

(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2019-103391
(P2019-103391A)

(43) 公開日 令和1年6月27日(2019.6.27)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 5/0786 (2010.01)	C 1 2 N 5/0786	2 G 0 4 5
A 6 1 P 3/00 (2006.01)	A 6 1 P 3/00	4 B 0 6 3
A 6 1 P 9/10 (2006.01)	A 6 1 P 9/10 1 0 1	4 B 0 6 5
A 6 1 P 19/00 (2006.01)	A 6 1 P 19/00	4 C 0 8 4
A 6 1 P 1/04 (2006.01)	A 6 1 P 1/04	4 C 0 8 5
審査請求 未請求 請求項の数 23 O L (全 32 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2016-80779 (P2016-80779)
(22) 出願日 平成28年4月14日 (2016.4.14)

(71) 出願人 504179255
国立大学法人 東京医科歯科大学
東京都文京区湯島 1-5-4 5
(74) 代理人 100106297
弁理士 伊藤 克博
(74) 代理人 100129610
弁理士 小野 暁子
(72) 発明者 樽木 俊聡
東京都文京区湯島一丁目5番45号 国立
大学法人東京医科歯科大学内
(72) 発明者 川村 俊輔
東京都文京区湯島一丁目5番45号 国立
大学法人東京医科歯科大学内

最終頁に続く

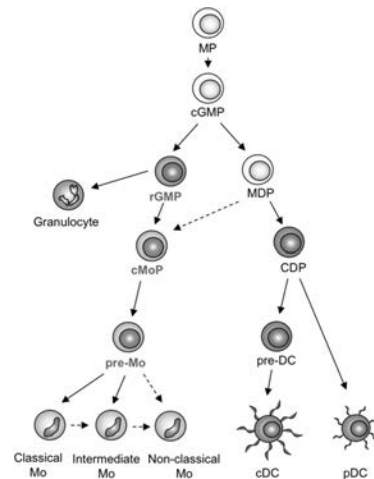
(54) 【発明の名称】 単球系統のみに分化するヒト単球前駆細胞およびその単離方法

(57) 【要約】

【課題】 単球系統以外の細胞には分化せず、かつ増殖能を有する、単離されたヒト単球前駆細胞を提供することを目的とする。

【解決手段】 本発明は、臍帯血試料または骨髓試料から、 $Lin^{-}CD34^{+}CD38^{+}CD10^{-}CD123^{int}/^{-}CD45RA^{+}CD135^{+}CLEC12A^{hi}CD64^{hi}$ の細胞を単離することにより、単球分化に限局した前駆細胞を得ることに関する。

【選択図】 図 1 6



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

単球系統以外の細胞には分化せず、かつ増殖能を有する、単離されたヒト単球前駆細胞。

【請求項 2】

C L E C 1 2 A および C D 6 4 を発現していることを特徴とする、請求項 1 記載の単離されたヒト単球前駆細胞。

【請求項 3】

C D 3 4 ⁺ C D 3 8 ⁺ C D 1 0 ⁻ C D 1 2 3 ^{i n t / -} C D 4 5 R A ⁺ C D 1 3 5 ⁺ C L E C 1 2 A ^{h i} C D 6 4 ^{h i} の表現型を有することを特徴とする、請求項 1 または 2 記載の単離されたヒト単球前駆細胞。

10

【請求項 4】

臍帯血または骨髄由来の細胞である、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項記載の単離されたヒト単球前駆細胞。

【請求項 5】

ヒト単球前駆細胞の単離方法であって、
単離された臍帯血試料または骨髄試料から、L i n ⁻ C D 3 4 ⁺ C D 3 8 ⁺ C D 1 0 ⁻ C D 1 2 3 ^{i n t / -} C D 4 5 R A ⁺ C D 1 3 5 ⁺ C L E C 1 2 A ^{h i} C D 6 4 ^{h i} の細胞を単離する工程
を含み、該前駆細胞は単球系統以外の細胞には分化せず、かつ該前駆細胞は増殖能を有する、方法。

20

【請求項 6】

単離された臍帯血試料または骨髄試料から、単核細胞 (M N C) を単離する工程、および / または、単離された単核細胞から、L i n ⁻ の細胞を単離する工程を含む、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

単離がフローサイトメトリーを用いて行われる、請求項 5 または 6 記載の方法。

【請求項 8】

共通単球前駆細胞 (c M o P) を死滅させる物質、共通単球前駆細胞 (c M o P) の増殖もしくは分化を阻害する物質、または単球もしくはマクロファージの生成を阻害する物質を有効成分として含む、マクロファージ関連疾患の治療に用いるための医薬組成物。

30

【請求項 9】

有効成分が、低分子、核酸、ポリペプチド、または抗体である、請求項 8 記載の医薬組成物。

【請求項 10】

抗 C L E C 1 2 A 抗体および / または抗 C D 6 4 抗体を有効成分として含む、マクロファージ関連疾患の治療に用いるための医薬組成物。

【請求項 11】

疾患が、癌、骨関連疾患、動脈硬化、線維症、炎症性腸疾患およびメタボリック症候群から成る群より選択される、請求項 8 ~ 10 のいずれか一項記載の医薬組成物。

40

【請求項 12】

抗 C L E C 1 2 A 抗体および / または抗 C D 6 4 抗体を有効成分として含む、癌の治療に用いるための医薬組成物。

【請求項 13】

他の薬剤と組み合わせて使用するための、請求項 12 記載の医薬組成物。

【請求項 14】

抗 C L E C 1 2 A 抗体および / または抗 C D 6 4 抗体を含む、ヒト共通単球前駆体細胞 (c M o P) の標識または単離に使用するためのキット。

【請求項 15】

単球の生成を阻害する物質のスクリーニング方法であって、

50

試験物質を含む単球分化培地中でヒト c M o P を培養する工程、および
試験物質が単球の生成を阻害するか否かを評価する工程
を含む、方法。

【請求項 16】

破骨細胞の生成を阻害する物質のスクリーニング方法であって、
試験物質を含む破骨細胞分化培地中でヒト c M o P を培養する工程、および
試験物質が破骨細胞の生成を阻害するか否かを評価する工程
を含む、方法。

【請求項 17】

ヒト c M o P の分化、増殖または生存に影響する物質のスクリーニング方法であって、
試験物質を含む培地中でヒト c M o P を培養する工程、および
試験物質がヒト c M o P の分化、増殖または生存に影響するか否かを評価する工程
を含む、方法。

10

【請求項 18】

ヒト c M o P の分化、増殖または生存に影響する抗体のスクリーニング方法であって、
ヒト c M o P の細胞表面に発現する分子を同定する工程、
該細胞表面分子に特異的な抗体を取得する工程、
該抗体を含む培地中でヒト c M o P を培養する工程、および
該抗体がヒト c M o P の分化、増殖または生存に影響するか否かを評価する工程
を含む、方法。

20

【請求項 19】

ヒト単球を有するマウスの作製方法であって、
免疫不全マウスの骨髄にヒト c M o P を移植する工程
を含む、方法。

【請求項 20】

ヒト F l t 3 L、T P O、S C F および M - C S F をマウスに投与する工程、および /
または、ヒト腫瘍細胞をマウスに移植する工程をさらに含む、請求項 19 記載の方法。

【請求項 21】

ヒト c M o P が遺伝子改変されていることを特徴とする、請求項 19 ~ 20 のいずれか
一項記載の方法。

30

【請求項 22】

ヒト単球を有し、ヒト顆粒球は有さないマウス。

【請求項 23】

C D 3 4 ⁺ C D 3 8 ⁺ C D 1 0 ⁻ C D 1 2 3 ^{i n t / -} C D 4 5 R A ⁺ C D 1 3 5 ⁺ C
L E C 1 2 A ^{h i} C D 6 4 ^{h i} の表現型を有するヒト単球前駆細胞を 7 5 % 以上、8 0 %
以上、8 5 % 以上、9 0 % 以上、9 5 % 以上、9 8 % 以上、または 9 9 % 以上含む、単離
された細胞集団。

【発明の詳細な説明】

40

【技術分野】

【0001】

本発明は、ヒト単球前駆細胞、その単離方法、およびその使用方法等に関する。

【背景技術】

【0002】

単球、マクロファージおよび樹状細胞 (D C) を含む単核系貪食細胞 (M P) は、組織
恒常性や免疫反応において中心的な役割を担っている。正常組織に常在するマクロファ
ージの大部分は胎生期の前駆細胞に由来するものであるが、腸管、心臓、肺、乳腺、真皮お
よび骨におけるマクロファージの一部は単球に由来する。

【0003】

50

さらに、炎症は、組織に浸潤した単球の単球由来マクロファージや樹状細胞への分化を促進し、それらは恒常的生体防御反応や炎症性疾患に關与する。マウス単球は、古典的 $Ly6c^{hi}$ 単球と非古典的 $Ly6c^{lo}$ 単球に分類される。 $Ly6c^{lo}$ 単球は血中のみに存在するが、 $Ly6c^{hi}$ 単球は血液および他の組織にも存在し、そこでマクロファージや樹状細胞に分化する。また、ほとんどの $Ly6c^{lo}$ 単球は $Ly6c^{hi}$ 単球に由来すると考えられている。ヒト単球は、古典的 $CD14^+CD16^-$ 単球、中間型 $CD14^+CD16^+$ 単球、そして非古典的 $CD14^{lo}/-CD16^+$ 単球に分類される。機能的解析や遺伝子発現解析によって、ヒト $CD14^+CD16^-$ 単球と $CD14^{lo}/-CD16^+$ 単球のカウンターパートはそれぞれマウス $Ly6c^{hi}$ 単球と $Ly6c^{lo}$ 単球であることが示されている。

10

【0004】

単球は、骨髓 (BM) 中で造血幹細胞 (HSC) から連続的な中間前駆細胞を経て分化する。単球系細胞に限局した分化能を有する共通単球前駆細胞 (cMOP) がマウスにおいて同定された (非特許文献1)。これら cMOP は単球 - 樹状細胞前駆細胞 (MDP) に由来すると考えられている (非特許文献2)。ヒトでは、IL-3 受容体 ($CD123$)、Flt3 ($CD135$)、および $CD45RA$ の発現パターンの違いを指標にして、共通ミエロイド前駆細胞 (CMP)、赤芽球系前駆細胞 (MEP)、および顆粒球 - 単球前駆細胞 (GMP) が同定された。また最近、ヒト MDP が GMP 分画中に同定された (非特許文献3)。

20

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0005】

【非特許文献1】Hettinger, J. et al. Origin of monocytes and macrophages in a committed progenitor. Nat. Immunol. 14, 821-830 (2013).

【非特許文献2】Fogg, D. K. et al. A clonogenic bone marrow progenitor specific for macrophages and dendritic cells. Science 311, 83-87 (2006).

【非特許文献3】Lee, J. et al. Restricted dendritic cell and monocyte progenitors in human cord blood and bone marrow. J. Exp. Med. 212, 385-399 (2015).

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

30

【0006】

ヒトの GMP および MDP が存在することから、単球系統の細胞のみに分化し他のいかなる造血系細胞にも分化しないヒト cMOP が下流に存在すると考えられていたが、これまでヒト cMOP は単離されていなかった。一方、メタボリックシンドロームや癌などの疾患病態形成および維持を担うマクロファージの多くは骨髓単球由来であることが知られており、これら疾患の治療薬および治療方法等の開発のためにも、単球系統のみに分化するヒト cMOP の単離と同定が強く求められていた。

【0007】

$Lin^-CD34^+CD38^+CD10^-CD123^{lo}CD135^+CD45RA^+$ の細胞として定義される従来型ヒト顆粒球 - 単球前駆細胞 (以下、cGMP) は、顆粒球 - 単球前駆細胞を含むが、T細胞等のリンパ系に分化できる細胞も一部含んでいる。また、単球 - DC 系統のみに分化する前駆細胞であるヒト MDP が、cGMP 分画中に同定されている (非特許文献3)。すなわち、cGMP は、実際には真の GMP と他の前駆細胞との混合集団であるといえる。そこで、本発明は、真の GMP を同定し、さらに、単球系統にのみ分化する cMOP を提供することを目的の一つとする。

40

【課題を解決するための手段】

【0008】

本発明の態様は以下の事項に関する。

1. 単球系統以外の細胞には分化せず、かつ増殖能を有する、単離されたヒト単球前駆細胞。

50

2. CLEC12AおよびCD64を発現していることを特徴とする、上記1記載の単離されたヒト単球前駆細胞。
3. CD34⁺CD38⁺CD10⁻CD123^{int}/⁻CD45RA⁺CD135⁺CLEC12A^{hi}CD64^{hi}の表現型を有することを特徴とする、上記1または2記載の単離されたヒト単球前駆細胞。
4. 臍帯血または骨髄由来の細胞である、上記1～3のいずれか一項記載の単離されたヒト単球前駆細胞。
5. ヒト単球前駆細胞の単離方法であって、
単離された臍帯血試料または骨髄試料から、Lin⁻CD34⁺CD38⁺CD10⁻CD123^{int}/⁻CD45RA⁺CD135⁺CLEC12A^{hi}CD64^{hi}の細胞を単離する工程
10
を含み、該前駆細胞は単球系統以外の細胞には分化せず、かつ該前駆細胞は増殖能を有する、方法。
6. 単離された臍帯血試料または骨髄試料から、単核細胞(MNC)を単離する工程、および/または、単離された単核細胞から、Lin⁻の細胞を単離する工程を含む、上記5に記載の方法。
7. 単離がフローサイトメトリーを用いて行われる、上記5または6記載の方法。
8. 共通単球前駆細胞(cMOP)を死滅させる物質、共通単球前駆細胞(cMOP)の増殖もしくは分化を阻害する物質、または単球もしくはマクロファージの生成を阻害する物質を有効成分として含む、マクロファージ関連疾患の治療に用いるための医薬組成物。
20
9. 有効成分が、低分子、核酸、ポリペプチド、または抗体である、上記8記載の医薬組成物。
10. 抗CLEC12A抗体および/または抗CD64抗体を有効成分として含む、マクロファージ関連疾患の治療に用いるための医薬組成物。
11. 疾患が、癌、骨関連疾患、動脈硬化、線維症、炎症性腸疾患およびメタボリック症候群から成る群より選択される、上記8～10のいずれか記載の医薬組成物。
12. 抗CLEC12A抗体および/または抗CD64抗体を有効成分として含む、癌の治療に用いるための医薬組成物。
13. 他の薬剤と組み合わせて使用するための、上記12記載の医薬組成物。
14. 抗CLEC12A抗体および/または抗CD64抗体を含む、ヒト共通単球前駆細胞(cMOP)の標識または単離に使用するためのキット。
30
15. 単球の生成を阻害する物質のスクリーニング方法であって、
試験物質を含む単球分化培地中でヒトcMOPを培養する工程、および
試験物質が単球の生成を阻害するか否かを評価する工程
を含む、方法。
16. 破骨細胞の生成を阻害する物質のスクリーニング方法であって、
試験物質を含む破骨細胞分化培地中でヒトcMOPを培養する工程、および
試験物質が破骨細胞の生成を阻害するか否かを評価する工程
を含む、方法。
17. ヒトcMOPの分化、増殖または生存に影響する物質のスクリーニング方法であって、
試験物質を含む培地中でヒトcMOPを培養する工程、および
試験物質がヒトcMOPの分化、増殖または生存に影響するか否かを評価する工程
40
を含む、方法。
18. ヒトcMOPの分化、増殖または生存に影響する抗体のスクリーニング方法であって、
ヒトcMOPの細胞表面に発現する分子を同定する工程、
該細胞表面分子に特異的な抗体を取得する工程、
該抗体を含む培地中でヒトcMOPを培養する工程、および
該抗体がヒトcMOPの分化、増殖または生存に影響するか否かを評価する工程
50

