL）を0.5mL/wellとなるように加えた（LCL: T = 1 X 10^5/well: 1 X 10^6/well = 1:10）。同時にペプチドを100nMとなるように添加した。

3. 3日目にIL-7（最終濃度5 ng/mL）、IL-15（最終濃度 1 ng/mL）を加えた。1週間ごとにサイトカインを添加したＴ細胞用培地で培地交換しながら2週間培養を行った。(LCLによるペプチド刺激1クール目)

4. 再度100nMのペプチドと加えた培地でLCLを2時間培養し、ここに CTLを加えた。

5. 3日目にIL-7（最終濃度5 ng/mL）とIL-15（最終濃度 1 ng/mL）を加えた。1週間ごとにサイトカインを添加したＴ細胞用培地で培地交換しながら2週間培養を行った。(LCLによるペプチド刺激2クール目)

6. フローサイトメトリー解析により、CD8陽性Ｔ細胞中にCD8陽性LMP-2テトラマー陽性細胞が80%以上の割合で検出されることを確認した。結果を図６に示す。

[0110] E. LMP2特異的CTLの抗原特異的キラー活性の測定

1. 標的細胞として用いるOUN-1白血病細胞株をCFSEラベルし、Ｔ細胞用培地に懸濁後、LMP2ペプチド1nM存在下で2時間培養を行った。

2. 96穴U底プレートに、ペプチド刺激によって増殖したLMP2特異的キラーＴ細胞とOUN-1白血病細胞株をそれぞれ0:1、1:9、 1:3、 1：1、 3：1となるように混合し、ペプチド存在下もしくは非存在下において標的細胞の死細胞比率をCFSE陽性分画中に見られるAnnexinVとPI(Propidium Iodide)の比率によって検定した。結果を図７に示す。

3. LMP2特異的キラーＴ細胞は標的細胞に対し、抗原特異的キラー活性を示すことを確認した。

[0111] 2) LMP2-T-iPS細胞の樹立

A. LMP2特異的CTLの活性化

1. MACS beadsによりCD8陽性細胞を濃縮した。

2. 全ての細胞をＴ細胞用培地に浮遊させ、IL-7（最終濃度5 ng/mL）、IL-15（最終濃度 10 ng/mL）を加えた。さらにDynabeads Human T-Activator CD3/CD28をＴ細胞：beadsが1：1となるように添加し、2日間培養することでCD8陽性細胞を活性化した。

[0112] B. センダイウィルスによる山中4因子とSV40の導入

1. 活性化させたLMP2特異的CTLをＴ細胞用培地に浮遊させ、山中4因子とSV40が組み込まれたセンダイウィルスを培地中に添加し、そのまま2日間培養した。

2. Ｔ細胞用培地で洗浄し、さらにIL-7（最終濃度5 ng/mL）、IL-15（最終濃度 1ng/mL）を加えたＴ細胞用培地で2日間培養した。

3. 全ての細胞を回収後、IL-7（最終濃度5 ng/mL）、IL-15（最終濃度 1ng/mL）を添加したＴ細胞用培地でＴ細胞を懸濁し、フィーダー細胞上に播種した。

4. 2日目にiPS細胞用培地にて半量交換し、翌日から毎日iPS細胞用培地への半量交換を行い続け、培養を続けた。

[0113] C. iPS細胞コロニーのピックアップ

1. 培養3週間後にiPS細胞コロニーを目視により確認した。

2. 200ulチップによりコロニーを物理的に拾い上げた。

3. 各クローンを個別にｉＰＳ細胞として樹立した。得られたクローンの写真を図８に示す。

[0114] 3) LMP2-iPS細胞からＴ細胞への分化誘導

各培地として下記の組成を用いた。

[表5]

medium A (OP9ストローマ細胞維持用)		最終濃度
αＭＥＭ	500mL	
ＦＣＳ	125mL	（２０%）
ペニシリン／ストレプトマイシン溶液	6.25mL	（１%）
Total	631.25mL	

*ペニシリン/ストレプトマイシン溶液は、ペニシリン10000U/mLおよびストレプトマイシン10000μg/mLからなり、それぞれの最終濃度を100U/mLおよび100μg/mLとした。

[0115]

[表6]

medium B（T細胞分化誘導用）		（最終濃度）
αMEM	500mL	
FCS	125mL	(20%)
ペニシリン/ストレプトマイシン溶液	5mL	(1%)
hrIL-7 (stock: 10μg/ml)	315μL	(5ng/mL)
hrFlt-3L (stock: 10μg/ml)	315μL	(5ng/mL)
hrSCF (stock: 10μg/ml)	630μL	(10ng/mL)
Total	631.26mL	

*ペニシリン/ストレプトマイシン溶液は、ペニシリン10000U/mLおよびストレプトマイシン10000μg/mLからなり、それぞれの最終濃度を100U/mLおよび 100μg/mLとした。

[0116] [表7]

medium C (未熟T細胞から成熟T細胞誘導用)		（最終濃度）
αMEM	500mL	
FCS	125mL	(20%)
ペニシリン/ストレプトマイシン溶液	5mL	(1%)
hrIL-7 (stock: 10μg/ml)	315μL	(5ng/mL)
Total	630.315mL	

*ペニシリン/ストレプトマイシン溶液は、ペニシリン10000U/mLおよびストレプトマイシン10000μg/mLからなり、それぞれの最終濃度を100U/mLおよび0μg/mLとした。

[0117] OP9細胞の準備

0.1% ゼラチン/PBS溶液6mlを10cm培養ディッシュに入れ、37℃で30分以上静置した。コンフルエントになったOP9細胞をトリプシン/EDTA溶液で剥がし、1/4相当量をゼラチンコートした10cm培養ディッシュに播種した。培地はmedium Aを10mlとなるように加えた。

