

(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  
2017 年 10 月 19 日(19.10.2017)



(10) 国際公開番号

WO 2017/179718 A1

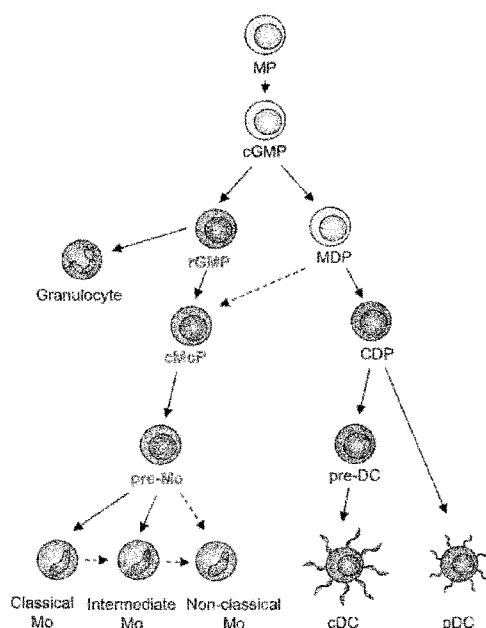
- (51) 国際特許分類:  
C12N 5/0786 (2010.01) A61P 35/00 (2006.01)  
A01K 67/027 (2006.01) C12Q 1/02 (2006.01)  
A61K 39/395 (2006.01) G01N 33/15 (2006.01)  
A61K 45/00 (2006.01) G01N 33/50 (2006.01)  
A61P 1/04 (2006.01) G01N 33/53 (2006.01)  
A61P 3/00 (2006.01) A61K 35/15 (2015.01)  
A61P 9/10 (2006.01) A61K 35/51 (2015.01)  
A61P 19/00 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2017/015356
- (22) 国際出願日: 2017 年 4 月 14 日(14.04.2017)
- (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 2016-080779 2016 年 4 月 14 日(14.04.2016) JP
- (71) 出願人: 国立大学法人 東京医科歯科大学(NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION TOKYO MEDICAL AND DENTAL UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒1138510 東京都文京区湯島一丁目 5 番 4 5 号 Tokyo (JP). 協和発酵キリン株式会社(KYOWA HAKKO KIRIN CO., LTD.) [JP/JP]; 〒1008185 東京都千代田区大手町一丁目 6 番 1 号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者: 榑木 俊聡(OHTEKI Toshiaki); 〒1138510 東京都文京区湯島一丁目 5 番 4 5 号 国立大学法人東京医科歯科大学内 Tokyo (JP). 川村 俊輔(KAWAMURA Shunsuke); 〒1138510 東京都文京区湯島一丁目 5 番 4 5 号 国立大学法人東京医科歯科大学内 Tokyo (JP). 小内 伸幸(ONAI Nobuyuki); 〒1138510 東京都文京区湯島一丁目 5 番 4 5 号 国立大学法人東京医科歯科大学内 Tokyo (JP).
- (74) 代理人: 特許業務法人栄光特許事務所(EIKOH PATENT FIRM, P.C.); 〒1050003 東京都港区西新橋一丁目 7 番 1 3 号 虎ノ門イーストビルディング 10 階 Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, 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, IR, IS, 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, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

[続葉有]

(54) Title: HUMAN COMMON MONOCYTE PROGENITORS CAPABLE OF DIFFERENTIATING EXCLUSIVELY INTO MONOCYTIC CELLS AND METHOD FOR ISOLATING SAME

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

[図16]



(57) Abstract: The purpose of the present invention is to provide isolated human common monocyte progenitors which do not differentiate into any cells other than monocytic cells and which have proliferative ability. The present invention relates to: the acquisition of human common monocyte progenitors with strict monocytic differentiation potential by isolating Lin<sup>-</sup>CD34<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup>CD10<sup>-</sup>CD123<sup>int/-</sup>CD45RA<sup>+</sup>CD135<sup>+</sup>CLEC12A<sup>hi</sup>CD64<sup>hi</sup> cells from an umbilical cord blood sample or a bone marrow sample; a therapeutic method targeting the human common monocyte progenitors capable of differentiating exclusively into monocytic cells; and a medicinal composition comprising a substance acting specifically on the human common monocyte progenitors capable of differentiating exclusively into monocytic cells.

(57) 要約: 本発明は単球系統以外の細胞には分化せず、かつ増殖能を有する、単離されたヒト共通単球前駆細胞を提供することを目的とする。本発明は、臍帯血試料または骨髓試料から、Lin<sup>-</sup>CD34<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup>CD10<sup>-</sup>CD123<sup>int/-</sup>CD45RA<sup>+</sup>CD135<sup>+</sup>CLEC12A<sup>hi</sup>CD64<sup>hi</sup>の細胞を単離することにより、単球分化に局限したヒト共通単球前駆細胞を得ること、該単球系統の細胞にのみ分化するヒト共通単球前駆細胞を標的とした治療方法、及び該単球系統の細胞にのみ分化するヒト共通単球前駆細胞に特異的に作用する物質を含む医薬組成物に関する。

WO 2017/179718 A1



(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))

## 明 細 書

発明の名称：

単球系統のみに分化するヒト共通単球前駆細胞およびその単離方法

### 技術分野

[0001] 本発明は、ヒト共通単球前駆細胞、その単離方法、およびその使用方法等に関する。

### 背景技術

[0002] 単球、マクロファージおよび樹状細胞（DC）を含む単核系貪食細胞（MΦ）は、組織恒常性や免疫反応において中心的な役割を担っている。正常組織に常在するマクロファージの大部分は胎生期の前駆細胞に由来するものであるが、腸管、心臓、肺、乳腺、真皮および骨におけるマクロファージの一部は単球に由来する。

[0003] さらに、炎症は、組織に浸潤した単球の単球由来マクロファージや樹状細胞への分化を促進し、それらは恒常的生体防御反応や炎症性疾患に関与する。マウス単球は、古典的Ly6c<sup>hi</sup>単球と非古典的Ly6c<sup>lo</sup>単球に分類される。Ly6c<sup>lo</sup>単球は血中のみに存在するが、Ly6c<sup>hi</sup>単球は血液および他の組織にも存在し、そこでマクロファージや樹状細胞に分化する。また、ほとんどのLy6c<sup>lo</sup>単球はLy6c<sup>hi</sup>単球に由来すると考えられている。

[0004] ヒト単球は、古典的CD14<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup>単球、中間型CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>単球、そして非古典的CD14<sup>lo/-</sup>CD16<sup>+</sup>単球に分類される。機能的解析や遺伝子発現解析によって、ヒトCD14<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup>単球とCD14<sup>lo/-</sup>CD16<sup>+</sup>単球のカウンターパートはそれぞれマウスLy6c<sup>hi</sup>単球とLy6c<sup>lo</sup>単球であることが示されている。

[0005] 単球は、骨髄（BM）中で造血幹細胞（HSC）から連続的な中間前駆細胞を経て分化する。単球系細胞に局限した分化能を有する共通単球前駆細胞（cMoP）がマウスにおいて同定された（非特許文献1）。これらcMo

Pは単球－樹状細胞前駆細胞（MDP）に由来すると考えられている（非特許文献2）。ヒトでは、IL-3受容体（CD123）、Flt3（CD135）、およびCD45RAの発現パターンの違いを指標にして、共通ミエロイド前駆細胞（CMP）、赤芽球系前駆細胞（MEP）、および顆粒球－単球前駆細胞（GMP）が同定された。また最近、ヒトMDPがGMP分画中に同定された（非特許文献3）。

## 先行技術文献

### 非特許文献

[0006] 非特許文献1: Hettinger, J. et al. Origin of monocytes and macrophages in a committed progenitor. Nat. Immunol. 14, 821-830 (2013).

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

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

## 発明の概要

### 発明が解決しようとする課題

[0007] ヒトのGMPおよびMDPが存在することから、単球系統の細胞のみに分化し他のいかなる造血系細胞にも分化しないヒトcMoPが下流に存在すると考えられていたが、これまでヒトcMoPは単離されていなかった。一方、メタボリックシンドロームや癌などの疾患病態形成および維持を担うマクロファージの多くは骨髄単球由来であることが知られており、これら疾患の治療薬および治療方法等の開発のためにも、単球系統の細胞のみに分化するヒトcMoPの単離と同定が強く求められていた。

[0008] Lin<sup>-</sup>CD34<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup>CD10<sup>-</sup>CD123<sup>lo</sup>CD135<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>の細胞として定義される従来型ヒト顆粒球－単球前駆細胞（以下、cG

MP)は、顆粒球-単球前駆細胞を含むが、T細胞等のリンパ系に分化できる細胞も一部含んでいる。また、単球-DC系統のみに分化する前駆細胞であるヒトMDPが、cGMP分画中に同定されている(非特許文献3)。すなわち、cGMPは、実際には真のGMPと他の前駆細胞との混合集団であるといえる。

[0009] そこで、本発明は、真のGMPを同定し、さらに、単球系統の細胞にのみ分化するヒトcMoPを提供することを目的の一つとする。

### 課題を解決するための手段

[0010] 本発明の態様は以下の事項に関する。

1. 単球系統以外の細胞には分化せず、かつ増殖能を有する、単離されたヒト共通単球前駆細胞。
2. CLEC12AおよびCD64を発現している、上記1に記載の単離されたヒト共通単球前駆細胞。
3. CD34<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup>CD10<sup>-</sup>CD123<sup>int</sup>/<sup>-</sup>CD45RA<sup>+</sup>CD135<sup>+</sup>CLEC12A<sup>hi</sup>CD64<sup>hi</sup>の表現型を有する、上記1または2に記載の単離されたヒト共通単球前駆細胞。
4. 臍帯血または骨髓由来の細胞である、上記1～3のいずれか1つに記載の単離されたヒト共通単球前駆細胞。
5. ヒト共通単球前駆細胞の単離方法であって、単離された臍帯血試料または骨髓試料から、Lin<sup>-</sup>CD34<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup>CD10<sup>-</sup>CD123<sup>int</sup>/<sup>-</sup>CD45RA<sup>+</sup>CD135<sup>+</sup>CLEC12A<sup>hi</sup>CD64<sup>hi</sup>の細胞を単離する工程を含み、該ヒト共通単球前駆細胞は単球系統以外の細胞には分化せず、かつ増殖能を有する、単離方法。
6. 単離された臍帯血試料または骨髓試料から、単核細胞を単離する工程、および単離された単核細胞から、Lin<sup>-</sup>の細胞を単離する工程の少なくとも一方を含む、上記5に記載の単離方法。
7. 単離がフローサイトメトリーを用いて行われる、上記5または6に記載の単離方法。

8. ヒト共通単球前駆細胞を死滅させる、ヒト共通単球前駆細胞の増殖若しくは分化を阻害する、または単球若しくはマクロファージの生成を阻害する物質を有効成分として含む、マクロファージ関連疾患の治療に用いるための医薬組成物。

9. 前記物質が、低分子、核酸、ポリペプチドまたは抗体若しくは該抗体断片である、上記8に記載の医薬組成物。

10. 前記抗体または該抗体断片が抗IRF8抗体、抗CEBPA抗体、抗CEBPB抗体、抗SLFN5抗体、抗AHR抗体、抗CCR2抗体、抗KLF4抗体、抗SPI1(PU.1)抗体、抗ZEB2抗体、抗CX3CR1抗体、抗PPARGC1A抗体、抗PPARGC1B抗体、抗PPARG抗体、抗HES1抗体、抗NR4A1抗体、抗POU2F2抗体、抗CD110抗体、抗CD115抗体、抗CD116抗体、抗CD117抗体、抗CLEC12A抗体、抗CD64抗体、抗CD135抗体、抗CD45RA抗体、抗CD34抗体、および抗CD38抗体からなる群より選ばれる少なくとも1つの抗体または該抗体断片である、上記9に記載の医薬組成物。

11. 抗IRF8抗体、抗CEBPA抗体、抗CEBPB抗体、抗SLFN5抗体、抗AHR抗体、抗CCR2抗体、抗KLF4抗体、抗SPI1(PU.1)抗体、抗ZEB2抗体、抗CX3CR1抗体、抗PPARGC1A抗体、抗PPARGC1B抗体、抗PPARG抗体、抗HES1抗体、抗NR4A1抗体、抗POU2F2抗体、抗CD110抗体、抗CD115抗体、抗CD116抗体、抗CD117抗体、抗CLEC12A抗体、抗CD64抗体、抗CD135抗体、抗CD45RA抗体、抗CD34抗体、および抗CD38抗体からなる群より選ばれる少なくとも1つの抗体または該抗体断片を有効成分として含む、マクロファージ関連疾患の治療に用いるための医薬組成物。

12. 前記マクロファージ関連疾患が、癌、骨関連疾患、動脈硬化、線維症、炎症性腸疾患およびメタボリック症候群から成る群より選択される少なくとも1である、上記8～11のいずれか1つに記載の医薬組成物。

13. 抗IRF8抗体、抗CEBPA抗体、抗CEBPB抗体、抗SLFN5抗体、抗AHR抗体、抗CCR2抗体、抗KLF4抗体、抗SPI1 (PU. 1) 抗体、抗ZEB2抗体、抗CX3CR1抗体、抗PPARGC1A抗体、抗PPARGC1B抗体、抗PPARG抗体、抗HES1抗体、抗NR4A1抗体、抗POU2F2抗体、抗CD110抗体、抗CD115抗体、抗CD116抗体、抗CD117抗体、抗CLEC12A抗体、抗CD64抗体、抗CD135抗体、抗CD45RA抗体、抗CD34抗体、および抗CD38抗体からなる群より選ばれる少なくとも1つの抗体または該抗体断片を有効成分として含む、癌の治療に用いるための医薬組成物。

14. 他の薬剤と組み合わせて使用するための、上記8～13のいずれか1に記載の医薬組成物。

15. 抗CLEC12A抗体および抗CD64抗体の少なくとも一方または該抗体断片を含む、ヒト共通単球前駆細胞の標識または単離に使用するためのキット。

16. 単球の生成を阻害する物質のスクリーニング方法であって、  
試験物質を含む単球分化培地中でヒト共通単球前駆細胞を培養する工程、  
および  
試験物質が単球の生成を阻害するか否かを評価する工程を含む、スクリーニング方法。

17. 破骨細胞の生成を阻害する物質のスクリーニング方法であって、  
試験物質を含む破骨細胞分化培地中でヒト共通単球前駆細胞を培養する工程、および  
試験物質が破骨細胞の生成を阻害するか否かを評価する工程を含む、スクリーニング方法。

18. ヒト共通単球前駆細胞の分化、増殖または生存に影響する物質のスクリーニング方法であって、  
試験物質を含む培地中でヒト共通単球前駆細胞を培養する工程、および  
試験物質がヒト共通単球前駆細胞の分化、増殖または生存に影響するか否

かを評価する工程を含む、スクリーニング方法。

19. ヒト共通単球前駆細胞の分化、増殖または生存に影響する抗体のスクリーニング方法であって、

ヒト共通単球前駆細胞の細胞表面に発現する分子を同定する工程、

該細胞表面分子に特異的な抗体を取得する工程、

該抗体を含む培地中でヒト共通単球前駆細胞を培養する工程、および

該抗体がヒト共通単球前駆細胞の分化、増殖または生存に影響するか否かを評価する工程を含む、スクリーニング方法。

20. 免疫不全マウスの骨髄にヒト共通単球前駆細胞を移植する工程を含む、ヒト単球を有するマウスの作製方法。

21. ヒトFLT3L、TPO、SCFおよびM-CSFを前記免疫不全マウスに静脈内投与する工程、およびヒト腫瘍細胞を前記免疫不全マウスに移植する工程の少なくとも一方をさらに含む、上記20に記載の作製方法。

22. 前記ヒト共通単球前駆細胞が遺伝子改変されていることを特徴とする、上記20または21に記載の作製方法。

23. ヒト単球を有し、ヒト顆粒球は有さないマウス。

24. CD34<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup>CD10<sup>-</sup>CD123<sup>int</sup>/<sup>-</sup>CD45RA<sup>+</sup>CD135<sup>+</sup>CLEC12A<sup>hi</sup>CD64<sup>hi</sup>の表現型を有するヒト共通単球前駆細胞を75%以上、80%以上、85%以上、90%以上、95%以上、98%以上、または99%以上含む、単離された細胞集団。

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

26. 前記物質が、低分子、核酸、ポリペプチド、または抗体若しくは該抗体断片である、上記25に記載の治療方法。

27. ヒト患者におけるマクロファージ関連疾患の治療方法であって、該ヒ

ト患者に対して抗 I R F 8 抗体、抗 C E B P A 抗体、抗 C E B P B 抗体、抗 S L F N 5 抗体、抗 A H R 抗体、抗 C C R 2 抗体、抗 K L F 4 抗体、抗 S P I 1 ( P U . 1 ) 抗体、抗 Z E B 2 抗体、抗 C X 3 C R 1 抗体、抗 P P A R G C 1 A 抗体、抗 P P A R G C 1 B 抗体、抗 P P A R G 抗体、抗 H E S 1 抗体、抗 N R 4 A 1 抗体、抗 P O U 2 F 2 抗体、抗 C D 1 1 0 抗体、抗 C D 1 1 5 抗体、抗 C D 1 1 6 抗体、抗 C D 1 1 7 抗体、抗 C L E C 1 2 A 抗体、抗 C D 6 4 抗体、抗 C D 1 3 5 抗体、抗 C D 4 5 R A 抗体、抗 C D 3 4 抗体、および抗 C D 3 8 抗体からなる群より選ばれる少なくとも 1 つの抗体または該抗体断片を投与する工程を含む、治療方法。

28. 前記マクロファージ関連疾患が、癌、骨関連疾患、動脈硬化、線維症、炎症性腸疾患およびメタボリック症候群から成る群より選択される少なくとも 1 である、上記 25 ~ 27 のいずれか 1 つに記載の治療方法。

29. ヒト患者における癌の治療方法であって、該ヒト患者に対して抗 I R F 8 抗体、抗 C E B P A 抗体、抗 C E B P B 抗体、抗 S L F N 5 抗体、抗 A H R 抗体、抗 C C R 2 抗体、抗 K L F 4 抗体、抗 S P I 1 ( P U . 1 ) 抗体、抗 Z E B 2 抗体、抗 C X 3 C R 1 抗体、抗 P P A R G C 1 A 抗体、抗 P P A R G C 1 B 抗体、抗 P P A R G 抗体、抗 H E S 1 抗体、抗 N R 4 A 1 抗体、抗 P O U 2 F 2 抗体、抗 C D 1 1 0 抗体、抗 C D 1 1 5 抗体、抗 C D 1 1 6 抗体、抗 C D 1 1 7 抗体、抗 C L E C 1 2 A 抗体、抗 C D 6 4 抗体、抗 C D 1 3 5 抗体、抗 C D 4 5 R A 抗体、抗 C D 3 4 抗体、および抗 C D 3 8 抗体からなる群より選ばれる少なくとも 1 つの抗体または該抗体断片を投与する工程を含む、治療方法。

30. 併用剤として他の薬剤を投与する工程を含む、上記 29 に記載の治療方法。

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

32. 前記物質が、低分子、核酸、ポリペプチド、または抗体若しくは該抗体断片である、上記31に記載の使用。

33. マクロファージ関連疾患の治療に用いるための医薬の製造における、抗IRF8抗体、抗CEBPA抗体、抗CEBPB抗体、抗SLFN5抗体、抗AHR抗体、抗CCR2抗体、抗KLF4抗体、抗SPI1 (PU. 1) 抗体、抗ZEB2抗体、抗CX3CR1抗体、抗PPARGC1A抗体、抗PPARGC1B抗体、抗PPARG抗体、抗HES1抗体、抗NR4A1抗体、抗POU2F2抗体、抗CD110抗体、抗CD115抗体、抗CD116抗体、抗CD117抗体、抗CLEC12A抗体、抗CD64抗体、抗CD135抗体、抗CD45RA抗体、抗CD34抗体、および抗CD38抗体からなる群より選ばれる少なくとも1つの抗体または該抗体断片の使用。

34. 前記マクロファージ関連疾患が、癌、骨関連疾患、動脈硬化、線維症、炎症性腸疾患およびメタボリック症候群から成る群より選択される少なくとも1である、上記31～33のいずれか1つに記載の使用。

35. 癌の治療に用いるための医薬の製造における、抗IRF8抗体、抗CEBPA抗体、抗CEBPB抗体、抗SLFN5抗体、抗AHR抗体、抗CCR2抗体、抗KLF4抗体、抗SPI1 (PU. 1) 抗体、抗ZEB2抗体、抗CX3CR1抗体、抗PPARGC1A抗体、抗PPARGC1B抗体、抗PPARG抗体、抗HES1抗体、抗NR4A1抗体、抗POU2F2抗体、抗CD110抗体、抗CD115抗体、抗CD116抗体、抗CD117抗体、抗CLEC12A抗体、抗CD64抗体、抗CD135抗体、抗CD45RA抗体、抗CD34抗体、および抗CD38抗体からなる群より選ばれる少なくとも1つの抗体または該抗体断片の使用。

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

37. 抗CD2抗体、抗CD3抗体、抗CD11b抗体、抗CD16抗体、抗CD19抗体、抗CD56抗体、抗CD235ab抗体、抗CD34抗体

、抗CD38抗体、抗CD10抗体、抗CD123抗体、抗CD45RA抗体、抗CD135抗体、抗CLEC12A抗体および抗CD64抗体からなる群より選ばれる少なくとも1つの抗体または該抗体断片を含むキット。

## 発明の効果

[0011] 本発明の一態様によると、単球系統以外の細胞に分化せずかつ増殖能を有する、単離されたヒト共通単球前駆細胞（ヒトcMoP）を提供することができる。

## 図面の簡単な説明

[0012] [図1]図1（a）～図1（d）は、従来型ヒトGMP（cGMP）のサブセットを示す（後述の〈例1〉参照）。図1（a）は、ヒトのUCBからのLin-MNCをFCMによって解析した結果を示す。図1（b）は、BMおよびPBからのLin-MNCをFCMによって解析した結果を示す。図1（c）は、各UCB亜集団のミエロイドコロニー形成能を示す。図1（d）は、各UCB前駆細胞のDiff-Quick染色の結果を表す。

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

[図3]図3（a）～図3（e）は、単一細胞レベルでのヒトcMoPおよびrGMPの解析結果を示す（〈例3〉参照）。図3（a）は、ヒトcMoP由来の代表的なコロニーのFCMプロファイルを示す。図3（b）は、rGMP由来の代表的なコロニーのFCMプロファイルを示す。図3（c）は、FCMによって検出された単球および顆粒球コロニーの少なくとも一方の比率を表す。図3（d）は、ヒトcMoPの限界希釈解析の結果を表す。図3（e）は、rGMPの限界希釈解析の結果を表す。

[図4]図4（a）～図4（c）は、ヒトcMoPおよびrGMPの増殖能を示

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

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

[図6]図6（a）～図6（c）は、プレ単球、ヒトcMoPおよびrGMPの分化関係を示す（＜例6＞参照）。図6（a）において、数字はソーティングしたヒトcMoPとrGMPの純度を示す。図6（b）は、ソーティングしたrGMPの発生段階を解析した結果を示し、図6（c）は、ヒトcMoPの発生段階を解析した結果を示す。

[図7]図7（a）～図7（f）は、CMP、rGMP、ヒトcMoP、プレ単球、ヒトcMoP由来単球、およびPB単球の転写解析の結果を示す（＜例7＞参照）。図7（a）は、表示の細胞における単球特異的遺伝子のRNA発現のヒートマップ（ $\log_2$ ）を表す。図7（b）は、表示の細胞集団における単球の分化に関与する転写因子の相対的mRNAレベルを示す。図7（c）は、細胞遊走に関与するケモカイン受容体の相対的mRNAレベルを示す。図7（d）は、表示の細胞集団における規準化された遺伝子発現プロファイルの主成分分析の結果を示す。図7（e）は、ヒトcMoP-MoまたはPB-Moからの表示の細胞集団のユークリッド距離を表す。図7（f）は、各細胞集団におけるヒト血液単球シグネチャの比較を示す図である。

[図8]図8（a）～図8（c）は、R1、R2、R3分画のFCMによる分析

の結果を示す（＜例１＞参照）。

[図9]図 9（a）および図 9（b）は、顆粒球、単球、および樹状細胞のサブセットを検出するためのゲーティング戦略を示す（＜例２＞参照）。

[図10]図 10（a）～図 10（c）は、R 1、R 2、R 3 分画から生じる単球由来樹状細胞への分化の様子を表す（＜例２＞参照）。

[図11]図 11（a）および図 11（b）は、R 4 および R 5 分画のリンパ球系分化能を示す図である（＜例２＞参照）。

[図12]図 12 は、R 1 ～R 5 分画のサイトカイン受容体の発現パターンを示す図である（＜例２＞参照）。

[図13]図 13（a）および図 13（b）は、マウスの c M o P と G M P 上の C L E C 1 2 A と C D 6 4 の発現パターンを示す図である（＜例２＞参照）。

