明　細　書

発明の名称 ： 単球またはＮＫ細胞を入手する方法

技術分野

[0001] 本発明は、免疫細胞療法に利用し得る細胞を末梢血から分離し、増殖させる方法に関し、より詳細には、単球またはＮＫ細胞を末梢血から分離し、増殖させる方法に関する。

背景技術

[0002] 免疫細胞療法であるＮＫ療法および単球由来の樹状細胞療法は、近年、多くの医療機関において実施されている。獲得免疫を利用する樹状細胞療法および自然免疫を利用するＮＫ療法は、その利点から組合せ療法として適用される場合も多い。

[0003] これまで、上記組合せ療法の場合、樹状細胞およびＮＫ細胞は、独立した血液から得られている。後ほど樹状細胞に分化させる単球は、アフェレーシス（成分採血）によって成分採取される。一方で、ＮＫ細胞は、末梢血から採取され、増殖される。したがって、上記組合せ療法には一般的に２回の採血が必要である。

先行技術文献

非特許文献

[0004] 非特許文献1：Castiello et al., Cancer Immunol. Immunother., 60: 457-466, 2011.

非特許文献2：Zamai et al., J. Immunol., 178: 4011-4016, 2007.

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0005] しかし、一方の採血（特にアフェレーシス）だけでも患者に負担をかけるため、両方の採血を行えば、患者に対する身体的な負担はさらに増大する。よって、免疫細胞療法において、患者にとってより負担の少ない、単球およびＮＫ細胞を得るための他の方法が求められている。

[0006] よって、このような課題に鑑みて、本発明の目的は、患者の負担を軽減しつつ、免疫細胞療法に利用可能な十分な数の免疫系細胞を提供することである。

課題を解決するための手段

[0007] 上記課題を解決するために、本発明に係る方法は、単球またはＮＫ細胞を入手する方法であって、

末梢血から、単球の表面マーカーに特異的な抗体を用いて単球を分離して、単球サンプルを回収する工程と、

単球を分離した後の細胞集団を、ＮＫ細胞サンプルとして回収する工程と、

上記単球サンプルまたはＮＫ細胞サンプルを培養して、単球またはＮＫ細胞を増殖させる工程とを包含している。

発明の効果

[0008] 本発明によれば、患者の負担を軽減しつつ、免疫細胞療法に利用可能な十分な数の免疫系細胞を提供することができる。

図面の簡単な説明

[0009] [図1]末梢血から単球が選択的に分離されていることを確認したＦＡＣＳ解析の結果を示す図である。

[図2]単球を選択的に分離した後のサンプルにＮＫ細胞が含まれていることを確認したＦＡＣＳ解析の結果を示す図である。

[図3]本発明に係る培養方法および従来の培養方法にしたがって増殖させた単球、および当該単球から分化した樹状細胞の細胞数の経時的変化を示す図である。

[図4]本発明に係る培養方法および従来の培養方法にしたがって増殖させたＮＫ細胞の細胞数の経時的変化を示す図である。

[図5]単球が増殖している（３日目）ことを確認したＦＡＣＳ解析の結果を示す図である。

[図6]樹状細胞が増殖していることを確認したＦＡＣＳ解析の結果を示す図で

ある。

[図7]ＮＫ細胞が増殖していることを確認したＦＡＣＳ解析の結果を示す図である。

発明を実施するための形態

[0010] 本発明に係る方法は、単球またはＮＫ細胞を入手する方法であって、末梢血から、単球の表面マーカーに特異的な抗体を用いて単球を分離して、単球サンプルを回収する工程と、単球を分離した後の細胞集団を、ＮＫ細胞サンプルとして回収する工程と、上記単球サンプルまたはＮＫ細胞サンプルを培養して、単球またはＮＫ細胞を増殖させる工程とを包含している。

[0011] つまり、本発明に係る方法は、少なくともいずれかを後ほど増殖させることを前提にして、末梢血から単球およびＮＫ細胞を分離することを包含している。したがって、分離して得られる単球およびＮＫ細胞は、免疫細胞療法の実施にとって十分な量である必要はない。本発明に係る方法によれば、少量の末梢血から分離された単球およびＮＫ細胞を増殖させて、免疫細胞療法に利用可能な十分な数の免疫系細胞を提供することが可能である。

[0012] 少量の末梢血から必要な免疫系細胞を分離した後に、免疫細胞療法に利用可能な数まで各細胞を増殖させることを例にして、本発明に係る方法における処理の詳細について以下に説明する。なお、本明細書に使用されるとき、用語“単球サンプル”は、単球を主とする細胞集団を含んでいるサンプルを指す。また、本明細書に使用されるとき、用語“ＮＫ細胞サンプル”は、単球を実質的に含んでいないが、ＮＫ細胞を含んでいる細胞集団のサンプルを指す。