4日後に播種したOP9細胞培養ディッシュに新たにmedium Aを10ml加え、全量が20mlとなるようにした。

[0118] iPS細胞からの血球前駆細胞誘導

共培養に使用するOP9細胞の培地を吸引し、新しいmedium Aに交換した。ま

たiPS細胞培養ディッシュの培地も同様に吸引し、新しいmedium Aを10ml加えた。EZ-passageローラーでiPS細胞塊を切った。カットしたiPS細胞塊を200ulピペットマンでピペッティングすることで浮遊させ、目視でおおよそ600個のiPS細胞塊をOP9細胞上に播種した。

iPS細胞1クローンあたり3枚以上のディッシュを用い、継代するときには細胞を一度一つに合わせてから同じ枚数に再分配することでディッシュ間のばらつきを減らした。

[0119] Day 1（培地交換）

iPS細胞塊が接着し分化し始めているかどうかを確認し、培地を新しいmedium A 20mlに交換した。

Day 5 （培地半量交換）

半量分の培地を新しいmedium A 10mlに交換した。

Day 9 （培地交換）

半量分の培地を新しいmedium A 10mlに交換した。

Day 13（誘導した中胚葉細胞をOP9細胞上からOP9/DLL1細胞上へ移しかえる）

培地を吸引し、HBSS(+Mg+Ca)で細胞表面上の培地を洗い流した。その後250U collagenase IV/HBSS(+Mg+Ca) 溶液10mlを加え、37℃で45分間培養した。

[0120] Collagenase溶液を吸引し、PBS(-)10mlで洗い流した。その後5mlの0.05%トリプシン/EDTA溶液を加え、37℃で20分培養した。培養後、細胞が膜状に剥がれてくるのでピペッティングにより物理的に細かくした(接着細胞同士を離すため)。ここに新しいmedium Aを20ml加え、さらに37℃で45分間培養した。培養後、浮遊細胞を含む上清を、100μmのメッシュを通して回収した。4℃、1200rpmで7分間遠心し、ペレットを10mlのmedium Bに懸濁させた。このうち1/10をFACS解析用にとりわけ、残りの細胞を新たに用意したOP9/DLL1細胞上に播種した。複数枚のディッシュから得た細胞をプールした場合、元々の枚数と同じ枚数になるように再分配して細胞を播き直した。

[0121] 得られた細胞に造血前駆細胞が含まれているかどうかを確かめるために抗CD34抗体、抗CD43抗体を用いてFACS解析した。結果を図９に示す。$CD34^{low}CD43^{+}$

細胞分画に十分な細胞数が確認できたことから、造血前駆細胞が誘導されていると確認した。

[0122] C. 血球前駆細胞からのＴ細胞分化誘導

次いで細胞をOP9/DLL1細胞上に播種した。この工程において、$CD34^{low}CD43^{+}$細胞分画の細胞のソーティングは行わなかった。（この分画をソーティングした場合、得られる細胞数が減少してしまうことやソーティングによる細胞へのダメージから、ソーティングしなかった場合に比べてＴ細胞への分化誘導効率が落ちることがある。）

[0123] 培養期間中に分化段階を確認するためにFACS解析を行うが、全ての期間において培養中に死細胞が多くみられた。そのためFACS解析時にはPI (Propidium Iodide)、7-AADなどを用い、死細胞除去したうえで解析を行った。

[0124] Day 16（細胞の継代）

OP9細胞に緩く接着している細胞を、穏やかに複数回ピペッティングし、100μｍのメッシュを通して50mlコニカルチューブに回収した。4℃、1200rpmで7分間遠心し、ペレットを10mlのmedium Bに懸濁させた。これらの細胞を新たに用意したOP9/DLL1細胞上に播種した。

[0125] Day 23（細胞の継代）: 血液細胞コロニーが見え始める。

OP9細胞に緩く接着している細胞を、穏やかに複数回ピペッティングし、100μｍのメッシュを通して50mlコニカルチューブに回収した。4℃、1200rpmで7分間遠心し、ペレットを10mlのmedium Bに懸濁させた。

[0126] Day 36: LMP2テトラマー陽性Ｔ細胞の確認。

ＬＭＰ２特異的Ｔ細胞が誘導されているかどうかを確かめるために抗ＣＤ３抗体、ＬＭＰ２テトラマーを用いてＦＡＣＳ解析した。

結果を図１０に示す。Ｔ細胞マーカーである$CD3^{+}$細胞がみられるようになり、一部の細胞は$CD3^{+}$ＬＭＰ２テトラマー$^{+}$にまで分化していることが確認された。

[0127] D. 未熟Ｔ細胞段階から成熟キラーＴ細胞段階への誘導

Day36において、フローサイトメトリーでLMP2陽性Ｔ細胞を確認後、成熟キラ

ーＴ細胞(CD8SP細胞)を誘導するためにここでIL-15を添加した。24穴プレートに新たにOP9/DLL1細胞を用意しておき、medium Cに懸濁したＴ細胞を3x10^{5}個/wellとなるように播種し。ここにIL-15（最終濃度10ng/mL）を添加した。

[0128] Day41: 成熟キラーＴ細胞が現れる。

ＩＬ－１５添加の５日目に、ＦＡＣＳ解析した。結果を図１１に示す。成熟ＣＤ８シングルポジティブ細胞が生成したことが確認された。

[0129] 4) 再生したLMP2特異的CTLの抗原特異的キラー活性の測定

1. 標的細胞として用いるLCLをCFSEラベルし、Ｔ細胞用培地に懸濁後、LMP2ペプチド1nM存在下で2時間培養を行った。

2. 96穴U底プレートに、再生したCD8Ｔ細胞と標的細胞として用いるLCLをれぞれ0:1、1:9、 1:3、 1：1、 3：1、10:1、30：1となるように混合し、ペプチド存在下（p+）もしくは非存在下（p-）において標的細胞の死細胞比率をCFSE陽性分画中に見られるAnnexinVとPI(Propidium Iodide)によって検定した。