[図14]図 14（a）～図 14（e）は、M D P と R 2 ～R 5 分画との表現型の比較を示す図である（＜例２＞参照）。

[図15]図 15 は、各前駆細胞における D C 特異的遺伝子の R N A 発現のヒートマップ（ $\log_2$ ）を示す図である（＜例 7＞参照）。

[図16]図 16 は、改訂版のヒトのミエロイド系細胞分化経路を模式的に示した図である。

[図17]図 17 は、ヒト臍帯血由来のヒト c M o P に対する抗 C D 6 4 キメラ抗体の A D C C 活性をフローサイトメトリーで測定した結果を示す図である。

### 発明を実施するための形態

[0013] まず、本明細書において用いた略語とその意味を以下に記載する。また、明示的な記載がない場合は、下記の組織や細胞等はヒトのものを表すものとする。

B M : 骨髄 (bone marrow)

c D C : 従来型樹状細胞 (conventional dendritic cell)

C D P : 共通 D C 前駆細胞 (common DC progenitor)

CMP : 共通骨髓系前駆細胞 (common myeloid progenitor)

cGMP : 従来型顆粒球-単球前駆細胞 (conventional granulocyte-monocyte progenitors)

cMoP : 共通単球前駆細胞 (common monocyte progenitor)

DC : 樹状細胞 (dendritic cell)

E : 赤芽球 (erythroblast)

FCM : 多重染色フローサイトメトリー (multi-color flow cytometry)

G : 顆粒球 (granulocyte)

GEMM : 顆粒球-赤芽球-マクロファージ-巨核球 (granulocyte-erythroblast-macrophage-megakaryocyte)

GM : 顆粒球-マクロファージ (granulocyte-macrophage)

GMDP : 顆粒球-単球-DC前駆細胞 (granulocyte-monocyte-DC progenitor)

MDP : 単球-DC前駆細胞 (monocyte-DC progenitor)

MLP : 多能リンパ球前駆細胞 (multi-lymphoid progenitor)

MNC : 単核細胞 (mononuclear cell)

moDC : 単球由来樹状細胞 (monocyte-derived dendritic cell)

MP : 単核食細胞 (Mononuclear phagocytes)

PB : 末梢血 (peripheral blood)

pDC : 形質細胞様樹状細胞 (plasmacytoid dendritic cell)

preMo、pre-Mono : プレ単球 (pre-monocyte)

rGMP : 修正型GMP集団 (revised GMP population)

TPO : トロンボポエチン (thrombopoietin)

UCB : 臍帯血 (umbilical-cord blood)

#### [0014] <ヒト共通単球前駆細胞>

本発明の単離されたヒト共通単球前駆細胞（単に「cMoP」とも記載する）は、単球系統以外の細胞には分化せず、かつ増殖能を有する。ここで、「単球系統以外の細胞には分化しない」とは、顆粒球、樹状細胞、リンパ球

には直接的に分化せず、単球系統の細胞（例えば、プレ単球、単球、マクロファージ、単球由来樹状細胞）にのみ分化する細胞であることを意味する。

[0015] すなわち、本発明の単離されたヒト共通単球前駆細胞は、GMPとは異なり、顆粒球への分化能は有していない。また、「増殖能を有する」とは、ヒトcMoPが細胞分裂を行い、細胞の数を増やすことができることを意味する。

[0016] なお、細胞数が全体として増加を続ける限り、ヒトcMoPの一部が、プレ単球、単球、マクロファージ等に分化してもよい。よって、別の言い方をすれば、本発明の単離されたヒト共通単球前駆細胞は、顆粒球への分化能を有さず、かつ増殖能を有する、単球の前駆細胞である。

[0017] 上述のとおり、従来型GMP（cGMP）は、Lin<sup>-</sup>CD34<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup>CD10<sup>-</sup>CD123<sup>+</sup>CD135<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>の細胞として定義されるが、これは真のGMPと他の前駆細胞との混合集団であると考えられる。

[0018] 本発明者らは、ヒトのcGMP集団を細分化してヒトcMoPを同定するために、C型レクチンファミリー（例えば、CLEC9A、CLEC12AおよびDC-SIGNなど）、サイトカイン受容体（例えば、CD115およびCD116など）、ケモカイン受容体（例えば、CX3CR1およびCXCR4など）、およびその他（例えば、CD64など）を含む、ヒトの単球、マクロファージ、およびDC上に発現している様々な細胞表面マーカーをスクリーニングした。細分化した集団の*in vitro*培養結果と組み合わせ、本発明者らは、cGMPを細分化してcGMP中のヒトcMoP分画を同定するために有用なマーカーとしてCD64とCLEC12Aを同定した。

[0019] より詳細には、本発明者らは、ヒトcMoPを同定するため、単球とマクロファージにおいて発現しているFcγRIIa（CD64）とC型レクチンCLEC12Aの発現に焦点を絞り、これらのマーカーを使用して、従来型GMP（cGMP）を細分化して詳細に検討し、4つの亜集団に分割した。

[0020] 各亜集団について詳細な検討を行った結果、CLEC12A<sup>hi</sup>CD64<sup>hi</sup>

亜集団（CLEC12AとCD64を高く発現している集団）をヒトcMoPとして同定した。また、cGMPに含まれるCLEC12A<sup>hi</sup>CD64<sup>int</sup>細胞のサブセットを、修正型（真の）ヒトGMP（rGMP）として再定義した。

[0021] 後述の実施例で示すとおり、rGMPは顆粒球と単球を生じるが、DCまたはリンパ球には分化しない。cGMP集団のCD64<sup>-</sup>分画のみが、DCとリンパ球への分化能を有する。

[0022] 本発明者らは、マイクロアレイデータを用いた複数の遺伝子の発現分析により、rGMPからヒトcMoP、プレ単球、そして単球が連続的に生じるが、おそらく、この過程はMDPとは無関係であることを明らかにした。本発明者らにより同定されたヒトcMoPと真のGMP（rGMP）およびこれらに関する分析は、ヒト骨髓系細胞分化経路に関する新たな知見をもたらすものである。

[0023] 本発明のヒトcMoPは、CD34<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup>CD10<sup>-</sup>CD123<sup>int</sup>/<sup>-</sup>CD45RA<sup>+</sup>CD135<sup>+</sup>CLEC12A<sup>hi</sup>CD64<sup>hi</sup>の表現型を有する。また、本発明のヒトcMoPはヒトの臍帯血中および骨髓中に存在するが、末梢血中には検出されない。

[0024] 実施例で詳細に示すように、本発明者らは、ヒトcMoPとrGMPを同定し、さらにこれらの特性等を詳細に調べ、ミエロイド系細胞発生経路を見直した（図16）。この見直された経路では、rGMPが顆粒球とヒトcMoPとに分化し、ヒトcMoPがプレ単球を介して全ての単球サブセットを生成する。

[0025] 上述のとおり、本発明のヒトcMoPは、単球系統の細胞のみに分化するヒト共通単球前駆細胞であり、かつ増殖能を有する。また、ヒトcMoPはヒトの臍帯血中および骨髓中に存在するが、末梢血中には検出されない。

[0026] 最近のマウスを用いた研究から、組織に常在し恒常性維持を担うマクロファージの大部分は胎生期（卵黄嚢・肝）由来であるが、メタボリックシンドロームや癌などの疾患における病態形成および維持を担うマクロファージの

多くは骨髄単球由来であることが明らかになっている。

[0027] 例えば、動脈硬化の原因である血管内プラーク形成を担うマクロファージ、肥満脂肪組織形成に関わるマクロファージ、炎症性骨破壊を担う破骨細胞、癌組織内に存在する免疫抑制性マクロファージ (Tumor associated macrophage、TAM) などは骨髄単球由来である。

[0028] よって、本発明のヒト cMoP は単球の源になる前駆細胞であることから、ヒト cMoP 特異的マーカーを標的とした上記疾患の治療法開発に使用できる。また、細胞分化系譜上、ヒト cMoP を標的としたり除去したりしたとしても樹状細胞分化には影響を与えないことから、易感染性などの懸念事項も極めて限定的にすることができる。

[0029] <ヒト共通単球前駆細胞の単離方法>

本発明の一態様は、ヒト共通単球前駆細胞 (cMoP) の単離方法に関する。該単離方法は、単離された臍帯血試料または骨髄試料から、CLEC12A および CD64 を高発現している細胞を単離する工程を含み、特に Lin<sup>-</sup>CD34<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup>CD10<sup>-</sup>CD123<sup>int</sup>/<sup>-</sup>CD45RA<sup>+</sup>CD135<sup>+</sup>CLEC12A<sup>hi</sup>CD64<sup>hi</sup>の細胞を単離する工程を含むことが好ましい。

[0030] なお、細胞表面マーカーの発現の有無 (陽性/陰性) および量 (強度) の高低を表す記号 (+/-/hi/int/lo 等) の意味は、当該技術分野において公知であり、当業者であれば、フローサイトメトリー等の機器を適切に設定して、目的とする細胞を単離することが可能である。

[0031] 例えば、CLEC12A<sup>hi</sup>CD64<sup>hi</sup>の細胞は、図1(a)に示されるように、cGMP中の他の亜集団と比較して最も高いCLEC12AとCD64の発現を有する分画である。

[0032] このような分画は、例えば、フローサイトメーターとしてBDバイオサイエンス社製のBD FACSAria (登録商標) III セルソーターを使用し、ゲート条件を「Lin<sup>-</sup>CD34<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup>CD10<sup>-</sup>CD123<sup>int</sup>/<sup>-</sup>CD45RA<sup>+</sup>CD135<sup>+</sup>CLEC12A<sup>hi</sup>CD64<sup>hi</sup>」と設定することで、cGMP集団から単離可能である。なお、ゲート条件は、必要とする細

胞の数、純度に応じて適当に調整することもできる。

[0033] 前記単離方法は、さらに、単離された臍帯血試料または骨髓試料から単核細胞（MNC）を単離する工程、および単離された単核細胞から、 $L i n^{-}$ の細胞を単離する工程の少なくとも一方を含むことがより好ましい。

[0034] 本発明のヒト共通単球前駆細胞の単離方法は、一態様として、

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

（工程2）：工程1で単離された単核細胞から、 $L i n^{-}$ の細胞を単離する工程と、

（工程3）：工程2で単離された $L i n^{-}$ の細胞から $L i n^{-} C D 3 4 + C D 3 8 + C D 1 0 - C D 1 2 3^{i n t} / - C D 4 5 R A + C D 1 3 5 + C L E C 1 2 A^{h i} C D 6 4^{h i}$ の細胞を単離する工程のうち、少なくとも1つの工程を含むのが好ましく、2つ以上の工程を含むのがより好ましく、すべての工程を含むのがさらに好ましい。工程1～工程3のうち、少なくとも工程3を含むのが好ましい。

[0035] 細胞の単離は、例えば、磁気分離またはフローサイトメトリーを用いて行うことができる。

[0036] 臍帯血試料または骨髓試料から、単核細胞（MNC）を単離する方法としては、例えば、リンパ球分離溶液を使用した密度勾配遠心分離による方法等が挙げられる。

[0037] 「 $L i n^{-}$ 」とは、分化抗原が陰性であることを意味し、既知の成熟血液系細胞（T細胞、B細胞、NK細胞、ミエロイド系細胞、赤芽球系細胞など）で発現している特定の表面抗原を有していないこと、すなわち該表面抗原を細胞表面に発現していないことをいい、本発明においては、 $C D 2$ 、 $C D 3$ 、 $C D 1 1 b$ 、 $C D 1 6$ 、 $C D 1 9$ 、 $C D 5 6$ および $C D 2 3 5 a b$ が陰性であることをいう。 $L i n^{-}$ の細胞を単離する方法としては、実施例に記載の方法を挙げることができる。

[0038]  $L i n^{-} C D 3 4 + C D 3 8 + C D 1 0 - C D 1 2 3^{i n t} / - C D 4 5 R A + C D$

135<sup>+</sup>CLEC12A<sup>hi</sup>CD64<sup>hi</sup>の細胞を単離することにより、単球系統以外の細胞には分化せず、かつ増殖能を有するヒトcMoPを得ることができる。

[0039] なお、本発明に係るヒトcMoPは、必ずしも100%の純度で単離されている必要はなく、CD34<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup>CD10<sup>-</sup>CD123<sup>int</sup>/<sup>-</sup>CD45RA<sup>+</sup>CD135<sup>+</sup>CLEC12A<sup>hi</sup>CD64<sup>hi</sup>の表現型を有するヒト共通単球前駆細胞を75%以上、80%以上、85%以上、90%以上、95%以上、98%以上、または99%以上含む細胞集団もまた、本発明の対象に含まれる。

[0040] <ヒトcMoPの増殖方法>

本発明のヒト共通単球前駆細胞(cMoP)は、増殖能を有する。ヒトcMoPの増殖方法としては、特に限定されないが、例えば、サイトカインカクテルの存在下において、培地中でヒトcMoPを培養することが好ましい。

[0041] サイトカインカクテルに含まれるサイトカインとしては、例えば、hFlt3L、hTPO、hSCF、M-CSF等が挙げられる。培地としては、例えば、メチルセルロース、血清、イスコフ改変ダルベッコ培地、RPMI-1640等が挙げられる。

[0042] ヒトcMoPの播種濃度は、培地中、 $1 \times 10^4$ 個/mL $\sim 4 \times 10^4$ 個/mLが好ましく、 $1 \times 10^4$ 個/mL $\sim 2 \times 10^4$ 個/mLがより好ましい。サイトカインカクテルの濃度は、例えば、25 $\sim 100$  ng/mL程度であることが好ましい。培養温度は、例えば、好ましくは30 $\sim 40$ °C、より好ましくは36 $\sim 38$ °C、さらに好ましくは37°Cである。

[0043] また、細胞をより好適に維持または増幅する観点から、培地交換を適当な時期に行うことが好ましい。培地交換の頻度としては、細胞を維持または増幅し得る限り特に制限されないが、例えば1 $\sim 5$ 日間経過毎、好ましくは3日間経過毎としてもよい。培地交換においては、培地の全部を交換してもよいし、一部のみを交換してもよい。

[0044] また、ヒトcMoPの培養においては必要により継代を行ってもよく、継代の頻度としては、細胞を維持または増幅し得る限り特に制限されず、細胞の集団が大きくなってきたタイミングで適宜行うことができ、例えば、4～12日間経過毎、好ましくは6～10日間経過毎とすることができる。

[0045] <ヒトcMoPの分化誘導方法>

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

[0046] <医薬組成物>

本発明の一態様は、ヒト共通単球前駆細胞（cMoP）を死滅させる、ヒト共通単球前駆細胞の増殖若しくは分化を阻害する、または単球若しくはマクロファージの生成を阻害する物質を有効成分として含む、マクロファージ関連疾患の治療に用いるための医薬組成物に関する。

[0047] 有効成分である前記物質としては、例えば、低分子、核酸（例えば、アンチセンスオリゴヌクレオチド、siRNA、アプタマーおよびリボザイム等）、ポリペプチド、または抗体若しくは該抗体断片が挙げられる。

[0048] また、医薬組成物は、薬学的に許容される担体、安定剤、または賦形剤を含むことができ、その投与経路については、使用する薬剤の種類、投与する対象に応じて、適宜決定することができる。

[0049] 上記の低分子、核酸、ポリペプチド、または抗体若しくは該抗体断片のターゲットは、ヒトcMoPに発現する分子であればいかなる分子でもよいが、ミエロイド系の細胞の分化の過程でヒトcMoPの上流にある細胞よりも、ヒトcMoPで発現が高い分子がより好ましい。

- [0050] ターゲットとなる分子の種類としては、例えば、タンパク質（例えば、細胞表面タンパク質および細胞内タンパク質）、核酸等が挙げられる。また、ヒトcMoPの上流にある細胞としては、例えば、rGMP、cGMPまたはMP等が挙げられる。
- [0051] ヒトcMoPに発現する分子としては、例えば、IRF8、CEBPA、CEBPB、SLFN5、AHR、CCR2、KLF4、SPI1（PU.1）、ZEB2、CX3CR1、PPARGC1A、PPARGC1B、PPARG、HES1、NR4A1、POU2F2、CD110、CD115、CD116、CD117、CLEC12A、CD64、CD135、CD45RA、CD34、およびCD38等が挙げられる。
- [0052] ヒトcMoPの上流にある細胞よりも、ヒトcMoPで発現が高い分子としては、例えば、CEBPB、KLF4、CX3CR1、CCR2、CLEC12A、CD64、およびCD115等が挙げられる。
- [0053] 有効成分である前記物質が抗体または該抗体断片の場合は、これら分子に結合する抗体または該抗体断片のうち、少なくとも1つの抗体または該抗体断片であることが好ましく、抗CX3CR1抗体、抗CCR2抗体、抗CLEC12A抗体、抗CD64抗体、および抗CD115抗体からなる群より選ばれる少なくとも1つの抗体または該抗体断片であることが更に好ましい。
- [0054] 抗CD64抗体としては、ヒトcMoPを死滅させる、ヒトcMoPの増殖若しくは分化を阻害する、または単球若しくはマクロファージの生成を阻害する抗体であればいずれの抗CD64抗体であってもよい。
- [0055] 抗CD64抗体としては、例えば、それぞれ配列番号4～6で表わされるCDR1～3のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域のアミノ酸配列を含み、かつそれぞれ配列番号9～11で表わされるCDR1～3のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域のアミノ酸配列を含む抗体が挙げられる。当該抗体の一態様としては、抗CD64マウス抗体m22抗体（国際公開第2005/052007号）をもとにして作製したm22キメラ抗体、m22ヒト化抗体等を

用いることができる。

[0056] 上述のヒトcMOPに発現する分子、またはミエロイド系の細胞の分化の過程でcMOPの上流にある細胞よりも、ヒトcMOPで発現が高い分子に結合する抗体が、ヒトcMOPを死滅させること、ヒトcMOPの増殖若しくは分化を阻害すること、または単球若しくはマクロファージの生成を阻害することを確認する方法としては、具体的には例えば、下記の(1)～(3)に示す方法が挙げられる。

[0057] (1) 被験抗体がヒトcMOPを死滅させることを確認する方法

フローサイトメトリーを用いて単離したヒトcMOPとNK細胞(CD56陽性/CD3陰性細胞)を適切な細胞比で混合し、被験抗体を添加して培養する。その後、当該細胞をCD64抗体(32.2-AF647)、CD56抗体(BV711標識、Biolegend社 #318336)、CLEC12A抗体(FITC標識、Biolegend社 #353608)および7-AADで染色し、CD56陰性/CD64陽性/CLEC12A陽性細胞として検出されるヒトcMOPの7-AADの染色強度を測定する。この7-AADの染色強度が、被験抗体を添加しなかったサンプルよりも被験抗体を添加したサンプルで上昇していれば、被験抗体はヒトcMOPを死滅させる抗体であることが確認できる。

[0058] (2) 被験抗体がヒトcMOPの増殖を阻害することを確認する方法

上記<ヒトcMOPの増殖方法>に従い、単離したヒトcMOPを被験抗体および適切な添加物を加えた培地で培養する。その後、ヒトcMOPの細胞数を公知の方法で検出し、被験抗体を添加しなかったサンプルよりも、被験抗体を添加したサンプルで細胞数が減少していれば、被験抗体は、ヒトcMOPの増殖を阻害する抗体であることが確認できる。

[0059] (3) 被験抗体がヒトcMOPの分化を阻害すること、または単球若しくはマクロファージの生成を阻害することを確認する方法

上記<ヒトcMOPの分化誘導方法>に従い、単離したヒトcMOPを被験抗体および適切な添加物の存在下で培養する。その後、当該細胞をヒトc

M $\alpha$ P、プレ単球および単球マーカーで染色し、フローサイトメーターで各細胞画分を検出する。被験抗体を添加しなかったサンプルよりも、被験抗体を添加したサンプルでヒトcM $\alpha$ P画分がプレ単球または単球画分よりも多ければ、被験抗体は、ヒトcM $\alpha$ Pの分化を阻害する抗体であることが確認できる。同様の方法で、被験抗体が単球若しくはマクロファージの生成を阻害することも確認できる。

[0060] 本発明の一態様は、抗CLEC12A抗体および抗CD64抗体の少なくとも一方または該抗体断片を有効成分として含む、医薬組成物に関する。上述のとおりcM $\alpha$ Pは、CLEC12AとCD64を発現していることから、これらの抗体または該抗体断片を有効成分として含む医薬組成物は、ヒトcM $\alpha$ P特異的マーカーを標的にできるため、単球由来のマクロファージ関連疾患の治療に用いることができる。

[0061] Clec12A (Gene Bank accession No. NM\_001207010) は、C型レクチンであり死細胞由来の尿酸結晶に結合する。また、細胞内にITIMモチーフを持つ。CD64 (Gene Bank accession No. NM\_000566、別名Fc $\gamma$ RIIA) は、糖タンパク質であり、ヒトIgG1及びIgG3に結合する。

[0062] 抗CLEC12A抗体および抗CD64抗体の少なくとも一方または該抗体断片を有効成分として含む医薬組成物は、抗癌剤として用いることができる。単球や腫瘍関連マクロファージ(TAM)の寿命は通常、数日から3週間程度と考えられており、本発明の医薬組成物を用いてヒトcM $\alpha$ Pを部分的または完全に除去することにより、腫瘍関連マクロファージ(TAM)も部分的または完全に除去され得ることが当業者には理解される。

[0063] また、本発明に係る医薬組成物は、併用剤として、他の抗癌剤などの薬物と組み合わせて用いることもできる。

[0064] 上記の医薬組成物は、抗IRF8抗体、抗CEBPA抗体、抗CEBPB抗体、抗SLFN5抗体、抗AHR抗体、抗CCR2抗体、抗KLF4抗体、抗SPI1(PU.1)抗体、抗ZEB2抗体、抗CX3CR1抗体、抗PPARGC1A抗体、抗PPARGC1B抗体、抗PPARG抗体、抗H

ES1抗体、抗NR4A1抗体、抗POU2F2抗体、抗CD110抗体、抗CD115抗体、抗CD116抗体、抗CD117抗体、抗CLEC12A抗体、抗CD64抗体、抗CD135抗体、抗CD45RA抗体、抗CD34抗体および抗CD38抗体から選ばれる少なくとも1つの抗体または該抗体断片を有効成分として含む、医薬組成物でもよい。

[0065] なかでも抗CEBPB抗体、抗KLF4抗体、抗CX3CR1抗体、抗CCR2抗体、抗CLEC12A抗体、抗CD64抗体、および抗CD115抗体から選ばれる少なくとも1つの抗体または該抗体断片を有効成分として含む医薬組成物がより好ましく、抗CX3CR1抗体、抗CCR2抗体、抗CLEC12A抗体、抗CD64抗体、および抗CD115抗体からなる群より選ばれる少なくとも1つの抗体または該抗体断片を有効成分として含む医薬組成物であることが更に好ましい。

[0066] 「抗体」は、ポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体であることができ、モノクローナル抗体であることが好ましい。当該抗体は、例えば任意の適当な生物学的供給源、例えば、マウス、ラット、ヒツジ、およびイヌ科動物から単離することができる。他に、任意の適当な抗原を適当な動物に免疫し、ハイブリドーマ法やファージディスプレイ法など任意の方法で抗体を取得することができる。

[0067] また、抗体は、モノクローナル抗体の断片、例えば消化断片またはその特定部分であってもよい。また、抗体または該抗体断片は、ファージディスプレイ法等によるスクリーニングによって同定されたペプチド配列を含むものであってもよい。抗体断片は、抗原結合部位を有していればいかなる断片でもよく、例えば、Fab、F(ab')<sub>2</sub>、scFv、diabody、Fcを含む抗体断片、CDRを含むペプチド等が挙げられる。

[0068] 抗体は、キメラ抗体、ヒト化抗体、ヒト抗体のいずれであってもよい。これらの抗体の作製方法は、当業者には既知である。ヒト抗体の作製には、例えば、KMマウス（商標）（協和発酵キリン社製）やXenomouse（商標）II（Amgen社製）を使用することができる。

