京都大学	博士（　医科学　）	氏　名	伊　東　幸　敬
論文題目	Turbulence Activates Platelet Biogenesis to Enable Clinical Scale *Ex Vivo* Production （乱流は血小板生成を活性化して臨床規模での生体外産生を可能にする）		

（論文内容の要旨）

血小板製剤は、血小板数減少によりおこる出血症状の治療・予防を目的として輸血され、その有効性が高く認められている。しかしながら、その供給のすべてを献血に依存しており、少子高齢化にともなって、将来的に供給が不足すると予測されている。近年、iPS 細胞を起点とした血小板産生法が報告され、献血に依存しない血小板輸血製剤の実現性が示された。しかしながら、治療・予防に有効な濃度まで血小板を補充するためには、1 回の輸血でおよそ 2000 億個もの血小板輸血が必要であり、それだけの数の血小板を生体外の培養によって産生させた実例はなかった。そこで、iPS 細胞由来血小板を臨床応用することを目的とし、一度の培養で大量に血小板を得るための培養法の構築を行った。iPS 細胞由来血小板を調製するにあたり、iPS 細胞より樹立した不死化巨核球前駆細胞株（imMKCL）を用いた。imMKCL の培養系は、増殖培養と分化培養の連続した 2 つの培養系により構成されるが、生体内における巨核球は、間葉系間質細胞および血管内皮細胞への接着依存的な成熟過程を示すことが知られているため、まず、接着非依存的な培養系の構築を行った。増殖培養は imMKCL の増殖特性に起因して、無フィーダー細胞環境下で増殖し、20L スケールまで拡大培養することによって、20 日間の培養で 10^{10} cells 以上への増殖が認められた。一方、分化培養は、フィーダー細胞がないと成熟が進まず、血小板産生量が著しく減弱した。そこで、フィーダー細胞の代替となる化合物をスクリーニングした結果、芳香族炭化水素受容体（AhR）阻害剤、及び、ROCK 阻害剤の併用により、フィーダー細胞非依存的に血小板が産生されることを見出した。しかしながら、薬剤添加条件においても、フラスコ振とう培養や増殖培養に用いた方法では、培養規模を上げるに従い血小板産生量が減少したことから、巨核球成熟に何らかの物理刺激も要求されることが推察された。そこで、二光子顕微鏡を用いてマウス頭蓋骨骨髄内の血小板産生巨核球をライブイメージング観察し、血流の流体解析を行ったところ、血小板が巨核球から放出される箇所において乱流が観察された。乱流を負荷可能な培養装置（VerMES）を用いて分化培養すると、培養規模拡大に伴う血小板産生量低下が改善したことから、乱流により生じる物理刺激が巨核球成熟を促すことが推察された。0.3L と 2.4L スケールの VerMES 培養槽を用い、様々な稼働条件で発生する「乱流エネルギー」「渦度」「剪断応力」「剪断歪み速度」などの流体シミュレーション計算から得た物理量と、実際の培養によって得られた血小板産生量との相対評価を行ったところ、2 つの培養スケール間において血小板産生量が至適となる稼働条件で、「乱流エネルギー」および「剪断応力」の値が完全に一致した。これらの値を 8L 培養系に応用し、分化培養を行ったところ、1000 億個以上の血小板が産生された。得られた血小板の生理機能を評価した結果、凝集能、血餅退縮能、モデル動物における循環能、止血能が確認され、臨床規模での血小板製造が可能であることを実証した。

（論文審査の結果の要旨）

高い献血依存度から供給不足が懸念される血小板製剤の代替が希求される背景をもとに、iPS 細胞から止血機能を有する血小板を臨床規模で生成する培養法を開発した。

先ず AhR 拮抗剤と ROCK 阻害剤の共添加によりフィーダー細胞に依存しない培養法を構築した。次にマウス骨髄内巨核球周辺の血流を流体解析し血小板生成に乱流が関与することを見出した。この知見を基に乱流制御可能な培養装置を用いて 1000 億個の血小板生成に成功し、本血小板が複数の血小板減少モデル動物において止血能を有することを確認し iPS 細胞由来血小板の有効性を明らかにした。

さらに、乱流負荷により分泌量が増加する可溶性タンパク質を同定し、MIF、IGFBP2 が巨核球からの細胞外基質の放出を増強すること、分泌 NRDC がペプチダーゼ活性に依存して血小板産生量を増大させること、細胞内 NRDC が tubulin、及び HDAC6 と会合し、HDAC6 阻害により血小板生成が抑制されることを示し、乱流刺激を受けた巨核球が細胞自律的な応答を通じて血小板生成を制御する新たなメカニズムを提唱した。

本研究は iPS 細胞由来血小板の臨床応用の実現性を示すとともに、生体内における血小板生成メカニズムの解明に貢献し、将来の医療に寄与するところが大きい。

したがって、本論文は博士（医科学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、令和 2 年 2 月 12 日実施の論文内容とそれに関連した研究分野並びに学識確認のための試問を受け、合格と認められたものである。

要旨公開可能日：　　年　　月　　日　以降