

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5283120号
(P5283120)

(45) 発行日 平成25年9月4日(2013.9.4)

(24) 登録日 平成25年6月7日(2013.6.7)

(51) Int.Cl.		F I	
C 1 2 N	5/071	(2010.01)	C 1 2 N 5/00 2 O 2 A
A 6 1 K	35/14	(2006.01)	A 6 1 K 35/14 Z
A 6 1 P	35/02	(2006.01)	A 6 1 P 35/02
A 6 1 P	7/00	(2006.01)	A 6 1 P 7/00
A 6 1 P	7/04	(2006.01)	A 6 1 P 7/04

請求項の数 6 (全 23 頁)

(21) 出願番号	特願2008-537409 (P2008-537409)	(73) 特許権者	504137912
(86) (22) 出願日	平成19年10月4日 (2007.10.4)		国立大学法人 東京大学
(86) 国際出願番号	PCT/JP2007/001081		東京都文京区本郷七丁目3番1号
(87) 国際公開番号	W02008/041370	(74) 代理人	100137512
(87) 国際公開日	平成20年4月10日 (2008.4.10)		弁理士 奥原 康司
審査請求日	平成22年9月27日 (2010.9.27)	(72) 発明者	中内 啓光
(31) 優先権主張番号	特願2006-272555 (P2006-272555)		東京都文京区本郷七丁目3番1号 国立大 学法人東京大学内
(32) 優先日	平成18年10月4日 (2006.10.4)	(72) 発明者	江藤 浩之
(33) 優先権主張国	日本国(JP)		東京都文京区本郷七丁目3番1号 国立大 学法人東京大学内
		(72) 発明者	高山 直也
			東京都文京区本郷七丁目3番1号 国立大 学法人東京大学内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 E S細胞からの造血前駆細胞を内包する構造物、及び該構造物を用いた血球細胞の調製方法。

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

E S細胞を10T1/2細胞、又はOP9細胞上に播き、VEGF存在下、14日間～15日間培養して得られるネット様構造物であって、UEA-1レクチン陽性細胞からなる隔壁よりなる小胞構造を有し、造血前駆細胞を小胞内に内包するネット様構造物。

【請求項2】

前記E S細胞がヒト由来であることを特徴とする請求項1に記載のネット様構造物。

【請求項3】

請求項1又は2のいずれかに記載のネット様構造物の隔壁を形成する細胞と造血前駆細胞を分離し、得られた造血前駆細胞をフィーダー細胞上に播き、血球細胞の分化誘導に適した条件で培養し、血球細胞を産生する方法。

【請求項4】

前記血球細胞が巨核球及び血小板であることを特徴とする請求項3に記載の方法。

【請求項5】

前記血球細胞の分化誘導に適した条件が、TPO存在下、7日間～9日間培養することである請求項4に記載の方法。

【請求項6】

前記血球細胞の分化誘導に適した条件が、TPO、SCF及びHeparin存在下、7～9日間培養することである請求項4に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

10

20

【技術分野】

【0001】

本発明は、ES細胞から調製された造血前駆細胞を内包するネット様構造物(Endothelial Sac; embryonic stem-sac; ES-sac)に関する。さらに、本発明は該ネット様構造物を用いた血球細胞の調製方法に関する。

【背景技術】

【0002】

白血病に代表される血液関連疾患の治療に対し、治療に必要な量の血球細胞を安定に増幅し、供給することは極めて重要なことであることから、これまでに多くの研究者によって、造血幹細胞又は造血前駆細胞の効率的な増幅が試みられてきた。血球細胞の中でも、巨核球は血小板前駆細胞(prop platelet)さらには血小板を産生せしめる細胞であり、治療的な応用において重要な位置を占めている。血球細胞のなかでも血小板は血液凝固(止血)において必須の細胞であるため、白血病、骨髄移植、抗癌治療などにおいて、血小板の需要は極めて高い。これまでに、血小板は、ドナーからの献血により採取する方法により供給されてきた。しかし、ドナーによる方法は、慢性的なドナー不足、採取した血小板を凍結することができないことなどにより、安定的な血小板の供給を達成することが困難である。一方、TPOを投与する方法、臍帯血又は骨髄細胞から巨核球を分化させる方法などが試みられたが、TPOの投与は、投与後TPOに対する無力化抗体が産生されることで実用化には至っていない。さらに、臍帯血又は骨髄細胞からの巨核球分化による方法も、巨核球のソースとなる造血幹細胞を極めて少数しか得ることができないことから、やはり安定した血小板の提供に適した方法ではない。

【0003】

近年、生体からは僅かしか得られない造血幹細胞又は造血前駆細胞を生体外において増幅させる試みが盛んに行われている。例えば、マウスES細胞から、自己複製可能で、リンパ球へも分化可能な造血幹細胞株を樹立する方法(特許文献1)、霊長類動物のES細胞を生体外で分化誘導した後、得られた細胞をヒツジの子宮内の胎仔に移植し出生したヒツジ胎仔から霊長類のES細胞を取得する方法(特許文献2)、或いは、造血幹細胞の未分化性を維持したCD34陽性/CD38陰性細胞を生体外で簡便かつ安定的に増幅させる方法(特許文献3)などが報告されている。

【0004】

血小板の安定的な供給には、造血幹細胞又は造血前駆細胞を効率的に巨核球及び血小板へ分化させる方法が必要である。そのため、種々の動物由来のES細胞から巨核球、さらには血小板を誘導させる試みも盛んに行われている。Etoらは、マウスES細胞をOP9ストローマ細胞と共培養することで巨核球へ分化誘導することを明らかにしており(非特許文献1)、Fujimotoraらは、Etoらと同様の方法を用いて血小板の誘導を確認したとの報告を行っている(非特許文献2)。また、サルのES細胞から巨核球の分化誘導に成功したとの報告(非特許文献3)、ヒトのES細胞から巨核球の分化誘導に成功したとの報告(非特許文献4)もあるが、いずれも、血小板の放出を確認していない。また、血小板や巨核球以外の血球細胞の治療上必要な量を安定的に取得するためには、造血幹細胞又は造血前駆細胞を効率的に取得する必要があるが、その方法も、未だ、確立されていないとは言い難い。

【0005】

【特許文献1】特開2006-141356号公報

【特許文献2】特開2004-380601号公報

【特許文献3】特開2006-61106号公報

【非特許文献1】Etoら, Proc. Acad. Sci. USA 2002; 99: 12819-12824.

【非特許文献2】Fujimotoraら, Blood 2003; 102: 4044-4051.

【非特許文献3】Hiroyamaraら, Exp. Hematol. 2006; 34: 7

10

20

30

40

50

60 - 769 .

【非特許文献4】Gaurā , J Thromb Haemost . 2005 ; 4 : 436 - 442 .

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

本発明者らは、上記事情に鑑み造血前駆細胞の効率的な取得方法並びに巨核球及び血小板の取得方法について鋭意研究を行った結果、造血前駆細胞が濃縮されて存在するネット様構造物の調製に成功し、さらには、ヒトES細胞からの血小板の調製に初めて成功し、本発明を完成させるに至った。

10

よって、本発明は造血前駆細胞を内包するネット様構造物及び該ネット様構造物の調製方法に関する。

さらに、本発明は該ネット様構造物から成熟巨核細胞、血小板などの血球細胞を効率的に調製する方法に関する。

【課題を解決するための手段】

【0007】

従来技術では、造血前駆細胞を比較的高濃度で得ることは困難であり、その結果、血球細胞の得られる量も少なかった。特に、血小板の治療上利用可能な量をES細胞から誘導することは難しく、ヒトにおいては、誘導すら行うことができなかった。発明者らはこれらの問題を解決するために、ES細胞を分化誘導する過程で得られるネット様構造物に着目し、該ネット様構造物から血球細胞の誘導を行った。

20

すなわち、本発明は、以下の(1)～(10)に関する。

(1)本発明の第1の態様は、「ES細胞をフィーダー細胞上に播き、造血前駆細胞の分化誘導に適した条件で培養して得られる、造血前駆細胞を内包するネット様構造物」である。

(2)本発明の第2の態様は、「前記造血前駆細胞の分化誘導に適した条件が、VEGF存在下、14日間～16日間培養することである上記(1)に記載のネット様構造物」である。

(3)本発明の第3の態様は、「前記ES細胞がヒト由来であることを特徴とする上記(1)又は(2)に記載のネット様構造物」である。

30

(4)本発明の第4の態様は、「前記フィーダー細胞が10T1/2細胞、又はOP9細胞であることを特徴とする上記(1)乃至(3)のいずれかに記載のネット様構造物」である。

(5)本発明の第5の態様は、「上記(1)乃至(4)のいずれかに記載のネット様構造物の隔壁を形成する細胞と造血前駆細胞を分離し、得られた造血前駆細胞をフィーダー細胞上に播き、血球細胞の分化誘導に適した条件で培養し、血球細胞を産生する方法」である。

(6)本発明の第6の態様は、「前記血球細胞が巨核球及び血小板であることを特徴とする上記(5)に記載の方法」である。

(7)本発明の第7の態様は、「前記血球細胞の分化誘導に適した条件が、TPO存在下、7日間～9日間培養することである上記(6)に記載の方法」である。

40

(8)本発明の第8の態様は、「前記血球細胞の分化誘導に適した条件が、TPO、SCF及びHeparin存在下、7～9日間培養することである上記(6)に記載の方法」である。

(9)本発明の第9の態様は、「上記(6)乃至(8)のいずれかに記載の方法により産生された巨核球及び血小板」である。

(10)本発明の第10の態様は、「上記(6)乃至(8)のいずれかに記載の方法により産生された血小板を有効成分とする血液製剤」である。

【発明の効果】

【0008】

50

本発明に係るネット様構造物中には、造血前駆細胞が比較的高濃度に濃縮されて存在しているため、各種血球細胞（例えば、好中球、マクロファージ、赤血球、巨核球を含む）への分化誘導を効率的に行うことができる。

【0009】

また、発明に係る血球細胞を産生する方法を用いると、生体外において所望の血球を効率的に取得することができる。特に、ヒトの血小板については、これまでに実現することができなかった生体外における血小板の産生を、比較的大量かつ効率的に行うことができる。

【0010】

さらに、本発明に係る血小板を産生する方法を用いると、血小板を有効成分とする血液製剤の安定的な供給を実現することができる。

【図面の簡単な説明】

【0011】

【図1】ネット様構造物の取得方法を模式的に示した図である。

【図2】ネット様構造物の取得方法、及びネット様構造物から巨核球/血小板を調製する方法の手順を模式的に示した図である。

【図3】未分化ES細胞からネット様構造物を産生する過程を示した図、及び、ネット様構造物の位相差顕微鏡による観察像を示す。

【図4】ネット様構造物の位相差顕微鏡による観察像である。D4及びD7は培養4日目、7日目であることを示す。また、Endothelial Sac (embryonic stem-sac; ES-sac)とは、ネット様構造物のことである。