を含む、方法。

19. ヒト単球を有するマウスの作製方法であって、
免疫不全マウスの骨髄にヒトcMOPを移植する工程

を含む、方法。

20. ヒトFlt3L、TPO、SCFおよびM-CSFをマウスに静脈内投与する工程、および/または、ヒト腫瘍細胞をマウスに移植する工程をさらに含む、上記19記載の方法。

21. ヒトcMOPが遺伝子改変されていることを特徴とする、上記19~20のいずれか一項記載の方法。

22. ヒト単球を有し、ヒト顆粒球は有さないマウス。

23. CD34⁺CD38⁺CD10⁻CD123^{int}/CD45RA⁺CD135⁺CLEC12A^{hi}CD64^{hi}の表現型を有するヒト単球前駆細胞を75%以上、80%以上、85%以上、90%以上、95%以上、98%以上、または99%以上含む、単離された細胞集団。

24. ヒト患者におけるマクロファージ関連疾患の治療方法であって、該ヒト患者に対して共通単球前駆細胞(cMOP)を死滅させる物質、共通単球前駆細胞(cMOP)の増殖もしくは分化を阻害する物質、または単球もしくはマクロファージの生成を阻害する物質を有効成分として含む組成物を投与する工程を含む、治療方法。

25. 有効成分が、低分子、核酸、ポリペプチド、または抗体である、上記24記載の治療方法。

26. ヒト患者におけるマクロファージ関連疾患の治療方法であって、該ヒト患者に対して抗CLEC12A抗体および/または抗CD64抗体を投与する工程を含む、治療方法。

27. 疾患が、癌、骨関連疾患、動脈硬化、線維症、炎症性腸疾患およびメタボリック症候群から成る群より選択される、上記24~26のいずれか記載の治療方法。

28. ヒト患者における癌の治療方法であって、該ヒト患者に対して抗CLEC12A抗体および/または抗CD64抗体を投与する工程を含む、治療方法。

29. 併用剤として他の薬剤を投与する工程を含む、上記28記載の治療方法。

30. マクロファージ関連疾患の治療に用いるための医薬の製造における、共通単球前駆細胞(cMOP)を死滅させる物質、共通単球前駆細胞(cMOP)の増殖もしくは分化を阻害する物質、または単球もしくはマクロファージの生成を阻害する物質の使用。

31. 前記物質が、低分子、核酸、ポリペプチド、または抗体である、上記30記載の使用。

32. マクロファージ関連疾患の治療に用いるための医薬の製造における、抗CLEC12A抗体および/または抗CD64抗体の使用。

33. 疾患が、癌、骨関連疾患、動脈硬化、線維症、炎症性腸疾患およびメタボリック症候群から成る群より選択される、上記30~32のいずれか記載の使用。

34. 癌の治療に用いるための医薬の製造における、抗CLEC12A抗体および/または抗CD64抗体の使用。

35. 前記医薬が他の薬剤と組み合わせて用いるためのものである、上記34記載の使用。

【発明の効果】

【0009】

本発明の一態様によると、単球系統以外の細胞に分化せずかつ増殖能を有する、単離されたヒト単球前駆細胞(ヒトcMOP)を提供することができる。

【図面の簡単な説明】

【0010】

【図1】従来型ヒトGMP(cGMP)のサブセットを示す(後述の<例1>参照)。(a)ヒトのUCBからのLin⁻MNCをFCMによって解析した結果を示す。(b)BMおよびPBからのLin⁻MNCをFCMによって解析した結果を示す。(c)各UC

10

20

30

40

50

B 垂集団のミエロイドコロニー形成能を示す。(d) 各UCB前駆細胞のDiff-Quick染色の結果を表す。

【図2】cGMP垂集団のミエロイド系およびリンパ球系細胞への分化能を示す(〈例2〉参照)。(a) ex vivoにおける、R1~R5分画からの単球およびDC分化を表す。(b) 各分画における細胞の種類の割合を示す。(c) 各分画のex vivoにおけるT細胞への分化能を表す。(d) 各分画のex vivoにおけるNK細胞への分化能を表す。

【図3】単一細胞レベルでのヒトcMoPおよびrGMPの解析結果を示す(〈例3〉参照)。(a) cMoP由来の代表的なコロニーのFCMプロファイルを示す。(b) rGMP由来の代表的なコロニーのFCMプロファイルを示す。(c) FCMによって検出された単球および/または顆粒球コロニーの比率を表す。(d) cMoPの限界希釈解析の結果を表す。(e) rGMPの限界希釈解析の結果を表す。

【図4】ヒトcMoPおよびrGMPの増殖能を示す図である(〈例4参照〉)。(a) CFSEで標識した各分画の細胞の増殖能を示す図である。(b) CFSE標識せずに(a)と同様にして培養し、各細胞から回収された細胞数を表す。(c)「単離後間もない」各細胞集団におけるKi67発現のFCMプロファイルを示す。

【図5】ヒトcMoPとrGMPのin vivoにおける分化能の評価結果を示す(〈例5〉参照)。(a) In vivoにおけるcMoPとrGMPの分化能を評価するためのアッセイ系を示す。(b) 骨髄における子孫細胞のFCMプロファイルを示す。(c) cMoPとrGMPの分化後の細胞種の割合を示す。(d) cMoP由来の単球およびrGMP由来の、単球および顆粒球をDiff-Quick染色した結果を示す。

【図6】プレ単球、cMoPおよびrGMPの分化関係を示す(〈例6〉参照)。(a) 数字はソーティングしたcMoPとrGMPの純度を表す。(b) ソーティングしたrGMPと(c) cMoPの発生段階を解析した。

【図7】CMP、rGMP、cMoP、プレ単球、cMoP由来単球、およびPB単球の転写解析の結果を示す(〈例7〉参照)。(a) 表示の細胞における単球特異的遺伝子のRNA発現のヒートマップ(log₂)を表す。(b) 表示の細胞集団における単球の分化に關与する転写因子の相対的mRNAレベルを示す。(c) 細胞遊走に關与するケモカイン受容体の相対的mRNAレベルを示す。(d) 表示の細胞集団における規準化された遺伝子発現プロファイルの主成分分析の結果を示す。(e) cMoP-MoまたはPB-Moからの表示の細胞集団のユークリッド距離を表す。(f) 各細胞集団におけるヒト血液単球シグネチャの比較を示す図である。

【図8】R1、R2、R3分画のFCMによる分析の結果を示す(〈例1〉参照)。

【図9】顆粒球、単球、および樹状細胞のサブセットを検出するためのゲーティング戦略を示す(〈例2〉参照)。

【図10】R1、R2、R3分画から生じる単球由来樹状細胞への分化の様子を表す(〈例2〉参照)。

【図11】R4およびR5分画のリンパ球系分化能を示す図である(〈例2〉参照)。

【図12】R1~R5分画のサイトカイン受容体の発現パターンを示す図である(〈例2〉参照)。

【図13】マウスのcMoPとGMP上のCLEC12AとCD64の発現パターンを示す図である(〈例2〉参照)。

【図14】MDPとR2~R5分画との表現型の比較を示す図である(〈例2〉参照)。

【図15】各前駆細胞におけるDC特異的遺伝子のRNA発現のヒートマップ(log₂)を示す図である(〈例7〉参照)。

【図16】改訂版のヒトのミエロイド系細胞分化経路を模式的に示した図である。

【発明を実施するための形態】

【0011】

まず、本明細書において用いた略語とその意味を以下に記載する。また、明示的な記載がない場合は、下記の組織や細胞等はヒトのものを表すものとする。

10

20

30

40

50

B M : 骨髄 (bone marrow)
 c D C : 従来型樹状細胞 (conventional dendritic cell)
 C D P : 共通 D C 前駆細胞 (common DC progenitor)
 C M P : 共通骨髄系前駆細胞 (common myeloid progenitor)
 c G M P : 従来型顆粒球-単球前駆細胞 (conventional granulocyte-monocyte progenitor s)
 c M O P : 共通単球前駆細胞 (common monocyte progenitor)
 D C : 樹状細胞 (dendritic cell)
 E : 赤芽球 (erythrocyte)
 F C M : 多重染色フローサイトメトリー (multi-color flow cytometry) 10
 G : 顆粒球 (granulocyte)
 G E M M : 顆粒球 - 赤芽球 - マクロファージ - 巨核球 (granulocyte-erythrocyte-macrophage-megakaryocyte)
 G M : 顆粒球-マクロファージ (granulocyte-macrophage)
 G M D P : 顆粒球-単球-DC前駆細胞 (granulocyte-monocyte-DC progenitor)
 M D P : 単球 - D C 前駆細胞 (monocyte-DC progenitor)
 M L P : 多能リンパ球前駆細胞 (multi-lymphoid progenitor)
 M N C : 単核細胞 (mononuclear cell)
 m o D C : 単球由来樹状細胞 (monocyte-derived dendritic cell)
 M P : 単核食細胞 (Mononuclear phagocytes) 20
 P B : 末梢血 (peripheral blood)
 p D C : 形質細胞様樹状細胞 (plasmacytoid dendritic cell)
 p r e M o、p r e - M o n o : プレ単球 (pre-monocyte)
 r G M P : 修正型 G M P 集団 (revised GMP population)
 T P O : トロンボポエチン (thrombopoietin)
 U C B : 臍帯血 (umbilical-cord blood)

【0012】

< ヒト単球前駆細胞 >

本発明の単離されたヒト単球前駆細胞 (単に「c M o P」とも記載する) は、単球系統以外の細胞には分化せず、かつ増殖能を有する。ここで、「単球系統以外の細胞には分化しない」とは、顆粒球、樹状細胞、リンパ球には直接的に分化せず、単球系統の細胞 (例えば、プレ単球、単球、マクロファージ、単球由来樹状細胞) にのみ分化する細胞であることを意味する。すなわち、本発明の単離されたヒト単球前駆細胞は、G M Pとは異なり、顆粒球への分化能は有していない。また、「増殖能を有する」とは、c M o Pが細胞分裂を行い、細胞の数を増やすことができることを意味する。なお、細胞数が全体として増加を続ける限り、c M o Pの一部が、プレ単球、単球、マクロファージ等に分化してもよい。よって、別の言い方をすれば、本発明の単離されたヒト単球前駆細胞は、顆粒球への分化能を有さず、かつ増殖能を有する、単球の前駆細胞である。 30

【0013】

上述のとおり、従来型 G M P (c G M P) は、L i n⁻ C D 3 4⁺ C D 3 8⁺ C D 1 0⁻ C D 1 2 3¹ C D 1 3 5⁺ C D 4 5 R A⁺ の細胞として定義されるが、これは真の G M P と他の前駆細胞との混合集団であると考えられる。 40

【0014】

本発明者らは、ヒトの c G M P 集団を細分化して c M o P を同定するために、C 型レクチンファミリー (C L E C 9 A、C L E C 1 2 A、D C - S I G N など)、サイトカイン受容体 (C D 1 1 5、C D 1 1 6 など)、ケモカイン受容体 (C X 3 C R 1、C X C R 4 など)、およびその他 (C D 6 4 など) を含む、ヒトの単球、マクロファージ、および D C 上に発現している様々な細胞表面マーカーをスクリーニングした。細分化した集団の i n v i t r o 培養結果と組み合わせて、本発明者らは、c G M P を細分化して c G M P 中の c M o P 分画を同定するために有用なマーカーとして C D 6 4 と C L E C 1 2 A を同 50

定した。

【0015】

より詳細には、本発明者らは、ヒトのcMoPを同定するため、単球とマクロファージにおいて発現しているFcγRIIA(CD64)とC型レクチンCLEC12Aの発現に焦点を絞り、これらのマーカーを使用して、従来型GMP(cGMP)を細分化して詳細に検討し、4つの亜集団に分割した。各亜集団について詳細な検討を行った結果、CLEC12A^{hi}CD64^{hi}亜集団(CLEC12AとCD64を高く発現している集団)をcMoPとして同定した。また、cGMPに含まれるCLEC12A^{hi}CD64^{int}細胞のサブセットを、修正型(真の)ヒトGMP(rGMP)として再定義した。後述の実施例で示すとおり、rGMPは顆粒球と単球を生じるが、DCまたはリンパ球には分化しない。cGMP集団のCD64⁻分画のみが、DCとリンパ球への分化能を有する。本発明者は、マイクロアレイデータを用いた複数の遺伝子の発現分析により、rGMPからcMoP、プレ単球、そして単球が連続的に生じるが、おそらく、この過程はMDPとは無関係であることを明らかにした。本発明者らにより同定されたヒトcMoPと真のGMP(rGMP)およびこれらに関する分析は、ヒト骨髄系細胞分化経路に関する新たな知見をもたらすものである。

10

【0016】

本発明のcMoPは、CD34⁺CD38⁺CD10⁻CD123^{int}/⁻CD45RA⁺CD135⁺CLEC12A^{hi}CD64^{hi}の表現型を有する。また、本発明のヒトのcMoPはヒトの臍帯血中および骨髄中に存在するが、末梢血中には検出されない。

20

【0017】

実施例で詳細に示すように、本発明者らは、ヒトcMoPとrGMPを同定し、さらにこれらの特性等を詳細に調べ、ミエロイド系細胞発生経路を見直した(図16)。この見直された経路では、rGMPが顆粒球とcMoPとに分化し、cMoPがプレ単球を介して全ての単球サブセットを生成する。

