

(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

(43) 国際公開日
2014年8月14日(14.08.2014)



(10) 国際公開番号
WO 2014/123242 A1

- (51) 国際特許分類:
C12N 5/10 (2006.01) A61P 7/00 (2006.01)
A61K 35/12 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2014/053087
- (22) 国際出願日: 2014年2月10日(10.02.2014)
- (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 2013-023013 2013年2月8日(08.02.2013) JP
- (71) 出願人: 国立大学法人京都大学(KYOTO UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒6068501 京都府京都市左京区吉田本町3番地1 Kyoto (JP).
- (72) 発明者: 江藤 浩之(ETO, Koji); 〒6068501 京都府京都市左京区吉田本町3番地1 国立大学法人京都大学内 Kyoto (JP).
- (74) 代理人: 稲葉 良幸, 外(INABA, Yoshiyuki et al.); 〒1066123 東京都港区六本木6-10-1 六

本木ヒルズ森タワー23階 TMI 総合法律事務所 Tokyo (JP).

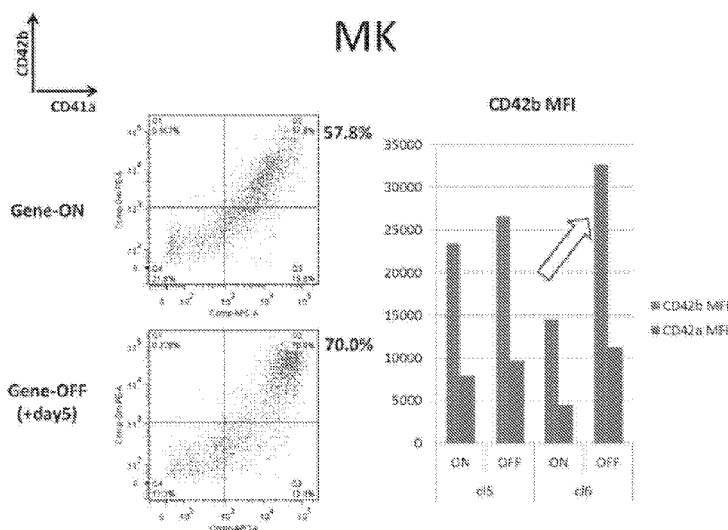
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, 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, 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

[続葉有]

(54) Title: PRODUCTION METHODS FOR MEGAKARYOCYTES AND PLATELETS

(54) 発明の名称: 巨核球及び血小板の製造方法

[図3]



(57) Abstract: The present invention addresses the problem of providing a method of efficiently producing mature megakaryocyte cell lines from hematopoietic precursor cells. The present invention provides a method of producing megakaryocytes from hematopoietic precursor cells, said method including (i) a step for inducing the expression of an apoptosis-inhibiting gene and a cancer gene in hematopoietic precursor cells, and culturing the cells; and (ii) a step for suppressing the expression of the apoptosis-suppressing gene and the cancer gene, and culturing the cells.

(57) 要約: 本発明は、造血前駆細胞から効率よく成熟した巨核球株を製造する方法を提供することを課題とする。本発明は、(i)アポトーシス抑制遺伝子および癌遺伝子を造血前駆細胞において強制発現させて培養する工程、およびアポトーシス抑制遺伝子および癌遺伝子の強制発現を止めて培養する工程を含む、造血前駆細胞から巨核球を製造する方法を提供する。

WO 2014/123242 A1

(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, — 明細書の別個の部分として表した配列リスト
MR, NE, SN, TD, TG). (規則 5.2(a))

添付公開書類:

- 国際調査報告 (条約第 21 条(3))

明 細 書

発明の名称：巨核球及び血小板の製造方法

技術分野

[0001] 本発明は、造血前駆細胞から巨核球および血小板を製造する方法、ならびに巨核球の製造に適した造血前駆細胞を選別する方法等に関する。

背景技術

[0002] 血液関連疾患の治療や、外科的な治療には、多くの血液細胞が必要とされる。血液細胞の中でも、血液凝固及び止血のために必須の細胞である血小板は特に重要な血液細胞の1つである。血小板は、白血病、骨髄移植、抗癌治療などにおいて需要が多く、安定供給の必要性は高い。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の他、TPO様類似構造（ミメティクス）製剤を投与する方法、臍帯血又は骨髄細胞から巨核球を分化させる方法などにより確保されてきた。最近では、ES細胞又はiPS細胞などの多能性幹細胞をインビトロにおいて分化誘導し、血小板などの血液細胞を調製する技術も開発されている。

[0003] 発明者らは、ヒトES細胞またはiPS細胞から巨核球及び血小板を分化誘導する技術を確立し、血小板のソースとしての多能性幹細胞の有効性を示している（特許文献1、非特許文献1及び特許文献2）。

[0004] さらに、発明者らは、幹細胞から調製される血小板等の量的な問題に対し、幹細胞をもとに不死化した巨核球前駆細胞株の樹立方法を見いだすことでその調製を行い、インビトロにおいて血小板等を大量に調製するために重要な技術を開発した（特許文献3）。この時、アポトーシス抑制遺伝子であるBcl-xlを巨核球の製造工程において強制発現させることで成熟化することに成功している（特許文献4）。

[0005] 生体において、巨核球は、proplatelets(血小板前駆体)と呼ばれる偽足形状(pseudopodial formation)を形成し、その細胞質を断片化して血小板を放出する。巨核球は、血小板を放出するまでに、核内分裂(endomitosis)によ

って多核化すると考えられている。巨核球の核内分裂は、分裂溝形成及び紡錘体伸長を伴わない、核分裂及び細胞質分裂の異常による多極性有糸分裂であり、その結果、幾つかに分葉化した核を含む細胞が形成される。このような核内分裂が繰り返し生じることで、巨核球の多核化が誘導される。

[0006] 巨核球の多核化に関し、これまでに多くの研究結果が報告されている。Lodierらは（非特許文献1）、巨核球の核内分裂において、分裂溝は形成されるものの、非筋細胞ミオシンIIの収縮環への局在が認められず、収縮環形成及び紡錘体伸長に欠陥が生じていることを明らかにした。そして、これら収縮環や紡錘体伸長の異常は、RhoA及びRockの活性を阻害することにより、より顕著になることが示された（非特許文献2）。RhoAは分裂溝に蓄積し、Rhoキナーゼ（Rock）、citron kinase、LIM kinase及びmDia/forminsなどを含む幾つかのエフェクター因子の活性化を促進する。これらの結果から、RhoA及びRockなど収縮環形成などに関与する因子の活性を阻害することで、巨核球の核内分裂が促進されることが示唆されている。また、integrin alpha2/beta1下流に位置するRhoのシグナルが増強されると、未熟な多核化していない巨核球のproplatelet形成が阻害されるとの報告もある。

[0007] 転写因子であるオールトランスレチノイン酸（ATRA；all trans retinoic acid）、ヒストン脱アセチル化酵素の阻害剤として知られるバルプロ酸が巨核球の分化に関与していることが報告されている。Schweinfurthらは、オールトランスレチノイン酸又はバルプロ酸で未成熟な巨核球を処理すると多核化が促進されることを見出している（非特許文献3）。さらに、癌抑制遺伝子産物であるp53をロックダウンすると巨核球の多核化を促進すること（非特許文献4）も報告されている。

[0008] その他、巨核球の分化過程に対する影響として、未成熟な巨核球を、通常の培養温度より高温の39℃で培養すると多核化した成熟巨核球の誘導及びproplateletsの形成を促進することなども示されている（非特許文献5）。

先行技術文献

特許文献

[0009] 特許文献1 : W02008/041370

特許文献2 : W02009/122747

特許文献3 : W02011/034073

特許文献4 : W02012/157586

非特許文献

[0010] 非特許文献1 : Takayamaら, Blood, 111 : 5298-5306 2008

非特許文献2 : Lordierら, Blood, 112 : 3164-3174 2009

非特許文献3 : Schweinfurthら, Platelets, 21 : 648-657 2010

非特許文献4 : Fuhrkenら, J. Biol. Chem., 283 : 15589-15600 2008

非特許文献5 : Proulxら, Biotechnol. Bioeng., 88 : 675-680 2004

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0011] 本発明者らは、血小板製剤を製造するためには、従来の方法よりも機能的な血小板（止血作用など生体内における活性を保持している血小板で、CD42b+として特徴付けられる）を安定的に、より多く産生する巨核球株の樹立が必要であることを見出し、この問題点を克服するためには、従来の方法で得られた巨核球株をさらに成熟させる必要があると考えた。

[0012] そこで、本発明は、巨核球数をいたずらに増殖させるのではなく、増殖を止め成熟させる方法、及びこのような巨核球を製造するために適した原料を選択する方法等を提供することを課題とする。

課題を解決するための手段

[0013] 上記課題に鑑み、本発明者らは、多能性幹細胞（ES細胞、iPS細胞など）から調製した造血前駆細胞において、巨核球を樹立するのに適した細胞と適さない細胞との違いを見出すことを試みた。さらに、巨核球を成熟させるために、造血前駆細胞から巨核球へ誘導するために必要であった遺伝子の強制発現を停止させることを試みた。

[0014] 発明者らは、上記の試行錯誤により、巨核球を樹立しやすい造血前駆細胞

のマーカーとして、KLF1およびFLI1を見出した。

[0015] さらに、巨核球の樹立において、必須の遺伝子の強制発現を停止させることでも巨核球の機能を維持できることを確認した。さらに、このように遺伝子の発現を停止させることで増殖を止めた巨核球はより効率よく機能的な血小板を産生することを見出し、本発明を完成するに至った。

[0016] すなわち、本発明は、

[1] 以下の(i)～(ii)の工程を含む、造血前駆細胞から巨核球を製造する方法；

(i)アポトーシス抑制遺伝子および癌遺伝子を造血前駆細胞において強制発現させて培養する工程、および

(ii)工程(i)で得られた細胞について、アポトーシス抑制遺伝子および癌遺伝子の強制発現を止めて培養する工程。

[2] 前記工程(i)において、p16遺伝子又はp19遺伝子の発現を抑制する遺伝子、Ink4a/Arf遺伝子の発現を抑制する遺伝子及びポリコーム遺伝子から成る群より選択される1つの遺伝子をさらに造血前駆細胞において強制発現させ、前記工程(ii)において、当該p16遺伝子又はp19遺伝子の発現を抑制する遺伝子、Ink4a/Arf遺伝子の発現を抑制する遺伝子及びポリコーム遺伝子から成る群より選択される1つの遺伝子の強制発現を止めて培養する、[1]に記載の方法。

[3] 前記工程(i)が、癌遺伝子、ならびにp16遺伝子又はp19遺伝子の発現を抑制する遺伝子、Ink4a/Arf遺伝子の発現を抑制する遺伝子及びポリコーム遺伝子から成る群より選択される1つの遺伝子を造血前駆細胞において強制発現させた後、アポトーシス抑制遺伝子をさらに当該細胞へ強制発現させる工程である、[2]に記載の方法。

[4] 前記工程(i)において、癌遺伝子、ならびにp16遺伝子又はp19遺伝子の発現を抑制する遺伝子、Ink4a/Arf遺伝子の発現を抑制する遺伝子及びポリコーム遺伝子から成る群より選択される1つの遺伝子を造血前駆細胞において少なくとも28日強制発現させて培養した後、アポトーシス抑制遺伝子をさらに当

該細胞へ強制発現させる工程である、[3]に記載の方法。

[5] 前記アポトーシス抑制遺伝子が、BCL-XL遺伝子である、[1]から[4]のいずれか1項に記載の方法。

[6] 前記癌遺伝子が、c-MYC遺伝子である、[1]から[5]のいずれか1項に記載の方法。

[7] 前記p16遺伝子又はp19遺伝子の発現を抑制する遺伝子、Ink4a/Arf遺伝子の発現を抑制する遺伝子及びポリコム遺伝子から成る群より選択される1つの遺伝子が、BMI1である、[1]から[6]のいずれか1項に記載の方法。

[8] 前記工程(i)および(ii)において、TPOを含有する培養液中でC3H10T1/2細胞上で該細胞を培養する、[1]から[7]のいずれか1項に記載の方法。

[9] 前記工程(i)および(ii)での培養において、SCFをさらに含有する培養液中で培養する、[8]に記載の方法。

[10] 前記遺伝子の強制発現が、薬剤応答性ベクターを用いて行われる、[1]から[9]のいずれか1項に記載の方法。

[11] 前記造血前駆細胞が、多能性幹細胞から分化誘導された細胞である、[1]から[10]のいずれか1項に記載の方法。

[12] 前記造血前駆細胞が、多能性幹細胞から分化誘導された細胞である、[11]に記載の方法であって、該分化誘導において、多能性幹細胞をVEGFを含有する培養液中でC3H10T1/2細胞上で培養する工程を含む、方法。

[13] 前記造血前駆細胞において、KLF1の発現が低い、またはFLI1の発現が高い、[1]から[12]のいずれか1項に記載の方法。

[14] 前記造血前駆細胞におけるKLF1またはFLI1の発現が、それぞれKhES3由来の造血前駆細胞での発現と比較してより低いまたはより高い、[13]に記載の方法。

[15] 工程(i)に先立って、前記造血前駆細胞におけるKLF1および／またはFLI1の発現を測定する工程を含む、[1]から[14]のいずれか1項に記載の方法。

[16] 前記工程(ii)を、5日間行う、[1]から[15]のいずれか1項に記載の

方法。

[17] 血小板の製造方法であって、[1]から[16]のいずれか1項に記載の方法で得られた巨核球の培養物から血小板を回収する工程を含む方法。

[18] [17]に記載の方法で製造された血小板。

[19] [18]に記載の血小板を含む血液製剤。

[20] 以下の(I)～(II)の工程を含む、造血前駆細胞から巨核球前駆細胞を製造する方法；

(I)癌遺伝子およびp16遺伝子又はp19遺伝子の発現を抑制する遺伝子、Ink4a/Arf遺伝子の発現を抑制する遺伝子及びポリコム遺伝子から成る群より選択される1つの遺伝子を造血前駆細胞において強制発現させて培養する工程、および

(II)工程(I)で得られた細胞へさらにアポトーシス抑制遺伝子を強制発現させる、またはカスパーゼ阻害剤を添加した培地で培養する工程。

[21] 前記アポトーシス抑制遺伝子が、BCL-XL遺伝子である、[20]に記載の方法。

[22] 前記癌遺伝子が、c-MYC遺伝子である、[20]から[21]のいずれか1項に記載の方法。

[23] 前記カスパーゼ阻害剤が、Z-DEVD-FMKである、[20]から[22]のいずれか1項に記載の方法。

[24] 前記p16遺伝子又はp19遺伝子の発現を抑制する遺伝子、Ink4a/Arf遺伝子の発現を抑制する遺伝子及びポリコム遺伝子から成る群より選択される1つの遺伝子が、BMI1である、[20]から[23]のいずれか1項に記載の方法。

[25] 前記工程(I)を、少なくとも28日間行う、[20]から[24]のいずれか1項に記載の方法。

[26] 前記巨核球前駆細胞が拡大培養可能な細胞である、[20]から[25]のいずれか1項に記載の方法。

[27] 薬剤応答性で発現する外来性のアポトーシス抑制遺伝子および癌遺伝

子が染色体に組み込まれている巨核球であって、当該外来性の遺伝子が発現していない細胞。

[28] 薬剤応答性で発現する外来性のp16遺伝子又はp19遺伝子の発現を抑制する遺伝子、Ink4a/Arf遺伝子の発現を抑制する遺伝子及びポリコム遺伝子から成る群より選択される1つの遺伝子がさらに染色体に組み込まれており、当該外来性遺伝子が発現していない、[27]に記載の細胞。

[29] 前記アポトーシス抑制遺伝子が、BCL-XL遺伝子である、[27]または[28]に記載の細胞。

[30] 前記癌遺伝子が、c-MYC遺伝子である、[27]から[29]のいずれか1項に記載の細胞。

[31] 前記p16遺伝子又はp19遺伝子の発現を抑制する遺伝子、Ink4a/Arf遺伝子の発現を抑制する遺伝子及びポリコム遺伝子から成る群より選択される1つの遺伝子が、BMI1である、[27]から[30]のいずれか1項に記載の細胞。

[32] 巨核球の製造に適した造血前駆細胞を選択する方法であって、KLF1の発現またはFLI1の発現を測定する工程を含む方法。

[33] 前記KLF1の発現が低い造血前駆細胞を選択する工程を含む、[32]に記載の方法。

[34] 前記FLI1の発現が高い造血前駆細胞を選択する工程を含む、[33]に記載の方法。

[35] 前記造血前駆細胞が、多能性幹細胞から分化誘導された細胞である、[32]から[33]のいずれか1項に記載の方法。

[36] 以下の工程を含む巨核球製造に適した多能性幹細胞を選択する方法；

(i) 多能性幹細胞から造血幹細胞を製造する工程、および、

(ii) 工程(i)で製造された造血前駆細胞において、KLF1の発現およびFLI1の発現の測定する工程。

に関する。

発明の効果

[0017] 本発明によれば、血小板産生に適した巨核球を製造することが可能となる。

また、本発明によれば、巨核球を製造するために適した造血前駆細胞を選択することが可能となる。

[0018] 幹細胞から造血前駆細胞を誘導し、例えば特許文献3や特許文献4に記載された方法でこの造血前駆細胞から巨核球を製造するにあたり、本発明の方法にしたがって、適切な造血前駆細胞を選択し、得られた巨核球を成熟させて血小板を産生させることにより、幹細胞からより確実に機能的な血小板を製造することを可能にする。さらに、得られた血小板は、CD42b陽性であり、臨床応用にも大きく貢献する。

図面の簡単な説明

[0019] [図1]図1Aは、c-MYCおよびBCL-XLの薬剤応答発現レンチウイルスの感染後12日目からの各巨核球株（TKDN SeV2 Clone-1からClone-6）の増殖曲線を示す。図1Bは、khES3由来およびTKDN SeV2由来の造血前駆細胞におけるKLF1（左図）またはFLI1（右図）の発現解析の結果を示す。

[図2]図2は、c-MYCおよびBCL-XLの薬剤応答発現レンチウイルスの感染後18日目の巨核球株（Clone-5（C15）およびClone-6（C16））において遺伝子の強制発現を止めた場合（Gene-OFF）および強制発現を続けた場合（Gene-ON）における細胞の増殖曲線を示す。図中、Day0は遺伝子の強制発現を止めた日を意味する。

[図3]図3は、遺伝子の強制発現停止直後の巨核球（Gene-ON）と停止後5日目の巨核球（Gene-OFF）の表面抗原（CD41aおよびCD42b）のフローサイトメトリの結果を示す。右図には、各巨核球株における表面マーカーであるCD42a（濃灰）およびCD42b（薄灰）の平均蛍光強度（MFI）を示す。図中、遺伝子の強制発現の停止により、各マーカーが増加することが矢印示されている。

[図4]図4は、遺伝子の強制発現停止直後の血小板（Gene-ON）と停止後5日目の血小板（Gene-OFF）の表面抗原（CD41aおよびCD42b）のフローサイトメトリの結果を示す。右図には、各血小板における表面マーカーであるCD42a（

濃灰) およびCD42b (薄灰) の平均蛍光強度 (MFI) を示す。図中、遺伝子の強制発現の停止により、各マーカーが増加することが矢印示されている。

[図5]図5Aは、各iPS細胞由来の巨核球株 (Clone-1 (Cl1) からClone-6 (Cl6))、における遺伝子の強制発現停止直後 (ON) および遺伝子発現停止3日経過後 (OFF) の内在性および外来性のいずれものc-Myc (薄灰) およびBcl-x1 (濃灰) の発現量を示す。数値は、ES細胞由来の巨核球 (ES21MK) に対する相対値を示す。図5Bは、各iPS細胞由来の巨核球株 (Clone-1 (Cl1) からClone-6 (Cl6))、における遺伝子発現停止直後 (ON) および遺伝子発現停止3日経過後 (OFF) の内在性および外来性のいずれものGATA1、p45、b1-tubulin およびMPL (各条件において左から順に示す) の発現量を示す。縦軸の数値は、ES細胞由来の巨核球 (ES21MK) に対する相対値を示す。

[図6]図6は、本発明の方法で樹立した巨核球株 (培養40日目) (上図) およびコントロール細胞であるTakayamaら, Blood, 111: 5298-5306 2008に記載の方法で樹立した巨核球 (21日目) (下図) においてPhorbol 12-Myristate 13-acetate (PMA) 刺激前 (左) 刺激後 (右) のAPC-fibrinogenの結合度 (X軸) を示す。