- [0069] 抗体のクラス、サブクラスは特に限定はされないが、好ましくは I g G クラス、より好ましくは I g G 1 である。抗体は、好適には、ヒト抗体の定常領域、特にヒト F c 領域を有する抗体である。
- [0070] 上述の抗体は、好適には、中和活性、抗体依存性細胞傷害（A D C C）活性および補体依存性細胞傷害（C D C）活性の少なくとも一方を有する抗体であることができる。抗体の F c 領域のアミノ酸残基を改変することで A D C C 活性や C D C 活性を増減させることができる。抗体の F c 領域の糖鎖を調節することにより A D C C 活性を増減させることもできる。これら抗体の活性を調節する方法は公知の手法を用いることができる。
- [0071] また、抗体薬物複合体（A D C）等のように、抗体に抗癌剤、放射性物質や細胞毒性物質などを結合させることもでき、さらに、異なる活性または補助機能を与えるために、1 つ以上の追加ドメインが結合しているキメラ抗体または融合抗体を作製してもよい。また、上述の抗体は、2 種類の抗原を認識する二重特異性抗体等であってもよい。
- [0072] また、本発明の一態様は、I R F 8、C E B P A、C E B P B、S L F N 5、A H R、C C R 2、K L F 4、S P I 1（P U. 1）、Z E B 2、C X 3 C R 1、P P A R G C 1 A、P P A R G C 1 B、P P A R G、H E S 1、N R 4 A 1、P O U 2 F 2、C D 1 1 0、C D 1 1 5、C D 1 1 6、C D 1 1 7、C L E C 1 2 A、C D 6 4、C D 1 3 5、C D 4 5 R A、C D 3 4 および C D 3 8 から選ばれる少なくとも 1 つの分子の発現を減少または増加させることができる、低分子、核酸またはポリペプチドを有効成分として含む医薬組成物が挙げられる。
- [0073] また、本発明の別の態様としては、C L E C 1 2 A および C D 6 4 の少なくとも一方の発現を減少または増加させることができる、低分子、核酸（例えば、アンチセンスオリゴヌクレオチド、s i R N A、アプタマーおよびリボザイム等）、またはポリペプチドを有効成分として含む医薬組成物に関する。例えば、C L E C 1 2 A および C D 6 4 の少なくとも一方の発現を減少させることができる有効成分を含む医薬組成物は、単球由来のマクロファ

ージ関連疾患の治療に用いることができ好ましい。

[0074] また、本発明の別の一態様としては、CEBPB、KLF4、CX3CR1、CCR2、CLEC12A、CD64およびCD115から選ばれる少なくとも1つの分子の発現を減少または増加させることができる、低分子、核酸またはポリペプチドを有効成分として含む医薬組成物がより好ましい。

[0075] 本明細書において、マクロファージ関連疾患とは、マクロファージの望ましくない活性により引き起こされる（または悪性化する、若しくは難治性となる）疾患を指す。マクロファージ関連疾患としては、特に限定されないが、例えば、癌（例えば、免疫抑制、血管新生および転移等）、骨関連疾患、神経変性（例えば、ALSおよびMS等）、アルツハイマー病、レット症候群、動脈硬化、脂質代謝異常、肺胞蛋白症、喘息、線維症、リウマチ、ループス腎炎、乾癬、炎症性腸疾患、クローン病、糖尿病、肥満およびメタボリック症候群等が挙げられる。

[0076] 癌としては、例えば、血液癌、乳癌、子宮体癌、卵巣癌、前立腺癌、肺癌、胃癌、非小細胞肺癌、頭頸部扁平上皮癌、食道癌、膀胱癌、メラノーマ、大腸癌、腎細胞癌および非ホジキンリンパ腫等が挙げられる。

[0077] 骨関連疾患としては、例えば、骨粗鬆症、大理石骨病、癌の骨転移、変形性関節症、関節リウマチ、高カルシウム血症、骨折およびベーチェット病等が挙げられる。

[0078] 線維症としては、例えば、肺線維症、肝線維症、腎線維症、心筋線維症、皮膚線維症等が挙げられる。炎症性腸疾患としては、例えば、クローン病や潰瘍性、肉芽腫性、虚血性、放射性、感染性結腸炎等の大腸炎が挙げられる。

[0079] <治療方法および医薬の製造における使用>

本発明の一態様は、ヒト患者におけるマクロファージ関連疾患の治療方法に関する。このような治療方法は、ヒト患者に対してヒト共通単球前駆細胞（cMφP）を死滅させる、ヒト共通単球前駆細胞の増殖若しくは分化を阻害する、または単球若しくはマクロファージの生成を阻害する物質を有効成

分として含む組成物を投与する工程を含みうる。有効成分である前記物質は低分子、核酸、ポリペプチドまたは抗体若しくは該抗体断片でありうるが、限定はされない。

[0080] 本発明に係る治療方法は、好ましくは、ヒト患者に対して抗CLEC12A抗体および抗CD64抗体の少なくとも一方または該抗体断片を投与する工程を含むものである。マクロファージ関連疾患は、癌、骨関連疾患、動脈硬化、線維症、炎症性腸疾患またはメタボリック症候群でありうるが、限定はされない。

[0081] 本発明の一態様は、ヒト患者における癌の治療方法に関する。このような治療方法は、ヒト患者に対して抗CLEC12A抗体および抗CD64抗体の少なくとも一方または該抗体断片を投与する工程を含みうる。また、本発明に係る治療方法は、併用剤として、抗癌剤などの他の薬剤を投与する工程を含むこともできる。

[0082] 本発明の一態様は、マクロファージ関連疾患の治療に用いるための医薬の製造における、ヒト共通単球前駆細胞（cMφP）を死滅させる、ヒト共通単球前駆細胞の増殖若しくは分化を阻害する、または単球若しくはマクロファージの生成を阻害する物質の使用に関する。用いられる物質は低分子、核酸、ポリペプチドまたは抗体若しくは該抗体断片でありうるが限定はされない。

[0083] 本発明に係る使用は、好ましくは、マクロファージ関連疾患の治療に用いるための医薬の製造における、抗CLEC12A抗体および抗CD64抗体の少なくとも一方または該抗体断片の使用である。マクロファージ関連疾患は、癌、骨関連疾患、動脈硬化、線維症、炎症性腸疾患、またはメタボリック症候群でありうるが、限定はされない。

[0084] 本発明の一態様は、癌の治療に用いるための医薬の製造における、抗CLEC12A抗体および抗CD64抗体の少なくとも一方または該抗体断片の使用に関する。また、製造される医薬は、併用剤として、抗癌剤などの他の薬剤と組み合わせて用いるためのものであってもよい。

[0085] 上記の治療方法は、抗IRF8抗体、抗CEBPA抗体、抗CEBPB抗体、抗SLFN5抗体、抗AHR抗体、抗CCR2抗体、抗KLF4抗体、抗SPI1(PU.1)抗体、抗ZEB2抗体、抗CX3CR1抗体、抗PPARGC1A抗体、抗PPARGC1B抗体、抗PPARG抗体、抗HES1抗体、抗NR4A1抗体、抗POU2F2抗体、抗CD110抗体、抗CD115抗体、抗CD116抗体、抗CD117抗体、抗CLEC12A抗体、抗CD64抗体、抗CD135抗体、抗CD45RA抗体、抗CD34抗体および抗CD38抗体から選ばれる少なくとも1つの抗体または該抗体断片をヒトに投与する工程を含む治療方法であってもよい。

[0086] なかでも、抗CEBPB抗体、抗KLF4抗体、抗CX3CR1抗体、抗CCR2抗体、抗CLEC12A抗体、抗CD64抗体および抗CD115抗体から選ばれる少なくとも1つの抗体または該抗体断片をヒトに投与する工程を含む治療方法であることがより好ましく、抗CX3CR1抗体、抗CCR2抗体、抗CLEC12A抗体、抗CD64抗体、および抗CD115抗体からなる群より選ばれる少なくとも1つの抗体または該抗体断片をヒトに投与する工程を含む治療方法であることが更に好ましい。抗体の使用についても同様である。

[0087] <キット>

本発明の一態様は、抗CLEC12A抗体および抗CD64抗体の少なくとも一方または該抗体断片を含む、ヒト共通単球前駆体細胞(cMoP)の標識または単離に使用するためのキットに関する。キットは、さらに、標識物、試薬、反応容器、取扱説明書等を含んでもよい。

[0088] 前記キットは、抗CD2抗体、抗CD3抗体、抗CD11b抗体、抗CD16抗体、抗CD19抗体、抗CD56抗体、抗CD235ab抗体、抗CD34抗体、抗CD38抗体、抗CD10抗体、抗CD123抗体、抗CD45RA抗体、抗CD135抗体、抗CLEC12A抗体および抗CD64抗体からなる群より選ばれる少なくとも1つの抗体または該抗体断片を含むキットであってもよい。

[0089] なかでも、抗CD2抗体、抗CD3抗体、抗CD11b抗体、抗CD16抗体、抗CD19抗体、抗CD56抗体、抗CD235ab抗体、抗CD34抗体、抗CD38抗体、抗CD10抗体、抗CD123抗体、抗CD45RA抗体、抗CD135抗体、抗CLEC12A抗体および抗CD64抗体または該抗体断片を含むキットであることがより好ましい。

[0090] <ヒト共通単球前駆細胞の使用>

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

[0091] (a) ヒトcMoPを単離してマイクロアレイ解析を行い、ヒトcMoPに発現する細胞表面分子を抽出して、同分子に対する抗体を作製する。該抗体を用いて、ヒトcMoP、単球、腫瘍随伴マクロファージ(TAM)への分化・機能を阻害するものを同定する。

[0092] 具体的には、例えば、

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

[0093] ここで、ヒトcMoPの分化、増殖または生存に「影響する」とは、ヒトcMoPの分化、増殖若しくは生存を促進する、または抑制することを指す。ヒトcMoPの分化、増殖または生存を促進すること、または抑制することは、当業者に公知の任意の手法により評価することができる。

[0094] また、別の態様として、

試験物質を含む培地中でヒトcMoPを培養する工程、および

試験物質がヒトcMoPの分化、増殖または生存に影響するか否かを評価する工程を含む、ヒトcMoPの分化、増殖または生存に影響する物質のスクリーニング方法も挙げられる。試験物質としては、各種サイトカイン、抗体若しくは抗体断片、ポリペプチド、ポリヌクレオチドまたは低分子化合物などが使用されうる。

[0095] (b) ヒトcMoPを単離して、*in vitro*で単球に分化誘導する培養系を用いて、ヒトcMoPから単球への分化機構を解明する。さらに、同培養系に各種サイトカイン、抗体若しくは該抗体断片、ポリペプチド、ポリヌクレオチドまたは低分子化合物などの試験物質を添加して、単球への分化を阻害または促進するものをスクリーニングする。

[0096] 具体的には、

試験物質を含む単球分化培地中でヒトcMoPを培養する工程、および

試験物質が単球の生成を阻害するか否かを評価する工程を含む、単球の生成を阻害する物質のスクリーニング方法が挙げられる。

[0097] (c) ヒトcMoPを単離して、*in vitro*で破骨細胞に分化誘導する培養系に各種サイトカイン、抗体若しくは該抗体断片、ポリペプチド、ポリヌクレオチドまたは低分子化合物などの試験物質を添加して、破骨細胞への分化を阻害または促進するものをスクリーニングする。

[0098] 具体的には、

試験物質を含む破骨細胞分化培地中でヒトcMoPを培養する工程、および

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

[0099] (d) 上記(b)または(c)のスクリーニングにより選択されたサイト

カイン、抗体若しくは該抗体断片または低分子化合物等を用いて、*in vivo*評価系で解析を行う。

[0100] 具体的には、臍帯血またはヒトcMoPを、免疫不全動物（例えば、NSGマウス、NOGマウス、BRGSマウスおよびMISTRGマウスなど）に移植して、造血系をヒト由来の細胞に置換した「ヒト化マウス」に、上記抗体若しくは該抗体断片または低分子化合物等を投与して、*in vivo*で単球やマクロファージへの分化能を阻害または促進するものをスクリーニングする。さらにヒト腫瘍細胞株を移植して、腫瘍内に浸潤してくる単球、同単球からTAMへの分化、腫瘍の増大などを指標にして、抗体若しくは該抗体断片または低分子化合物等の効果を検討する。

[0101] (e) 上記(b)または(c)のスクリーニングにより選択されたサイトカイン、抗体若しくは該抗体断片または低分子化合物等について、担癌マウスを用いた*in vivo*評価系で解析を行う。上記抗体若しくは該抗体断片または低分子化合物のマウス対応物を用いて、マウスcMoP、単球、TAMを標的として解析する。

[0102] (f) ヒトcMoPを単離して、MS（質量分析）などを用いて代謝解析を行い、ヒトcMoPに特徴的な代謝経路を同定し、同経路を遮断または活性化する、すなわち、ヒトcMoPの機能を阻害または促進する低分子薬物の探索を行う。

[0103] (g) ヒトcMoPを単離してマイクロアレイ解析を行い、ヒトcMoPに特徴的なマスター調節遺伝子を同定、同遺伝子を用いてiPSからヒトcMoPを誘導し、各種疾患治療に応用する。

[0104] (h) ヒトcMoPを単離して、*in vitro*でM2マクロファージへの分化を促進するサイトカインや低分子化合物のスクリーニングを行い、炎症性疾患へ治療応用する。

[0105] (i) ヒトcMoPを単離して、単球由来樹状細胞への分化を促進するサイトカインまたは低分子化合物の探索と各種疾患治療へ応用する。

[0106] (j) ヒトcMoPを単離して、CRISPR-Cas9などのゲノム編

集技術を用いて特定のケモカイン受容体や接着分子遺伝子を削除する。増殖・分化した単球は特定のケモカイン受容体や接着分子遺伝子を発現しないため、特定組織への移入集積のみを抑制することができる。

[0107] (k) また、本発明の一態様は、免疫不全マウス、好ましくは超免疫不全マウス（例えば、NSGマウス、NOGマウス、BRGSマウス、MISTRGマウスなど）の骨髓にヒトcMoPを移植する工程を含む、ヒト単球を有するマウスの作製方法に関する。

[0108] 前記マウスの作製方法により、ヒト単球を有し、ヒト顆粒球は有さないマウスが得られる。さらに、このようなマウスの作製方法は、ヒトFlt3L、TPO、SCFおよびM-CSFをマウスに投与する工程、およびヒト腫瘍細胞をマウスに移植する工程の少なくとも一方を含んでもよい。

[0109] 前記マウスの作製方法に用いられるヒトcMoPは当業者に公知の技術により遺伝子改変されていてもよく、特に、上記(j)に記載のCRISPR-Cas9などの技法により遺伝子改変されたものであってもよい。

[0110] よって、本発明に係るヒト単球を有するマウスは、遺伝子改変されたヒト単球およびそれに由来する細胞を有しうる。作製されたヒト化マウスは、例えば、上記(d)に記載のin vivo評価系等に用いることができる。

[0111] <ヒト共通単球前駆細胞の細胞医薬としての使用>

単離したヒトcMoPをex vivoで増殖させた後、単球系統の細胞の補充を必要とする患者に移植してもよい。その際、ex vivoでヒトcMoPに遺伝子改変を施してから、患者に移植することもできる。よって、本発明は、ヒトcMoPを含有する医薬組成物も対象としている。

[0112] 単球系統の細胞の補充を必要とする患者の治療方法は、具体的には、例えば、患者からヒトcMoPを単離する工程、場合によりヒトcMoPに遺伝子改変を施す工程、および、移植に必要な量が得られるようにヒトcMoPを培養する工程、を含むことができる。

## 実施例

[0113] 以下、実施例を示して本実施形態を詳細に説明するが、本実施形態は以下

の実施例に限定されるものではない。

[0114] まず、実施例で用いた試料、培養方法および分析方法等について以下説明する。

[0115] <試料>

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

[0116] <細胞の単離、ソーティング、およびフローサイトメトリー分析>

リンパ球分離溶液（ $d = 1.077$ 、ナカライテスク社製）を使用した密度遠心分離によって、UCB由来の新鮮な単核細胞（MNC）を単離した。次にMNCをCD2（RPA-2.10）、CD3（UCHT1）、CD11b（ICRF44）、CD16（3G8）、CD19（H1B19）、CD56（HCD56）、CD235ab（HIR2）（すべてBiolegend社製）、およびCD14（RMO52）（Beckman Coulter社製）を含む細胞系マーカーに対するPE-Cy5標識抗体（Ab）と反応させ、さらに抗Cy5マイクロビーズ（Miltenyi Biotec社製）と反応させた。

[0117] autoMACS Pro Separator（Miltenyi Biotec社製）の「deplete」プログラムを用いて、細胞系マーカーを事前に発現していない細胞（Lin<sup>-</sup>）を粗精製した。Lin<sup>-</sup>細胞をCD34（581；APC-Cy7）、CD10（H110a；BV412）、CD123（6H6；PerCP-Cy5.5）、CD45RA（H1100、BV510）、CD135（BV10A4H2；PE）、CLEC12A（50C1；FITC）、CD64（10.1；APC）（すべてBiolegend社製）、およびCD38（HB7；PE-Cy7）（BD社製）に対する抗体と反応させた。

[0118] 各前駆細胞におけるサイトカイン受容体の発現を評価するために、Lin<sup>-</sup>細胞をCD34（APC-Cy7）、CD10（BV412）、CD123（PerCP-Cy5.5）、CD45RA（BV510）、CLEC12

A (F I T C)、CD 6 4 (A P C) に対する抗体と、サイトカイン受容体であるCD 1 1 5 (9-4 D 2-1 E 4 ; P E)、CD 1 1 6 (4 H 1 ; P E)、CD 1 1 7 (1 0 4 D 2 ; P E) (すべてB i o l e g e n d 社製)、またはCD 1 1 0 (R E A 2 5 0 ; P E) (M i l t e n y i B i o t e c h 社製) に対する抗体と反応させた。

[0119] R 1 ~ R 5 と M D P を 比 べ る た め に、L i n<sup>-</sup>細胞をCD 3 4 (A P C - C y 7)、CD 1 0 (B V 4 1 2)、CD 1 2 3 (P e r C P - C y 5. 5)、CD 4 5 R A (B V 7 1 1)、C L E C 1 2 A (F I T C)、CD 6 4 (A P C)、CD 1 1 5 (P E)、CD 1 1 6 (ビオチン)、およびストレプトアビジン (B V 5 1 0) に対する抗体と反応させた。

[0120] 各前駆細胞の細胞周期状態を評価するために、L i n<sup>-</sup>細胞を転写因子染色バッファーセット (e B i o s c i e n c e) により固定し、CD 3 4 (A P C - C y 7)、CD 1 0 (B V 4 1 2)、CD 1 2 3 (P e r C P - C y 5. 5)、CD 4 5 R A (B V 5 1 0)、C L E C 1 2 A (P E)、CD 6 4 (A P C) (すべてB i o l e g e n d 社製)、CD 3 8 (P E - C y 7)、およびK i 6 7 (B 5 6 ; F I T C) (すべてB D 社製) に対する抗体で染色した。

[0121] <ミエロイド系細胞コロニー形成能アッセイ>

ソーティングした前駆細胞各200個を200  $\mu$  l のイスコフ改変ダルベッコ培地中に懸濁し、2  $\mu$  l の10 ng / m l h T P O (協和発酵キリン社製) を加えた2 m l のメチルセルロース培地 (S t e m c e l l T e c h n o l o g i e s 製のM e t h o C u l t H 4 4 3 5 E n r i c h e d) と混合した。細胞懸濁液1 m l を12ウェルプレート (二重の実験) の1つのウェルに加え、10日間培養し、そしてマクロファージ (M)、顆粒球/マクロファージ (G M)、顆粒球 (G)、顆粒球/赤芽球/マクロファージ/巨核球 (G E M M)、または赤芽球 (E) の分類に基づいてコロニーを計数した。

[0122] <形態学的解析>

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

[0123] <細胞の培養と分析>

ミエロイド系細胞分化アッセイのために、 $2 \times 10^3$ 個の前駆細胞を10%のFCS、100U/mlのペニシリン/ストレプトマイシン(ナカライテスク社製)、およびサイトカインカクテルを含む50 $\mu$ lのIMDM(Sigma社製)中で培養した。

[0124] ここで、本明細書において、サイトカインカクテルとしては、50ng/mlのhFlt3L(Miltenyi Biotech社製)、50ng/mlのhTPO(協和発酵キリン社製)、および100ng/mlのhSCF(Miltenyi Biotech社製)(FTS条件)が使用される。

[0125] 単球由来DCを誘導するため、FTSと50ng/mlのGM-CSF(Miltenyi Biotech社製)とを加えた培地中で細胞を培養した。ミエロイド系細胞を検出するために、分化してきた細胞をCD66b(G10F5; PerCP-Cy5.5)、HLA-DR(L243; BV510)、CD14(M5E2; BV412)、CD16(3G1; PE-Cy5)、CD123(6H6; FITC)、CD1c(L161; PE-Cy7)、ストレプトアビジン(APC-Cy7)(すべてBiolegend社製)、BDCA-2(AC144; ビオチン)(Miltenyi Biotech社製)、およびCD11c(B-ly6; APC)(BD社製)に対する抗体によって染色した。

[0126] T細胞およびB-NK細胞分化能を評価するために、Tst4/D114およびTst4ストローマ細胞を10%のFCS、100U/mlのペニシ

リン／ストレプトマイシン（ナカライテスク社製）、1%の非必須アミノ酸（Gibco）、および1%のピルビン酸ナトリウム（Gibco社製）を含む100  $\mu$ lのRPMI-1640培地（Sigma社製）（完全RPMI-1640培地）を用いて96ウェルプレート中で培養した。

[0127] 2日後、各前駆細胞からの細胞10個をストローマ細胞培養プレートに加え、4週間培養し、培地の半分を毎週交換した。培地には、T細胞を誘導するために5 ng/mlのFlt3Lと5 ng/mlのIL-7（Miltenyi Biotech社製）を加えた。B-NK細胞を誘導するために100 ng/mlのSCF、20 ng/mLのIL-7、50 ng/mlのTPO、10 ng/mlのIL-2（Miltenyi Biotech社製）を加えた。

[0128] さらに、2週間の培養の後、細胞を40  $\mu$ m孔径のNitexメッシュ（日本理化学器械社製）に通し、適切なサイトカインカクテルを含む完全RPMI-1640培地中の新鮮なストローマ細胞上に移した。4週間の培養後、細胞を回収し、T細胞を検出するためにhCD45およびCD3に対する抗体で染色するか、B-NK細胞を検出するためにhCD45、CD33、CD19、およびCD56に対する抗体で染色した。

[0129] ヒトcMoPおよびrGMPの増殖能を評価するために、それぞれの前駆細胞 $1 \times 10^3$ 個をソーティングし、CFSE（Life Technologies社製）で標識し、2mlのメチルセルロース培地（Stemcell Technologies社製MethoCult H4435-Enriched）を用いて7日間培養した。

[0130] FACS Aria IIIまたはFACSCanto II（BD社製）とFlowJoソフトウェア（TreeStar社製）を用いて、細胞を解析した。

[0131] <単一細胞解析>

10 ng/mlのhTPOと10 ng/mlのhFlt3Lを加えた2mlのメチルセルロース培地（Stemcell Technologies

社製 MethoCult H4435-Enriched) を用いて、100個のヒトcMoPまたはrGMPをそれぞれ5日および8日間、培養した。

[0132] P20ピペットを用いて単一のコロニーをピックアップし、丸底96ウェルプレート中で200 $\mu$ lのPBSに懸濁し、上下に十分にピペティングした。細胞懸濁液を2,000rpmでスピンドウンし、ミエロイド系細胞の検出のために上述の抗体と反応させた。FACS Aria IIIとFlowJoソフトウェア(TreeStar社製)を用いて、細胞を解析した。

[0133] <In vivo再構築アッセイ>

BRGSマウスにエックス線(0.5Gy)(Faxitron社製)を照射した。翌日、ソーティングしたヒトcMoPまたはCD64<sup>int</sup> GMP(5 $\times$ 10<sup>3</sup>~3 $\times$ 10<sup>4</sup>細胞)を10 $\mu$ lのPBS中に懸濁し、カスタマイズしたItoマイクロシリンジ(Ito Corp. 製)を使用して、BRGSマウスの骨髓腔に直接注入した。

[0134] 同じ日に、ヒト組換え体タンパク質Flt3L(Peprotech社製)、TPO(協和発酵キリン社製)、SCF(Peprotech社製)、およびM-CSF(Biolegend社製)(各8 $\mu$ g)を静脈内投与し、これを連続4日間続けた。移植後5日目と7日目にヒトcMoPとrGMP由来の細胞をそれぞれ解析した。

