

平成 30 年 6 月 24 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H03005

研究課題名(和文) 振動miRNA制御を介した高効率血小板放出システムの開発

研究課題名(英文) Development of platelet generation system through waved miRNA regulation

研究代表者

江藤 浩之(ETO, KOJI)

京都大学・iPS細胞研究所・教授

研究者番号：50286986

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,100,000円

研究成果の概要(和文)：血小板産生の親細胞である巨核球が生体骨髄の血管外から血管内に細胞質を出し、血流刺激下に血小板を産生する画像を特殊なベクトル解析によってさらに詳細に再検証した。その結果、血小板産生イベントが持続的に観察される骨髄巨核球の細胞壁に対しては血流中に乱流が起きていることを見出した。この観察結果を実証する新規モデルの培養槽を準備し、乱流概念中のどの物理パラメーターによって、巨核球のリモデリングが制御され、血小板産生が促進されるかのメカニズムの一端を明らかにした。この成果は、乱流刺激が制御する血小板産生機構解明という新規の研究領域を創出した。

研究成果の概要(英文)：We aimed to establish a novel "megakaryocyte maturation / platelet release system" that enables to generate bona fide platelets with the same function as in vivo with high efficiency. Based on the live bone marrow observation of mouse megakaryocytes protruding their cytoplasm into sinusoid blood vessels and producing platelets under blood flow stimulation, we analyzed flow vectors in those images. The results indicated that turbulence in the blood flow are present adjacent to the cell wall of megakaryocytes from which platelet production event is continuously observed. We then prepared a new model culture tank that demonstrated new mechanisms of how turbulence regulates remodeling of megakaryocytes and promotes platelet production. Using this model, we found conditions that enabled to produce 100 billion platelets by 8L-scale tank. These findings led to creating a new research area of a turbulent flow-controlled thrombopoiesis mechanism.

研究分野：幹細胞、再生医療

キーワード：血小板 バイオリクター ずり応力 大量培養 iPS細胞 巨核球

### 1. 研究開始当初の背景

我が国では近年若年層の献血ドナーが急激に減少し、厚生労働省の統計的予測では2027年には輸血必要量の実に1/5が不足し、このままでは患者の救命が困難であるとの報告がされた。血小板は室温保存が必須で採血後72時間しか有効期間が無く、海外からの輸入も不能であるため早期の対応策が急務である。血小板の産生・製造は、すべての血液を生み出す‘多能性造血前駆細胞’から血小板産生前駆細胞‘巨核球’を経て巨核球の細胞質が断片化することで産生される。予想される生体内の血液産生を模倣した培養システムでは、(i)産生巨核球数、(ii)1個当たりの巨核球からの血小板産生数が極度に低効率であった(*J Exp Med*, 2010)。そこで、申請者は先ず‘巨核球’を生体外で大量に増幅させた上で成熟させる全く新しい方法を確立した(*Cell Stem Cell*, 2014)。本法は元細胞(臍帯血 CD34 細胞、あるいはiPS細胞)に遺伝子操作を加えることで‘自己複製’によって数ヶ月に渡り一定した品質で巨核球を増やす事が可能な技術である(imMKCL、不死化タイプの巨核球細胞)。しかし、生体内骨髓環境での産生効率が1個の巨核球で1000~2000個と推測される一方で、生体外培養下の最大産生数は依然として10~30個と低効率であり、生体内環境の欠落がその原因と推測された。

### 2. 研究の目的

生体内に存在する組織幹細胞ニッチの維持・増殖機構の解明を通じた、生体外での人工ニッチ再構成の成功が希求されている。しかし、多くの細胞や組織を生体内と同じ構造・機能を持つ状態で維持・分化成熟させることが実現できずにいる。申請者の生体外製造の標的細胞は、止血機能およびDDS(ドラッグデリバリー)として働く血小板である。本研究は、生体内(骨髓内)血小板産生の場の画像解析から得られる血流・shear速度、生体内血小板産生環境場における細胞外基質特性解析、生体外再構築に資するための材料選定、を通じて、医療機器開発を出口とした“血小板産生を生体外製造する為の機器”の製造に繋がる基盤技術を開発する。

### 3. 研究の方法

- (1) マウス骨髓内部での血小板産生の‘場’をマーキングし、検体分解後の特定細胞外基質の種類と混合比率を蛋白アレーと代謝産物測定に基づく新規の手法によって解明する。
- (2) 静止時、shear 依存的状態での巨核球由来miRNAリストとそれぞれの血小板放出を指標とした標的分子及びその機能メカニズムを明らかにする。
- (3) 2013年に発表したPDMSを基盤とするデバイスを基に、1)2)で明らかにする情報

