

201009002A

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22年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 高 木 智

平成23(2011)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22年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 高 木 智

平成23(2011)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

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検討したものである。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。我々は、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

で注目される 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への応用を目指した。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。

研究代表者らは、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示した (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、巨核球の増殖能を増強することができることを確認した。これらの事実を発展・利用して高効率な試験管内での血小板産生法の確立を目指した。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の確立を目指した。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した。さらに、

iPS 細胞からの血小板産生系を検討した。実験用小動物への輸注実験などを行い生成血小板の機能や輸注の有効性を確認することを目的とした。

B. 研究方法

細胞内アダプター蛋白質 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で、効率の良いドミナントネガティブ変異体として機能すること、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 変異体を作製した。これを DNA プラスミドやウィ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検討した。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および免疫不全マウスへの移植系における効果を調べた。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した。生成された血小板について接

着や凝集等の機能を検討した。

(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。研究期間内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、付帯する個人情報無く、特に配慮や匿名化を必要とするような事項は無かった。

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

前年度までに、マウスの知見に基づきヒト Lnk/SH2B3 に変異を導入しドミナントネガティブ変異体の作成及びその効果確認を検討したが、ヒト細胞の内因性 Lnk/SH2B3 を凌駕する十分量の発現により機能阻害を達成する変異体を得ることはできなかった。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。これらをヒト 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 CD34 陽性ヒト臍帯血造血幹細胞に遺伝子導入した。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て回収し、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。また、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、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で測定することにより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 欠損マウスを用いた場合、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場合、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が、臍帯血の供給源の違いによると思われるばらつきが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のため効果が十分でない可能性を考え、レンチウイルスベクター系を用い長期間のノックダウンによる Lnk/SH2B3 mRNA の発現抑制の効果を検討した。6 種類のそれぞれ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、さらに 4 日培養後に mRNA レベルの変化を解析した。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、非致死量の放射線照射を施した NOD·Scid マウスへ移入した。ドナー前駆

細胞の感染効率及びレシピエントへの生着効率ともに、どちらのコンストラクトについてもコントロールと比較して有意差がみられず、現在までのところヒト臍帯血幹細胞を用いた実験系で、Lnk/SH2B3 発現抑制の効果は確認できていない。

Lnk/SH2B3 機能の阻害により、iPS 細胞から造血幹細胞・血液前駆細胞への分化効率を向上させることが可能かどうか、効果が確認できているマウスのドミナントネガティブ Lnk 変異体を用いて検討した。マウス iPS 細胞へ Lnk 変異体遺伝子を導入した細胞株を樹立した。この培養から胚様体を形成させ、Flk1 の発現を指標にし血球系へ分化した細胞の割合を解析した。Lnk 変異体発現細胞株は、コントロールと比較して Flk1 陽性細胞数が増加し、血球系細胞への分化誘導効率が高くなることがわかった。胚様体形成後の細胞を分離して OP9 ストローマと共培養し、コロニーアッセイ法により血液細胞への分化効率を評価した。より未分化な血液前駆細胞由来の多様な細胞系列を含むコロニー (CFU-Mix) が有意に上昇しており、Lnk/SH2B3 機能の阻害により iPS 細胞から造血幹細胞・血液前駆細胞への分化誘導がより効率良くおこることが確認された。一過性発現系の確立、効果検討を目指してアデノウイルスベクターを用いた発現系を準備した。

2. 多能性幹細胞をソースとする血液細胞誘導法の確立：ヒト iPS 細胞をソースとする血小板産生法の確立

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、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、血小板の誘導に成功した。Heterogeneity の特徴を有するヒト iPS 細胞をソースとする血小板産生における効率の良い細胞株の選択について貴重な知見を得た。(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*) での血小板機能評価に加えて、生体内 (*in vivo*) 機能評価法を開発した。昨年度までに高速共焦点レーザー顕微鏡を用いて、長時間・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。本年度は、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)の観察と評価に成功した。(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。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。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。

