

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 4 月 15 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25289295

研究課題名(和文)造血細胞挙動の統合的理解に基づく巨核球分化方向の質的・量的制御

研究課題名(英文) Qualitative and quantitative control of megakaryocytic differentiation based on comprehensive understanding of hematopoietic cell behaviors

研究代表者

田谷 正仁 (Taya, Masahito)

大阪大学・基礎工学研究科・教授

研究者番号：60144127

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：in vitro血小板生産系の確立に向けて、研究を実施した。最初に、血小板生産過程である巨核球分化において、内在的な酸化ストレスや高倍数化試薬が重要であることを明らかにした。続いて、CHRF細胞が産生する血小板様体の機能性評価を行ったところ、凝集反応が引き起こされず、その原因がGP1B遺伝子の発現不良であることが明らかとなった。そこで機能性付与のために、遺伝子改変によりCHRF株のGP1B遺伝子発現を強化した安定株を作製した。得られた細胞株が産生した血小板様体の評価を行った結果、mRNA発現量は500倍まで増加したものの、GP1Bタンパク質の発現は確認できなかった。

研究成果の概要(英文)：This study was conducted aiming the construction of platelet production in vitro. First, we clarified that both intracellular oxidative stress and polyploidy inducers were important for the promotion of megakaryocytic differentiation. However, platelets generated from CHRF cells did not show the aggregating response due to the malfunction of GP1B protein. Next, the gp1b gene was introduced into CHRF cell and a stable cell line was successfully constructed. Finally, though the mRNA expression of gp1b gene increased 500 times comparing to the original CHRF cells, the expression of GP1B protein could not be confirmed.

研究分野：生物化学工学

キーワード：血小板 in vitro生産 巨核球分化 細胞株

1. 研究開始当初の背景

現在、各種造血系疾患の治療に用いられる血小板製剤は、全て献血により供給されている。しかしながら、血小板製剤は冷蔵、冷凍による保存が困難であるという大きな欠点をもつ。さらに、献血者数の変動や総数自体の減少に伴って、医療現場における慢性的な血小板不足が問題となっており、*in vitro*での血小板生産系の確立が望まれている。血小板は、ヒト骨髄中の造血幹細胞から巨核球前駆細胞を経て成熟した巨核球から産生されるが、造血幹細胞は骨髄中の有核細胞に1000万分の1程度しか存在しない希少細胞であり、*in vitro*血小板生産におけるソースとしては成り立たない。最近では、ヒトiPS細胞からの産生系確立が試みられているが、生産効率が非常に低く、価格の低廉化も含め、献血に代わる血小板製造技術とするには克服すべき課題も多いのが現状である。

2. 研究の目的

造血幹細胞の*in vitro*培養における血小板産生は、トロンボポイエチン(TPO)と呼ばれるサイトカインを添加することで、細胞質分裂を伴わず細胞内核分裂のみが進行する巨核球分化が誘導され、約1週間程度で細胞寿命に達し細胞質が崩壊することで行われる。この巨核球分化には、培養として汎用性の高い細胞株が存在し、ヒト由来のCHRF-288(以下、CHRF)株、K562株などが巨核球分化機構解明のために研究されている。これらの内CHRF株は、種々の薬剤により巨核球様分化が進行し、倍数性の増加を経て最終的には血小板様体を産生するが、血小板としての機能が不完全であることが認められている。

以上の背景を踏まえ、本研究では、優れた増殖能を持つヒト培養細胞株からの血小板産生プロセスの確立を目指す。本研究で目的とする*in vitro*血小板生産を達成するためには、CHRF株などから産生される血小板様体に血小板機能を付与することが必要となる。原則として血小板は脱核細胞から派生・産出される有機構造体(非細胞体)と見なされる。血小板機能として、最も重要なものの1つに止血効果が挙げられ、主にフィブリノゲン等を介した血小板どうしの凝集反応が基になるが、CHRF細胞由来の血小板様体には、凝集機構が確認されていない。本研究では、その原因の解明を目的として、遺伝子解析などによる細胞の内的要因の究明と培養基材の設計や培養操作の制御といった外的要因の観点から整理し、これらの統合的理解に基づいて、ヒト培養細胞株から血小板機能を具備した産生物を得るプロセスの開発を目指す。

