

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2012年4月5日(05.04.2012)



(10) 国際公開番号
WO 2012/043651 A1

- (51) 国際特許分類:
C12N 5/10 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)
A61K 35/12 (2006.01) A61P 37/02 (2006.01)
A61P 9/00 (2006.01) A61P 37/06 (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01) C12N 15/09 (2006.01)
A61P 31/00 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2011/072234
- (22) 国際出願日: 2011年9月28日(28.09.2011)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2010-221809 2010年9月30日(30.09.2010) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 国立大学法人 熊本大学(NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION KUMAMOTO UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒8608555 熊本県熊本市黒髪二丁目3番1号 Kumamoto (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 千住 覚 (SENJU Satoru) [JP/JP]; 〒8608556 熊本県熊本市本荘1丁目1番1号 国立大学法人 熊本大学内 Kumamoto (JP).
- (74) 代理人: 特許業務法人特許事務所サイクス(SIKS & Co.); 〒1040031 東京都中央区京橋一丁目8番7号 京橋日殖ビル8階 Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

- 国際調査報告 (条約第21条(3))



WO 2012/043651 A1

(54) Title: PRODUCTION METHOD FOR MYELOID BLOOD CELLS

(54) 発明の名称: ミエロイド系血液細胞の製造方法

(57) Abstract: The purpose of the present invention is to provide a production method for myeloid blood cells with proliferation ability. Provided is a method for producing myeloid blood cells that have the ability to proliferate and which includes the forcible expression of (A) cMYC genes and (B) at least one gene selected from a group comprising MBI1 genes, EZH2 genes, MDM2 genes, MDM4 genes, and HIF1A genes.

(57) 要約: 本発明の目的は、増殖能力を有するミエロイド系血液細胞の製造方法を提供することにある。本発明によれば、ミエロイド系血液細胞において、(A) cMYC遺伝子、並びに(B) BMI1遺伝子、EZH2遺伝子、MDM2遺伝子、MDM4遺伝子、及びHIF1A遺伝子からなる群から選択される少なくとも一つの遺伝子を強制的に発現させることを含む、増殖能力を有するミエロイド系血液細胞を製造する方法が提供される。

明 細 書

発明の名称： ミエロイド系血液細胞の製造方法

技術分野

[0001] 本発明は、生体外で増殖する能力を有するヒトミエロイド系血液細胞の製造、およびその培養の方法に関する。より詳細には、本発明は、人体から採取されたミエロイド系血液細胞、あるいは、人工多能性幹細胞などの多能性幹細胞から所定の分化誘導法を用いて生体外において作製されたミエロイド系血液細胞に、その機能を保持しつつ生体外で増殖する能力を獲得させる方法に関する。さらに、該増殖能力を有するミエロイド系血液細胞を、より強力なT細胞刺激能力を有する樹状細胞様細胞へと分化させる方法に関する。本発明の方法により製造される生体外で増殖する能力を有するミエロイド系血液細胞は、微生物等を貪食する活性を有している。本発明により作製される増殖能力を有するミエロイド系血液細胞、あるいはそれに由来する樹状細胞様細胞は、アルツハイマー病、がん、感染症、プリオン病、アミロイドーシス、自己免疫疾患等の治療において有用であると期待される。本発明により作製される増殖能力を有するミエロイド系血液細胞およびそれに由来する樹状細胞様細胞は、また、臓器移植における拒絶反応や移植片対宿主病（GVHD）の治療においても有用であると期待される。さらに、ミエロイド系血液細胞は、がん、免疫関連疾患、代謝性疾患、血管病などの病態生理において生体内で重要な役割を有していることから、本発明により製造される増殖能を有するミエロイド系血液細胞は、医薬品等の薬効および毒性を検査するための評価細胞としても有用であると期待される。

背景技術

[0002] ミエロイド系血液細胞は、白血球中に分類される細胞群であり、マクロファージ、樹状細胞、顆粒球などを含む。マクロファージは、生体内における主要な異物処理細胞であり、生体内に侵入した感染性微生物等を貪食してこれを分解することにより、生体を感染症から防御する役割を有している。ま

た、生体内では、日々、大量の細胞が死滅しており、マクロファージは、生体内組織中に存在するその残骸物を貪食し分解する。それ以外にも、マクロファージは、生体内で生じる様々な代謝産物を貪食・分解処理することにより、生体の恒常性維持において必須の役割を担っている。また、マクロファージは、悪性腫瘍の局所においてしばしば浸潤が認められる。腫瘍の局所に存在するマクロファージは、腫瘍細胞を攻撃している場合と腫瘍細胞の増殖を促進している場合の両方があると考えられている。これまでに、マクロファージの腫瘍細胞に対する攻撃能力を活用して悪性腫瘍を治療しようとする試みもなされている。

[0003] 樹状細胞は、Tリンパ球を強力に刺激し活性化する細胞であり、生体内において免疫応答の制御を司っている細胞である。感染性微生物の生体内侵入に際して、樹状細胞は、微生物を貪食しそれに由来する抗原物質をTリンパ球に提示し、抗原特異的なTリンパ球を刺激し活性化することにより、免疫応答を誘導する。樹状細胞が有するTリンパ球を強力に刺激する能力を生かし、樹状細胞を、がんや感染症に対する免疫療法において細胞ワクチンとして用いる試みがなされている。

[0004] 細胞医薬としてマクロファージや樹状細胞を使用し、臨床的な効果を得るためには、大量の細胞を必要とする。マクロファージの場合、 10^{10} から 10^{12} 程度、樹状細胞の場合でも 10^8 から 10^9 の細胞を必要とする。生体内組織に存在するこれらの細胞の数は、有限であり、また、生体内組織からこれらの細胞を大量に採取することは困難である。そこで、マクロファージや樹状細胞による細胞医療を実現するためには、これらのミエロイド系血液細胞を大量に、かつ、より少ない費用で安定して供給できる方法を確立する必要がある。

[0005] マクロファージや樹状細胞は、がん、免疫関連疾患、代謝性疾患、血管病などの病態生理において重要な役割を有する細胞である。これらの疾患を治療するための各種医薬品を開発するにあたっては、マクロファージや樹状細胞に対する薬品の効果を評価することが必要である。医薬品の候補として多種類の化学物質について、同一の条件でその効果を比較するためには、均一な

性質を有するマクロファージや樹状細胞を大量に供給する方法が必要である。

[0006] 胚性幹細胞(ES細胞)や人工多能性幹細胞(誘導多能性幹細胞)(induced pluripotent stem cell; iPS細胞)などの多能性幹細胞は、様々な細胞へ分化する能力を有する細胞であり、かつ、ほぼ無限に増殖する能力を有する。そして、生体内に存在するマクロファージあるいは樹状細胞と機能的に一定の類似性を有するミエロイド系血液細胞を多能性幹細胞から作製する方法が報告されている(例えば、特許文献1及び非特許文献1~9参照)。そこで、多能性幹細胞を大量に増殖させた後に、これらの分化誘導法を用いて分化させることにより、大量のミエロイド系血液細胞を作製することは、理論的には可能である。例えば、特許文献1には、(A)ヒト胚性幹細胞と、血液細胞の分化と増殖とを誘導する性質を有する細胞とを共培養して、細胞群Aを得るステップ、(B)前記ステップ(A)で得られた細胞群Aと、血液細胞の分化と増殖とを誘導する性質を有する細胞とを、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)とマクロファージコロニー刺激因子(M-CSF)の存在下に共培養して、細胞群Bを得るステップ、及び(C)前記ステップ(B)で得られた細胞群Bを、GM-CSFとインターロイキン-4(IL-4)の存在下に培養するステップ、を含む、ヒト胚性幹細胞から樹状細胞への分化方法が開示されている。しかしながら、特許文献1に記載の分化方法を含め、これまでに報告されている分化誘導培養法は、相当な労力と時間(1か月以上)を必要とするため、細胞治療に用いることを目的としてミエロイド系血液細胞を作製する方法としてはコストと時間が過大である。また、これまでに、多能性幹細胞からの分化誘導により作製したミエロイド系血液細胞を長期間(1か月以上にわたり)増殖させ、大量の(例えば、材料として用いた多能性幹細胞の 10^5 倍以上の)ミエロイド系血液細胞を作製できる方法は報告されていない。

[0007] 他方、ヒトの末梢血中の単球(モノサイト、末梢血中のCD14分子を発現する細胞)から、樹状細胞およびマクロファージを作製する方法はよく知られている。健康なヒトの末梢血には、1mlあたり20,000-50,000個前後の単球が存

在するので、CD14分子の発現を指標としてヒトの末梢血から単球を分離し、これを用いて樹状細胞およびマクロファージを作製することが可能である。ただし、従来技術ではヒトの末梢血単球を生体外での培養により増殖させることは困難であるため、 10^{10} の樹状細胞あるいはマクロファージを作製するためには、 10^{10} の単球を必要とし、そのためには20リットル前後の末梢血から単球を分離することを必要とする。そこで、今日、がんに対する細胞ワクチン療法を行うために樹状細胞を作製する場合は、成分採血装置（アフレーション）を用いた細胞分離による白血球分離装置を用いた白血球の分離、さらに白血球中の単球の分離が行われている。また、末梢血中の単球の数および生体外での分化能力にはドナーによる違いが大きいため樹状細胞を安定して作製することが困難であるという問題もある。

先行技術文献

特許文献

[0008] 特許文献1：国際公開WO 2008/056734

非特許文献

[0009] 非特許文献1：Fairchild, P.J, Brook, FA, Gardner, RL, Graca, L, Strong, V, Tone, Y, Tone, M, Nolan, KF, Waldmann, H. 2000 Directed differentiation of dendritic cells from mouse embryonic stem cells. *Curr Biol*. 10:1515-1518.

非特許文献2：Lindmark, H, Rosengren, B, Hurt-Cmejo, E, and Bruder, CE. 2004. Gene expression profiling shows that macrophages derived from mouse embryonic stem cells is an improved in vitro model for studies of vascular disease. *Exp Cell Res* 300:335-344.

非特許文献3：Zhan, X, Dravid, G, Ye, Z, Hammond, H, Shamblott, M, Gearhart, J, and Cheng, L. 2004. Functional antigen-presenting leucocytes driven from human embryonic stem cells in vitro. *Lancet* 364:163-171

非特許文献4：Slukvin, II, Vodyanik, MA, Thomson, JA, Gumenyuk, M.E, and Choi, KD. 2006. Directed differentiation of human embryonic stem c

ells into functional dendritic cells through the myeloid pathway. *J Immunol* 176:2924-2932.

非特許文献5 : Odegaard, JI, Vats, D, Zhang, L, Ricardo-Gonzalez, R, Smith, KL, Sykes DB, Kamps, MP, and Chawla, A. 2007. Quantitative expansion of ES cell-derived myeloid progenitors capable of differentiating into macrophages. *J Leukoc Biol* 81:711-719.

非特許文献6 : Su, Z, Frye, C, Bae, KM, Kelley, V, and Vieweg, J. 2008. Differentiation of human embryonic stem cells into immunostimulatory dendritic cells under feeder-free culture conditions. *Clin Cancer Res* 14:6207-6217

非特許文献7 : Tseng, SY, Nishimoto, KP, Silk, KM, Majumdar AS, Dawes, GN, Waldmann, H, Fairchild, PJ, Lebkowski, JS, and Reddy, A. 2009. Generation of immunogenic dendritic cells from human embryonic stem cells without serum and feeder cells. *Regen Med* 4:513-526.

非特許文献8 : Senju S, Suemori H, Zembutsu H, Uemura Y, Hirata S, Fukuma D, Matsuyoshi H, Shimomura M, Haruta M, Fukushima S, Matsunaga Y, Katagiri T, Nakamura Y, Furuya M, Nakatsuji N, and Nishimura Y. Genetically manipulated human embryonic stem cell-derived dendritic cells with immune regulatory function. *Stem cells* 25:2720-2729, 2007

非特許文献9 : Choi, KD, Vodyanik, MA, and Slukvin, II. 2009. Generation of mature human myelomonocytic cells through expansion and differentiation of pluripotent stem cell-derived lin-CD34+CD43+CD45+progenitors. *J Clin Invest* 119:2818-2829.

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0010] 本発明の課題は、増殖能力を有するミエロイド系血液細胞の製造方法、該ミエロイド系血液細胞を増殖させる方法、該方法により得られるミエロイド系血液細胞、及び該ミエロイド系血液細胞を含む細胞医薬を提供することに

ある。より具体的には、本発明の課題は、細胞治療としての用途に有用なヒトのミエロイド系血液細胞を大量に製造する方法を提供することにある。また、ヒトの体内に存在するミエロイド系血液細胞と同等の機能を保持し、各種医薬品などのミエロイド系血液細胞に与える影響を調べるための検査において評価細胞として有用なミエロイド系血液細胞を安定的に製造する方法を提供することにある。

課題を解決するための手段

[0011] 本発明者は、上記課題を解決するため、多能性幹細胞から大量のミエロイド系血液細胞をできるだけ少ない費用で製造するべく、様々な方法を試みた。また、多能性幹細胞に由来するミエロイド系血液細胞に様々な遺伝子を強制的に発現させることにより、長期増殖能力を付与することを試みた。その結果、多能性幹細胞由来のミエロイド系血液細胞にcMYC遺伝子に加えてBMI1、EZH2、MDM2、MDM4、あるいはHIF1Aの遺伝子を導入し強制的に発現させ、M-CSFを添加した培養液を用いて継続的に培養することにより、長期間に渡ってミエロイド系血液細胞としての性質を保持しながら増殖させることが可能であることを見いだした。さらに、ヒトの体内に存在するミエロイド系血液細胞である末梢血中単球の場合も、これらの遺伝子を導入し強制的に発現させることにより、増殖させることが可能であることを見いだした。本発明は、かかる知見に基づいて完成されたものである。

[0012] すなわち、本発明の態様は以下に関する。

- (1) ミエロイド系血液細胞において、
 - (A) cMYC遺伝子、並びに
 - (B) BMI1遺伝子、EZH2遺伝子、MDM2遺伝子、MDM4遺伝子、及びHIF1A遺伝子からなる群から選択される少なくとも一つの遺伝子を強制的に発現させることを含む、増殖能力を有するミエロイド系血液細胞を製造する方法。
- (2) 前記ミエロイド系血液細胞に前記遺伝子を導入することにより、該ミエロイド系血液細胞において該遺伝子を強制的に発現させる、(1)に記

載の方法。

(3) 前記ミエロイド系血液細胞が、多能性幹細胞に由来する、(1)又は(2)に記載の方法。

(4) 前記多能性幹細胞が、人工多能性幹細胞である、(3)に記載の方法。

(5) 前記人工多能性幹細胞が、ヒト人工多能性幹細胞である、(4)に記載の方法。

(6) 前記ミエロイド系血液細胞が、末梢血単球である、(1)又は(2)に記載の方法。

(7) 前記末梢血単球が、ヒト末梢血単球である、(6)に記載の方法。

(8) 前記cMYC遺伝子、BMI1遺伝子、EZH2遺伝子、MDM2遺伝子、MDM4遺伝子、及びHIF1A遺伝子が、それぞれ、ヒトcMYC遺伝子、ヒトBMI1遺伝子、ヒトEZH2遺伝子、ヒトMDM2遺伝子、ヒトMDM4遺伝子、及びヒトHIF1A遺伝子である、(1)～(7)のいずれかに記載の方法。

(9) マクロファージコロニー刺激因子(M-CSF)の存在下で、(1)～(8)のいずれかに記載の方法で製造したミエロイド系血液細胞を培養することを含む、ミエロイド系血液細胞を増殖させる方法。

(10) (1)～(9)のいずれかに記載の方法により製造される細胞。

(11) (10)に記載の細胞を樹状細胞様細胞に分化誘導することを含む、樹状細胞様細胞を製造する方法。

(12) 顆粒球・マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)およびインターロイキン-4(IL-4)を含む培養液を用いて、前記ミエロイド系血液細胞を培養することにより、該ミエロイド系血液細胞を樹状細胞様細胞に分化誘導する、(11)に記載の方法。

(13) (11)又は(12)に記載の方法により製造される細胞。

(14) (10)又は(13)に記載の細胞を含む、細胞医薬。

(15) 前記細胞医薬は、感染症、腫瘍、アルツハイマー病、プリオン病

、アミロイドーシス、白血病、及び／又は自己免疫疾患の治療又は予防に用いるための細胞医薬である、(14)に記載の細胞医薬。

(16) (10)若しくは(13)に記載の細胞、又は(14)に記載の細胞医薬を製造するための、

(A) cMYC遺伝子、並びに

(B) BMI1遺伝子、EZH2遺伝子、MDM2遺伝子、MDM4遺伝子、及びHIF1A遺伝子からなる群から選択される少なくとも一つの遺伝子の使用。

(17) (14)に記載の細胞医薬を用いて、感染症、腫瘍、アルツハイマー病、プリオン病、アミロイドーシス、白血病、及び／又は自己免疫疾患を治療する方法。

発明の効果

[0013] 本発明によれば、細胞ドナーの身体的負荷を伴うことなく、ミエロイド系血液細胞を大量に、かつ、安定して供給することが可能になる。また、本発明により製造したミエロイド系血液細胞は、生体内に存在するマクロファージと同様に微生物などを貪食する活性を有しており、感染症や悪性腫瘍に対する細胞療法を行うための細胞医薬を提供することを可能とする。また、本発明によれば、アルツハイマー病、アミロイドーシス、あるいは、ある種の代謝性疾患など、体内に特定の物質が大量に蓄積することに起因する疾患に対する細胞医薬を提供することも可能となる。さらに、本発明によれば、悪性腫瘍、感染症などに対する細胞ワクチンとして使用可能な樹状細胞様細胞を製造することが可能である。また、本発明によれば、自己免疫疾患や臓器移植に伴う拒絶反応などを治療する目的で免疫応答を制御するための細胞医薬品としての樹状細胞様細胞あるいはマクロファージを製造することが可能になる。さらに、本発明によれば、各種医薬品のミエロイド系血液細胞へ与える影響を検査するための試験・研究において評価細胞として有用なミエロイド系血液細胞を安定的に製造することが可能になる。

図面の簡単な説明

[0014] [図1]図1は、本発明の製造方法を概説する図である。

[図2]図2は、ヒトiPS細胞由来のミエロイド系血液細胞(iPS-MC)の顕微鏡写真(位相差レンズ撮影像)である。

[図3]図3は、ヒトiPS細胞由来のミエロイド系血液細胞(iPS-MC)のCD45、CD11b、およびCD33分子の発現をフローサイトメーターにより解析した結果を示す。

[図4]図4は、cMYCとBMI1の強制発現により作製したヒトiPS細胞由来のミエロイド系血液細胞ライン(iPS-ML)の顕微鏡写真(位相差レンズ撮影像)である。

