

(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  
2023年1月5日(05.01.2023)



(10) 国際公開番号

WO 2023/277153 A1

(51) 国際特許分類:  
CI2N 5/0789 (2010.01) A61K 35/15 (2015.01)  
CI2N 5/10 (2006.01) A61P 7/00 (2006.01)  
CI2N 15/09 (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2022/026341

(22) 国際出願日: 2022年6月30日(30.06.2022)

(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 2021-109513 2021年6月30日(30.06.2021) JP

(71) 出願人: 国立大学法人千葉大学(NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION CHIBA UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒2638522 千葉県千葉市稲毛区弥生町1番33号 Chiba (JP). 国立大学法人京都大学(KYOTO UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒6068501 京都府京都市左京区吉田本町36番地1 Kyoto (JP).

(72) 発明者: ▲高▼山 直也(TAKAYAMA, Naoya); 〒2608670 千葉県千葉市中央区亥鼻一丁目8番1号 国立大学法人千葉大学 大学院医学研究院内 Chiba (JP). 江藤 浩之(ETO, Koji); 〒6068501 京都府京都市左京区吉田本町36番地1 国立大学法人京都大学内 Kyoto (JP). 中村 壮(NAKAMURA, Sou); 〒6068501 京都府京都市左京区吉田本町36番地1 国立大学法人京都大学内 Kyoto (JP). ポール スーディップクマール(PAUL, Sudip Kumar); 〒2608670 千葉県千葉市中央区亥鼻一丁目8番1号 国立大学法人千葉大学 大学院医学研究院内 Chiba (JP).

(74) 代理人: 稲葉 良幸, 外(INABA, Yoshiyuki et al.); 〒1066123 東京都港区六本木6-10-

1 六本木ヒルズ森タワー23階 T M I  
総合法律事務所 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, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, 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, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, 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, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

- 国際調査報告 (条約第21条(3))
- 明細書の別個の部分として表した配列リスト (規則5.2(a))

(54) Title: METHOD FOR IMPROVING PROLIFERATIVE PROPERTIES OF COMMON MYELOID PROGENITOR CELLS (CMP) OR MYELOCYTIC PROGENITOR CELLS

(54) 発明の名称: 骨髄系共通前駆細胞 (CMP) 又は骨髄球系前駆細胞の増殖性を向上させる方法

(57) Abstract: The present invention pertains to a method for improving proliferative properties of CMPs or myelocytic progenitor cells, said method comprising a step for forcedly expressing a MYC family gene and a BMI 1 gene in arbitrary cells in the process of differentiation from hematopoietic progenitor cells to myelocytic progenitor cells, wherein the myelocytic progenitor cells are progenitor cells of macrophages, dendritic cells, granulocytes, erythroblasts or erythrocytes.

(57) 要約: 本発明は、造血前駆細胞から骨髄球系前駆細胞への分化過程における任意の細胞において、MYCファミリー遺伝子及びBMI 1遺伝子を強制発現させる工程を含み、骨髄球系前駆細胞が、マクロファージ、樹状細胞、顆粒球、赤芽球、又は赤血球の前駆細胞である、CMP又は骨髄球系前駆細胞の増殖性を向上させる方法、に関する。



WO 2023/277153 A1

## 明 細 書

発明の名称：

骨髄系共通前駆細胞（CMP）又は骨髄球系前駆細胞の増殖性を向上させる方法

### 技術分野

[0001] 本発明は広く、骨髄系共通前駆細胞（CMP）又は骨髄球系前駆細胞の増殖性を向上させる方法等に関する。

### 背景技術

[0002] 末梢の血液細胞は、造血幹細胞から各系列の造血前駆細胞を経由して分化する。骨髄系共通前駆細胞は、血小板、赤血球、さらにリンパ球系以外の白血球細胞（好中球、マクロファージ、好塩基球、樹状細胞等）を産生する造血前駆細胞である。定常状態では骨髄中に存在するが、外傷や感染時等に必要に応じて分化し、成熟血液細胞を供給する。産生される好中球、マクロファージ、好塩基球、樹状細胞等は、自然免疫の主役であり、各種病原生物からの防御、腫瘍や変性した自己の細胞の排除、アレルギー反応、急性、慢性炎症に寄与する。

[0003] これらの細胞は、炎症・アレルギーに対する薬剤スクリーニング、体内異物を除去するための細胞療法のソースとして期待される。従来技術では、臍帯血、骨髄血、ヒトES/iPS細胞等から、試験管内で分化誘導する方法が取られてきたが、いずれの手技も煩雑であり、また大量の細胞を準備することが困難である。

### 先行技術文献

#### 非特許文献

[0004] 非特許文献1：Jie Z, Zhang Y, Wang C, Shen B, Guan X, Ren Z, et al. Large-scale ex vivo generation of human neutrophils from cord blood CD34+ cells. PLoS One. 2017;12(3).

非特許文献2：Caux C, Vanbervliet B, Massacrier C, Dezutter-Dambuyant

C, De Saint-Vis B, Jacquet C, et al. CD34+ hematopoietic progenitors from human cord blood differentiate along two independent dendritic cell pathways in response to GM-CSF+TNF $\alpha$ . *J Exp Med*. 1996;184(2):695-706.

非特許文献3 : Lachmann N, Ackermann M, Frenzel E, Liebhaber S, Brenning S, Happle C, et al. Large-scale hematopoietic differentiation of human induced pluripotent stem cells provides granulocytes or macrophages for cell replacement therapies. *Stem Cell Reports*. 2015;

非特許文献4 : Hiramoto T, Ebihara Y, Mizoguchi Y, Nakamura K, Yamaguchi K, Ueno K, et al. Wnt3a stimulates maturation of impaired neutrophils developed from severe congenital neutropenia patient-derived pluripotent stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110(8):3023-8.

非特許文献5 : Sweeney CL, Teng R, Wang H, Merling RK, Lee J, Choi U, et al. Molecular Analysis of Neutrophil Differentiation from Human Induced Pluripotent Stem Cells Delineates the Kinetics of Key Regulators of Hematopoiesis. *Stem Cells*. 2016;34(6):1513-26.

非特許文献6 : Takata K, Kozaki T, Lee CZW, Thion MS, Otsuka M, Lim S, et al. Induced-Pluripotent-Stem-Cell-Derived Primitive Macrophages Provide a Platform for Modeling Tissue-Resident Macrophage Differentiation and Function. *Immunity*. 2017;47(1):183-198.e6.

非特許文献7 : Cao X, Yakala GK, van den Hil FE, Cochrane A, Mummery CL, Orlova V V. Differentiation and Functional Comparison of Monocytes and Macrophages from hiPSCs with Peripheral Blood Derivatives. *Stem Cell Reports*. 2019;12(6):1282-97.

非特許文献8 : Ackermann M, Kempf H, Hetzel M, Hesse C, Hashtchin AR, Brinkert K, et al. Bioreactor-based mass production of human iPSC-derived macrophages enables immunotherapies against bacterial airway infections. *Nat Commun*. 2018;9(1).

## 発明の概要

### 発明が解決しようとする課題

- [0005] 臍帯血、骨髓血由来造血前駆細胞を用いた方法では、増殖因子を加えることで、好中球、マクロファージ等が得られるが（非特許文献1、2参照）、臍帯血、骨髓血自体の増殖が有限であり、且つロット差が大きく、均一な質の細胞を大量に準備することが困難である。
- [0006] ヒトES/iPS細胞を用いた方法では、ES/iPS細胞自体はほぼ無限に増殖可能であるが、分化誘導法が煩雑であり、且つ、血液細胞への誘導効率が悪く、臨床応用レベルでの大量供給は困難である（非特許文献3～7参照）。例えば報告されているヒトiPS細胞からのマクロファージ分化では、250mLの培養系で、 $10^8$ 細胞が限度である（非特許文献8参照）。薬剤スクリーニング、細胞療法いずれの観点からも従来技術では、細胞数が大幅に不足しており、より効率の良い誘導法の開発が必須である。
- [0007] 骨髓球系の不死化細胞株としては、白血病患者から培養により低確率で樹立した細胞株は存在するが、当該細胞株は白血病変異遺伝子が恒常的に発現した細胞であり、正常分化が不可能であり、成熟細胞を用いて行う薬剤スクリーニングは不可能である。また、ガン化のリスクがあり、細胞療法のソースとしては使用できない。
- [0008] かかる事情に鑑み、本発明は、好中球、マクロファージ、好塩基球、樹状細胞等の細胞の安定した産生系の確立のために、骨髓系共通前駆細胞（CMP）又は骨髓球系前駆細胞の増殖性を向上させる新規な方法を提供することを目的とする。

### 課題を解決するための手段

- [0009] 本発明者らは、上記課題を解決するために検討を重ねた結果、造血前駆細胞から特定の骨髓球系前駆細胞への分化過程における任意の細胞において、MYCファミリー遺伝子及びBMI1遺伝子を強制発現させることで、CMP又は骨髓球系前駆細胞の増殖性を向上できることを見出し、本発明を完成させるに至った。

[0010] すなわち、本願発明は以下の発明を包含する。

[1] 造血前駆細胞から骨髓球系前駆細胞への分化過程における任意の細胞において、MYCファミリー遺伝子及びBMI1遺伝子を強制発現させる工程を含み、

骨髓球系前駆細胞が、マクロファージ、樹状細胞、顆粒球、赤芽球、又は赤血球の前駆細胞である、CMP又は骨髓球系前駆細胞の増殖性を向上させる方法。

[2] CMP又は骨髓球系前駆細胞を抽出する工程をさらに含む、[1]に記載の方法。

[3] CMP又は骨髓球系前駆細胞において、MYCファミリー遺伝子及びBMI1遺伝子の発現、又はその発現産物の機能を抑制する工程をさらに含む、[1]又は[2]に記載の方法。

[4] CMP又は骨髓球系前駆細胞において、BCL-XL遺伝子を強制発現させる工程をさらに含む、[1]～[3]のいずれかに記載の方法。

[5] CMP又は骨髓球系前駆細胞において、BCL-XL遺伝子の発現、又はその発現産物の機能を抑制する工程をさらに含む、[4]に記載の方法。

[6] CMP又は骨髓球系前駆細胞において、CDKN1A遺伝子及びp53遺伝子の少なくともいずれかの発現、又はその発現産物の機能を抑制する工程をさらに含む、[1]～[5]のいずれかに記載の方法。

[7] [1]～[6]のいずれかに記載の方法で得られたCMP又は骨髓球系前駆細胞を培養する工程を含む、CMP又は骨髓球系前駆細胞を製造する方法。

[8] [1]～[7]のいずれかに記載の方法で得られたCMP又は骨髓球系前駆細胞を分化する工程を含む、CMP系分化細胞を製造する方法。

[9] CMP系分化細胞が、マクロファージ、樹状細胞、顆粒球、赤芽球、又は赤血球である、[8]に記載の方法。

[10] [1]～[7]のいずれかに記載の方法で得られたCMP若しく

は骨髓球系前駆細胞、又は〔8〕若しくは〔9〕に記載の方法で得られたCMP系分化細胞を含む、医薬組成物。

〔11〕 〔1〕～〔7〕のいずれかに記載の方法で得られたCMP、骨髓球系前駆細胞、〔8〕若しくは〔9〕に記載の方法で得られたCMP系分化細胞、又は〔10〕に記載の医薬組成物を、それを必要とする患者に投与することを含む、疾患の治療又は予防方法。

〔12〕 〔1〕～〔7〕のいずれかに記載の方法で得られたCMP又は骨髓球系前駆細胞。

〔13〕 〔8〕又は〔9〕に記載の方法で得られたCMP系分化細胞。

〔14〕 CMP又は骨髓球系前駆細胞の増殖促進剤であって、MYCファミリー遺伝子及びBMI1遺伝子を強制発現させる分子を有効成分として含み、

骨髓球系前駆細胞が、マクロファージ、樹状細胞、顆粒球、赤芽球、又は赤血球の前駆細胞である、増殖促進剤。

〔15〕 第1の外來性プロモーターと作用可能に連結されたMYCファミリー遺伝子及び第2の外來性プロモーターと作用可能に連結されたBMI1遺伝子を有する、CMP又は骨髓球系前駆細胞であって、骨髓球系前駆細胞が、マクロファージ、樹状細胞、顆粒球、赤芽球、又は赤血球の前駆細胞である、CMP又は骨髓球系前駆細胞。

〔16〕 〔15〕に記載のCMP又は骨髓球系前駆細胞を含む細胞集団であって、該細胞集団全体における該CMP又は骨髓球系前駆細胞の割合が10%以上である、細胞集団。

〔17〕 〔16〕に記載の細胞集団を含む、細胞調製物。

〔18〕 以下の工程を含む、マクロファージを製造する方法：

1) 造血前駆細胞からマクロファージ前駆細胞への分化過程における任意の細胞において、MYCファミリー遺伝子及びBMI1遺伝子を強制発現させる工程、

2) 工程1で得られた細胞を培養し、増殖させる工程、

3) 工程2で得られた細胞におけるMYCファミリー遺伝子及びBMI1遺伝子の強制発現を抑制し、マクロファージ分化条件下で更に培養することにより、マクロファージへの分化及び成熟を促進する工程。

[19] 工程1が、造血前駆細胞からマクロファージ前駆細胞への分化過程における任意の細胞において、BCL-XL遺伝子を強制発現させることを更に含む、請求項14記載の方法。

[20] 工程3が、工程2で得られた細胞におけるBCL-XL遺伝子の強制発現を抑制することを更に含む、[19]記載の方法。

[21] 工程1が、造血前駆細胞からマクロファージ前駆細胞への分化過程における任意の細胞において、CDKN1A遺伝子及び／又はp53遺伝子の発現、又はその発現産物の機能を抑制することを更に含む、[18]～[20]のいずれかに記載の方法。

[0011] [1B] CMP又は骨髓球系前駆細胞において、BCL-XL遺伝子を強制発現させる工程を含み、

骨髓球系前駆細胞が、GMP、マクロファージ前駆細胞又は樹状細胞前駆細胞である、CMP又は骨髓球系前駆細胞の増殖性を向上させる方法。

[2B] CMP又は骨髓球系前駆細胞を抽出する工程をさらに含む、[1B]に記載の方法。

[3B] CMP又は骨髓球系前駆細胞において、MYCファミリー遺伝子及びBMI1遺伝子を強制発現させる工程をさらに含む、[1B]又は[2B]に記載の方法。

[4B] CMP又は骨髓球系前駆細胞において、CDKN1A遺伝子及びp53遺伝子の少なくともいずれかの発現、又はその発現産物の機能を抑制する工程をさらに含む、[1B]～[3B]のいずれかに記載の方法。

[5B] [1B]～[4B]のいずれかに記載の方法で得られたCMP又は骨髓球系前駆細胞を培養する工程を含む、CMP又は骨髓球系前駆細胞を製造する方法。

[6B] [1B]～[5B]のいずれかに記載の方法で得られたCMP又

は骨髓球系前駆細胞を分化する工程を含む、CMP系分化細胞を製造する方法。

[7 B] CMP系分化細胞が、マクロファージ又は樹状細胞である、[6 B]に記載の方法。

[8 B] [1 B]～[5 B]のいずれかに記載の方法で得られたCMP又は骨髓球系前駆細胞、又は[6 B]若しくは[7 B]に記載の方法で得られたCMP系分化細胞を含む、医薬組成物。

[9 B] [1 B]～[5 B]のいずれかに記載の方法で得られたCMP、骨髓球系前駆細胞、又は[6 B]若しくは[7 B]に記載の方法で得られたCMP系分化細胞、又は[8 B]に記載の医薬組成物を、それを必要とする患者に投与することを含む、疾患の治療又は予防方法。

[10 B] [1 B]～[5 B]のいずれかに記載の方法で得られたCMP又は骨髓球系前駆細胞。

[11 B] [6 B]又は[7 B]に記載の方法で得られたCMP系分化細胞。

[12 B] CMP又は骨髓球系前駆細胞の増殖促進剤であって、  
BCL-XL遺伝子を強制発現させる分子を有効成分として含み、  
骨髓球系前駆細胞が、GMP、マクロファージ前駆細胞又は樹状細胞前駆細胞である、増殖促進剤。

[13 B] 外来性プロモーターと作用可能に連結されたBCL-XL遺伝子を有する、CMP又は骨髓球系前駆細胞であって、骨髓球系前駆細胞が、GMP、マクロファージ前駆細胞又は樹状細胞前駆細胞である、CMP又は骨髓球系前駆細胞。

[14 B] [13 B]に記載のCMP又は骨髓球系前駆細胞を含む細胞集団であって、該細胞集団全体における該CMP又は骨髓球系前駆細胞の割合が10%以上である、細胞集団。

[15 B] [14 B]に記載の細胞集団を含む、細胞調製物。

[0012] [1 C] CMP又は骨髓球系前駆細胞において、CDKN1A遺伝子及び



p 5 3 遺伝子の少なくともいずれかの発現、又はその発現産物の機能を抑制する工程を含み、

骨髓球系前駆細胞が、GMP、マクロファージ前駆細胞、樹状細胞前駆細胞又は赤血球前駆細胞である、CMP又は骨髓球系前駆細胞の増殖性を向上させる方法。

[2C] CMP又は骨髓球系前駆細胞を抽出する工程をさらに含む、[1C]に記載の方法。

[3C] CMP又は骨髓球系前駆細胞において、MYCファミリー遺伝子及びBMI1遺伝子を強制発現させる工程をさらに含む、[1C]又は[2C]に記載の方法。

[4C] CMP又は骨髓球系前駆細胞において、BCL-XL遺伝子を強制発現させる工程をさらに含む、[1C]～[3C]のいずれかに記載の方法。

[5C] [1C]～[4C]のいずれかに記載の方法で得られたCMP又は骨髓球系前駆細胞を培養する工程を含む、CMP又は骨髓球系前駆細胞を製造する方法。

[6C] [1C]～[5C]のいずれかに記載の方法で得られたCMP又は骨髓球系前駆細胞を分化する工程を含む、CMP系分化細胞を製造する方法。

[7C] CMP系分化細胞が、マクロファージ、樹状細胞又は赤血球である、[6C]に記載の方法。

[8C] [1C]～[5C]のいずれかに記載の方法で得られたCMP又は骨髓球系前駆細胞、又は[6C]若しくは[7C]に記載の方法で得られたCMP系分化細胞を含む、医薬組成物。

[9C] [1C]～[5C]のいずれかに記載の方法で得られたCMP、骨髓球系前駆細胞、又は[6C]若しくは[7C]に記載の方法で得られたCMP系分化細胞、又は[8C]に記載の医薬組成物を、それを必要とする患者に投与することを含む、疾患の治療又は予防方法。

[10C] [1C] ~ [5C] のいずれかに記載の方法で得られたCMP又は骨髓球系前駆細胞。

[11C] [6C] 又は [7C] に記載の方法で得られたCMP系分化細胞。

[12C] CMP又は骨髓球系前駆細胞の増殖促進剤であって、  
CDKN1A遺伝子及び／又はp53遺伝子の発現、又はその発現産物の機能を抑制する分子を有効成分として含み、  
骨髓球系前駆細胞が、GMP、マクロファージ前駆細胞、樹状細胞前駆細胞又は赤血球前駆細胞である、増殖促進剤。

[13C] 第5の外來性プロモーターと作用可能に連結されたCDKN1A遺伝子に対する発現抑制核酸、及び／又は第6の外來性プロモーターと作用可能に連結されたp53遺伝子に対する発現抑制核酸をコードする核酸を有する、CMP又は骨髓球系前駆細胞であって、骨髓球系前駆細胞が、GMP、マクロファージ前駆細胞、樹状細胞前駆細胞又は赤血球前駆細胞である、CMP又は骨髓球系前駆細胞。

[14C] [13C] に記載のCMP又は骨髓球系前駆細胞を含む細胞集団であって、該細胞集団全体における該CMP又は骨髓球系前駆細胞の割合が10%以上である、細胞集団。

[15C] [14C] に記載の細胞集団を含む、細胞調製物。

### 発明の効果

[0013] 本発明によれば、造血前駆細胞から特定の骨髓球系前駆細胞への分化過程における任意の細胞において、MYCファミリー遺伝子及びBMI1遺伝子を強制発現させることで、CMP又は骨髓球系前駆細胞の増殖性を向上させることが可能になる。

[0014] また、本発明は、ドキシサイクリン誘導性にヒトiPS細胞由来造血前駆細胞を長期間安定増殖させることが可能であり、任意のタイミングで培地からドキシサイクリンを除去するだけで、増殖を抑制すると同時に、正常機能を有する好中球、マクロファージ、赤芽球、赤血球等を大量に準備可能であ

る。

本発明は様々なiPS細胞から高効率に骨髓球系の不死化細胞株に誘導可能であることから異物特異的抗原を標的としたレセプター導入したiPS細胞、標的細胞への細胞毒性を強める遺伝子改変したiPS細胞、免疫拒絶反応を抑えたHLA null iPS細胞、遺伝性疾患iPS細胞を用いることで、より生理的であり、薬剤スクリーニング、細胞療法、双方で優位性が期待できる。

### 図面の簡単な説明

- [0015] [図1]図1は、実施例1-1で用いた不死化CMP株を樹立する方法を示す。
- [図2]図2は、培養14日後にc-MYC/BMI1の2遺伝子を導入したCMP株を、そのまま培養した株(MB)、培養21日後にMB株に更にドキシサイクリン誘導レンチウイルスベクターを用いてBCL-XL遺伝子を導入した株(MBX)、培養21日後にMB株に更に持続的に発現するshp21/p53レンチウイルスベクターを感染させた株(MB-p21/p53\_KD)、及び培養21日後にMBX株に更に持続的に発現するshp21/p53レンチウイルスベクターを感染させた株(MBX-p21/p53\_KD)について、14日目と31日目と43日目における細胞の増殖数の結果を示す。
- [図3]図3は、健常者由来iPS細胞から誘導したCMP株(上列:Clone7-3、下列:Clone7-4)について、培養液からドキシサイクリンを除去し、MYC/BMI1/BCL-XLの3因子の発現を抑制して7日目に、骨髓球系の主要な3系統への終末分化を確認した結果を示す。
- [図4]図4は、MBX株及びMBX-p21/p53\_KD株について、培養液からドキシサイクリンを除去し、MYC/BMI1/BCL-XLの3因子の発現を抑制して7日目に、マクロファージへの分化を確認した結果を示す。
- [図5]図5は、実施例2-1で用いたPiggyBac Systemを示す。

[図6]図6は、実施例2-1で樹立したマクロファージ株の増殖曲線を示す。

[図7]図7は、実施例2-1で得た1383D10由来のマクロファージ株をCD13, CD14, CD33, CD43, HLA-DRで染色しFACSで解析した結果を示す。

[図8]図8上部は、実施例2-1で得た各マクロファージ株をマクロファージのマーカであるCX3CR1でsorting後、遺伝子発現時(Dox on)と遺伝子発現抑制時(Dox off)とする操作を示す。図8下部は、遺伝子発現時(Dox on)のマクロファージ細胞表面マーカをFACSで解析した結果を示す。

[図9]図9は、実施例2-1で得た各マクロファージ株について、遺伝子発現抑制時(Dox off)のマクロファージ細胞表面マーカをFACSで解析した結果を示す。

[図10]図10は、実施例2-1で得た各マクロファージ株について、M1型、M2型のいずれの型であるかを検証した結果を示す。

[図11]図11は、実施例2-1で得た各マクロファージ株の培養液からドキシサイクリンを除去し、Dox off時にマトリゲル上で培養した細胞株をCD11bで染色した結果を示す。

[図12]図12は、実施例2-1で得た各マクロファージ株の貪食能を調べた結果を示す。

[図13]図13は、実施例2-1で得た各マクロファージ株の $\beta$ -amilo idの貪食能を調べた結果を示す。

[図14]図14は、実施例2-1で樹立した赤血球株について、細胞数をグリコフォリンA(Gly-A)陽性細胞でカウントした結果を示す。

[図15]図15は、実施例3-1で用いたPiggyBac Systemを示す。

[図16]図16は、実施例3-1で樹立したマクロファージ株の増殖曲線を示す。

[図17]図17は、実施例3-1で樹立した樹状細胞株の増殖曲線を示す。

[図18]図18上部は、実施例3-1で得た各マクロファージ株をマクロファージのマーカであるCX3CR1でsorting後、遺伝子発現時(Dox on)と遺伝子発現抑制時(Dox off)とする操作を示す。図18下部は、遺伝子発現時(Dox on)のマクロファージ細胞表面マーカーをFACSで解析した結果を示す。

[図19]図19は、実施例3-1で得た各マクロファージ株について、遺伝子発現抑制時(Dox off)のマクロファージ細胞表面マーカーをFACSで解析した結果を示す。

[図20]図20は、実施例3-1で得た各マクロファージ株の $\beta$ -amiloidの貪食能を調べた結果を示す。

[図21]図21上部は、実施例3-1で得た各樹状細胞株を樹状細胞のマーカであるCD209でsorting後、遺伝子発現時(Dox on)と遺伝子発現抑制時(Dox off)とする操作を示す。図21下部は、遺伝子発現時(Dox on)と遺伝子発現抑制時(Dox off)の樹状細胞表面マーカーをFACSで解析した結果を示す。

[図22]図22は、実施例3-1で得た各樹状細胞株について、遺伝子発現時(Dox on)と遺伝子発現抑制時(Dox off)の樹状細胞表面マーカーをFACSで解析した結果を示す。

[図23]図23は、実施例3-1で得た各樹状細胞株について、遺伝子発現時(Dox on)と遺伝子発現抑制時(Dox off)の樹状細胞表面マーカーをFACSで解析した結果を示す。

[図24]図24は、実施例3-1で樹立した赤血球株について、細胞数をGly-A陽性細胞でカウントした結果を示す。

## 発明を実施するための形態

### [0016] (1) 方法論1

本実施形態に係るCMP又は骨髓球系前駆細胞の増殖性を向上させる方法は、造血前駆細胞から骨髓球系前駆細胞への分化過程における任意の細胞において、MYCファミリー遺伝子及びBMI1遺伝子を強制発現させる工程

を含み、これにより、CMP又は骨髓球系前駆細胞の増殖性が向上し、無限に増殖する不死化細胞株を得ることが期待できる。

[0017] 「造血前駆細胞から骨髓球系前駆細胞への分化過程」には、造血前駆細胞は含まれない。造血前駆細胞から骨髓球系前駆細胞への分化過程の細胞としては、CMP及び下記に詳述する骨髓球系前駆細胞を挙げることができる。

本明細書で使用する場合、「骨髓系共通前駆細胞」(common myeloid progenitor: CMP)とは、マクロファージや樹状細胞等の単球系細胞、好中球や好塩基球等の顆粒球系細胞、血小板を産出する巨核球細胞、及び赤芽球細胞や赤血球等の赤血球系細胞に分化する能力を有し、T細胞、B細胞及びNK細胞等のリンパ球へ分化する能力を有していない前駆細胞である。

CMPは、フローサイトメトリー解析において、例えば、CD33<sup>+</sup>の細胞表面マーカー発現により特徴付けることができる。CMPは、造血前駆細胞や造血内皮細胞を、CMP分化誘導に適した条件下で培養することにより得ることができる。例えば、造血前駆細胞又は造血内皮細胞を、GM-CSF、G-CSF、IL-3、SCF及びTPOを含む適切な培地中で、CMPへの分化に十分な期間培養することにより得ることができる。培養の環境としては、例えば、5%CO<sub>2</sub>、36~38℃、好ましくは37℃の条件を用いることができる。CMPが誘導されたことは、培養した細胞をフローサイトメトリー解析に付して、上述のCMPに特徴的な細胞表面マーカー発現パターンを有する細胞の出現を検出するか、コロニー形成アッセイに付して、上述のCMPに特徴的な分化能力を有することを確認することにより、確かめることができる。CMPが誘導されるまでの培養期間は、出発細胞(造血前駆細胞、造血内皮細胞等)の種類によって異なるが分化誘導を開始してから、1~20日後くらいにはその存在を確認することができる。

[0018] 「造血前駆細胞」とは、CD34<sup>+</sup>CD43<sup>+</sup>細胞として特徴付けられる造血系の細胞であり、例えば、ES細胞、iPS細胞等の多能性幹細胞由来の細胞であってもよく、特に、ES細胞、iPS細胞等の多能性幹細胞から調製されるネット様構造物(「ES-sac」又は「iPS-sac」とも称

する)から得られる細胞(特に、ネット様構造物から分離した直後の細胞)が好ましい。ここで、ES細胞又はiPS細胞から調製される「ネット様構造物」とは、ES細胞又はiPS細胞由来の立体的な嚢状(内部に空間を伴うもの)構造体で、内皮細胞集団等で形成され、内部に造血前駆細胞を含むもののことである。ネット様構造については、例えば、W02008/041370; W02009/122747; Lordier et al., Blood, 112:3164-3174 2009; TAKAYAMA et al., BLOOD 2008, 111:5298-5306を参照できる。

[0019] 「造血内皮細胞」とは、VE-カドヘリンを発現し、1個の細胞から血液細胞と血管内皮細胞の両方のコロニーを形成する能力(二分化能)を持つ細胞をいう。造血内皮細胞は、VE-カドヘリン陽性、CD41陽性、CXCR4陽性の細胞であり得る。「造血内皮細胞」は、例えば、ES細胞、又はiPS細胞等の多能性幹細胞由来の細胞であってもよく、ES細胞又はiPS細胞からネット様構造物を誘導する過程で、誘導される。

[0020] ネット様構造物をヒトES細胞、ヒトiPS細胞等のヒト多能性幹細胞から調製するために適した細胞の培養条件は、用いる多能性幹細胞によって異なるが、例えば、培地としては、最終濃度15%のFBSを添加したIMDMを用い、その他無血清の場合においても適宜増殖因子及びサプリメント等を加えたものを使用することができる。さらに、ネット様構造物を効率的に形成させるために、VEGFを0~100ng/ml、より好ましくは、20ng/ml程度加えるのがよい。培養の環境としては、用いるES細胞又はiPS細胞の種類によって異なるが、例えば、5%CO<sub>2</sub>、36~38℃、好ましくは37℃の条件を用いることができる。ネット様構造物が形成されるまでの培養期間は、多能性幹細胞の種類や誘導条件によって異なるが、一般的には、多能性幹細胞をフィーダー細胞上に播いてから、7日後くらいまでに造血内皮細胞を含む細胞塊が形成され、14~16日後くらいまでに、造血前駆細胞を含むネット様構造物が形成される。

形成されたネット様構造物は、濾胞状構造になっており、内部には、造血前駆細胞が濃縮された状態で存在している。細胞塊に含まれる造血内皮細胞

やネット様構造物の内部に存在する造血前駆細胞は、物理的な手段、例えば、滅菌済みの篩状器具（例えば、セルストレイナー等）に通すことにより、分離することができる。

[0021] 「骨髓球系前駆細胞」とは、CMPから分化した、CMPに由来する細胞であり、マクロファージ、樹状細胞、顆粒球、赤芽球、又は赤血球の前駆細胞を広く意味する。CMPは、巨核球・赤芽球前駆細胞（megakaryocyte-erythrocyte progenitor：MEP）や顆粒球・マクロファージ前駆細胞（granulocyte-macrophage progenitor：GMP）に分化し得る。

その後多段階の分化を経て、GMPからは、マクロファージ、樹状細胞、及び顆粒球が、MEPからは、巨核球、赤芽球、又は赤血球が生成される。すなわち、マクロファージ、樹状細胞、顆粒球、赤芽球、又は赤血球の前駆細胞（骨髓球系前駆細胞）は、最終分化したマクロファージ、樹状細胞、顆粒球、巨核球、赤芽球、又は赤血球自体ではないものの、CMPからマクロファージ、樹状細胞、顆粒球、赤芽球、又は赤血球への分化過程における任意の細胞であればよい。骨髓球系前駆細胞としては、MEP、GMP、マクロファージ前駆細胞、樹状細胞前駆細胞、赤血球前駆細胞、好中球前駆細胞等を例示することができるが、これらに限定されない。なお、本発明においては、骨髓球系前駆細胞からは、MEPから巨核球への分化過程における巨核球の前駆細胞（多核化前のもの、WO2011/034073で「巨核前駆細胞」と記載しているものを含む）が除かれる。

[0022] MEPは、造血前駆細胞、造血内皮細胞又はCMPを、MEP分化誘導に適した条件下で培養することにより得ることができる。例えば、造血前駆細胞、造血内皮細胞又はCMPを、IL-3、SCF及びTPOを含む適切な培地中で、MEPへの分化に十分な期間培養することにより得ることができる。マクロファージ前駆細胞は、造血前駆細胞、造血内皮細胞、CMPを、マクロファージ前駆細胞分化誘導に適した条件下で培養することにより得ることができる。例えば、造血前駆細胞、造血内皮細胞、CMPを、IL-1b、SCF及びM-CSFを含む適切な培地中で、マクロファージ前駆細胞



への分化に十分な期間培養することにより得ることができる。樹状細胞前駆細胞は、造血前駆細胞、造血内皮細胞、CMPを、樹状細胞前駆細胞分化誘導に適した条件下で培養することにより得ることができる。例えば、造血前駆細胞、造血内皮細胞、CMPを、SCF、M-CSF及びGM-CSFを含む適切な培地中で、樹状細胞前駆細胞への分化に十分な期間培養することにより得ることができる。好中球前駆細胞は、造血前駆細胞、造血内皮細胞、CMPを、好中球前駆細胞分化誘導に適した条件下で培養することにより得ることができる。例えば、造血前駆細胞、造血内皮細胞、CMPを、SCF及びGM-CSFを含む適切な培地中で、好中球前駆細胞への分化に十分な期間培養することにより得ることができる。赤血球前駆細胞は、造血前駆細胞、造血内皮細胞、CMP又はMEPを、赤血球前駆細胞分化誘導に適した条件下で培養することにより得ることができる。例えば、造血前駆細胞、造血内皮細胞、CMP又はMEPを、SCF及びEPOを含む適切な培地中で、赤血球前駆細胞への分化に十分な期間培養することにより得ることができる。培養の環境としては、例えば、5%CO<sub>2</sub>、36~38℃、好ましくは37℃の条件を用いることができる。各骨髓球系前駆細胞が誘導されたことは、培養した細胞をフローサイトメトリー解析に付して、下述の各骨髓球系前駆細胞に特徴的な細胞表面マーカー発現パターンを有する細胞の出現を検出するか、コロニー形成アッセイに付して、各骨髓球系前駆細胞に特徴的な分化能力を有することを確認することにより、確かめることができる。CMPが誘導されるまでの培養期間は、出発細胞（造血前駆細胞、造血内皮細胞等）の種類によって異なるが、分化誘導を開始してから、7~14日後くらいにはその存在を確認することができる。