3. 結果を図１２に示す。LMP2特異的キラーＴ細胞は標的細胞として用いたLCL(HLA-A2402)に対し、抗原特異的キラー活性を示すことが確認された。

[0130] 5) 再生したLMP2特異的CTLのナチュラルキラー細胞様キラー活性の測定

1. 標的細胞としてHLAを表面に発現しないK562細胞株（アロ反応性）と自己末梢単核球（MA p-）（オート反応性）を用いた。これらの細胞をCFSEにてラベルし、Ｔ細胞用培地に懸濁した。

2. 96穴U底プレートに、再生したCD8Ｔ細胞と標的細胞として用いるLCLをれぞれ0:1、1:9、 1:3、 1：1、 3：1となるように混合し、標的細胞の死細胞比率をCFSE陽性分画中に見られるAnnexinVとPI(Propidium Iodide)によって検定した。

3. 結果を図１３に示す。LMP2特異的キラーＴ細胞は自己末梢単核球（MA p-）は傷害しなかったが、K562に対して高いキラー活性を示したことから、ナチュラルキラー様キラー活性を示すことを確認した。

実施例 5

[0131] 健常人ドナーの末梢血より誘導したWT１抗原特異的細胞傷害性Ｔ細胞（CTL）からＴ－ｉＰＳ細胞を誘導し、当該Ｔ－ｉＰＳ細胞よりＷＴ１抗原特異的成熟Ｔ細胞を誘導した。

[0132] 実施例は、以下の構成である。

1）WT1抗原特異的CTLの増幅

2） WT1-T-iPS細胞の樹立

3） WT1-T-iPS細胞からＴ細胞への分化誘導

[0133] 1）WT1抗原特異的CTLの増幅

i)用いた培地は以下の通りである。

[表8]

Ｔ細胞用培地

	配合量	培地中の最終濃度
RPMI	45ml	
human AB serum	5ml	10%
Total	50ml	

ii）用いたWT1ペプチドは以下の通りである。

WT1（改変型：CYTWNQMNL(配列番号２)，Cancer Immunol. Immunothera. 51: 614 (2002)）

以下で使用しているWT1ペプチド，WT1テトラマーともに改変型を用いた。

iii）用いたLCL(Lymphoblastoid cell line)は以下のとおりである

京都大学病院血液腫瘍内科（日本国京都府京都市）にて健常人ボランティアから採取されたHLA-A2402を有するLCLを用いた。

[0134] A.ヒト末梢血からのＴ細胞の単離とペプチドによる刺激

1.健常人ボランティアの末梢血より単核球をFicollによって精製し，Ｔ細胞培地で懸濁した。

2. 96穴U底プレートに1穴あたり2.5 x 10^5/mLとなるように細胞を播種し，ペプチドを10μｍ となるように添加した。

3.3日目にIL-2(最終濃度　12.5U/mL)，IL-7（最終濃度5 ng/mL），IL-15（最終濃度 1 ng/mL）を加え，1週間ごとにサイトカインを添加したＴ細胞用培地

で培地交換しながら2週間培養を行った。

[0135] B. LCLへのペプチド添加

1.LCLを回収し，35Gyの放射線照射を行った。

2. Ｔ細胞用培地に浮遊させ，5 X 10^5/mLとなるように調整した。

3. ペプチドを100 nMで添加し2時間培養した。

4. LCLを回収し，Ｔ細胞用培地で洗浄後，2 X 10^5/mLとなるように調整した。

[0136] C.ペプチドをパルスしたLCLとＴ細胞との共培養

1.ペプチド刺激を加えた後，2週間培養したＴ細胞を回収し，洗浄後にＴ細胞用培地に懸濁し，2 x 10^6/mLに調整した。この時一部の細胞をフローサイトメトリー解析のために取り分けた。

2.24穴プレートに，ペプチドを加えて培養したLCLの浮遊液（2 X 10^5/mL）を0.5mL/well，Ｔ細胞浮遊液（2 X 10^5/mL）を0.5mL/wellとなるように加えた（LCL: T = 1 X 10^5/well: 1 X 10^6/well = 1:10）。

3. 3日目にIL-2(最終濃度 12.5U/mL)，IL-7（最終濃度5 ng/mL），IL-15（最終濃度 1 ng/mL）を加えた。1週間ごとにサイトカインを添加したＴ細胞用培地で培地交換しながら2週間培養を行った。(LCLによるペプチド刺激1クール目)

4. 再度100nMのペプチドと加えた培地でLCLを2時間培養し，ここに CTLを加えた。

5. 3日目にIL-2(最終濃度 12.5U/mL)，IL-7（最終濃度5 ng/mL），IL-15（最終濃度 1 ng/mL）を加えた。1週間ごとにサイトカインを添加したＴ細胞用培地で培地交換しながら2週間培養を行った。(LCLによるペプチド刺激2クール目)

6. 再度100nMのペプチドと加えた培地でLCLを2時間培養し，ここに CTLを加えた。

7. 3日目にIL-2(最終濃度 12.5U/mL)，IL-7（最終濃度5 ng/mL），IL-15（最終濃度 1 ng/mL）を加えた。1週間ごとにサイトカインを添加したＴ細胞用培地で培地交換しながら2週間培養を行った。(LCLによるペプチド刺激3クー

ル目）

8. フローサイトメトリー解析を行った。結果を図１４に示す。CD8陽性WT1テトラマー陽性分画がCD8陽性Ｔ細胞中に60%以上の割合で検出されることを確認した。

[0137] 2) WT1-T-iPS細胞の樹立

A. WT1特異的CTLの活性化

1. MACS beadsによりCD8陽性細胞を濃縮した。

2. 全ての細胞をＴ細胞用培地に浮遊させ，IL-2（最終濃度 12.5U/mL），IL-7（最終濃度5 ng/mL），IL-15（最終濃度 1ng/mL）を加えた。さらにDynabeads Human T-Activator CD3/CD28をＴ細胞：beadsが1：1となるように添加し，2日間培養することでCD8陽性細胞を活性化した。