[図5]図5は、cMYCとBMI1の強制発現により作製したミエロイド系血液細胞ライン(iPS-ML)のCD45、CD11b、およびCD33分子の発現をフローサイトメーターにより解析した結果を示す。

[図6]図6は、ミエロイド系血液細胞ライン(iPS-ML)の増殖に関し、M-CSF及びGM-CSFに対する依存性を調べた結果を示す。

[図7]図7は、ミエロイド系血液細胞ライン(iPS-ML)による蛍光色素標識されたザイモザン粒子の貪食を解析した結果を示す。

[図8]図8は、ミエロイド系血液細胞ライン(iPS-ML)による蛍光色素標識されたザイモザン粒子の貪食に関し、経時的变化を示す。

[図9]図9は、ミエロイド系血液細胞ライン(iPS-ML)に由来する樹状細胞様細胞(ML-DC)の顕微鏡写真である。

[図10]図10は、ミエロイド系血液細胞ライン(iPS-ML)に由来する樹状細胞様細胞(ML-DC)に関し、細胞表面上のHLAクラスII、CD80、およびCD86の発現をフローサイトメトリーを用いて解析した結果を示す。

[図11]図11は、ミエロイド系血液細胞ライン(iPS-ML)、およびそれに由来する樹状細胞様細胞(ML-DC)に関し、アロT細胞の増殖応答の誘導活性を調べた結果を示す。

[図12]図12は、cMYCとEZH2の強制発現により作製したヒトiPS細胞由来のミエロイド系血液細胞ライン(iPS-ML)の顕微鏡写真(位相差レンズ撮影像)で

ある。

[図13]図13は、cMYC と EZH2の強制発現により作製したミエロイド系血液細胞ライン (iPS-ML) のCD45、CD11b、CD33およびCD14分子の発現をフローサイトメーターにより解析した結果を示す。

[図14]図14は、cMYCとMDM2の強制発現により作製したヒトiPS細胞由来のミエロイド系血液細胞ライン(iPS-ML) の顕微鏡写真 (位相差レンズ撮影像) である。

[図15]図15は、cMYC と MDM2の強制発現により作製したミエロイド系血液細胞ライン (iPS-ML) のCD45、CD11b、およびCD33分子の発現をフローサイトメーターにより解析した結果を示す。

[図16]図16は、cMYCとMDM4の強制発現により作製したヒトiPS細胞由来のミエロイド系血液細胞ライン(iPS-ML) の顕微鏡写真 (位相差レンズ撮影像) である。

[図17]図17は、cMYC と MDM4の強制発現により作製したミエロイド系血液細胞ライン (iPS-ML) のCD45、CD11b、およびCD33分子の発現をフローサイトメーターにより解析した結果を示す。

[図18]図18は、cMYCとHIF1Aの強制発現により作製したヒトiPS細胞由来のミエロイド系血液細胞ライン(iPS-ML) の顕微鏡写真 (位相差レンズ撮影像) である。

[図19]図19は、cMYCとHIF1Aの強制発現により作製したミエロイド系血液細胞ライン (iPS-ML) のCD45、CD11b、およびCD33分子の発現をフローサイトメーターにより解析した結果を示す。

[図20]図20は、フィーダー細胞を使用しない分化誘導法により作製した、ヒトiPS細胞に由来するミエロイド系血液細胞(iPS-MC)の顕微鏡写真 (位相差レンズ撮影像) である。

[図21]図21は、フィーダー細胞を使用しない分化誘導法により作製した、ヒトiPS細胞に由来するミエロイド系血液細胞(iPS-MC)のCD45、CD11b、およびCD33分子の発現をフローサイトメーターにより解析した結果を示す。

[図22]図22は、フィーダー細胞を使用しない分化誘導法により作製した、ヒトiPS細胞に由来するiPS-MCに、cMYCとBMI1を強制発現することにより作製したiPS-MLの顕微鏡写真（位相差レンズ撮影像）である。

[図23]図23は、フィーダー細胞を使用しない分化誘導法により作製した、ヒトiPS細胞に由来するiPS-MCに、cMYCとBMI1を強制発現することにより作製したiPS-MLのCD45、CD11b、およびCD33分子の発現をフローサイトメーターにより解析した結果を示す。

[図24]図24は、cMYCとBMI1の強制発現により作製したヒト末梢血単球由来のミエロイド系血液細胞ライン(Mo-ML)の顕微鏡写真（位相差レンズ撮影像）である。

[図25]図25は、cMYCとBMI1の強制発現により作製したヒト末梢血単球由来のミエロイド系血液細胞ライン(Mo-ML)のCD45、CD11b、CD33およびCD14分子の発現をフローサイトメーターにより解析した結果を示す。

[図26]図26は、ヒト末梢血単球由来のミエロイド系血液細胞ライン（Mo-ML）に由来する樹状細胞様細胞（ML-DC）に関し、細胞表面上のHLAクラスII、CD80、およびCD86の発現をフローサイトメトリーを用いて解析した結果を示す。

[図27]図27は、ミエロイド系血液細胞ライン（Mo-ML）、およびそれに由来する樹状細胞様細胞（ML-DC）に関し、アロT細胞の増殖応答の誘導活性を調べた結果を示す。

[図28]図28は、cMYCおよびMDM2の強制発現により作製したヒト末梢血単球由来のミエロイド系血液細胞ライン(Mo-ML)の顕微鏡写真（位相差レンズ撮影像）である。

[図29]図29は、cMYCおよびMDM2の強制発現により作製したヒト末梢血単球由来のミエロイド系血液細胞ライン(Mo-ML)のCD45およびCD11b分子の発現をフローサイトメーターにより解析した結果を示す。

[図30]図30は、cMYC、EZH2、およびMDM2の強制発現により作製したヒト末梢血単球由来のミエロイド系血液細胞ライン(Mo-ML)の顕微鏡写真（位相差レ

ンズ撮影像)である。

[図31]図31は、cMYC、EZH2、およびMDM2の強制発現により作製したヒト末梢血単球由来のミエロイド系血液細胞ライン(Mo-ML)のCD45およびCD11b分子の発現をフローサイトメーターにより解析した結果を示す。

発明を実施するための形態

[0015] 図1に示すように、本発明は、多能性幹細胞に由来するミエロイド系血液細胞、あるいは、生体から直接採取されたミエロイド系血液細胞に対し、CD11b分子あるいはCD33分子を発現する細胞として定義されるミエロイド系血液細胞に、生体外において増殖する能力を獲得させることを特徴とする。本発明は、前記細胞に増殖する能力を獲得させるために、該ミエロイド系血液細胞において、(A) cMYC 遺伝子、並びに

(B) BMI1 遺伝子、EZH2 遺伝子、MDM2 遺伝子、MDM4 遺伝子、及びHIF1A 遺伝子からなる群から選択される少なくとも一つの遺伝子を強制的に発現させることを含むことを特徴とする。

[0016] 本発明において、出発材料となる「ミエロイド系血液細胞」は、CD11b分子あるいはCD33分子を発現する細胞として定義され、その由来は特に限定されるものではないが、例えば、多能性幹細胞に由来するミエロイド系血液細胞、あるいは生体(例えば、人体)から採取されたミエロイド系血液細胞(例えば、末梢血単球)が例として挙げられる。

[0017] 本発明において、「多能性幹細胞」とは、試験管内などの人工的に構成された条件下(in vitro)で増殖能を持ち、生体を構成する全ての細胞に分化が可能な細胞を言う。本発明では、多能性幹細胞として、胚性幹細胞又は人工多能性幹細胞(誘導多能性幹細胞 iPS細胞)を用いることが好ましく、人工多能性幹細胞を用いることがより好ましい。以下、本発明において用いられる胚性幹細胞及び人工多能性幹細胞について説明する。

[0018] (胚性幹細胞)

本発明で用いる胚性(ES)細胞は、哺乳動物由来のES細胞であればよく、その種類などは特に限定されず、例えば、マウス、サル又はヒト由来の

ES細胞などを使用することができる。例えば、ヒトの胚性（ES）細胞は、ヒトの初期胚から樹立された幹細胞であり、生体内に存在する全ての細胞へ分化できる能力（分化多能性）を維持したまま、長期に渡って生体外で増殖できる細胞である。

[0019] （人工多能性幹細胞）

本発明で用いるiPS細胞とは、体細胞に人為的な操作を加えることにより、胚性幹細胞に類似した分化多能性を獲得させた細胞である。ここで用いる体細胞の種類は特に限定されず、生体を構成する全ての細胞を包含する。

[0020] 本発明で言うiPS細胞は、所定の培養条件下（例えば、ES細胞を培養する条件下）において長期にわたって自己複製能を有し、また所定の分化誘導条件下において外胚葉、中胚葉及び内胚葉への多分化能を有する幹細胞のことを言う。また、本発明における人工多能性幹細胞はマウスなどの試験動物に移植した場合にテラトーマを形成する能力を有する幹細胞でもよい。

[0021] 体細胞からiPS細胞を製造するためには、まず、少なくとも1種類以上の初期化遺伝子を体細胞に導入する。初期化遺伝子とは、体細胞を初期化してiPS細胞とする作用を有する初期化因子をコードする遺伝子である。初期化遺伝子の組み合わせの具体例としては、以下の組み合わせをあげることができるが、これらに限定されるものではない。

(i) Oct遺伝子、Klf遺伝子、Sox遺伝子、Myc遺伝子

(ii) Oct遺伝子、Sox遺伝子、NANOG遺伝子、LIN28遺伝子

(iii) Oct遺伝子、Klf遺伝子、Sox遺伝子、Myc遺伝子、hTERT遺伝子、SV40 large T遺伝子

(iv) Oct遺伝子、Klf遺伝子、Sox遺伝子

[0022] Oct遺伝子、Klf遺伝子、Sox遺伝子及びMyc遺伝子にはそれぞれ、複数のファミリー遺伝子が含まれている。それぞれのファミリー遺伝子の具体例としては、国際公開WO2007/069666号公報の明細書の第11頁から第13頁に記載されているものを用いることができる。具体的には、以下の通りである。

- [0023] Oct遺伝子に属する遺伝子の具体例としては、Oct3/4 (NM_002701)、Oct1A (NM_002697)、及びOct6(NM_002699)などを挙げることができる（括弧内は、ヒト遺伝子のNCBI accession 番号を示す）。好ましくはOct3/4である。Oct3/4はPOUファミリーに属する転写因子であり、未分化マーカーとして知られており、また多能性維持に関与しているとの報告もある。
- [0024] Klf遺伝子に属する遺伝子の具体例としては、Klf1(NM_006563)、Klf2(NM_016270)、Klf4(NM_004235)、及びKlf5(NM_001730)などを挙げることができる（括弧内は、ヒト遺伝子のNCBI accession 番号を示す）。好ましくはKlf4である。Klf4 (Kruppel like factor-4) は腫瘍抑制因子として報告されている。
- [0025] Sox遺伝子に属する遺伝子の具体例としては、例えば、Sox1(NM_005986)、Sox2(NM_003106)、Sox3(NM_005634)、Sox7(NM_031439)、Sox15(NM_006942)、Sox17(NM_0022454)、及びSox18(NM_018419)を挙げることができる（括弧内は、ヒト遺伝子のNCBI accession 番号を示す）。好ましくはSox2である。Sox2は初期発生過程で発現し、転写因子をコードする遺伝子である。
- [0026] Myc遺伝子に属する遺伝子の具体例としては、c-Myc(NM_002467)、N-Myc(NM_005378)、及びL-Myc(NM_005376)などを挙げることができる（括弧内は、ヒト遺伝子のNCBI accession 番号を示す）。好ましくは、c-Myc である。c-Mycは細胞の分化及び増殖に関与する転写制御因子であり、多能性維持に関与しているとの報告がある。
- [0027] 上記した遺伝子は、ヒトを含む哺乳類動物において共通して存在する遺伝子であり、本発明において任意の哺乳類動物由来（例えばヒト、マウス、ラット、サルなどの哺乳類動物由来）の遺伝子を用いることができる。また、野生型の遺伝子に対して、数個（例えば1～30個、好ましくは1～20、より好ましくは1～10個、さらに好ましくは1～5個、特に好ましくは1から3個）の塩基が置換、挿入及び／又は欠失した変異遺伝子であって、野生型の遺伝子と同様の機能を有する遺伝子を使用することもできる。
- [0028] 本発明では特に好ましくは、初期化遺伝子として、Oct3/4遺伝子、Klf4遺

伝子、Sox2遺伝子、及びc-Myc遺伝子の組み合わせを用いることができる。

[0029] 初期化遺伝子を体細胞に導入する方法は、導入された初期化遺伝子が発現して体細胞の初期化を達成できる限り特に限定されない。例えば、少なくとも1種類以上の初期化遺伝子を含む発現ベクターを用いて該初期化遺伝子を体細胞に導入することができる。ベクターを用いて2種類以上の初期化遺伝子を体細胞に導入する場合には、一つの発現ベクターに2種類以上の初期化遺伝子を組み込んで、該発現ベクターを体細胞に導入してもよいし、1種類の初期化遺伝子を組み込んだ発現ベクターを2種類以上用意して、それらを体細胞に導入してもよい。

[0030] 発現ベクターの種類は特に限定されず、ウイルスベクターでもプラスミドベクターでもよいが、誘導多能性幹細胞の作製に使用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を含む）、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を挙げることができる。

[0031] 組換えウイルスベクタープラスミドをパッケージング細胞に導入することで組換えウイルスベクターを生産することができる。上記パッケージング細胞への上記ウイルスベクタープラスミドの導入法は、特に限定されず、リン酸カルシウム法、リポフェクション法又はエレクトロポレーション法などの公知の遺伝子導入法で行うことができる。

[0032] ES細胞の未分化性及び多能性を維持可能な培地は当業界で公知であり、適当な培地を組み合わせるにより、本発明の人工多能性幹細胞を分離及び培養することができる。即ち、本発明の人工多能性幹細胞を培養するための培地としては、ES培地、ES培地に10ng/mlの濃度のFGF-2を添加後にマウス胚性線維芽細胞を24時間培養した上清であるMEF馴化ES培地（以下MEF馴化ES培地）などをあげることができる。本発明の人工多能性幹細胞を培養するための培地には、各種の成長因子、サイトカイン、ホルモンなど（例えば、FGF-2、TGF β -1、アクチビンA、ノギン（Nanoggin）、BDNF、NGF、NT-1、NT-2、NT-3等のヒトES細胞の増殖・維持に關与する成分）を添加してもよい。

。また、分離された人工多能性幹細胞の分化能及び増殖能は、ES細胞について知られている確認手段を利用することにより確認することができる。

[0033] (多能性幹細胞からのミエロイド系血液細胞への分化)

本発明において、「多能性幹細胞に由来するミエロイド系血液細胞」とは、多能性幹細胞を生体外で培養しつつ分化誘導することにより作製された細胞であり、細胞表面上にミエロイド系血液細胞のマーカ分子であるCD11bあるいはCD33分子を発現する細胞を言う。ヒト多能性幹細胞をミエロイド系血液細胞へ分化させる方法は、当業界では公知である。例えば、非特許文献6、7、8、9には、ヒトの多能性幹細胞から、ミエロイド系血液細胞である樹状細胞やマクロファージを作製する方法が記載されている。以下、多能性幹細胞をミエロイド系血液細胞へ分化させる方法の例について具体的に説明するが、本発明は、以下の方法による分化誘導により製造された多能性幹細胞由来のミエロイド系血液細胞に限定されるものではない。

[0034] (多能性幹細胞からのミエロイド系血液細胞分化誘導法)

血液細胞の分化と増殖とを誘導する性質を有する細胞をフィーダー細胞として、多能性幹細胞と、該フィーダー細胞とを共培養することにより、多能性幹細胞を、中胚葉系細胞を含む細胞群に分化させることができる。

[0035] 「血液細胞の分化と増殖とを誘導する性質を有する細胞」としては、例えば、OP9細胞(理研バイオリソースセンター寄託番号:RCB1124)を用いることができる。

[0036] 「血液細胞の分化と増殖とを誘導する性質を有する細胞」は、適切な培地の入った培養容器において、当該フィーダー細胞に応じた培養条件下に培養し、該培養容器の底面をほぼ覆う程度まで増殖させ、マイトマイシンC溶液による処理又は放射線照射により細胞増殖を失わせた後に、再度、別途用意した細胞培養容器に移植してフィーダー細胞層を形成させて用いられ得る。このようにして作製したフィーダー細胞上に、上記多能性幹細胞を播種し、共培養を行うことができる。

[0037] 前記フィーダー細胞の作製、及び共培養に用いられる培地としては、付着性

の哺乳動物細胞の培養に適した培地が用いられ、フィーダー細胞の種類などに応じて適宜選択される。例えば、 α MEM、DMEM（ダルベッコ改変イーグル培地）、IMDM（イスコブ改変ダルベッコ培地）等が挙げられる。

[0038] 前記フィーダー細胞の培養条件としては、フィーダー細胞として用いる細胞の種類などに応じて適宜設定され得る。例えば、OP9細胞等の場合、0.1重量%ゼラチン溶液等でコーティングされた培養容器上で培養する条件等が挙げられる。

[0039] 上記共培養の気相条件は、用いられる多能性幹細胞の種類、培養液の組成等に応じて、適宜設定されうるが、例えば、37℃前後（特に、37℃）、5体積%CO₂等の条件が挙げられる。

[0040] 上記共培養により得られる細胞群は、中胚葉系細胞の性質を示すものであり、球状に近い形態を示す細胞の塊を含有する細胞群として得られうる。

[0041] 多能性幹細胞と、フィーダー細胞との共培養物から、特に、多能性幹細胞に由来し、中胚葉系細胞に分化した細胞を多く含む細胞集団を分離して、後の工程に用いることが好ましい。分化した中胚葉系細胞を分離する方法としては、共培養後に回収した細胞を培養容器中に静置して付着性の強い細胞を除去することにより、付着性の弱い細胞である中胚葉系細胞を回収する方法を挙げることができる。例えば、上記共培養物をトリプシン、コラゲナーゼ等の酵素で処理し、全細胞を回収し、DMEM等の適切な培地適当量で希釈した後、該細胞溶液を新たに用意した培養容器に播種する。播種から2～5時間経過した後、培養容器に付着した細胞を廃棄し、培地中の付着しなかった細胞を中胚葉系細胞を多く含む細胞集団として回収することができる。また、回収した細胞浮遊液に含まれる100 μ m以上の大きさの細胞塊は、ナイロン製のメッシュ（例えば、BD、Falcon社、セルストレイナー、100 μ mナイロン）等を用いて除去することが好ましい。

[0042] 続いて、上記の通り得られた中胚葉系細胞を含む細胞群を、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（GM-CSF）及び／又はマクロファージコロニー刺激因子（M-CSF）の存在下で培養することにより、該中胚葉系細胞

