

特別企画①

iPS細胞を用いた血液事業戦略の方向性

[特別企画①]

iPS細胞を用いた血液事業戦略の方向性

江藤浩之

京都大学 iPS 細胞研究所臨床応用研究部門

iPS細胞技術の登場は、革新的な医療を発展させる土壌を提供し、我々の研究分野である血液領域においてもiPS細胞の有効利用方法が多数提案されている。造血幹細胞の移植を用いた骨髄治療法は、造血悪性腫瘍疾患や代謝疾患等に有効であることが実証されている一方、そのソースとなる細胞は圧倒的に足りていない。骨髄バンク、臍帯血バンクと同様に、現在京都大学iPS細胞研究所が整備を進めている各種のHLAドナーから樹立する“iPS細胞ストック”を利用する事で、iPS細胞からの分化細胞を誘導できることになれば、より多くの病気の患者の治療に貢献できることが期待される。血液疾患治療における最も魅力的な戦略は、造血幹細胞を生体外で創り出す事であるが、本課題に対する回答はいまだに得られていない。現段階でiPS細胞から移植可能レベルの造血幹細胞を生体外で分化誘導できる技術は確立されておらず、今後の研究開発が待たれる。代わって、理研中村や筆者らが進めてきた輸血用血液の誘導研究に関しては、少しずつであるが進展している。本稿ではあくまでも基礎的な研究であるがこうした研究が行われている背景について概説する。

【iPS細胞ストック】

20世紀初頭にランドスタイナーによって血液型が発見されて以来、輸血は医療の最も基本的な治療手段の一つとして用いられてきた。成分輸血や保存法に関する進歩はあるものの、輸血に必要な血液は依然として献血にのみ依存している。その結果、感染症やドナー側の有害事象（神経障害）、および献血者の減少に関しては完全な解決法は見いだされていない。加えて、“まれ血”と呼ばれる特殊な糖鎖や抗原が発現する赤血球のタイプが

次々と見いだされるようになり、まれ血患者への輸血の場合のドナー確保は益々困難な状況にあると言える。後述する血小板の“輸血不応症”と異なり、赤血球の“まれ血”ではタイプの異なる赤血球輸血により重篤な状態を引き起こすため注意が必要である事が知られている。一方で約3週間冷蔵保存可能である赤血球と異なり、血小板は室温保存が必須であり、保存可能期間が本邦の場合4日程度と極端に短く、医療における重要性にもかかわらず安定した供給を続けることは難しく、需要と供給のアンバランスが生じている。血小板輸血の場合、一般的には血液型やHLAを一致させる必要はないが繰り返し輸血を行っているとき自己と異なるHLA/HPAに対する血小板抗体が産生され、輸血不応を引き起こすことが知られる。こうした患者にはHLA適合血小板のみが唯一の治療法である。

多能性幹細胞である胚性幹（ES）細胞や誘導型多能性幹（induced pluripotent stem: iPS）細胞^{1), 2)}はソースとして無限に増やすことができるメリットがあり、血小板を含む血液細胞産生のソースとして魅力的である。赤血球、血小板は無核の細胞であり、さらに残存する有核細胞を取り除くために輸血前にフィルターによる有核細胞除去や放射線照射を行うことも可能であるため、iPS細胞由来の細胞を移植医療へ応用する際に問題視されているガン化の危険はないと考えられ、安全性の担保が比較的容易と想定される。さらに自己またはHLAの一致したドナーやまれ血ドナーの体細胞から樹立したiPS細胞を用いれば、まれ血赤血球製剤やHLA適合の血小板製剤を半永久的に供給可能となるであろう。以上の背景を考慮し、実現度の可能性を考慮した再生医療という観点におい

て、ヒトiPS細胞由来の赤血球製剤や血小板製剤作製は非常に魅力的と考えられる。

そのためにもまれなタイプのドナー由来のiPS細胞を予め作製し、提供するためのシステムが必要になってくると考えられる。現在、京都大学iPS細胞研究所 (CiRA) では、こうしたニーズに応えるべく、まず父方、母方の両方から受け継いだ同一のヒト白血球抗原 (HLA) を持つホモHLAドナーの方から善意で体細胞を供与いただき、iPS細胞ストックを作製する研究ならびに事業を推進している (図1、図2)。