3. 研究の方法

(1)K562細胞に対する内在性酸化ストレスの誘因が巨核球分化に与える影響の評価

使用細胞として、白血病細胞株であるK562を用いた。K562は、多能性幹細胞的性質を有しており、phorbol 12-myristate 13-acetate(PMA)により巨核球系細胞へと分化する。造血系幹細胞の巨核球分化に関しては、酸化ストレスが重要なシグナルとして働くことが報告されているため、PMAにより分化誘導させたK562細胞に近紫外光を照射することで、細胞内酸化ストレスを誘引した。10%FBSを添加したIMDM培地でK562細胞を培養し、PMA(10 ng/ml)を添加することで巨核球系分化を誘導した。PMAを添加する直前に、波長352 nmの近紫外光を3 $\mu\text{W}/\text{mm}^2$ の強度で2時間照射し、細胞内酸化ストレスを誘導した。近紫外光照射の有無の条件下で4日おきに培地交換を行い、8日間培養した。また、2日おきに、倍数性と巨核球分化マーカーであるCD41の発現量をフローサイトメトリーにより測定した。加えて、培養1日後の細胞内活性酸素(ROS)量を同じくフローサイトメトリーにより求めた。

(2)CHRF細胞に対する高倍数性誘引化合物の添加が巨核球分化と血小板様体産生に与える影響の評価

使用細胞として、CHRF-288細胞を用いた。K562の際と同様にPMA(5 ng/ml)を添加することで巨核球分化を誘導した。新規な倍数性誘導剤BMS-777607を共添加した条件で、4日おきに培地交換を行いながら8日間培養し、倍数性やCD41発現量に与える影響を評価した。また、産生した血小板様体を遠心分離により回収し、産生量と表面タンパク質発現量(CD41、CD42)ならびに凝集性に関する評価を行った。

(3)遺伝子導入によるCHRF細胞が産生する血小板様体の機能化の試み

CHRF細胞が産生する血小板様体には、凝集性が確認できず、その原因としてマーカータンパク質であるCD42(GP1B)の発現量が低いことが明らかとなった。そこで、プラスミドベクターpcDNA3を用いて、GP1BA遺伝子のクローニングを行い、構築されたベクターをエレクトロポレーション法によってCHRF細胞に導入し、安定発現株を構築した。構築した安定発現株に対して、巨核球分化を誘導しCD41、CD42の発現量を確認した。さらに、巨核球分化を誘導し、CD42マーカーを用いた評価を行った。

(4)Meg01細胞の巨核球分化と産生する血小板様体の機能評価

遺伝子導入を行わずとも、巨核球分化によりCD41とCD42の両方の発現が確認されたという報告がある新たな細胞株Meg01を入手し、バルプロ酸(VAP)の添加による巨核球分化の

誘導を行い，培養条件の最適化と巨核球分化ならびに産生した血小板様体の評価を行った．

4. 研究成果

(1) K562 細胞に対する内在性酸化ストレスの誘因が巨核球分化に与える影響の評価

近紫外光照射の有無の条件下で，培養1日後の細胞内活性酸素量を蛍光プローブとフローサイトメトリーを用いて比較した．図1に示すように，分化誘導剤であるPMAを添加していない場合，近紫外光照射によって，活性酸素量が約2倍に増加することが確認された．一方，PMAを添加した場合は分化誘導によって大幅な活性酸素量の増加が確認され，さらに近紫外光照射によって有意な産生促進が見られた．

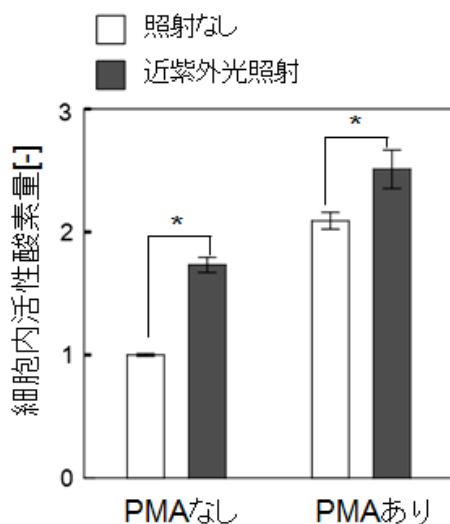


図1 近紫外光の前照射の有無における K562 細胞の細胞内活性酸素量．誘導剤である PMA の有無の条件において比較．* $p < 0.05$

次に，8日間培養した際の K562 細胞の高倍数性細胞の割合，全細胞濃度，生存率の結果を図2に示す．高倍数性細胞の割合に関しては，近紫外光照射によって，培養8日目に照射しない場合が20%程度であるのに対して，約30%まで増加し，細胞内活性酸素量の増加によって巨核球分化が促進されることがわかった．また全細胞濃度に関しては，若干減少する傾向が見られたが，生存率に関してはほぼ同等であり，全細胞濃度の低下は高倍数性細胞の増加によって，細胞分裂が抑制されたことに起因すると考えられる．以上のように，近紫外光の前照射は，K562 細胞の巨核球分化を促進することを明らかにした．得られた結果は新規性の高い内容として雑誌論文として発表した．

