

200808020A

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業

(政策創薬総合研究)

血小板の高効率試験管内産生に向けた
基盤技術の確立

平成 20 年度 研究報告書

研究代表者 高 木 智

平成 21 (2009) 年 3 月

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業

(政策創薬総合研究)

血小板の高効率試験管内産生に向けた
基盤技術の確立

平成 20 年度 研究報告書

研究代表者 高 木 智

平成 21 (2009) 年 3 月

目 次

I. 総括研究報告	
血小板の高効率試験管内産生に向けた基盤技術の確立	
高木 智	----- 5
II. 分担研究報告	
各種幹細胞からの血小板分化誘導技術改変	
江藤 浩之	----- 15
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 23
IV. 研究成果の刊行物・別刷	----- 27

I. 総括研究報告書

厚生労働科学研究費補助金
創薬基盤推進研究事業
(政策創薬総合研究)

血小板の高効率試験管内産生に向けた基盤技術の確立

(H20・政策創薬・一般・003)

研究代表者 高木 智

国立国際医療センター研究所・地域医療保健研究部長

研究要旨

本研究は、各種造血系疾患の治療に用いられる血小板製剤の安定な供給を目指し、臍帯血幹細胞やES細胞などの未熟な細胞から試験管内での血小板生成を目指すものである。造血幹細胞やES細胞からの巨核球系細胞の誘導効率や巨核球系細胞の増殖能はさほど高くなく、成熟血小板の十分な産生系の確立には至っていない。研究代表者は、造血幹細胞や巨核球系細胞の増幅を抑制する新しい制御系を発見し、その阻害分子を一過性に発現させることにより、造血幹細胞の生着や放射線照射したレシピエントの血小板回復を促進させることができること、巨核球の増殖能を増強させることができることを確認した。巨核球系細胞群や造血幹細胞の新しい制御系として注目されるLnk/SH2B3依存性制御系やその発現をコントロールすることで、造血前駆

細胞から巨核球への高効率な分化、増殖誘導を達成し、高効率な試験管内での血小板産生法確立を目指す。サイトカインや支持細胞との共培養系のみでは十分量の血小板産生は困難であり、巨核球系細胞群の増殖能自体を内因性に高める新しいアプローチである。

A. 研究目的

特発性血小板減少症や各種造血系腫瘍ならびに悪性腫瘍の治療に伴う骨髄抑制時の出血傾向に対しては血小板輸注が必須である。血小板輸注に用いられる血小板製剤は、健常人からの成分献血に依存しているうえに保存期間が極めて短いので、常に不足が懸念されている。このため、試験管内での血小板産生系の確立は、人工血液として望まれる重要な検討課題である。造血幹細胞や ES 細胞からの巨核球誘導が検討されているが、巨核球系細胞の増殖能はさほど高くなく、成熟血小板の十分な産生系の確立には至っていない。

代表者らは、マウスを用いた基礎研究から造血幹細胞や巨核球系細胞の増幅を抑制する新しい制御系、Lnk/SH2B3 を介する制御系発見し (Takaki et al. J Exp Med 2002, Seita et al. PNAS 2007)、その阻害分子を一過性に発現させることにより、造血幹細胞の生着や放射線照射したレシピエントの血小板回復を促進させることができることを確認した (Takizawa et al. Blood 2006)。さらに、未熟前駆細胞からの分化系を用いて、

Lnk/SH2B3 阻害分子を発現させることにより、巨核球の増殖能をも増強させることができることを確認している。これらの事実を発展・利用し高効率な試験管内での血小板産生法を確立しようとするものである。臍帯血幹細胞、ES 細胞などの各種未分化細胞群から試験管内で高効率に巨核球系細胞を分化誘導・増殖させ、血小板を生成するための基盤技術を確立する。マウス実験系で得られてきた知見を基盤とし、造血幹細胞・前駆細胞の増幅、巨核球系細胞群の分化及び増殖を亢進させるシグナル制御分子の阻害変異体や発現抑制分子を作製し、それらを用いて臍帯血幹細胞、ES 細胞などからの高効率に血小板を生成する方法を検討する。研究計画の期間内に実験用小動物への輸注実験などを行い、試験管内生成血小板の機能や有効性を確認する。