[0138] B. センダイウィルスによる山中4因子とSV40の導入

1.活性化させたWT1特異的CTLをＴ細胞用培地に浮遊させ，山中4因子とSV40が組み込まれたセンダイウィルスを培地中に添加し，そのまま2日間培養した。

2.Ｔ細胞用培地で洗浄し，さらにIL-2（最終濃度 12.5U/mL），IL-7（最終濃度5 ng/mL），IL-15（最終濃度 1ng/mL）を加えたＴ細胞用培地で2日間培養した。

3. 全ての細胞を回収後，サイトカインを含まないＴ細胞用培地でＴ細胞を懸濁し，フィーダー細胞上に播種した。

4. 2日目にiPS細胞用培地に半量交換し，翌日から毎日iPS細胞用培地への半量交換を行い続け，培養を続けた。

[0139] C. iPS細胞コロニーのピックアップ

1.3週間後にiPS細胞コロニーを目視により確認した。

2. 200ulチップによりコロニーを物理的に拾い上げた。

3. 各クローンを個別に樹立した。得られたクローンのコロニーを図１５に示す。

[0140] 3) WT1-T-iPS細胞からＴ細胞への分化誘導

各培地の組成を下記に示す。

[表9]

medium A (OP9ストローマ細胞維持用)		最終濃度
αMEM	500mL	
FCS	125mL	(20%)
ペニシリン/ストレプトマイシン溶液	6.25mL	(1%)
Total	631.25mL	

*ペニシリン/ストレプトマイシン溶液は、ペニシリン10000U/mLおよびストレプトマイシン10000μg/mLからなり、それぞれの最終濃度を100U/mLおよび100μg/mLとした。

[0141] [表10]

medium B (T細胞分化誘導用)		(最終濃度)
αMEM	500mL	
FCS	125mL	(20%)
ペニシリン/ストレプトマイシン溶液	5mL	(1%)
hrIL-7 (stock: 10μg/ml)	315μL	(5ng/mL)
hrFlt-3L (stock: 10μg/ml)	315μL	(5ng/mL)
hrSCF (stock: 10μg/ml)	630μL	(10ng/mL)
Total	631.26mL	

*ペニシリン/ストレプトマイシン溶液は、ペニシリン10000U/mLおよびストレプトマイシン10000μg/mLからなり、それぞれの最終濃度を100U/mLおよび 100μg/mLとした。

[0142] OP9細胞の準備

0.1% ゼラチン/PBS溶液6mlを10cm培養ディッシュに入れ，37℃で30分以上静置した。コンフルエントになったOP9細胞をトリプシン/EDTA溶液で剥がし，1/4相当量をゼラチンコートした10cm培養ディッシュに播種した。培地はmedium Aを10mlとなるように加えた。

4日後に播種したOP9細胞培養ディッシュに新たにmedium Aを10ml加え，全量が20mlとなるようにした。

[0143] iPS細胞からの血球前駆細胞誘導

共培養に使用するOP9細胞の培地を吸引し，新しいmedium Aに交換した。またiPS細胞培養ディッシュの培地も同様に吸引し，新しいmedium Aを10ml加えた

。EZ-passageローラーでiPS細胞を切った。カットしたiPS細胞塊を200ulピペットマンでピペッティングすることで浮遊させ，目視でおおよそ600個のiPS細胞塊をOP9細胞上に播種した。

iPS細胞1クローンあたり3枚以上のディッシュを用い，継代するときには細胞を一度一つに合わせてから同じ枚数に再分配することでディッシュ間のばらつきを減らした。

Day 1（培地交換）

iPS細胞塊が接着し分化し始めているかどうかを確認し，培地を新しいmedium A 20mlに交換した。

Day 5 （培地半量交換）

半量分の培地を新しいmedium A 10mlに交換した。

Day 9 （培地交換）

半量分の培地を新しいmedium A 10mlに交換した。

Day 13（誘導した中胚葉細胞をOP9細胞上からOP9/DLL1細胞上へ移しかえる）

培地を吸引し，HBSS(+Mg+Ca)で細胞表面上の培地を洗い流した。その後250U collagenase IV/HBSS(+Mg+Ca) 溶液10mlを加え，37℃で45分間培養した。Collagenase溶液を吸引し，PBS(-)10mlで洗い流す。その後5mlの0.05%トリプシン/EDTA溶液を加え，37℃で20分培養した。培養後，細胞が膜状に剥がれてくるので、ピペッティングにより物理的に細かくした(接着細胞同士を離すため)。ここに新しいmedium Aを20ml加え，さらに37℃で45分間培養した。培養後，浮遊細胞を含む上清を，100μmのメッシュを通して回収した。4℃，1200rpmで7分間遠心し，ペレットを10mlのmedium Bに懸濁させた。このうち1/10をFACS解析用にとりわけ，残りの細胞を新たに用意したOP9/DLL1細胞上に播種した。複数枚のディッシュから得た細胞をプールした場合，元々の枚数と同じ枚数になるように再分配して細胞を播き直した。

[0144] 得られた細胞に造血前駆細胞が含まれているかどうかを確かめるために抗CD34抗体，抗CD43抗体を用いてFACS解析した。結果を図１６に示す。ＣＤ３４^{low}ＣＤ４３$^{+}$細胞分画に十分な細胞数が確認できたことから，造血前駆細胞

が誘導されていると確認した。

[0145] C. 血球前駆細胞からのＴ細胞分化誘導

次いで細胞をOP9/DLL1細胞上に播種した。この工程において，ＣＤ３４^{low}ＣＤ４３$^{+}$細胞分画の細胞のソーティングは行わなかった。この分画をソーティングした場合，得られる細胞数が減少してしまうことやソーティングによる細胞へのダメージから，ソーティングしなかった場合に比べてＴ細胞への分化誘導効率が落ちることがある。

