明　細　書

発明の名称 ： 巨核球の品質管理マーカー

技術分野

[0001] 本発明は、巨核球の品質管理マーカーに関する。より詳細には、Ral遺伝子の転写産物またはタンパク質からなる、巨核球の品質管理マーカーなどに関する。

背景技術

[0002] ウイルス汚染、同種免疫輸血不応性、近年のCOVID-19パンデミックなど、さまざまな要因による供給不足の課題が続いているにもかかわらず、ドナー依存の血小板輸血は、標準的な医療慣行となっている。この状況下で、本発明者らは、ヒト人工多能性幹細胞（iPSC）を用いたex vivoでの血液製剤の生産という戦略を採用した。本発明者らは、ex vivoでのiPSC由来の血小板（iPSC-PLT）製造の開始細胞源として、不死化巨核球細胞株（imMKCL）を開発した（非特許文献１、２）。imMKCLは、ドキシサイクリン（DOX）の存在下で数ヶ月にわたる持続的な増殖を示し、DOX除去後にiPSC-PLTを放出し、乱流フローを用いたバイオリアクターで10^{11}個以上のiPSC-PLTを作製することが可能である(非特許文献３)。これらの成果を基に、本発明者らは世界初の臨床試験であるiPS細胞由来血小板のfirst-in-human臨床試験（iPLAT1）を開始した（非特許文献４－６）。iPLAT1では、有意な副作用なく有望な結果が示されたが、最大投与量の輸血後に一過性のD-ダイマーレベルの増加と白血球数の増加が観察された（非特許文献４）。これらの観察結果から、最近同定された免疫偏向型巨核球の関与が示唆されており（非特許文献７、８）、マスター細胞としてのimMKCLの品質管理に関する懸念を引き起こしている。一方で、本発明者らは、増殖およびiPSC-PLT生産能力に関して、imMKCLクローンの品質にかなりのばらつきがあることを見出した（非特許文献９）。具体的には、細胞老化を示す特定のimMKCLクローンは、iPSC-PLTを産生する能力が低下していたが、p53およびCDKN1Aのノックダウンによりその能力が回復した（非

特許文献９）。しかし、この不均一性の根底にある分子要因は、iPSC-PLT製造の効率と標準化を著しく妨げているが、依然として不明である。

先行技術文献

非特許文献

[0003] 非特許文献1：Takayama, N. et al. J Exp Med 207, 2817-2830 (2010)

非特許文献2：Nakamura, S. et al. Cell Stem Cell 14, 535-548 (2014)

非特許文献3：Ito, Y. et al. Cell 174, 636-648.e618 (2018)

非特許文献4：Sugimoto, N. et al. Blood 140, 2398-2402 (2022)

非特許文献5：Sugimoto, N. et al. Blood Adv 6, 6056-6069 (2022)

非特許文献6：Chen, S.J., Sugimoto, N. & Eto, K. Int J Hematol 117, 349-355 (2023)

非特許文献7：Wang, H. et al. Cell Stem Cell 28, 535-549.e538 (2021)

非特許文献8：Sun, S. et al. Blood 138, 1211-1224 (2021)

非特許文献9：Sone, M. et al. Stem Cell Reports 16, 2861-2870 (2021)

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0004] したがって、本発明は、前記不均一性の根底にある分子要因を解明することにより、巨核球の品質を制御できるバイオマーカー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

[0005] 本発明者らの研究チームのメンバーの一人が、巨核球（MK）を用いたある研究を進める中で、血小板産生効率における再現性が認められない事象に遭遇した。本発明者らが、この再現性が認められない原因を鋭意検証したところ、巨核球を長い期間培養してしまい、該巨核球が老化していたことが原因であることを突き止めた。RNA seqのデータを解析結果から、巨核球を長い期間培養することで、該巨核球が老化して免疫特性が強化されたことを見出した。そして、巨核球が老化するメカニズムを解明することで、巨核球の品質

を維持できるのではないかとの着想を得た。上記メカニズムを解明するために、本発明者らは、マイクロRNAに着目した。

[0006] マイクロRNA（miRNA）は、小さな非コーディングRNAであり、相補的なmRNA配列に結合することで、標的mRNAの安定性や翻訳を負に制御する。造血細胞において、miRNAは細胞の運命決定や機能における重要な役割を果たすことが明らかになっている（Mehta, A. & Baltimore, D. Nat Rev Immunol 16, 279-294 (2016)）。DNAベースの遺伝子回路がmiRNAの発現ではなく、miRNAの活性に依存してタンパク質の発現を制御するという証拠(Mullokandov, G. et al. Nat Methods 9, 840-846 (2012))に基づき、本発明者らは特定の細胞種の同定を可能にする革新的なバイオテクノロジー手法であるmiRNAスイッチを開発した(Miki, K. et al. Cell Stem Cell 16, 699-711 (2015)；Fujita, Y. et al. Sci Adv 8, eabj1793 (2022))。miRNAスイッチは、抗体標識を必要とせずに、内在性のmiRNA活性を検出して不均一な細胞集団を識別することができる。この技術は、iPS細胞由来の肝細胞、内皮細胞、心筋細胞（Miki, K. et al. Cell Stem Cell 16, 699-711 (2015)）、マウス胚性幹細胞（ESC）由来の神経細胞（Sunohara, T. et al. Front Neurosci 13, 1141 (2019)）、未分化のヒトES細胞およびiPS細胞（Parr, C.J. et al. Sci Rep 6, 32532 (2016)）など、さまざまな細胞種で成功が証明されている。

[0007] したがって、本発明者らは、miRNAスイッチを使用して、不均一なmiRNA活性（すなわち、miRNA活性の勾配変化）を伴うimMKCL間のサブポピュレーションを識別できると仮定した。まず、本発明者らは、269個の標的miRNAスイッチを含むライブラリーをスクリーニングし、imMKCL間で不均一な活性を示すlet-7a-5pおよびlet-7g-5p miRNAを同定した。let-7活性が高い、および低い（以下、それぞれ「let-7 high」および「let-7 low」と称する。）imMKCLサブポピュレーションの転写解析により、本発明者らはlet-7 low imMKCLが免疫偏向型の（immune-skewed）転写シグネチャー（transcriptional signatures）を示すことを発見した。さらなる研究により、let-7a-5pおよびその下流の標的であるRALB（RAS like proto-oncogene B）がimMKCL内の「免疫」巨核

球の系譜決定を調節する上で重要な役割を果たしていることが明らかになった。重要なことに、本発明者らにより、炎症性サイトカインの分泌とともにimMKCL内の免疫特性／サブポピュレーションの調節不全が、増殖の停止およびiPSC-PLT産生不全に基づく品質の低下をもたらすことが解明された。

[0008] さらに、本発明者らは、免疫偏向型のimMKCLの要因を探索する中で、クロマチン修飾と遺伝子制御に不可欠な、ヒストンアセチルトランスフェラーゼのMYSTファミリーの重要なメンバーである、リジンアセチルトランスフェラーゼ7(KAT7、HBO1およびMYST2としても知られる)に着目した。KAT7は、MEAF6、ING4/5、JADE、BRPFなどのタンパク質と複合体を形成し、リジン14でヒストンH3を、リジン5、8、および12でヒストンH4をアセチル化する機能を有する(Yokoyama A. et al. BiochimBiophys Acta Gene Regul Mech. 2024 Sep;1867(3):195045)。KAT7のimMKCLにおける機能を解析したところ、KAT7がimMKCLの免疫偏向特性を抑制する上で重要な役割を果たしていることを見出した。具体的には、KAT7はimMKCLの細胞周期維持に重要であり、その増殖能を維持することで、後の成熟期における血小板産生量に影響を与える。imMKCLでは、増殖期のG1またはG2/M由来から血小板が産生される。しかし老化したimMKCLではKAT7が減少し、IL-8またはTNF-α分泌が増加し、G1またはG2/M期からG0への移行が亢進して細胞周期も止まり、G1またはG2/M期由来の血小板形成が減少することが明らかとなった。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。

[0009] すなわち、本発明は以下の通りのものである。

［１］ Ral (RAS like proto-oncogene) 遺伝子の転写産物またはタンパク質からなる、巨核球の品質管理マーカー。

［２］ Ral遺伝子がRalB (RAS like proto-oncogene B) 遺伝子である、［１］に記載のマーカー。

［３］ Kat7 (リジンアセチルトランスフェラーゼ7) 遺伝子の転写産物もしくはタンパク質、またはKat7タンパク質の標的のアセチル化されたヒストンタンパク質からなる、巨核球の品質管理マーカー。

［４］　巨核球において、［１］～［３］のいずれか１つに記載のバイオマーカーの1種以上を検出する工程を含む、巨核球の品質評価方法。

［５］　巨核球において、RalB遺伝子の転写産物またはタンパク質およびKat7遺伝子の転写産物またはタンパク質を検出する工程を含む、［４］に記載の方法。

［６］　（１）対象の巨核球において、［１］～［３］のいずれか１つに記載のバイオマーカーの1種以上の存在量または活性の程度を測定する工程、および

（２）工程（１）で測定された値に基づき、巨核球の品質を評価する工程を含む、［４］または［５］に記載の方法。

［７］　Ral遺伝子の転写産物を特異的に認識する核酸プローブおよび／もしくは核酸プライマー、またはRalタンパク質を特異的に認識する抗体を用いて、前記マーカーを検出することを特徴とする、［４］または［５］に記載の方法。

［８］　Kat7遺伝子の転写産物を特異的に認識する核酸プローブおよび／もしくは核酸プライマー、もしくはKat7タンパク質を特異的に認識する抗体、またはKat7タンパク質の標的のアセチル化されたヒストンタンパク質を特異的に認識する抗体を用いて、前記マーカーを検出することを特徴とする、［４］または［５］に記載の方法。

［９］　巨核球が多能性幹細胞に由来する、［４］～［７］のいずれか1つに記載の方法。

［１０］　Ral遺伝子の転写産物を特異的に認識する核酸プローブおよび／もしくは核酸プライマー、またはRalタンパク質を特異的に認識する抗体を含む、巨核球の品質管理用キット。

［１１］　Kat7遺伝子の転写産物を特異的に認識する核酸プローブおよび／もしくは核酸プライマー、もしくはKat7タンパク質を特異的に認識する抗体、またはKat7タンパク質の標的のアセチル化されたヒストンタンパク質を特異的に認識する抗体を含む、巨核球の品質管理用キット。

［１２］　Ral阻害剤を含む培地中で巨核球を培養する工程を含む、品質が向上した巨核球の製造方法。

［１３］　Ral阻害剤の少なくとも1種がRBC8またはRalの発現抑制剤である、［１２］に記載の方法。

［１４］　巨核球において、Kat7タンパク質の存在量を上昇させる工程を含む、品質が向上した巨核球の製造方法。

［１５］　巨核球が多能性幹細胞に由来する、［１２］～［１４］のいずれか１つに記載の方法。

［１６］　［４］～［９］のいずれか1つに記載の方法により評価された巨核球、または［１２］～［１５］のいずれか1つに記載の方法により得られた巨核球。

［１７－１］　［１６］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。

［１７－２］　振盪培養工程を含む、［１７－１］に記載の方法。

［１７－３］　培地がRal阻害剤を含む、［１７－１］または［１７－２］に記載の方法。

［１８］　［１７－１］～［１７－３］のいずれか1つに記載の方法により得られた血小板。

［１９－１］　［１６］または［１８］に記載の細胞を含む、血液製剤。

［１９－２］　血液疾患または出血の治療または予防のための、［１９－１］に記載の剤。

［２０］　［１６］または［１８］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。

［２１］　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［１６］または［１８］に記載の細胞。

［２２］　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［１６］または［１８］に記載の細胞の使用。

発明の効果

[0010] 本発明により、巨核球の品質を管理することや巨核球の品質を評価することが可能となる。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

[0011] [図1]miRNAスイッチベースのスクリーニングにより、imMKCLにおける内在性の活性を有するmiRNAが同定された。(a)miRNAスイッチの設計の概略図。mRNAは、標的miRNAのアンチセンス配列とレポータートランスジーンで構成されている。活性化した標的miRNAの存在下では、レポーター遺伝子の発現が抑制される。(b)imMKCL用miRNAスイッチの設計。5’UTRにmiRNA標的のアンチセンス配列を含むtagBFPをコードするmRNAと、Azami Greenタンパク質のmRNAのペアをin vitroで合成した。これら2つのmRNAをリポフェクション法でimMKCLに共トランスフェクションした。トランスフェクション24時間後、フローサイトメトリーで細胞を解析し、imMKCL内のmiRNA活性をスクリーニングによって同定した。(c)imMKCL内の標的miRNA活性の代表的なドットプロット。活性化したmiRNAは、TagBFPの発現を低下させることが示された。(d)imMKCL内で内在性の活性を示す標的miRNAのフローサイトメトリー解析。269種類のmiRNAスイッチを含むライブラリー（表１）からmiRNAスイッチベースのスクリーニングを行い、imMKCLで内在性の活性を有する24種類のmiRNAを同定した。

[図2]let-7 miRNAは、免疫偏向型imMKCLの同定を可能にする。(a)let-7a-5p miRNAスイッチまたはlet-7g-5p miRNAスイッチにより、imMKCL内で不均一な応答活性が同定され、その結果let-7低応答性およびlet-7高応答性のサブポピュレーションが生じた。(b)バルクRNA-seqサンプリングのワークフローを示す概略図。let-7a-5pスイッチおよびlet-7g-5pスイッチをimMKCLにトランスフェクションし、フローサイトメトリーでlet-7低応答性および高応答性の細胞を選別した。3つの異なるimMKCLクローン（クローン7、クローン7-3、M35-1）をバルクRNA-seq解析に使用した。増殖期(c)、および成熟期(d)における、let-7低応答性imMKCLの上位の豊富な免疫関連遺伝子セットのGSEA（Gene sets enrichment analysis）結果を示す棒グラフ。増殖期(e)、および成熟

期(g)における、典型的な豊富な免疫関連遺伝子セットのGSEAプロット。増殖期(f)、および成熟期(h)における、let-7低応答性および高応答性imMKCLの上位の差次的に発現したTNF標的のヒートマップ。

[図3](a)RT-qPCRにより、let-7 high/low imMKCL（クローン7）におけるlet-7a-5pおよびlet-7g-5pの発現レベルを測定した。発現レベルはRNU6B（U6）に対して正規化した。選別後48時間でサンプリングを行った。データは、3回の独立した実験からの平均値±標準誤差（SEM）として示す。(b)クローン7-3は、クローン7と同じ遺伝的背景を持つ古いストックである。(c)静止条件下でのlet-7 high/lowimMKCLからのiPSC-PLT産生。選別後、細胞を直接DOX-OFFステップに進めた。3つの異なるimMKCLクローンを使用した。データは、3回の独立した実験からの平均値±SEMとして示す。統計的有意性の評価にはStudentのt検定を使用した。＊ P ＜ 0.05。

[図4]in vitroで誘導したESC由来のCD34^{+} HPC（造血前駆細胞）は、let-7 lowサブポピュレーションで免疫偏向型の転写シグネチャーを示した。(a)Sac法によるESC由来のHPC誘導の概略図。(b)let-7 low ESC由来のHPCにおいて有意に濃縮した（enriched）免疫関連遺伝子セットのGSEAプロット。(c)同じ細胞において豊富な遺伝子セットのヒートマップ。

[図5]シングルセルRNA-seq解析により、let-7a-5p低応答性imMKCLに豊富に含まれる(エンリッチメントされた)、転写的に異なる免疫偏向型のサブポピュレーションの存在が明らかとなった。(a)imMKCL（クローン7）を均一マニホールド近似投影（uniform manifold approximation and projection; UMAP）の可視化、およびlet-7a-5pの高応答性および低応答性のimMKCL（上部）とimMKCLのサブクラスター（下部）による、色分け。(b)各クラスター内のlet-7a-5p低応答性および高応答性細胞の分布（左）と、各クラスターにおけるlet-7a-5p低応答性および高応答性細胞の分布を示す棒グラフ（右）。(c)各クラスターにおける上位10個の発現変動遺伝子（differentially expressed genes; DEG）の相対的発現レベル。(d)各クラスターで豊富な代表的なGene Ontology（GO）：Biological Process（BP）ターム。(e)各クラスターにおける典

