

平成 21 年 5 月 26 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007 -2008

課題番号：19591096

研究課題名（和文） 巨核球成熟、血小板産生分子制御機構の解明：
ヒト胚性幹細胞研究への応用

研究課題名（英文） Studying molecular mechanisms of megakaryocyte maturation and platelet production derived from human embryonic stem cells

研究代表者

氏名（アルファベット）江藤 浩之（KOJI ETO）

所属機関・所属部局名・職名 東京大学・医科学研究所・特任准教授

研究者番号 50286986

研究成果の概要：

WAVE2/Abi1複合体を介した巨核球成熟及び血小板産生の分子機構解明

血小板産生に関わる様々な要因の内、巨核球への選択的分化、巨核球成熟、血小板放出などにはアクチン・ミオシン細胞骨格系の関与が示唆される。本研究では、アクチン制御分子Rhoファミリーの一つであるRacおよびそのエフェクターであるWAVEに焦点を当て、巨核球成熟、血小板放出機構におけるWAVE1, WAVE2の働きを明らかにした。WAVE1は、血小板産生を含む生体内造血においての関与は認められなかった。一方、WAVE2欠損マウスが胎生致死であることからWAVE2欠損胚性幹（ES）細胞を作製し、in vitroでの造血を観察した結果、WAVE2がAbi1との複合体構造維持により巨核球の多核化に伴う細胞質の拡大（成熟過程）および正常な血小板産生に必須であること、また血小板のインテグリン依存的細胞進展にもWAVE2/Abi1複合体が必須である事を明らかにした。

ヒトES細胞からの造血前駆細胞濃縮分子機構の解明と効率的血小板産生法への発展

ヒトES細胞の分化培養系の開発を進め、内部に造血前駆細胞が濃縮される特異的な形態を持つネット様構造物の作成に成功した。このネット様構造物は、造血を促進維持するニッチの役割も担っていると考えられる。造血前駆細胞からは、血小板前駆細胞体である巨核球への分化成熟が促進されることが観察された。産生された巨核球からは血小板も放出され、電子顕微鏡観察、機能解析の結果よりヒト末梢血の血小板に相同する血小板がヒトES細胞から産生可能なことを証明した。

37℃培養条件で産生された血小板の機能維持

血小板輸血製剤は、日赤から供給後 20 -24℃ という非常に狭い温度設定で保存し、4 日以内の使用に限定されている。ES 細胞から作成した血小板は、血小板細胞膜上の止血機能に必至な GPIb α 受容体が 37℃ 条件下で容易に切断（shedding）されてしまうことを見出した。また、コラーゲン受容体である GPVI も同様に shedding されることを明らかにした。ADAM ファミリー分子による修飾によるこれらの shedding は、メタロプロテアーゼ阻害剤により、血小板機能の保持に働くこと、培養時期の一定期間のみ阻害剤が必須であること、阻害剤処理血小板は in vivo でも機能を保持できることなどを発見した。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：臨床医学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・血液内科学

キーワード：ES細胞、巨核球、血小板、細胞骨格、再生医療、輸血

1. 研究開始当初の背景

様々な血液疾患、悪性腫瘍治療、骨髄移植後患者において頻発する血小板減少に対しては血小板輸血が唯一の治療である。しかしながら、本邦における近年の献血者減少に伴い治療に必要な血小板輸血製剤の確保ができない。

2. 研究の目的

ヒト ES 細胞から誘導できる血液は将来の輸血医療に多大な貢献が予想されるため、研究代表者らはヒト ES 細胞 3 株を用いて機能性血小板を分化誘導できる新規培養法を確立しようと試みてきた。現在まで *in vitro* での血小板産生はそのソース（源）となる細胞の種類（骨髄 CD34 陽性細胞、臍帯血 CD34 陽性細胞など）に関わらず産生効率が低い。その主たる原因は、生体内における成熟巨核球からの血小板産生機序が明らかになっていない事にあると考えられた。本研究において申請者は巨核球成熟および血小板放出の分子機構を細胞骨格制御分子 WAVE2/Abi1 複合体に焦点を当てて解析した。更に、分子機構を基にヒト ES 細胞からより効率性の高い血小板産生法を確立することを目的とした。血小板輸血製剤は、日赤から供給後 20-24 °C という非常に狭い温度設定で保存し、4 日以内の使用に限定されている。ES 細胞等の培養は、37 °C の体温相当の至適定常状態で行われており、産生された血小板は高い温度設定環境の影響によりその機能が維持されるか検証した。