[0023] CMP、MEPは、フローサイトメトリー解析において、以下の細胞表面マーカー発現パターンにより特徴付けられ得る。

CMP : Lin<sup>-</sup>/CD33<sup>+</sup>

MEP : CD41<sup>+</sup> 又はCD41<sup>+</sup>Gly-A<sup>+</sup>

[0024] その他の骨髓球系前駆細胞は、フローサイトメトリー解析において、例え

ば、以下の細胞表面マーカーの少なくとも1つ、好ましくは2以上を発現することにより特徴付けられ得る。

マクロファージ前駆細胞：CX3CR1、CD16、CD14、CD11b、CD13、CD86

樹状細胞前駆細胞：CD209、CD11c、CD303、CD80、CD86

赤血球前駆細胞：Gly-A、CD71

好中球前駆細胞：CD15、CD16

[0025] 本発明者らは、多能性幹細胞から誘導した多核化前の巨核球（WO2011/034073中で「巨核前駆細胞」と記載しているものを含む）中でMYC等の癌遺伝子とBMI1等の遺伝子を強制発現させ、該巨核球の増殖能を高めることについて報告をしているが（WO2011/034073、JEM, 207:2817-2830 2010）、本発明は、この方法論が、巨核球のみならず、造血前駆細胞から骨髓球系前駆細胞への分化過程における任意の細胞に適用可能であり、その増殖能を高め得ることを見出したことに基づく。

[0026] 本明細書で使用する場合、「遺伝子の発現」とは、対象の遺伝子をコードするDNAがmRNAへ転写されること、及び／又はmRNAがタンパク質へ翻訳されることを意味する。MYCファミリー遺伝子及びBMI1遺伝子の強制発現は、同時に行ってもよく、順次行ってもよい。なお、強制発現後に、細胞を継代培養してもよく、最後の継代から強制発現を解除する日までの期間も特に限定されないが、例えば、1日間、2日間又は3日間以上としてもよい。CMP又は骨髓球系前駆細胞の増殖を維持する場合には、培養期間中、MYCファミリー遺伝子及びBMI1遺伝子の強制発現を維持することが好ましい。

[0027] MYCファミリー遺伝子は、生体内において細胞の癌化を誘導する遺伝子である。MYCファミリー遺伝子としては、例えば、c-MYC、N-MYC、L-MYC遺伝子が挙げられる。これらの中でもc-MYCが好ましい。

[0028] BMI 遺伝子は、CDKN2a (INK4A/ARF) 遺伝子を負に制御し、細胞老化を回避するために機能する遺伝子である (小倉ら, 再生医療, vol. 6, No. 4, pp26-32; Jseus et al., Jseus et al., Nature Reviews Molecular Cell Biology vol. 7, pp667-677, 2006; Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 100, pp211-216, 2003)。

[0029] CMP又は骨髓球系前駆細胞の増殖性を向上させる方法においては、所望の特定の分化段階の細胞 (CMP又は骨髓球系前駆細胞) を抽出 (単離又は精製) する工程をさらに含んでもよい。特定の分化段階の細胞 (CMP又は骨髓球系前駆細胞) の抽出は、MYCファミリー遺伝子及びBMI1遺伝子を強制発現させる前に行っても後に行ってもよい。一態様において、MYCファミリー遺伝子及びBMI1遺伝子を強制発現させる前にこの抽出工程を行い、抽出した特定の分化段階の細胞 (CMP又は骨髓球系前駆細胞) において、MYCファミリー遺伝子及びBMI1遺伝子を強制発現させる。別の態様において、MYCファミリー遺伝子及びBMI1遺伝子を強制発現させた、所望の特定の分化段階の細胞 (CMP又は骨髓球系前駆細胞) を含む細胞集団を調製し、その後該細胞集団から、所望の特定の分化段階の細胞 (CMP又は骨髓球系前駆細胞) を抽出する。この抽出した特定の分化段階の細胞 (CMP又は骨髓球系前駆細胞) において、MYCファミリー遺伝子及びBMI1遺伝子を引き続き強制発現させてもよい。目的とする細胞を抽出し、抽出された細胞に対して、本発明の方法を適用することにより、或いは本発明の方法を適用した細胞集団から、目的とする細胞を抽出して、該細胞を継続して培養することにより、目的の細胞種を効率よく増殖させることができる。抽出する細胞は、抽出した細胞種の増殖性を効率的に向上させる観点から、CMPの細胞株のみとすることや、骨髓球系前駆細胞の単一種の細胞株のみとすることが好ましいが、これらの2種以上の細胞が混合した細胞集団としてもよい。

抽出する細胞としては、例えば、CMP、MEP、GMP、マクロファージ前駆細胞、樹状細胞前駆細胞、赤血球前駆細胞、好中球前駆細胞等を挙げることができる。目的とする細胞の抽出は、該細胞に特異的に発現している（又は発現していない）細胞表面マーカーに対する抗体を用いて、フローサイトメトリー、パニング、磁気ビーズ等の当業者に周知の方法により行うことができる。CMP、MEPの単離は、上述の細胞表面マーカー発現パターンを満足する細胞を単離することにより行うことができる。マクロファージ前駆細胞を抽出する場合、例えば、CX3CR1、CD16、CD14、CD11b、CD13及びCD86からなる群から選択される少なくとも1つの細胞表面マーカー（好ましくは、CX3CR1）が陽性の細胞を単離する。樹状細胞前駆細胞を抽出する場合、例えば、CD209、CD11c、CD303、CD80及びCD86からなる群から選択される少なくとも1つの細胞表面マーカー（好ましくは、CD209）が陽性の細胞を単離する。赤血球前駆細胞を抽出する場合、例えば、Gly-A及びCD71からなる群から選択される少なくとも1つの細胞表面マーカー（好ましくは、Gly-A）が陽性の細胞を単離する。好中球前駆細胞を抽出する場合、例えば、CD15及びCD16からなる群から選択される少なくとも1つの細胞表面マーカーが陽性の細胞を単離する。

抽出操作後の細胞集団に含まれる目的とする細胞の割合が、例えば、10%以上、20%以上、30%以上、40%以上、50%以上、60%以上、70%以上、80%以上、90%以上、95%以上（例、100%）となるように、目的とする細胞の単離を行うことができる。目的とする細胞のシングルセルを単離してもよい。

[0030] 本発明に係るCMP又は骨髓球系前駆細胞の増殖性を向上させる方法は、CMP又は骨髓球系前駆細胞において、BCL-XL遺伝子を強制発現させる工程をさらに含んでもよい。MYCファミリー遺伝子及びBMI1遺伝子に加えて、BCL-XL遺伝子を発現させることにより、CMP又は骨髓球系前駆細胞の増殖の更なる促進が期待できる。BCL-XL遺伝子の上

記強制発現の期間は当業者が適宜決定することができる。

[0031] BCL-XL 遺伝子は、細胞のアポトーシスを抑制する機能を有する遺伝子である。

[0032] MYCファミリー遺伝子、BMI1 遺伝子、及び／又はBCL-XL 遺伝子の強制発現は、同時に行ってもよく、順次行ってもよい。例えば、MYCファミリー遺伝子とBMI1 遺伝子を強制発現させ、続いてBCL-XL 遺伝子を強制発現させて、増殖能を向上させたCMP又は骨髓球系前駆細胞を得てもよい。また、MYCファミリー遺伝子とBMI1 遺伝子とBCL-XL 遺伝子を同時に強制発現させて、増殖能を向上させたCMP又は骨髓球系前駆細胞を得ることもできる。CMP又は骨髓球系前駆細胞の増殖を維持する場合には、培養期間中、MYCファミリー遺伝子及びBMI1 遺伝子に加えてBCL-XLの強制発現を維持することが好ましい。

[0033] MYCファミリー遺伝子、BMI1 遺伝子、及びBCL-XL 遺伝子は、CMP又は骨髓球系前駆細胞の細胞増殖を促進するが、CMP系分化細胞（例、マクロファージ、樹状細胞、好中球、赤血球）の終末分化を阻害し得るために、終末分化工程に入る前にこれら遺伝子の発現を抑制してもよい。CMP又は骨髓球系前駆細胞内のこれら遺伝子発現を抑制することにより、機能的でより成熟したCMP系分化細胞（例、マクロファージ、樹状細胞、好中球、赤血球）が誘導されやすくなる。

[0034] MYCファミリー遺伝子、BMI1 遺伝子、BCL-XL 遺伝子等の遺伝子を細胞内で強制発現させる場合、当業者において周知のいかなる方法により実施してもよいが、例えば、遺伝子を、レンチウイルスやレトロウイルス等のウイルスベクターやプラスミドベクター、エピソーマルベクター等の非ウイルスベクターによる遺伝子導入システムを利用して、細胞内に導入し、発現させてもよい。トランスポゾンを用いて非ウイルス的に、目的遺伝子を細胞のゲノムに組み込み、安定発現細胞株を樹立した後に、不要となった導入遺伝子をトランスポゾネースにより除去する方法（例、PiggyBac Transposonシステム）を用いることもまた好ましい。CMP又

は骨髓球系前駆細胞に、所望の遺伝子（例、MYCファミリー遺伝子及びBML1遺伝子、任意的に更にBCL-XL遺伝子）の発現ベクター（例、ウイルスベクター）をトランスフェクトしてもよいし、予め所望の遺伝子（例、MYCファミリー遺伝子及びBML1遺伝子、任意的に更にBCL-XL遺伝子）の発現カセットを組み込んだ多能性幹細胞（例、ES細胞、iPS細胞）、造血前駆細胞又は造血内皮細胞からCMP又は骨髓球系前駆細胞を誘導し、その段階で当該遺伝子を強制発現させてもよい。或いは、予め所望の遺伝子（例、MYCファミリー遺伝子及びBML1遺伝子、任意的に更にBCL-XL遺伝子）の発現カセットを組み込んだ多能性幹細胞（例、ES細胞、iPS細胞）、造血前駆細胞又は造血内皮細胞において、当該遺伝子を強制発現させながら、該多能性幹細胞、造血前駆細胞又は造血内皮細胞から、CMP又は骨髓球系前駆細胞への分化を誘導してもよい。遺伝子導入ベクターにより遺伝子発現を行う場合、適当なプロモーターの下流に該遺伝子を作用可能に連結し、これを遺伝子導入ベクターに挿入して、細胞内に導入して目的遺伝子を発現させてもよい。該プロモーターは外来性プロモーターであり得る。本明細書中、遺伝子の「内在性」プロモーターとは、ゲノム中における該遺伝子と自然な状態で連結されているプロモーターを意味し、遺伝子の「外来性」プロモーターとは、遺伝操作（すなわち分子生物学的技法）によって、人為的に該遺伝子の近位に、該遺伝子の転写が、作用可能に連結されているプロモーターによって指示されるように配置されているものを意味する。ここで、「作用可能」に連結するとは、該プロモーターによって目的遺伝子がシスに支配され、目的遺伝子の所望の発現が実現されるようにプロモーターと目的遺伝子を連結することを意味する。外来性プロモーターは、恒常的プロモーター又は調節性プロモーターであり得る。恒常的プロモーターとしては、例えば、CMVプロモーター、EF1プロモーター、ユビキチンプロモーター等を挙げることができる。調節性プロモーターとは、誘導可能又は抑制解除可能なプロモーターを意味し、リプレッサー又はインデューサーのいずれか一方と結合することのできる、プロモーターと共に働く

DNA配列を有するプロモーターを指す。プロモーターが誘導されるか或いは抑制解除されると「オンの状態」になり、プロモーターが誘導されないか或いは抑制解除されていない状態では、プロモーターは「オフの状態」となる。調節性プロモーターの例としては、テトラサイクリン反応性プロモーター、ステロイド反応性プロモーター、メタロチオネインプロモーター等の薬剤反応性プロモーターを挙げることができる。テトラサイクリン反応性プロモーターとは、テトラサイクリン又はその誘導體（例えば、ドキシサイクリン（Dox））の存在又は非存在によって可逆的に制御される、既知の調節性プロモーターである。テトラサイクリン反応性プロモーターは、内部にテトラサイクリン応答エレメント（TRE）が配置されたプロモーターであり、リバーステトラサイクリン制御性トランス活性化因子（rtTA）タンパク質又はテトラサイクリン制御性トランス活性化因子（tTA）のTREへの結合により、活性化される（即ち、目的タンパク質の発現を誘導する）プロモーターである。rtTAタンパク質はDox存在下でTREに結合し、一方tTAタンパク質はDox非存在下でTREに結合して、TRE配列の下流のプロモーターと機能的に連結された目的遺伝子の発現を誘導する。テトラサイクリン反応性プロモーターを用いる場合、テトラサイクリン反応性プロモーターと機能的に連結された該遺伝子と、rtTA又はtTAタンパク質とが導入された細胞を、Dox存在下で培養することにより、Dox依存的に該遺伝子の発現を誘導又は抑制することができる。外来性プロモーターは、好ましくは調節性プロモーターである。調節性プロモーターを用いることにより、例えば、薬剤添加等の制御により目的遺伝子を誘導的に発現させることもできる。このような薬剤による遺伝子発現システムは、MYCファミリー遺伝子、BMI1遺伝子、BCL-XL遺伝子等の所望の発現制御を実現するために、当業者において、適当なシステムを容易に選択することができる。このような発現を行うために、市販のキット等を使用してもよい。また、発現制御の目的遺伝子であるMYCファミリー遺伝子、BMI1遺伝子、BCL-XL遺伝子は、それぞれ別々のベクターに挿入してもよいし

、同一のベクターに挿入してもよい。

[0035] 細胞内におけるMYCファミリー遺伝子、BMI1遺伝子、BCL-XL遺伝子等の発現の抑制は、例えば、前述の調節性プロモーターを用いた薬剤誘導的な発現システムによる発現の誘導を、薬剤等の除去により解除することで達成してもよい。或いは、導入したMYCファミリー遺伝子、BMI1遺伝子、BCL-XL遺伝子等をCre/loxシステム等を使用して除去し、これらの遺伝子の発現を抑制的に制御してもよい。MYCファミリー遺伝子、BMI1遺伝子、BCL-XL遺伝子等の発現を抑制的に調節するために、市販のキット等を適宜使用することもできる。

[0036] 上記各遺伝子の強制発現及びその解除のためにTet-on（登録商標）又はTet-off（登録商標）システムのような市販の薬剤応答性の遺伝子発現誘導システムを用いてもよい。この場合、強制発現させる工程においては、対応する薬剤、例えば、テトラサイクリン又はドキシサイクリンを培地に含有させ、これらを培地から除くことによって強制発現を抑制してもよい。

[0037] 遺伝子の強制発現及び強制発現の解除は、国際公開第2011/034073号（上掲）及び米国特許出願公開第2012/0238023号、国際公開第2012/157586号（上掲）及び米国特許出願公開第2014/0127815号、国際公開第2014/123242号及び米国特許出願公開第2016/0002599号、又はNakamura Set al, Cell Stem Cell, 14, 535-548, 2014に記載された方法、その他の公知の方法又はそれに準ずる方法で行うことができる。

[0038] 本発明に係るCMP又は骨髄球系前駆細胞の増殖性を向上させる方法は、CMP又は骨髄球系前駆細胞において、CDKN1A遺伝子及びp53遺伝子の少なくともいずれかの発現、又はその発現産物の機能を抑制する工程を含んでいてもよい。ここで、発現とは、転写及び翻訳を含む概念で用いられ、発現を阻害するという場合、転写レベルで阻害することも翻訳レベルで阻



害することも含みうる。本発明の方法において、CDKN1A 遺伝子及び／又は p53 遺伝子の発現、又はその発現産物の機能を抑制することにより、CMP 又は骨髓球系前駆細胞の増殖の更なる向上が期待できる。

[0039] CDKN1A (cyclin-dependent kinase inhibitor 1A) 遺伝子は細胞周期の阻害因子 p21 をコードしており、癌抑制遺伝子である p53 遺伝子の下流遺伝子としても知られている。活性化した p53 タンパク質は転写因子として働き、p53 下流遺伝子群の発現を増加させる。そのため、本明細書で使用する場合、「遺伝子の発現、又はその発現産物の機能を抑制する」とは、対象の遺伝子の発現やその発現産物（例えば、CDKN1A 遺伝子の場合には p21）の機能を直接抑制することによって達成してもよいし、対象の遺伝子の上流にある遺伝子の発現やそれらの発現産物の機能を制御することで達成することもできる。ただし、本明細書においては、CDKN1A 遺伝子の発現、又はその発現産物の機能を抑制する場合、その対象となる CDKN1A 遺伝子の上流遺伝子の中に、p53 遺伝子、更には p53 遺伝子の上流にある別の癌抑制遺伝子である INK4A 遺伝子及び ARF 遺伝子は含まれない。

[0040] CDKN1A 遺伝子のみならず、p53 遺伝子の発現、或いはそれらの発現産物の機能を抑制することが好ましい。

[0041] 上記各遺伝子の発現又はその発現産物の機能の抑制は、既知の方法により行うことができ、例えば、各遺伝子の発現を特異的に抑制し得る siRNA、shRNA、アンチセンス核酸（「発現抑制核酸」という。）、又はこれらの発現抑制核酸を発現し得る発現ベクター等の、種々の分子を細胞に導入することにより行うことができる。或いは、それ以外の技術、例えばゲノム編集技術等を利用し、遺伝子をノックダウンしてもよい。例えば、CRISPR-Cas システムを利用して遺伝子をノックダウンする場合、その遺伝子を標的とするガイド RNA と、dCas のような不活化 Cas とリプレッサードメインの融合タンパク質等が用いられる。

[0042] siRNA は、典型的には、標的遺伝子の mRNA のヌクレオチド配列又

はその部分配列と相補的な配列を有するRNAとその相補鎖からなる2本鎖オリゴRNAである。siRNAの長さは、哺乳動物細胞に用いられる場合、通常19～30塩基程度、好ましくは21塩基～25塩基程度である。これらのRNAのヌクレオチド配列は、発現が抑制される遺伝子の配列情報により当業者が適宜設計することができる。siRNAの代わりにshRNAを使用することもできる。

[0043] アンチセンス核酸とは、標的mRNA（成熟mRNA又は初期転写産物）を発現する細胞の生理的条件下で標的mRNAと特異的にハイブリダイズし得るヌクレオチド配列を含み、かつハイブリダイズした状態で標的mRNAにコードされるポリペプチドの翻訳を阻害し得る核酸を意味する。アンチセンス核酸は、一般的には10塩基長～100塩基長、好ましくは15塩基長～30塩基長の一本鎖核酸である。アンチセンス核酸の種類は、DNA又はRNAであってもよいし、或いはDNAとRNAのキメラであってもよい。アンチセンス核酸のヌクレオチド配列は、発現が抑制される遺伝子の配列情報により当業者が適宜設計することができる。

[0044] 上記の技術に加え、各遺伝子の発現を抑制することが知られている化合物を使用することもできる。例えば、CDKN1A遺伝子の発現を抑制する化合物として、UC2288、ブチロラクトンI、LLW10、ソラフェニブ、ステリグマトシスチン等のp21阻害剤が知られている。また、p53阻害剤としては、ピフィスリン $\alpha$ 、ナトリン-3、ReACp53、RG7388等が知られている。

[0045] 或いは、遺伝子の発現又はその発現産物の機能の抑制のために、公知の技術を用いて対象の遺伝子をノックアウトしてもよい。遺伝子のノックアウトとは、遺伝子の全部又は一部がその本来の機能を発揮しないように破壊又は変異されていることを意味する。遺伝子は、ゲノム上の一つの対立遺伝子が機能しないように破壊又は変異されていてもよい。また、複数の対立遺伝子が破壊又は変異されていてもよい。ノックアウトは、既知の方法により行うことができ、例えば、標的遺伝子との間で遺伝的組換えが起こるように作ら

れたDNAコンストラクトを細胞に導入することによりロックアウトする方法や、TALENやCRISPR-Casシステム等のゲノム編集技術を利用して、塩基の挿入、欠失、置換導入によりロックアウトする方法が挙げられる。

[0046] その他、各遺伝子の転写及び転写産物を抑制する化合物、又は産生されたタンパクの標的タンパクとの結合阻害剤（p53結合阻害：ピフィスリン $\alpha$ 、ナトリン-3、ReACp53、RG7388等；p21結合阻害：UC2288、ブチロラクトンI、LLW10、ソラフェニブ、ステリグマトシチン等）等を使用してもよい。

[0047] 遺伝子の発現又はその発現産物の機能の抑制は、上述の方法により行うことができる。

[0048] CDKN1A遺伝子及び／又はp53遺伝子の発現の抑制は、好ましくは、各遺伝子に対する発現抑制核酸を発現する発現ベクターを細胞に導入することにより行う。CDKN1A遺伝子、p53遺伝子等の遺伝子に対する発現抑制核酸を細胞内で強制発現させる場合、当業者において周知のいかなる方法により実施してもよいが、例えば、該発現抑制核酸をコードする核酸を、レンチウイルスやレトロウイルス等のウイルスベクターやプラスミドベクター、エピソーマルベクター等の非ウイルスベクターによる遺伝子導入システムを利用して、細胞内に導入し、発現させてもよい。トランスポゾンを用いて非ウイルス的に、発現抑制核酸をコードする核酸を細胞のゲノムに組み込み、発現抑制核酸の安定発現細胞株を樹立した後に、不要となった導入核酸をトランスポゾネースにより除去する方法（例、PiggyBac Transposonシステム）を用いることもまた好ましい。CMP又は骨髄球系前駆細胞に、所望の遺伝子（例、CDKN1A遺伝子、p53遺伝子）に対する発現抑制核酸の発現ベクター（例、ウイルスベクター）をトランスフェクトしてもよいし、予め所望の遺伝子（例、CDKN1A遺伝子、p53遺伝子）に対する発現抑制核酸の発現カセットを組み込んだ多能性幹細胞（例、ES細胞、iPS細胞）、造血前駆細胞又は造血内皮細胞からCMP

又は骨髓球系前駆細胞を誘導し、その段階で当該 s i R N A、s h R N A 又はアンチセンス核酸を強制発現させてもよい。或いは、予め所望の遺伝子（例、C D K N 1 A 遺伝子、p 5 3 遺伝子）に対する発現抑制核酸の発現カセットを組み込んだ多能性幹細胞（例、E S 細胞、i P S 細胞）、造血前駆細胞又は造血内皮細胞において、当該発現抑制核酸を強制発現させながら、該多能性幹細胞、造血前駆細胞又は造血内皮細胞から、C M P 又は骨髓球系前駆細胞への分化を誘導してもよい。発現ベクターを用いて細胞内で発現抑制核酸の発現を行う場合、適当なプロモーターの下流に該発現抑制核酸をコードする核酸（例、D N A）を作用可能に連結し、これを発現ベクターに挿入して、細胞内に導入して目的とする発現抑制核酸を発現させてもよい。該プロモーターは外来性プロモーターであり得る。外来性プロモーターは、恒常的プロモーター又は調節性プロモーターであり得るが、好ましくは恒常的プロモーターである。恒常的プロモーターの例としては、s i R N A や s h R N A 等の比較的小さい R N A を発現する場合、U 6 プロモーター、H 1 プロモーター、t R N A プロモーター、レトロウイルス性 L T R プロモーター、アデノウイルス V A I プロモーター、5 S r R N A プロモーター、7 S K R N A プロモーター、7 S L R N A プロモーター等の p o l i i i 系プロモーターを用いることが好ましい。C D K N 1 A 遺伝子に対する発現抑制核酸をコードする核酸と、p 5 3 遺伝子に対する発現抑制核酸をコードする核酸は、それぞれ別々の発現ベクターに挿入してもよいし、同一の発現ベクターに挿入してもよい。

[0049] 本局面において、C D K N 1 A 遺伝子又は p 5 3 遺伝子の発現、又はその発現産物の機能の抑制は、M Y C ファミリー遺伝子、B M I 1 遺伝子、又は B C L - X L 遺伝子のいずれかの強制発現と同時であってもよい。好ましくは B C L - X L 遺伝子の強制発現と同時か、或いはその後である。例えば細胞増殖の低下が確認された後に実施することができる。一例として、ある時点の細胞増殖率を直近の細胞増殖率と比較し（例えば、一週間ごとに細胞の増殖を確認したとして、ある週の細胞増殖率をその一週間前の増殖率と比較

して)、増殖率が1/2以下になった状態が確認された後に実施することができる。細胞増殖の低下は、限定することを意図するものではないが、MYCファミリー遺伝子及びBMI1遺伝子の強制発現直後から約30日後、約40日後、約50日後、約60日後、約70日後、約80日後、又は約90日後まで見られる。一態様において、CMP又は骨髓球系前駆細胞において、MYCファミリー遺伝子(例、c-Myc遺伝子)及びBMI1遺伝子を強制発現させ、これと並行して、CDKN1A遺伝子及び/又はp53遺伝子の発現、又はその発現産物の機能を抑制する。一態様において、CMP又は骨髓球系前駆細胞において、MYCファミリー遺伝子(例、c-Myc遺伝子)、BMI1遺伝子、及びBCL-XL遺伝子を強制発現させ、これと並行して、CDKN1A遺伝子及び/又はp53遺伝子の発現、又はその発現産物の機能を抑制する。

[0050] 本明細書で使用する場合のMYCファミリー遺伝子、BMI1遺伝子、BCL-XL遺伝子、CDKN1A遺伝子、p53遺伝子等の各遺伝子は、それらの公知の核酸配列、例えばcDNA配列でコードされるものを意味する。各遺伝子には、公知の核酸配列の相同性に基づいて同定されるホモログも含まれ得る。「ホモログ」とは、遺伝子のcDNA配列が、その遺伝子の核酸配列と実質的に同一の配列からなる遺伝子のことである。

[0051] MYCファミリー遺伝子のうち、c-MYC遺伝子のホモログとは、そのcDNA配列が、例えば、配列番号1で示される核酸配列と実質的に同一の配列からなる遺伝子のことである。配列番号1で示される核酸配列と実質的に同一の配列からなるcDNAとは、配列番号1で表される配列からなるDNAと、約60%以上、好ましくは約70%以上、より好ましくは約80%以上、例えば81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、よりさらに好ましくは約90%以上、例えば91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、最も好ましくは約99%以上の同一性を有する配列からなるDNA、若しくは、配列番号1で示される核酸配列に相補的な配列からなるDNA又はRNAとストリンジェ

ントな条件下でハイブリダイズできるDNAであって、これらのDNAによってコードされるタンパク質が、細胞周期を阻害するものことである。或いは、配列番号1で示される核酸配列と実質的に同一の配列からなるcDNAとは、配列番号1で示される配列中の1又は複数個、例えば1～10個、好ましくは数個、例えば1～5個、1～4個、1～3個、1～2個の塩基が欠失、置換若しくは付加された配列からなるDNAであって、これらのDNAによってコードされるタンパク質が、細胞周期を阻害するものことである。

[0052] B M I 1 遺伝子のホモログとは、そのcDNA配列が、例えば、配列番号2で示される核酸配列と実質的に同一の配列からなる遺伝子のことである。配列番号2で示される核酸配列と実質的に同一の配列からなるcDNAとは、配列番号2で示される配列からなるDNAと、約60%以上、好ましくは約70%以上、より好ましくは約80%以上、例えば81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、よりさらに好ましくは約90%以上、例えば91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、最も好ましくは約99%以上の同一性を有する配列からなるDNA、若しくは、配列番号2で示される核酸配列に相補的な配列からなるDNA又はRNAとストリンジントな条件下でハイブリダイズできるDNAであって、これらのDNAによってコードされるタンパク質が、細胞周期を阻害するものことである。或いは、配列番号2で示される核酸配列と実質的に同一の配列からなるcDNAとは、配列番号2で示される配列中の1又は複数個、例えば1～10個、好ましくは数個、例えば1～5個、1～4個、1～3個、1～2個の塩基が欠失、置換若しくは付加された配列からなるDNAであって、これらのDNAによってコードされるタンパク質が、細胞周期を阻害するものことである。

[0053] B C L - X L 遺伝子のホモログとは、そのcDNA配列が、例えば、配列番号3で示される核酸配列と実質的に同一の配列からなる遺伝子のことである。配列番号3で示される核酸配列と実質的に同一の配列からなるcDNA

とは、配列番号3で示される配列からなるDNAと、約60%以上、好ましくは約70%以上、より好ましくは約80%以上、例えば81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、よりさらに好ましくは約90%以上、例えば91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、最も好ましくは約99%以上の同一性を有する配列からなるDNA、若しくは、配列番号3で示される核酸配列に相補的な配列からなるDNA又はRNAとストリンジントな条件下でハイブリダイズできるDNAであって、これらのDNAによってコードされるタンパク質が、細胞周期を阻害するものことである。或いは、配列番号3で示される核酸配列と実質的に同一の配列からなるcDNAとは、配列番号3で示される配列中の1又は複数個、例えば1~10個、好ましくは数個、例えば1~5個、1~4個、1~3個、1~2個の塩基が欠失、置換若しくは付加された配列からなるDNAであって、これらのDNAによってコードされるタンパク質が、細胞周期を阻害するものことである。

[0054] CDKN1A遺伝子のホモログとは、そのcDNA配列が、例えば、配列番号4で示される核酸配列と実質的に同一の配列からなる遺伝子のことである。配列番号4で示される核酸配列と実質的に同一の配列からなるcDNAとは、配列番号4で示される配列からなるDNAと、約60%以上、好ましくは約70%以上、より好ましくは約80%以上、例えば81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、よりさらに好ましくは約90%以上、例えば91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、最も好ましくは約99%以上の同一性を有する配列からなるDNA、若しくは、配列番号4で示される核酸配列に相補的な配列からなるDNA又はRNAとストリンジントな条件下でハイブリダイズできるDNAであって、これらのDNAによってコードされるタンパク質が、細胞周期を阻害するものことである。或いは、配列番号4で示される核酸配列と実質的に同一の配列からなるcDNAとは、配列番号4で示される配列中の1又は複数個、例えば1~10個、好ましくは数個、例えば1~5

個、1～4個、1～3個、1～2個の塩基が欠失、置換若しくは付加された配列からなるDNAであって、これらのDNAによってコードされるタンパク質が、細胞周期を阻害するものことである。

[0055] p53遺伝子とは、そのcDNA配列が、例えば、配列番号5で示される核酸配列と実質的に同一の配列からなる遺伝子のことである。配列番号5で示される核酸配列と実質的に同一の配列からなるcDNAとは、配列番号5で示される配列からなるDNAと、約60%以上、好ましくは約70%以上、より好ましくは約80%以上、例えば81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、よりさらに好ましくは90%以上、例えば91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、最も好ましくは約99%以上の同一性を有する配列からなるDNA、若しくは、配列番号5で示される核酸配列に相補的な配列からなるDNAとストリンジントな条件下でハイブリダイズできるDNAであって、そのDNAによってコードされるタンパク質が、癌を抑制するものことである。或いは、配列番号5で示される核酸配列と実質的に同一の配列からなるcDNAとは、配列番号5で示される配列中の1又は複数個、例えば1～10個、好ましくは数個、例えば1～5個、1～4個、1～3個、1～2個の塩基が欠失、置換若しくは付加された配列からなるDNAであって、これらのDNAによってコードされるタンパク質が、癌を抑制するものことである。

[0056] ここで、ストリンジントな条件とは、当業者によって容易に決定されるハイブリダイゼーションの条件のことであり、一般的に核酸の塩基長、洗浄温度、及び塩濃度に依存する経験的な実験条件である。一般に、塩基が長くなると適切なアニーリングのための温度が高くなり、塩基が短くなると温度は低くなる。ハイブリッド形成は、一般的に、相補的鎖がその融点よりやや低い環境における再アニール能力に依存する。

[0057] 具体的には、例えば、低ストリンジントな条件として、ハイブリダイゼーション後のフィルターの洗浄段階において、37℃～42℃の温度条件下、0.1×SSC、0.1%SDS溶液中で洗浄すること等が上げられる。



また、高ストリンジেন্টな条件として、例えば、洗浄段階において、65℃、5×SSC及び0.1%SDS中で洗浄すること等が挙げられる。ストリンジেন্টな条件をより高くすることにより、相同性の高いポリヌクレオチドを得ることができる。

[0058] 本実施形態に係るCMP又は骨髓球系前駆細胞を製造する方法は、上述した本実施形態に係るCMP又は骨髓球系前駆細胞の増殖性を向上させる方法で得られたCMP又は骨髓球系前駆細胞を培養する工程（培養工程）を含む。

[0059] CMP又は骨髓球系前駆細胞の培養条件は、細胞の種類やその状態に応じて当業者が適宜決定することができる。例えば、培養温度は約35℃～約42℃、約36℃～約40℃、又は約37℃～約39℃とすることができ、二酸化炭素濃度は例えば5%CO<sub>2</sub>、酸素濃度は例えば20%O<sub>2</sub>とすることができる。静置培養であっても、振とう培養であってもよい。振とう培養の場合の振とう速度も特に限定されず、例えば、10rpm～200rpm、30rpm～150rpm等とすることができる。

[0060] 培地は、血清、インスリン、トランスフェリン、セリン、チオールグリセロール、アスコルビン酸、TPOを含むイスコフ改変ダルベッコ培地（IMDM）培地であってもよい。この場合、IMDM培地はさらにSCFを含んでいてもよく、さらにヘパリンを含んでいてもよい。さらに、ホルボールエステル（例えば、ホルボール-12-ミリストート-13-アセート；PMA）を加えてもよい。

[0061] 細胞の培養工程は、フィーダー細胞の存在下又は不在下で実施することができる。本明細書において、「フィーダー細胞」とは、増殖又は分化させようとしている標的細胞の培養に必要な環境を整えるために、標的細胞と共培養される細胞をいう。フィーダー細胞は、標的細胞と識別できる細胞である限り、同種由来の細胞であっても異種由来の細胞であってもよい。フィーダー細胞は、抗生物質やガンマ線により増殖しないよう処理した細胞であっても、処理されていない細胞であってもよい。