[0013] （末梢血からの単球サンプルおよびＮＫ細胞サンプルの回収）

上述の通り、本発明に係る方法は、末梢血から単球サンプルおよびＮＫ細胞サンプルのそれぞれを分けて回収する工程を包含している。また、上述の通り、当該工程は、単球の表面マーカーに特異的な抗体を用いた単球の選択的な分離を介して実施される。当該抗体は、磁気ビーズなどの担体に結合されている。抗体と結合されている担体を、単球を含んでいるサンプルと混合

した後に、抗体を介して単球と結合している担体を回収することによって、単球サンプルが得られる。代替的な方法として、当該抗体はビオチンによって標識され得る。当該方法では、上記抗体を標識しているビオチンに対するストレプトアビジンの相互作用を利用して、単球を分離し得る。

[0014] ここで、上記抗体の例としては、抗ＣＤ１４抗体および抗ＣＤ１６抗体などが挙げられる。ここに挙げた抗体は一例であり、当該分野に公知の単球の表面マーカーに特異的な種々の抗体が、本発明に係る方法に使用され得る。

[0015] 上述のように抗体および担体を利用して、単球を選択的に分離する方法としては、Stem Cell Technologies社が提供しているRoboSep装置と、RoboSep Human CD14 Positive kitまたはRoboSep negative Human monocyte kitなどとを組み合わせた方法が挙げられる。当該方法は、血液サンプルからの単球の選択的な分離を、ほぼ人間の手を介さずに自動的に実施し得るため、本発明に係る方法にとって好適である。Stem Cell Technologies社は、上記キットの他に、使用する抗体をユーザが選択して、試薬と組み合わせるキットを提供している。したがって、例として挙げた抗体と当該キットとを組み合わせることによって、RoboSep装置を利用して血液サンプルからの単球の分離が可能である。

[0016] なお、RoboSep negative Human NK cell kitまたはRoboSep Human CD56 Positive kitなどとRoboSep装置とを組み合わせることによって、血液サンプルからＮＫ細胞を分離可能である。

[0017] 末梢血は、抗体を用いた単球の選択的な分離の前に、部分的に分離されていることが好ましい。末梢血から単核球画分を分離するフィコール溶液を用いた密度勾配遠心分離によって、末梢血はあらかじめ分離されていることが好ましい。フィコール溶液を用いたこのような密度勾配遠心分離は、免疫細胞療法に用いるＮＫ細胞を得るための一般的な手法であるため、詳細について特に説明しない。

[0018] なお、当該密度勾配遠心分離は、単核球画分を分離した後に、適切な抗体およびサイトカインとともにこの単核球画分を培養して、活性化させたＴリ

ンパ球およびＮＫ細胞を得ることを目的とした一般的な手法である。つまり、本発明に係る方法のように、単球を分離し、かつ増殖させる前に当該密度勾配遠心分離を実施することは、通常には行われていない。

[0019] 本発明に係る方法において、上述のようにして得られた単球サンプルにどの程度の単球が含まれているかを、確認することが好ましい。得られた単球サンプルにおける単球を、所望の細胞数まで増殖させるために必要な培養の日数、および必要に応じて樹状細胞に分化させる培養開始からの日数をあらかじめ知ることができる。単球サンプルに含まれている単球の程度は、公知のフローサイトメーターおよび蛍光標識された抗ＣＤ１４抗体を用いたＦＡＣＳ解析によって確認され得る。使用される抗体は、単球の表面マーカーに特異的な抗体であればよい。よって、例えば、単球を分離するための上述の抗体を、蛍光標識した上で、ＦＡＣＳ解析に使用し得る。

[0020] 後述するように、本発明に係る方法は、得られた単球サンプルおよびＮＫ細胞サンプルを培養して、単球およびＮＫ細胞のそれぞれを選択的に独立して増殖させる。したがって、得られた単球サンプルおよびＮＫ細胞サンプルのそれぞれは、免疫細胞療法に必要な数よりもはるかに少ない数の所望の細胞（単球およびＮＫ細胞のそれぞれ）を含んでいればよい。よって、本発明に係る方法は、わずかな量（例えば２５ｍＬ）の末梢血しか必要としない。つまり、単球の分離において一般的な大量（例えば数百ｍＬ～数Ｌ）の採血を実施しない。このため、本発明に係る方法は、免疫細胞療法において、採血による時間的および身体的な負担を大幅に軽減させる。

[0021] 本明細書において少量の末梢血は、例えば１００ｍＬ以下、好ましくは７５ｍＬ以下、より好ましくは５０ｍＬ以下、最も好ましくは２５ｍＬ以下の末梢血を意味している。採取される血液が少ないほど個体にとっての負担は軽減される。しかし、末梢血中の単球およびＮＫ細胞の数は、個体の身体的な状態に依存して大きく異なるので、採取される個体の状態および必要とされる細胞数にあわせて、採取する末梢血の量は、適宜変更され得る。