【血小板産生培養法の概説】

実際には、筆者らはiPS細胞の登場以前から多能性幹細胞 (ES細胞) が最も魅力的な血小板や赤血球の生体外での産生ソースと考えていたため、最初に手をつけたのはいうまでもなくマウスES細胞である。マウスES細胞からの分化培養では、3胚葉の分化を同時に進める培養技術であるembryoid body (胚様体) を液体培養の中で形成させてその一部の胚葉部分の特異的な細胞表面マーカーを用いて選別化するという方法が最先端であった。筆者らは胚様体法だと少なくとも巨核球では効率が悪いこと、OP9ストロマ細胞の助けを借りる事が血小板の前駆細胞である巨核球を選択的に誘導できることを見いだした³⁾。ほぼ筆者らと同様の培養方法により、広島大学の藤本らも

血小板産生に成功した⁴⁾。その後筆者らはマウスES細胞で成功した方法を基にさまざまなサイトカイン、フィーダー細胞の組み合わせを検討し、世界で初めてヒトES細胞から機能を有する血小板の誘導に成功した⁵⁾。この培養系では、血管内皮増殖因子 (VEGF) 存在下で、C3Hマウスの全胎仔由来の細胞株10T1/2細胞との共培養を14-15日間続けると、内皮細胞由来の多胞性の嚢状構造物 (ESC-derived sac like structure ; ES-Sacと命名) が誘導され、内部には球状構造の造血前駆細胞が濃縮される。この造血前駆細胞からはサイトカイン、フィーダー細胞の組み合わせを調節することにより、好中球、マクロファージ、リンパ球、赤血球、血小板などほぼすべての終末分化血液細胞が産生されることを確認している。血液細胞は発生初期には血管内皮細胞と共通の祖先であるヘマンジオブラストを経て発生することが知られており⁶⁾、ES-sacは血管内皮と血球が同時に発生する初期の造血像を模倣していると考えられる。最近になりこの培養系がなぜ普遍的に造血多能性前駆細胞を誘導できるのかが筆者らの解析によって明らかにされた。ヒト生体胎生期の血液細胞の発生そのものはいまだに解明されていないこともあり、10T1/2細胞が産生する増殖因子、サイトカインの同定ならびにどの細胞系譜を経て、造血細胞の発生分化に寄与するのかが明らかにされた意義は大きい。

iPS細胞による再生医療

患者自身から作るiPS細胞

倫理的問題、拒絶反応を回避

しかし、お金と時間がかかる

iPS細胞ストック

図1

再生医療用iPS細胞ストック

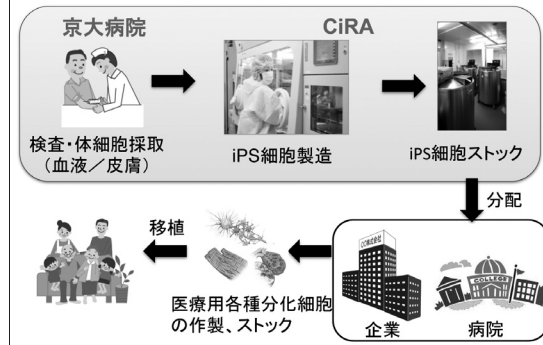


図2

複数のiPS細胞株から血小板産生を試みた結果、造血多能性前駆細胞を濃縮するiPS-sacの誘導効率は元になったiPS細胞株間で大きく異なっており、同一の皮膚細胞由来のiPS細胞株でも誘導効率の差は観察される。各iPS細胞株間の分化能力の違いはどのような機構によってもたらされているのであろうか？iPS因子のゲノムに挿入される場所による影響やiPS細胞として初期化された段階でのエピゲノム状態の違いなどが影響していると推察できるが現段階では明確な答えは明らかになれていない。さらには、iPS細胞のソースは、最終的な血小板産生効率にも影響する事が筆者らの研究で明らかになっており、こうした点を考慮した全体の戦略を設計する必要がある。

