

平成 28 年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名： (日本語) 再生医療の産業化に向けた評価基盤技術開発事業  
(英語) Project Focused on Developing Key Evaluation Technology: Evaluation for Industrialization in the Field of Regenerative Medicine

研究開発課題名： (日本語) 再生医療等の産業化に向けた評価手法の開発  
(英語) Development of Evaluation Technology for Industrialization in the Field of Regenerative Medicine

研究開発担当者 (日本語) ㈱メガカリオン京都開発センター長、赤松健一、  
所属 役職 氏名： (英語) Megakaryon Corp., Director of Kyoto Development Center, Kenichi Akamatsu

実施期間： 平成 28 年 5 月 25 日 ～ 平成 29 年 3 月 31 日

分担研究 (日本語) iPS 細胞由来血小板製剤および製剤原料マスターセルバンクの品質管理評価法の開発

開発課題名： (英語) Development of Evaluation Technology for Quality Control of iPSC Derived Platelet and Master Cell Bank as Cell Substrate

研究開発分担者 (日本語) 国立大学法人宮崎大学医学部、教授、澤口 朗  
所属 役職 氏名： (英語) University of Miyazaki, Faculty of Medicine, Akira Sawaguchi

研究開発分担者 (日本語) ㈱日立ハイテクノロジーズ、主管技師、川俣 茂  
所属 役職 氏名： (英語) Hitachi High-Technologies, General Manager of Technology, Shigeru Kawamata

## II. 成果の概要（総括研究報告）

澤口 朗教授（宮崎大学医学部）、川俣 茂主管技師（㈱日立ハイテクノロジーズ）らのグループとともに iPS 細胞由来血小板製剤の品質評価法を開発した。臨床に必要な血小板数を *in vitro* にて生産するため、巨核球細胞株の大量培養、巨核球細胞株の成熟・血小板放出、血小板の分離・濃縮プロセスを開発することにより、血液バッグに封入した iPS 細胞由来血小板製剤の状態で献血由来洗浄血小板 10 単位相当 ( $2 \times 10^{11}$  個) の血小板を調整することに成功した。このように調整した血小板製剤の品質特性を動物モデル及び新たに開発した電子顕微鏡観察を含む *in vitro* アッセイ系にて評価した。

得られた iPS 細胞由来血小板の品質特性を FDA のガイドライン等を参考に以下の方法にて評価した。確認試験として血小板細胞表面マーカー（CD41, CD42b）、活性化指標として PAC-1, CD62P, Annexin V 等の細胞表面抗原の解析法、また純度試験として巨核球混入率の測定系等をフローサイトメーターにて確立した。その他の活性化指標として血小板顆粒内容物である PF4、 $\beta$ -TG 放出測定系を ELISA にて確立した。効能試験としては *in vitro* での血小板凝集能のアグリコメーターでの測定系および血餅形成評価系を確立すると共に、ウサギ血小板減少モデルを用いて止血効果が評価できることを証明した。

iPS 細胞由来血小板の分泌顆粒、開放小管系等の微細形態を簡便かつ正確に検討するため、電子顕微鏡を用いたハイスループットかつ汎用性の高い新たなデジタル可視化技術を開発した。準超薄切片を走査型顕微鏡原理を応用して観察することにより、従来の透過型顕微鏡による超薄切片と同様の解像度での観察が出来ることを証明した。同時に血小板サイズおよび内部構造を解析・定量化する新たな画像解析ソフトウェアと画像保存・管理データベースを開発し、献血血小板と iPS 細胞由来血小板の微細形態の定量的な比較を可能とした。この成果は将来の血小板の細胞品質評価系として活用できるうえ、他の細胞治療製品の品質評価にも応用可能である。

（英文）

We, Megakaryon Corp. has developed evaluation technology of quality of iPSC-derived platelets in collaboration with the groups of Dr. Akira Miyazaki (Professor of University of Miyazaki, Faculty of Medicine) and Dr. Shigeru Kawakubo (Hitachi High-Technologies, General Manager of Technology). We succeeded to obtain a large amount of iPSC-derived platelets by developing the manufacturing processes, which includes the process of immortalized megakaryocyte cells (MKCL) culture process, the process of maturation and platelet release from MKCL, the process of separation, concentration and formulation of platelets. Establishment of these manufacturing processes gives us to prepare the formulated iPSC-derived platelets of up to  $2 \times 10^{11}$  (corresponds to 10 units of PC) in transfusion bag.