[0022] 単球およびＮＫ細胞を分離する末梢血は、単回採取された末梢血、または

複数回に分けて採取された末梢血の混合物であり得る。上述のように必要とされる量が少ないので、本発明に係る方法において、末梢血は通常では単回採取される。

[0023] （単球の増殖）

本発明に係る方法は、回収した単球サンプルに含まれている単球を選択的に増殖させることが好ましい。本発明に係る方法において、単球サンプルは、幹細胞の増殖因子として知られているＦｌｔ－３Ｌを補った単球増殖用培地を用いて培養される。当該培地を用いることによって、後述の実施例に示すように、一般的に行われていなかった単球の増殖が可能になる。

[0024] 上記単球増殖用培地は、単球の維持に使用される公知の培地を基本培地として使用している。上記基本培地は、実施例に示すようにタカラバイオ社などによって市販されているか、市販の製品を部分的に改変した培地であるか、または市販の製品と類似の組成を有している。上記単球増殖用培地は、単球の刺激（増殖、活性化および分化の促進）に使用される公知のサイトカイン（例えばＧＭ－ＣＳＦ）を含み得る。また、上記単球増殖用培地は、好適な公知の抗生物質によって補われ得る。また、上記単球増殖用培地は、単球サンプルを回収した末梢血から分離した血漿（自己血漿）をさらに含み得る。上記単球増殖用培地に対する好適な他の添加物は、単球の維持および樹状細胞への分化に使用される種々の添加物であるので、当業者に公知である。

[0025] Ｆｌｔ－３Ｌは、例えば、５００～５０００ＩＵ／ｍＬ、より好ましくは１０００～４０００ＩＵ／ｍＬ、最も好ましくは２０００ＩＵ／ｍＬの濃度において上記単球増殖用培地に含まれている。ＧＭ－ＣＳＦは、例えば、５００～５０００ＩＵ／ｍＬ、より好ましくは１０００～２５００ＩＵ／ｍＬ、最も好ましくは１０００ＩＵ／ｍＬの濃度において上記単球増殖用培地に含まれている。

[0026] 上記単球サンプルは、上記単球増殖用培地を用いて、任意の期間（所望の量の単球が得られるまで）培養される。上記期間は、得られた単球サンプルに含まれている単球の数に応じて変更される。後述の実施例の場合を例にと

れば、上記期間は、例えば、２５ｍＬの末梢血から単球サンプルが回収された場合に約１４日間である。上記場合の単球サンプルにおける単球は、約１４日間の培養によって例えば約１×１０^{7}細胞まで増殖可能である。

[0027] 以上の記載から明らかなように、本発明に係るＦｌｔ－３Ｌは、上記単球増殖用培地に加えられる添加剤（例えば単球の増殖促進剤）である。また、本発明は、上記単球増殖用培地に加えられる添加剤としての、Ｆｌｔ－３Ｌの使用に関する。

[0028] 後述するように、本発明に係る方法において、培養の途中（例えば培養の３日目）に、単球を樹状細胞に分化させる因子が培養物に加えられ得る。つまり、必ずしも単球のみを、例えば約１×１０^{7}細胞まで増殖させる必要はない。したがってこの場合、単球のみを選択的に培養させる期間は約３日間であり、培養全体の期間は約１４日間である。免疫細胞療法において実際に使用されるのは単球由来の樹状細胞である。よって、本発明に係る方法において、単球を増殖させつつ、実際に使用する樹状細胞に分化させることが好ましい。次の項目において、単球を増殖させつつ、樹状細胞に分化させることについて説明する。

[0029] （樹状細胞への単球の分化）

本発明に係る方法において、樹状細胞への単球の分化は、サイトカインなどをさらに補った上記単球増殖用培地を用いて実施される。単球から未成熟樹状細胞への分化において、上記単球増殖用培地に対してさらに補われるサイトカインは、一般的にＩＬ－４およびＧＭ－ＣＳＦである。未成熟樹状細胞への単球の分化に使用され得るＩＬ－４およびＧＭ－ＣＳＦは、市販されているか、またはＩＬ－４もしくはＧＭ－ＣＳＦをコードしている（組換え）ヒト遺伝子を発現させることによって得られる。

[0030] それから、未成熟樹状細胞は、抗原を含んでいる生物学的材料（例えば、腫瘍細胞（を含んでいる組織片）、腫瘍マーカー、特定の疾患の病巣部片およびウイルス感染細胞など）、または抗原を形成する生物学的材料（例えば、抗原ペプチド、タンパク質（長鎖ペプチド）もしくはその断片、および抗

原核酸など）を用いてパルスされる。パルスを受けた後の未成熟樹状細胞は、サイトカイン、生理活性物質および免疫賦活剤をさらに加えた培地において培養されることによって、成熟樹状細胞へと成熟する。

