

201006019A

厚生労働科学研究費補助金

再生医療実用化研究事業

生体イメージングによる幹細胞由来誘導細胞の生体内動態の可視化と  
臨床有用性・安全性評価系の確立

平成22年度 総括研究報告書

研究代表者 西村 智

平成23（2011）年 3月

厚生労働科学研究費補助金

再生医療実用化研究事業

生体イメージングによる幹細胞由来誘導細胞の生体内動態の可視化と  
臨床有用性・安全性評価系の確立に関する研究

平成22年度 総括研究報告書

研究代表者 西村 智

平成23（2011）年 3月

目 次

I. 総括研究報告

生体イメージングによる幹細胞由来誘導細胞の生体内動態の可視化と  
臨床有用性・安全性評価系の確立に関する研究 ----- 3  
西村 智

II. 分担研究報告

該当無し

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 10

IV. 研究成果の刊行物・別刷 ----- 12

厚生労働科学研究費補助金（再生医療実用化研究事業）  
総括研究報告書

生体イメージングによる幹細胞由来誘導細胞の生体内動態の可視化と  
臨床有用性・安全性評価系の確立に関する研究

研究代表者 西村智

東京大学附属病院システム疾患生命科学による先端医療技術開発拠点特任助教

研究要旨

近年の、多能性幹細胞(ES, iPS)の研究の進歩により、試験管内で幹細胞を分化誘導させ様々な機能を持った細胞を作成することが可能になり、山中四因子を導入せずとも簡便にiPS細胞を得ることも成功しつつある。今後は、幹細胞を用いて、細胞療法・再生療法を含む広い範囲での臨床応用(低侵襲なテーラーメイド医療)が期待されている。例えば、心筋細胞を試験管内で作成し、末期心臓病患者への治療に応用する、人工血小板を作成し輸血製剤として使用する、などの手法である。しかし、これらの実現にあたって、実験動物レベルでの基礎研究を臨床に繋げるためには、ヒトを対象とした臨床研究に移行する前に、実際に試験管内で作成した細胞が、実際の実験動物の個体(マウス及び大動物)の中でどのように機能しているか、どのように病変に働くか、その有用性と安全性を明らかにすることは必須である。しかし、これらを評価するシステムが存在せず、多くの研究者に求められているのが現状であった。

本研究では、光を用いた生体内での細胞の可視化手法(生体イメージング)により個体に導入された幹細胞由来の分化細胞がいかに関与し、機能するかを評価した。既に我々は、本手法を用いて多くの成果を得ている。一つは、生体イメージングを用いたメタボリックシンドロームの病態解明であり(Nishimura et al, 2007 Diabetes, 2008 J Clin Invest, 2009 Nat Med), 多様な免疫細胞が肥満脂肪組織に伴う炎症性の組織リモデリングを呈することを可視化手法により証明した。また、血栓症の病態解明を目指し、血栓形成過程の単一血小板の動態の可視化にも成功した。血球系幹細胞の維持に重要であるアダプター蛋白の一つLnkが、血栓の安定化に重要であることを示している(Nishimura et al, 2010 J Clin Invest)。さらに、我々はiPS誘導細胞の生体内動態の可視化を行っている。ヒトiPS細胞由来人工血小板の作成に成功し、生体内での血小板としての機能を明確に示した(Takayama & Nishimura et al, 2010 J Exp Med)。

本研究では、申請者の生体分子イメージング技術を軸として、全く新しい、高速・深部・高解像度イメージング技術を開発した。今まで可視化されることのなかった深部実質臓器における病態下での細胞連関を評価し、幹細胞由来の細胞を導入した際の体内での細胞動態と病態への影響に関する基礎的知見を得た。さらに、幹細胞由来の細胞療法・再生医学の基礎研究から臨床応用への橋渡しとして、幹細胞を用いた再生医療の安全性・有用性について検討を行っている。

研究代表者 西村智

東京大学附属病院システム疾患生命科学による先端医療技術開発拠点

特任助教

#### A. 研究目的

最近の研究により、心筋梗塞や脳卒中などの原因となるメタボリックシンドロームや動脈硬化、さらに悪性腫瘍は慢性炎症を本態とすることが明らかになってきた。慢性炎症は組織に不可逆的な構造変化(リモデリング)を生じて、様々な病態を引き起こす。つまり、三大疾病の元となる生活習慣病や悪性腫瘍の全ての根源は慢性炎症と考えられる。慢性炎症を基盤とする慢性疾患に関しては、慢性炎症の病態が不明であることから特效薬が存在せず、機能障害・合併症に対する対症療法のみが行われており、依然として多くの有病患者と高い死亡率を生ずる要因となっている。

生活習慣病、すなわち、慢性炎症を治療標的と考えた時に、組織の変化が不可逆的であることから、残存組織の再生を促す事は難しい。例えば、末期心不全となった心臓においてはその機能は著しく損なわれ、様々な薬物療法もほとんど効果が認められず、心臓移植のみが根治的であると現在考えられている。一方、幹細胞・万能細胞を用いた再生医学はこれらの病態に対して有効である可能性がきわめて高い。基礎実験では、心筋梗塞モデル、下肢虚血モデル、など様々な病態モデル動物を作成し、幹細胞・万能細胞・分化誘導細胞を生体に導入することで病態を改善する事が確かめられてきた。しかし、「いかに導入された細胞が病変において機能しているか」「生体内で幹細胞由来の細胞がいかに機能するか」は、評価手法が無いため今まで全く不明であった。本申請研究では、これらをイメージング手法により明らかにし、細胞療法の安全性・有用性の評価系を樹立する。本手法は、今後の再生医学において基礎的知見と臨床応用を結ぶ上できわめて重要な手法であると考えられる。

例えば、輸血製剤である血小板製剤は凍結保存が出来ず、管理が非常に困難であり、慢性的に供給不足状態にある。血小板は無核で移植片対宿主病を起こさない事からも、iPS細胞から作成した人工血小板は細胞療法として有望で、実用化に非常に近いところにあると言える。我々は、iPS細胞樹立のための初期化因子であるc-mycの発現を制御することでヒトiPS細胞から効率的に人工血小板を作成することに成功した。さらに生体内でいかに機能するか、本生体イメージング手法を用いて検討した(Takayama & Nishimura et al, 2010 J Exp Med)。マウスの中でiPS細胞由来人工血小板は体内を循環するだけでなく、レーザー傷害により宿主の血小板とiPS細胞由来血小板が相互作用しながら血栓を形成するさま

が観察された。すなわち、iPS細胞由来の血小板が生体内で血小板としての機能をもつ事をはじめて示し、将来の臨床応用にむけて輸血製剤としての有用性・安全性を示した。

#### B. 研究方法

本稿では我々は開発した「生体分子イメージング」手法について概説する。我々はまず、「組織をよりよくみるために」、レーザー共焦点顕微鏡を用いて、生きたままの組織をそのまま染色する、「生組織イメージング手法」を開発した。手法としては、組織をマウスより取り出し、未固定のまま細かく切り出し、蛍光色素の入った培養液中でインキュベートし、生きたまま蛍光標識を行う。血管内皮は蛍光標識レクチンで、血小板は血小板特異的蛍光標識抗体で、核はヘキストで染色し、生体内の組織構築の詳細を明らかにした。通常の固定した組織切片標本では、漠然としか組織構築が捉えられなかったが、我々の手法では組織構築の詳細が可視化された。

さらに、新たに開発した「生体内分子イメージング手法」を概説する。高速レーザー共焦点顕微鏡を用いて、血流の方向と平行にごく狭い断面に焦点を合わせて画像取得し、血管内を変形しながら流れる赤血球・白血球・血小板に各々フォーカスを合わせて観察が可能となった。血管内の細胞動態を明らかにするためには高速な画像取得が必須だが、我々は主に多数のピンホールを有する円盤を高速回転させて画像を取得するニポウ式の共焦点ユニット(横河電機 CSU X1)及びレゾナンス型高速共焦点システム(Nikon A1R)を用いることにより、高速イメージングを行っている。なお、我々のシステムでは、空間解像度は回折限界(光を用いて観察する際に、理論上、最大で得られる解像度が決まっていること)に既に達している。また、我々は高速スキャニングレーザー共焦点を用いて、多色マルチカラー撮影にも成功している他、二光子による画像取得にも成功している。

検体の準備としては、麻酔下のマウスに蛍光色素を静脈全身投与し、観察部位を切開・露出する。観察部位を生理食塩水により湿潤した後、観察窓を設け、マウスを倒立顕微鏡上のチャンバーにおいて蛍光観察を行う。観察中はヒーティングプレートを用いて体温37度を保つ。本手法により臓器表面から50ミクロン程度であれば細胞構築・血流が明瞭に観察可能である。血流は、蛍光物質FITCデキストランを尾静脈から全身投与することによりネガティブイメージで可視化される。分子量150,000のデキストランは血管外に漏出することはなく、血管内にとどまり血球成分を可視化する。我々の観察では直径3ミクロン程度の毛細血管網を変形しながら流れる血球成分が明瞭に可視化された。一方、白血球はアクリジンオレンジ及びローダミンを静脈投与し体内で核染色することで可視化される。さらに、細胞表面マーカーに応じた蛍光標識抗体を用いることにより、特定細胞集団を生体内

でも標識することが可能である。例えば、血小板に特異的な蛍光標識抗CD41抗体を全身投与することにより単一血小板も生体内ではじめて可視化されている。血管内皮に対しては、血管内皮表面の糖鎖に特異的に結合する蛍光標識レクチンを用いることで、生体内で血管系を明瞭に描出することが可能である。我々は、マウスでは血管内皮に特異性の高いlectin GS-IB4を用いている。本分子イメージング手法は脂肪組織だけでなく、骨格筋・肝臓・腎臓(糸球体を含む)など、さまざま実質臓器に応用可能であり、臓器血流・細胞動態を観察・定量することも可能になっている。

