明　細　書

発明の名称 ： 巨核球の製造方法

技術分野

[0001]　本発明は、巨核球の製造方法、該方法によって製造される巨核球、該巨核球の用途などに関する。

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、血液凝固およ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、臍帯血また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、胚性幹細胞（ES細胞）および人工多能性幹細胞（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]　血小板の社会的需要に応えるべく、本発明者らはヒトiPS細胞を用いて試験管内で血小板製剤の安定産生技術を開発した（非特許文献１、２）。本発明者らは、ヒトiPS細胞由来の造血前駆細胞等に、2つの因子（MYC／BMI1またはMYC／BCL-XL）または3つの因子（MYC／BMI1／BCL-XL）を導入して巨核球株を樹立し、当該巨核球株を成熟させて血小板を大量産生する技術（ヒトiPS細胞由来人工血小板製剤）を確立した（特許文献１～４、非特許文献１）。さらに、巨核球の成熟化工程において、血小板産生を飛躍的に向上させる培養条件（流体力学的な要件、特に乱流刺激）も報告している（特許文献５、非特許文献２）。

先行技術文献

特許文献

[0004] 特許文献1：国際公開第2011/034073号

特許文献2：国際公開第2012/157586号

特許文献3：国際公開第2014/123242号

特許文献4：国際公開第2021/075568号

特許文献5：国際公開第2019/009364号

非特許文献

[0005] 非特許文献1：Cell Stem Cell. 2014 Apr 3; 14(4): 535-548.

非特許文献2：Cell. 2018 Jul 26; 174(3): 636-648.

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0006] しかし、上記従来の分化誘導方法により誘導した巨核球（株）は、継代するにつれて血小板産性能が低下し、その低下度合いは造血前駆細胞が由来する多能性幹細胞の株間で大きく異なる、という課題を本発明者らは見出した（図1）。そこで本発明は、従来の誘導方法により誘導した巨核球を、血小板産生能を維持したまま増殖させる方法を提供することなどを課題とする。

課題を解決するための手段

[0007] 本発明者らは、ミトコンドリアにおける電子伝達系を担う複合体III（ユビキノール-シトクロムcレダクターゼ）のコアタンパク質（UQCRC1、UQCRC2）を強制発現させた巨核球では、長期間の継代培養後も血小板産生能が維持されることを見出した。

[0008] また、UQCRC2を強制発現させた巨核球の増殖期に、脂肪分化誘導因子（Dexamethasone、IBMX、Insulin）を添加することで血小板産性数が約1.5倍上昇すること、さらに、ここにJI051を加えると血小板産生数が約2倍上昇することを見出した。また、巨核球の増殖期にHDAC5（ヒストン脱アセチル化酵素5）阻害剤またはLSD1（リジン特異的ヒストン脱メチル化酵素）阻害剤を添加することでも、巨核球がCD34/CD41共陽性を維持し、長期培養後の血小板産生も維持できることを見出した。

[0009] 本発明者らは、iPS細胞株の由来による巨核球の増殖能を検証した。その結

果、２種の巨核球誘導因子（即ち、MYCdd遺伝子およびBCL2L1遺伝子）を導入して誘導した巨核球では、iPS細胞の由来により、巨核球の増殖能に差異が生じることを見出した。この差異の原因を探求したところ、ポリコーム抑制複合体1.1を構成するタンパク質が、巨核球の増殖能に関与することを突き止め、該タンパク質をノックダウンすることで、巨核球の増殖能を向上させることに成功した。

[0010] また、巨核球の増殖能に寄与する因子についてさらに探索するため、血球系譜の分化過程に関わる複数の転写因子について解析した。その結果、意外にも、赤血球形成とリンパ球形成に寄与するBACH1を過剰発現させると、巨核球の増殖力および血小板産生能を向上できることを見出した。本発明者らは、これらの知見に基づいてさらに研究を重ねた結果、本発明を完成するに至った。

[0011] すなわち、本発明は以下の通りのものである。

［１］ 巨核球において、ユビキノール-シトクロムcレダクターゼ（UQCR）を構成するタンパク質の少なくとも１種の存在量を上昇させる工程を含む、血小板産生能を維持した巨核球の製造方法。

［２］ UQCRを構成するタンパク質の少なくとも１種がUQCRコアタンパク質（UQCRC）である、［１］に記載の方法。

［３］ UQCRCの少なくとも１種がUQCRC2である、［２］に記載の方法。

［４－１］ UQCRを構成するタンパク質の存在量を上昇させる工程が、該タンパク質をコードする核酸を巨核球に導入する工程を含む、［１］～［３］のいずれか１つに記載の方法。

［４－２］ 前記核酸がウィルスベクターにより導入される、［１］～［４－１］のいずれか１つに記載の方法。

［５－１］ 巨核球において、ポリコーム抑制複合体1.1の機能を阻害する工程を含む、血小板産生能を維持した巨核球の製造方法。

［５－２］ ポリコーム抑制複合体1.1の機能を阻害する工程が、ポリコーム抑制複合体1.1を構成するタンパク質の少なくとも１種の存在量を低減させる

工程を含む、［５－１］に記載の方法。

［６］　巨核球において、ポリコーム抑制複合体1.1の機能を阻害する工程を含む、［１］～［４－２］のいずれか１つに記載の方法。

［７］　ポリコーム抑制複合体1.1の機能を阻害する工程が、ポリコーム抑制複合体1.1を構成するタンパク質の少なくとも１種の存在量を低減させる工程を含む、［６］に記載の方法。

［８］　ポリコーム抑制複合体1.1を構成するタンパク質が、BCORタンパク質、BCORL1タンパク質およびTRIM27タンパク質からなる群から選択される少なくとも１種である、［５－２］または［７］に記載の方法。

［９－１］　巨核球において、BACH1タンパク質の存在量を上昇させる工程を含む、［１］～［８］のいずれか１つに記載の方法。

［９－２］　巨核球において、（１）BCORタンパク質またはBCORL1タンパク質、および（２）TRIM27タンパク質の存在量を低減させ、かつ（３）BACH1タンパク質の存在量を上昇させる工程を含む、［１］～［９－１］のいずれか１つに記載の方法。

［１０－１］　HDAC5阻害剤を含む培地で巨核球を培養する工程を含む、［１］～［９－２］のいずれか１つに記載の方法。

［１０－２］　HDAC5阻害剤の少なくとも１種がLMK235である、［１０－１］に記載の方法。

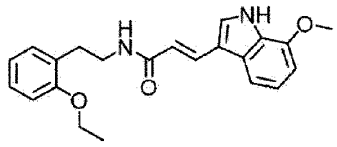
［１１－１］　脂肪分化誘導因子を含む培地で巨核球を培養する工程を含む、［１］～［１０－２］のいずれか１つに記載の方法。

［１１－２］　脂肪分化誘因子が、デキサメタゾン、IBMXおよびインスリンの組合せである、［１］～［１１－１］のいずれか１つに記載の方法。

［１２］　培地が以下の構造式で示される化合物（JI051）を含む、［１］～［１１－２］のいずれか１つに記載の方法。

[0012]

[化1]



[0013] ［１３］　巨核球において、MYCタンパク質およびアポトーシス抑制タンパク質の存在量を上昇させる工程を含む、［１］～［１２］のいずれか１つに記載の方法。

［１４－１］　巨核球が多能性幹細胞に由来する、［１］～［１３］のいずれか１つに記載の方法。

［１４－２］　巨核球がCD34遺伝子およびCD41遺伝子を発現する、［１］～［１４－１］のいずれか１つに記載の方法。

［１４－３］　巨核球がヒトに由来する、［１］～［１４－２］のいずれか１つに記載の方法。

［１５］　［１］～［１４－３］のいずれか１つに記載の方法により得られる巨核球。

［１６－１］　下記の特徴（Ａ）～（Ｃ）を全て有する巨核球。

（Ａ）外因性のユビキノール-シトクロムcレダクターゼ（UQCR）を構成するタンパク質の少なくとも１種を有する

（Ｂ）血小板産生能を有する

（Ｃ）CD34遺伝子およびCD41遺伝子を発現する

［１６－２］　さらに、下記の特徴（Ｄ）～（Ｆ）の少なくともいずれか１つを有する、［１６－１］に記載の巨核球。

（Ｄ）多能性幹細胞由来である

（Ｅ）外因性の巨核球誘導因子を有する

（Ｆ）TP53遺伝子および／またはCDKN1A遺伝子に対する発現抑制剤を有する

［１７－１］　UQCRを構成するタンパク質の少なくとも１種がUQCRコアタンパク質（UQCRC）である、［１６－１］または［１６－２］に記載の巨核球。

［１７－２］　UQCRCの少なくとも１種がUQCRC2である、［１７－１］に記載の巨核球。

［１８］　［１５］～［１７－２］のいずれか1つに記載の巨核球を成熟させる工程を含む、血小板の製造方法。

［１９－１］　振盪培養工程を含む、［１８］に記載の方法。

［１９－２］　培地がJI051を含む、［１８］または［１９－１］に記載の方法。

［２０］　［１８］～［１９－２］のいずれか１つに記載の方法により得られる血小板。

［２１－１］　［１５］～［１７－２］および［２０］のいずれか１つに記載の細胞を含む、血液製剤。

［２１－２］　血液疾患または出血の治療または予防のための、［２１－１］に記載の剤。

［２２－１］　造血前駆細胞を、HDAC5阻害剤および／またはLSD1阻害剤を含む培地中で培養する工程を含む、巨核球の製造方法。

［２２－２］　培地が、HDAC5阻害剤およびLSD1阻害剤を含む、［２２－１］に記載の方法。

［２３－１］　HDAC5阻害剤の少なくとも１種がLMK235である、［２２－１］または［２２－２］に記載の方法。

［２３－２］　LSD1阻害剤の少なくとも１種がトラニルシプロミンである、［２２－１］～［２３－１］のいずれか１つに記載の方法。

［２４］　［１５］～［１７－２］および［２０］のいずれか１つに記載の細胞の有効量を、哺乳動物に投与または移植する、血液疾患または出血の治療または予防方法。

［２５］　血液疾患または出血の治療または予防における使用のための［１５］～［１７－２］および［２０］のいずれか１つに記載の細胞。

［２６］　血液疾患または出血の治療または予防薬の製造における［１５］～［１７－２］および［２０］のいずれか１つに記載の細胞の使用。

発明の効果

[0014] 本発明により、多能性幹細胞株の種類を問わずに、長期間に亘り血小板産生能が維持される巨核球が製造できるようになる。これにより、高品質の血小板の安定的供給が可能となり得る。

図面の簡単な説明

[0015] [図1]MBXカセット導入15M41 ヒトiPS細胞由来巨核球について、血小板産生能の経時変化を表すグラフである。横軸はドキシサイクリン（Dox）含有培地（巨核球分化増殖培地）での培養を開始してからの日数、縦軸は巨核球１細胞あたりが放出した血小板数を表す。

[図2]MBXカセット導入TkDN sev2細胞由来巨核球に対し、UQCRC1および／またはUQCRC2ノックダウン後の血小板産生能を表すグラフである。横軸は巨核球に導入したshRNAの種類、縦軸はコントロール（LacZのshRNAを導入した巨核球）の血小板産生能に対する相対値を表す。

[図3]MBXカセット導入15M41細胞またはMXカセット導入15M41細胞から分化誘導した巨核球に、レンチウイルスベクターを用いてUQCRC1またはUQCRC2を導入し、成熟化後に血小板産生能を解析した結果を表す。横軸はレンチウイルスベクターを用いて導入した遺伝子の種類、縦軸は巨核球１細胞あたりが放出した血小板数を表す。N=2、エラーバー：標準偏差。

[図4]MBXカセット導入15M41細胞またはMXカセット導入15M41細胞から分化誘導した巨核球に、レンチウイルスベクターを用いてUQCRC2を導入し、長期間拡大培養後に成熟化させて血小板産生能を解析した結果を表すグラフである。横軸は巨核球分化増殖培地での培養を開始してからの日数、縦軸は巨核球１細胞あたりが放出した血小板数を表す。

[図5]外来性UQCRC2を発現するMBXカセット導入15M41細胞由来巨核球を、デキストラン、IBMX、インスリンを添加した分化増殖培地で3日間以上拡大培養し、成熟化培地に移して3日後にJI051を添加して血小板産生能を解析した結果を表すグラフである。横軸は添加した化合物、縦軸は巨核球１細胞あたりが放出した血小板数を表す。

[図6]UM729をLMK-235に置換した分化増殖培地を用いて巨核球への分化誘導を行い、3日後の細胞数（上グラフ）とCD34陽性細胞率（下グラフ）をFACSで計測した結果である。横軸は使用した化合物を表し、LMKの後ろの数字はLMK-235の濃度（単位はμM）を表す。

[図7]1μM UM729を、200nM LM-K235（HDAC4、5、6の阻害剤）、100nM TMP195(HDAC4、5、7、9の阻害剤)、または100nM Tasqunimod(HDAC4の阻害剤)のいずれかに置換した分化増殖培地を用いて巨核球への分化誘導を行い、増殖培養3日目のCD34陽性率、CD41a陽性率をFACSで計測した結果である。200nM LMK-235と100nM TMP195または100nM Tasqunimodは、HDACの阻害効果としてほぼ同等である。

[図8]1μM UM729を200nM LMK235に置換した分化増殖培地を用いて分化誘導と拡大培養を行い、成熟化を静置培養で行った場合の血小板産性能を表すグラフである。縦軸は巨核球１細胞あたりが放出した血小板数を表す。

[図9]UM729を用いた、多能性幹細胞から巨核球への誘導方法の概略図を示す。

[図10]iPS細胞株(15M41、MH09S01、MH15S01、MH15S01、MH23S01)に、図上に概要を示したベクターを導入してimMKCLを誘導し、CD34陽性率、CD41a陽性率をFACSで計測した結果である。A)SCF、TA-316、UM729およびDoxの添加開始から14日目のFACSの結果。CD34/CD41a共陽性分画を選別し、以後SCF、TA-316、UM729およびDox添加培地で培養した。B)imMKCL誘導後(Dox添加開始日を1日目とした)、いずれのiPS細胞株に由来する細胞も、42日間CD34/CD41a共陽性の表現系を維持した。

[図11]iPS細胞株(QHJI14s04/AB II-KO-03)に、図上に概要を示したベクターを導入してimMKCLを誘導し、CD34陽性率、CD41a陽性率をFACSで計測した結果である（グラフの縦軸がCD34発現レベル、横軸がCD41a発現レベルを示す）。誘導後19日目(Dox添加開始日を1日目とした)でCD34/CD41a共発現分画を選別し、imMKCL誘導後28日目、32日目、36日目、42日目の細胞をFACS解析した。その結果、CD34陰性のCD41a陽性の細胞が出現し、CD34/CD41aの発現を維持す

