

平成 28年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名：(日本語)再生医療実現拠点ネットワークプログラム(再生医療の実現化ハイウェイ)
(英語) Research Center Network for Realization of Regenerative Medicine
(Highway Program for Realization of Regenerative Medicine)

研究開発課題名：(日本語) iPS 細胞技術を基盤とする血小板製剤の開発と臨床試験
(英語) Development and clinical studies of platelet preparations based on
induced pluripotent stem (iPS) cell-techniques

研究開発担当者 (日本語) 国立大学法人京都大学 iPS 細胞研究所・教授 江藤浩之
所属 役職 氏名：(英語) Kyoto University, Center for iPS Cell Research and Application, Professor,
Koji Eto

実施期間：平成28年4月1日～平成29年3月31日

研究開発分担者 (日本語) 京都大学 iPS 細胞研究所・准教授・斎藤 潤(京都大学病院 iPS 細胞臨床
開発部副部長)
所属 役職 氏名：(英語) Kyoto University, iPS Cell Research and Application, Associate Professor,
Megumu Saito

研究開発分担者 (日本語) 京都大学大学院医学研究科・教授・高折晃史
所属 役職 氏名：(英語) Kyoto University Graduate School of Medicine, Professor, Akifumi Takaori

研究開発分担者 (日本語) 京都大学大学院医学研究科・教授・平家俊男(京都大学病院 iPS 細胞臨
床開発部部長)
所属 役職 氏名：(英語) Kyoto University Graduate School of Medicine, Professor, Akifumi Takaori

研究開発分担者 (日本語) 京都大学大学院医学研究科 (京大病院分子細胞治療センター：CCMT)
教授・前川 平
所属 役職 氏名：(英語) Kyoto University Graduate School of Medicine, Professor, Taira Maekawa

研究開発分担者 (日本語) 京都大学大学院医学研究科 (臨床研究総合センター)・講師・南 学
所属 役職 氏名: (英 語) Kyoto University Graduate School of Medicine, Junior Associate Professor,
Manabu Minami

研究開発分担者 (日本語) 京都大学大学院医学研究科・教授・小川誠司
所属 役職 氏名: (英 語) Kyoto University Graduate School of Medicine, Professor, Seishi Ogawa

II. 成果の概要 (総括研究報告)

iPS 細胞由来の血小板製剤の臨床応用への開発戦略は、iPS 細胞から血小板産生前駆細胞となる不死化巨核球細胞株を樹立してマスターセルバンク化し、この巨核球細胞株マスターセルから拡大培養して血小板を製造する方策に基づいている。本研究開発は、自家および同種の臨床開発戦略を同時に進め、臨床研究あるいは、臨床治験により iPS 細胞由来血小板製剤の安全性を先ず確認することを基本的な方針としている。

自家臨床研究での特記すべきことは、ドナーが見つけれられない非常に稀な血小板型 (HPA タイプ) の患者について、末梢血単核球由来 iPS 細胞から、より品質の高い不死化巨核球細胞株の樹立に成功したことである。

同種臨床研究および治験への対応では、京都大学 iPS 細胞研究所が提供する iPS 細胞ストッククローンである YZWJ 株 (HLA ホモストック 1 位) から治験用の巨核球株の樹立に成功し、マスターセルバンクの製造とそのウイルス等安全性試験の外注にまで進んだ。一方、YZWJ 株の製造工程での逸脱から、この巨核球細胞株は治験に使用不可であることが決定されたため、臨床試験開始が遅延することが明らかとなった。

それ以外の研究開発の成果として、

- (1) 生体内血小板産生機構に関する新たな知見を参考に、血小板産生バイオリアクターの開発とその作動条件の最適化に成功した。
- (2) バイオリアクター以降の製造工程 (精製と製剤化工程) における血小板培養液濃縮、血小板洗浄、残存巨核球株の除去等の製造工程 SOP を最適化した。
- (3) 生物由来原料基準を満たす原材料のみを使用する、不死化巨核球細胞株の新規樹立法を確立した。
- (4) 製造工程に使用する新規薬剤、血小板の GPIb-alpha 切断阻害薬 KP457 (血小板機能維持)、およびトロンボポイエチン(TPO) の代用薬である低分子化合物 TA-316 に関する論文発表を行った。

The development of iPS cell-derived platelets for clinical application is based on the strategy of establishing iPS cell derived immortalized megakaryocyte cell lines (imMKCLs) as platelet precursor cells, stocking them into 'master cell banks', and producing platelets after expansion culture from imMKCL master cells. In this research and development, the basic plan is to develop both autologous and allogeneic transfusion products, and then first conduct clinical studies that evaluate safety as the primary endpoint.

