(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)特許出願公表番号
特表2016-509474
(P2016-509474A)
(43)公表日　平成28年3月31日(2016.3.31)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
C12N 5/0784	***(2010.01)***	C12N	5/0784	ZNA	4B024
A61P 37/06	***(2006.01)***	A61P	37/06		4B065
A61P 37/02	***(2006.01)***	A61P	37/02		4C087
A61K 35/15	***(2015.01)***	A61K	35/15	Z	
A61P 29/00	***(2006.01)***	A61P	29/00	101	

審査請求 有　予備審査請求 未請求　（全 94 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2015-551179 (P2015-551179)
(86)(22)出願日　平成26年1月2日 (2014.1.2)
(85)翻訳文提出日　平成27年8月19日 (2015.8.19)
(86)国際出願番号　PCT/EP2014/050012
(87)国際公開番号　WO2014/106631
(87)国際公開日　平成26年7月10日 (2014.7.10)
(31)優先権主張番号　1300052.6
(32)優先日　平成25年1月3日 (2013.1.3)
(33)優先権主張国　英国 (GB)
(31)優先権主張番号　61/748,550
(32)優先日　平成25年1月3日 (2013.1.3)
(33)優先権主張国　米国 (US)

(71)出願人　515181948
トランシミューン　アーゲー
ドイツ国　４０２１２　デュッセルドルフ，ケーニヒスアレー　９０
(71)出願人　515183023
イェール　ユニバーシティー
アメリカ合衆国　コネチカット州　０６５１０，ニュー　ヘイブン，トゥー　ホイットニー　アベニュー
(74)代理人　100092783
弁理士　小林　浩
(74)代理人　100120134
弁理士　大森　規雄
(74)代理人　100110663
弁理士　杉山　共永

最終頁に続く

(54)【発明の名称】免疫抑制樹状細胞を得るための方法

(57)【要約】
本発明は、免疫抑制自己樹状細胞を産生するための方法に関する。本発明は、自己免疫疾患、過敏性疾患、固形臓器移植での拒絶および／または移植片対宿主病に罹患している患者を処置するためのそのような細胞の使用にさらに関する。

【特許請求の範囲】
【請求項１】
体外量の哺乳動物対象の血液試料に含有される単球の免疫抑制抗原提示細胞への分化を誘導するための方法であって、
ａ）前記単球が活性化され、少なくとも１つの分子マーカーによって同定可能である免疫抑制抗原提示細胞に分化するように誘導されるように、前記体外量の前記哺乳動物対象の血液試料を物理的な力に供するステップであって、前記少なくとも１つの分子マーカーが免疫抑制抗原提示細胞の指標であるステップ
を少なくとも含む方法。
【請求項２】
前記免疫抑制抗原提示細胞がＧＩＬＺ、ＩＤＯ、ＫＭＯ、および／またはＩＬ－１０の発現の増加によって同定可能である免疫抑制樹状細胞である、
請求項１に記載の方法。
【請求項３】
前記免疫抑制抗原提示または樹状細胞がＩＬ－１０対ＩＬ－１２ｐ７０比のＧＩＬＺ誘導増加によって同定可能である、
請求項１または２のいずれかに記載の方法。
【請求項４】
前記免疫抑制抗原提示または樹状細胞が免疫賦活抗原提示または樹状細胞の指標である少なくとも１個、２個、３個、４個、５個、６個、７個、８個、９個、１０個、１５個、２０個、２５個、３０個、３５個、４０個、４５個、５０個、５５個または６０個の分子マーカーの発現を決定するステップによって同定可能である、
請求項１、２または３のいずれかに記載の方法。
【請求項５】
表１から選択可能である前記少なくとも１個、２個、３個、４個、５個、６個、７個、８個、９個、１０個、１５個、２０個、２５個、３０個、３５個、４０個、４５個、５０個、５５個または６０個の分子マーカーが発現の増加を示さない、
請求項１、２、３または４のいずれかに記載の方法。
【請求項６】
前記少なくとも１個、２個、３個、４個、５個、６個、７個、８個、９個、１０個、１５個、２０個、２５個、３０個、３５個、４０個、４５個、５０個、５５個または６０個の分子マーカーがＰＬＡＵＲ、ＮＥＵ１、ＣＴＳＢ、ＣＸＣＬ１６、ＩＣＡＭ１、ＭＳＲ１、ＯＬＲ１、ＳＩＲＰＡ、ＴＮＦＲＳＦ１Ａ、ＴＮＦＳＦ１４、ＴＮＦＳＦ９、ＰＭＢ２２、ＣＤ４０、ＬＡＭＰ３、ＣＤ８０、ＣＣＲ７、ＬＯＸ１、ＣＤ８３、ＡＤＡＭデシシン、ＦＰＲＬ２、ＧＰＮＭＢおよび／またはＣＤ８６を含む、
請求項５に記載の方法。
【請求項７】
前記単球が、サイトカインおよび／またはケモカインを含む分子カクテルの添加を必要とせずに活性化され、前記免疫抑制抗原提示または樹状細胞に分化するように誘導される、
請求項１、２、３、４、５または６のいずれかに記載の方法。
【請求項８】
前記体外量の前記哺乳動物対象の血液試料が、前記哺乳動物対象の血液試料内に含有される前記単球に剪断力が適用されるようにデバイスのフローチャンバーを通る前記体外量の前記哺乳動物対象の血液試料の流速の固定または調節可能な調整を可能にする前記デバイスの前記フローチャンバーに、前記体外量の前記哺乳動物対象の血液試料を通すことによって物理的な力に供される、
請求項１、２、３、４、５、６または７のいずれかに記載の方法。
【請求項９】
前記体外量の前記哺乳動物対象の血液試料が、前記哺乳動物対象の血液試料内に含有さ

れる前記単球に剪断力が適用されるようにデバイスのフローチャンバーを通る前記体外量の前記哺乳動物対象の血液試料の流速の調整を可能にする前記デバイスの前記フローチャンバーに、前記体外量の前記哺乳動物対象の血液試料を通すことによって物理的な力に供され、
前記デバイスが温度および露光を含む群から選択される少なくとも１つのパラメーターの調整を追加的に可能にする、
請求項１、２、３、４、５、６、７または８のいずれかに記載の方法。
【請求項１０】
前記単球が、活性化血小板および／または血漿構成成分との相互作用を通じて活性化され、免疫抑制抗原提示または樹状細胞に分化するように誘導される、
請求項１、２、３、４、５、６、７、８または９のいずれかに記載の方法。
【請求項１１】
前記単球の活性化および免疫抑制抗原提示または樹状細胞への分化が、フローチャンバーの設計および寸法、単球がフローチャンバーを通る流速、８－ＭＯＰなどのＤＮＡ架橋剤の存在または非存在下で単球が曝露される光、単球、血小板、血小板由来因子および／もしくは血漿構成成分がフローチャンバーを通る温度、単球、血小板、血小板由来因子および／もしくは血漿構成成分がフローチャンバーを通る順序、血漿構成成分がフローチャンバーの表面にコートされる密度、血小板および／もしくは血小板由来因子がフローチャンバーの表面およびもしくは血漿構成成分に接着する密度、ならびに／または単球が血小板および／もしくは血小板由来因子に接着する、およびもしくは血漿構成成分がフローチャンバーの表面に接着する密度によって影響を受け得る、
請求項１、２、３、４、５、６、７、８、９または１０のいずれかに記載の方法。
【請求項１２】
ａ）少なくとも単球を含む前記体外量の前記哺乳動物対象の血液試料を、前記体外量の前記哺乳動物対象の血液試料が通ることができるフローチャンバーを提供するように構成されているデバイスに適用するステップ、
ｂ）前記体外量の前記哺乳動物対象の血液内に含まれ得る、または少なくとも単球を含む前記哺乳動物対象の血液試料から分離されて提供され得る血小板を活性化するステップ、
ｃ）前記単球がステップｂ）において得られた前記活性化血小板に結合することによって活性化され、免疫抑制抗原提示または樹状細胞に分化するように誘導されるように前記体外量の前記哺乳動物対象の血液試料内に含有される単球に物理的な力を適用することによって、少なくとも単球を含む前記体外量の前記哺乳動物対象の血液試料を前記デバイス中で処置するステップ
を少なくとも含む、
請求項１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０または１１のいずれかに記載の方法。
【請求項１３】
ａ）少なくとも単球を含む前記体外量の前記哺乳動物対象の血液試料を、前記体外量の前記哺乳動物対象の血液試料が通ることができるフローチャンバーを提供するように構成されているデバイスに適用するステップ、
ｂ）前記体外量の前記哺乳動物対象の血液試料内に含まれ得る、または前記哺乳動物対象の血液試料から分離されて提供され得る血漿構成成分を通すステップ、
ｃ）前記単球がステップｂ）において得られた前記血漿構成成分に結合することによって活性化され、免疫抑制抗原提示または樹状細胞に分化するように誘導されるように前記体外量の前記哺乳動物対象の血液試料内に含有される単球に物理的な力を適用することによって、少なくとも単球を含む前記体外量の前記哺乳動物対象の血液試料を前記デバイス中で処置するステップ
を少なくとも含む、
請求項１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０または１１のいずれかに記載の方法。
【請求項１４】
ａ）少なくとも単球を含む前記体外量の前記哺乳動物対象の血液試料を、前記体外量の

前記哺乳動物対象の血液試料が通ることができるフローチャンバーを提供するように構成されているデバイスに適用するステップ、
ｂ）前記体外量の前記哺乳動物対象の血液内に含まれ得る、または前記哺乳動物対象の血液試料から分離されて提供され得る血漿構成成分を通すステップ、
ｃ）前記体外量の前記哺乳動物対象の血液試料内に含まれ得る、または少なくとも単球を含む前記哺乳動物対象の血液試料から分離されて提供され得る血小板を活性化するステップ、
ｄ）前記単球がステップｂ）およびｃ）において得られた前記活性化血小板および／または前記血漿構成成分に結合することによって活性化され、免疫抑制抗原提示または樹状細胞に分化するように誘導されるように前記体外量の前記哺乳動物対象の血液試料内に含有される単球に物理的な力を適用することによって、少なくとも単球を含む前記体外量の前記哺乳動物対象の血液を前記デバイス中で処置するステップ
を少なくとも含む、
請求項１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０または１１のいずれかに記載の方法。
【請求項１５】
前記体外量の前記哺乳動物対象の血液試料が得られない、
請求項１２、１３または１４のいずれかに記載の方法。
【請求項１６】
前記体外量の前記哺乳動物対象の血液試料が前記哺乳動物対象の体外全血の約１０ｍｌから約５００ｍｌの間である、
請求項１５に記載の方法。
【請求項１７】
前記体外量の前記哺乳動物対象の血液試料が前記哺乳動物対象の体外全血の約１０ｍｌから約５００ｍｌから白血球を単離することによって得られる、
請求項１５から１６のいずれかに記載の方法。
【請求項１８】
前記体外量の前記哺乳動物対象の血液試料が前記哺乳動物対象の体外全血の約１０ｍｌから約５００ｍｌからバフィーコートを単離することによって得られる、
請求項１５、１６または１７のいずれかに記載の方法。
【請求項１９】
前記体外量の前記哺乳動物対象の血液試料が血漿構成成分を含まない、
請求項１５、１６、１７または１８のいずれかに記載の方法。
【請求項２０】
前記体外量の前記哺乳動物対象の血液試料が血小板を含まない、
請求項１５、１６、１７、１８または１９のいずれかに記載の方法。
【請求項２１】
前記血小板が、前記体外量の前記哺乳動物対象の血液が前記デバイスに適用される前に前記体外量の前記哺乳動物対象の血液から分離されている、
請求項２０に記載の方法。
【請求項２２】
前記体外量の前記哺乳動物対象の血液が得られる、
請求項１２、１３または１４のいずれかに記載の方法。
【請求項２３】
前記体外量の前記哺乳動物対象の血液が白血球を単離することによって得られる、
請求項２２に記載の方法。
【請求項２４】
前記体外量の前記哺乳動物対象の血液がバフィーコートを単離することによって得られる、
請求項２２から２３のいずれかに記載の方法。
【請求項２５】

前記体外量の前記哺乳動物対象の血液が血漿構成成分を含まない、
請求項２２、２３から２４のいずれかに記載の方法。
【請求項２６】
前記体外量の前記哺乳動物対象の血液が血小板を含まない、
請求項２２、２３、２４または２５のいずれかに記載の方法。
【請求項２７】
前記血小板が、前記体外量の前記哺乳動物対象の血液が前記デバイスに適用される前に前記体外量の前記哺乳動物対象の血液から分離されている、
請求項２６に記載の方法。
【請求項２８】
前記フローチャンバーが約１μｍから約４００μｍまでの高さ、および約１μｍから約４００μｍまでの幅の寸法を有する、請求項１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６または２７のいずれかに記載の方法。
【請求項２９】
前記フローチャンバーが約５μｍから約３００μｍを含むそれ以下の高さおよび約５μｍから約３００μｍを含むそれ以下の幅の寸法を有する、請求項２８に記載の方法。
【請求項３０】
前記フローチャンバーが約１０μｍから約２５０μｍを含むそれ以下の高さおよび約１０μｍから約２５０μｍを含むそれ以下の幅の寸法を有する、請求項２９に記載の方法。
【請求項３１】
前記フローチャンバーが約５０μｍから約２００μｍを含むそれ以下の高さおよび約５０μｍから約２００μｍを含むそれ以下の幅の寸法を有する、請求項３０に記載の方法。
【請求項３２】
前記フローチャンバーが約５０μｍから約１００μｍを含むそれ以下の高さおよび約５０μｍから約１００μｍを含むそれ以下の幅の寸法を有する、請求項３１に記載の方法。
【請求項３３】
前記フローチャンバーが前記体外の量の前記哺乳動物対象の血液試料約１ｍｌから約５０ｍｌの間の容積を取り込むように構成されている、請求項２８、２９、３０、３１または３２のいずれかに記載の方法。
【請求項３４】
前記フローチャンバーの材料がプラスチックではない、
請求項８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２または３３のいずれかに記載の方法。
【請求項３５】
前記非プラスチック材料がガラスからなる群から選択される、請求項３４に記載の方法。
【請求項３６】
前記フローチャンバーの材料がプラスチックである、請求項８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２または３３のいずれかに記載の方法。
【請求項３７】
前記プラスチック材料がアクリル、ポリカーボネート、ポリエーテルイミド、ポリスルホン、ポリフェニルスルホン、スチレン、ポリウレタン、ポリエチレン、テフロンまたは任意の他の適切な医療グレードプラスチックからなる群から選択される、請求項３６に記載の方法。
【請求項３８】
前記フローチャンバーが光の透過を可能にするように構成されている、請求項８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２

３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６または３７のいずれかに記載の方法。

【請求項３９】

前記フローチャンバーがＵＶ光の透過を可能にするように構成されている、請求項３８に記載の方法。

【請求項４０】

前記血小板の活性化が、前記体外量の前記哺乳動物対象の血液試料内に含まれる血漿構成成分を、前記血小板の少なくとも一部が前記血漿構成成分と相互作用でき、前記フローチャンバーの表面に固定化されるように前記フローチャンバーの表面に配置することによって達成される、請求項８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８または３９のいずれかに記載の方法。

【請求項４１】

前記血小板の活性化が、フィブリノーゲン、フィブロネクチンおよびフィブリノーゲンのガンマ構成成分を含む群から選択されるタンパク質を、前記血小板の少なくとも一部が前記タンパク質と相互作用でき、前記フローチャンバーの表面に固定化されるように前記フローチャンバーの表面に配置することによって達成される、請求項８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９または４０のいずれかに記載の方法。

【請求項４２】

前記血小板の活性化が、フィブロネクチンを、前記血小板の少なくとも一部が前記フィブロネクチンと相互作用でき、前記フローチャンバーの表面に固定化されるように前記フローチャンバーの表面に配置することによって達成される、請求項４１に記載の方法。

【請求項４３】

前記血小板が、前記フローチャンバーを約０．１から約１０．０ｄｙｎ／ｃｍ^2、好ましくは約０．１から約２．０ｄｙｎ／ｃｍ^{2}の範囲の剪断力下で通される、請求項８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９、４０、４１または４２のいずれかに記載の方法。

【請求項４４】

前記単球が、約０．１から約２０．０ｄｙｎ／ｃｍ^{2}の剪断力を産生するように前記フローチャンバーを約１０ｍｌ／分から約２００ｍｌ／分の流速で通される、請求項８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９、４０、４１、４２または４３のいずれかに記載の方法。

【請求項４５】

血小板の活性化がＰ－セレクチンおよび／またはαＩＩｂ－β３インテグリンの発現によってモニターできる、請求項１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９、４０、４１、４２、４３または４４のいずれかに記載の方法。

【請求項４６】

前記単球が、前記活性化血小板に結合できるように前記フローチャンバーを約０．１から約１０．０ｄｙｎ／ｃｍ^{2}の剪断力、好ましくは約０．１から約１．０ｄｙｎ／ｃｍ^{2}の力の下で通ることによって活性化され、免疫抑制抗原提示または樹状細胞に分化するように誘導される、請求項８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９、４０、４１、４２、４３、４４または４５のいずれかに記載の方法。

【請求項４７】
免疫抑制樹状細胞の形成を可能にするために活性化単球をインキュベートするステップをさらに含む、請求項１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９、４０、４１、４２、４３、４４、４５または４６のいずれかに記載の方法。
【請求項４８】
個体特異的な機能的成熟的に同期化された免疫抑制抗原提示または樹状細胞を得るための、請求項１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９、４０、４１、４２、４３、４４、４５、４６または４７のいずれかに記載の方法。
【請求項４９】
前記単球がＧＩＬＺの発現の増加をもたらすためにＤＮＡ架橋剤の存在下でＵＶ光に曝露される、
請求項１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９、４０、４１、４２、４３、４４、４５、４６、４７または４８のいずれかに記載の方法。
【請求項５０】
前記単球がＧＩＬＺの発現の増加をもたらすために８－ＭＯＰの存在下でＵＶＡ光に曝露される、
請求項４９に記載の方法。
【請求項５１】
免疫抑制自己抗原提示または樹状細胞を得るための、請求項１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９、４０、４１、４２、４３、４４、４５、４６、４７、４８、４９または５０のいずれかに記載の方法。
【請求項５２】
免疫抑制同種抗原提示または樹状細胞を得るための、請求項１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９、４０、４１、４２、４３、４４、４５、４６、４７、４８、４９または５０のいずれかに記載の方法。
【請求項５３】
自己免疫疾患の処置における使用のための、請求項１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９、４０、４１、４２、４３、４４、４５、４６、４７、４８、４９、５０または５１のいずれかに記載の方法によって得ることができる免疫抑制自己樹状細胞。
【請求項５４】
自己免疫疾患が、関節リウマチ、乾癬、多発性硬化症、１型糖尿病および全身性エリテマトーデスを含む群から選択される、請求項５３に記載の使用のための免疫抑制自己樹状細胞。
【請求項５５】
過敏性疾患の処置における使用のための、請求項１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３

６、３７、３８、３９、４０、４１、４２、４３、４４、４５、４６、４７、４８、４９、５０または５１のいずれかに記載の方法によって得ることができる免疫抑制自己樹状細胞。

【請求項５６】

固形臓器移植における拒絶および／または移植片対宿主病の処置における使用のための、請求項１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９、４０、４１、４２、４３、４４、４５、４６、４７、４８、４９、５０または５２のいずれかに記載の方法によって得ることができる免疫抑制同種樹状細胞。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【０００１】

本発明は、免疫抑制樹状細胞を産生するための方法に関する。本発明は、固形臓器移植を受けているならびに／または移植片対宿主病、自己免疫疾患および過敏性疾患に罹患している患者を処置するためのそのような細胞の使用にさらに関する。本発明は、具体的には、免疫賦活樹状細胞と比較して免疫抑制樹状細胞を優先的に産生する方法に関する。

【背景技術】

【０００２】

樹状細胞（ＤＣ）は、ヒトにおいて細胞性免疫応答の開始および制御のため強力な抗原提示細胞であると認識されている。ＤＣは、Ｔ細胞の応答性特異的クローンとの相互作用のときにそれらがその潜在的特性のどちらのセットを発現するかに依存して、免疫賦活性または免疫抑制性のいずれになる場合もあることから、Ｔ細胞媒介性免疫反応における非常に重要な中心的演者であると考えられている。広義だが広く支持された一般論として、未成熟ＤＣはそれらのより成熟した対応物よりも「免疫寛容原性」であり、一方成熟ＤＣはそれらの未成熟前駆体よりも「免疫原性」であると考えられている。単球からｅｘ　ｖｉｖｏで生成され、特定の抗原を有し、いずれの免疫学的方向においても有効に機能するＤＣの能力は、患者に戻された後のそれらの生存率および活力に依存する。対抗的な免疫賦活と免疫抑制ＤＣとの間の均衡が、ＤＣ依存性治療用免疫応答の方向および強度の両方の主な決定要因であることが論理的に結論される。

【０００３】

本発明の目的は強力で臨床的に関連する免疫応答の生成に特に貢献するＤＣ集団の産生を促進することである。抗がん免疫を増強する試みなどのＤＣに基づく治療の大きな見込みにもかかわらず、臨床結果は一般に残念なものであった。例えばＰｒｏｖｅｎｇｅ、血液単球からのＤＣのｅｘ　ｖｉｖｏ産生の従来の方法を適合する固形腫瘍のために近年初めてＦＤＡ認可された免疫治療は、進行性前立腺がんを有する患者の生存に４カ月の改善をもたらしただけであった。さらにＰｒｏｖｅｎｇｅは、これまでのところ処置された前立腺がんのサイズを減少させることが示されていない。ＤＣを誘導するその従来の方法および体外循環式光化学療法（Extracorporeal Photopheresis）（ＥＣＰ）、「液性」悪性皮膚Ｔ細胞リンパ腫（ＣＴＣＬ）のためのＦＤＡ認可治療は、生じるＤＣのｉｎ　ｖｉｖｏ活力および生存率に不利である条件下での比較的不均一なＤＣ集団の産生によって妨げられている。治療用ＤＣの産生にさらに生理学的な条件を用いることによって、本発明は、その生存および活力が、それが産生された方法に固有の要因によって阻害されない、さらに成熟的に同期化されたＤＣの産生を可能にする。さらにこの方法は、ヒトおよび動物白血球の両方に適用可能である。

【０００４】

ＤＣは、ＣＤ８$^{+}$細胞傷害性Ｔ細胞（ＣＴＬ）およびＣＤ４$^{+}$Ｔヘルパー（Ｔｈ１）応答の両方を刺激する。ＤＣは、抗原を捕捉および処理でき、捕捉した抗原を提示するために領域のリンパ節に移動でき、Ｔ細胞応答を誘導する。ヒトでは、ＤＣは、末梢血の比較的希少な構成成分である（白血球の＜１％）。しかし多量のＤＣをＣＤ３４$^{+}$前駆体また

は血液単球からの実験手順によって分化できる。

【０００５】

前述の特性からＤＣは、有効な抗腫瘍免疫応答を誘発するための重要な細胞性物質として同定されている。アイデアは、それらのＭＨＣクラスＩおよびＭＨＣクラスＩＩ複合体上に腫瘍特異的抗原を提示し、それにより腫瘍に対する免疫攻撃を始めるために患者に（再）導入できる樹状細胞を生成することである。しかしそのような免疫賦活樹状細胞の生成は、複雑でかなり高価なサイトカインカクテルを使用するＣＤ３４$^{+}$前駆体または血液単球の分化を通常必要とする。これらの標準的方法ではサイトカインは、生理的条件下のｉｎ　ｖｉｖｏで遭遇するよりも非常に高い濃度（しばしば桁で異なる）で用いられる。したがって、ＤＣに基づく免疫調節からの全般的に残念な臨床結果について提案された１つの理由は、通常のサイトカイン法によって産生されたＤＣが患者における実際にはるかに低いサイトカイン濃度では有効に機能しない可能性があることである。サイトカインなどの増殖因子の著しく超生理的な濃度でｅｘ　ｖｉｖｏで産生されたＤＣは、患者におけるｉｎ　ｖｉｖｏ環境において再産生される条件に応じて選択される。

【０００６】

前述の免疫賦活樹状細胞に加えて、他の種類の樹状細胞、すなわち免疫抑制または免疫阻害樹状細胞と称される場合もある免疫寛容原性樹状細胞が記載されている。これらの種類の樹状細胞は、免疫寛容の維持において重要な役割を演じており、固形臓器移植、移植片対宿主病、自己免疫疾患および過敏性疾患などの治療設定について考察されている（例えばHu et al. Immunology, (2010), 132, 307-314を参照されたい）。

【０００７】

古典的体外循環式光化学療法（ＥＣＰ）は、患者のサブセットにおいて皮膚Ｔ細胞リンパ腫（ＣＴＣＬ）を処置するために良好に使用されている。ＥＣＰではＣＴＣＬに罹患している患者は、光活性化可能化合物８－メトキシソラレン（８－ＭＯＰ）を受ける。次いで患者は、バフィーコートを得るために白血球アフェレーシスされ、これらのバフィーコートは白血球アフェレーシスされたバフィーコートを照射するために連続的閉鎖環式紫外線曝露デバイスに通され、それにより曝露されたリンパ球に致死性の障害を与える。このやり方では８－ＭＯＰは、ＤＮＡの塩基対を共有結合的に架橋するように誘導される。ＥＣＰの構想は、ＣＴＣＬの増殖性転移性Ｔ細胞を破壊し、次いで死にかけた細胞を患者に静脈内で再導入することである。このプロセスが、外来性サイトカインの追加による刺激を必要とすることなく、通過された血液単球のＤＣへの変換を追加的に生じることが知られている。これらのＥＣＰ誘導ＤＣは、８－ＭＯＰとＵＶ照射との組合せによって破壊された腫瘍細胞から抗原をさらに内部移行、処理および提示すると想定されている。これらのロードされた樹状細胞の患者への再導入が、ＣＴＬＣを処置するときのＥＣＰの成功の少なくとも部分的な要因となっていることが仮定されている。実際に、８－ＭＯＰまたはＵＶ光照射のいずれも使用されていないが、単球を含む体外血液試料がＥＣＰデバイスを通じて剪断ストレス下を通されるＥＣＰ様プロセスは、単球のＤＣへの分化を開始するとも想定されている。

【０００８】

しかし、ＥＣＰまたはＥＣ様プロセスが切断型、すなわち免疫抑制または免疫寛容原ＤＣをもたらし、骨髄幹同種移植後に一般に続く移植片対宿主病の処置においてＥＣＰの臨床的有効性に大きく貢献すると考えられることが見出されている。単球の免疫賦活または免疫抑制ＤＣへの分化でのＥＣＰの正確な機序的態様は、理解しにくいままである（ＥＣＰプロセスの概説についてGirardi et al. (2002), Transfusion and Apheresis Science, 26, 181-190を参照されたい）。

【０００９】

したがって本ＥＣＰおよびＥＣＰ様プロセスは、免疫賦活および免疫抑制ＤＣの複合体混合物をもたらすと考えられる。当然のことながら、とりわけ臨床的展望から、ＥＣＰおよびＥＣＰ様プロセスがこれらの制限を克服するためにどのように改変でき、どのように免疫賦活ＤＣと比較して免疫抑制ＤＣを合目的的および選択的優先的に得ることができる

か、逆も同様、を理解することは重要である。さらに古典的ＥＣＰプロセスは、得られた樹状細胞混合物が患者に再注入されることから原理的にｉｎ　ｖｉｖｏ法である。しかし、ヒトまたは動物の身体外で免疫賦活ＤＣよりも免疫抑制ＤＣの優先的産生を可能にする、逆も同様、方法を利用できるようにすることは望ましい。

【００１０】

したがって、患者への再導入により例えば、多発性硬化症または移植片対宿主病などの自己免疫疾患の処置を可能にする、予測可能で再現性のある個体特異的、すなわち自己免疫抑制樹状細胞の産生を可能にする方法に対する必要性が引き続きある。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【００１１】

本発明の１つの目的は、免疫抑制自己樹状細胞を産生するための方法を提供することである。

【００１２】

本発明の別の目的は、免疫抑制抗原提示細胞を産生する方法を提供することである。

【００１３】

本発明の別の目的は、患者から得られた体外の量の血液において免疫抑制樹状細胞または免疫抑制抗原提示細胞を産生するための方法を提供することである。

【００１４】

本発明のさらなる目的は、サイトカインカクテルを必要とせずに患者から得られた体外の量の血液において免疫抑制樹状細胞または免疫抑制抗原提示細胞を産生するための方法を提供することである。

【００１５】

本発明のさらに別の目的は、固形臓器移植を受けているならびに／または移植片対宿主病、自己免疫疾患および過敏性疾患に罹患している患者を処置するためのそのような免疫抑制樹状細胞または免疫抑制抗原提示細胞の使用に関する。

【００１６】

これらおよび他の目的は、それらが以下の記載から明らかになることから、独立請求項の主題によって解決される。本発明のいくつかの好ましい実施形態は、独立請求項の主題を形成する。本発明のさらに他の実施形態は、以下の記載から理解され得る。

【課題を解決するための手段】

【００１７】

本発明は、（ｉ）古典的ＥＣＰ手順のいくつかの態様を模倣すること、および（ｉｉ）体外の量の血液における単球の免疫賦活自己樹状細胞への分化の誘導の細胞性、分子性機序および生物物理学的条件を解明することを可能にする小型化され拡張可能なデバイスについて以下に示されるデータにある程度基づいている。このデータは、血小板の活性化および剪断力の条件下でのそのような活性化血小板への単球の結合が免疫賦活自己樹状細胞を得るために必須であることを示している。以下に記載の実験によって示されるとおり、これらの免疫賦活自己樹状細胞は、免疫賦活自己樹状細胞の指標となる分子マーカーの発現によって特徴付けることができる。データは、グルココルチコイド誘導ロイシンジッパー（ＧＩＬＺ）の発現の増加を導く条件が単球の免疫抑制樹状細胞への分化を有利に可能にすることも示している。単球由来未成熟樹状細胞を８－ＭＯＰで処置し、ＵＶＡに曝露した結果としてＧＩＬＺの発現の増加を示すこれらの免疫抑制樹状細胞は、アポトーシス性白血球との接触でさらに強いＧＩＬＺの発現を示す。さらに、そのような樹状細胞は、ＩＬ－１０対ＩＬ－１２ｐ７０比の低減から理解されるとおり、ＩＬ－１０の発現の増加を示し、種々の炎症促進性サイトカインおよびケモカインの産生が減少する。したがってこれらの発見は、使用されるデバイスの特性およびプロセスのパラメーターをしたがって注意深く選択することによって免疫抑制樹状細胞を得るための合理的な手法を可能にする。古典的ＥＣＰではどの種類の樹状細胞が産生され、どのようにそれらの産生をある程度操作できるかの理解を欠いている手順が、認可された適用以外のためのこの方法の使用の

拡張を防止していることから、本発明の発見は、免疫賦活樹状細胞と比較して免疫抑制樹状細胞の優先的産生を可能にし、これにより古典的ＥＣＰ手順の制限を克服する（Girardi et al. (2002), Transfusion and Apheresis Science, 26, 181-190を参照されたい）。さらに、Ｔｈｅｒａｋｏｓから入手可能なデバイスにおいて使用される古典的ＥＣＰ手順以外に、本発明は、体外の量の血液が身体と継続的に接続されていない実験的設定においてそのような免疫賦活樹状細胞を得ることを可能にする。データは、免疫賦活樹状細胞を得るプロセスが、全体的な単球活性化ステップ、およびそれに続く単球から免疫賦活抗原提示細胞（例えば樹状細胞）への分化ステップを含むことをとりわけ示唆している。これらのステップは、例えば本明細書に記載のデバイスを通して最初に活性化された単球の通過は活性化および分化を改善できるが、例えば活性化に十分な単球の初期精製または濃縮の際に生じる物理的な力での単球の物理的活性化に最初に依存すると考えられる。さらにデータは、単球活性化が生じると、８－ＭＯＰなどの光活性化可能作用因子およびＵＶ－Ａを適用することによって分化は、免疫抑制抗原提示樹状細胞の方向に導かれ、それによりＧＩＬＺの発現が増加することを示唆している。本データはこれらのプロセスが、例えば細胞傷害性Ｔ－細胞または他の異物細胞のアポトーシスの非存在下で、例えば所望の抗原でのそれらをローディングする前に免疫抑制抗原提示樹状細胞が得られるように行うことを示唆している。

【００１８】

このデータに基づく実施形態のいくつかは、以下により詳細に記載される。

【００１９】

第１の態様では、本発明は、体外量の哺乳動物対象の血液試料に含有される単球の免疫抑制樹状細胞への分化のための方法に関し、前記方法は、

ａ）前記単球が活性化され、少なくとも１つの分子マーカーによって同定可能である免疫抑制樹状細胞に分化するように誘導されるように、前記体外量の前記哺乳動物対象の血液試料を物理的な力に供するステップであって、前記少なくとも１つの分子マーカーが免疫抑制樹状細胞の指標であるステップ

を少なくとも含む。

【００２０】

免疫抑制樹状細胞の指標となる好適な分子マーカーは、ＧＩＬＺおよび／またはＩＬ－１０を含む。したがって、本明細書に記載の方法により得ることができ、ＧＩＬＺおよび／またはＩＬ－１０の発現の増加を示す樹状細胞は、免疫抑制樹状細胞であると考えられる。ＧＩＬＺは、免疫抑制樹状細胞についての指標である好ましい分子マーカーである。発現の増加は、本明細書に記載の方法に供される前の単球と比較して決定されることは理解される。そのような免疫抑制樹状細胞は、ＩＬ－１０対ＩＬ－１２ｐ７０比のＧＩＬＺ誘導低減も示す場合がある。

【００２１】

さらに、免疫抑制樹状細胞は、それらが免疫賦活自己樹状細胞の指標である分子マーカーの発現の増加を示さないことで免疫賦活自己樹状細胞から識別できる。発現が、本明細書に記載の方法に供される前の単球と比較して決定されることは理解される。

【００２２】

免疫賦活自己樹状細胞の指標となる分子マーカーは、本明細書以下に記載され、例えば表１から選ぶことができる。これらの分子マーカーは、例えば抗原提示細胞の分子マーカー、細胞接着の分子マーカーなどのそれらの公知の機能によってグループ分けできる。その発現が免疫賦活樹状細胞の指標であると考えられる好ましい分子マーカーは、ＰＬＡＵＲ、ＮＥＵ１、ＣＤ８０、ＣＣＲ７、ＬＯＸ１、ＣＤ８３、ＡＤＡＭデシシン（Decysin）、ＦＰＲＬ２、ＧＰＮＭＢ、ＩＣＡＭ－１、ＨＬＡ－ＤＲ、および／またはＣＤ８６を含む。ＨＬＡ－ＤＲ、ＰＬＡＵＲおよびＩＣＡＭ－１などのマーカーは、全体的な単球活性化の指標であると考えられるが、一方例えばＣＤ８３およびＡＤＡＭ－デシシンの発現の増加は、単球の樹状細胞分化への指標であると考えられる。したがって、これらの分子マーカーが発現の増加を示す場合、特にＧＩＬＺ発現が増加しない場合、本明細書に記載

の方法によって得ることができる樹状細胞は、免疫賦活自己樹状細胞であると考えられる。同様に本明細書に記載の方法によって得ることができる樹状細胞は、ＧＩＬＺおよび／またはＩＬ－１０の発現の増加を示す場合および特に表１から選ばれる分子マーカーが発現の増加を示さない場合に、免疫抑制樹状細胞であると考えられる。

【００２３】

この第１の態様の一実施形態では、単球の活性化は、とりわけ、前記体外量の前記哺乳動物対象の血液試料が、前記哺乳動物対象の血液試料内に含有される前記単球に剪断力が適用されるようにデバイスのフローチャンバーを通る前記体外量の前記哺乳動物対象の血液試料の流速の調整を可能にする前記デバイスの前記フローチャンバーに前記体外量の前記哺乳動物対象の血液試料を通すまたは循環させることによって物理的な力に供されることにおいて達成される。

【００２４】

したがって、単球の活性化および免疫抑制樹状細胞への分化の誘導は、そのようなデバイスのフローチャンバーを通る体外量の哺乳動物対象の血液試料の流力を変更すること、フローチャンバーの流路の形状を変更すること、フローチャンバーの寸法を変更すること、フローチャンバーの、したがって体外量の哺乳動物対象の血液試料の温度を変更すること、流路の生物物理学的および形状の表面特性を変化させること、フローチャンバー内の体外量の哺乳動物対象の血液試料の可視またはＵＶ光への曝露を可能にすること、８－ＭＯＰなどのＤＮＡ架橋剤を添加することなどによって達成され、影響を受け得る。

【００２５】

以下に示すとおり、単球の活性化および免疫抑制樹状細胞への分化の誘導は、例えば単球が以下に記載のデバイスによって提供され得る物理的な力を経験する状況での単球と活性化血小板および／または特異的血漿構成成分との相互作用によって媒介される。

【００２６】

この第１の態様の別の実施形態では、したがって本発明は、物理的な力を経験し、活性化血小板および／または、フィブリノーゲンもしくはフィブロネクチンなどの血漿構成成分と相互作用する単球の活性化に関する。活性化は次のステップ（ｉ）単離された構成成分としてまたは体外量の哺乳動物対象の血液試料の部分としてのいずれかでのフィブリノーゲンまたはフィブロネクチンなどの血漿構成成分を前記デバイスのフローチャンバーに固定するステップ（ｉｉ）体外量の哺乳動物対象の血液試料から精製画分としてまたは体外量の哺乳動物対象の血液試料の部分として得ることができる血小板を、血小板が血漿構成成分と相互作用でき、それによって活性化されるようにフローチャンバーを通すステップ、ならびに（ｉｉｉ）体外量の哺乳動物対象の血液試料から精製画分としてまたは体外量の哺乳動物対象の血液試料の部分として得ることができる単球を、単球が活性化血小板および／または血漿構成成分と相互作用でき、それによって活性化されるようにフローチャンバーを通すステップ、を含むプロセスであってよい。

【００２７】

したがって、構造およびデバイスが操作される条件に関連する上に記載のパラメーターおよび変更に加えておよび／または代替的に、単球の活性化および免疫抑制樹状細胞への分化の誘導は、血漿構成成分の性質、純度および濃度、血小板の性質、純度および濃度、血漿構成成分および／または血小板がフローチャンバーに通されるおよび／または配置されるステップの順序、フローチャンバーが血漿構成成分および／または血小板でコートされる密度、体外量の哺乳動物対象の血液試料、具体的には血小板および／または単球がそのようなデバイスのフローチャンバーを通る流力、体外量の哺乳動物対象の血液試料、具体的には血小板および／または単球がそのようなデバイスのフローチャンバーを通る温度および／または時間など、体外量の哺乳動物対象の血液試料に、具体的には単球に添加される８－ＭＯＰおよび／またはサイトカインなどの追加的因子の性質、純度および濃度を、変更することによって達成され、影響を受け得る。

【００２８】

しかし、そのようなデバイスが８－ＭＯＰなどの光活性化可能作用因子およびＵＶＡの

存在下で単球活性化および免疫抑制樹状細胞への分化を誘導することにおいて特に有効である場合がある一方で、単球が最初の精製または、以下に記載のＦｉｃｏｌｌ－Ｈｙｐａｑｕｅ濃縮などの濃縮の際に経験する物理的な力が単球を活性化し、それらの分化を誘導するために既に十分である場合があることは理解される必要がある。同様に活性化血小板および／または特異的血漿構成成分は、単球活性化および樹状細胞などの抗原提示細胞への分化を増加させることにおいて役立つ場合があるが、それらは絶対に必要でなくてもよい。単球活性化および樹状細胞などの抗原提示細胞への分化をもたらすために、したがって本発明は最少必要要件としての物理的な力の適用を企図する。活性化および分化プロセスが開始すると、８－ＭＯＰなどの光活性化可能作用因子およびＵＶＡまたはＧＩＬＺ発現を増加させる他の手段（デキサメタゾンなど）の適用は、分化プロセスを樹状細胞などの免疫抑制抗原提示細胞に向けて選択的に導くために使用できる。

【００２９】

上記および続く態様および実施形態では、体外量の哺乳動物対象の血液試料および具体的には単球は、したがって、白血球アフェレーシスによって得られても得られなくてもよい。

【００３０】

これらの実施形態に追加的または代替的に、本発明は、具体的にはＧＩＬＺの発現の増加ならびに／またはＣＤ４$^{+}$ＣＤ２５$^{+}$Ｆｏｘｐ３$^{+}$細胞の数の増加ならびに／またはＣＤ８０、ＣＤ８６およびＣＤ８３の下方制御を促進する条件下で実施されるそのような方法にも関する。したがって本発明は、例えば、８－ＭＯＰなどの光活性化可能作用因子の存在下で、ＵＶ－Ａなどの光への曝露を伴って実施される方法に関する。一実施形態では、本発明は、単球の活性化ならびに、ＧＩＬＺおよび／もしくはＩＬ－１０ならびに／または表１の分子マーカーの発現を決定することによって同定できる免疫賦活自己樹状細胞の誘導を回避する条件下で実施される方法に対応して関する。したがって、一実施形態では、本発明は、８－ＭＯＰなどの光活性化可能作用因子の非存在下、およびＵＶ－Ａなどの光への曝露なしで実施される方法に関しない。

【００３１】

別の実施形態は、例えば自己免疫疾患、過敏性疾患、固形臓器移植の拒絶および移植片対宿主病を処置することにおいて使用できる自己および／または同種免疫抑制抗原提示細胞を得るための本明細書以下に記載の方法に関する。

【００３２】

別の実施形態は、哺乳動物細胞であってよい免疫抑制抗原提示細胞、好ましくは免疫抑制樹状細胞を産生するための以下に記載の方法に関する。本発明の好ましい実施形態のいくつかは、ヒト免疫抑制抗原提示細胞、好ましくはヒト免疫抑制同種樹状細胞を産生することに関するが、本発明は、動物免疫抑制抗原提示細胞、好ましくはマウス、ラットなどの動物免疫抑制樹状細胞を産生するための方法を使用することも考慮する。本発明のこれらの実施形態は、有用な動物モデル、およびそれにより本明細書に記載の方法および結果の例えばマウスからヒトまでの拡張性を提供する。さらに、利用可能なマウスなど、動物の遺伝的に同一の株があることから、動物免疫抑制抗原提示細胞、好ましくはマウス免疫抑制抗原提示細胞などの動物免疫抑制樹状細胞および好ましくは、マウス免疫抑制樹状細胞は、体外の量の血液試料が取られた、厳密な意味で自己である個体、または遺伝的に同一の個体のいずれにも導入されてよい。これは、例えばこれらの細胞のいかなる予想外の効果についての検査も可能にする。

