

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(10) 国際公開番号

WO 2014/208100 A1

(43) 国際公開日

2014年12月31日(31.12.2014)

WIPO | PCT

- (51) 国際特許分類:
C12N 5/078 (2010.01) C12N 5/0775 (2010.01)
C07K 14/47 (2006.01) C12P 21/02 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2014/003445
- (22) 国際出願日: 2014年6月27日(27.06.2014)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2013-137004 2013年6月28日(28.06.2013) JP
特願 2013-137033 2013年6月28日(28.06.2013) JP
特願 2014-070058 2014年3月28日(28.03.2014) JP
- (71) 出願人: 学校法人慶應義塾(KEIO UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒1088345 東京都港区三田二丁目15番45号 Tokyo (JP). 公益財団法人神奈川科学技術アカデミー(KANAGAWA ACADEMY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY) [JP/JP]; 〒2130012 神奈川県川崎市高津区坂戸3丁目2番1号 Kanagawa (JP).
- (72) 発明者: 松原 由美子(MATSUBARA, Yumiko); 〒1608582 東京都新宿区信濃町35番地慶應義塾大学医学部内 Tokyo (JP). 座間 猛(ZAMA, Takeru); 〒1608582 東京都新宿区信濃町35番地慶應義塾大学医学部内 Tokyo (JP). 池田 康夫(IKEDA, Yasuo); 〒1608582 東京都新宿区信濃町35番地慶應義塾大学医学部内 Tokyo (JP). 宇留賀友佳子(URUGA, Yukako); 〒2130012 神奈川県川崎市高津区坂戸3丁目2番1号公益財団法人神奈川科学技術アカデミー内 Kanagawa (JP). 須田 年生(SUDA, Toshio); 〒1608582 東京都新宿区信濃町35番地慶應義塾大学医学部内 Tokyo (JP). 松岡佐保子(MATSUOKA, Sahoko); 〒2130012 神奈川県川崎市高津区坂戸3丁目2番1号公益財団法人神奈川科学技術アカデミー内 Kanagawa (JP).
- (74) 代理人: 廣田 雅紀(HIROTA, Masanori); 〒1070052 東京都港区赤坂二丁目2番19号アドレシビル6階 Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR,

[続葉有]

(54) Title: METHOD FOR PRODUCING MEGAKARYOCYTES, PLATELETS AND/OR THROMBOPOIETIN USING MESENCHYMAL CELLS

(54) 発明の名称: 間葉系細胞を利用した巨核球、血小板及び／又はトロンボポエチンの製造方法

(57) Abstract: Provided are: a method for producing megakaryocytes and/or platelets, with which it is possible to produce megakaryocytes and/or platelets in vitro from mesenchymal cells such as preadipocytes in a relatively short period of time, easily and in large quantities, and at lower cost and with greater efficiency; and a method for producing TPO easily and in large quantities. A first aspect of this invention is a method for producing megakaryocytes and/or platelets by culturing mesenchymal cells in a basal medium for mesenchymal cell culture that includes iron ions and an iron transporter, and collecting megakaryocytes and/or platelets from the culture. A second aspect of this invention is a method for producing thrombopoietin by culturing mesenchymal cells or megakaryocytes derived from mesenchymal cells in a basal medium for mesenchymal cell culture that includes iron ions and an iron transporter, and collecting thrombopoietin from the culture. A third aspect of this invention is a method for producing thrombopoietin by culturing preadipocytes in a basal medium for preadipocyte culture that includes dexamethasone, 3-isobutyl-1-methylxanthine and insulin, and collecting thrombopoietin from the culture.

(57) 要約: 脂肪前駆細胞等の間葉系細胞から巨核球及び／又は血小板を比較的短期間で簡便かつ多量に、しかもより低コスト或いはより効率的に生体外で製造し得る、巨核球及び／又は血小板の製造方法、および、TPOを簡便かつ多量に製造する方法を提供する。第1の本発明は、間葉系細胞を鉄イオン及び鉄輸送体を含む間葉系細胞培養用基本培地で培養し、培養物から巨核球及び／又は血小板を採取する、巨核球及び／又は血小板の製造方法である。第2の本発明は、間葉系細胞又は間葉系細胞由来の巨核球を鉄イオン及び鉄輸送体を含む間葉系細胞培養用基本培地で培養し、培養物からトロンボポエチンを採取する、トロンボポエチンの製造方法である。第3の本発明は、脂肪前駆細胞を、デキサメタゾン、3-イソブチル-1-メチルキサンチン及びインスリンを含む脂肪前駆細胞培養用基本培地で培養し、培養物からトロンボポエチンを採取する、トロンボポエチンの製造方法である。



WO 2014/208100 A1

GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT,
NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI
(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML,
MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

- 国際調査報告 (条約第 21 条(3))
- 明細書の別個の部分として表した配列リスト
(規則 5.2(a))

明 細 書

発明の名称：

間葉系細胞を利用した巨核球、血小板及び／又はトロンボポエチンの製造方法

技術分野

[0001] 本発明は、巨核球、血小板及び／又はトロンボポエチン（TPO）の製造方法に関し、より詳しくは、特定の細胞表面マーカープロファイルを有する間葉系細胞を鉄イオン及び鉄輸送体を含む培地で培養し、培養物から巨核球、血小板及び／又はTPOを採取する巨核球、血小板及び／又はTPOの製造方法等に関する。

背景技術

[0002] 血小板輸血は、事故に伴う出血や抗がん剤使用時などで起こる血小板減少の唯一の治療法であり、その際に用いられる血小板製剤は現在のところ善意の献血に100%依存している。血小板は非常に脆く、これまでに治療を目的とした血小板の長期保存を可能にする方法は存在しない。実際には、血小板の保管寿命は、最新の医療機関において4日間とされるが、検査ならびに出荷に要する時間を考慮すると、診療所を含む臨床現場での実質的な保管寿命は約3日とされる。このように、多くの血液バンクは常に、血小板を新鮮に維持し貯蔵する難点を抱えており、さらに、献血に依存する血小板製剤の供給量は、献血者の減少や、ウイルス感染症を患った献血者の増加による影響を受けやすい状況にある（非特許文献1、2）。

[0003] そこで、近年、このような問題を抱えた献血に代わる、新たな血小板供給源の開発が注目されている（非特許文献3）。例えば、体性幹細胞である造血幹細胞（臍帯血幹細胞）を利用して血小板を体外で大量に生産する技術開発がある。しかしながら、造血幹細胞自体を体外で増幅する方法が未だ確立されていないことから実用化には至っていない。一方、多能性幹細胞である胚性幹（ES）細胞は、体外で無限に増殖させることができるという利点が

あり、血小板を含む血液細胞を産生する供給源として注目されてきた。この点については、ヒトES細胞から成熟巨核球及び血小板を産生する技術が既に報告されている（非特許文献4、5）。しかし、この方法では血小板の産生効率が悪く、1回の輸血製剤をつくるのに、シャーレが何万枚も必要となるなど、実用性は不十分であった。

[0004] 血小板の輸血においては、血小板輸血不応が問題点としてあげられる。輸血初回時は、患者のものと異なるヒト白血球抗原（HLA）を有する血小板を使用できるが、輸血を繰り返すことで患者体内にこのHLAに対する特異的抗体が産生され、その結果、輸血した血小板が迅速に拒絶される。あるいは、血小板は独自の血液型であるヒト同種抗原（HPA）も有しており、この適合型の相違による輸血不応も認められる。この点の問題を解消し得る技術として、ヒト人工多能性幹（iPS）細胞から巨核球及び血小板を産生する技術が報告されている（非特許文献6、7）。例えば、患者由来のiPS細胞を用いて血小板を誘導すれば、理論上、拒絶を受けることのないオーダーメイドの血小板製剤を調製することが可能となる。しかし、iPS細胞からの血小板産生は線維芽細胞から血小板産生に至るまでに約50日も要するため（非特許文献6、7）、実用性は不十分であった。一方、線維芽細胞からダイレクトリプログラミングと呼ばれる手法により血小板を産生させる方法が知られている（非特許文献8）。この手法によれば、iPS細胞を経由させる方法よりも、血小板産生に至るまでの期間を大幅に短縮することができ、約14日で血小板産生に至るという利点を持つ。しかしながら、線維芽細胞を用いたダイレクトリプログラミングには遺伝子導入が必要であり、遺伝子導入用ベクターの混在による安全性への影響が懸念される。

[0005] ところで、造血幹細胞を巨核球、血小板へと分化誘導し得る培地として、MKL1培地（megakaryocyte lineage induction medium）が知られている。該MKL1培地は、イスコフ改変ダルベッコ培地（IMDM）に、2mM L-グルタミン、100U/mL ペニシリン-ストレプトマイシン溶液、0.5%ウシ血清アルブミン、4 μ g/mL LDLコレステロール、200 μ

g/mL 鉄飽和トランスフェリン（鉄結合型トランスフェリン）、 $10\ \mu\text{g/mL}$ インスリン、 $50\ \mu\text{M}$ 2- β -メルカプトエタノール、ヌクレオチド（ATP、UTP、GTP及びCTPを各 $20\ \mu\text{M}$ ）、及び $50\ \text{ng/mL}$ トロンボポエチン（thrombopoietin: TPO）を添加した培地である（非特許文献9）。本発明者らはこれまでに、造血幹細胞以外の細胞から巨核球、血小板へと分化誘導する技術について研究を進めており、上記MKL1培地にて、ヒトの皮下脂肪組織由来の脂肪前駆細胞（非特許文献9、10）や、マウス由来の脂肪前駆細胞（非特許文献9、11）を培養すると巨核球、血小板へと分化し得ることを見いだしている。脂肪前駆細胞を用いたこれらの方法では、生体外で血小板を比較的短期間で効率よく産生することができ、しかも、遺伝子導入を必要としないため、患者に投与した際の安全性にも優れている。しかし、より低コスト或いはより効率的に、巨核球や血小板を作製する方法が求められていた。

[0006] 血小板は、生体の止血において主要な役割を果たす血液有形成分の一つである。異常な血小板凝集塊の形成は、血栓性疾患の原因となり、さらに癌の転移や増殖にも血小板が関与しており、広い範囲においてその役割が近年注目されるようになってきている。血小板は、骨髄中の造血幹細胞が巨核球系前駆細胞を経て巨核芽球となり、さらに成熟し巨核球となった後、この巨核球の細胞質が数千個にちぎれて血液中に放出されたものである。骨髄中の造血幹細胞から巨核球コロニーを形成させるには、異なった作用をもつ2種類の因子が必要であると考えられてきた（非特許文献12）。すなわち、単独でコロニー形成を支持するM_eg-C_SFと、単独ではコロニー形成を支持する活性はないがM_eg-C_SF共存下で巨核球成熟を促進するM_eg-P_OTである。ヒトではM_eg-C_SF活性を有するものとしてIL-3（非特許文献13）やGM-C_SF（非特許文献14）などが知られている。また、ヒトでM_eg-P_OT活性を有するものとしては、IL-6（非特許文献15）、IL-11（非特許文献16）、LIF（非特許文献17）などが知られている。

[0007] しかし、これらはいずれも巨核球・血小板系に特異的な因子ではなく、むしろ他の血球系や血球以外の細胞にも作用を有することが知られている。したがって、これらのものを医薬品として巨核球、血小板系への作用を期待して投与した場合、それとは別の作用をも発現してしまうことが危惧される。このようなことから、巨核球・血小板系に特異的に作用し、医薬品としての有用性の高い生理活性物質が強く望まれている。この巨核球、血小板系に特異的に作用する因子として、ヒトc-MPL受容体のリガンドであるTPOの遺伝子がクローニングされた（非特許文献18）。c-MPLは、造血幹細胞や巨核球系の細胞に発現している糖蛋白質であり、サイトカイン受容体遺伝子ファミリーに属し、血小板造血に関与する新規因子の受容体として血小板造血に深く係わっていることが示唆されていた。クローニングされたTPOは、Meg-CSF活性とMeg-POT活性を併せもち、巨核球-血小板系に特異的な因子である。

[0008] TPOは、血小板産生の重要な調節因子であり、血小板を産生する巨核球の成長及び巨核球からの血小板の産生を刺激する（非特許文献19）。TPOは、肝臓において353アミノ酸の前駆タンパク質として合成され、21アミノ酸のシグナルペプチドが切断されて成熟分子となる。その成熟分子は、エリスロポエチンと相同性の高い2つのドメインと、そのタンパク質の安定性に重要な高度にグリコシル化されたカルボキシ末端より構成される（非特許文献20）。TPOは、免疫性血小板減少性紫斑病（ITP）の患者では上昇がみられない（非特許文献21）。血小板多増葉開発に向けTPOの大量生成及び精製の必要性が唱えられていたが、主たるTPO産生細胞である肝細胞からのTPO産生は恒常的であり、その産生量はきわめて少なく内因性のTPO精製物質の大量供給には至らなかった。

[0009] そこで、組換えTPOについて研究が進められ、これまでに、2種類の組換えTPOが大規模な臨床試験に用いられた。1つは、天然のTPOと同じ全長アミノ酸配列を有するグリコシル化分子である組換えヒトTPO（rHuTPOともrHTPOとも表示される。）であり、もう1つは、天然のT

POの生物活性ドメインに相当する1-163アミノ酸を含む非グリコシル化分子であるポリエチレングリコール(PEG)結合組換えヒト巨核球成長及び発達因子(PEG-rHuMGDF)である(非特許文献19、20、22)。両組換えTPOは、ヒトにおける血小板産生の強力な刺激物質であり、化学療法に起因する血小板減少症を軽減する能力を有し、血小板輸血の必要性を減少させ得る点で有益ではある(非特許文献23、24)。しかしながら、全長の組換えヒトTPO(rHuTPO)の発現が培養細胞を用いて試みられたが、糖鎖修飾が内因性TPOと異なっており、血小板産生を誘導・促進する能力を有するTPOをこのような方法で製造する技術は未だ確立されていない。また、PEG-rHuMDGFは、過去10年間に行われた臨床研究において、内生のTPOと交差反応する抗体を誘導することが判明し、健常人の4%及び集中的な化学療法を受けた癌患者の0.6%において血小板減少症を誘発した(非特許文献22)。

[0010] このような技術状況下において、肝細胞を用いたTPOの製造や、前述の問題点のない組換えTPOの製造等、実用的なTPOの製造技術が求められている。

[0011] ところで、造血幹細胞を巨核球、血小板へと分化誘導し得る培地として、MKL1培地(megakaryocyte lineage induction medium)が知られている。該MKL1培地は、イスコフ改変ダルベッコ培地(IMDM)に、2mM L-グルタミン、100U/mL ペニシリン-ストレプトマイシン溶液、0.5%ウシ血清アルブミン、4 μ g/mL LDLコレステロール、200 μ g/mL 鉄飽和トランスフェリン(鉄結合型トランスフェリン)、10 μ g/mL インスリン、50 μ M 2- β -メルカプトエタノール、ヌクレオチド(ATP、UTP、GTP及びCTPを各20 μ M)、及び50ng/mL TPOを添加した培地である(非特許文献9)。本発明者らはこれまでに、造血幹細胞以外の細胞から巨核球、血小板へと分化誘導する技術について研究を進めており、上記MKL1培地にて、ヒトの皮下脂肪組織由来の脂肪前駆細胞(非特許文献9、10)や、マウス由来の脂肪前駆細胞(非特許文

献9、11)を培養すると巨核球、血小板へと分化し得ることを見いだしている。しかし、脂肪前駆細胞等の間葉系細胞や、間葉系細胞由来の巨核球が、血小板分化誘導能を有するTPOを産生するという報告はこれまでになされていない。

[0012] また、デキサメタゾン、3-イソブチル-1-メチルキサンチン、インスリン及びインドメタシンを含む培養培地で脂肪前駆細胞を培養すると、脂肪細胞への分化誘導生じることは知られていた(非特許文献25)。しかし、TPOは肝臓細胞にて産生されるとされており、TPOが脂肪前駆細胞から脂肪細胞へ分化する過程で産生されることは知られていなかった。

[0013] なお、後述の本発明において利用する細胞表面マーカーに関しては、以下のようなことが知られている。CD31は、血管内皮細胞などで発現して、細胞間の接着に関与している。c-MPL(Myeloproliferative leukemia protein)は、血小板を産生する巨核球の分化・増殖作用を有するトロンボポエチンの受容体である。c-MPLは、血小板、巨核球の他、赤芽球に発現している。CD71は、II型膜糖タンパクであり、トランスフェリン受容体として知られている。CD71は、活性化T細胞や活性化B細胞の他、マクロファージ、並びにすべての増殖細胞で発現している。

先行技術文献

非特許文献

[0014] 非特許文献1: Stroncek DF, Rebull P. Platelet transfusions. *Lancet*. 2007;370 (9585): 427-438.

非特許文献2: Freireich EJ. Origins of platelet transfusion therapy. *Transfus Med Rev*. 2011; 25 (3): 252-256.

非特許文献3: Reems JA, Pineault N, Sun S. In vitro megakaryocyte production and platelet biogenesis: state of the art. *Transfus Med Rev*. 2010; 24 (1): 33-43.

非特許文献4: Gaur M, Kamata T, Wang S, et al. Megakaryocytes derived from human embryonic stem cells: a genetically tractable system to st

udy megakaryocytopoiesis and integrin function. *J Thromb Haemost.* 2006; 4 (2): 436-442.

非特許文献5: Takayama N, Nishikii H, Usui J, et al. Generation of functional platelets from human embryonic stem cells in vitro via ES-sacs, VEGF-promoted structures that concentrate hematopoietic progenitors. *Blood.* 2008; 111 (11): 5298-5306.

非特許文献6: 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.

非特許文献7: 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 Feb 12. pii: S1934-5909(14)00012-5. doi: 10.1016/j.stem.2014.01.011.

非特許文献8: Ono Y, Wang Y, Suzuki H, et al. Induction of functional platelets from mouse and human fibroblasts by p45NF-E2/Maf. *Blood.* 2012; 120: 3812-3821.

非特許文献9: Matsubara Y, Murata M, Ikeda Y. Culture of megakaryocytes and platelets from subcutaneous adipose tissue and a preadipocyte cell line. *Methods Mol Biol.* 2012; 788: 249-258.

非特許文献10: Matsubara Y, Saito E, Suzuki H, Watanabe N, Murata M, et al. Generation of megakaryocytes and platelets from human subcutaneous adipose tissues. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009; 378: 716-720.

非特許文献11: Matsubara Y, Suzuki H, Ikeda Y, Murata M. Generation of megakaryocytes and platelets from preadipocyte cell line 3T3-L1, but not the parent cell line 3T3, in vitro. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010; 402: 796-800.

非特許文献12: Williams, N. et al. *J Cell Physiol* 1982; 110, 101-104.

非特許文献13 : Teramura, M. et al. *Exp Hematol* 1988; 16, 843-848.

非特許文献14 : Teramura, M. et al. *Exp Hematol* 1989; 17, 1011-1016.

非特許文献15 : Teramura, M. & Mizoguchi, H. *Int J Cell Cloning* 1990; 8, 245-252.

非特許文献16 : Teramura, M. et al. *Blood* 1992; 79, 327-331.

非特許文献17 : Burstein, S.A. et al. *Blood* 1990; 76, 450a.

非特許文献18 : de Sauvage, et al. *Nature* 1994; 369, 533-538.

非特許文献19 : Kaushansky K. *Thrombopoietin*. *N Engl J Med* 1998; 339:746-754.

非特許文献20 : Kuter DJ, and Begley CG. *Recombinant human thrombopoietin: basic biology and evaluation of clinical studies*. *Blood* 2002; 100:3457-3469.

非特許文献21 : Kappers-Klunne MC, de Haan M, Struijk PC et al. *Serum thrombopoietin levels in relation to disease status in patients with immune thrombocytopenic purpura*. *Br J Haematol* 2001; 115:1004-1006.

非特許文献22 : Kuter DJ. *Future directions with platelet growth factors*. *Semin Hematol* 2000; 37:41-49.

非特許文献23 : Vadhan-Raj S, Verschraegen CF, Bueso-Ramos C et al. *Recombinant human thrombopoietin attenuates carboplatin-induced severe thrombocytopenia and the need for platelet transfusions in patients with gynecologic cancer*. *Ann Intern Med* 2000; 132:364-368.

非特許文献24 : Vadhan-Raj S, Patel S, Bueso-Ramos C et al. *Importance of predosing of recombinant human thrombopoietin to reduce chemotherapy-induced early thrombocytopenia*. *J Clin Oncol* 2003; 21:3158-3167.

非特許文献25 : Shahdadfar A1, Fronsdal K, Haug T, Reinholt FP, Brinckmann JE. *In vitro expansion of human mesenchymal stem cells: choice of serum is a determinant of cell proliferation, differentiation, gene expression, and transcriptome stability*. *Stem Cells*. 2005:1357-66.