B. 研究方法

細胞内アダプター蛋白質である Lnk/SH2B3 は、N 末端 SH2B ファミリー相同領域、PH ドメイン、SH2 ドメイン、C 末端領域からなる。マウスの実験結果から、

SH2 ドメインのミスセンス変異に PH ドメインの欠失と C 末端領域の欠失を組み合わせることにより、効率の良いドミナントネガティブ変異体として機能し、造血幹細胞の生着能増強に有効であることを示している。これらの知見を基盤として、マウス Lnk/SH2B3 阻害体に導入した変異に対応する部位にミスセンス変異や欠失変異を導入し、ヒト Lnk/SH2B3 変異体を作製する。これをプラスミド発現ベクターに組み入れ、電気穿孔法を始めとする各種の方法でヒト臍帯血造血幹細胞に一過性に発現させ、巨核球分化誘導や血小板産生に対する Lnk/SH2B3 阻害体導入の効果を確認する。マウス ES 細胞から支持細胞との共培養下に血小板を誘導する系を用いて、Lnk/SH2B3 阻害体の効果を検討する。マウス及びヒト Lnk/SH2B3 の発現を抑制する siRNA を作製し、それらの効果を臍帯血幹細胞やマウス ES 細胞を用いた培養系で巨核球分化への効果を検討する。巨核球や血小板の生成は、CD41 の発現を指標としてフローサイトメトリーにて解析する。

また、様々な細胞外基質による血小板放出への影響が示唆されているので、培養の様々な時期にフィブロネクチン、VCAM、MAdCAM 等の細胞外基質上での培養を行い、効率のよい血小板産生条件を検討する。生成された血小板について接着や凝集等の機能を検討する。マウスやヒト末梢血から

採取した不活性化状態の血小板と同様の状態で採取できるような培養条件を探索する。

(倫理面への配慮)

研究計画の実施にあたっては、「臨床研究に関する倫理指針(平成 16 年厚生労働省告示第 459 号)」「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針(平成 18 年厚生労働省告示第 425 号)」に従い、所属施設内の倫理委員会の承認のもとに推進した。ヒト検体の採取や使用は、インフォームドコンセントの達成に尽力し、倫理委員会の指導に従う。検体試料や研究データの保存は、患者個人情報を削除した連結可能匿名化にて行う予定である。本年度に遂行した実験においては、該当事項は無かった。

本研究は、遺伝子組換え実験、動物実験を含む。「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」「研究開発に関わる遺伝子組換え生物等の第二種使用等に当たって執るべき拡散防止措置等を定める省令」「厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針(平成 18 年厚生労働省大臣官房厚生科学課長通知)」他、関係法令、規則を遵守し遂行した。研究計画に関係する遺伝子組み換え実験ならびに動物実験は、所属する研究機関のバイオセーフティー委員会・動物実験委員会の審査を受け、承認を得て実施した。

C. 研究結果

1. 巨核球前駆細胞の効率的な増幅法の検討：Lnk/SH2B3 発現抑制及び機能阻害分子の作成

Lnk/SH2B3 の発現を一過性に抑制することにより巨核球前駆細胞の増殖を亢進させることを目的として、mRNA 発現抑制効果を持つことが期待される siRNA 3 種類をデザインした。これらの siRNA について、それぞれヒト B 細胞株数種に遺伝子導入し、リアルタイム PCR 法及びウェスタンブロット法により Lnk/SH2B3 の mRNA レベル及び蛋白質レベルでの発現抑制を評価した。次に、ヒト臍帯血由来造血幹細胞への遺伝子導入法の検討を行った結果、ヌクレオフェクターを使用したエレクトロポレーション法が最も導入効率が良いことが確認された。そこで、抑制効果の高かった 2 種類の siRNA をエレクトロポレーション法によりヒト臍帯血由来造血幹細胞(CD34+細胞)に遺伝子導入後に 24 時間培養した。処理を施した造血幹細胞及び前駆細胞における Lnk/SH2B3 mRNA 発現量をリアルタイム PCR 法で測定する一方、造血幹細胞機能への影響を検討するため放射線照射した免疫不全マウスへの移植を行った。その結果、コントロール siRNA 導入群と比較し Lnk/SH2B3 siRNA 導入群では、内因性に発現する