[0135] <マイクロアレイ解析とバイオインフォマティクス>

少なくとも20人のボランティアの臍帯血からヒトcMoP、rGMP、およびCMPをソーティングし、プールした。Ovation(登録商標) Pico WTA System V2(NuGEN Technologies社製)を用いて、6.622ngの総RNAからcDNAを作製し、増幅させた。増幅したcDNAの収量をNanoDrop ND-2000分光光度計(Thermo Scientific社製)を用いて測定した。

- [0136] SureTag Complete DNA Labeling Kit (Agilent社製)を用いて、Cy3標識cDNAを2.0  $\mu$ gのcDNAから調製し、その後、DNAの精製および濃縮のためにAmicon Ultra-0.5mL遠心フィルター(Merck Millipore社製)を用いて濾過した。色素の取り込みとcDNAの収量をNanoDrop ND-2000分光光度計を用いてチェックした。
- [0137] 2  $\mu$ gのCy3標識cDNAを1×Agilentブロッキング試薬と1×Agilentハイブリダイゼーションバッファーで50  $\mu$ lに調整し、回転Agilentハイブリダイゼーションオープン中、65℃にて17時間、SurePrint G3 Human GE 8×60K Microarray Ver2.0 (Agilent社製)にハイブリダイズさせた。
- [0138] ハイブリダイゼーション後、マイクロアレイをGE Wash Buffer 1 (Agilent社製)により室温で1分間洗浄し、そしてGE Wash buffer 2 (Agilent社製)により37℃にて1分間洗浄し、その後、短い遠心分離により直ちに乾燥させた。
- [0139] 8×60kアレイスライド用の単色スキャン設定を用いて、Agilent SureScanマイクロアレイスキャナ(G2600D)上で洗浄の直後にスライドをスキャンした(スキャン面積: 61×21.6mm、スキャン解像度: 3  $\mu$ m、色素チャンネルの設定: 緑色、PMTの設定: 100%)。
- [0140] バックグラウンドを減算し、空間的な傾きを除去した加工シグナル強度を得るために、デフォルトのパラメーターを使用し、Feature Extraction Software 11.5.1.1 (Agilent社製)を用いて、スキャンした画像を解析した。
- [0141] 複数の発現データを抽出するための操作は全て、Takara Bio Incが行った。生データはSubio Platform (ver1.1

8. 4667、Subio Inc. 社製）を用いて解析した。遺伝子セット濃縮解析（GSEA）はGSEA（v. 2. 2. 0 Broad Institute）を用いて実施した。

[0142] ヒトの血液単球シグネチャは、公表されているマイクロアレイデータ（GSE35459）から抽出した。ヒトcMoP、rGMP、およびCMP用の遺伝子セットは、上述のように、マイクロアレイデータから抽出した。

[0143] <例1：従来型GMP（cGMP）の細分化>

上述のとおり、cGMPは、Lin<sup>-</sup>CD34<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup>CD10<sup>-</sup>CD123<sup>lo</sup>CD135<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>の細胞として定義され、主に顆粒球-単球前駆細胞を含むが、T細胞への分化能をもつ細胞も一部含んでいる。加えて、単球-DC系統に局限した前駆細胞であるMDPが最近、cGMP分画中に同定された。

[0144] そこで、サイトカイン受容体、ケモカイン受容体、およびその他をスクリーニングした結果、本発明者らは、ヒトのcGMPサブセットについて調べるためのマーカーとしてC型レクチンCLEC12AとFcγR（CD64）を選択した〔図1（a）～図1（d）〕。いずれのマーカーも、マウスおよびヒトの単球において高発現している。

[0145] 図1（a）はヒトのUCBからのLin<sup>-</sup>MNC、図1（b）はヒトのBMおよびPB由来のLin<sup>-</sup>MNCを、フローサイトメーターにより解析した結果をそれぞれ示す。ゲート領域内またはその付近に記載の数値は、各垂集団の頻度を示している。cGMP、CMP、およびMLPは、それぞれCD34<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup>CD123<sup>lo</sup>CD10<sup>-</sup>CD135<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>、CD34<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup>CD123<sup>lo</sup>CD10<sup>-</sup>CD135<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup>、およびCD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>CD45RA<sup>+</sup>CD10<sup>+</sup>であった。

[0146] さらに、CLEC12AとCD64の発現に基づき、多色フローサイトメトリー（FCM）を用いて、ヒト臍帯血（UCB）由来のcGMPをCLEC12A<sup>hi</sup>CD64<sup>hi</sup>（R2）、CLEC12A<sup>hi</sup>CD64<sup>int</sup>（R3）、CD64<sup>-</sup>CLEC12A<sup>+</sup>（R4）およびCD64<sup>-</sup>CLEC12A<sup>-</sup>（R5

）という4つの分画に細分化した〔図1（a）〕。また、 $Lin^{-}CD34^{-}CD38^{+}CD10^{-}CD123^{lo}CD135^{+}CD45RA^{+}$ 分画中のCLEC12A<sup>hi</sup>CD64<sup>hi</sup>分画も定義に加えた（R1）。R1とR2の表現型は、R2細胞がCD34を発現し、R1細胞ではその発現が無い点を除き、同一であった。

[0147] cGMPを細分化した集団の詳細な表現型は、以下の通りであった： $CD34^{-}CD38^{+}CD123^{lo}CD10^{-}CD64^{hi}CLEC12A^{hi}CD135^{+}CD45RA^{hi}$ （R1）、 $CD34^{+}CD38^{+}CD10^{-}CD123^{int}/-CD45RA^{+}CD135^{+}CLEC12A^{hi}CD64^{hi}$ （R2）、 $CD34^{+}CD38^{+}CD10^{-}CD123^{int}/-CD45RA^{+}CD135^{+}CLEC12A^{hi}CD64^{int}$ （R3）、 $CD34^{+}CD38^{+}CD10^{-}CD123^{int}/-CD45RA^{+}CD135^{+}CD64^{-}CLEC12A^{+}GMP$ （R4）、および $CD34^{+}CD38^{+}CD10^{-}CD123^{int}/-CD45RA^{+}CD135^{+}CD64^{-}CLEC12A^{-}$ （R5）。

[0148] これら5つの分画（R1～R5）をヒト骨髄（BM）中にも検出した〔図1（b）上段〕。一方、ヒト末梢血（PB）においては、それらはほとんど検出されなかった〔図1（b）下段〕。

[0149] R1～R5分画のミエロイド系－赤芽球系分化能を評価するため、上述のミエロイド系細胞コロニー形成能アッセイの方法に基づき、コロニー形成単位（CFU）を*ex vivo*でアッセイした。サイトカインカクテルを含むメチルセルロース培地中でソーティングした各前駆細胞（ $1 \times 10^2$ 個）を培養し、10日後にコロニーをカウントした。

[0150] 比較対照として、 $Lin^{-}CD34^{+}CD38^{-}CD45RA^{+}CD10^{+}$ の多能リンパ球前駆細胞（MLP）と $Lin^{-}CD34^{+}CD38^{+}CD123^{lo}CD10^{-}CD135^{+}CD45RA^{-}$ の共通ミエロイド系前駆細胞（CMP）も同様にアッセイした〔図1（a）参照〕。

[0151] 図1（c）に、各UCB亜集団の骨髄コロニー形成能を示す。各バーは、培養した細胞（ $1 \times 10^2$ 個）あたりのコロニーの平均数を表し、図中の略号

の意味は次のとおりである。M：マクロファージ、GM：顆粒球－マクロファージ、G：顆粒球、E：赤芽球、GEMM：顆粒球－赤芽球－マクロファージ－巨核球。R 3分画とR 4分画は、マクロファージ（M）、顆粒球－マクロファージ（GM）、および顆粒球（G）コロニーを生じたが、R 3分画よりも多くのマクロファージコロニーがR 4分画から生じた。

[0152] 興味深いことに、R 2分画とR 5分画はMコロニーのみを形成し、R 1分画はミエロイド系コロニーをわずかに形成した。以前のcGMPの報告から予想されたように、いずれの分画もEあるいはGEMMコロニーを形成しなかった[図1(c)]。図1(d)は、各UCB前駆細胞のDiff-Quick染色の結果を表す。元の倍率は100倍であり、スケールバーは10  $\mu$ mを表す。

[0153] 図8(a)～図8(c)は、R 1～R 3分画のFCMによる分析結果を表す。本発明者らは、R 1～R 3分画を再び、CD34/CD38と細胞系マーカー(Lin)/CD34プロファイルについてゲーティングした。

[0154] 図8(a)～図8(c)は、3種の色でそれぞれR 1～R 3分画を表しており、濃い灰色がR 1分画、薄い灰色がR 2分画、黒がR 3分画を表す。注目すべきことに、R 1～R 3分画のミエロイド系分化能は、それらのCD34/CD38発現レベル、細胞の大きさ[図8(a)～図8(c)]、および形態[図1(d)]と相関関係があった。

[0155] R 1～R 3分画の、CD34/CD38およびリネージ(Lin)/CD34プロファイルを解析したところ、R 3分画の細胞はCD34<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup>であり、R 2分画の細胞はダウンレギュレートされたCD34の発現を示し(CD34<sup>int</sup>CD38<sup>+</sup>)、R 1はCD34をほぼ完全に失っていた(CD34<sup>-</sup>CD38<sup>+</sup>) [図8(a)、図8(b)]。

[0156] 細胞質の体積はR 3からR 1にかけて徐々に増加していた。これは、それらのCD64発現レベルおよびミエロイド系コロニー形成能とそれぞれ正および負に相関していた[図1(b)、図1(c)および図8(c)]。細胞の形態に関しては、R 2～R 5分画は核が丸く、拡張しており、細胞質の体

積が比較的小さいという典型的な前駆細胞の形態を有していた [図 1 (d)]。

[0157] なお、図 1 (a) ~ 図 1 (d) の各データは、図 1 (a) については少なくとも 20 回、図 1 (b) において、BM は 4 回、PB は 3 回、図 1 (c) および図 1 (d) は 3 回の独立した実験を行った。図 8 (a) ~ 図 8 (c) の各データは、3 回の独立した実験に基づくものである。

[0158] これらの結果により、cGMP は、異なるミエロイド系細胞分化能を有する 4 つの独立の亜集団に分画できることが示された。

[0159] <例 2 : ヒトの cMoP および rGMP の同定>

例 1 のとおり、R1 ~ R5 分画は、異なるミエロイド系細胞分化能を有していたため、上記のゲーティング戦略を用いて、顆粒球、単球および DC のサブセットを検出するための *in vitro* 培養系を立ち上げた [図 9 (a)]。

[0160] UCB からソーティングした各分画 ( $1 \times 10^3$  個) を Fms 様チロシンキナーゼ受容体 3 リガンド (Flt3L) ( $50 \text{ ng/mL}$ )、トロンボポエチン (TPO) ( $50 \text{ ng/mL}$ )、および幹細胞因子 (SCF) ( $100 \text{ ng/mL}$ ) の存在下 (FTS 条件) で、2 日間 (R1)、4 日間 (R2) または 8 ~ 10 日間 (R3 ~ R5) 培養し、顆粒球 ( $\text{CD}66\text{b}^+$ )、単球 ( $\text{CD}14^+\text{CD}16^-$ 、 $\text{CD}14^+\text{CD}16^+$  および  $\text{CD}14^-\text{CD}16^+$ )、pDC ( $\text{CD}123^+\text{BDCA}-2^+$ ) および cDC ( $\text{CD}141^{\text{hi}}\text{CD}11\text{c}^-$  および  $\text{CD}1\text{c}^+\text{CD}11\text{c}^+$ ) について分析した。

[0161] 図 2 (a) は、*ex vivo* における、R1 ~ R5 分画からの単球および DC 分化を表し、図 2 (b) は、分画における細胞の種類の割合を示す。図 2 (b) 中、 $\text{CD}14^+\text{CD}16^-$  単球は  $\text{CD}14^+\text{mono}$  と記載し、 $\text{CD}14^+\text{CD}16^+$  および  $\text{CD}14^-\text{CD}16^+$  単球は  $\text{CD}16^+\text{mono}$  と記載する。ゲート領域内またはその上の数字は、各分画の割合を示している。R3 分画と R4 分画は *in vitro* コロニー形成アッセイ [図 1 (c)] の結果と一致して顆粒球への分化能を示したが、R1、R2、および R5 分画

は顆粒球への分化能を示さなかった [図 2 (a)、図 2 (b)]。

[0162] なお、R 1～R 3分画は、古典的なCD 1 4<sup>+</sup>CD 1 6<sup>-</sup>単球、中間型CD 1 4<sup>+</sup>CD 1 6<sup>+</sup>単球、および非古典的なCD 1 4<sup>low</sup>/CD 1 6<sup>+</sup>単球などの単球サブセットを産生したが、pDC、CD 1 4<sup>high</sup>cDCまたはCD 1 c<sup>+</sup>cDCを含むDCサブセットは全く産生しなかった [図 2 (a)、図 2 (b)]。

[0163] これらの前駆細胞に由来する主たる単球サブセットは、古典的なCD 1 4<sup>+</sup>CD 1 6<sup>-</sup>単球ではなく、中間型CD 1 4<sup>+</sup>CD 1 6<sup>+</sup>細胞であり、これは最近の報告結果とも一致している。

[0164] さらに、図 1 0 (a)～図 1 0 (c) は、R 1、R 2、R 3分画から産生される単球由来の樹状細胞への分化の様子を表している。図 1 0 (a) は、R 1～R 3分画をFTSGM (FTSおよび単球由来DCを誘導する代表的なサイトカインであるGM-CSF) 50 ng/mLと共に培養すると、CD 1 4<sup>+</sup>CD 1 c<sup>+</sup>単球由来DCが生じることを表している。

[0165] また、FTSM (FTSおよびM-CSF) と共に培養すると、R 1～R 3分画のCD 1 4<sup>+</sup>CD 1 6<sup>+</sup>とCD 1 4<sup>low</sup>/CD 1 6<sup>+</sup>単球 (すなわちCD 1 6<sup>+</sup>単球) への分化がわずかに亢進することを確認した [図 1 0 (b)、図 1 0 (c)]。

[0166] これに関連して、R 1分画の単球生成のピークが2日目で、少なくとも4日間を要するR 2のピークよりも早かった (データ示さず)。この所見は、R 1およびR 2サブセットの両者が、単球分化に特化した前駆細胞であり、R 1がR 2の下流の前駆細胞であることを示唆している。

[0167] 一方、どちらもCD 6 4<sup>-</sup>であるR 4およびR 5分画は、すべての単球およびDCサブセットを生み出した [図 2 (a)、図 2 (b)]。R 4およびR 5分画に由来するCD 1 4<sup>high</sup>cDCは、CLEC 9 Aを発現していた [図 9 (b)]。R 1～R 3分画はDCへの分化能を、ほとんど示さなかったため、これらの結果から、R 4とR 5分画がcGMPにおけるDCの主要な源であることが示唆された。

[0168] 次に、R1～R5分画のリンパ球系分化能を調べた。図2(c)は、D114+Tst4ストローマ細胞、IL-7(5 ng/ml)、およびFlt3L(5 ng/ml)の存在下で、図2(d)は、Tst4ストローマ細胞、SCF(100 ng/ml)、TPO(50 ng/ml)、IL-2(10 ng/ml)、およびIL-7(40 ng/ml)の存在下で、各分画の細胞10個を96ウェルプレートの48個のウェル中において1ヶ月間、培養した。

[0169] 各ウェルをCD3+T細胞[図2(c)]またはCD19+B細胞およびCD56+NK細胞[図2(d)]について分析した。図中の各バーはCD3+T細胞[図2(c)]ならびにCD19+B細胞およびCD56+NK細胞の少なくとも一方[図2(d)]について陽性のウェルの割合を表し、NDは検出されなかったことを表す。

[0170] 図2(c)は、T細胞分化能を評価するため、T細胞の分化に不可欠なNotchリガンドであるデルタ様リガンド4(D114)を発現しているTst4ストローマ細胞上において、該Flt3LとIL-7の存在下で、各分画の細胞10個を培養した結果を示す。比較対照として、MLPを用いた。R1～R3分画はT細胞への分化能を全く有していなかった一方、R4およびR5分画は著しい数のT細胞を産生した。

[0171] 図2(d)は、Tst4ストローマ細胞上において、SCF、TPO、IL-2、およびIL-7の存在下で各分画の細胞10個を培養することにより、B-NKへの分化能を評価した結果を示す。比較対照として、Lin-CD34+CD38+CD123<sup>int</sup>CD10+CD45RA<sup>+</sup>の細胞として定義されるB-NK前駆細胞を用いた。B細胞とNK細胞は、それぞれ、CD33-CD19<sup>+</sup>およびCD33-CD56<sup>+</sup>の細胞と定義した。

[0172] 図11(a)および図11(b)は、R4およびR5分画のリンパ系分化能を示す。図11(a)は、MLP、R4分画、R5分画に由来するCD3+T細胞のFCMによる分析結果を示す。細胞は図2(b)と同様の方法で培養した。図11(b)は、B-NK前駆細胞、R4分画またはR5分画に由

来するB細胞、B-NK細胞およびNK細胞のFCMによる分析結果を示す。細胞は図2(c)と同様の方法で培養した。NDは検出されなかったことを示す。

[0173] 興味深いことに、R1～R5サブセットのリンパ系分化能は、CLEC12Aの発現が増加するにつれて減少する傾向が見られ、CD64をさらに獲得することにより完全に失われた[図2(c)、図2(d)、図11(a)および図11(b)]。R4およびR5のリンパ系分化能は、cGMP中に残存するT細胞への分化能を示唆する。

[0174] なお、図2(a)～図2(d)、図10(a)～図10(c)並びに図11(a)および図11(b)のデータはいずれも3回の独立した実験によるものである。

[0175] ヒト及びマウスのcGMPはどちらも顆粒球と単球に加えて、DCへも分化する。これらの前駆細胞は、ミエロイド系細胞分化能に加えて、明らかなリンパ球細胞への分化能を有している。例えば、マウスのcGMPは、リンパ系遺伝子を高レベルに発現し、*in vitro*と*in vivo*でT細胞とB細胞の両方を生じさせる。また、ヒトのUCB由来のcGMPも、T細胞に分化する能力を有している。

[0176] 本発明者らは、上述のとおり、前駆細胞のリンパ球系分化能を評価するために、最適化された方法であるTst4ストローマ細胞/D114およびTst4ストローマ細胞と複数のサイトカインカクテルとを組み合わせで培養し、ヒトのrGMPにはリンパ球系細胞への分化能がないことを明らかにした。

[0177] また、rGMPはDCへの分化能はなく、DC分化能はCD64-cGMP(R4およびR5分画)に保存されていた。R4とR5は、単球およびDCへの分化能に加えて、顆粒球およびリンパ球の少なくとも一方への分化能も備えていた。

[0178] R5が多分化能を有しており、また、ヒトのMLP様細胞群が赤芽球系への分化能を欠いていることから、上記実施例のデータは、赤芽球系統への分

岐がLin<sup>-</sup>CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>多分化能前駆細胞の段階でおこるというモデルに合致する。

[0179] さらに、R1～R5分画について、CD110（TPO受容体）、CD115（M-CSF受容体）、CD116（GM-CSF受容体）、CD117（SCF受容体）、およびCD123（IL3受容体 $\alpha$ ）などの、他のサイトカイン受容体の発現特性を調べた結果を図12に示す。図12中、黒塗り部分が、各受容体の発現パターンを表す。

[0180] R1分画におけるサイトカイン受容体の発現パターンは、プレ単球について既に報告されたもの [Breton, G. et al. Circulating precursors of human CD1c<sup>+</sup> and CD114<sup>+</sup> dendritic cells. J. Exp. Med. 212, 401-413 (2015).] と酷似しており、CD115、CD116、およびCD117を検出可能なレベルで発現していた。一方、R2とR3分画において観察された発現パターンは、これまで全く報告されていないものであった。

[0181] これらの表現型と発生分析に基づき、R1が最近定義されたプレ単球と同じプレ単球分画であり、R2がヒトcMoPであり、R3が真のGMP（修正型GMP、rGMP）であると結論した（表1）。

[0182] （ヒトcMoP等とマウスcMoP等との比較）

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

[0183] マウスとヒトのcMoPは単一細胞レベルで単球のみを産生する前駆細胞であり、どちらもCD64、CLEC12AおよびCD117を発現している。一方、ヒトcMoPはCD135を発現しているが、マウスcMoPはCD135を発現していない。

[0184] マウスcMoPの分化起源はMDPに由来するが、ヒトcMoPはrGMPに由来しており、おそらくMDPを介さずに分化してくる（rGMPがD

C分化能を有していないため)。この相違は、単にマウスとヒトの間のミエロイド系細胞分化経路の違いを反映している可能性がある。あるいは、マウスのcGMPはrGMPを含んでいる可能性も考えられる。

[0185] DC分化能を持たないrGMPの存在は、分化経路において単球由来DCがcDCとpDCとは異なる分化起源から由来することと一致しており、この単球由来DCとDCサブセットの分岐がrGMPの上流で起きていることを示唆している。

[0186] 最近、ヒトのUCBおよびBM中のcGMPにおいて、顆粒球-単球-DC前駆細胞(GMDP)、MDP、およびDC分化に制限されたDC共通前駆細胞(CDP)が同定されたことから、本発明者らは、CDP、MDP、ヒトcMoP、およびrGMPの表現型を比較した。

[0187] 図14(a)～図14(e)に、MDPとR2～R5分画との表現型の比較を示す。CDPはCD123<sup>hi</sup>分画[図1(a)の上の2番目のパネル]として現れ、cGMPには含まれていない。図14(a)は、CLEC12AおよびCD64の発現により、MDPがCD64<sup>int</sup>とCD64<sup>-</sup>の亜集団に分割されることを示している。図14(b)は、MDPがcGMPと重なることを示している。図14(c)は、MDP中の各分画の割合を示す。MDPはR3(rGMP)とR4中に確認されたが、R2(ヒトcMoP)およびR5中には確認されなかった。

[0188] これは、MDPがCD64<sup>int</sup>とCD64<sup>-</sup>の亜集団に分割されうることを示しており[図14(a)～図14(c)]、MDPが顆粒球分化能をいくらか有する不均一な集団であることを示唆している。CD64<sup>int</sup>MDPは、rGMPの14.4±5.0%を占めていた。

[0189] 次に、CD64<sup>int</sup>とCD64<sup>-</sup>MDPのミエロイドコロニー形成能を調べた。図14(d)および図14(e)は、ミエロイドコロニー形成能を示す。比較対照としてGMDPを用いた。サイトカインカクテルを含むメチルセルロース培地中でソーティングされた各前駆体細胞(1×10<sup>2</sup>個)を培養し、10日後にコロニー数を数えた。

[0190] 図14(d)は、培養した $1 \times 10^2$ 個中の各細胞の割合を示す。図14(e)は、FCMによる解析結果を表す。図14(d)中の略号は次のとおりである。M：マクロファージ、GM：顆粒球-マクロファージ、G：顆粒球。

[0191] 重複する表現型から予想されるように、CD64<sup>int</sup>およびCD64-MDPは、ミエロイドコロニー形成能を示したが、赤芽球系細胞形成能は示さず、まさしくR3(rGMP)およびR4のように、培養において単球と顆粒球をそれぞれ生じた[図1(c)、図14(d)および図14(e)]。CD64-MDPのみが、FTS条件下でDCを生じた(データ示さず)。

[0192] 以上より、MDPが不均一な集団であり、CD64<sup>int</sup>MDPはrGMPとして定義されるべきであると結論づけた。

[0193] なお、図12～図14(e)の各データは3回の独立した実験によるものである。

[0194] <例3：ヒトcMoPとrGMPのクローナル解析>

さらに、単一の細胞レベルでヒトcMoPとrGMP細胞の特性を評価した。ヒトcMoPとGMPをソーティングし、サイトカインカクテルを含むメチルセルロース培地中で、それぞれ、5日間と8日間培養し、FCM分析のために単一のコロニーをピックアップした(上述の「単一細胞解析」を参照)。顆粒球と単球について、代表的なコロニーの細胞を分析した。

[0195] 図3(a)～図3(e)は単一細胞レベルでのヒトcMoPおよびrGMPの特性を表す。図3(a)は100個のヒトcMoP由来、図3(b)は100個のrGMP由来の代表的なコロニーのFCMプロファイルを示す。ゲート領域中の数字は各集団の割合を示す。図3(c)は、FCMによって検出された単球および／または顆粒球コロニーの比率を表す。図3(a)～図3(c)中の略号の意味は次のとおりである。ND：コロニー検出されず、Mono：単球、Gra：顆粒球、undiff.：未分化細胞。

