(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
2024年2月15日(15.02.2024)

WIPO | PCT

(10) 国際公開番号
WO 2024/034656 A1

(51) 国際特許分類:
C12N 5/10 (2006.01) *C12N 5/02* (2006.01)

(21) 国際出願番号： PCT/JP2023/029198

(22) 国際出願日： 2023年8月9日(09.08.2023)

(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 2022-127477 2022年8月9日(09.08.2022) JP

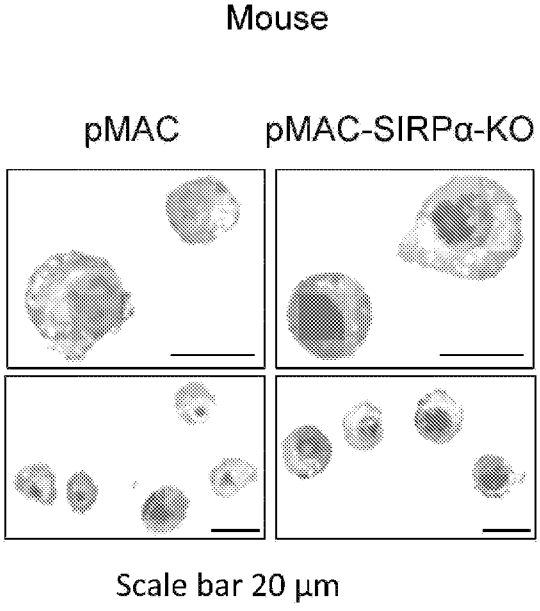
(71) 出願人：ＡＧＣ株式会社 **(AGC INC.)** [JP/JP]; 〒1008405 東京都千代田区丸の内一丁目５番１号 Tokyo (JP). 国立研究開発法人国立がん研究センター **(NATIONAL CANCER CENTER)** [JP/JP]; 〒1040045 東京都中央区築地五丁目１番１号 Tokyo (JP).

(72) 発明者：福田 恭子 **(FUKUDA, Kyoko)**; 〒2778577 千葉県柏市柏の葉六丁目５番１号 国立研究開発法人国立がん研究センター東病院内 Chiba (JP). 植村 靖史 **(UEMURA, Yasushi)**; 〒2778577 千葉県柏市柏の葉六丁目５番１号 国立研究開発法人国立がん研究センター東病院内 Chiba (JP). 萩谷 祐一郎 **(HAGIYA, Yuichiro)**; 〒1008405 東京都千代田区丸の内一丁目５番１号 ＡＧＣ株式会社内 Tokyo (JP). 井手 正迪 **(IDE, Masamichi)**; 〒1008405 東京都千代田区丸の内一丁目５番１号 ＡＧＣ株式会社内 Tokyo (JP). 苅谷 昌洋 **(KARIYA, Masahiro)**;

(54) Title: METHOD FOR PRODUCING PROLIFERATIVE MACROPHAGE-LIKE CELLS (pMAC)

(54) 発明の名称： 増殖性マクロファージ様細胞（ｐＭＡＣ）の製造方法

［図3］



(57) Abstract: The present invention provides: proliferative macrophage-like cells (pMAC), characterized by proliferating in a cytokine-dependent manner; a method for producing the same; and a method for producing chimeric antigen receptor (CAR)-proliferative macrophage-like cells (pMAC) that includes (1) a step (step 1) that deletes or suppresses the expression of a gene that inhibits macrophage-like function in pluripotent stem cells, then induces differentiation into myeloid cells to obtain macrophage-like cells (MAC), (2) a step (step 2) that brings about expression of a gene that adds a proliferative property to the MAC obtained in step 1 and obtains proliferative macrophage-like cells (pMAC), and (3) a step (step 3) that introduces a CAR. The present invention also provides the pharmaceutical use of CAR-pMAC. The

WO 2024/034656 A1

［続葉有］

〒1008405 東京都千代田区丸の内一丁目５番１号 ＡＧＣ株式会社内 Tokyo (JP).

(74) 代理人：鎌田 光宜，外 (KAMADA, Mitsunori et al.)；〒5410044 大阪府大阪市中央区伏見町四丁目１番１号 明治安田生命大阪御堂筋ビル 高島国際特許事務所 Osaka (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, CV, 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, MG, MK, MN, MU, 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, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, 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, ME, 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)）

present invention makes it possible to provide a novel CAR-loaded cell platform, especially a CAR-loaded cell platform having excellent quality stability, stable supply, and economy, and especially to provide a CAR-loaded cell platform that is excellent as a pharmaceutical.

(57) 要約：本発明は、サイトカイン依存的に増殖することを特徴とする、増殖性マクロファージ様細胞（ｐＭＡＣ）、その製造方法、並びに（１）多能性幹細胞において、マクロファージ様機能を阻害する遺伝子を欠損または発現抑制させた後、ミエロイド細胞への分化を誘導してマクロファージ様細胞（ＭＡＣ）を得る工程（工程１）、（２）工程１で得られたＭＡＣに増殖性を付加する遺伝子を発現させ増殖性マクロファージ様細胞（ｐＭＡＣ）を得る工程（工程２）、および（３）キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）を導入する工程（工程３）を含む、ＣＡＲ－ｐＭＡＣの製造方法、を提供する。さらに本発明は、ＣＡＲ－ｐＭＡＣの医薬用途を提供する。本発明により、新規なＣＡＲ搭載細胞プラットフォームの提供、特に、品質安定性と安定供給、経済性に優れたＣＡＲ搭載細胞プラットフォーム、特に医薬として優れたＣＡＲ搭載細胞プラットフォームの提供が可能になる。

明　細　書

発明の名称 ：

増殖性マクロファージ様細胞（ｐＭＡＣ）の製造方法

技術分野

[0001]　本発明は、多能性幹細胞由来の増殖性マクロファージ様細胞（ｐＭＡＣ）およびその製造方法、該ｐＭＡＣにキメラ抗原受容体（ＣＡＲ）遺伝子を導入することを含むＣＡＲ－ｐＭＡＣの製造方法および該方法により製造されるＣＡＲ－ｐＭＡＣ等に関する。

背景技術

[0002]　がん患者への免疫療法の一つとして、細胞傷害性Ｔ細胞（ＣＴＬ）がもつＴ細胞受容体（ＴＣＲ）に対して遺伝子改変を加え、直接的且つ選択的に腫瘍細胞をＣＴＬに認識させ、抗腫瘍効果を発揮するというキメラ抗原受容体（Ｃｈｉｍｅｒｉｃ　Ａｎｔｉｇｅｎ　Ｒｅｃｅｐｔｏｒ，　ＣＡＲ）Ｔ細胞（以下単にＣＡＲ－Ｔ細胞とも称する）による治療法がある（非特許文献１）。ＣＡＲ－Ｔ細胞によるがん治療は、従来の抗がん剤や放射線治療とは異なる機序でがん細胞を殺傷することから、難治性あるいは治療抵抗性のがんに対してもその有効性が期待されている。既に、一部の白血病や悪性リンパ腫等、血液腫瘍に対するＣＡＲ－Ｔ細胞が製剤化されている。しかしながら固形がんに対する効果が限定的である。

[0003]　ＣＡＲ－Ｔ細胞療法は、本質的な以下の問題を抱えている。

１．がん組織指向性がない（がん組織に近づく為の受容体がない）

２．がん組織内に浸潤しない

３．がん微小環境（ＴＭＥ）との相互作用による機能低下・機能不全（疲弊）

４．がんの遺伝子変異によるターゲット抗原消失＝がん逃避（治療抵抗性）

５．サイトカイン放出症候群（ＣＲＳ）の懸念

これらの問題点に鑑み、国内外で改良が試みられている。例えば、がん指

向型受容体の導入（ＣＣＲ２，ＣＸＣＲ２）；ＣＡＲの細胞内シグナル伝達領域の改良；免疫チェックポイント制御（抗ＰＤ－１抗体，ＰＤ－１－ＣＤ２８）；サイトカイン産生能付与（ＩＬ７，１２，１５，１８）；若返りＴ／ＮＫ細胞（ｉＰＳ－Ｔ／ＮＫ細胞，ＳＣＭ－Ｔ細胞）；デュアル抗原認識システム；等が挙げられる。

しかしながら、固形がんで顕著な臨床効果を示した報告がないのが現状である。

[0004] 近年、Ｔ細胞ではなくマクロファージにＣＡＲを搭載する細胞プラットフォームが固形癌治療において有効性を示す、という前臨床試験の結果が報告された（非特許文献２）。

これはマクロファージに元来備わっている以下の特性／機能に基づく。

１．がん指向型受容体を発現して、がんに集積・浸潤する

２．ＰＤ－１／ＰＤ－Ｌ１介在性の機能低下に陥らない

３．活性化（１型マクロファージ（Ｍ１）転換）によって２次的免疫応答を惹起する

また、特許文献１、２には、ＣＡＲを搭載した単球、マクロファージ、および樹状細胞、それらの細胞を含む薬学的組成物について記載されている。

このようにＣＡＲ－マクロファージ療法は極めて有望な細胞免疫療法となり得るが、細胞製剤化の為には、品質の安定性や規格化（安定供給）や大量生産（経済性）が求められる。品質安定性と安定供給という観点からＣＡＲを搭載する細胞は他家であることが好ましい。特許文献２、３には、多能性幹細胞からミエロイド細胞を分化する方法が記載されている。

また、ｉＰＳ細胞由来マクロファージをベースとしたｉＭＡＣにＣＡＲを導入する技術が開発されている（非特許文献３）。しかしながら、この方法では、最終製品を増殖させることができず、また、随時実施される分化誘導が煩雑であり、製造コストの高騰が懸念される。

先行技術文献

特許文献

[0005] 特許文献1：特表２０２１－５１１８０９号公報

特許文献2：特開２０２２－２８８３１号公報

特許文献3：国際公開第２０２１／２３０３０４号

非特許文献

[0006] 非特許文献1：Eshhar Z. et al., Proc Natl Acad Sci U S A, 1993, 90: 720-724.

非特許文献2：Klichinsky M. et al., Nat Biotechnol. 38(8):947-953, 2020

非特許文献3：Su S. et al., Cells. 2022, 11: 1652

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0007] 本発明は、新規なＣＡＲ搭載細胞プラットフォームの提供、特に、品質安定性と安定供給、経済性に優れたＣＡＲ搭載マクロファージ様細胞プラットフォームの提供を課題とする。

課題を解決するための手段

[0008] 本発明者らは、上記課題に鑑み、ＣＡＲを搭載する免疫細胞としてマクロファージ細胞に着目した。ＣＡＲを搭載するマクロファージ細胞として多能性幹細胞から誘導したものを使用することによって他家細胞を利用することが可能となり、さらに、該マクロファージ細胞にサイトカイン依存的な増殖活性を付与することにより、大量生産が可能となることを見出し、本発明を完成するに至った。

即ち、本発明は以下の通りである。

[0009] ［１］サイトカイン依存的に増殖することを特徴とする、増殖性マクロファージ様細胞（ｐＭＡＣ；ｐｒｏｌｉｆｅｒａｔｉｎｇ Ｍａｃｒｏｐｈａｇｅ－ｌｉｋｅ ｃｅｌｌ）。

［２］サイトカインが顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（ＧＭ－ＣＳＦ）および／またはマクロファージコロニー刺激因子（Ｍ－ＣＳＦ）である

、［１］記載のｐＭＡＣ。

［３］ＣＤ１４およびＣＤ８３が陰性である、［１］または［２］記載のｐＭＡＣ。

［４］多能性幹細胞由来である、［１］～［３］のいずれかに記載のｐＭＡＣ。

［５］前記多能性幹細胞が人工多能性幹細胞または胚性幹細胞である、［４］記載のｐＭＡＣ。

［６］マクロファージ様機能を阻害する遺伝子が欠損または発現抑制されていることを特徴とする、［１］～［５］のいずれかに記載のｐＭＡＣ。

［７］前記マクロファージ様機能を阻害する遺伝子が、シグナル制御タンパク質α（ＳＩＲＰα）遺伝子である、［６］記載のｐＭＡＣ。

［８］前記ｐＭＡＣが、さらにキメラ抗原受容体（ＣＡＲ）を含む、［１］～［７］のいずれかに記載のｐＭＡＣ。

[0010] ［９］マクロファージ様機能を阻害する遺伝子を欠損または発現抑制させる工程、および増殖性を付加する遺伝子を発現させる工程を含む、増殖性マクロファージ様細胞（ｐＭＡＣ）の製造方法。

［１０］（１）多能性幹細胞において、マクロファージ様機能を阻害する遺伝子を欠損または発現抑制させた後、ミエロイド細胞への分化を誘導してマクロファージ様細胞（ＭＡＣ）を得る工程（工程１）、および

（２）工程１で得られたＭＡＣに増殖性を付加する遺伝子を発現させ増殖性マクロファージ様細胞（ｐＭＡＣ）を得る工程（工程２）

を含む、［９］記載の製造方法。

［１１］（Ａ）多能性幹細胞から分化させたミエロイド細胞に増殖性を付加する遺伝子を発現させ増殖性ミエロイド細胞を得る工程（工程Ａ）、および

（Ｂ）工程Ａで得られた増殖性ミエロイド細胞において、マクロファージ様機能を阻害する遺伝子を欠損または発現抑制させた後、分化誘導して増殖性マクロファージ様細胞（ｐＭＡＣ）を得る工程（工程Ｂ）

を含む、［９］記載の製造方法。

［１２］マクロファージ様機能を阻害する遺伝子がシグナル制御タンパク質α（ＳＩＲＰα）遺伝子である、［９］～［１１］のいずれかに記載の製造方法。

［１３］増殖性を付加する遺伝子が、ｃ－ＭＹＣ、ＢＭＩ１およびＭＤＭ２からなる群より選択される少なくとも１種である、［９］～［１２］のいずれかに記載の製造方法。

[0011] ［１４］［９］～［１３］のいずれかに記載の製造方法により得られたｐＭＡＣにキメラ抗原受容体（ＣＡＲ）を導入する、ＣＡＲ－ｐＭＡＣの製造方法。

［１５］（１）多能性幹細胞において、マクロファージ様機能を阻害する遺伝子を欠損または発現抑制させた後、ミエロイド細胞への分化を誘導してマクロファージ様細胞（ＭＡＣ）を得る工程（工程１）、

（２）工程１で得られたＭＡＣに増殖性を付加する遺伝子を発現させ増殖性マクロファージ様細胞（ｐＭＡＣ）を得る工程（工程２）、および

（３）キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）を導入する工程（工程３）

を含む、ＣＡＲ－ｐＭＡＣの製造方法。

［１６］前記多能性幹細胞は人工多能性幹細胞または胚性幹細胞である、［１５］記載の製造方法。

［１７］工程１におけるミエロイド細胞への分化誘導が、以下（ｉ）または（ｉｉ）の方法により実施される、［１５］または［１６］記載の製造方法。

（ｉ）多能性幹細胞から誘導された胚様体（ＥＢ）を、ＶＥＧＦを含む培地中でフィーダー細胞の上で重層培養を行った後、ＶＥＧＦ、ＳＣＦおよびＴＰＯを含む培地でさらに培養すること、または

（ｉｉ）多能性幹細胞から誘導された胚様体（ＥＢ）を、ＢＭＰ－４、ＶＥＧＦおよびＳＣＦを含む培地中でフィーダー細胞なしの単層培養を行った後、さらにＶＥＧＦ、ＴＰＯおよびＧＭ－ＣＳＦを含む培地でさらに培養すること。

［１８］多能性幹細胞から胚葉体（ＥＢ）への誘導が、以下（ａ）および（ｂ）の方法により実施される［１７］記載の方法：

（ａ）多能性幹細胞を細胞塊形成培養容器に播種して胚様体（ＥＢ）を形成させ、および（ｂ）前記容器は、底に微細なスフェロイドウェルが設けられ、かつ、隣接するウェルの間に平坦な面は存在しないこと。

［１９］（１）多能性幹細胞において、マクロファージ様機能を阻害する遺伝子を欠損または発現抑制させる工程（工程１－１）、

工程１－１で得られたマクロファージ様機能を阻害する遺伝子を欠損または発現抑制させた多能性幹細胞を、底に微細なスフェロイドウェルが設けられ、かつ、隣接するウェルの間に平坦な面は存在しない細胞塊形成培養容器に播種して胚様体（ＥＢ）を形成させる工程（工程１－２）、

工程１－２で得られたＥＢから以下の（ｉ）または（ｉｉ）の方法によりマクロファージ様細胞（ＭＡＣ）を得る工程（工程１－３）、

（ｉ）前記ＥＢを、ＶＥＧＦを含む培地中でフィーダー細胞の上で重層培養を行った後、ＶＥＧＦ、ＳＣＦおよびＴＰＯを含む培地でさらに培養すること、または

（ｉｉ）前記ＥＢを、ＢＭＰ－４、ＶＥＧＦおよびＳＣＦを含む培地中でフィーダー細胞なしの単層培養を行った後、さらにＶＥＧＦ、ＴＰＯおよびＧＭ－ＣＳＦを含む培地でさらに培養すること、

（２）工程１－３で得られたＭＡＣに増殖性を付加する遺伝子を発現させ増殖性マクロファージ様細胞（ｐＭＡＣ）を得る工程（工程２）、および、

（３）工程２で得られたｐＭＡＣにキメラ抗原受容体（ＣＡＲ）を導入しＣＡＲ－ｐＭＡＣを得る工程（工程３）、

を含むＣＡＲ－ｐＭＡＣの製造方法。

［２０］マクロファージ様機能を阻害する遺伝子がシグナル制御タンパク質α（ＳＩＲＰα）遺伝子である、［１５］～［１９］のいずれかに記載の製造方法。

［２１］増殖性を付加する遺伝子が、ｃ－ＭＹＣ、ＢＭＩ１およびＭＤＭ２

からなる群より選択される少なくとも１種である、［１５］～［２０］のいずれかに記載の製造方法。

[0012] ［２２］ｉＰＳ細胞由来ミエロイド細胞、ｉＰＳ細胞由来マクロファージ、生体由来単球細胞、生体由来マクロファージＭ１、生体由来マクロファージＭ２および生体由来マクロファージＭ０からなるマクロファージ細胞系譜に沿った細胞群を比較対象として用いた全トランスクリプトーム解析を実施することによって得られる遺伝子発現プロファイルに基づく主成分分析を行い、寄与率の大きい上位２成分の指標を解析対象としたとき、以下の条件を満たす、増殖性マクロファージ様細胞：

条件１：既知のマクロファージ細胞系譜のプロットと重複しない、且つ、

条件２：ＰＣ１が１００以上であり、ＰＣ２が－８０～０の範囲にプロットされる。

[0013] ［２３］［８］記載の増殖性マクロファージ様細胞と薬学的に許容される担体とを含む医薬組成物。

［２４］腫瘍またはがんと関連のある疾患、神経変性疾患、炎症性疾患、心臓血管疾患、線維性疾患、およびアミロイドーシスからなる群より選択される少なくとも１種の治療用である、［２３］記載の医薬組成物。

［２５］［８］記載の増殖性マクロファージ様細胞の有効量を、それを必要とする対象に投与することを含む、腫瘍またはがんと関連のある疾患、神経変性疾患、炎症性疾患、心臓血管疾患、線維性疾患、およびアミロイドーシスからなる群より選択される少なくとも１種の治療方法。

［２６］腫瘍またはがんと関連のある疾患、神経変性疾患、炎症性疾患、心臓血管疾患、線維性疾患、およびアミロイドーシスからなる群より選択される少なくとも１種の治療に使用する為の、［８］記載の増殖性マクロファージ様細胞。

発明の効果

[0014] 本発明の方法によれば、品質安定性と安定供給、経済性に優れたＣＡＲ搭載増殖性マクロファージ様細胞（ＣＡＲ－ｐＭＡＣ）を製造できる。ＣＡＲ

搭載増殖性マクロファージ様細胞は、固形癌治療にも効果を示す。

図面の簡単な説明

[0015] [図1]マウスｐＭＡＣ、骨髄由来単球（ＢＭ－ｄｅｒｉｖｅｄ　ｍｏｎｏｃｙｔｅ）、骨髄由来マクロファージＭ０（ＢＭ－ｄｅｒｉｖｅｄ　ｍａｃｒｏｐｈａｇｅｓ　Ｍ０）、マウス骨髄由来Ｍ１型マクロファージ（ＢＭ－ｄｅｒｉｖｅｄ　ｍａｃｒｏｐｈａｇｅｓ　Ｍ１）、マウス骨髄由来Ｍ２型マクロファージ（ＢＭ－ｄｅｒｉｖｅｄ　ｍａｃｒｏｐｈａｇｅｓ　Ｍ２）および、腹腔由来マクロファージ（Ｉｎｔｒａｐｅｒｉｔｏｎｅａｌ　ｍａｃｒｏｐｈａｇｅｓ）のＲＮＡシーケンス解析により得た各細胞の遺伝子発現プロファイルを主成分分析して、第１主成分（ＰＣ１：寄与率３４％）を横軸に、第２主成分（ＰＣ２：寄与率２１％）を横軸にプロットした図。各細胞間のプロットの距離が近いほど遺伝子発現プロファイルが類似していることを示し、反対に各細胞間のプロットの距離が遠いと、遺伝子発現プロファイルが異なることを示す。

[図2-1]マウス骨髄由来単球（ＢＭ－ｄｅｒｉｖｅｄ　ｍｏｎｏｃｙｔｅ）、マウス腹腔内マクロファージ（Ｉｎｔｒａｐｅｒｉｔｏｎｅａｌ　ｍａｃｒｏｐｈａｇｅｓ）、マウス骨髄由来マクロファージ（ＢＭ-ｄｅｒｉｖｅｄ　ｍａｃｒｏｐｈａｇｅｓ　Ｍ０）、マウス骨髄由来Ｍ１型マクロファージ（ＢＭ－ｄｅｒｉｖｅｄ　ｍａｃｒｏｐｈａｇｅｓ　Ｍ１）、マウス骨髄由来Ｍ２型マクロファージ（ＢＭ－ｄｅｒｉｖｅｄ　ｍａｃｒｏｐｈａｇｅｓ　Ｍ２）およびマウスｐＭＡＣのフローサイトメーターによるＣＤ１１ｂ、Ｆ４／８０、ＣＤ１６／３２、ＣＤ６４、Ｉ－Ａ／ＥおよびＣＤ２０６表面抗原解析の結果を示すヒストグラム。縦軸は細胞存在割合（％）、横軸は各測定マーカーの蛍光強度を表す。

[図2-2]マウス骨髄由来単球（ＢＭ－ｄｅｒｉｖｅｄ　ｍｏｎｏｃｙｔｅ）、マウス腹腔内マクロファージ（Ｉｎｔｒａｐｅｒｉｔｏｎｅａｌ　ｍａｃｒｏｐｈａｇｅｓ）、マウス骨髄由来マクロファージ（ＢＭ－ｄｅｒｉｖｅｄ　ｍａｃｒｏｐｈａｇｅｓ　Ｍ０）、マウス骨髄由来Ｍ１型マクロファージ

（ＢＭ－ｄｅｒｉｖｅｄ　ｍａｃｒｏｐｈａｇｅｓ　Ｍ１）、マウス骨髄由来Ｍ２型マクロファージ（ＢＭ－ｄｅｒｉｖｅｄ　ｍａｃｒｏｐｈａｇｅｓ　Ｍ２）およびマウスｐＭＡＣのフローサイトメーターによるＣＤ１６３、Ｌｙ６Ｃ、ＣＤ８０、ＣＤ８６、ＳｉｇｌｅｃＦおよびＳＩＲＰα表面抗原解析の結果を示すヒストグラム。縦軸は細胞存在割合（％）、横軸は各測定マーカーの蛍光強度を表す。

[図2-3]マウス骨髄由来単球（ＢＭ－ｄｅｒｉｖｅｄ　ｍｏｎｏｃｙｔｅ）、マウス腹腔内マクロファージ（Ｉｎｔｒａｐｅｒｉｔｏｎｅａｌ　ｍａｃｒｏｐｈａｇｅｓ）、マウス骨髄由来マクロファージ（ＢＭ－ｄｅｒｉｖｅｄ　ｍａｃｒｏｐｈａｇｅｓ　Ｍ０）、マウス骨髄由来Ｍ１型マクロファージ（ＢＭ－ｄｅｒｉｖｅｄ　ｍａｃｒｏｐｈａｇｅｓ　Ｍ１）、マウス骨髄由来Ｍ２型マクロファージ（ＢＭ－ｄｅｒｉｖｅｄ　ｍａｃｒｏｐｈａｇｅｓ　Ｍ２）およびマウスｐＭＡＣのフローサイトメーターによるＴＬＲ２、ＴＬＲ４、ＣＤ１２４、ＣＣＲ１、ＣＣＲ２、ＣＣＲ３およびＣＣＲ４表面抗原解析の結果を示すヒストグラム。縦軸は細胞存在割合（％）、横軸は各測定マーカーの蛍光強度を表す。

[図2-4]マウス骨髄由来単球（ＢＭ-ｄｅｒｉｖｅｄ　ｍｏｎｏｃｙｔｅ）、マウス腹腔内マクロファージ（Ｉｎｔｒａｐｅｒｉｔｏｎｅａｌ　ｍａｃｒｏｐｈａｇｅｓ）、マウス骨髄由来マクロファージ（ＢＭ－ｄｅｒｉｖｅｄ　ｍａｃｒｏｐｈａｇｅｓ　Ｍ０）、マウス骨髄由来Ｍ１型マクロファージ（ＢＭ－ｄｅｒｉｖｅｄ　ｍａｃｒｏｐｈａｇｅｓ　Ｍ１）、マウス骨髄由来Ｍ２型マクロファージ（ＢＭ－ｄｅｒｉｖｅｄ　ｍａｃｒｏｐｈａｇｅｓ　Ｍ２）およびマウスｐＭＡＣのフローサイトメーターによるＣＣＲ５、ＣＸＣＲ２およびＣＸＣＲ４表面抗原解析の結果を示すヒストグラム。縦軸は細胞存在割合（％）、横軸は各測定マーカーの蛍光強度を表す。

[図3]マウスｐＭＡＣおよびＳＩＲＰα遺伝子を欠損するｐＭＡＣ－ＳＩＲＰα－ＫＯのメイギムザ染色による顕微鏡観察像。スケールバーは２０μｍを示す。ｐＭＡＣと比較してＳＩＲＰα遺伝子の欠損による特徴的な形態的変

化は見られなかった。

[図4]ｐＭＡＣに対してＧＰＣ３特異的キメラ抗原受容体（ＧＰＣ３－ＣＡＲ）遺伝子の導入に用いたレンチウイルスベクターのベクター地図（上段）およびＣＡＲ発現コンストラクト（下段）。

[図5]ｐＭＡＣの増殖速度に及ぼすＧＭ－ＣＳＦおよび／またはＭ－ＣＳＦを含む培地（２０％ＦＢＳ含有αＭＥＭ）の効果を調べたＭＴＴアッセイの測定結果を示す折れ線グラフ。マウスｐＭＡＣ（左上）、ＣＡＲ－ｐＭＡＣ（右上）、ｐＭＡＣ－ＳＩＲＰα－ＫＯ（左下）、ＣＡＲ－ｐＭＡＣ－ＳＩＲＰα－ＫＯ（右下）の結果を表す。縦軸はＭＴＴ試薬から代謝されたホルマザンの濃度（５９５ｎｍの吸光度として評価）、横軸は培養日数を表す。ｐＭＡＣ作製の為に実施したＳＩＲＰα遺伝子の欠損および／またはがん抗原ＧＰＣ３に対するＣＡＲの導入によるサイトカイン依存性の細胞増殖性能に変化はなかった。

[図6]マウスｐＭＡＣ、ｐＭＡＣ－ＳＩＲＰα－ＫＯ、ＣＡＲ－ｐＭＡＣおよびＣＡＲ－ｐＭＡＣ－ＳＩＲＰα－ＫＯのフローサイトメーターによるｈＧＰＣ３－ＦＩＴＣ、ＳＩＲＰαおよびｔｄＴｏｍａｔｏ発現解析の結果を示すサイトグラム。縦軸はｈＧＰＣ３－ＦＩＴＣの蛍光強度、横軸はｔｄＴｏｍａｔｏの蛍光強度（上段）。縦軸はＳＩＲＰαの蛍光強度、横軸はｔｄＴｏｍａｔｏの蛍光強度（中段）。縦軸はＳＩＲＰαの蛍光強度、横軸はｈＧＰＣ３－ＦＩＴＣの蛍光強度（下段）。ＧＰＣ３－ＣＡＲを発現するｐＭＡＣは単一の細胞集団として得られることから、純度が高く目的外の細胞をほとんど含まないことが分かる。

[図7]マウスｐＭＡＣ、ｐＭＡＣ－ＳＩＲＰα－ＫＯ、ＣＡＲ－ｐＭＡＣ、ＣＡＲ－ｐＭＡＣ－ＳＩＲＰα－ＫＯおよびマウス骨髄由来マクロファージ（ＢＭ－Ｍａｃｒｏｐｈａｇｅ）に対して、刺激成分無しの培地（Ｍｅｄｉｕｍ）、インターフェロンγおよびＬＰＳによるＭ１刺激、ＩＬ－４によるＭ２刺激を加えた際のサイトカインＩＬ－６，ＴＮＦα、ＩＬ－１２、またはＩＬ－１０の産生をＥＬＩＳＡにより測定した結果。縦軸は測定したサイト

カインの濃度（ｐｇ／ｍＬ）を示す。

[図8]マウスＣＡＲ－ｐＭＡＣ－ＳＩＲＰα－ＫＯをボイデンチャンバー方式のｘＣＥＬＬｉｇｅｎｃｅ　ＤＰシステムによって細胞遊走能をリアルタイム計測した結果。マウスがん細胞ＭＣ３８、ＬＬ／２、４Ｔ１、ＣＴ２６由来培養上清、および新鮮培地（Ｍｅｄｉｕｍ）に対する細胞遊走能（上段左）；マウスがん細胞ＭＣ３８、マウス正常細胞であるマウス胎児線維芽細胞ＭＥＦ、Ｔ細胞およびＢ細胞由来の培養上清および新鮮培地（Ｍｅｄｉｕｍ）に対する細胞遊走能（上段中央）；未処理、サイトカラシンＤ（＋ＣｙｔＤ）処理、または百日咳菌由来毒素（＋ＰＴＸ）処理したマウスＣＡＲ－ｐＭＡＣ－ＳＩＲＰα－ＫＯのマウスがん細胞ＭＣ３８の培養上清、または新鮮培地（Ｍｅｄｉｕｍ）に対する細胞遊走能（上段右）。リコンビナントＣＣＬ２、ＣＣＬ３、ＣＣＬ４、ＣＣＬ５、および新鮮培地（Ｍｅｄｉｕｍ）に対する細胞遊走能（下段左）；リコンビナントＣＣＬ７、ＣＣＬ８、ＣＸＣＬ１、ＣＸＣＬ２、および新鮮培地（Ｍｅｄｉｕｍ）に対する細胞遊走能（下段中央）；リコンビナントＣＸＣＬ５、ＳＤＦ－１α（ＣＸＣＬ１２）、ＳＤＦ－１β（ＣＸＣＬ１２）、ＣＸ３ＣＬ１および新鮮培地（Ｍｅｄｉｕｍ）に対する細胞遊走能（下段右）。横軸は培養時間、縦軸は測定開始時点（０ｈｒ）に相対的な細胞遊走能の程度を示すＣｅｌｌ　Ｉｎｄｅｘ（ＣＩ）を示す。

[図9-1]マウスｐＭＡＣ、ｐＭＡＣ－ＳＩＲＰα－ＫＯ、ＣＡＲ－ｐＭＡＣまたはＣＡＲ－ｐＭＡＣ－ＳＩＲＰα－ＫＯと、マウスがん細胞（ＧＰＣ３発現無し、またはＧＰＣ３発現有り）を４８時間共培養した際の培養上清中のサイトカインＩＬ－６産生のＥＬＩＳＡ測定結果。前述のｐＭＡＣ４種類と、乳がん細胞株４Ｔ１－ｍｏｃｋ（ＧＰＣ３発現無し）または４Ｔ１－ＧＰＣ３（ＧＰＣ３発現有り）（最上段）、大腸がん細胞株ＣＴ２６－ｍｏｃｋ（ＧＰＣ３発現無し）またはＣＴ２６－ＧＰＣ３（ＧＰＣ３発現有り）（上から２段目）、肺がん細胞株ＬＬ／２－ｍｏｃｋ（ＧＰＣ３発現無し）またはＬＬ／２－ＧＰＣ３（ＧＰＣ３発現有り）（上から３段目）、大腸がん細

胞株ＭＣ３８－ｍｏｃｋ（ＧＰＣ３発現無し）またはＭＣ３８－ＧＰＣ３（ＧＰＣ３発現有り）（最下段）とを共培養した結果。

[図9-2]マウスｐＭＡＣ、ｐＭＡＣ－ＳＩＲＰα－ＫＯ、ＣＡＲ－ｐＭＡＣまたはＣＡＲ－ｐＭＡＣ－ＳＩＲＰα－ＫＯと、マウスがん細胞（ＧＰＣ３発現無し、またはＧＰＣ３発現有り）を４８時間共培養した際の培養上清中のサイトカインＴＮＦα産生のＥＬＩＳＡ測定結果。前述のｐＭＡＣ４種類と、乳がん細胞株４Ｔ１－ｍｏｃｋ（ＧＰＣ３発現無し）または４Ｔ１－ＧＰＣ３（ＧＰＣ３発現有り）（最上段）、大腸がん細胞株ＣＴ２６－ｍｏｃｋ（ＧＰＣ３発現無し）またはＣＴ２６－ＧＰＣ３（ＧＰＣ３発現有り）（上から２段目）、肺がん細胞株ＬＬ／２－ｍｏｃｋ（ＧＰＣ３発現無し）またはＬＬ／２－ＧＰＣ３（ＧＰＣ３発現有り）（上から３段目）、大腸がん細胞株ＭＣ３８－ｍｏｃｋ（ＧＰＣ３発現無し）またはＭＣ３８－ＧＰＣ３（ＧＰＣ３発現有り）（最下段）とを共培養した結果。

[図9-3]マウスｐＭＡＣ、ｐＭＡＣ－ＳＩＲＰα－ＫＯ、ＣＡＲ－ｐＭＡＣまたはＣＡＲ－ｐＭＡＣ－ＳＩＲＰα－ＫＯと、マウスがん細胞（ＧＰＣ３発現無し、またはＧＰＣ３発現有り）を４８時間共培養した際の培養上清中のサイトカインＩＬ－１０産生のＥＬＩＳＡ測定結果。前述のｐＭＡＣ４種類と、乳がん細胞株４Ｔ１－ｍｏｃｋ（ＧＰＣ３発現無し）または４Ｔ１－ＧＰＣ３（ＧＰＣ３発現有り）（最上段）、大腸がん細胞株ＣＴ２６－ｍｏｃｋ（ＧＰＣ３発現無し）またはＣＴ２６－ＧＰＣ３（ＧＰＣ３発現有り）（上から２段目）、肺がん細胞株ＬＬ／２－ｍｏｃｋ（ＧＰＣ３発現無し）またはＬＬ／２－ＧＰＣ３（ＧＰＣ３発現有り）（上から３段目）、大腸がん細胞株ＭＣ３８－ｍｏｃｋ（ＧＰＣ３発現無し）またはＭＣ３８－ＧＰＣ３（ＧＰＣ３発現有り）（最下段）とを共培養した結果。

[図9-4]マウスｐＭＡＣ、ｐＭＡＣ－ＳＩＲＰα－ＫＯ、ＣＡＲ－ｐＭＡＣまたはＣＡＲ－ｐＭＡＣ－ＳＩＲＰα－ＫＯと、マウスがん細胞（ＧＰＣ３発現無し、またはＧＰＣ３発現有り）を４８時間共培養した際の培養上清中のサイトカインＩＬ－１２産生のＥＬＩＳＡ測定結果。前述のｐＭＡＣ４種類

と、乳がん細胞株４Ｔ１－ｍｏｃｋ（ＧＰＣ３発現無し）または４Ｔ１－ＧＰＣ３（ＧＰＣ３発現有り）（最上段）、大腸がん細胞株ＣＴ２６－ｍｏｃｋ（ＧＰＣ３発現無し）またはＣＴ２６－ＧＰＣ３（ＧＰＣ３発現有り）（上から２段目）、肺がん細胞株ＬＬ／２－ｍｏｃｋ（ＧＰＣ３発現無し）またはＬＬ／２－ＧＰＣ３（ＧＰＣ３発現有り）（上から３段目）、大腸がん細胞株ＭＣ３８－ｍｏｃｋ（ＧＰＣ３発現無し）またはＭＣ３８－ＧＰＣ３（ＧＰＣ３発現有り）（最下段）とを共培養した結果。

[図10]マウスｐＭＡＣ（Ａ）、ＣＡＲ－ｐＭＡＣ（Ｂ）、ｐＭＡＣ－ＳＩＲＰα－ＫＯ（Ｃ）およびＣＡＲ－ｐＭＡＣ－ＳＩＲＰα－ＫＯ（Ｄ）とルシフェラーゼ（Ｌｕｃ）遺伝子導入した肺がん細胞株ＬＬ／２（ヒトＧＰＣ３発現無しまたは有り；左上）、大腸がん細胞株ＣＴ２６（ヒトＧＰＣ３発現無しまたは有り；右上）、大腸がん細胞株ＭＣ３８（ヒトＧＰＣ３発現無しまたは有り；左下）および乳がん細胞株４Ｔ１（ヒトＧＰＣ３発現無しまたは有り；右下）を４８時間共培養した後に、がん細胞のルシフェラーゼ活性を定量した棒グラフ。縦軸はがん細胞の減少割合（％）を示す。白棒はｈＧＰＣ３を発現しないがん細胞、黒棒はｈＧＰＣ３を発現するがん細胞を表す。ＣＡＲ導入ｐＭＡＣ（Ｄ）は標的がん抗原ヒトＧＰＣ（ｈＧＰＣ）を発現するがん細胞を排除することが分かる。

[図11]ｔｄＴｏｍａｔｏを発現するマウスｐＭＡＣおよびＣＡＲ－ｐＭＡＣ－ＳＩＲＰα－ＫＯとＶｅｎｕｓを発現するがん細胞株（ヒトＧＰＣ３発現有り）を共培養して、２日後および４日後に行った蛍光顕微鏡観察画像（上段）。がん細胞は蛍光タンパク質Ｖｅｎｕｓに由来する緑色蛍光（励起波長４７０ｎｍ、吸収波長５２５ｎｍ）で検出され、ｐＭＡＣまたはＣＡＲ－ｐＭＡＣ－ＳＩＲＰα－ＫＯは蛍光タンパク質ｔｄＴｏｍａｔｏに由来する赤色蛍光（励起波長５４５ｎｍ、吸収波長６０５ｎｍ）で検出される。がん細胞の緑色蛍光シグナルおよび、ｐＭＡＣまたはＣＡＲ－ｐＭＡＣ－ＳＩＲＰα－ＫＯの赤色蛍光シグナルが重複して表示された領域の面積をプロットした棒グラフ（下段左側）。がん細胞の緑色蛍光シグナルが検出された領域の

面積をプロットした棒グラフ（下段右側）。ｐＭＡＣと共培養されたがん細胞は増殖するが、ＣＡＲ－ｐＭＡＣ－ＳＩＲＰα－ＫＯと共培養されたがん細胞はＣＡＲ－ｐＭＡＣ－ＳＩＲＰα－ＫＯに取り囲まれて貪食されることで排除されることが分かる。

[図12-1]マウスＣＡＲ－ｐＭＡＣ－ＳＩＲＰα－ＫＯをエフェクター細胞として、ターゲット細胞のマウスがん細胞４種類と共培養した際の、マウスＣＡＲ－ｐＭＡＣ－ＳＩＲＰα－ＫＯによるがん細胞の細胞傷害活性を示したグラフ。大腸がん細胞株ＣＴ２６（ヒトＧＰＣ３発現無しまたは有り；左上）、大腸がん細胞株ＭＣ３８（ヒトＧＰＣ３発現無しまたは有り；右上）、肺がん細胞株ＬＬ／２（ヒトＧＰＣ３発現無しまたは有り；左下）、および乳がん細胞株４Ｔ１（ヒトＧＰＣ３発現無しまたは有り；右下）を２４時間培養した後に、ＣＡＲ－ｐＭＡＣ－ＳＩＲＰα－ＫＯを、播種したがん細胞の１０倍、５倍、１倍量を加えて共培養を行い、６時間後の細胞傷害活性（％Ｃｙｔｏｌｙｓｉｓ）をプロットした図。縦軸はがん細胞の細胞傷害活性（％Ｃｙｔｏｌｙｓｉｓ）を示し、横軸はエフェクター細胞（ＣＡＲ－ｐＭＡＣ－ＳＩＲＰα－ＫＯ）とターゲット細胞（がん細胞）の混合比率（Ｅ：Ｔ　ｒａｔｉｏ）を示す。

[図12-2]マウスＣＡＲ－ｐＭＡＣ－ＳＩＲＰα－ＫＯをエフェクター細胞として、ターゲット細胞のマウスがん細胞（ヒトＧＰＣ３発現無しまたは有り）とＥ：Ｔ比１０：１、５：１、および１：１で共培養した際の、マウスＣＡＲ－ｐＭＡＣ－ＳＩＲＰα－ＫＯによるがん細胞ＣＴ２６の細胞生存シグナルＮｏｒｍａｌｉｚｅｄ　Ｃｅｌｌ　Ｉｎｄｅｘ（最上段）、マウスＣＴ２６細胞の細胞傷害活性％Ｃｙｔｏｌｙｓｉｓ（上から２段目）のｘＣＥＬＬｉｇｅｎｃｅ　ＲＴＣＡ　ＤＰシステムでの計測結果。マウスＣＡＲ－ｐＭＡＣ－ＳＩＲＰα－ＫＯによるがん細胞ＭＣ３８の細胞生存シグナルＮｏｒｍａｌｉｚｅｄ　Ｃｅｌｌ　Ｉｎｄｅｘ（上から３段目）、マウスＭＣ３８細胞の細胞傷害活性％Ｃｙｔｏｌｙｓｉｓ（最下段）のｘＣＥＬＬｉｇｅｎｃｅ　ＲＴＣＡ　ＤＰシステムでの計測結果。

[図12-3]マウスＣＡＲ－ｐＭＡＣ－ＳＩＲＰα－ＫＯをエフェクター細胞として、ターゲット細胞のマウスがん細胞（ヒトＧＰＣ３発現無しまたは有り）とＥ：Ｔ比１０：１、５：１、および１：１で共培養した際の、マウスＣＡＲ－ｐＭＡＣ－ＳＩＲＰα－ＫＯによるがん細胞ＬＬ／２の細胞生存シグナルＮｏｒｍａｌｉｚｅｄ　Ｃｅｌｌ　Ｉｎｄｅｘ（最上段）、マウスＬＬ／２細胞の細胞傷害活性％Ｃｙｔｏｌｙｓｉｓ（上から２段目）のｘＣＥＬＬｉｇｅｎｃｅ　ＲＴＣＡ　ＤＰシステムでの計測結果。マウスＣＡＲ－ｐＭＡＣ－ＳＩＲＰα－ＫＯによるがん細胞４Ｔ１の細胞生存シグナルＮｏｒｍａｌｉｚｅｄ　Ｃｅｌｌ　Ｉｎｄｅｘ（上から３段目）、マウス４Ｔ１細胞の細胞傷害活性％Ｃｙｔｏｌｙｓｉｓ（最下段）のｘＣＥＬＬｉｇｅｎｃｅ　ＲＴＣＡ　ＤＰシステムでの計測結果。

[図13]マウスｐＭＡＣ、ｐＭＡＣ－ＳＩＲＰα－ＫＯ、ＣＡＲ－ｐＭＡＣおよび、ＣＡＲ－ｐＭＡＣ－ＳＩＲＰα－ＫＯをエフェクター細胞として、ターゲット細胞のマウスＣＴ２６（ＧＰＣ３発現有り）とＥ：Ｔ比１０：１で共培養した場合のＣＴ２６の細胞傷害活性％Ｃｙｔｏｌｙｓｉｓを縦軸にプロットした棒グラフ（最上段左）。マウスＣＡＲ－ｐＭＡＣ－ＳＩＲＰα－ＫＯをエフェクター細胞として、ターゲット細胞のマウスがん細胞ＣＴ２６（ＧＰＣ３発現無しまたは有り）とＥ：Ｔ比１０：１で共培養した際の、ＣＴ２６細胞の細胞傷害活性％Ｃｙｔｏｌｙｓｉｓを縦軸にプロットした棒グラフ（最上段右）。マウスｐＭＡＣ、ｐＭＡＣ－ＳＩＲＰα－ＫＯ、ＣＡＲ－ｐＭＡＣおよび、ＣＡＲ－ｐＭＡＣ－ＳＩＲＰα－ＫＯをエフェクター細胞として、ターゲット細胞のマウスＣＴ２６（ＧＰＣ３発現無し）とＥ：Ｔ比１０：１で共培養した場合のＣＴ２６（ＧＰＣ３発現無し）の細胞生存を示すＮｏｒｍａｌｉｚｅｄ　Ｃｅｌｌ　Ｉｎｄｅｘの経時変化を縦軸に、共培養の時間を横軸にプロットした折れ線グラフ（中段左）、マウスＣＴ２６細胞（ＧＰＣ３発現無し）の細胞傷害活性％Ｃｙｔｏｌｙｓｉｓを縦軸にプロットした折れ線グラフ（最下段左）。マウスｐＭＡＣ、ｐＭＡＣ－ＳＩＲＰα－ＫＯ、ＣＡＲ－ｐＭＡＣおよび、ＣＡＲ－ｐＭＡＣ－ＳＩＲＰα－Ｋ

Ｏをエフェクター細胞として、ターゲット細胞のマウスＣＴ２６（ＧＰＣ３発現有り）とＥ：Ｔ比１０：１で共培養した場合のＣＴ２６（ＧＰＣ３発現有り）の細胞生存を示すＮｏｒｍａｌｉｚｅｄ　Ｃｅｌｌ　Ｉｎｄｅｘの経時変化を縦軸に、共培養の時間を横軸にプロットした折れ線グラフ（中段右）、マウスＣＴ２６細胞（ＧＰＣ３発現有り）の細胞傷害活性％Ｃｙｔｏｌｙｓｉｓを縦軸にプロットした折れ線グラフ（最下段右）。ＣＡＲ－ｐＭＡＣ－ＳＩＲＰα－ＫＯは、ｐＭＡＣ、ＣＡＲ－ｐＭＡＣ、ｐＭＡＣ－ＳＩＲＰα－ＫＯと比較して、がん細胞との共培養６時間で高い細胞傷害活性を示すことが分かる。

[図14]マウスｐＭＡＣ、ｐＭＡＣ－ＳＩＲＰα－ＫＯ、ＣＡＲ－ｐＭＡＣ、またはＣＡＲ－ｐＭＡＣ－ＳＩＲＰα－ＫＯとマウスがん細胞ＭＣ３８（ＧＰＣ３発現）を共培養して、タイムラプス観察により貪食細胞を計数した折れ線グラフ。横軸は共培養の時間を示し、縦軸は貪食細胞数を示す。

[図15]ＭＣ３８（ＧＰＣ３発現）を移植して腹膜播種を形成したＣ５７ＢＬ／６系統担がんマウスに対して、ＣＡＲ－ｐＭＡＣ－ＳＩＲＰα－ＫＯを投与して投与前Ｄａｙ０（上段）、１日後（中段）、３日後（下段）にＣＡＲ－ｐＭＡＣ－ＳＩＲＰα－ＫＯの体内動態を定量ＰＣＲで測定した結果。横軸は評価した各臓器を示し、縦軸は各臓器のゲノムＤＮＡ１００μｇ中に検出されたＣＡＲ－ｐＭＡＣ細胞数の常用対数を示す。

[図16]野生型Ｃ５７ＢＬ／６マウスにルシフェラーゼ遺伝子およびがん抗原ＧＰＣ３を発現するマウス大腸がん細胞株ＭＣ３８を腹腔内投与して未治療、または翌日、３日目、７日目、１０日目、１４日目および１７日目に１０Ｇｙの放射線照射を行ったＣＡＲ－ｐＭＡＣ－ＳＩＲＰα－ＫＯを投与した大腸がん腹膜播種モデルマウスにおける生存がん細胞を生物化学発光により測定した全個体のｉｎ　ｖｉｖｏイメージングの撮影画像（上）と、ルシフェラーゼ発光の全フラックスの経時変化を示す折れ線グラフ（左下）と、各担がんマウス個体の生存曲線（右下）。ｉｎ　ｖｉｖｏイメージングの撮影は、ＭＣ３８腹腔内投与時（Ｄａｙ　０）、３日目（Ｄａｙ　３）、７日目

（Ｄａｙ　７）、１０日目（Ｄａｙ　１０）および１４日目（Ｄａｙ　１４）に実施した。上の撮影画像の右はルシフェラーゼ発光強度を有彩色で表したスケールで、最小発光強度は２．００×ｅ^{8}で、最大発光強度は１．００×ｅ^{10}（単位：ｐ／ｓｅｃ／ｃｍ^{2}／ｓｒ）。左下の折れ線グラフの縦軸はルシフェラーゼ発光の全フラックス（単位：１０^{10}ｐｈｏｔｏｎｓ／ｓ）、横軸はがん細胞移植後の日数を表す。右下のグラフの縦軸はマウス生存率、横軸はがん細胞移植後の日数を表す。未治療のマウスではがん細胞の成長が見られるが、ＣＡＲ－ｐＭＡＣ－ＳＩＲＰα－ＫＯ投与マウスは放射線照射後の投与であってもがん細胞の成長を抑制し、大腸がん腹膜播種の進行を抑制してマウス個体の生存を延長することが分かる。

