

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2021-58165  
(P2021-58165A)

(43) 公開日 令和3年4月15日(2021.4.15)

(51) Int. Cl.	F 1	テーマコード (参考)
<b>C 1 2 N</b> 5/0783 (2010.01)	C 1 2 N 5/0783	4 B O 6 3
<b>C 1 2 N</b> 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10	4 B O 6 5
<b>C 1 2 Q</b> 1/02 (2006.01)	C 1 2 Q 1/02	

審査請求 未請求 請求項の数 12 O L (全 13 頁)

(21) 出願番号	特願2019-185826 (P2019-185826)	(71) 出願人	899000079 学校法人慶應義塾 東京都港区三田2丁目15番45号
(22) 出願日	令和1年10月9日(2019.10.9)	(74) 代理人	110002860 特許業務法人秀和特許事務所
		(72) 発明者	長谷 耕二 東京都港区芝公園1丁目5番30号 慶 應義塾大学芝共立キャンパス内
		(72) 発明者	高橋 大輔 東京都港区芝公園1丁目5番30号 慶 應義塾大学芝共立キャンパス内
		Fターム(参考)	4B063 QA01 QA18 QR32 QR48 QR60 QR77 QS28 QX02 4B065 AA90X AB01 BA02 BB19 BC41 CA44 CA46

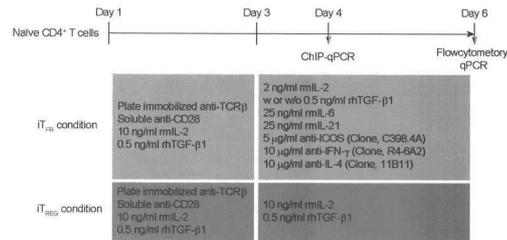
(54) 【発明の名称】 濾胞性制御性T細胞の製造方法

(57) 【要約】

【課題】 濾胞性制御性T細胞を簡便かつ高効率で分化誘導できる方法を提供すること。

【解決手段】 ナイーブT細胞などから得られる制御性T細胞をinterleukin 2 (IL 2)、IL 6、及び抗inducible T cell costimulator (ICOS) 抗体を含む培地で培養することにより濾胞性制御性T細胞を製造する。

【選択図】 図 1



## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

制御性 T 細胞を interleukin 2 (IL 2)、IL 6、及び抗 inducible T cell costimulator (ICOS) 抗体を含む培地で培養する工程を含む、濾胞性制御性 T 細胞の製造方法。

## 【請求項 2】

前記培地は、さらに IL 21 を含む、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 3】

前記培地は、さらに TGF(transforming growth factor) を含む、請求項 1 又は 2 に記載の方法。

## 【請求項 4】

前記培地は、さらに抗 IFN(interferon) 抗体及び / 又は抗 IL 4 抗体を含む、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 5】

前記制御性 T 細胞は、抗 CD28 抗体、IL 2 及び TGF を含む培地でナイーブ T 細胞を培養することにより得られたものである、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 6】

培養が抗 TCR(T cell receptor) 抗体で培養表面がコートされた培養器を用いて行われる、請求項 5 に記載の方法。

## 【請求項 7】

請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の方法で得られた濾胞性制御性 T 細胞。

## 【請求項 8】

請求項 7 に記載の制御性 T 細胞を含む細胞製剤。

## 【請求項 9】

自己免疫疾患治療用である、請求項 8 に記載の細胞製剤。

## 【請求項 10】

濾胞性制御性 T 細胞分化促進物質のスクリーニング方法であって、候補物質の存在下、制御性 T 細胞を IL 2、IL 6、抗 ICOS 抗体を含む培地で培養する工程、制御性 T 細胞から濾胞性制御性 T 細胞への分化効率を評価する工程、及び前記分化効率を向上させる物質を選択する工程、を含む方法。

## 【請求項 11】

前記制御性 T 細胞は、Bcl(B cell lymphoma) 6 プロモーター下に連結されたレポーター遺伝子を発現する、請求項 10 に記載のスクリーニング方法。

## 【請求項 12】

前記濾胞性制御性 T 細胞分化促進物質は、自己免疫疾患治療薬候補物質である、請求項 10 又は 11 に記載のスクリーニング方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は濾胞性制御性 T 細胞の製造方法及び得られた濾胞性制御性 T 細胞の利用に関する。

## 【背景技術】

## 【0002】

濾胞性制御性 T(Tfr)細胞は、制御性 T(Treg)細胞から分化して、リンパ濾胞に移動するという濾胞性 T(Tfh)細胞の機能を獲得した細胞である。Tfr細胞は、GC(胚中心)反応の制御因子といわれており(例えば、非特許文献 1)、リンパ濾胞で Tfh細胞と B細胞の相互作用を制御することで、自己免疫応答の抑制に重要な役割を果たすことが知られている(例えば、非特許文献 2)。そして、Tfr細胞が減少すると自己反応性 B細胞が増加し、自己抗体が増加して感染症にかかりやすくなったり、自己免疫疾患にかかりやすくなったりすることが知られている(例えば、非特許文献 3、4)。

## 【0003】

10

20

30

40

50

これまで、Tfr細胞の前駆細胞であるTreg細胞をナイーブT細胞から分化誘導する培養法は確立されている(例えば、非特許文献5)。また、ナイーブT細胞からTfh細胞を分化誘導する培養法も存在する(例えば、非特許文献6)が、ナイーブT細胞からTfr細胞を分化誘導できる培養法は確立されていなかった。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0004】

【非特許文献1】 Chung et al., Nat. Med. 17, 983 988. 2011

【非特許文献2】 Ritvo et al., Sci. Immunol. 2, eaan0368 2017

【非特許文献3】 Botta et al., Nat. Immunol. 18, 1249 1260. 2017

10

【非特許文献4】 Liu et al., Arthritis Rheumatol. 70, 711 721. 2018

【非特許文献5】 Furusawa et al., Nature 504, 446 450, 2013

【非特許文献6】 Nakayamada et al., Immunity 35, 919 931. 2011

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

上記の通り、Tfr細胞の前駆細胞であるTreg細胞の分化培養法は確立されているが、Treg細胞をTfr細胞に分化させる培養法はこれまで存在せず、株化されているTfr細胞も存在しなかった。この細胞を入手する唯一の手段は生体からの単離であり、回収できる細胞数も少なく大規模な薬剤スクリーニング等に使用することは難しかった。