一方で，CHRF 細胞に対しても同様に近紫外光の照射を行ったが，照射強度ならびに照射時間をパラメータとして，様々な条件で実験を行っても，巨核球分化の促進は確認できず，

K562 細胞に特異的な現象であることも明らかとなった．

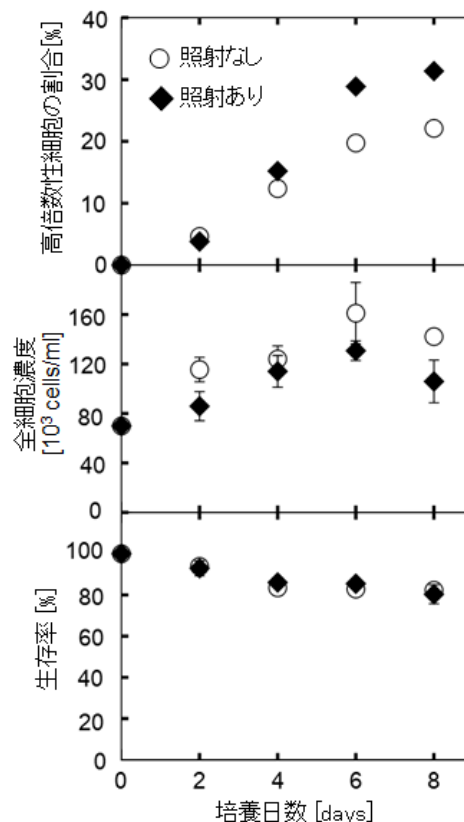


図2 近紫外光の前照射の有無の条件において巨核球分化を誘導した K562 細胞の高倍数性 ($\geq 8N$) 割合，全細胞濃度，細胞生存率．

(2) CHRF 細胞に対する高倍数性誘引化合物の添加が巨核球分化と血小板様体生産に与える影響の評価

続いて，巨核球分化の研究におけるモデル細胞として K562 よりも造血幹細胞に近いとされる CHRF 細胞を使用して実験を行った．図3の SEM 写真に見られるように，CHRF 細胞は PMA 添加による巨核球分化の誘導によって高倍数性細胞が増加し，最終的には血小板様体粒子を産生する．

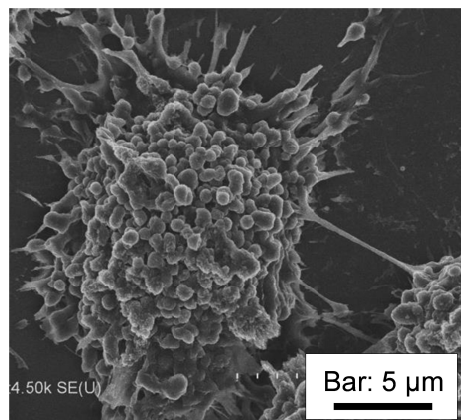


図3 PMA 添加による分化誘導で血小板様体を産生する CHRF 細胞の SEM 写真．

本研究では、PMA によって誘導される巨核球分化をさらに促進するために、BMS-777607 と呼ばれる新規な倍数化誘導剤を添加した(Sharma et al, Mol Cancer Ther, 12:1251-4, 2013) . 以下、BMS と略記する . BMS が巨核球分化に与える影響はこれまでに報告がない . 図 4 に培養 8 日後の CHRF 細胞の高倍数性細胞の割合ならびに 1 つの細胞あたりの CD41 平均蛍光強度を示す .

結果として、まず高倍数性の割合に関しては、BMS 濃度が 5 $\mu\text{mol/l}$ 以上で顕著な増加が見られた . 10 $\mu\text{mol/l}$ の添加で約 80% と最大値をとることが判明し、巨核球分化においても BMS が倍数化誘導剤として機能することが明らかとなった . 一方で、もう 1 つの巨核球分化指標である表面マーカー CD41 の発現量に関しては、1 つの細胞あたりの蛍光強度が BMS 濃度 10 $\mu\text{mol/l}$ 以上で増加する傾向画確認された . これらの結果から、PMA と同時に BMS を 10 $\mu\text{mol/l}$ の濃度で添加することにより、CHRF 細胞の巨核球分化が促進することが分かった .

