

日本医療研究開発機構 再生医療実現拠点ネットワークプログラム事業 事後評価報告書

I 基本情報

研究開発課題名: (日本語) 体外製造血小板の臨床実装に向けた巨核球の改造産生
(英語) **Generating platelets in vitro for the clinic: optimisation and added clinical efficacy**

研究開発実施期間: 令和2年9月16日～令和5年3月31日

研究開発代表者 氏名: (日本語) 江藤 浩之
(英語) Koji Eto

研究開発代表者 所属機関・部署・役職:
(日本語) 国立大学法人京都大学・iPS細胞研究所・教授
(英語) **Kyoto University・Center for iPS Cell Research and Application・Professor**

II 研究開発の概要

人工血小板産生を安定的に実行する巨核球細胞株の多能性幹細胞からの作出というアイデアに基づき、日本側（京都大学 江藤）は、c-MYC, BMI1, BCL-XL 導入による iPS 細胞由来巨核球細胞株を開発した（Cell Stem Cell, 2014）。後発の英国側（ケンブリッジ大学 Ghevaert）は、GATA-1, TAL1, FLI1 を直接未分化 iPS 細胞に導入し、巨核球細胞株を開発した（Nat Commun, 2016）。両者ともに、人工血小板製剤の社会実装を目指す共通の目的のため、巨核球細胞株の長期増殖維持できる最適な元細胞の多能性幹細胞を規定し、改善した細胞株作製方法を協力して見出すことに至った。そこで、真に血小板製造に適合する巨核球細胞株樹立のための多能性幹細胞の特性決定、既存細胞株の限定的増殖能を解決する方法開発の共通課題に、日英研究者がそれぞれの方法でアプローチし、そのデータを共有することで、解決方法を見出す戦略を進めた。

研究開発の成果

1. 巨核球細胞株 imMKCL の樹立は、レンチウイルスベクターを用いた c-MYC, BMI1, BCL-XL の3つの遺伝子の強制発現システムを用いていた。しかし、樹立効率の低さ、樹立後の増殖速度の長期維持に課題があった。特に、前駆細胞の細胞数増加時の増殖速度と成熟後の血小板産生能との間に強い相関が認められることを発見し、従来の3遺伝子強制発現法に加えて、細胞周期制御遺伝子 p21/p53 のノックダウンを追加する改良樹立法を確立した（論文公表済み）。

2. さらにレンチウイルスベクター使用遺伝子導入効率の不確実性の問題を回避するため piggyBac transposon ベクターによる遺伝子デリバリーに変更した上で、c-MYC 発現を抑制的に制御できる新規のベクターカセットの有用性を見出し、ほとんどの多能性幹細胞 (ES 細胞、iPS 細胞) クローンにおいて、imMKCL の樹立効率は 100% 近くに改善した。本改良樹立法によって、(1) 異なる細胞増殖能力 (2) 異なる血小板産生能力、を示す 10 株の巨核球細胞株を整備し、樹立に用いたオリジナルの iPS 細胞を英国側の研究者に提供し、解析を実施した。
3. 血小板産生に寄与する細胞周期ステージを規定し、巨核球細胞の増殖能と血小板産生能とが連動するメカニズムを明らかにした。
4. imMKCL にも“免疫巨核球”と呼ばれる血小板産生には寄与しない免疫分画が存在し、インターフェロン活性化関連遺伝子の発現上昇が imMKCL 全体の細胞増殖性、血小板産生能影響することを見いだした。異常なインターフェロン関連遺伝子群上昇を引き起こす上流制御遺伝子を発見し、本遺伝子を imMKCL に過剰発現させると血小板産生が抑制されたことから、この遺伝子が樹立巨核球細胞株の品質管理を実施していくための新たな指標として活用できる可能性が明らかとなった (論文投稿中)。
5. 機能増強人工血小板の開発に関しては、英国側の巨核球細胞株において機能したオリジナルのベクターカセットが、日本側の imMKCL においては機能しないことが判明した。

以上の成果は、以下の意義を提示する

(A) 細胞療法の社会実装においては、最終分化細胞の品質や製造効率に影響を及ぼす元細胞の多能性幹細胞の特性解析データが製造品質管理において必須である。人工血小板製造をモデルに、増殖能と成熟能を最大限発揮する前駆細胞のマスターセル細胞株を製造するための多能性幹細胞の基準を提示可能となった。

(B) 人工血小板の効率的製造に関し、培養環境 (物理的、化学的な刺激) に影響される巨核球細胞内のシグナル分子機構の解明に繋がり、社会実装の具体的な戦略が提案可能となった。

(C) imMKCL 特異的な強制発現技術の課題解決の方向性が明らかとなったことから、機能増強人工血小板の開発を通じて、今後は加速度的に人工血小板を用いた新規ドラッグデリバリー (DDS) システムの実装化が実現できるものと期待できる。特に血小板は、炎症局所、癌細胞への遊走、高親和性を有しており、新たな生物学的 DDS 製剤基材として有用となる。

(D) 英国側の巨核球細胞株の単一細胞 RNA 発現解析結果 (Science Advance, 2021) においても、転写因子 3 遺伝子の強制発現後に c-MYC が発現上昇することが巨核球増殖に必須であることが明らかとなり、その後の日本側の解析からも高品質血小板産生においても c-MYC が発現上昇が重要であることが明らかにされた。従って、高品質マスターセルの製造における c-MYC 制御の重要性が科学的にも明らかにされた。

1. Our original megakaryocyte cell line, imMKCL, was established by the forced expression of three genes, c-MYC, BMI1, and BCL-XL, using lentivirus vectors. On the other hand, there were problems with low rate of establishment efficiency and long-term maintenance of the growth rate. Particularly, we discovered that there is a strong correlation between the proliferation rate of megakaryocyte progenitor cells and the platelet productivity at maturation phase. An improved method was established by adding knockdown of p21 and p53 (paper was published).
2. Furthermore, in order to avoid the problem of uncertainty in gene transfer efficiency using lentivirus vectors, we introduced piggyBac transposon vector, along with vector cassette that can suppress c-MYC expression. As a result, efficiency became nearly 100% in most pluripotent stem cells (ES cells, iPS cells clones). Based on this improved method, we succeeded in preparation of 10 imMKCL clones displaying (1) different cell proliferation capabilities, and (2) different platelet production capabilities. The original iPS cells used for establishment of 10 imMKCLs were shared with UK group to perform genome and epigenome analysis.
3. We defined the cell cycle stages that contribute to platelet production. In addition, we clarified the mechanism by which megakaryocyte proliferating capacity and platelet-producing ability are correlated.
4. We found that imMKCLs also contains the immune subset called "immune megakaryocytes" that never contribute to platelet production, and that increased expression of interferon activation-related genes affects the cell proliferation and platelet productivity of imMKCLs. This new discovery should influence quality control of established megakaryocyte cell lines, because platelet production was suppressed when imMKCL overexpressed upstream regulatory gene that causes abnormal interferon-related gene cluster elevation. Such upstream gene might be good hallmark/indicator for quality control of imMKCLs.
5. Regarding the development of function-enhanced artificial platelets project, the original vector cassette that functioned in UK megakaryocyte cell lines did not express specific genes in our imMKCLs.