ることが難しいことが明らかとなった。

[図12]iPS細胞株(15M41)に、図上に概要を示したベクターを導入してimMKCLを誘導し、CD34陽性率、CD41a陽性率をFACSで計測した結果である。15M41は、BCOR遺伝子およびBRD3遺伝子に変異を有することが報告されている細胞である。A)の左：SCF、TA-316、UM729およびDoxの添加開始から14日目の結果を示す。CD34/CD41a共陽性分画を選別し、以後SCF、TA-316、UM729およびDox添加培地で培養した。A)の右：imMKCL誘導後(Dox添加開始日を1日目とした)、15M41iPS細胞株に由来する細胞のみがCD34/CD41a共陽性の表現系を維持した。

[図13]図１１のQHJI14s04/AB II-KO-03由来の巨核球細胞株（Dox添加開始から28日目のもの)に、レンチウイルスを用いてBCORまたはBCORL1をノックダウンさせた場合の、CD34陽性率、CD41a陽性率をFACSで計測した結果である。BCOR（BCL6 corepressor）またはBCORL1（BCL6 corepressor like 1）をノックダウンさせることで、CD34/CD41a共陽性を維持した巨核球を得ることに成功した。

[図14]QHJI14s04/AB II-KO-03由来の巨核球（No.3細胞；Control）、No.3細胞においてBCORをノックダウンした巨核球（sh BCOR）、およびNo.3細胞においてBCORL1をノックダウンした巨核球（sh BCORL1）における、血小板産性能の比較結果を示す。No.3細胞はDox添加開始から29日目、sh BCORおよびsh BCORL1はDox添加開始から36日目における結果である。sh BCORおよびNo3 sh BCORL1は、No.3細胞と比較して2～3倍血小板産生数が多くなっていることが示された。

[図15]BACH1を組み込んだプラスミド（図中に1～5の番号を付して概要を示す）を作製し、iPS細胞株(QHJI14s04/AB II-KO-03)に上記のプラスミドの各組合せ（1、4、5の組合せ、2、4、5の組合せ、3、4、5の組合せ）をリポフェクション法で導入して巨核球を誘導した。1、4、5の組合せは、Dox存在下でc-MYCddを過剰発現させ、BACH1およびBCL-XLを過剰発現させ、BCORをノックダウンさせる組合せである。2、4、5の組合せは、Dox存在下でc-MYCddを過剰発現させ、BACH1およびBCL-XLを過剰発現させ、BCORおよびBCORL1をノックダウン

させる組合せである。3、4、5の組合せは、Doxの存在下でc-MYCddを過剰発現させ、BACH1およびBCL-XLを過剰発現させ、BCORおよびTRIM27（Tripartite Motif Containing 27）をノックダウンさせる組合せである。

[図16-1]A)図１５のプラスミド1、4、5を導入したiPS細胞株(QHJI14s04/AB II-KO-03)を巨核球へと誘導し、CD34/CD41a共陽性細胞を選別後、誘導後（Dox添加開始日を1日目とした)58日目のFACSの結果を示す。B）図１５のプラスミド2、4、5を導入したiPS細胞株(QHJI14s04/AB II-KO-03)を巨核球へと誘導し、CD34/CD41a共陽性細胞を選別後、誘導後（Dox添加開始日を1日目とした)58日目のFACSの結果を示す。C)図１５のプラスミド3、4、5を導入したiPS細胞株(QHJI14s04/AB II-KO-03)を巨核球へと誘導し、CD34/CD41a共陽性細胞を選別後、誘導後（Dox添加開始日を1日目とした)58日目のFACSの結果を示す。BACH1を発現させることで、CD34/CD41a共陽性を維持した巨核球を得ることに成功した。

[図16-2]D)各細胞の血小板産性能の比較結果を示す。プラスミド3、4、5を導入して誘導した巨核球（BCOR/TRIM27）が最も多く血小板を産生した。一番左のグラフは、プラスミド4、5(c-MYC/BCL-XL/UQCRC2)を導入した巨核球の血小板産生数を示す。

[図17-1]iPS細胞(QHJI14s04/AB II-KO-11)に、図上に概要を示したプラスミド3、4、5をリポフェクション法で導入して巨核球を誘導し、CD34陽性率、CD41a陽性率をFACSで計測した結果である。A）プラスミド3、4、5を導入したiPS細胞株(QHJI14s04/AB II-KO-11)を巨核球に誘導し、CD34/CD41a共陽性細胞を選別後、誘導後(Dox添加開始日を1日目とした)64日目のFACSの結果を示す。

[図17-2]QHJI14s04/AB II-KO-3由来の巨核球（No.3細胞）およびQHJI14s04/AB II-KO-11由来の巨核球（No.11細胞）における、血小板産性能の比較結果を示す。グラフは、左から順に、No.3細胞(c-MYC/BCL-XL/sh p21（shRNAを用いてp21をノックダウン）/shp53（shRNAを用いてp53をノックダウン））のDox添加開始から40日目の血小板産生数、No.3 UQ2細胞(c-MYC/BCL-XL/UQCRC2/sh p

21/shp53)のDox添加開始から36日目の血小板産生数、No.3 UQ2 BACH1細胞(c-MYC/BCL-XL/UQCRC2/BACH1/sh BCOR/sh TRIM27（shRNAを用いてTRIM27をノックダウン）)のDox添加開始から26、27、33、42、48および50日目の血小板産生数（各時点における血小板数の平均値±標準偏差を示す）、No.11細胞(c-MYC/BCL-XL/sh p21/shp53)のDox添加開始から40日目の血小板産生数、No.11 UQ2細胞(c-MYC/BCL-XL/UQCRC2/sh p21/shp53)のDox添加開始から36日目の血小板産生数、No.11 UQ2 BACH1細胞(c-MYC/BCL-XL/UQCRC2/BACH1/sh BCOR/sh TRIM27)のDox添加から26および29日目の血小板産生数（各時点における血小板数の平均値±標準偏差を示す）を示す。No.11 UQ2 BACH1細胞が最も多く血小板を産生することが示された。

[図18-1]iPS細胞(QHJI14s04/AB II-KO-3、QHJI14s04/AB II-KO-11)に、図上に概要を示したプラスミドをリポフェクション法で導入して巨核球を誘導し、CD34陽性率、CD41a陽性率をFACSで計測した結果である。A）プラスミドを導入した各iPS細胞株を巨核球に誘導し、CD34/CD41a共陽性細胞を選別後、誘導後(Dox添加開始日を1日目とした)48日目（QHJI14s04/AB II-KO-3由来の巨核球の場合）または42日目（QHJI14s04/AB II-KO-11由来の巨核球の場合）のFACSの結果を示す。

[図18-2]B)各巨核球の血小板産性能の比較結果を示す。左図のグラフは、左から順に、No.3細胞(c-MYC/BCL-XL)のDox添加開始から40日目の血小板産生数、No.3 UQ2細胞(c-MYC/BCL-XL/UQCRC2)のDox添加開始から36日目の血小板産生数、No.3 UQ2 tet BACH1細胞(c-MYC/BCL-XL/UQCRC2/tet BACH1)のDox添加開始から33、35、39、43および46日目の血小板産生数（各時点における血小板数の平均値±標準偏差を示す）、No.11細胞(c-MYC/BCL-XL)のDox添加開始から40日目の血小板産生数、No.11 UQ2細胞(c-MYC/BCL-XL/UQCRC2)のDox添加開始から36日目の血小板産生数、No.11 UQ2 tet BACH1細胞(c-MYC/BCL-XL/UQCRC2/tet BACH1)のDox添加から26、28、32、36、39および46日目の血小板産生数（各時点における血小板数の平均値±標準偏差を示す）を示す。No.11 UQ2 tet BACH1細胞が最も多く血小板を産生することが示された。右図は、No.

11 UQ2 tet BACH1細胞における、血小板産生数を経時的に測定した結果を示す。

[図19]MXカセット導入15M41細胞から分化誘導したimMKCに、SCF、TA316およびDoxと、UM729(1μM)、LMK235(200nM)、2PCPA（trans-2-phenylcyclopropylamine）（別称：トラニルシプロミン）(1μM)またはLMK235(200nM)と2PCPA(1μM)との組み合わせを添加して10日間培養後の細胞数とFACS解析の結果を示す。LMK235単独、および2PCPA単独ではCD34/CD41a発現の維持効果は高いとはいえないが、LMK235と2PCPAとを併用することで、CD34/41aの発現維持が可能であった。

発明を実施するための形態

[0016] 1．巨核球の製法

本発明は、血小板産生能を維持した巨核球を製造する方法を提供する。具体的には、巨核球において、ユビキノール-シトクロムcレダクターゼ（UQCR）を構成するタンパク質の少なくとも１種の存在量を上昇させる工程を含む、血小板産生能を維持した巨核球の製造方法（以下、「本発明の製法」と称することがある。）を提供する。別の態様において、本発明は、巨核球において、ポリコーム抑制複合体1.1（Polycomb Repressive Complex 1.1; PRC1.1）（非カノニカルPRC1.1とも称される。）の機能を阻害する工程を含む、血小板産生能を維持した巨核球の製造方法（特に断らない限り、本方法も、「本発明の製法」に包含されるものとする。）を提供する。さらに、これらの方法を組み合わせてもよく、具体的には、巨核球において、UQCRを構成するタンパク質の少なくとも１種の存在量を上昇させる工程、および、巨核球において、PRC1.1の機能を阻害する工程を含む、血小板産生能を維持した巨核球の製造方法も提供される。これらの工程を組み合わせる場合には、各工程を順次行ってもよく、同時に行ってもよい。また、本明細書において、「巨核球の製造方法」は、「巨核球の増殖方法」または「巨核球の拡大培養方法」と適宜読み替えることもできる。

[0017] 本明細書において、特に断りのない限り、巨核球などの「細胞」には、「

細胞集団」が含まれるものとする。また、特に断らない限り、「細胞」は、細胞培養により得られるものを指す。細胞集団は、１種類の細胞から構成されていてもよく、２種類以上の細胞から構成されていてもよい。

[0018] 巨核球は、例えば、CD41a陽性/CD42a陽性/CD42b陽性として特徴付けられる細胞であり得る。巨核球は、これらのマーカーに加え、CD9、CD34、CD61、CD62p、CD42c、CD42d、CD49f、CD51、CD110、CD123、CD131、およびCD203cからなる群より選択される1以上のマーカーをさらに発現し得る。巨核球はまた、GATA1、FOG1、NF-E2およびβ1-tubulinを発現し得る。巨核球は多核化した細胞であってもよく、単核または二核の細胞であってもよい。また、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。

多核化していない巨核球は、拡大培養によって増殖させることが可能であり、不死化巨核球（immortalized mega-karyocyte progenitor cell line; imMKCL）」と称される場合がある。不死化巨核球は、成熟することで機能的な血小板を産生する。巨核球の成熟とは、巨核球が必要な多核化状態に分化し、機能的な血小板を産生できることをいう。機能的な血小板とは、例えば、CD42b陽性の血小板であってよい。巨核球の成熟は、例えば、GATA1、FOG1、FLI1、NF-E2およびβ1-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。

一実施態様において、本発明で用いる巨核球は、CD34陽性CD41陽性細胞である。また、別の実施態様において、本発明で用いる巨核球は、CD38陰性、CD90陽性、および/またはCD49f陽性である。本明細書において、CD41陽性細胞とは、CD41a陽性細胞を意味する。

[0019] 本発明の一態様において、巨核球は、MYCタンパク質をコードする外因性の遺伝子およびアポトーシス抑制タンパク質をコードする外因性の遺伝子を有し、好ましくはさらにポリコーム群タンパク質をコードする外因性の遺伝子を有する。本明細書において、これらMYCタンパク質、アポトーシス抑制タンパク質およびポリコーム群タンパク質を総称して、「巨核球誘導因子」と称

することができる。

[0020] MYCタンパク質をコードする遺伝子（以下、「MYC遺伝子」とも称する。）として、例えば、c-MYC遺伝子、N-MYC遺伝子およびL-MYC遺伝子が例示される。より好ましくは、c-MYC遺伝子である。c-MYC遺伝子として、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などが挙げられる。

[0021] c-MYC遺伝子は、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遺伝子であってもよい。「不安定化ドメイン」は、作動可能に連結しているタンパク質を不安定化するドメインを指す。不安定化ドメインは、該タンパク質のN末端またはC末端に作動可能に連結され得る。不安定化ドメインとして、例えば、ユビキチン、PEST配列（プロリン、グルタミン酸、セリンおよびスレオニンに富んだ配列）、サイクリン破壊ボックス、アミノ酸の疎水性ストレッチ、大腸菌ジヒドロ葉酸レダクターゼ（ecDHFR）、ヒトエストロゲン受容体リガンド結合ドメイン（ERLBD）、FK506結合タンパク質（FKBP12）、およびこれらの変異体などが挙げられる。不安定化ドメインとしては、例えば、FKBP12およびその変異体などが挙げられる。不安定化ドメインとして使用されるFKBP12変異体としては、例えば、F15S、V24A、H25R、E60G、L106P、M66T、R71G、D100G、D100N、E102GおよびK105I変異体などが挙げられる（Banaszynski et al., Cell 126:995 (2006)）。不安定化ドメインは市販品を使用してもよく、例えばTAKARA Bio社（Clontech ProteoTuner™ Shield System C, #631072）より販売されている。

[0022] 「アポトーシス抑制遺伝子」としては、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、BCL2L1遺伝子（タンパク質名称：Bcl-xL）、Survivin、MCL1などが挙げられる。好ましくは、BCL2L1遺伝子である。BCL2L1遺伝子として、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などが挙げられる。

[0023] 本明細書において、ポリコーム群タンパク質をコードする遺伝子（以下、「ポリコーム遺伝子」とも称する。）は、CDKN2a（サイクリン依存性キナー

ゼ阻害2A、INK4a/ARF）を負に制御し、細胞老化を回避するために機能すると知られている遺伝子を意味する。具体的には、ポリコーム遺伝子としては、例えば、BMI1 (Polycomb complex protein BMI-1、polycomb group RING finger protein 4 (PCGF4)、RING finger protein 51 (RNF51))、Mel18 (Polycomb group RING finger protein 2)、Ring (Ring Finger Protein) 1a/b、Phc (Polyhomeotic Homolog) 1/2/3、Cbx (Chromobox) 2/4/6/7/8、Ezh2 (Enhancer Of Zeste 2 Polycomb Repressive Complex 2 Subunit)、Eed (Embryonic Ectoderm Development)、Suz12 (SUZ12 Polycomb Repressive Complex 2 Subunit)、HADC (Histone deacetylases)、Dnmt (DNA (cytosine-5)-methyltransferase) 1/3a/3bなどが挙げられるが、好ましくは、BMI1遺伝子である。BMI1遺伝子として、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などが挙げられる。

[0024] 巨核球誘導因子をコードする各遺伝子（以下、「巨核球誘導因子遺伝子」とも称する。）の由来は特に限定されないが、好ましくは哺乳動物（例：ヒト、マウス、ラット、サル、ウシ、ウマ、ブタ、イヌ等）であり、中でもヒト由来のものが好ましい。あるいは、巨核球誘導因子遺伝子として、ヒト以外の哺乳動物種におけるヒトの遺伝子のホモログも好ましい。野生型の遺伝子と塩基配列の同一性の高い（例えば、80%以上、85%以上、90%以上、91%以上、92%以上、93%以上、94%以上、95%以上、96%以上、97%以上、98%以上または99%以上の同一性を有する）遺伝子もまた好ましい。