Notably for the autologous platelets, we improved the methodology and eventually succeeded in producing an imMKCL of higher quality from peripheral blood mononuclear cell-derived iPS cells of a patient with a rare platelet type that was not found among Japanese blood donors.

For the development of allogeneic platelets for clinical research or trials, we successfully established imMKCLs from YZWJ strain, the 1st ranking homozygous HLA haplotype iPS cell stock clone provided from CiRA. We were able to produce a master cell bank and proceed to viral and other safety testing done by testing service companies. However, as a result of the decision that this cell line is unusable in clinical trials due to a deviation event in manufacturing the YZWJ strain, the start of the clinical test is expected to delay.

Other achievements in research and development are as follows.

- (1) By referring to novel findings on platelet production mechanisms in the living body, we succeeded in the development of a platelet-producing bioreactor and its optimized operation.
- (2) SOPs of manufacturing processes after the bioreactor step (purification and packaging) such as platelet culture suspension concentration, washing, removal of residual megakaryocytes etc. were optimized.
- (3) A new method for generating imMKCLs only with materials that satisfy the criteria of biological origin materials was established.
- (4) Papers were published on novel drugs used in the manufacturing process: the platelet GPIb-alpha cleavage inhibitor agent KP 457 (for maintaining platelet functionality), and thrombopoietin (TPO) mimetic small molecule drug that substitute recombinant TPO, TA-316.

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 5 件、国際誌 9 件）

1. Karagiannis P, Eto K. Ten years of induced pluripotency: from basic mechanisms to therapeutic applications. *Development*. 2016 .143(12) : 2039-43.
2. Karagiannis P, Endo H, Eto K. Generating Blood from iPS Cells. *Molecular and Cellular Biology of Platelet Formation: Implications in Health and Disease* Springer. 2017. 399-420.
3. Hirata S, Murata T, Suzuki S, Nakamura S, Jono-Ohnishi R, Hirose H, Sawaguchi A, Nishimura S, Sugimoto N, Eto K. Selective inhibition of ADAM17 efficiently mediates glycoprotein Iba retention during ex vivo generation of human induced pluripotent stem cell-derived platelets. *Stem Cells Translational Medicine*. 2017. 6(3):720-730.
4. Aihara A, Koike T, Abe N, Nakamura S, Sawaguchi A, Nakamura T, Sugimoto N, Nakauchi H, Nishino T, Eto K. Novel TPO receptor agonist TA-316 contributes to platelet biogenesis from human iPS cells. *Blood Advances*. 2017. 1(7) :468-476.
5. Kataoka K, Shiraishi Y, Takeda Y, Sakata S, Matsumoto M, Nagano S, Maeda T, Nagata Y, Kitanaka A, Mizuno S, Tanaka H, Chiba K, Ito S, Watatani Y, Kakiuchi N, Suzuki H, Yoshizato T, Yoshida K, Sanada M, Itonaga H, Imaizumi Y, Totoki Y, Munakata W, Nakamura H, Hama N, Shide K, Kubuki Y, Hidaka T, Kameda T, Masuda K, Minato N, Kashiwase K, Izutsu K, Takaori-Kondo A, Miyazaki Y, Takahashi S, Shibata T, Kawamoto H, Akatsuka Y, Shimoda K, Takeuchi K, Seya T, Miyano S, Ogawa S. Aberrant PD-L1 expression through 3'-UTR disruption in multiple cancers. *Nature*. 2016; 534(7607):402-6.