[図17]ヒトｐＭＡＣ、採血由来ＣＤ１４陽性細胞由来単球（ＣＤ１４－ｄｅｒｉｖｅｄ　ｍｏｎｏｃｙｔｅ）、採血由来ＣＤ１４陽性細胞由来マクロファージＭ０（ＣＤ１４－ｄｅｒｉｖｅｄ　Ｍａｃｒｏｐｈａｇｅｓ　Ｍ０）、採血由来ＣＤ１４陽性細胞由来Ｍ１型マクロファージ（ＣＤ１４－ｄｅｒｉｖｅｄ　Ｍａｃｒｏｐｈａｇｅｓ　Ｍ１）、採血由来ＣＤ１４陽性細胞由来Ｍ２型マクロファージ（ＣＤ１４－ｄｅｒｉｖｅｄ　Ｍａｃｒｏｐｈａｇｅｓ　Ｍ２）、ヒトｉＰＳ細胞由来ミエロイド細胞（ｉＰＳＣ－ｄｅｒｉｖｅｄ　Ｍｙｅｌｏｉｄ　ｃｅｌｌｓ）および、ヒトｉＰＳ細胞由来マクロファージ（ｉＰＳＣ－ｄｅｒｉｖｅｄ　ｍａｃｒｏｐｈａｇｅｓ）のＲＮＡシーケンス解析により得た各細胞の遺伝子発現プロファイルを主成分分析して、第１主成分（ＰＣ１：寄与率４０％）を横軸に、第２主成分（ＰＣ２：寄与率１８％）を横軸にプロットした図。各細胞間のプロットの距離が近いほど遺伝子発現プロファイルが類似していることを示し、反対に各細胞間のプロットの距離が遠いと、遺伝子発現プロファイルが異なることを示す。ｐＭＡＣは既知の採血由来またはｉＰＳ細胞由来マクロファージのいずれとも遺伝子発現プロファイルが大きく異なることがわかる。

[図18-1]ヒト採血由来ＣＤ１４陽性細胞由来単球（ＣＤ１４－ｄｅｒｉｖｅｄ　Ｍｏｎｏｃｙｔｅ）、ｐＭＡＣ、ｐＭＡＣ－ＳＩＲＰα－ＫＯ、ＣＡＲ

－ｐＭＡＣ－ＳＩＲＰα－ＫＯ、採血由来ＣＤ１４陽性細胞由来マクロファージ（ＣＤ１４－ｄｅｒｉｖｅｄ　ｍａｃｒｏｐｈａｇｅｓ　Ｍ０）、採血由来ＣＤ１４陽性細胞由来Ｍ１型マクロファージ（ＣＤ１４－ｄｅｒｉｖｅｄ　ｍａｃｒｏｐｈａｇｅｓ　Ｍ１）、採血由来ＣＤ１４陽性細胞由来Ｍ２型マクロファージ（ＣＤ１４－ｄｅｒｉｖｅｄ　ｍａｃｒｏｐｈａｇｅｓ　Ｍ２）、ｉＰＳ細胞由来ミエロイド細胞（ｉＰＳＣ－ｄｅｒｉｖｅｄ　Ｍｙｅｌｏｉｄ　ｃｅｌｌｓ）、ｉＰＳ細胞由来マクロファージ（ｉＰＳＣ－ｄｅｒｉｖｅｄ　ｍａｃｒｏｐｈａｇｅｓ）のフローサイトメーターによるＨＬＡ－ＡＢＣ、ＨＬＡ－ＤＲ、ＣＤ４０、ＣＤ８０およびＣＤ８３表面抗原解析の結果を示すヒストグラム。縦軸は各細胞の存在割合（％）、横軸は各測定マーカーの蛍光強度を表す。

[図18-2]ヒト採血由来ＣＤ１４陽性細胞由来単球（ＣＤ１４－ｄｅｒｉｖｅｄ　Ｍｏｎｏｃｙｔｅ）、ｐＭＡＣ、ｐＭＡＣ－ＳＩＲＰα－ＫＯ、ＣＡＲ－ｐＭＡＣ－ＳＩＲＰα－ＫＯ、採血由来ＣＤ１４陽性細胞由来マクロファージ（ＣＤ１４－ｄｅｒｉｖｅｄ　ｍａｃｒｏｐｈａｇｅｓ　Ｍ０）、採血由来ＣＤ１４陽性細胞由来Ｍ１型マクロファージ（ＣＤ１４－ｄｅｒｉｖｅｄ　ｍａｃｒｏｐｈａｇｅｓ　Ｍ１）、採血由来ＣＤ１４陽性細胞由来Ｍ２型マクロファージ（ＣＤ１４－ｄｅｒｉｖｅｄ　ｍａｃｒｏｐｈａｇｅｓ　Ｍ２）、ｉＰＳ細胞由来ミエロイド細胞（ｉＰＳＣ－ｄｅｒｉｖｅｄ　Ｍｙｅｌｏｉｄ　ｃｅｌｌｓ）、ｉＰＳ細胞由来マクロファージ（ｉＰＳＣ－ｄｅｒｉｖｅｄ　ｍａｃｒｏｐｈａｇｅｓ）のフローサイトメーターによるＣＤ８６、ＣＤ６８、ＣＤ１６３、ＣＤ２０６およびＳＩＲＰα表面抗原解析の結果を示すヒストグラム。縦軸は各細胞の存在割合（％）、横軸は各測定マーカーの蛍光強度を表す。

[図18-3]ヒト採血由来ＣＤ１４陽性細胞由来単球（ＣＤ１４－ｄｅｒｉｖｅｄ　Ｍｏｎｏｃｙｔｅ）、ｐＭＡＣ、ｐＭＡＣ－ＳＩＲＰα－ＫＯ、ＣＡＲ－ｐＭＡＣ－ＳＩＲＰα－ＫＯ、採血由来ＣＤ１４陽性細胞由来マクロファージ（ＣＤ１４－ｄｅｒｉｖｅｄ　ｍａｃｒｏｐｈａｇｅｓ　Ｍ０）、採血

由来ＣＤ１４陽性細胞由来Ｍ１型マクロファージ（ＣＤ１４－ｄｅｒｉｖｅｄ　ｍａｃｒｏｐｈａｇｅｓ　Ｍ１）、採血由来ＣＤ１４陽性細胞由来Ｍ２型マクロファージ（ＣＤ１４－ｄｅｒｉｖｅｄ　ｍａｃｒｏｐｈａｇｅｓ　Ｍ２）、ｉＰＳ細胞由来ミエロイド細胞（ｉＰＳＣ－ｄｅｒｉｖｅｄ　Ｍｙｅｌｏｉｄ　ｃｅｌｌｓ）、ｉＰＳ細胞由来マクロファージ（ｉＰＳＣ－ｄｅｒｉｖｅｄ　ｍａｃｒｏｐｈａｇｅｓ）のフローサイトメーターによるＣＣＲ１、ＣＣＲ２、ＣＣＲ３、ＣＣＲ４、ＣＣＲ５、ＣＣＲ７、ＣＸＣＲ２、ＣＸＣＲ４およびＣＤ１４表面抗原解析の結果を示すヒストグラム。縦軸は各細胞の存在割合（％）、横軸は各測定マーカーの蛍光強度を表す。

[図19-1]ヒト採血由来ＣＤ１４陽性細胞由来単球（ＣＤ１４－ｄｅｒｉｖｅｄ　Ｍｏｎｏｃｙｔｅ）、ｉＰＳ細胞由来ミエロイド細胞（ｉＰＳＣ－ｄｅｒｉｖｅｄ　Ｍｙｅｌｏｉｄ　ｃｅｌｌｓ）、ｐＭＡＣ、採血由来ＣＤ１４陽性細胞由来マクロファージ（ＣＤ１４－ｄｅｒｉｖｅｄ　ｍａｃｒｏｐｈａｇｅｓ　Ｍ０）、採血由来ＣＤ１４陽性細胞由来Ｍ１型マクロファージ（ＣＤ１４－ｄｅｒｉｖｅｄ　ｍａｃｒｏｐｈａｇｅｓ　Ｍ１）、および採血由来ＣＤ１４陽性細胞由来Ｍ２型マクロファージ（ＣＤ１４－ｄｅｒｉｖｅｄ　ｍａｃｒｏｐｈａｇｅｓ　Ｍ２）の位相差顕微鏡観察像。スケールバーは４０μｍを示す。

[図19-2]ヒトｉＰＳ細胞由来マクロファージ（ｉＰＳＣ－ｍａｃｒｏｐｈａｇｅｓ）、ｐＭＡＣ、ｐＭＡＣ－ＳＩＲＰα－ＫＯ、ＣＡＲ－ｐＭＡＣ、およびＣＡＲ－ｐＭＡＣ－ＳＩＲＰα－ＫＯの刺激なし（Ｍ０）、インターフェロンγおよびＬＰＳ刺激（Ｍ１）、ＩＬ－４刺激（Ｍ２）条件における位相差顕微鏡観察像。

[図20]ヒトｐＭＡＣ、ｐＭＡＣ－ＳＩＲＰα－ＫＯ、ｉＰＳ細胞由来マクロファージ（ｉＰＳＣ－ｍａｃｒｏｐｈａｇｅｓ）の増殖速度に及ぼすＧＭ－ＣＳＦおよび／またはＭ－ＣＳＦを含む培地（２０％ＦＢＳ含有αＭＥＭ）の効果を調べたＭＴＴアッセイの測定結果を示す折れ線グラフ。ヒトｐＭＡＣ（左）、ｐＭＡＣ－ＳＩＲＰα－ＫＯ（中央）、ｉＰＳＣ－ｍａｃｒｏｐ

ｈａｇｅｓ（右）の結果を表す。縦軸はＭＴＴ試薬から代謝されたホルマザンの濃度（５９５ｎｍの吸光度として評価）、横軸は培養日数を表す。

[図21]ヒトｐＭＡＣ、ｐＭＡＣ－ＳＩＲＰα－ＫＯ、ＣＡＲ－ｐＭＡＣおよびＣＡＲ－ｐＭＡＣ－ＳＩＲＰα－ＫＯのフローサイトメーターによるｈＧＰＣ３－ＦＩＴＣ、ＳＩＲＰαおよびｔｄＴｏｍａｔｏ発現解析の結果を示すサイトグラム。縦軸はｈＧＰＣ３－ＦＩＴＣの蛍光強度、横軸はｔｄＴｏｍａｔｏの蛍光強度（上段）。縦軸はＳＩＲＰαの蛍光強度、横軸はｔｄＴｏｍａｔｏの蛍光強度（下段）。ＧＰＣ３－ＣＡＲを発現するｐＭＡＣは単一の細胞集団として得られることから、純度が高く目的外の細胞をほとんど含まないことが分かる。

[図22]ヒトｐＭＡＣ、ｐＭＡＣ－ＳＩＲＰα－ＫＯ、ＣＡＲ－ｐＭＡＣ、ＣＡＲ－ｐＭＡＣ－ＳＩＲＰα－ＫＯ、採血由来ＣＤ１４陽性細胞由来マクロファージ（ＣＤ１４－Ｍａｃｒｏｐｈａｇｅ）、およびｉＰＳ細胞由来マクロファージ（ｉＰＳＣ－Ｍａｃｒｏｐｈａｇｅ）に対して、刺激成分無しの培地（Ｍｅｄｉｕｍ）、インターフェロンγおよびＬＰＳによるＭ１刺激、ＩＬ－４によるＭ２刺激を加えた際のサイトカインＩＬ－６、ＴＮＦα、ＩＬ－１２、またはＩＬ－１０の産生をＥＬＩＳＡにより測定した結果。縦軸は測定したサイトカインの濃度（ｐｇ／ｍＬ）を示す。

[図23]ヒトＣＡＲ－ｐＭＡＣ－ＳＩＲＰα－ＫＯをボイデンチャンバー方式のｘＣＥＬＬｉｇｅｎｃｅ　ＤＰシステムによって細胞遊走能をリアルタイム計測した結果。ヒトがん細胞株ＨｅｐＧ２、ＳＫ－Ｈｅｐ１、ＪＨＨ７、ＫＯＣ７ｃ、ヒト胎児由来腎細胞株ＨＥＫ２９３由来の培養上清、および新鮮培地（Ｍｅｄｉｕｍ）に対する細胞遊走能（上段左）、未処理、サイトカラシンＤ（＋ＣｙｔＤ）処理、または百日咳菌由来毒素（＋ＰＴＸ）処理したヒトＣＡＲ－ｐＭＡＣ－ＳＩＲＰα－ＫＯのヒトがん細胞株ＨｅｐＧ２培養上清、ヒト胎児腎細胞株ＨＥＫ２９３培養上清、または新鮮培地（Ｍｅｄｉｕｍ）に対する細胞遊走能（上段中央）。ヒトｉＰＳＣ－ｍａｃｒｏｐｈａｇｅｓのがん細胞株ＨｅｐＧ２、ＳＫ－Ｈｅｐ１、ＪＨＨ７、ＫＯＣ７ｃ

、ヒト胎児由来腎細胞株ＨＥＫ２９３由来の培養上清、および新鮮培地（Ｍｅｄｉｕｍ）に対する細胞遊走能（上段右）。ヒトＣＡＲ－ｐＭＡＣ－ＳＩＲＰα－ＫＯのリコンビナントＣＣＬ２、ＣＣＬ３、ＣＣＬ３ＬＩ、ＣＣＬ４、および新鮮培地（Ｍｅｄｉｕｍ）に対する細胞遊走能（上から２段目左）。リコンビナントＣＣＬ５、ＣＣＬ７、ＣＣＬ８、ＣＣＬ１４、および新鮮培地（Ｍｅｄｉｕｍ）に対する細胞遊走能（上から２段目中央）、リコンビナントＣＣＬ１５、ＣＣＬ１７、ＣＣＬ２３、ＣＸ３ＣＬ１、および新鮮培地（Ｍｅｄｉｕｍ）に対する細胞遊走能（上から２段目右）。リコンビナントＣＸＣＬ１、ＣＸＣＬ２、ＣＸＣＬ５、および新鮮培地（Ｍｅｄｉｕｍ）に対する細胞遊走能（上から３段目左）。リコンビナントＣＣＬ１３、ＳＤＦ－１α（ＣＸＣＬ１２）、ＳＤＦ－１β（ＣＸＣＬ１２）および新鮮培地（Ｍｅｄｉｕｍ）に対する細胞遊走能（上から３段目右）。がん細胞株ＨｅｐＧ２由来の培養上清に対するＣＡＲ－ｐＭＡＣおよびＣＡＲ－ｐＭＡＣ－ＳＩＲＰα－ＫＯの細胞遊走能（最下段）。横軸は培養時間、縦軸は測定開始時点（０ｈｒ）に相対的な細胞遊走能の程度を示すＣｅｌｌ　Ｉｎｄｅｘ（ＣＩ）を示す。

[図24-1]ヒトｐＭＡＣ、ｐＭＡＣ－ＳＩＲＰα－ＫＯ、ＣＡＲ－ｐＭＡＣまたはＣＡＲ－ｐＭＡＣ－ＳＩＲＰα－ＫＯを４８時間培養した際の培養上清中のサイトカインＩＬ－６（左）、ＴＮＦα（左から２番目）、ＩＬ－１０（左から３番目）、ＩＬ－１２（右）産生のＥＬＩＳＡ測定結果。

[図24-2]ヒトｐＭＡＣ、ｐＭＡＣ－ＳＩＲＰα－ＫＯ、ＣＡＲ－ｐＭＡＣまたはＣＡＲ－ｐＭＡＣ－ＳＩＲＰα－ＫＯをヒトがん細胞株（ＧＰＣ３発現無し、またはＧＰＣ３発現有り）と４８時間共培養した際の培養上清中のサイトカインＩＬ－６産生のＥＬＩＳＡ測定結果。前述のｐＭＡＣ４種類と、肝がん細胞株ＳＫ－Ｈｅｐ１（ＧＰＣ３発現無し）またはＳＫ－Ｈｅｐ１－ＧＰＣ３（ＧＰＣ３発現有り）（最上段）、肝がん細胞株ＪＨＨ７－ＧＰＣ３－ＫＯ（ＧＰＣ３発現無し）またはＪＨＨ７（ＧＰＣ３発現有り）（上から２段目）とを共培養した結果。ヒトｐＭＡＣ、ｐＭＡＣ－ＳＩＲＰα－Ｋ

Ｏ、ＣＡＲ－ｐＭＡＣまたはＣＡＲ－ｐＭＡＣ－ＳＩＲＰα－ＫＯをヒトがん細胞株（ＧＰＣ３発現無し、またはＧＰＣ３発現有り）と４８時間共培養した際の培養上清中のサイトカインＩＬ－１０産生のＥＬＩＳＡ測定結果。前述のｐＭＡＣ４種類と、肝がん細胞株ＳＫ－Ｈｅｐ１（ＧＰＣ３発現無し）またはＳＫ－Ｈｅｐ１－ＧＰＣ３（ＧＰＣ３発現有り）（上から３段目）、肝がん細胞株ＪＨＨ７－ＧＰＣ３－ＫＯ（ＧＰＣ３発現無し）またはＪＨＨ７（ＧＰＣ３発現有り）（最下段）とを共培養した結果。

[図24-3]ヒトｐＭＡＣ、ｐＭＡＣ－ＳＩＲＰα－ＫＯ、ＣＡＲ－ｐＭＡＣまたはＣＡＲ－ｐＭＡＣ－ＳＩＲＰα－ＫＯをヒトがん細胞株（ＧＰＣ３発現無し、またはＧＰＣ３発現有り）と４８時間共培養した際の培養上清中のサイトカインＴＮＦα産生のＥＬＩＳＡ測定結果。前述のｐＭＡＣ４種類と、がん細胞株ＳＫ－Ｈｅｐ１（ＧＰＣ３発現無し）またはＳＫ－Ｈｅｐ１－ＧＰＣ３（ＧＰＣ３発現有り）（最上段）、がん細胞株ＪＨＨ７－ＧＰＣ３－ＫＯ（ＧＰＣ３発現無し）またはＪＨＨ７（ＧＰＣ３発現有り）（上から２段目）とを共培養した結果。ヒトｐＭＡＣ、ｐＭＡＣ－ＳＩＲＰα－ＫＯ、ＣＡＲ－ｐＭＡＣまたはＣＡＲ－ｐＭＡＣ－ＳＩＲＰα－ＫＯをヒトがん細胞株（ＧＰＣ３発現無し、またはＧＰＣ３発現有り）と４８時間共培養した際の培養上清中のサイトカインＩＬ－１２産生のＥＬＩＳＡ測定結果。前述のｐＭＡＣ４種類と、がん細胞株ＳＫ－Ｈｅｐ１（ＧＰＣ３発現無し）またはＳＫ－Ｈｅｐ１－ＧＰＣ３（ＧＰＣ３発現有り）（上から３段目）、がん細胞株ＪＨＨ７－ＧＰＣ３－ＫＯ（ＧＰＣ３発現無し）またはＪＨＨ７（ＧＰＣ３発現有り）（最下段）とを共培養した結果。

[図25]ヒトｐＭＡＣ（Ａ）、ＣＡＲ－ｐＭＡＣ（Ｂ）、ｐＭＡＣ－ＳＩＲＰα－ＫＯ（Ｃ）およびＣＡＲ－ｐＭＡＣ－ＳＩＲＰα－ＫＯ（Ｄ）とルシフェラーゼ（Ｌｕｃ）遺伝子導入したヒト肝がん細胞株ＪＨＨ７－Ｌｕｃ（ヒトＧＰＣ３発現有り；左）、ヒト肝がん細胞株ＳＫ－Ｈｅｐ１－ＧＰＣ３－Ｌｕｃ－Ｖｅｎｕｓ（ヒトＧＰＣ３有り；左から２番目）、ヒトがん細胞株ＫＯＣ７ｃ－ＧＰＣ３－Ｌｕｃ（ヒトＧＰＣ３発現有り；左から３番目）を

４８時間共培養した後に、がん細胞のルシフェラーゼ活性を定量した結果を示す棒グラフ。ＣＡＲ－ｐＭＡＣ－ＳＩＲＰα－ＫＯ（Ｄ）とヒト肝がん細胞株ＳＫ－Ｈｅｐ１－ＧＰＣ３－Ｌｕｃ－Ｖｅｎｕｓ（ヒトＧＰＣ３無しまたは有り；右）を４８時間共培養した後に、がん細胞のルシフェラーゼ活性を定量した結果を示す棒グラフ。縦軸はがん細胞の減少割合（％）を示す。白棒はｈＧＰＣ３を発現しないがん細胞、黒棒はｈＧＰＣ３を発現するがん細胞を表す。ＣＡＲ導入ｐＭＡＣ（Ｄ）は標的がん抗原ヒトＧＰＣ（ｈＧＰＣ）を発現するがん細胞を排除することが分かる。

[図26-1]ヒトＣＡＲ－ｐＭＡＣ－ＳＩＲＰα－ＫＯをエフェクター細胞として、ターゲット細胞のヒトがん細胞２種類とそれぞれ共培養した際の、ヒトＣＡＲ－ｐＭＡＣ－ＳＩＲＰα－ＫＯによるがん細胞の細胞傷害活性。ヒト肝がん細胞株ＳＫ－Ｈｅｐ１（ヒトＧＰＣ３発現無しまたは有り）を２４時間培養した後に、ＣＡＲ－ｐＭＡＣ－ＳＩＲＰα－ＫＯを、播種したがん細胞の１０倍、５倍、１倍量を加えて共培養を行い、６時間後の細胞傷害活性（％Ｃｙｔｏｌｙｓｉｓ）をプロットした図。縦軸はがん細胞の細胞傷害活性（％Ｃｙｔｏｌｙｓｉｓ）を示し、横軸はエフェクター細胞（ＣＡＲ－ｐＭＡＣ－ＳＩＲＰα－ＫＯ）とターゲット細胞（がん細胞）の混合比率（Ｅ：Ｔ　ｒａｔｉｏ）を示す。

[図26-2]ヒトＣＡＲ－ｐＭＡＣ－ＳＩＲＰα－ＫＯをエフェクター細胞として、ターゲット細胞のヒトがん細胞（ヒトＧＰＣ３発現無しまたは有り）とＥ：Ｔ比１０：１、５：１、および１：１で共培養した際の、ヒトＣＡＲ－ｐＭＡＣ－ＳＩＲＰα－ＫＯによる肝がん細胞ＳＫ－Ｈｅｐ１の細胞生存シグナルＮｏｒｍａｌｉｚｅｄ　Ｃｅｌｌ　Ｉｎｄｅｘ（上段）、ヒト肝がん細胞ＳＫ－Ｈｅｐ１の細胞傷害活性％Ｃｙｔｏｌｙｓｉｓ（下段）のｘＣＥＬＬｉｇｅｎｃｅ　ＲＴＣＡ　ＤＰシステムでの計測結果。

[図27]ヒトｐＭＡＣ、ｐＭＡＣ－ＳＩＲＰα－ＫＯ、ＣＡＲ－ｐＭＡＣおよび、ＣＡＲ－ｐＭＡＣ－ＳＩＲＰα－ＫＯをエフェクター細胞として、ターゲット細胞のヒト肝がん細胞ＳＫ－Ｈｅｐ１（ＧＰＣ３発現有り）とＥ：Ｔ

比１０：１で共培養した場合のＳＫ－Ｈｅｐ１の細胞傷害活性％Ｃｙｔｏｌｙｓｉｓを縦軸にプロットした棒グラフ（最上段左）。ヒトＣＡＲ－ｐＭＡＣ－ＳＩＲＰα－ＫＯをエフェクター細胞として、ターゲット細胞のヒト肝がん細胞ＳＫ－Ｈｅｐ１（ＧＰＣ３発現無しまたは有り）とＥ：Ｔ比１０：１で共培養した際の、肝がん細胞ＳＫ－Ｈｅｐ１の細胞傷害活性％Ｃｙｔｏｌｙｓｉｓを縦軸にプロットした棒グラフ（最上段右）。ヒトｐＭＡＣ、ｐＭＡＣ－ＳＩＲＰα－ＫＯ、ＣＡＲ－ｐＭＡＣおよび、ＣＡＲ－ｐＭＡＣ－ＳＩＲＰα－ＫＯをエフェクター細胞として、ターゲット細胞のヒトＳＫ－Ｈｅｐ１（ＧＰＣ３発現無し）とＥ：Ｔ比１０：１で共培養した場合のＳＫ－Ｈｅｐ１（ＧＰＣ３発現無し）の細胞生存を示すＮｏｒｍａｌｉｚｅｄ Ｃｅｌｌ Ｉｎｄｅｘの経時変化を縦軸に、共培養の時間を横軸にプロットした折れ線グラフ（中段左）、ヒト肝がん細胞ＳＫ－Ｈｅｐ１（ＧＰＣ３発現無し）の細胞傷害活性％Ｃｙｔｏｌｙｓｉｓを縦軸にプロットした折れ線グラフ（最下段左）。ヒトｐＭＡＣ、ｐＭＡＣ－ＳＩＲＰα－ＫＯ、ＣＡＲ－ｐＭＡＣおよび、ＣＡＲ－ｐＭＡＣ－ＳＩＲＰα－ＫＯをエフェクター細胞として、ターゲット細胞のヒトがん細胞ＳＫ－Ｈｅｐ１（ＧＰＣ３発現有り）とＥ：Ｔ比１０：１で共培養した場合のＳＫ－Ｈｅｐ１（ＧＰＣ３発現有り）の細胞生存を示すＮｏｒｍａｌｉｚｅｄ Ｃｅｌｌ Ｉｎｄｅｘの経時変化を縦軸に、共培養の時間を横軸にプロットした折れ線グラフ（中段右）。ヒト肝がん細胞ＳＫ－Ｈｅｐ１（ＧＰＣ３発現有り）の細胞傷害活性％Ｃｙｔｏｌｙｓｉｓを縦軸にプロットした折れ線グラフ（最下段右）。ＣＡＲ－ｐＭＡＣ－ＳＩＲＰα－ＫＯおよびＣＡＲ－ｐＭＡＣは、ｐＭＡＣ、ｐＭＡＣ－ＳＩＲＰα－ＫＯと比較して、がん細胞との共培養６時間で高い細胞傷害活性を示すことが分かる。

発明を実施するための形態

[0016] 以下、本発明を説明する。本明細書において使用される用語は、特に言及しない限り、当該分野で通常用いられる意味を有する。

[0017] ＜増殖性マクロファージ様細胞＞

本発明は、貪食能に加えサイトカイン依存的に増殖することを特徴とするマクロファージ細胞を提供する。本発明のマクロファージ細胞は、既存のマクロファージとは異なる特徴を有することから、増殖性マクロファージ様細胞（ｐＭＡＣ；ｐｒｏｌｉｆｅｒａｔｉｎｇ　Ｍａｃｒｏｐｈａｇｅ－ｌｉｋｅ　ｃｅｌｌ）と称することとする（以下、本発明のｐＭＡＣとも称する）。或いは、本発明のｐＭＡＣは、サイトカイン依存的増殖性マクロファージとも言い換えられる。一態様において、本発明のｐＭＡＣは、マクロファージ様機能を阻害する遺伝子が欠損または発現抑制されている。

[0018] 本明細書において、「サイトカイン依存的に増殖する」とは、サイトカイン刺激によって細胞増殖が促進され、３カ月以上に亘り培養が可能であり、且つ、サイトカイン非刺激下での細胞に比較して有意に増殖性が優れていることを意味する。サイトカイン刺激としては、具体的にはサイトカイン含有培地中で細胞を培養する工程が挙げられる。サイトカインは外来性に培地に添加してもよく細胞内で産生され培地中に分泌されるものであってもよい。サイトカインとしては、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（ＧＭ－ＣＳＦ）、マクロファージコロニー刺激因子（Ｍ－ＣＳＦ）、からなる群より選択される１種、好ましくは２種を併用する。ＧＭ－ＣＳＦとＭ－ＣＳＦとの併用が好ましい。

ＧＭ－ＣＳＦは、ＣＳＦ２としても知られ、Ｔ細胞、マクロファージ、内皮細胞、線維芽細胞等の細胞が免疫刺激を受けることで産生し、造血成長因子、免疫調節因子として機能する。ＧＭ－ＣＳＦは、骨髄前駆細胞を誘導して、顆粒球およびマクロファージの増殖を促す。

Ｍ－ＣＳＦは、骨髄幹細胞系のうち、特に単球－マクロファージ系の増殖・分化を誘導するサイトカインの一種である。

各サイトカインは、商業的に入手可能である。あるいは、各サイトカインのタンパク質、ゲノムＤＮＡまたはｃＤＮＡのさまざまな生物種の配列情報が、例えば、米国国立バイオテクノロジー情報センター（Ｎａｔｉｏｎａｌ　Ｃｅｎｔｅｒ　ｆｏｒ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ　Ｉｎｆｏｒｍａｔ

ｉｏｎ、ＮＣＢＩ）のデータベースのＧｅｎｅのような当業者に周知の情報源から入手することができるので、該情報に基づき、所望のサイトカインの遺伝子を細胞内で発現させ、タンパク質を細胞内で産生させ、場合によっては細胞外に分泌させることで得ることができる。

[0019] 本発明のｐＭＡＣは、サイトカイン依存的に増殖するという特徴に加え、ＣＤ８３およびＣＤ１４が陰性であることを特徴とする。

[0020] ＣＤ８３は、細胞表面に発現する樹状細胞系の成熟マーカーとして知られている。抗ＣＤ８３抗体を用いて免疫染色を行いフローサイトメーターで分析することで検出することができる。

[0021] ＣＤ１４は、細胞表面に発現する単球やマクロファージのマーカーとして知られている。抗ＣＤ１４抗体を用いて免疫染色を行いフローサイトメーターで分析することで検出することができる。

[0022] ここで、「ＣＤ８３およびＣＤ１４が陰性である」とは、ＣＤ８３およびＣＤ１４が発現していないか実質的に発現していないことを意味する。具体的には、細胞表面マーカーであるＣＤ８３抗原およびＣＤ１４抗原が細胞表面上に検出されないか、検出限界未満、検出されても極僅かであることを意味し、具体的には、既存のマクロファージにおけるＣＤ８３およびＣＤ１４発現量と比較して、１／５以下、好ましくは１／１０以下、より好ましくは１／２０以下、さらに好ましくは１／３０以下、最も好ましくは検出限界未満であることをいう。ＣＤ８３およびＣＤ１４の発現量は、フローサイトメトリー、定量的ＰＣＲ、マイクロアレイ、ノーザンハイブリダイゼーション、各抗原に対する抗体を用いた免疫組織化学的染色、ウエスタンブロッティング等の公知の方法により確認することができる。

[0023] また、以下の実施例および図面において詳細に実証される通り、本発明のｐＭＡＣは、既知のマクロファージ細胞系譜に含まれる細胞と比較して、その遺伝子発現プロファイルが大きく変化していることを特徴とする。従って、本発明のｐＭＡＣは、遺伝子発現プロファイルに基づく統計量等を用いて定義することもできる。例えばヒトのｐＭＡＣの場合、その一例としては、

実施例および図面（特に図１７）において詳細に実証される通り次のように定義することができる：

ｉＰＳ細胞由来ミエロイド細胞、ｉＰＳ細胞由来マクロファージ、生体由来単球細胞、生体由来マクロファージＭ１、生体由来マクロファージＭ２および生体由来マクロファージＭ０からなるマクロファージ細胞系譜に沿った細胞群を比較対象として用いた全トランスクリプトーム解析を実施することによって得られる遺伝子発現プロファイルに基づく主成分分析を行い、寄与率の大きい上位２成分の指標を解析対象としたとき、以下の条件を満たす、増殖性マクロファージ様細胞：

条件１：既知のマクロファージ細胞系譜のプロットと重複しない、且つ、

条件２：ＰＣ１が１００以上であり、ＰＣ２が－８０～０の範囲にプロットされる。

一態様において、本発明のｐＭＡＣは、ＰＣ１が１００以上であり、好ましくは１１０以上、１２０以上、１３０以上、または１４０以上であり、より好ましくは１５０以上であり得るが、これらに限定されない。また、本発明のｐＭＡＣは、ＰＣ１が２５０以下、好ましくは２２０以下、２１０以下、２００以下または１９０以下であり、より好ましくは１８０以下であり得るが、これらに限定されない。一態様において、本発明のｐＭＡＣは、ＰＣ１が１００～２５０以下であり、好ましくは１１０～２２０、１２０～２１０、１３０～２００、または１４０～１９０であり、より好ましくは１５０～１８０であるが、これらに限定されない。

[0024] 本発明のｐＭＡＣは、多能性幹細胞由来であり、より好ましくは人工多能性幹細胞または胚性幹細胞由来である。多能性幹細胞とは、インビトロにおいて未分化な状態を維持して培養することが可能で、かつ、胎盤を除く生体を構成するすべての細胞（三胚葉（外胚葉、中胚葉、内胚葉）由来の組織）に分化しうる能力（多能性（ｐｌｕｒｉｐｏｔｅｎｃｙ））を有する幹細胞をいう。受精後三胚葉の形成前の胚、始原生殖細胞を含む器官形成期以降の胚や胎仔または胎児から単離される胚性幹細胞（ＥＳ細胞）も「多能性幹細

胞」に含まれる。

[0025] 本発明において、「人工多能性幹細胞」とは、いったん多分化能を喪失した体細胞をＯｃｔ３／４、Ｓｏｘ２、Ｋｌｆ４、Ｍｙｃ等の数種類の遺伝子の発現により直接初期化するなどして多分化能を誘導した細胞をいう（以下、ｉＰＳＣまたはｉＰＳ細胞とも言う）。この「人工多能性幹細胞」も「多能性幹細胞」に含まれる。多能性幹細胞は、公知の方法で作製することが可能である。作製方法としては、例えばヒトの人工多能性幹細胞についてはＣｅｌｌ，２００７，１３１（５）ｐｐ．８６１－８７２やＫｉｔａｙａｍａ，Ｓ．ら（Ｓｔｅｍ Ｃｅｌｌ Ｒｅｐｏｒｔｓ．６：２１３－２２７，（２０１６））が、マウスの人工多能性幹細胞についてはＣｅｌｌ，２００６，１２６（４） ｐｐ．６６３－６７６に、それぞれ記載される方法が挙げられる。「多能性幹細胞」は、クローン胚、トランスジェニック動物、ゲノム編集による突然変異体動物をはじめとする胚操作技術を施した動物から得ることもできる。多能性幹細胞は、ミエロイド細胞（ＭＣ細胞）を含む、さまざまな細胞タイプの細胞に分化できることが知られている。

[0026] ヒトまたはマウスのｉＰＳＣは、再生医療用培地ＳｔｅｍＦｉｔ（味の素）を用いて維持・拡大培養することができる。このときにＬａｍｉｎｉｎ５１１を加えてもよい。また、細胞の継代培養のために細胞を解離することによるｉＰＳＣの損傷を軽減除去するためにＲｈｏキナーゼ（ＲＯＣＫ）阻害剤、例えば、Ｙ－２７６３２を、１０μＭ程度培地に添加してもよい。

[0027] 多能性幹細胞は、所定の機関より入手でき、また、市販品を購入することもできる。例えば、ヒト胚性幹細胞であるＫｈＥＳ－１、ＫｈＥＳ－２およびＫｈＥＳ－３は、京都大学再生医科学研究所より入手可能である。マウス胚性幹細胞である、ＥＢ５細胞は国立研究開発法人理化学研究所より、Ｄ３株はＡＴＣＣより、入手可能である。

[0028] 多能性幹細胞は、公知の方法により維持培養できる。例えば、ヒト多能性幹細胞は、Ｋｎｏｃｋｏｕｔ™ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ社）を添加した培地で培養することにより維持できる。

マウス多能性幹細胞は、ウシ胎児血清（ＦＢＳ）およびＬｅｕｋｅｍｉａ Ｉｎｈｉｂｉｔｏｒｙ Ｆａｃｔｏｒ（ＬＩＦ）を添加し、無フィーダー下に培養することにより維持できる。

[0029] ＜増殖性マクロファージ様細胞の製造方法＞

本発明において、ｐＭＡＣは、マクロファージ様機能を阻害する遺伝子を欠損または発現抑制させる工程、および増殖性を付加する遺伝子を発現させる工程を含む、方法によって製造することができる。以下、各工程について説明する。

[0030] １．マクロファージ様機能を阻害する遺伝子を欠損または発現抑制させる工程

「マクロファージ様機能を阻害する遺伝子」とは、マクロファージによって提供され得る機能を阻害する遺伝子を意味する。「マクロファージによって提供され得る機能」としては、異物の取り込みや消化に寄与する食作用（貪食作用）と、Ｔ細胞等の他の免疫細胞の活性化を促す抗原提示作用、活性化による２次的免疫応答の惹起等が挙げられる。マクロファージの活性化は、古典的（Ｍ１）活性化と選択的（Ｍ２）活性化に大別される。Ｍ１活性化されたマクロファージ（Ｍ１マクロファージ）は、単球を腫瘍壊死因子（ＴＮＦ）－αやインターフェロン（ＩＦＮ）－γなどの炎症性サイトカインで分化誘導することで得られ、病原性感染症防御に働き、微生物の感染性を低下させる前炎症性サイトカインを産生する。Ｍ２活性化されたマクロファージ（Ｍ２マクロファージ）は、ＩＬ－４やＩＬ－１３などＴｈ２型サイトカインで分化誘導することで得られ、宿主の免疫応答を抑制、創傷治癒および組織リモデリングの促進、組織内の代謝と内分泌シグナル伝達を改善する増殖因子および抗炎症性サイトカインの産生を担う。「マクロファージ様機能を阻害する遺伝子」は、その発現によって、このようなマクロファージによって提供され得る機能を阻害し得る遺伝子である。当該遺伝子としては、シグナル制御タンパク質α（ＳＩＲＰα）遺伝子が挙げられるが、これに限定されない。

[0031] ＳＩＲＰα遺伝子は、細胞の内外を分ける細胞膜上に存在する膜タンパク質の一つで、マクロファージに豊富に存在している。ＳＩＲＰαはマクロファージの貪食標的となる細胞上の別の膜タンパク質ＣＤ４７と結合することで、その貪食作用が弱められる。すなわち、例えばＳＩＲＰα遺伝子を欠損した、あるいは発現が抑制された細胞は、がん細胞の細胞膜上に存在するＣＤ４７との結合能を失っているので、その貪食作用が弱められることはない。

当該遺伝子を欠損あるいはその発現を抑制する方法は、当分野で通常実施される方法を用いることができる。

一実施態様として、ＳＩＲＰα遺伝子の発現を抑制する核酸が挙げられる。該核酸は、ＳＩＲＰα遺伝子の転写レベル、転写後調節のレベル、タンパク質への翻訳レベル、翻訳後修飾のレベル等のいかなる段階で作用するものであってもよい。従って、ＳＩＲＰα遺伝子の発現を抑制する核酸としては、例えば、ＳＩＲＰα遺伝子の転写を阻害する核酸（例、アンチジーン）、初期転写産物からｍＲＮＡへのプロセッシングを阻害する核酸、ｍＲＮＡからタンパク質への翻訳を阻害するか（例、アンチセンス核酸、ｍｉＲＮＡ）あるいはｍＲＮＡを分解する（例、ｓｉＲＮＡ、リボザイム、ｍｉＲＮＡ）核酸などが含まれる。いずれの段階で作用するものであっても用いることができるが、ｍＲＮＡに相補的に結合してタンパク質への翻訳を阻害するかあるいはｍＲＮＡを分解する物質が好ましい。

ＳＩＲＰα遺伝子のヌクレオチド配列は公知であり、例えば、公共のデータベース（例、ＮＣＢＩ、ＥＭＢＬ、ＤＤＢＪ等）から配列情報を入手することができる。

[0032] 別の好ましい実施態様として、ゲノム編集を用いてＳＩＲＰα遺伝子の発現を抑制する核酸が挙げられる。具体的には、ＳＩＲＰα遺伝子の発現を抑制する核酸は、ＳＩＲＰα遺伝子を不活性化（ノックアウト）し得る核酸であり得る。そのような核酸として、該遺伝子中の部分ヌクレオチド配列を標的として特異的に認識し得る核酸配列認識モジュール（例、ＣＲＩＳＰＲ／

Ｃａｓ９、ＺＦモチーフ、ＴＡＬエフェクター等）と、標的配列の内部もしくはその近傍で、該遺伝子に二重鎖切断（ＤＳＢ）を導入するヌクレアーゼとからなる人工ヌクレアーゼをコードする核酸が挙げられる。ＤＳＢ導入後、非相同末端結合（ＮＨＥＪ）修復エラーによる挿入または欠失変異により該遺伝子をノックアウトすることができる。あるいは、該遺伝子配列内にマーカー遺伝子（例、蛍光タンパク質遺伝子等のレポーター遺伝子、薬剤耐性遺伝子等の選択マーカー遺伝子）を挿入したターゲッティングベクターと組み合わせることによって、相同組換え（ＨＲ）修復による遺伝子ノックアウトを行うこともできる。

かくしてマクロファージ様機能を阻害する遺伝子を欠損または発現を抑制することにより、マクロファージ様細胞を調製することができる。

[0033] ２．増殖性を付加する遺伝子を発現させる工程

「増殖性を付加する遺伝子」とは、細胞に導入され、細胞内で発現することにより細胞増殖を促進し得る機能を有する遺伝子であり、各種因子の遺伝子が挙げられる。本明細書中、増殖遺伝子とも称する。具体的には、いずれかの生物種のｃ－ＭＹＣ、ＢＭＩ１、ＭＤＭ２等の遺伝子、またはそのホモログまたはオーソログが挙げられるが、これらに限定されない。生物種は導入対象となる細胞が由来する動物種に適合するものが選択される。好ましくはｃ－ＭＹＣ、ＢＭＩ１、およびＭＤＭ２からなる群より選択される少なくとも１種、好ましくは２種、より好ましくは３種全ての遺伝子を導入し発現させる。

[0034] 「ｃ－ＭＹＣ」、「ＢＭＩ１」、「ＭＤＭ２」のタンパク質、ゲノムＤＮＡまたはｃＤＮＡのさまざまな生物種の配列情報は、例えば、米国国立バイオテクノロジー情報センター（Ｎａｔｉｏｎａｌ　Ｃｅｎｔｅｒ　ｆｏｒ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ　Ｉｎｆｏｒｍａｔｉｏｎ、ＮＣＢＩ）のデータベースのＧｅｎｅのような当業者に周知の情報源から入手することができる。

本発明において、発現させるとは、所望の遺伝子またはタンパク質を細胞

内で産生させ、場合によっては細胞外に分泌させて、その遺伝子またはタンパク質の機能を発揮させることをいう。

[0035] 本発明において、「遺伝子導入された」とは、所望の遺伝子を特定の細胞に導入し、その遺伝子または当該遺伝子にコードされるタンパク質を細胞内で産生させ、場合によっては細胞外に分泌させて、そのタンパク質の機能を発揮させることをいう。

[0036] 本発明のｐＭＡＣの製造方法の一実施態様として以下の方法が挙げられる

（態様１）：（１）多能性幹細胞において、マクロファージ様機能を阻害する遺伝子を欠損または発現抑制させた後、ミエロイド細胞への分化を誘導してマクロファージ様細胞（ＭＡＣ）を得る工程（工程１）、および

（２）工程１で得られたＭＡＣに増殖性を付加する遺伝子を発現させ増殖性マクロファージ様細胞（ｐＭＡＣ）を得る工程（工程２）

を含む方法。

態様１の工程１では、多能性幹細胞に対し、上記「１．マクロファージ様機能を阻害する遺伝子を欠損または発現抑制させる工程」を実施する。ここで、多能性幹細胞は好ましくは人工多能性幹細胞または胚性幹細胞であり、より好ましくは人工多能性幹細胞である。次いで、マクロファージ様機能を阻害する遺伝子の欠損または発現抑制された多能性幹細胞、例えばＳＩＲＰα遺伝子を欠損または発現抑制された多能性幹細胞（特にｉＰＳ細胞）に対し、ミエロイド細胞への分化を誘導する（以下、「ミエロイド分化」とも称する）ことで、マクロファージ様細胞（ＭＡＣ）を得ることができる。

[0037] ミエロイド細胞とは、幹細胞から分化した白血球のうち、単球、マクロファージ、樹状細胞、およびこれらの細胞に分化する細胞系譜に属する前駆細胞の総称である。マクロファージ様機能を阻害する遺伝子の欠損または発現抑制された多能性幹細胞をミエロイド分化させることで、分化誘導されたミエロイド細胞はマクロファージ様細胞となる。マクロファージ様機能を阻害する遺伝子の欠損または発現抑制された多能性幹細胞をミエロイド分化させてマクロファージ様細胞（ＭＡＣ）を得る方法としては具体的には以下の方

法が挙げられる。

（ｉ）多能性幹細胞から誘導された胚様体（ＥＢ）を、ＶＥＧＦを含む培地中でフィーダー細胞の上で重層培養を行った後、ＶＥＧＦ、ＳＣＦおよびＴＰＯを含む培地中でさらに培養すること、または、

（ｉｉ）前記多能性幹細胞から誘導された胚様体（ＥＢ）を、ＢＭＰ－４、ＶＥＧＦおよびＳＣＦを含む培地中でフィーダー細胞なしの単層培養を行った後、さらにＶＥＧＦ、ＴＰＯおよびＧＭ－ＣＳＦを含む培地中で培養すること。

上記（ｉ）および（ｉｉ）において、多能性幹細胞は、マクロファージ様機能を阻害する遺伝子の欠損または発現抑制された多能性幹細胞である。

[0038] 態様１の工程２では、工程１で得られたＭＡＣに対し、上記「２．増殖性を付加する遺伝子を発現させる工程」を実施する。

[0039] 本発明のｐＭＡＣの製造方法の別の一実施態様として以下の方法が挙げられる（態様２）：

（Ａ）多能性幹細胞から分化させたミエロイド細胞に増殖性を付加する遺伝子を発現させ増殖性ミエロイド細胞を得る工程（工程Ａ）、および

（Ｂ）工程Ａで得られた増殖性ミエロイド細胞において、マクロファージ様機能を阻害する遺伝子を欠損または発現抑制させた後、分化誘導して増殖性マクロファージ様細胞（ｐＭＡＣ）を得る工程（工程Ｂ）。

態様２の工程Ａでは、多能性幹細胞から分化させたミエロイド細胞（多能性幹細胞由来のミエロイド細胞）に対し、上記「２．増殖性を付加する遺伝子を発現させる工程」を実施する。ここで、多能性幹細胞は好ましくは人工多能性幹細胞または胚性幹細胞であり、より好ましくは人工多能性幹細胞である。かかる工程により増殖性が付与されたミエロイド細胞を得ることができる。

多能性幹細胞からミエロイド細胞への分化誘導は、具体的には以下の方法が挙げられる。

（ｉ）多能性幹細胞から誘導された胚様体（ＥＢ）を、ＶＥＧＦを含む培地

中でフィーダー細胞の上で重層培養を行った後、ＶＥＧＦ、ＳＣＦおよびＴＰＯを含む培地中でさらに培養すること、または、

（ｉｉ）前記多能性幹細胞から誘導された胚様体（ＥＢ）を、ＢＭＰ－４、ＶＥＧＦおよびＳＣＦを含む培地中でフィーダー細胞なしの単層培養を行った後、さらにＶＥＧＦ、ＴＰＯおよびＧＭ－ＣＳＦを含む培地中で培養すること。

[0040] 態様２の工程Ｂでは、工程Ａで得られた増殖性ミエロイド細胞に対し、上記「１．マクロファージ様機能を阻害する遺伝子を欠損または発現抑制させる工程」を実施する。増殖性ミエロイド細胞に対しマクロファージ様機能を阻害する遺伝子、例えばＳＩＲＰα遺伝子を欠損させるか、または発現抑制することでマクロファージ様細胞へと誘導されｐＭＡＣを得ることができる。

[0041] 本発明における「胚様体」とは、未分化な多能性幹細胞が接着して形成された細胞塊をいう。該細胞塊の中での密接な細胞間相互作用により、前記細胞塊を構成する多能性幹細胞は細胞分化のレパートリーが限定されていく点で、あたかも着床後から胚葉が形成される発生段階の胚に類似する。

[0042] 本発明における胚様体の大きさは、特に制限されないが、直径が５０～１０００μｍであることが好ましく、５０～５００μｍであることがさらに好ましく、５０～２００μｍであることが特に好ましい。胚様体の大きさが上記範囲より大きすぎると胚様体内部への酸素供給が不十分になり細胞壊死が起こる恐れがある。胚様体の大きさが上記範囲より小さすぎると、胚様体を形成せず単一の細胞はアポトーシスによる細胞死を起こす恐れがある。マウスの胚様体は、マウス間葉系Ｃ３Ｈ１０Ｔ１／２細胞またはマウス骨髄由来間質ＯＰ９細胞をフィーダー細胞として用いて培養する場合がある。ヒトの胚様体はフィーダー細胞を用いずに培養することができる。

[0043] 本発明の「ＶＥＧＦ」、「ＳＣＦ」、「ＴＰＯ」、「ＢＭＰ－４」および／または「ＧＭ－ＣＳＦ」は、ヒトまたはヒト以外の哺乳類の多能性幹細胞からミエロイド細胞（ＭＣ）への分化を誘導する活性を有する、いずれかの

生物種のＶＥＧＦ、ＳＣＦ、ＴＰＯ、ＢＭＰ－４および／またはＧＭ－ＣＳＦタンパク質、およびそのホモログまたはオーソログをいう。

[0044] 本発明の「ＶＥＧＦ」、「ＳＣＦ」、「ＴＰＯ」および、「ＢＭＰ－４」および／または「ＧＭ－ＣＳＦ」は、培養される胚様体の生物種の「ＶＥＧＦ」、「ＳＣＦ」、「ＴＰＯ」、「ＢＭＰ－４」および／または「ＧＭ－ＣＳＦ」と同程度の分化誘導活性を有することを条件として、培養される胚様体の生物種以外の生物種のＶＥＧＦ、ＳＣＦ、ＴＰＯ、ＢＭＰ－４および／またはＧＭ－ＣＳＦタンパク質、または、培養される胚様体の生物種と同じ生物種のＶＥＧＦ、ＳＣＦ、ＴＰＯ、ＢＭＰ－４および／またはＧＭ－ＣＳＦタンパク質の変異体、を用いることができる。

