巨核球・血小板の *in vitro* 分化誘導法

松原由美子*

Megakaryocyte differentiation and platelet production in an *in vitro* culture system

Yumiko MATSUBARA*

Key words: megakaryocytes, platelets, embryonic stem cells, hematopoietic stem cells, adipose tissues

1. はじめに

再生医学研究における最近の発展は著しい。幹細胞研究や細胞分化の調節機構研究に対する成果は、*in vitro* 分化誘導によって目的とする細胞、組織、臓器を得る技術の開発に寄与している。また、*in vitro* 分化誘導を用いた研究は様々な細胞の分化・産生機序の解明において重要な知見を示し、多くの研究者に支持されている。従来、*in vitro* 分化誘導に関する研究には、大きく分けて2種類の細胞、(a) 限られた細胞や組織への分化能を有する組織幹細胞・臓器幹細胞と (b) 種々の組織への分化能を有する多能性幹細胞、が用いられてきた。最近では細胞の lineage reprogramming (transdifferentiation や transdetermination など) の相次ぐ報告から¹⁾、細胞分化に関する新しい概念が確立されつつあり、*in vitro* 分化誘導研究に用いられる細胞や方法にも変化がみられるようになってきた。

巨核球や血小板の *in vitro* 産生研究においても、実験システムの樹立に関する研究成果、その実験システムを用いた種々の検討結果が報告されるようになってきた。血小板は幹細胞より巨核球分化を経て、分化系列の最終産物として産生される^{2) 3)}。造血幹細胞から巨核球・血小板への分化決定に重要なサイトカインや転写因子などの解明により、

血小板産生機構に関して多くのデータ蓄積が得られている。しかしながら、幹細胞から巨核球分化・血小板産生の pathway は未だ十分に解明されていない事が指摘されている⁴⁾。血小板産生機序の解明研究において、これまでに遺伝子改変マウスを用いた検討が多くの貢献をもたらしているが、最近ではこの解明研究のアプローチのひとつに、*in vitro* で幹細胞から巨核球分化・血小板へと分化誘導を行い、その過程を時系列に検討する方法も用いられている。

in vitro 分化誘導実験の利点の代表は、遺伝子改変血小板の検討を行う際、動物個体を用いる場合に比べ、短時間・安価で行える場合が多い事である。ヒト正常幹細胞に対する遺伝子改変や薬剤添加条件での検討が可能である事も大きな利点である。これら特性を活かして、*in vitro* 巨核球・血小板分化誘導実験を重ね、血小板産生機構の研究を行うことは、血小板減少や増加に対する病態解明のみならず、血小板輸血製剤のより有用性の高い調整法の開発につながる期待が大きい。

2010 年現在、巨核球・血小板の *in vitro* 分化誘導の starting material として論文報告されているのは、造血幹細胞、胚性幹 (ES) 細胞、皮下脂肪組織である^{5) - 9)}。造血幹細胞から *in vitro* での巨核球・血小板産生プロトコールは以前より確立されており、比較的容易に巨核球や血小板を得る

*慶應義塾大学医学部臨床検査医学〔〒160-8582 新宿区信濃町 35〕

Department of Laboratory Medicine, School of Medicine, Keio University
[35 Shinanomachi, Shinjuku-ku, Tokyo 160-8582, Japan]

Tel: 03-3353-1211 Fax: 03-3359-6963 e-mail: yumikoma@sc.itc.keio.ac.jp

ことができる。しかし造血幹細胞は *in vitro* における未分化性の維持の困難や乏しい増殖能、という本実験には不利な特性を有していることに加え、造血幹細胞としてのヒト CD34 陽性細胞の典型的な採取源である骨髓細胞を研究目的で日常的に得ることはドナーの負担があまりにも大きく現実的ではない。マウスに関しても約 6 匹分の骨髓細胞から分化誘導にて得られる巨核球様的大型細胞は約 2000 個と少ない。一方、ES 細胞は *in vitro* において優れた増殖能を有している。遺伝子改変も可能なことから、*in vitro* 巨核球・血小板産生実験の starting material としては有力である。しかし ES 細胞から *in vitro* 分化誘導により巨核球分化・血小板産生を行うためには高度な実験技術を習得する必要がある。また、多くの場合は OP9 細胞 (M-CSF 欠損の大理石病マウスの骨髓間質細胞株) との共培養を必要としている点も、実験手技が煩雑となっている一因である。最近、脂肪組織に含まれる細胞の中に幹細胞の能力を有する細胞が存在することが報告されている¹⁰⁾。脂肪組織、特に皮下脂肪組織は採取における身体負担が比較的少なく、しかも患者本人から大量に得ることが可能であるため再生医学分野において非常に注目されている。脂肪組織中には種々の細胞 (脂肪前駆細胞、脂肪細胞、血管、間葉系幹細胞など) が混在しており、それらのどの細胞が脂肪組織に存在すると考えられる多能性幹細胞か、あるいは限られた分化能を有しているのか、など様々に議論されており、一定の見解は得られていないが、実際に皮下脂肪組織の細胞から *in vitro* 分化誘導により脂肪細胞、心筋細胞、軟骨細胞、血管内皮、筋細胞、そして骨芽細胞が得られたことがこれまでに報告されている¹⁰⁾。皮下脂肪組織の細胞から血小板、あるいは他の血球細胞への *in vitro* 分化誘導例は報告されていなかったが、私たちは皮下脂肪組織から *in vitro* 分化誘導において血小板を得ることが出来た⁹⁾。この知見に対する機序の解明など、今後取り組む課題は多いが、本分化誘導システムは簡単に多くの血小板を得ることが可能である。

