

# iPS血小板

## iPLAT1試験から第2世代製剤の開発へ



京都大学 iPS細胞研究所(江藤研究室)

杉本直志



# 2025年 ～輸血成功200周年～

Special Issue Articles

## James Blundell, Obstetrical Hemorrhage, and the Origins of Transfusion Medicine

Sunny Dzik \*

*Blood Transfusion Service, Massachusetts General Hospital, Boston, MA*



James Blundell  
(1790-1878)



輸血用注射器

**1818** James Blundell: 初期的成功

**1825** Blundell, Waller, Doubleday

産科出血4症例への全血輸血で長期生存

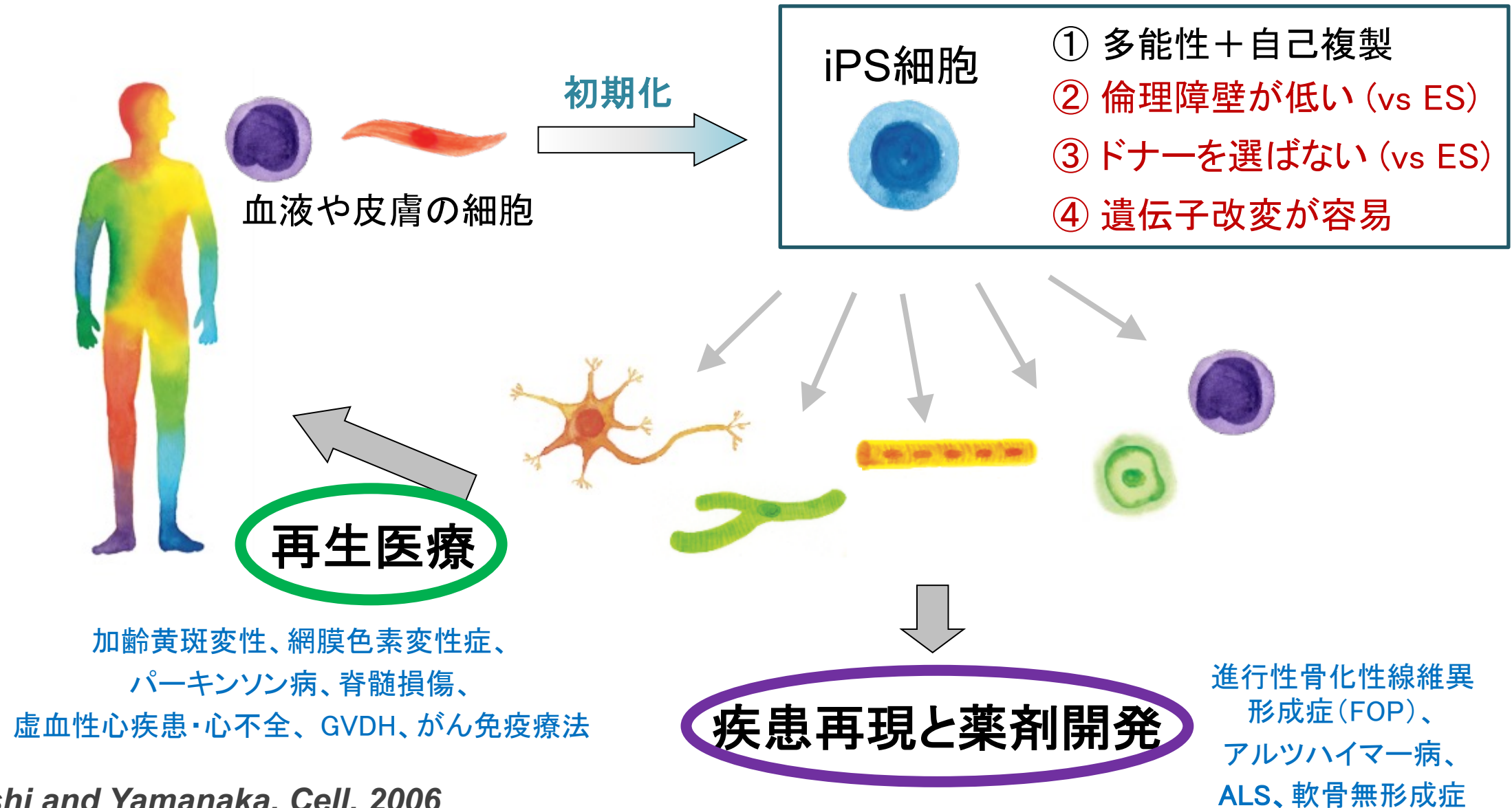
症例1 120mL -

症例2 240mL 30yo F

症例3 420mL 29yo F

症例4 350mL -

# iPS細胞の臨床応用



Takahashi and Yamanaka. *Cell*. 2006  
Takahashi et al. *Cell*. 2007