The quality properties of iPSC-derived platelets prepared by above mentioned methods were evaluated by establishing various assays *in vitro* including newly developed electric microscope (EM) system, and their efficacy was analyzed in animal thrombocytopenia models. The quality properties and functions of iPSC-derived platelets were analyzed by reference to the FDA pending guideline as below. Platelet surface markers CD41 and CD42b as identity test, the enhanced expressions of surface antigens of PAC-1, CD62P, Annexin V by agonists as platelet activation markers, estimation of megakaryocyte cells in formulated platelets as purity test, these all assays were established by using Flow Cytometer. The ELISA assays to evaluate release of PF4 and beta-TG from platelet granules were also established as activation markers. The estimation of platelet aggregation by Aggregometer and the observation system of clot formation were established as *in vitro* functional assays. The hemostatic activities of iPSC-derived platelets were repeatedly shown in the rabbit thrombocytopenia models.

The micromorphology of the platelet structure is important parameter to know the quality of iPSC-derived platelets in comparison with donor platelets. We newly developed high throughput EM system to enable accurate and simple observation of microstructure such as secretary granules and open canalicular system of platelets. We elucidated the same resolution image with that of ultrathin sections by transmission EM (TEM) could be obtained in sub-ultrathin section by application of scanning EM (SEM) principles. In parallel, new software to analyze and quantify platelet size and internal ultrastructure of platelets and data base to reserve and control big data of these images. Establishing these new EM systems could enable us quantitative comparison of the microstructures of iPSC-derived platelets and donor platelets and future evaluation system to evaluate cell quality, which is generally applicable to quality assay systems for other cell therapy products.

### III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧 (なし)

該当なし

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. AMED 再生医療公開シンポジウム、ポスター、澤口朗教授、TKP ガーデンシティ品川、2017/2/2、国内

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

該当なし

(4) 特許出願

該当なし

平成 28 年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名：(日本語) 再生医療の産業化に向けた評価基盤技術開発事業 (再生医療等の産業化に向けた評価手法等の開発)

(英語) Project Focused on Developing Key Evaluation Technology: Evaluation for Industrialization in the Field of Regenerative Medicine

研究開発課題名：(日本語) iPS 細胞由来血小板製剤および製造原料マスターセルバンクの品質管理評価法の開発

(英語) Development of Evaluation Methods for Quality Control of iPS cell-derived Platelet Products and the Source Master Cell Bank

研究開発担当者 (日本語) (株) メガカリオン COO 兼 京都開発センター センター長 赤松健一

所属 役職 氏名：(英語) Megakaryon Co. Ltd., COO & Kyoto Development Center, Director, Kenichi Akamatsu

実施期間：平成 28 年 5 月 25 日 ～ 平成 29 年 3 月 31 日

分担研究 (日本語) 増殖フェーズにある不均一集団の巨核球細胞株から、マスターセル細胞株として選別できる評価技術の確定

開発課題名：(英語) Establishment of Evaluation Technology for the Selection of Master Cells from the Heterogeneous Population of Proliferation Phase Megakaryocyte Cell Lines

研究開発分担者 (日本語) 国立大学法人京都大学 iPS 細胞研究所 教授 江藤浩之

所属 役職 氏名：(英語) Kyoto University, Center for iPS Cell Research and Application, Professor, Koji Eto

## II. 成果の概要（総括研究報告）

- ・ 研究開発分担者による報告の場合

研究開発代表者：(株)メガカリオン COO 兼 京都開発センター センター長 赤松健一 総括研究報告を参照。

研究開発者らが開発する iPS 細胞由来の血小板製剤の臨床応用への開発戦略は、iPS 細胞から血小板産生の前駆細胞となる不死化巨核球細胞株(imMKCL と名付けた)を樹立してマスターセルバンク化し、imMKCL のマスターセルバンクから血小板を製造する方策に基づいている。本細胞株は、(1) 血小板産生細胞である生体内ヒト巨核球と同じ細胞表面分子を発現し、(2) c-MYC, BMI1, BCL-XL の3遺伝子を強制発現させると99%の細胞集団は均一な細胞増殖速度を示す。一方で(3) 3遺伝子の強制発現をストップした後の静置培養条件における成熟過程では、10-15%の巨核球細胞のみが血小板産生に寄与する“不均一性”を示す問題点が見出されていた。

