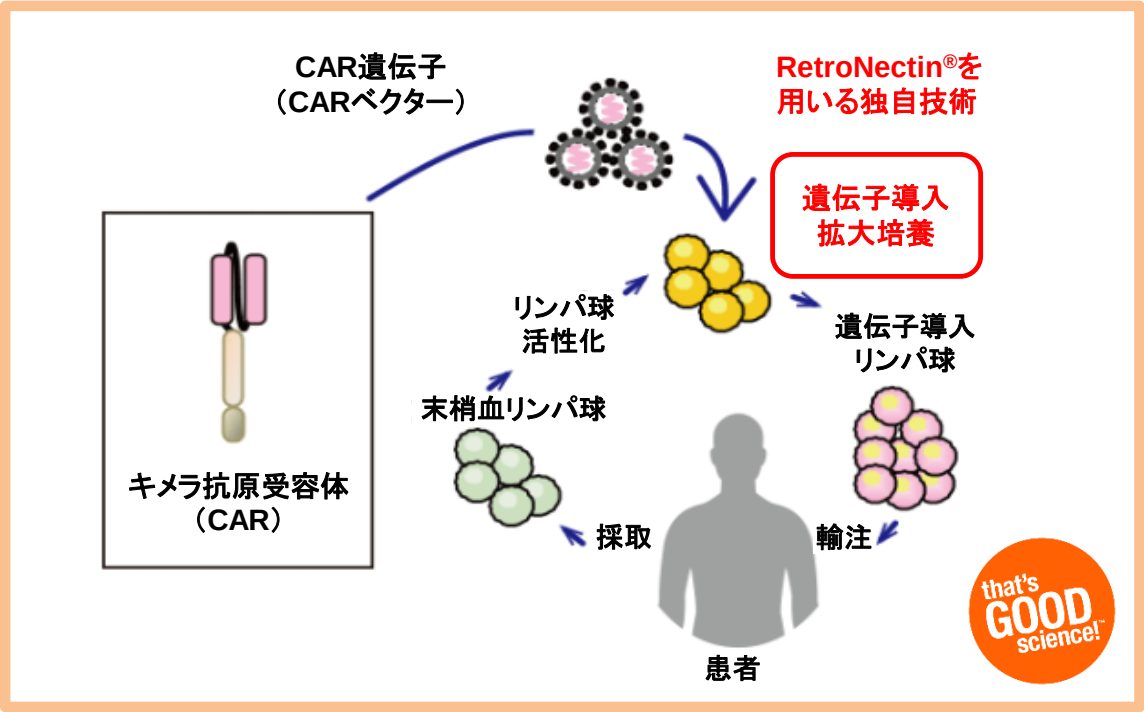
がん免疫研究（CAR-T／TCR療法）に

RetroNectin®を用いた リンパ球への遺伝子導入と拡大培養

タカラバイオは、遺伝子導入効率を増強するRetroNectin®を全世界に供給しており、多くの遺伝子治療の臨床試験で使用されています。がん免疫療法の1つとして注目されているキメラ抗原受容体発現T細胞（CAR-T）療法は、がん患者からT細胞を分離し、遺伝子操作によって標的能をもつCAR-T細胞を*in vitro*で増殖させた後、患者自身の体に戻す方法であり、遺伝子導入と拡大培養の過程でRetroNectin®が有効に活用されています。