Lnk/SH2B3 mRNA 量が約 20%にまで低下することを確認した。これらの細胞の移植を行ったマウスからは、経時的に末梢血を採取してフローサイトメトリーによりヒト前駆細胞由来の成熟血液細胞を検出し、造血幹細胞の造血能の亢進が誘導できるかどうかを評価中である。

ドミナントネガティブ効果を持つことが確認されたマウス Lnk/SH2B3 変異体(DN-mLnk)を基にして、ヒト Lnk/SH2B3 に対するドミナントネガティブ変異体(DN-hLnk)をデザインした。また、多量体形成に重要となるアミノ末端側はヒト由来、カルボキシル末端側はマウス DN-mLnk 由来であるキメラ変異体(DN-hNmCLnk)を作製した。培養細胞株を用いこれらの変異体の蛋白質発現を確認した。これらの変異体をまず発現プラスミドのエレクトロポレーション法でヒト臍帯血由来の造血幹細胞(CD34+細胞)に遺伝子導入し、試験管内での巨核球系細胞への分化誘導系を用いて Lnk/SH2B3 依存性経路への阻害効果を検討している。Lnk/SH2B3 変異体プラスミドの導入発現により、トロンボポイエチン依存性の巨核球系細胞コロニーアッセイにおいて血小板産生を伴う巨核球コロニー径および細胞数が増大する傾向がみられた。統計学的な有意差についての検証を進めているところである。また、遺伝子導入後に一晚培養した造血前駆細胞を非骨髄破壊的な条

件下に放射線照射した免疫不全マウスへ経静脈的に移植した。

2. 血小板放出の制御機構と細胞外基質

Tong らは Lnk/SH2B3 欠損巨核球では、TPO シグナルの主要な経路である Stat3, Stat5, Akt, MAPK のリン酸化が亢進していることを報告した。我々は骨髓より TPO 存在下で分化誘導した巨核球を精製し、野生型と Lnk/SH2B3 欠損細胞で核数が揃っている成熟段階の細胞を用いて解析した。そうすると Stat3, Stat5, Akt 及び p38 のリン酸化は野生型と Lnk/SH2B3 欠損細胞で顕著な差は見られなかった。一方で Erk1/2 のリン酸化が Lnk/SH2B3 欠損細胞で持続しており、Lnk/SH2B3 が TPO シグナルにおいて MAPK のリン酸化に至る経路を抑制し巨核球の成熟を制御していることが示唆された。TPO とインテグリンリガンドの一つである VCAM による共刺激は野生型巨核球において、TPO 刺激による Stat5 のリン酸化を低下させる一方、Erk1/2 及び p38 の活性化を増強した。ところが、Lnk/SH2B3 欠損巨核球ではいずれの活性化も BSA 刺激と比べ変化が見られなかった。また、BSA 及び VCAM 上での血小板産生時の巨核球の形態変化を観察したところ、BSA 上では野生型、Lnk/SH2B3 欠損細胞ともに類似した血小板産生形態変化を示した。VCAM 上では、野生型巨核球は平たい細胞体を示し細胞辺縁から分岐に富んだ血小板前駆体を形成した

のに対し、Lnk/SH2B3 欠損巨核球は辺縁のみならず細胞体からも突出する分岐の少ない血小板前駆体を形成した。以上の結果は、Lnk/SH2B3 が TPO シグナルに作用し巨核球成熟を抑制しているだけでなく、サイトカインとインテグリンシグナルのクロストークによる血小板放出制御機構にも関与していることを示唆する。