[0062] 培地は、血清又は血漿を含有していてもよく、或いは無血清でもよい。血清を用いる場合は、ヒト血清が好ましい。必要に応じて、培地は、例えば、アルブミン、インスリン、トランスフェリン、セレン、脂肪酸、微量元素、2-メルカプトエタノール、チオールグリセロール、モノチオールグリセロール (MTG)、脂質、アミノ酸 (例えばL-グルタミン)、アスコルビン酸、ヘパリン、非必須アミノ酸、ビタミン、増殖因子、低分子化合物、抗生物質、抗酸化剤、ピルビン酸、緩衝剤、無機塩類、サイトカイン等の1つ以上の物質も含有してもよい。サイトカインとしては、例えば、血管内皮細胞増殖因子 (VEGF)、トロンボポエチン (TPO)、各種TPO様作用物質、幹細胞因子 (SCF)、エリスロポエチン (EPO)、顆粒球コロニー刺激因子 (G-CSF)、インターロイキン3 (IL3)、ITS (インスリン-トランスフェリン-セレナイト) サプリメント、ADAM (A Disintegrin And Metalloprotease) 阻害剤等が挙げられる。

[0063] 培養するCMP又は骨髓球系前駆細胞の種類に応じ、細胞増殖に適したサイトカインの生み合わせを、培地に添加することが好ましい。例えば、CMPを培養する場合、CMPの増殖を促進するのに十分な量のGM-CSF、G-CSF、IL-3、SCF及びTPOから選択される少なくとも1つ、好ましくは全てのサイトカインを培地に添加することができる。MEPを培養する場合、IL-3、SCF及びTPOから選択される少なくとも1つ、好ましくは全てのサイトカインを培地に添加することができる。GMPを培養する場合、SCF及びGM-CSFから選択される少なくとも1つ、好ましくは全てのサイトカインを培地に添加することができる。マクロファージ前駆細胞を培養する場合、IL-1b、SCF及びM-CSFから選択される少なくとも1つ、好ましくは全てのサイトカインを培地に添加することができる。樹状細胞前駆細胞を培養する場合、SCF、M-CSF及びGM-CSFから選択される少なくとも1つ、好ましくは全てのサイトカインを培地に添加することができる。好中球前駆細胞を培養する場合、SCF及びG

M-C S Fから選択される少なくとも1つ、好ましくは全てのサイトカインを培地に添加することができる。赤血球前駆細胞を培養する場合、S C F及びE P Oから選択される少なくとも1つ、好ましくは全てのサイトカインを培地に添加することができる。

[0064] 本発明は、第1の外來性プロモーターと作用可能に連結されたMYCファミリー遺伝子及び第2の外來性プロモーターと作用可能に連結されたBM11遺伝子を有する、CMP又は骨髓球系前駆細胞（以下、本発明の細胞）を提供する。MYCファミリー遺伝子は、好ましくはc-MYCである。骨髓球系前駆細胞としては、MEP、GMP、マクロファージ前駆細胞、樹状細胞前駆細胞、赤血球前駆細胞、好中球前駆細胞等を例示することができる。第1の外來性プロモーター及び第2の外來性プロモーターは、独立して、恒常的プロモーター又は調節性プロモーターであり得るが、好ましくは、調節性プロモーターである。調節性プロモーターは、好ましくは薬剤反応性プロモーターであり、より好ましくは、テトラサイクリン反応性プロモーターである。第1の外來性プロモーターと第2の外來性プロモーターの種類は、同一であっても異なってもよいが、好ましくは同一の種類のプロモーターである。同一の種類のプロモーターを用いることにより、MYCファミリー遺伝子とBM11遺伝子を同期的に発現させることができ、また同期的に発現を抑制することができる。第1の外來性プロモーターと第2の外來性プロモーターは、好ましくは、同一の調節性プロモーター（例、薬剤反応性プロモーター）であり、より好ましくは共にテトラサイクリン反応性プロモーターである。第1の外來性プロモーターと第2の外來性プロモーターとは、それぞれ独立して、MYCファミリー遺伝子及びBM11遺伝子と作用可能に連結されていてもよいし、1つの外來性プロモーターに、MYCファミリー遺伝子とBM11遺伝子とが作用可能に連結されていてもよい。この場合、MYCファミリー遺伝子とBM11遺伝子とは、IRES等の介在配列を介して連結されることにより、1つの外來性プロモーターの制御下で、バイシストロニックな発現が可能となる。第1の外來性プロモーターと作用可能に

連結されたMYCファミリー遺伝子及び第2の外來性プロモーターと作用可能に連結されたBMI1遺伝子は、CMP又は骨髓球系前駆細胞のゲノムに組み込まれていてもよいし、CMP又は骨髓球系前駆細胞内に導入された発現ベクター中に存在してもよい。好ましくは、第1の外來性プロモーターと作用可能に連結されたMYCファミリー遺伝子及び第2の外來性プロモーターと作用可能に連結されたBMI1遺伝子は、CMP又は骨髓球系前駆細胞のゲノムに組み込まれている。

[0065] 第1の外來性プロモーター及び／又は第2の外來性プロモーターとしてテトラサイクリン反応性プロモーターを用いる場合、テトラサイクリン依存的な発現制御を可能とするため、本発明の細胞は、第3の外來性プロモーターと作用可能に連結されたrtTA遺伝子又はtTA遺伝子を更に有することが好ましい。第3の外來性プロモーターは、恒常的プロモーター又は調節性プロモーターであり得るが、好ましくは、恒常的プロモーターである。第3の外來性プロモーターと作用可能に連結されたrtTA遺伝子又はtTA遺伝子は、CMP又は骨髓球系前駆細胞のゲノムに組み込まれていてもよいし、CMP又は骨髓球系前駆細胞内に導入された発現ベクター中に存在してもよい。好ましくは、第3の外來性プロモーターと作用可能に連結されたrtTA遺伝子又はtTA遺伝子は、CMP又は骨髓球系前駆細胞のゲノムに組み込まれている。

[0066] 本発明の細胞は、該細胞をCMP又は骨髓球系前駆細胞が増殖し得る条件下で培養した場合に、インビトロでCMP又は骨髓球系前駆細胞の増殖を促進し得る量のMYCファミリー遺伝子（例、c-Myc遺伝子）及びBMI1遺伝子を発現する。インビトロでCMP又は骨髓球系前駆細胞の増殖を促進し得る量のMYCファミリー遺伝子（例、c-Myc）及びBMI1遺伝子とは、当該量のMYCファミリー遺伝子及びBMI1遺伝子を発現するCMP又は骨髓球系前駆細胞の増殖速度が、MYCファミリー遺伝子及びBMI1遺伝子を発現していないことを除いては上記細胞と同様に作成したCMP又は骨髓球系前駆細胞と比較して、有意に上昇するようなMYCファミリ

一遺伝子及びB M I 1 遺伝子の量を意味する。

[0067] 増殖能力を増強する観点から、本発明の細胞は、第4の外來性プロモーターと作用可能に連結されたB C L - X L 遺伝子を更に有していてもよい。該細胞を第4の外來性プロモーターが作動する条件下で培養すると、B C L - X L 遺伝子が発現し、本発明の細胞の増殖が更に促進されることが期待できる。第4の外來性プロモーターは、独立して、恒常的プロモーター又は調節性プロモーターであり得るが、好ましくは、調節性プロモーターである。調節性プロモーターは、好ましくは薬剤反応性プロモーターであり、より好ましくは、テトラサイクリン反応性プロモーターである。第4の外來性プロモーターの種類は、第1の外來性プロモーター及び／又は第2の外來性プロモーターと同一であっても異なってもよいが、好ましくは、第1、第2及び第4の外來性プロモーターは、同一の種類のプロモーターである。同一の種類のプロモーターを用いることにより、M Y C ファミリー遺伝子、B M I 1 遺伝子及びB C L - X L 遺伝子を同期的に発現させることができ、また同期的に発現を抑制することができる。第1、第2及び第4の外來性プロモーターは、好ましくは、同一の調節性プロモーター（例、薬剤反応性プロモーター）であり、より好ましくは全てテトラサイクリン反応性プロモーターである。第4の外來性プロモーターは、第1及び第2の外來性プロモーターと独立して、B C L - X L 遺伝子と作用可能に連結されていてもよいし、第1の外來性プロモーターにM Y C ファミリー遺伝子とB C L - X L 遺伝子とが作用可能に連結されていてもよいし、第2の外來性プロモーターにB M I 1 遺伝子と・BR>A C L - X L 遺伝子とが作用可能に連結されていてもよいし、1つの外來性プロモーターに、M Y C ファミリー遺伝子、B M I 1 遺伝子及びB C L - X L 遺伝子が作用可能に連結されていてもよい。複数の遺伝子をR E S 等の介在配列を介して連結することにより、1つの外來性プロモーターの制御下で、バイシストロニックな発現が可能となる。第4の外來性プロモーターと作用可能に連結されたB C L - X L 遺伝子は、C M P 又は骨髓球系前駆細胞のゲノムに組み込まれていてもよいし、C M P 又は骨髓球系前駆

細胞内に導入された発現ベクター中に存在してもよい。好ましくは、第4の外來性プロモーターと作用可能に連結されたBCL-XL遺伝子は、CMP又は骨髓球系前駆細胞のゲノムに組み込まれている。

[0068] 増殖能力を増強する観点から、本発明の細胞は、第5の外來性プロモーターと作用可能に連結されたCDKN1A遺伝子に対する発現抑制核酸（例、siRNA、shRNA、アンチセンス核酸）をコードする核酸、及び／又は第6の外來性プロモーターと作用可能に連結されたp53遺伝子に対する発現抑制核酸をコードする核酸を更に有していてもよい。該細胞を第5の外來性プロモーター、及び／又は第6の外來性プロモーターが作動する条件下で培養すると、CDKN1A遺伝子に対する発現抑制核酸、及び／又はp53遺伝子に対する発現抑制核酸が発現し、本発明の細胞の増殖が更に促進されることが期待できる。第5の外來性プロモーター及び第6の外來性プロモーターは、独立して、恒常的プロモーター又は調節性プロモーターであり得るが、好ましくは、恒常的プロモーターである。恒常的プロモーターは、好ましくは、H1プロモーター等のp0111系プロモーターである。第5の外來性プロモーターの種類は、第6の外來性プロモーターと同一であっても異なってもよい。第5の外來性プロモーターと作用可能に連結されたCDKN1A遺伝子に対する発現抑制核酸をコードする核酸、及び第6の外來性プロモーターと作用可能に連結されたp53遺伝子に対する発現抑制核酸をコードする核酸は、CMP又は骨髓球系前駆細胞のゲノムに組み込まれていてもよいし、CMP又は骨髓球系前駆細胞内に導入された発現ベクター中に存在してもよいが、好ましくは、CMP又は骨髓球系前駆細胞のゲノムに組み込まれている。

[0069] 一態様において、本発明の細胞は、  
第1の外來性プロモーターと作用可能に連結されたMYCファミリー遺伝子、  
第2の外來性プロモーターと作用可能に連結されたBMI1遺伝子、及び  
第4の外來性プロモーターと作用可能に連結されたBCL-XL遺伝子

を有する、CMP又は骨髓球系前駆細胞（例、MEP、GMP、マクロファージ前駆細胞、樹状細胞前駆細胞、赤血球前駆細胞、好中球前駆細胞）である。第1の外來性プロモーター及び／又は第2の外來性プロモーターとしてテトラサイクリン反応性プロモーターを用いる場合、本発明の細胞は、第3の外來性プロモーターと作用可能に連結されたrtTA遺伝子又はtTA遺伝子を更に有していてもよい。

[0070] 一態様において、本発明の細胞は、  
第1の外來性プロモーターと作用可能に連結されたMYCファミリー遺伝子、  
、  
第2の外來性プロモーターと作用可能に連結されたBMI1遺伝子、  
第5の外來性プロモーターと作用可能に連結されたCDKN1A遺伝子に対する発現抑制核酸をコードする核酸、及び  
第6の外來性プロモーターと作用可能に連結されたp53遺伝子に対する発現抑制核酸をコードする核酸  
を有するCMP又は骨髓球系前駆細胞（例、MEP、GMP、マクロファージ前駆細胞、樹状細胞前駆細胞、赤血球前駆細胞、好中球前駆細胞）である。第1の外來性プロモーター及び／又は第2の外來性プロモーターとしてテトラサイクリン反応性プロモーターを用いる場合、本発明の細胞は、第3の外來性プロモーターと作用可能に連結されたrtTA遺伝子又はtTA遺伝子を更に有していてもよい。

[0071] 一態様において、本発明の細胞は、  
第1の外來性プロモーターと作用可能に連結されたMYCファミリー遺伝子、  
、  
第2の外來性プロモーターと作用可能に連結されたBMI1遺伝子、  
第4の外來性プロモーターと作用可能に連結されたBCL-XL遺伝子  
第5の外來性プロモーターと作用可能に連結されたCDKN1A遺伝子に対する発現抑制核酸をコードする核酸、及び  
第6の外來性プロモーターと作用可能に連結されたp53遺伝子に対する発

現抑制核酸をコードする核酸

を有するCMP又は骨髓球系前駆細胞（例、MEP、GMP、マクロファージ前駆細胞、樹状細胞前駆細胞、赤血球前駆細胞、好中球前駆細胞）である。第1の外來性プロモーター及び／又は第2の外來性プロモーターとしてテトラサイクリン反応性プロモーターを用いる場合、本発明の細胞は、第3の外來性プロモーターと作用可能に連結されたrtTA遺伝子又はtTA遺伝子を更に有していてもよい。

[0072] 本発明の細胞は、上述した本発明のCMP又は骨髓球系前駆細胞の増殖性を向上させる方法、又はCMP又は骨髓球系前駆細胞を製造する方法により得ることができる。

[0073] また、本発明は、上記本発明の細胞を含む細胞集団（本発明の細胞集団という。）を提供する。該細胞集団は、上記本発明の細胞を豊富に含み、該細胞集団全体に含まれる本発明の細胞の割合は、例えば、10%以上、20%以上、30%以上、40%以上、50%以上、60%以上、70%以上、80%以上、90%以上、95%以上（例、100%）である。このような本発明の細胞を豊富に含む細胞集団は、上記本発明の方法を適用した細胞集団から、目的とする特定の分化段階の細胞（CMP又は骨髓球系前駆細胞（例、MEP、GMP、マクロファージ前駆細胞、樹状細胞前駆細胞、赤血球前駆細胞、好中球前駆細胞））を、抽出することにより得ることができる。好ましい態様において、本発明の細胞集団は、特定の分化段階にある本発明の細胞を豊富に含む。一態様において、細胞集団全体に含まれる本発明の細胞（該細胞はCMPである）の割合が、10%以上、20%以上、30%以上、40%以上、50%以上、60%以上、70%以上、80%以上、90%以上、95%以上（例、100%）である。一態様において、細胞集団全体に含まれる本発明の細胞（該細胞はMEPである）の割合が、10%以上、20%以上、30%以上、40%以上、50%以上、60%以上、70%以上、80%以上、90%以上、95%以上（例、100%）である。一態様において、細胞集団全体に含まれる本発明の細胞（該細胞はGMPである）



の割合が、10%以上、20%以上、30%以上、40%以上、50%以上、60%以上、70%以上、80%以上、90%以上、95%以上（例、100%）である。一態様において、細胞集団全体に含まれる本発明の細胞（該細胞はマクロファージ前駆細胞である）の割合が、10%以上、20%以上、30%以上、40%以上、50%以上、60%以上、70%以上、80%以上、90%以上、95%以上（例、100%）である。一態様において、細胞集団全体に含まれる本発明の細胞（該細胞は樹状細胞前駆細胞である）の割合が、10%以上、20%以上、30%以上、40%以上、50%以上、60%以上、70%以上、80%以上、90%以上、95%以上（例、100%）である。一態様において、細胞集団全体に含まれる本発明の細胞（該細胞は赤血球前駆細胞である）の割合が、10%以上、20%以上、30%以上、40%以上、50%以上、60%以上、70%以上、80%以上、90%以上、95%以上（例、100%）である。一態様において、細胞集団全体に含まれる本発明の細胞（該細胞は好中球前駆細胞である）の割合が、10%以上、20%以上、30%以上、40%以上、50%以上、60%以上、70%以上、80%以上、90%以上、95%以上（例、100%）である。このように特定の分化段階にある本発明の細胞を豊富に含む細胞集団は、上記本発明の方法の方法を適用した細胞集団から、目的とする分化段階の細胞を、該分化段階の細胞に特異的に発現する細胞表面マーカースに対する抗体を用いて、セルソーター等で単離・抽出することにより得ることができる。

[0074] 本発明の細胞、及び本発明の細胞集団は、上述した本発明のCMP又は骨髓球系前駆細胞の増殖性を向上させる方法、又はCMP又は骨髓球系前駆細胞を製造する方法により得ることができる。

[0075] また、本発明は、上記本発明の細胞集団を含む細胞調製物（本発明の細胞調製物という。）を提供する。本発明の細胞調製物は、上記本発明の細胞集団を、適切な生理的水溶液（例、生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液、液体培地）で懸濁することにより調整することができる。該生

理的水溶液には、緩衝剤（例えば、リン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液）、無痛化剤（例えば、塩酸リドカイン、塩酸プロカイン等）、安定剤（例えば、ヒト血清アルブミン、ポリエチレングリコール等）、保存剤（例えば、安息香酸ナトリウム、塩化ベンザルコニウム等）、酸化防止剤（例えば、アスコルビン酸、エドト酸ナトリウム等）等を配合してもよい。該細胞調製物中には、細胞濃度が、例えば $1.0 \times 10^1 \sim 1.0 \times 10^{12}$ 細胞/mLとなるように、上記本発明の細胞集団を懸濁する。

[0076] 細胞調製物に含まれるCMP又は骨髓球系前駆細胞の種類に応じ、該細胞の増殖に適したサイトカインの生み合わせを、該細胞調製物に添加してもよい。例えば、CMPを含む細胞調製物の場合、GM-CSF、G-CSF、IL-3、SCF及びTPOから選択される少なくとも1つ、好ましくは全てのサイトカインを該細胞調製物に添加することができる。MEPを含む細胞調製物の場合、IL-3、SCF及びTPOから選択される少なくとも1つ、好ましくは全てのサイトカインを該細胞調製物に添加することができる。GMPを含む細胞調製物の場合、SCF及びGM-CSFから選択される少なくとも1つ、好ましくは全てのサイトカインを該細胞調製物に添加することができる。マクロファージ前駆細胞を含む細胞調製物の場合、IL-1b、SCF及びM-CSFから選択される少なくとも1つ、好ましくは全てのサイトカインを該細胞調製物に添加することができる。樹状細胞前駆細胞を含む細胞調製物の場合、SCF、M-CSF及びGM-CSFから選択される少なくとも1つ、好ましくは全てのサイトカインを培地に添加することができる。好中球前駆細胞を含む細胞調製物の場合、SCF及びGM-CSFから選択される少なくとも1つ、好ましくは全てのサイトカインを該細胞調製物に添加することができる。赤血球前駆細胞を含む細胞調製物の場合、SCF及びEPOから選択される少なくとも1つ、好ましくは全てのサイトカインを該細胞調製物に添加することができる。

[0077] CMP又は骨髓球系前駆細胞は、凍結保存後解凍しても、細胞増殖能及び分化能を維持する凍結解凍耐性を有し得る。そのため、CMP又は骨髓球系

前駆細胞を凍結保存して、必要に応じて溶解して、分化誘導培養に付すことにより、CMP系分化細胞を製造することが可能である。従って、上記本発明の細胞を用いることにより、ES細胞やiPS細胞等の多能性幹細胞からCMP系分化細胞、例えばマクロファージ、樹状細胞、赤血球、好中球等を製造する一連の作業を最初の工程から行う必要がなくなる。つまり、本発明の細胞を原料として、多量に調製し、必要に応じて凍結保存をしておくことにより、製造プロセスの合理化・効率化が図られ、マクロファージ、樹状細胞、赤血球、好中球等の様々なCMP系分化細胞を迅速に供給可能な仕組みを構築することができる。したがって、一態様において、本発明の細胞調製物は、凍結した上記本発明の細胞集団を含む凍結細胞調製物である。本発明の細胞を用いて、凍結細胞調製物を作製する場合には、上記本発明の細胞集団と、凍結保存液とから構成することができ、その他必要に応じて添加剤等も組成中に含めることができる。凍結保存液としては、DMSO入りの凍結液等を利用できる。具体的にはセルバンカー（日本全薬工業株式会社）やバンバンカー（日本ジェネティクス株式会社）、TCプロテクター（DSファーマバイオメディカル株式会社）、アルブミン加c p - 1（極東製薬工業株式会社）等である。

[0078] 本実施形態に係るCMP系分化細胞を製造する方法は、上述したCMP又は骨髓球系前駆細胞の増殖性を向上させる方法又はCMP又は骨髓球系前駆細胞を製造する方法で得られたCMP又は骨髓球系前駆細胞（すなわち、本発明の細胞）を分化させる工程を含む。CMP系分化細胞は、CMP又は骨髓球系前駆細胞から分化した、マクロファージや樹状細胞等の単球系細胞、好中球や好塩基球等の顆粒球系細胞、赤芽球細胞や赤血球等であり、骨髓球系前駆細胞とは区別される。

[0079] CMP又は骨髓球系前駆細胞を分化する方法としては、マクロファージや樹状細胞等の単球系細胞、好中球や好塩基球等の顆粒球系細胞、赤芽球細胞や赤血球への公知の分化誘導方法を、上記で培養する方法も含め適宜選択することができる。例えば、各遺伝子を強制発現させる工程において用いた薬

剤、例えば、テトラサイクリン又はドキシサイクリンを培地に含有させ、これらを培地から除くことによって強制発現を抑制した後、引き続き細胞を培養すればよい。

[0080] CMP系分化細胞は、単球系細胞、顆粒球系細胞、又は赤芽球細胞を含んでもよく、単球系細胞又は顆粒球系細胞を含んでもよい。このように、CMPを特定の細胞に分化させるよう制御する方法は、好適な公知の培地やそれに準ずる培地を適宜使用することができる。例えば、本実施形態に係るCMP系分化細胞を製造する方法においては、培地に含まれるサイトカイン条件を制御することにより、分化する細胞の種類を制御することができる。具体的には、トロンボポエチン（TPO）、幹細胞因子（SCF）、エリスロポエチン（EPO）、顆粒球コロニー刺激因子（G-CSF）、及びインターロイキン3（IL3）のサイトカインを用いて培養することにより、単球系細胞、顆粒球系細胞、又は赤芽球細胞を含むCMP系分化細胞を得ることができる。また、トロンボポエチン（TPO）、幹細胞因子（SCF）、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（GM-CSF）、顆粒球コロニー刺激因子（G-CSF）、及びインターロイキン3（IL3）のサイトカインを用いることにより、単球系細胞又は顆粒球系細胞を含むCMP系分化細胞を得ることができる。具体的には、各種細胞に分化するためのサイトカイン条件として、実施例に示すものが挙げられる。

[0081] 例えば、薬剤（例、テトラサイクリン、ドキシサイクリン）反応性プロモーター制御下で、当該薬剤の添加により、MYCファミリー遺伝子（例、c-Myc遺伝子）及びBML1遺伝子（任意的に更にBCL-XL遺伝子）を強制発現させ、任意的にCDKN1A遺伝子及び／又はp53遺伝子の発現、又はその発現産物の機能を抑制したマクロファージ前駆細胞を、マクロファージ分化条件下（例、SCF、M-CSF、IL-1b存在下）で培養すると、マクロファージ前駆細胞は、その分化段階を維持したまま良好に増殖するが、該薬剤の除去により該細胞におけるMYCファミリー遺伝子（例、c-Myc遺伝子）及びBML1遺伝子（任意的に更にBCL-XL遺伝

子)の強制発現を抑制した後、引き続きマクロファージ分化条件下(例、SCF、M-CSF、IL-1b存在下)で培養することにより、細胞増殖が抑制され、マクロファージへの分化、成熟が促進される。薬剤(テトラサイクリン、ドキシサイクリン)反応性プロモーター制御下で、当該薬剤の添加により、MYCファミリー遺伝子(例、c-Myc遺伝子)及びBMI1遺伝子(任意的に更にBCL-XL遺伝子)を強制発現させ、任意的にCDKN1A遺伝子及び/又はp53遺伝子の発現、又はその発現産物の機能を抑制した樹状細胞前駆細胞を、樹状細胞分化条件下(例、SCF、M-CSF、GM-CSF存在下)で培養すると、樹状細胞前駆細胞は、その分化段階を維持したまま良好に増殖するが、当該薬剤の除去により該細胞におけるMYCファミリー遺伝子(例、c-Myc遺伝子)及びBMI1遺伝子(任意的に更にBCL-XL遺伝子)の強制発現を抑制した後、引き続き樹状細胞分化条件下(例、SCF、M-CSF、GM-CSF存在下)で培養することにより、細胞増殖が抑制され、樹状細胞への分化、成熟が促進される。薬剤(テトラサイクリン、ドキシサイクリン)反応性プロモーター制御下で、当該薬剤の添加により、MYCファミリー遺伝子(例、c-Myc遺伝子)及びBMI1遺伝子(任意的に更にBCL-XL遺伝子)を強制発現させ、任意的にCDKN1A遺伝子及び/又はp53遺伝子の発現、又はその発現産物の機能を抑制した赤血球前駆細胞を、赤血球分化条件下(例、SCF、EPO存在下)で培養すると、赤血球前駆細胞は、その分化段階を維持したまま良好に増殖するが、当該薬剤の除去により該細胞におけるMYCファミリー遺伝子(例、c-Myc遺伝子)及びBMI1遺伝子(任意的に更にBCL-XL遺伝子)の強制発現を抑制した後、引き続き赤血球分化条件下(例、SCF、EPO存在下)で培養することにより、細胞増殖が抑制され、赤芽球や赤血球への分化、成熟が促進される。

[0082] 本実施形態に係るCMP又は骨髓球系前駆細胞の増殖促進剤は、MYCファミリー遺伝子及びBMI1遺伝子を強制発現させる分子を有効成分として含み、任意に、BCL-XL遺伝子を強制発現させる分子を有効成分として

含み、或いはCDKN1A遺伝子又はp53遺伝子の発現又はその発現産物の機能を抑制する分子を有効成分として含む。また、骨髄球系前駆細胞は、マクロファージ、樹状細胞、顆粒球、赤芽球、又は赤血球の前駆細胞である。

[0083] 本実施形態に係る医薬組成物は、上述したCMP又は骨髄球系前駆細胞の増殖性を向上させる方法又はCMP又は骨髄球系前駆細胞を製造する方法で得られたCMP又は骨髄球系前駆細胞、或いは上述したCMP系分化細胞を製造する方法で得られたCMP系分化細胞を含む。

[0084] 上述したCMP又は骨髄球系前駆細胞の増殖性を向上させる方法又はCMP又は骨髄球系前駆細胞を製造する方法で得られたCMP又は骨髄球系前駆細胞、或いは上述したCMP系分化細胞を製造する方法で得られたCMP系分化細胞は、自然免疫系を司る細胞であり、腫瘍・変性細胞、病原性生物の除去に役立たせることができる。したがって、本実施形態に係る医薬組成物は、腫瘍・変性細胞、感染性病原生物の除去等のために用いられ得る。具体的には、正常体内における異物特異的抗原を標的としたレセプター導入や、標的細胞への細胞毒性を強める遺伝子改変を行うことで、疾患毎に特化した輸血用免疫細胞製剤として使用される。また、免疫製剤、抗がん剤、抗アレルギー製剤、抗動脈硬化用の医薬組成物として使用される。上述したCMP、骨髄球系前駆細胞又はCMP系分化細胞は、常套手段にしたがって医薬上許容される担体と混合する等して注射剤、懸濁剤、点滴剤等の非経口製剤として製造される。当該非経口製剤に含まれ得る医薬上許容される担体としては、例えば、生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液（例えば、D-ソルビトール、D-マンニトール、塩化ナトリウム等）等の注射用の水性液を挙げることができるが、これらに限定されない。本発明の医薬組成物は、例えば、緩衝剤（例えば、リン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液）、無痛化剤（例えば、塩酸リドカイン、塩酸プロカイン等）、安定剤（例えば、ヒト血清アルブミン、ポリエチレングリコール等）、保存剤（例えば、安息香酸ナトリウム、塩化ベンザルコニウム等）、酸化防止剤（例えば、ア

スコルビン酸、エドト酸ナトリウム等)等と配合しても良い。本発明の医薬組成物を水性懸濁液剤として製剤化する場合、例えば、上記水性液に約 $1.0 \times 10^2$ ~約 $1.0 \times 10^{12}$ 細胞/mLとなるように、上述したCMP、骨髓球系前駆細胞又はCMP系分化細胞を懸濁すればよい。

[0085] 本実施形態に係る疾患の治療又は予防方法は、上述したCMP又は骨髓球系前駆細胞の増殖性を向上させる方法又はCMP又は骨髓球系前駆細胞を製造する方法で得られたCMP又は骨髓球系前駆細胞、或いは上述したCMP系分化細胞を製造する方法で得られたCMP系分化細胞、或いは本実施形態に係る医薬組成物を、それを必要とする患者に投与することを含む。疾患としては、特に限定されないが、腫瘍・変性細胞、感染性病原生物に関する疾患や、炎症・アレルギー性疾患（自己免疫疾患、動脈硬化等の慢性炎症性疾患）等が挙げられる。投与方法は特に限定されないが、好ましくは注射であり、静脈内投与、腹腔内投与等が挙げられる。本発明の剤の投与量は、投与対象、治療標的部、症状、投与方法等により差異はあるが、通常、患者（体重60kgとして）においては、例えば、静脈内投与の場合、1回につきヒトミエロイド系血液細胞の量として約 $1.0 \times 10^6$ ~約 $1.0 \times 10^{11}$ 細胞を、1週間に約2~3回、約2~3週間以上投与することができる。

[0086] 本実施形態に係るキットは、上述したCMP又は骨髓球系前駆細胞の増殖促進剤を含み、腫瘍・変性細胞、感染性病原生物に関する疾患や、炎症・アレルギー性疾患（自己免疫疾患、動脈硬化等の慢性炎症性疾患）の診断に用いられる。

[0087] キットは、その用途に応じて試薬や、担体や添加物を含んでいてもよく、更には緩衝液、容器、使用説明書等を含んでいてもよい。具体的なキットの形態としては、CMP又は骨髓球系前駆細胞の増殖促進剤を含み、炎症・アレルギー性疾患（自己免疫疾患、動脈硬化等の慢性炎症性疾患）の主要な原因細胞である好中球、マクロファージ、樹状細胞等の特定の細胞種に用いられる疾患診断チップが挙げられる。

[0088] (2) 方法論2

更なる局面において、本発明は、CMP又は骨髓球系前駆細胞において、BCL-XL遺伝子を強制発現させる工程を含む、CMP又は骨髓球系前駆細胞の増殖性を向上させる方法（以下、「本発明の方法2」という。）を提供する。骨髓球系前駆細胞は、好ましくは、GMP、マクロファージ前駆細胞又は樹状細胞前駆細胞である。BCL-XL遺伝子を強制発現させることにより、CMP又は骨髓球系前駆細胞の増殖性が向上し、無限に増殖する不死化細胞株を得ることが期待できる。

[0089] 本発明の方法2においては、所望の特定の分化段階の細胞（CMP又は骨髓球系前駆細胞）を抽出（単離又は精製）する工程をさらに含んでもよい。特定の分化段階の細胞（CMP又は骨髓球系前駆細胞）の抽出は、BCL-XL遺伝子を強制発現させる前に行っても後に行ってもよい。一態様において、BCL-XL遺伝子を強制発現させる前にこの抽出工程を行い、抽出した特定の分化段階の細胞（CMP又は骨髓球系前駆細胞）において、BCL-XL遺伝子を強制発現させる。別の態様において、BCL-XL遺伝子を強制発現させた、所望の特定の分化段階の細胞（CMP又は骨髓球系前駆細胞）を含む細胞集団を調製し、その後該細胞集団から、所望の特定の分化段階の細胞（CMP又は骨髓球系前駆細胞）を抽出する。この抽出した特定の分化段階の細胞（CMP又は骨髓球系前駆細胞）において、BCL-XL遺伝子を引き続き強制発現させてもよい。目的とする細胞を抽出し、抽出された細胞に対して、本発明の方法を適用することにより、或いは本発明の方法を適用した細胞集団から、目的とする細胞を抽出して、該細胞を継続して培養することにより、目的の細胞種を効率よく増殖させることができる。抽出する細胞は、抽出した細胞種の増殖性を効率的に向上させる観点から、CMPの細胞株のみとすることや、骨髓球系前駆細胞の単一種の細胞株のみとすることが好ましいが、これらの2種以上の細胞が混合した細胞集団としてもよい。抽出する細胞は、好ましくは、CMP、GMP、マクロファージ前駆細胞又は樹状細胞前駆細胞である。目的とする細胞の抽出は、方法論1に記載した方法に従って行うことができる。抽出操作後の細胞集団に含まれ



る目的とする細胞の割合が、例えば、10%以上、20%以上、30%以上、40%以上、50%以上、60%以上、70%以上、80%以上、90%以上、95%以上（例、100%）となるように、目的とする細胞の単離を行うことができる。目的とする細胞のシングルセルを単離してもよい。

[0090] 本発明の方法2は、CMP又は骨髓球系前駆細胞において、MYCファミリー遺伝子（好ましくはc-My c）及びB M I 1遺伝子を強制発現させる工程をさらに含んでもよい。B C L - X L遺伝子に加えて、MYCファミリー遺伝子（好ましくはc-My c）及びB M I 1遺伝子を発現させることにより、CMP又は骨髓球系前駆細胞の増殖の更なる促進が期待できる。MYCファミリー遺伝子（好ましくはc-My c）及びB M I 1遺伝子の強制発現の期間は当業者が適宜決定することができる。