Day 16（細胞の継代）

OP9細胞に緩く接着している細胞を，穏やかに複数回ピペッティングし，100μｍのメッシュを通して50mlコニカルチューブに回収した。4℃，1200rpmで7分間遠心し，ペレットを10mlのmedium Bに懸濁させた。これらの細胞を新たに用意したOP9/DLL1細胞上に播種した。

Day 23（細胞の継代)：血液細胞コロニーが見え始める。

OP9細胞に緩く接着している細胞を，穏やかに複数回ピペッティングし，100μｍのメッシュを通して50mlコニカルチューブに回収した。4℃，1200rpmで7分間遠心し，ペレットを10mlのmedium Bに懸濁させた。

Day 36 ：WT1テトラマー陽性Ｔ細胞の確認。

WT1特異的Ｔ細胞が誘導されているかどうかを確かめるために抗CD3抗体，WT1テトラマーを用いてFACS解析した。結果を図１７に示す。

Ｔ細胞マーカーであるＣＤ３$^{+}$細胞がみられるようになり，大部分の細胞はＣＤ３$^{+}$ＷＴ１テトラマー$^{+}$にまで分化していることが確認された。

[0146] 上記のとおり、誘導されたＴ細胞が、元のＴ細胞と同じ抗原特異性を示すＴ細胞となることが確認された。また、得られたＴ細胞は成熟した細胞が出す表面抗原を発現していることから、機能的によく成熟していることが確認された。

実施例 6

[0147] ＷＴ１抗原特異的ＴＣＲを導入したＨＬＡホモドナー単核球由来ｉＰＳ細胞の作製

[0148] 京都大学ｉＰＳ細胞研究所で樹立された、ＨＬＡハプロタイプ一致ドナー単核球由来のｉＰＳ細胞株を用いた。

ＨＬＡ－Ａ２４０２拘束性を有するＷＴ１のＴＣＲは、愛媛大学血液内科にて樹立されたＷＴ１特異的ＣＴＬ株である、ＴＡＫ１株よりＴＣＲ遺伝子をクローニングを行う事で得た。ＷＴ１－ＴＣＲ遺伝子は、Ｖα２０／Ｊ３３／Ｃα、Ｖβ５．１／Ｊ２．１／Ｃβ２で成り立っており、ＧａｔｅｗａｙシステムのＥｎｔｒｙベクターにに ＴＣＲβ（Ｖβ５．１／Ｊ２．１／Ｃβ２）－ｐ２Ａ－ＴＣＲα（Ｖα２０／Ｊ３３／Ｃα）の順でつなぎ、プラスミド構築を行った。

[0149] １）ＷＴ１－ＴＣＲを組み込んだレンチウィルスベクターの作製

理化学研究所、三好浩之博士より提供されたＣＳ－ＵｂＣ－ＲｆＡ－ＩＲＥＳ２－ｈＫＯ１ベクターを用い，ＷＴ１ＴＣＲを組み込んだＧａｔｅｗａｙ Ｅｎｔｒｙ ベクターとＬＲ クロナーゼ（Ｌｉｆｅ ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）反応を行う事でＷＴ１－ＴＣＲを導入したＣＳ－ＵｂＣ－ＲｆＡ－ＩＲＥＳ２－ｈＫＯ１／ＷＴ１－ＴＣＲプラスミドを作製した。

２）ＷＴ１－ＴＣＲを組み込んだレンチウィルス上清の作製

ＣＳ－ＵｂＣ－ＲｆＡ－ＩＲＥＳ２－ｈＫＯ１／ＷＴ１－ＴＣＲをパッケージング細胞ＬｅｎｔｉＸ－２９３Ｔに導入し、レンチウィルスを含む培養上清を回収。超遠心を行い、ウィルスの濃縮を行った。

３）ＷＴ１－ＴＣＲ ｔｒａｎｓｄｕｃｅｄ－ＨＬＡホモ単核球由来ｉＰＳ細胞の樹立

ｉＭａｔｒｉｘ（ニッピ）上で培養したＨＬＡホモ単核球由来ｉＰＳ細胞（ｍｏｎｏ－ｉＰＳ）に、ＣＳ－ＵｂＣ－ＲｆＡ－ＩＲＥＳ２－ｈＫＯ１／ＷＴ１－ＴＣＲウィルス液を感染させた。ＷＴ１－ＴＣＲが導入されたｉＰＳ細胞（ＷＴ１－ＴＣＲ／ｍｏｎｏ－ｉＰＳ）を、ベクターに含まれるｈＫＯ１タンパク質の発現を蛍光顕微鏡下に観察する事で確認した。

４）ＷＴ１－ＴＣＲ／ｍｏｎｏ－ｉＰＳ細胞のクローン化

感染４日後に、感染ｉＰＳ細胞をＤｉｓｈより剥がし、染色せずにｈＫＯ

１発現細胞をＦＡＣＳ　Ａｒｉａを使用し、ｓｏｒｔｉｎｇ行った（ＷＴ１－ＴＣＲ／ｍｏｎｏ－ｉＰＳ　ｂａｌｋ）。ｈＫＯ１陽性細胞をｉＭａｔｒｉｘ上に播種し、１週間後増大したコロニーの内、蛍光顕微鏡下にｈＫＯ１が強陽性なコロニーを物理的にピックアップ行い、単一クローン化した（ＷＴ１－ＴＣＲ／ｍｏｎｏ－ｉＰＳ　ｃｌｏｎｅ）。ｈＫＯ１陽性にてｓｏｒｔしたもの、クローン化したもの両群について、WO2013176197 A1に記載の方法に準じてＴ細胞方向への分化を行った。