型的な免疫関連のGO:BPターム。(f)各クラスターにおける典型的な血小板産生関連および免疫関連遺伝子の発現レベルを示すバイオリンプロット。

[図6]Let-7a-5pは、imMKCLにおける免疫偏向型のサブセットの発生において機能的な役割を果たす。(a)特定のlet-7a-5p阻害剤を使用した実験のワークフローの概略図。(b)ネガティブコントロールまたはlet-7a-5p阻害剤で処理したimMKCL（クローン7）におけるlet-7a-5pの発現レベル。発現レベルをqRT-PCRで測定し、内在性コントロールであるRNU6B（U6）に対して正規化した。(c)FACSによってlet-7a-5pの活性パターンを解析した。(d)let-7a-5pの阻害は、増殖段階（DOX-ON）でimMKCLからのIL-8の分泌増加を誘導した。let-7a-5p阻害剤またはネガティブコントロールをトランスフェクションした後、imMKCLを増殖段階でLPS（50 ng/mL）の非存在下または存在下で24時間インキュベートした。炎症性分子は、上清中でサイトメトリックビーズアレイ（cytometric bead array）によって測定した。(e)imMKCL（クローン7）におけるlet-7a-5pの阻害は、クラスター3および5で同定されたマーカー遺伝子（図5）のmRNA発現レベルを増加させた。mRNA発現レベルをqRT-PCRで測定し、GAPDHに対して正規化した。データは、3回の独立した実験からの平均値±SEMとして示す。両側のStudentのt検定を使用して統計的有意性を評価した。

[図7]RALBは、免疫偏向型imMKCLの発生においてlet-7a-5pの標的である。(a)上流調節因子解析（upstream regulator analysis）のフローチャート。(b)scRNA-seqのデータセットに基づいて、インジェニュイティパスウェイ解析（ingenuity pathway analysis; IPA）により同定されたクラスター3およびクラスター5の上位10個の上流調節因子を示す棒グラフ。(c)クラスター3および5の共通の上流調節因子と予測されたhas-let-7a-5pの標的を比較することによる、8つの潜在的な上流調節因子の同定。(d)各クラスターにおける同定された上流調節因子の発現レベルを示すバイオリンプロット。調節因子CUX1およびRALBは、let-7a-5p低応答性細胞（クラスター3および5）で発現レベルの上昇を示し、灰色で色分けした。(e)TargetScanによって予測されたCUX1およびRALB上のlet-7a-5p結合部位。図中の配列について、上から順に配列番号４１

～４３として配列表に示す。(f)imMKCLにおいて、let-7a-5pの阻害はCUX1およびRALBのmRNA発現を誘導した。(g)レンチウイルスを介したRALBの過剰発現が、増殖段階（DOX-ON）および成熟段階（DOX-OFF）の両方でRALBのmRNA発現を上昇させた。(h)RALBの過剰発現はインターフェロンシグナル伝達遺伝子の発現を誘導した。(i)let-7 miRNA-RALB軸がimMKCLにおけるインターフェロンシグナル伝達を調節する概略図。データは、3回の独立した実験の平均値±標準偏差（SD）として示す。両側のStudentのt検定を使用して統計的有意性を評価した。*P < 0.05、**P < 0.01。

[図8](a)レンチウイルスを介したCUX1の過剰発現（O/E）により、imMKCL（クローン7）の増殖段階（DOX-ON）および成熟段階（DOX-OFF）の両方でCUX1のmRNA発現が増加した。(b)CUX1の過剰発現は、ISG15やIFIT3のmRNA発現には影響を与えなかった。発現レベルをGAPDHに対して正規化した。(c)let-7a-5pの発現は、CUX1の過剰発現によって有意に変化しなかった。発現レベルをRNU6Bに対して正規化した。増殖率(d)およびiPSC-PLTの産生(e)のいずれも、CUX1の過剰発現によって影響を受けなかった。データは、3回の独立した実験からの平均値±SEMとして示す。

[図9](a)細胞内フローサイトメトリーによる、MOCKまたはRALBを過剰発現させたimMKCL（O/E RALB）で検出されたRALBの細胞内タンパク質発現（平均蛍光強度、MFI）。(b)RALBの発現はヒストグラムオーバーレイ（histogram overlay）を使用して比較した。(c)MOCKとRALBを過剰発現させたimMKCLでは、同程度のlet-7a-5pの発現が観察された。(d)RALBの過剰発現は、MKの成熟に関連する遺伝子の発現に有意な影響を与えなかった。棒グラフは、遺伝子のFPKM値を示している。データは、3回の独立した実験からの平均値±SEMとして示す。

[図10]免疫特性の調節不全は、imMKCLクローンの増殖停止およびiPSC-PLT産生不全と関連している。(a)以前の研究（Sone, M. et al. Stem Cell Reports 16, 2861-2870 (2021)）による、増殖とiPSC-PLT産生との相関を示す概略図。(b)高品質クローンと比較して、低～中程度の品質のクローンにおいて豊

富なTNFシグナル伝達およびインターフェロン応答遺伝子のセットを示すGSEAプロット。(c)クローン7およびクローン7-3の14日目における増殖および細胞数の倍率変化(fold change)。(d)静止条件下または乱流条件下でのクローン7およびクローン7-3のiPSC-PLT産生。(e)静止条件下または乱流条件下でクローン7およびクローン7-3から生成されたiPSC-PLTの代表的なフローサイトメトリーのプロット。(f)クローン7-3において豊富なTNFシグナル伝達およびインターフェロン応答遺伝子セットを示すGSEAプロット。(g)クローン7と比較して、クローン7-3はRALB mRNA発現の上昇を示す。(h)増殖段階におけるクローン7およびクローン7-3からのIL-8の分泌。データは、3回の独立した実験からの平均値±SEMとして示す。両側のStudentのt検定を使用して統計的有意性を評価した。＊ P ＜ 0.05、**P ＜ 0.01。

[図11]高品質のクローンと比較して、低～中程度の品質のクローンが老化および加齢関連の遺伝子セットが豊富であることを示すGSEAプロット(a)およびヒートマップ(b)。(c)低～中程度の品質のクローンで豊富な免疫関連遺伝子セットのヒートマップ。(d)異なる品質のクローンにおけるRALBの発現レベル。

[図12](a)miRNAスイッチ技術によるクローン7およびクローン7-3におけるlet-7a-5p活性パターンのフローサイトメトリー解析。(b)クローン7-3で豊富な遺伝子セットのヒートマップ。各クローンからのlet-7 low細胞を比較した。(c)クローン7-3において、クローン7と比較してダウンレギュレーションされた老化関連TP53のターゲットが豊富であることを示すGSEAプロット。(d)クローン7-3において、クローン7と比較して炎症性サイトカインをコードする遺伝子の発現レベルの上昇が示された。

[図13](a)図中に示された濃度のヒト組換えIL-8存在下で作製されたクローン7由来のiPSC-PLTの代表的なフローサイトメトリーのプロット。(b)倍数性のフローサイトメトリー解析。(c)図中に示された条件下でのiPSC-PLT産生。(d)CXCR1/2の特異的阻害剤であるReparixinの分子構造。(e)図中に示された条件下でのiPSC-PLT産生。(f)図中に示された濃度のReparixin存在下で、RALB

を過剰発現するimMKCL（クローン7）から生成されたiPSC-PLTの代表的なフローサイトメトリーのプロット。(g)倍数性のフローサイトメトリー解析。データは、3回の独立した実験からの平均値±SDとして示す。多重比較を伴う一元配置分散分析（one-way ANOVA）を使用して統計的有意性を評価した。＊ P ＜ 0.05。

[図14]ヒト組換えインターフェロン-α2aの投与により、用量依存的に、imMKCLの増殖(a)および(b)iPSC-PLT産生が抑制された。imMKCL（クローン7）を、0、1、10、または100 ng/mLの濃度のヒトIFN-α2aで処理した。(c)imMKCLにおけるインターフェロン関連遺伝子およびCDKN2AのmRNA発現の誘導。mRNA発現レベルをRT-qPCRで測定し、GAPDHに対して正規化した。(d)図中に示された条件下で作製したiPSC-PLTの代表的なフローサイトメトリーのプロット。多重比較を伴う一元配置分散分析（ANOVA）または両側のStudentのt検定を使用して統計的有意性を評価した。＊ P ＜ 0.05、** P ＜ 0.01、*** P ＜ 0.001。

[図15]RALBの過剰発現により、imMKCLの増殖およびiPSC-PLT産生能が低下するが、これは、免疫特性の異常調節の誘発に起因する可能性がある。RALBのレンチウイルスを介した過剰発現（O/E）により、imMKCL（クローン7）において、増殖停止(a)およびiPSC-PLT産生不全(b)が生じる。(c)静止条件下および乱流条件下において、MOCKおよびO/E RALBから生成されたiPSC-PLTの代表的なフローサイトメトリーのプロット。(d)O/E RALBでは、MOCK imMKCLよりもIL-8の分泌量が増加した。(e)O/E RALB imMKCLにおいて、豊富なTNFシグナル伝達およびインターフェロン応答性遺伝子セットを示すGSEAプロット。(f)RALBと免疫関連遺伝子の遺伝子との発現相関解析。データは、3回の独立した実験の平均値±SEMとして示す。

[図16](a)MOCKと比較した、RALBを過剰発現するimMKCL（O/E RALB imMKCL）における、豊富な老化(senescent)および加齢(aging)関連遺伝子セットを示すGSEAプロットおよびヒートマップ。(b)O/E RALB（クローン7）で豊富な遺伝子セットのヒートマップ。

[図17](a)RALAおよびRALBの特異的阻害剤であるRBC8の分子構造。(b)0.1 μM

のRBC8投与により、imMKCL（クローン7）の増殖が抑制された。(c)図中で示された条件下でのiPSC-PLT産生。(d)RBC8の存在下または非存在下における、RALBを過剰発現するimMKCL（クローン7）から生成されたiPSC-PLTの代表的なフローサイトメトリーのプロット。(e)倍数性のフローサイトメトリー解析。(f)siRNAを介したRALBのノックダウンにより、imMKCL（クローン7）のiPSC-PLT産生が改善した。細胞に、RALBを標的とするsiRNA（siRALB）または非標的コントロール（siNT）をトランスフェクションした。(g)siNTまたはsiRALBから生成されたiPSC-PLTの代表的なフローサイトメトリーのプロット。(h)RALBのノックダウンは、成熟段階におけるIL-8分泌に有意な影響を与えなかった。(i)トランスフェクション手順の48時間後に、imMKCLにおける図中で示された遺伝子の相対的なmRNA発現を評価した。mRNA発現レベルを、RT-qPCRにより測定し、GAPDHに対して正規化した。データは、3回の独立した実験の平均値±SEMとして示す。両側のStudentのt検定を使用して統計的有意性を評価した。＊ $P < 0.05$。

[図18]PMAまたはADP/TRAP6刺激有り、または無しの場合の、クローン7またはクローン7-3から生成されたiPSC-PLTにおけるPAC-1結合(a)およびP-セレクチン発現(b)。(c)活性化したiPSC-PLTの代表的なフローサイトメトリーのプロット。(d)クローン7およびクローン7-3由来の$CD41^+$ iPSC-PLTに結合したAnnexin Vの代表的なヒストグラム。PMAまたはADP/TRAP6刺激有り、または無しの場合の、MOCKまたはRALBを過剰発現するimMKCL（O/E RALB）から生成されたiPSC-PLTにおけるPAC-1結合(e)およびP-セレクチンの発現(f)。(g)活性化したiPSC-PLTの代表的なフローサイトメトリーのプロット。(h)MOCKまたはO/E RALB由来の$CD41^+$ iPSC-PLTに結合したAnnexin Vの代表的なヒストグラム。

[図19](a)臍帯血由来$CD34^+$ 細胞由来のMKのin vitroでの分化の概略図。(b)let-7a-5pの阻害により、図中に示された遺伝子のmRNA発現(b)にも、PLT産生(c-d)にも有意な影響は生じなかった。(e)RALBを過剰発現する（O/E）細胞において、RALB、IRF7、ISG15、およびIFIT3の発現レベルの有意な上昇が観察された。総RNAを16日目の細胞から単離し、mRNA発現レベルをRT-qPCRにより測

定し、GAPDHに対して正規化した。(f-g)RALBの過剰発現により、20日目に臍帯血由来のMKから産生されるCD41a^{+}CD42b^{+} 血小板様粒子の有意な減少が誘導された。データは、3回の独立した実験の平均値±SEMとして示す。両側のStudentのt検定を使用して統計的有意性を評価した。＊ P ＜ 0.05。

[図20]miRNAスイッチによって区別されたimMKCLのサブポピュレーションのための(a)、およびAbsolute Counting Beadsを用いてカウントされたiPSC-PLTのための(b)のフローサイトメトリーのゲーティング戦略。

[図21]LT-C（長期培養） imMKCLにおけるKAT7およびH3K14acレベルの減少。（A）ST-C、LT-C、およびWSクローンについて、Wes Simple Western システムで測定したKAT7タンパク質レベル。（B）ST-Cクローン、LT-Cクローン、およびWSクローンについて、Wes Simple Westernシステムで測定したH3K14acタンパク質レベル。（C）3日間のDOX-ON培養期間中のST-CクローンおよびWSクローンについて、CCK8アッセイで測定した細胞増殖。（D）DOX-OFF成熟期間後のST-CクローンおよびWSクローンにつての血小板生産性。データは、3回以上の独立した実験からの平均値 ± SEMとして示す。対応のない両側の（unpaired two-tailed）Studentのt検定または一元配置分散分析を使用して統計的有意性を評価した。

[図22]WM3835は、細胞周期の停止を誘導することでimMKCLの増殖と成熟を阻害した。（A）WM3835(5 μM)は、WM1119と比較してKAT7シグナル伝達を効果的に阻害した。（B）成熟期間中の図中に示された日にWM3835処理を行った後の、ST-Cクローンの血小板産生能。（C）増殖期間中にWM3835処理を行った後のST-Cクローンにおける血小板産生能の低下。（D）WM3835処理による、3、6および9日間のDOX-ON培養期間中のST-Cクローンについて、CCK8アッセイにより測定した細胞増殖。（E）WM3835処理後のST-Cクローンについて、Fucciシステムを使用して解析した細胞周期。データは、3回以上の独立した実験からの平均値 ± SEMとして示す。対応のない両側の（unpaired two-tailed）Studentのt検定または二元配置分散分析（two-way ANOVA）を使用して統計的有意性を評価した。

[図23]KAT7機能喪失（loss of function）解析。shKAT7をコードするレンチウイルスベクターまたはコントロールベクター(shLacZ)をimMKCLに導入した。導入後、ハイグロマイシンを使用して選択を行った。（A）リアルタイムqPCRで測定したKAT7発現。（B）血小板生産性。（C）増殖段階の細胞周期解析。データは、3回以上の独立した実験から得た平均値± SEMとして示す。対応のない両側のStudentのt検定または一元配置分散分析を使用して統計的有意性を評価した。

[図24]KAT7の機能獲得（gain of function）解析。KAT7 CDS配列を含むレンチウイルスベクターまたはコントロールベクター(Mock)をimMKCLに導入した。導入後、ブラストサイジンを使用して選択を行った。（A）リアルタイムqPCRで測定したKAT7発現。（B）細胞内フローサイトメトリーで検出したH3K14ac発現。（C）3日間のDOX-ON培養期間中にCCK8アッセイで測定した細胞増殖。（D）血小板生産性。（E）増殖段階の細胞周期解析。データは、3回以上の独立した実験から得た平均値 ± SEMとして示す。対応のない両側のStudentのt検定を使用して統計的有意性を評価した。