[0091] MYCファミリー遺伝子、B M I 1遺伝子、及びB C L - X L遺伝子の強制発現は、同時に行ってもよく、順次行ってもよい。例えば、MYCファミリー遺伝子とB M I 1遺伝子を強制発現させ、続いてB C L - X L遺伝子を強制発現させて、増殖能を向上させたCMP又は骨髓球系前駆細胞を得てもよい。また、MYCファミリー遺伝子とB M I 1遺伝子とB C L - X L遺伝子を同時に強制発現させて、増殖能を向上させたCMP又は骨髓球系前駆細胞を得ることもできる。CMP又は骨髓球系前駆細胞の増殖を維持する場合には、培養期間中、MYCファミリー遺伝子、B M I 1遺伝子、及びB C L - X L遺伝子の強制発現を維持することが好ましい。

[0092] MYCファミリー遺伝子、B M I 1遺伝子、及びB C L - X L遺伝子は、CMP又は骨髓球系前駆細胞の細胞増殖を促進するが、CMP系分化細胞（例、マクロファージ、樹状細胞、好中球、赤血球）の終末分化を阻害し得るために、終末分化工程に入る前にこれら遺伝子の発現を抑制してもよい。CMP又は骨髓球系前駆細胞内のこれら遺伝子発現を抑制することにより、機能的でより成熟したCMP系分化細胞（例、マクロファージ、樹状細胞、好中球、赤血球）が誘導されやすくなる。

[0093] MYCファミリー遺伝子、B M I 1遺伝子、B C L - X L遺伝子等の遺伝

子は、方法論 1 に記載した方法に準じて細胞内で強制発現させることができる。CMP 又は骨髓球系前駆細胞に、所望の遺伝子（例、BCL-XL 遺伝子、任意的に更にMYCファミリー遺伝子及びBMI1 遺伝子）の発現ベクターをトランスフェクトしてもよいし、予め所望の遺伝子（例、BCL-XL 遺伝子、任意的に更にMYCファミリー遺伝子及びBMI1 遺伝子）の発現カセットを組み込んだ多能性幹細胞（例、ES細胞、iPS細胞）、造血前駆細胞又は造血内皮細胞からCMP 又は骨髓球系前駆細胞を誘導し、その段階で当該遺伝子を強制発現させてもよい。或いは、予め所望の遺伝子（例、BCL-XL 遺伝子、任意的に更にMYCファミリー遺伝子及びBMI1 遺伝子）の発現カセットを組み込んだ多能性幹細胞（例、ES細胞、iPS細胞）、造血前駆細胞又は造血内皮細胞において、当該遺伝子を強制発現させながら、該多能性幹細胞、造血前駆細胞又は造血内皮細胞から、CMP 又は骨髓球系前駆細胞への分化を誘導してもよい。発現制御の目的遺伝子であるMYCファミリー遺伝子、BMI1 遺伝子、BCL-XL 遺伝子は、それぞれ別々のベクターに挿入してもよいし、同一のベクターに挿入してもよい。

[0094] 細胞内におけるMYCファミリー遺伝子、BMI1 遺伝子、BCL-XL 遺伝子等の発現の抑制は、方法論 1 に記載した方法に準じて行うことができる。

[0095] 本発明の方法 2 は、CMP 又は骨髓球系前駆細胞において、CDKN1A 遺伝子及び／又はp53 遺伝子の発現、又はその発現産物の機能を抑制する工程を含んでもよい。本発明の方法 2 において、CDKN1A 遺伝子及び／又はp53 遺伝子の発現、又はその発現産物の機能を抑制することにより、CMP 又は骨髓球系前駆細胞の増殖の更なる向上が期待できる。

[0096] CDKN1A 遺伝子のみならず、p53 遺伝子の発現、或いはそれらの発現産物の機能を抑制することが好ましい。

[0097] 上記各遺伝子の発現又はその発現産物の機能の抑制は、方法論 1 に記載した方法に準じて行うことができる。

[0098] CDKN1A 遺伝子及び／又は p53 遺伝子の発現の抑制は、方法論 1 と同様に、好ましくは、各遺伝子に対する発現抑制核酸を発現する発現ベクターを細胞に導入することにより行う。CMP 又は骨髓球系前駆細胞に、所望の遺伝子（例、CDKN1A 遺伝子、p53 遺伝子）に対する発現抑制核酸の発現ベクター（例、ウイルスベクター）をトランスフェクトしてもよいし、予め所望の遺伝子（例、CDKN1A 遺伝子、p53 遺伝子）に対する発現抑制核酸の発現カセットを組み込んだ多能性幹細胞（例、ES 細胞、iPS 細胞）、造血前駆細胞又は造血内皮細胞から CMP 又は骨髓球系前駆細胞を誘導し、その段階で当該 siRNA、shRNA 又はアンチセンス核酸を強制発現させてもよい。或いは、予め所望の遺伝子（例、CDKN1A 遺伝子、p53 遺伝子）に対する発現抑制核酸の発現カセットを組み込んだ多能性幹細胞（例、ES 細胞、iPS 細胞）、造血前駆細胞又は造血内皮細胞において、当該発現抑制核酸を強制発現させながら、該多能性幹細胞、造血前駆細胞又は造血内皮細胞から、CMP 又は骨髓球系前駆細胞への分化を誘導してもよい。発現ベクターを用いて細胞内で発現抑制核酸の発現を行う場合、適当なプロモーターの下流に該発現抑制核酸をコードする核酸（例、DNA）を作用可能に連結し、これを発現ベクターに挿入して、細胞内に導入して目的とする発現抑制核酸を発現させてもよい。該プロモーターは外来性プロモーターであり得る。外来性プロモーターは、恒常的プロモーター又は調節性プロモーターであり得るが、好ましくは恒常的プロモーターである。CDKN1A 遺伝子に対する発現抑制核酸をコードする核酸と、p53 遺伝子に対する発現抑制核酸をコードする核酸は、それぞれ別々の発現ベクターに挿入してもよいし、同一の発現ベクターに挿入してもよい。

[0099] 本局面において、CDKN1A 遺伝子及び／又は p53 遺伝子の発現、又はその発現産物の機能の抑制は、MYC ファミリー遺伝子、BMI1 遺伝子、又は BCL-XL 遺伝子のいずれかの強制発現と同時であってもよい。好ましくは、BCL-XL 遺伝子の強制発現と同時か、或いはその後である。例えば細胞増殖の低下が確認された後に実施することができる。一例として

、ある時点の細胞増殖率を直近の細胞増殖率と比較し（例えば、一週間ごとに細胞の増殖を確認したとして、ある週の細胞増殖率をその一週間前の増殖率と比較して）、増殖率が1/2以下になった状態が確認された後に実施することができる。一態様において、CMP又は骨髓球系前駆細胞において、MYCファミリー遺伝子（例、c-Myc遺伝子）、BMI1遺伝子、及びBCL-XL遺伝子を強制発現させ、これと並行して、CDKN1A遺伝子及び/又はp53遺伝子の発現、又はその発現産物の機能を抑制する。

[0100] 本発明は、上記本発明の方法2で得られたCMP又は骨髓球系前駆細胞を培養する工程（培養工程）を含む、CMP又は骨髓球系前駆細胞を製造する方法（以下、本発明の製造方法2という）をも提供する。

[0101] CMP又は骨髓球系前駆細胞の培養条件は、方法論1に記載の通りである。方法論1に記載の通り、培養するCMP又は骨髓球系前駆細胞の種類に応じ、細胞増殖に適したサイトカインの生み合わせを、培地に添加することができる。

[0102] 本発明は、第4の外來性プロモーターと作用可能に連結されたBCL-XL遺伝子を有する、CMP又は骨髓球系前駆細胞（以下、本発明の細胞2）を提供する。骨髓球系前駆細胞は、好ましくは、GMP、マクロファージ前駆細胞又は樹状細胞前駆細胞である。第4の外來性プロモーターの用語の説明は、方法論1について記載した部分に準ずる。第4の外來性プロモーターと作用可能に連結されたBCL-XL遺伝子は、CMP又は骨髓球系前駆細胞のゲノムに組み込まれていてもよいし、CMP又は骨髓球系前駆細胞内に導入された発現ベクター中に存在してもよい。好ましくは、第4の外來性プロモーターと作用可能に連結されたBCL-XL遺伝子は、CMP又は骨髓球系前駆細胞のゲノムに組み込まれている。

[0103] 第4の外來性プロモーターとしてテトラサイクリン反応性プロモーターを用いる場合、テトラサイクリン依存的な発現制御を可能とするため、本発明の細胞は、第3の外來性プロモーターと作用可能に連結されたrtTA遺伝子又はtTA遺伝子を更に有することが好ましい。第3の外來性プロモータ

一は、恒常的プロモーター又は調節性プロモーターであり得るが、好ましくは、恒常的プロモーターである。第3の外來性プロモーターと作用可能に連結された r t T A 遺伝子又は t T A 遺伝子は、CMP 又は骨髓球系前駆細胞のゲノムに組み込まれていてもよいし、CMP 又は骨髓球系前駆細胞内に導入された発現ベクター中に存在してもよい。好ましくは、第3の外來性プロモーターと作用可能に連結された r t T A 遺伝子又は t T A 遺伝子は、CMP 又は骨髓球系前駆細胞のゲノムに組み込まれている。

[0104] 増殖能力を増強する観点から、本発明の細胞2は、第1の外來性プロモーターと作用可能に連結されたMYCファミリー遺伝子及び第2の外來性プロモーターと作用可能に連結されたBM11遺伝子を更に有していてもよい。MYCファミリー遺伝子は、好ましくはc-MYCである。第1の外來性プロモーター及び第2の外來性プロモーターの用語の説明は、方法論1について記載した部分に準ずる。第1の外來性プロモーターと作用可能に連結されたMYCファミリー遺伝子及び第2の外來性プロモーターと作用可能に連結されたBM11遺伝子は、CMP 又は骨髓球系前駆細胞のゲノムに組み込まれていてもよいし、CMP 又は骨髓球系前駆細胞内に導入された発現ベクター中に存在してもよい。好ましくは、第1の外來性プロモーターと作用可能に連結されたMYCファミリー遺伝子及び第2の外來性プロモーターと作用可能に連結されたBM11遺伝子は、CMP 又は骨髓球系前駆細胞のゲノムに組み込まれている。

[0105] 第1の外來性プロモーター及び／又は第2の外來性プロモーターの種類は、第4の外來性プロモーターと同一であっても異なってもよいが、好ましくは、第1、第2及び第4の外來性プロモーターは、同一の種類のプロモーターである。同一の種類のプロモーターを用いることにより、MYCファミリー遺伝子、BM11遺伝子及びBCL-XL遺伝子を同期的に発現させることができ、また同期的に発現を抑制することができる。第1、第2及び第4の外來性プロモーターは、好ましくは、同一の調節性プロモーター（例、薬剤反応性プロモーター）であり、より好ましくは全てテトラサイクリン

反応性プロモーターである。第4の外來性プロモーターは、第1及び第2の外來性プロモーターと独立して、BCL-XL遺伝子と作用可能に連結されていてもよいし、第4の外來性プロモーターにMYCファミリー遺伝子とBCL-XL遺伝子とが作用可能に連結されていてもよいし、第4の外來性プロモーターにBMI1遺伝子とBCL-XL遺伝子とが作用可能に連結されていてもよいし、1つの外來性プロモーターに、MYCファミリー遺伝子、BMI1遺伝子及びBCL-XL遺伝子が作用可能に連結されていてもよい。

[0106] 第1、第2及び第4の外來性プロモーターの少なくとも1つについてテトラサイクリン反応性プロモーターを用いる場合、テトラサイクリン依存的な発現制御を可能とするため、本発明の細胞2は、第3の外來性プロモーターと作用可能に連結されたrtTA遺伝子又はtTA遺伝子を更に有することが好ましい。第3の外來性プロモーターは、恒常的プロモーター又は調節性プロモーターであり得るが、好ましくは、恒常的プロモーターである。第3の外來性プロモーターと作用可能に連結されたrtTA遺伝子又はtTA遺伝子は、CMP又は骨髓球系前駆細胞のゲノムに組み込まれていてもよいし、CMP又は骨髓球系前駆細胞内に導入された発現ベクター中に存在してもよい。好ましくは、第3の外來性プロモーターと作用可能に連結されたrtTA遺伝子又はtTA遺伝子は、CMP又は骨髓球系前駆細胞のゲノムに組み込まれている。

[0107] 増殖能力を増強する観点から、本発明の細胞2は、第5の外來性プロモーターと作用可能に連結されたCDKN1A遺伝子に対する発現抑制核酸（例、siRNA、shRNA、アンチセンス核酸）をコードする核酸、及び／又は第6の外來性プロモーターと作用可能に連結されたp53遺伝子に対する発現抑制核酸をコードする核酸を更に有していてもよい。第5の外來性プロモーター及び第6の外來性プロモーターの用語の説明は、方法論1について記載した部分に準ずる。第5の外來性プロモーターと作用可能に連結されたCDKN1A遺伝子に対する発現抑制核酸をコードする核酸、及び第6の

外来性プロモーターと作用可能に連結された p 5 3 遺伝子に対する発現抑制核酸をコードする核酸は、CMP 又は骨髓球系前駆細胞のゲノムに組み込まれていてもよいし、CMP 又は骨髓球系前駆細胞内に導入された発現ベクター中に存在してもよいが、好ましくは、CMP 又は骨髓球系前駆細胞のゲノムに組み込まれている。

[0108] 一態様において、本発明の細胞 2 は、  
第 1 の外来性プロモーターと作用可能に連結された MYC ファミリー遺伝子（例、c-Myc）、  
第 2 の外来性プロモーターと作用可能に連結された BMI1 遺伝子、及び  
第 4 の外来性プロモーターと作用可能に連結された BCL-XL 遺伝子を有する、CMP 又は骨髓球系前駆細胞（例、GMP、マクロファージ前駆細胞、樹状細胞前駆細胞）である。第 1、2 及び 4 の外来性プロモーターから選択される少なくとも 1 つ（好ましくは全て）としてテトラサイクリン反応性プロモーターを用いる場合、本発明の細胞は、第 3 の外来性プロモーターと作用可能に連結された rtTA 遺伝子又は tTA 遺伝子を更に有していてもよい。

[0109] 一態様において、本発明の細胞 2 は、  
第 1 の外来性プロモーターと作用可能に連結された MYC ファミリー遺伝子、  
第 2 の外来性プロモーターと作用可能に連結された BMI1 遺伝子、  
第 4 の外来性プロモーターと作用可能に連結された BCL-XL 遺伝子  
第 5 の外来性プロモーターと作用可能に連結された CDKN1A 遺伝子に対する発現抑制核酸をコードする核酸、及び  
第 6 の外来性プロモーターと作用可能に連結された p 5 3 遺伝子に対する発現抑制核酸をコードする核酸  
を有する CMP 又は骨髓球系前駆細胞（例、GMP、マクロファージ前駆細胞、樹状細胞前駆細胞）である。第 1、2 及び 4 の外来性プロモーターから選択される少なくとも 1 つ（好ましくは全て）としてテトラサイクリン反応

性プロモーターを用いる場合、本発明の細胞は、第3の外來性プロモーターと作用可能に連結された r t T A 遺伝子又は t T A 遺伝子を更に有していてもよい。

[0110] 本発明の細胞2は、上述した本発明の方法2、又は本発明の製造方法2により得ることができる。

[0111] また、本発明は、上記本発明の細胞2を含む細胞集団（本発明の細胞集団2という。）を提供する。該細胞集団2は、上記本発明の細胞2を豊富に含み、該細胞集団2全体に含まれる本発明の細胞2の割合は、例えば、10%以上、20%以上、30%以上、40%以上、50%以上、60%以上、70%以上、80%以上、90%以上、95%以上（例、100%）である。このような本発明の細胞2を豊富に含む細胞集団は、上記本発明の方法2を適用した細胞集団から、目的とする特定の分化段階の細胞（CMP又は骨髓球系前駆細胞（例、GMP、マクロファージ前駆細胞、樹状細胞前駆細胞））を、抽出することにより得ることができる。好ましい態様において、本発明の細胞集団2は、特定の分化段階にある本発明の細胞2を豊富に含む。一態様において、細胞集団全体に含まれる本発明の細胞2（該細胞はGMPである）の割合が、10%以上、20%以上、30%以上、40%以上、50%以上、60%以上、70%以上、80%以上、90%以上、95%以上（例、100%）である。一態様において、細胞集団全体に含まれる本発明の細胞2（該細胞はマクロファージ前駆細胞である）の割合が、10%以上、20%以上、30%以上、40%以上、50%以上、60%以上、70%以上、80%以上、90%以上、95%以上（例、100%）である。一態様において、細胞集団全体に含まれる本発明の細胞2（該細胞は樹状細胞前駆細胞である）の割合が、10%以上、20%以上、30%以上、40%以上、50%以上、60%以上、70%以上、80%以上、90%以上、95%以上（例、100%）である。このように特定の分化段階にある本発明の細胞2を豊富に含む細胞集団は、上記本発明の方法2を適用した細胞集団から、目的とする分化段階の細胞を、該分化段階の細胞に特異的に発現する細胞



表面マーカーに対する抗体を用いて、セルソーター等で単離・抽出することにより得ることができる。

[0112] また、本発明は、上記本発明の細胞集団 2 を含む細胞調製物（本発明の細胞調製物 2 という。）を提供する。本発明の細胞調製物 2 は、方法論 1 と同様に、上記本発明の細胞集団 2 を、適切な生理的水溶液で懸濁することにより調製することができる。一態様において、本発明の細胞調製物 2 は、凍結した上記本発明の細胞集団 2 を含む凍結細胞調製物である。

[0113] 方法論 1 と同様に、本発明の方法 2 又は本発明の製造方法 2 で得られた CMP 又は骨髓球系前駆細胞（すなわち、本発明の細胞 2）を分化させることにより、CMP 系分化細胞を得ることができる。

[0114] 本実施形態に係る CMP 又は骨髓球系前駆細胞の増殖促進剤（本発明の増殖促進剤 2 という）は、BCL-XL 遺伝子を強制発現させる分子を有効成分として含む。本発明の増殖促進剤 2 は、MYC ファミリー遺伝子及び BMI1 遺伝子を強制発現させる分子を更に有効成分として含んでもよい。本発明の増殖促進剤 2 は、CDKN1A 遺伝子又は p53 遺伝子の発現又はその発現産物の機能を抑制する分子を更に有効成分として含んでもよい。

[0115] また、本発明の方法 2 又は本発明の製造方法 2 で得られた CMP 又は骨髓球系前駆細胞（本発明の細胞 2）、或いは上述した CMP 系分化細胞を製造する方法で得られた CMP 系分化細胞を含む医薬組成物を調製し、各種疾患の治療又は予防に用いることもできる。医薬組成物の調整及び、疾患の治療又は予防は、方法論 1 に準じて実施することができる。

[0116] 各用語の定義は、方法論 1 について記載した部分に準ずる。

[0117] (2) 方法論 3

更なる局面において、本発明は、CMP 又は骨髓球系前駆細胞において、CDKN1A 遺伝子及び／又は p53 遺伝子の発現、又はその発現産物の機能を抑制する工程を含む、CMP 又は骨髓球系前駆細胞の増殖性を向上させる方法（以下、「本発明の方法 2」という。）を提供する。骨髓球系前駆細胞

胞は、好ましくは、GMP、マクロファージ前駆細胞、樹状細胞前駆細胞、又は赤血球前駆細胞である。CDKN1A遺伝子及び／又はp53遺伝子の発現、又はその発現産物の機能を抑制することにより、CMP又は骨髓球系前駆細胞の増殖性が向上し、無限に増殖する不死化細胞株を得ることが期待できる。

[0118] CDKN1A遺伝子のみならず、p53遺伝子の発現、或いはそれらの発現産物の機能を抑制することが好ましい。

[0119] 上記各遺伝子の発現又はその発現産物の機能の抑制は、方法論1に記載した方法に準じて行うことができる。

[0120] CDKN1A遺伝子及び／又はp53遺伝子の発現の抑制は、方法論1と同様に、好ましくは、各遺伝子に対する発現抑制核酸（例、siRNA、shRNA、アンチセンス核酸）を発現する発現ベクターを細胞に導入することにより行う。CMP又は骨髓球系前駆細胞に、所望の遺伝子（例、CDKN1A遺伝子、p53遺伝子）に対する発現抑制核酸の発現ベクター（例、ウイルスベクター）をトランスフェクトしてもよいし、予め所望の遺伝子（例、CDKN1A遺伝子、p53遺伝子）に対する発現抑制核酸の発現カセットを組み込んだ多能性幹細胞（例、ES細胞、iPS細胞）、造血前駆細胞又は造血内皮細胞からCMP又は骨髓球系前駆細胞を誘導し、その段階で当該発現抑制核酸を強制発現させてもよい。或いは、予め所望の遺伝子（例、CDKN1A遺伝子、p53遺伝子）に対する発現抑制核酸の発現カセットを組み込んだ多能性幹細胞（例、ES細胞、iPS細胞）、造血前駆細胞又は造血内皮細胞において、当該発現抑制核酸を強制発現させながら、該多能性幹細胞、造血前駆細胞又は造血内皮細胞から、CMP又は骨髓球系前駆細胞への分化を誘導してもよい。発現ベクターを用いて細胞内で発現抑制核酸の発現を行う場合、適当なプロモーターの下流に該発現抑制核酸をコードする核酸（例、DNA）を作用可能に連結し、これを発現ベクターに挿入して、細胞内に導入して目的とする発現抑制核酸を発現させてもよい。該プロモーターは外来性プロモーターであり得る。外来性プロモーターは、恒常的

プロモーター又は調節性プロモーターであり得るが、好ましくは恒常的プロモーターである。CDKN1A遺伝子に対する発現抑制核酸をコードする核酸と、p53遺伝子に対する発現抑制核酸をコードする核酸は、それぞれ別々の発現ベクターに挿入してもよいし、同一の発現ベクターに挿入してもよい。

[0121] 本発明の方法3においては、所望の特定の分化段階の細胞（CMP又は骨髓球系前駆細胞）を抽出（単離又は精製）する工程をさらに含んでもよい。当該特定の分化段階の細胞（CMP又は骨髓球系前駆細胞）の抽出は、CDKN1A遺伝子及び／又はp53遺伝子の発現、又はその発現産物の機能を抑制する前に行っても後に行ってもよい。一態様において、CDKN1A遺伝子及び／又はp53遺伝子の発現、又はその発現産物の機能を抑制する前にこの抽出工程を行い、抽出した特定の分化段階の細胞（CMP又は骨髓球系前駆細胞）において、CDKN1A遺伝子及び／又はp53遺伝子の発現、又はその発現産物の機能を抑制する。別の態様において、CDKN1A遺伝子及び／又はp53遺伝子の発現、又はその発現産物の機能を抑制した、所望の特定の分化段階の細胞（CMP又は骨髓球系前駆細胞）を含む細胞集団を調製し、その後該細胞集団から、所望の特定の分化段階の細胞（CMP又は骨髓球系前駆細胞）を抽出する。この抽出した特定の分化段階の細胞（CMP又は骨髓球系前駆細胞）において、引き続きCDKN1A遺伝子及び／又はp53遺伝子の発現、又はその発現産物の機能を抑制してもよい。目的とする細胞を抽出し、抽出された細胞に対して、本発明の方法3を適用することにより、或いは本発明の方法3を適用した細胞集団から、目的とする細胞を抽出して、該細胞を継続して培養することにより、目的の細胞種を効率よく増殖させることができる。抽出する細胞は、抽出した細胞種の増殖性を効率的に向上させる観点から、CMPのみとすることや、骨髓球系前駆細胞の単一種の細胞のみとすることが好ましいが、これらの2種以上の細胞種が混合した細胞集団としてもよい。抽出する細胞は、好ましくは、CMP、GMP、マクロファージ前駆細胞、樹状細胞前駆細胞、又は赤血球前駆

細胞である。目的とする細胞の抽出は、方法論 1 に記載した方法に従って行うことができる。抽出操作後の細胞集団に含まれる目的とする細胞の割合が、例えば、10%以上、20%以上、30%以上、40%以上、50%以上、60%以上、70%以上、80%以上、90%以上、95%以上（例、100%）となるように、目的とする細胞の単離を行うことができる。目的とする細胞のシングルセルを単離してもよい。

[0122] 本発明の方法 3 は、CMP 又は骨髓球系前駆細胞において、MYC ファミリー遺伝子（好ましくは *c-Myc*）及び *BM11* 遺伝子を強制発現させる工程をさらに含んでもよい。CDKN1A 遺伝子及び／又は *p53* 遺伝子の発現、又はその発現産物の機能の抑制に加えて、MYC ファミリー遺伝子（好ましくは *c-Myc*）及び *BM11* 遺伝子を発現させることにより、CMP 又は骨髓球系前駆細胞の増殖の更なる促進が期待できる。MYC ファミリー遺伝子（好ましくは *c-Myc*）及び *BM11* 遺伝子の上記強制発現の期間は当業者が適宜決定することができる。

[0123] MYC ファミリー遺伝子及び *BM11* 遺伝子の強制発現は、CDKN1A 遺伝子及び／又は *p53* 遺伝子の発現、又はその発現産物の機能の抑制と同時に行ってもよく、順次行ってもよい。例えば、MYC ファミリー遺伝子と *BM11* 遺伝子を強制発現させ、続いて CDKN1A 遺伝子及び／又は *p53* 遺伝子の発現、又はその発現産物の機能を抑制して、増殖能を向上させた CMP 又は骨髓球系前駆細胞を得てもよい。また、MYC ファミリー遺伝子及び *BM11* 遺伝子の強制発現と、CDKN1A 遺伝子及び／又は *p53* 遺伝子の発現、又はその発現産物の機能の抑制を同時に行い、増殖能を向上させた CMP 又は骨髓球系前駆細胞を得ることもできる。

[0124] 本発明の方法 3 は、CMP 又は骨髓球系前駆細胞において、*BCL-XL* 遺伝子を強制させる工程をさらに含んでもよい。CDKN1A 遺伝子及び／又は *p53* 遺伝子の発現、又はその発現産物の機能の抑制に加えて、*BCL-XL* 遺伝子を発現させることにより、CMP 又は骨髓球系前駆細胞の増殖の更なる促進が期待できる。*BCL-XL* 遺伝子の上記強制発現の期間

は当業者が適宜決定することができる。

[0125] BCL-XL 遺伝子の強制発現は、CDKN1A 遺伝子及び／又は p53 遺伝子の発現、又はその発現産物の機能の抑制と同時に行ってもよく、順次行ってもよい。例えば、BCL-XL 遺伝子を強制発現させ、続いて CDKN1A 遺伝子及び／又は p53 遺伝子の発現、又はその発現産物の機能を抑制して、増殖能を向上させた CMP 又は骨髓球系前駆細胞を得てもよい。また、BCL-XL 遺伝子の強制発現と、CDKN1A 遺伝子及び／又は p53 遺伝子の発現、又はその発現産物の機能の抑制を同時に行い、増殖能を向上させた CMP 又は骨髓球系前駆細胞を得ることもできる。

[0126] 一態様において、本発明の方法 3 は、CMP 又は骨髓球系前駆細胞において、MYC ファミリー遺伝子（好ましくは c-Myc 遺伝子）、BMI1 遺伝子及び BCL-XL 遺伝子を強制させる工程をさらに含んでもよい。本態様において、CDKN1A 遺伝子又は p53 遺伝子の発現、又はその発現産物の機能の抑制は、MYC ファミリー遺伝子、BMI1 遺伝子、又は BCL-XL 遺伝子のいずれかの強制発現と同時であってもよい。好ましくは BCL-XL 遺伝子の強制発現と同時か、或いはその後に CDKN1A 遺伝子又は p53 遺伝子の発現、又はその発現産物の機能を抑制する。一態様において、CMP 又は骨髓球系前駆細胞において、MYC ファミリー遺伝子（好ましくは c-Myc 遺伝子）及び BMI1 遺伝子を強制発現した CMP 又は骨髓球系前駆細胞の細胞増殖の低下が確認された後に、CDKN1A 遺伝子又は p53 遺伝子の発現、又はその発現産物の機能を抑制する。一態様において、CMP 又は骨髓球系前駆細胞において、MYC ファミリー遺伝子（好ましくは c-Myc 遺伝子）及び BMI1 遺伝子を強制発現した CMP 又は骨髓球系前駆細胞の細胞増殖の低下が確認された後に、BCL-XL 遺伝子の強制発現と CDKN1A 遺伝子又は p53 遺伝子の発現、又はその発現産物の機能の抑制を実施する。一例として、ある時点の細胞増殖率を直近の細胞増殖率と比較し（例えば、一週間ごとに細胞の増殖を確認したとして、ある週の細胞増殖率をその一週間前の増殖率と比較して）、増殖率が 1/2

以下になった状態が確認された後に実施することができる。一態様において、CMP又は骨髓球系前駆細胞において、MYCファミリー遺伝子（例、c-Myc遺伝子）、BMI1遺伝子、及びBCL-XL遺伝子を強制発現させ、これと並行して、CDKN1A遺伝子及び／又はp53遺伝子の発現、又はその発現産物の機能を抑制する。

[0127] MYCファミリー遺伝子、BMI1遺伝子、及びBCL-XL遺伝子は、CMP又は骨髓球系前駆細胞の細胞増殖を促進するが、CMP系分化細胞（例、マクロファージ、樹状細胞、好中球、赤血球）の終末分化を阻害し得るために、終末分化工程に入る前にこれら遺伝子の発現を抑制してもよい。CMP又は骨髓球系前駆細胞内のこれら遺伝子発現を抑制することにより、機能的でより成熟したCMP系分化細胞（例、マクロファージ、樹状細胞、好中球、赤血球）が誘導されやすくなる。

[0128] MYCファミリー遺伝子、BMI1遺伝子、BCL-XL遺伝子等の遺伝子は、方法論1や方法論2に記載した方法に準じて細胞内で強制発現させることができる。細胞内におけるMYCファミリー遺伝子、BMI1遺伝子、BCL-XL遺伝子等の発現の抑制は、方法論1や方法論2に記載した方法に準じて行うことができる。

[0129] 本発明は、上記本発明の方法3で得られたCMP又は骨髓球系前駆細胞を培養する工程（培養工程）を含む、CMP又は骨髓球系前駆細胞を製造する方法（以下、本発明の製造方法2という）をも提供する。

[0130] CMP又は骨髓球系前駆細胞の培養条件は、方法論1に記載の通りである。方法論1に記載の通り、培養するCMP又は骨髓球系前駆細胞の種類に応じ、細胞増殖に適したサイトカインの生み合わせを、培地に添加することができる。

[0131] 本発明は、第5の外來性プロモーターと作用可能に連結されたCDKN1A遺伝子に対する発現抑制核酸（例、siRNA、shRNA、アンチセンス核酸）をコードする核酸、及び／又は第6の外來性プロモーターと作用可能に連結されたp53遺伝子に対する発現抑制核酸をコードする核酸を有す

る、CMP又は骨髓球系前駆細胞（以下、本発明の細胞3）を提供する。骨髓球系前駆細胞は、好ましくは、GMP、マクロファージ前駆細胞、樹状細胞前駆細胞又は赤血球前駆細胞である。第5の外来性プロモーター及び第6の外来性プロモーターの用語の説明は、方法論1について記載した部分に準ずる。第5の外来性プロモーターと作用可能に連結されたCDKN1A遺伝子に対する発現抑制核酸をコードする核酸、及び第6の外来性プロモーターと作用可能に連結されたp53遺伝子に対する発現抑制核酸をコードする核酸は、CMP又は骨髓球系前駆細胞のゲノムに組み込まれていてもよいし、CMP又は骨髓球系前駆細胞内に導入された発現ベクター中に存在してもよいが、好ましくは、CMP又は骨髓球系前駆細胞のゲノムに組み込まれている。

[0132] 増殖能力を増強する観点から、本発明の細胞3は、第1の外来性プロモーターと作用可能に連結されたMYCファミリー遺伝子及び第2の外来性プロモーターと作用可能に連結されたBMI1遺伝子を更に有していてもよい。第1の外来性プロモーター及び第2の外来性プロモーターの用語の説明は、方法論1について記載した部分に準ずる。第1の外来性プロモーターと作用可能に連結されたMYCファミリー遺伝子及び第2の外来性プロモーターと作用可能に連結されたBMI1遺伝子は、CMP又は骨髓球系前駆細胞のゲノムに組み込まれていてもよいし、CMP又は骨髓球系前駆細胞内に導入された発現ベクター中に存在してもよい。好ましくは、第1の外来性プロモーターと作用可能に連結されたMYCファミリー遺伝子及び第2の外来性プロモーターと作用可能に連結されたBMI1遺伝子は、CMP又は骨髓球系前駆細胞のゲノムに組み込まれている。

[0133] 増殖能力を増強する観点から、本発明の細胞3は、第4の外来性プロモーターと作用可能に連結されたBCL-XL遺伝子を更に有していてもよい。第4の外来性プロモーターの用語の説明は、方法論1について記載した部分に準ずる。第4の外来性プロモーターと作用可能に連結されたBCL-XL遺伝子は、CMP又は骨髓球系前駆細胞のゲノムに組み込まれていてもよい

し、CMP又は骨髓球系前駆細胞内に導入された発現ベクター中に存在してもよい。好ましくは、第4の外來性プロモーターと作用可能に連結されたBCL-XL遺伝子は、CMP又は骨髓球系前駆細胞のゲノムに組み込まれている。

[0134] 第1、第2及び第4の外來性プロモーターの種類は、第4の外來性プロモーターと同一であっても異なってもよいが、好ましくは、第1、第2及び第4の外來性プロモーターは、同一の種類のプロモーターである。同一の種類のプロモーターを用いることにより、MYCファミリー遺伝子、BMI1遺伝子及びBCL-XL遺伝子を同期的に発現させることができ、また同期的に発現を抑制することができる。第1、第2及び第4の外來性プロモーターは、好ましくは、同一の調節性プロモーター（例、薬剤反応性プロモーター）であり、より好ましくは全てテトラサイクリン反応性プロモーターである。

[0135] 第1、第2及び第4の外來性プロモーターの少なくとも1つについてテトラサイクリン反応性プロモーターを用いる場合、テトラサイクリン依存的な発現制御を可能とするため、本発明の細胞3は、第3の外來性プロモーターと作用可能に連結されたrtTA遺伝子又はtTA遺伝子を更に有することが好ましい。第3の外來性プロモーターは、恒常的プロモーター又は調節性プロモーターであり得るが、好ましくは、恒常的プロモーターである。第3の外來性プロモーターと作用可能に連結されたrtTA遺伝子又はtTA遺伝子は、CMP又は骨髓球系前駆細胞のゲノムに組み込まれていてもよいし、CMP又は骨髓球系前駆細胞内に導入された発現ベクター中に存在してもよい。好ましくは、第3の外來性プロモーターと作用可能に連結されたrtTA遺伝子又はtTA遺伝子は、CMP又は骨髓球系前駆細胞のゲノムに組み込まれている。

