

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 22 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2021

課題番号：18K18365

研究課題名（和文）iPS細胞を用いた長期自己複製型巨核球細胞株の新規樹立法の開発

研究課題名（英文）New method for establishing self-renewing megakaryocyte cell lines using iPS cells

研究代表者

中村 壮（Nakamura, Sou）

京都大学・iPS細胞研究所・特定拠点助教

研究者番号：50769833

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：増殖能が異なる巨核球細胞株のRNA-seq解析に基づき、巨核球細胞株の自己複製を阻害する原因遺伝子を同定した。また、多能性幹細胞から血液細胞分化誘導時に生じるエピジェネティック修飾の影響を受けにくいベクターシステムを新たに構築した。これらの結果を応用することで、多様なクローン特性を示す異なるヒトiPS細胞クローンから個別に巨核球細胞株を樹立することが可能となり、予測不能であったヒトiPS細胞クローン間での異なる樹立効率の問題点を解決することに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

同種免疫性の血小板輸血不応症を発症する患者では、HLA/HPAが適合するドナーの確保が必要であるが、稀な型の場合や緊急時は供給不足が危惧される。解決策として、申請者らは、iPS細胞から分化誘導した血小板前駆細胞、巨核球を細胞株化し、産業化可能な血小板製造法を確立したが、安定増殖株の樹立効率が低いことが課題となっていた。本研究で明らかとなった巨核球細胞株自己複製抑制機構を解除する方法を新規ベクターシステムに新たに組み込むことで、個性の異なる複数のiPS細胞クローン由来不死化巨核球の作製効率を飛躍的に改善することができるため、HLA/HPA一致血小板製剤供給源の問題点を解決する可能性が提示できた。

研究成果の概要（英文）：RNA-seq analysis of several megakaryocyte cell lines displaying different proliferative capabilities enabled to identify the responsible genes that inhibit self-renewal ability in megakaryocyte cell lines. Furthermore, alternative vector system was applied to generate megakaryocyte cell lines, whereby epigenetic modifications were silenced at the stage of hematopoietic cell differentiation from pluripotent stem cells. Such improvements allowed us to generate megakaryocyte cell lines from several human iPS cell clones, contributing to high efficiency of megakaryocyte cell line induction.

研究分野：幹細胞 再生医療

キーワード：巨核球 iPS細胞

1. 研究開始当初の背景

献血システムは血球減少をきたす多様な疾患の予後改善に寄与している。一方で、需要の増大、若年献血者の減少、パンデミックによる献血者の不足等が問題となり、ドナーのみに依存する体制の変革が必要とされている。更に、繰り返し輸血がほぼ必須である血液疾患患者への血小板輸血では、同種免疫性の血小板輸血不応症が発症する患者が多く、HLA (ヒト白血球抗原)、HPA (ヒト血小板抗原) が適合するドナーの確保が必要であるが、稀な型の場合や緊急時は供給不足が危惧される。そこで申請者らは、生体内造血過程および iPS 細胞から巨核球への分化過程で機能する遺伝子を検証した結果、*c-MYC* の時空間特異的な発現様式が血小板の前駆細胞である巨核球の分化・一過的な増殖の運命決定を担っていることを発見し、*c-MYC* の高発現により誘導される細胞老化・細胞死誘導因子の発現上昇を抑制するポリコム遺伝子 BMI1 と細胞死抑制遺伝子 *BCL-XL* を、レンチウイルスベクターシステムを用いて *c-MYC* と共に一定の法則に沿って ES・iPS 細胞由来多能性血液前駆細胞集団に共発現させることで、血小板産生前駆細胞である巨核球を自己複製型細胞 (imMKCL) に株化する新規技術を開発した。しかし、imMKCL 樹立法は、長期安定増殖株の樹立効率の低さが課題であり、ニーズのある各 HLA、HPA に対応する多様な iPS 細胞から安定的に作製が可能となる、効率的な新たな樹立法を検討する必要があった。

2. 研究の目的

imMKCL の樹立効率が低い要因として、以下の問題点を提唱した。

- (1) imMKCL の長期自己複製能に至適な範囲の *c-MYC* の発現レベルが存在し発現量を制御することが難しい。
- (2) レンチウイルスベクターは、血液細胞分化誘導時にエピジェネティックな発現抑制を受けやすい。

これらの問題点を解決すべく本研究では、*c-MYC* 発現量と巨核球細胞株樹立及び長期自己複製の関係性を解明し、長期安定型自己複製を可能とする imMKCL 細胞株をレンチウイルスベクターに依存せずに樹立する普遍的な細胞株製造方法を確立することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) imMKCL 自己複製能を抑制する原因遺伝子の同定