# 血小板輸血をとりまく社会環境と課題



## 献血血小板

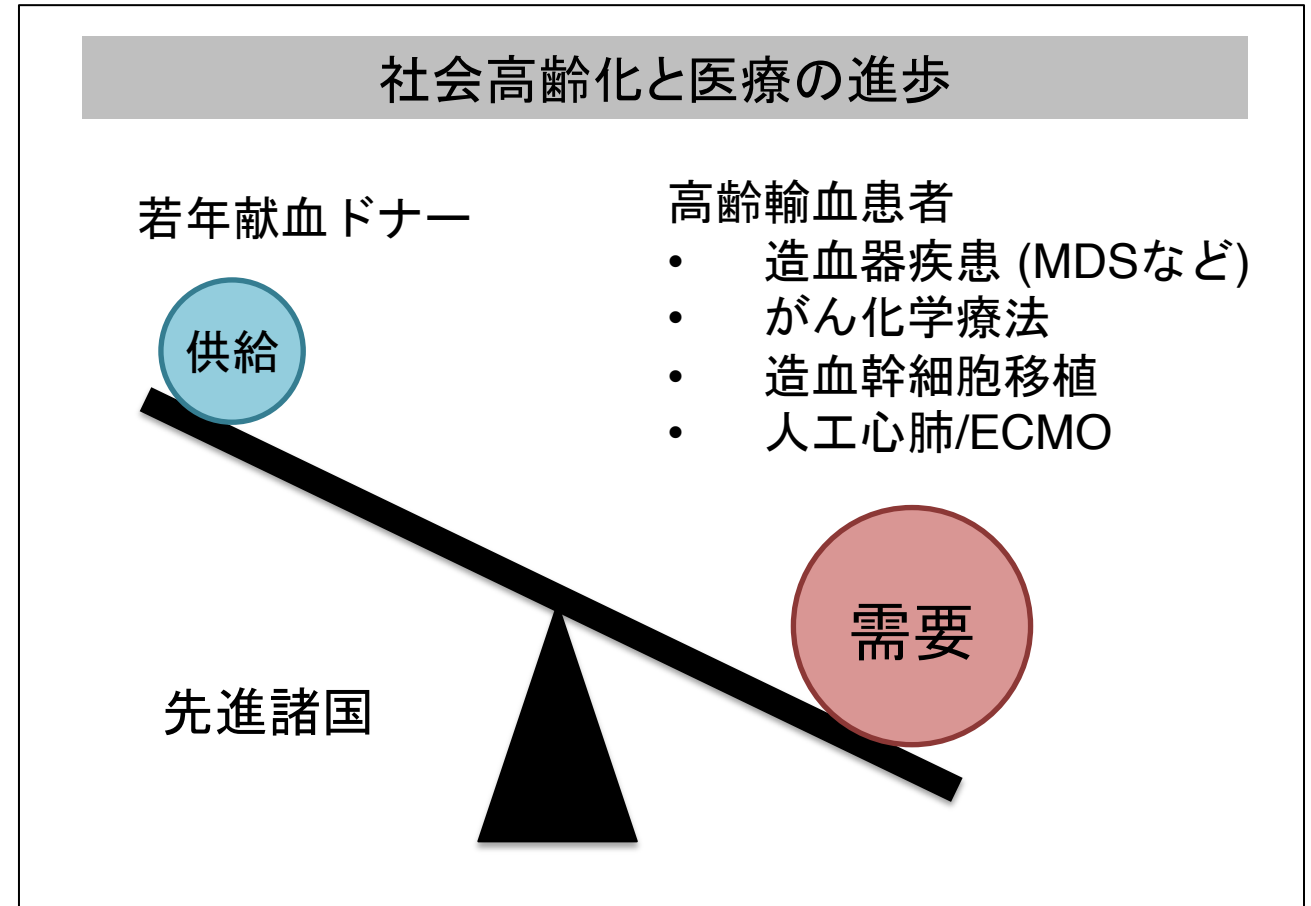
確立した供給システム  
高い安全性

### 供給不安リスク

- ・短い有効期限(4-5日)
- ・悪天候、長期休暇
- ・災害/パンデミック
- ・社会高齢化

輸血感染症  
(ウイルス、細菌)

血小板輸血不応症  
(同種免疫性)



iPS血小板により解決可能か？

# iPS細胞からの血小板造血

輸血に必要な1000億( $10^{11}$ )の血小板をいかに製造するか？

# 100年前の血小板のトピック

- 血小板は赤血球の前駆細胞なのか
- 血小板は生きてる細胞なのか
- 血小板は赤血球や白血球、血管内皮由来なのか、あるいは巨核球由来なのか



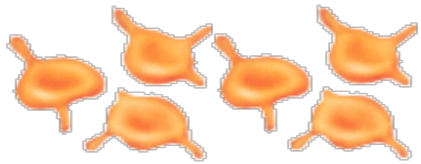
## ネコの脾臓の観察

1. 巨核球の血管周囲への局在
2. 血管内腔への偽足の伸長
3. 時に細胞全体の移行
4. 血小板は巨核球に接触した血漿成分から生成 (!?)

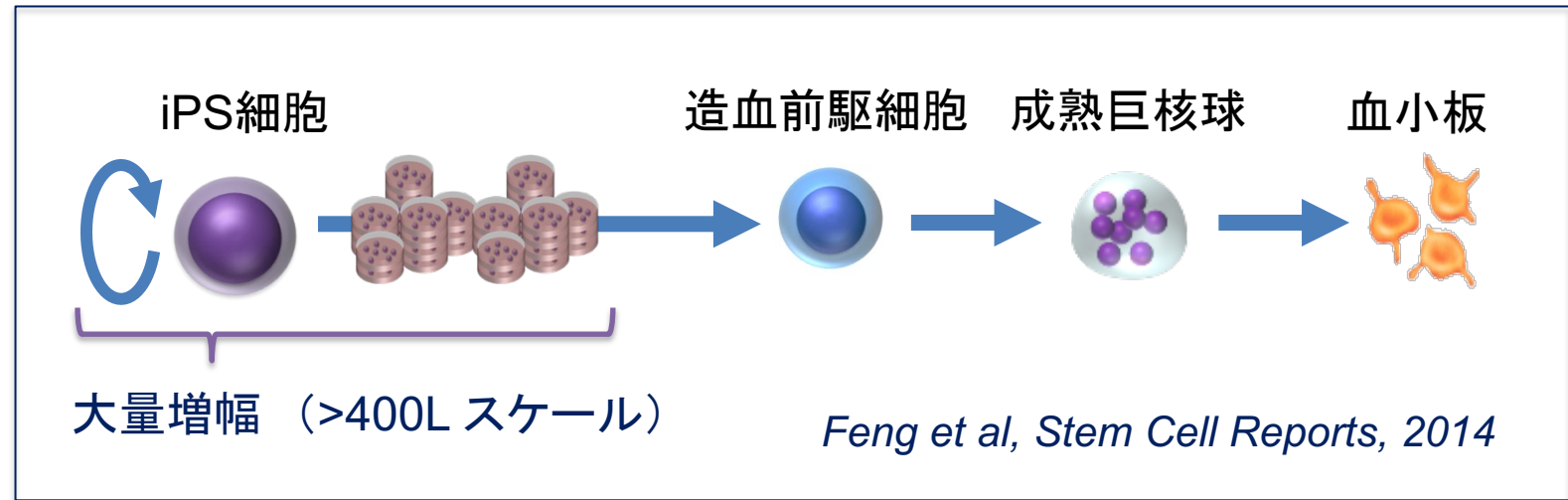
*Demel AC, Haematologica, 1923*  
*Balduini CL, Haematologica, 2020*