ES細胞、iPS細胞からの血小板産生系については、新しいプロトコルの確立により、マウス及びヒト細胞ともに確実に再現よく血小板を産生させることができるようになった。これは大きな進捗である。今後さらに効率化を目指して研究を継続し推進する必要がある。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非常に重要である。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は、期間内に十分な検討を加えるまでには至らなかった。巨核球系細

胞の増幅、血小板産生の増幅への効果、一過性発現系による検討については今後の課題である。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、ウイ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必要が残る。

得られた血小板の機能については、本研究で確立した生体内での機能評価系を用いて検討が可能となった。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は、生体内での血小板機能の評価を可能にするものとして大いに期待できる。この方法を用いることで、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やすく、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。巨核球系細胞の増殖や分化にはLnk/SH2B3の阻害が有効であり、成熟血小板では阻害効果が残存しない一過性の阻害方法の確立がますます重要な検討課題となる。一方、Lnk/SH2B3機能が障害された血小板については、血栓形成を起こしにくい性質を生かし増殖因子やサイトカインなどの担体として、様々な組織への有用なデリバリー法として利用することも将来の可能性として考えられる。

E. 健康危険情報

該当無し

F. 研究発表

1. 論文発表

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.

Matsumoto T, Ii M, Nishimura H, Shoji T, Mifune Y, Kawamoto A, Kuroda R, Fukui T, Kawakami Y, Kuroda T, Kwon SM, Iwasaki

H, Horii M, Yokoyama A, Oyamada A, Lee SY, Hayashi S, Kurosaka M, Takaki S, Asahara T. Lnk-dependent axis of SCF-cKit signal for osteogenesis in bone fracture healing. *The Journal of Experimental Medicine*. 2010; 207: 2207-23.

2. 学会発表

Iwasaki Y, Koyama J, Katayama H, Hamamichi R, Iseki M, Yamamoto K, Takatsu K, Takaki S. Lnk/SH2B3, a gene associated with risk of several autoimmune diseases regulates proliferation and retinoic acid production of dendritic cells. The 14th International Congress of Immunology. Kobe, Japan. Aug 2010.

Katayama H, Iwasaki Y, Fujimoto M, Hamamichi R, Iseki M, Yoshida N, Takatsu K, Takaki S. The maintenance of gut-associated lymphoid tissues regulated by Lnk/Sh2B3 adaptor, a shared risk factor gene associated with type 1 diabetes and celiac disease. The 14th International Congress of Immunology. Kobe, Japan. Aug 2010.

Iseki M, Omori-Miyake M, Shih WX, Sun X, Takaki S, Rawings DJ, Ziegler SF. Thymic stromal lymphopoietin (TSLP)-induced polyclonal B cell activation and

autoimmunity are mediated by CD4+ T cells and IL-4. The 14th International Congress of Immunology. Kobe, Japan. Aug 2010.

Suzuki N, Yamazaki S, Yamaguchi T, Takaki S, Nakauchi H. Generation of engraftable hematopoietic stem cells from teratomas formed by an injection of induced pluripotent stem cells. International Society for Stem Cell Research. San Francisco, USA, June 16-19, 2010.

鈴木奈穂、山崎聡、山口智之、高木智、中内啓光. The differentiation of engraftable hematopoietic stem cells from iPSCs. 第8回幹細胞シンポジウム. 兵庫. 2010年5月.

田代克久、大森美幸、川端健二、形山和史、櫻井文教、高木智、水口裕之. 細胞内アダプター蛋白質 Lnk 阻害によるマウス iPS 細胞から造血幹細胞、血液前駆細胞への分化誘導 Induction of hematopoietic stem/progenitor cells from mouse induced pluripotent stem cells by inhibition of adaptor protein, Lnk. 第10回日本再生医療学会総会. 東京. 2011年3月.