[0025] 各巨核球誘導因子遺伝子は、薬剤応答性プロモーターの制御下に連結されていることが好ましい。薬剤応答性プロモーターとは、対応する薬剤の存在下で遺伝子を発現する、あるいは遺伝子の発現が抑制されるプロモーターである。薬剤応答性プロモーターとしては、例えば、リバースtetR（rtetR）とVP16ADとの融合タンパク質（rtTA）、またはtetRとVP16ADとの融合タンパク質（rTA）と、対応する薬剤の存在下または非存在下において結合できるTREプロモーターなどが挙げられる。かかる薬剤としては、例えば、ドキシサイクリン（Dox）、テトラサイクリンまたはそれらの誘導体（「Dox等」と略記

する）などが挙げられる。また、メタロチオネインプロモーター（対応する薬剤：重金属イオン）、ステロイド応答性プロモーター（対応する薬剤：ステロイドホルモンまたはその誘導体）も、薬剤応答性プロモーターとして挙げることができる。これらの薬剤応答性プロモーターを含むベクターを、薬剤応答性ベクターとも称する。薬剤応答性プロモーターの他にも、光応答性プロモーター（光で誘導）、ヒートショックタンパク質プロモーター（ヒートショックで誘導）などを用いてもよく、これらの薬剤や刺激により誘導されるプロモーターを、誘導性プロモーターとも称する。

[0026] 本明細書において、「血小板産生能を維持した」とは、増殖日数の経過により巨核球の血小板産生能力が低下しないことだけでなく、コントロール（具体的には、対応するUQCRを構成するタンパク質の存在量を上昇させることなく、同じ条件で培養を行った巨核球、あるいは、PRC1.1の機能を阻害することなく（一態様において、対応するPRC1.1を構成するタンパク質の存在量を低減させることなく）、同じ条件で培養を行った巨核球）と比較して、血小板産生能力が高いことも包含される。また、本明細書において、「血小板産生能」とは、巨核球を成熟期に移行させることで、胞体突起形成を介して血小板を産生できる能力を意味する。巨核球の成熟期への移行は、下述の「巨核球を成熟させる工程」により行うことができる。また、下述の実施例で行ったように、巨核球の増殖を開始してから28日目に巨核球を成熟期に移行し、その後6日間培養して回収した血小板の割合（血小板数／巨核球数）が、コントロールの血小板の割合よりも多ければ、巨核球の血小板産生能が維持されているといえる。

[0027] ユビキノール-シトクロムcレダクターゼ（UQCR）は、ミトコンドリア内膜に存在する４つの複合体のうちの１つであり、「複合体III」とも称される複合体である。ミトコンドリア内で、UQCRは、ユビキノールからシトクロムcへの電子伝達反応を触媒し、同時にプロトンをマトリックス側から細胞質側に能動輸送する。いかなる理論にも拘束されるものではないが、UQCRコアタンパク質を強制発現させることにより血小板産生効果が向上された理由の１つ

としては、ミトコンドリアのエネルギー産生能の向上を介した巨核球の増殖能の向上が推測される。よって、このような効果を発揮できるタンパク質であれば、UQCRコアタンパク質以外のUQCRを構成するいずれのタンパク質も本発明に用いることができる。UQCRを構成するタンパク質として、例えば、UQCRC1、UQCRC2、UQCRB、BCS1L、UQCRQ、CYC1、TTC19、LYRM7、UQCC2、UQCC3などが挙げられるが、好ましくはUQCRコアタンパク質（即ち、UQCRC1、UQCRC2）であり、UQCRC2がより好ましい。これらは、１種類のみ用いてもよく、複数種類用いてもよい（例えば、UQCRC1およびUQCRC2を組み合わせて用いるなど）。

[0028] ヒトUQCRC1の塩基配列およびアミノ酸配列の一例を、配列番号１（NCBIのアクセッション番号NM_003365.3のコーディング配列（CDS））および配列番号２（NCBIのアクセッション番号NP_003356.2）として示す。また、ヒトUQCRC2の塩基配列およびアミノ酸配列の一例を、配列番号３（NCBIのアクセッション番号NM_003366.4のCDS）および配列番号４（NCBIのアクセッション番号NP_003357.2）として示す。ヒトBACH1の塩基配列およびアミノ酸配列の一例を、配列番号５（NCBIのアクセッション番号NM_001186.4のCDS）および配列番号６（NCBIのアクセッション番号NP_001177.1）として示す。

[0029] PRC1.1は、ポリコーム群タンパク質による転写抑制を担う複合体の一種であり、ヒストンH2A（H2AK119）のLys119のユビキチン化を介して遺伝子発現を抑制する。PRC1.1は、遺伝子発現のエピジェネティックな制御を通じて、細胞の分化や増殖、腫瘍形成の抑制など、多岐にわたる生物学的プロセスに関与している（例えば、Nakajima-Takagi Y. et al., Elife. 12:e83004 (2023)）。PRC1.1は、主に、PCGF1（Polycomb group RING finger protein 1）、RING1A（ring finger protein 1A）またはRING1B（ring finger protein 1B）、KDM2B（lysine demethylase 2B）、SKP1（S-phase kinase-associated protein 1）およびBCORまたはBCORL1から構成される。その他、TRIM27およびUSP7（Ubiquitin-specific-processing protease）もまた、PRC1.1を構成するタンパク質として挙げることができる（Maat H., et al., iScience. 24(5

): 102435 (2021)) 。本発明の製法において、PRC1.1の機能を阻害する方法は、上記H2AK119のLys119のユビキチン化を阻害できれば特に限定されないが、例えば、PRC1.1の阻害剤と巨核球を接触させる（典型的には、該阻害剤を含む培地で巨核球を培養する）方法、PRC1.1を構成するタンパク質の少なくとも１種の存在量を低減させる方法などが挙げられる。

[0030] 本発明で用いるPRC1.1阻害剤としては、例えば、PRT4165などのRING1B阻害剤、GSK-J4、SD70、CPI-455などのKDM2B阻害剤、Lenalidomide、Pomalidomideなどの BCOR阻害剤、AUX-001、PevonedistatなどのPCGF1阻害剤が挙げられるが、これらに限定されない。これらは、１種類のみ用いてもよく、複数種類用いてもよい。

[0031] BCORは、遺伝子の一部欠損によりフレームシフトが生じることや、PCGF1との結合部位に変異が入ることなどで、PRC1.1が目的配列に集積できなくなる。他のPRC1.1を構成するタンパク質についても、ノックダウンなどによりタンパク質量を低減させることで、PRC1.1の機能を阻害し得るため、低減させる対象のタンパク質は、PCGF1、RING1A、RING1B、KDM2B、SKP1、BCOR、BCORL1、TRIM27、USP7などのいずれのPRC1.1の構成タンパク質であってもよいが、好ましくは、BCOR、BCORL1、TRIM27である。これらは、１種類のタンパク質を対象としてもよく、複数種類のタンパク質を対象としてもよい。

[0032] 下述の実施例で示される通り、本発明の製法において、さらにBAHC1を過剰発現することで、血小板産生能が向上し得る。よって、本発明の一実施態様において、本発明の製法は、巨核球において、BACH1タンパク質の存在量を上昇させる工程を含む。従って、巨核球において、BACH1タンパク質の存在量を上昇させる工程は、上述のUQCRを構成するタンパク質の少なくとも１種の存在量を上昇させる工程、および／またはPRC1.1の機能を阻害する工程と組み合わせてもよい。これらの工程を組み合わせる場合には、各工程を順次行ってもよく、同時に行ってもよい。BACH1は、転写因子の１種であり、Bach2とともに、赤血球細胞のヘム代謝を調節することにより、赤血球形成を促進することなどが報告されている（例えば、Kato H., et al., Nat Immunol. 19(10

):1059-1070（2018）。

[0033] 本発明で用いるUQCRを構成する各タンパク質、およびBACH1タンパク質は、その由来は特に限定されないが、好ましくは哺乳動物（例：ヒト、マウス、ラット、サル、ウシ、ウマ、ブタ、イヌ等）であり、中でもヒト由来のものが好ましい。また、本発明で用いるUQCRを構成する各タンパク質、およびBACH1タンパク質は、ヒト以外の哺乳動物種におけるヒト由来のもののホモログタンパク質であることも好ましい。あるいは、パラログタンパク質であってもよい。また、UQCRを構成する各タンパク質、およびBACH1タンパク質には、野生型のものだけでなく、同様の機能を有するその改変体も含まれるものとする。改変体としては、例えば、特定の野生型タンパク質のアミノ酸配列（例えば、配列番号２、４、または６で示される配列）に対して、同一性の高い（例えば、80%以上、85%以上、90%以上、91%以上、92%以上、93%以上、94%以上、95%以上、96%以上、97%以上、98%以上または99%以上の同一性）を有するタンパク質などが挙げられる。特定の野生型タンパク質のアミノ酸配列（例えば、配列番号２、４、または６で示される配列）において、１個若しくは数個（２個、３個、４個、５個、６個、７個、８個、９個または１０個）のアミノ酸が欠失、置換、挿入および／若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、野生型のものと同様の機能を有するその改変体もまた好ましい。

[0034] 本明細書において、「タンパク質の存在量を上昇させる」とは、特定のタンパク質の存在量を上昇させる工程を行う前の巨核球に存在する該タンパク質量と比較して、巨核球に存在する該タンパク質量が多い状態にすることを意味する。巨核球において、タンパク質量が多い状態を常に維持してもよく、一過的にタンパク質量が多い状態としてもよい。巨核球において、UQCRを構成するタンパク質の存在量を上昇させる方法は特に限定されないが、例えば、UQCRを構成するタンパク質をコードする核酸（DNAまたはRNA）（以下、「外因性の核酸」とも称する。）を巨核球または巨核球への分化能を有する細胞（例えば、造血前駆細胞、多能性幹細胞など）に外部から導入して該タ

ンパク質を強制発現させる方法、ゲノム編集などの手法により、プロモーターを改変することなどによりUQCRを構成するタンパク質をコードする内因性の遺伝子の発現を活性化させる方法、培地中にUQCRを構成するタンパク質を添加して、該タンパク質を細胞内へと送達する方法などが挙げられる。UQCRを構成するタンパク質、または該タンパク質をコードする核酸は、１回のみ細胞に導入してもよく、複数回細胞に導入してもよい。巨核球においてBACH1タンパク質の存在量を上昇させる方法も、同様である。

[0035] 一方で、「タンパク質の存在量を低減させる」とは、特定のタンパク質の存在量を低減させる工程を行う前の巨核球に存在する該タンパク質量と比較して、巨核球に存在する該タンパク質量が低い状態にすることを意味する。かかるタンパク質量は、典型的には、野生型の（換言すれば機能が正常な）タンパク質の量である。巨核球において、タンパク質量が低い状態を常に維持してもよく、一過的にタンパク質量が低い状態としてもよい。PRC1.1を構成するタンパク質の存在量を低減させる方法は特に限定されないが、例えば、PRC1.1を構成するタンパク質をコードするmRNAに対する、アンチセンス核酸（例：アンチセンスオリゴヌクレオチド（ASO）等）（該核酸をコードする核酸も含む）、siRNA（該siRNAをコードする核酸も含む）、ヘテロ二本鎖核酸（heteroduplex oligonucleotide; HDO）、shRNA（該shRNAをコードする核酸も含む）、miRNA（microRNA）（該miRNAをコードする核酸も含む）などを巨核球または巨核球への分化能を有する細胞に導入して、各タンパク質の発現をノックダウンさせる方法などが挙げられる。これらの核酸の巨核球への導入は、１回のみ細胞に導入してもよく、複数回細胞に導入してもよい。複数回細胞に導入してもよい。例えば、これらの核酸が細胞のゲノムに組み入れられる場合には、１回の導入であっても、継続的に細胞内で該核酸の発現が期待できる。また、ゲノム編集などの手法により、PRC1.1を構成するタンパク質の機能が欠失する変異、該タンパク質の機能が低下及び／又のタンパク質の発現量の低下を伴う変異を遺伝子に導入してもよい。かかる変異としては、例えば、ナンセンス変異、フレームシフト変異、ミスセンス変異、ス

プライシング異常を伴う変異、遺伝子調節領域（例：プロモーター、エンハンサー）の変異、ドミナントネガティブ変異などが挙げられる。

[0036] アンチセンス核酸などの、PRC1.1を構成するタンパク質の発現を抑制等するための核酸は、公知の塩基配列情報などを参酌して適宜設計することができる。ヒトBCORの塩基配列およびアミノ酸配列の一例を、配列番号７（NCBIのアクセッション番号NM_001123385.2のCDS）および配列番号８（NCBIのアクセッション番号NP_001116857.1））として示す。ヒトBCORL1の塩基配列およびアミノ酸配列の一例を、配列番号９（NCBIのアクセッション番号NM_001184772.3のCDS）および配列番号１０（NCBIのアクセッション番号NP_001171701.1）として示す。ヒトTRIM27の塩基配列およびアミノ酸配列の一例を、配列番号１１（NCBIのアクセッション番号NM_006510.5のCDS）および配列番号１２（NCBIのアクセッション番号NP_006501.1）として示す。

[0037] また、本明細書において、巨核球において、タンパク質の存在量を上昇させる、あるいはタンパク質の存在量を低減させる、には、巨核球の段階のみでタンパク質の存在量が上昇または低減させる必要はなく、巨核球への分化能を有する細胞（例えば、多能性幹細胞、造血前駆細胞）にタンパク質または該タンパク質をコードする核酸を導入しておき、巨核球への分化する前の細胞において既にタンパク質の存在量が上昇または低減されていてもよい。従って、例えば、多能性幹細胞において、特定のタンパク質（即ち、BACH1タンパク質、UQCRを構成する任意のタンパク質）の発現量を上昇させておき、その状態を維持したまま該多能性幹細胞を巨核球に分化誘導させる工程も、巨核球において、目的のタンパク質の存在量を上昇させる（あるいは低減させる）工程に含まれる。巨核球において、PRC1.1の機能を阻害する、あるいはPRC1.1を構成する任意のタンパク質の存在量を低減させる工程についても、同様である。

[0038] 外因性の核酸は、典型的には、該核酸を有する発現ベクターの形態で細胞（例：巨核球、造血前駆細胞、多能性幹細胞等）に導入される。外因性の核酸を発現するベクターとは、例えば、レトロウイルス、レンチウィルス、ア

デノウイルス、アデノ随伴ウィルス、ヘルペスウイルスおよ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，pcDNAI/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。

[0039] 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、SRαプロモーター、SV40プロモーター、LTRプロモーター、CMV（サイトメガロウイルス）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（単純ヘルペスウイ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などが挙げられる。