# iPS細胞をマスターセルとする製造方法

1回の輸血に必要な血小板数  
(繰り返し必要)



10単位 ( $2 \times 10^{11}$ 個)



他のiPS細胞からの再生医療研究例

網膜色素上皮細胞  $10^4$ 個(理研)

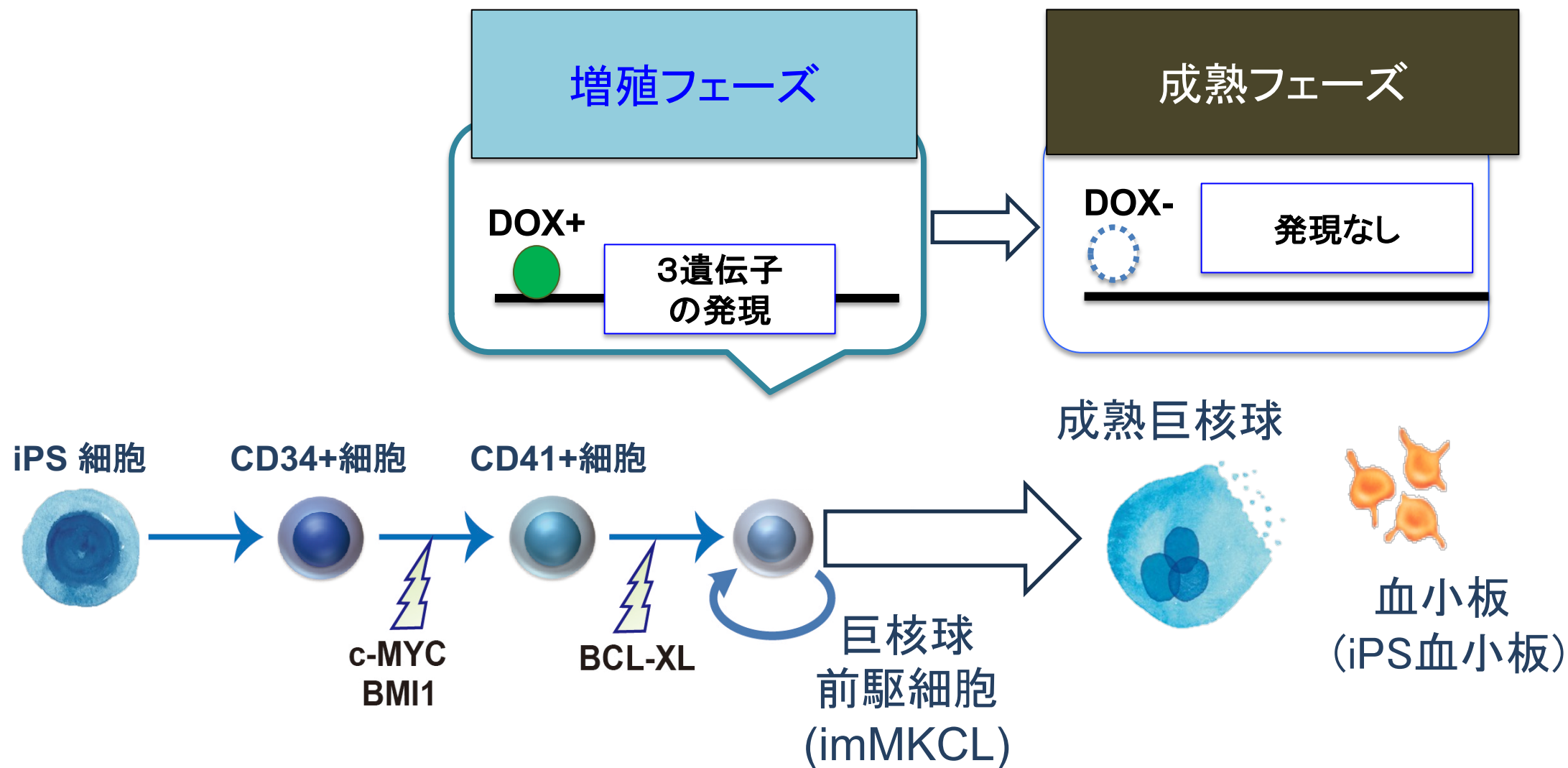
ドパミン産生細胞  $10^6$ 個(京大)

心筋細胞  $10^8$ 個(阪大)