[0045] 本明細書においては、Ｆｌｔ－３Ｌ、ＩＬ－３および／またはｂＦＧＦも、上述のＶＥＧＦ、ＳＣＦ、ＴＰＯ、ＢＭＰ－４および/またはＧＭ－ＣＳＦ等と一緒に、本発明の細胞の培養に用いられることがある。これらは、例えば、米国国立バイオテクノロジー情報センター（Ｎａｔｉｏｎａｌ Ｃｅｎｔｅｒ ｆｏｒ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ Ｉｎｆｏｒｍａｔｉｏｎ、ＮＣＢＩ）のデータベースのＧｅｎｅのような当業者に周知の情報源から入手することができる。また遺伝子組換えタンパク質試薬として、例えばＲ＆Ｄ Ｓｙｓｔｅｍｓ社（ｈｔｔｐｓ://ｗｗｗ.ｒｎｄｓｙｓｔｅｍｓ.ｃｏｍ/）からＲｅｃｏｍｂｉｎａｎｔ Ｈｕｍａｎ Ｆｌｔ－３ Ｌｉｇａｎｄ／ＦＬＴ３Ｌ Ｐｒｏｔｅｉｎ（３０８－ＦＫＮ）、Ｒｅｃｏｍｂｉｎａｎｔ Ｈｕｍａｎ ＩＬ－３ Ｐｒｏｔｅｉｎ（２０３－ＩＬ）、Ｒｅｃｏｍｂｉｎａｎｔ Ｈｕｍａｎ ＦＧＦ ｂａｓｉｃ／ＦＧＦ２／ｂＦＧＦ （１４５ ａａ） Ｐｒｏｔｅｉｎ（３７１８－ＦＢ）、Ｒｅｃｏｍｂｉｎａｎｔ Ｈｕｍａｎ ＶＥＧＦ １６５ Ｐｒｏｔｅｉｎ（２９３－ＶＥ）、Ｒｅｃｏｍｂｉｎａｎｔ Ｈｕｍａｎ ＳＣＦ Ｐｒｏｔｅｉｎ（２５５－ＳＣ）、Ｒｅｃｏｍｂｉｎａｎｔ Ｈｕｍａｎ Ｔｈｒｏｍｂｏｐｏｉｅｔｉｎ Ｐｒｏｔｅｉｎ（２８８－ＴＰ）、Ｒｅｃｏｍｂｉｎａｎｔ Ｈｕｍａｎ ＢＭＰ－４ Ｐｒｏｔｅｉｎ（３１４－ＢＰ）、Ｒｅｃｏｍｂｉｎａｎ

ｔ Ｈｕｍａｎ ＧＭ－ＣＳＦ Ｐｒｏｔｅｉｎ（２１５－ＧＭ）を購入することも出来る。

[0046] 本発明の「ＶＥＧＦ」、「ＳＣＦ」、「ＴＰＯ」、「ＢＭＰ－４」および／または「ＧＭ－ＣＳＦ」のタンパク質、ゲノムＤＮＡまたはｃＤＮＡのさまざまな生物種の配列情報は、例えば、米国国立バイオテクノロジー情報センター（Ｎａｔｉｏｎａｌ Ｃｅｎｔｅｒ ｆｏｒ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ Ｉｎｆｏｒｍａｔｉｏｎ、ＮＣＢＩ）のデータベースのＧｅｎｅのような当業者に周知の情報源から入手することができる。

[0047] なお、上述の遺伝子またはタンパク質は、用いる多能性幹細胞と同種の遺伝子またはタンパク質を用いることが好ましい。例えば、当該多能性幹細胞がヒト由来の場合には、ヒト由来のＶＥＧＦ、ＳＣＦ、ＴＰＯ、ＢＭＰ－４、ＧＭ－ＣＳＦ、Ｆｌｔ－３Ｌ、ＩＬ－３および／またはｂＦＧＦを用いることが好ましく、当該多能性幹細胞がマウス由来の場合には同様にマウス由来の当該遺伝子またはタンパク質を用いることが好ましい。

[0048] 本発明において、「物質Ｘを含む培地」とは、外因性（ｅｘｏｇｅｎｅｏｕｓ）の物質Ｘが添加された培地または外因性の物質Ｘを含む培地を意味し、「物質Ｘを含まない培地」とは、外因性の物質Ｘが添加されていない培地または外因性の物質Ｘを含まない培地を意味する。ここで、「外因性の物質Ｘ」とは、その培地で培養される細胞または組織にとって外来の物質Ｘを意味し、その細胞または組織が産生する内在性（ｅｎｄｏｇｅｎｏｕｓ）の物質Ｘはこれに含まれない。

[0049] 例えば、「ＶＥＧＦを含む培地」とは、外因性のＶＥＧＦが添加された培地または外因性のＶＥＧＦを含む培地である。ＶＥＧＦの用量は、他の成長因子などにも影響されることがあるが、０．２ｎｇ／ｍＬ～２００ｎｇ／ｍＬであることが好ましく、２ｎｇ／ｍＬ～１００ｎｇ／ｍＬがさらに好ましく、５ｎｇ／ｍＬ～５０ｎｇ／ｍＬが特に好ましい。「ＶＥＧＦを含まない培地」とは、外因性のＶＥＧＦが添加されていない培地または外因性のＶＥＧＦを含まない培地である。

[0050] 同様に、ＳＣＦ、ＴＰＯ、ＢＭＰ－４、ＧＭ－ＣＳＦについても、ＳＣＦ、ＴＰＯ、ＢＭＰ－４および／またはＧＭ－ＣＳＦを含む培地とは、外因性のＳＣＦ、ＴＰＯ、ＢＭＰ－４および／またはＧＭ－ＣＳＦが添加された培地または外因性のＳＣＦ、ＴＰＯ、ＢＭＰ－４および／またはＧＭ－ＣＳＦを含む培地である。したがって、ＳＣＦ、ＴＰＯ、ＢＭＰ－４および／またはＧＭ－ＣＳＦの用量は、他の成長因子などにも影響されることがあるが、０．２ｎｇ／ｍＬ～２００ｎｇ／ｍＬであることが好ましく、２ｎｇ／ｍＬ～１００ｎｇ／ｍＬがさらに好ましい。ＴＰＯの場合、より好ましくは５ｎｇ／ｍＬ～１５ｎｇ／ｍＬである。ＳＣＦ、ＢＭＰ－４及びＧＭ－ＣＳＦの場合、より好ましくは、５ｎｇ／ｍＬ～７０ｎｇ／ｍＬである。

[0051] 「ＳＣＦ、ＴＰＯ、ＢＭＰ－４および／またはＧＭ－ＣＳＦを含まない培地」とは、外因性のＶＥＧＦが添加されていない培地または外因性のＳＣＦ、ＴＰＯ、ＢＭＰ－４および／またはＧＭ－ＣＳＦを含まない培地である。

[0052] 本発明におけるマウスの胚様体用の培地としては、２０％のウシ胎児血清（ＦＢＳ）を添加したαＭＥＭを用いることができる。フィーダー細胞としては、マウス間葉系Ｃ３Ｈ１０Ｔ１／２細胞、またはマウス骨髄由来間質ＯＰ９細胞を用いることができる。ヒトの胚様体用の培地としては完全合成培地のＳｔｅｍＦｉｔ（味の素）を用いることができる。

[0053] 培地は、２０％ＦＢＳを添加したαＭＥＭなどを用いることができる。

[0054] 本発明における、「フィーダー細胞」とは、ｉＰＳ細胞の未分化維持培養や分化誘導培養の培養条件を整えるために用いる他の細胞種である。フィーダー細胞はマイトマイシンＣ処理や放射線照射で増殖を停止させて用いる。マウス骨髄由来間質細胞ＯＰ９や、マウス由来間葉系細胞Ｃ３Ｈ１０Ｔ１／２等を用いることができる。

[0055] 本発明における、「重層培養」とは、改め所定の培養容器にて培養したフィーダー細胞層の培養系に、目的のｉＰＳ細胞や胚様体を播種して共培養することである。本発明において、「単層培養」とは、単一の細胞種を組織培養用の容器に接着させて培養することである。

[0056] 本発明における、フィーダー細胞なしの単層培養とは、培養容器に目的のｉＰＳ細胞または胚様体を播種して静置培養することを指す。

[0057] また、本発明の1つの実施形態として、本発明は、以下の方法で多能性幹細胞より胚様体を形成させることを含む。

（i） 多能性幹細胞の単細胞分散液を細胞塊形成培養用容器に播種して胚様体（ＥＢ）を形成させ、および

（ii） 前記容器は、底に微細なスフェロイドウェルが設けられ、かつ、隣接するスフェロイドウェルの間に平坦な面が存在しないことを含む。

[0058] 「胚様体を形成させる」とは、未分化状態で増殖していた多能性幹細胞を解離して、多能性幹細胞の単細胞分散液を得て、該分散液を多能性幹細胞どうしが接着して集合する条件下で浮遊培養または静置培養させることにより、質的に均一な細胞塊を形成させることをいう。胚様体の形成の確認は、顕微鏡による目視観察で生細胞が存在することを確認することによって行われる。

[0059] 本明細書において、「浮遊培養」とは、細胞または細胞塊を懸濁状態に保つことにより、培養容器等の底面、壁面などの基質に接着させない条件で培養することをいう。

[0060] 浮遊培養を行う際に用いられる培養器は、「浮遊培養する」ことが可能なものであれば特に限定されず、当業者であれば適宜決定することが可能である。このような培養器としては、例えば、フラスコ、組織培養用フラスコ、ディッシュ、ペトリデッシュ、組織培養用ディッシュ、マルチディッシュ、マイクロプレート、マイクロウェルプレート、マイクロポア、マルチプレート、マルチウェルプレート、チャンバースライド、シャーレ、チューブ、トレイ、培養バック、またはローラーボトルが挙げられる。これらの培養器は、浮遊培養を可能とするために、細胞非接着性であることが好ましい。細胞非接着性の培養器としては、培養器の表面が、細胞との接着性を向上させる目的で人工的に処理（例えば、細胞外マトリクス等によるコーティング処理）されていないものなどを使用できる。

[0061] 本発明においては、多能性幹細胞を迅速に集合させて多能性幹細胞由来の胚様体を形成させることが好ましい。このように多能性幹細胞の細胞塊を形成させて、ＶＥＧＦを５０ｎｇ／ｍＬの濃度で添加した培地に移して培養すると、卵黄嚢の血島と同様に、細胞塊の細胞をミエロイド細胞への細胞系譜に分化させることができる。

[0062] 胚様体を形成させる実験的な操作としては、例えば、小さな口径の穴（ウェル）を多数備えたプレート（例えば、９６穴プレート）や細胞塊形成培養用容器などの培養容器を用いて小さいスペースに細胞を閉じ込める方法、小さな遠心チューブを用いて短時間遠心することで細胞を凝集させる方法が挙げられる。細胞また多能性幹細胞の凝集体の培養条件は、旋回培養、振蕩培養その他の浮遊培養の他、あらかじめ培養容器の細胞と接する基質表面に、疎水性にするなどの処理を施して、多能性幹細胞と培養容器の基質表面との接着を軽減または抑制することを条件として、静置培養とすることもできる。

[0063] 多能性幹細胞の細胞塊としての胚様体が形成されることや、胚様体の細胞からミエロイド細胞に分化することは、顕微鏡やFACSを用いた、胚様体のサイズおよび細胞数の確認、培養下での胚様体の微視的形態の確認、組織または細胞化学的所見の確認、および/または、分化並びに未分化マーカーの発現、その均一性、分化マーカーの発現制御、その同期性若しくは分化効率の胚様体間の再現性の確認、等を含むがこれらに限られない特性に基づき判断することが可能である。

[0064] 本発明において、ある細胞があるマーカーについて「陽性」であるとは、当該細胞をフローサイトメトリーで測定し、陰性対照に対する陽性細胞の平均蛍光強度比が１０倍以上を＋として、２倍以上～１０倍未満をｌｏｗ、２倍未満をーとする。

また、本発明において、ある細胞のある遺伝子の発現が高い、または、低いとは、当該遺伝子の発現量をリアルタイムＰＣＲ法で測定し、ハウスキーピング遺伝子であるβアクチン、ＧＡＰＤＨ（ｇｌｙｃｅｒａｌｄｅｈｙｄ

ｅ－３－ｐｈｏｓｐｈａｔｅ　ｄｅｈｙｄｒｏｇｅｎａｓｅ）、ＨＰＲＴ１（ｈｙｐｏｘａｎｔｈｉｎｅ　ｐｈｏｓｐｈｏｒｉｂｏｓｙｌｔｒａｎｓｆｅｒａｓｅ　１）またはβ２－ミクログロブリンに対する発現量が１倍以上を高いとして、それ未満を低いとする。

[0065] 本発明における、単細胞分散液とは、培養した細胞をＰＢＳ等で洗浄し、細胞剥離液トリプシン－ＥＤＴＡ（ライフテクノロジーズ）やＴｒｙｐＬＥ　Ｓｅｌｅｃｔ（ライフテクノロジーズ）を用いて４～５分間処理し、さらにＰＢＳ等で洗浄した後に遠心分離で得た目的細胞のペレットを、所望の培養液等でピペッティングにより再懸濁して調製したものである。

[0066] 本発明における、細胞塊形成培養用容器とは、培養時に播種した細胞が容器に接着することなく細胞の凝集塊を形成できるものをいう。好ましくは、当該容器は、培養面であるその底に微細なスフェロイドウェルが設けられ、かつ、隣接するスフェロイドウェルの間に平坦な面が存在せず、隣接するスフェロイドウェルは、いずれかのスフェロイドウェルに向かって傾斜する曲面で隔てられており、当該曲面には細胞の接着性を抑制するための表面処理が施されるために、当該培養用容器に播種された細胞はほとんどがいずれかのスフェロイドウェルに落下する。

[0067] 容器の例としては、直径約４００～８００μｍ、深さ１００～８００μｍのスフェロイドウェルが培養面（底）に隙間なく壁面まで均一にされた容器が挙げられる。好ましくは、スフェロイドウェルが直径４００～５００μｍ、深さ５０～２００μｍである。より好ましくは、スフェロイドウェルが直径約５００μｍ、深さ約４００μｍの容器、直径約８００μｍ、深さ約４００μｍの容器、または直径約８００μｍ、深さ約３００μｍの容器である。最も好ましくは、スフェロイドウェルが直径約４００μｍ、深さ１００～２００μｍ、の容器である。

[0068] 容器として、好ましくは、スフェロイドウェルが培養面（底）に隙間なく壁面まで均一に加工されているものがよい。このような容器の場合、当該容器には隣接するスフェロイドウェルの間に平坦な面が存在せず、播種された

単細胞懸濁液はいずれかのスフェロイドウェルに落下するため、均一な凝集体を形成することができるためである。より好ましくは、ＡＧＣによって製造される微細加工細胞培養容器（ＥＺＳＰＨＥＲＥ（登録商標））である。

[0069] ｐＭＡＣは態様１および態様２のいずれの方法でも製造することができるが、好ましくは態様１の方法で製造される。マクロファージ様機能を阻害する遺伝子を欠損または発現抑制させる工程の後に、増殖性を付加する遺伝子を発現させる工程を行うことにより、目的外の細胞が少なく、純度の高いｐＭＡＣを含む細胞集団を安定して製造することができる。態様１のより具体的な手順は以下の通りである。

（１）多能性幹細胞において、マクロファージ様機能を阻害する遺伝子を欠損または発現抑制させる工程（工程１－１）、

工程１－１で得られたマクロファージ様機能を阻害する遺伝子を欠損または発現抑制させた多能性幹細胞を、底に微細なスフェロイドウェルが設けられ、かつ、隣接するウェルの間に平坦な面は存在しない細胞塊形成培養容器に播種して胚様体（ＥＢ）を形成させる工程（工程１－２）、

工程１－２で得られたＥＢから以下の（ｉ）または（ｉｉ）の方法によりマクロファージ様細胞（ＭＡＣ）を得る工程（工程１－３）、

（ｉ）前記ＥＢを、ＶＥＧＦを含む培地中でフィーダー細胞の上で重層培養を行った後、ＶＥＧＦ、ＳＣＦおよびＴＰＯを含む培地でさらに培養すること、または

（ｉｉ）前記ＥＢを、ＢＭＰ－４、ＶＥＧＦおよびＳＣＦを含む培地中でフィーダー細胞なしの単層培養を行った後、さらにＶＥＧＦ、ＴＰＯおよびＧＭ－ＣＳＦを含む培地でさらに培養すること、

（２）工程１－３で得られたＭＡＣに増殖性を付加する遺伝子を発現させ増殖性マクロファージ様細胞（ｐＭＡＣ）を得る工程（工程２）。

ここで、マクロファージ様機能を阻害する遺伝子としては、ＳＩＲＰα遺伝子である。

かくして得られるｐＭＡＣはマクロファージ同様に貪食能を有し、加えて

、サイトカイン依存的に増殖する、等既存のマクロファージとは異なる特徴を有する。

[0070] ＜キメラ抗原受容体を含むｐＭＡＣおよびその製造方法＞

本発明は、キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）を含むｐＭＡＣ（以下、ＣＡＲ－ｐＭＡＣとも称する）およびその製造方法を提供する。本発明のＣＡＲ－ｐＭＡＣの製造方法において、ＣＡＲ遺伝子の導入は、上記した「本発明のｐＭＡＣの製造方法」の項で述べたようにサイトカイン依存性の増殖性が付与されたｐＭＡＣへの導入に加え、例えば、多能性幹細胞において、マクロファージ様機能を阻害する遺伝子を欠損または発現抑制させる前、または、多能性幹細胞において、マクロファージ様機能を阻害する遺伝子を欠損または発現抑制させた後に実施することもできる。本発明のＣＡＲ－ｐＭＡＣの製造方法は、得られたＣＡＲ－ｐＭＡＣを拡大培養する工程を含む。

本発明のＣＡＲ－ｐＭＡＣの製造方法の一実施態様として以下の方法が挙げられる（態様Ｉ）。

（１）多能性幹細胞において、マクロファージ様機能を阻害する遺伝子を欠損または発現抑制させた後、ミエロイド細胞への分化を誘導してマクロファージ様細胞を得る工程（工程１）、

（２）工程１で得られたマクロファージ様細胞に増殖性を付加する遺伝子を発現させ増殖性マクロファージ様細胞（ｐＭＡＣ）を得る工程（工程２）、および

（３）キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）を導入する工程（工程３）

を含む、ＣＡＲ－ｐＭＡＣの製造方法。

本態様における工程１および工程２は、それぞれ、上記した「本発明のｐＭＡＣの製造方法」の態様１の工程１および工程２と同様にして実施することができる。

[0071] 本発明のＣＡＲ－ｐＭＡＣの製造方法の別の一実施態様として以下の方法が挙げられる（態様ＩＩ）。

（Ａ）多能性幹細胞から分化させたミエロイド細胞に増殖性を付加する遺伝

子を発現させ増殖性ミエロイド細胞を得る工程（工程Ａ）、

（Ｂ）工程Ａで得られた増殖性ミエロイド細胞において、マクロファージ様機能を阻害する遺伝子を欠損または発現抑制させた後、分化誘導してｐＭＡＣを得る工程（工程Ｂ）、および

（Ｃ）キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）を導入する工程（工程Ｃ）。

本態様における工程Ａおよび工程Ｂは、それぞれ、上記した「本発明のｐＭＡＣの製造方法」の態様２の工程Ａおよび工程Ｂと同様にして実施することができる。

[0072] 本発明のＣＡＲ－ｐＭＡＣの製造方法の別の一実施態様として以下の方法が挙げられる（態様ＩＩＩ）

（１’）多能性幹細胞に、キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）を導入する工程（工程１’）、

（２’）工程１’で得られたＣＡＲ遺伝子が導入された多能性幹細胞にマクロファージ様機能を阻害する遺伝子を欠損または発現抑制させた後、ミエロイド細胞への分化を誘導して、ＣＡＲ遺伝子が導入されたマクロファージ様細胞を得る工程（工程２’）、および

（３’）工程２’で得られたＣＡＲ遺伝子が導入されたマクロファージ様細胞に増殖性を付加する遺伝子を発現させＣＡＲ遺伝子が導入された増殖性マクロファージ様細胞（ＣＡＲ－ｐＭＡＣ）を得る工程（工程３’）

を含む、ＣＡＲ－ｐＭＡＣの製造方法。

本態様における工程２’および工程３’は、それぞれ、対象とする細胞にあらかじめＣＡＲ遺伝子が導入されている以外は、上記した「本発明のｐＭＡＣの製造方法」の態様１の工程１および工程２と同様にして実施することができる。

[0073] 本発明のＣＡＲ－ｐＭＡＣの製造方法の別の一実施態様として以下の方法が挙げられる（態様ＩＶ）

（Ａ’）多能性幹細胞において、キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）を導入する工程（工程Ａ’）、

（Ｂ’）工程Ａ’で得られたＣＡＲ遺伝子が導入された多能性幹細胞から分化させたミエロイド細胞に増殖性を付加する遺伝子を発現させＣＡＲ遺伝子が導入された増殖性ミエロイド細胞を得る工程（工程Ｂ’）、および

（Ｃ’）工程Ｂ’で得られたＣＡＲ遺伝子が導入された増殖性ミエロイド細胞において、マクロファージ様機能を阻害する遺伝子を欠損または発現抑制させた後、分化誘導してＣＡＲ遺伝子が導入された増殖性マクロファージ様細胞（ＣＡＲ－ｐＭＡＣ）を得る工程（工程Ｃ’）。

本態様における工程Ａ’および工程Ｂ’は、それぞれ、対象とする細胞にあらかじめＣＡＲ遺伝子が導入されている以外は、上記した「本発明のｐＭＡＣの製造方法」の態様２の工程Ａおよび工程Ｂと同様にして実施することができる。

[0074] 態様Ｉならびに態様ＩＩの工程３、態様ＩＩＩの工程１’および態様ＩＶの工程Ａ’におけるＣＡＲ遺伝子の細胞への導入について以下に詳述する。

キメラ抗原受容体（本明細書中、ＣＡＲとも記載する）

ＣＡＲは、タンパク質のＮ末端側からＣ末端側に向けて、標的に特異的な細胞外ドメイン、膜貫通ドメイン、および免疫細胞のエフェクター機能のための細胞内シグナルドメインを含む構造体であり、ＣＡＲ遺伝子は、この受容体をコードする遺伝子である。細胞外ドメインは、標的に特異的な結合性を示す抗原認識部位を含む。膜貫通ドメインは、細胞外ドメインと細胞内シグナルドメインとの間に存在する。細胞内シグナルドメインは、免疫細胞のエフェクター機能の発揮に必要なシグナルを伝達する。即ち、細胞外ドメインが標的抗原と結合した際、免疫細胞の活性化に必要なシグナルを伝達することが可能な細胞内シグナルドメインが用いられる。

[0075] 尚、これまでにＣＡＲを利用した実験、臨床研究などの報告がいくつかあり（例えばRossig C, et al. Mol Ther 10:5-18, 2004; Dotti G, et al. Hum Gene Ther 20:1229-1239, 2009; Ngo MC, et al. Hum Mol Genet 20 (R1): R93-99, 2011; Ahmed N, et al. Mol Ther 17:1779-1787, 2009; Pule MA, et al. Nat Med 14:1264-1270, 2008; Louis CU, et al. Blood 118:6050-605

6, 2011; Kochenderfer JN, et al. Blood 116:4099-4102, 2010; Kochenderfer JN, et al. Blood 119 :2709-2720, 2012; Porter DL, et al. N Engl J Med 365:725-733, 2011; Kalos M, et al. Sci Transl Med 3:95ra73,2011; Brentjens RJ, et al. Blood 118:4817-4828, 2011; Brentjens RJ, et al. Sci Transl Med 5:177 ra38, 2013）、これらの報告を参考にして本発明におけるＣＡＲを構築することができる。

[0076] ＣＡＲ遺伝子のｐＭＡＣへの導入

本発明において、ＣＡＲ遺伝子の導入は、ＣＡＲ発現ベクターによりＣＡＲ遺伝子を所望する細胞に導入することにより実施される。ここでＣＡＲ遺伝子を導入する対象となる細胞は、例えば、上記した本発明により提供されるｐＭＡＣに加え、マクロファージ様機能を阻害する遺伝子を欠損または発現抑制させる前あるいは後の多能性幹細胞が挙げられる。ＣＡＲ発現ベクターとは、ＣＡＲ遺伝子をコードする核酸分子を対象とする細胞内へ輸送することができる核酸性分子を意味し、ＤＮＡであるかＲＮＡであるかを問わず、また、形態、由来なども特に限定されず、様々な種類のベクターが利用可能である。ベクターは、ウイルスベクターまたは非ウイルスベクターでありうる。ウイルスベクターとしては、レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、ヘルペスウイルスベクター、センダイウイルスベクター、ワクシニアウイルスベクター等が挙げられる。この中でもレトロウイルスベクター、レンチウイルスベクター、およびアデノ随伴ウイルスベクターでは、ベクターに組み込んだ目的遺伝子が宿主染色体へと組み込まれ、安定かつ長期的な発現が期待できる。各ウイルスベクターは、常法に従い、または市販される専用のキットを用いて、作製することができる。非ウイルスベクターとしては、プラスミドベクター、リポソームベクター、正電荷型リポソームベクター（Felgner, P.L., Gadek, T.R., Holm, M. et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 84:7413-7417, 1987）、ＹＡＣベクター、ＢＡＣベクター、人工染色体ベクター等が挙げられる。

[0077] ＣＡＲ発現ベクターは、ＣＡＲ遺伝子を発現するための発現ユニットを含み、当該発現ユニットは、通常、プロモーターと、ＣＡＲ遺伝子と、ポリＡ付加シグナルとを含む。発現ユニットは、各種生物やウイルス由来または任意の配列から成るものであり、その類似配列や、それらの改変ユニットも含まれる。ＣＡＲ発現カセットに利用可能なプロモーターとしては、ＣＡＧプロモーター、ＣＭＶ－ＩＥ（サイトメガロウイルス初期遺伝子由来プロモーター）、ＳＶ４０ｏｒｉ、レトロウイルスＬＴＲＳＲα、ＥＦ１α、βアクチンプロモーター等が挙げられる。ポリＡ付加シグナル配列としては、ＳＶ４０のポリＡ付加配列、ウシ由来成長ホルモン遺伝子のポリＡ付加配列、グロブリンポリＡ付加配列等が挙げられる。プロモーターによってＣＡＲ遺伝子の発現が制御されるように、通常、プロモーターの３’末端側に直接、または他の配列を介して、ＣＡＲ遺伝子が連結され、ＣＡＲ遺伝子の下流にポリＡ付加シグナル配列が配置される。このような発現ユニットによりＣＡＲ遺伝子がメッセンジャーＲＮＡ（ｍＲＮＡ）に転写され、当該ｍＲＮＡからＣＡＲが翻訳され、細胞表面に提示される。

発現ユニット内には、遺伝子発現を検出できるようにするための検出用遺伝子（レポーター遺伝子、細胞または組織特異的な遺伝子、選択マーカー遺伝子など）、発現効率の向上のためのエンハンサー配列、ＷＲＰＥ配列等を含めてもよい。

検出用遺伝子は、ＣＡＲ発現ベクターの導入の成否や効率の判定、ＣＡＲ遺伝子の発現の検出または発現効率の判定、ＣＡＲ遺伝子が発現した細胞の選択や分取等に利用される。検出用遺伝子としては、ネオマイシンに対する耐性を付与するｎｅｏ遺伝子、カナマイシン等に対する耐性を付与するｋｍｒ遺伝子やｎｐｔＩＩ遺伝子（Bernd Reiss et al. EMBO J. 3 (1984), 3317-3322）、ハイグロマイシンに対する耐性を付与するｈｐｈ遺伝子（Blochlinger & Diggelmann, Mol Cell Bio 4:2929-2931）、メソトレキサートに対する耐性を付与するＤＨＦＲ遺伝子（Bourouis et al., EMBO J. 2(7)）等（以上、マーカー遺伝子）；ルシフェラーゼ遺伝子（Giacomin, P1. Sci. 116 (1

996），59-72；Scikantha, J. Bact. 178（1996），121）、β－グルクロニダーゼ（ＧＵＳ）遺伝子、ＧＦＰ（Gerdes, FEBS Lett. 389（1996），44-47）またはその改変体（ＥＧＦＰやｄ２ＥＧＦＰなど）、ｔｄＴｏｍａｔｏまたはその改変体（ｐＴｄＴｏｍａｔｏなど）等の蛍光タンパク質の遺伝子（以上、レポーター遺伝子）；細胞内ドメインを欠く上皮成長因子受容体（ＥＧＦＲ）遺伝子等の遺伝子を用いることができる。検出用遺伝子は、例えば、バイシストロニック性制御配列（例えば、リボソーム内部認識配列（ＩＲＥＳ））や自己開裂ペプチドをコードする配列を介してＣＡＲ遺伝子に連結していてもよい。自己開裂ペプチドとしては、Ｔｈｏｓｅａ　ａｓｉｇｎａ　ｖｉｒｕｓ由来の２Ａペプチド（Ｔ２Ａ）が挙げられる。他の自己開裂ペプチドとしては、ピコルナウイルス由来の２Ａペプチド（Ｆ２Ａ）、蹄疫ウイルス（ＦＭＤＶ）由来の２Ａペプチド（Ｆ２Ａ）、ウマ鼻炎Ａウイルス（ＥＲＡＶ）由来の２Ａペプチド（Ｅ２Ａ）、ｐｏｒｃｉｎｅ　ｔｅｓｃｈｏｖｉｒｕｓ（ＰＴＶ－１）由来の２Ａペプチド（Ｐ２Ａ）等や、ロタウイルス、昆虫ウイルス、アフトウイルスまたはトリパノソーマウイルス由来の２Ａペプチドなどが挙げられるが、これらに限定されない。類似配列や、一部改変配列等も挙げられる。

[0078] 遺伝子導入用に調製されたＣＡＲ遺伝子発現ベクターは、常法によりｐＭＡＣに導入される。ウイルスベクターの場合、ウイルスの感染により細胞に導入される。プラスミドなどの非ウイルスベクターの場合、細胞への導入のため、エレクトロポレーション法、リポソーム法、リン酸カルシウム法、ヌクレオフェクション法等の常法を用いることができ、好ましくはエレクトロポレーション法により導入される。

[0079] 宿主染色体への組み込み効率を向上させるために、トランスポゾン法による遺伝子導入を行うことが好ましい。トランスポゾン法は、非ウイルス遺伝子導入法の一つで、遺伝子酵素（トランスポザーゼ）とその特異認識配列とのペアで遺伝子転位を引き起こすことを利用し、宿主染色体へ任意の遺伝子を組み込むことができる。トランスポゾン法として、例えば、ｐｉｇｇｙＢ

ａｃトランスポゾン法を用いることができる。ｐｉｇｇｙＢａｃトランスポゾン法は、昆虫から単離されたトランスポゾンを利用するものであり（Fraser MJ et al., Insect Mol Biol. 1996 May;5(2):141-51.; Wilson MH et al., Mol THER2007 Jan;15(1):139-45.）、哺乳類染色体への高効率な組込みを可能にする。ｐｉｇｇｙＢａｃトランスポゾン法は、実際に遺伝子の導入に利用されている（例えば、Nakazawa Y, et al., J Immunother 32:826-836, 2009；Nakazawa Y et al., J Immunother 6:3-10, 2013等を参照）。

[0080] トランスポゾン法は、ｐｉｇｇｙＢａｃを利用したものに限定されず、例えば、Sleeping Beauty (Ivics Z, Hackett PB, Plasterk RH, Izsvak Z (1997) Cell 91: 501-510.）、Frog Prince (Miskey C, Izsvak Z, Plasterk RH, Ivics Z (2003) Nucleic Acids Res 31: 6873-6881.）、Tol1 (Koga A, Inagaki H, Bessho Y, Hori H. Mol Gen Genet. 1995 Dec 10;249(4):400-5.; Koga A, Shimada A, Kuroki T, Hori H, Kusumi J, Kyono-Hamaguchi Y, Hamaguchi S. J Hum Genet. 2007;52(7):628-35. Epub 2007 Jun 7.）、Tol2 （Koga A, Hori H, Sakaizumi M (2002) Mar Biotechnol 4: 6-11.；Johnson Hamlet MR, Yergeau DA, Kuliyev E, Takeda M, Taira M, Kawakami K, Mead PE (2006) Genesis 44: 438-445.；Choo BG, Kondrichin I, Parinov S, Emelyanov A, Go W, Toh WC, Korzh V (2006) BMC Dev Biol 6: 5.）等のトランスポゾンを利用した方法であってもよい。

[0081] トランスポゾン法による遺伝子導入の操作は、常法で行うことができる。例えば、ｐｉｇｇｙＢａｃトランスポゾン法のため、ｐｉｇｇｙＢａｃトランスポザーゼをコードする遺伝子を搭載したベクター（トランスポザーゼプラスミド）と、ＣＡＲ遺伝子発現ユニットがｐｉｇｇｙＢａｃ逆向き反復配列に挟まれた構造を備えるベクター（トランスポゾンプラスミド）とを用意し、これらのベクターを標的細胞にエレクトロポレーション、ヌクレオフェクション、リポフェクション、リン酸カルシウム法などの各種手法で導入することができる。

[0082] ＣＡＲ遺伝子導入後の処理としては、ＣＡＲ－ｐＭＡＣを必要なスケール

まで拡大培養する。本発明のＣＡＲ－ｐＭＡＣは、サイトカイン依存的に増殖させることが可能である。従って、本発明のＣＡＲ－ｐＭＡＣの製造方法は、前述した拡大培養をＧＭ－ＣＳＦおよびＭ－ＣＳＦからなる群より選択されるサイトカインを少なくとも１種、好ましくは２種の存在下で実施することが好ましい。

[0083] ＣＡＲ－ｐＭＡＣ調製時の培地は、特に限定されず、通常の細胞培養に用いる培地、例えば、ＲＰＭＩ１６４０、ＭＥＭ、Ｘ－ＶＩＶＯ、ＩＭＤＭ、ＤＭＥＭ、ＤＣ ｍｅｄｉｕｍ、ＯｐｔｉＭＥＭ等を用いることができる。培地は、常法に従い血清（ヒト血清、ウシ胎仔血清など）を添加した培地であっても、無血清培地であってもよい。臨床応用する際の安全性が高く、かつ血清ロット間の差による培養効率の違いが出にくいことから、無血清培地を用いることが好ましい。無血清培地としては、ＴｅｘＭＡＣＳ ＴＭ（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ Ｂｉｏｔｅｃ）、ＡＩＭ Ｖ（登録商標）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）、ＡＬｙＳ培養液（株式会社細胞科学研究所）等が挙げられる。血清を用いる場合、自己血清、即ち、ＣＡＲ発現免疫細胞の由来である個体（より具体的には、本開示の製造方法で得られる細胞集団の投与を受ける患者）から採取した血清を用いてもよく、人工血清であってもよい。本発明において、自己血清を用いることが好ましい。基本培地は、細胞培養に適したものを用いればよく、前述のＴｅｘＭＡＣＳＴＭ（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ Ｂｉｏｔｅｃ）、ＡＩＭ Ｖ（登録商標）、ＡＬｙＳ培養液（株式会社細胞科学研究所）を用いることができる。その他の培養条件は、細胞の生存および増殖に適したものであればよく、一般的な条件を採用することができる。例えば、３７℃に設定したCO_2インキュベーター（CO_2濃度５％）内で培養すること、低酸素培養（酸素濃度０～２０％、好ましくは０～１０％、より好ましくは１～５％）等が挙げられる。

[0084] ＣＡＲ－ｐＭＡＣを拡大培養することで、臨床利用が可能な十分な量と質のＣＡＲ－ｐＭＡＣを含む細胞集団を得ることができる。

[0085] 拡大培養後はＣＡＲ－ｐＭＡＣを回収する。回収操作は常法で行えばよい

。例えば、ピペッティング、遠心処理等によって回収する。好ましい一態様では、回収操作の前に、拡大培養後の細胞を刺激物質の存在下で培養するステップを行う。このステップによれば、効率的な拡大培養が可能になり、また、細胞の生存率を高める利点もある。所望により、拡大培養後のＣＡＲ－ｐＭＡＣ集団をビーズ分離等の細胞分離工程に付してもよい。細胞分離工程の実施により、より高い効果を有するＣＡＲ－ｐＭＡＣの純度を高めることができる。

[0086] 本発明の方法により製造されるＣＡＲ－ｐＭＡＣを含む細胞集団は、腫瘍またはがんと関連のある疾患の治療、特に、当該ＣＡＲ発現免疫細胞の標的抗原を発現するがんの治療に用いることができる。腫瘍またはがんと関連のある疾患は、固形腫瘍であっても血液腫瘍であってもよい。具体的ながんとしては、各種Ｂ細胞リンパ腫（濾胞性悪性リンパ腫、びまん性大細胞Ｂ細胞性悪性リンパ腫、マントル細胞リンパ腫、ＭＡＬＴリンパ腫、血管内Ｂ細胞性リンパ腫、ＣＤ２０陽性ホジキンリンパ腫など）、骨髄増殖性腫瘍、骨髄異形成／骨髄増殖性腫瘍（ＣＭＭＬ，ＪＭＭＬ，ＣＭＬ，ＭＤＳ／ＭＰＮ－ＵＣ）、骨髄異形成症候群、急性骨髄性白血病、神経芽腫、脳腫瘍、ユーイング肉腫、骨肉腫、網膜芽細胞腫、小細胞肺がん、非小細胞肺がん、メラノーマ、骨軟部肉腫、腎臓がん、膵臓がん、悪性中皮腫、前立腺がん、乳がん、子宮体がん、子宮頚がん、卵巣がん、大腸がん等が挙げられるが、これらに限定されない。好適な実施形態において、がんは、固形腫瘍である。固形腫瘍としては、例えば、神経芽腫、脳腫瘍、ユーイング肉腫、骨肉腫、網膜芽細胞腫、小細胞肺がん、非小細胞肺がん、メラノーマ、卵巣がん、横紋筋肉腫、骨軟部肉腫、腎臓がん、膵臓がん、悪性中皮腫、前立腺がん、乳がん、子宮体がん、子宮頚がん、卵巣がん、大腸がん等が挙げられる。

[0087] また、本発明の方法により製造されるＣＡＲ－ｐＭＡＣを含む細胞集団は、神経変性疾患、炎症性疾患、心臓血管疾患、線維症疾患、およびアミロイドーシスの治療に用いることができる。「神経変性疾患」としては、タウオパチー、α－シヌクレオパチー、初老期認知症、老年認知症、アルツハイマ

一病、１７番染色体に連鎖したパーキンソン症（ＦＴＤＰ－１７）、進行性核上性麻痺（ＰＳＰ）、ピック病、原発性進行性失語、前頭側頭型認知症、皮質基底核認知症、パーキンソン病、認知症を伴うパーキンソン病、レビー小体型認知症、ダウン症候群、多系統萎縮症、筋萎縮性側索硬化症（ＡＬＳ）、ハラーフォルデン・シュパッツ症候群、ポリグルタミン病、トリヌクレオチドリピート病、プリオン病等が挙げられる。「炎症性疾患」としては、全身性エリテマトーデス、血管炎、関節リウマチ、歯周炎、潰瘍性大腸炎、副鼻腔炎、喘息、結核、クローン病、慢性感染症、遺伝性周期熱、悪性腫瘍、全身性血管炎、嚢胞性線維症、気管支拡張症、表皮水疱症、周期性好中球減少症、後天性または遺伝性免疫不全、注射薬使用（ｉｎｊｅｃｔｉｏｎ－ｄｒｕｇ　ｕｓｅ）、および集簇性ざ瘡、マックル・ウェルズ（ＭＷＳ）病、家族性地中海熱（ＦＭＦ）等が挙げられる。「心臓血管疾患」としては、アテローム性動脈硬化症、冠動脈疾患、末梢動脈疾患、高血圧性心疾患、メタボリック症候群、高血圧、脳血管疾患、心不全等が挙げられる。「線維症疾患」としては、肺線維症、突発性肺線維症、硬変、嚢胞性線維症、強皮症、心線維症、放射線誘導肺損傷、脂肪肝炎、糸球体硬化症、間質性肺疾患、肝線維症、縦隔線維症、後腹膜腔線維症、骨髄線維症、皮膚線維症等が挙げられる。「アミロイドーシス」としては、、原発性アミロイドーシス（ＡＬ）、続発性アミロイドーシス（ＡＡ）、家族性アミロイドーシス（ＡＴＴＲ）、他の家族性アミロイドーシス、β－２ミクログロブリンアミロイドーシス、限局性アミロイドーシス、重鎖アミロイドーシス（ＡＨ）、軽鎖アミロイドーシス（ＡＬ）、原発性全身性アミロイドーシス、ＡｐｏＡⅠアミロイドーシス、ＡｐｏＡⅠⅠアミロイドーシス、ＡｐｏＡⅠＶアミロイドーシス、アポリポタンパク質Ｃ２アミロイドーシス、アポリポタンパク質Ｃ３アミロイドーシス、角膜ラクトフェリンアミロイドーシス、トランスサイレチン関連アミロイドーシス、透析アミロイドーシス、フィブリノーゲンアミロイドーシス、Ｌｅｃｔ２アミロイドーシス（ＡＬＥＣＴ２）、リゾチームアミロイドーシス等が挙げられる。

[0088] 本発明の方法により製造されるＣＡＲ－ｐＭＡＣを含む細胞集団は、対象の年齢、体重、体表面積、症状などに応じて適宜決定される治療上有効量で投与される。本開示における対象は、通常ヒトであり、好ましくはがん患者である。本発明の方法により製造されるＣＡＲ－ｐＭＡＣを含む細胞集団は、例えば、１回あたり１ｘ１０^{4}個～１ｘ１０^{10}個で投与されうる。投与経路は、特に限定されず、腫瘍内、腫瘍周辺、脳室内、静脈内、動脈内、門脈内、皮内、皮下、筋肉内、または腹腔内に投与することができる。本開示の細胞集団は、全身投与しても、局所投与してもよく、局所投与としては、目的の組織・臓器・器官への直接注入が挙げられる。投与スケジュールは、対象の年齢、体重、体表面積、症状などに応じて適宜決定され、単回投与であっても、連続的または定期的な複数回投与であってもよい。

[0089] 本発明の方法により製造されるＣＡＲ－ｐＭＡＣを含む細胞集団は、薬学的に許容される担体と混合し医薬組成物とすることができる。「薬学上許容される担体」としては、慣用の賦形剤、結合剤、緩衝剤、注射用水、等張化剤、保存剤、無痛化剤等、通常医薬に用いられる成分が例示される。対象に投与すべき細胞集団に加えて、細胞の保護を目的としてジメチルスルフォキシド（ＤＭＳＯ）や血清アルブミン等、細菌の混入阻止を目的として抗生物質等、細胞の活性化、増殖または分化誘導などを目的とした各種の成分（ビタミン類、サイトカイン、成長因子、ステロイド等）等の成分を含んでもよい。医薬組成物は、常法により調製することができる。

以下に実施例を用いて本発明を詳述するが、本発明は何ら限定されるものではない。使用する試薬および材料は特に限定されない限り商業的に入手可能であるか、既知文献等によって調製可能である。また、同様の効果、作用を有するものであれば代替可能であることを当業者は理解している。

実施例

[0090] 実施例１：ヒトｉＰＳＣの作製

Ｋｉｔａｙａｍａ，　Ｓ．ら（Ｓｔｅｍ　Ｃｅｌｌ　Ｒｅｐｏｒｔｓ．６：　２１３－２２７，（２０１６））に記載の方法でヒトｉＰＳＣを作製

した。ヒトｉＰＳＣの維持培養は、再生医療用培地ＳｔｅｍＦｉｔ　ＡＫ０２Ｎ（味の素ヘルシーサプライ）を用いて、ｉＭａｔｒｉｘ５１１（ニッピ）をコートしたポリスチレン製組織培養プレートにて行った。１～２日毎に培地交換を実施して、細胞の増殖に応じて週に一度、細胞剥離液ＴｒｙｐＬＥ　Ｓｅｌｅｃｔ（ライフテクノロジーズ）を用いて４～５分間処理して単細胞分散液として回収し、適当な大きさの培養容器へ播種して培養を継続した。播種したｉＰＳＣはＲｏｃｋ阻害剤１０μＭ　Ｙ－２７６３２（富士フイルム和光純薬）の存在下で一晩培養して、翌日に培地交換してＹ－２７６３２を除去した。

[0091] 実施例２：マウスｉＰＳＣの作製

Ａｒａｋｉ，　Ｒ．ら（Ｎａｔｕｒｅ、４９４：１００－１０４．（２０１３））に記載の方法でマウスｉＰＳＣを作製した。マウスｉＰＳＣの維持培養は、ＥＳ細胞用培地ＥＳＭ（１５％ＫＳＲ（ライフテクノロジーズ）含有ＤＭＥＭ（富士フイルム和光純薬））に終濃度５５μＭ　２－メルカプトエタノール（ライフテクノロジーズ）および10^4Ｕ／ｍＬ　Ｌｅｕｋｅｍｉａ　Ｉｎｈｉｂｉｔｏｒｙ　Ｆａｃｔｏｒ　（ＬＩＦ）（メルク、商品名ＥＳＧＲＯｍＬＩＦ）を添加して調製した完全培地ｃｏｍｐｌｅｔｅ　ＥＳＭ（ｃＥＳＭ）を用いて、６穴組織培養プレート上に播種したマウス胎児線維芽細胞ＭＥＦ（リプロセル）のフィーダー細胞上で行った。

[0092] フィーダー細胞は、ゼラチンをコートしたディッシュにＭｉｔｏｍｙｃｉｎ　Ｃ処理によって細胞増殖を停止させたＭＥＦ（リプロセル）を播種して調製し、ＭＥＦが接着した翌日以降にマウスｉＰＳＣの維持培養に使用した。

[0093] 実施例３：ゲノム編集によるＳＩＲＰα遺伝子の欠損

米国国立バイオテクノロジー情報センター（Ｎａｔｉｏｎａｌ　Ｃｅｎｔｅｒ　ｆｏｒ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ　Ｉｎｆｏｒｍａｔｉｏｎ、ＮＣＢＩ）のデータベースの配列情報を用いて、核酸合成によってヒトＳＩＲＰα、マウスＳＩＲＰαのシングルガイドＲＮＡを合成した。各遺伝子のシ

ングルガイドＲＮＡをＧｕｉｄｅ－ｉｔ™ Ｒｅｃｏｍｂｉｎａｎｔ Ｃａｓ９タンパク質（タカラバイオ）と混合してＣａｓ９タンパク質ガイドＲＮＡ複合体（ＲＮＰ）を調製し、ｉＰＳＣ単細胞分散液に添加し、エレクトロポレーション法を用いてＲＮＡを細胞内に導入した。ガイドＲＮＡの標的となるゲノムＤＮＡ配列のシーケンス解析および実施例５の分化誘導によって得た分化細胞を用いたフローサイトメトリーによる発現解析によって、ＳＩＲＰα遺伝子が欠損したｉＰＳＣクローンを取得した。

[0094] 実施例４：ｉＰＳＣに由来する胚様体の作製

ヒトｉＰＳＣ（野生型またはＳＩＲＰα欠損型）に由来する胚様体（以下ヒトＥＢと記載する）の作製は、６穴プレートタイプの細胞塊形成培養容器ＥＺ ＳＰＨＥＲＥ ＳＰ（ＡＧＣテクノグラス）に、１０μＭ Ｙ－２７６３２を含有するＳｔｅｍＦｉｔで調製した所定密度のヒトｉＰＳＣを播種することで行った。直径５０～２００μｍの胚様体形成後１～４日後に後述の実施例５の分化誘導培養を行った。

[0095] マウスｉＰＳＣ（野生型またはＳＩＲＰα欠損型）に由来する胚様体（以下マウスＥＢと記載する）の作製は、６穴プレートタイプのＥＺ ＳＰＨＥＲＥに完全培地ｃＥＳＭで調製した所定密度のマウスｉＰＳＣを播種することで行った。直径５０～２００μｍの胚様体形成後１～４日後に後述の実施例５の分化誘導培養を行った。

[0096] 実施例５：胚様体のミエロイド系細胞への分化誘導

（１）フィーダー細胞の調製

マウス由来の培養細胞株Ｃ３Ｈ１０Ｔ１／２またはＯＰ９を、ゼラチンをコートしたディッシュに播種し、その細胞株を翌日に使用した。ヒトｉＰＳＣに由来する胚様体の分化誘導に用いるフィーダー細胞は、放射線６０Ｇｙを照射して増殖を停止させてから使用した。Ｃ３Ｈ１０Ｔ１／２細胞の培養には１０％ＦＢＳを含有するＢＭＥ培地（ライフテクノロジーズ）を、ＯＰ９細胞の培養には２０％ＦＢＳを含有するαＭＥＭ培地（ライフテクノロジーズ）を用いた。

[0097] （２）マウスｉＰＳＣのオンフィーダー分化誘導培養

マウスｉＰＳＣ（野生型またはＳＩＲＰα欠損型）から作製したマウスＥＢを、分化誘導培地２０％ＦＢＳ含有αＭＥＭを用いてフィーダー細胞ＯＰ９上で７～１０日間培養した後に、回収した細胞を新しく調製したＯＰ９フィーダー上に再播種した。５５μＭ　２－メルカプトエタノール、５０ｎｇ／ｍＬ　ＧＭ－ＣＳＦ存在下で７～１０日間培養してミエロイド細胞を含む分化細胞を得た。

[0098] （３）ヒトｉＰＳＣのフィーダーフリー分化誘導培養

ヒトｉＰＳＣ（野生型またはＳＩＲＰα欠損型）から作製したヒトＥＢを、ｉＭａｔｒｉｘ５１１およびＲｅｔｒｏｎｅｃｔｉｎ（タカラバイオ）をコートしたポリスチレン製組織培養プレートにて培養した後、分化誘導培地Ｘ－ＶＩＶＯ１５（ロンザ）を用いて、５０ｎｇ／ｍＬ　ｂＦＧＦ、５０ｎｇ／ｍＬ　ＢＭＰ－４、５０ｎｇ／ｍＬ　ＶＥＧＦおよび５０ｎｇ／ｍＬ　ＳＣＦの存在下で５～７日間培養した。その後、５０ｎｇ／ｍＬ　ｂＦＧＦ、５０ｎｇ／ｍＬ　ＶＥＧＦ、５０ｎｇ／ｍＬ　ＳＣＦ、５０ｎｇ／ｍＬ　Ｆｌｔ－３Ｌ、１０ｎｇ／ｍＬ　ＴＰＯ、２０ｎｇ／ｍＬ　ＩＬ－３および５０ｎｇ／ｍＬ　ＧＭ－ＣＳＦの存在下で７～１０日間培養した。その後、５０ｎｇ／ｍＬ　ＧＭ－ＣＳＦ、５０ｎｇ／ｍＬ　ＳＣＦおよび５０ｎｇ／ｍＬ　Ｆｌｔ－３Ｌの存在下で７～１０日間培養してミエロイド細胞を含む分化細胞を得た。他の成長因子などにも影響されることがあるが、０．２ｎｇ／ｍＬから２００ｎｇ／ｍＬの範囲内の任意の２つの濃度を上限および下限とすることができ、例えば、０．２ｎｇ／ｍＬ、２ｎｇ／ｍＬ、５ｎｇ／ｍＬ、１０ｎｇ／ｍＬ、２０ｎｇ／ｍＬ、５０ｎｇ／ｍＬ、１００ｎｇ／ｍＬ～２００ｎｇ／ｍＬ、のうちの任意の２つの濃度を上限および下限とすることができる。