[0136] 一態様において、本発明の細胞3は、第1の外來性プロモーターと作用可能に連結されたMYCファミリー遺伝子（例、c-Myc）、



第2の外來性プロモーターと作用可能に連結されたB M I 1 遺伝子、  
第5の外來性プロモーターと作用可能に連結されたC D K N 1 A 遺伝子に対する発現抑制核酸をコードする核酸、及び  
第6の外來性プロモーターと作用可能に連結されたp 5 3 遺伝子に対する発現抑制核酸をコードする核酸を有する、CMP又は骨髓球系前駆細胞（例、CMP、GMP、マクロファージ前駆細胞、樹状細胞前駆細胞、赤血球前駆細胞）である。第1及び2の外來性プロモーターから選択される少なくとも1つ（好ましくは全て）としてテトラサイクリン反応性プロモーターを用いる場合、本発明の細胞は、第3の外來性プロモーターと作用可能に連結されたr t T A 遺伝子又はt T A 遺伝子を更に有していてもよい。

[0137] 一態様において、本発明の細胞3は、

第1の外來性プロモーターと作用可能に連結されたM Y C ファミリー遺伝子、  
第2の外來性プロモーターと作用可能に連結されたB M I 1 遺伝子、  
第4の外來性プロモーターと作用可能に連結されたB C L - X L 遺伝子  
第5の外來性プロモーターと作用可能に連結されたC D K N 1 A 遺伝子に対する発現抑制核酸をコードする核酸、及び  
第6の外來性プロモーターと作用可能に連結されたp 5 3 遺伝子に対する発現抑制核酸をコードする核酸  
を有するCMP又は骨髓球系前駆細胞（例、CMP、GMP、マクロファージ前駆細胞、樹状細胞前駆細胞、赤血球前駆細胞）である。第1、2及び4の外來性プロモーターから選択される少なくとも1つ（好ましくは全て）としてテトラサイクリン反応性プロモーターを用いる場合、本発明の細胞は、第3の外來性プロモーターと作用可能に連結されたr t T A 遺伝子又はt T A 遺伝子を更に有していてもよい。

[0138] 本発明の細胞3は、上述した本発明の方法3、又は本発明の製造方法3により得ることができる。

[0139] また、本発明は、上記本発明の細胞3を含む細胞集団（本発明の細胞集団

3という。)を提供する。該細胞集団3は、上記本発明の細胞3を豊富に含み、該細胞集団3全体に含まれる本発明の細胞3の割合は、例えば、10%以上、20%以上、30%以上、40%以上、50%以上、60%以上、70%以上、80%以上、90%以上、95%以上(例、100%)である。このような本発明の細胞3を豊富に含む細胞集団は、上記本発明の方法3を適用した細胞集団から、目的とする特定の分化段階の細胞(CMP又は骨髓球系前駆細胞(例、GMP、マクロファージ前駆細胞、樹状細胞前駆細胞、赤血球前駆細胞))を、抽出することにより得ることができる。好ましい態様において、本発明の細胞集団3は、特定の分化段階にある本発明の細胞3を豊富に含む。一態様において、細胞集団全体に含まれる本発明の細胞3(該細胞はGMPである)の割合が、10%以上、20%以上、30%以上、40%以上、50%以上、60%以上、70%以上、80%以上、90%以上、95%以上(例、100%)である。一態様において、細胞集団全体に含まれる本発明の細胞3(該細胞はマクロファージ前駆細胞である)の割合が、10%以上、20%以上、30%以上、40%以上、50%以上、60%以上、70%以上、80%以上、90%以上、95%以上(例、100%)である。一態様において、細胞集団全体に含まれる本発明の細胞3(該細胞は樹状細胞前駆細胞である)の割合が、10%以上、20%以上、30%以上、40%以上、50%以上、60%以上、70%以上、80%以上、90%以上、95%以上(例、100%)である。一態様において、細胞集団全体に含まれる本発明の細胞3(該細胞は赤血球前駆細胞である)の割合が、10%以上、20%以上、30%以上、40%以上、50%以上、60%以上、70%以上、80%以上、90%以上、95%以上(例、100%)である。このように特定の分化段階にある本発明の細胞3を豊富に含む細胞集団は、上記本発明の方法3を適用した細胞集団から、目的とする分化段階の細胞を、該分化段階の細胞に特異的に発現する細胞表面マーカーに対する抗体を用いて、セルソーター等で単離・抽出することにより得ることができる。

- [0140] また、本発明は、上記本発明の細胞集団 3 を含む細胞調製物（本発明の細胞調製物 2 という。）を提供する。本発明の細胞調製物 3 は、方法論 1 と同様に、上記本発明の細胞集団 3 を、適切な生理的水溶液で懸濁することにより調製することができる。一態様において、本発明の細胞調製物 3 は、凍結した上記本発明の細胞集団 3 を含む凍結細胞調製物である。
- [0141] 方法論 1 と同様に、本発明の方法 3 又は本発明の製造方法 3 で得られた CMP 又は骨髓球系前駆細胞（すなわち、本発明の細胞 3）を分化させることにより、CMP 系分化細胞を得ることができる。
- [0142] 本実施形態に係る CMP 又は骨髓球系前駆細胞の増殖促進剤（本発明の増殖促進剤 3 という）は、CDKN1A 遺伝子及び／又は p53 遺伝子の発現、又はその発現産物の機能を抑制する分子を有効成分として含む。本発明の増殖促進剤 3 は、好ましくは、CDKN1A 遺伝子の発現を特異的に抑制し得る発現抑制核酸（例、siRNA、shRNA、アンチセンス核酸）又はこれらの発現抑制核酸を発現し得る発現ベクター、並びに／或いは p53 遺伝子の発現を特異的に抑制し得る発現抑制核酸、又はこれらの発現抑制核酸を発現し得る発現ベクターを有効成分として含む。本発明の増殖促進剤 3 は、MYC ファミリー遺伝子及び BMI1 遺伝子を強制発現させる分子を更に有効成分として含んでもよい。本発明の増殖促進剤 3 は、BCL-XL 遺伝子を強制発現させる分子を更に有効成分として含んでもよい。
- [0143] また、本発明の方法 3 又は本発明の製造方法 3 で得られた CMP 又は骨髓球系前駆細胞（本発明の細胞 3）、或いは上述した CMP 系分化細胞を製造する方法で得られた CMP 系分化細胞を含む医薬組成物を調製し、各種疾患の治療又は予防に用いることもできる。医薬組成物の調製及び、疾患の治療又は予防は、方法論 1 に準じて実施することができる。
- [0144] 各用語の定義は、方法論 1 について記載した部分に準ずる。
- [0145] 以下、本発明を実施例に基づいて具体的に説明するが、本発明は何らこれに限定されるものではない。当業者は、本発明の意義を逸脱することなく様々な態様に本発明を変更することができ、かかる変更も本発明の範囲に含ま

れる。

## 実施例

### [0146] 実施例 1-1 : CMP 株の増殖促進

ヒト iPS 細胞から、図 1 に示す方法に従って培養を 14 日間行い、血液前駆細胞への分化培養を実施し、セルソーターで CD34<sup>+</sup>CD43<sup>+</sup>細胞をソートすることにより単離した血液前駆細胞を得た。得られた血液前駆細胞に、以下の処理を行うことで増殖能を有する CMP 株を樹立した。まず、培養 14 日目の単離した血液前駆細胞 ( $1.0 \times 10^4 \sim 1.0 \times 10^5$  個) に、ドキシサイクリン制御により c-MYC/BMI1 を強制発現させるレンチウイルスベクターを導入し (MB)、GM-CSF (50 ng/ml)、G-CSF (10 ng/ml)、IL-3 (10 ng/ml)、SCF (25 ng/ml)、TPO (5 ng/ml) を含む培地中で、ドキシサイクリン存在下で培養することにより、増殖能を有する CMP (MB) を樹立した。増殖した細胞が CMP であることは、メチルセルロースコロニーアッセイにて、シングルセルから好中球、マクロファージ、赤芽球及び巨核球が誘導できたことから、樹立した細胞が CMP であることを確認した (Takayama et al., Blood, 111(11):5298-5306, 2008)。

[0147] 培養 21 日目に、CMP (MB) にドキシサイクリン制御により BCL-XL を強制発現させるレンチウイルスベクター、及び p21 に対する shRNA 及び p53 に対する shRNA を持続的に発現するレンチウイルスベクターを感染させて、GM-CSF、G-CSF、IL-3、SCF、TPO を含む培地中で、ドキシサイクリン存在下でさらに培養した。この培養操作により、MB 導入に加えてドキシサイクリン誘導レンチウイルスベクターを用いて BCL-XL 遺伝子を更に導入した CMP (MBX)、MB 導入に加えて持続的に発現する sh p21/p53 レンチウイルスベクターを更に感染させた CMP (MB-p21/p53\_KD)、及び MB 導入に加えてドキシサイクリン誘導レンチウイルスベクターを用いて BCL-XL 遺伝子を導入し、持続的に発現する sh p21/p53 レンチウイルスベクター

を感染させたCMP (MBX-p21/p53\_KD) を樹立した。樹立した細胞は、マクロファージ、MEP及び巨核球前駆細胞のマーカーを発現していないことから、CMP単一のポピュレーションと考えられた。

[0148] 各CMPについて、14日目と31日目と43日目の細胞数をカウントした結果を図2に示す。c-MYC及びBMI1の強制発現により、CMPは良好に増殖した。BCL-XLの強制発現により、細胞増殖が促進された。またp21及びp53のノックダウンによっても細胞増殖が促進された。同様の方法により、異なる7株のiPS細胞から、増殖性を有するCMPの樹立に成功した。

[0149] 実施例1-2：赤芽球・マクロファージ・好中球への分化誘導

実施例1-1で得た各細胞の培養液からドキシサイクリンを除去し、c-MYC/BMI1/BCL-XLの3因子の発現を抑制後、G-CSF、SCF、TPO、EPO、IL3のサイトカインの存在下で細胞を培養し、7日目にCMP株から分化した赤芽球・マクロファージ・好中球をFACSで解析した。抗体はCD43抗体、CD33抗体、CD14抗体、CD11b抗体、GPA (Glycophorin A) 抗体 (BioLegend、カタログ番号：306612)、APC anti-human CD41 Antibody (BioLegend、カタログ番号：303710) を使用した。結果を図3に示す。巨核球への分化も確認できた。ドキシサイクリン除去 (c-MYC/BMI1/BCL-XLの発現抑制) により、骨髄系の主要な3系統への終末分化が確認された。この結果から、実施例1-1で得られた細胞がCMPであること、及びc-MYC/BMI1/BCL-XLの発現抑制により、骨髄系細胞への終末分化が促進されることが示唆された。

[0150] 実施例1-3：マクロファージ・好中球への分化誘導

実施例1-1で得た各細胞の培養液からドキシサイクリンを除去し、MYC/BMI1/BCL-XLの3因子の発現を抑制後、GM-CSF、G-CSF、SCF、TPO、IL3のサイトカインの存在下で細胞を培養し、

7日目にCMP株から分化した赤芽球・マクロファージ・好中球をFACSで解析した。抗体はCD16抗体、CD14抗体、CD11b抗体、及びCD11c抗体を使用した。結果を図4に示す。MBX及びMBX-p21/p53KDのいずれのCMPからもマクロファージが誘導された。MBXよりもMBX-p21/p53KDの方が、マクロファージに分化した細胞のパーセンテージが高いことから、p21/p53KDによりマクロファージへの分化が促進される可能性が示唆された。

[0151] 実施例2-1: PiggyBac System

PiggyBacベクター内のテトラサイクリン応答因子(TRE)の下流にBMI1 IRESS c-MYCを導入し、H1 promoterの下流にsh p53, sh p21を導入したベクターを作製した(p b BMI1 IRESS c-MYC-rtTA sh p53 sh p21) (図5 (A) 参照)。PiggyBacベクター内のTREの下流にBCL-XLを導入した。このベクター内にUbic promoter下流にrtTA 2A puromycin耐性遺伝子が発現する(p b BclXL)。用いたPiggyBacベクターは、京都大学iPS細胞研究所のKnut Wolter教授から分与されたものである。

[0152] 上記のベクターを1383D10 (iPS細胞)、Khes3、Kthes14の各細胞株にリポフェクションで導入後、puromycinで導入細胞をセレクションした。その後、各細胞を14日間で血液前駆細胞に分化・単離後、図5 (B) に示す条件下で培養し、マクロファージ株、赤血球株の各細胞株を得た。

より具体的には、マクロファージ株を調製する場合、血液前駆細胞を、SCF (50 ng/ml)、M-CSF (20 ng/ml)、IL1 $\beta$  (10 ng/ml)、Doxycycline (1  $\mu$ g/ml) 存在下で7日間培養した後に、セルソーターでCX3CR1陽性CD14陽性細胞を単離した。単離されたCX3CR1陽性CD14陽性細胞を、引き続きSCF (50 ng/ml)、M-CSF (20 ng/ml)、IL1 $\beta$  (10 ng/ml)

、Doxycycline (1  $\mu$ g/ml) 存在下で培養することによりマクロファージ株を得た。

赤血球株を調製する場合、血液前駆細胞を、SCF (50 ng/ml) , EPO (3 U/ml) , Doxycycline (1  $\mu$ g/ml) 存在下で7日間培養した後に、セルソーターでCD71陽性CD235ab陽性細胞を単離した。単離されたCD71陽性CD235ab陽性細胞を、引き続きSCF (50 ng/ml) , EPO (3 U/ml) , Doxycycline (1  $\mu$ g/ml) 存在下で培養することにより、赤血球株を得た。

各マクロファージ細胞株の増殖曲線を図6に示す。細胞数はCX3CR1陽性細胞をカウントした。

[0153] 実施例2-2：マクロファージ株

実施例2-1で得た1383D10由来のマクロファージ株をCD13, CD14, CD33, CD43, HLA-DRで染色しFACSで解析した。抗体はCD13抗体、CD14抗体、CD33抗体、CD43抗体、HLA-DR抗体を使用した。結果を図7に示す。マクロファージのマーカであるCD13, CD14陽性細胞であることが確認された。

[0154] 実施例2-3：マクロファージ細胞表面マーカー

実施例2-1で得た各マクロファージ株をマクロファージのマーカであるCX3CR1でsortingした後、遺伝子発現時 (Dox on) と遺伝子発現抑制時 (Dox off) で、マクロファージ細胞表面マーカーをFACSで解析した。Dox onはSCF (50 ng/ml) 、M-CSF (20 ng/ml) 、IL1 $\beta$  (10 ng/ml) 、Doxycycline (1  $\mu$ g/ml) 存在下で培養し、Dox offはM-CSF (20 ng/ml) 存在下で3日間培養した (図16上部参照)。遺伝子発現時 (Dox on) の結果を図8下部に、遺伝子発現抑制時 (Dox off) の結果を図9に示す。Dox off時にはDox onと比べCD14, CD163, CD80が高発現した。しかし、CD11bの発現は低かった。

[0155] 実施例 2-4 : M1 型、M2 型

実施例 2-1 で得た各マクロファージ株が M1 型、M2 型どちらの型なのかを FACS で解析した。Dox off 細胞を M1 型のマーカーである CD32、M2 型のマーカーである Cd163 で染色したところ、どちらも陽性なため FACS では識別できなかった (図 10 参照)。

[0156] 実施例 2-5 : CD11b 陽性細胞

実施例 2-1 で得た各マクロファージ株の培養液からドキシサイクリンを除去し、Dox off 時に M-CSF の存在下マトリゲル上で培養した細胞株を CD11b で染色したところ、CD11b 陽性細胞が得られた。結果を図 11 に示す。培養環境の変化 (マトリゲル上での培養) でマクロファージマーカーである CD11b が発現することがわかった。

[0157] 実施例 2-6 : 貪食能

実施例 2-1 で得た各マクロファージ株の貪食能を調べた。各細胞の培養液からドキシサイクリンを除去し、Dox on, Dox off 後 1 日目、2 日目、3 日目の細胞株に蛍光標識した酵母細胞壁ペプチドを添加後 FACS で解析した。結果を図 12 に示す。Dox ON では貪食能が低かった。一方、off 時では 1 日目から貪食能が確認された。

[0158] 実施例 2-7 :  $\beta$ -amiloïd の貪食能

実施例 2-1 で得た各マクロファージ株の  $\beta$ -amiloïd の貪食能を調べた。各細胞の培養液からドキシサイクリンを除去し、Dox on, Dox off 後 5 日目の細胞株に蛍光標識したオリゴマー  $\beta$ -amiloïd を添加後 FACS で解析した。結果を図 13 に示す。Dox ON では貪食能が低かった。一方、Dox off 時では貪食能が確認された。

[0159] 実施例 2-8 : 赤血球株

実施例 2-1 において、khes3 (ES 細胞)、1383D10 (iPS 細胞) 由来血液前駆細胞を SCF (50 ng/ml), EPO (3 U/ml), Dox (1  $\mu$ g/ml) の条件下で培養することで、取得した不死化の赤血球株について、細胞数を Gly-A 陽性細胞でカウントした (図 14



参照)。

[0160] 実施例3-1: PiggyBac System

実施例2-1と同様に、ES細胞5株、iPS細胞5株を用いて血球分化7日目に、図15に示す各条件で培養することでマクロファージ株、樹状細胞株、赤血球株の各細胞株を得た。

より具体的には、マクロファージ株を調製する場合、造血内皮細胞を、SCF (50 ng/ml)、M-CSF (20 ng/ml)、IL1 $\beta$  (10 ng/ml)、Doxycycline (1  $\mu$ g/ml) 存在下で7日間培養した後に、セルソーターでCX3CR1陽性CD14陽性細胞を単離した。単離されたCX3CR1陽性CD14陽性細胞を、引き続きSCF (50 ng/ml)、M-CSF (20 ng/ml)、IL1 $\beta$  (10 ng/ml)、Doxycycline (1  $\mu$ g/ml) 存在下で培養することによりマクロファージ株を得た。

樹状細胞株を調製する場合、造血内皮細胞を、SCF (50 ng/ml)、M-CSF (20 ng/ml)、GM-CSF (20  $\mu$ g/ml)、Doxycycline (1  $\mu$ g/ml) 存在下で7日間培養した後に、セルソーターでCD209陽性細胞を単離した。単離されたCD209陽性細胞を、引き続きSCF (50 ng/ml)、M-CSF (20 ng/ml)、GM-CSF (20  $\mu$ g/ml)、Doxycycline (1  $\mu$ g/ml) 存在下で培養することにより樹状細胞株を得た。

赤血球株を調製する場合、造血内皮細胞を、SCF (50 ng/ml)、EPO (3 U/ml)、Doxycycline (1  $\mu$ g/ml) 存在下で7日間培養した後に、セルソーターでCD71陽性CD235ab陽性細胞を単離した。単離されたCD71陽性CD235ab陽性細胞を、引き続きSCF (50 ng/ml)、EPO (3 U/ml)、Doxycycline (1  $\mu$ g/ml) 存在下で培養することにより、赤血球株を得た。

SCF (50 ng/ml)、M-CSF (20  $\mu$ g/ml)、IL1 $\beta$  (10 ng/ml)、Dox (1  $\mu$ g/ml) の条件下で培養することで、取

得した増殖能を有する各マクロファージ細胞株の増殖曲線を図16に示す。細胞数はCX3CR1陽性細胞をカウントした。

SCF (50 ng/ml), M-CSF (20 μg/ml), GM-CSF (20 μg/ml), Dox (1 μg/ml) の条件下で培養することで、取得した増殖能を有する各樹状細胞株の増殖曲線を図17に示す。細胞数はCD209陽性細胞をカウントした。

[0161] 実施例3-2: マクロファージ細胞表面マーカー

実施例3-1で得た各マクロファージ株をマクロファージのマーカーであるCX3CR1でsortingした後、遺伝子発現時 (Dox on) と遺伝子発現抑制時 (Dox off) で、マクロファージ細胞表面マーカーをFACSで解析した。Dox onはSCF (50 ng/ml)、M-CSF (20 ng/ml)、IL1β (10 ng/ml)、Doxycycline (1 μg/ml) 存在下で培養し、Dox offはM-CSF (20 ng/ml) 存在下で3日間培養した (図18上部参照)。遺伝子発現時 (Dox on) の結果を図18下部に、遺伝子発現抑制時 (Dox off) の結果を図19に示す。Dox off時にはDox onと比べCD14, CD163, CD80が高発現した。しかし、CD11bの発現は低かった。

[0162] 実施例3-3: β-amiloïdの貪食能

実施例3-1で得た各マクロファージ株のβ-amiloïdの貪食能を調べた。各細胞の培養液からドキシサイクリンを除去し、Dox on, Dox off後3日目の細胞株に蛍光標識したオリゴマーβ-amiloïdを添加後FACSで解析した。結果を図20に示す。Dox ONでは貪食能が低かった。一方、Dox off時では貪食能が確認された。

[0163] 実施例3-4: 樹状細胞表面マーカー

実施例3-1で得た各樹状細胞株を樹状細胞のマーカーであるCD209でsortingした後、遺伝子発現時 (Dox on) と遺伝子発現抑制時 (Dox off) で、樹状細胞表面マーカーをFACSで解析した。D

ox onはSCF (50 ng/ml)、M-CSF (20 ng/ml)、GM-CSF (20 ng/ml)、Doxycycline (1 μg/ml)存在下で培養し、Dox offはGM-CSF (20 ng/ml)存在下で5日間培養した(図20上部参照)。遺伝子発現時(Dox on)の結果と、遺伝子発現抑制時(Dox off)の結果とをそれぞれ図21~23に示す。Dox off時にはDox onと比べCD11c, CD209, CD80が高発現した。また、一部の細胞でDox off時に細菌の脂質分子をT細胞に抗原提示する受容体であるCD1a, CD1cが発現した。

[0164] 実施例3-5：赤血球株

実施例3-1において、khES3 (ES細胞)、kthES14 (ES細胞)由来血液前駆細胞をSCF (50 ng/ml)、EPO (3 U/ml)、Dox (1 μg/ml)の条件下で培養することで、取得した増殖能を有する赤血球株について、細胞数をGly-A陽性細胞でカウントした(図24参照)。

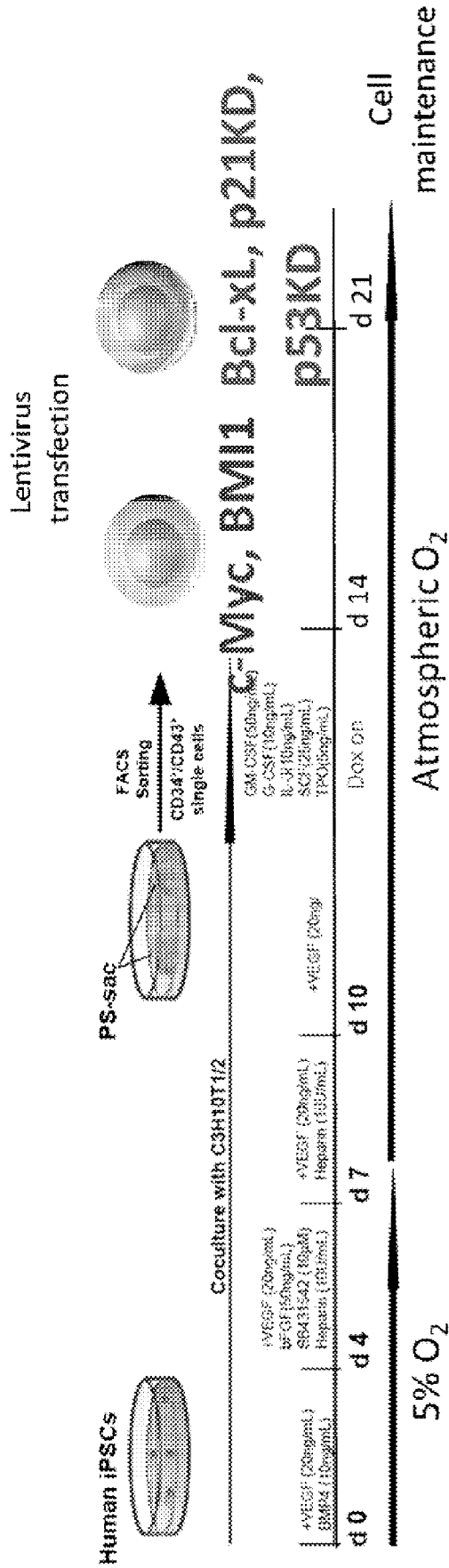
## 請求の範囲

- [請求項1] 造血前駆細胞から骨髓球系前駆細胞への分化過程における任意の細胞において、MYCファミリー遺伝子及びBMI1遺伝子を強制発現させる工程を含み、  
骨髓球系前駆細胞が、マクロファージ、樹状細胞、顆粒球、赤芽球、又は赤血球の前駆細胞である、骨髓系共通前駆細胞（CMP）又は骨髓球系前駆細胞の増殖性を向上させる方法。
- [請求項2] CMP又は骨髓球系前駆細胞を抽出する工程をさらに含む、請求項1に記載の方法。
- [請求項3] CMP又は骨髓球系前駆細胞において、MYCファミリー遺伝子及びBMI1遺伝子の発現、又はその発現産物の機能を抑制する工程をさらに含む、請求項1又は2に記載の方法。
- [請求項4] CMP又は骨髓球系前駆細胞において、BCL-XL遺伝子を強制発現させる工程をさらに含む、請求項1～3のいずれか一項に記載の方法。
- [請求項5] CMP又は骨髓球系前駆細胞において、BCL-XL遺伝子の発現、又はその発現産物の機能を抑制する工程をさらに含む、請求項4に記載の方法。
- [請求項6] CMP又は骨髓球系前駆細胞において、CDKN1A遺伝子及びp53遺伝子の少なくともいずれかの発現、又はその発現産物の機能を抑制する工程をさらに含む、請求項1～5のいずれか一項に記載の方法。
- [請求項7] 請求項1～6のいずれか一項に記載の方法で得られたCMP又は骨髓球系前駆細胞を培養する工程を含む、CMP又は骨髓球系前駆細胞を製造する方法。
- [請求項8] 請求項1～7のいずれか一項に記載の方法で得られたCMP又は骨髓球系前駆細胞を分化する工程を含む、CMP系分化細胞を製造する方法。

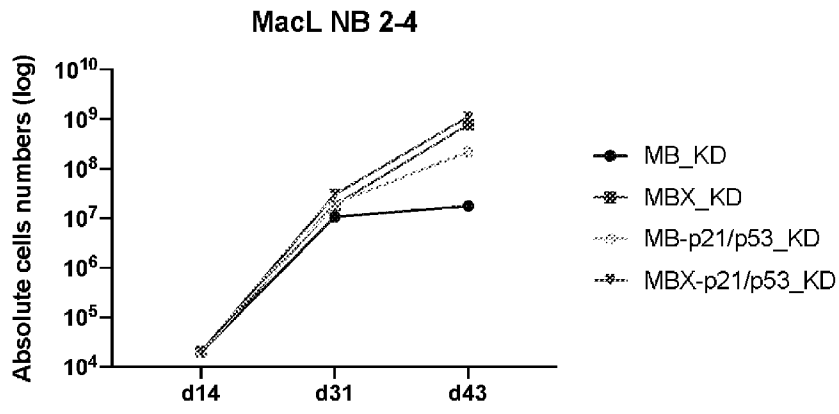
- [請求項9] CMP系分化細胞が、マクロファージ、樹状細胞、顆粒球、赤芽球、又は赤血球である、請求項8に記載の方法。
- [請求項10] 請求項1～7のいずれか一項に記載の方法で得られたCMP若しくは骨髓球系前駆細胞、又は請求項8若しくは9に記載の方法で得られたCMP系分化細胞を含む、医薬組成物。
- [請求項11] 請求項1～7のいずれか一項に記載の方法で得られたCMP又は骨髓球系前駆細胞。
- [請求項12] 請求項8又は9に記載の方法で得られたCMP系分化細胞。
- [請求項13] CMP又は骨髓球系前駆細胞の増殖促進剤であって、MYCファミリー遺伝子及びBMI1遺伝子を強制発現させる分子を有効成分として含み、  
骨髓球系前駆細胞が、マクロファージ、樹状細胞、顆粒球、赤芽球、又は赤血球の前駆細胞である、増殖促進剤。
- [請求項14] 以下の工程を含む、マクロファージを製造する方法：  
1) 造血前駆細胞からマクロファージ前駆細胞への分化過程における任意の細胞において、MYCファミリー遺伝子及びBMI1遺伝子を強制発現させる工程、  
2) 工程1で得られた細胞を培養し、増殖させる工程、  
3) 工程2で得られた細胞におけるMYCファミリー遺伝子及びBMI1遺伝子の強制発現を抑制し、マクロファージ分化条件下で更に培養することにより、マクロファージへの分化及び成熟を促進する工程。
- [請求項15] 工程1が、造血前駆細胞からマクロファージ前駆細胞への分化過程における任意の細胞において、BCL-XL遺伝子を強制発現させることを更に含む、請求項14記載の方法。
- [請求項16] 工程3が、工程2で得られた細胞におけるBCL-XL遺伝子の強制発現を抑制することを更に含む、請求項15記載の方法。
- [請求項17] 工程1が、造血前駆細胞からマクロファージ前駆細胞への分化過程

における任意の細胞において、CDKN1A遺伝子及び／又はp53  
遺伝子の発現、又はその発現産物の機能を抑制することを更に含む、  
請求項14～16のいずれか一項に記載の方法。

[ 1 ]

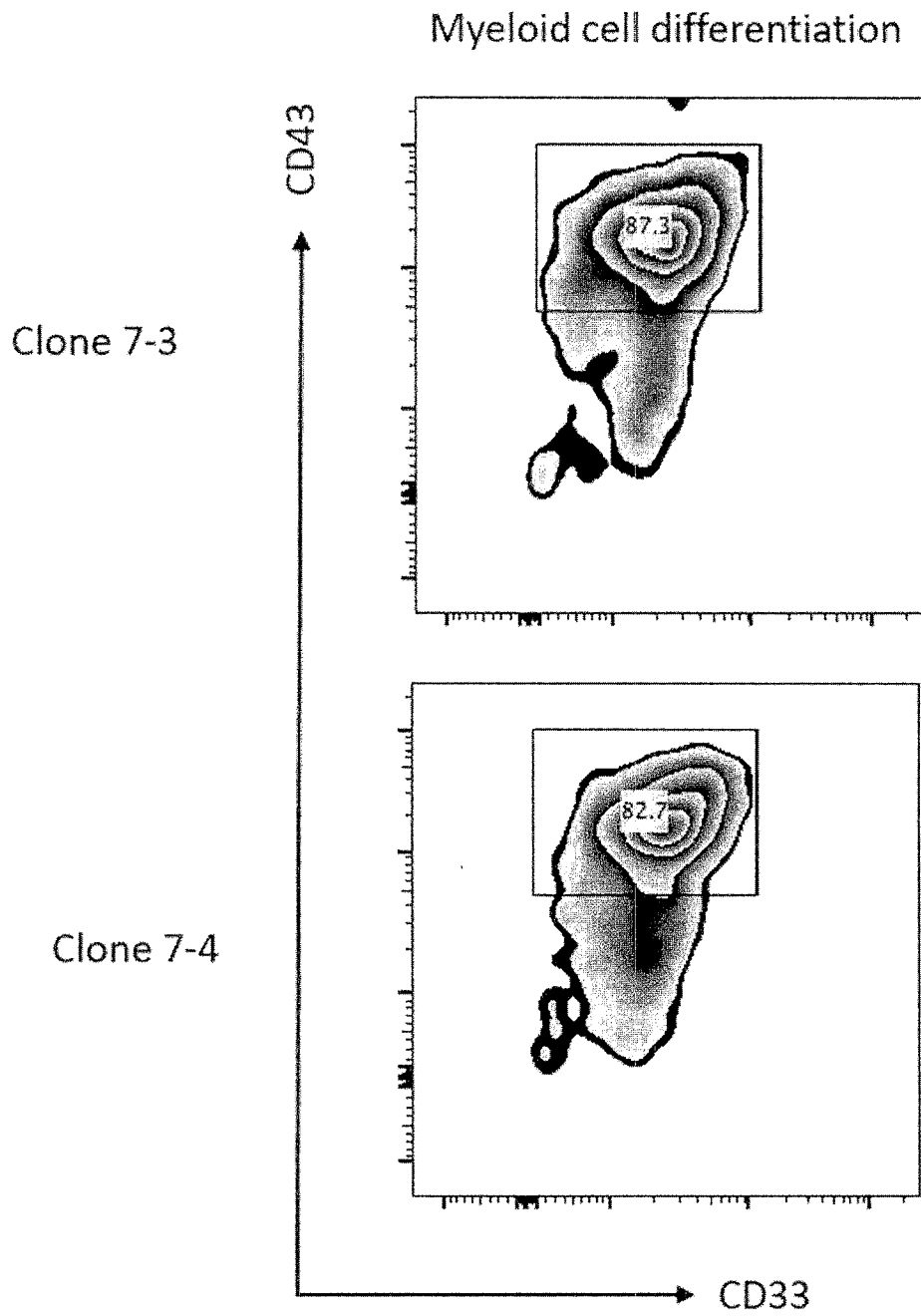


[Figure 2]