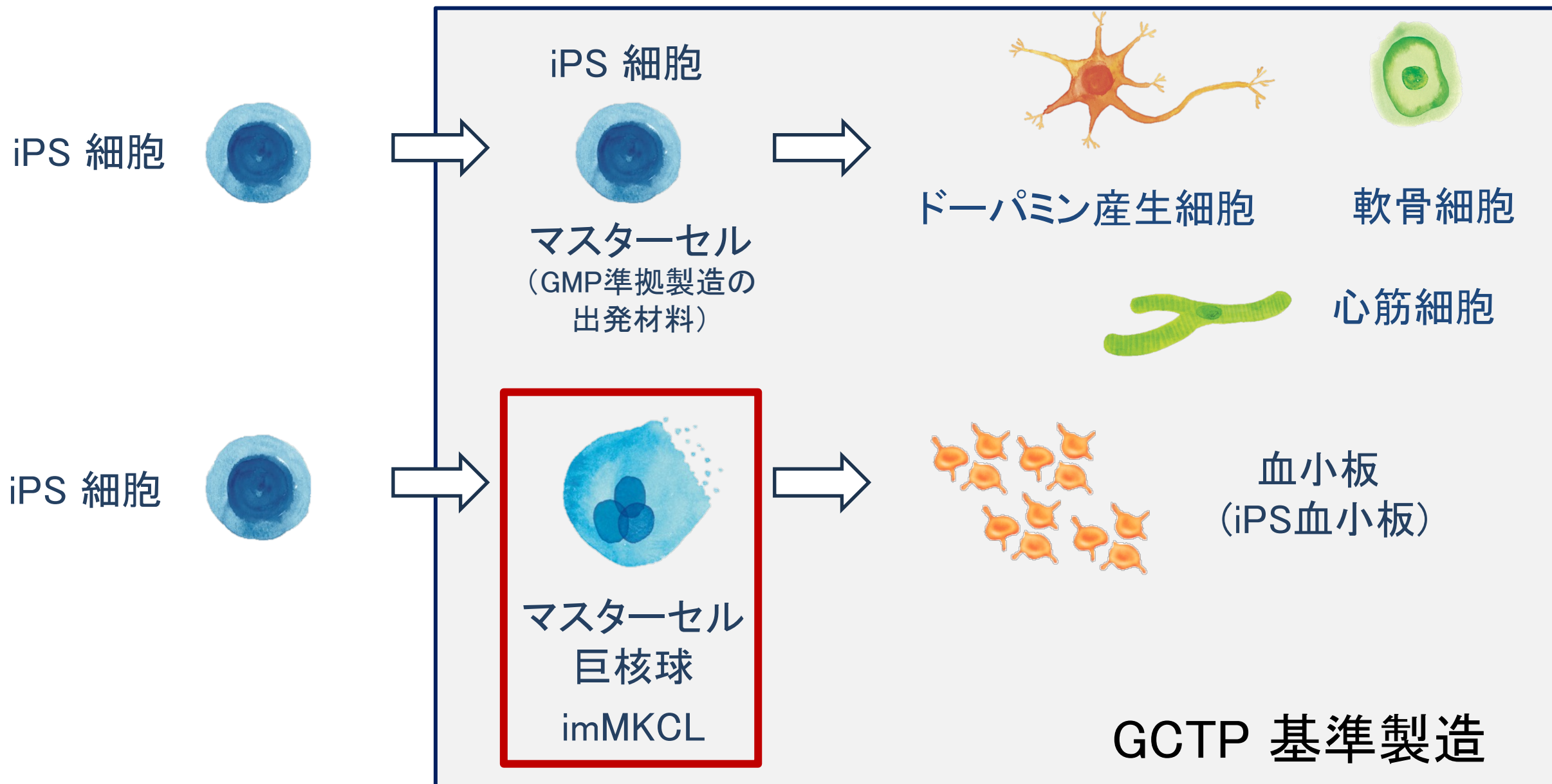
$5 \times 10^7$ 個(慶應大)

製造工程が長く非効率  
労力とコストが過大  
一定品質維持が困難

# Key Technology 1 ~ imMKCLシステムの構築

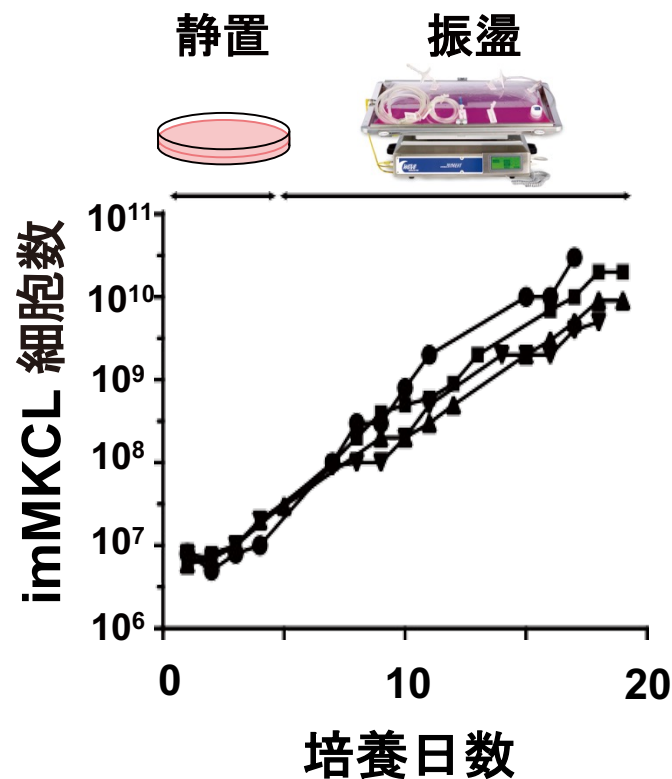


# imMKCL = マスターセル



# 化合物カクテル添加によるimMKCL培養

## 増幅ステージ



## 増幅

Dox-ON (~20日)