から細胞外基質材料とその比率を決定し、shear速度を随時変換させながらmiRNA効果を厳密に制御し、血小板放出を最大限に引き出す条件を加味した新規血小板放出製造装置を製造する。また、産生された血小板の機能・安全性試験も実施する。

### 4. 研究成果

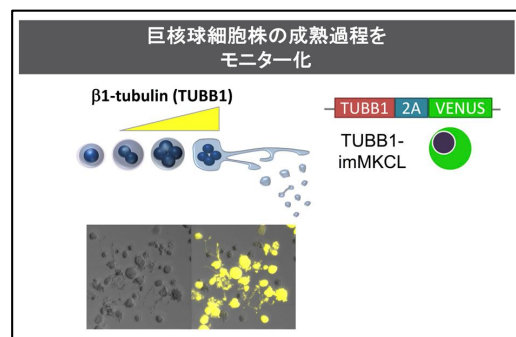
(1) 血小板産生“場”の分子機構解明を達成  
GFP発現巨核球遺伝子改変マウスの骨髓内部を2光子顕微鏡で観察した結果をH27年5月に*Journal of Cell Biology*に発表した(IL-1 induces thrombopoiesis through megakaryocyte rupture in response to acute platelet needs)。この発表論文で使用した解析技術の改良および解析ソフトの開発を通じて定常状態における生体内血小板放出を解析した。その結果、“ずり応力”も関与するものの、“ずり応力”以外の物理法則が血小板放出、血小板産生に寄与していることを示唆するデータを取得した。本データを元に生体外での大型血小板製造用バイオリクターの開発を進めた(*Cell*, 2018年7月)。

### (2) in vitro 培養下血小板産生に寄与するフィーター細胞由来の因子(群)データベースの構築

巨核球成熟に関与するbeta1 tubulin 遺伝子座にvenusレポーターをノックインした巨核球細胞株を作製し、巨核球成熟促進化合物・血小板放出促進化合物のドラッグスクリーニングを実施して新規の薬物、物質のリスト化を達成した(論文投稿中)。

### (3) 巨核球の成熟過程における不均一性の解析およびその解除に向けた方法の開発

上記(2)で作成したbeta1 tubulin venusレポーター巨核球細胞株は、ドキシサイクリン(DOX)非存在培養液条件下におくと、その遺伝子に組み込まれているDOX依存性誘導因子(c-MYC, BMI1, BCL-XL)が発現オフとなって増殖が止まり成熟が促進される。一方、その成熟過程においては特異マーカーTUBB1の発現が上昇し、蛍光タンパク質VENUSの発現強度が経時的に強くなって行くことが観察される。巨核球細胞株が自己複製により細胞増殖する過程でも、一部の細胞において



VENUS が発現することを見出した。そこでこの VENUS 発現を指標に細胞増殖期における巨核球細胞株のクローニングを試みた。その結果、先ず細胞増殖期において既に VENUS の発現が見られる細胞をクローニング培養し、VENUS 発現比率が非常に高い複数のクローン細胞集団を得ることに成功した。次にこの VENUS 発現比率が高い集団を、さらに VENUS の発現強度の高い集団と弱い集団に分けて解析を行ったところ、VENUS 発現が高いサブクローン集団では、巨核球マーカー比率が 98% 以上であることを確認した。また、血小板産生能力も選別以前の不均一な細胞集団に比し、平均で 3 倍以上に改善した。そこで、計画していた Single-cell RNA sequencing (RNA-seq) に関する既存の方法による上記 VENUS high と low での遺伝子発現の差を検証し、下記の別の方法によるクローニング方法によって見出した遺伝子 2 つを含む原因遺伝子候補を同定した。加えて、細胞内部の挙動分子に着目し、京都大学 iPS 細胞研究所の斎藤博英教授が開発した miRNA スイッチ法を導入し、巨核球細胞株はある特定の miRNA に対する反応性において血小板産生能（放出能）が高い集団と低い集団に分離可能なこと、遺伝子発現プロファイルの検証によって、特異的な遺伝子の発現が血小板産生における不均一性の指標になることを見出した。つまり巨核球細胞株のバリデーションに使用可能な指標を見出した。結果をまとめると、[1] 巨核球細胞株の不均一性を呈する原因の一端となる制御機構の発見、[2] miRNA スイッチ法を応用することにより、フローサイトメーターを用いない生物由来原料基準に適合する細胞集団単離技術の開発に繋がる知見を得た。