[図7]図7Aは、培養日数に対する各遺伝子を導入して製造された巨核球前駆細胞から得られたCD41a陽性細胞を計数した結果を示す。図7Bは、c-MYCおよびBMI1を導入して得られた巨核球前駆細胞のMay-Giemsa染色像を示す。図7Cは、c-MYC-2A-BMI1およびBMI1-2A- c-MYCの発現レトロウィルスベクターの模式図を示す。図7Dは、培養日数に対する各遺伝子を導入して製造された巨核球前駆細胞から得られたCD41a陽性細胞を計数した結果を示す。図7Eは、c-MYCおよびBMI1をそれぞれ導入した場合、c-MYC-2A-BMI1を導入した場合、ならびにBMI1-2A-c-MYCを導入した場合におけるc-Mycのタンパク質量を測定した結果を示す。

[図8]図8Aは、c-MYC-DD-2A-BMI1 (w DD) またはc-MYC -2A-BMI1 (w/o DD) を造血前駆細胞へ導入して得られたCD41a陽性細胞を計数した結果を示す。図8Bは、c-MYC-DD-2A-BMI1を導入し、各濃度のShield-1を添加した培地で培

養した7日目のCD41a陽性細胞を計数した結果を示す。図8Cは、c-MYC-DD-2A-BMI1を導入し、各濃度のShield-1を添加した培地で培養した2日目のCaspase3/7の活性を測定した結果を示す。

[図9]図9Aは、c-MYC、BMI1およびBCL-XL、またはc-MYCおよびBMI1を導入して巨核球前駆細胞を製造するプロトコールを示す。図9Bは、図9Aのプロトコールに従って製造した巨核球前駆細胞株(C1-1)の拡大培養した結果を示す。図9Cは、図9Aのプロトコールに従って製造した巨核球前駆細胞株(C1-2)の拡大培養した結果を示す。図9Dは、c-MYC-DD-2A-BMI1を導入し、各濃度のShield-1を添加した培地で培養した後におけるc-Mycのタンパク質量を測定した結果を示す。図9Eは、c-MYC-DD-2A-BMI1を導入し、各濃度のShield-1を添加した培地で培養した7日目のCD41a陽性細胞を計数した結果を示す。

[図10]図10Aは、c-MYC-2A-BMI1とBCL-XLを導入した場合、若しくはc-MYC-2A-BMI1を導入し、DMSOまたはZ-VAD-FMKを添加した培地で培養した場合における巨核球前駆細胞の増加倍率を示す。図10Bは、c-MYC、BMI1およびBCL-XLを同時に導入して製造した巨核球前駆細胞株(C1-3)の拡大培養した結果を示す。図10Cは、c-MYC、BMI1およびBCL-XLを同時に導入して製造した巨核球前駆細胞株(C1-4)の拡大培養した結果を示す。図10Dは、c-MYC、BMI1およびBCL-XLを同時に導入して製造した巨核球前駆細胞株(C1-6)の拡大培養した結果を示す。図10Eは、c-MYC、BMI1およびBCL-XLを同時に導入して製造した巨核球前駆細胞株(C1-7)の拡大培養した結果を示す。図10Fは、巨核球前駆細胞株(C1-1)、巨核球前駆細胞株(C1-7)、HL-60(巨核球細胞株)またはMeg01(巨核球細胞株)を投与されたマウスの生存率を示すKaplan-Meier曲線を示す。

[図11]図11Aは、巨核球前駆細胞株(C1-1)または巨核球前駆細胞株(C1-2)を凍結融解後0日目または21日目のCD41a陽性細胞数を示す。図11Bは、巨核球前駆細胞株(C1-1)の凍結融解後のCD41a、CD42a、CD42bおよびCD9を測定したフローサイトメトリーの結果を示す。

[図12]図12Aは、c-MYC、BMI1およびBCL-XLを導入して製造した巨核球前駆

細胞から外来性遺伝子の発現を停止させて巨核球へと成熟化（血小板を産生）させるプロトコールを示す。図1 2 Bは、図1 2 Aのプロトコールに従って得られた細胞（OFF）遺伝子発現停止前の細胞（ON）のGiemsa染色像（上図）およびDNA含有量を測定した結果を示す。図1 2 Cは、1 2 Aのプロトコールに従って得られた巨核球前駆細胞株（Cl-2またはCl-7）（OFF）遺伝子発現停止前の巨核球前駆細胞株（Cl-2またはCl-7）（ON）のCD41aおよびCD42bに対するフローサイトメトリーの結果を示す。

[図13]図1 3 Aは、巨核球前駆細胞株（Cl-2またはCl-7）の外来のc-MYC、BMI1およびBCL-XLを発現停止（OFF）または発現維持（ON）させた後のCD41a陽性/CD42b陽性細胞の増加倍率を示す。図1 3 Bは、c-MYC、BMI1およびBCL-XLの発現維持、BCL-XLのみ維持、全て発現停止した場合におけるCD41a陽性/CD42b陽性細胞数を示す。図1 3 Cは、c-MYC、BMI1およびBCL-XLの発現維持した場合と既存の巨核球株（CMK、Meg-01およびK562）をPMA刺激した場合におけるCD41a陽性/CD42b陽性細胞の増加倍率を示す。図1 3 Dは、巨核球前駆細胞株（Cl-2またはCl-7）の外来のc-MYC、BMI1およびBCL-XLを発現停止（OFF）または発現維持（ON）させた後の培地1mlあたりのCD42b陽性の血小板数を示す。

[図14]図1 4 Aは、巨核球前駆細胞株（Cl-7）から産生された血小板または採血された血小板の透過型電子顕微鏡像を示す。図1 4 Bは、巨核球前駆細胞株に対して刺激をしなかった場合（No stimulation）またはトロンビン刺激した場合（Thrombin）におけるCD42aおよび結合PAC-1に対するフローサイトメトリーの結果を示す。図1 4 Cは、採血した血小板（Fresh platelet）、37°Cで5日間保管した血小板（pooled platelet）および巨核球前駆細胞株由来の血小板（imMKCL platelet）に刺激をしなかった場合、若しくはADPまたはトロンビンで刺激した場合におけるPAC-1の結合強度を示す。図1 4 Dは、Fresh plateletまたはimMKCL plateletにおける刺激をしなかった場合、またはADPおよびTRAPで刺激した場合における凝集した血小板（CD9-APC陽性/CD9-Pacific Blue陽性）を測定した結果を示す。図1 4 Eは、図1 4 Dで測定された凝集した血小板の含有率（左図）およびCollaegen刺激した場合の凝集した血小板

の含有率（右図）を示す。図1 4 Fは、 1600S^{-1} の流速下（方向は上部に示す）におけるCl-7またはCl-2由来の血小板の凝集塊を観察した顕微鏡像を示す。

図1 4 Gは、図1 4 Fで観察された凝集塊の数を示す。

[図15]図1 5 AおよびBは、巨核球前駆細胞株由来の血小板（ 6×10^8 個または 1×10^8 個）または採血した血小板（ 1×10^8 個）をマウスに投与した後30分、2時間または24時間における血中における含有率（Human CD41a陽性/Mouse CD41陰性）を示す。図1 5 Cは、in vivoでの巨核球前駆細胞株由来の血小板（緑色）の血管（赤色）における経時的な動きを撮影した共焦点顕微鏡像を示す。図1 5 Dは、血管 $100\mu\text{m}$ あたりに接着した巨核球前駆細胞株由来の血小板数を示す。図1 5 Eは、レーザー照射損傷部位に発生した血栓（20 sec）中の巨核球前駆細胞株由来の血小板（緑色）の顕微鏡像を示す。図1 5 Eは、採血した血小板（Fresh）、保管した血小板（pooled）、および巨核球前駆細胞株由来の血小板（Cl-1、Cl-2、Cl-3およびCl-7）をマウスに投与した後の、血栓に含まれる血小板数を示す。

発明を実施するための形態

[0020]（巨核球の製造方法）

本発明は、造血前駆細胞から巨核球を製造する方法を提供する。

本発明に係る巨核球の製造方法の一態様は、造血前駆細胞において、アポトーシス抑制遺伝子および癌遺伝子を強制発現させて該細胞を培養する工程およびアポトーシス抑制遺伝子および癌遺伝子の強制発現を止めて培養する工程を含む。本発明において、造血前駆細胞において、アポトーシス抑制遺伝子および癌遺伝子を強制発現させて該細胞を培養する工程によって得られる細胞を巨核球前駆細胞としても良い。

[0021] 本発明における「巨核球」は、多核化した細胞であってもよく、例えば、CD41a陽性/CD42a陽性/CD42b陽性として特徴付けられる細胞を含む。この他にも、GATA1、FOG1、NF-E2および β 1-tubulinが発現している細胞として特徴づけてもよい。多核化した巨核球とは、造血前駆細胞と比較して核の数が相対的に増大した細胞又は細胞群のことをいう。例えば、本発明の方法を適用す

る造血前駆細胞の核が2Nの場合には、4N以上の細胞が多核化した巨核球となる。また、本発明において、巨核球は、巨核球株として不死化されていてもよく、クローン化された細胞群であってもよい。

[0022] 本発明における「巨核球前駆細胞」とは、成熟することで巨核球となる細胞であって、多核化していない細胞であり、例えば、CD41a陽性/CD42a陽性/CD42b弱陽性として特徴付けられる細胞を含む。本発明の巨核球前駆細胞は、好ましくは、拡大培養により増殖させることが可能である細胞であり、例えば、少なくとも60日以上は、適切な条件で拡大培養可能な細胞である。本発明において、巨核球前駆細胞は、クローン化されていてもされていなくても良く、特に限定されないが、クローン化されたものを巨核球前駆細胞株と呼ぶこともある。

[0023] 本発明において、造血前駆細胞とは、リンパ球、好酸球、好中球、好塩基球、赤血球、巨核球等の血球系細胞に分化可能な細胞である、本発明において、造血前駆細胞と造血幹細胞は、区別されるものではなく、特に断りがなければ同一の細胞を示す。造血幹細胞/前駆細胞は、例えば、表面抗原であるCD34および/またはCD43が陽性であることによって認識できる。本発明において、造血幹細胞は、多能性幹細胞、臍帯血・骨髓血・末梢血由来の造血幹細胞及び前駆細胞などから分化誘導された造血前駆細胞に対しても適用することができる。例えば、多能性幹細胞からは、Takayama N., et al. J Exp Med. 2817-2830 (2010)に記載の方法にしたがって、多能性幹細胞をVEGFの存在下でC3H10T1/2上で培養することで得られるネット様構造物(ES-sac又はiPS-sacとも称する)から調製することができる。ここで、「ネット様構造物」とは、多能性幹細胞由来の立体的な嚢状(内部に空間を伴うもの)構造体で、内皮細胞集団などで形成され、内部に造血前駆細胞を含む構造体である。この他にも、多能性幹細胞からの造血前駆細胞の製造方法として、胚様体の形成とサイトカインの添加による方法(Chadwick et al. Blood 2003, 102: 906-15、Vijayaragavan et al. Cell Stem Cell 2009, 4: 248-62、Saeki et al. Stem Cells 2009, 27: 59-67)または異種由来のストローマ細胞との

共培養法 (Niwa A et al. J Cell Physiol. 2009 Nov;221(2):367-77.) 等が例示される。

[0024] 本発明において好ましい造血前駆細胞は、KLF1遺伝子の発現が低い、またはFLI1遺伝子の発現が高い造血前駆細胞である。従って、巨核球の製造に際して、KLF1の発現が低い、またはFLI1の発現が高い造血前駆細胞を選択する工程を含んでも良い。ここで、KLF1の発現が低いとは、KLF1の発現が対照と比較して低いことを意味し、対照とは、特に限定されず、当業者が文献又は経験等に基づいて適宜選択することができるが、例えば、khES3からTakayama N., et al. J Exp Med. 2817-2830 (2010)に記載の方法にしたがって製造された造血前駆細胞が例示される。KLF1とは、NCBIのアクセッション番号NM_006563に記載された遺伝子である。

[0025] 同様に、FLI1の発現が低いとは、FLI1の発現が対照と比較して低いことを意味し、対照とは、特に限定されず、当業者が文献又は経験等に基づいて適宜選択することができるが、例えば、khES3からTakayama N., et al. J Exp Med. 2817-2830 (2010)に記載の方法にしたがって製造された造血前駆細胞が例示される。FLI1とは、NCBIのアクセッション番号NM_001167681、NM_001271010、NM_001271012またはNM_002017に記載された遺伝子である。

[0026] 遺伝子の発現を測定する方法として、当業者の常法にしたかっで行うことができ、例えば、DNAチップ法、サザンブロット法、ノーザンブロット法またはRT-PCR (Polymerase Chain Reaction) 法等が挙げられる。

[0027] KLF1の発現が低い、またはFLI1の発現が高い造血前駆細胞を選択する工程では、上記khES3細胞から製造された造血前駆細胞のほか、生体内の造血前駆細胞を対照としてもよい。また、任意の2種以上の造血前駆細胞(群)を比較して、KLF1の発現がより低い、又はFLI1の発現がより高いものを選択してもよい。このほかにも、多能性幹細胞から製造された造血前駆細胞を用いる場合、同時に製造された造血前駆細胞のうちKLF1の発現がより低い、又はFLI1の発現がより高いものを選択して本発明に用いてもよい。

[0028] 本明細書において、発現が低い又は高いという場合、対照と比較して有意に低い又は高い場合に限られず、低い又は高い傾向があると当業者が認識できる程度に低い又は高い場合も含まれる。

[0029] 本発明において、多能性幹細胞とは、生体に存在する全ての細胞に分化可能である多能性を有し、かつ、増殖能をも併せもつ幹細胞であり、それには、例えば胚性幹(ES)細胞、核移植により得られるクローン胚由来の胚性幹(nt ES)細胞、精子幹細胞(「GS細胞」)、胚性生殖細胞(「EG細胞」)、人工多能性幹(iPS)細胞、培養線維芽細胞や骨髄幹細胞由来の多能性細胞(Muse細胞)、刺激惹起性多能性獲得細胞(STAP細胞)などが含まれる。

[0030] (A) 胚性幹細胞

ES細胞は、ヒトやマウスなどの哺乳動物の初期胚(例えば胚盤胞)の内部細胞塊から樹立された、多能性と自己複製による増殖能を有する幹細胞である。

ES細胞は、受精卵の8細胞期、桑実胚後の胚である胚盤胞の内部細胞塊に由来する胚由来の幹細胞であり、成体を構成するあらゆる細胞に分化する能力、いわゆる分化多能性と、自己複製による増殖能とを有している。ES細胞は、マウスで1981年に発見され(M. J. Evans and M. H. Kaufman (1981), *Nature* 292:154-156)、その後、ヒト、サルなどの霊長類でもES細胞株が樹立された(J. A. Thomson et al. (1998), *Science* 282:1145-1147; J. A. Thomson et al. (1995), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92:7844-7848; J. A. Thomson et al. (1996), *Biol. Reprod.*, 55:254-259; J. A. Thomson and V. S. Marshall (1998), *Curr. Top. Dev. Biol.*, 38:133-165)。

[0031] ES細胞は、対象動物の受精卵の胚盤胞から内部細胞塊を取出し、内部細胞塊を線維芽細胞のフィーダー上で培養することによって樹立することができる。また、継代培養による細胞の維持は、白血病抑制因子(leukemia inhibitory factor (LIF))、塩基性線維芽細胞成長因子(basic fibroblast growth factor (bFGF))などの物質を添加した培養液を用いて行うことができる。ヒトおよびサルのES細胞の樹立と維持の方法については、例えばUSP5,843,780; T

Thomson JA, et al. (1995), Proc Natl. Acad. Sci. U S A. 92:7844-7848 ; Thomson JA, et al. (1998), Science. 282:1145-1147 ; H. Suemori et al . (2006), Biochem. Biophys. Res. Commun., 345:926-932 ; M. Ueno et al . (2006), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 103:9554-9559 ; H. Suemori et al . (2001), Dev. Dyn., 222:273-279;H. Kawasaki et al. (2002), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 99:1580-1585 ; Klimanskaya I, et al. (2006), Nature. 444:481-485などに記載されている。

[0032] ES細胞作製のための培養液として、例えば0.1mM 2-メルカプトエタノール、0.1mM 非必須アミノ酸、2mM L-グルタミン酸、20% KSRおよび4ng/ml bFGFを補充したDMEM/F-12培養液を使用し、37°C、5% CO₂、湿潤雰囲気下でヒトES細胞を維持することができる(H. Suemori et al. (2006), Biochem. Biophys. Res. Commun., 345:926-932)。また、ES細胞は、3~4日おきに継代する必要があり、このとき、継代は、例えば1mM CaCl₂および20% KSRを含有するPBS中の0.25% トリプシンおよび0.1mg/mlコラゲナーゼIVを用いて行うことができる。

[0033] ES細胞の選択は、一般に、アルカリホスファターゼ、Oct-3/4、Nanogなどの遺伝子マーカーの発現を指標にしてReal-Time PCR法で行うことができる。特に、ヒトES細胞の選択では、OCT-3/4、NANOG、ECADなどの遺伝子マーカーの発現を指標とすることができる(E. Kroon et al. (2008), Nat. Biotechnology, 26:443-452)。

[0034] ヒトES細胞株は、例えばWA01(H1)およびWA09(H9)は、WiCell Reserch Instituteから、KhES-1、KhES-2およびKhES-3は、京都大学再生医科学研究所(京都、日本)から入手可能である。

[0035] (B) 精子幹細胞

精子幹細胞は、精巣由来の多能性幹細胞であり、精子形成のための起源となる細胞である。この細胞は、ES細胞と同様に、種々の系列の細胞に分化誘導可能であり、例えばマウス胚盤胞に移植するとキメラマウスを作出できるなどの性質をもつ(M. Kanatsu-Shinohara et al. (2003) Biol. Reprod., 69

:612-616; K. Shinohara et al. (2004), *Cell*, 119:1001-1012)。神経膠細胞系由来神経栄養因子(glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF))を含む培養液で自己複製可能であるし、またES細胞と同様の培養条件下で継代を繰り返すことによって、精子幹細胞を得ることができる(竹林正則ら(2008), *実験医学*, 26巻, 5号(増刊), 41~46頁, 羊土社(東京、日本))。

[0036] (C) 胚性生殖細胞

胚性生殖細胞は、胎生期の始原生殖細胞から樹立される、ES細胞と同様な多能性をもつ細胞であり、LIF、bFGF、幹細胞因子(stem cell factor)などの物質の存在下で始原生殖細胞を培養することによって樹立しうる(Y. Matsui et al. (1992), *Cell*, 70:841-847; J.L. Resnick et al. (1992), *Nature*, 359:550-551)。

[0037] (D) 人工多能性幹細胞

人工多能性幹(iPS)細胞は、特定の初期化因子を、DNA又はタンパク質の形態で体細胞に導入することによって作製することができる、ES細胞とほぼ同等の特性、例えば分化多能性と自己複製による増殖能、を有する体細胞由来の人工の幹細胞である(K. Takahashi and S. Yamanaka (2006) *Cell*, 126:663-676; K. Takahashi et al. (2007), *Cell*, 131:861-872; J. Yu et al. (2007), *Science*, 318:1917-1920; Nakagawa, M.ら, *Nat. Biotechnol.* 26:101-106 (2008); 国際公開WO 2007/069666)。初期化因子は、ES細胞に特異的に発現している遺伝子、その遺伝子産物もしくはnon-coding RNAまたはES細胞の未分化維持に重要な役割を果たす遺伝子、その遺伝子産物もしくはnon-coding RNA、あるいは低分子化合物によって構成されてもよい。初期化因子に含まれる遺伝子として、例えば、Oct3/4、Sox2、Sox1、Sox3、Sox15、Sox17、Klf4、Klf2、c-Myc、N-Myc、L-Myc、Nanog、Lin28、Fbx15、ERas、ECAT15-2、Tcl1、beta-catenin、Lin28b、Sall1、Sall4、Esrrb、Nr5a2、Tbx3またはGls1等が例示され、これらの初期化因子は、単独で用いても良く、組み合わせて用いても良い。初期化因子の組み合わせとしては、WO2007/069666、WO2008/118820、WO2009/007852、WO2009/032194、WO2009/058413、WO2009/057831、

