



「革新的血小板創製技術の確立と医療応用」グループ

## 研究概要集

平成 30 年 3 月 26 日

グループリーダー 松原 由美子

地方独立行政法人神奈川県立産業技術総合研究所



# 目次

## <総括>

1. はじめに	(1)
2. 基本構想	(1)
3. 研究成果	(3)
4. 今後の展望	(4)
5. 業績	(5)
6. プロジェクト参加者一覧	(11)

## <研究報告>

ASC から血小板作製を行う際の効率化研究	1
ヒト脂肪由来間葉系間質細胞からの巨核球・血小板分化誘導システム： トランスフェリン/CD71/TPO 分泌機序を介した高効率産生	
ASC から血小板作製を行う際の効率化研究	14
ヒト脂肪由来間葉系間質細胞の株化	



# < 総括 >



## 総括

### 1. はじめに

血小板は、幹細胞から未成熟巨核球、成熟巨核球への分化を経て、最終分化産物として産生される。この過程において、幹細胞から巨核球に分化する際には細胞分裂を行わず、染色体数を増加させる多倍核化 (DNA ploidy) という非常にユニークな現象を示す。この多倍核化は2Nから128N程度が認められるが、この様式を有するために出血時において、血小板は通常の20倍以上の産生増加が可能であるとも考えられている。成熟巨核球は血小板を産生する。通常、血小板の産生は巨核球1個あたり約1,000個で1日あたりの産生量は $10^{11}$ 個である、と計算されている。血小板寿命は約1週間である。

血小板は、1800年代の中～後期にAddisonやOsler、De Gaetano、Hayemらによって血液循環中に発見された。その後Bizzozeroは、血小板の機能を見いだした。1900年はじめには、血小板が巨核球に由来することがWrightにより示唆された。1970年代に開発が進んだコロニーアッセイにより血球前駆細胞の解析が進んだ。1980年・1990年代には、たんぱく解析も遺伝子解析も技術の発展を背景に巨核球・血小板に特異的に直接作用するサイトカインであるトロンボポエチン(TPO)の同定、また巨核球分化・血小板産生に重要な転写因子が明らかにされた。遺伝子制御に関わる転写因子の同定・その機能解析により、巨核球分化・血小板産生における遺伝子発現制御機構を理解することができる。また、TPOの同定は、*in vitro* 分化誘導システムにおける巨核球の誘導を可能とし、更に発展著しい再生医学技術を応用することにより巨核球・血小板造血研究は最近急速に発展してきたと言える。これら背景、そして私たちの血小板研究の実績を強みとして、本プロジェクト研究では、将来的に輸血医療応用を目指す血小板作製プロトコールの確立を基礎研究を中心に行った。

### 2. 基本構想

血小板は体内で止血作用を有する他類なき細胞である。抗がん剤使用時や外傷などで起こる血小板減少に対する確立された治療法は血小板輸血のみである。その血小板輸血は100%献血に依存している。解決が急務とされている問題点は、高齢化社会に伴い血小板輸血を必要とするがん患者の増加しているが、一方で献血者は減少していることである。さらに輸血用血小板は、採血日を含み僅か4日間の保存期間であることから、輸血用血小板の不安定在庫が問題視されている。この世界的課題解決に向けて、医療応用できる血小板を安全、安定的、大量に作製する試みが注目され、血小板の専門家や幹細胞の専門家などが研究を行っている。

しかし血小板のみならず、その産生源である造血幹細胞も試験管内での増殖能が期待出来ない。皮膚の線維芽細胞は、採取が比較的容易であることや試験管内での増殖能の高さから、従来は皮膚の線維芽細胞から iPS 細胞を作成し、次にそれを血小板に分化させて輸血医療に応用するという煩雑で長い行程が考えられていた。私たちは 2012 年の研究成果により、皮膚の線維芽細胞から単純で短い行程で血小板作成を可能にした。これは、血小板分化の決定因子 NF-E2 の同定に成功し、NF-E2 遺伝子発現ベクターを皮膚線維芽細胞に導入することにより、皮膚線維芽細胞から血小板を作製する基礎の知見となった。従来は、皮膚線維芽細胞をスタート細胞とする場合、4 種類の遺伝子導入を行って iPS 細胞を作製し、iPS 細胞から血小板を作製する技術のみが存在していたが、私たちの血小板作製方法は、皮膚線維芽細胞から iPS 細胞を経由せず、直接血小板を作製する方法である。さらに皮膚の線維芽細胞に導入した血小板への運命決定因子は、生体内における血小板が元々持っている因子であるため、この新規方法は、iPS 細胞を作成するための 4 種類の運命決定因子のようにがん関連因子の持つ医療応用への懸念点を回避し、皮膚の線維芽細胞の利点のみを活かしている。この新規方法は、長い間不明であった血小板への運命決定因子を独創性の高い研究デザインから発見した基礎研究成果に基づいて、安全に輸血用血小板を安定供給出来るシステム確立を目指して開発されていた。

その後、医療応用可能な血小板を皮下脂肪組織に存在する細胞から作製できる可能性に着目した。その大きな理由は、遺伝子導入を必要としないことである。先に、転写因子である NF-E2 (p45NFE2/Mafs) の遺伝子導入を皮膚線維芽細胞に行えば血小板作製と述べたが、皮下脂肪組織に存在する細胞の中で脂肪前駆細胞として市販されている細胞は NF-E2 を内在していることを見出したことから、医療応用目的として細胞作製を行うには遺伝子導入の過程は無い方が好ましいと考えた。

本プロジェクトは、2013 年 4 月から 2015 年 3 月の間の戦略的シーズ事業、2014 年 10 月から 2018 年 3 月の間の「革新的血小板創製技術の確立と医療応用プロジェクト」として、合計 5 年間（フィージビリティ研究期間として戦略的シーズ事業の 2 年間を含む）にて行っている（図 1）。本研究期間において、プロジェクトの目的である作製血小板のプロトコル確立の大枠は、基礎研究に基づき、概ね完成できた。本研究終了後の今後は、実際に大量培養や規制当局の基準下での培養を行う研究を遂行していく。

## 革新的血小板創製技術の確立と医療応用プロジェクト

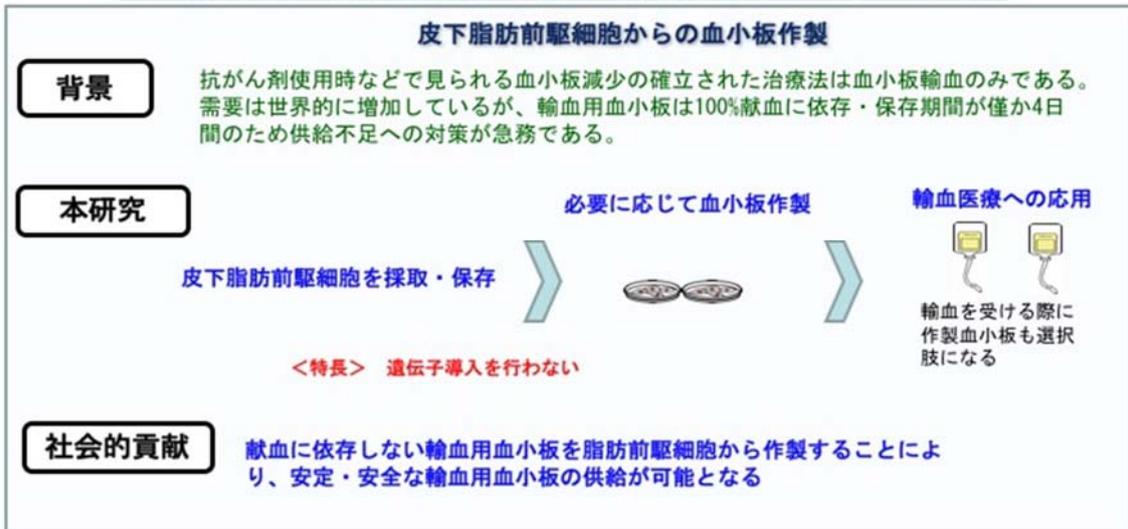


図 1. 革新的血小板創製技術の確立と医療応用プロジェクトの概要

### 3. 研究成果

本プロジェクトにおける重要な成果は、(1) 皮下脂肪前駆細胞（皮下脂肪由来間葉系間質細胞）(ASC) から血小板作製を行う際の効率化研究、(2) ASC の株化研究である。これら成果は、皮下脂肪前駆細胞（皮下脂肪由来間葉系間質細胞）をスタート細胞として血小板を作製するプロトコール（図 2）において、競争力のある新規知見であり、特許は慶應義塾と共同出願、現在は松原らが設立したバイオベンチャーである株式会社 AdipoSeeds に譲渡され実用化に向けたトラックにのっている。



図 2. 皮下脂肪組織に存在する細胞から血小板作製の工程

#### (1) ASC から血小板作製を行う際の効率化研究

血液細胞は、白血球、赤血球や血小板が存在する。これら血液細胞は、造血幹細胞からの分化最終産物である。その分化機構のメカニズムとして、転写因子とサイトカインの関与が重要と考えられている。血小板分化では、転写因子の NF-E2、サイトカインは TP0 が重要である。これまでの研究で ASC が NF-E2 を内在していることを見出していたが、本