6. Nishizawa M, Chonabayashi K, Nomura M, Tanaka A, Nakamura M, Inagaki A, Nishikawa M, Takei I, Oishi A, Tanabe K, Ohnuki M, Yokota H, Koyanagi-Aoi M, Okita K, Watanabe A, Takaori-Kondo A, Yamanaka S, Yoshida Y. Epigenetic Variation between Human Induced Pluripotent Stem Cell Lines Is an Indicator of Differentiation Capacity. *Cell Stem Cell*. 2016;19(3):341-54.
7. Maeda T, Nagano S, Ichise H, Kataoka K, Yamada D, Ogawa S, Koseki H, Kitawaki T, Kadowaki N, Takaori-Kondo A, Masuda K, Kawamoto H. Regeneration of CD8alpha T Cells from T-cell-Derived iPSC Imparts Potent Tumor Antigen-Specific Cytotoxicity. *Cancer Res*. 2016;76(23):6839-50.
8. Mandai M, Watanabe A, Kurimoto Y, Hiramitsu Y, Morinaga C, Daimon T, Fujihara M, Akimaru H, Sakai N, Shibata Y, Terada M, Nomiyama Y, Tanishima S, Nakamura M, Kamao H, Sugita S, Onishi A, Ito T, Fujita K, Kawamata S, Go MJ, Shinohara C, Hata KI, Sawada M, Yamamoto M, Ohta S, Ohara Y, Yoshida K, Kuwahara J, Kitano Y, Amano N, Umekage M, Kitaoka F, Tanaka A, Okada C, Takasu N, Ogawa S, Yamanaka S, Takahashi M. Autologous Induced Stem-Cell-Derived Retinal Cells for Macular Degeneration. *N Engl J Med*. 2017. 376:1038-1046.
9. Fujikawa R, S. Higuchi, M. Nakatsuji, M. Yasui, T. Ikedo, M. Nagata, M. Yokode, and M. Minami*. EP4 Receptor-Associated Protein in Microglia Promotes Inflammation in the Brain. *Am J Pathol*. 2016. pii: S0002-9440(16)30112-2. doi: 10.1016/j.ajpath.2016.04.002.
10. 重盛智大・江藤浩之、iPS 細胞技術を用いた血小板製剤の開発—献血に依存しない in vitro 血小板製造の実現に向けて、医学のあゆみ、2016、Vol.257 No.3 : 208-212.
11. 橋本一哉・江藤浩之、iPS 細胞由来血小板・赤血球製剤開発に向けた取り組み、月刊糖尿病、2016、Vol.8 No.6 : 83-90.
12. 中村壮・江藤浩之、iPS 細胞からの血小板分化と臨床応用、小児内科、2016、Vol.48 No.7 : 1067-1069.
13. 杠 明憲・江藤浩之、生命維持装置として登場した巨核球による造血幹細胞制御機構、実験医学増刊 再生医療と疾患解明の鍵となる組織幹細胞、2016、Vol.34 No.17 : 76-81.
14. 福永淳一・江藤浩之、iPS 細胞による再生医療：血小板、臨床薬学テキストシリーズ バイオ医薬品と再生医療、2016、pp218-223.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. iPS 細胞由来血小板の臨床試験に向けた開発現状報告、口頭、江藤浩之、第 64 回日本輸血・細胞治療学会総会、2016/4/30、国内.
2. Challenge of “HLA omnipotent platelets” for overcoming allogenic immune response using induced Pluripotent Stem Cell (iPSC) technology、口頭、Daisuke Suzuki, Naoshi Sugimoto, Norihide Yoshikawa, Sou Nakamura, Hiroshi Endo, Akitsu Hotta and Koji Eto、第 14 回幹細胞シンポジウム、2016/5/20、国内.
3. 「iPS 細胞を基盤とする血小板製剤の開発と臨床試験」「同種血小板輸血製剤の上市に向けた開発」、杉本直志・江藤浩之、再生医療プログラム間連携のための情報交換会、2016/5/30、国内.
4. Plenary VII : Cell therapy in clinical trials “How should we generate 300b platelets from iPSC cells?”、口頭、Koji Eto、ISSCR 2016、Jun25,2016、国外.