[0031] 成熟樹状細胞への分化に使用されるサイトカイン、生理活性物質および免疫賦活剤は、例えばＩＬ－１β、ＩＬ－６、ＴＮＦα、ＰＧＥ２および塩化ピシバニール（ＯＫ４３２）などであり、これらはいずれも市販品として入手可能であるか、またはこれらのサイトカインをコードしている（組換え）ヒト遺伝子を発現させることによって得られる。なお、ここでは、成熟樹状細胞への未成熟樹状細胞の分化にとって最適なサイトカイン、生理活性物質および免疫賦活剤の組合せを挙げている。当該分化に必須の組合せは、例えば、ＰＧＥ２およびＯＫ４３２である。

[0032] ＩＬ－１βは、例えば、２～１００ｎｇ／ｍＬ、より好ましくは５～５０ｎｇ／ｍＬ、最も好ましくは１０ｎｇ／ｍＬの濃度において、単球を樹状細胞に分化させるための上記単球増殖用培地に含まれている。ＩＬ－６は、例えば、２００～６０００ＩＵ／ｍＬ、より好ましくは５００～４０００ＩＵ／ｍＬ、最も好ましくは１０００ＩＵ／ｍＬの濃度において、単球を樹状細胞に分化させるための上記単球増殖用培地に含まれている。ＴＮＦαは、例えば、２～１００ｎｇ／ｍＬ、より好ましくは１０～５０ｎｇ／ｍＬ、最も好ましくは２０ｎｇ／ｍＬの濃度において、単球を樹状細胞に分化させるための上記単球増殖用培地に含まれている。ＰＧＥ２は、例えば、０．０５～５μｇ／ｍＬ、より好ましくは０．５～２μｇ／ｍＬ、最も好ましくは１μｇ／ｍＬの濃度において、単球を樹状細胞に分化させるための上記単球増殖用培地に含まれている。塩化ピシバニールは、例えば、０．００５～１０ＫＥ、より好ましくは０．０５～５ＫＥ、最も好ましくは０．１ＫＥの濃度において、単球を樹状細胞に分化させるための上記単球増殖用培地に含まれている。

[0033] 本発明に係る方法において、２５ｍＬの末梢血から単球サンプルが得られた場合に、上述のように、単球サンプルの培養は約１４日にわたって実施さ

れる。この場合、単球を未成熟樹状細胞に分化させるサイトカインは、例えば培養の３日目に培地に加えられる。上記パルスは例えば培養の１１日目に実施される。パルスの後に成熟樹状細胞への分化を誘導するサイトカインおよび免疫賦活剤が、培地に加えられる。培養の１４日目には、所望の数（例えば1×10^{7}細胞）の樹状細胞が得られる（実施例２－１．を参照）。

[0034] 以上の記載から明らかなように、本発明に係るＦｌｔ－３Ｌは、樹状細胞を得るための培地に加えられる添加剤（例えば樹状細胞の増殖促進剤）である。また、本発明は、樹状細胞を得るための培地に加えられる添加剤としてＦｌｔ－３Ｌを使用することに関する。

[0035] ２５μｍＬの末梢血から単球サンプルが得られた場合を一例として、単球の増殖および分化の期間について説明した。しかし、上述した通り、得られた単球サンプルに含まれている単球の数に応じて、培養の期間は延長または短縮され得る。このような培養の期間の設定は、当業者にとって経験的に知られている事項である。

[0036] 細胞数は、任意の時点において、例えばトリパンブルーを用いてカウントされ得る。また、カウントされた細胞集団に含まれている単球および樹状細胞の割合は、蛍光標識した抗ＣＤ１４抗体（単球）および抗ＣＤ８３抗体（樹状細胞）を用いたＦＡＣＳ解析によって決定され得る。よって、培養および分化の期間のそれぞれは、細胞数および細胞種を決定した各時点において、任意に変更され得る。

[0037] 樹状細胞は、体内の異物（例えばウイルスおよび細菌ならびにこれらの断片）を細胞内に取り込む。それから、樹状細胞は、抗原（上記異物または当該異物の処理物）を他の免疫系の細胞に提示することによって、当該異物に特異的な免疫応答を活性化させる。よって、通常は樹状細胞に異物として認識されない疾患（例えば腫瘍）に特異的な疾患マーカー（例えば腫瘍にとってのＷＴ１）を用いて、単球由来の樹状細胞をパルスすることによって、種々の疾患を処置し得る樹状細胞を入手できる。

[0038] （ＮＫ細胞の増殖）

本発明に係る方法は、回収したＮＫ細胞サンプルに含まれているＮＫ細胞を選択的に増殖させることが好ましい。本発明に係る方法において、ＮＫ細胞サンプルは、ＮＫ細胞の表面マーカーを認識する抗ＣＤ５６抗体を補ったＮＫ細胞増殖用培地を用いて培養される。当該培地を用いることによって、後述の実施例に示すように、ＮＫ細胞サンプル（単球を分離した残りの細胞集団）におけるＮＫ細胞を選択的に増殖可能である。

