明　細　書

発明の名称 ： 多核化巨核球細胞、及び血小板の製造方法

技術分野

[0001] 本発明は、多核化前の巨核球細胞を効率よく多核化させる方法、及びかかる巨核球細胞から血小板を製造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細胞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細胞から巨核球細胞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ES細胞の有効性を示している（特許文献１及び非特許文献１）。また、発明者らは、iPS細胞からの巨核球細胞及び血小板の調製法を確立させ、ES細胞由来の血小板の輸血では回避困難であった、白血球抗原（human leukocyte antigen; ＨＬＡ）適合性の問題を解決可能にした（特許文献２）。

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）

[0004] 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。

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。

[0005] 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をノ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。

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

[0006] 特許文献1：WO2008/041370

特許文献2：WO2009/122747

特許文献3：WO2011/034073

非特許文献

[0007] 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羅,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

[0008] 本発明者らは、「多核化」が進んでいない巨核球細胞から得られる機能的な血小板（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）の量が臨床応用展開を実施するためには非常に少ないことを見出し、インビトロにおいて機能的な血小板を効率よく産生させるためには、巨核球細胞の多核化を促進する必要があると考えた。

そこで、本発明は、巨核球細胞の多核化を促進し、より多核化した多核化巨核球細胞を調製する方法、さらに多核化巨核球細胞から効率よく血小板を産生させ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

[0009] 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）から調製した多核化が進んでいない巨核球細胞の多核化を促進することを試みた。まず、本発明者らは、この試みを、自ら開発した多能性幹細胞から調製した不死化巨核球前駆細胞株（特許文献３参照）を用いて行った。この不死化巨核球前駆細胞株は、多能性幹細胞から誘導した巨核球の前駆細胞内で、MYCなどの癌遺伝子及びBMI1などの遺伝子を発現させることにより、増殖能を

高め、株化（不死化）したものである。

発明者らは、この不死化巨核球前駆細胞株を用いて多核化を促進するために、癌遺伝子及びポリコーム遺伝子の発現抑制を行う際、アポトーシス抑制遺伝子を強制発現させることで、多核化をより効率よく進めることに成功した。

また、アポトーシス抑制遺伝子の強制発現に加え、p53遺伝子産物の発現又は機能を阻害することにより、多核化の効率が一層上昇することを確認した。また、上記巨核球前駆細胞株に対して、ROCK（Rho-associated coiled－coil forming kinase/Rho結合キナーゼ）阻害剤、HDAC阻害剤、39℃に於ける培養などの処理を行うことも、多核化の誘導に有効であることを確認し、さらに、アクトミオシン複合体（アクチンとミオシンの複合体）の機能阻害剤で処理すると、多核化がより高度に促進されることを見出した。

そして、本発明によって産生される多核化が促進された巨核球細胞は、4N、あるいは、8N以上の巨核球細胞の割合が既報のものよりも高く、また、生体内で生成される成熟巨核球細胞と比べてもその割合が非常に高いことを見出した。

さらに、本発明者らは、十分に多核化した成熟巨核球細胞において、上記アポトーシス抑制遺伝子の強制発現を抑制することにより、一つの巨核球細胞から産生される血小板の数が飛躍的に増えることを見出すとともに、培地にROCK阻害剤を加えて培養すること等で、血小板産生効率をさらに上げることが可能であることを確認し、培養期間、培養温度等の最適な条件を調べて本発明を完成するに至った。

[0010] すなわち、本発明は、

〔１〕多核化巨核球細胞を製造する方法であって、多核化前の巨核球細胞において、アポトーシス抑制遺伝子を強制発現させて、該細胞を培養する工程を含む、方法；

〔２〕前記アポトーシス抑制遺伝子が、BCL－XL遺伝子である、上記〔１〕に記載の方法；

〔３〕前記培養工程において、p53遺伝子産物の発現又は機能を阻害する、上記〔１〕または〔２〕に記載の方法；

〔４〕前記培養工程において、多核化前の巨核球細胞に対して以下の(a)～(c)の少なくとも1つを行う、上記〔１〕から〔３〕のいずれか１項に記載の方法：

(a)アクトミオシン複合体機能阻害剤による処理；

(b)ROCK阻害剤による処理；及び

(c)HDAC阻害剤による処理；

〔５〕前記ROCK阻害剤がY27632であり、前記HDAC阻害剤がバルプロ酸であり、前記アクトミオシン複合体機能阻害剤がブレビスタチンである、上記〔４〕に記載の方法；

〔６〕前記培養工程を37℃より高い温度で行う、上記〔１〕から〔５〕のいずれか１項に記載の方法；

〔７〕前記多核化前の巨核球細胞は、

造血前駆細胞から多核化前の巨核球細胞に至る分化段階のいずれかで、該細胞において、癌遺伝子と以下の(i)～(iii)のいずれかの遺伝子とを強制発現させ、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である、上記〔１〕から〔６〕のいずれか１項に記載の方法：

(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；

〔８〕前記癌遺伝子としてc-MYC遺伝子を、前記(i)～(iii)の遺伝子としてBMI1を用いる、上記〔７〕に記載の方法；

〔９〕前記造血前駆細胞は、iPS細胞、ES細胞、並びに、臍帯血、骨髄血若しくは末梢血由来の造血幹細胞及び造血幹細胞からなる群より選択される細胞に由来する、上記〔７〕又は〔８〕に記載の方法；

〔１０〕上記〔１〕から〔９〕のいずれか１項に記載の方法で製造された多核化巨核球細胞を含む血液細胞組成物；

〔１１〕血小板の製造方法であって、

上記〔１〕から〔９〕のいずれか１項に記載の方法で多核化巨核球細胞を得て、これを培養する工程と、

前記多核化巨核球細胞の培養物から血小板を回収する工程と、を含む方法；

〔１２〕前記多核化巨核球細胞の培養工程は、前記アポトーシス抑制遺伝子の強制発現を抑制して、又は、前記アポトーシス抑制遺伝子を細胞から除去して行う、上記〔１１〕に記載の方法；

〔１３〕前記多核化巨核球細胞の培養工程は、血清なし、及び／又はフィーダー細胞なしで行う、上記〔１１〕又は〔１２〕に記載の方法；

〔１４〕前記多核化巨核球細胞の培養工程を、1日から15日間行う、上記〔１１〕から〔１３〕のいずれか１項に記載の方法；

〔１５〕前記多核化巨核球細胞の培養工程は、37℃で行う、上記〔１１〕から〔１４〕のいずれか１項に記載の方法；

〔１６〕前記多核化巨核球細胞の培養工程で、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、上記〔１１〕から〔１５〕のいずれか１項に記載の方法；

〔１７〕前記ROCK阻害剤がY27632であり、アクトミオシン複合体機能阻害剤がブレビスタチンである、上記〔１６〕に記載の方法；

〔１８〕上記〔１１〕から〔１７〕のいずれか１項に記載の方法で製造された血小板；及び

〔１９〕上記〔１８〕に記載の血小板を含む血液製剤、

に関する。

発明の効果

[0011] 本発明によれば、巨核球細胞の多核化を人為的に促進することが可能となる。特に、本発明は、既報のインビトロで調製した巨核球細胞の多核化の促進にも効果的であり、生体から得られる巨核球細胞と比較しても、より多核化の程度が進んだ巨核球細胞（例えば、4N以上の巨核球細胞の割合の高い巨

核球細胞集団）を取得することを可能にする。

また、本発明によれば、多核化した巨核球細胞1個当たりから産生される血小板の数を著しく増加させることが可能となる。

幹細胞から多核化前の巨核球細胞を誘導し、例えば特許文献３に記載された方法でこの多核化前の巨核球細胞を増殖させ、本発明の方法にしたがって、当該多核化前の巨核球細胞を多核化させて血小板を産生させることにより、幹細胞から血小板を製造するのに要する時間を飛躍的に短縮させて、大量調製を可能にする。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

[0012] [図1A]iMKPC－typeIの増殖のサイトカイン依存性を調べるために行った実験の概要を示す。

[図1B]図１Ａに示すスケジュールにしたがって、SCFとTPO（S＋T）、SCFとEPO（S＋E）、SCF（S）、TPO（T）及びEPO（E）を培地に加えてiMKPC－typeIを培養したときの、細胞数の変化を示す。