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0015] 第1の本発明の課題は、脂肪前駆細胞等の間葉系細胞から、血小板産生能を有する巨核球及び／又は血栓形成能を有する血小板を、比較的短時間で簡便かつ多量に、しかもより低コスト或いはより効率的に生体外で製造し得る、より実用的な巨核球及び／又は血小板の製造方法を提供することにある。また、第2や第3の本発明の別の課題は、血小板産生を誘導・促進する能力を有するTPOを、簡便かつ多量に製造する方法を提供することや、副作用がより少ないより実用的なTPOを製造する方法を提供することにある。

課題を解決するための手段

[0016] まず、第1の本発明の課題を解決するための手段について以下に記載する。脂肪前駆細胞から巨核球、血小板へ分化誘導する場合にも、造血幹細胞から巨核球、血小板へ分化誘導する場合と同様に、TPOが必須であると考えられていた。このような状況下で、本発明者らは、巨核球、血小板への分化誘導培地として知られるMKL1培地からTPOを除いた培地で、脂肪前駆細胞の培養を行ったところ、予想に反して巨核球、血小板への分化誘導が起こることを見いだした。本発明者らは研究を進め、MKL1培地からTPO、ウシ血清アルブミン(BSA)、LDLコレステロール、鉄結合型トランスフェリン、インスリン及び2-β-メルカプトエタノールの6成分を除いた培地(本発明における間葉系細胞培養用基本培地の1種)に、TPO以外の5成分のうち1成分ずつを添加した計5種類の培地で脂肪前駆細胞の培養を行ったところ、本発明者らは、基本培地に鉄結合型トランスフェリンを添加した培地を用いた場合にのみ、巨核球や血小板への産生が示されることを見いだした。

[0017] 本発明者らは、さらに、トランスフェリンの受容体であるCD71をsiRNAでノックダウンしたところ、CD41(巨核球及び血小板の特異的マーカー)陽性細胞の割合(%)の減少を認め、巨核球や血小板の産生が抑制されることを見いだした。また、本発明者らは、MKL1培地からTPO、

B S A、L D L コレステロール、インスリン及び2-β-メルカプトエタノールを除き、そこに鉄結合型トランスフェリンを添加した培地（“基本培地+鉄結合型トランスフェリン”）において、鉄結合型トランスフェリンの濃度を変動させて、脂肪前駆細胞からの巨核球や血小板の産生を調べたところ、従来のM K L 1培地における鉄結合型トランスフェリンの濃度である200 μg/mLよりも該濃度が低くても、200 μg/mLの場合と同程度の巨核球や血小板が産生され得ることを見いだした。加えて、本発明者らは、鉄結合型トランスフェリンを添加した基本培地に、鉄キレート剤又はアポトランスフェリン（鉄と結合していないトランスフェリン）を添加して脂肪前駆細胞を培養したところ、鉄キレート剤やアポトランスフェリンの添加量依存的に巨核球や血小板の減少が認められることを見いだした。また、本発明者らは、脂肪前駆細胞由来の血小板と、造血幹細胞由来の血小板との血栓形成能を比較したところ、脂肪前駆細胞由来の血小板は、造血幹細胞由来の血小板に対して、血栓形成に寄与した血小板数の割合が有意に高いことを見いだした。

[0018] これらのことから、本発明者らは、脂肪前駆細胞等の間葉系細胞から巨核球や血小板を産生させるには、鉄イオン及び鉄輸送体がきわめて重要であり、これらのうち、少なくとも鉄イオンは必須であることを見いだした。

[0019] 本発明者らは、脂肪前駆細胞等の間葉系細胞から巨核球や血小板をより効率的に製造する方法についてさらに研究を進めたところ、該間葉系細胞の中でも、特定の細胞表面マーカープロファイルを有する間葉系細胞、すなわち、C D 3 1 陰性かつC D 7 1 陽性の間葉系細胞、好ましくはさらにc-M P L 陽性の間葉系細胞が、より高い効率で巨核球や血小板に分化し得ることを見いだした。

[0020] 以上のことから、本発明者らは、第1の本発明を完成するに至った。

[0021] 次に、第2の本発明の課題を解決するための手段について以下に記載する。脂肪前駆細胞から巨核球、血小板へ分化誘導する場合にも、造血幹細胞から巨核球、血小板へ分化誘導する場合と同様に、T P Oが必須であると考え

られていた。このような状況下で、本発明者らは、巨核球、血小板への分化誘導培地として知られるMKL I培地からTPOを除いた培地（“MKL I培地 TPO-”）で脂肪前駆細胞を培養して得られた培養物の培養上清にて、造血幹細胞の培養を行ったところ、予想に反して巨核球・血小板への分化誘導が起こることを見いだした。また、本発明者らは、脂肪前駆細胞を“MKL I培地 TPO-”で培養して得られた培養物の培養上清中にTPOが存在するか否かを調べたところ、培養上清中にTPOが比較的高い濃度で存在していることを見いだした。さらに、本発明者らは、トランスフェリンの受容体であるCD71をsiRNAでノックダウンしたところ、CD71をノックダウンするとTPOの産生が抑制されることを見いだした。また、本発明者らは、MKL I培地からTPO、ウシ血清アルブミン（BSA）、LDLコレステロール、インスリン及び2-β-メルカプトエタノールを除き、そこに鉄結合型トランスフェリンを添加した培地（“基本培地+トランスフェリン”）と、MKL I培地からTPOを除いた“MKL I培地 TPO-”を用いて、脂肪前駆細胞を培養した際のTPOの濃度の推移を調べたところ、“基本培地+トランスフェリン”を用いた場合の方が、TPOの産生が持続的になり得ることを見いだした。さらに本発明者らは、“基本培地+トランスフェリン”において、鉄結合型トランスフェリンの濃度を変動させて、脂肪前駆細胞からのTPOの産生を調べたところ、従来のMKL I培地における鉄結合型トランスフェリンの濃度である200 μg/mLよりも該濃度が低くても、200 μg/mLの場合と同程度あるいはそれを上回る濃度のTPOが産生され得ることを見いだした。加えて、本発明者らは、初代培養の脂肪前駆細胞や、株化した間葉系幹細胞、間質細胞、脂肪前駆細胞について、TPO mRNAの発現を調べたところ、いずれにおいてもTPO mRNAが発現していることを見いだした。

[0022] 以上のことから、本発明者らは、第2の本発明を完成するに至った。

[0023] 次に、第3の本発明の課題を解決するための手段について以下に記載する。デキサメタゾン、3-イソブチル-1-メチルキサンチン及びインスリン

を含む培養培地で脂肪前駆細胞を培養すると、脂肪細胞への分化誘導生じることは知られていた。しかし、TPOは肝臓細胞にて産生されるとされており、TPOが脂肪前駆細胞から脂肪細胞へ分化する過程で産生されることは知られていなかった。本発明者らは、上記第1や第2の本発明についてさらに検討していく中で、脂肪前駆細胞を巨核球や血小板に分化誘導する場合だけでなく、脂肪前駆細胞を脂肪細胞に分化誘導する場合にもTPOが産生されることを偶然見いだした。このことは、当業者にとって予想できない意外な事実であった。

[0024] 以上のことから、本発明者らは、第3の本発明を完成するに至った。

[0025] すなわち、本発明は、

(1) 間葉系細胞を、鉄イオン及び鉄輸送体を含む間葉系細胞培養用基本培地で培養し、培養物から巨核球及び／又は血小板を採取することを特徴とする巨核球及び／又は血小板の製造方法や、

(2) 間葉系細胞又は間葉系細胞由来の巨核球を、鉄イオン及び鉄輸送体を含む間葉系細胞培養用基本培地で培養し、培養物からトロンボポエチンを採取することを特徴とするトロンボポエチンの製造方法や、

(3) 間葉系細胞が、CD31陰性かつCD71陽性の間葉系細胞であることを特徴とする上記(1)又は(2)に記載の製造方法や、

(4) CD31陰性かつCD71陽性の間葉系細胞が、さらにc-MPL陽性であることを特徴とする上記(1)～(3)のいずれかに記載の製造方法や、

(5) 鉄輸送体が、トランスフェリンであることを特徴とする上記(1)～

(4)のいずれかに記載の製造方法や、

(6) 鉄イオン及び鉄輸送体が、鉄結合型トランスフェリンであることを特徴とする上記(1)～(5)のいずれかに記載の製造方法や、

(7) 5～17日間培養することを特徴とする上記(1)及び(3)～(6)のいずれかに記載の製造方法や、

(8) 4～7日間培養することを特徴とする上記(2)～(6)のいずれか

に記載の製造方法や、

(9) 巨核球及び／又は血小板の収率が、270～1080%であることを特徴とする上記(1)及び(3)～(7)のいずれかに記載の製造方法や、

(10) 血小板が、血栓形成能解析により測定した、血栓形成に寄与した血小板数の割合が70%～85%であることを特徴とする上記(1)、(3)～(7)及び(9)のいずれかに記載の製造方法や、

(11) TPOの収量が、培地1mL当たり、30pg～100pgであることを特徴とする上記(2)～(6)及び(8)のいずれかに記載の製造方法や、

(12) さらに、培養物から巨核球及び／又は血小板を精製する工程を有することを特徴とする上記(1)、(3)～(7)、(9)及び(10)のいずれかに記載の製造方法や、

(13) さらに、培養物からTPOを精製する工程を有することを特徴とする上記(2)～(6)、(8)及び(11)のいずれかに記載の製造方法からなる。

[0026] また、本発明は、

(14) 上記(1)、(3)～(7)、(9)、(10)及び(12)のいずれかに記載の製造方法により製造される巨核球及び／又は血小板や、

(15) 上記(2)～(6)、(8)、(11)及び(13)のいずれかに記載の製造方法により製造されるTPOからなる。

[0027] さらに、本発明は、

(16) 以下の工程a)～c)を備えた巨核球及び／又は血小板バンク構築方法；

a) HLAタイプ及び／又はHPAタイプの異なる種々の間葉系細胞を準備する工程；

b) 工程a)で準備した間葉系細胞の中から、特定のHLAタイプ及び／又はHPAタイプの間葉系細胞を選定する工程；

c) 工程b)で選定した間葉系細胞を用いた、上記(1)、(3)～(7)

、（９）、（１０）、（１２）及び（１４）のいずれかに記載の製造方法により、特定のHLAタイプ及び／又はHPAタイプの巨核球及び／又は血小板を調製する工程；
からなる。

[0028] また、本発明は、

（１７）脂肪前駆細胞を、成熟脂肪細胞への分化誘導剤を含む脂肪前駆細胞培養用基本培地で培養し、培養物からトロンボポエチンを採取することを特徴とするトロンボポエチンの製造方法や、

（１８）成熟脂肪細胞への分化誘導剤が、３－イソブチル－１－メチルキサンチン、インスリン、デキサメタゾン及びインドメタシンからなる群から選択される１種又は２種以上であることを特徴とする上記（１７）に記載のトロンボポエチンの製造方法からなる。

発明の効果

[0029] 第１の本発明によれば、脂肪前駆細胞等の間葉系細胞から、血小板産生能を有する巨核球及び／又は血栓形成能を有する血小板を、比較的短期間で簡便かつ多量に、しかもより低コスト或いはより効率的に生体外で製造し得る、より実用的な巨核球及び／又は血小板の製造方法を提供することができる。また、第１の本発明に用いる間葉系細胞として、巨核球や血小板を投与する対象に由来する間葉系細胞を用いれば、投与対象のHLAタイプやHPAタイプと一致する巨核球や血小板を製造することができる。かかる巨核球や血小板は、対象に投与しても、内生の巨核球や血小板と交差反応する抗体を誘導するなどの問題が生じず、頻回輸血しても不応状態とならないため、非常に優れた巨核球や血小板である。また、第１の本発明に用いる間葉系細胞として、特定の細胞表面マーカープロファイルを有する間葉系細胞、すなわち、CD31陰性かつCD71陽性の間葉系細胞、好ましくはさらにc-MPL陽性の間葉系細胞を用いると、より高い効率で巨核球や血小板に分化させることができる。

[0030] 第２や第３の本発明によれば、血小板産生を誘導・促進する能力を有する

TPOを、簡便かつ多量に製造する方法を提供することができる。また、第2の本発明に用いる間葉系細胞や間葉系細胞由来の巨核球として、TPOを投与する対象に由来する間葉系細胞や間葉系細胞由来の巨核球を用いたり、第3の本発明に用いる脂肪前駆細胞として、TPOを投与する対象に由来する脂肪前駆細胞を用いれば、副作用がより少ない、より実用的なTPOを製造することもできる。

図面の簡単な説明

[0031] [図1]間葉系細胞からの巨核球、血小板の産生を示す図である。[図1上段パネル] マウス間質細胞(OP9細胞)をMKL1培地により培養した結果を示す。左のパネルは分化培養開始直後の結果を表し、中央のパネルは分化培養開始から7日目の結果を表し、右のパネルは10日目の結果を表す。[図1下段パネル] ヒト脂肪前駆細胞(HPAd細胞)をMKL1培地により培養した結果を示す。左のパネルは分化培養開始直後の結果を表し、中央のパネルは分化培養開始から7日目の結果を表し、右のパネルは10日目の結果を表す。

[図2]ヒト脂肪前駆細胞をMKL1培地で培養した細胞について解析した結果を示す図である。[図2左パネル] ヒト脂肪前駆細胞をMKL1培地で培養した細胞を、ヨウ化プロピジウム(PI)染色し、フローサイトメトリー法を用いてPIの蛍光を測定した結果を示す。[図2右パネル] ヒト脂肪前駆細胞をMKL1培地で培養した細胞について、巨核球及び血小板の特異的マーカーであるCD41及びCD42bに対する標識抗体の蛍光を測定した結果を示す。

[図3]血栓形成能の解析方法の模式図である。

[図4]血栓形成能の解析結果を示す図である。[図4上段パネル] 血小板減少マウスに、脂肪前駆細胞から産生された巨核球を輸血した血液サンプルを、血栓形成能解析システムに還流した後の、該システムのチップ部分を表す。左パネルは通常の顕微鏡写真を表し、右パネルは巨核球に標識した蛍光を検出した写真を表す。[図4下段左パネル] 血液サンプルを還流する前の、血

栓形成能解析システムのチップ部分を表す。〔図4下段右パネル〕巨核球を輸血していない血小板減少マウスの血液サンプルを、血栓形成能解析システムに還流した後の、該システムのチップ部分を表す。

〔図5〕実施例3の実験の培養で用いた培地群と、それらの培地を用いた培養により巨核球、血小板を産生し得たかどうかの結果を示す図である。

〔図6〕脂肪前駆細胞からの巨核球及び血小板の産生における、 $c-MPL$ の中和抗体である抗 $c-MPL$ 抗体（AMM2抗体）の影響を測定した結果を表す図である。横軸はAMM2抗体の濃度（ $\mu g/mL$ ）を表し、縦軸はCD41陽性細胞数を表す。

〔図7〕脂肪組織由来の細胞を各種のマーカーでラベルし、フローサイトメトリー法を用いて蛍光を測定した結果を示す図である。〔図7左上パネル〕脂肪組織由来の細胞の蛍光を測定した結果を示す図である。〔図7右上パネル〕脂肪組織由来の細胞を蛍光標識抗CD45抗体、蛍光標識抗Ter119抗体、7-AADでラベルし、それらの蛍光を測定した結果を示す図である。

〔図7左下パネル〕図7右上パネルに示される細胞から分取したCD45陰性、Ter119陰性かつ7-AAD陰性の細胞を、蛍光標識抗CD31抗体でラベルし、その蛍光を測定した結果を示す図である。〔図7右下パネル〕図4左下パネルに示される細胞から分取したCD31陰性細胞を、蛍光標識抗 $c-MPL$ 抗体及び蛍光標識抗CD71抗体でラベルし、それらの蛍光を測定した結果を示す図である。

〔図8〕図7の右下パネル（図8の左パネル）の各部分に示される細胞を、基本培地に鉄結合型トランスフェリンを加えた培地にて5日間培養したときの、CD41陽性細胞の割合（%）を示す図である。〔図8右下パネル〕は、図8の左パネルの左下部分に示される細胞（CD45陰性、Ter119陰性、CD31陰性、 $c-MPL$ 陰性かつCD71陰性の細胞）を培養したときのCD41陽性細胞の検出結果及びその割合（10.8%）を示す図である。〔図8右中央パネル〕図8の左パネルの右下部分に示される細胞（CD45陰性、Ter119陰性、CD31陰性、 $c-MPL$ 陰性かつCD71陽

性の細胞)を培養したときのCD4⁺陽性細胞の検出結果及びその割合(26.9%)を示す図である。[図8右上パネル]図8の左パネルの右上部分に示される細胞(CD4⁺陰性、Ter119⁺陰性、CD3⁺陰性、c-MPL⁺陽性かつCD7⁺陽性の細胞)を培養したときのCD4⁺陽性細胞の検出結果及びその割合(62.3%)を示す図である。

[図9]脂肪前駆細胞から産生されたTPOの巨核球及び血小板産生活性を表す図である。[図9上段パネル]脂肪前駆細胞を“MKLI培地 TPO-”を用いて培養した際の培養上清により造血幹細胞を培養した結果を示す。左のパネルは培養開始から2日目の結果を表し、右のパネルは8日目の結果を表す。[図9中段パネル]TPOを含有するMKLI培地により造血幹細胞を培養した結果を示す。左のパネルは培養開始から2日目の結果を表し、右のパネルは8日目の結果を表す。[図9下段パネル]TPOを含有しない“MKLI培地 TPO-”により造血幹細胞を培養した結果を示す。左のパネルは培養開始から2日目の結果を表し、右のパネルは8日目の結果を表す。

発明を実施するための形態

[0032] [第1の本発明]

第1の本発明の巨核球及び／又は血小板の製造方法(以下、単に「第1の本発明の製造方法」としては、間葉系細胞を、鉄イオン及び鉄輸送体を含む間葉系細胞培養用基本培地(以下、「第1の本発明に用いる培養培地」と表示する。)で培養し、培養物から巨核球及び／又は血小板を採取する方法である限り特に制限されず、ここで「培地」とは、細胞を培養できる「培地成分」に水を添加した状態のものをいう。脂肪前駆細胞等の間葉系細胞を、鉄イオン及び鉄輸送体を含む間葉系細胞培養用基本培地で培養すると、どのような作用機序で該細胞から巨核球や血小板が産生するか、その詳細は不明であるが、間葉系細胞内に取り込まれた鉄イオン、あるいは、鉄イオン及び鉄輸送体が何らかのメカニズムで該細胞からのTPO分泌を促進し、それが一因となって、該細胞から巨核球及び血小板への分化誘導を促進していることが考えられる。なお、巨核球は、成熟すると分離膜が形成され、その細胞

質が分離膜によって分断されることで血小板が産生されることが知られている。1個の巨核球から2000~7000個の血小板が放出されるとされている。

[0033] 第1の本発明に用いる間葉系細胞としては、鉄イオン及び鉄輸送体を含む間葉系細胞培養用基本培地で培養することによって、巨核球や血小板を産生し得る間葉系細胞である限り特に制限されず、該間葉系細胞としては(a)脂肪前駆細胞(preadipocytesあるいはadipose progenitor cells)、(b)間葉系幹細胞(mesenchymal stem cell)、(c)間質細胞(stromal cell)等を挙げることができ、上記間葉系幹細胞としては、皮下脂肪組織由来間葉系幹細胞、骨髄間葉系幹細胞を挙げることができ、上記間質細胞としては、脂肪組織由来間質細胞、骨髄間質細胞、前立腺由来間質細胞、子宮内膜由来間質細胞を挙げることができる。好ましい間葉系細胞として、脂肪前駆細胞、皮下脂肪組織由来間葉系幹細胞を挙げることができる。第1の本発明に用いる間葉系細胞は、培養細胞株であってもよいし、組織から採取した細胞(初代培養細胞や継代培養細胞を含む)であってもよい。第1の本発明に用いる間葉系細胞のより具体的な例として、ヒト初代培養脂肪前駆細胞(HPA d細胞)、マウス初代培養前駆細胞(皮下脂肪組織由来)、株化されたマウス間質細胞(OP9細胞)、株化されたマウス骨髄間葉系幹細胞(HS-22細胞)、株化されたマウス脂肪前駆細胞(3T3-L1細胞)などを挙げることができる。なお、第1の本発明の効果(血小板産生能を有する巨核球及び/又は血栓形成能を有する血小板を、比較的短期間で簡便かつ多量に、しかもより低コストかつより効率的に生体外で製造し得る)が得られる限り、第1の本発明の製造方法は、間葉系細胞以外の幹細胞にも適用し得る。

[0034] 上記間葉系細胞の培養細胞株や、組織から採取した間葉系細胞は、Lonza社やPromoCell社やCELL APPLICATIONS社や、独立行政法人医薬基盤研究所 JCRB細胞バンクなどの企業から市販されているものを用いてもよいが、第1の本発明の製造方法により得られた巨核球や血小板を投与する対象の組織から採取した間葉系細胞を用いると、かかる巨核球や血小板のHLAタイプ

やH P Aタイプが投与対象のタイプと一致するため、該巨核球や血小板をその対象に投与した場合に、内生の巨核球や血小板と交差反応する抗体を誘導するなどの問題が生じず、頻回輸血しても不応状態とならないため、かかる間葉系細胞を用いることを好ましく挙げることができる。

[0035] 間葉系細胞として培養細胞株を用いる場合、用意した間葉系細胞を株化したものを用いてもよい。間葉系細胞の株化方法については特に制限されず、公知の方法などを用いることができる。脂肪前駆細胞を株化する好適な方法として、後述の実施例15に記載されているように、脂肪前駆細胞を成熟脂肪細胞へ分化誘導した後、成熟脂肪細胞の株化方法として公知の天井培養法を適用することにより、脂肪前駆細胞株を得る方法を挙げることができる。間葉系細胞を株化すると、分化能及び増殖能が半永久的に維持されるため、間葉系細胞株を冷凍保存などしておけば、巨核球や血小板が必要なときにすぐに巨核球や血小板の製造に着手することができるというメリットがある。

[0036] より効率的に巨核球や血小板を製造する観点から、第1の本発明に用いる間葉系細胞は、C D 3 1陰性かつC D 7 1陽性の間葉系細胞（好ましくは脂肪前駆細胞）であることが好ましく、C D 3 1陰性、C D 7 1陽性かつc - M P L陽性の間葉系細胞（好ましくは脂肪前駆細胞）であることがより好ましい。前述したように脂肪前駆細胞を株化する場合、脂肪前駆細胞から、C D 3 1陰性、C D 7 1陽性かつc - M P L陽性の脂肪前駆細胞をあらかじめ選択し、その細胞について前述の株化方法を適用してもよい。

[0037] 上記の脂肪前駆細胞や皮下脂肪組織由来間葉系幹細胞は、皮下脂肪組織や内臓組織等の脂肪組織から採取することができ、骨髄間葉系幹細胞は骨髄組織から採取することができ、間質細胞は脂肪組織、骨髄組織、前立腺、子宮内膜などから採取することができるが、上記の脂肪前駆細胞や皮下脂肪組織由来間葉系幹細胞としては、採取する際の侵襲性が低く、より多数の間葉系細胞をより簡便に採取し得る点で、脂肪組織（好ましくは皮下脂肪組織）由来の間葉系細胞を好適に挙げることができる。間葉系細胞を組織から採取する方法は、常法を用いることができる。

[0038] CD31陰性かつCD71陽性の間葉系細胞、あるいは、CD31陰性、CD71陽性かつc-MPL陽性の間葉系細胞などの、特定の細胞表面マーカープロファイルを有する間葉系細胞は、それらの特定の細胞表面マーカーの有無を指標として、間葉系細胞を含む細胞集団から選別することができる。第1の本発明において、特定の細胞表面マーカープロファイルを有する間葉系細胞を選別することには、間葉系細胞を含む細胞集団から、特定の細胞表面マーカープロファイルを有する間葉系細胞のみを単離することの他、特定の細胞表面マーカープロファイルを有する間葉系細胞が含まれる割合が、選別前の細胞集団よりも高くなるように処理することも含まれる。

