

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2006-94827

(P2006-94827A)

(43) 公開日 平成18年4月13日(2006.4.13)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 Q 1/02 (2006.01)	C 1 2 Q 1/02	2 G 0 4 5
G O 1 N 33/15 (2006.01)	G O 1 N 33/15	4 B 0 6 3
G O 1 N 33/50 (2006.01)	G O 1 N 33/50	Z

審査請求 未請求 請求項の数 8 O L (全 16 頁)

(21) 出願番号	特願2004-287226 (P2004-287226)	(71) 出願人	000002831 第一製薬株式会社 東京都中央区日本橋3丁目14番10号
(22) 出願日	平成16年9月30日(2004.9.30)	(72) 発明者	小松 則夫 栃木県河内郡南河内町祇園5-17-2
		(72) 発明者	山口 京二 栃木県下部賀郡石橋町大字下石橋519 第一製薬株式会社栃 木研究センター内
		(72) 発明者	畑野 陵 栃木県下部賀郡石橋町大字下石橋519 第一製薬株式会社栃 木研究センター内
		Fターム(参考)	2G045 BB20 BB24 CA24 CB01 FA16 FB03
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 血小板分化を調節する因子の同定方法

(57) 【要約】

【課題】

巨核球から巨核球胞体突起および／または血小板への分化を誘導および／または促進する因子を同定するための、生体事象を反映した多検体処理が可能な簡便な方法を提供することを目的とする。また、本発明は巨核球から巨核球胞体突起および／または血小板への分化を阻害および／または抑制する因子を同定するための、生体事象を反映した多検体処理が可能な簡便な方法を提供することを目的とする。また、本発明は、上記の方法によって同定された巨核球から血小板へと分化する過程を誘導、促進、阻害および／または抑制する因子を提供することを目的とする。

【解決手段】

巨核球としての性質を持つ培養細胞株UT-7/TPO細胞を用いて、巨核球から巨核球胞体突起および／または血小板への分化を誘導、促進、阻害および／または抑制する因子を同定するための方法を構築した。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

巨核球から血小板への分化を誘導および／または促進する因子の同定方法であって、以下：

- (1) 候補因子を U T - 7 / T P O 細胞に添加する工程、および
- (2) U T - 7 / T P O 細胞が血小板に分化したか否かを判定する工程

を含む方法。

【請求項 2】

請求項 1 に記載の方法によって同定された、巨核球から血小板への分化を誘導および／または促進する因子。

10

【請求項 3】

巨核球から巨核球胞体突起 (p r o p l a t e l e t) への分化を誘導および／または促進する因子の同定方法であって、以下：

- (1) 候補因子を U T - 7 / T P O 細胞に添加する工程、および
- (2) U T - 7 / T P O 細胞が巨核球胞体突起 (p r o p l a t e l e t) に分化したか否かを判定する工程

を含む方法。

【請求項 4】

請求項 3 に記載の方法によって同定された、巨核球から巨核球胞体突起 (p r o p l a t e l e t) への分化を誘導および／または促進する因子。

20

【請求項 5】

巨核球から血小板への分化を阻害および／または抑制する因子の同定方法であって、以下：

- (1) フィブロネクチンおよび候補因子を U T - 7 / T P O 細胞の培養液中に添加する工程、
 - (2) U T - 7 / T P O 細胞から血小板への分化が阻害および／または抑制されたか否かを判定する工程
- を包含する方法。

【請求項 6】

請求項 5 に記載の方法によって同定された、巨核球から血小板への分化を阻害および／または抑制する因子。

30

【請求項 7】

巨核球から巨核球胞体突起 (p r o p l a t e l e t) への分化を阻害および／または抑制する因子の同定方法であって、以下：

- (1) フィブロネクチンおよび候補因子を U T - 7 / T P O 細胞の培養液中に添加する工程、
 - (2) U T - 7 / T P O 細胞から巨核球胞体突起 (p r o p l a t e l e t) への分化が阻害および／または抑制されたか否かを判定する工程
- を包含する方法。

【請求項 8】

請求項 7 に記載の方法によって同定された、巨核球から巨核球胞体突起 (p r o p l a t e l e t) への分化を阻害および／または抑制する因子。

40

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、巨核球 (m e g a k a r y o c y t e) から巨核球胞体突起 (p r o p l a t e l e t) および／または血小板 (p l a t e l e t) への分化を誘導および／または促進する因子の同定方法に関する。また、本発明は、巨核球から巨核球胞体突起 (p r o p l a t e l e t) および／または血小板への分化を阻害および／または抑制する因子の同定方法に関する。また、本発明は、上記の方法を用いて同定された、巨核球から巨核球

50

胞体突起 (prop platelet) および／または血小板への分化に関連する因子に関する。

【背景技術】

【0002】

血小板は、造血幹細胞から巨核球前駆細胞、巨核球（本明細書中、巨核球前駆細胞および巨核球を総称して巨核球系細胞という）、さらに巨核球胞体突起 (prop platelet) に至る種々の分化段階を経る。巨核球の分化および／または成熟の機構は、近年の細胞生物学および分子生物学の進展によって、徐々に解明されつつある。例えば、1994年に同定されたトロンボポエチン (TPO) は、この機構の解明に大きく貢献した。TPOは、巨核球前駆細胞から巨核球に至る分化段階の細胞に作用する、巨核球の産生に必須の可溶性蛋白質である（非特許文献1および2を参照のこと）。しかし、TPOは、巨核球前駆細胞から巨核球になる初期の分化には作用するが、巨核球から血小板が形成される段階には作用しないことが明らかとなり、巨核球から血小板が形成される機構には未だ不明な部分が多く残されている。

10

【0003】

血小板は、傷口の周囲に血栓を形成し止血することが主要な役割である。何らかの理由で血小板数が減少すると止血機構が破綻し出血傾向となる。血小板数の減少と関連する疾患としては、血小板減少症が挙げられる。血小板減少症の原因としては、骨髄における血小板産性の抑制および末梢での血小板の消費が挙げられる。例えば、癌化学療法または放射線療法によって生じる、骨髄での血小板産生の抑制によって引き起こされる血小板減少症の治療方法としては、血小板輸血が挙げられる。しかし、健常人から供給される血液から調製される輸血用血小板は、保存可能期間が短く、調製後の細菌による感染、提供者由来のウィルス感染、および輸血後拒絶反応などの問題点がある。血小板減少症の他の治療方法としては、TPOを用いた方法が挙げられる。TPOは、前臨床試験および臨床試験において、血小板増加作用や癌化学療法剤投与時の血小板減少の改善作用が確認されており、血小板減少症の治療薬の候補と考えられている。しかし、TPOは血小板産生の後期の段階（巨核球から巨核球胞体突起および／または血小板への分化段階）に顕著な活性を示さないので、TPOによる血小板増加は巨核球数の増加に付随して生じるものであり、TPOを用いても血小板のみを増加することはできない。