申請者らがレンチウイルスで樹立した imMKCL クローンの増殖能を高/中/低の 3 つのグループに分類する。次に、各グループを RNA-sequencing 法で遺伝子発現解析を行い、グループ間の遺伝子発現を比較することで、自己複製能を抑制している原因遺伝子を同定する。

(2) 普遍的な imMKCL 樹立法の確立

- ① CRISPR/Cas9 を用いたノックイン法や piggyBac トランスポゾン法などレンチウイルスを併用もしくは用いない imMKCL 樹立法を構築する。(1) で同定した原因遺伝子の抑制系もしくは強制発現系をベクターシステムに組み込み、imMKCL 樹立効率を検証する。
- ② 由来の異なるヒト iPS 細胞 10 株を用いて、(2)-①で構築した新規 imMKCL 樹立法で imMKCL の樹立効率を検証する。樹立した各 imMKCL の *c-MYC* の発現量を比較することで、*c-MYC* 発現量と巨核球細胞株樹立及び長期自己複製の関係性を検証する。

4. 研究成果

(1) imMKCL 自己複製能を抑制する原因遺伝子の同定

増殖能が高/中/低の3つのグループに分けた imMKCL を RNA sequencing 法で網羅的遺伝子発現解析を行ったところ、高い増殖能の imMKCL と比べ、中程度から低い増殖能の imMKCL では細胞老化、細胞周期に関わる *CDKN2A* と *CDKN1A* が高く発現していることを見出した(図1)。これらの遺伝子を抑制することで増殖能が改善するか検証したところ、*CDKN1A* もしくは *CDKN1A* の発現を促進させる *p53* を抑制させた中程度から低い増殖能の imMKCL では、増殖が著しく改善された。一方、*CDKN2A* の抑制では増殖能の改善は見られなかった(図2)。