【0018】

上述のとおり、本発明のcMoPは、単球系統のみに分化する前駆細胞であり、かつ増殖能を有する。また、cMoPはヒトの臍帯血中および骨髄中に存在するが、末梢血中には検出されない。最近のマウスを用いた研究から、組織に常在し恒常性維持を担うマクロファージの大部分は胎生期(卵黄嚢・肝)由来であるが、メタボリックシンドロームや癌などの疾患病態形成および維持を担うマクロファージの多くは骨髄単球由来であることが明らかになっている。例えば、動脈硬化の原因である血管内プラーク形成を担うマクロファージ、肥満脂肪組織形成に関わるマクロファージ、炎症性骨破壊を担う破骨細胞、癌組織内に存在する免疫抑制性マクロファージ(Tumor associated macrophage, TAM)などは骨髄単球由来である。よって、本発明のcMoPは単球の源になる前駆細胞であることから、cMoP特異的マーカーを標的とした上記疾患の治療法開発に使用できる。また、細胞分化系譜上、cMoPを標的としたり除去したりしたとしても樹状細胞分化には影響を与えないことから、易感染性などの懸念事項も極めて限定的にすることができる。

30

40

【0019】

<ヒト単球前駆細胞の単離方法>

本発明の一態様は、ヒト共通単球前駆細胞(cMoP)の単離方法に関する。該単離方法は、単離された臍帯血試料または骨髄試料から、CLEC12AおよびCD64を高発現している細胞を単離する工程を含み、特にLin⁻CD34⁺CD38⁺CD10⁻CD123^{int}/⁻CD45RA⁺CD135⁺CLEC12A^{hi}CD64^{hi}の細胞を単離する工程を含むことが好ましい。なお、細胞表面マーカーの発現の有無(陽性/陰性)および量(強度)の高低を表す記号(+/-/hi/int/lo等)の意味は、当該技術分野において公知であり、当業者であれば、フローサイトメトリー等の機器を適切に設定して、目的とする細胞を単離することが可能である。例えば、CLEC12A^{hi}

50

CD64^{hi}の細胞は、図1aに示されるように、cGMP中の他の亜集団と比較して最も高いCLEC12AとCD64の発現を有する分画である。このような分画は、例えば、フローサイトメーターとしてBDバイオサイエンス社製のBD FACSAria（登録商標）IIIセルソーターを使用し、ゲート条件を「Lin⁻CD34⁺CD38⁺CD10⁻CD123^{int}/⁻CD45RA⁺CD135⁺CLEC12A^{hi}CD64^{hi}」と設定することで、cGMP集団から単離可能である。なお、ゲート条件は、必要とする細胞の数、純度に応じて適当に調整することもできる。該単離方法は、さらに、単離された臍帯血試料または骨髄試料から単核細胞（MNC）を単離する工程、および/または、単離された単核細胞から、Lin⁻の細胞を単離する工程を含むことがより好ましい。

10

【0020】

本発明のヒト単球前駆細胞の単離方法は、一態様として、

（工程1）：単離された臍帯血試料または骨髄試料から、単核細胞（MNC）を単離する工程と、

（工程2）：工程1で単離された単核細胞から、Lin⁻の細胞を単離する工程と、

（工程3）：工程2で単離されたLin⁻の細胞からLin⁻CD34⁺CD38⁺CD10⁻CD123^{int}/⁻CD45RA⁺CD135⁺CLEC12A^{hi}CD64^{hi}の細胞を単離する工程のうち、少なくとも1つの工程を含むのが好ましく、2つ以上の工程を含むのがより好ましく、すべての工程を含むのがさらに好ましい。工程1～工程3のうち、少なくとも工程3を含むのが好ましい。

20

【0021】

細胞の単離は、例えば、磁気分離またはフローサイトメトリーを用いて行うことができる。

【0022】

臍帯血試料または骨髄試料から、単核細胞（MNC）を単離する方法としては、例えば、リンパ球分離溶液を使用した密度勾配遠心による方法等が挙げられる。

【0023】

「Lin⁻」とは、分化抗原が陰性であることを意味し、既知の成熟血液系細胞（T細胞、B細胞、NK細胞、ミエロイド系細胞、赤芽球系細胞など）で発現している特定の表面抗原を有していないこと、すなわち該表面抗原を細胞表面に発現していないことをいい、本発明においては、CD2、CD3、CD11b、CD16、CD19、CD56およびCD235abが陰性であることをいう。Lin⁻の細胞を単離する方法としては、実施例に記載の方法を挙げることができる。

30

【0024】

Lin⁻CD34⁺CD38⁺CD10⁻CD123^{int}/⁻CD45RA⁺CD135⁺CLEC12A^{hi}CD64^{hi}の細胞を単離することにより、単球系統以外の細胞には分化せず、かつ増殖能を有するヒトcMoPを得ることができる。なお、本発明に係るヒトcMoPは、必ずしも100%の純度で単離されている必要はなく、CD34⁺CD38⁺CD10⁻CD123^{int}/⁻CD45RA⁺CD135⁺CLEC12A^{hi}CD64^{hi}の表現型を有するヒト単球前駆細胞を75%以上、80%以上、85%以上、90%以上、95%以上、98%以上、または99%以上含む細胞集団もまた、本発明の対象に含まれる。

40

【0025】

<ヒトcMoPの増殖方法>

本発明のヒト単球前駆細胞（cMoP）は、増殖能を有する。ヒトcMoPの増殖方法としては、特に限定されないが、例えば、サイトカインカクテルの存在下で、培地中で培養することが好ましい。サイトカインカクテルに含まれるサイトカインとしては、例えば、hFlt3L、hTPO、hSCF、M-CSF等が挙げられる。培地としては、例えば、メチルセルロース、血清、イスコフ改変ダルベッコ培地、RPMI-1640等を含むことが好ましい。cMoPの播種濃度は、培地中、 1×10^4 個/mL～ 4×10^4 個

50

/mLが好ましく、 1×10^4 個/mL ~ 2×10^4 個/mLがより好ましい。サイトカインカクテルの濃度は、例えば、 $25 \sim 100$ ng/mL程度であることが好ましい。培養温度は、例えば、好ましくは $30 \sim 40$ 、より好ましくは $36 \sim 38$ 、さらに好ましくは 37 である。また、細胞をより好適に維持または増幅する観点から、培地交換を適当な時期に行うことが好ましい。培地交換の頻度としては、細胞を維持または増幅し得る限り特に制限されないが、例えば1~5日間経過毎、好ましくは3日間経過毎としてもよい。培地交換においては、培地の全部を交換してもよいし、一部のみを交換してもよい。また、cMOPの培養においては必要により継代を行ってもよく、継代の頻度としては、細胞を維持または増幅し得る限り特に制限されず、細胞の集団が大きくなってきたタイミングで適宜行うことができ、例えば、4~12日間経過毎、好ましくは6~10日間経過毎とすることができる。

10

【0026】

<ヒトcMOPの分化誘導方法>

本発明のヒト単球前駆細胞(cMOP)は、下流の単球細胞への分化能を有している。単球細胞への分化を誘導する際には、例えば、前駆細胞を10%のFC5、 100 U/mLのペニシリン/ストレプトマイシン、およびサイトカインカクテルを含むイスコフ改変ダルベッコ培地中で培養する。ここで、サイトカインカクテルとしては、hFlt3L、hTPO、およびhSCF(FTS)が使用されうる。単球由来DCを誘導するためには、FTSに加えて、GM-CSFを補充した培地中で細胞を培養することができる。

20

【0027】

<医薬組成物>

本発明の一態様は、共通単球前駆細胞(cMOP)を死滅させる物質、共通単球前駆細胞(cMOP)の増殖もしくは分化を阻害する物質、または単球もしくはマクロファージの生成を阻害する物質を有効成分として含む、マクロファージ関連疾患の治療に用いるための医薬組成物に関する。このような医薬組成物は、有効成分として低分子、核酸(アンチセンスオリゴヌクレオチド、siRNA、アプタマー、リボザイム等)、ポリペプチド、または抗体を含むことができる。また、医薬組成物は、薬学的に許容される担体、安定剤、または賦形剤を含むことができ、その投与経路については、使用する薬剤の種類、投与する対象に応じて、適宜決定することができる。

30

【0028】

本発明の一態様は、抗CLEC12A抗体および/または抗CD64抗体を有効成分として含む、医薬組成物に関する。上述のとおりcMOPは、CLEC12AとCD64を発現していることから、これらの抗体を有効成分として含む医薬組成物は、cMOP特異的マーカーを標的にできるため、単球由来のマクロファージ関連疾患の治療に用いることができる。Clecl2A(Gene Bank accession No.NM_001207010)は、C型レクチンであり死細胞由来の尿酸結晶に結合する。また、細胞内にITIMモチーフを持つ。CD64(Gene Bank accession No.NM_000566、別名FcR1A)は、糖タンパク質であり、ヒトIgG1及びIgG3に結合する。

40

【0029】

抗CLEC12A抗体および/または抗CD64抗体を有効成分として含む医薬組成物は、抗癌剤として用いることができる。単球や腫瘍関連マクロファージ(TAM)の寿命は通常、数日から3週間程度と考えられており、本発明の医薬組成物を用いてcMOPを部分的または完全に除去することにより、腫瘍関連マクロファージ(TAM)も部分的または完全に除去され得ることが当業者には理解される。また、本発明に係る医薬組成物は、併用剤として、他の抗癌剤などの薬物と組み合わせて用いることもできる。

40

【0030】

「抗体」は、ポリクローナルまたはモノクローナルであることができ、任意の適当な生物学的供給源、例えば、マウス、ラット、ヒツジ、およびイヌ科動物から単離することができる。また、抗体は、モノクローナル抗体の消化断片またはその特定部分であってもよい。また、抗体または抗体の断片は、ファージディスプレイ法等によるスクリーニングに

50

よって同定されたペプチド配列を含むものであってもよい。

【0031】

抗体は、キメラ抗体、ヒト化抗体、ヒト抗体のいずれかでありうる。これらの抗体の作製方法は、当業者には既知である。ヒト抗体の作製には、例えば、KMマウス（協和発酵キリン）やXenomouse II（Amgen）を使用することができる。抗体のクラス、サブクラスは特に限定はされないが、好ましくはIgGクラスである。抗体は、好適には、ヒト抗体の定常領域、特にヒトFc領域を有する抗体である。

【0032】

上述の抗体は、好適には、中和活性、抗体依存性細胞障害活性（ADCC）活性、および/または補体依存性細胞傷害（CDC）活性を有する抗体であることができる。抗体のFc領域のアミノ酸残基を改変することでADCC活性やCDC活性を増減させることができる。また、抗体薬物複合体（ADC）等のように、抗体に抗癌剤、放射性物質や細胞毒性物質などを結合させることもでき、さらに、異なる活性または補助機能を与えるために、1つ以上の追加ドメインが結合しているキメラ抗体または融合抗体を作製してもよい。また、上述の抗体は、2種類の抗原を認識する二重特異性抗体であってもよい。

10

【0033】

また、本発明の一態様は、CLEC12Aおよび/またはCD64の発現を減少または増加させることができる、低分子、核酸（アンチセンスオリゴヌクレオチド、siRNA、アプタマー、リボザイム等）、またはポリペプチドを有効成分として含む医薬組成物に関する。例えば、CLEC12Aおよび/またはCD64の発現を減少させることができる有効成分を含む医薬組成物は、単球由来のマクロファージ関連疾患の治療に用いることができ好ましい。

20

【0034】

本明細書において、マクロファージ関連疾患とは、マクロファージの望ましくない活性により引き起こされる（または悪性化する、もしくは難治性となる）疾患を指す。マクロファージ関連疾患としては、特に限定されないが、例えば、癌（免疫抑制、血管新生、転移）、骨関連疾患、神経変性（ALS、MS）、アルツハイマー病、レット症候群、動脈硬化、脂質代謝異常、肺胞蛋白症、喘息、線維症、リウマチ、ループス腎炎、乾癬、炎症性腸疾患、クローン病、糖尿病、肥満およびメタボリック症候群等が挙げられる。癌としては、例えば、血液癌、乳癌、子宮体癌、卵巣癌、前立腺癌、肺癌、胃癌、非小細胞肺癌、頭頸部扁平上皮癌、食道癌、膀胱癌、メラノーマ、大腸癌、腎細胞癌、非ホジキンリンパ腫等が挙げられる。骨関連疾患としては、例えば、骨粗鬆症、大理石骨病、癌の骨転移、変形性関節症、関節リウマチ、高カルシウム血症、骨折、ベーチェット病等が挙げられる。線維症としては、例えば、肺線維症、肝線維症、腎線維症、心筋線維症、皮膚線維症等が挙げられる。炎症性腸疾患としては、例えば、クローン病や潰瘍性、肉芽腫性、虚血性、放射性、感染性結腸炎等の大腸炎が挙げられる。

30

【0035】

<治療方法および医薬の製造における使用>

本発明の一態様は、ヒト患者におけるマクロファージ関連疾患の治療方法に関する。このような方法は、ヒト患者に対して共通単球前駆細胞（cMoP）を死滅させる物質、共通単球前駆細胞（cMoP）の増殖もしくは分化を阻害する物質、または単球もしくはマクロファージの生成を阻害する物質を有効成分として含む組成物を投与する工程を含みうる。有効成分は低分子、核酸、ポリペプチド、または抗体でありうるが、限定はされない。本発明に係る方法は、好ましくは、ヒト患者に対して抗CLEC12A抗体および/または抗CD64抗体を投与する工程を含むものである。マクロファージ関連疾患は、癌、骨関連疾患、動脈硬化、線維症、炎症性腸疾患、またはメタボリック症候群でありうるが、限定はされない。

40

【0036】

本発明の一態様は、ヒト患者における癌の治療方法に関する。このような方法は、ヒト患者に対して抗CLEC12A抗体および/または抗CD64抗体を投与する工程を含み

50

うる。また、本発明に係る方法は、併用剤として、抗癌剤などの他の薬剤を投与する工程を含むこともできる。

【0037】

本発明の一態様は、マクロファージ関連疾患の治療に用いるための医薬の製造における、共通単球前駆細胞(cMoP)を死滅させる物質、共通単球前駆細胞(cMoP)の増殖もしくは分化を阻害する物質、または単球もしくはマクロファージの生成を阻害する物質の使用に関する。用いられる物質は低分子、核酸、ポリペプチド、または抗体でありうるが限定はされない。本発明に係る使用は、好ましくは、マクロファージ関連疾患の治療に用いるための医薬の製造における、抗CLEC12A抗体および/または抗CD64抗体の使用である。マクロファージ関連疾患は、癌、骨関連疾患、動脈硬化、線維症、炎症性腸疾患、またはメタボリック症候群でありうるが、限定はされない。

10

【0038】

本発明の一態様は、癌の治療に用いるための医薬の製造における、抗CLEC12A抗体および/または抗CD64抗体の使用に関する。また、製造される医薬は、併用剤として、抗癌剤などの他の薬剤と組み合わせて用いるためのものであってもよい。

【0039】

<キット>

本発明の一態様は、抗CLEC12A抗体および/または抗CD64抗体を含む、ヒト共通単球前駆細胞(cMoP)の標識または単離に使用するためのキットに関する。キットは、さらに、標識物、試薬、反応容器、取扱説明書等を含んでもよい。