[0039] 一般的に、免疫細胞療法に使用されるＮＫ細胞は、ＮＫ細胞の分化、成熟、活性化および増殖を誘導するサイトカイン（ＩＬ－２、ＩＬ－１２およびＩＬ－１５）を含んでいる培地を用いて、末梢血由来の単核球画分を培養することによって増殖する。しかし、このような培地を用いて、本発明に係るＮＫ細胞サンプルを培養したところ、ＮＫ細胞は十分な数まで増殖しなかった（実施例の２－６．を参照）。よって、これまでに知られているＮＫ細胞を増殖させる条件および手法は、本発明に係る方法には適用され得ない。

[0040] 上記ＮＫ細胞増殖用培地は、ＮＫ細胞の増殖に使用される公知の培地を基本培地として使用している。上記基本培地は、実施例に示すようにコージンバイオ社などによって市販されているか、市販の製品を部分的に改変した培地であるか、または市販の製品と類似の組成を有している。上記ＮＫ細胞増殖用培地は、通常のＮＫ細胞の増殖および活性化に使用されるＩＬ－２、ＩＬ－１２およびＩＬ－１５を含み得る。また、ここまでに挙げた添加物以外の上記ＮＫ細胞増殖用培地に対する添加物は、上述のようなこれまでに知られているＮＫ細胞を増殖させる条件および手法を通じて当業者にとって公知である。

[0041] 抗ＣＤ５６抗体は、例えば、１～２００μｇ／ｍＬ、より好ましくは１０～１５０μｇ／ｍＬ、最も好ましくは８０μｇ／ｍＬの濃度において、ＮＫ細胞を増殖させ、活性化させるための上記ＮＫ増殖用培地に含まれている。なお、以上において抗ＣＤ５６抗体を培地に対して直接的に添加すると説明したが、任意の支持体（例えば、プラスチックフラスコおよびディッシュ）に固定した抗ＣＤ５６抗体（固相化されている抗ＣＤ５６抗体）を使用し得

る。固相化する場合、上記濃度範囲は、使用する培地の量に対する抗ＣＤ５６抗体の使用量を示す。ＩＬ－２は、例えば、１００～３０００ＩＵ／ｍＬ、より好ましくは１０００～２０００ＩＵ／ｍＬ、最も好ましくは１７５０ＩＵ／ｍＬの濃度において、ＮＫ細胞を増殖させ、活性化させるための上記ＮＫ増殖用培地に含まれている。ＩＬ－１２は、例えば、１００～５０００ＩＵ／ｍＬ、より好ましくは５００～３０００ＩＵ／ｍＬ、最も好ましくは２０００ＩＵ／ｍＬの濃度において、ＮＫ細胞を増殖させ、活性化させるための上記ＮＫ増殖用培地に含まれている。ＩＬ－１５は、例えば、１００～５０００ＩＵ／ｍＬ、より好ましくは５００～３０００ＩＵ／ｍＬ、最も好ましくは２０００ＩＵ／ｍＬの濃度において、ＮＫ細胞を増殖させ、活性化させるための上記ＮＫ増殖用培地に含まれている。

[0042] ＮＫ細胞サンプルは、上述の単球サンプルと同様の期間にわたって培養され得る。例えば、本発明に係るＮＫ細胞サンプルは、上記ＮＫ細胞増殖用培地を用いて約１４日にわたって培養される。約１４日にわたる培養によって、例えばＮＫ細胞は、1×10^{9}細胞まで増殖可能である（実施例の２－３．を参照）。

[0043] 以上の記載から明らかなように、本発明に係る抗ＣＤ５６抗体は、ＮＫ細胞増殖用培地に加えられる添加剤（例えばＮＫ細胞の増殖促進剤）である。また、本発明は、ＮＫ細胞増殖用培地に加えられる添加剤としての、抗ＣＤ５６抗体の使用に関する。

[0044] 培養物における細胞数は、単球と同様にトリパンブルーを用いて培養の間における任意の時点において実施される。このとき、培養物の細胞集団におけるＮＫ細胞の割合は、蛍光標識した抗ＣＤ５６抗体を用いたＦＡＣＳ解析によって決定され得る。

[0045] ＮＫ細胞の通常の役割は、主に腫瘍細胞および感染細胞を攻撃することである。よって、活性化させたＮＫ細胞は、がんおよび感染症の処置に有用である。したがって、腫瘍マーカーを用いたパルスによって樹状細胞を成熟させて、ＮＫ細胞とともに用いれば、がんに対して特に優れた治療効果が見込

まれる。

[0046] また、これまでに説明した通り、本発明に係る方法によれば、免疫細胞療法にとって十分な数のＮＫ細胞および樹状細胞を少量の末梢血から得ることが可能である。よって、患者に対する採血による時間的および身体的な負担を大幅に軽減し得る。特に、免疫細胞療法によるがんの治療において、長期に及ぶ複数回の免疫細胞の投与を必要とする場合が多い。このとき、大量の採血は患者にとって非常な負担であるばかりでなく、患者の状態によっては、採血ができずに治療行為そのものを延期または中止せざるを得なくなる。このように、本発明に係る方法は、継続的な免疫細胞療法の実施を、患者の負担を軽減した上で、容易に実現し得る。

