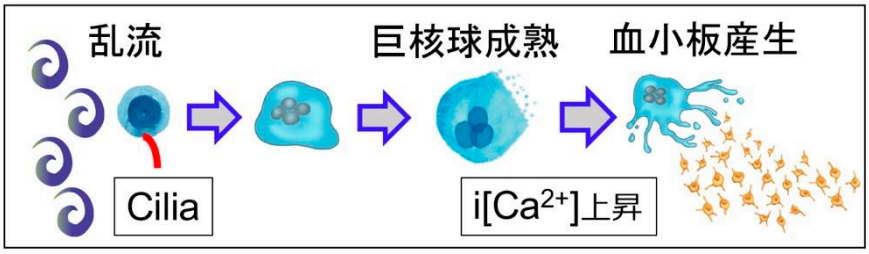
78　血小板造血乱流センシングのモニタリング法開発	江藤　浩之

【目的】献血だけでは供給に限界がある状況を補完することを目的に開発されている iPS 細胞由来血液製剤は、ドナー確保が困難な稀な血液型製剤も供給可能と期待されている。また血小板は、室温保存特性のために有効期限が 4 日と短く、需要供給制御の難しさも伴う。我が国の血小板の基本輸血量は約 2,000 億個と膨大であり、iPS 細胞から如何にして作製するかが大きな課題である。この課題解決のため、ヒト iPS 細胞由来巨核球前駆細胞株（imMKCL）の作製によって巨核球を量産化する技術を開発した。次に、マウス骨髄内の血小板造血の場で流体物理因子“乱流”が関与していることを発見し、その物理作用を培養技術に応用し、8 L 培養槽から 1,000 億個の止血機能を有する血小板（iPS 血小板）を得る製造法を見出した。一方、生体内の血小板造血に近似する高効率の生体外製造を実現させて産業化に発展させるには、培養槽内部の乱流による巨核球への最大限の刺激を達成する培養条件の最適化が必須である。そこで、最も重要な物理負荷因子として同定した「乱流エネルギー」の細胞刺激応答をモニタリングする技術を開発し、巨核球成熟を可視化することで 100%の巨核球が再教育される物理負荷条件や培地条件の最適化を達成する。具体的には、巨核球の成熟が乱流刺激の複数の機械刺激受容体の感受性変化によるという仮説を実証し、乱流刺激に応答する感受性変化のモニタリングとしての細胞内シグナルを規定する。

【方法】乱流エネルギーセンサーの候補として cilia（繊毛）に着目した。imMKCL 成熟期における外界の刺激や流体等の細胞外環境の変化を感知する cilia 形成の有無を観察し、cilia の形成と imMKCL の血小板産生能について検討した。Cilia を通じた細胞内 Ca^{2+}シグナルに関わる候補機械刺激受容体を欠失させた imMKCL を作製し、乱流環境下における imMKCL 成熟期の細胞内 Ca^{2+}動態を観察した。

【結果】imMKCL 成熟培養の経時的な cilia 形成をアセチル化α-tubulin 免疫染色によって観察し、成熟培養 1 日目に cilia の形成が認められた。持続的な乱流刺激は、cilia の進展を逆に阻害した。また、cilia 形成を薬物で阻害すると imMKCL の血小板産生能が低下した。これらの所見は、乱流刺激依存的な血小板産生機構に cilia が関与することを示唆している。次に cilia の細胞内下流シグナルとして想定される機械刺激受容体を欠失させた imMKCL を準備し、観察したところ成熟培養 5 日目から 6 日目にかけて細胞内 Ca^{2+}濃度が野生型と比べ低下し、血小板産生能も低下していた。以上の結果から、cilia センシングメカニズムには、Ca^{2+}シグナルに関わる機械刺激受容体が関わり、巨核球成熟における血小板産生に寄与することが示唆された。特に、成熟期後期に imMKCL 細胞内への急激な Ca^{2+}上昇が観察され、imMKCL 成熟のマーカーの一つになることが明らかとなった。