WO2009/075119、WO2009/079007、WO2009/091659、WO2009/101084、WO2009/101407、WO2009/102983、WO2009/114949、WO2009/117439、WO2009/126250、WO2009/126251、WO2009/126655、WO2009/157593、WO2010/009015、WO2010/033906、WO2010/033920、WO2010/042800、WO2010/050626、WO2010/056831、WO2010/068955、WO2010/098419、WO2010/102267、WO2010/111409、WO2010/111422、WO2010/115050、WO2010/124290、WO2010/147395、WO2010/147612、Huangfu D, et al. (2008), Nat. Biotechnol., 26: 795-797、Shi Y, et al. (2008), Cell Stem Cell, 2: 525-528、Eminli S, et al. (2008), Stem Cells. 26:2467-2474、Huangfu D, et al. (2008), Nat Biotechnol. 26:1269-1275、Shi Y, et al. (2008), Cell Stem Cell, 3, 568-574、Zhao Y, et al. (2008), Cell Stem Cell, 3:475-479、Marson A, (2008), Cell Stem Cell, 3, 132-135、Feng B, et al. (2009), Nat Cell Biol. 11:197-203、R.L. Judson et al., (2009), Nat. Biotech., 27:459-461、Lyssiotis CA, et al. (2009), Proc Natl Acad Sci U S A. 106:8912-8917、Kim JB, et al. (2009), Nature. 461:649-643、Ichida JK, et al. (2009), Cell Stem Cell. 5:491-503、Heng JC, et al. (2010), Cell Stem Cell. 6:167-74、Han J, et al. (2010), Nature. 463:1096-100、Mali P, et al. (2010), Stem Cells. 28: 713-720、Maekawa M, et al. (2011), Nature. 474:225-9.に記載の組み合わせが例示される。

[0038] 上記初期化因子には、ヒストンデアセチラーゼ (HDAC) 阻害剤 [例えば、バルプロ酸 (VPA)、トリコスタチンA、酪酸ナトリウム、MC 1293、M344等の低分子阻害剤、HDACに対するsiRNAおよびshRNA (例、HDAC1 siRNA Smartpool (Millipore)、HuSH 29mer shRNA Constructs against HDAC1 (OriGene)等)等の核酸性発現阻害剤など]、MEK阻害剤 (例えば、PD184352、PD98059、U0126、SL327およびPD0325901)、Glycogen synthase kinase-3阻害剤 (例えば、BioおよびCHIR99021)、DNAメチルトランスフェラーゼ阻害剤 (例えば、5-azacytidine)、ヒストンメチルトランスフェラーゼ阻害剤 (例えば、BIX-01294等の低分子阻害剤、Suv39h1、Suv39h2、SetDB1およびG9aに対するsiRN

AおよびshRNA等の核酸性発現阻害剤など)、L-channel calcium agonist (例えばBayk8644)、酪酸、TGF β 阻害剤またはALK5阻害剤(例えば、LY364947、SB431542、616453およびA-83-01)、p53阻害剤(例えばp53に対するsiRNAおよびshRNA)、ARID3A阻害剤(例えば、ARID3Aに対するsiRNAおよびshRNA)、miR-291-3p、miR-294、miR-295およびmir-302などのmiRNA、Wnt Signaling(例えばsoluble Wnt3a)、神経ペプチドY、プロスタグランジン類(例えば、プロスタグランジンE2およびプロスタグランジンJ2)、hTERT、SV40LT、UTF1、IRX6、GLIS1、PITX2、DMRTB1等の樹立効率を高めることを目的として用いられる因子も含まれており、本明細書においては、これらの樹立効率の改善目的にて用いられた因子についても初期化因子と別段の区別をしないものとする。

[0039] 初期化因子は、タンパク質の形態の場合、例えばリポフェクション、細胞膜透過性ペプチド(例えば、HIV由来のTATおよびポリアルギニン)との融合、マイクロインジェクションなどの手法によって体細胞内に導入してもよい。

[0040] 一方、DNAの形態の場合、例えば、ウィルス、プラスミド、人工染色体などのベクター、リポフェクション、リポソーム、マイクロインジェクションなどの手法によって体細胞内に導入することができる。ウィルスベクターとしては、レトロウィルスベクター、レンチウィルスベクター(以上、Cell, 126, pp.663-676, 2006; Cell, 131, pp.861-872, 2007; Science, 318, pp.1917-1920, 2007)、アデノウィルスベクター(Science, 322, 945-949, 2008)、アデノ随伴ウィルスベクター、センダイウィルスベクター(WO 2010/008054)などが例示される。また、人工染色体ベクターとしては、例えばヒト人工染色体(HAC)、酵母人工染色体(YAC)、細菌人工染色体(BAC、PAC)などが含まれる。プラスミドとしては、哺乳動物細胞用プラスミドを使用しうる(Science, 322:949-953, 2008)。ベクターには、核初期化物質が発現可能なように、プロモーター、エンハンサー、リポソーム結合配列、ターミネーター、ポリアデニル化サイトなどの制御配列を含むことができるし、さらに、必要に応

じて、薬剤耐性遺伝子(例えばカナマイシン耐性遺伝子、アンピシリン耐性遺伝子、ピューロマイシン耐性遺伝子など)、チミジンキナーゼ遺伝子、ジフテリアトキシン遺伝子などの選択マーカー配列、緑色蛍光タンパク質(GFP)、 β グルクロニダーゼ(GUS)、FLAGなどのレポーター遺伝子配列などを含むことができる。また、上記ベクターには、体細胞への導入後、初期化因子をコードする遺伝子もしくはプロモーターとそれに結合する初期化因子をコードする遺伝子を共に切除するために、それらの前後にLoxP配列を有してもよい。

[0041] また、RNAの形態の場合、例えばリポフェクション、マイクロインジェクションなどの手法によって体細胞内に導入しても良く、分解を抑制するため、5-メチルシチジンおよびpseudouridine (TriLink Biotechnologies)を取り込ませたRNAを用いても良い (Warren L, (2010) Cell Stem Cell, 7:618-630)。

[0042] iPS細胞誘導のための培養液としては、例えば、10~15%FBSを含有するDME M、DMEM/F12又はDME培養液(これらの培養液にはさらに、LIF、penicillin/streptomycin、puromycin、L-グルタミン、非必須アミノ酸類、 β -メルカプトエタノールなどを適宜含むことができる。)または市販の培養液[例えば、マウスES細胞培養用培養液(TX-WES培養液、トロンボX社)、霊長類ES細胞培養用培養液(霊長類ES/iPS細胞用培養液、リプロセル社)、無血清培地(mTeSR、Stemcell Technology社)]などが含まれる。

[0043] 培養法の例としては、たとえば、37°C、5%CO₂存在下にて、10%FBS含有DME M又はDMEM/F12培養液上で体細胞と初期化因子とを接触させ約4~7日間培養し、その後、細胞をフィーダー細胞(たとえば、マイトマイシンC処理ST0細胞、SNL細胞等)上にまきなおし、体細胞と初期化因子の接触から約10日後からbFGF含有霊長類ES細胞培養用培養液で培養し、該接触から約30~約45日又はそれ以上ののちにiPS様コロニーを生じさせることができる。

[0044] あるいは、37°C、5% CO₂存在下にて、フィーダー細胞(たとえば、マイトマイシンC処理ST0細胞、SNL細胞等)上で10%FBS含有DMEM培養液(これにはさらに、LIF、ペニシリン/ストレプトマイシン、ピューロマイシン、L-グルタミ

ン、非必須アミノ酸類、 β -メルカプトエタノールなどを適宜含むことができる。)で培養し、約25~約30日又はそれ以上ののちにES様コロニーを生じさせることができる。望ましくは、フィーダー細胞の代わりに、初期化される体細胞そのものを用いる (Takahashi K, et al. (2009), PLoS One. 4:e8067 またはW02010/137746)、もしくは細胞外基質 (例えば、Laminin-5 (W02009/123349) およびマトリゲル (BD社)) を用いる方法が例示される。

[0045] この他にも、血清を含有しない培地を用いて培養する方法も例示される (Sun N, et al. (2009), Proc Natl Acad Sci U S A. 106:15720-15725)。さらに、樹立効率を上げるため、低酸素条件 (0.1%以上、15%以下の酸素濃度) によりiPS細胞を樹立しても良い (Yoshida Y, et al. (2009), Cell Stem Cell. 5:237-241 またはW02010/013845)。

[0046] 上記培養の間には、培養開始2日目以降から毎日1回新鮮な培養液と培養液交換を行う。また、核初期化に使用する体細胞の細胞数は、限定されないが、培養ディッシュ100cm²あたり約 5×10^3 ~約 5×10^6 細胞の範囲である。

[0047] iPS細胞は、形成したコロニーの形状により選択することが可能である。一方、体細胞が初期化された場合に発現する遺伝子 (例えば、Oct3/4、Nanog) と連動して発現する薬剤耐性遺伝子をマーカー遺伝子として導入した場合は、対応する薬剤を含む培養液 (選択培養液) で培養を行うことにより樹立したiPS細胞を選択することができる。また、マーカー遺伝子が蛍光タンパク質遺伝子の場合は蛍光顕微鏡で観察することによって、発光酵素遺伝子の場合は発光基質を加えることによって、また発色酵素遺伝子の場合は発色基質を加えることによって、iPS細胞を選択することができる。

[0048] 本明細書中で使用する「体細胞」なる用語は、卵子、卵母細胞、ES細胞などの生殖系列細胞または分化全能性細胞を除くあらゆる動物細胞 (好ましくは、ヒトを含む哺乳動物細胞) をいう。体細胞には、非限定的に、胎児(仔)の体細胞、新生児(仔)の体細胞、および成熟した健全なもしくは疾患性の体細胞のいずれも包含されるし、また、初代培養細胞、継代細胞、および株化細胞のいずれも包含される。具体的には、体細胞は、例えば (1) 神経幹細胞

、造血幹細胞、間葉系幹細胞、歯髄幹細胞等の組織幹細胞（体性幹細胞）、
（2）組織前駆細胞、（3）リンパ球、上皮細胞、内皮細胞、筋肉細胞、線維芽細胞（皮膚細胞等）、毛細胞、肝細胞、胃粘膜細胞、腸細胞、脾細胞、膵細胞（膵外分泌細胞等）、脳細胞、肺細胞、腎細胞および脂肪細胞等の分化した細胞などが例示される。

[0049] また、本発明では、iPS細胞由来の血小板を移植材料として用いることを考慮すると、拒絶反応が起きにくいことが望ましいという観点から、移植先の個体のHLA遺伝子型が同一もしくは実質的に同一である体細胞をiPS細胞の製造に用いることが望ましい。ここで、「実質的に同一」とは、移植した細胞に対して免疫抑制剤により免疫反応が抑制できる程度にHLA遺伝子型が一致していることであり、例えば、HLA-A、HLA-BおよびHLA-DRの3遺伝子座あるいはHLA-Cを加えた4遺伝子座が一致するHLA型を有する体細胞であってもよい。

[0050] (E) 核移植により得られたクローン胚由来のES細胞

nt ES細胞は、核移植技術によって作製されたクローン胚由来のES細胞であり、受精卵由来のES細胞とほぼ同じ特性を有している（T. Wakayama et al. (2001), *Science*, 292:740-743; S. Wakayama et al. (2005), *Biol. Reprod.*, 72:932-936; J. Byrne et al. (2007), *Nature*, 450:497-502）。すなわち、未受精卵の核を体細胞の核と置換することによって得られたクローン胚由来の胚盤胞の内部細胞塊から樹立されたES細胞がnt ES(nuclear transfer ES)細胞である。nt ES細胞の作製のためには、核移植技術（J.B. Cibelli et al. (1998), *Nature Biotechnol.*, 16:642-646）とES細胞作製技術との組み合わせが利用される（若山清香ら(2008), *実験医学*, 26巻, 5号(増刊), 47~52頁）。核移植においては、哺乳動物の除核した未受精卵に、体細胞の核を注入し、数時間培養することで初期化することができる。

[0051] (F) Multilineage-differentiating Stress Enduring cells (Muse細胞)

Muse細胞は、W02011/007900に記載された方法にて製造された多能性幹細胞であり、詳細には、線維芽細胞または骨髄間質細胞を長時間トリプシン処理、好ましくは8時間または16時間トリプシン処理した後、浮遊培養することで

得られる多能性を有した細胞であり、SSEA-3およびCD105が陽性である。

[0052] (G) 刺激惹起性多能性獲得細胞 (STAP細胞)

STAP細胞は、W02013/163296に記載された方法にて製造された多能性幹細胞であり、例えば、体細胞をpH5.4から5.8の酸性溶液中で30分間培養して得られる、SSEA-4およびE-cadherinが陽性の細胞である。

[0053] 本発明において、好ましい多能性幹細胞は、巨核球に分化誘導できる造血前駆細胞を製造できる細胞である。このような多能性幹細胞を選択において、KLF1の発現がより低い、又はFLI1の発現がより高い造血前駆細胞が製造できるか否かによって行われ得る。ここで、多能性幹細胞から造血前駆細胞の製造方法およびKLF1の発現およびFLI1の発現の測定方法は上記の方法を用いて行うことができる。

[0054] 従って、本発明の他の態様として、(1) 多能性幹細胞から造血幹細胞を製造する工程、および(2) 工程(1)で製造された造血前駆細胞において、KLF1の発現およびFLI1の発現の測定する工程、を含む巨核球製造に適した多能性幹細胞を選択する方法を提供する。

[0055] 本発明において、「癌遺伝子」とは、その発現、構造または機能等が正常細胞と異なることに起因して、正常細胞のがん化を引き起こす遺伝子であり、例えば、MYCファミリー遺伝子、Srcファミリー遺伝子、Rasファミリー遺伝子、Rafファミリー遺伝子、c-KitやPDGFR、Ablなどのプロテインキナーゼファミリー遺伝子などを挙げることができる。MYCファミリー遺伝子として、c-MYC、N-MYCおよびL-MYCが例示される。より好ましくは、c-MYC遺伝子である。c-MYC遺伝子とは、例えば、NCBIのアクセッション番号NM_002467で示される核酸配列からなる遺伝子である。また、c-MYC遺伝子には、そのホモログも含まれてよく、c-MYC遺伝子ホモログとは、そのcDNA配列が、例えば、NCBIのアクセッション番号NM_002467で示される核酸配列と実質的に同一の配列からなる遺伝子のことである。NCBIのアクセッション番号NM_002467で示される核酸配列と実質的に同一の配列からなるcDNAとは、NCBIのアクセッション番号NM_002467で表される配列からなるDNAと、約60%以上、好ましくは約70%以上

、より好ましくは約80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、最も好ましくは約99%の同一性を有する配列からなるDNA、もしくは、NCBIのアクセッション番号NM_002467で表わされる核酸配列に相補的な配列からなるDNAとストリンジентな条件下でハイブリダイズできるDNAであって、これらのDNAによってコードされるタンパク質が、造血前駆細胞など、分化段階の細胞の増幅に寄与するものことである。

[0056] ここで、ストリンジентな条件とは、当業者によって容易に決定されるハイブリダイゼーションの条件のことで、一般的にプローブ長、洗浄温度、及び塩濃度に依存する経験的な実験条件である。一般に、プローブが長くなると適切なアニーリングのための温度が高くなり、プローブが短くなると温度は低くなる。ハイブリッド形成は、一般的に、相補的鎖がその融点よりやや低い環境における再アニール能力に依存する。

[0057] 例えば、低ストリンジентな条件として、ハイブリダイゼーション後のフィルターの洗浄段階において、37℃～42℃の温度条件下、0.1×SSC、0.1% SDS溶液中で洗浄することなどが上げられる。また、高ストリンジентな条件として、例えば、洗浄段階において、65℃、5×SSCおよび0.1% SDS中で洗浄することなどが挙げられる。ストリンジентな条件をより高くすることにより、相同性の高いポリヌクレオチドを得ることができる。

[0058] 本発明において、c-MYCの発現量を抑制することが好ましいため、不安定化ドメインと融合させたタンパク質をコードするc-MYCであってもよい。不安定化ドメインは、ProteoTuner社またはClontech社から購入して用いることができる。

[0059] 本発明において、「アポトーシス抑制遺伝子」とは、アポトーシスを抑制する遺伝子であれば特に限定されず、例えば、BCL2遺伝子、BCL-XL遺伝子、Survivin、MCL1などが挙げられる。好ましくは、BCL-XL遺伝子である。BCL-XL遺伝子とは、例えば、NCBIのアクセッション番号NM_001191またはNM_138578で示される核酸配列からなる遺伝子である。また、BCL-XL遺伝子には、そ

のホモログも含まれてよく、BCL-XL遺伝子のホモログとは、そのcDNA配列が、例えば、NCBIのアクセッション番号NM_001191またはNM_138578で示される核酸配列と実質的に同一の配列からなる遺伝子のことである。NCBIのアクセッション番号NM_001191またはNM_138578で示される核酸配列と実質的に同一の配列からなるcDNAとは、NCBIのアクセッション番号NM_001191またはNM_138578で表される配列からなるDNAと、約60%以上、好ましくは約70%以上、より好ましくは約80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、最も好ましくは約99%の同一性を有する配列からなるDNA、もしくは、NCBIのアクセッション番号NM_001191またはNM_138578で表わされる核酸配列に相補的な配列からなるDNAとストリンジентな条件下でハイブリダイズできるDNAであって、そのDNAによってコードされるタンパク質が、アポトーシスを抑制する効果を有するものことである。

[0060] 本発明の態様として、造血前駆細胞へさらに以下の(i)~(iii)のいずれかの遺伝子を強制発現させ、該細胞を培養して増殖させる工程によって得られたものを用いることができる。

(i)p16遺伝子又はp19遺伝子の発現を抑制する遺伝子；

(ii)Ink4a/Arf遺伝子の発現を抑制する遺伝子；及び

(iii)ポリコーム遺伝子。

[0061] この(i)~(iii)の遺伝子としては、例えば、BMI1、Mei18、Ring1a/b、Phc1/2/3、Cbx2/4/6/7/8、Ezh2、Eed、Suz12、HADC、Dnmt1/3a/3bなどを挙げることができるが、BMI1遺伝子が特に好ましい。BMI1遺伝子とは、例えば、NCBIのアクセッション番号NM_005180で示される核酸配列からなる遺伝子である。また、BMI1遺伝子には、そのホモログも含まれてよく、BMI1遺伝子のホモログとは、そのcDNA配列が、例えばNCBIのアクセッション番号NM_005180で示される核酸配列と実質的に同一の配列からなる遺伝子のことである。NCBIのアクセッション番号NM_005180で示される核酸配列と実質的に同一の配列からなるcDNAとは、NCBIのアクセッション番号NM_005180で表される配列からなる

DNAと、約60%以上、好ましくは約70%以上、より好ましくは約80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、最も好ましくは約99%の同一性を有する配列からなるDNA、もしくは、NCBIのアクセッション番号NM_005180で表わされる核酸配列に相補的な配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズできるDNAであって、そのDNAによってコードされるタンパク質が、MYCファミリー遺伝子などの癌遺伝子が発現している細胞内で生じる癌遺伝子誘導性細胞老化を抑制し、該細胞の増幅を促進するものことである。

[0062] 本発明において、(i)p16遺伝子又はp19遺伝子の発現を抑制する遺伝子、(ii)Ink4a/Arf遺伝子の発現を抑制する遺伝子及び(iii)ポリコム遺伝子から成る群より選択される1つの遺伝子をさらに強制発現する場合、当該強制発現した遺伝子を止めて培養する工程をさらに含む巨核球の製造方法が好ましい。本工程において、好ましくは、癌遺伝子、ならびに(i)p16遺伝子又はp19遺伝子の発現を抑制する遺伝子、(ii)Ink4a/Arf遺伝子の発現を抑制する遺伝子及び(iii)ポリコム遺伝子から成る群より選択される1つの遺伝子を造血前駆細胞において強制発現させた後、アポトーシス抑制遺伝子をさらに当該細胞へ強制発現させる工程である。

[0063] 本発明において、上記の遺伝子を造血前駆細胞において強制発現させる方法として、当業者の常法にしたがって行うことができ、例えば、これらの遺伝子を発現するベクター、またはこれらの遺伝子をコードするタンパク質またはRNAの形態で造血前駆細胞へ導入することによって成し得る。さらには、これらの遺伝子の発現を誘導する低分子化合物等を造血前駆細胞と接触させることによって行うことができる。ここで、本発明では、一定期間、上記遺伝子を発現し続ける必要があることから、発現ベクター、タンパク質、RNAまたは発現を誘導する低分子化合物等は、必要な期間に合わせて複数回導入することによって行い得る。

[0064] これらの遺伝子を発現するベクターとは、例えば、レトロウイルス、レンチウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、ヘルペスウイルス及び

センダイウィルスなどのウィルスベクター、動物細胞発現プラスミド（例、pA1-11, pXT1, pRc/CMV, pRc/RSV, pcDNA1/Neo）などが用いられ得る。単回導入により実施し得るという点において、好ましくは、レトロウィルスベクターまたはレンチウィルスベクターである。

[0065] 発現ベクターにおいて使用されるプロモーターの例としては、EF- α プロモーター、CAGプロモーター、SR α プロモーター、SV40プロモーター、LTRプロモーター、CMV（サイトメガロウィルス）プロモーター、RSV（ラウス肉腫ウィルス）プロモーター、MoMuLV（モロニーマウス白血病ウィルス）LTR、HSV-TK（単純ヘルペスウィルスチミジンキナーゼ）プロモーターなどが用いられる。発現ベクターは、プロモーターの他に、所望によりエンハンサー、ポリA付加シグナル、選択マーカー遺伝子、SV40複製起点などを含有していてもよい。有用な選択マーカー遺伝子としては、例えば、ジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子、ネオマイシン耐性遺伝子、ピューロマイシン耐性遺伝子等が挙げられる。