発明を実施するための形態

[0012] 本明細書において使用する場合、単数形「a」、「an」および「the」は、「のみ」、「単一」および／または「１つ」などの単語を用いて語が別段明示的に示されない限り、単数形及び複数形の両方を含むことが意図される。本明細書において使用する場合、用語「含む（comprises）」、「含む（comprising）」、「含む（includes）」および／または「含む（including）」は、記述される特徴、工程、操作、要素、着想、および／または成分の存在を特定するが、それ自体が、１つ以上の他の特徴、工程、操作、要素、成分、着想、および／またはその群の存在又は付加を除外しないことがさらに理解される。

[0013] １．巨核球の品質管理マーカー

本発明は、巨核球の品質管理マーカー（以下、「本発明のバイオマーカー」とも称する。）を提供する。本発明のバイオマーカーを用いることで、巨

核球の品質を評価することができるため、該バイオマーカーは、巨核球の品質の管理（特に、巨核球が一定の品質を備えていることの保証）に有用である。本明細書において、巨核球の品質管理は、「巨核球の品質評価」と適宜読み替えることもできる。本発明のバイオマーカーとして、具体的には、Ral（RAS like proto-oncogene）遺伝子の転写産物またはタンパク、Kat7（リジンアセチルトランスフェラーゼ7）遺伝子の転写産物またはタンパク質、およびKat7タンパク質の標的のアセチル化されたヒストンタンパク質（以下、「ヒストンタンパク質」を単に「ヒストン」と称する。）が挙げられる。

[0014] Ralタンパク質は、small GTPaseの一種であり、Ralタンパク質には、RalA（RAS like proto-oncogene A）タンパク質（「GTPaseRalA」とも称される。）とRalB（RAS like proto-oncogene B）タンパク質（「GTPaseRalB」ともされる。）の２種類が存在する。RalAタンパク質とRAlBタンパク質とは、約80%の相同性を有し、これらのタンパク質は、C末端のhypervariable regionを除いて大部分が同一のアミノ酸配列を有する。本発明のバイオマーカーとしては、RalAおよびRalBどちらを用いることができるが、好ましくはRalBである。

[0015] Kat7タンパク質は、ヒストンアセチルトランスフェラーゼ(HAT)の１種で、主にヒストンH3およびヒストンH4のリジンをアセチル化することで、クロマチン構造の調節、遺伝子発現の制御、細胞分裂などに関与するタンパク質であり、ヒストンH3、H4などがKat7タンパク質のアセチル化の標的のヒストンとなる。Kat7タンパク質の標的のアセチル化されたヒストンとしては、例えば、H3K14ac（リジン14がアセチル化されたヒストン3）、H4K5ac（リジン5がアセチル化されたヒストン4）、H4K8ac（リジン8がアセチル化されたヒストン4）、H4K12ac（リジン12がアセチル化されたヒストン4）、H4K16ac（リジン16がアセチル化されたヒストンH4）などが挙げられるが、なかでもH3K14acが好ましい。ここで、リジン14とは、タンパク質のアミノ酸配列の14番目（開始コドンにコードされるメチオニンはカウントしない）のリジンがメチル化されていることを意味する。リジン8、リジン12、リジン16も同様である。

[0016] 本明細書において、「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。

一実施態様において、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、巨核球は、CD38陰性、CD90陽性、および/またはCD49f陽性である。

[0017] 本明細書において、「転写産物」は、タンパク質をコードするRNAを意味し、特に断らない限り、以下ではmRNAを指す。RNAを鋳型に逆転写酵素により合成した相補的DNA（cDNA）も、転写産物に含まれるものとする。

[0018] Ral遺伝子の転写産物（単に「Ralの転写産物」とも称する）は、公知の転写産物であり、例えば、ヒトRalAの転写産物はNCBI Accession No.: NM_005402.4（配列番号１）として、ヒトRalBの転写産物はNCBI Accession No.: NM_001369400.1（配列番号２）およびNCBI Accession No.: NM_002881.3（配列番号３）として配列が開示されている。Kat7遺伝子の転写産物は、公知の転写産物であり、例えば、ヒトKat7の転写産物（アイソフォーム１）はNCBI Accession No.: NM_007067.5（配列番号４）として配列が開示されている。Kat7タンパク質には、アイソフォーム１以外にも、それよりも配列が短い他のアイソフォーム２～６（それぞれ、配列番号５～９として配列表に示す）も知られており、これらをコードする転写産物はいずれも、本発明のバイオマーカーとして用いることができるが、本明細書においてKat7遺伝子の転写産物は、好ましくは配列番号４で示される配列からなるものである。本発明において、各転写産物は、配列番号１～９のいずれかで示される塩基配列（但し、TをUと読み替えるものとする）を含むRNAであってもよく、該塩基配列と実質的に同一な塩基配列を含むRNAであってもよい。各転写産物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。各転写産物は、ヒト以外の哺乳動物種におけるヒトの対応する転写産物のホモログであってもよい。

[0019] 配列番号１～９のいずれかで示される塩基配列と実質的に同一な塩基配列としては、例えば、これらの塩基配列と80%以上、好ましくは90%以上、より好ましくは95%以上（例:96%、97%、98%、99%またはそれ以上）の同一性を有する塩基配列が挙げられる。かかる配列は、典型的には、Ralタンパク質またはKat7タンパク質と実質的に同質の活性を有するタンパク質をコードする配列である。

[0020] また、配列番号１～９のいずれかで示される塩基配列と実質的に同一の塩基配列としては、これらの塩基配列のうち1または2個以上（好ましくは、1～300個程度、好ましくは1～150個程度、さらに好ましくは1～30個程度、特に好ましくは1～数（2、3、4、5、6、7、8、9もしくは10）個）のヌクレオチドが置換、挿入、付加および／または欠失した塩基配列が挙げられる。かかる配列は、典型的には、Ralタンパク質またはKat7タンパク質と実質的に同質の活性を有するタンパク質をコードする配列である。

[0021] 各転写産物は、例えば、該転写産物を含有する細胞または生体試料から、自体公知の方法により単離、精製することにより得ることができる。また、化学合成により作製してもよく、またインビトロ転写反応（IVT）法により作製することもできる。

[0022] Ralタンパク質は、公知のタンパク質であり、例えば、ヒトRalAタンパク質はNCBI Accession No.: NP_005393.2（配列番号１０）として、ヒトRalBタンパク質はNCBI Accession No.: NP_001356329.1およびNP_002872.1（どちらも同じ配列（配列番号１１）である。）として配列が開示されている。Kat7タンパク質も、公知のタンパク質であり、例えば、ヒトKat7タンパク質（アイソフォーム１）はNCBI Accession No.: NP_NP_008998.1（配列番号１２）として配列が開示されている。ヒトKat7タンパク質のアイソフォーム２～６の配列を、配列番号１３～１７として配列表に示す。本発明において、各タン

パク質は、配列番号１０～１７のいずれかで示されるアミノ酸配列を含むタンパク質であってもよく、該アミノ酸配列と実質的に同一なアミノ酸配列を含むタンパク質であってもよい。各タンパク質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。各タンパク質は、ヒト以外の哺乳動物種におけるヒトの対応するタンパク質のホモログであってもよい。

[0023] 配列番号１０～１７のいずれかで示されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列としては、例えば、これらのアミノ酸配列と80％以上、好ましくは90％以上、より好ましくは95%以上（例:96%、97%、98%、99%またはそれ以上）の同一性を有するアミノ酸配列などが挙げられる。かかる配列を含むタンパク質は、典型的には、Ralタンパク質またはKat7タンパク質と実質的に同質の活性を有する。

[0024] また、配列番号１０～１７のいずれかで示されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列としては、これらのアミノ酸配列のうち1または2個以上（好ましくは、1～100個程度、好ましくは1～50個程度、さらに好ましくは1～10個程度、特に好ましくは1～数（2、3、4もしくは5）個）のアミノ酸が置換、挿入、付加および／または欠失したアミノ酸配列などが挙げられる。かかる配列を含むタンパク質は、典型的には、Ralタンパク質またはKat7タンパク質と実質的に同質の活性を有する。

[0025] Ralタンパク質またはKat7タンパク質は、公知のタンパク質合成法、例えば、固相合成法、液相合成法等に従って製造することができる。得られたタンパク質は、公知の精製法、例えば、溶媒抽出、蒸留、カラムクロマトグラフィー、液体クロマトグラフィー、再結晶、これらの組み合わせ等により精製単離することができる。また、自体公知の方法により、生体試料から単離、精製してもよい。あるいは、Ralタンパク質またはKat7タンパク質は、それをコードする核酸を含有する形質転換体を培養し、得られる培養物からタンパク質を分離精製することによって製造することもできる。かかる核酸はDNAで

あってもRNAであってもよく、あるいはDNA/RNAキメラであってもよいが、好ましくはDNAである。該核酸は二本鎖であっても、一本鎖であってもよい。

[0026] ２．巨核球の品質の評価方法

本発明は、巨核球において、本発明のバイオマーカーを検出する工程を含む、巨核球の品質を評価する方法（以下、「本発明の評価方法」と称することがある。）を提供する。本明細書において、「評価する」は、「判定する」、「検査する」、「検証する」などと適宜読み替えることもできる。本発明の評価方法では、本発明のバイオマーカーを１種のみ検出してもよく、２種以上検出してもよい。２種以上検出する場合に、検出対象のバイオマーカーの組合せは特に限定されず、異なる種類の転写産物またはタンパク質を検出してもよく（例えば、RalAの転写産物およびRalBの転写産物を検出するなど）、同種の転写産物またはタンパク質を検出してもよい（例えば、RalBの転写産物およびRalBタンパク質を検出するなど）。また、Ral遺伝子（一態様において、RalB遺伝子）の転写産物またはタンパク質（一態様において、転写産物）およびKat7遺伝子の転写産物またはタンパク質（一態様において、Kat7タンパク質）を検出することも、好ましい態様である。

[0027] 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。

[0028] 本発明で用いる巨核球は、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。本発明で用いる巨核球は、典型的には、CD34陽性CD41陽性の不死化巨核球である。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。

[0029] 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。以下では、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」と称することがある。

[0030] 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。

[0031] 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。

[0032] 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（ClontechProteoTuner™ Shield System C, #631072）より販売されている。

[0033] 「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。

[0034] 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 (SUZ12Polycomb 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。

[0035] 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。

[0036] 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。

[0037] 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。具体的な単離方法や製造方法は、下述の通りである。

[0038] また、本明細書において、「バイオマーカーを検出する」には、巨核球において本発明のバイオマーカーの存在の有無（即ち、検出方法における検出限界以上の量の転写産物またはタンパク質が存在するか否か）を調べることだけでなく、その存在量または活性の程度を測定する（定量する）ことも包含されるものとする。よって、本発明のバイオマーカーの存在量または活性の程度を指標として、本発明の評価方法を実施することもできる。従って、別の態様において、本発明の評価方法は、

（１）対象の巨核球において、本発明のバイオマーカーの1種以上の存在量または活性の程度を測定する工程、および

（２）工程（１）で測定された値に基づき、巨核球の品質を評価する工程を含む方法である。

[0039] 一態様において、上記工程（２）は、（２’）工程（１）で測定された値が基準値以下または未満の場合に、巨核球の品質が高いと評価する工程である。一態様において、本工程で用いる基準値は、品質が低い巨核球（例えば、巨核球を樹立後または生体組織から単離後に、複数回継代して老化した巨核球、IL-8などの老化マーカーの発現が高い巨核球など）における本発明のバイオマーカーの測定値に基づく値である。かかる測定値は、典型的には、対象の巨核球集団と、巨核球数が同じ細胞集団において測定されたものである。本発明に用いる「基準値」としては、例えば、複数の細胞集団における測定値の平均値、最頻値、中央値や、これらの値から四則演算により算出した値などを採用することもできる。

[0040] 本工程で用いる基準値は、品質が高い巨核球（例えば、巨核球を樹立直後または生体組織から単離直後の巨核球、IL-8などの老化マーカーの発現が低い巨核球など）における本発明のバイオマーカーの測定値に基づく値であってもよい。

[0041] 上記基準値は、カットオフ値であってもよい。カットオフ値の算出方法は、この分野において周知である。例えば、ROC（Receiver Operating Characteristic）曲線を作成し、診断感度と診断特異度が可能な限り100％に近いと

きの値を求めて、その値をカットオフ値とすることができる。

[0042] 本明細書において、「巨核球の品質」とは、巨核球の増殖能および血小板産生能を意味する。よって、「巨核球の品質が高い」とは、巨核球の増殖能および血小板産生能のうちの少なくとも１つ（好ましくは両方）が高いこと、あるいは高いと予測されることを意味する。

[0043] 巨核球における本発明のバイオマーカーの検出または定量は、巨核球集団からRNA（例：全RNA、mRNA）画分を調製し、該画分中に含まれるRalまたはKat7の転写産物を検出することにより調べることができる。従って、一実施態様において、本発明の評価方法は、RalまたはKat7の転写産物をそれぞれ特異的に認識し得る核酸プローブまたは核酸プライマーを用いて検出または定量することを含む。

[0044] RNA画分の調製は、グアニジン-CsCl超遠心法、AGPC法など公知の手法を用いて行うことができ、市販のRNA抽出用キット（例：RNeasy Mini Kit；QIAGEN製等）を用いて、微量検体から迅速かつ簡便に高純度の全RNAを調製することもできる。RNA画分中のRalまたはKat7の転写産物を検出する手段としては、例えば、ハイブリダイゼーション（ノーザンブロット、ドットブロット等）を用いる方法、あるいは定量PCR（例：リアルタイムPCR、デジタルPCR等）などを用いる方法などが挙げられる。

[0045] ノーザンブロットまたはドットブロットハイブリダイゼーションによる場合、RalまたはKat7の転写産物の検出または定量は、例えば、RalまたはKat7の転写産物を特異的に認識し得る核酸プローブを用いて行うことができる。そのような核酸プローブとして、例えば、前述の公知の転写産物の塩基配列において、１５塩基以上、好ましくは１６～１００塩基、より好ましくは１７～８０塩基、さらに好ましくは１８～５０塩基の連続した領域の配列と相補的な配列を含む核酸などが挙げられる。該核酸はDNAであってもRNAであってもよく、あるいはDNA/RNAキメラであってもよいが、好ましくはDNAである。また、プローブとして用いられる核酸は、二本鎖であっても一本鎖であってもよい。二本鎖の場合は、二本鎖DNA、二本鎖RNAまたはDNA:RNAのハイブリ

ッドでもよい。一本鎖の場合は、アンチセンス鎖配列を含むものを用いることができる。

[0046] 上記核酸プローブは、標的核酸の検出を可能とするために、標識剤により標識されていることが好ましい。標識剤としては、例えば、放射性同位元素、酵素、蛍光物質、発光物質などが用いられる。放射性同位元素としては、例えば、〔^{32}P〕、〔^{3}H〕、〔^{14}C〕などが用いられる。酵素としては、安定で比活性の大きなものが好ましく、例えば、β－ガラクトシダーゼ、β－グルコシダーゼ、アルカリホスファターゼ、パーオキシダーゼ、リンゴ酸脱水素酵素などが用いられる。蛍光物質としては、例えば、フルオレスカミン、フルオレッセンイソチオシアネートなどが用いられる。発光物質としては、例えば、ルミノール、ルミノール誘導体、ルシフェリン、ルシゲニンなどが用いられる。さらに、プローブと標識剤との結合にビオチン－（ストレプト）アビジンを用いることもできる。

[0047] 上記核酸プローブは、RalまたはKat7の転写産物の配列に基づき設計したプライマーセットを用い、細胞由来のcDNAもしくはゲノムDNAを鋳型としてPCR法によって所望の長さの核酸を増幅するか、該cDNAもしくはゲノムDNAライブラリーから、コロニーもしくはプラークハイブリダイゼーション等により上記の遺伝子もしくはcDNAをクローニングし、必要に応じて制限酵素等を用いて適当な長さの断片とすることにより取得することができる。あるいは、市販のDNA/RNA自動合成機等を用いて化学的に合成することによっても得ることができる。