[0150] 具体的には各ｉＰＳ細胞の小塊（＜１００細胞数以下）を放射線照射済みのＣ３Ｈ１０Ｔ１／２細胞上に移し、２０ｎｇ／ｍＬ　ＶＥＧＦ、５０ｎｇ／ｍＬ　ＳＣＦ及び５０ｎｇ／ｍＬ　ＦＬＴ－３Ｌ存在下（Ｐｅｐｒｏｔｅｃｈ社製）、ＥＢ培地にて共培養した。培養１４日目に、ｉＰＳサックに含まれている造血細胞を回収し、それら細胞を放射線照射済みのＯＰ９－ＤＬ１細胞上に移し、１０ｎｇ／ｍＬ　ＦＬＴ－３Ｌ及び１ｎｇ／ｍＬ　ＩＬ－７存在下、ＯＰ９培地内にて培養した。分化38日目のＦＡＣＳ解析結果を図１８に示す。

[0151] 分化38日目に、mono-iPS　WT1-TCR/mono-iPS balk WT1-TCR/mono-iPS cloneの3群をFACS Ariaにて解析した。単核球由来のiPS細胞は、CD3を発現しなかったのに対し、WT1-TCRを導入したiPS細胞は、CD3を発現し、またCD3発現細胞はほぼ100%、導入したTCR鎖の一部である、Vβ5.1抗体陽性であった。TCRαβ抗体も陽性であり導入したWT1-TCRが機能的な形で細胞表面に発現している事が確認できた。

実施例 7

[0152] Ｔ細胞に山中因子を導入して調製されたＴ細胞由来のｉＰＳ細胞株ＴＫＴ３ｖ１－７は東京大学より供与された。以下ＴＫＴ３ｖと略称する。

１．PAM配列を有するヒトＲＡＧ２遺伝子配列を標的とするｇＤＮＡを設計し、Ｈ３プロモーターを有する発現プラスミドに組み込んだ。ｇＤＮＡは標的配列GGTTATGCTTTACATCCAGATGGに(配列番号３)おいて、片方のアレルは下線部の２塩基を除去し、もう一方のアレルは下線部塩基の５’側に１塩基挿入す

るよう設計した。

２．上記プラスミドをＣａｓ９タンパク質発現プラスミドとともにヒト末梢血Ｔ細胞由来iPS細胞（TKT3V）に遺伝子導入した。

３．遺伝子導入後のｉＰＳ細胞５０株をクローニングした後、Ｔ７Ｅ１アッセイでゲノム上にミスマッチが生じているクローンをスクリーニングした。（図１９）

４．スクリーニング後のクローンに対しＲＡＧ２遺伝子配列のシークエンス解析を行い、両アリルの同遺伝子にミスセンス変異が入っているクローン（ＴＫＴ３Ｖ１－７／ＲＡＧ２ＫＯ）を選択した。

[0153] ５．選択したｉＰＳ細胞クローンについて、染色体解析、テラトーマ形成による多分化能評価を行い、遺伝子改変ｉＰＳ細胞として異常が無いことを確認した。

[0154] ６．ＴＫＴ３Ｖ株、ＴＫＴ３Ｖ／ＲＡＧ２ＫＯ株をWO2013176197 A1に記載の方法に準じてＴ細胞へと分化させた。具体的にはＴ－ｉＰＳ細胞の小塊（＜１００細胞数以下）を放射線照射済みのＣ３Ｈ１０Ｔ１／２細胞上に移し、２０ｎｇ／ｍＬ　ＶＥＧＦ、５０ｎｇ／ｍＬ　ＳＣＦ及び５０ｎｇ／ｍＬ　ＦＬＴ－３Ｌ存在下（Ｐｅｐｒｏｔｅｃｈ社製）、ＥＢ培地にて共培養した。培養１４日目に、ｉＰＳサックに含まれている造血細胞を回収し、それら細胞を放射線照射済みのＯＰ９－ＤＬ１細胞上に移し、１０ｎｇ／ｍＬ　ＦＬＴ－３Ｌ及び１ｎｇ／ｍＬ　ＩＬ－７存在下、ＯＰ９培地内にて培養した。誘導された細胞のＦＡＣＳ解析結果を図２０に示す。ＣＤ４$^{+}$ＣＤ８＋のＤＰ分画の出現を確認した。

[0155] ７．ＤＰ分画をフローサイトメトリーで採取し、細胞よりｍＲＮＡを抽出した。

８．ＴＣＲα鎖の各Ｖ領域プライマーとＣ領域プライマーをもちいてＲＴ－ＰＣＲを行い、α鎖の再構成を検出した。同様にしてＴＫ３Ｖ株についてもＲＴ－ＰＣＲを行った。ＴＫＴ３Ｖ株（iPS細胞）ではＶａ１４に特異的なＴＣＲα鎖のみを持つことが確認された（図２１）。

[0156] ｉＰＳ細胞であるＴＫＴ３Ｖ細胞からＴ細胞へ分化誘導した場合、ＣＤ４⁻ＣＤ８⁻両陰性（ＤＮ）から両陽性ＤＰ段階へ進んだ細胞ではＲＡＧ２の再活性化が認められた(図２２)。ＤＮ段階とＤＰ段階それぞれのＴ細胞のＴＣＲα鎖再構成を図２３および２４に示す。ＤＮ細胞はｉＰＳ細胞同様にＶａ１４の再構成のみを持っていたが、ＤＰ細胞はＶａ１４以外の再構成が頻出した。これは、活性化したＲＡＧタンパクによりＴＣＲα鎖の再構成が生じたものと考えられる。この非特異的再構成は誘導されたＴ細胞の抗原特異性を失わせる結果となりうる。

[0157] ＲＡＧ２遺伝子をノックアウトしたＴＫＴ３ｖ／Ｒａｇ２ＫＯ株から誘導したＤＰ細胞のＴＣＲα再構成を図２５に示す。ＲＡＧ２ノックアウト株から誘導したＤＰ細胞では、Ｖａ１４以外の再構成は確認されなかった。Ｒａｇ２遺伝子のノックアウトによりＲＡＧ２タンパクが作製されず、ＴＣＲａ鎖の再構成が妨げられたものと考えられる。