血小板造血乱流センシング機構



78. 血小板造血乱流センシングのモニタリング法開発

江藤　浩之

京都大学 iPS 細胞研究所 臨床応用研究部門

Key words : 巨核球，血小板，iPS，乱流エネルギー，cilia

緒　言

血小板は巨核球から産生され、止血凝固機能に加え、発生期の血管構築、肺発生、抗細菌作用、抗マラリア作用、骨・軟骨・腱の組織修復効果などの多様な恒常性維持、組織修復作用も発揮する。一方、献血由来の血小板製剤は有効期限が 4 日程度と極端に短く、医療における重要性が高いにもかかわらず医療高度化と社会高齢化が進んでいる現在、安定した供給を続けることは容易ではない。血小板造血機能が回復しない限り輸血は繰り返し必要であるが、特に免疫的に適合する製剤しか受け付けない “血小板輸血不応症”を呈する患者における供給リスクは高く［1］、iPS 細胞技術をもとに新規の治療方法のフィージビリティーを示すことが希求されていた。しかし、血小板 1 回の輸血量は通常 2,000 億個と膨大であり、世界的競争の中でもその数を製造可能な企業やアカデミア機関は存在しなかった。

これらの問題を解決すべく、私たちは iPS 細胞から巨核球へ分化させる段階で、造血過程で機能する遺伝子検証結果をもとに *c-MYC／BMI1／BCL-XL* を遺伝子導入することで不死化巨核球株（immortalized megakaryocyte cell line : imMKCL）を樹立することに成功し、巨核球を量産化する技術を開発した［2，3］。次に、血小板産生過程に対するアプローチに関して概説する。生体内の血流における層流条件下で発生する “せん断応力”依存的な非能動的（受動的）な巨核球の細胞質断片化が、従来の血小板産生の基本概念であった［4］。一方、我々は生体内観察から得たヒントを基に再構成した縦型可動式培養槽を新たに提案し、シミュレーションによる数値計算から、「乱流エネルギー（turbulent energy）」が巨核球のリモデリング（再教育工程）を促進し、より効率よく機能の高い血小板を産生させる能動的な概念メカニズムを発見した。この知見に基づき、我々は 8L スケール培養槽を用いた 6 日間の産生条件培養により、生体内血小板と同等の機能をもつ人工血小板を 1,000 億個製造可能なことを証明した［5］。

今後、生体内の血小板造血に近似する高効率の生体外製造の実現に伴う産業化の発展には、培養槽内部の乱流による巨核球への最大限の刺激を達成する培養条件の最適化が必須である。しかし、現状は最大 20～25%の巨核球しか血小板を放出しない。その最たる要因として、成熟過程で発生する巨核球細胞質、細胞膜のリモデリング誘導刺激を感知する巨核球の受容体側に問題があることが示唆された。本研究では、我々が最も重要な物理負荷因子として同定した「乱流エネルギー」の巨核球側のモニタリング技術を開発し、最終的に 100%の巨核球が再教育される物理負荷条件や培地条件の最適化を目標とした。巨核球成熟過程では、ヒストン脱アセチル化酵素 HDAC6 による Tubulin／Cortactin などの細胞骨格タンパクの安定的な構造変化が必要で、さらに HDAC6 - Cortactin 複合体は cilia の突起進展短縮メカニズムに関わっていることが知られている。Cilia（繊毛）は全ての有核細胞がもつ鞭毛様構造物で、外界の刺激や流体等の物理刺激に反応して、ヘッジホッグ等の多数の受容体シグナルを活性化する［6］。我々は、細胞外環境の変化を感知する cilia が、乱流環境下における imMKCL 成熟期に関与し、乱流環境下における cilia 構造変化が血小板産生の結果に関与することを見出した。また、cilia 下流の Ca^{2+}シグナルに関わる機械刺激受容体を欠失させた imMKCL では、巨核球成熟期における細胞内の Ca^{2+}濃度上昇阻害が生じ、血小板産生の低下が観察された。以上の結果より、乱流環境下における imMKCL 成熟期は cilia が「乱流エネルギー」を感知し、cilia の細胞内下流機械刺激受容体を介して細胞内 Ca^{2+}が上昇するメカニズムが明らかとなった。