PBMC分離

リンパ球活性化

遺伝子導入

拡大培養

回収

凍結保存

RetroNectin®
GMP grade

Anti-CD3 mAb
GMP grade

リンパ球培養用培地
LymphoONE™ T-Cell Expansion Xeno-Free Medium

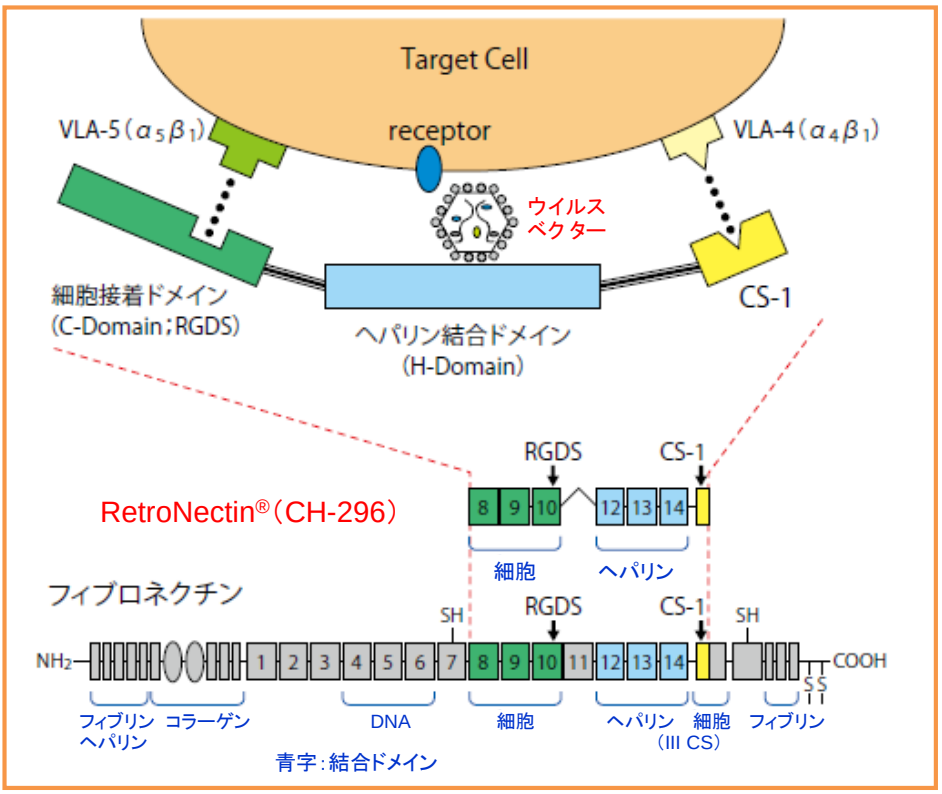
細胞培養用ガス透過性バック
CultiLife™ Culture bag

Clontech TaKaRa cellartis

RetroNectin®を用いた遺伝子導入

レトロネクチン®を用いた高効率遺伝子導入法**「レトロネクチン法」**は、従来難しいとされてきた造血幹細胞等の血球系細胞へのレトロウイルスベクターおよびレンチウイルスベクターによる高効率遺伝子導入を可能にしました。
現在、世界で実施された遺伝子治療臨床試験の多数のプロトコールに採用されており、**体外遺伝子治療における遺伝子導入法のスタンダード**となっています。

RetroNectin®



フィブロネクチンの構造とRetroNectin®による遺伝子導入のメカニズム

RetroNectin®は、ヒトフィブロネクチンの細胞接着ドメイン、ヘパリン結合ドメイン、CS-1部位の3種類の機能性ドメインを含む組換えタンパク質です。
VLA-4を発現している細胞はCS-1部位と、VLA-5を発現している細胞は細胞接着ドメインと接着し、一方、レトロ／レンチウイルスベクターはヘパリン結合ドメインに結合することにより、RetroNectin®上に共配置されます。

この細胞とウイルスベクターの共配置により局所的に両者の濃度が高められ、遺伝子導入が促進されると考えられています。

製　品　名	容　量	製品コード	価格（税別）
RetroNectin® **（Recombinant Human Fibronectin Fragment）**	0.5 mg　（0.5 ml）	T100A	¥35,000
	2.5 mg　（2.5 ml）	T100B	¥138,000
RetroNectin® Dish **（RetroNectin® Pre-coated Dish, 35 mmφ）**	10 dishes	T110A	¥70,000
RetroNectin® GMP grade　※	2.5 mg／2.5 ml	T202	¥162,000

※RetroNectin® GMP gradeはGMPグレードのRetroNectin®であり、治験薬GMPに関するガイドラインに準拠し、製造および品質管理されています。そのため、*ex vivo*での遺伝子治療や細胞調製等の臨床研究に使用可能です。
また、CH-296 with Carbonateとして米国FDAのドラッグマスターファイルに登録されています。

＜RetroNectin®の使用方法＞

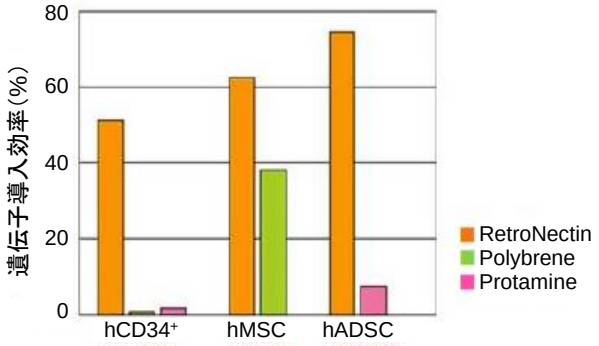
細胞培養用デイッシュに、RetroNectin®を4～20 μg/cm^2 の濃度でコーティングして使用します。
あらかじめRetroNectin®をコーティングした細胞培養ディッシュ（製品コード T110A）もラインナップしています。

RetroNectin®のもう1つの特性として、Anti-CD3 mAb GMP grade（製品コード T210）で共刺激することにより、Tリンパ球（T細胞）の培養効率が上がり、増殖後のTリンパ球にはナイーブT細胞が多く含まれていることが分かっています。
この拡大培養方法については6ページでご紹介します。

実験例1. 幹細胞への遺伝子導入

ヒト造血幹細胞（hCD34⁺）、ヒト間葉系幹細胞（hMSC）およびヒト脂肪由来幹細胞（hADSC）に、蛍光タンパク質発現レトロウイルスベクターをReroNectin法、Polybrene法およびProtamine法で導入した。