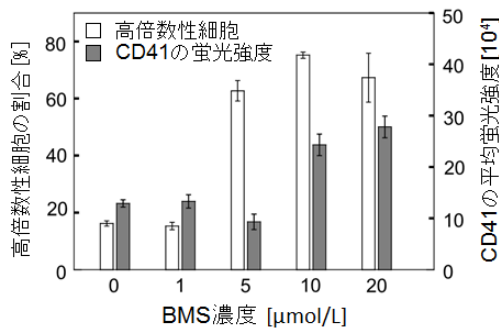


図 4 CHRF 細胞の高倍数性 ($\geq 8N$) 割合、1 つの細胞あたりの CD41 平均蛍光強度 .

続いて、BMS 添加の有無の条件下で CHRF 細胞が産生する血小板様体を回収し、量的・質的な評価を行った . まず、1 つの細胞あたりの血小板様体の産生量に関しては、BMS 添加の有無に関わらず 0.5 個となり、有意な差は確認されなかった(データ未掲載) . 一方で、CD41 表面マーカーの蛍光強度に示される GPIIb/IIIa タンパク質の発現量は、BMS を添加することが約 2 倍に増加し、機能性が向上していることが確認された . しかしながら、血小板の凝集反応に必須の GP1B タンパク質に関しては、BMS 添加の有無に関わらずほとんど検出されず発現量が極めて低いことがわかった .

以上の結果から、新規な倍数化誘導剤 BMS の添加により CHRF 細胞の巨核球分化が促進され、産生する血小板様体の GPIIb/IIIa タンパク質の発現量は増加したが、GP1B タンパク質発現量は増加せず、異なるアプローチが必要であることが明らかとなった . 得られた結果は、新規性の高い内容として国内学会ならびに雑誌論文として発表した .

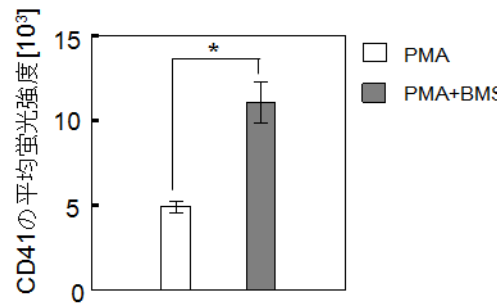


図 5 CHRF 細胞が産生する血小板様体の CD41 平均蛍光強度に及ぼす BMS の効果 .
* $p < 0.05$

(3) 遺伝子導入によって CHRF 細胞が産生する血小板様体を機能化する試み

まずクローニング過程においては、GP1BA 遺伝子を PCR により増幅し、pcDNA3 ベクターに挿入が成功したことを電気泳動により確認した . 続いて、トランスフェクションにより CHRF 細胞に遺伝子導入し、薬剤耐性を用いたスクリーニングにより安定株の樹立に成功した . リアルタイム PCR によって、構築した安定株の GP1BA 遺伝子の mRNA 発現量を比較すると、元株よりも約 500 倍高い値を示し、遺伝子導入に成功した . しかしながら、この安定株に対して巨核球分化を誘導した後に、GP1B タンパク質の表面マーカーである CD42 で評価した際には、蛍光値の増加は認められず(データ省略)、遺伝子導入には可能であったものの、細胞表層での発現は困難であった .

(4) Meg01 細胞の巨核球分化と産生する血小板様体の機能評価

前項目の実験結果を受けて、CHRF 細胞において GP1B タンパク質を発現することが困難であったため、細胞株を Meg01 に変更し実験を行った . Meg01 細胞は、バルボル酸(VPA) と呼ばれる試薬の添加によって巨核球分化が進行し、高倍数化や血小板様体の産生量は CHRF 細胞と比較して低下するものの、GP1B の発現が確認されている(Schweinfurth et al, Platelets, 21:648-65, 2010) . そこで本研究では、VPA の濃度が Meg01 細胞の巨核球分化に与える影響を確認した . 結果を図 6 に示す . 高倍数性細胞の割合に関しては、VPA を添加していない条件で約 10% 程度であり、3 mM 以上の濃度で 15% 程度まで増加した . さらに濃度を高くした場合は、再度 10% 前後まで低下した . 一方で、CD41 陽性細胞の割合に関しても同様に、VPA 3-4mM で極大値である 60% 前後となり、6 mM では大幅な低下が確認された . これらの結果より、Meg01 細胞の巨核球分化に関しては、VPA を 3 mM の濃度で添加することに決定した .