方　法

1. imMKCL 増殖培養

ドキシサイクリン（Dox）誘導性遺伝子発現ベクターシステムを組み込んだ imMKCL は、Dox 添加により各導入遺伝子が発現することで自己増殖性を有する。imMKCL 培地組成は IMDM（I3390、Sigma-Aldrich）、L-glutamine（25030-081、Thermo Fisher Scientific）、Insulin-transferrin-selenium（41400-045、Thermo）、50 mg/mL Ascorbic acid（A4544、Sigma-Aldrich）、450 mM 1-Thioglycerol（M6145、Sigma-Aldrich）、15% fetal bovine serum（Gibco）に 50 ng/mL animal-derived-free recombinant human stem cell factor（SCF）（193-15513、Wako）、200 ng/mL TA-316（Nissan Chemical）[7]、1 mg/mL DOX（631311、Clontech）を加え、37℃、5% CO_2で培養した。

2. imMKCL 成熟培養

6-well plates（静置培養）または 125 mL Corning Erlenmeyer cell culture flasks（flask 培養）（431143、Sigma-Aldrich）を用いて、播種密度 1×10^5 imMKCLs/mL、37℃、5% CO_2で 6 日間培養した。培地組成は、imMKCL 培地に 50 ng/mL SCF、200 ng/mL TA-316、15 mM KP-457（Kaken Pharmaceutical）[8]、0.75 mM SR-1（Calbiochem）、10 mM Y27632（Wako）を添加した。Flask 培養は、Lab-Therm shaker（Kuhner）を用いた。

3. Flow cytometry

血小板数は、培養上清を anti-hCD41-APC（303710、Biolegend Inc）と anti-hCD42b-PE（303906、Biolegend Inc）antibody を用いて室温、30 分で染色し、BD Trucount Tubes（340334、Becton Dickinson and Company：BD)を用いて算出した。FACSVerse（BD）を用いて検体のデータを取得し、FlowJo（BD）を用いて解析した。

4. q-PCR

RNA は miRNeasy Mini Kit（QIAGEN）を用いて抽出した。cDNA 合成は、ReverTra Ace qPCR RT Master Mix with gDNA Remover（TOYOBO）を用いて作製した。Real-time quantitative PCR は EagleTaq Master Mix with ROX と各遺伝子の primer と the Universal ProbeLibrary（Roche Applied Science）を用いて ABI7900HT Real-Time PCR System（Applied Biosystems）で解析した。 Primer sets（*GAPDH* と *IFT27*）は the Universal ProbeLibrary Set for humans（https://qpcr.probefinder.com/input.jsp?organism=h_sap）を基に作製した。

5. 免疫染色

細胞は 4% paraformaldehyde（H-1200、Wako）を用いて、室温、10 分で固定した。固定細胞は 0.1% Triton X-100（9002-93-1、Sigma-Aldrich）を用いて室温、5 分で透過処理を行った。その後、10% goat serum（G6767、Sigma-Aldrich）でブロッキングした。一次抗体は、mouse anti–acetylated-α-tubulin（T751、Sigma-Aldrich）と rabbit anti-HDAC6（7558、CST）を用いて、室温、1 時間で染色した。二次抗体は Alexa Flour conjugated goat secondary antibodies（anti-mouse-IgG Alexa-488 と anti-rabit-IgG Alexa-555）（Invitrogen）を用いて、室温、1 時間で染色した。最後に、DAPI（Vector）で核染色し、confocal microscope（H1200、Zeiss LSM710）で観察した。

