

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月1日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21300160

研究課題名（和文）献血を必要としない血小板輸血療法の戦略

研究課題名（英文）New Strategy of Platelet Transfusion Independent of Donor Blood

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

研究成果の概要（和文）：

ヒトES細胞、iPS細胞をソースにした血小板輸血製剤の開発目的に、①特定分子の蛋白発現制御に基づく産生巨核球数の増多方法の開発、②新規のshear stress刺激に伴う血小板産生装置の開発、③血小板におけるメタロプロテアーゼ活性制御分子によるADAM10/ADAM17活性化・抑制の生理機構解明に基づいた保存方法開発、の3つの課題に取り組んだ結果、ほぼすべての課題に対する新規の開発に成功した。

研究成果の概要（英文）：

This research program enabled to establish the methodology of induction of ‘megakaryocyte cell line’ from human embryonic stem (ES) cells or induced pluripotent stem (iPS) cells, contributing to the huge amount of platelet generation *in vitro*. We also developed new drug to block the platelet inactivation occurred at 37°C through the inhibition of ADAM10 and ADAM17. The program of the development of new device for platelet production from megakaryocytes based upon ‘shear stress theory’ enabled the

交付決定額

（金額単位：円）

|        | 直接経費       | 間接経費      | 合計         |
|--------|------------|-----------|------------|
| 2009年度 | 5,000,000  | 1,500,000 | 6,500,000  |
| 2010年度 | 4,500,000  | 1,350,000 | 5,850,000  |
| 2011年度 | 4,800,000  | 1,440,000 | 6,240,000  |
| 年度     |            |           |            |
| 年度     |            |           |            |
| 総計     | 14,300,000 | 4,290,000 | 18,590,000 |

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：医用生体工学・生体材料学

キーワード：再生医工学・人工臓器工学

## 1. 研究開始当初の背景

血液悪性腫瘍患者に対する治癒療法として、同種造血幹細胞移植による骨髄再構築は既に実施済みである。しかしながら骨髄バンクを含むソースは非常に限られている上、組織幹細胞を体外増幅できる技術は未だに

確立されていない。こうした背景から、胚性幹（ES）細胞をソースとする細胞治療が提案された。加えて人工多能性幹（iPS）細胞の出現によって自己組織あるいは同一白血球型抗原（HLA）ドナーに由来するES様細胞が作成できるため、免疫的拒絶が回避で

きる治療法の選択も可能である。

ES・iPS細胞は理論上、無限に増殖可能なため造血ソースとして魅力的である。申請者らは、安全性が担保されたヒトES細胞株、iPS細胞株から血小板が高効率に体外で分化誘導するシステムを構築することで不特定者からの献血に依存しない輸血医療の実現が近いと期待された。

## 2. 研究の目的

ヒトES細胞、iPS細胞をソースにした血小板輸血製剤の開発目的に、①特定分子の蛋白発現制御に基づく産生巨核球数の増多方法の開発、②新規のshear stress刺激に伴う血小板産生装置の開発、③血小板におけるメタロプロテアーゼ活性制御分子によるADAM10/ADAM17活性化・抑制の生理機構解明に基づいた保存方法開発、の3つの課題の解明・解決を目指した。

## 3. 研究の方法

ヒトES細胞、iPS細胞由来の造血前駆細胞を誘導した後、生体外で自己複製能力がある巨核球を誘導する遺伝子セットをスクリーニングした。またADAM10, 17の阻害効果を持つ複数候補から効果の高い試薬をスクリーニングした。デバイス開発は名古屋大学と共同でMEMS技術を用いて試作品を作製した。

## 4. 研究成果

c-MYC遺伝子の発現パターンが正常な巨核球成熟およびその後の血小板産生を制御している事を見いだした(Takayama N et al., J Exp Med, 2010)。この発見をもとにc-MYCおよびBMI-1(ポリコム遺伝子)を同時に造血前駆細胞に導入することで、巨核球が前駆細胞レベルで増殖継続可能である事を発見した(2011年12月の米国血液学会年次総会においてPlenaryセッションに選択)。これはc-MYC依存的にINK4A関連分子(p14, p19)の上昇に伴って発生した細胞老化現象をBMI-1が抑制した結果、細胞死を誘導せずにトロンボポイエチン(TPO)の細胞増殖作用に伴う巨核球のみの自己複製が成立したと推測される。次に、名古屋大学の福田敏男教授との共同研究により血小板放出デバイスを作製し、特許申請まで行ったが、既存の方法以上に血小板産生効率を高めることはできなかった。その結果、別のコンセプトによるデバイスの開発を新たに開始した。さらには外部製薬企業との共同研究から、培養血小板の不活性化阻害効果のあるADAM10/ADAM17阻害剤を開発し、その効果をiPS細胞から産生させた血小板を用いて検証し、そのin vivoでの機能を確認した。