**Cocktail A**  
SCF  
TA-316  
Doxycycline

**TA-316** TPO様作用薬

## 血小板生成

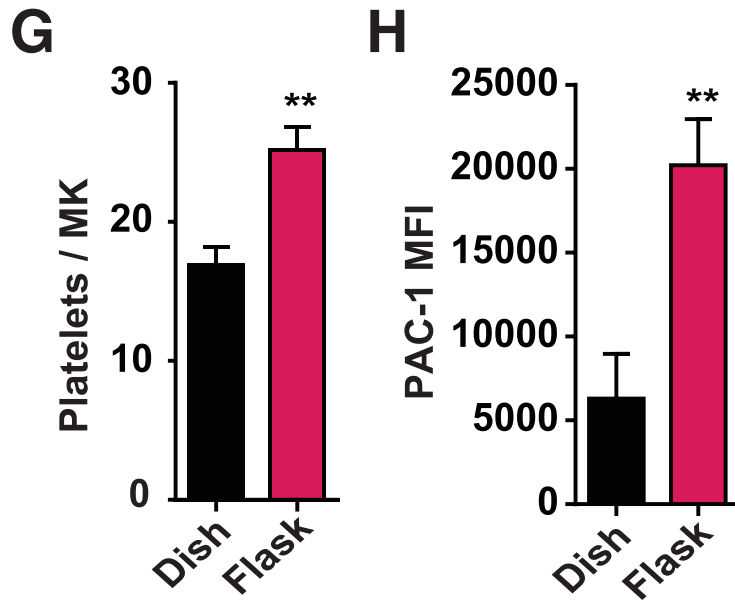
Dox-OFF (6日)

**Cocktail B**  
SCF, TA-316  
AhR競合剤  
ROCK阻害剤, KP-457

**KP-457** ADAM17阻害薬  
(CD42b/GPIbαの切断阻止)

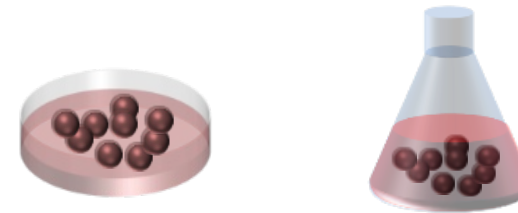
フィーダーフリーでの  
増幅から成熟までを実現

# 血小板産生における振盪の重要性



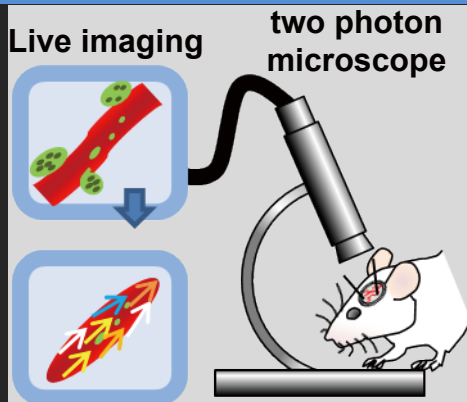
## フラスコ振盪培養条件

- 血小板産生が高い
- 血小板の活性化能が高い。

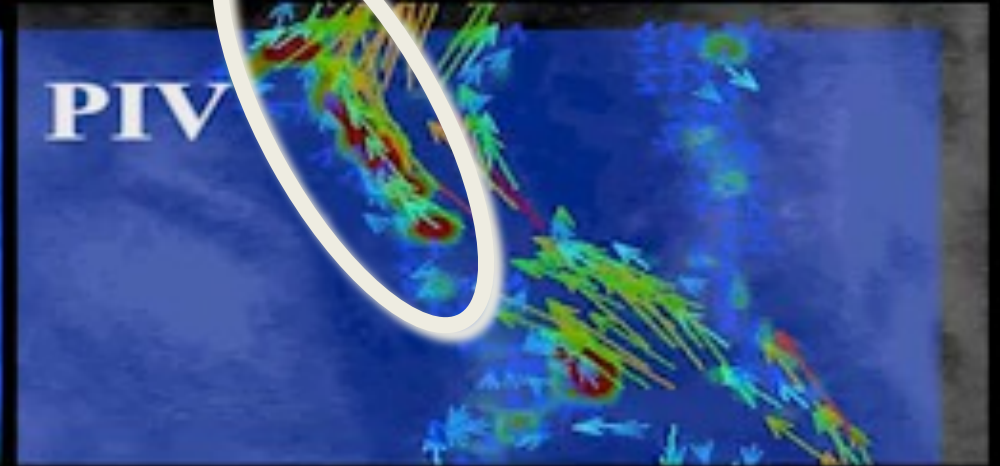
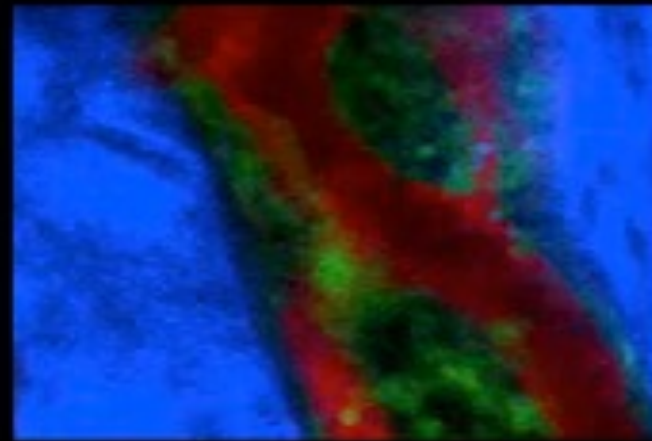
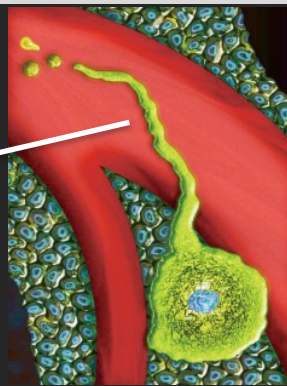