[0066] 本発明の発現ベクターにおいて、テトラサイクリンまたはドキシサイクリンによりその遺伝子の発現を制御するため、プロモーター領域にはテトラサイクリン反応性エレメントを有している薬剤応答性ベクターであってもよい。この他にも、Cre-loxPシステムを使用して、遺伝子をベクターから切り出すため、loxP配列にて遺伝子またはプロモーター領域もしくはその両方をはさむようにloxP配列を設置された発現ベクターを用いてもよい。

[0067] 本発明では、同時に複数の遺伝子を導入するため、遺伝子が縦に連結されてポリシストロニックなベクターを得てもよい。ポリシストロニックな発現を可能にするために、口蹄疫ウィルスの2A自己開裂ペプチド（Science, 322, 949-953, 2008などを参照）およびIRES配列などを強制発現させる遺伝子の間にライゲーションされて用いられ得る。

[0068] 本発明において、発現ベクターを造血前駆細胞への導入する方法として、ウィルスベクターの場合、該核酸を含むプラスミドを適当なパッケージング細胞（例、Plat-E細胞）や補完細胞株（例、293細胞）に導入して、培養上清

中に産生されたウィルスを回収し造血前駆細胞と接触させ感染させることによって成し得る。非ウィルスベクターの場合、リポフェクション法、リポソーム法、エレクトロポレーション法、リン酸カルシウム共沈殿法、DEAEデキストラン法、マイクロインジェクション法、遺伝子銃法などを用いてプラスミドベクターを細胞に導入することができる。

[0069] 本発明では、アポトーシス抑制遺伝子を造血前駆細胞において強制発現させることに代わって、カスパーゼ阻害剤を細胞と接触させても良い。本発明において、カスパーゼ阻害剤は、ペプチド性化合物、非ペプチド性化合物、あるいは、生物由来のタンパク質のいずれであってもよい。ペプチド性化合物としては、例えば人工的に化学合成された下記(1)～(10)のペプチド性化合物を挙げることができる。

- (1) Z-Asp-CH₂-DCB (分子量454.26)
- (2) Boc-Asp(OMe)-FMK (分子量263.3)
- (3) Boc-Asp(OBzl)-CMK (分子量355.8)
- (4) Ac-AAVALLPAVLLALLAP-YVAD-CHO (分子量1990.5) (配列番号: 1)
- (5) Ac-AAVALLPAVLLALLAP-DEVD-CHO (分子量2000.4) (配列番号: 2)
- (6) Ac-AAVALLPAVLLALLAP-LEVD-CHO (分子量1998.5) (配列番号: 3)
- (7) Ac-AAVALLPAVLLALLAP-IETD-CHO (分子量2000.5) (配列番号: 4)
- (8) Ac-AAVALLPAVLLALLAP-LEHD-CHO (分子量2036.5) (配列番号: 5)
- (9) Z-DEVD-FMK (Z-Asp-Glu-Val-Asp-fluoromethylketone) (配列番号: 6)
- (10) Z-VAD FMK

例えば、ペプチド性化合物のカスパーゼ阻害剤として、(1) VX-740 - Ve

rtex Pharmaceuticals (Leung-Toung et al., *Curr. Med. Chem.* 9, 979-1002 (2002)), (2) HMR-3480 - Aventis Pharma AG (Randle et al., *Expert Opin. Investig. Drugs* 10, 1207-1209 (2001)), を挙げることができる。

[0070] 非ペプチド性化合物のカスパーゼ阻害剤としては、(1) アニリノキナゾリン (anilinoquinazolines (AQZs)) - AstraZeneca Pharmaceuticals (Scott et al., *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 304, 433-440 (2003))、(2) M826 - Merck Frosst (Han et al., *J. Biol. Chem.* 277, 30128-30136 (2002))、(3) M867 - Merck Frosst (Methot et al., *J. Exp. Med.* 199, 199-207 (2004))、(4) ニコチルアスパチルケトンズ (Nicotinyl aspartyl ketones) - Merck Frosst (Isabel et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 13, 2137-2140 (2003))、などを例示することができる。

[0071] また、その他の非ペプチド性化合物のカスパーゼ阻害剤として、(1) IDN-6556 - Idun Pharmaceuticals (Hoglen et al., *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 309, 634-640 (2004))、(2) MF-286 and MF-867 - Merck Frosst (Los et al., *Drug Discov. Today* 8, 67-77 (2003))、(3) IDN-5370 - Idun Pharmaceuticals (Deckwerth et al., *Drug Dev. Res.* 52, 579-586 (2001))、(4) IDN-1965 - Idun Pharmaceuticals (Hoglen et al., *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 297, 811-818 (2001))、(5) VX-799 - Vertex Pharmaceuticals (Los et al., *Drug Discov. Today* 8, 67-77 (2003))、などを挙げることができる。このほかに、M-920 and M-791 - Merck Frosst (Hotchkiss et al., *Nat. Immunol.* 1, 496-501 (2000))などもカスパーゼ阻害剤として挙げることができる。

[0072] 本発明において、好ましいカスパーゼ阻害剤は、Z-VAD FMKであり、Z-VAD FMKを用いる場合、造血前駆細胞を培養する培地へ添加することで行われ、Z-VAD FMKの好ましい培地中の濃度は、例えば、10 μ M以上、20 μ M以上、30 μ M以上、40 μ M以上、および50 μ M以上が挙げられ、好ましくは、30 μ M以上である。

[0073] 本発明において、上記の通り、アポトーシス抑制遺伝子等の外来性遺伝子

を強制発現させた細胞の培養方法としては、任意の培地を用いて、フィーダー細胞上で培養する方法が例示される。フィーダー細胞としては、巨核球または巨核球前駆細胞を誘導することができる細胞であれば特に限定されないが、例えば、C3H10T1/2 (Katagiri T, et al., Biochem Biophys Res Commun . 172, 295-299 (1990)) が挙げられる。

[0074] 本発明において用いる培地は、特に限定されないが、動物細胞の培養に用いられる培地を基礎培地として調製することができる。基礎培地としては、例えばIMDM培地、Medium 199培地、Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM)培地、 α MEM培地、Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM)培地、Ham's F12培地、RPMI 1640培地、Fischer's培地、Neurobasal Medium (ライフテクノロジーズ) およびこれらの混合培地などが包含される。培地には、血清が含有されていてもよいし、あるいは無血清でもよい。必要に応じて、培地は、例えば、アルブミン、インスリン、トランスフェリン、セレン、脂肪酸、微量元素、2-メルカプトエタノール、チオールグリセロール、脂質、アミノ酸、L-グルタミン、非必須アミノ酸、ビタミン、増殖因子、低分子化合物、抗生物質、抗酸化剤、ピルビン酸、緩衝剤、無機塩類、サイトカインなどの1つ以上の物質も含有し得る。サイトカインとは、血球系分化を促進するタンパク質であり、例えば、VEGF、TPO、SCFなどが例示される。本発明において好ましい培地は、血清、インスリン、トランスフェリン、セリン、チオールグリセロール、アスコルビン酸、TPOを含むIMDM培地である。より好ましくは、さらにSCFを含む。また、薬剤応答性のプロモーターを含む発現ベクターを用いた場合、強制発現する工程においては、対応する薬剤、例えば、テトラサイクリンまたはドキシサイクリンを培地に含有させることが望ましい。

[0075] 本発明において、培養する際の条件は、特に限定されないが、37°C以上の温度で培養することにより、巨核球または巨核球前駆細胞の分化を促進することが確認されている。ここで、37°C以上の温度とは、細胞にダメージを与えない程度の温度が適当であることから、例えば、約37°C～約42°C程度、約37～約39°C程度が好ましい。また、37°C以上の温度における培養期間について

は、巨核球または巨核球前駆細胞の数などをモニターしながら、適宜決定することが可能である。所望の巨核球前駆細胞が得られる限り、日数は特に限定されないが、例えば、少なくとも6日間以上、12日以上、18日以上、24日以上、30日以上、42日以上、48日以上、54日以上、60日以上であり、好ましくは60日以上である。培養期間が長いことについては、巨核球の製造においては問題とされない。また、培養期間中は、適宜、継代を行うことが望ましい。

[0076] 本発明において、巨核球の製造方法の一態様は、さらに、(a)p53遺伝子産物の発現又は機能を阻害する物質、(b)アクトミオシン複合体機能阻害剤、(c)ROCK阻害剤および(d)HDAC阻害剤をさらに培地に含んでもよい。これらの方法は、例えば、W02012/157586に記載された方法にしたがって実施し得る。

[0077] 本発明の巨核球の製造方法では、上記の通り外来性遺伝子を強制発現する工程で得られた巨核球または巨核球前駆細胞に対して、強制発現を停止して培養する工程をさらに含む。強制発現を停止する方法として、例えば、薬剤応答性ベクターを用いて強制発現をしている場合には、対応する薬剤と当該細胞と接触させないことによって達成させてもよい。この他にも、上記のLoxPを含むベクターを用いた場合は、Creリコンビナーゼを当該細胞に導入することによって達成させてもよい。さらに、一過性発現ベクター、およびRNAまたはタンパク質導入を用いた場合は、当該ベクター等との接触を止めることによって達成させてもよい。本工程において用いられる培地は、上記と同一の培地を用いて行うことができる。

[0078] 強制発現を停止して培養する際の条件は、特に限定されないが、例えば、約37°C～約42°C程度、約37～約39°C程度が好ましい。また、37°C以上の温度における培養期間については、巨核球の数などをモニターしながら、適宜決定することが可能であるが、例えば、2日間～10日間、好ましくは3日間～7日間程度である。少なくとも3日以上であることが望ましい。また、培養期間中は、適宜、継代を行うことが望ましい。

[0079] 上述の方法で得られた巨核球は、十分に成熟し、CD42b陽性の機能的な血小

板を効率よく産生する。このCD42b陽性の血小板は、in vivo及びin vitroにおいて、高い血栓形成能を有している。本発明で得られた巨核球は、少なくとも外来性のアポトーシス抑制遺伝子および癌遺伝子が染色体に組み込まれている巨核球であるが、当該遺伝子の発現は停止されている巨核球である。本明細書において、巨核球の成熟とは、巨核球が十分に多核化し、機能的な血小板を産生できることをいう。巨核球の成熟は、例えば、GATA1、p45 NF-E2、beta1-tubulinなどの巨核球成熟関連遺伝子群の発現の上昇によっても確認することができる。

[0080] また、巨核球および／または巨核球前駆細胞は、凍結保存後、融解しても機能的な血小板を産生することができるため、本発明の方法を用いて製造された巨核球および／または巨核球前駆細胞は、凍結保存した状態で流通させることができる。

[0081] (血液細胞組成物)

本発明はまた、造血前駆細胞を分化誘導して得られる血液細胞組成物であって、巨核球の含有率が高い血液細胞組成物を提供する。ここで、「血液細胞組成物」には、本発明の方法で製造された「巨核球」を含む他、その他の方法によって調製された巨核球、又は、その他の血液細胞が含まれて又は加えられていてもよい。

本発明の方法によって造血前駆細胞を処理すると、巨核球への分化を促進することができる。そのため、例えば、多能性幹細胞などから分化させた造血前駆細胞に対し、本発明の方法を適用することで、巨核球の含有率の高い細胞組成物を取得することができる。血液細胞組成物において巨核球の含有率が高いか否かは、当業者が経験や文献に基づいて判断することができる。本発明の方法で造血前駆細胞を処理した場合、他の方法で処理した場合と比較して、巨核球の含有率を、少なくとも、20%以上、30%以上、好ましくは、40%以上、50%以上、より好ましくは80%以上にまで増大させることが可能である。従って、本発明の方法により、巨核球の存在比率の高い巨核球集団、あるいは、血液細胞集団を調製することが可能となる。

[0082] 本発明の方法で得られた巨核球等は、適切な方法によって、生体内に移植し、生体内における機能性血小板を産生させるためにも有効である。従って、本発明の方法で得られた巨核球を含む治療剤を提供する。

本発明の方法によって得られる巨核球等の移植は、骨髄移植におけるドナー数の不足及びドナーの負担の問題、臍帯血移植における生体内での血小板産生能力の問題を解決することが可能で、従来の移植法と比較して、非常に優れた方法といえることができる。

[0083] (血小板の製造方法)

本発明に係る血小板の製造方法は、本発明の方法で得られた巨核球から、*in vitro*で血小板を産生させるものである。

[0084] 本発明に係る血小板の製造方法は、上述の方法で得られた巨核球を培養し、培養物から血小板を回収する工程を含む。

[0085] 培養条件は、限定はしないが、例えば、TPO (10~200ng/mL、好ましくは50~100ng/mL程度)の存在下で、あるいは、TPO (10~200ng/mL、好ましくは50~100ng/mL程度)、SCF (10~200ng/mL、好ましくは50ng/mL程度)及びHeparin (10~100U/mL、好ましくは25U/mL程度)の存在下で、培養してもよい。血小板の機能が維持される限り、培養を継続することができ、例えば、培養期間として、7日から15日程度が挙げられる。

[0086] 培養温度は、本発明の効果が得られる限り特に限定されず、35°C~40°Cで行うことができるが、37°C~39°Cが好適である。

[0087] 本発明に係る製造方法では、巨核球の培養工程を、血清フリー及び／又はフィーダー細胞フリーの条件で行ってもよい。好ましくは、TPOを含有する培地で本発明の方法にしたがって製造された巨核球を培養することで行う方法である。血小板産生工程においては、血清フリー且つフィーダー細胞フリーで行うことができれば、得られた血小板を臨床的に用いる場合に免疫原性の問題が生じにくい。また、フィーダー細胞を用いないで血小板を産生させることができれば、フィーダー細胞を接着させる必要がないので、フラスコなどで浮遊培養することができるので、製造コストを抑制できるとともに、大

量生産に適している。なお、フィーダー細胞を用いない場合は、conditioned mediumを使用してもよい。conditioned mediumは、特に限定されず、当業者が公知の方法等に従って作製することができるが、例えば、フィーダー細胞を適宜培養し、培養物からフィーダー細胞をフィルターで除去することによって得ることができる。

[0088] 本発明に係る血小板の製造方法の一態様では、培地にROCK阻害剤及び／又はアクトミオシン複合体機能阻害剤を加える。ROCK阻害剤及びアクトミオシン複合体機能阻害剤としては、上述した多核化巨核球の製造方法で使用したのと同じものを使用することができる。ROCK阻害剤としては、例えばY27632が挙げられる。アクトミオシン複合体機能阻害剤としては、ミオシン重鎖II ATPase阻害剤である、プレビスタチンが挙げられる。ROCK阻害剤を単独で加えてもよく、ROCK阻害剤とアクトミオシン複合体機能阻害剤を単独で加えてもよいし、これらを組み合わせて加えてもよい。

[0089] ROCK阻害剤及び／又はアクトミオシン複合体機能阻害剤は、 $0.1\ \mu\text{M}$ ～ $30\ \mu\text{M}$ で加えることが好ましく、例えば $0.5\ \mu\text{M}$ ～ $25\ \mu\text{M}$ 、 $5\ \mu\text{M}$ ～ $20\ \mu\text{M}$ 等としてもよい。

[0090] ROCK阻害剤及び／又はアクトミオシン複合体機能阻害剤を加えてからの培養期間は1日～15日とすることができ、3日、5日、7日等としてもよい。ROCK阻害剤及び／又はアクトミオシン複合体機能阻害剤を加えることにより、CD42b陽性血小板の割合をさらに増加させることが可能である。

[0091] 本発明で得られた血小板は、製剤として患者に投与することができる。投与に当たっては、本発明の方法で得られる血小板は、例えば、ヒト血漿、輸液剤、クエン酸含有生理食塩液、ブドウ糖加アセテートリンゲル液を主剤とした液、PAS (platelet additive solution) (Gulliksson, H. et al., Transfusion, 32 : 435-440, (1992)) 等にて保存、製剤化してもよい。保存期間は、3日から7日程度で、好ましくは4日間である。保存条件として、室温（20-24度）で振盪攪拌して保存することが望ましい。

[0092] (巨核球及び／または血小板の製造キット)

本発明の実施形態には、巨核球及び／または血小板を製造するためのキットが含まれる。当該キットには、アポトーシス抑制遺伝子、癌遺伝子、上記(i)～(iii)の遺伝子等を細胞内で発現するのに必要な発現ベクター等及び試薬などの他、細胞培養のための培地、血清、増殖因子などのサプリメント（例えば、TPO、EPO、SCF、Heparin、IL-6、IL-11など）、抗生物質などが含まれる。その他、例えば、多能性細胞由来の細胞を使用する場合、これらの細胞から調製したネット様構造物を同定するためのマーカー確認用の抗体（例えば、Flk1、CD31、CD34、UEA-Iレクチンなどに対する抗体）なども含まれる。さらに、巨核球の製造に適した造血前駆細胞を選択するため、KLF1及び／またはFLI1の発現を測定するキットを含んでも良い。キット中に含まれる試薬、抗体等は、構成成分が活性を長期間有効に持続し、容器の材質によって吸着されず、変質を受けないような何れかの種類の容器中に供給される。

[0093] 本明細書中に記載される「細胞」の由来は、ヒト及び非ヒト動物（例えば、マウス、ラット、ウシ、ウマ、ブタ、ヒツジ、サル、イヌ、ネコ、トリなど）であり特に限定はされないが、特に好ましくは、ヒト由来の細胞である。

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。

実施例 1

[0094] 1) ES/iPS細胞からの造血前駆細胞の調製

ヒトES細胞（khES3：京都大学より入手）およびiPS細胞（TKDN SeV2：センダイウィルスを用いて樹立されたヒト胎児皮膚繊維芽細胞由来iPS細胞、585A1、585B1、606A1、648B1および692D2：Okita K, et al, Stem Cells 31, 458-66, 2012に記載のエピソーマルベクターを用いて樹立されたヒト末梢血単核球由来iPS細胞）から、Takayama N., et al. J Exp Med. 2817-2830 (2010)に記載の方法に従って、血球細胞への分化培養を実施した。即ち、ヒトES/iPS細胞コロニーを20ng/mL VEGF (R&D SYSTEMS)存在下でC3H10T1/2フィーダー細胞と14日間共培養して造血前駆細胞（Hematopoietic Progenitor Cells (H

PC)) を作製した。培養条件は20% O₂、5% CO₂で実施した（特に記載がない限り、以下同条件）。

[0095] 2) 造血前駆細胞へのウイルス感染

予めC3H10T1/2フィーダー細胞を播種した6 well plate上に、上記の方法で得られたHPCを5x10⁴cells/wellずつ播種し、レンチウイルス法にてc-MycおよびBCL-xLを強制発現させた。このとき、細胞株1種類につき6 wellずつ使用した。即ち、それぞれMOI 20になるように培地中にウイルス粒子を添加し、スピニンフェクション（32℃ 900rpm, 60分間遠心）で感染させた。本操作は、12時間おきに2回実施した。このとき、基本培地（15% Fetal Bovine Serum (GIBCO)、1% Penicillin-Streptomycin-Glutamine (GIBCO)、1% Insulin, Transferrin, Selenium Solution (ITS -G) (GIBCO)、0.45mM 1-Thioglycerol (Sigma-Aldrich)、50 μg/mL L-Ascorbic Acid (Sigma-Aldrich)を含有するIDM (Iscove' s Modified Dulbecco' s Medium) (Sigma-Aldrich)) へ50ng/mL Human thrombopoietin (TPO) (R&D SYSTEMS)、50ng/ml Human Stem Cell Factor (SCF) (R&D SYSTEMS)および2 μg/mL Doxycyclin (Dox)を加えた培地（以下、分化培地）を用いた。なお、レンチウイルスベクターは、Tetracycline制御性のinducible vectorであり、LV-TRE-mOKS-Ubc-tTA-I2G (Kobayashi, T., et al. Cell 142, 787-799 (2010)) のmOKSカセットをBcl-xLおよびc-Mycに組み替えることで作製された（それぞれ、LV-TRE-BCL-xL-Ubc-tTA-I2GおよびLV-TRE- c-Myc-Ubc-tTA-I2G）。感染に用いたウイルス粒子は、293T細胞へ上記レンチウイルスベクターを発現させて作製された。

[0096] 3) 巨核球株の樹立および維持培養

上記の方法でウイルス感染を実施した日を感染0日目として、以下の通り、巨核球株を培養し、樹立した。

・感染2日目：継代。

ピペティングにて上記の方法で得られたウイルス感染した細胞を回収し、1200rpm, 5分間遠心操作を行って上清を除去した後、新しい分化培地で懸濁して新しいC3H10T1/2フィーダー細胞上に播種した(6well plate)。