この成果は以下の国際的な科学雑誌で報告された。

Nakamura S et al., 2021 *Stem cell Report*

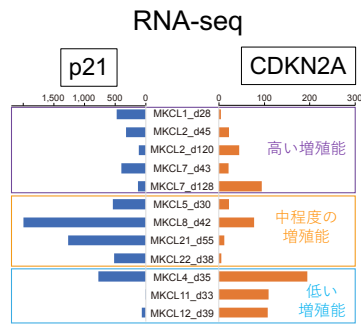


図1 中程度から低い増殖能のimMKCLは *p21* *CDKN2A*の発現が高い

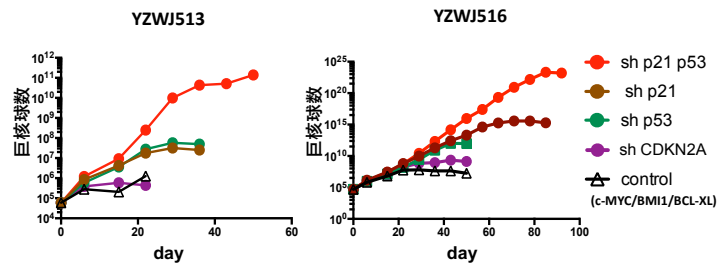


図2 imMKCL 増殖曲線

(2) 普遍的な imMKCL 樹立法の確立

- ① 目的遺伝子発現カセットを CRISPR/Cas9 法によってノックインした iPS 細胞は、血液細胞分化誘導時のエピジェネティックな修飾を受け一方で、piggyBac トランスポゾンベクターは分化誘導時のエピジェネティックな修飾を受けにくいことがわかった。次に、imMKCL 分化誘導時の *p53/CDKN1A* の発現抑制の有用性を検証したところ、以前にレンチウイルスベクター方式に伴う *c-MYC/BMI1/BCL-XL* 遺伝子導入では樹立できなかったヒト胚性幹 (ES) 細胞から imMKCL を樹立することに成功した。
- ② (2)-①で構築した新規 imMKCL 樹立法により、ほぼ全ての iPS 細胞から樹立することに成功し、飛躍的に樹立効率が改善した。樹立した iPS 細胞由来 imMKCL の *c-MYC* の発現量は、どの細胞株も同程度であり、imMKCL の長期自己複製能には至適な範囲の *c-MYC* の発現量が重要であることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Yuzuriha Akinori, Nakamura Sou, Sugimoto Naoshi, Kihara Shunsuke, Nakagawa Masato, Yamamoto Takuya, Sekiguchi Kiyotoshi, Eto Koji	4. 巻 53
2. 論文標題 Extracellular laminin regulates hematopoietic potential of pluripotent stem cells through integrin 1-ILK- β -catenin-JUN axis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Stem Cell Research	6. 最初と最後の頁 102287 ~ 102287
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.scr.2021.102287	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Kumon Hiroki, Sakuma Shinya, Nakamura Sou, Maruyama Hisataka, Eto Koji, Arai Fumihito	4. 巻 12
2. 論文標題 Microfluidic Bioreactor Made of Cyclo-Olefin Polymer for Observing On-Chip Platelet Production	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Micromachines	6. 最初と最後の頁 1253 ~ 1253
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/mi12101253	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Sone Masamitsu, Nakamura Sou, Umeda Sachiko, Ginya Harumi, Oshima Motohiko, Kanashiro Maria Alejandra, Paul Sudip Kumar, Hashimoto Kanae, Nakamura Emiri, Harada Yasuo, Tsujimura Kyoko, Saraya Atsunori, Yamaguchi Tomoyuki, Sugimoto Naoshi, Sawaguchi Akira, Iwama Atsushi, Eto Koji, Takayama Naoya	4. 巻 16
2. 論文標題 Silencing of p53 and CDKN1A establishes sustainable immortalized megakaryocyte progenitor cells from human iPSCs	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Stem Cell Reports	6. 最初と最後の頁 2861 ~ 2870
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.stemcr.2021.11.001	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Nakamura S, Sugimoto N, Eto K.	4. 巻 63
2. 論文標題 Development of platelet replacement therapy using human induced pluripotent stem cells.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Development, Growth & Differentiation	6. 最初と最後の頁 178-186
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/dgd.12711.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Nakamura S, Sugimoto N, Eto K.	4. 巻 40
2. 論文標題 Ex vivo generation of platelet products from human iPS cells.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Inflamm Regen.	6. 最初と最後の頁 10
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s41232-020-00139-2.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Nakamura S, Eto K.	4. 巻 61
2. 論文標題 [Novel physico-chemical regulation mechanism enables the production of 100 billion platelets]	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Rinsho Ketsueki.	6. 最初と最後の頁 628-633.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.11406/rinketsu.61.628.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Takei Hiraku, Edahiro Yoko, Mano Shuichi, Masubuchi Nami, Mizukami Yoshihisa, Imai Misa, Morishita Soji, Misawa Kyohei, Ochiai Tomonori, Tsuneda Satoshi, Endo Hiroshi, Nakamura Sou, Eto Koji, Ohsaka Akimichi, Araki Marito, Komatsu Norio	4. 巻 181
2. 論文標題 Skewed megakaryopoiesis in human induced pluripotent stem?cell-derived haematopoietic progenitor cells harbouring calreticulin mutations	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 British Journal of Haematology	6. 最初と最後の頁 791 ~ 802
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/bjh.15266	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ito Yukitaka, Nakamura Sou, Sugimoto Naoshi, Sawaguchi Akira, Nakagawa Masato, Yamamoto Takuya, Handa Makoto, Watanabe Naohide, Nishi Eiichiro, Arai Fumihito, Nishimura Satoshi, Eto Koji 他	4. 巻 174
2. 論文標題 Turbulence Activates Platelet Biogenesis to Enable Clinical Scale Ex Vivo Production	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cell	6. 最初と最後の頁 636 ~ 648.e18
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cell.2018.06.011	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Toki Tsutomu, Yoshida Kenichi, Wang RuNan, Nakamura Sou, Takahashi Satoru, Eto Koji, Ogawa Seishi, Ito Etsuro 他	4. 巻 103
2. 論文標題 De Novo Mutations Activating Germline TP53 in an Inherited Bone-Marrow-Failure Syndrome	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 The American Journal of Human Genetics	6. 最初と最後の頁 440 ~ 447
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ajhg.2018.07.020	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 中村 壮
2. 発表標題 iPS細胞を用いた血小板の作製
3. 学会等名 第14回日本血栓止血学会学術標準化委員会シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中村 壮
2. 発表標題 Novel physico-chemical regulation mechanism enables to manufacture 1011 order platelets
3. 学会等名 第80回日本血液学会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 国立大学法人千葉大学, 国立大学法人京都大学	発明者 高山直也, 江藤浩之, 曽根正光, 中村壮	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2020/ 39162	出願年 2020年	国内・外国の別 外国

〔取得〕 計0件

〔その他〕

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------