【図5】VEGFによるネット様構造物の誘導効果を示す。No cytokine; VEGF、IGF-II, BMP-4などのサイトカインを添加しないコントロールのことである。

【図6】抗ヒトFlk-1 (VEGF-R)抗体でネット様構造物（培養14日目）を蛍光免疫染色した結果である。

【図7】ネット様構造（培養14日目）を、抗ヒトFlk-1 (VEGF-R)抗体、抗CD31抗体、抗UEA-Iレクチン (Lectin)抗体で蛍光染色した結果を示す。HE:ヘマトキシリン-エオジン染色。ネット様構造は、内皮細胞のマーカーを発現しており、その内部はレクチン陽性細胞の隔壁による多数の小胞より構成されている。また、小胞内には血球様の細胞が存在する。

【図8】ネット様構造物内部の血液前駆細胞の表面抗原を示す（培養14日目）。抗ヒトFlk-1 (VEGF-R)抗体、抗ヒトCD31抗体、抗ヒトCD34抗体、抗ヒトCD41抗体、抗ヒトvascular endothelial cadherin (VE-cadherin)抗体、抗ヒトCXCR4 (stroma-derived factor-1 受容体)抗体を用いてネット様構造物内部の血液前駆細胞表面抗原を調べた結果である。

【図9】ネット様構造物内部の血液前駆細胞を使用し、血液細胞分化用コロニー作成培養後7日目の多種コロニー像を示す。コロニー像は、コロニーを採取後に細胞成分をギムザ (wright-giemsa)染色した結果である。ミックスコロニーを含む多種の血液細胞への分化が観察された。

【図10】ネット様構造物内部の血液前駆細胞 1×10^4 個あたりから産生された各種血液細胞コロニー数を定量化した結果を示す。

【図11】Khes細胞 (Khes-3細胞) から誘導された巨核球のFACSによる解析結果を示す。

【図12】Khes細胞 (Khes-3細胞) から誘導された培養24日目の巨核球のフローサイトメーターによる解析結果を示す。

【図13】Khes-3細胞から誘導された培養24日目の巨核球をサイトスピン後、ギムザ (wright-giemsa)染色を行った観察像である。倍率 $\times 40$ 。

【図14】Khes-3細胞から誘導された巨核球及び血小板前駆体の顕微鏡による観察

10

20

30

40

50

像を示す。i, ii; K h E S - 3細胞から誘導された巨核球の血小板前駆体形態の位相差顕微鏡観察像、iii, iv, v; 抗ヒトCD41a (G P I I b, i n t e g r i n I I b) 抗体を用いて染色したプロプレイトレットの蛍光顕微鏡による観察像。

【図15】K h E S - 3細胞から誘導された血小板を、F A C Sを用いて解析した結果を示す。A; コントロールとしてヒト末梢血から回収血小板の解析結果、B; K h E S細胞由来の血小板の解析結果。

【図16】K h E S - 3細胞から誘導された血小板を、F A C Sフローサイトメーターを用いて解析した結果を示す。A - a; コントロールとしてヒト末梢血から回収した血小板の解析結果、B A - b; K h E S細胞由来の血小板の解析結果。C D 4 2 a (G P I X), C D 4 2 b (G P I b) はともに成熟巨核球、及び血小板の特異的発現分子である。B; 電子顕微鏡によるヒト末梢血血小板、およびK h E S細胞由来の血小板写真。

10

【図17】K h E S - 3細胞由来の血小板のフィブリノーゲン結合アッセイの結果を示す。Aは、培養24日目の上清を回収し、細胞成分を除き、濃縮した血小板を、血小板活性化剤(トロンピン)により刺激し、F I T C標識したフィブリノーゲンの結合度をフローサイトメーターで解析した結果である。Bは、トロンピンの量依存的にA l e x a F l u o r 4 8 8標識フィブリノーゲンがC D 4 1陽性パーティクルに結合した結果を示す。n o a g o n i s t; A l e x a F l u o r 4 8 8標識フィブリノーゲン無しの結果。

【図18】K h E S - 3細胞由来の血小板のフィブリノーゲン結合アッセイの結果を示す。A; 培養24日目の上清を回収し、細胞成分を除き、濃縮した血小板を、血小板活性化剤(A D P)により刺激し、F I T C標識したP A C - 1抗体フィブリノーゲンの結合度をフローサイトメーターで解析した結果である。P A C - 1 (B D I n v i t r o g e n社) は、活性化した血小板膜上のヒトC D 4 1 a / C D 6 2 (G P I I b I I I a, i n t e g r i n I I b 3) にのみ結合する抗体である。B; A D Pの量依存的にF I T C標識したP A C - 1抗体が、C D 4 1陽性パーティクルに結合した結果を示す。n o a g o n i s t; A D Pなしの結果。

20

【図19】K h E S - 3細胞由来の血小板が、末梢血由来の血小板と同様に、P M A刺激によって細胞の骨格変化を示した様子を蛍光顕微鏡により観察した結果を示す。B及びEは、抗F - アクチン抗体による染色像を、C及びFは、抗C D 4 1 a抗体による染色像を示す。A及びDは、各々、BとC、EとFを重ね合わせた観察像である。

30

【図20】K h E S - 3細胞由来の血小板が、末梢血由来の血小板と同様に、A D P及びトロンピン(t h r o m b i n)刺激によって細胞の骨格変化を示した様子を蛍光顕微鏡により観察した結果を示す。比較のため、ヒト末梢血小板での像を上に表示した。抗F - アクチン抗体及び抗C D 4 1 a抗体による染色像を示す。

【発明を実施するための最良の形態】

【0012】

本発明の実施形態の1つは、E S細胞をフィーダー細胞上に播き、造血系細胞の分化誘導に適した条件で培養して得られる、造血前駆細胞を内包するネット様構造物である。該ネット様構造物には、造血前駆細胞が濃縮されて存在しているため、各種血球細胞を生体外において効率的に分化誘導することができる。ここで「E S細胞」とは、胚性幹細胞のことであり、多分化能と自己複製能を備えた未分化細胞のことである。「E S細胞」のソースとしては如何なる動物であってもよいが、ヒト由来の細胞が最も好ましい。また、ヒト由来のE S細胞としては、例えば、K h E S細胞株などが好適に使用可能である。また、「フィーダー細胞」としては、E S細胞の分化誘導に寄与するものであれば使用可能であるが、例えば、マウス胚繊維芽細胞、好ましくは、10T1/2細胞株、OP9細胞などを用いることができる。「フィーダー細胞」を用いる際には、放射線を照射するなどして、細胞の増殖を抑制しておくのがよい。

40

【0013】

E S細胞の培養条件としては、ネット様構造物を調製するために適した条件を選択することができる。この培養条件は、用いるE S細胞によって異なるが、例えば、ヒトE S細胞

50

胞であるK h E S細胞株を用いる場合、培地としては、最終濃度15%のF B Sを添加したI M D Mを用い、その他適宜サプリメント等を加えたものを使用することができる。さらに、K h E S細胞株を用いる場合、ネット様構造物を効率的に形成させるために、V E G F及びI G F - I Iを、各々、0 ~ 100 ng / ml、0 ~ 300 ng / ml程度、より好ましくは、20 ng / ml、200 ng / ml程度加えるのがよい。あるいは、I G F - 11は加えなくてもよい。また、培養の環境としては、用いるE S細胞によって異なるが、K h E S細胞株の場合、例えば、5% C O₂、36 ~ 38、好ましくは37の条件を用いることができる。ネット様構造物が形成されるまでの培養期間は、E S細胞によって異なるが、K h E S細胞株の場合、フィーダー細胞上に播いてから、14 ~ 16日後くらいにその存在を確認することができる。

10

【0014】

形成されたネット様構造物は、濾胞状構造になっており、中胚葉細胞のマーカーの一つであるF l k 1 (f e t a l l i v e r k i n a s e 1)、C D 3 1、C D 3 4、又はU E A - Iレクチン(U l e x e u r o p a e u s . a g g l u t i n i n - 1)陽性細胞によって隔壁が構成されている。このネット様構造物の内部には、造血前駆細胞が濃縮された状態で存在している。ネット様構造物の内部に存在する造血前駆細胞を各種血球細胞の分化誘導に用いる場合には、隔壁構成している細胞などから分離する必要がある。この分離は、物理的な手段により行うのが望ましい。例えば、滅菌済みの篩状器具(例えば、セルストレイナーなど)に通すことにより、隔壁細胞と造血前駆細胞を分離することができる。

20

【0015】

本発明のさらなる実施形態は、ネット様構造物から分離した造血前駆細胞から各種血球細胞を産生する方法である。得られた造血前駆細胞をフィーダー細胞上に播き、所望の血球細胞の分化誘導に適した条件で培養を行う。ここで「血球細胞の分化誘導に適した条件」とは、目的の血球細胞の種類に応じて、例えば、T P O、I L - 1、I L - 3、I L - 4、I L - 5、I L - 6、I L - 9、I L - 11、E P O、G M - C S F、S C F、G - C S F、F l t 3リガンド、H e p a r i nなどを添加した条件を挙げることができる。巨核球及び血小板を分化誘導する場合には、例えば、T P Oの存在下で、又はS C F、H e p a r i n及びT P Oの存在下で、7 ~ 9日間程度培養することができる。培養環境としては、生体外で血球細胞の分化誘導を行うにあたり適した環境であればよいが、例えば、5% C O₂、36 ~ 38、好ましくは37の条件下で培養を実施する。

30

【0016】

本発明によって生産される血球細胞は、生体外で生産するため、生体内に天然に存在するものを取得する場合に比べて、簡便、かつ、豊富に取得することができる点において、本発明に係る方法は優れた方法である。特に、ヒト血小板については、これまでに、生体外で確認できる程の量が生産されたとの報告はなく、生体外で生産されたヒト血小板としては本発明によるものが初めてである。

血小板は、白血病、骨髄移植、抗ガン剤治療の際の血小板減少の予防又は改善に有効であるため、本発明により得られたヒト血小板を製剤の形態で安定的に供給することも可能である。血液製剤を調製するにあたっては、血小板が保存に対して不安定であることなどを考慮して、血小板の安定化に資する他の成分を含有せしめることもできる。血小板を安定化させる条件は、当該技術分野の専門家において周知の方法を選択することが可能である。より具体的には、取得した血小板(ヒトE S細胞由来洗浄血小板)は、例えば、以下の方法により製剤化することができる。

