

## 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 15 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21591250

研究課題名（和文）

ヒト皮下脂肪組織からの新規分化誘導法による血小板産生

研究課題名（英文）

Generation of platelets from human subcutaneous adipose tissues in a culture system

研究代表者

松原 由美子 (MATSUBARA YUMIKO)

慶應義塾大学・医学部・特任講師

研究者番号：70365427

研究成果の概要（和文）：ヒトあるいはマウス皮下脂肪組織、脂肪前駆細胞は、造血幹細胞からの血小板産生用の培地を培養に用いると血小板を再現性よく、大量に産生する。これら細胞から得られた血小板と造血幹細胞から得られた血小板、末梢血小板の機能を詳細に比較した結果、皮下脂肪組織あるいは脂肪前駆細胞から得られた血小板は造血幹細胞から得られた血小板より、血小板機能は亢進していることを見いだした。末梢血小板との比較では、採血後 2 時間の血小板の方が高い血小板機能を示したが、採血後 6-7 時間の血小板の方が低い血小板機能を示した。

研究成果の概要（英文）：A large amount of platelets were generated from subcutaneous adipose tissues and preadipocytes in a highly-reproducible culture system using established culture media to differentiate of hematopoietic stem cells into platelets. Platelet functions were examined in peripheral platelets and cultured platelets. As compared with hematopoietic stem cell-derived platelets and platelets after 6-7hrs of blood drawing, adipose tissue-derived platelets showed higher functions in platelet activation and thrombus formation.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010 年度	700,000	210,000	910,000
2011 年度	800,000	240,000	1,040,000
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

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：輸血学

## 1. 研究開始当初の背景

血小板は生理的止血の中心的役割を演じており、血小板減少による出血症状で重篤な場合は死に至る。血小板減少に対するアプローチとして血小板輸血が用いられているが、需要と供給のアンバランスに加え、血小板輸血製剤は短い保存期間、感染症のリスク、繰り

返し輸血による抗体産生など問題点を有しており、安全な血小板輸血の安定供給システムの確立は医療現場において急務である。幹細胞の概念の確立や細胞の分化・増殖因子の近年著しい研究成果により、血小板も試験管内で幹細胞からの分化誘導により得られるようになり、輸血用血小板の試験管内の大

量産研究が非常に注目されている。これまでに試験管内での血小板産生の starting material として論文や学会で報告されているものに CD34 陽性細胞、胚性幹細胞 (ES 細胞)、人口多能性幹細胞 (iPS 細胞)、そして申請者らが発表した脂肪組織がある。

造血幹細胞として知られる CD34 陽性細胞から試験管内での血小板産生プロトコールは以前より確立されており、比較的容易に血小板を得ることができる。しかし大きな問題は、CD34 陽性細胞の典型的な採取源である骨髄細胞を得るためにはドナーに大きな負担がかかる点である。さらに CD34 陽性細胞は試験管内における未分化性の維持の困難や増殖能が乏しいことから、研究目的においても臨床応用目的においても血小板産生研究では不利な点が多い。ES 細胞は優れた増殖能を有している。したがって、試験管内での血小板産生の starting material として有力であるが、ES 細胞から分化誘導により血小板産生を行うためには高度な実験技術を習得する必要がある。現在、世界中で申請者の研究グループを含むわずかな数のグループが日常的に ES 細胞から血小板産生を試験管内で成功させているに過ぎない。iPS 細胞は患者本人の体細胞からの作成が可能であり、繰り返し輸血による白血球抗原に対する抗体産生の対策においては有効な starting material と考えられる。しかしながら、iPS 細胞作成にあたり遺伝子導入が避けられない現況において、iPS 細胞使用における安全性の検討には今後相当な時間を要することは間違いない。このように、CD34 陽性細胞、ES 細胞、iPS 細胞は試験管内で血小板産生を行うための starting material として長所と短所を有している。そこで申請者はこれら 3 つのすべての長所を有し、短所を持たない皮下脂肪組織を血小板産生の starting material として着目した。

## 2. 研究の目的

申請者が見いだした「ヒト皮下脂肪組織から血小板が得られる細胞培養システム」により産生される血小板、造血幹細胞から分化誘導にて得られる血小板、末梢血小板の characterization、特に機能を詳細に比較して、ヒト皮下脂肪組織から得られた血小板の基礎研究・臨床応用への有用性を検討する。

## 3. 研究の方法

ヒトあるいはマウス皮下脂肪組織、脂肪前駆細胞株、造血幹細胞から分化誘導で得られた血小板と末梢血小板のそれぞれに機能検討をはじめとする characterization を詳細に行い、対象サンプルの相違を比較解析する。

## 4. 研究成果

*in vitro*血小板産生の starting material として、ヒト皮下脂肪組織、ヒト造血幹細胞、マウス脂肪前駆細胞株、マウス皮下脂肪組織を用い、それぞれから得られた血小板とヒト血小板あるいはマウス血小板の characterization を行った。血小板の characterization として、電子顕微鏡による微細構造の観察、フローサイトメトリー法による血小板特異的表面マーカー (CD41、CD42a、CD42b) の検討、機能検討として、4種の血小板機能惹起剤 (エピネフリン、ADP、コラーゲン、リストセチン) それぞれで刺激した際の血小板活性化マーカーの P-selectin 血小板膜発現、fibrinogen との結合能、そして活性化血小板に反応する抗体 PAC-1 との反応性の解析を行った。固相 fibrinogen に上記 4種の惹起剤と TRAP それぞれで刺激した場合の血小板を反応させ、上記同様に免疫染色を行った。これら検討の結果、脂肪組織から *in vitro* 分化誘導にて得られた血小板は造血幹細胞から得られるものに比し、高い血小板機能を有する事を認めた。また、採血後 2 時間での血小板サンプルとの比較では、採血された血小板の方が高い血小板機能を示したが、採血後 6-7 時間の血小板との比較では、脂肪組織から *in vitro* 分化誘導にて得られた血小板の方が高い機能を有する事を認めた。本研究結果は、ヒト皮下脂肪組織から *in vitro* 分化誘導にて得られた血小板は血小板輸血に有用な可能性を示した。