【００３３】

以下に記載の方法が、免疫抑制細胞を産生すると示されたことは理解され、これは、それらの分子マーカーが樹状細胞と一般に称される細胞に対応しない場合でも関連すると考えられるためである。したがって本発明による免疫抑制細胞は、免疫抑制樹状細胞と名付けられている。しかし樹状細胞は抗原提示細胞と称することができる細胞の広範なクラスの代表である。したがって以下に記載の方法は、免疫抑制樹状細胞が好ましい免疫抑制抗原提示細胞の産生に一般に言及する。

【００３４】
本発明の第２の態様は、自己免疫疾患、過敏性疾患、固形臓器移植の拒絶および移植片対宿主病の処置における使用のための、本明細書以下に記載の方法によって得ることができる自己および／もしくは同種免疫抑制樹状細胞または自己および／もしくは同種免疫抑制抗原提示細胞に関する。
【００３５】
さらなる実施形態は、以下に記載される。
【図面の簡単な説明】
【００３６】
【図１】単球血小板相互作用の数および続く単球表現型への血小板密度の効果を示すグラフである。単球は、低、中または高密度の血小板でコートされた平行プレートに通された。（Ａ）単球－血小板相互作用の数は、高密度の血小板でコートされたプレートについて実質的に増加した。（Ｂ）一晩インキュベーション後、高レベルの血小板に曝露された単球は、膜ＣＤ８３およびＨＬＡ－ＤＲの発現によって評価されたとおり、ＤＣ分化に一致する表現型を有意に発達させやすかった（高密度対中または低密度：ｐ＜０．０００１、中密度対低密度：ｐ＜０．００５）。示されたデータは、少なくとも６回の独立した実験の平均（＋／－ＳＤ）である。ｌｐｆ、低倍率視野。
【図２】血小板への曝露後の遺伝子発現を示すグラフである。単球は流れにおいて高または低レベルの血小板に曝露された。一晩インキュベーション後、細胞はＲＴ－ＰＣＲを使用して遺伝子発現における差異について評価された。図２は、高レベルの血小板に曝露された単球における遺伝子発現変化を低レベルに曝露されたものと比較して示す。ＤＣ分化および／または機能に関連する７個の遺伝子が上方制御されたことが見出された一方で、３個は下方制御された。下方制御された遺伝子のＧＰＮＭＢおよびＦＰＲＬ２は、それぞれサイトカイン産生の減少およびＤＣ成熟の阻害において公知の機能を有する。上方制御された遺伝子は、すべて免疫促進機能またはＤＣ生物学の多岐にわたる役割のいずれかを有する。遺伝子の具体的な記載については本文を参照されたい。示されたデータは、２回の独立した実験の平均（＋／－ＳＤ）である。
【図３】静止条件での単球分化への血小板の影響を示すグラフである。単球は、低、中または高濃度の血小板と共に流れのない静止条件で１８時間、共培養された。これらの条件下で、ＤＣ分化への血小板の影響は観察されず、すべての条件は、低い、ベースラインレベルのＤＣマーカー発現細胞を生じた。さらに、培養物中のトロンビンでの血小板の活性化（青線）は、血小板を含有し、トロンビンによって活性化されない培養物のもの（赤線）と比較して単球分化において識別可能な差異を生じなかった。
【図４】プレートへの血小板接着での血漿タンパク質の影響を示すグラフである。血小板は、フィブリノーゲン、血漿、フィブロネクチンまたはＲＭＰＩでコートされたプレートをｘ軸によって示される剪断ストレスレベルで通された。流れの中の血小板は、フィブロネクチンに最適に接着した。すべてのタンパク質に関して、血小板接着は最大で０．５から１．０ｄｙｎ／ｃｍ^2　ｌｐｆ、低倍率視野の間で生じた。示されたデータは、少なくとも２回の独立した実験の平均（＋／－ＳＤ）である。
【図５】フィブリノーゲン（Ａ）またはフィブロネクチン（Ｂ）でコートされたプレートへの血小板接着についての血漿タンパク質の影響を示すグラフである。血小板は、未処置（ベースライン）、またはＲＧＤ断片（＋ＲＧＤ）もしくはガンマ断片（＋ガンマ）のいずれかで事前処置のいずれかであり、それらの続くフィブリノーゲン（左パネル）およびフィブロネクチン（右パネル）への接着が評価された。フィブリノーゲンへの血小板結合は、ガンマ断片によって減少し（ｐ＜０．０５）、一方フィブロネクチンへの結合はＲＧＤペプチドによって減少した（ｐ＜０．００１）。ｌｐｆ、低倍率視野。示されたデータは、少なくとも２回の独立した実験の平均（＋／－ＳＤ）である。
【図６】単球血小板相互作用へのタンパク質の関与を示すグラフである。単球は、ｘ軸によって示される条件下で、０．５ｄｙｎ／ｃｍ２の壁剪断ストレスで血小板コートプレート間を通された：血小板は抗Ｐ－セレクチン（Ｐ－）またはアイソタイプ対照（Ｐ＋）の

いずれかで事前処置され、単球はＲＧＤペプチド（ＲＧＤ－）または対照断片（ＲＧＤ＋）のいずれかで事前処置された。単球血小板相互作用は、デジタル顕微鏡を使用して各セットの条件下で定量され、Ｐ＋／ＲＧＤ＋の条件下で見られた最大値の割合として図に表されている。相互作用は、３秒未満持続したもの（短期間、黒バー）と安定結合を含んで３秒を超えて持続したもの（長期間、灰色バー）とに分割された。抗Ｐ－セレクチン（Ｐ－）でのブロッキングを含むすべての条件は、短期間および長期間の両方の相互作用における有意な減少を生じた（＊＊、ｐ＜０．０１）、ＲＧＤ（ＲＧＤ－）だけのブロッキングは長期間の相互作用における有意な減少を生じた（＊、ｐ＜０．０５）が、短期間の相互作用に変化を生じなかった。示されたデータは、３回の独立した実験の平均（＋／－ＳＤ）である。

【図７】単球インテグリンへのｐ－セレクチン曝露の効果を示すグラフである。プラスチックプレートは、ｘ軸によって示される相対密度で血小板でコートされた。次いで血小板は、抗ｐ－セレクチン（破線）もしくはアイソタイプ対照（灰色線）で事前処置された、または事前処置を受けなかった（黒線）。単球は、０．５ｄｙｎ／ｃｍ２でプレートを通され、次いで活性β１インテグリンの発現についてフローサイトメトリーによってただちに評価された。ｙ軸は、インテグリンが開いたコンフォメーションにある場合にだけ曝露されるエピトープに方向付けられた抗体に結合した単球の百分率を示している。示されたデータは、３回の独立した実験の平均（＋／－ＳＤ）である。

【図８】一晩インキュベーション後の単球表現型へのＰ－セレクチン曝露の効果を示すグラフである。血小板コートプレートは、未処置（第１のカラム）、またはアイソタイプ対照（第２のカラム）もしくは抗Ｐ－セレクチン（第３のカラム）で事前処置のいずれかであった。単球は、０．５ｄｙｎ／ｃｍ２でプレートを通され、次いで一晩インキュベートされた。ｙ軸は、ＤＣ分化と一致する表現型、すなわち、膜ＨＬＡ－ＤＲ＋／ＣＤ８３＋を生じた単球の百分率を示している。示されたデータは、３回の独立した実験の平均（＋／－ＳＤ）である。

【図９】ＤＣ分化への単球の誘導について提案された機序を示す図である。本原稿に表されたデータに基づいて、次の事象の配列が推論される：（１）血漿フィブリノーゲンがフローチャンバーのプラスチック表面をコートする、（２）それらのαＩＩｂβ３受容体を通じて、活性化されていない血小板が固定化フィブリノーゲンのガンマ構成成分に結合する、（３）血小板が活性化され、瞬間的に予め形成されているＰ－セレクチンおよび他の表面タンパク質を発現する、（４）通過した単球は、ＰＳＧＬ－１を介して一過的にＰ－セレクチンに結合し、部分的な単球活性化およびインテグリン受容体コンフォメーション変化を生じる、（５）部分的に活性化された単球は、ここでさらに相互作用でき、ＲＧＤドメインを含有するものを含む追加的血小板発現リガンドに結合する、（６）最終的に、そのように影響を受けた単球は、１８時間以内にＤＣ成熟経路に効率的に入る。ｉｎ－ｖｉｖｏで上記ステップ（１）は、局所内皮で作用する組織由来炎症性シグナルによって生理学的に置き換えられる場合があり、同様のやり方で血小板を動員および活性化するようにそれを生じることに注目されたい。

【図１０】ＧＩＬＺの発現が、単球が未成熟ＭｏＤＣに分化すると急速に下方制御され、デキサメタゾンへの曝露後に上方制御されることを示す図である。Ａ．）ＣＤ１１ｃ＋ＭｏＤＣでのＧＩＬＺ　ｍＲＮＡ発現は、新鮮に単離された単球と比較した倍数変化として表される。Ｂ．）０および３６時間後の細胞内および細胞表面マーカーについての蛍光強度中央値。Ｃ．）２４時間後のＣＤ１１ｃ＋ＭｏＤＣでのＧＩＬＺ　ｍＲＮＡ発現はデキサメタゾンを受けていないＭｏＤＣと比較した倍数変化として表される。Ｄ．）ＣＤ１１ｃ＋ＭｏＤＣでのＧＩＬＺ　ｍＲＮＡ発現は０時間でのＭｏＤＣと比較した倍数変化として表される。Ｅ．）２４時間後のＣＤ１１ｃ＋ＭｏＤＣでのＧＩＬＺ　ｍＲＮＡ発現は未処置ＭｏＤＣと比較した倍数変化として表される。Ｆ．）ＣＤ１１ｃ＋ＭｏＤＣでのＧＩＬＺ　ｍＲＮＡ発現は未処置ＭｏＤＣと比較した倍数変化として表される。すべてのデータは、最少３回の独立した実験についての平均±標準偏差として表される。差次的遺伝子発現について：＊≧２．５倍変化およびｐ＜０．０５、＊＊≧２．５倍変化およびｐ＜０

．０１、＊＊＊≧２．５倍変化およびｐ＜０．００１
【図１１】８－ＭＯＰに加えてＵＶＡ光が、未成熟ＭｏＤＣにおいてＧＩＬＺを線量依存的様式で上方制御することを示す図である。Ａ．）ＧＩＬＺ発現は、１Ｊ／ｃｍ２および２Ｊ／ｃｍ２のＵＶＡ光で８－ＭＯＰ濃度の関数として表される。ＰＵＶＡ処置２４時間後のＣＤ１１ｃ＋ＭｏＤＣにおけるＧＩＬＺ　ｍＲＮＡ発現は、８－ＭＯＰを受けていないＭｏＤＣと比較した倍数変化として表される。Ｂ．）ＧＩＬＺ発現は、ＵＶＡ線量を乗じた８－ＭＯＰ濃度の関数として表される。Ｃ．）２４時間後の初期アポトーシス性ＣＤ１１ｃ＋細胞の百分率。Ｄ．）２４時間後の後期アポトーシス性ＣＤ１１ｃ＋細胞の百分率。Ｅ．）１Ｊ／ｃｍ２および２Ｊ／ｃｍ２のＵＶＡ線量でのＣＤ１１ｃ＋ゲート細胞のドットプロットは、４回の実験から代表的な１回について示されている。アネキシン－Ｖ＋／７－ＡＡＤ－またはアネキシン－Ｖ＋／７－ＡＡＤ＋表現型を示しているＣＤ１１ｃ＋細胞の百分率が示されている。初期および後期アポトーシス性マーカーを発現しているＦ．）ＣＤ１１ｃ＋細胞およびＧ．）ＣＤ３＋細胞の百分率は、８－ＭＯＰ（１００ｎｇ／ｍＬ）およびＵＶＡ光（１Ｊ／ｃｍ２）での処置の２４時間後に定量された。すべてのデータは、少なくとも４回の独立した実験の平均±標準偏差を表す。差次的遺伝子発現について：＊≧２．５倍変化およびｐ＜０．０５、＊＊≧２．５倍変化およびｐ＜０．０１
【図１２】８－ＭＯＰに加えてＵＶＡ光が、未成熟ＭｏＤＣにおいて線量依存的なやり方でＣＤ８３、ＣＤ８０およびＣＤ８６を下方制御し、ＨＬＡ－ＤＲを上方制御することを示すグラフである。Ａ．）ＨＬＡ－ＤＲおよびＣＤ８３、ならびにＢ．）ＣＤ８０およびＣＤ８６の膜発現についての相対蛍光強度は、ＰＵＶＡ処置の２４時間後にＵＶＡ線量（１または２Ｊ／ｃｍ２）を乗じた８－ＭＯＰ濃度（０から２００ｎｇ／ｍＬ）の関数として表される。未処置ＭｏＤＣは、対照となり、ＲＦＩ値１を与えられる。データは、４回の独立した実験の平均±標準偏差を表す。＊ｐ＜０．０５、＊＊ｐ＜０．０１
【図１３】アポトーシス性リンパ球に曝露された未成熟ＭｏＤＣがＧＩＬＺを上方制御することを示す図である。Ａ．）共培養２４時間後のＣＤ１１ｃ＋ＭｏＤＣにおけるＧＩＬＺ　ｍＲＮＡ発現は、単独で培養された未処置ＭｏＤＣと比較した倍数変化として表される。Ｂ．）共培養２４時間後のＣＤ１１ｃ＋ＭｏＤＣにおけるＧＩＬＺ　ｍＲＮＡ発現は、単独で培養された未処置ＭｏＤＣと比較した倍数変化として表される。Ｃ．）共培養２４時間後の細胞内ＧＩＬＺについての相対蛍光強度。Ｄ．）ＣＤ８０およびＣＤ８６ならびにＥ．）ＨＬＡ－ＤＲおよびＣＤ８３についてのＬＰＳ刺激後から前の相対蛍光強度は、次のとおり算出された：（ＭＦＩ処置ＬＰＳ後－ＭＦＩ処置ＬＰＳ前）／（ＭＦＩ未処置ＬＰＳ後－ＭＦＩ未処置ＬＰＳ前）。データは、少なくとも４回の独立した実験についての平均±標準偏差を表す。差次的遺伝子発現について：＊≧２．５倍変化、ｐ＜０．０５
【図１４】ＧＩＬＺを発現しているＭｏＤＣがＩＬ－１０の産生を増加させ、種々の炎症促進性サイトカインおよびケモカインの産生を減少させることを示す図である。ＬＰＳ刺激２４時間後に、培養上清はＡ．）ＩＬ－１０および炎症促進性サイトカインＢ．）ＩＬ－１２ｐ７０およびＩＦＮ－γ、Ｃ．）ＩＬ－６およびＴＮＦ－αについての磁気ビーズ多重免疫アッセイによるサイトカイン定量のために採取された。同じ分析が炎症促進性ケモカインＤ．）ＩＬ－８ならびにＥ．）ＭＣＰ－１、ＭＩＰ－１βおよびＲＡＮＴＥＳについて実施された。データは、３回の独立した実験についての平均±標準偏差として表される。＊ｐ＜０．０５未処置ＭｏＤＣ群と比較。
【図１５】ＧＩＬＺのｓｉＲＮＡ媒介性ノックダウンは、免疫寛容原性樹状細胞に特徴的なＩＬ－１０対ＩＬ－１２ｐ７０比の増加を消滅させることを示す図である。Ａ．）ＧＩＬＺ　ｍＲＮＡ発現は、単独で培養された未処置ＭｏＤＣと比べた倍数変化として表される。＊≧２．５倍数変化およびｐ＜０．０５。Ｂ．）ＬＰＳ刺激後の培養上清におけるＩＬ－１０およびＩＬ－１２ｐ７０タンパク質レベルの定量。データは、３回の独立した実験の平均±標準偏差を表す。＊ｐ＜０．０５、ｓｉＲＮＡで形質移入されていない、同一に処置されたＭｏＤＣと比較。
【図１６】ＵＶＡおよび８－ＭＯＰの存在下での古典的ＥＣＰプロセスにおける単球の流

れを示す図である。中央の単球は、チャネルの表面に向いた単球よりも低いＵＶＡ曝露を経験する。
【図１７】古典的ＥＣＰプロセスにおいて使用されるデバイスのチャネルの設計を示す図である。
【図１８ａｂ】ａ）からｄ）は、本発明の方法のために使用できるデバイスのフローチャンバーのさまざまな形状を示す図である。
【図１８ｃｄ】ａ）からｄ）は、本発明の方法のために使用できるデバイスのフローチャンバーのさまざまな形状を示す図である。
【図１９】Ａ）実施例のいくつかにおいて使用されるデバイスの形状を示す図である。Ｂ）代替的デバイスの形状を示す図である。
【図２０】図１９のデバイスを通じた単球の物理的活性化でのＨＬＡ－ＤＲの発現の増加を示すグラフである。
【図２１】図１９のデバイスを通じた単球の物理的活性化でのＦＳＣ／ＳＳＣ複雑度（complexity）の増加を示す図である。
【図２２】図１９のデバイスを通すことによる単球の物理的活性化でのＦＳＣ／ＳＳＣ複雑度の増加を示すグラフである。
【図２３】図１９のデバイスを通じた単球の物理的活性化でのＨＬＡ－ＤＲ、ＣＤ８６、ＩＣＡＭ－１、ＰＬＡＵＲの発現およびまたはＦＳＣ／ＳＳＣ複雑度の増加を示す図である。　[図２４] 図１９のデバイスを通じた単球の物理的活性化ならびに８－ＭＯＰおよびＵＶＡの適用でのＧＩＬＺの発現の増加を示す図である。
【発明を実施するための形態】
【００３７】
本発明がそのいくつかの好ましい実施形態に関して詳細に記載される前に、次の全般的定義が示される。
【００３８】
次に例示的に記載される本発明は、本明細書に具体的に開示されていない任意の１つまたは複数の要素、１つまたは複数の制限の非存在下で好適に実施できる。
【００３９】
本発明は、具体的な実施形態に関しておよび特定の図を参照して記載されるが、本発明はそれらではなく特許請求の範囲によってのみ限定される。
【００４０】
本記載および特許請求の範囲において用語「含む（comprising）」が使用される場合、それは他の要素を排除しない。本発明の目的のために用語「からなる（consisting of）」は、用語「を構成する（comprising of）」の好ましい実施形態であると考えられる。以下で、群が少なくとも一定数の実施形態を含むと定義される場合、これは、好ましくはこれらの実施形態だけからなる群を開示するとも理解される。
【００４１】
本発明の目的のために用語「得られた（obtained）」は、用語「得ることができる（obtainable）」の好ましい実施形態であると考えられる。以下で例えば抗体が具体的な供給源から得ることができると定義される場合、これはこの供給源から得られる抗体を開示するとも理解される。
【００４２】
不定または定冠詞が単数名詞、例えば「ａ」、「ａｎ」または「ｔｈｅ」を参照して使用される場合、これは、他に具体的に述べられている場合を除いてその名詞の複数を含む。本発明の内容では、用語「約（about）」または「およそ（approximately）」は、当業者が問題となる特質の技術的効果をまだ確保すると理解する正確さの区間を記す。用語は、±２０％、好ましくは±１５％、より好ましくは±１０％、さらにより好ましくは±５％の示された数値からの偏差を典型的には示す。
【００４３】
さらに、記載および特許請求の範囲における用語「第１の（first）」、「第２の（sec

ond）」、「第３の（third）」または「（ａ）」、「（ｂ）」、「（ｃ）」、「（ｄ）」または「（ｉ）」、「（ｉｉ）」、「（ｉｉｉ）」、「（ｉｖ）」などは、逐次的または時間的順序を記載する必要がない、類似の要素間を識別するために使用される。そのように使用される用語が適切な環境下で互換的であり、本明細書に記載の本発明の実施形態が本明細書に記載または例示される以外の配列において運用できることは理解される。

【００４４】

用語「第１の（first）」、「第２の（second）」、「第３の（third）」または「（ａ）」、「（ｂ）」、「（ｃ）」、「（ｄ）」または「（ｉ）」、「（ｉｉ）」、「（ｉｉｉ）」、「（ｉｖ）」などが、方法または使用またはアッセイのステップに関する場合、他に示さない限りステップ間に時間または時間間隔の干渉性はない、すなわち本明細書上記または下記に明記された適用において他に示さない限り、ステップは同時に実行されてよいまたはそのようなステップ間に数秒、数分、数時間、数日、数週間、数カ月もしくは数年の時間間隔があってよい。

【００４５】

技術的用語は、それらの一般的な意味で使用される。具体的な意味が特定の用語に移される（conveyed）場合、用語の定義は次の用語が使用される内容において示される。

【００４６】

既に述べたとおり、本発明は、（ｉ）古典的ＥＣＰ手順のいくつかの態様を模倣すること、（ｉｉ）体外の量の血液における単球の免疫賦活自己樹状細胞への分化の誘導の細胞性および分子性機序を解明することを可能にする小型化されたデバイスについて、以下に提示するデータにある程度基づいている。以下に記載の実験によって示されるとおり、これらの免疫賦活自己樹状細胞は免疫賦活自己樹状細胞の指標である分子マーカーの発現によって特徴付けることができる。データは、グルココルチコイド誘導ロイシンジッパー（ＧＩＬＺ）の発現の増加を導く条件が、単球の免疫抑制樹状細胞への分化を有利に可能にすることも示している。本発明の目的のために、そのような免疫抑制樹状細胞は免疫阻害自己樹状細胞、免疫寛容原性自己樹状細胞または切断型自己樹状細胞とも称される。このデータは、例えば剪断力の条件下での血小板の逐次的活性化およびそのような活性化血小板への単球の結合が単球の樹状細胞へ、選ばれた具体的な条件に応じて詳細には免疫賦活または免疫抑制樹状細胞への分化に必須であることを示している。さらに、これらの発見は、免疫賦活および免疫抑制樹状細胞を得るための合理的な手法をただちに可能にする。古典的ＥＣＰプロセスにおいて得られた免疫賦活自己樹状細胞および免疫抑制樹状細胞の形成を導く一連の分子事象を模倣および精査できると仮定すると、単球の免疫賦活自己樹状細胞および免疫抑制樹状細胞への分化を導く分子事象のさらなる精査を研究目的のために好適な規模で可能にし、治療目的のために免疫賦活自己樹状細胞および免疫抑制樹状細胞を得ることも可能にするデバイス、より詳細にはフローチャンバーをここで設計できる。これは、さらに詳細に説明される。

【００４７】

古典的ＥＣＰ手順では、血液２．５Ｌから６Ｌは、典型的にはＣＴＬＣに罹患している患者から白血球アフェレーシスなどのアフェレーシスによって得られる。この体外の量の血液は、単球および血漿構成成分、血小板およびがん性Ｔ細胞を含む白血球を含む約２００ｍｌから５００ｍｌの最終容量をもたらすように白血球アフェレーシスなどのアフェレーシスによって典型的には処理され、次いで、剪断ストレス下で光活性化可能剤８－ＭＯＰと一緒に透明なプラスチックチャネルを有するフォトフェレーシスデバイスを通される。８－ＭＯＰを含むこの体外の量の血液は、次いで透明なチャネルを波長３１５から３８０ｎｍを有するＵＶ－Ａに曝露することによって照射される。照射された体外の量の血液は、次いで患者に再導入される。処置された患者の一部での一連のＣＴＬＣへのこの手順の有益な効果は、がん性Ｔ細胞の破壊から生じると最初に仮説を立てられた。この仮説に基づいて、患者がＥＣＰの反復サイクルを受ける必要があることが想定された。しかし一部の患者については、有益な長期効果が観察され、反復処置を不適切とし、次のＣＴＬＣ処置に対するＥＣＰの肯定的結果のいくつかを説明できる、興味深く、部分的に一致しな

い効果が見出された。

【００４８】

例えば、ＵＳ６，５２４，８５５に記載されるとおり、ＤＣの誘導が体外の量の血液において観察され、ＣＴＬＣへのＥＣＰの有益な効果のいくつかがこれらの細胞の８－ＭＯＰ誘導アポトーシスおよび分化を始めたＤＣのこれらの抗原でのローディングの結果としてがん性Ｔ細胞によって発せられるがん特異的抗原から生じることが仮定された。自己ＤＣをロードされたがん抗原などを含む体外の量の血液の再導入は、ワクチン接種様の長期間継続する治療効果を提供すると想定された。しかし同時に、ＥＣＰ手順の際に、免疫賦活効果をもたらさず、むしろ反対に、すなわち免疫抑制効果をもたらすいわゆる「切断型」ＤＣが形成されたことが観察された。同じプロセスにより反対の効果を有する、そのような異なる種類のＤＣの誘導は、不可解であり、実用的観点から、免疫賦活または免疫抑制ＤＣを得るためのＥＣＰの合理的な使用に関する障害を示した。さらに、十分な量の体外血液を得るための白血球アフェレーシスなどのアフェレーシスの必要性は、患者に対する処置の品質に悪影響を与える別の要因である。

【００４９】

以下に提示するデータは、原理上は剪断ストレスがＤＣの誘導の原因であることを示唆している。以下に記載の小型化されたモデルデバイスを使用することにより、白血球アフェレーシスなどのアフェレーシスによって得られたのではない実質的に少ない量の体外血液が使用される場合でも、８－ＭＯＰが体外の量の血液に加えられない場合でも、およびＵＶ－Ａでの照射が行われない場合でさえ、免疫賦活ＤＣの誘導が生じることが示された。したがって、古典的ＥＣＰ手順の中心的ステップの削除にもかかわらずＤＣの誘導が生じた。しかし、剪断ストレスは、ＤＣ自体を得るための決定的な一要因であると考えられる。樹状細胞形成の誘導のための他の決定的ステップは、血漿構成成分による血小板の活性化およびそのような活性化血小板による単球の活性化であると考えられる。データは、剪断ストレスが８－ＭＯＰおよびＵＶＡでの照射の存在下で行われる樹状細胞形成の誘導を誘導する場合、グルココルチコイド誘導ロイシンジッパー（ＧＩＬＺ）の発現が増加し、次に切断型、すなわち免疫抑制免疫寛容原ＤＣの形成を導く経路を活性化する（実施例２を参照されたい）ことをさらに示唆している。剪断ストレスが誘導した免疫賦活ＤＣの誘導が、８－ＭＯＰの添加を伴わず、ＵＶ－Ａでの照射も伴わずに剪断ストレスを適用することによって達成できたという事実は、古典的ＥＣＰ手順では、プラスチックチャネルの寸法のために、最初に剪断ストレスに誘導されたＤＣの一部は、これらのＤＣが免疫賦活ＤＣにさらに発達できた結果から効果的に照射されなかった（おそらくそれらがＥＣＰデバイスのチャネルの中央を動いていたためである）ことをさらに示唆している（図１６を参照されたい）。この以前のデータは、図１７の全体構造を有するデバイスを使用して得られた。しかし古典的ＥＣＰおよびＥＣＰ様手順では、免疫賦活自己と免疫抑制自己ＤＣとの混合物が得られた。以下に示すデータに基づいて、例えば、先行技術のＥＣＰおよびＥＣＰ様プロセスの必要要件のいくつか、例えば白血球アフェレーシスなどのアフェレーシスによって処理される必要がある多量の血液を使用することは省略できる。さらに、免疫賦活自己または免疫抑制自己ＤＣのいずれかを意図的に得るために、物理的な力を単球に発揮するために使用されるプロセスパラメーターおよびデバイスの設計を意図的に適合させることができる。例えば、フローチャンバーの設計および寸法を選択することによって、免疫抑制ＤＣが形成されるように基本的にすべてのＤＣが８－ＭＯＰに接触され、ＵＶＡで照射されることを確実にできる。さらに、本明細書に記載の方法によって得ることができる免疫抑制ＤＣおよび免疫賦活自己ＤＣの指標である分子マーカーが判別されたことから、選ばれた方法パラメーターに応じて既に実質的に免疫抑制ＤＣまたは免疫賦活自己ＤＣだけである樹状細胞集団を、例えば均一性についてＦＡＣＳ分析によって、さらに精製できる。

【００５０】

以下に記載の方法は、単球の免疫抑制樹状細胞への成熟および分化を達成するために分子カクテルの必要を伴わずに実施できる。さらに、本発明が体外量の哺乳動物対象の血液

試料に含有される単球の分化を誘導することに基づくことから、分化プロセスは典型的サイトカインカクテルによって引き起こされる場合がある分子事象に限定されない。どちらかといえば、以下に記載の方法で得ることができる樹状細胞は、これらの樹状細胞の広い機能性の代表であると考えられるさらに複雑な分子パターンを有すると考えられる。

【００５１】

第１の態様では、したがって本発明は、体外量の哺乳動物対象の血液試料に含有される単球の免疫抑制樹状細胞への分化を誘導するための方法に関し、前記方法は、

ａ）前記単球が活性化され、少なくとも１つの分子マーカーによって同定可能である免疫抑制樹状細胞に分化するように誘導されるように、前記体外量の前記哺乳動物対象の血液試料を物理的な力に供するステップであって、前記少なくとも１つの分子マーカーが免疫抑制樹状細胞の指標であるステップ

を少なくとも含む。

【００５２】

既に述べたとおり以下に記載の方法は、免疫抑制細胞を産生すると示されており、これは、それらの分子マーカーが免疫抑制または免疫寛容原性樹状細胞と一般に称される細胞に対応しない場合でも関連すると考えられるためである。したがって本発明による免疫抑制細胞は、免疫抑制樹状細胞と名付けられている。しかし樹状細胞は抗原提示細胞と称することができる細胞の広範なクラスの代表である。したがって以下に記載の方法は、免疫抑制樹状細胞が好ましい免疫抑制抗原提示細胞の産生に一般に言及する。

【００５３】

免疫寛容原性、免疫阻害、または切断型樹状細胞と同義で使用される用語「免疫抑制樹状細胞」は、したがって、体外量の前記哺乳動物対象の血液試料に含有される単球を本明細書に記載のとおり処置することによって単球に由来でき、下に記載の分子マーカーによって同定可能である細胞を指す。これらの分子マーカーはＧＩＬＺ、ＩＤＯ（インドールアミン）、ＫＭＯ（キヌレニン３－ヒドロキシラーゼ）、形質転換増殖因子ベータ（ＴＧＦβ）、および／またはＩＬ－１０（インターロイキン１０）を、ＧＩＬＺが好ましい分子マーカーで含む。したがって、本明細書に記載の方法により得ることができ、ＧＩＬＺ、ＩＤＯ、ＫＭＯ、ＴＧＦβおよび／またはＩＬ－１０、好ましくはＧＩＬＺの発現の増加を示す樹状細胞は、免疫抑制樹状細胞であると考えられる。発現の増加が本明細書に記載の方法に供される前の単球と比較して決定されることは理解される。そのような免疫抑制樹状細胞は、ＩＬ－１０対ＩＬ－１２ｐ７０比のＧＩＬＺ誘導増加またはＩＬ－１２、ＴＮＦ－αおよびＩＬ－６などの種々の炎症促進性サイトカインおよびケモカインの産生の減少を示す場合もある。免疫抑制樹状細胞についての指標であると考えられる好ましい分子マーカーは、現在のところＧＩＬＺである。さらにより詳細に下に説明されるとおり免疫抑制樹状細胞は、自己および／または同種免疫抑制樹状細胞であってよい。自己免疫抑制樹状細胞は、例えば自己免疫疾患の処置のために本明細書に記載の方法によって産生できる。同種免疫抑制樹状細胞は、例えば移植片対宿主病の処置のために本明細書に記載の方法によって産生できる。樹状細胞などの免疫抑制抗原提示細胞が本明細書で述べられる場合、これは、これらの細胞が疾患特異的抗原と接触した後に、例えば疾患特異的抗原をそれらの表面に提示する能力を有する樹状細胞などの免疫抑制抗原提示細胞を指すことは、理解される必要がある。本明細書に記載の方法によって得ることができ、一実施形態において本明細書に記載の分子マーカーによって同定できる免疫抑制樹状細胞は、それらがより一般には免疫抑制自己および／または同種抗原提示細胞であると考えられるように、既に十分に分化し、内部移行され、例えば自己免疫疾患に関与する細胞由来、または例えば移植片対宿主病適用におけるレシピエント由来細胞の抗原でさえ提示する樹状細胞であると考えられてよいことはさらに理解される。これらの免疫抑制自己および／または同種抗原提示細胞は、免疫寛容原性の種類であるにもかかわらず、示された抗原に対する免疫応答（immune answer）を抑制する。したがって用語「免疫抑制自己および／または同種樹状細胞」は、一実施形態では免疫抑制自己および／または同種抗原提示樹状細胞を包含する。しかしプロセスは、樹状細胞が免疫抑制自己および／または同種樹状細胞の指標

である分子マーカーを発現し、例えば細胞が自己免疫疾患また移植片対宿主病に罹患していないドナーの試料から得られたために、まだ内部移行および抗原を提示していないように実施されてもよい。しかし、本発明のデータおよび結論によって提供される知見は、樹状細胞などの免疫抑制抗原提示細胞とは別に同時にではなく得られた自己免疫疾患に特徴的な抗原または移植設定におけるドナー由来の抗原でロードできる、樹状細胞などの免疫抑制抗原提示細胞を作り出せるようにする。そのような抗原は、続く治療設定におけるそれらの提示をもたらすために、次いで樹状細胞などの免疫抑制抗原提示細胞と同時インキュベートされてよい。

【００５４】

ＧＩＬＺ、ＩＤＯ、ＫＭＯ、ＰＤＬ１、ＰＤＬ２、ＴＧＦβおよび／またはＩＬ－１０、好ましくはＧＩＬＺを過剰発現し、本明細書に記載のプロセスを使用して単球を活性化することによって得られた樹状細胞は、ＧＩＬＺを発現しているそのような樹状細胞が例えばＬＰＳによって誘導され、ＨＬＡ－ＤＲ、ＣＤ８３、ＣＤ８０およびＣＤ８６の発現の増加によって決定される完全な成熟に抵抗性であるという観察からとりわけ理解される、免疫寛容原性樹状細胞を連想させる特性を示す。さらに、ＧＩＬＺの上方制御ならびにＩＬ－１２、ＴＮＦ－αおよびＩＬ－６などの種々の炎症促進性サイトカインおよびケモカインの産生の減少は、免疫寛容原性樹状細胞を得るために使用できるデキサメタゾンの公知の効果を連想させる（Cohen et al., Blood (2006), 107(5), 2037-2044）。

【００５５】

したがって免疫抑制樹状細胞は、免疫賦活自己樹状細胞の指標である分子マーカーの発現の増加を示さない免疫賦活自己樹状細胞から追加的に識別できる。発現が、本明細書に記載の方法に供する前の単球と比較して決定されることは理解される。

【００５６】

用語「免疫賦活自己樹状細胞」は、本明細書に記載の方法を使用して単球を活性化することによって得ることができ、免疫賦活自己樹状細胞の指標である分子マーカーの発現の増加を示す樹状細胞を指す。免疫賦活自己樹状細胞の指標であるこれらの分子マーカーは、ＭＨＣ　ＩおよびＭＨＣ　ＩＩを経て抗原を提示できる樹状細胞についての文献において考察されている。本明細書に記載の方法により得ることができ、本明細書に記載の分子マーカーによって同定可能である免疫賦活自己樹状細胞は、既に十分に分化し、内部移行されている樹状細胞であると考えられてよく、それぞれの体外量の哺乳動物対象の血液試料に含有されている細胞傷害性Ｔ細胞などのアポトーシス性細胞由来の、例えば腫瘍特異的抗原、またはそれぞれの体外量の哺乳動物対象の血液試料に含有されている例えばウイルス性もしくは細菌性抗原でさえそれらが免疫賦活抗原提示樹状細胞と見なされてよいように提示することは理解される。しかしプロセスは、樹状細胞が、まだ内部移行されず、抗原を提示していない免疫賦活樹状細胞の指標となる分子マーカーを発現するような方法で実施してもよい。一実施形態では用語「免疫賦活自己樹状細胞」は、免疫賦活自己抗原提示樹状細胞を包含する。免疫賦活自己樹状細胞としての免疫賦活樹状細胞の指定が、得られた免疫賦活樹状細胞が後に同じドナーに再導入されるかどうかに依存することは理解される。これは、樹状細胞がドナーに再導入される前に長時間培養される場合に連続的または非連続的な様式で行われてよい。免疫賦活樹状細胞について本明細書以下に考察されるすべての論点は免疫賦活自己樹状細胞を指す。しかしそのような実施形態の考察が、プロセスが免疫賦活樹状細胞自体を作り出すために使用される場合およびこれらの細胞の後の投与だけがそれらを潜在的な免疫賦活自己樹状細胞にする場合の筋書きを常に含むことは理解される。

【００５７】

本発明は、免疫賦活ＤＣと比較して免疫抑制ＤＣの優先的産生を可能にする。免疫賦活樹状細胞と比較した免疫抑制樹状細胞の優先的産生は、体外の量の血液試料から出発して免疫賦活ＤＣより多い免疫抑制樹状細胞を、例えば血液試料の同じ体外の量が古典的ＥＣＰ手順に供される状況と比較して選択的に得ることができることを意味する。免疫抑制ＤＣの産生は、免疫賦活ＤＣと比較して優先的に産生されるが、免疫賦活ＤＣは本発明によ

る方法が実施された後もまだ存在する場合がある。それでも本発明は、他よりも１つの樹状細胞集団の産生に偏らせるように操作できるパラメーターおよび変更を提供する。さらに、最終的に残っている免疫賦活樹状細胞は、例えば免疫賦活樹状細胞の指標である分子マーカーに対する親和性精製によって除去できる。

【００５８】

実施例に記載のとおり、本明細書に記載の方法により得ることができる免疫賦活自己樹状細胞の指標である分子マーカーは、健常志願者のいずれかに由来する体外量の哺乳動物対象の血液試料に含有される単球を小型化されたデバイスを使用するプロセスに供することによって同定された（表１のマーカー８８から９９を参照されたい）。さらに、実施例においても記載されるとおり、免疫賦活自己樹状細胞の指標である分子マーカーは、健常志願者またはＣＴＣＬに罹患している患者のいずれかに由来する体外量の哺乳動物対象の血液試料に含有される単球をＥＣＰプロセスに供することによって同定された。免疫抑制樹状細胞の指標である分子マーカーが、健常志願者またはＧｖＨ疾患（ＧｖＨＤ）に罹患している患者のいずれか由来の体外量の哺乳動物対象の血液試料に含有される単球をＥＣＰプロセスに供することによってどのように同定されたかも実施例に記載されている（表１のマーカー１から８７を参照されたい）。次いで樹状細胞は、単離され、免疫賦活樹状細胞において役割を演じることが公知であるまたは疑われる分子マーカーの発現の上方制御が分析された。

【００５９】

免疫賦活および免疫抑制樹状細胞の複合混合物を生じると想定されるＥＣＰプロセスに関して同定されたマーカーのいくつかは、免疫賦活樹状細胞だけを導くはずである、小型化されたデバイスでのプロセスによって得られた樹状細胞について観察されたものと同じである。したがって、ＥＣＰプロセスが樹状細胞機能と関連する場合がある分子マーカーの上方制御を導く範囲で、これらのマーカーが、免疫賦活樹状細胞を同定するためにも好適であると想定することは、それらが小型化されたデバイスなどの本明細書に記載のプロセスによって得ることができることから正当であると考えられる。全体で９９個の分子マーカーは、本明細書に記載の方法により得ることができる免疫賦活自己樹状細胞について上方制御されるとして同定された。このセットは、比較分析を通じて将来的にはさらなる分子マーカーによって拡大される可能性がある。

【００６０】

これにより実施例１および３のデータは、免疫賦活自己樹状細胞の指標であると考えられる９９個のマーカーのセットをもたらす。これらのマーカーを表１に要約する。

【００６１】

【表１】

表１

番号	マーカー	NCBI 遺伝子番号	mRNA REF	配列番号
1	ABCA1	19	NM_005502.3	1
2	ACVR1B	91	NM_004302.4	2
3	ANPEP	290	NM_001150.2	3
4	AQP9	366	NM_020980.3	4
5	ATP6V0B	533	NM_001039457.1	5
6	BASP1	10409	NM_001271606.1	6
7	BEST1	7439	NM_001139443.1	7
8	CD63	967	NM_001257389.1	8
9	CD68	968	NM_001040059.1	9
10	CDCP1	64866	NM_022842.3	10
11	CPM	1368	NM_001005502.2	11
12	CRK	1398	NM_005206.4	12
13	CSF2RA	1438	NM_001161529.1	13
14	CTNND1	1500	NM_001085458.1	14
15	CTSB	1508	NM_001908.3	15
16	CXCL16	58191	NM_001100812.1	16
17	EMP1	2012	NM_001423.2	17
18	ENG	2022	NM_000118.2	18
19	EPB41L3	23136	NM_012307.2	19
20	FLOT1	10211	NM_005803.2	20
21	GNA15	2769	NM_002068.2	21
22	GPNMB	93695	NM_053110.4	22
23	GPR137B	83924	NM_031999.2	23
24	GPR157	269604	NM_177366.3	24
25	HEXB	3074	NM_000521.3	25
26	HOMER3	9454	NM_001145721.1	26
27	ICAM1	3383	NM_000201.2	27
28	IL1R1	3554	NM_000877.2	28
29	IRAK1	3654	NM_001025242.1	29
30	ITGA5	3678	NM_002205.2	30
31	ITGB8	3696	NM_002214.2	31
32	KCTD11	147040	NM_001002914.2	32
33	LAMP2	3920	NM_001122606.1	33
34	LEPROT	54741	NM_001198681.1	34
35	LGALS3	3958	NM_001177388.1	35
36	LILRB4	11006	NM_001081438.1	36
37	MARCKSL1	65108	NM_023009.6	37
38	MCOLN1	57192	NM_020533.2	38
39	MFAP3	4238	NM_001135037.1	39
40	MGAT4B	11282	NM_014275.4	40
41	MR1	3140	NM_001194999.1	41
42	MRAS	22808	NM_001085049.2	42
43	MSR1	4481	NM_002445.3	43
44	NEU1	4758	NM_000434.3	44
45	NPC1	4864	NM_000271.4	45
46	OLR1 (LOX1)	4973	NM_001172632.1	46
47	OMG	4974	NM_002544.4	47
48	P2RX4	5025	NM_001256796.1	48
49	PI4K2A	55361	NM_018425.2	49
50	PLAUR	5329	NM_001005376.2	50
51	PMP22	5376	NM_000304.2	51
52	PPAP2B	8613	NM_003713.4	52
53	PSEN1	5663	NM_000021.3	53
54	PVRL2	5819	NM_001042724.1	54
55	RAB13	5872	NM_002870.2	55
56	RAB8B	51762	NM_016530.2	56
57	RAB9A	9367	NM_001195328.1	57