40

A C D - A液: F F P (f r e s h f r o z e n p l a s m a ; 献血で得られた全血液から調整したもの、アルブミン、凝固因子など血液成分以外のものをすべて含む)を1 : 10の比率で調整し、15 - 50 Gyの放射線照射後に20 - 24にて振とうしながら保存する。A C D - A液; クエン酸ナトリウム22 g / クエン酸8 g / ブドウ糖22 gを注射用水で全体を1 Lとするように調整する。

以上の方法を使用する場合、血小板の濃度としては、例えば、 1×10^9 血小板 / mL

50

程度が望ましい。

また、GM6001 (a broad-range hydroxamic acid-based metalloprotease inhibitor) (Calbiochem社、La Jolla, CA, USA) を添加しておく、冷凍保存および室温保存中に起きる血小板機能分子 GPIb-V-IX や GPVI の切断に伴う不活化を予防できる。本発明者らは、この方法により、マウス ES 細胞由来血小板に関し不活性化の予防が可能であることを確認している。なお、ヒト血小板を使用したこの血小板不活性化に関する機序の参考論文として、Bergmeier, W et al., *Circ Res* 95: 677-683, 2004 及び Gardiner, EE et al., *J Thrombosis and Haemostasis*, 5: 1530-1537, 2007 を参照のこと。

10

【実施例】

【0017】

以下に実施例を示してさらに詳細に説明するが、本発明は実施例により何ら限定されるものではない。

【0018】

本実施例は、ヒト ES 細胞から巨核球及び血小板を分化誘導するものである (図 1 及び図 2 参照)。

1. ネット様構造物の調製

1-1. 細胞株

20

本実施例で用いた KhES 細胞株 (KhES-1; Passage 30-50, KhES-2; passage 20-40, KhES-3; passage 20-40) は、文部科学省の特定胚及びヒト ES 細胞等研究専門委員会での審議及び承諾を経て、京都大学再医科学研究所 所長 中辻憲夫先生より供与された。また、フィーダー細胞は、マウス胎児由来細胞、C3H10T1/2 細胞株をつくば理研 BioResource center より供与を受けて使用し、又は OP9 細胞株を大阪大学医学部、仲野徹教授から供与を受けて使用した。分化実験を行う前日に、0.1% ゼラチンコート化ディッシュに 10T1/2 細胞を $6 \times 10^5 / 10 \text{ cm}$ ディッシュの密度となるように播き、分化実験の当日に、10T1/2 細胞の増殖を止めるため 50 Gy の放射線照射を行い、フィーダー細胞として用いた。また、OP9 細胞株をフィーダー細胞として使用する場合には、分化実験の前日に 50 Gy の放射線照射を行い、播き直しを行った後に使用した。

30

【0019】

1-2. ネット様構造物の調製方法

ヒト ES 細胞、KhES 細胞は、0.05% トリプシン-EDTA (Sigma 社) を用いて解離し、P-1000 ピペットを用いて小さいコロニーに碎き、10T1/2 細胞上に播いた。ネット様構造物を調製するための培地の組成を表 1 に示す。

【表1】

IMDM (Sigma社)	85%	
FBS	15%	
L-グルタミン (Invitrogen社)	2mM	
ITS サプリメント (Sigma社)		
インスリン	10 μ g/ml	
トランスフェリン	5.5 mg/ml	10
亜セレン酸ナトリウム	5 ng/ml	
アスコルビン酸 (Sigma社)	50 μ g/ml	
MTG (Sigma社)	0.45mM	
リコンビナント ヒトVEGF (R&D systems)	20 ng/ml	
リコンビナント ヒトIGF-1I (Pepro tech)	200 ng/ml	

ヒトES細胞を播いた日から3、7、10、13日目に、細胞の播種は行わず、培養液の交換のみを行った。7、10、14日目に培地中に浮遊している細胞を用いて、巨核球/血小板の誘導を試みたが、いずれの時期においても巨核球がごく少数誘導されたのみで、血小板を確認することができなかった。

20

【0020】

1-3. ネット様構造物の確認

未分化ES細胞にVEGFを添加したところ、培養14-15日前後に内部に血球様細胞を含んだネット様構造物が多数確認された(図3及び図4)。また、IGF-1Iによるネット様構造物産生に対する更なる増強作用は認められず、ヒトES細胞からの造血促進効果が報告されたBMP-4の添加ではVEGFの効果が阻害された(図5)。このネット様構造物を回収し、メタノール又はパラホルムアルデヒド固定を行った後、ホールマウントで抗ヒトFlk-1(VEGF-R)抗体により蛍光染色したところ、ネット内部はFlk-1陽性の細胞からなる隔壁により、濾胞状構造をとっている事が分かった(図6)。さらに、このネット様構造物を、抗ヒトFlk-1(VEGF-R)抗体、抗CD31抗体、抗UEA-Iレクチン抗体で蛍光染色したところ、ネット構造内部の血球は、血管内皮細胞、造血幹細胞、前駆細胞、分化血液細胞に発現するCD31に対する抗体でも染色されることが明らかとなった(図7)。KHES-1細胞株、KHES-2細胞株、KHES-3細胞株のいずれからもネット様構造物を確認できた。

30

【0021】

1-4. ネット内の血球の特徴

このネット様構造物内部の血液前駆細胞の表面には、抗ヒトFlk-1(VEGF-R)抗体、抗ヒトCD31抗体、抗ヒトCD34抗体、抗ヒトCD41抗体、抗ヒトvascular endothelial cadherin(VE-cadherin)抗体、抗ヒトCXCR4(stroma-derived factor-1受容体)抗体で染色される未熟な血液細胞に特徴的な細胞表面抗原が発現されていた(図8)。なお、これらのマーカーは、大量培養系で、時間短縮のためフローサイトメーターまたは磁気細胞分離法を用いて細胞単離、選別する際にマーカーとして利用することができる。

40

また、ネット内の血球は 1×10^4 個あたり、すべての骨髓細胞系分化血液細胞(リンパ球以外)を含む(図9)、100-200前後のコロニーを形成することが分かった(図10)。

【0022】

2. 巨核球/血小板の誘導

50

2 - 1 . 巨核球の誘導

P - 1 0 0 0 ピペットを用いて、位相差顕微鏡下でネット様構造物をピックアップし、70 μ m セルストレイナーを用いて、血球細胞とネット様構造物を分離した。新たに、6ウェルプレートに用意した放射線照射済みの10 T 1 / 2 細胞 (6×10^5 / 6ウェルプレート1枚) 上に血球細胞を $2 \sim 3 \times 10^4$ / ウェルで播いた。巨核球 / 血小板を誘導するための培地の組成を表2に示す。

【表2】

IMDM (Sigma社)	85%	
FBS	15%	10
L-グルタミン (Invitrogen社)	2mM	
ITS サプリメント (Sigma社)		
インスリン	10 μ g/ml	
トランスフェリン	5.5 mg/ml	
亜セレン酸ナトリウム	5 ng/ml	
アスコルビン酸 (Sigma社)	50 μ g/ml	
MTG (Sigma社)	0.45mM	
リコンビナント ヒトTPO (キリンビール)	100 ng/ml	20

また、表2に示す組成に、SCF 50 ng/ml、Heparin 25 U/mlを加えると、産生する血小板の量は2倍に増量した。

【0023】

表2に組成を示す培養液に変更し、さらに7 - 8日間(培養液を17日、19日目に交換)(累積培養期間21 - 22日間)培養すると、FACSで巨核球 / 血小板特異的マーカーであるCD41a(インテグリン IIb鎖、GPIIb分子)、CD42a(GPIX分子)、陽性細胞が50 - 60%前後得られた(図11)。さらに、累積培養期間を22 - 24日間で実験を行うと、巨核球 / 血小板特異的マーカーであるCD41a(インテグリン IIb鎖、GPIIb分子)、CD42a(GPIX分子)、及びCD42b(GPIb)陽性細胞が50 - 60%前後得られた(図12)。CD42a(GPIX分子)、及びCD42b(GPIb)はともに成熟巨核球特異的発現分子である(図12)。形態学的にも多核、大型の細胞で巨核球の形態と一致した(図13)。免疫染色により、CD41a陽性細胞が血小板放出に関わるとされる血小板前駆体(Proplatelet)の形態をとっていることが確認された(図14)。また、ネット内部の血球由来のRNAに対するRT-PCRの結果(メッセンジャーRNAの半定量)から、より未分化なCD34+ / CD41a-と分化の進んだCD41a+分画の存在が確認され、CD41a陽性分画には、正常な巨核球分化細胞と同様の遺伝子発現をしていることが明らかとなった。

以上より、ネット内部の血球が巨核球を効率よく産生する造血前駆細胞である事が証明された。

【0024】

2 - 2 . 血小板の確認

培養22日目の培養上清を回収し、血球細胞を分離して血小板を濃縮した。血小板のコントロールとしてヒト末梢血中の血小板を回収し、血小板分画のゲートを確定した(図15左列)。培養上清の血小板をCD41aPE抗体で染色し、同じ分画でゲートをかけて解析したところ、CD41a陽性パーティクルが確認された(図15右列)。時系列を追って培養上清を回収し、Beadsを用いて血小板数をカウントしたところ、培養7日 - 9日目をピークに血小板が産生され、9日目以降は徐々に減少した。本実施例では、 $1 - 2 \times 10^5$ のKhes細胞から $3 - 12 \times 10^4$ のCD41a陽性パーティクルが産生さ

れていた。

同様に、培養24日目の培養上清から回収した血小板にも、血小板マーカーであるCD41a陽性のパーティクルが確認され(図16A)、このCD41a陽性パーティクル中には、血栓形成に重要な機能を果たすGPIIb/IIIa複合体のGPIIbとGPIIIaの発現が70-80%の効率で認められた。本パーティクルを電子顕微鏡で観察したところ、末梢血血小板同様、血小板顆粒及び微小管構造等が確認された(図16B)。

培養24日目には、SCF(Stem cell factor) 50ng/ml、TPO 100ng/ml、Heparin 25U/mlの条件で、 1×10^5 個のヒトES細胞から、 5×10^6 個の血小板が確認された。

【0025】

2-3. 血小板機能解析1; フィブリノーゲン結合アッセイ

生体内血小板は、活性化に伴い細胞接着分子GPIIb/IIIa(インテグリン IIb3)の持続的なフィブリノーゲンとの結合により、血小板凝集を起こし血栓形成に寄与する。培養21-23日目の上清中の血小板を回収し、Alexa Fluor 488-標識化フィブリノーゲンを血小板活性化剤トロンビン存在下で反応させたところ、トロンビン刺激では強い凝集により、FSC、SSCの異なった分画に凝集したCD41陽性パーティクルが出現した(図17A)。また強い凝集の起きていない分画でのフィブリノーゲン-Alexaの結合を見ると、トロンビンの量依存的に、フィブリノーゲンのCD41パーティクルへの結合が認められた(図17B)。