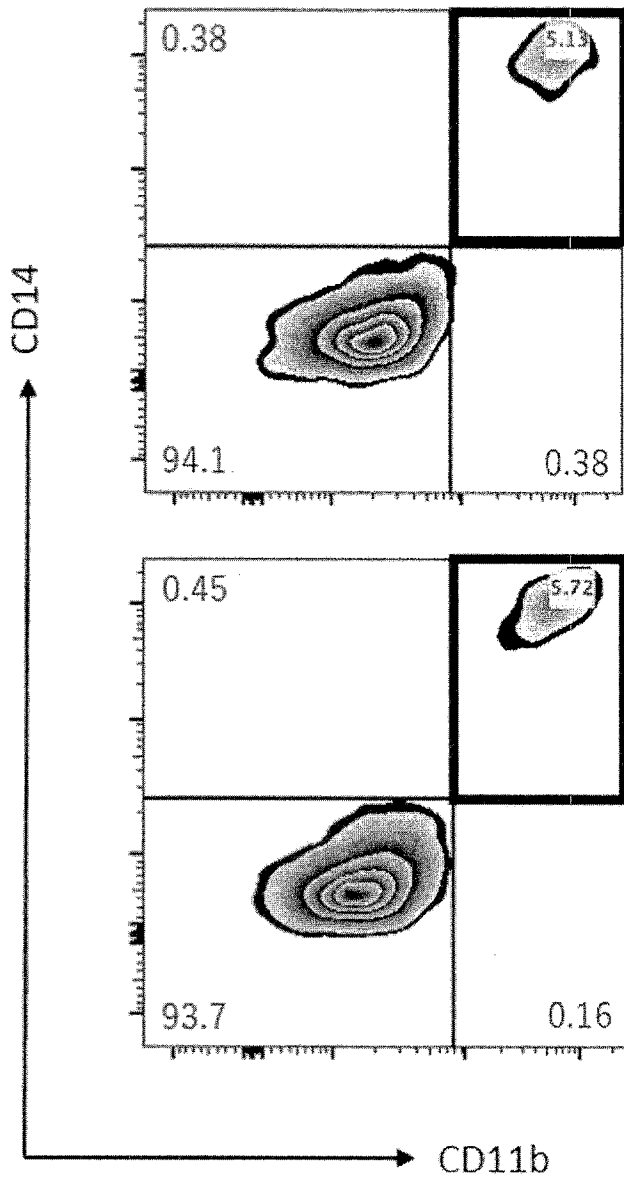


[図 3]



[図 3]の続き

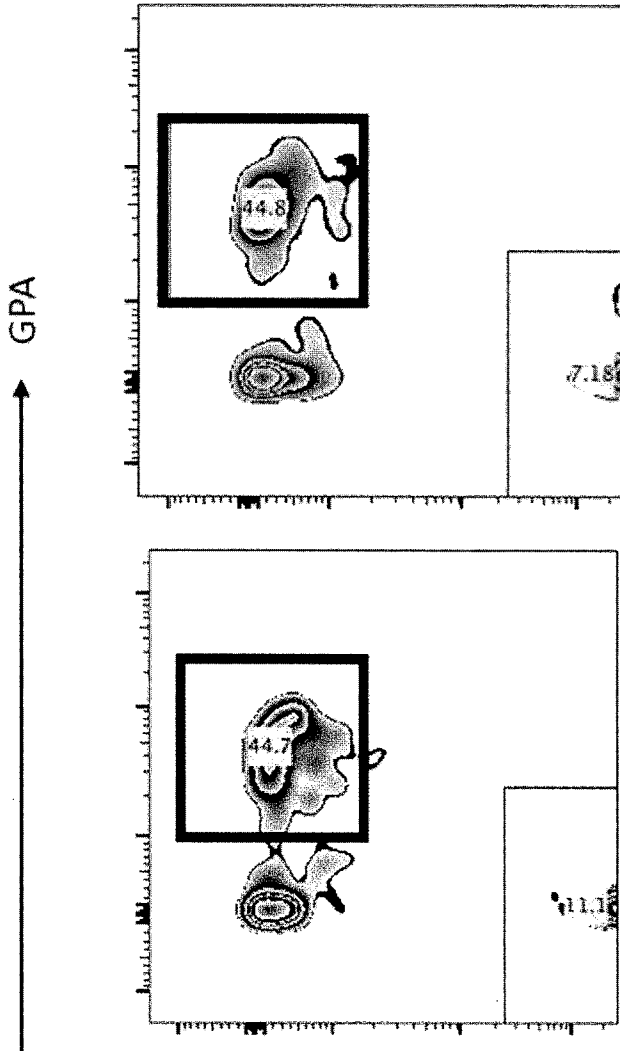
骨髓球系分化細胞



[図 3]の続き

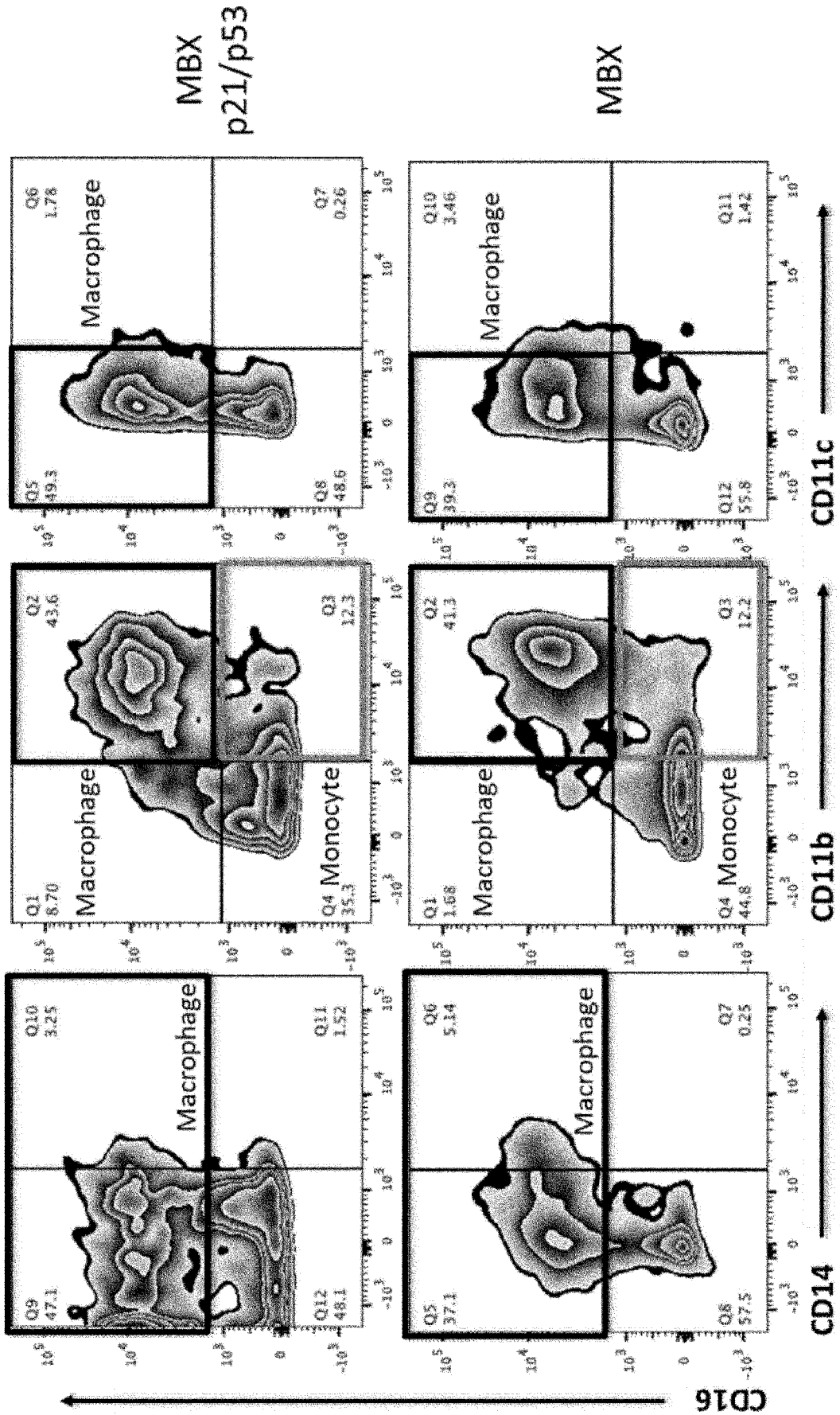
### Erythroid cell differentiation

赤芽球細胞

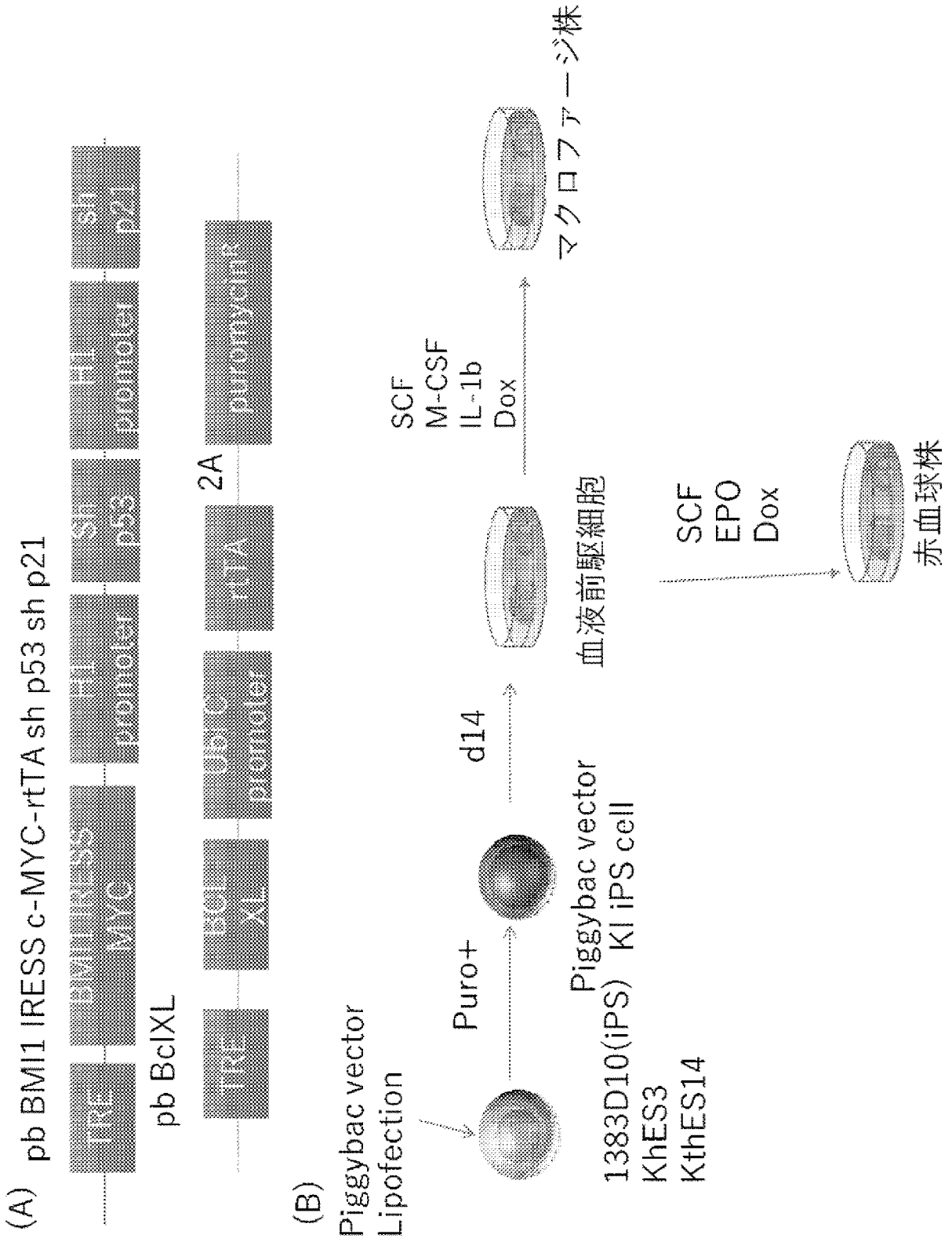


[4]

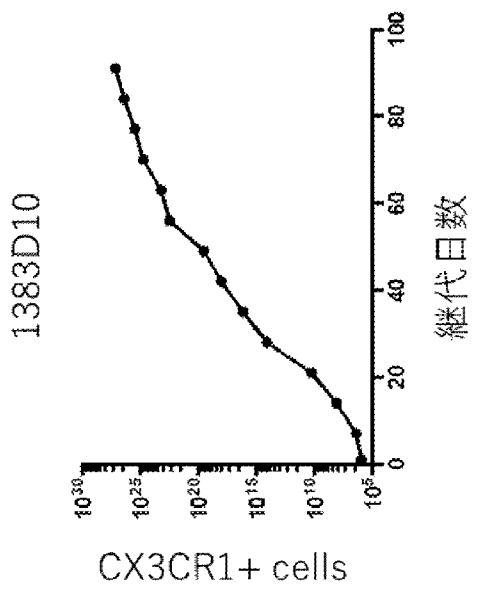
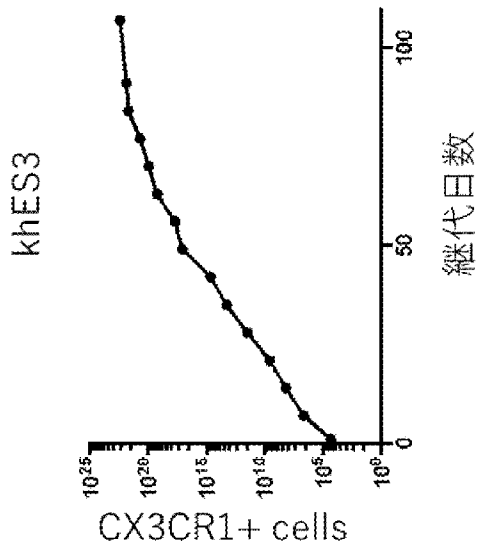
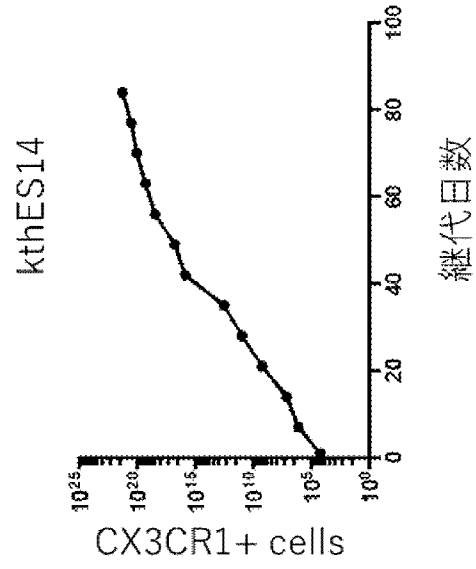
Clone: WB 3-1



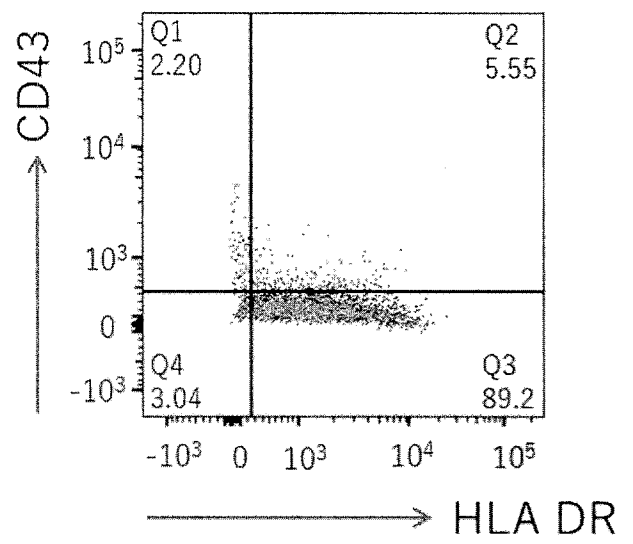
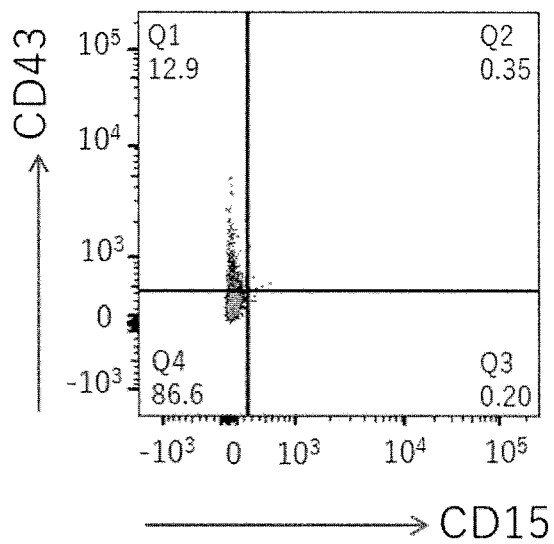
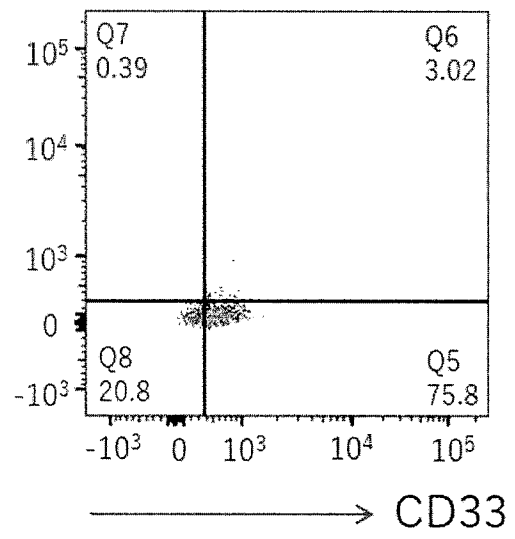
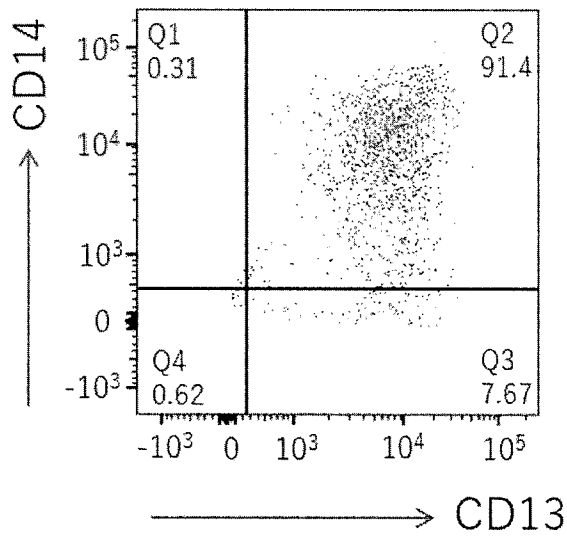
[図5]



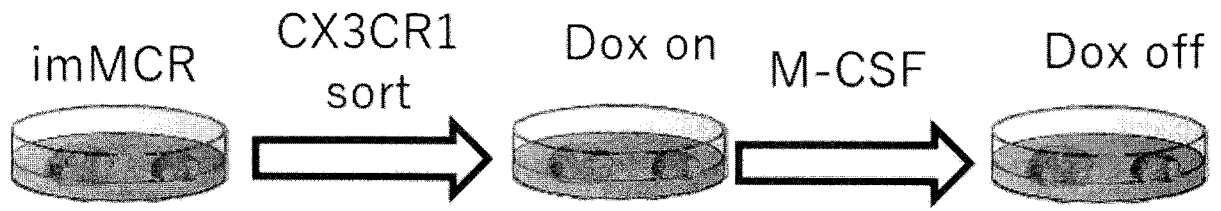
[図6]



[図 7]

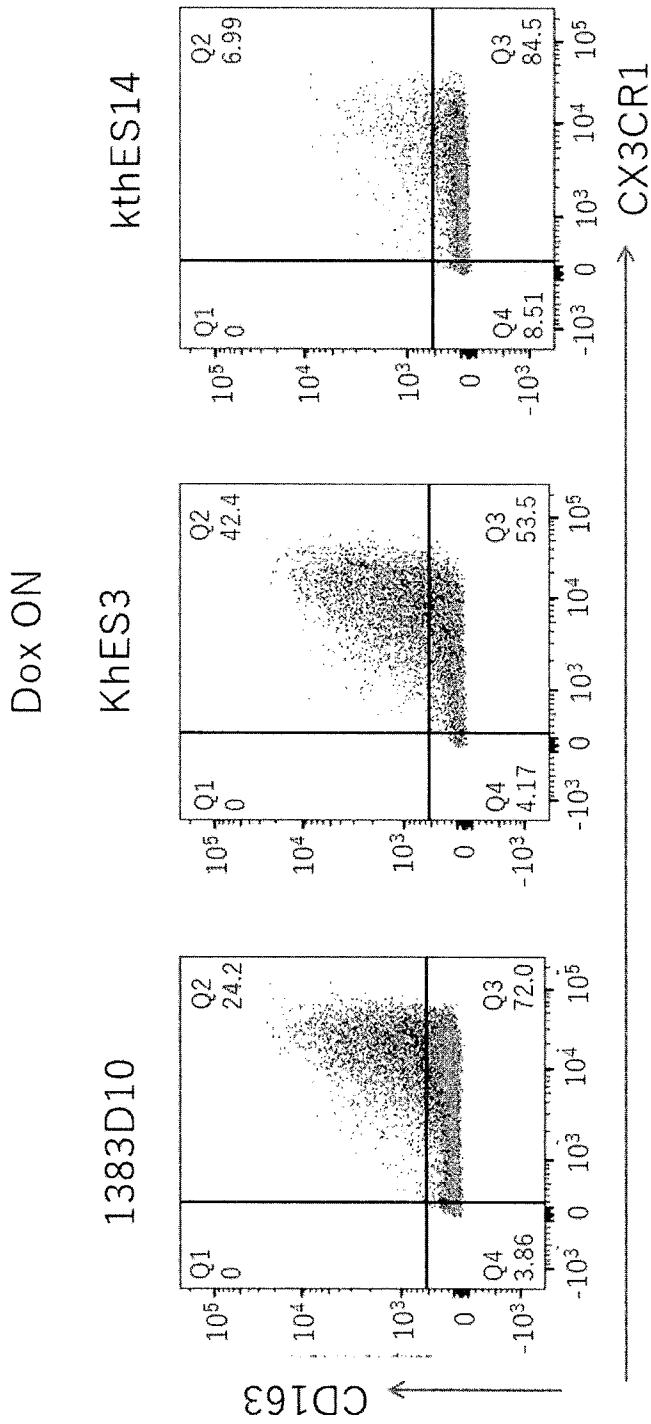


[図 8]

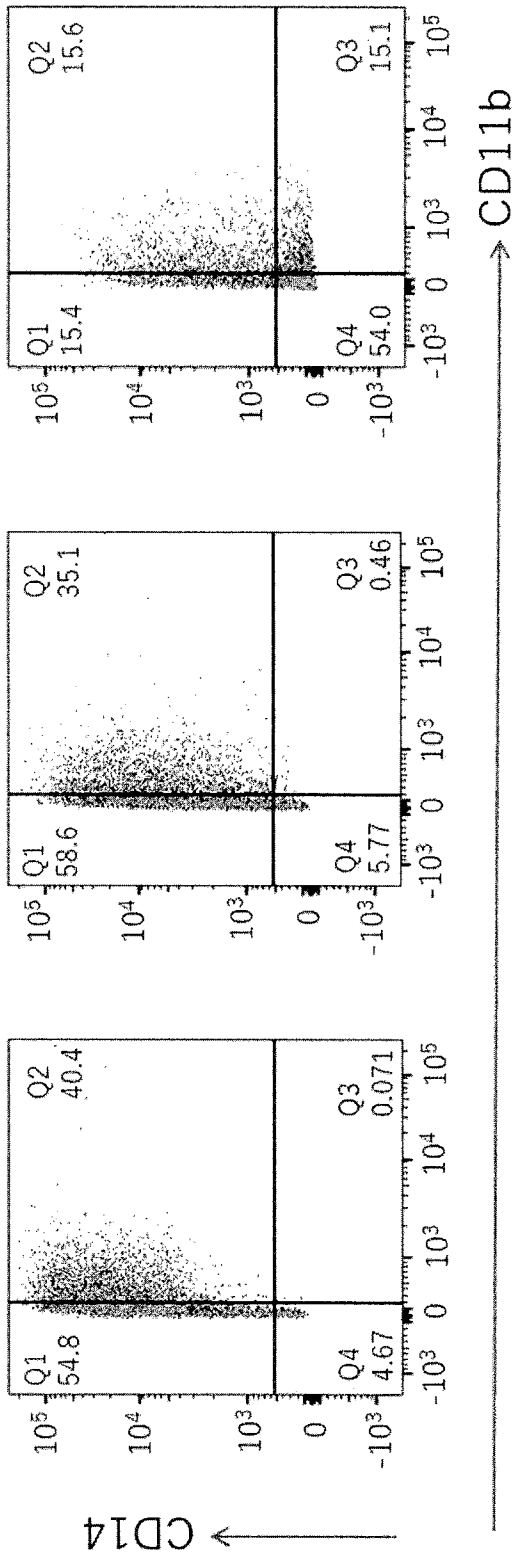




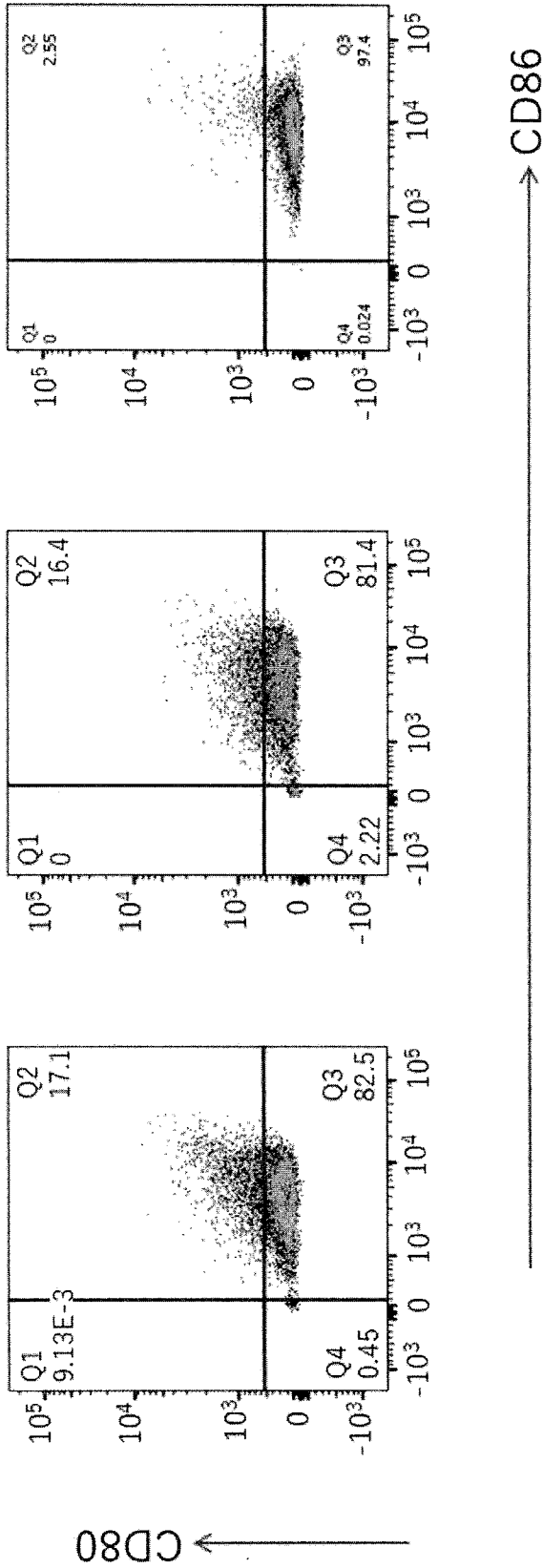
[図 8]の続き



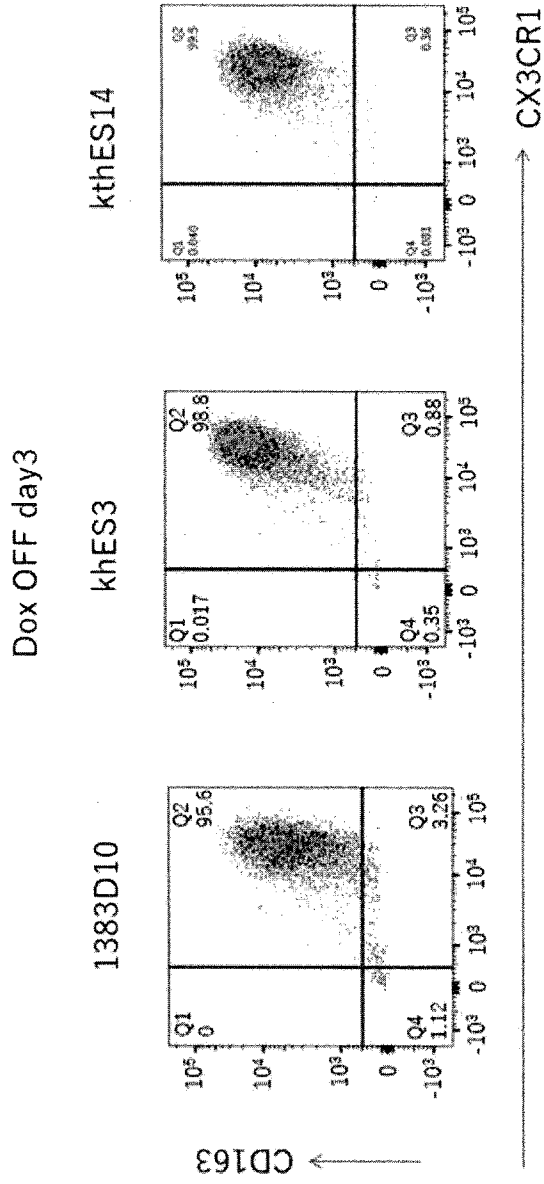
[図 8]の続き



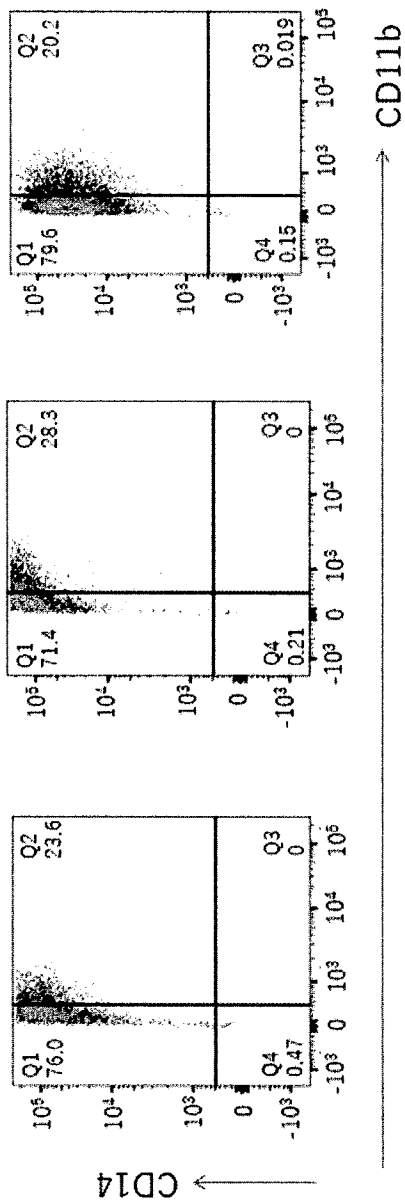
[図 8]の続き



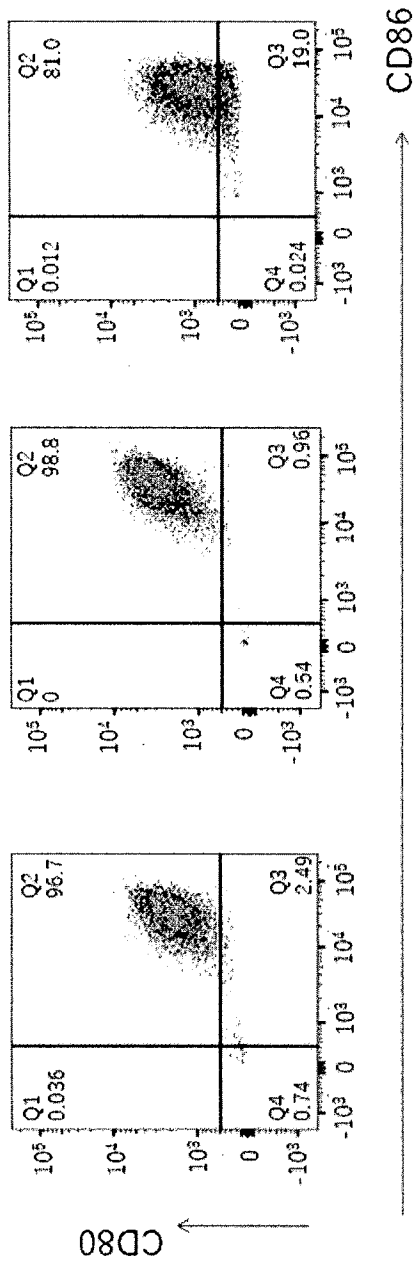
[図 9]



