

血小板と再生医学

遠藤 大 江藤 浩之

要 旨：ヒト多能性幹細胞の樹立は再生医療の可能性を広げた。多能性幹細胞を用いた細胞療法では腫瘍化のリスクが危惧されているが，血小板は無核であり，さらに放射線照射可能であることから混在している他の有核細胞による腫瘍化のリスクが回避でき，早期の臨床応用が期待されている。われわれはヒト多能性幹細胞から血小板を産生する方法を確立した。その解析の中で c-MYC が巨核球・血小板産生に重要な役割を果たしていることを見出した。ヒト多能性幹細胞は臨床・基礎研究の双方にとって重要なツールと成り得る。 (J Jpn Coll Angiol, 2011, 51: 339-345)

Key words: platelet, embryonic stem cell, induced pluripotent stem cells, regenerative medicine, c-MYC

はじめに

再生医療の実現を促進する道具として，多能性幹細胞が脚光を浴びている。ヒト胚性幹細胞(ES 細胞)¹⁾，および近年報告されたヒト人工多能性幹細胞(iPS 細胞)の樹立²⁾はまさに，再生医療・細胞療法の実現可能性を高めている。ES/iPS 細胞は適切な培養条件により未分化状態を維持でき，半永久的に増殖可能である。さらに特定の条件で培養することで，人体を構成するほぼすべての細胞に分化できる。そのため，細胞機能の欠失に伴う病態(脊髄損傷・心筋梗塞・肝不全など)に対する細胞療法を遂行するためのソース(源)として期待されている。

再生医療

現状では，心筋梗塞や拡張型心筋症などによる心不全，劇症肝炎・自己免疫機序による肝不全，糖尿病性腎症や糸球体腎炎による腎不全といった臓器機能不全を根治させる治療は，脳死患者または成体ドナーからの臓器移植のみである。しかし本邦では臓器移植ドナーの不足が大きな問題となり広く普及するに至っていない。また，他人からの移植では免疫による拒絶を抑制するための免疫抑制療法が必須であり日和見感染症の合併は避けられない。血液腫瘍疾患・造血不全症・先天性代謝異常症などに対して行われている造血幹細胞移植(同種

骨髄移植や臍帯血移植)や赤血球・血小板輸血も移植治療(細胞療法)の範囲に含まれるが臓器移植同様にヒト白血球抗原(HLA)一致の問題や骨髄ドナー・十分量の臍帯血の不足，献血ドナーの減少といった問題を抱えている。

再生医療の目指す一つの方向性は，臓器移植でしか達成できない機能再生を，ドナー非依存的かつ免疫抑制なしで可能とすることにある。ヒト ES 細胞は細胞ソースとして有力視される一方で，作製過程で受精卵の破壊を伴うために倫理的な問題点を有しており，原理的に免疫学的な拒絶のリスク・免疫抑制療法の必要性が避けられない。iPS 細胞の魅力的な点は，患者自身の体細胞から作製することでこうした諸問題を解決できるところにある。

一方，ES 細胞等からの各終末細胞への分化が可能になったとしても臓器の三次元的構造をどのように再構成するかという問題点は解決されずに残っており，今後の研究が待たれる。体外での臓器構築に関しては様々な技術的ブレイクスルーを要すると思われるが，最近 blastocyst complementation の概念とその応用技術を用いた異種間での臓器作製に成功する報告がなされ，臓器を構築する一つの可能性として注目されている³⁾。