# 生体の血小板産生に乱流が関与

生体内分子イメージング  
＋粒子画像流速測定法(PIV)



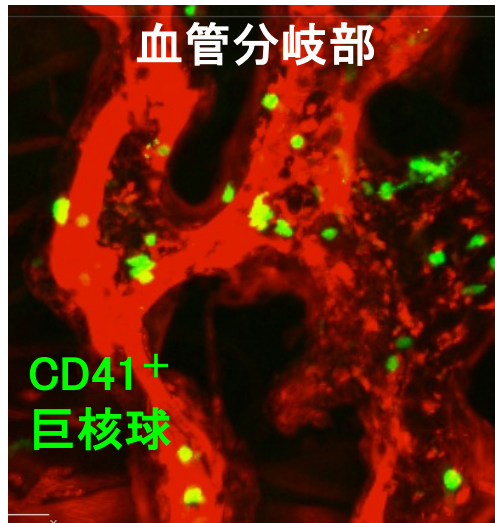
血小板  
前駆体



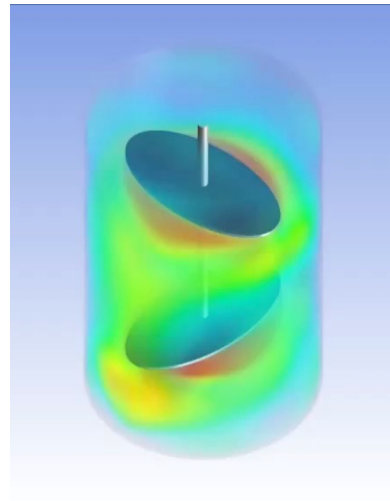
血小板前駆体は乱流が生じる部位に形成  
(乱流が血小板生成に重要)