以上のことから、血小板機能の1つである薬物刺激に対するGPIIb/IIIa(インテグリン IIb3)の活性化とその後のフィブリノーゲンとの結合反応が確認された。

さらに、培養23-24日目の上清中の血小板を回収し、FITC標識した活性型インテグリン IIb3結合抗体(商品名; PAC-1)(BD Invitrogen社)で、インテグリン活性化(止血血栓に必須な血小板機能の一つ)を確認したところ、血小板活性化生体内薬物ADPの低濃度から高濃度(0.5-500 μ M)まで濃度依存性に、インテグリンの活性化が確認された(ヒト血小板と同程度の反応性を示した)(図18A)。また、FITC標識した活性型インテグリン IIb3結合抗体(PAC-1)は、トロンビンの量依存的にCD41陽性パーティクルに結合し、この結合は、ヒト特異的抗CD41a/CD62薬である、チロフィバン(tirofiban)によって完全に阻害された(図18B)。

【0026】

2-4. 血小板機能解析2; 固相下フィブリノーゲン上でのスプレッディング

これらの血小板は、フィブリノーゲンを固相化したスライドガラス上でPMA刺激(図19)、ADP刺激及びトロンビン刺激(図20)により、細胞骨格変化の一つであるアクチンストレスファイバーを形成して広がった。血小板活性化後に起きるアクチンストレスファイバーは成体内での安定的持続的な血栓形成において必須である。

以上のように、末梢血由来血小板同様に、ヒトES細胞由来血小板もインテグリンを介するアクチン再重合を伴う骨格変化を誘導した。

【産業上の利用可能性】

【0027】

本発明のネット様構造物は、生体外において血球細胞を効率的に増幅することができるため、医療等の分野において極めて有益な効果をもたらす。特に、生体外において調製することができない血小板などを安定に供給するための手段としての利用価値が高い。

