(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2022年12月22日(22.12.2022)

WIPO | PCT

(10) 国際公開番号
WO 2022/265117 A1

(51) 国際特許分類:
C12N 5/078 (2010.01) *C12N 5/10* (2006.01)
A61K 35/19 (2015.01) *C12N 15/09* (2006.01)
A61P 7/04 (2006.01)

(21) 国際出願番号： PCT/JP2022/024432

(22) 国際出願日： 2022年6月17日(17.06.2022)

(25) 国際出願の言語： 日本語

(26) 国際公開の言語： 日本語

(30) 優先権データ：
特願 2021-102068 2021年6月18日(18.06.2021) JP

(71) 出願人:株式会社メガカリオン(**MEGAKARYON CORPORATION**) [JP/JP]; 〒6008813 京都府京都市下京区中堂寺南町１３４番地 Kyoto (JP).

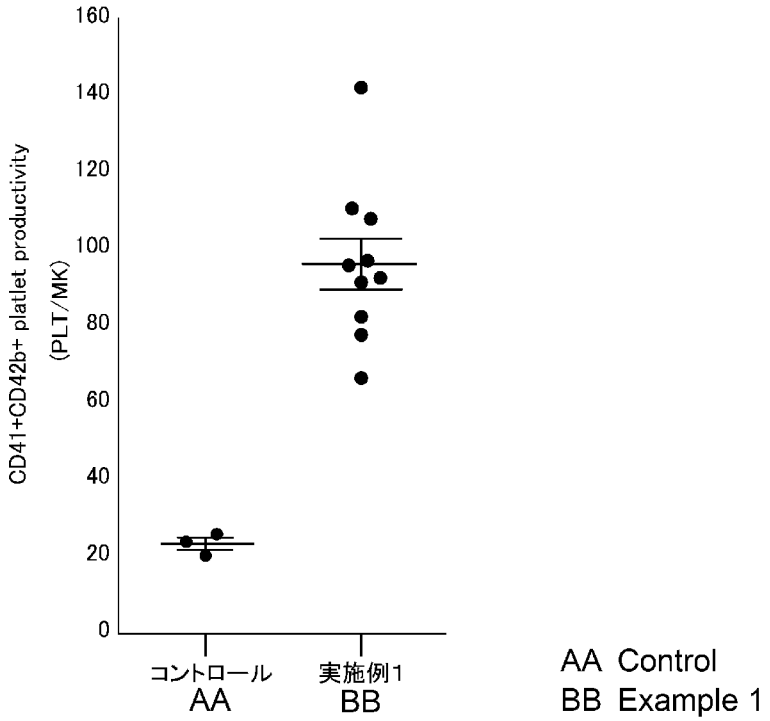
(72) 発明者:伊東 幸敬(**ITO Yukitaka**); 〒6008813 京都府京都市下京区中堂寺南町１３４ 京都リサーチパーク 株式会社メガカリオン内 Kyoto (JP).
三角 吉代(**MISUMI Sachiyo**); 〒6008813 京都府京都市下京区中堂寺南町１３４ 京都リサーチパーク 株式会社メガカリオン内 Kyoto (JP).

(74) 代理人:弁理士法人レクシード・テック(**IP LAW FIRM LEXCEED TECH**); 〒1006213 東京都千代田区丸の内１丁目１１番１号 パシフィックセンチュリープレイス丸の内１３Ｆ Tokyo (JP).

WO 2022/265117 A1

(54) **Title:** METHOD FOR PRODUCING MULTINUCLEATED MEGAKARYOCYTE WITH ENHANCED PLATELET PRODUCTION CAPABILITY, METHOD FOR PRODUCING PLATELETS, METHOD FOR PRODUCING PLATELET PREPARATION, AND METHOD FOR PRODUCING BLOOD PREPARATION

(54) 発明の名称： 血小板産生能が増強された多核化巨核球細胞の製造方法、血小板の製造方法、血小板製剤の製造方法、および血液製剤の製造方法



(57) **Abstract:** The present invention addresses the problem of providing a method that is capable of improving platelet production. This production method is for producing a multinucleated megakaryocyte with an enhanced platelet production capability, the method comprising a multinucleation step in which, in the presence of a growth factor of a megakaryocyte

［続葉有］

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告(条約第21条(3))

before multinucleation, a megakaryocyte before multinucleation is multinucleated to induce a multinucleated megakaryocyte. In the multinucleation step, the activity of at least one selected from the group consisting of an aromatic hydrocarbon receptor (AhR), Rho-binding kinase (ROCK), a bispecific tyrosine-phosphorylation regulated kinase (DYRK), and myosin 2 is suppressed, and in the presence of harmine, the megakaryocyte before multinucleation is multinucleated to induce a multinucleated megakaryocyte.

(57) 要約:血小板の産生量を向上可能な方法の提供を目的とする。本発明の製造方法は、血小板産生能が増強された多核化巨核球細胞の製造方法であって、多核化前の巨核球細胞の増殖因子の存在下、多核化前の巨核球細胞を多核化させ、多核化巨核球細胞を誘導する多核化工程を含み、前記多核化工程において、芳香族炭化水素受容体(ＡｈＲ)、Ｒｈｏ結合キナーゼ(ＲＯＣＫ)、二重特異性チロシンリン酸化調節キナーゼ(ＤＹＲＫ)、およびミオシン２からなる群から選択された少なくとも１つの活性を抑制し、かつハルミン(Harmine)の存在下、前記多核化前の巨核球細胞を多核化させ、多核化巨核球細胞を誘導する。

明　細　書

発明の名称 ：

血小板産生能が増強された多核化巨核球細胞の製造方法、血小板の製造方法、血小板製剤の製造方法、および血液製剤の製造方法

技術分野

[0001] 本発明は、血小板産生能が増強された多核化巨核球細胞の製造方法、血小板の製造方法、血小板製剤の製造方法、および血液製剤の製造方法に関する。

背景技術

[0002] 血小板製剤は、手術、傷害等の出血時、その他血小板の減少を伴う患者に対して投与される。血小板製剤は、献血で得られた血液から現在製造されている。しかしながら、人口構成の変化から、献血量が低減し、血小板製剤が不足することが懸念されている。

[0003] また、献血の提供者が細菌等の感染症に罹患している場合、血液が細菌汚染されている可能性があるため、細菌汚染された血小板製剤の投与による感染症のリスクがある。このため、in vitroで血小板を製造する方法が開発されている（非特許文献１）。

先行技術文献

非特許文献

[0004] 非特許文献1：Takayama N et.al, “Generation of functional platelets from human embryonic stem cells in vitro via ES-sacs, VEGF-promoted structures that concentrate hematopoietic progenitors.”, 2008, Blood, Vol. 111, No.11, pages 5298-5306

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0005] しかしながら、前記非特許文献１の方法で、ヒトに１回で通常投与する量

の血小板を製造する場合、巨大な製造タンクが必要となるとの問題がある。

[0006] 多核化前の巨核球細胞（以下、「多核化前巨核球」という）は、多核化後に血小板を産生する。具体的には、多核化前巨核球は、多核化することで細胞質を肥大化させる。そして、得られた多核化巨核球細胞（以下、「多核化巨核球」ともいう）は、肥大化した細胞質が断裂することにより血小板が生じる。そこで、本発明者らは、多核化前の巨核球細胞について、多核化およびそれに伴う肥大化の促進によって、血小板産生能を向上させようと試みた。しかしながら、多核化および肥大化が生じても、必ずしも、得られた多核化巨核球の血小板産生能が向上しないということを見出した。これは、巨核球細胞の多核化および肥大化の促進により、血小板産生の最大能力は向上するものの、巨核球細胞の分化または成熟が十分に進まず、その結果、血小板の放出能が向上しないことに起因すると推定された。

[0007] そこで、本発明は、血小板産生能が増強された多核化巨核球の製造方法の提供を目的とする。

課題を解決するための手段

[0008] 前記目的を達成するために、本発明の製造方法（以下、「多核化巨核球の製造方法」ともいう）は、血小板産生能が増強された多核化巨核球細胞の製造方法であって、

多核化前の巨核球細胞の増殖因子の存在下、多核化前の巨核球細胞またはその前駆細胞を多核化させ、多核化巨核球細胞を誘導する多核化工程を含み、

前記多核化工程において、芳香族炭化水素受容体（ＡｈＲ）、Ｒｈｏ結合キナーゼ（ＲＯＣＫ）、二重特異性チロシンリン酸化調節キナーゼ（ＤＹＲＫ）、およびミオシン２からなる群から選択された少なくとも１つの活性を抑制し、かつハルミン（Harmine）の存在下、前記多核化前の巨核球細胞を多核化させ、多核化巨核球細胞を誘導する。

[0009] 本発明の血小板の製造方法は、多核化前の巨核球細胞から多核化巨核球細胞を誘導する多核化工程と、

前記多核化巨核球細胞から血小板を産生する血小板産生工程とを含み、

前記多核化工程は、前記本発明の多核化巨核球細胞の製造方法により実施される。

[0010] 本発明の血小板製剤の製造方法は、血小板から血小板製剤を製造する製剤工程を含み、

前記血小板は、前記本発明の血小板の製造方法で得られたことを特徴とする。

[0011] 本発明の血液製剤の製造方法は、血小板と他の成分とを混合することにより、血液製剤を製造する血液製剤工程を含み、

前記血小板は、前記本発明の血小板の製造方法で得られたことを特徴とする。

[0012] 本発明の細胞集団は、多核化巨核球を含む細胞集団であって、

前記多核化巨核球は、核相が１６Ｎ以上の多核化巨核球を含み、

前記細胞集団において、前記１６Ｎ以上の多核化巨核球の割合（細胞数）は、２０％以上である。

[0013] 本発明の細胞集団は、多核化巨核球を含む細胞集団であって、

前記多核化巨核球は、核相が３２Ｎ以上の多核化巨核球を含み、

前記細胞集団において、前記３２ｎ以上の多核化巨核球の割合（細胞数）は、５～５０％である。

発明の効果

[0014] 本発明によれば、血小板産生能が増強された多核化巨核球を製造できる。

図面の簡単な説明

[0015] [図1]図１は、実施例１における多核化の程度を示すグラフである。

[図2]図２は、実施例１における巨核球あたりの血小板産生量を示すグラフである。

[図3A]図３Ａは、参考例１Ａにおける多核化の程度および細胞の大きさを示すグラフである。

[図3B]図３Ｂは、参考例１Ｂにおける多核化の程度および細胞の大きさを示すグラフである。

[図3C]図３Ｃは、実施例１における多核化の程度および細胞の大きさを示すグラフである。

[図4]図４は、実施例１におけるＦ１分画の細胞の位相差像を示す写真である。

[図5]図５は、実施例１における巨核球あたりの血小板産生量を示すグラフである。

[図6]図６は、実施例２における巨核球あたりの血小板産生量を示すグラフである。

[図7]図７は、実施例３における多核化巨核球の核相を示すグラフである。

発明を実施するための形態

[0016] ＜多核化巨核球の製造方法＞

本発明の多核化巨核球の製造方法は、前述のように、血小板産生能が増強された多核化巨核球細胞の製造方法であって、多核化前の巨核球細胞の増殖因子の存在下、多核化前の巨核球細胞またはその前駆細胞を多核化させ、多核化巨核球細胞を誘導する多核化工程を含み、前記多核化工程において、芳香族炭化水素受容体（ＡｈＲ）、Ｒｈｏ結合キナーゼ（ＲＯＣＫ）、二重特異性チロシンリン酸化調節キナーゼ（ＤＹＲＫ）、およびミオシン２からなる群から選択された少なくとも１つの活性を抑制し、かつハルミン（Harmine）の存在下、前記多核化前の巨核球細胞を多核化させ、多核化巨核球細胞を誘導する。本発明によれば、ＡｈＲ、ＲＯＣＫ、ＤＹＲＫ、およびミオシン２からなる群から選択された少なくとも１つの活性を抑制し、かつハルミン（Harmine）の存在下、前記多核化前の巨核球細胞を多核化させることにより、得られた多核化巨核球の血小板の産生能を増強できる。

[0017] 本発明の血小板産生能が増強された多核化巨核球細胞の製造方法は、例えば、分化が進行したまたは成熟度の増進された多核化巨核球細胞の製造方法ということもできる。また、本発明の多核化巨核球細胞の製造方法によれば、巨核球の多核化を促進できるため、巨核球細胞の多核化促進方法または巨核球細胞の核相の増強方法ということもできる。

[0018] 本発明において、前記「増強」は、対照群と比較して、所望のパラメータが有意に増加していることを意味する。このため、前記増強は、例えば、増加、向上、または強化ということもできる。

[0019] 本発明の多核化巨核球の製造方法は、血小板の産生能を増強可能であり、その結果、例えば、血小板の産生量を増強可能であることから、例えば、血小板産生または血小板産生量の増強方法、血小板産生または血小板産生量の向上方法、血小板産生または血小板産生量の改善方法等ということもできる。本発明の多核化巨核球の製造方法は、例えば、in vitroにおいて実施する方法である。

[0020] 本発明において、「巨核球細胞（巨核球）」は、生体内においては骨髄中に存在する最大の細胞であり、血小板を放出しうる細胞、血小板を放出する細胞および同等の機能を有する細胞を意味する。前記同等の機能を有する細胞は、血小板産生能を有する細胞を意味する。本発明において、巨核球は、多核化（多倍体化）前の巨核球、すなわち、未成熟な巨核球または増殖期の巨核球でもよいし、多核化後の巨核球（多核化巨核球）でもよい。具体例として、前記巨核球は、例えば、前巨核芽球、巨核芽球、前巨核球、および成熟巨核球のいずれでもよい。前記多核化後の巨核球が有する染色体のセット数（核相：Ｎ）は、２セットを超えればよく、具体例として４～６４セット（４Ｎ～６４Ｎ）、４～３２セット（４Ｎ～３２Ｎ）、８～６４セット（８～６４Ｎ）、１６～３２セット（１６～３２Ｎ）、または１６～６４セット（１６～６４Ｎ）である。

[0021] 前記巨核球の由来は、特に制限されないが、例えば、ヒトおよび非ヒト動物があげられる。前記非ヒト動物は、例えば、サル、ゴリラ、チンパンジー、マーモセット等の霊長類、マウス、ラット、イヌ、ネコ、ウサギ、ヒツジ、ウマ、モルモット等があげられる。

[0022] 本発明において、前記巨核球は、細胞表面マーカーにより特定できる。前記巨核球がヒト由来の場合、前記細胞表面マーカーは、CD41a、CD42aおよびCD42bがあげられる。すなわち、前記巨核球は、CD41a、CD42aおよびCD42bが陽

性の細胞である。前記巨核球がヒト由来の場合、前記細胞表面マーカーは、例えば、CD9、CD61、CD62p、CD42c、CD42d、CD49f、CD51、CD110、CD123、CD131、およびCD203cからなる群から選択された少なくとも１つであってもよい。

[0023] 前記多核化前の巨核球および前記多核化巨核球は、例えば、染色体のセット数により特定できる。具体例として、対象の巨核球細胞において、染色体のセット数（Ｎ）が８Ｎ未満、前記対象の巨核球細胞は、多核化前の巨核球であると評価できる。他方、対象の巨核球細胞において、染色体のセット数（Ｎ）が８Ｎ以上、好ましくは、１６Ｎ以上の前記対象の巨核球細胞は、多核化巨核球であると評価できる。前記染色体のセット数（核相）は、後述の実施例１（３）に準じて評価できる。

[0024] 前記対象の巨核球細胞が複数の場合、すなわち、前記対象の巨核球細胞の集団（細胞集団）である場合、前記対象の巨核球細胞の集団において、染色体のセット数（Ｎ）が８Ｎ以上の細胞の割合が１０％未満の場合、前記対象の巨核球細胞の集団は、多核化前の巨核球の集団であると評価できる。また、前記対象の巨核球細胞の集団において、染色体のセット数（Ｎ）が８Ｎ以上の細胞の割合が２０％以上、２１％以上、２２％以上、２３％以上、２４％以上、２５％以上、２６％以上、２７％以上、２８％以上、２９％以上、３０％以上、３５％以上、４０％以上、４５％以上、または５０％以上の場合、前記対象の巨核球細胞の集団は、多核化巨核球を含む集団であると評価できる。前記対象の巨核球細胞の集団は、例えば、1×10^{5}～1×10^{6}個の細胞である。

[0025] 本発明において、「血小板の産生能」は、例えば、血小板産生に供する巨核球細胞の数を基準とした際の血小板の数として評価できる。前記巨核球細胞は、例えば、多核化前の巨核球、多核化巨核球、成熟巨核球等があげられる。前記「血小板の産生能」は、例えば、略同じ、分化、成熟または培養段階の巨核球細胞を用い、略同数の巨核球細胞を培養することにより、比較検討できる。具体例として、前記「血小板の産生能」は、例えば、前記血小板

の産生開始時の多核化巨核球の数（Ｍ）に対する前記血小板産生工程後における血小板の数（Ｐ）の比（Ｐ／Ｍ比）として表すことができる。この場合、前記多核化巨核球の血小板産生能の向上は、例えば、ＡｈＲ、ＲＯＣＫ、ＤＹＲＫ、およびミオシン２の活性を抑制せず、かつハルミンの非存在下、前記多核化前の巨核球細胞を多核化させた多核化巨核球のＰ／Ｍ比として、有意にＰ／Ｍ比が高いことを意味する。後述のように、不死化巨核球を用いて血小板の産生を開始する場合、前記血小板の産生開始時の多核化巨核球の数（Ｍ）は、遺伝子の強制発現を解除した際の不死化巨核球の数（Ｍ）と読み替えて、前記Ｐ／Ｍ比の説明を援用できる。

[0026] 本発明において、「血小板」は、血液中の細胞成分の一つであり、CD41aおよびCD42bが陽性である細胞成分を意味する。前記血小板は、例えば、細胞核を有さず、また、前記巨核球と比較して、大きさが小さい。このため、前記血小板と前記巨核球とは、例えば、細胞核の有無および／または大きさにより区別できる。前記血小板は、血栓形成と止血において重要な役割を果たすとともに、損傷後の組織再生や炎症の病態生理にも関与することが知られている。また、前記血小板は、出血等により血小板が活性化されると、その膜上にIntegrin αIIBβ3（glycoprotein IIb/IIIa; CD41aとCD61の複合体）等の細胞接着因子の受容体が発現することが知られている。また、前記血小板が活性化されると、血小板同士が凝集し、血小板から放出される各種の血液凝固因子によってフィブリンが凝固することにより、血栓が形成され、止血が進む。本発明において、前記血小板の由来は、前記巨核球の由来と同じである。

[0027] 本発明において、前記血小板の生理活性は、公知の方法により評価することができる。前記血小板の生理活性は、例えば、活性化した血小板膜上のIntegrin αIIBβ3に特異的に結合するPAC-1に対する抗体を用いて、活性化した血小板量を評価することができる。また、前記血小板の生理活性は、例えば、血小板の活性化マーカーであるCD62p（P-selectin）を抗体で検出し、活性化した血小板量を評価してもよい。前記血小板の生理活性は、例えば、フロ

ーサイトメトリーを用い、活性化非依存性の血小板マーカーCD61またはCD41に対する抗体でゲーティングを行い、その後、抗PAC-1抗体や抗CD62p抗体の結合を検出することにより実施してもよい。これらの血小板の生理活性の評価は、アデノシン二リン酸（ADP）存在下で実施してもよい。

[0028] 本発明において、前記血小板の生理活性の評価は、例えば、ADP存在下でフィブリノーゲンと結合するか否かを見て評価してもよい。前記血小板がフィブリノーゲンと結合することにより、血栓形成の初期に必要なインテグリンの活性化が生じる。さらに、前記血小板の生理活性は、例えば、国際公開第２０１１／０３４０７３号の図６に示されるように、in vivoでの血栓形成能を可視化して観察する方法で実施してもよい。

[0029] 本発明において、「機能性が高い（生理活性が高い）」は、例えば、従来の方法で得られた血小板と比較して、前述のいずれかの方法で測定した血小板の生理活性が有意に高い、高い傾向がある、または生体から単離された血小板と生理活性が同等であることを意味する。また、前記「機能性が高い」は、例えば、前述のいずれかの方法で測定した血小板の生理活性が、生体から単離された血小板の生理活性と比較して、５０％以上、６０％以上、７０％以上、８０％以上、または９０％以上であることを意味してもよい。