20

【0004】

一方、血小板数が増加し過ぎると血栓が出来やすい状態となる。血小板の増加と関連する疾患としては、血小板増加症が挙げられる。血小板増加症の治療方法としては、血栓の形成を抑制する治療が挙げられる。血小板増加症は血中の血小板が異常増加している状態であり、原因として、原発性と二次性のものがある。前者では骨髄増殖性疾患（例えば、本態性血小板血症、慢性骨髄性白血病、または特発性骨髄線維症）が原因疾患となる。後者では感染症、悪性腫瘍、薬剤などが原因となる。従って、通常の治療は原疾患の治療が重要であり、対症療法として抗血栓治療が行なわれる。

30

【0005】

上記のような血小板と関連する疾患（例えば、血小板減少症または血小板増加症）の治療剤および／または治療方法の開発には、巨核球系細胞から血小板への分化機構の解明、特に、巨核球から巨核球胞体突起および／または血小板への分化機構の解明が重要である。現在、巨核球から血小板への分化機構、および巨核球から血小板への分化に関与する因子についての報告はほとんどなく、高密度リポ蛋白質 (high density lipoprotein) (HDL) とアンチトロンビン III あるいは C1 インヒビターの複合体がマウス骨髄由来初代培養細胞からの巨核球胞体突起の形成を促進するという報告（非特許文献3）、およびヒトフィブロネクチンがプロテインキナーゼ C (protein kinase C) の活性化剤との併用でヒト巨核球株 CHRK-288 細胞に対して巨核球胞体突起構造の誘導を促進するとの報告（非特許文献4）があるのみである。

40

【0006】

巨核球から血小板への分化を誘導、促進、阻害および／または抑制する生体内因子ある

50

いはそのような機能を持つ低分子化合物がほとんど見つからない原因として、確立された同定方法が極めて少ないことが挙げられる。現在、同定方法の1つとしてマウス骨髄由来の初代培養細胞が用いられている。この同定方法は、動物取り扱いの技術の習得、質の良い骨髄細胞の調製、培養の至適条件の検討、評価に用いるための巨核球への分化条件の検討などに相当の期間を要する。また、同定方法に使用するためには純度の高い巨核球を大量に必要とするが、初代培養細胞は培養細胞株と比較して得られる細胞数が非常に少なく、スクリーニングに必要な細胞数を確保するためには多数の動物が必要になる。このように、上記のマウス骨髄由来の初代培養細胞を用いる方法は、大規模なスクリーニングの実施には不向きである。近年、ヒト臍帯血由来の血球系細胞を用いて巨核球の分化、血小板産生の研究が行なわれるようになってきた。しかしながら、一般の研究者がヒト臍帯血を日常のおよび／または継続的に入手することは困難であり、長期間に及ぶスクリーニングに使用することは不可能である。 10

【0007】

大規模なスクリーニングには、培養細胞株を用いる方法が好都合である。培養細胞株を用いる方法は、入手も取り扱いも上記の初代培養細胞を用いる方法と比較して簡便である。その一方で、培養細胞株を用いる方法は、その細胞株が本来の巨核球および／または血小板の性質を維持しているかを精査する必要がある。巨核球から血小板、特に、巨核球から巨核球胞体突起への移行を示す培養細胞株は、現在ほとんど知られていない。最近、Jiangらは、ヒトフィブロネクチンおよびPMA (Phorbol 12-myristate 13-acetate) の同時添加によって巨核球胞体突起の構造を形成する 20、CHRF-288という細胞株を報告している（非特許文献4を参照のこと）。しかしながら、この細胞株の巨核球胞体突起への構造変化は、マウス骨髄由来の初代培養細胞を用いる方法と比較研究していないので、生体内での血小板産生過程をどれだけ反映しているのかは不明である。また、CHRF-288細胞株は巨核球前駆細胞様であり、巨核球へと成熟させるための操作が必要であり、至適条件の設定の必要性や煩雑さが問題である。また、マウスのES細胞 (embryonic stem cell) を用いて、本来の機能を備えた血小板の産生を誘導することも報告されている（非特許文献5を参照のこと）。しかし、この方法は、分化支持能を持つストローマ細胞株との共培養が必要で手間がかかること、すべてのES細胞が巨核球および／または血小板に分化するわけではなく様々な細胞の集合体となることなどから、スクリーニングへの使用には適していない。 30

【0008】

上記のように、現在色々な方向から血小板産生についての研究がなされているが、未だ、生体内の事象を反映した簡便かつ多検体処理が可能な血小板分化関連因子の同定方法は存在しない。

【0009】

【非特許文献1】de Sauvage et al., Nature, vol. 369, 533-565 (1994)

【非特許文献2】Bartley T. D., et al., Cell, vol. 77, 1117-1124 (1994)

【非特許文献3】Ishida Y. et al., Thromb. Haemost., vol. 85, 349-55. (2001) 40

【非特許文献4】Jiang F. et al., Blood, vol. 99, 3579-3584. (2002)

【非特許文献5】Fujimoto T. T., Blood, vol. 102, 4044-4051, (2003)

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0010】

従って、本発明の課題は、生体事象を反映した多検体処理が可能であり簡便な、巨核球から巨核球胞体突起および／または血小板への分化に関与する因子の同定方法を提供する 50

こと、ならびに、そのような同定方法によって同定された巨核球から巨核球胞体突起および／または血小板への分化に關与する因子を提供することである。

【課題を解決するための手段】

【0011】

本発明者らは上記課題を解決すべく鋭意研究した結果、巨核球としての性質を持つ培養細胞株UT-7/TPO細胞が巨核球から巨核球胞体突起に分化すること、およびその分化機構は生体内事象を反映したものであることを見出した。本発明者らは、この知見に基づき、巨核球から巨核球胞体突起および／または血小板への分化に關与する因子の同定方法を構築し、本発明を完成した。

【0012】

10

すなわち、本発明は、以下からなる。

[1] 巨核球から血小板への分化を誘導および／または促進する因子の同定方法であって、以下：

- (1) 候補因子をUT-7/TPO細胞に添加する工程、および
- (2) UT-7/TPO細胞が血小板に分化したか否かを判定する工程を含む方法、

[2] [1]に記載の方法によって同定された、巨核球から血小板への分化を誘導および／または促進する因子、

[3] 巨核球から巨核球胞体突起 (proplatelet) への分化を誘導および／または促進する因子の同定方法であって、以下：

20

- (1) 候補因子をUT-7/TPO細胞に添加する工程、および
- (2) UT-7/TPO細胞が巨核球胞体突起 (proplatelet) に分化したか否かを判定する工程を含む方法、

