

200908010A

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21年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 高 木 智

平成22(2010)年5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21年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 高木 智

平成22(2010)年5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）
総括研究報告書

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

国立国際医療研究センター研究所・免疫制御研究部長
(旧：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。

研究分担者

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

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 DNA プラスミドやウイルスベクター等を用いてヒト臍帯血造血幹細胞に発現させ、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。一方、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多能性幹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。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 20 年厚生労働省告示第 415 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。ヒト検体検体試料や研究データの保存は、患者個人情報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、市販のヒト臍帯血前駆細胞を用いたため、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。研究計画に係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

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ところ、これらの変異蛋白質のいずれにおいても蛋白質レベルの発現量は野生型ヒト Lnk/SH2B3 に比較してやや低かった。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あったが、統計学的な有意差はみられなかった。

立体構造変化等何らかの要因で、内因性蛋白質を超える大量の発現が十分期待できないこれらの変異体ではドミナントネガティブ効果を得られる可能性は低いと判断した。

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 数種をデザインした。これらの siRNA について、ヒト B 細胞株に導入し、mRNA 及び蛋白質レベルでの発現抑制を評価した。抑制効果の高かった siRNA をエレクトロポレーション法により、市販または研究用幹細胞バンクより入手した凍結 CD34 陽性ヒト臍帯血造血幹細胞に遺伝子導入した。その後トロンボポイエチン (thrombopoietin: TPO)、幹細胞因子 (stem cell factor: SCF)、Flt-3 リガンド存在下に一晚培養し回収した。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 法で測定した。一方、造血幹細胞機能への影響を検討するため、低線量の放射線 (350Gy) を照射した RAG2/ γ c 欠損免疫不全マウスあるいは NOD.scid 免疫不全マウスへの移植を行った。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 30~40% にまで低下することを確認した。これらの細胞を移植したマウスから経時的に末梢血を採取して、その中

に含まれるヒト前駆細胞由来の各種血液細胞をフローサイトメトリーにより測定し、造血幹細胞の造血能亢進が誘導できるかを評価した。RAG2/ γ c 欠損マウスについては、siRNA 処理群でもヒト血球細胞の産生は確認できなかった。NOD-Scid マウスをレシピエントとした実験群においては、数回の実験でコントロール処理群と比較して siRNA 処理群でより高いヒト血球細胞の産生が観察された。ただし、臍帯血の供給ソースの違い（個体差）によると思われる実験間のばらつきも大きく、安定した結果は得られなかった。

siRNA による抑制では一過性発現での効果が十分でない可能性を考え、レンチウイルスシステムを用いて shRNA 導入し、長期間ノックダウンによる LNK mRNA の発現抑制の効果を検討した。6 種類の異なる部位に対する shRNA を発現するレンチウイルスを作製し、ヒト臍帯血由来造血幹細胞におけるノックダウン効果を検討した。ウイルス感染から 2 日後に遺伝子導入された GFP 陽性細胞をセルソーターにより精製分離し、感染から 6 日後に mRNA レベルの発現変化を解析した。発現抑制効果が高いコンストラクト 2 種を選別し移植系での効果を検討した。感染 2 日後に GFP 陽性細胞を分離し、低線量の X 線を照射した NOD-Scid マウスへ移入した。現在、末梢血の経時的なフローサイトメトリー解析を

行っているところである。コンストラクトの一つでは、移植から 3 週間後にコントロールと比較して高い比率で GFP 陽性のヒト血球細胞の産生が観察されており有望な結果が得られつつある。

2. 多能性幹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を検討し、前年度までにヒト胚性幹細胞 (ES 細胞) からの血小板誘導法を確立した。この際のプロトコールの鍵である造血前駆細胞が濃縮可能である構造体 (ES-Sac) 誘導法を、ヒト人工多能性幹 (iPS) 細胞をソースとして適用を試みた。(詳細を分担研究報告書に記載)

3. 多能性幹細胞由来血小板の生体内での機能評価系の確立：新しい生体内評価技術の確立

従来から用いて来た生体外 (*in vitro*) での機能評価に加えて、ヒト血小板の生体内 (*in vivo*) 機能評価法を開発した。高速共焦点レーザー顕微鏡を用いて、高時間・空間解像度の生体内分子イメージング手法を新たに開発し、血小板機能評価に有用であることを示した。