3. ES 細胞をソースとする血液細胞誘導法の確立

無限に培養できて全ての細胞に分化できる胚性幹細胞 (ES 細胞) をソースとした細胞培養、血小板誘導法を検討した。

(詳細を分担研究報告書に記載)

4. ES 細胞から生成された血小板機能の検討：機能性血小板の獲得法。

通常の培養条件では、血小板は速やかに機能を失うかアポトーシスに陥る。この問題の克服に有用となる新知見を得て、細胞培養により生成された血小板の機能保持に成功した。

(詳細を分担研究報告書に記載)

D. 考察と今後の方針

本研究は、安定した血小板製剤の供給源・供給法を新たに提供しようとするものである。さらに、血管再生を始めとして再

生医療で注目される増殖因子やサイトカインの新しいデリバリー法の一つとして試験管内産生血小板が提供できる可能性がある。一過性発現系ではゲノム遺伝子への組み込みを起こすウイルスベクターを使用する必要がなく、ゲノム破壊や内因性及び外因性遺伝子の発現異常等の危険を考慮しなくても良い。もし生成過程で外因性遺伝子の恒常的な発現が必要となる場合でも、成熟血小板は核を持たないため、最終産物である血小板には導入した外来遺伝子の残存がないことも大きな利点と考えられる。今後、自己細胞から作製する万能細胞 (iPS 細胞) から血小板を分化誘導するという可能性も出てくると思われるが、その際も十分量の血小板を得るためには本研究のアプローチが有効である。また、血小板の解析から、Lnk/SH2B3 欠損血小板は障害された血管内皮への初期接着に著しい異常はみられないが、血小板同士が接着凝集して生じる二次血栓の形成が起こりにくく、血管閉塞につながる病的な血栓を生じにくいことがわかっている。この利点を生かして、増殖因子やサイトカインなどの担体として、様々な組織への有効なデリバリー法として生成した血小板を利用することも考えられる。さらに今後は、ヒト Lnk/SH2B3 の発現や機能の阻害による造血化細胞の骨髄への遊走・生着の変化の観察や巨核球および血小板への分化誘導系への検討を行い、造血前駆細胞・造血幹細胞における増殖分化制御機構

を明らかにしていくとともに血小板産生技術の改変へ展開を目指す予定である。

E. 健康危険情報

該当無し

F. 研究発表

1. 論文発表

Takizawa H, Eto K, Yoshikawa A, Nakauchi H, Takatsu K, Takaki S. Growth and maturation of megakaryocytes is regulated by Lnk/SH2B3 adaptor protein through crosstalk between cytokine- and integrin-mediated signals. *Exp Hematol* 36: 897-906, 2008.

2. 学会発表

Iwasaki Y, Takizawa H, Yamamoto K, Takatsu K, Takaki S. Novel regulatory machinery for dendritic cell production mediated by Lnk/SH2B3, a negative regulator of lymphohematopoiesis. 第 38 回 日本免疫学会学術集会. 京都. 2008 年 12 月.

Katayama H, Iikutani M, Iwasaki Y, Yoshida N, Takatsu K, Takaki S. Regulated

expression of Lnk/Sh2b3 adaptor protein in lymphohematopoietic system in an Lnk:GFP knock-in reporter mice. 第38回日本免疫学会学術集会. 京都. 2008年12月.

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

無し

2. 実用新案登録

無し

3. その他

無し

II. 分担研究報告書

厚生労働科学研究費補助金
創薬基盤推進研究事業
(政策創薬総合研究)

血小板の高効率試験管内産生に向けた基盤技術の確立
分担研究報告書

各種幹細胞からの血小板分化誘導技術改変

分担研究者 江藤 浩之

東京大学医科学研究所・幹細胞治療研究センター特任准教授

研究要旨

近年の献血者の急激な減少およびウイルス感染血液の増加などに対応する目的から各種幹細胞からの血小板分化誘導技術を開発している。私たちはマウス胚性幹（ES）細胞から試験管内で血小板を誘導できるシステムに加え、ヒト ES 細胞から血小板を誘導するシステムの確立に成功した。

