

科学研究費助成事業（基盤研究（S））公表用資料
〔令和5（2023）年度 中間評価用〕

令和5年3月31日現在

研究期間：2021～2025
課題番号：21H05047
研究課題名：血小板産生メカニズムの基本原理解明と医療応用技術の展開
研究代表者氏名（ローマ字）：江藤 浩之（ETO Koji）
所属研究機関・部局・職：京都大学・iPS細胞研究所・教授
研究者番号：50286986

研究の概要：

本研究では血小板造血の生体外再構成システムを活用し、血小板産生場であるヒト巨核球の脂質二重膜が乱流シグナルを通じて再構成され、最終的に脂質二重膜が切断されるまでの血小板産生分子メカニズムを理解する。具体的には、複数のセンシング受容体の使い分け機構や、脂質膜の切断が行われる分子機構を示し、新しい造血概念を提唱するとともに、人工血小板製造を今までにない高い効率で実現させる。

研究分野：血液および腫瘍内科学、生体医工学

キーワード：血小板、巨核球、バイオリアクター、脂質膜、乱流

1．研究開始当初の背景

血小板は止血機能に不可欠であり、血小板減少時には輸血治療が実施されるが、他にも生理活性物質の運搬、血管統合性の維持、細菌感染症への自然免疫防御等の生体の恒常性維持に寄与する。代表者らは、ヒトiPS細胞由来巨核球前駆細胞株imMKCLを活用した巨核球の大量培養技術、マウス生体内観察による血小板造血メカニズム探索から、血小板を効率よく産生させる乱流エネルギー及びせん断力応力の発見に基づく乱流刺激依存バイオリアクターを開発することに成功し、輸血製剤に必要な1000億個レベルの良質な血小板の製造を実現した。この乱流概念は、骨髄以外の肺静脈における血小板産生に血管内で発生する乱流も関与するなど、重要な機構と推測されるがその作用メカニズムは不明のままである。

2．研究の目的

(1) 乱流刺激が巨核球成熟を制御するメカニズムおよび成熟過程の時空間的不均一性の原因は何か？
(2) 巨核球から血小板を産生する際の、巨核球の細胞膜の再構成および膜切断の分子メカニズムは何か？
の2つに対する解答を本提案では明らかにする。従来のマウス固体モデルでは明らかにできなかった新規概念の発見を目指し、生体外再構成システムを最大限活用し、視覚的・統合的な解析を通じて細胞の多様性不均一性の背景にある普遍的な原理を解明することを目指す。その出口として最終的に人工血小板製造を今までにない高い効率で実現させる。

3．研究の方法

乱流刺激が、血小板産生予備状態である分離膜形成、ミトコンドリア数の増加と分配、脂質二重膜再構成を促進することを予備実験から発見していた。その知見に基づき、下記の項目を進める。

(1) **乱流刺激が巨核球成熟を制御するメカニズム解明、成熟過程の時空間的不均一性の原因探索**
成熟過程の時間的な推移ごとに異なる乱流センサーが存在することを強く示唆する結果を得たことから、複数の候補分子・構造体の発現抑制（ノックダウンまたはノックアウト）に伴う巨核球成熟と血小板産生の評価を実施し、成熟過程の分子メカニズムとそれが細胞毎に不均一になる原因を解明する。
(2) **巨核球からの血小板産生時の、巨核球の細胞膜の切断責任分子の同定と切断膜モデルの構築**
巨核球由来の複数の脂質膜切断タンパクに関し、人工脂質膜（リボソーム）を用いてその膜変形能力、膜切断活性を検証し、候補タンパクを絞り込む。さらに、巨核球由来脂質膜の調整法を最適化し、見出したタンパクによる脂質膜切断のin vitro再構成（実証実験）とそのエフェクター同定までを目指す。
(3) **新規培養システムの開発**
非閉鎖系回転式培養槽のアイデアの実現による高効率血小板産生方法の確立を行う。

4．これまでの成果

1) 乱流のセンサーは、細胞膜表面の繊毛と当初は想定していたが、典型的な繊毛とは異なる構造体を認めた。そしてイオンチャンネルおよび細胞外小胞（EV）が寄与し、ミトコンドリア活性が血小板品質に寄与する可能性も見出した。
2) 計画外であったが、脂質膜切断に寄与すると目されるBARドメインタンパクの一つIRSp53は、貪食に関与する新規細胞集合メカニズムやEV形成に寄与することが示唆され、IRSp53依存性の細胞突起形成の亢進が細胞接着依存的な機構として機能することを見出した。

- 3) 血小板製造培養槽の開発は、乱流エネルギーとせん断ずり応力の2つの規定パラメータの最適値を維持したまま50L規模まで乱流型培養槽を拡大しても産生効率が低下する事が判明した。この原因となる新たな物理パラメータは同定され、新規培養槽開発に繋げている。
- 4) 計画外であったが、成熟過程での細胞不均一性を示すimMKCLには、生体内巨核球と同様に、“低血小板生成・免疫性分画”及び“自然免疫血小板産生分画”が存在し、免疫巨核球の質が細胞老化と関連し、血小板産生能力にも強い影響を与える新しいメカニズムを発見しつつある。