解決すべき別の問題点として腫瘍化のリスクが挙げられる。多能性幹細胞は 3 胚葉への多分化能を持ち，奇

形腫を形成する能力を有している。また、現段階での iPS 細胞樹立方法の多くはウイルスベクターに依存しており、ゲノム修飾による癌化の危険性が常に存在する。最近、遺伝子治療に伴って、導入細胞のクローナルな増殖を認めた例が2件報告された^{4,5)}。したがって未分化な状態の多能性幹細胞の除去および癌化のリスク回避のためにウイルスベクターを用いない iPS 細胞樹立の方法が模索されている。最近も本邦の研究者らによって報告された論文^{6,7)}では、iPS 細胞の安全性に関する内容が議論されている。マウス iPS 細胞を分化させて得た神経細胞を脊髄損傷モデルマウスの損傷部位に移植させたところ、全く腫瘍化せずに機能回復を起こす場合と、一定期間後に腫瘍が発生して機能低下を起こす場合があり、これらは使用する iPS 細胞株毎の特性に依存していることが明らかにされた⁶⁾。また、c-MYC を用いて樹立したマウス iPS 細胞と、c-MYC を用いないか代わりに L-MYC や c-MYC 変異体を用いて樹立したマウス iPS 細胞を用いてキメラマウスを作製した場合、後者(L-MYC 等)には腫瘍形成が起こらないのに対し、前者では腫瘍が発症して生存率が低いことがわかった⁷⁾。これらの結果は iPS 細胞の実際の臨床応用に際しては、安全性評価がより重要であることを示唆している。

その点輸血に用いられている赤血球や血小板は三次元的構造が不要、さらに無核であるため、投与前に放射線照射を行うことで有核細胞の混入による腫瘍化のリスクを除去できると考えられる。以上の理由から、多能性幹細胞からの細胞療法としてより早期に臨床応用可能であると期待される。

血小板再生の必要性和その戦略

血小板輸血は、心臓外科分野や外傷、様々な血液疾患といった血小板が重度に減少する病態に対する有力かつ必須の治療手段である。血液腫瘍疾患や造血不全に対する造血幹細胞移植においても化学療法、放射線照射等の前処置の必要性などから長期の血小板減少期間が必至であるため、血小板輸血による一時的なサポートが必須である。

血小板輸血のソースは献血ドナーに依存している。近年、本邦でも献血者の減少が問題視され、とくに若年層の減少が著しいことが報告された。少子化が進む現在、また高齢化が進み血液疾患を含めた血小板輸血依存性疾患が増加することも予想される状況では、献血ドナー

に寄らない血小板ソースの開発は可及的速やかに達成される必要がある。また、臨床上的の問題として抗 HLA 抗体の出現が挙げられる。血小板はその表面に HLA 分子を発現しており、HLA 型不一致血小板を頻回に輸血された場合、免疫系が輸血された血小板を異物と認識して抗体を産生する場合が生じることで HLA 型不一致の血小板は免疫系によって速やかに排除され、止血に寄与できない。現状では HLA 型一致のドナーに献血を依頼することで対応しているが、ドナー不足の現状では不十分と言わざるをえない。

これら二点の大きな問題を解決する可能性として、iPS 細胞からの血小板産生系が挙げられる。**Fig. 1** に戦略を図示した。具体的には、自己の細胞由来の iPS 細胞から誘導した血小板を用いて血小板ソースとする、または自己由来だけでなく事前に様々な HLA 型を持つ iPS 細胞を作製しておき、細胞バンクとして管理・保存しておけば、必要な樹立期間(2~3 週間)を省略することも可能であり、より迅速に細胞・輸血療法を行うことができる。

培養系における血小板分化と機能維持

当研究室ではヒト ES 細胞から効率よく血小板を産生可能とするために、各種のストローマ細胞との共培養による血液分化系を検討して、血液細胞への分化を効率的に再現できる培養方法の確立を目指した。その結果、血管内皮細胞様組織と共存する造血前駆細胞集団を濃縮できる嚢状構造体(ES-Sac と命名)の誘導に成功し、内部の造血前駆細胞集団を回収後さらにストローマ細胞と共培養することで比較的高い効率で成熟巨核球、さらには血小板産生が可能な系を確立した⁸⁾(**Fig. 2**)。とくに、骨髓間葉系細胞株である C3H10T1/2 をストローマ細胞として用いた場合に、ES-Sac および血小板産生の両方において効果的であった。ヒト ES 細胞からは、培養開始約2週間後に ES-sac が出現する。免疫組織化学的検討では Sac の外壁は血管内皮細胞マーカー陽性であり、内部に多数存在する球状細胞は血球細胞マーカー陽性であった。これらの内部細胞を回収後に血球分化系であるセミソリッド培地でのコロニーアッセイ法で検討することで、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(**Fig. 3**)。ES-Sac 内部の造血前駆細胞は、培養条件の変化に伴い、血小板だけでなく赤血球および様々な白血球細胞へも分化できることが明らかになった。さらに造血前駆細胞を効率良く産生できる