## 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24件)

1. Takayama N, \*Eto K. In vitro generation of megakaryocytes and platelets from human embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells. *Methods Mol Biol.* 2012;788:205-17. **\*corresponding author**
2. Umemoto T, Yamato M, Ishihara J, Shiratsuchi Y, Utsumi M, Morita Y, Tsukui H, Terasawa M, Shibata T, Nishida K, Kobayashi Y, Petrich BG, Nakauchi H, \*Eto K, Okano T. Integrin  $\alpha v \beta 3$  regulates thrombopoietin-mediated maintenance of hematopoietic stem cells. *Blood.* 119(1):83-94. 2012 Jan.5.(Epub 2011 Nov 16.) **\*corresponding author**
3. Nishimura S, Manabe I, Nagasaki M, Kakuta S, Iwakura Y, Takayama N, Ooehara J, Otsu M, Kamiya A, Petrich B, Urano T, Kadono T, Sato S, Aiba A, Yamashita H, Sugiura S, Kadowaki T, Nakauchi H, \*Eto K, Nagai R. In vivo imaging visualizes discoid platelet aggregations without endothelium disruption and implicates contribution of inflammatory cytokine and integrin signaling. *Blood.* 119(8):e45-56. 2012 Feb. 23. (Epub 2011 Nov 16.) **\*corresponding author**
4. Kunishima S, Kashiwagi H, Otsu M, Takayama N, Eto K, Onodera M, Miyajima Y, Takamatsu Y, Suzumiya J, Matsubara K, Tomiyama Y, Saito H. Heterozygous ITGA2B R995W mutation inducing constitutive activation of the  $\{\alpha\}IIb\{\beta\}3$  receptor affects proplatelet formation and causes congenital macrothrombocytopenia. *Blood.* 117:5479-84, 2011 May. (Epub 2011 Mar 31.)
5. Hayashi Y, Chan T, Warashina M, Fukuda M, Ariizumi T, Okabayashi K, Takayama N, Otsu M, Eto K, Furue MK, Michiue T, Ohnuma K, Nakauchi H, Asashima M. Reduction of N-Glycolylneuraminic Acid in Human Induced Pluripotent Stem Cells Generated or Cultured under Feeder-

- and Serum-Free Defined Conditions. *PLoS One*. 5:e14099, 2010.
6. Takayama N, Nishimura S, Nakamura S, Shimizu T, Ohnishi R, Endo H, Yamaguchi T, Otsu M, Nishimura K, Nakanishi M, Sawaguchi A, Nagai R, Takahashi K, Yamanaka S, Nakauchi H, \*Eto K. Transient activation of c-MYC expression is critical for efficient platelet generation from human induced pluripotent stem cells. *J Exp Med*. 207:2817-30, 2010. (Epub 2010 Nov 22.) \**corresponding author*
  7. Suzuki-Inoue K, Inoue O, Ding G, Nishimura S, Hokamura K, Eto K, Kashiwagi H, Tomiyama Y, Yatomi Y, Umemura K, Shin Y, Hirashima M, Ozaki Y. Essential in vivo roles of the c-type lectin receptor CLEC-2: Embryonic/neonatal lethality of CLEC-2-deficient mice by blood/lymphatic misconnections and impaired thrombus formation of CLEC-2-deficient platelets. *J Biol Chem*. 285:24494-507, 2010. Aug 6. (Epub 2010 Jun 4.)
  8. Takizawa H, Nishimura S, Takayama N, Oda A, Nishikii H, Morita Y, Kakinuma S, Yamazaki S, Okamura S, Tamura N, Goto S, Sawaguchi A, Manabe I, Takatsu K, Nakauchi H, Takaki S, Eto K. Lnk regulates integrin alphaIIb beta3 outside-in signaling in mouse platelets, leading to stabilization of thrombus development in vivo. *J Clin Invest*. 120:179-90, 2010. Jan 4. (Epub 2009 Dec 21.)
  9. Oki T, Eto K, Izawa K, Yamanishi Y, Inagaki N, Frampton J, Kitamura T, Kitaura J. Evidence that integrin alpha IIb beta 3-dependent interaction of mast cells with fibrinogen exacerbates chronic inflammation. *J Biol Chem*. 284:31463-72, 2009. Nov 6. (Epub 2009 Sep 15.)
  10. Okabe M, Otsu M, Ahn DH, Kobayashi T, Wakiyama Y, Morita Y, Onodera M, Eto K, Ema H, Nakauchi H. Definitive proof for direct reprogramming of hematopoietic cells to pluripotency. *Blood*. 114:1764-7, 2009. Aug 27. (Epub 2009 Jun 29.)
  11. Nishimura S, Manabe I, Nagasaki M, Eto K, Yamashita H, Ohsugi M, Otsu M, Hara K, Ueki K, Sugiura S, Yoshimura K, Kadowaki T, Nagai R. CD8+ effector T cells contribute to macrophage recruitment and adipose tissue inflammation in obesity. *Nat Med*. 15:914-20, 2009. Aug. (Epub 2009 Jul 26.)
  12. 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*. 27:1120-9, 2009. May.
- 他
- [学会発表] (計 56 件)
1. Eto K. “Blood generation from iPS cells toward clinical applications” (第 32 回日本炎症・再生医学会 1st Meeting of Asian-Pacific Federation of Inflammation and Regeneration 合同開催) Jun 2-3, 2011. (Kyoto, JAPAN.) *Invited Speaker*
  2. Takayama N, Sano S, Shimizu T, Kawahata R, Endo H, Nakamura S, Ogawa S, Nakauchi H, Eto K. “Epigenetic Memory Enables the Dominant Generation of Adult-Type Erythrocytes From Human Induced Pluripotent Stem Cells” 52st American Society of Hematology Annual Meeting and Exposition. Dec 4-7, 2010. (Orlando, U.S.A.) *Oral*
  3. Nishimura T, Kaneko S, Gotoh H, Takayama N, Shimizu T, Iriguchi S, Tajima Y, Yasui Y, Watanabe N, Takahashi S, Eto K, Nakauchi H. “Generation of Monoclonal TCR-Expressing Human T-Lineage Lymphocytes From Induced Pluripotent Stem Cells of Signal Peripheral T-Lymphocyte Origin” 52st American Society of Hematology Annual Meeting and Exposition. Dec 4-7, 2010. (Orlando, U.S.A.) *Oral*
  4. Eto K, Gary Lyons, Andre Terzic. “ES Cells and iPS Cells for Cardiovascular Research” American Heart Association SCIENTIFIC SESSIONS 2010. Nov 13-17, 2010. (Chicago, U.S.A.) *Invited Speaker (Session)*
  5. Eto K. “Novel Target of Ex Vivo Expansion; Integrin  $\alpha v \beta 3$  Ligation Enables Regulation of Hematopoietic Stem Cell Division Leading to