20

【0006】

そこで、本発明では、Tfr細胞を大量に分化誘導し、簡便に培養できる方法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】

【0007】

本発明者らは上記課題を解決するために鋭意検討を行った。その結果、ナイーブT細胞から分化誘導して得られるTreg細胞をIL 2、IL 6及び抗ICOS抗体を含む培地で培養することにより、生体内に存在するTfr細胞と同等の機能を有する誘導型Tfr細胞(iTfr細胞)を効率よく得られることを見出し、さらに酪酸などのヒストン脱アセチル化酵素阻害剤がTfr細胞の分化効率をさらに促進させることを見出し、本発明を完成させるに至った。

30

【0008】

すなわち、本発明の要旨は以下のとおりである。

[ 1 ] 制御性T細胞をinterleukin 2 (IL 2)、IL 6、及び抗inducible T cell costimulator (ICOS) 抗体を含む培地で培養する工程を含む、濾胞性制御性T細胞の製造方法。

[ 2 ] 前記培地は、さらにIL 21を含む、[ 1 ]に記載の方法。

[ 3 ] 前記培地は、さらにTGF(transforming growth factor) を含む、[ 1 ]又は[ 2 ]に記載の方法。

[ 4 ] 前記培地は、さらに抗IFN(interferon) 抗体及び/又は抗IL 4抗体を含む、[ 1 ] ~ [ 3 ]のいずれかに記載の方法。

[ 5 ] 前記制御性T細胞は、抗CD28抗体、IL 2及びTGF を含む培地でナイーブT細胞を培養することにより得られたものである、[ 1 ] ~ [ 4 ]のいずれかに記載の方法。

40

[ 6 ] 培養が抗TCR(T cell receptor) 抗体で培養表面がコートされた培養器を用いて行われる、[ 5 ]に記載の方法。

[ 7 ] [ 1 ] ~ [ 6 ]のいずれかに記載の方法で得られた濾胞性制御性T細胞。

[ 8 ] [ 7 ]に記載の制御性T細胞を含む細胞製剤。

[ 9 ] 自己免疫疾患治療用である、[ 8 ]に記載の細胞製剤。

[ 10 ] 濾胞性制御性T細胞分化促進物質のスクリーニング方法であって、候補物質の存在下、制御性T細胞をIL 2、IL 6、抗ICOS抗体を含む培地で培養する工程、制御性T細胞から濾胞性制御性T細胞への分化効率を評価する工程、及び前記分化効率を向上させる物質を選択する工程、

50

を含む方法。

[ 1 1 ] 前記制御性T細胞は、Bcl(B cell lymphoma) 6プロモーター下に連結されたレポーター遺伝子を発現する、[ 1 0 ]に記載のスクリーニング方法。

[ 1 2 ] 前記濾胞性制御性T細胞分化促進物質は、自己免疫疾患治療薬候補物質である、[ 1 0 ]又は[ 1 1 ]に記載のスクリーニング方法。

【発明の効果】

【 0 0 0 9 】

本発明によれば、一般的な細胞培養プレートを用いた簡便な方法で、生体に豊富に存在するナイーブT細胞を材料とし、in vitroで直接、Tfr細胞を分化誘導できる。この分化誘導されたTfr細胞は慢性関節リウマチ等の自己免疫疾患の治療薬としての応用が期待できる。また、分化誘導されたTfr細胞を用いたスクリーニング系を構築することで、自己免疫疾患治療薬となりうる低分子化合物等の薬剤の同定も可能となる。

10

【図面の簡単な説明】

【 0 0 1 0 】

【図 1】本発明の一態様にかかるiTfr細胞分化誘導方法の概略を示す図。

【図 2】iTfr細胞又はiTreg細胞分化誘導開始から5日後のTCR<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>細胞における相対mRNA発現量を示す図。\*\*\*はP<0.001(ウェルチt検定又は対応のない両側学生t検定)を示す。

【図 3】iTfr細胞又はiTreg細胞分化誘導開始から5日後のCD4<sup>+</sup>T細胞におけるCD25及びFoxp3の発現量をフローサイトメトリーで調べた結果を示す図。

20

【図 4】iTfr細胞分化誘導条件下で培養したCD25<sup>-</sup>Foxp3<sup>+</sup>細胞内及びiTreg細胞分化誘導条件下で培養したCD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>細胞内のTfr細胞表現型マーカーの発現を調べた結果を示す図。

【図 5】Fixable Viability Stain 780(FVS780)染色による、CD19<sup>+</sup>B細胞内における生存細胞の頻度を解析した結果を示す図。B細胞とTfh細胞を共存させ、さらにそこに生体から単離されたTfr細胞又はiTfr細胞を加えて評価を行った。\*\*\*はP<0.001(片側ANOVAの後ダネット事後検定)を示す。

【図 6】FVS780染色による、生存B細胞内IgG<sub>1</sub><sup>+</sup>細胞、IgG<sub>2a</sub><sup>+</sup>細胞内における生存細胞の頻度を解析した結果を示す図。B細胞とTfh細胞を共存させ、さらにそこに生体から単離されたTfr細胞又はiTfr細胞を加えて評価を行った。\*\*\*はP<0.001(片側ANOVAの後ダネット事後検定)を示す。

30

【図 7】iTreg又はiTfr細胞分化誘導条件でヒト末梢血単核球由来ナイーブT細胞を培養して得られたCD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>T細胞分画中のBcl 6<sup>+</sup>CXCR5<sup>+</sup>細胞の割合を解析した結果を示す図。

【図 8】iTfr細胞分化誘導条件下において、12.5 μM、25.0 μM、50.0 μM又は100 μMの酢酸ナトリウム(SA)、プロピオン酸ナトリウム(SP)、酪酸ナトリウム(SB)の各々と共にナイーブT細胞を5日間培養したときの、CD4<sup>+</sup>T細胞内のCD25<sup>-</sup>Foxp3<sup>+</sup>細胞又はBcl 6<sup>+</sup>CXCR5<sup>+</sup>細胞の頻度を示す図。