本稿では、造血幹細胞を多く含むヒト CD34 陽性細胞や low-density bone marrow mononuclear cells, ES 細胞、皮下脂肪組織からの *in vitro* 巨

核球・血小板分化誘導法について述べたい。

2. ヒト CD34 陽性細胞や low-density bone marrow mononuclear cells からの *in vitro* 分化誘導による巨核球分化・血小板産生

造血幹細胞は表面マーカーを用いての分離が可能である。ヒトの場合は CD34 陽性、マウスの場合は Sca-1(+)/c-Kit(+)/Lin(-) である。*in vitro* 巨核球・血小板の分化誘導には、これらマーカーを用いて分離された細胞や造血幹細胞を多く含む low-density bone marrow mononuclear cells が用いられる。CD34 陽性細胞の採取源は骨髓細胞、臍帯血、そして末梢血の報告例があるが、正常ヒト CD34 陽性細胞として巨核球分化・血小板産生の実験に用いるためには骨髓細胞由来の CD34 陽性細胞を用いられていることが多い。骨髓細胞の採取もドナーに多くの負担がかかるが、臍帯血は *in vitro* での血小板への分化能の問題、末梢血は採血量の多さの問題があり、相対的な比較で骨髓細胞が選ばれていると考えられる。以下に私たちの研究室で行っている正常ヒト CD34 陽性細胞あるいは low-density bone marrow mononuclear cells からの *in vitro* 分化誘導による血小板産生法について述べる。

正常ヒト骨髓 CD34 陽性細胞は Lonza 社より購入している。ヒト骨髓から low-density bone marrow mononuclear cells (BMMNCs) を得る場合は、Leucosep[®] (greiner bio-one 社) と Ficoll-Paque Plus[®] (GE bioscience 社) を用いて添付のプロトコールに従っている。通常 6-well plate を使用しており、得られた細胞は $1 \times 10^6/\text{ml}$ を starting density として分化誘導に用いる。この方法で骨髓約 10ml から 6-well plate 約 6 枚分の BMMNCs が得られる。マウスから BMMNCs を得る場合は、大腿骨と頸骨の内含物を 23G あるいは 25G の針と 3ml のシリンジを用いて buffer (PBS に 2% BSA, 0.38% trisodium citrate) 中に入れ BMMNC 分離用サンプルとする。別の Tube に Ficoll (1.080g/ml) を用意し、次に上記のサンプルを注意深く重層する。400g 30min (室温) にて遠心後、ほぼ中央に認められる白っぽい層を分離する。得られた細胞は $1 \times 10^6/\text{ml}$

図1 ヒト CD34 陽性細胞からの *in vitro* 分化誘導による巨核球・血小板産生

を starting density として分化誘導に用いる。マウスの種類や年齢などにもよるが、約 2~3 匹から 6-well plate 約 3 枚分の BMMNCs が得られる。これら CD34 陽性細胞や BMMNCs は Megakaryocyte Lineage Induction (MKLI) Media [Iscove's Modified Dulbecco's Medium に 2mM L-glutamine, 100U/ml penicillin G sodium, 0.1mg/ml streptomycin sulfate, 0.5% bovine serum albumin, 4 μ g/ml LDL cholesterol, 200 μ g/ml iron-saturated transferrin, 10 μ g/ml insulin, 50 μ M 2- β -mercaptoethanol, 20 μ M each nucleotide, 20 μ M dNTP, 50ng/ml thrombopoietin (TPO)] にて培養を行う^{9) 11) 12)}。細胞のロットにより差はあるが、培養 3~4 日で未成熟巨核球の存在、培養 8~10 日で成熟巨核球の存在が顕微鏡観察で認められる。血小板は培養 14~16 日で得られる。図 1 はヒト CD34 陽性細胞から *in vitro* 巨核球・血小板分化誘導を行った顕微鏡観察の写真である。培養 8 日では、巨核球様の大型細胞がはっきり観察できる。図の写真では明確に示すことが出来ないが、培養 12 日では、巨核球様の大型細胞の辺縁が崩れているもの（血小板産生が行われていると考えられる）が頻度多く観察される。これら *in vitro* 分化誘導で得られた巨核球や血小板は電子顕微鏡による微細構造の観察、免疫電顕による観察、ギムザ染色、フローサイトメトリー法による DNA ploidy の検討、血小板特異的表面マーカーの検討やリガンドとの反応性の検討により評価される。産生された巨核球・血小板の数はフローサイトメトリー法を用いて CD41 陽性細胞でサイズの大きいものを巨核球、サイズの小さいものを血小板と