[0039] 上記の特定の細胞表面マーカープロファイルを有する間葉系細胞を選別する方法としては特に制限されないが、より簡便かつ迅速に目的とする間葉系細胞を選別する観点から、上記の各細胞表面マーカーに対する抗体（好ましくは標識抗体、より好ましくは蛍光標識抗体）を用い、これら各抗体の特異的結合の有無を指標として、特定の細胞表面マーカープロファイルを有する間葉系細胞を選別する方法を好適に例示することができる。上記の「抗体の特異的結合の有無を指標として選別する」とは、プロファイル中の陽性の細胞表面マーカーについては、該マーカーに対する抗体が特異的結合を示す細胞を選別し、プロファイル中の陰性の細胞表面マーカーについては該マーカーに対する抗体が特異的結合を示さない細胞を選別することを意味し、例えば、間葉系細胞集団からCD31陰性かつCD71陽性の間葉系細胞を選別する場合は、抗CD31抗体に対する特異的結合を示さず、かつ、抗CD71抗体に対する特異的結合を示す細胞を選別することを意味する。抗体の特異的結合の有無を指標として、特定の細胞表面マーカープロファイルを有する間葉系細胞を選別する方法としては特に制限されないが、セルソーター、磁気ビーズ又は細胞吸着用カラム等を用いた方法を挙げることができ、より簡便かつ迅速である点で、セルソーターを用いた方法を好適に挙げることができる。セルソーターを用いた方法は、フローサイトメトリー法に基づくものであり、当業者に良く知られている。具体的な方法は、セルソーターの取

扱説明書の他、特表2009-513161号公報などにも記載されている。磁気ビーズを用いた方法は磁気分離法などとして当業者に良く知られており、具体的な方法としては、特定の抗体を担持した磁気ビーズを細胞に接触させた後、その磁気ビーズを磁石で回収することにより、その特定の抗体に特異的に結合する細胞を分離する方法などを挙げることができる。また、細胞吸着用カラムを用いた方法は当業者に良く知られており、具体的な方法としては、特定の抗体を担持する細胞吸着用カラムに細胞群を接触させ、目的とする細胞以外の細胞をカラムに吸着させる方法などを挙げることができる。

[0040] CD31陰性かつCD71陽性の間葉系細胞（好ましくは脂肪前駆細胞）や、CD31陰性、CD71陽性かつc-MPL陽性の間葉系細胞（好ましくは脂肪前駆細胞）を脂肪組織から採取する際は、これらの細胞表面マーカに加えて、CD45（赤血球及び血小板以外の造血細胞のマーカ）陰性及びTer119（赤血球やその前駆細胞のマーカ）陰性であることを指標にすると、脂肪組織に含まれていた血液に関連する細胞を排除することができるため好ましい。間葉系細胞の表面ではCD45やTer119は発現しないため、その細胞が間葉系細胞であれば、CD45及びTer119が陰性であることを確認する必要はない。また、細胞表面マーカではないが、7-アミノ-アクチノマイシンD（7-AAD）が陰性であることを指標にすると、脂肪組織に含まれていた死細胞を排除できるため好ましい。7-AADは、死細胞のDNA鎖にインターカレートし、488nmの励起光により赤色蛍光を発する。

[0041] 蛍光標識抗CD45抗体、蛍光標識抗Ter119抗体、蛍光標識抗CD31抗体、蛍光標識抗c-MPL抗体、蛍光標識抗CD71抗体は、免疫生物研究所、BD Biosciences社などから市販されているものを用いることができる。また、7-AADについても、BD Biosciences社などから市販されているものを用いることができる。

[0042] 第1の本発明の製造方法において、CD31陰性かつCD71陽性の間葉

系細胞、好ましくはさらにc-MPL陽性である間葉系細胞を用いる場合は、かかる間葉系細胞を、鉄イオン及び鉄輸送体を含む間葉系細胞培養用基本培地で培養する前に、間葉系細胞を含む細胞集団からCD31陰性かつCD71陽性の間葉系細胞（好ましくは脂肪前駆細胞）、好ましくはさらにc-MPL陽性である間葉系細胞（好ましくは脂肪前駆細胞）を選別することをさらに有していることが好ましい。間葉系細胞を含む細胞集団として、脂肪組織由来の細胞集団を用いる場合は、CD31陰性、CD71陽性、好ましくはさらにc-MPL陽性という細胞表面マーカープロファイルに加えて、CD45陰性及びTer119陰性という細胞表面マーカープロファイルを指標とすると、間葉系細胞以外の、血液に関連する細胞を効率良く排除することができる点で好ましい。また、さらに7-AADが陰性であることも確認すると、脂肪組織に含まれていた死細胞を効率良く排除できるため好ましい。

[0043] また、上記間葉系細胞の由来となる生物種としては脊椎動物である限り特に制限されず、該脊椎動物としては、哺乳動物、鳥類、爬虫類、両生類、魚類等を挙げることができ、中でも、ヒト、マウス、ラット、モルモット、ウサギ、ネコ、イヌ、ウマ、ウシ、サル、ヒツジ、ヤギ、ブタ等の哺乳動物を好ましく挙げることができ、中でもヒトを特に好ましく挙げることができる。

[0044] 第1の本発明における培養に用いる培地は、間葉系細胞培養用基本培地に鉄イオン及び鉄輸送体を含有させた培地である。

[0045] 上記鉄イオンとしては、鉄イオン(II)、鉄イオン(III)のいずれでもよいが、鉄イオン(III)を好ましく挙げることができる。鉄イオンを間葉系細胞培養用基本培地に含有させる方法としては、鉄の無機塩及び有機塩からなる群から選ばれる1種又は2種以上の鉄の塩を間葉系細胞培養用基本培地に添加させる方法を挙げることができる。かかる鉄の塩としては、有機塩でも無機塩でもよく、該無機塩としては、塩化鉄(II)、塩化鉄(III)、酸化鉄(II)、酸化鉄(III)、硝酸鉄(II)、硝酸鉄(III)、硫酸鉄(II)、硫酸鉄(III)、硫酸アン

モニウム鉄(II)、硫酸アンモニウム鉄(III)、ピロリン酸鉄(II)、ピロリン酸鉄(III)、硫化鉄(II)、硫化鉄(III)、水酸化鉄(II)、酸化水酸化鉄(III)等を挙げることができ、上記有機塩としては、酢酸鉄(II)、酢酸鉄(III)、ヒドロキシジアセトキシ鉄(III)、クエン酸鉄(II)、クエン酸鉄(III)、クエン酸鉄(III)ナトリウム、クエン酸鉄(III)アンモニウム、安息香酸鉄(II)、安息香酸鉄(III)、炭酸鉄(II)、炭酸鉄(III)、ギ酸鉄(II)、ギ酸鉄(III)、シュウ酸鉄(II)、シュウ酸鉄(III)、フマル酸鉄(II)、フマル酸鉄(III)、コハク酸鉄(II)、コハク酸鉄(III)、グルコン酸鉄(II)、グルコン酸鉄(III)、乳酸鉄(II)、乳酸鉄(III)、マレイン酸鉄(II)、マレイン酸鉄(III)、ジエチレントリアミン五酢酸鉄(III)ナトリウム、ジエチレントリアミン五酢酸鉄(III)アンモニウム、エチレンジアミン四酢酸鉄(III)ナトリウム、エチレンジアミン四酢酸鉄(III)アンモニウム、ジカルボキシメチルグルタミン酸鉄(III)ナトリウム、ジカルボキシメチルグルタミン酸鉄(III)アンモニウム等を挙げることができる。これらの鉄の塩は、1種を用いてもよいし、2種以上を併用してもよい。これらの鉄の塩は市販されているものを用いることができる。

[0046] 上記鉄輸送体は、第1の本発明に用いる培養培地に含まれる鉄イオンと結合して、間葉系細胞が該培養培地から鉄イオンを取り込む能力を提供する。また、鉄イオンと結合している鉄輸送体を用いれば、鉄の供給源としても機能する。鉄輸送体は、鉄と結合していない場合にはアポ型と呼ばれ、鉄と結合している場合はホロ型と呼ばれ、アポ型とホロ型の中間のレベルの量の鉄と結合している場合はシデロ型と呼ばれることがある。上記鉄輸送体としては、鉄と結合して細胞内へ取り込まれるタンパク質（特開平08-029429号公報、特表2005-517042号公報、特表2004-505932号公報、特表2007-508026号公報等）を挙げることができ、アポ型又はそれに相当する鉄輸送体としてアポトランスフェリン（アポセロトランスフェリン）、アポラクトフェリン、アポオボトランスフェリン、アポメラノトランスフェリン、アポフェリチン、プロトポルフィリンIX等が含まれ、中でもアポトランスフェリンを好ましく挙げることができる。かか

る鉄輸送体の由来となる生物種は、共に用いる間葉系細胞の由来となる生物種と同種のものを用いることが好ましい。

[0047] 第1の本発明における鉄イオン及び鉄輸送体として、鉄イオンと鉄輸送体が結合して形成された複合体（鉄イオン-鉄輸送体複合体）を好ましく用いることができる。かかる鉄イオン-鉄輸送体複合体としては、アポトランスフェリンが鉄イオンと結合したホロトランスフェリン（鉄結合型トランスフェリン）、アポラクトフェリンが鉄イオンと結合したホロラクトフェリン（鉄結合型ラクトフェリン）、アポオボトランスフェリンが鉄イオンと結合したホロオボトランスフェリン（鉄結合型オボトランスフェリン）、アポメラノトランスフェリンが鉄イオンと結合したホロメラノトランスフェリン（鉄結合型メラノトランスフェリン）、アポフェリチンが鉄イオンと結合したホロフェリチン（鉄結合型フェリチン）、プロトポルフィリンIXが鉄と結合したヘム等を挙げることができ、中でも、鉄結合型トランスフェリンを特に好ましく挙げるができる。鉄イオンと結合しているホロ型の上記鉄輸送体や、鉄イオンと結合していないアポ型の鉄輸送体や、アポ型とホロ型の中間のレベルの量の鉄と結合しているシデロ型の鉄輸送体は、市販されているものを用いることができる。

[0048] 上記の鉄イオン-鉄輸送体複合体における鉄イオンと鉄輸送体との結合形式は特に制限されず、配位結合、イオン結合、水素結合、金属結合、ファンデルワールス力等の非共有結合であっても、共有結合であってもよいが、結合の程度が適度であり、間葉系細胞内へ鉄イオンを輸送するのに適している点で、配位結合を好ましく挙げるができる。なお、鉄イオン-鉄輸送体複合体においては鉄がイオンの状態でないものの、複合体が間葉系細胞内に取り込まれると、鉄イオンを放出し得るものも、便宜上、第1の本発明における鉄イオン-鉄輸送体複合体に含まれる。

[0049] 第1の本発明に用いる培養培地中の鉄イオンの濃度としては、そのような鉄濃度の第1の本発明に用いる培養培地で間葉系細胞を培養することにより血小板を製造し得る培地であれば特に制限されないが、例えば1 pg/mL

～10 μg/mLの範囲内、好ましくは10 pg～1 μg/mLの範囲内、より好ましくは150 pg/mL～300 pg/mLの範囲内、さらに好ましくは150 pg/mL～250 pg/mLの範囲内を挙げることができる。

[0050] また、第1の本発明に用いる培養培地中の鉄輸送体の含有量としては、そのような鉄輸送体の含有量の第1の本発明に用いる培養培地で間葉系細胞を培養することにより巨核球や血小板を製造し得る培地であれば特に制限されないが、例えば10 fM (1×10^{-15} M)～100 nMの範囲内、好ましくは100 fM～10 nMの範囲内、より好ましくは1 pM～2.8 pMの範囲内、さらに好ましくは1 pM～2.5 pMの範囲内を挙げることができる。

[0051] また、第1の本発明に用いる培養培地に鉄結合型トランスフェリンを用いる場合、その添加濃度は特に制限されず、上記の鉄イオン濃度の数値範囲にしたがってもよいが、例えば、25 μg/mL～200 μg/mL未満、好ましくは50 μg/mL～200 μg/mL未満を挙げることができる。なお、1 mgの鉄結合トランスフェリンには、約1.3 μgの鉄イオンが結合しているとされている。

[0052] 第1の本発明における間葉系細胞培養用基本培地としては、第1の本発明における鉄イオン及び鉄輸送体を添加した場合に、その培地で間葉系細胞を培養することにより巨核球や血小板を製造し得る培地であれば特に制限されないが、調製が容易であり、ロットごとのばらつきを防ぐ点から化学合成培地が好ましく、1又は2種類以上の糖（類）と、1又は2種類以上の無機塩（類）、1又は2種類以上のアミノ酸（類）、及び1又は2種類以上のビタミン（類）、及び1又は2種類以上のその他成分を含むことが好ましい。

[0053] 上記糖類としては、具体的には、グルコース、ラクトース、マンノース、フルクトース、ガラクトース等の単糖類や、スクロース、マルトース、ラクトース等の二糖類を挙げることができるが、中でもグルコースが特に好ましく、これら糖類は、1又は2以上組み合わせて添加することもできる。

[0054] 上記無機塩類としては、具体的には、塩化カルシウム、硝酸カルシウム、硫酸銅五水和物、硝酸鉄(III)九水和物、硫酸鉄(II)七水和物、塩化マグネシウム六水和物、硫酸マグネシウム、塩化カリウム、塩化ナトリウム、炭酸水素ナトリウム、リン酸水素二ナトリウム、リン酸水素二ナトリウム二水和物、リン酸二水素ナトリウム、リン酸二水素ナトリウム一水和物、リン酸二水素ナトリウム二水和物、亜セレン酸ナトリウム五水和物、硫酸亜鉛七水和物から選ばれる1種又は2種以上の無機塩(類)を挙げることができるが、間葉系細胞からの巨核球産生や血小板産生に有利に作用する成分であればいずれの無機塩類又はその組合せも用いることができる。

[0055] 上記アミノ酸類としては、具体的には、アラニン、アルギニン、アスパラギン、アスパラギン酸、シスチン、システイン、グルタミン、グリシン、ヒスチジン、グルタミン酸、ヒドロキシプロリン、イソロイシン、ロイシン、リジン、メチオニン、フェニルアラニン、プロリン、セリン、スレオニン、トリプトファン、チロシン、バリン等から選ばれる1種又は2種以上のアミノ酸(類)、好ましくはL-体のアミノ酸とそれらの誘導體及びそれらの塩並びにそれらの水和物などの派生物を挙げることができる。例えば、上記アルギニンとしては、L-塩酸アルギニン、L-アルギニン-塩酸塩等のアルギニンの派生物を挙げることができ、上記アスパラギン酸としては、L-アスパラギン酸ナトリウム塩一水和物、L-アスパラギン酸一水和物、L-アスパラギン酸カリウム、L-アスパラギン酸マグネシウム等のアスパラギン酸の派生物を挙げることができ、上記システインとしては、L-システイン二塩酸塩、L-システイン塩酸塩一水和物等のシステインの派生物や、L-リジン塩酸塩等のリジンの派生物を挙げることができ、上記グルタミン酸としては、L-グルタミン酸一ナトリウム塩等のグルタミンの派生物を挙げることができ、上記アスパラギンとしては、L-アスパラギン一水和物等のアスパラギンの派生物を挙げることができ、上記チロシンとしては、L-チロシン二ナトリウム二水和物等のチロシンの派生物を挙げることができ、上記ヒスチジンとしては、ヒスチジン塩酸塩、ヒスチジン塩酸塩一水和物等のヒス

チジンの派生物を挙げることができ、上記リジンとしては、L-リジン塩酸塩等のリジンの派生物を挙げることができる。

[0056] 上記ビタミン類としては、具体的には、ビオチン、コリン、葉酸、イノシトール、ナイアシン、パントテン酸、ピリドキシン、リボフラビン、チアミン、ビタミンB12、パラアミノ安息香酸（PABA）、アスコルビン酸から選択される1種又は2種以上のビタミン（類）と、これらの成分各々の誘導体及びそれらの塩並びにそれらの水和物などの派生物を挙げることができる。例えば、上記コリンとしては、塩化コリン等のコリンの派生物を挙げることができ、ナイアシンとしては、ニコチン酸、ニコチン酸アミド、ニコチンアルコール等のナイアシンの派生物を挙げることができ、パントテン酸としては、パントテン酸カルシウム、パントテン酸ナトリウム、パンテノール等のパントテン酸の派生物を挙げることができ、ピリドキシンとしては、ピリドキシン塩酸塩、ピリドキサル塩酸塩、リン酸ピリドキサル、ピリドキサミン等のピリドキシンの派生物を挙げることができ、チアミンとしては、塩酸チアミン、硝酸チアミン、硝酸ビスチアミン、チアミンジセチル硫酸エステル塩、塩酸フルスルチアミン、オクトチアミン、ベンフォチアミン等のチアミンの派生物等を挙げることができ、アスコルビン酸としては、アスコルビン酸2-リン酸エステル（Ascorbic acid 2-phosphate）、アスコルビン酸リン酸マグネシウム、アスコルビン酸硫酸ナトリウム、リン酸アスコルビルアミノプロピル、アスコルビン酸リン酸ナトリウム等のアスコルビン酸の派生物を挙げることができる。

[0057] 上記その他成分としては、HEPES等の緩衝剤、ヌクレオチド等の核酸、ペニシリンやストレプトマイシン等の抗生物質、ピルビン酸、及びその誘導体及びそれらの塩並びにそれらの水和物などの派生物、フェノールレッドなどを挙げることができ、上記ヌクレオチドとしては、ATP、UTP、GTP、CTP、好ましくはこれら4種の等モル混合物を好ましく挙げることができ、上記抗生物質の派生物としては、ペニシリンGナトリウムや硫酸ストレプトマイシン、あるいは、ペニシリン-ストレプトマイシン溶液を好まし

く挙げることができ、ピルビン酸の派生物としてはピルビン酸ナトリウムを好ましく挙げるができる。

[0058] 上記間葉系細胞培養用基本培地の具体例としては、市販のイスコフ改変ダルベッコ培地 (IMDM)、RPMI 1640培地、ダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM)、最小必須培地 (MEM)、イーグル基礎培地 (BME)、F12培地等の公知の化学合成培地や、DMEM/F12培地 (DMEMとF12培地を1:1で混合した培地)等のこれらの培地のいずれか2以上を適当な割合で混合した培地や、これらのいずれかの培地にヌクレオチド等の核酸、ペニシリンやストレプトマイシン等の抗生物質、及び、L-グルタミンをさらに添加した培地を好ましく挙げることができ、特にIMDMやRPMI 1640培地に核酸 (好ましくはATP、UTP、GTP及びCTPの等モル混合物)、抗生物質 (好ましくはペニシリンGナトリウム、硫酸ストレプトマイシン、あるいは、ペニシリン-ストレプトマイシン溶液)及びL-グルタミンをさらに添加した培地をより好ましく挙げることができ、中でも、IMDMに核酸 (好ましくはATP、UTP、GTP及びCTPの等モル混合物)、抗生物質 (好ましくはペニシリンGナトリウム、硫酸ストレプトマイシン、あるいは、ペニシリン-ストレプトマイシン溶液)及びL-グルタミンをさらに添加した培地を特に好ましく挙げるができる。

[0059] 第1の本発明において特に好適な間葉系細胞培養用基本培地としては、後述の組成のIMDMに対して、2mM (最終濃度)のL-グルタミン、100U/mL (最終濃度)のペニシリン-ストレプトマイシン溶液、並びに、各20 μ M (最終濃度)のATP、UTP、GTP及びCTPを添加した培地 (以下、「第1の本発明における特に好適な基本培地」と表示する。)や、第1の本発明における特に好適な基本培地における各成分の濃度に対して、各成分ごとに独立に70%~130%の範囲内の割合の濃度の各成分を含む培地を挙げるができる。

[0060] (IMDMの組成)

0.4mM グリシン、0.281mM L-アラニン、0.398mM L

ー塩酸アルギニン、0.167mM L-アスパラギン、0.226mM L-アスパラギン酸、0.381mM L-シスチン二塩酸塩、0.51mM L-グルタミン酸、4mM L-グルタミン、0.2mM L-ヒスチジン塩酸塩一水和物、0.802mM L-イソロイシン、0.802mM L-ロイシン、0.798mM L-リジン塩酸塩、0.201mM L-メチオニン、0.4mM L-フェニルアラニン、0.348mM L-プロリン、0.4mM L-セリン、0.798mM L-スレオニン、0.0784mM L-トリプトファン、0.462mM L-チロシン二ナトリウム二水和物、0.803mM L-バリン、0.0000533mM ビオチン、0.0286mM 塩化コリン、0.00839mM D-パントテン酸カルシウム、0.00907mM 葉酸、0.0328mM ニコチン酸アミド、0.0196mM ピリドキサール塩酸塩、0.00106mM リボフラビン、0.119mM 塩酸チアミン、0.0000096mM ビタミンB12、0.04mM L-イノシトール、1.49mM 無水塩化カルシウム、0.84mM 無水硫酸マグネシウム、4.4mM 塩化カリウム、0.000752mM 硝酸カリウム、36mM 炭酸水素ナトリウム、77.59mM 塩化ナトリウム、0.906mM リン酸二水素ナトリウム一水和物、0.0000658mM 亜セレン酸ナトリウム五水和物、25mM D-グルコース、25.03mM HEPES、0.0399mM フェノールレッド、1mM ピルビン酸ナトリウム。

[0061] 第1の本発明に用いる特に好適な培養培地として、前述の第1の本発明における特に好適な基本培地に、鉄イオン及び鉄輸送体を含有させた培地を挙げることができ、中でも、前述の第1の本発明における特に好適な基本培地に鉄結合型トランスフェリンを単独の有効成分として含有させた培地をより好ましく挙げることができる。

[0062] 第1の本発明に用いる培養培地には、TPO、BSA、LDLコレステロール、インスリン、2-β-メルカプトエタノール等を添加してもよいが、添加しない場合に、より低コストで血小板を製造し得るなどの意義がより多