[図1C]図１Ａに示すスケジュールの8日目に、iMKPC－typeIの表面マーカーの発現をフローサイトメーターで解析した結果を示す。

[図1D]臍帯血由来CD34陽性細胞でc-MYCとBMI1を強制発現させ、多核化前の巨核球細胞の増殖を促進させた結果を示す。

[図2A]iMKPC－typeIIの増殖に対するサイトカインの影響を調べた結果を示す。

[図2B]iMKPC－typeIIにおけるCD41aとCD42bの発現を調べた結果を示す。

[図3]iMKPC－typeIIにおいてBCL－XLの強制発現とp53遺伝子の発現抑制を行ったときの多核化と、さらにブレビスタチンを培地に添加した場合の多核化を顕微鏡で観察した結果を示す。

[図4]iMKPC－typeIIの増殖に対するBCL－XLの影響を調べた結果を示す。

[図5]ROCK阻害剤の巨核球細胞の多核化への影響。巨核球細胞中のMYC／BMI1の発現を抑えた後(ドキシサイクリン存在下、エストラジオール非存在下での

培養)、ROCK阻害剤（Y27632）（10μM）を添加し、７日間培養した後、多核化の程度を調べた。Ａは、ROCK阻害剤を加えていない細胞（vehicle）と加えた細胞（Rock i）を、核を染めるヘキストで染色後、巨核球マーカーであるCD41aを抗CD41a抗体で染色し、フローサイトメーターで解析した結果である。Ｂは、Ａの結果をグラフ化したものである。

[図6]39℃で培養における、巨核球の成熟に関連する遺伝子の発現量を調べた結果。巨核球細胞中のMYC／BMI1の発現を抑えた後、39℃で５日間培養した後、巨核球の成熟に必須である遺伝子群（GATA1（Ａ）、PF4（Ｂ）、NFE2（Ｃ）、βーチューブリン（Ｄ））の発現量を定量PCR（q-PCR）法により検討した。発現量は、GAPDHの発現量に対する割合を示す。

[図7]アポトーシス抑制遺伝子の1つであるBCL－XLの巨核球細胞の多核化に対する影響を検討した結果。巨核球細胞中のMYC／BMI1の発現を抑え、ROCK阻害剤（10μM）存在下、BCL－XLを発現させ、7日間培養した後、多核化の程度を調べた。Ａは、MYC／BMI1発現細胞（左図）、MYC／BMI1の発現を抑制しROCK阻害剤処理を行った細胞（中図）、MYC／BMI1の発現抑制及びROCK阻害剤処理に加え、BCL－XLを発現させた細胞（右図）を、各々、核を染めるヘキストで染色後、巨核球マーカーであるCD41aを抗CD41a抗体で染色し、フローサイトメーターで解析した結果である。Ｂは、Ａの結果をグラフ化したものである。また、Ｃは、核が2N、4N、8N及び8N以上になっている細胞の顕微鏡写真である。

[図8]BCL－XL発現細胞の増殖曲線。巨核球細胞中のMYC／BMI1の発現を抑制し、ROCK阻害剤（10μM）存在下、BCL－XLを発現させた細胞（$CD41a^+$）（■）と発現させていない細胞（$CD41a^+$）（▲）の細胞数の変化を培養日数に対しグラフ化した結果である。

[図9]p53ノックダウンの多核化への影響。巨核球細胞中のMYC／BMI1の発現を抑え、ROCK阻害剤（10μM）存在下、BCL－XLを発現させ、さらに、p53遺伝子をノックダウンした後、39℃で7日間培養し、$CD41a^+$細胞の多核化の程度を調べた。Ａは、p53をノックダウンしていないコントロール細胞（コントロール

）とp53をノックダウンした細胞（SiP53）を、各々、核を染めるヘキストで染色後、巨核球マーカーであるCD41aを抗CD41a抗体で染色し、フローサイトメーターで解析した結果である。Ｂは、Ａの結果をグラフ化したものである。

[図10]バルプロ酸処理の多核化への影響。巨核球細胞中のMYC／BMI1の発現を抑え、ROCK阻害剤存在（10μM）下、BCL－XLを発現させ、p53遺伝子をノックダウンし、さらに、バルプロ酸（0.5mM）で処理し、39℃で7日間培養した後、$CD41a^+$細胞の多核化の程度を調べた。Ａは、バルプロ酸処理していない細胞（Si P53）とバルプロ酸処理した細胞（SiP53 VLP）を、各々、核を染めるヘキストで染色後、巨核球マーカーであるCD41aを抗CD41a抗体で染色し、フローサイトメーターで解析した結果である。Ｂは、Ａの結果をグラフ化したものである。

[図11]ミオシン重鎖IIA/B ATPase阻害剤（アクトミオシン複合体機能阻害剤）の巨核球細胞の多核化への影響。巨核球細胞中のMYC／BMI1の発現を抑えた後(ドキシサイクリン存在下、エストラジオール非存在下での培養)、ミオシン重鎖IIA/B ATPase阻害剤であるブレビスタチン（10μg/ml）を添加し、7日間培養した後、多核化の程度を調べた。Ａは、ブレビスタチンを添加しなかった細胞（－）とブレビスタチン（10μg/ml）を添加した細胞（＋）を、核を染めるヘキストで染色後、巨核球マーカーであるCD41aを抗CD41a抗体で染色し、フローサイトメーターで解析した結果である。Ｂは、Ａの結果をグラフ化したものである。

[図12]ブレビスタチン処理を他の処理と併用した場合の巨核球細胞の多核化への影響。巨核球細胞中のMYC／BMI1の発現を抑え、Y27632（10μM）及びバルプロ酸（0.5mM）存在下、BCL－XLを発現させ、p53遺伝子をノックダウンし、さらに、ブレビスタチン（10μg/ml）を添加し、39℃で７日間培養した後、$CD41a^+$細胞の多核化の程度を調べた。Ａは、ブレビスタチン処理を行っていない細胞（－）とブレビスタチン処理を行った細胞（＋）を、各々、核を染めるヘキストで染色後、巨核球マーカーであるCD41aを抗CD41a抗体で染色

し、フローサイトメーターで解析した結果である。Ｂは、Ａの結果をグラフ化したものである。

[図13]ブレビスタチン処理を他の処理と併用した細胞の増殖曲線。巨核球細胞中のMYC／BMI1の発現を抑え、Y27632（10μM）及びバルプロ酸（0.5mM）存在下、BCL－XLを発現させ、p53遺伝子をノックダウンし、ブレビスタチン処理をした細胞（$CD41a^+$）（▲）とブレビスタチン処理をしていない細胞（$CD41a^+$）（■）の細胞数の変化を培養日数に対しグラフ化した（Ａ）。また、Ｂにこれらの細胞の顕微鏡写真を示す。

[図14]血小板放出期に、BCL－XLの発現を抑制した場合と抑制しない場合において、巨核球と血小板におけるCD41aとCD42bの発現を調べた結果である。

[図15]図１４と同一の結果に基づいて、BCL－XL発現のON/OFF時における細胞数を計測した結果を示す。Ａは、CD42b陽性血小板数、Ｂは、CD41a陽性/CD42b陽性巨核球細胞数、Ｃは、CD41a陽性巨核球細胞数を示す。

[図16]血小板放出期に、BCL－XLの発現を抑制した場合と抑制しない場合において、培養温度を35℃、37℃、39℃とし、血小板数への影響を調べた結果を示す。

[図17]血清、フィーダー細胞、ブレビスタチンの有無が、血小板数に与える影響を調べた結果を示す。

[図18]血清、フィーダー細胞、ブレビスタチンの有無が、CD42b血小板の割合に与える影響を調べた結果を示す。

[図19]巨核球細胞の多核化工程（MCB expansion）と血小板放出期（Platelet production）の好適な培養条件の一例を示す。

[図20]BCL－XLの発現抑制によりCD42b血小板の割合が上昇し、培地から血清及びフィーダー細胞を除き、ブレビスタチンを加えることによりCD42b血小板の割合がさらに上昇したことを示す。

[図21]末梢血血小板のリストセチン凝集効果に、CD42bに対する機能的阻害抗体HIP1が与える影響を調べた結果を示す。

[図22]in vivoの血栓形成に、CD42bに対する機能的阻害抗体HIP1が与える影

響を調べた結果を示す。

[図23]ADAM17阻害剤KP-457（S-45457）を加えて産生させることによりGPIba（CD42b）の発現量を高くしたiPS細胞由来血小板と、ADAM17阻害剤を加えないで産生させたiPS細胞由来血小板を、それぞれNOGマウスに輸血し、血栓形成に寄与した血小板の数を測定した結果を示す。