[0099] 実施例６：増殖遺伝子の導入による増殖マクロファージ様細胞ｐＭＡＣの作製

（１）レンチウイルスベクターの調製

米国国立バイオテクノロジー情報センター（Ｎａｔｉｏｎａｌ　Ｃｅｎｔｅｒ　ｆｏｒ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ　Ｉｎｆｏｒｍａｔｉｏｎ、ＮＣＢＩ）のデータベースの配列情報を用いて、遺伝子合成によってヒトｃ－ＭＹＣ、ＢＭＩ１、ＭＤＭ２のｃＤＮＡを合成した。各遺伝子のｃＤＮＡ断片をレンチウイルスベクターｐＳＬまたはＣＳＩＩ－ＥＦ－ＭＳＣ－ＩＲＥＳ２－Ｖｅｎｅｕｓへ挿入した。リポフェクション法を用いて、上記で作製したレンチウイルスベクターｐＳＬまたはＣＳＩＩ－ＥＦ－ＭＳＣ－ＩＲＥＳ２－Ｖｅｎｅｕｓに導入した遺伝子の各々とパッケージングコンストラクトｐＣＡＧ－ＨＩＶｇｐおよびエンベロープおよびＲｅｖのコンストラクトｐＣＭＶ－ＶＳＶ－Ｇ－ＲＳＶ－Ｒｅｖをパッケージング細胞（ウイルス産生細胞）である２９３Ｔ細胞へ導入した。

２９３Ｔ細胞への遺伝子導入の３日後に、細胞培養液を回収し、細孔径０．４５μｍのフィルターでろ過した後、Ｌｅｎｔｉ－Ｘコンセントレーター（クロンテック）によって、ウイルス粒子を濃縮して回収した。回収した組換えウイルス粒子はＤＭＥＭ溶液に懸濁した後、クライオバイアルに分注し、－１５０℃環境下で保管した。

[0100] （２）ｉＰＳＣ由来ミエロイド細胞への増殖遺伝子導入による増殖能の付与

前項で作製したミエロイド細胞を４８穴組織培養プレートで培養し、そこへマウスミエロイド細胞の場合はｃ－ＭＹＣを発現するレンチウイルス懸濁液を同時に加えることにより、感染させた。また、ヒトミエロイド細胞の場合はｃ－ＭＹＣ、ＢＭＩ１、およびＭＤＭ２を発現するレンチウイルス懸濁液を同時に加えることにより、感染させた。遺伝子導入の翌日より、細胞の増殖に応じて培養液を追加しつつ、培養スケールの拡大を行った。ウイルス感染後のミエロイド細胞の培養液として２０％ＦＢＳ含有αＭＥＭを用いて、５０ｎｇ／ｍＬ　ＧＭ－ＣＳＦおよび５０ｎｇ／ｍＬ　Ｍ－ＣＳＦ存在下で感染後の細胞の培養を行った。遺伝子導入を行った細胞は、３ヶ月以上に渡り増殖を続けた。本明細書の各実施例では、野生型ｉＰＳＣに由来するものをｐＭＡＣと称し、マクロファージ様機能を阻害するＳＩＲＰα遺伝子を

欠損した多能性幹細胞に由来する細胞をＳＩＲＰα欠損増殖性マクロファージ様細胞（ｐＭＡＣ－ＳＩＲＰα－ＫＯ）と称する。本実施例では、マクロファージ様機能を阻害する遺伝子を欠損した多能性幹細胞としてＳＩＲＰα欠損ｉＰＳＣを用いた。

[0101] （３）マウス生体由来マクロファージの調製

Ｃ５７ＢＬ／６系統マウス個体から生体由来マクロファージを調製するために、骨髄由来モノサイト（ＢＭ－ｄｅｒｉｖｅｄ　ｍｏｎｏｃｙｔｅ）および腹腔マクロファージを回収した。骨髄由来モノサイトは１０％ウシ胎児血清を含むＲＰＭＩ－１６４０培地を用いて、５０ｎｇ／ｍＬ　Ｍ－ＣＳＦ存在下、６穴組織培養プレート上で４日間培養して、骨髄由来マクロファージＭ０（ＢＭ－ｄｅｒｉｖｅｄ　ｍａｃｒｏｐｈａｇｅｓ　Ｍ０）を誘導した。その後、２０ｎｇ／ｍＬ　インターフェロンγ（フナコシ）、５０ｎｇ／ｍＬ　リポポリサッカライド（富士フイルム和光純薬）存在下で２４時間培養することで骨髄由来マクロファージＭ１（ＢＭ－ｄｅｒｉｖｅｄ　ｍａｃｒｏｐｈａｇｅｓ　Ｍ１）を誘導した。骨髄由来マクロファージＭ２（ＢＭ－ｄｅｒｉｖｅｄ　ｍａｃｒｏｐｈａｇｅｓ　Ｍ２）は、骨髄由来マクロファージＭ０を２０ｎｇ／ｍＬ　ＩＬ－４存在下で２４時間培養することで誘導した。また、マウス腹腔内にチオグリコレート培地（メルク）２mLを投与し、投与３日後に腹腔内マクロファージを回収した。

[0102] （４）マウスｐＭＡＣの遺伝子発現プロファイリング

ｉＰＳ細胞から作製したｐＭＡＣと生体由来マクロファージに対して全トランスクリプトーム解析であるＲＮＡｓｅｑ解析（生物種Ｍｕｓ　ｍｕｓｃｕｌｕｓ、リファレンスゲノムｍｍ１０）を行い、転写産物の発現定量化を行った。各細胞から、ＱＩＡＧＥＮ　ＲＮｅａｓｙｍｉｎｉ　ｋｉｔを用いてトータルＲＮＡを抽出して、ｓｔｒａｎｄ－ｓｐｅｃｉｆｉｃライブラリー調製法（ｄＵＴＰ法）により、ＮＥＢＮｅｘｔ（Ｒ）　Ｐｏｌｙ　（Ａ）ｍＲＮＡ　Ｍａｇｎｅｔｉｃ　Ｉｓｏｌａｔｉｏｎ　Ｍｏｄｕｌｅ（型番Ｅ７４９０）、ＮＥＢＮｅｘｔ（Ｒ）　Ｕｌｔｒａ™ ＩＩ　Ｄｉｒｅｃｔｉ

ｏｎａｌ　ＲＮＡ　Ｌｉｂｒａｒｙ　Ｐｒｅｐ　Ｋｉｔ（型番Ｅ７７６０）を用いて、Ｉｎｄｅｘ配列を含むプライマーによりＰＣＲ増幅を行いシーケンスライブラリーを調製した。次世代シーケンサーＮｏｖａＳｅｑ　６０００（ｉｌｌｕｍｉｎａ）を用いてライブラリー調製したサンプルの塩基配列を取得し、リード長ＰＥ１５０（１５０ｂｐ×２ｐａｉｒｅｄ－ｅｎｄ）、データ量４Ｇ　ｂａｓｅｓ　ｐｅｒ　ｓａｍｐｌｅ、リード数２６．７Ｍ　ｒｅａｄｓ　ｐｅｒ　ｓａｍｐｌｅ（１３．３Ｍ　ｐａｉｒｓ）のデータを取得した。

取得したデータを用いて、インフォマティクス解析を実施して、主成分分析（Ｐｒｉｎｃｉｐａｌ　ｃｏｍｐｏｎｅｎｔ　ａｎａｌｙｓｉｓ；ＰＣＡ）を行った。シーケンスリードの品質を確認するために、ソフトウェアＦａｓｔＱＣ（バージョン０．１１．７）を用いて、Ｒ１（Ｒｅａｄ１）およびＲ２（Ｒｅａｄ２）のクオリティスコア（シーケンス情報エラー率を示すスコア）を算出し、異常なし（Ｅｎｔｉｒｅｌｙ　Ｎｏｒｍａｌ、クオリティスコア＞２８）を確認した。次いで、ソフトウェアＴｒｉｍｍｏｍａｔｉｃ（バージョン０．３８）を用いて、設定値（ＩＬＬＵＭＩＮＡＣＬＩＰ　２：３０：１０、ＬＥＡＤＩＮＧ＝２０、ＴＲＡＩＬＩＮＧ＝２０、ＳＬＩＤＩＮＧＷＩＮＤＷ＝４：１５、ＭＩＮＬＥＮ＝３６）に基づいてシーケンスリードのトリミングを行い、クオリティの良いデータを得るために、ＦａｓｔＱＣの品質確認の結果を踏まえて、クオリティの低いリードの末端やアダプター配列、ショートリードなどを除去した。次に、ソフトウェアＨＩＳＡＴ２（バージョン２．１．０）によって、トリミング後のシーケンスリードをリファレンスゲノムへマッピングしてリードのマップ率を計算し、すべてのサンプルが９８％超であることを確認した。続いて、ソフトウェアｆｅａｔｕｒｅＣｏｕｎｔｓ（バージョン１．６．３）によって、遺伝子ごとの既知エクソン領域にマッピングされたＲａｗリードカウントを算出した。さらに、マッピングされたフラグメントのカウントを行い、Fragments Per Kilobase of exon per Million mapped fragments（ＦＰＫＭ）値、Fragments Per

Kilobase of Transcript per Million mapped reads upper quartile（ＦＰＫＭ－ＵＱ）値、およびTranscripts Per Million（ＴＰＭ）値を算出した。ソフトウェアｓｔａｔｓ（バージョン３．６．１）を用いて、検出された全遺伝子について、ｒａｗリード数、ＦＰＫＭ値およびＴＰＭ値によるサンプルの主成分分析を行った。各データのばらつきが最大になる成分で最も多くデータを反映する指標をプリンシパルコンポーネント（ＰＣ）１として横軸に、２番目にばらつきが大きい成分で２番目に多くデータを反映する指標をＰＣ２として縦軸に各サンプルをプロットして描画データを作成した（図１）。マウスｐＭＡＣはＰＣ１（－１００～－７５）かつＰＣ２（－７５～－５０）の範囲にプロットされて、ほかの生体由来単球やマクロファージとは異なる領域に存在することが分かった。

[0103] （５）マウスｐＭＡＣの表面抗原解析

マウス骨髄由来モノサイト（ＢＭ－ｄｅｒｉｖｅｄ　ｍｏｎｏｃｙｔｅ）、ｐＭＡＣをピペッティング操作により回収した。骨髄由来マクロファージＭ０（ＢＭ－ｄｅｒｉｖｅｄ　ｍａｃｒｏｐｈａｇｅｓ　Ｍ０）および骨髄由来マクロファージＭ２（ＢＭ－ｄｅｒｉｖｅｄ　ｍａｃｒｏｐｈａｇｅｓ　Ｍ２）は２ｍＭ　ＥＤＴＡ（ナカライテスク）を含むＤ－ＰＢＳ（ナカライテスク）で、骨髄由来マクロファージＭ１（ＢＭ－ｄｅｒｉｖｅｄ　ｍａｃｒｏｐｈａｇｅｓ　Ｍ１）は、Ａｃｃｕｔａｓｅ（ナカライテスク）で３７℃、１５分間処理してピペッティング操作により回収した。細胞は抗ＣＤ１１ｂ抗体、抗Ｆ４／８０抗体、抗ＣＤ１６／３２抗体、抗ＣＤ６４抗体、抗Ｉ－Ａ／Ｅ抗体、抗ＣＤ２０６抗体、抗ＣＤ１６３抗体、抗Ｌｙ６Ｃ抗体、抗ＣＤ８０抗体、抗ＣＤ８６抗体、抗ＳｉｇｌｅｃＦ抗体、抗ＳＩＲＰα抗体、抗ＴＬＲ２抗体、抗ＴＬＲ４抗体、抗ＣＤ１２４抗体、抗ＣＣＲ１抗体、抗ＣＣＲ２抗体、抗ＣＣＲ３抗体、抗ＣＣＲ４抗体、抗ＣＣＲ５抗体、抗ＣＸＣＲ２抗体および抗ＣＸＣＲ４抗体あるいは、アイソタイプ適合対照抗体を用いて染色した。その後、細胞を２％ＦＢＳ含有ＰＢＳまたはＰＢＳを用いて２回洗浄した。洗浄後の細胞をフローサイトメーター解析装置（商

品名：ＢＤ　Ａｃｃｕｒｉ　Ｃ６　Ｆｌｏｗ　Ｃｕｔｏｍｅｔｅｒ，　Ｂｅｃｋｔｏｎ　Ｄｉｃｋｉｎｓｏｎ社製）を用いて分析した。図２に抗体染色後のフローサイトメーターによる表面抗原解析の結果を示す。この解析の結果から、マウスｐＭＡＣは、比較対照として用いた骨髄由来マクロファージＭ１およびＭ２の両者の性質を有することが分かった。

[0104] （６）マウスｐＭＡＣの形態

マウスｐＭＡＣおよびｐＭＡＣ－ＳＩＲＰα－ＫＯはＳＩＲＰαの欠損による細胞形態の変化は見られず、図３に示すミエロイド系細胞の示す突起を持った歪な形態を保持していた。

[0105] 実施例７：ｉＰＳＣ由来キメラ抗原受容体導入マクロファージ様細胞（ＣＡＲ－ｐＭＡＣ）の作製

（１）レンチウイルスベクターの調製

遺伝子合成によってｔｄＴｏｍａｔｏ遺伝子およびまたは、ＧＣ３３ｓｃＦｖドメイン、ＣＤ３ζドメインを有するキメラ抗原受容体（ＣＡＲ）のｃＤＮＡを合成し、実施例６（１）と同様にレンチウイルスベクターｐＳＬへ挿入したのちに、ウイルス粒子を調製した。図４にレンチウイルスベクターの調製に用いたプラスミドマップとＣＡＲ遺伝子発現コンストラクトを示す。回収した組換えウイルス粒子はＤＭＥＭ溶液に懸濁した後、クライオバイアルに分注し、－１５０℃環境下で保管した。

[0106] （２）ｉＰＳＣ由来ｐＭＡＣへのＣＡＲ遺伝子の導入（ヒト・マウス）

実施例６（２）で作製したヒトまたはマウス増殖マクロファージ様細胞である、ｐＭＡＣまたはｐＭＡＣ－ＳＩＲＰα－ＫＯを４８穴組織培養プレートで培養し、そこへＧＣ３３　ＣＡＲを発現するレンチウイルス懸濁液を加えることにより、感染させた。

遺伝子導入の翌日より、細胞の増殖に応じて培養液を追加しつつ、培養スケールの拡大を行った。培養液には２０％ＦＢＳ含有αＭＥＭを用いて、５０ｎｇ／ｍＬ　ＧＭ－ＣＳＦおよび５０ｎｇ／ｍＬ　ヒトＭ－ＣＳＦ存在下で培養を行った。なお、ヒトｐＭＡＣにはヒトのＧＭ－ＣＳＦを、マウスｐ

ＭＡＣにはマウスのＧＭ－ＣＳＦを用いた。

[0107] （４）マウスｐＭＡＣに対する遺伝子操作が細胞増殖に与える影響

遺伝子導入後、２週間以上培養を継続した後のヒトまたはマウスｐＭＡＣ、ＳＩＲＰα欠損のｐＭＡＣ－ＳＩＲＰα－ＫＯ、ＣＡＲ導入ｐＭＡＣ（ＣＡＲ－ｐＭＡＣ）、ＳＩＲＰα欠損のＣＡＲ導入ｐＭＡＣ（ＣＡＲ－ｐＭＡＣ－ＳＩＲＰα－ＫＯ）のＧＭ－ＣＳＦおよびＭ－ＣＳＦによる細胞増殖をＭＴＴアッセイによって調べた。ｐＭＡＣ、ｐＭＡＣ－ＳＩＲＰα－ＫＯ、ＣＡＲ－ｐＭＡＣ、ＣＡＲ－ｐＭＡＣ－ＳＩＲＰα－ＫＯを回収して９６穴組織培養プレートに播種し（３×１０^{3}細胞／ｗｅｌｌ）培養を行った。そして、培養液中にＧＭ－ＣＳＦおよびＭ－ＣＳＦが含まれている場合と含まれていない場合とで増殖の速度を比較した。９６穴組織培養プレートでの培養開始直後から、２４時間ごとに3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide（ＭＴＴ）試薬（メルク）０．５ｍｇ／ｍＬを添加し、その４時間後に代謝されたホルマザンを波長５９５ｎｍの吸光度により測定した。代謝されたホルマザンの量はＭＴＴ試薬添加時点における細胞数、すなわち細胞増殖の速度に比例する。

図５に各種マウスｐＭＡＣのＭＴＴアッセイの測定結果を示す。ｐＭＡＣの増殖には培養液中に５０ｎｇ／ｍＬ程度のＧＭ－ＣＳＦまたはＭ－ＣＳＦが必要であった。また、ＧＭ－ＣＳＦとＭ－ＣＳＦを併用することで、増殖を促進する効果があった。ｐＭＡＣの作製のために実施したＳＩＲＰα遺伝子の欠損、ＣＡＲ遺伝子の導入が細胞増殖に与える影響は見られず、ＣＡＲ－ｐＭＡＣはｐＭＡＣと同様な細胞増殖能を有することが分かる。

[0108] （５）マウスＣＡＲ－ｐＭＡＣの細胞表面抗原分析

マウスｐＭＡＣ、ＣＡＲ－ｐＭＡＣ、ｐＭＡＣ－ＳＩＲＰα－ＫＯ、ＣＡＲ－ｐＭＡＣ－ＳＩＲＰα－ＫＯにおけるｔｄＴｏｍａｔｏ、ＧＣ３３ζＣＡＲ、ＳＩＲＰαの発現をフローサイトメーターで調べた。レンチウイルスベクターに組込んだＧＣ３３ζＣＡＲ　ｃＤＮＡ３’末端側の核酸配列に、Ｔ２Ａ配列を介して蛍光タンパク質であるｔｄＴｏｍａｔｏを発現させた。

また、ＣＡＲの標的抗原であるＦＩＴＣ標識ヒトグリピカン３（ｈＧＰＣ３）を細胞サンプルに添加した。これにより、ＣＡＲの発現をｔｄＴｏｍａｔｏとｈＧＰＣ３－ＦＩＴＣの蛍光を指標としてフローサイトメーターにより解析することが可能になる。図６に、ｐＭＡＣ、ＣＡＲ－ｐＭＡＣ、ｐＭＡＣ－ＳＩＲＰα－ＫＯ、ＣＡＲ－ｐＭＡＣ－ＳＩＲＰα－ＫＯにおけるＧＣ３３ζＣＡＲの発現をフローサイトメーターで調べた結果を示す。ｐＭＡＣおよびｐＭＡＣ－ＳＩＲＰα－ＫＯと比較して、ＣＡＲ－ｐＭＡＣおよびＣＡＲ－ｐＭＡＣ－ＳＩＲＰα－ＫＯはｈＧＰＣと抗原特異的に結合していることが分かる。また、ｐＭＡＣおよびＣＡＲ－ｐＭＡＣと比較して、ｐＭＡＣ－ＳＩＲＰα－ＫＯおよびＣＡＲ－ｐＭＡＣ－ＳＩＲＰα－ＫＯはＳＩＲＰαの発現が低下していることが分かる。各サイトグラムから作製した各種細胞は単一の細胞集団であることが分かり、不純物となる細胞がほとんど含まれておらず純度の高い細胞であると言える。

[0109] （６）マウスｐＭＡＣによるサイトカイン産生

生体内に存在するマクロファージはがん組織の微小環境で細胞間相互作用などにより、Ｍ１型やＭ２型と分類される機能的な表現型に分かれる。生体由来マクロファージの表現型と比較するために、マウスｐＭＡＣ、ｐＭＡＣ－ＳＩＲＰα－ＫＯ、ＣＡＲ－ｐＭＡＣ、ＣＡＲ－ｐＭＡＣ－ＳＩＲＰα－ＫＯから産生されるサイトカインを評価した。

マウスｐＭＡＣ、ｐＭＡＣ－ＳＩＲＰα－ＫＯ、ＣＡＲ－ｐＭＡＣ、ＣＡＲ－ｐＭＡＣ－ＳＩＲＰα－ＫＯ、およびマウス骨髄由来マクロファージ（２×１０^{5}細胞）を４８穴組織培養プレートに播種し、２０ｎｇ／ｍＬ　インターフェロンγ（ＢｉｏＬｅｇｅｎｄ）、５０ｎｇ／ｍＬ　ＬＰＳ（富士フイルム和光純薬）の存在下で４８時間培養することでＭ１型を誘導した。マウス骨髄由来マクロファージとしては実施例６（３）で調製したマウス骨髄由来マクロファージＭ０を用いた。同様にして、２０ｎｇ／ｍＬ　ＩＬ－４（ＢｉｏＬｅｇｅｎｄ）の存在下で４８時間培養することでＭ２型を誘導した。得られた培養上清を用いて、Ｍ１またはＭ２型のマーカーとして知られ

るＩＬ－６、ＴＮＦα、ＩＬ－１２、ＩＬ－１０の産生を定量した（図７）。ｐＭＡＣはＳＩＲＰαまたはＣＡＲの発現の有無によらず、Ｍ１刺激によって、ＩＬ－６、ＴＮＦα、ＩＬ－１０の産生が誘導されることが分かる一方で、ＩＬ－１２は産生されなかった。

[0110] （７）マウスＣＡＲ－ｐＭＡＣ－ＳＩＲＰα－ＫＯの細胞遊走能

マウスＣＡＲ－ｐＭＡＣ－ＳＩＲＰα－ＫＯの細胞遊走能を調べるために、ウシフィブロネクチン（富士フイルム和光純薬）をコートしたボイデンチャンバー型（トランスウェル型）の１６穴プレートＣＩＭ－Ｐｌａｔｅ １６（Ａｇｉｌｅｎｔ）のＬｏｗｅｒ ｃｈａｍｂｅｒに、がん細胞の培養上清またはリコンビナントケモカインを添加した１０％ＦＣＳ含有ＲＰＭＩ－１６４０培地１６０μＬを加えて、Ｕｐｐｅｒ ｃｈａｍｂｅｒにＧＭ－ＣＳＦおよびＭ－ＣＳＦを含む２０％ＦＣＳ含有αＭＥＭでマウスＣＡＲ－ｐＭＡＣ－ＳＩＲＰα－ＫＯ（３×１０^{5}細胞）を播種して、３７℃、５％ＣＯ$_{2}$で培養した。Ｌｏｗｅｒ ｃｈａｍｂｅｒの誘因因子によりＵｐｐｅｒ ｃｈａｍｂｅｒのＣＡＲ－ｐＭＡＣはトランスウェルの細孔を通って、メンブレン裏面の電極センサーに吸着することで電気抵抗値が増加する。この電気抵抗値をｘＣＥＬＬｉｇｅｎｃｅ ＲＴＣＡ ＤＰシステム（Ａｇｉｌｅｎｔ）によって測定することでマウスＣＡＲ－ｐＭＡＣの細胞遊走を評価できる。

マウスがん細胞培養上清を調製するために、マウスＭＣ３８、ＬＬ／２、４Ｔ１、ＣＴ２６細胞（それぞれ１×１０^{6}細胞）を６穴組織培養プレートに播種した。翌日に新鮮な１０％ＦＣＳ含有ＲＰＭＩ－１６４０培地２ｍＬに交換してさらに２４時間培養して培養上清を調製した。正常細胞として、ｃ５７ＢＬ／６系統マウス脾臓から単離したＴ細胞、Ｂ細胞（１×１０^{6}細胞）を用いて培養上清を調製した。

[0111] がん細胞の培養上清に対するＣＡＲ－ｐＭＡＣ－ＳＩＲＰα－ＫＯの細胞遊走能を測定した結果を図８上段に示す。マウスがん細胞ＭＣ３８、ＬＬ／２、ＣＴ２６、４Ｔ１の培養上清に対して電気抵抗値Ｃｅｌｌ Ｉｎｄｅｘ

値が上昇し、マウスＣＡＲ－ｐＭＡＣ－ＳＩＲＰα－ＫＯが遊走能を有することが分かる（図８上段左）。陰性対照として、正常細胞マウス脾臓由来Ｂ細胞、Ｔ細胞の培養上清を用いた場合、誘因因子を含まない１０％ＦＣＳ含有ＲＰＭＩ１６４０（Ｍｅｄｉｕｍ）と同様にＣｅｌｌ　Ｉｎｄｅｘ値が低く、ＣＡＲ－ｐＭＡＣは細胞遊走活性を示さなかった（図８上段中央）。また、細胞遊走の阻害剤として知られるサイトカラシンＤ（富士フイルム和光純薬）または、Ｐｅｒｔｕｓｓｉｓ　Ｔｏｘｉｎ（富士フイルム和光純薬）２００ｎｇ／ｍＬ存在下で培養したＣＡＲ－ｐＭＡＣ－ＳＩＲＰα－ＫＯは、がん細胞ＭＣ３８の培養上清に対するＣｅｌｌ　Ｉｎｄｅｘ値の上昇が、サイトカラシンＤ（ＣｙｔＤ）によって一部低下し、Ｐｅｒｔｕｓｓｉｓ　Ｔｏｘｉｎ（ＰＴＸ）によって完全に抑制された（図８上段右）。以上の結果から、ＣＡＲ－ｐＭＡＣ－ＳＩＲＰα－ＫＯは複数のがん細胞が産生する誘因因子に対して細胞遊走能を有することが分かる。

続いて、リコンビナントケモカインに対するＣＡＲ－ｐＭＡＣ－ＳＩＲＰα－ＫＯの細胞遊走能を調べるために、誘因因子の候補としてマウスリコンビナントケモカインＣＣＬ２、ＣＣＬ３、ＣＣＬ４、ＣＣＬ５、ＣＣＬ７、ＣＣＬ８、ＣＸ３ＣＬ１、ＣＸＣＬ１、ＣＸＣＬ２、ＣＸＣＬ５、ＣＸＣＬ１２ＳＤＦ－１α、ＣＸＣＬ１２ＳＤＦ－１β（いずれもＢｉｏＬｅｇｅｎｄ社製）をいずれも１００ｎｇ／ｍＬの濃度で用いた。結果を図８下段に示す。

マウスリコンビナントケモカインに対するマウスＣＡＲ－ｐＭＡＣ－ＳＩＲＰα－ＫＯの細胞遊走能を評価した結果、ＣＣＬ３、ＣＣＬ４、ＣＣＬ７に対して応答することが分かる（図８下段左および中央）。

[0112] （８）がん細胞との共培養によるマウスｐＭＡＣのサイトカイン産生

がん抗原ｈＧＰＣ３発現または非発現がん細胞とマウスｐＭＡＣ、ｐＭＡＣ－ＳＩＲＰα－ＫＯ、ＣＡＲ－ｐＭＡＣ、ＣＡＲ－ｐＭＡＣ－ＳＩＲＰα－ＫＯを共培養してサイトカイン産生を評価した。マウスがん細胞ｈＧＰＣ３導入または非発現４Ｔ１、ｈＧＰＣ３導入または非発現ＣＴ２６、ｈＧＰ

Ｃ３導入または非発現ＬＬ／２、ｈＧＰＣ３導入または非発現ＭＣ３８（いずれも５×１０^{4}細胞）と、マウスｐＭＡＣ、ｐＭＡＣ－ＳＩＲＰα－ＫＯ、ＣＡＲ－ｐＭＡＣ、ＣＡＲ－ｐＭＡＣ－ＳＩＲＰα－ＫＯ（いずれも２×１０^{5}細胞）を４８穴組織培養プレートに１０％ＦＣＳ含有ＲＰＭＩ－１６４０を用いて播種し、３７℃、５％CO_2で４８時間培養した。得られた培養上清を用いて、ＩＬ－６（図９－１）、ＴＮＦα（図９－２）、ＩＬ－１０（図９－３）、ＩＬ－１２（図９－４）の産生を定量した。４Ｔ１－ＧＰＣ３、ＣＴ２６－ＧＰＣ３、ＬＬ／２－ＧＰＣ３、ＭＣ３８－ＧＰＣ３とＣＡＲ－ｐＭＡＣ－ＳＩＲＰα－ＫＯの共培養によってＩＬ－６、ＴＮＦαの産生が誘導されることが分かる。ＩＬ－１０は試験した条件における産生量の違いは見られず、ＩＬ－１２は検出されなかった。

[0113] （９）マウスＣＡＲ－ｐＭＡＣによる抗原特異的ながん細胞貪食

９６穴組織培養プレートにエフェクター細胞としてマウスｐＭＡＣ、ＣＡＲ－ｐＭＡＣ、ｐＭＡＣ－ＳＩＲＰα－ＫＯ、ＣＡＲ－ｐＭＡＣ－ＳＩＲＰα－ＫＯ（３×１０^{4}細胞／ｗｅｌｌ）を播種し、１０％ＦＢＳ含有ＲＰＭＩ－１６４０を用いてターゲット細胞であるルシフェラーゼ遺伝子を導入したマウスがん細胞ｈＧＰＣ３導入または非発現４Ｔ１、ｈＧＰＣ３導入または非発現ＣＴ２６、ｈＧＰＣ３導入または非発現ＬＬ／２、ｈＧＰＣ３導入または非発現ＭＣ３８（いずれも３×１０^{3}細胞／ｗｅｌｌ）と２日間共培養を行った。ＣＡＲ標的抗原に特異的ながん細胞の貪食を評価するために、がん抗原ｈＧＰＣ３を導入したがん細胞を使用した。共培養後の９６穴組織培養プレートにルシフェラーゼの基質であるＢｒｉｇｈｔ－Ｇｌｏ　Ｌｕｃｉｆｅｒａｓｅ　Ａｓｓａｙ（Ｐｒｏｍｅｇａ）を添加することで得られる生物発光を定量することによりターゲット細胞の生存を調べた結果を図１０に示す。ｐＭＡＣ、ＣＡＲ－ｐＭＡＣ、ｐＭＡＣ－ＳＩＲＰα－ＫＯとの共培養ではターゲット細胞の殺細胞効果は２０％程度であったが、ＣＡＲ－ｐＭＡＣ－ＳＩＲＰα－ＫＯとの共培養では６０％程度まで向上していることが分かる。また、ＣＡＲ－ｐＭＡＣ－ＳＩＲＰα－ＫＯによる殺細胞効果はｈＧ

ＰＣ３非発現のターゲット細胞では見られないことから、ＣＡＲ－ｐＭＡＣ－ＳＩＲＰα－ＫＯは標的抗原に特異的ながん細胞の貪食能を有することが分かる。

４８穴組織培養プレートでｔｄＴｏｍａｔｏを発現するマウスｐＭＡＣまたはＣＡＲ－ｐＭＡＣ－ＳＩＲＰα－ＫＯ（５×１０^{4}細胞／ｗｅｌｌ）とＶｅｎｕｓを発現するｈＧＰＣ３導入大腸がん細胞ＭＣ３８（５×１０^{3}細胞／ｗｅｌｌ）を１０％ＦＢＳ含有ＲＰＭＩ－１６４０培地を用いて共培養して、２日後、４日後に蛍光顕微鏡（キーエンスＢＺ－Ｘ８１０）を用いて蛍光観察を行った結果を図１１に示す。がん細胞は蛍光タンパク質Ｖｅｎｕｓに由来する緑色蛍光（励起波長４７０ｎｍ、吸収波長５２５ｎｍ）で検出され、ｐＭＡＣまたはＣＡＲ－ｐＭＡＣ－ＳＩＲＰα－ＫＯは蛍光タンパク質ｔｄＴｏｍａｔｏに由来する赤色蛍光（励起波長５４５ｎｍ、吸収波長６０５ｎｍ）で検出される。がん細胞の緑色蛍光シグナルおよび、ｐＭＡＣまたはＣＡＲ－ｐＭＡＣ－ＳＩＲＰα－ＫＯの赤色蛍光シグナルが重複して表示された領域の面積をプロットした棒グラフ（図１１下段左側）。がん細胞の緑色蛍光シグナルが検出された領域の面積をプロットした棒グラフ（図１１下段右側）。ｐＭＡＣと共培養されたがん細胞は増殖するが、ＣＡＲ－ｐＭＡＣ－ＳＩＲＰα－ＫＯと共培養されたがん細胞はＣＡＲ－ｐＭＡＣ－ＳＩＲＰα－ＫＯに取り囲まれて貪食されることで排除されることが分かる。

[0114] （１０）マウスＣＡＲ－ｐＭＡＣのがん細胞傷害性

マウスＣＡＲ－ｐＭＡＣのがん細胞傷害性を調べるために、１６穴プレートＥ－Ｐｌａｔｅ　１６（Ａｇｉｌｅｎｔ）でがん細胞とＣＡＲ－ｐＭＡＣ－ＳＩＲＰα－ＫＯを共培養して３７℃、５％CO_2で培養した。前培養によってプレート上の電極センサーに接着したがん細胞は、ＣＡＲ－ｐＭＡＣ－ＳＩＲＰα－ＫＯとの共培養によって貪食されることで、細胞接着が弱まり電気抵抗値が減少する。この電気抵抗値をｘＣＥＬＬｉｇｅｎｃｅ　ＲＴＣＡ　ＤＰシステム（Ａｇｉｌｅｎｔ）によって測定することでＣＡＲ－ｐＭＡＣ－ＳＩＲＰα－ＫＯのがん細胞傷害活性を評価できる。

ターゲットとするマウスがん細胞ｈＧＰＣ３導入または非発現ＣＴ２６（５×１０^{3}細胞）、ｈＧＰＣ３導入または非発現ＭＣ３８（１×１０^{4}細胞）、ｈＧＰＣ３導入または非発現ＬＬ／２（１×１０^{4}細胞）、ｈＧＰＣ３導入または非発現４Ｔ１（５×１０^{3}細胞）を、ｉＭａｔｒｉｘ－５１１でコートしたＥ－Ｐｌａｔｅ１６に播種して３７℃、５％CO_2で２４時間培養後、エフェクター細胞のマウスＣＡＲ－ｐＭＡＣ－ＳＩＲＰα－ＫＯをターゲットとするがん細胞の１倍、または５倍、または１０倍量を加えて共培養を行った。共培養開始後６時間（Ｔ＝３０時間）でのエフェクター：ターゲット比（Ｅ：Ｔ比）＝１：１、５：１、１０：１におけるＣＡＲ－ｐＭＡＣ－ＳＩＲＰα－ＫＯのがん細胞傷害性（％Ｃｙｔｏｌｙｓｉｓ）は、どのがん細胞をターゲットとした場合であっても、がん抗原ｈＧＰＣ３発現およびＥ：Ｔ比が高いほど優れた活性を示した（図１２－１）。がん細胞とＣＡＲ－ｐＭＡＣ－ＳＩＲＰα－ＫＯを共培養することでがん細胞の生存を示す接着シグナル（Ｎｏｒｍａｌｉｚｅｄ　Ｃｅｌｌ　Ｉｎｄｅｘ値；ＣＩ値）と、がん細胞単独培養した場合で標準化したがん細胞の細胞傷害活性（％Ｃｙｔｏｌｙｓｉｓ）の経時変化を図１２－２および図１２－３に示す。がん抗原ｈＧＰＣ３の発現と、ＣＡＲ－ｐＭＡＣ－ＳＩＲＰα－ＫＯの細胞数（Ｅ：Ｔ比）に依存して、経時的にがん細胞のＣＩ値が低下して、％Ｃｙｔｏｌｙｓｉｓが上昇していくことが分かる。

[0115] （１１）マウスＣＡＲ－ｐＭＡＣによる細胞傷害性におけるＳＩＲＰα遺伝子欠損、またはＧＣ３３－ζ-ＣＡＲ導入の重要性の検討

ＣＡＲ－ｐＭＡＣによるがん細胞傷害性におけるＳＩＲＰα遺伝子欠損、またはＧＣ３３－ζ-ＣＡＲ導入の重要性を検討するために、エフェクター細胞としてヒトまたはマウスｐＭＡＣ、ｐＭＡＣ－ＳＩＲＰα－ＫＯ、ＣＡＲ－ｐＭＡＣ、ＣＡＲ－ｐＭＡＣ－ＳＩＲＰα－ＫＯを用いてＥ：Ｔ比１０：１でのがん細胞傷害性をｘＣＥＬＬｉｇｅｎｃｅ　ＲＴＣＡ　ＤＰシステムで評価した。

マウスがん細胞ｈＧＰＣ導入または非発現ＣＴ２６（５×１０^{3}細胞）をｉ

Ｍａｔｒｉｘ－５１１でコートしたＥ－Ｐｌａｔｅ１６に播種して、３７℃、２４時間培養した後、エフェクター細胞マウスｐＭＡＣ、ｐＭＡＣ－ＳＩＲＰα－ＫＯ、ＣＡＲ－ｐＭＡＣ、ＣＡＲ－ｐＭＡＣ－ＳＩＲＰα－ＫＯ（５×１０^{4}細胞）を加えて共培養を行った。ｈＧＰＣ３導入ＣＴ２６に対して、ＳＩＲＰα欠損およびＧＣ３３－ζ－ＣＡＲ導入によって抗原特異的な細胞傷害活性（％Ｃｙｔｏｌｙｓｉｓ）が向上することが分かる（図１３）。

[0116] （１２）マウスＣＡＲ－ｐＭＡＣによるがん細胞貪食のタイムラプス観察

ＣＡＲ－ｐＭＡＣによるがん細胞の貪食能を評価するために、ｐＨ感受性赤色蛍光色素ｐＨｒｏｄｏ Ｄｅｅｐ Ｒｅｄ（Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）の存在下で２０℃、２時間の条件で標識したがん細胞ＭＣ３８－ＧＰＣ３－Ｌｕｃ－Ｖｅｎｕｓ（５×１０^{5}細胞／ｍＬ）とｐＭＡＣ、ｐＭＡＣ－ＳＩＲＰα－ＫＯ、ＣＡＲ－ｐＭＡＣ、またはＣＡＲ－ｐＭＡＣ－ＳＩＲＰα－ＫＯ（それぞれ５×１０^{6}細胞／ｍＬ）を１ｍＬずつ、１０％ＦＣＳ含有ＲＰＭＩ－１６４０培地と１２－ｗｅｌｌ組織培養プレートを用いて共培養し、蛍光顕微鏡（キーエンスＢＺ－Ｘ８１０）を用いて特定の４視野を１０分毎に５０回ずつ撮影することで８時間のタイムラプス観察を行った結果を図１４に示す。ｐＨｒｏｄｏ標識がん細胞が貪食されてｐＭＡＣの細胞内に取り込まれると、ｐＨ低下に応答してｐＨｒｏｄｏに由来する赤色蛍光（励起波長６２０ｎｍ、吸収波長７００ｎｍ）が検出された撮影画像が得られる。ＢＺ－Ｘ８１０ ａｎａｌｙｚｅｒ解析アプリケーションによって画像解析（時系列セルカウント）することで、貪食細胞数Ｐｈａｇｏｃｙｔｉｃ ｃｅｌｌｓの経時的変化を測定した。ｐＭＡＣ、ｐＭＡＣ－ＳＩＲＰα－ＫＯ、ＣＡＲ－ｐＭＡＣと比較して、ＣＡＲ－ｐＭＡＣ－ＳＩＲＰα－ＫＯは貪食能が向上することが分かる。

[0117] （１３）担癌マウスにおけるマウスＣＡＲ－ｐＭＡＣの体内動態

Ｃ５７ＢＬ６／Ｎ系統のマウス腹腔内にｈＧＰＣ３導入ＭＣ３８（５×１０^{5}細胞）を移植して作製した大腸がん腹膜播種モデル（ｎ＝６）に、ＣＡＲ－ｐＭＡＣ－ＳＩＲＰα－ＫＯ（１×１０^{7}細胞）を腹腔内投与して、治療前

、治療１、３日後に摘出した各臓器から抽出したゲノムＤＮＡ１００ μｇを鋳型として、ＣＡＲ（ＧＣ３３－ζ）を特異的に認識する特注のＰｒｉｍｅＴｉｍｅリアルタイムＰＣＲ用プローブ（Ｉｎｔｅｇｒａｔｅｄ ＤＮＡ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）を用いて、リアルタイムＰＣＲ装置７５００Ｆａｓｔ（Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）により、肺、肝臓、腎臓、心臓、脾臓、骨髄、腫瘍、末梢血におけるＣＡＲ－ｐＭＡＣの存在量を測定した（図１５）。治療前のマウスからはＣＡＲシグナルは検出されず、腹腔内投与後１日目に、肺、肝臓、腎臓、心臓、脾臓、腫瘍においてＣＡＲ－ｐＭＡＣ－ＳＩＲＰα－ＫＯが検出されて、骨髄、末梢血では検出されなかった。腹腔内投与後３日目に、肺、腎臓、心臓、脾臓の正常組織でＣＡＲ－ｐＭＡＣ－ＳＩＲＰα－ＫＯが検出されるマウス個体数は減少したが、腫瘍組織では６匹中５匹でＣＡＲ－ｐＭＡＣが検出されて存在量も多いことが分かった。

[0118] （１４）ＣＡＲ－ｐＭＡＣの生体内での抗腫瘍効果

Ｃ５７ＢＬ６／Ｎ系統のマウス腹腔内にｈＧＰＣ３導入ＭＣ３８（５×10^5細胞）を移植して作製した大腸がん腹膜播種モデルに、１０Ｇｙの放射線を照射したＣＡＲ－ｐＭＡＣ－ＳＩＲＰα－ＫＯ（３×10^6細胞）を合計６回腹腔内投与して治療効果を評価した。２０％以上の体重減少あるいは、体温が３０℃以下となったマウス個体を死亡と判定して生存曲線を作成した。生体内におけるｈＧＰＣ３導入ＭＣ３８の細胞生存を、３～４日毎にＩＶＩＳイメージングシステム（パーキンエルマー）で生物化学発光により測定した。図１６に、ｉｎ ｖｉｖｏイメージングの撮影画像およびルシフェラーゼ発光の全フラックスの経時変化を示す。ＣＡＲ－ｐＭＡＣ－ＳＩＲＰα－ＫＯを投与しないＮｏ ｔｒｅａｔｍｅｎｔ群はがん細胞の移植後に顕著な腫瘍の増殖を認めた。対して、ＣＡＲ－ｐＭＡＣ－ＳＩＲＰα－ＫＯは腫瘍の増大を顕著に抑制して有意に生存を延長した。

[0119] 実施例８ヒトＣＡＲ－ｐＭＡＣの機能解析

（１）ヒト生体由来マクロファージおよびｉＰＳ細胞由来マクロファージの

調製

健常ヒトドナー採血由来ＣＤ１４モノサイト（Ｌｏｎｚａ）をＩｍｍｕｎｏＣｕｌｔ－ＳＦ Ｍａｃｒｏｐｈａｇｅ Ｄｉｆｆｅｒｅｎｔｉａｔｉｏｎ Ｍｅｄｉｕｍ（Ｓｔｅｍｃｅｌｌ ｔｅｃｈｎｏｌｉｇｉｅｓ）を用いて、５０ｎｇ／ｍＬ ヒトＭ－ＣＳＦの存在下、６穴組織培養プレートに播種（２×１０^{6}細胞／ｗｅｌｌ）して、４日間培養してＣＤ１４モノサイト由来マクロファージＭ０（Ｈｕｍａｎ ＣＤ１４－ｄｅｒｉｖｅｄ ｍａｃｒｏｐｈａｇｅｓ Ｍ０）を誘導した。その後、５０ｎｇ／ｍＬ リポポリサッカライド、５０ｎｇ／ｍＬヒトインターフェロンγ存在下、２日間培養することで、ＣＤ１４モノサイト由来マクロファージＭ１（Ｈｕｍａｎ ＣＤ１４－ｄｅｒｉｖｅｄ ｍａｃｒｏｐｈａｇｅｓ Ｍ１）を誘導した。また、ＣＤ１４モノサイト由来マクロファージＭ０（Ｈｕｍａｎ ＣＤ１４－ｄｅｒｉｖｅｄ ｍａｃｒｏｐｈａｇｅｓ Ｍ０）を５０ｎｇ／ｍＬ ＩＬ－４（ＢｉｏＬｅｇｅｎｄ）存在下で２日間培養することでＣＤ１４モノサイト由来マクロファージＭ２（Ｈｕｍａｎ ＣＤ１４－ｄｅｒｉｖｅｄ ｍａｃｒｏｐｈａｇｅｓ Ｍ２）を誘導した。

実施例５（３）で得たミエロイド細胞を含む分化細胞を５０ｎｇ／ｍＬ Ｍ－ＣＳＦおよび２０ｎｇ／ｍＬ ＩＬ－３存在下７～１４日間培養することでヒトｉＰＳ細胞由来マクロファージを誘導した。

[0120] （２）ヒトｐＭＡＣの遺伝子発現プロファイリング

ｉＰＳ細胞から作製したｐＭＡＣと生体由来マクロファージ、およびｉＰＳＣ由来マクロファージに対して全トランスクリプトーム解析であるＲＮＡｓｅｑ解析（生物種Ｈｕｍａｎ、リファレンスゲノムｈｇ３８）を行い、転写産物の発現定量化を行った。各細胞から、ＱＩＡＧＥＮ ＲＮｅａｓｙｍｉｎｉ ｋｉｔを用いてトータルＲＮＡを抽出して、ｓｔｒａｎｄ－ｓｐｅｃｉｆｉｃ ライブラリー調製法（ｄＵＴＰ 法）により、ＮＥＢＮｅｘｔ（Ｒ） Ｐｏｌｙ （Ａ） ｍＲＮＡ Ｍａｇｎｅｔｉｃ Ｉｓｏｌａｔｉｏｎ Ｍｏｄｕｌｅ（型番Ｅ７４９０）、ＮＥＢＮｅｘｔ（Ｒ） ＵｌｔｒａＴ

ＭｌｌＤｉｒｅｃｔｉｏｎａｌＲＮＡＬｉｂｒａｒｙＰｒｅｐＫｉｔ（型番Ｅ７７６０）を用いて、Ｉｎｄｅｘ配列を含むプライマーによりＰＣＲ増幅を行いシーケンスライブラリーを調製した。次世代シーケンサーＮｏｖａＳｅｑ　６０００（ｉｌｌｕｍｉｎａ）を用いてライブラリー調製したサンプルの塩基配列を取得し、リード長ＰＥ１５０（１５０ｂｐ×２ｐａｉｒｅｄ－ｅｎｄ）、データ量４Ｇ　ｂａｓｅｓ　ｐｅｒ　ｓａｍｐｌｅ、リード数２６．７Ｍ　ｒｅａｄｓ　ｐｅｒ　ｓａｍｐｌｅ（１３．３Ｍｐａｉｒｓ）のデータを取得した。

取得したデータを用いて、インフォマティクス解析を実施して、主成分分析（Ｐｒｉｎｃｉｐａｌ　ｃｏｍｐｏｎｅｎｔ　ａｎａｌｙｓｉｓ；ＰＣＡ）を行った。シーケンスリードの品質を確認するために、ソフトウェアＦａｓｔＱＣ（バージョン０．１１．７）を用いて、Ｒ１（Ｒｅａｄ１）およびＲ２（Ｒｅａｄ２）のクオリティスコア（シーケンス情報エラー率を示すスコア）を算出し、異常なし（Ｅｎｔｉｒｅｌｙ　Ｎｏｒｍａｌ、クオリティスコア＞２８）を確認した。次いで、ソフトウェアＴｒｉｍｍｏｍａｔｉｃ（バージョン０．３８）を用いて、設定値（ＩＬＬＵＭＩＮＡＣＬＩＰ　２：３０：１０、ＬＥＡＤＩＮＧ＝２０、ＴＲＡＩＬＩＮＧ＝２０、ＳＬＩＤＩＮＧＷＩＮＤＷ＝４：１５、ＭＩＮＬＥＮ＝３６）に基づいてシーケンスリードのトリミングを行い、クオリティの良いデータを得るために、ＦａｓｔＱＣの品質確認の結果を踏まえて、クオリティの低いリードの末端やアダプター配列、ショートリードなどを除去した。次に、ソフトウェアＨＩＳＡＴ２（バージョン２．１．０）によって、トリミング後のシーケンスリードをリファレンスゲノムへマッピングしてリードのマップ率を計算し、すべてのサンプルが９８％超であることを確認した。続いて、ソフトウェアｆｅａｔｕｒｅＣｏｕｎｔｓ（バージョン１．６．３）によって、遺伝子ごとの既知エクソン領域にマッピングされたＲａｗリードカウントを算出した。さらに、マッピングされたフラグメントのカウントを行い、Fragments Per Kilobase of exon per Million mapped fragments（ＦＰＫＭ）値、Fragments Per

Kilobase of Transcript per Million mapped reads upper quartile（ＦＰＫＭ－ＵＱ）値、およびTranscripts Per Million（ＴＰＭ）値を算出した。ソフトウェアｓｔａｔｓ（バージョン３．６．１）を用いて、検出された全遺伝子について、ｒａｗリード数、ＦＰＫＭ値およびＴＰＭ値によるサンプルの主成分分析を行った。各データのばらつきが最大になる成分で最も多くデータを反映する指標をプリンシパルコンポーネント（ＰＣ）１として横軸に、２番目にばらつきが大きい成分で２番目に多くデータを反映する指標をＰＣ２として縦軸に各サンプルをプロットして描画データを作成した（図１７）。ヒトｐＭＡＣはＰＣ１（１５０～２００）かつＰＣ２（－２０～－４０）の範囲にプロットされて、ほかの生体由来ＣＤ１４陽性細胞由来単球やＣＤ１４陽性細胞由来マクロファージ（Ｍ０、Ｍ１、Ｍ２型）、さらにｉＰＳ細胞由来ミエロイド細胞、ｉＰＳ細胞由来マクロファージとは異なる領域に存在することが分かった。