研究において、ASCはTPOも内在していること、さらにASC内在TPOは刺激により誘導性に発現・分泌を行うという従来の発現様式とは異なっている点、その発現・分泌のメカニズムを基礎研究により解明した。これまで、TPOは肝臓にて主に恒常的に産生されていると報告されている。血小板分化の重要サイトカインであるTPOは組換え体としてつくられ、造血幹細胞、iPS細胞やES細胞など多能性幹細胞から*in vitro*で血小板に分化させるためには組換えTPOの添加が必須である。最近ではTPOの受容体c-MPL作動薬も開発され、その一部は*in vitro*血小板分化に適応するものもあるが、作製血小板の医療応用実用化において、それら使用は培地添加物としての適応、機能、コスト、使用権利などの点で、ASC細胞内在TPOの使用に比し、超えるべきハードルは高いと考えられる。したがって、本研究成果はASCからの血小板を作製する際の効率化につながっている。

## (2) ASCの株化研究

ASCは医療応用において優位性（免疫原性が低い、*in vitro*での増殖能が優れている、複数回の細胞継代においても遺伝子に置換が認められず安定）を持っており、世界各国で臨床研究が行われている。しかしASCは、単一の細胞から構成される細胞集団ではなく、間葉系幹細胞や血管内皮前駆細胞など種々の細胞を含んでいる。そのため、ロット差が大きく、他家細胞を用いた医療応用に使用する際の規格設定が容易ではない。そのロット差には増殖能も含まれる。そこで私たちは、ASCを精製・株化して比較的規格が均一な株化ASCであるASCL (Adipose-derived mesenchymal stem/stroma cell line) の作製を試み、ASCL樹立に成功した。ASCLはくりかえしの冷凍保存が可能で、作製血小板を計画的に大量供給するための大きな利点である。血小板を作製プロトコールにおいて、上記2つの研究成果は非常に独創力が強く、競争力が持てる知見と考える。

## 4. 今後の展望

本プロジェクト研究では、将来的に輸血医療応用を目指す血小板作製プロトコールの確立を基礎研究を中心に行った。本研究期間において、プロジェクトの目的である作製血小板のプロトコール確立の大枠は、基礎研究に基づき、概ね完成できた。本研究終了後の今後は、実際に大量培養や規制当局の基準下での培養を行う研究を遂行していく。

## 5. 業績

### 論文

1. Ono-Uruga Y, Tozawa K, Horiuchi T, Murata M, Okamoto S, Ikeda Y, Suda T, Matsubara Y. Human adipose tissue-derived stromal cells can differentiate into megakaryocytes and platelets by secreting endogenous thrombopoietin. *J Thromb Haemost.* 14(6):1285-1297, 2016.
2. Tozawa K, Ono-Uruga Y, Matsubara Y. Megakaryopoiesis. Clinical and experimental thrombosis and hemostasis. *Clin Exp Thromb Hemost*,1(2)54-58, 2014
3. Matsubara Y, No more sugar-coating it: mucins and platelet biology. *Blood* 122 (9): 1537-1538, 2013.
4. Yamaguchi Y, Moriki T, Igari A, Matsubara Y, Ohnishi T, Hosokawa K, Murata M. Studies of a microchip flow-chamber system to characterize whole blood thrombogenicity in healthy individuals. *Thromb Res.* 132 (2): 263-270, 2013.
5. Matsubara Y, Ono Y, Suzuki H, Arai F, Suda T, Murata M, Ikeda Y. OP9 bone marrow stromal cells differentiate into megakaryocytes and platelets. *Plos One* 8 (3): e58123, 2013.
6. Yamaguchi Y, Abe T, Sato Y, Matsubara Y, Moriki T, Murata M. Effects of VerifyNow P2Y12 test and CYP2C19\*2 testing on clinical outcomes of patients with cardiovascular disease: A systematic review and meta-analysis. *Platelets* 24 (5): 352-361, 2013。

### 総説

1. 松原由美子 : *in vitro*での血小板産生 日本血栓止血学会誌 27(5) 532-537, 2016
2. 戸澤圭一、松原由美子 : アナグレライド 日本血栓止血学会誌 27(1) 49-53, 2016
3. 小野-宇留賀友佳子、松原由美子 : 体細胞から直接血小板を作成する技術 医学のあゆみ 257 (3) 213-218, 2016

4. 小野-宇留賀友佳子、松原由美子：造血幹細胞ニッチとしての巨核球 巨核球  
Megakaryocytes regulate hematopoietic stem cell quiescence through CXCL4 secretion.  
Megakaryocytes maintain hematopoietic quiescence and promote post-injury regeneration of  
hematopoietic stem cells. Megakaryocytes are essential for HSC quiescence through the production of  
thrombopoietin. Annual Review 2016 血液 1-6 2016
5. 松原由美子、村田満：血小板と止血 止血・血栓ハンドブック 49-55 2015
6. 松原由美子：脂肪前駆細胞からの血小板作製 Thrombosis Medicine 5 (2) 22-27 2015
7. 松原由美子：血小板産生のメカニズム（新・血栓止血血管学） 2015
8. 小野-宇留賀友佳子、松原由美子：線維芽細胞→巨核球・血小板 ダイレクトリプログラミング 22-30 2015
9. 松原由美子：血栓形成における血小板の役割 ファーマコナビゲーターシリーズ 抗凝固  
療法編 38-46 2014
10. 松原由美子、村田満：血小板と止血（単行本）止血・血栓ハンドブック 49-55 2014
11. 松原由美子：マウスおよびヒト線維芽細胞から血小板への直接リプログラミング 細胞  
46 (5) 8-11, 2014
12. 松原由美子：血小板 再生医学学会用語集 2014
13. 松原由美子：線維芽細胞から巨核球へのダイレクトリプログラミング (Generation of  
Megakaryocytes from fibroblasts and preadipocytes) 臨床血液 55 (4) 387-395, 2014
14. 松原由美子：線維芽細胞から巨核球・血小板への direct conversion Annual Review 2014 血  
液 181-185, 2014
15. 松原由美子：抗血小板療法モニタリングの現状と問題点 Angiology Frontier 12 (3) 43-48,  
2013

16. Ono Y, Matsubara Y. Induction of megakaryocytes and platelet production from mouse and human fibroblasts by p45NF-E2/Maf 臨床血液 54 (11) 2025-2030, 2013

17. 森木隆典、松原由美子：血流下血栓形成能診断システム (T-TAS) の有用性 検査と技術 41 (9) 802-804, 2013

#### 学会発表

1. Keiichi Tozawa, Yukako Ono-Uruga, Masaki Yazawa, Taisuke Mori, Mitsuru Murata, Shinichiro Okamoto, Yasuo Ikeda, Yumiko Matsubara; Function of Manufactured Platelets from Adipose Stem Cell Line: Compared to Platelet Concentrates. 第 79 回 日本血液学会学術集会, 2017 年 10 月, 東京,

2. Keiichi Tozawa, Yukako Ono-Uruga, Taisuke Mori, Noriko Takizawa, Mitsuru Murata, Shinichiro Okamoto, Yasuo Ikeda, Yumiko Matsubara, Masaki Yazawa: Effects of Activated Human Platelet Releases on Wound Healing Immunodeficient Mice: Comparison with basic FGF. XXVI The International Society on Thrombosis and Haemostasis. 2017 年 7 月 ベルリン

3. Noriko Takizawa, Yukako Ono-Uruga, Keiichi Tozawa, Yasuo Ikeda, Yumiko Matsubara; c-MPL Adipose-derived Stromal Cells as a Megakaryocyte-biased Cells by a Single Cell Analysis. 第 78 回 日本血液学会学術集会, 2016 年 10 月, 横浜,

4. Keiichi Tozawa, Yukako Ono-Uruga, Masaki Yazawa, Taisuke Mori, Noriko Takizawa, Mitsuru Murata, Shinichiro Okamoto, Yasuo Ikeda, Yumiko Matsubara: Manufacture of Platelets from Human Adipose Tissue-derived Mesenchymal Stromal/Stem Cells: Functional Comparison to Platelet Concentrates. 58<sup>th</sup> American Society of Hematology .2016 年 12 月 サンディエゴ (Abstract Award 受賞)

5. Keiichi Tozawa, Yukako Ono-Uruga, Noriko Takizawa, Tadashi Horiuchi, Shinichiro Okamoto, Mitsuru Murata, Yasuo Ikeda, Yumiko Matsubara : Establishment of Human Adipose Tissue-derived Stromal Cell Lines: a Culture System to Manufacture Megakaryocytes Releasing Functional Platelets. 57<sup>th</sup> American Society of Hematology .2015 年 12 月 オランダ (Abstract Award 受賞)