[0196] 注目すべきことに、ヒトcMoP由来のすべての単一コロニーは100%が単球から成っていた[図3(a)、図3(c)]。rGMP由来の一部の

単一コロニーは単球のみを含んでいたが（33.2 ± 3.5%）、残りは、単球と顆粒球の両方（21.7 ± 2.8%）、顆粒球のみ（37.6 ± 1.9%）、または未分化細胞（6.6 ± 2.3%）を含んでいた〔図3（b）、図3（c）〕。

[0197] 単一細胞レベルで二つの細胞系列への分化能をもつ前駆細胞の頻度は、ヒトMDP（12.5%）のそれより高く、マウスCDP（18.0%）に匹敵していた。

[0198] さらに、図3（d）にヒトcMoPの限界希釈解析の結果を示し、図3（e）にrGMPの限界希釈解析の結果を示す。細胞を、サイトカインカクテルを含むメチルセルロース培地中で7日間培養した。図3（d）、図3（e）においては、縦軸がコロニー陰性ウェルの割合を表し、横軸が培養した細胞の数を表し、点線が予想されるクローン原性頻度での37%検出失敗を表す。また、括弧内の数字は、それぞれ、図3（d）においてはヒトcMoP、図3（e）についてはrGMPの平均のクローン頻度を、それぞれ表す。

[0199] 限界希釈解析によりコロニー形成能を推定したところ、同じ培養条件下において、6.85個のヒトcMoPのうち1個、1.04個のrGMPのうち1個の頻度で各々コロニーを形成した〔図3（d）、図3（e）〕。このヒトcMoPの前駆細胞頻度は、ヒトpreDC（1/7.84）、マウスCDP（1/7.1~8.6）、およびマウスcMoP（1/3.9~9.2）について報告されたものと同等であった。

[0200] これらの結果により、ヒトcMoPが、マウスcMoPについて報告されたように単一分化能性の前駆細胞であり、また、rGMPが単一細胞レベルで単球と顆粒球を生成できる二分化能性の前駆細胞を含むことが示された。

[0201] なお、図3（a）~図3（e）のデータは、3回〔図3（a）~図3（c）〕および4回〔図3（d）、図3（e）〕の独立した実験によるものである。

[0202] <例4：ヒトcMoPおよびrGMPの増殖能>

前駆細胞は分裂を伴って分化することから、本発明者らは、CFSE希釈

アッセイにより単球、プレ単球 (preMo)、ヒトcMoP、およびrGMPがもつ増殖能を評価した。

[0203] 図4 (a) は、これらの集団をCFSEで標識し、各分画の細胞  $1 \times 10^3$  個を適切なサイトカインカクテルを含むメチルセルロース培地中で7日間培養し、分化してきた細胞をFCMによって解析した結果を示す。CFSE希釈による評価によって、単球とプレ単球では細胞分裂が確認されなかったが、ヒトcMoPとrGMPは大きな増殖能を示した。

[0204] 図4 (b) は、CFSE標識せずに図4 (a) と同様にして培養して各細胞を回収した結果を示す。図4 (a) の観察と一致して、 $10^3$ 個のプレ単球の培養7日後には細胞は全く回収されなかったが、同じ培養条件下で $10^3$ 個のヒトcMoPからは  $31,000 \pm 3,875$  個の細胞が得られた [図4 (b)]。

[0205] 図4 (c) は、「単離後間もない」各細胞におけるKi67発現のFCMプロファイルを示す。「単離後間もない」プレ単球は、増殖能を示さなかったが [図4 (c)]、それらはKi67<sup>+</sup>であった [図4 (a)、図4 (b)]。

[0206] G1期、S期、G2期、およびM期の細胞はすべてKi67<sup>+</sup>であるため、この標識は*in vivo*においてヒトcMoPとして増殖した後の最後のG2期およびM期の細胞を反映しているのかもしれない。これらの結果から、rGMP、ヒトcMoPおよびプレ単球の間における増殖能（一般的に利用されている前駆細胞の指標）の明らかな違いが示された。

[0207] なお、図4 (a) ~ 図4 (c) の各データは少なくとも3回の独立した実験に基づくものである。

[0208] <例5: *In vivo*におけるヒトcMoPとrGMPの分化能>

*In vivo*におけるヒトcMoPとrGMPの分化能を評価するために、発明者は、新たなアッセイ系を開発した [図5 (a)]。本発明者らは、NOD型*Sirpa*を有するB6. Rag2<sup>-/-</sup>Il2rg<sup>-/-</sup>マウス (BRGSマウス) に0.5 Gyの照射を行い、ヒトcMoPまたはrGMP (

5 × 10<sup>3</sup> ~ 3 × 10<sup>4</sup>個の細胞)を該マウスのBMに直接移植した。同日に、ヒト組換え体タンパク質F l t 3 L、T P O、S C FおよびM - C S Fの該マウスへの静脈内投与を開始し、それを連続4日間続けた。

[0209] 図5 (b) に、5日目 (ヒトcM o P) および7日目 (r G M P) に移植したヒトcM o Pまたはr G M PのBM子孫細胞をF C Mによって、分析した結果を示す。図5 (c) では、ヒトcM o Pは単球のみを生成したが、これはC D 1 4 + C D 1 6 - 単球 (C D 1 4 + m o n o、26.3 ± 5.3%) と C D 1 4 + C D 1 6 + およびC D 1 4 - C D 1 6 + 単球 (C D 1 6 + m o n o、54.2 ± 7.07%) から成っていた。r G M Pは、単球 (C D 1 4 + m o n o、30.4 ± 8.7%; C D 1 6 + m o n o、11.4 ± 5.03%) と顆粒球 (15.2 ± 2.34%) の両方を生じさせた [図5 (b)、図5 (c)]。

[0210] これに関連して、ヒトcM o Pとr G M Pに由来する単球と顆粒球の細胞形態をD i f f - Q u i c k染色によって確認した [図5 (d)]。図5 (d)において、元の倍率は100倍であり、スケールバーは10 μmを表す。

[0211] これらの結果から、ヒトcM o Pがi n v i v oにおいて単球分化に特化した前駆細胞であり、r G M Pが単球-顆粒球前駆細胞であることが示された。

[0212] なお、図5 (a) ~ 図5 (d) のデータは少なくとも3回の独立した実験に基づくものである。

[0213] 前述のとおり、ヒトの単球は、古典的なC D 1 4 + C D 1 6 - 単球、中間型C D 1 4 + C D 1 6 + 単球、そして、非古典的なC D 1 4 <sup>l o</sup> / - C D 1 6 + 単球という3つのサブセットに細分化される。

[0214] 機能的解析およびトランスクリプトーム解析から、ヒトの古典的C D 1 4 + C D 1 6 - と非古典的C D 1 4 <sup>l o</sup> / - C D 1 6 + 単球が、おそらくマウスのL y 6 c <sup>h i</sup> とL y 6 c <sup>l o</sup> 単球にそれぞれ対応するものであることが明らかになっている。

[0215] これに関連して、マウス  $Ly6c^{hi}$  単球は、血液中で自然に  $Ly6c^{lo}$  単球へと分化するが、これは、一定の条件下では、ヒトの単球の場合にもあてはまると考えられる。定常状態では、ヒト単球の主要分画は  $CD14^{+}CD16^{-}$  である。

[0216] しかしながら、 $M-CSF$  で処理すると、 $CD14^{+}CD16^{+}$  単球の数が増加し、 $CD14^{lo/-}CD16^{+}$  単球が徐々に拡大する。これは  $CD14^{+}CD16^{-}$ 、 $CD14^{+}CD16^{+}$ 、そして  $CD14^{lo/-}CD16^{+}$  単球という、段階的な分化経路を示唆している。

[0217] *In vitro* で培養した場合、あるいはヒト  $cMoP$  および  $rGMP$  の *in vivo* 移植後にそれらから産生される主要な単球サブセットの1つは、 $CD14^{+}CD16^{+}$  単球であった。

[0218] これに関連して、ヒト胎児肝臓  $CD34^{+}$  前駆細胞を移植した  $MISTG$  マウスおよび  $MISTRG$  マウスの血液、脾臓、肺、および肝臓では、 $CD14^{+}CD16^{-}$  単球よりもむしろ  $CD14^{+}CD16^{+}$  細胞が主な単球サブセットであった。

[0219] <例6：  $rGMP$ 、ヒト  $cMoP$  およびプレ単球の連続的な分化>

次に、 $rGMP$ 、ヒト  $cMoP$  およびプレ単球の間における分化経路の上下関係を調べた。 $rGMP$  は顆粒球と単球に分化できたことから、本発明者らは、 $rGMP$  がその顆粒球分化能を失うことによってヒト  $cMoP$  に分化し、さらにプレ単球に分化すると仮定した。100%の純度で  $rGMP$  をソーティングし、 $FTS$  条件下、*in vitro* で2日間、細胞を培養した [図6 (a)]。図6 (a) 中の数字はソーティングしたヒト  $cMoP$  と  $rGMP$  の純度を示す。図6 (b) および図6 (c) に、それぞれ、ソーティングした  $rGMP$  [図6 (b)] とヒト  $cMoP$  [図6 (c)] について、 $FTS$  条件下で24時間培養し、それらの発生段階を分析した結果を示す。

[0220]  $rGMP$  からの子孫細胞が、ヒト  $cMoP$  とプレ単球に極めて似た集団を含んでおり [図6 (b)]、ヒト  $cMoP$  からの子孫細胞はプレ単球に酷似していることを見出した [図6 (c)]。ヒト  $cMoP$  が  $rGMP$  を生じる

ことは全くなかった。これらの結果から、rGMPがヒトcMoPとプレ単球に連続して分化することが強く示唆された。

[0221] なお、図6(a)～図6(c)のデータは少なくとも3回の独立した実験に基づく。

[0222] <例7：ヒトcMoPがもつ単球シグネチャ>

ヒトcMoPが単球シグネチャを有するか否か（すなわち、それらが単球分化に適した遺伝子を発現しているか否か）を調べるため、ソーティングして精製したrGMP、ヒトcMoP、プレ単球（preMo）、ヒトcMoP由来のCD14<sup>+</sup>単球（cMoP-Mo）、および末梢血CD14<sup>+</sup>単球（PB-Mo）の網羅的遺伝子発現解析を行った結果を図7(a)～図7(f)に示す。比較対照として、複数のミエロイド系細胞への分化能を有しており、単球分化に局限していないCMPを含めた。

[0223] 単球特異的遺伝子の発現レベルは、単球分化に伴い徐々に増加し、前駆細胞の中では、CMPで単球特異的遺伝子の発現レベルが最も低く、rGMPでは弱く、ヒトcMoPで最も高くなっていた[図7(a)]。この傾向は、DC特異的な遺伝子発現については観察されなかった(図15)。

[0224] 図7(b)に、単球の分化に関与する転写因子の相対的mRNAレベルを示し、図7(c)に遊走に関与するケモカイン受容体の相対的mRNAレベルを示す。図7(b)及び図7(c)において、データはCMPに対する相対値として記載している。

[0225] 単球の発生に重要な転写因子であるPU.1、IRF8、CEBPB、およびKLF4の発現レベルは、ヒトcMoPで横ばい状態になっており[図7(b)]、単球の遊走に必要なケモカイン受容体であるCX3CR1、およびCCR2の発現レベルは、プレ単球、ヒトcMoP由来のCD14<sup>+</sup>単球、および末梢血CD14<sup>+</sup>単球のステージでさらに増加していた[図7(c)]。また、CEBPB、KLF4、CX3CR1およびCCR2は、rGMPよりもヒトcMoPで発現レベルが増加していた[図7(b)、図7(c)]。

[0226] 図7(d)に、表示の細胞における規準化された遺伝子発現プロファイルの主成分分析の結果を示す。主成分(PC)分析に基づく各集団のプロットフロー(点の位置)は、連続的な単球の分化過程に合致しており、*in vitro*および*in vivo*における所見と相関していた。

[0227] これに関連して、集団間の分化ステージの距離を表すユークリッド距離も計算した[図7(e)]。cMoP-MoまたはPB-Moからの距離は、CMPからプレ単球へと徐々に減少していた。

[0228] さらに、遺伝子セット濃縮解析(GSEA)を使い、ヒト血液中のCD14<sup>+</sup>単球において濃縮されていることが知られている遺伝子セットの発現レベル(ヒト単球シグネチャ)をヒトcMoP由来のCD14<sup>+</sup>単球、プレ単球、ヒトcMoP、rGMP、およびCMPの間で比較した[図7(f)]。

[0229] 具体的には、ヒト血液単球シグネチャをヒト血液CD14<sup>+</sup>単球(GSE35459)の上位200遺伝子から作製し、遺伝子セット濃縮解析(GSEA)をヒトcMoP対rGMP、rGMP対CMP、ヒトcMoP対プレ単球、プレ単球対ヒトcMoP-Moにおいて濃縮されている遺伝子を比較するために実施した。

[0230] 図7(f)において、pは正規p値、NESは遺伝子濃縮スコアを表す。データは、プールされた20個の試料から取得した。ヒト単球シグネチャは、単球に向かう分化の程度と共に有意に増加しており(すなわち、ヒトcMoP由来の単球>プレ単球>ヒトcMoP>rGMP>CMP)、これは、各前駆細胞における単球への分化レベルを裏付けている。

[0231] これらの結果から、単球に限局した分化能をもつ前駆細胞としてヒトcMoPが同定され、rGMPからヒトcMoPそして単球への連続経路が強く裏付けられた。

[0232]

[表1]

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

### <例8：CD64発現細胞の作製>

#### (1) ヒトCD64発現細胞の作製

ヒトCD64のアミノ酸配列（配列番号1）をコードするDNA配列（配

列番号2)を遺伝子合成(Genscript社製)し、発現ベクターpcDNA3.1(+ )のBamHI-XhoIサイトに組み込み、プラスミドhCD64 / pcDNA3.1を作製した。精製したhCD64 / pcDNA3.1をCHO-S(Thermo Fisher Scientific社製)に導入し、ヒトCD64発現細胞株を作製した。

[0233] 遺伝子導入はFugene HD(プロメガ社製)を用いて下記のように行った。 $1 \times 10^5$ 細胞/mLに調製した細胞を6ウェルプレートに2.5 mLずつ播種し、24時間後に、hCD64 / pcDNA3.1, Fugene HDの混合物を培養液に添加した。添加後72時間後に1 mg/mLのG418(Invitrogen社製)を添加し、約2週間の薬剤選択を行った。

[0234] 薬剤耐性を獲得した細胞を回収し、市販の抗CD64抗体(Biolegend社製#305013)を用いてフローサイトメトリー(FACS Calibur、BD Biosciences社製)による発現解析を行ったところ、導入したヒトCD64の発現が確認できた。この細胞株をCHO-S-hCD64と記載する。

[0235] <例9：遺伝子組換え抗CD64キメラ抗体の作製>

抗CD64抗体によるヒトcMoP除去効果を確認するため、2種の抗CD64キメラ抗体を作製した。これら抗CD64キメラ抗体は、抗CD64マウス抗体32.2抗体[J Immunol. 1987 Nov 15;139(10):3536-41. Graziano RF, Fanger MW]、および、抗CD64マウス抗体m22抗体(国際公開第2005/052007号)をもとにして作製した。

[0236] (1) 32.2キメラ抗体の作製

1. 32.2抗体の可変領域遺伝子のクローニングと配列の決定

32.2抗体を産生するハイブリドーマ(ATCC HB-9469)からTrizol(Life Technologies社製)を用いてトータルRNAを抽出し、5'-RACE法により抗体遺伝子を増幅させた。RACE用cDNAの合成にはSMARTer RACE Kit(Clontech社製)を用いた。

t e c h社製)を用いた。R A C E用c D N A合成過程で付加される配列に特異的なプライマーと、マウス I g g a m m a鎖あるいはk a p p a鎖増幅用プライマーを用いたP C Rによって抗体可変領域断片を増幅させ、クローニングして該D N A断片の塩基配列を確認した。

[0237] 得られた3 2. 2抗体の可変領域をコードする塩基配列および該塩基配列から推定される3 2. 2抗体の可変領域のアミノ酸配列を以下に記載する(表2)。

[0238] [表2]

|     | 塩基配列    | アミノ酸配列  |
|-----|---------|---------|
| V H | 配列番号1 3 | 配列番号1 4 |
| V L | 配列番号1 5 | 配列番号1 6 |

[0239] 2. 3 2. 2キメラ抗体の発現ベクターの作製

前項で作製した3 2. 2抗体の可変領域をコードする塩基配列を含むD N A断片を用いて、3 2. 2抗体の可変領域をヒトI g G 1定常領域、またはS 2 2 8 P、L 2 3 5 EおよびR 4 0 9 Kのアミノ酸改変を含むヒトI g G 4定常領域(以下、ヒトI g G 4 P E \_ R 4 0 9 Kと記載する)と連結した3 2. 2キメラ抗体の発現ベクターを以下に記載する方法で作製した。

[0240] 3 2. 2抗体の可変領域のアミノ酸配列をコードする塩基配列がクローニングされたプラスミドD N Aを鋳型として、相同組換え用の塩基配列を付加したプライマーを用いたP C Rで各抗体の可変領域のアミノ酸配列をコードする塩基配列を増幅させた。

[0241] I n - F u s i o n H D C l o n i n g K i t (C l o n t e c h社製)を使用して、該塩基配列を、N 5 K G 1ベクター(米国特許第6, 0 0 1, 3 5 8号明細書)、あるいは、N 5 K G 4 P E \_ R 4 0 9 Kベクター[N 5 K G 1ベクター中のヒトI g G 1の定常領域をコードする塩基配列を、変異ヒトI g G 4の定常領域をコードする塩基配列に置換したベクター]に連結させ、キメラ抗体の発現ベクターを作製した。実験の手順はキットに付属のマニュアルに従った。

[0242] 3. 3 2. 2キメラ抗体の産生と精製

前項で作製した32.2キメラ抗体発現ベクターおよびExpi293 Expression System (Life Technologies社製)を使用して、32.2キメラ抗体を産生した。手順は付属マニュアルに従い以下のように行った。

- [0243] Expi293F細胞 (Thermo Fisher Scientific社製) を  $2 \times 10^6$  細胞/mL の密度で  $37^\circ\text{C}$  にて24時間培養し、その後、1反応あたり  $1.25 \times 10^8$  細胞を、42.5 mL の Expi293 Expression Medium (Thermo Fisher Scientific社製) に加えた。
- [0244] Opti-MEM (Thermo Fisher Scientific社製) に  $50 \mu\text{g}$  のプラスミドDNAとExpiFectamin 293 Reagent (Thermo Fisher Scientific社製) を添加し、30分間静置した後に、該プラスミド溶液を上記の細胞液に添加した。
- [0245] さらに一晩の培養後に、該細胞液にExpiFectamin 293 Transfection Enhancerを添加した（培養ボリュームはトータルで50 mL）。該細胞液を7～10日間培養した後に、培養上清を回収した。
- [0246] 抗体の精製には、Protein G Sepharose 4Fast Flow (GE Healthcare社製) を使用した。回収した培養上清を遠心分離し、得られた培養上清をフィルターでろ過した。カラムに  $400 \mu\text{L}$  の担体を充填し、DPBSでバッファーを置換した。
- [0247] 該カラムに培養上清を添加し、単体に抗体を吸着させた後に、該カラムを10 mL のDPBSで2回洗浄した。該カラムに0.4 mL のIgG Elution Buffer (Thermo Scientific社製) を添加して抗体を溶出させ、ただちに該抗体溶液に0.1 mL の1M Tris-HCl pH 8.6を加えて中和した。NAPカラム (GE Healthcare社製) を用いて該抗体溶液を脱塩し、精製抗体を以降の解析に使

用した。

[0248] 32.2キメラ抗体のヒトIgG1型とヒトIgG4PE\_\_R409K型を、それぞれ32.2G1抗体、および32.2G4PE\_\_R409K抗体と記載する。

[0249] (2) m22キメラ抗体の作製

1. m22キメラ抗体発現ベクターの作製

m22抗体の可変領域のアミノ酸配列（国際公開第2005/052007号に記載）をコードする塩基配列を、CHO細胞での発現に最適化されたコドンを含む塩基配列に変換し、該塩基配列の両側に相同組換え用の塩基配列を付加したDNAを人工遺伝子合成により合成した。

[0250] 該DNAをヒトIgG1定常領域およびκ鎖をコードする塩基配列を含むpCIベクターにIn-Fusion HD Cloning Kit（Clontech社製）を使用して連結し、ヒトIgG1型のm22キメラ抗体発現ベクターを作製した。実験の手順はキットに付属のマニュアルに従った。

[0251] ヒトIgG4PE\_\_R409K型のm22キメラ抗体発現ベクターについても、IgG4PE\_\_R409Kおよびκ鎖をコードする塩基配列を含むpCIベクターを用いて、同様の方法で作製した。

[0252] m22キメラ抗体の可変領域をコードする塩基配列、該塩基配列から推定されるアミノ酸配列、およびCDRのアミノ酸配列を以下に記載する（表3）。

[0253] [表3]

|       | アミノ酸配列 | 塩基配列   |
|-------|--------|--------|
| VH    | 配列番号3  | 配列番号7  |
| HCDR1 | 配列番号4  | —      |
| HCDR2 | 配列番号5  | —      |
| HCDR3 | 配列番号6  | —      |
| VL    | 配列番号8  | 配列番号12 |
| LCDR1 | 配列番号9  | —      |
| LCDR2 | 配列番号10 | —      |
| LCDR3 | 配列番号11 | —      |

[0254] 2. m22キメラ抗体の作製

前項で作製したキメラ抗体発現ベクターおよびExpiCHO Expression System (Thermo Fisher Scientific社製)を使用してm22キメラ抗体を産生した。手順は付属のマニュアルに従い、以下のように行った。

[0255] ExpiCHO細胞 (Thermo Fisher Scientific社製)を100mLのExpiCHO expression medium (Thermo Fisher Scientific社製)中で $6 \times 10^6$ 細胞/mLの密度で播種し、37℃にて攪拌しながら培養した。

[0256] 24時間後に4mLのOptiPRO (Thermo Fisher Scientific社製)に100 $\mu$ gの発現ベクターを懸濁し、3.7mL OptiPROで希釈した320 $\mu$ LのExpifectamine CHO (Thermo Fisher Scientific社製)と混合して5分間室温で静置した後、ExpiCHO細胞へ添加した。

[0257] ベクターの添加24時間後に600 $\mu$ LのExpifectamine CHO Enhancerおよび24mLのExpiCHO fedcを添加し11日間37℃にて培養した後、遠心分離により上清を回収した。

[0258] 抗体の精製にはAb-Capture Extra (Proteinova社製)を用いた。カラムに800 $\mu$ Lの担体を充填し、D-PBSでバッファーを置換した。該カラムに培養上清を添加し、担体に抗体を吸着させたのち、該カラムを10mLのD-PBSで2回洗浄した。

[0259] 該カラムに3mLの0.1Mクエン酸ナトリウム溶液 (pH 3.5)を添加して抗体を溶出させ、ただちに該抗体溶液を600 $\mu$ Lの2M Tris-Cl (pH 8.5)を添加し中和した。NAPカラム (GE Healthcare社製)を用いて該抗体溶液のバッファーをPBSに置換し、以降の解析に使用した。

[0260] m22キメラ抗体のヒトIgG1型とヒトIgG4PE\_\_R409K型を、それぞれm22G1抗体、m22G4PE\_\_R409K抗体と記載する。

[0261] <例10：デフコース型抗CD64キメラ抗体の作製>

32. 2G1抗体および m22G1抗体のFc領域に結合してるN結合コンプレックス型糖鎖に $\alpha$ 1-6フコースが結合していない抗体（デフコース体）を産生するため、各抗体の重鎖および軽鎖をコードする発現ベクターを、Fut8遺伝子ノックアウトCHO細胞株である513-1細胞に導入し、抗体を一過性発現させた。培養上清中の抗体を例9（1）3または（2）2と同様の方法で精製した。作製したデフコース型の抗体をそれぞれ32. 2G1（defucose）抗体、m22G1（defucose）抗体と記載する。

[0262] <例11：抗CD64キメラ抗体の結合性の評価>

例9（1）3または（2）2で作製した各抗CD64キメラ抗体32. 2G4PE\_\_R409K抗体、およびm22G4PE\_\_R409K抗体のヒトCD64への結合性をフローサイトメトリー（FCM）により測定した。ヒトCD64発現細胞としては、例8で作製したCHO-S-hCD64、および、ヒト単球系白血病細胞株であるTHP-1を使用した。

[0263] FCM解析は以下のように行った。細胞を96ウェルプレートに $2 \times 10^5$ 細胞/ウェルで播種し、染色バッファー〔3% FBS（Thermo Fisher Scientific社製）/DPBS（ナカライテスク社製）/0.1%アジ化ナトリウム（ナカライテスク社製）〕で洗浄した。

