

201009002B

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～22年度 総合研究報告書

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20年度～22年度 総合研究報告書

研究代表者 高 木 智

平成23（2011）年 5月

目 次

I. 総合研究報告	
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. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 25
III. 研究成果の刊行物・別刷	----- 31

I. 総合研究報告書

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）

平成20年度～22年度 総合研究報告書

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

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。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 Lnk/SH2B3 依存性制御系を発見した。その阻害や発現を制御することにより、造血前駆細胞から巨核球への高効率な分化、増殖誘導の達成を目指した。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を試みた。また、新しい供給源としての可能性が期待される各種幹細

胞からの血小板分化誘導技術の開発を検討した。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。このシステムを基にして、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。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。

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。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り、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。

我々は、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。一方、新しい供給源としての可能性が期待される各種幹細胞からの血小板分化誘導技術の開発を検討した。マウス及びヒト ES 細胞から試験管内で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。さらに、iPS 細胞からの血小板産生系を検討した。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て、実験用小動物を用いた新しい *in vivo* 評価系の確立、輸注実験などによる生理機能評価系の検討を行った。

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。

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。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。また、様々なストロマ細胞との共培養法による分化誘導を試みた。また iPS 細胞から血小板の誘導が可能かどうか、生成される血小板の機能について検討した。

培養系で産生される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。その分子機構の解析から、止血活性を維持した血小板の獲得法を探索した。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した。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、血小板の生体内（*in vivo*）機能評価系の構築を試みた。

（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

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、内因性蛋白を超える発現が期待できないこれらのヒト Lnk/SH2B3 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/γc 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/SH2B 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により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/γc 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。しかし、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変異体(DN·mLnk)を用いて検討した。マウス iPS 細胞へ DN·mLnk 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。DN·mLnk 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. 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。以上の結果より、Lnk/SH2B3 は 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することを明らかにした。

3. 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

ヒト ES 細胞 khES-1, khES-2, khES-3 (京都大学再生医科学研究所にて樹立) を未分化維持培養から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。米国 Wisconsin 大学が樹立した H1 細胞株では報告があるが、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、様々なストロマ細胞との共培養法による分化誘導を試みた。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 と命名した嚢状構造体が培養開始後培養皿上に観察された。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た。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 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。

確立したヒト 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 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できること、血小板の誘導が可能であることを確認した。10 株以上のヒト iPS 細胞で検討した結果、誘導効率は均一でなく、各細胞株毎に特徴を持つことが明らかとなった。

4. 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、山中初期化因子を導入する事で作製可能である。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。我々も作製したヒト 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おいて大きく株間での違いがあることを確認した。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。

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って明らかになった。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 細胞株選別のための研究により、巨核球成熟、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。

5. 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) が固層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、固層化された 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。我々は ES 細胞をソースとして産生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ない血小板を 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。

6. 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

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。従来から用いられて来た生体外（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。そ

こで、高速共焦点レーザー顕微鏡を用いた長時間・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、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。

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。血小板増多症を示す Lnk/SH2B3 欠損マウス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/SH2B3 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。

さらに、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、今後も研究の継続が必要である。

D. 考察

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。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

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.

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.

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. *Circ Res* 104: 969-977, 2009.

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: 1250-1256, 2009.

- Matsumoto K, Isagawa T, Nishimura T, Ogaeri T, Eto K, Miyazaki S, Miyazaki JI, Aburatani H, Nakauchi H, Ema H. Stepwise development of hematopoietic stem cells from embryonic stem cells. *PLoS ONE* 4: 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: 1120-1129, 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: 1764-1767, 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: 914-920, 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: 31463-31472, 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. 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.
- 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. *J Exp Med* 207: 2207-2223, 2010.
- 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: 24494-24507, 2010.
- 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: 2817-2830, 2010.
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, Ikutani 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.
- 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.

高山直也、中村壮、大西棕子、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

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 $\beta 3$ 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)

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.

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.

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)

Nishimura S, Nagasaki M, Manabe I, Eto K, Kadowaki T, Nagai R. 「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、江藤造之、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

Nishimura S, Nagasaki M, Manabe I, Yamashita H, Eto K, Nagai R. 「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)

Nishimura S, Nagasaki M, Manabe I,

Yamashita H, Eto K, Nagai R. 「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. 「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

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

Matsubara K, Kunishima S, Takafuta T, Uchida Y, Fukakya T, Inoue D, Kashiwagi H, Tomiyama Y, Otsu M, Eto K, Onodera M. 「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

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.