6. Tozawa K, Ono-Uruga Y, Horiuchi T, Okamoto S, Murata M, Ikeda Y, Suda T, Matsubara Y: Identification of Megakaryocytic Progenitor Cells among Subcutaneous Pre-adipocytes Thrombopoietin. XXV The International Society on Thrombosis and Haemostasis. 2015 年 6 月 トロント
7. Keiichi Tozawa, Yukako Ono-Uruga, Noriko Takizawa, Tadashi Horiuchi, Yasuo Ikeda, Shin-ichiro Okamoto, Yumiko Matsubara; Establishment and Characterization of Human Pre-adipocyte Cell Line for Manufacturing Platelets. 第 77 回 日本血液学会学術集会, 2015 年 10 月, 金沢,
8. Yukako Ono-Uruga, Keiichi Tozawa, Noriko Takizawa, Tadashi Horiuchi, Mitsuru Murata, Shinichiro Okamoto, Yasuo Ikeda, Yumiko Matsubara; Characterization of MPL in Human Pre-adipocytes and Its Role in Megakaryocyte Differentiation 第 77 回 日本血液学会学術集会, 2015 年 10 月, 金沢,
9. 戸澤 圭一、小野-宇留賀 友佳子、堀内 正、村田 満、岡本 真一郎、池田 康夫、須田 年生、松原 由美子: ヒト脂肪前駆細胞からの巨核球分化誘導システム: トランスフェリン/CD71/TPO 分泌機序を介した高効率産生 第 37 回 日本血栓止血学会 2015 年 5 月 甲府
10. Ono-Uruga Y, Tozawa K, Matsuoka S, Horiuchi T, Okamoto S, Murata M, Ikeda Y, Suda T, Matsubara Y. A Novel Mechanism of Megakaryopoiesis from Pre-adipocytes: Involvement of Transferrin/ CD71/ TPO Pathways. 56<sup>rd</sup> The American Society of Hematology. 2014 年 12 月 サンフランシスコ
11. Ono-Uruga Y, Matsuoka S, Horiuchi T, Okamoto S, Murata M, Ikeda Y, Suda T, and Matsubara Y. Megakaryocyte Differentiation from Preadipocytes through the Production of Endogenous Thrombopoietin via CD71 第 76 回 日本血液学会 2014 年 10 月 大阪
12. Ono Y, Tanaka T, Igari A, Moriki T, Yokoyama K, Zama T, Horiuchi T, Murata M, Ikeda Y, Suda T, Matsubara Y. Subcutaneous Preadipocytes Are Ideal Candidate to

Produce A Large Number of Functional Platelets in a Culture System. 55<sup>rd</sup> The American Society of Hematology. 2013  
(Abstract Award 受賞)

13. Ono Y, Matsubara Y, Tanaka T, Goda N, Okamoto S, Ikeda Y, Murata M. Human Pre-adipocytes Differentiate into Megakaryocytes and Platelets using Endogenous Thrombopoietin. XXIV The International Society on Thrombosis and Haemostasis. 2013

#### 招待講演

1. 松原由美子:皮下脂肪組織に由来する間葉系間質細胞株からの血小板創製技術の医療応用 第24回 血液代替物学会学術総会 2017年12月 東京
2. 松原由美子:皮下脂肪組織に由来する間葉系間質細胞株からの血小板創製技術の医療応用 第7回 レギュラトリーサイエンス学会学術総会 2017年9月 東京
3. 松原 由美子:皮下脂肪組織に由来する間葉系細胞からの血小板産生 第17回 Pharmaco-Hematology シンポジウム 2016年9月 東京
4. 松原 由美子:巨核球・血小板産生研究の新展開 第38回 日本血栓止血学会 2016年6月 奈良
5. 松原由美子:再生医療応用を目指した血小板作成研究の動向 培養システムと血小板機能評価の重要性 藤森工業株式会社講演会 2015年12月 横浜
6. 松原由美子:脂肪前駆細胞からの巨核球分化・血小板産生における TPO/c-MPL の役割 第5回 Platelet Immunology 研究会 2015年9月 大阪
7. 松原由美子:iPS細胞を経ない線維芽細胞/皮下脂肪前駆細胞からの血小板創製 日本赤十字社 2015年7月 札幌
8. 松原由美子:脂肪幹細胞(脂肪前駆細胞)由来の巨核球・血小板(教育講演) 第63回 日本輸血・細胞治療学会総会 2015年5月 東京

9. Matsubara Y: A Novel Mechanism of Megakaryopoiesis from Pre-adipocytes:  
Involvement of Transferrin/CD71/TPO Pathways The 9<sup>th</sup> Aso International Meeting 2015  
年 5月 阿蘇
10. 松原由美子：脂肪前駆細胞からの巨核球分化・血小板産生 日本赤十字社 2014
11. 松原由美子：血小板産生研究のトピックス（招待講演）第 20 回 再生医療研究会 2013
12. Matsubara Y: Platelets derived from pre-adipocytes. JCR conference 2013
13. 松原由美子：線維芽細胞から巨核球への Direct Conversion  
（シンポジウム）第 75 回 日本血液学会 2013
14. 松原由美子：血小板産生研究のトピックス 第 35 回 日本血栓止血学会 2013
15. Matsubara Y. Generation of Megakaryocytes and Platelets from Pre-adipocytes  
8<sup>th</sup> Aso International meeting 2013
16. Matsubara Y. Generation of Megakaryocytes and Platelets from Adult Fat,  
Non-hematopoietic Cells. The Gordon Research Conference 2013
17. 松原由美子：血小板部会 Platelet Function Analyzer 100 第 7 回 日本血栓止血学会 学  
術標準化委員会シンポジウム, 2013

## 6. プロジェクト参加者一覧

氏名	役職	在籍期間
松原 由美子	非常勤プロジェクトリーダー 慶應義塾大学医学部臨床研究推進センター 特任准教授	平成 26 年 11 月～平成 30 年 3 月
宇留賀 友佳子	常勤研究員 慶應義塾大学医学部臨床研究推進センター 特任助教 (非常勤)	平成 26 年 11 月～平成 30 年 3 月
瀧澤 典子	常勤研究員 研究補助員 (非常勤) 慶應義塾大学医学部臨床研究推進センター 共同研究員※	平成 27 年 2 月～平成 29 年 3 月 平成 29 年 4 月～平成 30 年 3 月
戸澤 圭一	研究補助員 (非常勤) 非常勤研究員 慶應義塾大学医学部血液内科 大学院	平成 26 年 11 月～平成 29 年 3 月 平成 29 年 4 月～平成 30 年 3 月
下平 綾	研究補助員 (非常勤) 慶應義塾大学医学部臨床研究推進センター 研究員	平成 26 年 11 月～平成 30 年 3 月

※慶應義塾大学との共同研究を展開するための同学における身分



# <研究報告>



# ASC から血小板作製を行う際の効率化研究

ヒト脂肪由来間葉系間質細胞からの巨核球・血小板分化誘導システム:トランスフェリン/CD71/TPO 分泌機序を介した高効率産生

小野-宇留賀 友佳子 松原 由美子

## 1. 研究背景

血小板は、成熟巨核球から産生（放出）され、体内で止血作用を有する他類なき細胞である。血小板減少は、抗がん剤治療時などに認められ重篤な場合は死に至る。その血小板減少に対する確立された治療法は血小板輸血のみである。高齢化社会に伴うがん患者の増加などにより血小板輸血の需要は世界各国で急増している。しかし血小板輸血は 100%ドナー依存であり、そのドナーは減少している。血小板輸血は、他の血液製剤に比し極めて保存期間が短く、採血日を含めて僅か 4 日間（日本）である（米国では 5 日間である）。他に感染のリスクも有している。これら問題点（需要と供給のアンバランス、不安定在庫、感染リスク）の解決のために、ドナーに依存しない血小板を *in vitro* で計画的に、大量に、安定に作製する試みが各国で注目されている。

*in vitro* での血小板作製は、血小板作製のスタート細胞から血小板へ分化誘導を行い、産生された血小板を得るという工程が用いられる。私たちは本プロジェクトの開始時には皮膚線維芽細胞をスタート細胞として血小板作製を計画した。皮膚の線維芽細胞からシンプルで短い行程で血小板作成を可能にした成果を得ていたことが理由である。それまで不明であった血小板分化の決定因子 NF-E2 の同定に成功し、NF-E2 遺伝子発現ベクターを皮膚線維芽細胞に導入することにより、皮膚線維芽細胞から血小板の作製に成功した。従来は、皮膚線維芽細胞をスタート細胞とする場合、4 種類の遺伝子導入を行って iPS 細胞を作製し、iPS 細胞から血小板を作製する技術のみが存在していたが、私たちの血小板作製方法は、皮膚線維芽細胞から iPS 細胞を経由せず、直接血小板を作製する方法である。さらに皮膚の線維芽細胞に導入した血小板への運命決定因子は、生体内における血小板が元々持っている因子であるため、この新規方法は、iPS 細胞を作成するための 4 種類の運命決定因子のようになん関連因子の持つ医療応用への懸念点を回避していた。

従来法として、*in vitro* 血小板分化誘導のスタート細胞は、造血幹細胞、ES 細胞、iPS 細胞が報告されている。造血幹細胞からの *in vitro* 血小板はシンプルな方法を用いて容易である。しかし造血幹細胞は採取の際のドナー負担が大きい。その上に *in vitro* での増殖能が低いため、造血幹細胞をスタート細胞

胞とした医療応用可能な血小板作製を行うことは現実的ではない。多能性幹細胞である ES 細胞や iPS 細胞は *in vitro* での増殖能は優れている。しかしこれら細胞から血小板を作製する工程は煩雑であり、高度な実験技術を必要とする。また、iPS 細胞と皮膚線維芽細胞は遺伝子導入の工程を必要とする。血小板は核は持たないが、RNA を有しており、たんぱく合成も行う。したがって、遺伝子導入に伴う影響を考慮しなければならない。