[0047] 本発明に係る方法は、個体（例えばヒト）から採取した血液に含まれている有用な免疫系細胞を分離し、増殖させる方法である。本発明にしたがって得られた単球は、分化させられることによって、免疫細胞療法に使用される樹状細胞を作製する材料である。また、本発明にしたがって得られたＮＫ細胞および樹状細胞は、免疫細胞療法において直接的に使用される細胞（医薬品）である。

[0048] 〔まとめ〕

本発明に係る方法は、単球またはＮＫ細胞を入手する方法であって、

末梢血から、単球の表面マーカーに特異的な抗体を用いて単球を分離して、単球サンプルを回収する工程と、

単球を分離した後の細胞集団を、ＮＫ細胞サンプルとして回収する工程と、

上記単球サンプルまたはＮＫ細胞サンプルを培養して、単球またはＮＫ細胞を増殖させる工程とを包含している。

[0049] また、本発明に係る方法において、単球またはＮＫ細胞を増殖させる上記工程は、上記単球サンプルを、ＦＩｔ－３Ｌを含んでいる第１の培地を用いて培養して、単球を増殖させる工程であることが好ましい。

[0050] また、本発明に係る方法は、上記第１の培地にＧＭ－ＣＳＦおよびＩＬ－

４を加えることによって、単球を増殖させながら、単球を樹状細胞に分化させる工程をさらに包含していることが好ましい。

[0051] また、本発明に係る方法において、単球またはＮＫ細胞を増殖させる上記工程は、上記ＮＫ細胞サンプルを、抗ＣＤ５６抗体またはＩＦＮ－γを含んでいる第２の培地を用いて培養して、ＮＫ細胞を増殖させる工程であることが好ましい。

[0052] また、本発明に係る方法は、単球またはＮＫ細胞を増殖させる上記工程において、上記ＮＫ細胞サンプルを、抗ＣＤ５６抗体またはＩＦＮ－γを含んでいる第２の培地を用いて培養して、ＮＫ細胞をさらに増殖させることが好ましい。

[0053] また、本発明に係る方法において、上記第２の培地は抗ＣＤ５６抗体を含んでいることが好ましい。

[0054] また、本発明に係る方法において、上記第２の培地は、ＩＬ－２、ＩＬ－１２およびＩＬ－１５をさらに含んでいることが好ましい。

[0055] また、本発明に係る方法において、上記末梢血は個体から単回採取されていることが好ましい。

実施例

[0056] 〔１．単回採取の末梢血からの単球およびＮＫ細胞の分離〕

（１－１．単球の選択的な分離およびその確認）

フィコール溶液（ＧＥヘルスケア社）を用いた密度勾配遠心分離（３０分間、９００ｇ、２０℃）によって、健常者から採取した２５ｍＬの末梢血から単球画分を分離した。RoboSep装置（Stem Cell Technologies社）を用いて、得られた単球画分から単球をさらに分離した。この単球画分からの単球の分離において、単球を選択的に分離する試薬として、RoboSep Human CD14 Positive kit（Stem Cell Technologies社）を用いた。単球の選択的な分離における手順および必要な他の試薬のすべてについて、上記試薬に対応しているRoboSep装置の動作プログラム、および付属のユーザマニュアルにしたがった。

[0057] 以上の操作にしたがって得られた試料の一部を、蛍光標識された抗ＣＤ１４抗体（BioLegend社、単球の細胞表面マーカーに対する抗体）と混合した。それから、この混合物に含まれている単球の程度を、BD FACSCalibur（登録商標）フローサイトメーター（日本ＢＤ社）によって調べた。このＦＡＣＳ解析の結果を図１に示す。図１は、ＣＤ１４陽性細胞についてＦＡＣＳ解析した、クワドラントリージョンのヒストグラムを示す図である。図１に示すように、上記試料には、表面にＣＤ１４を発現している単球が主に含まれていることが確認できた。

[0058] （１－２．ＮＫ細胞の存在の確認）

１－１．において得られた単球の残りの細胞集団の一部を、蛍光標識した抗ＣＤ５６抗体（BioLegend社、ＮＫ細胞の細胞表面マーカーに対する抗体）と混合した。それから、この混合物に含まれているＮＫ細胞の程度をBD FACS Calibur（登録商標）フローサイトメーターによって調べた。このＦＡＣＳ解析の結果を図２に示す。図２は、ＣＤ５６陽性細胞についてＦＡＣＳ解析した、クワドラントリージョンのヒストグラムを示す図である。図２に示すように、従来では廃棄されていた細胞集団に、有用なＮＫ細胞が含まれていることが明らかになった。