【発明を実施するための形態】

【 0 0 1 1 】

40

< Tfr細胞の製造法 >

本発明のTfr細胞の製造法は、Treg細胞をIL 2、IL 6、及び抗ICOS抗体を含む培地で培養する工程を含む。

【 0 0 1 2 】

Tfr細胞とは、CD4陽性T細胞の一種であって、Tfh細胞とB細胞の相互作用を制御する能力を有する細胞を意味し、マーカーとしてCXCR5、PD 1(Programmed Cell Death 1)、Foxp 3を発現する細胞をいう。CD25については陽性でも陰性でもよいが、陰性であることが好ましい。Tfr細胞は、さらに、Bcl 6、T cell factor 1(TCF 1)及びICOSから選択される1以上のマーカーの陽性によって定義づけることもできる。

なお、Tfh細胞とB細胞の相互作用は、後述の実施例のように、Tfh細胞とB細胞を共存させ

50

、そこにTfr細胞をさらに加えてインキュベートし、B細胞の生存率やIgGへのクラススイッチする割合を評価することにより、確認することができる。

本発明においてはTfr細胞を定義づけるときのマーカーの陽性・陰性とは、市販の抗体を用いて免疫組織染色又は細胞選別（フローサイトメトリー）を行ったときのマーカーの発現量が、下記のTreg細胞と比較して1倍以上、好ましくは2倍以上、より好ましくは5倍以上の時は陽性、1/2倍以下、好ましくは1/5倍以下の時は陰性と定義することができる。

【0013】

Treg細胞とは、CD4陽性T細胞の一種であって、異常又は過剰な免疫応答を抑制し、免疫寛容に参与する細胞を意味し、マーカーとしてFoxp3を発現し、さらにCD25陽性である細胞をいう。Treg細胞は、CXCR5、PD 1、Bcl 6、TCF 1、ICOSから選択される1以上、好ましくは全てのマーカーが陰性であることによっても定義づけることもできる。

10

【0014】

以下、Treg細胞をIL 2、IL 6、及び抗ICOS抗体を含む培地で培養する工程について説明する。

【0015】

IL 2としては特に制限されないが、哺乳類由来が好ましく、マウスまたヒト由来が好ましい。培地中におけるIL 2の濃度は、通常0.1 ng/ml～50 ng/mlであり、好ましくは、0.5 ng/ml～20 ng/mlであり、より好ましくは1 ng/ml～10ng/mlである。

【0016】

IL 6は特に制限されないが、哺乳類由来が好ましく、マウスまたヒト由来が好ましい。培地中におけるIL 6の濃度は、通常0.5 ng/ml～200 ng/mlであり、好ましくは、5 ng/ml～100 ng/mlであり、より好ましくは10 ng/ml～50ng/mlである。

20

【0017】

抗ICOS抗体は特に制限されないが、哺乳類由来ICOS（別名CD278）を認識できる抗体が好ましく、マウスまたヒト由来ICOSを認識できる抗体が好ましい。抗体の種類は特に制限されないが、ICOSの細胞外領域を認識する抗体が好ましく、また、モノクローナル抗体又はその抗原認識断片が好ましい。抗ICOS抗体は市販のものでも、動物を免疫したりして新たに作製したものでもよい。培地中における抗ICOS抗体の濃度は、通常0.5 μg/ml～100 μg/mlであり、好ましくは、1 μg/ml～50 μg/mlであり、より好ましくは2 μg/ml～20 μg/mlである。

30

【0018】

前記Treg細胞を培養する培地は、さらにIL 21を含んでもよい。

IL 21は特に制限されないが、哺乳類由来が好ましく、マウスまたヒト由来が好ましい。培地中におけるIL 21の濃度は、通常0.5 ng/ml～200 ng/mlであり、好ましくは、5 ng/ml～100 ng/mlであり、より好ましくは10 ng/ml～50ng/mlである。

【0019】

前記Treg細胞を培養する培地は、さらにTGF $\beta$ を含んでもよい。

TGF $\beta$ は特に制限されないが、哺乳類由来が好ましく、マウスまたヒト由来が好ましい。培地中におけるTGF $\beta$ の濃度は、通常0.05 ng/ml～10 ng/mlであり、好ましくは、0.1 ng/ml～5 ng/mlであり、より好ましくは0.2 ng/ml～2 ng/mlである。

40

【0020】

前記Treg細胞を培養する培地は、さらに抗IFN $\gamma$ 抗体及び/又は抗IL 4抗体を含んでもよい。

抗IFN $\gamma$ 抗体及び抗IL 4抗体は特に制限されないが、それぞれ哺乳類由来IFN $\gamma$ 及びIL 4を認識できる抗体が好ましく、マウスまたヒト由来IFN $\gamma$ 及びIL 4を認識できる抗体が好ましい。抗体の種類は特に制限されないが、モノクローナル抗体又はその抗原認識断片が好ましい。抗IFN $\gamma$ 抗体及び抗IL 4抗体は市販のものでも、動物を免疫したりして新たに作製したものでもよい。培地中における抗IFN $\gamma$ 抗体及び抗IL 4抗体の濃度は、いずれも通常0.5 μg/ml～100 μg/mlであり、好ましくは、1 μg/ml～50 μg/mlであり、より好ましくは2 μg/ml～20 μg/mlである。

50

## 【 0 0 2 1 】

この工程において用いられる培養液は、特に限定されないが、動物細胞の培養に用いられる培地を基礎培地として使用し、上記の因子を添加することで調製することができる。基礎培地としては、例えばIscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM) 培地、Medium 199培地、Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM)培地、MEM培地、Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM)培地、Ham's F12培地、RPMI 1640培地、Fischer's培地、Neurobasal Medium (ライフテクノロジー) 及びこれらの混合培地などが例示される。培地には、血清が含有されていてもよいし、あるいは無血清を使用してもよい。必要に応じて、基礎培地は、例えば、アルブミン、インスリン、トランスフェリン、セレン、脂肪酸、微量元素、2メルカプトエタノール、チオールグリセロール、脂質、アミノ酸、Lグルタミン、非必須アミノ酸、ビタミン、増殖因子、低分子化合物、抗生物質、抗酸化剤、ピルビン酸、緩衝剤、無機塩類、サイトカインなどの1つ以上の物質も含有し得る。