[0048] 好ましい実施態様によれば、RalまたはKat7の転写産物を検出または定量する方法として、定量PCRが用いられる。定量PCRは、公知の方法で行うことができ、例えば、全RNAを鋳型に逆転写酵素によりcDNAを合成し、標的の遺伝子に特異的な一組の核酸プライマー、DNAポリメラーゼ、さらに、発現量を定量するためのDNAインターカレーターとして機能できる色素またはプローブの存在下でPCRを行うことにより実施できる。

[0049] デジタルPCRとしては、例えば、ドロプレットデジタルPCR（ddPCR）、チッ

プベースのデジタルPCR（Chip-based digital PCR; cdPCR）などが挙げられる。デジタルPCRは、例えば、次の手順により行われる。デジタルPCR装置に、プローブセット、DNAサンプル、PCRプライマーセットおよびDNAポリメラーゼを含む反応溶液をセットする。ここで各反応液成分の混合比率は、公知の範囲で適宜選択し、最適化することができ、使用するプライマーセットやプローブセット等に応じて適宜変更することができる。

[0050] RalタンパクまたはKat7タンパクの検出または定量は、巨核球集団からタンパク質画分を調製し、該画分中に含まれるタンパク質を検出または定量することにより調べることができる。これらのタンパク質の検出または定量は、各タンパク質を特異的に認識する抗体を用いて、免疫学的測定法（例：ELISA、FIA、RIA、ウェスタンブロット等）によって行うことができる。

[0051] RalタンパクまたはKat7タンパクをそれぞれ特異的に認識し得る抗体は、これらのタンパクまたはエピトープを有する部分ペプチドを免疫原として用い、既存の一般的な製造方法によって製造することができる。本明細書において、抗体には、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体（mAb）等の天然型抗体、遺伝子組換技術を用いて製造され得るキメラ抗体、ヒト化抗体や一本鎖抗体、およびこれらの結合性断片などが含まれるが、これらに限定されない。好ましくは、抗体はポリクローナル抗体、モノクローナル抗体またはこれらの結合性断片である。結合性断片とは、特異的結合活性を有する前述の抗体の一部分の領域を意味し、具体的には例えば$F(ab')_2$、Fab'、Fab、Fv、sFv、dsFv、sdAbなどが挙げられる（Exp. Opin. Ther. Patents, Vol. 6, No.5, p.441-456, 1996）。抗体のクラスは、特に限定されず、IgG、IgM、IgA、IgDあるいはIgE等のいずれのアイソタイプを有する抗体をも包含する。好ましくは、IgGまたはIgMであり、精製の容易性等を考慮するとより好ましくはIgGである。また、本発明において、RalタンパクまたはKat7タンパクをそれぞれ特異的に認識し得る抗体として、市販の抗体または抗体を含むキットやアレイ等を使用することもまた好ましい。

[0052] 個々の免疫学的検出法または定量法を本発明の評価方法に適用するにあた

っては、特別の条件、操作等の設定は必要とされない。それぞれの方法における通常の条件、操作法に当業者の通常の技術的配慮を加えて本発明のバイオマーカーの検出または定量系を構築すればよい。

[0053] 巨核球における本発明のバイオマーカーの活性の程度の測定は、例えば以下の方法により行うことができる。Ralタンパク質は、GTP結合型（活性型）とGDP結合型（不活性型）の2つの状態をとる。よって、GTP結合型Ralタンパク質の存在量を測定することや、活性型と不活性型との割合を算定することなどにより、活性の程度を測定することができる。具体的には、例えば、Pull-downアッセイにより、Ralタンパク質のエフェクターである（例えば、RalBP1など）のRal結合ドメインを用いて、活性型（GTP結合型）のRalBだけをプルダウンし、免疫学的測定法などによりタンパク質量を検出または測定する方法、G-LISA（GTPase-linked Immunosorbent Assay）により、GTP結合型Ralタンパク質を検出または検出する方法、FRET（Forster Resonance Energy Transfer）アッセイによりRalタンパク質の活性変化を測定する方法、GDP/GTP交換アッセイ（Nucleotide Exchange Assay）によりRalタンパク質のGDP/GTP交換速度を測定する方法などが挙げられる。

[0054] Kat7タンパク質の活性の程度の測定は、例えば、放射性標識アセチル転移アッセイ（^{14}C-アセチルCoA法）により、ヒストンに取り込まれた^{14}C量を測定する方法、抗アセチルヒストン抗体を用いた免疫学的測定法などによりアセチル化されたヒストンを検出または測定する方法、質量分析（LC-MS/MS）を用いて、アセチル化されたヒストンを解析する方法、FRET（蛍光共鳴エネルギー移動）アッセイにより、アセチル化が起こる際の蛍光強度の変化を解析する方法などが挙げられる。

[0055] 以上より、一態様において、本発明の評価方法は、１種以上のRalの転写産物を特異的に認識する核酸プローブおよび／もしくは核酸プライマー、またはRalタンパク質を特異的に認識する抗体を用いて、前記バイオマーカーを検出することを特徴とする方法である。別の一態様において、本発明の評価方法は、Kat7遺伝子の転写産物を特異的に認識する核酸プローブおよび／もし

くは核酸プライマー、もしくはKat7タンパク質を特異的に認識する抗体、またはKat7タンパク質の標的のアセチル化されたヒストンタンパク質を特異的に認識する抗体を用いて、前記マーカーを検出することを特徴とする方法である。これらの評価方法を組み合わせて用いてもよく、一実施態様において、本発明の評価方法は、（１）１種以上のRalの転写産物を特異的に認識する核酸プローブおよび／もしくは核酸プライマー、またはRalタンパク質を特異的に認識する抗体（一態様において、Ral遺伝子（特に、RalB遺伝子）の転写産物を特異的に認識する核酸プローブおよび／もしくは核酸プライマー）を用いて、Ralの転写産物またはタンパク質を検出する工程、および（２）Kat7遺伝子の転写産物を特異的に認識する核酸プローブおよび／もしくは核酸プライマー、もしくはKat7タンパク質を特異的に認識する抗体、またはKat7タンパク質の標的のアセチル化されたヒストンタンパク質を特異的に認識する抗体（一態様において、Kat7タンパク質を特異的に認識する抗体）を用いて、Kat7の転写産物またはタンパク質を検出する工程を含む。これらの工程は、順次行ってもよく、同時に行ってもよい。また、工程（２）を行った後、工程（１）を行ってもよい。

[0056] ３．巨核球の品質管理用キット

さらに本発明は、巨核球の品質管理用キット（以下、本発明のキット）を提供する。本発明のキットには、好ましくは、Ralの転写産物を特異的に認識する核酸プローブおよび／もしくは核酸プライマー、またはRalタンパク質を特異的に認識する抗体が含まれる。また、別の態様において、Kat7遺伝子の転写産物を特異的に認識する核酸プローブおよび／もしくは核酸プライマー、もしくはKat7タンパク質を特異的に認識する抗体、またはKat7タンパク質の標的のアセチル化されたヒストンタンパク質を特異的に認識する抗体を含む、巨核球の品質管理用キット（本キットも、「本発明のキット」に包含されるものとする）も提供される。これらは１種類のみ含まれていてもよいし、複数種類含まれていてもよい。これらのキットを組み合わせて用いてもよく、一実施態様において、本発明のキットは、（１）１種以上のRalの転写産

物を特異的に認識する核酸プローブおよび／もしくは核酸プライマー、またはRalタンパク質を特異的に認識する抗体（一態様において、Ral遺伝子（特に、RalB遺伝子）の転写産物を特異的に認識する核酸プローブおよび／もしくは核酸プライマー）、および（２）Kat7遺伝子の転写産物を特異的に認識する核酸プローブおよび／もしくは核酸プライマー、もしくはKat7タンパク質を特異的に認識する抗体、またはKat7タンパク質の標的のアセチル化されたヒストンタンパク質を特異的に認識する抗体（一態様において、Kat7タンパク質を特異的に認識する抗体）を含む。

[0057] 本発明のキットが前記の核酸プローブまたは核酸プライマー（単に「核酸」ともいう。）を構成として含む場合、これらの核酸としては、上記２．の本発明の評価方法で例示されたものと同じものを用いることができる。これらの核酸は、乾燥した状態もしくはアルコール沈澱の状態で、固体として提供することもできるし、水もしくは適当な緩衝液（例：TE緩衝液等）中に溶解した状態で提供することもできる。標識プローブとして用いられる場合、核酸は予め上記のいずれかの標識物質で標識した状態で提供することもできるし、標識物質とそれぞれ別個に提供され、用時標識して用いることもできる。あるいは、該核酸は、適当な基板に固定された（担持された、または固相化されたともいう。）状態で提供することもできる。基板としては、例えば、ガラス、シリコーン、プラスチック、ニトロセルロース、ナイロン、ポリビニリデンジフロリド等が挙げられるが、これらに限定されない。また、固定化手段としては、予め核酸にアミノ基、アルデヒド基、SH基、ビオチンなどの官能基を導入しておき、一方、基板上にも該核酸と反応し得る官能基（例：アルデヒド基、アミノ基、SH基、ストレプトアビジンなど）を導入し、両官能基間の共有結合で基板と核酸を架橋する方法、ポリアニオン性の核酸に対して、基板をポリカチオンコーティングして静電結合を利用して核酸を固定化するなどの方法が挙げられるが、これらに限定されない。

[0058] 本発明のキットが前記の抗体を構成として含む場合、これらの抗体としては、上記２．の本発明の評価方法で例示された抗体と同じものが挙げられる

。

[0059] 本発明のキットには、上記核酸や抗体に加えて、本発明のバイオマーカーの発現を検出または定量するための反応において必要な他の物質を含んでいてもよい。これらの他の物質は、反応に悪影響を及ぼさない限り、核酸や抗体等と共存状態で提供されてもよく、あるいは、別個の試薬とともに提供されてもよい。例えば、本発明のバイオマーカーの発現を検出または定量するための反応がPCRの場合、当該他の物質としては、例えば、反応緩衝液、dNTPs、耐熱性DNAポリメラーゼ等が挙げられる。定量PCRを用いる場合は、competitor核酸や蛍光試薬（上記インターカレーターや蛍光プローブ等）などをさらに含むことができる。また、本発明のバイオマーカーの発現を検出または定量するための反応が抗原抗体反応の場合、当該他の物質としては、例えば、反応緩衝液、competitor抗体、標識された二次抗体（例えば、一次抗体がウサギ抗体の場合、ペルオキシダーゼやアルカリホスファターゼ等で標識されたマウス抗ウサギIgGなど）、ブロッキング液、ELISA用プレートなどが挙げられる。また、本発明のキットには、キットや試薬の使用方法や、評価基準等の説明が記載された説明書を含んでいてもよい。さらに、上記判定キットには、例えばポジティブコントロールとして用いるため、本発明のバイオマーカーを１種以上含んでいてもよい。本発明のキットに用いる試薬などの種類や具体例、使用方法等は、「２．巨核球の品質の評価方法」に記載の内容が全て援用される。

[0060] ４．巨核球および血小板の製法

別の態様において、本発明は、品質が向上した巨核球を製造する方法を提供する。具体的には、Ral（RAS like proto-oncogene）阻害剤を含む培地中で巨核球を培養する工程を含む、品質が向上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。

[0061] また、下述の実施例で示される通り、Kat7遺伝子の発現レベルは巨核球の増殖能の維持とその後の成熟段階における血小板産生量（収量）に影響することが示された。よって、巨核球において、Kat7タンパク質の存在量を上昇

させる工程を含む、品質が向上した巨核球の製造方法（本方法も、「本発明の製法」に包含されるものとする））も提供される。かかる方法で用いる巨核球は、典型的には、Kat7遺伝子の発現量が低い巨核球である。Kat7遺伝子の発現量が低い巨核球としては、例えば、巨核球を樹立後または生体組織から単離後と比較して、複数回継代することでKat7遺伝子の発現量が低下した巨核球、Kat7遺伝子に変異を有することで、野生型のKat7遺伝子を有する巨核球と比較してKat7遺伝子の発現量が低い巨核球が挙げられる。

[0062] これらの製造方法を組み合わせて用いてもよく、一実施態様において、本発明の製造方法は、（１）Ral阻害剤を含む培地中で巨核球を培養する工程、および（２）巨核球において、Kat7タンパク質の存在量を上昇させる工程を含む。これらの工程は、順次行ってもよく、同時に行ってもよい。また、工程（２）を行った後、工程（１）を行ってもよい。また、本発明の製法で得られた巨核球を「本発明の巨核球」とも称することがある。）を提供する。「品質が向上した巨核球の製造方法」は、「巨核球の品質を向上させる方法」と適宜読み替えることもできる。

[0063] 本明細書において、「Kat7タンパク質の存在量を上昇させる」とは、Kat7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、Kat7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、Kat7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Kat7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Kat7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。Kat7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。

[0064] 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。

[0065] 発現ベクターにおいて使用されるプロモーターの例としては、EF-αプロモーター、CAGプロモーター、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イルス）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。

[0066] 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。外因性の核酸がウイ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。

[0067] 本明細書において、「品質が向上した」とは、本発明の製法を行う前の巨核球と比較して、本発明の製法を行った後の巨核球において、増殖能および／または血小板産生能が高いことを意味する。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。下述の実施例において、増殖開始から14日目における巨核球数を巨核球の増殖を開始した時点の巨核球数で除することにより算出される増殖率が、本発明の製法を行う前の巨核球における増殖率と比較して高ければ、巨核球の増殖能が高いといえる。また、下述の実施例で行ったように、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、本発明の製法を行う前の巨核球における割合よりも高ければ、巨核球の血小板産生能が高いといえる。

[0068] 本発明の製法は、典型的には、Ral阻害剤の存在下で巨核球を増殖させる工程を含む。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。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。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。

[0069] 本発明で用いるRal阻害剤は、RalAまたはRalBに特異的な阻害剤に限らず、RalAおよびRalBの両方を阻害するものであっても、他の分子（典型的には、他のGTPase）に対する阻害活性も有していているものであってもよい。かかるRal阻害剤としては、例えば、RBC6（Cas No: 381186-64-7）、RBC8（Cas No: 361185-42-4; 6-amino-4-(2,5-dimethoxyphenyl)-1,4-dihydro-3-(2-naphthalenyl)-pyrano[2,3-c]pyrazole-5-carbonitrile）、RBC10（CAS No: 362503-73-9）、BAY 293 Negative Control、BQU57、CE3F4、CID-1067700などが挙げられるが、RBC8が好ましい。また、Ralタンパク質に対する抗体、ペプチドまたはアプタマーもまた好ましい。あるいは、Ral阻害剤は、Ral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Ralの発現抑制剤であってもよい。Ral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。

[0070] Ral阻害剤の濃度は、使用するRal阻害剤に応じて当業者が適宜選択可能である。Ral阻害剤がRBC8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～10μMであり、より好ましくは20nM～1μM（一態様において、100nM）である。

[0071] 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。Ral阻害剤存在下での培養期間（巨核球を増殖させる期間）について特に制限はないが、典型的には、3日間以上、5日間以上、7日間以上または10日間以上であり、典型的には、20日間以下、17日間以下、15日間以下または14日間以下である。上記培養期間において、3～4日毎に培地を交換することが好ましい。

[0072] また、Ral阻害剤を含む培地中で巨核球を培養する期間（換言すれば、Ral阻害剤と巨核球とを接触させる期間）、および巨核球において、Kat7タンパク質の存在量が上昇した状態を維持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。

[0073] 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。

[0074] 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。

[0075] 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、表面抗原を指標にして、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、品質が向上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。

[0076] 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、（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（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。

[0077] 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., 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。

[0078] 「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。

[0079] 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 : 113-117）、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.）。

[0080] 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、inGen

ious 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。

[0081] 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 a

l., 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。

[0082] 人工多能性幹細胞株としては、NIH、理研、京都大学等が樹立した各種iPSC株が利用可能である。例えば、ヒトiPSC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、FfI-01s04株、Ff-MH23s01株、15M41株、TkDN-sev2株などが挙げられる。

[0083] 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。

[0084] 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。

[0085] 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。

[0086] 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。

[0087] 工程（Ｂ）も、公知の方法（例えば、WO 2011/034073、WO 2012/157586、WO 2014/123242、WO 2021/075568）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。