をミエロイド系血液細胞に分化させることができる。中胚葉系細胞を含む細胞群をミエロイド系血液細胞に分化させる際に用いることができる培地、培養条件等は特に限定させるものではないが、上述のフィーダー細胞の培養及び共培養と同様の培地、培養条件等を採用することができる。

[0043] 培地中の顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 (GM-CSF) の含有量は、中胚葉系細胞のミエロイド系血液細胞への分化を促進させる観点から、50~200 ng/ml、好ましくは75~150 ng/mlの範囲とすることができる。また、培地中のマクロファージコロニー刺激因子 (M-CSF) の含有量は、中胚葉系細胞のミエロイド系血液細胞への分化を促進させる観点から、10~100 ng/ml、好ましくは25~75 ng/mlの範囲とすることができる。

[0044] 中胚葉系細胞のミエロイド系血液細胞への分化に要する培養期間としては、培養条件等により限定されるものではないが、例えば、1日~20日、好ましくは2日~15日程度である。

[0045] 多能性幹細胞からミエロイド系血液細胞への分化を誘導する培養法としては、非特許文献6あるいは7に記載されているように、フィーダー細胞を用いない方法、あるいは、動物由来の血清を含有しない培養液を用いる方法を使用することも可能である。以下、フィーダー細胞を使用せず、かつ、動物由来の血清を含有しない培養液を使用して、多能性幹細胞をミエロイド系血液細胞へ分化させる方法の一例について、具体的に説明する。なお、フィーダー細胞を用いることなく多能性幹細胞からミエロイド系血液細胞への分化を誘導する培養法としては、非特許文献6あるいは7に記載されているように、ここで説明する方法以外にも知られている。本発明で用いるミエロイド系血液細胞は、いずれかの方法による分化誘導により製造された多能性幹細胞由来のミエロイド系血液細胞に限定されるものではない。

[0046] (フィーダー細胞を用いない多能性幹細胞からのミエロイド系血液細胞分化誘導法の例)

フィーダー細胞と非ヒト動物の血清のいずれをも用いずに分化誘導を行う場

合、細胞の培養容器への付着を助けるために、フィブロネクチンなどによるコーティングを施した培養容器を用いることができる。培養容器のコーティングに用いるフィブロネクチンは、ヒト血漿から精製したもの、あるいは、遺伝子組換えタンパク質として作製されたヒトフィブロネクチン断片等を用いることが可能である。

- [0047] 非ヒト動物の血清を含まない培養液を用いる場合は、D-MEM（ダルベッコ改変イーグル培地）あるいは α -MEM（アルファ-ミニマムエッセンシャル培地）等にKSR（ライフテクノロジー社製）あるいはPeprogrow III（ペプロテック社製）等の血清代替添加物を加えたもの、あるいは、市販の無血清培養液（AIM-V、OpTmizer: ライフテクノロジー社 Stemline: シグマ社）を用いることができる。
- [0048] ヒトのフィブロネクチンをコートした培養容器中で、ヒトの多能性幹細胞を動物由来の血清を含有しない培養液を用いて、15-20日間培養する。また、非ヒト動物の血清を含まない培養液には、多能性幹細胞の分化を促進する目的で、ヒトBMP-4（Bone Morphogenic Protein 4）を添加する。
- [0049] 分化誘導培養を行うと様々な細胞系譜の分化細胞が出現するが、この中から中胚葉系細胞に分化した細胞を分離して、分離した細胞を、中胚葉系細胞を含む細胞群として後の工程に用いることが好ましい。分化した中胚葉系細胞を分離する方法としては、フィーダー細胞を用いた分化誘導法の場合と同様に、共培養後に回収した細胞を培養容器中に静置して付着細胞を除去することにより、浮遊細胞である中胚葉系細胞を多く含む細胞集団を回収する方法を挙げることができる。
- [0050] 続いて、上記の通り得られた中胚葉系細胞を多く含む細胞群を、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（GM-CSF）及び／又はマクロファージコロニー刺激因子（M-CSF）の存在下で培養することにより、該中胚葉系細胞をミエロイド系血液細胞に分化させることができる。中胚葉系細胞を含む細胞群をミエロイド系血液細胞に分化させる際に用いることができる培地、培養条件等は特に限定されるものではなく、各種の無血清培養液を使用す

ることができる。

[0051] 本発明においては、生体内（例えば、ヒトの体内）に存在するミエロイド系血液細胞を用いることも可能である。生体内に存在するミエロイド系血液細胞として、例えば、末梢血中の単球（モノサイト）を用いることも可能であり、ヒトの末梢血単球を用いることが好ましい。以下に、生体内に存在するミエロイド系血液細胞を得る方法の一例としてヒトの末梢血中からの単球の分離方法を説明するが、本発明において用いられるミエロイド系血液細胞を得る方法は、この方法に限定されるものではない。

[0052] （ヒト末梢血からの単球の分離）

ヒトの末梢血を採血する。抗凝固剤としては、ヘパリンあるいはクエン酸などを用いる。採血した血液を等量の生理的食塩水、リン酸緩衝生理的食塩水、あるいは、ハンクス緩衝溶液などを用いて希釈する。次に、希釈した血液を、あらかじめ遠心チューブ（BD-Falcon 352070等）中に分注しておいたフィコール液（GE ヘルスケア社）の上に重層する。そして、遠心分離装置を用いて、遠心力500gで20分間遠心した後、界面付近に存在する単核細胞分画（リンパ球と単球を含む）を回収する。

[0053] 単球は、単核細胞中からCD14分子の発現を指標として、磁気ビーズ法などにより分離することができる。例えば、CD14マイクロビーズ（ミルテニー社 130-050-201）等を用いることにより分離することが可能である。あるいは、単核細胞分画を、細胞培養用の表面処理がなされた細胞培養容器を用いて6-16時間ほど培養し、容器に付着した細胞を回収することにより、単球あるいはそれに由来するマクロファージを得ることも可能である。通常、健康な成人の末梢血10mlから、200,000-500,000個の単球を回収することができる。

[0054] （ミエロイド系血液細胞への長期増殖能力の付与）

本発明は、多能性幹細胞由来のミエロイド系血液細胞、あるいは、生体から採取したミエロイド系血液細胞において、cMYC遺伝子、並びにBMI1、EZH2、MDM2、MDM4、及びHIF1A遺伝子からなる群から選択される少なくとも一つ

の遺伝子を強制的に発現させることにより、これらの細胞に長期増殖能を付与する。前記遺伝子を強制的に発現させるための方法として、ミエロイド系血液細胞のゲノム上に存在する内在性の遺伝子を強制的に発現させても良いし、あるいは外来の遺伝子を該ミエロイド系血液細胞に導入することにより、これら遺伝子の強制的な発現を行っても良い。遺伝子の効率的かつ高レベルの発現を達成し、ミエロイド系血液細胞に長期増殖能を確実に付与する観点から、遺伝子工学技術を用いて外来遺伝子を該ミエロイド系血液細胞に導入する方法が好ましい。

本発明において、「増殖能力を有するミエロイド系血液細胞」とは、上記の通り、ミエロイド系血液細胞において上記遺伝子を強制的に発現させることにより長期増殖能が付与されたミエロイド系血液細胞を意味する。本発明の「増殖能力を有するミエロイド系血液細胞」は、上記遺伝子が導入されていない、対照となるミエロイド系血液細胞（つまり、出発材料として用いたミエロイド系血液細胞）と比較して、より長期に渡り増殖することが可能となり、例えば、上記遺伝子を強制的に発現させた時点（上記遺伝子を細胞に導入した時点）から2週間以上増殖することが可能である。

[0055] cMYC遺伝子の具体例としては、上記人工多能性幹細胞の調製に用いられる、ヒトのcMYC遺伝子（NM__002467）を挙げることができる（括弧内は、NCBI accession番号を示す。）。BMI1遺伝子、EZH2遺伝子、MDM2遺伝子、MDM4遺伝子、HIF1A遺伝子の具体例としては、それぞれ、ヒトのBMI1遺伝子（NM__005180）、ヒトのEZH2遺伝子（NM__004456）、ヒトのMDM2遺伝子（NM__002392）、ヒトのMDM4遺伝子（NM__002393）、ヒトのHIF1A遺伝子（NM__001530）を挙げることができる（括弧内は、NCBI accession番号を示す。）。

[0056] cMYC遺伝子、BMI1遺伝子、EZH2遺伝子、MDM2遺伝子、MDM4遺伝子、及びHIF1A遺伝子は、ヒトを含む哺乳類動物において共通して存在する遺伝子であり、本発明において任意の哺乳類動物由来（例えばヒト、マウス、ラット、サルなどの哺乳類動物由来）の遺伝子を用いることができる。また

、野生型の遺伝子に対して、数個（例えば1～30個、好ましくは1～20、より好ましくは1～10個、さらに好ましくは1～5個、特に好ましくは1から3個）の塩基が置換、挿入及び／又は欠失した変異遺伝子であって、野生型の遺伝子と同様の機能を有する遺伝子を使用することもできる。また、野生型の遺伝子と同等あるいはそれ以上の機能を有する限りにおいて、該遺伝子の産物が他のタンパク質あるいはペプチドとの融合タンパク質として発現されるように人為的に修飾を加えた遺伝子でも良い。

[0057] cMYC、BMI1、EZH2、MDM2、MDM4、あるいはHIF1A遺伝子を上記ミエロイド系血液細胞に導入する方法は、導入されたこれら遺伝子が発現してミエロイド系血液細胞に長期増殖能を付与できる限り、特に限定されるものではない。例えば、導入遺伝子を含む発現ベクターを用いて該遺伝子をミエロイド系血液細胞に導入することができる。また、一つの発現ベクターに複数の遺伝子を組み込んで、該発現ベクターをミエロイド系血液細胞に導入してもよいし、各遺伝子を別々に組み込んだ発現ベクターを用意して、それらをミエロイド系血液細胞に導入してもよい。

[0058] 発現ベクターの種類は特に限定されず、ウイルスベクターでもプラスミドベクターでもよいが、好ましくはウイルスベクターであり、特に好ましくは導入した遺伝子がミエロイド系血液細胞の染色体に組み込まれるようなウイルスベクターである。本発明で使用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、アデノ随伴ウイルスベクターなどを挙げるができる。

[0059] 組み換えウイルスベクターを作製するために用いるパッケージング細胞としては、ウイルスのパッケージングに必要なタンパク質をコードする遺伝子の少なくとも1つを欠損している組換えウイルスベクタープラスミドの該欠損するタンパク質を補給できる細胞であれば任意の細胞を用いることができる。例えばヒト腎臓由来のHEK293細胞、マウス線維芽細胞NIH3T3に基づくパッケージング細胞を用いることができる。

[0060] 組換えウイルスベクタープラスミドをパッケージング細胞に導入すること

で組換えウイルスベクターを生産することができる。上記パッケージング細胞への上記ウイルスベクタープラスミドの導入法は、特に限定されず、リン酸カルシウム法、リポフェクション法又はエレクトロポレーション法などの公知の遺伝子導入法で行うことができる。さらに、プラスミドを導入したパッケージング細胞の培養上清から、遠心分離法、あるいはウイルス精製用として市販されているカラムを用いる濃縮する方法などにより遺伝子組換えウイルスを濃縮した溶液を回収することができる。

[0061] 多能性幹細胞に由来するミエロイド系血液細胞、あるいは、人体から直接採取したミエロイド系血液細胞に対して、培養容器の中で、前記の様に調整した遺伝子組換えウイルスを含む溶液を添加することにより、ウイルスを感染させ、目的とする遺伝子を導入する。

[0062] (増殖能力を有するミエロイド系血液細胞の増殖方法)

上記の通り製造した生体外で増殖する能力を有するミエロイド系血液細胞は、M-CSFを含む細胞培養液を用いて培養することができる。培養液中のマクロファージコロニー刺激因子(M-CSF)の含有量は、25~100 ng/mlの範囲とすることができる。あるいは、レンチウイルスベクター等を用いてM-CSF遺伝子をミエロイド系血液細胞自身に導入することによりミエロイド系血液細胞自身にM-CSFを産生させることも可能である。この場合は、M-CSFを添加していない細胞培養液を用いて培養し、増殖させることが可能である。

[0063] (ミエロイド系血液細胞からの樹状細胞様細胞への分化)

本発明の生体外で増殖する能力を有するミエロイド系血液細胞から、樹状細胞様細胞を製造することが可能である。例えば、本発明の長期増殖能を有するミエロイド系血液細胞を、GM-CSF及びインターロイキン4(IL-4)の存在下で培養することにより、樹状細胞様細胞を製造することができる。培養液中のGM-CSFの含有量は、50~200 ng/mlの範囲、IL-4の含有量は、5~20 ng/mlの範囲とすることができる。本発明において、「樹状細胞様細胞」とは、形態、細胞表面分子、T細胞刺激能力と

いう点で単球由来樹状細胞等と類似した性質を有する細胞である。

[0064] (細胞医薬)

本発明のミエロイド系血液細胞は、生体内に存在するマクロファージ等と同様に微生物などを貪食する活性を有しており、感染症や悪性腫瘍に対する免疫細胞療法を行うための細胞医薬を提供することができる。また、本発明のミエロイド系血液細胞は、アルツハイマー病、プリオン病、アミロイドーシス、がん、白血病、或いはある種の代謝性疾患など、体内に特定の物質が大量に蓄積することに起因する疾患等の治療に用いるための細胞医薬を提供することもできる。また、本発明の長期増殖能を有するミエロイド系血液細胞に由来する樹状細胞様細胞は、悪性腫瘍や感染症の治療に用いるための細胞ワクチンとして使用することができる。さらに、本発明のミエロイド系血液細胞に由来する樹状細胞様細胞は、自己免疫疾患や臓器移植に伴う拒絶反応等を治療する目的で、免疫応答の制御に用いるための細胞医薬を提供することができる。

[0065] 本発明の細胞医薬の製造の際には、本発明の長期増殖能を有するミエロイド系血液細胞、及びそれに由来するミエロイド系血液細胞を安定に保持しうることを目的として、前記したもの以外の助剤、例えば、培地等を適宜用いてもよい。

[0066] 以下の実施例により本発明をさらに具体的に説明するが、本発明は以下の実施例により特に限定されるものではない。

実施例

[0067] 実施例1：レンチウイルスベクターの作製

PCR法により初期化因子であるヒトのOCT3/4, SOX2, KLF4, および c-MYCのcDNAを合成し、プラスミドベクター (pENTR-D-TOPO, Gibco-Invitrogen社) へ挿入しクローニングを行った。その後、クローニングを行ったプラスミドDNAの塩基配列をシーケンス解析により確認した。ヒトBMI1、EZH2、MDM2、MDM4、及びHIF1AのcDNAクローンは、理化学研究所BRC遺伝子材料開発室あるいは製品評価技術基盤機構より入手した。

- [0068] LR clonase (Gibco-Invitrogen社)を用いて、前記したcDNA断片をレンチウイルスベクター (CSII-EF-RfA1, 理化学研究所 三好浩之博士より分与) へ挿入した。
- [0069] リポフェクション法 (Lipofectamine 2000, Invitrogen社) を用いて、上記で作製したCSII-EFに導入した遺伝子の各々とパッケージングコンストラクト (pCAG-HIVgp, 三好博士より分与)、およびエンベロープおよびRevのコンストラクト (pCMV-VSV-G-RSV-Rev, 三好博士より分与) をパッケージング細胞 (ウイルス産生細胞) である293T細胞へ導入した。
- [0070] 293T細胞への遺伝子導入の3日後に、細胞培養液を回収し、0.45 μ mのフィルターを通した後、遠心分離法 (50,000G、2時間) によりウイルス粒子を沈澱させ回収した。回収した組換えウイルス粒子は、DMEM溶液に懸濁した後、凍結チューブに分注し、使用時まで冷凍庫 (-80°C) にて保存した。
- [0071] 実施例2：ヒト人工多能性幹 (iPS) 細胞の作製
ヒト腹部の皮膚片を採取し、細胞培養用プレート中で培養液 (DMEM / 10% 牛血清) を用いて培養した。培養開始1週間目以降より、皮膚片からの線維芽細胞の遊走と増殖が認められたので、トリプシン/EDTA含有リン酸干渉生理食塩水 (トリプシン-EDTA) を用いて、適宜、線維芽細胞を回収し凍結保存した。
- [0072] 凍結保存しておいたヒト線維芽細胞を解凍し、数日間、再度培養した後、培養プレート中において前述のとおり作製し凍結保存しておいたOCT3/4, SOX2, KLF4, およびc-MYCを発現するレンチウイルスベクターを同時に加え、遺伝子導入を行った。
- [0073] 遺伝子導入の4-6日後、トリプシン-EDTAを用いて感染細胞を回収し、事前に準備しておいたマイトマイシンC処理により増殖を停止させたマウス胎児由来線維芽細胞 (フィーダー細胞) との共培養を開始した。その翌日より、培養液をヒトES細胞用の培養液に置換し、培養を継続した。
- [0074] レンチウイルスベクターによる初期化因子の遺伝子の導入から20-30日の後、顕微鏡観察の下で、マイクロチップを用いてES細胞様の形態を示すコロ

ニーを人工多能性幹 (iPS) 細胞クローンとして単離し、別に準備しておいたマウス胎児由来フィーダー細胞との共培養を行った。その後、細胞の増殖に応じて、培養容器を拡大しつつ培養を継続した。

[0075] ヒトiPS細胞の維持培養は、ヒト胚性幹細胞用培養液 (DMEM-F12(Wako Chemicals)/20% KSR(Gibco-Invitrogen)/bFGF (basic fibroblast growth factor: 10 ng/ml)/2-ME (2-メルカプトエタノール, 50 μ M)) を用いて、マイトマイシンC処理マウス胎児線維芽細胞をフィーダー細胞としてポリスチレン製培養皿にて行った。細胞の増殖に応じて、4-5日に一度、細胞をCTK液 (コラゲナーゼ-トリプシン-KSR液、Biochemical and Biophysical Research Communications 345: 926-932, 2006年) を用いて5-10分間処理して回収し、適当な大きさの培養容器へ播種し培養を継続した。

[0076] 実施例3 : ヒト人工多能性幹細胞のミエロイド系血液細胞 (iPS-MC) への分化誘導

(1) OP9フィーダー細胞の調整

マウス由来の培養細胞株OP9をマイトマイシンCにて処理 (0.01 mg/ml、60分) したものを、ゼラチンをコートしたディッシュに播種し、翌日以降に使用した。

[0077] (2) 分化誘導培養

未分化なiPS細胞を、CTK液を用いて5-10分間処理し、牛胎児(FCS)血清入りのDMEM培養液で回収した。細胞を α -MEM/20%FCSに懸濁し、OP9フィーダー細胞上へ播種し、分化誘導培養を開始した。以降、3日に1度、培養液 (α -MEM/20%FCS) を交換しつつ培養を継続した。