10

## 【 0 0 2 2 】

培養は接着培養が好ましい。抗TCR 抗体で培養表面がコートされた培養器を用いて接着培養することがより好ましい。

抗TCR 抗体は特に制限されないが、哺乳類由来TCR を認識できる抗体が好ましく、マウスまたヒト由来TCR を認識できる抗体が好ましい。抗体の種類はTCR の細胞外領域を認識する抗体であれば特に制限されないが、モノクローナル抗体又はその抗原認識断片が好ましい。抗TCR 抗体は市販のものでも、動物を免疫したりして新たに作製したものでもよい。

20

抗TCR 抗体で培養器の培養表面をコートするためには、例えば、 $0.5 \mu\text{g/ml} \sim 100 \mu\text{g/ml}$  の抗TCR 抗体を含む水溶液で培養器の培養表面を  $0.5 \sim 12$  時間処理することが好ましい。

## 【 0 0 2 3 】

培養温度条件は、特に限定されないが、例えば、約 $37^\circ\text{C}$  ~ 約 $42^\circ\text{C}$  程度、約 $37^\circ\text{C}$  ~ 約 $39^\circ\text{C}$  程度が好ましい。また、培養期間については、Tfr細胞への分化の程度などをモニターしながら、適宜決定することが可能であるが、例えば、1日間以上、2日以上又は3日以上であり、特に上限はないが、10日以下、又は5日以下である。

## 【 0 0 2 4 】

上記の培養工程によりTfr細胞が得られるが、Tfr細胞への分化が100%ではない場合には、Tfr細胞を含む細胞集団が得られる。その場合、細胞集団におけるTfr細胞の割合は50%以上であることが好ましく、80%以上であることが好ましく、90%以上であることがより好ましい。

30

細胞集団からは、必要に応じてTfr細胞を選別・分離することができる。この場合、上述したようなTfr細胞マーカーに対する抗体を用いたフローサイトメトリーなどにより、Tfr細胞を分離して精製することも可能である。

## 【 0 0 2 5 】

Tfr細胞の分化誘導に使用するTreg細胞は、特に制限されず、生体から単離されたTreg細胞でもよいし、T細胞の分化誘導で得られたTreg細胞でもよい。好ましくは、ナイーブT細胞を培養することにより得られたTreg細胞を用いることができる。

40

ここで、ナイーブT細胞はナイーブ $\text{CD4}^+$ T細胞であることが好ましく、例えば、非ヒト動物の脾臓や、ヒトの単離末梢血単核球から通常的手段により、分離取得することができる。

例えば、後述の実施例のように、 $\text{CD45}^+ \text{CD4}^+ \text{CD44}^{\text{lo}} \text{CD62}^{\text{hi}} \text{CD25}^- \text{NK1.1}^-$  ナイーブT細胞 (例えば、<https://bio-protocol.org/e1862>のFig. 1など) を使用することができる。

## 【 0 0 2 6 】

< ナイーブT細胞からTreg細胞の誘導方法 >

以下に、ナイーブT細胞からTreg細胞を誘導する方法について説明する。ただし、Treg細胞は以下の工程で得られたものには限定されない。例えば、抗CD28抗体、IL 2及びTGF

50

を含む培地でナイーブT細胞を培養することによりTreg細胞を得ることができる。なお、本明細書では分化誘導により得られたTreg細胞を誘導型Treg細胞（iTreg細胞）ということがある。

【0027】

IL 2としては特に制限されないが、哺乳類由来が好ましく、マウスまたヒト由来が好ましい。この工程における培地中のIL 2の濃度は、通常0.5 ng/ml～250 ng/mlであり、好ましくは、2.5 ng/ml～100 ng/mlであり、より好ましくは5 ng/ml～50ng/mlである。

【0028】

抗CD28抗体は特に制限されないが、哺乳類由来CD28を認識できる抗体が好ましく、マウスまたヒト由来CD28を認識できる抗体が好ましい。抗体の種類はCD28の細胞外領域を認識する抗体であれば特に制限されないが、モノクローナル抗体又はその抗原認識断片が好ましい。抗CD28抗体は市販のものでも、動物を免疫したりして新たに作製したものでもよい。培地中における抗CD28抗体の濃度は、通常0.1 μg/ml～50 μg/mlであり、好ましくは、0.5 μg/ml～10 μg/mlであり、より好ましくは1 μg/ml～5 μg/mlである。

10

【0029】

TGF $\beta$  は特に制限されないが、哺乳類由来が好ましく、マウスまたヒト由来が好ましい。培地中におけるTGF $\beta$  の濃度は、通常0.05 ng/ml～10 ng/mlであり、好ましくは、0.1 ng/ml～5 ng/mlであり、より好ましくは0.2 ng/ml～2 ng/mlである。

【0030】

この工程において用いられる培養液は、特に限定されないが、動物細胞の培養に用いられる培地を基礎培地として使用し、上記の因子を添加することで調製することができる。基礎培地としては、例えばIscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM) 培地、Medium 199培地、Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM) 培地、MEM培地、Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM) 培地、Ham's F12培地、RPMI 1640培地、Fischer's培地、Neurobasal Medium (ライフテクノロジー) 及びこれらの混合培地などが例示される。培地には、血清が含有されていてもよいし、あるいは無血清を使用してもよい。必要に応じて、基礎培地は、例えば、アルブミン、インスリン、トランスフェリン、セレン、脂肪酸、微量元素、2メルカプトエタノール、チオールグリセロール、脂質、アミノ酸、Lグルタミン、非必須アミノ酸、ビタミン、増殖因子、低分子化合物、抗生物質、抗酸化剤、ピルビン酸、緩衝剤、無機塩類、サイトカインなどの1つ以上の物質も含有し得る。