- Maintenance of Reconstitution Potential” The 1st ISCT Asia-Pacific Regional Meeting. Oct 17-20, 2010. (Miyazaki, Japan.) **Invited Speaker**
6. Eto K. “Human Induced Pluripotent Stem Cell-derived Blood Cells toward Clinical Application” The 1st ISCT Asia-Pacific Regional Meeting. Oct 17-20, 2010. (Miyazaki, Japan.) **Invited Speaker**
  7. Suzuki N, Yamazaki S, Yamaguchi T, Takaki S, Eto K., Nakauchi H. “Generation of engraftable hematopoietic stem cells from teratomas formed by an injection of induced pluripotent stem cells” International Society for Stem Cell Research 8th Annual Meeting (ISSCR). June 16-19, 2010. (San Francisco, U.S.A.) **Oral Session**
  8. Chan T, Hayashi Y, Takayama N, Otsu M, Eto K., Furue-Kusuda M, Ohnuma K, Nakauchi H, Asashima M. “Feeder and serum free culture of human induced pluripotent stem cells” International Society for Stem Cell Research 8th Annual Meeting (ISSCR). June 16-19, 2010. (San Francisco, U.S.A.) **Poster Session**
  9. Nishimura T, Kaneko S, Gotoh H, Takayama N, Nakamura S, Shimizu T, Iriguchi S, Tachikawa-Kawana A, Takahashi S, Watanabe N, Otsu M, Eto K., Nakauchi H. “Monoclonal guidance of T Lineage lymphocytes from human induced pluripotent stem cells originating from a single peripheral T Lymphocyte” International Society for Stem Cell Research 8th Annual Meeting (ISSCR). June 16-19, 2010. (San Francisco, U.S.A.) **Poster Session**
  10. Umemoto T, Yamato M, Shiratsuchi Y, Utsumi M, Terasawa M, Morita Y, Nishida K, Kobayashi Y, Petrich Brian G, Ginsberg Mark H, Nakauchi H, Eto K., Okano T. “CD61 is involved in thrombopoietin-mediated maintenance of mouse hematopoietic stem cells” International Society for Stem Cell Research 8th Annual Meeting (ISSCR). June 16-19, 2010. (San Francisco, U.S.A.) **Poster Session**
  11. Nishimura S, Takayama N, Otsu M, Nakamura S, Ohnishi R, Endo H, Nagai R, Nakauchi H, Eto K. “Novel in vivo imaging enables single-cell-level evaluation of the functionality of platelets derived from human induced pluripotent stem cells” International Society for Stem Cell Research 8th Annual Meeting (ISSCR). June 16-19, 2010. (San Francisco, U.S.A.) **Poster Session**
  12. Eto K. “Human iPS cells from Blood and Blood from iPS cells” Hematopoiesis in Health and Disease in Lund. May 15-17, 2010. (Lund, Sweden.) **Invited Speaker**
  13. Takayama N, Nakamura S, Nishimura S, Ohnishi R, Takahashi K, Yamanaka S, Eto K., and Nakauchi H. “Cancellation of c-MYC Silencing in Human Induced Pluripotent Stem Cells Contributes to the Efficient in Vitro Production of Platelets with the Ability of Hemostasis In Vivo” 51st American Society of Hematology Annual Meeting and Exposition. Dec 5-8, 2009. (New Orleans, U.S.A.) **Poster Session**
  14. Umemoto T, Yamato M, Shiratsuchi Y, Tsukada K, Utsumi M, Morita Y, Terasawa M, Shibata T, Nishida K, Kobayashi Y, Petrich Brian G, Ginsberg Mark H, Nakauchi H, Eto K., and Okano T. “CD61/Integrin  $\beta 3$  Ligation Contributes to the Thrombopoietin-Mediated Niche Function of Mouse Hematopoietic Stem Cells” 51st American Society of Hematology Annual Meeting and Exposition. Dec 5-8, 2009. (New Orleans, U.S.A.) **Speaker**
  15. Eto K. “NOVEL THERAPEUTIC STRATEGY IN PATIENTS WHO REQUIRE REPEATED TRANSFUSION OF HUMAN LEUKOCYTE ANTIGEN-MATCHED PLATELETS DERIVED FROM HUMAN INDUCED PLURIPOTENT STEM CELLS” XXth REGIONAL CONGRESS, ASIA. Nov 14-18, 2009. (Nagoya, JAPAN.) **Invited Speaker**
  16. Takayama N, Eto K., Nakamura S, Ohnishi R, Yamanaka S, Nakauchi H. “NOVEL THERAPEUTIC STRATEGY IN PATIENTS WHO REQUIRE REPEATED TRANSFUSION OF HUMAN LEUKOCYTE ANTIGEN-MATCHED PLATELETS DERIVED FROM HUMAN IPS CELLS” International Society for Stem Cell Research 7th Annual Meeting (ISSCR). June 8-11,