・感染6日目：継代。

感染2日目と同様の操作を実施。ただし、樹立は複数回行い、このうち1回目 (Exp. 1) ではSCFを添加しない分化培地でおこなった。SCFを添加した方が増殖がよい印象を得られた。

・感染12日目：継代。

感染6日目と同様の操作を実施。細胞数を計測後 3×10^5 cells/ 10mL / 100 mm dishで播種した。

・感染18日目：継代。

感染6日目と同様の操作を実施。細胞数を計測後 3×10^5 cells/ 10mL / 100 mm dishで播種した。

・感染24日目：継代、凍結保存、FACS解析。

細胞の一部を上記と同様に継代 (1×10^5 cells/well) し、残りを凍結保存した (5×10^5 cells/tube程度)。以後、4-7日毎に継代を行い、維持培養を行った。その間の培地替えは行わなかった。

[0097] 4) 巨核球株の解析

ES細胞 (khES3) およびiPS細胞 (TKDN SeV2) 由来の造血前駆細胞から上述の方法で巨核球株の樹立を試みたところ、TKDN SeV2由来の造血前駆細胞からは6例中3例にて巨核球株の樹立が確認されたが、KhES3由来では巨核球株が6例中では樹立できなかった (図 1 A)。

[0098] なお、巨核球株の樹立の判断は、次の方法にて行った。感染24日目に血球細胞を回収し、細胞 1.0×10^5 個あたり、抗ヒトCD41a-APC抗体 (BioLegend)、抗ヒトCD42b-PE抗体 (eBioscience)、抗ヒトCD235ab-pacific blue抗体をそれぞれ $2 \mu\text{L}$, $1 \mu\text{L}$, $1 \mu\text{L}$ ずつを用いて免疫染色した後にFACSAria™ IIセルソーター (BD) を用いて解析することで巨核球株の樹立を確認した。さらに、通常のiPS細胞由来の巨核球は本分化系においては10日目以降には細胞数が減少するため (Takayama N., et al. J Exp Med. 2817-2830 (2010))、感染24日目においても継続してCD41a+細胞が増殖していることにより巨核球株の樹立を確認した。

[0099] 続いて、iPS細胞 (TKDN SeV2) 由来の造血前駆細胞を用いて同様に巨核球株の樹立を行い、感染細胞において継続して増殖しているwellを選別し、細胞数を計測した (図1A)。接着細胞が多い株では、やや細胞増殖率が低いことが確認された。また、少なくとも40日間は継代できることが確認された。

[0100] ES細胞由来の造血前駆細胞から巨核球株が樹立できなかったことから、ES細胞およびiPS細胞由来の造血前駆細胞にてStepOnePlus™ リアルタイムPCRシステム (Applied Biosystems) を用いてKLF1およびFLI1の遺伝子解析を行ったところ、これらの遺伝子の発現の違いが確認された (図1B)。このことから、KLF1の発現が低い造血前駆細胞またはFLI1の発現が高い造血前駆細胞では巨核球が樹立しやすいことが示唆された。

[0101] 5) 導入遺伝子発現停止による巨核球成熟化

感染24日目に巨核球株を 5.0×10^5 cells/wellずつ、C3H10T1/2フィーダー細胞上でDox含有あるいは不含の分化培地 (SCFについては添加および非添加の2条件にて行った) を用いて3あるいは5日間培養した。それぞれ導入遺伝子発現条件 (Gene-ON)、導入遺伝子停止条件 (Gene-OFF) とする。ピペティングで培養液を回収し、細胞の増殖速度 (図2)、血球分画および血小板分画のFACS解析 (図3および4) および遺伝子発現解析 (図5) に供した。FACS解析は上述した方法と同様に実施した。遺伝子発現解析は定法に従い、RNA抽出し、cDNA化を行った後、universal probeあるいはtaqman probeを用いて実施した。解析した遺伝子はGAPDH、c-Myc、Bcl-xL、GATA1、p45 NF-E2、beta1-tubulin、c-MPLである。

[0102] その結果、Gene-OFFによって導入遺伝子c-MycおよびBcl-xLは顕著に低下し、細胞増殖が停止することが確認された。それに伴い巨核球成熟関連遺伝子群 (GATA1、p45 NF-E2、beta1-tubulin) の顕著な発現上昇が認められた。また、これらの遺伝子発現変化と関連して、巨核球株および血小板上のCD42b発現は上昇した。以上のように、造血前駆細胞から樹立された巨核球株は導入遺伝子の発現停止により巨核球成熟が亢進することが示唆された。

[0103] 6) 巨核球の機能試験

上記の方法でiPS細胞 (TKDN SeV2) から作製した巨核球株 (培養40日目) およびTakayamaら, Blood, 111: 5298-5306 2008に記載の方法でES細胞 (khES3) から作製した巨核球 (分化誘導開始から21日目) に対して、Phorbol 12-Myristate 13-acetate (PMA) 刺激した直後のFibrinogenへの結合能を測定した (図6)。その結果、本発明の方法を用いて作製した巨核球株では、PMA刺激に反応してFibrinogenへの結合能を有することが確認できたが、従来の方法で得られた巨核球ではPMA刺激後においても顕著なFibrinogen結合能は有さなかった。以上より、本発明の方法で作製された巨核球では、より成熟した巨核球が作製できることが示唆された。

実施例 2

[0104] 1) c-MYCおよびBMI1を用いた拡大培養可能な巨核球前駆細胞の誘導

実施例1に記載の方法で得られたKhES3由来のHPCへ (1) c-Mycのみ、(2) Bmi1のみ、(3) c-MYCおよびsh-p53、(4) c-MYCおよびBCL-XL、(5) c-MYCおよびsh-ARF、(6) c-MYCおよびBMI1、または(7) c-MYC、sh-INK4Aおよびsh-ARFを各遺伝子に1つのレトロウイルスベクターを用いて導入し、基本培地へ50ng/mL TPOおよび50ng/ml SCFを加えた培地で培養したところ、少なくともc-MYCを導入した場合は、CD41a、CD42a、CD42bおよびCD9が陽性である巨核球前駆細胞が得られた。さらに培養を継続したところ、(6) c-MYCおよびBMI1、ならびに(7) c-MYC、sh-INK4Aおよびsh-ARFについては、2ヶ月間につづき拡大培養することが可能であった (図7A)。レトロウイルスベクターはpMXsレトロベクター (Takahashi K, et al, Cell.;131:861-872, 2007またはOhmine K, et al, Oncogene 20, 8249-8257, 2001を参照のこと)、pGCDNsamレトロベクター (千葉大学岩間教授より受領) を用いて導入した。sh-p53は、Brummelkamp TR, et al, Science 296, 550-553, 2002を参照し、sh-INK4Aおよびsh-ARFは、Voorhoeve PM and Agami R, Cell 4, 311-319, 2003を参照して作製した。

[0105] 得られた巨核球前駆細胞は、好塩基球性の単芽球様の形態を示し (図7B)、CD42bの発現がやや低いCD41a陽性の異常な血小板様粒子を産生した。この

ことは、c-Mycの強制発現を維持したためと思われる。

[0106] 2) c-MYC発現レベルの重要性の確認

c-MYCおよびBMI1の発現様式を図7Cに示したコンストラクトを用いてc-MYC-2A-BMI1またはBMI1-2A-c-MYCをレトロウィルスベクターを用いて強制発現させ、上記と同様の培養条件にて巨核球前駆細胞を誘導したところ、c-MYC-2A-BMI1を用いた場合のみ40日以上 of 拡大培養が可能であった(図7D)。それぞれの導入方法によるc-Mycの発現量を確認したところ、c-MYC-2A-BMI1を用いた場合、BMI1-2A-c-MYCを用いた場合よりもc-MYCの発現が低いことが確認された(図7E)。そこで、c-Mycの発現を抑制する目的で、不安定ドメイン(DD (Destabilization Domain))をC末端に有するc-MYCを発現するベクターを用いた。DDを有する発現ベクターは、pTunerC vector and Shield-1 (Clontech/Takara Bio社)を用いて、c-MYC-DD-2A-BMI1を発現するベクターを構築した。このc-MYC-DD-2A-BMI1を上記と同様にHPCへ導入し培養を継続したところ、少なくとも50日間、CD41a陽性の巨核球前駆細胞の拡大培養が可能であった(図8A)。一方、c-MYC-2A-BMI1では、拡大培養を維持することができなかった。このことは、Shield-1を添加し、c-MYCの発現を安定させたところ、容量依存的に巨核球前駆細胞数が減少し、Shield-1そのものの毒性によるものではないことを確認したことから、c-MYCの発現量が拡大培養に影響することが確認された(図8B)。このc-MYCの発現による拡大培養への影響は、Caspase依存型アポトーシスによるものと予想し、Shield-1を添加によるCaspase-3/7の活性を測定したところ、c-MYCの安定化に伴いCaspaseが活性化されることが確認された(図8C)。以上のことから、c-MYCの過剰発現によるアポトーシスのため、巨核球前駆細胞の拡大培養が阻害されていると示唆された。

[0107] 3) BCL-XL発現によるCaspaseの活性抑制による巨核球前駆細胞の誘導

c-MYCおよびBMI1の強制発現では、巨核球前駆細胞の誘導は可能であるが、c-MYCの発現量に依存したアポトーシスにより拡大培養に限度が生じる。そこで、アポトーシスを抑制するためBCL-XLをc-MYCおよびBMI1の導入後14日から21日後の間に導入したところ(図9A)、iPS細胞由来(Cl-1:692D2株由来)

およびES細胞由来（Cl-2：khES3由来）のHPCから誘導した巨核球前駆細胞は、5か月間以上もの拡大培養が可能であることが確認された（図9BおよびC）。さらに、c-MYC-DD、BMI1およびBCL-XLを同時にHPCにて共発現させ、Shield-1の添加量を変えてc-MYCの発現量を調節し、7日目の巨核球細胞数を検討したところ、c-MYCの発現量が高くとも、BCL-XLを発現させることで巨核球前駆細胞が誘導できることが確認された（図9DおよびE）。

[0108] カスパーゼの制御をBCL-XLの発現する以外の方法について検討するため、c-MycおよびBMI1の導入後、カスパーゼ阻害剤であるZ-VAD FMK (Merck) を10 μ Mまたは30 μ Mを添加した条件で培養を66日間継続したところ、BCL-XLを発現した場合には、64倍に増殖したのに対し、30 μ MのZ-VAD FMKでは21倍であった（図10A）。一方、DMSO（陰性対照）を用いた場合は、増殖しなかった。また、DMSOの添加した場合においてAnnexin Vの陽性細胞数を検討したところ、Annexin V陽性細胞が多かったことから（66.5%）、アポトーシスが抑制されていないことが確認された。

[0109] 続いて、BCL-XLの導入時期について検討を行うため、4つのiPS細胞クローンを次の2つのプロトコルを用いて巨核球前駆細胞を誘導した（Cl-3：KhES3株由来、Cl-4：692D2株由来、Cl-6：585A1株由来およびCl-7：TKDN SeV2株由来）；（1）BCL-XL、c-MYCおよびBMI1を同時に導入する方法、および（2）BCL-XLおよびc-MYCを導入後、14日から21日後に導入する方法。（1）同時に導入するプロトコルを用いた場合、いずれのiPS細胞クローンをを用いた場合においても巨核球前駆細胞は最大40日～50日まで拡大培養が可能であったが、BCL-XLを後日発現させる（2）の方法では、いずれのES細胞またはiPS細胞クローンをを用いた場合でも60日以上の間拡大培養を継続することが可能であった（図10B、C、DおよびE）。

[0110] 長期培養における核型の変異を検討するため、3つのiPS細胞クローン由来の巨核球前駆細胞（Cl-1、Cl-2およびCl-7）を5か月間継続培養した後の核型解析を行ったところ、一つの巨核球前駆細胞（Cl-7）のみ核型が正常であった。この3つの巨核球前駆細胞を放射線を照射していない免疫不全マウス（n=

5) に静脈注射により 2×10^6 個を投与し、16週または20週において観察したところ、核型異常のあった2つの巨核球前駆細胞のうち1つの細胞 (Cl-2) では、白血病誘発により早期に致死した (図 1 OF)。しかし、本方法を用いることで、Cl-7のように正常な核型を示し、*in vivo*においても投与により白血病を誘発しない巨核球前駆細胞を誘導できることが確認された。

[0111] 4) 誘導巨核球前駆細胞の凍結融解

上記の通りc-MYCおよびBMI1の導入後、BCL-xLを導入した方法で作製した巨核球前駆細胞株を凍結融解後、同条件で培養したところ、21日間の拡大培養が可能であった (図 1 1 A)。このときの細胞マーカーを調べたところ、CD41a、CD42a、CD42bおよびCD9の発現は、凍結前と変化がなかった (図 1 1 B)。従って、本方法で製造される巨核球前駆細胞は、凍結保存が可能であることが示された。

[0112] 5) 誘導巨核球前駆細胞の成熟化工程

上記の方法で得られた巨核球前駆細胞において外来遺伝子であるc-MYC、BMI1およびBCL-XLの発現を、Doxを含有しない培地へ交換することで止めて、5日間培養を続けたところ (図 1 2 A)、20.2%の細胞において多核化を示した (図 1 2 B)。このときCD42b陽性である血小板前駆体の形成が確認された。さらに、発現停止後4日目における2つのクローン由来の巨核球前駆細胞 (Cl-2およびCl-7) のCD42bの強発現化で確認できる成熟例を図 1 2 Cに示す。このような巨核球前駆細胞から巨核球への成熟により、GATA1、FOG1、NF-E2および β 1-tubulinの発現が増強することが確認された。

[0113] 6) CD41a陽性、CD42b陽性の血小板の誘導

上記のとおり、外来性のc-MYC、BMI1およびBCL-XLの発現を停止することでCD42bの発現が増強し、CD41a陽性およびCD42b陽性である血小板が得られた (図 1 3 A)。いずれの外来遺伝子の発現を停止させることが最も効率よく血小板を産生するのかを検討するため、BCL-XLの発現のみ維持した場合と3つの遺伝子全てを停止した場合を比較したところ、3つの遺伝子全てを停止した場合において最も効率よく血小板が産生されることが確認された (図 1 3 B)。さ

らに既存の巨核球株 (Meg01 (ATCC)、CMKおよびK562 (大阪大学Dr. H. Kashiwagiより受領)) を10% FBSおよびPSGを添加したRPMIで培養し、100 nM PMAを添加して生じるCD41a陽性およびCD42b陽性粒子の産生量とiPS細胞由来の巨核球前駆細胞からの同粒子の産生量を比較したところ、iPS細胞由来の巨核球前駆細胞から産生する血小板量が有意に多いことが確認された (図13C)。このとき、既存の巨核球株からは、CD41a陽性およびCD42b陰性の血小板様粒子の数が多く見られた。続いて、外来遺伝子の強制発現を停止して5日間無血清培地において、1つの誘導巨核球前駆細胞から産生されるCD42b陽性の血小板の量を確認したところ、Cl-2では1つの細胞から3個の血小板が得られ、Cl-7では10個の血小板が得られた。同様に、10cmディッシュ (10mlの培地) を用いて巨核球前駆細胞から外来遺伝子の発現を停止させて血小板を産生させたところ、培地1mlあたり 4×10^6 個 (Cl-7) または 2×10^6 個 (Cl-2) の血小板が確認された (図13D)。このことから、一度の血小板輸血に必要量である 10^{11} 個の血小板を得るためには、25~50Lの培地で巨核球前駆細胞を培養することによって製造することができることが示唆された。

[0114] 上記の方法 (外来遺伝子発現停止後、無血清培地で5日間培養) によって得られた血小板 (以下、imMKCL血小板) を走査型電子顕微鏡で観察したところ微小管は通常であったが採血により得られたヒト血小板 (以下、Fresh platelet) と比較してやや顆粒が少なかった (図14A)。さらにimMKCL血小板の機能確認するため、De Cuyper, IM, et al, Blood 121, e70-80, 2013に記載と同様の方法で抽出した血小板を1 U/mlのトロンビン、200 μ MのADPで刺激した場合のPAC-1との結合能をフローサイトメーターを用いて測定したところ、imMKCL血小板は刺激に应答してPAC-1と結合することが確認された (図14BおよびC)。この結合能は、採血により得たヒト血小板よりは劣るが、37°Cで5日間保管した保管血小板 (以下、pooled platelet) よりも高かった。さらに、imMKCL血小板またはFresh plateletを同数のFresh plateletと混合し、100 μ MのADPおよび100 μ MのTRAP6、または10 μ g/mL collagen (Nycomed) を添加し振とう下で37°C10分間刺激した後、血小板の凝集を確認したところi

imMKCL血小板においても血小板の凝集が確認された（図14DおよびE）。このほかにも20%の血小板不含有血漿を含むIMDMへimMKCL血小板を添加し、2 U/mlのトロンビンで刺激したClot試験（凝固試験）を行ったところ、トロンビン刺激に応答して凝固することが確認された。また、thrombin、100 nMのPMAおよび10 μ g/mlのcollagenでimMKCL血小板を刺激した後、EnzyLight™ ADP Assay Kit (BioAssay System)を用いてADP放出能をVon Willebrand factor Human ELISA Kit (Abcam)を用いてvon Willebrand factor (vWF)の放出能を確認したところ、Fresh plateletには劣るが、これらの放出能が確認された。以上より、imMKCL血小板は、Fresh plateletよりも反応が劣るが、pooled plateletよりは機能が高いことが確認された。

[0115] Ex vivoでのimMKCL血小板の機能を検討するため、10 μ g/mlのvWFをコートしたチャンバーへ1600s⁻¹の流速でマイクロ流路 (Ibidi) を流したところ、Fresh plateletの62.3% (Cl-2由来の場合) および75.8% (Cl-7由来の場合) が流路へ結合した。この機能は、anti-CD42b (HIP1) (Abcam) を添加することで抑制されることから、CD42b依存的な機能であることが示された（図14FおよびG）。

[0116] 7) 誘導血小板の血小板減少症モデルマウスにおける血栓形成活性

2.4Gyの放射線照射後9日目のNOGマウス（血小板減少症モデルマウス）へFresh platelet (1×10^8)、またはimMKCL血小板 (6×10^8 または 1×10^8) を尾静脈より投与して、30分後、2時間後、および24時間後に採血 (50から100 μ L) し、ヒトCD41a陽性の血小板数を測定した（図15A）。その結果、マウス体内におけるヒトCD41a陽性血小板の減少速度は、imMKCL血小板およびFresh plateletにおいて有意差は見られなかった。

[0117] さらに、血小板減少症モデルマウスにおけるレーザー照射による血管損傷モデルにおける血栓形成を高空間時間分解能共焦点顕微鏡を用いて内皮を破壊せず血流を維持したまま観察したところ、Fresh plateletおよびimMKCL血小板のいずれを投与した場合でもレーザー照射部位において血栓が形成されることが確認された。このとき、単一のヒト由来の血小板がマウスの血小板

と凝集することなく血管に接着することが確認された（図15C）。さらに、AK4抗体（anti-P-selectin抗体）を投与するとこのような血管への接着が抑制された（図15D）。つまり、imMKCL血小板はP-selectinに依存して、血管壁への初期接着を行うことが示唆された。4つのiPS細胞クローンから作製されたimMKCL血小板についても同様に試験を行ったところ、pooled plateletよりも血栓形成に関与が可能であることが確認された（図15EおよびF）。

[0118] 以上のように、巨核球前駆細胞にて拡大培養および凍結保存を可能とすることで、多能性幹細胞から巨核球前駆細胞を必要数増殖させ保存することで、必要な血小板を準備するためにはわずか5日間で行うことが可能となる。さらに巨核球前駆細胞を拡大培養することで、中間体であるHPCの製造に必要な培養液が抑制され、血小板を作製するために必要なコストを抑制することが可能となる。