A. 研究目的

善意の供給に支えられた献血供給システムは、多くの病気や病態の改善に寄与して

いる。一方で、本邦での献血者の持続的な減少、ウイルス感染症に汚染された献血者の増加等によって将来の輸血治療へ不安が

生じ、益々献血に代わる輸血ソースを開発する研究がクローズアップされるようになった。私たちが着目した血小板は、赤血球が冷蔵保存可能であるのに比し、20~24°C に振とうしながら保存されなければならない。その理由は、血小板は 18°C 以下に保存された場合、輸血直後に肝臓マクロファージによる貧食を受けてしまう為である。また室温（及び高温）に保存した場合にも、止血開始起点になる血小板膜の機能分子が切断 (shedding) され不活化されてしまう。このため本邦では室温保存によるバクテリア繁殖に対する危惧もあり、供給後 4 日を超えた血小板濃厚製剤は廃棄処分されている。こうした現状に対応するための新規の血小板産生のためのソースの確保と血小板産生法の開発が急務である。

B. 研究方法

胚性幹細胞 (ES 細胞) は無限に培養でき、しかも体を構成するほぼすべての細胞に分化できることから様々な再生医療の材料として期待される。そこで、ヒト ES 細胞 (京都大学再生医科学研究所にて樹立した khES-1, khES-2, khES-3 を使用) をソースとした細胞培養を検討した。ヒト ES 細胞を未分化維持培養から既報のような胚葉体を介した液体培養法により、分化誘導を試みたが血液細胞のマーカーである CD45 陽性細胞

の出現は確認できなかった。既報で使用している細胞株は米国 Wisconsin 大学が樹立した H1 細胞株であるが、うまくいかない理由がヒト ES 細胞ごとの株差によるものか培養法そのものによる差なのかは判別できなかった。そこで、様々な栄養細胞 (ストロマ細胞) との共培養法に戦略を変更した。その結果、研究結果に記述するような特徴的な構造体を観察し、その内部に造血前駆細胞が集約されることが明らかになった。

一方、産生される ES 細胞由来血小板は通常の培養設定である 37°C に固定された CO2 培養機器内部で産生される。前述したようにヒト血小板製剤は 20~24°C という非常に狭い範囲での保存にも関わらず、最大 4 日を過ぎた製剤は廃棄される (細胞死の増加とバクテリア繁殖)。こうした事実から培養による影響から産生される巨核球 (血小板前駆細胞体)、及び血小板でも血小板製剤同様の細胞死が発生していることが予想されたので細胞膜表面抗原、機能等を検証した。

C. 研究結果

1. ヒト ES 細胞をソースとする血液細胞誘導法の確立

ストロマ C3H10T1/2 細胞との共培養を 2

週間継続することで、ES-sac と命名した囊状構造体が培養開始後培養皿上に観察される。ES-sac は、外壁が血管内皮細胞に特徴的な分子を発現しており、内部の細胞は丸く明るい血球細胞様の特徴を有している。造血コロニーアッセイ法にて検証したところ、多系統への分化能を有する「造血前駆細胞」が含まれていることが示された。またES-sac の形成と内部の造血前駆細胞数に対し血管内皮増殖因子 (VEGF) 及び胎盤増殖因子 (PlGF) は促進的に、既報にて報告されていた造血促進因子 basic FGF、BMP-4 は ES-sac 産生に対しては抑制的に作用した。ES-sac 内部の「造血前駆細胞」集団を再度ストロマ細胞上にてトロンボポイエチン (TPO) 及び他の造血サイトカイン存在下でさらに 1 週間培養を継続すると、生存細胞中ほぼ 60%以上が成熟巨核球へと分化し、培養液中への血小板放出が観察された。電子顕微鏡では巨核球レベルでの特異的成熟構造が観察され、血小板も内部構造上は我々のヒト血小板とほぼ同様であった。本研究により、ヒト ES 細胞をソースとする血小板産生法が確立できた。