[4] [3]に記載の方法によって同定された、巨核球から巨核球胞体突起 (proplatelet) への分化を誘導および／または促進する因子、

[5] 巨核球から血小板への分化を阻害および／または抑制する因子の同定方法であって、以下：

- (1) フィブロネクチンおよび候補因子をUT-7/TPO細胞の培養液中に添加する工程、
- (2) UT-7/TPO細胞から血小板への分化が阻害および／または抑制されたか否かを判定する工程を含む方法、

30

[6] [5]に記載の方法によって同定された、巨核球から血小板への分化を阻害および／または抑制する因子、

[7] 巨核球から巨核球胞体突起 (proplatelet) への分化を阻害および／または抑制する因子の同定方法であって、以下：

- (1) フィブロネクチンおよび候補因子をUT-7/TPO細胞の培養液中に添加する工程、
- (2) UT-7/TPO細胞から巨核球胞体突起 (proplatelet) への分化が阻害および／または抑制されたか否かを判定する工程を含む方法、

40

[8] [7]に記載の方法によって同定された、巨核球から巨核球胞体突起 (proplatelet) への分化を阻害および／または抑制する因子。

【発明の効果】

【0013】

本発明によって、生体事象を反映した多検体処理が可能であり簡便な、巨核球から巨核球胞体突起および／または血小板への分化に關与する因子の同定方法が提供される。また、本発明の同定方法によって、巨核球から血小板への分化に關与する因子の提供が可能となる。

50

【発明を実施するための最良の形態】

【0014】

本発明者らは上記課題を解決すべく、巨核球としての性質を持つ培養細胞株であるUT-7/TPO細胞を用いて巨核球から血小板への分化に関与する因子を同定するための方法を構築した。UT-7/TPO細胞とは、巨核芽球性白血病(megakaryoblastic leukemia)患者から分離されたUT-7細胞の亜株(sub-line)でTPO依存的増殖能および巨核球への分化能を持つ。これまでの詳細な生化学および/または分子生物学的研究により、UT-7/TPO細胞は巨核球前駆細胞および巨核球としての性質を維持していることが明らかとなっている(Komatsu N., et al., Blood, vol. 87, 4552-4560, (1996))。しかし、このUT-7/TPO細胞が巨核球から血小板に分化および/または成熟するか否かは検討されていない。 10

【0015】

本発明者らは、UT-7/TPO細胞は、自然発生的な巨核球胞体突起形成は起こさないが、特定の培養条件において巨核球から巨核球胞体突起への形態変化を示すことを見出した。具体的には、UT-7/TPO細胞は自然発生的な巨核球胞体突起の形成は全く起こさない(すなわち、通常の継代操作および培養操作では巨核球から巨核球胞体突起に変化しない)が、フィブロネクチンを添加した培養条件において巨核球から巨核球胞体突起への分化を示す。

【0016】

さらに、本発明者らは、この形態変化は、生体内事象を反映したものであることを見出した。具体的には、巨核球から巨核球胞体突起への分化に関連する因子の同定において確立された方法であるマウス骨髄細胞由来の初代培養細胞を用いる方法においても、UT-7/TPO細胞において設定された条件と類似の条件下(すなわち、フィブロネクチン添加)で、巨核球から巨核球胞体突起への形態変化が促進されることを見出した。これにより本発明者らは、UT-7/TPO細胞を用いた巨核球から巨核球胞体突起への分化に関連する因子の同定方法が、生体内での巨核球から巨核球胞体突起への分化段階を反映した方法であることを確認した。UT-7/TPO細胞を用いる本発明の方法は、UT-7/TPO細胞の培養に手間がかからないので、多検体を簡便かつ短時間で実施することができる。一般に、インビトロで巨核球を血小板に分化誘導しても巨核球胞体突起までしか分化しないことが知られている。巨核球胞体突起の細胞は血小板の直前段階の細胞であること、および巨核球胞体突起まで誘導できれば血小板までの分化は十分に方向付けられていることから、本発明者らは、UT-7/TPO細胞を用いれば巨核球から巨核球胞体突起への分化に関連する因子だけでなく、巨核球から血小板への分化に関連する因子も同定できると考えている。 30

【0017】

本明細書において、「巨核球前駆細胞」とは、造血幹細胞から、骨髄系前駆細胞を経て、さらに巨核球系細胞へと分化したものである。この巨核球前駆細胞がさらに分化すると巨核球となる。

【0018】

本明細書において、「巨核球」とは、巨核球系前駆細胞がさらに分化したものであり、細胞質の分裂を伴わないDNA合成(endomitosis)によって、核内のDNA量は、8~32Nとなっている。細胞質は広く、ピンク色を呈し、微細なアズール好性顆粒が認められ、大型な細胞で100μmを超えるものもある。分子マーカー的には、CD41陽性である。 40

【0019】

本明細書において、「巨核球胞体突起」とは、血小板の直前段階の細胞を意味する。巨核球胞体突起は、成熟した巨核球が核数の増加を伴わずに変化する、ひも状の構造を特徴とする細胞の形態で、このひも状構造が細かく切断され血小板になると考えられている。

【0020】

本明細書において、「血小板」とは、巨核球が、巨核球胞体突起と呼ばれる形態変化を経て、そのひも状構造の細胞質が断片化されて、形成されたものである。血小板は、止血機構に重要な役割を果たす、核を有しない円盤状の直径2～4 μmの小さな血球成分であり、分子マーカーは、CD41陽性である。

UT-7/TPO細胞とは、巨核芽球性白血病(megakaryoblastic leukemia)患者から分離されたUT-7細胞の亜株である。UT-7/TPO細胞は、文献に記載の方法(Komatsu N., et al., Blood, vol. 87, 4552-4560, (1996))に従ってUT-7細胞にTPOを作用させることによって入手可能である。これまでの詳細な生化学および/または分子生物学的研究により、UT-7/TPO細胞は巨核球前駆細胞および巨核球としての性質を維持していることが明らかとなっている(Komatsu N., et al., Blood, vol. 87, 4552-4560, (1996))。しかし、このUT-7/TPO細胞が巨核球から血小板に分化または成熟するか否かは検討されていない。