Regenerative therapy for Thrombocytopenic disorders

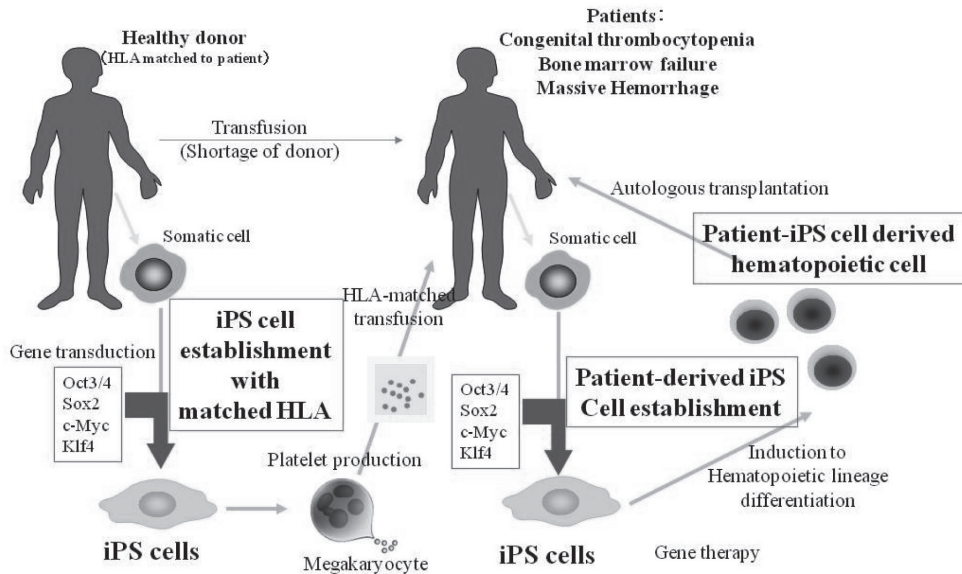


Figure 1 Strategy for platelet regenerative medicine using induced pluripotent stem cells.

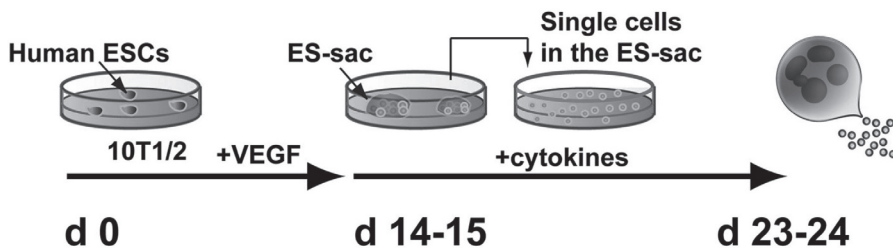


Figure 2 Protocol to induce megakaryocytes and platelets from human embryonic stem cells.

因子を検討したところ、血管内皮増殖因子(VEGF)を加えることでより効率よく造血前駆細胞を誘導できることを見出している。ES-Sac の内部にある造血前駆細胞を回収後ストローマ細胞上に播種し直してトロンボポエチンやほかの造血サイトカインを加えてさらに培養を継続した結果、さらに1週間程度で成熟巨核球および培養液中への血小板放出を観察し、誘導した血小板を *in vitro* で機能解析すると通常の血小板と同様の結果を示した。また電子顕微鏡で細胞の内部構造を確認し、顆粒の存在