(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ィ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。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多能性幹細胞 (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、新しく樹立した生体内血小板機能評価法を用いることで、Lnk/SH2B3 欠損血小板は障害血管内皮への初期接着に著しい異常はみられないものの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明らかとなった。産生された血小板について、止血機能に障害が残らないように外来導入遺伝子の発現量や時期をコントロールする方策

の検討が必要かも知れない。一方、この利点を生かし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 ES 細胞、iPS 細胞からの血小板産生系について検討を推進する。繰り返し血小板輸血を受ける患者では白血球型抗原 (HLA) に対する抗体が生じ、治療に支障が生じる場合がある。この点からも iPS 細胞株からの血小板産生系の確立は、特異抗体の産生や拒絶を受けない血小板供給の可能性を拡大するものであり重要である。ES 細胞や iPS 細胞に対する Lnk/SH2B3 制御系阻害の効果について、巨核球系細胞の増幅、血小板産生の増幅への効果を検討する。一過性発現系による検討を進めるとともに、成熟血小板は核を持たないため最終産物に導入した外来遺伝子の残存がないことを考慮して、ウィルスベクターによる発現誘導系を用いた培養系についても検討を試みる。得られた血小板の機能については生体内での機能評価を進める。抗血小板抗体投与マウスやトロンボポイエチン欠損マウスなど血小板減少症モデルマウスへの産生血小板の輸注、開発した血管内イメージングによるレシピエント内での動態検討により血小板機能評価を推進する。

E. 健康危険情報

該当無し

F. 研究発表

1. 論文発表

Kwon SM, Suzuki T, Kawamoto A, Ii M, Eguchi M, Akimaru H, Wada M, Matsumoto T, Masuda H, Nakagawa Y, Nishimura H, Kawai K, Takaki S, Asahara T. Pivotal role of Lnk adaptor protein in endothelial progenitor cell biology for vascular regeneration. *Circulation Research*. 104: 969-977, 2009.

Kamei N, Kwon SM, Alev C, Ishikawa M, Yokoyama A, Nakanishi K, Yamada K, Horii M, Nishimura H, Takaki S, Kawamoto A, Ii M, Akimaru H, Tanaka N, Nishikawa SI, Ochi M, Asahara T. Lnk deletion reinforces the function of bone marrow progenitors in promoting neovascularization and astrogliosis following spinal cord injury. *Stem Cells*. 28: 365-375, 2010.

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. (*corresponding author) Lnk/Sh2b3 regulates integrin α IIb β 3 outside-in signaling in

platelets leading to stabilization of developing thrombus in vivo. *The Journal of Clinical Investigation*. 120: 179-190, 2010.

2. 学会発表

Koyama J, Iwasaki Y, Katayama H, Hamamichi R, Iseki M, Takaki S. Regulation of dendritic cell production and function by Lnk/SH2B3, a negative regulator of lymphohematopoiesis. 第39回日本免疫学会学術集会. 大阪. 2009年12月.

Katayama H, Iseki M, Iwasaki Y, Ikutani M, Hamamichi R, Yoshida N, Takatsu K, Takaki S. An adopter protein Lnk/Sh2B3, negative regulator of lymphohematopoiesis, contributes to the maintenance of gut-associated lymphoid tissue. 第39回日本免疫学会学術集会. 大阪. 2009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）
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

研究分担者 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。私たちは前年度に報告したヒト胚性幹（ES）細胞から試験管内で血小板を誘導できるシステムをベースにして、さらにヒト人工多能性幹（iPS）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

前年度までに既に確立したヒト胚性幹細胞 (ES 細胞) から造血前駆細胞が濃縮可能である構造体 (ES-Sac) を誘導できる方法を、ヒト人工多能性幹 (iPS) 細胞をソースとして試みた。京都大学山中伸哉教授から供与されたヒト iPS 細胞株 (合計 3 株、3 因子、あるいは 4 因子の初期化因子を用いてヒト皮膚線維芽細胞から樹立した iPS 細胞) および私たちが独自に開発した高タイトアの濃縮型レトロウイルスを使用して樹

立した 8 株の合計 11 株のヒト iPS 細胞をソースとして、ストロマ細胞との共培養法を行った。ヒト ES 細胞研究と同様に、特徴的な構造体 (iPS-Sac) を観察し、その内部に造血前駆細胞が集約されることを確認した。明らかになった。その後、産生される血小板もヒト ES 細胞研究時と同様に確認したが、産生される血小板を輸血した後の生体内部での機能評価系の開発を新規に行った。