【0021】

本発明の方法において、無血清培地に懸濁した細胞を96ウェルプレートなどの培養用プレートに播種し、試験サンプルを添加し37℃でCO₂インキュベータ中で培養する。巨核球から血小板への分化に関与するか否かを試験する候補因子の添加は、細胞の播種の前であっても、播種と同時にであっても、播種の後であってもよいが、好ましくは、細胞の播種と同時にである。培養用プレートはコラーゲンコートをしたものであってもコラーゲンコートをしていないものであってもよいが、コラーゲンコートをした培養用プレートが好ましい。好ましくは約1～6時間、より好ましくは約1～3時間培養した後、細胞の形態変化を観察することによって候補因子の活性を評価する。

【0022】

評価する細胞が巨核球、巨核球胞体突起、または血小板のいずれかであることの判断は、細胞の形態変化によって行なう。巨核球、巨核球胞体突起、または血小板の分化マーカーとして一般に使用されるCD41やフォンビルブランド因子は三者間で共通に発現しており、分化マーカーのみを用いて巨核球、巨核球胞体突起、および血小板を識別することはできず、顕微鏡またはカメラ等による目視が必須である。形態の観察は、細胞を染色せずに実施してもよいし、細胞を染色してから観察してもよいが、細胞を染色してから観察することが好ましい。酵素活性に基づく染色または免疫染色によって細胞の形態をより明確にすることができる。酵素活性に基づく染色としては、例えば、コリンエステラーゼ染色が挙げられる。免疫染色に用いることができる抗体としては、抗CD41抗体、抗フォンビルブランド因子抗体等が挙げられる。以下の実施例にも記載するように、巨核球、巨核球胞体突起または血小板の膜蛋白質特異的マーカーとしてCD41(インテグリンαIIb、GP1Ib)およびフォンビルブランド因子を用い、これらのマーカーの局在性を免疫染色により解析した。これらのマーカーは、巨核球表面にも血小板の膜表面にも局在する。これらのマーカーが、形態変化した巨核球の突起部分にも存在するならば、この突起構造は血小板形成の過程で現れるものと考えられる。

【0023】

本発明者らは、UT-7/TPO細胞がフィブロネクチンの添加により、再現性良く巨核球胞体突起に形態変化することを見出した。フィブロネクチンとしては、哺乳動物由来のフィブロネクチンが挙げられる。ヒト、サル、マウス、ラット、ウサギ、ネコ、イヌ、ウシ、またはウマ由来のフィブロネクチンが好ましく、ヒト由来のフィブロネクチンがより好ましく、ヒト血清由来のフィブロネクチンがさらに好ましい。細胞に添加するフィブロネクチンの濃度としては、好ましくは100 ng/mL～10 μg/mL、より好ましくは250 ng/mL～8 μg/mLである。

【0024】

本発明によって、巨核球から巨核球胞体突起および/または血小板への分化を誘導および/または促進する因子を同定することができる。具体的には、(1) UT-7/TPO細胞に候補因子を添加し、(2) 候補因子を添加したUT-7/TPO細胞が巨核球胞体

突起および／または血小板に形態変化したときに、その候補因子を巨核球から巨核球胞体突起および／または血小板への分化を誘導および／または促進する因子として同定することができる。

【0025】

また、本発明によって、フィブロネクチンを陽性コントロールとして用いて巨核球から巨核球胞体突起および／または血小板への分化を誘導および／または促進する因子を同定することができる。具体的には、(1) 一方のUT-7/TPO細胞にフィブロネクチンを添加し、他方のUT-7/TPO細胞に候補因子を添加し、(2) 候補因子を添加したUT-7/TPO細胞が、フィブロネクチンを添加した細胞と比較して同様に巨核球胞体突起および／または血小板に形態変化したときに、その候補因子を巨核球から巨核球胞体突起および／または血小板への分化を誘導および／または促進する因子として同定することができる。

【0026】

あるいは、フィブロネクチンを用いて、巨核球から巨核球胞体突起および／または血小板への分化を阻害および／または抑制する因子を同定することができる。具体的には、(1) 巨核球から巨核球胞体突起および／または血小板への分化を誘導および／または促進する濃度のフィブロネクチンならびに候補因子をUT-7/TPO細胞に添加し、(2) UT-7/TPO細胞が巨核球のままである場合に、その候補因子を巨核球から巨核球胞体突起および／または血小板への分化を阻害および／または抑制する因子として同定することができる。細胞に添加するフィブロネクチンの濃度としては、好ましくは100 ng/mL～10 μg/mL、より好ましくは250 ng/mL～8 μg/mLである。

【0027】

さらに、フィブロネクチンを用いて、巨核球から巨核球胞体突起および／または血小板への分化をフィブロネクチンと共同して誘導および／または促進する因子を同定することができる。具体的には、(1) (A) 巨核球から巨核球胞体突起および／または血小板への分化は誘導しないが巨核球から巨核球胞体突起および／または血小板への分化を方向付ける濃度のフィブロネクチンと(B) 候補因子を、UT-7/TPO細胞に添加し、(2) そのUT-7/TPO細胞が血小板および／または巨核球胞体突起への分化したときに、その候補因子を、巨核球から血小板および／または巨核球胞体突起への分化をフィブロネクチンと共同して誘導および／または促進する因子として同定することができる。本明細書において、「巨核球から巨核球胞体突起および／または血小板への分化は誘導しないが巨核球から巨核球胞体突起および／または血小板への分化を方向付ける濃度」とは、その濃度のフィブロネクチン単独では巨核球から巨核球胞体突起および／または血小板への分化を誘導も促進もしないが、共同して作用する因子の存在下で巨核球から巨核球胞体突起および／または血小板への分化を誘導および／または促進するようなフィブロネクチンの濃度をいう。巨核球から巨核球胞体突起および／または血小板への分化は誘導しないが巨核球から巨核球胞体突起および／または血小板への分化を方向付けるフィブロネクチンの濃度とは、好ましくは10 ng/mL～125 ng/mLの範囲であり、より好ましくは10 ng/mL～62.5 ng/mLの範囲である。

【0028】

以下、実施例を示してこの発明をさらに詳細かつ具体的に説明するが、この発明は以下の実施例によって限定されるものではない。

【実施例】

【0029】

(実施例1. UT-7/TPO細胞を用いた血小板への分化誘導)

(1. 1. UT-7/TPO細胞を用いた形態変化の誘導)

5% CO₂ インキュベータ中、継代用培地 (Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM) (LIFE TECHNOLOGIES社製) + 10% ウシ胎仔血清 (FBS) (MORGATE社製) + 6 ng/mL TPO (PEPROTECH LTD社製)) を用いて25 cm² フラスコにて