[0040] また、発現ベクターに使用されるプロモーターとして上述の誘導性プロモーターを用いてもよい。それにより、所望のタイミングおよび期間で、外因性の核酸を発現させることが可能となる。この他にも、Cre-loxPシステムを使用して、外因性の核酸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。これにより、外因性の核酸の発現が不要となった段階で、発現を停止させることができる。

[0041] 外因性の核酸は、トランスポゾンシステムにより細胞に導入してもよい。トランスポゾンは、進化の過程で保存されてきた、遺伝子転位を引き起こす短い遺伝子配列の総称である。トランスポゾンシステムは、遺伝子酵素（トランスポザーゼ）とその特異認識配列のペアで遺伝子転位を引き起こす。トランスポゾンシステムとして、例えば、PiggyBac™トランスポゾンシステムを用いることができる。PiggyBac™トランスポゾンシステムは、昆虫から単離さ

れたトランスポゾンを利用するものであり（Fraser MJ et al., Insect Mol Biol. 1996 May;5(2):141-51.; Wilson MH et al., Mol Ther. 2007 Jan;15(1):139-45.）、哺乳類染色体への高効率な組込みを可能にする。PiggyBac™トランスポゾンシステムは実際に遺伝子の導入に利用されている（例えばNakazawa Y, et al., J Immunother 32:826-836, 2009；Nakazawa Y et al., J Immunother 6:3-10, 2013等を参照）。本発明に適用可能なトランスポゾンシステムはPiggyBac™を利用したものに限定されるものではなく、例えば、Sleeping Beauty（Ivics Z, Hackett PB, Plasterk RH, Izsvak Z (1997) Cell 91: 501-510.）、Frog Prince（Miskey C, Izsvak Z, Plasterk RH, Ivics Z (2003) Nucleic Acids Res 31: 6873-6881.）、Tol1（Koga A, Inagaki H, Bessho Y, Hori H. Mol Gen Genet. 1995 Dec 10;249(4):400-5.；Koga A, Shimada A, Kuroki T, Hori H, Kusumi J, Kyono-Hamaguchi Y, Hamaguchi S. J Hum Genet. 2007;52(7):628-35. Epub 2007 Jun 7.）、Tol2（Koga A, Hori H, Sakaizumi M (2002) Mar Biotechnol 4: 6-11.；Johnson Hamlet MR, Yergeau DA, Kuliyev E, Takeda M, Taira M, Kawakami K, Mead PE (2006) Genesis 44: 438-445.；Choo BG, Kondrichin I, Parinov S, Emelyanov A, Go W, Toh WC, Korzh V (2006) BMC Dev Biol 6: 5.）等のトランスポゾンを利用したシステムを採用してもよい。

[0042] トランスポゾンシステムによる導入操作は常法で行えばよく、公知の文献（例えば、PiggyBac™トランスポゾンシステムについては上述のNakazawa Y, et al., J Immunother 32:826-836, 2009、Nakazawa Y et al., J Immunother 6:3-10, 2013、或いはSaha S, Nakazawa Y, Huye LE, Doherty JE, Galvan DL, Rooney CM, Wilson MH. J Vis Exp. 2012 Nov 5;(69):e4235）などを参照できる。一実施態様において、上記の遺伝子はPiggyBac™トランスポゾンシステムにより細胞中に導入される。典型的には、PiggyBac™トランスポゾンシステムではPiggyBac™トランスポザーゼをコードする遺伝子を保持したベクター（トランスポザーゼプラスミド）と、目的のタンパク質をコードする遺伝子がPiggyBac™逆向き反復配列に挟まれた構造を備えるベクター（トランスポ

ゾンプラスミド；PiggyBac™ベクター）を用意し、これら二つのベクターを標的細胞に導入する。巨核球誘導因子をコードする遺伝子も、多能性幹細胞および造血幹細胞などの細胞にトランスポゾンシステムを用いて導入してもよい。

[0043] また、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。

[0044] 外因性の核酸の細胞への導入には、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、ヌクレオフェクション法、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および遺伝子銃法など、各種手法を利用できる。外因性の核酸がウィルスベクターに含まれる場合、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細胞と接触させ感染させることによって、細胞への導入が可能となる。

[0045] タンパク質を細胞に送達する場合には、公知の細胞へのタンパク質導入方法を用いて実施することができる。そのような方法としては、例えば、タンパク質導入試薬を用いる方法、タンパク質導入ドメイン（PTD）若しくは細胞透過性ペプチド（CPP）融合タンパク質を用いる方法、マイクロインジェクション法等が挙げられる。タンパク質導入試薬としては、カチオン性脂質をベースとしたBioPOTER Protein Delivery Reagent（Gene Therapy Systems）、Pro-JectTM Protein Transfection Reagent（PIERCE）およびProVectin（IMGENEX）、脂質をベースとしたProfect-1（Targeting Systems）、膜透過性ペプチドをベースとしたPenetrain Peptide（Q biogene）およびChariot Kit（Active Motif）、HVJエンベロープ（不活化センダイウイルス）を利用したGenomONE（石原産業）等が市販されている。導入はこれらの試薬に添付のプロ

トコルに従って行うことができる。

[0046] 一態様において、巨核球は、MYCタンパク質（特に、c-MYC）およびアポトーシス抑制タンパク質（特に、Bcl-xL）の存在量を上昇させる（好ましくは、さらにポリコーム群タンパク質（特に、BMI1）の存在量を上昇させる）ことで、増殖を開始することが可能である。よって、本発明の好ましい態様において、本発明の製法は、巨核球を、MYCタンパク質およびアポトーシス抑制タンパク質の存在量を上昇させる（好ましくは、さらにポリコーム群タンパク質の存在量を上昇させる）工程を含む。巨核球において、これらのタンパク質の存在量を上昇させる方法は特に限定されないが、例えば、タンパク質をコードする核酸の発現レベルを上昇させる方法や、培地中にタンパク質を添加して、細胞内へと送達する方法などが挙げられる。タンパク質をコードする遺伝子の発現レベルを上昇させる方法として、具体的には、例えば、タンパク質をコードする外因性の核酸（DNAまたはRNA）を巨核球に導入する方法や、上述の誘導性プロモーターを用いて、対応する薬剤または刺激の存在下で巨核球を培養する方法などが挙げられる。

[0047] 本発明の製法における培養は、浮遊培養であっても接着培養であってもよいが、典型的には、浮遊培養である。また、生体から単離した巨核球は、接着培養により培養し得る。本発明の製法により、血小板産生能を維持した巨核球を長期間に亘って増殖させることができるため、培養期間について特に制限はないが、典型的には6日間以上であり、12日間以上、18日間以上、24日間以上、30日間以上、36日間以上、42日間以上、48日間以上、54日間以上、または60日間以上であってもよい。

[0048] また、巨核球において、UQCRを構成するタンパク質の少なくとも１種の存在量が上昇した状態を維持する期間、およびBACH1タンパク質の存在量が上昇した状態を維持する期間、およびPRC1.1の機能を阻害する期間は特に限定されず、巨核球を増殖させる期間のみでもよいが、巨核球を成熟させる期間においても継続してもよい。かかる期間としては、典型的には6日間以上であり、12日間以上、18日間以上、24日間以上、30日間以上、36日間以上、42日間

以上、48日間以上、54日間以上、または60日間以上であってもよい。一方で、効率的な成熟の観点からは、巨核球において、巨核球誘導因子（特に、MYCタンパク質）の存在量が上昇した状態を維持する期間は、巨核球を増殖させる期間のみであることが好ましい。

[0049] 本明細書において、「浮遊培養」とは、細胞または細胞の凝集体が培養液に浮遊して存在する状態を維持する条件で行われる培養、即ち細胞または細胞の凝集体と培養容器との間に強固な細胞－基質間結合（cell-substratum junction）を作らせない条件での培養を意味する。浮遊培養は、静置培養であってもよく、振盪培養であってもよく、振盪培養の場合には、細胞が一箇所に固定されない条件であれば、浮遊培養といえる。

[0050] 浮遊培養に用いる培養器としては、特に限定されないが、例えば、フラスコ、組織培養用フラスコ、ディッシュ、ペトリデッシュ、組織培養用ディッシュ、マルチディッシュ、マイクロプレート、マイクロウェルプレート、マイクロポア、マルチプレート、マルチウェルプレート、チャンバースライド、シャーレ、チューブ、トレイ、培養バック、ローラーボトルなどが挙げられるが、下述する振盪培養（「撹拌培養」とも称する。）のためには密封されている培養器であることが好ましい。そのような培養器としては、組織培養用フラスコ、培養バック、ローラーボトルなどが挙げられる。また、非接着性の条件下での培養を可能とするため、培養器は、細胞非接着性であることが好ましい。細胞非接着性の培養容器としては、培養容器の表面が、細胞との接着性を向上させる目的で人工的に処理（例：細胞外マトリクス等によるコーティング処理）されていないもの、または人工的に接着を抑制する処理（例えば、ポリヒドロキシエチルメタクリル酸（poly-HEMA）によるコーティング処理）したものなどが使用できる。

[0051] 本発明で用いる巨核球は、公知の方法により得ることができる。例えば、生体組織（例：骨髄、臍帯血、末梢血等）から、公知の手法により単離する方法、多能性幹細胞または造血前駆細胞を分化誘導する方法、ATCCなどの企業から入手する方法などが挙げられる。生体組織からは、例えば、表現抗原

を指標にして、フローサイトメトリーまたはマスサイトメトリーを用いた方法、磁気細胞分離法、所望の抗原を固定化したアフィニティカラム等を用いて巨核球を単離することができる。本発明で用いる巨核球は、造血前駆細胞を分化誘導する方法により得ることが好ましい。よって、本発明の製法は、血小板産生能を維持した巨核球の製造に先立ち、多能性幹細胞または造血前駆細胞から巨核球を製造する（「分化誘導」とも換言できる）工程（以下、「巨核球製造工程」とも称する。）を含んでいてもよい。造血前駆細胞は、例えば、生体組織（例：骨髄、臍帯血、末梢血等）から単離する方法、多能性幹細胞から分化誘導する方法などにより得ることができる。

[0052] 巨核球製造工程は、特に制限されず、公知の誘導方法により実施できる。具体例として、巨核球の製造は、例えば、国際公開第２０１１／０３４０７３号、国際公開２０１２／１５７５８６号等に記載された方法などを用いて行うことができる。一実施態様において、巨核球製造工程は、工程（Ａ）多能性幹細胞を培養して造血前駆細胞を製造（「分化誘導」とも換言できる。）する工程、および／または工程（Ｂ）造血前駆細胞を培養して巨核球を製造する工程を含む。

[0053] 工程（Ａ）の多能性幹細胞から造血前駆細胞への分化方法としては、造血前駆細胞へ分化できる限り特に制限されないが、例えば、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またはiPS－sacとも称する）から調製する方法などが挙げられる。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、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.）などが例示される。さらに、例えば、

国際公開第2013／075222号、国際公開第2016/076415号、国際公開第2017/221975号、Liu S. et al., Cytotherapy, 17 (2015);344-358などに記載されている方法なども挙げられる。

[0054] 「多能性幹細胞（pluripotent stem cell）」とは、生体の種々の異なった形態や機能を持つ組織や細胞に分化でき、三胚葉（内胚葉、中胚葉、外胚葉）のどの系統の細胞にも分化し得る能力を有する幹細胞を指す。本発明で用いる多能性幹細胞としては、例えば、人工多能性幹細胞（induced pluripotent stem cell：iPS細胞）、胚性幹細胞（embryonic stem cell：ES細胞）、核移植により得られるクローン胚由来の胚性幹細胞（nuclear transfer Embryonic stem cell：ntES細胞）、多能性生殖幹細胞（multipotent germline stem cell）（「mGS細胞」）、胚性生殖幹細胞（EG細胞）などが挙げられるが、好ましくはiPS細胞(より好ましくはヒトiPS細胞)である。上記多能性幹細胞がES細胞またはヒト胚に由来する任意の細胞である場合、その細胞は胚を破壊して作製された細胞であっても、胚を破壊することなく作製された細胞であってもよいが、倫理的な観点からは、好ましくは、胚を破壊することなく作製された細胞である。

[0055] 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、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）。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。あるいは、ES細胞は、胚盤胞期以前の卵割期の胚の単一割球のみを用いて樹立することもできるし（Chung Y. et al. (2008), Cell Stem Cell 2: 113-1

17）、発生停止した胚を用いて樹立することもできる（Zhang X. et al. (2006), Stem Cells 24: 2669-2676.）。

[0056] 本発明で用いるES細胞株としては、マウスES細胞であれば、例えば、inGenious targeting laboratory社、理研（理化学研究所）等が樹立した各種マウスES細胞株が利用可能であり、ヒトES細胞株であれば、例えば、ウィスコンシン大学、NIH、理研、京都大学、国立成育医療研究センターおよびCellartis社などが樹立した各種ヒトES細胞株が利用可能である。具体的には、例えば、ヒトES細胞株としては、ESI Bio社が分譲するCHB-1～CHB-12株、RUES1株、RUES2株、HUES1～HUES28株等、WiCell Researchが分譲するH1株、H9株等、理研が分譲するKhES-1株、KhES-2株、KhES-3株、KhES-4株、KhES-5株、SSES1株、SSES2株、SSES3株などが挙げられる。

[0057] iPS細胞は、哺乳動物体細胞または未分化幹細胞に、特定の因子（核初期化因子）を導入して再プログラミングすることにより得られる細胞である。現在、iPS細胞にはさまざまなものがあり、山中らにより、マウス線維芽細胞にOct3/4・Sox2・Klf4・c-Mycの４因子を導入することにより、樹立されたiPSC（Takahashi K, Yamanaka S., Cell, (2006) 126: 663-676）のほか、同様の４因子をヒト線維芽細胞に導入して樹立されたヒト細胞由来のiPSC（Takahashi K, Yamanaka S., et al. Cell, (2007) 131: 861-872.）、上記４因子導入後、Nanogの発現を指標として選別し、樹立したNanog-iPSC（Okita, K., Ichisaka, T., and Yamanaka, S. (2007). Nature 448, 313-317.）、c-Mycを含まない方法で作製されたiPSC（Nakagawa M, Yamanaka S., et al. Nature Biotechnology, (2008) 26, 101 - 106）、ウイルスフリー法で6因子を導入して樹立されたiPSC（Okita K et al. Nat. Methods 2011 May;8(5):409-12, Okita K et al. Stem Cells. 31(3):458-66.）等も用いることができる。また、Thomsonらにより作製されたOCT3/4・SOX2・NANOG・LIN28の４因子を導入して樹立された人工多能性幹細胞（Yu J., Thomson JA. et al., Science (2007) 318: 1917-1920.）、Daleyらにより作製された人工多能性幹細胞（Park IH, Daley GQ. et al., Nature (2007) 451: 141-146）、桜田らにより作製