く得られる。すなわち、従来から用いられているMKLI培地には、IMDM培地に加えて、TPO、BSA、LDLコレステロール、インスリン及び2-β-メルカプトエタノール（以下、これら成分をまとめて「5成分」とも表示する。）が添加されているところ、第1の本発明に用いる培養培地でこれら5成分を用いない場合は、より低コストで巨核球や血小板を製造することが可能となる。脂肪前駆細胞から巨核球や血小板への分化誘導を行う際に、BSA、LDLコレステロール、インスリン及び2-β-メルカプトエタノールがいずれも必要でないことは、本発明者らが実験で確認している。なお、培地中に鉄輸送体が存在していなくても、間葉系細胞が培地中の鉄イオンを細胞内に取り込むことができる場合は、第1の本発明に用いる培養培地を、「鉄イオン及び鉄輸送体を含む間葉系細胞培養用基本培地」ではなく、「鉄イオンを含む間葉系細胞培養用基本培地」とすることもできる。

[0063] 第1の本発明における培養条件としては、間葉系細胞を、第1の本発明に用いる培養培地で培養することにより、血小板を製造し得る限り特に制限されないが、培養温度として通常12～45℃の範囲内、好ましくは15～37℃の範囲内を挙げることができ、培養期間として通常4～20日間の範囲内、好ましくは5～17日間の範囲内を挙げることができる。

[0064] 第1の本発明の製造方法は、第1の本発明に用いる間葉系細胞を、第1の本発明に用いる培養培地で培養する前に、該間葉系細胞を維持培養して細胞数を増加させる工程をさらに有することが好ましい。かかる維持培養工程を有していると、後述するように、第1の本発明に用いる培養培地での培養に用い得る間葉系細胞数を増やすことができ、最初に用意した間葉系細胞数に対する血小板の収率を格段に上昇させることができるからである。かかる維持培養に用いる培養培地としては、第1の本発明に用いる間葉系細胞を増殖させ得る培地である限り特に制限されず、例えば、前述の間葉系細胞培養用基本培地（鉄イオンや鉄輸送体を含まないもの）などを挙げることができる。維持培養を行う場合は、血清や血清成分を含む間葉系細胞培養用基本培地を用いることが好ましい。維持培養工程では、継代や培地交換を適宜行うこ

とが好ましい。

[0065] 第1の本発明における培養物から巨核球や血小板を採取する方法としては特に制限されないが、かかる培養物から、巨核球や血小板を含む培養上清を分取する方法を挙げることができる。第1の本発明の製造方法では、造血幹細胞ではなく、間葉系細胞（好ましくはCD31陰性かつCD71陽性の間葉系細胞）を用いるので、巨核球や血小板を高効率で得ることができる。造血幹細胞の場合は分化誘導培養の前に維持培養を行っても、細胞数の増加はほとんど認められないが、間葉系細胞（好ましくは脂肪前駆細胞や皮下脂肪組織由来間葉系幹細胞）の場合、第1の本発明に用いる培養培地にて分化誘導を行う前に前述の維持培養工程を行うことによって、最初に用意した間葉系細胞の数を10～40倍、好ましくは30～40倍にまで増殖させることができ、それらの間葉系細胞を分化誘導させることで、巨核球や血小板を高効率で得ることができる。造血幹細胞や脂肪前駆細胞から巨核球や血小板への分化効率は約20%であるので、造血幹細胞の場合は最初に用意した造血幹細胞から巨核球や血小板への収率は約20%であるのに対し、間葉系細胞では約200～800%、好ましくは約600～800%というかなり高い収率を達成することができる。また、間葉系細胞（特に脂肪前駆細胞）がCD31陰性かつCD71陽性である場合は、巨核球や血小板への分化効率は約27%であるので、最初に用意したそのような間葉系細胞から巨核球や血小板への収率は約270～1080%、好ましくは約810～1080%という収率を達成することができ、間葉系細胞（特に脂肪前駆細胞）がCD31陰性、CD71陽性かつc-MPL陽性である場合は、巨核球や血小板への分化効率は約62%であるので、最初に用意したそのような間葉系細胞から巨核球や血小板への収率は620～2480%、好ましくは1860～2480%という極めて高い収率を達成することができる。

[0066] 第1の本発明の製造方法は、さらに、第1の本発明における培養物から巨核球や血小板を精製する工程を有していても良い。かかる精製方法としては特に制限されないが、抗巨核球抗体や抗血小板抗体を用いて巨核球や血小板

を精製する方法等を挙げることができる。

[0067] 第1の本発明の巨核球や血小板としては、第1の本発明の製造方法により製造される巨核球や血小板である限り特に制限されない。第1の本発明の製造方法により得られる血小板としては、従来法である造血幹細胞を用いた製造方法により得られる血小板よりも、血栓形成能が高い血小板を好ましく挙げることができ、具体的には、以下の血栓形成能解析方法により測定した、血栓形成に寄与した血小板数の割合が60～85%、好ましくは70～85%である血小板を好ましく挙げることができる。また、第1の本発明の製造方法により得られる巨核球については、該巨核球から産生される血小板が前述の血栓形成能であるような巨核球を好ましく挙げることができる。なお、従来法である造血幹細胞を用いた製造方法により得られる血小板における上記割合は、後述の実施例6に記載したように、 $52.5 \pm 5.3\%$ であった。

[0068] (血栓形成能解析方法)

血栓形成能解析方法として以下の方法を好適に用いることができる。間葉系細胞を、第1の本発明に用いる培養培地で培養して血小板を得る。一方、前記間葉系細胞の由来と同種の脊椎動物（好ましくは前記間葉系細胞の由来となった脊椎動物）から採取した血液（内在性血小板を 1×10^5 個含む）に、前述の培養により得られた血小板（ 2×10^4 個）を加えて血液サンプルとする。血液サンプルを、血栓形成能解析システムT-TAS（登録商標）（Total Thrombus-formation Analysis System、藤森工業社製）のコラーゲン固相チップに還流して血栓を形成後、これに寄与した血小板数の割合（%）を求める。

[0069] 第1の本発明の製造方法により得られる巨核球や血小板は、巨核球や血小板の一般的な用途等に用いることができる。例えば、該巨核球自体、該血小板自体、又は薬学的に許容される担体と共に、血小板製剤等の輸血製剤や巨核球含有製剤などとして用いることができる。上記の薬学的に許容される担体としては、巨核球からの血小板産生や、血小板の血栓形成能を妨げない限

り特に制限されず、希釈剤、注入剤、塩、緩衝剤、安定剤、溶解剤、および当技術分野において周知である他の材料を含み、中でも、巨核球や血小板の調製物を7.4のpH、血液の生理的なpHに安定させる緩衝剤を好ましく挙げるができる。

[0070] 第1の本発明における巨核球や血小板や前述の製剤の投与対象としては、
1) 事故や手術などによる出血症状やそれに伴う血小板減少がある患者、2) 血小板減少若しくは血小板の機能低下を伴う疾患のある患者、3) 化学療法あるいは放射線療法などの医療の副作用によって血小板が減少している患者などを好ましく挙げるができる。

[0071] 第1の本発明における巨核球や血小板や血小板製剤の投与方法としては、従来の巨核球や血小板や前述の製剤の投与方法を用いることができる。一方、第1の本発明における血小板や、第1の本発明における巨核球から産生される血小板は優れた血栓形成能を有しているため、投与量については、従来のものよりも少なくしてもよい。

[0072] 第1の本発明における巨核球や血小板や前述の製剤の投与対象の生物種としては、前述したような脊椎動物、好ましくは哺乳動物、より好ましくはヒトを挙げるができる。第1の本発明における巨核球や血小板を製造する際に用いた間葉系細胞の由来である脊椎動物の種類は、第1の本発明における巨核球や血小板や前述の製剤の投与対象となる脊椎動物の種類と一致していることが、より優れた血栓形成効果を得る観点から好ましい。

[0073] 第1の本発明には、以下の工程a)～c)を備えた巨核球及び/又は血小板バンク構築方法も含まれる。

a) HLAタイプ及び/又はHPAタイプの異なる種々の間葉系細胞を準備する工程；

b) 工程a)で準備した間葉系細胞の中から、特定のHLAタイプ及び/又はHPAタイプの間葉系細胞を選定する工程；

c) 工程b)で選定した間葉系細胞を用いた第1の本発明の製造方法により、特定のHLAタイプ及び/又はHPAタイプの巨核球及び/又は血小板を調

製する工程；

[0074] 血小板輸血を繰り返し受けなければならない患者の中には、特異的な遺伝子異常に伴う出血性疾患などの患者もいる。このような患者の場合、患者由来の i P S 細胞から実際に巨核球や血小板の産生が可能であるか不明であり、また、機能異常が維持されたままの血小板しか産生されない可能性もある。そこで、様々な H L A タイプや H P A タイプの健常人ドナーから、様々な H L A タイプや H P A タイプの巨核球や血小板を調製し得るような巨核球や血小板バンクが実現すれば、前述のような遺伝子異常を伴う患者にも、自己と同じ H L A タイプや H P A タイプの正常な巨核球や血小板を供給することが可能となる。また、遺伝子異常を伴う患者に限らず、突発的な怪我や手術などの出血患者などの場合にも、第 1 の本発明における巨核球及び／又は血小板バンクの利点がある。すなわち、第 1 の本発明における巨核球及び／又は血小板バンクによれば、H L A タイプ及び／又は H P A タイプの異なる種々の間葉系細胞をあらかじめ準備しておくため、患者自身から間葉系細胞を採取する工程が不要となり、巨核球や血小板をより早く製造することができ、その結果、血小板投与の必要性の高い段階で、自己の H L A タイプ及び／又は H P A タイプに一致する巨核球や血小板の投与を受けることが可能となる。

[0075] 上記工程 a) としては、H L A タイプ及び／又は H P A タイプの異なる種々の間葉系細胞を準備する工程である限り特に制限されないが、これら種々の間葉系細胞を速やかに培養に用いることができ、しかも長期保存し得る観点で、これら種々の間葉系細胞を凍結して準備しておくことを好ましく挙げることができる。なお、間葉系細胞は、凍結前に維持培養するなどして細胞数を増やすと共に細胞密度をある程度低下させた後、複数の凍結バイアルなどに分注して保存しておくことが好ましい。このようにしておくこと、凍結過程において特定のバイアル中の細胞が損傷を受け、それによって凍結後に生着できない時のリスクを回避することができ、また、工程 c) でその凍結した間葉系細胞から巨核球や血小板を調製する際に立ち上がりの増殖速度が速いなどのメリットがある。このメリットは、間葉系細胞の中でも、分裂回数が

少なく寿命が比較的短いことが知られている初代培養脂肪前駆細胞や間葉系幹細胞を用いる場合に特に多く享受することができる。

[0076] また、より効率的に巨核球や血小板を製造する観点から、巨核球及び／又は血小板バンク構築方法に用いる間葉系細胞は、CD31陰性かつCD71陽性の間葉系細胞（好ましくは脂肪前駆細胞）であることが好ましく、CD31陰性、CD71陽性かつc-MPL陽性の間葉系細胞（好ましくは脂肪前駆細胞）であることがより好ましい。

[0077] また、巨核球及び／又は血小板バンク構築方法に用いる間葉系細胞は、間葉系細胞株であることが好ましく、脂肪前駆細胞株であることがより好ましい。様々なHLAタイプ及び／又はHPAタイプの間葉系細胞（好ましくは脂肪前駆細胞）についてあらかじめ株化し、間葉系細胞株バンク（好ましくは脂肪前駆細胞株バンク）を作製しておけば、患者から間葉系細胞を採取する労力、コスト及び時間を少なくすることができ、巨核球や血小板の投与が必要な患者に適合するHLAタイプ及び／又はHPAタイプの巨核球や血小板などを、より低い労力及びコストで、かつ、より短期間で製造することができるからである。また、患者が巨核球や血小板に関連する遺伝子に異常を持っている場合は、患者由来の間葉系細胞から正常な巨核球や血小板を製造することが困難になるが、前述の間葉系細胞株バンクを利用すれば、その患者に適合するHLAタイプ及び／又はHPAタイプの巨核球や血小板を製造することも可能になる。なお、本発明には、入手した間葉系細胞（好ましくは株化した脂肪前駆細胞）を株化した「間葉系細胞株」それ自体も含まれる。かかる間葉系細胞の株化方法としては公知の方法などを用いることができるが、脂肪前駆細胞を株化する好適な方法として、後述の実施例15に記載されているように、脂肪前駆細胞を成熟脂肪細胞へ分化誘導した後、成熟脂肪細胞の株化方法として公知の天井培養法を適用することにより、脂肪前駆細胞株を得る方法を挙げることができる。

[0078] 上記工程b)としては、上記工程a)で準備した間葉系細胞の中から、特定のHLAタイプ及び／又はHPAタイプの間葉系細胞を選定する工程である

限り特に制限されないが、工程 a) で準備している間葉系細胞群のうち、いずれの間葉系細胞がどのようなHLAタイプ及び/又はHPAタイプであるかをあらかじめ同定しておくこと、工程 b) において特定のHLAタイプ及び/又はHPAタイプの間葉系細胞を速やかに選定できる点で好ましい。上記の特定のHLAタイプ及び/又はHPAタイプとは、血小板の投与を必要とする患者のHLAタイプ及び/又はHPAタイプにできるだけ一致するタイプを意味し、HLAタイプ及びHPAタイプのいずれかのみが一致するタイプも含まれるが、HLAタイプ及びHPAタイプのいずれも一致するタイプが特に好適に含まれる。

[0079] 上記工程 c) としては、上記工程 b) で選定した間葉系細胞を用いた第1の本発明の製造方法により、特定のHLAタイプ及び/又はHPAタイプの巨核球や血小板を調製する工程である限り特に制限されない。間葉系細胞におけるHLAタイプ及びHPAタイプと、その間葉系細胞から製造される巨核球や血小板のそれらのタイプは一致するため、上記工程 c) は、間葉系細胞として上記工程 b) で選定したものをを用いること以外は、第1の本発明の製造方法と何ら変わらない。

[0080] [第2の本発明]

第2の本発明のTPOの製造方法（以下、単に「第2の本発明の製造方法」としては、間葉系細胞又は間葉系細胞由来の巨核球（以下、これらをまとめて「間葉系細胞等」とも表示する。）を、鉄イオン及び鉄輸送体を含む間葉系細胞培養用基本培地で培養し、培養物からTPOを採取する方法である限り特に制限されず、ここで「培地」とは、細胞を培養できる「培地成分」に水を添加した状態のものをいう。脂肪前駆細胞等の間葉系細胞を、鉄イオン及び鉄輸送体を含む間葉系細胞培養用基本培地で培養すると、該間葉系細胞が巨核球、血小板へと分化誘導され、その過程で、間葉系細胞、巨核球及び血小板のいずれか、又はこれらから選択される2種以上若しくは3種すべての細胞から培養培地へTPOが分泌されると考えられる。これらの細胞からどのような作用機作でTPOが分泌されるのか、未だ明らかではないが

、間葉系細胞等の細胞内に取り込まれた鉄イオン、あるいは、鉄イオン及び鉄輸送体が何らかのメカニズムで該細胞等からのTPO分泌を促進していることが考えられる。

[0081] 第2の本発明に用いる間葉系細胞又は間葉系細胞由来の巨核球としては、鉄イオン及び鉄輸送体を含む間葉系細胞培養用基本培地で培養することによって、TPOを培地中に分泌し得る間葉系細胞又は間葉系細胞由来の巨核球である限り特に制限されず、該間葉系細胞としては(a)脂肪前駆細胞(pre adipocytesあるいはadipose progenitor cells)、(b)間葉系幹細胞(mesenchymal stem cell)、(c)間質細胞(stromal cell)等を挙げることができ、上記間葉系幹細胞としては、皮下脂肪組織由来間葉系幹細胞、骨髄間葉系幹細胞を挙げることができ、上記間質細胞としては、脂肪組織由来間質細胞、骨髄間質細胞、前立腺由来間質細胞、子宮内膜由来間質細胞を挙げることができる。好ましい間葉系細胞として、脂肪前駆細胞、皮下脂肪組織由来間葉系幹細胞を挙げることができる。第2の本発明に用いる間葉系細胞のより具体的な例として、ヒト初代培養脂肪前駆細胞(HPA d細胞)、マウス初代培養前駆細胞(皮下脂肪組織由来)、株化されたマウス間質細胞(OP9細胞)、株化されたマウス骨髄間葉系幹細胞(HS-22細胞)、株化されたマウス脂肪前駆細胞(3T3-L1細胞)などを挙げることができる。上記巨核球としては、間葉系細胞由来の巨核球である限り特に制限されない。第2の本発明に用いる間葉系細胞等は、培養細胞株であってもよいし、組織から採取した細胞(初代培養細胞や継代培養細胞を含む)であってもよい。なお、第2の本発明に用いる培養培地で培養することによって、培養培地中にTPOを産生し得る細胞や巨核球であれば、間葉系細胞等に代えてそれらの細胞や巨核球を第2の本発明の製造方法に適用し得る。例えばiPS細胞等の幹細胞から分化させた巨核球が、第2の本発明に用いる培養培地(TPOが添加されたものが好ましい)などで培養することによって、培養培地中にTPOを産生することができた場合などは、TPOを簡便かつ多量に製造し得ることになる。iPS細胞から巨核球を得る方法として、例えば以下のよう

な方法が挙げられる。iPS細胞を、OP9細胞などの補助的な feeder 細胞と共培養して、iPS細胞を造血幹細胞の前駆細胞様に形態変化させた後、該造血幹細胞の前駆細胞様の細胞を、再びOP9細胞と共にTPO添加条件下にて培養するか又はTPOを含むMKLI培地を用いて培養して、巨核球を得る。

[0082] 上記間葉系細胞の培養細胞株や、組織から採取した間葉系細胞は、Lonza社やPromoCell社やCELL APPLICATIONS社や、独立行政法人医薬基盤研究所 JCRB細胞バンクなどの企業から市販されているものを用いてもよいが、第2の本発明の製造方法により得られたTPOを投与する対象の組織から採取した間葉系細胞等を用いると、該TPOをその対象に投与した場合に、内生のTPOと交差反応する抗体を誘導するなどの問題が生じないため、かかる間葉系細胞等を用いることを好ましく挙げることができる。

[0083] より効率的にTPOを製造する観点から、第2の本発明に用いる間葉系細胞等は、CD31陰性かつCD71陽性の間葉系細胞等（好ましくは脂肪前駆細胞又は脂肪前駆細胞由来の巨核球）であることが好ましく、CD31陰性、CD71陽性かつc-MPL陽性の間葉系細胞等（好ましくは脂肪前駆細胞又は脂肪前駆細胞由来の巨核球）であることがより好ましい。

[0084] 上記の脂肪前駆細胞や皮下脂肪組織由来間葉系幹細胞は、皮下脂肪組織や内臓組織等の脂肪組織から採取することができ、骨髄間葉系幹細胞は骨髄組織から採取することができ、間質細胞は脂肪組織、骨髄組織、前立腺、子宮内膜などから採取することができるが、上記の脂肪前駆細胞や皮下脂肪組織由来間葉系幹細胞としては、採取する際の侵襲性が低く、より多数の間葉系細胞をより簡便に採取し得る点で、脂肪組織（好ましくは皮下脂肪組織）由来の間葉系細胞を好適に挙げることができる。間葉系細胞を組織から採取する方法は、常法を用いることができる。なお、上記の間葉系細胞由来の巨核球は、間葉系細胞を、第2の本発明に用いる培養培地で培養することなどにより、作製することができる。

[0085] また、上記間葉系細胞等の由来となる生物種としては脊椎動物である限り

特に制限されず、該脊椎動物としては、哺乳動物、鳥類、爬虫類、両生類、魚類等を挙げることができ、中でも、ヒト、マウス、ラット、モルモット、ウサギ、ネコ、イヌ、ウマ、ウシ、サル、ヒツジ、ヤギ、ブタ等の哺乳動物を好ましく挙げることができ、中でもヒトを特に好ましく挙げることができる。

[0086] 第2の本発明に用いる培地の組成や好適な態様は、前述の第1の本発明に用いる培地と同様である。

[0087] 第2の本発明に用いる培養培地には、TPO、ウシ血清アルブミン（BSA）、LDLコレステロール、インスリン、2-β-メルカプトエタノール等を添加してもよいが、添加しない場合に、より低コストでTPOを製造し得るなどの意義がより多く得られる。すなわち、従来から用いられているMKLI培地には、IMDM培地に加えて、TPO、BSA、LDLコレステロール、インスリン及び2-β-メルカプトエタノール（以下、これら成分をまとめて「5成分」とも表示する。）が添加されているところ、第2の本発明に用いる培養培地でこれら5成分を用いない場合は、より低コストでTPOを製造することが可能となる。脂肪前駆細胞から巨核球・血小板への分化誘導を行う際に、BSA、LDLコレステロール、インスリン及び2-β-メルカプトエタノールがいずれも必要でないことは、本発明者らが実験で確認した（本願の図5）。また、脂肪前駆細胞を培養する際に、第2の本発明に用いる培養培地でこれら5成分を用いない場合は、MKLI培地を用いた場合に比べて、TPO分泌が持続的になり、また、鉄イオン及び鉄輸送体（好ましくは鉄結合型トランスフェリン）が低濃度でもTPOを効率よく製造することができる。なお、培地中に鉄輸送体が存在していなくても、間葉系細胞等が培地中の鉄イオンを細胞内に取り込むことができる場合は、第2の本発明に用いる培養培地を、「鉄イオン及び鉄輸送体を含む間葉系細胞培養用基本培地」ではなく、「鉄イオンを含む間葉系細胞培養用基本培地」とすることもできる。

[0088] 第2の本発明における培養条件としては、間葉系細胞等を第2の本発明に

用いる培養培地で培養することによりTPOを製造し得る限り特に制限されないが、培養温度として通常12～45℃の範囲内、好ましくは15～37℃の範囲内を挙げることができ、培養期間として通常3～8日間の範囲内、好ましくは4～7日間の範囲内を挙げることができる。培養期間が長すぎると、TPOが細胞に再度取り込まれるなどして、培養培地中のTPO濃度が低下する傾向があるからである。

