慶應義塾大学学術情報リポジトリ
Keio Associated Repository of Academic resouces

Title	自己細胞由来血小板成長因子によるパーソナル治療剤の開発
Sub Title	Basic studies on the autologous cure by manufacturing platelets
Author	矢澤, 真樹(Yazawa, Masaki) 森, 泰昌(Mori, Taisuke) 松原, 由美子(Matsubara, Yumiko)
Publisher	
Publication year	2017
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2016.)
JaLC DOI	
Abstract	血小板には各種成長因子が多く含まれており, 止血・凝固作用後の傷において, これらの成長因子が複合的に働き, 創部の創傷治癒過程で大きな寄与をしていることが分かってきた。そこで自己細胞由来誘導性血小板を作製してパーソナル治療剤の開発に繋げる本研究を行った。in vitro血小板分化に用いるヒト細胞ソースの検討をはじめに行った。脂肪前駆細胞から作製した血小板は, 創傷治癒に有効性を示すサイトカインを含有し, 刺激による活性化能を有していた。免疫不全創傷治癒モデルマウスを用いた検討を行った。本研究の成果は, 自己細胞由来誘導性血小板を用い, 血小板に含まれる成長因子による, パーソナル治療剤の開発に繋がった。 Platelets are released from mature megakaryocytes and have an essential role in hemostatic plug formation. Recently, a line of evidence supports the clinical application of platelets to accelerate wound healing. However, it is difficult to use peripheral platelets for wide-range wound. Thus, new strategies for manufacturing megakaryocytes and subsequently platelets are urgently needed. Thus, the use of pre-adipocytes from adipose tissues would be advantageous for establishing a culture system to produce platelets for clinical application. Pre-adipocyte-derived platelets have the ability of activation and contain cytokines in relation to wound healing. We also examined the effect of pre-adipocyte-derived platelets on wound healing of immunodeficient NOG mouse with full-thickness excisional wound. Taken together, manufacturing platelets from pre-adipocytes would be advantageous for wound healing.
Notes	研究種目 : 基盤研究(C)(一般) 研究期間 : 2013 ~ 2016 課題番号 : 25462800 研究分野 : 医歯薬学
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_25462800seika

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成　２９　年　　５　月　２５　日現在

機関番号：　３２６１２
研究種目：　基盤研究(C)（一般）
研究期間：　2013～2016
課題番号：　２５４６２８００

研究課題名（和文）自己細胞由来血小板成長因子によるパーソナル治療剤の開発

研究課題名（英文）Basic studies on the autologous cure by manufacturing plateles

研究代表者
矢澤　真樹（Yazawa, Masaki）

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・講師

研究者番号：６０３２７５６７

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　3,800,000円

研究成果の概要（和文）：血小板には各種成長因子が多く含まれており、止血・凝固作用後の傷において、これらの成長因子が複合的に働き、創部の創傷治癒過程で大きな寄与をしていることが分かってきた。そこで自己細胞由来誘導性血小板を作製してパーソナル治療剤の開発に繋げる本研究を行った。 in vitro血小板分化に用いるヒト細胞ソースの検討をはじめに行った。脂肪前駆細胞から作製した血小板は、創傷治癒に有効性を示すサイトカインを含有し、刺激による活性化能を有していた。免疫不全創傷治癒モデルマウスを用いた検討を行った。本研究の成果は、自己細胞由来誘導性血小板を用い、血小板に含まれる成長因子による、パーソナル治療剤の開発に繋がった。

研究成果の概要（英文）：Platelets are released from mature megakaryocytes and have an essential role in hemostatic plug formation. Recently, a line of evidence supports the clinical application of platelets to accelerate wound healing. However, it is difficult to use peripheral platelets for wide-range wound. Thus, new strategies for manufacturing megakaryocytes and subsequently platelets are urgently needed. Thus, the use of pre-adipocytes from adipose tissues would be advantageous for establishing a culture system to produce platelets for clinical application. Pre-adipocyte-derived platelets have the ability of activation and contain cytokines in relation to wound healing. We also examined the effect of pre-adipocyte-derived platelets on wound healing of immunodeficient NOG mouse with full-thickness excisional wound. Taken together, manufacturing platelets from pre-adipocytes would be advantageous for wound healing.