本プロジェクトでは終了時の現在に至るまで、皮下脂肪組織に存在する細胞から血小板を作製している。脂肪組織に存在する脂肪由来間葉系間質細胞 (ASC) は、造血細胞とは分化系列が異なる細胞である。なぜ?造血細胞と異なる ASC から血小板に分化できるのか?その主たるメカニズムの一つは以下である。私たちが先行研究で発見した「転写因子である NF-E2 (p45NFE2/Mafs) は血小板分化の決定因子」であり、血小板に分化できない皮膚線維芽細胞に NF-E2 遺伝子を導入すると血小板に分化する。ASC は NF-E2 を内在し、巨核球・血小板への分化誘導に伴い、NF-E2 発現量が増加することを認めた。したがって、ASC は血小板分化決定の転写因子をもともと有しているので、遺伝子導入を必要とせず、造血幹細胞から血小板に分化誘導を行う場合と同じ培地で培養するのみで ASC 由来血小板が作製できる。医療応用目的として細胞作製を行う際に遺伝子導入を必要としないことは優位性が高いと考えている。の過程は無い方が好ましいと考えた。

血液細胞は、白血球、赤血球や血小板が存在する。これら血液細胞は、造血幹細胞からの分化最終産物である。その分化機構のメカニズムとして、転写因子とサイトカインの関与が重要と考えられている。血小板分化では、転写因子の NF-E2、サイトカインはトロンボポエチン (TPO) が重要である。これまでの研究で ASC が NF-E2 を内在していることを見出していた。そのデータ収集の際、マウス骨髄由来の間葉系間質細胞株において僅かな量であるが TPO の遺伝子発現が認められた。この知見から、ヒト ASC も TPO 遺伝子を内在しているのでは?と考え、さらに ASC 内在 TPO を用いて血小板分化に至ることができるのでは?と仮説をたてた。*in vitro* 血小板分化誘導において、スタート細胞に造血幹細胞や ES 細胞、iPS 細胞を用いる場合はいずれにおいても組換え TPO の添加を必要とする。組換え TPO はコストが高いことが医療用製剤として大量培養する際には使用のハードルが上がる。TPO 受容体の作動薬のいくつかは *in vitro* 血小板分化誘導に使用可能だが、やはりコストが高いことや権利化の問題で医療用製剤として大量培養する際には使用のハードルが上がる。本研究を遂行することで、*in vitro* 血小板分化誘導に ASC 内在 TPO を使用でき、遺伝子導入も必要としないプロトコールができれば作製血小板を効率良く得ることに繋がると考えた。

## 2. 実験方法

細胞：市販ヒト ASC は Cell Applications 社の細胞を用いた。培養方法や培地は Cell Applications 社の使用説明書に従い、培地は細胞と一緒に購入するキットを用いた。ヒト CD34 陽性細胞（造血幹細胞）は Lonza 社の細胞を用いた。ASC や造血幹細胞から巨核球・血小板への分化用培地は、Megakaryocyte-lineage medium (MKLI 培地)に組換え TPO (50 ng/mL) 添加有無の条件で行った。阻害実験は抗ヒト CD71 抗体、抗マウス c-MPL 抗体、抗ヒト IL-6 抗体を用いた。抗体は R&D 社のものを使用した。

リアルタイム定量 PCR: RNA サンプルはトライゾール (ライフテクノロジー社) を用いて行った。Applied Biosystems 社の使用説明にしたがって遂行した。

TPO level 測定: 培養上清中の TPO level は ELISA (R&D 社) にて測定した。

フローサイトメトリーと FACS: CD41, CD42b, CD61, CD29, CD13, CD73, CD90, CD44, CD34, CD45, CD31, CD14, CD11b, CD235, and CD56 の抗体は BioLegend 社のものである。CD49b は BD Pharmingen 社、CD41 は BD Bioscience 社のものである。FACS は CD71 抗体 (BD Bioscience 社) を用いて行った。

siRNA-CD71: siRNA-CD71 と negative control siRNA はタカラ社から購入した。配列は以下のとおりである。siRNA-CD71 sense, GAACUUGAAACUGCGUAAATT, anti-sense, UUUACGCAGUUUCAAGUUCTT, and negative control sense, UCUUAAUCGCGUAUAAGGCTT, and anti-sense, GCCUUAUACGCGAUUAAGATT.

## 3. 結果

### (1) ASC 内在 TPO の遺伝子とタンパクは ASC から巨核球への分化に伴い遺伝子発現増加、細胞外への分泌量の増加を示した

前述において、マウス骨髄由来の間葉系間質細胞に僅かな量ではあるが以前の研究で TPO 遺伝子を認めたことを記載した。その知見を進展させ、本研究ではヒト ASC を用いて、巨核球・血小板への分化誘導培地である MKLI 培地に組換え TPO 添加の有無 (rTPO+/-) で培養した。はじめに、rTPO(-)において、その際の遺伝子発現や培養上清中の TPO 量、すなわち ASC が巨核球・血小板への分化に伴って、TPO を分泌しているかどうか？を検討した。

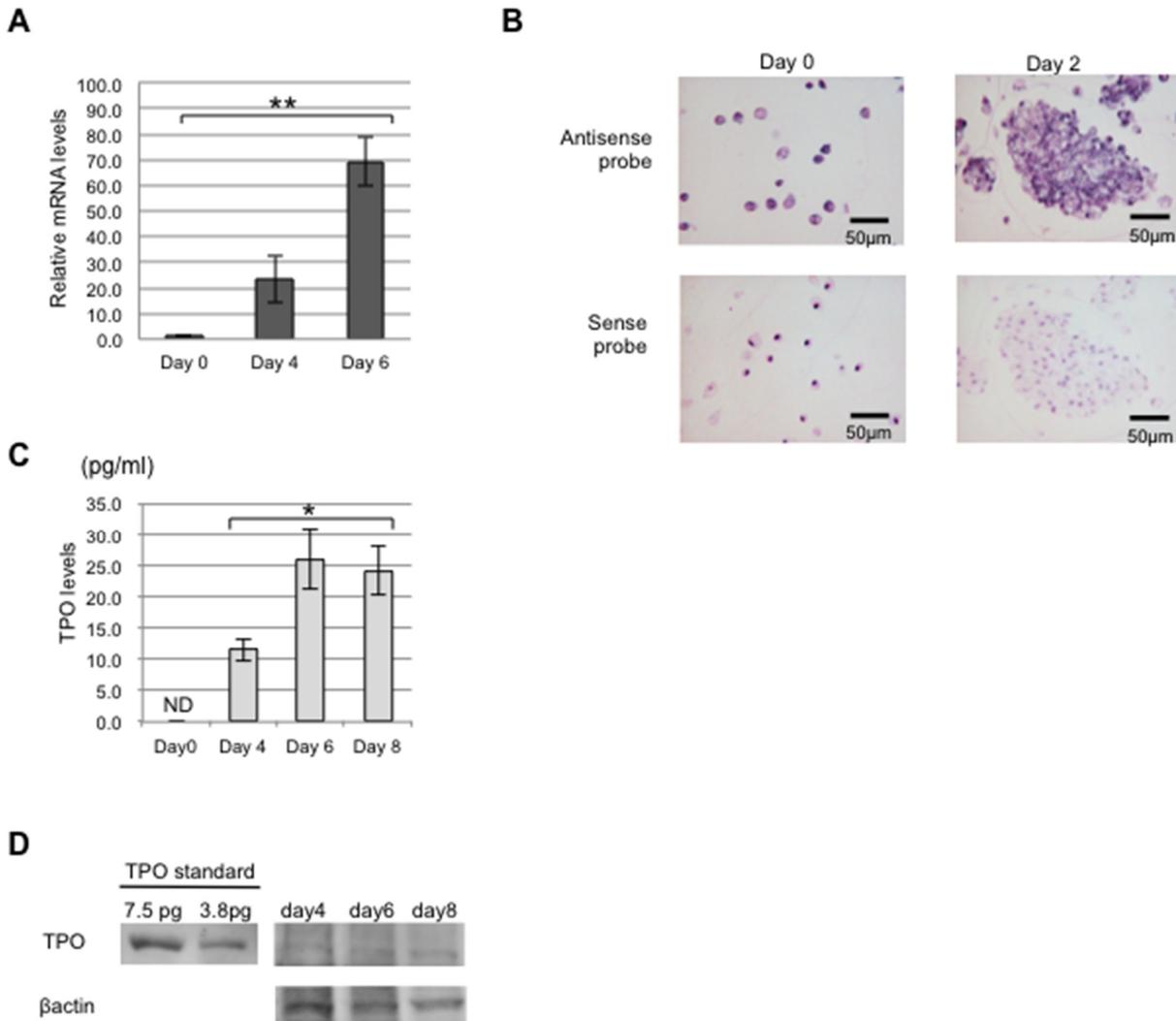


図 1. ASC から血小板分化誘導の際の TPO 遺伝子とタンパクの定量

図 1 に示すように、TPO 遺伝子の発現量は分化誘導にしたがって増加した (図 1 A)。この遺伝子発現増加は、in situ hybridization においても認められた(図 1 B)。TPO タンパク発現に関して、分化誘導刺激に伴い、培養上清中に TPO タンパクを分泌していることを認めた(図 1 C)。一方、細胞内に残っている TPO タンパクは極僅か、あるいは検出限界以下であった(図 1 D)。さらに、この培養上清 (ASC から分泌された TPO を含む) を用いて造血幹細胞を培養したところ、巨核球への分化が認められ、ASC 内在 TPO は巨核球・血小板への分化誘導機能をもつ TPO であることがわかった。これら結果は、ASC から血小板を作製するプロトコールにおいて非常に優位性が高いことが示唆された。