大森美幸、田代克久、形山和史、櫻井文教、高木智、川端健二、水口裕之. アデノウイ

ルスベクターによる遺伝子導入法を用いたマウス iPS 細胞から造血幹細胞・血液前駆細胞への分化誘導 Efficient differentiation of hematopoietic stem/progenitor cells from mouse induced pluripotent stem cells by adenoviral transduction. 第33回日本分子生物学会年会. 神戸. 2010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。私たちは前年度に報告したヒト人工多能性幹 (iPS) 細胞から血小板を誘導するシステムの最適化を行い、どのような iPS 細胞株が血小板産生に適しているかを決定するための指標を見いだした。

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

前々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ることで、iPS-Sacの誘導および造血前駆細胞の濃縮が再現できる事を確認した。用いた10株以上のヒトiPS細胞は均一でなく、各細胞株毎に特徴を持っている。これらの細胞株すべてを用いて、造血前駆細胞および最終産物である血小板の産生効率をFACSおよびビーズを使用して定量化した。またiPS細胞から誘導した血小板の機能を、前年の実績として報告した新規のマウス血栓モデルを用いて遂行した。

C. 研究結果

1. Heterogeneityの特徴を有するヒトiPS細胞をソースとする血小板産生における効率の良い細胞株の選択法

iPS細胞は、容易に山中初期化因子を導入する事で作製可能である。一方、作製されるiPS細胞は、その初期化段階でのエピゲノム調節機構が様々であることが予想され、heterogeneityを有する事が明らかになって来ている。われわれも作製したヒトiPS細胞が造血前駆細胞や最終産物である血小板の産生効率に大きく差が生じている事を確認した。そこで、どのようなiPS細胞株が血小板産生において最適であるかの検証

を行った。iPS 細胞株の中でも山中初期化 4 因子 (OCT3/4, KLF4, SOX2, c-MYC) のうち c-MYC を除いた 3 因子で作製した iPS 細胞よりも 4 因子を用いて作製した iPS 細胞で有為に血小板産生効率が高い事を見いだした。この現象は、一旦初期化した後に遺伝子発現抑制される導入初期化遺伝子群が細胞分化段階でランダムに再活性化することによることが明らかになった。次に、4 因子初期化遺伝子を用いて作製した iPS 細胞クローン間での血小板産生効率を比較することで、c-MYC の再活性化レベルにも差異があり、その c-MYC の発現パターンを詳細に検討した。その結果、血小板前駆細胞である巨核球の分化・成熟過程での最適の c-MYC の発現活性パターンを決定することに成功した。従来からマウスモデルである c-Myc-Tg マウス (強制発現モデル) および c-Myc-KO (欠損モデル) での共通した表現系が報告され、c-Myc 自体の巨核球での機能においては論争段階であった。今回の最適な iPS 細胞株を選別するための研究により、巨核球成熟、その後の血小板産生における c-MYC 遺伝子の発現調節機構を明らかにすることができた。

2. 生体内での iPS 細胞由来血小板の機能評価

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。本年度は、上記手法を取り入れた免疫不全 NOG マウスを用いた血小板減少解析モデルを開発し、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) の観察と評価に成功した。現在までの研究は、まだまだ小規模での血小板産生系であるが、今後、大量に安定的に供給可能となるシステムの開発が求められており、今後も研究を継続していく。

D. 研究発表

1. 論文発表

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 regulates integrin alphaIIb beta3 outside-in signaling in mouse platelets, leading to stabilization of thrombus development in vivo. *J Clin Invest.* 120:179-90 (2010). (Epub 2009 Dec 21.)

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. 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.* 285:24494-507 (2010). (Epub 2010 Jun 4.)

Hayashi Y, Chan T, Warashina M, Fukuda M, Ariizumi T, Okabayashi K, Takayama N, Otsu M, Eto K, Furue MK, Michiue T, Ohnuma K, Nakauchi H, Asashima M. Reduction of N-Glycolylneuraminic Acid in Human Induced Pluripotent Stem Cells Generated or Cultured under Feeder- and Serum-Free Defined Conditions. *PLoS One.* 5:e14099 (2010).

Takayama N, Nishimura S, 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. *J Exp Med.* 207:2817-30 (2010). (Epub 2010 Nov 22.)