研究分野：　医歯薬学

キーワード：　再生医学

１．研究開始当初の背景

長い間、血小板の主な機能は、止血作用と凝固作用と考えられてきた。しかし近年の研究で、血小板には各種成長因子が多く含まれており、止血・凝固作用後の傷において、これらの成長因子が複合的に働き、創部の創傷治癒過程で大きな寄与をしていることが分かってきた。そこで現在は、患者自身の血小板を採血により採取し遠心分離法を組み合わせて濃縮調整することで、多血小板血漿(PRP：platelet rich plasma）を作成し、創部の創傷治癒の促進を期待して、直接創部に適応されるようになったが、その調整は患者毎に不安定であるため、期待される効果も予測不能であり確実ではない。一方で、創傷治癒に十分量となる多種の成長因子を合成タンパクで応用することは、作業効率、コストから現状では困難である。近年、iPS 細胞の開発に始まる自己細胞をソースとした治療法の開発が進んでいるが、iPS 細胞の作成には、作成後の腫瘍化など安全面での課題は多く、臨床応用には、その解決が急務となっている。その中で、そもそも血小板は核を持たないことから、安全面に関しては、最も臨床応用に近い素材の１つとして注目され、自己細胞由来誘導性血小板は、大量出血時に必要な血小板輸血や、造血器疾患等で繰り返し必要になる HLA 血小板などの血小板のソースとして、献血者の負担軽減のための開発が行われている。研究分担者の松原らは、iPS 細胞を経由せずに、自己脂肪組織から作成した線維芽細胞で、血小板を作成できることを報告し、既に凝固作用・止血作用があることを確認している(Matsubara. Blood 2012)。しかしながら、現在までに、この血小板に含まれる成長因子等についての解析や創傷治癒効果の検討は行われていない。仮に、この自己細胞由来血小板に成長因子が十分含まれていれば、自己細胞由来血小板から複数の成長因子を同時に安定して獲得することができる。パーソナル治療剤として利用できる可能性があると考えている。

これまで申請者らは、創傷治癒および組織移植の分野で継続的な研究を行ってきた。移植組織生着促進・創傷治癒を目的とした成長因子のソースとして、PRP の研究では、血小板は傷に対する単なる痂皮ではなく、患者自身の成長因子を複数含有する担体であるという発想で、PRP の臨床応用への根拠となる基礎データを示した(Yazawa et al. Cell Transplant 2003)。自己血輸血に相当するコンセプトで、患者自身から患者自身の血小板に多く含まれる各種成長因子を、血小板を回収することで収集・濃縮し、局所の創傷治癒促進・骨形成促進に利用できることを明らかにしたこの研究は、現在では移植組織の創傷治癒法の一つとして臨床応用するに至り国内外で評価されている(Yazawa. Chapter 4:Platelet Rich Plasma for Clinical Application. Trend in Blood Transfusion Research.NOVA Science Publisher Inc. 2006, Yazawa et al. J craniofac Surg 2004, Yazawa et al. J Oral Maxillofac Surg 2004, Kimura, Yazawa et al. J Dermatol Sci 2005)。

また、近年開発が進んでいる組織工学において、成長因子やサイトカインの創傷治癒への寄与は重要視され、組織移植において不可欠なものとなっており、移植組織を成長因子やサイトカインと共に移植する試みや、成長因子やサイトカインを用いて移植先の母床を整える試みなどが行われている(Yazawa et al. Wound Rep Reg 2006)。

２．研究の目的

前述の一連の研究は申請者が本研究の研究分担者である森らと行った共同研究であり、これまでの成果を元に、本研究では、iPS 細胞よりもより安全で効率の高い線維芽細胞をはじめとした候補細胞から作成した血小板において、血小板としてのさらなる性能検証から始め、自己細胞由来の成長因子獲得のソースとしての可能性について、臨床応用を前提に検討する。最終的には、自己細胞由来血小板を利用した成長因子の獲得によって、組織移植および創傷治癒促進を目的とするパーソナル治療剤を開発に繋げることを目的とする。

