

令和 4 年 6 月 7 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09615

研究課題名(和文) iPS細胞由来多血小板血漿の開発と骨癒合促進効果に関する研究

研究課題名(英文) Development of iPS cell-derived platelet preparation with bone fusion promoting effect

研究代表者

志賀 康浩 (Shiga, Yasuhiro)

千葉大学・大学院医学研究院・特任准教授

研究者番号：90568669

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：近年、多血小板血漿PRPの臨床使用が拡大しているが、自己血由来のため品質および効果の不均一性が問題となっている。本研究では、同種血小板輸血製剤であるiPS細胞由来人工血小板の製造基盤を活用し、自己PRPに代わる機能強化型人工血小板製剤の開発を推進した。結果、ラット脊椎手術において凍結乾燥iPS血小板製剤の骨癒合効果を証明し、世界に先駆けて論文発表した。さらに、組織修復効果を有する特定サイトカインの強制発現システムの改良を進め機能強化型巨核球株を作出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

本研究では血小板を大量に製造可能な巨核球細胞株が遺伝子操作可能であり高機能血小板を作出できることを証明した。これは遺伝子治療を組み込んだ再生医療の細胞治療モデルを世界で初めて示すことに繋がる。自己血由来PRPと異なり、パッケージされた凍結乾燥製剤で骨折や手術における早期骨癒合が効率的に促進されれば、患者のADL・QOL向上に大きく寄与するものと考えられる。その他にもこれまで治療が困難であった潰瘍性難治創や神経損傷・脊髄損傷等に対しても有用である可能性が期待される。

研究成果の概要(英文)：In recent years, the clinical use of platelet-rich plasma has been expanding, but the non-uniformity of quality and effect has become a problem because it is derived from autologous blood. In this study, we promoted the development of a function-enhanced artificial platelet preparation that replaces autologous PRP by utilizing the production base of iPS cell-derived artificial platelets, which is an allogeneic platelet transfusion product. As a result, we proved the bone fusion effect of freeze-dried iPS platelet preparation in rat spinal surgery, and published the paper for the first time in the world. Furthermore, we succeeded in creating a function-enhanced megakaryocyte strain by improving the forced expression system of a specific cytokine having a tissue repair effect.

研究分野：整形外科

キーワード：iPS細胞由来血小板 骨癒合促進

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

骨折および不安定性のある変性疾患に対して行われる固定手術では早期の ADL・QOL 回復に寄与しうる迅速な骨癒合の実現が臨床上的大きな課題である。我々は、多血小板血漿が骨融合促進作用を有することを先行研究で確認した。その一方、高齢者や外傷を含む全ての患者の自己血由来 PRP を安定して調達することは困難である。研究分担者らのグループは iPS 細胞技術を用いてヒト白血球抗原(HLA)を欠損させ、自己免疫反応の誘発を抑制したユニバーサルタイプの人工血小板を大量に生産する手法を確立した。iPS 細胞由来血小板製剤の大量製造技術を応用し、均一性の担保された大量生産可能な血小板製剤の骨癒合への応用を提案した。

2. 研究の目的

本研究では血小板による骨修復の根源的メカニズムに基づくユニバーサルタイプの高機能人工血小板を開発し、安全性の高い画期的な骨癒合製剤を開発すること、及びその安全性・有効性の確認を目的とする。

3. 研究の方法

iPS-MK/Plts が含有する成長因子の検証

ヒト iPS 細胞由来不死化巨核球株を特殊操作で血小板生成・濃縮工程を経て iPS-MK/Plts を回収した。フローサイトメトリーで CD41 および CD42b 陽性の血小板と成熟巨核球を確認した。iPS-MK/Plts を凍結乾燥機で粉末化して FD-iPS-MK/Plts とした。蒸留水で再溶解し組織修復に関与する各サイトカイン (TGF- β , PDGF-BB, EGF, VEGFA, FGF2) の濃度を ELISA で測定し、他の研究において測定済みであるヒト末梢血由来 PRP のサイトカイン濃度との比較検証を実施した。