#### (4)3 年間の総括

本研究課題の目的は、生体内に存在する特定の細胞の特異的ニッチ機構の解明を通じ、生体内と同じ機能をもつ血小板を高効率で放出産生させる“巨核球成熟・血小板放出システム”の構築である。前年まで、物理刺激、特に従来から想定されている shear stress 刺激によって放出されるエクソソーム由来の miRNA が巨核球に働きかけて、巨核球のリモデリングを通じて成熟を促進するとの仮説に基づく検証研究を実施した。しかしながら、miRNA は細胞増殖期の単核巨核球の機能には関与する証拠が得られたが、成熟期の多核巨核球への関与を明らかにできなかった。

そこで最終年度は前年度までの観察結果である、血小板産生の親細胞である巨核球が生体骨髄の血管外から血管内に細胞質を出し、血流刺激下に血小板を産生する画像を、特殊なベクトル解析によってさらに詳細に再検証した。その結果、血小板産生イベントが持続的に観察される骨髄巨核球の細胞壁に対しては血流中に“乱流”が起きていることを見出した。この新たな知見を実証するた

め新規モデルの培養槽を準備し、乱流概念中のどの物理パラメーターによって、巨核球のリモデリングが制御され、血小板産生が促進されるかのメカニズムの一端を明らかにした (Cell, 2018 年 7 月)。この結果、8L スケールの培養槽を用いることで 1000 億個の血小板を産生可能な条件を見出すことに成功した。これらの研究成果は、乱流刺激が制御する血小板産生機構解明という新規の研究領域を創出し、次期基盤研究推進のための新規の提案を行うことに繋がった。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 10 件)

1. Nishimura S\*, Nagasaki M, Kunishima S, Sawaguchi A, Sakata A, Sakaguchi H, Ohmori T, Manabe I, Italiano JE Jr, Ryu T, Takayama N, Komuro I, Kadowaki T, Eto K\*, Nagai R. IL-1 induces thrombopoiesis through megakaryocyte rupture in response to acute platelet needs. *J Cell Biol.* 2015 May 11;209(3):453-66. doi: 10.1083/jcb.201410052  
*\*corresponding author*
2. Karagiannis P, Eto K. Manipulating megakaryocytes to manufacture platelets ex vivo. *J Thromb Haemost.* 2015 Jun;13 Suppl 1:S47-53. doi: 10.1111/jth.12946
3. Fujii T, Sakata A, Nishimura S, Eto K, Nagata S. TMEM16F is required for phosphatidylserine exposure and microparticle release in activated mouse platelets. *Proc Nat Acad Sci. USA.* 2015 Oct 13;112(41):12800-5. doi: 10.1073/pnas.1516594112.
4. Eto K, Kunishima S. Linkage between the mechanisms of thrombocytopenia and thrombopoiesis. *Blood.* 2016 Mar 10;127(10):1234-1241. DOI:http://dx.doi.org/10.1182/blood-2015-07-607903.
5. Suzuki D, Eto K. Progress towards development of a platelet transfusion product employing iPS cells. **臨床血液** 2016 Mar;57(3):308-14. Doi:10.11406/rinketsu.57.308.
6. Karagiannis P, Eto K. Ten years of induced pluripotency: from basic mechanisms to therapeutic applications. *Development.* 2016 Jun