[0158] ｉＰＳ細胞の段階でＲＡＧ２遺伝子にミスセンス変異を導入することでＴＣＲα鎖の追加再構成を防ぐ事が可能であり、再分化Ｔ細胞の抗原特異性を保持することができることが確認された。

[0159] ＴＫＴ３Ｖ／ＲＡＧ２ＫＯ株由来のＤＰ細胞を引き続き常法により分化させ、ＣＤ８単独陽性の細胞傷害性Ｔ細胞を得た(図２６)。フローサイトメトリーを用いてＣＤ８単独陽性細胞を回収した後ｍＲＮＡを抽出し、ＲＴ－ＰＣＲによってＴＣＲ再構成の有無を検出した。結果を図２７に示す。遺伝子改変されたｉＰＳ細胞に由来するＣＤ８Ｔ細胞はＶａ１４のみを再構成として有することを確認した。Ｖａ１９レーンに見られるバンドは、図中枠で囲んだＴＣＲａのサイズを外れた非特異的バンドである。

実施例 8

[0160] ヒト単球由来HLAハプロタイプホモ型iPS細胞における、Rag2遺伝子の欠失

[0161] １．ヒト単球由来iPS細胞株を対象とした。使用したｉＰＳ細胞株はHLAハプロタイプ(HLA-A*3303-B*4403-C*1403-DRB1*1302)ホモドナーの末梢血単核球から誘導して得た株である。京都大学ｉＰＳ細胞研究所プロトコルCiRA_FFiP

SC_protocol_JP_vl40310にてフィーダーフリー条件下で維持培養したものを使用した。

[0162] ２．ｉＰＳ細胞のヒトＲａｇ２のｅｘｏｎ１の配列にダブルで切断を入れた。具体的にはｅｘｏｎ１の塩基配列４４０－４４１および６７９－６８０の間をＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ９により切断した。

[0163] ３．使用したターゲットｓｇＲＮＡは下記である：

i)センス鎖　caccGATTAATGTGGTGTACAGCCG　（配列番号４）

アンチセンス鎖　aaacCGGCTGTACACCACATTAATC　（配列番号５）

ii)センス鎖　caccGTTGGCAGGCCGGATATTAT　（配列番号６）

アンチセンス鎖　aaacATAATATCCGGCCTGCCAAC　（配列番号７）

４．addgeneより入手したプラスミドpSpCas9(BB)-2A-Puro (PX459)に上記sgRNAを挿入した。iPS細胞を酵素処理により単個細胞浮遊状態にし、ネッパジーンのNEPA21を用いてエレクトロポレーシスにて導入した。

[0164] ５．　遺伝子導入後、プレートに播種し、ピューロマイシン存在下に培養して、複数のクローンをピックアップした。

[0165] ６.それぞれのクローンからDNAを採取し、PCRで遺伝子の欠失の有無を調べた。PCRに用いたプライマーは下記のとおりである。

For: CCCAAAAGATCCTGCCCCACTGG　（配列番号８）

Rev: AGTCAGGATTGCACTGGAGACAG　（配列番号９）

[0166] ７．　57個のクローンをピックアップした。PCRの結果、下記のように判定した。

i）欠失されなかったクローン　　31個

ii）片アレルで欠失が起こったクローン　14個

iii）両アレルで欠失が起こったクローン　2個

[0167] ８．　元のｉＰＳ細胞（ＷＴ）、両アレルで欠失が起こったｉＰＳ細胞（Ｒａｇ２ＫＯ）のＰＣＲ解析結果を示す（図２８）。短くなったバンドは、両アレルで欠失が起こった事を示している。

９．　以上より、Ｒａｇ２遺伝子を欠損するｉＰＳ細胞クローンを２株樹立

した。

実施例 9

[0168] 抗原特異的ＣＤ８シングルポジティブＴ細胞に山中因子を導入して調製された実施例７とは別のＴ－ｉＰＳ細胞を用いた。Ｔ－ｉＰＳ細胞のＲａｇ２遺伝子を、実施例7と同じ方法によりノックアウトした。Ｒａｇ２ノックアウト無しのＴ－ｉＰＳ細胞（ＷＴ）およびＲａｇ２ノックアウトＴ－ｉＰＳ細胞を実施例７と同様の方法にてＴ細胞へと誘導した。ＯＰ９培地内での培養４１日目（分化開始５５日目）の細胞の解析を行った。結果を図２９および３０に示す。図中ＡｇＤｅｘはＴ－ｉＰＳ細胞が由来するＴ細胞が特異的に結合する抗原のマルチマー(デキストラマー)を示す。

[0169] Ｒａｇ２ノックアウト株では、比較的長期間かけてＴ細胞への分化を誘導した本実施例においてもテトラマー強陽性のＴＣＲを発現する集団が保たれた（ＣＤ８陽性細胞の６０％以上）。一方、ＷＴ株では多くの細胞においてＴＣＲが維持されなかった。

請求の範囲

[請求項1] （１）所望の抗原特異性Ｔ細胞受容体遺伝子を有し、Ｒａｇ１および／またはＲａｇ２遺伝子がノックアウトされたヒト多能性幹細胞を提供する工程、および

（２）工程（１）の多能性幹細胞からＴ細胞を誘導する工程

を含む、免疫細胞療法用Ｔ細胞を誘導する方法。

[請求項2] 工程（１）の多能性幹細胞が、下記工程：

（a）所望の抗原特異性Ｔ細胞受容体遺伝子を有する多能性幹細胞を誘導する工程、および

（ｂ）工程（ａ）で得られた多能性細胞のＲａｇ１および／またはＲａｇ２遺伝子をゲノム編集によりノックアウトする工程

を含む方法にて得られる、請求項１記載の方法。

[請求項3] （ａ）の所望の抗原特異性Ｔ細胞受容体遺伝子を有する多能性幹細胞が、所望の抗原特異性Ｔ細胞受容体遺伝子を有するヒトＴ細胞から多能性幹細胞を誘導する工程を含む方法によって得られる、請求項２記載の方法。