ラット腰椎人工骨移植モデルにおける iPS-MK/Plts の効果

SD ラットを使用し iPS-MK/Plts の骨形成促進効果を検証した。全身麻酔下に腰椎 L4-L6 の左横突起を露出し 0.5mL の人工骨を充填した。FD-iPS-MK/Plts を蒸留水で溶解し人工骨に含浸させたものを iPS 群、人工骨のみを対照群とした (各群 n=6)。第 4-6 腰椎の上位終板から下位終板までを CT を用いて解析ソフトによって骨体積の算出を行い、iPS 群と対照群を比較した。解析後、各検体に HE 染色を行い新規骨形成部の病理学的評価を加えた。また、移植後比較的早期の 1 週後、2 週後で骨形成系および骨吸収系指標 6 項目 (CTX-1, RANKL, Osteocalcin, OPG, P1NP, TRACP) に関して椎体移植部 (新規骨形成部) の免疫染色解析を実施した。

iPS-MK/Plts が in Vitro で MSC の分化に与える効果

間葉系細胞→骨芽細胞→骨細胞の各分化過程に与える iPS-MK/Plts の効果を検証するため、まずは分化の評価系の最適化を実施した。購入したヒト MSC に分化促進キットを用いて骨芽細胞への分化を誘導し、14, 21 日目に ALP 染色および Alizarin Red 染色陽性による確認を実施した。同細胞から mRNA を回収し、RT-qPCR で分化マーカーである Runx2, Osterix, ALP, Colla, Osteocalcin 遺伝子の発現を定量評価できる系を確立した。以上を用いて iPS 血小板製剤の MSC 分化促進効果を詳細に解析した。

VEGF 強制発現巨核球細胞株の作製

骨形成促進効果をより強化した機能拡張型血小板の開発を目指し、サイトカインの発現遺伝子を既存の imMKCL 巨核球細胞株に導入した。VEGF 強制発現レンチウイルスベクター pLV[Exp]-EGFP-UBC>hVEGFA の構築およびウイルスパッケージングは Vector Builder を用いた。imMKCL にウイルスを感染させ 7 日後にセルソーターを用いて EGFP 陽性の感染集団を分離取得した。VEGF 強制発現株から mRNA を回収し、RT-qPCR により VEGF 遺伝子の発現を導入前の imMKCL と比較した。また (1) と同様に血小板への分化刺激を行い、得られた iPS-MK/Plts の VEGF 濃度を ELISA で測定した。

骨形成タンパク製剤との比較による iPS-MK/Plts の検証

欧米で臨床使用されているリコンビナント BMP2 製剤は骨形成に関して一定の有効性があることは実証されている。しかし、単独サイトカインの添加による有害事象も同時に報告されている。ラット腰椎固定術モデルを用い、scaffold となる人工骨に加え、以下の添加材料での群分けによる比較検討を行った。① iPS 血小板単独群、② rhBMP2 単独 (0-15 μ g で濃度振り分け) 群、③ iPS 血小板+rhBMP2 (0-15 μ g で濃度振り分け) 群、と BMP と併用による iPS-MK/Plts の性質を検証した。