20

30

【0031】

培養は接着培養が好ましい。抗TCR 抗体で培養表面がコートされた培養器を用いて接着培養することがより好ましい。

抗TCR 抗体は特に制限されないが、哺乳類由来TCR を認識できる抗体が好ましく、マウスまたヒト由来TCR を認識できる抗体が好ましい。抗体の種類はTCR の細胞外領域を認識する抗体であれば特に制限されないが、モノクローナル抗体又はその抗原認識断片が好ましい。抗TCR 抗体は市販のものでも、動物を免疫したりして新たに作製したものでもよい。

抗TCR 抗体で培養器の培養表面をコートするためには、例えば、0.5 μg/ml～100 μg/mlの抗TCR 抗体を含む水溶液で培養器の培養表面を0.5～12時間処理することが好ましい。

40

【0032】

培養温度条件は、特に限定されないが、例えば、約37℃～約42℃程度、約37℃～約39℃程度が好ましい。また、培養期間については、Treg細胞への分化の程度などをモニターしながら、適宜決定することが可能であるが、例えば、1日間以上、2日以上又は3日以上であり、5日以下である。

【0033】

得られたTreg細胞はそのまま、上記Tfr細胞分化誘導に供してもよいし、Treg細胞を精製してから上記Tfr細胞分化誘導に供してもよい。

【0034】

50

< 本発明の分化誘導方法で得られたTfr細胞 >

本発明はまた、本発明の分化誘導方法で得られたTfr細胞を提供する。本発明のTfr細胞は生体内に存在するTfr細胞と同等の性質を有し、インビトロで大量に培養し、増殖させることができる点に優れている。

【 0 0 3 5 】

< Tfr細胞を含む細胞製剤 >

本発明は、上述の方法によって製造されたTfr細胞を含む細胞製剤を提供する。

【 0 0 3 6 】

本発明のTfr細胞を含む細胞製剤は、上記で得られたTfr細胞又はTfr細胞を含む細胞集団を生理食塩水やリン酸緩衝液などの緩衝液に懸濁させることによって得ることができる。また、Tfr細胞を含む細胞製剤は、ジメチルスルフォキシド (DMSO)、血清アルブミン、抗生物質等を含含有してもよい。また、薬理的に許容される、担体、賦形剤、崩壊剤、緩衝剤、乳化剤、懸濁剤、無痛化剤、安定剤、保存剤、防腐剤などの他の成分を含含有してもよい。

【 0 0 3 7 】

細胞製剤の投与量は、有効成分であるTfr細胞が、自己免疫疾患等の治療や予防において所望の効果が得られるような細胞数で含まれるように、対象の性別、年齢、体重、患部の状態、使用する細胞の状態等を考慮して、適宜、調整することができる。

なお、対象とする個体はヒトなどの哺乳動物を含むがこれに限定されない。

また、本発明の細胞製剤は、単回投与でもよいし、複数回投与でもよい。

治療上有効量としては、例えば、一個体あたり一回につき  $1 \times 10^3$  細胞 ~  $1 \times 10^{10}$  細胞である。

【 0 0 3 8 】

本発明の細胞製剤に使用されるTfr細胞は、特に制限されないが、ヒトに投与される場合はヒト由来であることが好ましく、自己由来であることがより好ましい。したがって、投与対象の患者より末梢血単核球を単離し、それを用いてTreg細胞を経由して、Tfr細胞を製造し、当該患者に投与することが好ましい。

細胞製剤の投与部位や投与方法は限定されないが、血管内投与 (静脈内又は動脈内)、髄腔内投与、脳実質内などが例示される。

【 0 0 3 9 】

本発明のTfr細胞を含む細胞製剤は、関節リウマチなどの自己免疫疾患の治療や予防に有効である。

【 0 0 4 0 】

< Tfr細胞分化促進物質のスクリーニング方法 >

本発明のTfr細胞分化促進物質のスクリーニング方法は以下の工程を含む。

被験物質の存在下、Treg細胞をIL 2、IL 6、抗ICOS抗体を含む培地で培養する工程、

Treg細胞からTfr細胞への分化効率を評価する工程、及び

前記分化効率を向上させる物質を選択する工程。

【 0 0 4 1 】

すなわち、上記のTfr細胞分化誘導系に被験物質を添加して培養し、被験物質非添加時と比べて分化効率を向上する物質を得ることで、それをTfr細胞分化促進物質として得ることができる。なお、ナイーブT細胞からTreg細胞を経由してTfr細胞へ分化誘導させる場合には、被験物質はナイーブT細胞の段階から添加することもできるが、好ましくはTreg細胞が存在する段階で被験物質を添加することが好ましい。

被験物質をTreg細胞に接触させる時間は特に制限されず、一定期間接触させたのちに、被験物質を除去してもよいし、Treg細胞を培養している期間中は常に被験物質を存在させてもよい。被験物質をTreg細胞に接触させる時間は具体的には、例えば、30分 ~ 24時間である。

【 0 0 4 2 】

Tfr細胞は自己免疫反応と自己抗体の産生を抑制するので、Tfr細胞分化促進物質は自己免

10

20

30

40

50

疫疾患治療薬候補物質となりうる。

【0043】

本発明のスクリーニング方法においては、任意の被験物質を用いることができる。

例えば、細胞抽出物、細胞培養上清、微生物発酵産物、海洋生物由来の抽出物、植物抽出物、精製タンパク質又は粗タンパク質、ペプチド、非ペプチド化合物、合成低分子化合物、及び天然化合物が例示される。被験物質はまた、上記のような化合物のライブラリーを使用することもできる。

【0044】

Tfr細胞分化効率を指標にしてスクリーニングを行う場合、例えば、上述したようなCXCR5、PD 1、Foxp3などのTfr細胞特異的なマーカーの発現を測定することができる。

例えば、Treg細胞に被験物質を接触させて一定期間インキュベートしたのちに、マーカー発現を測定し、その結果を、被験物質を接触させることなく測定を行った場合（溶媒のみを接触させる場合を含む）と比較する態様が挙げられる。