5. ヒト iPS 細胞を用いた血小板の生産に関する最新の話題、口頭、江藤浩之、第 23 回八幡平造血セミナー、2016/8/20、国内。
6. iPS 細胞由来血小板製造の出口戦略、口頭、江藤浩之、第 17 回 Pharmaco-Hematology、2016/9/3、国内。
7. Engineering Biogenesis of Human Platelets by iPS Cell Technology and New Type of Bioreactor System、口頭、Koji Eto、Platelets 2016、Sep18,2016、国外。
8. Production and purification of 1U/300 billion platelets towards development of universal type transfusion products using iPS cell technology、口頭、Koji Eto、Cell Symposium: 10Years of iPSCs、Sep26,2016、国外。
9. Universal Platelet Products using iPS Cell Technology、口頭、江藤浩之、The 8th Congress of the International Federation of Shock Societies、2016/10/5、国内。
10. iPS 細胞由来血小板製剤の出口戦略、口頭、江藤浩之、第 52 回日本赤十字社医学会総会、2016/10/21、国内。
11. なぜ iPS 細胞を使うのか？献血に依存しない血小板製剤の開発ストーリー、口頭、江藤浩之、新薬理学セミナー2016、2016/11/19、国内。
12. Natural Killer Cell Activities Against iPSCs-Derived HLA-Knockout Platelets and Megakaryocytes Reveal Perfect Rejection Profiles for Allogeneic Transfusion、Poster、Daisuke Suzuki, Naoshi Sugimoto, Norihide Yoshikawa, Hiroshi Endo, Sou Nakamura, Akitsu Hotta and Koji Eto、58th ASH Annual Meeting & Exposition、2016/12/5、国外。
13. Synthetic miRNA Switch Technology Elucidates Heterogeneity in Regulation of Immortalized Megakaryocyte Cell Lines, Associated with Improvement of Platelet Generation Efficiency for Clinical Use、Poster、Kazuya Hashimoto, Satoshi Matsuura, Yoshihiko Fujita, Karin Hayashi, Naoshi Sugimoto, Takuya Yamamoto, Hirohide Saito and Koji Eto、58th ASH Annual Meeting & Exposition、2016/12/5、国外。
14. iPS 細胞技術を基盤とする血小板製剤の開発と臨床試験・同種血小板輸血製剤の上市に向けた開発、ポスター、中村壮・江藤浩之、平成 28 年度 AMED 再生医療公開シンポジウム、2017/2/2、国内。
15. NK 細胞から見た HLA 欠失血小板の有用性と安全性の保証、口頭、鈴木大助、杉本直志、吉川典秀、中村壮、遠藤大、堀田秋津、江藤浩之、第 16 回日本再生医療学会総会、2017/3/8、国内。
16. miRNA スイッチテクノロジーによる工業化製造に向けた血小板産生の不均一性改善方法の開発、口頭、橋本一哉、松浦理史、藤田祥彦、林香倫、杉本直志、山本拓也、齊藤博英、江藤浩之、第 16 回日本再生医療学会総会、2017/3/9、国内。
17. Human bone marrow mesenchymal stromal/stem cells modulate IMiDs-induced differentiation of HSPCs. [Abstract #OS-1-90]、口頭、Fujii S, Miura Y, Iwasa M, Fujishiro A, Sugino N, Sato A, Yokota A, Hirai H, Takaori-Kondo A, Ichinohe T, Maekawa T、第 78 回日本血液学会学術総会、2016/10/13、国内。
18. Vitamin K2 supports hematopoiesis through acting on human bone marrow mesenchymal stromal/stem cells. [Abstract #PS-2-7]、ポスター、Fujishiro A, Miura Y, Iwasa M, Fujii S, Sugino N, Sato A, Yokota A, Hirai H, Ando A, Tohyama K, Ichinohe T, Maekawa T、第 78 回日本血液学会学術総会、2016/10/14、国内。

19. 低線量放射線が間葉系幹細胞の機能に与える影響、口頭、藤城 綾・三浦康生・岩佐磨佐紀・藤井紀恵・杉野典子・安藤 朗・前川 平、第 59 回日本放射線影響学会大会、2016/10/28、国内.
20. 凍結保存されたさい帯血細胞からの間葉系幹細胞分離、口頭、藤井紀恵・三浦康生・岩佐磨佐紀・吉岡聡・藤城綾・杉野典子・平位秀世・高折晃史・一戸辰夫・前川 平、第 39 回日本造血細胞移植学会総会、2017/3/3、国内.