３．研究の方法

(1) 臨床応用を目指す自己作製血小板の細胞ソースの選択を行うために、候補細胞を iPS 細胞、NE-E2 遺伝子導入線維芽細胞、脂肪前駆細胞、造血幹細胞とした。iPS 細胞は京都大学作製のものを購入、NE-E2 遺伝子導入線維芽細胞は Cell Application 社から購入した線維芽細胞に NF-E2 遺伝子を導入し作製した。脂肪前駆細胞は Cell Application 社から購入したものを使用した。造血幹細胞は Lonza 社から購入した CD34 陽性細胞を使用した。それぞれの細胞は Megakaryocyte-lineage induction media に組換えサイトカイン TPO の添加の有無条件で培養した。この条件に加え、iPS 細胞からの血小板分化誘導はマウス間葉系間質細胞である OP9 細胞との共培養を行った。作製血小板の評価は CD41 発現、CD42b 発現にて行った。

(2) 文書にて同意を得た再建手術患者から余剰脂肪組織を得た。皮下脂肪組織はコラゲナーゼ処理、遠心分離にて脂肪前駆細胞を得た。Cell Application 社の脂肪前駆細胞増殖培地を用いて維持培養・拡大培養を行った後に Megakaryocyte-lineage induction media に組換えサイトカイン TPO の添加の有無条件を用いて培養した。作製血小板の評価は CD41 発現、CD42b 発現、刺激によるリガンド（フィブリノーゲン）との結合、刺激による血小板活性化マーカー（CD62P）の細胞膜表面発現、刺激による血小板活性化を示す表面マー

カー（PAC1）の発現検討にて行われた。患者検体の本研究への使用は、慶應義塾大学医学部に設置された倫理委員会にて許可を得ている。

(3) 脂肪前駆細胞から得られた血小板の創傷治癒への有効性を検討するために、作製血小板の機能と動物モデル実験を行った。血小板の創傷治癒作用発現において重要と考えられている血小板活性化能は、血小板機能測定機器(T-TAS®)を用いて検討した。脂肪前駆細胞からの作製血小板が含有する成長因子量の測定は、創傷治癒作用を有するとされている PDGF と TGF-□1 の遺伝子発現レベル、脂肪前駆細胞から血小板分化誘導過程における培養上清中のタンパク濃度を ELISA 法により測定した。動物実験として、免疫不全マウス背部皮膚全層欠損モデルにて脂肪前駆細胞からの作製血小板塗布実験を行った。本動物実験は、慶應義塾大学医学部から許可を得て遂行している。

４．研究成果

(1) in vitro 血小板分化に用いるヒト細胞ソースの検討をはじめに行った。臨床応用を目指す自己作製血小板の細胞ソース候補を iPS 細胞、NE-E2 遺伝子導入線維芽細胞、脂肪前駆細胞、造血幹細胞の中から選択するにあたり、(a) 安全性、(b) 培養安定性、(c) 利便性、に関して検討した。(a) 安全性：iPS 細胞と NE-E2 遺伝子導入線維芽細胞は遺伝子導入操作が加わることから臨床応用を行うためには他の細胞使用に比し検査項目が多くなることがわかった。(b) 培養安定性: iPS 細胞、NE-E2 遺伝子導入線維芽細胞、脂肪前駆細胞の培養は少なくとも 8 継代は比較的安定に培養可能であった。造血幹細胞はロット差を認められたものの増殖はほとんど認められなかった。(c) 利便性：iPS 細胞から作製血小板を得るためにはフィーダー細胞としてマウス OP9 細胞を用いる必要があった。さらに血小板分化誘導基礎培地には血小板分化に必要な組換えサイトカイン TPO の添加が必要であった。NE-E2 遺伝子導入線維芽細胞から作製血小板を得るためには線維芽細胞への遺伝子導入を行い、その後血小板への分化誘導を行った。この分化誘導においても血小板分化誘導基礎培地に組換えサイトカイン TPO の添加が必要であった。脂肪前駆細胞から作製血小板を得るため血小板分化誘導基礎培地のみで培養が可能であった。このメカニズムとして脂肪前駆細胞はサイトカイン TPO を内在しており、血小板分化誘導基礎培地に含まれるトランスフェリンの添加刺激でトランスフェリン受容体を介してサイトカイン TPO を細胞外に分泌することを見出し論文報告した。脂肪前駆細胞からの血小板は、iPS 細胞や NE-E2 遺伝子導入線維芽細胞に比し非常にシンプルな培養法で作製可能のため細胞ソースとして脂肪前駆細胞を用いることは非常に利便性が高いと考えられた。造血幹細胞から作製血小板を得るためにも血小板分化誘導基礎培地に組換えサイトカイン TPO の添加が必要であった。造血幹細胞はドナーからの採取が容易ではない点からも血小板作製の細胞ソースには適していないと考えた。いずれの細胞を用いても血小板への分化誘導効率は約 20%から 50%であった。これら結果から脂肪前駆細胞は、早期臨床応用可能な作製血小板のソースとして適していると考えた。