[0030] 前記血小板は、例えば、前記血小板のCD42bの発現率が低い場合、またはアネキシンV陽性率が低い場合、劣化している、または異常である（以下、あわせて「劣化」ともいう）と評価できる、すなわち、前記血小板の生理活性は低いと評価できる。このため、産生された血小板における劣化している血小板の割合が低いほど、例えば、前記産生された血小板は、生理活性が高いと評価できる。また、劣化している血小板は、例えば、血栓形成機能（血液凝固機能）および止血機能を十分に有さず、臨床的な有用性が低い。

[0031] 本発明において、前記「血小板の劣化」は、例えば、前記血小板表面のCD42b（GPIbα）が減少することをいう。すなわち、劣化している血小板は、例えば、CD42bの発現が低下した血小板およびシェディング反応によってCD42bの細胞外領域が切断された血小板を含む。前記血小板表面のCD42bがなくなる

と、前記血小板は、例えば、フォン・ウィルブランド因子（von Willebrand factor：VWF）との会合ができなくなり、結果的に、前記血小板の血液凝固機能が失われる。前記血小板の劣化は、例えば、前記血小板分画中のCD42b陽性率（またはCD42b陽性粒子数）に対するCD42b陰性率（またはCD42b陰性粒子数）を指標として評価することができる。具体例として、CD42b陽性率に対するCD42b陰性率が高いほど、または、CD42b陽性粒子数に対するCD42b陰性粒子数が多いほど、前記血小板は、劣化していると評価できる。前記CD42b陽性率は、前記血小板分画に含まれる血小板のうち、抗CD42b抗体が結合できる血小板の割合を意味する。また、前記CD42b陰性率は、血小板分画に含まれる血小板のうち、抗CD42b抗体が結合しない血小板の割合を意味する。

[0032] 本発明において「異常な血小板」は、例えば、陰性電荷リン脂質であるホスファチジルセリンが脂質二重層の内側から外側に露出した血小板をいう。生体内においては、ホスファチジルセリンは血小板の活性化に伴って表面に露出し、そこに多くの血液凝固因子が結合することによって、血液凝固カスケード反応が増幅されることが知られている。一方、前記異常な血小板では、例えば、常に多くのホスファチジルセリンが表面に露出しているため、前記異常な血小板が患者に投与されると、例えば、過剰な血液凝固反応を引き起こし、播種性血管内凝固症候群等の重篤な病態が惹起される可能性がある。ホスファチジルセリンにはアネキシンＶが結合することが知られているため、前記血小板表面上のホスファチジルセリンは、例えば、蛍光標識したアネキシンＶの結合量を指標とし、フローサイトメーターを用いて検出できる。このため、前記異常な血小板の量は、例えば、前記血小板分画中のアネキシンＶ陽性率、すなわち、アネキシンＶが結合する血小板の割合または数で評価することができる。具体例として、アネキシンＶ陽性率が高いほど、またはアネキシンＶ粒子数が多いほど、対象の血小板には、異常な血小板が多いと評価できる。

[0033] 本発明において、前記多核化前の巨核球は、例えば、巨核球より未分化な細胞（「多核化前の巨核球の前駆細胞」ともいう）から誘導することができ

る。このため、本発明の多核化巨核球の製造方法は、例えば、前記多核化工程に先立ち、巨核球より未分化な細胞から多核化前の巨核球を誘導する巨核球誘導工程を含んでもよい。前記巨核球誘導工程において使用する培地、培養条件等は、例えば、後述の多核化工程の説明を援用できる。

[0034] 前記「巨核球より未分化な細胞」は、前記巨核球への分化能を有する細胞を意味する。具体例として、前記巨核球より未分化な細胞は、例えば、造血幹細胞、造血前駆細胞、ＣＤ３４陽性細胞、巨核球・赤芽球前駆細胞（megakaryocyte-erythroid progenitor：MEP）、巨核球前駆細胞等があげられる。前記巨核球より未分化な細胞は、例えば、骨髄、臍帯血、末梢血等から単離してもよいし、ＥＳ細胞（胚性幹細胞、embryonic stem cells）、人工多能性幹細胞（induced pluripotent stem cells、iPS細胞）、核移植ＥＳ細胞（ntES細胞）、生殖性幹細胞、体性幹細胞、胚性腫瘍細胞等の多能性細胞または多能性幹細胞から誘導してもよい。

[0035] 前記巨核球の誘導方法は、特に制限されず、公知の誘導方法により実施できる。具体例として、前記巨核球の誘導方法は、例えば、国際公開第２０１１／０３４０７３号、国際公開２０１２／１５７５８６号等に記載された方法があげられる。具体例として、前記巨核球誘導工程では、例えば、前記巨核球より未分化な細胞に、癌遺伝子およびポリコーム遺伝子を強制発現させてもよい。これにより、前記巨核球誘導工程では、例えば、多核化前の巨核球に相当する無限に増殖する不死化巨核球を得ることができる。さらに、例えば、前記不死化巨核球の前記強制発現を解除することにより、前記不死化巨核球は多核化巨核球に誘導され、血小板を産生させることができる。このため、前記不死化巨核球は、多核化前の巨核球に相当する。また、前記巨核球誘導工程では、例えば、前記巨核球前駆細胞にアポトーシス抑制遺伝子を強制発現させてもよい。これにより、前記巨核球誘導工程では、前記不死化巨核球を得ることができる。さらに、後述の血小板産生工程において、例えば、前記不死化巨核球の前記強制発現を解除することにより、前記不死化巨核球が成熟し、前記血小板が産生される。

[0036] 前記巨核球誘導工程では、例えば、前記癌遺伝子、前記ポリコーム遺伝子、および前記アポトーシス抑制遺伝子を強制発現させてもよい。この場合、前記癌遺伝子、前記ポリコーム遺伝子、および前記アポトーシス抑制遺伝子の強制発現は、同時に行なってもよいし、別個に行なってもよい。具体例として、前記巨核球誘導工程では、前記癌遺伝子および前記ポリコーム遺伝子を強制発現後、前記強制発現を解除し、つぎに、前記アポトーシス抑制遺伝子を強制発現させてもよいし、前記癌遺伝子、前記ポリコーム遺伝子、および前記アポトーシス抑制遺伝子を強制発現させてもよいし、前記癌遺伝子および前記ポリコーム遺伝子を強制発現させ、さらに、前記アポトーシス抑制遺伝子を発現させてもよい。これにより、前記巨核球誘導工程では、前記不死化巨核球を得ることができる。さらに、後述の血小板産生工程において、例えば、前記不死化巨核球の前記強制発現を解除することにより、前記不死化巨核球が成熟し、前記血小板が産生される。

[0037] 前記巨核球誘導工程は、例えば、各遺伝子の導入効率を向上できることから、前記巨核球より未分化な細胞に、癌遺伝子およびポリコーム遺伝子を強制発現させる第１の発現工程と、前記未分化な細胞において、Ｂｃｌ－ｘＬ遺伝子等のアポトーシス抑制遺伝子を強制発現させる第２の発現工程と、前記強制発現を全て解除する解除工程とを含むことが好ましい。前述のように、前記強制発現を解除することにより、例えば、前記不死化巨核球から多核化巨核球が誘導され、前記血小板が産生される。このため、前記解除工程は、後述の血小板産生工程ということもできる。

[0038] 各遺伝子の強制発現および強制発現の解除は、例えば、国際公開第２０１１／０３４０７３号、国際公開第２０１２／１５７５８６号、国際公開第２０１４／１２３２４２号または下記参考文献１に記載された方法等の公知の方法、またはそれに準ずる方法で実施できる。具体例として、各遺伝子の強制発現および強制発現の解除は、例えば、薬剤応答性の遺伝子発現誘導システムを用いて実施できる。前記遺伝子発現誘導システムは、例えば、Ｔｅｔ－ｏｎ（登録商標）システム、Ｔｅｔ－ｏｆｆ（登録商標）システム等があ

げられる。前記Ｔｅｔ－ｏｎシステムを用いる場合、例えば、前記強制発現する工程では、テトラサイクリン、ドキシサイクリン等の遺伝子発現を誘導する薬剤の存在下、培養を実施し、前記強制発現を解除する工程では、前記薬剤の非存在下で、前記培養を実施する。

参考文献１：Nakamura S et al, “Expandable megakaryocyte cell lines enable clinically applicable generation of platelets from human induced pluripotent stem cells.”, Cell Stem Cell, 2014, vol.14, No.4, pages 535-548

[0039] 本発明において、「癌遺伝子」は、生体内で細胞の癌化を誘導可能な遺伝子を意味し、例えば、ｃ－ＭＹＣ、Ｎ－ＭＹＣ、Ｌ－ＭＹＣ等のＭＹＣファミリー遺伝子、ＳＲＣファミリー遺伝子、ＲＡＳファミリー遺伝子、ＲＡＦファミリー遺伝子、ｃ－ｋｉｔ（ＣＤ１１７）、ＰＤＧＦＲ（血小板成長因子受容体）、Ａｂｌ（Abelson murine leukemia viral oncogene homolog）等のプロテインキナーゼファミリー遺伝子等があげられる。

[0040] 本発明において、「ポリコーム遺伝子」は、ＣＤＫＮ２ａ（サイクリン依存性キナーゼ阻害２Ａ、ＩＮＫ４ａ／ＡＲＦ）を負に制御し、細胞老化を回避するために機能すると知られている遺伝子を意味する（下記参考文献２～４）。具体例として、前記ポリコーム遺伝子は、例えば、BMI1 (Polycomb complex protein BMI-1、polycomb group RING finger protein 4 (PCGF4)、RING finger protein 51 (RNF51))、Mel18 (Polycomb group RING finger protein 2)、Ring (Ring Finger Protein) 1a/b、Phc (Polyhomeotic Homolog) 1/2/3、Cbx (Chromobox) 2/4/6/7/8、Ezh2 (Enhancer Of Zeste 2 Polycomb Repressive Complex 2 Subunit)、Eed (Embryonic Ectoderm Development)、Suz12 (SUZ12 Polycomb Repressive Complex 2 Subunit)、HADC (Histone deacetylases)、Dnmt (DNA (cytosine-5)-methyltransferase) 1/3a/3b等があげられる。

参考文献２：小黒秀行ら、「ポリコーム群蛋白複合体による幹細胞の老化制御」、再生医療、２００７年、第６巻、第４号、２６－３２頁

参考文献３：Jesus Gil et.al, “Regulation of the INK4b-ARF-INK4a tumour suppressor locus: all for one or one for all”, Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2007, vol.7, pages 667-677
参考文献４：Soo-Hyun Kim et.al., “Absence of $p16^{INK4a}$ and truncation of ARF tumor suppressors in chickens”, PNAS, 2003, vol.100, No.1, pages 211-216

[0041] 本発明において、「アポトーシス抑制遺伝子」は、細胞のアポトーシスを抑制可能な機能を有する遺伝子を意味し、例えば、BCL2（B-cell lymphoma 2）、Bcl-xL（B-cell lymphoma-extra large）、Survivin（Baculoviral IAP Repeat Containing 5）、MCL1（BCL2 Family Apoptosis Regulator）等があげられる。

[0042] 本発明の多核化巨核球の製造方法では、前記多核化前の巨核球細胞の増殖因子の存在下、前記多核化前の巨核球細胞を増殖させる増殖工程を含んでもよい。この場合、前記増殖工程では、ＡｈＲ、ＲＯＣＫ、ＤＹＲＫおよびミオシン２の活性を抑制せず、かつハルミン（Harmine）の非存在下、前記多核化前の巨核球細胞を増殖させる。これにより、前記増殖工程では、前記多核化前の巨核球細胞について、多核化前の状態を維持したまま、増殖させることができる。具体的には、前記増殖工程では、前記多核化前の巨核球細胞の増殖因子の存在下、多核化前巨核球を培養し、前記多核化前巨核球を増殖させる。前記多核化前の巨核球細胞の増殖因子は、培養液中に存在してもよいし、前記多核化前巨核球内に存在してもよい。また、前記増殖工程では、前記培養液に、ＡｈＲ、ＲＯＣＫ、ＤＹＲＫおよびミオシン２の活性を阻害する物質およびハルミンを添加しないことにより、ＡｈＲ、ＲＯＣＫ、ＤＹＲＫおよびミオシン２の活性を抑制せず、ハルミン非存在下で、増殖を実施できる。前記増殖工程において使用する培地、培養条件等は、例えば、後述の多核化工程の説明を援用できる。

[0043] 前記多核化前の巨核球細胞の増殖因子としては、例えば、幹細胞因子（ＳＣＦ）、トロンボポエチン（ＴＰＯ）等があげられる。

[0044] 前記多核化前の巨核球細胞の増殖因子の濃度は、特に制限されず、例えば、前記増殖因子の種類および有効濃度に応じて、適宜設定できる。前記増殖因子がＳＣＦまたはＴＰＯの場合、前記増殖因子の濃度は、例えば、０．１～１０００ｎｇ／ｍｌ、または１～２００ｎｇ／ｍｌである。

[0045] 前記増殖工程の培養期間は、例えば、所望の細胞数の多核化前巨核球が得られるまでの期間とできる。具体的には、前記増殖工程の培養期間は、例えば、１日以上であり、具体例として、１～２０日、１～１５日、１～１０日、１～５日、２～５日、または２～４日である。

[0046] 前記多核化前巨核球として、前記不死化巨核球を用いる場合、前記不死化巨核球は、前記癌遺伝子および前記ポリコーム遺伝子、または前記癌遺伝子、前記ポリコーム遺伝子、および前記アポトーシス抑制遺伝子が発現していると、前記不死化巨核球が多核化前の状態を維持しながら、増殖する。このため、前記不死化巨核球を用いる場合、前記第１の発現工程および／または前記第２の発現工程を、増殖工程ということができる。また、前記癌遺伝子、前記ポリコーム遺伝子、および／または前記アポトーシス抑制遺伝子がコードするタンパク質、すなわち、前記癌遺伝子、前記ポリコーム遺伝子、および／または前記アポトーシス抑制遺伝子から発現するタンパク質は、前記多核化前の巨核球細胞の増殖因子ということもできる。前記多核化前巨核球として、前記不死化巨核球を用いる場合、前記増殖工程は、前記不死化巨核球に関する巨核球誘導工程の説明を援用できる。

[0047] つぎに、本発明の多核化巨核球の製造方法では、前記多核化工程において、前記多核化前の巨核球細胞の増殖因子の存在下、前記多核化前の巨核球細胞から多核化巨核球を誘導する。また、前記多核化工程では、ＡｈＲ、ＲＯＣＫ、ＤＹＲＫおよびミオシン２からなる群から選択された少なくとも１つの活性を抑制し、かつハルミンの存在下、前記多核化前の巨核球細胞を多核化させ、多核化巨核球細胞を誘導する。具体的には、前記多核化工程では、前記多核化前の巨核球細胞の増殖因子と、ＡｈＲの活性抑制物質、ＲＯＣＫの活性抑制物質、ＤＹＲＫの活性抑制物質、およびミオシン２の活性抑制物

質からなる群から選択された少なくとも１つと、ハルミンとの存在下、前記多核化前巨核球を培養し、前記多核化巨核球を誘導する。前記多核化前の巨核球細胞の増殖因子は、培養液中に存在してもよいし、前記多核化前巨核球内に存在してもよい。前記ＡｈＲの活性抑制物質、前記ＲＯＣＫの活性抑制物質、前記ＤＹＲＫの活性抑制物質、前記ミオシン２の活性抑制物質、および／または、ハルミンは、例えば、前記多核化前巨核球の培地に含有される。前記多核化工程では、巨核球の肥大化が誘導されることから、例えば、肥大化工程ということもできる。前記多核化前の巨核球細胞の増殖因子、前記ＡｈＲの活性抑制物質、前記ＲＯＣＫの活性抑制物質、前記ＤＹＲＫの活性抑制物質、および／または前記ミオシン２の活性抑制物質がタンパク質または核酸分子である場合、前記多核化工程では、リポフェクション、エレクトロポレーション等により、前記多核化前巨核球に導入してもよい。

[0048] 前記多核化工程において、ＡｈＲ、ＲＯＣＫ、ＤＹＲＫおよびミオシン２のうち、いずれか１つの活性を抑制してもよいし、２つ以上の活性を抑制してもよい。後者の場合、活性を抑制する対象の組合せは、任意の組合せとでき、多核化の促進能または血小板の産生向上能が高いことから、好ましくは、ＡｈＲおよびミオシン２の組合せ、ＡｈＲ、ＲＯＣＫ、およびミオシン２の組合せ、ＡｈＲ、ＤＹＲＫおよびミオシン２の組合せ、またはＡｈＲ、ＲＯＣＫ、ＤＹＲＫおよびミオシン２の組合せである。このため、前記多核化工程は、好ましくは、ＡｈＲおよびミオシン２の活性を抑制し、ハルミンの存在下実施するか、ＡｈＲ、ＲＯＣＫ、およびミオシン２の活性を抑制し、ハルミンの存在下実施するか、ＡｈＲ、ＤＹＲＫおよびミオシン２の活性を抑制し、ハルミンの存在下実施するか、ＡｈＲ、ＲＯＣＫ、ＤＹＲＫおよびミオシン２の活性を抑制し、ハルミンの存在下実施する。

[0049] 前記ＡｈＲは、芳香族炭化水素受容体（Aryl Hydrocarbon Receptor）を意味する。前記ＡｈＲは、通常、細胞質に存在し、活性化にともない核内に移行し、転写活性を発揮する。

[0050] 前記多核化工程において、ＡｈＲの活性抑制は、前記ＡｈＲの活性抑制物

質非存在下と比較して、ＡｈＲの活性が低下していることを意味する。前記ＡｈＲの活性は、例えば、ＡｈＲの核内移行を指標に測定できる。前記ＡｈＲの活性は、例えば、市販のＡｈＲタンパク質の活性測定キットを利用でき、具体例として、核内受容体アッセイキット（PURACYP社製）等があげられる。本発明において、前記活性の抑制は、例えば、活性の阻害、活性の低下、活性化の抑制、活性化の防止等ということもできる。

[0051] 前記ＡｈＲは、Per/ARNT/SIM (PAS)ファミリーに属する転写因子である。ＡｈＲは、例えば、リガンドが結合していない状態では不活性であり、芳香族炭化水素化合物がリガンドとして結合すると、核内に移行する。そして、前記核内移行後、前記ＡｈＲは、例えば、ARNT（Ahr Nuclear Translocator）とヘテロ二量体を形成し、異物応答配列（Xenobiotic Responsive Element（XRE)、DREともいう）と結合し、転写を活性化する。

[0052] 前記ＡｈＲ阻害剤は、特に制限されず、例えば、ＡｈＲアンタゴニスト、ＡｈＲの発現を抑制可能な発現抑制核酸分子等があげられる。前記ＡｈＲアンタゴニストは、特に制限されず、例えば、4-(2-(2-(Benzo[b]thiophen-3-yl)-9-isopropyl-9H-purin-6-ylamino)ethyl)phenol（SR1)、α-ナフトフラボン（CAS 604-59-1)、1,4-ジヒドロシアントラキノン、1,5-ジヒドロシアントラキノン、1,8-ジヒドロシアントラキノン、galangin（CAS 548-83-4)、レスベラトロール、2-methyl-2H-pyrazole-3-carboxylic acid (2-methyl-4-o-tolylazo-phenyl)-amide（CH-223191)、N-(2-(3H-Indol-3-yl)ethyl)-9-isopropyl-2-(5-methyl-3-pyridyl)-7H-purin-6-amine（GNF351)、2-(29- amino-39-methoxyphenyl)-oxanaphthalen-4-one（PD98059)、(Z)-3-[(2,4-dimethylpyrrol-5-yl)methylidenyl]-2-indolinone（TSU-16)、6, 2', 4'-trimethoxyflavone（TMF)、3', 4'-dimethoxyflavone（DMF)等があげられる。また、前記ＡｈＲアンタゴニストは、例えば、国際公開第2012/015914号にＡｈＲアンタゴニストとして記載された化合物であってもよい。前記ＡｈＲの発現抑制核酸分子は、例えば、前記ＡｈＲをコードするｍＲＮＡを標的とするｓｉＲＮＡ、ｍｉＲＮＡ等の発現抑制核酸分子等があげられる。前記ＡｈＲに対す

る発現抑制核酸分子は、例えば、データベースに登録されているＡｈＲのｍＲＮＡの塩基配列に基づき、適宜設定できる。具体例として、ヒトＡｈＲのｍＲＮＡは、例えば、Genbankにおいて、アクセッション番号：NM_001621で登録された塩基配列からなるポリヌクレオチドがあげられる。前記ＡｈＲの活性抑制物質は、１種類を単独で使用してもよいし、２種類以上を併用してもよい。

[0053] 前記多核化工程において、前記ＡｈＲ阻害剤の濃度は、特に制限されず、化合物の種類およびその有効濃度に応じて、適宜決定できる。前記ＡｈＲ阻害剤の濃度は、例えば以下の濃度があげられる。

SR1：200nmmol/L以上1000mmol/L未満

CH-223191：0.2μmol/l以上4μmol/l未満

GNF351：20nmol/l以上300nmol/l未満、20nmol/l以上1000nmol/l未満

TMF：2.5μmol/l以上40μmol/l未満

DMF：2.5μmol/l以上40μmol/l未満

[0054] 前記ROCKは、Rho結合キナーゼ（Rho-associated coiled-coil forming kinase（ROCK））を意味する。

[0055] 前記多核化工程において、ROCKの活性抑制は、例えば、前記ROCKの活性抑制物質非存在下と比較して、ROCKの活性が低下していることを意味する。前記ROCKの活性は、例えば、ROCKによる基質のリン酸化を指標に測定できる。前記ROCKの活性は、例えば、市販のROCKタンパク質の活性測定キットを利用でき、具体例として、ROCK活性測定キット（96-Well ROCK Activity Assay Kit、Cell Bioloabs社製）等があげられる。本発明において、前記活性の抑制は、例えば、活性の阻害、活性の低下、活性化の抑制、活性化の防止等ということもできる。

[0056] 前記ROCK阻害剤は、例えば、ROCKアンタゴニスト、ROCKの発現を抑制可能な発現抑制核酸分子等があげられる。前記ROCK阻害剤は、例えば、(R)-(＋)-trans-N-(4-pyridyl)-4-(1-aminoethyl)-cyclohexanecarboxamide（Y-27632）、4-[(1R)-1-aminoethyl]-N-(1H-pyrrolo[2,3-b]pyridin-4-yl)benzamide（

Y-39983)、ファスジル塩（Fasudil(HA1077)塩酸塩）、4-fluoro-5-[[(2S)-hexahydro-2-methyl-1H-1,4-diazepin-1-yl]sulfonyl]-isoquinoline（Ripasudil）、2-(3-(4-((1H-indazol-5-yl)amino)quinazolin-2-yl)phenoxy)-N-isopropylacetamide（SLx-2119)、N-[(3-Hydroxyphenyl)methyl]-N'-[4-(4-pyridinyl)-2-thiazolyl]urea dihydrochloride（RKI-1447)、6-Chloro-N4-[3,5-difluoro-4-[(3-methyl-1H-pyrrolo[2,3-b]pyridin-4-yl)oxy]phenyl]-2,4-pyrimidinediamine（TC-S 7001, Azaindole 1)、N-[2-[2-(Dimethylamino)ethoxy]-4-(1H-pyrazol-4-yl)phenyl-2,3-dihydro-1,4-benzodioxin-2-carboxamide（SR-3677)、Staurosporine、(S)-(+)-2-Methyl-1-[(4-methyl-5-isoquinolinyl)sulfonyl]homopiperazine（H-1152)、rac-(2R)-2-(dimethylamino)-N-(1-oxo- 1,2-dihydroisoquinolin-6-yl)-2-(thiophen-3-yl)acetamide（AR-12286)、N-(1-{[4-(methylsulfanyl)phenyl]methyl}piperidin-3-yl)-1H-indazol-5-amine（INS-117548)等があげられる。前記ROCKの発現抑制核酸分子は、例えば、前記ROCKをコードするｍＲＮＡを標的とするｓｉＲＮＡ、ｍｉＲＮＡ等の発現抑制核酸分子等があげられる。前記ROCKに対する発現抑制核酸分子は、例えば、データベースに登録されているROCKのｍＲＮＡの塩基配列に基づき、適宜設定できる。具体例として、ヒトROCK1のｍＲＮＡは、例えば、Genbankにおいて、アクセッション番号：NM_005406で登録された塩基配列からなるポリヌクレオチドがあげられる。また、ヒトROCK2のｍＲＮＡは、例えば、Genbankにおいて、アクセッション番号：NM_004850で登録された塩基配列からなるポリヌクレオチドがあげられる。前記ROCKの活性抑制物質は、１種類を単独で使用してもよいし、２種類以上を併用してもよい。

[0057] 前記多核化工程において、前記ROCK阻害剤の濃度は、特に制限されず、化合物の種類およびその有効濃度に応じて、適宜決定できる。前記ROCKの活性抑制物質がY-39983の場合、前記ROCKの活性抑制物質の濃度は、例えば、１×１０$^{-8}$～１×１０$^{-3}$ｍｏｌ／ｌであり、好ましくは、１×１０$^{-7}$～１×１０$^{-5}$ｍｏｌ／ｌである。

[0058] 前記ＤＹＲＫは、二重特異性チロシンリン酸化調節キナーゼ（Dual Specif

icity Tyrosine Phosphorylation Regulated Kinase）を意味する。

[0059] 前記ＤＹＲＫ活性の抑制において、対象とするDYRKは、例えば、DYRK1A、DYRK1B、DYRK2等があげられ、好ましくは、DYRK1Aである。一例として、以下に、DYRK1A活性を阻害する場合を例にあげて説明する。

[0060] 前記多核化工程において、前記DYRK1A活性の抑制は、前記DYRK1Aの活性抑制物質非存在下と比較して、DYRK1Aの活性が低下していることを意味する。前記DYRK1Aの活性は、例えば、DYRK1Aタンパク質と、基質とを用いた測定系、基質のリン酸化を指標に測定できる。前者としては、例えば、市販のDYRK1Aタンパク質の活性測定キットを利用でき、具体例として、DYRK1A Kinase Enzyme System（Promega社製、Cat. No. VA7423、VA7424）等があげられる。後者としては、例えば、下記参考文献５を参照できる。本発明において、前記活性の抑制は、例えば、活性の阻害、活性の低下、活性化の抑制、活性化の防止等ということもできる。

参考文献５：Isao Kii et.al., “Selective inhibition of the kinase DYRK1A by targeting its folding process”, Nat. Commun., 2016, vol. 7, article number 11391

[0061] 前記DYRK1Aの活性抑制物質は、特に制限されず、例えば、前記DYRK1Aの活性または発現を抑制する化合物、タンパク質、核酸分子等があげられる。前記DYRK1A活性抑制化合物は、例えば、公知のDYRK1A活性抑制化合物（DYRK1A阻害剤）が使用できる。具体例として、前記DYRK1A活性抑制化合物（DYRK1Aアンタゴニスト）は、例えば、Harmine（ハルミン、7-Methoxy-1-methyl-9H-pyrido[3,4-b]indole、Cas No. 442-51-3）、INDY ((1Z)-1-(3-Ethyl-5-hydroxy-2(3H)-benzothiazolylidene)-2-propanone、Pubchem No.：69538603）、GSK626616 ((5Z)-2-[(2,6-Dichlorophenyl)amino]-5-(6-quinoxalinylmethylene)-4(5H)-thiazolone、Cas No. 1025821-33-3）、TBB (casein kinase 2 inhibitor 1、4,5,6,7-tetrabromobenzotriazole、Cas No. 17374-26-4）、AZ191 (N-[2-Methoxy-4-(4-methyl-1-piperazinyl)phenyl]-4-(1-methyl-1H-pyrrolo[2,3-c]pyridin-3-yl)-2-pyrimidinamine 、Cas No. 1594092-37-1）、

Mrik-IN-1(TC-S 7004、N-[2-Chloro-5-[[[(3-chlorophenyl)methyl]amino]carbonyl]phenyl]-7,8-dihydro-2-methoxy-7-oxopyrido[2,3-d]pyrimidine-6-carboxamide、Cas No. 1386979-55-0)、EHT5372 (methyl 9-((2,4-dichlorophenyl)amino)thiazolo[5,4-f]quinazoline-2-carbimidate、Cas No. 1425945-60-3) 、GNF4877 ((R)-1-(3-(3-Amino-6-(2-fluoro-5-isopropoxyphenyl)pyrazine-2-carboxamido)pyridin-4-yl)piperidine-3-carboxylic acid、Cas No. 2041073-22-5) 、FINDY ((5Z)-5-[[4-Methoxy-3-[2-(trimethylsilyl)ethynyl]phenyl]methylene]-2-thioxo-4-thiazolidinone 、Cas No. 1507367-37-4) 、ML351 (5-(Methylamino)-2-(1-naphthalenyl)-4-oxazolecarbonitrile 、Cas No. 847163-28-4) 、CLK-IN-T3 (N-(6-(3,5-di-tert-butylphenyl)imidazo[1,2-a]pyridin-2-yl)-4-(2-methyl-1-(4-methylpiperazin-1-yl)-1-oxopropan-2-yl)benzamide、Cas No. 2109805-56-1) 、casein kinase 2 inhibitor IX.IQA (5-Oxo-5,6-dihydroindolo[1,2-a]quinazoline-7-acetic acid 、Cas No. 391670-48-7) 、protein kinase inhibitor 1 ((E)-5-((2-Oxo-6'-(piperazin-1-yl)-1,2-dihydro-[3,3'-bipyridin]-5-yl)methylene)thiazolidine-2,4-dione hydrochloride、Cas No. 1365986-44-2) 、Leucettine L41 ((5Z)-5-(1,3-benzodioxol-5-ylmethylene)-3,5-dihydro-2-(phenylamino)-4H-imidazol-4-one、Cas No. 1112978-84-3) 等があげられる。前記DYRK1A活性抑制化合物は、例えば、Harmineを除いてもよい。前述のように、前記多核化工程は、ハルミンの存在下で実施する。このため、前記DYRK1A活性抑制化合物は、前記ハルミンに加えて、前記ハルミン以外の化合物を用いることが好ましく、具体例として、AZ191があげられる。前記DYRK1Aの活性抑制タンパク質は、例えば、DYRK1Aのドミナントネガティブフォーム（DN）のタンパク質があげられる。具体例として、ヒトDYRK1AのDNタンパク質は、例えば、１８８番目のリシン（Ｋ）を、アルギニン（Ｒ）に置換した変異体タンパク質があげられる。前記DYRK1Aの発現抑制核酸分子は、例えば、前記DYRK1AをコードするｍＲＮＡを標的とするｓｉＲＮＡ、ｍｉＲＮＡ等の発現抑制核酸分子等があげられる。前記DYRK1Aに対する発現抑制核酸分子は、例えば、デー

タベースに登録されているDYRK1AのｍＲＮＡの塩基配列に基づき、適宜設定できる。具体例として、ヒトDYRK1AのｍＲＮＡは、例えば、Genbankにおいて、アクセッション番号：NM_001396、NM_101395、NM_130436、NM_130437、NM_130438、NM_001347721、NM_001347722またはNM_001347723で登録された塩基配列からなるポリヌクレオチドがあげられる。前記DYRK1Aの活性抑制物質は、１種類を単独で使用してもよいし、２種類以上を併用してもよい。

[0062] 前記DYRK1Aの活性抑制物質の濃度は、特に制限されず、例えば、前記DYRK1Aの活性抑制物質の種類および有効濃度に応じて、適宜設定できる。前記DYRK1Aの活性抑制物質がharmineの場合、前記DYRK1Aの活性抑制物質の濃度は、例えば、１×１０$^{-8}$～１×１０$^{-3}$ｍｏｌ／ｌであり、好ましくは、１×１０$^{-6}$～１×１０$^{-4}$ｍｏｌ／ｌである。前記DYRK1Aの活性抑制物質がAZ191の場合、前記DYRK1Aの活性抑制物質の濃度は、例えば、１×１０$^{-9}$～１×１０$^{-3}$ｍｏｌ／ｌであり、好ましくは、１×１０$^{-7}$～１×１０$^{-5}$ｍｏｌ／ｌである。

[0063] 前記ミオシン２は、ＡＴＰａｓｅ活性を有するアクチン上を運動するタンパク質であり、２つの重鎖と、各重鎖に対してそれぞれ付属する２つの軽鎖（合計４つ）から構成される複合体を意味する。

[0064] 前記多核化工程において、ミオシン２の活性抑制は、前記ミオシン２の活性抑制物質非存在下と比較して、ミオシン２のＡＴＰａｓｅ活性が低下していることを意味する。前記ミオシン２の活性は、例えば、ミオシン２から放出されるリン酸を指標に測定できる。前記ミオシン２の活性は、例えば、市販のミオシン２タンパク質の活性測定キットを利用できる。本発明において、前記活性の抑制は、例えば、活性の阻害、活性の低下、活性化の抑制、活性化の防止等ということもできる。

[0065] 前記ミオシン２阻害剤は、例えば、ミオシン２アンタゴニスト、ミオシン２の発現を抑制可能な発現抑制核酸分子、ミオシン軽鎖キナーゼ（MLCK）阻害剤等があげられる。前記ミオシン２阻害剤は、例えば、3a-Hydroxy-6-methyl-1-phenyl-2,3-dihydropyrrolo[2,3-b]quinolin-4-one (Blebbistatin)、CK1122534、Omecamtiv mecarbil (methyl 4-[[2-fluoro-3-[(6-methylpyridi

n-3-yl)carbamoylamino]phenyl]methyl]piperazine-1-carboxylate）、Ammosamides A&B、CTK2018448、Manassantin B ((1R,2R)-1-(1,3-benzodioxol-5-yl)-2-[4-[(2S,3R,4R,5S)-5-[4-[(1R,2R)-1-(3,4-dimethoxyphenyl)-1-hydroxypropan-2-yl]oxy-3-methoxyphenyl]-3,4-dimethyloxolan-2-yl]-2-methoxyphenoxy]propan-1-ol）等があげられる。前記MLCK阻害剤は、例えば、ML7（Hexahydro-1-[(5-iodo-1-naphthalenyl)sulfonyl]-1H-1,4-diazepine）、ML9（1-(5-chloronaphthalene-1-sulfonyl)-1H-hexahydro-1,4-diazepine）等があげられる。前記ミオシン２の発現抑制核酸分子は、例えば、前記ミオシン２またはミオシン軽鎖キナーゼをコードするｍＲＮＡを標的とするｓｉＲＮＡ、ｍｉＲＮＡ等の発現抑制核酸分子等があげられる。前記ミオシン２に対する発現抑制核酸分子は、例えば、データベースに登録されているミオシン２を構成する重鎖もしくは軽鎖、またはミオシン軽鎖キナーゼのｍＲＮＡの塩基配列に基づき、適宜設定できる。具体例として、ヒトミオシン２を構成する重鎖のｍＲＮＡは、例えば、Genbankにおいて、アクセッション番号：NM_005963、NM_001100112、NM_017534、NM_002470、NM_017533、NM_002147、NM_002471、NM_000257、NM_002472、NM_002473、NM_001256012、NM_002474、NM_001382347、NM_003802、NM_001145809、またはNM_014981で登録された塩基配列からなるポリヌクレオチドがあげられる。ヒトミオシン２を構成する軽鎖のｍＲＮＡは、例えば、Genbankにおいて、アクセッション番号：NM_079420、NM_000432、NM_000258、NM_002476、NM_001363650、NM_021019、NM_021223、NM_006097、NM_138403、またはNM_001324458で登録された塩基配列からなるポリヌクレオチドがあげられる。ヒトミオシン軽鎖キナーゼのｍＲＮＡは、例えば、Genbankにおいて、アクセッション番号：NM_001321309、NM_053025、NM_053026、NM_053027、NM_053028、NM_053031、NM_053032、NM_033118、NM_053032、またはNM_18249で登録された塩基配列からなるポリヌクレオチドがあげられる。前記ミオシン２の活性抑制物質は、１種類を単独で使用してもよいし、２種類以上を併用してもよい。

[0066] 前記多核化工程において、前記ミオシン２阻害剤の濃度は、特に制限され

ず、化合物の種類およびその有効濃度に応じて、適宜決定できる。前記ミオシン２の活性抑制物質がBlebbistatinの場合、前記ミオシン２の活性抑制物質の濃度は、例えば、１×１０$^{-8}$～１×１０$^{-3}$ｍｏｌ／ｌであり、好ましくは、１×１０$^{-6}$～１×１０$^{-4}$ｍｏｌ／ｌである。

[0067] 前記多核化工程において、前記ハルミンの濃度は、例えば、１×１０$^{-8}$～１×１０$^{-3}$ｍｏｌ／ｌであり、好ましくは、１×１０$^{-6}$～１×１０$^{-4}$ｍｏｌ／ｌである。

[0068] 前記多核化工程において、ＡｈＲ、ＲＯＣＫ、ＤＹＲＫおよび／またはミオシン２の活性抑制と、ハルミンとの共存とは、同時に実施してもよいし、異なる時期に実施してもよいが、同時に実施することが好ましい。すなわち、前記多核化前巨核球から前記多核化巨核球への誘導は、ＡｈＲ、ＲＯＣＫ、ＤＹＲＫおよびミオシン２からなる群から選択された少なくとも１つの活性を抑制し、かつハルミンとの共存を行なった状態で実施することが好ましい。

[0069] 前記多核化前の巨核球が不死化巨核の場合、前記多核化工程は、例えば、以下のように実施できる。具体的に、前記癌遺伝子、前記ポリコーム遺伝子、および／または前記アポトーシス抑制遺伝子から発現するタンパク質は、前述のように、前記不死化巨核球における多核化前の巨核球細胞の増殖因子として機能する。そこで、前記不死化巨核球を用いる場合、前記不死化巨核球は、例えば、前記癌遺伝子、前記ポリコーム遺伝子、および／または前記アポトーシス抑制遺伝子の強制発現を維持し、ＡｈＲ、ＲＯＣＫ、ＤＹＲＫおよびミオシン２からなる群から選択された少なくとも１つの活性を抑制し、かつハルミンの存在下、培養することにより、多核化巨核球を誘導する。この場合、前記多核化工程では、前記不死化巨核球の培養中に、前記不死化巨核球を含む培地を、例えば、前記ＡｈＲ阻害剤、前記ＲＯＣＫ阻害剤、前記ＤＹＲＫ阻害剤、および前記ミオシン２阻害剤からなる群から選択された少なくとも１つと、ハルミンとを含む培地に交換する、または前記不死化巨核球を含む培地に前記ＡｈＲ阻害剤、前記ＲＯＣＫ阻害剤、前記ＤＹＲＫ阻

害剤、および前記ミオシン２阻害剤からなる群から選択された少なくとも１つと、ハルミンとを添加することで実施できる。前記添加または交換は、例えば、１回実施してもよいし、２回以上実施してもよい。

[0070] 前記多核化工程における培地は、例えば、特に制限されず、例えば、前記巨核球または巨核球から血小板を産生するのに好適な公知の培地およびそれに準ずる培地があげられる。具体例として、前記培地は、例えば、動物細胞の培養に用いる培地を基礎培地として調製することができる。前記基礎培地は、例えば、IMDM培地、Medium 199培地、Eagle’s Minimum Essential Medium（EMEM）培地、αMEM培地、Dulbecco’s modified Eagle’s Medium（DMEM）、Ham’s F12培地、RPMI1640培地、Fischer’s培地、Neurobasal（登録商標） Medium（Thermo Fisher Scientific社製）等の単独培地またはこれらの混合培地があげられる。前記培地は、例えば、血清または血漿を含んでもよいし、これらを含まない無血清培地でもよいが、無血清培地が好ましい。前記多核化工程の培地として無血清培地を用いることにより、本発明の多核化巨核球の製造方法は、例えば、前記多核化前の巨核球から多核化巨核球の多核化の程度を向上できる。前記無血清培地は、例えば、StemSpan ACF（StemCell Technologies社製、Cat.No.:9855)、Stemline 2（Sigma Aldrich社製、Cat.No.:S0192)等があげられる。前記血清および血漿の由来は、前記巨核球の由来と同じ由来であることが好ましい。具体例として、前記巨核球がヒト由来である場合、前記血清および血漿は、それぞれ、ヒト由来であることが好ましい。前記巨核球および血清の由来を同じとすることにより、本発明の製造方法は、例えば、前記多核化工程において、前記巨核球の多核化をより促進できる。

[0071] 前記培地は、例えば、他の成分を含んでもよい。前記他の成分は、特に制限されず、例えば、アルブミン、インスリン、トランスフェリン、セレン、脂肪酸、微量元素、2-メルカプトエタノール、チオールグリセロール、モノチオグリセロール（ＭＴＧ）、脂質、アミノ酸（例えば、Ｌ－グルタミン）、アスコルビン酸、ヘパリン、非必須アミノ酸、ビタミン、増殖因子、低分

子化合物、抗生物質、抗酸化剤、ピルビン酸、緩衝剤、無機塩類、サイトカイン等があげられる。前記他の成分は、例えば、１種類でもよいし、２種類以上でもよい。前記サイトカインは、例えば、血球系細胞の分化を促進する物質であり、具体例として、血管内皮細胞増殖因子（ＶＥＧＦ）、トロンボポエチン（ＴＰＯ）、各種ＴＰＯ様作用物質、Stem Cell Factor（SCF）、ITS（インスリン－トランスフェリン－セレナイト）サプリメント、ADAM阻害剤、FLT阻害剤、WNT阻害剤等があげられる。前記培地は、例えば、血清、インスリン、トランスフェリン、セリン、チオールグリセロール、アスコルビン酸、ＴＰＯを含むIMDM培地が好ましい。前記培地は、例えば、さらにSCFを含んでいてもよく、さらにヘパリンを含んでいてもよい。前記他の成分の濃度は、特に制限されない。前記TPOの濃度は、例えば、約10ng/ml～約200ng/ml、約50ng/ml～約100ng/mlである。前記SCFの濃度は、例えば、約10ng/ml～約200ng/ml、約50ng/mlである。前記ヘパリンの濃度は、例えば、約10U/ml～約100U/ml、約25U/mlである。前記培地は、例えば、さらに、ホルボールエステル（例えば、ホルボール-12-ミリスタート-13-アセタート；PMA）を含んでもよい。

[0072] 前記多核化工程において、前記開始時の多核化前の巨核球の細胞密度は、特に制限されない。前記細胞密度の下限は、例えば、１×１０^{5}細胞／ｍｌ、２×１０^{5}細胞／ｍｌ、３×１０^{5}細胞／ｍｌ、４×１０^{5}細胞／ｍｌである。前記細胞密度の上限は、特に制限されず、例えば、４×１０^{5}細胞／ｍｌ、６×１０^{5}細胞／ｍｌ、８×１０^{5}細胞／ｍｌである。前記細胞密度の範囲は、例えば、１×１０^{5}細胞／ｍｌ～８×１０^{5}細胞／ｍｌ、１×１０^{5}細胞／ｍｌ～８×１０^{5}細胞／ｍｌ、１×１０^{5}細胞／ｍｌ～５×１０^{5}細胞／ｍｌ、２×１０^{5}細胞／ｍｌ～８×１０^{5}細胞／ｍｌ、３×１０^{5}細胞／ｍｌ～６×１０^{5}細胞／ｍｌ、４×１０^{5}細胞／ｍｌ～６×１０^{5}細胞／ｍｌであり、多核化を促進できる、または血小板の産生を向上できることから、好ましくは、１×１０^{5}細胞／ｍｌ～８×１０^{5}細胞／ｍｌ、または１×１０^{5}細胞／ｍｌ～５×１０^{5}細胞／ｍｌである。前記細胞密度は、例えば、前記多核化前の巨核球の

細胞数を、前記多核化前の巨核球を懸濁する培地の体積で除する（割る）ことにより算出できる。

[0073] 前記多核化工程における培養条件は、特に制限されず、前記巨核球の通常の培養条件を採用できる。具体例として、培養温度は、例えば、約３５～約４２℃、約３６～約４０℃、約３７～約３９℃である。CO_2濃度は、例えば、約５～約１５％である。O_2濃度は、例えば、約１５～約２５％、約２０％である。

[0074] 前記多核化工程の培養期間は、例えば、前記多核化前の巨核球が多核化するまでの期間として設定できる。前記多核化工程の培養期間は、培養中の巨核球に占める多核化巨核球の割合に応じ、適宜設定してもよい。前記多核化工程の培養期間は、例えば、培養中の巨核球に占める８Ｎ以上の多核化巨核球の割合が、１５％以上、１６％以上、１７％以上、１８％以上、１９％以上、２０％以上、２１％以上、２２％以上、２３％以上、２４％以上、２５％以上、２６％以上、２７％以上、２８％以上、２９％以上、３０％以上、３５％以上、４０％以上、４５％以上、５０％以上、５５％以上、または６０％以上となる期間に設定することが好ましい。具体例として、前記多核化工程の培養期間は、例えば、０～２０日、１～１５日である。前記巨核球に占める多核化巨核球の割合は、例えば、培養中の巨核球の一部を抜き取り、後述の実施例１（３）に準じて、算出できる。

[0075] 前記多核化工程において、前記多核化前の巨核球の培養は、例えば、フィーダ細胞上で実施してもよいし、フィーダ細胞なしで実施してもよい。前記多核化前の巨核球は、例えば、浮遊培養できるため、前記フィーダ細胞なしで培養できる。前記フィーダ細胞は、増殖または分化させようとする目的の細胞（目的細胞）の培養に必要な環境を整えるために、前記目的細胞と共培養される細胞を意味する。前記フィーダ細胞は、前記目的細胞と識別可能な細胞であればよく、前記目的細胞と同種由来の細胞でもよいし、異種由来の細胞でもよい。前記フィーダ細胞は、例えば、抗生物質、抗癌剤、γ線照射等により増殖しないように処理された細胞であってもよい。

[0076] 前記多核化工程後において、本発明の製造方法は、多核化巨核球を含む。前記多核化工程後の多核化巨核球は、例えば、多核化巨核球のみから構成されてもよいし、他の細胞を含んでもよい。後者の場合、前記多核化工程後の多核化巨核球は、例えば、多核化巨核球を含む細胞集団ということもできる。前記多核化巨核球は、例えば、８Ｎ以上の多核化巨核球でもよいし、１６Ｎ以上多核化巨核球でもよいし、３２Ｎ以上の多核化巨核球でもよい。前記多核化工程後の多核化巨核球は、例えば、前記８Ｎ以上の多核化巨核球、前記１６Ｎ以上多核化巨核球、および／または前記３２Ｎ以上の多核化巨核球を含む。本発明の製造方法によれば、例えば、前記１６Ｎ以上多核化巨核球および前記３２Ｎ以上の多核化巨核球の割合を増強できる。

[0077] 前記多核化巨核球が、核相が８Ｎ以上の多核化巨核球を含む場合、前記細胞集団において、前記８Ｎ以上の多核化巨核球の割合（細胞数）の下限値は、例えば、１５％以上、１６％以上、１７％以上、１８％以上、１９％以上、２０％以上、２１％以上、２２％以上、２３％以上、２４％以上、２５％以上、２６％以上、２７％以上、２８％以上、２９％以上、３０％以上、３５％以上、４０％以上、４５％以上、５０％以上、５５％以上、または６０％以上である。前記細胞集団において、前記８Ｎ以上の多核化巨核球の割合（細胞数）の上限値は、例えば、９０％以下、８５％以下、８０％以下、７５％以下、７０％以下、６５％以下、６０％以下、５９％以下、５８％以下、５７％以下、５６％以下、５５％以下、５４％以下、５３％以下、５２％以下、５１％以下、５０％以下、４９％以下、４８％以下、４７％以下、または４６％以下である。前記８Ｎ以上の多核化巨核球の割合（細胞数）は、例えば、１５～９０％、２０～９０％、２５～９０％、３０～９０％、３５～９０％、４０～９０％、４５～９０％、５０～９０％、５５～９０％、６０～９０％、１５～８５％、１５～８０％、１５～７５％、１５～７０％、１５～６５％、１６～６０％、１７～５９％、１８～５８％、１９～５７％、２０～５６％、２１～５５％、２２～５４％、２３～５４％、２４～５３％、２５～５１％、２６～５０％、２７～４９％、２８～４８％、２９～４

７％、または３０～４６％である。前記割合（細胞数）は、例えば、対象の細胞集団について十分に懸濁後、得られた細胞懸濁液の一部を分取し、後述の実施例１（３）に準じた染色体のセット数（核相）の測定方法により測定できる（以下、同様）。

[0078] 前記多核化巨核球が、核相が１６Ｎ以上の多核化巨核球を含む場合、前記細胞集団において、前記１６Ｎ以上の多核化巨核球の割合（細胞数）の下限値は、例えば、１５％以上、１６％以上、１７％以上、１８％以上、１９％以上、２０％以上、２１％以上、２２％以上、２３％以上、２４％以上、または２５％以上である。前記細胞集団において、前記１６Ｎ以上の多核化巨核球の割合（細胞数）の上限値は、例えば、９０％以下、８５％以下、８０％以下、７５％以下、７０％以下、６５％以下、６０％以下、５５％以下、５４％以下、５３％以下、５２％以下、５１％以下、５０％以下、４９％以下、４８％以下、４７％以下、４６％以下、４５％以下、４４％以下、または４３％以下である。前記１６Ｎ以上の多核化巨核球の割合（細胞数）は、例えば、１５～９０％、１５～８５％、１５～８０％、１５～７５％、１５～７０％、１５～６５％、１５～６０％、１６～５５％、１７～５４％、１８～５３％、１９～５２％、２０～５１％、２１～５０％、２２～４９％、２３～４８％、２４～４７％、２５～４６％、２５～４５％、２５～４４％、または２５～４３％である。

[0079] 前記多核化巨核球が、核相が３２Ｎ以上の多核化巨核球を含む場合、前記細胞集団において、前記３２Ｎ以上の多核化巨核球の割合（細胞数）の下限値は、例えば、５％以上、６％以上、７％以上、８％以上、９％以上、１０％以上、１１％以上、１２％以上、１３％以上、１４％以上、または１５％以上である。前記細胞集団において、前記３２Ｎ以上の多核化巨核球の割合（細胞数）の上限値は、例えば、５０％以下、４９％以下、４８％以下、４７％以下、４６％以下、４５％以下、４４％以下、４３％以下、４２％以下、４１％以下、４０％以下、３９％以下、３８％以下、３７％以下、３６％以下、３５％以下、３４％以下、３３％以下、３２％以下、３１％以下、ま

たは３０％以下である。前記３２Ｎ以上の多核化巨核球の割合（細胞数）は、例えば、５～５０％、５～４９％、５～４８％、５～４７％、５～４６％、５～４５％、５～４４％、５～４３％、５～４２％、５～４１％、５～４０％、６～３９％、７～３８％、８～３７％、９～３６％、１０～３５％、１１～３４％、１２～３３％、１３～３２％、１４～３１％、１５～３１％、または１５～３０％である。

[0080] このようにして、本発明の多核化巨核球の製造方法は、血小板の産生能が増強された巨核球を製造できる。本発明の多核化巨核球の製造方法によれば、核相が増強された多核化巨核球、特に、１６Ｎおよび３２Ｎの核相を有する多核化巨核球が富化された細胞集団を得ることができる。このため、本発明の多核化巨核球の製造方法によれば、血小板の産生能に優れた多核化巨核球が得られる。このため、前記多核化巨核球は、血小板の産生能に優れる。したがって、本発明の多核化巨核球の製造方法によれば、例えば、血小板の産生量を向上可能な多核化巨核球を準備できる。

[0081] ＜多核化巨核球を含む細胞集団＞

別の態様において、本発明は、血小板産生能が増強された多核化巨核球を含む細胞集団を提供する。本発明の細胞集団は、多核化巨核球を含む細胞集団であって、前記多核化巨核球は、核相が１６Ｎ以上の多核化巨核球を含み、前記細胞集団において、前記１６Ｎ以上の多核化巨核球の割合（細胞数）は、１５％以上である。

[0082] また、本発明の細胞集団は、多核化巨核球を含む細胞集団であって、前記多核化巨核球は、核相が３２Ｎ以上の多核化巨核球を含み、前記細胞集団において、前記３２ｎ以上の多核化巨核球の割合（細胞数）は、５～５０％である。

[0083] 前記多核化巨核球は、８Ｎ以上の多核化巨核球を含んでもよい。前記８Ｎ以上の多核化巨核球、前記１６Ｎ以上の多核化巨核球、および前記３２Ｎ以上の多核化巨核球の割合は、例えば、前述の例示を援用できる。

[0084] 本発明の細胞集団は、所定の核相を有する多核化巨核球を一定量含むこと

が特徴であり、その他の構成および条件は、特に制限されない。本発明の細胞集団は、例えば、本発明の多核化巨核球の製造方法の説明を援用できる。本発明の細胞集団は、核相が高い多核化巨核球が富化されている。前記巨核球では、核相の多核化が進むと、細胞質が相対的に大きくなり、血小板産生能が向上する。また、前記巨核球では、より核相の多核化が進むと、より成熟が進む。本発明の細胞集団は、核相が特に高い多核化巨核球（例えば、１６Ｎ以上または３２Ｎ以上）の割合が富化されている。このため、本発明の細胞集団は、例えば、血小板産生能が増強されている。

[0085] 前記多核化前巨核球細胞は、例えば、多能性細胞に由来する細胞であり、好ましくは、in vitroで多能性細胞から誘導された細胞である。前記多核化前巨核球は、不死化巨核球であることが好ましい。前記不死化巨核球は、例えば、前述のように、前記癌遺伝子、前記ポリコーム遺伝子、および／または前記アポトーシス抑制遺伝子を導入することにより、調製できる。このため、前記多核化前の巨核球および前記多核化巨核球は、例えば、外来性の癌遺伝子、ポリコーム遺伝子、および／またはアポトーシス抑制遺伝子を含む。前記癌遺伝子は、好ましくは、c-MYC遺伝子である。前記ポリコーム遺伝子は、好ましくは、BMI1遺伝子である。前記アポトーシス抑制遺伝子は、好ましくは、BCL-xL遺伝子である。前記多核化前の巨核球および前記多核化巨核球は、例えば、外来性の癌遺伝子、ポリコーム遺伝子、および／またはアポトーシス抑制遺伝子を発現している。

[0086] 本発明の細胞集団は、例えば、前記本発明の多核化巨核球の製造方法により製造できる。また、本発明の細胞集団は、例えば、多核化巨核球を含む細胞集団について、後述の実施例１（５）に準じて、血清アルブミン溶液を用いて分画し、多核化巨核球が富化された細胞集団として調製してもよい。

[0087] ＜血小板の製造方法＞

別の態様において、本発明は、血小板の製造方法を提供する。本発明の血小板の製造方法は、前述のように、多核化前の巨核球細胞から多核化巨核球細胞を誘導する誘導工程と、前記多核化巨核球細胞から血小板を産生する血

小板産生工程とを含み、前記誘導工程は、前記本発明の多核化巨核球の製造方法により実施される。本発明の血小板の製造方法は、前記誘導工程が、前記本発明の多核化巨核球の製造方法により実施されることが特徴であり、その他の工程および条件は、特に制限されない。本発明の血小板の製造方法は、例えば、本発明の多核化巨核球の製造方法の説明を援用できる。本発明の血小板の製造方法によれば、血小板の産生量が向上する。

[0088] 本発明の血小板の製造方法において、前記誘導工程では、多核化前の巨核球細胞から多核化巨核球細胞を誘導する。前記誘導工程は、前記本発明の多核化巨核球の製造方法の多核化工程と同様にして実施できる。

[0089] つぎに、本発明の血小板の製造方法において、前記血小板産生工程（以下、「産生工程」ともいう）では、前述のように、前記多核化巨核球から血小板を産生する。前記産生工程は、例えば、培地の存在下、前記多核化巨核球を培養することにより実施できる。前記多核化巨核球の培養は、例えば、フィーダ細胞上で実施してもよいし、フィーダ細胞なしで実施してもよい。

[0090] 前記産生工程において、前記多核化巨核球から血小板を産生させる期間は、特に制限されず、例えば、１～１０日、３～６日である。

[0091] 前記産生工程は、例えば、産生された血小板の生理活性を向上できることから、ＡｈＲ阻害剤の存在下、実施してもよい。具体的には、前記産生工程は、例えば、ＡｈＲ阻害剤を含む培地の存在下、実施する。前記産生工程は、例えば、前記巨核球を含む培地を、例えば、ＡｈＲ阻害剤を含む培地に交換する、または前記巨核球を含む培地に、ＡｈＲ阻害剤を添加することで実施できる。

[0092] 前記ＡｈＲ阻害剤の存在下で培養する期間は、特に制限されず、例えば、産生された血小板の数、生理活性等に応じて、適宜決定できる。前記ＡｈＲ阻害剤は、例えば、前記産生工程の全期間または一部の期間存在する。前記ＡｈＲ阻害剤がＳＲ１の場合、特に機能性の高い血小板を得られることから、前記培養期間は、好ましくは、約５日である。

[0093] 前記産生工程において、前記ＡｈＲ阻害剤の濃度は、特に制限されず、化

合物の種類およびその有効濃度に応じて、適宜決定できる。前記ＡｈＲアンタゴニストの濃度は、例えば、産生された血小板の生理活性をより向上できることから、一例として、以下の濃度があげられる。

SR1：200nmmol/L以上1000mmol/L未満

CH-223191：0.2μmol/L以上4μmol/L未満

GNF351：20nmol/L以上300nmol/L未満

TMF：2.5μmol/L以上40μmol/L未満

DMF：2.5μmol/L以上40μmol/L未満

[0094] 前記産生工程は、例えば、産生された血小板の生理活性を向上できることから、ROCK阻害剤の存在下、実施してもよい。具体的には、前記産生工程は、例えば、ROCK阻害剤を含む培地の存在下、実施する。前記産生工程は、例えば、機能性が高められた血小板をより得られることから、前記ROCK阻害剤と前記ＡｈＲ阻害剤とを併用することが好ましい。前記産生工程は、例えば、前記巨核球を含む培地を、例えば、ROCK阻害剤を含む培地に交換する、または前記巨核球を含む培地に、ROCK阻害剤を添加することで実施できる。前記ROCK阻害剤と前記ＡｈＲ阻害剤とを併用する場合、前記ROCK阻害剤と前記ＡｈＲ阻害剤とは、例えば、同時に添加または交換してもよいし、別個に添加または交換してもよい。

[0095] 前記産生工程において、前記血小板の産生開始時の多核化巨核球の細胞密度は、特に制限されない。前記細胞密度の下限は、例えば、１×１０^{5}細胞／ｍｌ、２×１０^{5}細胞／ｍｌ、３×１０^{5}細胞／ｍｌ、４×１０^{5}細胞／ｍｌである。前記細胞密度の上限は、特に制限されず、例えば、４×１０^{5}細胞／ｍｌ、６×１０^{5}細胞／ｍｌ、８×１０^{5}細胞／ｍｌである。前記細胞密度の範囲は、例えば、１×１０^{5}細胞／ｍｌ～８×１０^{5}細胞／ｍｌ、２×１０^{5}細胞／ｍｌ～８×１０^{5}細胞／ｍｌ、３×１０^{5}細胞／ｍｌ～６×１０^{5}細胞／ｍｌ、４×１０^{5}細胞／ｍｌ～６×１０^{5}細胞／ｍｌである。前記細胞密度は、例えば、前記多核化巨核球細胞の細胞数を、前記多核化巨核球細胞を懸濁する培地の体積で除する（割る）ことにより算出できる。

[0096] 前記産生工程において、前記巨核球の培養条件は、特に制限されず、前記巨核球の通常の培養条件を採用できる。具体例として、培養温度は、例えば、約３５～約４２℃、約３６～約４０℃、約３７～約３９℃である。CO_2濃度は、例えば、約５～約１５％である。O_2濃度は、例えば、約１５～約２５％、約２０％である。

[0097] このようにして、前記巨核球から血小板を産生できる。前記産生工程後の培地は、例えば、前記血小板を含む。

[0098] 本発明の血小板の製造方法は、例えば、前記産生工程で得られた血小板を精製する精製工程を含んでもよい。前記血小板の精製方法は、特に制限されず、例えば、中空糸膜等の分離手段を用いた精製方法、遠心分離による精製方法等の公知の方法により実施できる。

[0099] ＜血小板＞

本発明の血小板は、前記本発明の血小板の製造方法により得られたことを特徴とする。本発明の血小板は、前記本発明の血小板の製造方法により得られたことが特徴であり、その他の工程および条件は、特に制限されない。本発明の血小板は、例えば、前記本発明の血小板の製造方法の説明を援用できる。

[0100] ＜血小板製剤の製造方法＞

本発明の血小板製剤の製造方法は、前述のように、血小板から血小板製剤を製造する製剤工程を含み、前記血小板は、前記本発明の血小板の製造方法で得られたことを特徴とする。本発明の血小板製剤の製造方法は、前記血小板が、前記本発明の血小板の製造方法で得られたことを特徴とし、その他の工程および条件は、特に制限されない。本発明の血小板製剤の製造方法は、前記本発明の血小板の製造方法の説明を援用できる。

[0101] 前記製剤工程では、例えば、他の成分を添加してもよい。前記他の成分は、例えば、前記血小板等の細胞の安定化剤等の薬学的に許容される添加剤または担体等があげられる。

[0102] 本発明の血小板製剤の製造方法は、前記製剤工程に先立ち、前記本発明の

血小板の製造方法により、血小板を製造する血小板製造工程を含んでもよい。前記血小板製造工程は、例えば、前記本発明の血小板の製造方法の説明を援用できる。

[0103] ＜血小板製剤＞

本発明の血小板製剤は、前記本発明の血小板製剤の製造方法により得られたことを特徴とする。本発明の血小板製剤は、前記本発明の血小板製剤の製造方法により得られたことが特徴であり、その他の工程および条件は、特に制限されない。本発明の血小板製剤は、例えば、前記本発明の血小板の製造方法および血小板製剤の製造方法の説明を援用できる。

[0104] ＜血液製剤の製造方法＞

本発明の血液製剤の製造方法は、前述のように、血小板と他の成分とを混合することにより、血液製剤を製造する血液製剤工程を含み、前記血小板は、前記本発明の血小板の製造方法で得られたことを特徴とする。本発明の血液製剤の製造方法は、前記血小板が、前記本発明の血小板の製造方法で得られたことを特徴とし、その他の工程および条件は、特に制限されない。本発明の血液製剤の製造方法は、前記本発明の血小板の製造方法の説明を援用できる。

[0105] 前記他の成分は、特に制限されず、例えば、赤血球等の他の血球系細胞等の細胞；前記血小板等の細胞の安定化剤等の添加剤；等があげられる。

[0106] 本発明の血液製剤の製造方法は、前記血液製剤工程に先立ち、前記本発明の血小板の製造方法により、血小板を製造する血小板製造工程を含んでもよい。前記血小板製造工程は、例えば、前記本発明の血小板の製造方法の説明を援用できる。

[0107] ＜血液製剤＞

本発明の血液製剤は、前記本発明の血液製剤の製造方法により得られたことを特徴とする。本発明の血液製剤は、前記本発明の血液製剤の製造方法により得られたことが特徴であり、その他の工程および条件は、特に制限されない。本発明の血液製剤は、例えば、前記本発明の血小板の製造方法および

血液製剤の製造方法の説明を援用できる。

[0108] ＜多核化巨核球の誘導剤＞

別の態様において、本発明は、血小板産生能が増強された多核化巨核球の誘導剤を提供する。本発明の誘導剤は、血小板産生能が増強された多核化巨核球の誘導剤であって、ＡｈＲの活性抑制物質、ＲＯＣＫの活性抑制物質、ＤＹＲＫの活性抑制物質、およびミオシン２の活性抑制物質からなる群から選択された少なくとも１つと、ハルミンとを含む。本発明の誘導剤は、ＡｈＲの活性抑制物質、ＲＯＣＫの活性抑制物質、ＤＹＲＫの活性抑制物質、およびミオシン２の活性抑制物質からなる群から選択された少なくとも１つと、ハルミンとを含むことが特徴であり、その他の構成および条件は、特に制限されない。本発明の誘導剤は、例えば、前記本発明の多核化巨核球の製造方法の説明を援用できる。本発明の誘導剤は、例えば、血小板の産生能が向上された成熟巨核球または多核化巨核球細胞の誘導剤ということもできる。また、本発明の誘導剤は、例えば、巨核球細胞の多核化促進剤または巨核球細胞の核相の増強剤ということもできる。

[0109] ＜使用＞

本発明は、血小板産生能が増強された多核化巨核球の誘導のための、ＡｈＲの活性抑制物質、ＲＯＣＫの活性抑制物質、ＤＹＲＫの活性抑制物質、およびミオシン２の活性抑制物質からなる群から選択された少なくとも１つと、ハルミンとの使用である。また、本発明は、巨核球細胞の多核化促進または巨核球細胞の核相の増強に用いるためのＡｈＲの活性抑制物質、ＲＯＣＫの活性抑制物質、ＤＹＲＫの活性抑制物質、およびミオシン２の活性抑制物質からなる群から選択された少なくとも１つと、ハルミンとの使用である。本発明は、例えば、前記本発明の多核化巨核球の製造方法の説明を援用できる。

実施例

[0110] 以下、実施例を用いて本発明を詳細に説明するが、本発明は実施例に記載された態様に限定されるものではない。

[0111] ［実施例１］

多核化前巨核球を、ＡｈＲ阻害剤、ＲＯＣＫ阻害剤、ＤＹＲＫ阻害剤、およびミオシン２阻害剤と、ハルミンとの存在下で培養することにより、血小板の産生能を増強できることを確認した。

[0112] （１）不死化巨核球の作製

多核化前巨核球としては、不死化巨核球を用いた。前記不死化巨核球は、以下の手順で作製した。

[0113] （１－１）iPS細胞からの造血前駆細胞の調製

ヒトiPS細胞から、下記参考文献７に記載の方法に従って、血球細胞への分化培養を実施した。具体的には、ラミニン511-E8（ニッピ）上で維持したヒトiPS細胞コロニーを50 ng/ml アクチビンA（WAKO）、3μM CHIR99021（WAKO）存在下で一晩培養したのち、20ng/mL VEGF（R&D SYSTEMS社製）存在下でC3H10T1/2フィーダ細胞と１４日間共培養して造血前駆細胞（Hematopoietic Progenitor Cells：HPC）を作製した。培養条件は、iPS細胞の維持と、HPC誘導の前半７日間とは、３７℃、５％O_2、５％CO_2とし、その後は、３７℃、２０％O_2、５％CO_2で実施した。

参考文献７：Takayama N. et al., “Transient activation of c-MYC expression is critical for efficient platelet generation from human induced pluripotent stem cells”, J. Exp. Med., 2010, vo.13, pages 2817-2830

[0114] （１－２）遺伝子導入システム

遺伝子導入システムは、レンチウイルスベクターシステムを利用した。レンチウイルスベクターは、Tetracycline制御性のTet-on（登録商標）遺伝子発現誘導システムベクターを用いた。前記ベクターは、TREプロモーターの下に、c-MYC、BMI1、またはBCL-xLが導入されたベクターとし、各ベクターは、それぞれ、EN-TRE-c-Myc-Ubc-rtTA-KR、EN-TRE-BMI1-Ubc-rtTA-KR、およびEN-TRE-BCL-xL-Ubc-rtTA-KRと構成した。つぎに、c-MYC、BMI1、およびBCL-xLのベクターを含むウイルスは、前記レンチウイルスベクターを293T細胞に遺

伝子導入することにより調製した（前記参考文献１および下記参考文献８）。そして、得られたウイルスを目的の細胞に感染させることによって、c-MYC、BMI1、およびBCL-xL遺伝子を、目的の細胞のゲノム配列に導入できる。また、得られた細胞において、c-MYC、BMI1、およびBCL-xL遺伝子が、安定的にゲノム配列に導入されると、前記細胞は、培地にドキシサイクリン（clontech#631311）を加えることによって、c-MYC、BMI1、およびBCL-xL遺伝子を強制発現できる。

参考文献８： Yamaguchi et al., “Development of an All-in-One Inducible Lentiviral Vector for Gene Specific Analysis of Reprogramming.” PLoS ONE, 2012, vol.7 (7) e41007

[0115] （１－３）造血前駆細胞への３遺伝子の導入による巨核球細胞株の誘導

前記実施例１（１－１）で作製したHPCに、前記実施例１（１－２）で作製した３種類のレンチウィルスを感染させ、巨核球前駆細胞を誘導した。前記感染から約２５日後に十分な増殖能を有している株について、抗ヒトCD41a-APC抗体(BioLegend社製)、抗ヒトCD42b-PE抗体(eBioscience社製)、および抗ヒトCD235ab-Pacific Blue（Anti-CD235ab-PB; BioLegend社製）抗体を用いて、免疫染色した後にFACS Verse（商標）を用いて解析した。CD41a陽性率、CD42b陽性率がともに50%以上である株を不死化巨核球細胞株（MKCL、多核化前の巨核球細胞に相当）とし、以後の検討に用いた。

[0116] （１－４）巨核球細胞株の増殖培養

得られたMKCLの増殖培養は、10cmディッシュ（10ml/ディッシュ）または125 ml振とうフラスコで行なった。培地は、IMDM（Sigma Aldrich #I3390）を基本培地として、以下の成分を加えた（濃度は終濃度、増殖培地）。培養条件は、３７℃、５％CO_2、振とう時の振とう速度は、回転直径19 mmのシェイカーにて100 rpmに設定した。

FBS（Hyclone #SH30071.03、ウシ胎仔血清）15%

Glutamax（GIBCO #3505-061） 2mmol/l

ITS-G (Gibco #41400-045) 100倍希釈

MTG (monothioglycerol,富士フィルム和光純薬　#195-157) 450μmol/l

アスコルビン酸(NIPRO #49871900040329) 50μg/ml

SCF (AGC #MEGAKARYON-SCF) 50ng/ml

TPO様作用物質200ng/mL

Doxycycline (DOX) (clontech #631311)　1μg/ml

[0117] （２）不死化巨核球の多核化の誘導

つぎに、DOXに加えて、ＡｈＲ阻害剤、ＲＯＣＫ阻害剤、ＤＹＲＫ阻害剤、およびミオシン２阻害剤と、ハルミンとを添加した培地で培養することにより、不死化巨核球の多核化を誘導した。具体的には、前記実施例１（１）で得た不死化巨核球細胞株を、以下の多核化培地に、3.0×10^5 cells/mlとなるように懸濁した。そして、６ウェルディッシュに、２ｍｌ／ウェル、または、125mL容のErlenmeyer Flaskに２５ｍｌ／フラスコで播種し、３日間100rpmで振とう培養した。培養条件は、３７℃、５％CO_2とした。

[0118] （多核化培地）

FBS (Hyclone #SH30071.03) 15%

Glutamax　(GIBCO #3505-061) 2mmol/L

ITS-G (Gibco #41400-045) 100倍希釈

MTG (monothioglycerol, 富士フィルム和光純薬　#195-157) 450μmol/l

アスコルビン酸 (NIPRO #49871900040329) 50μg/ml

脂質混合液１ 既知組成 (Sigma Aldrich #L0288-100ML) 0.75%

SCF (AGC #MEGAKARYON-SCF) 50ng/ml

TPO様作用物質200ng/ml

Doxycycline (clontech #631311)　1μg/ml

芳香族炭化水素受容体 (AhR) 阻害剤 GNF351 (Calbiochem #182707)　500nmol/l

ROCK阻害剤 Y-39983 (Medchemexpress #MCH-HY-13300-10) 500nmol/l

Harmine　(Sigma Aldrich　#286044-1G) 5μmol/l

DYRK阻害剤 AZ191 (Medchem Express #HY-12277) １μmol/l

ミオシン２阻害剤 (-)-Blebbistatin (Medchem Express #HY-13441) 10μmol/l

[0119] （３）多核化への作用

前記培養後の細胞懸濁液を回収し、前記細胞懸濁液中の染色体のセット数および細胞の大きさを、フローサイトメーターを用いて測定した。具体的には、細胞懸濁液について、冷却した100%エタノールを用いて、終濃度70%、-20℃で30分間の固定処理後、PBS(-)で洗浄した。ついで、核染色液を用いて染色した。前記各染色液は、１ｍｇ／ｍｌのＰＩ (Propidium Iodide、Sigma Aldrich #P4864-10ML) を終濃度10μg/mL、100mg/mL RNase (NIPPON GENE #318-06391) を終濃度20μg/mLになるようにPBSに添加して調製した。染色後サンプルについて、フローサイトメーターで測定した。得られた結果について、ＦＳＣおよびＰＩの染色強度に基づき、巨核球が含有する染色体のセット数（Ｎ）および細胞の大きさを解析した（実施例１）。コントロール１は、前記多核化培地に代えて、前記増殖培地を用いた以外は同様にして、コントロール２は、前記多核化培地に代えて、前記増殖培地に、Harmine 10μmol/lとなるように添加した培地を用いた以外は、同様にして実施した。これらの結果を、図１に示す。

[0120] 図１は、多核化の程度を示すグラフである。図１において、横軸は、PIの染色強度を示し、縦軸は、カウント数を示し、図中の数値は、各染色体のセット数の細胞の割合を示す。図１に示すように、コントロール１では、不死化巨核球の増殖が維持されるため、多核化巨核球はほとんど検出されなかった。他方、図１に示すように、Harmineを添加した場合、不死化巨核球が多核化され、３２Ｎの多核化巨核球も若干検出された。これらに対して、実施例１では、巨核球の多核化がより進み、３２Ｎの多核化巨核球だけでなく、６４Ｎおよび１２８Ｎの多核化巨核球が検出された。これらのことから、本発明の多核化巨核球の製造方法によれば、より多核化の程度が進んだ多核化巨核球が得られることがわかった。

[0121] （４）血小板の産生

つぎに、DOXを除いたIMDMに以下の成分を添加した下記産生培地で培養することにより、多核化巨核球から血小板を産生させた。具体的には、前記実施例１（２）で得た多核化巨核球を、PBS(-)で2度洗浄し、以下の産生培地に、1.0×10^5 cells/mlとなるように懸濁した。そして、６ウェルディッシュに、２ｍｌ／ウェルで播種し、６日間培養した。

[0122] （産生培地）

ヒトAB血清10% (AccessBiologicals)

Glutamax (GIBCO #3505-061) 2mmol/L

ITS-G (Gibco #41400-045) 100倍希釈

MTG (monothioglycerol, 富士フィルム和光純薬 #195-157) 450μmol/L

アスコルビン酸 (NIPRO #49871900040329) 50μg/mL

SCF (AGC #MEGAKARYON-SCF) 50ng/mL

TPO様作用物質200ng/mL

芳香族炭化水素受容体 (AhR) 阻害剤 GNF351 (Calbiochem #182707) 500nmol/L

ROCK阻害剤 Y-39983 (Medchemexpress #MCH-HY-13300-10) 500nmol/L

エノキサパリン (Sanofi) 1U/mL

[0123] つぎに、血小板を含む細胞懸濁液について、前記細胞懸濁液中の血小板濃度を、フローサイトメーターを用いて測定した。具体的には、5mL FACSチューブにTyrode’s Buffer 180μLを添加し、前記細胞懸濁液20μLを添加し、混合した。次に、各チューブに下記標識抗体を添加して15分間静置して染色した。染色後に各チューブにPBS(-)を４００μL添加して混合し、うち５００μＬをTrucount Tube（商標）に添加して混合してフローサイトメーターで測定した。得られた結果について、前方散乱光（ＦＳＣ）および側方散乱光（ＳＳＣ）で、血小板の画分を抽出した後、ＣＤ４１$^+$ＣＤ４２ｂ$^+$画分の割合を求め、Trucount beadsのカウント数によって算出された測定液量に基づき、血小板濃濃度を算出した。前記血小板濃度から前記細胞懸濁液中の血小板

の総数を算出後、前記血小板の総数と、播種した多核化巨核球の数とから、巨核球あたりの血小板産生量を算出した（実施例１）。また、コントロールは、前記実施例１（２）において、前記多核化培地に代えて、前記増殖培地を用いた以外は同様にして実施した。これらの結果を図２に示す。

・血小板濃度の測定

0.5μL抗CD41抗体APC標識（BioLegend、Cat.No.:303710）

0.5μL抗CD42b抗体PE標識（BioLegend、Cat.No.:303906）

[0124] 図２は、巨核球あたりの血小板産生量を示すグラフである。図２において、横軸は、サンプルの種類を示し、縦軸は、巨核球あたりの血小板産生量を示す。図２に示すように、実施例１は、コントロールと比較して、血小板の産生量が４倍程度に増強された。これらの結果から、本発明の多核化巨核球の製造方法によれば、血小板の産生量を増強できることがわかった。

[0125] （５）血小板の産生能

前記実施例１（１）で得た不死化巨核球細胞株を、前記実施例１（２）と同様に培養することにより、多核化を誘導した。得られた多核化巨核球について、ウシ血清アルブミンを用いて、多核化巨核球の大きさにより分画した。具体的には、押子を外した５０ｍｌ注射シリンジに三方活栓を装着し、筒先を下にしてクランプで固定した。３０％（w/v）アルブミン溶液（ウシ血清由来　脂肪酸フリー、富士フィルム和光純薬＃017-22231）を、１×HBSS（ThermoFisher ＃14175095）で希釈して調製し、２％、４％、１６％のBSA溶液を調製後、前記シリンジ内に、１６％（１０ｍｌ）、４％（４ｍｌ）、２％（４ｍｌ）、および０％（２ｍｌ）の順に重層した。つぎに、２ｍｌのHBSSで調製した７５×１０^{5}細胞の多核化巨核球を含む細胞懸濁液をアプライした後、５０分間静置して細胞を自然重力下で沈降させた。そして、前記三方活栓を緩め、滴下にて細胞を回収した。これにより、前記多核化巨核球を含む細胞集団をフラクション１～４（Ｆ１～Ｆ４）に分画した。各画分の多核化巨核球について、前記実施例１（３）と同様にして、染色体のセット数（N）を解析した（実施例１）。参考例１Ａは、前記多核化培地に代えて、Harmi

ne、AZ191、およびBlebbistatinを添加しない多核化培地を用いた以外は同様にして、参考例１Ｂは、前記多核化培地に代えて、Harmineを添加しない多核化培地を用いた以外は同様にして実施した。

[0126] 前記分画後、DOXを除いた前記産生培地で培養することにより、多核化巨核球から血小板を産生させた。具体的には、Ｆ１～Ｆ４の多核化巨核球を、それぞれ、PBS(-)で2度洗浄し、前記産生培地に、1.0×10^5 cells/mlとなるように懸濁した。そして、６ウェルディッシュに、２ｍｌ／ウェルで播種し、４～７日間（合計７～１０日間）培養した。前記産生培地の培養１日目において、各ウェルの細胞を位相差顕微鏡（ECLIPSE TS100、ニコンインステック社製）を用いて観察した。そして、前記培養後、血小板を含む細胞懸濁液について、前記実施例１（４）と同様にして、巨核球あたりの血小板産生量を算出した。これらの結果を図３～図５に示す。

[0127] 図３Ａ～Ｃは、多核化の程度および細胞の大きさを示すグラフである。図３Ａ～Ｃにおいて、図３Ａは、参考例１Ａの結果を示し、図３Ｂは、参考例１Ｂの結果を示し、図３Ｃは、実施例１の結果を示す。図３Ａ～Ｃにおいて、横軸は、PIの染色強度または細胞の大きさ（ＦＳＣ）を示し、縦軸は、カウント数を示し、図中の数値は、各染色体のセット数の細胞の割合を示す。図３Ａ～Ｃに示すように、参考例１Ａ、参考例１Ｂおよび実施例１のいずれにおいても、Ｆ１が最も大きな細胞が富化されており、Ｆ２～Ｆ４に進むにつれて、細胞の大きさが小さくなっていることが確認できた。また、参考例１Ｂと実施例１とを比較すると、Ｆ１～Ｆ４のいずれにおいても、細胞の大きさは同程度であった。

[0128] つぎに、図４は、Ｆ１分画の細胞の位相差像を示す写真である。図４において、（Ａ）は、参考例１Ａの結果であり、（Ｂ）は、参考例１Ｂの結果であり、（Ｃ）は、実施例１の結果である。図４（Ａ）～（Ｃ）に示すように、AZ191およびBlebbistatinを添加し、ＤＹＲＫおよびミオシン２を阻害すると、多核化巨核球の肥大化が促進されることがわかった。他方、図４（Ｂ）～（Ｃ）に示すように、Harmineを添加しても、多核化巨核球の肥大化には影

響がないことがわかった。

[0129] 図５は、巨核球あたりの血小板産生量を示すグラフである。図５において、横軸は、サンプルの種類および画分を示し、縦軸は、巨核球あたりの血小板産生量を示す。図５に示すように、多核化巨核球が特に富化されているＦ１画分およびＦ２画分において、実施例１は、参考例１Ａおよび参考例１Ｂと比較して、血小板産生量が２～３倍程度増強されていた。このため、本発明の多核化巨核球の製造方法では、血小板産生能が増強された多核化巨核球が得られることがわかった。また、前述のように、実施例１の多核化巨核球と参考例１Ｂの多核化巨核球とは、同程度の大きさを有する。このため、実施例１の多核化巨核球と参考例１Ｂの多核化巨核球とは、血小板の血小板産生の最大能力、すなわち、全ての細胞質を血小板として放出したときに放出できる血小板数は同程度であると推定される。しかしながら、図５に示すように、実施例１の多核化巨核球と参考例１Ｂの多核化巨核球とは、血小板産生量が大きく異なることから、実施例１の多核化巨核球は、参考例１Ｂの多核化巨核球と比較して、効率よく血小板を放出できること、すなわち、血小板の産生能が増強されていることがわかった。また、前記血小板の産生能の増強は、実施例１の多核化巨核球では、参考例１Ｂの多核化巨核球等と比較して、巨核球細胞の分化の進行または成熟度の増進によると推定された。

[0130] ［実施例２］

実施例１で用いた阻害剤を用いて、多核化に特に寄与する分子を確認した。

[0131] （１）添加剤の検討

（１－１）不死化巨核球の多核化の誘導

不死化巨核球の多核化の誘導に用いたＡｈＲ阻害剤、ＲＯＣＫ阻害剤、およびミオシン２阻害剤と、ハルミンの５種類の添加剤の中で、血小板産生数を増加させるのに寄与する添加剤について、検討を行った。前記検討は、具体的には、実施例１（１）で得た不死化巨核球細胞株を、以下の多核化培地に、3.0×10^5 cells/mlとなるように懸濁した。そして、６ウェルディッシュ

に、２ｍｌ／ウェル、または、125mL容のErlenmeyer Flaskに２５ｍｌ／フラスコで播種し、３日間100rpmで振とう培養した。培養条件は、３７℃、５％CO_2とした。前記多核化培地において、（１）全ての下記阻害剤（ＧＹＨＡＢ）、（２）AZ191以外の下記阻害剤（Ａ（－））、（３）GNF351以外の下記阻害剤（Ｇ（－））、（４）Y-39983以外の下記阻害剤（Ｙ（－））、（５）Harmine以外の下記阻害剤（Ｈ（－））、（６）Blebbistatin以外の下記阻害剤（Ｂ（－））、（７）AZ191およびY-39983以外の下記阻害剤（ＧＨＢ）を添加した。

[0132] （多核化培地）

FBS (Hyclone #SH30071.03) 15%

Glutamax (GIBCO #3505-061) 2mmol/L

ITS-G (Gibco #41400-045) 100倍希釈

MTG (monothioglycerol, 富士フィルム和光純薬 #195-157) 450μmol/l

アスコルビン酸 (NIPRO #49871900040329) 50μg/ml

SCF (AGC #MEGAKARYON-SCF) 50ng/ml

TPO様作用物質200ng/ml

Doxycycline (clontech #631311) 1μg/ml

[0133] （阻害剤）

（Ｇ）芳香族炭化水素受容体 (AhR) 阻害剤 GNF351 (Calbiochem #182707) 500nmol/l

（Ｙ）ROCK阻害剤 Y-39983 (Medchemexpress #MCH-HY-13300-10) 500nmol/l

（Ｈ）Harmine (Sigma Aldrich #286044-1G) 5μmol/l

（Ａ）DYRK阻害剤 AZ191 (Medchem Express #HY-12277) 1 μmol/l

（Ｂ）ミオシン２阻害剤 (-)-Blebbistatin (Medchem Express #HY-13441) 10μmol/l

[0134] （１－２）多核化への作用

前記培養後の細胞懸濁液を回収し、前記細胞懸濁液中の染色体のセット数および細胞の大きさを、フローサイトメーターを用いて測定した。具体的に

は、実施例１（３）と同様の方法で行った。得られた結果について、ＦＳＣおよびＰＩの染色強度に基づき、巨核球が含有する染色体のセット数（Ｎ）および細胞の大きさを解析した。これらの結果を、図６に示す。

[0135] 図６は、巨核球あたりの血小板産生量を示すグラフである。図６において、横軸は、サンプルの種類を示し、縦軸は、巨核球あたりの血小板産生量を示す。図６に示すように、AZ191を添加しなかった（Ａ（－））においては、全ての阻害剤を添加した（ＧＹＨＡＢ）と比較して、血小板産生量は減少しなかった。また、AZ191およびY-39983を添加しなかった（ＧＨＢ）においては、AZ191を添加しなかった（Ａ（－））または全ての阻害剤を添加した（ＧＹＨＡＢ）と比較して、血小板産生量は減少しなかった。また、他の１剤を抜いた場合においては、全ての阻害剤（ＧＹＨＡＢ）を添加した場合と比較して、血小板産生量が減少した。以上の結果から、ＡｈＲ、ミオシン２の活性を抑制し、ハルミンの存在下培養することにより、巨核球の多核化を相乗的に促進でき、これにより、血小板の産生能を向上できることが分かった。

[0136] ［実施例３］

本発明の多核化巨核球の製造方法において、巨核球の多核化が促進されていることを確認した。

[0137] 本発明の多核化巨核球の製造方法で得られる多核化巨核球の核相について検討した。前記実施例１（１）で得た不死化巨核球細胞株を、１５％ＦＢＳを含む前記多核化培地に、$2.0\sim3.0\times10^5$ cells/mlとなるように懸濁した懸濁液を用いた以外は、前記実施例２（２）と同様にして培養した。得られた多核化巨核球を含む細胞集団について、前記実施例１（３）と同様にして、フローサイトメーターで測定した。得られた結果について、ＦＳＣおよびＰＩの染色強度に基づき、巨核球が含有する染色体のセット数（Ｎ）および細胞の大きさを解析した。同様の実験を１１回実施した（ｎ＝１２）。これらの結果を図７に示す。

[0138] 図７は、多核化巨核球の核相を示すグラフである。図７（Ａ）～（Ｃ）において、横軸は、細胞集団に占める割合を示し、縦軸は、巨核球あたりの血

小板産生量を示す。図７において、（Ａ）は、細胞集団における核相が８Ｎ以上の多核化巨核球の割合を示し、（Ｂ）は、細胞集団における核相が１６Ｎ以上の多核化巨核球の割合を示し、（Ｃ）は、細胞集団における核相が３２Ｎ以上の多核化巨核球の割合を示す。図７（Ａ）～（Ｃ）に示すように、核相が８Ｎ以上の多核化巨核球の割合が、２８．２～５６．７％であり、核相が１６Ｎ以上の多核化巨核球の割合が、２０．２～４５．９％であり、核相が３２Ｎ以上の多核化巨核球の割合が、９．１５～３０．７％であった。なお、播種密度を変化させることにより、１６Ｎ以上および３２Ｎ以上の多核化巨核球の含有割合を調整できた。

[0139] 以上のことから、本発明の多核化巨核球の製造方法によれば、特に、核相が１６Ｎ以上の多核化巨核球および核相が３２Ｎ以上の多核化巨核球の含有割合が高い細胞集団を調製できること、すなわち、巨核球の多核化が促進されていることが分かった。

[0140] 以上、実施形態および実施例を参照して本発明を説明したが、本発明は、上記実施形態および実施例に限定されるものではない。本発明の構成や詳細には、本発明のスコープ内で当業者が理解し得る様々な変更をすることができる。

[0141] この出願は、２０２１年６月１８日に出願された日本出願特願２０２１－１０２０６８を基礎とする優先権を主張し、その開示の全てをここに取り込む。

[0142] ＜付記＞

上記の実施形態および実施例の一部または全部は、以下の付記のように記載されうるが、以下には限られない。

＜多核化巨核球細胞の製造方法＞

（付記１）

血小板産生能が増強された多核化巨核球細胞の製造方法であって、

多核化前の巨核球細胞の増殖因子の存在下、多核化前の巨核球細胞またはその前駆細胞を多核化させ、多核化巨核球細胞を誘導する多核化工程を含み、

前記多核化工程において、芳香族炭化水素受容体（ＡｈＲ）、Ｒｈｏ結合キナーゼ（ＲＯＣＫ）、二重特異性チロシンリン酸化調節キナーゼ（ＤＹＲＫ）、およびミオシン２からなる群から選択された少なくとも１つの活性を抑制し、かつハルミン（Harmine）の存在下、前記多核化前の巨核球細胞を多核化させ、多核化巨核球細胞を誘導する、製造方法。

（付記２）

前記多核化工程において、ＡｈＲ阻害剤、ＲＯＣＫ阻害剤、ＤＹＲＫ阻害剤、およびミオシン２阻害剤からなる群から選択された少なくとも１つの阻害剤と、ハルミンとの存在下、前記多核化前の巨核球細胞またはその前駆細胞を培養して多核化させ、多核化巨核球細胞を誘導する、付記１に記載の製造方法。

（付記３）

前記多核化工程において、前記ＡｈＲ阻害剤、前記ミオシン２阻害剤およびハルミンの存在下、前記多核化前の巨核球細胞またはその前駆細胞を培養して多核化させ、多核化巨核球細胞を誘導する、付記２に記載の製造方法。

（付記４）

前記多核化前の巨核球細胞の増殖因子の存在下、前記多核化前の巨核球細胞を増殖させる増殖工程を含み、

前記増殖工程では、ＡｈＲ、ＲＯＣＫ、ＤＹＲＫ、およびミオシン２の活性を抑制せず、かつハルミン（Harmine）の非存在下、前記多核化前の巨核球細胞を増殖させる、付記１から３のいずれかに記載の製造方法。

（付記５）

前記増殖工程後に、前記多核化工程を実施する、付記４に記載の製造方法。

（付記６）

前記多核化工程において、ＡｈＲ阻害剤を用いて、前記ＡｈＲの活性を阻害する、付記１から５のいずれかに記載の製造方法。

（付記７）

前記ＡｈＲ阻害剤は、ＧＮＦ３５１を含む、付記２、３、および６のいずれ

かに記載の製造方法。

（付記８）

前記多核化工程において、ＲＯＣＫ阻害剤を用いて、前記ＲＯＣＫの活性を阻害する、付記１から７のいずれかに記載の製造方法。

（付記９）

前記ＲＯＣＫ阻害剤は、Ｙ－３９９８３を含む、付記２、３、および８のいずれかに記載の製造方法。

（付記１０）

前記多核化工程において、ＤＹＲＫ阻害剤を用いて、前記ＤＹＲＫの活性を阻害する、付記１から９のいずれかに記載の製造方法。

（付記１１）

前記ＤＹＲＫ阻害剤は、ＡＺ１９１を含む、付記２、３、および１０のいずれかに記載の製造方法。

（付記１２）

前記多核化工程において、ミオシン２阻害剤を用いて、前記ミオシン２の活性を阻害する、付記１から１１のいずれかに記載の製造方法。

（付記１３）

前記ミオシン２阻害剤は、ブレビスタチン（Ｂｌｅｂｂｉｓｔａｔｉｎ）を含む、付記２、３、および１２のいずれかに記載の製造方法。

（付記１４）

前記多核化巨核球細胞は、前記多核化巨核球細胞を含む細胞集団であり、

前記多核化巨核球細胞は、核相が１６Ｎ以上の多核化巨核球細胞を含み、

前記多核化巨核球細胞を含む細胞集団において、前記１６Ｎ以上の多核化巨核球細胞の割合（細胞数）は、２０％以上である、付記１から１３のいずれかに記載の製造方法。

（付記１５）

前記細胞集団において、前記１６Ｎ以上の多核化巨核球細胞の割合（細胞数）は、２０～９０％である、付記１４に記載の製造方法。

（付記１６）

前記細胞集団において、前記１６Ｎ以上の多核化巨核球細胞の割合（細胞数）は、２０～７０％である、付記１５に記載の製造方法。

（付記１７）

前記多核化巨核球細胞は、前記多核化巨核球細胞を含む細胞集団であり、

前記多核化巨核球細胞は、核相が８Ｎ以上の多核化巨核球細胞を含み、

前記細胞集団において、前記８Ｎ以上の多核化巨核球細胞の割合（細胞数）は、２０～９０％である、付記１から１６のいずれかに記載の製造方法。

（付記１８）

前記細胞集団において、前記８Ｎ以上の多核化巨核球の割合（細胞数）は、２５～６０％である、付記１６に記載の製造方法。

（付記１９）

前記多核化巨核球細胞は、前記多核化巨核球細胞を含む細胞集団であり、

前記多核化巨核球細胞は、核相が３２Ｎ以上の多核化巨核球を含み、

前記細胞集団において、前記３２Ｎ以上の多核化巨核球の割合（細胞数）は、５～５０％である、付記１から１７のいずれかに記載の製造方法。

（付記２０）

前記多核化巨核球細胞は、核相が３２Ｎ以上の多核化巨核球を含み、

前記細胞集団において、前記３２Ｎ以上の多核化巨核球の割合（細胞数）は、５～３５％である、付記１９に記載の製造方法。

（付記２１）

前記多核化前の巨核球細胞の増殖因子は、癌遺伝子、ポリコーム遺伝子、および／またはアポトーシス抑制遺伝子がコードするタンパク質である、付記１から２０のいずれかに記載の製造方法。

（付記２２）

前記多核化前の巨核球細胞は、不死化巨核球である、付記１から２１のいずれかに記載の製造方法。

（付記２３）

前記多核化前の巨核球細胞は、多能性細胞に由来する、付記１から２２のいずれかに記載の製造方法。

（付記２４）

前記多能性細胞は、人工多能性幹細胞である、付記２３に記載の製造方法。

（付記２５）

前記多核化前の巨核球細胞は、ヒト由来である、付記１から２４のいずれかに記載の製造方法。

＜血小板の製造方法＞

（付記２６）

多核化前の巨核球細胞から多核化巨核球細胞を誘導する多核化工程と、

前記多核化巨核球細胞から血小板を産生する血小板産生工程とを含み、

前記多核化工程は、付記１から２５のいずれかに記載の多核化巨核球細胞の製造方法により実施される、血小板の製造方法。

＜血小板製剤の製造方法＞

（付記２７）

血小板から血小板製剤を製造する製剤工程を含み、

前記血小板は、付記２６に記載の血小板の製造方法で得られたことを特徴とする、血小板製剤の製造方法。

＜血液製剤の製造方法＞

（付記２８）

血小板と他の成分とを混合することにより、血液製剤を製造する血液製剤工程を含み、

前記血小板は、付記２６に記載の血小板の製造方法で得られたことを特徴とする、血液製剤の製造方法。

＜多核化巨核球細胞を含む細胞集団＞

（付記２９）

多核化巨核球を含む細胞集団であって、

前記多核化巨核球は、核相が１６Ｎ以上の多核化巨核球を含み、

前記細胞集団において、前記１６Ｎ以上の多核化巨核球の割合（細胞数）は、２０％以上である、細胞集団。

（付記３０）

前記細胞集団において、前記１６Ｎ以上の多核化巨核球の割合（細胞数）は、２０～９０％である、付記２９に記載の細胞集団。

（付記３１）

前記細胞集団において、前記１６Ｎ以上の多核化巨核球の割合（細胞数）は、２０～７０％である、付記３０に記載の細胞集団。

（付記３２）

前記多核化巨核球は、核相が８Ｎ以上の多核化巨核球を含み、

前記細胞集団において、前記８Ｎ以上の多核化巨核球の割合（細胞数）は、２０～９０％である、付記２９から３１のいずれかに記載の細胞集団。

（付記３３）

前記細胞集団において、前記８Ｎ以上の多核化巨核球の割合（細胞数）は、２５～６０％である、付記３２に記載の細胞集団。

（付記３４）

前記多核化巨核球は、核相が３２Ｎ以上の多核化巨核球を含み、

前記細胞集団において、前記３２Ｎ以上の多核化巨核球の割合（細胞数）は、５～５０％である、付記２９から３３のいずれかに記載の細胞集団。

（付記３５）

前記多核化巨核球は、核相が３２Ｎ以上の多核化巨核球を含み、

前記細胞集団において、前記３２Ｎ以上の多核化巨核球の割合（細胞数）は、５～３５％である、付記３４に記載の細胞集団。

（付記３６）

多核化巨核球を含む細胞集団であって、

前記多核化巨核球は、核相が３２Ｎ以上の多核化巨核球を含み、

前記細胞集団において、前記３２Ｎ以上の多核化巨核球の割合（細胞数）は、５～５０％である、細胞集団。

（付記３７）

前記多核化巨核球は、核相が３２Ｎ以上の多核化巨核球を含み、

前記細胞集団において、前記３２Ｎ以上の多核化巨核球の割合（細胞数）は、５～３５％である、付記３６に記載の細胞集団。

（付記３８）

前記多核化巨核球は、核相が８Ｎ以上の多核化巨核球を含み、

前記細胞集団において、前記８Ｎ以上の多核化巨核球の割合（細胞数）は、２０～７０％である、付記３６または３７に記載の細胞集団。

（付記３９）

前記細胞集団において、前記８Ｎ以上の多核化巨核球の割合（細胞数）は、２５～６０％である、付記３８に記載の細胞集団。

（付記４０）

前記多核化前の巨核球細胞は、不死化巨核球である、付記２９から３９のいずれかに記載の細胞集団。

（付記４１）

前記多核化前の巨核球細胞は、多能性細胞に由来する、付記２９から４０のいずれかに記載の細胞集団。

（付記４２）

前記多核化前の巨核球細胞は、外来性の癌遺伝子、ポリコーム遺伝子、および／またはアポトーシス抑制遺伝子を含む、付記２９から４１のいずれかに記載の細胞集団。

産業上の利用可能性

[0143] 以上のように、本発明によれば、血小板産生能が増強された多核化巨核球を得ることができる。このため、本発明によれば、例えば、血小板の産生量を向上できる。したがって、本発明は、例えば、血小板を使用する細胞医薬分野、医療分野等において極めて有用である。

請求の範囲

[請求項1] 血小板産生能が増強された多核化巨核球細胞の製造方法であって、

多核化前の巨核球細胞の増殖因子の存在下、多核化前の巨核球細胞またはその前駆細胞を多核化させ、多核化巨核球細胞を誘導する多核化工程を含み、

前記多核化工程において、芳香族炭化水素受容体（ＡｈＲ）、Ｒｈｏ結合キナーゼ（ＲＯＣＫ）、二重特異性チロシンリン酸化調節キナーゼ（ＤＹＲＫ）、およびミオシン２からなる群から選択された少なくとも１つの活性を抑制し、かつハルミン（Harmine）の存在下、前記多核化前の巨核球細胞を多核化させ、多核化巨核球細胞を誘導する、製造方法。

[請求項2] 前記多核化工程において、ＡｈＲ阻害剤、ＲＯＣＫ阻害剤、ＤＹＲＫ阻害剤、およびミオシン２阻害剤からなる群から選択された少なくとも１つの阻害剤と、ハルミンとの存在下、前記多核化前の巨核球細胞またはその前駆細胞を培養して多核化させ、多核化巨核球細胞を誘導する、請求項１に記載の製造方法。

[請求項3] 前記多核化工程において、前記ＡｈＲ阻害剤、前記ミオシン２阻害剤およびハルミンの存在下、前記多核化前の巨核球細胞またはその前駆細胞を培養して多核化させ、多核化巨核球細胞を誘導する、請求項２に記載の製造方法。

[請求項4] 前記多核化前の巨核球細胞の増殖因子の存在下、前記多核化前の巨核球細胞を増殖させる増殖工程を含み、

前記増殖工程では、ＡｈＲ、ＲＯＣＫ、ＤＹＲＫ、およびミオシン２の活性を抑制せず、かつハルミン（Harmine）の非存在下、前記多核化前の巨核球細胞を増殖させる、請求項１から３のいずれか一項に記載の製造方法。