6. 細胞内カルシウム計測

細胞は Ca^{2+}-free HEPES-Tyrode に懸濁し、5 μM Fluo-4 AM（565878、BD Pharmingen）を用いて、室温、30 分で染色した。次に、細胞を培地を用いて室温 30 分でインキュベートし、AM 部位を加水分解した。その後、Ca^{2+}-free HEPES-Tyrode に置換し BD FACSVerse で解析した。

結果および考察

1. imMKCL の成熟期における cilia の形成（突起進展）

imMKCL は乱流刺激により成熟が亢進する。はじめに、細胞内染色及び cilia の形成（突起進展）に関わる IFT27 の発現を成熟培養の 24 時間毎に観察した。成熟培養 1 日目に IFT27 が高発現し cilia の突起進展に寄与することがわかった（図 1A）。免疫染色では、静置培養（乱流刺激無し）では cilia 突起が進展し、flask 培養（乱流刺激）において短縮した（図 1B）。この flask 培養（乱流刺激）において、cilia の形成を阻害する Ciliobrevin A を添加すると血小板産

生が減少し、乱流環境下における血小板産生に cilia が重要であることが示唆された（図 1C）。

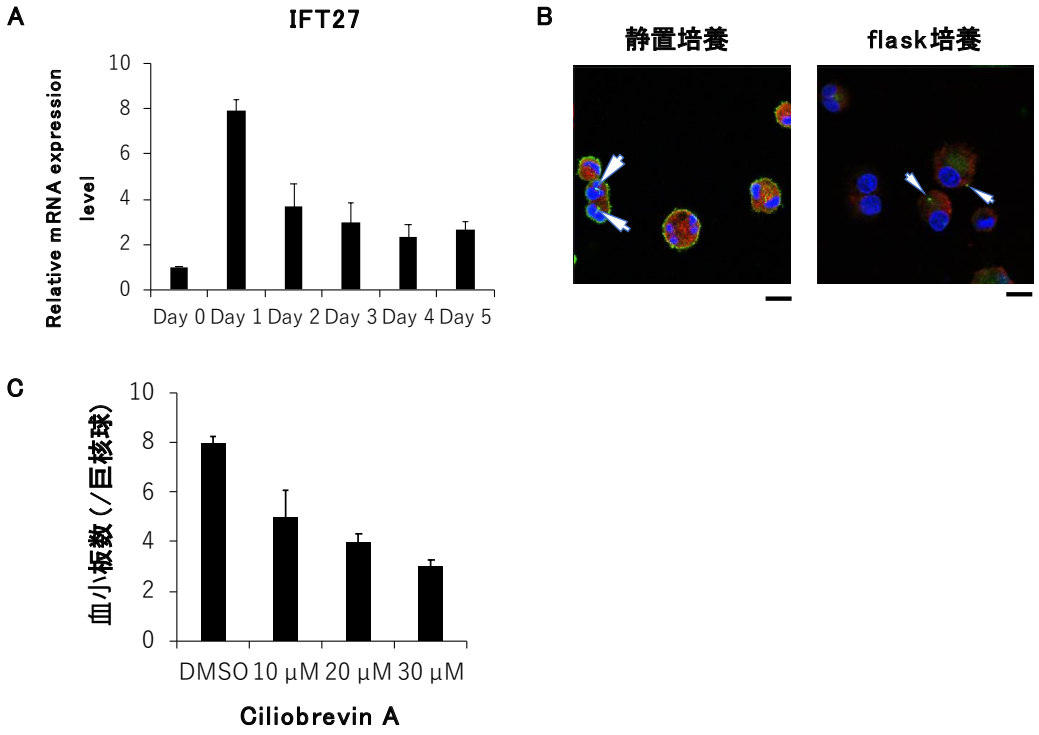


図 1. imMKCL 成熟期における cilia の形成

A） imMKCL 成熟培養 1 日目から 5 日目における *IFT27* 遺伝子の qPCR の結果。Day 0 を 1 とし、24 毎の遺伝子発現の比較を示す。