3. 研究の方法

マウスES細胞からの巨核球を使用した細胞成熟過程の解析：巨核球成熟、血小板放出は、アクチン重合阻害薬により完全に遮断でき、アクチン重合反応は必須であると考えられてきた。アクチン重合制御 Wiskott-Aldrich 症候群タンパク (WASp) の関与が示唆されてが、欠損マウスの解析から巨核球成熟、血小板放出における WASp の重要性は低い事が示唆されてきた (Sabri ら、Blood 2004, Blood 2006)。一方、WASp ファミリーの他の分子群の中で small GTPase Rac 下流の effector 分子である WAVE2 は巨核球、血小板での発現・分布が特異的かつ豊富だが、その欠損マウスは胎生致死 (E11.5) であり造血機能については明らかでなかった。研究代表者は WAVE2

欠損マウス ES 細胞を作成し、既法 (研究代表者ら、PNAS 2002, Methods Enzym 2003) に基づいた *in vitro* での巨核球分化、血小板産生を試み、その分化成熟過程の解析を行った。

ES 細胞由来血小板の機能保持法の開発：ヒト ES 細胞からの効率の良い血小板産生法の開発およびマウス ES 細胞を用いた機能保持法の開発を行い、新規の輸血ソースの可能性を探索した。

4. 研究成果

WAVE2 の蛋白発現後の構造安定に必須と報告されている Abl-interactor1 (Abi1) は互いに複合体を形成している事が知られている。本研究では、WAVE2/Abi1 複合体は *Rac* 非依存的に (*PIP2/PIP3* シグナル依存的を強く示唆) 巨核球後期分化、成熟に必須であり、血小板産生を制御していることを明らかにした (Eto ら、Blood, 2007)。さらに、造血幹細胞での WAVE2 の役割にも焦点を当てて解析を進めた結果、WAVE2 は造血幹細胞において細胞質および核内に特異的な発現が観察された。WAVE2 ノックダウン造血幹細胞は、その多分化能は阻害されなかった。一方、放射線照射マウスへの移植及び骨髄への移植後のコロニー形成能が完全に阻害され、WAVE2 複合体は骨髄 niche での幹細胞増殖に必須であることが明らかになった (Ogaeri ら、Stem Cells, 2009)。

ES 細胞から作成した血小板は、血小板細胞膜上の止血機能に必至な von Willebrand 因子受容体 GPIb α およびコラーゲン受容体である GPVI が 37 °C の培養条件下で時間依存的に切断 (shedding) されてしまうことを見出した。ADAM (A disintegrin and metalloprotease) ファミリー分子が制御するメタロプロテアーゼ活性修飾によるこれら血小板の機能分子の shedding は、メタロプロテアーゼ阻害剤を用いた培養により改善した。その結果、ES 細胞から産生される血小板の機能保持に働くこと、培養時期の一定期間のみ阻害剤が必須であること、阻害剤処理血小板は *in vivo* でも循環、止血機能が発揮できることなどを明らかにした (Nishikii ら、J Exp Med, 2008)。同時に進行中であったヒト ES 細胞からの血小板産生法にも成功し (Takayama ら、Blood, 2008)、これらの技術は現在ヒト iPS 細胞からの血小板産生に転用されている。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 8 件)