58	RALA	5898	NM_005402.3	58
59	RHEB	6009	NM_005614.3	59
60	RNASE1	6035	NM_002933.4	60
61	SC5DL	6309	NM_001024956.2	61
62	SDC2	6383	NM_002998.3	62
63	SEMA6B	10501	NM_032108.3	63
64	SIRPA	140885	NM_001040022.1	64
65	SLC17A5	26503	NM_012434.4	65
66	SLC1A4	6509	NM_001193493.1	66
67	SLC22A4	6583	NM_003059.2	67
68	SLC31A1	1317	NM_001859.3	68
69	SLC35E3	55508	NM_018656.2	69
70	SLC39A6	25800	NM_001099406.1	70
71	SLC6A6	6533	NM_001134367.1	71
72	SLC6A8	6535	NM_001142805.1	72
73	SLC7A11	23657	NM_014331.3	73
74	STX3	6809	NM_001178040.1	74
75	STX6	10228	NM_005819.4	75
76	TM9SF1	10548	NM_001014842.1	76
77	TMBIM1	64114	NM_022152.4	77
78	TMEM33	55161	NM_018126.2	78
79	TNFRSF10B	8795	NM_003842.4	79
80	TNFRSF11A	8792	NM_001270949.1	80
81	TNFRSF1A	7132	NM_001065.3	81
82	TNFRSF1B	7133	NM_001066.2	82
83	TNFSF14	8740	NM_003807.3	83
84	TNFSF9	8744	NM_003811.3	84
85	TRIP10	9322	NM_004240.2	85
86	TRIP6	7205	NM_003302.2	86
87	YKT6	10652	NM_006555.3	87
88	DC-LAMP (LAMP3)	27074	NM_014398.3	88
89	CLEC5A	23601	NM_013252.2	89
90	SPC2 (PCSK2)	5126	NM_002594.3	90
91	THBS1	7057	NM_003246.2	91
92	CD14	929	NM_000591.3	92
93	CD40	958	NM_001250.4	93
94	CD80	941	NM_005191.3	94
95	CCR7	1236	NM_001838.3	95
96	CD83	9308	NM_001251901.1	96
97	ADAM デシシン	27299	NM_014479.3	97
98	FPRL2 (FPR3)	2359	NM_002030.3	98
99	CD86	942	NM_006889.4	99

【００６２】

免疫賦活ＤＣ機能の表面マーカー／機能メディエーターを表す８７個の遺伝子（マーカー１から８７）の内、６６個は「古典的」樹状細胞についての発現データベースとの比較後にＥＣＰ誘導プロセス（プレートを通過し、一晩培養された、実施例を参照されたい）樹状細胞において、独自に同定されたことが見出された。これらは、ＡＢＣＡ１、ＡＣＶＲ１Ｂ、ＡＴＰ６Ｖ０Ｂ、ＢＡＳＰ１、ＢＥＳＴ１、ＣＰＭ、ＣＲＫ、ＣＳＦ２ＲＡ、ＣＴＮＮＤ１、ＣＴＳＢ、ＣＸＣＬ１６、ＥＮＧ、ＦＬＯＴ１、ＧＮＡ１５、ＧＰＲ１３７Ｂ、ＧＰＲ１５７、ＨＥＸＢ、ＨＯＭＥＲ３、ＩＣＡＭ１、ＩＲＡＫ１、ＩＴＧＡ５、ＩＴＧＢ８、ＫＣＴＤ１１、ＬＡＭＰ２、ＬＥＰＲＯＴ、ＭＡＲＣＫＳＬ１、ＭＣＯＬＮ１、ＭＦＡＰ３、ＭＧＡＴ４Ｂ、ＭＲ１、ＭＲＡＳ、ＭＳＲ１、ＮＥＵ１、ＯＬＲ１、ＯＭＧ、ＰＩ４Ｋ２Ａ、ＰＬＡＵＲ、ＰＭＰ２２、ＰＶＲＬ２、ＲＡＢ１３、ＲＡＢ８Ｂ、ＲＡＢ９Ａ、ＲＡＬＡ、ＲＮＡＳＥ１、ＳＣ５ＤＬ、ＳＥＭＡ６Ｂ、ＳＩＲＰＡ、ＳＬＣ１Ａ４、ＳＬＣ２２Ａ４、ＳＬＣ３１Ａ１、ＳＬＣ３５Ｅ３、ＳＬＣ３９Ａ６、ＳＬＣ６Ａ６、ＳＬＣ６Ａ８、ＳＴＸ３、ＳＴＸ６、ＴＭ９ＳＦ１、ＴＭＢＩＭ１、ＴＭＥＭ３３、

ＴＮＦＲＳＦ１０Ｂ、ＴＮＦＲＳＦ１１Ａ、ＴＮＦＲＳＦ１Ａ、ＴＮＦＲＳＦ１Ｂ、ＴＮＦＳＦ１４、ＴＮＦＳＦ９、ＹＫＴ６である。

【００６３】

免疫抑制樹状細胞は、したがって、本明細書に記載の方法によって得ることができる免疫賦活自己樹状細胞に対する少なくとも１つの分子マーカーの発現を決定することによって、および体外量の哺乳動物対象の血液試料内に含有される単球についてその発現を比較することによって免疫賦活樹状細胞から識別できる。推定される免疫抑制樹状細胞対単球についてこれらのマーカーの発現の増加が観察されなかった場合、これは単球の免疫抑制樹状細胞への分化の指標である。

【００６４】

ＧＩＬＺ（配列番号１００）、ＩＤＯ（配列番号１０１）、ＫＭＯ（配列番号１０２）、ＴＧＦβ（配列番号１０３）および／またはＩＬ－１０（配列番号１０４）、好ましくはＧＩＬＺの発現の増加に加えて、免疫抑制樹状細胞は、したがって、本明細書に記載の方法によって得ることができる免疫賦活自己樹状細胞に対する少なくとも１つの分子マーカーの発現を決定することによって、および体外量の哺乳動物対象の血液試料内に含有される単球についてその発現を比較することよって同定できる。樹状細胞対単球についてそのような分子マーカーの発現の増加が観察されない場合、これは単球の免疫抑制自己および／または同種樹状細胞への分化の指標である。

【００６５】

免疫賦活自己樹状細胞は、表１から選択可能である少なくとも２個、３個、４個、５個、６個、７個、８個、９個、１０個、１５個、２０個、２５個、３０個、３５個、４０個、４５個、５０個以上の分子マーカーについての発現を決定することによって同定可能である。例えば、ＰＬＡＵＲ、ＮＥＵ１、ＣＴＳＢ、ＣＸＣＬ１６、ＩＣＡＭ１、ＭＳＲ１、ＯＬＲ１、ＳＩＲＰＡ、ＴＮＦＲＳＦ１Ａ、ＴＮＦＳＦ１４、ＴＮＦＳＦ９、ＰＭＢ２２、ＣＤ４０、ＬＡＭＰ３、ＣＤ８０、ＣＣＲ７、ＬＯＸ１、ＣＤ８３、ＡＤＡＭデシシン、ＦＰＲＬ２、ＧＰＮＭＢおよび／またはＣＤ８６を含む群から選択可能な少なくとも１個、２個、３個、４個、５個、６個、７個、８個、９個、１０個、１１個、１２個、１３個、１４個、１５個、１６個、１７個、１８個、１９個、２０個、２１個または２２個の分子マーカーについて発現を決定することによって免疫賦活自己樹状細胞を同定できる。より好ましくは、ＰＬＡＵＲ、ＮＥＵ１、ＣＤ８０、ＣＣＲ７、ＬＯＸ１、ＣＤ８３、ＡＤＡＭデシシン、ＦＰＲＬ２、ＧＰＮＭＢおよび／またはＣＤ８６を含む群から選択可能な少なくとも１個、２個、３個、４個、５個、６個、７個、８個、９個または１０個の分子マーカーについての発現を決定することによって免疫賦活自己樹状細胞を同定できる。免疫賦活自己樹状細胞の指標であると考えられる最も好ましいマーカーは、ＰＬＡＵＲ、ＮＥＵ１、ＣＤ８０、ＣＤ８３および／またはＣＤ８６である。本明細書に提示するデータおよび結論は、免疫賦活樹状細胞を得るプロセスが全体的な単球活性化ステップおよび単球から免疫賦活抗原提示細胞（例えば樹状細胞）への分化ステップを含むと考えられることを示唆している。これらのさまざまなステップは、上に記載の分子マーカー、およびＦＡＣＳ分析によって決定可能である前方散乱／側方散乱複雑度（ＦＳＣ／ＳＳＣ複雑度）によって追跡可能であると考えられる。分子マーカーは、それらの公知の機能、例えば抗原提示の分子マーカー、細胞接着の分子マーカーなどによりさらにグループ分けできる。ＨＬＡ－ＤＲ、ＣＤ８６およびＣＤ８０は、抗原提示を代表するものであると考えられる。ＰＬＡＵＲおよびＩＣＡＭ－１は、細胞接着を代表するものであると考えられる。ＨＬＡ－ＤＲ、ＰＬＡＵＲおよびＩＣＡＭ－１などのマーカーならびにＦＳＣ／ＳＳＣ複雑度は、全体的な単球活性化の指標であるとさらに考えることができる一方で、例えばＣＤ８３、ＡＤＡＭ－デシシン、ＣＤ４０、ＣＤ８０、ＬＡＭＰ－３およびＣＣＲ７の発現の増加は、単球から樹状細胞への分化の指標であると考えられる。

【００６６】

本明細書に記載の方法によって得ることができる免疫賦活抑制樹状細胞は、したがって、ＧＩＬＺ、ＩＤＯ、ＫＭＯ、ＴＧＦβ、および／またはＩＬ－１０などの免疫抑制樹状

細胞の指標である分子マーカーによって肯定的に同定できるだけでなく、ＰＬＡＵＲ、ＣＤ８０およびＣＤ８３などの免疫賦活樹状細胞の指標である分子マーカーの上方制御の非存在によっても同定できる。さらに、これら両方の細胞型、すなわち免疫抑制および免疫賦活樹状細胞は、その分化プロセスを誘導するために物理的な力に供される単球から、ＣＤ３３、ＣＤ３６、および／またはＦＣＧＲ１ａ（ＩｇＧＦｃ断片１Ａに対する受容体）などの単球の指標であると考えられる分子マーカーの発現を決定することによって識別できる。本明細書に記載の物理的な力およびプロセスに供される前にこれらの因子の発現が単球の発現と比較して下方制御されることが見出される場合、単球が免疫賦活および／または免疫抑制樹状細胞への成熟および分化経路に入ったことの指標であると考えられる。次いでこれら後者２つの樹状細胞集団の間の識別は、ＰＬＡＵＲ、ＣＤ８０、ＣＤ８３およびＧＩＬＺなどの分子マーカーの発現を決定することによって行うことができる。

【００６７】

上に述べたとおり本明細書以下に記載の方法は、単球の免疫抑制自己および／または同種樹状細胞への成熟および分化を達成するために分子カクテルの必要性なく実施できる。そのようなカクテルは、例えばデキサメタゾンＩＬ－１０、ＩＬ－４またはＴＧＦ－βなどの因子を含む場合がある。しかし一実施形態では、そのような成熟カクテルを、本発明による方法によって得ることができる免疫抑制自己および／または同種樹状細胞に加えることは、例えばそのようなカクテルで達成できるある種の樹状細胞プロファイルへの分化を後押しするために考慮される。

【００６８】

理解および対応するツール、例えば免疫抑制自己および／または同種樹状細胞と免疫賦活自己樹状細胞との間を識別するために手元にある分子マーカーをここに有することを考えると、体外量の哺乳動物対象の血液試料、したがって単球が物理的な力を経験するために通るデバイスおよびフローチャンバーの設計、ならびに単球の免疫抑制自己および／または同種樹状細胞への分化を誘導するプロセスが実施されるパラメーターを、単球の免疫抑制自己および／または同種樹状細胞への分化を目的に合うように可能にするために意図的に変更することがいまやできる。

【００６９】

上に述べたとおり、体外量の哺乳動物対象の血液試料はデバイスのフローチャンバーを前記哺乳動物対象の血液試料内に含有される前記単球に剪断力が適用されるように通される。単球の免疫抑制自己および／または同種樹状細胞への分化に影響を与える、デバイスおよびフローチャンバーの設計の修正は、流力の変更、フローチャンバーの流路の形状の変更、フローチャンバーの寸法の変更、温度調整の実現性、フローチャンバー中の体外量の哺乳動物対象の血液試料の可視またはＵＶ光への曝露の実現性などを含む。物理的な力の適用は、例えば体外の量の血液試料をフローチャンバーに通すことによってだけでなく、体外の量の血液試料を例えばＭａｃｏｐｈａｒｍａから得ることができるＥＶＡプラスチックバッグに入れ、この血液試料を満たしたバッグを穏やかに動かすまたは振ることによっても達成できる（例えばAndreu et al., (1994), Trans. Sci., 15(4), 443-454を参照されたい）。

【００７０】

上に述べ、以下で示すとおり単球の活性化ならびに免疫抑制自己および／または同種樹状細胞への分化の誘導は、単球が以下に記載のデバイスによって提供され得る物理的な力を経験する状況での単球と活性化血小板および／または特異的血漿構成成分との相互作用に依存している。したがってプロセスパラメーターの変更は、血漿構成成分の性質、純度および濃度、血小板の性質、純度および濃度、血漿構成成分および／または血小板がフローチャンバーに通されるおよび／または配置されるステップの順序、フローチャンバーが血漿構成成分および／または血小板でコートされる密度、体外量の哺乳動物対象の血液試料、具体的には血小板および／または単球がそのようなフローチャンバーのフローチャンバーを通る流力、体外量の哺乳動物対象の血液試料、具体的には血小板および／または単球がそのようなデバイスのフローチャンバーを通る温度および／または時間など、体外量

の哺乳動物対象の血液試料に、具体的には単球に加えられる８－ＭＯＰおよび／またはサイトカインなどの追加的因子の性質、純度および濃度を、変更することを含む。

【００７１】

デバイスおよびフローチャンバーの設計ならびにプロセスパラメーターに関連する因子は、単球の免疫抑制自己および／または同種樹状細胞への分化に対するそれらの関連に関して、ここでより詳細に考察される。次に考察されるいずれの実施形態についても、単球の免疫抑制自己および／または同種樹状細胞への分化は達成され、免疫抑制自己および／または同種樹状細胞は、少なくともＧＩＬＺ、ＩＤＯ、ＫＭＯ、ＴＧＦβおよび／もしくはＩＬ－１０、好ましくはＧＩＬＺの発現を決定することによって、ならびに／または表１の分子マーカーの発現を決定することによって同定可能であることは理解される。例えばＧＩＬＺの発現が増加する場合、および表１の分子マーカーの発現が増加しない場合、これは、単球が免疫抑制自己および／または同種樹状細胞に分化したことの指標であると考えられる。さらに次に考察されるすべての実施形態について、体外量の哺乳動物対象の血液試料に含有される単球が、例えば活性化血小板および／または血漿構成成分との相互作用でそれらを樹状細胞に分化させるために剪断ストレスなどの物理的な力に供されることは理解される。

【００７２】

第１の態様の一実施形態では、本発明は、体外量の哺乳動物対象の血液試料に含有される単球の免疫抑制自己および／または同種樹状細胞のへ分化を誘導する方法に関し、前記体外量の前記哺乳動物対象の血液試料は、前記哺乳動物対象の血液試料内に含有される前記単球に剪断力が適用されるように、前記デバイスの前記フローチャンバーを通る前記体外量の前記哺乳動物対象の血液試料の流速の調整を可能にする、デバイスのフローチャンバーに前記体外量の前記哺乳動物対象の血液試料を通すことによって物理的な力に供される。

【００７３】

第１の態様の別の実施形態では、本発明は、体外量の哺乳動物対象の血液試料に含有される単球の免疫抑制自己および／または同種樹状細胞への分化を誘導する方法に関し、前記体外量の前記哺乳動物対象の血液試料は、前記哺乳動物対象の血液試料内に含有される前記単球に剪断力が適用されるように、デバイスのフローチャンバーを通る前記体外量の前記哺乳動物対象の血液試料の流速の調整を可能にする、前記デバイスの前記フローチャンバーに前記体外量の前記哺乳動物対象の血液試料を通すことによって物理的な力に供され、前記デバイスの前記フローチャンバーは前記哺乳動物対象の血液試料内に含有される前記単球に剪断力が適用されるようにする設計を有する。

【００７４】

第１の態様の別の実施形態では、本発明は、体外量の哺乳動物対象の血液試料に含有される単球の免疫抑制自己および／または同種樹状細胞への分化を誘導する方法に関し、前記体外量の前記哺乳動物対象の血液試料は、前記哺乳動物対象の血液試料内に含有される前記単球に剪断力が適用されるように、デバイスのフローチャンバーを通る前記体外量の前記哺乳動物対象の血液試料の流速の調整を可能にする、前記デバイスの前記フローチャンバーに前記体外量の前記哺乳動物対象の血液試料を通すことによって物理的な力に供され、前記デバイスは温度および露光を含む群から選択される少なくとも１つのパラメーターの調整を追加的に可能にする。

【００７５】

第１の態様の別の実施形態では、本発明は、体外量の哺乳動物対象の血液試料に含有される単球の免疫抑制自己および／または同種樹状細胞への分化を誘導する方法に関し、前記体外量の前記哺乳動物対象の血液試料は、前述のデバイスのフローチャンバーに前記体外量の前記哺乳動物対象の血液試料を通すことによって物理的な力に供され、前記単球は活性化血小板および／または血漿構成成分との相互作用を通じて活性化され、免疫抑制自己および／または同種樹状細胞に分化するように誘導される。

【００７６】

これらのすべての実施形態および次に考察されるすべての実施形態について、体外の量の哺乳動物の血液試料内に含有される単球を、ＧＩＬＺの発現の増加がもたらされるように、８－ＭＯＰなどのＤＮＡ架橋剤の存在下で剪断ストレスなどの物理的力に供し、単球を光、好ましくはＵＶＡ光に曝露することは好ましい。これらすべての実施形態のためのフローチャンバーの設計および寸法は、実質的にすべての単球が８－ＭＯＰなどのＤＮＡ架橋剤に接触され、実質的にすべての単球が光、好ましくはＵＶＡに曝露されるように好ましくは選択されるべきである。

【００７７】

例えば、第１の態様の一実施形態では、本発明は、体外量の哺乳動物対象の血液試料に含有される単球の免疫抑制自己および／または同種樹状細胞への分化を誘導する方法に関し、前記方法は、

ａ）少なくとも単球を含む前記体外量の前記哺乳動物対象の血液試料を、前記体外量の前記哺乳動物対象の血液試料が通ることができるフローチャンバーを提供するように構成されているデバイスに適用するステップ、

ｂ）前記体外量の前記哺乳動物対象の血液内に含まれ得る、または少なくとも単球を含む前記哺乳動物対象の血液試料から分離されて提供され得る血小板を活性化するステップ、

ｃ）前記単球がステップｂ）において得られた前記活性化血小板に結合することによって活性化され、免疫抑制自己および／または同種樹状細胞に分化するように誘導されるように前記体外量の前記哺乳動物対象の血液試料内に含有される単球に物理的な力を適用することによって、少なくとも単球を含む前記体外量の前記哺乳動物対象の血液試料を前記デバイス中で処置するステップ

を少なくとも含む。

【００７８】

第１の態様の別の実施形態では、本発明は、体外量の哺乳動物対象の血液試料に含有される単球の免疫抑制自己および／または同種樹状細胞への分化を誘導する方法に関し、前記方法は、

ａ）少なくとも単球を含む前記体外量の前記哺乳動物対象の血液試料を、前記体外量の前記哺乳動物対象の血液試料が通ることができるフローチャンバーを提供するように構成されているデバイスに適用するステップ、

ｂ）前記体外量の前記哺乳動物対象の血液試料内に含まれ得る、または前記哺乳動物対象の血液試料から分離されて提供され得る血漿構成成分を通すステップ、

ｃ）前記単球がステップｂ）において得られた前記血漿構成成分に結合することによって活性化され、免疫抑制自己および／または同種樹状細胞に分化するように誘導されるように前記体外量の前記哺乳動物対象の血液試料内に含有される単球に物理的な力を適用することによって、少なくとも単球を含む前記体外量の前記哺乳動物対象の血液試料を前記デバイス中で処置するステップ

を少なくとも含む。

【００７９】

第１の態様のさらに別の実施形態では、本発明は、体外量の哺乳動物対象の血液試料に含有される単球の免疫抑制自己および／または同種樹状細胞への分化を誘導する方法に関し、前記方法は、

ａ）少なくとも単球を含む前記体外量の前記哺乳動物対象の血液試料を、前記体外量の前記哺乳動物対象の血液試料が通ることができるフローチャンバーを提供するように構成されているデバイスに適用するステップ、

ｂ）前記体外量の前記哺乳動物対象の血液内に含まれ得る、または前記哺乳動物対象の血液試料から分離されて提供され得る血漿構成成分を通すステップ、

ｃ）前記体外量の前記哺乳動物対象の血液試料内に含まれ得る、または少なくとも単球を含む前記哺乳動物対象の血液試料から分離されて提供され得る血小板を活性化するステップ、

ｄ）前記単球がステップｂ）およびｃ）において得られた前記活性化血小板および／また

は血漿構成成分に結合することによって活性化され、免疫抑制自己および／または同種樹状細胞に分化するように誘導されるように前記体外量の前記哺乳動物対象の血液試料内に含有される単球に物理的な力を適用することによって、少なくとも単球を含む前記体外量の前記哺乳動物対象の血液を前記デバイス中で処置するステップ
を少なくとも含む。

【００８０】

第１の態様のさらに別の実施形態では、本発明は、体外量の哺乳動物対象の血液試料に含有される単球の免疫抑制自己および／または同種樹状細胞への分化を誘導する方法に関し、前記方法は、

ａ）任意選択で、血小板に富む血漿を、前記体外量の前記哺乳動物対象の血液試料が通ることができるフローチャンバーを提供するように構成されているデバイスを通すステップ、

ｂ）少なくとも単球を含む前記体外量の前記哺乳動物対象の血液試料を、前記体外量の前記哺乳動物対象の血液試料が通ることができるフローチャンバーを提供するように構成されているデバイスに適用するステップ、

ｃ）前記単球がステップａ）の得られた前記血小板に富む血漿に任意選択で結合することによって活性化され、免疫抑制自己および／または同種樹状細胞に分化するように誘導されるように前記体外量の前記哺乳動物対象の血液試料内に含有される単球に物理的な力を適用することによって、少なくとも単球を含む前記体外量の前記哺乳動物対象の血液を前記デバイス中で処置するステップ
を少なくとも含む。

【００８１】

本明細書に記載の実験から理解されるとおり、体外量の哺乳動物対象の血液に含有される単球の免疫抑制自己および／または同種樹状細胞への分化を誘導するための方法は、前記体外量の前記哺乳動物対象の血液内に含まれる血小板が活性化された場合、および前記デバイス中の少なくとも単球を含む体外量の前記哺乳動物対象の血液が、活性化血小板に結合することによって前記単球が活性化され、樹状細胞に分化するように誘導されるように、前記体外量の前記哺乳動物対象の血液内に含有される単球に物理的な力を適用することによって処置される場合に最適に働く。しかし単球の活性化は、血漿構成成分との直接相互作用によって、すなわち活性化血小板との相互作用を伴わずに達成される場合がある。次いでこれらの樹状細胞を、単球を８－ＭＯＰなどのＤＮＡ架橋剤およびＵＶＡ光などの光に追加的に曝露することによって免疫抑制自己および／または同種樹状細胞へ分化させることができる。

【００８２】

血小板を活性化するステップならびに続く単球の活性化および樹状細胞への分化は（ｉ）血漿タンパク質などの血漿構成成分はデバイスのフローチャンバーを通され、それによりこれらの構成成分はフローチャンバーの壁に接着する、（ｉｉ）血小板はフローチャンバーを通され、血漿構成成分への結合によって活性化される、および（ｉｉｉ）少なくとも単球を含む体外量の前記哺乳動物対象の血液などの単球含有画分は、フローチャンバーを通され、活性化血小板への結合によって樹状細胞への分化のために活性化される、実施形態について次に考察される。しかし、これらの活性が、全血画分が下に記載のとおり体外の量の血液から得られた場合と同様に血漿画分または血漿タンパク質もしくはその断片、血小板画分および単球含有画分が、チャネルまたはチャネル様構造を同時に通る場合にも生じることは理解される。プロセスが、血漿構成成分だけをフローチャンバーの壁に接着させ、単球を血漿構成成分と相互作用させることによっても同じ有効性ではないが実施できることもさらに理解される。それでも次にこれらの態様は、好ましい実施形態、すなわちステップ（ｉ）、（ｉｉ）および（ｉｉｉ）が実現される場合に関して次に考察される。

【００８３】

第１のステップに関して、フィブリノーゲンもしくはフィブロネクチン、またはフィブ

リノーゲンのガンマ構成成分などのその断片などのタンパク質を含む血漿構成成分は、体外の量の血液試料から得られた画分としてまたは他の供給源から精製された形態、例えば組換え的に発現されたタンパク質の形態のいずれかで提供されてよい。フィブリノーゲンおよびフィブロネクチンなどの血漿タンパク質による血小板の活性化は十分であり、これらのタンパク質の組換え的に発現された形態が十分であると考えられるが、体外の量の血液試料から得られ、これらのタンパク質を含む血漿画分を使用することは、これらの血漿画分がさらに複雑な組成を有し、血小板の最適な活性化を提供するすべての血漿構成成分を含み得ることから、好ましい場合がある。

【００８４】

血漿タンパク質画分、血漿タンパク質またはその断片は、チャネルまたはチャネル様構造の壁に接着させるためにプラスチックまたはガラスなどの非プラスチック材料で作ることができるフローチャンバーを通すことができる。血漿画分または血漿タンパク質が、例えば具体的な圧力などの具体的な物理的な力でフローチャンバーを通される必要性はない。しかしプロセスを能率化するために、血漿画分または血漿タンパク質をフローチャンバーに、下により詳細に記載される単球活性化のために必要とされる剪断ストレスと同一でなくとも同等である剪断ストレスで通すことが構想される。一般に、血漿画分または血漿タンパク質は、フィブロネクチンおよびフィブリノーゲンを含む血漿タンパク質でその表面をコートするために最初にフローチャンバーをポンプで通される。フローチャンバーを通る血漿タンパク質画分、血漿タンパク質またはその断片の流速は、プラスチック表面へのタンパク質接着の所望のレベルを得るために制御される。所望により流れは一定時間停止される場合があり、血漿構成成分はフローチャンバーの表面を「浸漬」する場合がある。フローチャンバーを通して血漿構成成分を進ませるポンプの速度および時間を制御することによって、コーティングの程度を制御できる。一手法では、血漿画分または血漿タンパク質は、フローチャンバー構造の表面に約１から６０分の間、約１から約３０分の間、約１から約２０分の間または約１から約１０分の間の時間曝露される。フローチャンバーの表面への血漿タンパク質接着を増強するために、流れは一時的に中止してよく（約６０分間まで）、再開の前に、または手順のこの相の際に流速は充填速度（１００ｍｌ／分まで）から５ｍｌ／分まで遅くしてよい。

【００８５】

フローチャンバーの表面が、例えば精製された血漿タンパク質またはフィブリノーゲンのガンマ構成成分などのその断片でプレコートされているフローチャンバーを有するデバイスが使用される筋書きも構想できる。そのようなプレコートされたデバイスは、例えば１回限りの使用のために構成されているフローチャンバーを備えるカートリッジを含む手持ち式のデバイスでプロセスが実施される場合に使用できる。フローチャンバーの表面が、例えば血小板に富む血漿でプレコートされているフローチャンバーを有するデバイスのために使用される筋書きも構想できる。

【００８６】

血漿画分もしくは血漿タンパク質またはその断片がチャネルまたはチャネル様構造を通され、その表面が血漿タンパク質でコートされた後に、血小板画分は、例えばポンプによってフローチャンバーに入れられて通される。フローチャンバー内での血小板の流速および滞留時間は、フローチャンバーの表面に既に接着しており、それにより活性化されている、血漿構成成分またはタンパク質もしくはその断片への血小板の結合を可能にするように選択される。

【００８７】

本明細書に提示するデータは血漿構成成分による血小板の活性化が、不活性化血小板が最初にフィブロネクチンのガンマ構成成分に結合し、それにより活性化され、次いでフィブロネクチンまたはフィブリノーゲンなどの多くの血漿タンパク質において見出されるＲＧＤモチーフ（アルギニン、グリシン、アスパラギン酸）に結合する場合がある逐次的プロセスであることを示唆している。精製されたおよび／または組換え的に発現された血漿タンパク質またはその断片が血小板の活性化のために使用される場合、それにより少なく

ともフィブリノーゲンのガンマ構成成分および任意選択で追加的にＲＧＤペプチドを有するプレコートチャネルまたはチャネル様構造が構想できる。これらの血漿タンパク質断片およびペプチドは、血小板の効率的な活性化、および同時にチャネルまたはチャネル様構造の表面のコーティングプロセスの最適な制御を可能にできる。当然のことながらこれらすべての構成成分は、体外の量の血液から得られた血漿画分がコーティングおよび活性化のために使用される場合に、存在する。

【００８８】

血小板の血漿構成成分への効率的な結合およびそれによる活性化のために、流速は血漿構成成分のコーティングステップと比較して上方にまたは下方に調整される場合がある、または流れは血漿構成成分に結合した所望のレベルの血小板を得るために一定時間停止されてよい。血漿活性化のための流速は、典型的には約５ｍｌ／分から約２００ｍｌ／分、約１０ｍｌ／分から約１５０ｍｌ／分、約１０ｍｌ／分から約１００ｍｌ／分または約５ｍｌ／分から約５０ｍｌ／分の範囲である。典型的には、約１から６０分の間、約１から約３０分の間、約１から約２０分の間、または約１から約１０分の間、血小板を血漿構成成分に結合できるようにすることが望ましい。

【００８９】

剪断ストレスが血小板の活性化について、単球の活性化についてと同じ重要性であるとは考えないが、血小板画分を、約０．２から約０．４まで、約０．５まで、約０．６まで、約０．７まで、約０．８まで、約０．９まで、約１まで、約２まで、約３まで、約４まで、約５までまたは約６ｄｙｎ／ｃｍ^{2}までのなどの約０．１から約２０．０ｄｙｎ／ｃｍ^2、約０．２から約１５．０ｄｙｎ／ｃｍ^2、約０．３から約１０．０ｄｙｎ／ｃｍ^{2}の剪断力下でフローチャンバーを通すことは好ましい場合がある。血小板含有画分の典型的流速は、約５ｍｌ／分から約２００ｍｌ／分、約１０ｍｌ／分から約１５０ｍｌ／分、約１０ｍｌ／分から約１００ｍｌ／分または約５ｍｌ／分から約５０ｍｌ／分の範囲である場合がある。流速は、フローチャンバーのサイズおよび形状にある程度依存し、下に述べる寸法のフローチャンバーが使用される場合に具体的に使用できる。一般に、前述の剪断ストレス値を達成するために流速を選択できる。

【００９０】

したがって、約０．１から約１０．０ｄｙｎ／ｃｍ^{2}の剪断力を産生するために約１０ｍｌ／分から約２００ｍｌ／分の流速で、血小板含有画分をチャネルまたはチャネル様構造に通すことが企図される。

【００９１】

血小板がチャネルまたはチャネル様構造を通され、チャネルまたはチャネル様構造の表面に配置されている血漿タンパク質またはその断片によって活性化された後に、単球含有画分、例えば前記体外量の哺乳動物対象の血液試料または体外の量の血液試料から得られた下に述べる白血球もしくはバフィーコート画分は、物理的な力を適用することによって、例えばポンプによってチャネルまたはチャネル様構造に入れられて通されることによって通される。血漿構成成分との相互作用を通じた血小板の活性化が血漿構成成分への血小板の接着を導くことは理解される。

【００９２】

血小板および血漿構成成分を含む体外量の哺乳動物対象の血液試料がフローチャンバーを通される場合に上記と同じ事象が起きることも理解される。この場合血漿構成成分は、フローチャンバーの壁に接着し、次いで血小板を活性化する。しかしこの筋書きでは、プロセスは制御可能ではない場合があり、血小板および血漿構成成分を含む体外量の哺乳動物対象の血液試料のフローチャンバーでの滞留時間が増加することによりこのことが考慮される場合がある。

【００９３】

活性化血小板の代わりに、単球に十分である血小板由来の因子を使用できることはさらに注目される。これらの因子は、例えばフィブロネクチンを含み、Ｐ－セレクチン、インテグリンα５β１Ｃ型レクチン受容体、ＣＤ６１、ＣＤ３６、ＣＤ４７ならびにＣＤ５５

およびＣＤ５９などの補体阻害剤、またはＴＲＥＭ様転写物－１などの因子も含む場合がある。そのような血小板由来因子は、例えば精製された構成成分の混合物または、例えば体外量の哺乳動物対象の血液試料内に含有される血小板の溶解によって得られた構成成分の混合物としてのいずれかでフローチャンバーの表面に直接配置されてもよい。この場合、例えばフローチャンバーの表面を血漿構成成分でコーティングする必要性は、省くことができる。

【００９４】

本明細書に示すデータは、血小板が一度活性化されると、Ｐ－セレクチンおよびＲＧＤ含有リガンドなどのタンパク質が活性化血小板によって発現され、次いで単球と相互作用し、樹状細胞へのそれらの分化を活性化することを示唆している。さらに、活性化血小板による単球活性化および樹状細胞誘導は、静止条件下では生じないことが見出された。むしろ単球は、物理的な力の適用下でチャネルまたはチャネル様構造を通される必要がある。活性化において血小板が、次いで単球を活性化するＰ－セレクチンなどの因子を発現するために約６０から約１２０分間を必要とすることを考えると、単球の通過は血小板がこれらの因子を発現し始めるまで、例えば約６０から約１２０分間、遅らせてもよい。単球、血小板および血漿構成成分を含む体外量の哺乳動物対象の血液試料がフローチャンバーを通される場合、この時間はより長い時間に調整してよい。

【００９５】

単球と活性化血小板、血小板由来因子または血漿構成成分との相互作用が、同時の物理的な力の適用なしでは単球の活性化および分化のために不十分であることは理解される。

【００９６】

フローチャンバーを通して単球含有画分を動かすための物理的な力の適用は、好ましくは体外量の哺乳動物対象の血液試料などの単球含有画分が剪断ストレス下でフローチャンバーを通って動かされることを意味できる。典型的には、単球含有画分は、約０．２から約０．３まで、約０．４まで、約０．５まで、約０．６まで、約０．７まで、約０．８まで、約０．９まで、約１まで、約１．５までまたは約２ｄｙｎ／ｃｍ^{2}までなどの約０．１から約２０．０ｄｙｎ／ｃｍ^2、約０．２から約１０．０ｄｙｎ／ｃｍ^{2}の剪断力下でフローチャンバーを通してよい。単球含有画分の典型的な流速は、約５ｍｌ／分から約２００ｍｌ／分、約１０ｍｌ／分から約１５０ｍｌ／分、約１０ｍｌ／分から約１００ｍｌ／分または約５ｍｌ／分から約５０ｍｌ／分の範囲であってよい。流速は、フローチャンバーのサイズおよび形状にある程度依存し、下に述べる寸法のチャネルまたはチャネル様構造が使用される場合に具体的に使用できる。一般に、前述の剪断ストレス値を達成するために流速を選択できる。

【００９７】

したがって、約０．１から約０．５ｄｙｎ／ｃｍ^{2}の剪断力を産生するために約１０ｍｌ／分から約２００ｍｌ／分の流速で、単球含有画分をチャネルまたはチャネル様構造に通すことが企図される。いずれの場合でも、活性化血小板への単球の結合およびそのような活性化単球の樹状細胞への分化を可能にする剪断力が生成されることは確実にされなければならない。

【００９８】

本明細書に提示するデータは、単球血小板相互作用が光学顕微鏡での検出によって３秒間未満について生じる接触として任意に定義される短期作用型相互作用および光学顕微鏡での検出によって３秒間より長い接触として定義される長期作用型相互作用に分割できることを示唆している。初期短期作用型相互作用は、活性化血小板上で発現されるＰ－セレクチンによって媒介されると考えられる。これらの初期接触は、次いで活性化血小板によって発現されるＲＧＤ含有タンパク質によって媒介される長期作用型相互作用を引き起こすことができる。

【００９９】

単球の活性化および樹状細胞への分化は、例えば単球と血小板とを十分な時間相互作用させることにより、単球が血小板と長期作用型接触を確立できるようにすることによって

、肯定的に影響を受ける場合がある。例えば単球がチャネルまたはチャネル様構造を通って流れるときに、それらは、フローチャンバーを通る流れによって誘導される剪断力によって血小板に交互に結合および脱接着する。単球／血小板相互作用の滞留時間は、例えばポンプの速度を制御することによって流速を変更することによって制御できる。例えばポンプは、最初に単球／血小板相互作用を増強するために遅い速度／低い流速で操作されてよく、次いで速度／流速は、処置された単球の処置デバイスからの脱接着および収集を促進するために増加されてよい。血小板への単球の接着は約０．１から約２ｄｙｎ／ｃｍ^{2}で、約０．１から約１ｄｙｎ／ｃｍ^{2}で、好ましくは約０．１から約０．５ｄｙｎ／ｃｍ^{2}で最適に成し遂げることができ、一方単球の脱接着および収集は増加した剪断レベルで最適に成し遂げることができると考えられる。

【０１００】

例えば活性化血小板、血小板由来因子または血漿構成成分との相互作用によって、単球の活性化が固定化を導くことは理解される。誘導された免疫抑制自己および／または同種樹状細胞を採取するために、例えば２０ｄｙｎ／ｃｍ^{2}に剪断ストレスを増加させることができる、および／またはＰｌａｖｉｃ、アスピリンもしくは他の血液希釈剤などの因子を加えることによって、免疫抑制自己および／または同種樹状細胞を活性化血小板、血小板由来因子または血漿構成成分からの脱接着を可能にする因子で処置できる。

【０１０１】

温度は、単球の活性化およびそれらの樹状細胞への分化に影響を与える別の因子である。本発明による方法は、約１８℃から約４２℃の範囲、好ましくは約２２℃から約４１℃の範囲およびより好ましくは約３７℃から約４１℃の範囲で実施してよい。

【０１０２】

単球の活性化を調節するために変更してよい１つのパラメーターは、フローチャンバーが血漿構成成分およびしたがって血漿構成成分に結合する血小板でコートされる密度である。一般に、フローチャンバーの表面が血漿構成成分および血小板でより高密度にコートされればされるほど、単球活性化はより効率的になる。

【０１０３】

血小板が血漿構成成分への結合によって活性化されることは上に述べられている。本発明による用語「活性化血小板」は、フィブロネクチンおよび／またはフィブリノーゲンなどの血漿構成成分への血小板の結合の結果としてＰ－セレクチン、αＩＩｂ－β３インテグリンおよび／またはフィブロネクチン、フィブリノーゲンもしくはビトロネクチンなどのＲＧＤ含有タンパク質の発現の増加を示す血小板を指して使用される。発現は、ＲＴ－ＰＣＲ、ウエスタンブロッティングまたはＦＡＣＳ分析などの従来の方法によって決定できる。本発明による用語「非活性化血小板」は、フィブロネクチンまたはフィブリノーゲンなどの血漿タンパク質へのその結合が、血小板をフィブリノーゲンのガンマ構成成分と事前インキュベートすることによって低減できない血小板を指して使用される。

【０１０４】

単球が、剪断ストレス条件下での活性化血小板への結合によって活性化され、樹状細胞への分化を始めることは上に述べられている。本発明による用語「活性化単球」は、剪断ストレス条件下で活性化血小板への結合でβ１－インテグリンの開いたコンフォメーションを増加したレベルで発現し、ＨＬＡ－ＤＲ$^{+}$／ＣＤ８３$^{+}$などの成熟樹状細胞のマーカーを発現し始める単球を指して使用される。活性化血小板との単球の相互作用が樹状細胞の活性化および分化を導くかどうかを決定するための対照として、抗Ｐ－セレクチン抗体の非存在下（活性化）または抗Ｐ－セレクチン抗体の存在下（対照）のいずれかの剪断ストレス条件下での活性化血小板への単球の結合後にＨＬＡ－ＤＲ$^{+}$／ＣＤ８３$^{+}$の発現を比較できる。発現は、ＲＴ－ＰＣＲ、ウエスタンブロッティングまたはＦＡＣＳ分析などの従来の方法によって決定できる。８－ＭＯＰなどのＤＮＡ架橋剤を追加的に適用し、活性化単球をＵＶＡなどの光に曝露する場合、分化プロセスを免疫抑制自己および／または同種樹状細胞に方向付け、それによりＧＩＬＺの発現を増加させることができる。実施例２のデータから理解されるとおり、ＬＰＳで処置された場合でさえもそのような細胞は、

免疫賦活自己樹状細胞への分化に抵抗性であり、したがって、ＨＬＡ－ＤＲ、ＣＤ８３、ＣＤ８０およびＣＤ８６を高レベルで発現し続けず、むしろ免疫寛容原性状態を維持する。

【０１０５】

単球が本発明による方法によって活性化された後に、それらは免疫抑制自己および／または同種樹状細胞へ分化し始める。本発明による用語「免疫抑制自己および／または同種樹状細胞」は、上に述べたとおり使用される。これらの免疫抑制自己および／または同種樹状細胞は、例えばＧＩＬＺの発現の増加、および好ましくは追加的に表１の分子マーカーの発現が増加しないことによって同定できる。

【０１０６】

本明細書に記載の実験的発見は、さらに、さまざまな有利点を提供できるこの第１の態様の種々の実施形態をただちに示唆する。

【０１０７】

単球の活性化および続くこれらの単球の免疫抑制自己および／または同種樹状細胞への分化の誘導が小型化されたデバイスにおいて達成できるという発見は、少量の体外血液試料でプロセスを実施できるようにする。上に述べたとおり古典的ＥＣＰ手順は、単球ならびに血漿構成成分および血小板を含む白血球を含む約２００ｍｌから５００ｍｌの最終容量を得るために、白血球アフェレーシスなどのアフェレーシスによって患者から典型的には得られる２．５Ｌから６Ｌの血液の処理を必要とする。