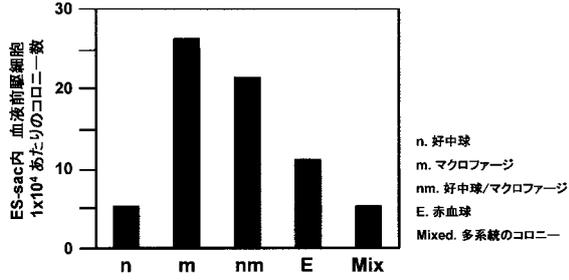
10

20

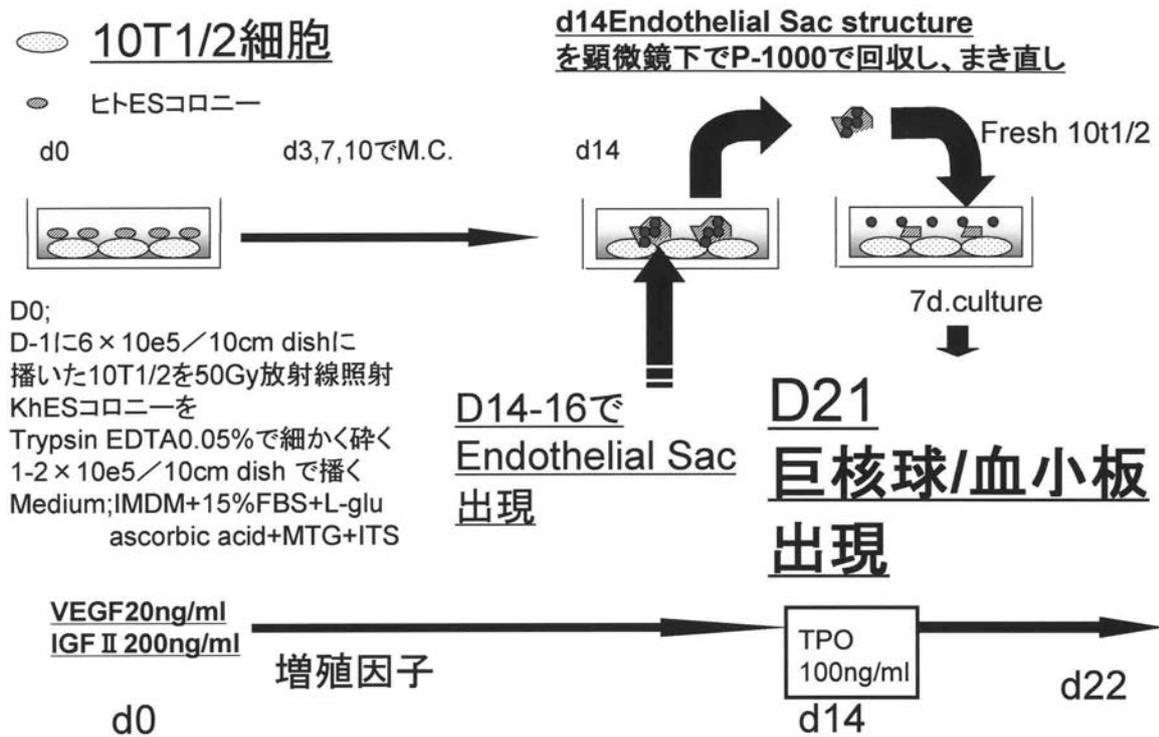
30

40

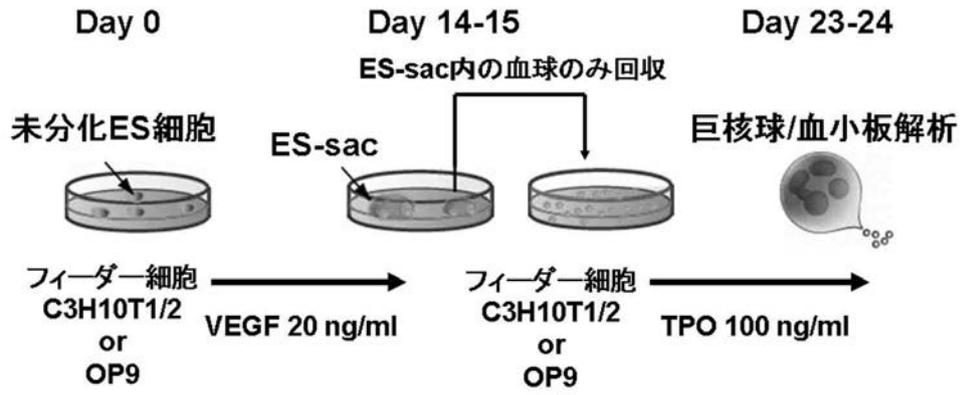
【 図 1 0 】



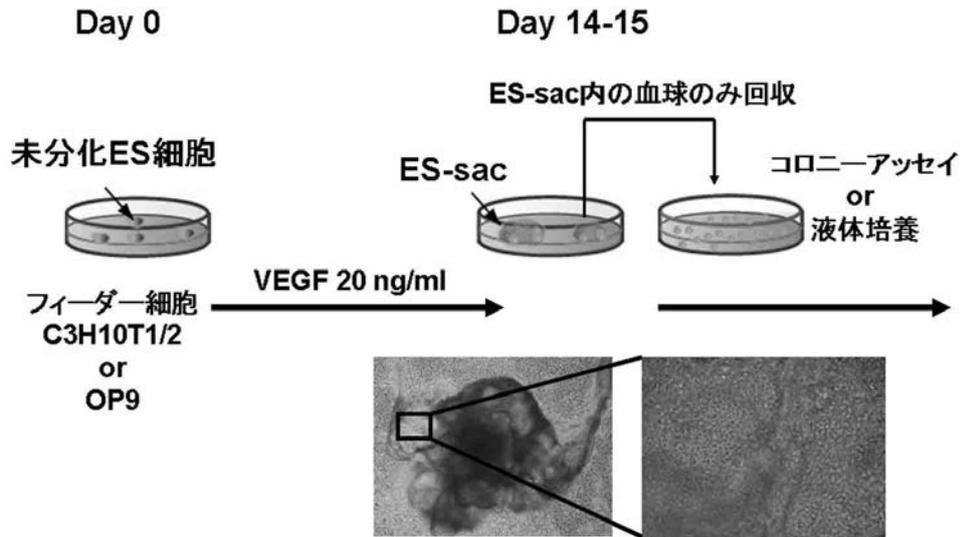
【 図 1 】



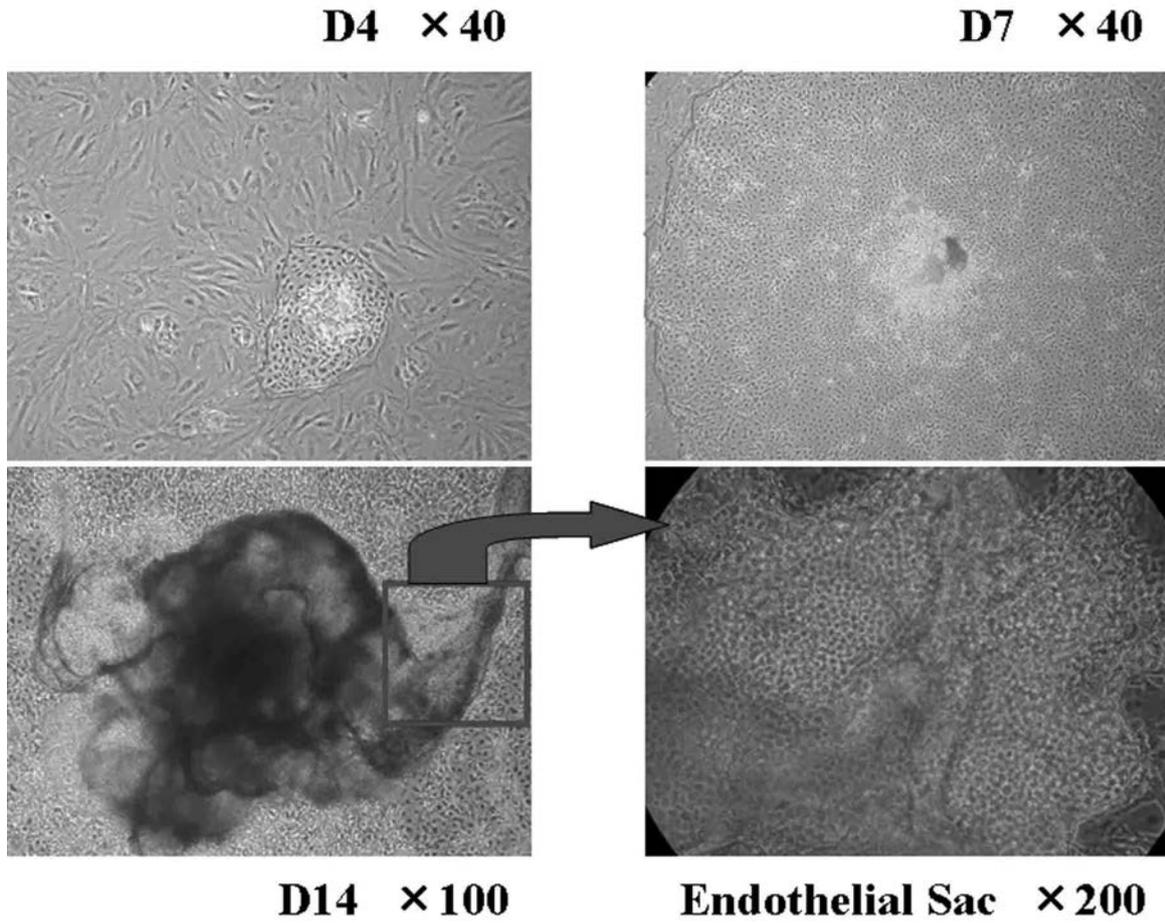
【図2】



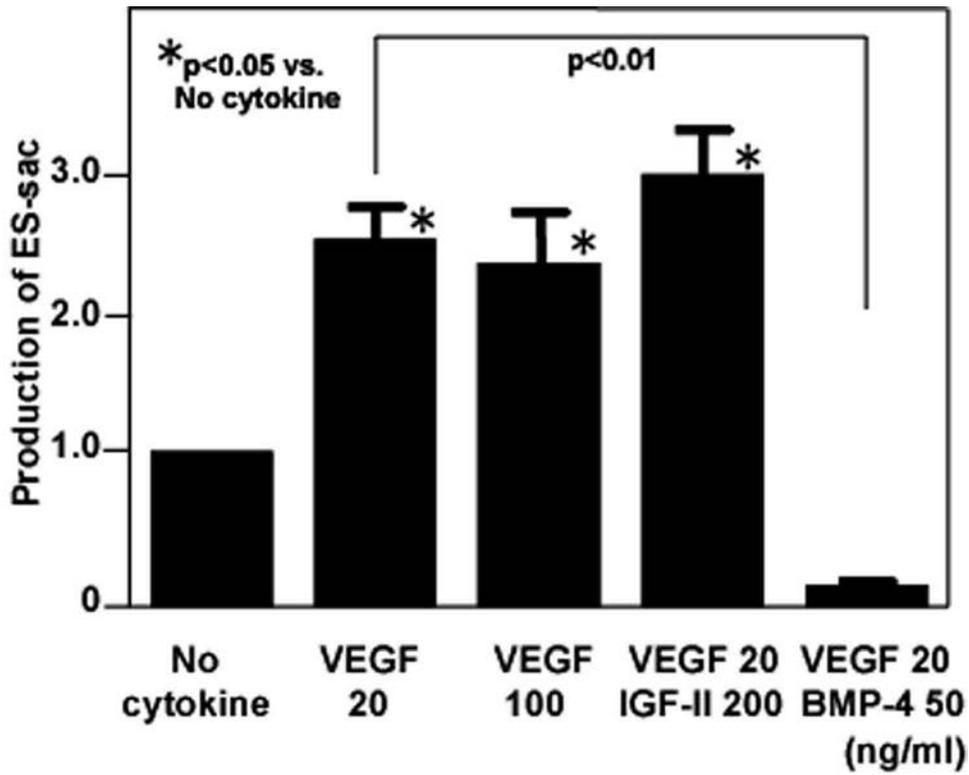
【図3】



【 図 4 】

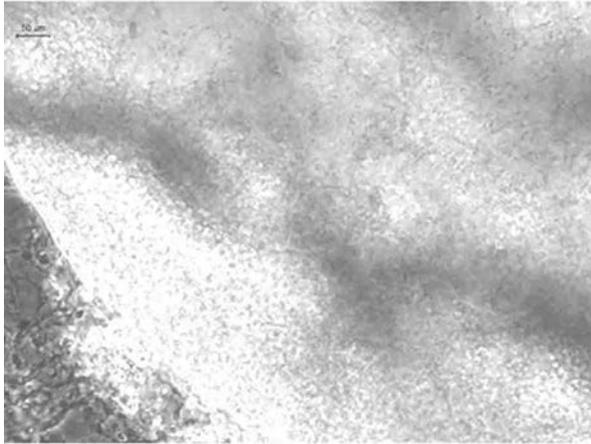


【 図 5 】

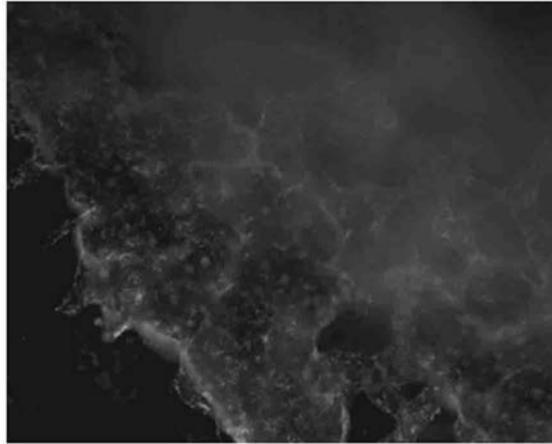


【 図 6 】

A Blight Feeld