# Key Technology 2 ～ 乱流型バイオリアクター

マウス骨髄血管

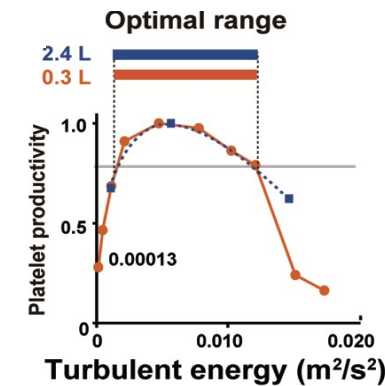


乱流発生培養槽

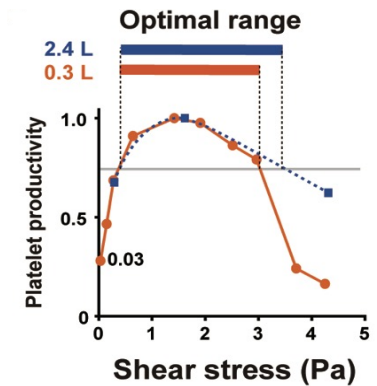


パラメーター同定

乱流エネルギー



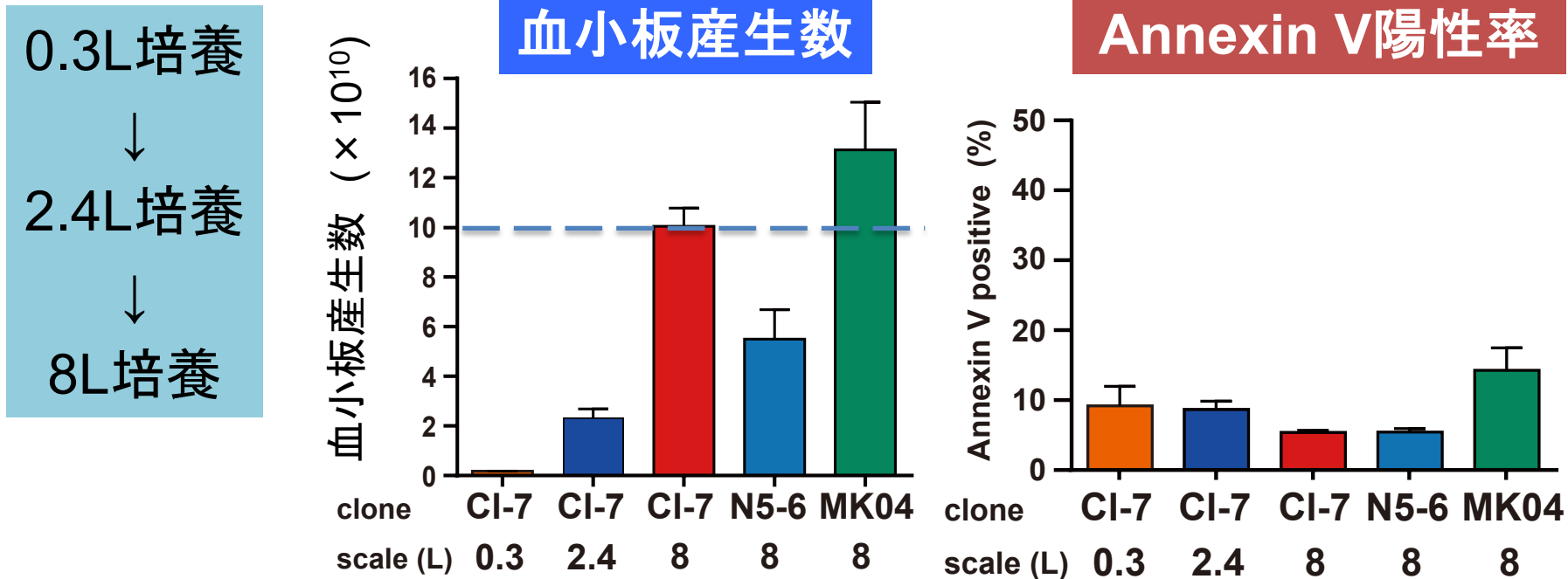
せん断応力



Nishimura et al., *J Cell Biol*, 2015  
Ito & Nakamura et al., *Cell*, 2018

Ito & Nakamura et al., *Cell*, 2018

# 乱流エネルギーとせん断応力の最適条件でのスケールアップ製造

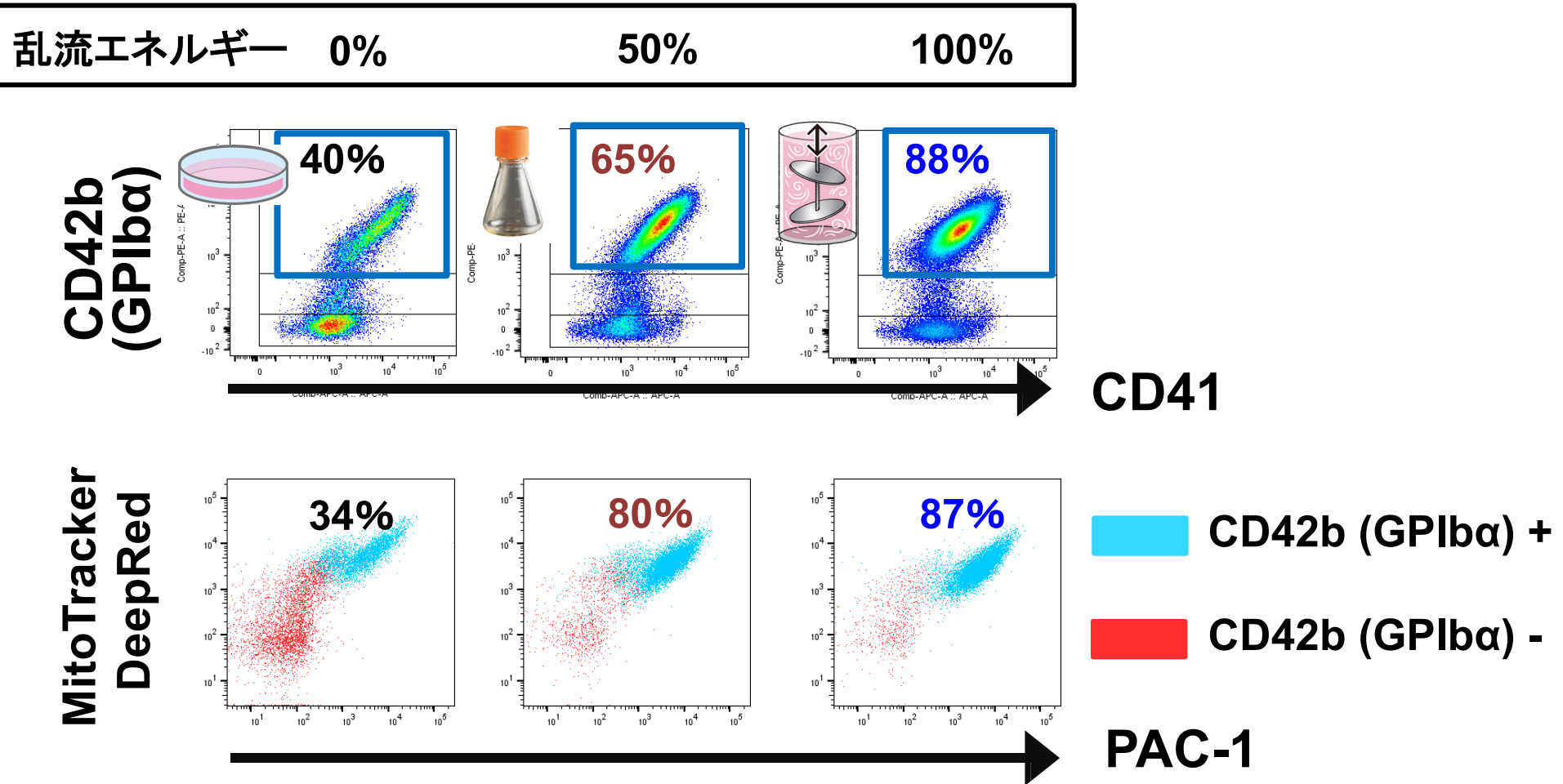


8Lスケールで5単位相当の良質な血小板を産生

# (血小板製造の)北風と太陽

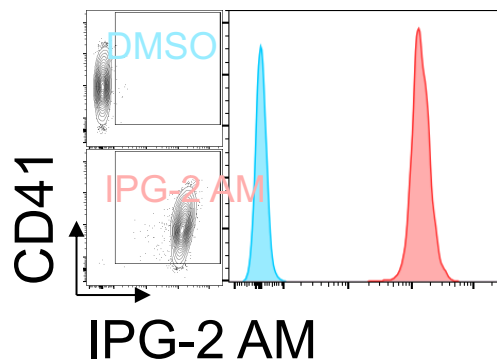


# 乱流刺激に伴い製造される血小板の品質・ミトコンドリア含有量が変化

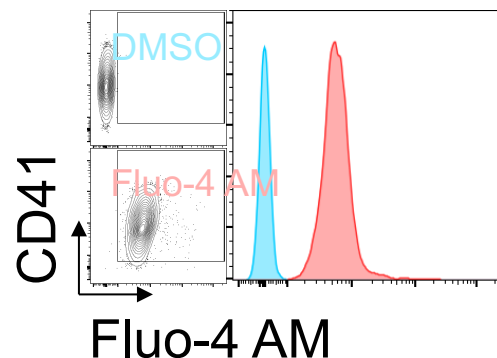