[0078] 分化誘導開始から18日後、トリプシン-EDTA (エチレンジアミン四酢酸) - コラゲナーゼ液を用いて細胞を処理 (37°C 60分) して解離させて回収し、ピペッティング操作により細胞浮遊液を作製した。そして、直径10cmのディッシュ1枚に由来する細胞を10 ml のDMEM/10% FCSに懸濁し、フィーダー細胞なし、ゼラチンコートなしの直径10cmのディッシュ2枚に播種した。2-5時間後、ディッシュに付着しなかった細胞を回収し、100ミクロンのメッシュ (

BD Falcon社製 セルストレイナー) を通過させることにより、凝集細胞塊を除いた細胞浮遊液を得た。

[0079] メッシュを通過した細胞を、 α -MEM / 20%FCS / ヒト GM-CSF (100 ng/ml、ペプロテック社製) / ヒト M-CSF (50 ng/ml、ペプロテック社製) に浮遊させ、OP9フィーダー細胞を用いずに、培養を行った。その後、3~9日程度経過すると、浮遊性あるいは弱付着性の細胞が出現し、日を追って細胞数が増加するのが観察された。図2に、このiPS細胞に由来する分化細胞の顕微鏡写真を示す。

[0080] 前記の浮遊細胞を回収し、白血球マーカー分子であるCD45、および、ミエロイド系細胞マーカーであるCD11bとCD33の発現を検討した。まず、抗体の非特異的な結合を阻害する目的で、Fcレセプターブロック試薬 (Miltenyi Biotec社製) を用いて10分間処理した。その後、フルオレセインイソチオシアネート (FITC) 標識-抗ヒトCD45モノクローナル抗体、フィコエリスロシン (PE) 標識-抗ヒト/マウスCD11b抗体、あるいは、PE標識-抗ヒトCD33抗体を用いて室温中で40分間染色した。また、陰性対照として、同一の蛍光色素で標識したアイソタイプ適合対照抗体を用いて染色した。

[0081] その後、細胞を、PBS / 2% FCSで2回洗浄し、洗浄後の細胞について、CellQuest ソフトウェアを備えたフローサイトメーター解析装置 (商品名: FACScan, Becton Dickinson社製) を用いて分析した。

[0082] 図3に、フローサイトメーター解析により、この細胞の細胞表面に発現する分子を調べた結果を示す。特異的染色のパターンとアイソタイプ適合対照抗体を用いた染色パターンを重ねあわせたヒストグラムを示している。この図に示す結果から、このヒトiPS細胞を分化誘導することによって得られた浮遊細胞が、汎白血球マーカー分子であるCD45を発現していることが分かる。さらに、その多くがミエロイド系血液細胞のマーカー分子であるCD11bあるいはCD33を発現していることが分かる。この、iPS細胞に由来し、ミエロイド系

血液細胞のマーカー分子を発現する細胞をiPS-MC (iPS cell-derived myeloid cells: iPS細胞に由来するエロイド系血液細胞) と命名した。

[0083] 実施例4: iPS-MCへのcMYCおよびBMI1の導入による長期増殖能力の付与 (iPS-MLの作製)

前項で作製したiPS-MCを24穴培養プレート中で培養し、そこへcMYCあるいはBMI1を発現するレンチウイルス懸濁液を単独で、あるいは同時に加えることにより、感染させた。遺伝子導入の翌日より、細胞の増殖に応じて培養液を追加しつつ、培養スケールの拡大を行った。培養液としては、継続的に、 α -MEM / 20%FCS / ヒト GM-CSF (100 ng/ml) / ヒト M-CSF (50 ng/ml、) を用いた。

[0084] cMYCを発現するレンチウイルスのみを感染させた場合には、iPS-MCは倍加時間約2日の速度で増殖した。しかしながら、レンチウイルスを感染させてから約2週間後、増殖を停止した。結果的に、レンチウイルスによるcMYCの強制的発現により、iPS-MCは30倍から100倍程度に増殖した後に増殖を停止した。

[0085] cMYCレンチウイルスのみを感染させた後、2週間以上が経過し増殖を停止しているiPS-MCに、さらにcMYCレンチウイルスを感染させてもその後の細胞増殖は観察されなかった。

[0086] BMI1のレンチウイルスのみを感染させた場合には、iPS-MCは、ゆっくりと増殖し、2-3倍程度の細胞数となった後、増殖を停止した。

[0087] cMYCとBMI1を発現するレンチウイルスを同時に感染させた場合には、iPS-MCはcMYCレンチウイルスのみを感染させた場合よりも速い速度で増殖した。また、cMYCレンチウイルスのみを感染させた場合とは異なり、レンチウイルスを感染させてから2週間目以降も増殖を続けた。このように長期間にわたり増殖する能力を獲得したiPS-MCをiPS-ML (iPS-MC line、iPS cell-derived myeloid cell line、長期増殖能を有するiPS細胞に由来するミエロイド系血液細胞ライン) と名付けた。

[0088] 増殖するiPS-MLを一定の細胞密度 ($1 \times 10^5 - 1 \times 10^6$ 個/ml) を維持しつつ培養を継続した。iPS-MLは、レンチウイルスを感染させた後、4か月間以上

にわたって一定の速度(倍加時間2-3日)で増殖を続けた。図4に、iPS-MLの顕微鏡写真を示す。

[0089] 図5に、iPS-MLにおける、CD45、CD11b、およびCD33の発現を検討したフローサイトメーター解析の結果を示す。この結果から、iPS-MLは、細胞表面上に白血球マーカー分子であるCD45、さらにミエロイド細胞のマーカー分子であるCD11bおよびCD33を発現していることが確認された。

[0090] 実施例5：iPS-MLの増殖におけるM-CSFおよびGM-CSFの必要性の検討

cMYCとBMI1を発現するレンチウイルスを感染させた後、2か月間培養を継続した後のiPS-MLを回収し96穴培養プレート(FALCON 353072)に播種し(5 x 10³細胞 / well)培養を行った。そして、培養液中にGM-CSFとM-CSFが含まれている(50 ng/mlあるいは100 ng/ml)場合と含まれていない場合とで増殖の速度を比較した。

[0091] 96穴培養プレートでの培養開始から48時間後に、³H-メチルチミジン(37 K bq/well)を添加し、その18時間後にセルハーベスタ(Wallac社)を用いて細胞中の高分子量DNAをガラスフィルターに捕捉した。そして、高分子量DNAへの³H-チミジンの取込みを、シンチレーション計測(Wallac社のマイクロベータシステムを使用)により測定した。高分子量DNAへの³H-チミジンの取込みは、DNA合成の速度すなわち細胞増殖の速度に比例する。

[0092] 図6にシンチレーション計測の結果を示す。この結果から、iPS-MLの増殖には、培養液中に50 ng/ml程度のM-CSFが含まれていることが必要であることがわかる。一方、GM-CSFは必ずしも必要ではないが、増殖を促進する効果があることがわかる。

[0093] 実施例6：iPS-MLによる真菌の菌体粒子(ザイモサン)の貪食能の解析

一般に、ミエロイド系血液細胞は、細菌や真菌などの微生物を貪食する強い活性を有している。そこで、iPS-MLによる真菌の菌体粒子(ザイモサン)の貪食活性を検討した。維持培養中のiPS-MLをピペッティング操作により培養フラスコから回収し、細胞培養用のコーティングがなされている24穴培養プレート(FALCON 353047)へ播種した(2 x 10⁵/well)。3時間静置しiPS-ML

の多くが培養プレートの底面に付着したのを確認した後、FITC標識ザイモサン(Molecular Probe社 22841)を加えた。さらに3時間が経過した後、蛍光顕微鏡による観察を行った。

[0094] 図7に顕微鏡写真を示す。左側の明視野画像(位相差レンズにより撮影)に、培養プレートに付着しているiPS-MLが認められる。右側の画像は、左側の画像と同じ視野をFITCが発する蛍光を検出する条件で撮影したものである。この蛍光観察画像では、FITC標識ザイモサン粒子の局在を示すシグナルが、iPS-MLに一致して集積しているのが認められる。この結果から、iPS-MLが、FITC標識ザイモサン粒子を貪食していることが示された。

[0095] 次に、iPS-MLによるザイモサン粒子貪食の時間経過を観察した。24穴培養プレートに付着しているiPS-MLにFITC標識ザイモサンを加え、一定時間(5, 10, 20, 40, あるいは80分)が経過した後、トリプシン/EDTAを用いてiPS-MLを回収した。フローサイトメーター解析装置を用いて特異的な蛍光を有する細胞、すなわち、FITC標識ザイモサンを貪食した細胞の割合を解析した。

[0096] 図8に、フローサイトメーターによる解析の結果を示す。この結果から、時間の経過に従って、ザイモサン粒子を貪食したiPS-MLの頻度が増加することが示された。今回の実験では、ザイモサン粒子を添加してから30分の間に約半数のiPS-MLがザイモサン粒子を貪食していた。

[0097] 実施例7：iPS-MLの樹状細胞様細胞(ML-DC)への分化誘導

cMYCを発現するレンチウイルスとBMI1を発現するレンチウイルスを同時に感染させた後、40日経過した後のiPS-MLをGM-CSF(100 ng/ml)とIL-4(10 ng/ml)の存在下で4日間培養し、樹状細胞様細胞(ML-DC)への分化誘導を行った。さらにTNF(腫瘍壊死因子)- α (10 ng/ml)を添加して2日間培養した時の細胞の形態(位相差顕微鏡写真)を、図9に示す。突起を有する不規則な形態の細胞がクラスターを形成しているのがわかる。

[0098] 上記のように作製したML-DCをピペッティング操作により回収し、抗HLAクラスII抗体、抗ヒト80抗体、あるいは抗ヒト86抗体を用いて染色した。あるいは、アイソタイプ適合対照抗体を用いて染色した。その後、細胞を、PB

S / 2% FCSで2回洗浄した。洗浄後の細胞について、CellQuestソフトウェアを備えたフローサイトメーター解析装置（商品名：FACSscan, Becton Dickinson社製）を用いて分析した。

[0099] 図10に抗体染色後のフローサイトメーター解析の結果を示す。この図では、特異的染色のパターン（実線）とアイソタイプ適合対照抗体を用いた染色パターン（破線）を重ねあわせて示している。この解析の結果からML-DCは、生理的に存在する樹状細胞と同様に、Tリンパ球の活性化に関連するCD80、CD86、およびHLAクラスIIを細胞表面上に発現していることが判明した。

[0100] 実施例8：ML-DCのT細胞刺激能力の検討

iPS-MLをGM-CSF(100 ng/ml)とIL-4 (10 ng/ml)の存在下で4日間培養してML-DCを作製し、さらにTNF(腫瘍壊死因子)- α (10 ng/ml)を添加して2日間培養した後、細胞を回収した。この細胞に45 GyのX線を照射して細胞増殖を停止させた後、96穴丸底培養プレート (FALCON 353077) に播種し (1×10^2 細胞- 1×10^4 細胞/well)、刺激細胞とした。TNF- α の添加を行っていないML-DC、あるいは、GM-CSFとIL-4を加えていないiPS-MLも、同様に45GyのX線を照射して細胞増殖を停止させた後、培養プレートに播種し、刺激細胞とした。そして、反応細胞として、アロのドナー由来の末梢血T細胞を加え (5×10^4 細胞/well)、培養を行った。末梢血T細胞は、ヒトT細胞分離キット (ミルテニーバイオテク社 130-091-156) を用いて分離したものを用了。

[0101] 培養開始から4日後に ^3H -メチルチミジンを添加 (37 Kbp/well) した。その18時間後にセルハーベスタ (Wallac社) を用いて細胞中の高分子量DNAをガラスフィルターに捕捉した。ガラスフィルターに捕捉された ^3H -チミジンの放射活性をシンチレーション計測 (Wallac社のマイクロベータシステムを使用) により測定することにより、高分子DNA合成の速度、すなわちT細胞の増殖速度を定量化した。

[0102] 図11にT細胞増殖応答解析の結果を示す。3種類の刺激細胞 (iPS-MLあるいはTNF- α 処理を行った、あるいは、行っていないML-DC) のいずれも、アロT細胞を刺激し増殖応答を誘導する活性を有していることが判明した。そして

、3種類の刺激細胞のなかでは、TNF- α 処理を行ったML-DCが最も強力なT細胞刺激能力を有していることが分かる。以上の結果から、iPS-MLに由来するML-DCが、強力なT細胞刺激能力を有していることが示された。

[0103] 実施例9：iPS-MCへのcMYCとEZH2の導入によるiPS-MLの作製

前項で作製したiPS-MCを24穴培養プレート中で培養し、そこへcMYCとEZH2を発現するレンチウイルス懸濁液を同時に加えることにより感染させ、iPS-MLを作製した。図12に、この細胞の顕微鏡写真を示す。図13に、フローサイトメーターによりCD45、CD11b、CD33およびCD14の発現を検討した結果を示す。

本実施例により得られたiPS-MLは、cMYCのみを導入した細胞よりも速い速度で増殖した。さらに、得られたiPS-MLは、cMYCのみ導入した細胞よりも長期に渡り増殖し、レンチウイルスを感染させてから2週間目以降も増殖を続けた。

[0104] 実施例10：iPS-MCへのcMYCとMDM2の導入によるiPS-MLの作製

前項で作製したiPS-MCを24穴培養プレート中で培養し、そこへcMYCとMDM2を発現するレンチウイルス懸濁液を同時に加えることにより感染させ、iPS-MLを作製した。図14に、この細胞の顕微鏡写真を示す。図15に、フローサイトメーターによりCD45、CD11b、およびCD33の発現を検討した結果を示す。

本実施例により得られたiPS-MLは、cMYCのみを導入した細胞よりも速い速度で増殖した。さらに、得られたiPS-MLは、cMYCのみ導入した細胞よりも長期に渡り増殖し、レンチウイルスを感染させてから2週間目以降も増殖を続けた。

[0105] 実施例11：iPS-MCへのcMYCとMDM4の導入によるiPS-MLの作製

前項で作製したiPS-MCを24穴培養プレート中で培養し、そこへcMYCとMDM4を発現するレンチウイルス懸濁液を同時に加えることにより感染させ、iPS-MLを作製した。図16に、この細胞の顕微鏡写真を示す。図17に、フローサイトメーターによりCD45、CD11b、およびCD33の発現を検討した結果を示す。

。

本実施例により得られたiPS-MLは、cMYCのみを導入した細胞よりも速い速度で増殖した。さらに、得られたiPS-MLは、cMYCのみ導入した細胞よりも長期に渡り増殖し、レンチウイルスを感染させてから2週間目以降も増殖を続けた。

[0106] 実施例12：iPS-MCへのcMYCとHIF1aの導入によるiPS-MLの作製

前項で作製したiPS-MCを24穴培養プレート中で培養し、そこへcMYCとHIF1aを発現するレンチウイルス懸濁液を同時に加えることにより感染させ、iPS-MLを作製した。図18に、この細胞の顕微鏡写真を示す。図19に、フローサイトメーターによりCD45、CD11b、およびCD33の発現を検討した結果を示す。

本実施例により得られたiPS-MLは、cMYCのみを導入した細胞よりも速い速度で増殖した。さらに、得られたiPS-MLは、cMYCのみ導入した細胞よりも長期に渡り増殖し、レンチウイルスを感染させてから2週間目以降も増殖を続けた。

[0107] 実施例13：フィーダー細胞を用いないヒト人工多能性幹細胞のミエロイド系血液細胞(iPS-MC)への分化誘導およびiPS-MLの作製

未分化なヒトiPS細胞を、CTK液を用いて回収し、ヒトフィブロネクチンをコートした培養容器中で培養した。培養液は、OpTmizer™ T-Cell Expansion SFM (Life Technologies社)とStemline II Hematopoietic Stem Cell Expansion Medium(SIGMA社)を1:1で混合したもの、および、Peprogrow III(Peprotech社)を順次用いた。さらに、培養液には、中胚葉系細胞への分化を促進することを意図して、ヒトBMP-4 (Bone Morphogenic Protein 4)を5ng/mlの濃度で添加した。

[0108] 培養開始から25日後、トリプシン-EDTA-コラゲナーゼ液を用いて細胞を処理(37°C 60分)して解離させて回収し、ピペッティング操作により細胞浮遊液を作製した。そして、直径10cmのディッシュ1枚に由来する細胞を10mlのDMEM/10% FCSに懸濁し、フィーダー細胞なし、ゼラチンコートなしの直径10cmのディッシュ2枚に播種した。2-5時間後、ディッシュに付着しなかつ

た細胞を回収し、100ミクロンのメッシュ（BD Falcon社製 セルストレイナー）を通過させることにより、凝集細胞塊を除いた細胞浮遊液を得た。その後、細胞保存液（セルバンカー 十慈フィールド）を用いて細胞を凍結保存した。

[0109] 上記で凍結保存しておいた細胞を解凍し、GM-CSF(50ng/ml)およびM-CSF(50ng/ml)を含む α -MEM/20%FCSを用いて培養し10日間培養した。その結果、浮遊性あるいは付着性の細胞が出現し増殖するのが観察された。図20に、この細胞の顕微鏡写真を示す。図21に、フローサイトメーターによりCD45、CD11b、およびCD33の発現を検討した結果を示す。この結果から、細胞表面上に白血球マーカー分子であるCD45、さらにミエロイド系血液細胞のマーカー分子であるCD11bおよびCD33を発現していることが確認された。そこで、このiPS細胞由来の分化細胞もiPS-MCであると判断された。

[0110] 次に、このiPS-MCを回収し、24穴培養プレート中で培養した。そこへcMYCとBMI1を発現するレンチウイルス懸濁液を同時に加えることにより感染させ、iPS-MLを作製した。図22に、この細胞の顕微鏡写真を示す。図23に、フローサイトメーターによりCD45、CD11b、およびCD33の発現を検討した結果を示す。

本実施例により得られたiPS-MLは、cMYCのみを導入した細胞よりも速い速度で増殖した。さらに、得られたiPS-MLは、cMYCのみ導入した細胞よりも長期に渡り増殖し、レンチウイルスを感染させてから2週間目以降も増殖を続けた。

[0111] 実施例14：ヒト末梢血単球へのcMYCおよびBMI1の導入による長期増殖能力の付与（Mo-MLの作製）

少量（0.5ml程度）のヘパリンを吸引した50mlの注射シリンジを用いて、健康人ドナーより末梢血を50ml採血した。血液は、50mlの遠心チューブ2本に25mlずつ分注し、等量のリン酸緩衝生理的食塩水（PBS）で希釈した。次に、この希釈した血液25mlを、あらかじめ遠心チューブ（BD-Falcon 352070等）中に分注しておいたフィコール液（GEヘルスケア社 17-1440

-03) 15 mlの上にゆっくりと重層した。そして、遠心分離装置を用いて、遠心力500gで20分間遠心した後、界面付近に存在する単核細胞分画（リンパ球と単球を含む細胞集団）を回収した。

