

Title	Expandable Megakaryocyte Cell Lines Enable Clinically Applicable Generation of Platelets from Human Induced Pluripotent Stem Cells(Abstract_要旨)
Author(s)	Nakamura, Sou
Citation	Kyoto University (京都大学)
Issue Date	2015-11-24
URL	http://dx.doi.org/10.14989/doctor.r12971
Right	
Type	Thesis or Dissertation
Textversion	ETD

京都大学	博士（ 医科学 ）	氏 名	中 村 壮
論文題目	Expandable Megakaryocyte Cell Lines Enable Clinically Applicable Generation of Platelets from Human Induced Pluripotent Stem Cells (ヒト iPS 細胞から誘導した自己複製能をもつ巨核球細胞株は臨床応用における血小板の安定供給を可能にする)		
<p>(論文内容の要旨)</p> <p>献血システムは多くの病気や病態の改善に寄与している一方、世界的な献血者の減少、ウイルス感染症献血者の増加が問題となり、ドナーのみに依存する体制の変革が必要とされている。更に繰り返し輸血が必要である血液疾患患者への血小板輸血では、血小板輸血不応症が発症する患者が増加し、HLA（ヒト白血球抗原）、HPA（ヒト血小板抗原）が完全に一致するドナーの確保が必要である。以上の背景から、本研究では予め高齢化して献血ドナー候補から逸脱する前段階で、各種のHLA/HPAタイプを持つiPS細胞あるいは同細胞由来の血小板産生前駆細胞である巨核球をマスターセル・ワーキングセルの形態で凍結ストックする系を開発し上記の諸問題を解決する可能性を提示した。</p> <p>以前の報告より、生体外ヒトES細胞及びiPS細胞の分化培養系の構築を基盤とし巨核球分化段階での細胞周期制御因子c-MYCの発現制御が巨核球前駆細胞の増殖、及びその後の多核化を伴う成熟過程を規定することを明らかにした(Takayama N et al. <i>J Exp Med.</i> 2010)。つまり、c-MYCは巨核球前駆細胞の増殖段階では必要であるが、巨核球の成熟段階では発現が抑制されなければならない。そこで、その増殖過程でc-MYCの高発現により誘導される細胞老化誘導因子 <i>INK4A/ARF</i> の発現上昇を抑制し、更に巨核球系への運命決定に寄与するポリコム遺伝子BMI1を共発現させることで、ヒトES細胞から約2ヶ月間に渡り自己複製が可能な巨核球細胞株(megakaryocytic cell lines :MKCLs)に誘導できることを発見した。</p> <p>更に、巨核球細胞株が凍結細胞ストックとして使用に耐えうるには、数ヶ月以上に渡る自己複製を達成する必要がある。そこで、下記の2つの科学的な問題を解決することで、長期の自己複製を達成することに成功した。①c-MYCの活性化に基づく自己複製開始は、iPS細胞クローン間の多様性(heterogeneity)によりc-MYCの活性発揮の範囲が異なっており、自己複製能を発揮するc-MYCの許容範囲が存在すること、②c-MYCの活性化に基づく細胞老化・細胞死が時間空間的に制御され、INK4a/ARF経路に依存しないapoptosis経路の更なる活性化を誘発するためBMI1の他に細胞死抑制分子BCL-XLを強制発現させる必要があることの発見であった。これらを解決した結果、5ヶ月以上に渡って自己複製、凍結保存が可能な不死化巨核球細胞株(immortalized MKCLs :imMKCLs)を京都大学樹立のKhES-3細胞および複数のiPS細胞から樹立することに成功した。</p> <p>上記のc-MYCの活性化行動パターンのエビデンスを基にドキシサイクリン誘導性遺伝子発現ベクターシステムを用いて一旦3遺伝子(<i>c-MYC/BMI1/BCL-XL</i>)を強制発現させ、その後発現を抑制させたところ、巨核球成熟因子である<i>GATA1, NFE2, FOG1, beta1-tubulin</i>の発現が上昇し、血小板産生形態であるproplateletが観察され、vWF受容体CD42b(GPIb-alpha)を有する血小板が放出し、巨核球を増殖から成熟へ誘導させることに成功した。</p> <p>次に、imMKCLsから放出した血小板について下記に示す機能評価をした。①生理的血小板刺激物質(ADP, Thrombin)によって惹起され、血小板凝集起点に寄与するインテグリンαIIbβ3の活性化過程を特異的抗体PAC-1を用いたFACSによる確認、②血小板減少を惹起したNOG(NOD/Shi-scid IL2rgnull)マウスに対する輸血後の循環動態の確認、③NOGマウス生体血管内での血流下血栓形成能の確認を行った。対照群にヒト新鮮血小板および保存血小板(aged platelet)を用いて評価した。その結果、産生された血小板が機能を発揮することをin vitro及びin vivo環境下において確認した。</p> <p>本研究は、1回の血小板輸血に必要な10^{11}個オーダーレベルの血小板を製造する為の巨核球数を大量に増やすための技術革新として位置付けられる。実際に10^6個の凍結imMKCLsストックからは、約20日間の液体培養によって10^{11}個の巨核球を20Lスケールの培養液で得る事にも成功しており、現在の輸血医療が抱える血液供給源の問題点を解決する新たな可能性を提示していると考えられる。</p>			

(論文審査の結果の要旨)

ドナーのみに依存する輸血製剤供給体制の変革が希求される背景をもとに、申請者は、産業化に必須のマスターセル・ワーキングセルの形態で凍結ストック可能な血小板産生前駆細胞である巨核球へとiPS細胞を分化誘導する新規技術の開発に成功した。

先ず巨核球分化段階での増殖に関わる細胞周期制御因子 c-MYC に着目した。c-MYC の高発現により誘導される細胞老化誘導因子 INK4A/ARF の発現上昇を抑制するポリコム遺伝子 BMI1 を c-MYC と同時に ES 及び iPS 細胞由来血液前駆細胞に共発現させると巨核球の特徴を保持したまま自己複製が可能であること、一方で、INK4a/ARF 経路非依存的 apoptosis 経路の活性化が長期的な自己複製を阻害することを見出した。そこで2遺伝子に加え、細胞死抑制分子 BCL-XL をさらに強制発現させ、長期の自己複製型巨核球細胞の創出に成功した。最終的に、自己複製フェーズと血小板放出のための成熟フェーズとを制御可能なドキシサイクリン誘導性遺伝子発現ベクターシステムを用いて、c-MYC、BMI1、BCL-XL を抑制することで血小板接着に必須な CD42b を発現する血小板が放出されることを確認した。本血小板は、in vivo の止血機能試験において、健常人末梢血血小板の70%の値を示し、巨核球細胞株システムの有用性を明らかにした。

以上の研究は新規の血小板輸血医療のための血小板製剤製造システムを提案し、将来の医療に寄与するところが大きい。

したがって、本論文は博士(医科学)の学位論文として価値あるものと認める。なお、本学位授与申請者は、平成27年8月7日実施の論文内容とそれに関連した研究分野並びに学識確認のための試問を受け、合格と認められたものである。

要旨公開可能日： 年 月 日以降