【０１０８】

しかし、本発明による方法は、実質的に少ない量の血液試料を必要とする可能性があり、それにより患者への考慮すべき負担である白血球アフェレーシスなどのアフェレーシスまたは他のプロセスの必要性を省くことができる。

【０１０９】

したがって本発明は、白血球アフェレーシスなどのアフェレーシスに対する必要性なく実施でき、そのような免疫抑制自己樹状細胞を得るプロセス全体が手持ち式のデバイスで実施できる。

【０１１０】

したがって上に記載の実施形態と組み合わせることができる本発明の第１の態様の一実施形態では、前記体外量の前記哺乳動物対象の血液が白血球アフェレーシスなどのアフェレーシスによって得られない第１の態様による方法を実施することが企図される。

【０１１１】

前記体外量の前記哺乳動物対象の血液は、哺乳動物の体外の量の血液試料の約１ｍｌから約１００ｍｌの間、約１ｍｌから約５０ｍｌの間、約１ｍｌから約４０ｍｌの間、または約１ｍｌから約３０ｍｌの間の最終容量をもたらすように、前記哺乳動物対象の体外血液の約５ｍｌから約５００ｍｌの間、約１０ｍｌから約４５０ｍｌの間約２０ｍｌから約４００ｍｌの間、約３０ｍｌから約３５０ｍｌの間、約４０ｍｌから約３００ｍｌの間、または約５０ｍｌから約２００ｍｌの間または約５０ｍｌから約１００ｍｌの間であってよい。

【０１１２】

採血され、デバイスに適用された体外血液の量は、全血であってよい。代替的に、前記体外量の前記哺乳動物対象の血液は、約５ｍｌから約５００ｍｌの間、約１０ｍｌから約４５０ｍｌの間、約２０ｍｌから約４００ｍｌの間、約３０ｍｌから約３５０ｍｌの間、約４０ｍｌから約３００ｍｌの間または約５０ｍｌから約２００ｍｌの間または約５０ｍｌから約１００ｍｌの間の前記哺乳動物対象の体外全血から白血球を単離することによって得られてもよい。

【０１１３】

前記体外量の前記哺乳動物対象の血液は、約５ｍｌから約５００ｍｌの間、約１０ｍｌから約４５０ｍｌの間、約２０ｍｌから約４００ｍｌの間、約３０ｍｌから約３５０ｍｌの間、約４０ｍｌから約３００ｍｌの間または約５０ｍｌから約２００ｍｌの間また約５

０ｍｌから約１００ｍｌの間の前記哺乳動物対象の体外全血からバフィーコートを単離することによっても得ることができる。

【０１１４】

前述のすべての場合（全血、白血球画分、バフィーコート）において、前記体外の量の血液は、典型的には単核細胞約５×１０^{6}個／ｍｌなどの約１×１０^{4}個から約１×１０^{8}個の間を含む。

【０１１５】

当業者は、ろ過、分画遠心分離を含む、全血、その白血球画分またはそのバフィーコート画分をどのように得るかに精通している（例えばBruil et al., Transfusion Medicine Reviews (1995), IX (2), 145-166を参照されたい）。好ましい方法は、例えばＰａｌｌから入手可能であるフィルターによる。そのようなフィルターは、体外試料の処理を手持ち式のデバイス中で行えるようにデバイスに組み入れられてよい。供給源として、例えば臍帯の血液も使用できる。

【０１１６】

遠心分離を使用する場合、例えば１７または１８ゲージゲージ針を有するシリンジを通して全血を得ることができる。そのような全血試料は、デブリおよび他の構成成分を除去するために遠心分離されてよい。次いで全血試料は、Ｐａｌｌから得られるなどの一般的フィルターを通してろ過されてよい。

【０１１７】

単核白血球画分を得るために、記載の全血試料を得る場合があり、次いでそのような試料を例えばＦｉｃｏｌｌ－Ｈｙｐａｑｕｅに重層できる。続いて遠心分離ステップが例えば１８０ｇなどの約１００ｇから約２００ｇで実施され、次いで単核白血球画分は界面から収集され、ＨＢＳＳなどの一般的緩衝液で洗浄されてよい。次いで洗浄された単核白血球画分は、ＲＰＭＩ－１６４０培地（ＧＩＢＣＯ）などの血清不含有細胞培養培地に再懸濁されてよい。単核白血球画分を得るための他の方法は、水簸、ろ過、密度遠心分離などを含む。

【０１１８】

上で指摘したとおり、樹状細胞形成の誘導のための決定的ステップは、血漿構成成分による血小板の活性化およびそのような活性化血小板による単球の活性化を含むと考えられる。原理上は、剪断ストレス下で全血試料をデバイスに通すことができる。次いでそのような試料の血漿構成成分は、フローチャンバーの表面に結合し、血漿構成成分によるそのような試料内の血小板の接着および活性化を可能にする。そのような試料の単球は、次いで活性化血小板に結合し、それら自体が活性化される。

【０１１９】

同様に、上に記載のとおり得られた全血試料を全血試料のデブリを分離するために約１５０ｇなどの約１００ｇから約１８０ｇで、約１５分間などの約１０分間から約２０分間遠心分離することによって得ることできる画分を含有する血小板に富む血漿などの種々の構成成分の組合せを得ることができる。血小板に富む血漿層は、次いで収集され、約９００ｇなどの約７００ｇから約１０００ｇで、約５分間などの約３分間から約１０分間再遠心分離される。生じたペレットは、次いで血清不含有細胞培養培地に再懸濁される。

【０１２０】

しかし、プロセス全体について最良の制御を得るために、最初に血漿構成成分をフローチャンバーに通し、それらを接着させ、次いで血小板、次いで単球含有画分であることは望ましい。この手法について、単球または単球を含むバフィーコート画分を含み、血漿構成成分を含まず、血小板を含まない白血球画分を得ることは望ましい場合がある。そのような血漿および血小板を含まない単球含有画分は、当技術分野において記載のとおり得ることができる。白血球またはバフィーコート画分が上に記載のとおり得られる場合、それらは血漿または血小板を本発明の目的のために十分な程度含まない。この手法のために血小板および／または血漿画分を有することは望ましい。

【０１２１】

したがって本発明は、前記体外量の前記哺乳動物対象の血液が前記デバイスに適用される前に体外量の前記哺乳動物対象の血液から分離されている血小板を使用することを企図する。次いでこれらの血小板は、フィブロネクチンなどの血漿構成成分でコートされたフローチャンバーを通してよい。

【０１２２】

別の実施形態では、本発明は、前記体外量の前記哺乳動物対象の血液が前記デバイスに適用される前に体外量の前記哺乳動物対象の血液から分離されている血漿構成成分を使用することを考慮する。次いでこれらの血漿構成成分は、それらが接着できるようにフローチャンバーを通してよい。

【０１２３】

体外の量の血液から得られた血漿構成成分を使用する代わりに、例えば組換えタンパク質発現などの他の供給源から単離された血漿構成成分を使用することもできる。そのような血漿構成成分は、フィブリノーゲン、フィブロネクチン、Ｐ－セレクチン、およびフィブリノーゲンのガンマ構成成分などのその断片を含む。

【０１２４】

白血球アフェレーシスなどのアフェレーシスによって得られなかった体外の量の血液を使用することは好ましい場合があるが、白血球アフェレーシスなどのアフェレーシスによって得られた体外の量の血液を使用することは、本発明によって排除されない。

【０１２５】

したがって本発明の第１の態様の別の実施形態では、上に記載の方法を実施することが企図され、前記体外量の前記哺乳動物対象の血液は、白血球アフェレーシスなどのアフェレーシスによって得られる。

【０１２６】

白血球アフェレーシスなどのアフェレーシスは、当技術分野において公知のとおり実施できる。したがって、２．５Ｌから６Ｌなどの体外量の血液が対象から得られ、３つの画分、すなわち血漿、血小板およびバフィーコートを得るために従来の白血球アフェレーシスによって処置されてよい。フィブロネクチンおよびフィブリノーゲンなどのタンパク質を含有する血漿は、最も軽い血液画分であり、したがって遠心分離によって選択的に除去され、チャネルまたはチャネル様構造を通される血液の第１の部分である。血漿がチャネルまたはチャネル様構造をポンプで通され、その表面が血漿タンパク質でコートされた後に、白血球アフェレーシス遠心分離物において二番目に軽い構成成分、血小板画分が、チャネルまたはチャネル様構造をポンプで入れられて通される。白血球アフェレーシス遠心分離物から溶出される三番目に軽い画分は、白血球細胞を含有するバフィーコートであり血液単球を含む。次いで単球を含むバフィーコートは、チャネルまたはチャネル様構造をポンプで通される。血液試料はＴｈｅｒａｋｏｓデバイス、Ｓｐｅｃｔｒａ ｃｅｌｌ ｓｅｐａｒａｔｏｒ（Andreu et al., (1994), Transf. Sci., 15(4), 443-454を参照されたい）、またはＭａｃｏｐｈａｒｍａからのＴｈｅｒａｆｌｅｘデバイスを使用して得られてもよい。

【０１２７】

したがって本発明は、一実施形態において本発明は、単球を含む前記体外量の前記哺乳動物対象の血液が前記デバイスに適用される前に体外量の前記哺乳動物対象の血液から白血球アフェレーシスなどのアフェレーシスによって分離されている血小板を使用することを考慮する。

【０１２８】

別の実施形態では、本発明は、単球および／または血小板を含む前記体外量の前記哺乳動物対象の血液が前記デバイスに適用される前に体外量の前記哺乳動物対象の血液から白血球アフェレーシスなどのアフェレーシスによって分離されている血漿構成成分を使用することを考慮する。

【０１２９】

体外の量の血液から得られた血漿構成成分を使用する代わりに、例えば組換えタンパク

質発現などの他の供給源から単離された血漿構成成分も使用できる。そのような血漿構成成分は、フィブリノーゲン、フィブロネクチンまたはＰ－セレクチンを含む。アミノ酸４００～４１１（配列番号１０５、Ｈｉｓ－Ｈｉｓ－Ｌｅｕ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ａｌａ－Ｌｙｓ－Ｇｌｎ－Ａｌａ－Ｇｌｙ－Ａｓｐ－Ｖａｌ）に対応するフィブリノーゲンのガンマ構成成分などの血漿タンパク質の断片も使用できる。このガンマ構成成分は、血小板を活性化できることが本明細書において表されるデータによって示されている。したがって、主にではなくても少なくともフィブロネクチンを含む血漿画分を使用することが好ましい場合がある。同様に、例えば組換え的に発現されたおよび／または精製されたフィブロネクチンまたはそのガンマ構成成分を、血小板を活性化するために使用することが好ましい場合がある。

【０１３０】

体外の量の血液が白血球アフェレーシスなどのアフェレーシスによって得られたまたは得られていない本発明の第１の態様の両方の実施形態について、３つすべての画分、すなわち血漿構成成分、血小板および単球含有画分を、例えば全血試料の形態であってもまたは全血の事前精製だけされた画分を使用することによってでも同時にフローチャンバーを通すことは、これらの画分を前述の逐次的通過でフローチャンバーを通すことがプロセス全体のより良い制御を提供できる場合もあるが、考慮することができる。全血の事前精製された画分は、例えば血液バッグを遠心分離し、白血球細胞および血小板が濃縮されている上清を絞り出すことによって得ることができる。

【０１３１】

述べたとおり、フローチャンバーを通る流速、およびそれにより生じる剪断ストレスは、単球の樹状細胞への分化をもたらす。さらに、８－ＭＯＰなどの光活性化可能ＤＮＡ架橋剤の適用およびＵＶＡ光などの光への曝露は、ＧＩＬＺの発現の増加を誘導するために使用できる。流速の他に、フローチャンバーの設計および寸法は、単球への物理的な力の適用を操作する、さらに改善するため、および実質的にすべての単球が８－ＭＯＰなどのＤＮＡ架橋剤に接触され、ＵＶＡなどの光に曝露されることを確実にするために変更されてよい。

【０１３２】

チャネルまたはチャネル様構造を含むフローチャンバーを有するデバイスは、好適である場合がある。古典的ＥＣＰ手順のために使用されるデバイスの全体構造、より小さな寸法だが、を有するそのようなフローチャンバーは、図１７に示されている。

【０１３３】

しかし図１８ａ）からｄ）に示すものなどの他の形状も使用できる。したがって本明細書に記載の発見は、プロセスの際に生じる乱流および剪断ストレスに関してプロセス全体に良い制御を有することを可能にする顕著に簡易化された形状のフローチャンバーを考慮することを可能にする。

【０１３４】

多数のフローチャンバーを有するデバイスは、好適である場合がある。古典的ＥＣＰ手順のために使用されるデバイスの全体構造、より小さな寸法だが、を有するフローチャンバーは、図１７に示されている。

【０１３５】

典型的には、流れ勾配は、単球含有画分が通されるときにチャネルなどのフローチャンバー内で作り出される。単球は、血小板および／または血漿構成成分に交互に結合し、離脱する。単球の樹状細胞への成熟は、血小板および／または血漿構成成分への曝露の増加に伴って、この相互作用によって大きく増強され、それによりこの成熟プロセスのシグナル伝達の増加をもたらす。

【０１３６】

したがって、免疫抑制自己および／または同種樹状細胞の可能な限り均質な集団を得るために、チャネルなどのフローチャンバーの設計および寸法が、フローチャンバー中のさまざまな流域を回避するように選択されることが望ましい。

【０１３７】
チャネルなどのフローチャンバーは、原理上は上に記載の目的のために好適な任意の断面形状を有してよい。したがってそれらは、矩形、円形、楕円形、または他の断面形態を有する場合がある。そのようなフローチャンバーの寸法は、下で主に矩形断面に関して考察されているが、楕円形または円形断面を有するチャネルなどのフローチャンバーが使用されることは、そのような断面が例えば血漿構成成分でのさらに均質なコーティングおよび／または乱流をあまり含まないさらに継続的な流れ特性を可能にするはずであることから好ましい場合がある。
【０１３８】
矩形断面を有する場合、チャネルなどのフローチャンバーは、約５μｍから約５００μｍまでの高さおよび約５μｍから約５００μｍまでの幅の寸法を有する場合がある。チャネルまたはチャネル様構造は、約１０μｍから約４００μｍを含むそれ以下の高さおよび約１０μｍから約４００μｍを含むそれ以下の幅、約１０μｍから約３００μｍを含むそれ以下の高さおよび約１０μｍから約３００μｍを含むそれ以下の幅、約１０μｍから約２５０μｍを含むそれ以下の高さおよび約１０μｍから約２５０μｍを含むそれ以下の幅、約１０μｍから約１００μｍを含むそれ以下の高さおよび約１０μｍから約１００μｍを含むそれ以下の幅、または約１０μｍから約５０μｍを含むそれ以下の高さおよび約１０μｍから約５０μｍを含むそれ以下の幅の寸法を有してよい。
【０１３９】
楕円形断面のチャネルなどのフローチャンバーが使用される場合、前述の高さおよび幅の寸法は、相当する容積を可能にするように相応に適合される必要がある。
【０１４０】
円形断面のチャネルなどのフローチャンバーが使用される場合、直径は、典型的には約５μｍから約５００μｍを含むそれ以下、約１０μｍから約４００μｍを含むそれ以下、約１０μｍから約３００μｍを含むそれ以下、約１０μｍから約２５０μｍを含むそれ以下、約１０μｍから約１００μｍを含むそれ以下、または約１０μｍから約５０μｍを含むそれ以下の範囲であってよい。
【０１４１】
さらに小さな寸法は、５０μｍなどの１００μｍ未満の高さ、幅または直径について具体的な優先性を有するフローチャンバーにとって一般に好ましく、その理由は、そのようなさらに小さな寸法について、血小板との単球の相互作用がさらに効率的および均一であり、フローチャンバーの表面および中心での流れ特性がさらに同等であることであると考えられる。
【０１４２】
チャネルチャネル様構造などのフローチャンバーの長さは、フローチャンバーが体外血液の容量の通過を可能にするように通常選択される。例えばフローチャンバーおよびデバイスは、約１ｍｌから約５０ｍｌの間、約１ｍｌから約４０ｍｌの間、または約１ｍｌから約３０ｍｌの間の全容量の通過を可能にするように構成されていてよい。
【０１４３】
フローチャンバーは、表面積を増加させるためまたは流れの状態を不均一でないようにするために内部サブ構造を有してよい。
【０１４４】
フローチャンバーは、表面積を増加させるためまたは流れの状態を不均一でないようにするために粒子で満たされてよい。
【０１４５】
フローチャンバーの材料はプラスチックまたは非プラスチックであってよい。
【０１４６】
非プラスチック材料を考慮する場合、ガラスを使用してよい。
【０１４７】
チャンバーの表面は、共有結合的にまたは吸着を介してコートしてよい。

【０１４８】
補助チューブ、チャンバー、バルブなどのための材料は、血液構成成分との相互作用を低減するように選択してよい。
【０１４９】
補助チューブ、チャンバー、バルブなどの表面は、血液構成成分との相互作用を低減するように処置／コートしてよい。
【０１５０】
プラスチック材料を考慮する場合、アクリル、ポリカーボネート、ポリエーテルイミド、ポリスルホン、ポリフェニルスルホン、スチレン、ポリウレタン、ポリエチレン、テフロンまたは任意の他の適切な医療グレードプラスチックを使用してよい。本発明の好ましい実施形態ではフローチャンバーは、アクリルプラスチックから作られている。
【０１５１】
フローチャンバーは、単球含有画分などのフローチャンバー内の試料を可視またはＵＶ光、好ましくはＵＶ－Ａで照射できるようなある程度の透明度を提供する材料で作ることができる。実験によって示されたとおり、ＵＶ－Ａおよび８－ＭＯＰへの曝露は、ＧＩＬＺの発現の増加、ならびにそれによる単球の活性化および免疫抑制自己および／または同種樹状細胞への分化を導く。したがってＵＶ－Ａなどの光および８－ＭＯＰなどのＤＮＡ架橋剤への曝露は、免疫抑制自己および／または同種樹状細胞を産生する場合には、最適化されるべきである。
【０１５２】
しかし単球が、上に述べる分子マーカーによって決定できるような免疫抑制自己および／または同種樹状細胞が形成されるように成熟経路に十分長くあると、８－ＭＯＰなどのＤＮＡ架橋剤を添加することを停止すること、ならびに免疫抑制自己および／または同種樹状細胞を例えばＵＶ－Ａに曝露することを停止することを構想できる。実施例２に示すとおり、ＧＩＬＺの発現の増加によって決定される免疫抑制自己および／または同種樹状細胞が形成されると、それらは例えばＬＰＳ誘導成熟に抵抗性である。しかし、体外量の哺乳動物の血液試料内に含有され、例えばＵＶＡ投与によってアポトーシス性になった自己および／または同種白血球を接触させるステップによって、免疫抑制自己および／または同種樹状細胞のＧＩＬＺ発現はさらに増加される場合がある。したがって、免疫抑制自己および／または同種抗原提示細胞を得るために免疫抑制自己および／または同種樹状細胞がアポトーシス性白血球から抗原を取り込んで提示するように、免疫抑制自己および／または同種樹状細胞をそのようなアポトーシス性白血球と例えばインキュベートできる。免疫抑制自己および／または同種樹状細胞が既に免疫寛容原性状態にあると考えると、次いでそのような免疫抑制自己および／または同種抗原提示細胞は、自己免疫疾患、過敏性疾患、固形臓器移植での拒絶の処置または移植片対宿主病の処置のために使用できる。
【０１５３】
典型的なフローチャンバーは、図１９Ａ）に示す形状を有してよい。流路は、２０ｍｍ×８０ｍｍの寸法を有する。チャンバーは、ポリスチレン、ＰＥＴ（ポリエチレンテレフタレート）、ＰＭＭＡ（ポリ（メチルメタクリレート））およびシリコンで作られている。血液試料は、例えば細胞10^{10}個／ｍｌの白血球細胞の濃度を有する試料例えば８ｍｌを得るためにＦｉｃｏｌｌ勾配を通して低速で遠心してよい。チャンバーは、血小板に富む血漿でプレコートしてよい。試料は、約０．０２８Ｐａで約…分間チャンバーを通してよい。次いでチャンバーは、ＲＰＭＩ約３ｍｌ、０．０２８Ｐａで洗浄されてよい。ＲＰＭＩ　３０～５５ｍｌでの２回目の洗浄は、約１．２Ｐａで実施してよい。収集された活性化単球を次いで組み合わせ、さらなる分析のために使用する。
【０１５４】
このように、免疫抑制自己および／または同種樹状細胞ならびに免疫抑制自己および／または同種抗原提示細胞は、単球の樹状細胞分化への誘導のために非生理的に高い濃度を使用し、２、３日間の細胞インキュベーションを必要とするかなり高価なサイトカインのカクテルの必要なく得ることができる。必要でなくとも、そのような免疫抑制自己および

／または同種樹状細胞ならびに免疫抑制自己および／または同種抗原提示細胞をインキュベーション期間にＩＬ－１０、ＩＬ－４またはＴＧＦ－βなどの１つまたは複数のサイトカインおよび／またはケモカインを含む緩衝培養培地中で培養することは免疫寛容原性状態への分化をさらに増強するために考慮されてよい。培養を考慮する場合、培養は、標準的条件下、例えば３７℃、５％CO_2、１５％ＡＢ血清（例えばＧｅｍｉｎｉ　Ｂｉｏ－Ｐｒｏｄｕｃｔｓから入手できる）を補充したＲＰＭＩ－１６４０培地（例えばＧＩＢＣＯから入手できる）などのヒト細胞の培養のための標準的培地中で実施してよい。

【０１５５】

さらに免疫抑制自己および／または同種樹状細胞は、次いで望ましい治療目的についてそれらを調整するために、対象への再投与の前にｅｘ　ｖｉｖｏで操作されてよい。

【０１５６】

したがって対象への再投与の前に、そのような免疫抑制自己および／または同種樹状細胞は、自己免疫疾患、過敏性疾患、固形臓器移植拒絶および移植片対宿主病に関与する細胞由来の抗原でロードすることなどによって、例えばｅｘ　ｖｉｖｏで処理されてよい。そのような抗原は、これらの抗原を含むアポトーシス性細胞の形態で例えば提供されてよい。これは、免疫抑制自己および／または同種抗原提示細胞をもたらす。本明細書に提示される知見によって提供される本発明の１つの有利点は、免疫抑制自己および／または同種樹状細胞を得ることが、自己免疫疾患、過敏性疾患、固形臓器移植拒絶および移植片対宿主病に関与する細胞由来の抗原でロードすることから分離されてよいことである。このように免疫抑制自己および／または同種樹状細胞は、具体的な目的で単離され、調整されてよい。

【０１５７】

免疫抑制自己および／または同種樹状細胞は、対象への再導入の際に抗原に対する免疫応答を抑制する抗原提示樹状細胞を産生するために疾患抗原で特にロードされてよい。

【０１５８】

自己免疫疾患の処置のために抗原は、自己免疫疾患が関節リウマチ、乾癬、多発性硬化症、１型糖尿病および全身性エリテマトーデスを含む群から選択されるなどの疾患に対して選択されてよい。

【０１５９】

本発明により得られた免疫抑制自己および／または同種樹状細胞ならびに疾患エフェクター物質は、インキュベートされた細胞集団中の機能性抗原提示樹状細胞の数を最大化するために十分な一定時間についてインキュベートされる。典型的には、処置された血液細胞濃縮物および場合によっては抗原は、約１から約２４時間の間、好ましいインキュベーション時間が約１２から約２４時間の間にわたってインキュベートされる。追加的インキュベーション時間は、対象への再導入の前にロードされた免疫抑制抗原提示細胞が完全に成熟するために必要である場合がある。好ましくは血液細胞濃縮物および疾患エフェクター物質は、３５℃から４０℃の間の温度でインキュベートされる。特に好ましい実施形態ではインキュベーションは約３７℃で実施される。

【０１６０】

上に述べたとおり、本明細書に記載の方法により得ることができる免疫抑制樹状細胞を抗原でロードすることによって、免疫抑制抗原提示細胞を産生することが可能になる。

【０１６１】

例えば送達された抗原のタンパク質分解および樹状細胞による可溶性抗原の不十分な処理を回避し、ポリ乳酸などの生分解性ポリマーから作ることができるポリマー性ナノ粒子（ＮＰ）中への抗原のカプセル封入によって免疫抑制抗原提示細胞の形成を増強することが企図される（Waeckerle-Men et al., Adv Drug Deliv Rev (2005), 57:475-82）。そのようなＮＰは、ＤＥＣ－２０５抗体などのＤＥＣ－２０５に対する標的化部分で、受容体媒介性エンドサイトーシスおよび抗原提示を改善するためにさらに修飾されてよい。

【０１６２】

したがって本発明は、任意選択で免疫抑制抗原提示細胞の形成をさらに増強するために

、ポリマー性ナノ粒子中への抗原のカプセル封入を使用することを企図する。

【０１６３】

上に記載の方法により単球分化を誘導することは、ＩＬ－１０、ＩＬ－４またはＴＧＦ－βなどのサイトカインの存在下での２日間の白血球の高価で労力を要する培養によって得られる樹状細胞の数と同等またはそれを超える免疫抑制自己および／または同種樹状細胞を提供する。上に記載の方法によって生成された多くの機能性樹状細胞は、例えばアポトーシス性細胞、疾患抗原、抗原、プラスミド、ＤＮＡまたはこれらの組合せなどの選択された材料を提示する既製の手段を提供し、それにより効率的な免疫治療に貢献する。

【０１６４】

上に述べたとおり免疫抑制自己および／または同種樹状細胞は、８－ＭＯＰなどの光活性化可能ＤＮＡ架橋剤の存在下での本発明による方法およびＵＶ－Ａなどの光への曝露によって好ましくは得ることができる。

【０１６５】

したがって本発明は、個体特異的な機能的成熟的に同期化された免疫抑制自己および／または同種樹状細胞を得ることを目指すものである。

【０１６６】

第２の態様では、本発明は、好ましくは自己免疫疾患、過敏性疾患、固形臓器移植拒絶および移植片対宿主病の処置における使用のための、本明細書に記載の方法によって得ることができる免疫抑制自己および／または同種樹状細胞に関する。自己免疫疾患は、関節リウマチ、乾癬、多発性硬化症、１型糖尿病および全身性エリテマトーデスを含む群から選択されてよい。

【０１６７】

第３の態様では、本発明は、本明細書に記載の方法によって得ることができる免疫抑制自己および／または同種樹状細胞を必要とする患者に投与することによって自己免疫疾患、過敏性疾患、固形臓器移植拒絶または移植片対宿主病を処置する方法に関する。

【０１６８】

本発明は、いくつかの具体的な実施例に関してここに記載されるが、それは例示的な目的であり、限定的なやり方で解釈されない。

【０１６９】

実験

実験１－単球活性化を誘導するための剪断ストレスおよび血小板活性化

材料および方法

白血球および血小板の調達

すべての試料は、アスピリンを含む血小板機能に影響を与えることが公知である薬物療法を受けていない若年の健康な対象から取得された。試料は、Ｙａｌｅ Ｈｕｍａｎ Ｉｎｖｅｓｔｉｇａｔｉｏｎａｌ Ｒｅｖｉｅｗ Ｂｏａｒｄのガイドラインの下で得られ、インフォームドコンセントは、ヘルシンキ宣言に従って提供された。末梢血検体は、前腕前部の血管からヘパリンを含有するシリンジに１９－ゲージ針を通して収集され、次いでＦｉｃｏｌｌ－Ｈｙｐａｑｕｅ（Ｇａｌｌａｒｄ－Ｓｃｈｌｅｓｓｉｎｇｅｒ、Ｃａｒｌｅ Ｐｌａｃｅ、Ｎ．Ｙ．）に重層された。１８０ｇでの遠心分離後、単核白血球画分を含有する界面は収集され、ＨＢＳＳ中で２回洗浄され、次いで単核細胞５×１０^{6}個／ｍｌの最終濃度でＲＰＭＩ－１６４０培地（ＧＩＢＣＯ）中に再懸濁された。細胞は取得の１時間以内に利用された。

【０１７０】

血小板に富む血漿の調製

全血は１５０ｇで１５分間、室温で遠心分離された。血小板に富む血漿（ＰＲＰ）層は収集され、９００ｇで５分間遠心分離され、血小板ペレットはＲＰＭＩ １６４０中、所望の濃度に再懸濁された。

【０１７１】

平行プレートの調製

平行プレートフローチャンバー様のもの２個がＥＣＰの流動力学をモデル化するために使用された。流れ後の細胞表現型の評価を含む実験がｌａｒｇｅｒ　Ｇｌｙｃｏｔｅｃｈ　ｓｙｓｔｅｍ（Ｇｌｙｃｏｔｅｃｈ、Ｒｏｃｋｖｉｌｌｅ、ＭＤ）を使用して実施された。この系は、流量路容積測定２００００×１００００×２５４ミクロン（長さ×幅×高さ）からできていた。この系の下部プレートは、ガスケットによって分けられた１５ｍｍペトリ皿（ＢＤ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ、Ｄｕｒｈａｍ、ＮＣ）からできており、上部プレートを形成するアクリルフローデッキに真空接続されていた。血小板でプレコートされたプレートを必要とする実験のために、フローチャンバーを組み立てる前に、所望の濃度のＰＲＰの２０滴がペトリ皿の中央に置かれ、血小板を２０分間、室温で定着させた。ペトリ皿はＲＰＭＩ　２ｍｌで２回洗浄され、次いでフローチャンバーが組み立てられた。

【０１７２】

流れ後の細胞の収集および表現型決定を含まない実験のために、Ｖｅｎａ８　ｂｉｏｃｈｉｐｓ（Ｃｅｌｌｉｘ　Ｌｔｄ、Ｄｕｂｌｉｎ、Ｉｒｅｌａｎｄ）が層流を作るために使用された。Ｖｅｎａ８　ｂｉｏｃｈｉｐｓのチャネルについての流量路容積は２０００×４００×１００ミクロン（長さ×幅×高さ）と測定された。これらのチップのタンパク質コーティングは、下の適切なセクションに記載されている。

【０１７３】

平行プレートを使用する実験

平行プレートフローチャンバーは、対物レンズ１０×を有する位相差光学顕微鏡（ＣＫ４０、Ｏｌｙｍｐｕｓ、Ｊａｐａｎ）のステージにマウントされた。すべての実行は室温で実施された。均一な層流場はほとんど一定の容積流量を生成できるシリンジポンプ（ＫＤ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ、Ｎｅｗ　Ｈｏｐｅ、ＰＡ）の使用によってシミュレートされた。立体配置の構成成分は、管を最少にするように考案された。プレートを通して細胞懸濁物を注入する前に、系はＲＰＭＩ　５ｍｌ、およそ１ｄｙｎ／ｃｍ^{2}の壁剪断ストレスを生じる流速で洗浄された。次いで目的の細胞懸濁物は固定の流速および壁剪断ストレスでチャンバーを通された。

【０１７４】

すべての実験はリアルタイムで見られ、ＤＰ２００デジタルカメラおよびソフトウェア（ＤｅｌｔａＰｉｘ、Ｍａａｌｏｖ、Ｄｅｎｍａｒｋ）を使用して１秒あたり１５．２コマで記録され、Ｉｍａｇｅ　Ｊ　ｓｏｆｔｗａｒｅ（ＮＩＨ）を使用して分析された。

【０１７５】

一晩培養

一晩培養が必要であった場合、細胞は遠心分離され、１５％ＡＢ血清（Ｇｅｍｉｎｉ　Ｂｉｏ－Ｐｒｏｄｕｃｔｓ）を補充したＲＰＭＩ－１６４０培地（ＧＩＢＣＯ）中に最終濃度、細胞５×１０６個／ｍｌで再懸濁した。細胞を１２ウエルポリスチレン組織培養プレート（１ウエルあたり２ｍｌ）中、３７℃、５％ＣＯ２で１８時間、一晩培養した。

【０１７６】

免疫表現型検査

免疫表現型検査のためのモノクローナル抗体は、ＣＤ１４（ＬＰＳ受容体、単球）、ＣＤ１１ｃ（インテグリンサブユニット、単球およびＤＣ）、ＨＬＡ－ＤＲ（クラスＩＩ　ＭＨＣ分子）、ＣＤ８３（ＤＣマーカー）、ＣＤ６２ｐ（Ｐ－セレクチン、活性化血小板）およびＣＤ６１（インテグリンサブユニット、血小板）を含んでいた。抗体はＢｅｃｋｍａｎ　Ｃｏｕｌｔｅｒ（ＣＤ１４、ＣＤ１１ｃ、ＨＬＡＤＲ、ＣＤ８３）またはＳｉｇｍａ（ＣＤ６２ｐ、ＣＤ６１）から得られ、それらの予め決定された最適希釈で使用された。バックグラウンド染色は適切なアイソタイプ対照で確立され、免疫蛍光はＦＣ５００　ｆｌｏｗ　ｃｙｔｏｍｅｔｅｒ（Ｂｅｃｋｍａｎ　Ｃｏｕｌｔｅｒ）を使用して分析された。２色膜染色は、ＦＩＴＣまたはＰＥに直接コンジュゲートされた両方の抗体を予め決定された最適濃度で加え、２０分間、４℃でインキュベートすることによって実施され、次に未結合抗体を除去するために洗浄された。膜および細胞質の組合せ染色は細胞固定

および透過処理についての製造業者の説明書（Ｉｎｔｒａｐｒｅｐ ｋｉｔ、Ｂｅｃｋｍａｎ Ｃｏｕｌｔｅｒ）に従って実施された。

【０１７７】

定量的リアルタイムＰＣＲ

遺伝子発現が平行プレートを通って流れる際に血小板の低（１０±５／低倍率視野［ｌｐｆ］）対高（１０２±３２／ｌｐｆ）レベルに曝露され、次に一晩培養された細胞間で比較された。細胞ＲＮＡは、ＲＮｅａｓｙ Ｍｉｎｉ Ｋｉｔ ｃｏｌｕｍｎｓ ｗｉｔｈ ｏｎ－ｃｏｌｕｍｎ ＤＮａｓｅ Ｉ ｔｒｅａｔｍｅｎｔ（ＱＩＡＧＥＮ）を使用して単離された。ＲＮＡ収量および純度はＮａｎｏＤｒｏｐ ＮＤ－１０００分光光度計およびＡｇｉｌｅｎｔ ２１００ Ｂｉｏａｎａｌｙｚｅｒを使用して測定された。ＲＮＡは、Ｈｉｇｈ Ｃａｐａｃｉｔｙ ｃＤＮＡ Ｒｅｖｅｒｓｅ Ｔｒａｎｓｃｒｉｐｔｉｏｎ Ｋｉｔ（Ａｐｐｌｉｅｄ Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ）を使用してｃＤＮＡに逆転写された。逆転写は、９６－ｗｅｌｌ ｔｈｅｒｍｏｃｙｃｌｅｒ（ＭＪ Ｒｅｓｅａｒｃｈ ＰＴＣ－２００）で次の条件で実行された：２５℃１０分間、３７℃１２０分間、８５℃５秒間。ＴａｑＭａｎリアルタイムＰＣＲは、ＤＣ－ＬＡＭＰ、ＣＤ４０、ＡＤＡＭデシシン、Ｌｏｘ１、ＣＣＲ７、ＣＤ８０、ＣＤ８３、ＣＤ８６、ＦＰＲＬ２およびＧＰＮＭＢの転写物を検出するために使用された。各配列に対するプライマーおよびプローブは、一覧のＴａｑｍａｎ Ｇｅｎｅ Ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ Ａｓｓａｙｓ（Ａｐｐｌｉｅｄ Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ）として得られた。ＨＰＲＴ１は参照遺伝子として使用された。

【０１７８】

単球との血小板の共培養

追加的血小板を含む単球の共培養を含む実験は、いくつかの必要な改変を伴って一晩培養セクションにおいて記載のとおり実施された。Ｆｉｃｏｌｌ－Ｈｙｐａｑｕｅ分離に続いて、単核細胞は、３０％ＡＢ血清／ＲＭＰＩに最終濃度細胞１０×１０６個／ｍｌで再懸濁され、その１ｍｌは１６ウエルプレートの各ウエルに配分された。血小板（ＲＰＭＩ中に懸濁、所望の最終濃度の２×）または血小板を含まないＲＰＭＩの追加的な１ｍｌを次いで各ウエルに加えた。血小板を活性化するために、トロンビン２単位を含有する５００μｌを半分のウエルに加え、ＲＰＭＩの５００μｌを、容量を揃えるために他に加えた。次いで細胞を既に記載のとおりインキュベートした。

【０１７９】

血小板接着研究

血小板接着実験は、上に記載のＶｅｎａ８フローチャンバーを使用して実施された。フィブリノーゲンおよびフィブロネクチン（Ｓｉｇｍａ）はＰＢＳに最終濃度２００ｍｃｇ／ｍｌで溶解された。Ｖｅｎａ８ ｃｈｉｐｓのチャネルは、室温、加湿したチャンバー中で２時間、タンパク質溶液、自己血漿またはＰＢＳ単独と共にインキュベートされた。チャネルは、５×容量のＲＰＭＩで洗浄された。次いで血小板に富む血漿は一定に保たれた表示の剪断ストレスでタンパク質コートチャネルを通じて灌流された。各チャネルについてさらに画像が流路に沿って位置付けられた４個の予め定めた低倍率視野（視野は、注入の開始点から２５００、７５００、１２５００および１７５００ミクロンに中心を置いた）での実験で正確に９０秒間取得された。

【０１８０】

いくつかの実験は、チャネルを通じた注入の前にタンパク質断片での血小板に富む血漿の事前処置を含む。アミノ酸配列Ａｒｇ－Ｇｌｙ－Ａｓｐ－Ｓｅｒを含有する小さなＲＧＤペプチド、アミノ酸配列Ｓｅｒ－Ａｓｐ－Ｇｌｙ－Ａｒｇを含有するＤＲＧペプチドまたはアミノ酸配列Ｈｉｓ－Ｈｉｓ－Ｌｅｕ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ａｌａ－Ｌｙｓ－Ｇｌｎ－Ａｌａ－Ｇｌｙ－Ａｓｐ－Ｖａｌを含有するフィブリノーゲンの４００～４１１断片は、２ｍＭの濃度にてＰＲＰで２０分間、室温でインキュベートされた。次いでＰＲＰは、既に記載のとおりチャネルを通じて灌流された。

【０１８１】

受容体リガンド研究

血小板コートＶｅｎａ８チャネルは、４０μｇ／ｍｌ抗Ｐ－セレクチン（Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ）または４０μｇ／ｍｌアイソタイプ対照のいずれかで３０分間、室温で事前処置され、次いで５×容量のＲＰＭＩで洗浄された。単核細胞懸濁物はＲＧＤまたはＤＧＲペプチドのいずれかの濃度２．５ｍＭで事前処置された。４００コマ（２６．３秒間）継続するビデオ試料を、流れの開始点から７５００ミクロンに中心を置いた４００ミクロンにわたる視野の低倍率視野を使用して、流れの開始後６０秒間記録した。

【０１８２】

β－１インテグリンコンフォメーションは、Ｇｌｙｃｏｔｅｃｈフローチャンバーを使用して評価された。１５ｍｍ血小板コートペトリ皿（上に記載）は、４０μｇ／ｍｌ抗Ｐ－セレクチンまたはアイソタイプ対照で２０分間、室温で事前処置され、次いで５×容量のＲＰＭＩで洗浄された。血小板を通す灌流の直後に、細胞は、抗ＣＤ２９　ＨＵＴＳ－２１（ＢＤ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ）、β１インテグリンの活性（開いた）コンフォメーションに特異的に結合する抗体で免疫表現型検査された。

【０１８３】

結果

流れ中の単球は固定化された血小板と一過的に相互作用する

ＥＣＰは、紫外線Ａ（ＵＶＡ）活性化８－メトキシソラレン（８－ＭＯＰ）、ＤＮＡ架橋薬への病原性白血球の体外化学療法的曝露を可能にする手段として最初は開発された。したがってＥＣＰは、１ｍｍ離された大きな透明のプラスチック平行プレートの間の白血球アフェレーシスされた血液の流れを含む。ＥＣＰの際に関連する流動力学の詳細な分析を可能にするために、ＵＶＡ／８－ＭＯＰ曝露とは無関係に、ＥＣＰの流れの条件は、０．８mm^2だけの表面積を有し、１００ミクロン離された縮小型平行プレートを使用して再産生された。このモデルは、デジタル顕微鏡を使用する視覚化を可能にした。モデルを使用する研究は、次の配列（ビデオ分析によって決定された）：流れからプレートへの血小板の最初の接着、続く固定化された血小板への通過単球の一過的結合を明らかにした。

【０１８４】

ＤＣ誘導は、単球血小板相互作用の数と相関する

上に記載の最初の定性的観察に基づいて、血小板は流れの条件下で単球からＤＣへの分化を誘導すると仮定された。単球からＤＣへの分化についての血小板の影響を検査するために、単球は低（１０±５／低倍率視野［ｌｐｆ］）、中（４４±２０／ｌｐｆ）および高（１０２±３２／ｌｐｆ）密度での自己血小板でプレコートされた平行プレートの間を通された。細胞は、後毛細血管細動脈での壁剪断ストレスと類似の、０．５ｄｙｎ／cm^2の壁剪断ストレスを生じる流速でプレートを通された。単位時間あたりの単球血小板相互作用の数は、血小板の密度（ビデオ分析によって決定された）の増大に比例して増加した。１秒あたりｌｐｆあたり平均５２．３±１５の単球血小板相互作用が高密度プレートで観察され、中および低密度プレートで相互作用１秒あたり１８．３±１４および３．４±１にそれぞれ下がった（図１ａ）。

【０１８５】

一晩インキュベーション後、ＤＣ表現型を発達させた細胞の百分率と、前日に観察された単球血小板物理的相互作用の頻度との間に相関が観察された（図１ｂ）。単球血小板相互作用の数の増加は、ＤＣ分化と一致するマーカー、膜ＨＬＡ－ＤＲおよびＣＤ８３を発現している細胞の割合の増加と相関していた。高密度血小板コートプレートに曝露された単球の平均１４．２％は一晩インキュベーション後にＨＬＡ－ＤＲ＋／ＣＤ８３＋であり、中および低レベルの血小板でコートされたプレートに曝露された単球のそれぞれ４．９％および０．８％と比較された。