など血小板に特徴的な構造を認めた。この結果をヒト iPS 細胞にも応用し、同様に血球誘導、および巨核球・血小板誘導ができることを示した⁹⁾。

血小板における別の問題として、その保存方法の特殊性が挙げられる。献血ドナーから得られる血小板製剤は、細菌の繁殖リスクと冷蔵による生体内での機能喪失のため、室温での振盪によって数日間しか保存できない。培養系では血小板の機能を維持したままで産生を続けるという点が重要な課題となる。37°C に設定された培

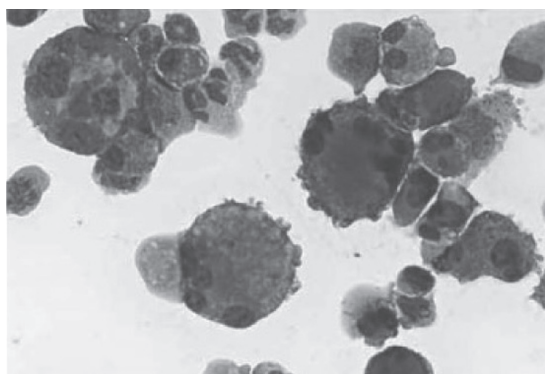


Figure 3 Multi-lineage differentiation from hematopoietic cells in ES or iPS-Sac.

養機器内部での3週間以上の培養から産生される血小板では、容易に止血初期に必須な血小板受容体が切断修飾を受けてしまうことを当研究室から報告した¹⁰⁾。生体内部の血流下での止血には、血小板糖タンパク(Glycoprotein; GP)のうち、フォンブランド因子(vWF)受容体, GPIb-V-IX 複合体およびコラーゲン受容体 GPVI が重要な働きをする。これらの分子群は、温度依存性に血小板あるいはストローマ細胞から放出されるメタロプロテアーゼにより切断される。そこで、メタロプロテアーゼの活性阻害剤を培養皿に添加することで、機能を担保した血小板が培養皿において産生できるプロトコルを確立した¹⁰⁾。本プロトコルはiPS細胞から産生させる血小板においても効果的であることを確認している。

実際に作製したiPS細胞由来血小板はin vitro のデータでは通常の血小板とほぼ変わらない機能を示しているが、より確実な担保としてin vivo で確認することが理想的である。当研究室では東京大学医学部循環器内科西村 智先生との共同研究により、レーザー照射で血栓形成を誘発した際に、血管内で一つ一つの血小板が血栓形成に寄与する様子を生体内でリアルタイムに観察することに成功した⁹⁾(Fig. 4)。

血小板産生の分子メカニズム

iPS細胞を用いた研究は、臨床応用のみならず基礎医学への貢献も大きい。われわれの確立したiPS細胞を用いた血小板分化誘導系の解析を通して、血小板産生に関係する分子メカニズムの一端を明らかにすることに成功した⁹⁾。樹立した複数のヒトiPS細胞とヒトES細胞を

比較すると、血小板産生の能力に株間で著しく差があることがわかった。とくに4因子(c-MYCあり)と3因子(c-MYCなしでのiPS細胞樹立)の株を比較した場合、4因子株のほうが高い血小板産生能を有する傾向にあることがわかった。この結果を基に、導入したc-MYCの発現動態を時系列で追うと、樹立に使用したレトロウイルスベクターで導入したc-MYCが分化途中で再度活性化していたことがわかった。さらに発現の程度が大きいほど巨核球の数が增加することがわかった。さらに、その後の血小板産生においてはc-MYCの再活性化が持続すると血小板産生数が低くなり、c-MYCの発現および活性化が巨核球の成熟過程で減少する株では血小板産生数が高くなることがわかった。また巨核球の成熟指標である多核化の程度もc-MYCの発現量が高いままであると多核化が阻害され、下がる株ではより多核化が促進されることがわかった。株間の比較によって得られた上記の知見は、その後外来遺伝子の分化後の再活性化がないiPS細胞(センダイウイルスベクターによって樹立したiPS細胞を使用)を用いてc-MYCの発現を時間空間的に制御することで再現した。その概略をFig. 5に示す。