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

1. iPS 細胞技術による血小板製剤の開発、杉本直志、江藤浩之、京都大学アカデミックデイ、2016/9/18、国内.
2. iPS 細胞技術を基盤とする血小板製剤の開発と臨床試験、同種血小板輸血製剤の上市に向けた開発、江藤浩之、AMED 再生医療公開シンポジウム、2017/2/2、国内.

(4) 特許出願

(報告様式4)

【課題管理番号】 16bm0504008h0105

平成 29 年 3 月 31 日

平成 28 年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名： (日本語) 再生医療実現拠点ネットワークプログラム 再生医療の実現化ハイウェイ
(英語) Research Center Network for Realization of Regenerative Medicine,
Highway Program for Realization of Regenerative Medicine

研究開発課題名： (日本語) iPS 細胞技術を基盤とする血小板製剤の開発と臨床試験
(英語) Development and clinical studies of platelet preparations based on induced
pluripotent stem (iPS) cell-techniques

研究開発担当者 (日本語) 国立大学法人京都大学 iPS 細胞研究所・教授 江藤浩之
所属 役職 氏名： (英語) Kyoto University, Center for iPS Cell Research and Application, Professor, Koji Eto

実施期間： 平成 28 年 4 月 1 日 ～ 平成 29 年 3 月 31 日

分担研究 (日本語)
開発課題名： (英語)

研究開発分担者 (日本語)
所属 役職 氏名： (英語)

II. 成果の概要（総括研究報告）

・ 研究開発代表者による報告の場合

・ 研究開発分担者による報告の場合

研究開発代表者： 国立大学法人京都大学・iPS細胞研究所 教授・江藤浩之 総括研究報告を参照。

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 0件、国際誌 0件）
なし

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. ウサギを用いた改良型血小板血中滞留時間測定法によるヒト血小板の経時的劣化の検討、口頭、渡邊直英、野川誠之、江藤浩之、半田誠、京都国際会議場、第64回 日本輸血細胞治療学会総会 2016年4月29-5月1日、国内
2. ウサギを用いた改良型出血時間測定法によるヒト血小板の経時的劣化の検討、口頭／ポスター両方、渡邊直英、野川誠之、江藤浩之、半田誠、奈良、第38回 日本血栓止血学会学術集会 2016年6月16-18日、国内

(2) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み
なし

(4) 特許出願
なし

平成 28 年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

- 事業名： (日本語) 再生医療実現拠点ネットワークプログラム 再生医療の実現化ハイウェイ
(英語) Research Center Network for Realization of Regenerative Medicine,
Highway Program for Realization of Regenerative Medicine
- 研究開発課題名： (日本語) iPS 細胞技術を基盤とする血小板製剤の開発と臨床試験
(HLA-A,-B ホモ接合型ドナーからの iPS 細胞の作製と HLA-PC 用人工血
血小板製剤の開発)
(英語) Development of and clinical studies on platelet preparations based
on induced pluripotent stem (iPS) cell techniques: Preparation of
iPS cells from HLA-A, -B homozygous donors and development of
artificial platelet products for HLA-PC
- 研究開発担当者 (日本語) 京都大学 iPS 細胞研究所・教授・江藤浩之
所属 役職 氏名： (英語) Center for iPS Cell Research and Application, Kyoto University,
Professor, Koji Eto
- 実施期間： 平成 28 年 4 月 1 日 ～ 平成 29 年 3 月 31 日
- 分担研究 (日本語) 1) iPS 細胞由来血小板の「血液製剤としての品質評価」予備試験の実施
及び品質試験項目の決定
2) iPS 細胞由来血小板上の発現抗原の確認
- 開発課題名： (英語) 1) Preliminary tests for the quality evaluation and establishment of
the qualification test items of iPS cell-derived platelets as blood
products
2) Verification of the surface antigen expression on iPS cell-derived
platelets