## (2) ASC 内在 TPO は ASC を巨核球・血小板分化誘導機能を有する

次に ASC 内在 TPO の血小板分化誘導への効果を検討するために、ASC を MKLI 培地 rTPO(+/-)

の条件で培養した。

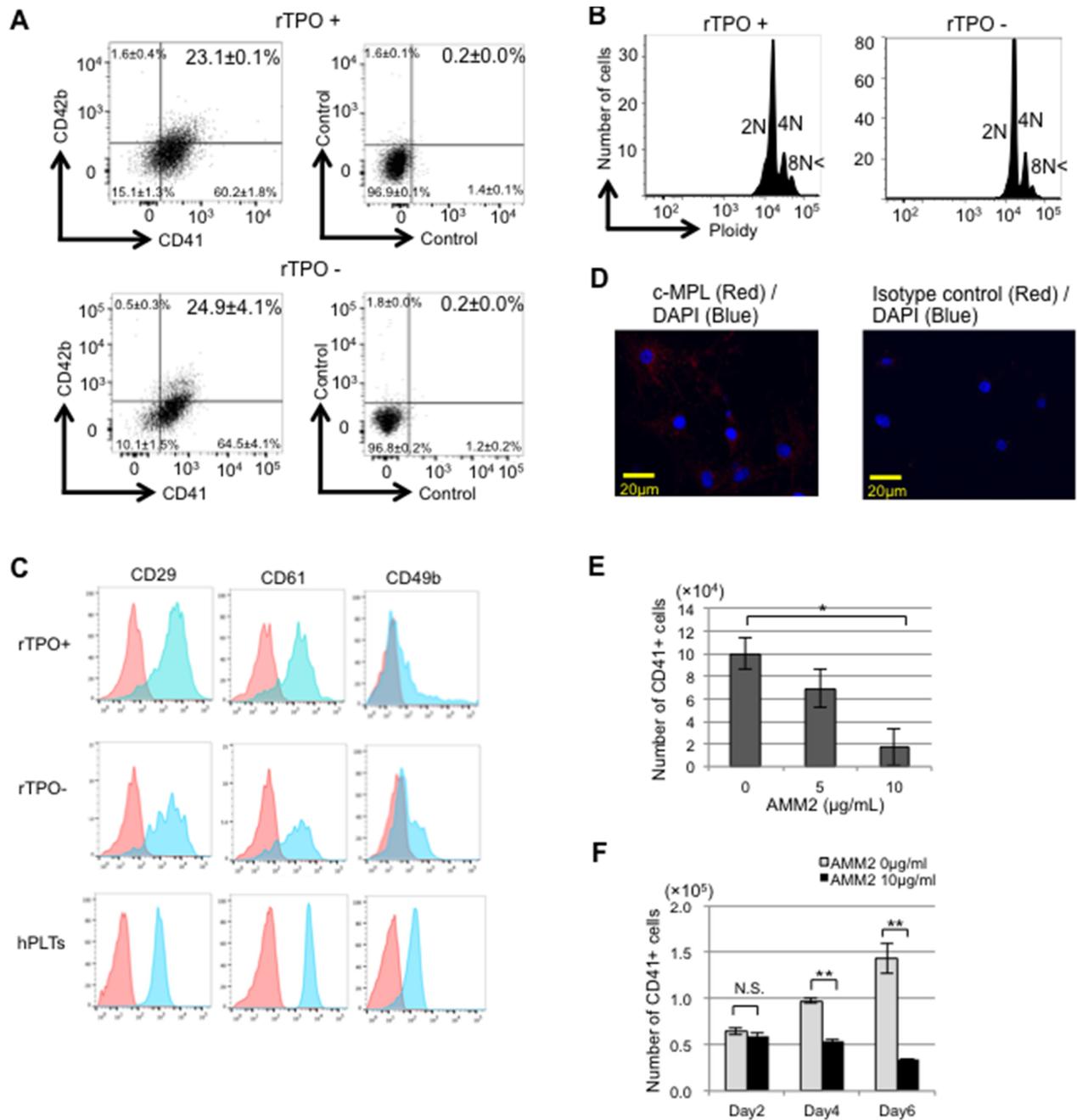


図 2. ASC 内在 TPO の血小板分化誘導への効果

ASC を MKLI 培地 rTPO(+/-)で 14 日間培養を行い、血小板の特異的表面マーカーである CD41 と CD42 の陽性細胞を検討した。その結果、血小板への分化誘導効率率は rTPO (+/-)で同等であった (図 2A)。巨核球の特徴である DNA ploidy の検討においても rTPO (+/-)で同等であった (図 2B)。血小板に発現が認められている他のマーカーである CD29、CD61、CD49b も rTPO (+/-)で同等であった (図 2C)。また、TPO

受容体 c-MPL 発現を ASC に認めた(図 2D)。ASC を MKLI 培地 rTPO(-)/c-MPL 中和抗体(+)で培養した結果、その抗体濃度依存性に巨核球分化効率が減少し (図 2 E)、血小板産生は減少した(図 2 F)。これら結果から、ASC 内在 TPO は血小板分化誘導効果の機能を有することが示された。

### (3) ASC 内在 TPO は機能を有する ASC 由来血小板を誘導できる

ASC を MKLI 培地 rTPO(+/-)で培養を行い、得られた血小板の機能を比較した。血小板機能はスタンダードな方法で行った。その結果、培養条件の違いによる ASC 由来血小板の機能への影響は認めず、いずれの血小板も機能を有していた。

### (4) ASC 内在 TPO の分泌メカニズム

ASC を MKLI 培地 rTPO(-)で培養を行った際の培養上清中に分泌される ASC 内在 TPO は機能を有している。そして、従来報告されていた TPO 主要産生臓器の肝臓から産生される TPO は恒常的に発現しているが、ASC 内在 TPO は、巨核球・血小板の分化誘導培地 MKLI で ASC を培養すると分泌される、すなわち誘導性である。この ASC 内在 TPO 分泌のメカニズムを解明するために、MKLI 培地の構成成分と TPO 分泌の関係を検討した。

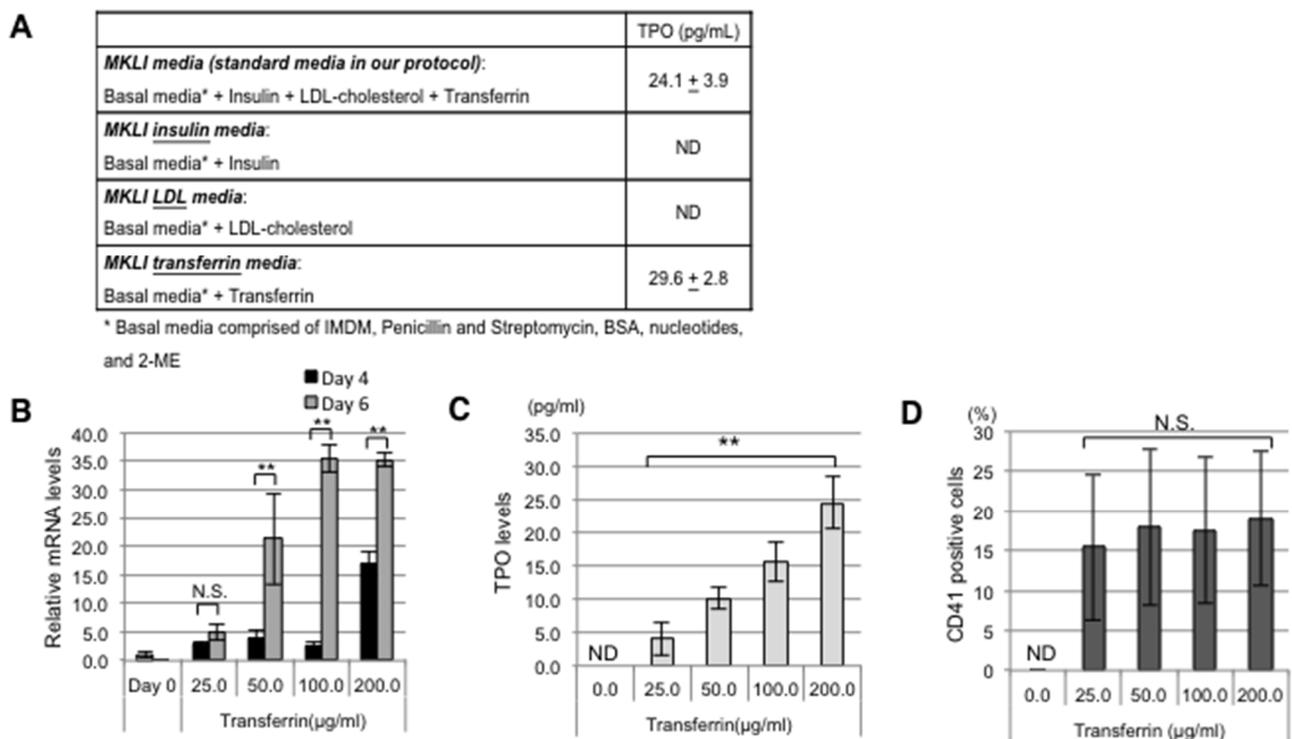


図 3. ASC 内在 TPO は巨核球・血小板分化誘導において、培地成分であるトランスフェリン刺激で分泌される

MKLI 培地の構成成分による ASC 内在 TPO 分泌への影響を検討した結果、トランスフェリンの添加有無による ASC 内在 TPO 分泌への影響を認めた (図 3 A)。トランスフェリンは生体内の鉄輸送体である。この知見の検証のために、トランスフェリンの濃度依存実験を行った。その濃度依存性に TPO 遺伝子量は増加 (図 3 B)、TPO 分泌量も増加した (図 3 C)。血小板産生は、濃度依存は認められなかったが、添加の有無では血小板産生への強い影響が認められた (図 3 D)。これら結果により、ASC 内在 TPO は巨核球・血小板分化誘導において、トランスフェリン刺激で分泌されるメカニズムを持つことが示された。