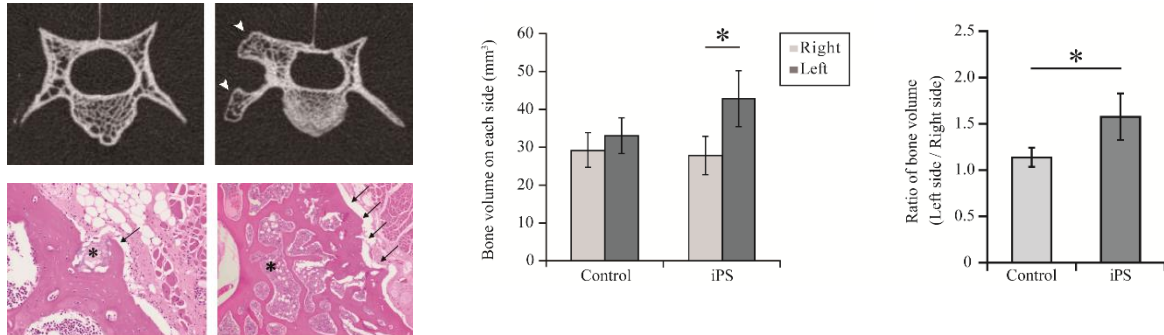
4. 研究成果

iPS-MK/Plts が含有する成長因子の検証

回収した iPS-MK/Plts において CD41+CD42b+ の分画が確認された。これは imMKCL の分化および血小板産生を示しており、過去の研究結果の再現性を確認できた。ELISA の結果、FD-iPS-MK/Plts 溶解液中に含まれる TGF- β および PDGF-BB の濃度はヒト末梢血 PRP と同程度であった。VEGFA はヒト末梢血 PRP より有意に少なく、また FGF2 は PRP からは検出されなかったが FD-iPS-MK/Plts に多く含有されていた。

ラット腰椎人工骨移植モデルにおける iPS-MK/Plts の効果

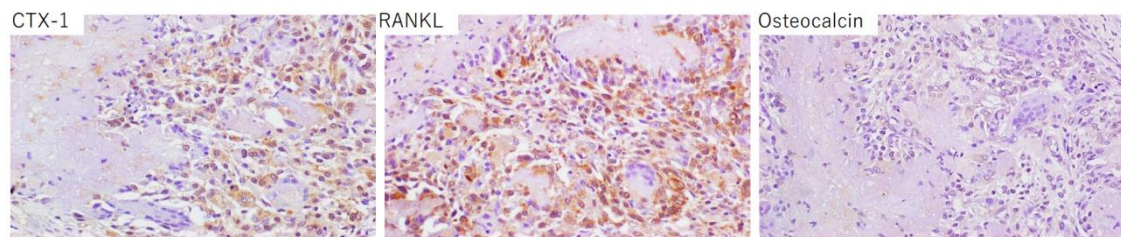
CT 画像上、iPS 群では左横突起に連続する骨新生を認めた。解析の結果、左側（人口骨充填側）の骨体積が右側の iPS-MK/Plts 投与群より有意に上昇していた。また左側と右側（非充填側）の比率を算出し比較したところ、iPS 群がコントロール群に比べ高値であった。組織学的には、コントロール群では人工骨周囲にわずかな骨化を認めるのみであったが、iPS 群では正常な骨組織で椎骨がリモデリングされていた。以上の結果から、iPS-MK/Plts の骨形成促進効果が示唆された（図 1）。



(コントロール群 (左) と iPS 群 (右) の CT 画像, 組織像および定量的評価)

免疫染色の結果では、iPS 血小板製剤投与群において骨形成骨吸収ともに有意に染色される結果となり、新規骨形成のためのターンオーバーが上昇していることが示唆された。

(代表的骨代謝マーカーの免疫染色)