請求の範囲

- [請求項1] 以下の(i)～(ii)の工程を含む、造血前駆細胞から巨核球を製造する方法；
- (i)アポトーシス抑制遺伝子および癌遺伝子を造血前駆細胞において強制発現させて培養する工程、および
- (ii)工程(i)で得られた細胞について、アポトーシス抑制遺伝子および癌遺伝子の強制発現を止めて培養する工程。
- [請求項2] 前記工程(i)において、p16遺伝子又はp19遺伝子の発現を抑制する遺伝子、Ink4a/Arf遺伝子の発現を抑制する遺伝子及びポリコーム遺伝子から成る群より選択される1つの遺伝子をさらに造血前駆細胞において強制発現させ、前記工程(ii)において、当該p16遺伝子又はp19遺伝子の発現を抑制する遺伝子、Ink4a/Arf遺伝子の発現を抑制する遺伝子及びポリコーム遺伝子から成る群より選択される1つの遺伝子の強制発現を止めて培養する、請求項1に記載の方法。
- [請求項3] 前記工程(i)が、癌遺伝子、ならびにp16遺伝子又はp19遺伝子の発現を抑制する遺伝子、Ink4a/Arf遺伝子の発現を抑制する遺伝子及びポリコーム遺伝子から成る群より選択される1つの遺伝子を造血前駆細胞において強制発現させた後、アポトーシス抑制遺伝子をさらに当該細胞へ強制発現させる工程である、請求項2に記載の方法。
- [請求項4] 前記工程(i)において、癌遺伝子、ならびにp16遺伝子又はp19遺伝子の発現を抑制する遺伝子、Ink4a/Arf遺伝子の発現を抑制する遺伝子及びポリコーム遺伝子から成る群より選択される1つの遺伝子を造血前駆細胞において少なくとも28日強制発現させて培養した後、アポトーシス抑制遺伝子をさらに当該細胞へ強制発現させる工程である、請求項3に記載の方法。
- [請求項5] 前記アポトーシス抑制遺伝子が、BCL-XL遺伝子である、請求項1から4のいずれか1項に記載の方法。
- [請求項6] 前記癌遺伝子が、c-MYC遺伝子である、請求項1から5のいずれか

1 項に記載の方法。

[請求項7] 前記p16遺伝子又はp19遺伝子の発現を抑制する遺伝子、Ink4a/Arf 遺伝子の発現を抑制する遺伝子及びポリコム遺伝子から成る群より 選択される1つの遺伝子が、BMI1である、請求項1から6のいずれか 1 項に記載の方法。

[請求項8] 前記工程(i)および(ii)において、TP0を含有する培養液中でC3H10T 1/2細胞上で該細胞を培養する、請求項1から7のいずれか1項に記 載の方法。

[請求項9] 前記工程(i)および(ii)での培養において、SCFをさらに含有する培 養液中で培養する、請求項8に記載の方法。

[請求項10] 前記遺伝子の強制発現が、薬剤応答性ベクターを用いて行われる、 請求項1から9のいずれか1項に記載の方法。

[請求項11] 前記造血前駆細胞が、多能性幹細胞から分化誘導された細胞である 、請求項1から10のいずれか1項に記載の方法。

[請求項12] 前記造血前駆細胞が、多能性幹細胞から分化誘導された細胞である 、請求項11に記載の方法であって、該分化誘導において、多能性幹 細胞をVEGFを含有する培養液中でC3H10T1/2細胞上で培養する工程を 含む、方法。

[請求項13] 前記造血前駆細胞において、KLF1の発現が低い、またはFLI1の発現 が高い、請求項1から12のいずれか1項に記載の方法。

[請求項14] 前記造血前駆細胞におけるKLF1またはFLI1の発現が、それぞれKhES 3由来の造血前駆細胞での発現と比較してより低いまたはより高い、 請求項13に記載の方法。

[請求項15] 工程(i)に先立って、前記造血前駆細胞におけるKLF1および／また はFLI1の発現を測定する工程を含む、請求項1から14のいずれか1 項に記載の方法。

[請求項16] 前記工程(ii)を、5日間行う、請求項1から15のいずれか1項に 記載の方法。

- [請求項17] 血小板の製造方法であって、請求項1から16のいずれか1項に記載の方法で得られた巨核球の培養物から血小板を回収する工程を含む方法。
- [請求項18] 請求項17に記載の方法で製造された血小板。
- [請求項19] 請求項18に記載の血小板を含む血液製剤。
- [請求項20] 以下の(I)～(II)の工程を含む、造血前駆細胞から巨核球前駆細胞を製造する方法；
(I)癌遺伝子およびp16遺伝子又はp19遺伝子の発現を抑制する遺伝子、Ink4a/Arf遺伝子の発現を抑制する遺伝子及びポリコム遺伝子から成る群より選択される1つの遺伝子を造血前駆細胞において強制発現させて培養する工程、および
(II)工程(I)で得られた細胞へさらにアポトーシス抑制遺伝子を強制発現させる、またはカスパーゼ阻害剤を添加した培地で培養する工程。
- [請求項21] 前記アポトーシス抑制遺伝子が、BCL-XL遺伝子である、請求項20に記載の方法。
- [請求項22] 前記癌遺伝子が、c-MYC遺伝子である、請求項20から21のいずれか1項に記載の方法。
- [請求項23] 前記カスパーゼ阻害剤が、Z-DEVD-FMKである、請求項20から22のいずれか1項に記載の方法。
- [請求項24] 前記p16遺伝子又はp19遺伝子の発現を抑制する遺伝子、Ink4a/Arf遺伝子の発現を抑制する遺伝子及びポリコム遺伝子から成る群より選択される1つの遺伝子が、BMI1である、請求項20から23のいずれか1項に記載の方法。
- [請求項25] 前記工程(I)を、少なくとも28日間行う、請求項20から24のいずれか1項に記載の方法。
- [請求項26] 前記巨核球前駆細胞が拡大培養可能な細胞である、請求項20から25のいずれか1項に記載の方法。

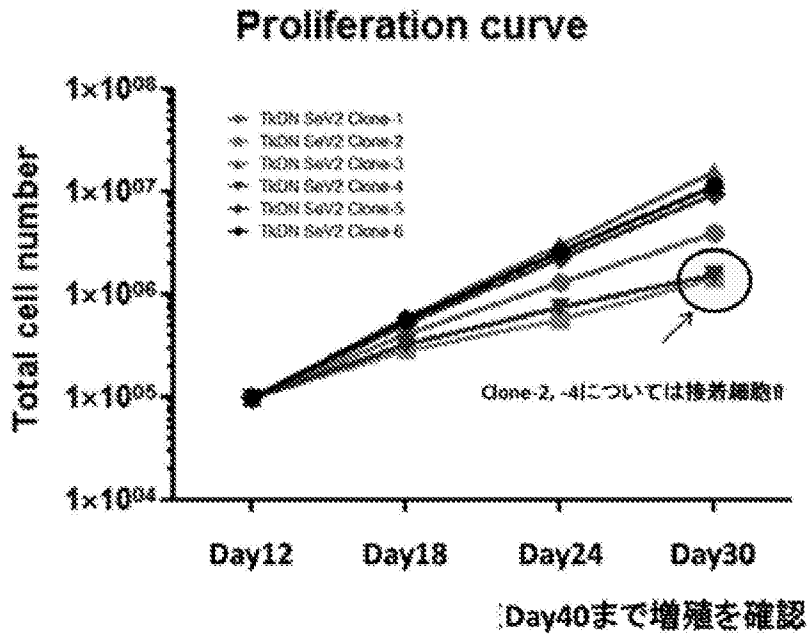
- [請求項27] 薬剤応答性で発現する外来性のアポトーシス抑制遺伝子および癌遺伝子が染色体に組み込まれている巨核球であって、当該外来性の遺伝子が発現していない細胞。
- [請求項28] 薬剤応答性で発現する外来性のp16遺伝子又はp19遺伝子の発現を抑制する遺伝子、Ink4a/Arf遺伝子の発現を抑制する遺伝子及びポリコム遺伝子から成る群より選択される1つの遺伝子がさらに染色体に組み込まれており、当該外来性遺伝子が発現していない、請求項27に記載の細胞。
- [請求項29] 前記アポトーシス抑制遺伝子が、BCL-XL遺伝子である、請求項27または28に記載の細胞。
- [請求項30] 前記癌遺伝子が、c-MYC遺伝子である、請求項27から29のいずれか1項に記載の細胞。
- [請求項31] 前記p16遺伝子又はp19遺伝子の発現を抑制する遺伝子、Ink4a/Arf遺伝子の発現を抑制する遺伝子及びポリコム遺伝子から成る群より選択される1つの遺伝子が、BMI1である、請求項27から30のいずれか1項に記載の細胞。
- [請求項32] 巨核球の製造に適した造血前駆細胞を選択する方法であって、KLF1の発現またはFLI1の発現を測定する工程を含む方法。
- [請求項33] 前記KLF1の発現が低い造血前駆細胞を選択する工程を含む、請求項32に記載の方法。
- [請求項34] 前記FLI1の発現が高い造血前駆細胞を選択する工程を含む、請求項33に記載の方法。
- [請求項35] 前記造血前駆細胞が、多能性幹細胞から分化誘導された細胞である、請求項32から33のいずれか1項に記載の方法。
- [請求項36] 以下の工程を含む巨核球製造に適した多能性幹細胞を選択する方法
；
(i) 多能性幹細胞から造血幹細胞を製造する工程、および、
(ii) 工程(i)で製造された造血前駆細胞において、KLF1の発現お

よびFLI1の発現の測定する工程。

[図1]

A

Proliferation Curve



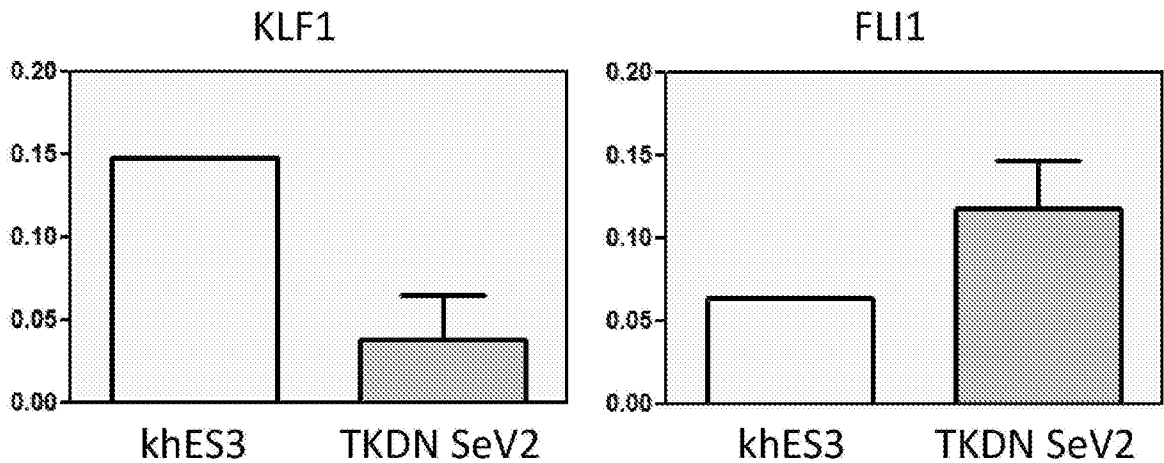
Exp.1

Cell lines	Successful rate
khES3	0 / 6
TKDN SeV2	3 / 6



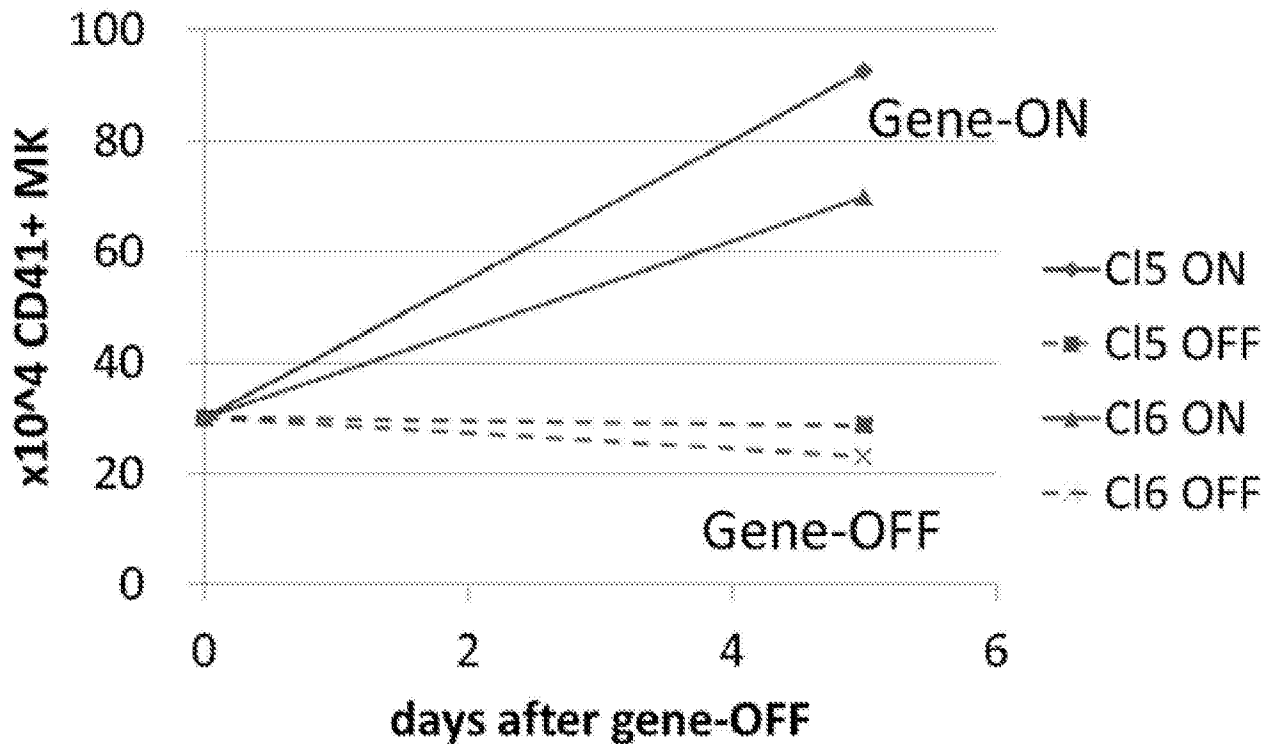
Clone No	Doubling Time (h)
1	70
2	97
3	57
4	86
5	61
6	58
EP6 iMKPCL	≈48

B

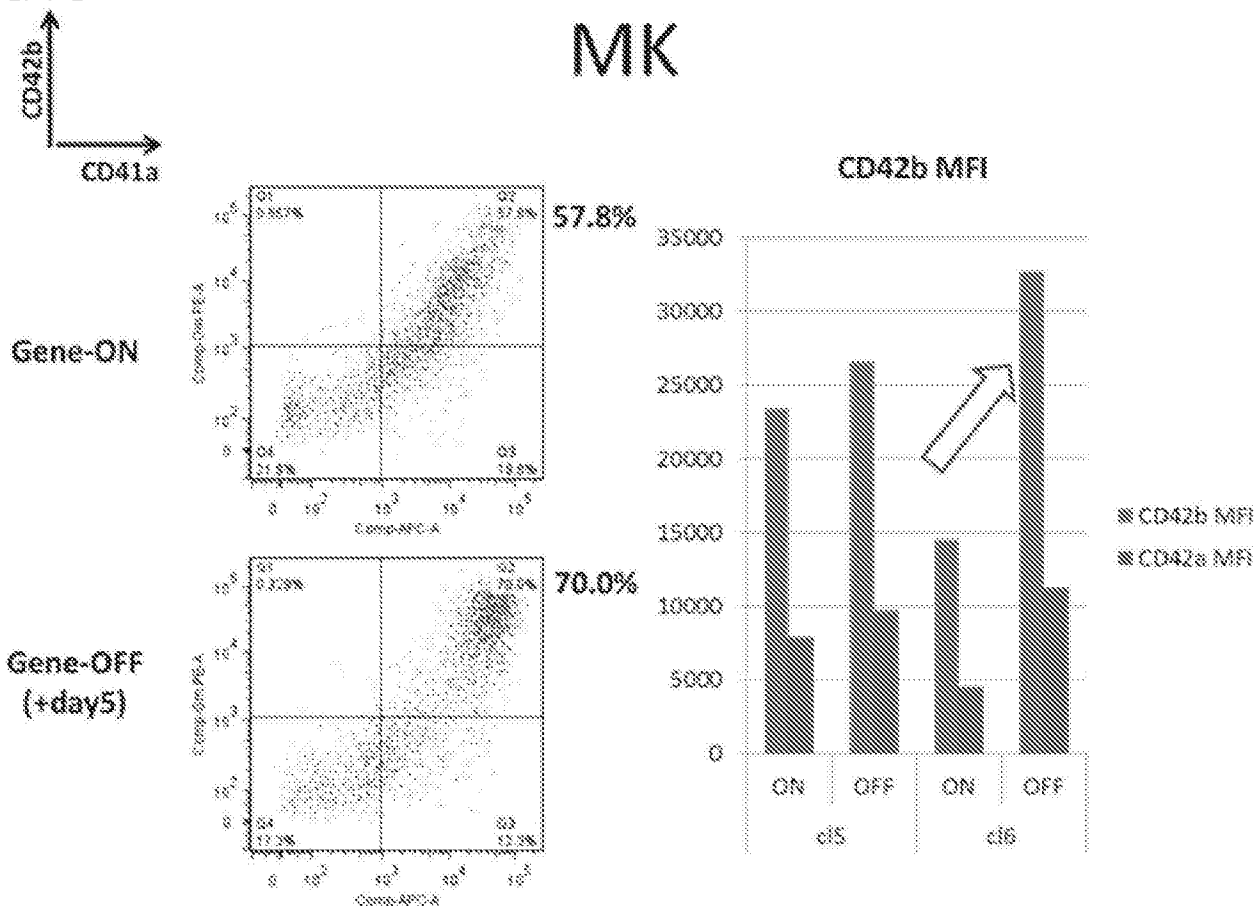


[圖2]

Growth arrest after Gene-OFF

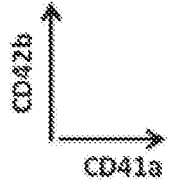


[圖3]

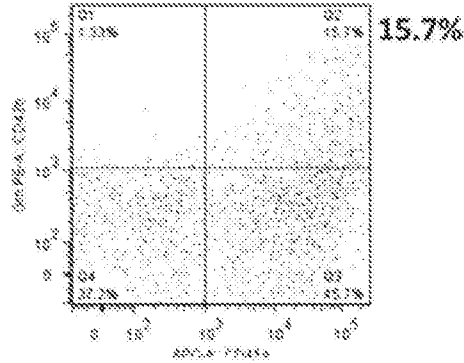


[4]

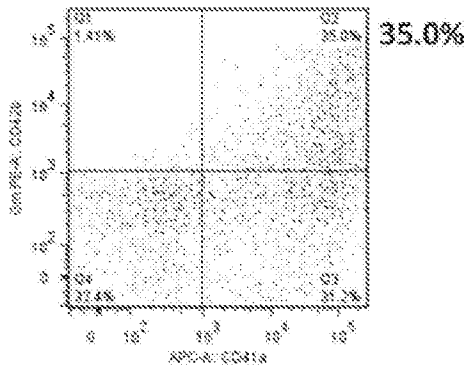
Plt



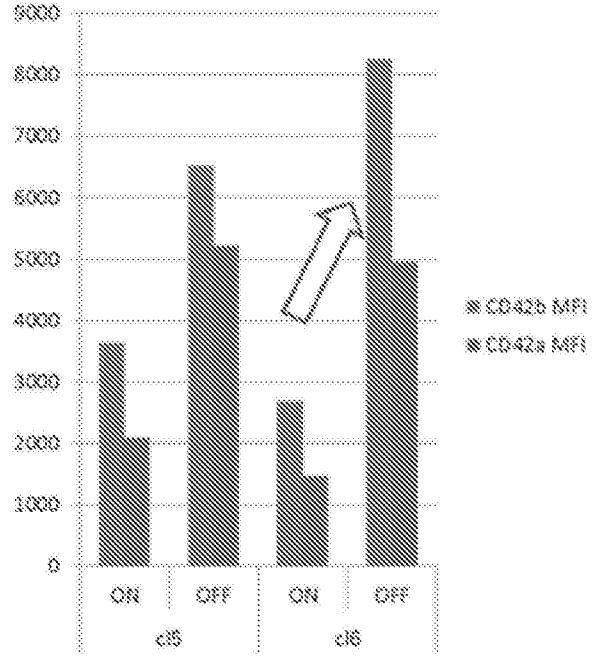
Gene-ON



Gene-OFF (+day5)