培養したUT-7/TPO細胞の懸濁液（10 mL）を15 mL遠沈管に入れ、約2時間自然沈降させた。上清を7 mL除去後、新たに7 mLの継代用培地を加え、懸濁して細胞数を測定した。約2 mLの細胞懸濁液を、室温にて1,000 rpmで、5分間遠心した。上清を捨て、 2.0×10^5 個/mLになるように形態変化誘導用培地（300 μ g/mL トランスフェリン（LIFE TECHNOLOGIES社製）を含むDulbecco's Modified Eagle's Medium（DMEM）（SIGMA社製））にて細胞を懸濁した。形態変化誘導用培地にて16 μ g/mL フィブロネクチン（CHEMICON社製）溶液を調製した。

【0030】

Collagen Coated Microplate 96-ウェル（旭テクノグラス社製）のウェル中でフィブロネクチン溶液の2倍系列希釈液を作製した。液量は20 μ L/ウェルとし、16 μ g/mLを最高濃度として11段階の希釈を行った。それぞれのウェルに上記の調製した細胞懸濁液20 μ Lを添加して混合後、5% CO₂ インキュベータ中、37℃にて約1時間保温した。各ウェルの容量は40 μ Lで、フィブロネクチンの最終濃度は7.8 ng/mLから8 μ g/mLまでとした。また、20 μ L/ウェルずつの形態変化誘導用培地と細胞懸濁液とを混合したコントロールも用意した。形態変化の割合は顕微鏡観察により評価した。

【0031】

観察された形態変化は、いくつかの特徴があった（図1）。成熟化が進んだと考えられる大型の細胞から比較的高頻度で突起の出現が見られたが、小型の細胞でも形態変化が誘導された。突起構造は細胞からほぼ直線的に伸びる形で出現し、多い場合はひとつの細胞から4～5本現れた（図1、下の矢印で示した細胞）。通常は直線上の突起構造のみが観察されたが、時々突起の中間部付近に節状の円形の構造物が観察された。一本の突起構造からの枝分かれは観察されなかった。形態変化は、突起物の出現が特徴であって、通常細胞自体には大きな変化は伴わないが、特に小型の細胞の場合でまれに細胞側も変化して、全体として紡錘状の形態を示すこともあった（図1、上の矢印で示した細胞）。

【0032】

2本以上の突起が形成されている細胞が鏡検（倍率100倍）一視野あたり平均5以上存在する場合を+、1以上5未満の場合を±、1未満の場合を-として、誘導条件の検討を行った。その結果、コラーゲンコートしたプレート上、フィブロネクチン濃度250 ng/mL以上で形態変化が誘導され、フィブロネクチン濃度4～8 μ g/mLで最も高い効率を得られることがわかった（表1）。形態変化する細胞は、最高で全体の約5%であった。コラーゲンコートしたプレート上で、8 μ g/mL フィブロネクチンの刺激により形態が変化した細胞の例を図1に示した。

【0033】

【表1】

表1 フィブロネクチン(FN)がUT-7/TPOの形態変化に与える影響

FN 濃度 (ng/mL)	8000	4000	2000	1000	500	250	125	62.5
細胞の形態変化	+	+	+	+	+	+	±	-

倍率100倍にて鏡検し、2本以上の突起が形成されている細胞数を測定した。

+: 視野あたり平均5個以上存在する場合

±: 視野あたり平均1個以上5個未満存在する場合

-: 視野あたり平均1個未満存在する場合

【0034】

(1. 2. 形態変化を誘導したUT-7/TPO細胞の抗CD41抗体を用いた免疫染色)

5% CO₂ インキュベータ中、継代用培地（IMDM+10% FBS+6 ng/mL

TPO)を用いて 25 cm^2 フラスコにて培養したUT-7/TPO細胞の懸濁液(10 mL)を15 mL遠沈管に入れ、約2時間自然沈降させた。上清を7 mL除去後、新たに7 mLの継代用培地(IMDM+10% FBS+6 ng/mL TPO)を加え、懸濁して細胞数を測定した。約2 mLの細胞懸濁液を、室温にて1,000 rpmで、5分間遠心した。上清を捨て 3.8×10^5 個/mLになるように、形態変化誘導用培地(300 µg/mL トランスフェリンを含むDMEM)にて調製した。16 µg/mLのフィブロネクチン溶液を、形態変化誘導用培地にて調製した。上記の調製した細胞懸濁液(40 µL)と、調製したフィブロネクチン溶液(40 µL)を混合した。Collagen I Cellware 8-well Culture Slide (Becton Dickinson社製)を用意し、上記の混合液を4ウェルにスポットした。その後5% CO₂ インキュベータ中、37℃にて約1時間保温し、形態変化を誘導させた。

【0035】

形態変化誘導処理を行った細胞を含むCulture Slideに、100 µLの10% ホルマリン溶液を細胞液スポット上に滴下した。室温にて10分間放置し、細胞を固定した。固定後、細胞をPhosphate Buffered Salts (PBS) (TAKARA BIO INC社製)(0.1 mL)で3回洗浄した。0.75% ウシ血清アルブミン(BSA) (LIFE TECHNOLOGIES社製)を含むPBS (100 µL)で、細胞を室温にて約1時間ブロッキングした。ブロッキング後、細胞をPBS (0.1 mL)で3回洗浄し、一次抗体(抗CD41抗体(フナコシ社製)あるいは陰性コントロール用抗体(ノーマルマウスIgG: Santa Cruz社製))を添加した。抗CD41抗体は4滴/ウェル添加し、陰性コントロール用抗体は250倍希釈したものを50 µL/ウェル添加した。約1~1.5時間室温にて放置した。細胞をPBS (0.1 mL)で3回洗浄し、100倍希釈した二次抗体(FITC-ヤギ抗マウスIgG: Santa Cruz社製)を50 µL/ウェル添加した。このCulture Slideをアルミホイルで遮光して、約1~1.5時間室温にて放置した。PBS (0.1 mL)で3回洗浄し、Culture Slideのチャンバーをはずした。VECTASHIELD (VECTOR社製)を1滴/ウェル滴下した。カバーガラスをつけ、トップコートでシールした後、蛍光顕微鏡で鏡検した。鏡検終了後、作製したプレパラートは、アルミホイルで遮光して冷蔵保存した。プレパラート作製後、一週間以内に共焦点レーザー顕微鏡で鏡検した。