された人工多能性幹細胞（特開2008-307007号）等も用いることができる。

このほか、公開されているすべての論文（例えば、Shi Y., Ding S., et al., Cell Stem Cell, (2008) Vol3, Issue 5,568-574；、Kim JB., Scholer HR., et al., Nature, (2008) 454, 646-650；Huangfu D., Melton, DA., et al., Nature Biotechnology, (2008) 26, No 7, 795-797）、あるいは特許公報（例えば、特開2008-307007号、特開2008-283972号、US2008-2336610、US2009-047263、WO2007-069666、WO2008-118220、WO2008-124133、WO2008-151058、WO2009-006930、WO2009-006997、WO2009-007852）に記載されている当該分野で公知の人工多能性幹細胞のいずれも用いることができる。

[0058] 人工多能性幹細胞株としては、NIH、理研、京都大学、京都大学iPS細胞研究財団等が樹立した各種iPS細胞株が利用可能である。例えば、ヒトiPS細胞株であれば、理研のHiPS-RIKEN-1A株、HiPS-RIKEN-2A株、HiPS-RIKEN-12A株、Nips-B2株等、京都大学の253G1株、253G4株、1201C1株、1205D1株、1210B2株、1383D2株、1383D6株、201B7株、409B2株、454E2株、606A1株、610B1株、648A1株、1231A3株、TkDN-sev2株等、京都大学iPS細胞研究財団が樹立したFfI-01s04株、Ff-MH23s01株、15M41株（Ff-I 01s01株）、QHJI14s04株等が挙げられる。上記以外で樹立されたヒトiPS細胞株を用いることもでき、例としてRONZA社のTC-1133株等が挙げられる。また、PRC1.1を構成する各タンパク質（特にBCOR）に変異を有し、PRC1.1の機能が低減したiPS細胞株も好ましい。

さらに、iPS細胞株に対して遺伝子改変を行った細胞株、例えば、抗原性を低減させるための遺伝子破壊または改変を行った細胞株も好適に用いることができる。このようなiPS細胞株の例としては、京都大学iPS細胞研究財団が樹立したQHJI 14s04-AB II-KO-03、QHJI14s04-AB II-KO-11、QHJI14s04-AB II-KO-12株等、ヘリオス社が樹立したユニバーサルドナーセル等が挙げられる。

[0059] 本発明で用いる人工多能性幹細胞は、遺伝性疾患（例えば、遺伝性の血液疾患患者など）の患者由来の細胞であってもよい。遺伝性疾患の血液疾患患者由来の多能性幹細胞から分化誘導させた細胞は、該疾患の病態を反映する

疾患モデルとなり得るため、該疾患の治療または予防薬のスクリーニングなどに適している。あるいは、遺伝性疾患の血液疾患患者由来の多能性幹細胞に対して、CRISPR-Casシステムなどを用いたゲノム編集により遺伝子を修復した上で目的の細胞へと分化させることで、該細胞を該疾患の治療薬として用いることも可能となる。

[0060] 多能性幹細胞の由来種も特に限定されず、例えば、ラット、マウス、ハムスター、モルモット等のげっ歯類、ウサギ等のウサギ目、ブタ、ウシ、ヤギ、ヒツジ等の有蹄目、イヌ、ネコ等のネコ目、ヒト、サル、アカゲザル、マーモセット、オランウータン、チンパンジーなどの霊長類などの細胞であってよい。好ましい由来種は、ヒトである。

[0061] 本明細書において、「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への分化能を有する細胞を意味する。本明細書において、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。造血前駆細胞は、典型的には、CD34遺伝子および/またはCD43遺伝子を発現する細胞である。

[0062] 工程（Ａ）の培養期間については、当業者であれば造血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。造血前駆細胞が得られる限り、日数は特に限定されないが、典型的には、6日間以上であり、7日間以上、8日間以上、9日間以上、10日間以上、11日間以上、12日間以上、13日間以上、14日間以上（特に、14日間）であることが好ましい。培養期間が長いことについては、造血前駆細胞の製造においては問題とされないが、典型的には30日間以下であり、20日間以下であってもよい。

[0063] 工程（Ｂ）も、公知の方法（例えば、特許文献１～４）に記載の方法により行うことができる。具体的には、アポトーシス抑制遺伝子（例えば、BCL2L1遺伝子）およびMYC遺伝子（例えば、c-MYC遺伝子）を造血前駆細胞において同時に強制発現させて該細胞を培養する方法などが挙げられる。

[0064] 工程（Ｂ）の培養期間については、当業者であれば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。巨核球が得られる限り、日

数は特に限定されないが、典型的には、5日間以上であり、好ましくは6日間以上であり、より好ましくは7日間以上である。培養の上限も特に限定されないが、典型的には20日間であり、好ましくは17日間以下であり、より好ましくは14日間以下である。

[0065] 本発明の一態様において、本発明の製法の任意の工程（例えば、巨核球製造工程）は、ピリミドインドール誘導体の存在下で行われる。ピリミドインドール誘導体としては、例えば、UM171（(1r,4r)-N1-(2-ベンジル-7-(2-メチル-2H-テトラゾール-5-イル)-9H-ピリミド[4,5-b]インドール-4-イル)シクロヘキサン-1,4-ジアミン）、UM729（メチル4-(3-(1-ピペリジル)プロピルアミノ)-9H-ピリミド[4,5-b]インドール-7-カルボキシラート）などが挙げられる。ピリミドインドール誘導体として、ピリミド[4,5-b]インドール誘導体が好ましく、UM171またはUM729がより好ましい。ピリミドインドール誘導体は、１種類のみ用いてもよく、複数種類用いてもよい。

[0066] ピリミドインドール誘導体の濃度は、使用するピリミドインドール誘導体に応じて当業者が適宜選択可能である。ピリミドインドール誘導体がUM729である場合、その培地中での濃度は、典型的には1nM～100μMであり、好ましくは10nM～100μMであり、より好ましくは100nM～10μM（一態様において、1μM）である。

[0067] ピリミドインドール誘導体は、造血前駆細胞を培養する際に培地中に添加されてもよく、多能性幹細胞または多能性幹細胞から造血前駆細胞に至る分化段階のいずれかの細胞の培養時に培地中に添加されてもよい。例えば、多能性幹細胞または多能性幹細胞から造血前駆細胞に至る分化段階のいずれかの細胞は、ピリミドインドール誘導体を含む培地中で培養され得る。

[0068] 本発明の製法の任意の工程（例えば、巨核球製造工程、巨核球増殖工程）は、HDAC（ヒストン脱アセチル化酵素）5阻害剤および／またはLSD1阻害剤の存在下で行われてもよい。よって、一態様において、本発明の製法は、HDAC5阻害剤および／またはLSD1阻害剤を含む培地（好ましくは、HDAC5阻害剤（例：LMK235）とLSD1阻害剤（例：トラニルシプロミン）を両方含む培地）で巨

核球を培養する工程を含む。別の態様において、本発明は、造血前駆細胞を、HDAC5阻害剤および／またはLSD1阻害剤を含む培地中で培養する工程を含む、巨核球の製造方法も提供する。

[0069] 本発明で用いるHDAC5阻害剤は、HDAC5特異的な阻害剤に限らず、他の分子（典型的には、他のHDAC）に対する阻害活性を有していてもよい。HDAC5阻害剤として、例えば、LMK235、TMP195、Quisinostat (JNJ-26481585) 2HCl、CUDC-101、Pracinostat (SB939)、TMP269、Domatinostat (4SC-202)などが挙げられるが、好ましくはLMK235およびTMP195であり、LMK235がより好ましい。また、HDAC5に対する抗体、ペプチドまたはアプタマーもまた好ましい。あるいは、HDAC5阻害剤は、HDAC5の発現を抑制する、アンチセンス核酸、siRNA、shRNA、ヘテロ二本鎖核酸などのHDAC5の発現抑制剤であってもよい。HDAC5阻害剤は、１種類のみ用いてもよく、複数種類用いてもよい。また、HDAC5阻害剤とピリミドインドール誘導体とを組み合わせることも好ましい。

[0070] HDAC5阻害剤の濃度は、使用するHDAC5阻害剤に応じて当業者が適宜選択可能である。HDAC5阻害剤がLMK235である場合、その培地中での濃度は、典型的には、1nM～100μMであり、好ましくは10nM～100μMであり、より好ましくは20nM～1μM（一態様において、50nM～200nM）である。

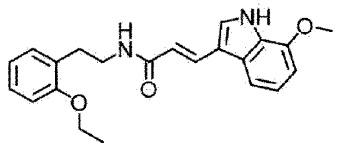
[0071] LSD1阻害剤は、LSD1の酵素活性（即ち、ヒストンH3K4me1/2およびH3K9me1/2の脱メチル化活性）を阻害できるものであれば特に限定されないが、例えば、トラニルシプロミン（TCP）、ORY-1001（Iadademstat）、GSK2879552、IMG-7289（Bomedemstat）、SP-2509、HCI-2509、RN-1、MC3324、SP-2577（Seclidemstat）、Corinなどが挙げられるが、好ましくはトラニルシプロミンである。また、LSD1に対する抗体、ペプチドまたはアプタマーもまた好ましい。あるいは、LSD1阻害剤は、LSD1の発現を抑制する、アンチセンス核酸、siRNA、shRNA、ヘテロ二本鎖核酸などのLSD1の発現抑制剤であってもよい。LSD1阻害剤は、１種類のみ用いてもよく、複数種類用いてもよい。また、LSD1阻害剤とピリミドインドール誘導体とを組み合わせることも好ましい。

[0072] LSD1阻害剤の濃度は、使用するLSD1阻害剤に応じて当業者が適宜選択可能

である。LSD1阻害剤がトラニルシプロミンである場合、その培地中での濃度は、典型的には、5nM～500μMであり、好ましくは50nM～500μMであり、より好ましくは500nM～5μM（一態様において、1μM）である。

[0073] 下述の実施例で示される通り、骨髄内での現象に着想を得て、脂肪分化誘導因子の存在下で巨核球を培養したところ、血小板産生能を促進することに成功した。したがって、本発明の製法の任意の工程（例えば、巨核球製造工程）は、脂肪分化誘導因子の存在下で行われてもよい。脂肪分化誘導因子としては、例えば、インスリン、3-イソブチル-1-メチルキサンチン（IBMX）、デキサメタゾン、インドメタシンなどが挙げられる。一態様において、本発明の製法は、デキサメタゾン、IBMXおよびインスリンを含む培地で巨核球を培養する工程を含む。また、巨核球製造工程で用いる培地は、JI051を含むことも好ましい。一実施態様において、巨核球製造工程で用いる培地には、デキサメタゾン、IBMX、インスリンおよびJI051が含まれる。JI051の構造式を以下に示す。

[0074] [化2]



[0075] また、造血前駆細胞においてTP53遺伝子（タンパク質名称：p53）および／またはCDKN1A遺伝子（タンパク質名称：p21）の発現またはその発現産物の機能が抑制してもよい。TP53遺伝子として、例えば、NCBIのアクセッション番号NM_000546.6で示される核酸配列からなる遺伝子が挙げられる。CDKN1A遺伝子として、例えば、NCBIのアクセッション番号NM_001291549.3で示される核酸配列からなる遺伝子などが挙げられる。これらの遺伝子由来は特に限定されないが、好ましくは哺乳動物（例：ヒト、マウス、ラット、サル、ウシ、ウマ、ブタ、イヌ等）であり、中でもヒト由来のものが好ましい。また、一態様において、これらの遺伝子は、ヒトの遺伝子であるか、他の哺乳動物種におけるヒトの遺伝子のホモログである。野生型の遺伝子と塩基配列の同一

性の高い（例えば、80%以上、85%以上、90%以上、91%以上、92%以上、93%以上、94%以上、95%以上、96%以上、97%以上、98%以上または99%以上の同一性を有する）遺伝子も好ましい。

[0076] 本発明の巨核球は、血小板産生能力が維持されているため、血小板製造のための出発細胞として適している。従って、別の態様において、本発明の巨核球を成熟させる工程を含む、血小板の製造方法（以下、「本発明の血小板の製法」と称することがある。）が提供される。

[0077] 本発明の血小板の製法は、公知の方法により行うことができる。例えば、巨核球が、巨核球誘導因子が強制発現されている場合に、巨核球誘導因子の１つ以上（好ましくは、少なくともMYC遺伝子）または全ての強制発現を低減または停止させるさせることで、巨核球を成熟させることができる。例えば、巨核球誘導因子を、薬剤を用いて強制発現させている場合には、該薬剤の非存在下で巨核球を培養することで、強制発現を低減または停止させることできる。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。

[0078] 本発明の血小板の製法で用いる培地には、ADAM17阻害剤、AhR（アリール炭化水素受容体）阻害剤およびROCK阻害剤のいずれか１種（好ましくは全種）含まれていることも好適な態様である。ADAM17阻害剤としては、例えば、KP-457、DPC333、GW280264X、Aderbasib、TMI-1、JG26などが挙げられるが、好ましくはKP-457である。AhR阻害剤としては、例えば、ステムレゲニン1(SR-1)、SR-1類似体(例：US2014/0369973に記載のもの等)、スチルベン誘導体（例：(E)-1-(4'-トリフルオロメチルフェニル)-2-(3,5-ジトリフルオロメチルフェニル)-エテン、(E)-1-(4'-メトキシフェニル)-2-(3,5-ジクロロフェニル)-エテン、(E)-1-(4'-クロロフェニル)-2-(3,5-ジクロロフェニル)-エテン、3,5,4'-トリヒドロキシスチルベン等）、CH-223191などが挙げられるが、好ましくはSR-1である。ROCK阻害剤としては、例えば、Y-27632（例、Ishizaki e

t al., Mol. Pharmacol. 57, 976-983 (2000)；Narumiya et al., Methods Enzymol. 325,273-284 (2000)参照）、ファスジル/HA1077（例、Uenata et al., Nature 389: 990-994 (1997)参照）、SR3677（例、Feng Y et al., J Med Chem. 51: 6642-6645(2008)参照）、GSK269962（例、Stavenger RA et al., J Med Chem. 50: 2-5 (2007)またはWO2005/037197参照）、GSK429286A、H1152（例、Sasaki et al., Pharmacol. Ther. 93: 225-232 (2002)参照）、Wf-536（例、Nakajima et al., Cancer Chemother Pharmacol. 52(4): 319-324 (2003)参照）、チアゾビビンおよびそれらの誘導体などが挙げられるが、Y-27632が好ましい。

[0079] 本発明の血小板の製法で用いる培地には、上述の脂肪分化誘導因子および／またはJI051が含まれていてもよい。一態様において、本発明の血小板の製法で用いる培地には、JI051が含まれる。具体的な化合物の種類などは、本発明の製法での記載が全て援用される。

[0080] 本発明の血小板の製法により製造された成熟巨核球は、CD34陽性CD41陽性細胞であり得る。本方法により製造された成熟巨核球はまた、CD38陰性、CD90陽性、および／またはCD49f陽性であり得る。