[請求項4] （ａ）の所望の抗原特異性Ｔ細胞受容体遺伝子を有する多能性幹細胞が、所望の抗原特異性Ｔ細胞受容体遺伝子を多能性幹細胞を多能性幹細胞へ導入する工程を含む方法によって得られる、請求項２記載の方法。

[請求項5] （１）の多能性幹細胞が下記工程：

（ａ）ヒト多能性幹細胞のＲａｇ１および／またはＲａｇ２遺伝子をゲノム編集によりノックアウトする工程、

（ｂ）工程（ａ）で得られたＲａｇ１および／またはＲａｇ２遺伝子がノックアウトされた多能性幹細胞へ所望の抗原特異性Ｔ細胞受容体遺伝子を導入する工程、

を含む方法にて得られる、請求項１または２記載の方法。

[請求項6] ヒト多能性幹細胞がヒトｉＰＳ細胞である、請求項１～５いずれかに

記載の方法。

[請求項7] Ｒａｇ１および／またはＲａｇ２遺伝子のノックアウトをＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ９を用いて行う、請求項１～６何れかに記載の方法。

[請求項8] （１）ＨＬＡハプロタイプホモのドナーから得た細胞由来のｉＰＳ細胞を提供する工程、

（２）該ｉＰＳ細胞のＲａｇ１および／またはＲａｇ２遺伝子をゲノム編集によりノックアウトする工程、および

（３）該Ｒａｇ１および／またはＲａｇ２遺伝子をノックアウトしたｉＰＳ細胞を、ドナーの情報とひも付けて保存する工程を含む、細胞免疫療法用ｉＰＳ細胞バンクを製造する方法。

[請求項9] ＨＬＡハプロタイプホモのドナー由来のｉＰＳ細胞であって、Ｒａｇ１および／またはＲａｇ２遺伝子がノックアウトされているｉＰＳ細胞群が、各ドナーのＨＬＡ情報とひも付けて保存されている、細胞免疫療法用ｉＰＳ細胞バンク。

[請求項10] （１）請求項９記載の細胞免疫療法用ｉＰＳ細胞バンクより、治療対象者のＨＬＡの少なくとも一方と合致するＨＬＡをホモで有するドナー由来の細胞を選択する工程、

（２）選択したＲａｇ１および／またはＲａｇ２遺伝子ノックアウトｉＰＳ細胞へ、治療のための抗原特異性Ｔ細胞受容体遺伝子を導入する工程、および

（３）当該抗原特異性Ｔ細胞受容体遺伝子を導入したＲａｇ１および／またはＲａｇ２ノックアウトｉＰＳ細胞をＴ細胞へ分化誘導する工程

を含む、免疫療法用Ｔ細胞誘導方法。

[請求項11] （１）ＨＬＡハプロタイプホモのドナーから得た細胞由来のｉＰＳ細胞を提供する工程、

（２）該ｉＰＳ細胞のＲａｇ１および／またはＲａｇ２遺伝子をゲノム編集によりノックアウトする工程、

（３）工程（２）で得たＲａｇ１および／またはＲａｇ２遺伝子ノックアウトｉＰＳ細胞に所望の抗原特異性Ｔ細胞受容体遺伝子を導入する工程および

（４）工程（３）で得られたｉＰＳ細胞を、各ドナーのＨＬＡ情報および抗原特異性Ｔ細胞受容体遺伝子情報とひも付けて保存する工程を含む、免疫細胞療法用ｉＰＳ細胞バンクを製造する方法。

[請求項12] （１）ＨＬＡハプロタイプホモのドナー由来のｉＰＳ細胞群が、ドナーのＨＬＡ情報にひも付けて保存されているｉＰＳ細胞バンクより、治療対象者のＨＬＡハプロタイプの少なくとも一方と合致するＨＬＡを有するドナー由来のｉＰＳ細胞を選択する工程、

（２）選択した細胞のＲａｇ１および／またはＲａｇ２遺伝子をゲノム編集にてノックアウトする工程、

（３）（２）で得たＲａｇ１および／またはＲａｇ２遺伝子ノックアウトｉＰＳ細胞へ、治療のための抗原特異性Ｔ細胞受容体遺伝子を導入する工程、および

（４）当該抗原特異性Ｔ細胞受容体遺伝子を導入したＲａｇ１および／またはＲａｇ２ノックアウトｉＰＳ細胞をＴ細胞へ分化誘導する工程

を含む、免疫療法用Ｔ細胞誘導方法。

[請求項13] ＨＬＡハプロタイプホモのドナーから得た細胞由来の多能性幹細胞であって、所望の抗原特異性Ｔ細胞受容体遺伝子を有する多能性幹細胞からＴ前駆細胞あるいは成熟Ｔ細胞を誘導し、当該Ｔ前駆細胞あるいは成熟Ｔ細胞をドナーのＨＬＡハプロタイプのいずれか一方または両方と同一のハプロタイプを有するレシピエントに投与することを含む、免疫細胞療法。

[請求項14] 所望の抗原特異性Ｔ細胞受容体遺伝子を有する多能性幹細胞が、所望の抗原特異性Ｔ細胞受容体遺伝子を有するヒトＴ細胞から多能性幹細胞を誘導する工程を含む方法によって得られる、請求項１３記載の方

法。

[請求項15] 所望の抗原特異性Ｔ細胞受容体遺伝子を有する多能性幹細胞が、所望の抗原特異性Ｔ細胞受容体遺伝子を多能性幹細胞へ導入する工程を含む方法によって得られる、請求項１３記載の方法。

[請求項16] ＨＬＡハプロタイプホモのドナーから得た細胞由来のｉＰＳ細胞であって、所望の抗原特異性Ｔ細胞受容体遺伝子を有するｉＰＳ細胞を、それぞれのドナーのＨＬＡならびに抗原特異性Ｔ細胞受容体の情報にひも付けして保存したｉＰＳ細胞バンク。