その結果、ReroNectin法が最も導入効率が高いことが確認できた。

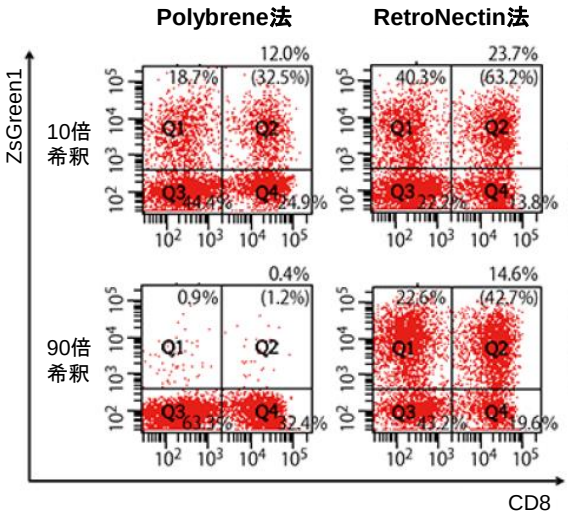


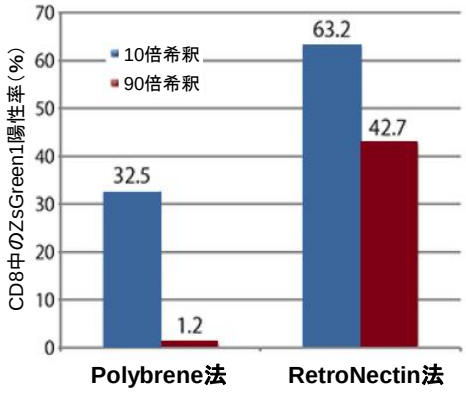
実験例2. 末梢血単核球への遺伝子導入

ヒト末梢血単核球（PBMC）にZsGreen1を発現するレンチウイルスベクターをPolybrene法とReroNectin法で導入した。

その結果、ポリブレン法では10倍希釈したレンチウイルスで32.5%の陽性率を示したが、RBV-Spin法では10倍希釈したウイルスを使用した場合で63.2%もの高い陽性率を示し、また90倍希釈したウイルスを用いても42.7%の高い陽性率が得られた。

※左図の（）内はCD8陽性細胞中のZsGreen1陽性率を示す。

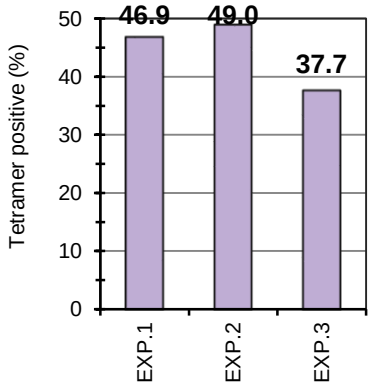




実験例3. ガス透過性細胞用バッグを用いた末梢血単核球への遺伝子導入

ヒト末梢血単核球（PBMC）に標的遺伝子を搭載したレトロウイルスベクターをRBV-LTS法で導入した。

CD8陽性細胞中のテトラマー陽性細胞率にて導入効率が高いことが確認できた（n=3）。



＜RBV-LTS法の概要＞

閉鎖系での遺伝子導入細胞調製には、ガス透過性細胞培養用バッグ（CultiLife™ 215 Culture bagなど）**を用いたRBV-LTS法**（RetroNectin-boundvirus transduction with Low-Temperature Shaking）**が有効です**（文献 ※1）。

参考文献 ※1

Dodo K, Chono H, Saito N, Tanaka Y, Tahara K, Nukaya I and Mineno J. An Efficient Large-Scale Retroviral Transduction Method Involving Preloading the Vector into a RetroNectin-Coated Bag with Low-Temperature Shaking. *PLoS ONE*. 2014; **9**(1): e86275 doi:10.1371/journal.pone.0086275

レトロネクチン刺激によるT細胞拡大培養法

タカラバイオが開発した**「レトロネクチン®刺激T細胞拡大培養法」**は、少量の末梢血からT細胞を効率よく増殖することができ、得られた細胞集団には、体内での抗腫瘍活性が期待できる未分化細胞であるナイーブT細胞（★）を多く含むことが明らかとなっています。レトロネクチン®刺激T細胞拡大培養法はT細胞などのリンパ球を用いる細胞医療・遺伝子治療における細胞加工技術として臨床応用が進みつつあります。

★ ナイーブT細胞とは・・・

ナイーブT細胞は未分化型細胞であり、エフェクターT細胞と比較して、*in vitro*でのがん細胞株に対する細胞傷害活性は弱いものの、体内に戻した時に逆にエフェクターT細胞より高い抗腫瘍活性を発揮することが知られています（文献※2）。さらに、レトロネクチンによる刺激は他の刺激方法と比較してサイトカインの生産性を高め、強い抗腫瘍効果を発揮できることも報告されています（文献※3）。

参考文献

※2：L Gattinoni, *et al*. Acquisition of full effector function in vitro paradoxically impairs the in vivo antitumor efficacy of adoptively transferred CD8⁺ T cells. *J Clin Invest*. 2005; **115**(6)：1616-26

※3：Hosoi H, *et al*. Stimulation through very late antigen-4 and -5 improves the multifunctionality and memory formation of CD8⁺ T cells. *Eur J immunol*. 2014; **44**:1747-1758

ヒトTリンパ球培養用培地

- 抗CD3抗体の刺激とIL-2存在下でヒトTリンパ球の高い増殖を維持。血清無添加でも高い増殖性を維持可能（実験例4）
- ヒト血清アルブミンおよび組換え型ヒトインスリン以外のタンパク質は不含