20

【0040】

<ヒト単球前駆細胞の使用>

本発明のcMoPは単球由来マクロファージに関連する疾患の治療方法等の開発において、スクリーニング等に用いることができる。cMoPの使用方法について、例えば下記の態様が挙げられる。なお、下記のスクリーニング等において、cMoPの分化および増殖の促進または抑制、単球の生成の促進または抑制、腫瘍随伴マクロファージ(TAM)への分化・機能の阻害等については、当業者に公知の任意の手法により評価することができる。

【0041】

(a) ヒトcMoPを単離してマイクロアレイ解析を行い、cMoPに発現する細胞表面分子を抽出して、同分子に対する抗体を作成する。同抗体を用いて、cMoP、単球、腫瘍随伴マクロファージ(TAM)への分化・機能を阻害するものを同定する。

30

【0042】

具体的には、例えば、

ヒトcMoPの細胞表面に発現する分子を同定する工程、

該細胞表面分子に特異的な抗体を取得する工程、

該抗体を含む培地中でヒトcMoPを培養する工程、および

該抗体がヒトcMoPの分化、増殖または生存に影響するか否かを評価する工程

を含む、ヒトcMoPの分化、増殖または生存に影響する抗体のスクリーニング方法が挙げられる。

40

【0043】

ここで、ヒトcMoPの分化、増殖または生存に「影響する」とは、ヒトcMoPの分化、増殖もしくは生存を促進する、または抑制することを指す。ヒトcMoPの分化、増殖または生存を促進すること、または抑制することは、当業者に公知の任意の手法により評価することができる。

【0044】

また、別の態様として、

試験物質を含む培地中でヒトcMoPを培養する工程、および

試験物質がヒトcMoPの分化、増殖または生存に影響するか否かを評価する工程

を含む、ヒトcMoPの分化、増殖または生存に影響する物質のスクリーニング方法も挙

50

げられる。試験物質としては、各種サイトカイン、抗体、ポリペプチド、ポリヌクレオチド、低分子化合物などが使用されうる。

【0045】

(b) ヒトcMoPを単離して、*in vitro*で単球に分化誘導する培養系を用いて、cMoPから単球への分化機構を解明する。さらに、同培養系に各種サイトカイン、抗体、ポリペプチド、ポリヌクレオチド、低分子化合物などの試験物質を添加して、単球への分化を阻害または促進するものをスクリーニングする。

【0046】

具体的には、

試験物質を含む単球分化培地中でヒトcMoPを培養する工程、および試験物質が単球の生成を阻害するか否かを評価する工程を含む、単球の生成を阻害する物質のスクリーニング方法が挙げられる。

10

【0047】

(c) ヒトcMoPを単離して、*in vitro*で破骨細胞に分化誘導する培養系に各種サイトカイン、抗体、ポリペプチド、ポリヌクレオチド、低分子化合物などの試験物質を添加して、破骨細胞への分化を阻害または促進するものをスクリーニングする。

【0048】

具体的には、

試験物質を含む破骨細胞分化培地中でヒトcMoPを培養する工程、および試験物質が破骨細胞の生成を阻害するか否かを評価する工程を含む、破骨細胞の生成を阻害する物質のスクリーニング方法が挙げられる。破骨細胞の生成を阻害するか否かは、当業者に公知の任意の手法により評価することができる。

20

【0049】

(d) 上記(b)または(c)のスクリーニングにより選択されたサイトカイン、抗体、低分子化合物等を用いて、*in vivo*評価系で解析を行う。

【0050】

具体的には、臍帯血またはヒトcMoPを、免疫不全動物(NSGマウス、NOGマウス、BRGSマウス、MISTRGマウスなど)に移植して、造血系をヒト由来の細胞に置換した「ヒト化マウス」に、上記抗体や低分子化合物等を投与して、*in vivo*で単球やマクロファージへの分化能を阻害または促進するものをスクリーニングする。さらにヒト腫瘍細胞株を移植して、腫瘍内に浸潤してくる単球、同単球からTAMへの分化、腫瘍の増大などを指標にして、抗体や低分子化合物等の効果を検討する。

30

【0051】

(e) 上記(b)または(c)のスクリーニングにより選択されたサイトカイン、抗体、低分子化合物等について、担癌マウスを用いた*in vivo*評価系で解析を行う。上記抗体や低分子化合物のマウス対応物を用いて、マウスcMoP、単球、TAMを標的として解析する。

【0052】

(f) ヒトcMoPを単離して、MS(質量分析)などを用いて代謝解析を行い、cMoPに特徴的な代謝経路を同定し、同経路を遮断または活性化する、すなわち、cMoPの機能を阻害または促進する低分子薬物の探索を行う。

40

【0053】

(g) ヒトcMoPを単離してマイクロアレイ解析を行い、cMoPに特徴的なマスター調節遺伝子を同定、同遺伝子を用いてiPSからcMoPを誘導し、各種疾患治療に応用する。

【0054】

(h) ヒトcMoPを単離して、*in vitro*でM2マクロファージへの分化を促進するサイトカインや低分子化合物のスクリーニングを行い、炎症性疾患へ治療応用する。

【0055】

50

(i) ヒト c M o P を単離して、単球由来樹状細胞への分化を促進するサイトカインや低分子化合物の探索と各種疾患治療へ応用する。

【0056】

(j) ヒト c M o P を単離して、C R I S P R - C a s 9 などのゲノム編集技術を用いて特定のケモカイン受容体や接着分子遺伝子を削除する。増殖・分化した単球は特定のケモカイン受容体や接着分子遺伝子を発現しないため、特定組織への移入集積のみを抑制することができる。

【0057】

(k) また、本発明の一態様は、免疫不全マウス、好ましくは超免疫不全マウス（例えば、N S G マウス、N O G マウス、B R G S マウス、M I S T R G マウスなど）の骨髓にヒト c M o P を移植する工程を含む、ヒト単球を有するマウスの作製方法に関する。この作製方法により、ヒト単球を有し、ヒト顆粒球は有さないマウスが得られる。さらに、このようなマウスの作製方法は、ヒト F l t 3 L、T P O、S C F および M - C S F をマウスに投与する工程、および/または、ヒト腫瘍細胞をマウスに移植する工程を含んでもよい。該マウスの作製方法に用いられる c M o P は当業者に公知の技術により遺伝子改変されていてもよく、特に、上記(j)に記載の C R I S P R - C a s 9 などの技法により遺伝子改変されたものであってもよい。よって、本発明に係るヒト単球を有するマウスは、遺伝子改変されたヒト単球およびそれに由来する細胞を有しうる。作製されたヒト化マウスは、例えば、上記(d)に記載の i n v i v o 評価系等に用いることができる。

10

【0058】

20

<ヒト単球前駆細胞の細胞医薬としての使用>

単離したヒト c M o P を e x v i v o で増殖させた後、単球系統の細胞の補充を必要とする患者に移植しても良い。その際、e x v i v o で c M o P に遺伝子改変を施してから、患者に移植することもできる。よって、本発明は、ヒト c M o P を含有する医薬組成物も対象としている。単球系統の細胞の補充を必要とする患者の治療方法は、具体的には、例えば、患者から c M o P を単離する工程、場合により c M o P に遺伝子改変を施す工程、および、移植に必要な量が得られるように c M o P を培養する工程、を含むことができる。

【実施例】

【0059】

30

以下、実施例を示して本実施形態を詳細に説明するが、本実施形態は以下の実施例に限定されるものではない。

【0060】

まず、実施例で用いた試料、培養方法および分析方法等について以下説明する。

<試料>

ヒトの臍帯血試料は日本赤十字社関東甲信越臍帯血バンクから提供され、ヒト B M 試料は A l l C e l l s から入手した。

【0061】

<細胞の単離、ソーティング、およびフローサイトメトリー分析>

リンパ球分離溶液 (d = 1 . 0 7 7、ナカライテスク) を使用した密度遠心によって、U C B 由来の新鮮な単核細胞 (M N C) を単離した。次に M N C を C D 2 (R P A - 2 . 1 0)、C D 3 (U C H T 1)、C D 1 1 b (I C R F 4 4)、C D 1 6 (3 G 8)、C D 1 9 (H I B 1 9)、C D 5 6 (H C D 5 6)、C D 2 3 5 a b (H I R 2) (すべて B i o l e g e n d 製)、および C D 1 4 (R M O 5 2) (B e c k m a n C o u l t e r 製) を含む細胞系マーカーに対する P E - C y 5 標識抗体 (A b) と反応させ、さらに抗 C y 5 マイクロビーズ (M i l t e n y i B i o t e c h) と反応させた。a u t o M A C S P r o S e p a r a t o r (M i l t e n y i B i o t e c h) の「d e p l e t e」プログラムを用いて、細胞系マーカーを事前に発現していない細胞 (L i n -) を粗精製した。L i n - 細胞を C D 3 4 (5 8 1 ; A P C - C y 7)、C D 1 0 (H I 1 0 a ; B V 4 1 2)、C D 1 2 3 (6 H 6 ; P e r C P - C y 5 . 5)、C

40

50

D45RA (HI100、BV510)、CD135 (BV10A4H2; PE)、CLEC12A (50C1; FITC)、CD64 (10.1; APC) (すべてBiolegend社製)、およびCD38 (HB7; PE-Cy7) (BD) に対する抗体と反応させた。各前駆細胞におけるサイトカイン受容体の発現を評価するために、Lin⁻細胞をCD34 (APC-Cy7)、CD10 (BV412)、CD123 (PerCP-Cy5.5)、CD45RA (BV510)、CLEC12A (FITC)、CD64 (APC) に対する抗体と、サイトカイン受容体であるCD115 (9-4D2-1E4; PE)、CD116 (4H1; PE)、CD117 (104D2; PE) (すべてBiolegend社製)、またはCD110 (REA250; PE) (Miltenyi Biotech) に対する抗体と反応させた。R1~R5とMDPを比べるために、Lin⁻細胞をCD34 (APC-Cy7)、CD10 (BV412)、CD123 (PerCP-Cy5.5)、CD45RA (BV711)、CLEC12A (FITC)、CD64 (APC)、CD115 (PE)、CD116 (ビオチン)、およびストレプトアビジン (BV510) に対する抗体と反応させた。各前駆細胞の細胞周期状態を評価するために、Lin⁻細胞を転写因子染色バッファーセット (eBioscience) により固定し、CD34 (APC-Cy7)、CD10 (BV412)、CD123 (PerCP-Cy5.5)、CD45RA (BV510)、CLEC12A (PE)、CD64 (APC) (すべてBiolegend製)、CD38 (PE-Cy7)、およびKi67 (B56; FITC) (すべてBD製) に対する抗体で染色した。

10

【0062】

20

< ミエロイド系細胞コロニー形成能アッセイ >

ソーティングした前駆細胞各200個を200 μ lのイスコフ改変ダルベッコ培地中に懸濁し、2 μ lの10ng/ml hTPO (協和醗酵キリン) を加えた2mlのメチルセルロース培地 (Stemcell Technologies製のMethoCult H4435 Enriched) と混合した。細胞懸濁液1mlを12ウェルプレート (二重の実験) の1つのウェルに加え、10日間培養し、そしてマクロファージ (M)、顆粒球/マクロファージ (GM)、顆粒球 (G)、顆粒球/赤芽球/マクロファージ/巨核球 (GEMM)、または赤芽球 (E) の分類に基づいてコロニーを計数した。

【0063】

30

< 形態学的解析 >

形態学的解析のために、ソーティングした前駆細胞各1,000個をスライドガラス上に、700rpmで5分間遠心し密着させた (Thermo Scientific製Cytospin4)。Diff-Quick染色キットを使用し、メーカー推奨の手順 (Sysmex) に従って、細胞を染色した。画像は100倍の倍率で取得した (Leica製DM4500B)。

【0064】

< 細胞の培養と分析 >

ミエロイド系細胞分化アッセイのために、 2×10^3 個の前駆細胞を10%のFCS、100U/mlのペニシリン/ストレプトマイシン (ナカライテスク)、およびサイトカインカクテルを含む50 μ lのIMDM (Sigma) 中で培養した。ここで、本明細書において、サイトカインカクテルとしては、50ng/mlのhFlt3L (Miltenyi Biotech)、50ng/mlのhTPO (協和醗酵キリン)、および100ng/mlのhSCF (Miltenyi Biotech) (FTS条件) が使用される。単球由来DCを誘導するため、FTSと50ng/mlのGM-CSF (Miltenyi Biotech) とを加えた培地中で細胞を培養した。ミエロイド系細胞を検出するために、分化してきた細胞をCD66b (G10F5; PerCP-Cy5.5)、HLA-DR (L243; BV510)、CD14 (M5E2; BV412)、CD16 (3G1; PE-Cy5)、CD123 (6H6; FITC)、CD1c (L161; PE-Cy7)、ストレプトアビジン (APC-Cy7) (すべてBiolegend製)、BDCA-2 (AC144; ビオチン) (Miltenyi Biotech)、

40

50

およびCD11c (B-ly6; APC) (BD) に対する抗体によって染色した。

【0065】

T細胞およびB-NK細胞分化能を評価するために、Tst4/D114およびTst4ストローマ細胞を10%のFCS、100U/mlのペニシリン/ストレプトマイシン(ナカライテスク)、1%の非必須アミノ酸(Gibco)、および1%のビルビン酸ナトリウム(Gibco)を含む100μlのRPMI-1640培地(Sigma)(完全RPMI-1640培地)を用いて96ウェルプレート中で培養した。2日後、各前駆細胞からの細胞10個をストローマ細胞培養プレートに加え、4週間培養し、培地の半分を毎週交換した。培地には、T細胞を誘導するために5ng/mlのFlt3Lと5ng/mlのIL-7(Miltenyi Biotech)を加えた。B-NK細胞を誘導するために100ng/mlのSCF、20ng/mlのIL-7、50ng/mlのTPO、10ng/mlのIL-2(Miltenyi Biotech)を加えた。さらに、2週間の培養の後、細胞を40μm孔径のNitetexメッシュ(日本理化学器械)に通し、適切なサイトカインカクテルを含む完全RPMI-1640培地中の新鮮なストローマ細胞上に移した。4週間の培養後、細胞を回収し、T細胞を検出するためにhCD45およびCD3に対する抗体で染色するか、B-NK細胞を検出するためにhCD45、CD33、CD19、およびCD56に対する抗体で染色した。

10

【0066】

cMoPおよびrGMPの増殖能を評価するために、それぞれの前駆細胞 1×10^3 個をソーティングし、CFSE(Life Technologies)で標識し、2mlのメチルセルロース培地(Stemcell Technologies製MethoCult H4435-Enriched)を用いて7日間培養した。