#### (5) ASC 内在 TPO は巨核球・血小板分化誘導において、トランスフェリン受容体を介するメカニズムで分泌される

トランスフェリンはその受容体である CD71 に結合する。ASC を MKLI 培地 rTPO(-) で培養を行った際の CD71 と巨核球・血小板の特異的の marker である CD41 の発現を検討した。

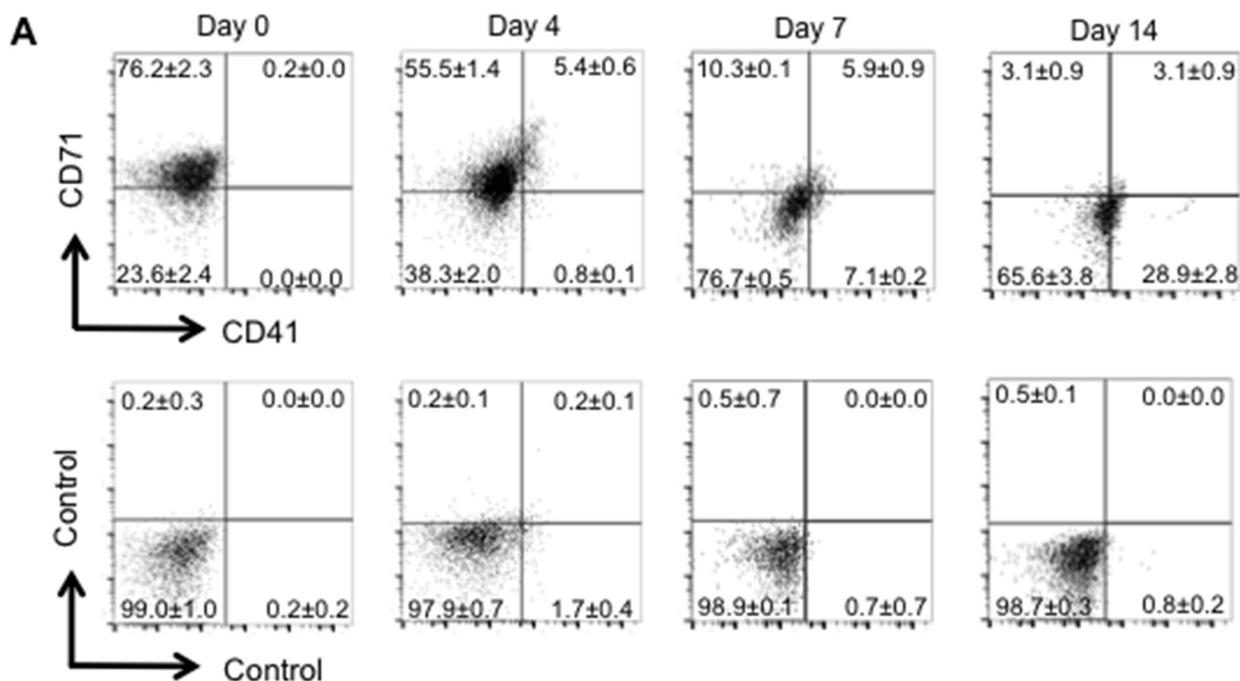


図 4. ASC を MKLI 培地 rTPO(-) で培養を行った際の CD71 と巨核球・血小板の特異的の marker である CD41 の発現

図 4A の上段に示すように、分化誘導前の ASC は CD71 高発現、CD41 は発現が認められなかった。分化誘導に伴って、CD71 の発現減少、CD41 の発現が認められた。

分化誘導前の ASC に関して、種々の抗体を用いて発現解析を行った。その結果も合わせて記載する。

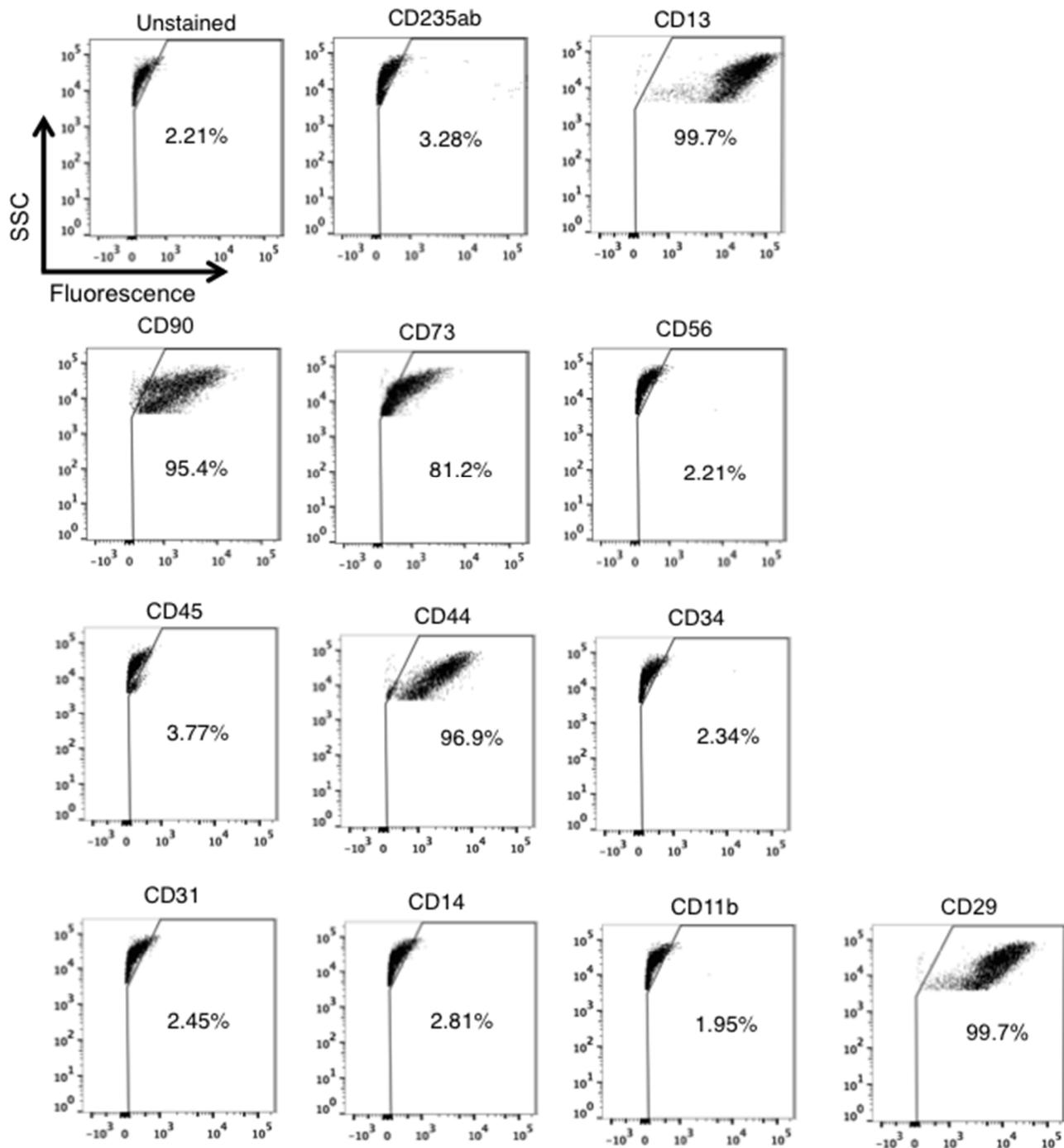


図 5. 分化誘導前 ASC の表面抗原発現解析

造血細胞の表面抗原は発現しておらず、間葉系細胞の表面抗原が認められた。

次に CD71 が巨核球・血小板への分化誘導に伴う ASC 内在 TPO 分泌に関与しているかどうか？ CD71 をターゲットとした 3 種類の方法 (CD71 中和抗体、siRNA-CD71、FACS による CD71+/-細胞) で検討した。