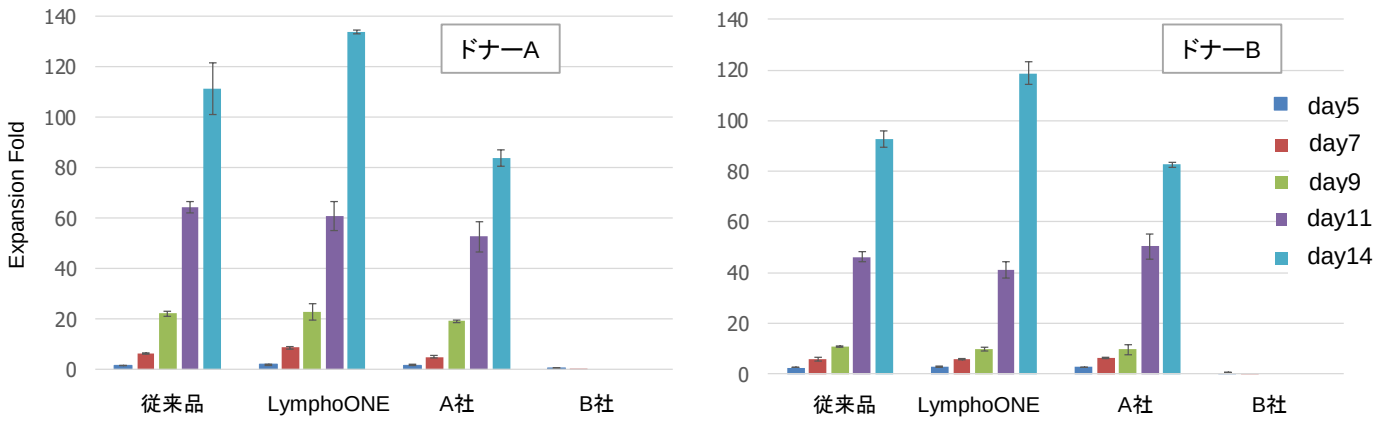
製　品　名	容　量	製品コード	価格（税別）
LymphoONE™ T-Cell Expansion Xeno-Free Medium, 1L Bottle ※	1,000 ml×1	WK552S	¥13,000
	1,000 ml×10	WK552	¥121,000

※本培地では、培地成分の最適化により、従来品GT-T551 Culture medium（製品コード WK551S）と比較して、血清や血漿を添加しない場合のT細胞増殖率が向上しています。

実験例4. Tリンパ球の拡大培養における培地性能の比較

ヒト末梢血単核球（PBMC）をCultiLife 215 Culture bag固定化Anti-CD3 mAb刺激下で4日間培養後、IL-2を含むリンパ球培養用培地で適宜希釈しながらさらに10日間培養した。
その結果、LymphoONE T-Cell Expansion Xeno-Free Mediumは血清（human AB serum）無添加でも安定した細胞増殖性を示し、従来品より増殖能が優れていることが確認できた。

（弊社取得データ）



ガス透過性細胞培養用バック　CultiLife™シリーズ

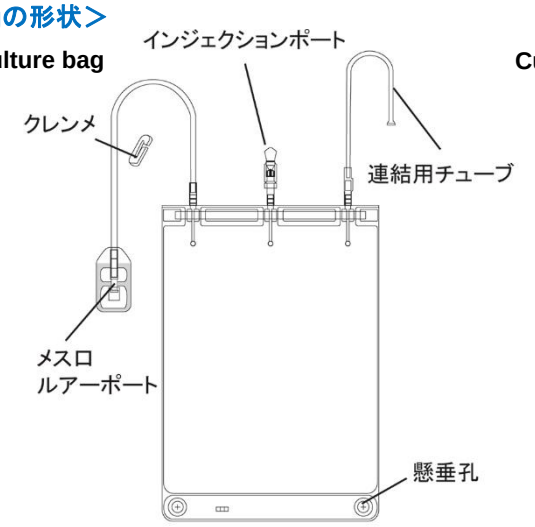
- フラスコよりも高い細胞増殖率を実現（実験例5）
- 閉鎖系培養を可能にし、コンタミネーション及び培養作業者の感染リスクを軽減
- 各種連結ポートにより容易に液輸送が可能
- 透明性に優れた素材で、容易に顕微鏡観察が可能

製　品　名	概　要		容　量	製品コード	価格（税別）
	培養面積	培養液量			
CultiLife™ 215 Culture bag ※	215 cm^2	～300 ml	10個	FU0005	¥39,000
GT-T610 (CultiLife™ Eva) Culture bag	640 cm^2	～1,000 ml	10個	FU0010	¥43,000