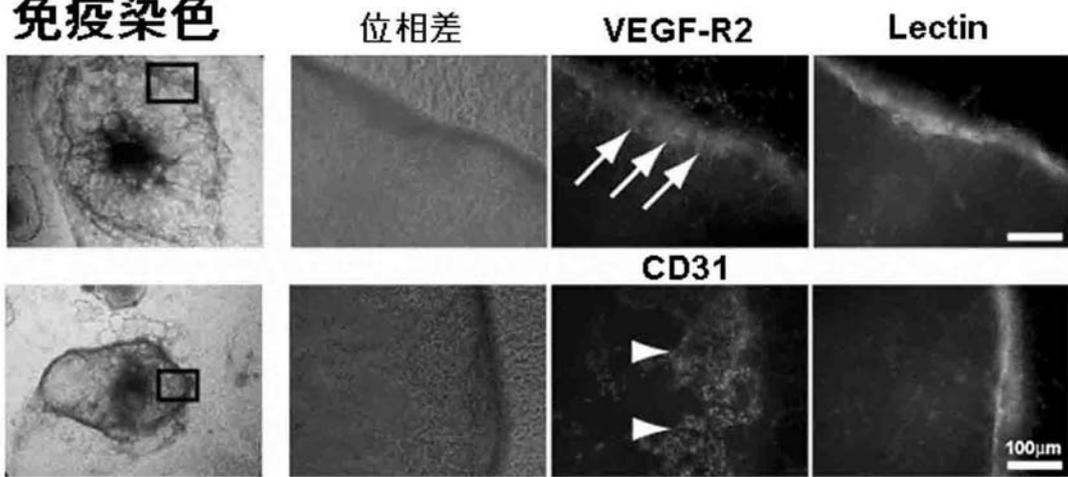


B anti-human Flk-1

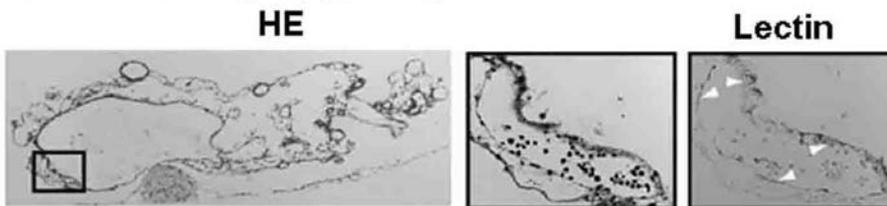


【 図 7 】

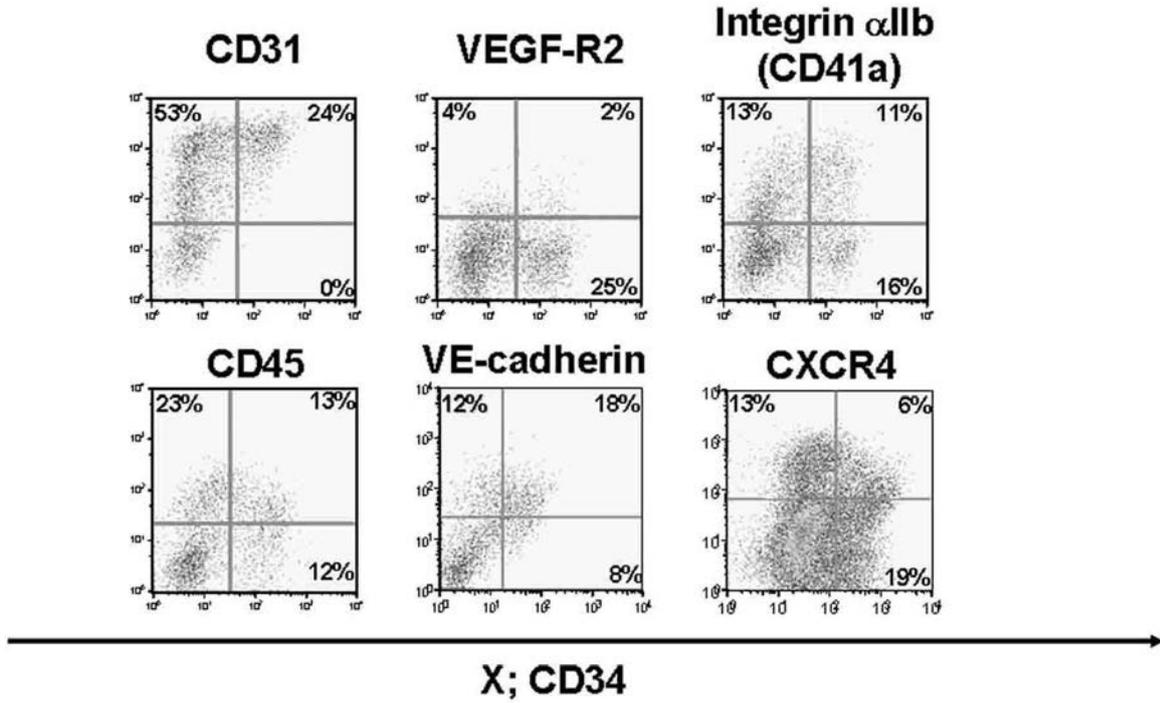
A. 免疫染色



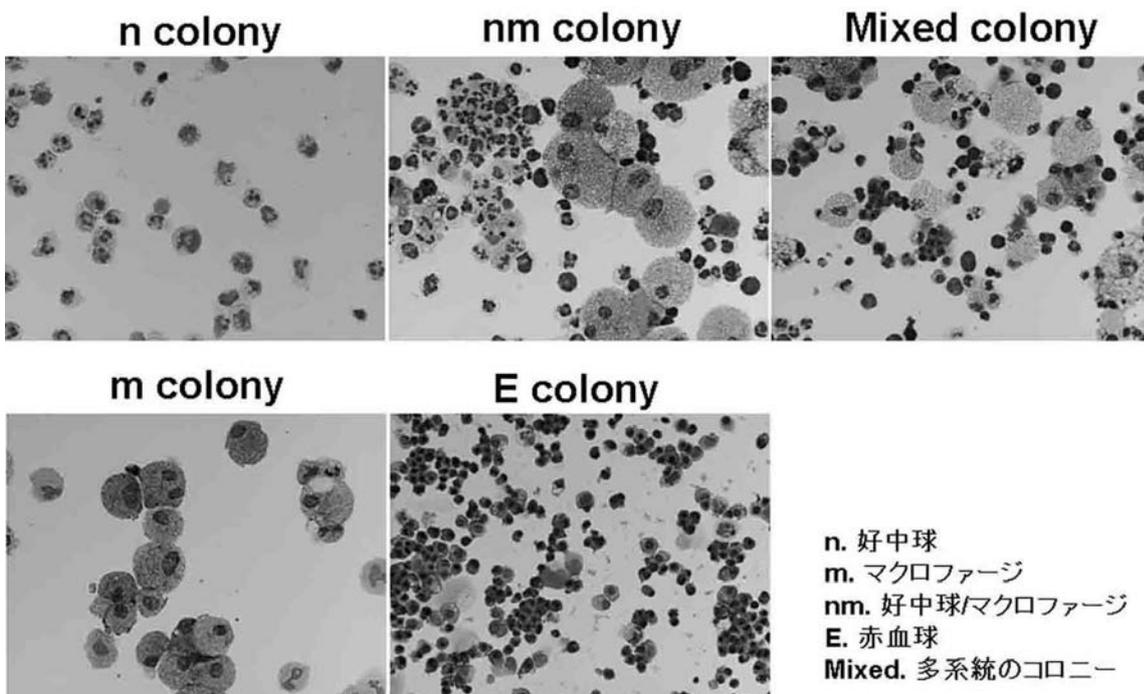
B. ホルマリン固定切片



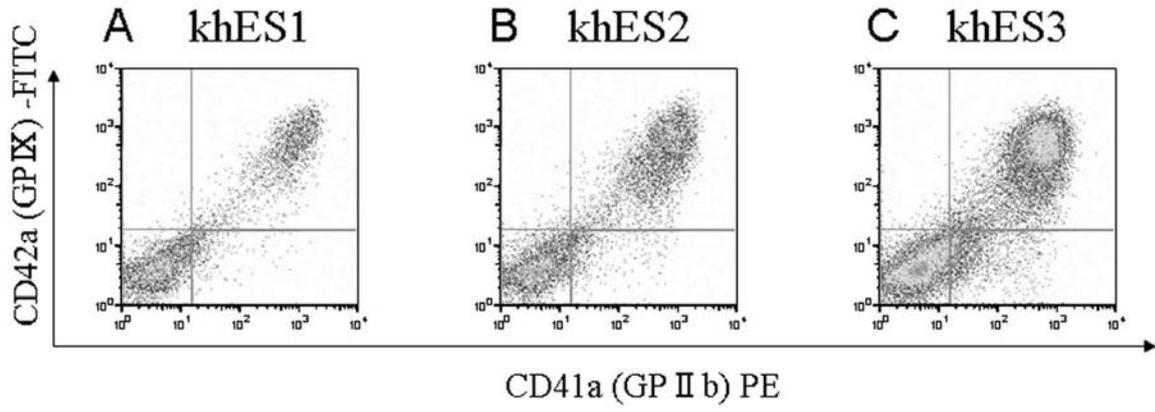
【 図 8 】



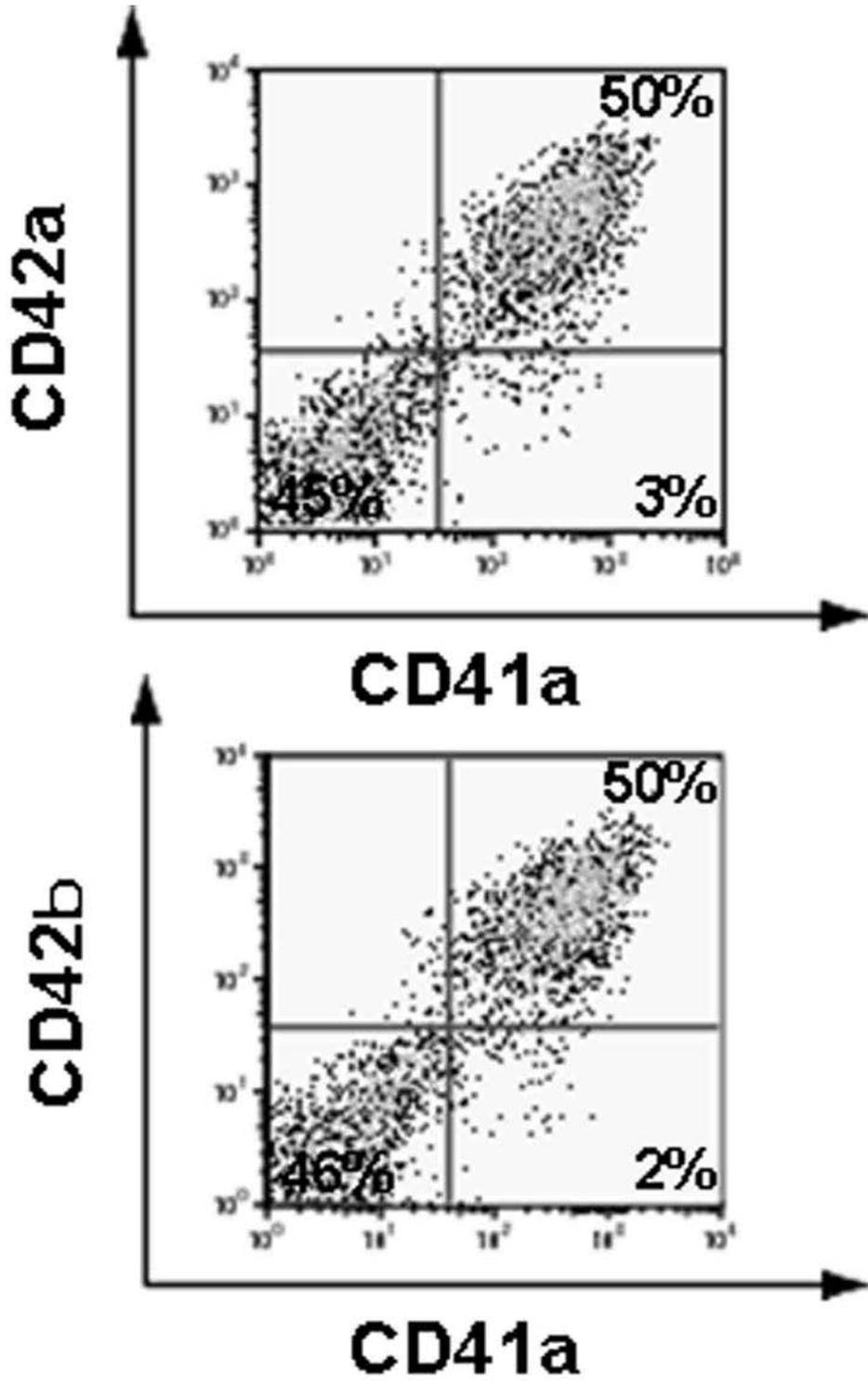
【 図 9 】



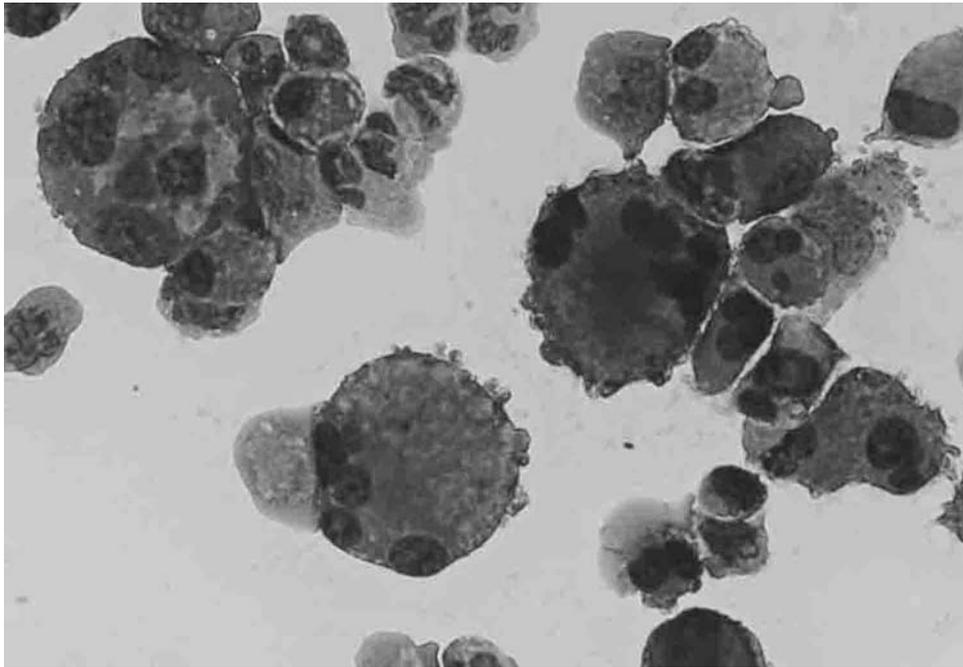
【 図 1 1 】



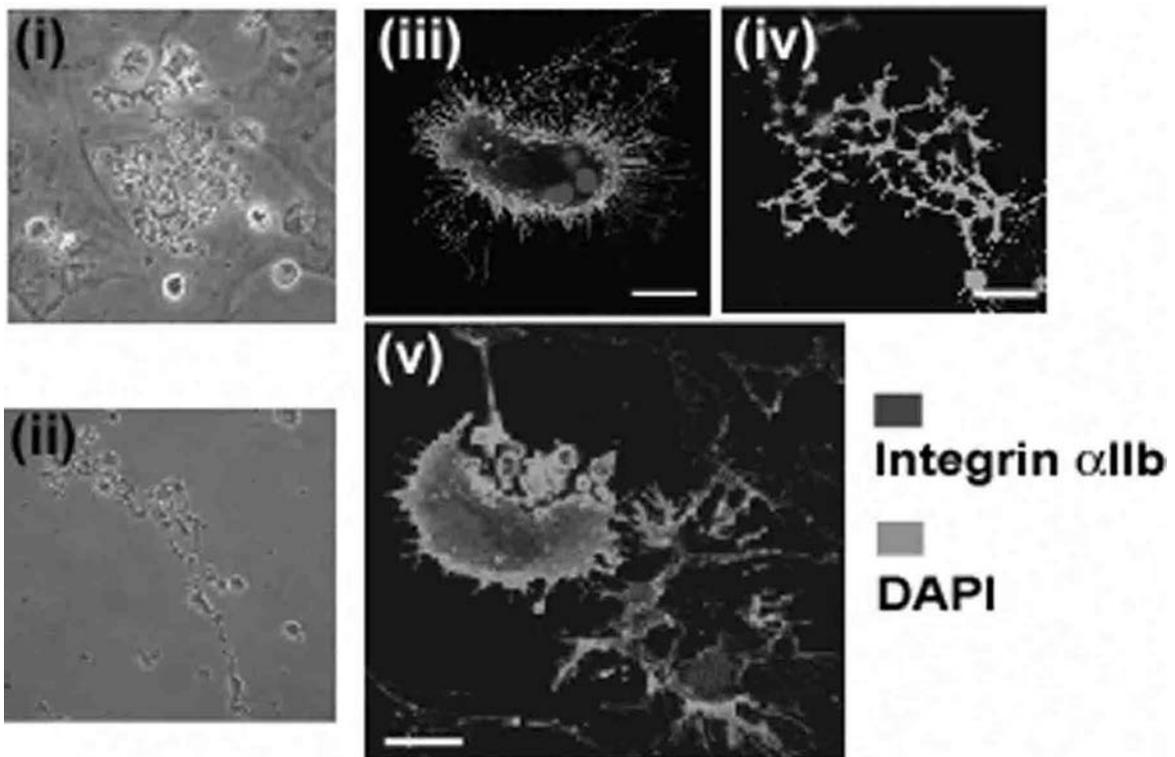
【 図 1 2 】