[0088] 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。

[0089] 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。

[0090] 本発明の巨核球は、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。また、本発明の製法で得られた血小板を「本発明の血小板」とも称することがある。）が提供される。

[0091] 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ができる。この他にも、LoxPを含むベクターを用いて巨核球誘導因子遺伝子を細胞に導入した場合は、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。

[0092] 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 et 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 ChemotherPharmacol. 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。

[0093] 本発明の血小板の製法で用いる培地には、上述のRal阻害剤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、Ral阻害剤が含まれる。具体的な化合物の種類、培地中での濃度などは、本発明の製法での記載が全て援用される。Ral阻害剤として、好ましくはRBC8であり、RBC8の培地中の濃度は、好ましくは20nM～1μM（一態様において、100nM）である。

[0094] 本発明の血小板の製法により誘導された成熟巨核球は、CD34陽性CD41陽性細胞であり得る。本方法により誘導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。

[0095] 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。Ral阻害剤を用いる場合には、本発明の血小板の製法のおける培養期間の全期間（一態様において、6日間）に亘ってRal阻害剤の存在下で培養してもよく、一部の期間であってもよい。上記培養期間において、適時培地を交換

してもよく、交換しなくともよいが、一実施態様において、培地は交換しない。

[0096] 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。

[0097] 本発明の血小板の製法における振盪培養は、WO 2019/009364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0.0005m^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を含む、方法などが挙げられる。

[0098] 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。

[0099] 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。

[0100] 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。

[0101] 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。

[0102] 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。

[0103] 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。

[0104] 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。

[0105] 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。

[0106] 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。

[0107] ５．巨核球および血小板の用途

本発明の別の態様において、本発明の評価方法で評価された（典型的には、品質が高いと評価された）、あるいは本発明の製法および本発明の血小板の製法で得られた（「得られた」は、適宜「得られる」と読み替えることができる。）巨核球（即ち、本発明の巨核球）および血小板（即ち、本発明の血小板）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。

[0108] 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。

[0109] 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。

[0110] 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遺伝子型が同一も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。

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。

[0111] 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。

[0112] 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。

[0113] 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、血清もしくはその代替物、有機溶剤（例、DMSO）等をさらに含んでいてもよい。この場合、血清も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。

[0114] 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。

[0115] 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。

[0116] 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。

[0117] 本発明は、本発明の例示的な非限定的な実施態様を提供する以下の実施例を参照することにより、より十分に理解される。

実施例

[0118] ＜結果＞

<u>imMKCLにおける内在性の活性を有するmiRNAの同定</u>

miRNAスイッチ技術は、miRNA活性を介してトランスジーンの発現を制御する合成mRNAベースの遺伝子回路を指す（Miki, K. et al. Cell Stem Cell 16

, 699-711 (2015)；Fujita, Y. et al. Sci Adv 8, eabj1793 (2022)) 。本発明者らは、miRNAスイッチにより、異なるmiRNA活性を有するimMKCLのサブセットを同定でき、これによりimMKCL内の不均一性を探索するための有用なツールが提供されるではないかとの仮説を立てた。図1aは、miRNAスイッチ技術の概略図を示している。本発明者らは、標的miRNAに対する相補的配列を5’非翻訳領域（UTR）に含み、内在性miRNA活性をモニタリングするためのレポーターの蛍光タンパク質をコードする合成mRNAを設計した。トランスフェクションコントロールとしてAzami-Green 1(AG1)をコードするmRNAと、標的miRNA配列を含むTagBFPをコードするmRNAである一対のmRNAを合成し、imMKCLへと共トランスフェクションした（図1b）。特定のmiRNAに対して内在性の活性を有する細胞において、TagBFPの発現レベルをフローサイトメトリーにより測定した（図1c）。269種類のmiRNAスイッチを含むライブラリーを用いて、miRNAスイッチベースのスクリーニングを行い（表1）、その結果imMKCLにおいて内在性の活性を有する24種類のmiRNAを同定した（図1d）。

[0119]

[表1-1]

miRNAスイッチのスクリーニングライブラリに含まれる標的miRNA

miR-1234-5p	miR-185-3p	miR-301a-5p	miR-425-3p	miR-497-5p	miR-10b-3p
miR-329	miR-144-3p	miR-211-3p	miR-485-5p	miR-450-5p	miR-379-5p
miR-629-5p	miR-362-3p	miR-589-5p	miR-671-5p	miR-506-3p	miR-125b-1-3p
miR-30b-3p	miR-296-3p	miR-506-5p	miR-361-3p	miR-582-3p	miR-422a
miR-98-3p	miR-499a-5p	miR-24-2-5p	miR-105-5p	miR-381-3p	miR-181b-3p
miR-122-5p	miR-27a-5p	miR-505-5p	miR-454-3p	miR-301a-3p	miR-510
miR-411-5p	miR-29c-5p	miR-148b-5p	miR-204-3p	miR-486-3p	miR-125b-2-3p
miR-212-5p	miR-582-5p	miR-197-5p	miR-222-5p	miR-93-3p	miR-483-5p
miR-576-5p	miR-146a-3p	miR-548-3p	miR-34a-3p	miR-190a	miR-383
miR-140-5p	miR-326	miR-576-3p	miR-219-5p	miR-342-5p	miR-590-3p
miR-133a	miR-17-3p	miR-17-5p	miR-1	miR-206	miR-21-5p
miR-367-3p	miR-373-5p	miR-92a-3p	miR-16-5p	miR-197-3p	miR-24-3p
miR-339-5p	miR-224-5p	miR-127-3p	miR-365a-3p	miR-183-5p	miR-331-3p
miR-203a	miR-214-3p	miR-137	miR-298	miR-325	miR-449a
miR-498	miR-661	miR-429	miR-1182	miR-208a-3p	miR-320b
miR-423-5p	miR-140-3p	miR-378c	miR-185-5p	miR-101-3p	miR-378b
miR-128	miR-509-5p	miR-340-5p	miR-25-5p	miR-92b-3p	miR-320c
miR-508-3p	miR-744-5p	miR-3180-3p	miR-30d-3p	miR-215	miR-4510
miR-1260a	miR-151a-5p	miR-584-5p	miR-503-5p	miR-34c-5p	miR-3180
miR-514a-3p	miR-374b-5p	miR-28-3p	miR-1307-5p	miR-21-3p	miR-193a-5p
miR-1269a	miR-365b-3p	miR-4286	miR-4454	miR-138-5p	miR-1307-3p
miR-652-3p	miR-502-3p	miR-92b-5p	miR-501-3p	miR-1285-3p	miR-126-3p

[0120]

[表1-2]

miR-4531	miR-193b-5p	miR-181a-2-3p	miR-1301	miR-877-5p	miR-4443
miR-425-5p	miR-320d	let-7a-3p	miR-92a-1-5p	miR-365b-5p	miR-142-3p
miR-320e	miR-106b-3p	miR-548	miR-1261	miR-9-3p	miR-129-1-3p
miR-424-3p	miR-760	miR-365a-5p	miR-374a-5p	miR-873-5p	miR-30c-2-3p
miR-99b-3p	miR-4532	20b-3p	miR-4448	miR-363-5p	miR-145-3p
miR-574-5p	miR-223-3p	miR-4521	miR-22-5p	miR-339-3p	miR-16-2-3p
miR-374a-3p	miR-542-3p	miR-452-5p	miR-513a-3p	miR-532-39	miR-548a-3p
miR-27b-5p	miR-3180-5p	miR-4324	let-7d-3p	miR-184	miR-95
miR-664a-5p	let-7a-5p	let-7g-5p	let-7i-5p	miR-191-5p	miR-125b-5p
miR-100-5p	miR-342-3p	miR-210	miR-193b-3p	miR-99b-5p	miR-106b-5p
miR-27a-3p	miR-30a-3p	miR-423-3p	miR-409-3p	miR-186-5p	miR-324-3p
miR-22-3p	miR-378a-3p	miR-196b-5p	miR-296-5p	miR-99a-5p	miR-34a-5p
miR-501-5p	miR-500a-3p	miR-155-5p	miR-182-5p	miR-10a-5p	miR-345-5p
miR-335-5p	miR-362-5p	miR-193a-5p	miR-134	miR-195-5p	miR-26a-5p
miR-151a-3p	miR-200c-3p	miR-212-3p	miR-143-3p	miR-149-5p	miR-28-5p
miR-505-3p	miR-192-5p	miR-187-3p	miR-129-5p	miR-106a-5p	miR-299-3p
miR-483-3p	miR-18a-3p	miR-330-3p	miR-200b-3p	miR-154-5p	miR-150-5p
miR-145-5p	miR-199a-5p	miR-135a-5p	miR-200a-3p	miR-133b	miR-141-3p
miR-148a-3p	miR-9-5p	miR-520c-3p	miR-328	miR-361-5p	miR-375
miR-378a-5p	miR-382-5p	miR-484	miR-486-5p	miR-7-5p	miR-124-3p
miR-302a-5p	miR-370	miR-373-3p	miR-492	miR-509-3p	miR-512-5p
miR-516b-5p	miR-518b	miR-518c-3p	miR-518c-5p	miR-519d	miR-520f
miR-520g	miR-523-3p	miR-525-5p	miR-526a	miR-98-5p	

[0121] Let-7 miRNAスイッチによる免疫偏向型imMKCLの濃縮

活性化したmiRNAのうち、本発明者らは、imMKCL間で不均一な活性を示した

let-7a-5pおよびlet-7g-5pに着目した（図2a）。本発明者らが、let-7活性が高いサブポピュレーションと低いサブポピュレーションとに選別したところ、let-7活性が低いサブポピュレーションは全体の5%未満であった。本発明者らは、これらのポピュレーションにおけるlet-7活性レベルは、imMKCLサブポピュレーションにおけるそれらの発現レベルと相関することを確認した（図3a）。let-7 highサブポピュレーションとlet-7 lowサブポピュレーションとの間の分子的差異を特性付けるため、本発明者らは3種類の異なるimMKCLクローン（M35-1、クローン7、クローン7-3）を用い、増殖期および成熟期においてバルクRNA-seq解析を行った。クローン7のimMKCLの特性、およびそれに由来するiPSC-PLTの機能については、既に報告されている（非特許文献２、３）。また、クローン7は、複数の研究グループによって巨核球形成（megakaryopoiesis）および血小板新生（thrombopoiesis）の研究に使用されており（Lo, R.W. et al. Blood 136, 715-725 (2020).；Ver Donck, F. et al. Blood (2023)；Seo, H. et al. Blood Adv 2, 2262-2272 (2018)）、研究ツールとしてのその重要性が強調されている。クローン7に由来し、継代培養を繰り返すことで増殖能の低下やiPSC-PLT産生の減少により特徴づけられる老化表現型を示すクローン7-3も選択した（図3b）。M35-1は、他の適切な患者由来のimMKCLクローンと比較して増殖能およびiPSC-PLT産生能に比較的優れているため、iPLAT1臨床試験のために患者のiPSCから樹立された（非特許文献５）。3種類のクローンにおいて、それぞれlet-7 lowまたはlet-7 highのサブポピュレーションで同等のiPSC-PLT産生が観察された（図3c）。

[0122] バルクRNA-seqのサンプリング手順を、図2bに示す。遺伝子発現の差分解析により、let-7 highimMKCLとlet-7 lowimMKCLとの間で、発現プロファイルが変化した多くの遺伝子が明らかとなった。各サブポピュレーションで豊富な転写経路を同定するため、本発明者らは遺伝子セットエンリッチメント解析（GSEA）を行った。とりわけ、本発明者らにより、let-7 low imMKCLにおいて、増殖期および成熟期の両方で免疫関連の遺伝子セットが有意に濃縮されていることが観察された（図2c、d）。特に増殖期において、腫瘍壊死因子（

TNF）、リポ多糖（LPS）、およびエンテロトキシンに対する応答における遺伝子セットがlet-7 low細胞で豊富であったが、この結果は、ナイーブなマウスおよびヒトの巨核球が病原体の侵入を感知する特性を有するという報告と一致する（Pariser, D.N. et al. J Clin Invest 131 (2021)；Campbell, R. A. et al. Blood 133, 2013-2026 (2019)）。TNFに駆動される炎症は、加齢に伴う血小板の過剰反応性を誘導することも示唆されている（Davizon-Castillo, P. et al. Blood 134, 727-740 (2019)）。成熟期において、インターフェロンのシグナル伝達に関連する遺伝子セットがlet-7 low細胞で有意に濃縮されていた。中には、免疫関連の特性が増殖期から成熟期にかけて維持されているものもあった（図2e-h、表2）。これらの知見は、let-7活性がより低いimMKCLが免疫偏向型MKの表現型を選択的に濃縮することを示唆している。本発明者らのバルクRNA-seq解析により、let-7 lowの免疫偏向型imMKCLのサブポピュレーションにおいて、C-X-Cモチーフケモカインリガンド10（CXCL10）、C-Cモチーフケモカインリガンド2（CCL2）、CCL3を含むケモカインやサイトカインをコードする複数の遺伝子がアップレギュレーションされていることも明らかとなった（図2f、h）が、これにより、これらの分子の分泌を介した多様な免疫応答の一貫性が示唆された（Cunin, P. & Nigrovic, P.A. J Leukoc Biol 105, 1111-1121 (2019)）。興味深いことに、これらの分子のmRNAレベルの上昇は、重症急性呼吸器症候群（SARS）や中東呼吸器症候群（MERS）患者で報告されている（Channappanavar, R. & Perlman, S. Semin Immunopathol 39, 529-539 (2017)）。さらに、COVID-19患者において、CXCL10、CCL2、およびTNFのmRNA発現レベルの上昇が、MKの増加と相関している（Ren, X. et al. Cell 184, 5838 (2021)；Bernardes, J.P. et al. Immunity 53, 1296-1314.e1299 (2020)）。

[0123]

[表2]

増殖段階または分化段階のlet-7 low imMKCLおよびlet-7 low ESC由来のCD34+細胞における、有意に濃縮された免疫関連遺伝子セット

GSEA Gene Sets	NES	*P* value	FDR
imMKCLs (Dox-ON)			
Immune response to enterotoxin	2.471	0.000	0.000
TNF signaling via NFKB	2.295	0.000	0.000
NFKB targets	2.172	0.000	0.000
IFNB1 targets	2.304	0.000	1.54E-04
Inflammatory response to LPS	2.279	0.000	2.42E-04
Interferon responsive genes	2.215	0.000	0.003
imMKCLs (Dox-OFF)			
Immune response to enterotoxin	2.665	0.000	3.41E-04
TNF signaling via NFKB	2.578	0.000	0.000
NFKB targets	2.214	0.000	0.008
IFNB1 targets	2.843	0.000	0.000
Inflammatory response to LPS	2.041	0.000	0.002
Interferon responsive genes	2.931	0.000	0.000
ESC-derived CD34+ HPCs			
Immune response to enterotoxin	1.926	0.000	0.005
TNF signaling via NFKB	1.870	0.000	0.009
NFKB targets	1.719	0.003	0.032
IFNB1 targets	2.317	0.000	0.000
Inflammatory response to LPS	1.665	0.000	0.045
Interferon responsive genes	2.408	0.000	0.000

[0124] let-7 miRNAスイッチを用いた免疫型MKの同定

本発明者らは、ヒト胚性幹細胞（ESC）から直接分化させたMKにおいて、免疫型MKがlet-7 miRNAスイッチにより同定できるかさらに検証した。本発明者らは、Sac.法（Takayama, N. et al. Blood 111, 5298-5306 (2008)；Yuzuriha, A. et al. Stem Cell Res 53, 102287 (2021)）により作製したCD34+造血前駆細胞（HPC）を用いて、let-7a-5pおよびlet-7g-5pの活性が異なる2つの別々の細胞集団についてバルクRNA-seq解析を実施した（図4a）。GSEAにより、let-7 low ESC由来のHPCにおいて、免疫関連の遺伝子セットが同様に豊富に含まれていることが明らかになったが（図4b、c、表2）、この結果は、MK発生過程における免疫偏向型MKの運命決定が、早くも造血前駆細胞の段階で起こり得ることを示唆している。