なお、動物実験においては当大学の倫理委員会の規定に基づき、前もって申請許可を得ている上に、動物愛護の精神に基づき、適切な麻酔処理を行いイメージングを施している。

### C. 研究結果

#### ヒトiPS由来人工血小板の作成と機能解析

近年の、多能性幹細胞(ES, iPS)の研究の進歩により、細胞療法を含む再生医学での広い範囲での臨床応用が期待されている。我々は、東京大学医科学研究所幹細胞治療分野江藤准教授チームとの連携の元で、ヒトiPS細胞由来血小板の作製に成功した。我々は本血小板の作製において、その分化過程におけるC-Mycの特異的活性化パターンが、血小板への効率的な樹立を規定することを示した。持続的なC-Mycの活性化はp14, p16の発現増加、GATA1の低下を来し、血小板への分化を抑制した。そこで、骨髄ニッチを再現する培養条件を整え、C-Mycを一時的に活性化させることで、効率的にヒトiPS細胞由来人工血小板を作成することに成功した(Takayama & Nishimura et al, 2010 J Exp Med)。しかし、今までこれらiPS細胞由来の分化誘導細胞の体内での細胞動態を検討する手法は存在しなかった。そこで、光を用いた生体内での細胞の可視化手法により個体に導入された幹細胞由来の分化細胞がいかに関与し機能するかを評価した。免疫不全(NOG)マウス体内でのiPS細胞由来の細胞動態を捉え、本血小板がマウス体内を循環し、血管傷害部位においてはホスト血小板とiPS細胞由来血小板が相互作用しながら血栓を形成するさまが観察された。つまり「人工血小板は体内を循環し、血栓形成能も保持する」事が証明されたわけである。iPS細胞を用いた細胞療法の臨床応用にむけてきわめて有用性が高い手法と言える。

#### 生体内血小板機能解析システムの構築

iPS細胞由来の血小板の機能解析を行うために、生体内の単一血小板の可視化・解析システムを構築した。本手法を用いて、リンパ管新生に必須であるCLEC-2が血小板血栓の安定化にも重要であることを示している。

#### 骨髄内再構築におけるT細胞の役割

我々はさらに、二光子顕微鏡を用いることにより、骨髄内の詳細な構築もリアルタイムかつ長期間にわたり画像取得することに成功している。そして、骨髄移植・T細胞移植後の骨髄再構築過程で、T細胞が骨髄内で活発に動き廻りながら増殖し、生着していることを示した。同様の現象は、T細胞欠損RAG2マウスへのT細胞移植でも認められ、一方、異種間のT細胞移植ではさらに異なったT細胞の反応が認められた。すなわち骨髄内再構築過程においてT細胞が宿主の免疫系の構築に積極的に関わっていることが示唆されており、現在そのメカニズムについて詳細を検討している。

### D. 考察

我々の手法では生体内の単一血小板を可視化することも可能となった。例えば、血小板をFITC-Dextran及びanti-CD41抗体により可視化したところ、定常状態においては、細動脈・静脈では血管壁近傍で血小板は運動していた。一方、流速の遅い毛細血管のレベルでは、血小板は血管内皮と相互作用して「stop and go」を繰り返しており、血流によってrollingしながら流れているさまが可視化された。さらに、レーザー照射による血栓形成と生体イメージングを組み合わせる事で、生体内の血栓形成過程を単一血小板レベルで捉えることに成功し、各種遺伝子改変や抗血小板薬の効果を検討することも可能となった。本手法を用いて、本年度はiPS由来人工血小板の体内動態を明らかにしたが、本手法は非常に応用範囲が広く、今後様々な幹細胞由来の誘導細胞の体内動態を明らかにしていくことが可能であり、きわめて将来性が高いと言える。

### E. 結論

我々の生体分子イメージング手法では、立体的な微細構造・細胞動態を生体内で明瞭に描出し、組織・細胞の形態や機能を直接観察することができるという優位性がある。本手法により、iPS由来の誘導細胞の体内動態が可視化され、その生体内での詳細な機構が明らかになった。また、血栓形成過程における各種細胞動態といった素過程も明らかになった。今後は、各種機能プローブや遺伝子改変動物と組み合わせて研究を進め、これらの背景にある分子生物学的メカニズムを明らかにしていきたい。

### F. 健康危険情報

マウスを対象とした研究のため該当なし。

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

Transient activation of c-MYC expression is critical for efficient platelet generation from human induced pluripotent stem cells.

Takayama N, Nishimura S, Nakamura S, Shimizu T, O

hnishi R, Endo H, Yamaguchi T, Otsu M, Nishimura K, Nakanishi M, Sawaguchi A, Nagai R, Takahashi K, Yamanaka S, Nakauchi H, Eto K.  
Journal of Experimental Medicine, 2010; 207(13):2817-2830

Involvement of CaV3.1 T-type calcium channels in cell proliferation in mouse preadipocytes.  
Oguri A, Tanaka T, Iida H, Meguro K, Takano H, Oonuma H, Nishimura S, Morita T, Yamasoba T, Nagai R, Nakajima T.  
Am J Physiol Cell Physiol. 2010;298(6):C1414-23..

Adipose tissue remodeling and chronic inflammation in obesity visualized by in vivo molecular imaging method  
Nishimura S, Nagasaki M.  
Journal of Biorheology, 2010, Volume 24, Number 1, 11-15.

Essential in vivo roles of the c-type lectin receptor CLEC-2: Embryonic/neonatal lethality of CLEC-2-deficient mice by blood/lymphatic misconnections and impaired thrombus formation of CLEC-2-deficient platelets.  
Suzuki-Inoue K, Inoue O, Ding G, Nishimura S, Hokamura K, Eto K, Kashiwagi H, Tomiyama Y, Yatomi Y, Umemura K, Shin Y, Hirashima M, Ozaki Y.  
J Biol Chem. 2010 285(32):24494-507

Structural Heterogeneity in the Ventricular Wall Plays a Significant Role in the Initiation of Stretch-Induced Arrhythmias in Perfused Rabbit Right Ventricular Tissues and Whole Heart Preparations  
Seo K, Inagaki M, Nishimura S, Hidaka I, Sugimachi M, Hisada T, Sugiura S  
Circ Res, 2010, 106,176-184.

Lnk/Sh2b3 regulates integrin alpha-IIb-beta3 outside-in signaling in platelets leading to stabilization of developing thrombus in vivo  
Nishimura S\*, Takizawa H\*, 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. (\*same contribution)  
J Clin Invest., 2010, 120(1): 179-190.

Cardiac fibroblasts are essential for the adaptive response of the murine heart to pressure overload  
Takeda N, Manabe I, Uchino Y, Eguchi K, Matsumoto

S, Nishimura S, Shindo T, Sano M, Otsu K, Snider P, Conway S, Nagai R  
J Clin Invest., 2010, 120(1): 254-265.

## 2. 学会発表

2011.3.11. 東京 TSBMI第4回シンポジウム  
In vivo imaging reveals parenchymal and interstitial cell cross-talks in chronic inflammatory diseases  
Nishimura S

2011.3.5. 東京 日本顕微鏡学会第35回関東支部講演会(招待講演)  
生体分子イメージングによる生活習慣病病態の解析:慢性炎症を背景とする実質と間質のクロストーク  
西村 智、長崎 実佳

2011.3.1. 東京 第10回日本再生医療学会総会シンポジウム 革新的先端技術 レクチャー「生体分子イメージングが切り開く再生医療の未来」(招待講演)  
生体分子イメージングによる慢性炎症下の病態解析:実質細胞と間質の相互作用  
西村 智

2011.2.18. 大阪 千里ライフサイエンスセミナー 免疫・感染症シリーズ第3回「免疫応答の生体イメージング」(招待講演)  
生体分子イメージングによる慢性炎症病態の解析:肥満脂肪組織炎症と血栓  
西村 智

2011.2.10. 東京 第84回 発生工学・疾患モデル研究会(招待講演)  
生体分子イメージングによる慢性炎症を基盤とする生活習慣病病態の解析  
西村智

2011.2.5. 香川 第40回日本心脈管作動物質学会シンポジウム「炎症のイメージングについての最先端研究関連」(招待講演)  
生体分子イメージングによる肥満脂肪組織炎症の病態解析:実質・間質のクロストーク  
西村 智

2011.1.9-10. 東京 レーザー学会学術講演会第31回年次集会  
二光子生体分子イメージング技術の開発とその応用  
西村智、長崎実佳、真鍋一郎、江藤浩之、永井良三

2010.12.7-10. 神戸 第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会 BMB2010  
ワークショップ「生体4Dイメージングによる細胞ダイナミクス研究の最前線」

生体二光子4Dイメージングによる生活習慣病病態解析：慢性炎症を背景とする実質と間質のクロストーク(招待講演)

In vivo two-photo 4D imaging reveals parenchymal and interstitial cell cross-talks in chronic inflammatory disease

西村智、長崎実佳、真鍋一郎、江藤浩之、永井良三

2010.12.1-2. 東京 武田科学振興財団生命科学シンポジウム The 16th Takeda Science Foundation Symposium on Bioscience “Casting light on life”

In vivo imaging reveals parenchymal and interstitial cell cross-talks in chronic inflammatory diseases

Nishimura S, Nagasaki M, Manabe I, Eto K, Nagai R

2010.11.25-26. 箱根 箱根リトリートSmall Scientific Discussion in Hakone - Frontiers of Stem Cell Research -

In vivo molecular imaging reveals cell kinetics and parenchymal-stromal cross talks in obese adipose tissue, developing thrombus, and bone marrows

Nishimura S, Nagasaki M, Manabe I, Eto K, Nagai R

2010.11.18. 秋葉原 バイオフロンティアセミナー「免疫・疾患制御に向けたイメージング解析と今後の応用」

生体分子イメージングでみる慢性炎症を背景とする生活習慣病病態

～脂肪組織炎症・血小板血栓形成過程・骨髄内応答～(招待講演)

西村 智

2010.11.8. 群馬 群馬大学GCOE特別セミナー

生体分子イメージングでみる肥満脂肪組織炎症・血栓形成過程・骨髄内応答：実質と間質のクロストーク(招待講演)

西村 智

2010.10.31-11.3. The 11th International Congress of the Immunology of Diabetes Society

In vivo imaging reveals inflammatory processes in adipose tissue microcirculation: parenchymal and stromal cell cross talks (Symposium, invited)

Nishimura S, Nagasaki M, Manabe I, Eto K, Nagai R

2010.10.12-13. 埼玉 エクストリーム・フォトニクス研究シンポジウム

生体分子イメージング技術の開発とその応用 慢性炎症を背景とする生活習慣病病態の解明をめざして(招待講演)

西村 智

2010.10.1-2. 前橋 第31回 日本肥満学会

生体分子イメージングでみる肥満脂肪組織炎症

西村 智、長崎 実佳、真鍋 一郎、江藤 浩之、門脇孝、永井 良三

2010.9.30. 新潟 新潟腎カンファランス

生体分子イメージングを用いた生活習慣病病態解析：慢性炎症を背景とする実質と間質のクロストーク(招待講演)

西村 智

2010.9.24-26. 横浜 第72回日本血液学会学術集会

生体分子イメージング手法で明らかになる血栓形成の素過程

西村智、長崎実佳、真鍋一郎、江藤浩之、永井良三

2010.9.21. 東京 第3回 細胞機能可視化研究会 研究集会

生体分子イメージングでみる慢性炎症を背景とする生活習慣病病態

～脂肪組織炎症及び血小板血栓形成過程の解明～(招待講演)