[0059] 以上のように、単球のみを分離する従来の手法に加えて、これまで廃棄されていた細胞集団をさらに回収することよって、単回の採血によって得られた少量の末梢血から単球およびＮＫ細胞のそれぞれを分けて入手可能であることがわかった。

[0060] 〔２．単球およびＮＫ細胞の増殖〕

（２－１．本発明に係る、単球の増殖および樹状細胞への分化）

１－１．において分離した単球を、増殖させ、それから樹状細胞に分化させた。培養の０～３日目まで、１０００ＩＵ／ｍＬのＧＭ－ＣＳＦ（Miltenyi Biotec社）、２０００ＩＵ／ｍＬのＦｌｔ－３Ｌ（Cellgenix社）、５０ｎｇ／ｍＬのゲンタマイシン、および５％の自己血漿を、X-VIVO-15培地（タカラバイオ社）に補った培地Ａ１を用いて、単球を選択的に増殖させた。３日

目に、培地Ａ１に１０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－４（Miltenyi Biotec社）を加えた（培地Ａ２）。それから、培養を１１日目まで続けることによって、単球を未成熟樹状細胞に分化させた。１１日目に、未成熟樹状細胞を、ＭＵＣ１ペプチド（ThermoFisher社）、または脂質小胞に封入されているＷＴ１などを用いてパルスした。それから、１０ｎｇ／ｍＬのＩＬ－１β（Miltenyi Biotec社）、１０００ＩＵ/ｍＬのＩＬ－６（Miltenyi Biotec社）、１μｇ／ｍＬのＰＧＥ２（Cayman Chemical社）、２０ｎｇ／ｍＬのＴＮＦ－α（Miltenyi Biotec社）、および０．１ＫＥの塩化ピシバニール（中外製薬）を、培地Ａ２に加えた培地Ａ３を用いて、未成熟樹状細胞を成熟樹状細胞に分化させた。以上におけるすべての培養は、５％CO_2存在下の３７℃において実施した。培養の０、３、６、８、１１および１４日目のそれぞれにおける細胞数（細胞数／ｍＬ）を、トリパンブルー染色によって決定した。決定した細胞数の経時的変化を図３に示した。

[0061] 図３（ＦＩｔ－３Ｌ添加）に示すように、培養の１４日後には、０日目において７．４×10^5細胞であった細胞は、１．０５×10^7細胞まで増殖していることが確認できた。以上において単球から分化し、増殖した樹状細胞の数は、１．０５×10^7細胞であった。よって、単回採取の２５ｍＬの末梢血から免疫細胞療法に十分な数の樹状細胞を得ることができた。

[0062] （２－２．増殖させた細胞種の確認）

２－１．の培養の３および１４日目のそれぞれにおいて、増殖している細胞の種類をＦＡＣＳ解析によって確認した。３日目の培養物の一部を、蛍光標識されたＣＤ１４抗体（BioLegend社）を用いて調べた。１４日目の培養物の一部を、蛍光標識された抗ＣＤ１１ｃ抗体（BD社）および蛍光標識された抗ＣＤ８３抗体（eBioscience社）を用いて調べた。すべてのＦＡＣＳ解析を、BD FACSCalibur（登録商標）フローサイトメーター（日本ＢＤ社）を用いて実施した。これらのＦＡＣＳ解析の結果を図５および６に示す。

[0063] 図５に示すように、３日目の培養物には、実質的に単球のみが含まれていることがわかった。図６に示すように、１４日目の培養物には、実質的に成

熟樹状細胞のみが含まれていることがわかった。したがって、２－１．における増殖および分化は、所望の通りに進行していると確認された。

[0064] （２－３．単球を刺激する公知の因子を用いた単球の培養）

２－１．とは別に１－１．の操作をふたたび行って、単球を分離した。この単球を、ＦＩｔ－３Ｌを培地に添加しない点を除いて、２－１．と同じ条件において培養した。この培養の各時点における細胞数を図３に示す。図３（Flt-3L非添加）に示すように、単球の分化を誘導させる一般的なこの方法では、培養の１４日目において２．８×10^6／ｍＬまでしか細胞が増殖しなかった。

[0065] 以上のように、本発明に係る方法では、これまで単球の増殖に作用することが知られていなかった因子を用いることによって、医療用途にとって十分な数の成熟樹状細胞を得ることができた。

[0066] （２－４．ＮＫ細胞の選択的増殖）

１－１．において得られた細胞集団を次のように培養した。培養の０日目において、２００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１２（Miltenyi Biotec社）、２０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５（Cellgenix社）、８０μｇ／ｍＬの抗ＣＤ５６抗体（Biolegend社）、および５％の自己血漿を、KBM502 Medium（コージンバイオ社）（１７５０ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２をあらかじめ含んでいる）に補った培地を用いて、５％CO_2存在下の３８℃において２４時間にわたってリンパ球を活性化させた。それから、５％CO_2存在下の３７℃に、培養条件を変更して、１４日目まで細胞を培養した。培養の０、３、６、８、１１および１４日目のそれぞれにおける細胞数（細胞数／ｍＬ）を、トリパンブルー染色によって決定した。決定した細胞数の経時的変化を図４に示した。