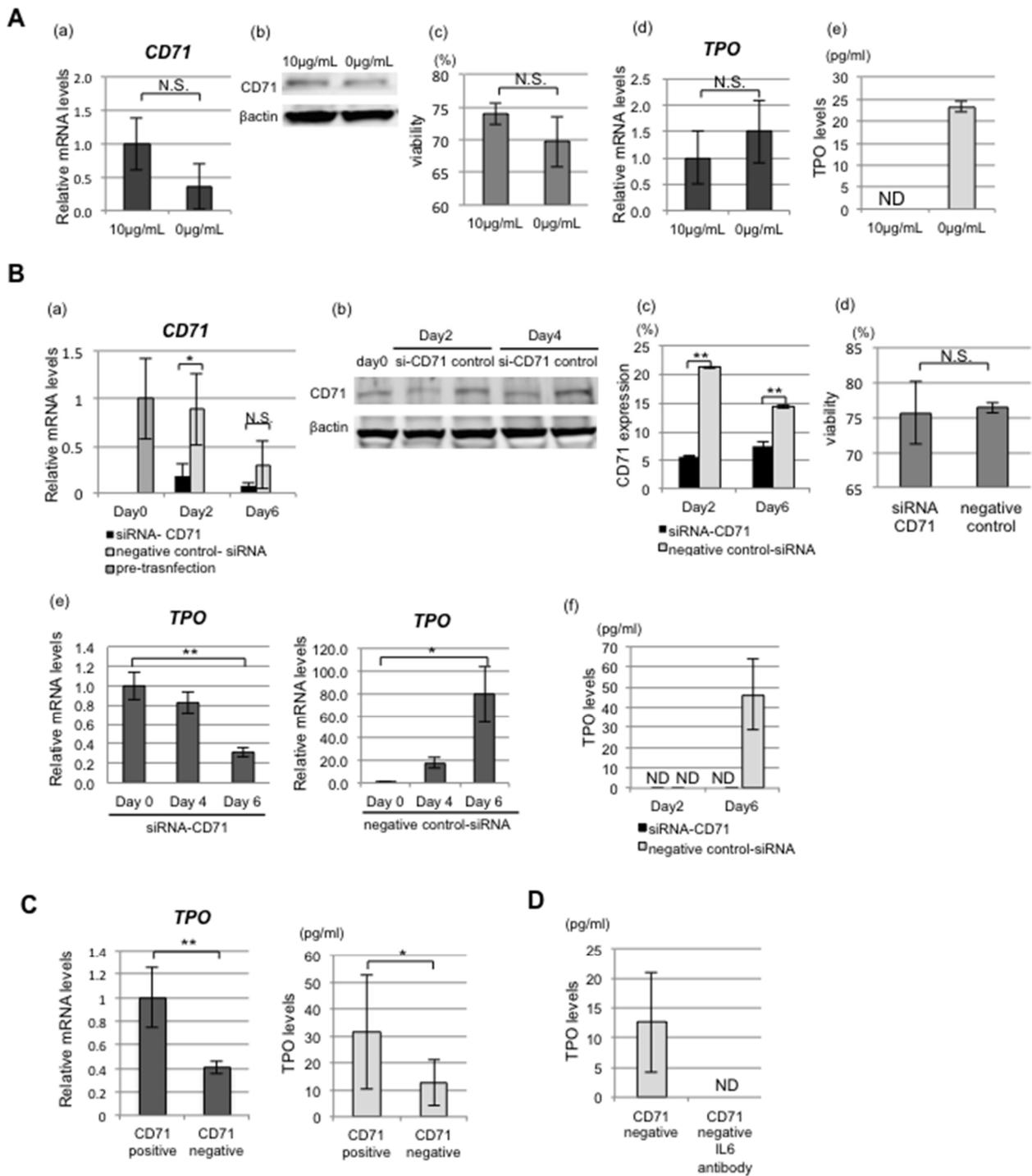


図6. トランスフェリン受容体 CD71 は巨核球・血小板への分化誘導に伴う ASC 内在 TPO 分泌に関与する

CD71 をターゲットとした 3 種類の方法 (CD71 中和抗体、siRNA-CD71、FACS による CD71<sup>+</sup>/細胞) で検討した。その一つ目は CD71 の機能を阻害する中和抗体を用いた検討を行った。ASC を MKLI 培地 rTPO(-)/ CD71 中和抗体 (+/-) の条件で培養を行った。その際の CD71 遺伝子発現量は CD71 中和抗体 (+/-) で有意差はなかった (図 6Aa)。CD71 中和抗体 (+/-) において、細胞内 CD71 のタンパク発現量 (図 6Ab)、細胞生存率 (図 6Ac)、TPO 遺伝子発現量 (図 6Ad) に有意差は認められなかった。一方、細胞外分泌 TPO 量に有意差を認めた。CD71 中和抗体 (+) では TPO 分泌が認められず、CD71 中和抗体 (-) で TPO 分泌が認められた (図 6Ae)。これら結果から ASC 内在 TPO 分泌は、細胞表面に発現している CD71 が関与していることを示している。

次の二つ目は、siRNA-CD71 を用いて、CD71 遺伝子をノックダウンした。ASC にリポフェクタミン試薬を用いた siRNA-CD71 と negative control siRNA をそれぞれトランスフェクションした。それら細胞を MKLI 培地 rTPO(-) にて培養した。siRNA-CD71 による CD71 遺伝子ノックダウンを確認した (図 6Ba)。siRNA-CD71 による CD71 タンパク発現減少 (図 6Bb)、細胞表面発現の減少 (図 6Bc) も確認した。siRNA-CD71 による細胞生存率への影響は認められなかった (図 6Bd)。negative control siRNA では TPO 遺伝子発現は分化誘導に伴って増加が認められるという、これまでの知見と同じであったが、siRNA-CD71 は分化誘導を行っても TPO 遺伝子発現は減少した (図 6Be)。細胞外分泌 TPO は、negative control siRNA では分化誘導に伴って増加が認められ、siRNA-CD71 は分化誘導を行っても認められなかった (図 6Bf)。

三つ目は、FACS を用いて ASC 細胞を CD71 発現(+)細胞群と CD71 発現(-)細胞群に分け、それぞれを MKLI 培地 rTPO(-) にて培養を行った。その結果、分化誘導に伴う TPO 遺伝子発現量と細胞外分泌タンパク量は CD71 発現(+/-)細胞群で有意差をもって、いずれも CD71 発現(+)細胞群が高かった (図 6C)。TPO 分泌に IL-6 の関与するメカニズムが考えられたため、追加実験として IL-6 中和抗体の添加条件で検討を行った。CD71 発現(-)細胞群で少量ながら認められた TPO 発現は、IL-6 中和抗体存在下で認められなくなった (図 6D)。これら結果から、ASC 内在 TPO 分泌は、細胞表面に発現している CD71 が主たる関与をしているという知見を得た。

#### **(6) ASC から巨核球・血小板分化誘導におけるトランスフェリン受容体 CD71 の影響**

ここまでの結果で、ASC は生体内で鉄輸送体として働くトランスフェリンの添加刺激でトランスフェリン受容体である CD71 を介して巨核球・血小板分化の重要サイトカインである TPO を分泌することが解明された。次にトランスフェリン/CD71 による ASC 内在 TPO 分泌のメカニズムが ASC からの血小板産生に影響を与えるか? を検討した。

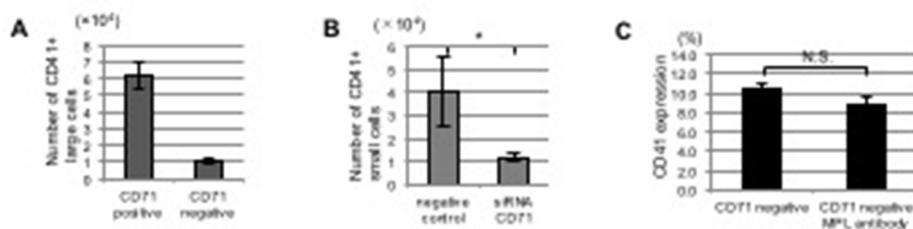


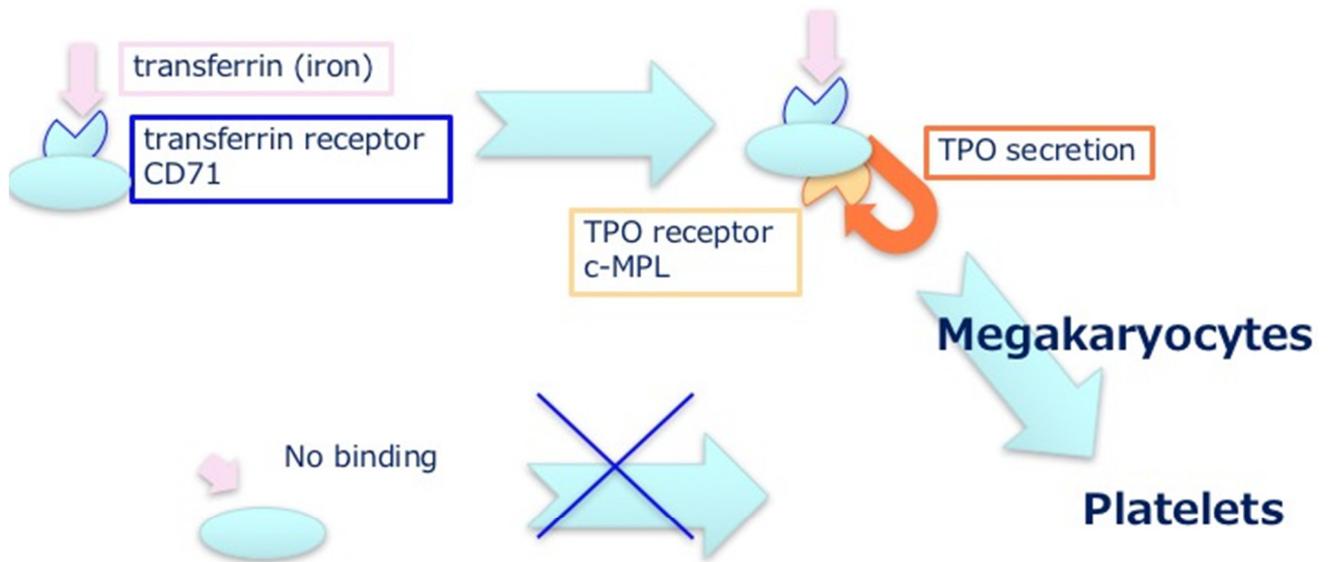
図 7. トランスフェリン/CD71 による ASC 内在 TPO 分泌のメカニズムが ASC からの血小板産生に影響を与える