研究開発分担者 (日本語) 日本赤十字社近畿ブロック血液センター・委嘱・谷慶彦
所属 役職 氏名: (英語) Japanese Red Cross Kinki Block Blood Center, Commissioner,
Yoshihiko Tani

II. 成果の概要 (総括研究報告)

- ・ 研究開発代表者による報告の場合

- ・ 研究開発分担者による報告の場合

研究開発代表者: 国立大学法人京都大学・iPS細胞研究所 教授・江藤浩之 総括研究報告を参照。

(総括研究報告:和文)

江藤浩之教授(京都大学 iPS 細胞研究所)らと株式会社メガカリオンによって試験的に作製された iPS 細胞由来血小板(iPS-PC)の最終製造工程で巨核球除去を目的としてフィルターA が用いられたが、巨核球の除去効率が不十分であったため軽遠心法に切り替えた。しかし、同法でも巨核球が多数混入したため、別の濾過フィルターB を試用した。その結果、これまでの方法と比較して良好な結果が得られたため、巨核球除去効率の向上を目指して引き続き同フィルターの性能を検討することとなった。

濾過フィルターによる精製後の iPS-PC はスワリングも良好であるが、顕微鏡観察や粒度分布解析では献血由来 PC と比較して大きな細胞径を有することが明らかとなった。このため、血小板数および混入巨核球数の測定に用いた血球測定機器の仕様に変更が必要と判断した。

血液製剤としての品質評価項目である低浸透圧ショック回復試験および Stop & Flow 法による血小板形態観察はいずれも評価困難であった。血小板凝集能試験は従来法では測定できず、評価困難であるが、測定条件を変更することにより、測定可能であった。臨床的意義の高い流路での血小板粘着・凝集能および血栓形成能については、献血由来血小板と同等かそれ以上の成績を示した。

いっぽう、損傷や細胞死の指標としてのアネキシン V の発現についてフローサイトメトリー法で評価したところ、献血由来 PC に比べて iPS-PC での発現が有意に高かった。

iPS-PC での血液型抗原の発現については発現していないという確実な結果は得られていない。また HLA、HPA の発現については献血由来の血小板の発現量と比較中である。

(総括研究報告:英文)

The filter A, which was tried out in the final preparation process of platelet products derived from iPS cells (iPS-PCs) experimentally established by Prof. Koji Eto (Center for iPS Cell Research and Application) and Megakaryon Corp., has been found to be ineffective to purge the residual megakaryocytes. The purging procedure then was switched to brief centrifugation. Considerable number of megakaryocytes, however, still remained. We therefore experimentally used the micropore filter B. Since the purging efficiency was improved after introducing the filter B, we keep thinking of the availability of it for practical use.

While iPS-PCs showed good swirling even after purification by the filter B, it was revealed that they have larger diameters than those of donated platelets. This finding made us notice the

need for some specification change of the blood cell counter device to exactly measure the numbers of iPS-PCs and the residual megakaryocytes, both of which are larger in size compared to normal human blood cells.

We further assessed the quality of iPS-PCs as blood products by some *in vitro* tests including percent hypotonic shock response and evaluation of platelet shape by a stop and flow method, each datum from which was found to be difficult or impossible to evaluate the quality of iPS-PCs with precision. Platelet aggregation test cannot be measured by the conventional method and evaluation is difficult. But it was measurable by changing measurement condition. On the other hand, clinically significant tests such as platelet adhesion, aggregation and thrombus formation in a flow channel suggested equivalent or higher hemostatic ability of iPS-PCs compared with donated platelets.

In addition, the surface expression of Annexin V on iPS-PCs was assessed by flow cytometry. We found significantly higher Annexin V expression on iPS-PCs, as compared to that on donated platelets. We also examined the blood group antigen expression by iPS-PCs. The surface expression of ABO antigen, HLA and HPA on iPS-PCs have not been confirmed yet. We are analyzing the surface expression patterns of HLA and HPA on iPS-PCs compared with those on donated PCs.

Ⅲ. 成果の外部への発表

- (1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 0 件、国際誌 0 件）
該当なし
- (2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表
該当なし
- (3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み
該当なし
- (3)
- (4) 特許出願
該当なし