[0125] scRNA-seqにより、imMKCLの不均一性と機能的多様性が明らかとなる

imMKCLの細胞不均一性をさらに特徴付け、let-7 miRNAスイッチによる「免疫型」imMKCLの濃縮のメカニズムを探索するため、本発明者らは増殖期にあるlet-7 lowおよびlet-7 highのimMKCLに対してシングルセル（sc）RNA-seq解析を実施した。バルクRNA-seq解析において、let-7a-5pおよびlet-7g-5pの両miRNAスイッチの類似した挙動が実証されたため（図2）、let-7a-5pに焦点を当てて調査を行った。5つの転写的に異なるimMKCLのサブポピュレーションを同定したが（図5a）、let-7 lowのimMKCLはクラスター3および5に比較的集中していた（図5b）。本発明者らはさらに、最も発現差の大きい遺伝子（DEG）の発現を決定し、各クラスターに豊富に含まれる遺伝子オントロジー（GO）用語を特徴づけた（図5c、d）。

[0126] クラスター1では、酸化的リン酸化に関連するGO:BP（生物学的プロセス）用語が豊富であり、エネルギー供給におけるそれらの役割が示唆された。一方、クラスター2および4は、細胞周期および有糸分裂による核分裂に関連するGO:BP用語が豊富であり、細胞分裂中の（cycling）MK前駆細胞のサブセットを示していた。細胞分裂中のMKの2つのマーカー遺伝子であるPCNA（proliferating cell nuclear antigen）およびTPM4（tropomyosin 4）が同定されたことは、ヒト骨髄（BM）の細胞分裂中のMKに関する最近の研究とも一致する（Liu, C. et al. Adv Sci (Weinh) 8, e2100921 (2021)）。クラスター3では、「血小板活性化」および「血液凝固」に関連する遺伝子が高発現しており、これは血小板産生に特化したMK前駆細胞のサブセットであることを示唆している。特に、トロンボスポンジン1（THBS1）（非特許文献７）、フォンヴィルブランド因子（VWF）（Ruggeri, Z.M. Von Willebrand factor, platelets and endothelial cell interactions. J ThrombHaemost 1, 1335-1342 (2003)）、および血小板膜糖タンパク質IX（GP9）（Romo, G.M. et al. J Exp Med 190, 803-814 (1999)）などの血小板新生に関連する遺伝子は、他のクラスターと比較してクラスター3でより高く発現していた（図5f）。さらに、クラスター3では、免疫システムプロセスに関連する遺伝子も豊富であり、これは機能的な二重性を有するMK前駆細胞のサブセットを示し得ることを示唆

している。例えば、クラスター3に最も多く含まれるDEGの１つである血小板因子4（PF4）は、血液凝固を促進し（図5c）（Kowalska, M.A., Rauova, L. & Poncz, M. Thromb Res 125, 292-296 (2010)）、マクロファージ（Scheuer, B. et al. Blood 95, 1158-1166 (2000)）および好中球（Xiao, Z., Visentin, G.P., Dayananda, K.M. & Neelamegham, S. Blood 112, 1091-1100 (2008)）に対する活性を通じて自然免疫の重要な調節因子である。さらに、細菌に対する好中球の活性化因子であるプロ血小板塩基性タンパク質（PPBP）（Laarman, A.J. et al. EMBO J 31, 3607-3619 (2012)）も、クラスター3で有意にアップレギュレーションされていた。

[0127] クラスター3および5は共に、潜在的な免疫関連遺伝子の発現が高度に上昇したMK前駆細胞のサブポピュレーションを表し得る。GO解析によると、クラスター3および5にアノテーションされた免疫遺伝子は、免疫システムプロセスおよび免疫応答に関与している（図5e）。クラスター5では、I型インターフェロン、サイトカイン、およびウイルス応答における遺伝子群が高度に発現していたのに対し、クラスター3は骨髄性白血球を介した免疫に応答するようであった。重要な炎症性ケモカインであるCCL5（Marques, R.E., Guabiraba, R., Russo, R.C. & Teixeira, M.M. Expert Opin Ther Targets 17, 1439-1460 (2013)）は、クラスター5に最も多く含まれるDEGの１つであった。特に、CCL5は血小板新生における血小板前駆細胞の形成を促進することが報告されており（Machlus, K.R. et al. Blood 127, 921-926 (2016)）、クラスター3において、クラスター1、2または4と比較してCCL5の発現がアップレギュレーションされていた（図5c、f）。ユビキチン様タンパク質であり、宿主およびウイルスのタンパク質に共有結合できるinterferon-stimulated 15（ISG15）（Perng, Y.C. & Lenschow, D.J. Nat Rev Microbiol 16, 423-439 (2018)）に関するインターフェロン刺激遺伝子（interferon-stimulated gene）が、クラスター5の上位DEGとして同定された。ウイルス感染細胞からのI型インターフェロン分泌が抗ウイルス免疫の特徴であることを考慮すると（Grandvaux, N., tenOever, B.R., Servant, M.J. & Hiscott, J. Curr Opin Inf

ect Dis 15, 259-267 (2002))、これらの結果は、クラスター5が抗ウイルス機能に関する代表的な「免疫型」MKを表すことを示している。近年のナイーブMKのin vivoモデルでは、「免疫型」MK、造血幹細胞（HSC）ニッチを支持するMK、および血小板新生に偏ったMKの存在が実証されている（非特許文献7、8；Liu, C. et al. Adv Sci (Weinh) 8, e2100921 (2021)）。特に、これらの結果から、imMKCLには血小板新生に偏ったサブセット（クラスター3）と、代表的な免疫型のサブセット（クラスター5）が含まれていることが示唆される。ニッチを支持するサブセットは観察されなかったが、imMKCLには内在性MK認められるもの同様の免疫偏向型の細胞集団が含まれていると考えられる。

[0128] let-7a-5p活性の阻害は「免疫型」imMKCLの発生を駆動する

次に、本発明者らは、let-7がimMKCLにおける「免疫型」サブセットの発生を機能的に駆動するかどうかを検討するため、機能喪失実験を実施した（図6a）。let-7a-5p阻害剤を用いてlet-7a-5pの発現／活性を阻害したところ（図6b、c）、クラスター3および5で同定されたPF4、PPBP、ISG15、およびテトラトリコペプチド反復配列3を有するインターフェロン誘導タンパク質(interferon induced protein with tetratricopeptide repeats 3; IFIT3)を含む様々な免疫関連分子の発現が亢進されることを見出した（図6e）。本発明者らはまた、imMKCLにおけるlet-7a-5p活性の阻害が免疫刺激に対する応答を変化させるかどうかを調べた。細胞を病原体受容体アゴニストであるLPSまたはコントロールバッファーで刺激し、上清を、フローサイトメトリーによるサイトメトリックビーズアレイキットを用いて分析した。本発明者らは、imMKCLにおけるlet-7a-5pの阻害により、重要な炎症性ケモカインであるインターロイキン-8（IL-8）（David, J.M., Dominguez, C., Hamilton, D.H. & Palena, C. Vaccines (Basel) 4 (2016)）の分泌が促進されることを見出した（図6d）。IL-8およびその受容体は、MKの増殖および成熟を制御することが知られている（Emadi, S. et al. Blood 105, 464-473 (2005)）。これらの結果は、ヒト臍帯血由来のMKが刺激なしでさえIL-8を産生することを見出したとの

従前の報告（Higuchi, T. et al. Br J Haematol 99, 509-516 (1997)）と一致している。これらを総合して、本発明者らは、let-7a-5pはimMKCL間の「免疫型MK」の発生を調節する機能的な因子であると結論付けた。

[0129] RALBは免疫偏向型imMKCLの発生におけるlet-7a-5pの機能的標的である

これまでの実験により、免疫偏向型imMKCLにおけるlet-7a-5pの重要な役割が明らかになった。免疫関連の転帰に寄与する根本的な要因をさらに特定するため、クラスター3およびクラスター5（let-7 low imMKCL）の上流調節因子を調査するため、インジェニュイティパスウェイ解析（IPA）を実施した。図7aは、全体の分析デザインを示すフローチャートを表す。IPA解析の結果、クラスター3において、MKの転写因子であるGATA1（Orkin, S.H., Shivdasani, R.A., Fujiwara, Y. & McDevitt, M.A. Stem Cells 16 Suppl 2, 79-83 (1998)）および骨髄発生の調節因子であるKLF2が潜在的な転写活性化因子として同定された（図7b）。特に、KLF2は、多菌種感染に対する宿主の自然免疫応答を制御することが示されている（Mahabeleshwar, G.H. et al. Immunity 34, 715-728 (2011)）。一方、クラスター5において、IRF7（Ning, S., Pagano, J.S. & Barber, G.N. Genes Immun 12, 399-414 (2011)）およびIRF3（Kubota, T. et al. J Biol Chem 283, 25660-25670 (2008)）などのウイルス誘導性の細胞内遺伝子の既知の活性化因子が、潜在的な上流調節因子として同定された（図7b）。本発明者らはまた、クラスター3および5の共通の上流調節因子を、予測上のlet-7a-5pの標的と比較した（図7c）。この解析により、20個の上流調節因子の候補が同定され、そのうち8個がimMKCLで検出可能な発現レベルを示した（図7d）。さらに、濃縮されたlet-7 lowクラスター（クラスター3および5）における発現レベルの上昇に基づき、cut-like homeobox 1（CUX1）およびRAS like proto-oncogene B（RALB）がlet-7a-5pの標的であり（図7e）、観察された免疫関連の転帰に寄与し得ることが示唆された。それに伴い、let-7a-5pの阻害により、CUX1およびRALBのmRNA発現レベルは、増殖期および成熟期の両方でアップレギュレーションされた（図7f）。CUX1の過剰発現は有意な影響を与えなかったが（図8）、RALBの過剰発現により、

IRF7、ISG15、およびIFIT3のmRNA発現がアップレギュレーションされたが（図7g、h、図9a、b）、let-7a-5pの発現レベルには影響を与えなかった（図9c）。一方で、クラスター3および5の両方の上流調節因子として予測されていたにも関わらず、RALBの過剰発現は、クラスター3で同定された血小板新生に関連する遺伝子の発現には影響を与えなかった（図9d）。これは、imMKCLにおける免疫経路と血小板形成経路の制御には、異なるlet-7の標的が関与し得ることを示している。IPA解析での知見（図7b）と合わせて、本発明者らは、RALBを標的とすることで、let-7a-5pがimMKCLの免疫特性を調節することを提案する（図7i）。

[0130] 免疫特性/サブセットの調節不全は、imMKCLの品質に関連する

本発明者らは以前、増殖段階において増殖速度が遅い特定のimMKCLクローンは、iPSC-PLTを生成する能力が低いことを報告した(図10a)（非特許文献９）。しかし、細胞の老化／加齢の転写シグネチャー(図11a、b)とともに、imMKCLの品質低下を引き起こす要因は不明のままであった。そこで、本発明者らは、以前の研究（非特許文献９）で用いた様々な品質のMKCLのGSEAを再解析した。let-7 lowおよびlet-7 hight集団のGSEAと同様に（図2）、TNFシグナル伝達およびインターフェロン応答遺伝子セットが、中間から低品質のMKCLにおいて有意に濃縮されていることを見出した(図10b、図11c)。本発明者らはまた、クローン7およびクローン7-3は、同一の遺伝的背景を有した同一のiPSCクローン由来であるにもかかわらず（非特許文献２、３）、静止条件下および乱流条件下の両方で、増殖およびiPSC-PLT産生に関して異なる特性を示すこと（図10c-e）、let-7a-5p活性パターンも異なる(図12a)ことを見出した。クローン7-3では、クローン7と比較して、TNFシグナル伝達およびインターフェロン応答シグナルに富むことが示された(図10f、図12b)。これらの結果から、誘導された免疫関連経路が、低品質のimMKCLと関連していることが示唆された。GSEAにより、ダウンレギュレーションされた、老化した腫瘍タンパク質53(tumor protein 53; TP53)の標的が、クローン7で豊富に含まれていることがさらに実証されたが（図12c）、これは、クローン7-3の細胞老化を

示す。クローン7-3のRALBのmRNA発現およびIL-8の分泌は、クローン7よりも高かった(図10g、h)。炎症性サイトカインは、持続的なDNA損傷を伴う老化細胞によって分泌されることが知られている（Rodier, F. et al. Nat Cell Biol 11, 973-979 (2009)）。IL-8の分泌（図10h）に加え、炎症性サイトカインをコードする遺伝子（IFNB1、CXCL8、CXCL10、CXCL11)もまた、クローン7(より若いクローン)と比較してクローン7-3(老化したクローン)でより高い発現レベルを示した(図12d)。特に、imMKCLで組換えIL-8を誘導すると、iPSC-PLT産生の減少をもたらした(図13a-c)。一方、特異的なCXCR1/2阻害剤であるReparixin (Gorio, A. et al. J Pharmacol Exp Ther 322, 973-981 (2007))を用いたIL-8シグナル伝達の遮断は、増殖には影響を与えず(データは示さず)、iPSC-PLTの産生を改善した(図13d-g)。さらに、組換えインターフェロン-α2aを投与により、増殖率が低下した(図14a)だけでなく、iPSC-PLTの産生が濃度依存的に低下した(図14b、d)。インターフェロン処理により、imMKCLにおいて、老化マーカーであるCDKN2A、ならびにインターフェロン応答遺伝子であるISG15およびIFIT3のmRNA発現が上昇した(図14c)。総合すると、これらの知見より、imMKCL内の免疫特性／サブポピュレーションの調節不全と炎症性サイトカインの分泌が、RALBレベルのアップレギュレーションに起因し得る、imMKCL集団全体の増殖の停止および血小板生成の低下を引き起こすことが示唆される。さらに、これらの結果から、免疫サイトカインがex vivoでのiPSC-PLTの製造に与える影響が強調されており、臨床応用において重要な意味を持つ。

[0131] 興味深いことに、RALBの調査により、RALBレベルのアップレギュレーションが、増殖の停止、iPSC-PLT産生の減少およびIL-8分泌の増加を誘導し(図15a-d)、さらに細胞の老化／加齢の転写シグネチャーを伴う(図16a)ことが明らかとなった。本発明者らは、このメカニズムが低品質のimMKCLの特性を再現している可能性があると考えた。また、バルクRNA-seq解析により、RALBを過剰発現しているimMKCLにおいて、TNFシグナル伝達およびインターフェロン応答が豊富に含まれることが明らかとなったが(図15e、図16b)、これは、本発

明者らの仮説をさらに支持する。さらに、RALBの発現レベルは、複数のimMKCLクローンにおけるインターフェロン応答遺伝子の発現レベルと相関していた(図15f)。

[0132] 本発明者らは、RALBの効果を検証するために、２つの追加アプローチを採用した。GTPase Ralに対する選択的阻害剤として報告されている低分子化合物であるRBC8(図17a)(Yan, C. et al. Nature 515, 443-447 (2014))を、0.1μMで添加した結果、増殖の促進(図17b)およびiPSC-PLT産生の改善(図17c-e)が生じた。siRNAを介したRALBのノックダウンも、iPSC-PLT産生を促進した(図17f、g)。IL-8の分泌に有意な変化は認められなかったものの(図17h)、RALBのノックダウンにより、IRF7、ISG15、IFIT3のmRNA発現レベルが低下した(図17i)。最後に、低品質のクローンから生成されたiPSC-PLTは、PAC-1結合およびP-セレクチン発現の低下を示した(図18)。これらの結果を総合すると、imMKCL内の免疫特性／サブセットの調節不全が、imMKCLの増殖の低下およびiPSC-PLT産生の減少に関連しており、この表現型はRALB発現のアップレギュレーションによる起因する可能性があることが示唆される。