【０１８６】

血小板への単球の曝露は遺伝子発現における変化を生じる

血小板曝露後に観察された単球表現型での記載した変化に捕捉して、ＲＴ－ＰＣＲが遺伝子発現での変化を評価するために実施された。単球は、前のセクションにおいて記載の

とおり高または低密度の血小板でコートされた平行プレートを通された。一晩インキュベーション後、ＲＮＡは抽出され、ＲＴ－ＰＣＲがＤＣに関連する１０個の遺伝子についての発現レベルを決定するために実施された（図２）。ＣＤ４０、成熟樹状細胞上での公知の発現を有する同時刺激分子（Cella et al., 1996、参考文献表を参照されたい）は、高密度の血小板に曝露された単球では低レベルに曝露された単球と比較して５６７％を超えて上方制御されることが見出された。ＬＡＭＰ３、ＤＣ分化に特異的なマーカー（de Saint-Vis at al., 1998、参考文献表を参照されたい）は、３９８％まで上方制御された。ＣＤ８０は、ＡＰＣ活性化において上方制御されることが公知の同時刺激分子であり（Slavik et al., 1999、参考文献表を参照されたい）、高レベルの血小板に曝露された単球においては２２０％まで上方制御される。ＣＣＲ７、リンパ器官へのＤＣ遊走において役割を演じることが公知のケモカイン受容体は、３７６％まで上方制御された。ＬＯＸ１、ＣＤ８３、ＣＣＲ７およびＡＤＡＭデシシン、ＤＣに関連するすべての遺伝子も（Berger et al., 2010、参考文献表を参照されたい）、高レベルの血小板に曝露された単球で上方制御された。ＦＰＲＬ２、ＧＰＮＭＢおよびＣＤ８６は、高レベルの血小板に曝露された単球において、すべて下方制御された。ＦＰＲＬ２は、活性化された場合にＤＣ成熟を阻害することが公知の受容体である（Kang et al., 2005、参考文献表を参照されたい）ＧＰＮＭＢは、サイトカイン産生減少に関与するタンパク質である（Ripoll et al., 2007、参考文献表を参照されたい）、ＣＤ８６はＡＰＣによって発現される同時刺激分子である。

【０１８７】

血小板の存在下でのＤＣ誘導は静止条件下では生じない

血小板は、受容体リガンド相互作用を通じて直接、またはサイトカインおよび他の分泌メディエーターを介して単球に影響を与える可能性がある。単球からＤＣへの分化の血小板誘導が流動力学を必要とするどうかを決定するために、本発明者らは静止条件下で血小板の役割を検査した。単球は、低（＜５０，０００／ｍｍ^3）、中（１００～２００，０００／ｍｍ^3）および高（＞４００，０００／ｍｍ^3）濃度の血小板と、血小板が不活性または活性状態（トロンビンの添加によって誘導された）のいずれかで共培養された。静止条件での一晩インキュベーション後（剪断ストレス＝０）、本発明者らは、活性化または不活性化血小板のいずれも流れの非存在下では単球のＤＣ分化を誘導できなかったことを見出した（図３を参照されたい）。

【０１８８】

流れに懸濁された血小板は、プレートに吸着された血清タンパク質に結合する

フィブロネクチンおよびフィブリノーゲンを含む、血漿中に多量に存在するいくつかのタンパク質は、ガラスおよびプラスチック表面に吸着することが周知であり、したがって血小板接着および活性化への接着血漿タンパク質の寄与が評価された。平行プレートは、フィブリノーゲン、フィブロネクチン、血漿または生理食塩水のいずれかでプレコートされた。次いで非活性化血小板は０．２から６．０ｄｙｎ／ｃｍ^{2}の範囲の壁剪断ストレスを生じる剪断速度で通された。最も高い濃度の血小板がフィブリノーゲンでコートされたプレートに接着した（図４）。フィブロネクチンコート、血漿コートおよび未コートプレートへの接着は同様に観察されたが、有意に低い程度であった（ｐ＜０．０５）。流れの非存在下では、血小板接着は、すべてのタンパク質基質について同等であった。

【０１８９】

フィブリノーゲンおよびフィブロネクチンの両方は、アミノ酸配列アルギニン（Ｒ）－グリシン（Ｇ）－アスパラギン酸（Ｄ）、ＲＧＤを含むセグメントを含有する。ＲＧＤセグメントは、多数のインテグリン受容体、特にインテグリンが活性コンフォメーションにある場合に曝露されるベータサブユニットのＩ／Ａドメインと相互作用することが周知である（Xiongら、2002、参考文献を参照されたい）。フィブリノーゲンコートプレートを使用する実験では、血小板接着はＲＧＤペプチドとの血小板の事前インキュベーションによって顕著に変えられなかった、しかし接着は、フィブリノーゲンのアミノ酸４００～４１１に対応するペプチド断片、タンパク質のガンマ構成成分での血小板の事前インキュベ

ーションによって有意に減少された（ｐ＜０．０５）（図５ａ）。フィブロネクチンコートプレートを使用する実験では、ＲＧＤペプチドと事前インキュベートした血小板は接着が有意に減少した、一方フィブリノーゲンのアミノ酸４００～４１１に対応するペプチド断片と事前インキュベートした血小板は影響されなかった（図５ｂ）。興味深いことに、タンパク質のＲＧＤドメインと相互作用することが公知であるインテグリンのＩ／Ａドメインとは異なり、フィブリノーゲンのガンマ構成成分と相互作用することが見出されたインテグリンの領域が、インテグリンの不活性状態で曝露されることは注目されるべきである（Weiselら、1992、参考文献を参照されたい）。したがってこのデータは、流れの中の非活性化血小板はフィブリノーゲンコートプレートのガンマ構成成分に結合することを示唆している。非活性化状態の血小板についてフィブリノーゲンに結合する能力は、前段落で説明したフィブリノーゲンコートプレートにおいて見られるより高い血小板接着レベルを説明できる。

【０１９０】

血小板はプレートへの接着によって活性化される

血小板は、細胞内顆粒中に保存されている多量のタンパク質と共に不活性状態で生理的には循環している。内皮の損傷またはトロンビンなどの刺激との遭遇で、血小板は活性化され、ほとんど瞬間的にこれらの細胞内タンパク質を血漿膜に移行させる（Kaplan et al., 1979、参考文献を参照されたい）。プラスチックプレート／吸収されたタンパク質への血小板接着は、周知の刺激によって生じるものに類似の血小板活性化を生じることが推論された。この仮説を検査するために、血小板活性化の周知のマーカー、Ｐ－セレクチンの表面発現が、接着の前後で評価された。接着の前に血小板の６±３％は、平均蛍光強度（ＭＦＩ）１２．４±６．９でＰ－セレクチンを発現していることが見出され、接着後に、Ｐ－セレクチン陽性は６４±１３％（ＭＦＩ　９８．２±１４）に増加した。陽性対照、トロンビンで活性化した血小板は、７１±１８％Ｐ－セレクチン陽性（ＭＦＩ　１０８．３±２３）であった。Ｐ－セレクチンの発現は、血小板接着後３０、６０および９０分でさらに評価され、Ｐ－セレクチン発現は、接着後９０分で７２±１１％の血小板がＰ－セレクチン陽性で、すべての時点で安定のままであり、血小板が手順の間に活性状態のままであることを示していた。同様の傾向がαＩＩｂ－β３、フィブリノーゲン結合インテグリンの評価において、このタンパク質の表面発現の接着前４±３％から接着後４９±１８％への増加を伴って見出された。

【０１９１】

単球は、活性化血小板で発現されたＰ－セレクチンおよびＲＧＤ含有リガンドと相互作用する

ビデオで観察された単球血小板相互作用は、２つの種類に分割される：（１）短期作用型、３秒間（４６コマ）未満について生じる接触として任意に定義される、および（２）長期作用型、安定結合を含んで３秒間より長い接触として定義される。ＥＣＰ系における血小板は活性状態にあり、活性化血小板はＰ－セレクチンおよびＲＧＤ含有タンパク質（例えばフィブロネクチン、フィブリノーゲンおよびビトロネクチン）を含む多量のタンパク質を発現することが既に判定されていることから、存在する場合、これらのタンパク質の関与が短期間のまたは長期間のいずれの相互作用にあるかを決定することが試みられた。プレートは、血小板でプレコートされ、４種の条件が検査された：（１）無関係なアイソタイプ対照で事前処置された血小板、および単球未処置（Ｐ＋ＲＧＤ＋）、（２）無関係なアイソタイプ対照で事前処置された血小板、およびＲＧＤペプチドで事前インキュベートされた単球（Ｐ＋ＲＧＤ－）、（３）抗Ｐ－セレクチンで事前処置された血小板、および未処置単球（Ｐ－ＲＧＤ＋）、（４）抗Ｐ－セレクチンで事前処置された血小板、およびＲＧＤペプチドで事前処置された単球（Ｐ－ＲＧＤ－）。ＲＧＤペプチドで単球を事前処置することは、血小板によって発現されるＲＧＤ含有タンパク質と相互作用できる遊離ＲＧＤ認識受容体の数の減少を生じるはずであることが想定された。したがって検査した４種の条件は、２個の血小板リガンド、Ｐ－セレクチンおよびＲＧＤ含有タンパク質との潜在的相互作用のすべての順列を表している。図６に示すとおり、ＲＧＤおよびＰ－セ

レクチンがどちらもブロッキングされなかった場合（Ｐ＋ＲＧＤ＋）に、短期作用型および長期作用型相互作用の両方が最大になった、他のすべての条件における相互作用のレベルは、この最大値の百分率として表された。抗Ｐ－セレクチン単独でのブロッキング（Ｐ－ＲＧＤ＋）は、短期および長期の両方の単球血小板相互作用におけるほぼゼロ（ｐ＜０．０１、図６、ビデオ分析によっても確認された）への減少を生じた。対照的にＲＧＤ単独（Ｐ＋ＲＧＤ－）のブロッキングは、短期間相互作用の数を有意に変えなかったが、長期間単球血小板相互作用を４４％（ｐ＜０．０５、図６）まで減少させた。Ｐ－セレクチンおよびＲＧＤの両方の同時のブロッキング（Ｐ－ＲＧＤ－）は、長期および短期相互作用の両方がほぼゼロに低減して、Ｐ－セレクチンだけがブロッキングされた場合に見られるものと類似のパターンを生じた。４種の条件それぞれにおいて観察された相互作用のパターンに基づいて最適な結論は、次のとおりである：（１）Ｐ－セレクチンは、主に短期間相互作用に関与する、（２）血小板によって発現されるＲＧＤ含有タンパク質は長期間相互作用に関与するが、短期間相互作用にはしない、（３）Ｐ－セレクチンとの単球相互作用は血小板によって発現されるＲＧＤ含有タンパク質との単球相互作用の上流で生じなければならない。この最終結論は、Ｐ－ＲＧＤ＋の条件が短期間および長期間相互作用の両方をほとんどゼロに減少させ、一方Ｐ＋ＲＧＤ－条件が長期相互作用だけを減少させた観察に基づいている。相互作用が逐次的でなかった場合、Ｐ－ＲＧＤ＋の条件は、長期相互作用に関してＰ＋ＲＧＤ＋と同様の結果をもたらすはずである。さらに相互作用の順序、すなわちＰ－セレクチンがＲＧＤ相互作用の上流で作用することは、Ｐ＋ＲＧＤ－の条件だけが長期相互作用に影響を与え、一方Ｐ－ＲＧＤ＋の条件がＰ－ＲＧＤ－のものと同様の結果をもたらすという発見から明らかである。

【０１９２】

Ｐ－セレクチンへの単球曝露は下流単球インテグリン活性化を生じる

インテグリン受容体は、それらの開いたコンフォメーションで、ＲＧＤ含有リガンドと相互作用することが公知である（Ruoslathi et al., 1996、参考文献を参照されたい）。β１インテグリンがその開いたコンフォメーションにある場合だけ曝露されるエピトープを認識する抗体を使用して、本発明者らはモデルを通って流れる前後での単球インテグリンのコンフォメーションを評価した。図７は、短期作用型単球血小板相互作用の数が増加すると流れの直後に、開いたコンフォメーションでインテグリンを発現している単球の百分率における対応する増加があったことを示している。黒線は、少数（＜５．１＋２／ｌｐｆ×秒）の血小板相互作用を受けた単球の９％と比較して、多数（＞６１±１９／ｌｐｆ×秒）の血小板相互作用を受けた単球の平均７１％がβ１を活性形態で発現したことを示している。これらの結果は、無関係なアイソタイプ対照で接着血小板を事前処置することによって顕著な影響を受けなかった（灰色線）。対照的に抗Ｐ－セレクチンで事前処置した血小板は、単球血小板相互作用をほとんどゼロに低減し、これらの条件で流れから現れた単球（破線）は、それらが曝露された血小板の密度とは無関係に低レベルの活性β１インテグリンを示した。すべての細胞集団がプレートの通過前には同様の低レベルのベースラインインテグリン活性化（＜１０％）を実証したことは注目に値し、したがって、短期間単球血小板相互作用において見られる差異は、流れの前のインテグリンコンフォメーションにおける差異の結果ではなかった。

【０１９３】

Ｐ－セレクチンへの単球曝露はＤＣ分化のために必要である

単球血小板相互作用の血小板Ｐ－セレクチンへの依存を仮定して、本発明者らは、時間０でのＰ－セレクチンへの単球の曝露と、一晩インキュベーション、１８時間後に単球によって後から現れる表現型との間に関連があるかどうかを判定することを計画した（図８）。単球は、未処置（非ブロッキング）、または抗Ｐ－セレクチンもしくはアイソタイプ対照のいずれかで事前処置のいずれかの高密度の血小板（１０８±３６／ｌｐｆ）でコートされた平行プレートを通された。非ブロッキング血小板に曝露された単球の１５．５±４％は一晩インキュベーション後に膜ＨＬＡ－ＤＲ＋／ＣＤ８３＋（成熟ＤＣのマーカー）になり、無関係なアイソタイプ対照でブロッキングされた血小板に曝露されたものは１

３±４％であった。対照的に抗Ｐ－セレクチンでブロッキングされた血小板に曝露された単球の３±２％だけが一晩インキュベーション後にＨＬＡ－ＤＲ＋／ＣＤ８３＋になった。

【０１９４】

実験２－免疫抑制樹状細胞に対するさらなる分子マーカーの同定

材料および方法

試料収集および単球濃縮

末梢血検体は、健康な対象からＹａｌｅ Ｈｕｍａｎ Ｉｎｖｅｓｔｉｇａｔｉｏｎａｌ Ｒｅｖｉｅｗ Ｂｏａｒｄのガイドラインの下で取得され、インフォームドコンセントは、ヘルシンキ宣言に従って提供された。ＰＢＭＣは、Ｆｉｃｏｌｌ－Ｈｙｐａｑｕｅ勾配（Ｉｓｏｌｙｍｐｈ、ＣＴＬ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）上で遠心分離によって単離された。単球は、新鮮に単離されたＰＢＭＣから：１）デキサメタゾン用量漸増実験のためにプラスチック接着（純度：７１．６±５．６％ＣＤ１４$^{+}$）、２）ＰＵＶＡ用量漸増実験のためにＣＤ１４磁気ビーズ正の選択（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ Ｂｉｏｔｅｃ）（純度：８８．１±３．５％ＣＤ１４$^{+}$）、および３）ＬＰＳ刺激実験のためにＭｏｎｏｃｙｔｅ Ｉｓｏｌａｔｉｏｎ Ｋｉｔ ＩＩ（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ Ｂｉｏｔｅｃ）（純度：８３．８±３．８％ＣＤ１４$^{+}$）によって濃縮された。

【０１９５】

単球由来樹状細胞（ＭｏＤＣ）の生成

単球は、細胞５×１０^{6}個／ｍＬの密度、６および１２ウエルポリスチレン組織培養プレート、３７℃、５％CO_2で、熱不活性化１５％ＡＢ血清（Ｇｅｍｉｎｉ）および１％ペニシリン／ストレプトマイシンを補充したＲＰＭＩ－１６４０（Ｇｉｂｃｏ）（ここで完全培地と呼ばれている）中で培養された。８００ＩＵ／ｍＬ組換えヒトＧＭ－ＣＳＦ（Ｒ＆Ｄ Ｓｙｓｔｅｍｓ）および１０００ＩＵ／ｍＬ組換えヒトＩＬ－４（Ｒ＆Ｄ Ｓｙｓｔｅｍｓ）は、記載の単球からＤＣへの分化を誘導するために３６時間培養物に添加された。

【０１９６】

８－ＭＯＰおよびＵＶＡ光処置

培養物は、８－ＭＯＰ（Ｕｖａｄｅｘ、２０μｇ／ｍＬ）と共に３０分間、暗所でインキュベートされ、次いで連続した直管蛍光灯１２本を有する卓上ＵＶＡライトボックスで照射された。管は、３２０から４００ｎｍの範囲のＵＶＡ光を発光した。ＵＶＡ照射量（出力、Ｗ／ｍ^{2}）は光ダイオードを使用して測定された。測定された照射量および系の種々の構成成分の吸収特性を考えると、所与の線量のＵＶＡ照射（Ｊ／ｃｍ^{2}）を細胞に送るために曝露する必要がある時間（秒）を決定できた。

【０１９７】

ＭｏＤＣ／リンパ球共培養

プラスチック接着の間に除去された非接着細胞（純度：６６．０±４．５％ＣＤ３$^{+}$）は、現在一般にリンパ球と呼ばれている。リンパ球は、８－ＭＯＰ（１００ｎｇ／ｍＬ）およびＵＶＡ（１Ｊ／ｃｍ^{2}）で処置され、ＰＢＳで洗浄され、完全培地３７℃、５％CO_2中で、ＰＵＶＡ処置または未処置ＭｏＤＣのいずれかとリンパ球を５または１０対ＭｏＤＣを１の比で共培養された。１００ｎＭデキサメタゾン（Ｓｉｇｍａ）で２４時間処置されたＭｏＤＣは、陽性対照群となった。２４時間後、細胞は採取され、ＭｏＤＣは再精製された。ＲＮＡがリンパ球からは相当量では単離されなかったことを確実にするために、ＣＤ１１ｃ磁気ビーズ（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ Ｂｉｏｔｅｃ）正の選択を使用してすべての培養物からＭｏＤＣを再精製することは重要であった（純度：９６．４±１．０％ＣＤ１１ｃ$^{+}$）。ＣＤ１１ｃ$^{+}$ ＭｏＤＣは、細胞０．５～１．０×１０^{6}個／ｍＬで完全培地に再び蒔かれ、１００ｎｇ／ｍＬ ＬＰＳ（Ｓｉｇｍａ）で刺激された。ＬＰＳ刺激２４時間後、細胞はＲＮＡ単離および免疫表現型検査のために採取され、上清は、サイトカイン定量のために収集された。陰性対照として、並行群はＬＰＳを受けなかった。

【０１９８】

ｓｉＲＮＡ実験

Ｓｉｌｅｎｃｅｒ ｓｅｌｅｃｔ ｐｒｅ－ｄｅｓｉｇｎｅｄ ａｎｄ ｖａｌｉｄａｔｅｄ ＧＩＬＺ ｓｉＲＮＡ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）は、オフ標的予測アルゴリズムと共にＧＩＬＺ発現をノックダウンするために使用された。Ｍｏ－樹状細胞はＬｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ ＲＮＡｉＭＡＸ Ｒｅａｇｅｎｔ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）を使用して形質移入された。ＲＮＡ$_i$二重鎖およびリポフェクタミン試薬は、一緒に２０分間インキュベートされ、次いでＭｏＤＣ培養物に加えられ、２時間、３７℃、５％CO_2でインキュベートされた。形質移入ＭｏＤＣは、ＭｏＤＣ／リンパ球共培養物についての記載と同一の様式で処置された。ＭｏＤＣもスクランブルｓｉＲＮＡで形質移入された。

【０１９９】

免疫表現型検査

モノクローナル抗体は、ＨＬＡ－ＤＲ、ＣＤ８０、ＣＤ８３、ＣＤ３、ＣＤ８６、ＣＤ１４、ＣＤ１１ｃおよびＧＩＬＺを含んだ。抗体は、Ｂｅｃｋｍａｎ－ＣｏｕｌｔｅｒおよびｅＢｉｏｓｃｉｅｎｃｅから得られ、それらの予め決定された最適希釈で使用された。アポトーシスは、アポトーシス性細胞の表面上のホスファチジルセリン（ＰＳ）を認識するアネキシン－Ｖと共にＡｎｎｅｘｉｎ－Ｖ Ａｐｏｐｔｏｓｉｓ Ｄｅｔｅｃｔｉｏｎ Ｋｉｔ（ｅＢｉｏｓｃｉｅｎｃｅ）を使用して評価された。７－ＡＡＤが細胞生存率色素としてＰＩの代わりとなった。アネキシン－V^+／７－AAD^-表現型を提示する細胞は初期アポトーシス性細胞として分類され、およびアネキシン－V^+／７－AAD^+表現型を提示している細胞は後期アポトーシス性細胞として分類された。二重膜および細胞質内染色は、ＩｎｔｒａＰｒｅｐ ｆｉｘ ａｎｄ ｐｅｒｍｅａｂｉｌｉｚａｔｉｏｎ Ｋｉｔ（Ｂｅｃｋｍａｎ－Ｃｏｕｌｔｅｒ）を使用して実施された。バックグラウンド染色は、適切なアイソタイプおよび蛍光から１つの対照を引いて確立された。免疫蛍光は、ＦＡＣＳＣａｌｉｂｕｒ Ｌ（ＢＤ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ）を使用して、２％パラホルムアルデヒドでの固定の２時間以内に分析された。最低１０，０００事象が各群について収集された。

【０２００】

定量的リアルタイムＰＣＲ

ＲＮＡは、ＱＩＡＳｈｒｅｄｄｅｒ ｃｏｌｕｍｎ（ＱＩＡＧＥＮ）およびＲＮｅａｓｙ Ｍｉｎｉ Ｋｉｔ（ＱＩＡＧＥＮ）をｏｎ－ｃｏｌｕｍｎ ＤＮａｓｅ Ｉ ｔｒｅａｔｍｅｎｔ（ＱＩＡＧＥＮ）と共に使用して$CD11c^+$ ＭｏＤＣから単離された。ＲＮＡ収量および純度はＮａｎｏＤｒｏｐ ＮＤ－１０００分光光度計を使用して評価された。ｃＤＮＡは、Ｈｉｇｈ Ｃａｐａｃｉｔｙ ｃＤＮＡ Ｒｅｖｅｒｓｅ Ｔｒａｎｓｃｒｉｐｔｉｏｎ Ｋｉｔ（Ａｐｐｌｉｅｄ Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ）を使用して、９６－ｗｅｌｌ ｔｈｅｒｍｏｃｙｃｌｅｒ（ＭＪ Ｒｅｓｅａｒｃｈ ＰＴＣ－２００）で得られた。ＴａｑＭａｎリアルタイムＰＣＲは、ＧＩＬＺ、ＣＤ８０、およびＣＤ８６の転写物を検出するために使用された。プライマーおよびプローブは、予め設計され、検証されたＴａｑｍａｎ Ｇｅｎｅ Ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ Ａｓｓａｙｓ（Ａｐｐｌｉｅｄ Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ）として得られた。ＳＹＢＲ ｇｒｅｅｎ ｒｅａｌ－ｔｉｍｅ ＰＣＲ（Ａｐｐｌｉｅｄ Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ）は、ＩＬ－１２、ＩＬ－１０、ＩＬ－６、ＴＮＦ－アルファおよびＴＧＦ－βの転写物を検出するために使用された。プライマーは、プライマー３Ｐｌｕｓを使用してイントロン連結に広がるように設計された。プライマー融解曲線は単一の産生物を確認するために得られた。ＨＰＲＴ－１およびＧＡＰＤＨは、参照遺伝子として使用された。試料は７５００ Ｒｅａｌ Ｔｉｍｅ ＰＣＲ Ｓｙｓｔｅｍ（Ａｐｐｌｉｅｄ Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ）で３連で実行された。三角三角Ｃ（ｔ）法が倍数変化を算出するために使用された。

【０２０１】

サイトカイン定量

培養上清は、ＩＬ－６、ＩＬ－８、ＩＬ－１０、ＩＬ－１２ｐ７０、ＩＦＮ－γ、ＴＮＦ－α、ＲＡＮＴＥＳ、ＭＣＰ－１、およびＭＩＰ－１βへの磁気ビーズ（ＢｉｏＲａｄ

Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ）を利用する多重フォーマットで分析された。ｓｉＲＮＡ実験のために上清は、酵素結合免疫吸着アッセイ（ＥＬＩＳＡ）キットでＩＬ－１０（Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ）およびＩＬ－１２ｐ７０（Ｅｎｚｏ　Ｌｉｆｅ　Ｓｃｉｅｎｃｅ）について分析された。すべての試料および標準物質は２連で実行され、ＬＵＭＩＮＥＸ２００（ＬＵＭＩＮＥＸ）またはＢｉｏＴｅｋ　ＥＬ８００（ＢｉｏＴｅｋ）を使用して分析された。

【０２０２】

統計解析

スチューデントのｔ検定が、ｐ値＜０．０５を統計的に有意として群間の統計的比較のために使用された。差次的遺伝子発現は、≧２．５倍変化およびｐ値＜０．０５で統計的に有意と見なされた。

【０２０３】

結果

ＧＩＬＺの発現は、単球が未成熟ＭｏＤＣに分化する際に急速に下方制御される

新鮮に単離されたＣＤ１４$^{+}$単球はＧＩＬＺを発現するが、それらが未成熟ＭｏＤＣに分化すると、９９％を超えてＧＩＬＺを急速に下方制御する（図１０Ａ）。ＧＩＬＺ　ｍＲＮＡにおける低減は、ＧＩＬＺタンパク質レベルにおける６１％減少によって確認された（図１０Ｂ）。ＧＩＬＺ下方制御は、ＣＤ１４の発現の低減（単球特異的マーカー、Ｚｈｏｕら、参考文献を参照されたい）、および細胞質性ＣＤ８３の発現の増加と関連する（未成熟ＭｏＤＣマーカー、Ｋｌｅｉｎら、参考文献を参照されたい）。重要なことに、ＭｏＤＣは未成熟のままであり、低い膜ＣＤ８３（成熟ＤＣマーカー、Ｒｅｎｚｏら、参考文献を参照されたい、ｐ＝０．１６）を発現している。ＭｏＤＣは、デキサメタゾン（ｄｅｘ）での処置後に用量依存的なやり方でＧＩＬＺを上方制御する（図１０Ｃ）。２４時間の１００ｎＭ　ｄｅｘでの処置がＭｏＤＣにおいてＧＩＬＺ発現を誘導することの陽性対照として選択された（Ｄｅｘ－樹状細胞）（図１０Ｄ）。

【０２０４】

８－ＭＯＰまたはＵＶＡ処置単独は、ＧＩＬＺ発現に影響を与えなかった（図１０Ｅ）。しかしＭｏＤＣが８－ＭＯＰおよびＵＶＡ光の組合せで処置された場合（ＰＵＶＡ－樹状細胞）、ＧＩＬＺ発現は５．５倍増加した。ＧＩＬＺの誘導は、処置２４時間後にピークに達し、７２時間顕著に上昇したままになる遅い経時変化を示した（図１０Ｆ）。比較してＤｅｘ－樹状細胞は、処置わずか２時間後にＧＩＬＺを上方制御した。

【０２０５】

８－ＭＯＰおよびＵＶＡ光の組合せで処置された未成熟ＭｏＤＣはＧＩＬＺを上方制御し、免疫寛容原性、免疫抑制性の表現型をとる

ＧＩＬＺ発現にＰＵＶＡ用量依存的効果があるかどうかが次に試験された。１Ｊ／ｃｍ^{2}　ＵＶＡおよび１００または２００ｎｇ／ｍＬ　８－ＭＯＰで処置されたＭｏＤＣは、ＧＩＬＺを２．９および４．４倍それぞれ上方制御した（図１１Ａ）。類似の用量依存的現象は、８－ＭＯＰの濃度５０ｎｇ／ｍＬで開始した２Ｊ／ｃｍ^{2}で観察された。０．５Ｊ／ｃｍ^{2}での処置は、８－ＭＯＰ濃度が２００ｎｇ／ｍＬに達するまでＧＩＬＺ発現に効果を有さず、４Ｊ／ｃｍ^{2}での処置は高レベルの非特異的細胞死を生じた（データ未記載）。塩基対１０^{6}個あたりで形成された光付加体の数は、８－ＭＯＰ濃度とＵＶＡ投与量との積に直接関連する、Ｇａｓｐａｒｒｏら、参考文献を参照されたい。８－ＭＯＰとＵＶＡとの積が１００に達すると、ＧＩＬＺは３倍上方制御され、積が２００および４００に増加すると、ＧＩＬＺはそれぞれ４．８および８．６倍に上方制御された（図１１Ｂ）。

【０２０６】

初期アポトーシス性ＣＤ１１ｃ$^{+}$細胞の百分率は、検査した８－ＭＯＰのすべての用量についての１Ｊ／ｃｍ^{2}と比較して２Ｊ／ｃｍ^{2}で少なくとも高かった（ｐ＞０．０５）（図１１Ｃ）。２Ｊ／ｃｍ^{2}および２００ｎｇ／ｍＬでは、初期アポトーシス性ＣＤ１１ｃ$^{+}$細胞の百分率において未処置ＭｏＤＣと比較して増加があった（図１１Ｃ）。後期ア

ポトーシス性ＣＤ１１ｃ$^{+}$細胞の百分率は、検査した８－ＭＯＰのすべての用量について１Ｊ／ｃｍ^{2}で１３％未満、および２Ｊ／ｃｍ^{2}で１６％未満でのままであった（図１１Ｄ）。さらに、ドットプロットは、ＰＵＶＡの増量に伴うＭｏＤＣのプロアポトーシス性効果への相対的抵抗性を強調している（図１１Ｅ）。培養物から回収された細胞の数は、１または２Ｊ／ｃｍ^{2}で処置されたいずれの群においても統計的に異ならず（データ未記載）、９０％を超えるＣＤ１１ｃ$^{+}$細胞（９１．０～９７．５％の範囲）が処置後に採取された。

【０２０７】

対照的にリンパ球は、１Ｊ／ｃｍ^{2}および１００ｎｇ／ｍＬでの処置後わずか２時間でアネキシン－Ｖを示す（データ未記載）。１００ｎｇ／ｍＬおよび１Ｊ／ｃｍ^{2}で処置したＭｏＤＣ（図１１Ｆ）とは対照的に、同じ用量のＰＵＶＡで処置した２４時間後に、初期アポトーシス性リンパ球の百分率は未処置ＭｏＤＣでの６．６％からＰＵＶＡ－樹状細胞での４４．３％に増加し、後期アポトーシス性リンパ球の百分率は４．５％から３３．７％に増加した（図１１Ｇ）。リンパ球の６４．３±３．２％が処置２４時間後にアネキシン－Ｖ$^{+}$であったと考えて、ＰＵＶＡ処置リンパ球は、次にアポトーシス性リンパ球と呼ばれる（ＡｐｏＬ）。

【０２０８】

ＧＩＬＺのＰＵＶＡ用量依存的誘導は、ＣＤ８０、ＣＤ８６およびＣＤ８３の細胞表面発現における減少と関連した（図１２Ａ、３Ｂ）。これらのマーカーの下方制御はＧＩＬＺの誘導と平行し（図１１Ｂを参照されたい）、１および２Ｊ／ｃｍ^{2}の両方について１００ｎｇ／ｍＬの８－ＭＯＰ濃度で始まる。８－ＭＯＰとＵＶＡとの積が１００を超えると、ＣＤ８３、ＣＤ８０およびＣＤ８６発現はそれぞれ３１％、３０％および５４％まで低減され、ＨＬＡ－ＤＲ発現は３８％まで増加した。

【０２０９】

アポトーシス性リンパ球に曝露されたＭｏＤＣは、ＧＩＬＺを上方制御し、ＬＰＳ誘導完全成熟に抵抗性である

ＰＵＶＡおよびアポトーシス性細胞への曝露の個々の寄与を精査するために、ＭｏＤＣは最初にＡｐｏＬと比を変化させて共培養された。ＧＩＬＺは、ＡｐｏＬに用量依存的様式で上方制御された（図１３Ａ）。ＰＵＶＡ－樹状細胞がＡｐｏＬに曝露された場合、ＧＩＬＺは、単独で培養されたＰＵＶＡ－樹状細胞においてよりも高いレベルで発現された（図１３Ｂ）。ＡｐｏＬに曝露されたＰＵＶＡ－樹状細胞もＡｐｏＬに曝露された未処置ＭｏＤＣにおいてよりもＧＩＬＺを高いレベルで発現した（それぞれ６．７倍および３．６倍高い）。ＧＩＬＺ　ｍＲＮＡが上方制御されたすべての群においてＧＩＬＺタンパク質レベルにおける対応する１．５倍増加があった（図１３Ｃ）。ＧＩＬＺの上方制御を実証したすべての群において＜１２％の初期アポトーシス性（３．８～１１．４％範囲）および後期アポトーシス性（６．３～１１．５％範囲）ＣＤ１１ｃ$^{+}$細胞があったことから、ＧＩＬＺの誘導は初期または後期アポトーシス性ＣＤ１１ｃ$^{+}$細胞の数における増加と関連しなかった。

【０２１０】

未処置ＭｏＤＣよりも２．５倍を超えるＧＩＬＺを発現しているＭｏＤＣは、ＬＰＳによる完全成熟に抵抗性であり、半成熟、免疫寛容原性表現型を表した。ＬＰＳ刺激は、ＧＩＬＺを上方制御しているＭｏＤＣにおいてＣＤ８０発現を、未処置ＭｏＤＣにおけるＬＰＳ刺激後に見られるレベルの５０％だけ増加させ（図１３Ｄ、０．４８～０．５７％範囲）、ＣＤ８６発現を未処置ＭｏＤＣの４５％だけ増加させた（図１３Ｄ、０．４２～０．４７％範囲）。同様の結果がＨＬＡ－ＤＲおよびＣＤ８３から得られた（図１４Ｅ、ＬＰＳ後にそれぞれ未処置ＭｏＤＣの４７～６５％および２３～５７％範囲）。さらに、ＧＩＬＺを上方制御しているＭｏＤＣは、ｑＲＴ－ＰＣＲによって評価されたとおり未処置ＭｏＤＣのＣＤ８０　ｍＲＮＡの６％（４．５～７．５％範囲）を発現し、未処置ＭｏＤＣのＣＤ８６　ｍＲＮＡの５０％を発現した（１２．４～８５．１％範囲）。

【０２１１】

ＧＩＬＺを発現しているＭｏＤＣは、免疫寛容原性サイトカインプロファイルを示し、ＧＩＬＺのノックダウンはＩＬ－１０対ＩＬ－１２ｐ７０比を低減する

上清は、図１３Ｂに記載のとおり共培養から採取された。Ｄｅｘ－樹状細胞は、ＧＩＬＺを４．２９倍に上方制御し（図１３Ｂを参照されたい）、ＩＬ－１０の産生を増加させ（図１４Ａ）、検査したすべての炎症促進性サイトカイン（図１４Ｂ、１４Ｃ）およびケモカイン（図１４Ｄ、１４Ｅ）の産生を減少させた。比較して、ＰＵＶＡ－樹状細胞は、ＧＩＬＺを２．７８倍に上方制御し（図１３Ｂを参照されたい）、ＩＬ－１０の産生を増加させ、ＴＮＦ－αおよびＩＦＮ－γを除く検査したすべての炎症促進性サイトカインおよびケモカインの産生を減少させた。ＡｐｏＬに曝露されたＰＵＶＡ－樹状細胞または未処置ＭｏＤＣは、ＧＩＬＺを単独で培養されたＰＵＶＡ－樹状細胞よりも高レベルで発現した（それぞれ３．６および６．７倍高い、図１３Ｂを参照されたい）。これら２群はＩＬ－１０の産生が増加し、検査したすべての炎症促進性サイトカインおよびケモカインの産生が減少した。サイトカインレベルは、ＧＩＬＺを上方制御するＭｏＤＣが未処置ＭｏＤＣよりも８倍のＩＬ－１０　ｍＲＮＡの上方制御を実証して（５．５～１１．８範囲、ｐ＜０．０１）、ＲＮＡレベルで確認された。ＩＬ－１２、ＴＮＦ－α、およびＩＬ－６における低減もＲＮＡレベルで確認された（データ未記載）。ＴＧＦ－βは、ＧＩＬＺを上方制御しているＭｏＤＣにおいて２．５倍上方制御された（データ未記載）。ＴＧＦ－βは、多重分析に含まれず、したがってｍＲＮＡレベルで分析されただけであった。

【０２１２】

免疫寛容原性樹状細胞がＩＬ－１０対ＩＬ－１２ｐ７０比の増加によって特徴付けられることから、ＩＬ－１０対ＩＬ－１２ｐ７０比は、免疫寛容原性の有用な指標である、Ｓｔｅｉｎｍａｎら、参考文献を参照されたい）。ＩＬ－１０対ＩＬ－１２ｐ７０の比は、未処置ＭｏＤＣでの６．７からＤｅｘ－樹状細胞における６７．７に増加した。同様にＩＬ－１０対ＩＬ－１２ｐ７０比は、ＰＵＶＡ－樹状細胞において３８．７に、未処置ＭｏＤＣおよびＡｐｏＬに曝露されたＰＵＶＡ－樹状細胞においてそれぞれ８９．４および１１４．９に増加した（ｐ＜０．０５）。

【０２１３】

ＧＩＬＺの誘導が免疫寛容原性サイトカインプロファイルを媒介するかどうかを評価するために、ＭｏＤＣは、ＧＩＬＺ発現をノックダウンするためにｓｉＲＮＡで形質移入された。ＧＩＬＺ　ｓｉＲＮＡでの形質移入はＭｏ－樹状細胞においてＧＩＬＺ発現を６８％まで低減した（図１５Ａ、５９～７９％範囲）。スクランブルｓｉＲＮＡでの形質移入は、ＧＩＬＺ発現を顕著に変化させなかった。非形質移入群と比較して、ｓｉＲＮＡで形質移入した任意の群から回収された細胞の数においても顕著な差異はなかった（データ未記載）。

【０２１４】

未処置ＭｏＤＣよりもＧＩＬＺを２．５倍高く上方制御している処置ＭｏＤＣは、より高いレベルのＩＬ－１０を産生し（図１５Ｂ）、ＧＩＬＺのノックダウンは３９％まで（３４～４８％範囲、ｐ＜０．０５）ＩＬ－１０産生を低減した。未処置ＭｏＤＣよりもＧＩＬＺを２．５倍高く上方制御している処置ＭｏＤＣは、少量のＩＬ－１２ｐ７０も産生し（図１５Ｃ）、ＧＩＬＺのノックダウンはＩＬ－１２ｐ７０産生を１８８％まで（１４９～２１４％範囲、ｐ＜０．０５）増加させた。スクランブルｓｉＲＮＡでの処置は、ＩＬ－１０またはＩＬ－１２ｐ７０の産生に感知できる効果を有さなかった。ＧＩＬＺのノックダウンは、ＧＩＬＺ誘導後に上昇していたＩＬ－１０対ＩＬ－１２ｐ７０比を低減させた。ＧＩＬＺ　ｓｉＲＮＡで処置したＤｅｘ－樹状細胞は、ＩＬ－１０対ＩＬ－１２ｐ７０比における、非形質移入ＭｏＤＣでの１５．３から形質移入Ｄｅｘ－樹状細胞での３．９への低減を実証した。ＰＵＶＡ－樹状細胞では、比は非形質移入ＭｏＤＣでの８．４からＰＵＶＡ－樹状細胞での２．９に減少し、未処置ＭｏＤＣおよびＡｐｏＬに曝露されたＰＵＶＡ－樹状細胞では、それぞれ１８．１から７．８および２８．４から８．３の比の低減が観察された。

【０２１５】

これらの結果は、他の免疫抑制メディエーターと同様に、ＰＵＶＡがＧＩＬＺの発現を誘導し、同時刺激分子ＣＤ８０およびＣＤ８６、ならびに成熟マーカーＣＤ８３の低い発現によって特徴付けられる免疫寛容原性免疫抑制樹状細胞を生成することを実証している。ＧＩＬＺ誘導は、ＩＬ－１０産生の増加、ＩＬ－１２ｐ７０を含む炎症促進性サイトカインおよびケモカイン産生の減少によって特徴付けられる免疫寛容原性サイトカインプロファイルへの分極のために必要である。これらの結果は、さらにＧＩＬＺをアポトーシス性細胞の免疫抑制効果を媒介する分子スイッチとして関連付ける。

【０２１６】

実験３－免疫賦活樹状細胞に対するさらなる分子マーカーの同定

患者試料

ＥＣＰを受けている患者由来の白血球は、ＵＶＡＲ　ＸＴＳ　Ｐｈｏｔｏｐｈｅｒｅｓｉｓ　Ｓｙｓｔｅｍ（Ｔｈｅｒａｋｏｓ）を使用して、Ｙａｌｅ　Ｈｕｍａｎ　Ｉｎｖｅｓｔｉｇａｔｉｏｎａｌ　Ｒｅｖｉｅｗ　Ｂｏａｒｄのガイドラインの下で得られ、インフォームドコンセントは、ヘルシンキ宣言に従って提供された。アリコートは、３つの時点で調達された：処置前（ＥＣＰ前）、８－ＭＯＰ／紫外線Ａ（ＵＶＡ）曝露直後（ＥＣＰ　０日目）または処置された血液単核白血球の１－Ｌ血小板保存バッグ（ＰＬ－２４１０、Ｂａｘｔｅｒ）での１８時間インキュベーション後（ＥＣＰ　１日目）。

【０２１７】

正常対象

ＥＣＰが健康な対象由来の単球のＤＣへの変換を誘導するかどうかを決定するために、正常対象由来の単核白血球は２つの方法で試験された。正常対象由来の白血球アフェレーシスされた白血球（Ｎ＝３）は、処置前（ＥＣＰ前）、ＥＣＰ直後（ＥＣＰ　０日目）、およびＥＣＰ後１８時間（ＥＣＰ　１日目）に研究された。ＵＶＡ光源およびプラスチック曝露プレートを組み入れている卓上装置は、臨床ＥＣＰ系の実験室での再現および平行するＲＮＡ単離、免疫表現型検査および機能研究への試料利用を可能にした。代替的に正常対象由来の血液単位は、輸送用バッグに入れられ、処置患者のもの（Ｎ＝３）と同一の様式でＥＣＰ処置装置を通された。正常血液の単位から得られた細胞は、マイクロアレイおよび抗原提示アッセイのために使用された。