この背景にある分子機構としてc-MYCを持続的に高発現させた血球ではINK4A/ARF遺伝子の発現が誘導され、同時に巨核球成熟に必要とされるGATA1, β -tubulin, NF-E2の発現が低下していることが確認された。以上の知見と今までの報告から、c-MYCの持続的な発現はINK4A/ARF経路を介した細胞老化を起こし、それによって血小板産生を障害していることが考えられた。以上からヒト造血における血小板産生にはc-MYCの各段階における適切なレベルでの発現が要求されると考えられ、その緻密な制御が生体内で行われていることが推測された。

われわれの実験結果は、ヒト造血メカニズムの解明にiPS細胞からの分化系が極めて有効であったことを示している。マウスでのin vivoの実験は比較的容易であるが、ヒトでは困難であり、ヒト骨髓中の現象を観察することも、また介入することも倫理的に極めて不可能に近い。しかし、多能性幹細胞であれば、in vitroではあるものの細胞・分子動態の観察・介入が侵襲的に複数試行できる。また、上記の知見は再生医療に用いるiPS細胞として、樹立した複数の株の中からどのようなものを選ぶようにして選択するべきか、という問題にも実の良い模範解答を提示している。

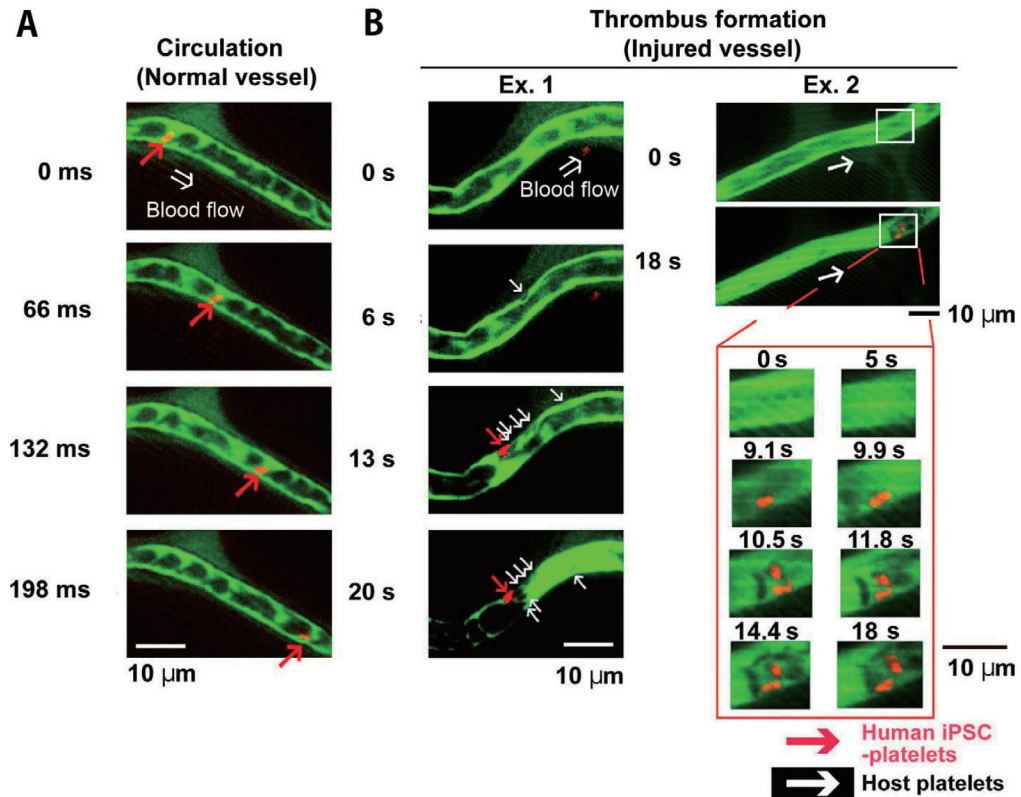


Figure 4 In vivo imaging of human iPSC-derived platelet circulation (A) and contribution to thrombus formation (B).