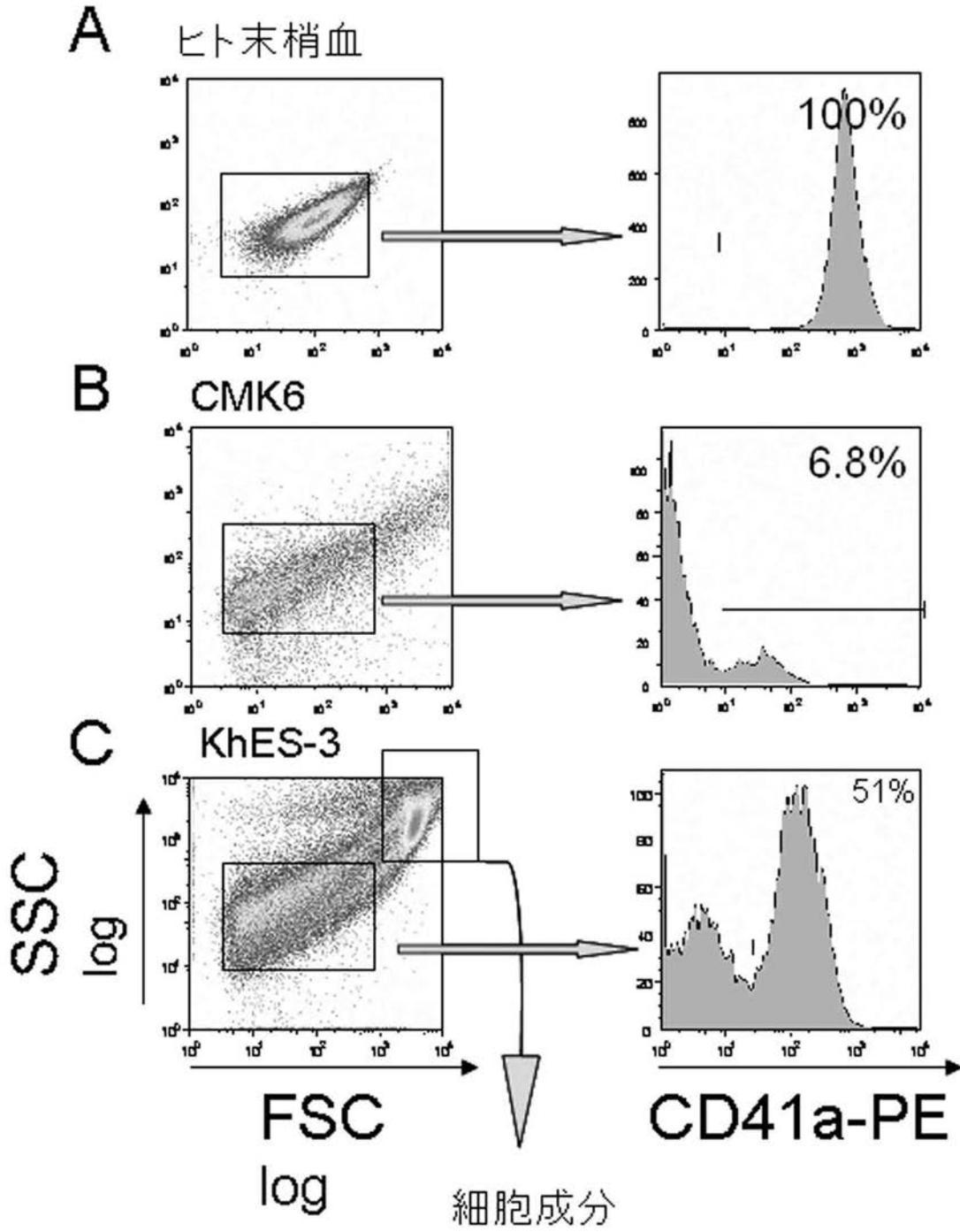
【 図 1 3 】



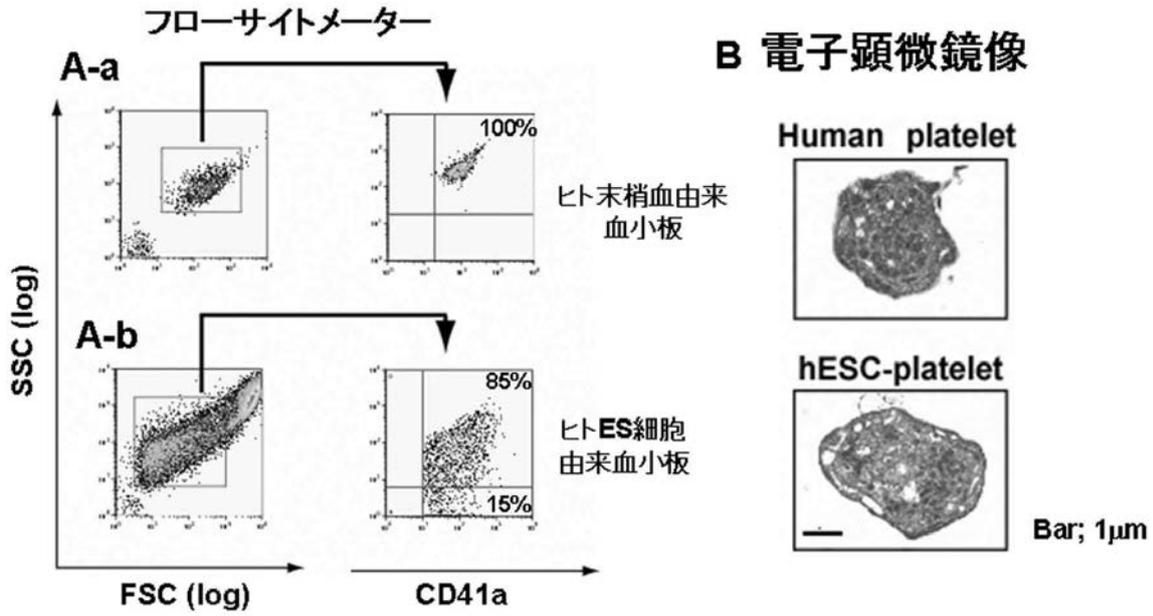
【 図 1 4 】



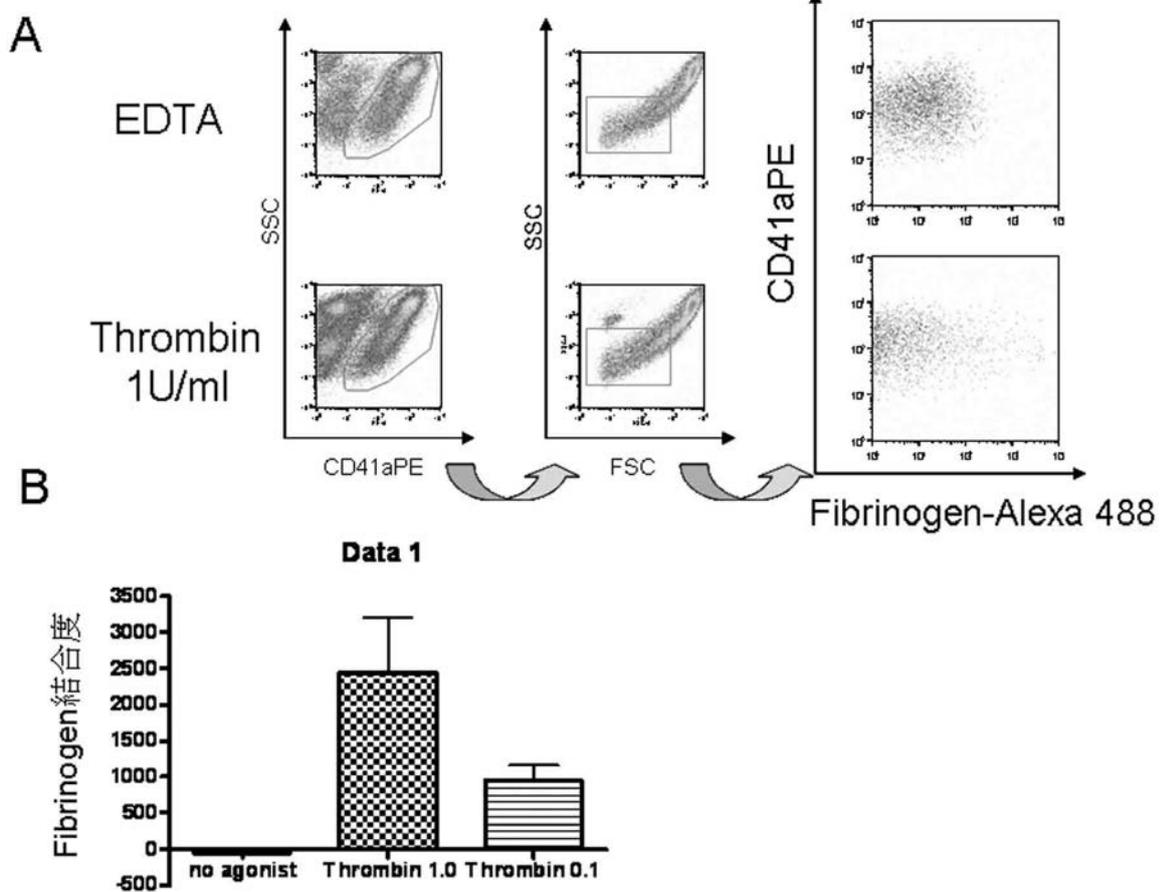
【図15】



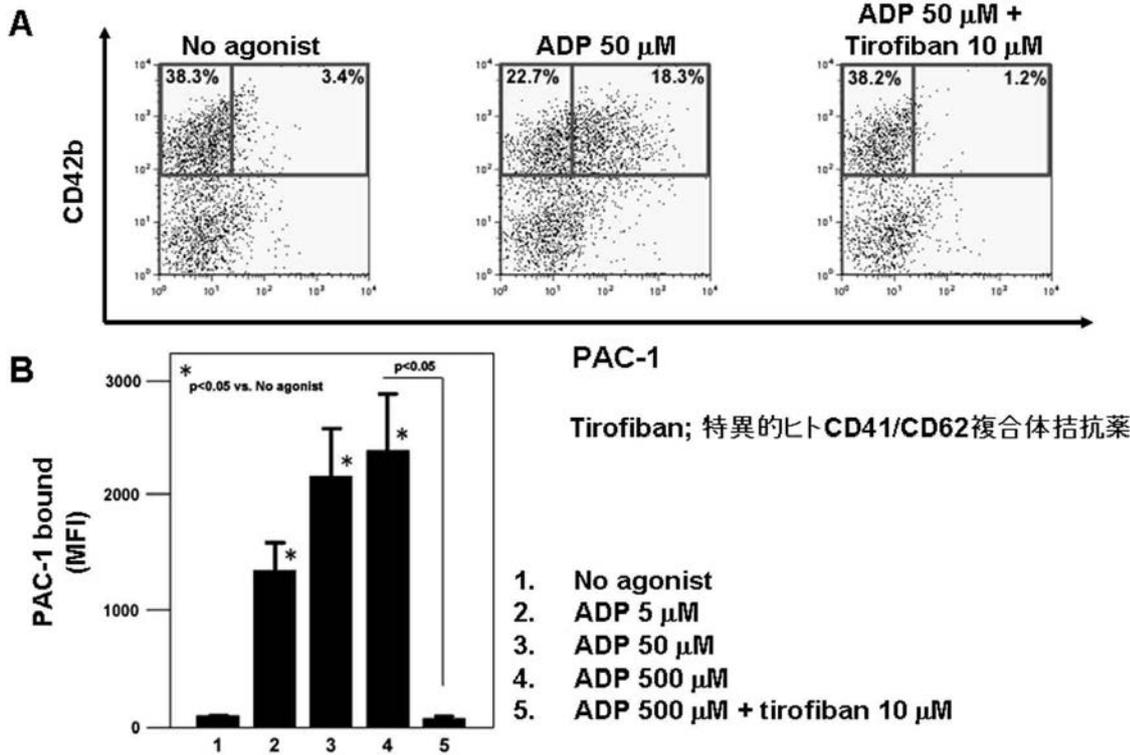
【 図 1 6 】



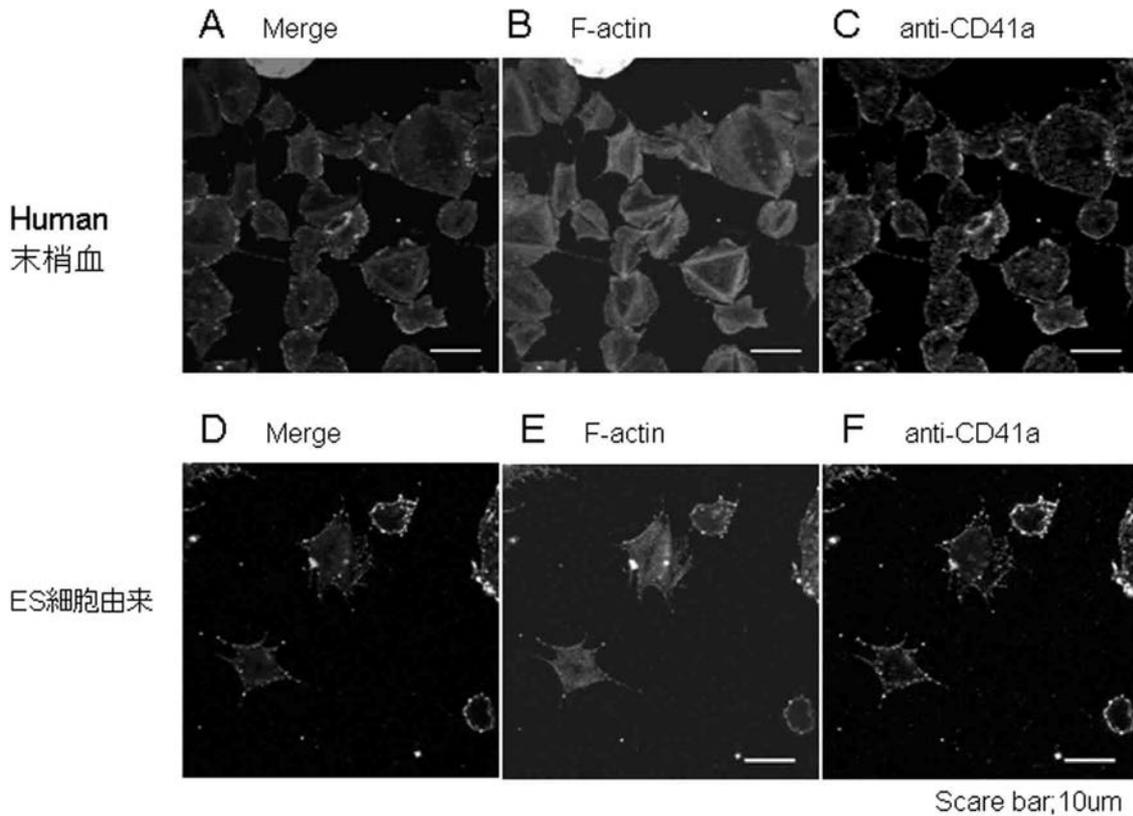
【 図 1 7 】



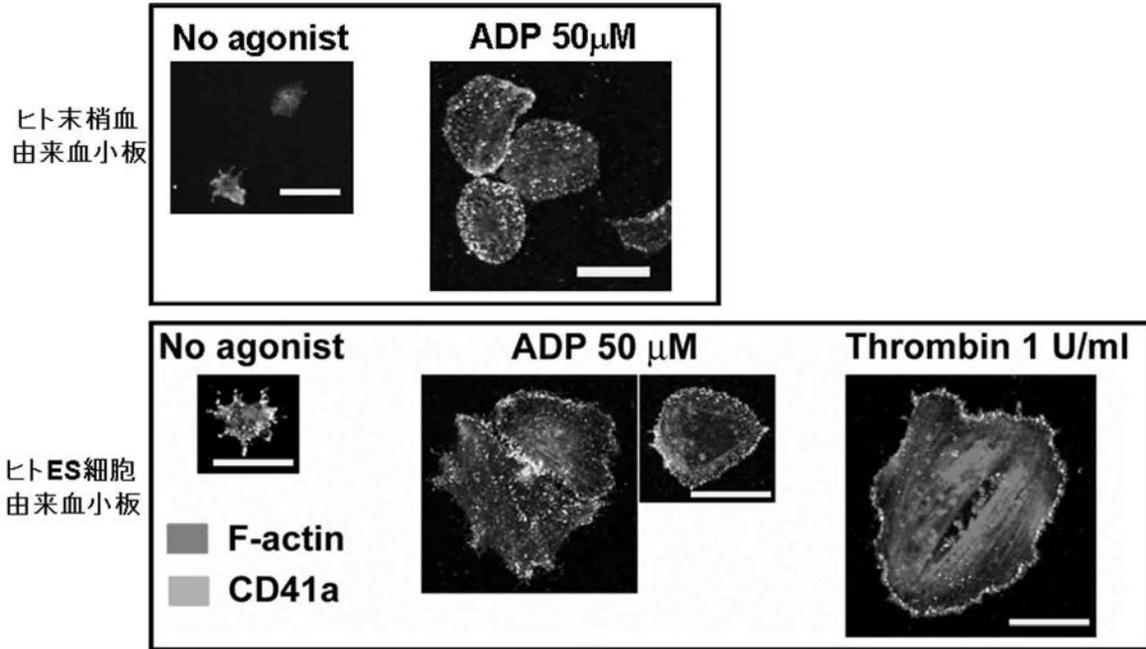
【 図 1 8 】



【 図 1 9 】



【 図 2 0 】



フロントページの続き

- (72)発明者 錦井 秀和
東京都文京区本郷七丁目3番1号 国立大学法人東京大学内
- (72)発明者 津久井 弘子
東京都文京区本郷七丁目3番1号 国立大学法人東京大学内

審査官 太田 雄三

- (56)参考文献 米国特許出願公開第2006/0099198 (US, A1)
国際公開第2006/020773 (WO, A1)
特表2005-511084 (JP, A)
国際公開第2005/019441 (WO, A1)
特開2005-287479 (JP, A)
Experimental Hematology, 2006年 6月, Vol. 34, No. 6, pp. 760-769
Journal of Chemotherapy, 2005年, Vol. 17, No. 3, pp. 302-308
上原記念生命科学財団研究報告集, 1999年, Vol. 13, pp. 89-91

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 5/071
CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)
PubMed
Cinii
WPIDS(STN)