## 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 9 件)

Matsubara Y, Murata M, Ikeda Y. Culture of megakaryocytes and platelets from subcutaneous adipose tissue and a preadipocyte cell line. *Methods Mol Biol.* 2012;788:249-58. 査読有り

Arai T, Kawamura A, Matsubara Y, Yokoyama K, Ikeda Y, Fukuda K, Murata M. Effect of chronic kidney disease on platelet reactivity to dual antiplatelet therapy in patients treated with drug eluting stents. *Heart Vessels*. 2011 Aug 12. [Epub ahead of print] 査読有り

Ono M, Matsubara Y, Shibano Y, Ikeda Y, Murata M: GSK-3 $\beta$  negatively regulates megakaryocyte differentiation and platelet production from human bone marrow cells *in vitro*. *Platelets*. 22: 196-203, 2011

Matsubara Y: Low Responsiveness to Antiplatelet Drugs. *J Jpn Coll Angiol* 51: 309-314, 2011 査読無し

Matsubara Y, Suzuki H, Ikeda Y, Murata M: Generation of megakaryocytes and platelets from preadipocyte cell line 3T3-L1, but not the parent cell line 3T3, *in vitro*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 402: 796-800, 2010 査読有り

松原由美子: 巨核球・血小板の *in vitro* 分化誘導法 *日本血栓止血学会誌* 21 (5); 509-513, 2010 査読無し

Matsubara Y, Saito E, Suzuki H, Watanabe N, Murata M, Ikeda Y. Generation of megakaryocytes and platelets from human subcutaneous adipose tissues. *Biochem Biophys Res Commun.* 378: 716-720, 2009 査読有り

松原由美子: I 総説 血小板産生機構 最新医学・新しい診断と治療のABC 63: 9-16, 2009 査読無し

松原由美子: I 総論 血小板・凝固線溶系検査の解釈 *日本内科学会誌* 98: 19-24, 2009 査読無し

[学会発表](計11件)

Wang Y, Ono Y, Ikeda Y, Okamoto S, Murata M, Poncz M, Matsubara Y. Induction of

Megakaryocytes from Fibroblasts by p45NF-E2/Maf. 53<sup>rd</sup> The American Society of Hematology. 2011年12月13日 San Diego (USA)

Ono Y, Matsubara Y, Iida K, Suzuki H, Ikeda Y, Okamoto S, Murata M. Induction of Megakaryocytes from Fibroblasts by p45NF-E2/Maf 第73回日本血液学会 2011年10月15日 名古屋国際会議場 (名古屋)

Sonoda A, Matsubara Y, Suzuki H, Ikeda Y, Matsuo K, Murata M: Generation of Megakaryocytes from Mouse Subcutaneous Adipose Tissues *in vitro*. 第72回日本血液学会 2010年9月24日 パシフィコ横浜 (横浜)

Matsubara Y, Ono Y, Suzuki H, Arai F, Suda T, Murata M, Ikeda Y. Differentiation of OP9 Bone Marrow Stroma Cells into Megakaryocytes and Platelets via a p45NF-E2-mediated Mechanism. XXIII The International Society on Thrombosis and Haemostasis. 2011年7月25日 国立京都国際会館 (京都)

Ono M, Matsubara Y, Shibano T, Ikeda Y, Mitsuru Murata. GSK-3 negatively regulates thrombopoiesis in an *in vitro* normal human CD34 positive cell derived differentiation system. XXII The International Society on Thrombosis and Haemostasis. 2009年7月14日 Boston (USA)

Matsumoto K, Matsubara Y, Hoshino H, Yokoyama K, Watanabe G, Shibano T, Suzuki N, Ikeda Y, Murata M. An inhibitory role of platelet CD109 in platelet function. XXII The International Society on Thrombosis and Haemostasis. 2009年7月13日 Boston (USA)

Yamaji K, Matsubara Y, Hoshino H, Suzuki N, Ikeda Y, Murata M. Effect of aspirin administration on GPIb alpha shedding: association of glyocalycin level with platelet sensitivity to aspirin. XXII The

International Society on Thrombosis and Haemostasis. 2009年7月13日 Boston (USA)

Yokoyama K, Tsukada Y, Matsubara Y, Kawai Y, Oikawa Y, Shimada A, Itoh H, Murata M, Ikeda Y. Could D-dimer in the type 2 diabetic patients be a marker of the macrovascular complications. XXII The International Society on Thrombosis and Haemostasis. 2009年7月13日 Boston (USA)

小野真由美、松原由美子、芝野俊郎、池田康夫、村田満。血小板産生における GSK-3β の役割: *in vitro* 分化誘導法による検討。第32回日本血栓止血学会 2009年6月6日 リーガロイヤルホテル (北九州)

松本公宏、松原由美子、星野晴彦、横山健次、芝野俊郎、鈴木則宏、池田康夫、村田満。血小板CD109の血小板機能調節における役割。第32回日本血栓止血学会 2009年6月6日 リーガロイヤルホテル (北九州)

松原由美子。ヒト皮下脂肪組織からの *in vitro* 分化誘導による巨核球分化・血小板産生。第32回日本血栓止血学会 2009年6月4日 リーガロイヤルホテル (北九州)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

松原 由美子 (MATSUBARA YUMIKO)

慶應義塾大学・医学部・特任講師

研究者番号: 70365427

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし