

## [特別講演4]

## iPS細胞を用いた血小板製剤の臨床応用の展望

杉本直志

京都大学iPS細胞研究所

iPS細胞からの血小板製造は、献血血小板製剤10単位(約 $2 \times 10^{11}$ 個)と同量かつ同等の品質の繰り返し製造が求められる。iPS細胞を大量に増幅して血小板まで連続的に一気に分化させる方法では、長期の培養工程を要して膨大なコストがかかり臨床応用に至っていないが、iPS細胞から巨核球に分化させる過程で3遺伝子を導入することにより樹立された不死化巨核球株(imMKCL)はこの課題を解決した。増殖亢進、抗細胞老化、抗細胞死をそれぞれ付与するc-MYC, BMI1, BCL-XLの3遺伝子は、ドキシサイクリン(DOX)誘導性遺伝子発現ベクターに組み込まれており、DOX添加培地では発現が誘導されてimMKCLは旺盛な増殖を示す(DOXオン)。ついでDOXを抜くと発現は消退し、imMKCLは成熟に転じ、血小板を放出するようになる(DOXオフ)。

imMKCL株をマスターセルバンクとして大量に冷凍ストックし、需要に応じて解凍し、GCTP(good gene, cellular, and tissue-based products manufacturing practice)基準にのっとり以降の拡大培養を経て血小板を製造する。imMKCLの培養にはTPO(トロンボポイエチン)受容体作動薬TA-316とSCF(stem cell factor)が添加され、成熟工程(DOXオフ)では、AhR(aryl hydrocarbon receptor)阻害剤とROCK(Rho kinase)阻害剤を培地に添加することにより無フィーダー条件でも可能となった。また血小板産生培養に適した37°Cでは活性化して血小板表面分子のGPIb $\alpha$ (CD42b)を切断するメタロプロテアーゼADAM17の阻害剤KP-457も添加する。

巨核球からの血小板放出には血流によって生じる剪断応力が重要との知見に基づき、さまざまな

タイプの血小板産生バイオリアクターが世界中で提案されたが血小板産生効率は依然として低かった。そこで生体内での血小板産生の流体物理解析を行ったところ、剪断応力に加え乱流が巨核球からの血小板放出には重要であることが示唆された。この知見に基づき、乱流が生じる縦型上下攪拌バイオリアクターを用いたところ、産生効率が劇的に改善し、品質も改善できることが見出された。さらにこの乱流条件を規定するパラメーターは剪断応力と乱流エネルギーであることが判明し、その結果、8lスケールのバイオリアクターを用いることにより $10^{11}$ 個レベルの品質も良好な血小板の産生が可能となった。

バイオリアクター内の血小板を含む大量の培養液は、中空糸膜や閉鎖回路型連続遠心機を使用して濃縮・分離、洗浄がなされ、ACD-A液・アルブミン添加重炭酸リンゲル液に容量を調整して再浮遊することによりパッケージングされる。なお巨核球が一定量残存し、iPS細胞の残存も否定できず、これらの細胞による造腫瘍性リスクを払拭するため、輸血後GVHDの予防目的で献血製剤に行われるのと同様の放射線照射が行われる。

血小板に発現するヒト組織適合性抗原クラスI(HLA-I)やヒト血小板抗原(HPA)に対する同種抗体は、輸血不応症(PTR)や血小板輸血後紫斑病(PTP)の原因となり、適合する製剤が必要となる。適合ドナーが乏しい場合、iPS血小板は、造血不全となっている患者自身からでも、皮膚やリンパ球から作製したiPS細胞を介して製造することが可能であり、替えの効かない治療手段となる。

しかし、一人一人から自己のiPS細胞を作製してimMKCLを調製するのは、やはり時間と手間

とコストがかかり、加えて個体差やiPS細胞の株間の違い、そして、製造工程によって血小板の産生効率と品質にロット差が生じる。このため、同種iPS血小板製剤の臨床応用が検討されている。あらかじめ、血小板を高効率に産生可能で、かつ輸血感染症の心配のないimMKCLを凍結保存しておけば、必要に応じていつでも速やかに安全性の高い血小板を均質に製造でき、安定した供給が低コストで可能となる。