[0112] 回収した単核細胞分画をRPMI-1640培養液により洗浄した後、磁気ビーズ分離用緩衝液（2mMのEDTAおよび2%のFCSを含有するPBS）に浮遊させた。そして、抗ヒトCD14抗体を結合した磁気マイクロビーズ（ミルテニーバイオテク社製 130-050-201）を加え、6℃で15分間静置した。その後、磁気ビーズ分離用緩衝液で洗浄した後、細胞分離用カラム（ミルテニーバイオテク社製 MSカラム 130-042-201）を用いて、細胞表面にCD14を発現する細胞、すなわち、単球を分離した。また、同様の方法により分離され研究用として市販されていたヒト末梢血単球（Lonza社 2W-400C）も使用した。

[0113] 前項で分離したヒト末梢血単球（CD14陽性細胞）を24穴培養プレート中で培養し、そこへcMYCを発現するレンチウイルス懸濁液およびBMI1を発現するレンチウイルス懸濁液を同時に加えることにより、感染させた。培養液としては、 α -MEM / 20%FCS / ヒト GM-CSF (100 ng/ml) / ヒト M-CSF (50 ng/ml、)を用いた。

[0114] レンチウイルスを感染させた後、2週間目までは、明らかな細胞増殖は認めなかった。3週間目以降、増殖が観察されたので、細胞の増殖に応じて培養液を追加しつつ、培養スケールの拡大を行った。レンチウイルスを感染させた後、約40日後の細胞の顕微鏡写真を図24に示す。また、同時期の細胞を回収し、フローサイトメーターにより、CD45、CD11b、CD33、およびCD14の発現を調べた結果を図25に示す。この結果から、cMYCおよびBMI1の導入により長期増殖能力を獲得した単球由来の細胞が、ミエロイド系血液細胞のマーカーを発現していることが確認された。そこで、この細胞をMo-ML (Monocyte-derived myeloid cell line、単球に由来するミエロイド系血液細胞ライン)と名付けた。

[0115] 実施例15： Mo-MLの樹状細胞様細胞(ML-DC)への分化誘導
cMYCとBMI1を発現するレンチウイルスを同時に感染させた後、40日経過した

後のMo-MLをGM-CSF(100 ng/ml)とIL-4 (10 ng/ml)の存在下で4日間培養し、樹状細胞様細胞(ML-DC)への分化誘導を行った。さらにTNF- α (10 ng/ml)を添加して2日間培養した。

[0116] フローサイトメトリーによるML-DCの細胞表面上のマーカ分子の発現の検討を行った。

まず、Fcレセプターブロック試薬 (Miltenyi Biotec社製) を用いて10分間処理した。次に、FITC-抗ヒト80抗体、抗ヒト86抗体、あるいは抗HLAクラスII抗体を用いて室温中で40分間染色した。また、FITCあるいはPEで標識されたアイソタイプ適合対照抗体を用いて染色した。染色した細胞を、FACSscan(BD社)を用いて解析した。

[0117] 図26に抗体染色後のフローサイトメーター解析の結果を示す。この図では、特異的染色のパターン(実線)とアイソタイプ適合対照抗体を用いた染色パターン(破線)を重ねあわせて示している。この解析の結果からML-DCは、生理的に存在する樹状細胞と同様に、Tリンパ球の活性化に関連するCD80、CD86、およびHLAクラスIIを細胞表面上に発現していることが判明した。

[0118] 実施例16: Mo-ML由来のML-DCのT細胞刺激能力の検討

Mo-MLをGM-CSF(100 ng/ml)とIL-4 (10 ng/ml)の存在下で4日間培養してML-DCを作製し、さらにTNF- α (10 ng/ml)を添加して2日間培養した後、細胞を回収した。この細胞に45 GyのX線を照射して細胞増殖を停止させた後、96穴丸底培養プレート (FALCON 353077) に播種し (1×10^2 細胞- 1×10^4 細胞/well)、刺激細胞とした。TNF- α の添加を行っていないML-DC、あるいは、GM-CSFとIL-4を加えていないMo-MLも、同様に45GyのX線を照射して細胞増殖を停止させた後、培養プレートに播種し、刺激細胞とした。そして、反応細胞として、アロのドナー由来の末梢血T細胞を加え (5×10^4 細胞/well)、培養を行った。

[0119] 培養開始から4日後に ^3H -メチルチミジン(37 Kbpq/well)を添加した。その18時間後にセルハーベスタ(Wallac社)を用いて細胞中の高分子量DNAをガラスフィルターに捕捉した。ガラスフィルターに捕捉された ^3H -チミジンの放射活

性をシンチレーション計測により測定することにより、T細胞の増殖速度を定量化した。

[0120] 図27にT細胞増殖応答解析の結果を示す。3種類の刺激細胞（iPS-MLあるいはTNF- α 処理を行った、あるいは、行っていないML-DC）のいずれも、アロT細胞を刺激し増殖応答を誘導する活性を有していることが判明した。そして、3種類の刺激細胞のなかでは、TNF- α 処理を行ったML-DCが最も強力なT細胞刺激能力を有していることが分かる。以上の結果から、Mo-ML由来のML-DCが、強力なT細胞刺激能力を有していることが示された。

[0121] 実施例17：末梢血単球へのcMYCおよびMDM2の導入によるMo-MLの作製

ヒト末梢血単球（CD14陽性細胞）を24穴培養プレート中で培養し、そこへcMYCおよびMDM2を発現するレンチウイルス懸濁液を同時に加えることにより、感染させた。培養液としては、 α -MEM / 20%FCS / ヒト GM-CSF (100 ng/ml) / ヒト M-CSF (50 ng/ml、)を用いた。細胞は、レンチウイルスを感染させた後、3週間目頃よりはっきりとした増殖傾向を示した。図28に、レンチウイルスを感染させた約1月後の細胞の顕微鏡写真を示す。図29に、同時期にフローサイトメーターによりCD45、CD11b、CD33およびCD14の発現を検討した結果を示す。

[0122] 実施例18：末梢血単球へのcMYC、EZH2およびMDM2の導入によるMo-MLの作製

ヒト末梢血単球を24穴培養プレート中で培養し、そこへcMYC、EZH2およびMDM2を発現するレンチウイルス懸濁液を同時に加えることにより、感染させた。細胞は、レンチウイルスを感染させた後、3週間目頃よりはっきりとした増殖傾向を示した。図30に、レンチウイルスを感染させた約1月後の細胞の顕微鏡写真を示す。図31に、同時期にフローサイトメーターによりCD45、CD11b、CD33およびCD14の発現を検討した結果を示す。

請求の範囲

- [請求項1] ミエロイド系血液細胞において、
- (A) cMYC 遺伝子、並びに
- (B) BMI1 遺伝子、EZH2 遺伝子、MDM2 遺伝子、MDM4 遺伝子、及びHIF1A 遺伝子からなる群から選択される少なくとも一つの遺伝子を強制的に発現させることを含む、増殖能力を有するミエロイド系血液細胞を製造する方法。
- [請求項2] 前記ミエロイド系血液細胞に前記遺伝子を導入することにより、該ミエロイド系血液細胞において該遺伝子を強制的に発現させる、請求項1に記載の方法。
- [請求項3] 前記ミエロイド系血液細胞が、多能性幹細胞に由来する、請求項1又は2に記載の方法。
- [請求項4] 前記多能性幹細胞が、人工多能性幹細胞である、請求項3に記載の方法。
- [請求項5] 前記人工多能性幹細胞が、ヒト人工多能性幹細胞である、請求項4に記載の方法。
- [請求項6] 前記ミエロイド系血液細胞が、末梢血単球である、請求項1又は2に記載の方法。
- [請求項7] 前記末梢血単球が、ヒト末梢血単球である、請求項6に記載の方法。
- [請求項8] 前記cMYC 遺伝子、BMI1 遺伝子、EZH2 遺伝子、MDM2 遺伝子、MDM4 遺伝子、及びHIF1A 遺伝子が、それぞれ、ヒトcMYC 遺伝子、ヒトBMI1 遺伝子、ヒトEZH2 遺伝子、ヒトMDM2 遺伝子、ヒトMDM4 遺伝子、及びヒトHIF1A 遺伝子である、請求項1～7のいずれか1項に記載の方法。
- [請求項9] マクロファージコロニー刺激因子 (M-CSF) の存在下で、請求項1～8のいずれか1項に記載の方法で製造したミエロイド系血液細胞を

培養することを含む、ミエロイド系血液細胞を増殖させる方法。

[請求項10] 請求項1～9のいずれか1項に記載の方法により製造される細胞。

[請求項11] 請求項10に記載の細胞を樹状細胞様細胞に分化誘導することを含む、樹状細胞様細胞を製造する方法。

[請求項12] 顆粒球・マクロファージコロニー刺激因子（GM-CSF）およびインターロイキン-4（IL-4）を含む培養液を用いて、前記ミエロイド系血液細胞を培養することにより、該ミエロイド系血液細胞を樹状細胞様細胞に分化誘導する、請求項11に記載の方法。

[請求項13] 請求項11又は12に記載の方法により製造される細胞。

[請求項14] 請求項10又は13に記載の細胞を含む、細胞医薬。

[請求項15] 前記細胞医薬は、感染症、腫瘍、アルツハイマー病、プリオン病、アミロイドーシス、白血病、臓器移植に伴う拒絶反応、及び／又は自己免疫疾患の治療又は予防に用いるための細胞医薬である、請求項14に記載の細胞医薬。

[請求項16] 請求項10若しくは13に記載の細胞、又は請求項14に記載の細胞医薬を製造するための、

(A) cMYC遺伝子、並びに

(B) BMI1遺伝子、EZH2遺伝子、MDM2遺伝子、MDM4遺伝子、及びHIF1A遺伝子からなる群から選択される少なくとも一つの遺伝子

の使用。

[請求項17] 請求項14に記載の細胞医薬を用いて、感染症、腫瘍、アルツハイマー病、プリオン病、アミロイドーシス、白血病、及び／又は自己免疫疾患を治療する方法。

[図1]

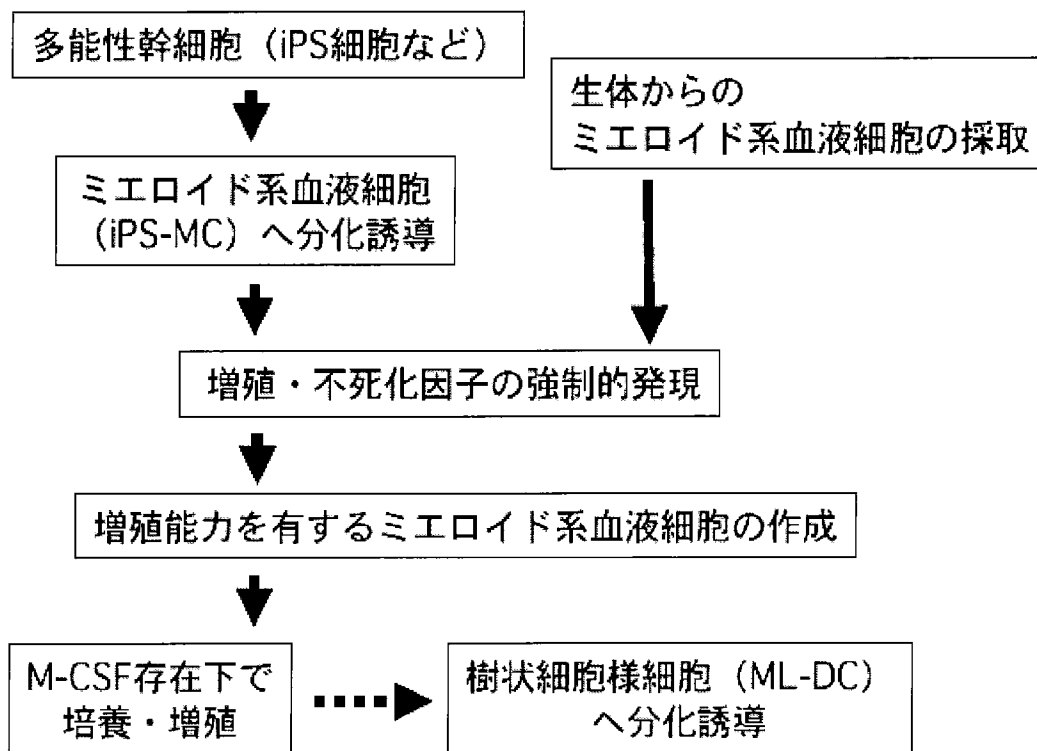


図1 増殖能力を有するミエロイド系血液細胞作成法の概要

[図2]

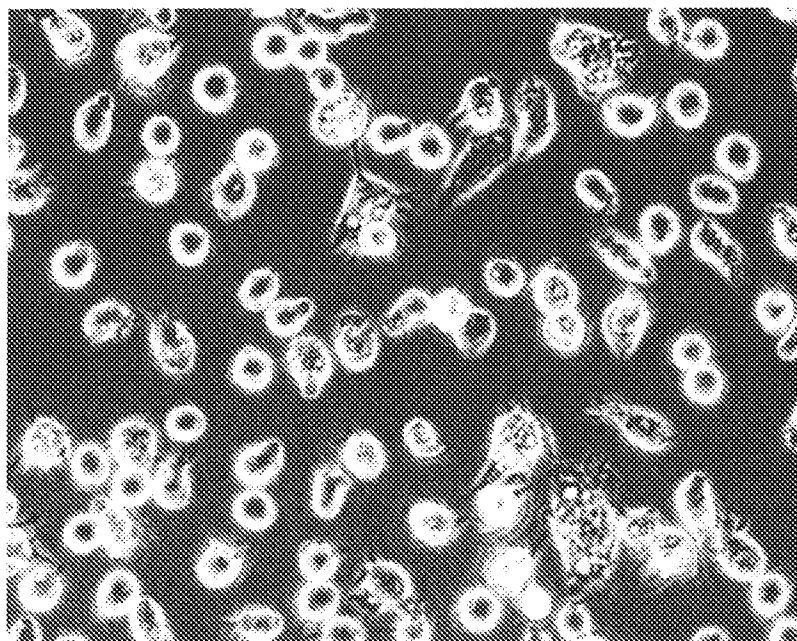


図2 ヒトiPS細胞由来のミエロイド系血液細胞の形態

[図3]

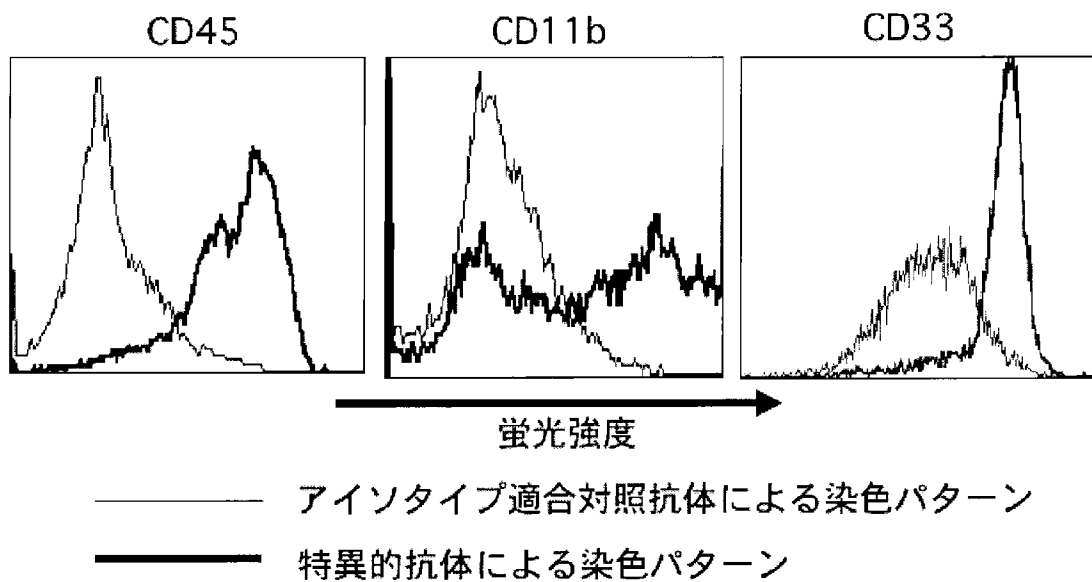


図3 ヒトiPS細胞由来のミエロイド系血液細胞の細胞表面分子

[図4]

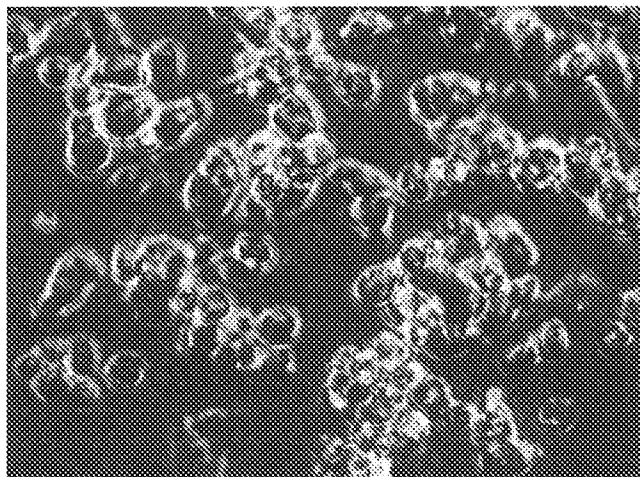


図4 cMYCとBMI-1の強制発現により作成した
 ヒトiPS細胞由来のミエロイド系血液細胞ライン(iPS-ML)の形態

[図5]

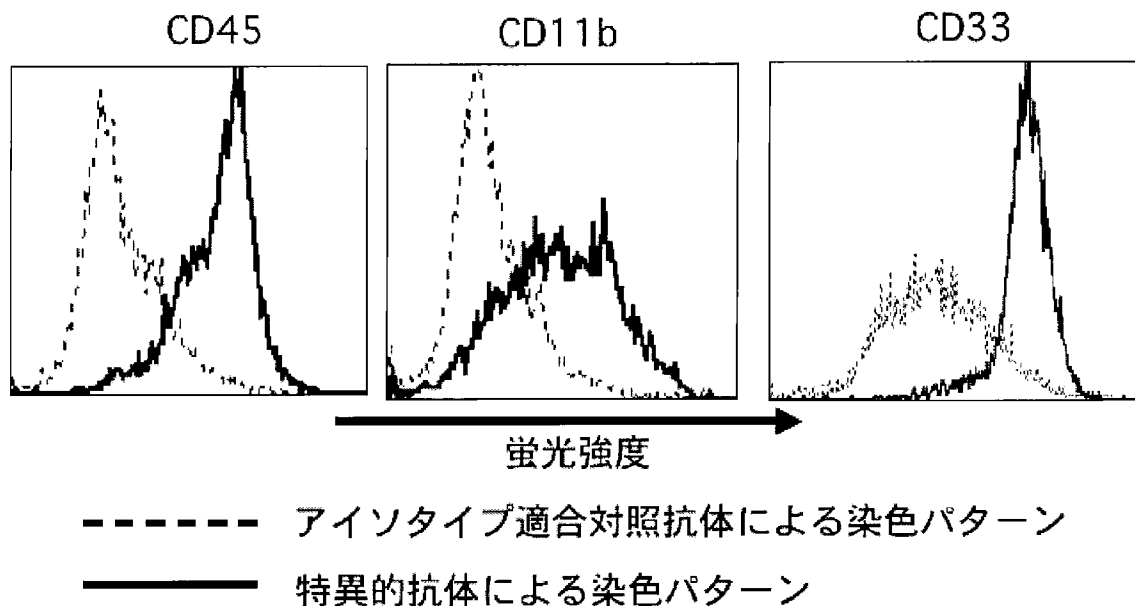


図5 cMYCとBMI-1の強制発現により作成した
 ミエロイド系血液細胞ライン(iPS-ML)の細胞表面分子

[図6]