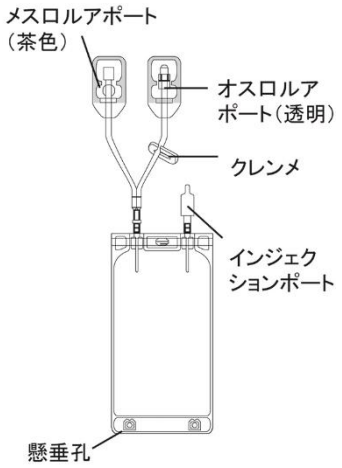
※抗CD3抗体、RetroNectinのコーティングが可能

＜CultiLife™ Culture bagの形状＞

GT-T610 (CultiLife Eva) Culture bag



CultiLife 215 Culture bag

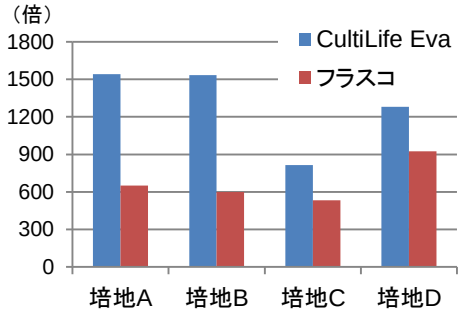


実験例5. Tリンパ球拡大培養における培養容器の違いによる細胞増殖率の比較

ヒト末梢血単核球（PBMC）を固定化Anti-CD3 mAb刺激下で4日間培養後、4種類のリンパ球培養用培地にて適宜希釈しながらさらに15日間培養した。

その結果、CultiLife Evaの使用により、どの培地でもフラスコより高い細胞増殖率を示した。

（弊社取得データ）



T細胞の活性化抗体

- T細胞刺激用抗体 OKT3クローン（Isotype：mouse IgG2a）抗体
- 動物由来成分不含。*ex vivo*での遺伝子治療や細胞調製等の臨床研究に最適
- GMPに準拠した製造・品質管理

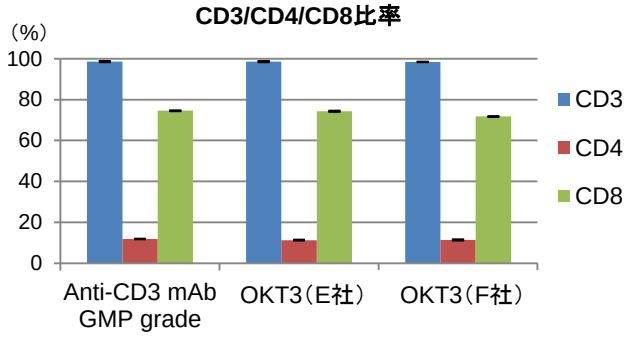
製　品　名	容　量	製品コード	価格（税別）
Anti-CD3 mAb GMP grade	1.0 mg / 1.0 ml	T210	¥165,000

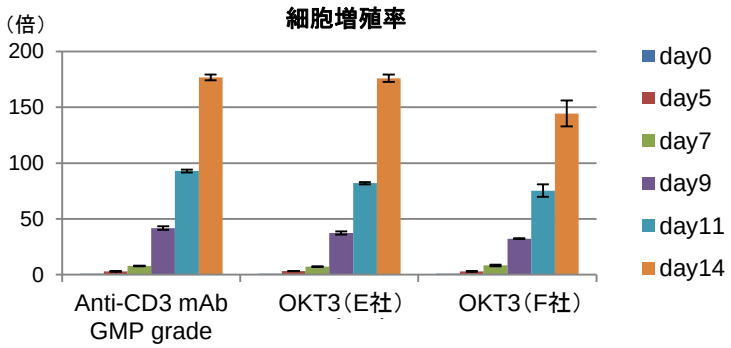
実験例6. Tリンパ球拡大培養におけるOKT3の性能比較

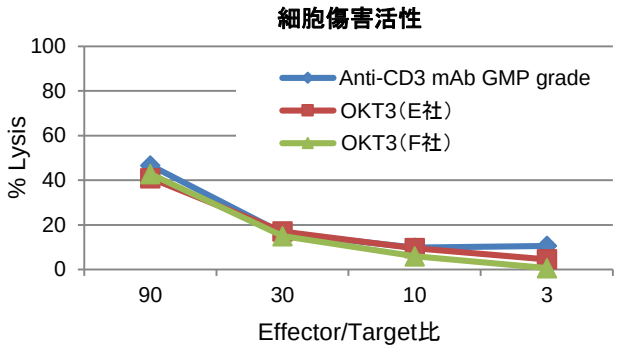
ヒト末梢血単核球（PBMC）を固定化Anti-CD3 mAbの刺激下で5日間培養後、リンパ球培養用培地で適宜希釈しながらさらに9日間培養を行った。

細胞増殖率、免疫表現型（CD3/CD4/CD8比率）およびK562細胞に対する細胞傷害活性を比較した結果、Anti-CD3 mAb GMP gradeは他社製品（A社およびB社）と同等の性能を示した。