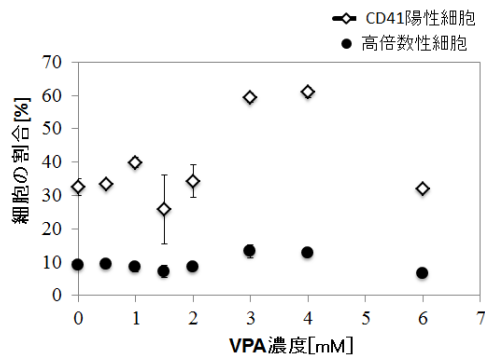


図6 Meg01細胞の巨核球分化(高倍数性細胞の割合, CD41発現)におよぼすバルボリン酸(VPA)の効果.

続いて、ヒト由来の実際の血小板をポジティブコントロールとして、VPA濃度3mMの培養条件においてMeg01細胞から産生された血小板様体と、PMA濃度5ng/mlの条件でCHRF細胞から産生された血小板様体の質的(CD41, CD42発現)評価を行った。Meg01細胞とCHRF細胞の血小板様体はどちらも培養8日後に回収した。結果を図7に示す。まず、ヒト由来の血小板に関しては、約50%程度の割合でCD41, CD42に対して陽性であることが確認された。一方で、CHRF由来の血小板様体の場合は、CD41に関しては20%程度が陽性であったものの、CD42に関しては全く陽性の分布が確認されなかった。さらに、Meg01細胞の場合は、CD41の陽性割合が5%程度であり、CD42が陽性のものは確認できなかった。

以上の結果より、種々の細胞株を用いて巨核球分化の誘導条件を探索し、血小板様体を産生した結果、産生量の観点からCHRF細胞が最も有望であったが、GP1Bタンパク質の発現量が低いことが問題点として挙げられた。遺伝子組換えなどの手法により、GP1Bタンパク質の発現量の向上を試みたが、遺伝子発現量の増加は達成できたものの、細胞ならびに

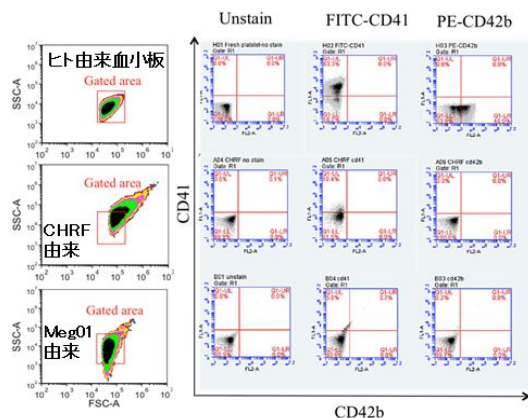


図7 ヒト由来血小板, 培養8日後のCHRFならびにMeg01細胞由来の血小板様体の質的(CD41, CD42発現)評価.

血小板様体の表面にGP1Bタンパク質を発現させることはできなかった。今後は、これまでとは別のアプローチによりGP1Bタンパク質を発現することを試みていく。

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 3件)

Retno W. Nurhayati, Yoshihiro Ojima, Masahito Taya, Recent developments in ex vivo platelet production (Review), Cytotechnology, 査読有, in press. DOI: 10.1007/s10616-016-9963-4

Retno W. Nurhayati, Yoshihiro Ojima, Masahito Taya, BMS-777607 promotes megakaryocytic differentiation and induces polyploidization in the CHRF-288-11 cells, 査読有, Human Cell, Vol. 28, No. 2, 2015, 65-72. DOI: 10.1007/s13577-014-0102-2

Retno W. Nurhayati, Yoshihiro Ojima, Naoki Nomura, Masahito Taya, Promoted megakaryocytic differentiation of K562 cells through oxidative stress caused by near ultraviolet irradiation, Cell Mol Biol Lett, 査読有, Vol. 19, No. 4, 2014, 590-600. DOI: 10.2478/s11658-014-0215-3.

[学会発表](計 1件)

Retno W Nurhayati, Yoshihiro Ojima, Masahito Taya, Enhancement of megakaryocytic differentiation in vitro for generating functional platelet-like fragments, 化学工学会第80年会, H307, 東京, 2015年3月

[図書](計 0件)

[産業財産権]

出願状況(計 0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.cheng.es.osaka-u.ac.jp/tayalabo/home.html>

6．研究組織

(1)研究代表者

田谷 正仁 (TAYA, Masahito)

大阪大学・大学院基礎工学研究科・教授

研究者番号：60144127

(2)研究分担者

尾島 由紘 (OJIMA, Yoshihiro)

大阪大学・大学院基礎工学研究科・助教

研究者番号：20546957