【０２１８】

ソラレン添加

ＥＣＰの際に日常的に行われるとおり、標準８－ＭＯＰ濃度溶液（Ｔｈｅｒａｋｏｓ）は、臨床ＥＣＰ装置、および実験室モデル系に直接加えられた。導入のモードは、臨床手順および実験の間にわたって正確な１００～２００ｎｇ／ｍＬの濃度を可能にした。

【０２１９】

一晩培養

ＥＣＰでは、処置された単球が患者にただちに再注入されることから、処置された単球の表現型的機能的変化を試験することは不可能である。したがってＥＣＰ後に細胞は、誘導された単球の遺伝子活性化、成熟および機能を研究するために１８時間培養された（ＲＰＭＩ　１６４０／１５％自己血清）。ＥＣＰの前（ＥＣＰ前）および直後に（ＥＣＰ　０日目）、患者および正常対象の試料は、Ｆｉｃｏｌｌ－Ｈｙｐａｑｕｅ勾配上での遠心分離によって単離された。細胞は、７．５％ＡＢ血清、７．５％ＡＢ血清（Ｇｅｍｉｎｉ　Ｂｉｏ－Ｐｒｏｄｕｃｔｓ）を補充されたＲＰＭＩ－１６４０培地（Ｇｉｂｃｏ）に再懸濁され、６ウエルポリスチレン組織培養プレート中、細胞５＊10^6個／ｍＬの密度で（患者について）、およびＢａｘｔｅｒ血小板保存バッグ（正常対象について３７℃、５％CO_2）中で培養された。一晩培養後（ＥＣＰ　１日目）、細胞は単球濃縮を受ける前に採取された。比較表現型分析用のＤＣを生成するために、細胞はＲＰＭＩ　１６４０　１５％血清中、ＧＭＣＳＦおよびＩＬ４（２５ｎｇ／ｍＬ、Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ）１ｍＬの存在下で６日間培養された。

【０２２０】

単球集団の磁気ビーズ濃縮

ＥＣＰが単球を樹状細胞成熟経路に方向付ける遺伝子を活性化するかどうかの決定を可能にするために、単球の物理的または細胞膜摂動を最少化しながらトランスクリプトーム分析へのリンパ球の寄与を除外する、陰性単球の穏やかな濃縮方法を開発する必要があった。単球は、親和性カラムの単回通過によって単核細胞プールから濃縮された。この陰性選択法は、物理的摂動を限定する一方で、関連モノクローナル抗体（抗ＣＤ４、ＣＤ８、ＣＤ１９）にコンジュゲートした磁気マイクロビーズ（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ　Ｂｉｏｔｅｃ）に接着したリンパ球は枯渇した。しかし、ＥＣＰ損傷リンパ球によるリンパ球マーカーの表面提示の減少が、ＴおよびＢ細胞の画分のカラムでの保持を免れさせることから、６０％～８０％を超えるＥＣＰ　１日目の単球の濃縮は、課題であると証明された。単球純度をさらに増強するための、反復的な親和性カラム通過は、この手法が受動的にろ過された単球の物理的摂動を複雑にすることから、選択肢ではなかった。幸運にも、一連の分析は、リンパ球のＥＣＰ選択的損傷が、ＤＣ遺伝子活性化レベルの正確な評価のための単球の完全な精製の必要性をなくすことを明らかにした。ＵＶＡ活性化８－ＭＯＰへのそれらの極端な感受性のために、ＥＣＰ処理リンパ球の９９％が、一晩インキュベーション後にアポトーシス性であった（ＡＰＯ２－ＰＥ、トリパンブルーおよび／またはアネキシンフルオレセインイソチオシアネートＦＩＴＣ／ヨウ化プロピジウムでの染色によって決定されたとおり）。ＥＣＰが全体的なリンパ球アポトーシスを生じることから、ＥＣＰ　１日目画分中の生単核白血球の９０％～９５％は単球であった。この現象が次のとおり実施され、９５％を超える単球純度をもたらすアポトーシス性リンパ球の複数ステップ磁気ビーズ除去が、研究した細胞集団において観察された遺伝子発現レベルを変えないという観察の主な理由である。比較を成し遂げるために、本発明者らは、磁気ビーズおよびＥａｓｙＳｅｐ　ｍａｇｎｅｔを使用する陰性選択プロトコールを適合させることによって単球精製手順を改変した。末梢血単核細胞は、血小板を除去するために低速（１２０ｇ、１０分間）で遠心分離された。次いで細胞は、次の改変と共に製造業者の手順に従ってＭｏｎｏｃｙｔｅ　Ｉｓｏｌａｔｉｏｎ　Ｋｉｔ　ＩＩ（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ　Ｂｉｏｔｅｃ）を使用して標識された：（１）緩衝液は２％自己血清および１ｍＭ　ＥＤＴＡ（エチレンジアミン四酢酸）を含有する氷冷リン酸緩衝生理食塩水からなる、（２）ブロッキング時間は１０分間に延ばされた、（３）ビオチン抗体カクテルでの標識は２０分間に延ばされた、および（４）細胞はビオチン抗体カクテルでと抗Ｂｉｏｔｉｎ　Ｍｉｃｒｏｂｅａｄでの標識化との間に１度洗浄された。単球をカラムに通過させることにより単球を刺激することを回避するために、代わりに磁気的に標識化された細胞は、未標識単球からＥａｓｙＳｅｐ　ｍａｇｎｅｔ（ＳｔｅｍＣｅｌｌ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）を使用して分離された。５ｍＬポリスチレンチューブ中緩衝液２ｍｌ中の細胞は、磁石中に１０分間置かれ、次いで未標識細胞は新たなチューブに注意深く捨てられた。この手順は単球純度を最大に増強するために２回反復された。この点で純度がまだ不十分であったことから、細胞はＭｏｎｏｃｙｔｅ　Ｉｓｏｌａｔｉｏｎ　Ｋｉｔ　ＩＩ試薬で再標識化され、ＥａｓｙＳｅｐ　ｍａｇｎｅｔ中に追加的に１０分間置かれ、未標識単球は溶出された。最終純度（Ｘ＝９６％＋４．５）は、ＣＤ１４染色のフローサイトメトリー分析によって評価された。

【０２２１】

免疫表現型検査

単球および樹状細胞に対して特異的なモノクローナル抗体は、ＣＤ１４（リポ多糖類［ＬＰＳ］受容体、単球）、ＣＤ３６（アポトーシス性細胞に対する受容体、単球）、ヒト白血球抗原ＤＲ－１（ＨＬＡ－ＤＲ、クラスＩＩ主要組織適合性複合体［ＭＨＣ］分子）、ＣＤ８３（樹状細胞マーカー）、細胞質性樹状細胞リソソーム関連膜タンパク質（ＤＣ－ＬＡＭＰ、樹状細胞マーカー）ならびにＣＤ８０およびＣＤ８６（Ｂ７．１およびＢ７．２同時刺激分子）を含む。抗体は、Ｂｅｃｋｍａｎ　Ｃｏｕｌｔｅｒから得て、それらの予め決定された最適希釈で使用された。バックグラウンド染色は、適切なアイソタイプ対照で確立され、免疫蛍光はＦＣ５００　ｆｌｏｗ　ｃｙｔｏｍｅｔｅｒ（Ｂｅｃｋｍａｎ　Ｃｏｕｌｔｅｒ）を使用して分析された。膜および細胞質の組合せ染色は細胞固定お

よび透過処理についての製造業者の説明書（Ｉｎｔｒａｐｒｅｐ　ｋｉｔ、Ｂｅｃｋｍａｎ　Ｃｏｕｌｔｅｒ）に従って実施された。

【０２２２】

抗原提示アッセイ

志願者の新鮮に単離された、磁気ビーズ濃縮、抗原を経験したＣＤ４$^{+}$集団（２＊１０^{6}／ｍＬ、５０μＬ／ウエル）は、破傷風トキソイド（１０μｇ／ｍＬ、１００μＬ／ウエル）およびＲＰＭＩ培地１６４０／１５％自己血清の存在下で単球（２＊１０^{6}／ｍＬ、５０μＬ／ウエル）に加えられた。５日間の培養後、細胞は１μＣｉの［^{3}Ｈ］－チミジンを受け、一晩インキュベートされ、採取され、ベータ液体シンチレーションカウンター（ＰｅｒｋｉｎＥｌｍｅｒ）で計数された。結果は、５回反復培養の平均および標準偏差として表される。

【０２２３】

ＭＬＲ／ＣＭＬアッセイ

ＥＣＰ処理単球がＣＤ８Ｔ細胞によるＭＨＣクラスＩ限定細胞傷害性を機能的に刺激できるかどうかを評価するために、３名の正常対象由来の単核白血球が研究された。ＨＬＡ－Ａ２陽性志願者３名それぞれから新鮮に調達された抗凝固血液１単位は、実際のＥＣＰ手順と同一のやり方で臨床ＥＣＰ装置を通じて処理される前後に、刺激単球／樹状細胞の供給源となった。単核画分は、ＥＣＰ処理の直前（ＥＣＰ前）およびＥＣＰ直後（ＥＣＰ　Ｄ０）に血液から単離された。一方向性のＴ細胞刺激を確実にするためのガンマ照射（３０００ｒａｄ、セシウム源）後、ＥＣＰ前画分は、ＲＰＭＩ　１６４０／１５％自己血清中に系列希釈され、細胞２５０００から２５０個を含有する１００μＬは、円形底マイクロタイタープレートウエルに、５回反復で蒔かれた。ＥＣＰ　Ｄ０画分は、１８時間、ラージウエルプレートでインキュベートされ、接着細胞を剥がすためにウエルをこすることによって採取された。次いで再懸濁細胞は、系列希釈され、上に記載のとおり蒔かれた。Ａ－２－陰性正常ドナーは、応答者ＣＤ４およびＣＤ８Ｔ細胞の供給源となり、Ｍｉｌｔｅｎｙｉ磁気ビーズカラムでの陽性選択によって精製された（平均純度９８％）。次いで応答者Ｔ細胞（５００００／ウエル１００μＬ中）は、ＥＣＰ前またはＥＣＰ－Ｄ０刺激因子のいずれかを含有するウエルに加えられ、プレートは７日間、３７℃、ＣＯ２インキュベーター中で培養された。標的細胞について、Ａ－２陽性Ｔ－Ｂ融合細胞リンパ芽球細胞系、１７４×ＣＷＭ．Ｔ１、は^{51}Ｃｒで標識され、ＭＬＲ培養物に細胞１０^{4}個／ウエルで加えられた。４時間インキュベーション後、プレートは遠心分離され、ガンマカウンターでの計数のために各ウエルから上清１００μＬが除去された。「比溶解百分率」は、次の割合：

平均ｃｐｍ（試料）－平均ｃｐｍ（Ｔ細胞のみ）

平均ｃｐｍ（界面活性剤最大遊離）－平均ｃｐｍ（Ｔ細胞のみ）

の１００倍として定義された。

【０２２４】

ＲＮＡ単離およびマイクロアレイハイブリダイゼーション

全ＲＮＡは、ＲＮｅａｓｙ　Ｍｉｎｉ　Ｋｉｔ　ｃｏｌｕｍｎｓ　ｗｉｔｈ　ｏｎ－ｃｏｌｕｍｎ　ＤＮａｓｅ　Ｉ　ｔｒｅａｔｍｅｎｔ（ＱＩＡＧＥＮ）を使用して単離された。ＲＮＡ収量および純度はＮａｎｏＤｒｏｐ　ＮＤ－１０００分光光度計およびＡｇｉｌｅｎｔ　２１００　Ｂｉｏａｎａｌｙｚｅｒを使用して測定された。断片化ｃＲＮＡは、Ａｆｆｙｍｅｔｒｉｘ　ＨＧ　Ｕ１３３　Ｐｌｕｓ　２．０　ｈｕｍａｎ　ｃｈｉｐｓにハイブリダイズされ、ヒト遺伝子およそ４７４００個についてスクリーニングされ、ＥＳＴはｔｈｅ　Ｙａｌｅ　Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ　Ｗ．Ｍ．Ｋｅｃｋ　Ｒｅｓｏｕｒｃｅ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙによって実施された。マイクロアレイ結果は、遺伝子発現情報データベース受入番号ＧＳＥ２３６０４で利用可能である。

【０２２５】

データ分析

Ａｆｆｙｍｅｔｒｉｘ　ＧｅｎｅＣｈｉｐ　Ｏｐｅｒａｔｉｎｇ　Ｓｏｆｔｗａｒｅ

Ｖｅｒｓｉｏｎ １．２（ＧＣＯＳ １．２、Ａｆｆｙｍｅｔｒｉｘ）から生成された標準化していない生データは、Ｇｅｎｅｓｐｒｉｎｇ ｓｏｆｔｗａｒｅ ７．２（Ａｇｉｌｅｎｔ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ－Ｓｉｌｉｃｏｎ Ｇｅｎｅｔｉｃｓ）を使用して分析された。データは、Ｒｏｂｕｓｔ Ｍｕｌｔｉ－Ａｒｒａｙを使用して標準化された。最少倍数変化＞２．０と組み合わせて、白血球アフェレーシスなどのアフェレーシスまたは処置試料いずれかにおいて５００以上の平均シグナル強度を有するプローブセットだけを分析に含めた。差次的遺伝子発現は、＞２倍数変化およびＰ＜．０５とされた。誘導されたトランスクリプトームの主成分分析（ＰＣＡ）は、標準的方法によって実施された。シグナル伝達経路関与は、ＭｅｔａＣｏｒｅ Ｓｏｆｔｗａｒｅ Ｖｅｒｓｉｏｎ １．０（ＧｅｎｅＧｏ）で同定された。

【０２２６】

定量的リアルタイムＰＣＲ

選択された遺伝子のマイクロアレイ発現は、同じＲＮＡ試料のアリコートにおいて定量的リアルタイムポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）を使用して確認された。ＲＮＡは、Ｈｉｇｈ Ｃａｐａｃｉｔｙ ｃＤＮＡ Ｒｅｖｅｒｓｅ Ｔｒａｎｓｃｒｉｐｔｉｏｎ Ｋｉｔ（Ａｐｐｌｉｅｄ Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ）を使用してｃＤＮＡに逆転写された。逆転写は、９６－ｗｅｌｌ ｔｈｅｒｍｏｃｙｃｌｅｒ（ＭＪ Ｒｅｓｅａｒｃｈ ＰＴＣ－２００）で次の条件：２５℃１０分間、３７℃１２０分間、８５℃５秒間で実行された。ＴａｑＭａｎリアルタイムＰＣＲは、ＤＣ－ＬＡＭＰ、ＣＣＲ７、ＣＤ８０、ＣＤ８６およびＣＤ１４の転写物を検出するために使用された。各配列に対するプライマーおよびプローブは、一覧のＴａｑｍａｎ Ｇｅｎｅ Ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ Ａｓｓａｙｓ（Ａｐｐｌｉｅｄ Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ）として得られた。ＨＰＲＴ１は、参照遺伝子として使用された。

【０２２７】

結果

個々の遺伝子発現における大きなＥＣＰ誘導変化

単球における個々の遺伝子活性化のＥＣＰによる刺激は、関連遺伝子についてのＥＣＰ１日目対ＥＣＰ前発現の比として表される。単球濃縮の際の偶発性遺伝子誘導をなくすために、陰性カラム精製法が使用され、それによりリンパ球は保持され、単球は受動的にろ過された。結果は患者および正常対象の両方由来のＥＣＰ処理単球が、共有トランスクリプトームサインを再現性よく発現するために十分生存可能であることを明らかにした。

【０２２８】

遺伝子は、ＥＣＰ前と比較して倍数変化が＞２であり、有意性がＰ＜．０５であった場合に、ＥＣＰによって有意に上方または下方制御されたと見なされた。遺伝子およそ３０００個からのＲＮＡ転写物のレベルは、各患者群と正常対象において顕著に変化した（表２）。全体的に遺伝子１１２９個は、ＣＴＣＬおよびＧＶＨＤ患者および正常対象の両方由来のＥＣＰ処理単球によって共通して上方または下方制御され、ＥＣＰ誘導遺伝子活性化における共有性を示している。

【０２２９】

【表２】

表 2: ECP 後に発現が変わった単球遺伝子の数

単球供給源	合計	上方制御	下方制御
正常対象(単独): N=6	3,666	1494 (41%)	2172 (59%)
CTCL(単独): N=3	4,315	2613 (61%)	1702 (38%)
GVHD(単独): N=3	4,350	2658 (61%)	1692 (39%)

ECP によって有意に誘導または抑制された遺伝子の数

【０２３０】

樹状細胞分化、接着、および機能に関連する多数の遺伝子の発現の増加（表３）は、単球の経路への進入のＥＣＰ刺激をさらに支持する。

【０２３１】

【表３】

表 3: DC マーカー遺伝子の ECP 増強発現、ECP 後/ECP 前レベルの比*

遺伝子	帰属	CTCL および GVHD(N-6)誘導発現比	正常対象(N-6)誘導発現比
DC-LAMP	DC リソソームタンパク質	27.6 $p=1.2x10^{-09}$	17.2 $p=1.4\ x10^{-07}$
GPNMB	膜貫通糖タンパク質	205.7 $p=9.6x10^{-15}$	123.3 $p=2.8x10^{-14}$
CD80	同時刺激分子、B7.1	13.4 $p=2.3x10^{-13}$	NC
CD86	同時刺激分子、B7.2[8]	NC	5.0 $p=1.4x10^{-05}$
CD40	DC 生存に関与	2.3 $p=5.7^{-04}$	NC
デシシン	ADAM 様、LPS 成熟 DC において発現	26.5 $p=1.0x10^{-09}$	7.1 $p=5.6x10^{-04}$
CCR7	リンパ節ホーミング分子	2.6 $p=7.0x10^{-03}$	NC
CD83	DC 成熟分子	NC	2.3 p=0.03
OLR1	Lox1、レクチン様受容体	13.6 $p=3.3x10^{-05}$	100.1 $p=8.3x10^{-08}$
CLEC5A	MDL-1	10.9 $p=9.5x10^{-07}$	45.5 $p=1.6x10^{-08}$
FPRL2	ホルミルペプチド受容体様 2	33.9 $p=2.1x10^{-08}$	43.2 $p=1.9x10^{-08}$
SDC2	シンデカン、細胞表面プロテオグリカン	21.7 $p=9.3x10^{-08}$	98.9 $p=3.3x10^{-09}$
THBS1	トロンボスポンジン 1	6.2 $p=7.8x10^{-08}$	10.4 $p=4.7x10^{-09}$

*比=(ECP 前遺伝子発現)対(ECP 後遺伝子発現)、ECP によって誘導される DC 成熟および機能に関与する複数の遺伝子の発現における倍数増加。遺伝子発現への処置の影響は、誘導発現比(関連遺伝子についての ECP 後対 ECP 前発現の比)として示される。RNA は、3 名の CTCL 患者および 3 名の GVHD 患者および 6 名の正常対象から関連する時点で単離された。

【０２３２】

その発現が増加することが見出され、免疫賦活樹状細胞の分子マーカーであると考えられる場合があるさらなる遺伝子は、表１に示されている。

【０２３３】

単球から樹状細胞への成熟の際に予測されるとおり、ＥＣＰ処理単球の一晩培養後に、患者および正常対象すべての単球集団での平均蛍光強度を測定することによって評価されたとおり、ＣＤ１４（単球マーカー）発現は減少された。この結果は、患者のＥＣＰ後細胞のＲＴ－ＰＣＲ研究において確認された（結果未記載）。その発現の低減が単球から樹状細胞への成熟を示すさらなる因子を表４に示す。

【０２３４】

【表４】

表 4: 単球マーカー遺伝子の ECP 低減発現、ECP 後/ECP 前レベルの比*

遺伝子	帰属	CTCL および GVHD(N=6) 誘導発現比	正常対象(N=6) 誘導発現比
CD33	単球上に発現された細胞表面タンパク質	-2.2 $p=4.5x10^{-04}$	NC
CD36	アポトーシス性細胞に対する受容体	-7.4 $p=7.9x10^{-05}$	NC
FCGR1A	IgGFc 断片 1A に対する受容体	-6.9 $p=6.6x10^{-05}$	-4.4 $p=2.1x10^{-03}$

*比=(ECP 前遺伝子発現)対(ECP 後遺伝子発現)、ECP によって誘導される単球に特徴的な遺伝子の発現における倍数減少(単球が DC に分化するため)。遺伝子発現への処置の影響は、誘導発現比(関連遺伝子についての ECP 後対 ECP 前発現の比)として示される。RNA は、3 名の CTCL 患者および 3 名の GVHD 患者および 6 名の正常対象から関連する時点で単離された。

【０２３５】

その発現が低減され、それにより単球から免疫抑制樹状細胞への成熟を示すさらなる因子は表５に示されている。

【０２３６】

【表５】

表 5: 免疫抑制関連遺伝子の ECP 増強発現、ECP 後/ECP 前レベルの比*

遺伝子	帰属(正常)	CTCL および GVHD(N-6) 誘導発現比	正常対象(N-6) 誘導発現比
IDO	インドールアミン	27.8 $p=4.0x10^{-10}$	9.4 $p=1.1x10^{-06}$
KMO	キヌレニン 3-ヒドロキシラーゼ	6.0 $p=2.5x10^{-06}$	NC
IL10	インターロイキン 10	6.3 $p=9.2x10^{-06}$	8.6 $p=5.7x10^{-06}$

*比=(ECP 前遺伝子発現)対(ECP 後遺伝子発現)、T 細胞媒介性免疫反応を抑制する DC の能力に寄与する遺伝子の発現における ECP 誘導倍数増加。遺伝子発現への処置の影響は、誘導発現比(関連遺伝子についての ECP 前対 ECP 後発現の比)として示される。RNA は、3 名の CTCL 患者および 3 名の GVHD 患者および 6 名の正常対象から関連する時点で単離された。

【０２３７】

実験４－免疫賦活ＤＣの表面分子マーカーおよび機能性メディエーター

ＥＣＰ誘導樹状細胞トランスクリプトームのさらなる分析は、免疫賦活樹状細胞のマーカーおよび機能メディエーターとしての表面分子遺伝子産生物のサブセットを同定するために実施された。ＥＣＰ誘導樹状細胞において上方制御された４６６個の遺伝子は、８７個の共有表面タンパク質を同定するためにおよそ２０００個の公知のまたは推定される全長ヒト膜貫通遺伝子と相互参照された。

【０２３８】

材料および方法

白血球および血小板の調達

すべての試料は、アスピリンを含む血小板機能に影響を与えることが公知である薬物療法を受けていない若年の健康な対象から取得した。試料は、Ｙａｌｅ Ｈｕｍａｎ Ｉｎｖｅｓｔｉｇａｔｉｏｎａｌ Ｒｅｖｉｅｗ Ｂｏａｒｄのガイドラインの下で得られ、インフォームドコンセントは、ヘルシンキ宣言に従って提供された。末梢血検体は、前腕

前部の血管からヘパリンを含有するシリンジに１９－ゲージ針を通して収集され、次いでＦｉｃｏｌｌ－Ｈｙｐａｑｕｅ（Ｇａｌｌａｒｄ－Ｓｃｈｌｅｓｓｉｎｇｅｒ、Ｃａｒｌｅ　Ｐｌａｃｅ、Ｎ．Ｙ．）に重層された。１８０ｇでの遠心分離後、単核白血球画分を含有する界面は収集され、ＨＢＳＳ中で２回洗浄され、次いで単核細胞５×１０^{6}個／ｍｌの最終濃度でＲＰＭＩ－１６４０培地（ＧＩＢＣＯ）中に再懸濁された。細胞は取得の１時間以内に利用された。

【０２３９】

血小板に富む血漿の調製

全血は１５０ｇで１５分間、室温で遠心分離された。血小板に富む血漿（ＰＲＰ）層は収集され、９００ｇで５分間遠心分離され、血小板ペレットはＲＰＭＩ　１６４０中、所望の濃度に再懸濁された。

【０２４０】

プレートの調製

プレートの通過はＧｌｙｃｏｔｅｃｈ　ｓｙｓｔｅｍ（Ｇｌｙｃｏｔｅｃｈ、Ｒｏｃｋｖｉｌｌｅ、ＭＤ）を使用して行われた。この系は、流量路容積測定２００００×１００００×２５４ミクロン（長さ×幅×高さ）からできていた。この系の下部プレートは、ガスケットによって分けられた１５ｍｍペトリ皿（ＢＤ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ、Ｄｕｒｈａｍ、ＮＣ）からできており、上部プレートを形成するアクリルフローデッキに真空接続されていた。血小板でプレコートするために、フローチャンバーを組み立てる前に、所望の濃度のＰＲＰの２０滴がペトリ皿の中央に置かれ、血小板を２０分間、室温で定着させた。ペトリ皿はＲＰＭＩ　２ｍｌで２回洗浄され、次いでフローチャンバーが組み立てられた。

【０２４１】

一晩培養

一晩培養が必要であった場合、細胞は遠心分離され、１５％ＡＢ血清（Ｇｅｍｉｎｉ　Ｂｉｏ－Ｐｒｏｄｕｃｔｓ）を補充したＲＰＭＩ－１６４０培地（ＧＩＢＣＯ）中に最終濃度、細胞５×１０６個／ｍｌで再懸濁した。細胞を１２ウエルポリスチレン組織培養プレート（１ウエルあたり２ｍｌ）中、３７℃、５％ＣＯ２で１８時間、一晩培養した。

【０２４２】

免疫表現型検査

免疫表現型検査のためのモノクローナル抗体は、ＣＤ１４（ＬＰＳ受容体、単球）、ＣＤ１１ｃ（インテグリンサブユニット、単球およびＤＣ）、ＨＬＡ－ＤＲ（クラスＩＩ　ＭＨＣ分子）、ＣＤ８３（ＤＣマーカー）、ＣＤ６２ｐ（Ｐ－セレクチン、活性化血小板）およびＣＤ６１（インテグリンサブユニット、血小板）を含む。抗体はＢｅｃｋｍａｎ　Ｃｏｕｌｔｅｒ（ＣＤ１４、ＣＤ１１ｃ、ＨＬＡＤＲ、ＣＤ８３）またはＳｉｇｍａ（ＣＤ６２ｐ、ＣＤ６１）から得られ、それらの予め決定された最適希釈で使用された。バックグラウンド染色は適切なアイソタイプ対照で確立され、免疫蛍光はＦＣ５００　ｆｌｏｗ　ｃｙｔｏｍｅｔｅｒ（Ｂｅｃｋｍａｎ　Ｃｏｕｌｔｅｒ）を使用して分析された。２色膜染色は、ＦＩＴＣまたはＰＥに直接コンジュゲートされた両方の抗体を予め決定された最適濃度で加え、２０分間、４℃でインキュベートし、次に未結合抗体を除去するために洗浄することによって実施された。膜および細胞質の組合せ染色は細胞固定および透過処理についての製造業者の説明書（Ｉｎｔｒａｐｒｅｐ　ｋｉｔ、Ｂｅｃｋｍａｎ　Ｃｏｕｌｔｅｒ）に従って実施された。

【０２４３】

結果

プレート通過および／またはＰＢＭＣ　Ｄ１集団は、ＳＩＲＰａ、ＩＣＡＭ１、ＣＸＣＬ１６、ＬＩＧＨＴ、ＰＬＡＵＲ（ＣＤ８７、プラスミノーゲン活性化因子、ウロキナーゼ受容体）、ＭＳＲ１、Ｎｅｕ１（シアリダーゼ）、ＣＤ１３７ＬおよびＣＡＴＢ（ＣＴＳＢ、カテプシンＢ）の分析された表面発現の顕著な上方制御を示した。

【０２４４】

実験５－単球をフローチャンバーに通した後の分子マーカーの発現およびＦＳＣ／ＳＳＣ複雑度の決定

材料および方法

単球は、図１９に示すデバイスを通された。簡潔には、血液試料は、例えば細胞10^{10}個／ｍｌの濃度の末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）を含む試料８ｍｌを例えば得るためにＦｉｃｏｌｌ勾配を通して低速で遠心した。チャンバーは、血小板でプレコートされた。試料は、約０．０２８Ｐａでチャンバーを通された。次いでチャンバーは、ＲＰＭＩ約３ｍｌ、０．０２８Ｐａで洗浄された。ＲＰＭＩ　３０～５５ｍｌでの２回目の洗浄は、約１．２Ｐａで実施された。収集された活性化単球は、合わせられ、１日インキュベートされ、さらなる分析のために使用された（ＰＰ　Ｄ１　ＰＢＭＣ）。対照としてＰＢＭＣは、デバイスを通されずに、１日インキュベートされた（Ｄ１　ＰＢＭＣ）。別の対照として未成熟ｆａｓｔ　ＤＣは、ＰＢＭＣをＧＭ－ＣＳＦおよびＩＬ－４の存在下で直接培養することによって得られた（未成熟Ｆａｓｔ　ＤＣ）。さらにＰＢＭＣは、Ｆｉｃｏｌｌ勾配を通じた採取直後に分析された（新鮮（Ｆｉｃｏｌｌ）ＰＢＭＣ）。

【０２４５】

次いで細胞および対照は、ＨＬＡ－ＤＲ、ＣＤ８６、ＩＣＡＭ－１およびＰＬＡＵＲの発現について分析された。それらは、ＦＳＣ／ＳＳＣ複雑度についてさらに分析された。結果は、ＨＬＡ－ＤＲについては図２０に、ＦＳＣ／ＳＳＣ複雑度については図２１および２２に示されている。要約は図２３に示されている。

【０２４６】

結果

結果は、これらの細胞を１日インキュベートした（Ｄ１　ＰＢＭＣ）ことから明らかになるとおり、Ｆｉｃｏｌｌ勾配を通じた遠心分離に供された細胞が分化し始めるために十分な物理的な力を既に経験したと考えられることを示している。しかし活性化および分化は、デバイスを通じたプレート通過でよりはっきりする（ＰＰ　Ｄ１　ＰＤＭＣ）。例えば８－ＭＯＰおよびＵＶ－Ａの非存在下で本発明による方法によって得られた樹状細胞は、サイトカインカクテルで得られた未成熟Ｆａｓｔ　ＤＣよりもさらに複雑で異なるパターンを有する。

【０２４７】

実験６－活性化単球への８－ＭＯＰおよびＵＶＡの影響の決定

材料および方法

単球は、Ｔｈｅｒａｋｏｓシステム由来のデバイスを通された。フローチャンバーの寸法は、幅３０ｍｍ、長さ１６００ｍｍおよび高さ１ｍｍであった。簡潔には血液試料は、例えば細胞１．５＊10^{6}個／ｍｌの濃度の末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）を含む試料８０ｍｌを例えば得るためにＦｉｃｏｌｌ勾配を通して低速で遠心された。チャンバーは、血小板でプレコートされた。試料は、約０．１３Ｐａの剪断ストレスに対応する約２４ｍｌ／分の流速で６０分間チャンバーを通された。収集された活性化単球は、低速で遠心され、８－ＭＯＰを含む少量の培地に再懸濁され、合わせられて照射され、１日インキュベートされ、さらなる分析のために使用された（１日目　ＰＢＭＣ＋ＰＰ）。対照ＰＢＭＣは、デバイスを通されずに、１日インキュベートされた（１日目　ＰＢＭＣ）。さらにＰＢＭＣは、Ｆｉｃｏｌｌ勾配を通した採取の直後に分析された（０日目　ＰＢＭＣ）。次いで１日目ＰＢＭＣ＋ＰＰは、８－ＭＯＰおよびＵＶＡ（ＰＵＶＡ）でさらに処置された。

【０２４８】

次いで細胞および対照は、ＧＩＬＺの発現について分析された。結果は、ＧＩＬＺについて図２４に示されている。

【０２４９】

結果

結果は、単球を活性化し、免疫賦活樹状細胞に分化する細胞が、８－ＭＯＰおよびＵＶＡの適用によって免疫抑制樹状細胞へ導かれ得ることを示している。

【０２５０】

参考文献：

1. Berger C, Hoffmann K, Vasquez JG, Mane S, Lewis J, Filler R et al. Rapid generation of maturationally synchronized human dendritic cells: contribution to the clinical efficacy of extracorporeal photochemotherapy. Blood 2010; 116(23): 4838-4847.

2. Cella M, Scheidegger D, PalmerLehmann K, Lane P, Lanzavecchia A, Alber G. Ligation of CD40 on dendritic cells triggers production of high levels of interleukin-12 and enhances T cell stimulatory capacity: T-T help via APC activation. Journal of Experimental Medicine 1996; 184(2): 747-752.

3. de Saint-Vis B, Vincent J, Vandenabeele S, Vanbervliet B, Pin JJ, Ait-Yahia S et al. A novel lysosome-associated membrane glycoprotein, DC-LAMP, induced upon DC maturation, is transiently expressed in MHC class II compartment. Immunity 1998; 9(3): 325-336.

4. Slavik JM, Hutchcroft JE, Bierer BE. CD80 and CD86 are not equivalent in their ability to induce the tyrosine phosphorylation of CD28. Journal of Biological Chemistry 1999; 274(5): 3116-3124.

5. Kang HK, Lee HY, Kim MK, Park KS, Park YM, Kwak JY et al. The synthetic peptide Trp- Lys-Tyr-Met-Val-D-Met inhibits human monocyte-derived dendritic cell maturation via formyl peptide receptor and formyl peptide receptor-like 2. Journal of Immunology 2005; 175(2): 685-692.

6. Ripoll VM, Irvine KM, Ravasi T, Sweet MJ, Hume DA. Gpnmb is induced in macrophages by IFN-gamma and lipopolysaccharide and acts as a feedback regulator of proinflammatory responses. Journal of Immunology 2007; 178(10): 6557-6566.

7. Chen SQ, Springer TA. Selectin receptor-ligand bonds: Formation limited by shear rate and dissociation governed by the Bell model. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 2001; 98(3): 950-955.

8. Thomas WE. Understanding the counterintuitive phenomenon of catch bonds. Current Nanoscience 2007; 3: 63-83.

9. Xiong JP, Stehle T, Zhang RG, Joachimiak A, Frech M, Goodman SL et al. Crystal structure of the extracellular segment of integrin alpha V beta 3 in complex with an Arg-Gly-Asp ligand. Science 2002; 296(5565): 151-155.

10. Weisel JW, Nagaswami C, Vilaire G, Bennett JS. Examination of the Platelet Membrane Glycoprotein-IIB-IIIA Complex and its Interaction with Fibrinogen and Other Ligands by Electron-Microscopy. Journal of Biological Chemistry 1992; 267(23): 16637-16643.

11. Kaplan KL, Broekman MJ, Chernoff A, Lesznik GR, Drillings M. Platelet alpha-granule proteins - studies on release and subcellular-localization. Blood 1979; 53(4): 604-618.

12. Ruoslahti E. RGD and other recognition sequences for integrins. Annual Review of Cell and Developmental Biology 1996; 12: 697-715.

13. Zhou LJ, Tedder TF. CD14+ blood monocytes can differentiate into functionally mature CD83+ dendritic cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1996;93(6):2588-2592.

14. Klein E. CD83 localization in a recycling compartment of immature human monocyte-derived dendritic cells. International Immunology. 2005;17(4):477-487.

15. Renzo MD, Rubegni P, Pasqui AL, et al. Extracorporeal photopheresis affects interleukin (IL)-10 and IL-12 production by monocytes in patients with chronic graft-versus-host disease. Br J Dermatol. 2005;153(1):59-65.

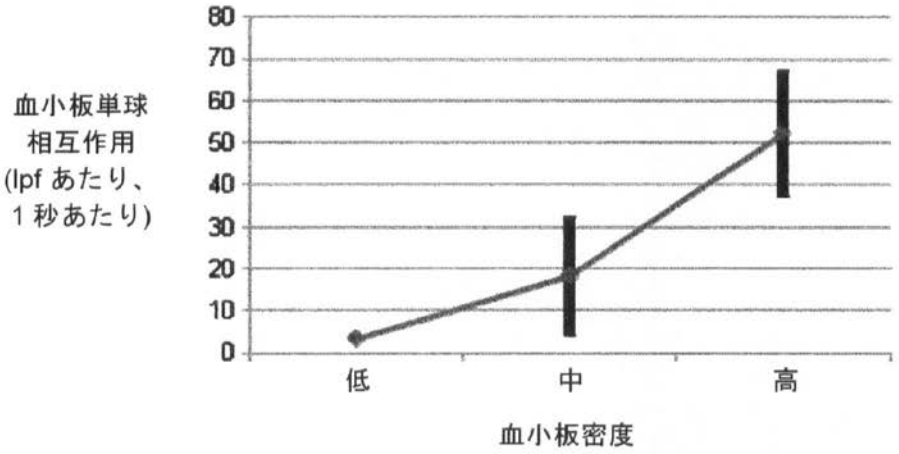
16. Gasparro FP, Bevilacqua PM, Goldminz D, et al. Repair of 8-MOP photoadducts in human lymphocyte. In DNA Damage and Repair in Human Tissues (edited by B. M. Sutherland and A.D. Woodhead). Plenum Press, New York.