西村 智

2010.9.9-11. 第19回バイオイメージング学会学術集会

生体二光子イメージングによる生活習慣病病態解析：慢性炎症を背景とする実質と間質のクロストーク

西村智、長崎実佳、真鍋一郎、江藤浩之、永井良三

2010.9.8-11. Kyoto 2010 World Molecular Imaging Congress

In vivo molecular imaging reveals parenchymal and interstitial cell cross-talks in chronic inflammatory diseases

Nishimura S, Nagasaki M, Manabe I, Eto K, Nagai R

2010.9.4. 東京第51回日本組織細胞化学会総会・学術集会

生体分子イメージングによる慢性炎症病態解析：実質・間質の相互作用の可視化(優秀演題講演)

西村 智、長崎 実佳、真鍋 一郎、江藤 浩之、永井 良三

2010.9.3. 新潟 新潟分子病態・再生医学セミナー

生体分子イメージングを用いた生活習慣病病態解析：慢性炎症を背景とする実質と間質のクロストークの解明(招待講演)

西村智

2010.8.26-27. 旭川 第51回日本人間ドック学会学術大会

リン脂質生合成系の変化はメタボリックシンドロームの発症を規定する

長崎 実佳、西村 智、中村 和宏、大川 龍之介、田嶋 美智子、宇野 漢成、真鍋 一郎、林 直人、矢富 裕、



永井 良三

総・高分子量アディポネクチン値はメタボリックシンドロームの予後規定因子となる  
田嶋美智子, 西村智, 長崎実佳, 良永千穂, 宇野漢成, 林直人, 永井良三

2010.8.25. 神戸 14th International Conference of Immunology

In vivo imaging reveals adipose tissue remodeling in obesity based on chronic inflammation and abnormal local immunity

Nishimura S, Nagasaki M, Manabe I, Eto K, Nagai R

2010.7.31.-8.1. 永原 再生医学・臓器再建医学コース ミーティング (招待講演)

生体分子イメージングでアプローチする生活習慣病病態 ~肥満脂肪組織炎症・血栓形成・骨髄内免疫応答~

西村智

再生医学・臓器再建医学コースミーティング キャリアパス(招待講演)

西村智

2010.7.14-16. 長浜 第57回毒素シンポジウム (招待講演)

生体分子細胞イメージングでみる慢性炎症を背景とする生活習慣病病態

~メタボリックシンドロームから血栓形成過程まで~

西村 智

2010.7.9. 東京 第2回臨床研修4病院合同セミナー

生体分子イメージングでみる慢性炎症と生活習慣病病態 ~肥満脂肪組織炎症から血栓形成過程まで~ (招待講演)

西村 智

2010.7.6. 埼玉 レーザー顕微鏡研究会第36回講演会 (SLM36)

生体分子イメージングによる慢性炎症病態解析:実質細胞と間質のクロストーク

In vivo imaging reveals chronic inflammatory processes: parenchymal and stromal cell cross talks

西村 智, 長崎 実佳, 真鍋 一郎, 江藤 浩之, 永井 良三

2010.7.2. 東京 Seminar for Vascular Protection Strategy 2010

生体分子イメージングでみる慢性炎症病態 ~メタボリックシンドロームから血栓形成過程まで~ (招待講演)

西村 智

2010.6.29.-7.1. London, Microscience 2010

In vivo molecular imaging technique reveals

parenchymal and interstitial cell cross-talks in chronic inflammatory disease

Satoshi Nishimura, Mika Nagasaki, Ichiro Manabe, Koji Eto, Ryozo Nagai

2010.6.24. 東京 第27回幹細胞治療フォーラム

生体分子イメージングによる慢性炎症下の病態解析:実質細胞と間質のクロストーク(招待講演)

西村 智, 長崎 実佳, 真鍋 一郎, 江藤 浩之, 永井 良三

2010.6.22. 東京 五人会 内科講演

生体分子イメージングによる生活習慣病病態の解明を目指して(招待講演)

西村 智

2010.6.16-19. San Francisco, International Society for Stem Cell Research 8th annual Meeting

Novel in vivo imaging enables single-cell-level evaluation of the functionality of platelets derived from human induced pluripotent stem cells

Nishimura S, Takayama N, Otsu M, Nakamura S, Ohnishi R, Nagai R, Nakauchi H, Eto K

2010.6.14-15. 群馬 第52回脂質生化学会大会

血清リン脂質・生合成系を用いた新規メタボリックシンドロームマーカーの探索

西村 智, 長崎実佳, 中村和宏, 大川龍之介, 田嶋美智子, 良永千穂, 宇野漢成, 真鍋一郎, 永井良三, 林直人, 矢富裕

2010.6.7-8. 松島 日本分子生物学会第10回春季シンポジウム

シンポジウム「慢性炎症を基盤とする生活習慣病病態へのアプローチ」(オーガナイザー・座長)

生体イメージングでみる慢性炎症を基盤とする生活習慣病病態

西村 智

2010.6.4. 埼玉 バイオレオロジー学会年会 論文賞受賞講演

生体分子イメージングで明らかになる慢性炎症を背景とする生活習慣病病態 (招待講演)

~メタボリックシンドロームから血栓形成過程まで~

西村 智

2010.6.1. 東京 Meet the Specialist 2010

血清リン脂質プロファイル・生合成系を用いた新規メタボリックシンドロームマーカーの探索(招待講演)

西村智

2010.6.1-2. 東京 第6回 食品免疫学会 学術大会

シンポジウム1「メタボリックシンドローム研究の新展開 -

食品・炎症・免疫」

生体分子イメージングでみる肥満脂肪組織炎症と血栓形成(招待講演)

西村 智, 長崎 実佳, 真鍋 一郎, 江藤 浩之, 永井 良三

2010.5.27-29. 岡山 糖尿病学会第53回年次学術集会

Symposium 「In vivo imaging reveals adipose tissue remodeling in obesity, and thrombosis: parenchymal and stromal cross talks」(招待講演)

西村 智, 長崎 実佳, 真鍋 一郎, 江藤 浩之, 門脇 孝, 永井 良三

2010.5.23-26. 名古屋 日本顕微鏡学会第66回学術講演会

生体内細胞イメージングによる慢性炎症病態の解析

西村 智, 長崎 実佳, 真鍋 一郎, 江藤 浩之, 永井 良三

写真コンクール: 生体内細胞イメージングでみる肥満脂肪組織

西村 智, 長崎 実佳, 真鍋 一郎, 江藤 浩之, 永井 良三

2010.5.22-23. 大津 分子イメージング学会第5回学術集会

生体分子イメージングによる生活習慣病病態解析: 慢性炎症を背景とする実質と間質のクロストーク

In vivo imaging reveals inflammatory processes of common diseases: parenchymal and stromal cell cross talks

西村 智, 長崎 実佳, 真鍋 一郎, 江藤 浩之, 永井 良三

2010.5.19-21. 大阪 第62回細胞生物学会大会

In vivo molecular imaging reveals inflammatory processes in obese adipose tissue and thrombus formation: parenchymal and stromal cell cross talks (Workshop, 座長)

生体イメージングにより明らかになる慢性炎症病態、実質と間質の相互作用: 肥満脂肪組織と血栓

西村 智

2010.5.11. 北京 北京大学招待講演(2010年Nikon共焦点最新技術交流会)

In vivo molecular imaging reveals inflammatory processes in obese adipose tissue and thrombus formation: cell cross talks between parenchymal and stromal

西村 智

2010.5.6. 大阪 大阪大学免疫学フロンティアセンター招待講演 iFReC Seminar

生体分子イメージングでみる慢性炎症病態

～脂肪組織炎症から血栓形成過程まで～

西村 智

2010.5.1. 東京 第10回東京大学生命科学シンポジウムリン脂質・生合成酵素を用いた新規メタボリックシンドロームマーカーの探索

長崎実佳, 西村智, 中村和宏, 大川龍之介, 真鍋一郎, 田嶋美智子, 宇野漢成, 林直人, 永井良三, 矢富裕

2010.4.22-24. 鹿児島 第33回日本血栓止血学会学術集会

生体分子イメージング手法でみる血栓形成過程と血小板機能

西村 智, 長崎 実佳, 真鍋 一郎, 江藤 浩之, 永井 良三

Lnk/Sh2b3は血小板インテグリンシグナルを正に、肝臓では線溶系タンパク生成を負に制御することで止血血栓に寄与する

江藤浩之, 西村 智, 真鍋一郎, 柿沼 晴, 小田 淳, 永井良三, 中内啓光, 高木 智

巨核球造血、血小板産生異常を呈する病態解析細胞モデルの開発

大西椋子, 高山直也, 大津 真, 西村 智, 西 眞範, 浜崎雄平, 石井榮一, 小田 淳, 國島伸治, 中内啓光, 江藤浩之

脳卒中学会共催シンポジウム 大塚製薬共催セミナー「血栓を観る 血栓のイメージング」(シンポジウム招待講演)

生体分子イメージング手法でみる血栓形成の素過程

西村 智

第33回日本血栓止血学会共催セミナー 第4回 Daiichi-Sankyo Symposium for Thrombosis Update「血栓の成立と制御の新潮流」(シンポジウム招待講演)

生体分子イメージング手法による慢性炎症病態の解明 肥満脂肪組織と血栓症

西村 智

日本血管生物学会ジョイントシンポジウム「iPS・幹細胞研究によってわかってきた血栓・血管医学の最前線」

ヒES細胞・iPS細胞をソースとするin vitro血小板産生モデル

江藤浩之, 高山直也, 大西椋子, 中村壮, 西村 智, 國島伸治, 大津真, 中内啓光

2010.4.17. 大阪 第6回LIVER研究会

生体分子イメージングでみる慢性炎症病態

～局所免疫と脂肪組織炎症から血栓形成過程まで～(招待講演)