【0036】

作製したプレパラートを蛍光顕微鏡で鏡検したところ、抗CD41抗体を添加した細胞のみが染色され、陰性コントロール用抗体を添加した細胞は染色されなかった。さらに、共焦点レーザー顕微鏡で鏡検したところ、抗CD41抗体を添加した細胞では細胞の周縁部と突起部分が顕著に染色されており、陰性コントロール用抗体を添加した細胞では染色が確認されなかった(図2)。

【0037】

(1. 3. 形態変化を誘導したUT-7/TPO細胞の抗フォンビルブランド因子抗体を用いた免疫染色)

5% CO₂ インキュベータ中、継代用培地(IMDM+10% FBS+6 ng/mL TPO)を用いて 25 cm^2 フラスコにて培養したUT-7/TPO細胞の懸濁液(10 mL)を15 mL遠沈管に入れて、約2時間自然沈降させた。上清を7 mL除去後、新たに7 mLの継代用培地(IMDM+10% FBS+6 ng/mL TPO)を加え、懸濁して細胞数を測定した。約2 mLの細胞懸濁液を、室温にて1,000 rpmで、5分間遠心した。上清を捨て 3.8×10^5 個/mLになるように、形態変化誘導用培地(300 mg/mL トランスフェリンを含むDMEM)にて調製した。16 µg/mLのフィブロネクチン溶液を、形態変化誘導用培地にて調製した。上記の調製した細胞懸濁液(40 µL)と、調製したフィブロネクチン溶液(40 µL)を混合した。Collagen I Cellware 8-well Culture Slide (Becton Dickinson社製)を用意し、上記の混合液を4ウェルにスポットした。その後5

% CO₂ インキュベータ中、37℃にて約1時間保温し、形態変化を誘導させた。

【0038】

形態変化誘導処理を行った細胞を含むCulture Slideに、100μLの10%ホルマリン溶液を細胞液スポット上に滴下した。室温にて10分間放置し、細胞を固定した。固定後、PBS(0.1mL)で3回洗浄した。0.75% BSAを含むPBS(100μL)で、室温にて約1時間ブロッキングした。ブロッキング後、細胞をPBS(0.1mL)で3回洗浄し、一次抗体{抗フォンビルブランド因子抗体(Santa Cruz社製)あるいは陰性コントロール用抗体(ノーマルヤギIgG: Santa Cruz社製)}を添加した。抗フォンビルブランド因子抗体は100倍希釈したものを50μL/ウェル添加し、陰性コントロール用抗体は250倍希釈したものを50μL/ウェル添加した。約1~1.5時間室温にて放置した。細胞をPBS(0.1mL)で3回洗浄し、100倍希釈した二次抗体(FITC-ロバ抗ヤギIgG: Santa Cruz社製)を50μL/ウェル添加した。このCulture Slideをアルミホイルで遮光して、約1~1.5時間室温にて放置した。細胞をPBS(0.1mL)で3回洗浄し、Culture Slideのチャンバーをはずした。VECTASHIELD(VECTOR社製)を1滴/ウェル滴下した。カバーガラスをつけ、トップコートでシールした後、蛍光顕微鏡で鏡検した。鏡検終了後、作製したプレパラートは、アルミホイルで遮光して冷蔵保存した。プレパラート作製後、一週間以内に共焦点レーザー顕微鏡で鏡検した。

【0039】

作製したプレパラートを蛍光顕微鏡で鏡検したところ、抗フォンビルブランド因子抗体を添加した細胞のみが染色され、陰性コントロール用抗体を添加した細胞は染色されなかった。さらに、共焦点レーザー顕微鏡で鏡検したところ、抗フォンビルブランド因子抗体を添加した細胞では周縁部と突起部分が顕著に染色されており、陰性コントロール用抗体を添加した細胞は染色されなかった(図3)。

【0040】

免疫染色したサンプルを共焦点レーザー顕微鏡で観察した実験によって、抗CD41抗体および抗フォンビルブランド因子抗体が細胞表面および突起部分に特異的に結合することが明らかになった(図2および3)。これは、フィブロネクチンによって分化を誘導したUT-7/TPO細胞の細胞表面および突起部分に血小板のマーカー蛋白質であるCD41およびフォンビルブランド因子が発現していることを示す。一方、コントロール抗体ではシグナルはほとんど検出されなかった。また、正常の巨核球がポリリジンプレート上に接着する際に生じる糸状偽足(filopodia)の中にはフォンビルブランド因子は存在しないことが報告されているので、この突起が接着に関係したものである可能性は低い。従って、本実施例の結果は、UT-7/TPO細胞の形態変化(突起形成)がヒトの巨核球から血小板形成への分化によるものであることを示唆する。

【0041】

(実施例2. マウス骨髄由来巨核球細胞を用いた血小板への分化誘導)

実施例1のUT-7/TPO細胞を用いる方法が妥当であるか否かを検討するために、巨核球から血小板への分化および/または誘導の研究において確立されているマウス骨髄由来巨核球を用いて、本質的に実施例1と同様の実験を行い比較検討した。

【0042】

(2. 1. マウス骨髄由来巨核球細胞を用いた巨核球胞体突起の形成)

まず、マウス骨髄を採取し、培養するために以下の操作を行なった。1回のマウス骨髄採取につき、ddyマウス(日本SLC、5週齢以上)10匹を準備し、その体重を測定した。ddyマウス1匹あたり、大腿骨を2本摘出し、PBS(TAKARA BIO INC社製)(20mL入りのシャーレ(旭テクノグラス社製)内へ湿保存した。全10匹のマウス大腿骨を採取後、それに付随している肉片をおおまかにトリミングした。このときPBS(-)20mL入りのシャーレは、適宜新たなものに交換し、できるだけ大腿骨以外のもの例えば肉片や体毛を、次のステージに持ち越さないようにした。続いて滅菌

したキムワイプなどを用い、大腿骨に付随する肉片をさらにトリミングした。大腿骨の両端をダイヤモンド刃付きの動物解剖用ハサミにてカット後、HBSS (－) (Hanks' Balanced Salt Solution, LIFE TECHNOLOGIES 社製) (20 mL 入りシャーレ内で、25 G×1 針付き 1 mL シリンジ (ともにテルモ社製) を用い、HBSS (－) にてサスペンドするようにして骨髓を採取した。骨髓採取後、その細胞懸濁液 20 mL を 50 mL 遠沈管へ移した。シャーレをさらに HBSS (－) 5 mL で洗い込みをし、その細胞懸濁液を先の 50 mL 遠沈管へと移した。50 mL 遠沈管内の約 25 mL の細胞懸濁液を、軽く均一にサスペンドした後、10 分間静置した。10 分後、50 mL 遠沈管内の上清を回収して、細胞をカウントした。細胞をカウント後、上記上清を室温にて 1,000 rpm で、5 分間遠心した。遠心終了後、沈殿物を巨核球増殖培地 (IMDM + 10% FBS + 10 ng/mL TPO) 20 mL にてサスペンドした。培養には、浮遊細胞用 75 cm² フラスコ (住友ベークライト社製) を用いることとし、8 個用意した。そして 75 cm² フラスコ 1 個あたり、先の細胞懸濁液 2.5 mL と巨核球増殖培地 17.5 mL を混合し、5% CO₂ インキュベータ中、37℃ にて 5 日間培養した。