マーカー発現は、mRNAの発現でもよいし、タンパク質の発現でもよい。

mRNAの発現は定量RT PCRなどで測定でき、タンパク質の発現は抗体染色やフローサイトメトリーなどで測定することができる。

【0045】

なお、Tfr細胞又はその前駆細胞にTfr細胞マーカー遺伝子のプロモーターとそれに連結されたレポーター遺伝子を含むポリヌクレオチドを導入し、当該プロモーターの制御下でレポーター遺伝子が発現できるようにし、レポーター遺伝子の発現量を指標にしてTfr細胞分化促進物質をスクリーニングすることもできる。

Tfr細胞マーカー遺伝子としては、CXCR5、PD 1、Foxp3などが挙げられ、そのプロモーターは公知のデータベースなどから配列情報を得ることができる。

レポーター遺伝子としては、レポーター遺伝子としては、その発現が検出可能なものであれば特に制限されず、例えば、当業者において一般的に使用されるYFP、GFPなどの蛍光タンパク質遺伝子、カルニチンアセチルトランスフェラーゼ（CAT）遺伝子、ガラクトシダーゼ（lacZ）遺伝子、ルシフェラーゼ遺伝子、グルクロニダーゼ遺伝子（GUS）等を挙げることができる。

Tfr細胞マーカー遺伝子のプロモーターとそれに連結されたレポーター遺伝子を含むポリヌクレオチドの構築及び細胞導入は公知の遺伝子組み換え技術により行うことができる。Bcl 6プロモーター下に連結されたYFPレポーター遺伝子を発現するマウスはKitano et al .Immunity. 2011 Jun 24;34(6):961-72.に開示されている。

【0046】

例えば、被験物質非接触時と比べてTfr細胞分化効率を50%倍以上、好ましくは100%以上向上させる物質をTfr細胞分化促進物質として選択できる。

【0047】

また、被験物質の効果を、Tfr細胞分化促進効果を有する陽性コントロールの効果と比較することにより、評価することもできる。陽性コントロールとしては、酪酸などのヒストン脱アセチル化酵素阻害剤が挙げられる。

【実施例】

【0048】

以下、実施例を挙げて本発明を具体的に説明するが、本発明の態様は以下に限定されるものではない。

【0049】

<実験手順>

マウス脾臓からの細胞分離

ナイーブT細胞を分離するため、iMag細胞分離システム（BD Biosciences社）を製造者の説明書に従って使用することにより、ネガティブ選択により脾臓からCD4<sup>+</sup>ナイーブT細胞を濃縮した。

具体的には、CD8（53-6.7；BioLegend社）、CD11b（M1/7

10

20

30

40

50

0 ; BioLegend社)、CD11c (N418 ; BioLegend社)、B220 (RA3-6B2 ; BioLegend社)、Gr-1 (RB6-8C5 ; BioLegend社)、及びTER-119 (TER-119 ; BioLegend社)に対するビオチン結合mAbの混合物と共に、染色バッファー (2mMのEDTAを有し2% FCSを含有するPBS) 中において、単一細胞の状態に分散させた脾臓由来細胞懸濁液を4

で30分間インキュベートした。

細胞を染色バッファーで洗浄してから、Streptavidin Particle Plus - DM (BD Biosciences社) と共に4 で30分間インキュベートした。7 - AAD (Tonbo Biosciences社)、及び下記抗体: BV605を結合した抗CD4抗体 (RM4-5 ; BioLegend社)、BV510を結合した抗マウスCD44抗体 (IM7 ; BD Biosciences社)、eFluor450を結合した抗CD62L抗体 (MEL-14 ; Thermo Fisher Scientific社)、PE-Cy7を結合した抗CD25抗体 (PC61 ; BioLegend社)、APC-eFluor780を結合した抗NK1.1抗体 (PK136 ; Thermo Fisher Scientific社)、redFluor710を結合した抗CD45抗体 (30-F11 ; Tonbo Biosciences社) を含むmAbを用いて、濃縮したCD4<sup>+</sup>分画を染色した。染色した細胞をFACS Aria IIIセルソーターを用いて細胞選別し、生存しているCD45<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD44<sup>1.0</sup>CD62<sup>hi</sup>CD25<sup>-</sup>NK1.1<sup>-</sup>ナイーブT細胞 (ナイーブCD4<sup>+</sup>T細胞) を分離した。

10

20

#### 【0050】

B細胞を分離するためには、7 - AAD及び下記抗体: BV510を結合した抗CD45抗体、BV421を結合した抗CD3抗体 (145-2C11 ; BioLegend社)、PE-Cy7を結合した抗CD43抗体 (1B11 ; BioLegend社)、PEを結合した抗IgG1抗体 (A85-1 ; BD Biosciences社)、PEを結合した抗IgG2a抗体 (RMG2a-62 ; BioLegend社)、PEを結合した抗IgG2b抗体 (RMG2b-1 ; BioLegend社)、FITCを結合した抗IgG3抗体 (R40-82 ; BD Biosciences社)、FITCを結合した抗IgE抗体 (RME-1 ; BioLegend社)、FITCを結合した抗IgA抗体 (C10-3 ; BD Biosciences社)、APC-eFluor780を結合した抗CD19抗体 (eBio1D3 ; Thermo Fisher Scientific社) を含むmAbを用いて、DLN (所属リンパ節) 細胞を染色した。染色した細胞をFACS Aria IIIセルソーターを用いて細胞選別し、CD45<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>CD43<sup>-</sup>Ig<sup>-</sup>休止B細胞を分離した。

30

#### 【0051】

濾胞性T細胞を分離するためには、7 - AAD及び下記抗体: BV605を結合した抗CD4抗体、BV510を結合した抗CD45抗体、BV421を結合した抗ICOS抗体、PE-eFluor610を結合した抗Nr p-1抗体、PEを結合した抗CXCR5抗体 (L138D7 ; BioLegend社)、APC-eFluor780を結合した抗NK1.1抗体、redFluor710を結合した抗CD45抗体、を含むmAbを用いて、CIAマウス由来のDLN細胞を染色した。APCを結合した抗ヒトCD2抗体 (hCD2、RPA-2.10 ; BioLegend社) でCD4<sup>+</sup>分画を染色して、Foxp3<sup>hCD2</sup>マウスからCXCR5+ICOS+Foxp3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>T細胞を濾胞性T細胞として分離した。