[0264] 該細胞を $10 \mu\text{g/mL}$ のE5971によって1時間氷上で処理し、染色バッファーによる洗浄後、二次抗体Alexa Fluor 647 goat Anti-Rabbit IgG（Thermo Fisher Scientific社製）を終濃度 $1 \mu\text{g/mL}$ で添加し、室温にて30分間処理した。該細胞について、再度染色バッファーによる洗浄を行った後に、染色バッファーにて懸濁し、BD FACSCalibur（BD Biosciences社製）を用いて解析を行った。

[0265] その結果、いずれの抗CD64キメラ抗体もヒトCD64に結合することが示された。また、いずれの抗体もTHP-1細胞に対して強く結合したこ

とから、THP-1細胞はヒトCD64を強発現することが示された。

[0266] <例12：蛍光標識抗体の作製>

32.2G4PE\_\_R409K抗体およびm22G4PE\_\_R409K抗体について、Alexa Fluor 647にて蛍光標識した抗体を作製した。Alexa Fluor 647 Monoclonal Antibody Labeling Kit (Thermo Fisher Scientific社製)を使用し、キットに添付のマニュアルに従った。標識した抗体のCHO-S-hCD64、および、THP-1細胞への結合性をフローサイトメトリーで確認した。各標識抗体をそれぞれ32.2-AF647抗体、m22-AF647抗体と記載する。

[0267] <例13：各抗CD64キメラ抗体の競合評価>

作製した抗CD64キメラ抗体が競合するか否かを調べるために、以下の実験を行った。

[0268] THP-1細胞を10  $\mu$ g/mLの32.2G4PE\_\_R409K抗体あるいはm22G4PE\_\_R409K抗体で室温30分間の前処理を行ったうえで、0.1  $\mu$ g/mLの32.2-AF647抗体、m22-AF647抗体または市販CD64抗体 (Biolegend社製#305013)で染色し、前処理した抗体との競合によって染色強度が低下するか否かをフローサイトメトリーで調べた。

[0269] 結果を表4に示す。表4において、前処理なしの染色強度（平均蛍光強度MFI）に対して、前処理ありのMFIが50%以上低下した場合はYes（競合する）、低下しなかった場合はNo（競合しない）で表した。

[0270]

[表4]

| 前処理  | 染色      | 競合  |
|------|---------|-----|
| 32.2 | 32.2    | Yes |
|      | m22     | No  |
|      | #305013 | No  |
| m22  | 32.2    | No  |
|      | m22     | Yes |
|      | #305013 | Yes |

[0271] 表4に示すように、32.2キメラ抗体とm22キメラ抗体は互いに競合しないことが示された。

[0272] <例14：ヒトcMoPへの結合性評価>

作製した抗CD64キメラ抗体のヒトcMoPへの結合性を調べるため、以下の実験を行った。

[0273] Lymphocyte Separation Solution (ナカライテスク社製、#20828-15)を用いて、密度勾配遠心分離法により新鮮ヒト臍帯血から単核球画分を分離した。次いで、分離した単核球をMACSバッファー(2mM EDTA in 1xPBS)に懸濁し、下記のLineage抗体と反応させた。

[0274] 当該細胞液に、Anti-Cy5/Anti-Alexa Fluor 647 MicroBeads (Miltenyi社製、#130-091-395)を添加した後、AutoMACS (Miltenyi社製)を使用して表5に示すLineage抗体のいずれでも染色されなかった細胞(Lineage-negative細胞)を分離した。

[0275]

[表5]

## Lineage抗体

| 色素    | 抗原      | クローン     | 製造会社            | カタログ # |
|-------|---------|----------|-----------------|--------|
| PECy5 | CD2     | RPA-2.10 | biolegend       | 300210 |
| PECy5 | CD3     | UCHT1    | biolegend       | 300410 |
| PECy5 | CD11b   | ICRF44   | biolegend       | 301308 |
| PECy5 | CD14    | RMO52    | Beckman Coulter | A07765 |
| PECy5 | CD16    | 3G8      | biolegend       | 302010 |
| PECy5 | CD19    | H1B19    | biolegend       | 302210 |
| PECy5 | CD56    | HCD56    | biolegend       | 318308 |
| PECy5 | CD235ab | HIR2     | biolegend       | 306606 |

[0276] 続いて、表6に示すヒトcMoP検出用抗体と反応させ、例2と同様の方法で、フローサイトメトリーでヒトcMoPを検出した。さらに、作製した抗CD64キメラ抗体の評価のために、下記の検出用抗体のうち、CD64抗体(biolegend社製、#305014)を32.2-AF647抗体あるいはm22-AF647抗体のいずれかに置換してフローサイトメトリーを実施し、各抗体でヒトcMoPを検出できるか否かを検討した。

[0277] その結果、いずれの抗体でもヒトcMoPの検出は可能であったことから、これらの抗体がヒトcMoPへの結合性を有していることが示された。

[0278] [表6]

## cMoP検出用抗体

| 色素         | 抗原      | クローン     | 製造会社      | カタログ # |
|------------|---------|----------|-----------|--------|
| FITC       | CLEC12A | 50C1     | biolegend | 353608 |
| PerCPCy5.5 | CD123   | 6H6      | biolegend | 306016 |
| APC        | CD64    | 10.1     | biolegend | 305014 |
| APCCy7     | CD34    | 581      | biolegend | 343514 |
| BV412      | CD10    | HI10a    | biolegend | 312218 |
| BV510      | CD45RA  | HI100    | biolegend | 304142 |
| PE         | FLT3    | BV10A4H2 | biolegend | 313306 |
| PECy5      | Lineage |          |           |        |
| PECy7      | CD38    | HB7      | BD        | 335790 |

[0279] <例15：ヒトcMoPに対するADCC活性評価>

例2と同様の方法で、ヒト臍帯血からヒトcMoP画分をフローサイトメ

トリーによって分離した。この際、ヒトcMoPの検出用抗体としては、m22キメラ抗体と競合しないことが示されている32. 2-AF647抗体を用いた。

[0280] また、ヒト凍結末梢血単核球（Precision Bioservices社製AccuCell Human PBMC Purified 10M）から、下記のNK細胞検出用抗体（表7）を用いて、CD56陽性／CD3陰性細胞をNK細胞としてフローサイトメトリーによって分離した。

[0281] 分離したヒトcMoPとNK細胞を細胞数比5000：16300で混合し、さらに、10 $\mu$ g/mLのm22G1（defucose）抗体を添加して12時間培養した。続いて、細胞をCD64抗体（32. 2-AF647）、CD56抗体（BV711標識、Biolegend社製#318336）、CLEC12A抗体（FITC標識、Biolegend社製#353608）および7-AADで染色し、フローサイトメトリーで解析を行った。

[0282] [表7]

NK細胞検出用抗体

| 色素    | 抗原   | クローン  | 製造会社      | カタログ # |
|-------|------|-------|-----------|--------|
| BV711 | CD56 | HCD56 | biolegend | 318336 |
| FITC  | CD3  | UCHT1 | biolegend | 300406 |

[0283] 得られた結果を図17に示す。図17において、ヒトcMoPは、CD56陰性／CD64陽性／CLEC12A陽性細胞として検出されており、NK細胞のみを加えたサンプル（cMoP+NK）に比べ、NK細胞およびm22G1（defucose）抗体を添加したサンプル（cMoP+NK+m22）は、cMoPの7-AADによる染色強度が上昇した。

[0284] したがって、抗CD64キメラ抗体m22G1（defucose）抗体によってヒトcMoPが傷害されていることが示された。

[0285] 本明細書には、本発明の好ましい実施態様を示してあるが、そのような実

施態様が単に例示の目的で提供されていることは、当業者には明らかであり、当業者であれば、本発明から逸脱することなく、様々な変形、変更、置換を加えることが可能であろう。本明細書に記載されている発明の様々な代替的实施形態が、本発明を実施する際に使用されることが理解されるべきである。また、本明細書中において参照している特許および特許出願書類を含む、全ての刊行物に記載の内容は、その引用によって、本明細書中に明記された内容と同様に取り込まれていると解釈すべきである。

[0286] 本発明を特定の態様を用いて詳細に説明したが、本発明の意図と範囲を離れることなく様々な変更および変形が可能であることは、当業者にとって明らかである。なお、本出願は、2016年4月14日付けで出願された日本特許出願（特願2016-080779）に基づいており、その全体が引用により援用される。

### 産業上の利用可能性

[0287] 本発明により、ヒトcMoPが同定され、さらに、骨髓系細胞分化経路の詳細を明らかになった。単球および単球由来のマクロファージが、メタボリック症候群を含むさまざまな炎症性疾患や、腫瘍の成長を引き起こすことから、本発明は、ヒトcMoPおよび単球を標的とした上記疾患の治療方法及び予防方法への応用が可能である。

### 配列表フリーテキスト

[0288] 配列番号3 - 人工配列の説明：m22のVHのアミノ酸配列

配列番号4 - 人工配列の説明：m22のHCDR1のアミノ酸配列

配列番号5 - 人工配列の説明：m22のHCDR2のアミノ酸配列

配列番号6 - 人工配列の説明：m22のHCDR3のアミノ酸配列

配列番号7 - 人工配列の説明：m22のVHの塩基配列

配列番号8 - 人工配列の説明：m22のVLのアミノ酸配列

配列番号9 - 人工配列の説明：m22のLCDR1のアミノ酸配列

配列番号10 - 人工配列の説明：m22のLCDR2のアミノ酸配列

配列番号11 - 人工配列の説明：m22のLCDR3のアミノ酸配列

配列番号 1 2 - 人工配列の説明 : m 2 2 の V L の塩基配列

配列番号 1 3 - 人工配列の説明 : 3 2 . 2 の V H の配列

配列番号 1 4 - 合成コンストラクトのアミノ酸配列

配列番号 1 5 - 人工配列の説明 : 3 2 . 2 の V L の配列

配列番号 1 6 - 合成コンストラクトのアミノ酸配列

### 請求の範囲

- [請求項1] 単球系統以外の細胞には分化せず、かつ増殖能を有する、単離されたヒト共通単球前駆細胞。
- [請求項2] CLEC12AおよびCD64を発現している、請求項1に記載の単離されたヒト共通単球前駆細胞。
- [請求項3] CD34<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup>CD10<sup>-</sup>CD123<sup>int/-</sup>CD45RA<sup>+</sup>CD135<sup>+</sup>CLEC12A<sup>hi</sup>CD64<sup>hi</sup>の表現型を有する、請求項1または2に記載の単離されたヒト共通単球前駆細胞。
- [請求項4] 臍帯血または骨髓由来の細胞である、請求項1～3のいずれか一項に記載の単離されたヒト共通単球前駆細胞。
- [請求項5] ヒト共通単球前駆細胞の単離方法であって、単離された臍帯血試料または骨髓試料から、Lin<sup>-</sup>CD34<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup>CD10<sup>-</sup>CD123<sup>int/-</sup>CD45RA<sup>+</sup>CD135<sup>+</sup>CLEC12A<sup>hi</sup>CD64<sup>hi</sup>の細胞を単離する工程を含み、該ヒト共通単球前駆細胞は単球系統以外の細胞には分化せず、かつ増殖能を有する、単離方法。
- [請求項6] 単離された臍帯血試料または骨髓試料から、単核細胞を単離する工程、および単離された単核細胞から、Lin<sup>-</sup>の細胞を単離する工程の少なくとも一方を含む、請求項5に記載の単離方法。
- [請求項7] 前記単離がフローサイトメトリーを用いて行われる、請求項5または6に記載の単離方法。
- [請求項8] ヒト共通単球前駆細胞を死滅させる、ヒト共通単球前駆細胞の増殖若しくは分化を阻害する、または単球若しくはマクロファージの生成を阻害する物質を有効成分として含む、マクロファージ関連疾患の治療に用いるための医薬組成物。
- [請求項9] 前記物質が、低分子、核酸、ポリペプチド、または抗体若しくは該抗体断片である、請求項8に記載の医薬組成物。
- [請求項10] 前記抗体または該抗体断片が抗IRF8抗体、抗CEBPA抗体、抗CEBPB抗体、抗SLFN5抗体、抗AHR抗体、抗CCR2抗

体、抗KLF4抗体、抗SP11（PU. 1）抗体、抗ZEB2抗体、抗CX3CR1抗体、抗PPARGC1A抗体、抗PPARGC1B抗体、抗PPARG抗体、抗HES1抗体、抗NR4A1抗体、抗POU2F2抗体、抗CD110抗体、抗CD115抗体、抗CD116抗体、抗CD117抗体、抗CLEC12A抗体、抗CD64抗体、抗CD135抗体、抗CD45RA抗体、抗CD34抗体、および抗CD38抗体からなる群より選ばれる少なくとも1つの抗体または該抗体断片である、請求項9に記載の医薬組成物。

[請求項11] 抗IRF8抗体、抗CEBPA抗体、抗CEBPB抗体、抗SLFN5抗体、抗AHR抗体、抗CCR2抗体、抗KLF4抗体、抗SP11（PU. 1）抗体、抗ZEB2抗体、抗CX3CR1抗体、抗PPARGC1A抗体、抗PPARGC1B抗体、抗PPARG抗体、抗HES1抗体、抗NR4A1抗体、抗POU2F2抗体、抗CD110抗体、抗CD115抗体、抗CD116抗体、抗CD117抗体、抗CLEC12A抗体、抗CD64抗体、抗CD135抗体、抗CD45RA抗体、抗CD34抗体、および抗CD38抗体からなる群より選ばれる少なくとも1つの抗体または該抗体断片を有効成分として含む、マクロファージ関連疾患の治療に用いるための医薬組成物。

[請求項12] 前記マクロファージ関連疾患が、癌、骨関連疾患、動脈硬化、線維症、炎症性腸疾患およびメタボリック症候群から成る群より選択される少なくとも1である、請求項8～11のいずれか一項に記載の医薬組成物。

[請求項13] 抗IRF8抗体、抗CEBPA抗体、抗CEBPB抗体、抗SLFN5抗体、抗AHR抗体、抗CCR2抗体、抗KLF4抗体、抗SP11（PU. 1）抗体、抗ZEB2抗体、抗CX3CR1抗体、抗PPARGC1A抗体、抗PPARGC1B抗体、抗PPARG抗体、抗HES1抗体、抗NR4A1抗体、抗POU2F2抗体、抗CD110抗体、抗CD115抗体、抗CD116抗体、抗CD117抗体

、抗C L E C 1 2 A抗体、抗C D 6 4抗体、抗C D 1 3 5抗体、抗C D 4 5 R A抗体、抗C D 3 4抗体、および抗C D 3 8抗体からなる群より選ばれる少なくとも1つの抗体または該抗体断片を有効成分として含む、癌の治療に用いるための医薬組成物。

[請求項14]       他の薬剤と組み合わせて使用するための、請求項8～13のいずれか一項に記載の医薬組成物。

[請求項15]       抗C L E C 1 2 A抗体および抗C D 6 4抗体の少なくとも一方または該抗体断片を含む、ヒト共通単球前駆細胞の標識または単離に使用するためのキット。

[請求項16]       単球の生成を阻害する物質のスクリーニング方法であって、  
試験物質を含む単球分化培地中でヒト共通単球前駆細胞を培養する工程、および  
試験物質が単球の生成を阻害するか否かを評価する工程を含む、スクリーニング方法。

[請求項17]       破骨細胞の生成を阻害する物質のスクリーニング方法であって、  
試験物質を含む破骨細胞分化培地中でヒト共通単球前駆細胞を培養する工程、および  
試験物質が破骨細胞の生成を阻害するか否かを評価する工程を含む、スクリーニング方法。

[請求項18]       ヒト共通単球前駆細胞の分化、増殖または生存に影響する物質のスクリーニング方法であって、  
試験物質を含む培地中でヒト共通単球前駆細胞を培養する工程、および  
試験物質がヒト共通単球前駆細胞の分化、増殖または生存に影響するか否かを評価する工程を含む、スクリーニング方法。

[請求項19]       ヒト共通単球前駆細胞の分化、増殖または生存に影響する抗体のスクリーニング方法であって、  
ヒト共通単球前駆細胞の細胞表面に発現する分子を同定する工程、

該細胞表面分子に特異的な抗体を取得する工程、

該抗体を含む培地中でヒト共通単球前駆細胞を培養する工程、および

該抗体がヒト共通単球前駆細胞の分化、増殖または生存に影響するか否かを評価する工程を含む、スクリーニング方法。

[請求項20] 免疫不全マウスの骨髓にヒト共通単球前駆細胞を移植する工程を含む、ヒト単球を有するマウスの作製方法。

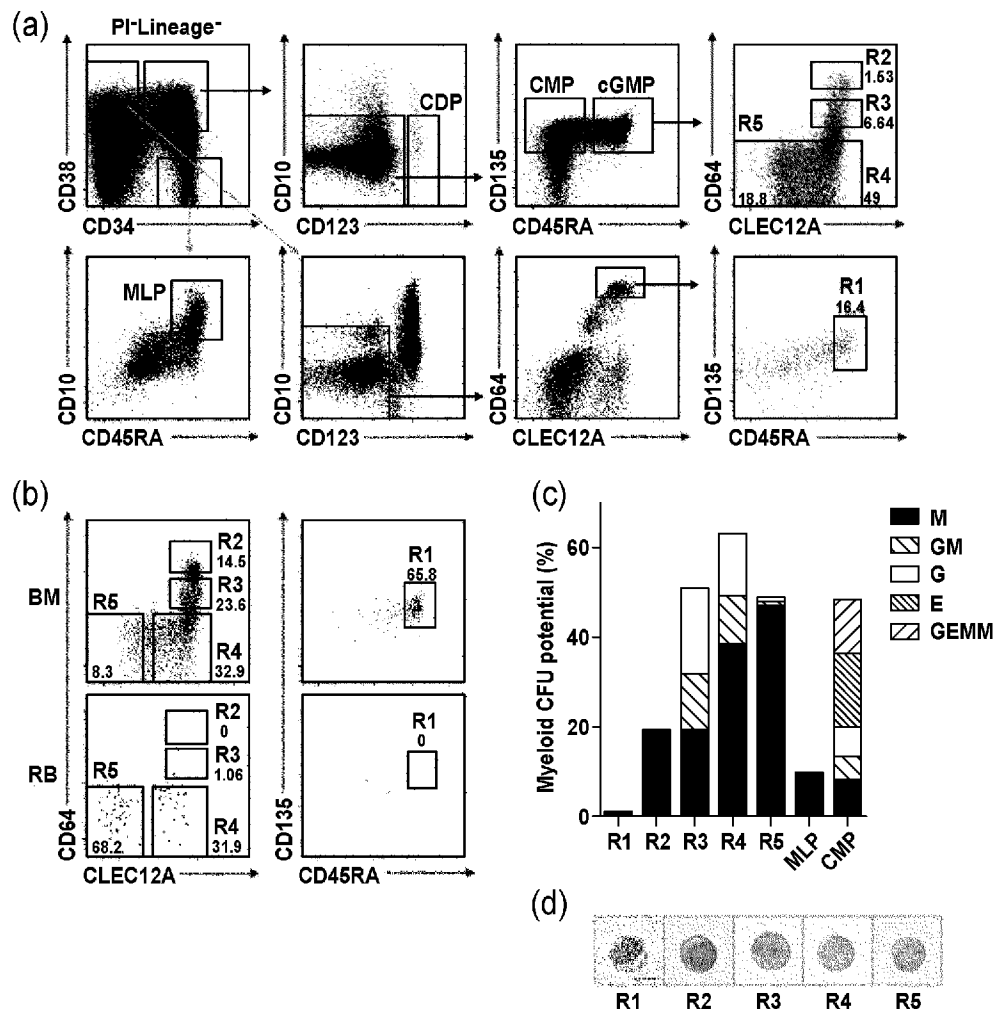
[請求項21] ヒト  $Flt3L$ 、 $TPO$ 、 $SCF$  および  $MCSCF$  を前記免疫不全マウスに投与する工程、およびヒト腫瘍細胞を前記免疫不全マウスに移植する工程の少なくとも一方をさらに含む、請求項20に記載の作製方法。

[請求項22] ヒト共通単球前駆細胞が遺伝子改変されていることを特徴とする、請求項20または21に記載の作製方法。

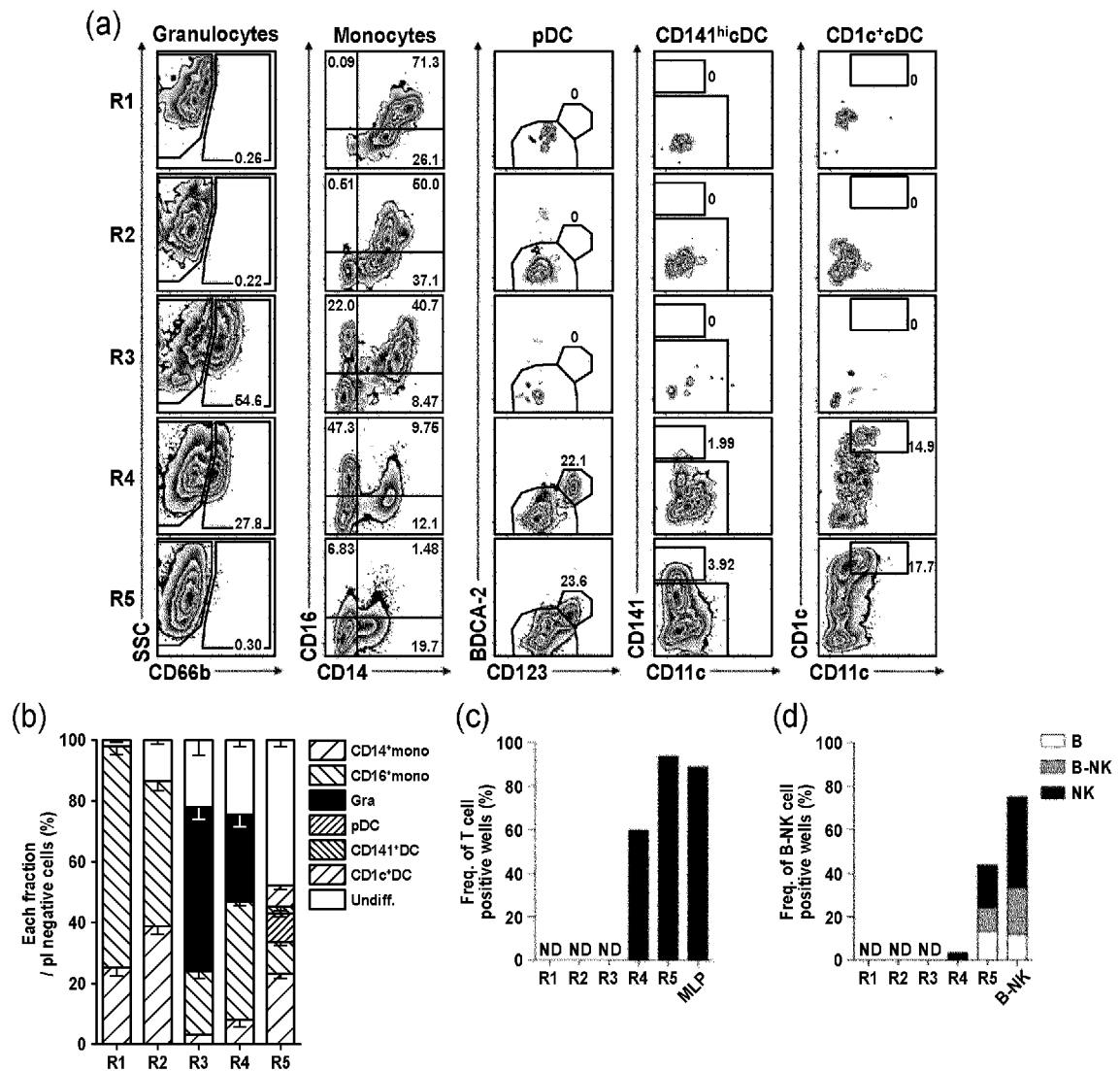
[請求項23] ヒト単球を有し、ヒト顆粒球は有さないマウス。

[請求項24]  $CD34^{+}CD38^{+}CD10^{-}CD123^{int/-}CD45RA^{+}CD135^{+}CLEC12A^{hi}CD64^{hi}$  の表現型を有するヒト共通単球前駆細胞を75%以上、80%以上、85%以上、90%以上、95%以上、98%以上、または99%以上含む、単離された細胞集団。