B） imMKCL 成熟培養 1 日目における imMKCL 静置および flask 培養の cilia 染色像。矢印：cilia、緑：Acetylated-alpha tubulin、赤：HDAC6、青：核（スケールバー：10 μm）。

C） flask 培養（乱流刺激）での Ciliobrevin 添加における imMKCL の血小板産生数。

2. 環境下における、細胞内 Ca^{2+}動態の観察

乱流環境下において、cilia 細胞内下流の Ca^{2+}シグナルに関わる機械刺激受容体を調べた。成熟期の imMKCL の RNA sequencing 解析から候補となる機械刺激受容体を絞り込んだ。CRISPR/Cas9 法で候補機械刺激受容体を欠失させた imMKCL を作製し、成熟期における静置培養と flask 培養（乱流刺激）各条件下における細胞内 Ca^{2}の動態を測定した。その結果、静置培養では機械刺激受容体の野生型、欠失型 imMKCL ともに Ca^{2}の動態に大きな差はみられなかった。一方、flask 培養では、野生型で成熟培養 5 日目から 6 日目にかけて比較的高い細胞内への Ca^{2+}上昇が観察された。他方、候補機械刺激受容体欠失型 imMKCL では、成熟培養 5 日目から 6 日目にかけて細胞内 Ca^{2+}上昇が観察されなかった。この欠失型 imMKCL では、血小板産生数が減少していた。以上の結果から、乱流刺激依存的な cilia、Ca^{2+}シグナル関連機械刺激受容体は、巨核球成熟および血小板産生に寄与していると結論できる。この Ca^{2+}上昇は、成熟期後期での imMKCL 細胞内へ Ca^{2+}の流入と考えられるが、細胞小胞体からの供給の可能性はまだ検証できていない。また、細胞内 Ca^{2+}測定が imMKCL 成熟後期の重要なマーカーになることが示唆された。今後は、細胞内の Ca^{2+}を瞬時に検出することができる蛍光性 Ca^{2+}センサータンパク（G-GECO 等）を imMKCL に発現させることで「乱流エネルギー」を感知する次世代 imMKCL を作製し、100%の巨核球が再教育される物理負荷条件や培地条件の最適化検証に移行する。