[図24]ヒト末梢血血小板をKP-457存在下で血小板傷害剤CCCP 100μMを加えて擬似劣化させたもの、KP-457非存在下でCCCPを加えたもの、新鮮血小板を、それぞれ輸血し、血栓形成に寄与した血小板の数を測定した結果を示す。

発明を実施するための形態

[0013] （多核化巨核球細胞の製造方法）

本発明は、巨核球細胞の多核化を促進することにより、多核化した巨核球細胞を調製する方法を提供する。

本発明に係る多核化巨核球細胞の製造方法の一態様は、多核化前の巨核球細胞において、アポトーシス抑制遺伝子を強制発現させて、該細胞を培養する工程を含む。

本発明における「多核化前の巨核球細胞」は、特に限定はなく、臍帯血や骨髄細胞から得られる多核化の進んでいない巨核球細胞であってもよく、また、ES細胞、iPS細胞、臍帯血・骨髄血・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多核化の進んでいない巨核球細胞であってもよい。

また、本発明における「多核化前の巨核球細胞」には、例えば、CD41a陽性／CD42a陽性/CD42b陽性として特徴付けられる細胞も含まれる。

「多核化巨核球細胞」又は「多核化した巨核球細胞」とは、「多核化前の巨核球細胞」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巨核球細胞の核が2Nの場合には、4N以上の細胞が「多核化巨核球細胞」あるいは「多核化した巨核球細胞」となる。多核化前の巨核球細胞であっても、核の数は1つとは限らない。また、細胞群において、一定期間経過後にその細胞群に全体における核の数が有意に

増加した場合、当該期間経過前の細胞群を多核化前の巨核球細胞と呼び、期間経過後の細胞群を多核化した巨核球細胞ということもある。

[0014] 本発明は、多能性幹細胞（ES細胞やiPS細胞など）、臍帯血・骨髄血・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多核化前の巨核球細胞に対しても適用することができる。例えば、ES細胞又はiPS細胞から調製されるネット様構造物（ES－sac又はiPS－sacとも称する）から得られる巨核球細胞が好ましい。ここで、ES細胞又はiPS細胞から調製される「ネット様構造物」とは、ES細胞又はiPS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もののことである（特許文献１、特許文献２及び非特許文献２を参照のこと）。

本発明で使用されるES細胞は、特に限定されるものではなく、一般的には、胚盤胞期の受精卵をフィーダー細胞と共に培養し、増殖した内部細胞塊由来の細胞をばらばらにして、さらに、植え継ぐ操作を繰り返し、最終的にES細胞株として樹立されたものを使用することができる。

また、iPS細胞を使用する場合、体細胞（例えば、線維芽細胞や血液細胞など）へ分化多能性を付与する数種類の転写因子（以下、ここでは「分化多能性因子」と称する）遺伝子を導入することにより、ES細胞と同様の分化多能性を獲得した細胞であれば、如何なる由来の細胞であってもよい。分化多能性因子としては、すでに多くの因子が報告されており、限定はしないが、例えば、Octファミリー（例えば、Oct3/4）、SOXファミリー（例えば、SOX2、SOX1、SOX3、SOX15及びSOX17など）、Klfファミリー（例えば、Klf4、Klf2など）、MYCファミリー（例えば、c-MYC、N-MYC、L-MYCなど）、NANOG、LIN28などを挙げることができる。

[0015] 本発明者らは、多能性幹細胞から誘導した多核化前の巨核球細胞（特許文献３中で「巨核前駆細胞」と記載しているものを含む）中でMYC等の癌遺伝子とBMI1などの遺伝子等を強制発現させ、該巨核球細胞の増殖能を高めることについて報告をしている（特許文献３、JEM, 207:2817-2830 2010）。

この方法により調製された多核化前の巨核球細胞は、本発明の方法に好適

に用いることができる。

したがって、本発明に係る多核化巨核球細胞の製造方法では、多核化前の巨核球細胞として、造血前駆細胞から多核化前の巨核球細胞に至る分化段階のいずれかで、該細胞において、癌遺伝子と以下の(i)～(iii)のいずれかの遺伝子とを強制発現させ、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。

癌遺伝子としては、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。また、(i)～(iii)の遺伝子としては、例えば、BMI1、Mel18、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。癌遺伝子及びポリコーム遺伝子の発現制御は、当業者が常法にしたがって行うことができ、例えば特許文献３などに詳細が記載された方法を用いることができる。癌遺伝子及び(i)～(iii)の遺伝子は、造血前駆細胞から多核化前の巨核球細胞に分化するいずれかの段階で、細胞に導入すればよい。いずれにしても、本発明で使用される多核化前の巨核球細胞においてそれらの遺伝子の発現が誘導されればよい。

[0016] 本発明で用いられる癌遺伝子及び(i)～(iii)の遺伝子（例えば、BMI1遺伝子）には、既にそのcDNA配列が公開されている遺伝子は勿論のこと、これら公知のcDNA配列の相同性に基づいて従来技術により同定されるホモログも含まれる。

例えば、MYCファミリー遺伝子のうち、c-MYC遺伝子とは、例えば、配列番号１で示される核酸配列からなる遺伝子である。また、c-MYC遺伝子のホモログとは、そのcDNA配列が、例えば、配列番号１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。配列番号１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、配列番号１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、配列番号１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、これらのDNAによってコードされるタンパク質が、多核化前の巨核球細胞など、分化段階の細胞の増幅に寄与するもののことである。

[0017] BMI1遺伝子とは、例えば、配列番号２で示される核酸配列からなる遺伝子である。また、BMI1遺伝子のホモログとは、そのcDNA配列が、例えば、配列番号２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。配列番号２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、配列番号２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、配列番号２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のことである。

[0018] 上記癌遺伝子及び(i)～(iii)の遺伝子は、細胞増殖には必要であるが、多核化の促進や血小板放出等を阻害しうるために、多核化工程に入る前にこれら遺伝子の発現を抑制してもよい。細胞内のこれら遺伝子発現を抑制することにより、機能的な血小板がより放出されやすくなる（特許文献３）。

[0019] 本明細書において、「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。

本発明者らは、上記癌遺伝子及び(i)～(iii)の遺伝子の強制発現を抑制すると、増殖させた多核化前の巨核球細胞の細胞死が誘導されうることを見出した。後述する実施例に示されるとおり、多核化前の巨核球細胞中の癌遺伝子と(i)～(iii)の遺伝子の発現抑制を行うと共に、アポトーシス抑制遺伝子を該細胞中で強制発現させることにより、該巨核球細胞の多核化が促進され、その結果多核化前の巨核球細胞から血小板を効率的に産生させることができる。

後述する実施例に示されるとおり、アポトーシス抑制遺伝子を強制発現させることにより、巨核球細胞は長期的に増殖を継続する。

[0020] 本発明で用いられるBCL－XL遺伝子、BCL2遺伝子などのアポトーシスを抑制する遺伝子には、すでにそのcDNA配列が公開されている遺伝子は勿論のこと、これら公知のcDNA配列の相同性に基づいて従来技術により同定されるホモログも含まれる。例えば、アポトーシスを抑制する遺伝子の１つであるBCL－XL遺伝子とは、配列番号３で示される核酸配列からなる遺伝子である。また、BCL－XL遺伝子のホモログとは、そのcDNA配列が、例えば、配列番号３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。配列番号３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、配列番号３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、配列番号３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、アポトーシスを抑制する効果を有するもののことである。

[0021] ここで、ストリンジェントな条件とは、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。

例えば、低ストリンジェントな条件として、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、高ストリンジェントな条件として、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。ストリンジェント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。

[0022] 癌遺伝子、(i)～(iii)の遺伝子、アポトーシス抑制遺伝子等の遺伝子を細胞内で強制発現させる場合、当業者において周知のいかなる方法により実施してもよいが、例えば、遺伝子を、レンチウイルスやレトロウイルスなどによる遺伝子導入システムを利用して、細胞内に導入し、発現させてもよい。ウイルス遺伝子導入ベクターにより遺伝子発現を行う場合、適当なプロモーターの下流に該遺伝子を作用可能に連結し、これを遺伝子導入ベクターに挿入して、細胞内に導入して目的遺伝子を発現させてもよい。ここで、「作用可能」に連結するとは、該プロモーターによって目的遺伝子がシスに支配され、目的遺伝子の所望の発現が実現されるようにプロモーターと目的遺伝子を連結することを意味する。本発明の実施においては、例えば、CMVプロモーター、EF1プロモーターなどを使用して恒常的に目的遺伝子を発現してもよく、あるいは、テトラサイクリンなどの薬剤応答エレメントなどのトランス因子によって活性制御されるエレメントの支配下に、適当なプロモーター（誘導型のプロモーター）を配置し、例えば、薬剤添加などの制御により目的遺伝子を誘導的に発現させることもできる。このような薬剤による遺伝子発現システムは、癌遺伝子又は(i)～(iii)の遺伝子の所望の発現制御を実現するために、当業者において、適当なシステムを容易に選択することができる。このような発現を行うために、市販のキットなどを使用してもよい。また、発現制御の目的遺伝子である癌遺伝子と(i)～(iii)の遺伝子は、それぞれ別々のベクターに挿入してもよいし、同一のベクターに挿入してもよい。