C. 研究結果

1. ヒト iPS 細胞をソースとする血小板産生法の確立

ヒト ES 細胞と同様の方法により、ストロマ C3H10T1/2 細胞との共培養を 2 週間継続することで、iPS-Sac が形成できた。Sac 内部には、血液細胞多系統への分化能を有する「造血前駆細胞」が含まれ造血活性の高さに関しては、コロニーアッセイによる評価上、ヒト ES 細胞との差は認められなかった。使用した iPS 細胞 11 株間での造血前駆細胞誘導効率にも有為差は認められなかった。一方、面白い事に血小板産生能においては、株による優位性が認められた。血小板産生前駆細胞である巨核球への分化過程の解析から、iPS 細胞を誘導する際の初期化因子、OCT3/4, KLF4, SOX2, c-MYC のうち、c-MYC が iPS 細胞樹立時においては未発現 (サイレント状態) であっても分化誘導に

従って再活性化すること、それを裏つけるように c-MYC を初期化因子として使用した iPS 細胞株（4 因子株）はすべて、c-MYC を使用しない iPS 細胞株（3 因子株）よりも血小板産生効率が高かった。現在、c-MYC の再活性化のレベルの差異が血小板産生能をどのように規定しているのかを検証中である。

2. 生体内での iPS 細胞由来血小板の機能評価系の確立

3 週間もの比較的長い培養期間を経て作製される血小板が、実際に輸血使用できるかは、最も重要なポイントである。そこで、従来から用いて来た生体外 (*in vitro*) での機能評価に加えて、ヒト血小板の生体内 (*in vivo*) 機能評価系を構築する事が必須と考えた。

本年度は、高速共焦点レーザー顕微鏡を用いた高時間・空間解像度の生体内分子イメージング手法を新たに開発し、マルチカラーでの生体内での細胞動態や末梢組織の詳細な三次元構造の可視化手法を応用することで、生体内の単一血小板の細胞動態が解析可能となった。

また新規に開発した血栓形成モデルでは、まずレーザー照射により活性酸素 (ROS) 産生が誘発されて血管内皮に血小板が付着する。その後、血小板はその数を増やし積み上がり (piling up)、血管内腔を狭小化し、

血液の流速は遅くなる。その後、赤血球、もしくは、白血球が plugging を起こし、血管は閉塞する。本モデルが特徴的なのは、血栓形成の全過程が数十秒で終わり、時間的に経過がきわめて早い事である。しかも、従来の塩化鉄傷害モデルでの実験結果とも強い相関を示しており、生体内の血小板機能をきわめて鋭敏に示していると考えられる。加えて、従来の止血時間の計測ではブラックボックスであった“止血血栓形成の素過程”が可視化されており、マウスモデル動物の場合、遺伝子改変の効果がどの過程に影響を及ぼしているかを時空間的に明らかにすることが可能となった。具体的な成果として、研究代表者の高木との共同研究により、アダプター蛋白 Lnk が欠損した遺伝子改変動物の血小板を用いた検討では、血小板は血管内皮に付着するものの安定化・piling up せず、血流に押し流されており、Lnk が血小板では促進的に血栓の安定化に寄与している事を示した（業績参照）。この手法を取り入れた免疫不全マウスを用いた解析モデルも開発中であり、ヒト iPS 細胞由来血小板の生体内の細胞動態（循環及び血栓形成）も本手法により検証できると考えられる。

ヒト iPS 細胞由来の輸血システムを臨床応用する過程での機能、安全性、宿主細胞との関連等を詳細に検証する上でも、欠くことのできない技術と考えられる。

D. 研究発表

1. 論文発表

Yamazaki S, Iwama A, Takayanagi S, Eto K, Ema H, Nakauchi H. TGF-beta as a candidate bone marrow niche signal to induce hematopoietic stem cell hibernation. *Blood* 113:1250-56, 2009.

Matsumoto K, Isagawa T, Nishimura T, Ogaeri T, Eto K, Miyzaki S, Miyazaki JI, Aburatani H, Nakauchi H, Ema H. Stepwise development of hematopoietic stem cells from embryonic stem cells. *PLoS ONE* 4(3):e4820, 2009.

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(5):1120-29, 2009.

Okabe M, Otsu M, Ahn DH, Kobayashi T, morita Y, Wakiyama Y, Onodera M, Eto K, Ema H, Nakauchi H. Definitive proof for direct reprogramming of hematopoietic cells to pluripotency. *Blood*. 114(9):1764-67, 2009.

Nishimura S, Manabe I, Nagasaki M, Eto K, Yamashita H, Ohsugi M, Otsu M, Hara 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(8):914-20, 2009.