1. Eto K*, Nishikii H, Ogaeri T, Suetsugu S, Kamiya A, Kobayashi T, Yamazaki D, Oda A, Takenawa T, Nakauchi H. The WAVE2/Abi1 complex differentially regulates megakaryocyte development and spreading: implications for platelet biogenesis and spreading machinery. *Blood* 110, 3637-3647, 2007. (*corresponding author)
2. Tamaru S, Kitajima K, Nakano T, Eto K, Yazaki A, Kobayashi T, Matsumoto T, Wada H, Katayama N, Nishikawa M. Calyculin A retraction of mature megakaryocytes proplatelets from embryonic stem cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 366, 763-768, 2008.
3. Takayama N, Nishikii H, Usui J, Tsukui H, Sawaguchi A, Hiroyama T, Eto K*, Nakauchi H. Generation of functional platelets from human embryonic stem cells in vitro via ES-sacs, VEGF-promoted structures that concentrate hematopoietic progenitors. *Blood* 111:5298-5306, 2008. (*corresponding author)
4. Takizawa H, Eto K, Yoshikawa A, Nakauchi H, Takatsu K, Takaki S. Growth and maturation of megakaryocytes is regulated by Lnk/SH2B3 adaptor protein through crosstalk between cytokine- and integrin-mediated signals. *Exp Hematol* 36, 897-906, 2008.
5. Nishikii H, Eto K*, Tamura N, Hattori K, Heissig B, Kanaji T, Sawaguchi A, Goto S, Ware J, Nakauchi H. Metalloproteinase regulation improves in vitro generation of efficacious platelets from mouse embryonic stem cells. *J Exp Med* 205:1917-1927, 2008. (*corresponding author)
6. Yamazaki S, Iwama A, Takayanagi S, Eto K, Ema H, Nakauchi H. TGF- β induces hibernation of hematopoietic stem cells in the bone marrow niche. *Blood* 113:1250-1256, 2009.
7. Matsumoto K, Isagawa T, Nishimura T, Ogaeri T, Eto K, Miyazaki S, Miyazaki JI, Aburatani H, Nakauchi H, Ema H. Stepwise development of hematopoietic stem cells from embryonic stem cells. *PLoS ONE* 4(3):e4820, 2009.
8. Ogaeri T, Eto K, Otsu M, Ema H, Nakauchi H. The actin polymerization regulator WAVE2 is required for early bone marrow repopulation by hematopoietic stem cells. *Stem Cells* 27(5):1120-1129, 2009.

[学会発表] (計 14 件)

1. 高山直也、江藤浩之、臼井丈一、錦井秀

和、寛山 隆、中内啓光：ヒト ES 細胞由来造血支持構造体：嚢状構造物 (ES - Sac) からの血液細胞の分化誘導、第 69 回日本血液学会総会、平成 19 年 10 月 12 日、パシフィコ横浜

2. 江藤浩之、高山直也、錦井秀和、中内啓光：巨核球造血、血小板産生におけるマウスとヒトの差異：胚性幹細胞を用いた検討、第 30 回日本血栓止血学会、平成 19 年 11 月 17 日、賢島宝生苑 (三重県)
3. Eto K, Takizawa H, Takaki S, Nishikii H, Oda A, Nakauchi H: The Cytokine Signal Inhibitor Lnk Promotes α IIb β 3 Integrin Outside-In Signaling through β 3 Tyrosine Phosphorylation in Platelets. The American Society of Hematology 49th Annual Meeting 平成 19 年 12 月 10 日、Georgia Congress Center, Atlanta, GA, USA
4. 高山直也、中村壮、大西棕子、三木敬三郎、澤口朗、江藤浩之、中内啓光：ヒト ES 細胞/iPS 細胞をソースとする血液分化誘導法の樹立：ES (iPS) - Sac 法の可能性、第 70 回日本血液学会総会、平成 20 年 10 月 10 -12 日、京都国際会議場
5. 錦井秀和、中村壮、高山直也、江藤浩之、中内啓光：ES 細胞/iPS 細胞から産生した血小板が有用であるための戦略、第 70 回日本血液学会総会、平成 20 年 10 月 10 -12 日、京都国際会議場
6. 梅本晃正、大和雅之、江藤浩之、寺沢公男、柴田岳彦、内海美香、西田幸二、小林芳郎、中内啓光、岡野光夫：造血幹細胞における CD61 の役割の検討、第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会合同大会 (BMB2008)、平成 20 年 12 月 9-12 日、神戸国際会議場
7. Eto K, Nishikii H, Nakauchi H : Metalloproteinase regulation improves in vitro generation of efficacious platelets from embryonic stem cells. The 23th Naito Conference on Molecular Basis for Maintenance and Differentiation of Stem Cells. 平成 20 年 11 月 11-14 日、葉山湘南国際村
8. Takayama N, Eto K, Yamanaka S, Nakauchi H : Generation of megakaryocytes and platelets from human ES cells and iPS cells in vitro via unique structures, 'ES-sacs or iPS-sacs'. The American Society of Hematology 50th Annual Meeting 平成 20 年 12 月 5-10 日 Moscone Center, San Francisco, CA, USA
9. 江藤浩之「夢？献血に頼らない代替血小板製剤の開発は可能か」第 7 回日本再生医療学会シンポジウム【ES 細胞研究の最前線】平成 20 年 3 月 8 日 名古屋