[0023] また、巨核球細胞内における癌遺伝子や（i)～(iii)の遺伝子の発現の抑制は、例えば、前述の誘導的な発現システムによる発現の誘導を、薬剤等の除去により解除することで達成してもよい。あるいは、導入した癌遺伝子や（i)～(iii)の遺伝子をCre/loxシステムなどを使用して除去し、これらの遺伝子の発現を抑制的に制御してもよい。癌遺伝子又は（i)～(iii)の遺伝子の発現を抑制的に調節するために、市販のキット等を適宜使用することもできる。

[0024] 本発明に係る多核化巨核球細胞の製造方法の一態様は、アポトーシス抑制遺伝子を強制発現させた細胞において、並行してp53遺伝子産物の発現又は機能を阻害する工程を含む。ここで、発現とは、転写及び翻訳を含む概念で用いられ、発現を阻害するという場合、転写レベルで阻害することも翻訳レベルで阻害することも含みうる。

p53遺伝子産物は、癌抑制遺伝子として、広く知られているもので、種々の動物種における遺伝子配列等も公知である。

巨核球細胞内のp53遺伝子産物の機能を阻害する方法は、当該技術分野における通常の技術により達成できる。その方法として、例えば、p53遺伝子に突然変異（置換、挿入又は欠失、あるいは、改変又は修飾）を導入することで該遺伝子産物の生産を阻害する方法、該遺伝子産物の機能を直接阻害する方法などを挙げることができる。遺伝子に突然変異（置換、挿入又は欠失、あるいは、改変又は修飾）を導入する方法としては、適切な遺伝子ターゲティングベクターを利用してp53遺伝子全体を相同組換えにより破壊する方法、Cre/loxシステムなどを利用して、該遺伝子産物の活性に重要な領域に変異を導入する方法が挙げられる。

[0025] また、p53遺伝子産物の機能を阻害する方法として、ドミナントネガティブ法を用いてもよい。ドミナントネガティブ法は、変異を導入して活性を低下または喪失させたp53タンパク質を細胞内で大量に発現させ、細胞内の正常p53タンパク質に対する不活性なp53タンパク質の比率を圧倒的に高くして、結果的にp53タンパク質の機能が得られなくなった挙動を示す細胞を得る方法である。

[0026] p53遺伝子産物の発現を抑制する方法としては、アンチセンス法、リボザイム法、RNAi法などを用いてもよい。

[0027] アンチセンス法は、標的遺伝子（基本的には転写産物であるmRNA）に相補的な塩基配列を有し、一般的には10塩基長～100塩基長、好ましくは15塩基長～30塩基長の一本鎖核酸を用いて遺伝子の発現を抑制する方法である。アンチセンス核酸を細胞内に導入し、標的遺伝子にハイブリダイズさせることによって遺伝子の発現が阻害される。アンチセンス核酸は、標的遺伝子の発現阻害効果が得られる限り、標的遺伝子と完全に相補的でなくてもよい。アンチセンス核酸は、公知のソフトウエア等を用いて当業者が適宜設計することができる。アンチセンス核酸は、ＤＮＡ、RNA、DNA－RNAキメラのいずれであっても良く、また修飾されていてもよい。

[0028] リボザイムは、標的RNAを触媒的に加水分解する核酸分子であり、標的RNAと相補的な配列を有するアンチセンス領域と、切断反応を担う触媒中心領域から構成されている。リボザイムは当業者が公知の方法に従って適宜設計することができる。リボザイムは一般的にはRNA分子であるが、DNA－RNAキメラ型分子を用いることもできる。

[0029] RNAi法は、二本鎖核酸によって誘導される配列特異的な遺伝子発現抑制機構である。標的特異性が非常に高く、生体内にもともと存在する遺伝子発現抑制メカニズムを利用する方法なので安全性が高い。

RNAi効果を有する二本鎖核酸としては、例えば、siRNAが挙げられる。siRNAは、哺乳動物細胞に用いられる場合、通常19～30塩基程度、好ましくは21塩基～25塩基程度の二本鎖RNAである。RNAi効果を有する二本鎖核酸は、一般に、その一方が標的核酸の一部と相補的な塩基配列を有し、他方がこれに相補的な配列を有する。

RNAi効果を有する二本鎖核酸は、標的遺伝子の塩基配列に基づき、公知の方法に従って設計することができる。また、RNAi効果を有する二本鎖核酸は、二本鎖RNAであっても良いし、DNA－RNAキメラ型二本鎖核酸であってもよく、人工核酸や各種の修飾が施された核酸であってもよい。

siRNA、アンチセンス核酸、リボザイムは、それぞれをコードする核酸を含むベクター（例えば、レンチウイルスベクター）を細胞内に導入することによって、細胞内で発現させることができる。siRNAは、二本鎖のそれぞれをコードするDNAを用いてもよいし、二本鎖核酸がループを介して連結されてできる一本鎖核酸をコードするDNAを用いてもよい。後者の場合、細胞内で転写により得られる一本鎖RNAは、その相補的な部分が分子内でハイブリダイズし、ヘアピン型の構造を取る。このRNAはshRNA（short hairpin RNA）と呼ばれる。shRNAは細胞質に移行すると酵素（Dicer）によってループ部分が切断され、二本鎖RNAとなってRNAi効果を発揮する。

[0030] その他、巨核球細胞内のp53遺伝子産物の機能を阻害する方法として、p53遺伝子産物の機能を直接又は間接的に阻害する方法、p53のリン酸化を阻害することで間接的にp53の活性化を阻害する方法などであってもよい。

[0031] 後述する実施例に示すとおり、アポトーシス抑制遺伝子の強制発現と、p53遺伝子産物の発現又は機能の阻害を行う前の巨核球細胞は、増殖を続けるが、サイトカイン依存性がSCFであり、放出される血小板もCD42b陽性でないものを含む。アポトーシス抑制遺伝子の強制発現と、p53遺伝子産物の発現又は機能の阻害を行うと、巨核球細胞は、その後も増殖しつつ一部多核化し、CD42b陽性の血小板を多く放出するようになる。この段階では、巨核球細胞のサイトカイン依存性がSCFからTPOに変わり、増殖と成熟化が並行して進む。

[0032] 本発明に係る多核化巨核球細胞の製造方法の一態様は、アポトーシス抑制遺伝子を強制発現させて培養している細胞を、(a)アクトミオシン複合体機能阻害剤で処理する工程、(b)ROCK阻害剤で処理する工程、(c)HDAC阻害剤で処理する工程、の少なくとも１つを含む。これらの処理により、より安定な増殖と多核化が進む。

ここで、アクトミオシン複合体とは、アクチンとミオシンIIの複合体のことで、例えば、細胞質分裂の際に出現する収縮環などを構成している。アクトミオシン複合体において、ミオシンIIは、アクチンと相互作用をしながら、モーター蛋白質として機能し、収縮環の収縮運動などに関与している。本

発明の「アクトミオシン複合体機能阻害剤」は、どのようなメカニズムでその機能を阻害するものであってもよく、例えば、アクトミオシン複合体の形成を阻害することによってアクトミオシン複合体の機能を阻害するもの、ミオシン重鎖（Myosin heavy chain：MHC）IIA/B ATPase阻害に伴ってアクトミオシン複合体の機能を阻害するもの、ミオシン軽鎖キナーゼ阻害剤（Myosin light chain kinase：MLCK）阻害に伴ってアクトミオシン複合体の機能を阻害するものなどが含まれる。ミオシン重鎖IIA/B ATPaseは、細胞質分裂の際に、収縮環の収縮運動において重要な役割を担う分子であり、ミオシン軽鎖キナーゼは、ミオシン軽鎖のうちL2をリン酸化して、アクチンーミオシン間の滑り運動を誘導する。