【0043】

次に、マウス骨髓由来巨核球を選択的に培養するために以下の操作を行なった。上記のように、5% CO₂ インキュベータ中、75 cm² フラスコにて 5 日間培養したマウス骨髓細胞 (20 mL) を 8 個用意し、その骨髓細胞培養液を、50 mL 遠沈管 4 本へ移した (約 40 mL×4 本)。そして室温にて 1,000 rpm で、5 分間遠心した。遠心終了後、沈殿物を巨核球誘導培地 (IMDM + 10 ng/mL TPO + 10 µg/mL インシュリン (和光純薬社製) + 5 µg/mL トランスフェリン + 0.1% BSA) 40 mL にてサスペンドした (遠沈管 1 本あたり 10 mL とした)。培養は、浮遊細胞用 25 cm² フラスコ (住友ベークライト社製) を用いることとし、8 個用意した。そして 25 cm² フラスコ 1 個あたり、先の細胞懸濁液 5 mL を分注し、5% CO₂ インキュベータ中、37℃ にて 2 日間培養した。

【0044】

次いで、マウス骨髓由来巨核球を調製するために以下の操作を行なった。上記のように、5% CO₂ インキュベータ中、25 cm² フラスコにて 2 日間培養したマウス骨髓細胞 (5 mL) を 8 個用意し、その骨髓細胞培養液を、15 mL 遠沈管 4 本へ移し (約 10 mL×4 本)、1 時間静置させ、細胞を自然沈降させた。1 時間の自然沈降後、15 mL 遠沈管の下部 2.0 mL を採取した (2.0 mL×4 本)。新たに 15 mL 遠沈管を 2 本用意し、各 1 本ずつその底部から 16% BSA/HBSS (－) 1.5 mL、4% BSA/HBSS (－) 3.0 mL、2% BSA/HBSS (－) 1.5 mL、そして最上段に自然沈降を終えたサンプル 4.0 mL を静かに重層し、1 時間静置させ、BSA/HBSS (－) 密度勾配沈降法を行った。上記のように 1 時間の BSA/HBSS (－) 密度勾配沈降法を実施した後、15 mL 遠沈管各 1 本ずつより下部 2.0 mL を採取した。続いて、2 本の遠沈管内の細胞溶液を 1 本にまとめた (2.0 mL×2 本を 4.0 mL へ)。さらに IMDM 6.0 mL を加え、軽くサスペンドし室温にて 1,000 rpm で、5 分間遠心することによって、選択的に培養したマウス骨髓由来巨核球を回収した。遠心終了後、沈殿物 (マウス骨髓由来巨核球) を、巨核球突起形成培地 (IMDM + 10 µg/mL インシュリン + 5 µg/mL トランスフェリン + 10 ng/mL IL-6 (upstate 社製) + 20 µM 硫酸亜鉛 (和光純薬社製) + 0.1% BSA) 1.0 mL にてサスペンドし、細胞をカウントした。細胞をカウントした後、実験の目的に応じた細胞溶液濃度に、巨核球突起形成培地を用い希釈した。これによって回収したマウス骨髓由来巨核球を実験の目的に応じた細胞溶液濃度に調製した。

【0045】

上記のように調製したマウス骨髓由来巨核球を用いて、以下のような巨核球胞体突起細胞への分化を調べた。上記の調製した巨核球を Collagen Coated Microplate 96-well (旭テクノグラス社製) へ 700 細胞/ウェルで播種し

た。液量は、 $75\mu\text{L}$ ／ウェルとした。巨核球突起形成培地を用いてフィブロネクチン溶液を作製し、 $512\mu\text{g}/\text{mL}$ を最高濃度として $8\mu\text{g}/\text{mL}$ まで7段階の2倍系列希釈液を作製した。上記の細胞を播種したそれぞれのウェルに、上記で調製したフィブロネクチン溶液 $25\mu\text{L}$ を添加して混合後、5% CO_2 インキュベータ中、 37°C にて培養を開始した。各ウェルの容量は $100\mu\text{L}$ で、フィブロネクチンの最終濃度は $2\mu\text{g}/\text{mL}$ から $128\mu\text{g}/\text{mL}$ までとした。またコントロールとして、巨核球突起形成培地のみを添加して混合したサンプルも用意した。

【0046】

1日間の培養後、倒立顕微鏡 *Leica DMIL*にて鏡検し、ウェルあたりの巨核球胞体突起数を計測した。図4に誘導された巨核球胞体突起細胞の形態を示す。また、図5 10
にフィブロネクチンの濃度と誘導された巨核球胞体突起様細胞の数との関係を示した。

【0047】

マウス骨髄由来巨核球を用いた場合も、フィブロネクチンによって巨核球胞体突起細胞への形態変化が観察された（図4および5）。

【0048】

本実施例において、フィブロネクチンを添加した *UT-7/TPO* 細胞の形態変化（実施例1）は、フィブロネクチンを添加したマウス骨髄由来巨核球の形態変化（実施例2）と同様の变化であったことが実証された。上記にも説明したように、マウス骨髄由来巨核球細胞は、巨核球から血小板への分化誘導の研究において頻繁に使用されている細胞である。信頼性のあるマウス骨髄由来巨核球細胞を用いる方法と同様の分化形態を示すことから、*UT-7/TPO* 細胞を用いる方法も巨核球から血小板への分化プロセスを反映した方法であるといえる。さらに、*UT-7/TPO* 細胞は自然発生的な巨核球胞体突起形成を起こさないので実験に使用し易く、巨核球から血小板へ分化を誘導、促進、阻害、または抑制する因子の同定に好適であるといえる。 20

【図面の簡単な説明】

【0049】

【図1】図1は、フィブロネクチン刺激により *UT-7/TPO* 細胞に認められる突起状形態変化を示す。A. フィブロネクチン非添加。B. $8\mu\text{g}/\text{mL}$ のフィブロネクチンを添加した際の細胞の形態。矢印は典型的な形態変化を起こした細胞を示す。