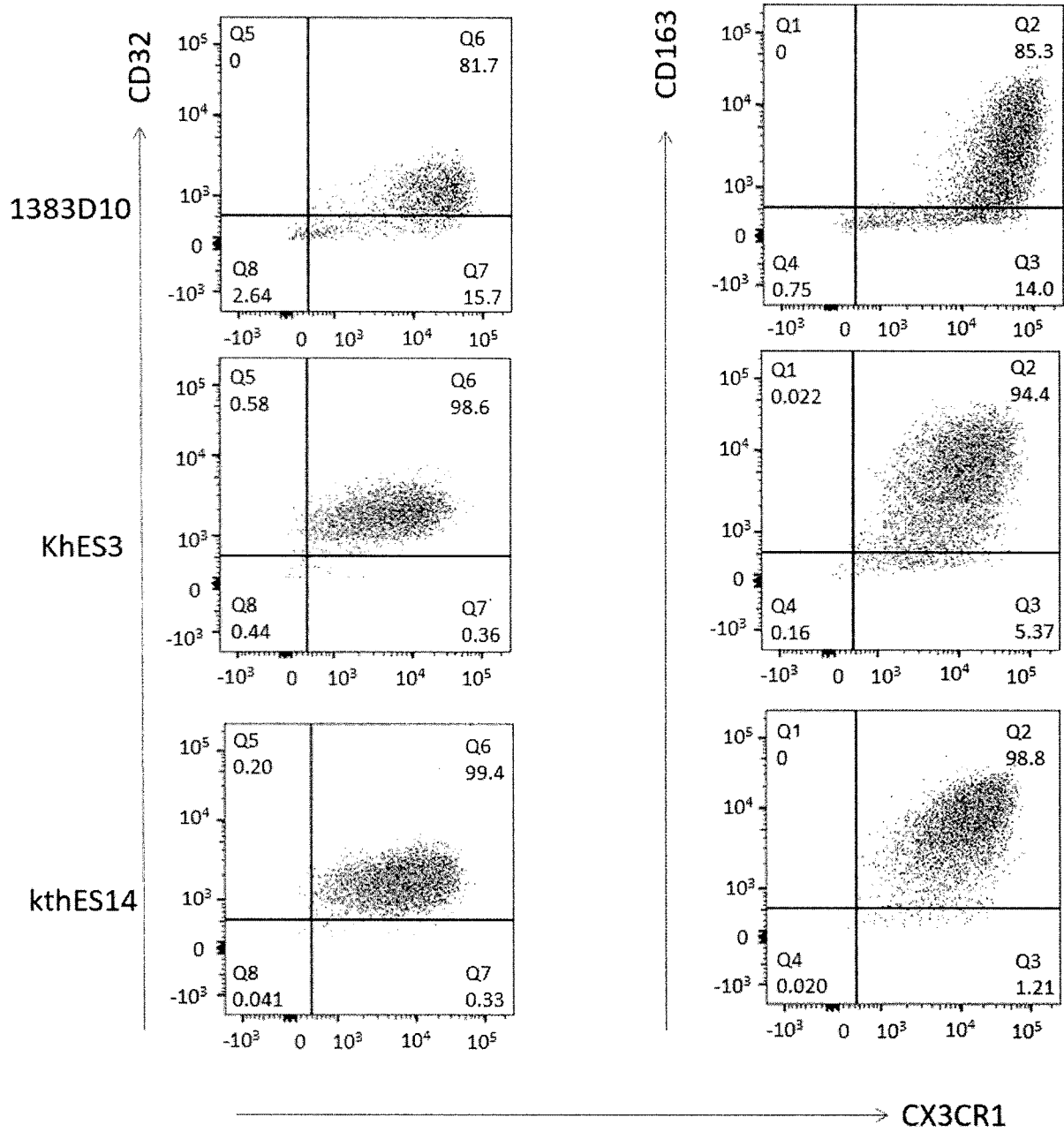
[図 9]の続き



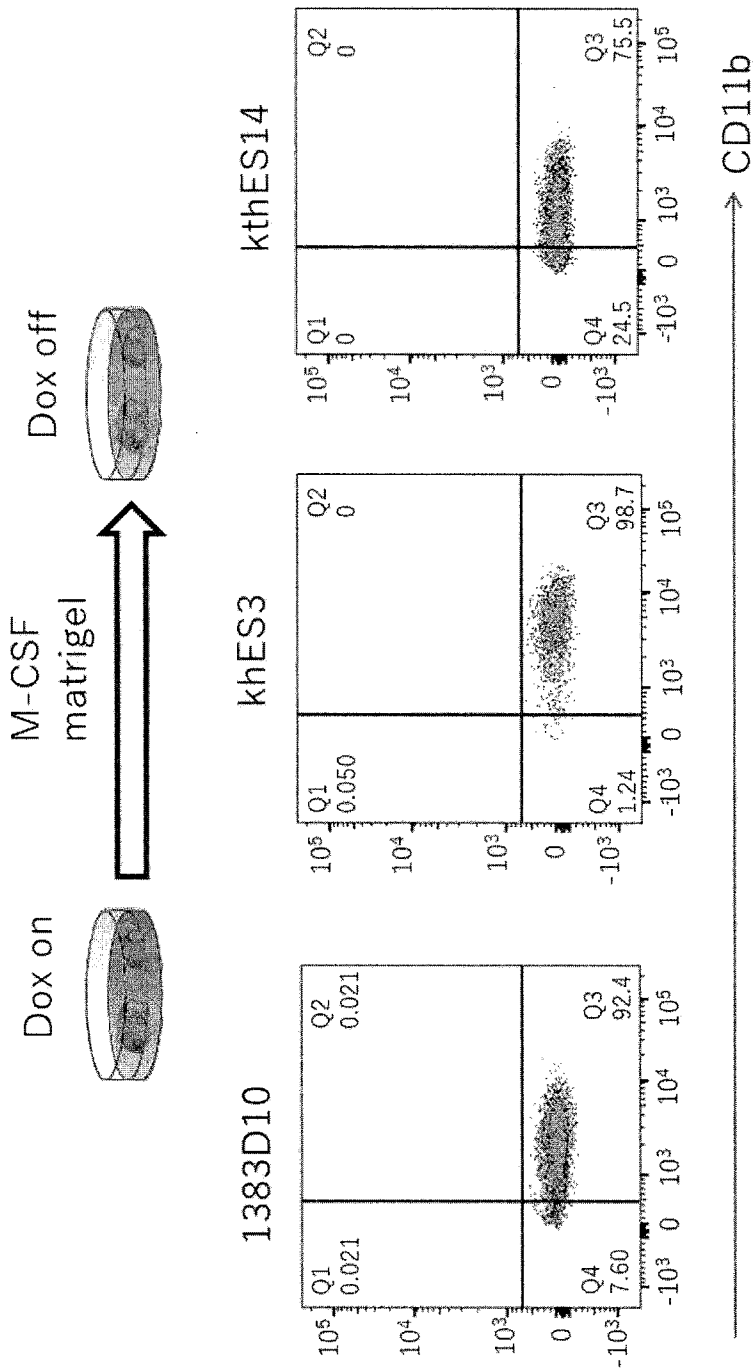
[図 9]の続き



[図 10]

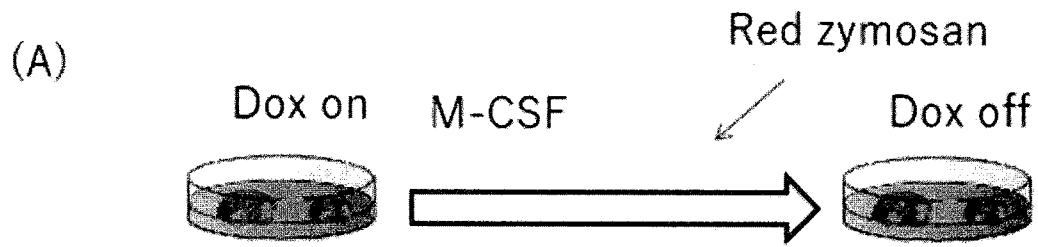


[ 11 ]

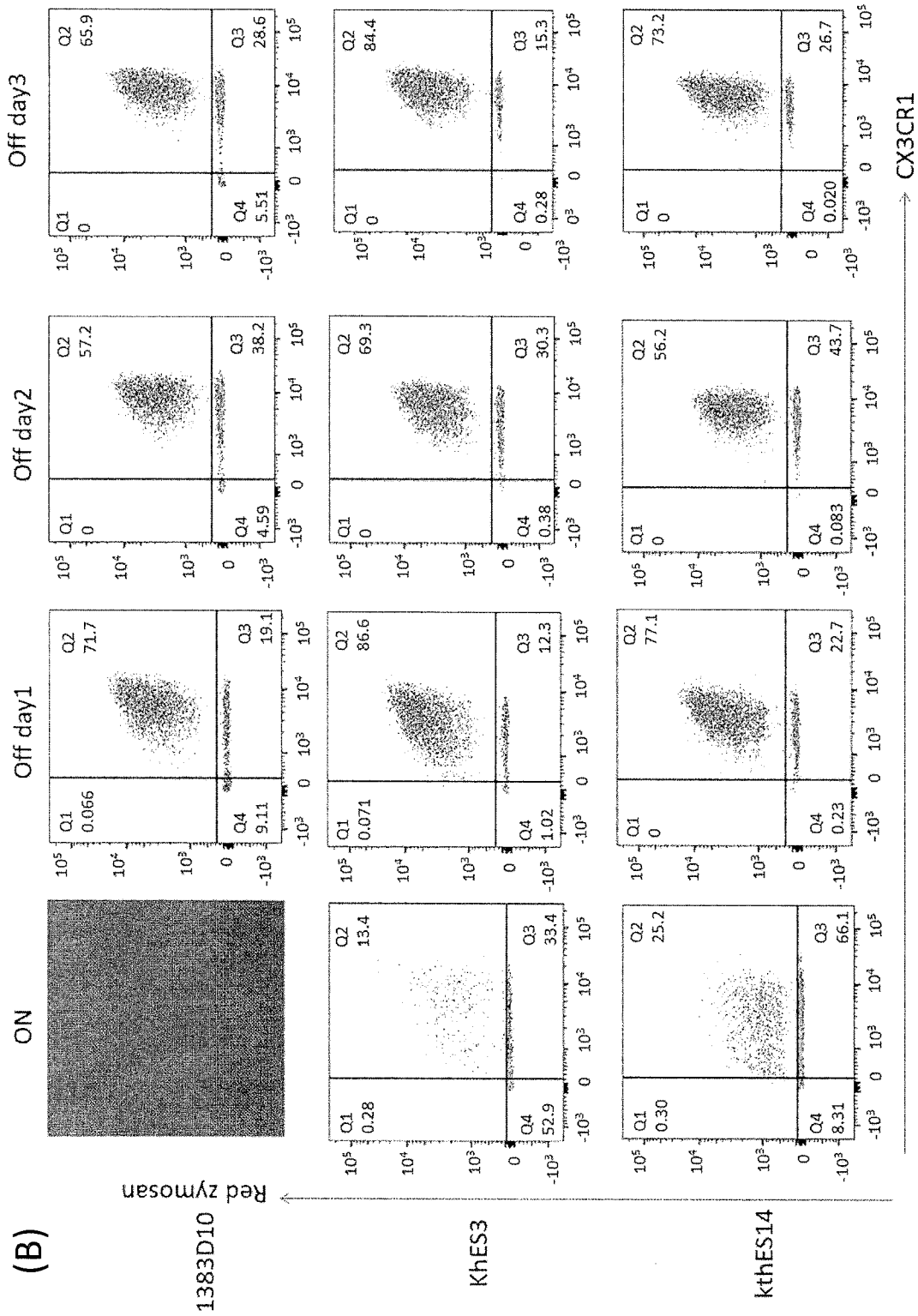




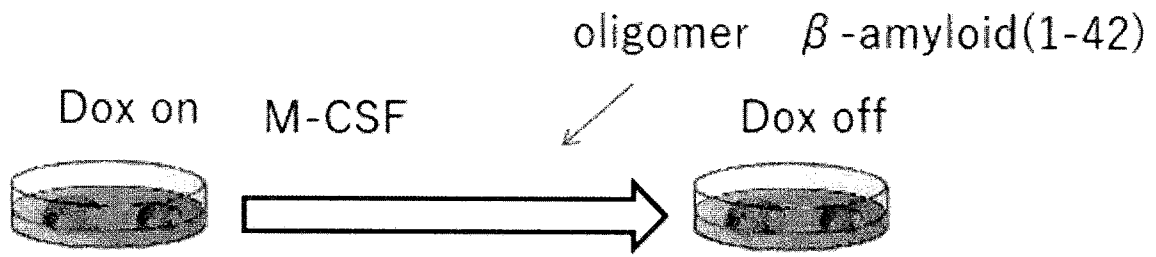
[図 12]



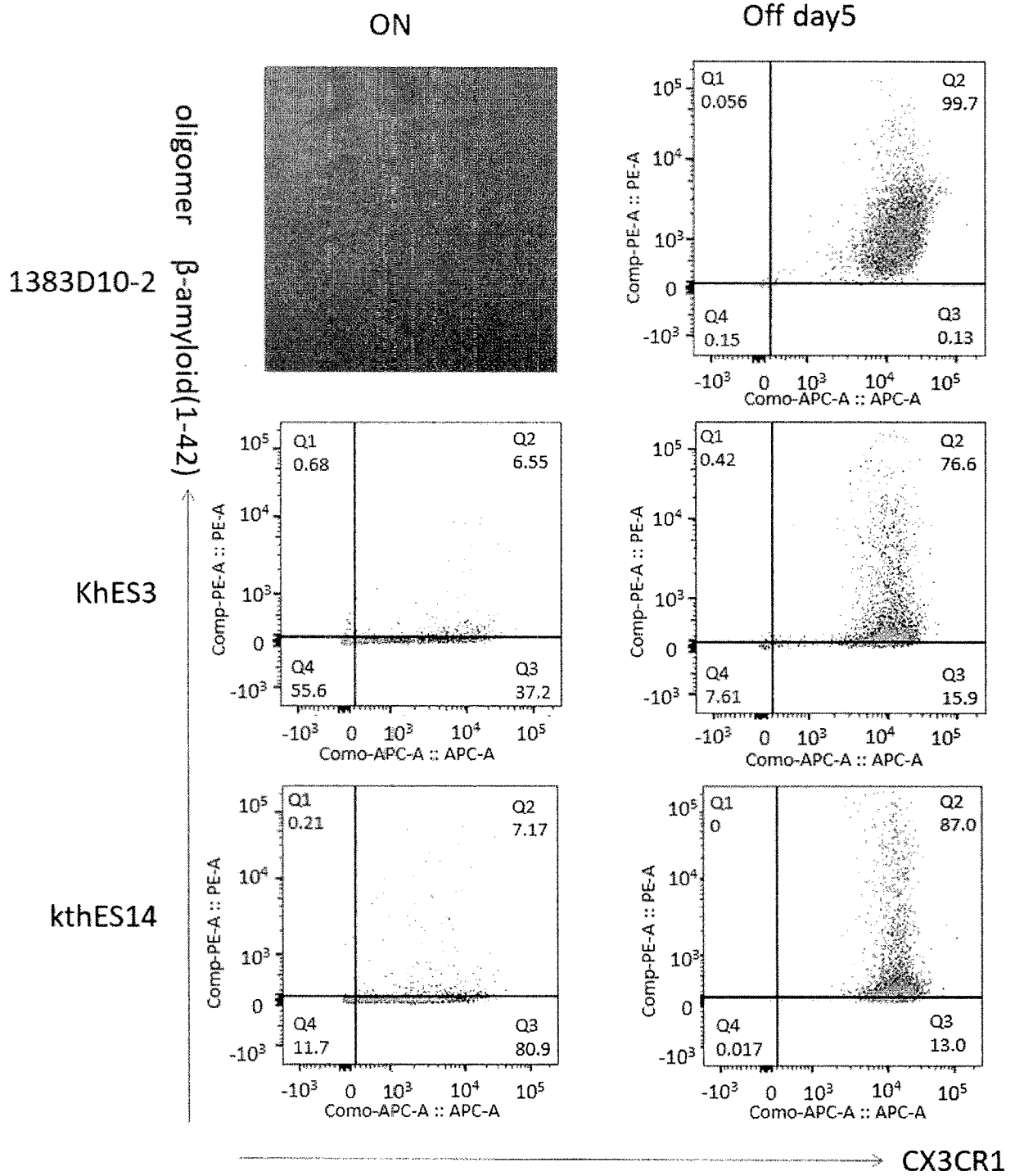
[図 12]の続き



[図 13]

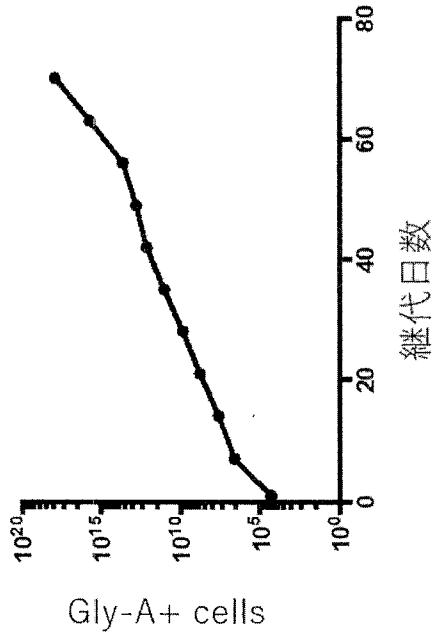
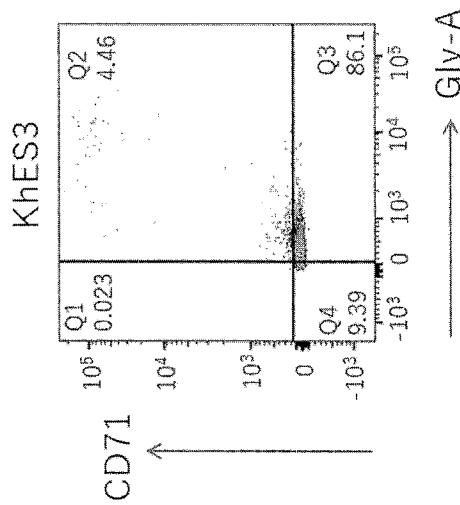
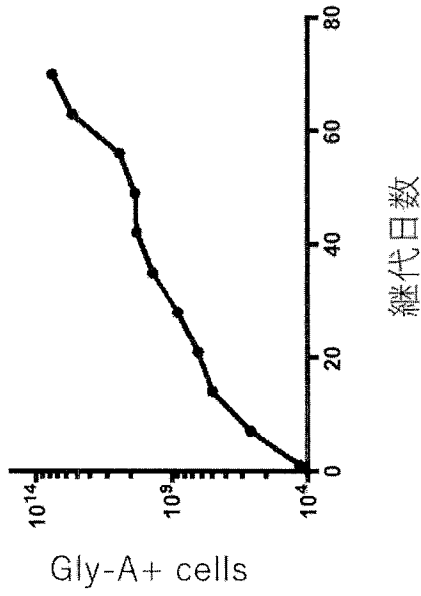
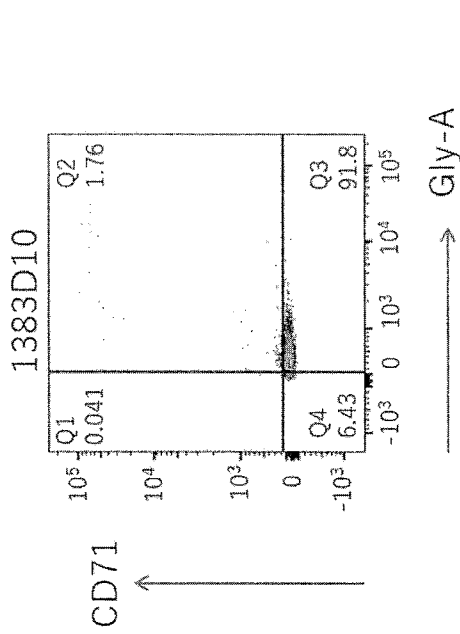


[図 13]の続き

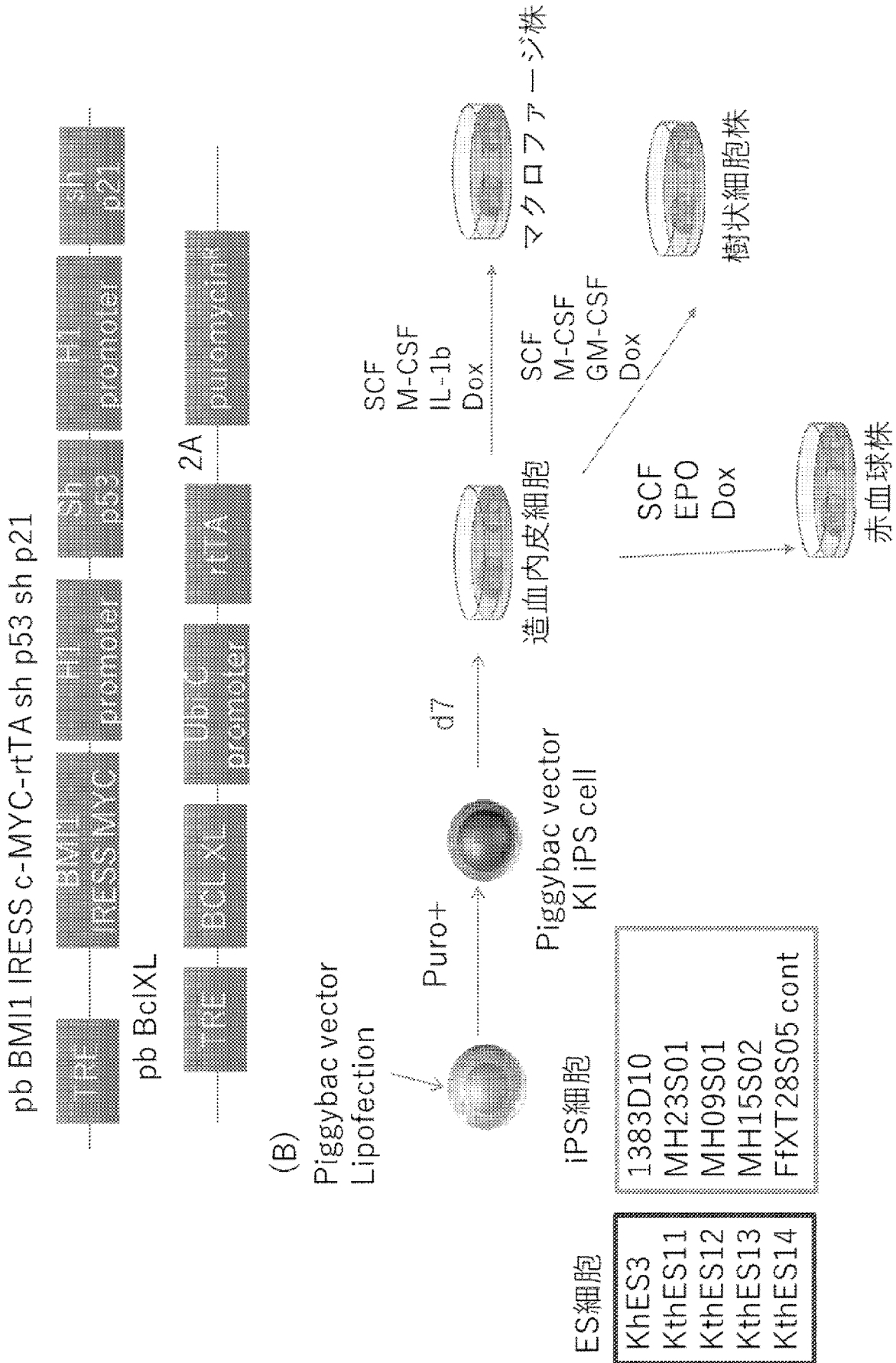


[図 14]

赤血球株

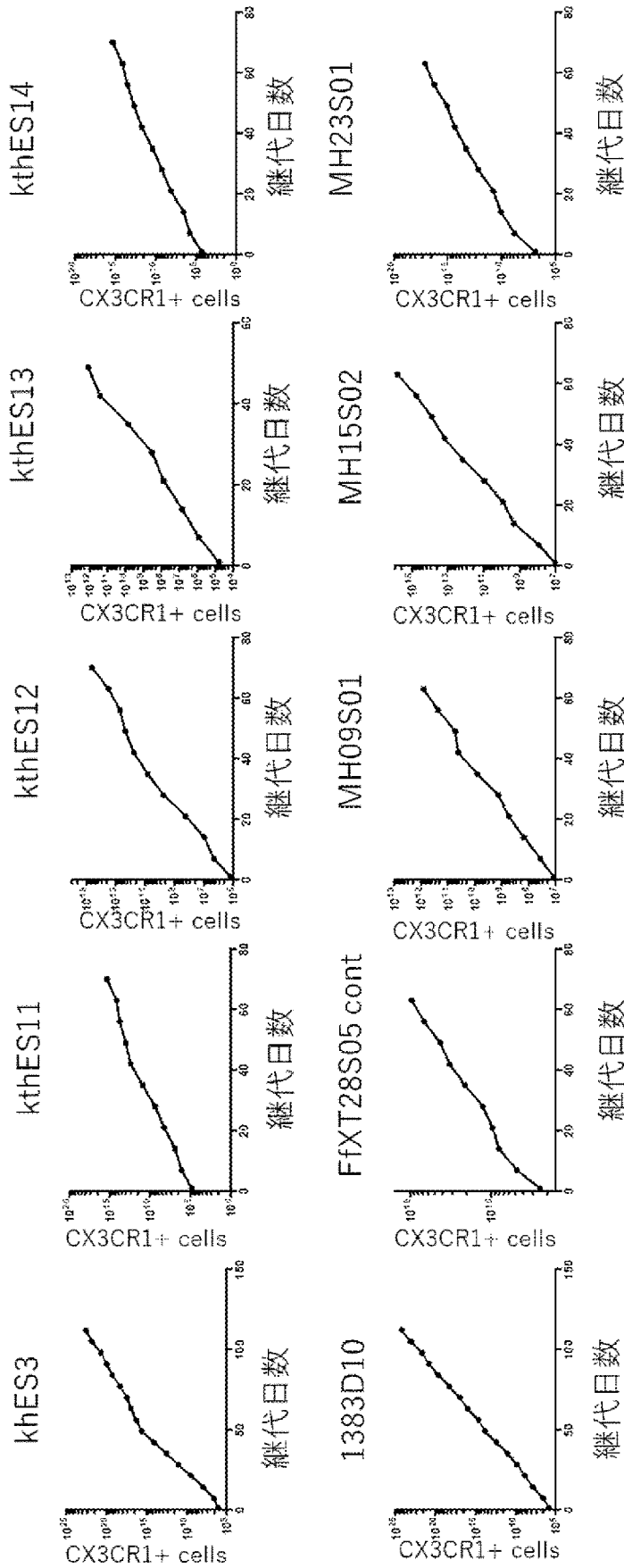


[図15]



[図16]

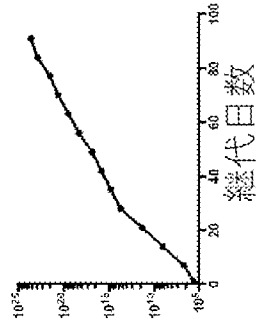
マクロファージ株



[図17]

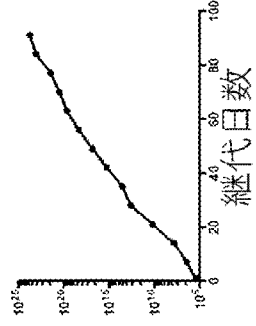
樹状細胞株

kthES14



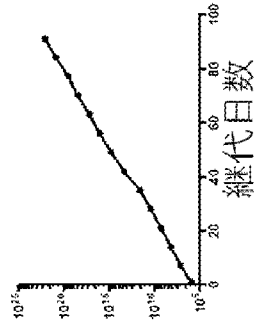
MH23S01

kthES13



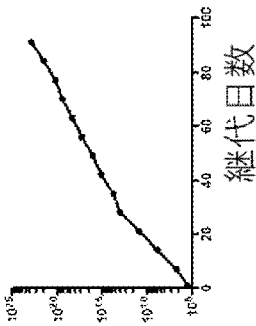
MH15S02

kthES12



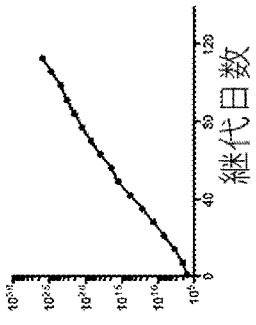
MH09S01

kthES11



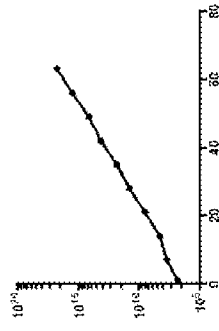
FfXT28S05 cont

khES3

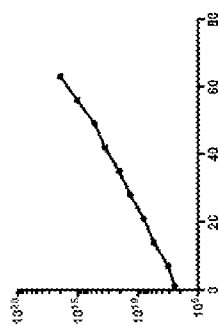


1383D10

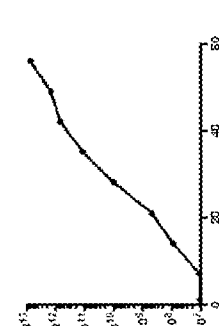
継代日数



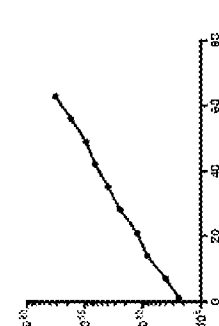
継代日数



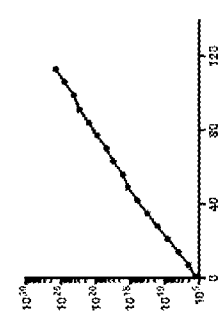
継代日数



継代日数

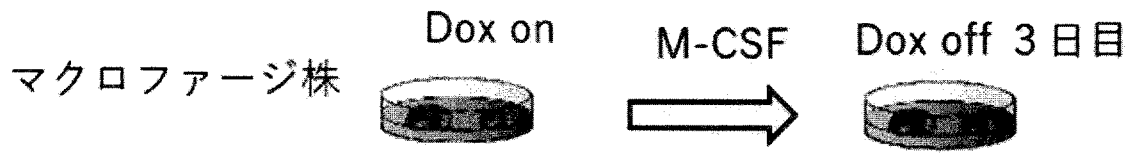


継代日数

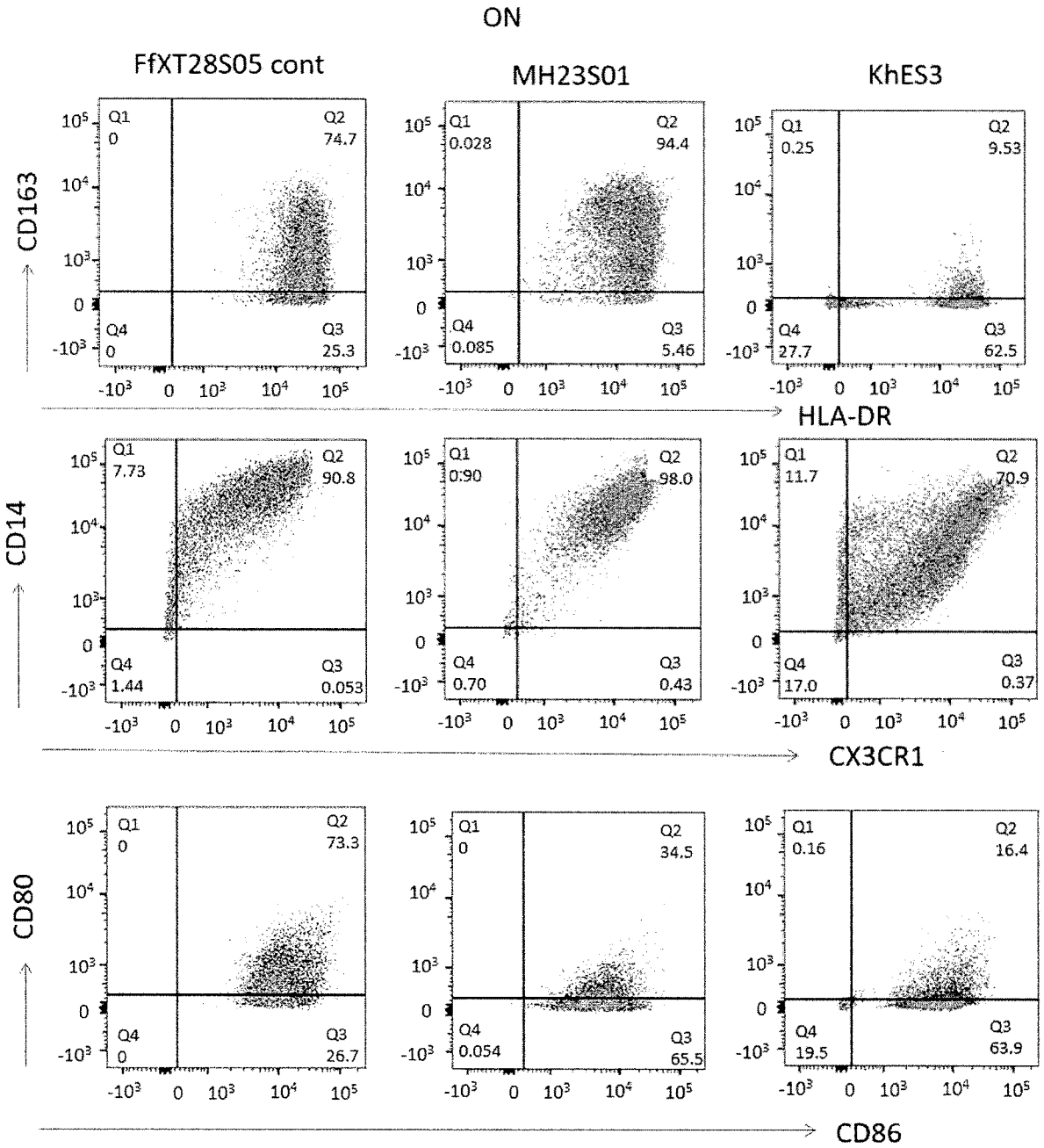




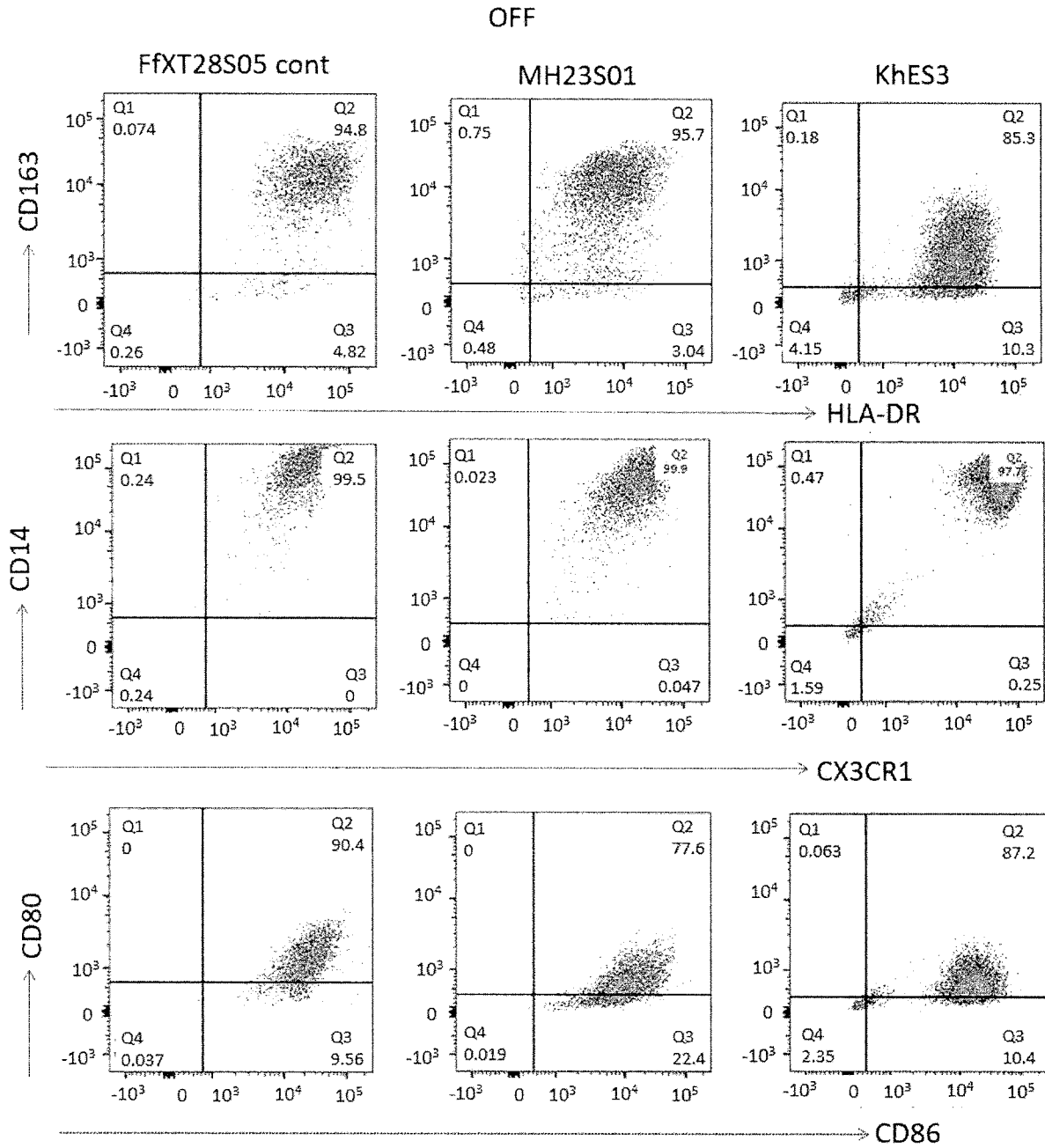
[図 18]