17. Steinman RM, Hawiger D, Nussenzweig MC. Tolerogenic dendritic cells. Annu. Rev. Immunol. 2003;21:685-711.

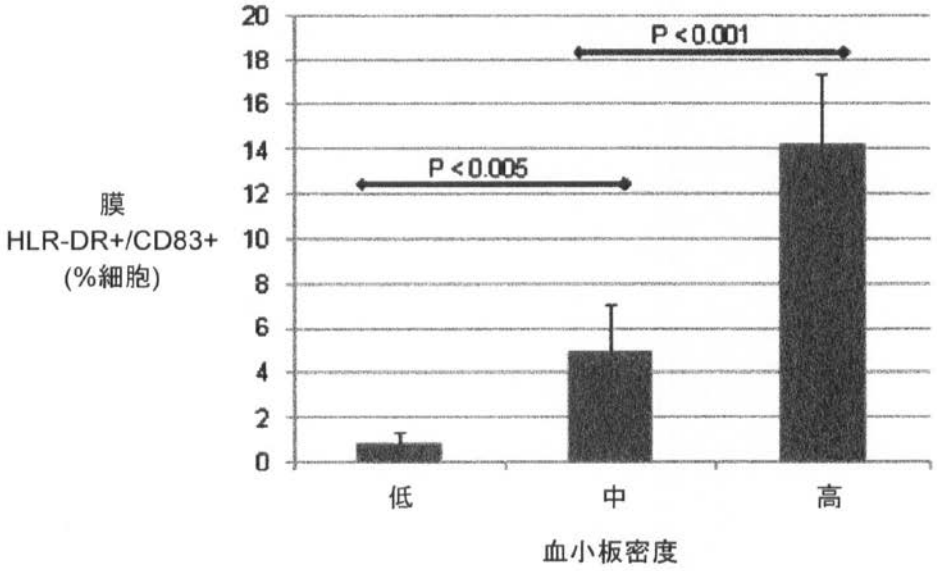
【図１】

図 1

a)

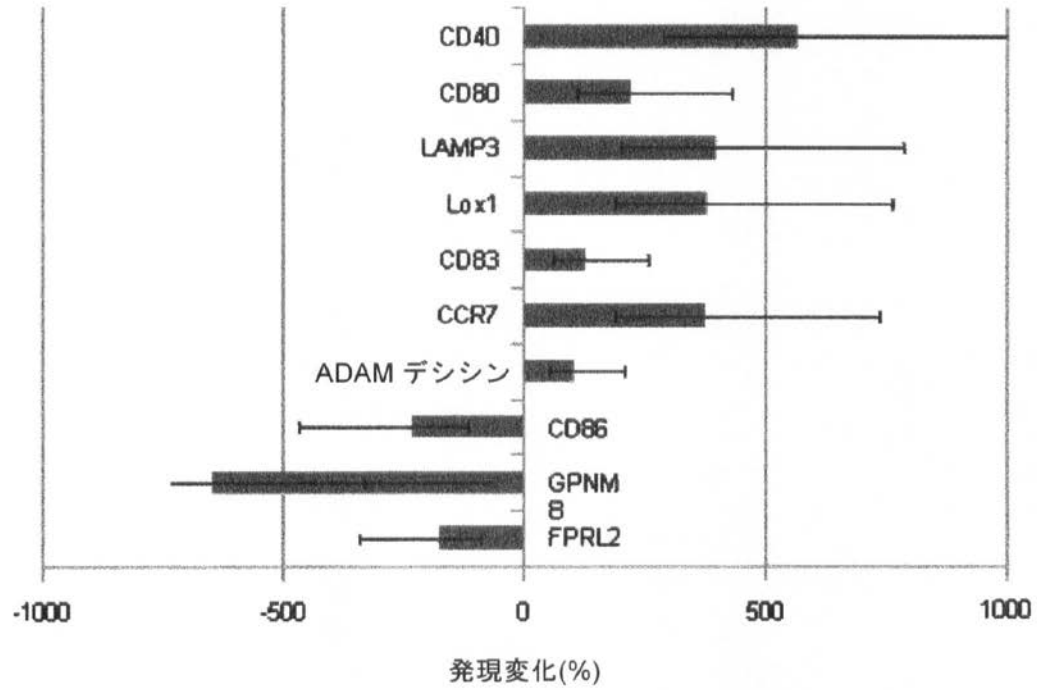

血小板単球
相互作用
(lpf あたり、
１秒あたり)
80
70
60
50
40
30
20
10
0
低
中
高
血小板密度

b)


膜
HLR-DR+/CD83+
(%細胞)
20
18
16
14
12
10
8
6
4
2
0
P < 0.001
P < 0.005
低
中
高
血小板密度

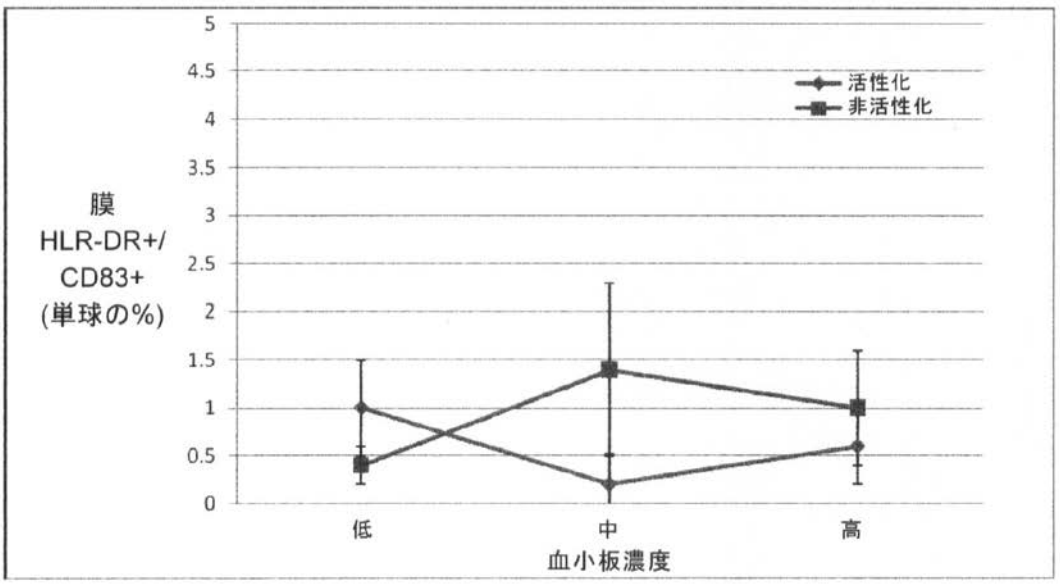
【図２】

図２


CD40
CD80
LAMP3
Lox1
CD83
CCR7
ADAM デシシン
CD86
GPNM
8
FPRL2
-1000
-500
0
500
1000
発現変化(%)

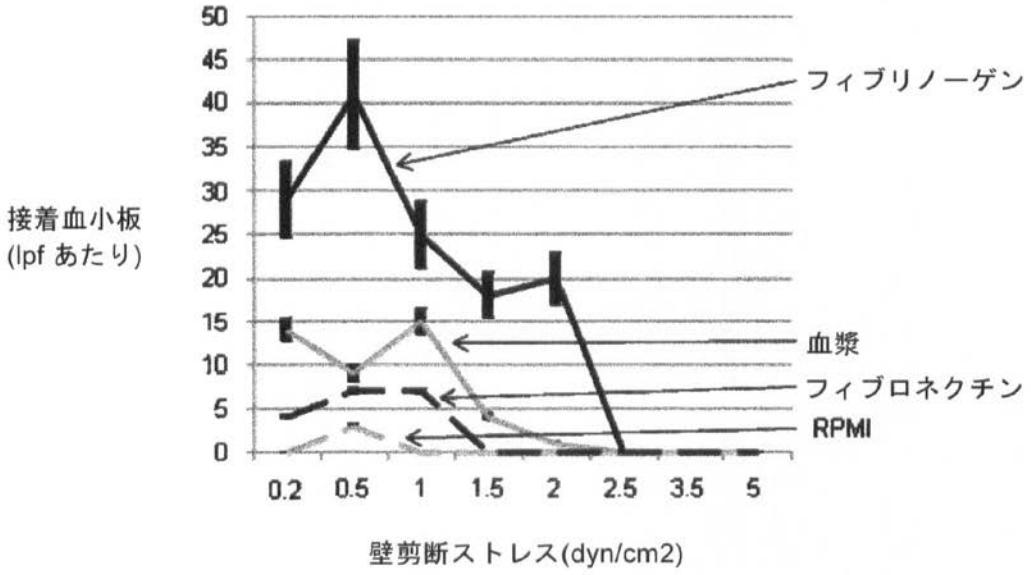
【図３】

図３


膜
HLR-DR+/
CD83+
(単球の%)
5
4.5
4
3.5
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
活性化
非活性化
低
中
高
血小板濃度

【図４】

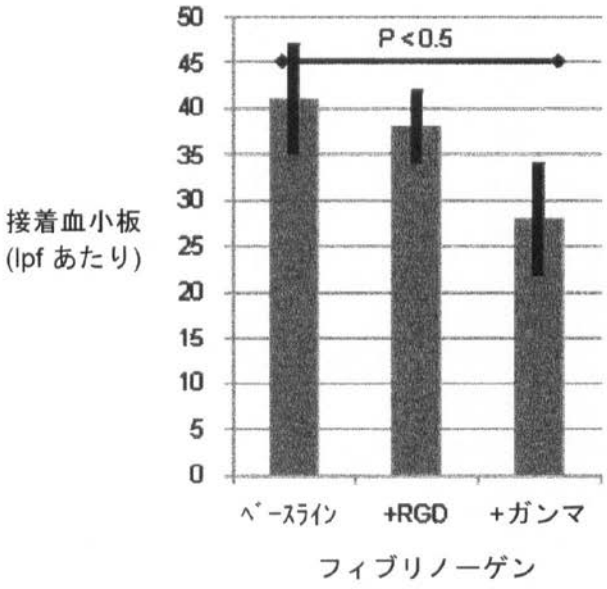
図４


接着血小板
(lpf あたり)
50
45
40
35
30
25
20
15
10
5
0
0.2
0.5
1
1.5
2
2.5
3.5
5
壁剪断ストレス(dyn/cm2)
フィブリノーゲン
血漿
フィブロネクチン
RPMI

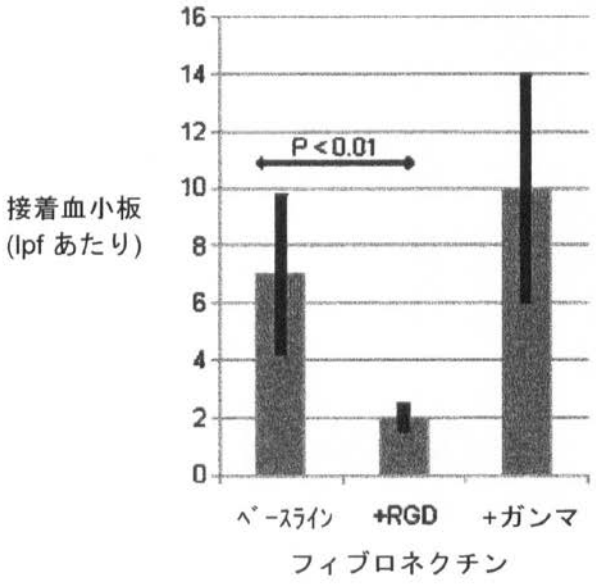
【図５】

図５

a)

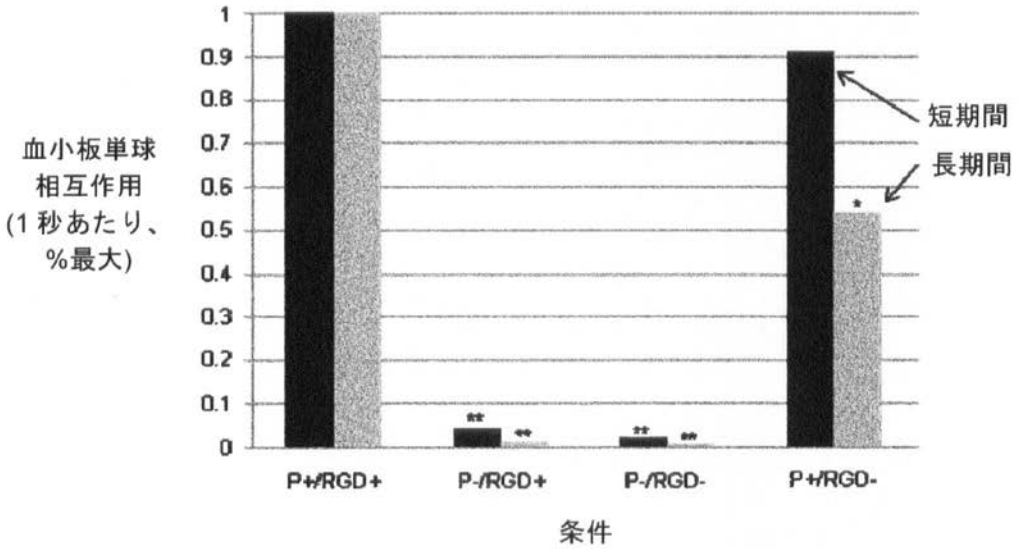

P<0.5
接着血小板
(Ipf あたり)
50
45
40
35
30
25
20
15
10
5
0
ベースライン
+RGD
+ガンマ
フィブリノーゲン

b)


P<0.01
接着血小板
(Ipf あたり)
16
14
12
10
8
6
4
2
0
ベースライン
+RGD
+ガンマ
フィブロネクチン

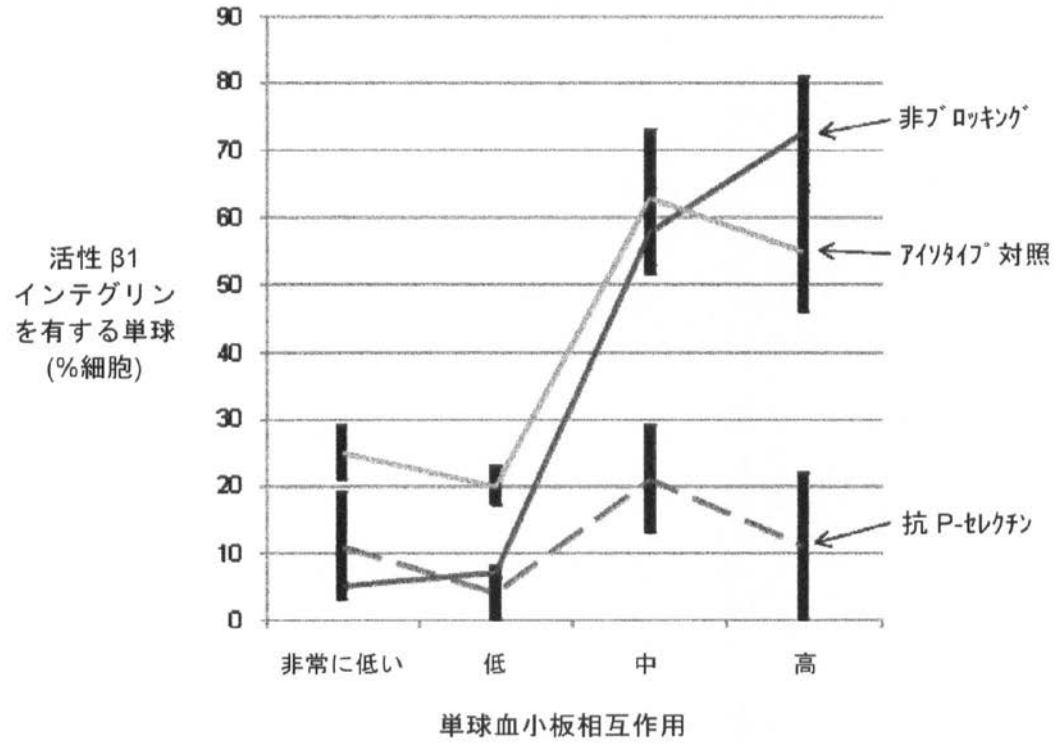
【図６】

図６


血小板単球
相互作用
(1秒あたり、
%最大)
1
0.9
0.8
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
短期間
長期間
P+/RGD+
P-/RGD+
P-/RGD-
P+/RGD-
条件

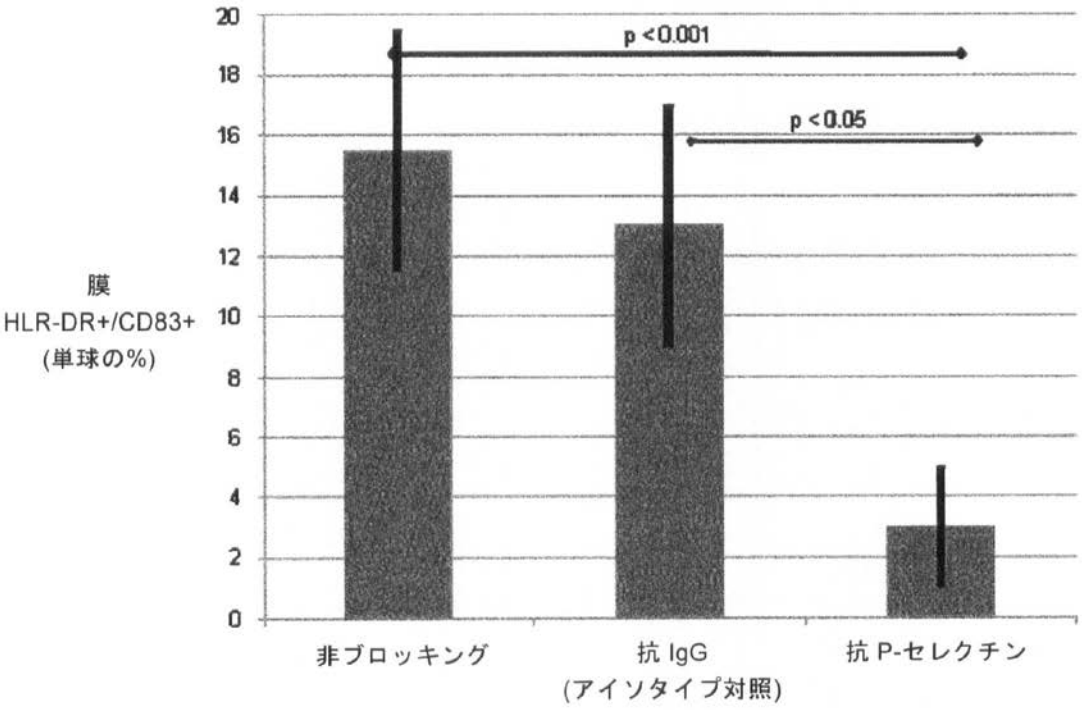
【図７】

図７


活性β1
インテグリン
を有する単球
(%細胞)
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
非ﾌﾞﾛｯｷﾝｸﾞ
ｱｲｿﾀｲﾌﾟ対照
抗 P-ｾﾚｸﾁﾝ
非常に低い
低
中
高
単球血小板相互作用

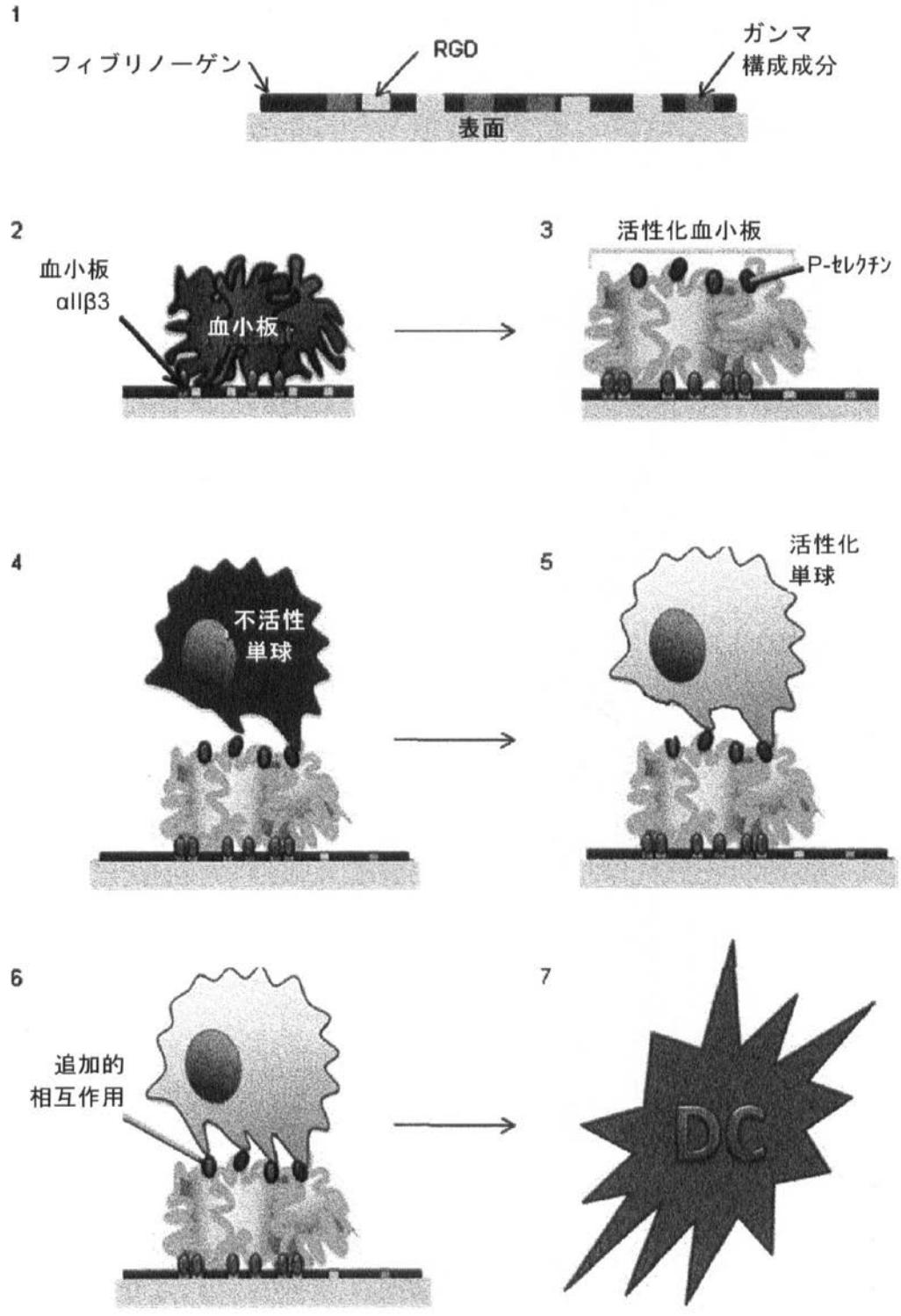
【図８】

図８


膜
HLR-DR+/CD83+
(単球の%)
20
18
16
14
12
10
8
6
4
2
0
p <0.001
p <0.05
非ブロッキング
抗 IgG
(アイソタイプ対照)
抗 P-セレクチン

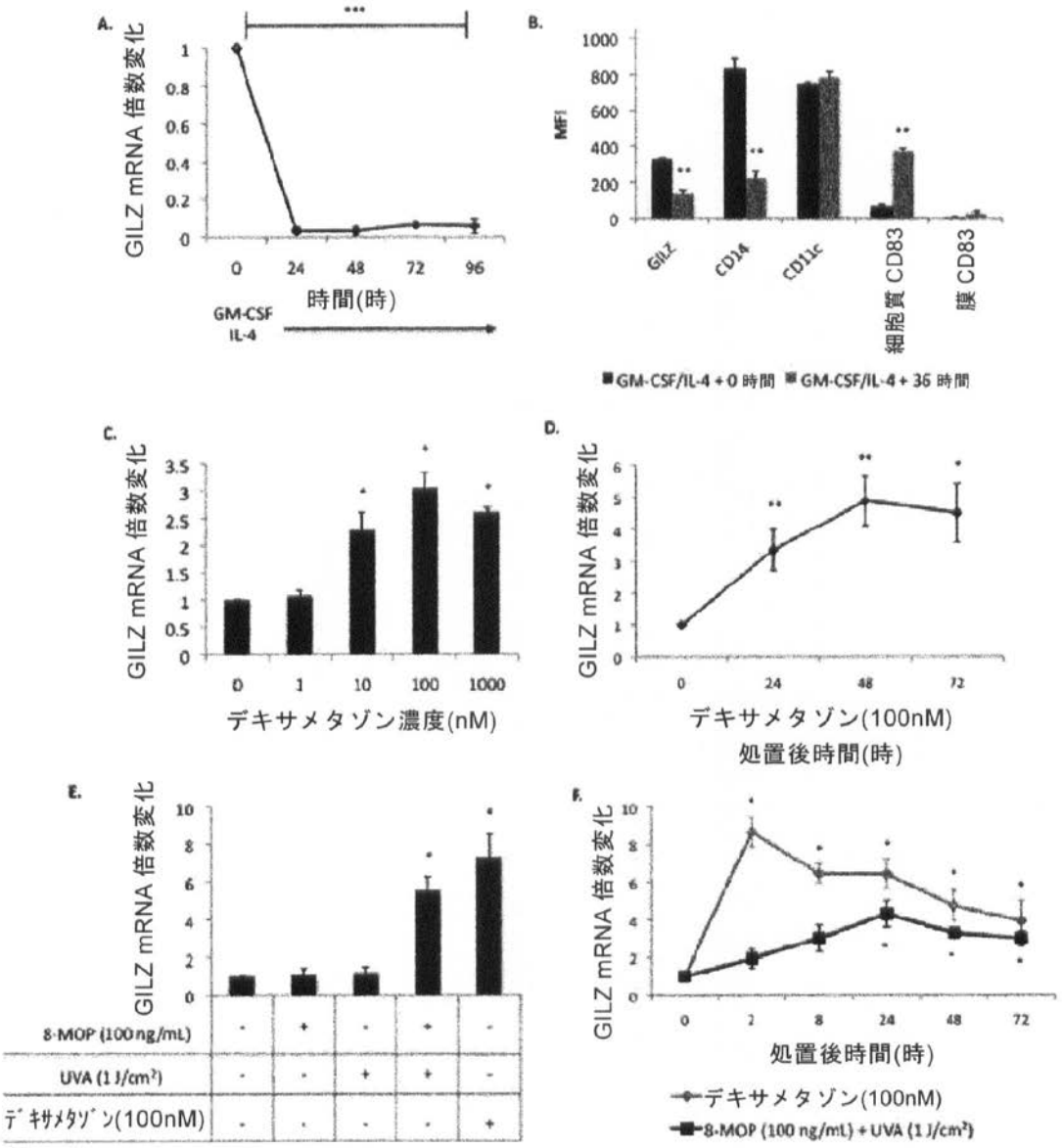
【図９】

図９


1
フィブリノーゲン
RGD
ガンマ
構成成分
表面
2
血小板
αIIβ3
血小板
3
活性化血小板
P-セレクチン
4
不活性
単球
5
活性化
単球
6
追加的
相互作用
7
DC

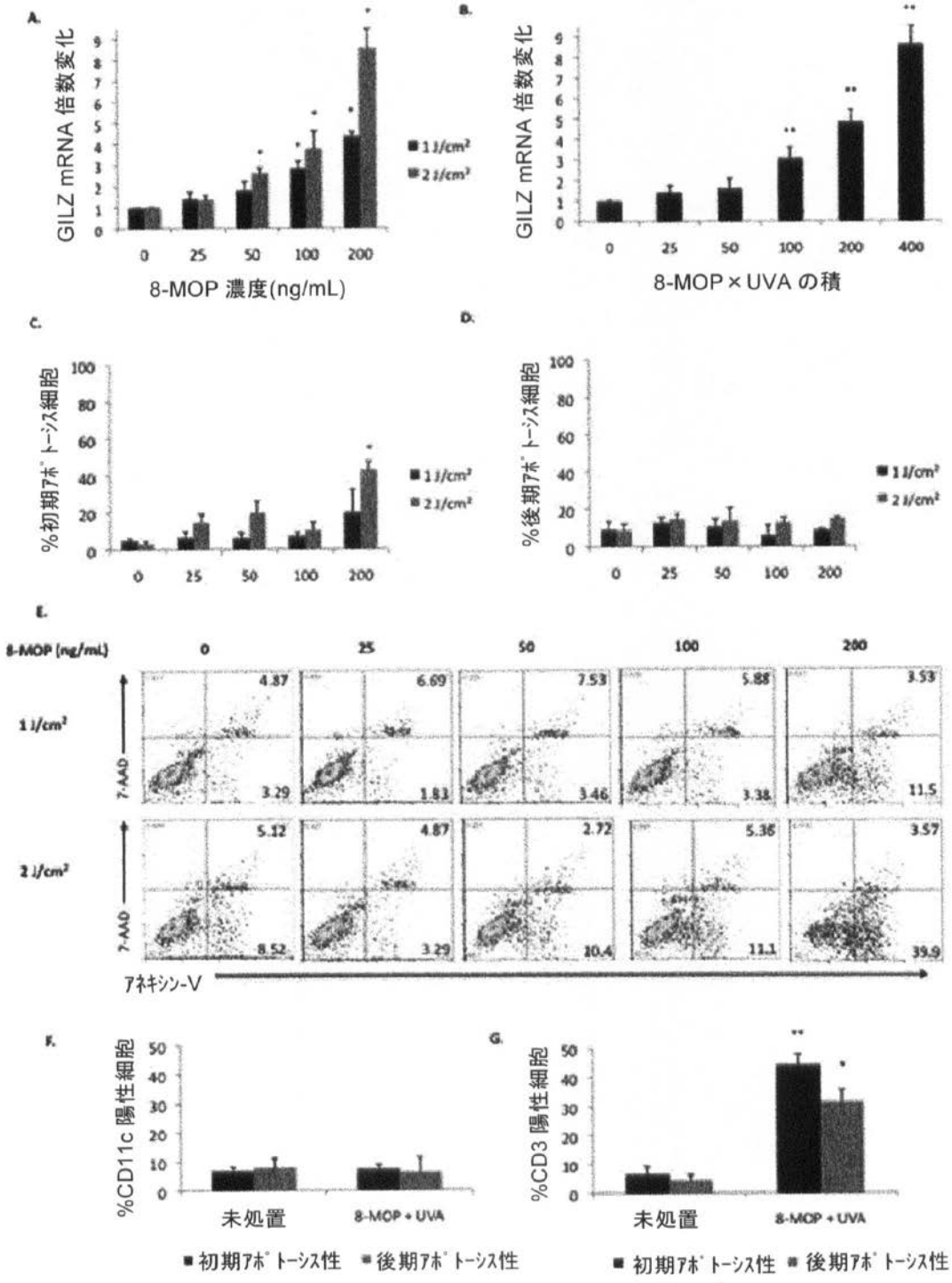
【図１０】

図 10


A.
GILZ mRNA 倍数変化
時間(時)
GM-CSF
IL-4
B.
MFI
GILZ
CD14
CD11c
細胞質 CD83
膜 CD83
GM-CSF/IL-4 + 0 時間
GM-CSF/IL-4 + 36 時間
C.
GILZ mRNA 倍数変化
デキサメタゾン濃度(nM)
D.
GILZ mRNA 倍数変化
デキサメタゾン(100nM)
処置後時間(時)
E.
GILZ mRNA 倍数変化
8-MOP (100 ng/mL)
UVA (1 J/cm²)
デキサメタゾン(100nM)
F.
GILZ mRNA 倍数変化
処置後時間(時)
デキサメタゾン(100nM)
8-MOP (100 ng/mL) + UVA (1 J/cm²)

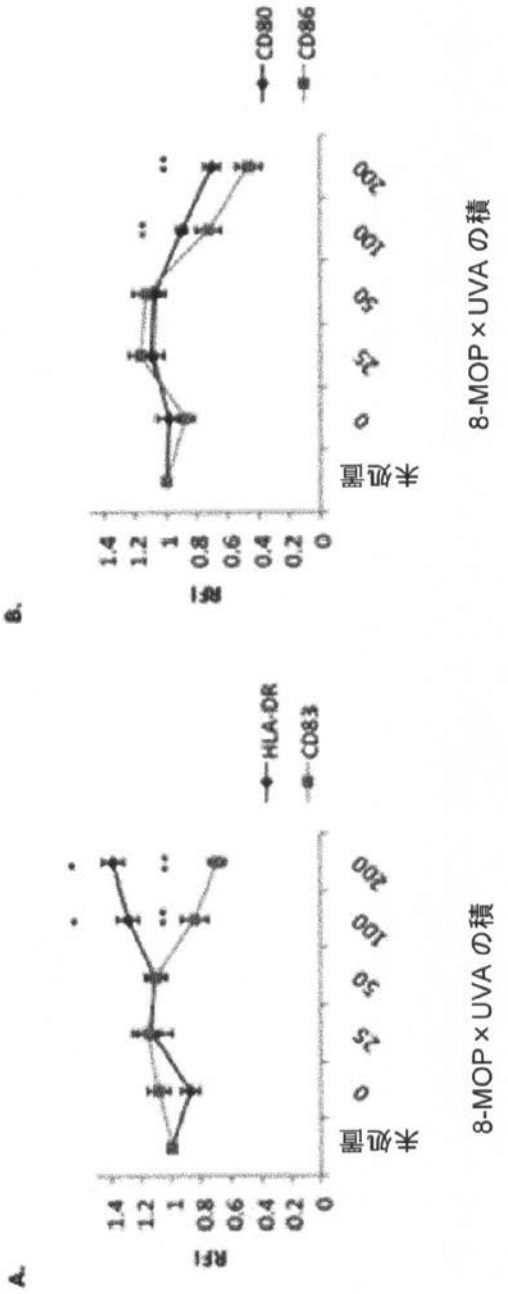
【図１１】

図 11


A.
GILZ mRNA 倍数変化
8-MOP 濃度(ng/mL)
1 J/cm²
2 J/cm²
B.
GILZ mRNA 倍数変化
8-MOP × UVA の積
C.
%初期アポトーシス細胞
D.
%後期アポトーシス細胞
E.
8-MOP (ng/mL)
7-AAD
アネキシン-V
F.
%CD11c 陽性細胞
未処置
8-MOP + UVA
■ 初期アポトーシス性 ■ 後期アポトーシス性
G.
%CD3 陽性細胞
未処置
8-MOP + UVA
■ 初期アポトーシス性 ■ 後期アポトーシス性

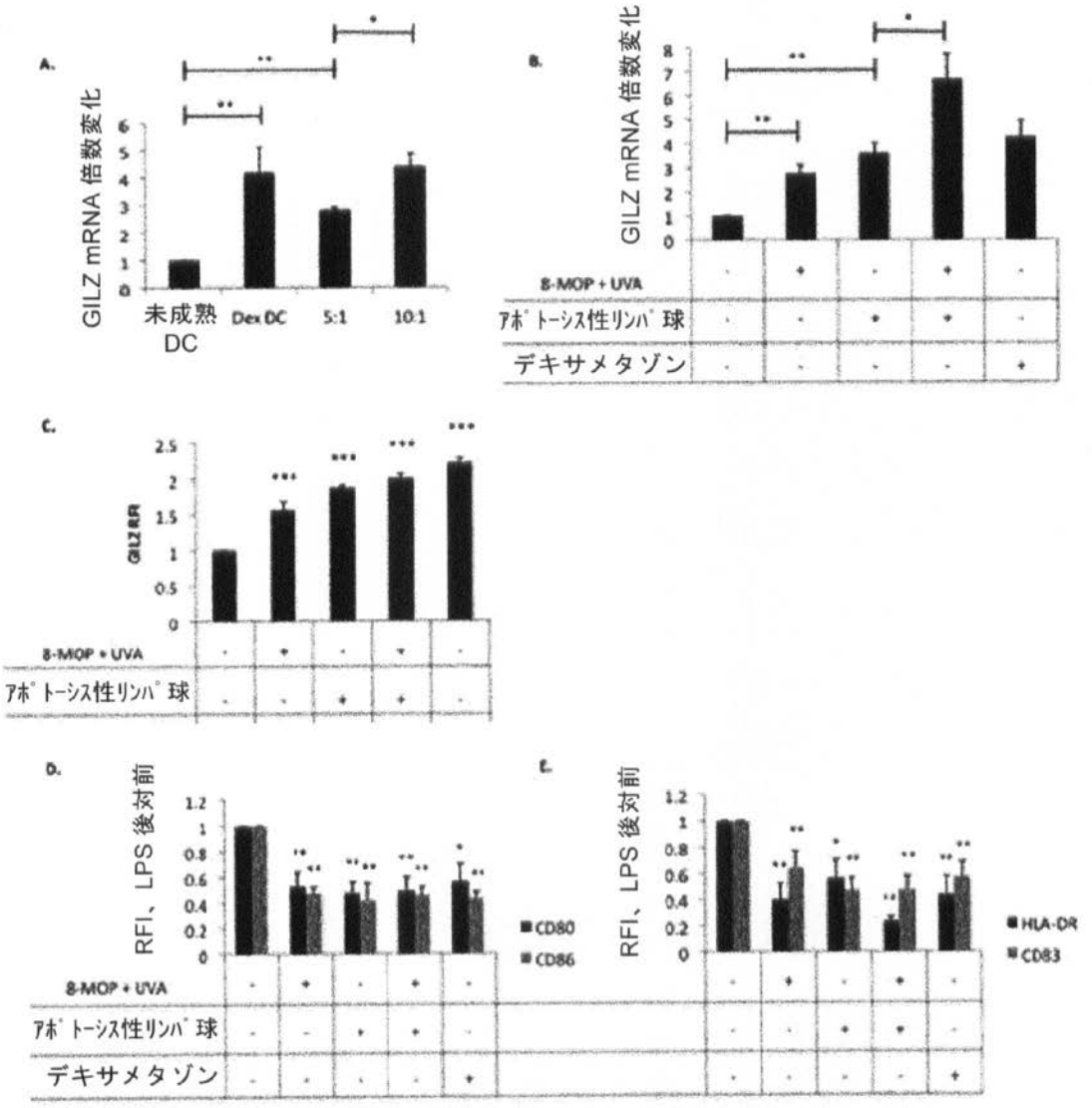
【図１２】

図 12


A.
HLA-DR
CD83
RFI
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
水処置
0
25
50
100
200
8-MOP × UVA の積
B.
CD80
CD86
RFI
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
水処置
0
25
50
100
200
8-MOP × UVA の積

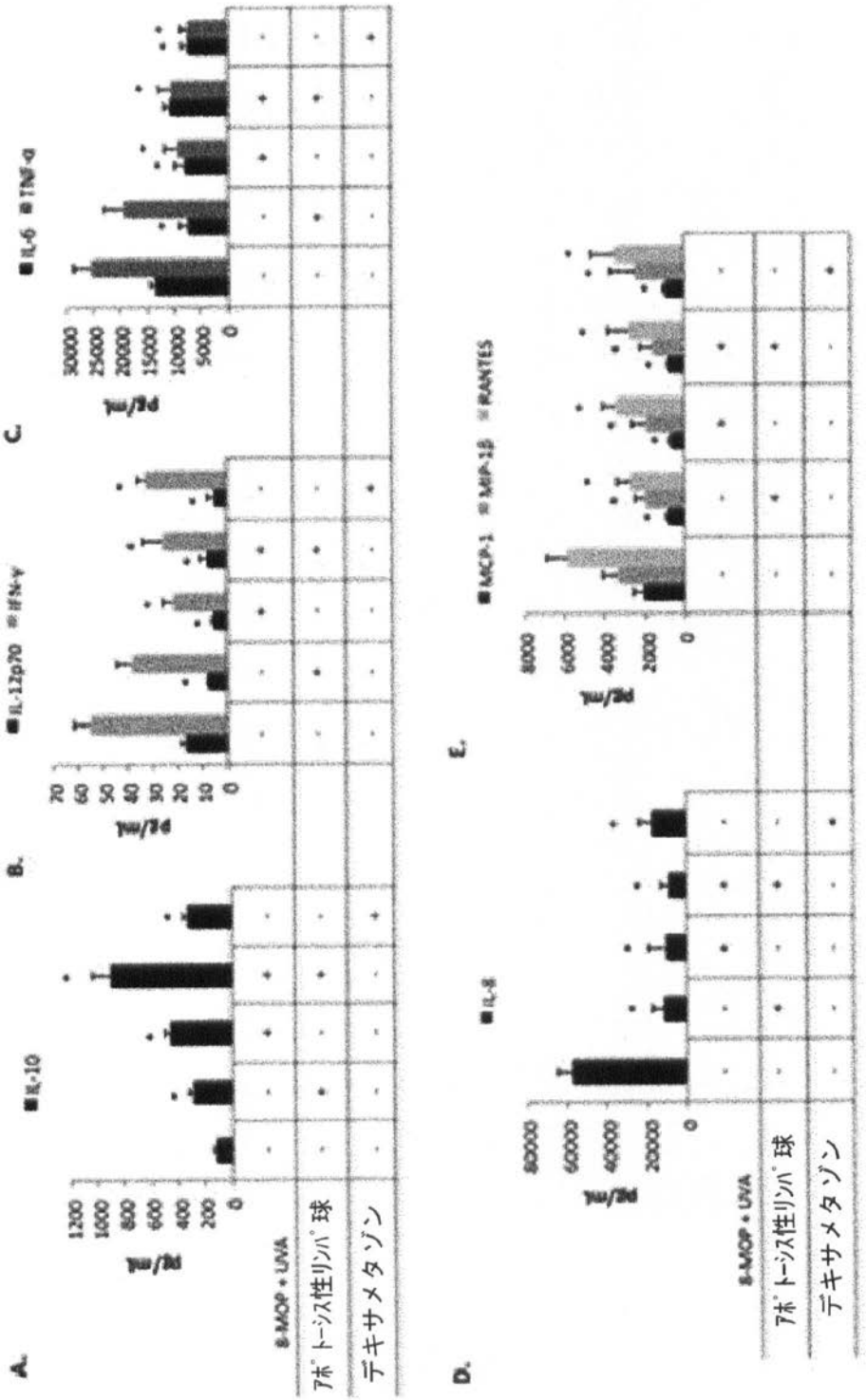
【図１３】

図 13


A.
GILZ mRNA 倍数変化
未成熟 DC
Dex DC
5:1
10:1
B.
GILZ mRNA 倍数変化
8-MOP + UVA
アポトーシス性リンパ球
デキサメタゾン
C.
8-MOP + UVA
アポトーシス性リンパ球
D.
RFI、LPS 後対前
CD80
CD86
8-MOP + UVA
アポトーシス性リンパ球
デキサメタゾン
E.
RFI、LPS 後対前
HLA-DR
CD83

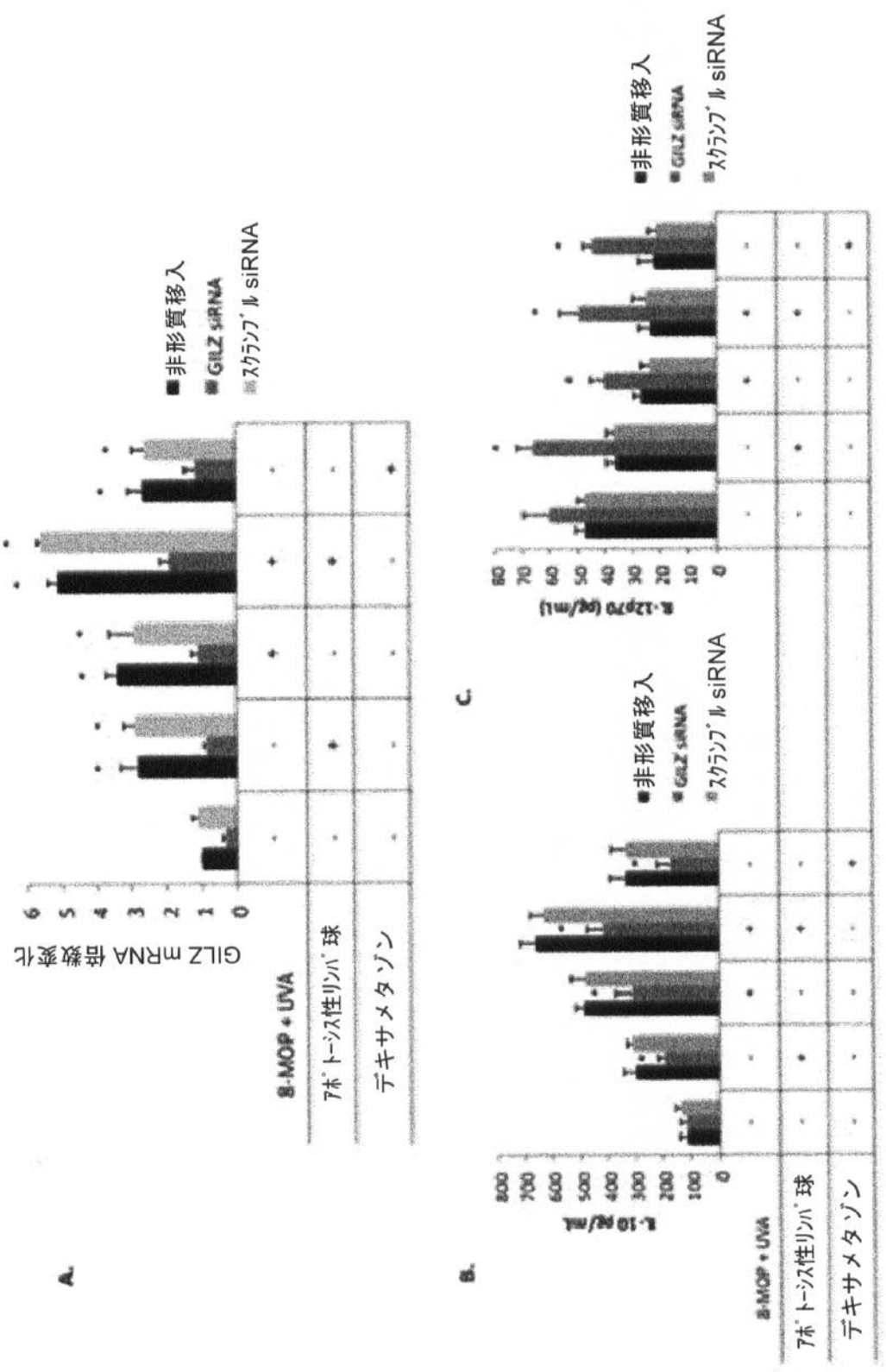
【図１４】

図 14


A.
■IL-10
B.
■IL-12p70 ■IFN-γ
C.
■IL-6 ■TNF-α
D.
■IL-8
E.
■MCP-1 ■MIP-1β ■RANTES
pg/ml
8-MOP + UVA
プボトーシス性リンパ球
デキサメタゾン

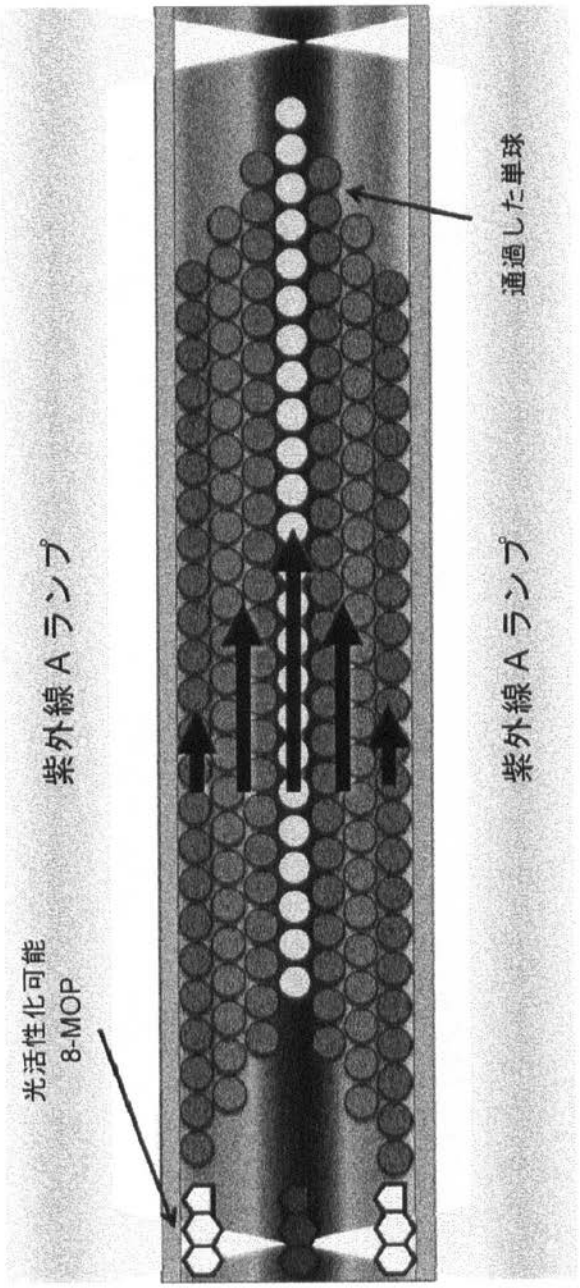
【図１５】

図 15


A.
GILZ mRNA 倍数変化
8-MOP + UVA
アポトーシス性リンパ球
デキサメタゾン
非形質移入
GILZ siRNA
スクランブル siRNA
B.
IL-10 pg/mL
C.
IL-12p70 (pg/mL)

【図１６】

図 16



【図１７】

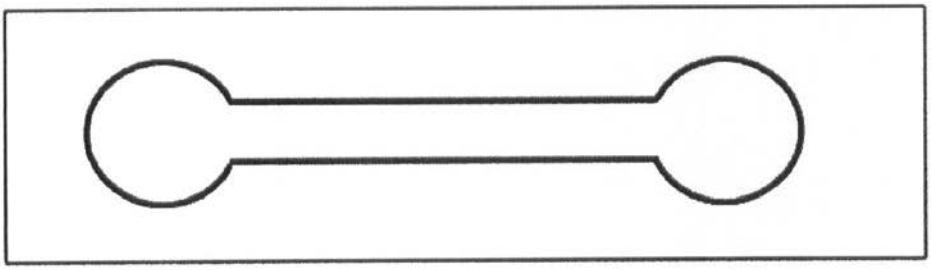
図 17



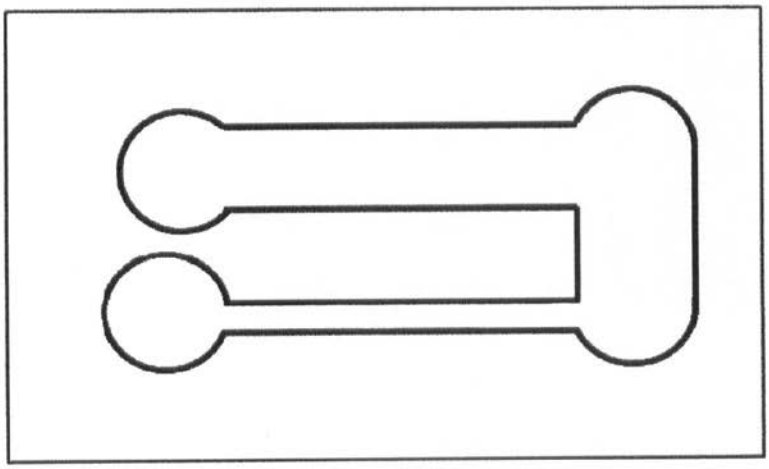
【図１８ａｂ】

図 18

a)