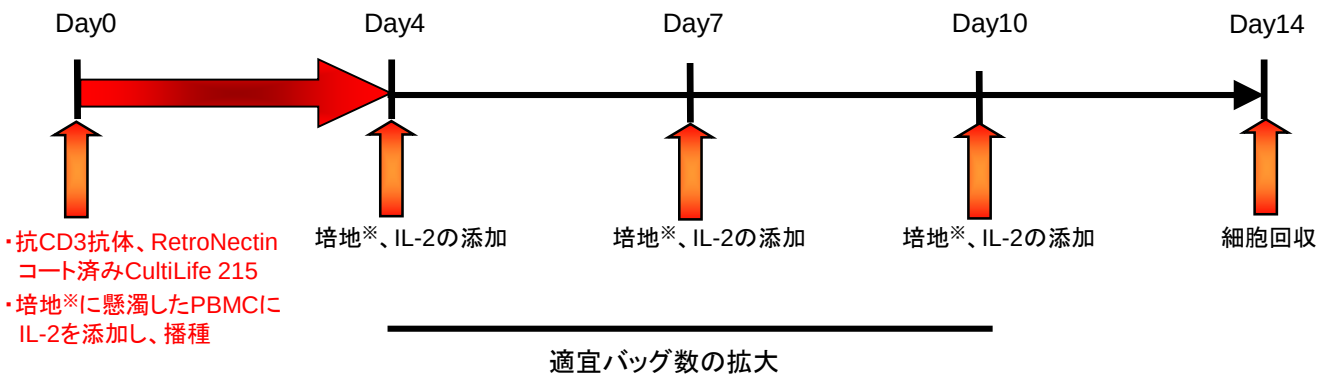
（弊社取得データ）







RetroNectin®共刺激によるTリンパ球拡大培養プロトコール



※培地：LymphoONE™ T-Cell Expansion Xeno-Free Medium

1）CultiLife™ 215 Culture bagへのAnti-CD3 mAbとRetroNectin®のコーティング

- Anti-CD3 mAb（5 μg/ml）とRetroNectin（25 μg/ml）を含むPBSを30 ml調製し、CultiLife 215 Culture bagに全量添加する。
- 37℃ CO_2インキュベータにて2～5時間保温し、コーティングする。
- バッグ内溶液を全量除去し、PBS 30 mlを用いてバッグ内を3回洗浄する。

2）末梢血単核球（PBMC）播種

- PBMC 3×10^7細胞を0～1%の血清または血漿を含む培地（ LymphoONE T-Cell Expansion Xeno-Free Mediumなど）30～50 mlに懸濁する。
- PBMC懸濁液に必要量のIL-2を添加する（最終培養液量に対し、200～1,000 U/ml）。
- 1）にてコーティング処理したCultiLife 215 Culture bagにIL-2入りPBMC懸濁液を全量添加する。
- バッグ内に同じ培地を添加し、計200～300 mlとする。
- 37℃ 5% CO_2インキュベータにて培養する。

3）拡大培養

- CultiLife 215 Culture bag内の細胞を懸濁し、一部～全量をGT-T610 Culture bagへ移す。
- 培地とIL-2（200～1,000 U/ml 培養液量）を必要量添加する。
- 37℃ 5% CO_2インキュベータにて培養を継続する。
- 以降、細胞増殖に伴って、適宜希釈しながらGT-T610 Culture bagの枚数を増やし、10～14日間培養を継続する。

4）回収

- GT-T610 Culture bag内の細胞を懸濁し、遠心等により回収する。

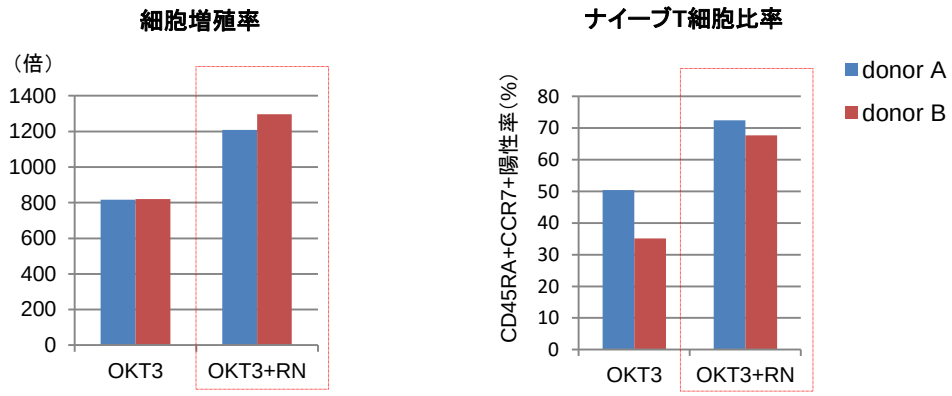
注：RetroNectinを用いたリンパ球拡大培養を研究目的以外で実施される場合には、個別に弊社とのライセンス契約の締結が必要となります。

※培養プレートを用いた培養プロトコールは弊社ウェブサイトをご覧ください。

実験例7. RetroNectin®共刺激によるTリンパ球拡大培養

ヒト末梢血単核球（PBMC）を固定化Anti-CD3 mAbとRetroNectin（RN）の共刺激下で4日間培養後、リンパ球培養用培地で適宜希釈しながら更に10日間培養を行った。

その結果、RetroNectinの使用により、細胞増殖率の向上（左図）およびナイーブT細胞比率（CD45RA$^+$CCR7$^+$陽性細胞比率）の上昇（右図）がみられた。

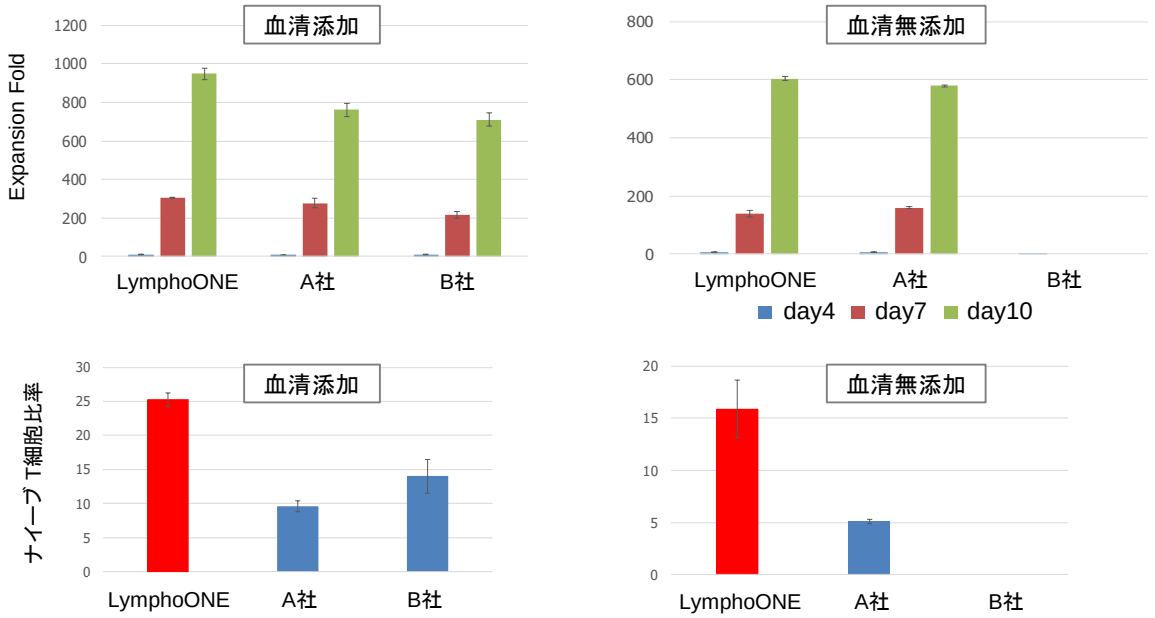


実験例8. RetroNectin共刺激によるTリンパ球拡大培養（他社培地との比較）

ヒト末梢血単核球（PBMC）をCultiLife 215 Culture bag固定化Anti-CD3 mAbとRetroNectin（RN）の共刺激下で4日間培養後、IL-2を含むリンパ球培養用培地を用い、血清（human AB serum）の有無の条件で10日間培養を行った。血清添加条件として、Day0～Day7は1%血清を含み、Day7～Day10は0.5%血清を含む条件で培養した。

その結果、血清（human AB serum）無添加でも安定した細胞増殖性を示し、 ナイーブT細胞比率（CCR7⁺CD45RA⁺）が高いことが確認できた。

（弊社取得データ）



リンパ球の回収・洗浄／凍結保存液

- STEM-CELLBANKER® GMP grade、STEM-CELLBANKER® DMSO Free GMP grade およびCELLOTION™はケミカリーディファインドで動物由来成分不含
- STEM-CELLBANKER® GMP grade、STEM-CELLBANKER® DMSO Free GMP grade は共にGMPに準拠した製造・品質管理を実施

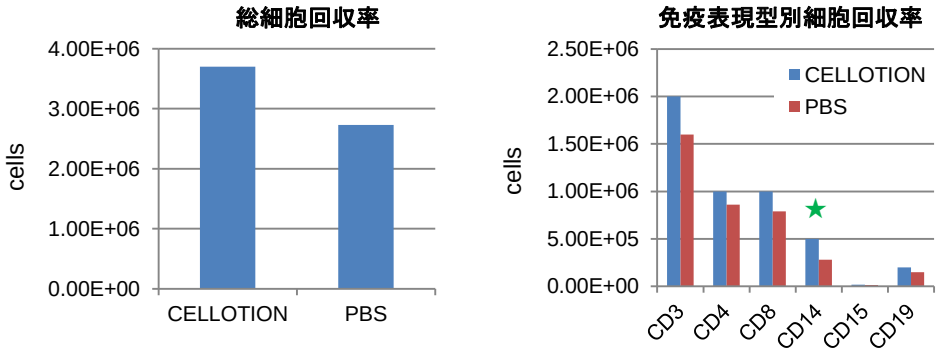
製　品　名	概要	容　量	製品コード	価格（税別）
CELLOTION™	細胞洗浄・回収液	100 ml	11918	¥7,000
STEM-CELLBANKER® GMP grade	GMP gradeの細胞凍結保存液	100 ml	11924	¥28,000
		20 ml×4	CB047	¥28,000
STEM-CELLBANKER® DMSO Free GMP grade	DMSO不含の細胞凍結保存液	100 ml	13926	¥28,000
		20 ml×4	CB063	¥28,000

製造元　日本全薬工業株式会社　　発売元　ゼノジェンファーマ株式会社

実験例9. 全血からの末梢血単核球分離

血液からリンパ球や単球を分離採取する試薬とCELLOTIONを併用して、血液からの末梢血単核球分離操作を行った。

PBS使用時の1.3倍の細胞が回収でき、免疫表現型別にみると、特にCD14陽性細胞（単球）で高い回収率の向上（★）が認められた。単球は白血球の中でも接着性の高い細胞であることから、通常の回収方法では回収ロスが多く、CELLOTIONを使用することで顕著に回収率が向上したと考えられる。