[0133] 最後に、本発明者らは、臍帯血のCD34$^+$ 細胞に由来する、in vitro分化のMKモデルで本研究の知見を検証した(図19a)。let-7の阻害は、インターフェロンシグナル伝達や血小板産生に有意な影響を与えなかった(図19b-d)。しかし、RALBの過剰発現により、インターフェロン応答性遺伝子のアップレギュレーションおよび血小板産生の減少をもたらした(図19e-g)。これらの結果から、imMKCLと初代のMKはlet-7の阻害に対して異なる応答を示すことが示唆されるが、RALBの影響は共通しており、MKの発生における免疫特性／サブセットを決定する上でのRALBの極めて重要な役割が強調されている。

[0134] LT-C imMKCLはKAT7およびH3K14acレベルが低下している

細胞周期停止は細胞老化の指標でもあり (Kumari, R., Jat, P., 2021. Front. Cell Dev. Biol. 9, 645593 ; Mohamad Kamal, N.S. et al. 2020. Eur. J. Cell Biol. 99, 151108)、本発明者らは以前、PLT産生能が低い、または中程度のクローンが老化シグネチャーを示すことを報告した(Sone, M. et al

. Stem Cell Reports 16, 2861-2870 (2021))。特に、KAT7は細胞老化の新規な制御因子である可能性が示唆されているため(Wang, W. et al, 2021. Sci. Transl. Med. 13, eabd2655)、増殖率およびその後のPLT産生能と関連し得る、KAT7レベルをST-C（短期培養、１ヶ月未満）およびLT-C imMKCL（長期培養、４ヶ月を超える）で試験した。ウェスタンブロット解析から、LT-C imMKCLおよび早老症として知られているウェルナー症候群患者のiPSC由来のimMKCL(WS imMKCL)の両方で、ST-C imMKCLと比較してKAT7およびその下流のH3K14acタンパク質のレベルが低下していた(Paul, S.K., et al. 2024. Nat. Commun. 15, 4772)(図21A、B)。さらに、WS imMKCLはST-C imMKCLと比較して増殖能および血小板産生能の低下を示した(図21C、D)。これらの結果から、KAT7がimMKCLの増殖を制御する重要な制御因子であり、加齢に依存したKAT7レベルが細胞周期進行に影響を与え得ることが示唆された。

[0135] KAT7の薬理学的阻害は細胞周期停止を引き起こし、imMKCLの増殖および成熟を阻害する

imMKCLにおけるKAT7の役割を調べるため、まずKAT6/KAT7阻害剤であるWM3835およびWM1119を用いてH3K9アセチル化活性を抑制した。初期試験の結果、5μMのWM3835がWM1119と比較して有意にH3K14acレベルを低下させることが確認されたため、本実施例において選択的KAT7阻害剤として適していることが示唆された(MacPherson, L., et al. 2020. 266-270) (図22A)。Dox-OFF段階の1日目から5日目にかけてWM3835を投与してもPLT産生能には影響を与えないことから、KAT7が成熟期には機能しないことが示唆された(図22B)。対照的に、Dox-ON段階で、WM3835を3日間または6日間前処理した場合には影響がなかったが、9日間前処理し、その後Doxを除去してさらに6日間血小板成熟を行った場合、血小板産生量が有意に低下した(図22C、D)。Fucciセンサーを用いた解析の結果、KAT7阻害によりG0期の細胞が増加し、G1期およびG2/M期の細胞が減少することが確認された(図22E)。

[0136] WM3835によるオフターゲット効果を回避するため、shRNAを介したKAT7ノックダウン(shKAT7)実験も実施し、RT-qPCRによりKAT7mRNA発現の有意な減少を

確認した(図23A)。shKAT7 imMKCLでは、細胞増殖および血小板産生能の両方が顕著に低下した(図23B)。また、shKAT7 imMKCLにおいて、G0期の細胞の割合が2倍に増加し、KAT7ノックダウンによるG0期での細胞周期停止が示唆された(図23C)。これらの結果から、WM3835処理によって観察されたものと類似した表現型が実証された。一方で、KAT7を過剰発現させても増殖率、PLT産生、および細胞周期状態は変化しなかった(図23A-E)。これらの結果から、KAT7がDox-ON段階のimMKCLの細胞周期維持に重要であり、imMKCLの増殖能の維持とその後の成熟段階における血小板収量への影響におけるその役割が強調されている。

[0137] ＜材料および方法＞

細胞

ヒトiPSC株のTkDN-Sev2およびT-1は、本発明者らの研究室で樹立された。imMKCL（クローン7、クローン7-3、M35-1）は、ヒトiPSCからDOX誘導性規定の因子により誘導し、過去の研究で使用した（非特許文献２、３）。ヒトESC株のKhES-3は、京都大学再生医科学研究所（京都、日本）から入手した。WS imMKCLは、千葉大学医学研究院（イノベーション再生医学、本発明者の一人である江藤浩之が京都大学と兼務）より提供を受けた。すべての細胞の使用は、京都大学および千葉大学の倫理委員会の承認を得た。

[0138] 細胞培養

imMKCL（クローン7、クローン7-3、M35-1）を、以前の報告（非特許文献３）と同様に培養した。ドキシサイクリンを用いて増殖段階および分化段階を制御した。

[0139] 細胞増殖測定

細胞増殖は、製造元の説明書に従い、CCK-8キットを使用して評価した。Dox-ON段階で3日間培養したimMKCLを、96ウェルプレートに5×10^3 細胞/ウェルの密度で播種した。450 nmでの吸光度を、マイクロプレートリーダー（Envision 2104, PerkinElmer)を使用して測定した。

[0140] マイクロRNAスイッチ

miRNA応答性mRNA（miRNAスイッチ）を、MegaScript T7 kit（Ambion）を用いて、既報の方法に従い作製した（Miki, K. et al. Cell Stem Cell 16, 699-711 (2015)）。miRNAスイッチは、imMKCL内で発現する任意のmiRNA（miR-X）の活性に応答して、青色蛍光タンパク質であるTagBFPを転写後に制御するように修飾mRNA上にコードされている。TagBFPをコードするmRNAは、5’UTR内に標的miR-X配列を含み、miR-X活性の増加に応じてTagBFPの発現レベルが抑制される。Azami Green 1（hmAG1）をコードするmRNAは、トランスフェクションコントロールとして用いた（図1B）。

[0141] miRNAスイッチベースのスクリーニング

miRNAスイッチベースのスクリーニングは、独自に構築したライブラリー（合計269種類のmiRNAスイッチ）を用いて実施した。それぞれTagBFPおよびAG1をコードする2種類の異なるmRNAを細胞へ共トランスフェクションした。miRNAスイッチのトランスフェクションは、既報（Miki, K. et al. Cell Stem Cell 16, 699-711 (2015)）に従い実施した。簡潔に説明すると、imMKCLの増殖期において、150 ngのmRNA（各75 ng）をStemFect mRNA（Stemgent）とともに50 μLの細胞懸濁液（1×10^6 cells/mL）内で30分間リバーストランスフェクションを行い、その後96ウェルプレート内で培養液を用いて200 μLに希釈した。24時間後、LSRFortessa（BD Biosciences, San Jose, CA, USA）を用いてフローサイトメトリーを実施した。候補のmiRNAスイッチを、標的のmiR-Xに対するimMKCLの活性応答パターンに基づいて選択した（図1cにおける「active」）。imMKCL内で強い応答活性を示さなかったmiRNAを「inactive」と定義した（図1c）。let-7a-5pおよびlet-7g-5pについては、本発明者らは候補のスイッチをコントロールであるhmAG1をコードするmRNAとともにimMKCLへ個別にトランスフェクションした。24時間のインキュベーション後、BD FACSAria IIを用いて細胞を選別し、さらなる解析を行った。

[0142] 細胞選別およびフローサイトメトリー

細胞を染色用培地に懸濁し、適切な抗体とともに氷上で、30分間暗所でインキュベーションした後、BD FACSAria IIを用いて選別または解析を行った

。血小板数の測定は、既報の方法に従い実施した（非特許文献２、３）。フローサイトメトリーには以下の抗体を使用した。アロフィコシアニン（APC）をコンジュゲートした抗CD41a（インテグリンαIIbβ3複合体: HIP8クローン）（Biolegend, San Diego, CA）、フィコエリスリン（PE）をコンジュゲートした抗CD42b（GPIbα）（eBioscience, San Diego, CA）、PEをコンジュゲートした抗CD41a（HIP8クローン）（Biolegend）。あるいは、imMKCLを、100μmノズルを備えたFACS S6装置を使用して選別し、DIVAソフトウェアパッケージ（バージョン8.0.2）を用いて操作した。

[0143] 抗体ベースの定量的タンパク質分析(シンプルWES)

細胞溶解液は、EpiQuik Total Histone Extraction Kit(Epigentek)を使用して調製した。タンパク質濃度は、Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific)を使用して測定した。溶解液を最終濃度0.5または1 μg/μLに調整し、Wes自動ウェスタンブロッティングシステム（ProteinSimple）を使用して解析した。使用した抗体は、マウス抗β-アクチン(1:500、Sigma)、ウサギ抗ヒストンH3(1:50、Cell Signaling Technology)、ウサギ抗アセチルヒストンH3(Lys14)(D4B9)(1:25、Cell Signaling Technology)、およびウサギ抗MYST2(D4N3F)(1:50、Cell Signaling Technology)である。

[0144] 逆転写およびリアルタイムPCR

総RNAを、microRNeasy Micro Kit または microRNeasy Mini Kit（Qiagen, Hilden, Germany）を用いて抽出し、SuperScript VILO™ Master Mix (Thermo Fisher Scientific) またはReverTraAce（登録商標） qPCR RT Master Mix with gDNA Remover(東洋紡)を用いて逆転写した。qPCRを、StepOnePlusシステム（Thermo Fisher Scientific）を用いて、SYBR™ Green PCR Master Mix（Applied Biosystems, Foster City, CA, USA）により実施した。あるいは、リアルタイムPCRを、QuantStudio3システム（Applied Biosystems）を用いて、THUNDERBIRD(登録商標) Next SYBR™ qPCR Mix（東洋紡）により実施した。内部対照としてGAPDHを使用した。使用したプライマーセットを表3に示す。表3における配列について、上から順に配列番号１８～３９として配列表に

示す。let-7a-5pおよびlet-7g-5p miRNAの逆転写は、TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific) およびmiRNA特異的ステムループRTプライマーを用い、製造元の説明書に従って行った。qPCRを、StepOnePlus システムを用いて、TaqMan Fast Advanced Master Mix (Thermo Fisher Scientific) により実施した。let-7の発現レベルは、特異的なTaqManプローブを用い、RNU6Bに対する相対値として算出した。

[0145]

[表3]

qRT-PCRに用いたプライマーペア

遺伝子シンボル	プライマー	配列（5'→3'）
ISG15	フォワード	GAGAGGCAGCGAACTCATCT
	リバース	CTTCAGCTCTGACACCGACA
KAT7	フォワード	TCAGGATGCCCACTGTATCATAAC
	リバース	ATCTGCTTATCCCGGCTCTGT
CCL5	フォワード	ATCCTCATTGCTACTGCCCTC
	リバース	GCCACTGGTGTAGAAATACTCC
IFIT3	フォワード	GAAGGAACTGGGCCGCCTGCTAAG
	リバース	GCCCTGGCCCATTTCCTCACTACC
PF4	フォワード	GTGTGAAGACCACCTCCCAG
	リバース	GCTTGCAGGTCCAAGCAAAT
PPBP	フォワード	TTGTAGGCAGCAACTCACCC
	リバース	TGCAAGGCATGAAGTGGTCT
RALB	フォワード	GACTACGCAGCCATTCGAGA
	リバース	CCGCTCCTCTAGGTCAGACT
CUX1	フォワード	ACAGACACTGAAGAACCAAGCCGA
	リバース	TGTGAGGCCAGCTGGAGGGA
IRF7	フォワード	CTTCCAAGAAGAGCTGGTGGAAT
	リバース	TTCCAGCTTCACCAGGAC
CDKN2A	フォワード	GCCCAACGCACCGAATAGTT
	リバース	AATCGGGGATGTCTGAGGGA
GAPDH	フォワード	GTTGCCATCAATGACCCCTTC
	リバース	CATTGATGACAAGCTTCCCG

[0146] imMKCLによるサイトカイン分泌の解析

培養上清中のサイトカイン分泌を、製造元のガイドラインに従い、ヒト炎症性サイトカインサイトメトリックビーズアレイキット（BD Biosciences）を用いて測定した。簡潔に説明すると、捕捉抗体タンパク質でコーティング

した異なる蛍光強度を有するビーズ集団を、PEをコンジュゲートした検出抗体および組換え標準品またはサンプルと混合し、次いでインキュベーションを行い、サンドイッチ複合体を形成させた。フローサイトメトリーによりサンプルデータを取得した後、サイトカイン濃度をFCAP Array™ ソフトウェア（BD Biosciences）を用いて算出した。

[0147] let-7a-5p阻害剤のトランスフェクション

mirVana let-7a-5pに特異的な阻害剤およびネガティブコントロールをThermo Fisher Scientificより購入し、製造元の説明書に従い使用した。トランスフェクションは、Stemfect RNA Transfection Kit（ReproCell、横浜、日本）を用いて実施した。

[0148] レンチウイルス産生

ウイルスベクターの使用は、京都大学および千葉大学の委員会により承認された。ヒトCUX1およびRALBの全長をコードする配列をレンチウイルスベクターのCS2-Ubic-IG-GFPまたはCS2-Ubic-IBにクローニングした。過剰発現実験用に、ヒトKAT7の全長をコードする配列をCS2-Ubic-IBレンチウイルスベクターにクローニングした。ノックダウン実験用に、KAT7またはLacZ(コントロール)を標的とするshRNAオリゴヌクレオチドを、FG12-HYGレンチウイルスベクタープラスミドに挿入した。Fucciベクターは、TAKARA Bioから入手した。293T系細胞を用いたレンチウイルス産生は、既報に準じて行った（非特許文献１）。shKAT7のオリゴヌクレオチド配列は以下の通りであった：GCCCTTCCTGTTCTATGTTAT（配列番号４０）。

[0149] 免疫蛍光共焦点顕微鏡

細胞を、4% パラホルムアルデヒド(Wako)で10分間固定し、0.1% Triton X-100 (Sigma)を使用して5分間透過処理した。サンプルを10%ヤギ血清(Sigma)でブロッキングし、マウス抗CD41a抗体(eBioscience)とともに1時間インキュベートした。その後、細胞をAlexa Fluor 647がコンジュゲートした二次抗体(Thermo Fisher Scientific)で30分間処理した。核染色は、DAPI(Vector)を使用して行った。画像を、63×/1.40 開口数の油浸対物レンズを備えたZeiss

LSM900共焦点顕微鏡を使用して取得した。

[0150] バルクRNAシーケンシング解析

総RNAを、microRNeasy Micro Kitを用いて抽出した。製造元のプロトコルに従い、RNA-seqライブラリーを調製した。簡潔に説明すると、約10 ngの総RNAを、SMART-Seq v4 Ultra Low Input RNA Kit for sequencing (Takara Bio) を用いたcDNA合成に使用した。cDNAをS220 Focused-ultrasonicator (Covaris, Woburn, MA, USA) を用いて断片化した。次いで、NEBNext (登録商標) Ultra™ DNA Library Prep Kit for Illumina (New England BioLabs, Beverly, MA, USA) を用いてcDNAライブラリーを作製した。最後に、NEBnextライブラリーのサイズを、Agilent High Sensitivity DNA Kitを備えるバイオアナライザーを用いて評価した。シーケンシングは、シングルリードシーケンシング長 (single-read sequencing length) が60 bpのHiSeq2500 (Illumina) またはNextSeq 500 (Illumina) プラットフォームを用いて実施した。iGenomes (Illumina) からのアノテーションデータを用いた参照ゲノム (UCSC/hg19) へのマッピングのため、TopHat (バージョン2.1.1) を使用した。遺伝子発現レベルを、Cuffdiff (Cufflinks バージョン2.2.1) を用いて定量化し、fragments per kilobase of exon per million mapped sequence reads(FPKM) として表した。

[0151] 遺伝子セットのエンリッチメント解析 (GSEA)