2. 学会発表

Nishimura T, Kaneko S, Gotoh H, Takayama N, Shimizu T, Iriguchi S, Tajima Y, Yasui Y, Watanabe N, Takahashi S, Eto K, Nakauchi H. 「Generation of Monoclonal TCR-Expressing Human T-Lineage Lymphocytes From Induced Pluripotent Stem Cells of Signal Peripheral T-Lymphocyte Origin.」 52st American Society of Hematology Annual Meeting. (Dec 4-7, 2010). Orlando, U.S.A. 口頭発表 (Award)

Takayama N, Sano S, Shimizu T, Kawahata R, Endo H, Nakamura S, Ogawa S, Nakauchi H, Eto K. 「Epigenetic Memory Enables the Dominant Generation of Adult-Type Erythrocytes From Human Induced Pluripotent Stem Cells.」 52st American Society of Hematology Annual Meeting. (Dec 4-7, 2010). Orlando, U.S.A. 口頭発表 (Award)

Satoshi Nishimura, Mika Nagasaki, Ichiro Manabe, Koji Eto, Takashi Kadowaki, Ryozi Nagai. 「In vivo imaging reveals multi-cellular kinetics in pathological conditions including metabolic syndrome and thrombus formation.」 第71回日本血液学会学術総会 2010年10月23-25日(京都) シンポジウム発表(英語)

高山直也、中村壮、大西棕子、澤口朗、高橋和利、山中伸弥、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 回日本血液学会学術総会 2010 年 10 月 23-25 日（京都）一般演題口演

Satoshi Nishimura, Mika Nagasaki, Ichiro Manabe, Hiroshi Yamashita, Koji Eto（江藤浩之）, Ryozo Nagai. 「In vivo Imaging Reveals Multi-Cellular Kinetics in Inflammatory Diseases: Adipose Tissue Obesity and Thrombosis.」第 74 回日本循環器学会総会・学術集会 2010 年 3 月 5-7 日（京都）

Satoshi Nishimura, Mika Nagasaki, Ichiro Manabe, Hiroshi Yamashita, Koji Eto, Ryozo Nagai. 「Multi-cellular Kinetics in Thrombosis Visualized by in Vivo Molecular Imaging.」第 74 回日本循環器学会総会・学術集会 平成 22 年 3 月 5-7 日（京都）

大西椋子、高山直也、大津真、安東赫、中村壮、遠藤大、西眞範、浜崎雄平、石井榮一、有賀正、國島伸治、中内啓光、江藤浩之. 「東京大学 iPS 細胞等研究拠点における疾患特異的 iPS 細胞の樹立」第 9 回日本再生医療学会総会 2010 年 3 月 18-19 日（広島）一般演題口演

高山直也、中村壮、遠藤大、大西椋子、工藤都湖、安東赫、大津真、江藤浩之、中内啓光. 「血液細胞由来 iPS 細胞の機能的‘記憶’」第 9 回日本再生医療学会総会 2010 年 3 月 18-19 日（広島）一般演題口演

大西椋子、高山直也、大津真、西村智、西範、浜崎雄平、石井榮一、小田淳、國島伸治、中内啓光、江藤浩之. 「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」第 33 回日本血栓止血学会学術集会 2010 年 4 月 22-24 日（鹿児島）一般演題口演

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. 「Lnk/Sh2b3 による血小板シグナルおよび線溶系制御を介した止血血栓制御機構」第 33 回日本血栓止血学会学術集会 2010 年 4 月 22-24 日（鹿児島）一般演題口演

Satoshi Nishimura, Mika Nagasaki, Ichiro Manabe, Koji Eto, Ryozo Nagai. 「In vivo imaging reveals multi-cellular kinetics in thrombus formation.」第 72 回日本血液学会学術集会 2010 年 9 月 24-26 日（横浜）一般演題口演

Kousaku Matsubara, Shinji Kunishima, Toshiro Takafuta, Yoshiko Uchida, Takashi Fukakya, Daichi Inoue, Hiroakazu Kashiwagi, Yoshiaki Tomiyama, Makoto Otsu, Koji Eto, Masafumi Onodera. 「R995W mutation in integrin α IIb-gene(ITGA2B) is a novel cause for congenital macrothrombocytopenia.」第 72 回日本血液学会学術集会、2010 年 9 月 24-26 日（横浜）一般演題口演

E. 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