[請求項5] 前記増殖工程後に、前記多核化工程を実施する、請求項４に記載の製造方法。

[請求項6] 前記多核化工程において、ＡｈＲ阻害剤を用いて、前記ＡｈＲの活性を阻害する、請求項１から５のいずれか一項に記載の製造方法。

[請求項7] 前記ＡｈＲ阻害剤は、ＧＮＦ３５１を含む、請求項２、３、および６のいずれか一項に記載の製造方法。

[請求項8] 前記多核化工程において、ＲＯＣＫ阻害剤を用いて、前記ＲＯＣＫの活性を阻害する、請求項１から７のいずれか一項に記載の製造方法。

[請求項9] 前記ＲＯＣＫ阻害剤は、Ｙ－３９９８３を含む、請求項２、３、および８のいずれか一項に記載の製造方法。

[請求項10] 前記多核化工程において、ミオシン２阻害剤を用いて、前記ミオシン２の活性を阻害する、請求項１から９のいずれか一項に記載の製造方法。

[請求項11] 前記ミオシン２阻害剤は、ブレビスタチン（Ｂｌｅｂｂｉｓｔａｔｉｎ）を含む、請求項２、３、および１０のいずれか一項に記載の製造方法。

[請求項12] 前記多核化巨核球細胞は、前記多核化巨核球細胞を含む細胞集団であり、

前記多核化巨核球細胞は、核相が１６Ｎ以上の多核化巨核球細胞を含み、

前記多核化巨核球細胞を含む細胞集団において、前記１６Ｎ以上の多核化巨核球細胞の割合（細胞数）は、２０％以上である、請求項１から１１のいずれか一項に記載の製造方法。

[請求項13] 前記細胞集団において、前記１６Ｎ以上の多核化巨核球細胞の割合（細胞数）は、２０～９０％である、請求項１２に記載の製造方法。

[請求項14] 前記細胞集団において、前記１６Ｎ以上の多核化巨核球細胞の割合（細胞数）は、２０～７０％である、請求項１３に記載の製造方法。

[請求項15] 前記多核化巨核球細胞は、前記多核化巨核球細胞を含む細胞集団であり、

前記多核化巨核球細胞は、核相が３２Ｎ以上の多核化巨核球を含み、

前記細胞集団において、前記３２Ｎ以上の多核化巨核球の割合（細胞数）は、５～５０％である、請求項１から１４のいずれか一項に記載の製造方法。

[請求項16] 前記多核化巨核球細胞は、核相が３２Ｎ以上の多核化巨核球を含み、
前記細胞集団において、前記３２Ｎ以上の多核化巨核球の割合（細胞数）は、５～３５％である、請求項１５に記載の製造方法。

[請求項17] 前記多核化前の巨核球細胞の増殖因子は、癌遺伝子、ポリコーム遺伝子、および／またはアポトーシス抑制遺伝子がコードするタンパク質である、請求項１から１６のいずれか一項に記載の製造方法。

[請求項18] 前記多核化前の巨核球細胞は、不死化巨核球である、請求項１から１７のいずれか一項に記載の製造方法。

[請求項19] 多核化前の巨核球細胞から多核化巨核球細胞を誘導する多核化工程と、
前記多核化巨核球細胞から血小板を産生する血小板産生工程とを含み、
前記多核化工程は、請求項１から１８のいずれか一項に記載の多核化巨核球細胞の製造方法により実施される、血小板の製造方法。

[請求項20] 血小板から血小板製剤を製造する製剤工程を含み、
前記血小板は、請求項１９に記載の血小板の製造方法で得られたことを特徴とする、血小板製剤の製造方法。

[請求項21] 血小板と他の成分とを混合することにより、血液製剤を製造する血液製剤工程を含み、
前記血小板は、請求項１９に記載の血小板の製造方法で得られたことを特徴とする、血液製剤の製造方法。

[請求項22] 多核化巨核球を含む細胞集団であって、
前記多核化巨核球は、核相が１６Ｎ以上の多核化巨核球を含み、
前記細胞集団において、前記１６Ｎ以上の多核化巨核球の割合（細胞数）は、２０％以上である、細胞集団。

[請求項23] 前記細胞集団において、前記１６Ｎ以上の多核化巨核球の割合（細胞数）は、２０～９０％である、請求項２２に記載の細胞集団。

[請求項24] 前記細胞集団において、前記１６Ｎ以上の多核化巨核球の割合（細胞数）は、２０～７０％である、請求項２３に記載の細胞集団。

[請求項25] 前記多核化巨核球は、核相が８Ｎ以上の多核化巨核球を含み、
前記細胞集団において、前記８Ｎ以上の多核化巨核球の割合（細胞数）は、２０～９０％である、請求項２２から２４のいずれか一項に記載の細胞集団。

[請求項26] 前記細胞集団において、前記８Ｎ以上の多核化巨核球の割合（細胞数）は、２５～６０％である、請求項２５に記載の細胞集団。

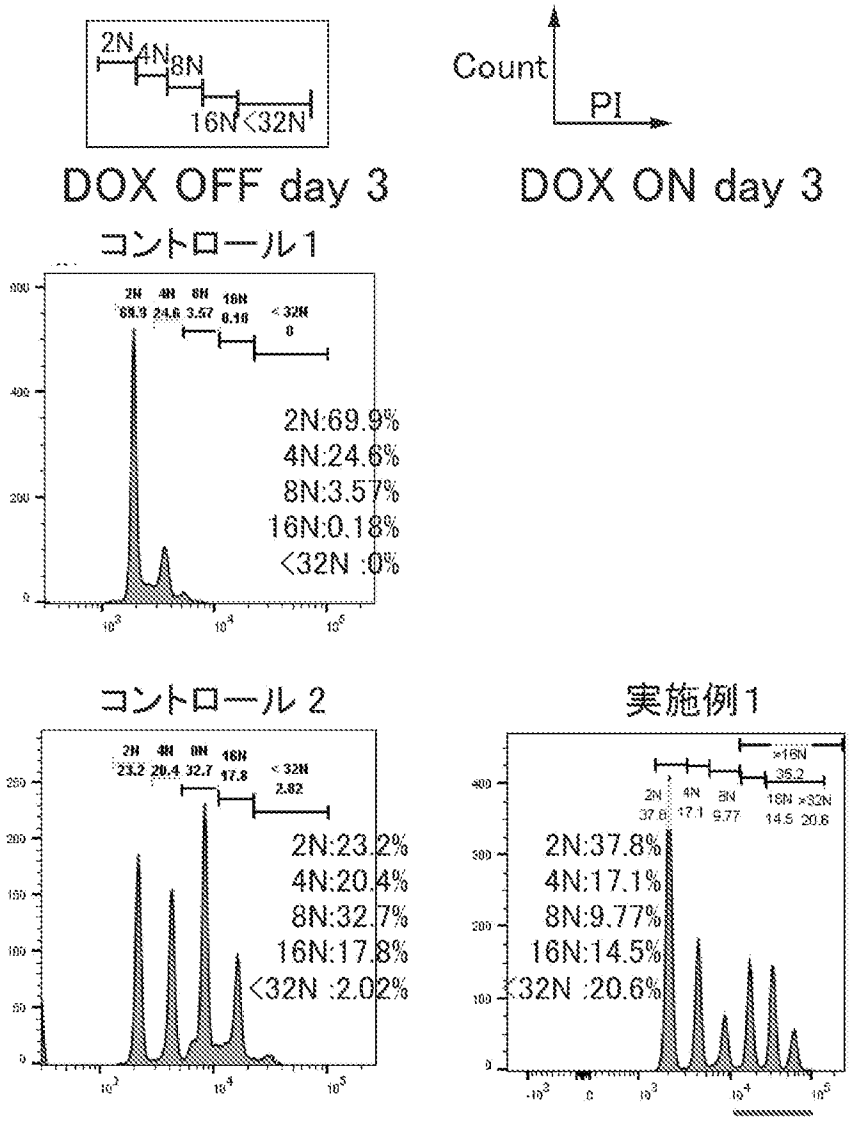
[請求項27] 前記多核化巨核球は、核相が３２Ｎ以上の多核化巨核球を含み、
前記細胞集団において、前記３２Ｎ以上の多核化巨核球の割合（細胞数）は、５～５０％である、請求項２２から２６のいずれか一項に記載の細胞集団。

[請求項28] 前記多核化巨核球は、核相が３２Ｎ以上の多核化巨核球を含み、
前記細胞集団において、前記３２Ｎ以上の多核化巨核球の割合（細胞数）は、５～３５％である、請求項２７に記載の細胞集団。

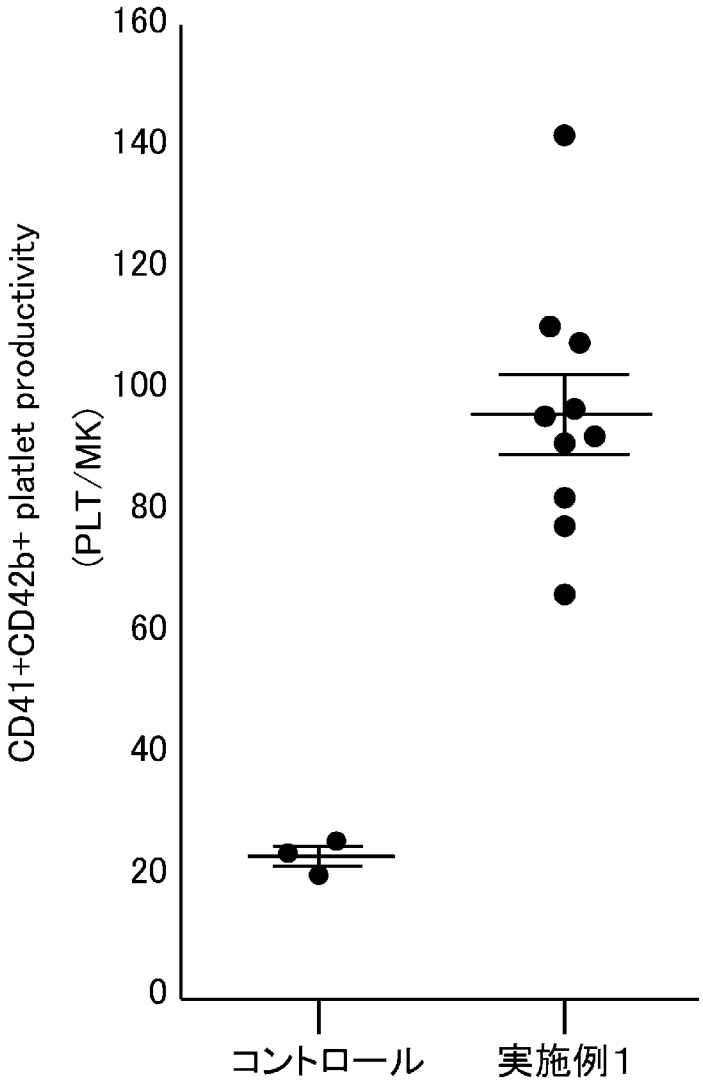
[請求項29] 前記多核化前の巨核球細胞は、不死化巨核球である、請求項２２から２８のいずれか一項に記載の細胞集団。

[請求項30] 前記多核化前の巨核球細胞は、外来性の癌遺伝子、ポリコーム遺伝子、および／またはアポトーシス抑制遺伝子を含む、請求項２２から２９のいずれか一項に記載の細胞集団。

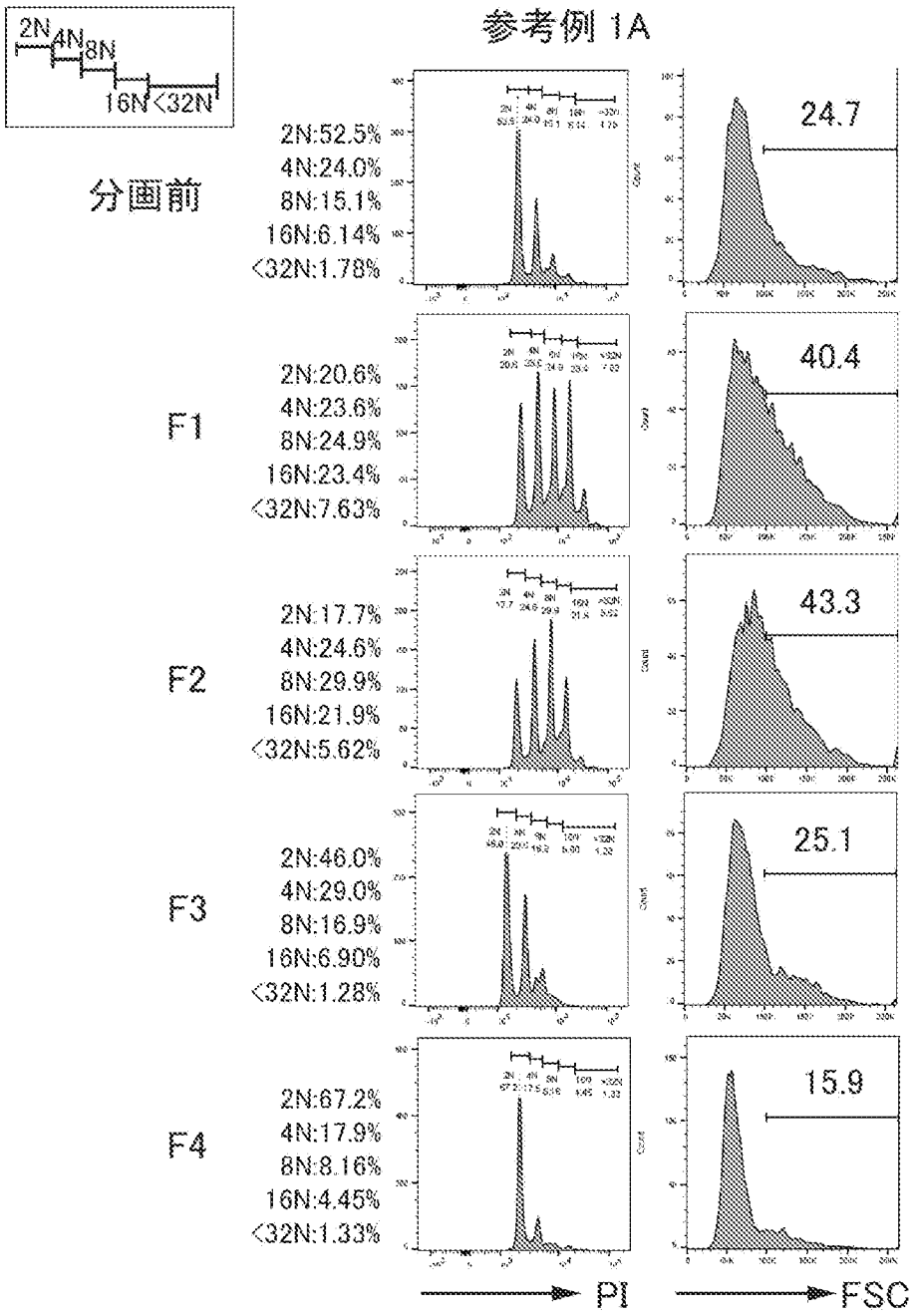
[図1]


2N
4N
8N
16N<32N
Count
PI
DOX OFF day 3
DOX ON day 3
コントロール1
2N:69.9%
4N:24.6%
8N:3.57%
16N:0.18%
<32N :0%
コントロール 2
2N:23.2%
4N:20.4%
8N:32.7%
16N:17.8%
<32N :2.02%
実施例1
2N:37.8%
4N:17.1%
8N:9.77%
16N:14.5%
<32N :20.6%

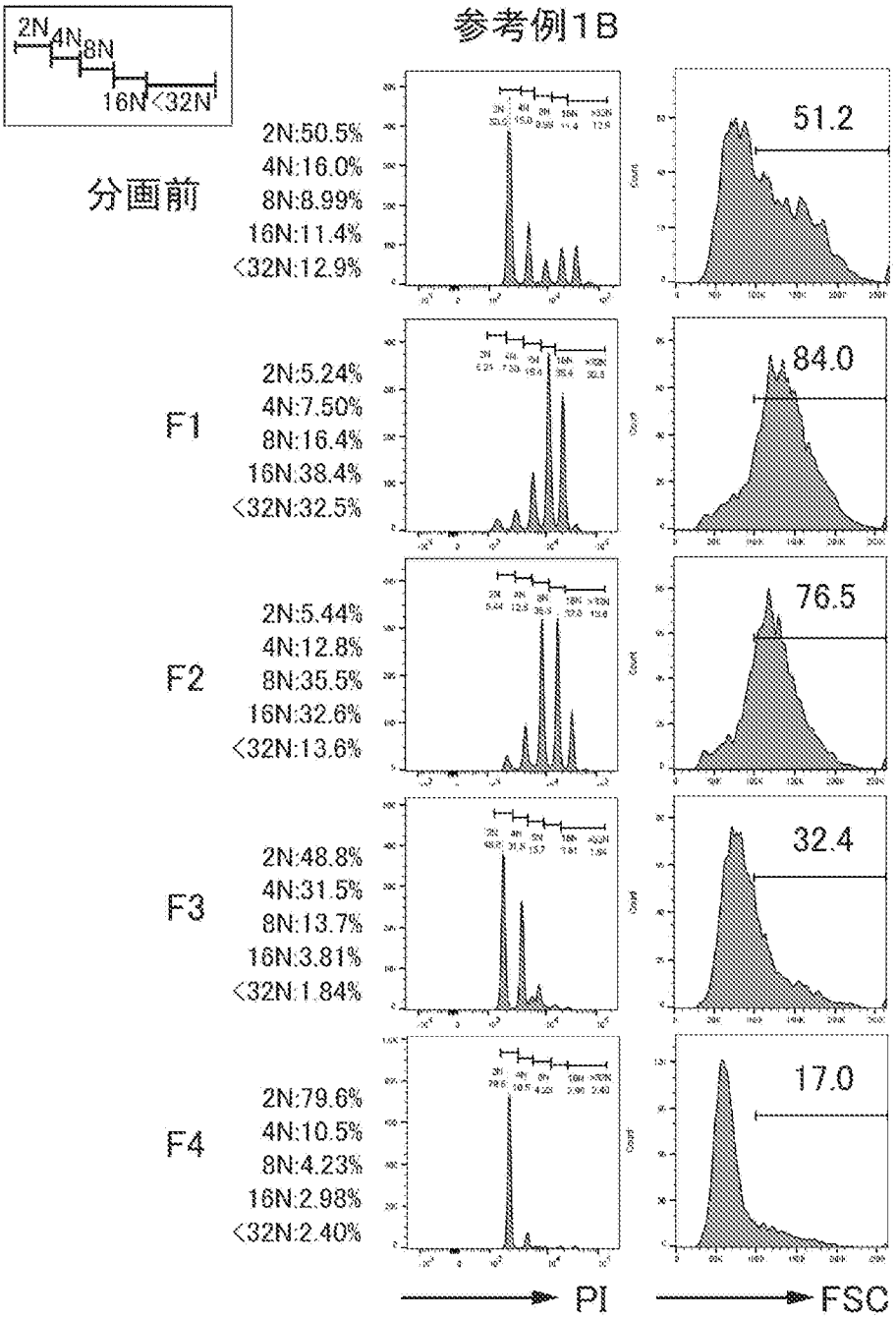
[図2]


160
140
120
100
80
60
40
20
0
CD41+CD42b+ platlet productivity
(PLT/MK)
コントロール
実施例1