屋国際会議場

10. 江藤浩之「ES・iPS 細胞由来血小板製剤の可能性」第 81 回日本組織培養学会シンポジウム【ES 細胞関連研究の最前線】平成 20 年 5 月 19 日 文部科学省研究交流センター（筑波）
11. 江藤浩之「ES・iPS 細胞由来血小板製剤の産業化プロジェクト」第 18 回日本サイトメトリー学会シンポジウム【再生医学とサイトメトリー】平成 20 年 6 月 28 日、東京慈恵医科大学講堂（東京）
12. 江藤浩之「ES・iPS 細胞由来血小板製剤の可能性」第 29 回日本炎症・再生医学会シンポジウム【幹細胞を用いた臓器形成の基礎と応用】平成 20 年 7 月 9 日、日本都市センタービル（東京）
13. 江藤浩之「Strategy of efficient platelet production from ES・iPS cells」第 7 回血管・血液オルピス、平成 20 年 8 月 10 日、東京ドームホテル
14. 江藤浩之「サイトカインアダプター Lnk は安定的血栓形成に寄与する」第 31 回日本血栓止血学会学術集会シンポジウム、平成 20 年 11 月 20-22 日、大阪国際交流センター

〔図書〕(計 8 件)

1. Yamazaki S, Iwama A, Morita Y, Eto K, Ema H, Nakauchi H: Cytokine signaling, lipid raft clustering, and HSC hibernation. *Ann N Y Acad Sci.* 1106:54-63, 2007.
2. 江藤浩之、高山直也、松本憲二、中内啓光「ヒト ES 細胞からの血小板など造血系細胞への分化誘導」医学のあゆみ 220(2):181-185, 2007.
3. 高山直也、中内啓光、江藤浩之【ヒト ES 細胞をソースとする血小板産生培養法】実験医学別冊 (改訂) 培養細胞実験ハンドブック (許南浩、中村幸夫 編, 羊土社) 308-313, 2008
4. 江藤浩之、中内啓光「胚性幹細胞および iPS 細胞から誘導した血小板を用いた輸血療法」Drug Delivery System 23(5):553-559, 2008.
5. 高山直也、小林俊寛、江藤浩之、中内啓光「iPS 細胞の樹立と再生医療への応用」Arthritis 6(2):4-9, 2008.
6. 江藤浩之「ES 細胞および iPS 細胞から誘導した血小板を用いた輸血療法の可能性」日本血栓止血学会誌 19(6):754-760, 2008.
7. 江藤浩之、中内啓光「iPS 細胞を用いた再生医療実現化に向けて：東京大学の活動・ヒト iPS 細胞等研究拠点整備事業」最新医学 187:667-673, 2009.
8. 江藤浩之、高山直也、中内啓光【ヒト ES 細胞をソースとする血小板産生培

養法】幹細胞の分化誘導と応用(NTS 出版) 159-167, 2009.

〔産業財産権〕

出願状況 (計 2 件)

1. 特願 2008-85204
出願日 平成 20 年 3 月 28 日
【GPIb α +GPV+GPVI+血小板のインビトロ調整法】中内啓光、江藤浩之、高山直也、錦井秀和 (申請者：東京大学 TLO)
2. 特願 2008-94584
出願日 平成 20 年 4 月 1 日
【iPS 細胞からの血小板の調整方法】中内啓光、江藤浩之、高山直也、錦井秀和、高橋和成、山中伸哉 (申請者：東京大学 TLO・京都大学 TLO)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

6. 研究組織
- (1) 研究代表者
江藤 浩之 (KOJI ETO)
東京大学医科学研究所・特任准教授
50286986
- (2) 研究分担者
なし
- (3) 連携研究者
なし