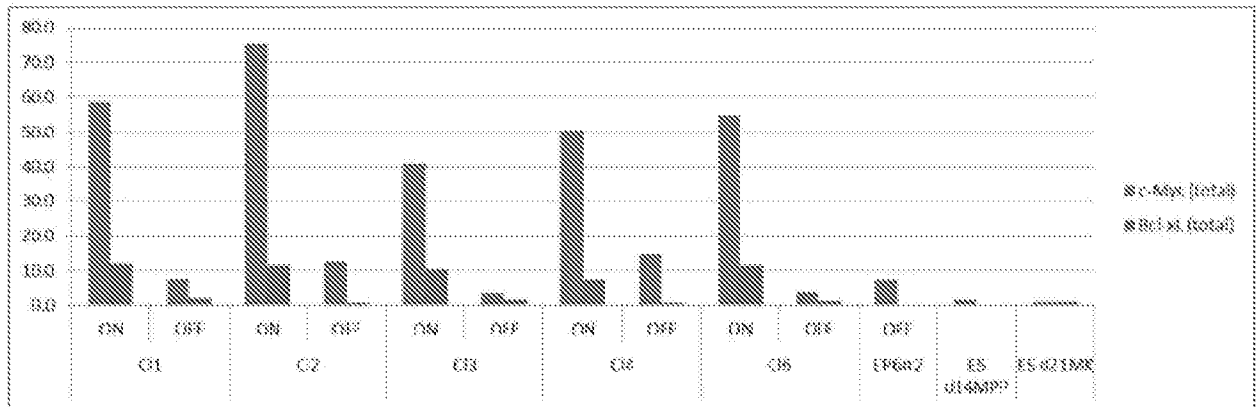


CD42b MFI



[図5]

A

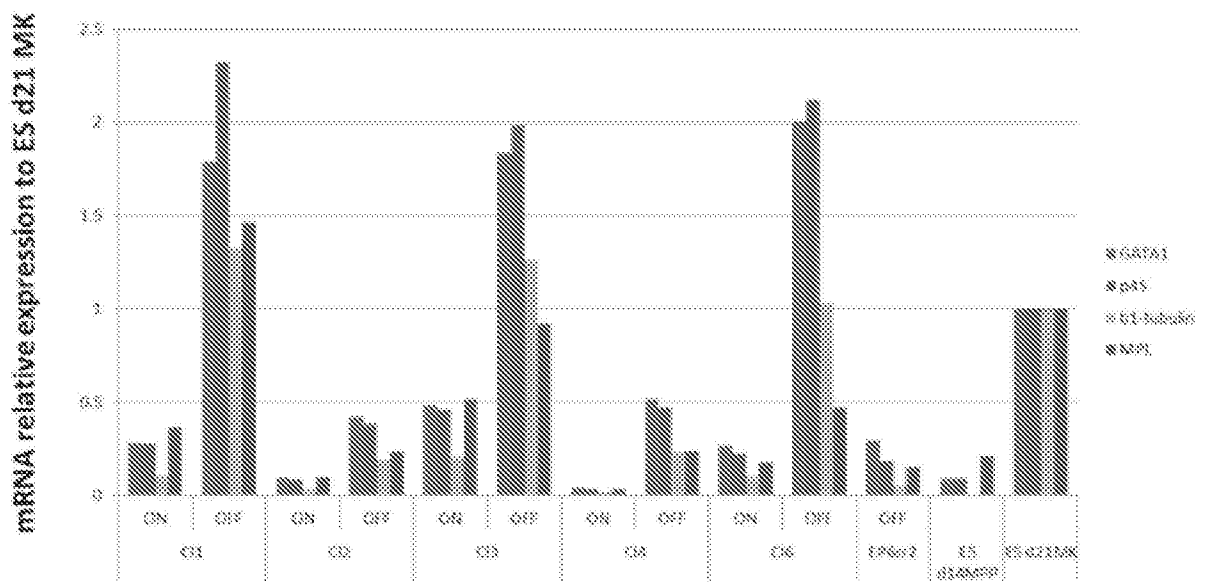


B

遺伝子発現まとめ

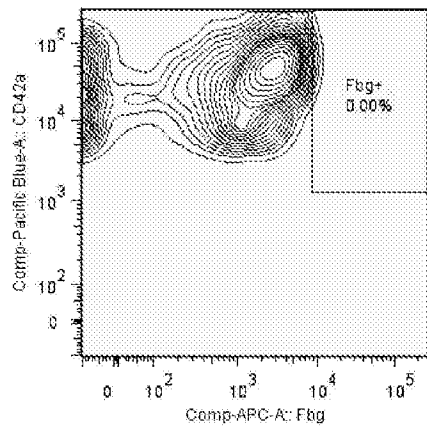
GATA1/p45 NF-E2/b1-tubulin/MPL

qPCR (Relative expression to ES d21 MK)

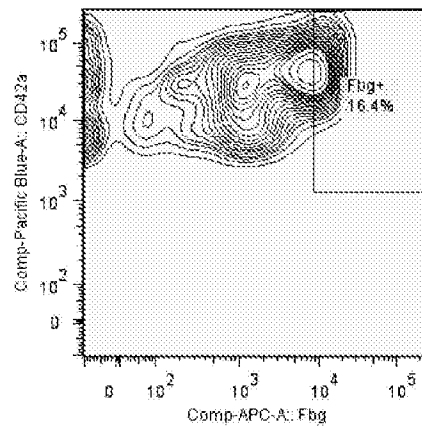


[図6]

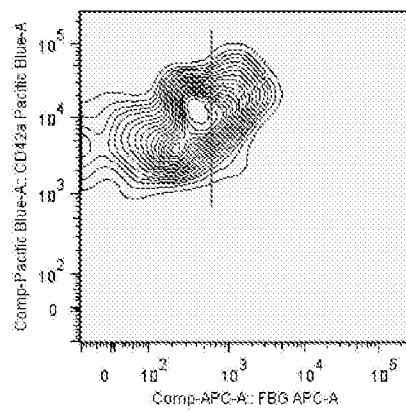
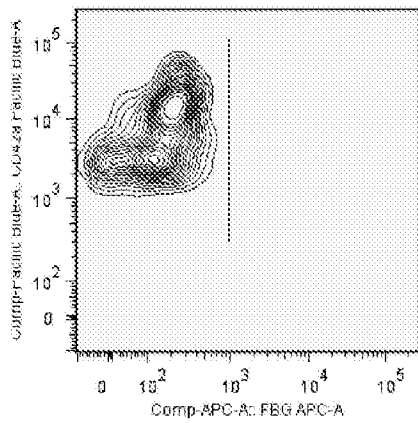
刺激無し



PMA 100 nM刺激

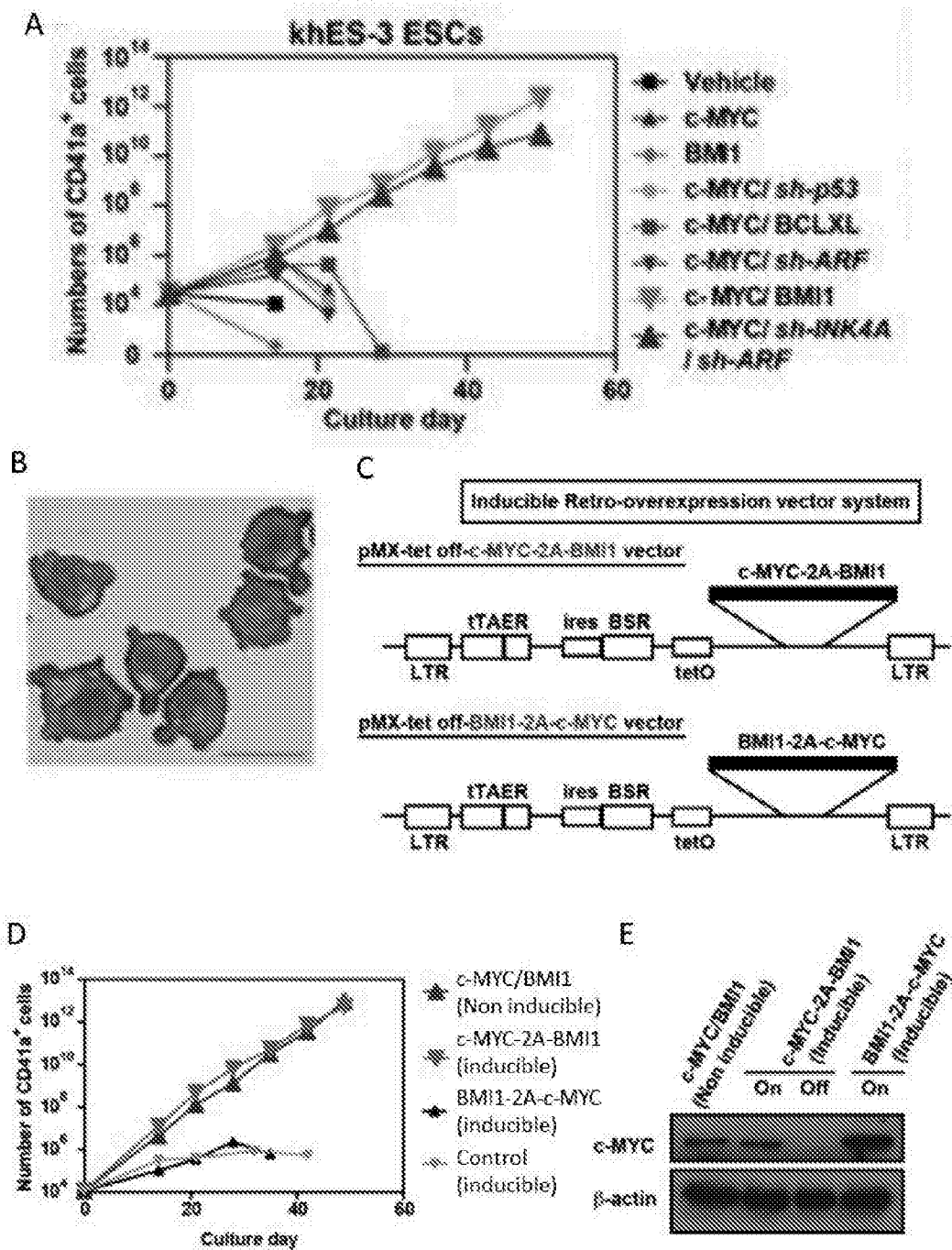


本発明の方法で
樹立した巨核球株

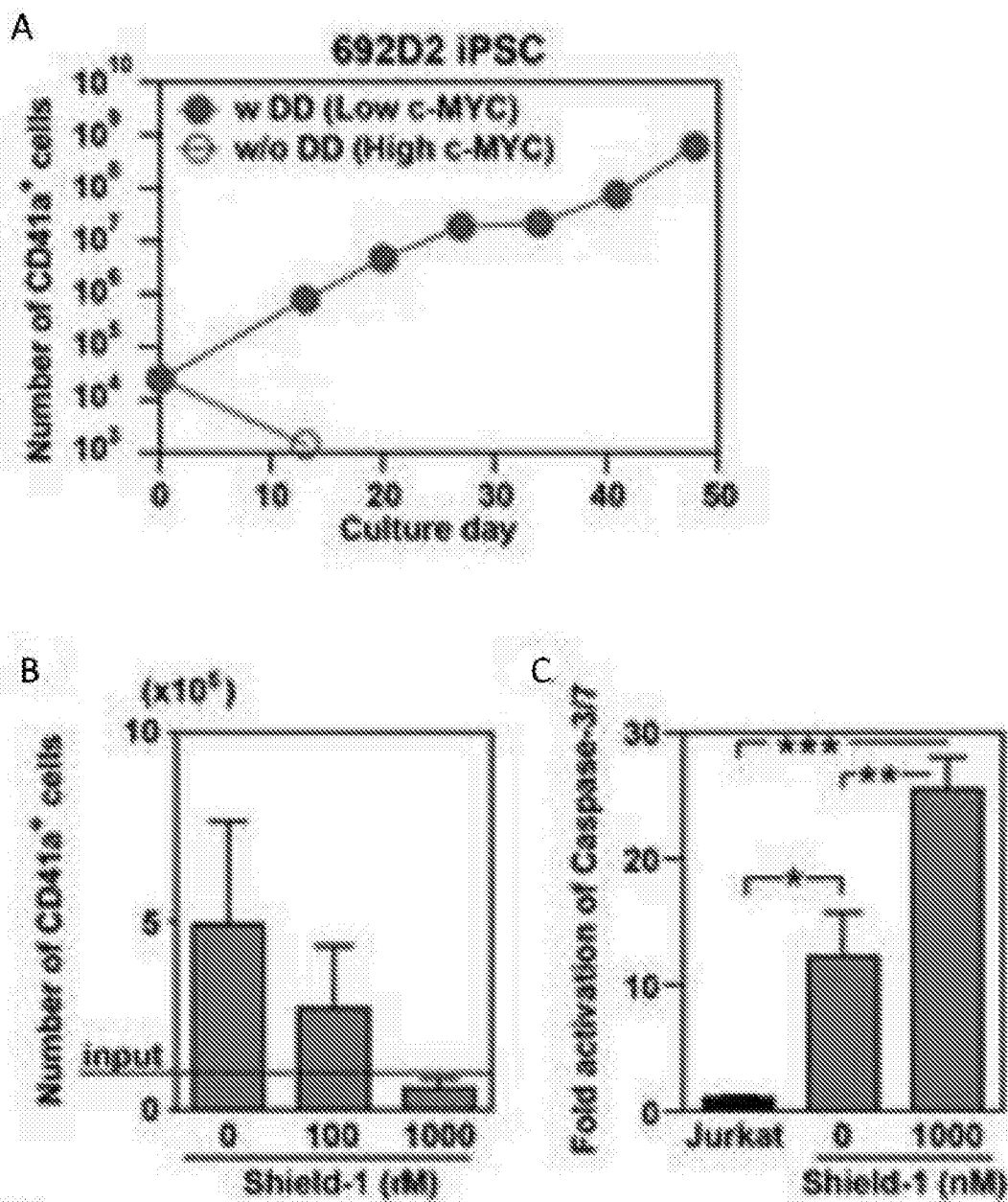


ES-sac 由来
巨核球

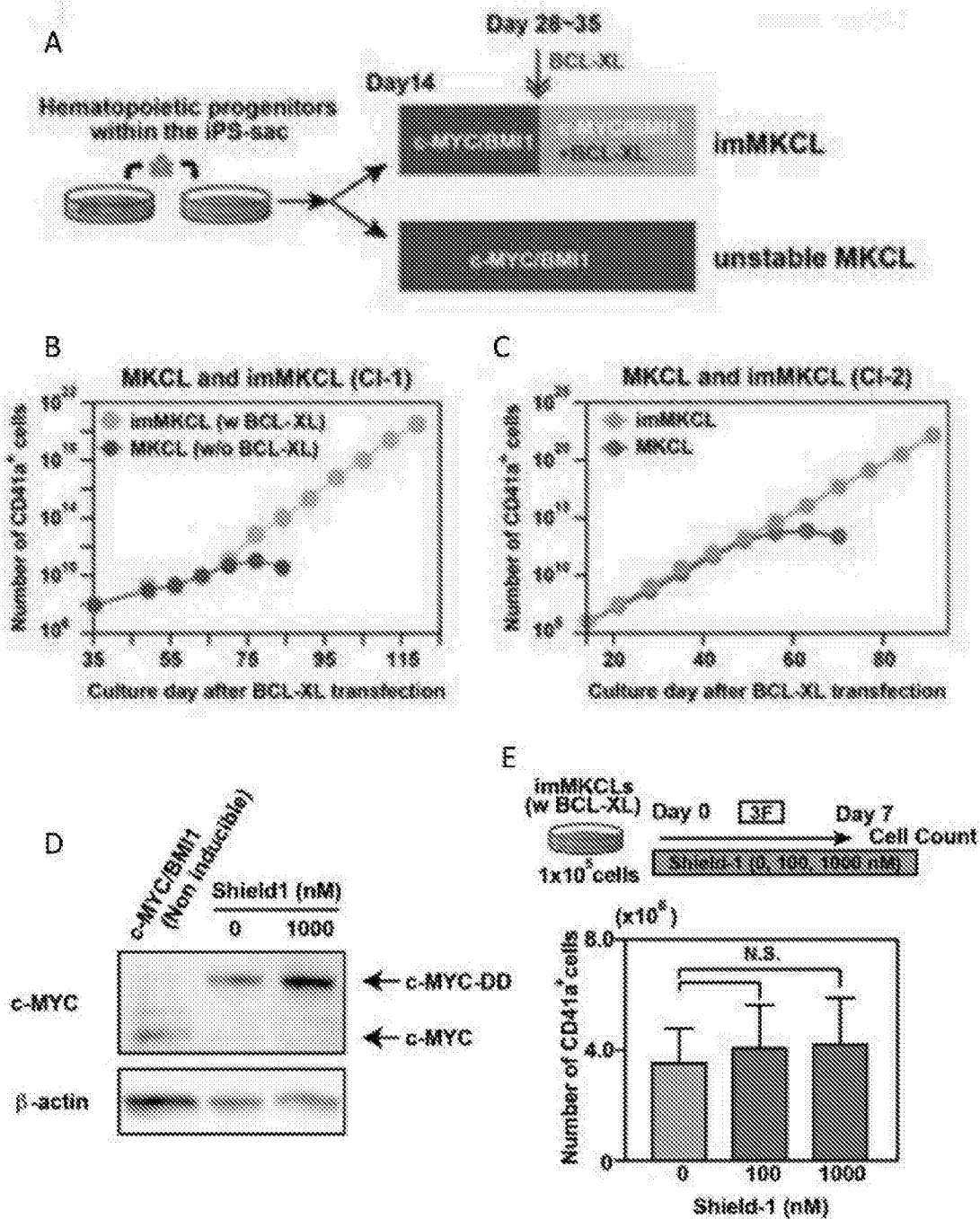
[Figure 7]



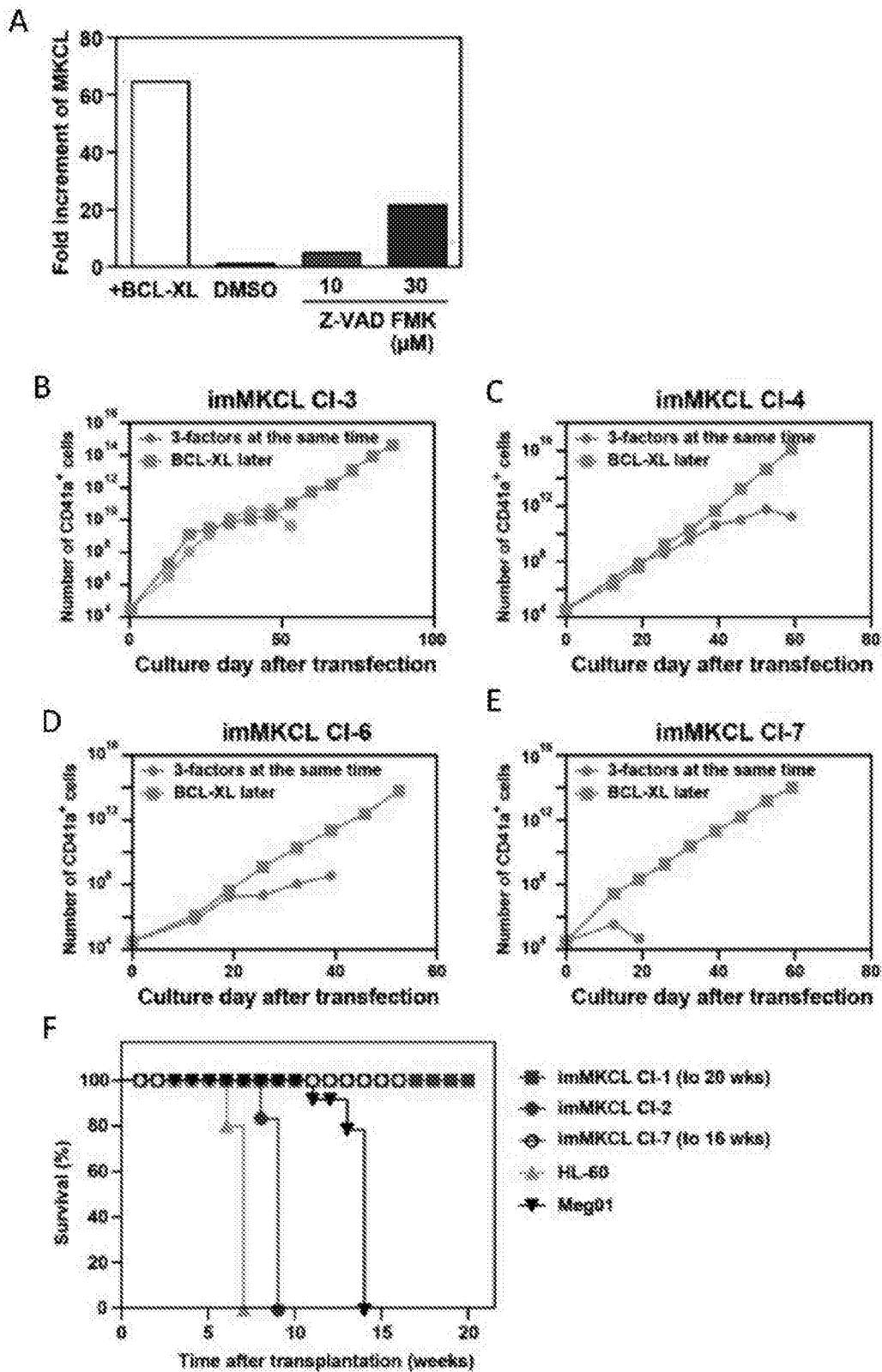
[圖8]