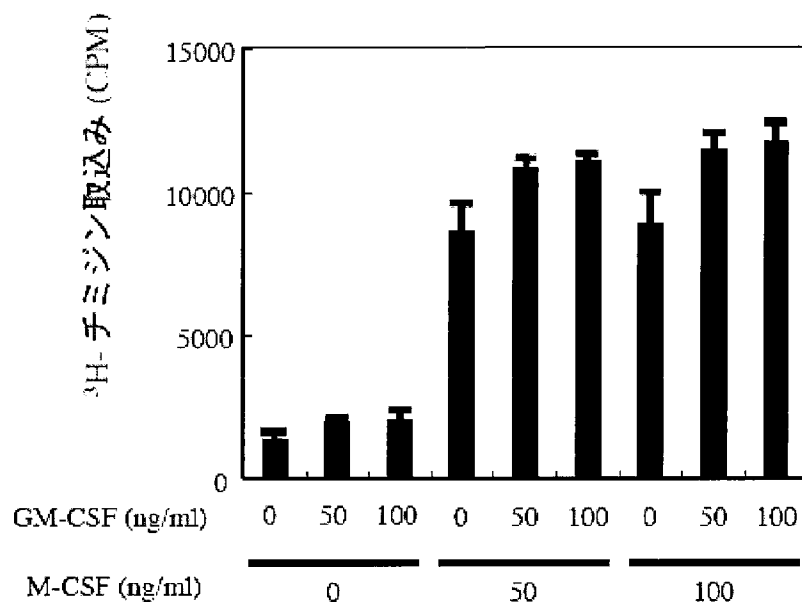


図6 cMYCとBMI-1の強制発現により作成した
 iPS-MLの増殖のM-CSFおよびGM-CSFに対する依存性

[図7]

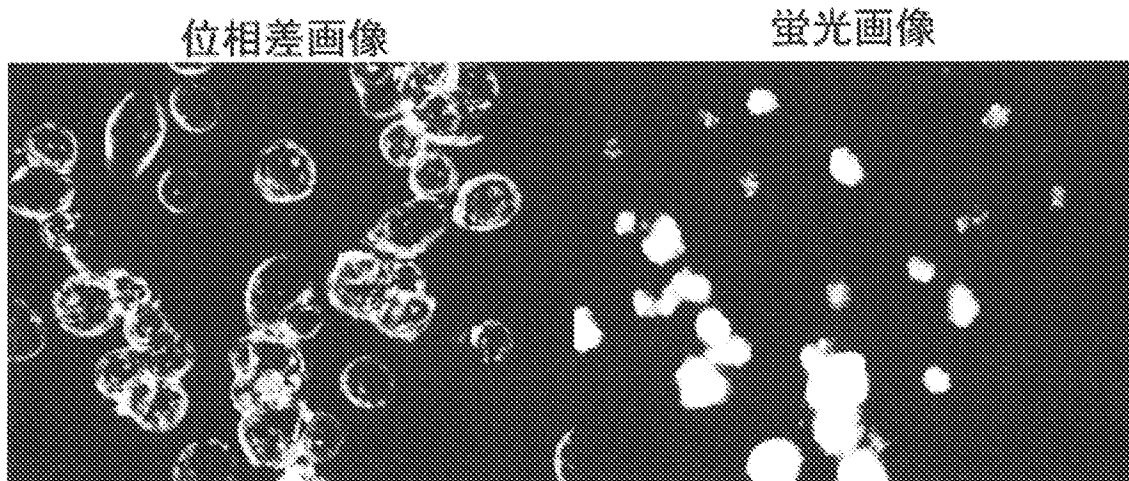


図7 iPS-MLによる蛍光標識ガイモサン粒子の貪食
(蛍光顕微鏡による観察)

[図8]

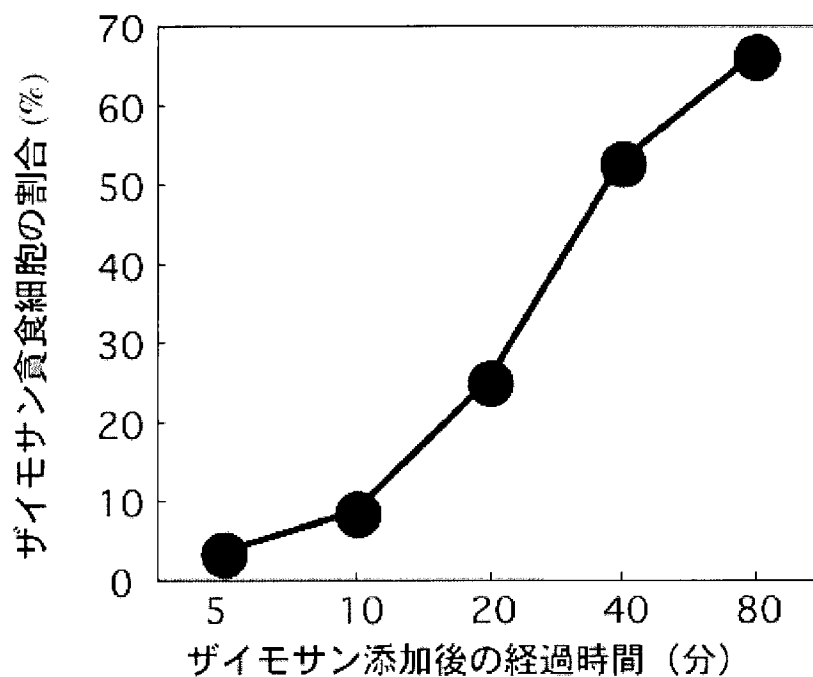


図8 iPS-MLによる蛍光標識ガイモサンの貪食
(フローサイトメーターによる経時的変化の定量的解析)

[図9]

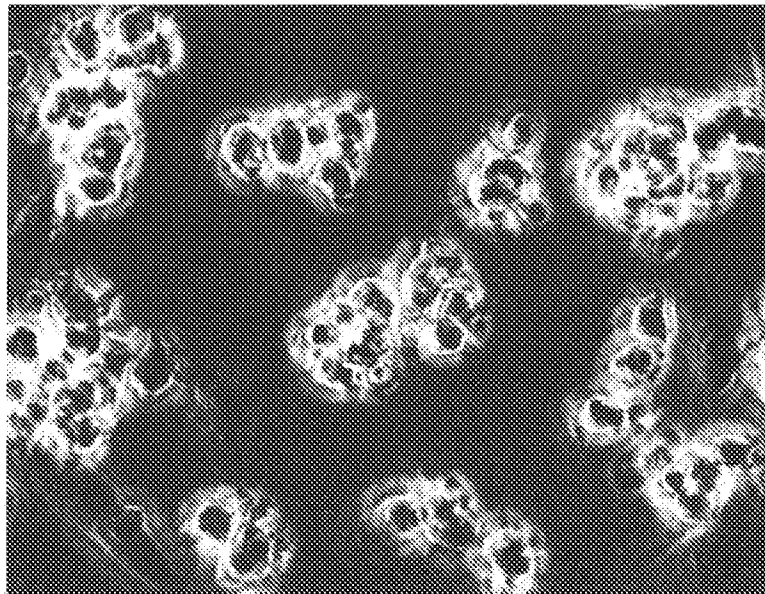


図9 cMYCとBMI-1の強制発現により作成した
iPS-MLに由来する樹状細胞様細胞（ML-DC）の形態

[図10]

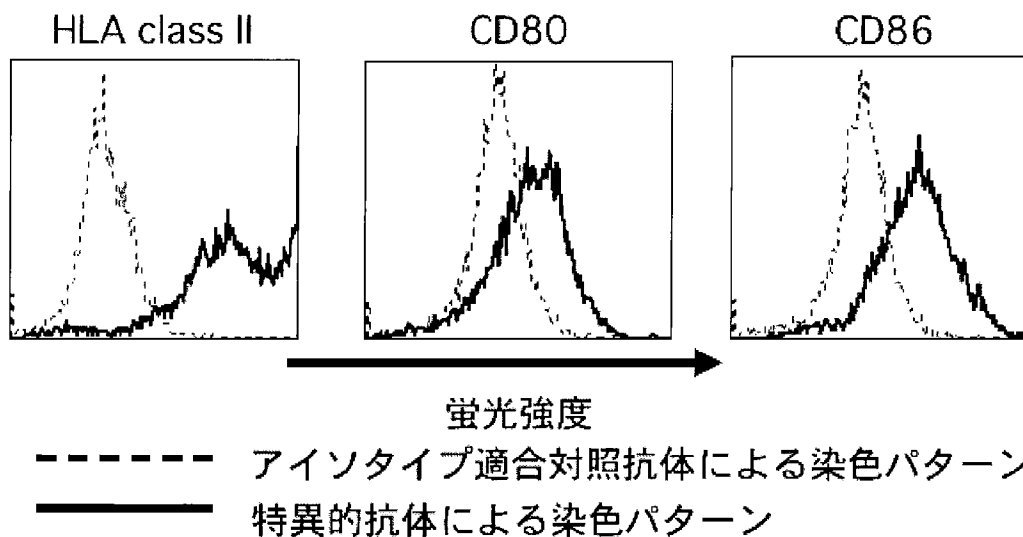


図10 cMYCとBMI-1の強制発現により作成した
iPS-MLに由来する樹状細胞様細胞（ML-DC）の細胞表面分子

[図11]

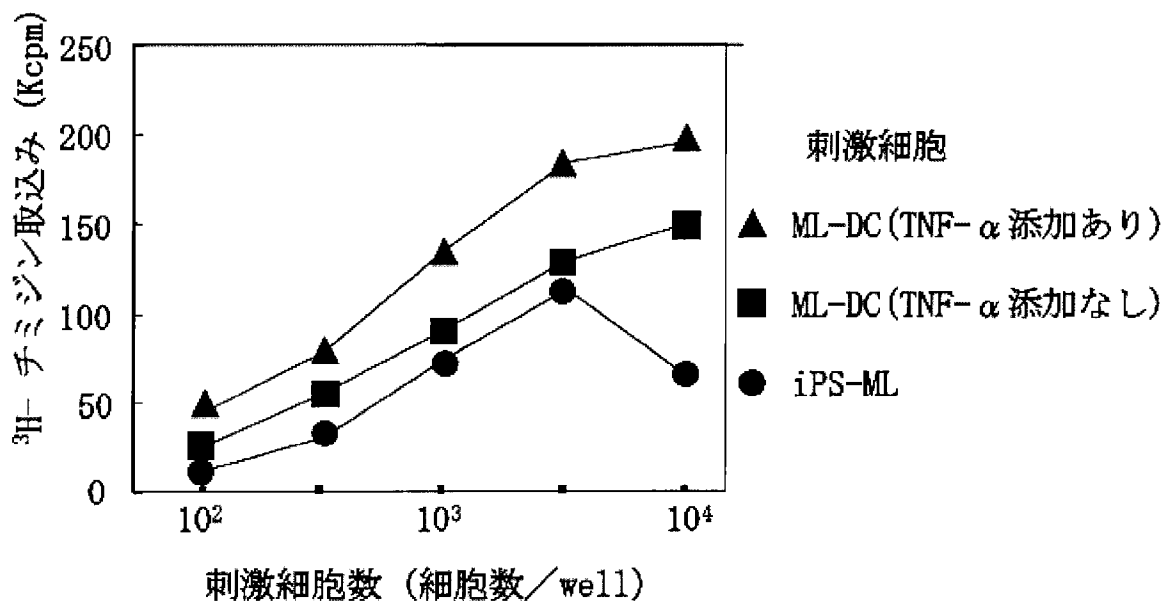


図11 ML-DCによるアロT細胞の増殖反応の誘導

[図12]

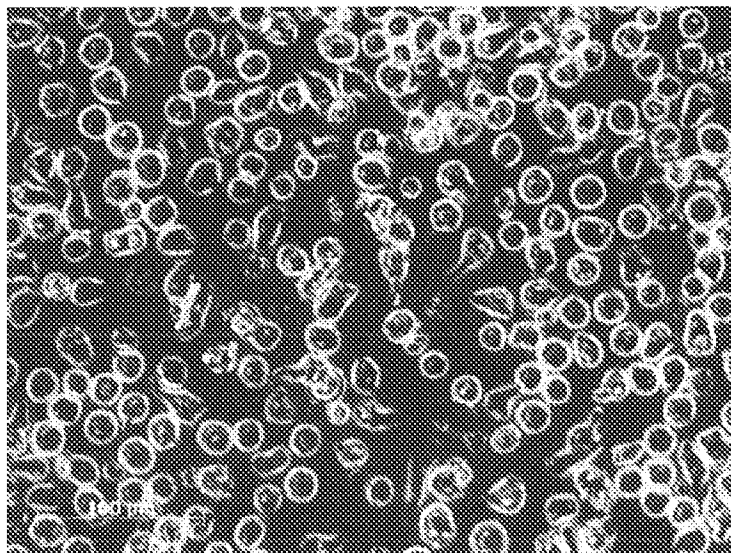


図12 cMYCとEZH2の強制発現により作成した
ヒトiPS細胞由来のミエロイド系血液細胞ライン(iPS-ML)の形態

[図13]

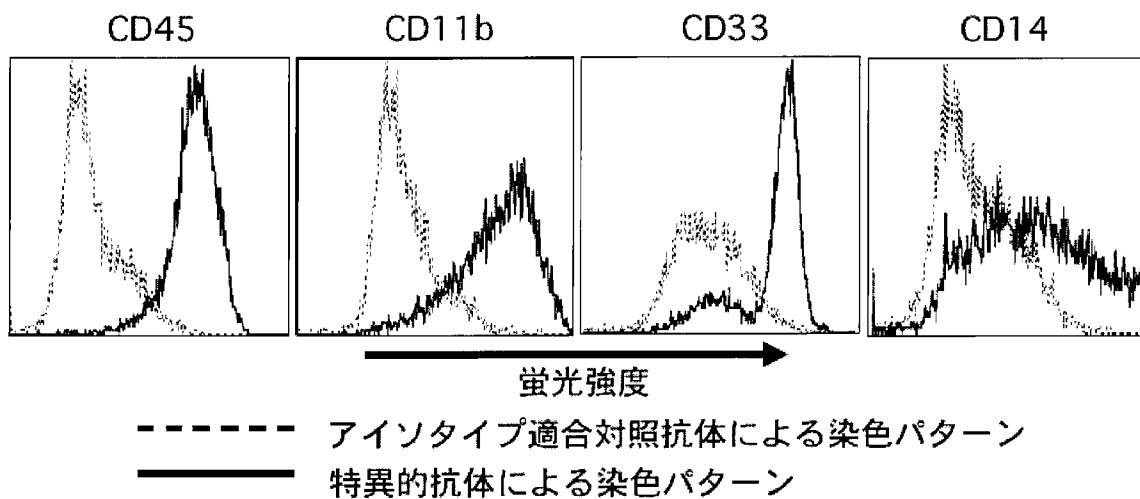


図13 cMYC とEZH2の強制発現によるiPS-MLの細胞表面分子

[図14]

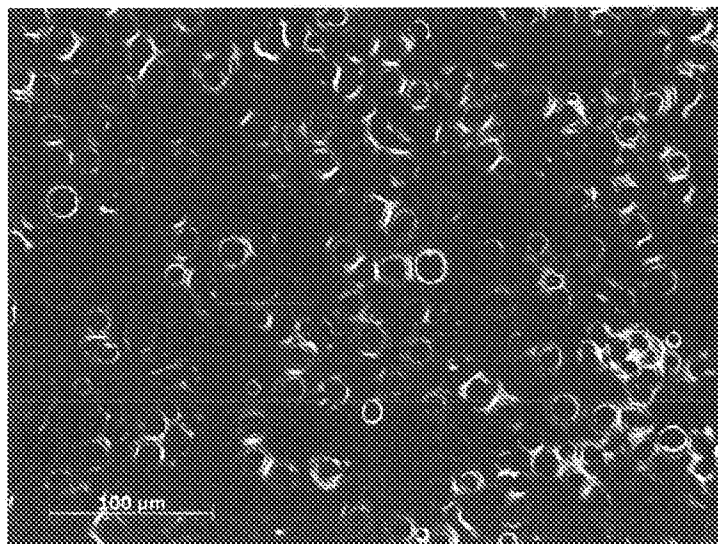
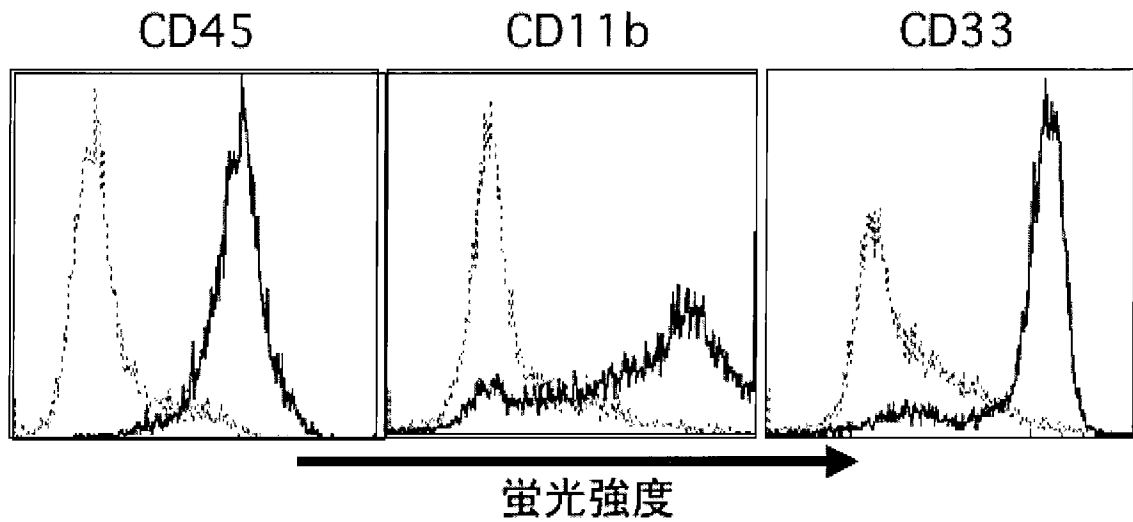