- 15.143(12):2039-43.  
Doi:10.1242/dev.138172.
7. Hirata S, Murata T, Suzuki S, Nakamura S, Jono-Ohnishi R, Hirose H, Sawaguchi A, Nishimura S, Sugimoto N, Eto K. Selective inhibition of ADAM17 efficiently mediates glycoprotein Iba retention during ex vivo generation of human induced pluripotent stem cell-derived platelets. *Stem Cells Translational Medicine*. 2017, 6(3), 720-30. doi: 10.5966/sctm.2016-0104.
  8. Aihara A, Koike T, Abe N, Nakamura S, Sawaguchi A, Nakamura T, Sugimoto N, Nakauchi H, Nishino T, Eto K. Novel TPO receptor agonist TA-316 contributes to platelet biogenesis from human iPS cells. *Blood Advances*. 2017, 1(7), 468-76. doi: 10.1182/bloodadvances.2016000844. eCollection 2017 Feb 28.
  9. Sugimoto N, Eto K. Platelet production from induced pluripotent stem cells. *J Thromb Haemost*. 2017, 15(9), 1717-27. doi: 10.1111/jth.13736
  10. Watanabe N, Nogawa M, Ishiguro M, Maruyama H, Shiba M, Satake M, Eto K, Handa M. Refined methods to evaluate the in vivo hemostatic function and viability of transfused human platelets in rabbit models. *Transfusion*. 2017, 57(8), 2035-44. doi: 10.1111/trf.14189.
- [学会発表](計 25 件)
1. “ Platelet Production from Human Pluripotent Stem Cells In Vitro ” Gordon Research Conference Cell Biology of Megakaryocytes & Platelets. Barga/Toscana, Italy ( 国外 ) 平成 27 年 4 月
  2. 江藤浩之 iPS 細胞由来血小板製造の苦労しているところ 第 63 回日本輸血・細胞治療学会総会 国内 平成 27 年 5 月
  3. 江藤浩之 輸血製剤製造開発に向けた iPS 細胞研究所の取り組み 日本麻酔科学会第 62 回学術集会 国内 2015/5/29
  4. Koji Eto Towards a self-renewing megakaryocyte International Society of Thrombosis and Hemostasis 2015 Congress. Toronto, Canada ( 国外 ) 平成 27 年 6 月
  5. Koji Eto Manipulating Megakaryocytes to Manufacture ‘ intact ’ platelets using iPS cell-based technology 第 77 回日本血液学会学術集会シンポジウム 国内 平成 27 年 10 月
  6. Koji Eto Engineering biogenesis of human platelet on chip system. The 26th International Symposium on Micro-NanoMechatronics and Human Science 国内 平成 27 年 11 月
  7. 江藤浩之 臨床研究と治験を選択する戦略:血小板の場合 第 15 回日本再生医療学会総会 国内 平成 28 年 3 月
  8. 江藤浩之 iPS 細胞由来血小板の臨床試験に向けた開発現状報告、口頭、第 64 回日本輸血・細胞治療学会総会、国内、平成 28 年 4 月
  9. Daisuke Suzuki, Naoshi Sugimoto, Norihide Yoshikawa, Sou Nakamura, Hiroshi Endo, Akitsu Hotta, Koji Eto Challenge of “ HLA omnipotent platelets ” for overcoming allogenic immune response using induced Pluripotent Stem Cell (iPSC) technology、第 14 回幹細胞シンポジウム、国内 平成 28 年 5 月
  10. Plenary : Cell therapy in clinical trials “ How should we generate 300b platelets from iPS cells? ”、口頭、Koji Eto、国際幹細胞学会総会 国外、San Francisco, California, 米国 ( 国外 ) 平成 28 年 6 月
  11. 江藤浩之 iPS 細胞由来血小板製造の出口戦略、第 17 回 Pharmaco-Hematology、国内、平成 27 年 9 月
  12. Koji Eto Engineering Biogenesis of Human Platelets by iPS Cell Technology and New Type of Bioreactor System、口頭、Platelets 2016 シンポジウム、国外、ボストン郊外、米国 ( 国外 ) 平成 28 年 9 月
  13. Koji Eto Production and purification of 1U/300 billion platelets towards development of universal type transfusion products using iPS cell technology、Cell Symposium: 10Years of iPSCs. Berkeley, California, 米国 ( 国外 ) 平成 28 年 9 月
  14. 江藤浩之 Universal Platelet Products using iPS Cell Technology. The 8th Congress of the International Federation of Shock Societies. 国内 平成 28 年 10 月
  15. 江藤浩之 iPS 細胞由来血小板製剤の出口戦略、第 52 回日本赤十字社医学会総会、国内 平成 28 年 10 月
  16. Daisuke Suzuki, Naoshi Sugimoto, Norihide Yoshikawa, Hiroshi Endo, Sou Nakamura, Akitsu Hotta, Koji Eto Natural Killer Cell Activities Against iPSCs-Derived HLA-Knockout Platelets and Megakaryocytes Reveal Perfect