[0121] （３）ヒトｉＰＳＣ－ｐＭＡＣの表面抗原解析

ヒトｐＭＡＣ、ｐＭＡＣ－ＳＩＲＰα－ＫＯ、ＣＡＲ－ｐＭＡＣ－ＳＩＲＰα－ＫＯ、採血由来ＣＤ１４陽性単球（ＣＤ１４－ｄｅｒｉｖｅｄ ｍｏｎｏｃｙｔｅ）、ｉＰＳＣ由来ミエロイド細胞（ｉＰＳＣ－ｄｅｒｉｖｅｄ Ｍｙｅｌｏｉｄ ｃｅｌｌｓ）、ｉＰＳＣ由来マクロファージ（ｉＰＳＣ－ｍａｃｒｏｐｈａｇｅｓ）をピペッティング操作により回収した。ＣＤ１４モノサイト由来マクロファージＭ０（ＣＤ１４－ｄｅｒｉｖｅｄ ｍａｃｒｏｐｈａｇｅｓ Ｍ０）およびＣＤ１４モノサイト由来マクロファージＭ２（ＣＤ１４－ｄｅｒｉｖｅｄ ｍａｃｒｏｐｈａｇｅｓ Ｍ２）は２ｍＭ ＥＤＴＡ（ナカライテスク）を含むＤ－ＰＢＳ（ナカライテスク）で、ＣＤ１４モノサイト由来マクロファージＭ１（ＣＤ１４－ｄｅｒｉｖｅｄ ｍａｃｒｏｐｈａｇｅｓ Ｍ１）は、Ａｃｃｕｔａｓｅ（ナカライテスク）で３７℃、１５分間処理してピペッティング操作により回収した。

細胞は抗ＨＬＡ－ＡＢＣ抗体、抗ＨＬＡ－ＤＲ抗体、抗ＣＤ４０抗体、抗ＣＤ８０抗体、抗ＣＤ８３抗体、抗ＣＤ８６抗体、抗ＣＤ６８抗体、抗ＣＤ

１６３抗体、抗ＣＤ２０６抗体、抗ＳＩＲＰα抗体、抗ＣＣＲ１抗体、抗ＣＣＲ２抗体、抗ＣＣＲ３抗体、抗ＣＣＲ４抗体、抗ＣＣＲ５抗体、抗ＣＣＲ７抗体、抗ＣＸＣＲ２抗体、抗ＣＸＣＲ４抗体および抗ＣＤ１４抗体、あるいは、アイソタイプ適合対照抗体を用いて染色した。その後、細胞を２％ＦＢＳ含有ＰＢＳまたはＰＢＳを用いて２回洗浄した。洗浄後の細胞をフローサイトメーター解析装置（商品名：ＢＤ　Ａｃｃｕｒｉ　Ｃ６　Ｆｌｏｗ　Ｃｕｔｏｍｅｔｅｒ，　Ｂｅｃｋｔｏｎ　Ｄｉｃｋｉｎｓｏｎ社製）を用いて分析した。図１８に抗体染色後のフローサイトメーターによる表面抗原解析の結果を示す。この解析の結果から、ヒトｐＭＡＣ（ｐＭＡＣ、ｐＭＡＣ－ＳＩＲＰα－ＫＯ、ＣＡＲ－ｐＭＡＣ－ＳＩＲＰα－ＫＯ）は、ＣＤ１４陽性細胞由来マクロファージ（Ｍ０、Ｍ１、およびＭ２）やｉＰＳＣ由来マクロファージに発現するＣＤ８３、ＣＤ１４に陰性であることが分かる。

[0122] （４）ヒトｐＭＡＣの形態

ヒトＣＤ１４陽性単球、ｉＰＳＣ由来ミエロイド細胞、ｐＭＡＣ、ＣＤ１４陽性細胞由来マクロファージ（未刺激Ｍ０、Ｍ１およびＭ２刺激条件）の位相差顕微鏡観察像を図１９－１に、ｉＰＳ細胞由来マクロファージ、ｐＭＡＣ、ｐＭＡＣ－ＳＩＲＰα－ＫＯ、ＣＡＲ－ｐＭＡＣ、ＣＡＲ－ｐＭＡＣ－ＳＩＲＰα－ＫＯ（未刺激Ｍ０、Ｍ１およびＭ２刺激条件）の位相差顕微鏡観察像を図１９－２に示す。ｐＭＡＣ、ｐＭＡＣ－ＳＩＲＰα－ＫＯ、ＣＡＲ－ｐＭＡＣ、ＣＡＲ－ｐＭＡＣ－ＳＩＲＰα－ＫＯはＳＩＲＰαの欠損やＣＡＲ導入による細胞形態の変化は見られず、図１９－１に示す採血由来ＣＤ１４陽性細胞由来マクロファージの示す突起を持った歪な形態を有していることが分かる。

[0123] （５）ヒトｐＭＡＣの細胞増殖

遺伝子導入後、２週間以上培養を継続した後のヒトｐＭＡＣ、ｐＭＡＣ－ＳＩＲＰα－ＫＯ、比較対照としてｉＰＳ細胞由来マクロファージのＧＭ－ＣＳＦおよびＭ－ＣＳＦによる細胞増殖をＭＴＴアッセイによって調べた。ｐＭＡＣ、ｐＭＡＣ－ＳＩＲＰα－ＫＯを回収して９６穴組織培養プレート

に播種し（３×１０^{3}細胞／ｗｅｌｌ）培養を行った。そして、培養液中にＧＭ－ＣＳＦおよびＭ－ＣＳＦが含まれている場合と含まれていない場合とで増殖の速度を比較した。

図２０にＭＴＴアッセイの測定結果を示す。ヒトｐＭＡＣおよびｐＭＡＣ－ＳＩＲＰα－ＫＯの増殖には培養液中に５０ｎｇ／ｍＬ程度のＧＭ－ＣＳＦまたはＭ－ＣＳＦが必要であった。また、ＧＭ－ＣＳＦとＭ－ＣＳＦを併用することで、増殖を促進する効果があった。一方で、ｉＰＳ細胞由来マクロファージではサイトカインに依存した細胞増殖は見られず、ｐＭＡＣは高い細胞増殖能を有することが分かる。

[0124] （６）ヒトＣＡＲ－ｐＭＡＣの細胞表面抗原分析

ヒトｐＭＡＣ、ｐＭＡＣ－ＳＩＲＰα－ＫＯ、ＣＡＲ－ｐＭＡＣ、ＣＡＲ－ｐＭＡＣ－ＳＩＲＰα－ＫＯにおけるｔｄＴｏｍａｔｏ、ＧＣ３３ζＣＡＲ、ＳＩＲＰαの発現をフローサイトメーターで調べた。レンチウイルスベクターに組込んだＧＣ３３ζＣＡＲ　ｃＤＮＡ３’末端側の核酸配列に、Ｔ２Ａ配列を介して蛍光タンパク質であるｔｄＴｏｍａｔｏを発現させた。また、ＣＡＲの標的抗原であるＦＩＴＣ標識ヒトグリピカン３（ｈＧＰＣ３）を細胞サンプルに添加した。これにより、ＣＡＲの発現をｔｄＴｏｍａｔｏとｈＧＰＣ３－ＦＩＴＣの蛍光を指標としてフローサイトメーターにより解析することが可能になる。図２１に、ヒトｐＭＡＣ、ｐＭＡＣ－ＳＩＲＰα－ＫＯ、ＣＡＲ－ｐＭＡＣ、ＣＡＲ－ｐＭＡＣ－ＳＩＲＰα－ＫＯにおけるＧＣ３３ζＣＡＲの発現をフローサイトメーターで調べた結果を示す。ｐＭＡＣおよびｐＭＡＣ－ＳＩＲＰα－ＫＯと比較して、ＣＡＲ－ｐＭＡＣおよびＣＡＲ－ｐＭＡＣ－ＳＩＲＰα－ＫＯはｈＧＰＣと抗原特異的に結合していることが分かる。また、ｐＭＡＣおよびＣＡＲ－ｐＭＡＣと比較して、ｐＭＡＣ－ＳＩＲＰα－ＫＯおよびＣＡＲ－ｐＭＡＣ－ＳＩＲＰα－ＫＯはＳＩＲＰαの発現が低下していることが分かる。各サイトグラムから作製した各種細胞は単一の細胞集団であることが分かり、不純物となる細胞がほとんど含まれておらず純度の高い細胞であると言える。

[0125] （７）ヒトＣＡＲ－ｐＭＡＣによるサイトカイン産生

実施例８（１）で作製したヒトＣＤ１４単球由来マクロファージＭ０型、ヒトｉＰＳ細胞由来マクロファージ、および実施例６（２）で作製したヒトｐＭＡＣ、ｐＭＡＣ－ＳＩＲＰα－ＫＯ、および実施例７（２）で作製したＣＡＲ－ｐＭＡＣ、ＣＡＲ－ｐＭＡＣ－ＳＩＲＰα－ＫＯを（２×１０^{5}細胞）を４８穴組織培養プレートに播種し、５０ｎｇ／ｍＬ　インターフェロンγ（ＢｉｏＬｅｇｅｎｄ）、５０ｎｇ／ｍＬ　ＬＰＳ（富士フイルム和光純薬）の存在下で４８時間培養することでＭ１型を誘導した。同様にして、５０ｎｇ／ｍＬ　ＩＬ－４（ＢｉｏＬｅｇｅｎｄ）の存在下で４８時間培養することでＭ２型を誘導した。得られた培養上清を用いて、Ｍ１またはＭ２型のマーカーとして知られるＩＬ－６、ＴＮＦα、ＩＬ－１２、ＩＬ－１０の産生を定量した（図２２）。インターフェロンγおよびＬＰＳ刺激によって、ｐＭＡＣ、ｐＭＡＣ－ＳＩＲＰα－ＫＯ、ＣＡＲ－ｐＭＡＣ、ＣＡＲ－ｐＭＡＣ－ＳＩＲＰα－ＫＯはＩＬ－６、ＴＮＦα、ＩＬ－１０の産生が誘導されることが分かる。一方で、ＩＬ－１２の産生は検出されなかった。

[0126] （８）ヒトＣＡＲ－ｐＭＡＣの細胞遊走能

ヒトＣＡＲ－ｐＭＡＣ－ＳＩＲＰα－ＫＯの細胞遊走能を調べるために、ウシフィブロネクチン（富士フイルム和光純薬）をコートしたボイデンチャンバー型（トランスウェル型）の１６穴プレートＣＩＭ－Ｐｌａｔｅ　１６（Ａｇｉｌｅｎｔ）のＬｏｗｅｒ　ｃｈａｍｂｅｒに、がん細胞の培養上清またはリコンビナントケモカインを添加した１０％ＦＣＳ含有ＲＰＭＩ－１６４０培地１６０μＬを加えて、Ｕｐｐｅｒ　ｃｈａｍｂｅｒにＧＭ－ＣＳＦおよびＭ－ＣＳＦを含む２０％ＦＣＳ含有αＭＥＭでヒトＣＡＲ－ｐＭＡＣ－ＳＩＲＰα－ＫＯ（３×１０^{5}細胞）を播種して、３７℃、５％CO_2で培養した。Ｌｏｗｅｒ　ｃｈａｍｂｅｒの誘因因子によりＵｐｐｅｒ　ｃｈａｍｂｅｒのＣＡＲ－ｐＭＡＣはトランスウェルの細孔を通って、メンブレン裏面の電極センサーに吸着することで電気抵抗値が増加する。この電気抵抗値をｘＣＥＬＬｉｇｅｎｃｅ　ＲＴＣＡ　ＤＰ システム（Ａｇｉｌｅｎｔ

）によって測定することでＣＡＲ－ｐＭＡＣの細胞遊走を評価できる。

ヒトがん細胞培養上清を調製するために、ヒトＨｅｐＧ２、ＪＨＨ－７、ＫＯＣ７ｃ細胞（それぞれ２×１０^{6}細胞）、ＳＫ－Ｈｅｐ１（５×１０^{5}細胞）を６穴組織培養プレートに播種した。翌日に新鮮な１０％ＦＣＳ含有ＲＰＭＩ－１６４０培地２ｍＬに交換してさらに２４時間培養して培養上清を調製した。正常細胞としてＨＥＫ２９３（５×１０^{5}細胞）を用いて培養上清を調製した。

がん細胞の培養上清に対するヒトＣＡＲ－ｐＭＡＣ－ＳＩＲＰα－ＫＯの細胞遊走能を測定した結果を図２３に示す。ヒトがん細胞ＨｅｐＧ２、ＳＫ－Ｈｅｐ１、ＪＨＨ－７の培養上清に対してＣｅｌｌ　Ｉｎｄｅｘ値が上昇し、ヒトＣＡＲ－ｐＭＡＣ－ＳＩＲＰα－ＫＯが遊走能を有することが分かる。がん細胞ＫＯＣ７ｃに対する遊走能は低く、Ｃｅｌｌ　Ｉｎｄｅｘ値は正常細胞ＨＥＫ２９３と同程度であった（図２３上段左）。また、細胞遊走の阻害剤として知られるサイトカラシンＤ（富士フイルム和光純薬）または、Ｐｅｒｔｕｓｓｉｓ　Ｔｏｘｉｎ（富士フイルム和光純薬）２００ｎｇ／ｍＬ存在下で培養したＣＡＲ－ｐＭＡＣ－ＳＩＲＰα－ＫＯは、がん細胞ＭＣ３８の培養上清に対するＣｅｌｌ　Ｉｎｄｅｘ値の上昇が、サイトカラシンＤ（ＣｙｔＤ）によって一部低下し、Ｐｅｒｔｕｓｓｉｓ　Ｔｏｘｉｎ（ＰＴＸ）によって完全に抑制された（図２３上段中央）。がん細胞の培養上清に対するヒトｉＰＳ－ｍａｃｒｏｐｈａｇｅの細胞遊走能を測定した結果、がん細胞ＨｅｐＧ２、ＳＫ－Ｈｅｐ１、ＫＯＣ７ｃのいずれも陰性対照であるＭｅｄｉｕｍおよび正常細胞ＨＥＫ２９３と同程度のＣＩ値を示した（図２３上段右）。以上の結果から、ＣＡＲ－ｐＭＡＣ－ＳＩＲＰα－ＫＯは複数のがん細胞が産生する誘因因子に対して、ｉＰＳ－ｍａｃｒｏｐｈａｇｅよりも高い細胞遊走能を有することが分かる。

続いて、リコンビナントケモカインに対するＣＡＲ－ｐＭＡＣ－ＳＩＲＰα－ＫＯの細胞遊走能を調べるために、誘因因子の候補としてヒトリコンビナントケモカインＣＣＬ２（ＢｉｏＬｅｇｅｎｄ）、ＣＣＬ３（ＢｉｏＬｅ

ｇｅｎｄ）、ＣＣＬ３ＬＩ（ＢｉｏＬｅｇｅｎｄ）、ＣＣＬ４（ＢｉｏＬｅｇｅｎｄ）、ＣＣＬ５（ＢｉｏＬｅｇｅｎｄ）、ＣＣＬ７（Ｒ＆Ｄ Ｓｙｓｔｅｍｓ）、ＣＣＬ８（ＢｉｏＬｅｇｅｎｄ）、ＣＣＬ１３（Ｒ＆Ｄ Ｓｙｓｔｅｍｓ）、ＣＣＬ１４（Ｎｏｖｕｓ Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌｓ）、ＣＣＬ１５（Ｒ＆Ｄ Ｓｙｓｔｅｍｓ）、ＣＣＬ２３（ＢｉｏＬｅｇｅｎｄ）、ＣＸ３ＣＬ１（Ｒ＆Ｄ Ｓｙｓｔｅｍｓ）、ＣＸＣＬ１（ＢｉｏＬｅｇｅｎｄ）、ＣＸＣＬ２（ＢｉｏＬｅｇｅｎｄ）、ＣＸＣＬ５（ＢｉｏＬｅｇｅｎｄ）、ＣＸＣＬ１２ＳＤＦ－１α（ＢｉｏＬｅｇｅｎｄ）、ＣＸＣＬ１２ＳＤＦ－１β（ＢｉｏＬｅｇｅｎｄ）をいずれも１００ｎｇ／ｍＬの濃度で用いた。

ヒトリコンビナントケモカインに対するヒトＣＡＲ－ｐＭＡＣ－ＳＩＲＰα－ＫＯの細胞遊走能を評価した結果、ＣＣＬ２、ＣＣＬ３ＬＩ、ＣＣＬ５、ＣＣＬ７、ＣＣＬ２３および、ＳＤＦ－１α（ＣＸＣＬ１２）に対して応答することが分かる。（図２３上から２段目および３段目）。さらに、がん細胞ＨｅｐＧ２の培養上清に対するＣＡＲ－ｐＭＡＣ、ＣＡＲ－ｐＭＡＣ－ＳＩＲＰα－ＫＯの細胞遊走を調べた（図２３最下段）。ＳＩＲＰαの欠損により野生型ｉＰＳ細胞に由来するＣＡＲ－ｐＭＡＣと比較して、ＣＡＲ－ｐＭＡＣ－ＳＩＲＰα－ＫＯは細胞遊走能が向上することが分かる。

[0127] （９）ヒトＣＡＲ－ｐＭＡＣのサイトカイン産生（がん細胞との共培養）

ヒトｐＭＡＣ、ｐＭＡＣ－ＳＩＲＰα－ＫＯ、ＣＡＲ－ｐＭＡＣ、ＣＡＲ－ｐＭＡＣ－ＳＩＲＰα－ＫＯ（いずれも２×１０^{5}細胞）を４８穴組織培養プレートに１０％ＦＣＳ含有ＲＰＭＩ－１６４０を用いて播種し、３７℃、５％CO_2で４８時間培養した。得られた培養上清を用いて、ＩＬ－６、ＴＮＦα、ＩＬ－１０、ＩＬ－１２の産生を定量した（図２４－１）。また、培養がん抗原ｈＧＰＣ３発現または非発現がん細胞とヒトｐＭＡＣ、ｐＭＡＣ－ＳＩＲＰα－ＫＯ、ＣＡＲ－ｐＭＡＣ、ＣＡＲ－ｐＭＡＣ－ＳＩＲＰα－ＫＯを共培養してサイトカイン産生を評価した。ヒトがん細胞ｈＧＰＣ３導入または非発現ＳＫ－Ｈｅｐ１、ｈＧＰＣ３発現または欠損ＪＨＨ－７（い

ずれも５×１０^{4}細胞）と、ヒトｐＭＡＣ、ｐＭＡＣ－ＳＩＲＰα－ＫＯ、ＣＡＲ－ｐＭＡＣ、ＣＡＲ－ｐＭＡＣ－ＳＩＲＰα－ＫＯ（いずれも２×１０^{5}細胞）を共培養して得られた培養上清を用いて、ＩＬ－６（図２４－２）、ＴＮＦα（図２４－３）、ＩＬ－１０（図２４－２）、ＩＬ－１２（図２４－３）の産生を定量した。

ヒトＣＡＲ－ｐＭＡＣ、ＣＡＲ－ｐＭＡＣ－ＳＩＲＰα－ＫＯは、ＣＡＲの導入によって、ＩＬ－６、ＴＮＦα、ＩＬ－１０を産生することが分かる。がん細胞ヒトがん細胞ｈＧＰＣ３導入または非発現ＳＫ－Ｈｅｐ１、ｈＧＰＣ３発現または欠損ＪＨＨ－７との共培養によって抗原特異的なサイトカイン産生の誘導は見られないことが分かる。ＩＬ－１２は検出されなかった。

[0128] （１０）ヒトＣＡＲ－ｐＭＡＣによるがん細胞の傷害性

９６穴組織培養プレートにエフェクター細胞としてヒトｐＭＡＣ、ＣＡＲ－ｐＭＡＣ、ｐＭＡＣ－ＳＩＲＰα－ＫＯ、ＣＡＲ－ｐＭＡＣ－ＳＩＲＰα－ＫＯ（３×１０^{4}細胞／ｗｅｌｌ）を播種し、１０％ＦＢＳ含有ＲＰＭＩ－１６４０を用いてターゲット細胞であるルシフェラーゼ遺伝子を導入したがん細胞ＪＨＨ７－Ｌｕｃ、ＳＫ－Ｈｅｐ１－ＧＰＣ３－Ｌｕｃ－Ｖｅｎｕｓ、ＫＯＣ７ｃ－ＧＰＣ３－Ｌｕｃ（３×１０^{3}細胞／ｗｅｌｌ）と２日間共培養を行った。ＣＡＲ標的抗原に特異的ながん細胞の貪食を評価するために、がん抗原ｈＧＰＣ３を内在性に発現する、あるいは遺伝子導入したがん細胞を使用した。共培養後の９６穴組織培養プレートにルシフェラーゼの基質であるＢｒｉｇｈｔ－Ｇｌｏ　Ｌｕｃｉｆｅｒａｓｅ　Ａｓｓａｙ（Ｐｒｏｍｅｇａ）を添加することで得られる生物発光を定量することによりターゲット細胞の生存を調べた結果を図２５に示す。ｐＭＡＣ、ＣＡＲ－ｐＭＡＣ、ｐＭＡＣ－ＳＩＲＰα－ＫＯとの共培養ではターゲット細胞の殺細胞効果は２０～４０％程度であったが、ＣＡＲ－ｐＭＡＣ－ＳＩＲＰα－ＫＯとの共培養では６０～９０％程度まで向上することが分かる。また、ＣＡＲ－ｐＭＡＣ－ＳＩＲＰα－ＫＯによる殺細胞効果はｈＧＰＣ３非発現のターゲット

細胞ＳＫ－Ｈｅｐ１－ｍｏｃｋ－Ｌｕｃ－Ｖでは見られないことから、ＣＡＲ－ｐＭＡＣ－ＳＩＲＰα－ＫＯは標的抗原に特異的ながん細胞の貪食能を有することが分かる。

[0129] （１１）ヒトＣＡＲ－ｐＭＡＣ－ＳＩＲＰα－ＫＯのがん細胞傷害性（リアルタイム計測）

ヒトＣＡＲ－ｐＭＡＣ－ＳＩＲＰα－ＫＯをエフェクター細胞として用いて、ヒトがん細胞に対する傷害性をｘＣＥＬＬｉｇｅｎｃｅ　ＲＴＣＡ　ＤＰシステムで評価した（図２６－１および図２６－２）。ｈＧＰＣ３導入または非発現ＳＫ－Ｈｅｐ１（５×１０^{4}細胞）をＥ－Ｐｌａｔｅ１６に播種して３７℃、５％CO_2で２４時間培養後、ヒトＣＡＲ－ｐＭＡＣ－ＳＩＲＰα－ＫＯをＥ：Ｔ比＝１：１、５：１、１０：１となるように加えて共培養を行った。ヒトＣＡＲ－ｐＭＡＣ－ＳＩＲＰα－ＫＯはｈＧＰＣ３発現とＥ：Ｔ比が高くなるにつれて、優れた細胞傷害活性を示すことが分かる。がん細胞とＣＡＲ－ｐＭＡＣ－ＳＩＲＰα－ＫＯを共培養することでがん細胞の生存を示す接着シグナル（Ｃｅｌｌ　Ｉｎｄｅｘ値；ＣＩ値）と、がん細胞単独培養した場合で標準化したがん細胞の細胞傷害活性（％Ｃｙｔｏｌｙｓｉｓ）の経時変化を図２６－２に示す。がん抗原ｈＧＰＣ３の発現と、ＣＡＲ－ｐＭＡＣ－ＳＩＲＰα－ＫＯの細胞数（Ｅ：Ｔ比）に依存して、経時的にがん細胞のＣＩ値が低下して、％Ｃｙｔｏｌｙｓｉｓが上昇していくことが分かる。

[0130] （１２）ＣＡＲ－ｐＭＡＣによる細胞傷害性におけるＳＩＲＰα遺伝子欠損、またはＧＣ３３－ζ-ＣＡＲ導入の重要性の検討

ＣＡＲ－ｐＭＡＣによるがん細胞傷害性におけるＳＩＲＰα遺伝子欠損、またはＧＣ３３－ζ-ＣＡＲ導入の重要性を検討するために、エフェクター細胞としてヒトｐＭＡＣ、ｐＭＡＣ－ＳＩＲＰα－ＫＯ、ＣＡＲ－ｐＭＡＣ、ＣＡＲ－ｐＭＡＣ－ＳＩＲＰα－ＫＯを用いてＥ：Ｔ比１０：１でのがん細胞傷害性をｘＣＥＬＬｉｇｅｎｃｅ　ＲＴＣＡ　ＤＰシステムで評価した。

ヒトがん細胞ｈＧＰＣ３導入または非発現ＳＫ－Ｈｅｐ１（５×１０^{4}細胞

）をＥ－Ｐｌａｔｅ１６に播種して、３７℃、２４時間培養した後、エフェクター細胞ヒトｐＭＡＣ、ｐＭＡＣ－ＳＩＲＰα－ＫＯ、ＣＡＲ－ｐＭＡＣ、ＣＡＲ－ｐＭＡＣ－ＳＩＲＰα－ＫＯ（５×１０^{5}細胞）を加えて共培養を行った。ｈＧＰＣ３導入ＳＫ－Ｈｅｐ１に対して、ＧＣ３３－ζ－ＣＡＲ導入によって細胞傷害活性（％Ｃｙｔｏｌｙｓｉｓ）が向上することが分かる（図２７上段左）。がん抗原ｈＰＧＣ３を発現しないＳＫ－Ｈｅｐ１に対する細胞傷害活性と比較して、顕著に高いことが分かる（図２７上段右）。がん細胞とヒトｐＭＡＣ、ｐＭＡＣ－ＳＩＲＰα－ＫＯ、ＣＡＲ－ｐＭＡＣ、ＣＡＲ－ｐＭＡＣ－ＳＩＲＰα－ＫＯを共培養することでがん細胞の生存を示す接着シグナル（Ｎｏｒｍａｌｉｚｅｄ　Ｃｅｌｌ　Ｉｎｄｅｘ値；ＣＩ値）と、がん細胞単独培養した場合で標準化したがん細胞の細胞傷害活性（％Ｃｙｔｏｌｙｓｉｓ）の経時変化を図２７中段および下段に示す。ＧＣ３３－ζ－ＣＡＲ導入とＳＩＲＰα欠損によって、経時的ながん細胞のＣＩ値の低下と、％Ｃｙｔｏｌｙｓｉｓの上昇が最も顕著に見られた。

産業上の利用可能性

[0131] 本発明の方法によれば、品質安定性と安定供給、経済性に優れた新規なＣＡＲ搭載プラットフォームを提供することができる。新規なＣＡＲ搭載プラットフォームは、増殖性マクロファージ様細胞（ｐＭＡＣ）を用いる。ＣＡＲ搭載ｐＭＡＣは、固形癌治療にも効果を示す。

本出願は、日本で出願された特願２０２２－１２７４７７（出願日：２０２２年８月９日）を基礎としておりその内容は本明細書に全て包含されるものである。

請求の範囲

[請求項1] サイトカイン依存的に増殖することを特徴とする、増殖性マクロファージ様細胞（ｐＭＡＣ；ｐｒｏｌｉｆｅｒａｔｉｎｇ Ｍａｃｒｏｐｈａｇｅ－ｌｉｋｅ ｃｅｌｌ）。

[請求項2] サイトカインが顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（ＧＭ－ＣＳＦ）および／またはマクロファージコロニー刺激因子（Ｍ－ＣＳＦ）である、請求項１記載のｐＭＡＣ。

[請求項3] ＣＤ１４およびＣＤ８３が陰性である、請求項１記載のｐＭＡＣ。

[請求項4] マクロファージ様機能を阻害する遺伝子が欠損または発現抑制されていることを特徴とする、請求項１記載のｐＭＡＣ。

[請求項5] 前記マクロファージ様機能を阻害する遺伝子が、シグナル制御タンパク質α（ＳＩＲＰα）遺伝子である、請求項４記載のｐＭＡＣ。

[請求項6] 前記ｐＭＡＣが、さらにキメラ抗原受容体（ＣＡＲ）を含む、請求項１～５のいずれか１項に記載のｐＭＡＣ。

[請求項7] マクロファージ様機能を阻害する遺伝子を欠損または発現抑制させる工程、および増殖性を付加する遺伝子を発現させる工程を含む、増殖性マクロファージ様細胞（ｐＭＡＣ）の製造方法。

[請求項8] （１）多能性幹細胞において、マクロファージ様機能を阻害する遺伝子を欠損または発現抑制させた後、ミエロイド細胞への分化を誘導してマクロファージ様細胞（ＭＡＣ）を得る工程（工程１）、および
（２）工程１で得られたＭＡＣに増殖性を付加する遺伝子を発現させ増殖性マクロファージ様細胞（ｐＭＡＣ）を得る工程（工程２）
を含む、請求項７記載の製造方法。

[請求項9] （Ａ）多能性幹細胞から分化させたミエロイド細胞に増殖性を付加する遺伝子を発現させ増殖性ミエロイド細胞を得る工程（工程Ａ）、および
（Ｂ）工程Ａで得られた増殖性ミエロイド細胞において、マクロファージ様機能を阻害する遺伝子を欠損または発現抑制させた後、分化誘

導して増殖性マクロファージ様細胞（ｐＭＡＣ）を得る工程（工程Ｂ）

を含む、請求項７記載の製造方法。

[請求項10] マクロファージ様機能を阻害する遺伝子がシグナル制御タンパク質α（ＳＩＲＰα）遺伝子である、請求項７記載の製造方法。

[請求項11] 増殖性を付加する遺伝子が、ｃ－ＭＹＣ、ＢＭＩ１およびＭＤＭ２からなる群より選択される少なくとも１種である、請求項７記載の製造方法。

[請求項12] 請求項７～１１のいずれか１項に記載の製造方法により得られたｐＭＡＣにキメラ抗原受容体（ＣＡＲ）を導入する、ＣＡＲ－ｐＭＡＣの製造方法。

[請求項13] （１）多能性幹細胞において、マクロファージ様機能を阻害する遺伝子を欠損または発現抑制させた後、ミエロイド細胞への分化を誘導してマクロファージ様細胞（ＭＡＣ）を得る工程（工程１）、

（２）工程１で得られたＭＡＣに増殖性を付加する遺伝子を発現させ増殖性マクロファージ様細胞（ｐＭＡＣ）を得る工程（工程２）、および

（３）キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）を導入する工程（工程３）

を含む、ＣＡＲ－ｐＭＡＣの製造方法。

[請求項14] 工程１におけるミエロイド細胞への分化誘導が、以下（ｉ）または（ｉｉ）の方法により実施される、請求項１３記載の製造方法。

（ｉ）多能性幹細胞から誘導された胚様体（ＥＢ）を、ＶＥＧＦを含む培地中でフィーダー細胞の上で重層培養を行った後、ＶＥＧＦ、ＳＣＦおよびＴＰＯを含む培地でさらに培養すること、または

（ｉｉ）多能性幹細胞から誘導された胚様体（ＥＢ）を、ＢＭＰ－４、ＶＥＧＦおよびＳＣＦを含む培地中でフィーダー細胞なしの単層培養を行った後、さらにＶＥＧＦ、ＴＰＯおよびＧＭ－ＣＳＦを含む培地でさらに培養すること。

[請求項15] 多能性幹細胞から胚葉体（ＥＢ）への誘導が、以下（ａ）および（ｂ）の方法により実施される請求項１４記載の方法：

（ａ）多能性幹細胞を細胞塊形成培養容器に播種して胚様体（ＥＢ）を形成させ、および（ｂ）前記容器は、底に微細なスフェロイドウェルが設けられ、かつ、隣接するウェルの間に平坦な面は存在しないこと。

[請求項16] （１）多能性幹細胞において、マクロファージ様機能を阻害する遺伝子を欠損または発現抑制させる工程（工程１－１）、

工程１－１で得られたマクロファージ様機能を阻害する遺伝子を欠損または発現抑制させた多能性幹細胞を、底に微細なスフェロイドウェルが設けられ、かつ、隣接するウェルの間に平坦な面は存在しない細胞塊形成培養容器に播種して胚様体（ＥＢ）を形成させる工程（工程１－２）、

工程１－２で得られたＥＢから以下の（ｉ）または（ｉｉ）の方法によりマクロファージ様細胞（ＭＡＣ）を得る工程（工程１－３）、

（ｉ）前記ＥＢを、ＶＥＧＦを含む培地中でフィーダー細胞の上で重層培養を行った後、ＶＥＧＦ、ＳＣＦおよびＴＰＯを含む培地でさらに培養すること、または

（ｉｉ）前記ＥＢを、ＢＭＰ－４、ＶＥＧＦおよびＳＣＦを含む培地中でフィーダー細胞なしの単層培養を行った後、さらにＶＥＧＦ、ＴＰＯおよびＧＭ－ＣＳＦを含む培地でさらに培養すること、

（２）工程１－３で得られたＭＡＣに増殖性を付加する遺伝子を発現させ増殖性マクロファージ様細胞（ｐＭＡＣ）を得る工程（工程２）、および、

（３）工程２で得られたｐＭＡＣにキメラ抗原受容体（ＣＡＲ）を導入しＣＡＲ－ｐＭＡＣを得る工程（工程３）、

を含むＣＡＲ－ｐＭＡＣの製造方法。

[請求項17] マクロファージ様機能を阻害する遺伝子がシグナル制御タンパク質

α（ＳＩＲＰα）遺伝子である、請求項１３～１６のいずれか１項に記載の製造方法。

[請求項18] 増殖性を付加する遺伝子が、ｃ－ＭＹＣ、ＢＭＩ１およびＭＤＭ２からなる群より選択される少なくとも１種である、請求項１３～１６のいずれか１項に記載の製造方法。

[請求項19] ｉＰＳ細胞由来ミエロイド細胞、ｉＰＳ細胞由来マクロファージ、生体由来単球細胞、生体由来マクロファージＭ１、生体由来マクロファージＭ２および生体由来マクロファージＭ０からなるマクロファージ細胞系譜に沿った細胞群を比較対象として用いた全トランスクリプトーム解析を実施することによって得られる遺伝子発現プロファイルに基づく主成分分析を行い、寄与率の大きい上位２成分の指標を解析対象としたとき、以下の条件を満たす、増殖性マクロファージ様細胞：

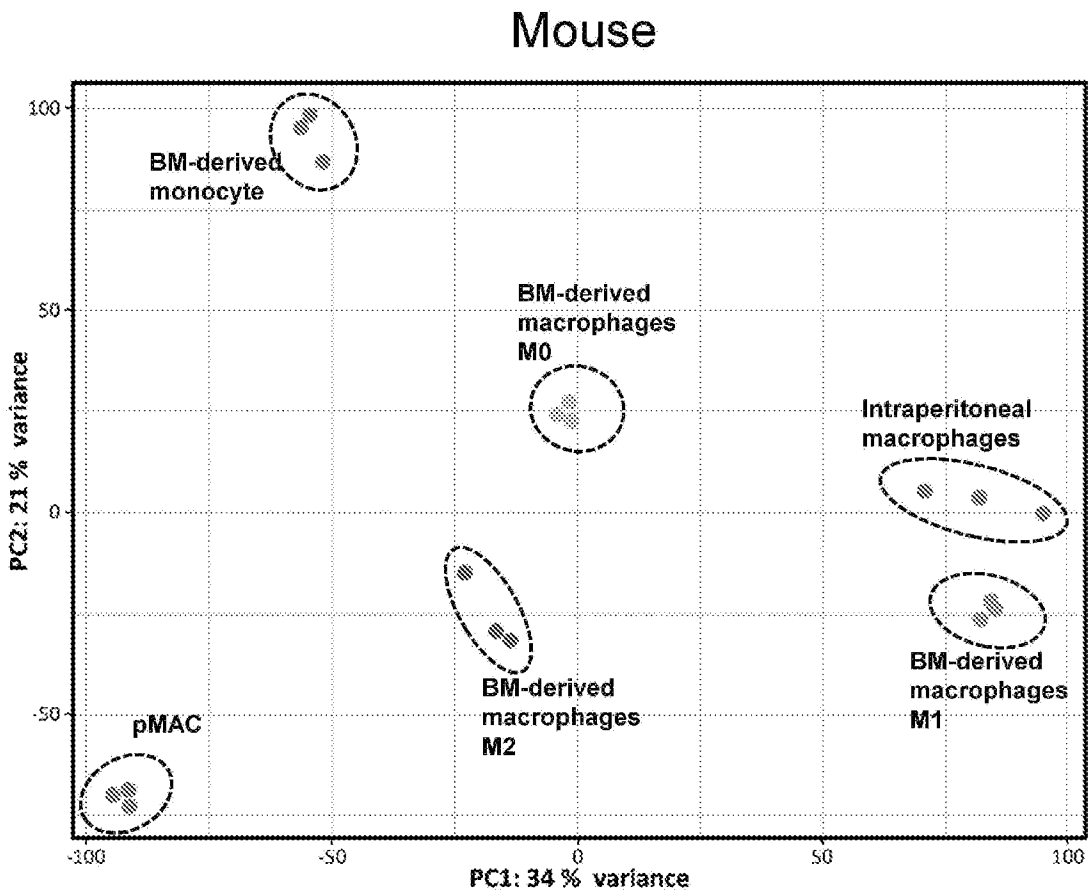
条件１：既知のマクロファージ細胞系譜のプロットと重複しない、且つ、

条件２：ＰＣ１が１００以上であり、ＰＣ２が－８０～０の範囲にプロットされる。

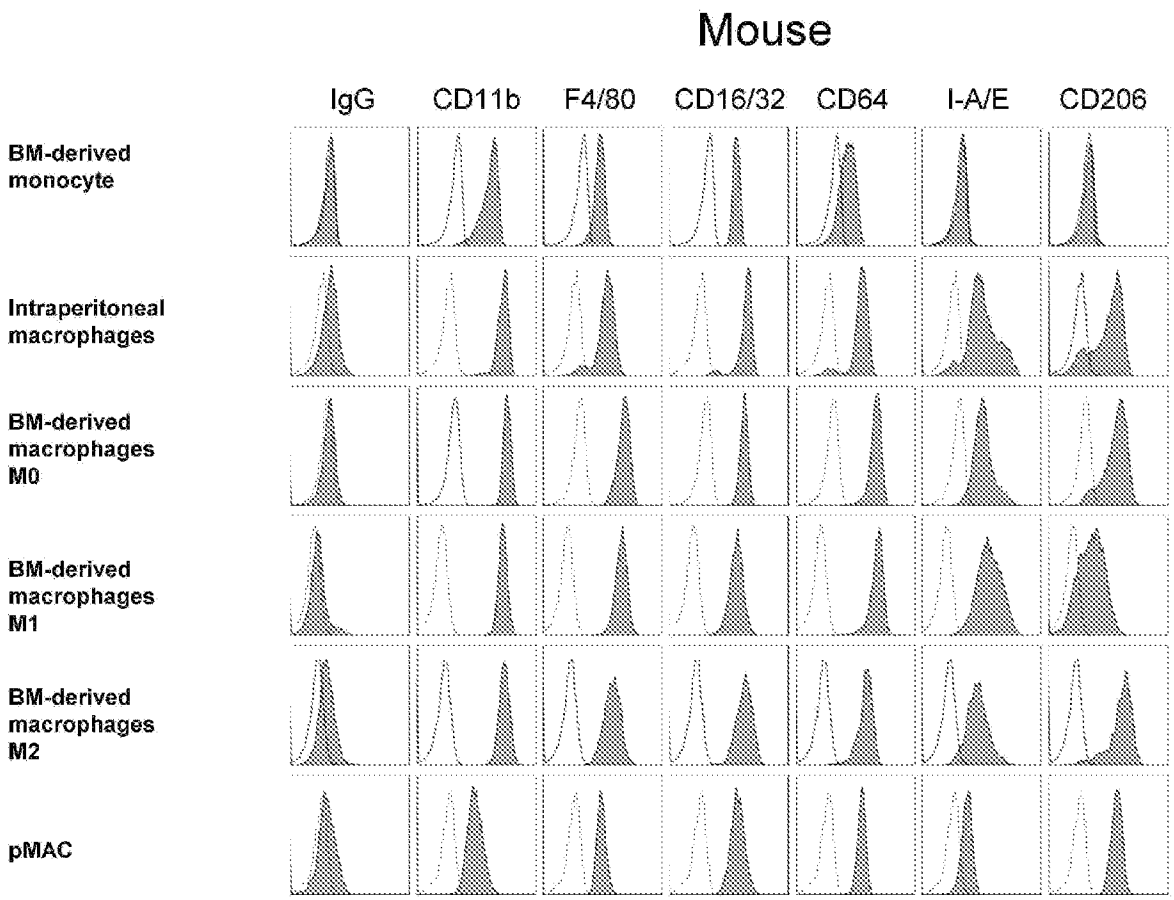
[請求項20] 請求項６記載の増殖性マクロファージ様細胞と薬学的に許容される担体とを含む医薬組成物。

[請求項21] 腫瘍またはがんと関連のある疾患、神経変性疾患、炎症性疾患、心臓血管疾患、線維性疾患、およびアミロイドーシスからなる群より選択される少なくとも１種の治療用である、請求項２０記載の医薬組成物。

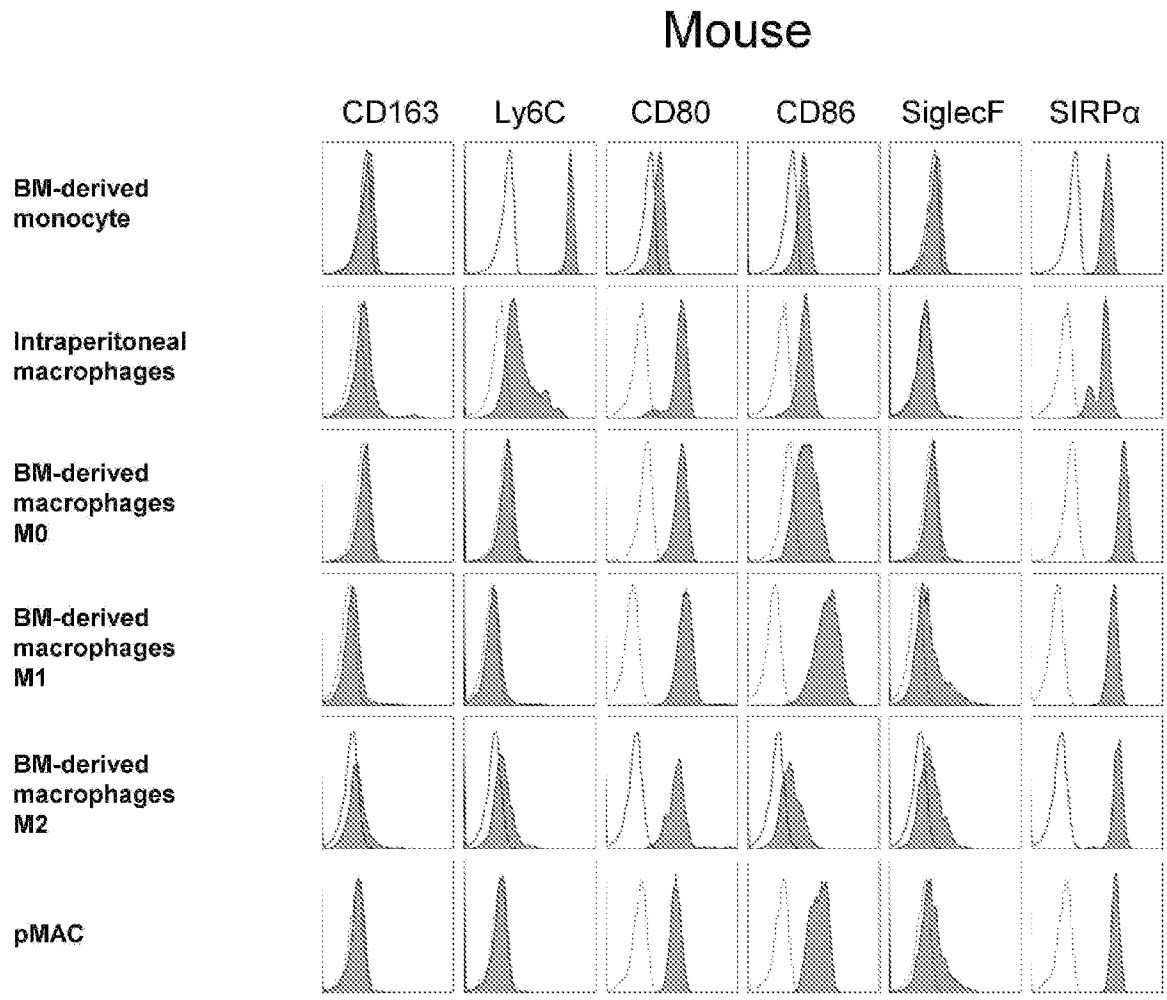
[図1]


Mouse
BM-derived monocyte
BM-derived macrophages M0
Intraperitoneal macrophages
BM-derived macrophages M2
BM-derived macrophages M1
pMAC
PC2: 21 % variance
PC1: 34 % variance
100
50
0
-50
-100
-50
0
50
100

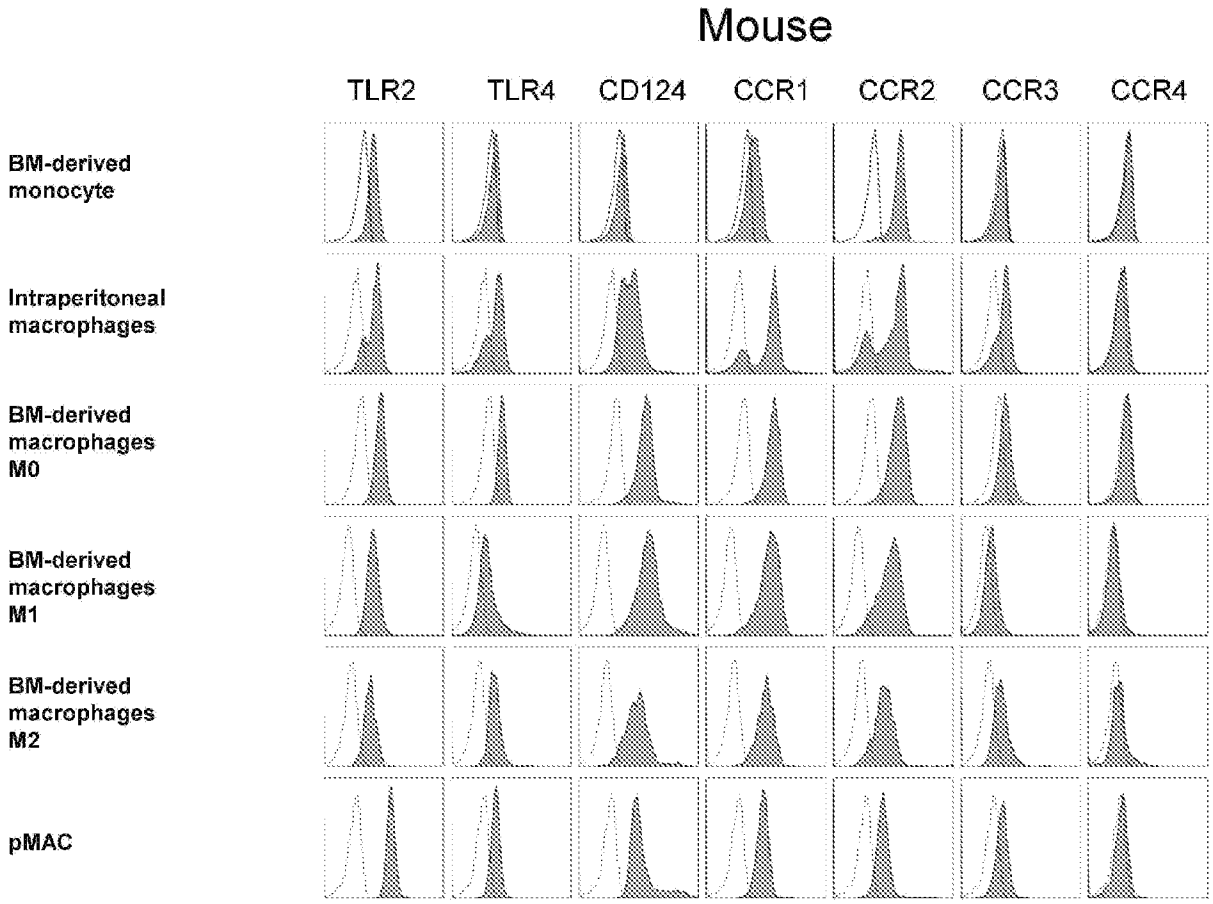
[図2-1]


Mouse
IgG
CD11b
F4/80
CD16/32
CD64
I-A/E
CD206
BM-derived monocyte
Intraperitoneal macrophages
BM-derived macrophages M0
BM-derived macrophages M1
BM-derived macrophages M2
pMAC

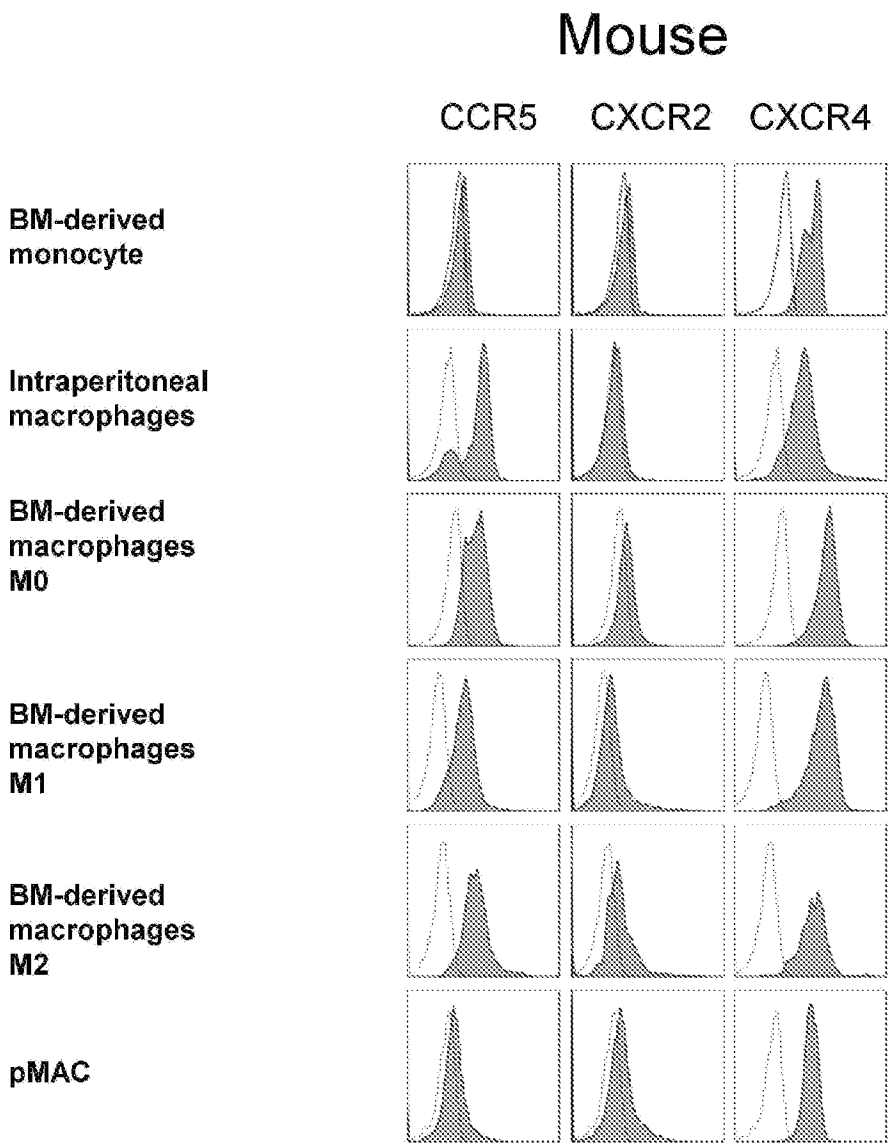
[図2-2]