同種製剤は、同種免疫反応に起因するPTRやPTPに対する方策が問われる。血小板の同種免疫にはHLAクラスI、HPAのほかにもABO抗原も程度は弱いながら関与し、O型のドナーが選択される。HLAクラスI型では、片アリの一致のみが必要なHLAホモ接合体型のiPS細胞が、iPS細胞研究所のストック・プロジェクトで多種蓄えられつつあり、計算上、最も頻度の高い100タイプ分のimMKCLマスターセルを作製すれば、日本人の約8割に供給が可能となる。

遺伝子改変によってHLAクラスIを欠失させた血小板が製造可能となれば、HLA型を問わない万人向けの製剤になり、1ラインの大量製造で済むため、大幅なコストダウンも期待される。拒絶されにくいO型HLA欠失血小板は、さらな

る改変血小板やドラッグデリバリーシステム (drug delivery system, DDS) の基材にも適していると考えられる。HPA型不適合に関しては、血小板機能に必須な分子群であることから欠失させえないが、遺伝子改変技術によって需要のあるHPA型に変換することが可能である。なお、ウイルス感染細胞や腫瘍細胞など一般にHLA class-Iの発現が低下した細胞は、NK細胞に攻撃されるが、血小板は攻撃されないことがインビトロ実験および動物モデルを用いた検証で明らかになった。

iPS血小板の臨床試験に向けては、ほかの医薬品と同様、有効性を確認するとともに、ウイルス試験や実験動物での投与試験、造腫瘍試験などさまざまな前臨床安全性試験が行われる。有効性については*in vitro*の血小板活性化試験で十分な活性化がみられ、*in vivo*では、マウスモデルに加え、慶応義塾大学輸血部の半田・渡邊らが開発した止血評価モデルによって検証した結果、とくに毒性や凝固異常をきたすことはなく、採血後2日目の献血血小板と同程度の止血機能があることが示された。

同種iPS血小板製剤は、治験を経て上市される展望を有しており、製剤としての品質ガイドライ

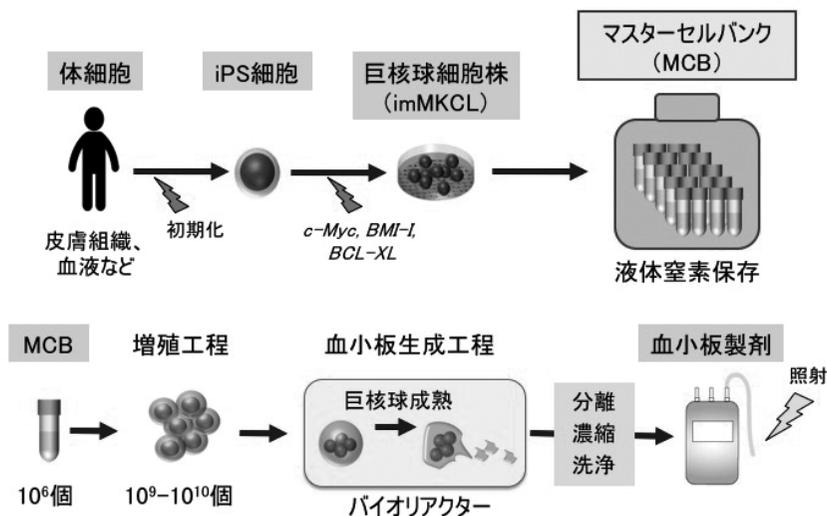


図1 iPS血小板の製造工程概要

ンの策定が望まれる。そこで、厚生労働局長通知「ヒト（同種）iPS（様）細胞加工医薬品等の品質および安全性の確保について」に加え、医薬品医療機器総合機構（PMDA）との面談を通じながら、血小板製剤の指針として「ヒト（同種）iPS細胞由来血小板の品質に関する留意点」と「細胞加工製品の製造工程由来不純物の安全性評価に関する基本的な考え方」の作成が進められている。

iPS血小板は、imMKCLをはじめとする増殖力の高い巨核球株の樹立とともに良質の血小板を大量に製造する方法の開発が進み、臨床応用が始ま

っている。さらにHLA欠失血小板の巨核球株からの大量製造技術が確立すれば、血小板の工業生産の実現も予想される。細胞を用いる再生医療の観点からは、iPS血小板は無核の細胞を用いることから、造腫瘍性という安全性における大きなリスクを最大限に低減することが可能である。そのため、最終製剤化するまでの一連の製造工程技術が確立できれば早期の普及が見込まれ、標準治療化の先例となって他のiPS細胞応用医療を牽引することが期待される。