20

【0067】

FACSAria IIIまたはFACSCanto II(BD)とFlowJoソフトウェア(TreeStar)を用いて、細胞を解析した。

【0068】

<単一細胞解析>

10ng/mlのhTPOと10ng/mlのhFlt3Lを加えた2mlのメチルセルロース培地(Stemcell Technologies製MethoCult H4435-Enriched)を用いて、100個のcMoPまたはrGMPをそれぞれ5日および8日間、培養した。単一のコロニーをP20ピペットを用いてピックアップし、丸底96ウェルプレート中で200μlのPBSに懸濁し、上下に十分にピペッティングした。細胞懸濁液を2,000rpmでスピンドウンし、ミエロイド系細胞の検出のために上述の抗体と反応させた。FACSAria IIIとFlowJoソフトウェア(TreeStar)を用いて、細胞を解析した。

30

【0069】

<In vivo再構築アッセイ>

BRGSマウスにエックス線(0.5Gy)(Faxitron)を照射した。翌日、ソーティングしたcMoPまたはCD64^{int}GMP($5 \times 10^3 \sim 3 \times 10^4$)を10μlのPBS中に懸濁し、カスタマイズしたItoマイクロシリンジ(Ito Corp.)を使用して、BRGSマウスの骨髄腔に直接注入した。同じ日に、ヒト組換え体タンパク質Flt3L(Peprotech)、TPO(協和醗酵キリン)、SCF(Peprotech)、およびM-CSF(Biolegend)(各8μg)を静脈内投与し、これを連続4日間続けた。移植後5日目と7日目にcMoPとrGMP由来の細胞をそれぞれ解析した。

40

【0070】

<マイクロアレイ解析とバイオインフォマティクス>

少なくとも20人のボランティアの臍帯血からcMoP、rGMP、およびCMPをソーティングし、プールした。Ovation(登録商標)PicoWTA System V2(NUGEN Technologies)を用いて、6.622ngの総R

50

NAからcDNAを作製し、増幅させた。増幅したcDNAの収量をNanoDrop ND-2000分光光度計(Thermo Scientific)を用いて測定した。SureTag Complete DNA Labeling Kit(Agilent)を用いて、Cyanine-3(Cy3)標識cDNAを2.0 μ gのcDNAから調製し、その後、DNAの精製および濃縮のためにAmicon Ultra-0.5mL遠心フィルター(Merck Millipore)を用いて濾過した。色素の取り込みとcDNAの収量をNanoDrop ND-2000分光光度計を用いてチェックした。2 μ gのCy3標識cDNAを1xAgilentブロッキング試薬と1xAgilentハイブリダイゼーションバッファーで50 μ lに調整し、回転Agilentハイブリダイゼーションオープン中、65 $^{\circ}$ Cで17時間、SurePrint G3 Human GE 8x60K Microarray Ver2.0(Agilent)にハイブリダイズさせた。ハイブリダイゼーション後、マイクロアレイをGE Wash Buffer 1(Agilent)により室温で1分間洗浄し、そしてGE Wash buffer 2(Agilent)により37 $^{\circ}$ Cで1分間洗浄し、その後、短い遠心により直ちに乾燥させた。8x60kアレイスライド用の単色スキャン設定を用いて、Agilent SureScanマイクロアレイスキャナ(G2600D)上で洗浄の直後にスライドをスキャンした(スキャン面積:61x21.6mm、スキャン解像度:3 μ m、色素チャンネルの設定:緑色、PMTの設定:100%)。バックグラウンドを減算し、空間的な傾きを除去した加工シグナル強度を得るために、デフォルトのパラメーターを使用し、Feature Extraction Software 11.5.1.1(Agilent)を用いて、スキャンした画像を解析した。複数の発現データを抽出するための操作は全て、Takara Bio Incが行った。生データはSubio Platform(ver1.18.4667、Subio Inc.)を用いて解析した。遺伝子セット濃縮解析(GSEA)はGSEA(v.2.2.0 Broad Institute)を用いて実施した。ヒトの血液単球シグネチャは、公表されているマイクロアレイデータ(GSE35459)から抽出した。cMoP、rGMP、およびCMP用の遺伝子セットは、上述のように、マイクロアレイデータから抽出した。

【0071】

<例1:従来型GMP(cGMP)の細分化>

上述のとおり、cGMPは、Lin⁻CD34⁺CD38⁺CD10⁻CD123^{lo}CD135⁺CD45RA⁺の細胞として定義され、主に顆粒球-単球前駆細胞を含むが、T細胞への分化能をもつ細胞も一部含んでいる。加えて、単球-DC系統に限局した前駆細胞であるMDPが最近、cGMP分画中に同定された。そこで、サイトカイン受容体、ケモカイン受容体、およびその他をスクリーニングした結果、本発明者は、ヒトのcGMPサブセットについて調べるためのマーカーとしてC型レクチンCLEC12AとFCR(CD64)を選択した(図1)。いずれのマーカーも、マウスおよびヒトの単球において高発現している。

【0072】

図1aはヒトのUCBからのLin⁻MNC、図1bはヒトのBMおよびPB由来のLin⁻MNCを、フローサイトメーターにより解析した結果をそれぞれ示す。ゲート領域内またはその付近に記載の数値は、各垂集団の頻度を示している。cGMP、CMP、およびMLPは、それぞれCD34⁺CD38⁺CD123^{lo}CD10⁻CD135⁺CD45RA⁺、CD34⁺CD38⁺CD123^{lo}CD10⁻CD135⁺CD45RA⁻、およびCD34⁺CD38⁻CD45RA⁺CD10⁺であった。

【0073】

さらに、CLEC12AとCD64の発現に基づき、多色フローサイトメトリー(FCM)を用いて、ヒト臍帯血(UCB)由来のcGMPをCLEC12A^{hi}CD64^{hi}(R2)、CLEC12A^{hi}CD64^{int}(R3)、CD64⁻CLEC12A⁺(R4)およびCD64⁻CLEC12A⁻(R5)という4つの分画に細分化した(図1a)。また、Lin⁻CD34⁻CD38⁺CD10⁻CD123^{lo}CD135⁺CD

45RA⁺分画中のCLEC12A^{hi}CD64^{hi}分画も定義に加えた(R1)。R1とR2の表現型は、R2細胞がCD34を発現し、R1細胞ではその発現が無い点を除き、同一であった。

【0074】

cGMPを細分化した集団の詳細な表現型は、以下の通りであった：CD34⁻CD38⁺CD123^{lo}CD10⁻CD64^{hi}CLEC12A^{hi}CD135⁺CD45RA^{hi}(R1)、CD34⁺CD38⁺CD10⁻CD123^{int}/⁻CD45RA⁺CD135⁺CLEC12A^{hi}CD64^{hi}(R2)、CD34⁺CD38⁺CD10⁻CD123^{int}/⁻CD45RA⁺CD135⁺CLEC12A^{hi}CD64^{int}(R3)、CD34⁺CD38⁺CD10⁻CD123^{int}/⁻CD45RA⁺CD135⁺CD64⁻CLEC12A⁺GMP(R4)、およびCD34⁺CD38⁺CD10⁻CD123^{int}/⁻CD45RA⁺CD135⁺CD64⁻CLEC12A⁻(R5)。

10

【0075】

これら5つの分画(R1~R5)をヒト骨髄(BM)中にも検出した(図1b上段)。一方、ヒト末梢血(PB)においては、それらはほとんど検出されなかった(図1b下段)。

【0076】

R1~R5分画のミエロイド系-赤芽球系分化能を評価するため、上述のミエロイド系細胞コロニー形成能アッセイの方法に基づき、コロニー形成単位(CFU)をex vivoでアッセイした。ソーティングした各前駆細胞(1×10²)をサイトカインカクテルを含むメチルセルロース培地中で培養し、10日後にコロニーをカウントした。比較対照として、Lin⁻CD34⁺CD38⁻CD45RA⁺CD10⁺の多能リンパ球前駆細胞(MLP)とLin⁻CD34⁺CD38⁺CD123^{lo}CD10⁻CD135⁺CD45RA⁻の共通ミエロイド系前駆細胞(CMP)も同様にアッセイした(図1a参照)。図1cに、各UCB亜集団の骨髄コロニー形成能を示す。各バーは、培養した細胞(1×10²)あたりのコロニーの平均数を表し、図中の略号の意味は次のとおりである。M：マクロファージ、GM：顆粒球-マクロファージ、G：顆粒球、E：赤芽球、GEMM：顆粒球-赤芽球-マクロファージ-巨核球。R3分画とR4分画は、マクロファージ(M)、顆粒球-マクロファージ(GM)、および顆粒球(G)コロニーを生じたが、R3分画よりも多くのマクロファージコロニーがR4分画から生じた。興味深いことに、R2分画とR5分画はMコロニーのみを形成し、R1分画はミエロイド系コロニーをわずかに形成した。以前のcGMPの報告から予想されたように、いずれの分画もEあるいはGEMMコロニーを形成しなかった(図1c)。図1dは、各UCB前駆細胞のDiff-Quick染色の結果を表す。元の倍率は100倍であり、スケールバーは10μmを表す。

20

30

【0077】

図8は、R1~R3分画のFCMによる分析結果を表す。本発明者らは、R1~R3分画を再び、CD34/CD38と細胞系マーカー(Lin)/CD34プロファイルについてゲーティングした。図8は、3種の色でそれぞれR1~R3分画を表しており、濃い灰色がR1分画、薄い灰色がR2分画、黒がR3分画を表す。注目すべきことに、R1~R3分画のミエロイド系分化能は、それらのCD34/CD38発現レベル、細胞の大きさ(図8a~c)、および形態(図1d)と相関関係があった。

40

【0078】

R1~R3分画の、CD34/CD38およびリネージ(Lin)/CD34プロファイルを解析したところ、R3分画の細胞はCD34⁺CD38⁺であり、R2分画の細胞はダウンレギュレートされたCD34の発現を示し(CD34^{int}CD38⁺)、R1はCD34をほぼ完全に失っていた(CD34⁻CD38⁺)(図8a、b)。細胞質の体積はR3からR1にかけて徐々に増加していた。これは、それらのCD64発現レベルおよびミエロイド系コロニー形成能とそれぞれ正および負に相関していた(図1b、cお

50

よび図8c)。細胞の形態に関しては、R2～R5分画は核が丸く、拡張しており、細胞質の体積が比較的小さいという典型的な前駆細胞の形態を有していた(図1d)。

【0079】

なお、図1の各データは、aについては少なくとも20回、bにおいて、BMは4回、PBは3回、cおよびdは3回の独立した実験を行った。図8の各データは、3回の独立した実験に基づくものである。

【0080】

これらの結果により、cGMPは、異なるミエロイド系細胞分化能を有する4つの独立の亜集団に分画できることが示された。

【0081】

<例2：ヒトのcMoPおよびrGMPの同定>

例1のとおり、R1～R5分画は、異なるミエロイド系細胞分化能を有していたため、上記のゲーティング戦略を用いて、顆粒球、単球およびDCのサブセットを検出するための*in vitro*培養系を立ち上げた(図9a)。UCBからソーティングした各分画(1×10^3)をFms様チロシンキナーゼ受容体3リガンド(Flt3L)(50ng/mL)、トロンボポエチン(TPO)(50ng/mL)、および幹細胞因子(SCF)(100ng/mL)の存在下(FTS条件)で、2日間(R1)、4日間(R2)または8～10日間(R3～R5)培養し、顆粒球(CD66b⁺)、単球(CD14⁺CD16⁻、CD14⁺CD16⁺およびCD14⁻CD16⁺)、pDC(CD123⁺BDCA-2⁺)およびcDC(CD141^{hi}CD11c⁻およびCD11c⁺CD11c⁺)について分析した。図2aは、*ex vivo*における、R1～R5分画からの単球およびDC分化を表し、図2bは、分画における細胞の種類割合を示す。図2中、CD14⁺CD16⁻単球はCD14⁺monoと記載し、CD14⁺CD16⁺およびCD14⁻CD16⁺単球はCD16⁺monoと記載する。ゲート領域内またはその上の数字は、各分画の割合を示している。R3分画とR4分画は*in vitro*コロニー形成アッセイ(図1c)の結果と一致して顆粒球への分化能を示したが、R1、R2、およびR5分画は顆粒球への分化能を示さなかった(図2a, 2b)。なお、R1～R3分画は、古典的なCD14⁺CD16⁻単球、中間型CD14⁺CD16⁺単球、および非古典的なCD14^{lo/-}CD16⁺単球などの単球サブセットを産生したが、pDC、CD141^{hi}cDCまたはCD11c⁺cDCを含むDCサブセットは全く産生しなかった(図2a, 2b)。これらの前駆細胞に由来する主たる単球サブセットは、古典的なCD14⁺CD16⁻単球ではなく、中間型CD14⁺CD16⁺細胞であり、これは最近の報告結果とも一致している。

【0082】

さらに、図10は、R1、R2、R3分画から産生される単球由来の樹状細胞への分化の様子を表している。図10aは、R1～R3分画をFTSGM(FTSおよび単球由来DCを誘導する代表的なサイトカインであるGM-CSF)50ng/mLと共に培養すると、CD14⁺CD11c⁺単球由来DCが生じることを表している。また、FTSM(FTSおよびM-CSF)と共に培養すると、R1～R3分画のCD14⁺CD16⁺とCD14^{lo/-}CD16⁺単球(すなわちCD16⁺単球)への分化がわずかに亢進することを確認した(図10b, c)。これに関連して、R1分画の単球生成のピークが2日目で、少なくとも4日間を要するR2のピークよりも早かった(データ示さず)。この所見は、R1およびR2サブセットの両者が、単球分化に特化した前駆細胞であり、R1がR2の下流の前駆細胞であることを示唆している。一方、どちらもCD64⁻であるR4およびR5分画は、すべての単球およびDCサブセットを生み出した(図2a, 2b)。R4およびR5分画に由来するCD141^{hi}cDCは、CLEC9Aを発現していた(図9b)。R1～R3分画はDCへの分化能を、ほとんど示さなかったため、これらの結果から、R4とR5分画がcGMPにおけるDCの主要な源であることが示唆された。

【0083】

次に、R1～R5分画のリンパ球系分化能を調べた。図2cは、D114⁺Tst4ス

10

20

30

40

50

トローマ細胞、IL-7 (5 ng/ml)、およびFlt3L (5 ng/ml)の存在下で、図2dは、Tst4ストローマ細胞、SCF (100 ng/ml)、TPO (50 ng/ml)、IL-2 (10 ng/ml)、およびIL-7 (40 ng/ml)の存在下で、各分画の細胞10個を96ウェルプレートの48個のウェル中において1ヶ月間、培養した。各ウェルをCD3⁺T細胞(図2c)またはCD19⁺B細胞およびCD56⁺NK細胞(図2d)について分析した。図中の各バーはCD3⁺T細胞(図2c)ならびにCD19⁺B細胞および/またはCD56⁺NK細胞(図2d)について陽性のウェルの割合を表し、NDは検出されなかったことを表す。図2cは、T細胞分化能を評価するため、T細胞の分化に不可欠なNotchリガンドであるデルタ様リガンド4(DLL4)を発現しているTst4ストローマ細胞上において、該Flt3LとIL-7の存在下で、各分画の細胞10個を培養した結果を示す。比較対照として、MLPを用いた。R1~R3分画はT細胞への分化能を全く有していなかった一方、R4およびR5分画は著しい数のT細胞を産生した。図2dは、Tst4ストローマ細胞上において、SCF、TPO、IL-2、およびIL-7の存在下で各分画の細胞10個を培養することにより、B-NKへの分化能を評価した結果を示す。比較対照として、Lin⁻CD34⁺CD38⁺CD123^{int}CD10⁺CD45RA⁺の細胞として定義されるB-NK前駆細胞を用いた。B細胞とNK細胞は、それぞれ、CD33⁻CD19⁺およびCD33⁻CD56⁺の細胞と定義した。