[0081] 本発明の血小板の製法のおける培養期間は、血小板の機能が維持される限り特に限定されないが、例えば2日間～9日間（一態様において、6日間）である。

[0082] 本発明の血小板の製法における培養は、典型的には浮遊培養である。また、培養は、振盪しながら行うことが好ましい。よって、一態様において、本発明の血小板の製法は、振盪培養工程を含む。振盪培養は、例えば市販の回転式振盪培養機（例：VerMES リアクター（佐竹マルチミクス社製）等）などを用いて、撹拌翼の旋回運動により培養液を撹拌することで実施され得る。攪拌速度は、50～200rpmであり得、例えば約100rpmである。

[0083] 本発明の血小板の製法における振盪培養は、特許文献５に記載の装置および方法を用いて実施されてもよい。具体的には、例えば、撹拌翼を用いて培養容器内の培地を撹拌する工程を含み、該撹拌する工程が、以下：

（ａ）約0.0005m2/s2～約0.02m2/s2の乱流エネルギー；

（ｂ）約0.2Pa～約6.0Paの剪断応力；および

（ｃ）約100μm～約600μmのコルモゴロフスケール

から選択される１以上の指標を充足するように、前記撹拌翼を往復動させることを含む、方法などが挙げられる。

[0084] また、培養装置として、具体的には、例えば、巨核球を含む培地を収容する容器と、前記容器内を往復動する撹拌翼とを備え、前記培地中にて以下：

（ａ）約0.0005m^2/s^2～約0.02m^2/s^2の乱流エネルギー；

（ｂ）約0.2Pa～約6.0Paの剪断応力；および

（ｃ）約100μm～約600μmのコルモゴロフスケール

から選択される１以上の指標を充足するように前記撹拌翼を往復動させることによって前記培地を撹拌した状態で、巨核球から血小板を産生する血小板の製造装置などが挙げられる。

[0085] 撹拌対象物である容器内の培地における乱流エネルギー、剪断応力、およびコルモゴロフスケールは、乱流の基本方程式に基づき、シミュレーションにより算出することができる。例えば、熱流体解析ソフトFLUENT（ANSYS社製）を用いて計算することができるが、特定のソフトウエアには限定されない。より具体的には、乱流エネルギーは、撹拌翼を往復動させるように構成する場合には、撹拌翼翼の往復動のストローク、往復動の速度、往復動の周波数等により変化する。複数の撹拌翼を用いて構成される場合には、撹拌翼の数も、変化を生じさせる一要素となり得る。剪断応力およびコルモゴロフスケールも、同様の要素の変更により変化する。

[0086] 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、αMEM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。TPOに代えて、TA-316 ((2E)-2-[1-[5-(4-Bromophenyl)-4-hydroxy-3-thienyl]ethylidene]hydrazide-5-[[[[4-[[(2-hydroxyethyl)amino]carbonyl]phenyl]methyl]amino]carbonyl]-2-thiophenecarboxylic Acid) を用いることも好ましい。一実施態様において、本発明の製法で用いる培地は、SCFおよびTA-316を含む培地である。また、一実施態様において、本発明の血小板の製法で用いる培地は、SCF、TA-316、SR-1、KP-457およびY27632を含む培地である。また、巨核球が薬剤応答性のプロモーター有する場合、該プロモーター下の遺伝子を発現させる際には、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好ましい。

[0087] 本発明において、細胞の培養条件は、特に制限されず、通常の培養条件を採用できる。具体例として、培養温度は、例えば、約35～約42℃、約36～約40℃、約37～約39℃である。CO_2濃度は、例えば、約5～約15％である。O_2濃度は、例えば、約15～約25％である。

[0088] 本発明の製法および本発明の血小板の製法の各工程において、フィーダーフリー条件下および／またはゼノフリー条件下で細胞を培養してもよい。本発明の製法および血小板の製法では、全行程をフィーダーフリーかつゼノフリー条件下で行ってもよい。本明細書において、「フィーダーフリー」とは、培養対象の細胞の培養条件を整えるために用いる、補助役を果たす他の細胞種（即ち、フィーダー細胞）を含まない培地または培養条件を意味する。また、「ゼノフリー」とは、培養対象の細胞の生物種とは異なる生物由来の成分を含まない培地または培養条件を意味する。

[0089] 本発明の製法および本発明の血小板の製法の各工程における細胞の播種密度は、細胞が増殖できる限り特に限定されない。典型的には1.0×10^{2}～1.0×10^{7}細胞/cm^{2}、好ましくは1.0×10^{3}～1.0×10^{6}細胞/cm^{2}、より好ましくは1.0×10^{4}～1.0×10^{5}細胞/cm^{2}である。

[0090] 本発明で用いる物質が、低分子化合物の場合には、該化合物には、フリー体だけでなく、その薬理学的に許容される塩および水和物も包含されるものとする。薬理学的に許容される塩は化合物の種類によって異なるが、例えば、アルカリ金属塩（ナトリウム塩、カリウム塩等）、アルカリ土類金属塩（カルシウム塩、マグネシウム塩等）、アルミニウム塩、アンモニウム塩等の無機塩基塩、並びにトリメチルアミン、トリエチルアミン、ピリジン、ピコリン、エタノールアミン、ジエタノールアミン、トリエタノールアミン、ジシクロヘキシルアミン、N, N’-ジベンジルエチレンジアミン等の有機塩基塩などの塩基付加塩、あるいは塩酸塩、臭化水素酸塩、硫酸塩、ヨウ化水素酸塩、硝酸塩、リン酸塩等の無機酸塩、クエン酸塩、シュウ酸塩、酢酸塩、ギ酸塩、プロピオン酸塩、安息香酸塩、トリフルオロ酢酸塩、マレイン酸塩、酒石酸塩、メタンスルホン酸塩、ベンゼンスルホン酸塩、パラトルエンスルホン酸塩等の有機酸塩などの酸付加塩が挙げられる。

[0091] 本発明で用いる各物質は、公知の方法により合成してもよく、市販品を用いてもよい。また、タンパク質またはペプチドを用いる場合には、該タンパク質またはペプチドは、これを発現する細胞から得られたものであってもよい。目的のタンパク質またはペプチドをコードするDNAを公知の発現ベクターに挿入し、得られた発現ベクターを適切な宿主細胞に導入することにより、目的のタンパク質またはペプチドを発現する細胞を作製することができる。

[0092] 本発明の製法および本発明の血小板の製法において、各工程で得られた目的の細胞または組織を回収する工程を含んでいてもよい。回収した細胞は、細胞凍結保存液を用いて凍結保存してもよい。また、得られた各細胞は、セルカンターにてセルカウントを行ってもよく、細胞の表面マーカーに対する抗体により標識し、フローサイトメトリーやマスサイトメトリー、磁気細胞

分離法などにより選別や純化してもよい。

[0093] さらに別の態様において、巨核球において、ユビキノール-シトクロムcレダクターゼ（UQCR）を構成するタンパク質の少なくとも１種の存在量を上昇させる工程を含む、巨核球の血小板産生能を維持する方法も提供される。この方法に関して、本発明の製法について記載した事項が全て援用されるものとする。

[0094] ２．巨核球および血小板

本発明の別の態様において、本発明の製法および本発明の血小板の製法で得られる（「得られる」は、適宜「得られた」と読み替えることができる。）巨核球（以下、「本発明の巨核球」とも称することがある。）および血小板（以下、「本発明の血小板」と称することがある。）が提供される。以下では、本発明の巨核球と血小板を総称して「本発明の細胞」との用語を用いることがある。

[0095] 本発明の巨核球は、典型的には、下記の特徴（Ａ）～（Ｃ）を全て有する。

（Ａ）外因性のUQCRを構成するタンパク質の少なくとも１種を有する

（Ｂ）血小板産生能を有する

（Ｃ）CD34遺伝子およびCD41遺伝子を発現する

[0096] また、本発明の巨核球は、さらに、下記の特徴（Ｄ）～（Ｆ）のいずれか１つ、２つまたは３つを有する。

（Ｄ）多能性幹細胞由来である

（Ｅ）外因性の巨核球誘導因子を有する

（Ｆ）TP53遺伝子および／またはCDKN1A遺伝子に対する発現抑制剤を有する

[0097] 別の態様において、本発明により、上記特徴（Ａ）～（Ｃ）を全て有する巨核球も提供される。また、さらに上記の特徴（Ｄ）～（Ｆ）の少なくともいずれか１つ、２つまたは３つ有する巨核球も提供される。かかる巨核球は、本発明の製法により得られるものであってもよく、別の方法により得られ

るものであってもよい。以下では、前記巨核球も、「本発明の巨核球」と称することがある。

[0098] 本明細書において、「外因性」とは、哺乳動物の生体内に存在する巨核球には、外部から導入しない限り存在しないことを意味する。また、本明細書において、遺伝子を「発現する」または「陽性」とは、特に断らない限り、遺伝子にコードされたタンパク質が産生されることを意味する。したがって、目的のタンパク質が下述の実施例で用いられたFACSにより検出された場合には、遺伝子が発現しているといえる。

[0099] 上記特徴（Ａ）において、外因性のUQCRを構成するタンパク質の少なくとも１種は、UQCRコアタンパク質であることが好ましく、特にUQCRC2が好ましい。上記特徴（Ｂ）の「血小板産生能を有する」とは、巨核球を成熟期に移行させることで血小板産生が認められることを意味する。成熟期に移行させる方法は限定されず、少なくとも１つの方法により血小板産生が確認されれば、巨核球は「血小板産生能を有する」といえる。上記特徴（Ｃ）において、巨核球誘導因子の少なくとも１つを有していればよいが、MYCタンパク質（特に、c-MYC）とアポトーシス抑制タンパク質（特に、Bcl-xL）とを有するか、MYCタンパク質（特に、c-MYC）とアポトーシス抑制タンパク質（特に、Bcl-xL）とポリコーム群タンパク質（特に、BMI1）とを有することが好ましい。上記特性（Ｆ）の発現抑制剤としては、例えば、TP53遺伝子および／またはCDKN1A遺伝子の転写産物に対するアンチセンス核酸、siRNA、shRNA、ヘテロ二本鎖核酸などが挙げられる。

[0100] ３．巨核球および血小板の用途

本発明の細胞は、輸血などの医療に用いることができるため、別の態様において、本発明の細胞を含む、血液製剤（以下、「本発明の血液製剤」と称することがある。）が提供される。本明細書において、血液製剤は、巨核球、血小板などの血液細胞を含む組成物を意味する。本発明の巨核球は、例えば、生体内に投与または移植することで、生体内における機能性血小板を産生させるために用いることができる。また、本発明の血小板は、例えば、血

小板減少または血小板機能異常による出血予防のため、出血の治療のため、または血液疾患の治療のために用いることができる。また、本発明の細胞の有効量を、治療または予防の対象とする哺乳動物（例：ヒト、マウス、ラット、サル、ウシ、ウマ、ブタ、イヌ等）に投与または移植する、血液疾患または出血の治療または予防方法も、本発明に包含される。本明細書において、特に断らない限り、疾患の治療または予防薬（あるいは治療または予防方法）には、該疾患を治療でき、かつ予防できる医薬（あるいは方法）も包含される。

[0101] 治療または予防の対象となる血液疾患としては、例えば、血小板減少症、血小板機能異常症などが挙げられる。血小板減少症の原因としては、例えば、骨髄不全による汎血球減少、血小板破壊による血小板寿命の低下に起因する血小板減少、血小板消費の亢進による血小板減少、薬剤性血小板減少、体内臓器での血小板分布異常による血小板減少などが挙げられる。血小板機能異常症の原因としては、例えば、薬剤性の血小板機能異常、遺伝性の血小板機能異常（例：血小板無力症、ベルナール・スリエ症候群、MYH9異常症、Wiskott Aldrich syndrome等）などが挙げられる。

[0102] 本発明の細胞を、血液製剤として用いる場合、拒絶反応が起こらないという観点から、投与または移植先の個体のHLA遺伝子型が同一若しくは実質的に同一である体細胞から樹立したiPS細胞に由来する細胞を用いることが望ましい。ここで、「実質的に同一」とは、投与また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遺伝子座或いは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る。年齢や体質などの理由から充分な細胞が得られない場合には、ポリエチレングリコールやシリコーンのようなカプセル、多孔性の容器などに包埋して拒絶反応を回避した状態で投与または移植することも可能である。

MHCクラスI、IIの構成因子（例えば、HLA、B2Mなど）をコードする遺伝子、および／または当該遺伝子の転写因子（例えば、CIITA、RFX5、RFXAP、RFX

ANKなど）をコードする遺伝子が破壊または改変されたiPS細胞に由来する細胞も好ましい。また、HLA-Aタンパク質、HLA-BタンパクおよびHLA-Cタンパク質は、細胞移植を行った場合の拒絶反応に関連性が高い。よって、本発明の細胞は、HLA-A遺伝子およびHLA-B遺伝子のみが破壊される、もしくは、HLA-A遺伝子、HLA-B遺伝子およびHLA-C遺伝子の３遺伝子座が全て破壊されていることも好ましく、さらにHLA-E遺伝子が破壊されていることがより好ましい。例えば、多能性幹細胞、または多能性幹細胞から血小板に至る分化段階のいずれかの細胞（例：造血前駆細胞、巨核球等、特に巨核球）において、HLA-A遺伝子およびHLA-B遺伝子、あるいはHLA-A遺伝子、HLA-B遺伝子およびHLA-C遺伝子（任意により、さらにHLA-E遺伝子）を破壊した遺伝子改変細胞を製造し、該細胞から分化誘導工程および／または成熟工程を経て血小板を産生させることにより、血小板表面のHLAタンパク質の発現を消失させることが可能となる。これにより、血小板移植時の抗原性を低下させることができると期待される。また、HLAクラス１に対する抗体を持つ患者に対しても、移植可能な血小板製剤などの血液製剤を提供することができる。

[0103] 本発明の細胞は、常套手段にしたがって医薬上許容される担体と混合するなどして、注射剤、懸濁剤、点滴剤等の非経口製剤として製造される。従って、一態様において、本発明の細胞を製剤化する工程を含む、血液製剤の製法も提供される。かかる製法は、本発明の細胞を準備する工程を含んでいてもよい。さらに、本発明の細胞を保存する工程を含むこともできる。

[0104] 当該非経口製剤に含まれ得る医薬上許容される担体としては、例えば、生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液（例えば、D-ソルビトール、D-マンニトール、塩化ナトリウムなど）などの注射用の水性液を挙げることができる。本発明の細胞は、例えば、ヒト血漿、輸液剤、緩衝剤（例えば、リン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液）、無痛化剤（例えば、塩化ベンザルコニウム、塩酸プロカインなど）、安定剤（例えば、ヒト血清アルブミン、ポリエチレングリコールなど）、保存剤、酸化防止剤などと配合してもよい。

[0105] 本発明の血液製剤は、細胞の凍結保存に通常使用される条件で凍結保存された状態で提供され、用時融解して用いることもできる。その場合、血清若しくはその代替物、有機溶剤（例、DMSO）等をさらに含んでいてもよい。この場合、血清若しくはその代替物の濃度は、特に限定されるものではないが約1～約30%(v/v)、好ましくは約5～約20%(v/v)であり得る。有機溶剤の濃度は、特に限定されるものではないが0～約50%(v/v)、好ましくは約5～約20%(v/v)であり得る。