これまでに、ROCK阻害剤が巨核球細胞の核内分裂を抑制し、多核化を促進することが報告されてはいるが、アクトミオシン複合体の形成又は機能を制御するミオシン重鎖IIA/B ATPaseやミオシン軽鎖キナーゼは、ROCKシグナルの下流において機能しており、アクトミオシン複合体の形成又は機能調節を介して、より直接的に収縮環の収縮運動の制御を行っている。そのため、アクトミオシン複合体機能阻害剤は、ROCK阻害剤よりも効果的に巨核球細胞の核内分裂を抑制し、多核化をより一層促進するものと考えられる。

本発明で使用可能な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IIA/B　ATPase阻害剤である、ブレビスタチン（Blebbistatin；Science, 299:1743-1747 2003）を挙げることができる。また、ミオシン軽鎖キナーゼ阻害剤である、ML7などを挙げることができる。その他、ミオシン重鎖IIA/B ATPase阻害剤又はミオシン軽鎖キナーゼ阻害剤として、ミオシン重鎖IIA/B ATPase又はミオシン軽鎖キナーゼの活性を阻害する核酸（例えば、shRNAなど）や抗体なども使用することができる。

なお、本明細書中において、「処理」とは、阻害剤等の効果が対象細胞において発揮されるようする操作のことで、例えば、細胞の培養液中に適当量の阻害剤等を添加し、細胞内に取りこませるような状態に置くことである。場合によっては、細胞への取り込みを促進するような操作を併用してもよい

。

[0033] 本発明に係る巨核球細胞の製造方法の一態様は、アポトーシス抑制遺伝子を強制発現させて培養している細胞を、Rock阻害剤で処理する工程を含む。

ROCK（Rho-associated coiled－coil forming kinase／Rho結合キナーゼ）阻害剤としては、例えば、〔（R）－（＋）－トランス－N－（4－ピリジル）－4－（1－アミノエチル）-シクロヘキサンカルボキサミド・2HCl・H_2O〕（Y27632）などを挙げることができる場合によっては、Rhoキナーゼ活性を阻害するような抗体、あるいは、核酸（例えば、shRNAなど）も、ROCK阻害剤として使用することができる。

[0034] 本発明に係る巨核球細胞の製造方法の一態様は、アポトーシス抑制遺伝子を強制発現させて培養している細胞を、HDAC阻害剤で処理する工程を含む。

HDAC阻害剤は、ヒストン脱アセチル化酵素（HDAC）活性を阻害する作用をもつ。これまでに、HDAC阻害剤は多数知られており、例えば、バルプロ酸、トリコスタチンA、SAHA（スベロイルアニリドヒドロキサム酸）、APHA（アロイルピロリルヒドロキシアミド）などを挙げることができ、特に、バルプロ酸、トリコスタチンAなどを好適に使用することができる。使用薬物が塩の形態を有する場合には、塩の形態で使用してもよい。

[0035] アクトミオシン複合体機能阻害剤、ROCK阻害剤、HDAC阻害剤等で細胞を処理する場合の至適濃度などは、当業者であれば、予備的な実験によって予め決定することができる。また、処理する期間や方法なども、当業者において適宜選択することができる。例えば、ミオシン重鎖II ATPase阻害剤であるブレビスタチン処理の場合、2～15μg/ml、あるいは、5～10μg/ml程度を培養液中に添加し、培養期間としては、例えば、5～10日間程度、特に、6～7日間程度が好ましい。また、ROCK阻害剤であるY27632は、5～15μM、あるいは、8～12μM、好ましくは10μM程度で使用し、HDAC阻害剤であるバルプロ酸は、0.1～1mM、あるいは、0.2～0.7mM、好ましくは0.5mM程度で使用することができる。Y27632、バルプロ酸の処理時間としては、10～21日間、好ましくは14日間程度である。

[0036] 本発明に係る多核化巨核球細胞の製造方法の一態様は、アポトーシス抑制遺伝子を強制発現させて培養している細胞を、37℃以上の温度に置くことを含む。

また、巨核球細胞を通常の37℃以上の温度で培養することにより、多核化した巨核球細胞の分化を促進することが確認されている。ここで、37℃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℃～約42℃程度、約37～約39℃程度が好ましい。また、37℃以上の温度における培養期間については、多核化した巨核球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が、例えば、10日間～28日間、好ましくは14日間～21日間程度である。

[0037] 多核化前の巨核球細胞においてアポトーシス抑制遺伝子を強制発現させて培養する工程の他の培養条件などは、本発明の効果が好適に得られる限り特に限定されず、公知の培養条件やそれに準ずる条件を使用することができる。例えば、TPO、IL-1、IL-3、IL-4、IL5、IL-6、IL-9、IL-11、EPO、GM-CSF、SCF、G-CSF、Flt3リガンド、Heparinなどのいずれか又はこれらのうちの2つ以上を組合せて培地に添加してもよい。

また、適宜フィーダー細胞を用いて培養してもよい。

[0038] 上述の方法で得られた多核化した巨核球細胞は、CD42b陽性の機能的な血小板を効率よく産生する。実施例に示すとおり、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。また、多核化した巨核球細胞は、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。

[0039] 本発明はまた、多核化巨核球細胞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、本発明の方法で多核化が促進された「多核化巨核球細胞」を含む他、その他の方法によって調製された巨核球細胞、又は、その他の血液細胞が含まれていてもよい。

本発明の方法によって多核化前の巨核球細胞を処理すると、4N以上の多核化巨核球細胞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巨核球細胞集団に対し、本発明の方法を適用することで、4N以上の多核化巨核球細胞の含有率の高い血液細胞組成物を取得することができる。本発明の方法で巨核球細胞集団を処理した場合、4N以上の多核化巨核球細胞の含有率を、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（例えば、図１１Ｂ参照）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、多核化巨核球細胞の存在比率の高い巨核球細胞集団、あるいは、血液細胞集団を調製することが可能となる。

かかる血液細胞組成物も凍結保存が可能である。したがって、凍結保存した状態で流通させ、ユーザにおいて後述する血小板の製造方法を行ってもよい。

[0040] 本発明の方法で処理を行い多核化が促進された巨核球細胞等は、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。

現在、造血幹細胞の移植方法として、骨髄移植や臍帯血移植などが行われており、特に、臍帯血移植は、ドナー数の不足やドナーへの負担の大きさといった骨髄移植における問題を軽減することが可能となることから、近年、臍帯血移植の機会が増えてきている。しかし、臍帯血移植により生体内に産生される巨核球細胞は、多核化の程度が低く、十分な血小板を生体内で産生するまでには、時間を要し、早急に血小板の産生能力を高める必要がある場合には、臍帯血移植では十分な対応ができにくい状況にある。

本発明の方法によって得られる多核化巨核球細胞等の移植は、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うことができる。

[0041] （血小板の製造方法）

一方、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多核化巨核球細胞等から、in vitroで血小板を産生させるものである。

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多核化した巨核球細胞を培養し、培養物から血小板を回収する工程を含む。

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、7～15日間程度培養してもよい。

[0042] 本発明に係る血小板の製造方法の一態様では、多核化巨核球細胞の培養工程で、上記アポトーシス遺伝子の強制発現を抑制するか、上記アポトーシス抑制遺伝子を多核化巨核球細胞から除去する。

アポトーシス抑制遺伝子の発現の抑制は、例えば、前述の誘導的な発現システムによる発現の誘導を、薬剤等の除去により解除することで達成してもよい。あるいは、導入したアポトーシス抑制遺伝子をCre/loxシステムなどを使用して除去し、これらの遺伝子の発現を抑制的に制御してもよい。アポトーシス抑制遺伝子の発現を抑制的に調節するために、市販のキット等を適宜使用することもできる。

後述する実施例に示すとおり、多核化の促進のために強制発現させたアポトーシス抑制遺伝子の発現を抑制すると、CD41a陽性／CD42b陽性の機能的な血小板の産生効率が上昇する。

アポトーシス抑制遺伝子の発現抑制又は除去は、血小板回収の15日前から、好ましくは10日前から、より好ましくは3日～7日前から、さらに好ましくは約3日前から行う。

なお、この工程では、外因性のアポトーシス抑制遺伝子のみではなく、内因性のアポトーシス抑制遺伝子の発現も抑制してもよい。また、p53遺伝子産物の発現又は機能阻害を、本工程において引き続き行ってもよい。

[0043] 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℃～40℃で行うことができるが、実施例に示されるとおり、37℃～39℃が好適である。