[0089] 第2の本発明の製造方法は、第2の本発明に用いる培養培地で間葉系細胞や間葉系細胞由来の巨核球を培養する前に、該間葉系細胞あるいは該巨核球へ誘導する前の間葉系細胞を維持培養して細胞数を増加させる工程をさらに有することが好ましい。かかる維持培養工程を有していると、最初に用意した間葉系細胞（好ましくは脂肪前駆細胞や皮下脂肪組織由来間葉系幹細胞）の数を10～40倍、好ましくは30～40倍にまで増殖させることができ、それらの間葉系細胞や該間葉系細胞由来の巨核球を第2の本発明の製造方法に用いることによって、培養後の培地（培養上清）1mL当たりのTPOの収量を格段に上昇させることができるからである。かかる維持培養に用いる培養培地としては、本発明に用いる間葉系細胞を増殖させ得る培地である限り特に制限されず、例えば、前述の間葉系細胞培養用基本培地（鉄イオンや鉄輸送体を含まないもの）などを挙げることができる。維持培養を行う場合は、血清や血清成分を含む間葉系細胞培養用基本培地を用いることが好ましい。維持培養工程では、継代や培地交換を適宜行うことが好ましい。

[0090] 第2の本発明における培養物からTPOを採取する方法としては特に制限されないが、かかる培養物から、TPOを含む培養上清を分取する方法を挙げることができる。第2の本発明の製造方法はTPOを高効率で得ることができ、例えば培養後の培地（培養上清）1mL当たりのTPOの収量（乾燥重量）として、30pg～100pgを達成することができる。

[0091] 第2の本発明の製造方法は、さらに、第2の本発明における培養物からTPOを精製する工程を有していても良い。かかる精製方法としては特に制限されないが、TPOの受容体であるc-MPL受容体を用いてTPOを精製

する方法（特表平10-511681号公報参照）や、TPOに対する特異的抗体を用いてTPOを精製する方法等を好ましく挙げることができる。

[0092] 第2の本発明の製造方法により得られるTPOは、TPOの用途としてすでに確立している、血小板産生誘導剤、血小板産生促進剤、血小板減少若しくは血小板の機能低下を伴う疾患（以下、「血小板減少症等」と表示する。）の予防又は治療剤（以下、これら3剤をまとめて「第2の本発明の剤」とも表示する。）などとして利用することができる。すなわち、TPOを造血幹細胞等に生体外で作用させることによって、生体外で血小板産生を誘導又は促進し、血小板を高効率で得ることができ、また、TPOを造血幹細胞等に生体内で作用させることによって、生体内で血小板産生を誘導又は促進し、その結果、血小板減少症等の予防や治療をなし得る。

[0093] 第2の本発明の製造方法により得られるTPOは、それ自体を血小板産生誘導剤、血小板産生促進剤、血小板減少症等の予防又は治療剤としてもよいが、常法によって適宜の製剤とすることもできる。製剤の剤型としては散剤、顆粒剤などの固形製剤であってもよいが、より優れた血小板産生誘導効果、血小板産生促進効果、血小板減少症等の予防又は治療効果を得る観点からは、溶液剤、乳剤、懸濁剤などの液剤とすることが好ましい。前述の液剤の製造方法としては、例えばTPOを溶剤と混合する方法や、さらに懸濁化剤や乳化剤を混合する方法を好適に例示することができる。以上のように、第2の本発明におけるTPOを製剤とする場合には、製剤上の必要に応じて、適宜の薬学的に許容される担体、例えば、賦形剤、結合剤、溶剤、溶解補助剤、懸濁化剤、乳化剤、等張化剤、緩衝剤、安定化剤、無痛化剤、防腐剤、抗酸化剤、着色剤、滑沢剤、崩壊剤、湿潤剤、吸着剤、甘味剤、希釈剤などの任意成分を配合することができる。なお、上記の血小板産生誘導剤や血小板産生促進剤を生体外で使用する場合は、TPOを含む培養上清そのものを、血小板産生誘導剤や血小板産生促進剤とすることもできる。

[0094] 上記の血小板産生誘導剤や血小板産生促進剤を生体外で使用する場合は、基本培地にその剤を添加し、造血幹細胞等を培養するなどして使用すること

ができる。基本培地への添加濃度としては、乾燥状態のTPO換算濃度で1 ng/mL~2.5 μg/mLの範囲内、好ましくは5 ng/mL~500 ng/mLの範囲内を挙げることができる。

[0095] 一方、生体内で使用する場合の第2の本発明の剤や、第2の本発明の予防又は治療剤は、脊椎動物、好ましくは哺乳動物、より好ましくはヒトに投与して使用することができる。かかる投与方法としては特に制限されないが、血管内投与（好ましくは静脈内投与）、腹腔内投与、腸管内投与、皮下投与等を好ましく挙げることができ、中でも、血管内投与をより好ましく挙げることができ、中でも静脈内投与をさらに好ましく挙げることができる。

[0096] 第2の本発明の剤の投与量としては、血小板減少症等の種類や、その症状の度合い、剤型、投与対象の体重等によって変わり得るが、乾燥状態のTPO換算で、例えば、1日当たり、0.2 μg/kg~20 mg/kgの範囲を好適に例示することができ、中でも、0.4 μg/kg~10 mg/kgの範囲をより好適に例示することができる。なお、第2の本発明の剤の投与は、1日のうち1~複数回に分けて行ってもよい。また、第2の本発明の剤の投与は継続的に行うことが好ましい。例えば、3日に1回以上の頻度で、2回以上継続して投与することが好ましく、中でも、2日に1回以上の頻度で、3回以上継続して投与することがより好ましく、中でも、1日に1回以上の頻度で4回以上継続して投与することが好ましい。

[0097] 第2の本発明の剤の投与対象は前述したような脊椎動物、好ましくは哺乳動物、より好ましくはヒトを挙げることができる。第2の本発明の剤に含まれるTPOを製造する際に用いた間葉系細胞等の由来である脊椎動物の種類は、第2の本発明の剤の投与対象となる脊椎動物の種類と一致していることが、より優れた血小板産生誘導効果、血小板産生促進効果、血小板減少症等の予防又は治療効果を得る観点から好ましい。

[0098] なお、第2の本発明の他の態様として、第2の本発明の剤の調製に使用するための、「第2の本発明の製造方法により得られるTPO」の使用や、血小板減少症等の予防又は治療における、「第2の本発明の製造方法により得

られる T P O」の使用や、「第 2 の本発明の製造方法により得られる T P O」を対象脊椎動物に投与することにより、血小板減少症等を予防又は治療する方法を挙げることができる。

[0099] [第 3 の本発明]

第 3 の本発明の T P O の製造方法（以下、単に「第 3 の本発明の製造方法」としては、脂肪前駆細胞を、成熟脂肪細胞への分化誘導剤（以下、単に「分化誘導剤」とも表示する。）を含む脂肪前駆細胞培養用基本培地で培養し、培養物からトロンボポエチンを採取する方法である限り特に制限されず、ここで「培地」とは、細胞を培養できる「培地成分」に水を添加した状態のものをいう。脂肪前駆細胞を、上記 3 成分を含む脂肪前駆細胞培養用基本培地で培養すると、該脂肪前駆細胞が脂肪細胞（成熟脂肪細胞）へと分化誘導され、その過程で、メカニズムは不明であるものの、T P O が分泌されると考えられる。

[0100] 第 3 の本発明に用いる脂肪前駆細胞は、第 2 の本発明における脂肪前駆細胞と同様である。より効率的に T P O を製造する観点から、第 3 の本発明に用いる脂肪前駆細胞は、C D 3 1 陰性かつ C D 7 1 陽性の脂肪前駆細胞であることが好ましく、C D 3 1 陰性、C D 7 1 陽性かつ c - M P L 陽性の脂肪前駆細胞であることがより好ましい。

[0101] 第 3 の本発明における培養に用いる培地（以下、「第 3 の本発明に用いる培養培地」と表示する。）は、脂肪前駆細胞培養用基本培地に、分化誘導剤を含有させた培地である。第 3 の本発明における「成熟脂肪細胞への分化誘導剤」とは、脂肪前駆細胞から成熟脂肪細胞への分化を誘導する物質又は組成物を意味する。かかる分化誘導剤としては公知のものを用いることができ、例えば、3 - イソブチル - 1 - メチルキサンチン（単に「イソブチルメチルキサンチン」とも表示される）；インスリン；デキサメタゾン；インドメタシン等のインドール誘導体；ロシグリタゾン及びピオグリタゾン等のチアゾール誘導体；（特開 2 0 1 0 - 1 9 3 7 2 1 号公報参照）からなる群から選択される 1 種又は 2 種以上（好ましくは 3 種以上、より好ましくは 4 種以

上)を挙げることができ、中でも、イソブチルメチルキサンチン、インスリン、デキサメタゾン及びインドメタシンからなる群から選ばれる1種又は2種以上(好ましくは3種以上)を好ましく挙げることができ、中でも、イソブチルメチルキサンチン、インスリン、デキサメタゾン及びインドメタシンの4種の組合せを特に好ましく挙げることができる。これらの分化誘導剤は、市販されているものを用いることができる。

[0102] 第3の本発明に用いる培養培地中の分化誘導剤の濃度は、用いる分化誘導剤の種類等に応じて適宜調節されるが、通常、イソブチルメチルキサンチンは、10~1000 μ M程度、好ましくは250~750 μ M程度である。インスリンは、0.1~10 μ M程度、好ましくは0.5~2.5 μ M程度である。デキサメタゾンは、0.1~10 μ M程度、好ましくは0.5~2.5 μ M程度である。インドメタシン等のインドール誘導体は、10~500 μ M程度、好ましくは50~300 μ M程度である。チアゾール誘導体は、0.1~10 μ M程度、好ましくは0.5~5 μ M程度である。

[0103] 第3の本発明における脂肪前駆細胞培養用基本培地としては、上記成熟脂肪細胞への分化誘導剤を添加した場合に、その培地で脂肪前駆細胞を培養することによりTPOを製造し得る培地であれば特に制限されないが、調製が容易であり、ロットごとのばらつきを防ぐ点から化学合成培地が好ましく、1又は2種類以上の糖(類)と、1又は2種類以上の無機塩(類)、1又は2種類以上のアミノ酸(類)、及び1又は2種類以上のビタミン(類)、及び1又は2種類以上のその他成分を含むことが好ましい。脂肪前駆細胞培養用基本培地の組成や好適な態様は、上記第1及び第2の本発明における間葉系細胞培養用基本培地と同様であるが、第3の本発明においては、脂肪前駆細胞を維持培養する場合だけでなく、脂肪前駆細胞から成熟脂肪細胞へ分化誘導する場合も、脂肪前駆細胞培養用基本培地には、血清や血清成分を含有させることが好ましい。かかる血清や血清成分としては、ウシ胎児血清が好ましく、濃度としては、培地における最終濃度で5~25%の範囲内を挙げることができる。

- [0104] 第3の本発明における培養条件としては、脂肪前駆細胞を、第3の本発明に用いる培養培地で培養することにより、TPOを製造し得る限り特に制限されないが、培養温度として通常12～45℃の範囲内、好ましくは15～37℃の範囲内を挙げることができ、培養期間として通常4～20日間の範囲内、好ましくは5～17日間の範囲内を挙げることができる。また、CO₂濃度としては、3～8%の範囲内を挙げることができ、5%を好ましく挙げることができる。
- [0105] 第3の本発明の製造方法は、第3の本発明に用いる脂肪前駆細胞を、第3の本発明に用いる培養培地で培養する前に、該脂肪前駆細胞を維持培養して細胞数を増加させる工程をさらに有することが好ましい。かかる維持培養工程を有していると、最初に用意した脂肪前駆細胞の数を10～40倍、好ましくは30～40倍にまで増殖させることができ、それらの脂肪前駆細胞を第3の本発明の製造方法に用いることによって、培養後の培地（培養上清）1mL当たりのTPOの収量を格段に上昇させることができるからである。かかる維持培養に用いる培養培地としては、本発明に用いる脂肪前駆細胞を増殖させ得る培地である限り特に制限されず、例えば、前述の脂肪前駆細胞培養用基本培地（上記分化誘導剤を含まないもの）などを挙げることができる。かかる維持培養工程では、継代や培地交換を適宜行うことが好ましい。
- [0106] 第3の本発明における培養物からTPOを採取する方法は、第2の本発明における培養物からTPOを採取する方法と同様である。第3の本発明の製造方法は、さらに、第3の本発明における培養物からTPOを精製する工程を有していても良い。かかる精製方法は、第2の本発明で述べたとおりである。
- [0107] 第3の本発明の製造方法により得られるTPOは、上記第2の本発明の製造方法により得られるTPOと特に変わるところはなく、第2の本発明によるTPOと同様の用途に用いることができる。なお、第3の本発明の他の態様として、第3の本発明の剤の調製に使用するための、「第3の本発明の製造方法により得られるTPO」の使用や、血小板減少症等の予防又は治療に

おける、「第3の本発明の製造方法により得られるTPO」の使用や、「第3の本発明の製造方法により得られるTPO」を対象脊椎動物に投与することにより、血小板減少症等を予防又は治療する方法を挙げることができる。

[0108] 以下に実施例により本発明を詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。なお、以下の実施例1～8及び15は、第1の本発明に関しており、実施例9～15は、第2の本発明に関しており、実施例16は、第3の本発明に関している。

実施例 1

[0109] [間葉系細胞からの巨核球・血小板産生]

ヒト初代培養脂肪前駆細胞 (Human Preadipocytes : HPAd) は、CELL APPLICATIONS社 (San Diego, CA) から購入した。維持培養は、DMEM培地 (Dulbecco's Modified Eagle's Medium、ライフテクノロジー社製) に、10%ウシ胎児血清 (シグマ社製)、非必須アミノ酸 (ライフテクノロジー社製)、及び100U/mL ペニシリン-ストレプトマイシン溶液 (ライフテクノロジー社製) を添加した培地を用いて行なった。継代は3日ごとに行い、2倍に希釈した。細胞を剥がす際には、0.05%トリプシン溶液 (ライフテクノロジー社製) を用いた。培地の交換は、2日ごとに行なった。

[0110] また、マウス間質細胞 (OP9細胞) は、大阪大学大学院から供与された。維持培養は、 α MEM (Minimum Essential Media、ライフテクノロジー社製) に、20%ウシ胎児血清 (ニチレイ社) を添加した培地を用いて行なった。

[0111] ヒト脂肪前駆細胞やマウス間質細胞を巨核球・血小板へ分化誘導するための培地 (MKLI培地) を作製した。MKLI培地は、IMDM培地 (Iscove's Modified Dulbecco's Medium、ライフテクノロジー社製) に、2mM L-グルタミン (ライフテクノロジー社製)、100U/mL ペニシリン-ストレプトマイシン溶液 (ライフテクノロジー社製)、0.5% BSA (シグマ社製)、4 μ g/mL LDLコレステロール (シグマ社製)、200 μ g/mL 鉄飽和トランスフェリン (シグマ社製)、10 μ g/mL インスリン (シグマ社製)、50 μ M 2- β -メルカプトエタノール (ラ

イフテクノロジー社製)、 $20\ \mu\text{M}$ 各ヌクレオチド (ATP、UTP、GTP、及びCTP) (ライフテクノロジー社製)、及び $50\ \text{ng}/\text{mL}$ ヒトトロンボポエチン (TPO、Stem Cell Technologies製) を添加し作製した。

[0112] マウス間質細胞 (OP9細胞) ならびにヒト脂肪前駆細胞 (HPAd細胞) を $5,000\ \text{個}/\text{cm}^2$ で播き、MKLI培地を用いて培養することにより分化させた。各々の細胞の分化培養開始直後、培養開始から7日目、及び10日目の細胞を、光学顕微鏡を用いて形態解析した結果を、図1に示す。マウス間質細胞及びヒト脂肪前駆細胞のいずれの場合も、培養7日目及び培養10日目では大型の細胞である巨核球様細胞が観察された (ホワイトボックスにて示す)。

[0113] また、分化培養後8日目のヒト脂肪前駆細胞を、細胞核を染める染色剤であるPI (Propidium iodide、シグマ社製) にて染色し、フローサイトメトリ法を用いて測定した。その結果を図2左に示す。分化培養後8日目のヒト脂肪前駆細胞において、巨核球の特徴である多倍核化が起きていることが示された。

[0114] 更に、分化培養後10日目のヒト脂肪前駆細胞を、PE (R-フィコエリスリン) 標識抗CD41抗体 (BDバイオサイエンス社製) 及びFITC標識抗CD42b抗体 (BDバイオサイエンス社製) で直接ラベルし、フローサイトメトリ法を用いて測定した。その結果を図2右に示す。CD41 (血小板糖タンパク質IIb (platelet glycoprotein IIb)) 及びCD42b (血小板糖タンパク質Ib α (platelet glycoprotein Ib α)) はいずれも、巨核球及び血小板の特異的マーカーである。分化培養後10日目のヒト脂肪前駆細胞には、CD41及びCD42bの両方が発現している細胞が見られる。

実施例 2

[0115] [脂肪前駆細胞から産生された巨核球及び血小板の機能]

脂肪前駆細胞から産生された巨核球及び血小板が、各々機能を有するかど

うかを検討するために、血小板産生能と血流状態下での血栓形成能を解析した。図3は、該血栓形成能の解析方法の模式図である。まず、マウス皮下脂肪組織を単離後、コラゲナーゼを加え37℃1時間インキュベーションし、遠心分離により下層に細胞層を得た。その後、実施例1に記載の通り、これらの細胞を維持用培地で3回継代した後、同方法を用いて分化させた巨核球を、蛍光色素CFSE (5-(and 6)-carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester、同人化学研究所製)を用いて標識した。マウスに放射線を2グレイ照射し、これによって得た血小板減少マウスに、CFSEで標識した 5×10^6 個の巨核球を輸血した。ここにおいて、マウスから採血した血液を、PE標識抗CD41抗体を用いて染色し、フローサイトメトリー法にてCFSEとCD41の二重陽性細胞を確認することで、マウス体内におけるCFSEで標識した巨核球による血小板放出能を確認した。続いて、血小板を含む全血サンプルを採取し、血流状態下での血栓形成能を、血栓形成能解析システムT-TAS (登録商標) (Total Thrombus-formation Analysis System、藤森工業社製)にて解析した。

[0116] 図4上段は、上記CFSEで標識した巨核球を輸血した血小板減少マウスから得た血液サンプルを、T-TASを用いて解析した結果である。チップ上に血栓が形成されていることが確認できた(図4上段左)が、この血栓には蛍光標識された血小板が取り込まれていることが分かる(図4上段右)。これに対し、測定用コラーゲン固相チップのみ(図4下段左)、及び巨核球を輸血していない血小板減少マウスの血液サンプル(図4下段右)を用いて血栓形成能を測定しても、血栓の形成は認められないことが示された。

以上により、本発明の製造方法により脂肪前駆細胞から分化した巨核球及び血小板は生理的機能を有すること、すなわち、かかる巨核球は血小板産生能を有し、前記血小板や前記巨核球から産生される血小板は血栓形成能を有することが示された。

実施例 3

[0117] [巨核球・血小板産生誘導物質の同定]

脂肪前駆細胞からの巨核球・血小板産生誘導に重要な因子を同定するために、基本培地（IMDM培地に2 mM L-グルタミン、100 U/mL ペニシリン-ストレプトマイシン溶液、及び20 μM 各ヌクレオチド（ATP、UTP、GTP、及びCTP）を加えたもの）に、巨核球・血小板への分化誘導培地（MKLI培地）に含まれる各試薬をそれぞれ加えた培地を製作した。すなわち、前述の基本培地に対し、0.5% ウシ血清アルブミン、10 μg/mL インスリン、4 μg/mL LDLコレステロール、200 μg/mL 鉄飽和トランスフェリン（鉄結合型トランスフェリン）、又は50 μM 2-β-メルカプトエタノールを添加した培地を計5種類製作した（図5）。実施例1記載の方法で維持培養していたマウス脂肪前駆細胞を、上記5種類の培地と、基本培地自体の計6種類（図5）の各培地で7日間培養した。

[0118] それぞれの培地で培養後7日目のマウス脂肪前駆細胞を、FITC標識抗CD41抗体で直接ラベルし、フローサイトメトリー法を用いて測定した。その結果、基本培地にBSA、LDLコレステロール、インスリン又は2-β-メルカプトエタノールを添加した培地では、巨核球及び血小板の特異的マーカーであるCD41が発現している細胞がいずれも見られず、基本培地に鉄結合型トランスフェリンを添加した培地でのみ、巨核球及び血小板の特異的マーカーであるCD41が発現している細胞が見られ、巨核球及び血小板が産生していることが示された（図5）。

[0119] この結果を踏まえ、トランスフェリン受容体であるCD71をノックダウンした脂肪前駆細胞が、巨核球及び血小板への分化能を有しているかを調べた。ヒト脂肪前駆細胞に対し、CD71のsiRNA（siRNA-CD71）（センス鎖の配列を配列番号1に示し、アンチセンス鎖の配列を配列番号2に示す）あるいはそのスクランブルオリゴ（ネガティブコントロール）（センス鎖の配列を配列番号3に示し、アンチセンス鎖の配列を配列番号4に示す）を遺伝子導入した。その48時間後、ヒト脂肪前駆細胞を基本培地にトランスフェリンのみを添加した培地を用いて4日間培養した。

[0120] 培養後4日目のヒト脂肪前駆細胞を、FITC標識抗CD41抗体で直接ラベルし、フローサイトメトリー法を用いて測定した。その結果、CD71をノックダウンしたヒト脂肪前駆細胞では、巨核球及び血小板の産生が認められなかった(表1)。これより、脂肪前駆細胞からの巨核球・血小板誘導には、トランスフェリン受容体を介した経路が必要であることが明らかとなった。

[0121] [表1]

	0日目 (siRNAの導入から48時間後)		4日目	
	CD71	CD41	CD71	CD41
	%	%	%	%
siRNA-CD71	5.7±0.2	0.1>	7.5±0.7	0.1>
ネガティブコントロール	14.6±0.2	0.3±0.1	13.8±0.9	9.5±1.3

実施例 4

[0122] [鉄結合型トランスフェリンの濃度の検討]

実施例1記載の方法で維持培養していたヒト脂肪前駆細胞を用意した。実施例3記載の基本培地に種々の濃度の鉄結合型トランスフェリンを加えた培地にて、前述のヒト脂肪前駆細胞を培養し、培養開始から4日目の細胞におけるCD41 (巨核球及び血小板の特異的マーカー) 陽性細胞の割合 (%) を測定した結果を表2に示す。

[0123] [表2]

	鉄結合型トランスフェリン(μg/mL)					
	0	25	50	100	200	400
CD41 (%)	0.1>	15.5±9.2	18±9.9	17.5±9.2	19±8.5	11±7.1