西村 智

2010.4.1. 奈良 島津製作所 招待講演

生体分子イメージングの意義付け

～肥満における局所免疫と脂肪組織炎症から血栓形成過程まで～

西村 智

## 別紙 4

## 研究成果の刊行に関する一覧表レイアウト (参考)

書籍

該当無し

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Takayama N, <u>Nishimura S</u> , Nakamura S, Shimizu T, Ohnishi R, Endo H, Yamaguchi T, Otsu M, Nishimura K, Nakanishi M, Sawaguchi A, Nagai R, Takahashi K, Yamanaka S, Nakauchi H, Eto K.	Transient activation of c-MYC expression is critical for efficient platelet generation from human induced pluripotent stem cells.	Journal of Experimental Medicine	207(13)	2817-2830	2010
Oguri A, Tanaka T, Iida H, Meguro K, Takano H, Oonuma H, <u>Nishimura S</u> , Morita T, Yamasoba T, Nagai R, Nakajima T.	Involvement of CaV3.1 T-type calcium channels in cell proliferation in mouse preadipocytes.	Am J Physiol Cell Physiol	298(6)	1414-23	2010
<u>Nishimura S</u> , Nagasaki M.	Adipose tissue remodeling and chronic inflammation in obesity visualized by in vivo molecular imaging method	Journal of Biomechanics	Volume 24, Number 1	11-15	2010
Suzuki-Inoue K, Inoue O, Ding G, <u>Nishimura S</u> , Hokamura K, Eto K, Kashiwagi H, Tomiyama Y, Yatomi Y, Umemura K, Shin Y, Hirashima M, Ozaki Y.	Essential in vivo roles of the c-type lectin receptor CLEC-2: Embryonic/neonatal lethality of CLEC-2-deficient mice by blood/lymphatic misconnections and impaired thrombus formation of CLEC-2-deficient platelets.	J Biol Chem	285(32)	24494-507	2010

Seo K, Inagaki M, <u>Nishimura S</u> , Hidaka I, Sugimachi M, Hisada T, Sugiura S	Structural Heterogeneity in the Ventricular Wall Plays a Significant Role in the Initiation of Stretch-Induced Arrhythmias in Perfused Rabbit Right Ventricular Tissues and Whole Heart Preparations	Circ Res	106	176-184	2010
Takizawa H, <u>Nishi mura S</u> , Takayama N, Oda A, Nishi kii H, Morita Y, K akinuma S, Yamazaki S, Okamura S, Tamura N, Got o S, Sawaguchi A, Manabe I, Tak atsu K, Nakauchi H, Takaki S, Eto K	Lnk/Sh2b3 regulates in tegrin alpha-IIb-beta3 outside-in signaling in platelets leading to sta bilization of developing thrombus <i>in vivo</i>	J Clin Invest	120(1)	179-190	2010
Takeda N, Manabe I, Uchino Y, Eguchi K, Matsumoto S, <u>Nishimura S</u> , Shindo T, Sano M, Otsu K, Snider P, Conway S, Nagai R	Cardiac fibroblasts are essential for the adaptive response of the murine heart to pressure overload	J Clin Invest	120(1)	254-265	2010

# Transient activation of *c-MYC* expression is critical for efficient platelet generation from human induced pluripotent stem cells

Naoya Takayama,<sup>1</sup> Satoshi Nishimura,<sup>3,4,5</sup> Sou Nakamura,<sup>1</sup> Takafumi Shimizu,<sup>2</sup> Ryoko Ohnishi,<sup>1</sup> Hiroshi Endo,<sup>1,2</sup> Tomoyuki Yamaguchi,<sup>2</sup> Makoto Otsu,<sup>2</sup> Ken Nishimura,<sup>4,6</sup> Mahito Nakanishi,<sup>6</sup> Akira Sawaguchi,<sup>7</sup> Ryoza Nagai,<sup>3,5</sup> Kazutoshi Takahashi,<sup>8</sup> Shinya Yamanaka,<sup>8</sup> Hiromitsu Nakauchi,<sup>2</sup> and Koji Eto<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Stem Cell Bank and <sup>2</sup>Division of Stem Cell Therapy, Center for Stem Cell Biology and Regenerative Medicine, the Institute of Medical Science, and <sup>3</sup>Department of Cardiovascular Medicine and <sup>5</sup>Translational Systems Biology and Medicine Initiative, the University of Tokyo, Tokyo 113-0033, Japan

<sup>4</sup>PRESTO, Japan Science and Technology Agency, Tokyo 102-8666, Japan

<sup>6</sup>Gene Function Research Center, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, Ibaraki 305-8562, Japan

<sup>7</sup>Department of Anatomy, University of Miyazaki Faculty of Medicine, Miyazaki 889-1692, Japan

<sup>8</sup>Center for iPS Research and Application, Kyoto University, Kyoto 606-8507, Japan

**Human (h) induced pluripotent stem cells (iPSCs) are a potentially abundant source of blood cells, but how best to select iPSC clones suitable for this purpose from among the many clones that can be simultaneously established from an identical source is not clear. Using an in vitro culture system yielding a hematopoietic niche that concentrates hematopoietic progenitors, we show that the pattern of *c-MYC* reactivation after reprogramming influences platelet generation from hiPSCs. During differentiation, reduction of *c-MYC* expression after initial reactivation of *c-MYC* expression in selected hiPSC clones was associated with more efficient in vitro generation of CD41a<sup>+</sup>CD42b<sup>+</sup> platelets. This effect was recapitulated in virus integration-free hiPSCs using a doxycycline-controlled *c-MYC* expression vector. In vivo imaging revealed that these CD42b<sup>+</sup> platelets were present in thrombi after laser-induced vessel wall injury. In contrast, sustained and excessive *c-MYC* expression in megakaryocytes was accompanied by increased p14 (*ARF*) and p16 (*INK4A*) expression, decreased *GATA1* expression, and impaired production of functional platelets. These findings suggest that the pattern of *c-MYC* expression, particularly its later decline, is key to producing functional platelets from selected iPSC clones.**

Platelets are key elements not only of hemostasis and thrombosis but also of tissue regeneration after injury and the pathophysiology of inflammation (Gawaz et al., 2005; Nesbitt et al., 2009). The production of platelets, thrombopoiesis, is regulated primarily by thrombopoietin (TPO)-mediated megakaryopoiesis within the BM (Patel et al., 2005; Schulze and Shivdasani, 2005). Notably, many patients with critical thrombocytopenia, caused by dysregulation of BM as a result of hematopoietic disease or aggressive chemotherapy, require platelet transfusions using platelet concentrates obtained through blood donation (Webb and Anderson, 1999). It is well known, however, that repeated transfusion induces antibodies in recipients against allo-genic human leukocyte antigen (HLA) on the

transfused platelets (Schiffer, 2001). To establish a supply of identical platelet concentrates without loss of responsiveness as a result of immunorejection, particularly for patients with a rare HLA, human (h) induced pluripotent stem cells (iPSCs) represent a potentially abundant source.

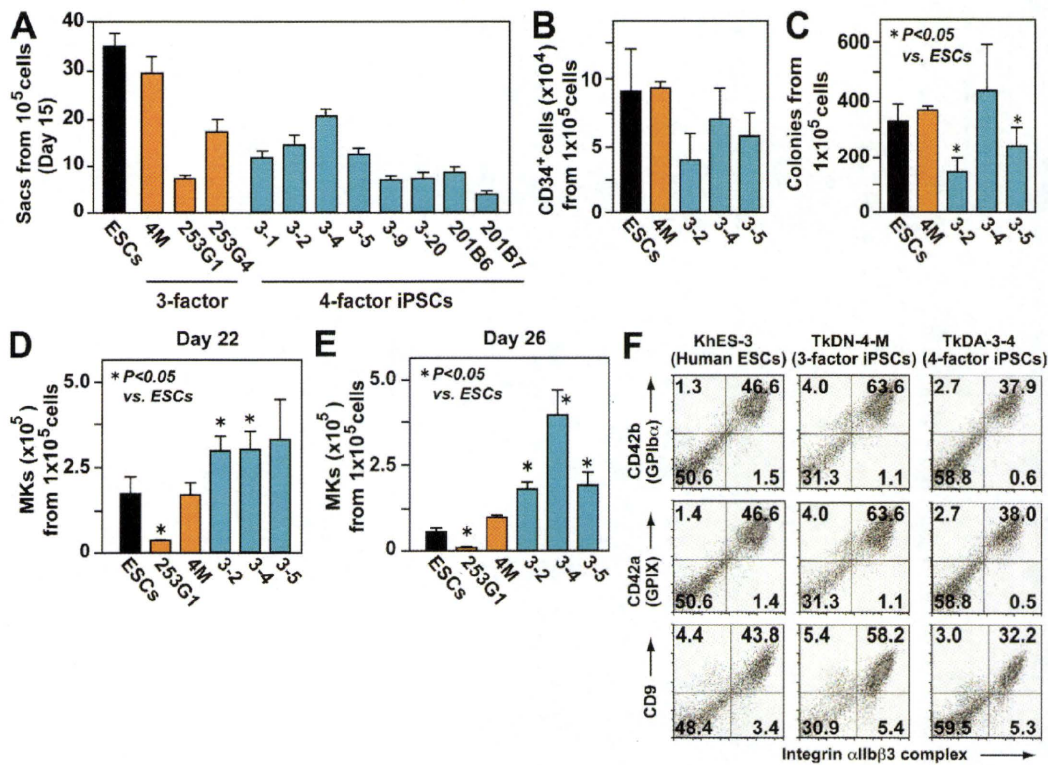
Successful reprogramming of differentiated fibroblasts into a pluripotent stage using the defined genes *OCT3/4*, *KLF4*, *SOX2*, and *c-MYC* (Takahashi et al., 2007; Yu et al., 2007) is a potentially effective means of generating HLA-matched iPSCs for regenerative medicine

## CORRESPONDENCE

K. Eto:  
keto@ims.u-tokyo.ac.jp

Abbreviations used: CB, cord blood; DOX, doxycycline; ESC, embryonic stem cell; HDF, human dermal fibroblast; HLA, human leukocyte antigen; iPSC, induced pluripotent stem cell; KO, Kusabira orange; MK, megakaryocyte; PB, peripheral blood; SCF, stem cell factor; Tg, transgene; TPO, thrombopoietin; VEGF-R2, vascular endothelial growth factor type 2 receptor.

© 2010 Takayama et al. This article is distributed under the terms of an Attribution-Noncommercial-Share Alike-No Mirror Sites license for the first six months after the publication date (see <http://www.rupress.org/terms>). After six months it is available under a Creative Commons License (Attribution-Noncommercial-Share Alike 3.0 Unported license, as described at <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/>).



**Figure 1. Four-factor human iPSCs are better than three-factor iPSCs for megakaryopoiesis, which is independent of hematopoietic colony potential.** (A) Numbers of ESC- and iPSC-sac-like structures generated from  $10^5$  cells ( $n = 3$ , means  $\pm$  SEM from three independent experiments). (B) Numbers of CD34<sup>+</sup> hematopoietic progenitors within ESC- or iPSC-sacs yielded from  $10^5$  human ESCs or iPSCs ( $n = 3$ , means  $\pm$  SEM). (C) Numbers of hematopoietic colonies derived from  $10^5$  human ESCs or iPSCs within sacs ( $n = 3$ , means  $\pm$  SEM). (D and E) Numbers of CD42b (GPIIb)<sup>+</sup> MKs derived from  $10^5$  hematopoietic progenitors within sacs on day 22 (D) and day 26 (E;  $n = 5$ , means  $\pm$  SEM). (F) Representative flow cytometry dot plots for KhES-3-, TkDN-4-M-, and TkDA3-4-derived MKs examined on day 24.