[0106] また、本発明の細胞は、血液疾患の治療または予防に有用な薬剤である候補薬剤をスクリーニングする方法にも用いることができる。よって、本発明のさらに別の態様において、被験物質の存在下または非存在下で、本発明の細胞を培養する工程を含む、血液疾患の治療または予防薬のスクリーニング方法が提供される。例えば、細胞として、血液疾患の病態を反映する疾患モデルを用いて、被験物質の存在下において該病態が改善した場合に、該被験物質を血液疾患の治療または予防薬の候補物質として選別することができる。かかる血液疾患としては、本発明の血液製剤の治療または予防目的となる上記の血液疾患と同様のものが挙げられる。

[0107] 被験物質と、本発明の細胞とを接触させる工程は、典型的には、本発明の細胞を培養している培地に被験物質を添加すること、あるいはあらかじめ被験物質を添加しておいた培地に本発明の細胞を移すことにより行うことができる。被験物質と、本発明の細胞とを接触させる工程の期間は特に限定されないが、典型的には、１分間～５日間、好ましくは、１時間～１日間である。

[0108] 本発明で用いる被験物質としては、例えば、細胞抽出物、細胞培養上清、微生物発酵産物、海洋生物由来の抽出物、植物抽出物、精製タンパク質または粗タンパク質、ペプチド、非ペプチド化合物、合成低分子化合物、天然化合物などが挙げられる。被験物質は、医薬品や栄養食品等の既存成分あるいは候補成分などであってもよい。

[0109] 本発明のさらに別の態様において、血小板産生能を維持した巨核球および

／または血小板を製造するためのキットが提供される。当該キットには、UQCRを構成するタンパク質または該タンパク質をコードする核酸が含まれるが、それ以外にも、巨核球誘導因子または該因子をコードする核酸、これらの核酸を細胞内で発現するのに必要な発現ベクター、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、TA-316、TPO、EPO、SCF、Heparin、IL-6、IL-11など）、抗生物質、出発細胞（例：多能性幹細胞、造血前駆細胞等）などが含まれていてもよい。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）なども含まれ得る。さらに、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。

[0110] 以下に実施例を挙げて本発明をより具体的に説明するが、本発明はこれらに何ら限定されるものではない。

実施例

[0111] 特に断りがない限り、実施例では下記の材料および方法を用いた。

１．iPS細胞

以下のヒトiPS細胞株を京都大学iPS細胞研究財団より入手して用いた：15M41（別称：Ff-I 01s01）、Ff-MH23s01（略記：MH23S01）、TkDN-sev2、QHJI14s04、QHJI 14s04-AB II-KO-03、QHJI14s04-AB II-KO-11。このうち、15M41およびQHJI14s04は最頻度HLAホモドナー末梢血由来、MH23S01は第二位HLAホモドナー末梢血由来である。TkDN-sev2は、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である。QHJI 14s04-AB II-KO-03およびQHJI14s04-AB II-KO-11は、QHJI14s04において、HLA-A、HLA-BおよびCIITAをゲノム編集によりノックアウトした株である。

巨核球への分化誘導には、前記iPS細胞株に巨核球誘導因子を導入した下記細胞株を使用した。これらの細胞株は、造血前駆細胞に分化誘導後、培地に

テトラサイクリンまたはその誘導体（本実施例ではドキシサイクリン）を添加することで巨核球へと分化し、培地からドキシサイクリン等を除去することで成熟化して血小板を産生する。

[0112] ・MBXカセット導入15M41細胞

テトラサイクリン誘導性プロモーターの制御下に不安定化ドメイン（destabilization domain）融合c-MYC遺伝子（MYCdd遺伝子）、BMI1遺伝子、およびBCL2L1遺伝子の3遺伝子（3因子：MYCdd/BMI1/BCLxL）をコードし、H1プロモーターの制御下にp21 shRNAおよびp53 shRNAをコードするコンストラクトが、piggyBac™システムを用いてゲノムに挿入された15M41ヒトiPS細胞株である（Sone M., et al., Silencing of p53 and CDKN1A establishes sustainable immortalized megakaryocyte progenitor cells from human iPSCs, Stem Cell Reports, 16 (12), 2861-2870, 2021を参照）。本明細書では、当該コンストラクトを [c-MYC/BMI1/BCLXL/p21 KD/p53 KD]カセット、または単にMBXカセットと呼称する場合がある。以下では、15M41株以外のiPS細胞株にMBXカセットを導入したもの、およびMBXカセット導入15M41細胞を総称して、「MBXカセット導入iPS細胞株」との用語を用いる。

[0113] ・MXカセット導入15M41細胞

テトラサイクリン誘導性プロモーターの制御下にMYCdd遺伝子、およびBCL2L1遺伝子の2遺伝子（2因子：MYCdd/BCLxL）をコードし、H1プロモーターの制御下にp21 shRNAおよびp53 shRNAをコードするコンストラクトが、piggyBac™システムを用いてゲノムに挿入された15M41ヒトiPS細胞株である。本明細書では、当該コンストラクトを [c-MYC/BCLXL/p21 KD/p53 KD]カセット、または単にMXカセットと呼称する場合がある。

[0114] ・MBXカセット導入TkDN sev2細胞

MBXカセットがゲノムに挿入されたTkDN sev2ヒトiPS細胞株である。

[0115] ２．iPS細胞から造血前駆細胞への分化誘導

Takayama N., et al. J Exp Med. 2817-2830 (2010)に記載の方法を改変して行った。

GSK-3β阻害剤CHIR-99021およびY-27632で3日間処理したiPS細胞を細胞塊小片として剥離し、フィーダー細胞（マイトマイシン処理を施したヒト線維芽細胞株C3H/10T1/2細胞（ATCC番号：CCL-226））上に前記iPS細胞塊小片を添加した。

[0116] 基礎培地として15% Fetal Bovine Serum (FBS) (Life Technologies、Code No.10270-106)、2mM Glutamine (Life Technologies、Code No. 25030-081)、1% Insulin / Transferrin / Selenium Solution (ITS-G) (Life Technologies、Code No.41400-045)、0.45 mM 1-Thioglycerol (Sigma-Aldrich、Code No. A6145)、50 μg/mL L-Ascorbic Acid (Sigma-Aldrich、Code No. A4544) を含有するIMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Medium) (Sigma-Aldrich、Code No.I3390)) を調製した。

[0117] iPS細胞の培養開始時の培地として、20 ng/mL VEGF（富士フィルム和光純薬、Code No.226-01786）を含有する基礎培地を使用し、37℃、5-8%O_2、5%CO_2の培養条件で培養を開始した。

[0118] 培養開始4日目に、20 ng/mL VEGF、10 U/mL Heparin（エイワイファーマ）、50 ng/mL bFGF（和光純薬、Code No.068-04544）、10μM SB431542（和光純薬、Code No.037-24293）を含有する基礎培地に交換し、37℃、5-8%O_2、5%CO_2の培養条件で培養した。

培養開始7日目に、20 ng/mL VEGF、10 U/mL Heparinを含有する基礎培地に交換し、37℃、20%O_2、5%CO_2の培養条件で培養した。

培養開始11日目に、20 ng/mL VEGF、0.75μM SR-1 (Stemregenin-1) を含有する基礎培地を添加、または交換し、37℃、20%O_2、5%CO_2の培養条件で培養した。

培養開始から7－14日目の浮遊細胞を造血前駆細胞として回収し、以降の分化誘導実験に使用した。

[0119] ３．造血前駆細胞から巨核球への分化誘導、拡大培養、および成熟化

方法２における培養開始から7日目の造血前駆細胞を、0.2 μg/mL TPO mimetic compound、50 ng/mL SCF、UM729 1μM(MERCK Code No. ATEH97ECEE61)

、1 μg/mL ドキシサイクリンを含有する基礎培地（巨核球分化増殖培地、または分化増殖培地と呼ぶ場合がある）中で、フィーダーフリー条件下、37℃、20%O_2、5%CO_2の培養条件で培養することで、巨核球へと分化誘導した。実施例では、巨核球分化誘導培地で培養開始した日をDay 0とし、以降の培養日数をDayで表す。この方法では、基本的に、Day 7くらいからCD34陽性CD41陽性の細胞集団が出現する。同培地を用いて継代培養を継続することで、巨核球を拡大培養した。なお、以下の実施例では、「iPS細胞から造血前駆細胞を分化誘導し、当該造血前駆細胞から巨核球を分化誘導し」を、「iPS細胞から巨核球を分化誘導し」と短縮化する場合がある。

[0120] 培地をドキシサイクリン含有培地から不含培地に切り替えることで、前記カセットの3因子（MYCdd/BMI1/BCLxL）または2因子（MYCdd/BCLxL）の強制発現を解除し、巨核球の成熟化を誘導した。使用したドキシサイクリン不含培地（巨核球成熟化培地）の組成は以下の通りである。

・巨核球成熟化培地（または、成熟化培地）

5% human plasma、2 mM Glutamine、1% ITS-G、0.45 mM 1-Thioglycerol、50 μg/mL L-Ascorbic Acid、50 ng/mL SCF、0.2 μg/mL TPO mimetic compound、15 μM KP-457（科研製薬）、10 μM Y-27632（ナカライテスク、Code No.18188-04）、0.75 μM SR-1（Stemregenin-1）または0.1μM AhR阻害剤を含有するIMDM（濃度は終濃度）

巨核球の成熟化工程は、巨核球を125 mL培養フラスコに播種密度1 x 10^5 cells/mL、25 mL/flaskで播種して、振盪培養することにより実施した。振盪培養は、LT-X（Lab-Therm）（Kuhner）あるいはS41i（Eppendorf）を使用し、37℃、5%CO_2の条件下に100 rpmの振盪速度で実施した。

[0121] ４．巨核球の増殖性評価

Day 0以降、定期的に細胞数計測とフローサイトメトリーによる巨核球特異表面マーカーCD41の検出を行った。

細胞数計測はトリパンブルー染色法で行い、播種細胞数を基準に算出した増殖倍率をもとにDay 0からの累積増殖率を算出した。同時にCD41陽性率の測

定結果から算出した巨核球存在比率を乗じ、巨核球の増殖率とした。継代n回目の巨核球の累積増殖率を下記式により算出した。

[0122] [数1]

$$\text{継代n回目の巨核球の累積増殖率} = \left(\prod_{k=1}^{n} \frac{\text{継代k回目の回収生細胞密度}}{\text{継代k-1回目の播種密度}}\right) \times \text{継代n回目のCD41陽性率}$$

[0123] ただし、継代0回目の播種密度はDay 0における播種密度とする。

[0124] ５．血小板産生能および血小板機能評価

巨核球を、巨核球成熟化培地中で振盪培養して6日後に、細胞懸濁液を一部採取し、BD FACSVerse™（BD Biosciences）を用いてフローサイトメトリー解析を行い、下記の手順で産生血小板数計測および血小板機能評価を行った。

[0125] 産生血小板数を計測するために、以下の抗体で染色を行った。

APC標識抗CD41抗体（BioLegend、Code No. 303710）

PE標識抗CD42b抗体（BioLegend、Code No. 303906）

eFluor™ 450標識抗CD42a抗体（Thermo Fisher, Code No. 48-0428-42）

染色30分後に、TruCOUNT™（BD Biosciences、Code No. 340334）を用いて血小板数（FSC/SSCによって微小粒子としてゲーティングされたCD41 / CD42b両陽性もしくはCD41 / CD42a / CD42b陽性）を計測した。産生血小板数の算出に用いるフローサイトメトリーのデータ解析にはFlowJo™ Version 10（BD Biosciences）を用いた。データは血小板産生培養の開始時に播種した巨核球数を引用して巨核球1個あたりの産生数として表示した。

[0126] 血小板機能を評価するために、以下の２種類の刺激条件でそれぞれ刺激した。

刺激剤1：0.02～0.4 μM PMA

刺激剤2：100 μM ADP / 40 μM Thrombin Receptor Activator Peptide 6 (TRAP6)

添加後、以下の抗体で染色した。

APC標識抗CD41抗体（BioLegend、Code No. 303710）

PE標識抗CD62P抗体（BioLegend、Code No. 304906）

FITC標識抗PAC-1抗体（BD Bioscience、Code No. 34507）

30分後にBD FACSVerse™ で測定を行った。

[0127] 実施例１：巨核球の継代による血小板産性能の影響の検証

MBXカセット導入15M41細胞を造血前駆細胞に分化誘導し、当該前駆細胞を巨核球に分化誘導した。巨核球誘導21日目（Day 21）～78日目（Day 78）の細胞について血小板産生能を解析した結果を図１に示す。Day 21には巨核球1細胞あたり200個以上の血小板を産生する能力を有していたが、その後産生能は低下し、Day 64以降にはDay 21の産生能の約1/10にまで低下した。

また、他のヒトiPS細胞株（例として、MH23S01、TkDN-sev2）から同様の方法で分化誘導した巨核球においても、継代培養に伴う血小板産生能の低下が観察された（データは非開示）。

よって、ヒトiPS細胞から分化誘導した巨核球では、継代するにつれて血小板産生能が低下する傾向があることが確認された。

[0128] 実施例２：血小板産生を促進するタンパク質の探索

本発明者らは、血小板産生を飛躍的に向上させる条件で振盪培養を行って成熟させた巨核球から培地に放出される因子として、既に6種類のタンパク質を同定し、その中でも、エンドペプチターゼドメインを有するNRDCに注目していた（非特許文献２）。NRDCの血小板産生における役割を調べるために、巨核球特異的NRDC欠損マウスを作製し、生体内における血小板量を解析した。しかしながら、予想に反し、当該NRDC欠損マウスでは、コントロールマウスと比較して、血小板量の明らかな減少は観察されなかった（データ非開示）。

そこで、血小板産生効率を真に制御し得る因子を見出すために、前記振盪培養を行って成熟させた巨核球において、静置培養を行って成熟させた巨核球と比べて発現量が増加しているタンパク質を解析した。その結果、ミトコンドリアに局在し、NRDCと同じくM16エンドペプチターゼドメインを有するUQCRC1およびUQCRC2について、当該発現をノックダウンすると巨核球の血小板

産生能が低下することを見出した（図２）。MBXカセット導入TkDN sev2細胞から分化誘導した巨核球に対し、Day 45にUQCRC1および／またはUQCRC2のshRNAを、レンチウイルスを用いて導入し、Day 66-81に血小板産生能を測定した結果を図２に示す。コントロール（LacZのshRNAを導入した巨核球）に対し、UQCRC1 shRNAまたはUQCRC2 shRNAを導入した巨核球では血小板産生能が約30％に減少し、さらに、UQCRC1 shRNAとUQCRC2 shRNAを両方とも導入した巨核球では約20％にまで血小板産生能が低下した。