10

【0084】

図11は、R4およびR5分画のリンパ系分化能を示す。図11aは、MLP、R4分画、R5分画に由来するCD3⁺T細胞のFCMによる分析結果を示す。細胞は図2bと同様の方法で培養した。図11bは、B-NK前駆細胞、R4分画またはR5分画に由来するB細胞、B-NK細胞およびNK細胞のFCMによる分析結果を示す。細胞は図2cと同様の方法で培養した。NDは検出されなかったことを示す。

20

【0085】

興味深いことに、R1~R5サブセットのリンパ系分化能は、CLEC12Aの発現が増加するにつれて減少する傾向が見られ、CD64をさらに獲得することにより完全に失われた(図2c, 2dおよび図11a, b)。R4およびR5のリンパ系分化能は、cGMP中に残存するT細胞への分化能を示唆する。

【0086】

なお、図2、図10および図11のデータはいずれも3回の独立した実験によるものである。

30

【0087】

ヒト及びマウスのcGMPはどちらも顆粒球と単球に加えて、DCへも分化する。これらの前駆細胞は、ミエロイド系細胞分化能に加えて、明らかなリンパ球細胞への分化能を有している。例えば、マウスのcGMPは、リンパ系遺伝子を高レベルに発現し、*in vitro*と*in vivo*でT細胞とB細胞の両方を生じさせる。また、ヒトのUCB由来のcGMPも、T細胞に分化する能力を有している。本発明者は、上述のとおり、前駆細胞のリンパ球系分化能を評価するために、最適化された方法であるTst4ストローマ細胞/DLL4およびTst4ストローマ細胞と複数のサイトカインカクテルとを組み合わせ培養し、ヒトのrGMPにはリンパ球系細胞への分化能がないことを明らかにした。また、rGMPはDCへの分化能はなく、DC分化能はCD64⁻cGMP(R4およびR5分画)に保存されていた。R4とR5は、単球およびDCへの分化能に加えて、顆粒球および/またはリンパ球への分化能も備えていた。R5が多分化能を有しており、また、ヒトのMLP様細胞群が赤芽球系への分化能を欠いていることから、上記実施例のデータは、赤芽球系統への分岐がLin⁻CD34⁺CD38⁻多分化能前駆細胞の段階でおこるというモデルに合致する。

40

【0088】

さらに、R1~R5分画について、CD110(TPO受容体)、CD115(M-CSF受容体)、CD116(GM-CSF受容体)、CD117(SCF受容体)、およ

50

びCD123 (IL3受容体)などの、他のサイトカイン受容体の発現特性を調べた結果を図12に示す。図12中、黒塗り部分が、各受容体の発現パターンを表す。R1分画におけるサイトカイン受容体の発現パターンは、プレ単球について既に報告されたもの (Breton, G. et al. Circulating precursors of human CD1c+ and CD114+ dendritic cells. J. Exp. Med. 212, 401-413 (2015).)と酷似しており、CD115、CD116、およびCD117を検出可能なレベルで発現していた。一方、R2とR3分画において観察された発現パターンは、これまで全く報告されていないものであった。

【0089】

これらの表現型と発生分析に基づき、R1が最近定義されたプレ単球と同じプレ単球分画であり、R2がcMoPであり、R3が真のGMP (修正型GMP、rGMP)であると結論した (表1)。

10

【0090】

(ヒトのcMoP等とマウスのcMoP等との比較)

図13に、マウスのcMoPとGMP上のCLEC12AとCD64の発現パターンを示す。ゲート領域内またはその付近に記載の数値は、各亜集団の頻度を示している。CLEC12AとCD64は、ヒトのcMoPとrGMPで見られるように、マウスのcMoPとGMPでも発現されていた。

【0091】

マウスとヒトのcMoPは単一細胞レベルで単球のみを産生する前駆細胞であり、どちらもCD64、CLEC12AおよびCD117を発現している。一方、ヒトのcMoPはCD135を発現しているが、マウスcMoPはCD135を発現していない。マウスのcMoPの分化起源はMDPに由来するが、ヒトのcMoPはrGMPに由来しており、おそらくMDPを介さずに分化してくる (rGMPがDC分化能を有していないため)。この相違は、単にマウスとヒトの間のミエロイド系細胞分化経路の違いを反映している可能性がある。あるいは、マウスのcGMPはrGMPを含んでいる可能性も考えられる。DC分化能を持たないrGMPの存在は、分化経路において単球由来DCがcDCとpDCとは異なる分化起源から由来することと一致しており、この単球由来DCとDCサブセットの分岐がrGMPの上流で起きていることを示唆している。

20

【0092】

最近、ヒトのUCBおよびBM中のcGMPにおいて、顆粒球-単球-DC前駆細胞 (GM DP)、MDP、およびDC分化に制限されたDC共通前駆細胞 (CDP) が同定されたことから、本発明者らは、CDP、MDP、cMoP、およびrGMPの表現型を比較した。図14に、MDPとR2~R5分画との表現型の比較を示す。CDPはCD123^{hi}分画 (図1aの上の2番目のパネル)として現れ、cGMPには含まれていない。図14aは、CLEC12AおよびCD64の発現により、MDPがCD64^{int}とCD64^{lo}の亜集団に分割されることを示している。図14bは、MDPがcGMPと重なることを示している。図14cは、MDP中の各分画の割合を示す。MDPはR3 (rGMP)とR4中に確認されたが、R2 (cMoP)およびR5中には確認されなかった。これは、MDPがCD64^{int}とCD64^{lo}の亜集団に分割されうること示しており (図14a~c)、MDPが顆粒球分化能をいくらか有する不均一な集団であることを示唆している。CD64^{int} MDPは、rGMPの14.4 ± 5.0%を占めていた。

30

40

【0093】

次に、CD64^{int}とCD64^{lo} MDPのミエロイドコロニー形成能を調べた。図14dおよび14eは、ミエロイドコロニー形成能を示す。比較対照としてGM DPを用いた。ソーティングされた各前駆体細胞 (1 × 10²個)をサイトカインカクテルを含むメチルセルロース培地中で培養し、10日後にコロニー数を数えた。図14dは、培養した1 × 10²個中の各細胞の割合を示す。図14eは、FCMによる解析結果を表す。図14中の略号は次のとおりである。M: マクロファージ、GM: 顆粒球-マクロファージ、G: 顆粒球。

【0094】

50

重複する表現型から予想されるように、CD64^{int}およびCD64⁻MDPは、ミエロイドコロニー形成能を示したが、赤芽球系細胞形成能は示さず、まさしくR3 (rGMP) およびR4のように、培養において単球と顆粒球をそれぞれ生じた(図1c, 図14d, 14e)。CD64⁻MDPのみが、FTS条件下でDCを生じた(データ示さず)。以上より、MDPが不均一な集団であり、CD64^{int}MDPはrGMPとして定義されるべきであると結論づけた。

【0095】

なお、図12~14の各データは3回の独立した実験によるものである。

【0096】

<例3: ヒトcMoPとrGMPのクローナル解析>

さらに、単一の細胞レベルでcMoPとrGMP細胞の特性を評価した。cMoPとGMPをソーティングし、サイトカインカクテルを含むメチルセルロース培地中で、それぞれ、5日間と8日間培養し、FCM分析のために単一のコロニーをピックアップした(上述の「単一細胞解析」を参照)。顆粒球と単球について、代表的なコロニーの細胞を分析した。図3は単一細胞レベルでのヒトcMoPおよびrGMPの特性を表す。図3aは100個のcMoP由来、図3bは100個のrGMP由来の代表的なコロニーのFCMプロファイルを示す。ゲート領域中の数字は各集団の割合を示す。図3cは、FCMによって検出された単球および/または顆粒球コロニーの比率を表す。図3中の略号の意味は次のとおりである。ND: コロニー検出されず、Mono: 単球、Gra: 顆粒球、undiff.: 未分化細胞。

【0097】

注目すべきことに、cMoP由来のすべての単一コロニーは100%が単球から成っていた(図3a, 3c)。rGMP由来の一部の単一コロニーは単球のみを含んでいたが(33.2 ± 3.5%)、残りは、単球と顆粒球の両方(21.7 ± 2.8%)、顆粒球のみ(37.6 ± 1.9%)、または未分化細胞(6.6 ± 2.3%)を含んでいた(図3b, 3c)。単一細胞レベルで二つの細胞系列への分化能をもつ前駆細胞の頻度は、ヒトMDP(12.5%)のそれより高く、マウスCDP(18.0%)に匹敵していた。

【0098】

さらに、図3dにcMoPの限界希釈解析の結果を示し、図3eにrGMPの限界希釈解析の結果を示す。細胞を、サイトカインカクテルを含むメチルセルロース培地中で7日間培養した。(d)、(e)においては、縦軸がコロニー陰性ウェルの割合を表し、横軸が培養した細胞の数を表し、点線が予想されるクローン原性頻度での37%検出失敗を表す。また、括弧内の数字は、(d)cMoPおよび(e)rGMPの平均のクローン頻度を、それぞれ表す。

【0099】

限界希釈解析によりコロニー形成能を推定したところ、同じ培養条件下において、6.85個のcMoPのうち1個、1.04個のrGMPのうち1個の頻度で各々コロニーを形成した(図3d, 3e)。このヒトcMoPの前駆細胞頻度は、ヒトpreDC(1/7.84)、マウスCDP(1/7.1~8.6)、およびマウスcMoP(1/3.9~9.2)について報告されたものと同程度であった。これらの結果により、ヒトcMoPが、マウスcMoPについて報告されたように単一分化能性の前駆細胞であり、また、rGMPが単一細胞レベルで単球と顆粒球を生成できる二分化能性の前駆細胞を含むことが示された。

【0100】

なお、図3のデータは、3回(a~c)および4回(d, e)の独立した実験によるものである。

【0101】

<例4: ヒトcMoPおよびrGMPの増殖能>

前駆細胞は分裂を伴って分化することから、本発明者は、CFSE希釈アッセイにより単球、プレ単球(preMo)、cMoP、およびrGMPがもつ増殖能を評価した。図

10

20

30

40

50

4 a は、これらの集団を C F S E で標識し、各分画の細胞 1×10^3 個を適切なサイトカインカクテルを含むメチルセルロース培地中で7日間培養し、分化してきた細胞を F C M によって解析した結果を示す。C F S E 希釈による評価によって、単球とプレ単球では細胞分裂が確認されなかったが、c M o P と r G M P は大きな増殖能を示した。

【0102】

図4 b は、C F S E 標識せずに図4 a と同様にして培養して各細胞を回収した結果を示す。図4 a の観察と一致して、 10^3 個のプレ単球の培養7日後には細胞は全く回収されなかったが、同じ培養条件下で 10^3 個の c M o P からは $31,000 \pm 3,875$ 個の細胞が得られた(図4 b)。

【0103】

図4 c は、「単離後間もない」各細胞における K i 6 7 発現の F C M プロファイルを示す。「単離後間もない」プレ単球は、増殖能を示さなかったが(図4 c)、それらは K i 6 7 + であった(図4 a, 4 b)。G 1 期、S 期、G 2 期、および M 期の細胞はすべて K i 6 7 + であるため、この標識は i n v i v o において c M o P として増殖した後の最後の G 2 期および M 期の細胞を反映しているのかもしれない。これらの結果から、r G M P、c M o P およびプレ単球の間における増殖能(一般的に利用されている前駆細胞の指標)の明らかな違いが示された。

【0104】

なお、図4の各データは少なくとも3回の独立した実験に基づくものである。

【0105】

<例5: I n v i v o における c M o P と r G M P の分化能>

I n v i v o における c M o P と r G M P の分化能を評価するために、発明者は、新たなアッセイ系を開発した(図5 a)。本発明者は、N O D 型 S i r p a を有する B 6 . R a g 2 - / - I l 2 r g - / - マウス(B R G S マウス)に 0.5 Gy の照射を行い、c M o P または r G M P ($5 \times 10^3 \sim 3 \times 10^4$ 個の細胞)を該マウスの B M に直接移植した。同日に、ヒト組換え体タンパク質 F l t 3 L、T P O、S C F および M - C S F の該マウスへの静脈内投与を開始し、それを連続4日間続けた。図5 b に、5日目(c M o P)および7日目(r G M P)に移植した c M o P または r G M P の B M 子孫細胞を F C M によって、分析した結果を示す。図5 c では、c M o P は単球のみを生成したが、これは $\text{CD}14^+ \text{CD}16^-$ 単球 ($\text{CD}14^+ \text{mono}$, $26.3 \pm 5.3\%$) と $\text{CD}14^+ \text{CD}16^+$ および $\text{CD}14^- \text{CD}16^+$ 単球 ($\text{CD}16^+ \text{mono}$, $54.2 \pm 7.0\%$) から成っていた。r G M P は、単球 ($\text{CD}14^+ \text{mono}$, $30.4 \pm 8.7\%$; $\text{CD}16^+ \text{mono}$, $11.4 \pm 5.03\%$) と顆粒球 ($15.2 \pm 2.34\%$) の両方を生じさせた(図5 b, 5 c)。これに関連して、c M o P と r G M P に由来する単球と顆粒球の細胞形態を D i f f - Q u i c k 染色によって確認した(図5 d)。図5 d において、元の倍率は100倍であり、スケールバーは $10 \mu\text{m}$ を表す。これらの結果から、c M o P が i n v i v o において単球分化に特化した前駆細胞であり、r G M P が単球-顆粒球前駆細胞であることが示された。