FACS を用いて ASC 細胞を CD71 発現(+)細胞群と CD71 発現(-)細胞群に分け、それぞれを MKLI 培地 rTPO(-)にて培養を行った際に ASC 内在 TPO 分泌量は CD71 発現(+)細胞群が有意差を持って高い値を示した (図 6C)。巨核球・血小板の特異的マーカーである CD41 発現陽性細胞の産生も CD71 発現(+)細胞群において有意差を持って高かった(図 7A)。

siRNA-CD71 を用いて、CD71 遺伝子をノックダウンした ASC を MKLI 培地 rTPO(-)にて培養した際、細胞外分泌 TPO は、negative control siRNA では分化誘導に伴って増加が認められ、siRNA-CD71 は分化誘導を行っても認められなかった (図 6Bf)。巨核球・血小板の特異的マーカーである CD41 発現陽性細胞の産生も siRNA-CD71 において有意差を持って低かった(図 7B)。

トランスフェリン/CD71 による ASC 内在 TPO 分泌のメカニズムが ASC からの血小板産生の主たるメカニズムであることを示したが、図 7A の結果では、TPO に依存しない ASC からの血小板産生メカニズムも存在することが示唆されている。そこで、FACS を用いて ASC 細胞の CD71 発現(-)細胞群を得て、それぞれを MKLI 培地 rTPO(-)/TPO 受容体 c-MPL 阻害抗体(+/-)の条件にて培養を行った。その結果、CD71 発現(-)細胞群での c-MPL 阻害抗体(-)条件から産生される CD41 発現陽性細胞は、これまでの結果のように僅かであった。そして、CD71 発現(-)細胞群での c-MPL 阻害抗体(+/-)条件から産生される CD41 発現陽性細胞は同等であった(図 7C)。

以上、これらの結果をまとめた概要図を図 8 に示す。



Binding of transferrin, iron transporter, to its receptor CD71 leads to the production of endogenous TPO.

Interaction between TPO and its receptor c-MPL is involved in megakaryocyte differentiation and subsequently platelet production.

**Megakaryocytes:** 巨核球

**Platelets:** 血小板

図 8. トランスフェリン/CD71 による ASC 内在 TPO 分泌のメカニズムによる ASC からの巨核球・血小板産生

血液細胞の分化は、転写因子とサイトカインの関与が重要と冒頭に述べた。血小板分化では、転写因子の NF-E2、サイトカインは TPO が重要であり、これまでの研究で ASC が NF-E2 を内在していることを見出していた。本研究では ASC 内在 TPO に着目した研究を行った。その結果、新規知見として、ASC は TPO を内在し、ASC 維持培養培地を用いた維持培養では TPO 遺伝子発現の増加やタンパク分泌は行われないが、トランスフェリン(生体内では鉄輸送体として働いている)の添加刺激により、ASC に発現しているトランスフェリン受容体 CD71 を介した ASC 内在 TPO の遺伝子発現増加、それに伴う細胞外への TPO 分泌を行う。その分泌された TPO は ASC に発現する TPO 受容体 c-MPL を介した刺激で巨核球・血小板へと分化する。

これら知見は基礎研究として ASC から血小板産生のメカニズムを解明した点で大きな意義があるが、このメカニズムは ASC をスタート細胞として医療応用可能な血小板を作製する際には、細胞そのものが有

している血小板分化のポテンシャル刺激に基づくため、低コストでシンプルに安全に作製できる点で非常に優位性の高い血小板作製プロトコル確立につながった。

<参考文献>

Ono-Uruga Y, Tozawa K, Horiuchi T, Murata M, Okamoto S, Ikeda Y, Suda T, Matsubara Y. Human adipose tissue-derived stromal cells can differentiate into megakaryocytes and platelets by secreting endogenous thrombopoietin. *J Thromb Haemost.* 14(6):1285-1297, 2016.

Ono Y, Wang Y, Suzuki H, Okamoto S, Ikeda Y, Murata M, Poncz M, Matsubara Y. Induction of functional platelets from mouse and human fibroblasts by p45NF-E2/Maf. *Blood* 120 (18): 3812-21, 2012.

# ASC から血小板作製を行う際の効率化研究

## ヒト脂肪由来間葉系間質細胞の株化

小野-宇留賀 友佳子 戸澤 圭一 瀧澤 典子 松原 由美子

### 1. 研究背景

皮下脂肪前駆細胞（皮下脂肪由来間葉系間質細胞）(ASC) は医療応用において優位性（免疫原性が低い、in vitro での増殖能が優れている、複数回の細胞継代においても遺伝子に置換が認められず安定）を持っており、世界各国で臨床研究が行われている。しかし ASC は、単一の細胞から構成される細胞集団ではなく、間葉系幹細胞や血管内皮前駆細胞など種々の細胞を含んでいる。そのため、ロット差が大きく、他家細胞を用いた医療応用に使用する際の規格設定が容易ではない。そのロット差には増殖能も含まれる。そこで私たちは、ASC を精製・株化して比較的規格が均一な株化 ASC である ASCL (Adipose-derived mesenchymal stem/stroma cell line) の作製を試みた。

### 2. 実験方法

細胞： 市販ヒト ASC は Cell Applications 社の細胞を用いた。培養方法や培地は Cell Applications 社の使用説明書に従い、培地は細胞と一緒に購入するキットを用いた。

リアルタイム定量 PCR: RNA サンプルはトライゾール（ライフテクノロジー社）を用いて行った。Applied Biosystems 社の使用説明にしたがって遂行した。

フローサイトメトリー： CD41, CD42b, の抗体は BioLegend 社のものである。

### 3. 結果

#### ASCL の樹立と特性解析

ASC (Cell Applications 社) は細胞と共に培養キットに添付されている培地で維持培養し、成熟脂肪細胞へ分化させる際は、同社で販売している成熟脂肪細胞分化用培地を用いた。それら細胞を用いて ASCL を作製した。

ASCL の増殖能は 6 ヶ月観察できた。ASCL を巨核球・血小板への分化誘導培地である MKLI 培地で培養し、その過程における遺伝子発現を定量解析した。その結果、多能性に関与する遺伝子として、*OCT3/4*, *KLF4*, *Myc*, *Nanog*, *Gal*, *GABRB3* の発現が認められた。巨核球・血小板分化に関与する遺伝子として、

*p45NF-E2, RUNX1, GATA2, Fli1, FOG1, TPO, c-MPL* の発現が認められた。また、ASCL を巨核球・血小板への分化誘導培地である MKLI 培地で培養し、その過程における巨核球と血小板の特性解析を行った。その結果、巨核球と血小板の特異的マーカーである CD41、CD42 陽性細胞が認められた。巨核球においては、その特性である DNA ploidy が観察された。

以上、これらの結果から、ASCL 樹立に成功したことが示唆された。ASCL はくりかえしの冷凍保存が可能で、作製血小板を計画的に大量供給するための大きな利点である。血小板を作製プロトコールにおいて、この研究成果は非常に独創力が強く、競争力が持てる知見と考える。

<参考文献>

Keiichi Tozawa, Yukako Ono-Uruga, Masaki Yazawa, Taisuke Mori, Noriko Takizawa, Mitsuru Murata, Shinichiro Okamoto, Yasuo Ikeda, Yumiko Matsubara: Manufacture of Platelets from Human Adipose Tissue-derived Mesenchymal Stromal/Stem Cells: Functional Comparison to Platelet Concentrates. 58<sup>th</sup> American Society of Hematology. 2016 年アメリカ血液学会

Keiichi Tozawa, Yukako Ono-Uruga, Noriko Takizawa, Tadashi Horiuchi, Shinichiro Okamoto, Mitsuru Murata, Yasuo Ikeda, Yumiko Matsubara : Establishment of Human Adipose Tissue-derived Stromal Cell Lines: a Culture System to Manufacture Megakaryocytes Releasing Functional Platelets. 57<sup>th</sup> American Society of Hematology. 2015 年アメリカ血液学会

---

「革新的血小板創製技術の確立と医療応用」グループ研究概要集

平成30年3月26日発行

発行 地方独立行政法人神奈川県立産業技術総合研究所  
溝の口支所 研究開発部  
神奈川県川崎市高津区坂戸 3-2-1 / 〒213-0012  
TEL (044)819-2034

印刷 野崎印刷紙器株式会社  
TEL (045)571-3508

---

●無断転載・複製を禁じます。