してカウントしている。10⁶ 個の CD34 陽性細胞から約 10⁵ 個の巨核球、約 10⁴ 個の血小板が認められている。

3. マウス ES 細胞からの *in vitro* 分化誘導による巨核球分化・血小板産生

ヒトあるいはマウス ES 細胞からの *in vitro* 巨核球・血小板分化誘導法が論文報告されている^{5)・8)}。本稿では私たちの研究室で行っているマウス ES 細胞からの *in vitro* 巨核球・血小板分化誘導法を記載したい。マウス ES 細胞は購入先の添付記載に従って維持培養を行う。筆者の経験では、ES 細胞の維持培養でのトラブル遭遇はほとんど無いが、分化誘導の際に共培養を行う OP9 細胞の取り扱いには注意が必要と考えている。OP9 細胞の維持培養は文献^{5) 13)}に従って行う。OP9 細胞は 6-well plate に confluent としたものをを用いる。そこに ES 細胞 1 $\times$ 10⁴ cells/well を重ね入れ（培養 day 0 とする）、OP9 細胞の維持用培地で培養を行う。巨核球・血小板への *in vitro* 分化誘導中の顕微鏡観察写真を図 2 に示す。培養 5 日目で OP9 細胞の上に Mesodermal-like hemopoietic progenitor cells と考えられる細胞の集合体が頻度よく認められる。これら細胞 (OP9 細胞 + ES 細胞から分化した細胞) を全てトリプシン処理、2 - 4 $\times$ 10⁴ cells/well (6-well plate) として、新しく用意した OP9 細胞に重ね入れ、OP9 細胞維持用培地に TPO（終濃度 50ng/ml）を加えた培地で培養を行う。培養 8 日と 12 日において浮遊あるいは緩く粘着している細胞をピ

図2 マウス ES 細胞からの *in vitro* 分化誘導 (OP9 細胞共培養) による巨核球・血小板産生

図3 ヒト脂肪組織からの *in vitro* 分化誘導による巨核球・血小板産生

ペッチングで取り (トリプシン処理は行わない), 新しく用意した OP9 細胞に重ね入れ, OP9 細胞維持用培地に TPO (終濃度 50ng/ml) を加えた培地で培養を行う. 得られた巨核球・血小板の評価は上述の造血幹細胞から得る場合と同様である. 10^4 個の ES 細胞から約 10^5 個の巨核球 (巨核球大の CD41 陽性細胞数をフローサイトメトリー法にて評価), 約 10^8 個 (血小板大の CD41 陽性細胞数をフローサイトメトリー法にて評価) の血小板が認められる.

4. ヒト皮下脂肪組織からの *in vitro* 分化誘導による巨核球分化・血小板産生

ヒト皮下脂肪組織は Lonza 社より購入している. 約 1.5×10^5 個/well (6-well plate) を前駆脂肪細胞培地キット (Lonza 社) を用いて維持培養と脂肪細胞への分化誘導を行う (図3). 脂肪細胞への分化誘導 12 日目には細胞集団の約 80% が脂肪細胞に分化 (Oil Red O 染色陽性) している⁹⁾. これら全ての細胞をトリプシン処理, そして遠心した後, 前述の MKLI Media 中に約 1.5×10^5 個/well (6-well plate) として播き約 12 日間培

養を行う (図 3)。MKLI Media で培養 4 日目、少しずつではあるが細胞に変化が認められる (辺縁が崩れてくる)。培養 8 日～12 日目では巨核球様の細胞が顕微鏡観察で認められる。巨核球や血小板の評価は前述のように、電子顕微鏡による微細構造の観察、免疫電顕による観察、ギムザ染色、フローサイトメトリー法による DNA ploidy の検討、血小板特異的表面マーカーの検討やリガンドとの反応性の検討により行われる。これら検討結果も前述の造血幹細胞や ES 細胞から得た巨核球や血小板における検討結果と極めて類似している⁹⁾。10⁷ 個の脂肪組織から約 10⁶ 個の巨核球 (巨核球大の CD41 陽性細胞数をフローサイトメトリー法にて評価)、約 10⁵ 個 (血小板大の CD41 陽性細胞数をフローサイトメトリー法にて評価) の血小板が認められる。同様の培養スケールにおいて、脂肪組織より分化誘導にて得られる巨核球や血小板の数は骨髄細胞を用いた場合より多いが、図 3 に示すように巨核球以外の細胞も多く認められる。今後さらなる誘導法の開発が必要と考えている。