- Rejection Profiles for Allogeneic Transfusion. 58th ASH Annual Meeting & Exposition San Diego, California, 米国(国外)平成28年12月
17. Synthetic miRNA Switch Technology Elucidates Heterogeneity in Regulation of Immortalized Megakaryocyte Cell Lines, Associated with Improvement of Platelet Generation Efficiency for Clinical Use. Kazuya Hashimoto, Satoshi Matsuura, Yoshihiko Fujita, Karin Hayashi, Naoshi Sugimoto, Takuya Yamamoto, Hirohide Saito, Koji Eto, 58th ASH Annual Meeting & Exposition San Diego, California, 米国(国外)平成28年12月
  18. 中村壮・江藤浩之 iPS 細胞技術を基盤とする血小板製剤の開発と臨床試験・同種血小板輸血製剤の上市に向けた開発、平成28年度AMED再生医療公開シンポジウム、国内、平成29年2月
  19. 鈴木大助、杉本直志、吉川典秀、中村壮、遠藤大、堀田秋津、江藤浩之 NK 細胞から見た HLA 欠失血小板の有用性と安全性の保証、第16回日本再生医療学会総会、国内、平成29年3月
  20. 江藤浩之 iPS cell technology と血栓止血学 日本血栓止血学会シンポジウム、国内、平成29年6月
  21. 江藤浩之 iPS 血小板は、献血PC製剤とは別物か、第65回日本輸血・細胞治療学会総会シンポジウム、国内 平成29年6月
  22. Koji Eto System of 300B In Vitro Platelet Biogenesis From iPS Cells, 口頭, 国際血栓止血学会【State of the Art 招待講演】ベルリン、ドイツ(国外)平成29年7月
  23. 杉本直志、江藤浩之 iPS 細胞を用いた血液製剤の開発と法整備、第79回日本血液学会学術集会 特別教育講演、国内平成29年10月
  24. 杉本直志、江藤浩之 HLA gene knockout in human iPS cells: a tool in developing versatile cellular regenerative therapy 第28回日本組織適合性学会大会 Young Investigator Cutting-Edge Lecture 国内 平成29年10月
  25. 江藤浩之 iPS cell technology を用いた血小板大量供給システムの開発 第47回日本創傷治癒学会特別講演 国内平成29年11月

〔図書〕(計1件)

1. Karagiannias P, Endo H, Eto K. Generating Blood from iPS Cells. **Molecular and Cellular Biology of Platelet**

**Formation: Implications in Health and Disease.** Springer. 2017, 399-420.

〔産業財産権〕

出願状況(計8件)

1) 名称: 巨核球を含む培養物の製造方法及びこれを用いた血小板の製造方法  
発明者: 江藤浩之/遠藤大/中村壮/堂田文明/小林佐知

権利者: 国立大学法人京都大学/株式会社メガカリオン

番号: PCT/JP2016/057467

出願年月日: 平成28年3月9日

国内外の別: 国外(公開番号 W02016/143836)

2) 名称: 血小板の機能を維持および/または増強するための組成物

発明者: 江藤浩之/瀬尾英哉/仲野篤史

権利者: 国立大学法人京都大学/一般社団法人

日本血液製剤機構

番号: PCT/JP2016/053825

出願年月日: 平成28年2月9日

国内外の別: 国外(公開番号 W02016/129593)

3) 名称: 体細胞への分化誘導に適した幹細胞クローンを製造する方法

発明者: 江藤浩之/遠藤大/重盛智大

権利者: 国立大学法人京都大学/株式会社メガカリオン

番号: PCT/JP2016/062040

出願年月日: 平成28年4月14日

国内外の別: 国外(公開番号 W02016/167329)

4) 名称: 血小板の製造方法

発明者: 江藤浩之/中村壮/伊東幸敬/重盛智大/堂田文明

権利者: 国立大学法人京都大学/株式会社メガカリオン

番号: PCT/JP2016/068015

出願年月日: 平成28年6月16日

国内外の別: 国外

5) 名称: 特定のラミニン上での多能性幹細胞の培養方法

発明者: 江藤浩之/中村壮/関口清俊/重盛智大

権利者: 国立大学法人京都大学/国立大学法

人大阪大学/株式会社メガカリオン

番号: PCT/JP2016/068015

出願年月日: 平成29年8月25日

国内外の別: 国外

6) 名称: 血小板産生促進剤及びこれを用い

た血小板の製造方法

発明者：江藤浩之/中村壮/関口清俊/重盛智大

権利者：国立大学法人京都大学/国立大学法人名古屋大学

番号：PCT/JP2017/003191

出願年月日：平成29年1月30日

国内外の別： 国外

7) 名称：血小板産生促進剤のスクリーニング方法

発明者：江藤 浩之/ 瀬尾 英哉/太田 章/伊藤幸敬/間靖子

権利者：国立大学法人京都大学/株式会社メガカリオン

番号：PCT/JP2017/003169

出願年月日：平成29年1月30日

国内外の別： 国外

8) 名称：血球分化能の高い中胚葉誘導方法

発明者：江藤浩之/遠藤大/伊藤幸敬/福永淳一  
権利者：国立大学法人京都大学/株式会社メガカリオン

番号：PCT/JP2017/033518

出願年月日：平成29年9月15日

国内外の別： 国外

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

江藤 浩之 (ETO, Koji)

京都大学・iPS細胞研究所・教授

千葉大学・大学院医学研究院・教授

研究者番号：50286986

### (2) 連携研究者

新井 史人 (ARAI, Fumihito)

名古屋大学・工学研究科(研究院)・教授

研究者番号：90221051