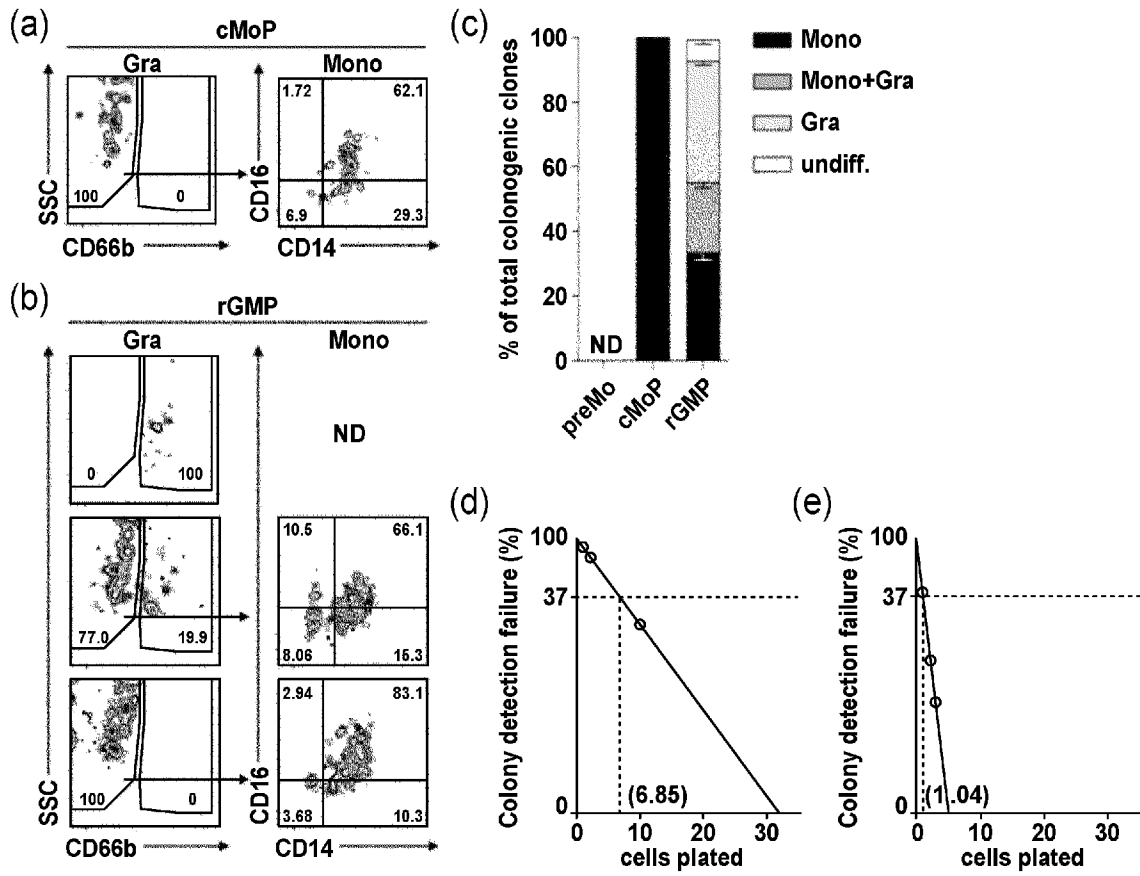
[図1]



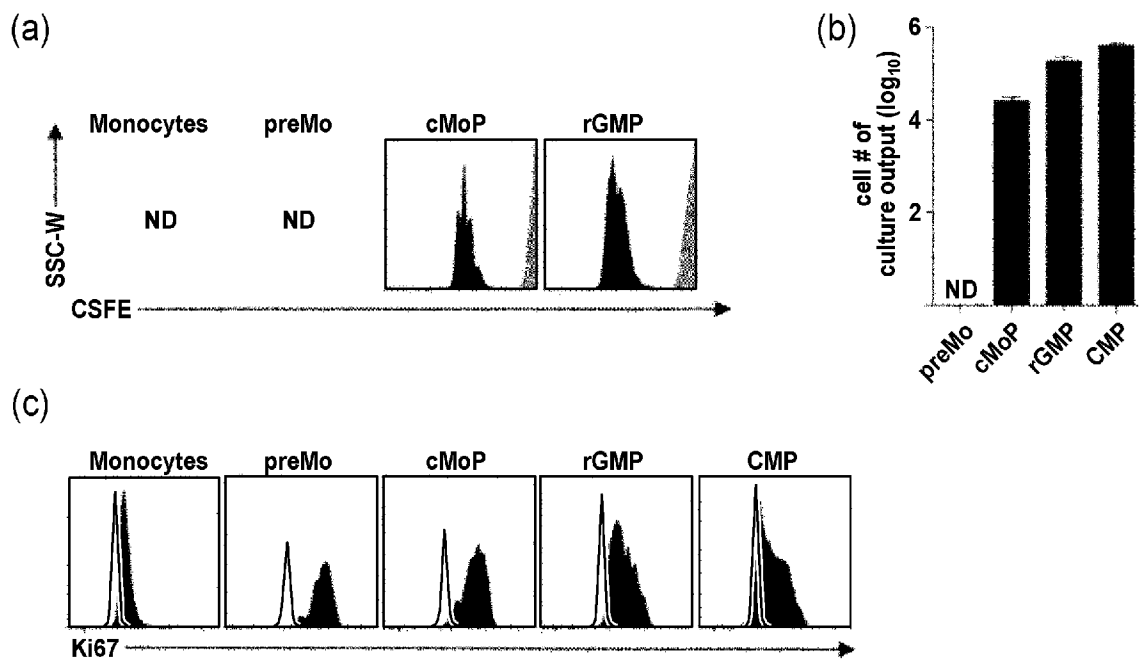
[図2]



[図3]

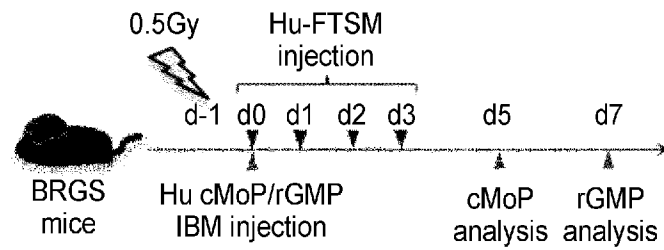


[図4]

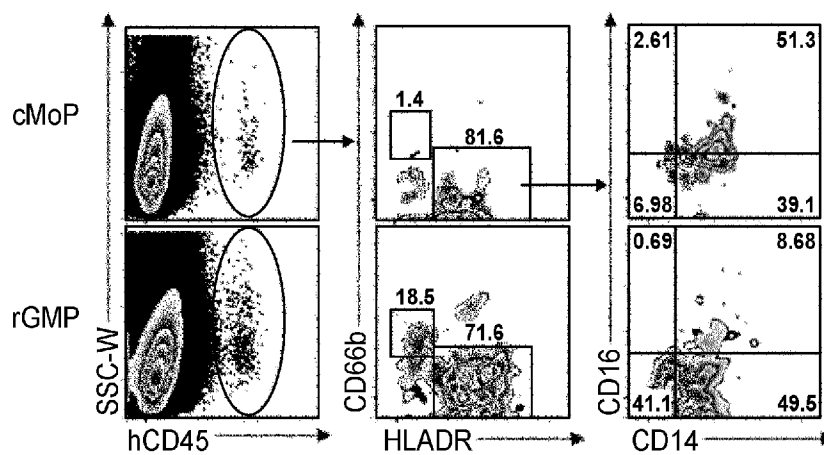


[図5]

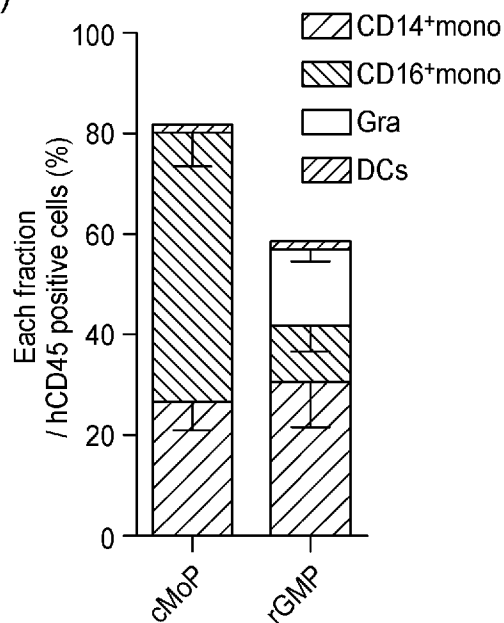
(a)



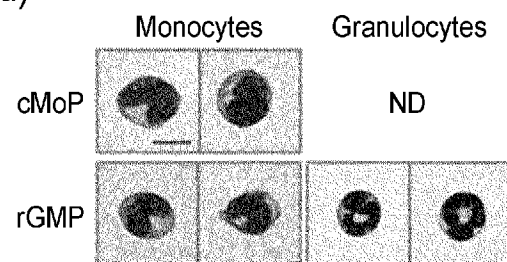
(b)



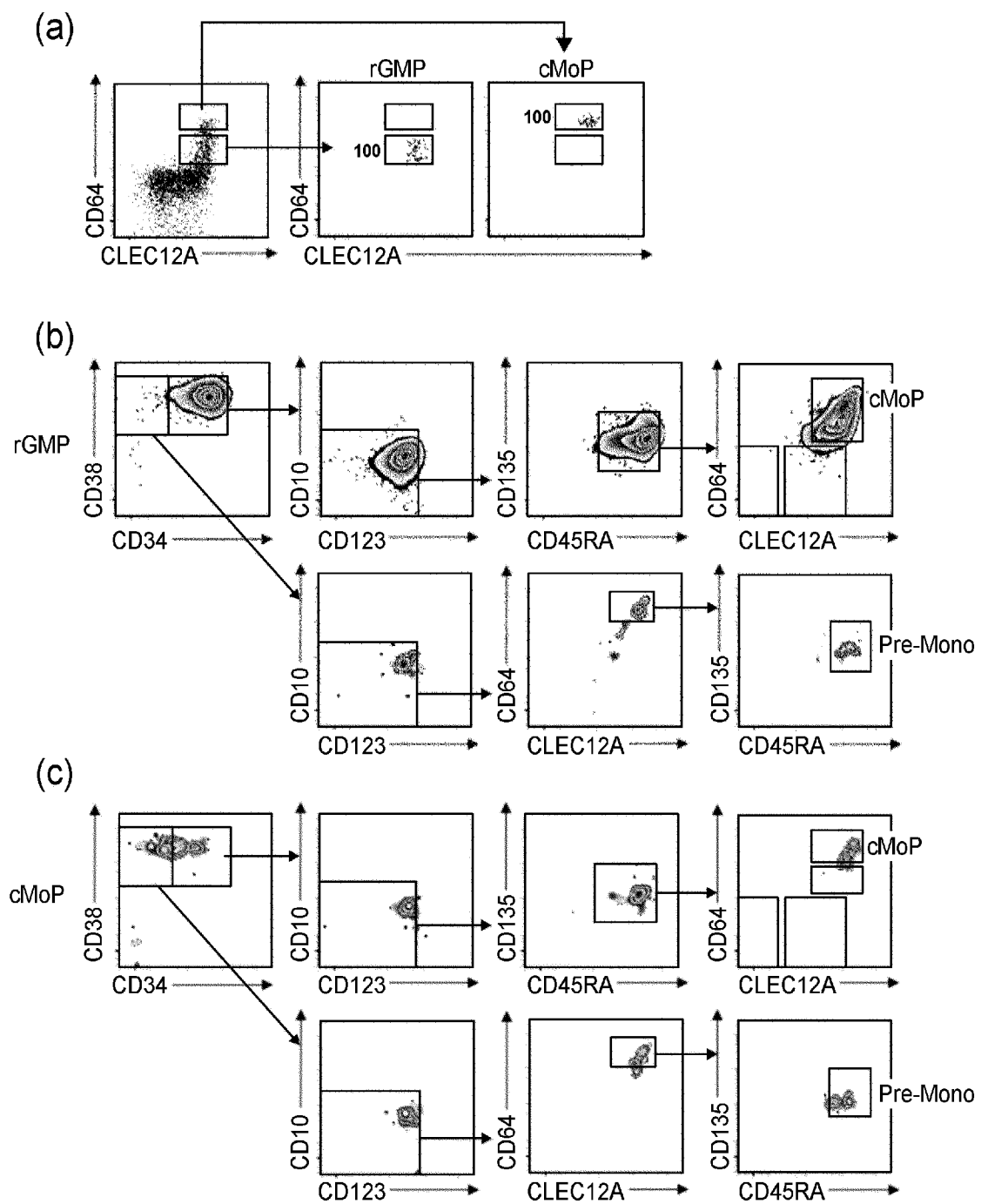
(c)



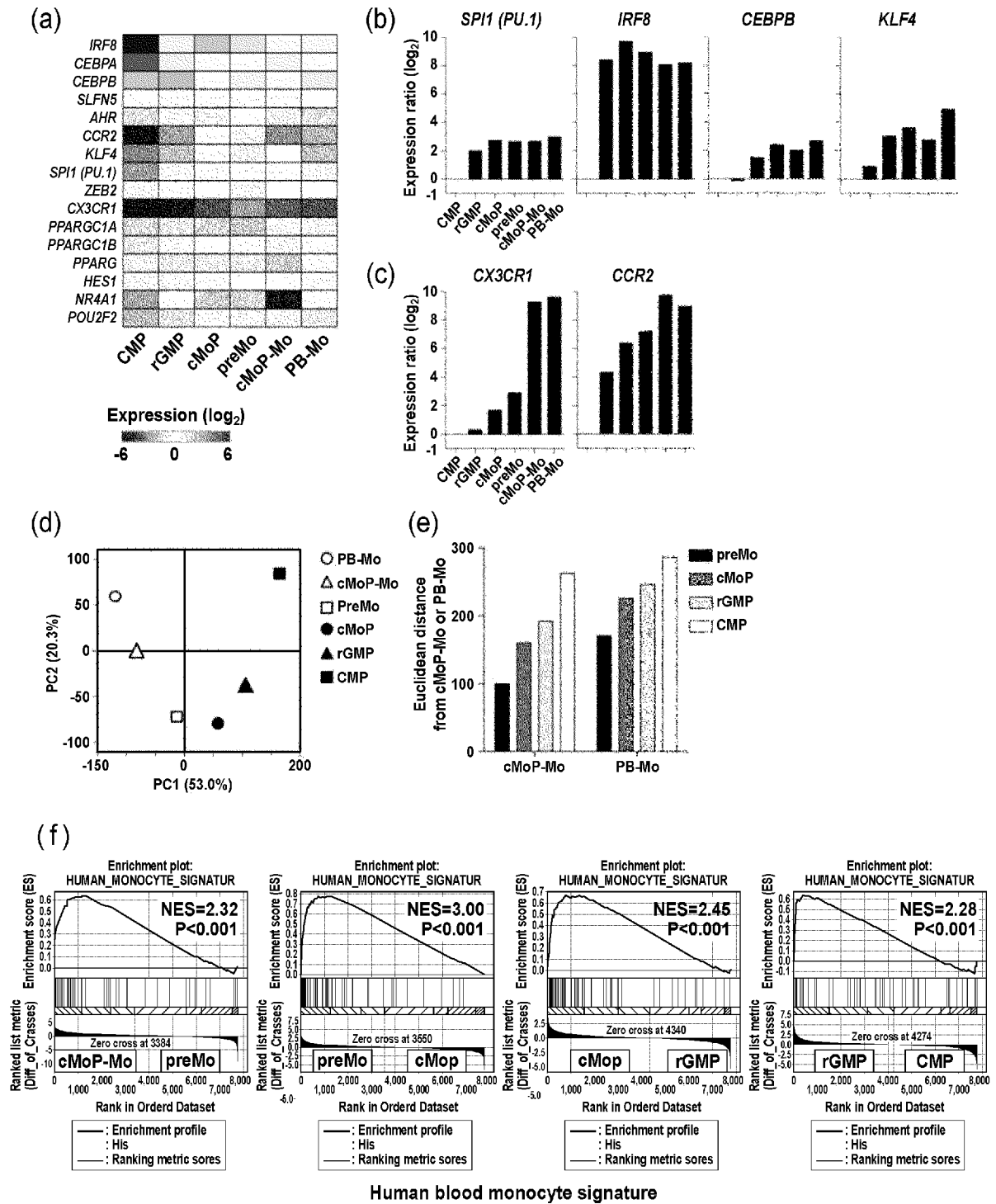
(d)



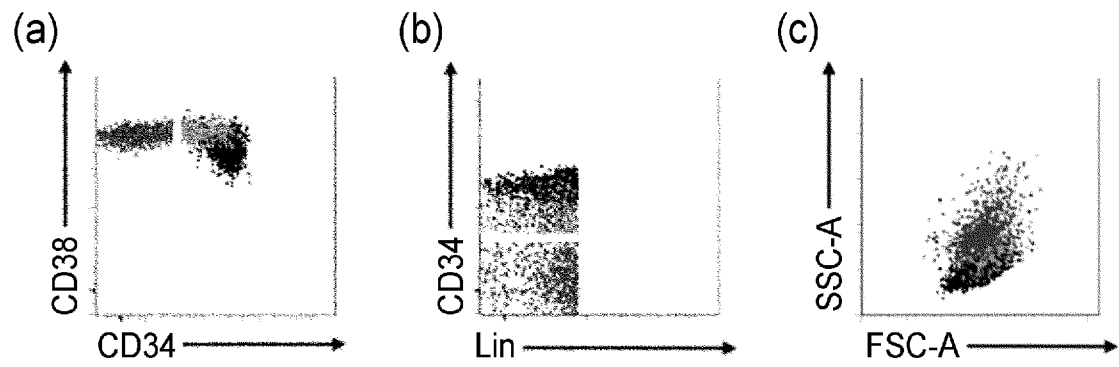
[図6]



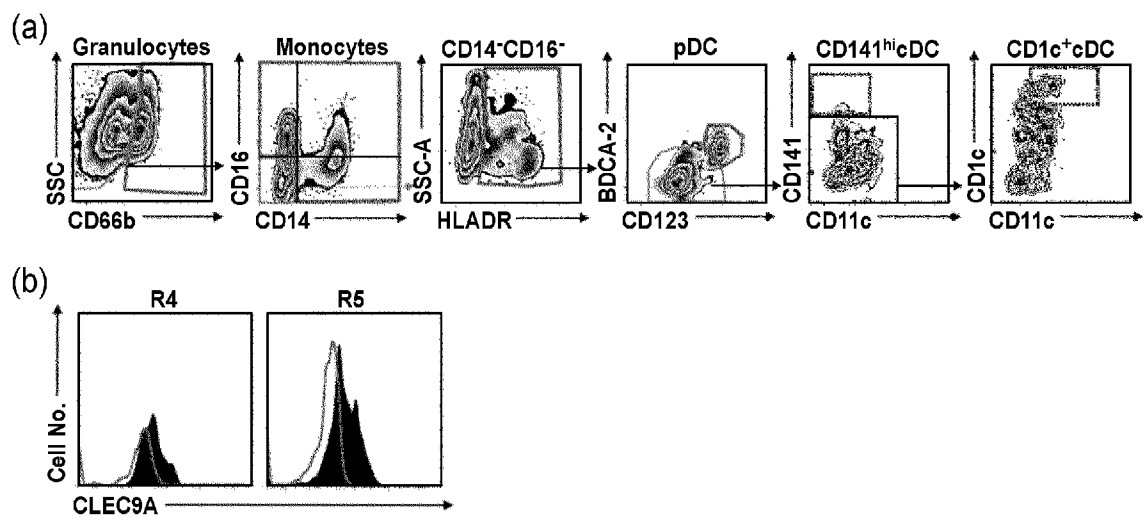
[図7]



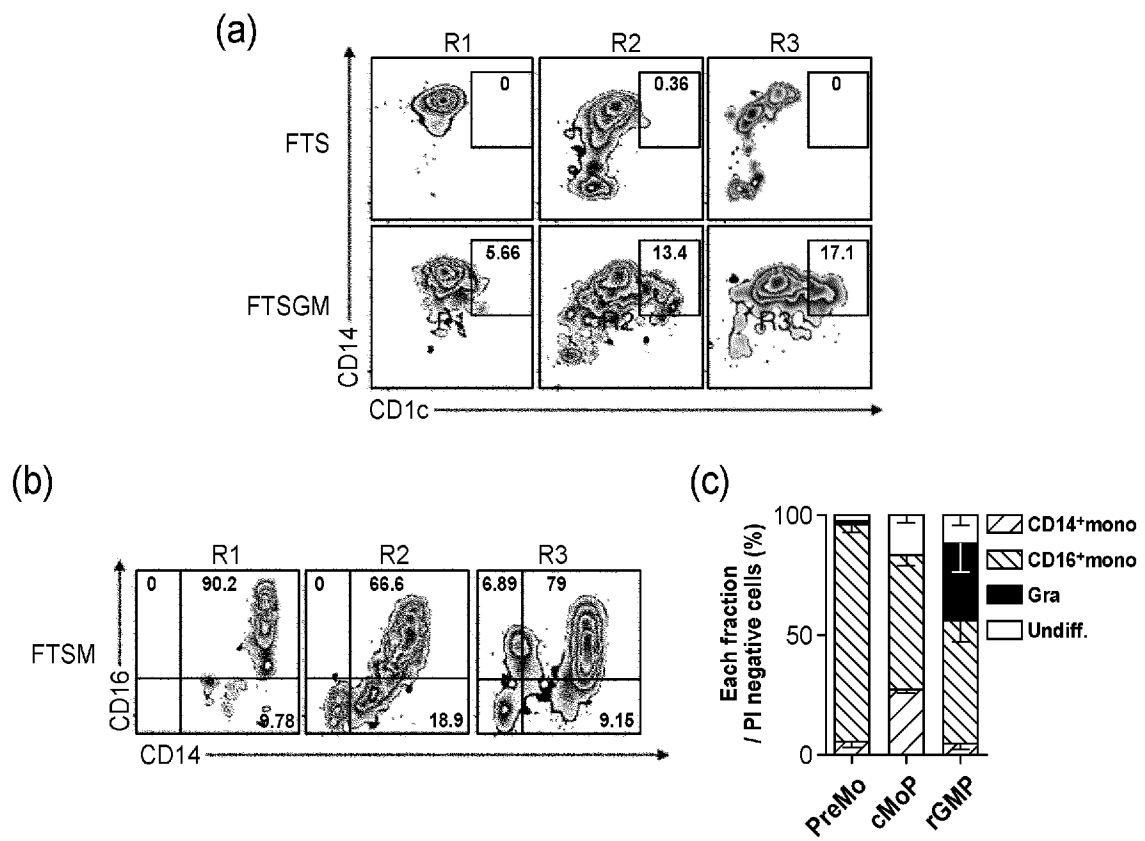
[図8]



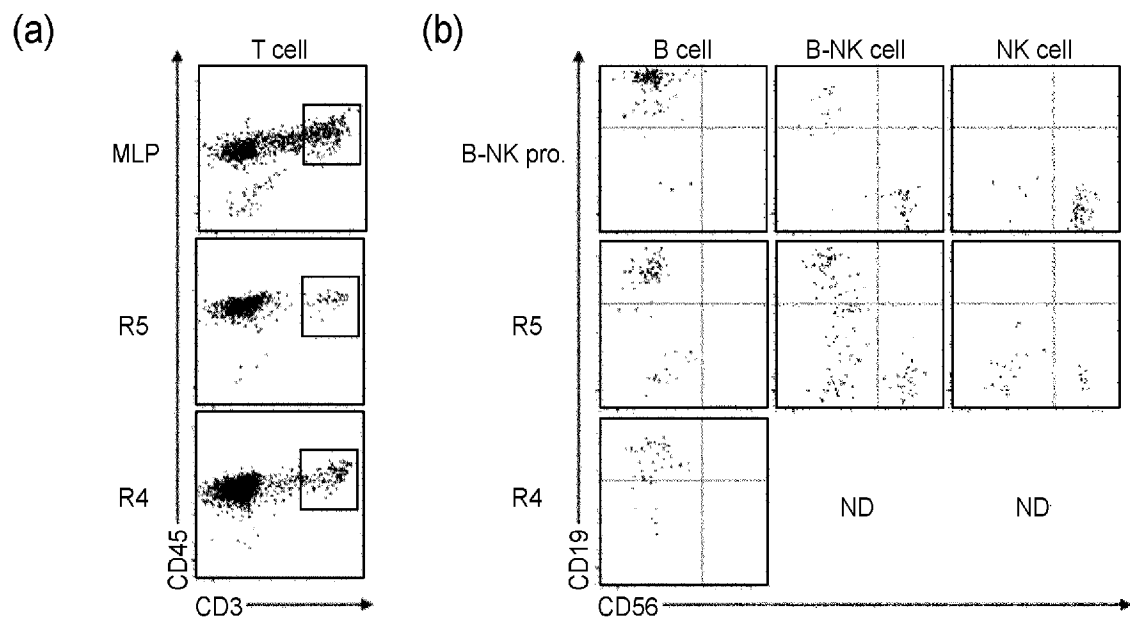
[図9]