5. おわりに

以上、造血幹細胞を多く含むヒト CD34 陽性細胞や low-density bone marrow mononuclear cells, ES 細胞、皮下脂肪組織からの *in vitro* 分化誘導による巨核球分化・血小板産生について述べた。実験に用いる CD34 陽性細胞や low-density bone marrow mononuclear cells の入手は容易とは言えないが、これら細胞は巨核球や血小板産生の starting materials としての地位を確立しているため、研究内容によっては、これらを用いての検討結果の併記も必要と考えている。ES 細胞や脂肪組織を用いる *in vitro* 血小板産生の研究においては、starting materials としての大量確保が可能な点、ヒト細胞が日常研究で用いることが可能な点、そして分化系列の解明研究への発展が期待できる点など、これまで造血幹細胞を用いての研

究では行うことが難しかった検討も着手できる可能性がある。それぞれの特性を活かした検討を行い、成果を蓄積することにより、巨核球・血小板研究の幅広い領域、そして再生医学研究に対しても多くの貢献が期待できると考えている。

Disclosure of Conflict of Interests

The author indicated no potential conflict of interest.

文 献

- 1) Graf T, Enver T : Forcing cells to change lineages. *Nature* **462** : 587-594, 2009.
- 2) Kuter DJ : The physiology of platelet production. *Stem Cells* **14** : 88-101, 1994.
- 3) Chang Y, Bluteau D, Debili N, Vainchenker W : From hematopoietic stem cells to platelets. *J Thromb Haemost* **5** : 318-327, 2007.
- 4) Battinelli EM, Hartwig JH, Italiano JE : Delivering new insight into biology of megakaryopoiesis and thrombopoiesis. *Curr Opin Hematol* **14** : 419-426, 2007.
- 5) Eto K, Murphy R, Kerrigan SW, Berton A, Stuhlmann H, Nakano T, Leavitt AD, Shattil SJ : Megakaryocytes derived from embryonic stem cells implicate CalDAG-GEFI integrin signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* **99** : 12819-12824, 2002.
- 6) Fujimoto TT, Kohata S, Suzuki H, Miyazaki K, Fijimura K : Production of functional platelets by differentiated embryonic stem (ES) cells *in vitro*. *Blood* **102** : 4044-4051, 2003.
- 7) Gaur M, Kamata T, Wang S, Moran B, Shattil SJ, Leavitt AD : Megakaryocytes derived from human embryonic stem cells : a genetically tractable system to study megakaryocytopoiesis and integrin function. *J Thromb Haemost* **4** : 436-442, 2006.
- 8) Takayama N, Nishikii H, Usui J, Tsukui H, Sawaguchi A, Hiroshima T, Eto K, Nakauchi H : Generation of functional platelets from human embryonic stem cells *in vitro* via ES-sacs, VEGF-promoted structures that concentrate hematopoietic progenitors. *Blood* **111** : 5298-5306, 2008.
- 9) Matsubara Y, Saito E, Suzuki H, Watanabe N, Murata M, Ikeda Y : Generation of megakaryocytes and platelets from human subcutaneous adipose tissues. *Biochem Biophys Res Commun* **378** : 716-720, 2009.
- 10) Gomillion CT, Burg KJ : Stem cells and adipose tissue engineering. *Biomaterials* **27** : 6052-6063, 2006.
- 11) Zauli G, Bassini A, Vitale M, Gibellini D, Celeghini C, Caramelli E, Pierpaoli S, Guidotti L, Capitani S : Thrombopoietin enhances the alpha IIb beta 3-dependent adhesion of megakaryocytic cells to fibrinogen or fibronectin through PI 3 kinase. *Blood* **89** : 883-895, 1997.
- 12) Kerrigan SW, Gaur M, Murphy RP, Shattil SJ, Leavitt AD : Caspase-12 : a developmental link between G-protein-coupled receptors and integrin alphaIIb beta3 activation. *Blood* **104** : 1327-1334, 2004.
- 13) Nakano T, Kodama H, Honjo T : Generation of lymphohematopoietic cells from embryonic stem cells in culture. *Science* **265** : 1098-1101, 1994.