

## 血小板の産業的生産に向けた巨核球成熟のシングルセルアプローチ

曾根正光

千葉大学大学院医学研究院 イノベーション再生医学

### 【研究の背景】

少子高齢化に伴う血小板製剤の深刻なドナー不足や血小板不応症に対処するため、我々は iPS 細胞技術に基づく人工血小板製造システムの構築を目指している<sup>1,2)</sup>。これまで、iPS 細胞から血小板前駆細胞である巨核球を誘導し、そこに Dox 誘導性の不死化因子を導入した imMKCL 細胞株を樹立した。imMKCL は無限に増殖でき、Dox を除去するとわずか 5 日で成熟して、血小板を産生するというマスターストック細胞としての優れた性質を有する。

### 【目 的】

しかし、imMKCL の血小板産生は平均して生体の巨核球の数十分の 1 にとどまり、この低い生産性が人工血小板の産業化における障壁となっている。巨核球分化の最終段階である proplatelet の形成 (PPF) が見られるのは、Dox 除去後、imMKCL 全体の 10% 未満である。本研究において、シングルセルレベルでの解析を行い、そのような imMKCL 成熟の不均一性を解決することを目的とする。

### 【方 法】

培養皿底面に 200  $\mu$ m 四方のマイクロラフト構造が敷き詰められた QIAscout という装置の上に Dox 除去後 3 日目の imMKCL を低密度で播種した。翌日、細胞形態を詳細に観察するため、巨核球の細胞表面マーカー CD41 で染色し、PPF 陽性と PPF 陰性のシングルセルをマイクロラフトごと分取し、次にそれらを RNA-seq 解析し、両者で異なって発現する遺伝子を解析した。

### 【結 果】

17 個の PPF 陽性と 12 個の PPF 陰性のシングルセルについて RNA-seq 解析を行った。主成分解析を行うと、一部オーバーラップするものの PPF 陽性と陰性の細胞群は分離する傾向があった。PPF 陰性のシングルセルは、およそ 100 個の浮遊細胞を解析したデータと近い遺伝子発現プロファイルを示したことから、本実験の妥当性が示唆された。また、Dox 除去後、経時的に取得した imMKCL 集団の RNA-seq データと比較すると、PPF の有無と相関を示す遺伝子群は、細胞集団の経時的变化をドライブしている遺伝子群とは異なっていた。すなわち、Dox 除去により細胞増殖因子の発現が降下することで自然と引き起こされる転写カスケードとは異なる分子機構によって、proplatelet 形成とそれに続く血小板産生が制御されている可能性を示唆している。そして、大変興味深いことに、PPF 陽性細胞ではヘモグロビンやフェリチンといった、赤血球で発現の高い鉄結合性のタンパク質をコードする遺伝子群が発現上昇していた。

## 【考 察】

赤血球特異的遺伝子が PPF の形成および血小板放出にいかなる機能を有するのか現時点では不明ではあるが、今後、こうした PPF の有無と相関する遺伝子群の機能解析を通じて、血小板放出のメカニズムを明らかにすることにより、効率的な人工血小板生産技術が開発できる可能性がある。

## 【臨床的意義・臨床への貢献度】

今回の、細胞形態に基づいたシングルセルレベルでの解析によって imMKCL による血小板産生の効率が飛躍的に高まれば、人工血小板の産業化に大きく近づくことになる。我が国の将来におけるドナー不足の解決や血小板不応症の治療へ道を開く点から臨床的意義は大きい。

## 【参考・引用文献】

1. Nakamura, S. et al., 2014, Cell Stem Cell, 14(4) 535-548
2. Ito, Y. et al., 2018, Cell, 178(3) 636-648