2. メタロプロテアーゼ活性の制御による ES 細胞からの機能性血小板の獲得法

流血中において内皮細胞が傷害された血管壁ではコラーゲンが暴露され、コラーゲン上には血液中の細胞外基質である von

Willebrand 因子 (VWF) が固着化されることが知られている。血管内壁をローリングする血小板の膜糖蛋白 GPIb α は、固着化された VWF と会合する。さらにコラーゲン受容体 GPVI を通じて血小板活性化が促進され、止血・血栓が進行する。分担研究者らは ES 細胞をソースとした血小板において、GPIb α 及び GPVI の一部 (最大 50-60%) が切断されることを観察した。これらは、血小板膜の機能分子が切断 (shedding) され不活性化されてしまうこの現象は 20-24 $^{\circ}$ C に保存しなければならぬ血小板を 37 $^{\circ}$ C で培養したことによる shedding 反応であり、この反応の起因であるメタロプロテアーゼを培養の一定時期に阻害することで止血活性を維持した血小板が得られることを発見した。開発した方法を組み合わせることで産生されたヒト ES 細胞由来の血小板は、血小板凝集や安定的止血・血栓に必須である GPIIb/IIIa (インテグリン α IIb β 3) の機能を調べると、採血直後の新鮮なヒト血小板と比較するとやや劣るもののほぼ遜色ないレベルであることも判明した。

A. 考察と今後の方針

繰り返し血小板輸血を受けたことで白血球型抗原 (HLA) に対する抗体産生が認められた患者では、輸血した血小板が迅速に拒絶され輸血不応状態になるため、同一 HLA

血小板しか輸血できないことが知られている。予め同一 HLA ドナー（健常人）から人工多能性幹（iPS）細胞株が作成されていれば稀な HLA であっても安定した輸血ソースとして機能でき、理論的には拒絶を受けないオーダーメイドの血小板供給による繰り返し輸血が容易となる。必要な数（日本人の場合約 200 パターン）の HLA パリアントに基づく iPS 細胞株のバンク化と輸血用血小板の安定的供給が可能となるシステムの構築が期待される。

B. 研究発表

1. 論文発表

Takayama N, Nishikii H, Usui J, Tsukui H, Sawaguchi A, Hiroyama T, Eto K, Nakauchi H. Generation of functional platelets from human embryonic stem cells in vitro via ES-sacs, VEGF-promoted structures that concentrate hematopoietic progenitors. *Blood* 111: 5298-5306, 2008.

Nishikii H, Eto K, Tamura N, Hattori K, Heissig B, Kanaji T, Sawaguchi A, Goto S, Ware J, Nakauchi H. Metalloproteinase regulation improves in vitro generation of efficacious platelets from mouse embryonic stem cells. *J Exp Med* 205: 1917-1927, 2008.

Tamaru S, Kitajima K, Nakano T, Eto K, Yazaki A, Kobayashi T, Matsumoto T, Wada H, Katayama N, Nishikawa M. Calyculin A retraction of mature megakaryocytes proplatelets from embryonic stem cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 366: 763-768, 2008.

Takizawa H, Eto K, Yoshikawa A, Nakauchi H, Takatsu K, Takaki S. Growth and maturation of megakaryocytes is regulated by Lnk/SH2B3 adaptor protein through crosstalk between cytokine- and integrin-mediated signals. *Exp Hematol* 36: 897-906, 2008.

Yamazaki S, Iwama A, Takayanagi S, Eto K, Ema H, Nakauchi H. TGF- β induces hibernation of hematopoietic stem cells in the bone marrow niche. *Blood*, 113: 1250-1256, 2009.