Mouse
CD163
Ly6C
CD80
CD86
SiglecF
SIRPα
BM-derived monocyte
Intraperitoneal macrophages
BM-derived macrophages M0
BM-derived macrophages M1
BM-derived macrophages M2
pMAC

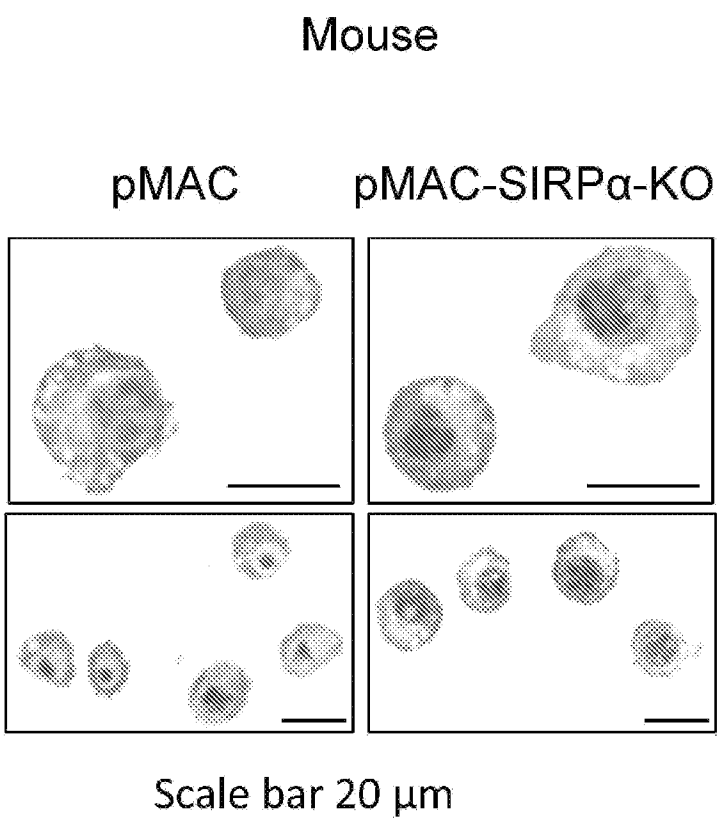
[図2-3]


Mouse
TLR2
TLR4
CD124
CCR1
CCR2
CCR3
CCR4
BM-derived monocyte
Intraperitoneal macrophages
BM-derived macrophages M0
BM-derived macrophages M1
BM-derived macrophages M2
pMAC

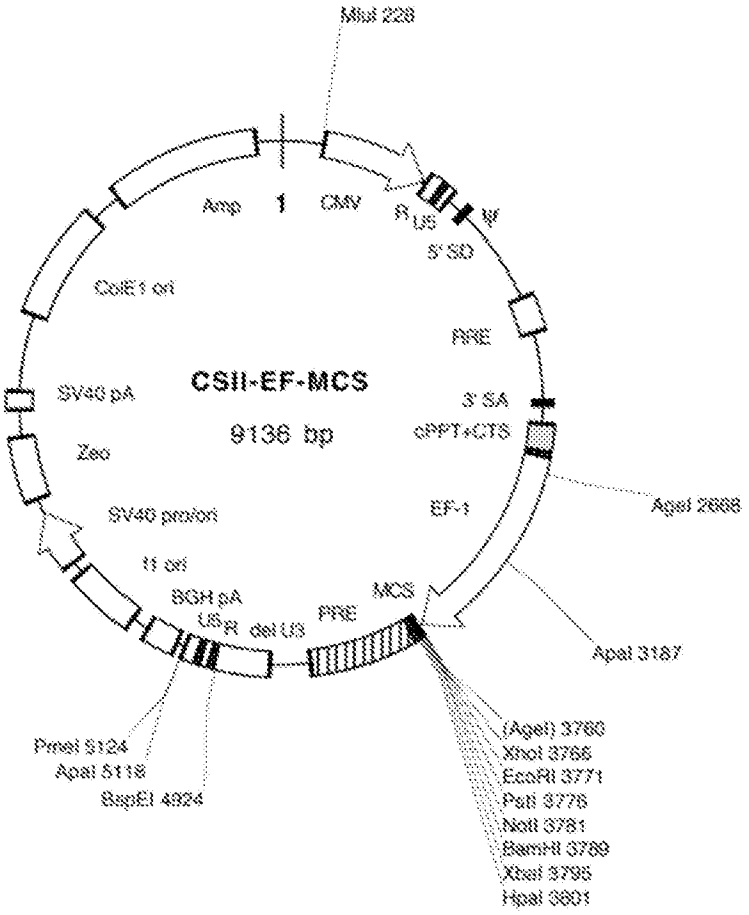
[図2-4]


Mouse
CCR5
CXCR2
CXCR4
BM-derived monocyte
Intraperitoneal macrophages
BM-derived macrophages M0
BM-derived macrophages M1
BM-derived macrophages M2
pMAC

[図3]

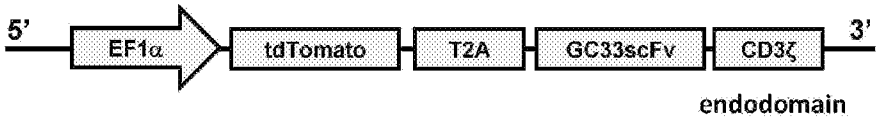


[図4]

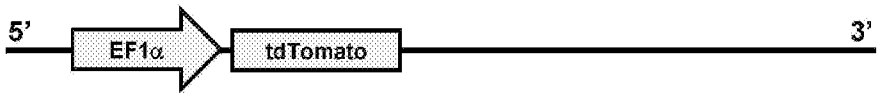


Plasmid name: CSII-EF-MCS
Plasmid size: 9136 bp

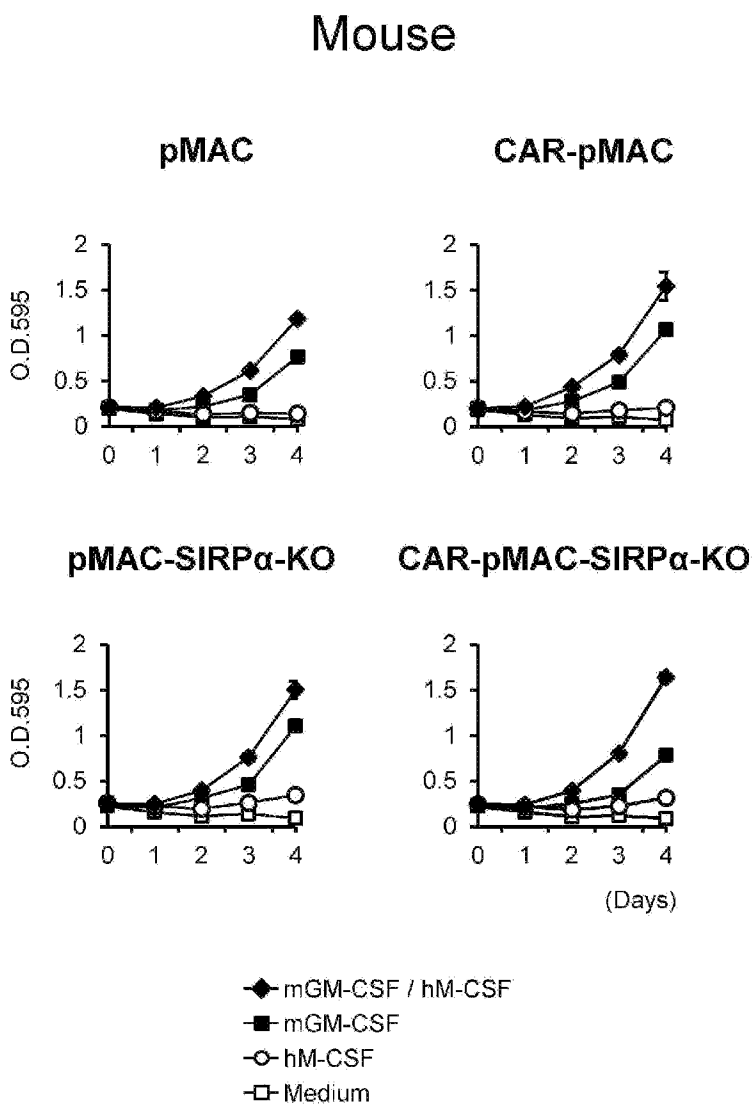
CAR- expressing construct



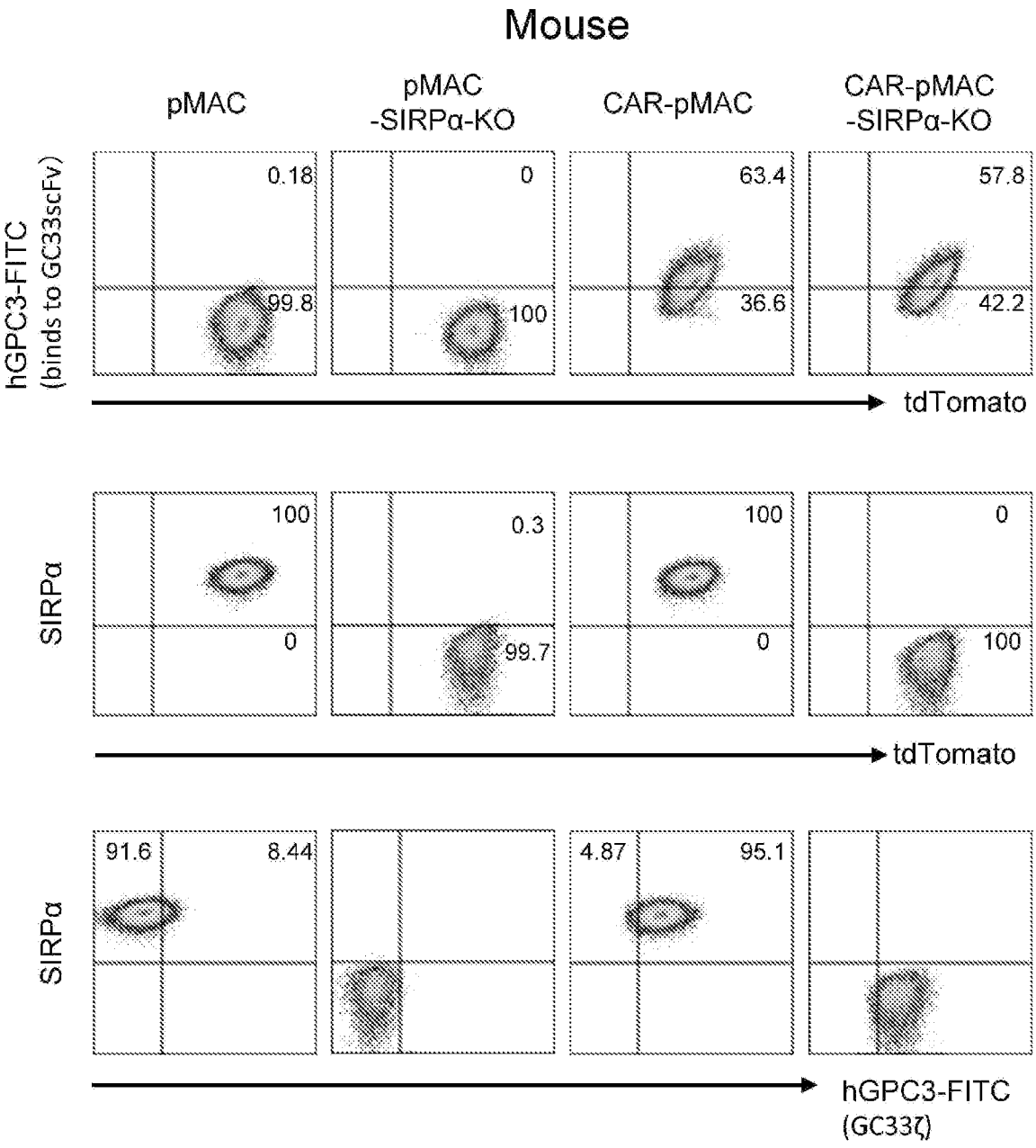
Control construct



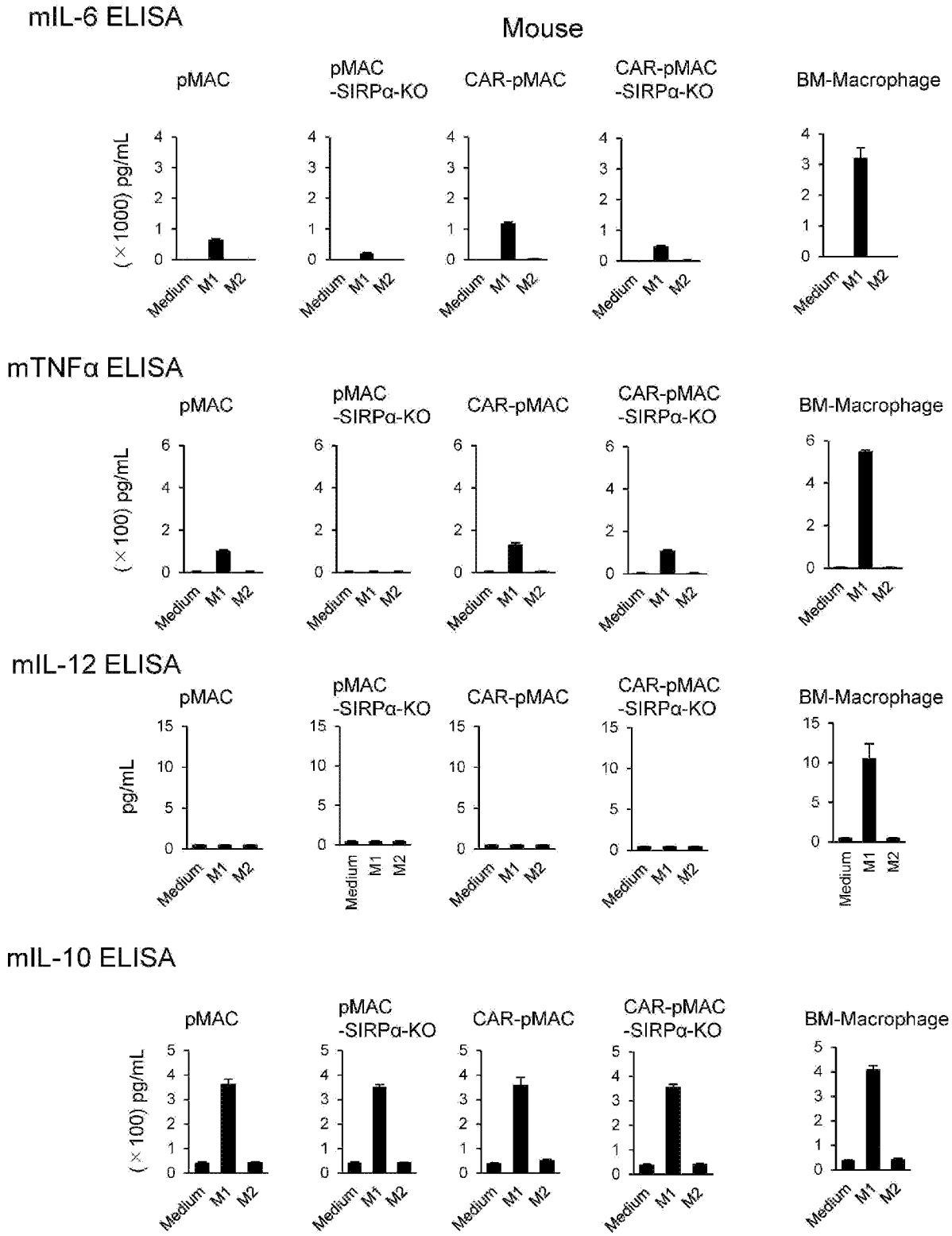
[図5]


Mouse
pMAC
CAR-pMAC
pMAC-SIRPα-KO
CAR-pMAC-SIRPα-KO
O.D.595
2
1.5
1
0.5
0
0 1 2 3 4
(Days)
mGM-CSF / hM-CSF
mGM-CSF
hM-CSF
Medium

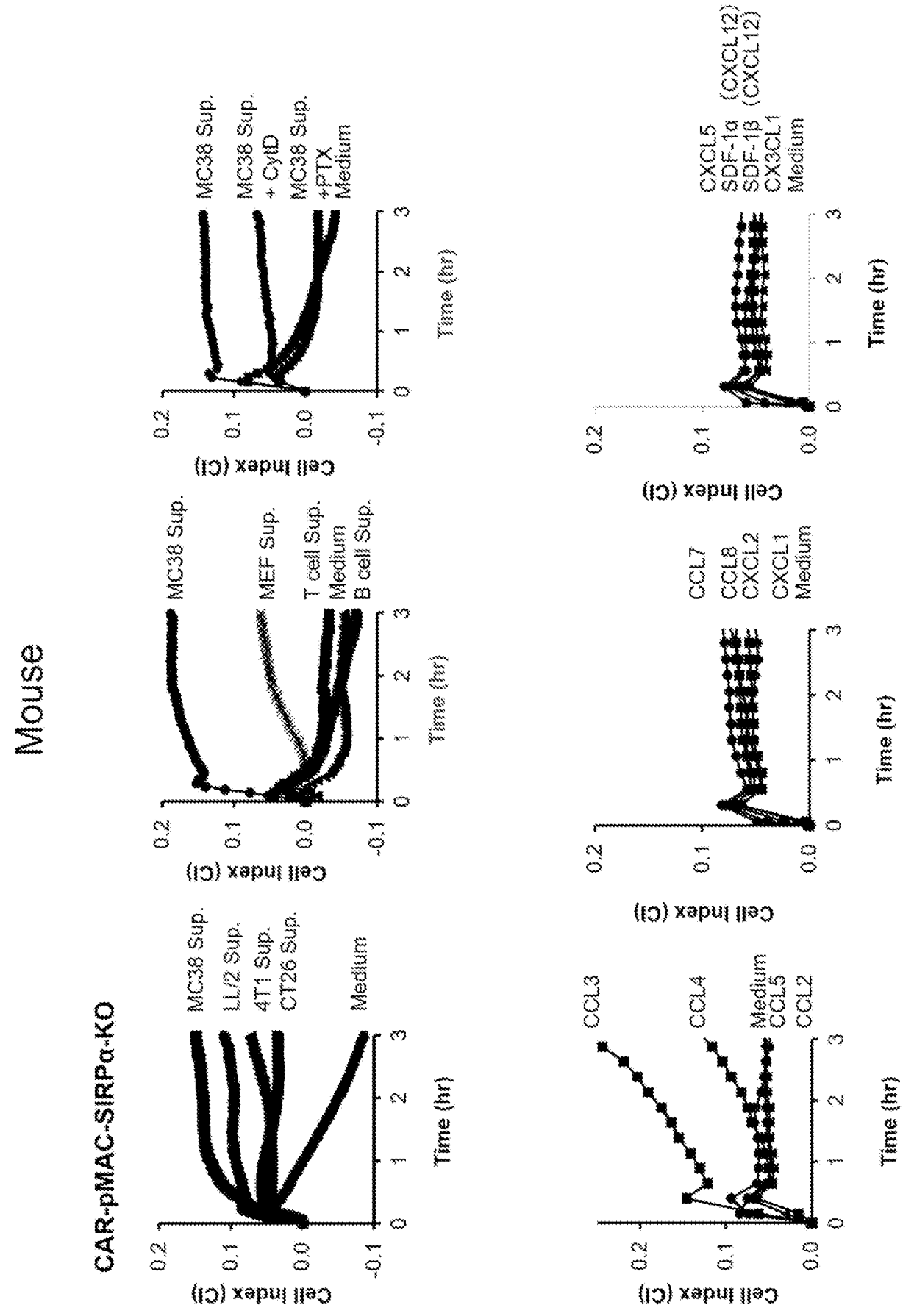
[図6]


Mouse
pMAC
pMAC -SIRPα-KO
CAR-pMAC
CAR-pMAC -SIRPα-KO
hGPC3-FITC (binds to GC33scFv)
0.18
99.8
0
100
63.4
36.6
57.8
42.2
tdTomato
SIRPα
100
0
0.3
99.7
100
0
0
100
tdTomato
SIRPα
91.6
8.44
4.87
95.1
hGPC3-FITC (GC33ζ)

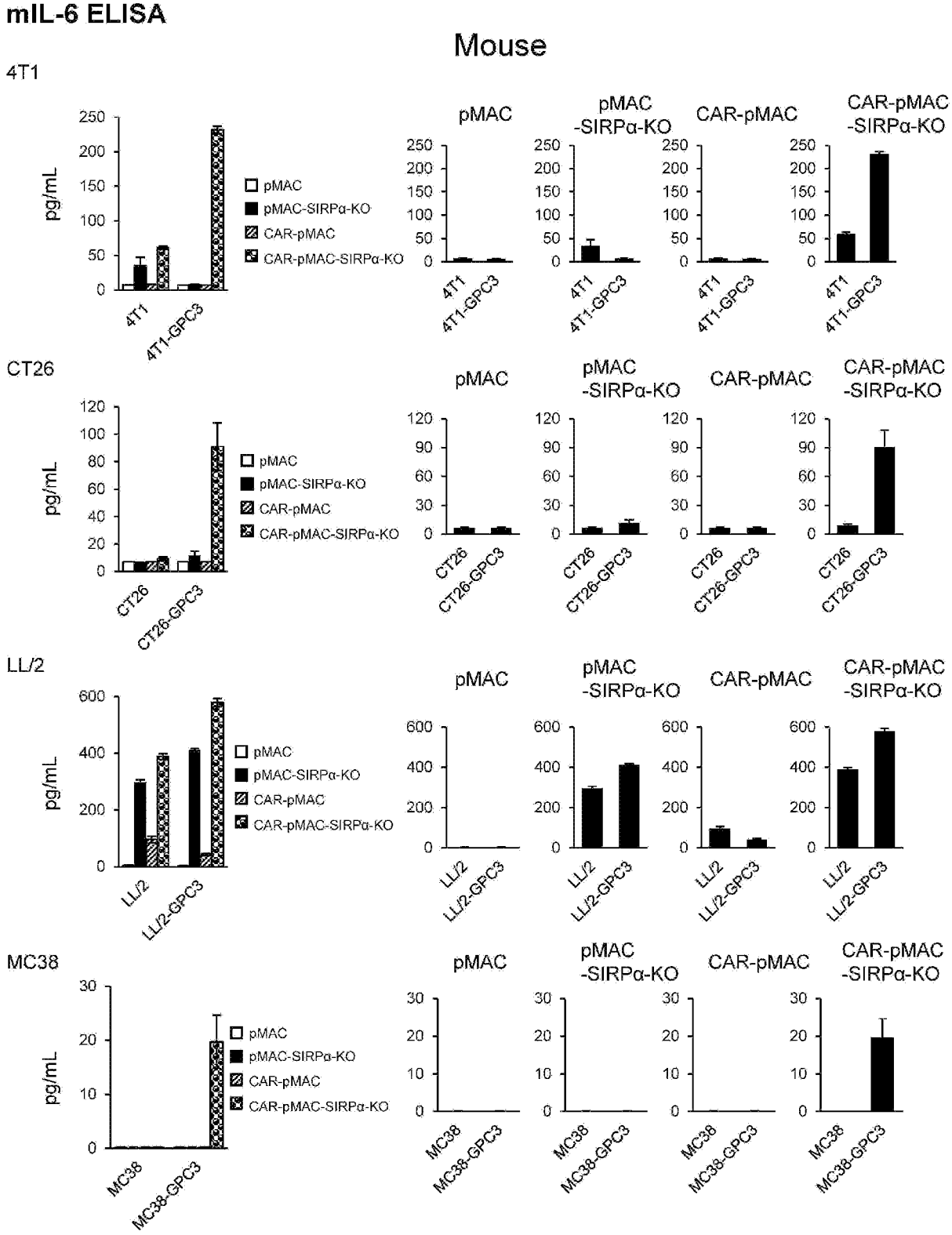
[図7]


mIL-6 ELISA
Mouse
pMAC
pMAC -SIRPα-KO
CAR-pMAC
CAR-pMAC -SIRPα-KO
BM-Macrophage
(×1000) pg/mL
Medium
M1
M2
mTNFα ELISA
(×100) pg/mL
mIL-12 ELISA
pg/mL
mIL-10 ELISA
(×100) pg/mL

[図8]

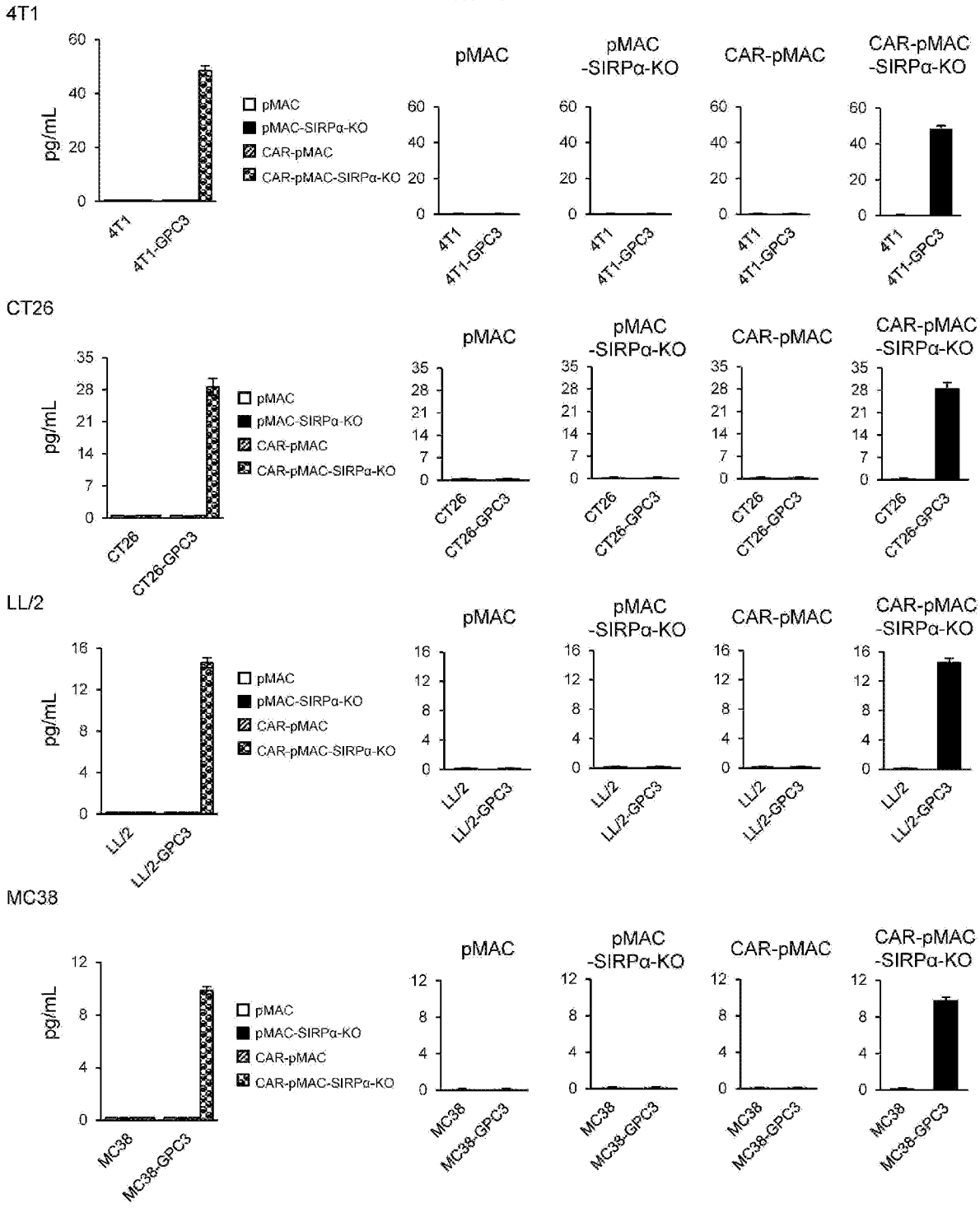

Mouse
CAR-pMAC-SIRPα-KO
Cell Index (CI)
Time (hr)
MC38 Sup.
LL/2 Sup.
4T1 Sup.
CT26 Sup.
Medium
MC38 Sup.
MEF Sup.
T cell Sup.
Medium
B cell Sup.
MC38 Sup.
MC38 Sup. + CytD
MC38 Sup. +PTX
Medium
CCL3
CCL4
Medium
CCL5
CCL2
CCL7
CCL8
CXCL2
CXCL1
Medium
CXCL5
SDF-1α (CXCL12)
SDF-1β (CXCL12)
CX3CL1
Medium

[図9-1]


mIL-6 ELISA
Mouse
4T1
CT26
LL/2
MC38
pg/mL
pMAC
pMAC-SIRPα-KO
CAR-pMAC
CAR-pMAC-SIRPα-KO
4T1
4T1-GPC3
CT26
CT26-GPC3
LL/2
LL/2-GPC3
MC38
MC38-GPC3

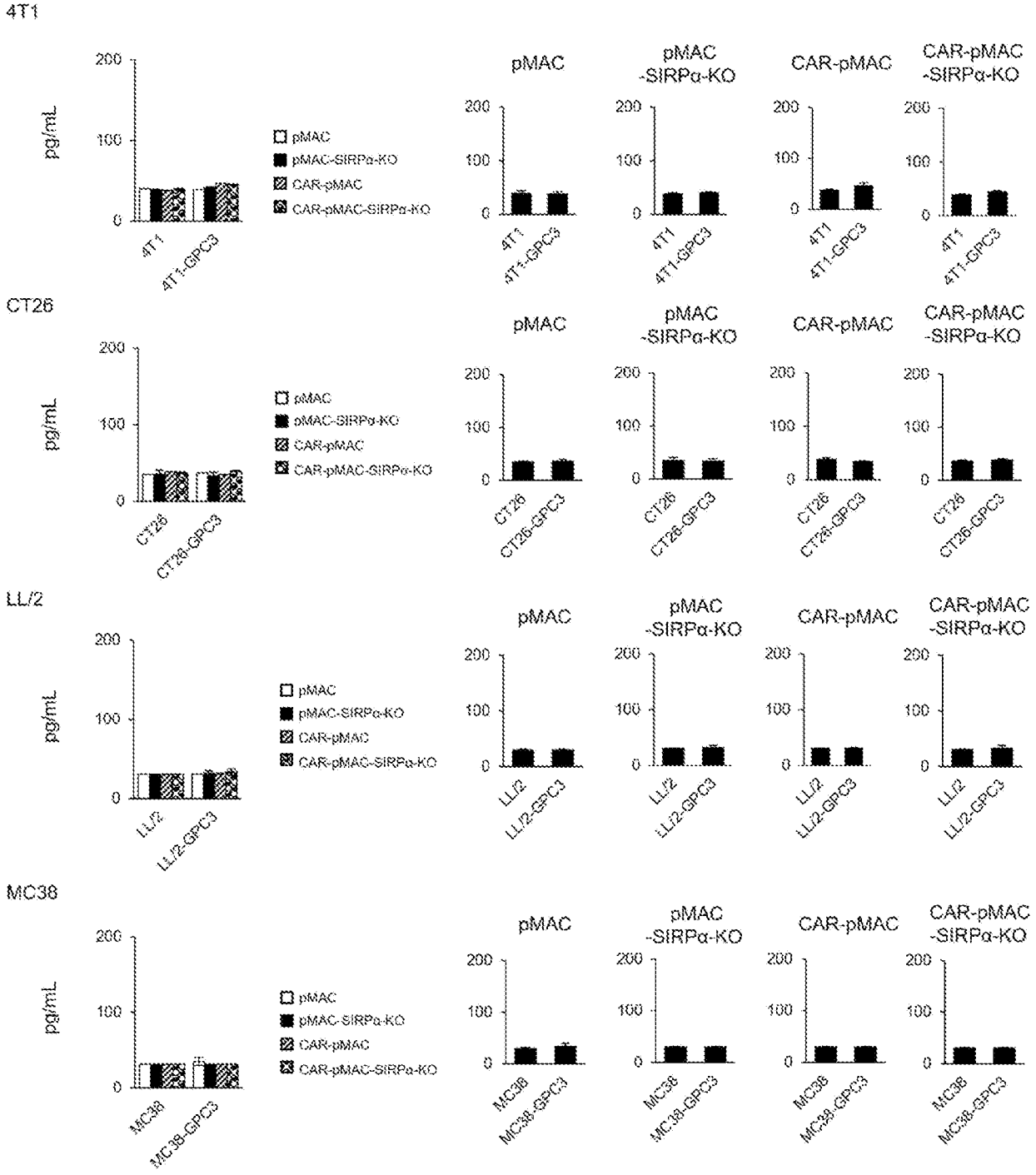
[図9-2]

mTNFα ELISA



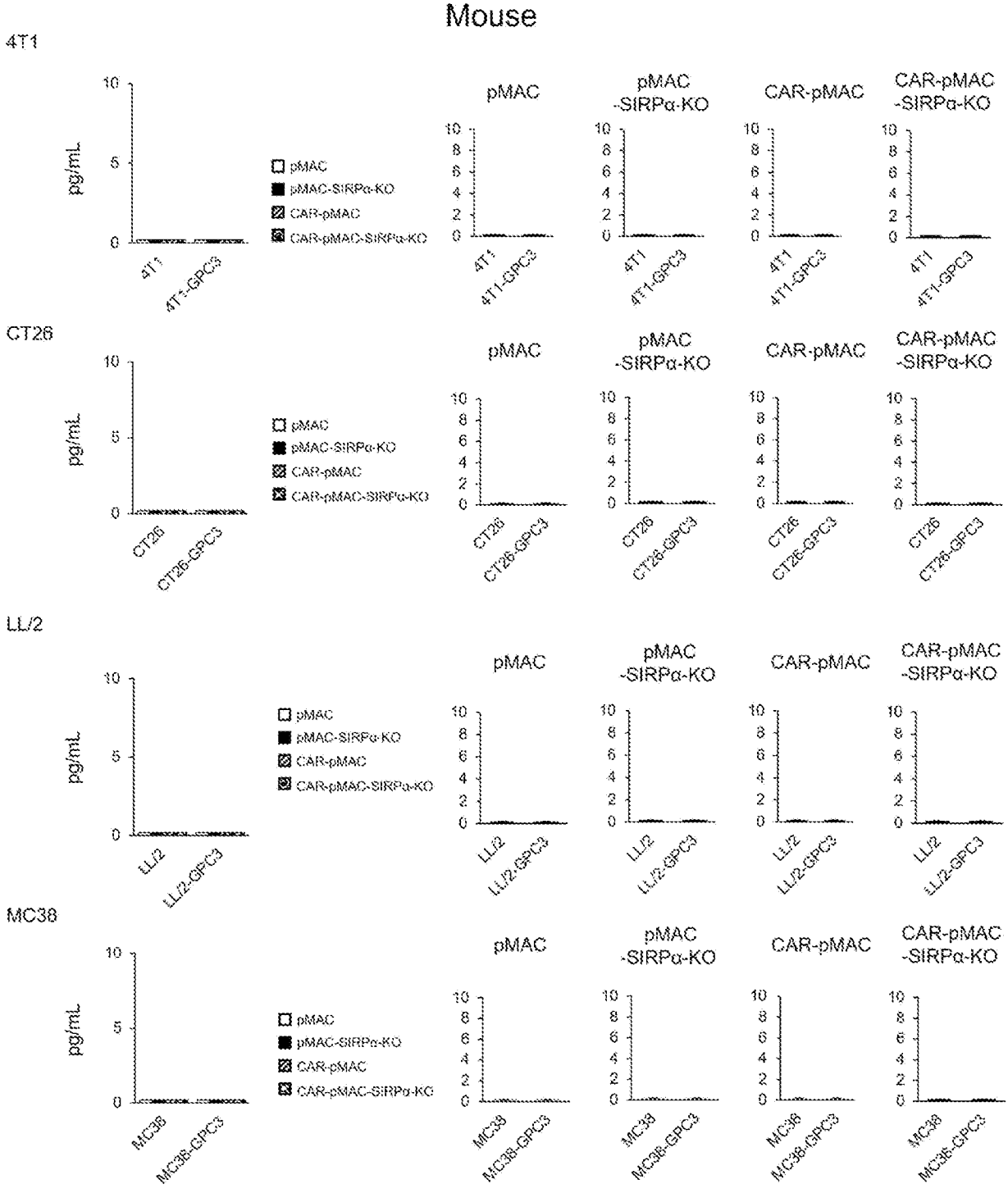
[図9-3]

mIL-10 ELISA

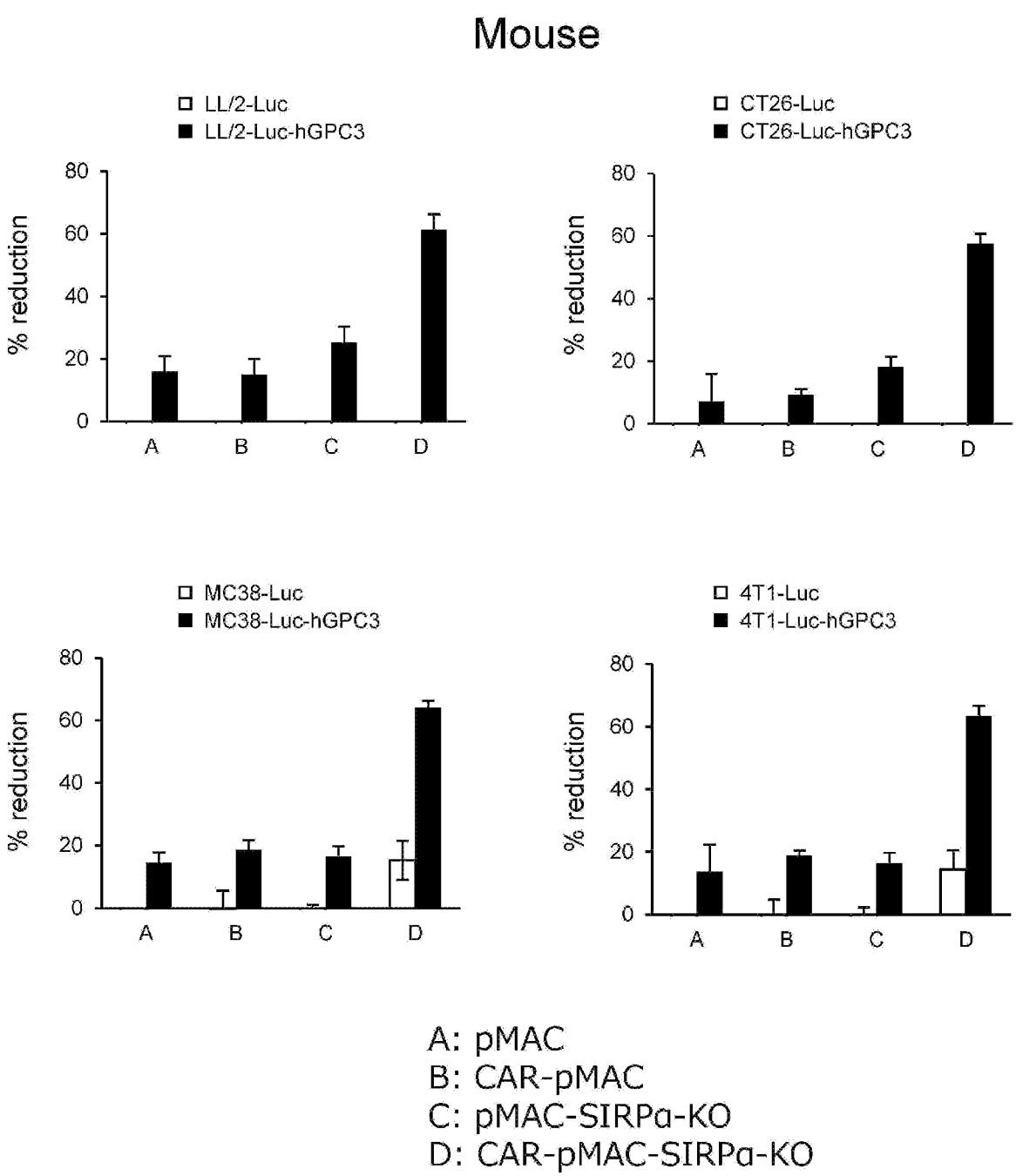


[図9-4]

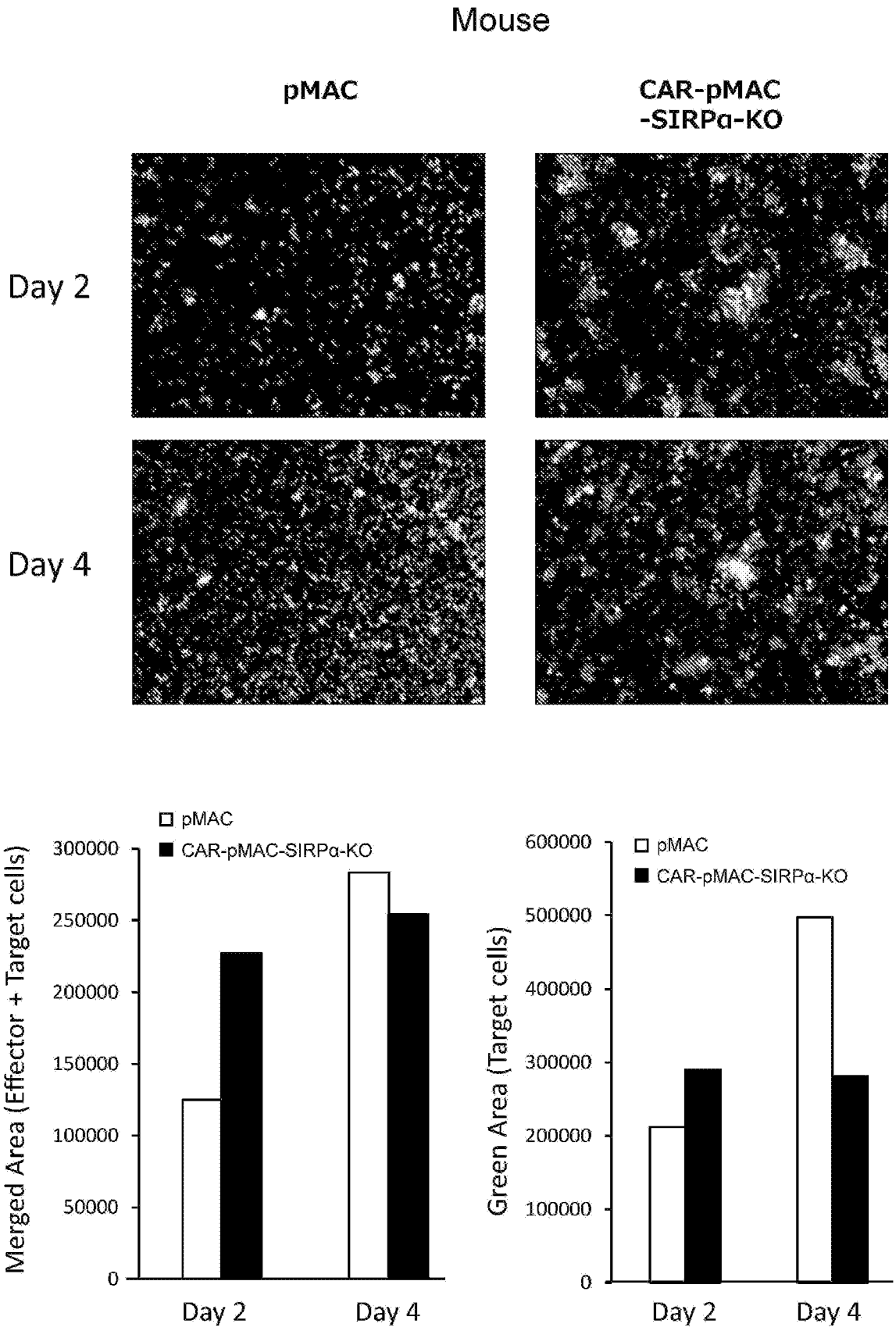
mIL-12 ELISA



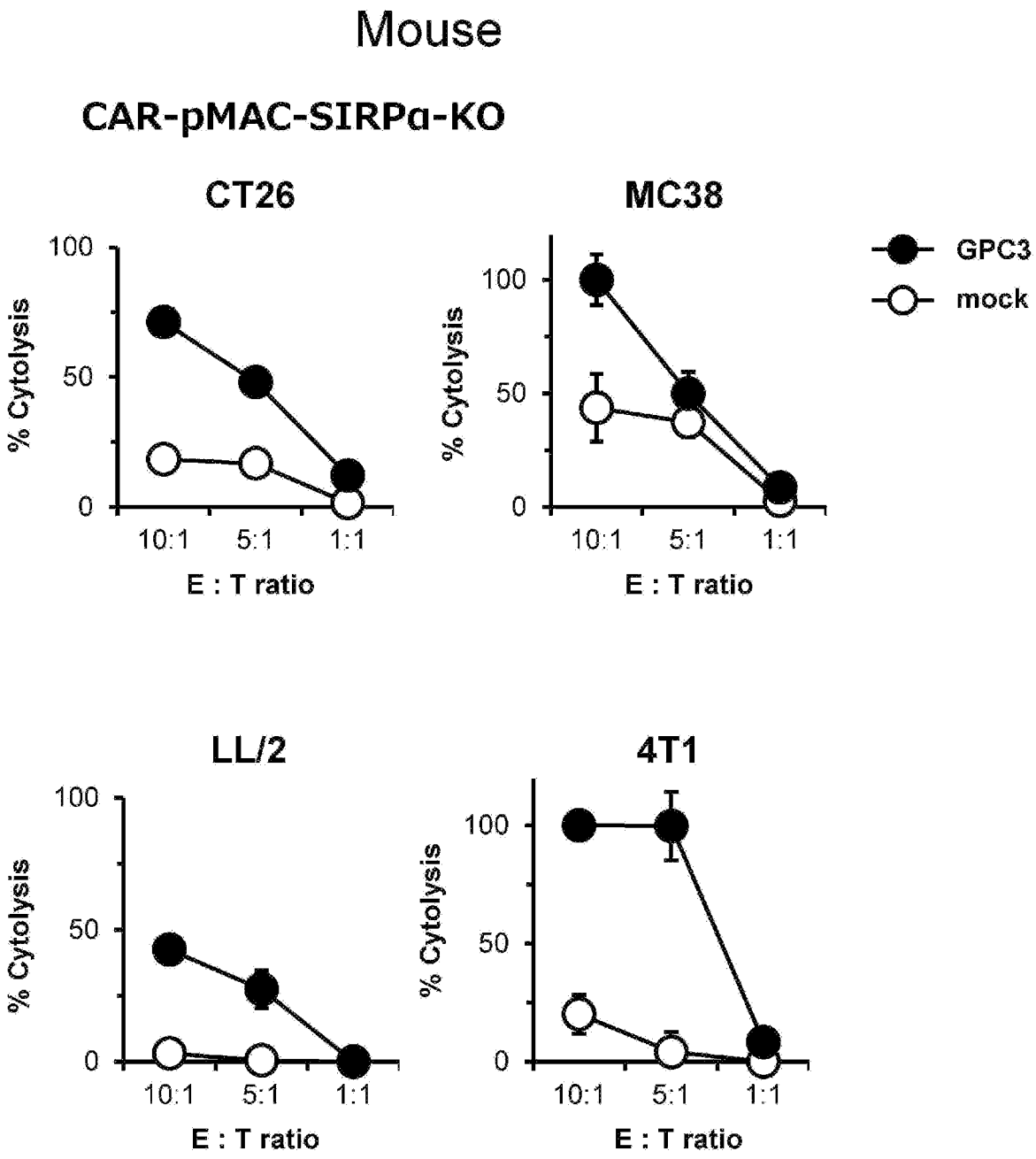
[図10]


Mouse
LL/2-Luc
LL/2-Luc-hGPC3
CT26-Luc
CT26-Luc-hGPC3
MC38-Luc
MC38-Luc-hGPC3
4T1-Luc
4T1-Luc-hGPC3
% reduction
0
20
40
60
80
A
B
C
D
A: pMAC
B: CAR-pMAC
C: pMAC-SIRPα-KO
D: CAR-pMAC-SIRPα-KO