2009. (Barcelona, Spain.) **Poster Session**

他

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 5 件)

名称：多能性幹細胞からの巨血球及び／又は血小板の製造方法

発明者：西野泰斗、中村隆典、岩本俊介、江藤浩之、辻嘉代子、中内啓光

権利者：日産化学工業株式会社、国立大学法人東京大学

種類：特許

番号：特願 2011-219545

出願年月日：2011/10/3

国内外の別：日本

名称：血小板の機能を維持するための組成物

発明者：江藤浩之、大西椋子、中内啓光、村田隆彦

権利者：国立大学法人東京大学 科研製薬株式会社

種類：特許

番号：PCT/JP2011/071190

出願年月日：2011/9/16

国内外の別：世界知的所有権機関 (WIPO)

名称：多能性幹細胞からの血液細胞分化に関する培養方法

発明者：佐野進弥、江藤浩之、高山直也、中内啓光

権利者：国立大学法人東京大学 テルモ株式会社

種類：特許

番号：PCT/JP2011/070563

出願年月日：2011/9/9

国内外の別：世界知的所有権機関 (WIPO)

名称：血小板産生方法及び血小板産生装置

発明者：江藤浩之、中内啓光、福田敏男、高松遼、新井史人

権利者：国立大学法人東京大学 国立大学法人名古屋大学

種類：特許

番号：特願 2011-143383

出願年月日：2011/6/28

国内外の別：日本

名称：血小板産生の場構築の為の巨核球細胞の多核化の促進法

発明者：江藤浩之、中内啓光、高山直也、中村壮

権利者：国立大学法人東京大学

種類：特許

番号：特願 2011-108253

出願年月日：2011/5/13

国内外の別：日本

○取得状況 (計 1 件)

名称：ES 細胞からの造血前駆細胞を内包する構造物、及び該構造物を用いた血球細胞の調製法

発明者：中内啓光、江藤浩之、高山直也、錦井秀和、津久井弘子

権利者：国立大学法人東京大学

PCT/JP2007/001081/W02008/41370 登録済み  
2011年7月20日 (英国) 2011年11月15日 (米国)

〔その他〕

ホームページ等

[http://www.cira.kyoto-u.ac.jp/j/research/eto\\_summary.html](http://www.cira.kyoto-u.ac.jp/j/research/eto_summary.html)

<http://www.cira.kyoto-u.ac.jp/eto/>

## 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

研究者番号：50286986