5 . 今後の計画

生体内での各種の病態や年齢差に伴って生まれる複数の血小板産生様式に関し、生体外再構成実験を通じて、脂質膜リモデリング機構を含む多様な血小板産生メカニズムを理解し、新たな生体外製造方法の開発に繋げることが期待される。

- 1) 乱流センシングの解明に関しては、ミトコンドリア応答メカニズム、イオンの制御の観点を含めて進め、ミトコンドリアとマイトファジー機構の関与、ミトコンドリア活性と血小板品質、チューブリン構造の減弱化とHDACファミリーなどの検証とメカニズム解明を行う。
- 2) 巨核球から血小板が産生される際の脂質膜再構成と切断機構の解明は、関与候補 BAR ドメインタンパク質の改変 imMKCL の作製、乱流刺激後に脂質膜集積において変動したタンパク質の個別解析、M16 エンドペプチダーゼの脂質膜管形成や脂質 EV 形成に関する確認検証、などを行う。
- 3) 血小板製造に応用した新規の培養槽の開発では、新規判明因子がうまく設定できない50L縦型乱流刺激型血小板製造培養槽の問題点を明確化して解決策を見出し、灌流様式による新設計培養に関する設計とそのプロトタイプを作製を開始する。
- 4) imMKCLにおいて老化した免疫巨核球集団が全体への影響を及ぼし、血小板産生を低下させる分子レベルでのメカニズムの解明を行う。

6 . これまでの発表論文等 (受賞等も含む)

1. Mukherjee A, Ron JE, *Suetsugu S (10人中9番), *Nain AS. Actin Filaments Couple the Protrusive Tips to the Nucleus through the I-BAR Domain Protein IRSp53 during the Migration of Cells on 1D Fibers. **Adv Sci (Weinh)**. 2023 Mar;10(7):e2207368. doi: 10.1002/advs.202207368.
2. Sugimoto N (19人中1番), Nakamura S (19人中2番), *Eto K (19人中19番). Production and nonclinical evaluation of an autologous iPSC-derived platelet product for the iPLAT1 clinical trial. **Blood Adv**. 2022 Dec 13;6(23):6056-6069.
3. Sugimoto N (26人中1番), Nakamura S (26人中3番), *Eto K (26人中26番). iPLAT1: The first-in-human clinical trial of iPSC-derived platelets as a phase 1 autologous transfusion study. **Blood**. 2022 Dec 1;140(22):2398-2402.
4. Anggraini D, Mubarak W, Hosokawa Y, Eto K, Suetsugu S, *Yalikun Y. Reverse sorting of immortalized megakaryocyte progenitor cell lines (imMKCLs) by femtosecond laser scanning. **Applied Physics Express** 2022,15 (10): 107001.
5. Nishimura T, *Suetsugu S. Super-resolution analysis of PACSIN2 and EHD2 at caveolae. **PLoS One**. 2022 Jul 14;17(7):e0271003.
6. Oe Y, Kakuda K, Ikenaka K, Suetsugu S (12人中10番目), Mochizuki H, Yoshimori T, *Nakamura S. PACSIN1 is indispensable for amphisome-lysosome fusion during basal autophagy and subsets of selective autophagy. **PLoS Genet**. 2022 Jun 30;18(6):e1010264.
7. 江藤浩之 “生体外血小板製造システムの発展” **日本内科学会雑誌** 111(9): 1747-1751, 2022.
8. 杉本直志、江藤浩之 “血小板の再生医療” **日本医師会雑誌** 151(4): 605-608, 2022.
9. Elagib KE, Brock A, Eto K (21人中11番目), *Goldfarb AN. Relieving Dyrk1a repression of MLK1 confers an adult-like phenotype to human infantile megakaryocytes. **J Clin Invest**. 2022, 132(19): e154839.
10. Itokawa N, Oshima M, Eto K (12人中11番目), *Iwama A. Epigenetic traits inscribed in chromatin accessibility in aged hematopoietic stem cells. **Nat Comm**. 2022 May 16;13(1):2691.
11. 杉本直志、江藤浩之 “iPS細胞由来血小板の臨床応用” **臨床血液**. 63(10): 1430-1439, 2022.
12. Senju Y, *Suetsugu S. Interaction of Proteins with Biomembranes. **Membranes (Basel)**. 2022 Feb 2;12(2):181.
13. Sone M, Nakamura S (19人中2番), Sugimoto N (19人中14番), *Eto K (19人中18番), *Takayama N. Silencing of p53 and CDKN1A establishes sustainable immortalized megakaryocyte progenitor cells from human iPSCs. **Stem Cell Rep**. 2021 Dec 14;16(12):2861-2870.

7 . ホームページ等

京都大学 iPS細胞研究室 臨床応用研究部門 幹細胞応用研究分野

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

奈良先端科学技術大学院大学 バイオサイエンス領域 分子医学細胞生物学

<https://bsw3.naist.jp/suetsugu/>