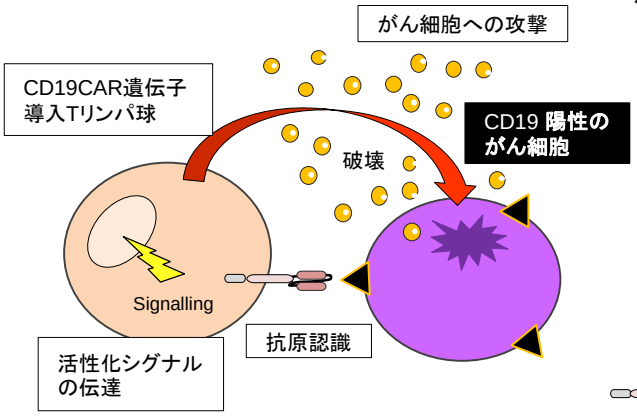


RetroNectin® GMP gradeは遺伝子治療の臨床研究で採用されています

CAR-T／TCR遺伝子治療臨床試験での使用例

- Ali, S. A. *et al.* T cells expressing an Anti-B-cell maturation antigen chimeric antigen receptor cause remissions of multiple myeloma. *Blood* 2016; **128**: 1688–1700
- Brentjens, R. *et al.* CD19-targeted T cells rapidly induce molecular remissions in adults with chemotherapy-refractory acute lymphoblastic leukemia. *Science Translational Medicine* 2013; **5**: 177ra38
- Humphries, C. Adoptive cell therapy: honing that killer instinct. *Nature* 2013; **504**: S13–S15
- Kochenderfer, J. N. *et al.* B-cell depletion and remissions of malignancy along with cytokine-associated toxicity in a clinical trial of anti-CD19 chimeric-antigen-receptor-transduced T cells. *Blood* 2012; **119**: 2709–2720
- Koury, J. *et al.* Immunotherapies: exploiting the immune system for cancer treatment. *J. Immuno. Res.* 2018; **585614**
- Ramos, C. A. *et al.* Clinical and immunological responses after CD30-specific chimeric antigen receptor-redirected lymphocytes. *J. Clin. Invest.* 2017; **127**: 3462–71
- Robbins, P. F. *et al.* Tumor regression in patients with metastatic synovial cell sarcoma and melanoma using genetically engineered lymphocytes reactive with NY-ESO-1. *J. Clin. Oncol.* 2011; **29**: 917–924
- Stroncek, D. F. *et al.* Myeloid cells in peripheral blood mononuclear cell concentrates inhibit the expansion of chimeric antigen receptor T cells. *Cytotherapy* 2016; **18**: 893–901
- Tang, X. Y. *et al.* Third-generation CD28/4-1BB chimeric antigen receptor T cells for chemotherapy relapsed or refractory acute lymphoblastic leukemia: A non-randomised, open-label phase I trial protocol. *BMJ Open*. 2016; **6**: e013904
- Tomuleasa, C. *et al.* Chimeric antigen receptor T-cells for the treatment of B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Front. Immunol.* 2018; **19**: 239
- Zhang, L. *et al.* Evaluation of γ-retroviral vectors that mediate the inducible expression of IL-12 for clinical application. *J. Immunother.* 2013; **35**: 430–439

＜CAR-T細胞療法の作用機序＞



がん抗原特異的CAR遺伝子導入Tリンパ球は、がん細胞に対して傷害作用を示し、がんの縮小などの抗腫瘍効果を引き起こします。

1. Tリンパ球に導入されたCAR遺伝子により、Tリンパ球の細胞表面上にがん抗原特異的CARが発現されます。
2. 発現されたCAR分子は、標的がん細胞の抗原を認識します。
その後、遺伝子導入Tリンパ球内に活性化シグナルが伝達され、細胞傷害性分子の放出等により、患者体内のがん細胞に対する細胞傷害活性を発揮します。

▲ ：CD19 抗原

：遺伝子導入により発現させたキメラ抗原受容体（CAR）

：細胞傷害性分子

・本パンフレットで紹介した製品はすべて研究用として販売しております。ヒト、動物への医療、臨床診断用には使用しないようご注意ください。また、食品、化粧品、家庭用品等として使用しないでください。　・タカラバイオの承認を得ずに製品の再販・譲渡、再販・譲渡のための改変、商用製品の製造に使用することは禁止されています。
・ライセンス情報については弊社ウェブサイトにてご確認ください。　・本パンフレットに記載された社名および製品名は、特に記載がなくても各社の商標または登録商標です。
・本パンフレット記載の価格は2024年2月15日現在の希望小売価格です。価格に消費税は含まれておりません。

2024年2月修正N

タカラバイオ株式会社

東日本支店・西日本支店　TEL 03-3271-8553　FAX 03-3271-7282
関西支店・営業第2部　TEL 077-565-6969　FAX 077-565-6995
テクニカルサポートライン
TEL 077-565-6999　FAX 077-565-6995
Website　https://www.takara-bio.co.jp
Facebook　https://www.facebook.com/takarabio.jp

取扱店