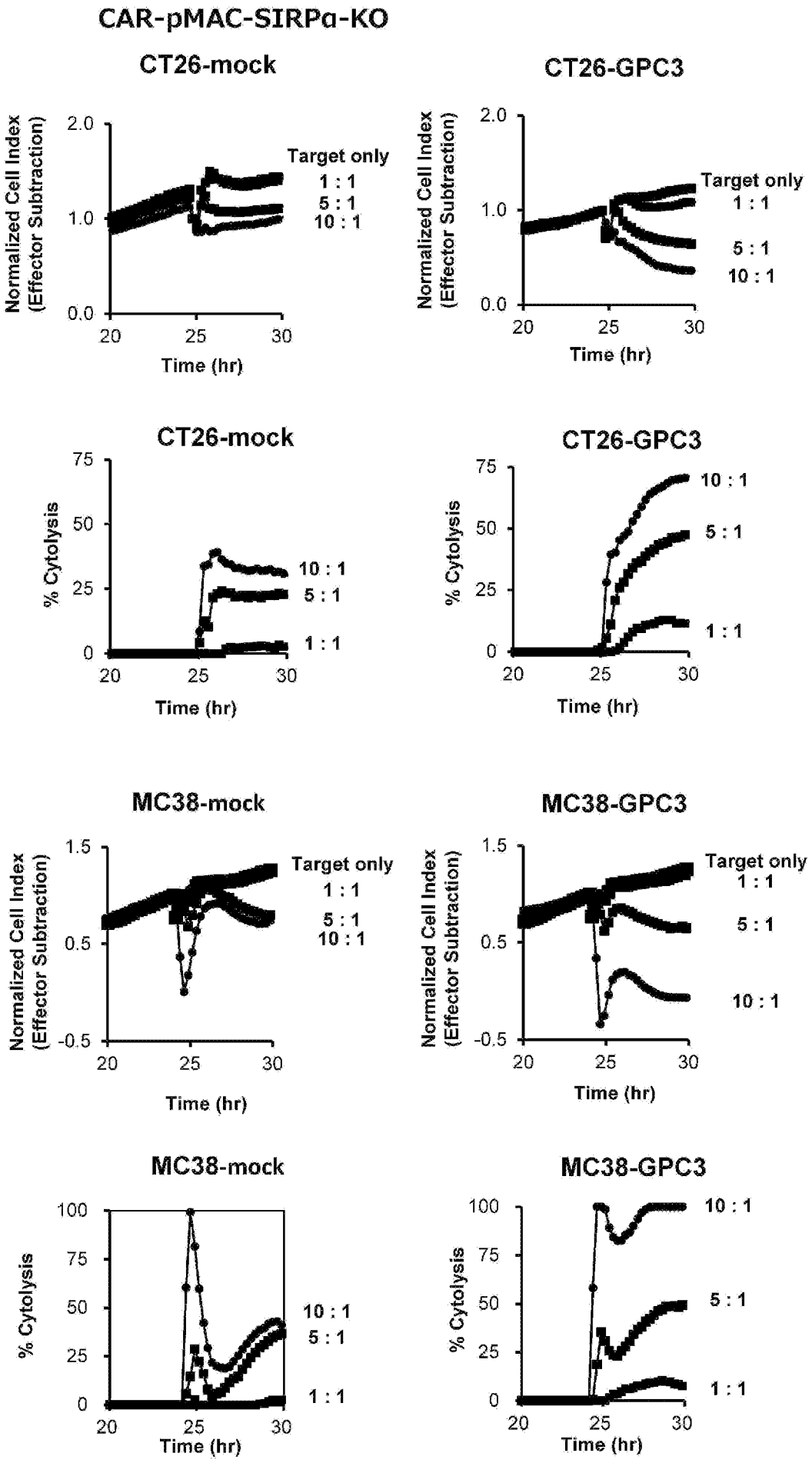
[図11]


Mouse
pMAC
CAR-pMAC
-SIRPα-KO
Day 2
Day 4
pMAC
CAR-pMAC-SIRPα-KO
Merged Area (Effector + Target cells)
300000
250000
200000
150000
100000
50000
0
Day 2
Day 4
pMAC
CAR-pMAC-SIRPα-KO
Green Area (Target cells)
600000
500000
400000
300000
200000
100000
0
Day 2
Day 4

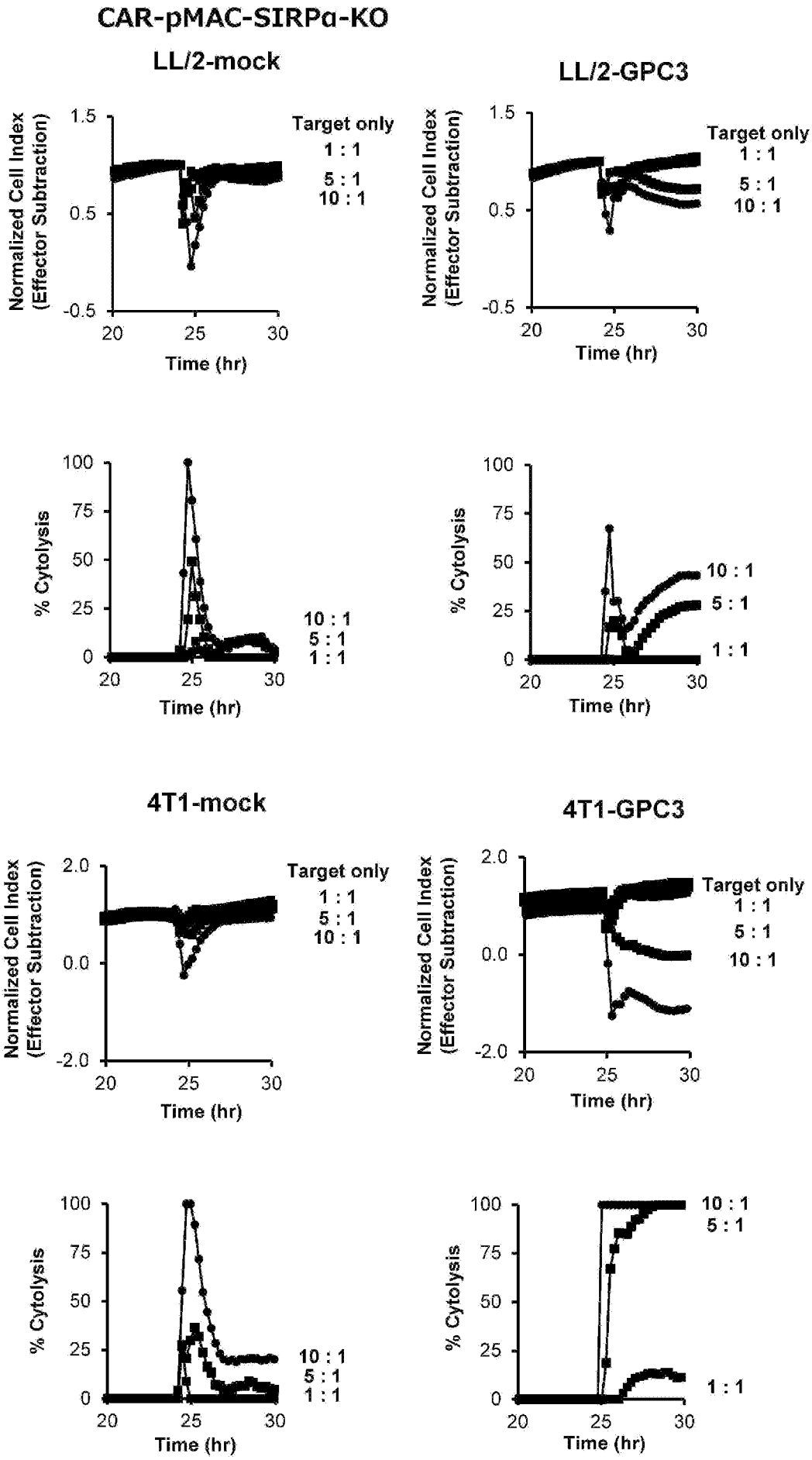
[図12-1]


Mouse
CAR-pMAC-SIRPα-KO
CT26
MC38
LL/2
4T1
% Cytolysis
E : T ratio
10:1
5:1
1:1
100
50
0
GPC3
mock

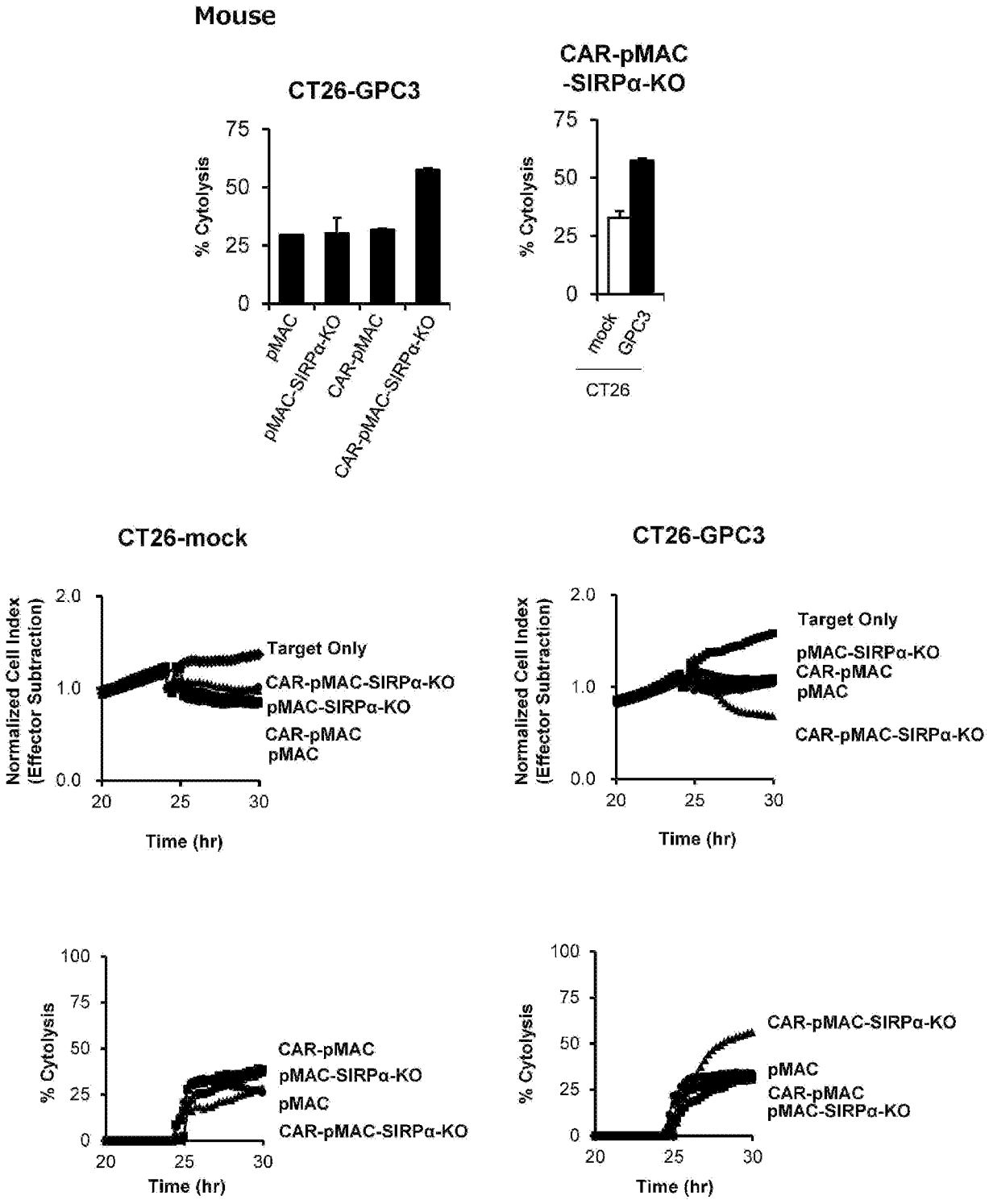
[図12-2]


CAR-pMAC-SIRPα-KO
CT26-mock
Normalized Cell Index (Effector Subtraction)
2.0
1.0
0.0
20
25
30
Time (hr)
Target only
1 : 1
5 : 1
10 : 1
CT26-GPC3
Normalized Cell Index (Effector Subtraction)
2.0
1.0
0.0
20
25
30
Time (hr)
Target only
1 : 1
5 : 1
10 : 1
CT26-mock
% Cytolysis
75
50
25
0
20
25
30
Time (hr)
10 : 1
5 : 1
1 : 1
CT26-GPC3
% Cytolysis
75
50
25
0
20
25
30
Time (hr)
10 : 1
5 : 1
1 : 1
MC38-mock
Normalized Cell Index (Effector Subtraction)
1.5
0.5
-0.5
20
25
30
Time (hr)
Target only
1 : 1
5 : 1
10 : 1
MC38-GPC3
Normalized Cell Index (Effector Subtraction)
1.5
0.5
-0.5
20
25
30
Time (hr)
Target only
1 : 1
5 : 1
10 : 1
MC38-mock
% Cytolysis
100
75
50
25
0
20
25
30
Time (hr)
10 : 1
5 : 1
1 : 1
MC38-GPC3
% Cytolysis
100
75
50
25
0
20
25
30
Time (hr)
10 : 1
5 : 1
1 : 1

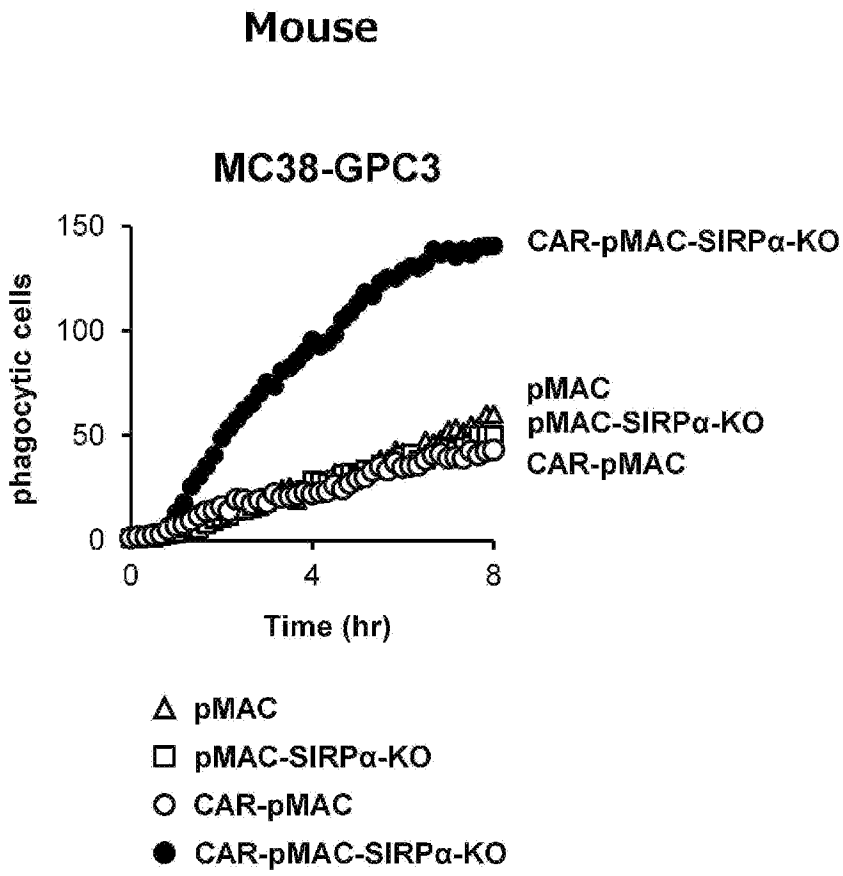
[図12-3]


CAR-pMAC-SIRPα-KO
LL/2-mock
LL/2-GPC3
Normalized Cell Index (Effector Subtraction)
Target only
1 : 1
5 : 1
10 : 1
Time (hr)
% Cytolysis
4T1-mock
4T1-GPC3

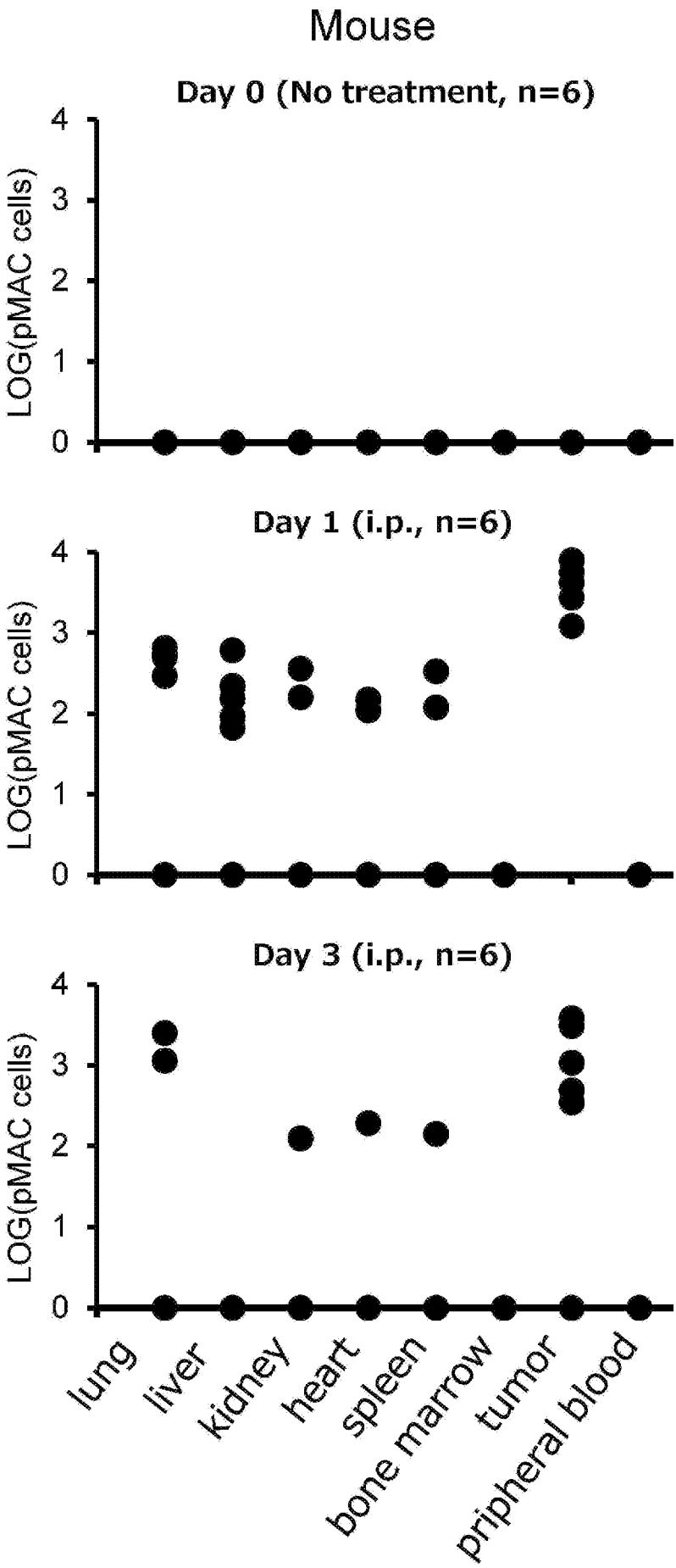
[図13]


Mouse
CT26-GPC3
% Cytolysis
75
50
25
0
pMAC
pMAC-SIRPα-KO
CAR-pMAC
CAR-pMAC-SIRPα-KO
CAR-pMAC
-SIRPα-KO
% Cytolysis
75
50
25
0
mock
GPC3
CT26
CT26-mock
Normalized Cell Index
(Effector Subtraction)
2.0
1.0
0.0
20
25
30
Time (hr)
Target Only
CAR-pMAC-SIRPα-KO
pMAC-SIRPα-KO
CAR-pMAC
pMAC
CT26-GPC3
Normalized Cell Index
(Effector Subtraction)
2.0
1.0
0.0
20
25
30
Time (hr)
Target Only
pMAC-SIRPα-KO
CAR-pMAC
pMAC
CAR-pMAC-SIRPα-KO
% Cytolysis
100
75
50
25
0
20
25
30
Time (hr)
CAR-pMAC
pMAC-SIRPα-KO
pMAC
CAR-pMAC-SIRPα-KO
% Cytolysis
100
75
50
25
0
20
25
30
Time (hr)
CAR-pMAC-SIRPα-KO
pMAC
CAR-pMAC
pMAC-SIRPα-KO

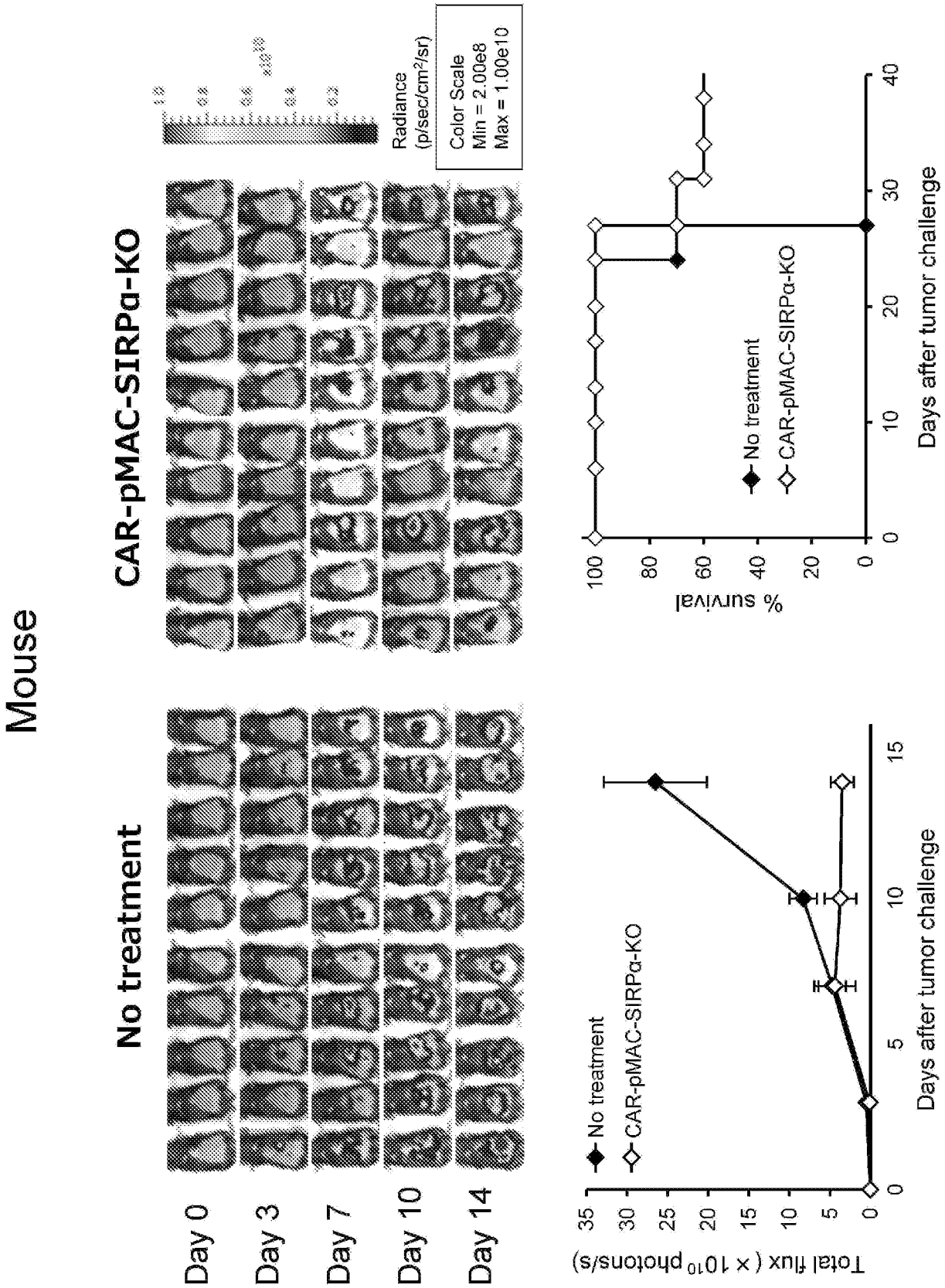
[図14]


Mouse
MC38-GPC3
150
100
50
0
phagocytic cells
0
4
8
Time (hr)
CAR-pMAC-SIRPα-KO
pMAC
pMAC-SIRPα-KO
CAR-pMAC
△ pMAC
□ pMAC-SIRPα-KO
○ CAR-pMAC
● CAR-pMAC-SIRPα-KO

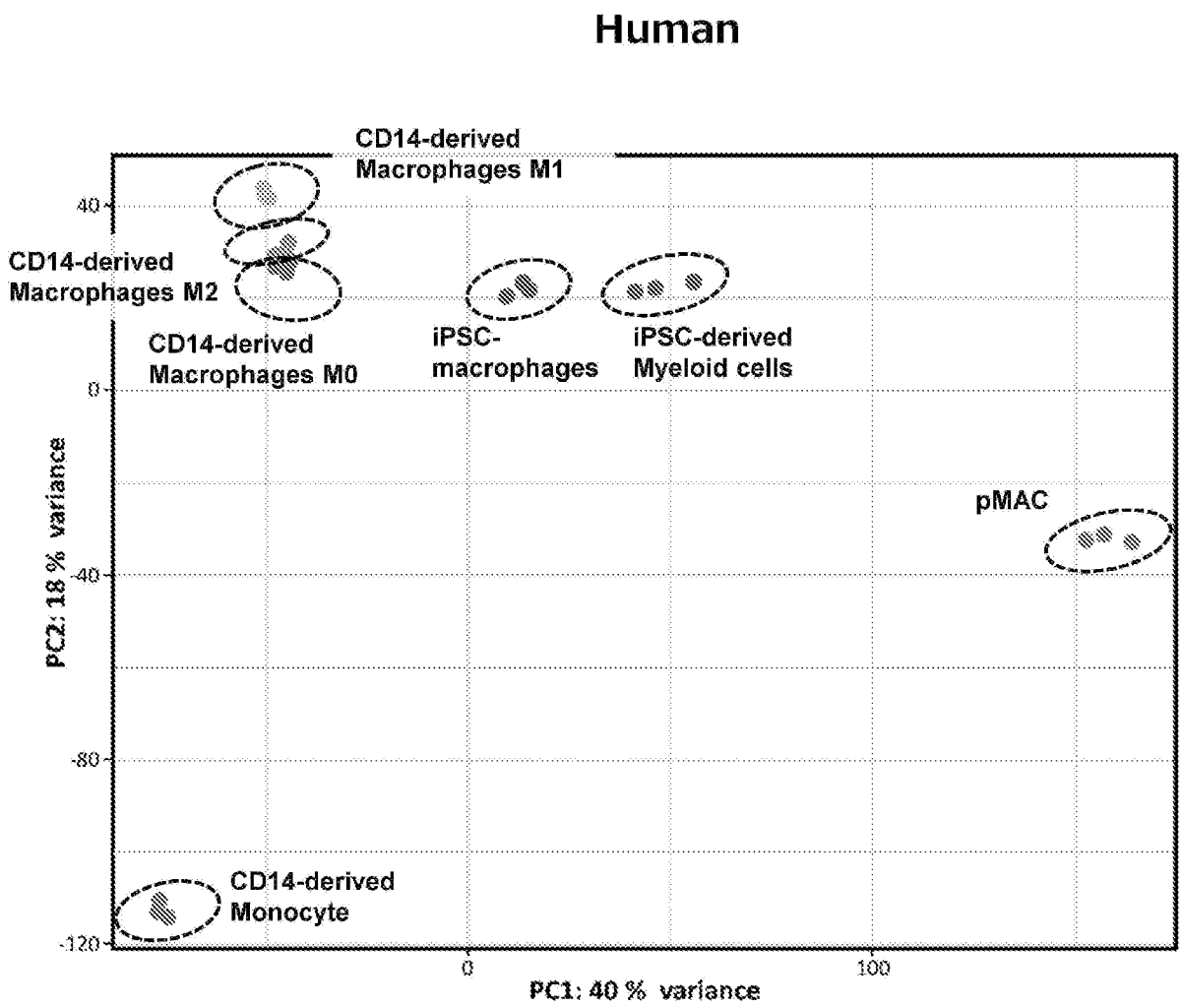
[図15]


Mouse
Day 0 (No treatment, n=6)
Day 1 (i.p., n=6)
Day 3 (i.p., n=6)
LOG(pMAC cells)
0
1
2
3
4
lung
liver
kidney
heart
spleen
bone marrow
tumor
pripheral blood

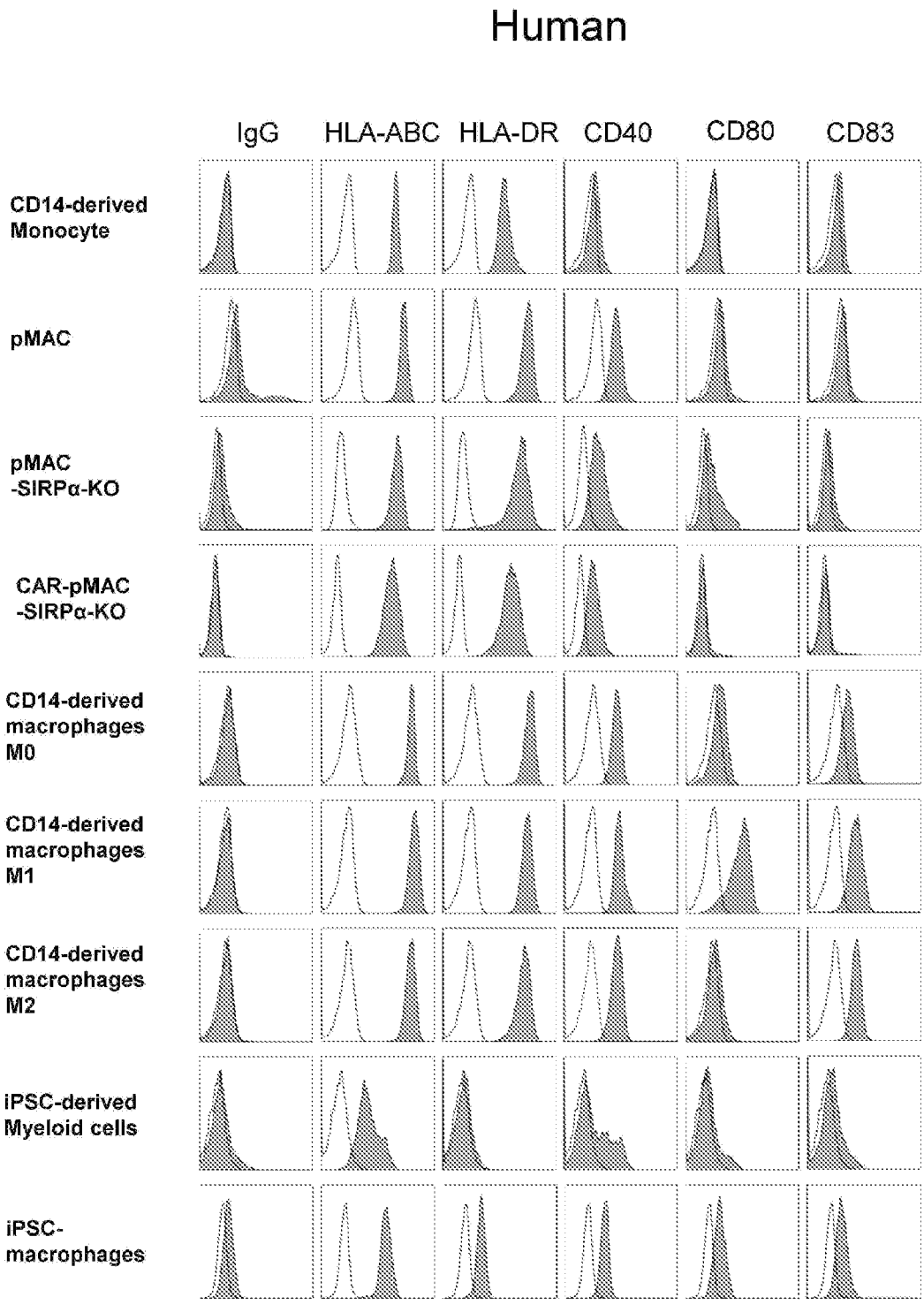
[図16]


Mouse
No treatment
CAR-pMAC-SIRPα-KO
Day 0
Day 3
Day 7
Day 10
Day 14
Radiance (p/sec/cm²/sr)
Color Scale
Min = 2.00e8
Max = 1.00e10
Total flux (× 10¹⁰ photons/s)
No treatment
CAR-pMAC-SIRPα-KO
Days after tumor challenge
% survival
No treatment
CAR-pMAC-SIRPα-KO
Days after tumor challenge

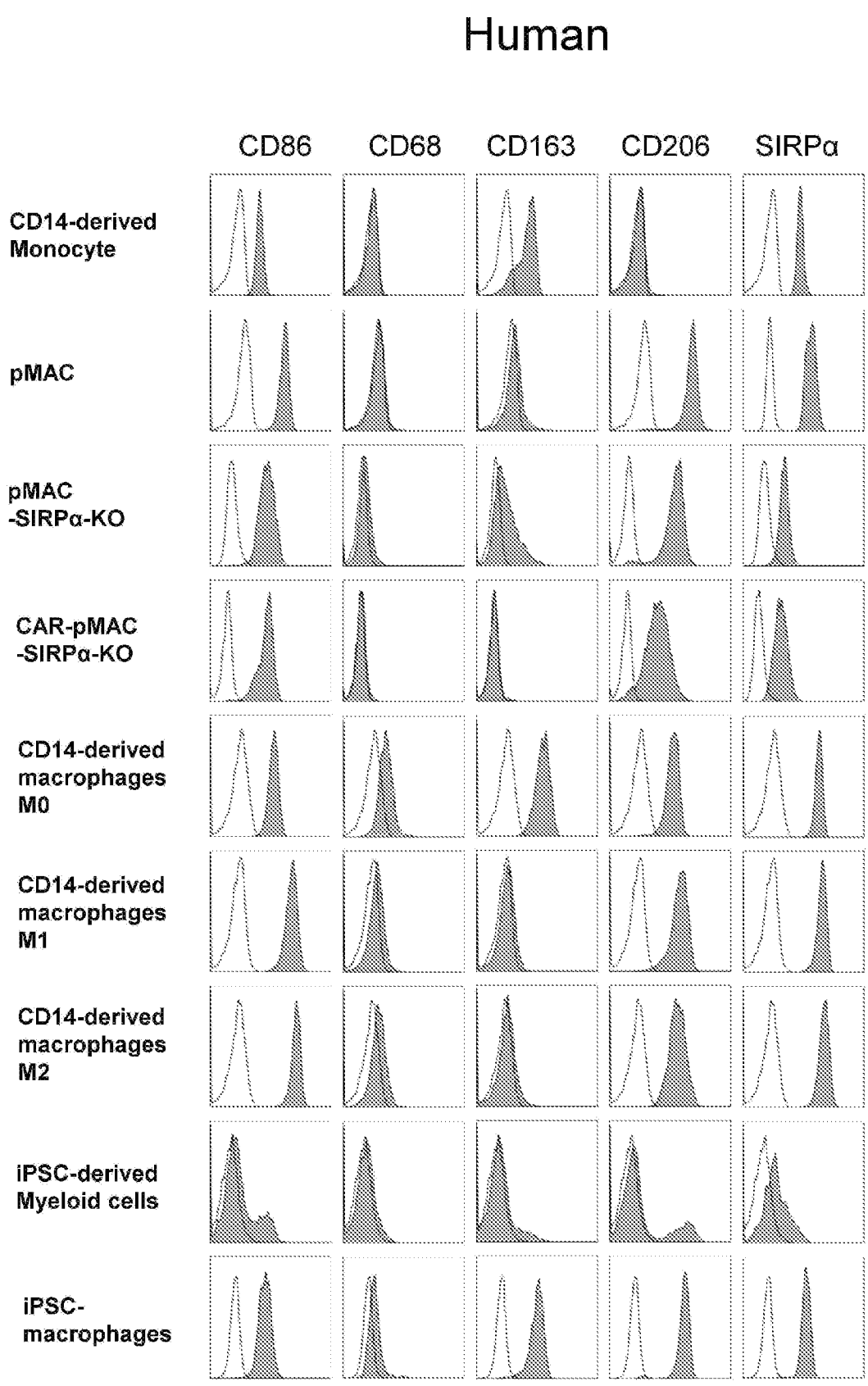
[図17]


Human
CD14-derived
Macrophages M1
CD14-derived
Macrophages M2
CD14-derived
Macrophages M0
iPSC-
macrophages
iPSC-derived
Myeloid cells
pMAC
CD14-derived
Monocyte
40
0
-40
-80
-120
PC2: 18 % variance
0
100
PC1: 40 % variance

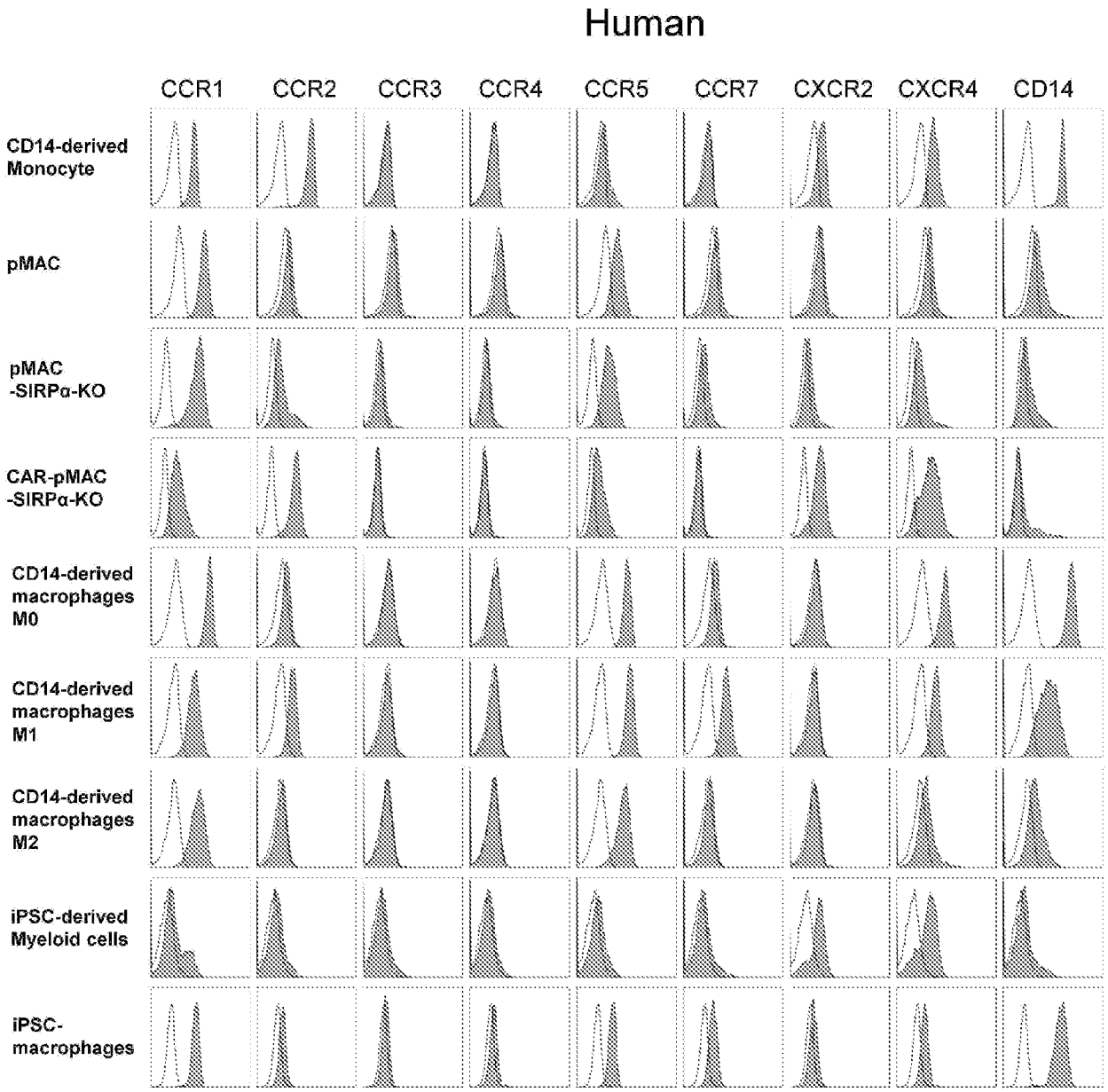
[図18-1]


Human
IgG
HLA-ABC
HLA-DR
CD40
CD80
CD83
CD14-derived Monocyte
pMAC
pMAC -SIRPα-KO
CAR-pMAC -SIRPα-KO
CD14-derived macrophages M0
CD14-derived macrophages M1
CD14-derived macrophages M2
iPSC-derived Myeloid cells
iPSC-macrophages

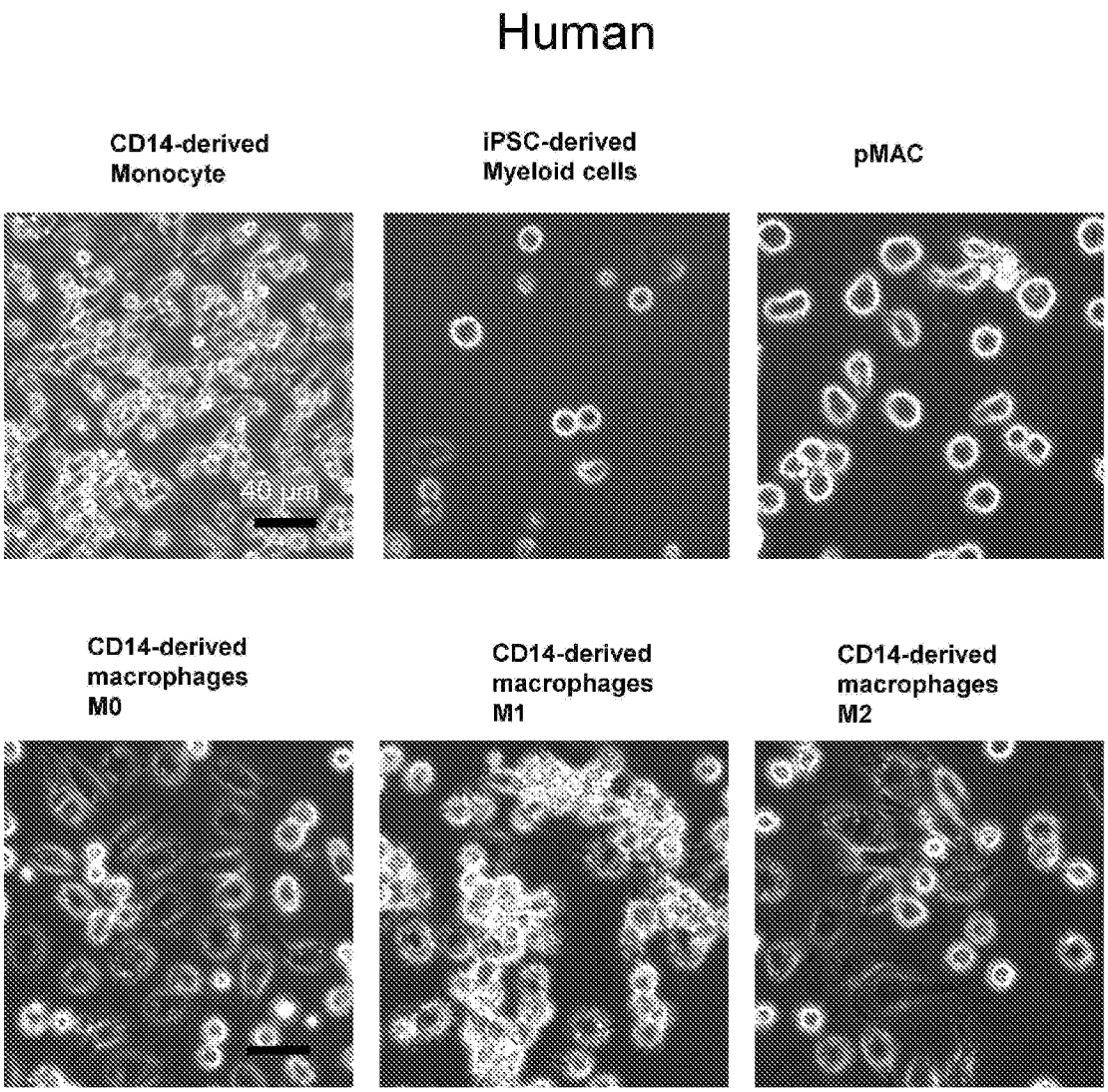
[図18-2]


Human
CD86
CD68
CD163
CD206
SIRPα
CD14-derived Monocyte
pMAC
pMAC -SIRPα-KO
CAR-pMAC -SIRPα-KO
CD14-derived macrophages M0
CD14-derived macrophages M1
CD14-derived macrophages M2
iPSC-derived Myeloid cells
iPSC-macrophages

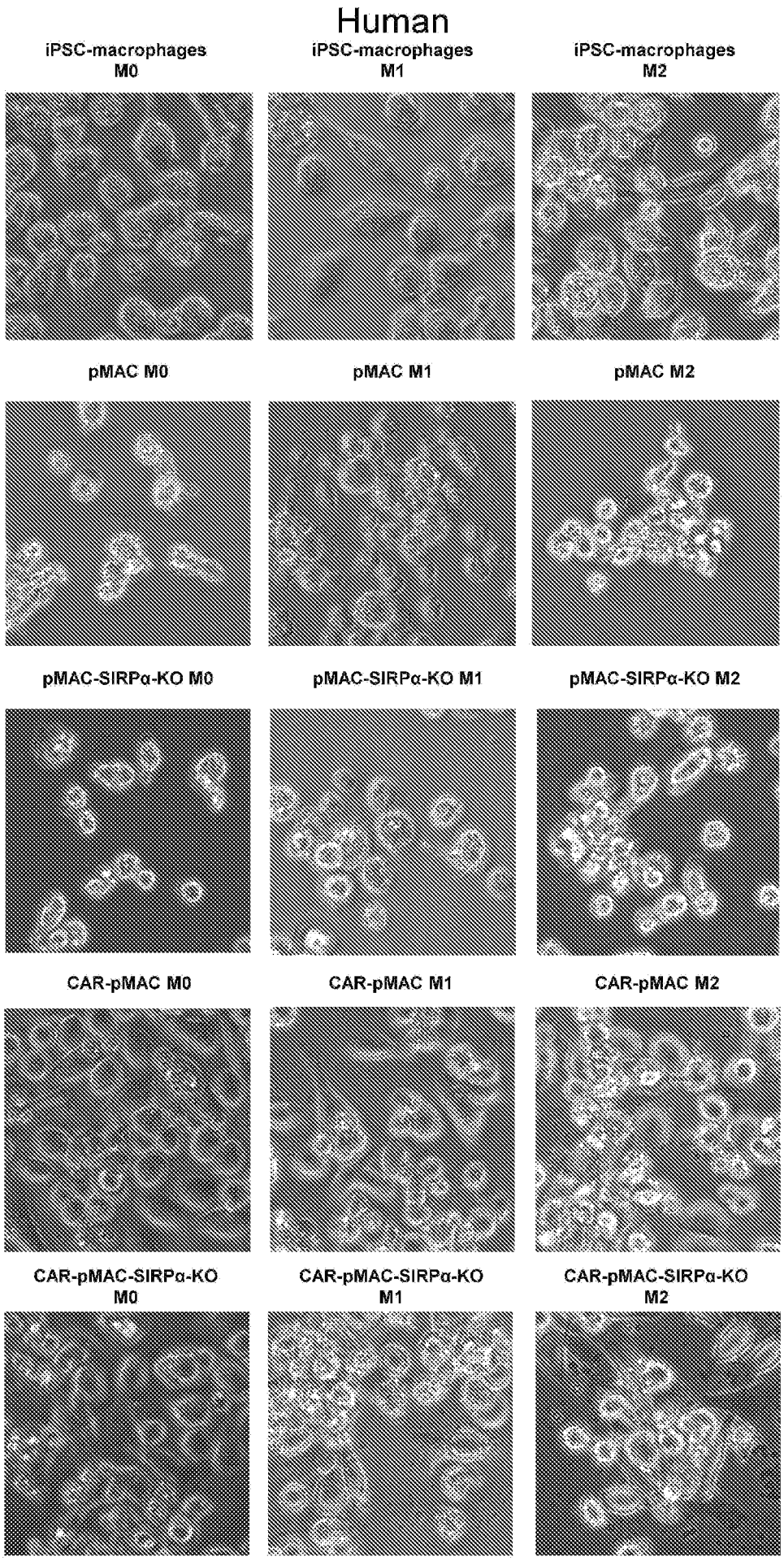
[図18-3]


Human
CCR1
CCR2
CCR3
CCR4
CCR5
CCR7
CXCR2
CXCR4
CD14
CD14-derived Monocyte
pMAC
pMAC -SIRPα-KO
CAR-pMAC -SIRPα-KO
CD14-derived macrophages M0
CD14-derived macrophages M1
CD14-derived macrophages M2
iPSC-derived Myeloid cells
iPSC-macrophages

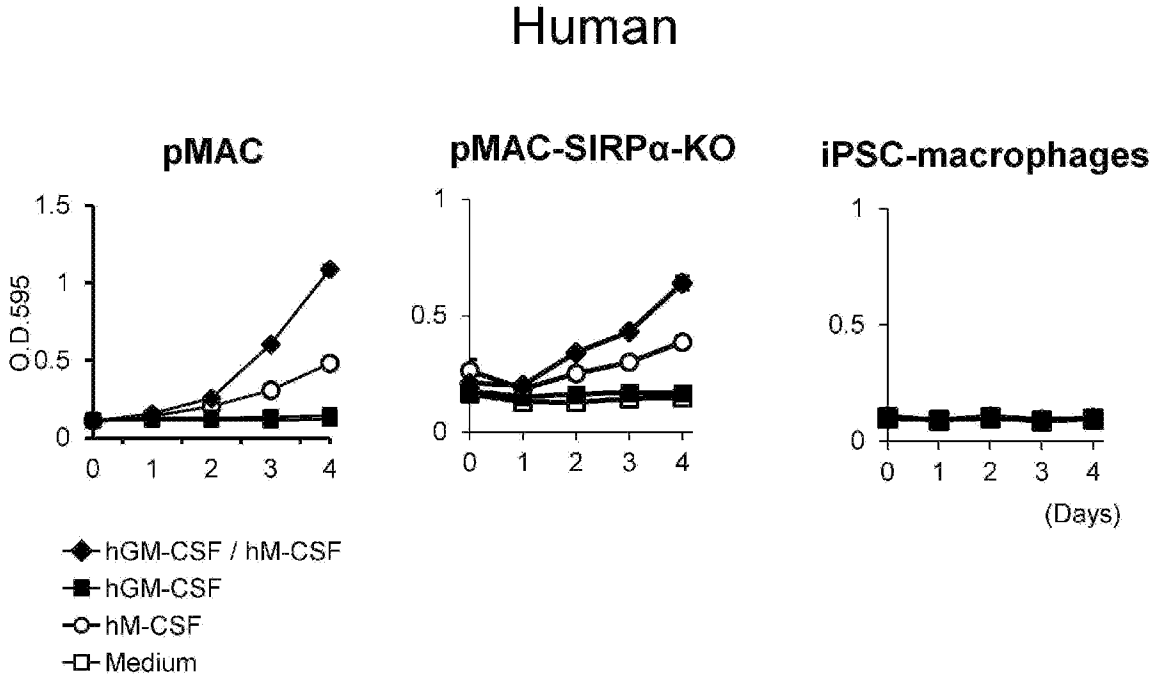
[図19-1]


Human
CD14-derived Monocyte
iPSC-derived Myeloid cells
pMAC
40 μm
CD14-derived macrophages M0
CD14-derived macrophages M1
CD14-derived macrophages M2