【0106】

なお、図5のデータは少なくとも3回の独立した実験に基づくものである。

【0107】

前述のとおり、ヒトの単球は、古典的な $\text{CD}14^+ \text{CD}16^-$ 単球、中間型 $\text{CD}14^+ \text{CD}16^+$ 単球、そして、非古典的な $\text{CD}14^{\text{lo}} / - \text{CD}16^+$ 単球という3つのサブセットに細分化される。機能的解析およびトランスクリプトーム解析から、ヒトの古典的 $\text{CD}14^+ \text{CD}16^-$ と非古典的 $\text{CD}14^{\text{lo}} / - \text{CD}16^+$ 単球が、おそらくマウスの $\text{Ly}6\text{c}^{\text{hi}}$ と $\text{Ly}6\text{c}^{\text{lo}}$ 単球にそれぞれ対応するものであることが明らかになっている。これに関連して、マウス $\text{Ly}6\text{c}^{\text{hi}}$ 単球は、血液中で自然に $\text{Ly}6\text{c}^{\text{lo}}$ 単球へと分化するが、これは、一定の条件下では、ヒトの単球の場合にもあてはまると考えられる。定常状態では、ヒト単球の主要分画は $\text{CD}14^+ \text{CD}16^-$ である。しかしながら、M - C S F で処理すると、 $\text{CD}14^+ \text{CD}16^+$ 単球の数が増加し、 $\text{CD}14^{\text{lo}} / - \text{CD}$

10

20

30

40

50

16⁺単球が徐々に拡大する。これはCD14⁺CD16⁻、CD14⁺CD16⁺、そしてCD14^{low}CD16⁺単球という、段階的な分化経路を示唆している。In vitroで培養した場合、あるいはcMoPおよびrGMPのin vivo移植後にそれらから産生される主要な単球サブセットの1つは、CD14⁺CD16⁺単球であった。これに関連して、ヒト胎児肝臓CD34⁺前駆細胞を移植したMISTGマウスおよびMISTRGマウスの血液、脾臓、肺、および肝臓では、CD14⁺CD16⁻単球よりもむしろCD14⁺CD16⁺細胞が主な単球サブセットであった。

【0108】

<例6：rGMP、cMoPおよびプレ単球の連続的な分化>

次に、rGMP、cMoPおよびプレ単球の間における分化経路の上下関係を調べた。rGMPは顆粒球と単球に分化できたことから、本発明者らは、rGMPがその顆粒球分化能を失うことによってcMoPに分化し、さらにプレ単球に分化すると仮定した。100%の純度でrGMPをソーティングし、FTS条件下、in vitroで2日間、細胞を培養した(図6a)。図6a中の数字はソーティングしたcMoPとrGMPの純度を示す。図6に、ソーティングした(b)rGMPと(c)cMoPを、それぞれ、FTS条件下で24時間培養し、それらの発生段階を分析した結果を示す。rGMPからの子孫細胞が、cMoPとプレ単球に極めて似た集団を含んでおり(図6b)、cMoPからの子孫細胞はプレ単球に酷似していることを見出した(図6c)。cMoPがrGMPを生じることが全くなかった。これらの結果から、rGMPがcMoPとプレ単球に連続して分化することが強く示唆された。

10

20

【0109】

なお、図6のデータは少なくとも3回の独立した実験に基づく。

【0110】

<例7：cMoPがもつ単球シグネチャ>

cMoPが単球シグネチャを有するか否か(すなわち、それらが単球分化に適した遺伝子を発現しているか否か)を調べるため、ソーティングして精製したrGMP、cMoP、プレ単球(preMo)、cMoP由来のCD14⁺単球(cMoP-Mo)、および末梢血CD14⁺単球(PB-Mo)の網羅的遺伝子発現解析を行った結果を図7に示す。比較対照として、複数のミエロイド系細胞への分化能を有しており、単球分化に限局していないCMPを含めた。単球特異的遺伝子の発現レベルは、単球分化に伴い徐々に増加し、前駆細胞の中では、CMPで単球特異的遺伝子の発現レベルが最も低く、rGMPでは弱く、cMoPで最も高くなっていた(図7a)。この傾向は、DC特異的な遺伝子発現については観察されなかった(図15)。図7bに、単球の分化に関与する転写因子の相対的mRNAレベルを示し、図7cに遊走に関与するケモカイン受容体の相対的mRNAレベルを示す。図7b及び7cにおいて、データはCMPに対する相対値として記載している。単球の発生に重要な転写因子であるPU.1、IRF8、CEBPB、およびKLF4の発現レベルは、cMoPで横ばい状態になっており(図7b)、単球の遊走に必要なケモカイン受容体であるCX3CR1、およびCCR2の発現レベルは、プレ単球、cMoP由来のCD14⁺単球、および末梢血CD14⁺単球のステージでさらに増加していた(図7c)。図7dに、表示の細胞における規準化された遺伝子発現プロファイルの主成分分析の結果を示す。主成分(PC)分析に基づく各集団のプロットフロー(点の位置)は、連続的な単球の分化過程に合致しており、in vitroおよびin vivoにおける所見と相関していた。これに関連して、集団間の分化ステージの距離を表すユークリッド距離も計算した(図7e)。cMoP-MoまたはPB-Moからの距離は、CMPからプレ単球へと徐々に減少していた。さらに、遺伝子セット濃縮解析(GSEA)を使い、ヒト血液中のCD14⁺単球において濃縮されていることが知られている遺伝子セットの発現レベル(ヒト単球シグネチャ)をcMoP由来のCD14⁺単球、プレ単球、cMoP、rGMP、およびCMPの間で比較した(図7f)。具体的には、ヒト血液単球シグネチャをヒト血液CD14⁺単球(GSE35459)の上位200遺伝子から作成し、遺伝子セット濃縮解析(GSEA)をcMoP対rGMP、rGMP対CM

30

40

50

P、cMoP対プレ単球、プレ単球対cMoP-Moにおいて濃縮されている遺伝子を比較するために実施した。図7fにおいて、pは正規p値、NESは遺伝子濃縮スコアを表す。データは、プールされた20個の試料から取得した。ヒト単球シグネチャは、単球に向かう分化の程度と共に有意に増加しており(すなわち、cMoP由来の単球>プレ単球>cMoP>rGMP>CMP)、これは、各前駆細胞における単球への分化レベルを裏付けている。これらの結果から、単球に限局した分化能をもつ前駆細胞としてcMoPが同定され、rGMPからcMoPそして単球への連続経路が強く裏付けられた。

【0111】

【表 1】

分画	表現型	名称	割合 (% MNCs±SD)	割合 (% cGMPs±SD)	派生する細胞
R1	CD34 ⁺ CD38 ⁺ CD10 ⁻ CD123 ^{int/-} CLEC12A ^{hi} CD64 ^{hi} CD135 ⁺ CD45RA ^{hi}	pre-Mono	0.042±0.02	-	Mono, moDC
R2	CD34 ⁺ CD38 ⁺ CD10 ⁻ CD123 ^{int/-} CD45RA ⁺ CD135 ⁺ CLEC12A ^{hi} CD64 ^{hi}	cMoP	0.019±0.008	3.91±2.2	Mono, moDC
R3	CD34 ⁺ CD38 ⁺ CD10 ⁻ CD123 ^{int/-} CD45RA ⁺ CD135 ⁺ CLEC12A ^{hi} CD64 ^{int}	rGMP	0.05±0.04	7.93±1.64	Mono, moDC, G
R4	CD34 ⁺ CD38 ⁺ CD10 ⁻ CD123 ^{int/-} CD45RA ⁺ CD135 ⁺ CLEC12A ⁺ CD64 ⁻	-	0.286±0.227	46.7±4.71	Mono, moDC, G, DC, T, B
R5	CD34 ⁺ CD38 ⁺ CD10 ⁻ CD123 ^{int/-} CD45RA ⁺ CD135 ⁺ CLEC12A ⁻ CD64 ⁻	-	0.146±0.077	25.8±5.91	Mono, moDC, DC, T, B, NK

10

20

30

40

【0112】

本明細書には、本発明の好ましい実施態様を示してあるが、そのような実施態様が単に例示の目的で提供されていることは、当業者には明らかであり、当業者であれば、本発明から逸脱することなく、様々な変形、変更、置換を加えることが可能であろう。本明細書

50

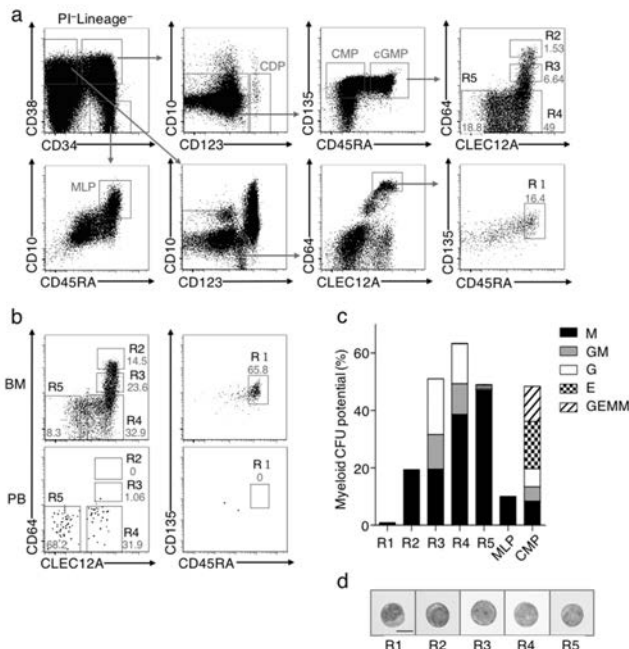
に記載されている発明の様々な代替的实施形態が、本発明を実施する際に使用されることが理解されるべきである。また、本明細書中において参照している特許および特許出願書類を含む、全ての刊行物に記載の内容は、その引用によって、本明細書中に明記された内容と同様に取り込まれていると解釈すべきである。

【産業上の利用可能性】

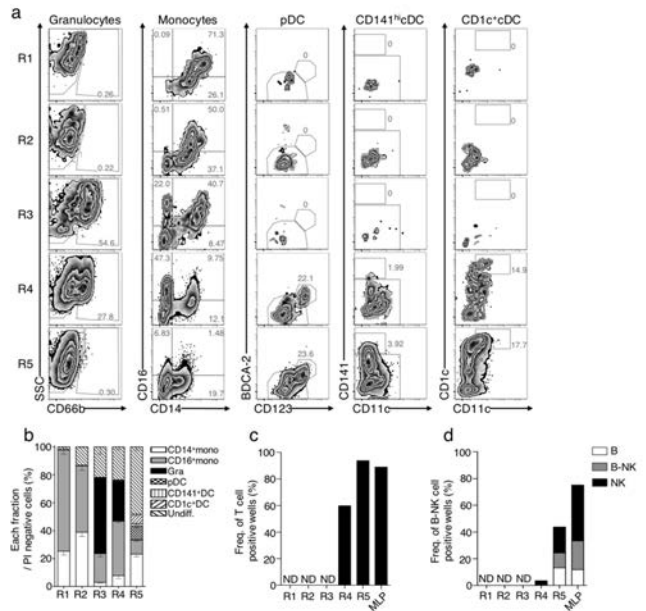
【0113】

本発明により、ヒトcMoPが同定され、さらに、骨髓系細胞分化経路の詳細を明らかになった。単球および単球由来のマクロファージが、代謝リック症候群を含むさまざまな炎症性疾患や、腫瘍の成長を引き起こすことから、本発明は、cMoPおよび単球を標的とした上記疾患の治療方法及び予防方法への応用が可能である。