[0044] 本発明に係る製造方法では、多核化巨核球細胞の培養工程を、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。実施例に示されるとおり、本発明に係る方法では、胎仔牛血清を培地に加えた場合と、血清フリー培地で培養した場合とでは、血小板の産生量には大きな差が見られなかったが、血清フリー培地又はフィーダー細胞フリー培地で培養した場合のほうが、CD42b陽性血小板の割合が高かった。血小板産生工程を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。

[0045] 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細胞の製造方法で使用したも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、ブ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。

ROCK阻害剤及び／又はアクトミオシン複合体機能阻害剤は、0.1μM～30μMで加えることが好ましく、例えば0.5μM～25μM、5μM～20μM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。

[0046] 本発明の実施形態には、巨核球細胞の多核化を促進し、成熟巨核球細胞及び／又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、癌遺伝子、上記(i)～(iii)の遺伝子、BCL－XL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、ES細胞又はiPS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。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。

さらに、本発明のキットには、癌遺伝子及び上記(i)～(iii)の遺伝子を強制発現した多核化前の巨核球細胞が含まれていてもよい。

[0047] 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。

[0048] 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

[0049] １．多核化前の巨核球細胞の調製

１－１．ES細胞からの多核化前の巨核球細胞の調製

巨核球の多核化について検討するために、ES細胞から多核化する前の巨核球細胞の調製を行った（詳細については、特許文献３を参照のこと。）。

ヒトES細胞株〔KhES-3〕を20ng/ml VEGF存在下で14日間培養してネット様構造物を調製し、このネット様構造物から取り出した造血前駆細胞を回収し

て、10T1/2細胞上に細胞数1×10^5/ウェルになるように播いた。

このように調製した造血前駆細胞に、c-MYC－2A－BMI1を組み込んだpMx tet off c-MYC 2A BMI1レトロウイルスベクターをMOI＝10（Jurkat細胞で確認）で12時間ごとに3回感染させてc-MYCとBMI1の発現誘導を行った（特許文献３）。pMx tet off c-MYC 2A BMI1ベクターは、エストラジオール存在化で、c-MYC遺伝子及びBMI1遺伝子を発現させる一方、ドキシサイクリン（Dox）存在化、エストラジオール非存在化では、c-MYC遺伝子及びBMI1遺伝子の発現を抑制する。

1回目の感染と同時にエストラジオール2mMを添加し、また、最後の感染から12時間後にウイルスを除去した。この時期は、c-MYC遺伝子やBMI1遺伝子の発現をOffにしても、CD42b陽性血小板の放出が少なく、未成熟な巨核球細胞であるものと考えられた。この細胞を以降、「iMKPC－typeI」と呼ぶこともある。

iMKPC－typeIのサイトカイン依存性を調べるために、10T1/2フィーダー細胞上に2x10^{5}個のiMKPC－typeIを播種し、2uM β-estradiol存在下、37℃でSCF(50ng/ml)、TPO(50ng/ml)、EPO(6U/ml)のサイトカインを用いて、図１Ａに示す条件で14日間培養した。4、11日目に増殖が確認された群は細胞数を測定し2×10^{5}個で再播種し、それ以外は培地交換を行なった。8、14日目に細胞数を測定し2×10^{5}個で再播種するとともに、8日目には、一部の細胞をCD41抗体、CD42b抗体およびGPA抗体を用いて染色し、フローサイトメーターで解析を行った。

結果を図１Ｂ及びＣに示す。図１Ｂに示されるとおり、iMKPC－typeIの増殖はSCFに強く依存していた。また、図１Ｃに示されるとおり、いずれの群もほぼCD41陽性であったが、SCFを除いた群では、CD41+/CD42b-の群の増殖が極端に低下していた。CD41+/CD42b-の群が、iMKPC－typeIの中でも増殖の良い集団である。

SCF依存性であることからも、iMKPC－typeIは未成熟な巨核球細胞であることが示唆された。

[0050] １－２．臍帯血由来CD34陽性細胞からの多核化前の巨核球細胞の調製

臍帯血由来CD34陽性細胞からも、ES細胞やiPS細胞と同様の方法で多核化前の巨核球細胞を調製できることを確認した。

具体的には、臍帯血由来CD34陽性細胞にpMx-c-MYCとDNsam BMI1ウイルス（いずれもレトロウイルスベクター）をMOI10で三回感染後、14日目と21日目の細胞について、FACSを用いてCD41a(巨核球マーカー)陽性細胞をカウントした。コントロールとして、Mock(Empty vector）を用いた。

結果を図１Ｄに示す。Mockと比較して、c-MYCとBMI1を強制発現させた群ではCD41陽性巨核球の増殖が観察され、臍帯血由来細胞からも、１－１．と同様の方法で多核化前の巨核球細胞が得られることを確認した。

[0051] ２．多核化前の巨核球細胞からの多核化巨核球の調製

２－１．BCL－XL発現による多核化への影響

１－１．において、c-MYC－2A－BMI1を組み込んだpMx tet off c-MYC 2A BMI1レトロウイルスベクター感染後、23日目に、ドキシサイクリン誘導性のLv-BCL-XL-GFP（レンチウイルスベクター）をMOI10で1回感染させた。このベクターは、EcoRI、BamHI処理したAi-Lv tet onベクター（clontech）にPCR増幅したBCL－XLのcDNAを、In-Fusion advance PCR cloning kit（clontech）を用いて導入することにより作製した。感染から24時間後に、ウイルス除去した。エストラジオールを除去し、Doxycylineを加えることで、c-MYCとBMI1の発現を抑制し、同時にBCL－XLの発現を開始した。

[0052] ２－２．p53遺伝子のノックダウンによる多核化への影響

ドキシサイクリン誘導性のLv－BCL－XL－GFPレンチウイルスベクターに加えて、FG12-sh p53レンチウイルスベクターを感染させて、p53遺伝子をノックダウンした。以降、この細胞を「iMKPC－typeII」と呼ぶ場合がある。

[0053] ２－３．iMKPC－typeIIのサイトカイン依存性

10T1/2フィーダー細胞上に、2×10^5個のiMKPC－typeIIを播種し、Dox0.5μg/ml存在下、39℃で、SCF(50ng/ml)、TPO(50ng/ml)、EPO(6U/ml)のサイトカイン条件で21日間培養した。結果を図２Ａに示す。iMKPC－typeII株は、サイト

カインの非存在下においても増殖するが、TPOの添加によって増殖がより促進されることが確認された。iMKPC－typeIはSCF依存性で、TPOは増殖に無関係であったが、typeIIでは、TPO存在下での増殖が促進され、SCFは増殖に無関係であった。

[0054] ２－４．iMKPC－typeIIの表面マーカーの解析

サイトカイン添加後21日目に、細胞をCD41抗体、CD42b抗体、及びGPA抗体を用いて染色し、フローサイトメーターで解析した。結果を図２Ｂに示す。TPOを添加した群では、他の群に比べてCD41a及びCD42bの発現が高かった。より巨核球にコミットした集団であると考えられた。

[0055] ２－５．形態的変化及びブレビスタチンの影響

iMKPC－typeI及びtypeIIを顕微鏡で観察した結果を図３に示すc-MYCとBMI1の発現をoffにし、BCL－XLを強制発現させるとともに、p53をノックダウンすることによって、多核化が進むことが観察された。また、ブレビスタチン（5μg/ml）を添加するとさらに多核化が進むことが確認された。

２－３．～２－５．に示されるとおり、iMKPC－typeIIの段階では、巨核球細胞は増殖しつつ、放出される血小板ではCD42b陽性の割合が高くなり、一部多核化が進んで、サイトカインの依存性がTPOに変わったことから、増殖と成熟化が並行して進んでいるものと考えられた。

[0056] ２－６．BCL－XL発現抑制の影響

10T1/2フィーダー細胞上に、2×10^5個のiMKPC－typeIIを播種し、Dox0.5μg/ml存在下（BCL－XL　ON）または非存在下（BCL－XL　OFF）、39℃で長期培養した。2日～5日に一度細胞数を測定し、2×10^5個を再播種した。

結果を図４に示す。Dox OFFによりBCL－LXの発現を抑制すると、iMKPC－typeIIの増殖速度が低下し、長期経過後（100日以降）には増殖能が失われた。BCL－XLは、iMKPC－typeIIの長期増殖に必須であることがわかった。