2. 学会発表

高山直也、中村壮、大西棕子、三木敬三郎、澤口朗、江藤浩之、中内啓光; ヒト ES 細胞/iPS 細胞をソースとする血液分化誘導法の樹立: ES(iPS) Sac 法の可能性、第 70 回日本血液学会総会、平成 20 年 10 月 10-12 日 (京都) 一般演題口演

錦井秀和、中村壮、高山直也、江藤浩之、

中内啓光; ES 細胞/iPS 細胞から産生した血小板が有用であるための戦略、第 70 回日本血液学会総会、平成 20 年 10 月 10-12 日 (京都) 一般演題口演

江藤浩之; サイトカインアダプター Lnk は安定的血栓形成に寄与する、第 31 回日本血栓止血学会学術集会、平成 20 年 11 月 20-22 日 (大阪) シンポジウム発表

梅本晃正、大和雅之、江藤浩之、寺沢公男、柴田岳彦、内海美香、西田幸二、小林芳郎、中内啓光、岡野光夫; 造血幹細胞における CD61 の役割の検討、第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会合同大会 (BMB2008)、12 月 9-12 日 (神戸) 一般口頭発表、ポスター発表

Eto K, Nishikii H, Nakauchi H. "Metalloproteinase regulation improves in vitro generation of efficacious platelets from embryonic stem cells" The 23th Naito Conference on Molecular Basis for Maintenance and Differentiation of Stem Cells [IV]. Nov 11-14, 2008. (Hayama, Kanagawa Japan) Poster Session

Takayama N, Eto K, Nakauchi H. "Generation of megakaryocytes and functional platelets from human ES cells in vitro via unique structures, 'ES-sacs'" The 23th Naito Conference on Molecular Basis for Maintenance and Differentiation of Stem

Cells [IV]. Nov 11-14, 2008. (Hayama, Kanagawa Japan) Poster Session

Eto K, Nishimura S, Takizawa H, Takayama N, Tamura N, Goto S, Takaki S, Nakauchi H. "Cytokine signal modulator Lnk promotes stable thrombus formation in vivo" 5th Congress of the Asian-Pacific Society on Thrombosis and Hemostasis. Sep 18-20, 2008. (Singapore)

Takayama N, Eto K, Yamanaka S, Nakauchi H. Generation of blood cells from human iPS cells *in vitro* through the hematopoietic progenitors concentrated within the unique structures, iPS-sac. 50th American Society of Hematology. Dec 5-10, 2008 (San Francisco).

C. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
無し
2. 実用新案登録
無し
3. その他
無し

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻	ページ	出版年
Takizawa H, <u>Eto K</u> , Yoshikawa A, Nakauchi H, Takatsu K, <u>Takaki S</u> .	Growth and maturation of megakaryocytes is regulated by Lnk/SH2B3 adaptor protein through crosstalk between cytokine- and integrin-mediated signals.	Experimental Hematology	36	897-906	2008
Takayama N, Nishikii H, Usui J, Tsukui H, Sawaguchi A, Hiroyama T, <u>Eto K</u> , Nakauchi H.	Generation of functional platelets from human embryonic stem cells in vitro via ES-sacs, VEGF-promoted structures that concentrate hematopoietic progenitors.	Blood	111	5298-5306	2008
Nishikii H, <u>Eto K</u> , Tamura N, Hattori K, Heissig B, Kanaji T, Sawaguchi A, Goto S, Ware J, Nakauchi H.	Metalloproteinase regulation improves in vitro generation of efficacious platelets from mouse embryonic stem cells.	The Journal of Experimental Medicine	205	1917-1927	2008
Tamaru S, Kitajima K, Nakano T, <u>Eto K</u> , Yazaki A, Kobayashi T, Matsumoto T, Wada H, Katayama N, Nishikawa M.	Calyculin A retraction of mature megakaryocytes proplatelets from embryonic stem cells.	Biochemical and Biophysical Research Communications	366	763-768	2008
Yamazaki S, Iwama A, Takayanagi S, <u>Eto K</u> , Ema H, Nakauchi H.	TGF- β induces hibernation of hematopoietic stem cells in the bone marrow niche.	Blood	113	1250-1256	2009

IV. 研究成果の刊行物・別刷