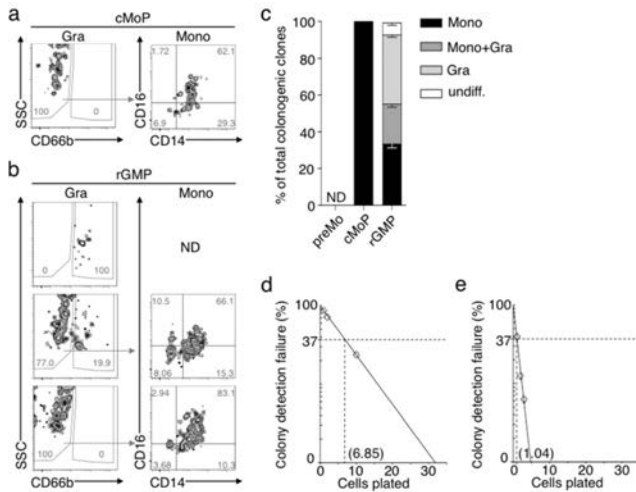
【図1】



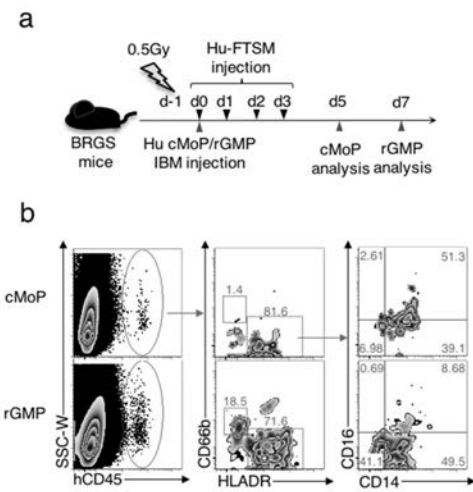
【図2】



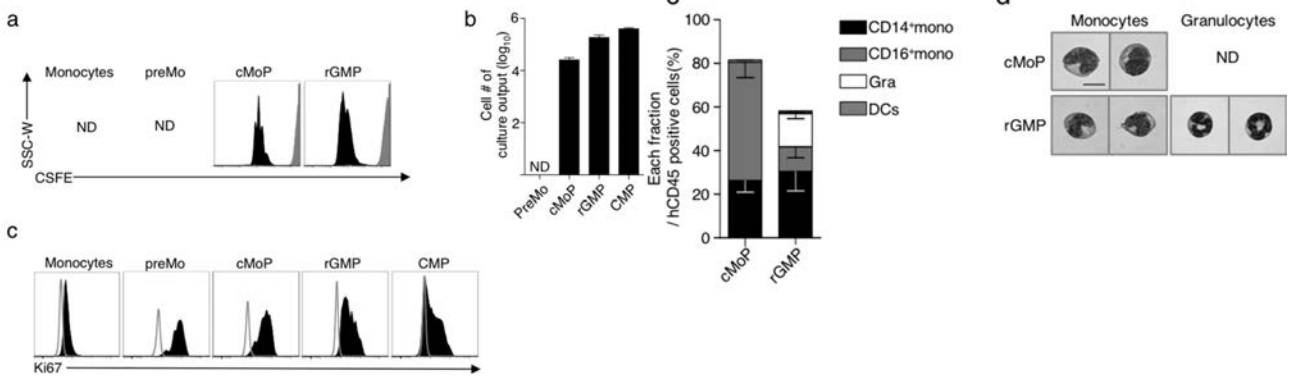
【 図 3 】



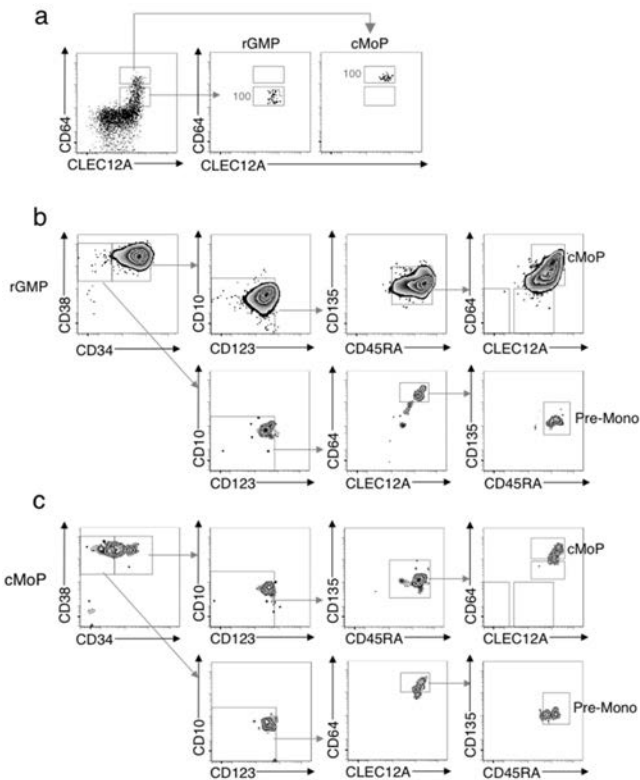
【 図 5 】



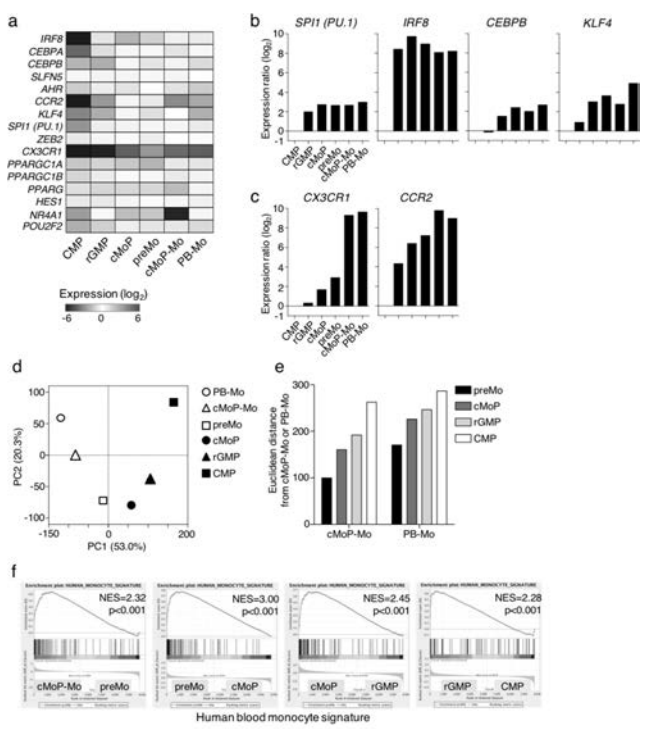
【 図 4 】



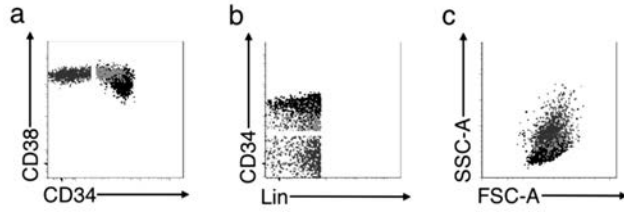
【 図 6 】



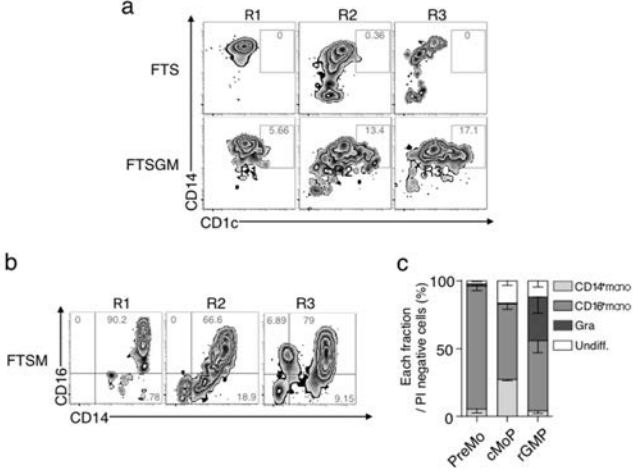
【 図 7 】



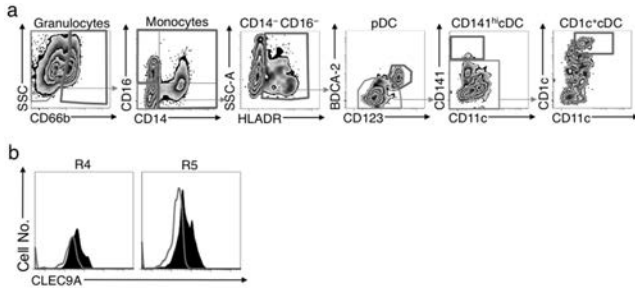
【 図 8 】



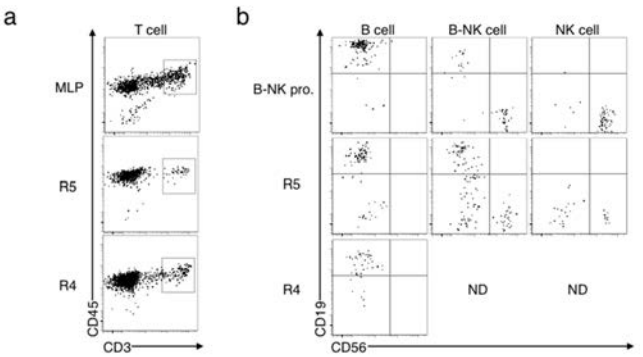
【 図 10 】



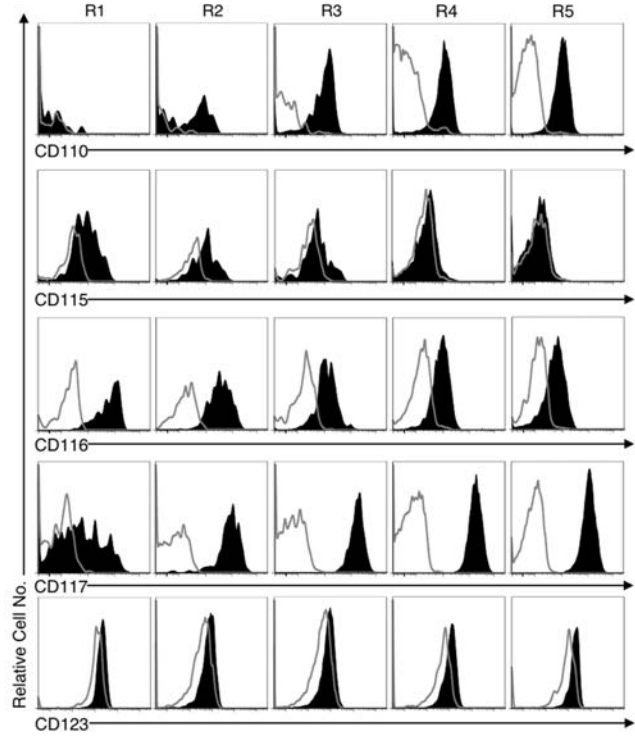
【 図 9 】



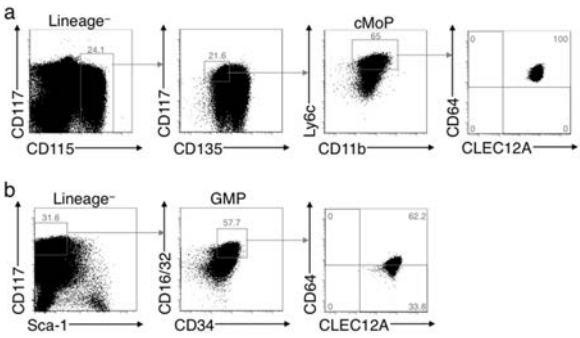
【 図 11 】



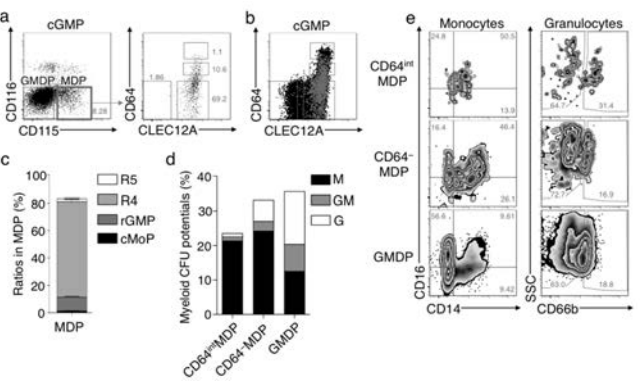
【 図 12 】



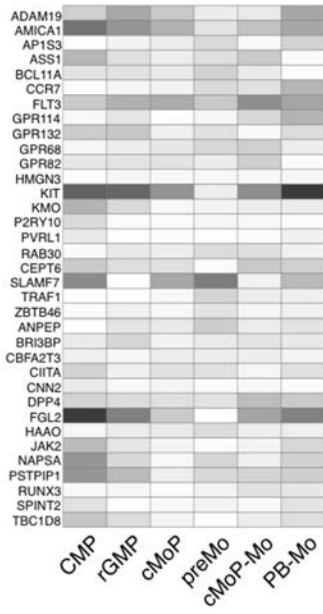
【 図 13 】



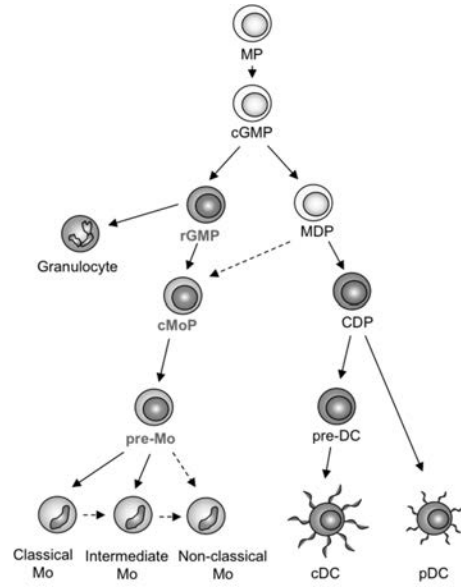
【 図 14 】



【 図 1 5 】



【 図 1 6 】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード(参考)
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 P	35/00	4 C 0 8 7
A 6 1 K	45/00 (2006.01)	A 6 1 K	45/00	
A 6 1 K	39/395 (2006.01)	A 6 1 K	39/395	D
C 1 2 Q	1/02 (2006.01)	A 6 1 K	39/395	N
A 0 1 K	67/027 (2006.01)	C 1 2 Q	1/02	
G 0 1 N	33/15 (2006.01)	A 0 1 K	67/027	
G 0 1 N	33/50 (2006.01)	G 0 1 N	33/15	Z
G 0 1 N	33/53 (2006.01)	G 0 1 N	33/50	Z
A 6 1 K	35/15 (2015.01)	G 0 1 N	33/53	Y
A 6 1 K	35/51 (2015.01)	A 6 1 K	35/15	A
		A 6 1 K	35/51	

(72)発明者 小内 伸幸

東京都文京区湯島一丁目5番45号 国立大学法人東京医科歯科大学内

Fターム(参考) 2G045 AA24 BB20 CB01 FB03
 4B063 QA01 QA05 QA18 QQ41 QQ61 QQ79 QQ96 QR77 QS07 QS12
 QS39
 4B065 AA91X AA93X AC20 BA21 BB25 BB34 BB37 BD14 BD15 CA44
 4C084 AA01 AA02 AA17 AA19 NA14 ZA451 ZA452 ZA661 ZA662 ZA961
 ZA962 ZB261 ZB262 ZC211 ZC212
 4C085 AA13 AA14 AA16 BB36 EE01 EE03
 4C087 AA01 AA02 BB44 BB59 CA10 DA03 ZA45 ZA66 ZA96 ZB26
 ZC21

专利名称(译)	人单核细胞前体细胞仅分化成单核细胞谱系及其分离方法		
公开(公告)号	JP2019103391A	公开(公告)日	2019-06-27
申请号	JP2016080779	申请日	2016-04-14
申请(专利权)人(译)	国立大学法人东京医科齿科大学		
发明人	樗木 俊聡 川村 俊輔 小内 伸幸		
IPC分类号	C12N5/0786 A61P3/00 A61P9/10 A61P19/00 A61P1/04 A61P35/00 A61K45/00 A61K39/395 C12Q1/02 A01K67/027 G01N33/15 G01N33/50 G01N33/53 A61K35/15 A61K35/51		
CPC分类号	A61K35/15 A61K45/06 A61P1/04 A61P3/00 A61P19/00 C07K16/283 C07K2317/24 C07K2317/32 C07K2317/41 C07K2317/52 C12N5/0645 G01N33/5008 G01N33/5044		
FI分类号	C12N5/0786 A61P3/00 A61P9/10.101 A61P19/00 A61P1/04 A61P35/00 A61K45/00 A61K39/395.D A61K39/395.N C12Q1/02 A01K67/027 G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.Y A61K35/15.A A61K35/51		
F-TERM分类号	2G045/AA24 2G045/BB20 2G045/CB01 2G045/FB03 4B063/QA01 4B063/QA05 4B063/QA18 4B063/QQ41 4B063/QQ61 4B063/QQ79 4B063/QQ96 4B063/QR77 4B063/QS07 4B063/QS12 4B063/QS39 4B065/AA91X 4B065/AA93X 4B065/AC20 4B065/BA21 4B065/BB25 4B065/BB34 4B065/BB37 4B065/BD14 4B065/BD15 4B065/CA44 4C084/AA01 4C084/AA02 4C084/AA17 4C084/AA19 4C084/NA14 4C084/ZA451 4C084/ZA452 4C084/ZA661 4C084/ZA662 4C084/ZA961 4C084/ZA962 4C084/ZB261 4C084/ZB262 4C084/ZC211 4C084/ZC212 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/AA16 4C085/BB36 4C085/EE01 4C085/EE03 4C087/AA01 4C087/AA02 4C087/BB44 4C087/BB59 4C087/CA10 4C087/DA03 4C087/ZA45 4C087/ZA66 4C087/ZA96 4C087/ZB26 4C087/ZC21		
代理人(译)	伊藤 克博		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明的一个目的是提供一种分离的人单核细胞前体细胞，它不分化成除单核细胞谱系以外的细胞并具有增殖能力。 种类代码：A1本发明涉及从脐带血样品或骨髓样品制备Lin-CD34 + -CD38-CD10-的方法。 sup>CD123 -> CD45RA + CD135 + CLEC12A hi CD64 hi 它涉及通过分离细胞获得定位于单核细胞分化的祖细胞。 [选定图]图16