(Raya et al., 2009). However, reactivation of *c-Myc* during establishment of iPSCs can reportedly lead to oncogenicity after transplantation (Okita et al., 2007). But because platelets are anucleate, they can be irradiated before transfusion to eliminate residual hiPSCs or other differentiated nucleated cells that could form teratomas or malignant tumors (van der Meer and Pietersz, 2005). Thus, platelet concentrates derived from hiPSCs could be a useful source of HLA-identical platelets, which eliminates the need for scarce donor blood. That said, because a large number of iPSC clones can be simultaneously generated from an identical source, the iPSC clone most suitable for the desired purpose must be selected before the differentiation phase (Miura et al., 2009). We therefore sought to determine the hallmark of such cells as well as the best way to select iPSC clones in vitro for generation of functional platelets in vivo.

*c-Myc* plays essential roles in both embryonic and adult hematopoiesis, although its effects on megakaryopoiesis and thrombopoiesis in various mouse models remains unclear (Thompson et al., 1996a,b; Chanprasert et al., 2006; Guo et al., 2009). For example, two studies of inducible *c-Myc* overexpression (O/E) under the control of megakaryocyte (MK)-specific differentiation revealed that *c-Myc* plays a positive role

in the proliferation of MK progenitors (Thompson et al., 1996a,b). Moreover, *c-Myc* is reportedly essential for the TPO-*c-mpl* axis in megakaryopoiesis (Chanprasert et al., 2006). In contrast, recent studies using *c-Myc*-deficient mice showed that the absence of the gene actually led to an increase in the platelet count (Guo et al., 2009).

Using a culture system that yields an in vitro hematopoietic niche containing hematopoietic progenitors (which we named iPSC-Sac), we show in this paper that limited reactivation of *c-MYC* and its subsequent decline after a reactivation-dependent increase in the gene's expression in immature MKs are key components of platelet generation in vitro and contribute to the selection and validation of iPSC clones in which genome integration is accomplished through reprogramming. These clones are suitable for transfusion in clinical applications or mechanistic studies of thrombopoiesis using disease-specific iPSCs.

## RESULTS

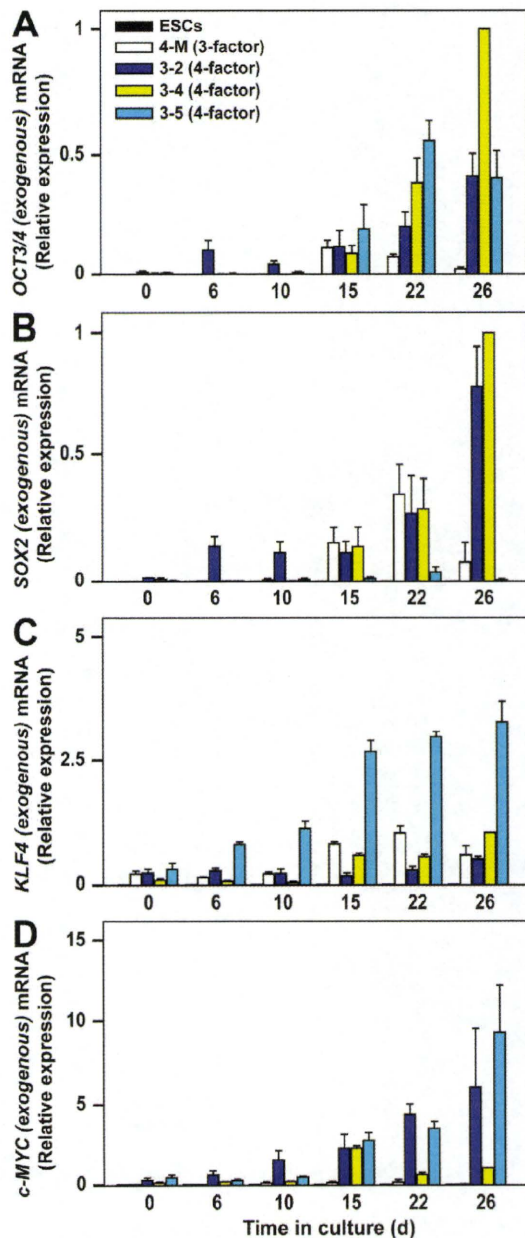
### Four-factor hiPSC-derived hematopoietic progenitors contribute to enhanced generation of MKs and platelets

Using VSV-G-pseudotyped retroviruses (Ory et al., 1996) harboring human reprogramming factors (*OCT3/4*, *SOX2*,

*KLF4*, and/or *c-MYC*), we sought to establish iPSCs from human dermal fibroblasts (HDFs). With our system, we consistently generated 200–300 hiPSC clones from  $10^5$  HDFs. For evaluation of pluripotency, established iPSC clones obtained through transduction with four or three factors (with or without *c-MYC*) and all clones showing a normal karyotype (not depicted) were examined for morphology, SSEA-4 expression (Fig. S1 A), other gene expression (Fig. S1 B), and the ability to form teratomas in vivo (Fig. S1 C). Our findings confirmed that exogenous *OCT3/4*, *SOX2*, *KLF4*, and *c-MYC* remained unexpressed in established iPSCs (Fig. S1 B).

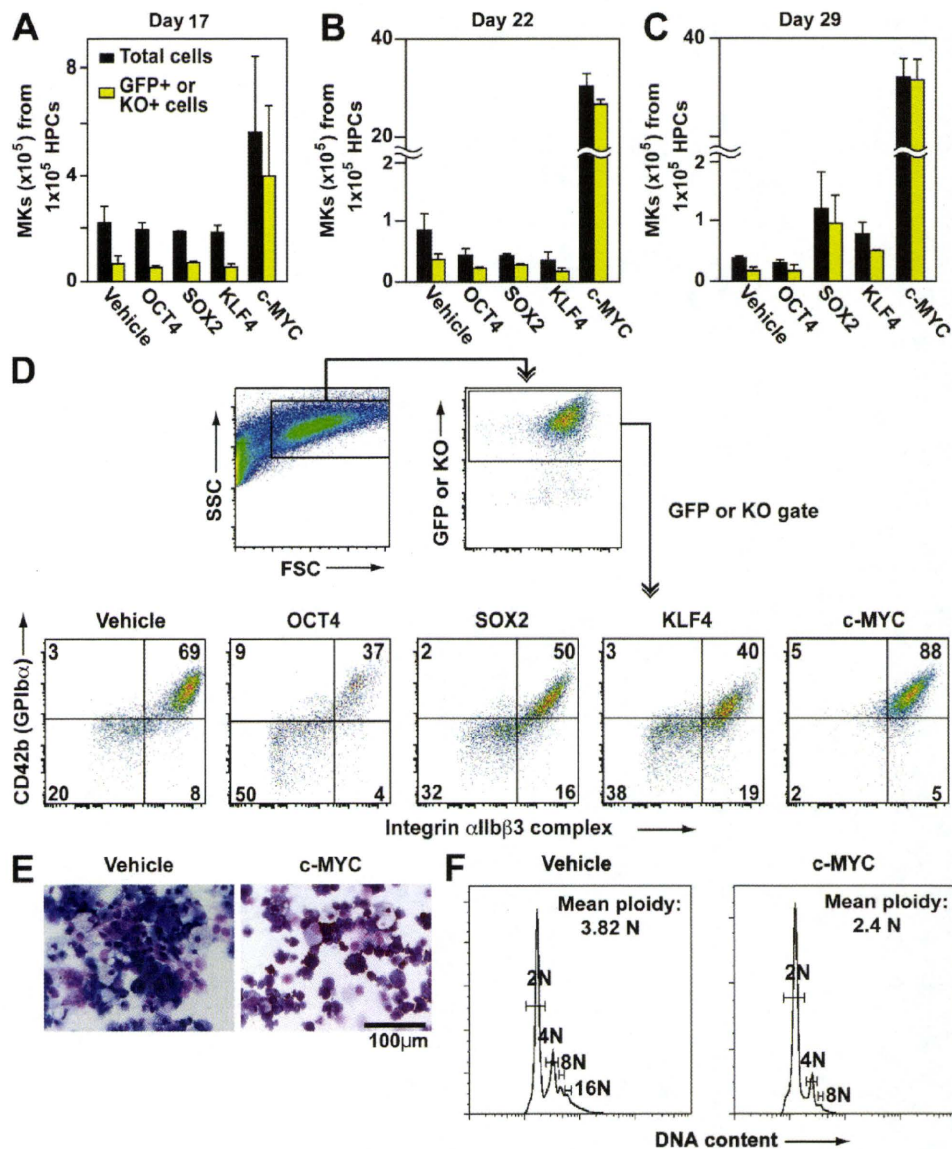
To explore the hiPSC clones' potential for differentiation into hematopoietic cells (Takayama et al., 2008), we evaluated several iPS-Sacs (Fig. S2 A) from individual clones (four-factor hiPSCs: TkDA3-1, -2, -4, -5, -9, -20, 201B6, and 201B7; three-factor hiPSCs: TkDN4-M, 253G1, and 253G4) and compared them to previously evaluated human (h) embryonic stem cells (ESCs; KhES3 clone, Kyoto University, Japan; Takayama et al., 2008). On day 15 of culture, iPS-Sacs that contained numerous hematopoietic-like round cells (Fig. S2 B) and showed expression of vascular endothelial growth factor type 2 receptor (VEGF-R2<sup>+</sup>; Fig. S2 B) or platelet endothelial cell adhesion molecule 1 (CD31<sup>+</sup>; not depicted) were deemed to be potentially suitable microenvironments from which to obtain hematopoietic progenitors, as was observed in hESC-derived structures (Takayama et al., 2008).