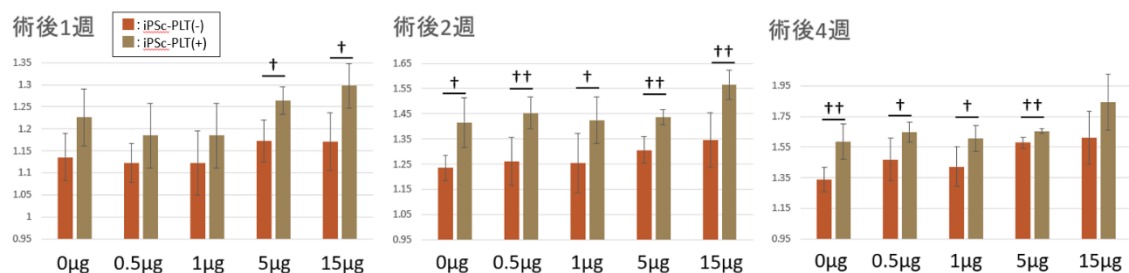
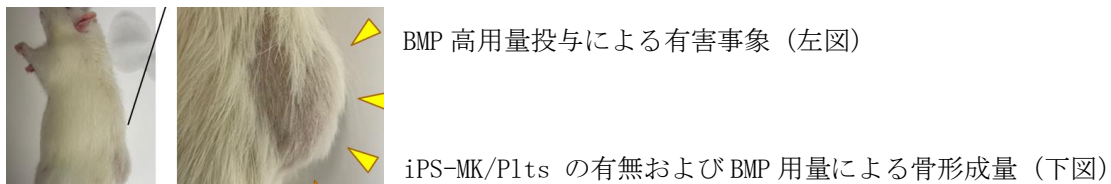


VEGF 強制発現巨核球細胞株の作製

RT-qPCR の結果、VEGF 強制発現株は導入前の imMKCL と比較し VEGF 遺伝子の発現が約 14 倍に上昇していた。また分化誘導後の ELISA により、強制発現株由来の iPS-MK/Plts が多量の VEGF を含んでいることが確認された(図 4)。今後は組織修復に関与する種々の遺伝子を強制発現あるいはノックダウンすることにより、より骨再生能の高い機能拡張型血小板の作製が可能となる基盤を確立した。

骨形成タンパク製剤との比較による iPS-MK/Plts の検証

実験の結果、BMP の添加状況によらず、iPS 血小板製剤を添加することで、BMP 単独使用よりも早期（移植後 2 週）に新規に骨形成が開始されることを確認した。また、BMP は用量依存性に骨形成能を発揮したが、高用量 BMP 使用群の 80% に過剰炎症および異所性骨化による有害事象が生じた。有害事象が生じない安全域で最も旺盛な骨形成を示したのが、iPS 血小板+rhBMP2（低用量 0.5 μg）であった。今回、骨再生における安全な BMP 至適濃度が判明したことは、今後 AI 解析等に使用出来るレベルでの骨形成能の定量化方法が明らかになった。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 志賀康浩
2. 発表標題 The Platelet derived from induced pluripotent stem cells accelerates bone union with adequate rigidity in posterolateral lumbar fusion surgery model in rats
3. 学会等名 国際腰椎学会（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 志賀康浩
2. 発表標題 iPS細胞由来巨核球・血小板製剤の骨癒合促進効果
3. 学会等名 日本整形外科学会 学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 志賀康浩
2. 発表標題 iPS細胞由来血小板製剤の骨癒合促進効果
3. 学会等名 日本自己血輸血学会 学術集会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 志賀康浩
2. 発表標題 iPS細胞由来血小板製剤は骨癒合促進効果を有する -自己血由来多血小板血漿を凌駕する組織修復効果の可能性-
3. 学会等名 日本脊椎脊髄病学会 学術集会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 巨核球および血小板を含む凍結乾燥製剤	発明者 江藤浩之 大鳥精司 志賀康浩	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2019-224781	出願年 2019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
研究分担者	高山 直也 (Takayama Naoya) (10584229)	千葉大学・大学院医学研究院・准教授 (12501)	
研究分担者	大鳥 精司 (Ohtori Seiji) (40361430)	千葉大学・大学院医学研究院・教授 (12501)	
研究分担者	折田 純久 (Orita Sumihisa) (60638310)	千葉大学・大学院医学研究院・教授 (12501)	
研究分担者	稲毛 一秀 (Inage Kazuhide) (80793629)	千葉大学・大学院医学研究院・助教 (12501)	
研究分担者	曽根 正光 (Sone Masamitu) (90599771)	北海道大学・低温科学研究所・助教 (10101)	

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
---------	---------