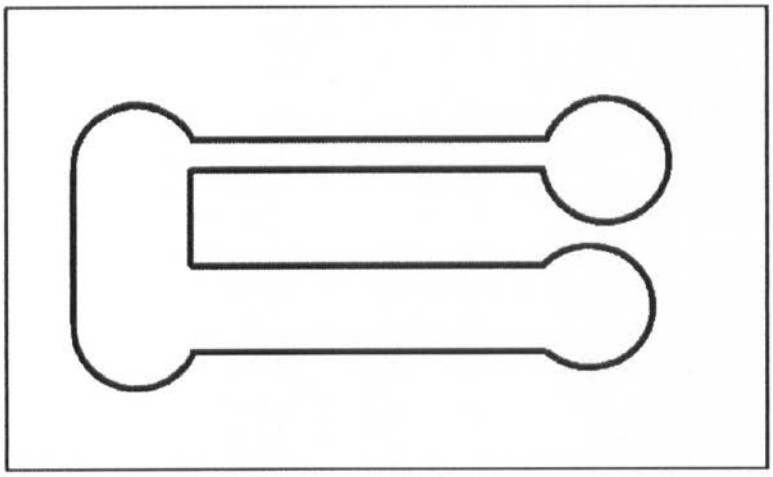
b)



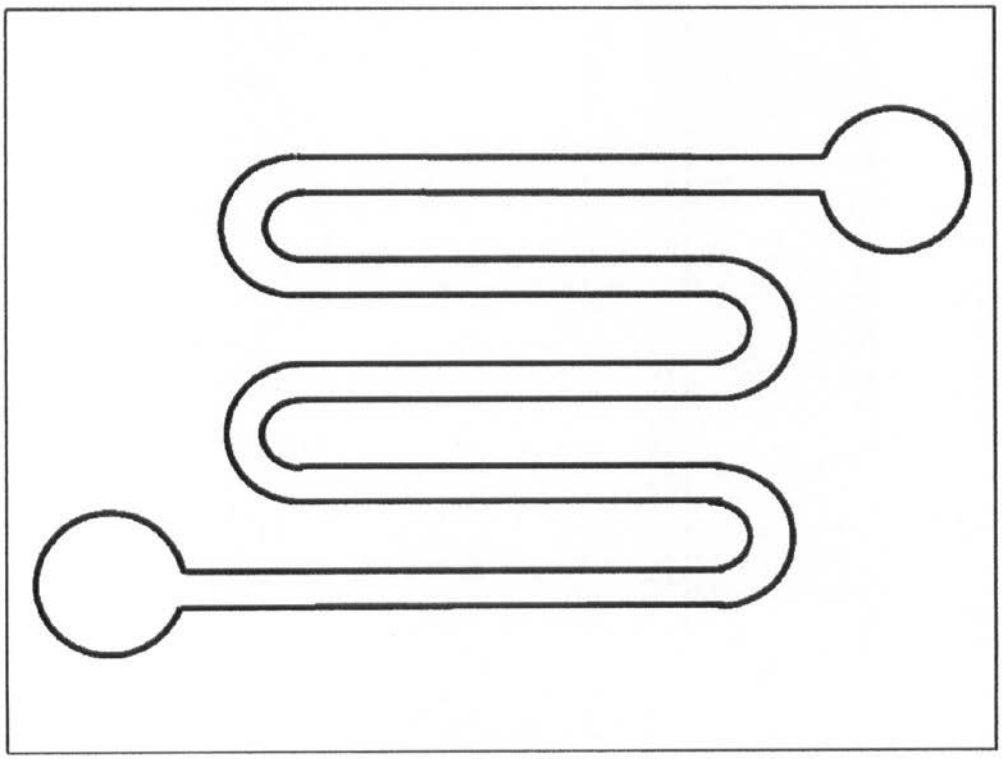
【図１８ｃｄ】

図 18 続き

c)



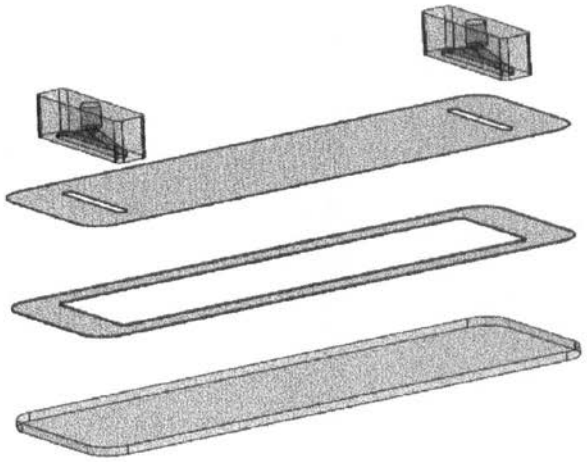
d)



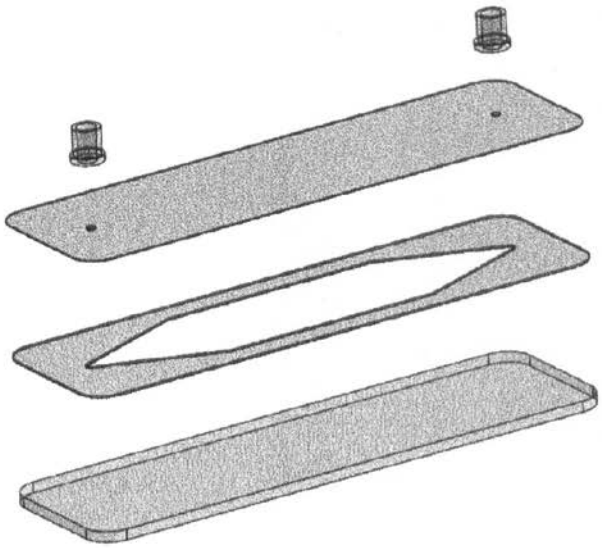
【図１９】

図 19

A)

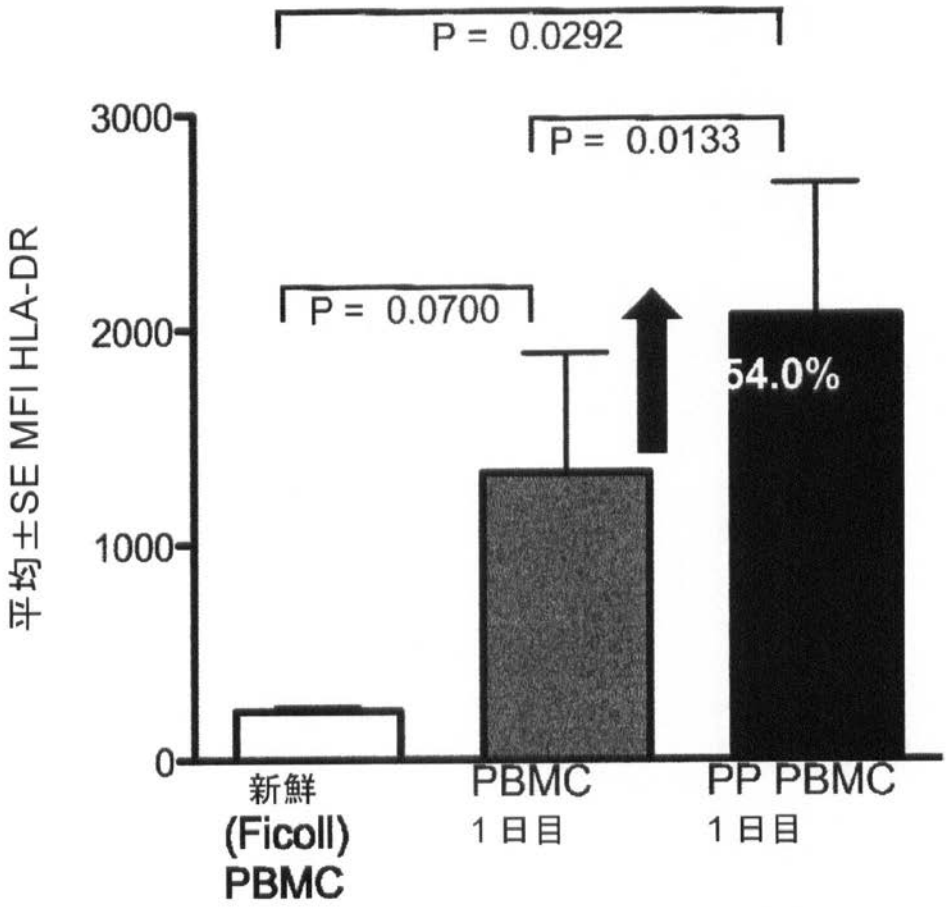


B)



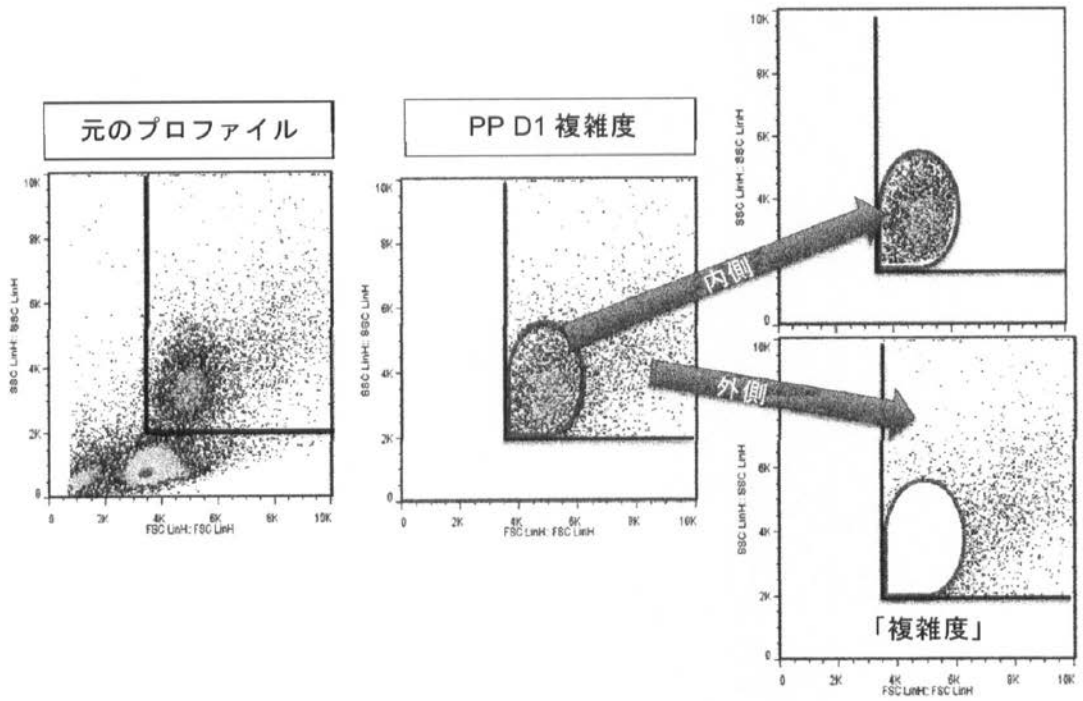
【図２０】

図 20


P = 0.0292
P = 0.0133
P = 0.0700
3000
2000
1000
0
平均±SE MFI HLA-DR
54.0%
新鮮
(Ficoll)
PBMC
PBMC
1日目
PP PBMC
1日目

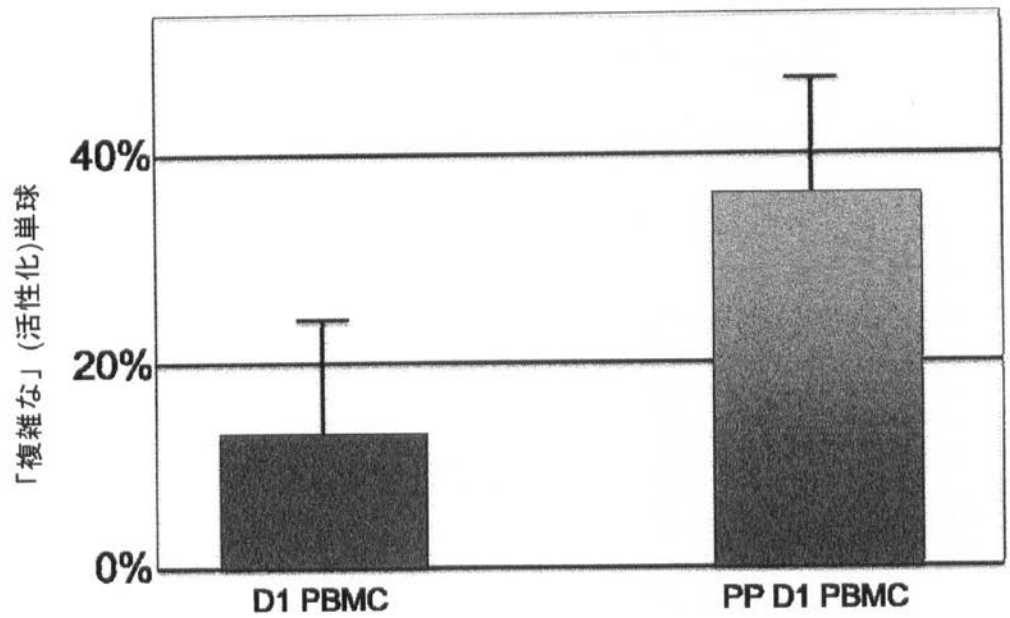
【図２１】

図 21



【図２２】

図 22



【図２３】

図 23

	HLA-DR	CD86	ICAM-1	PLAUR	FSC/SSC 複雑度
新鮮(Ficoll)PBMC	0	0	0	0	0
D1 PBMC	++	0	++	++	+
PP D1 PBMC	+++	+	++++	++++	+++
未成熟 Fast DC	++++	+++	++	-	?

【配列表】
2016509474000001.app
【手続補正書】
【提出日】平成27年9月11日(2015.9.11)
【手続補正１】
【補正対象書類名】特許請求の範囲
【補正対象項目名】全文
【補正方法】変更
【補正の内容】
【特許請求の範囲】
【請求項１】
哺乳動物対象から得られた体外量の血液試料に含有される単球の免疫抑制抗原提示細胞への分化を誘導するための方法であって、
ａ）前記単球が活性化され、少なくとも１つの分子マーカーによって同定可能である免疫抑制抗原提示細胞に分化するように誘導されるように、前記哺乳動物対象から得られた体外量の血液試料を物理的な力に供するステップであって、前記少なくとも１つの分子マーカーが免疫抑制抗原提示細胞の指標であるステップ
を少なくとも含む方法。
【請求項２】
前記免疫抑制抗原提示細胞がＧＩＬＺ、ＩＤＯ、ＫＭＯ、および／またはＩＬ－１０の発現の増加によって同定可能である免疫抑制樹状細胞である、
請求項１に記載の方法。
【請求項３】
前記免疫抑制抗原提示または樹状細胞がＩＬ－１０対ＩＬ－１２ｐ７０比のＧＩＬＺ誘導増加によって同定可能である、
請求項１または２に記載の方法。
【請求項４】
前記免疫抑制抗原提示または樹状細胞が免疫賦活抗原提示または樹状細胞の指標である少なくとも１個、２個、３個、４個、５個、６個、７個、８個、９個、１０個、１５個、２０個、２５個、３０個、３５個、４０個、４５個、５０個、５５個または６０個の分子マーカーの発現を決定するステップによって同定可能である、
請求項１から３のいずれかに記載の方法。

【請求項５】
下記表１から選択可能である前記少なくとも１個、２個、３個、４個、５個、６個、７個、８個、９個、１０個、１５個、２０個、２５個、３０個、３５個、４０個、４５個、５０個、５５個または６０個の分子マーカーが発現の増加を示さない、
請求項１から４のいずれかに記載の方法。

【表１】

表１

番号	マーカー	NCBI 遺伝子番号	mRNA REF	配列番号
1	ABCA1	19	NM_005502.3	1
2	ACVR1B	91	NM_004302.4	2
3	ANPEP	290	NM_001150.2	3
4	AQP9	366	NM_020980.3	4
5	ATP6V0B	533	NM_001039457.1	5
6	BASP1	10409	NM_001271606.1	6
7	BEST1	7439	NM_001139443.1	7
8	CD63	967	NM_001257389.1	8
9	CD68	968	NM_001040059.1	9
10	CDCP1	64866	NM_022842.3	10
11	CPM	1368	NM_001005502.2	11
12	CRK	1398	NM_005206.4	12
13	CSF2RA	1438	NM_001161529.1	13
14	CTNND1	1500	NM_001085458.1	14
15	CTSB	1508	NM_001908.3	15
16	CXCL16	58191	NM_001100812.1	16
17	EMP1	2012	NM_001423.2	17
18	ENG	2022	NM_000118.2	18
19	EPB41L3	23136	NM_012307.2	19
20	FLOT1	10211	NM_005803.2	20
21	GNA15	2769	NM_002068.2	21
22	GPNMB	93695	NM_053110.4	22
23	GPR137B	83924	NM_031999.2	23
24	GPR157	269604	NM_177366.3	24
25	HEXB	3074	NM_000521.3	25
26	HOMER3	9454	NM_001145721.1	26
27	ICAM1	3383	NM_000201.2	27
28	IL1R1	3554	NM_000877.2	28
29	IRAK1	3654	NM_001025242.1	29
30	ITGA5	3678	NM_002205.2	30
31	ITGB8	3696	NM_002214.2	31
32	KCTD11	147040	NM_001002914.2	32
33	LAMP2	3920	NM_001122606.1	33
34	LEPROT	54741	NM_001198681.1	34
35	LGALS3	3958	NM_001177388.1	35
36	LILRB4	11006	NM_001081438.1	36
37	MARCKSL1	65108	NM_023009.6	37
38	MCOLN1	57192	NM_020533.2	38
39	MFAP3	4238	NM_001135037.1	39
40	MGAT4B	11282	NM_014275.4	40
41	MR1	3140	NM_001194999.1	41
42	MRAS	22808	NM_001085049.2	42
43	MSR1	4481	NM_002445.3	43
44	NEU1	4758	NM_000434.3	44
45	NPC1	4864	NM_000271.4	45
46	OLR1 (LOX1)	4973	NM_001172632.1	46
47	OMG	4974	NM_002544.4	47
48	P2RX4	5025	NM_001256796.1	48
49	PI4K2A	55361	NM_018425.2	49
50	PLAUR	5329	NM_001005376.2	50
51	PMP22	5376	NM_000304.2	51
52	PPAP2B	8613	NM_003713.4	52
53	PSEN1	5663	NM_000021.3	53
54	PVRL2	5819	NM_001042724.1	54
55	RAB13	5872	NM_002870.2	55
56	RAB8B	51762	NM_016530.2	56
57	RAB9A	9367	NM_001195328.1	57

58	RALA	5898	NM_005402.3	58
59	RHEB	6009	NM_005614.3	59
60	RNASE1	6035	NM_002933.4	60
61	SC5DL	6309	NM_001024956.2	61
62	SDC2	6383	NM_002998.3	62
63	SEMA6B	10501	NM_032108.3	63
64	SIRPA	140885	NM_001040022.1	64
65	SLC17A5	26503	NM_012434.4	65
66	SLC1A4	6509	NM_001193493.1	66
67	SLC22A4	6583	NM_003059.2	67
68	SLC31A1	1317	NM_001859.3	68
69	SLC35E3	55508	NM_018656.2	69
70	SLC39A6	25800	NM_001099406.1	70
71	SLC6A6	6533	NM_001134367.1	71
72	SLC6A8	6535	NM_001142805.1	72
73	SLC7A11	23657	NM_014331.3	73
74	STX3	6809	NM_001178040.1	74
75	STX6	10228	NM_005819.4	75
76	TM9SF1	10548	NM_001014842.1	76
77	TMBIM1	64114	NM_022152.4	77
78	TMEM33	55161	NM_018126.2	78
79	TNFRSF10B	8795	NM_003842.4	79
80	TNFRSF11A	8792	NM_001270949.1	80
81	TNFRSF1A	7132	NM_001065.3	81
82	TNFRSF1B	7133	NM_001066.2	82
83	TNFSF14	8740	NM_003807.3	83
84	TNFSF9	8744	NM_003811.3	84
85	TRIP10	9322	NM_004240.2	85
86	TRIP6	7205	NM_003302.2	86
87	YKT6	10652	NM_006555.3	87
88	DC-LAMP (LAMP3)	27074	NM_014398.3	88
89	CLEC5A	23601	NM_013252.2	89
90	SPC2 (PCSK2)	5126	NM_002594.3	90
91	THBS1	7057	NM_003246.2	91
92	CD14	929	NM_000591.3	92
93	CD40	958	NM_001250.4	93
94	CD80	941	NM_005191.3	94
95	CCR7	1236	NM_001838.3	95
96	CD83	9308	NM_001251901.1	96
97	ADAM デシシン	27299	NM_014479.3	97
98	FPRL2 (FPR3)	2359	NM_002030.3	98
99	CD86	942	NM_006889.4	99

【請求項６】

前記少なくとも１個、２個、３個、４個、５個、６個、７個、８個、９個、１０個、１５個、２０個、２５個、３０個、３５個、４０個、４５個、５０個、５５個または６０個の分子マーカーがＰＬＡＵＲ、ＮＥＵ１、ＣＴＳＢ、ＣＸＣＬ１６、ＩＣＡＭ１、ＭＳＲ１、ＯＬＲ１、ＳＩＲＰＡ、ＴＮＦＲＳＦ１Ａ、ＴＮＦＳＦ１４、ＴＮＦＳＦ９、ＰＭＢ２２、ＣＤ４０、ＬＡＭＰ３、ＣＤ８０、ＣＣＲ７、ＬＯＸ１、ＣＤ８３、ＡＤＡＭデシシン、ＦＰＲＬ２、ＧＰＮＭＢおよび／またはＣＤ８６を含む、

請求項５に記載の方法。

【請求項７】

前記単球が、サイトカインおよび／またはケモカインを含む分子カクテルの添加を必要とせずに活性化され、前記免疫抑制抗原提示または樹状細胞に分化するように誘導される、

請求項１から６のいずれかに記載の方法。

【請求項８】

前記哺乳動物対象から得られた体外量の血液試料が、前記哺乳動物対象から得られた血液試料内に含有される前記単球に剪断力が適用されるようにデバイスのフローチャンバーを通る前記哺乳動物対象から得られた体外量の血液試料の流速の固定または調節可能な調整を可能にする前記デバイスの前記フローチャンバーに、前記哺乳動物対象から得られた体外量の血液試料を通すことによって物理的な力に供される、
請求項１から７のいずれかに記載の方法。
【請求項９】
前記哺乳動物対象から得られた体外量の血液試料が、前記哺乳動物対象から得られた血液試料内に含有される前記単球に剪断力が適用されるようにデバイスのフローチャンバーを通る前記哺乳動物対象から得られた体外量の血液試料の流速の調整を可能にする前記デバイスの前記フローチャンバーに、前記哺乳動物対象から得られた体外量の血液試料を通すことによって物理的な力に供され、
前記デバイスが温度および露光を含む群から選択される少なくとも１つのパラメーターの調整を追加的に可能にする、
請求項１から８のいずれかに記載の方法。
【請求項１０】
前記単球が、活性化血小板および／または血漿構成成分との相互作用を通じて活性化され、免疫抑制抗原提示または樹状細胞に分化するように誘導される、
請求項１から９のいずれかに記載の方法。
【請求項１１】
前記単球の活性化および免疫抑制抗原提示または樹状細胞への分化が、フローチャンバーの設計および寸法、単球がフローチャンバーを通る流速、８－ＭＯＰなどのＤＮＡ架橋剤の存在または非存在下で単球が曝露される光、単球、血小板、血小板由来因子および／もしくは血漿構成成分がフローチャンバーを通る温度、単球、血小板、血小板由来因子および／もしくは血漿構成成分がフローチャンバーを通る順序、血漿構成成分がフローチャンバーの表面にコートされる密度、血小板および／もしくは血小板由来因子がフローチャンバーの表面およびもしくは血漿構成成分に接着する密度、ならびに／または単球が血小板および／もしくは血小板由来因子に接着する、およびもしくは血漿構成成分がフローチャンバーの表面に接着する密度によって影響を受け得る、
請求項１から１０のいずれかに記載の方法。
【請求項１２】
ａ）少なくとも単球を含む前記哺乳動物対象から得られた体外量の血液試料を、前記哺乳動物対象から得られた体外量の血液試料が通ることができるフローチャンバーを提供するように構成されているデバイスに適用するステップ、
ｂ）前記哺乳動物対象から得られた体外量の血液試料内に含まれ得る、または少なくとも単球を含む前記哺乳動物対象から得られた血液試料から分離されて提供され得る血小板を活性化するステップ、
ｃ）前記単球がステップｂ）において得られた前記活性化血小板に結合することによって活性化され、免疫抑制抗原提示または樹状細胞に分化するように誘導されるように前記哺乳動物対象から得られた体外量の血液試料内に含有される単球に物理的な力を適用することによって、少なくとも単球を含む前記哺乳動物対象から得られた体外量の血液試料を前記デバイス中で処置するステップ
を少なくとも含む、
請求項１から１１のいずれかに記載の方法。
【請求項１３】
ａ）少なくとも単球を含む前記哺乳動物対象から得られた体外量の血液試料を、前記哺乳動物対象から得られた体外量の血液試料が通ることができるフローチャンバーを提供するように構成されているデバイスに適用するステップ、
ｂ）前記哺乳動物対象から得られた体外量の血液試料内に含まれ得る、または前記哺乳動物対象から得られた血液試料から分離されて提供され得る血漿構成成分を通すステップ、

ｃ）前記単球がステップｂ）において得られた前記血漿構成成分に結合することによって活性化され、免疫抑制抗原提示または樹状細胞に分化するように誘導されるように前記哺乳動物対象から得られた体外量の血液試料内に含有される単球に物理的な力を適用することによって、少なくとも単球を含む前記哺乳動物対象から得られた体外量の血液試料を前記デバイス中で処置するステップ
を少なくとも含む、
請求項１から１１のいずれかに記載の方法。
【請求項１４】
ａ）少なくとも単球を含む前記哺乳動物対象から得られた体外量の血液試料を、前記哺乳動物対象から得られた体外量の血液試料が通ることができるフローチャンバーを提供するように構成されているデバイスに適用するステップ、
ｂ）前記哺乳動物対象から得られた体外量の血液試料内に含まれ得る、または前記哺乳動物対象から得られた血液試料から分離されて提供され得る血漿構成成分を通すステップ、
ｃ）前記哺乳動物対象から得られた体外量の血液試料内に含まれ得る、または少なくとも単球を含む前記哺乳動物対象から得られた血液試料から分離されて提供され得る血小板を活性化するステップ、
ｄ）前記単球がステップｂ）およびｃ）において得られた前記活性化血小板および／または前記血漿構成成分に結合することによって活性化され、免疫抑制抗原提示または樹状細胞に分化するように誘導されるように前記哺乳動物対象から得られた体外量の血液試料内に含有される単球に物理的な力を適用することによって、少なくとも単球を含む前記哺乳動物対象から得られた体外量の血液試料を前記デバイス中で処置するステップ
を少なくとも含む、
請求項１から１１のいずれかに記載の方法。
【請求項１５】
前記哺乳動物対象から得られた体外量の血液試料がアフェレーシスによって得られない、
請求項１２から１４のいずれかに記載の方法。
【請求項１６】
前記哺乳動物対象から得られた体外量の血液試料が前記哺乳動物対象の体外全血の約１０ｍｌから約５００ｍｌの間である、
請求項１５に記載の方法。
【請求項１７】
前記哺乳動物対象から得られた体外量の血液試料が前記哺乳動物対象から得られた体外全血の約１０ｍｌから約５００ｍｌから白血球を単離することによって得られる、
請求項１５または１６に記載の方法。
【請求項１８】
前記哺乳動物対象から得られた体外量の血液試料が前記哺乳動物対象から得られた体外全血の約１０ｍｌから約５００ｍｌからバフィーコートを単離することによって得られる、
請求項１５から１７のいずれかに記載の方法。
【請求項１９】
前記哺乳動物対象から得られた体外量の血液試料が血漿構成成分を含まない、
請求項１５から１８のいずれかに記載の方法。
【請求項２０】
前記哺乳動物対象から得られた体外量の血液試料が血小板を含まない、
請求項１５から１９のいずれかに記載の方法。
【請求項２１】
前記血小板が、前記哺乳動物対象から得られた体外量の血液試料が前記デバイスに適用される前に前記哺乳動物対象から得られた体外量の血液試料から分離されている、
請求項２０に記載の方法。

【請求項２２】
前記哺乳動物対象から得られた体外量の血液試料がアフェレーシスによって得られる、請求項１２から１４のいずれかに記載の方法。
【請求項２３】
前記哺乳動物対象から得られた体外量の血液試料がアフェレーシスによって白血球を単離することによって得られる、
請求項２２に記載の方法。
【請求項２４】
前記哺乳動物対象から得られた体外量の血液試料がアフェレーシスによってバフィーコートを単離することによって得られる、
請求項２２または２３に記載の方法。
【請求項２５】
前記哺乳動物対象から得られた体外量の血液試料が血漿構成成分を含まない、
請求項２２から２４のいずれかに記載の方法。
【請求項２６】
前記哺乳動物対象から得られた体外量の血液試料が血小板を含まない、
請求項２２から２５のいずれかに記載の方法。
【請求項２７】
前記血小板が、前記哺乳動物対象から得られた体外量の血液試料が前記デバイスに適用される前に前記哺乳動物対象から得られた体外量の血液試料から分離されている、
請求項２６に記載の方法。
【請求項２８】
前記フローチャンバーの材料がプラスチックではない、
請求項８から２７のいずれかに記載の方法。
【請求項２９】
前記非プラスチック材料がガラスからなる群から選択される、請求項２８に記載の方法。
【請求項３０】
前記フローチャンバーの材料がプラスチックである、請求項８から２７のいずれかに記載の方法。
【請求項３１】
前記プラスチック材料がアクリル、ポリカーボネート、ポリエーテルイミド、ポリスルホン、ポリフェニルスルホン、スチレン、ポリウレタン、ポリエチレン、テフロン（登録商標）または任意の他の適切な医療グレードプラスチックからなる群から選択される、請求項３０に記載の方法。
【請求項３２】
前記フローチャンバーが光の透過を可能にするように構成されている、請求項８から３１のいずれかに記載の方法。
【請求項３３】
前記フローチャンバーがＵＶ光の透過を可能にするように構成されている、請求項３２に記載の方法。
【請求項３４】
前記血小板の活性化が、前記哺乳動物対象から得られた体外量の血液試料内に含まれる血漿構成成分を、前記血小板の少なくとも一部が前記血漿構成成分と相互作用でき、前記フローチャンバーの表面に固定化されるように前記フローチャンバーの表面に配置することによって達成される、請求項８から３３のいずれかに記載の方法。
【請求項３５】
前記血小板の活性化が、フィブリノーゲン、フィブロネクチンおよびフィブリノーゲンのガンマ構成成分を含む群から選択されるタンパク質を、前記血小板の少なくとも一部が前記タンパク質と相互作用でき、前記フローチャンバーの表面に固定化されるように前記

フローチャンバーの表面に配置することによって達成される、請求項８から３４のいずれかに記載の方法。
【請求項３６】
前記血小板の活性化が、フィブロネクチンを、前記血小板の少なくとも一部が前記フィブロネクチンと相互作用でき、前記フローチャンバーの表面に固定化されるように前記フローチャンバーの表面に配置することによって達成される、請求項３５に記載の方法。
【請求項３７】
前記血小板が、前記フローチャンバーを約０．１から約１０．０ｄｙｎ／ｃｍ^2、好ましくは約０．１から約２．０ｄｙｎ／ｃｍ^{2}の範囲の剪断力下で通される、請求項８から３６のいずれかに記載の方法。
【請求項３８】
血小板の活性化がＰ－セレクチンおよび／またはαＩＩｂ－β３インテグリンの発現によってモニターできる、請求項１０から３７のいずれかに記載の方法。
【請求項３９】
前記単球が、前記活性化血小板に結合できるように前記フローチャンバーを約０．１から約１０．０ｄｙｎ／ｃｍ^{2}の剪断力、好ましくは約０．１から約１．０ｄｙｎ／ｃｍ^{2}の力の下で通ることによって活性化され、免疫抑制抗原提示または樹状細胞に分化するように誘導される、請求項８から３８のいずれかに記載の方法。
【請求項４０】
免疫抑制樹状細胞の形成を可能にするために活性化単球をインキュベートするステップをさらに含む、請求項１から３９のいずれかに記載の方法。
【請求項４１】
個体特異的な機能的成熟的に同期化された免疫抑制抗原提示または樹状細胞を得るための、請求項１から４０のいずれかに記載の方法。
【請求項４２】
前記単球がＧＩＬＺの発現の増加をもたらすためにＤＮＡ架橋剤の存在下でＵＶ光に曝露される、
請求項１から４１のいずれかに記載の方法。
【請求項４３】
前記単球がＧＩＬＺの発現の増加をもたらすために８－ＭＯＰの存在下でＵＶＡ光に曝露される、
請求項４２に記載の方法。
【請求項４４】
免疫抑制自己抗原提示または樹状細胞を得るための、請求項１から４３のいずれかに記載の方法。
【請求項４５】
免疫抑制同種抗原提示または樹状細胞を得るための、請求項１から４４のいずれかに記載の方法。
【請求項４６】
自己免疫疾患の処置における使用のための、請求項１から４５のいずれかに記載の方法によって得ることができる免疫抑制自己樹状細胞。
【請求項４７】
自己免疫疾患が、関節リウマチ、乾癬、多発性硬化症、１型糖尿病および全身性エリテマトーデスを含む群から選択される、請求項４６に記載の使用のための免疫抑制自己樹状細胞。
【請求項４８】
過敏性疾患の処置における使用のための、請求項１から４７のいずれかに記載の方法によって得ることができる免疫抑制自己樹状細胞。
【請求項４９】
固形臓器移植における拒絶および／または移植片対宿主病の処置における使用のための

、請求項１から４８のいずれかに記載の方法によって得ることができる免疫抑制同種樹状細胞。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2014/050012

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C12N5/0784 A61K35/15
ADD.

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)
C12N

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

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2011/137365 A1 (UNIV YALE [US]; EDELSON RICHARD LESLIE [US]) 3 November 2011 (2011-11-03)	1-54,56
Y	the whole document -----	55
X	SPISEK RADEK ET AL: "Maturation state of dendritic cells during the extracorporeal photopheresis and its relevance for the treatment of chronic graft-versus-host disease.", TRANSFUSION JAN 2006, vol. 46, no. 1, January 2006 (2006-01), pages 55-65, XP55112614, ISSN: 0041-1132	1-54,56
Y	the whole document -----	55
	-/--	

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C.

[X] 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
2 May 2014	09/05/2014

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Manu, Dominique

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2014/050012

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	BAIRD A H ET AL: "Generation of immature dendritic cells by modified Extracorporeal photophoresis", JOURNAL OF INVESTIGATIVE DERMATOLOGY, vol. 130, no. Suppl. 1, April 2010 (2010-04), page S136, XP55112893, & ANNUAL MEETING OF THE SOCIETY-FOR-INVESTIGATIVE-DERMATOLOGY; ATLANTA, GA, USA; MAY 05 -08, 2010 ISSN: 0022-202X	1-52,56
Y	abstract	55

A	BERGER CAROLE ET AL: "Rapid generation of maturationally synchronized human dendritic cells: contribution to the clinical efficacy of extracorporeal photochemotherapy.", BLOOD 2 DEC 2010, vol. 116, no. 23, 2 December 2010 (2010-12-02), pages 4838-4847, XP55112768, ISSN: 1528-0020 the whole document	1-14, 28-56

A	KHALIL D ET AL: "Conversion of monocytes to dendritic cells by platelet signaling", JOURNAL OF INVESTIGATIVE DERMATOLOGY, vol. 132, no. Suppl. 1, May 2012 (2012-05) , page S101, XP55113116, & 75TH ANNUAL MEETING OF THE SOCIETY-FOR-INVESTIGATIVE-DERMATOLOGY; RALEIGH, NC, USA; MAY 09 -12, 2012 abstract	1-14, 28-56

A	DURAZZO T S ET AL: "Platelet induction of monocyle-to-dendritic cell maturation", JOURNAL OF INVESTIGATIVE DERMATOLOGY, vol. 130, no. Suppl. 1, April 2010 (2010-04), page S121, XP55113123, & ANNUAL MEETING OF THE SOCIETY-FOR-INVESTIGATIVE-DERMATOLOGY; ATLANTA, GA, USA; MAY 05 -08, 2010 ISSN: 0022-202X abstract	1-14, 28-56

Y	HU JIM ET AL: "Tolerogenic dendritic cells and their potential applications.", IMMUNOLOGY MAR 2011, vol. 132, no. 3, March 2011 (2011-03), pages 307-314, XP55112839, ISSN: 1365-2567 cited in the application the whole document	55

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/EP2014/050012

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2011137365 A1	03-11-2011	AU 2011245180 A1	15-11-2012
		CA 2797965 A1	03-11-2011
		EP 2563425 A1	06-03-2013
		US 2010267137 A1	21-10-2010
		US 2013323710 A1	05-12-2013
		WO 2011137365 A1	03-11-2011

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			FI			テーマコード（参考）
Ａ６１Ｐ	*17/06*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	17/06		
Ａ６１Ｐ	*25/00*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	25/00		
Ａ６１Ｐ	*3/10*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	3/10		
Ａ６１Ｐ	*17/00*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	17/00		
Ｃ１２Ｎ	*15/09*	*(2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/00	Ａ	

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,JP,KE,KG,KN,KP,KR,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US

(74)代理人 100104282
弁理士 鈴木 康仁
(72)発明者 ヘンコ，カーステン
ドイツ国 ４０６２９ デュッセルドルフ アム ティーフェンベルク ２７
(72)発明者 バウアー，ギュンター
ドイツ国 ２４６４０ シュマルフェルト アム アルテンホーフ ２３
(72)発明者 ダックワース，ジャスティン
イギリス国 ケーティー１３ ８エックスビー ウェイブリッジ サリー メイフィールド ロード ２８
(72)発明者 ヘイデイ，エイドリアン
イギリス国 ビーアール６ ９ディーアール オーピントン ケント ゴッディントン レーン １３
(72)発明者 エーデルソン，リチャード
アメリカ合衆国 コネチカット州 ０６８８０，ウェストポート コーリータウン ロード ７６
(72)発明者 ティゲラー，ロバート
アメリカ合衆国 コネチカット州 ０６５１２，ニュー ヘイブン モリス コーブ ロード ７６
(72)発明者 ジラルディ，マイケル
アメリカ合衆国 コネチカット州 ０６４４３，マディソン ケルシー スプリングス ドライブ ３５

Ｆターム(参考) 4B024 AA01 CA04 CA09 CA11 CA12 CA20 HA12
4B065 AA90X AC20 CA44
4C087 AA01 AA02 BB34 BB63 NA14 ZA02 ZA89 ZB07 ZB08 ZB15
ZC35