[0124] この結果から、従来のMKL1培地における鉄結合型トランスフェリンの濃度である200μg/mLよりも該濃度が低くても、すなわち、鉄結合型

トランスフェリン濃度が25～200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 未満（好ましくは50～200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 未満）であっても、200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の場合と同程度の巨核球及び血小板産生が達成されることが示された。

実施例 5

[0125] [培養培地への鉄キレート剤及びアポトランスフェリン添加の影響]

続いて、脂肪前駆細胞からの巨核球・血小板誘導における鉄イオンの影響を検討するため、前述の脂肪前駆細胞を用いて解析を行った。具体的には、細胞を200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の鉄結合型トランスフェリンを添加した基本培地に鉄キレート剤であるデスフェラル（ノバルティス ファーマ社製）を添加したもの（基本培地+鉄結合型トランスフェリン+デスフェラル）、あるいは基本培地のみ非鉄結合型トランスフェリンであるアポトランスフェリン（Athens Research and Technology社製）を添加したもの（基本培地+アポトランスフェリン）を用意し、これらを用いて培養後4日目の細胞におけるCD41（巨核球や血小板の特異的マーカー）陽性細胞の割合（%）を測定した。デスフェラルを添加した場合の結果を表3に示し、アポトランスフェリンを添加した場合の結果を表4に示す。

[0126] [表3]

	デスフェラル (mg/mL)					
	0	0.005	0.05	0.5	5	50
CD41 (%)	52±9.9	36±11.3	35.5±10.6	14±5.7	10.5±6.4	5±2.8

[0127] [表4]

	アポトランスフェリン ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	
	200	400
CD41 (%)	16.5±4.95	14.5±3.54

[0128] 表3や表4の結果から分かるように、鉄キレート剤やアポトランスフェリンの添加量に依存して、CD41（巨核球や血小板の特異的マーカー）陽性細胞の減少が認められた。以上のことから、脂肪前駆細胞等の間葉系細胞から巨核球及び血小板を産生させるには、鉄イオン及び鉄輸送体がきわめて重

要であり、これらのうち、少なくとも鉄イオンは必須であることが示された。

実施例 6

[0129] [脂肪前駆細胞由来の血小板と、造血幹細胞由来の血小板との血栓形成能の比較]

脂肪前駆細胞由来の血小板と、造血幹細胞由来の血小板との血栓形成能を比較するために、以下の実験を行った。

[0130] C57BL/6系統のマウスの組織由来造血幹細胞を、TPO (50 ng/mL) を含有するMKL1培地 (ただし、TPOは、Stem Cell Technologies社から購入したものをを用いた) で培養して血小板へ分化誘導させ、血小板を得た。かかるマウスから採取した血液 (内在性血小板を 1×10^5 個含む) に、前述の分化誘導により得られた血小板 (2×10^4 個) を加えて血液サンプルとした。また、前述の組織由来造血幹細胞に代えて、同系統のマウスの組織由来脂肪前駆細胞を用い、TPOを含有するMKL1培地に代えて、TPOを除いたMKL1培地を用いたこと以外は同様の方法で、血液サンプルを作製した。両血液サンプルをそれぞれ、血栓形成能解析システムT-TAS (登録商標) (Total Thrombus-formation Analysis System、藤森工業社製) のコラーゲン固相チップに還流して血栓を形成後、これに寄与した血小板数の割合 (%) を求めた。その結果、造血幹細胞由来血小板のサンプルでは $52.5 \pm 5.3\%$ であったのに対し、脂肪前駆細胞由来血小板のサンプルでは $77.8 \pm 5.1\%$ となり、血栓形成に寄与した血小板数の割合は、脂肪前駆細胞由来血小板が有意に ($P = 0.0257$) 高いことが明らかとなった。このことから、脂肪前駆細胞由来血小板は、より少ない血小板数で、造血幹細胞由来血小板と同等の血小板輸血効果が得られることが強く示唆された。

実施例 7

[0131] [脂肪前駆細胞からの巨核球及び血小板の産生における、c-MPL阻害抗体の影響]

脂肪前駆細胞からの巨核球・血小板の産生における、トロンボポエチン（TPO）とトロンボポエチン受容体（c-MPL）の働きを調べるために、以下の実験を行った。

[0132] トロンボポエチン受容体であるc-MPLは、トロンボポエチンが結合すると活性化し、c-MPLが関与するシグナル経路が活性化される。ヒトc-MPLの機能を阻害するモノクローナル抗体として、AMM2抗体（免疫生物研究所（IBL）社製）を用意した。また、実施例1記載の方法で維持培養していたヒト脂肪前駆細胞を用意した。

[0133] 実施例3記載の基本培地に、200 μ g/mLの鉄結合型トランスフェリンと、5 μ g/mL又は10 μ g/mLのAMM2抗体とを加えた培地にて、前述のヒト脂肪前駆細胞を4日間培養した。また、AMM2抗体を加えなかったこと以外は同様の方法でも前述のヒト前駆細胞の培養を行った。これら3種類の培養における細胞を、FITC標識抗CD41抗体で直接ラベルし、フローサイトメトリー法を用いてCD41陽性細胞数を測定した。その結果を図6に示す。

[0134] 図6から分かるように、培地中のAMM2抗体の濃度が高くなるにしたがって、CD41（巨核球及び血小板の特異的マーカー）陽性細胞数が減少した。このことから、脂肪前駆細胞から巨核球及び血小板を誘導するには、トロンボポエチン受容体を介した経路が必要であることが明らかとなった。

実施例 8

[0135] [血小板に効率良く分化する細胞の表面抗原の同定]

血小板に効率良く分化する脂肪前駆細胞の表面抗原を同定するために、以下のような実験を行った。

[0136] マウスから皮下脂肪組織を単離後、コラゲナーゼを加え37 $^{\circ}$ C、1時間インキュベーションし、遠心分離により下層に細胞層を得た。その後、それらの細胞を、蛍光標識抗CD45抗体（BD Bioscience社製）、蛍光標識抗Ter119抗体（BD Bioscience社製）、7AAD（BD Bioscience社製）でラベルし、フローサイトメトリー法を用いて蛍光を測定した結果を図7の右上

パネルに示す。図7の右上パネルに示される細胞のうち、CD45陰性、Ter119陰性かつ7-AAD陰性の細胞（図7の右上パネルの中央を区切る線の下側の細胞）を分取した。CD45は赤血球及び血小板以外の造血細胞（白血球、リンパ球、好酸球、単球、好塩基球、好中球）のマーカーとして知られ、Ter119は成熟赤血球や赤血球系前駆細胞のマーカーとして知られ、7-AAD（7-アミノ-アクチノマイシンD）は死細胞のマーカーとして知られている。

[0137] 次に、分取したCD45陰性、Ter119陰性かつ7-AAD陰性の細胞を、蛍光標識抗CD31抗体（BD Bioscience社製）でラベルし、フローサイトメトリー法を用いて蛍光を測定した結果を図7の左下パネルに示す。図7の左下パネルに示される細胞のうち、CD31陰性の細胞（図7の左下パネルの中央を区切る線の下側の細胞）を分取した。CD31は血管内皮細胞のマーカーとして知られている。

[0138] 次に、先に分取した細胞（CD45陰性、Ter119陰性、7-AAD陰性かつCD31陰性）を、蛍光標識抗c-MPL抗体（BD Bioscience社製）及び蛍光標識抗CD71抗体（BD Bioscience社製）でラベルし、フローサイトメトリー法を用いて蛍光を測定した結果を図7の右下パネルや、図8の左パネルに示す。図8の左パネルに示される細胞のうち、左下（c-MPL陰性かつCD71陰性）、右下（c-MPL陰性かつCD71陽性）、右上（c-MPL陽性かつCD71陽性）の各部分の細胞を分取した。

[0139] 図8の左パネルの各部分に示される細胞を、実施例3記載の基本培地に200 μ g/mLの鉄結合型トランスフェリンを加えた培地にてそれぞれ培養し、培養開始から5日目の細胞におけるCD41（巨核球及び血小板の特異的マーカー）陽性細胞の割合（%）を測定した。その結果を図8の右に示す（右上パネル、右中央パネル、右下パネル）。図8の右下のパネルは、図8の左パネルの左下部分に示される細胞（CD45陰性、Ter119陰性、CD31陰性、c-MPL陰性かつCD71陰性の細胞）（すなわち、CD31陰性、c-MPL陰性かつCD71陰性の脂肪前駆細胞）を培養したと

きのCD41陽性細胞の検出結果及びその割合（10.8%）を示し、図8の右中央のパネルは、図8の左パネルの右下部分に示される細胞（CD45陰性、Ter119陰性、CD31陰性、c-MPL陰性かつCD71陽性の細胞）（すなわち、CD31陰性、c-MPL陰性かつCD71陽性の脂肪前駆細胞）を培養したときのCD41陽性細胞の検出結果及びその割合（26.9%）を示し、図8の右上パネルは、図8の左パネルの右上部分に示される細胞（CD45陰性、Ter119陰性、CD31陰性、c-MPL陽性かつCD71陽性の細胞）（すなわち、CD31陰性、c-MPL陽性かつCD71陽性の脂肪前駆細胞）を培養したときのCD41陽性細胞の検出結果及びその割合（62.3%）を示す。このように、CD31陰性、c-MPL陰性かつCD71陽性の脂肪前駆細胞や、CD31陰性、c-MPL陽性かつCD71陽性の脂肪前駆細胞は、CD31陰性、c-MPL陰性かつCD71陰性の脂肪前駆細胞と比較して、巨核球・血小板への誘導効率が顕著に高く（2.5倍以上）、中でも、CD31陰性、c-MPL陽性かつCD71陽性の脂肪前駆細胞は、CD31陰性、c-MPL陰性かつCD71陰性の脂肪前駆細胞と比較して、巨核球・血小板への誘導効率が約5.8倍も高かった。

[0140] 本実施例8の実験により、CD31陰性、c-MPL陰性かつCD71陽性の脂肪前駆細胞や、CD31陰性、c-MPL陽性かつCD71陽性の脂肪前駆細胞は、巨核球・血小板へ効率良く分化すること、及び、CD31陰性、c-MPL陽性かつCD71陽性の脂肪前駆細胞は巨核球・血小板へ特に効率良く分化することが示された。

実施例 9

[0141] [脂肪前駆細胞から巨核球・血小板への分化誘導に伴うTPO産生]

まず、巨核球・血小板への分化誘導培地（“MKLI培地 TPO-”）を調製した。かかる分化誘導培地の組成は、MKLI培地（例えば非特許文献9）の251ページ2.2参照）の組成からTPOのみを抜いた組成であり、具体的には以下のとおりである。

[0142] I MDM培地 (Iscove's Modified Dulbecco's Medium、ライフテクノロジー社製) に、2 mM L-グルタミン (ライフテクノロジー社製)、100 U/mL ペニシリン-ストレプトマイシン溶液 (ライフテクノロジー社製)、0.5% ウシ血清アルブミン (シグマ社製)、4 μ g/mL LDLコレステロール (シグマ社製)、200 μ g/mL 鉄飽和トランスフェリン (鉄結合型トランスフェリン) (シグマ社製)、10 μ g/mL インスリン (シグマ社製)、50 μ M 2- β -メルカプトエタノール (ライフテクノロジー社製)、及び20 μ M 各ヌクレオチド (ATP、UTP、GTP、及びCTP) (ライフテクノロジー社製) を添加した培地。

[0143] マウス初代培養脂肪前駆細胞は、マウス皮下脂肪組織を単離後、コラゲナーゼを加え37°Cで1時間インキュベーションし、遠心分離により下層に細胞層を得た。また、ヒト初代培養脂肪前駆細胞 (Human Preadipocytes: HPAd) は、CELL APPLICATIONS社 (San Diego, CA) から購入した。双方の維持培養は、DMEM培地 (Dulbecco's Modified Eagle's Medium、ライフテクノロジー社製) に、10% ウシ胎児血清 (シグマ社製)、非必須アミノ酸 (ライフテクノロジー社製)、及び100 U/mL ペニシリン-ストレプトマイシン溶液 (ライフテクノロジー社製) を添加した培地を用いて行なった。継代は3日ごとに行い、2倍に希釈した。細胞を剥がす際には、0.05%トリプシン溶液 (ライフテクノロジー社製) を用いた。培地の交換は、2日ごとに行なった。

[0144] 得られたマウス及びヒト脂肪前駆細胞10⁶個を、2 mLの“MKLI培地 TPO-”を用いて12日間培養した。脂肪前駆細胞の培養開始直後、培養開始から7日目、及び12日目の各培養上清中のTPO濃度を、TPO Quantikine ELISA キット (R&D Systems社製) にて測定した。マウス脂肪前駆細胞を用いた結果を表5に示す。この結果から、脂肪前駆細胞から巨核球・血小板への分化誘導刺激により、TPOの分泌が惹起されることが明らかとなった。

[0145]

[表5]

分化誘導後	0日目	7日目	12日目
培養上清中の TPO (pg/mL)	検出限界以下	170.1 ± 8.1	8 ± 2

実施例 10

[0146] [産生されたTPOの血小板産生活性]

脂肪前駆細胞から巨核球・血小板を産生する過程において分泌されるTPOの活性を、これを用いたマウス造血幹細胞から巨核球・血小板への分化誘導能力の有無によって検討した。血小板産生の有無は、光学顕微鏡による形態解析、及び、フローサイトメトリー法を用いた血小板特異的マーカーCD41の発現解析により行った。これらの結果を図9に示す。

[0147] 図9の上段パネルは、脂肪前駆細胞を“MKLI培地 TPO-”を用いて培養した際の培養上清（TPO濃度：43.1 ± 4.9 pg/mL）により造血幹細胞を培養した結果を示す。造血幹細胞の培養開始から2日目及び8日目のいずれにおいても、血小板産生が認められ、8日目におけるCD41陽性細胞の割合は、培養前の造血幹細胞における割合（1.26%）から、15.2%にまで上昇した。

[0148] 図9の中段パネルは、TPO（50 ng/mL）を含有するMKLI培地（ただし、TPOは、Stem Cell Technologies社から購入したものをを用いた）により造血幹細胞を培養した結果を示す。造血幹細胞の培養開始から2日目及び8日目のいずれにおいても、血小板産生がいくらか認められた。8日目におけるCD41陽性細胞の割合は、5.56%と、培養前の造血幹細胞における割合（1.26%）よりも上昇したものの、脂肪前駆細胞の培養上清を用いた図9の上段パネルの場合ほどではなかった。

[0149] 図9の下段パネルは、TPOを含有しない“MKLI培地 TPO-”により造血幹細胞を培養した結果を示す。造血幹細胞の培養開始から2日目及び8日目のいずれにおいても、血小板産生は認められず、死細胞が検出され、また、CD41陽性細胞も認められなかった。

[0150] 以上の結果から、脂肪前駆細胞から血小板を産生する過程において分泌されるTPOは、造血幹細胞を巨核球・血小板へ分化誘導するためにTPOに求められる活性を有していることが示された。また、脂肪前駆細胞の培養上清は、造血幹細胞から巨核球・血小板へと、非常に高効率に分化誘導する活性を有していることが明らかとなった。

実施例 11

[0151] [TPO産生誘導に関与するトランスフェリン受容体]

MKL1培地からウシ血清アルブミン、インスリン、LDLコレステロール及び2-β-メルカプトエタノールを除いた培地を用意した。かかる培地は、MKL1培地のうち、基本培地に相当する培地（イスコフ改変ダルベッコ培地+MDMに2mM L-グルタミン、100U/mL ペニシリン-ストレプトマイシン溶液、及び20μM 各ヌクレオチド（ATP、UTP、GTP、及びCTP）を加えた培地）に、200μg/mLの鉄結合型トランスフェリンを加えた培地（“基本培地+トランスフェリン”）であり、該培地は、本願の詳細な説明中の「本発明における特に好適な基本培地」に、200μg/mLの鉄結合型トランスフェリンを加えた培地に相当する。

[0152] 脂肪前駆細胞にトランスフェリン受容体CD71のsiRNA（siRNA-CD71）（センス鎖の配列を配列番号1に示し、アンチセンス鎖の配列を配列番号2に示す）あるいはそのスクランブルオリゴ（ネガティブコントロール）（センス鎖の配列を配列番号3に示し、アンチセンス鎖の配列を配列番号4に示す）を遺伝子導入した後、前述の“基本培地+トランスフェリン”にて培養した。それぞれの培養上清中のTPOを、TPO Quantikine ELISA キット（R&D Systems社製）にて測定した。その結果を表6に示す。表6中の測定不能は、計測値がバックグラウンドと同等であったことを意味する。表6から分かるように、スクランブルオリゴを用いた脂肪前駆細胞からはTPOの分泌が認められたのに対し、トランスフェリン受容体CD71をsiRNAによりロックダウンした脂肪前駆細胞からはTPOの分泌が認められなかった。このことから、TPOの産生誘導にはトランスフェリン受容体を介する必要

があることが明らかとなった。

[0153] [表6]

	0日目 (siRNAの導入から48時間後)		2日目		4日目	
	CD71	TPO	CD71	TPO	CD71	TPO
	%	pg/mL	%	pg/mL	%	pg/mL
siRNA-CD71	5.7±0.2	測定不能	13.7±0.6	測定不能	7.5±0.7	測定不能
ネガティブコントロール	14.5±0.3	測定不能	32.0±0.1	6.7±2.9	5.7±0.2	46.2±17.8

実施例 12

[0154] [“MKLI培地 TPO-”を用いた場合と、“基本培地+鉄結合型トランスフェリン”を用いた場合の、TPO産生の比較]

ヒト脂肪前駆細胞を、1) “MKLI培地 TPO-”あるいは2) 前述の“基本培地+鉄結合型トランスフェリン”(200µg/mLの鉄結合型トランスフェリンを含有)にて、37℃8日間培養した。ヒト脂肪前駆細胞の培養開始直後(0日目)、培養開始から4日目、及び8日目の各培養上清中のTPO濃度を、TPO Quantikine ELISA キット (R&D Systems社製)にて測定した。その結果を表7に示す。

[0155] [表7]

	TPO (pg/mL)		
	0日目	4日目	8日目
1) MKLI培地 TPO-	検出限界以下	69.4±2.0	36.1±5.8
2) 基本培地+鉄結合型トランスフェリン	検出限界以下	49.4±11.3	44.4±4.2

[0156] 表7の結果から、“基本培地+鉄結合型トランスフェリン”を用いた場合は、“MKLI培地 TPO-”を用いた場合よりも、培養4日目のTPO濃度は低かったが、8日目でも4日目に近い水準を保ち、“MKLI培地 TPO-”を用いた場合よりも高かった。

実施例 13

[0157] [鉄結合型トランスフェリンの濃度の検討]

実施例 9 記載の方法で維持培養していたヒト脂肪前駆細胞を用意した。実施例 11 記載の、基本培地に種々の濃度の鉄結合型トランスフェリンを加えた培地にて、前述のヒト脂肪前駆細胞を培養し、培養開始から 4 日目の細胞における CD41 (巨核球及び血小板の特異的マーカー) 陽性細胞の割合 (%) を測定した結果を表 8 に示す。

[0158] [表8]

	鉄結合型トランスフェリン($\mu\text{g/mL}$)					
	0	25	50	100	200	400
TPO (pg/mL)	測定限界 以下	測定限界 以下	7.5 ± 1.1	10.8 ± 3.5	10 ± 2.4	測定限界 以下

[0159] この結果から、従来の MKL1 培地における鉄結合型トランスフェリンの濃度である $200 \mu\text{g/mL}$ よりも該濃度が低くても、すなわち、鉄結合型トランスフェリン濃度が $100 \mu\text{g/mL}$ であっても、 $200 \mu\text{g/mL}$ の場合と同程度あるいはそれを上回る濃度の TPO が産生されることが示され、鉄結合型トランスフェリンが $50 \mu\text{g/mL}$ であっても、産生される TPO 濃度は $200 \mu\text{g/mL}$ の場合と比較して 25% 程度の低下にとどまることが示された。

実施例 14

[0160] [脂肪前駆細胞等の間葉系細胞から巨核球・血小板への分化誘導に伴う TPO 産生]

上記実施例 9 などの結果から、脂肪前駆細胞が巨核球、血小板に分化する過程において、その培養上清中に TPO の分泌がなされることが確認できた。そこで、この TPO の産生、分泌を行う細胞を明らかにするため、脂肪前駆細胞を含む間葉系細胞の巨核球、血小板への分化誘導前後における TPO の遺伝子発現を確認した。具体的には、実施例 9 に記載のヒト及びマウスの初代培養脂肪前駆細胞、ならびに、株化細胞であるマウス骨髓間葉系幹細胞 (HS-22、独立行政法人医薬基盤研究所 JCRB 細胞バンクから購入

）、骨髄間質細胞（OP9、大阪大学大学院から供与）、マウス脂肪前駆細胞（3T3-L1、独立行政法人医薬基盤研究所 JCRB細胞バンクから購入）を用いた。これら細胞はすべて、分化誘導培地（“MKLI培地 TPO-”）を用いて、巨核球、血小板への分化誘導を行った。

[0161] TPOの遺伝子発現解析は、分化誘導前の間葉系細胞ならびに分化誘導後の巨核球及び血小板に対して、リアルタイムPCR法を用いて行った。始めに、これら細胞からライゾール（ライフテクノロジー社製）を用いてRNAを抽出し、これを用いてQuantiTect Reverse Transcription（キアゲン社製）にて逆転写反応を行った。続いて、得られたcDNAに対しTaqMan(登録商標)Gene Expression Assays（ライフテクノロジー社製）から購入したTPO及び内因性コントロールであるGAPDHのプローブを用いて、定量発現解析を行った。これらプローブは、ヒト細胞種の解析には、TPO：Hs01061346_m1、GAPDH：Hs02758991_g1を用い、マウス細胞種の解析には、TPO：Mm00437040_m1、GAPDH：Mm99999915_g1を用いた。測定は、7500 FastリアルタイムPCRシステム（ライフテクノロジー社製）にて行い、得られたデータは内因性コントロールであるGAPDHの値にて補正を行った。初代培養細胞の結果を表9に示し、株化細胞の結果を表10に示す。

[0162] [表9]

	TPO mRNA		
	分化誘導前	5日目	8日目
ヒト脂肪前駆細胞 (HPAd)	16.5±0.8	15.9±0.6	16.0±0.5
マウス脂肪前駆細胞 (皮下脂肪組織由来)	13.8±0.4	13.2±0.5	13.9±0.1

[0163] [表10]