Oki T, Eto K, Izawa K, Yamanishi Y, Inagaki N, Frampton J, Kitamura T, Kitaura J. Evidence that integrin α IIb β 3-dependent interaction of mast cells with fibrinogen exacerbates chronic inflammation. *J Biol Chem*. 284(45):31463-72, 2009.

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/Sh2b3 regulates integrin α IIb β 3 outside-in signaling in platelets leading to stabilization of developing thrombus *in vivo*. *J Clin Invest*. 120: 179-190, 2010.

2. 学会発表

高山直也、中村壮、大西椋子、澤口朗、高橋和利、山中伸哉、江藤浩之、中内

啓光; c-MYC 再活性化に伴うヒト iPS 細胞からの効率の良い巨核球/血小板 産生法の確立、第 71 回日本血液学会総 会、平成 21 年 10 月 23 日 (京都) 一 般演題口演

無し

2. 実用新案登録

無し

3. その他

無し

Umemoto T, Yamato M, Shiratsune Y, Tsukada K, Utsumi M, Morita Y, Terasawa M, Shibata T, Nishida K, Kobayashi Y, Petrich GB, Ginsberg MH, Nakauchi H, Eto K, Okano T. CD61/ Integrin β 3 Ligation Contributes to the Thrombopoietin-Mediated Niche Function of Mouse Hematopoietic Stem Cells. 51th American Society of Hematology. Oral presentation. Dec 4-9, 2009 (New Orleans)

Takayama N, Nakamura S, Nishimura S, Ohnishi R, Takahashi K, Yamanaka S, Eto K, 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. 51th American Society of Hematology. Poster presentation. Dec 4-9, 2009 (New Orleans)

E. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

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
Kwon SM, Suzuki T, Kawamoto A, Ii M, Eguchi M, Akimaru H, Wada M, Matsumoto T, Masuda H, Nakagawa Y, Nishimura H, Kawai K, <u>Takaki S</u> , Asahara T.	Pivotal role of Lnk adaptor protein in endothelial progenitor cell biology for vascular regeneration.	Circulation Research	104	969-977	2009
Kamei N, Kwon SM, Alev C, Ishikawa M, Yokoyama A, Nakanishi K, Yamada K, Horii M, Nishimura H, <u>Takaki S</u> , Kawamoto A, Ii M, Akimaru H, Tanaka N, Nishikawa SI, Ochi M, Asahara T.	Lnk deletion reinforces the function of bone marrow progenitors in promoting neovascularization and astrogliosis following spinal cord injury.	Stem Cells	28	365-375	2010
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, <u>Takaki S</u> , <u>Eto K</u> .	Lnk/Sh2b3 regulates integrin α IIb β 3 outside-in signaling in platelets leading to stabilization of developing thrombus in vivo.	The Journal of Clinical Investigation.	120	179-190	2010
Yamazaki S, Iwama A, Takayanagi S, <u>Eto K</u> , Ema H, Nakauchi H.	TGF-beta as a candidate bone marrow niche signal to induce hematopoietic stem cell hibernation.	Blood	113	1250-1256	2009

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻	ページ	出版年
Matsumoto K, Isagawa T, Nishimura T, Ogaeri T, <u>Eto K</u> , Miyzaki S, Miyazaki JI, Aburatani H, Nakauchi H, Ema H.	Stepwise development of hematopoietic stem cells from embryonic stem cells.	PLosONE	4	e4820	2009
Ogaeri T, <u>Eto K</u> , 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	1120-1129	2009
Okabe M, Otsu M, Ahn DH, Kobayashi T, morita Y, Wakiyama Y, Onodera M, <u>Eto K</u> , Ema H, Nakauchi H.	Definitive proof for direct reprogramming of hematopoietic cells to pluripotency.	Blood	114	1764-1167	2009
Nishimura S, Manabe I, Nagasaki M, <u>Eto K</u> , Yamashita H, Ohsugi M, Otsu M, Hara K, Sugiura S, Yoshimura K, Kadowaki T, Nagai R.	CD8+ effector T cells contribute to macrophage recruitment and adipose tissue inflammation in obesity.	Nature Medicine	15	914-920	2009
Oki T, <u>Eto K</u> , Izawa K, Yamanishi Y, Inagaki N, Frampton J, Kitamura T, Kitaura J.	Evidence that integrin α IIb β 3-dependent interaction of mast cells with fibrinogen exacerbates chronic inflammation.	The Journal of Biological Chemistry	284	31463-31472	2009