[図 18]の続き



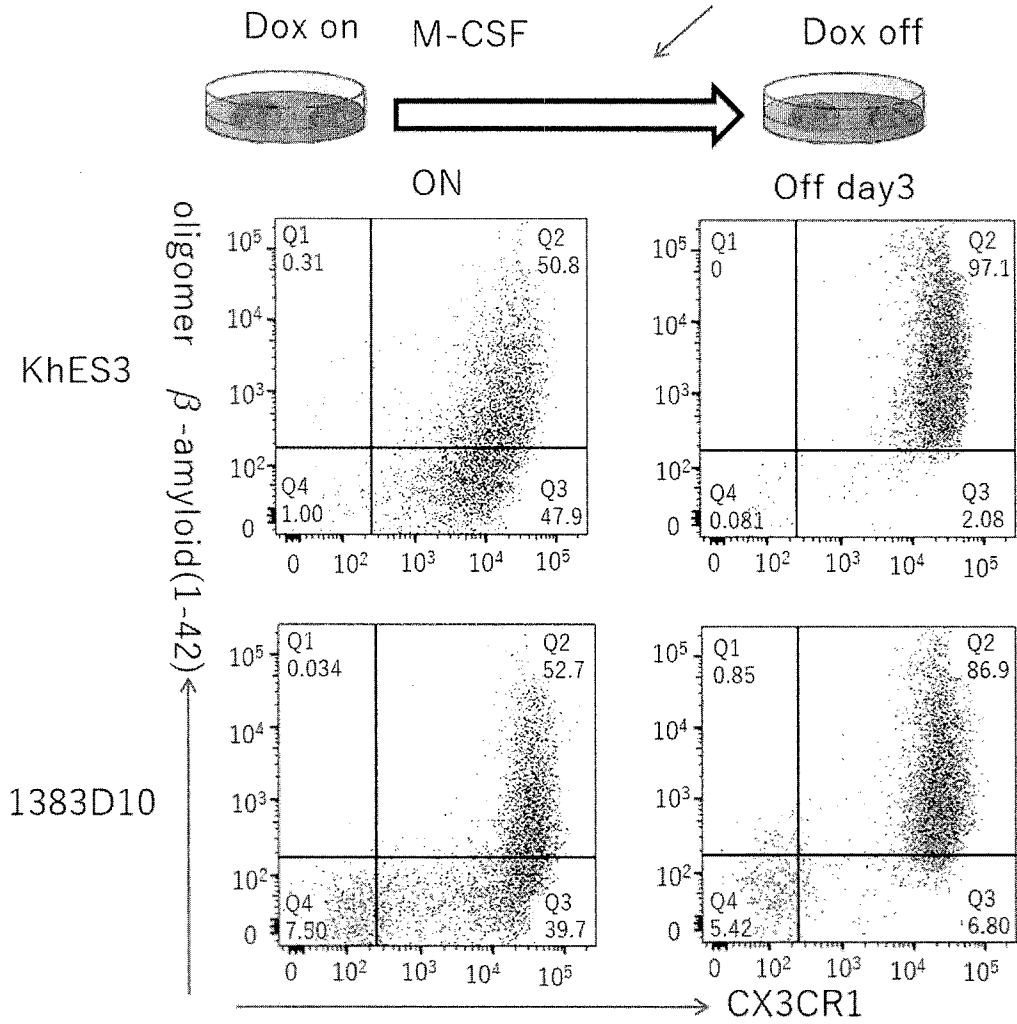
[図 19]



[図 20]

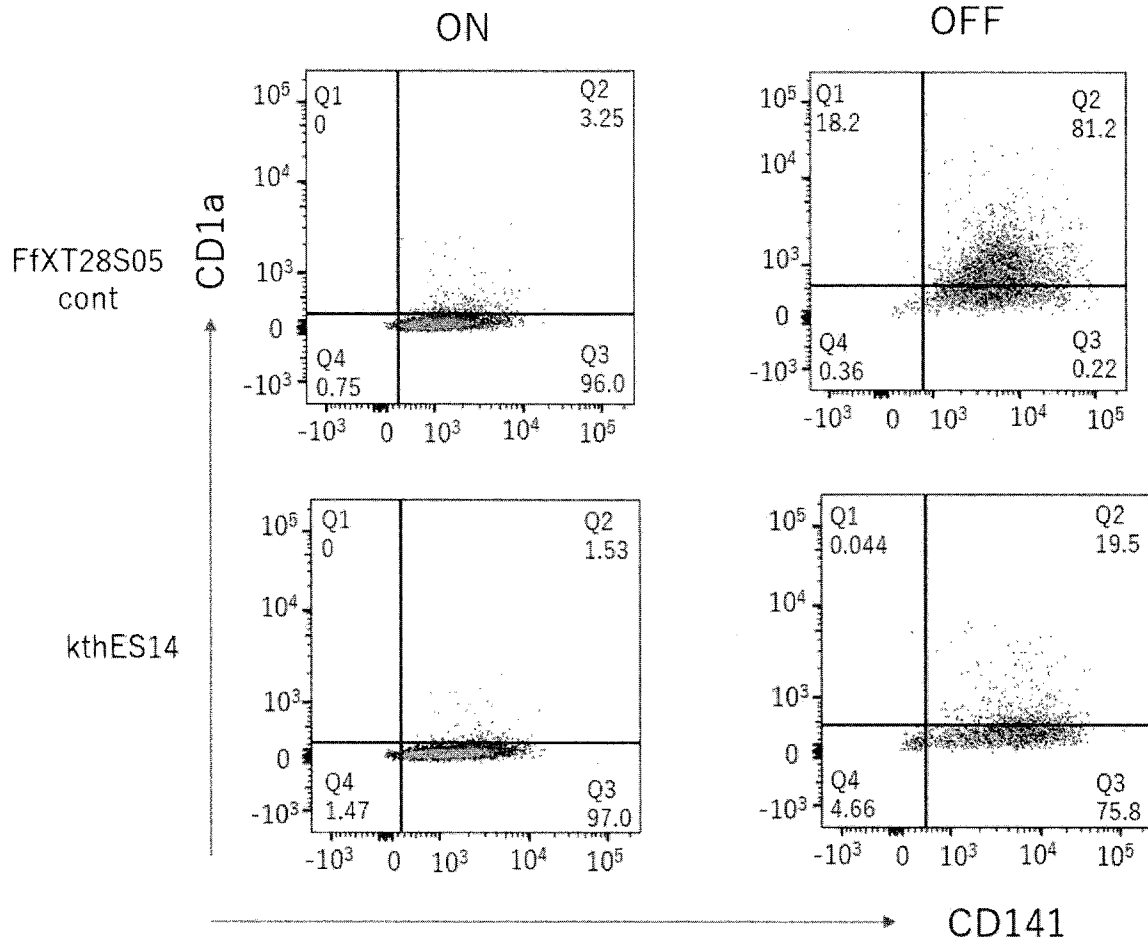
マクロファージ株

oligomer  $\beta$ -amyloid(1-42)

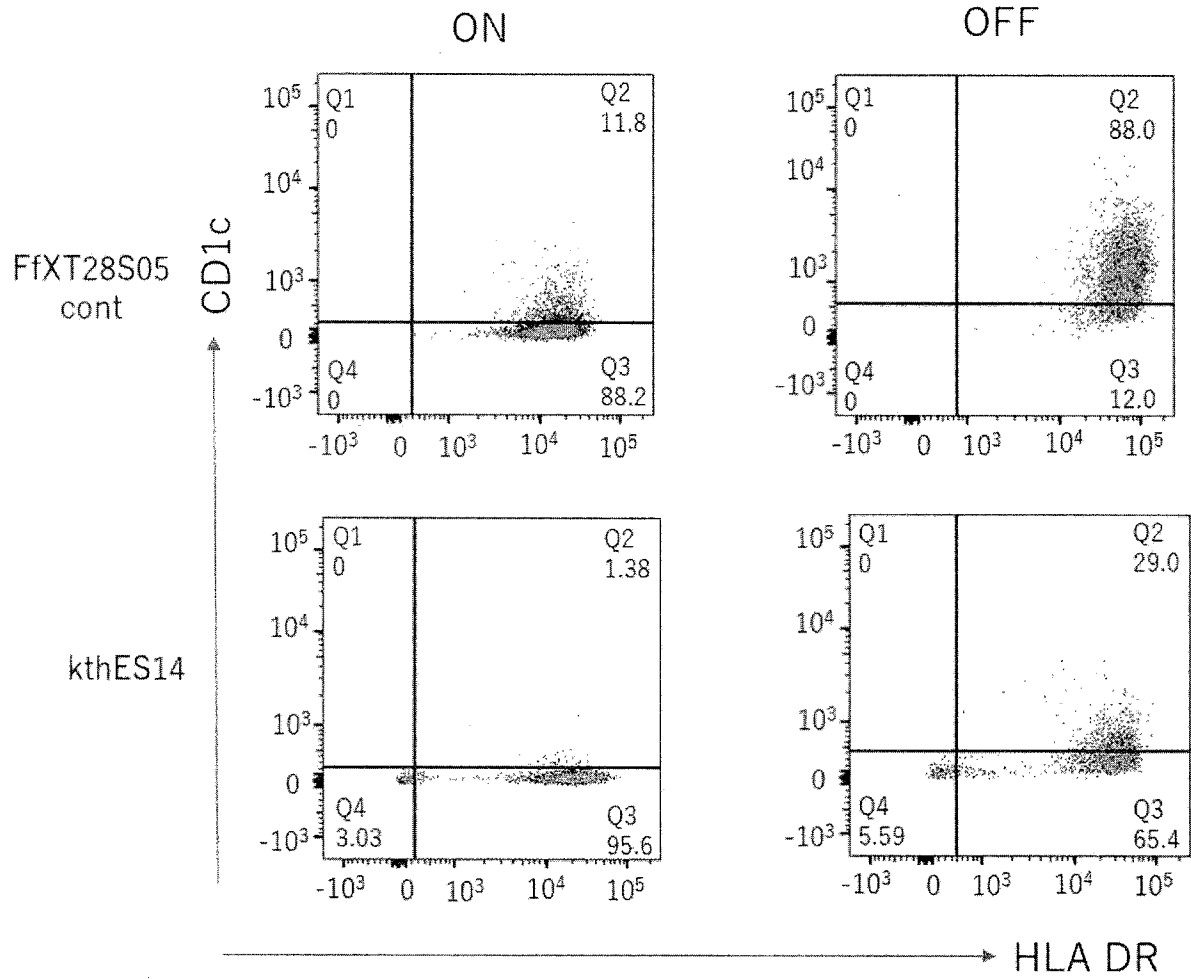




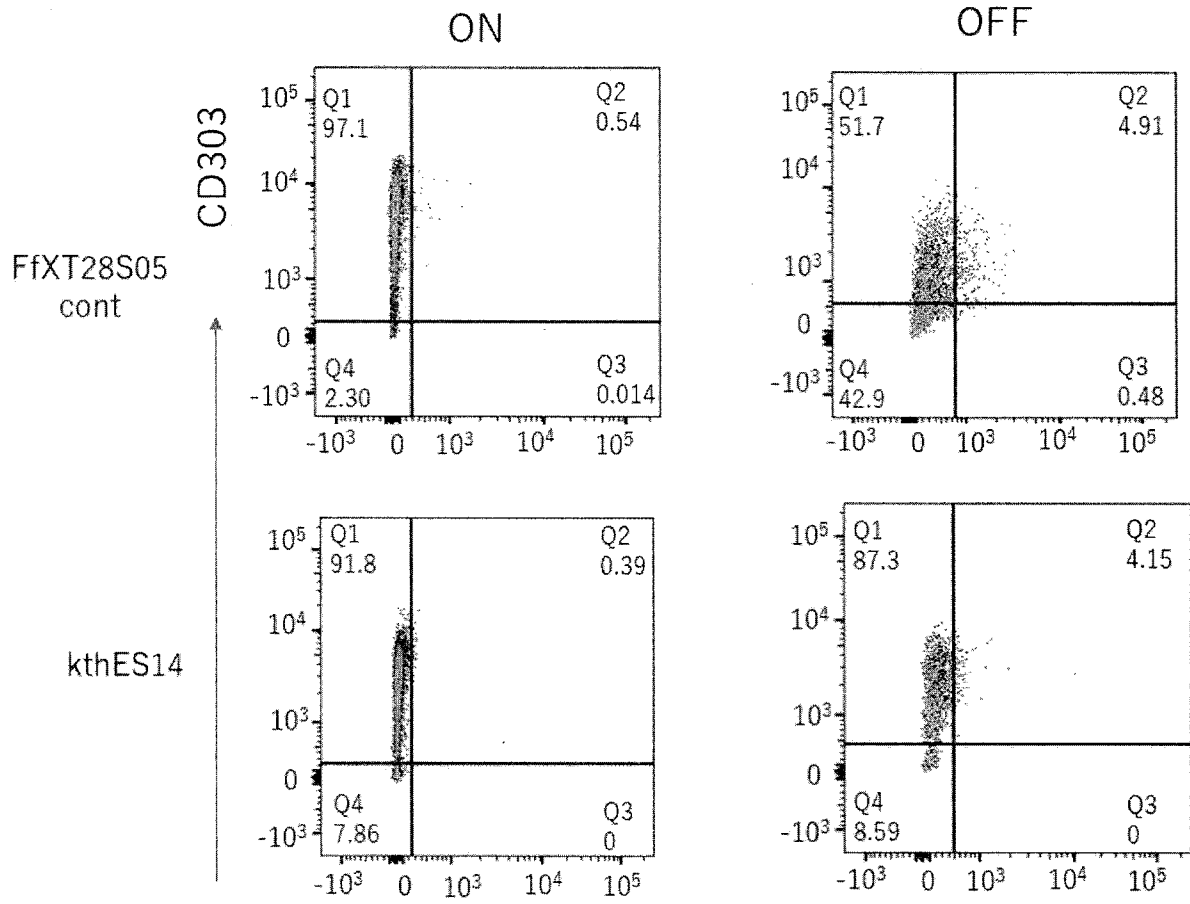
[図 22]



[図 22]の続き

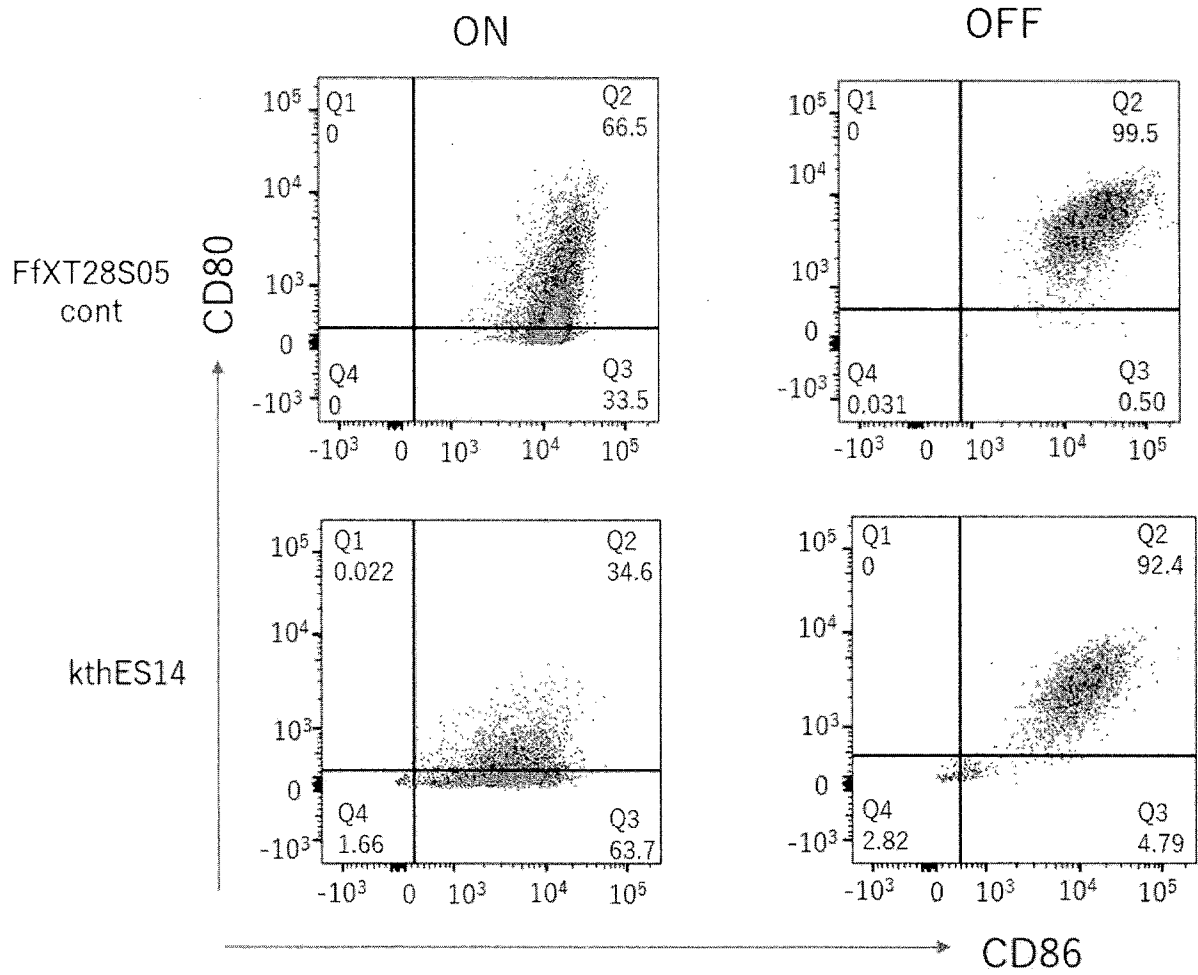


[図 23]



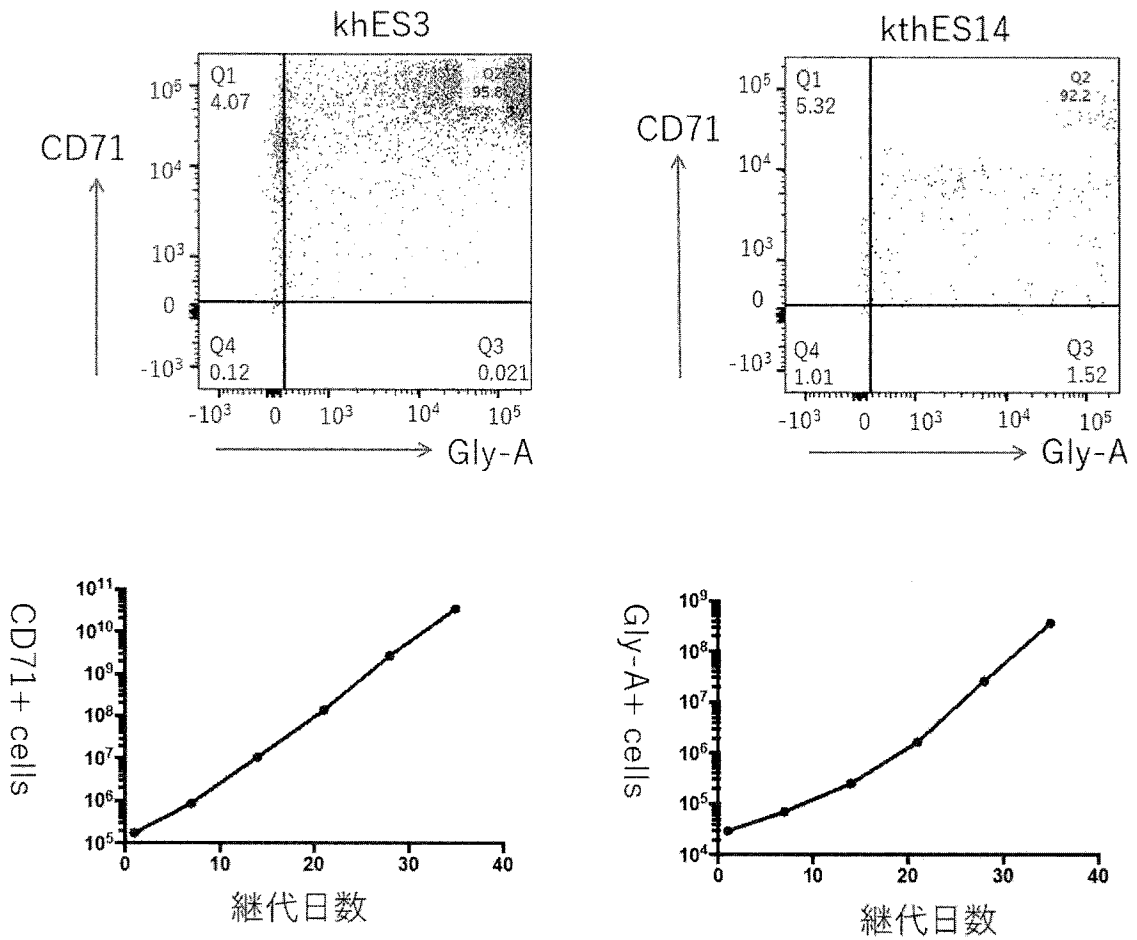


[図 23]の続き



[図 24]

# 赤血球株



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2022/026341

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>		
<i>C12N 5/0789</i> (2010.01)i; <i>C12N 5/10</i> (2006.01)i; <i>C12N 15/09</i> (2006.01)i; <i>A61K 35/15</i> (2015.01)i; <i>A61P 7/00</i> (2006.01)i FI: C12N5/0789; A61K35/15 Z; A61P7/00; C12N15/09 Z; C12N5/10 ZNA		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12N5/0789; C12N5/10; C12N15/09; A61K35/15; A61P7/00		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Published examined utility model applications of Japan 1922-1996 Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2022 Registered utility model specifications of Japan 1996-2022 Published registered utility model applications of Japan 1994-2022		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); Cplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2012/043651 A1 (NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION KUMAMOTO UNIVERSITY) 05 April 2012 (2012-04-05) in particular, claims 1-17, examples 1-18	1, 2, 7-13
Y	in particular, claims 1-17, examples 1-18	1-17
X	WO 2021/090594 A1 (THE UNIVERSITY OF TOKYO) 14 May 2021 (2021-05-14) in particular, claims 1-15, examples	1-5, 7-13
Y	in particular, claims 1-15, examples	1-17
Y	JP 2009-511081 A (NATIONAL JEWISH MEDICAL AND RESEARCH CENTER) 19 March 2009 (2009-03-19) in particular, claims 1-55, paragraphs [0070]-[0083], examples 1-13	1-17
A	JP 2020-518263 A (MEDIZINISCHE HOCHSCHULE HANNOVER) 25 June 2020 (2020-06-25) entire text	1-17
A	JP 2017-046719 A (THE UNIVERSITY OF TOKYO) 09 March 2017 (2017-03-09) entire text	1-17
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date</p> <p>“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)</p> <p>“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>“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</p> <p>“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</p> <p>“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</p> <p>“&amp;” document member of the same patent family</p>		
Date of the actual completion of the international search <b>08 August 2022</b>		Date of mailing of the international search report <b>06 September 2022</b>
Name and mailing address of the ISA/JP <b>Japan Patent Office (ISA/JP) 3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915 Japan</b>		Authorized officer  Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

**PCT/JP2022/026341**

<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2020-525031 A (ETABLISSEMENT FRANCAIS DU SANG) 27 August 2020 (2020-08-27) entire text	1-17
<hr/>		

**Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)**

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
  - a.  forming part of the international application as filed:
    - in the form of an Annex C/ST.25 text file.
    - on paper or in the form of an image file.
  - b.  furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
  - c.  furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
    - in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).
    - on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2.  In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
**Information on patent family members**

International application No.

**PCT/JP2022/026341**

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
WO	2012/043651	A1	05 April 2012	US 2013/0195818 A1 in particular, claims 1-18, examples 1-18	
WO	2021/090594	A1	14 May 2021	(Family: none)	
JP	2009-511081	A	19 March 2009	US 2007/0116691 A1 in particular, claims 1-55, paragraphs [0093]-[0106], examples 1-13	
				WO 2007/047583 A2	
				EP 1942739 A2	
				CN 101330830 A	
JP	2020-518263	A	25 June 2020	US 2021/0155902 A1 entire text	
				WO 2018/202881 A1	
				EP 3399027 A1	
JP	2017-046719	A	09 March 2017	US 2012/0238023 A1 entire text	
				WO 2011/034073 A1	
				EP 2500418 A1	
				CN 102712906 A	
JP	2020-525031	A	27 August 2020	US 2020/0370015 A1 entire text	
				WO 2019/002625 A1	
				EP 3645707 A1	
				CN 111373029 A	

<p>A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））                  C12N 5/0789(2010.01)i; C12N 5/10(2006.01)i; C12N 15/09(2006.01)i; A61K 35/15(2015.01)i;                  A61P 7/00(2006.01)i                  FI: C12N5/0789; A61K35/15 Z; A61P7/00; C12N15/09 Z; C12N5/10 ZNA</p>																										
<p>B. 調査を行った分野</p> <p>調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC））                  C12N5/0789; C12N5/10; C12N15/09; A61K35/15; A61P7/00</p> <p>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</p> <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922 - 1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971 - 2022年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996 - 2022年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994 - 2022年</td> </tr> </table> <p>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）                  JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CPlus/MEDLINE/EMBASE/BIOISIS (STN)</p>			日本国実用新案公報	1922 - 1996年	日本国公開実用新案公報	1971 - 2022年	日本国実用新案登録公報	1996 - 2022年	日本国登録実用新案公報	1994 - 2022年																
日本国実用新案公報	1922 - 1996年																									
日本国公開実用新案公報	1971 - 2022年																									
日本国実用新案登録公報	1996 - 2022年																									
日本国登録実用新案公報	1994 - 2022年																									
<p>C. 関連すると認められる文献</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>引用文献の カテゴリー*</th> <th>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</th> <th>関連する 請求項の番号</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td>WO 2012/043651 A1 (国立大学法人 熊本大学) 05.04.2012 (2012 - 04 - 05) 特に、請求項1 - 17、実施例1 - 18</td> <td>1, 2, 7-13</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>特に、請求項1 - 17、実施例1 - 18</td> <td>1-17</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>WO 2021/090594 A1 (国立大学法人 東京大学) 14.05.2021 (2021 - 05 - 14) 特に、請求項1 - 15、実施例</td> <td>1-5, 7-13</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>特に、請求項1 - 15、実施例</td> <td>1-17</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>JP 2009-511081 A (ナショナル ジューイッシュ メディカル アンド リサーチ センター) 19.03.2009 (2009 - 03 - 19) 特に、請求項1 - 55、[0070] - [0083]、実施例1 - 13</td> <td>1-17</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>JP 2020-518263 A (メディツィーニシエ・ホーホシューレ・ハノーファー) 25.06.2020 (2020 - 06 - 25) 全文</td> <td>1-17</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>JP 2017-046719 A (国立大学法人 東京大学) 09.03.2017 (2017 - 03 - 09) 全文</td> <td>1-17</td> </tr> </tbody> </table>			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	X	WO 2012/043651 A1 (国立大学法人 熊本大学) 05.04.2012 (2012 - 04 - 05) 特に、請求項1 - 17、実施例1 - 18	1, 2, 7-13	Y	特に、請求項1 - 17、実施例1 - 18	1-17	X	WO 2021/090594 A1 (国立大学法人 東京大学) 14.05.2021 (2021 - 05 - 14) 特に、請求項1 - 15、実施例	1-5, 7-13	Y	特に、請求項1 - 15、実施例	1-17	Y	JP 2009-511081 A (ナショナル ジューイッシュ メディカル アンド リサーチ センター) 19.03.2009 (2009 - 03 - 19) 特に、請求項1 - 55、[0070] - [0083]、実施例1 - 13	1-17	A	JP 2020-518263 A (メディツィーニシエ・ホーホシューレ・ハノーファー) 25.06.2020 (2020 - 06 - 25) 全文	1-17	A	JP 2017-046719 A (国立大学法人 東京大学) 09.03.2017 (2017 - 03 - 09) 全文	1-17
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																								
X	WO 2012/043651 A1 (国立大学法人 熊本大学) 05.04.2012 (2012 - 04 - 05) 特に、請求項1 - 17、実施例1 - 18	1, 2, 7-13																								
Y	特に、請求項1 - 17、実施例1 - 18	1-17																								
X	WO 2021/090594 A1 (国立大学法人 東京大学) 14.05.2021 (2021 - 05 - 14) 特に、請求項1 - 15、実施例	1-5, 7-13																								
Y	特に、請求項1 - 15、実施例	1-17																								
Y	JP 2009-511081 A (ナショナル ジューイッシュ メディカル アンド リサーチ センター) 19.03.2009 (2009 - 03 - 19) 特に、請求項1 - 55、[0070] - [0083]、実施例1 - 13	1-17																								
A	JP 2020-518263 A (メディツィーニシエ・ホーホシューレ・ハノーファー) 25.06.2020 (2020 - 06 - 25) 全文	1-17																								
A	JP 2017-046719 A (国立大学法人 東京大学) 09.03.2017 (2017 - 03 - 09) 全文	1-17																								
<p><input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input checked="" type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。</p>																										
<p>* 引用文献のカテゴリー</p> <p>“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</p> <p>“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</p> <p>“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）</p> <p>“O” 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献</p> <p>“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</p> <p>“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抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの</p> <p>“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</p> <p>“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</p> <p>“&amp;” 同一パテントファミリー文献</p>																										
<p>国際調査を完了した日</p> <p>08.08.2022</p>	<p>国際調査報告の発送日</p> <p>06.09.2022</p>																									
<p>名称及びあて先</p> <p>日本国特許庁(ISA/JP) 〒100-8915 日本国 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号</p>	<p>権限のある職員（特許庁審査官）</p> <p>伊達 利奈 4N 3960</p> <p>電話番号 03-3581-1101 内線 3448</p>																									

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	JP 2020-525031 A (エタプリスモン フランセ ドュ サン) 27.08.2020 (2020 - 08 - 27) 全文	1-17
.....		



## 第 I 欄      ヌクレオチド又はアミノ酸配列（第 1 ページの 1. c の続き）

1. この国際出願で開示されたヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、以下の配列表に基づき国際調査を行った。
- a.  出願時における国際出願の一部を構成する配列表
- 附属書C/ST.25テキストファイル形式
- 紙形式又はイメージファイル形式
- b.  国際出願とともに、PCT規則13の3.1(a)に基づき国際調査のためにのみ提出された、附属書C/ST.25テキストファイル形式の配列表
- c.  国際出願日後に、国際調査のためにのみ提出された配列表
- 附属書C/ST.25テキストファイル形式(PCT規則13の3.1(a))
- 紙形式又はイメージファイル形式(PCT規則13の3.1(b)及びPCT実施細則第713号)
2.  さらに、複数の版の配列表又は配列表の写しが提出され、変更後の配列表又は追加の写しに記載された情報が、出願時における配列表と同一である旨、又は出願時における国際出願の開示の範囲を超えない旨の陳述書の提出があった。
3. 補足意見:

国際調査報告  
 パテントファミリーに関する情報

国際出願番号

PCT/JP2022/026341

引用文献			公表日	パテントファミリー文献			公表日
WO	2012/043651	A1	05.04.2012	US	2013/0195818	A1	
				特に、請求項1-18、実施例1-18			
-----							
WO	2021/090594	A1	14.05.2021	(ファミリーなし)			
JP	2009-511081	A	19.03.2009	US	2007/0116691	A1	
				特に、請求項1-55、 [0093]-[0106]、実施例1-13			
				WO	2007/047583	A2	
				EP	1942739	A2	
				CN	101330830	A	
-----							
JP	2020-518263	A	25.06.2020	US	2021/0155902	A1	
				全文			
				WO	2018/202881	A1	
				EP	3399027	A1	
-----							
JP	2017-046719	A	09.03.2017	US	2012/0238023	A1	
				全文			
				WO	2011/034073	A1	
				EP	2500418	A1	
				CN	102712906	A	
-----							
JP	2020-525031	A	27.08.2020	US	2020/0370015	A1	
				全文			
				WO	2019/002625	A1	
				EP	3645707	A1	
				CN	111373029	A	
-----							