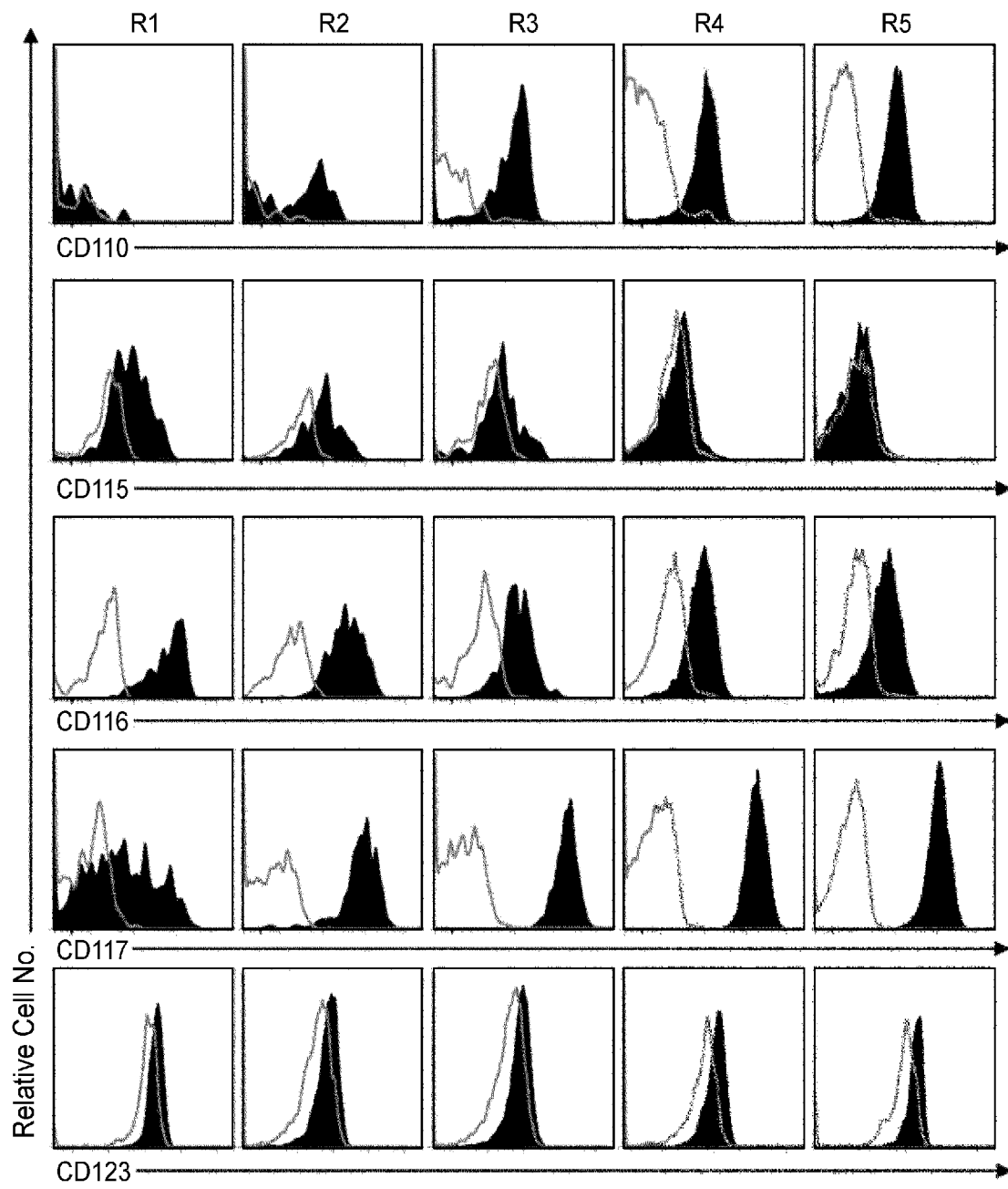
[図10]



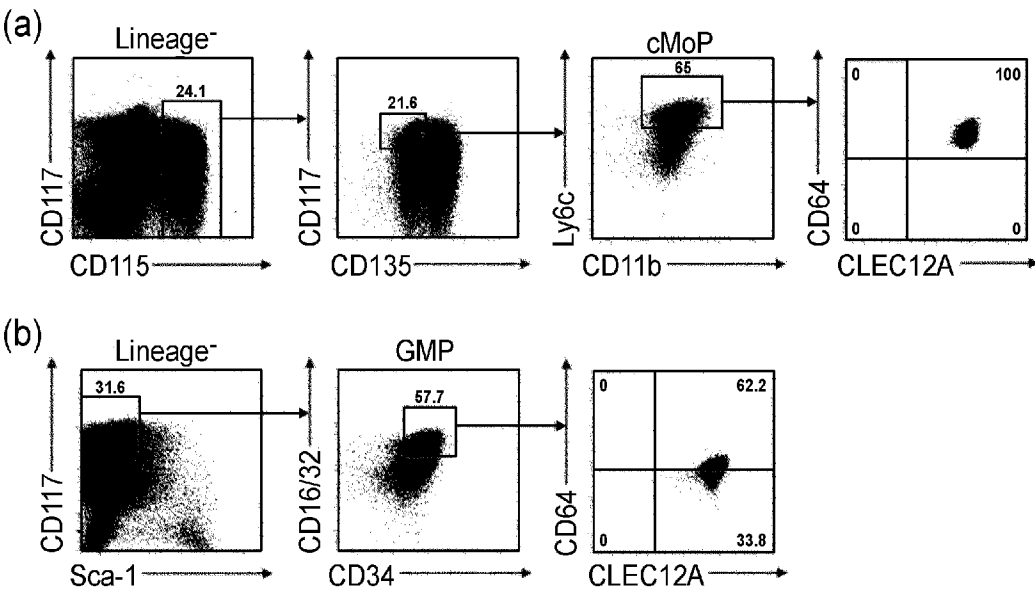
[図11]



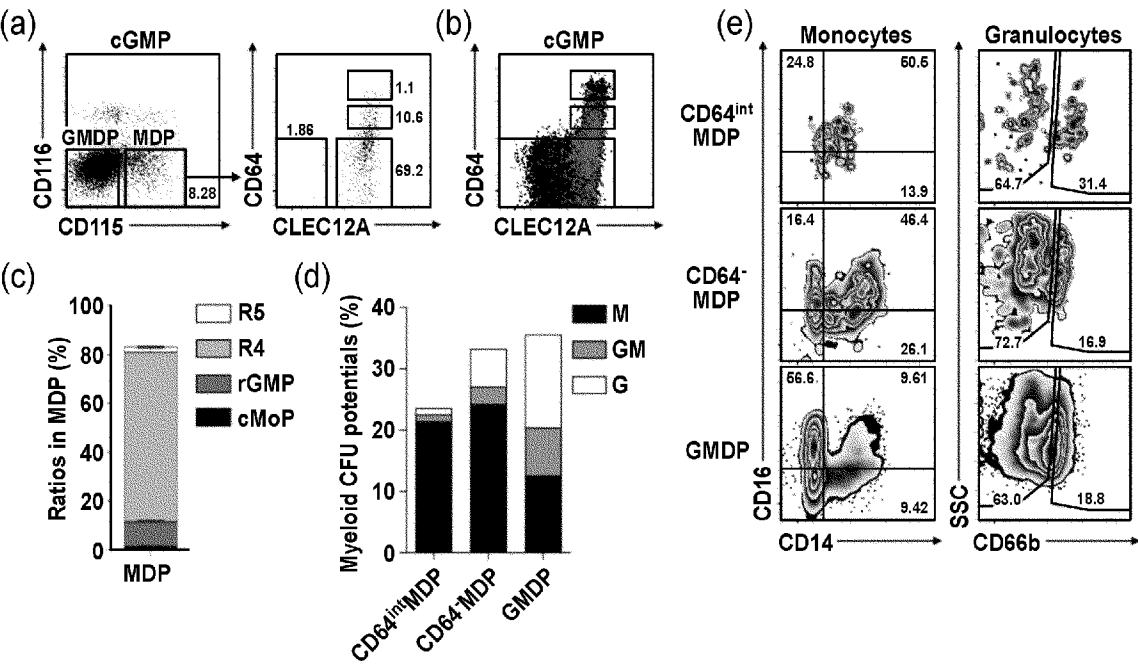
[図12]



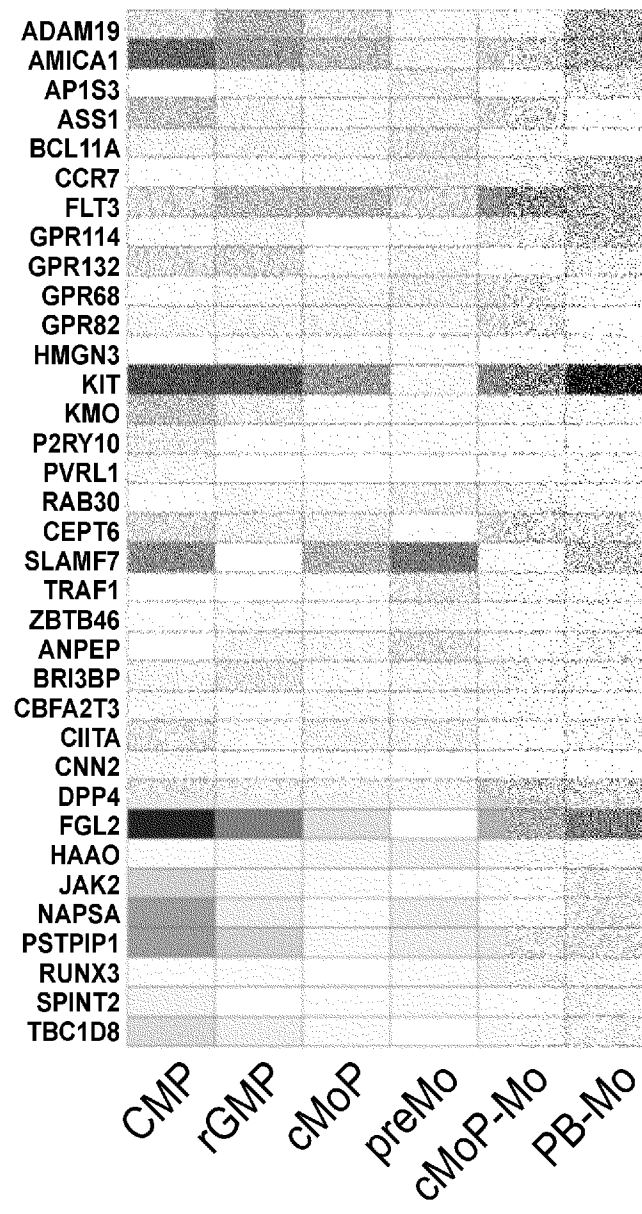
[図13]



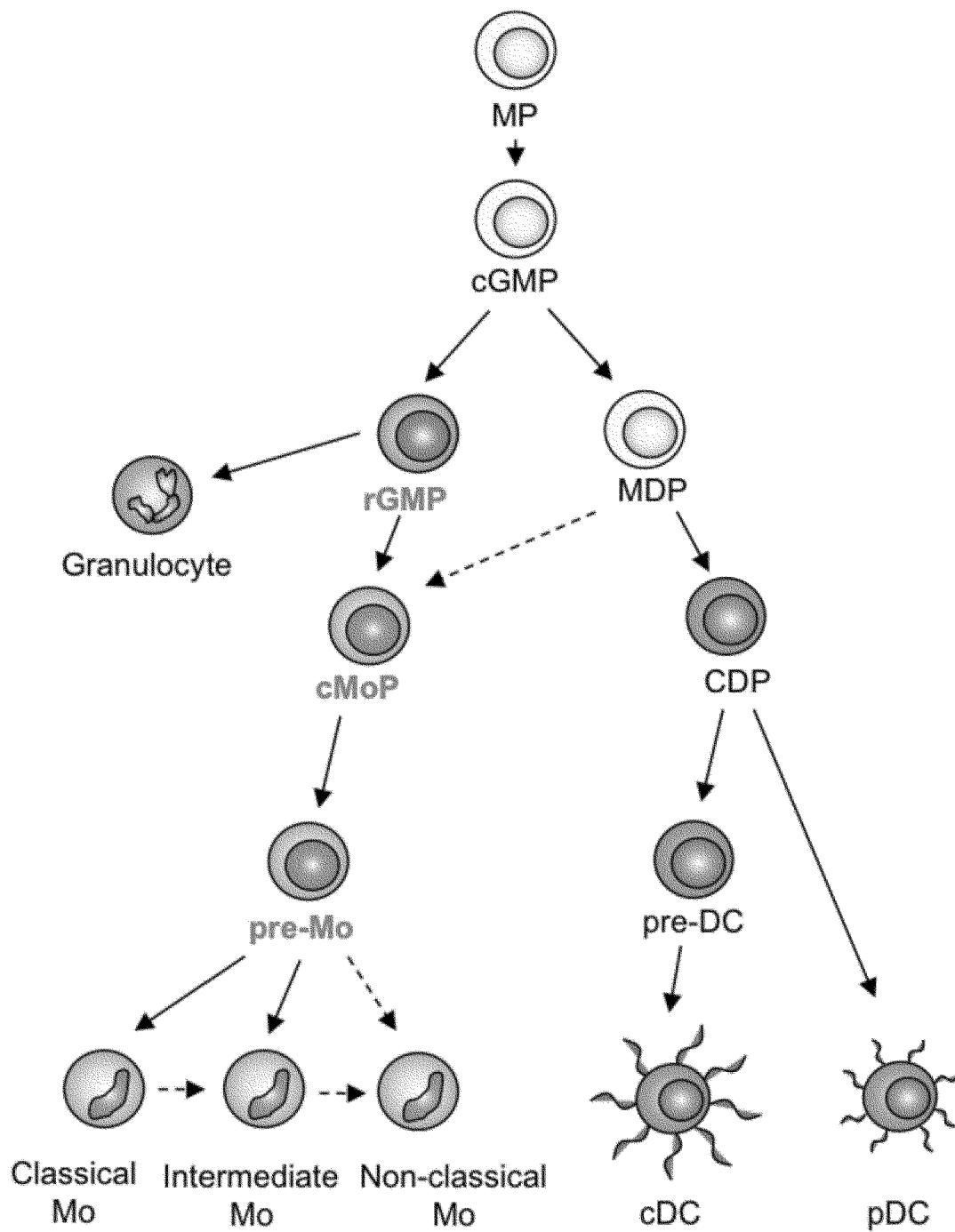
[図14]



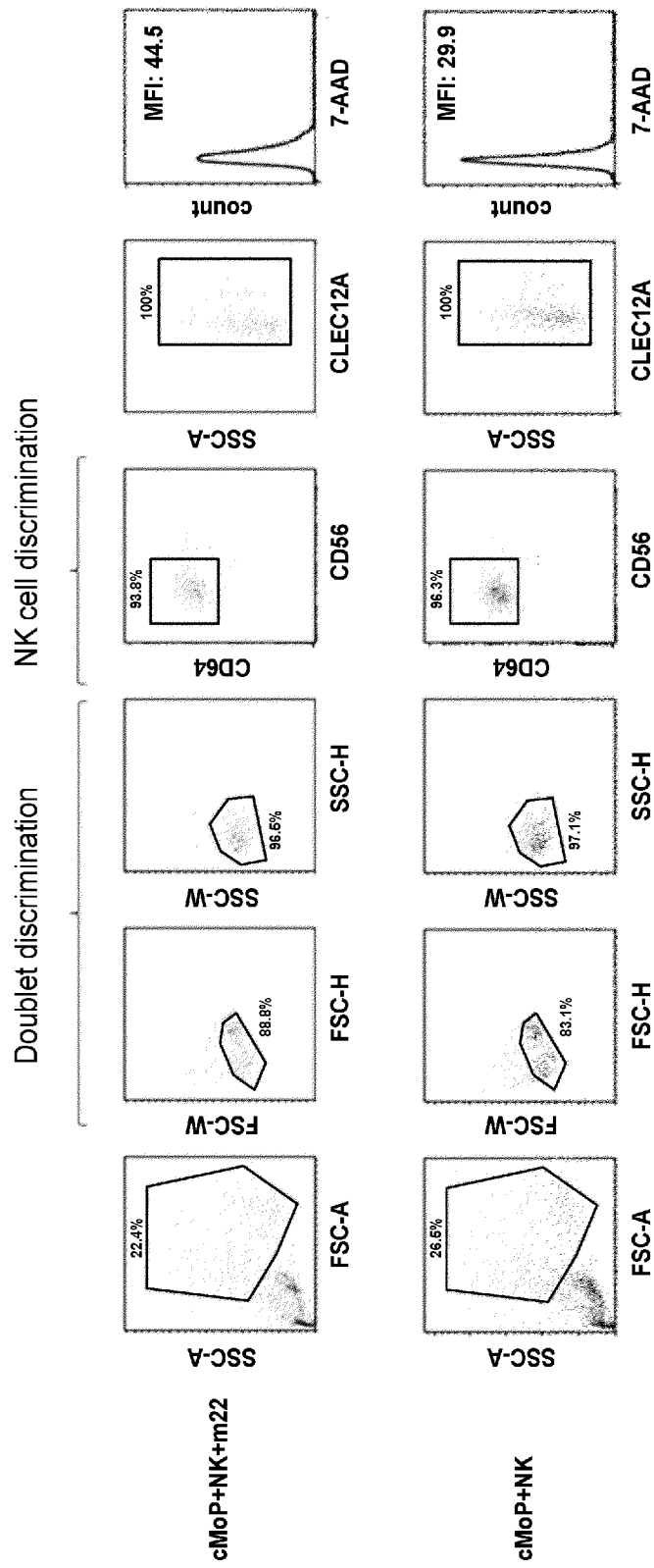
[図15]



[図16]



[図17]



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2017/015356

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

See extra sheet.

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

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N5/0786, A01K67/027, A61K39/395, A61K45/00, A61P1/04, A61P3/00, A61P9/10, A61P19/00, A61P35/00, C12Q1/02, G01N33/15, G01N33/50, G01N33/53, A61K35/15, A61K35/51

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

|                           |           |                            |           |
|---------------------------|-----------|----------------------------|-----------|
| Jitsuyo Shinan Koho       | 1922-1996 | Jitsuyo Shinan Toroku Koho | 1996-2017 |
| Kokai Jitsuyo Shinan Koho | 1971-2017 | Toroku Jitsuyo Shinan Koho | 1994-2017 |

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

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII),  
CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS(STN)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                                        | Relevant to claim No. |
|-----------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| X<br>Y    | Shunsuke Kawamura, Identification of Common Monocyte Progenitors, Pre-monocytes, and Granulocyte Progenitors in Human Umbilical Cord Blood, Experimental Hematology, 2015.09, Vol.43, p.572, Abstract No.3085 entire text | 1-7, 16-24<br>15      |
| X         | Takahiro Shima, Identification of Human Monocyte Lineage Progenitors Lacking Granulocyte Potential: Revision of Phenotypic Definition of Human GMP, Blood, 2010, Vol.116, Abstract No.1614 entire text                    | 1-4, 16-19            |

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance  
 "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date  
 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)  
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means  
 "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention  
 "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone  
 "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art  
 "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
15 May 2017 (15.05.17)

Date of mailing of the international search report  
23 May 2017 (23.05.17)

Name and mailing address of the ISA/  
Japan Patent Office  
3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku,  
Tokyo 100-8915, Japan

Authorized officer

Telephone No.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2017/015356

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                                                                                                                   | Relevant to claim No. |
|-----------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| X<br>Y    | WO 2006/002438 A2 (MEDAREX, INC.),<br>05 January 2006 (05.01.2006),<br>claims; Background of the Invention<br>& JP 2008-508860 A & US 2008/0095784 A1<br>& EP 1765870 A1 & CA 2568661 A<br>& AU 2005258336 A                                                                                         | 8-14<br>15            |
| Y         | Andrew S.J. Marshall, Identification and<br>Characterization of a Novel Human Myeloid<br>Inhibitory C-type Lectin-like Receptor (MICL)<br>That Is Predominantly Expressed on Granulocytes<br>and Monocytes, The Journal of Biological<br>Chemistry, 2004, Vol.279, No.15, pp.14792-14802<br>Abstract | 15                    |
| A         | Yen K Lieu, Impaired Adult Myeloid Progenitor<br>CMP and GMP Cell Function in Conditional c-myb-<br>knockout Mice, Cell Cycle, 2012, Vol.11, Issue<br>18, pp.3504-3512, page 3511, left column, 3rd<br>paragraph                                                                                     | 5, 6                  |

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP2017/015356

Continuation of A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

(International Patent Classification (IPC))

*C12N5/0786(2010.01)i, A01K67/027(2006.01)i, A61K39/395(2006.01)i,  
A61K45/00(2006.01)i, A61P1/04(2006.01)i, A61P3/00(2006.01)i,  
A61P9/10(2006.01)i, A61P19/00(2006.01)i, A61P35/00(2006.01)i,  
C12Q1/02(2006.01)i, G01N33/15(2006.01)i, G01N33/50(2006.01)i,  
G01N33/53(2006.01)i, A61K35/15(2015.01)n, A61K35/51(2015.01)n*

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

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. 特別ページ参照

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. C12N5/0786, A01K67/027, A61K39/395, A61K45/00, A61P1/04, A61P3/00, A61P9/10, A61P19/00, A61P35/00, C12Q1/02, G01N33/15, G01N33/50, G01N33/53, A61K35/15, A61K35/51

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

|             |            |
|-------------|------------|
| 日本国実用新案公報   | 1922-1996年 |
| 日本国公開実用新案公報 | 1971-2017年 |
| 日本国実用新案登録公報 | 1996-2017年 |
| 日本国登録実用新案公報 | 1994-2017年 |

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

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), Cplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS (STN)

## C. 関連すると認められる文献

| 引用文献の<br>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<br>請求項の番号 |
|-----------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------|
| X               | Shunsuke Kawamura, Identification of Common Monocyte Progenitors, Pre-monocytes, and Granulocyte Progenitors in | 1-7, 16-24     |
| Y               | Human Umbilical Cord Blood, Experimental Hematology, 2015.09, Vol.43, p.S72, Abstract No.3085<br>全文             | 15             |

☑ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

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

の日の後に公表された文献

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

国際調査を完了した日

15.05.2017

国際調査報告の発送日

23.05.2017

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

安居 拓哉

4 B

3437

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

| C (続き) . 関連すると認められる文献 |                                                                                                                                                                                                                                                                                       |                |
|-----------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------|
| 引用文献の<br>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<br>請求項の番号 |
| X                     | Takahiro Shima, Identification of Human Monocyte Lineage Progenitors Lacking Granulocyte Potential: Revision of Phenotypic Definition of Human GMP, Blood, 2010, Vol.116, Abstract No.1614<br>全文                                                                                      | 1-4, 16-19     |
| X                     | WO 2006/002438 A2 (MEDAREX, INC.) 2006.01.05,<br>Claims, Background of the Invention                                                                                                                                                                                                  | 8-14           |
| Y                     | & JP 2008-508860 A & US 2008/0095784 A1<br>& EP 1765870 A1 & CA 2568661 A & AU 2005258336 A                                                                                                                                                                                           | 15             |
| Y                     | Andrew S.J. Marshall, Identification and Characterization of a Novel Human Myeloid Inhibitory C-type Lectin-like Receptor (MICL) That Is Predominantly Expressed on Granulocytes and Monocytes, The Journal of Biological Chemistry, 2004, Vol.279, No.15, pp.14792-14802<br>Abstract | 15             |
| A                     | Yen K Lieu, Impaired Adult Myeloid Progenitor CMP and GMP Cell Function in Conditional c-myb-knockout Mice, Cell Cycle, 2012, Vol.11, Issue 18, pp.3504-3512<br>第 3511 頁左欄第 3 段落                                                                                                      | 5, 6           |

## 発明の属する分野の分類

C12N5/0786(2010.01)i, A01K67/027(2006.01)i, A61K39/395(2006.01)i,  
A61K45/00(2006.01)i, A61P1/04(2006.01)i, A61P3/00(2006.01)i, A61P9/10(2006.01)i,  
A61P19/00(2006.01)i, A61P35/00(2006.01)i, C12Q1/02(2006.01)i, G01N33/15(2006.01)i,  
G01N33/50(2006.01)i, G01N33/53(2006.01)i, A61K35/15(2015.01)n, A61K35/51(2015.01)n