【大量血小板供給システムの開発】

前述の血液発生を模した培養系によって、機能性の血小板を獲得することができるようになったものの⁷⁾、効率は非常に悪く、血小板製剤を実際に提供する事はできないレベルであった。

大量の血小板を作製するためのkeyは2つある。
①血小板前駆細胞の巨核球を大量に増やす技術、
②巨核球からの高効率での血小板産生させる技術、を開発する事である。②に関しては、in vivoでの血小板産生機序が明らかになっていないことも問題である^{8), 9)}。

そこで、筆者らは血小板前駆細胞である巨核球が成熟する前に単核のまま増殖できる事に着目し、その自己複製を促進するための因子探索を行ってきた。その結果、巨核球の自己複製における重要な遺伝子を見だし、多能性幹細胞から誘導した造血多能性前駆細胞集団にこれらの遺伝子を導入する事で不死化巨核球細胞株を誘導する事に成功している。10cmの培養皿を用いた解析ではあるが、この細胞株は自己複製により増殖を継続することができており、数カ月に渡り巨核球特異的な細胞表面分子の発現を維持している。筆者らは本細胞株由来の血小板がマウスモデルでの生体内止血機能を有する事を確かめてはいるが、依然として巨核球成熟レベルが低く、1個あたりの巨核球が産生する血小板数が少ない。こうした問題点を解決すべく現在も基礎研究を継続している。

【iPS細胞から誘導する血小板の今後】

ヒトiPS細胞からの血小板誘導法は、現在の輸血医療が抱える問題点を解決する新たな可能性を提示している。臨床応用に際しては効率面ではいまだ問題が残るが、血小板輸血が放射線照射後に可能である事実を踏まえ、新たな戦略による巨核球増幅方法を開発すること、さらには産生された血小板の回収や機能保存に関する開発を進める事も必要であろう。

参考文献

- 1) Takahashi K and Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. 126 (4): 663-76, 2006.
- 2) <http://www.cell.com/COLLECTIONS-Induced-Pluripotency>
- 3) Eto K, Murphy R, Kerrigan SW, Berton A, Stuhlmann H, Nakano T, Leavitt AD, Shattil SJ. Megakaryocytes derived from embryonic stem cells implicate CalDAG-GEFI in integrin signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 99: 12819-24, 2002.
- 4) Fujimoto TT, Kohata S, Suzuki H, Miyazaki H, Fujimura K. Production of functional platelets by differentiated embryonic stem (ES) cells in vitro. *Blood*. 102 (12): 4044-51, 2003.
- 5) Takayama N, Nishikii H, Usui J, Tsukui H, Sawaguchi A, Hiroshima T, Eto K, Nakauchi H. Generation of functional platelets from human embryonic stem cells in vitro via ES-sacs, VEGF-promoted structures that concentrate hematopoietic progenitors. *Blood*. 111: 5298-306, 2008.
- 6) Choi, K., Kennedy, M., Kazarov, A., Papadimitriou, J.C. & Keller, G. A common precursor for hematopoietic and endothelial cells. *Development* 125: 725-732, 1998.
- 7) Takayama N, Nishimura S, Nakamura S, Shimizu T, Ohnishi R, Endo H, Yamaguchi T, Otsu M,

- Nishimura K, Nakanishi M, Sawaguchi A, Nagai R, Takahashi K, Yamanaka S, Nakauchi H, Eto K. Transient activation of c-MYC expression is critical for efficient platelet generation from human induced pluripotent stem cells. *J Exp Med.* 207: 2817-30, 2010.
- 8) Junt, T., Schulze, H., Chen, Z., Massberg, S., Goerge, T., Krueger, A., Wagner, D. D., Graf, T., Italiano, J. E., Jr., Shivdasani, R. A., von Andrian, U. H. Dynamic visualization of thrombopoiesis within bone marrow. *Science*: 317 (5845): 1767-70, 2007
- 9) Patel, S. R., Hartwig, J. H., Italiano, J. E., Jr. The biogenesis of platelets from megakaryocyte proplatelets. *J Clin Invest.* 115 (12): 3348-54, 2005