We detected considerable heterogeneity in the production of iPS-Sacs (a hallmark of the efficiency of hematopoietic progenitors) from iPSCs derived from the same source (i.e., TkDA3-1, -2, -4, -5, -9, or -20; Fig. 1 A), which was also consistent with previous observations in hESCs (Osafune et al., 2008). In particular, CD34<sup>+</sup>, but not CD34<sup>-</sup>, cells from iPS-Sacs showed successful colony formation in methylcellulose colony assays (Fig. S2 C). The three-factor clone TkDN4-M, as well as KhES-3, appeared to have a greater potential for myeloid lineage hematopoiesis, as exemplified by the numbers of Sacs (Fig. 1 A, red bar) composed of CD34<sup>+</sup> cells (Fig. 1 B, red bar), and the numbers of hematopoietic colonies formed from each Sac (Fig. 1 C, red bar). Nonetheless, the number of CD42b (GPIIb $\alpha$ ; von Willebrand factor receptor)<sup>+</sup> MKs obtained with four-factor iPSC clones (e.g., TkDA3-2, TkDA3-4, and TkDA3-5) was higher than that obtained with TkDN4-M or KhES-3 when equal numbers of cells from iPS-Sacs were seeded onto fresh culture dishes in the presence of TPO, stem cell factor (SCF), and heparin (Fig. 1, D [day 22] and E; and Fig. S3 day 26; Takayama et al., 2008). For example, clone TkDA3-4 generated three times as many MKs as TkDN4-M or KhES-3 at the peak of production (Fig. 1 E, day 26; and Fig. S3). By days 22–38, phase-contrast imaging revealed the presence of proplatelets, a prerelease platelet form (Video 1), as well as mature MKs by May-Giemsa staining (Fig. S4). Moreover, flow cytometric analysis showed that 40–60% of floating cells expressed CD41a (integrin  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 complex), a fibrinogen receptor, as well as CD42a (GPIX), GPIIb $\alpha$ , and CD9, all of which are hallmarks of MKs (Fig. 1 F; Tomer, 2004; Takayama et al., 2008).



**Figure 2.** Time-dependent changes in qPCR induced by exogenous reprogramming genes in three-factor or four-factor iPSCs. mRNA encoding exogenous *OCT3/4* (A), *SOX2* (B), *KLF4* (C), and *c-MYC* (D) in human ES cells (ESCs), TkDN4-M (three-factor iPSCs), TkDA3-2, TkDA3-4, and TkDA3-5 (four-factor iPSCs) on day 0 or their derivatives (on days 6, 10, 15, 22, and 26 after initiation of MK-lineage culture) were examined by qPCR as described in the Materials and methods section. TkDA3-4-derived mature MKs (day 26) was assigned a value of 1.0 ( $n = 4$ , means  $\pm$  SEM from two independent experiments).

To determine the mechanism underlying the enhanced megakaryopoiesis exhibited by four-factor hiPSC-derived hematopoietic progenitors, we assessed the potential of progenitors



**Figure 3. Effects of reprogramming factors on megakaryopoiesis.** (A–C) Each reprogramming factor was transduced, together with EGFP or KO markers, on day 15 of MK-lineage culture. Numbers of total and marker genes EGFP or KO-expressing cells in floating cells on day 17 (A) and CD42b<sup>+</sup> MKs on days 22 (B) and 26 (C) were measured ( $n = 3$ , means  $\pm$  SEM). (D) Representative flow cytometry dot plots of hESC-derived hematopoietic cells transduced with vehicle (EGFP), *OCT3/4-KO*, *SOX2-EGFP*, *KLF4-EGFP*, or *c-MYC-EGFP* on day 22. (E and F) On day 22, May-Giemsa staining (E) or ploidy analysis (F) of the cells transduced with vehicle or *c-MYC* was examined.

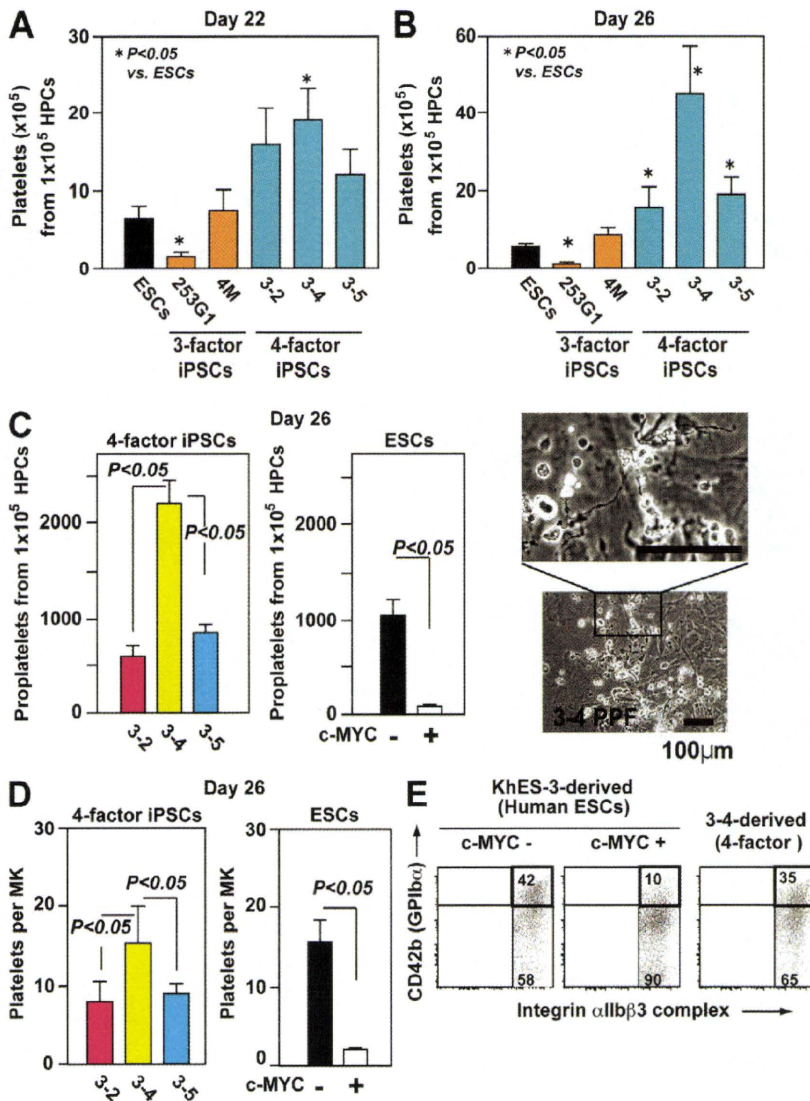
within iPS-Sacs, based on colony-forming capacity (Fig. S2 D) and their surface markers (not depicted). We found no significant differences between TkDA3-4 (four-factor) and TkDN4-M (three-factor; Fig. S2 D), which means the potential and the capacity to drive most myeloid lineage commitment from iPSC-derived progenitors is independent of the clone type, or at least there was no detectable difference between the three- and four-factor iPSC clones we examined (not depicted).

In contrast, quantitative (q) PCR analysis of hematopoietic cells on days 22–26 (7–11 d after replating for selective

MK lineage culture) revealed expression of the exogenous (transgene [Tg]) reprogramming genes, which were not expressed before hematopoiesis (Fig. 2, A–D, day 0; and Fig. S1 B). Although qPCR after day 15 suggested that, in four-factor iPSCs, activation of *OCT3/4*Tg and/or *c-MYC*Tg might affect the enhanced megakaryopoiesis (Fig. 2, A and D), individual Tg activation was not dependent on the copy number in the genome (Fig. S1, D and E).

Thus, to confirm the functional effect of *OCT3/4* and/or *c-MYC* Tg on megakaryopoiesis from pluripotent stem cells,





**Figure 4.** Level of *c-MYC* reactivation in individual iPSC-derived MKs may determine the efficiency of platelet generation in vitro. (A and B) Numbers of CD41a<sup>+</sup>CD42b<sup>+</sup> platelets generated from hESCs or hiPSCs on days 22 (A) and 26 (B); peak of platelet generation;  $n = 5$ , means  $\pm$  SEM). (C and D) Numbers of proplatelets (C) and platelets (D) derived from four-factor iPSCs and from ESC hematopoietic progenitors, with or without *c-MYC* transduction (ii);  $n = 5$ , means  $\pm$  SEM). Representative photomicrographs of proplatelets are derived from four-factor iPSCs. (D) Numbers of platelets per MK was calculated as the total number of platelets divided by the total number of MKs on day 26 ( $n = 5$ , means  $\pm$  SEM). (E) Representative flow cytometry dot plots show MKs derived from TkDA3-4 and KhES-3, with or without *c-MYC* transduction, on day 26.

#### *c-MYC* levels in hiPSC-derived MKs determines the number of platelets generated per MK

We next tested whether iPSC-derived MKs actually yield platelets in vitro. We confirmed that four-factor iPSCs generate greater numbers of platelets than three-factor iPSCs or hESCs (Fig. 4, A and B; and Fig. S5). Moreover, we noticed that, at the peak of production (day 26), many more proplatelets and platelets were generated from TkDA3-4 iPSCs than from any other four-factor iPSCs (Fig. 4, B and C; and Fig. S5). We also noted that TkDA3-2 and TkDA3-5 iPSC-derived MKs showed an earlier peak, on day 22 (Fig. 1, D and E; and Fig. S3) and that there were

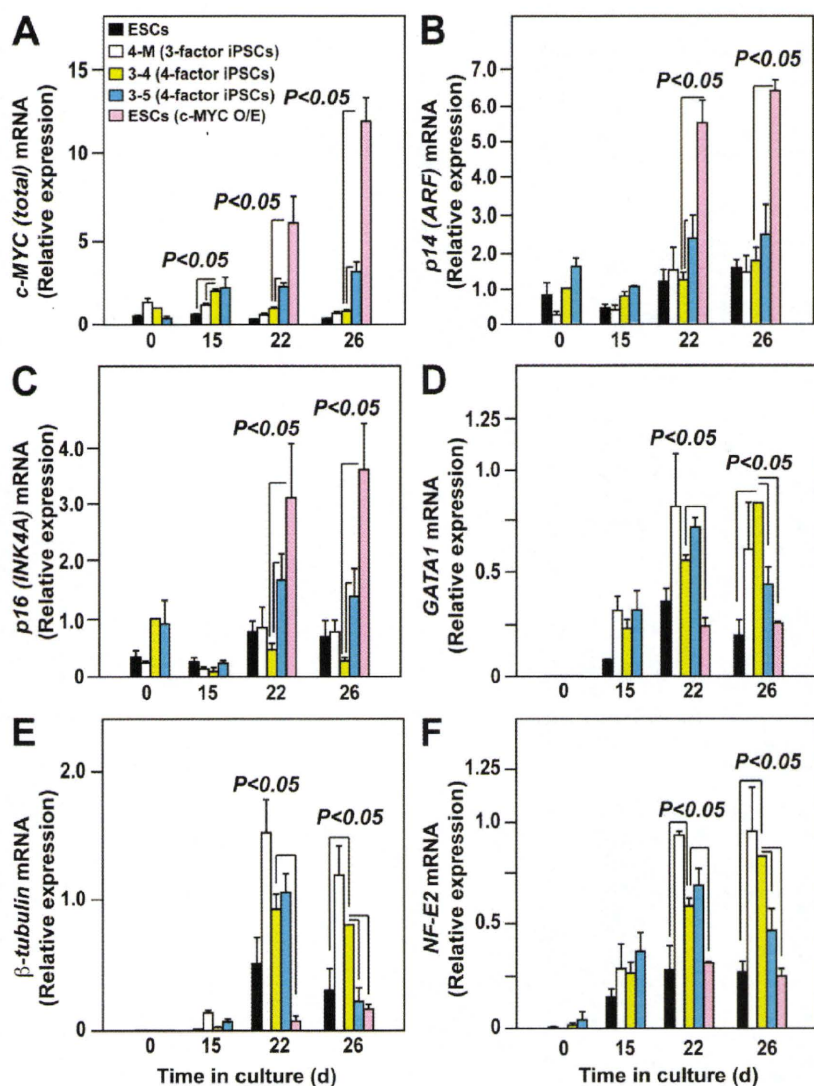
fewer proplatelets in the dishes (Fig. 4 C), which suggests that most MKs promote apoptosis and/or senescence leading to inhibition of platelet release in those two clones.