【図2】図2は、フィブロネクチン刺激により形態変化した *UT-7/TPO* 細胞における *CD41* の局在性を示す。二次抗体に *FITC*-ヤギ抗マウス *IgG* を用い、共焦点レーザー顕微鏡にて鏡検した。A：一次抗体は、抗 *CD41* 抗体を用いた。B：一次抗体は、陰性コントロール用抗体（ノーマルマウス *IgG*）を用いた。 30

【図3】図3は、フィブロネクチン刺激により形態変化した *UT-7/TPO* 細胞におけるフォンビルブランド因子の局在性を示す。二次抗体に *FITC*-ロバ抗ヤギ *IgG* を用い、共焦点レーザー顕微鏡にて鏡検した。A：一次抗体は、抗フォンビルブランド因子抗体を用いた。B：一次抗体は、陰性コントロール用抗体（ノーマルヤギ *IgG*）を用いた。

【図4】図4は、マウス骨髄細胞由来巨核球からフィブロネクチンによって誘導された巨核球胞体突起細胞の形態を示す。フィブロネクチン含有培地中で一晚培養した巨核球の形態を顕微鏡により観察した。巨核球胞体突起に特徴的なひも状構造が観察された。1～3. フィブロネクチンの添加によって巨核球胞体突起形態変化を起こした細胞。1～3は各々、同一条件下での細胞である。4. フィブロネクチン非存在下で培養したコントロール細胞（巨核球）。 40

【図5】図5は、フィブロネクチンがマウス骨髄細胞由来巨核球から巨核球胞体突起細胞への分化に与える効果を示す。*ddy* マウス大腿骨由来骨髄細胞から成熟させた巨核球（700細胞／ウェル／96ウェルプレート）を、種々の濃度のフィブロネクチンを含む培地中で96ウェルプレートを用いて一晚培養した後、巨核球胞体突起形態変化を起こした細胞数を測定した。各濃度3連にて実験を行い、平均値を示した。エラーバーは標準偏差を示す。縦軸はウェルあたりの巨核球胞体突起細胞の数を示し、横軸はフィブロネクチン 50

の濃度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$) を示す。

【図 1】

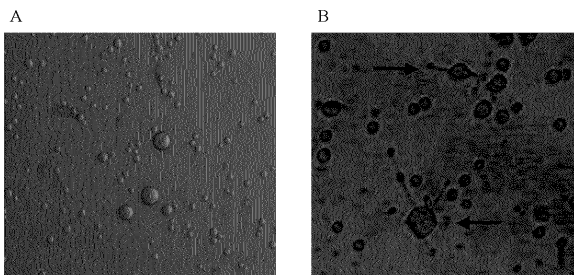


図 1 フィブロネクチン刺激によりUT-7/TPOに認められる突起状態変化
A: 形態変化誘導前
B: 形態変化誘導後(矢印は、典型的な形態変化した細胞を示す。)

【図 2】

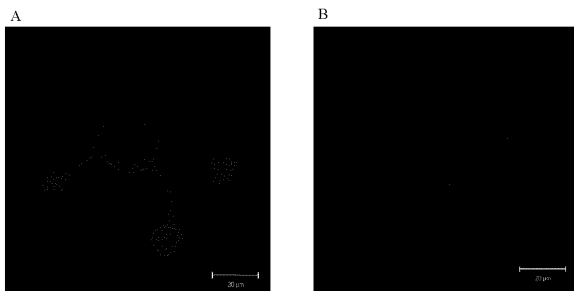


図2 フィブロネクチン刺激により形態変化したUT-7/TPOにおけるCD41の局在性
二次抗体にFITC-goat anti-mouse IgG を用い、共焦点レーザー顕微鏡にて鏡検した。
A: 一次抗体は、抗CD41抗体
B: 一次抗体は、陰性コントロール用抗体 (normal mouse IgG)

【図 3】

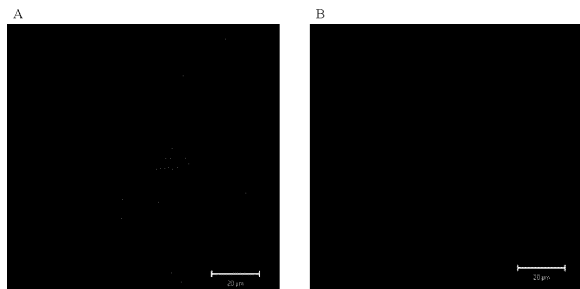
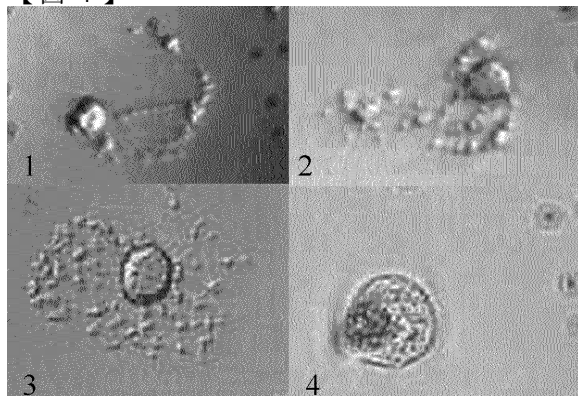
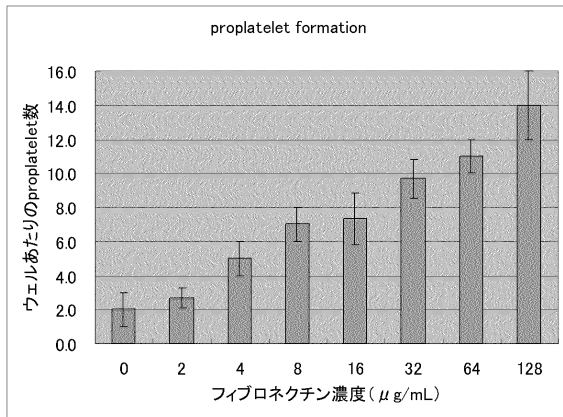


図3 フィブロネクチン刺激により形態変化したUT-7/TPOにおけるvon Willebrand Factor の局在性
二次抗体にFITC-donkey anti-goat IgG を用い、共焦点レーザー顕微鏡にて鏡検した。
A: 一次抗体は、抗 von Willebrand Factor 抗体
B: 一次抗体は、陰性コントロール用抗体 (normal goat IgG)

【図 4】



【図 5】



フロントページの続き

Fターム(参考) 4B063 QA01 QA18 QQ08 QQ20 QR41 QR48 QR69 QR77 QS24 QS28
QS36 QX01