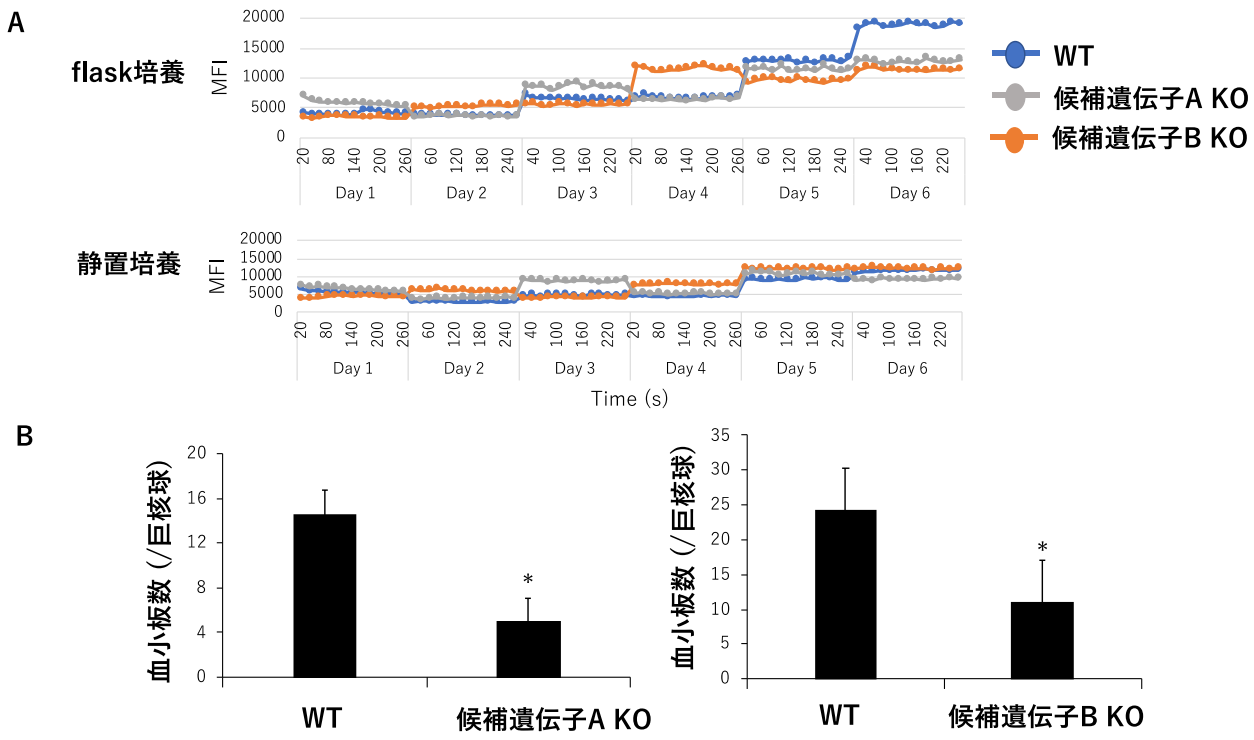


図 2. 乱流環境下における、細胞内 Ca^{2+}動態の観察

A) Fluo-4 で標識した imMKCL の flask（上図）および静置培養（下図）での細胞内 Ca^{2+}動態。

B) 候補遺伝子 A（左）及び B（右）KO imMKCL の血小板産生数。Student's t-test を使用（* $p<0.05$）。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、京都大学 iPS 細胞研究所臨床応用研究部門の本学修士生 Do Thi Thanh Tam、中村壮助教との共同研究である。本研究は、上原記念生命科学財団研究費のサポートによって実施された。

文　献

1) Stanworth SJ, Navarrete C, Estcourt L, Marsh J. Platelet refractoriness - practical approaches and ongoing dilemmas in patient management. Br J Haematol. 2015;171(3):297-305. doi:10.1111/bjh.13597

2) Takayama N, Nishimura S, Nakamura S, 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(13):2817-2830. doi:10.1084/jem.20100844

3) Nakamura S, Takayama N, Hirata S, et al. Expandable megakaryocyte cell lines enable clinically applicable generation of platelets from human induced pluripotent stem cells. Cell Stem Cell. 2014;14(4):535-548. doi:10.1016/j.stem.2014.01.011

4) Junt T, Schulze H, Chen Z, et al. Dynamic visualization of thrombopoiesis within bone marrow. Science (80-). 2007. doi:10.1126/science.1146304

5) Ito Y, Nakamura S, Sugimoto N, et al. Turbulence Activates Platelet Biogenesis to Enable Clinical Scale Ex Vivo Production. Cell. 2018;174(3):636-648. doi:10.1016/j.cell.2018.06.011

6) Singh M, Chaudhry P, Merchant AA. Primary cilia are present on human blood and bone marrow cells and mediate Hedgehog signaling. Exp Hematol. 2016;44(12):1181-1187.e2. doi:10.1016/j.exphem.2016.08.009
7) Aihara A, Koike T, Abe N, et al. Novel TPO receptor agonist TA-316 contributes to platelet biogenesis from human iPS cells. Blood Adv. 2017;1(7):468-476. doi:10.1182/bloodadvances.2016000844
8) Hirata S, Murata T, Suzuki D, et al. Selective Inhibition of ADAM17 Efficiently Mediates Glycoprotein Ibα Retention During Ex Vivo Generation of Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Platelets. Stem Cells Transl Med. 2017;6(3):720-730. doi:10.5966/sctm.2016-0104