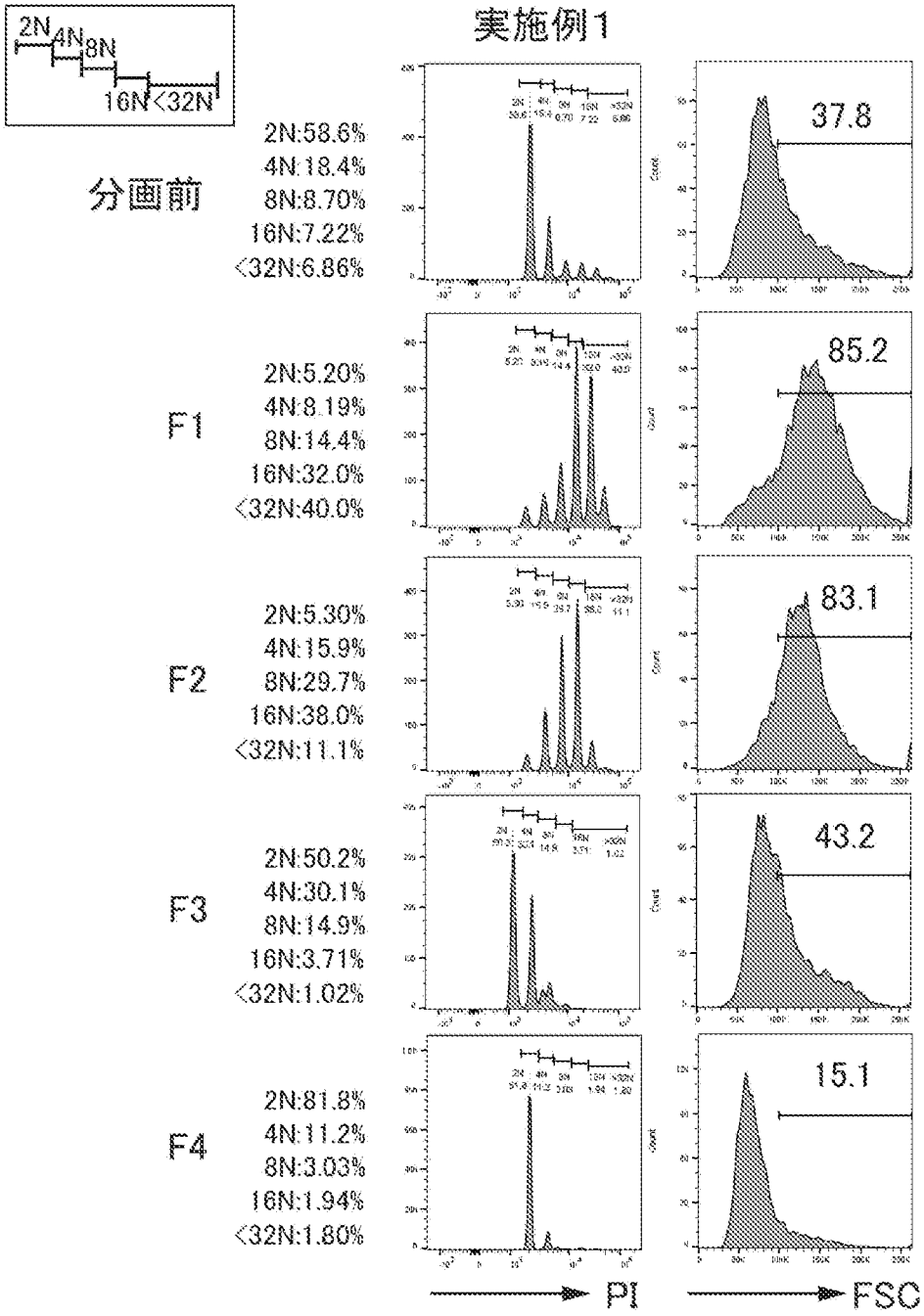
[図3A]


参考例 1A
2N
4N
8N
16N<32N
分画前
2N:52.5%
4N:24.0%
8N:15.1%
16N:6.14%
<32N:1.78%
24.7
F1
2N:20.6%
4N:23.6%
8N:24.9%
16N:23.4%
<32N:7.63%
40.4
F2
2N:17.7%
4N:24.6%
8N:29.9%
16N:21.9%
<32N:5.62%
43.3
F3
2N:46.0%
4N:29.0%
8N:16.9%
16N:6.90%
<32N:1.28%
25.1
F4
2N:67.2%
4N:17.9%
8N:8.16%
16N:4.45%
<32N:1.33%
15.9
PI
FSC

[図3B]

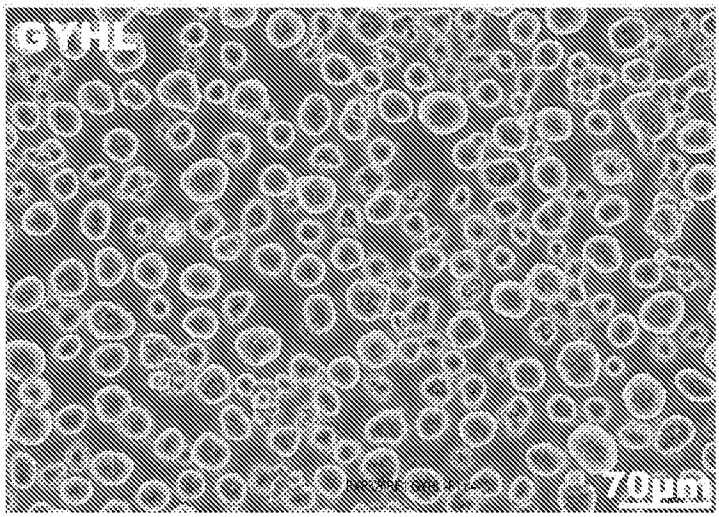

2N
4N
8N
16N<32N
参考例1B
分画前
2N:50.5%
4N:16.0%
8N:8.99%
16N:11.4%
<32N:12.9%
51.2
F1
2N:5.24%
4N:7.50%
8N:16.4%
16N:38.4%
<32N:32.5%
84.0
F2
2N:5.44%
4N:12.8%
8N:35.5%
16N:32.6%
<32N:13.6%
76.5
F3
2N:48.8%
4N:31.5%
8N:13.7%
16N:3.81%
<32N:1.84%
32.4
F4
2N:79.6%
4N:10.5%
8N:4.23%
16N:2.98%
<32N:2.40%
17.0
PI
FSC

[図3C]

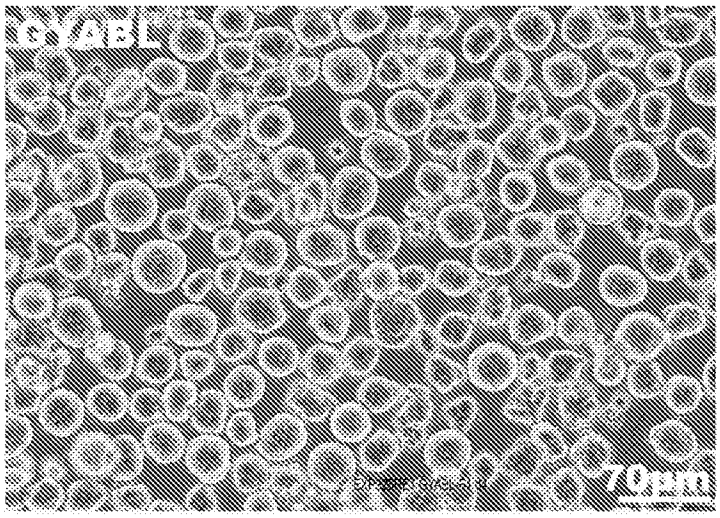

2N
4N
8N
16N<32N
実施例1
分画前
2N:58.6%
4N:18.4%
8N:8.70%
16N:7.22%
<32N:6.86%
37.8
F1
2N:5.20%
4N:8.19%
8N:14.4%
16N:32.0%
<32N:40.0%
85.2
F2
2N:5.30%
4N:15.9%
8N:29.7%
16N:38.0%
<32N:11.1%
83.1
F3
2N:50.2%
4N:30.1%
8N:14.9%
16N:3.71%
<32N:1.02%
43.2
F4
2N:81.8%
4N:11.2%
8N:3.03%
16N:1.94%
<32N:1.80%
15.1
PI
FSC

[図4]

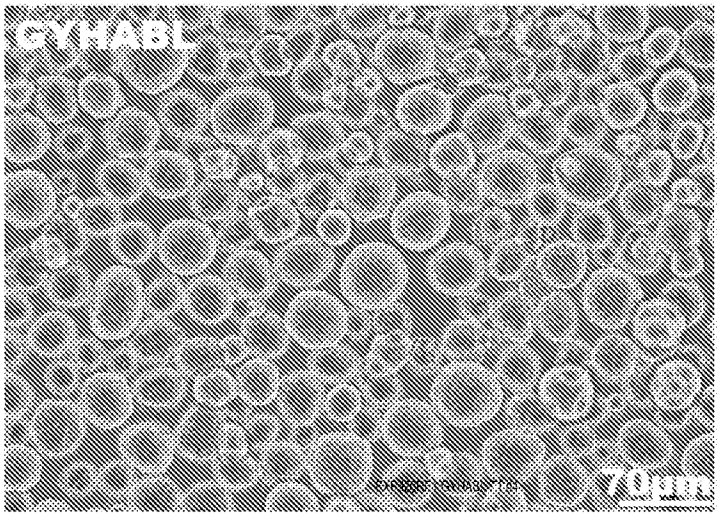
（A）参考例1A



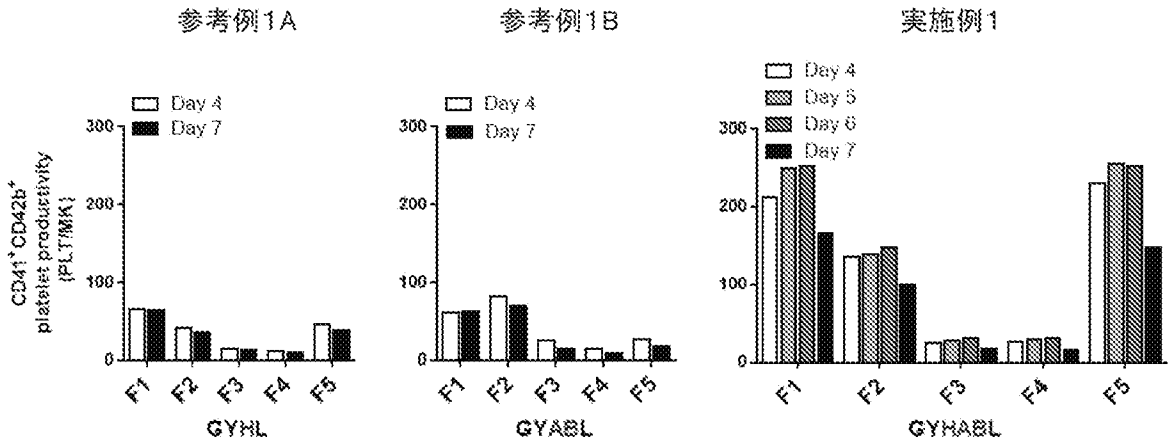
（B）参考例1B



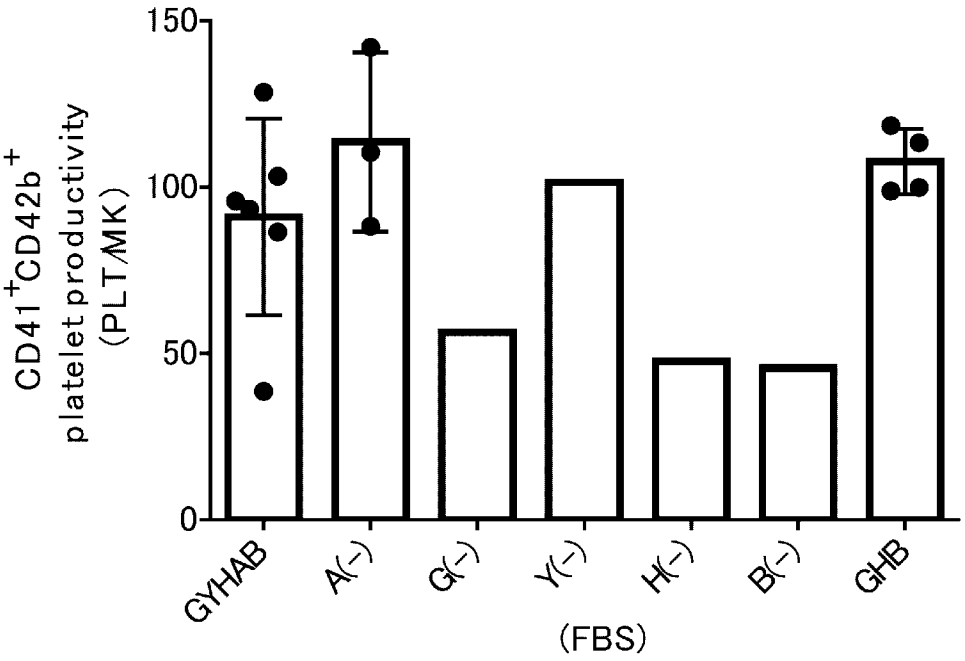
（C）実施例1



[図5]

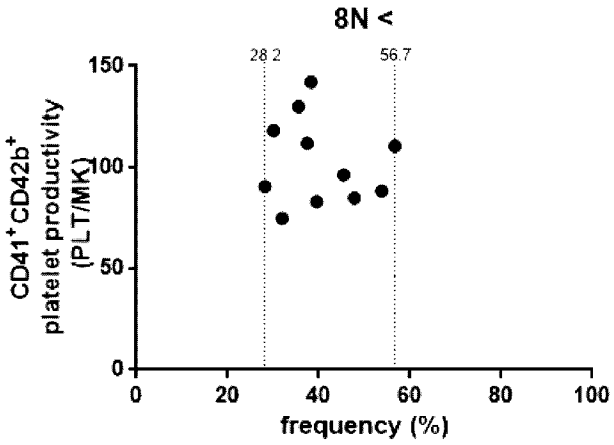

参考例1A
参考例1B
実施例1
Day 4
Day 5
Day 6
Day 7
CD41+CD42b+ platelet productivity (PLT/MK)
300
200
100
0
F1
F2
F3
F4
F5
GYHL
GYABL
GYHABL

[図6]

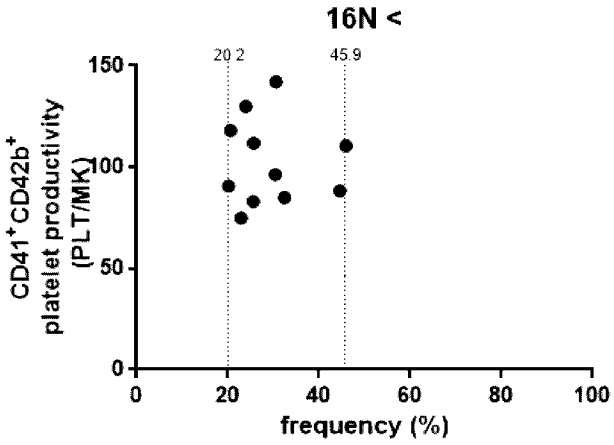

CD41+CD42b+ platelet productivity (PLT/MK)
150
100
50
0
GYHAB
A(−)
G(−)
Y(−)
H(−)
B(−)
GHB
(FBS)

[図7]

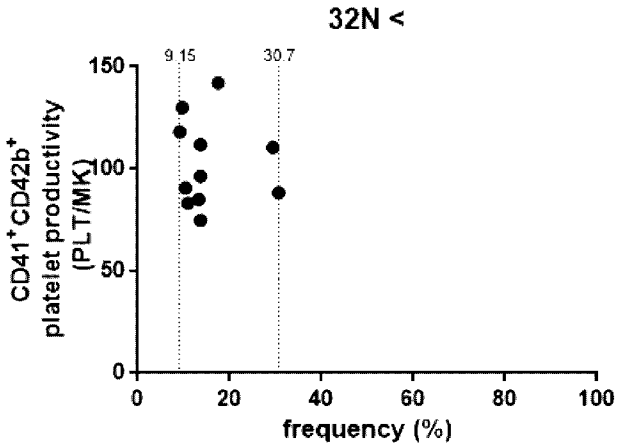
(A)


8N <
28.2
56.7
CD41+CD42b+ platelet productivity (PLT/MK)
frequency (%)
0
50
100
150
0
20
40
60
80
100

(B)


16N <
20.2
45.9
CD41+CD42b+ platelet productivity (PLT/MK)
frequency (%)
0
50
100
150
0
20
40
60
80
100

(C)


32N <
9.15
30.7
CD41+CD42b+ platelet productivity (PLT/MK)
frequency (%)
0
50
100
150
0
20
40
60
80
100

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2022/024432

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 5/078(2010.01)i; ***A61K 35/19***(2015.01)i; ***A61P 7/04***(2006.01)i; ***C12N 5/10***(2006.01)i; *C12N 15/09*(2006.01)n
FI: C12N5/078; A61K35/19 Z; A61P7/04; C12N5/10; C12N15/09 Z

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N5/078; A61K35/19; A61P7/04; C12N5/10; C12N15/09

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Published examined utility model applications of Japan 1922-1996
Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2022
Registered utility model specifications of Japan 1996-2022
Published registered utility model applications of Japan 1994-2022

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CAplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 2019-026591 A (UNIV KYOTO) 21 February 2019 (2019-02-21) in particular, claims 1-4, paragraphs [0012]-[0040], examples	22-30
A	in particular, claims 1-4, paragraphs [0012]-[0040], examples	1-21
X	WO 2021/075568 A1 (NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION CHIBA UNIVERSITY) 22 April 2021 (2021-04-22) in particular, paragraphs [0036]-[0059], [0064], examples, claims 1-16	22-30
A	in particular, paragraphs [0036]-[0059], [0064], examples, claims 1-16	1-21
Y	WO 2021/117886 A1 (NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION CHIBA UNIVERSITY) 17 June 2021 (2021-06-17) in particular, paragraphs [0042]-[0063], examples	1-30
Y	ELAGIB, K. E. et al. Harnessing a Novel Dyrk1a-Ablim2-MKL1 Regulatory Module in Megakaryocyte Morphogenesis to Enable Scalable Platelet "Pharming". Blood. 2019, vol. 134, No.Supplement_1, Article No.3250, pp. 1-3, http://doi.org/10.1182/blood-2019-129049 in particular, p. 2, second paragraph	1-30

☑ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☑ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
03 August 2022	**16 August 2022**
Name and mailing address of the ISA/JP **Japan Patent Office (ISA/JP)** **3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915** **Japan**	Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2022/024432

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2021/117900 A1 (MEGAKARYON CORPORATION) 17 June 2021 (2021-06-17) entire text	1-30

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/JP2022/024432

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
JP 2019-026591 A	21 February 2019	(Family: none)	
WO 2021/075568 A1	22 April 2021	TW 202128987 A entire text	
WO 2021/117886 A1	17 June 2021	(Family: none)	
WO 2021/117900 A1	17 June 2021	(Family: none)	

国際調査報告

国際出願番号
PCT/JP2022/024432

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

C12N 5/078(2010.01)i; A61K 35/19(2015.01)i; A61P 7/04(2006.01)i; C12N 5/10(2006.01)i; C12N 15/09(2006.01)n
FI: C12N5/078; A61K35/19 Z; A61P7/04; C12N5/10; C12N15/09 Z

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（ＩＰＣ））

C12N5/078; A61K35/19; A61P7/04; C12N5/10; C12N15/09

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	１９２２－１９９６年
日本国公開実用新案公報	１９７１－２０２２年
日本国実用新案登録公報	１９９６－２０２２年
日本国登録実用新案公報	１９９４－２０２２年

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CAplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー*	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
X	JP 2019-026591 A (国立大学法人京都大学) 21.02.2019 (2019-02-21) 特に、請求項１－４、［００１２］－［００４０］、実施例	22-30
A	特に、請求項１－４、［００１２］－［００４０］、実施例	1-21
X	WO 2021/075568 A1 (国立大学法人千葉大学) 22.04.2021 (2021-04-22) 特に、［００３６］－［００５９］、［００６４］、実施例、請求項１－１６	22-30
A	特に、［００３６］－［００５９］、［００６４］、実施例、請求項１－１６	1-21
Y	WO 2021/117886 A1 (国立大学法人千葉大学) 17.06.2021 (2021-06-17) 特に、［００４２］－［００６３］、実施例	1-30
Y	ELAGIB, K.E. et al., Harnessing a Novel Dyrkla-Ablim2-MKL1 Regulatory Module in Megakaryocyte Morphogenesis to Enable Scalable Platelet "Pharming", Blood, 2019, Vol.134, No.Supplement_1, Article No.3250, pp.1-3, http://doi.org/10.1182/blood-2019-129049 特に、第２頁第２段落	1-30
A	WO 2021/117900 A1 (株式会社メガカリオン) 17.06.2021 (2021-06-17) 全文	1-30

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☑ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー
"A" 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
"E" 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
"L" 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
"O" 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
"P" 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献
"T" 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
"X" 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
"Y" 特に関連のある文献であって、当該文献と他の１以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
"&" 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日	国際調査報告の発送日
03.08.2022	16.08.2022

名称及びあて先
日本国特許庁(ISA/JP)
〒100-8915
日本国
東京都千代田区霞が関三丁目４番３号

権限のある職員（特許庁審査官）
伊達　利奈 4N 3960

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

国際調査報告
パテントファミリーに関する情報

国際出願番号
PCT/JP2022/024432

引用文献	公表日	パテントファミリー文献	公表日
JP 2019-026591 A	21.02.2019	（ファミリーなし）	
WO 2021/075568 A1	22.04.2021	TW 202128987 A 全文	
WO 2021/117886 A1	17.06.2021	（ファミリーなし）	
WO 2021/117900 A1	17.06.2021	（ファミリーなし）	