40

#### 【0052】

インビトロのT細胞分化

インビトロでTreg細胞を誘導するため、高結合96ウェルプレート (Corning社、米国ニューヨーク州コーニング) に固定化された抗TCR mAb (H57-597 ; BioXCell社、米国ニューハンプシャー州ウェストレバノン、5µg/ml)、及び完全なAdvanced RPMI 1640培地 (Thermo Fisher

50

Scientific社) (5% v/v ウシ胎仔血清 (FCS; MP Biomedicals社、米国カリフォルニア州サンタアナ) を含有し、0.1 ng/ml の遺伝子組換えヒト (rh) TGF- $\beta$ 1 と 10 ng/ml の遺伝子組換えマウス (rm) IL-2 (両方とも BioLegend社) を追加したもの) における可溶性の抗 CD28 mAb (37.51; BioXCell社、2  $\mu$ g/ml) と共に、上記マウス脾臓より分離したナイーブ CD $4^{+}$  T細胞 (細胞数  $5 \times 10^5$  /ml) を 2 日間刺激した。rh TGF- $\beta$ 1 と rm IL-2 を追加した完全培地において、刺激した T細胞をさらに 3 日かけて増やし、T<sub>REG</sub>細胞 (iT<sub>reg</sub>細胞) を得た。

また、ヒトの末梢血単核球由来ナイーブ CD $4^{+}$  T細胞を同様の条件で培養し、ヒト T細胞においても、T<sub>reg</sub>細胞を経て T<sub>fr</sub>細胞を誘導した (ヒト iT<sub>fr</sub>細胞)。

10

#### 【0053】

濾胞性制御性 T細胞 (iT<sub>fr</sub>細胞) を誘導するためには、ナイーブ CD $4^{+}$  T細胞 (細胞数  $5 \times 10^5$  /ml) をまず上記の iT<sub>reg</sub>細胞培養条件下で培養し、次いで、2 ng/ml の rm IL-2、25 ng/ml の rm IL-6、25 ng/ml の rm IL-21 (いずれも BioLegend社)、5  $\mu$ g/ml の抗 ICOS 抗体 (C398.4A; BioLegend社)、10  $\mu$ g/ml の抗 IFN- $\gamma$  抗体 (R4-6A2; BioXCell社)、10  $\mu$ g/ml の抗 IL-4 抗体 (11B11; BioXCell社) が添加され、0.1 ng/ml の rh TGF- $\beta$ 1 を有する又は有しない完全培地において、さらに 3 日間、培養を継続した。

#### 【0054】

iT<sub>fr</sub>細胞の評価

上記のようにして得られた iT<sub>fr</sub>細胞の評価を行うため、上記マウスより選別取得された、Foxp3<sup>hi</sup>CD $2^{-}$ マウスから CD45<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup>CD19<sup>+</sup>Ig<sup>-</sup>CD43<sup>-</sup>休止 B細胞、CD19<sup>-</sup>CD4<sup>+</sup>ICOS<sup>+</sup>CXCR5<sup>+</sup>hCD2 (Foxp3)<sup>-</sup>T<sub>FH</sub>細胞、及び CD19<sup>-</sup>CD4<sup>+</sup>ICOS<sup>+</sup>CXCR5<sup>+</sup>hCD2<sup>+</sup>T<sub>fr</sub>細胞を使用した。

20

#### 【0055】

完全な Advanced RPMI 1640 培地において、B細胞及び T<sub>FH</sub>細胞をそのまま、又は T<sub>FR</sub>細胞と iT<sub>fr</sub>細胞のいずれかを伴って培養した。2  $\mu$ g/ml の抗 CD3 抗体 (145-2C11; BioLegend社) と 5  $\mu$ g/ml の F(ab')<sub>2</sub> ヤギ抗 IgM  $\mu$ 鎖抗体 (Thermo Fisher Scientific社) を加えた 96 ウェル丸底プレートにおいて、B細胞 ( $5 \times 10^4$ )、及び T<sub>FR</sub>細胞 ( $1.5 \times 10^4$ )、さらに T<sub>FR</sub>細胞と iT<sub>fr</sub>細胞のいずれか ( $1.5 \times 10^4$ ) を加えて 6 日間培養した。

30

#### 【0056】

B細胞を、BUV737 を結合した抗 CD19 抗体、PerCP/Cy5.5 を結合した抗 I-A/I-E 抗体、eFluor660 を結合した抗 GL7 抗体を含む mAb で染色した後、FVS780 で死細胞染色を行った。転写因子バッファセット (BD Biosciences社) を用いて、この細胞を固定し、透過処理し、BUV395 を結合した抗 IgG1 抗体と PE を結合した抗 IgG<sub>2a</sub> 抗体 (RMG2a-62; BioLegend社) を含む mAb で染色した。LSR II フローサイトメーター又は FACSCelesta フローサイトメーター、及び DIVA v8.0 (BD Biosciences社) を用いてフローサイトメトリーを行い、FlowJoバージョン 10.4 (FlowJo) を用いてデータを解析した。

40

#### 【0057】

< iT<sub>fr</sub>細胞分化促進物質の検討 >

Bcl-6 プロモーターの制御下で YFP 遺伝子を発現するマウス (Kitano et al. Immun. 2011 Jun 24;34(6):961-72.) の脾臓からナイーブ T細胞を単離し、上記の手順で iT<sub>fr</sub>細胞分化誘導を行った。そして当該 iT<sub>fr</sub>細胞分化誘導条件において、分化誘導開始時点から酢酸ナトリウム (SA)、プロピオン酸ナトリウム (SP)、酪酸ナトリウ

50

ム ( S B ) のいずれかを添加して5日間培養し、i T f r 細胞分化効率を評価した。

【 0 0 5 8 】

< 結果 >

ナイーブT細胞を図1に記載の培養条件で培養し、T r e g 細胞を誘導し、さらに、T r e g 細胞からT f r 細胞を誘導した。その結果、図2に示すように、得られたi T f r 細胞は生体で見いだされるT f r 細胞と同様、マーカーとしてP D - 1、C X C R 5、B c l 6、T C F - 1を発現することが分かった。