そこで、成熟巨核球、血小板にのみ特異的な $\beta$ -tubulin (TUBB1)の発現を蛍光で確認することが可能な TUBBI 発現レポーターライン巨核球細胞株 (TUBB1/VENUS imMKCL) を作製した。H28年度では、この蛍光発現を指標に増殖期の巨核球細胞株をクローニングし、蛍光タンパクを強発現する細胞の含有比率が高い細胞集団を複数得ることに成功した。さらにこれらの細胞集団を蛍光タンパク発現強度の高い集団と弱い集団に分けて解析を行ったところ、TUBB1 発現が高い集団では、98%が成熟巨核球であることを確認した。このことから、細胞株の多様性・不均一性の根本的かつ直接的に関与する原因因子を探索し、候補となる遺伝子の情報が得られた。

また別のアプローチとして、細胞内部の miRNA の挙動に着目し、連携研究者である京都大学 iPS 細胞研究所の斎藤博英教授が開発した miRNA スイッチ法を導入した。その結果、特定の miRNA による反応性においてははっきりと血小板産生の高い集団と低い集団の2つに分離できることを見出した。

The development of iPS cell-derived platelets for clinical application is based on the strategy of establishing immortalized megakaryocyte cell lines (which we named, imMKCLs) from iPS cells as platelet precursor cells and producing platelets from the imMKCL master cells. (1) imMKCLs express the same cell surface molecule as the in vivo platelet-producing cells, megakaryocytes, and (2) under the induced expression of 3 transgenes, c-MYC, BMI1 and BCL-XL, 99% of imMKCL MKs show uniform cell proliferation rate. Whereas, (3) under the maturation process after stopping the expression of 3 transgenes in static culture conditions, we observed “heterogeneity” in platelet biogenesis, a problematic issue that only 10-15% of imMKCL contributed to platelet production.

Therefore, we generated a TUBBI expression reporter megakaryocyte cell line (TUBB1 / VENUS imMKCL) which is capable of monitoring the expression of  $\beta$ 1-tubulin (TUBB1), a protein specific to mature megakaryocytes and platelets, by VENUS fluorescent protein. In fiscal year 2016, cloning of

imMKCL in the cell growth phase was performed using this fluorescent protein VENUS expression as an indicator, and multiple clones with a high percentage of cells with high VENUS intensity were successfully obtained. When these cell populations were analyzed after sorting into populations with high intensity or weak intensity, it was confirmed that 98% of the cells in the high intensity population was mature megakaryocytes. Further in search of causal factors which are fundamentally and directly related to diversity / heterogeneity, a list of candidate genes was obtained.

As another approach, the miRNA switch method, developed by Professor Hirohide Saito at CiRA, was introduced. As a result, it was found that the reactivity to a particular miRNA could be clearly separated into two cell populations, a population with increased platelet generation and another with decreased platelet generation.

### III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 0 件、国際誌 0 件）  
なし

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. Synthetic miRNA Switch Technology Elucidates Heterogeneity in Regulation of Immortalized Megakaryocyte Cell Lines, Associated with Improvement of Platelet Generation Efficiency for Clinical Use, Poster, Kazuya Hashimoto, Satoshi Matsuura, Yoshihiko Fujita, Karin Hayashi, Naoshi Sugimoto, Takuya Yamamoto, Hirohide Saito and Koji Eto, 58th ASH Annual Meeting & Exposition, 2016/12/5、国外.
2. miRNA スイッチテクノロジーによる工業化製造に向けた血小板産生の不均一性改善方法の開発、口頭、橋本一哉、松浦理史、藤田祥彦、林香倫、杉本直志、山本拓也、齊藤博英、江藤浩之、第 16 回日本再生医療学会総会、2017/3/9、国内.

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み  
なし

(4) 特許出願  
なし