[9]

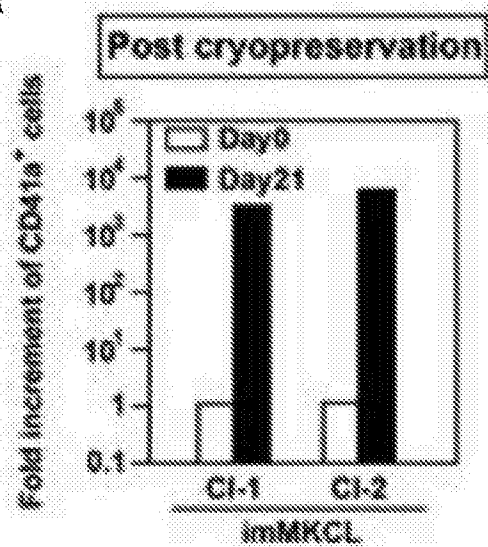


[10]

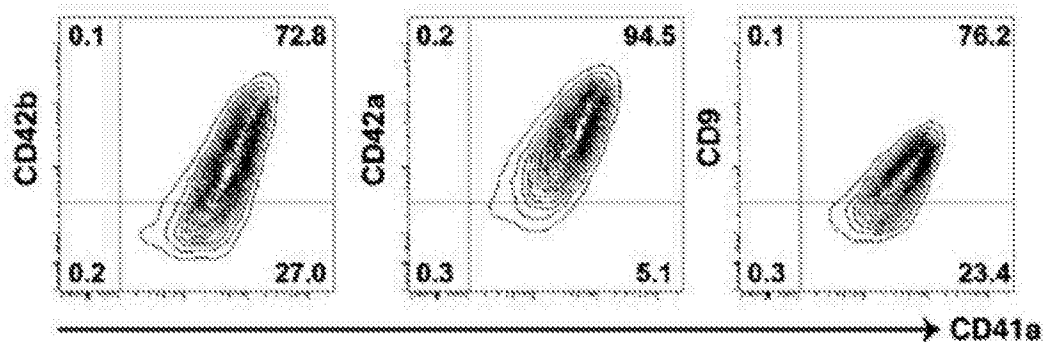


[11]

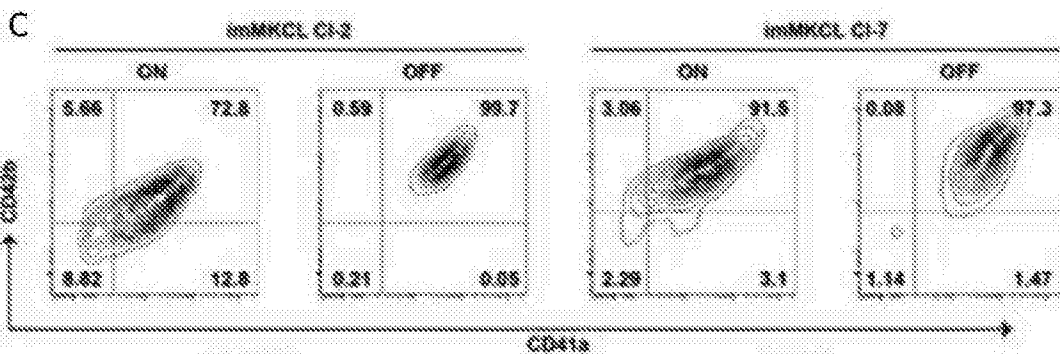
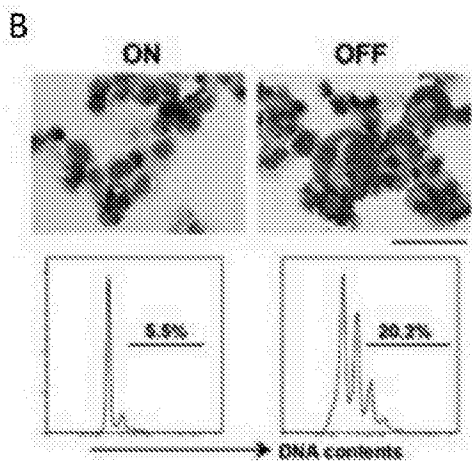
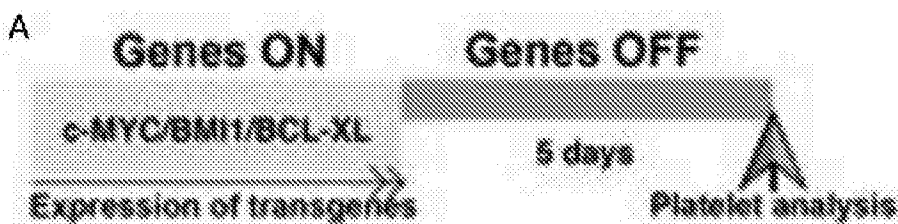
A



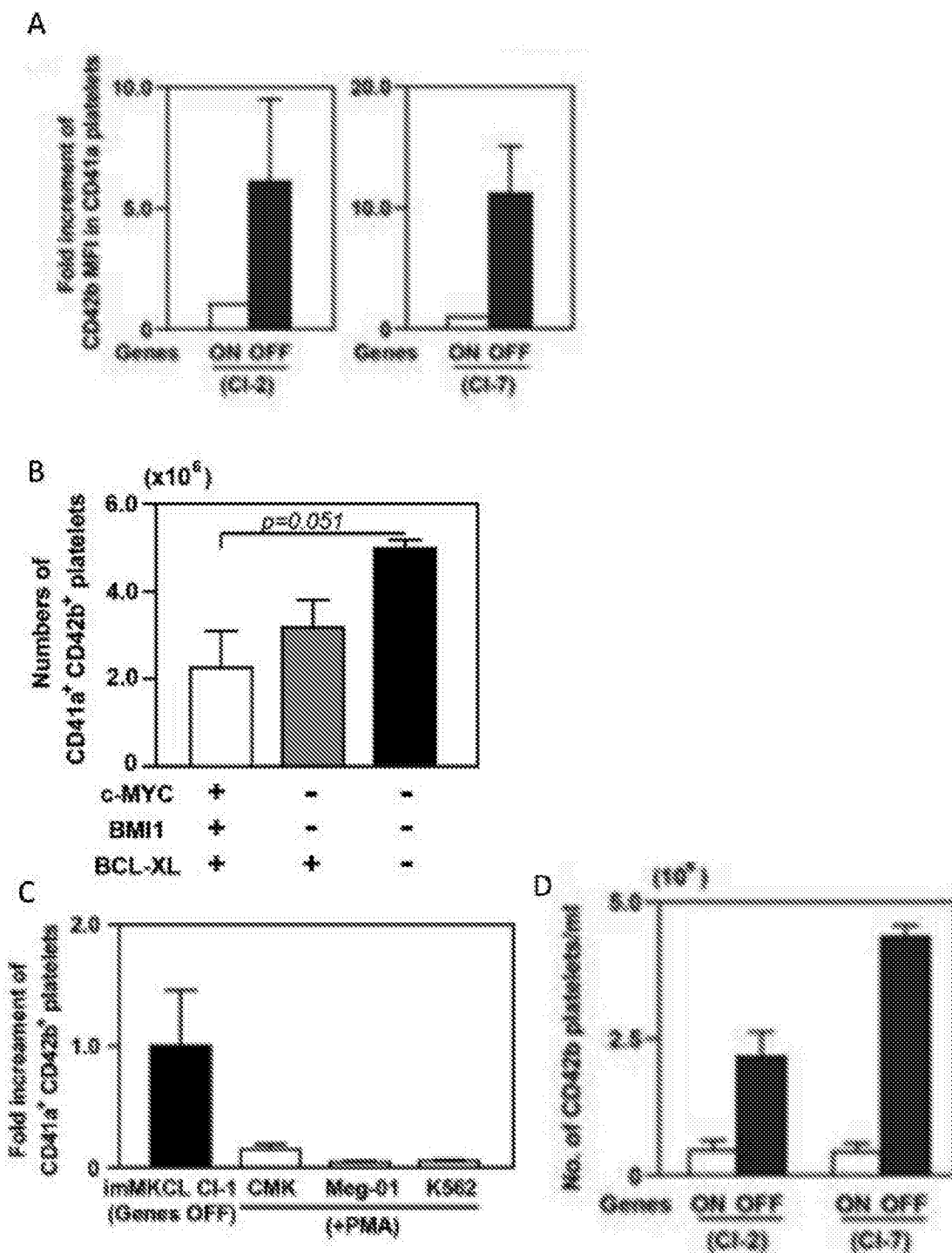
B



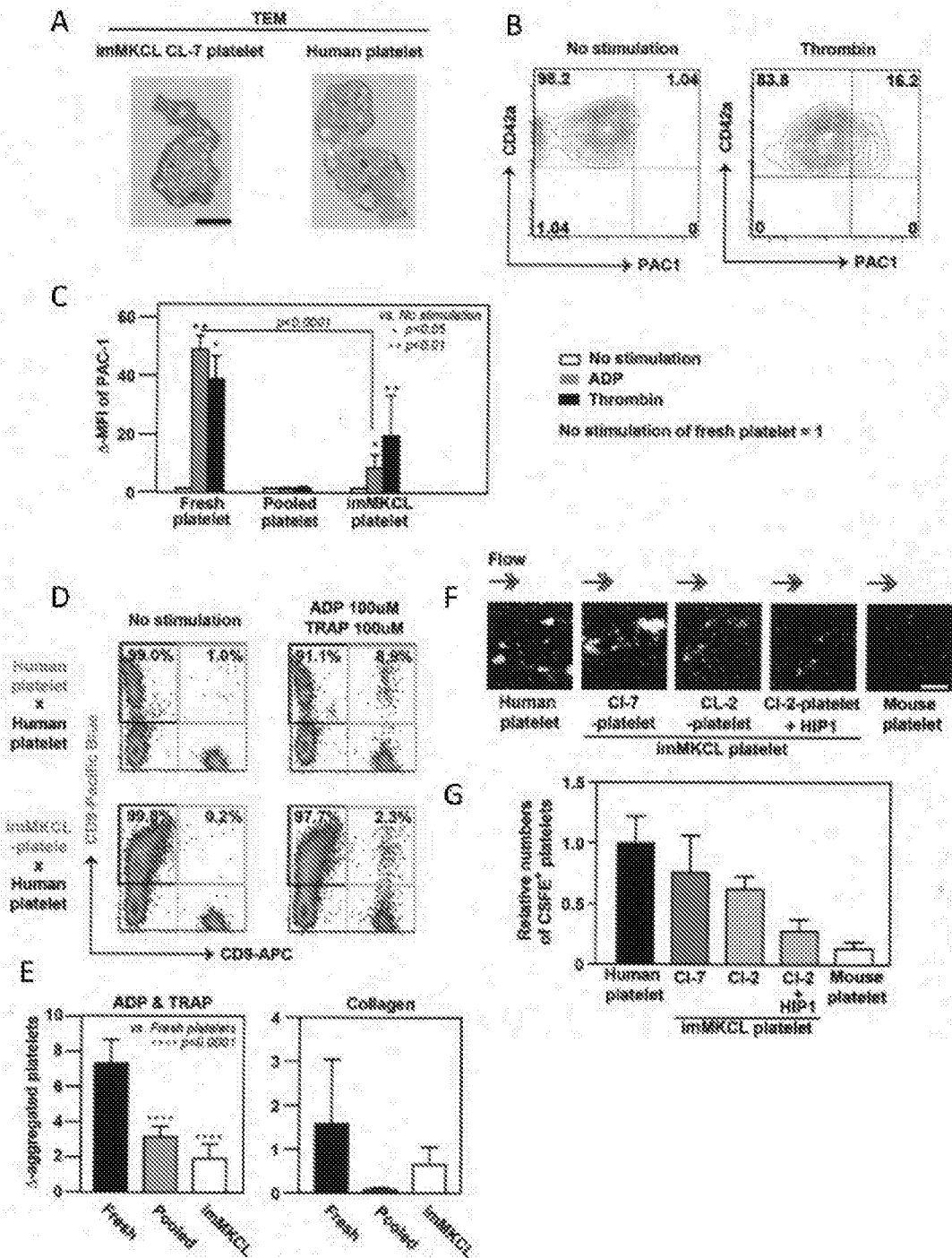
[圖12]



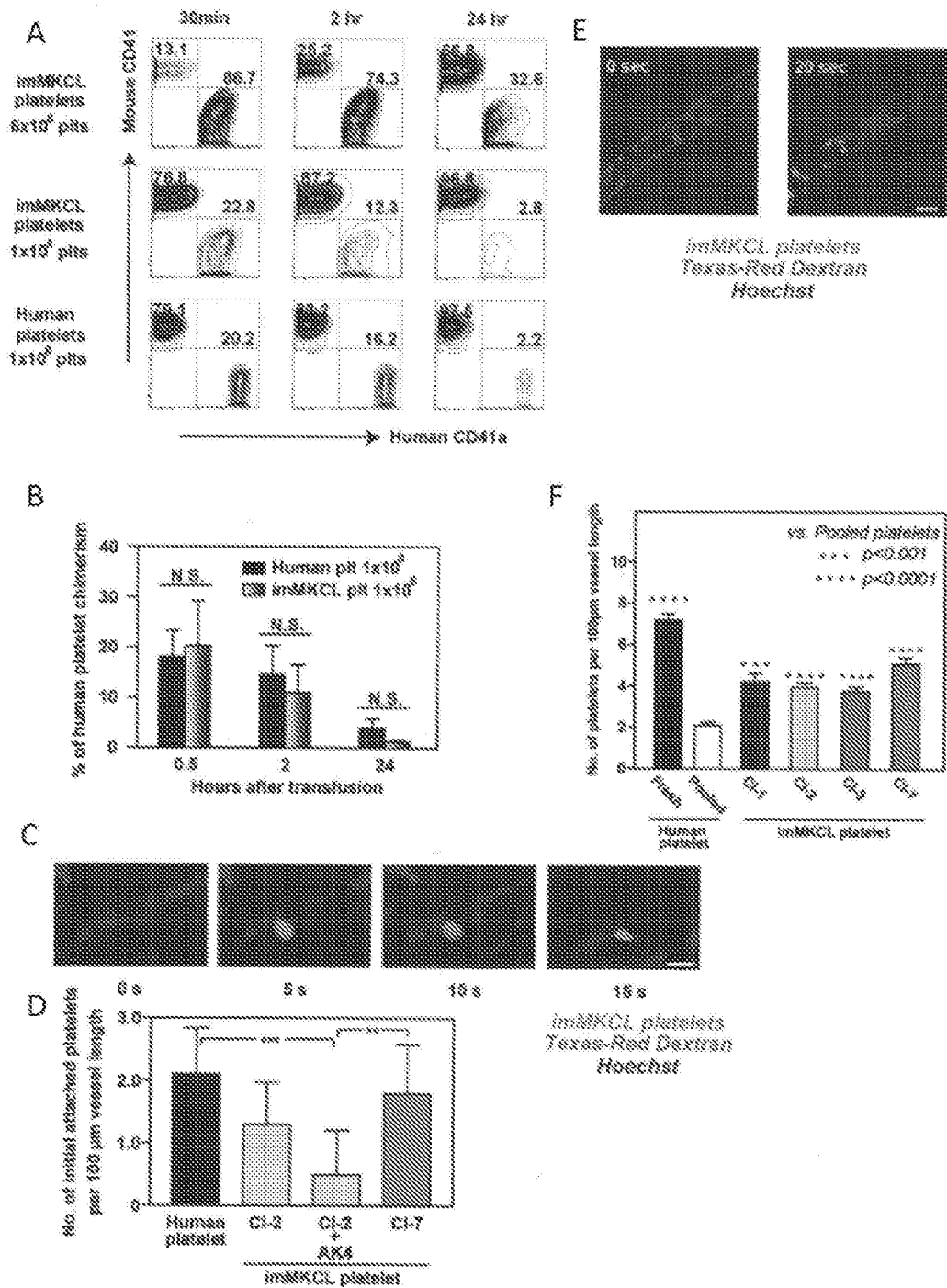
[Figure 13]



[Figure 14]



[15]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2014/053087

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
C12N5/10(2006.01)i, A61K35/12(2006.01)i, A61P7/00(2006.01)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)
C12N5/10, A61K35/12, A61P7/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2014
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2014	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2014

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS/WPIX (STN),
JSTPLUS/JMEDPLUS/JST7580 (JDreamIII)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
<u>A</u> <u>X</u> <u>Y</u>	WO 2012/157586 A1 (The University of Tokyo), 22 November 2012 (22.11.2012), claims; paragraph [0063]; fig. 15; examples 1 to 4 (Family: none)	<u>1-16, 32-36</u> <u>17-22, 24-31</u> 23
<u>A</u> <u>X</u> <u>Y</u>	KLUTER H. et al., Impact of buffy coat storage on the generation of inflammatory cytokines and platelet activation, Transfusion, 1997, Vol.37, p.362-367	<u>1-16, 32-36</u> <u>18, 19</u> 17, 20-31
<u>A</u> <u>Y</u>	JP 2002-526093 A (Isis Pharmaceuticals Inc.), 20 August 2002 (20.08.2002), paragraphs [0159], [0205] & US 2001/0007025 A1 & EP 1507005 A2 & WO 2000/020432 A1	<u>1-16, 32-36</u> 17-31

Further documents are listed in the continuation of Box C. 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	"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
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"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
"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)	"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
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search 30 April, 2014 (30.04.14)	Date of mailing of the international search report 13 May, 2014 (13.05.14)
--	---

Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2014/053087

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
<p>A X</p>	<p>DORE Louis C. et al., Transcription factor networks in erythroid cell and megakaryocyte development, Blood, 2011, Vol.118, No.2, p.231-239</p>	<p>1-31 32-36</p>
<p>A</p>	<p>WO 2011/034073 A1 (The University of Tokyo), 24 March 2011 (24.03.2011), claims; paragraph [0027] & US 2012/0238023 A1 & EP 2500418 A1 & CN 102712906 A</p>	<p>1-36</p>
<p>A</p>	<p>TAKAYAMA Naoya, Platelet Production System Using an Immortalized Megakaryocyte Cell Line Derived From Human Pluripotent Stem Cells, [online], 2011.12.10, American Society of Hematology, [retrieval date 24 April 2014 (24.04.2014)], Internet <URL:http://www.reuters.com/article/2011/12/10/idUS70817+10-Dec-2011+PRN20111210></p>	<p>1-36</p>

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））
 Int.Cl. C12N5/10(2006.01)i, A61K35/12(2006.01)i, A61P7/00(2006.01)i

B. 調査を行った分野
 調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC））
 Int.Cl. C12N5/10, A61K35/12, A61P7/00

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
 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

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）
 CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS/WPIX(STN), JSTplus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

C. 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
A X Y	WO 2012/157586 A1（国立大学法人東京大学）2012. 11. 22, 【特許請求の範囲】【0063】【図 15】【実施例 1-4】（ファミリーなし）	<u>1-16, 32-36</u> <u>17-22, 24-31</u> 23
A X Y	KLUTER H. et al., Impact of buffy coat storage on the generation of inflammatory cytokines and platelet activation, Transfusion, 1997, Vol. 37, p. 362-367	<u>1-16, 32-36</u> <u>18, 19</u> 17, 20-31

C 欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー	の日の後に公表された文献
「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	「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
「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	「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
「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）	「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
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献	「&」同一パテントファミリー文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願	

国際調査を完了した日 30.04.2014	国際調査報告の発送日 13.05.2014
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁（ISA/J P） 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官（権限のある職員） 鳥居 敬司 電話番号 03-3581-1101 内線 3448
	4 B 5 2 7 8

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
A Y	JP 2002-526093 A (アイシス・ファーマシューティカルス・インコーポレーテッド) 2002.08.20, 【0159】【0205】 & US 2001/0007025 A1 & EP 1507005 A2 & WO 2000/020432 A1	<u>1-16, 32-36</u> 17-31
A X	DORE Louis C. et al., Transcription factor networks in erythroid cell and megakaryocyte development, Blood, 2011, Vol.118, No.2, p.231-239	<u>1-31</u> 32-36
A	WO 2011/034073 A1 (国立大学法人東京大学) 2011.03.24, 【特許請求の範囲】【0027】 & US 2012/0238023 A1 & EP 2500418 A1 & CN 102712906 A	1-36
A	TAKAYAMA Naoya, Platelet Production System Using an Immortalized Megakaryocyte Cell Line Derived From Human Pluripotent Stem Cells, [online], 2011.12.10, American Society of Hematology, [検索日 2014.04.24], インターネット <URL:http://www.reuters.com/article/2011/12/10/idUS70817+10-Dec-2011+PRN20111210>	1-36