そして、図3に示すように、i T r e g 細胞ではC D 2 5 の発現が見られるが、i T f r 細胞ではC D 2 5 の発現がほとんど見られず、C D 2 5 の発現量により、両者を区別できることがわかった。また、図4の結果から、P D - 1、C X C R 5、B c l 6、T C F - 1の発現でも両者を区別できることが分かった。

また、ヒトの末梢血単核球由来ナイーブC D 4 + T細胞を同様の条件で培養し、T r e g 細胞を経てT f r 細胞を誘導したところ、図7に示すように、ヒトT細胞においてもB c l 6及びC X C R 5陽性のi T f r 細胞を得ることができた。

【 0 0 5 9 】

さらに、B細胞とT f h細胞の共培養系に得られたi T f r 細胞を加えてその機能を評価したところ、図5及び図6に示すように、生体から単離されたT f r 細胞と同様、i T f r 細胞はB細胞の生存を抑制し、また、T f h細胞によるB細胞のI g Gクラススイッチ組換えも抑制することがわかった。

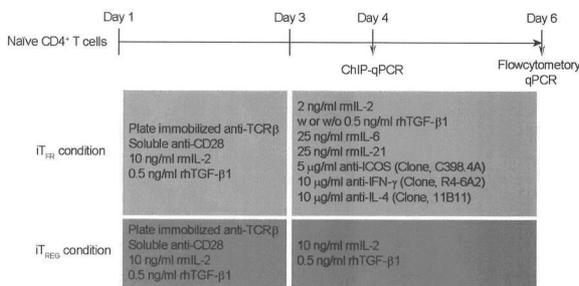
【 0 0 6 0 】

そして、本発明で確立されたi T f r 細胞誘導培養系において、酢酸ナトリウム ( S A )、プロピオン酸ナトリウム ( S P )、酪酸ナトリウム ( S B ) を添加してi T f r 細胞誘導効率を調べたところ、図8に示すように、特に酪酸ナトリウム ( S B ) が顕著にi T f r 細胞誘導効率を向上させることが分かった。

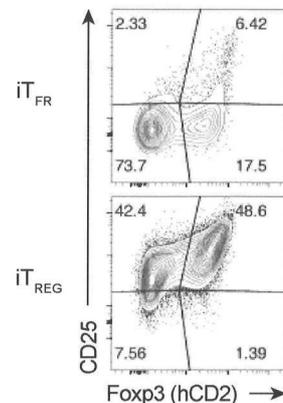
10

20

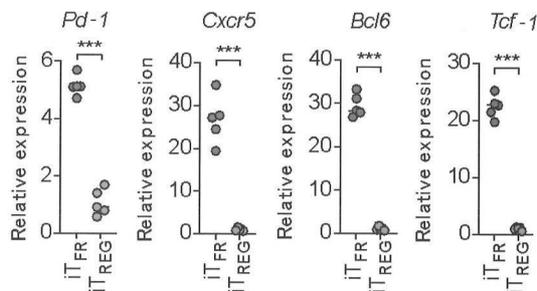
【 図 1 】



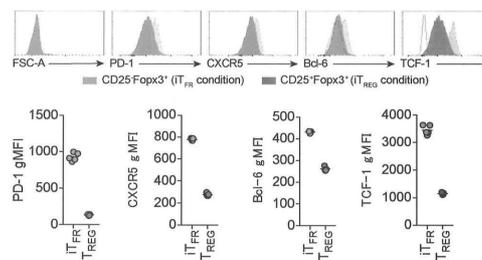
【 図 3 】



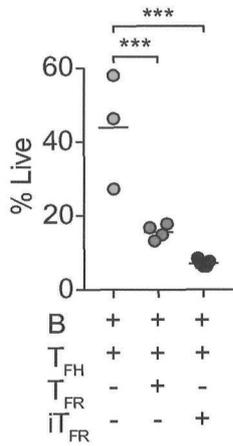
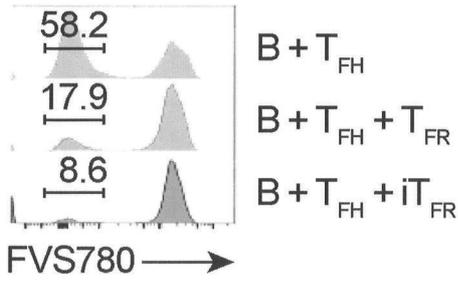
【 図 2 】



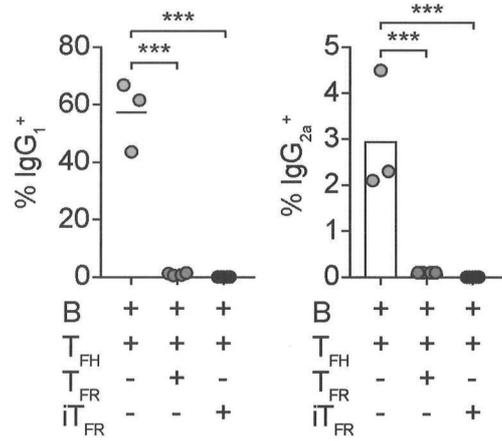
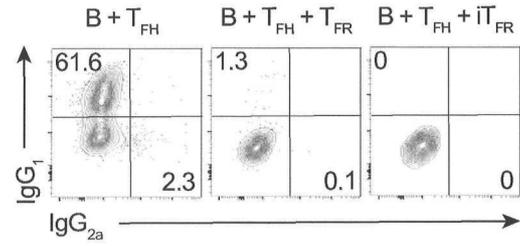
【 図 4 】



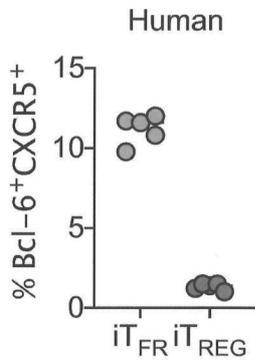
【 図 5 】



【 図 6 】



【 図 7 】



【 図 8 】