図14 cMYCとMDM2の強制発現により作成した
 ヒトiPS細胞由来のミエロイド系血液細胞ライン(iPS-ML)の形態

[図15]



----- アイソタイプ適合対照抗体による染色パターン
 ———— 特異的抗体による染色パターン

図15 cMYC と MDM2 による iPS-ML の細胞表面分子

[図16]

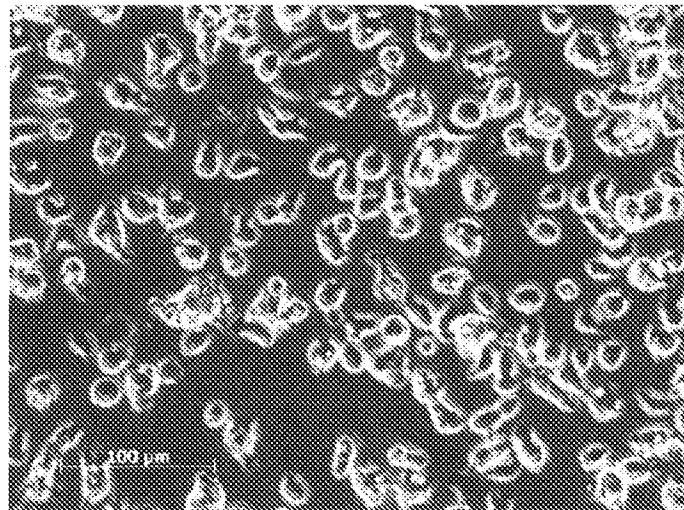


図16 cMYCとMDM4の強制発現により作成した
 ヒトiPS細胞由来のミエロイド系血液細胞ライン(iPS-ML)の形態

[図17]

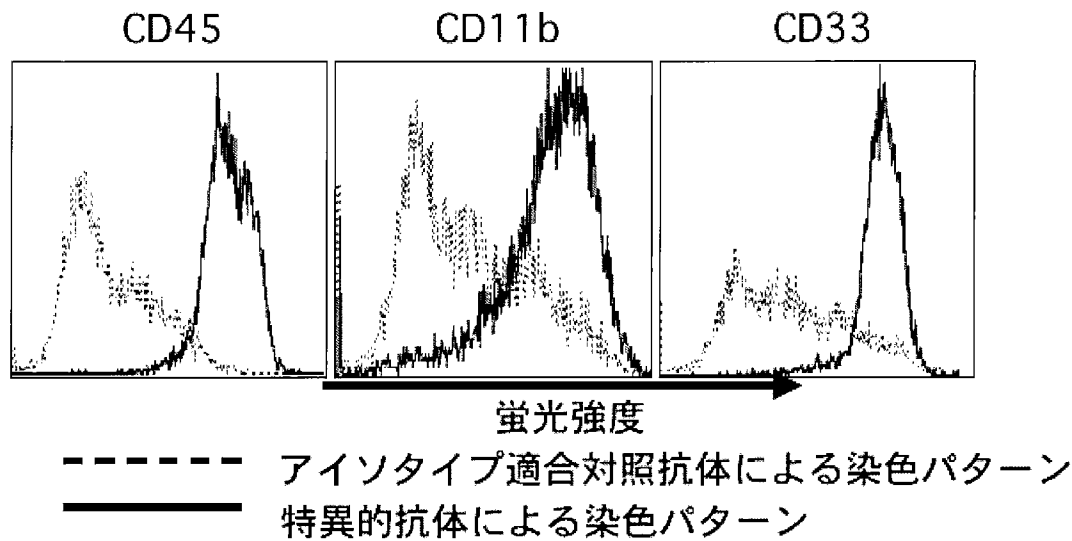


図17 cMYCとMDM4の強制発現の強制発現により作成した
iPS-MLの細胞表面分子

[図18]

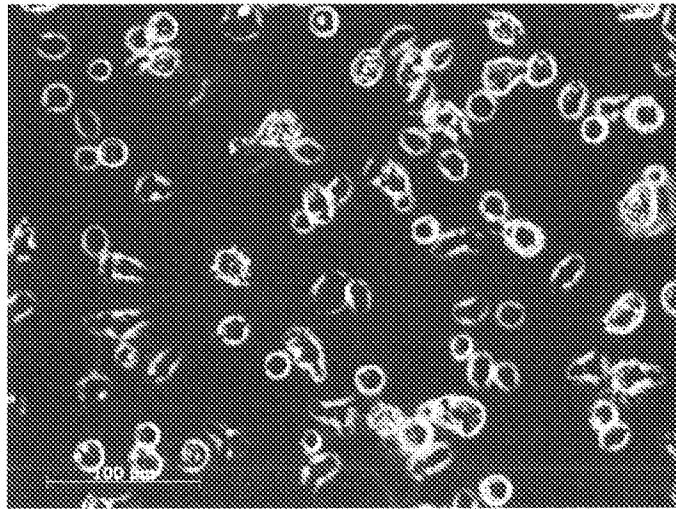


図18 cMYCとHIF1aの強制発現により作成した
ヒトiPS細胞由来のミエロイド系血液細胞ライン(iPS-ML)の形態

[図19]

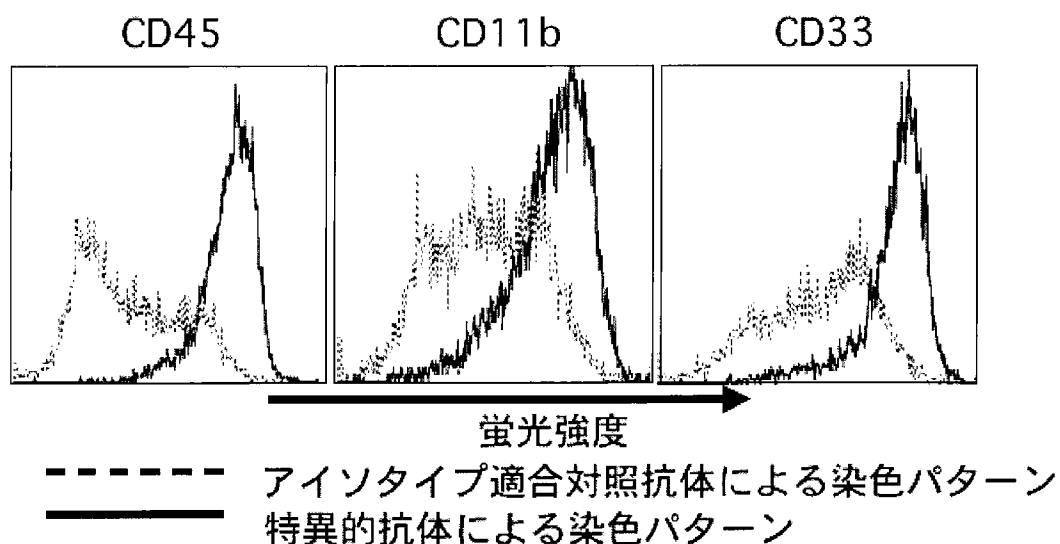


図19 cMYCとHIF1aの強制発現の強制発現により作成した
iPS-MLの細胞表面分子

[図20]

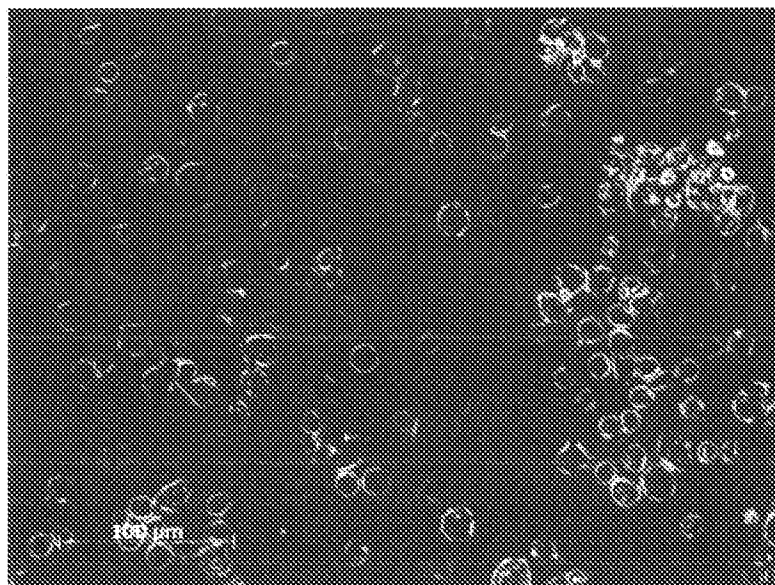


図20ヒトiPS細胞由来のミエロイド系血液細胞の形態
(フィーダー細胞使用なし)

[図21]

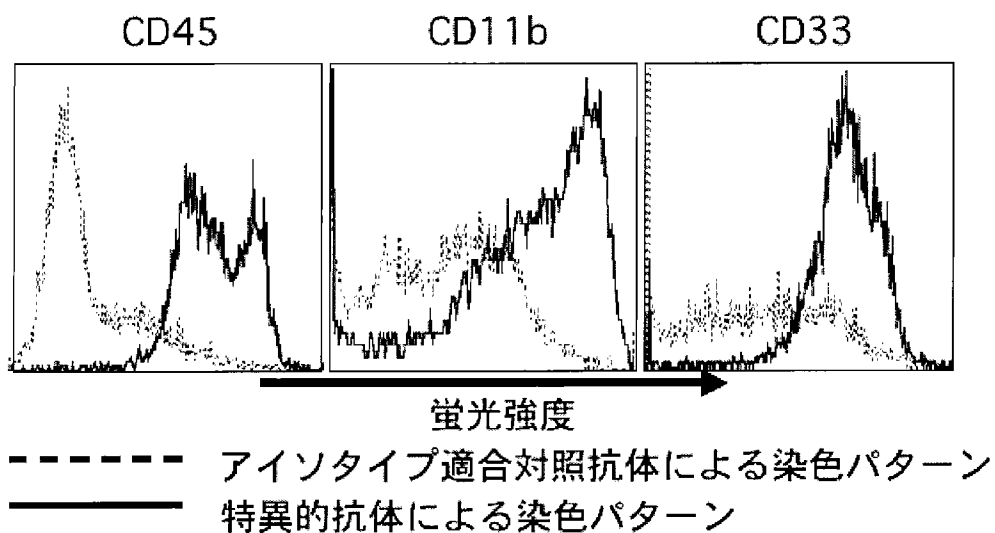


図21 ヒトiPS細胞由来のミエロイド系血液細胞の細胞表面分子
 (フィーダー細胞使用なし)

[図22]

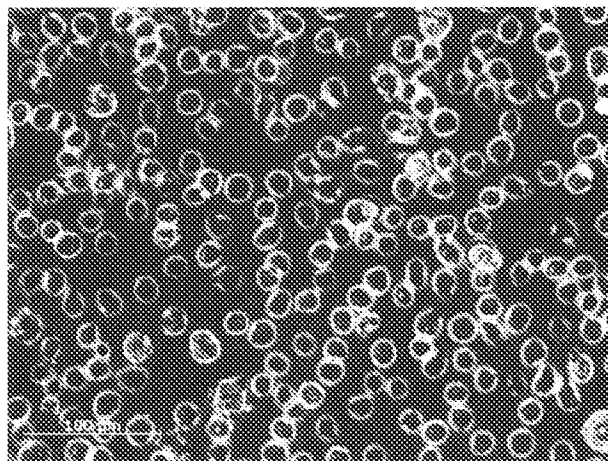


図22 cMYCとBMI1の強制発現により作成した
 ヒトiPS細胞由来のミエロイド系血液細胞ライン(iPS-ML)の形態
 (フィーダー細胞使用なし)

[図23]

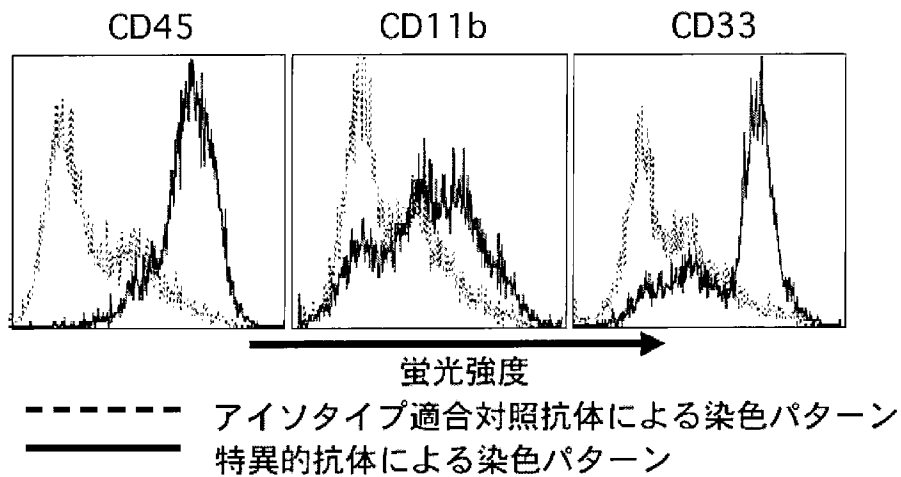


図23 cMYCとBMI1の強制発現の強制発現によるiPS-MLの細胞表面分子
 (フィーダー細胞使用なし)

[図24]

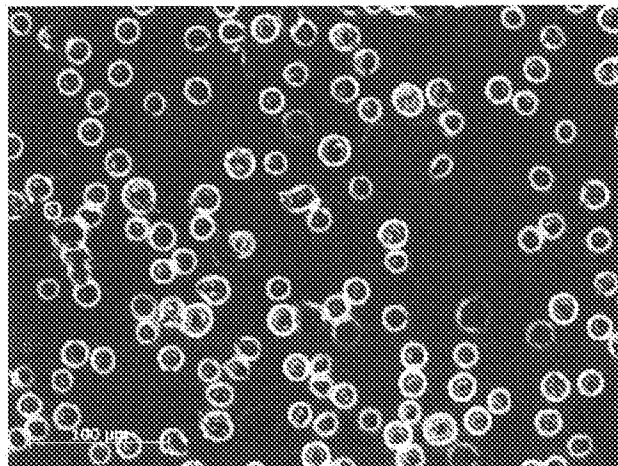


図24 cMYCとBMI-1の強制発現により作成したヒト単球由来の
 ミエロイド系血液細胞ライン (Mo-ML) の形態

[図25]

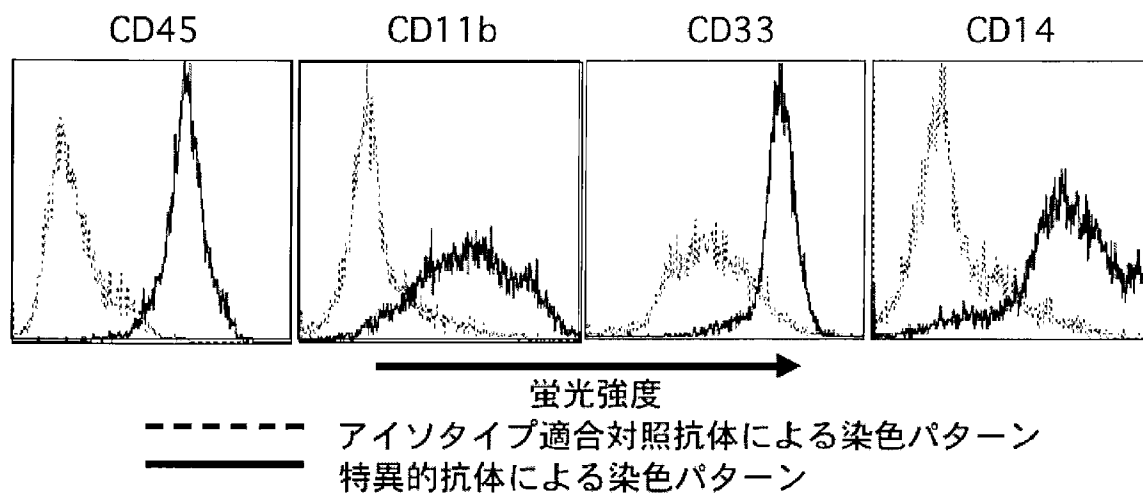


図25 cMYCとBMI1の強制発現により作成した
 ヒト単球由来ミエロイド系血液細胞ライン (MO-ML) の細胞表面分子

[図26]

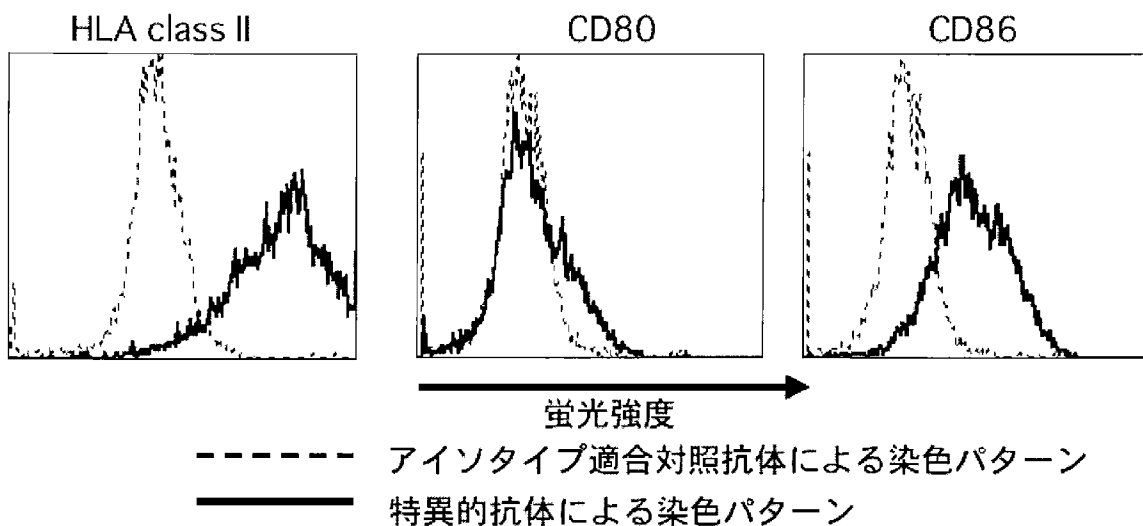


図26 ヒト単球由来ミエロイド系血液細胞ラインに由来する
 樹状細胞(CD14ML-DC)の細胞表面分子

[図27]