[0057] ２－７．その他の処理の多核化への影響の検討

２－７－１．ROCK阻害剤の影響

MYC及びBMI1遺伝子導入後、ドキシサイクリン非存在下及びエストラジオー

ル存在下において、培養条件、37℃、5%CO_2存在下にて、巨核球細胞（10^5程度）を30日間程度培養して、10^{11}個程度に増殖させた。増殖した巨核球細胞株中のMYC遺伝子及びBMI1遺伝子の発現を抑制するために、ドキシサイクリン存在下、エストラジオール非存在下の条件に変え、ROCK阻害剤（Y27632；和光純薬）の多核化への影響を見るために、Y27632を培養液中へ10μMになるように添加し、さらに培養を続けた。Y27632を添加してから培養7日目にFACSにより多核化の程度を調べた（図５）。ROCK阻害剤を添加した細胞（図５上図（Rocki）、下図白抜き）は、添加していない細胞（図５上図（vehicle）、下図黒塗り）と比較して4N以上の細胞数が増加した。このことから、ES細胞から誘導し、c-MYC遺伝子及びBMI1遺伝子の発現によって増殖能を獲得した多核化前の巨核球細胞に対し、ROCK阻害剤は多核化を促進することが明かとなった。

[0058] ２－７－２．ROCK阻害剤＋高温条件での培養の影響

これまでに、未成熟巨核球細胞を39℃のような通常の培養温度よりも高温で培養すると、多核化やproplatlet形成など、巨核球の成熟が促されることが報告されている（非特許文献５）。この点をES細胞から誘導した多核化前の巨核球細胞において確認するため、巨核球の成熟に伴い発現が上昇することが知られている遺伝子（GATA1、PF4、NFE2及びβ－チューブリン）の発現量について定量PCR法により検討を行った。

多核化前の巨核球細胞の増殖を促した。得られた多核化前の巨核球細胞中のMYC遺伝子及びBMI1遺伝子の発現を抑制するために、ドキシサイクリン存在下、エストラジオール非存在下の条件に変え、培養温度を39℃とし、5日間培養後、定量PCR法により、各種遺伝子の発現量を測定した（図６）。その結果、37℃で培養するときよりも、39℃で培養を行ったときの方が、巨核球の成熟化の指標となる遺伝子の発現が上昇していることが分かった。

[0059] ２－７－３．ROCK阻害剤＋BCL－XL遺伝子強制発現の影響

多核化前の巨核球細胞中におけるMYC／BMI1の発現を抑制すると同時にドキシサイクリン存在下で２－１．と同様のBCL－XLを発現させるレンチウイルス

ベクターを細胞内に導入した。

BCL－XL遺伝子の発現の有無が、ROCK阻害剤によって誘導される巨核球前駆細胞の多核化へどのような影響を与えるかを調べた（図７）。

10μMのY27632存在下でMYC／BMI1の発現を抑え、かつ、BCL－XLを発現させ、7日間培養した後、多核化の程度を検討した(ploidy assay)。BCL－XL発現細胞株（図７Ｂ、斜線バー）はBCL－XLを発現させていない細胞株（図７Ｂ、白抜きバー）と比べ、8N以上の多核化細胞が優位に増加していることが確認された。また、BCL－XLを発現させていない細胞の細胞数が減少していくのに対し（図８、▲）、BCL－XLを発現させた細胞の細胞数は、緩やかに増殖していくのが観察された（図８、■）。

以上のことから、癌遺伝子の強制発現によって高い増殖能を獲得した多核化前の巨核球細胞において、癌遺伝子依存性を回避するためには、BCL－XL遺伝子などのアポトーシスを抑制する遺伝子が効果的であることが示された。

[0060] ２－７－４．ROCK阻害剤＋BCL－XL遺伝子強制発現＋p53遺伝子抑制の影響

多核化前の巨核球細胞において、p53の発現抑制が多核化を促進するかどうか検討を行った。

p53遺伝子の発現抑制は、２－２．と同様に、１プロモーター、ｓｈp53を導入したlenti virus FG12ベクターを用いてMOI10でレンチウイルス感染させて行った。

MYC／BMI1の発現を抑制し、BCL－XLを強制発現させ、Y27632の存在下、p53の発現抑制を行い、39℃にて、7間培養を行った。培養後、多核化の程度を調べたところ、p53をノックダウンしていないコントロール細胞（図９Ｂ、黒バー）と比較して、p53をノックダウンした細胞（図９Ｂ、白抜きバー）では、8N以上の細胞数が増加し、多核化が促進されていた。

[0061] ２－７－５．ROCK阻害剤＋BCL－XL遺伝子強制発現＋p53遺伝子抑制＋バルプロ酸の影響

上記２－７－４の処理に加えて、さらに細胞に対しバルプロ酸の処理を行い、多核化への影響を検討した。MYC／BMI1の発現を抑制、BCL－XLの強制発

現、ROCK阻害剤処理（10μM）、p53発現抑制に加え、培地中にバルプロ酸（最終濃度0.5mM）を加え、39℃で7日間培養したところ、バルプロ酸処理を行っていないコントロール細胞（図１０Ｂ、黒バー）と比較して、バルプロ酸で処理した細胞（図１０Ｂ、白抜きバー）では、多核化が促進されていた。

[0062] ２－７－６．BCL－XL遺伝子強制発現＋ミオシン重鎖IIA/B ATPase阻害剤の影響、及びROCK阻害剤＋BCL－XL遺伝子強制発現＋p53遺伝子抑制＋バルプロ酸＋ミオシン重鎖IIA/B ATPase阻害剤の影響

多核化の進んでいない巨核球細胞を、ミオシン重鎖IIA/B ATPase阻害剤のブレビスタチンで処理した場合、多核化の程度に影響が出るかどうか検討した。MYC／BMI1の発現を抑制、BCL－XLの強制発現、ブレビスタチン（10μg/ml）処理を行い、39℃で7日間培養した。ブレビスタチン処理を行っていないコントロール細胞（図１１Ｂ、黒バー）と比較して、ブレビスタチン処理を行った細胞（図１１、白抜きバー）では、8N以上の細胞数が増加し、多核化が促進されていた。

次に、他の処理とブレビスタチン処理を組み合わせた場合の多核化の程度について検討を行った。上記２－７－５．の処理に加え、細胞に対しブレビスタチン処理を行い、多核化への影響を検討した。MYC／BMI1の発現を抑制、BCL－XLの強制発現、ROCK阻害剤（10μM）処理、p53発現抑制、バルプロ酸（0.5mM）処理に加え、ブレビスタチン（10μg/ml）処理を行い、39℃で7日間培養した。ブレビスタチン処理を行っていないコントロール細胞（図１２Ｂ、黒バー）と比較して、ブレビスタチン処理を行った細胞（図１２、白抜きバー）では、8N以上の細胞数が増加し、多核化が促進していた。また、培養7日後、ブレビスタチン処理を行った細胞ではやや増殖能は低下しているものの（図１３、上図）、細胞質の肥大化が観察され、成熟巨核球への誘導が確認された（図１３、下図）。

[0063] ３．多核化巨核球細胞からの血小板の産生

３－１．BCL－XL発現抑制の血小板産生への影響（１）

10T1/2フィーダー細胞上に、２－２．で得られた$2x10^5$個のiMKPC－typeIIを

播種し、Dox 0.5μg/ml存在下（BCL－XL ON）で、またはDoxを培養液中から除去して（BCL－XL OFF）、39℃で培養した。3-4日目に巨核球および培養液中の血小板をCD41抗体およびCD42b抗体を用いて染色し、フローサイトメーターで解析を行った。

結果を図１４に示す。Dox ONでBCL－XLが発現している巨核球細胞（Ａ）に比較して、Dox OFFによりBclxLの発現を抑えた群ではCD42bを発現している成熟した巨核球細胞が主体となっていた（Ｂ）。また、そこから放出された血小板も、BCL－XL ONの巨核球細胞から放出された血小板（Ｃ）に比較して、機能発現に必要なCD42bを発現しているものの割合が増加していた（Ｄ）。

[0064] ３－２．BCL－XL発現抑制の血小板産生への影響（２）

３－１．と同一の結果に基づいて、BCL－XL発現のON/OFF時における細胞数を計測した結果を図１５に示す。BCL－XLの発現を抑えた群では血小板数が著しく増加した。

Ａは、CD42b陽性血小板数、Ｂは、CD41a陽性/CD42b陽性巨核球細胞数、Ｃは、CD41a陽性巨核球細胞数を示す。

CD41を発現している巨核球細胞の数においてはBclxLの発現による影響は見られないが（Ｃ）、CD41+中のCD42b発現比率がBclxLの発現抑制により増加し、より成熟した巨核球が増えていたと言える。