バルクRNA-seqデータセットに基づき、(1)let-7(let-7a-5pおよびlet-7g-5p) lowまたはhigh imMKCL(M35-1、クローン7、クローン7-3)、(2)クローン7-3またはクローン7のlet-7 lowimMKCL、および(3)MOCKまたはRALBを過剰発現するimMKCL(クローン7)で濃縮された経路をスクリーニングするために、GSEAを適用した。プロットをブロード研究所のGSEAソフトウェア (バージョン4.2.3) を用いて作成した。本発明者らはまた、高品質、中品質、および低品質のMKCLクローンからのバルクRNA-seqデータセット (非特許文献９) を再解析した。あるいは、MsigDB Hallmarksライブラリーを採用したPythonのGSEApyパッケージを使用して、WM3835で処理した、およびDMSOで処理したimMKCLか

らのバルクRNA-seqデータで濃縮されている経路を同定するために実行した。正規化された遺伝子発現マトリックスをGSEAに入力し、FDRおよびP値が0.05未満の場合に統計的に有意であると判断した。

[0152] Chromium 10x シングルセルRNA-seqライブラリーの構築

異なるlet-7a-5p活性を有するimMKCL（クローン7）を別々に選別し、0.4% BSAを含むPBSに、1000 cells/μLの濃度で再懸濁した（図5）。細胞を、Chromium Next Gel Beads-in-EMulsion (GEMs) Chip G Single Cell Kit (10x Genomics, USA) にローディングした。GEM生成とバーコード付与、逆転写、cDNA生成およびライブラリー構築を、製造元のプロトコル（Chromium Next GEM Single Cell 3' Reagent Kits v3.1 Dual Index, 10x Genomics）に従って行った。デュアルインデックス化されたシングルセルライブラリーをプールし、NovaSeq6000（Illumina）でペアエンドリードによりシーケンシングを行った。

[0153] バイオインフォマティクス解析

10x Genomics由来のデータセットを収集し、低品質および汚染細胞を除去するための品質管理を実施した。一般的に、リードはCell Ranger pipeline v.3.0.2（10x Genomics）で前処理した。下流解析および可視化には、R（バージョン 4.1.1）上で実装されたSeurat（バージョン 4.0.5）を用いた。品質管理指標の検討後、ミトコンドリア含有率が15%を超える細胞および検出された遺伝子が2500個未満の細胞は、下流解析から除外した。本発明者らは、正規化された負の二項回帰を使用して、ユニーク分子識別子（UMI; unique molecular identifier）カウントを正規化し、スケーリングした。その後、本発明者らは線形次元削減（主成分分析）を行い、上位20の主成分を用いて、教師なしの均一マニホールド近似投影（UMAP）およびクラスタリングを実行し、解像度1.2から0.05の解像度の範囲で計算した。let-7a-5p highおよびlowimMKCL集団は、すべての後続解析で統合した。細胞クラスターを、SeuratのFindClusters機能を用いて同定した。DOX-ONサンプルでは、5つのクラスターが同定された（解像度0.2）。SeuratのFindAllMarkers機能を用いて異なるク

ラスター間のDEGを同定した。各遺伝子についてWilcoxon検定を実施し、P値および調整済みP値を算出し、調整済みP値が0.01未満の場合に統計的に有意とみなした。GOから豊富に含まれる機能的タームの同定のため、g:Profilerを使用した。

[0154] 統計解析

統計解析をGraphPad Prismソフトウエア（GraphPad Software, La Jolla, CA）を用いて行った。データは平均値 ± 標準誤差（SEM）として表記した。P値が0.05未満の場合に統計学的に有意とみなした。使用したサンプルサイズ、統計手法、および統計学的有意性の詳細は各図面の簡単な説明欄に示した。統計学的有意の閾値は、*p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001および****p < 0.0001に設定した。

[0155] ヒトESC由来$CD34^{\pm}$ 細胞の分化

ヒト胚性幹細胞（ESC）株のKhES-3を、京都大学再生医科学研究所（京都、日本）から入手し、iMatrix-511 silk（タカラバイオ、滋賀、日本）でプレコーティングした6ウェルプレート上で、AK02N培地（味の素、東京、日本）で維持した。$CD34^{+}$ HPCの分化は、本発明者らが以前確立したSac法（Takayama, N. et al. Blood 111, 5298-5306 (2008)；Yuzuriha, A. et al. Stem Cell Res 53, 102287 (2021)）を用いて実施した。簡潔に説明すれば、等量の細胞（1.5～1.6×10^{5} 個）を小さなクラスターを、マイトマイシンCで処理したC3H10T1/2マウスフィーダー細胞（理研バイオリソースセンター、茨城、日本）でコーティングした10 cmディッシュへ移し、L-グルタミン（Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA）、インスリン-トランスフェリン-セレン（Thermo Fisher Scientific）、50 μg/mLのアスコルビン酸（Sigma-Aldrich）、450 μMのα-モノチオグリセロール（Sigma-Aldrich）、および20 ng/mLの組換えヒト VEGF（和光純薬、大阪、日本）を補充した基礎培地（IMDM培地（Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA））で培養した。次いで、4～7日目に50 ng/mL 塩基性FGF（Wako）および10 μM SB431542（Wako）を添加し、4～10日目に10 U/mL ヘパリン（AY Pharmaceuticals、東京、日本）を添加し

た。培地交換は、4、7および11日目に実施した（図4a）。14日目に、細胞をセルスクレーパーで回収し、セルストレーナーで濾過してさらなる調査を行った。

[0156] ヒト臍帯血由来のCD34$^{\pm}$ 細胞の精製

健康なドナーから採取した新鮮な臍帯血（UCB）サンプルを、日本赤十字社関東甲信越ブロック血液センターから入手した。単核細胞（MNC）を、リンパ球分離培地（Ficoll）を用いた密度遠心法により分離した。その後、細胞を免疫磁気ビーズ（CD34）（Miltenyi Biotech）と共にインキュベートし、製造元の説明書に従い、QuadroMACS（登録商標）分離装置を用いて、細胞を選択した。精製効率はフローサイトメトリーで確認した。得られたCD34^{+} 画分を小分けし、使用するまで液体窒素中で保存した。

[0157] 臍帯血由来のCD34$^{\pm}$ 細胞から巨核球への分化

臍帯血由来のCD34^{+} 細胞のin vitro分化は、既報のプロトコルに軽微な改変を加えて実施した（Kaushansky, K. et al. Proc Natl Acad Sci U S A 92, 3234-3238 (1995)；Bruno, S. et al. Haematologica 88, 379-387 (2003)）。簡潔に説明すれば、CD34^{+} 細胞を、1% ウシ血清アルブミン（BSA, StemCell Technologies）、100 ng/mLヒト SCF（R&D Systems）、100 ng/mLヒトFlt-3リガンド（PeproTech EC Ltd.）、50 ng/mLヒトトロンボポエチン（TPO）（R&D Systems）、10 ng/mLヒトIL-6（PeproTech EC Ltd.）、および10 ng/mLヒトIL-3（PeproTech EC Ltd.）を補充したX-VIVO 10培地（Lonza）中で拡大培養した。9日間培養した後、細胞を回収および計数した。4×10^{5} 細胞を、1% BSA、SCF、TPO、およびIL-6を補充した総量1 mLのX-VIVO10培地に播種し、さらに11日間培養した。RNAを16日目に単離し、フローサイトメトリー解析を20日目に実施し、CD41a^{+}CD42b^{+} の血小板様粒子を評価した。培地は、分化期間中2日ごとに交換した（図18a）。

[0158] siRNAを介した遺伝子ノックダウン

異なる部位を標的とする4種のsiRNAおよび非標的コントロールsiRNA(siNT)を含む、ヒトRALB遺伝子に対して設計されたDharmacon™siGENOME siRNA SMAR

Tpool（siRALB）を、Horizon Discovery Ltd.から購入した。遺伝子サイレンシング手順は、軽微な改変を加えたDharmaconの逆転写トランスフェクションプロトコルに基づき実施した。簡潔に説明すれば、最終濃度10 nMのsiRNAをStemfect RNA Transfection Kit（ReproCELL）のトランスフェクションバッファーで希釈し、トランスフェクション試薬を、同量のバッファーで希釈した。希釈したsiRNAとトランスフェクション試薬を混合し、室温で15分間インキュベートした。その後、96ウェルプレートに12.5 μL/ウェルのトランスフェクション混合液を添加し、続いて100 μL培地中の2×10^5 細胞を各ウェルに添加した。4時間のインキュベーション期間後、PBSで洗浄し、細胞を増殖または分化培養条件に供した。ノックダウン効率の確認のため、トランスフェクションの48時間後に総RNAを単離し、解析した。

[0159] imMKCL培養における組換えヒトインターフェロン-α2aまたはIL-8の添加

imMKCLの増殖およびiPSC-PLT産生におけるインターフェロンまたはIL-8の潜在的な関与を調べるため、組換えヒトインターフェロン-α2a（Miltenyi Biotec）またはIL-8（R&D Systems）を添加して、増殖または分化培養条件下で細胞を培養した。作業濃度として0～100 ng/mLの範囲の濃度を使用した。それに応じて増殖およびiPSC-PLT産生能力を評価した。

[0160] imMKCL培養における低分子化合物の添加

imMKCLの増殖およびiPSC-PLT産生に対する2種類の低分子化合物の影響を調査した。(1)Reparixin（Selleckchem）：IL-8シグナル伝達経路を阻害するために一般的に使用されるCXCL8受容体のCXCR1/2の特異的阻害剤、および(2)RBC8（Selleckchem）：GTPaseであるRALAおよびRALBの選択的阻害剤。imMKCLを、増殖培養条件または分化培養条件のいずれかで、0～10 μMの作業濃度のReparixinまたはRBC8の存在下または非存在下で培養した。増殖培養条件下では、imMKCLをReparixinまたはRBC8で14日間処理した。培地交換を3～4日ごとに行い、培地交換中にimMKCLの数を計測し、その成長曲線を作成した。分化培養条件では、imMKCLをReparixinまたはRBC8で6日間処理し、そのiPSC-PLT産生を評価した。これらの研究では、ジメチルスルホキシド(DMSO)をコントロ

ールウェルに添加した。注目すべきことに、いずれかの分子の高濃度(10 μM)を適用すると、増殖が停止した。

[0161] 細胞内フローサイトメトリー

細胞を4% PFAで15分間固定し、メタノールで透過処理した（氷上で15分間）。PBS洗浄後、抗RalB抗体（Merck Millipore、1:3000）で、氷上で1時間染色した。次に二次抗体 Alexa Fluor™647（Invitrogen, 1:1000）を用いて染色し、フローサイトメトリーで解析した。細胞内フローサイトメトリーアッセイを、imMKCL用に次のように最適化した。細胞を4% パラホルムアルデヒド(PFA)で、室温で15分間固定し、続いてメタノール透過処理(氷上で15分間)を行った。PBSで2回洗浄した後、細胞を抗RalB抗体(Merck Millipore、1:3000)とともに氷上で1時間インキュベートした。その後、細胞を洗浄し、ヤギ抗マウス二次抗体 Alexa Fluor™ 647（Invitrogen、1:1000)とともに氷上でインキュベートした。次いで、染色した細胞と染色していないコントロールをフローサイトメトリーで解析した。

[0162] imMKCL細胞を、製造元の説明書に従って、PerFix-nc kit(Beckman Coulter)を使用して固定および染色した。一次抗体として、アセチルヒストンH3(Lys14)(D4B9)ウサギ抗体(Cell Signaling Technology)を使用し、続いてAlexa Fluor 647がコンジュゲートしたヤギ二次抗体(Thermo Fisher Scientific)を使用した。サンプルを、FACSLyric 装置(BD Biosciences)を使用して解析した。

[0163] iPSC-PLTのPAC-1結合およびP-セレクチン発現

PAC-1結合およびP-セレクチン発現レベルの測定は、本発明者らの以前の研究（Sugimoto, N. et al. Blood Adv 6, 6056-6069 (2022)）で概説したプロトコルに準拠した。簡潔に説明すれば、培養懸濁液(iPSC-PLT)を、ホルボール-12-ミリステート-13-アセテート(PMA、0.2 μM)またはアデノシン三リン酸＋トロンビン受容体活性化ペプチド6（adenosine triphosphate plus thrombin receptor activator peptide 6）(ADP/TRAP6、それぞれ100 μMおよび40 μM)を用いて、または用いずに刺激した。その後、混合物をBV421マウス抗

ヒトCD62P (BD Biosciences)、APC-抗ヒトCD41a(Bio Legend)、およびFITC-PAC-1(BD Biosciences)抗体とともにインキュベートした。室温で30分間インキュベートした後、サンプルをHepes-Tyrodeバッファーで希釈し、フローサイトメトリーで分析した。

[0164] 本出願は、米国仮特許出願第63/558,394号（出願日：2024年2月27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] Ral（RAS like proto-oncogene）遺伝子の転写産物またはタンパク質からなる、巨核球の品質管理マーカー。

[請求項2] Ral遺伝子がRalB（RAS like proto-oncogene B）遺伝子である、請求項１に記載のマーカー。

[請求項3] Kat7（リジンアセチルトランスフェラーゼ7）遺伝子の転写産物もしくはタンパク質、またはKat7タンパク質の標的のアセチル化されたヒストンタンパク質からなる、巨核球の品質管理マーカー。

[請求項4] 巨核球において、請求項１～３のいずれか１項に記載のバイオマーカーの1種以上を検出する工程を含む、巨核球の品質評価方法。

[請求項5] 巨核球において、RalB遺伝子の転写産物またはタンパク質およびKat7遺伝子の転写産物またはタンパク質を検出する工程を含む、請求項４に記載の方法。

[請求項6] （１）対象の巨核球において、請求項１～３のいずれか１つに記載のバイオマーカーの1種以上の存在量または活性の程度を測定する工程、および

（２）工程（１）で測定された値に基づき、巨核球の品質を評価する工程

を含む、請求項４または５に記載の方法。

[請求項7] Ral遺伝子の転写産物を特異的に認識する核酸プローブおよび／もしくは核酸プライマー、またはRalタンパク質を特異的に認識する抗体を用いて、前記マーカーを検出することを特徴とする、請求項４または５に記載の方法。

[請求項8] Kat7遺伝子の転写産物を特異的に認識する核酸プローブおよび／もしくは核酸プライマー、もしくはKat7タンパク質を特異的に認識する抗体、またはKat7タンパク質の標的のアセチル化されたヒストンタンパク質を特異的に認識する抗体を用いて、前記マーカーを検出することを特徴とする、請求項４または５に記載の方法。

[請求項9] 巨核球が多能性幹細胞に由来する、請求項４～７のいずれか1項に記載の方法。

[請求項10] Ral（RAS like proto-oncogene）遺伝子の転写産物を特異的に認識する核酸プローブおよび／もしくは核酸プライマー、またはRalタンパク質を特異的に認識する抗体を含む、巨核球の品質管理用キット。

[請求項11] Kat7（リジンアセチルトランスフェラーゼ7）遺伝子の転写産物を特異的に認識する核酸プローブおよび／もしくは核酸プライマー、もしくはKat7タンパク質を特異的に認識する抗体、またはKat7タンパク質の標的のアセチル化されたヒストンタンパク質を特異的に認識する抗体を含む、巨核球の品質管理用キット。

[請求項12] Ral（RAS like proto-oncogene）阻害剤を含む培地中で巨核球を培養する工程を含む、品質が向上した巨核球の製造方法。

[請求項13] Ral阻害剤の少なくとも1種がRBC8またはRalの発現抑制剤である、請求項１２に記載の方法。

[請求項14] 巨核球において、Kat7タンパク質の存在量を上昇させる工程を含む、品質が向上した巨核球の製造方法。

[請求項15] 巨核球が多能性幹細胞に由来する、請求項１２～１４のいずれか１項に記載の方法。

[請求項16] 請求項４～９のいずれか1項に記載の方法により評価された巨核球、または請求項１２～１５のいずれか1項に記載の方法により得られた巨核球。

[請求項17] 請求項１６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18] 請求項１７に記載の方法により得られた血小板。

[請求項19] 請求項１６または１８に記載の細胞を含む、血液製剤。