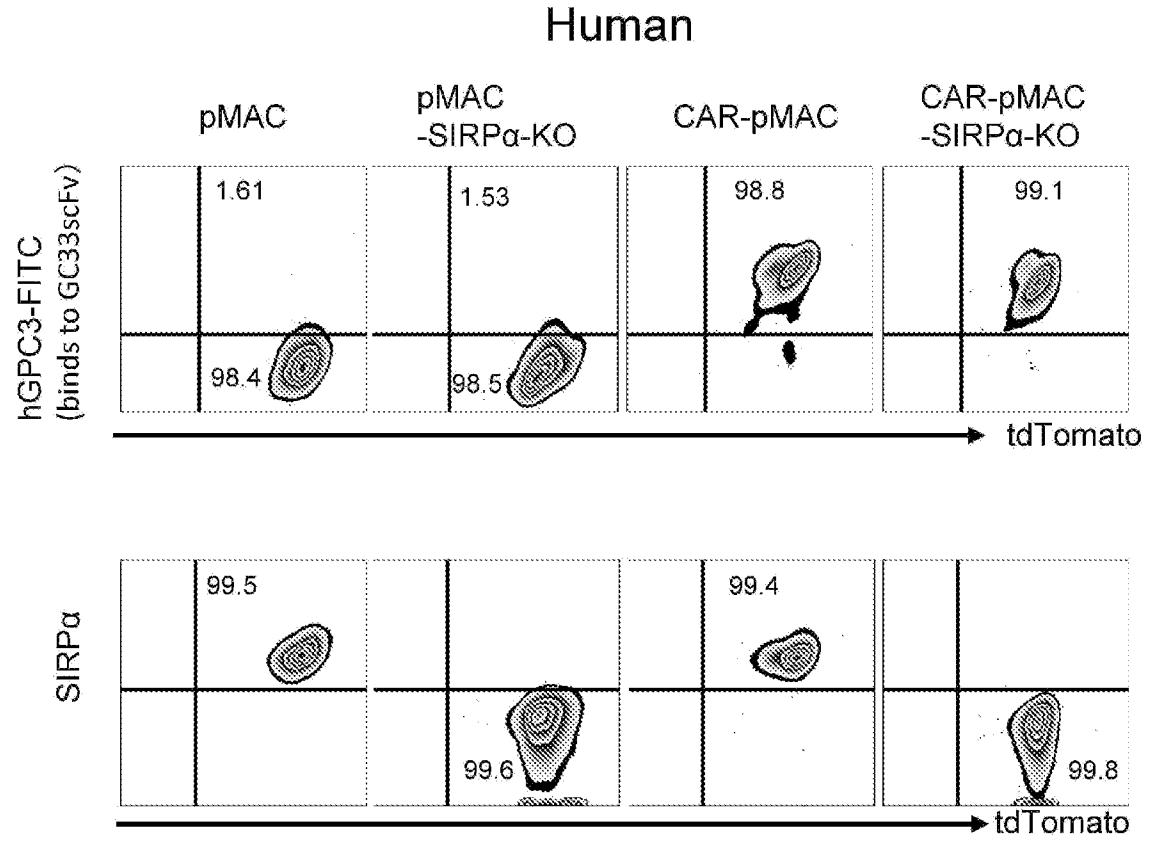
[図19-2]


Human
iPSC-macrophages M0
iPSC-macrophages M1
iPSC-macrophages M2
pMAC M0
pMAC M1
pMAC M2
pMAC-SIRPα-KO M0
pMAC-SIRPα-KO M1
pMAC-SIRPα-KO M2
CAR-pMAC M0
CAR-pMAC M1
CAR-pMAC M2
CAR-pMAC-SIRPα-KO M0
CAR-pMAC-SIRPα-KO M1
CAR-pMAC-SIRPα-KO M2

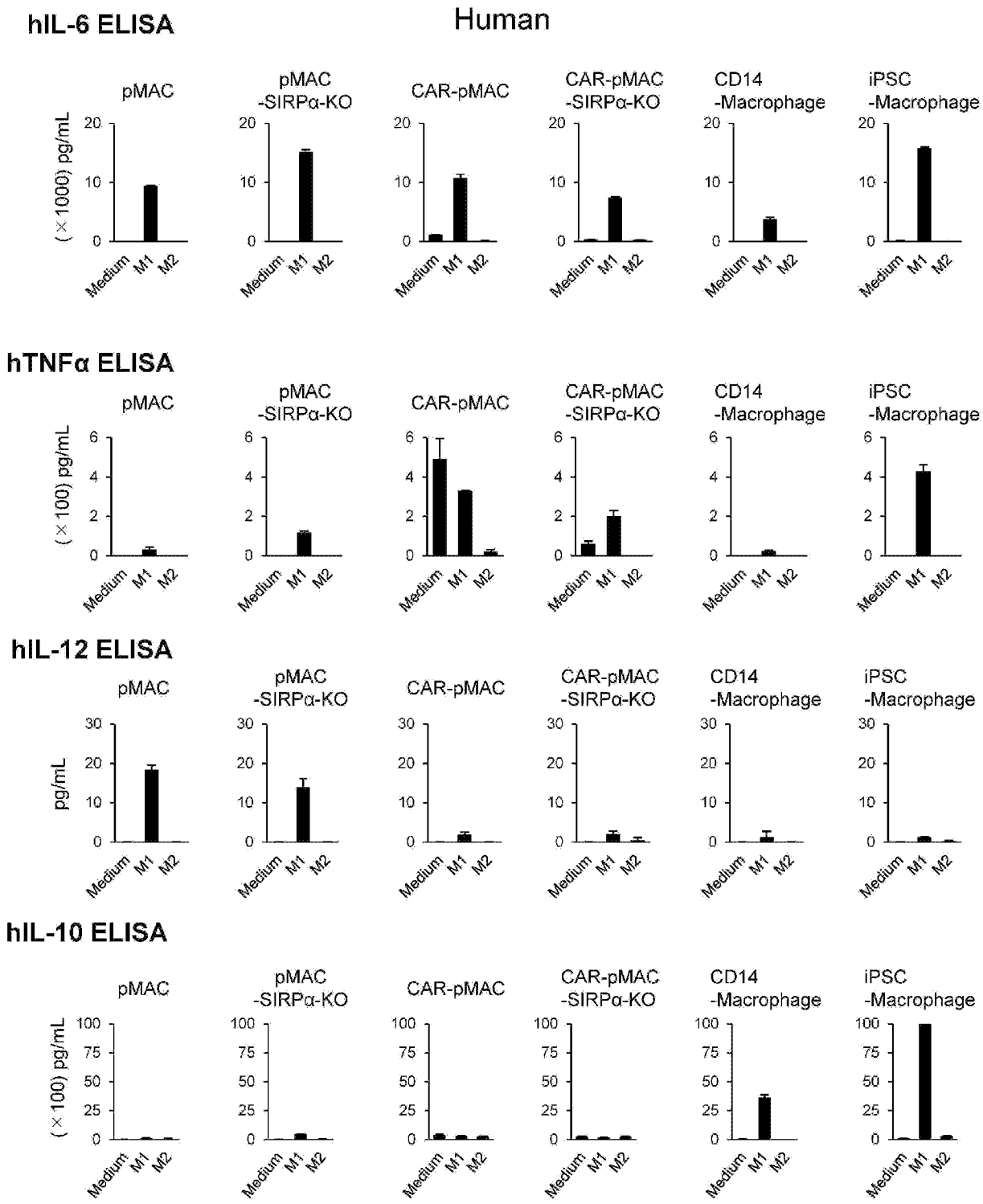
[図20]


Human
pMAC
pMAC-SIRPα-KO
iPSC-macrophages
O.D.595
1.5
1
0.5
0
0 1 2 3 4
(Days)
hGM-CSF / hM-CSF
hGM-CSF
hM-CSF
Medium

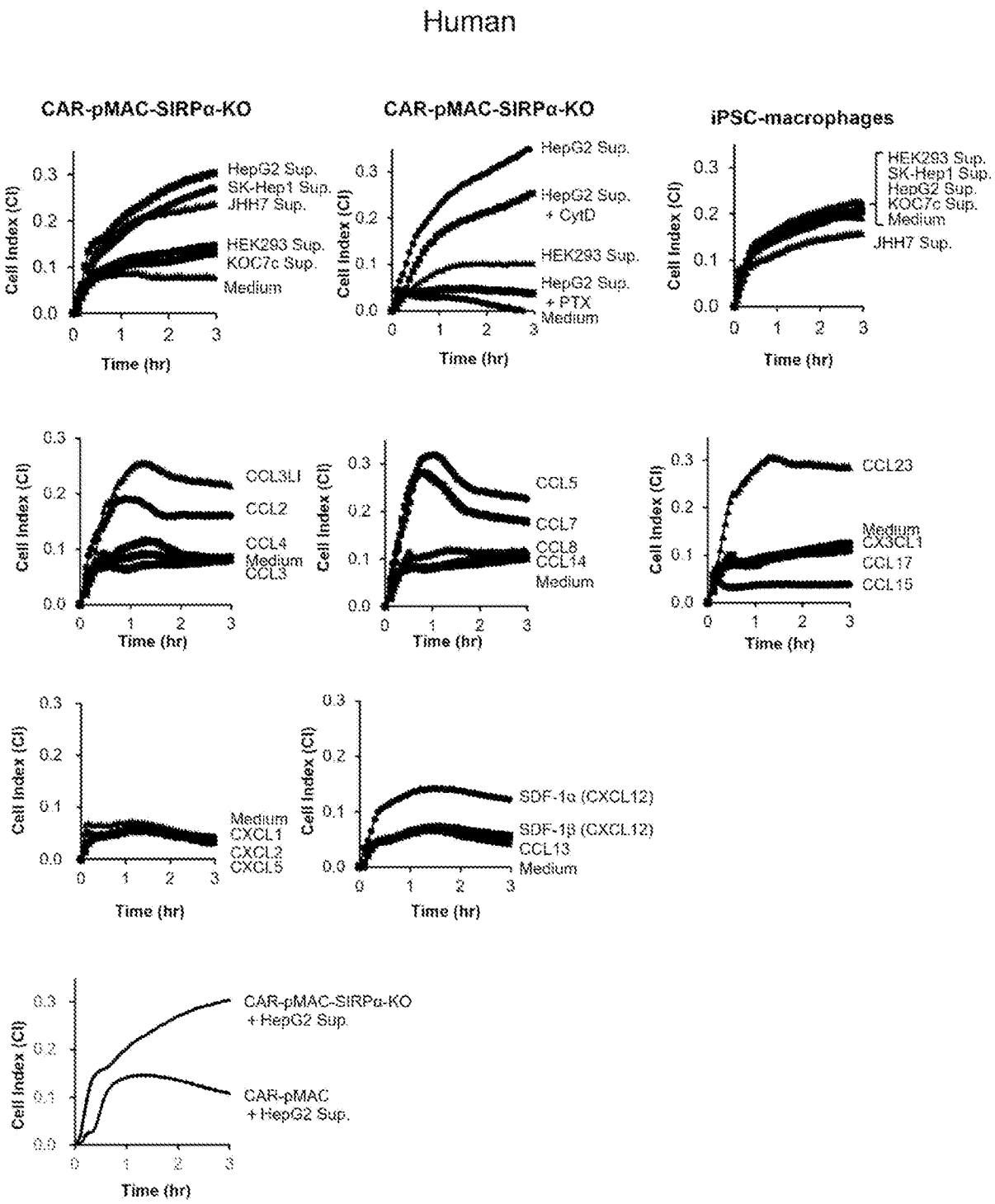
[図21]


Human
pMAC
pMAC -SIRPα-KO
CAR-pMAC
CAR-pMAC -SIRPα-KO
hGPC3-FITC (binds to GC33scFv)
1.61
98.4
1.53
98.5
98.8
99.1
tdTomato
SIRPα
99.5
99.6
99.4
99.8
tdTomato

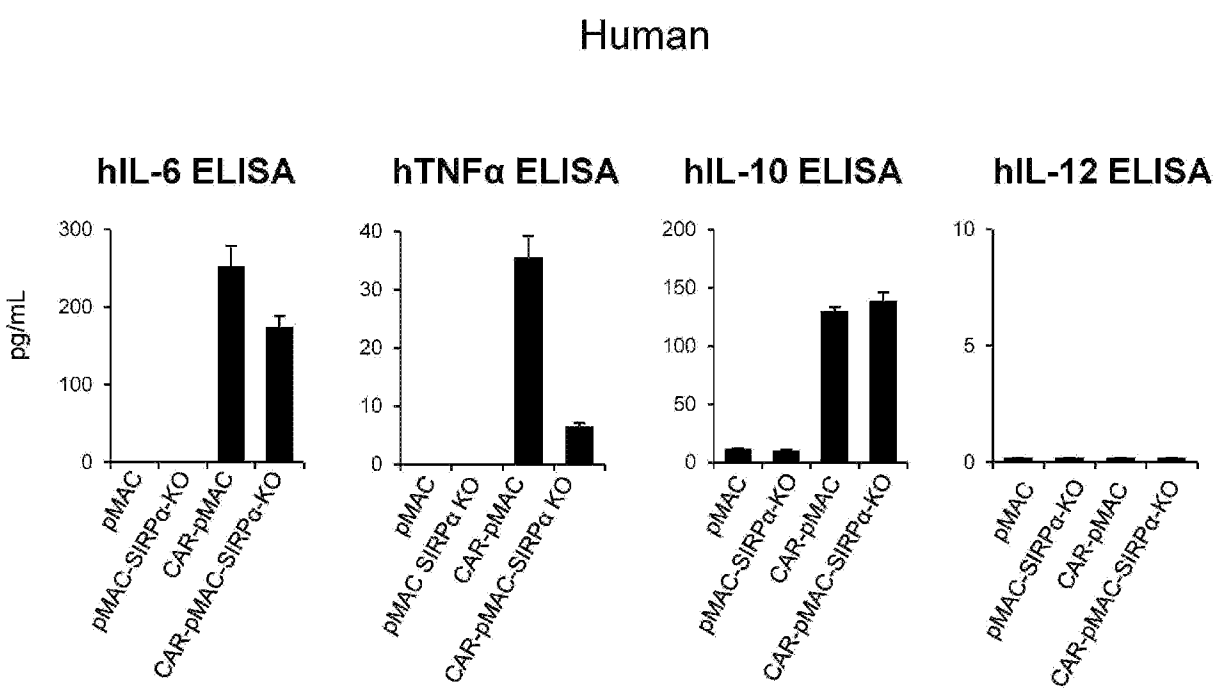
[図22]


hIL-6 ELISA
Human
pMAC
pMAC -SIRPα-KO
CAR-pMAC
CAR-pMAC -SIRPα-KO
CD14 -Macrophage
iPSC -Macrophage
(×1000) pg/mL
hTNFα ELISA
(×100) pg/mL
hIL-12 ELISA
pg/mL
hIL-10 ELISA
(×100) pg/mL
Medium
M1
M2

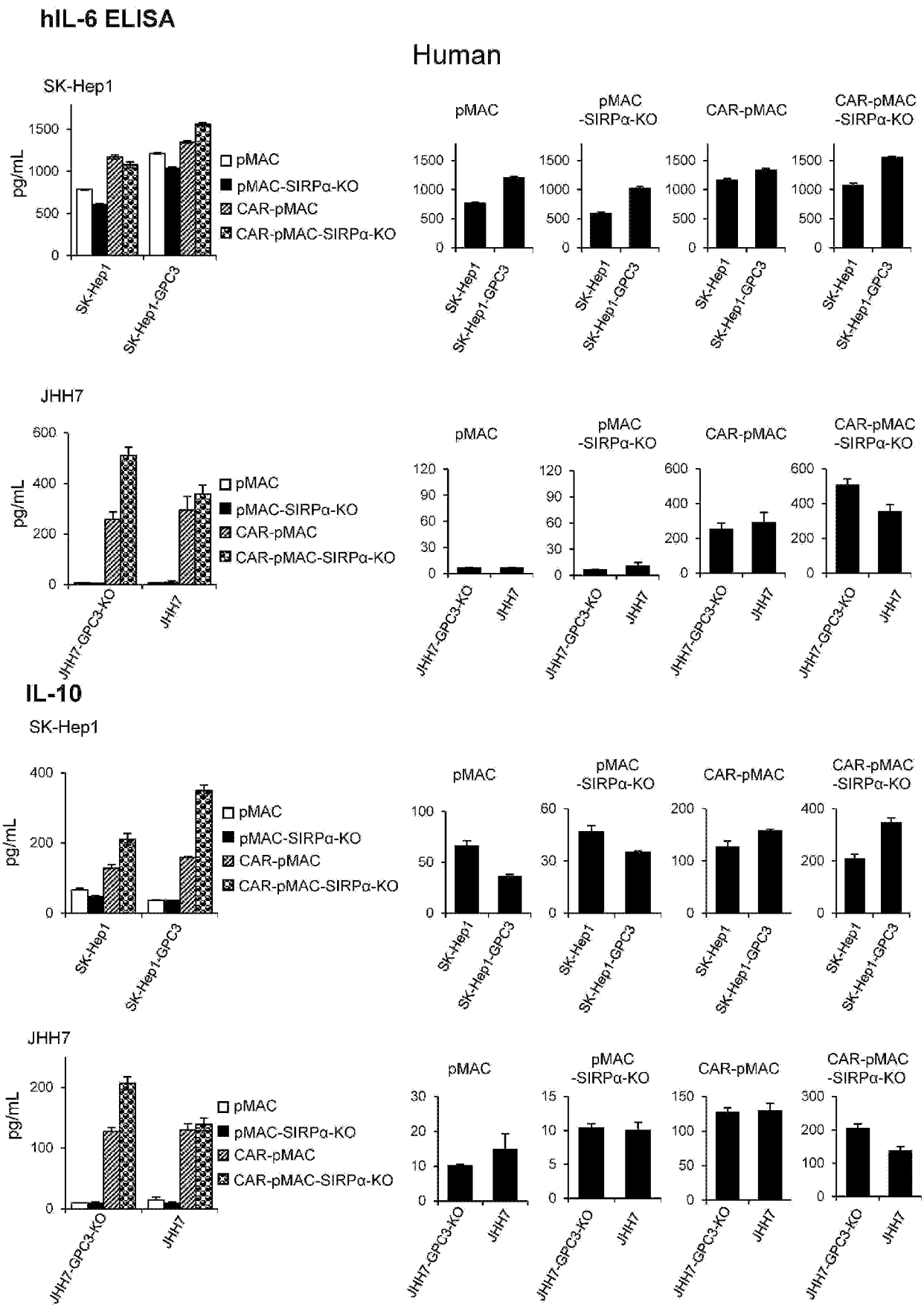
[図23]


Human
CAR-pMAC-SIRPα-KO
HepG2 Sup.
SK-Hep1 Sup.
JHH7 Sup.
HEK293 Sup.
KOC7c Sup.
Medium
Cell Index (CI)
Time (hr)
CAR-pMAC-SIRPα-KO
HepG2 Sup.
HepG2 Sup. + CytD
HEK293 Sup.
HepG2 Sup. + PTX
Medium
iPSC-macrophages
HEK293 Sup.
SK-Hep1 Sup.
HepG2 Sup.
KOC7c Sup.
Medium
JHH7 Sup.
CCL3L1
CCL2
CCL4
Medium
CCL3
CCL5
CCL7
CCL8
CCL14
Medium
CCL23
Medium
CX3CL1
CCL17
CCL15
Medium
CXCL1
CXCL2
CXCL5
SDF-1α (CXCL12)
SDF-1β (CXCL12)
CCL13
Medium
CAR-pMAC-SIRPα-KO + HepG2 Sup.
CAR-pMAC + HepG2 Sup.

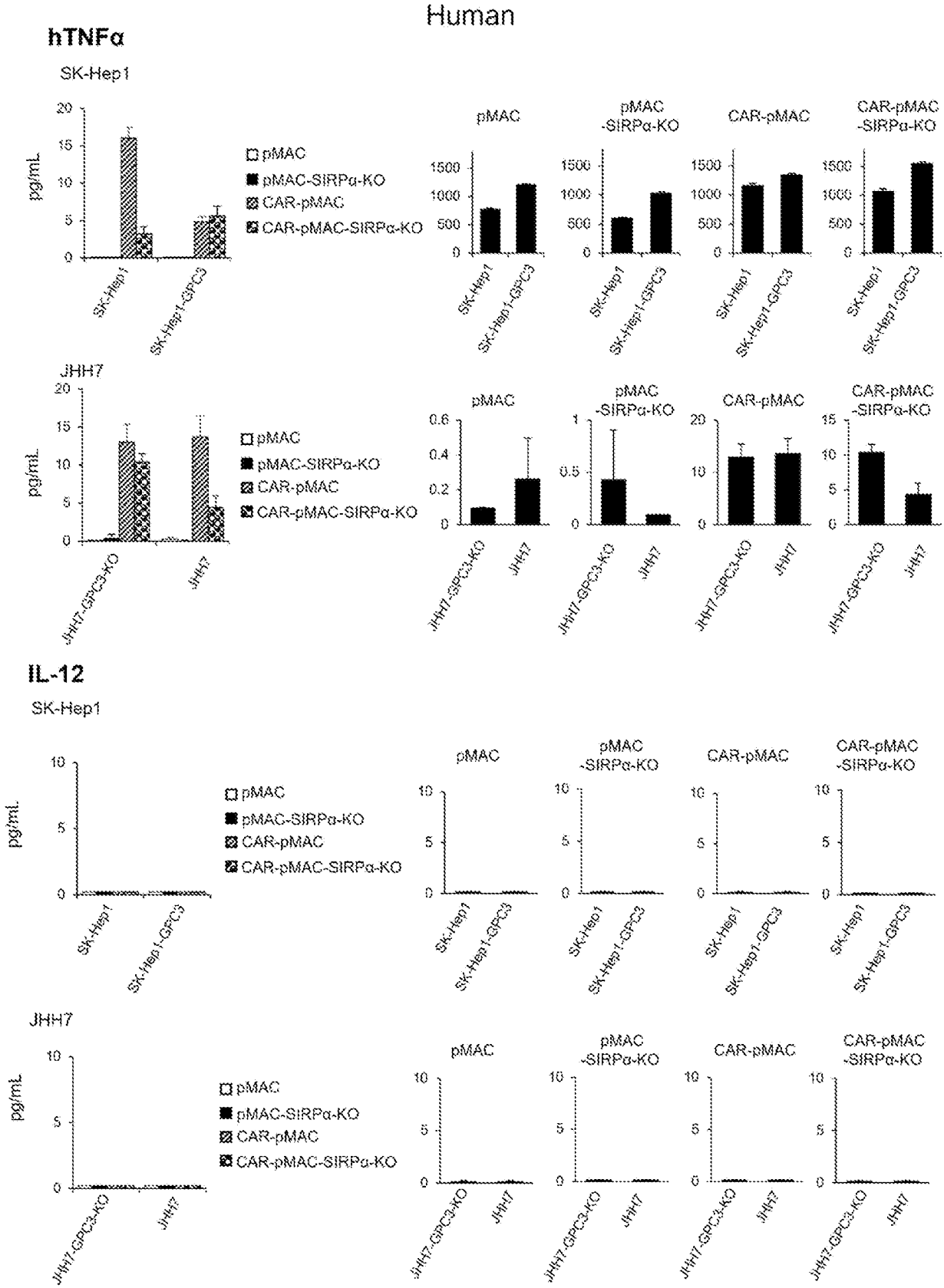
[図24-1]


Human
hIL-6 ELISA
hTNFα ELISA
hIL-10 ELISA
hIL-12 ELISA
pg/mL
300
200
100
0
40
30
20
10
200
150
100
50
10
5
pMAC
pMAC-SIRPα-KO
CAR-pMAC
CAR-pMAC-SIRPα-KO

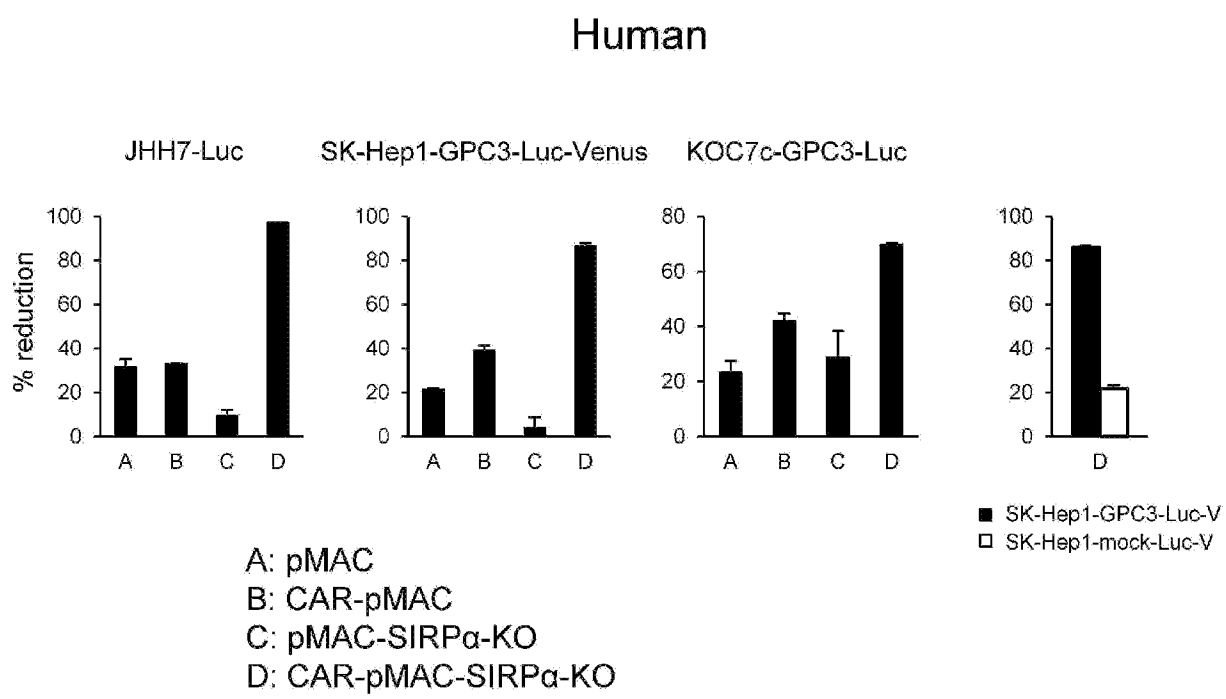
[図24-2]


hIL-6 ELISA
Human
SK-Hep1
pg/mL
pMAC
pMAC-SIRPα-KO
CAR-pMAC
CAR-pMAC-SIRPα-KO
SK-Hep1
SK-Hep1-GPC3
JHH7
JHH7-GPC3-KO
IL-10

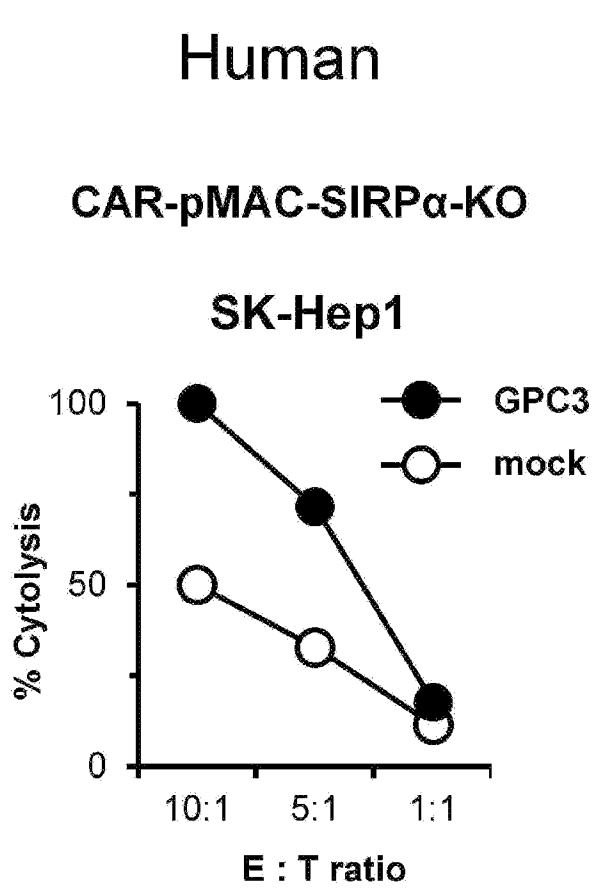
[図24-3]


Human
hTNFα
SK-Hep1
pg/mL
pMAC
pMAC-SIRPα-KO
CAR-pMAC
CAR-pMAC-SIRPα-KO
SK-Hep1
SK-Hep1-GPC3
JHH7
JHH7-GPC3-KO
IL-12

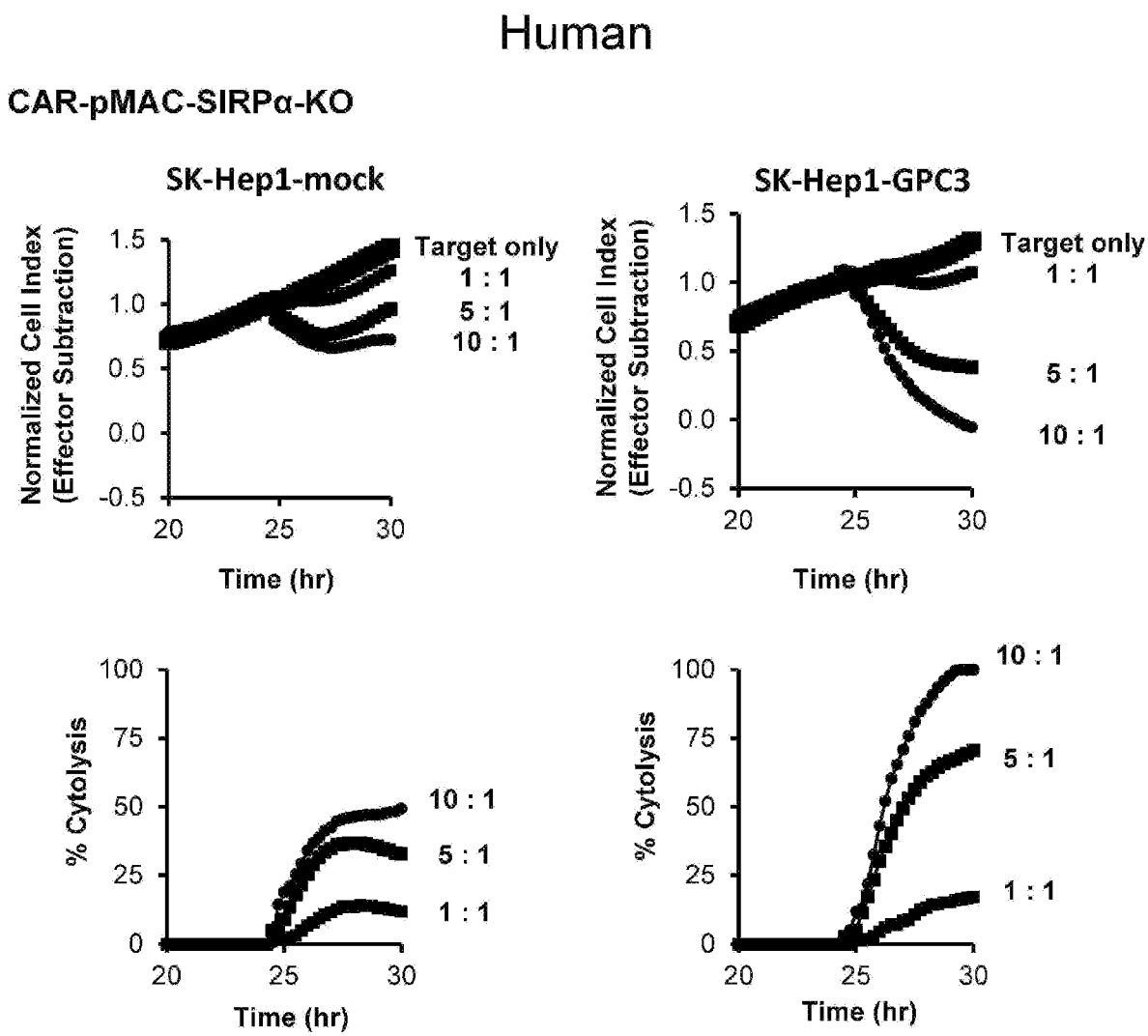
[図25]


Human
JHH7-Luc
SK-Hep1-GPC3-Luc-Venus
KOC7c-GPC3-Luc
% reduction
100
80
60
40
20
0
A B C D
SK-Hep1-GPC3-Luc-V
SK-Hep1-mock-Luc-V
A: pMAC
B: CAR-pMAC
C: pMAC-SIRPα-KO
D: CAR-pMAC-SIRPα-KO

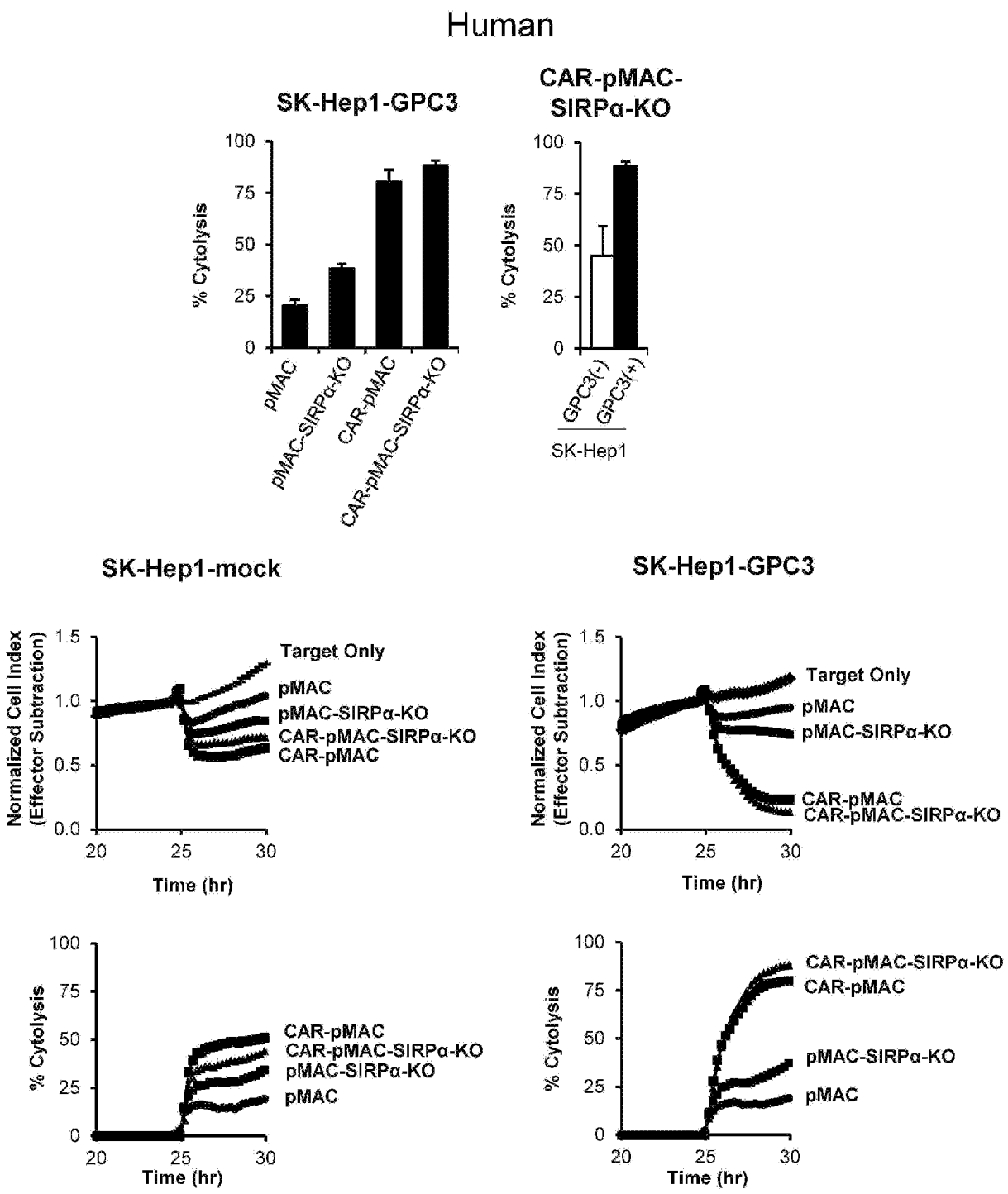
[図26-1]


Human
CAR-pMAC-SIRPα-KO
SK-Hep1
GPC3
mock
% Cytolysis
100
50
0
10:1
5:1
1:1
E : T ratio

[図26-2]


Human
CAR-pMAC-SIRPα-KO
SK-Hep1-mock
SK-Hep1-GPC3
Normalized Cell Index (Effector Subtraction)
Target only
1 : 1
5 : 1
10 : 1
Time (hr)
% Cytolysis
10 : 1
5 : 1
1 : 1
Time (hr)

[図27]


Human
SK-Hep1-GPC3
% Cytolysis
100
75
50
25
0
pMAC
pMAC-SIRPα-KO
CAR-pMAC
CAR-pMAC-SIRPα-KO
CAR-pMAC-SIRPα-KO
SK-Hep1
GPC3(-)
GPC3(+)
SK-Hep1-mock
SK-Hep1-GPC3
Normalized Cell Index (Effector Subtraction)
1.5
1.0
0.5
0.0
20
25
30
Time (hr)
Target Only
pMAC
pMAC-SIRPα-KO
CAR-pMAC-SIRPα-KO
CAR-pMAC
CAR-pMAC
CAR-pMAC-SIRPα-KO
pMAC-SIRPα-KO
pMAC

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2023/029198

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 5/10(2006.01)i; ***C12N 5/02***(2006.01)i
FI: C12N5/10; C12N5/02

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N5/10; C12N5/02

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 1971-2023
Registered utility model specifications of Japan 1996-2023
Published registered utility model applications of Japan 1994-2023

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 (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KITANI, Hiroshi et al., A novel isolation method for macrophage-like cells from mixed primary cultures of adult rat liver cells, Journal of Immunological Methods, 2010, 360, pp. 47-55 abstract, fig. 7	1-2
Y		4-6, 20-21
X	JP 2018-503375 A (AGENCY FOR SCIENCE, TECHNOLOGY AND RESEARCH) 08 February 2018 (2018-02-08) claims, paragraph [0058]	1-2
Y		4-6, 20-21
X	JP 2016-28592 A (INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE) 03 March 2016 (2016-03-03) paragraphs [0004], [0154]	1-2
Y		4-7, 10-12, 20-21

☑ 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	Date of mailing of the international search report
17 October 2023	**24 October 2023**
Name and mailing address of the ISA/JP **Japan Patent Office (ISA/JP)** **3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915** **Japan**	Authorized officer Telephone No.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2018-521667 A (THE TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF PENNSYLVANIA) 09 August 2018 (2018-08-09) claims, paragraph [0185]	4-7, 10-12, 20-21
Y	SLOAS, Christopher et al., Engineered CAR-Macrophages as Adoptive Immunotherapies for Solid Tumors, Frontiers in Immunology, 2021, vol. 12, article 783305, pp. 1-10 in particular, abstract, p. 3, right column, second paragraph	4-7, 10-12, 20-21
Y	JP 2021-511809 A (THE TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF PENNSYLVANIA) 13 May 2021 (2021-05-13) claims, paragraph [0238]	4-7, 10-12, 20-21
A	WO 2012/043651 A1 (UNIVERSITY KUMAMOTO NATIONAL UNIVERSITY CORP.) 05 April 2012 (2012-04-05) entire text, all drawings	1-21
A	岩本芳浩ほか, iPS細胞とマクロファージ, 実験医学, 2022.03, vol. 40, no. 5 (増刊) , pp. 19 (655)-24 (660) (Experimental Medicine, extra edition), non-official translation (IWAMOTO, Yoshihiro et al. iPS Cells and Macrophage) particularly, pp. 21 (657)-23 (659)	1-21

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2023/029198

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

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

Document 1: KITANI, Hiroshi et al., A novel isolation method for macrophage-like cells from mixed primary cultures of adult rat liver cells, Journal of Immunological Methods, 2010, 360, pp. 47-55, particularly, abstract, fig. 7.
Document 2: JP 2018-503375 A (AGENCY FOR SCIENCE, TECHNOLOGY AND RESEARCH) 08 February 2018 (2018-02-08), claims, paragraph [0058] & US 2018/0010096 A1, claims, paragraph [0085] & WO 2016/114723 A1 & CN 107208062 A
Document 3: JP 2016-28592 A (INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE) 03 March 2016 (2016-03-03), paragraphs [0004], [0154] & US 2012/0156179 A1, paragraphs [0004], [0156] & WO 2011/003988 A1 & CA 2765504 A1 & KR 10-2012-0060201 A

(Invention 1) Claims 1-6 and 20-21

Document 1 (see, in particular, the abstract, fig. 7, etc.) describes "microphage-like cells that proliferate in response to GM-CSF", document 2 (see, in particular, the claims, paragraph [0058], etc.) describes "primitive macrophages, the proliferation of which is promoted by M-CSF", and document 3 (see, in particular, paragraph [0004], etc.) describes "macrophages that proliferate in the presence of at least one cytokine, such as M-CSF". Claims 1-2 thus lack novelty in the light of document 1, etc., and thus do not have special technical features.

However, claim 6 depending from claim 1 has the special technical feature of "the proliferative macrophage-like cells (pMAC), which is characterized by proliferating in response to cytokines, further includes a chimeric antigen receptor (CAR)". Claims 20-21 also have the same special technical feature as claim 6.

Therefore, claims 1-2, 6, and 20-21 are classified as invention 1.

Furthermore, claims 3-5 depend from claim 1 and are inventively linked with claim 1. Thus, claims 3-5 are classified as invention 1.

(Invention 2) Claims 7-18

Claims 7-18 cannot be said to share the same or corresponding special technical features with claim 6 classified as invention 1.

Furthermore, claims 7-18 do not depend from claim 1. Additionally, claims 7-18 are not substantially identical to or similarly closely related to any of the claims classified as invention 1.

Therefore, claims 7-18 cannot be classified as invention 1.

Claims 7-18 are classified as invention 2 as a result of having the special technical feature of "a method for manufacturing proliferative macrophage-like cells (pMAC), including: a step for deleting or suppressing the expression of genes which inhibit macrophage-like functions; and a step for expressing genes which add proliferative characteristics".

(Invention 3) Claim 19

Claim 19 cannot be said to share the same or corresponding feature with claim 6 classified as invention 1 or claims 7, 13, and 16 classified as invention 2.

Furthermore, claim 19 does not depend from any of claims 1, 7, 13, and 16. Additionally, claim 19 is not substantially identical to or similarly closely related to any of the claims classified as invention 1 or invention 2.

Therefore, claim 19 cannot be classified as either invention 1 or 2.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2023/029198

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

1. ☑ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

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

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

☑ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/JP2023/029198

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
JP 2018-503375 A	08 February 2018	US 2018/0010096 A1 claims, paragraph [0085] WO 2016/114723 A1 CN 107208062 A	
JP 2016-28592 A	03 March 2016	US 2012/0156179 A1 paragraphs [0004], [0156] WO 2011/003988 A1 CA 2765504 A1 KR 10-2012-0060201 A	
JP 2018-521667 A	09 August 2018	US 2018/0244748 A1 claims, paragraph [0294] WO 2017/019848 A1 KR 10-2018-0028533 A CN 108025024 A	
JP 2021-511809 A	13 May 2021	US 2021/0046110 A1 claims, paragraph [0249] WO 2019/152781 A1 KR 10-2020-0120917 A CN 112004823 A	
WO 2012/043651 A1	05 April 2012	US 2013/0195818 A1 entire text, all drawings	

国際調査報告

国際出願番号
PCT/JP2023/029198

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））
C12N 5/10(2006.01)i; C12N 5/02(2006.01)i
FI: C12N5/10; C12N5/02

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））
C12N5/10; C12N5/02

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　１９７１－２０２３年
日本国実用新案登録公報　１９９６－２０２３年
日本国登録実用新案公報　１９９４－２０２３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); CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)

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
X	KITANI, Hiroshi et al., A novel isolation method for macrophage-like cells from mixed primary cultures of adult rat liver cells, Journal of Immunological Methods, 2010, 360, pp. 47-55 ABSTRACT, Fig. 7	1-2
Y		4-6, 20-21
X	JP 2018-503375 A (エージェンシー フォー サイエンス, テクノロジー アンド リサーチ) 08.02.2018 (2018-02-08) [特許請求の範囲], [0058]	1-2
Y		4-6, 20-21
X	JP 2016-28592 A (アンスティチュ ナショナル ドゥ ラ サンテ エ ドゥ ラ ルシェルシュ メディカル) 03.03.2016 (2016-03-03) [0004], [0154]	1-2
Y		4-7, 10-12, 20-21
Y	JP 2018-521667 A (ザ トラスティーズ オブ ザ ユニバーシティ オブ ペンシルバニア) 09.08.2018 (2018-08-09) [特許請求の範囲], [0185]	4-7, 10-12, 20-21

☑ 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
“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	国際調査報告の発送日
17.10.2023	24.10.2023

名称及びあて先
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

権限のある職員（特許庁審査官）
山内　達人 4N 3348
電話番号 03-3581-1101 内線 3488

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
Y	SLOAS, Christopher et al., Engineered CAR-Macrophages as Adoptive Immunotherapies for Solid Tumors, Frontiers in Immunology, 2021, Volume 12, Article 783305, pp. 1-10 特に要約, p. 3右欄第2段落	4-7, 10-12, 20-21
Y	JP 2021-511809 A (ザ トラスティーズ オブ ザ ユニバーシティ オブ ペンシルバニア) 13.05.2021 (2021-05-13) [特許請求の範囲], [0238]	4-7, 10-12, 20-21
A	WO 2012/043651 A1 (国立大学法人 熊本大学) 05.04.2012 (2012-04-05) 全文, 全図	1-21
A	岩本芳浩ほか, iPS細胞とマクロファージ, 実験医学, 2022.03, Vol. 40, No. 5 (増刊), pp. 19 (655)-24 (660) 特にpp. 21 (657)-23 (659)	1-21

第Ⅲ欄　　発明の単一性が欠如しているときの意見（第１ページの３の続き）

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

文献１：KITANI, Hiroshi et al., A novel isolation method for macrophage-like cells from mixed primary cultures of adult rat liver cells, Journal of Immunological Methods, 2010, 360, pp. 47-55, 特にABSTRACT, Fig. 7
文献２：JP 2018-503375 A (エージェンシー フォー サイエンス, テクノロジー アンド リサーチ) 08.02.2018(2018-02-08)　[特許請求の範囲], [0058] & US 2018/0010096 A1　特許請求の範囲, [0085] & WO 2016/114723 A1 & CN 107208062 A
文献３：JP 2016-28592 A (アンスティチュ ナショナル ドゥ ラ サンテ エ ドゥ ラ ルシェルシュ メディカル) 03.03.2016(2016-03-03)　[0004], [0154] & US 2012/0156179 A1　[0004], [0156] & WO 2011/003988 A1 & CA 2765504 A1 & KR 10-2012-0060201 A

（発明1）請求項1-6、20-21
文献1（特にABSTRACT, Fig. 7等参照）には「ＧＭ-ＣＳＦ依存的に増殖するマクロファージ様細胞」が、文献２（特に[特許請求の範囲], [0058]等参照）には「Ｍ－ＣＳＦで増殖が促進される原始様マクロファージ」が、文献３（特に [0004] 等参照）には「Ｍ－ＣＳＦなどの少なくとも１つのサイトカインの存在下において増殖するマクロファージ」が記載されており、請求項1-2は文献1等により新規性が欠如しているため、特別な技術的特徴を有しない。
しかしながら、請求項1の従属請求項である請求項6は「サイトカイン依存的に増殖することを特徴とする、増殖性マクロファージ様細胞（ｐＭＡＣ）が、さらにキメラ抗原受容体（ＣＡＲ）を含む」という特別な技術的特徴を有しており、請求項20-21も、請求項6と同一の特別な技術的特徴を有している。
したがって、請求項1-2、6、20-21を発明1に区分する。
また、請求項3-5は請求項1の従属請求項であり、請求項1に対して発明の連関を有しているので、発明1に区分する。

（発明2）請求項7-18
請求項7-18は、発明1に区分された請求項6と、同一の又は対応する特別な技術的特徴を有しているとはいえない。
また、請求項7-18は請求項1の従属請求項でもない。さらに、請求項7-18は、発明1に区分されたいずれの請求項に対しても実質同一又はそれに準ずる関係にはない。
したがって、請求項7-18は発明1に区分できない。
そして、請求項7-18は、「マクロファージ様機能を阻害する遺伝子を欠損または発現抑制させる工程、および増殖性を付加する遺伝子を発現させる工程を含む、増殖性マクロファージ様細胞（ｐＭＡＣ）の製造方法」という特別な技術的特徴を有しているので、発明2に区分する。

（発明3）請求項19
請求項19は、発明1に区分された請求項6又は発明2に区分された請求項7、13、16と、同一の又は対応する特別な技術的特徴を有しているとはいえない。
また、請求項19は請求項1、7、13及び16のいずれの従属請求項でもない。さらに、請求項19は、発明1又は発明2に区分されたいずれの請求項に対しても実質同一又はそれに準ずる関係にはない。
したがって、請求項19は発明1及び2のいずれにも区分できない。

国際調査報告

国際出願番号
PCT/JP2023/029198

第Ⅲ欄　発明の単一性が欠如しているときの意見（第１ページの３の続き）

1. ☑ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求項について作成した。

2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求項について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。

3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求項のみについて作成した。

4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求項について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

☐ 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。

☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。

☑ 追加調査手数料の納付はあったが、異議申立てはなかった。

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/JP2023/029198

引用文献	公表日	パテントファミリー文献	公表日
JP 2018-503375 A	08.02.2018	US 2018/0010096 A1 特許請求の範囲，[0085] WO 2016/114723 A1 CN 107208062 A	
JP 2016-28592 A	03.03.2016	US 2012/0156179 A1 [0004]，[0156] WO 2011/003988 A1 CA 2765504 A1 KR 10-2012-0060201 A	
JP 2018-521667 A	09.08.2018	US 2018/0244748 A1 特許請求の範囲，[0294] WO 2017/019848 A1 KR 10-2018-0028533 A CN 108025024 A	
JP 2021-511809 A	13.05.2021	US 2021/0046110 A1 特許請求の範囲，[0249] WO 2019/152781 A1 KR 10-2020-0120917 A CN 112004823 A	
WO 2012/043651 A1	05.04.2012	US 2013/0195818 A1 全文，全図	