[0065] ３－３．培養温度の血小板産生への影響

10T1/2フィーダー細胞上に2～3x10^{5}個のiMKPC－typeIIを播種し、Dox 0.5μg/mLの添加あるいは非添加条件において、35、37、39℃の培養温度で3日間培養した。上清中に含まれる血小板をCD41抗体およびCD42b抗体を用いて染色し、フローサイトメーターで解析を行った。37℃ Dox+を1として、各群のCD41+CD42b+血小板数の平均値および標準偏差を図１６に示す。

培養温度は、37℃または39℃が適当であることがわかった。以降の実験では、培養温度を37℃とした。

[0066] ３－４．フィーダー細胞、培地中の血清、及びブレビスタチンの有無の血小板産生への影響

フィーダー細胞使用／非使用、Conditioned Medium使用／非使用、血清培地使用／無血清培地使用、ブレビスタチン投与／非投与、の条件を図１７に示すように組合せて血小板産生効率を測定した。

Conditioned Mediumは、Gelatin coatingした10cm dishにMMC処理した10T1/2を8x10^{5}播種し、翌日（細胞が接着後）SCF(50ng/ml)、TPO(50ng/ml)を含む15%血清を含む分化培地(EBM)または血清フリーの分化培地10mlに交換し、24時間後に培地を回収して新たな培地（含SCF、TPO）を10ml添加し、3日間分のConditioned Mediumをプールし、0.22μmのフィルターを通し、10T1/2を除去して調製した。試験に用いる際にはSCF、TPOは新たに添加した。

フィーダー細胞使用群は、10T1/2フィーダー細胞上に2～3x10^{5}個のiMKPC－typeIIを播種し、非使用群は、ゼラチンコートしたディッシュ上に同様に細胞を播種した。血清培地使用群は、15%血清を含む分化培地またはConditioned Mediumを用い、ブレビスタチン投与群は、培地に5μMのブレビスタチンを添加した。培養は、37℃で3日間行った。

培養上清中に含まれる血小板をCD41抗体およびCD42b抗体を用いて染色し、フローサイトメーターで解析を行った。フィーダー細胞上でブレビスタチン非添加、15%血清添加して培養したものをnormal conditionとし、各群のCD41+CD42b+血小板数のnormal conditionに対する割合の平均値および標準偏差を棒グラフにしたものを図１７に示す。血小板産生量としては、いずれの群においても大きな差は認められなかった。

また、各群のCD41陽性血小板中のCD42b発現量（各群の平均蛍光強度のnormal conditionの平均蛍光強度に対する割合）の比較を図１８に示す。血清なし、フィーダー細胞なしの条件で、最もCD42bの発現の高い血小板が産生された。ブレビスタチンの影響は見られなかった。

[0067] 最適化した条件の一例を図１９に示す。また、この条件で培養したときのCD41陽性、CD42b（GPIbaともいう）陽性血小板の割合を図２０に示す。

図２０に示されるとおり、本発明によって得られる多核化巨核球細胞から得られる血小板は、約20%がCD41陽性CD42b陽性であり、BCL－XLの発現を抑

制することによって、その割合が55%へと上昇し、さらにフィーダー細胞と血清を除いて培養することにより81%まで上昇させることができた。

[0068] ４．CD42b発現の血小板機能への重要性（参考）

ヒト末梢血血小板を用いて、リストセチン凝集反応（vWFと血小板上のレセプター〔GPIba、GPIXなどからなるヘテロ5量体〕を介した凝集反応）に対するHIP1抗体の阻害効果を測定した。HIP1抗体は、GPIbaの機能的阻害抗体である。

1x10^{8}個の血小板を５０％血漿中に懸濁し、HIP1抗体を添加して37℃で3分間前培養してGPIbaの効果を阻害した後、リストセチン（最終濃度2mg/ml）を添加して凝集反応を惹起し、7分間光透過度をモニターした。各群の最大光透過度（凝集の強度を示す）を示す棒グラフを図２１に示す。HPI1抗体は10μg/ml以上の濃度でGPIb/alpha-von Willebrand factor（vWF)会合による凝集を完全に阻害した。

[0069] 次に、NOGマウス体内に100ugのHIP1抗体またはコントロールIgGを投与し、TAMRA(赤い色素)で染色した血小板を輸血した。血管内皮をレーザー照射により傷害して血栓形成を惹起し、血栓形成に寄与したヒト血小板（赤）数をカウントした。

血栓中のヒト血小板数を単位血管長で補正した値の平均値および標準誤差を棒グラフで示した（図２２）。HIP1抗体投与群では、ヒト血小板の血栓への寄与が阻害された。

以上から、GPIba（CD42b）はin vivo及びin vitroにおける血栓形成に重要な役割を果たしている分子であることがわかる。

産業上の利用可能性

[0070] 本発明は、巨核球前駆細胞の多核化を促し、さらに、血小板の放出を効率よく行わせる方法を提供する。特に、本発明の方法は、各種幹細胞などからインビトロにおいて巨核球や血小板を調製する際に、非常に有効であり、医療分野における治療法や血液製剤の開発に大いに寄与するものである。

請求の範囲

[請求項1] 多核化巨核球細胞を製造する方法であって、

多核化前の巨核球細胞において、アポトーシス抑制遺伝子を強制発現させて、該細胞を培養する工程を含む、方法。

[請求項2] 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に記載の方法。

[請求項3] 前記培養工程において、p53遺伝子産物の発現又は機能を阻害する、請求項１または２に記載の方法。

[請求項4] 前記培養工程において、多核化前の巨核球細胞に対して以下の(a)～(c)の少なくとも1つを行う、請求項１から３のいずれか１項に記載の方法：

(a)アクトミオシン複合体機能阻害剤による処理；

(b)ROCK阻害剤による処理；及び

(c)HDAC阻害剤による処理。

[請求項5] 前記ROCK阻害剤がＹ27632であり、前記HDAC阻害剤がバルプロ酸であり、前記アクトミオシン複合体機能阻害剤がブレビスタチンである、請求項４に記載の方法。

[請求項6] 前記培養工程を37℃より高い温度で行う、請求項１から５のいずれか１項に記載の方法。

[請求項7] 前記多核化前の巨核球細胞は、

造血前駆細胞から多核化前の巨核球細胞に至る分化段階のいずれかで、該細胞において、癌遺伝子と以下の(i)～(iii)のいずれかの遺伝子とを強制発現させ、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である、請求項１から６のいずれか１項に記載の方法：

(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。

[請求項8] 前記癌遺伝子としてc-MYC遺伝子を、前記(i)～(iii)の遺伝子とし

てBMI1を用いる、請求項７に記載の方法。

[請求項9] 前記造血前駆細胞は、iPS細胞、ES細胞、並びに、臍帯血、骨髄血若しくは末梢血由来の造血幹細胞及び造血幹細胞からなる群より選択される細胞に由来する、請求項７又は８に記載の方法。

[請求項10] 請求項１から９のいずれか１項に記載の方法で製造された多核化巨核球細胞を含む血液細胞組成物。

[請求項11] 血小板の製造方法であって、

請求項１から９のいずれか１項に記載の方法で多核化巨核球細胞を得て、これを培養する工程と、

前記多核化巨核球細胞の培養物から血小板を回収する工程と、を含む方法。

[請求項12] 前記多核化巨核球細胞の培養工程は、前記アポトーシス抑制遺伝子の強制発現を抑制して、又は、前記アポトーシス抑制遺伝子を細胞から除去して行う、請求項１１に記載の方法。

[請求項13] 前記多核化巨核球細胞の培養工程は、血清なし、及び／又はフィーダー細胞なしで行う、請求項１１又は１２に記載の方法。

[請求項14] 前記多核化巨核球細胞の培養工程を、1日から15日間行う、請求項１１から１３のいずれか１項に記載の方法。

[請求項15] 前記多核化巨核球細胞の培養工程は、37℃で行う、請求項１１から１４のいずれか１項に記載の方法。

[請求項16] 前記多核化巨核球細胞の培養工程で、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、請求項１１から１５のいずれか１項に記載の方法。

[請求項17] 前記ROCK阻害剤が、Ｙ27632であり、前記アクトミオシン複合体機能阻害剤が、ブレビスタチンである、請求項１６に記載の方法。

[請求項18] 請求項１１から１７のいずれか１項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。