It has been reported that forced expression of *c-Myc* impairs maturation of MKs displaying polyploidization, leading to an increase in immature MKs (Thompson et al., 1996a). Indeed, we confirmed the appearance of immature MKs (Fig. 3, D–F) on day 22 after retroviral transduction of *c-MYC* into hESC-derived hematopoietic progenitors, which diminished proplatelet formation and platelet yield (Fig. 4, C and D; and Fig. S6 A). Dot plots for CD41a<sup>+</sup>CD42b<sup>+</sup> platelets obtained by flow cytometric analysis of KhES-3, TkDN4-M (three-factor iPSCs), and TkDA3-4 (four-factor iPSCs) showed similar patterns (Fig. 4 E and Fig. S6 A), although most of the CD41a<sup>+</sup>CD42b<sup>-</sup> platelets appeared to have shed the extracellular domain of

each reprogramming factor was separately introduced into hematopoietic progenitors derived from KhES-3, along with EGFP or Kusabira orange (KO), which served as markers. Only *c-MYC* expression recapitulated the time course of the enhanced megakaryopoiesis, as it was accompanied by greater transduction efficiency as a result of the increased cell proliferation it induced (Fig. 3, A–C). Flow cytometry revealed that on day 22, most of the EGFP<sup>+</sup> or KO<sup>+</sup> population was CD41a<sup>+</sup>CD42b<sup>+</sup> in the *c-MYC* O/E specimens but not in the others (Fig. 3 D), although only mononuclear and lower ploidy cells were present (Fig. 3, E and F). These suggest that *OCT3/4* O/E might not accelerate megakaryopoiesis (Fig. 3 D). Collectively then, these findings suggest that stronger expression of *c-MYC* in hESCs might promote lineage commitment into megakaryopoiesis without maturation.

fewer proplatelets in the dishes (Fig. 4 C), which suggests that most MKs promote apoptosis and/or senescence leading to inhibition of platelet release in those two clones.

It has been reported that forced expression of *c-Myc* impairs maturation of MKs displaying polyploidization, leading to an increase in immature MKs (Thompson et al., 1996a). Indeed, we confirmed the appearance of immature MKs (Fig. 3, D–F) on day 22 after retroviral transduction of *c-MYC* into hESC-derived hematopoietic progenitors, which diminished proplatelet formation and platelet yield (Fig. 4, C and D; and Fig. S6 A). Dot plots for CD41a<sup>+</sup>CD42b<sup>+</sup> platelets obtained by flow cytometric analysis of KhES-3, TkDN4-M (three-factor iPSCs), and TkDA3-4 (four-factor iPSCs) showed similar patterns (Fig. 4 E and Fig. S6 A), although most of the CD41a<sup>+</sup>CD42b<sup>-</sup> platelets appeared to have shed the extracellular domain of



**Figure 5.** Level of *c-MYC* expression affects *INK4A/ARF* locus genes and genes related to MK maturation during megakaryopoiesis from pluripotent stem cells. qRT-PCR analysis of total *c-MYC* (A, endogenous plus exogenous), *p14ARF* (B), *p16INK4A* (C), *GATA1* (D), *β1-tubulin* (E), and *NF-E2 p45* (F) expression in hESCs, with and without overexpression (O/E) of exogenous *c-MYC*, on days 22 and 26 (7 and 11 d after transduction) in three-factor hiPSCs (TkDN4-M) or in four-factor hiPSCs (TkDA3-4 and TkDA3-5) on days 0, 15, 22, and 26. All levels were normalized to the level of *GAPDH* expression ( $n = 4$  of two independent samples). The levels of *c-MYC* (A), *p14ARF* (B), and *p16INK4A* (C) expression in an undifferentiated TkDA3-4 iPSC clone (day 0) or expression of the other genes (D-F) in TkDA3-4-derived mature MKs (day 26) was assigned a value of 1.0 ( $n = 4$ , means  $\pm$  SEM).

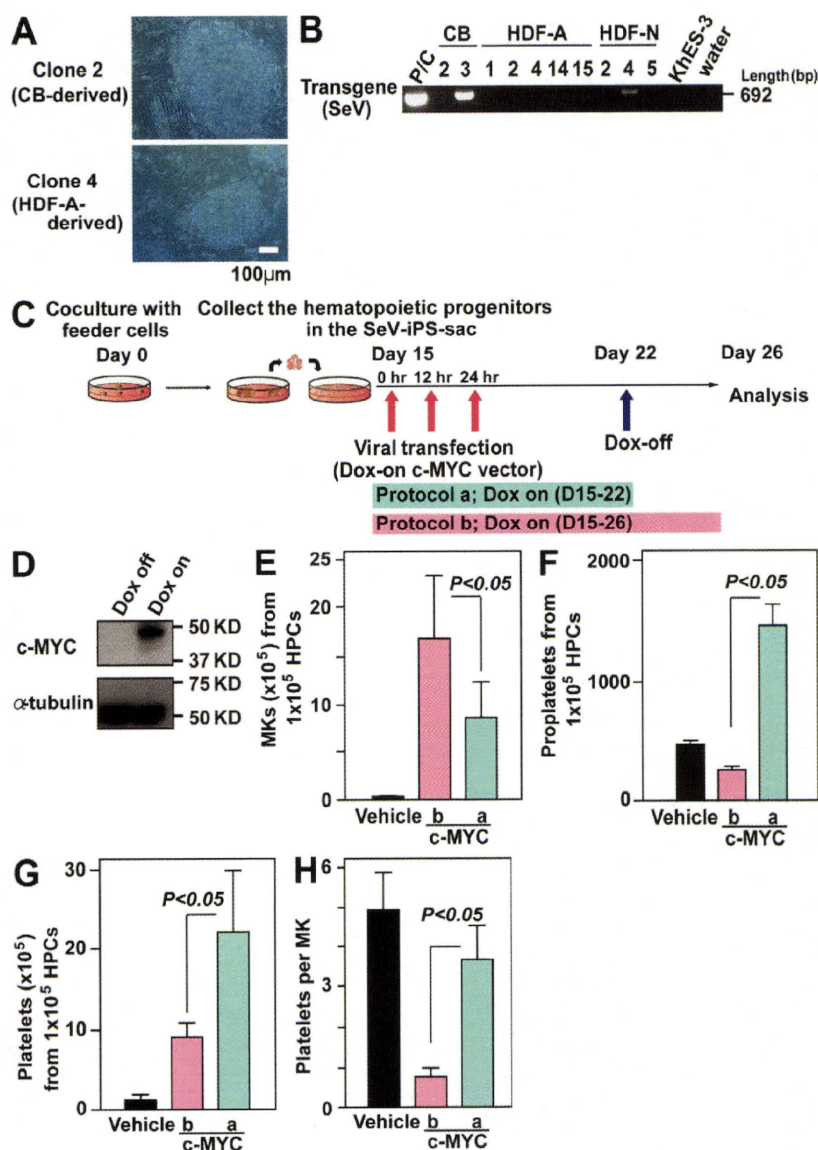
*c-MYC* and the genes involved in *c-MYC* activation and thrombopoiesis. qPCR analyses confirmed that total (endogenous plus exogenous) *c-MYC* expression in TkDA3-4, TkDA3-5, and *c-MYC*-O/E hESCs (KhES-3) was higher than in TkDN4-M (three-factor) or hESCs without *c-MYC* (control) on days 15 (hematopoietic progenitors) and 22 (immature MKs) of culture (Fig. 5 A). Intriguingly, however, total *c-MYC* expression in TkDA3-5 increased progressively from days 15 through 26, whereas in TkDA3-4, the iPSC clone showing the most efficient platelet generation, total *c-MYC* expression declined after day 15

(Fig. 5 A). To confirm whether reactivation actually influenced total *c-MYC* expression (Fig. 5 A), we separately examined endogenous and exogenous (Tg) *c-MYC* expression. We found that although levels of total and exogenous *c-MYC* differed among the clones (Fig. 5 A and Fig. S7 A), there was no significant difference in endogenous *c-MYC* levels among TkDN4-M, TkDA3-4, and TkDA3-5 (Fig. S7 B). In contrast, expression of two *INK4A* locus genes, *p14 (ARF)* and *p16 (INK4A)*, which act as a safety net system against *c-Myc* hyperactivation leading to senescence (Murphy et al., 2008), was higher in *c-MYC*-O/E hESCs and TkDA3-5 than in TkDA3-4 on day 22 (immature MKs; Fig. 5, B and C). We therefore assumed that elevation of *p14* and *p16*, beginning at an earlier phase of differentiation, is associated with inhibition of MK maturation (Fig. 3, E and F). *MYC* associates with the *GATA1* promoter during immature erythroblast expansion, perhaps suppressing *GATA-1* expression (Rylski et al., 2003). Similarly,

#### How does the level of *c-MYC* expression control platelet generation from iPSCs?

The results so far suggest that excess *c-MYC* expression diminishes platelet yield. To confirm that hypothesis, we evaluated the time-dependent changes in the total expression of

CD42b (GPIb $\alpha$ ), as indicated by the recovery of CD42b expression in the presence of a metalloprotease inhibitor (Fig. S6 B; Nishikii et al., 2008). In contrast, platelet-like particles from hESC-derived MKs ectopically expressing *c-MYC* (*c-MYC*-O/E) showed significantly lower CD42b expression, a distinct pattern on dot plots (Fig. 4 E and Fig. S6 A), and no recovery of CD42b expression after administration of metalloprotease inhibitor (not depicted). Given the platelet generation per MK, it appears that forced expression of *c-MYC* in ESCs impairs platelet yield on day 26 (Fig. 4 D), which might recapitulate in TkDA3-2 or TkDA3-5 iPSC-MKs (Fig. 4 D).