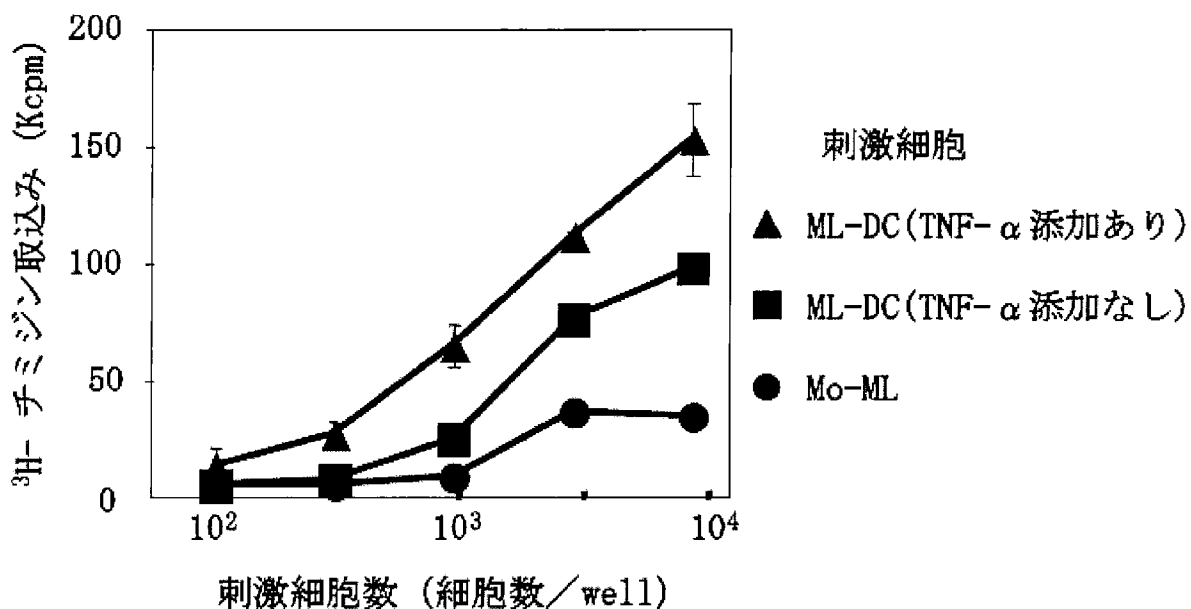


図27 ML-DCによるアロT細胞の増殖反応の誘導

[図28]

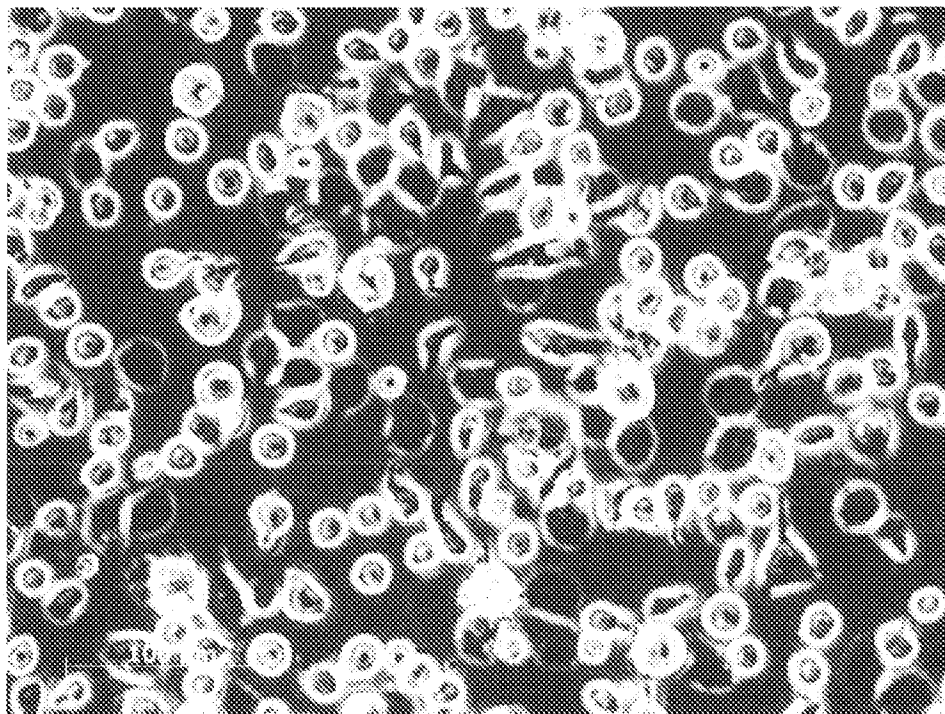


図28 cMYCおよびMDM2の強制発現により作成したヒト単球由来のMo-MLの形態

[図29]

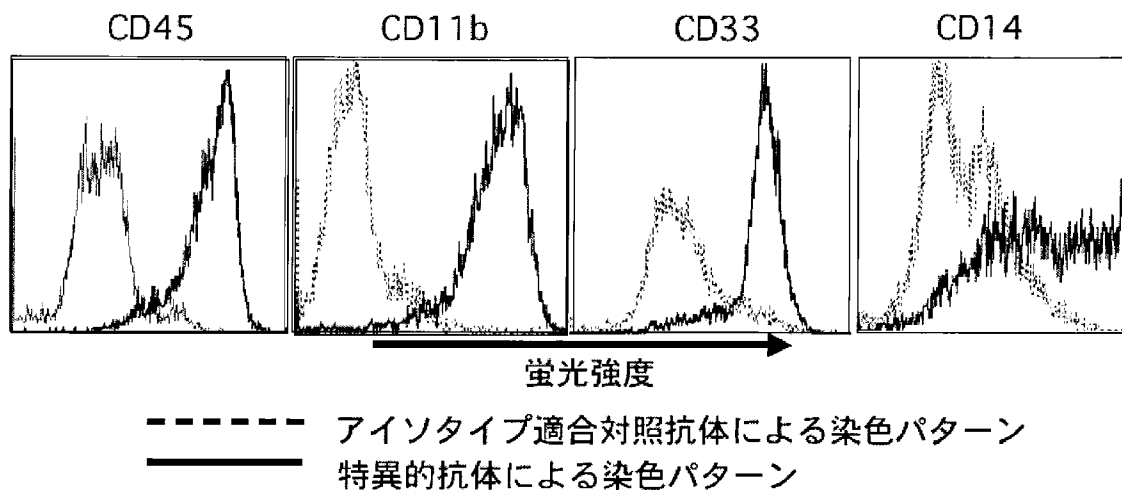


図29 cMYCとMDM2の強制発現により作成した
 ヒト単球由来ミエロイド系血液細胞ライン (MO-ML) の細胞表面分子

[図30]

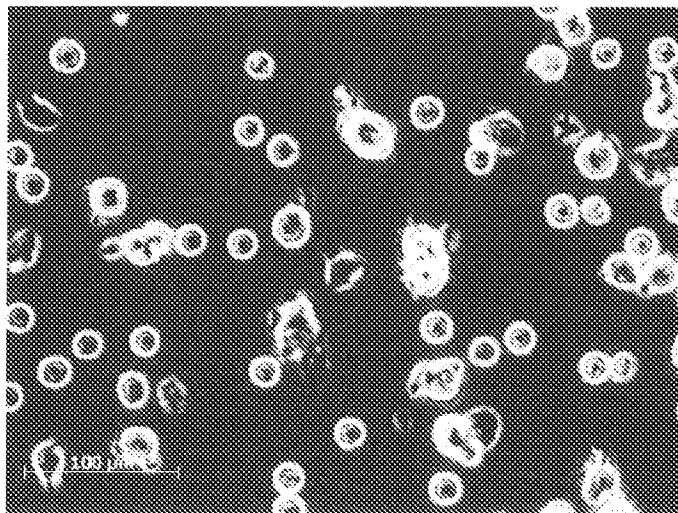


図30 cMYC、EZH2、およびMDM2の強制発現により作成した
 ヒト単球由来のMo-MLの形態

[図31]

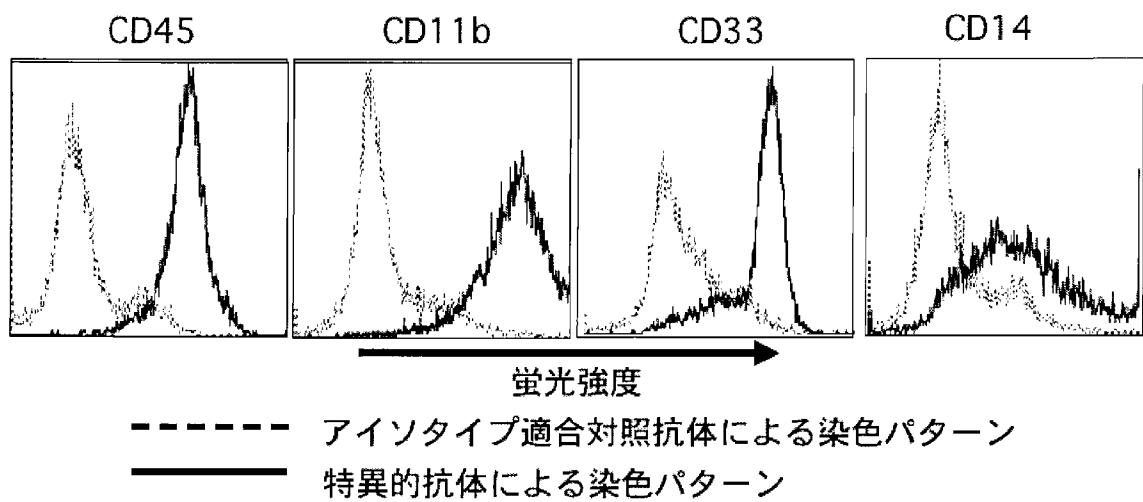


図31 cMYC、EZH2、およびMDM2の強制発現により作成した
ヒト単球由来ミエロイド系血液細胞ライン (MO-ML) の細胞表面分子

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2011/072234

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N5/10(2006.01)i, A61K35/12(2006.01)i, A61P9/00(2006.01)i, A61P25/28(2006.01)i, A61P31/00(2006.01)i, A61P35/00(2006.01)i, A61P37/02(2006.01)i, A61P37/06(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N5/10, A61K35/12, A61P9/00, A61P25/28, A61P31/00, A61P35/00, A61P37/02, A61P37/06, C12N15/09

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2011
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2011	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2011

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII), Science Direct, Wiley InterScience, CiNii

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Satoru SENJU, "Anti-Cancer Therapy with Pluripotent Stem Cell-Derived Dendritic Cells", Biotherapy (Tokyo), 2010.03, vol.24, no.2, pages 87 to 94	1-16
A	Satoru SENJU, "Jujo Saibo Ryoho to Tanosei Kansaibo", Dojin News, 2010.01, no.133, pages 1 to 5	1-16
A	CHOI KD, et al., Generation of mature human myelomonocytic cells through expansion and differentiation of pluripotent stem cell-derived lin-CD34+CD43+CD45+ progenitors, J Clin Invest. 2009, Vol.119, No.9, p.2818-29.	1-16

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
27 December, 2011 (27.12.11)

Date of mailing of the international search report
10 January, 2012 (10.01.12)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2011/072234

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2008/056734 A1 (Kumamoto University), 15 May 2008 (15.05.2008), entire text (Family: none)	1-16
A	JP 2005-528899 A (Merck Patent GmbH), 29 September 2005 (29.09.2005), entire text & WO 2003/100040 A1 & AU 2003246396 A1 & EP 1507850 A1 & US 2006/228342 A1	1-16
A	WO 2010/011644 A2 (TAIGA BIOTECHNOLOGIES INC.), 28 January 2010 (28.01.2010), entire text & US 2010/047217 A1 & AU 2009274172 A1	1-16
A	WO 2007/047583 A2 (NATIONAL JEWISH MEDICAL AND RESEARCH CENTER), 26 April 2007 (26.04.2007), entire text & US 2007/116691 A1 & EP 1942739 A2 & AU 2006304392 A1 & IN 200803332 P1 & CN 101330830 A & JP 2009-511081 A & CA 2626525 A1 & DE 602006018768 E & KR 10-2008-0070005 A & IL 190946 D & AT 491022 T & ES 2357627 T	1-16
A	Naoya TAKAYAMA et al., "c-MYC Sai Kasseika ni Tomonau Hito iPS Saibo kara no Koritsu no Yoi Kyokakukyu/Kesshoban Sanseiho no Kakuritsu", Dai 71 Kai The Japanese Society of Hematology Gakujutsu Shukai Program · Shorokushu, 2009, page 914	1-16
A	Hideyuki OGURO et al., "'Mijika na Wadai · Sekai no Wadai' (33) Zoketsu Kansaiho no Jiko Fukusei ni Okeru Polycomb Idenshi Bmi-1 no Kino", Hematology Frontier, 2006, vol.16, no.4, pages 608 to 612	1-16
A	BRACKEN, A.P. et al, EZH2 is downstream of the pRB-E2F pathway, essential for proliferation and amplified in cancer, EMBO J, 2003, Vol.22, No.20, p.5323-5335	1-16
A	GOETZ, A.W. et al, Requirement for Mdm2 in the Survival Effects of Bcr-Abl and Interleukin 3 in Hematopoietic Cells., Cancer Res, 2001, Vol.61, No.20, p.7635-7641	1-16

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2011/072234

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2003-521439 A (Merckle GmbH), 15 July 2003 (15.07.2003), entire text & WO 1999/044629 A2 & AU 9929324 A & NO 200004393 A & BR 9908518 A & EP 1059931 A2 & KR 10-2001-041624 A & CZ 200003238 A3 & HU 200102046 A2 & DE 59903541 G & ES 2188140 T3 & MX 2000008633 A1 & US 6627200 B1 & NZ 506695 A & ZA 9903078 A & CA 2322684 A & IS 5613 A & EE 200000510 A & PL 343427 A & AT 228371 T & DK 1059931 T & SI 1059931 T & PT 1059931 E	1-16
T	WO 2011/034073 A1 (The University of Tokyo), 24 March 2011 (24.03.2011), entire text (Family: none)	1-16

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2011/072234

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

- 1. Claims Nos.: 17
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claim 17 pertains to "a method for treatment of the human body by therapy" and thus relates to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of PCT Rule 39.1 (iv), to search.

- 2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

- 3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

- 1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
- 2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
- 3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

- 4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

- Remark on Protest**
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
 - The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
 - No protest accompanied the payment of additional search fees.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. C12N5/10(2006.01)i, A61K35/12(2006.01)i, A61P9/00(2006.01)i, A61P25/28(2006.01)i, A61P31/00(2006.01)i, A61P35/00(2006.01)i, A61P37/02(2006.01)i, A61P37/06(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. C12N5/10, A61K35/12, A61P9/00, A61P25/28, A61P31/00, A61P35/00, A61P37/02, A61P37/06, C12N15/09

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2011年
日本国実用新案登録公報	1996-2011年
日本国登録実用新案公報	1994-2011年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN), JSTplus/JMEDplus/JST7580(JDreamII), Science Direct, Wiley InterScience, CiNii

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	千住覚, 多能性幹細胞由来の樹状細胞を用いたがんの免疫療法, Biotherapy (Tokyo), 2010.03, Vol.24, No.2, p.87-94	1-16
A	千住覚, 樹状細胞療法と多能性幹細胞, Dojin News, 2010.01, No.133, p.1-5	1-16

C欄の続きにも文献が列挙されている。

パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的な技術水準を示すもの
 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献
 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
 「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

27.12.2011

国際調査報告の発送日

10.01.2012

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)
 郵便番号100-8915
 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

山本 匡子

4B

3038

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	CHOI KD, et al., Generation of mature human myelomonocytic cells through expansion and differentiation of pluripotent stem cell-derived lin-CD34+CD43+CD45+ progenitors, J Clin Invest. 2009 , Vol.119, No. 9, p.2818-29.	1 - 1 6
A	WO 2008/056734 A1 (国立大学法人熊本大学) 2008.05.15, 全文 (ファミリーなし)	1 - 1 6
A	JP 2005-528899 A (メルク パテント ゲゼルシャフト ミット ベ シュレンクテル ハフトング) 2005.09.29, 全文 & WO 2003/100040 A1 & AU 2003246396 A1 & EP 1507850 A1 & US 2006/228342 A1	1 - 1 6
A	WO 2010/011644 A2 (TAIGA BIOTECHNOLOGIES INC) 2010.01.28, 全文 & US 2010/047217 A1 & AU 2009274172 A1	1 - 1 6
A	WO 2007/047583 A2 (NATIONAL JEWISH MEDICAL AND RESEARCH CENTER) 2007.04.26, 全文 & US 2007/116691 A1 & EP 1942739 A2 & AU 2006304392 A1 & IN 200803332 P1 & CN 101330830 A & JP 2009-511081 A & CA 2626525 A1 & DE 602006018768 E & KR 10-2008-0070005 A & IL 190946 D & AT 491022 T & ES 2357627 T	1 - 1 6
A	高山直也 他, c-MYC 再活性化に伴うヒト iPS 細胞からの効率の良い巨核球/血小板産生法の確立, 第71回日本血液学会学術集会プログラム・抄録集, 2009, p.914	1 - 1 6
A	小黒秀行 他, 「身近な話題・世界の話」(33) 造血幹細胞の自己複製におけるポリコム遺伝子 Bmi-1 の機能, 血液フロンティア, 2006, Vol.16, No.4, p.608-612	1 - 1 6
A	BRACKEN, A.P. et al, EZH2 is downstream of the pRB-E2F pathway, essential for proliferation and amplified in cancer , EMBO J, 2003, Vol.22, No.20, p.5323-5335	1 - 1 6
A	GOETZ, A.W. et al, Requirement for Mdm2 in the Survival Effects of Bcr-Abl and Interleukin 3 in Hematopoietic Cells. , Cancer Res, 2001, Vol.61, No.20, p.7635-7641	1 - 1 6

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	JP 2003-521439 A (メルクレ、ゲーエムベーハー) 2003. 07. 15, 全文 & WO 1999/044629 A2 & AU 9929324 A & NO 200004393 A & BR 9908518 A & EP 1059931 A2 & KR 10-2001-041624 A & CZ 200003238 A3 & HU 200102046 A2 & DE 59903541 G & ES 2188140 T3 & MX 2000008633 A1 & US 6627200 B1 & NZ 506695 A & ZA 9903078 A & CA 2322684 A & IS 5613 A & EE 200000510 A & PL 343427 A & AT 228371 T & DK 1059931 T & SI 1059931 T & PT 1059931 E	1 - 16
T	WO 2011/034073 A1 (国立大学法人東京大学) 2011. 03. 24, 全文 (ファミリーなし)	1 - 16

第II欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. 請求項 _____ 17 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、請求項17は「治療による人体の処置方法に関するもの」であって、PCT規則39.1(iv)の規定により、国際調査をすることを要しない対象に係るものである。
2. 請求項 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. 請求項 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。

1. 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求項について作成した。
2. 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求項について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求項のみについて作成した。
4. 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求項について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。
- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。
- 追加調査手数料の納付はあったが、異議申立てはなかった。