	TPO mRNA	
	分化誘導前	6日目
間葉系幹細胞 (HS-22)	16.5±0.5	11.8±0.1
間質細胞 (OP9)	11.3±0.4	8.9±0.0
脂肪前駆細胞 (3T3-L1)	13.4±0.1	12.7±0.1

[0164] これらの結果から、脂肪前駆細胞を含む間葉系細胞及びこれら細胞が分化した巨核球・血小板にはTPO mRNAが発現していることが明らかとな

った。

[0165] また、ヒト脂肪前駆細胞を“MK L I 培地 T P O-”で培養した細胞から、トータルRNAを抽出した。かかる抽出は、トライゾール（ライフテクノロジー社製）を用いたトライゾール法により行った。Quan Tect Reverse Transcription kit（キアゲン社製）を用いて、前述の抽出RNAからcDNA合成を行った。かかるcDNAを鋳型にPCRを施行し、そのPCR産物のヌクレオチド配列を決定したところ、そのヌクレオチド配列は、ヒトTPOの公知のヌクレオチド配列であるアクセッションナンバーNM_000460のヌクレオチド配列と一致した。

[0166] これらの結果は、間葉系細胞から巨核球、血小板に分化する過程において、これら細胞がTPOを産生し、培養上清中に分泌することを支持するものである。

実施例 15

[0167] [脂肪前駆細胞の株化、及び、株化脂肪前駆細胞からの血小板産生やTPO産生]

脂肪前駆細胞を株化し、その株化脂肪前駆細胞から血小板やTPOを製造し得るかを念のために確認するために、以下の実験を行った。なお、以下の（1）には、脂肪前駆細胞の株化を記載し、以下の（2）には、CD31陰性、CD71陽性かつc-MPL陽性の脂肪前駆細胞の株化を記載する。

[0168] （1）脂肪前駆細胞の株化

10%ウシ胎児血清（FBS）（シグマ社製）を含むDMEM培地（Dulbecco's Modified Eagle's Medium、ライフテクノロジー社製）を調製し、脂肪前駆細胞培養用基本培地とした。かかる脂肪前駆細胞培養用基本培地に、成熟脂肪への分化誘導剤である3-isobutyl-1-methylxanthin（IBMX）（シグマ社製）、インスリン（シグマ社）、デキサメタゾン（シグマ社製）及びインドメタシン（シグマ社製）を添加することによって、分化誘導剤を含む脂肪前駆細胞培養用基本培地を調製した。前述の分化誘導剤の添加濃度は、IBMXを500 μ M、インスリンを1.6 μ M、デキサメタゾンを1 μ M、イ

ンドメタシンを200 μ Mとした。

[0169] 培養皿に入れた前述の分化誘導剤を含む脂肪前駆細胞培養用基本培地にて、ヒト脂肪前駆細胞を、37℃、CO₂濃度5%条件下で14日間培養した。培養後の細胞（成熟脂肪細胞）を、トリプシンを用いて培養皿からはがし、その細胞にトリプシン及び前述の脂肪前駆細胞培養用基本培地を加えて遠心分離器にかけ、その上清に浮いてくる細胞（成熟脂肪細胞）を回収した。20% FBSを含むDMEM培地を十分量入れた培養フラスコに、回収した成熟脂肪細胞を加え、該成熟脂肪細胞を、培地が充満した培養フラスコの上面の内側に浮遊、付着させて培養した（いわゆる「天井培養」）。かかる天井培養は、37℃、CO₂濃度5%条件下で7日間行った。その後、培養フラスコ内の培地を注出して約4分の1の量にまで減らし、細胞を培養フラスコの下面に付着させた状態で、37℃、CO₂濃度5%条件下にて7日間培養を行った。このように培養することにより、脂肪前駆細胞株が得られた。得られた脂肪前駆細胞株は、前述の脂肪前駆細胞培養用基本培地で継代培養を行った。

[0170] (2) CD31陰性、CD71陽性かつc-MPL陽性の脂肪前駆細胞の株化

FACSを用いたフローサイトメトリー法（上記実施例8参照）にて、ヒト脂肪前駆細胞から、CD31陰性、CD71陽性かつc-MPL陽性の脂肪前駆細胞を分離した。培養皿に入れた前述の分化誘導剤を含む脂肪前駆細胞培養用基本培地（本実施例15の上記（1）参照）を用意し、該培地にて、「分離後すぐの脂肪前駆細胞」、又は、「分離後に前述の脂肪前駆細胞培養用基本培地で培養した後の脂肪前駆細胞」を、37℃、CO₂濃度5%条件下で14日間培養した。培養後の細胞（成熟脂肪細胞）を、トリプシンを用いて培養皿からはがし、その細胞にトリプシン及び前述の脂肪前駆細胞培養用基本培地を加えて遠心分離器にかけ、その上清に浮いてくる細胞（成熟脂肪細胞）を回収した。20% FBSを含むDMEM培地を十分量入れた培養フラスコに、回収した成熟脂肪細胞を加え、該成熟脂肪細胞を、培地が充満

した培養フラスコの上面の内側に浮遊、付着させて培養した（いわゆる「天井培養」）。かかる天井培養は、37℃、CO₂濃度5%条件下で7日間行った。その後、培養フラスコ内の培地を注出して約4分の1の量にまで減らし、細胞を培養フラスコの下面に付着させた状態で、37℃、CO₂濃度5%条件下にて7日間培養を行った。このように培養することにより、脂肪前駆細胞株が得られた。得られた脂肪前駆細胞株は、前述の脂肪前駆細胞培養用基本培地で継代培養を行った。

[0171] 本実施例15の上記(1)又は(2)で得られた脂肪前駆細胞株を、上記実施例1に記載の方法で巨核球、血小板へ分化誘導を行ったところ、実施例1と同様に、巨核球や血小板の産生が確認できた。また、これらの脂肪前駆細胞株について、上記実施例10に記載の方法で巨核球、血小板への分化誘導を行ったところ、実施例10と同様に、TPOの産生が確認できた。

実施例 16

[0172] [脂肪前駆細胞から成熟脂肪細胞への分化過程でのTPO産生]

脂肪前駆細胞から成熟脂肪細胞への分化過程でTPOが産生されるかどうかを確認するために、以下の実験を行った。

[0173] 上記実施例15における分化誘導剤を含む脂肪前駆細胞培養用基本培地にて、ヒト脂肪前駆細胞を、37℃、CO₂濃度5%条件下で14日間培養した。その培養上清中のTPO濃度をTPO Quankine ELISAキット(R&D System社製)にて測定した。その結果、培養開始直後(0日目)の培養上清中のTPO濃度は検出限界以下であったのに対し、培養開始から14日目の培養上清中のTPO濃度は、 51.5 ± 21.9 pg/mLであった。この結果から、脂肪前駆細胞に対して成熟脂肪細胞への分化刺激を与えると、その分化過程で、TPO分泌が惹起されることが明らかとなった。

産業上の利用可能性

[0174] 第1の本発明によれば、脂肪前駆細胞等の間葉系細胞から、血小板産生能を有する巨核球及び/又は血栓形成能を有する血小板を、比較的短時間で簡便かつ多量に、しかもより低コストかつより効率的に生体外で製造し得る、

より実用的な巨核球及び／又は血小板の製造方法を提供することができる。
また、第2や第3の本発明によれば、血小板産生を誘導・促進する能力を有するTPOを、簡便かつ多量に製造する方法を提供することができる。

請求の範囲

- [請求項1] 間葉系細胞を、鉄イオン及び鉄輸送体を含む間葉系細胞培養用基本培地で培養し、培養物から巨核球及び／又は血小板を採取することを特徴とする巨核球及び／又は血小板の製造方法。
- [請求項2] 間葉系細胞又は間葉系細胞由来の巨核球を、鉄イオン及び鉄輸送体を含む間葉系細胞培養用基本培地で培養し、培養物からトロンボポエチンを採取することを特徴とするトロンボポエチンの製造方法。
- [請求項3] 間葉系細胞が、CD31陰性かつCD71陽性の間葉系細胞であることを特徴とする請求項1又は2に記載の製造方法。
- [請求項4] CD31陰性かつCD71陽性の間葉系細胞が、さらにc-MPL陽性であることを特徴とする請求項1～3のいずれかに記載の製造方法。
- [請求項5] 鉄輸送体が、トランスフェリンであることを特徴とする請求項1～4のいずれかに記載の製造方法。
- [請求項6] 鉄イオン及び鉄輸送体が、鉄結合型トランスフェリンであることを特徴とする請求項1～5のいずれかに記載の製造方法。
- [請求項7] 5～17日間培養することを特徴とする請求項1及び3～6のいずれかに記載の製造方法。
- [請求項8] 4～7日間培養することを特徴とする請求項2～6のいずれかに記載の製造方法。
- [請求項9] 巨核球及び／又は血小板の収率が、270～1080%であることを特徴とする請求項1及び3～7のいずれかに記載の製造方法。
- [請求項10] 血小板が、血栓形成能解析により測定した、血栓形成に寄与した血小板数の割合が70%～85%であることを特徴とする請求項1、3～7及び9のいずれかに記載の製造方法。
- [請求項11] TPOの収量が、培地1mL当たり、30pg～100pgであることを特徴とする請求項2～6及び8のいずれかに記載の製造方法。
- [請求項12] さらに、培養物から巨核球及び／又は血小板を精製する工程を有す

ることを特徴とする請求項 1、3～7、9 及び 10 のいずれかに記載の製造方法。

[請求項13] さらに、培養物から TPO を精製する工程を有することを特徴とする請求項 2～6、8 及び 11 のいずれかに記載の製造方法。

[請求項14] 請求項 1、3～7、9、10 及び 12 のいずれかに記載の製造方法により製造される巨核球及び／又は血小板。

[請求項15] 請求項 2～6、8、11 及び 13 のいずれかに記載の製造方法により製造される TPO。

[請求項16] 以下の工程 a)～c) を備えた巨核球及び／又は血小板バンク構築方法。

a) HLA タイプ及び／又は HPA タイプの異なる種々の間葉系細胞を準備する工程；

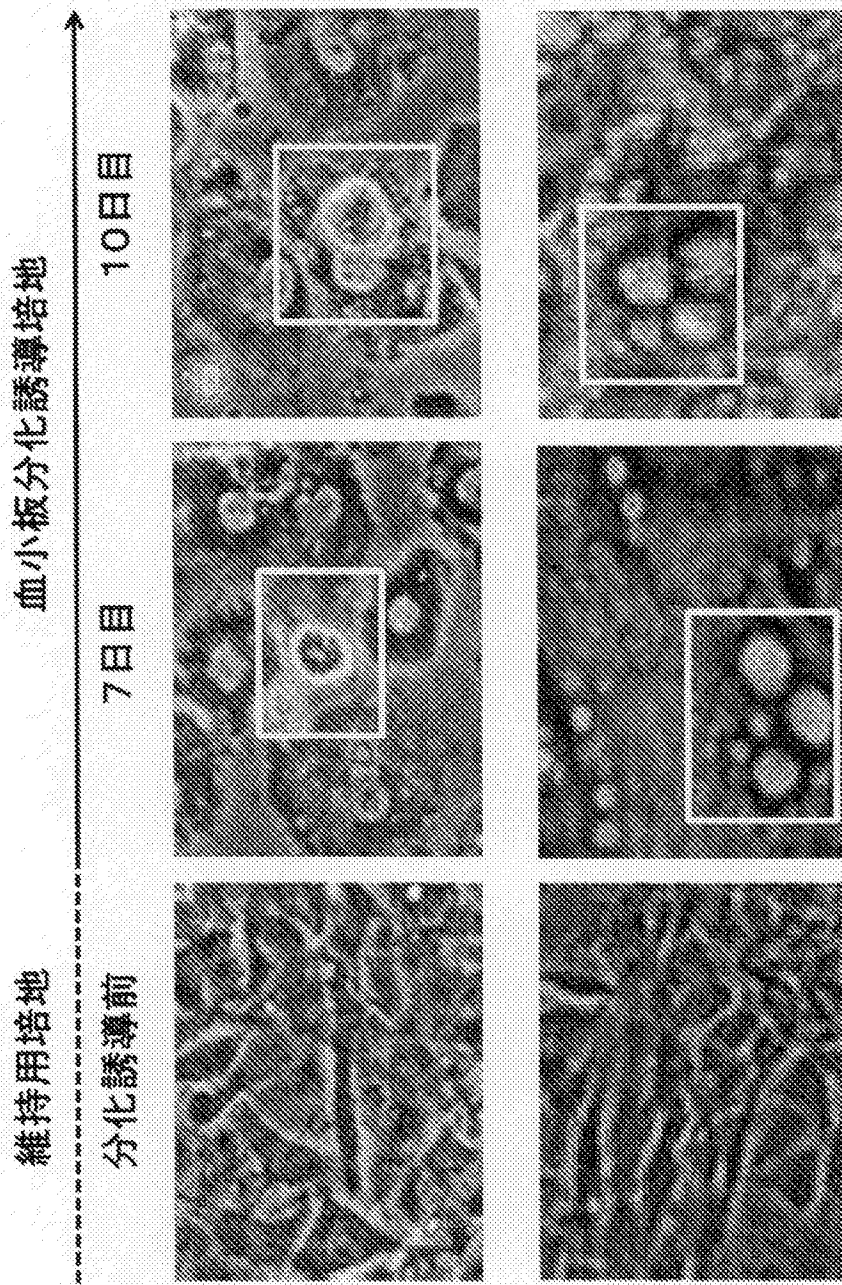
b) 工程 a) で準備した間葉系細胞の中から、特定の HLA タイプ及び／又は HPA タイプの間葉系細胞を選定する工程；

c) 工程 b) で選定した間葉系細胞を用いた、請求項 1、3～7、9、10、12 及び 14 のいずれかに記載の製造方法により、特定の HLA タイプ及び／又は HPA タイプの巨核球及び／又は血小板を調製する工程；

[請求項17] 脂肪前駆細胞を、成熟脂肪細胞への分化誘導剤を含む脂肪前駆細胞培養用基本培地で培養し、培養物からトロンボポエチンを採取することを特徴とするトロンボポエチンの製造方法。

[請求項18] 成熟脂肪細胞への分化誘導剤が、3-イソブチルー1-メチルキサンチン、インスリン、デキサメタゾン及びインドメタシンからなる群から選択される1種又は2種以上であることを特徴とする請求項 17 に記載のトロンボポエチンの製造方法。

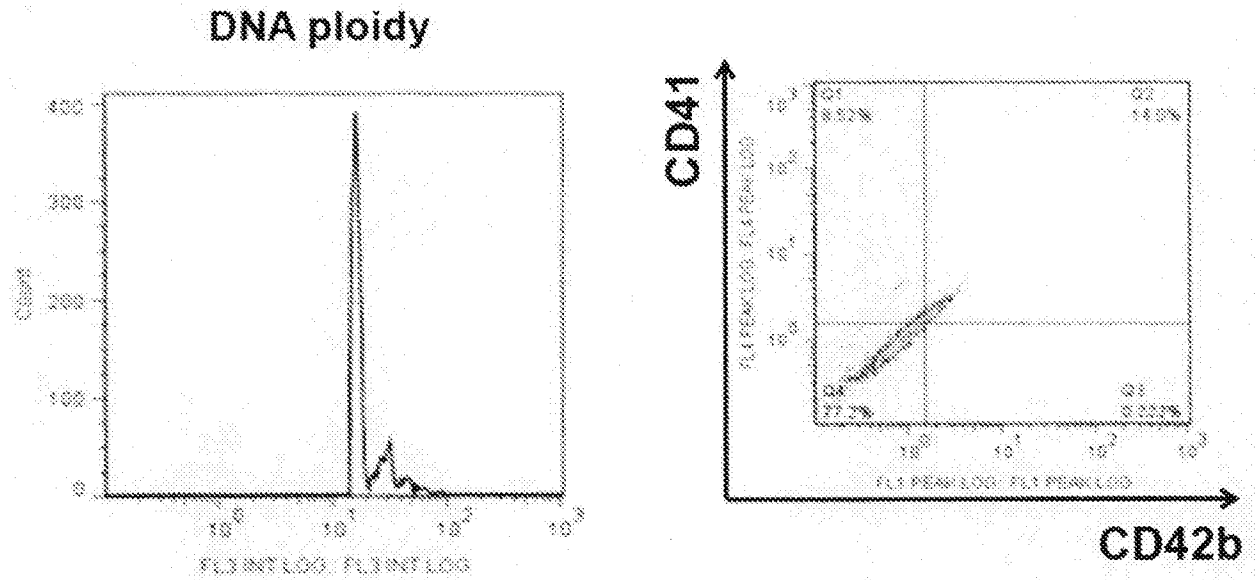
[図1]



間質細胞
(OP9細胞)

脂肪前駆細胞

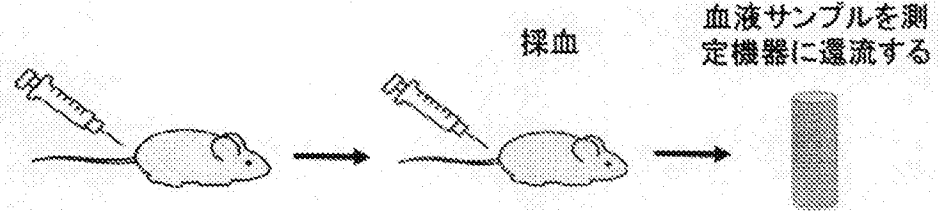
[図2]



[図3]

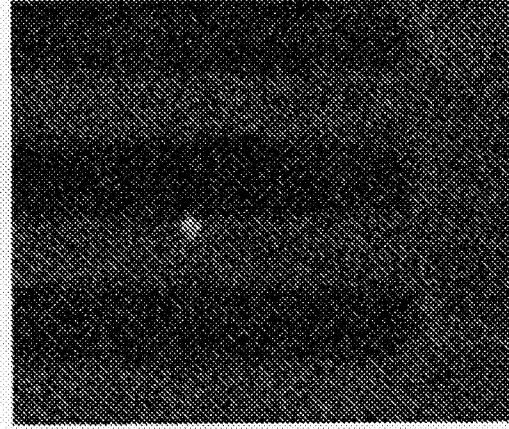
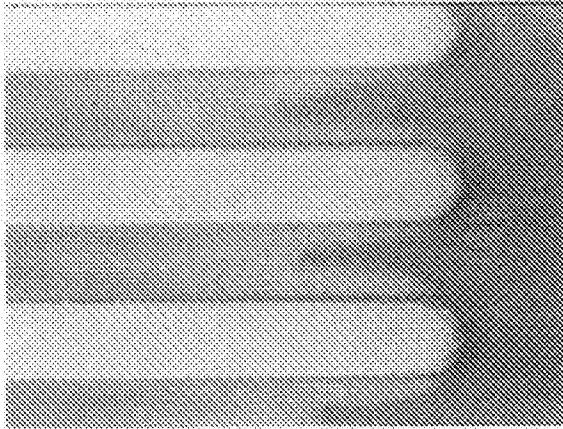
Total Thrombus-formation Analysis System (流動状態下での血栓形成能測定)

脂肪前駆細胞から産
生された巨核球を血小
板減少マウスに輸血し、
体内で血小板を放出さ
せる

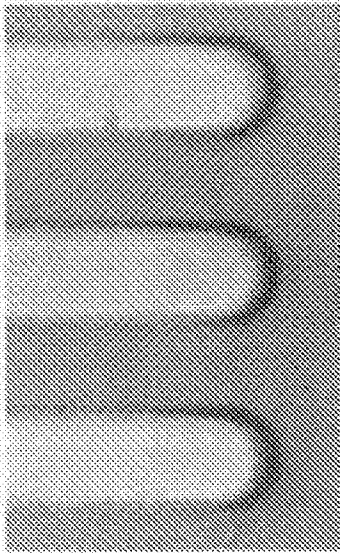


[図4]

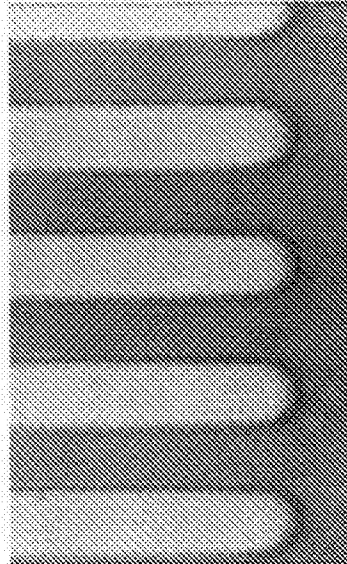
血小板減少マウスに脂肪前駆細胞から産生された巨核球を輸血した血液サンプルを還流後