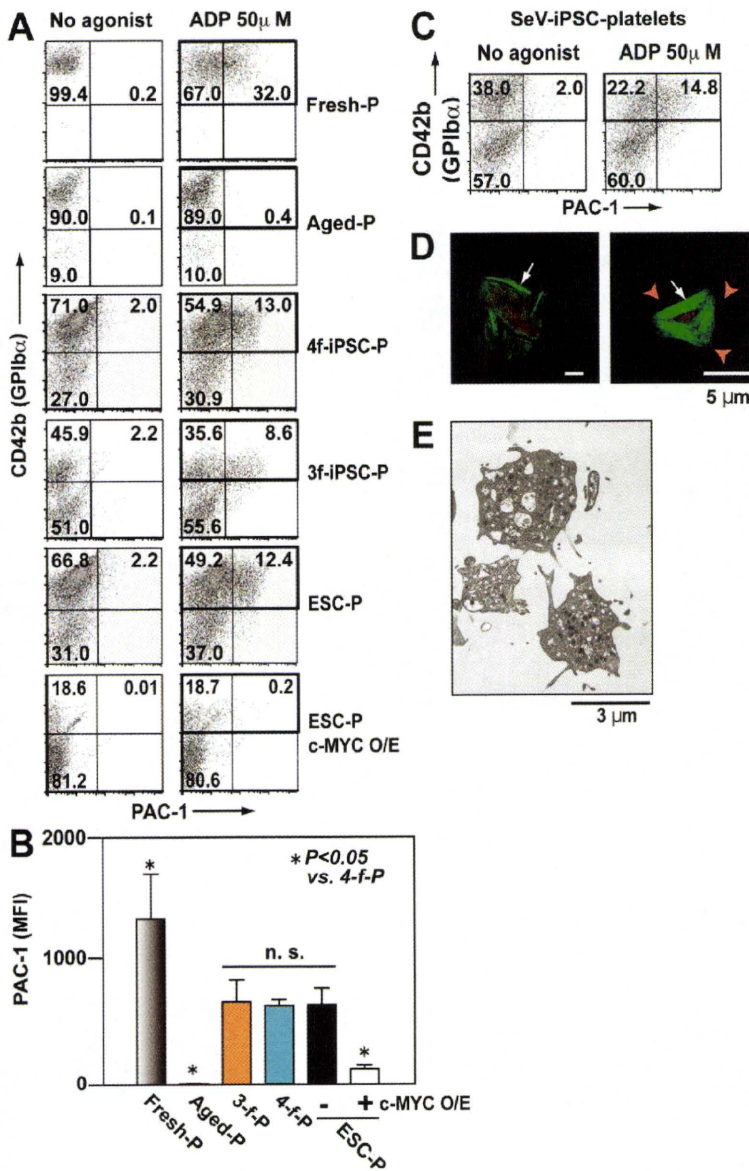
*GATA-1* expression was reduced in *c-MYC*-O/E hESC (KhES-3)-MKs showing higher levels of *c-MYC* expression on day 22, as were levels of  $\beta 1$ -tubulin and *NF-E2* (*p45*; Fig. 5, D–F). Consistent with those findings, both *c-MYC*-O/E MKs and TkDA3-5–derived MKs showed less proplatelet formation (Fig. 4 C) and had a smaller platelet yield than TkDA3-4 (Fig. 4 D). Thus, high levels of sustained expression of *INK4A* locus genes in MKs are also associated with impaired platelet release.

These results suggest that an increase in *c-MYC* expression, peaking on day 22, followed by a decline may be critical for efficient platelet generation on day 26, as exemplified in TkDA3-4. Sustained increases in *c-MYC* expression may contribute to activation of senescence genes, thereby impairing MK maturation and intact platelet yield.

**Figure 6. Inducible *c-MYC* expression system enabling Sendai viral vector-based iPSCs without reactivation to recapitulate enhanced MK maturation with increased platelet generation.** (A) Representative photomicrographs of SeV-iPSCs derived from CB CD34<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup> cells or HDFs. Original magnification, 100 $\times$ . (B) RT-PCR analyses of Sendai virus Tg (harboring reprogramming factors) expression in SeV-iPSC clones (passage number 4) derived from CB, HDF-A (adult), and HDF-N (neonate). A sample of HDFs transfected with SeV is used as a positive control for the SeV Tg. (C) Scheme of *c-MYC* induction in SeV-iPSC-derived hematopoietic cells. Hematopoietic progenitors derived from SeV-iPSCs were transfected with DOX-inducible *c-MYC*O/E vector on day 15 and analyzed on day 26. In Protocol a, DOX was added only from days 15 to 22. In protocol b, DOX was added from days 15 through 26. (D) Representative Western blots of cell lysates with *c-MYC*O/E (DOX-on; protocol b) or without *c-MYC*O/E (DOX-off; Protocol a) on day 26. The  $\alpha$ -tubulin levels indicate same protein value. (E–G) Numbers of CD42b (GPIIb $\alpha$ )<sup>+</sup> MKs (E), proplatelets (F), and platelets (G) on day 26 derived from  $10^5$  hematopoietic progenitors transfected with vehicle or DOX-inducible *c-MYC*O/E vector in protocol a or protocol b ( $n = 4$ , means  $\pm$  SEM). (H) Numbers of platelets per MK generated on day 26 of culture (peak of platelet generation;  $n = 4$ , means  $\pm$  SEM). Numbers of platelets per MK were calculated as the total number of platelets divided by the total number of MKs on day 26.

**Inducible *c-MYC* expression in iPSCs without reactivation exhibited behavior similar to that of iPSCs with reactivation, leading to efficient generation of functional platelets**

To further confirm whether an increase and subsequent decline in *c-MYC* is critical for megakaryopoiesis, leading to an efficient platelet yield, we prepared a Sendai viral vector (SeV) harboring the four reprogramming genes, which, during the generation of human iPSCs, enabled RNA viral transduction without integration of DNA into the chromosome (Nishimura et al., 2007; Fig. 6, A and B). Thereafter, doxycycline (DOX)-inducible expression system in a lentiviral vector was applied to the SeV-based human iPSCs (SeV-iPSCs; skin-fibroblast [HDF]-derived SeV-iPSCs and cord blood [CB] CD34<sup>+</sup> cell-derived SeV-iPSCs; Fig. 6 A). We selected CB-derived SeV-iPSCs (clone 2; Fig. 6, A and B) for most experiments because they showed no detectable Tg and better differentiation to hematopoietic progenitors than other clones, including HDF-derived SeV-iPSCs (not depicted). *c-MYC* O/E was regulated by DOX (Fig. 6 C), and



**Figure 7. Integrin activation and the structure of human iPSC platelets are comparable to those in human PB-derived platelets.**

(A–C) Integrin activation in fresh human platelets (Fresh-P), aged human platelets (48-h incubation at 37°C; Aged-P), TkDN4-M (three-factor iPSC) platelets (3f-iPSC-P), TkDA3-4 (four-factor iPSC) platelets (4f-iPSC-P), and ESC platelets (ESC-P), with or without *c-MYC*O/E. The binding of PAC-1 (indicative of platelet activation) to individual platelets was quantified in the absence and presence of 50  $\mu$ M ADP using flow cytometry. (A) Representative flow cytometry dot plots. Square indicates CD42b<sup>+</sup> platelets. (B) Mean fluorescence intensity (MFI) of bound PAC-1, obtained from square gate in A. Error bars depict means  $\pm$  SEM for four independent experiments (duplicate). (C) Representative flow cytometry analysis of PAC-1-bound platelets generated from integration-free SeV-iPSCs subjected to biphasic activation and, thereafter, decline of *c-MYC* expression as protocol b shown in Fig. 6 C. Square indicates CD42b<sup>+</sup> platelets. (D) Spreading of iPSC platelets on fibrinogen. Human CD41a (red) and phalloidin (green) were used to identify F-actin fibers. Arrowheads indicate lamellipodia. Arrows indicate actin stress fibers. Bars, 5  $\mu$ m. (E) Transmission electron micrographs of hiPSC (TkDA3-4) platelets on day 26. Bar, 3  $\mu$ m.

integrin activation in human platelets (from peripheral blood [PB]), PB-based aged platelets (48-h incubation; Bergmeier et al., 2003; Nishikii et al., 2008), iPSC platelets, and ESC platelets. The aged platelets were tested because iPSC-derived platelets were heterogeneously produced from MKs at various stages in culture, so that many of the platelets produced could have become aged (Nishikii et al., 2008). Conformational changes in integrins are required for platelet aggregation and stable thrombosis in vivo (Shattil et al., 1985). Indeed, although PB-based aged platelets were nonresponders, the integrin activity of

we confirmed that day 22 was the most suitable point to turn off O/E. The results also showed that continuous *c-MYC* O/E from days 22 to 26 still increased the number of MKs (Fig. 6 E), whereas the lack of *c-MYC* O/E from days 22 to 26 increased the total numbers of proplatelets (Fig. 6 F) or CD41a<sup>+</sup>CD42b<sup>+</sup> platelets (Fig. 6 G). An increase in platelet yield per MK was also evident with the absence of *c-MYC* O/E after day 22 (Fig. 6 H), confirming the effect of *c-MYC* expression on megakaryopoiesis.

#### Human iPSC-derived platelets function normally in vitro and in vivo

To assess the effect of *c-MYC* reactivation on the functionality of platelets from TkDA3-4, we compared agonist-induced

TkDA3-4 (four-factor iPSCs) platelets was comparable to that of TkDN4-M (three-factor iPSCs) platelets, which showed a weaker response than human PB platelets (Fig. 7, A and B; and Fig. S8 A). Notably, *c-MYC* O/E-dependent iPSC-derived platelets showed little binding (Fig. 7, A and B). In contrast, platelets produced from SeV-iPSCs-MKs in the absence of *c-MYC* O/E after its activation responded well to ADP stimulation (Fig. 7 C). We therefore conclude that *c-MYC* activation and decline during MK differentiation may lead to the generation of functional platelets from iPSCs. We also examined expression of P-selectin (CD62P) on platelets in the presence of 50  $\mu$ M ADP and observed weak but positive P-selectin expression in iPSC-derived platelets (Fig. S8 B).