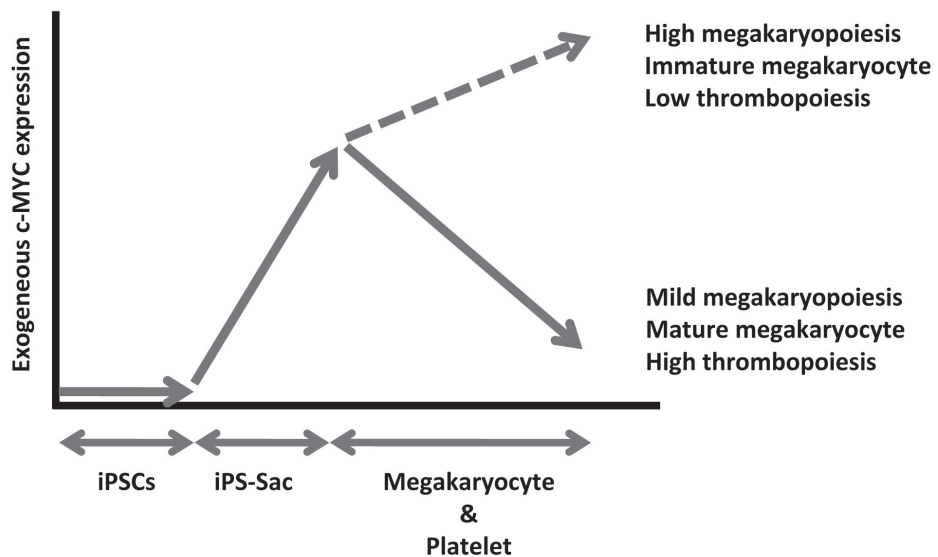


Figure 5 Summary of c-MYC reactivation effect on megakaryopoiesis and thrombopoiesis.

血小板現象性疾患由来 iPS 細胞の樹立と 遺伝子治療

抗癌剤治療や人工心肺を用いた手術による血小板減少症に対する輸血治療以外の血小板再生の対象疾患として、遺伝子変異による血小板減少症や血小板機能異常症がある。機能異常の例としては Bernard-Soulier 症候群 (GP Ib-IX-V 複合体 (vWF 受容体) 欠損) や血小板無力症 (GPIIb/IIIa 複合体欠損または発現低下) が、減少症の例としては先天性無巨核球性血小板減少症 (Congenital AMegakaryocytic Thrombocytopenia; CAMT, TPO 受容体である c-MPL の変異による発現欠損) などが挙げられる。われわれは骨髓移植により生存可能となった CAMT 患者のご好意から患者皮膚 (c-MPL ホモ欠損) 由来の iPS 細胞を樹立することに成功した。この iPS 細胞から血球前駆細胞を誘導し、血小板を産生する誘導をかけたところ産生が観察されず、病態が *in vitro* でも再現できたと考えられる。現在も解析を進めているが、こうした疾患 iPS 細胞は原因が特定できていない疾患の iPS 細胞の作製・解析によって、未知の原因の同定へと繋がる可能性を強く示唆している。

遺伝子異常が判明している疾患に関しては、iPS 細胞の段階で遺伝子治療を行い、それを体内に戻すという戦略も想定している。通常の同種造血幹細胞移植や、自己造血幹細胞への遺伝子治療が現在の治療法であるものの、GVHD のリスクや白血病化のリスクが避けられないのが現状の問題点である。とくに、遺伝子治療を行った症例で白血病発症の例が先日報告され、ウイルスベクターの挿入部位近傍の遺伝子の発現変化が原因と考えられている。また、サラセミアへの β グロビン導入の遺伝子治療例でも特定の遺伝子近傍への挿入によって遺伝子発現に影響を与えたという報告もなされた^{4,5)}。iPS 細胞の有利な点は、培養系で維持でき、かつ半永久的に増殖できるために移植前に十分な細胞数を確保できるうえ、ゲノム検査が事前に十分行える点にある。したがって遺伝子導入を行った細胞をクローン化し、検査を経て安全と決定できるクローンのみを選別することでリスクを最小化できる。