[0067] 図４（IL-2, anti-CD56, IL-12, IL-15）に示すように、培養の１４日後には、０日目において９．６×10^6細胞であった細胞数は、８．８×10^8細胞まで増加していると確認できた。以上において増殖したＮＫ細胞の数は、およそ10^9細胞であった。よって、単回採取の２５ｍＬの末梢血から免疫細胞療法に十分な数のＮＫ細胞を得ることができた。

[0068] （２－５．増殖させた細胞種の確認）

２－４．の培養の１４日目に、増殖している細胞の種類をＦＡＣＳ解析によって確認した。各培養物の一部を、蛍光標識された抗ＣＤ５６抗体（BioLegend社）を用いて調べた。ＦＡＣＳ解析を、BD FACSCalibur（登録商標）フローサイトメーター（日本ＢＤ社）を用いて実施した。このＦＡＣＳ解析の結果を図７に示す。

[0069] 図７に示すように、最終的にＮＫ細胞のみを実質的に含んでいる培養物が得られることが確認された。

[0070] （２－６．ＩＬ－２のみを増殖因子として用いたＮＫ細胞の増殖）

２－４．とは別に１－１．の操作をふたたび行って、ＮＫ細胞を含んでいる細胞集団を得た。この細胞集団を、ＩＬ－２のみを増殖因子として用いる点を除いて、２－４．と同じ条件において培養した。この培養の各時点における細胞数を図４に示す。図４（IL-2）に示すように、この方法では、培養の１４日目において４．６×10^7細胞までしか細胞数が増加しておらず、十分な細胞が得られなかった。

[0071] 以上のことから、末梢血から分離したＮＫ細胞を選択的に増殖させて、所望の程度の数を得るためには、ＩＬ－２だけでは不十分であり、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５および抗ＣＤ５６抗体のいずれかが少なくとも必要なことが明らかであった。

[0072] 本実施例から明らかなように、わずか２５ｍＬの単回採取の末梢血から、免疫細胞療法にとって十分な量の樹状細胞およびＮＫ細胞のそれぞれを得ることができた。よって、検査を目的とする程度の量の末梢血から２種類の有用な免疫系細胞を大量に得ることができる。つまり、本発明に係る方法は、樹状細胞およびＮＫ細胞を用いた免疫細胞療法の有用性を高める（採血を受ける対象にとっての時間的および身体的な負担を大幅に低減させる）ことができる。

[0073] 本発明は、上述した各実施形態および実施例に限定されず、特許請求の範囲に示した範囲における種々の変更が可能であり、異なる実施形態および実

施例にそれぞれ開示された技術的手段を適宜組み合わせて得られる実施形態についても本発明の技術的範囲に含まれる。

産業上の利用可能性

[0074] 本発明は、種々の疾患に対する免疫細胞療法に利用することができる。

請求の範囲

［請求項1］ 単球またはＮＫ細胞を入手する方法であって、

末梢血から、単球の表面マーカーに特異的な抗体を用いて単球を分離して、単球サンプルを回収する工程と、

単球を分離した後の細胞集団を、ＮＫ細胞サンプルとして回収する工程と、

上記単球サンプルおよびＮＫ細胞サンプルのうちの少なくとも一方を培養して、単球またはＮＫ細胞を増殖させる工程とを包含している、方法。

［請求項2］ 単球またはＮＫ細胞を増殖させる上記工程は、上記単球サンプルを、ＦＩｔ－３Ｌを含んでいる第１の培地を用いて培養して、単球を増殖させる工程である、請求項１に記載の方法。

［請求項3］ 上記第１の培地に単球の刺激因子を加えることによって、単球を増殖させながら、単球を樹状細胞に分化させる工程をさらに包含している、請求項２に記載の方法。

［請求項4］ 単球またはＮＫ細胞を増殖させる上記工程は、上記ＮＫ細胞サンプルを、抗ＣＤ５６抗体またはＩＦＮ－γを含んでいる第２の培地を用いて培養して、ＮＫ細胞を増殖させる工程である、請求項１に記載の方法。

［請求項5］ 単球またはＮＫ細胞を増殖させる上記工程において、上記ＮＫ細胞サンプルを、抗ＣＤ５６抗体またはＩＦＮ－γを含んでいる第２の培地を用いて培養して、ＮＫ細胞をさらに増殖させる、請求項２または３に記載の方法。

［請求項6］ 上記第２の培地は抗ＣＤ５６抗体を含んでいる、請求項４または５に記載の方法。

［請求項7］ 上記第２の培地は、ＩＬ－２、ＩＬ－１２およびＩＬ－１５をさらに含んでいる、請求項４～６のいずれか１項に記載の方法。

［請求項8］ 上記末梢血は個体から単回採取されている、請求項１～７のいずれ

か１項に記載の方法。