この結果より、UQCRC1およびUQCRC2は、巨核球の血小板産生能を正に制御する役割を担っていることが強く示唆された。

[0129] 実施例３：UQCRC1およびUQCRC2による血小板産生能の検証

UQCRC1およびUQCRC2を強制発現させた場合の、血小板産生への影響を解析した。

MBXカセット導入15M41細胞から分化誘導した巨核球（Day 21）またはMXカセット導入15M41細胞から分化誘導した巨核球（Day 28）に、レンチウイルスベクターを用いてUQCRC1またはUQCRC2を導入し、Day 47またはDay 56(MBX)、Day 56またはDay 63(MX)に成熟化を誘導し、血小板産生能を解析した。図３に結果を示す。MBXカセット導入15M41細胞から分化誘導した巨核球は、コントロール（UQCRC1/UQCRC2非コードレンチウイルスベクターを感染させた巨核球）と比べて、UQCRC1、UQCRC2のいずれを強制発現させた場合も非常に多くの血小板を産生した（図３右グラフ）。図１との比較により、UQCRC1またはUQCRC2の強制発現により、長期間の継代培養に伴う血小板産生能の低下が非常によく抑制されたことがわかる。

同様に、MXカセット導入15M41細胞から分化誘導した巨核球においても、UQCRC1またはUQCRC2の強制発現により、MBXカセット導入15M41細胞から分化誘導した巨核球と同レベルの高い血小板産生能が維持されていた（図３左グラフ）。

図４に、レンチウイルスを用いてUQCRC2を導入した巨核球の、Day 53以降の血小板産生能を解析した結果を示す。MXカセット導入15M41細胞、MBXカセ

ット導入15M41細胞のいずれから分化誘導した巨核球においても、Day 67またはDay 60という長期にわたって血小板産生能がよく維持された。

これらの結果より、少なくとも増殖期の巨核球においてUQCRC1および／またはUQCRC2の発現量を増加させると、継代培養に伴う血小板産生能の低下が顕著に改善され、長期間にわたって血小板産生能が維持される巨核球となることが明らかになった。

[0130] 実施例４：血小板産生を促進する化合物の探索

次に、化合物による血小板産生の促進を試みた。骨髄内の巨核球は脂肪細胞から放出される脂肪酸を取り込むことで血小板産生を促進することが知られている(Adipocyte Fatty Acid Transfer Supports Megakaryocyte Maturation. Cell reports. 2020;32(1):107875)。また、巨核球の成熟および血小板産生形成には脂質合成および外からの脂肪酸の取り込みが重要であることも知られている(Critical shifts in lipid metabolism promote megakaryocyte differentiation and proplatelet formation Nat Cardiovasc Res. 2023 Sep; 2: 835-852)。以上より、脂質代謝、合成を行っている脂肪細胞に誘導する薬剤を使用することで、巨核球において脂質合成がより活発に行われるのではないかとの仮説を立てた。そこで、脂肪分化誘導因子の存在下で巨核球の培養を行うことでこの仮説の検証を行った。

前記外来性UQCRC2を発現する巨核球（MBXカセット導入15M41細胞由来巨核球）の培地（分化増殖培地）に、Day 1-Day 3の間、デキストラン（1μM）、IBMX（50μM）、インスリン（10μg/ml）を添加した。カッコ内は終濃度を表す。巨核球成熟化培地に移して3日後にJI051(10μM)を添加し、血小板産生能を解析した結果を図５に示す。JI051非添加コントロールに対し、JI051を添加した巨核球の血小板産生能は約２倍に上昇した。

よって、デキストラン、IBMX、およびインスリンを添加して巨核球の拡大培養を行い、その後の成熟化工程でJI051を添加して成熟化させると、巨核球の血小板産生能が一段と向上することが明らかになった。

[0131] さらに、巨核球分化増殖培地中のUM729に代わる化合物として、LMK-235を

見出だした。UM729をLMK-235に置換した分化増殖培地を用いて巨核球への分化誘導を行い、3日後の細胞数（図６上グラフ）とCD34陽性細胞率（図６下グラフ）を解析した結果を図６に示す。なお、本実験ではUQURC2の強制発現は行っていない。LMK-235を終濃度0.2 μMで使用した場合には、UM729を使用した場合よりも細胞数・CD34陽性細胞率ともに増加した。

LMK-235はHDAC4、5、6の阻害剤として知られるため、他のHDAC阻害剤についても同様の解析を行った。図７に、UQCRC2を強制発現させたMBXカセット導入15M41細胞由来、またはMXカセット導入15M41細胞由来の巨核球について、CD34、CD41a陽性細胞率を解析した結果を示す。LMK-235とTMP195（HDAC4、5、7、9の阻害剤）ではCD34が維持されたが、Tasqunimod（HDAC4の阻害剤）ではCD34の発現が減少した。この結果から、増殖期の巨核球では、CD34の維持にHDAC5が寄与することが示唆された。

これまでは成熟化工程で振盪培養を行っていたが、静置培養に代えた場合のUM729、LMK-235の効果を解析した。UQCRC2を強制発現させたMXカセット導入15M41細胞由来の巨核球に対し、1μM UM729を含む通常の分化増殖培地、またはUM729を200nM LMK235に置換した分化増殖培地を用いて分化誘導と拡大培養を行い、その後静置培養下で成熟させて血小板産性能を比較した（図８）。静置培養での成熟化のため、振盪培養で成熟化した場合と比べて血小板の産生数は少ないが、LMK-235含有培地で拡大培養を行っても、UM729含有培地で拡大培養を行った場合と大差ない数の血小板が産生された。

よって、本発明の一態様として造血前駆細胞から巨核球への分化誘導とその後の拡大培養工程で培地に添加しているピリミドインドール誘導体（UM729等）は、LMK-235やTMP195等のHDAC5阻害剤で代替できることが明らかになった。

[0132] 実施例５：iPS細胞株の由来による巨核球の増殖能の検証

iPS細胞株の由来により、誘導された巨核球の増殖能に差異が生じるか否かを検証した。まず、各種iPS細胞株（15M41、MH09S01、MH15S01、MH15S01およびMH23S01）にMBXカセットを導入して、MBXカセット導入iPS細胞株を作製し

た（３種の巨核球誘導因子を導入した）。このMBXカセット導入iPS細胞株をimMKCLに誘導し、CD34/CD41a共陽性画分を選別して培養を続け、CD34およびCD41の発現をFACSにより評価した。その結果、いずれのiPS細胞株に由来するimMKCLも、42日間CD34/CD41a共陽性の表現系を維持することが示された（図１０）。

[0133] 次に、３種ではなく２種の巨核球誘導因子を用いて検証を行った。各種iPS細胞（15M41およびQHJI14s04-AB II-KO-03）にテトラサイクリン誘導性プロモーターの制御下のMYCdd遺伝子、およびUbiCプロモーター下のBCL2L1遺伝子の2遺伝子（2因子：MYCdd/BCLxL）をコードし、H1プロモーターの制御下にp21 shRNAおよびp53 shRNAをコードするコンストラクト導入したiPS細胞から巨核球を分化誘導し、CD34/CD4a共陽性画分を選別して培養を続け、CD34およびCD41の発現をFACSにより評価した。その結果、QHJI14s04-AB II-KO-03由来の巨核球集団では、CD34/CD41a共発現を維持できない細胞が多く認められた（図１１）。一方で、15M41由来の巨核球は、CD34/CD41a共発現を維持していた（図１２）。

[0134] 実施例６：ポリコーム複合体1.1と巨核球の増殖能との関連性の検証

15M41は、BCOR（BCL6 corepressor）遺伝子およびBRD3遺伝子に変異を有し、QHJI14s04はこれらの変異を有さないことが報告されている。そこで、BCOR遺伝子またはBRD3の変異の差異が、iPS細胞の由来により、CD34/CD41a共発現の維持効果に差異が生じる原因であり得ると考えた。まずはBCOR遺伝子、およびそのホモログであるBCORL1（BCL6 corepressor like 1）遺伝子に着目した。

[0135] そこで、BCORまたはBCORL1の発現を抑制することで、QHJI14s04/AB II-KO-03由来の巨核球においても、15M41株由来の巨核球と同等の表現系を表すか否かを検討した。QHJI14s04/AB II-KO-03由来の巨核球細胞において、Dox添加開始から28日目に、レンチウイルスを用いて、BCORまたはBCORL1の発現を、これらの遺伝子の転写産物を標的とするshRNA（それぞれ、sh BCORおよびsh BCORL1とも称する。）を用いてノックダウンさせた。その結果、CD34/CD41a

共発現を維持した巨核球株を得ることに成功した（図１３）。さらに、BCORまたはBCORL1の発現をノックダウンした巨核球は、ノックダウンしていない巨核球と比較して、血小板産生能が高いことも実証された（図１４）。

[0136] BCORおよびBCORL1は、ポリコーム抑制複合体1.1（PRC1.1）を構成するタンパク質の１種であり、胚形成、間葉系幹細胞の機能、造血、およびリンパ系の発生の制御に関与する転写因子として知られている（例えば、Sportoletti P., Sorcini D. and Falini B., Blood. 138(24):2455-2468 (2021)。また、本発明者らは以前、3因子（MYCdd/BMI1/BCLxL）を用いた巨核球誘導において、誘導効率が大きく異なるiPS細胞間でメチル化レベルが顕著に異なっていた遺伝子の１つとして、TRIM27（tripartite motif containing 27）を同定していた（データ非開示）。TRIM27もまた、PRC1.1の構成成分であることが報告されている（Maat H., et al., iScience. 24(5):102435 (2021)）。また、本発明者らは、血球系譜の分化過程に関わる転写因子の中に、巨核球の増殖に関与するものが存在する可能性を考えた。そして、鋭意検討の結果、赤血球形成とリンパ球形成に寄与するBACH1に着目し、さらなる解析を行った。

[0137] iPS細胞から、図１５に示すベクターの組合せを導入して巨核球を誘導したところ、UQCRC2およびBACH1を過剰発現させ、BCORをノックダウンすることで、CD34/CD41aを共発現する巨核球を維持でき、血小板産生能も高く維持できること、さらにBCORL1またはTRIM27をノックダウンすることで、血小板産生能がより高くなることが示された（図１６、図１７）。また、BCOR、BCORL1およびTRIM27のいずれもノックダウンさせない場合であっても、巨核球においてBACH1を過剰発現させるだけで、血小板産生能を高く維持できることも示された（図１８）。

[0138] 実施例７：巨核球維持に寄与する化合物の探索

HDAC5阻害剤以外にも、巨核球維持や血小板産生能を促進する化合物の探索を行ったところ、リジン特異的ヒストン脱メチル化酵素１（LSD1）の阻害剤（トラニルシプロミン）が、巨核球におけるCD34/CD41a共発現の維持効果を

有することが示された。特に、HDAC5阻害剤とLSD1阻害剤を組み合わせることで、巨核球においてCD34/CD41a共発現性が高く維持されることが示された（図１９）。

産業上の利用可能性

[0139] 本発明により、iPS細胞株の種類を問わずに、長期間高品質が維持される巨核球（高品質マスターセル）が製造できるようになる。これにより、高品質血小板（止血および循環能力が維持された血小板）の安定的供給が可能となり得る。簡便且つ低コストでこれらが実現できるため、人工血小板の社会実装化の観点から非常に有用であり得る。

[0140] 本出願は、日本で出願された特願２０２４－０２０８５４（出願日：２０２４年２月１５日）を基礎としており、その内容は本明細書に全て包含されるものである。

請求の範囲

[請求項1] 巨核球において、ユビキノール-シトクロムcレダクターゼ（UQCR）を構成するタンパク質の少なくとも１種の存在量を上昇させる工程を含む、血小板産生能を維持した巨核球の製造方法。

[請求項2] UQCRを構成するタンパク質の少なくとも１種がUQCRコアタンパク質（UQCRC）である、請求項１に記載の方法。

[請求項3] UQCRCの少なくとも１種がUQCRC2である、請求項２に記載の方法。

[請求項4] UQCRを構成するタンパク質の存在量を上昇させる工程が、該タンパク質をコードする核酸を巨核球に導入する工程を含む、請求項１～３のいずれか１項に記載の方法。

[請求項5] 巨核球において、ポリコーム抑制複合体1.1の機能を阻害する工程を含む、血小板産生能を維持した巨核球の製造方法。

[請求項6] 巨核球において、ポリコーム抑制複合体1.1の機能を阻害する工程を含む、請求項１～４のいずれか１項に記載の方法。

[請求項7] ポリコーム抑制複合体1.1の機能を阻害する工程が、ポリコーム抑制複合体1.1を構成するタンパク質の少なくとも１種の存在量を低減させる工程を含む、請求項６に記載の方法。

[請求項8] ポリコーム抑制複合体1.1を構成するタンパク質が、BCORタンパク質、BCORL1タンパク質およびTRIM27タンパク質からなる群から選択される少なくとも１種である、請求項７に記載の方法。

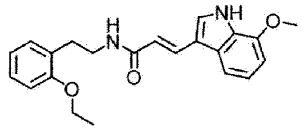
[請求項9] 巨核球において、BACH1タンパク質の存在量を上昇させる工程を含む、請求項１～８のいずれか１項に記載の方法。

[請求項10] HDAC5阻害剤を含む培地で巨核球を培養する工程を含む、請求項１～９のいずれか１項に記載の方法。

[請求項11] 脂肪分化誘導因子を含む培地で巨核球を培養する工程を含む、請求項１～１０のいずれか１項に記載の方法。

[請求項12] 培地が以下の構造式で示される化合物を含む、請求項１～１１のいずれか１項に記載の方法。

[化1]



[請求項13] 巨核球において、MYCタンパク質およびアポトーシス抑制タンパク質の存在量を上昇させる工程を含む、請求項１～１２のいずれか１項に記載の方法。

[請求項14] 巨核球が多能性幹細胞に由来する、請求項１～１３のいずれか１項に記載の方法。

[請求項15] 請求項１～１４のいずれか１項に記載の方法により得られる巨核球。

[請求項16] 下記の特徴（Ａ）～（Ｃ）を全て有する巨核球。

（Ａ）外因性のユビキノール-シトクロムcレダクターゼ（UQCR）を構成するタンパク質の少なくとも１種を有する

（Ｂ）血小板産生能を有する

（Ｃ）CD34遺伝子およびCD41遺伝子を発現する

[請求項17] UQCRを構成するタンパク質の少なくとも１種がUQCRコアタンパク質である、請求項１６に記載の巨核球。

[請求項18] 請求項１５～１７のいずれか1項に記載の巨核球を成熟させる工程を含む、血小板の製造方法。

[請求項19] 振盪培養工程を含む、請求項１８に記載の方法。

[請求項20] 請求項１８または１９に記載の方法により得られる血小板。

[請求項21] 請求項１５～１７および２０のいずれか１項に記載の細胞を含む、血液製剤。

[請求項22] 造血前駆細胞を、HDAC5阻害剤および／またはLSD1阻害剤を含む培地中で培養する工程を含む、巨核球の製造方法。

[請求項23] HDAC5阻害剤の少なくとも１種がLMK235である、請求項２２に記載の方法。