現時点での問題点としては、造血幹細胞活性を持つ細胞へと *in vitro* で分化誘導する系が確立されていないことが挙げられる。また、分化させた造血幹細胞へは放射線照射を行うことができないため、残存する未分化細胞

による奇形腫形成のリスクを避ける別の方法が必要となる。

おわりに

以上、血小板を中心に再生医療へ向けた研究の現状を概観した。解決すべき問題点として、輸血製剤に匹敵するだけの十分な量を製造する技術が未確立であるということが挙げられる。二次元培養から三次元培養 (浮遊培養) へと大量培養へ向けた技術開発、およびより効率的な血小板産生のための条件検討が必須である。上述のように多能性幹細胞を用いた研究は臨床応用と基礎研究の双方を利するものであり、どちらかを取捨選択する類のものではない。基礎研究・臨床面の双方に貢献し得る、さらなる研究成果が今後も期待される。

文 献

- 1) Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, et al: Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 1998; **282**: 1145–1147
- 2) Takahashi K, Yamanaka S: Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 2006; **126**: 663–676
- 3) Kobayashi T, Yamaguchi T, Hamanaka S, et al: Generation of rat pancreas in mouse by interspecific blastocyst injection of pluripotent stem cells. *Cell* 2010; **142**: 787–799
- 4) Cavazzana-Calvo M, Payen E, Negre O, et al: Transfusion independence and HMGA2 activation after gene therapy of human β -thalassaemia. *Nature* 2010; **467**: 318–322
- 5) Stein S, Ott MG, Schultze-Strasser S, et al: Genomic instability and myelodysplasia with monosomy 7 consequent to EVI1 activation after gene therapy for chronic granulomatous disease. *Nat Med* 2010; **16**: 198–204
- 6) Tsuji O, Miura K, Okada Y, et al: Therapeutic potential of appropriately evaluated safe-induced pluripotent stem cells for spinal cord injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; **107**: 12704–12709
- 7) Nakagawa M, Takizawa N, Narita M, et al: Promotion of direct reprogramming by transformation-deficient Myc. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; **107**: 14152–14157
- 8) Takayama N, Nishikii H, Usui J, et al: Generation of functional platelets from human embryonic stem cells *in vitro* via ES-sacs, VEGF-promoted structures that concentrate hematopoietic progenitors. *Blood* 2008; **111**: 5298–5306
- 9) Takayama N, Nishimura S, Eto K, et al: Transient activation

of c-MYC expression is critical for efficient platelet generation from human induced pluripotent stem cells. *J Exp Med* 2010; **207**: 2817–2830

10) Nishikii H, Eto K, Tamura N. et al: Metalloproteinase regu-

lation improves in vitro generation of efficacious platelets from mouse embryonic stem cells. *J Exp Med* 2008; **205**: 1917–1927

Platelet and Regenerative Medicine

Hiroshi Endo and Koji Eto

Center for iPS Cell Research and Application (CiRA) Kyoto University, Kyoto, Japan

Key words: platelet, embryonic stem cell, induced pluripotent stem cells, regenerative medicine, c-MYC

The wide availability of human pluripotent stem cells makes feasible clinical applications of regenerative medicine, including cytotherapy and organ transplantation. Induced pluripotent stem cells (iPSC) do not have the limitations of embryonic stem cells, such as ethical problems and allogenic immunogenicity. In particular, blood is a promising organ because no 3-dimensional structure is necessary. Platelets and erythrocytes are anucleate cells, which can be irradiated before transfusion, eliminating the risk of tumorigenesis, unlike other somatic cells that have nuclei. We have established an in vitro culture system to efficiently generate megakaryocytes/platelets from human iPSCs. By comparing different iPSC lines on platelet production efficiency, we determined the critical effect of c-MYC expression levels and behaviors on thrombopoiesis. Overexpression of c-MYC augmented megakaryopoiesis, but its continuous expression over the maturation phase impaired the maturation of megakaryocytes and thereafter, platelet release. An appropriate c-MYC expression level increased the platelet production efficiency. Collectively, human iPSCs could be important tools for clinical and basic science research.

(*J Jpn Coll Angiol*, 2011, **51**: 339–345)