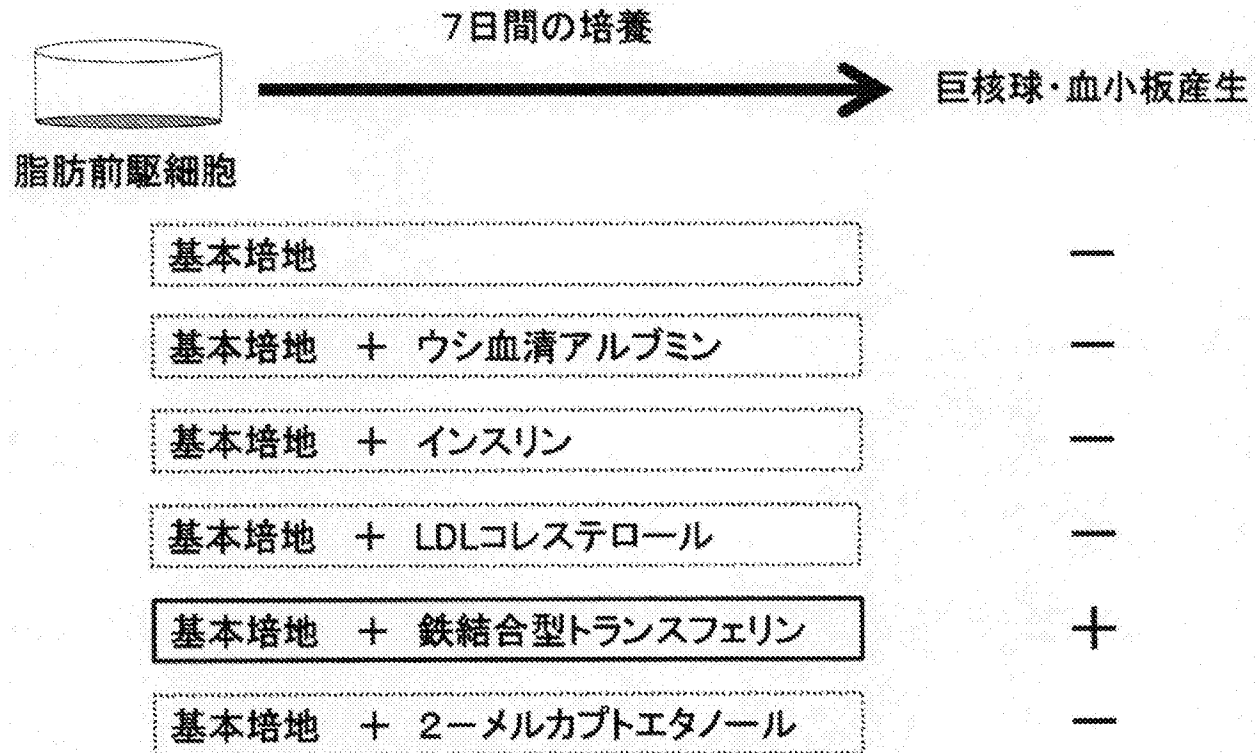
サンプル還流前の
血栓測定用チップ



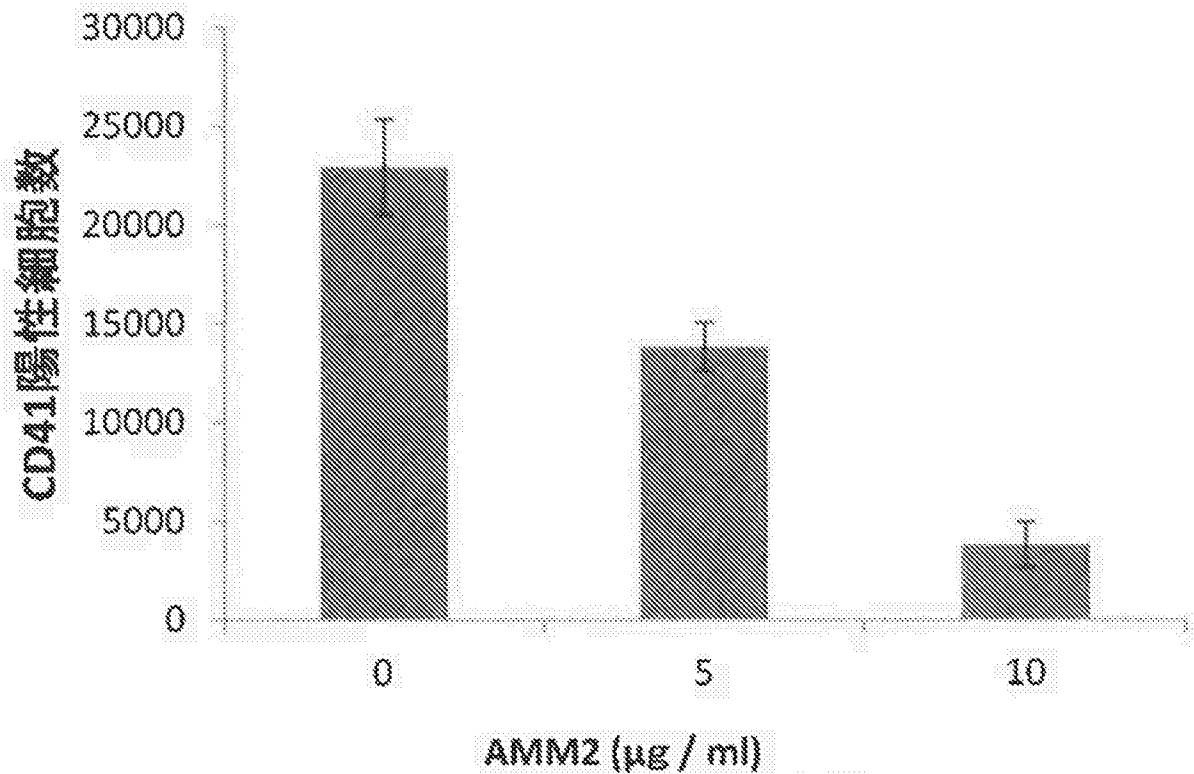
血小板減少マウス
の血液を還流後



[図5]



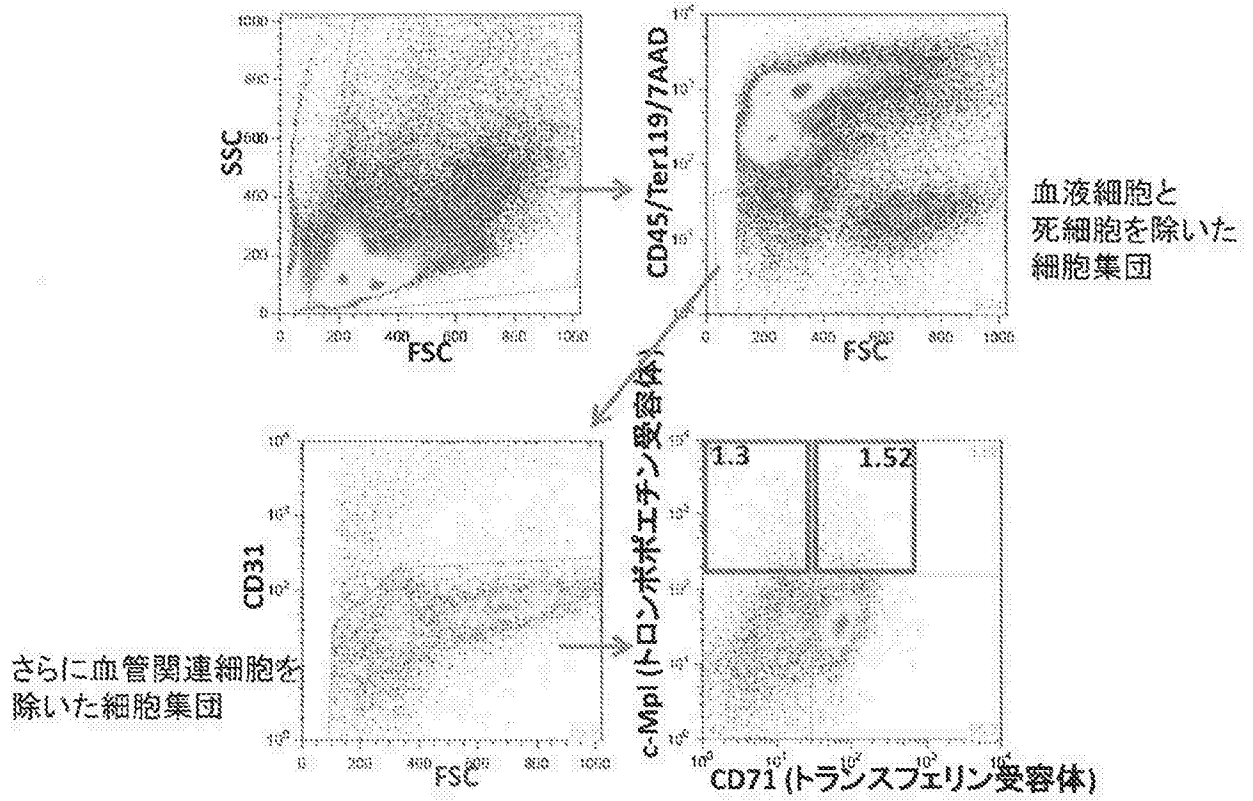
[図6]



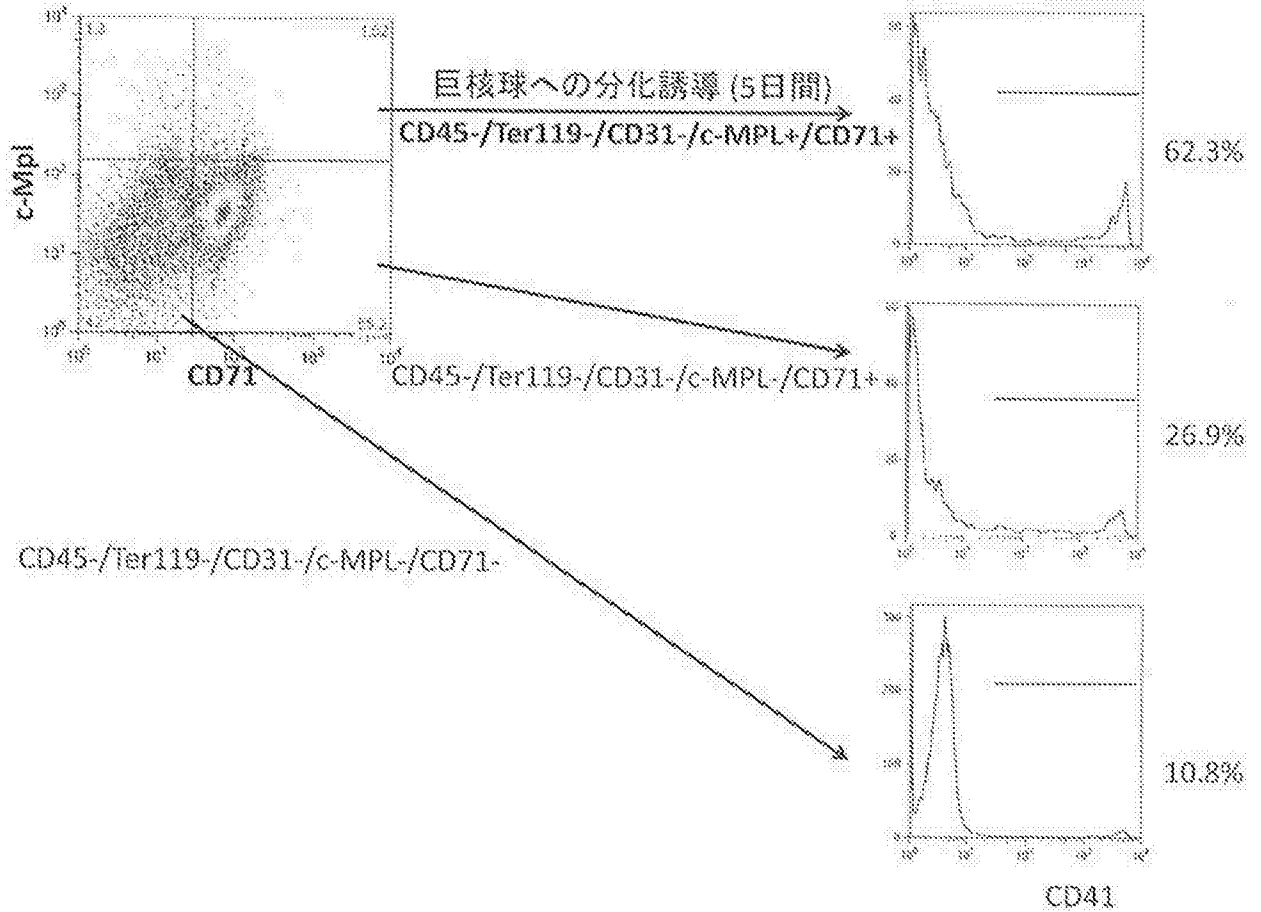
脂肪前駆細胞の分化誘導に対する
AMM2の影響の検討

[図7]

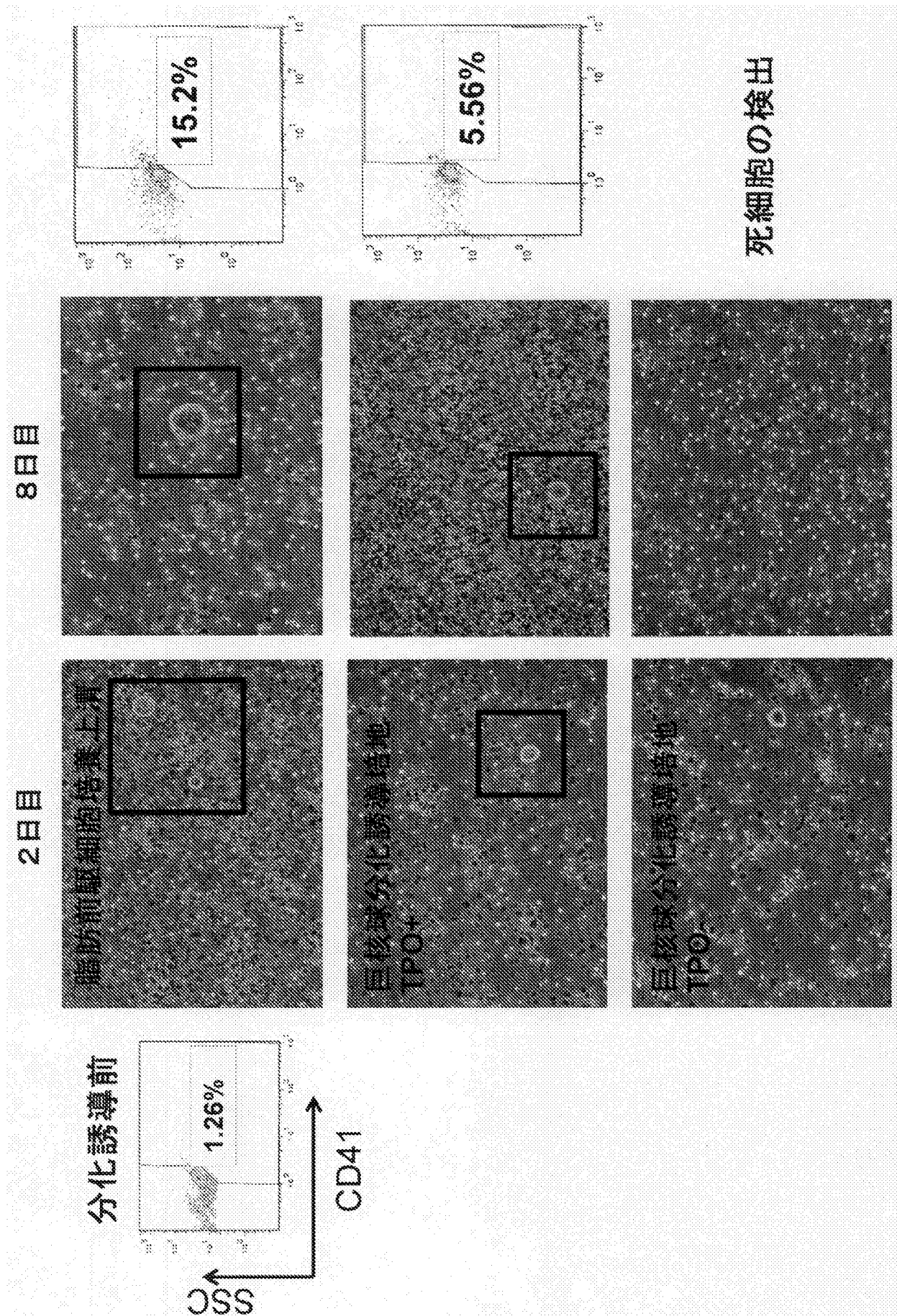
WT adipose tissue stromal cells staining & sorting



[図8]



[図9]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2014/003445

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER <i>C12N5/078(2010.01)i, C07K14/47(2006.01)i, C12N5/0775(2010.01)i, C12P21/02(2006.01)i</i> According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) <i>C12N5/078, C07K14/47, C12N5/0775, C12P21/02</i> Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched <i>Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2014</i> <i>Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2014 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2014</i> Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) <i>CAPLUS/MEDLINE/BIOSIS (STN), JSTPLUS/JMEDPLUS/JST7580 (JDreamIII), Thomson Innovation, G-Search</i>		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/Y/A	MATSUBARA Y.et al., Generation of megakaryocytes and platelets from human subcutaneous adipose tissues, <i>Biochem.Biophys. Res.Commun.</i> , 2009 Jan 23, 378(4), p.716-20, Epub 2008 Dec 6	1, 3-7, 10, 12, 14/9, 10, 12, 14, 16/2, 8, 11, 13, 15, 17, 18
X/Y/A	MATSUBARA Y.et al., Culture of megakaryocytes and platelets from subcutaneous adipose tissue and a preadipocyte cell line, <i>Methods Mol.Biol.</i> , 2012, 788, p.249-58	1, 3-7, 10, 12, 14/9, 10, 12, 14, 16/2, 8, 11, 13, 15, 17, 18
X/Y/A	MATSUBARA Y.et al., Generation of megakaryocytes and platelets from preadipocyte cell line 3T3-L1, but not the parent cell line 3T3, in vitro, <i>Biochem.Biophys. Res.Commun.</i> , 2010 Nov 26, 402(4), p.796-800, Epub 2010 Oct 30	1, 3-7, 10, 12, 14/9, 10, 12, 14, 16/2, 8, 11, 13, 15, 17, 18
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 19 September, 2014 (19.09.14)		Date of mailing of the international search report 07 October, 2014 (07.10.14)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2014/003445

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/A	ONO Y.et al., Pre-Adipocytes Differentiate Into Megakaryocytes (MK) by a Paracrine Thrombopoietin (TPO) Loop, Blood (ASH Annual Meeting Abstracts), 2012, 120, Abstract 4742	15/1-14, 16-18
Y/A	JP 2000-083656 A (Meiji Milk Products Co., Ltd.), 28 March 2000 (28.03.2000), claims 1 to 4; paragraphs [0010] to [0014] (Family: none)	9, 10, 12, 14, 16/1-8, 11, 13, 15, 17, 18
Y/A	iPS Saibo: Kesshoban Tairyo Sakusei Antei Kyokyu ni Michi --Todai · Kyodai Kaihatsu, Mainichi Shinbun, 11 December 2011 (11.12.2011), Tokyo Chokan, page 30, Retrieved from: G-Search	16/1-15, 17, 18

<p>A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))</p> <p>Int.Cl. C12N5/078(2010.01)i, C07K14/47(2006.01)i, C12N5/0775(2010.01)i, C12P21/02(2006.01)i</p>										
<p>B. 調査を行った分野</p> <p>調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))</p> <p>Int.Cl. C12N5/078, C07K14/47, C12N5/0775, C12P21/02</p>										
<p>最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの</p> <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922-1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971-2014年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2014年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2014年</td> </tr> </table>			日本国実用新案公報	1922-1996年	日本国公開実用新案公報	1971-2014年	日本国実用新案登録公報	1996-2014年	日本国登録実用新案公報	1994-2014年
日本国実用新案公報	1922-1996年									
日本国公開実用新案公報	1971-2014年									
日本国実用新案登録公報	1996-2014年									
日本国登録実用新案公報	1994-2014年									
<p>国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)</p> <p>CAplus/MEDLINE/BIOSIS(STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII), Thomson Innovation, G-Search</p>										
<p>C. 関連すると認められる文献</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>引用文献の カテゴリー*</th> <th>引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示</th> <th>関連する 請求項の番号</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X/Y/A</td> <td>MATSUBARA Y. et al., Generation of megakaryocytes and platelets from human subcutaneous adipose tissues, Biochem. Biophys. Res. Commun., 2009 Jan 23, 378(4), p. 716-20, Epub 2008 Dec 6</td> <td>1, 3-7, 10, 12, 14 /9, 10, 12, 14, 16 /2, 8, 11, 13, 15, 17, 18</td> </tr> </tbody> </table>			引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号	X/Y/A	MATSUBARA Y. et al., Generation of megakaryocytes and platelets from human subcutaneous adipose tissues, Biochem. Biophys. Res. Commun., 2009 Jan 23, 378(4), p. 716-20, Epub 2008 Dec 6	1, 3-7, 10, 12, 14 /9, 10, 12, 14, 16 /2, 8, 11, 13, 15, 17, 18		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号								
X/Y/A	MATSUBARA Y. et al., Generation of megakaryocytes and platelets from human subcutaneous adipose tissues, Biochem. Biophys. Res. Commun., 2009 Jan 23, 378(4), p. 716-20, Epub 2008 Dec 6	1, 3-7, 10, 12, 14 /9, 10, 12, 14, 16 /2, 8, 11, 13, 15, 17, 18								
<p><input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。</p>										
<p>* 引用文献のカテゴリー</p> <p>「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの</p> <p>「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの</p> <p>「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)</p> <p>「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献</p> <p>「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献</p> <p>「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの</p> <p>「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの</p> <p>「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの</p> <p>「&」 同一パテントファミリー文献</p>										
<p>国際調査を完了した日</p> <p>19.09.2014</p>	<p>国際調査報告の発送日</p> <p>07.10.2014</p>									
<p>国際調査機関の名称及びあて先</p> <p>日本国特許庁 (ISA/J P)</p> <p>郵便番号100-8915</p> <p>東京都千代田区霞が関三丁目4番3号</p>	<p>特許庁審査官 (権限のある職員)</p> <p>渡邊 潤也</p> <p>電話番号 03-3581-1101 内線 3448</p>	<table border="1"> <tr> <td>4B</td> <td>3131</td> </tr> </table>	4B	3131						
4B	3131									

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X/Y/A	MATSUBARA Y. et al. , Culture of megakaryocytes and platelets from subcutaneous adipose tissue and a preadipocyte cell line, Methods Mol. Biol. , 2012, 788, p. 249-58	1, 3-7, 10, 12, 14 /9, 10, 12, 14, 16 /2, 8, 11, 13, 15, 17, 18
X/Y/A	MATSUBARA Y. et al. , Generation of megakaryocytes and platelets from preadipocyte cell line 3T3-L1, but not the parent cell line 3T3, in vitro, Biochem. Biophys. Res. Commun. , 2010 Nov 26, 402(4) , p. 796-800, Epub 2010 Oct 30	1, 3-7, 10, 12, 14 /9, 10, 12, 14, 16 /2, 8, 11, 13, 15, 17, 18
X/A	ONO Y. et al. , Pre-Adipocytes Differentiate Into Megakaryocytes (MK) by a Paracrine Thrombopoietin (TPO) Loop, Blood (ASH Annual Meeting Abstracts), 2012, 120, Abstract 4742	15 /1-14, 16-18
Y/A	JP 2000-083656 A (明治乳業株式会社) 2000. 03. 28, 請求項 1-4, [0010]-[0014] (ファミリーなし)	9, 10, 12, 14, 16 /1-8, 11, 13, 15, 17, 18
Y/A	iPS 細胞: 血小板大量作成 安定供給に道--東大・京大開発, 毎日新聞, 2011. 12. 11, 東京朝刊, p. 30, Retrieved from: G-Search	16 /1-15, 17, 18