(2) 臨床応用を目指す自己作製血小板の検討を進めるため、患者脂肪組織検体から血小板作製を試みた。患者脂肪組織検体からの血小板作製を行う際も購入した脂肪前駆細胞を用いる場合と同様に組換えサイトカイン TPO の添加は不要であった。購入細胞を用いて作製した血小板の CD41 発現、CD42b 発現、刺激によるリガンド（フィブリノーゲン）との結合、刺激による血小板活性化マーカー(CD62P) の細胞膜表面発現、刺激による血小板活性化を示す表面マーカー（PAC1）の発現に関して、購入した脂肪前駆細胞と患者検体それぞれから作製した血小板のこれら検討結果は同様であった。購入した脂肪前駆細胞と患者検体をソースとして得られた血小板の特性解析結果は同様であったが、血小板に分化誘導を行う前の脂肪前駆細胞の維持培養や拡大培養においては、患者検体から得られた脂肪前駆細胞の方が増殖能や安定継代数において高いことを認めた。

(3) 次に、血小板の創傷治癒作用発現において重要と考えられている血小板活性化能を血小板機能測定機器(T-TAS®)を用いて検討した。その結果、脂肪前駆細胞から作製された血小板の活性化能が高かった。更に脂肪前駆細胞からの作製血小板が含有する成長因子量の測定を行った。創傷治癒作用を有するとされている PDGF と TGF-B1 の遺伝子発現を確認後、脂肪前駆細胞から血小板分化誘導過程における培養上清中のタンパク濃度を ELISA 法により測定した。PDGF は少量であったが、TGF-B1 は 6 ng/mL (アブカム社 ELISA 使用)を認めた。動物実験として、免疫不全マウス背部皮膚全層欠損モデルに脂肪前駆細胞からの作製血小板塗布実験を行った。本研究の成果は、自己細胞由来誘導性血小板を用い、血小板に含まれる成長因子による、パーソナル治療剤の開発に繋がった。

５．主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計　0　件）

〔学会発表〕（計　1　件）

Keiichi Tozawa, Yukako Ono-Uruga, Masaki Yazawa, Taisuke Mori, Noriko

Takizawa, Mitsuru Murata, Shinichiro Okamoto, Yasuo Ikeda, Yumiko Matsubara. Manufacture of Platelets from Human Adipose Tissue-derived Mesenchymal Stromal/Stem Cells: Functional Comparison to Platelet Concentrates. The 58th the American Society of Hematology (ASH) annual meeting. 2nd Dec-6th Dec,2016 San Diego(USA)

〔図書〕（計　0　件）

〔産業財産権〕
○出願状況（計　0　件）

○取得状況（計　0　件）–

〔その他〕
なし

６．研究組織
(1)研究代表者
矢澤　真樹（YAZAWA, Masaki）
慶應義塾大学・医学部・専任講師
研究者番号：60327567

(2)研究分担者
森　泰昌（MORI, Taisuke）
国立研究開発法人国立がん研究センター・中央病院・医員
研究者番号：00296708

松原　由美子（MATSUBARA, Yumiko）
慶應義塾大学・医学部・特任准教授
研究者番号：70365427

(3)連携研究者
（　　）
研究者番号：
(4)研究協力者
（　　）