# imMKCL成熟にはKイオンの変動が重要？

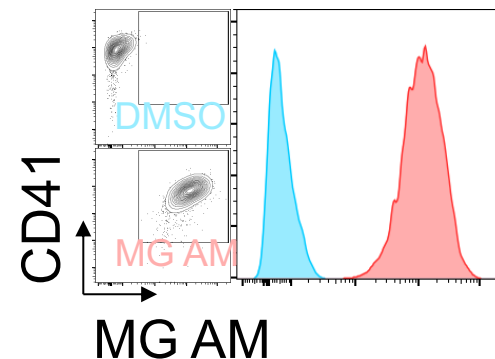
## K<sup>+</sup> indicator



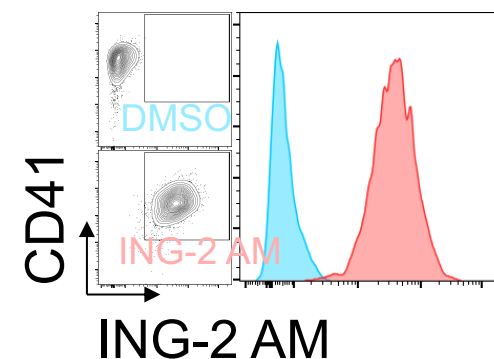
## Ca<sup>2+</sup> indicator



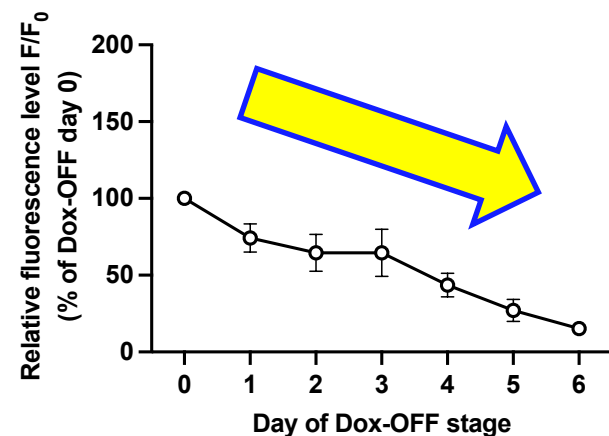
## Mg<sup>2+</sup> indicator



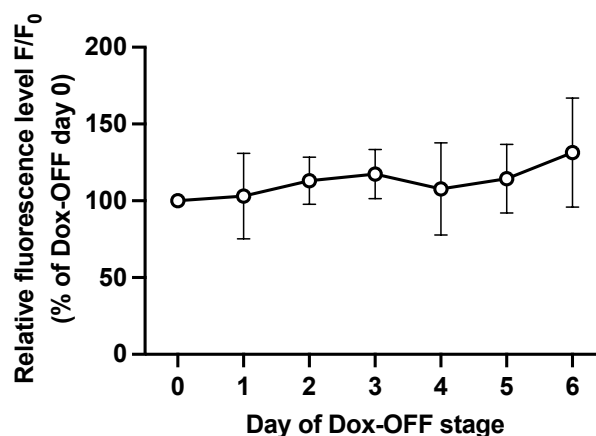
## Na<sup>+</sup> indicator



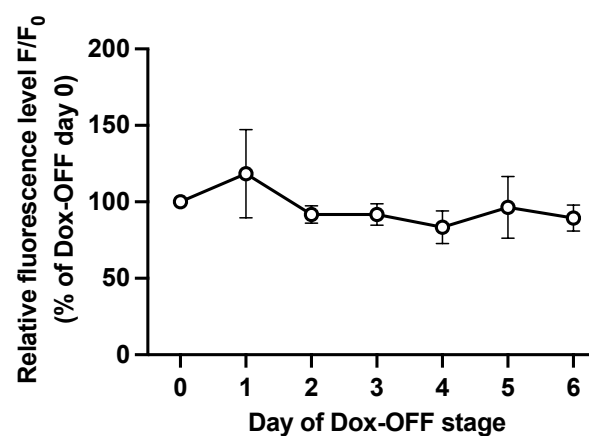
[K<sup>+</sup>]<sub>i</sub>



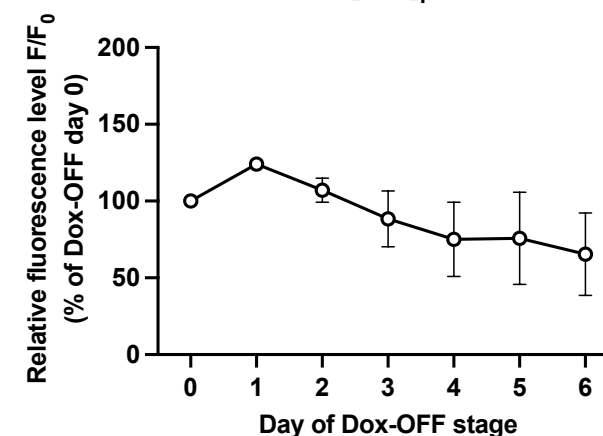
[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>



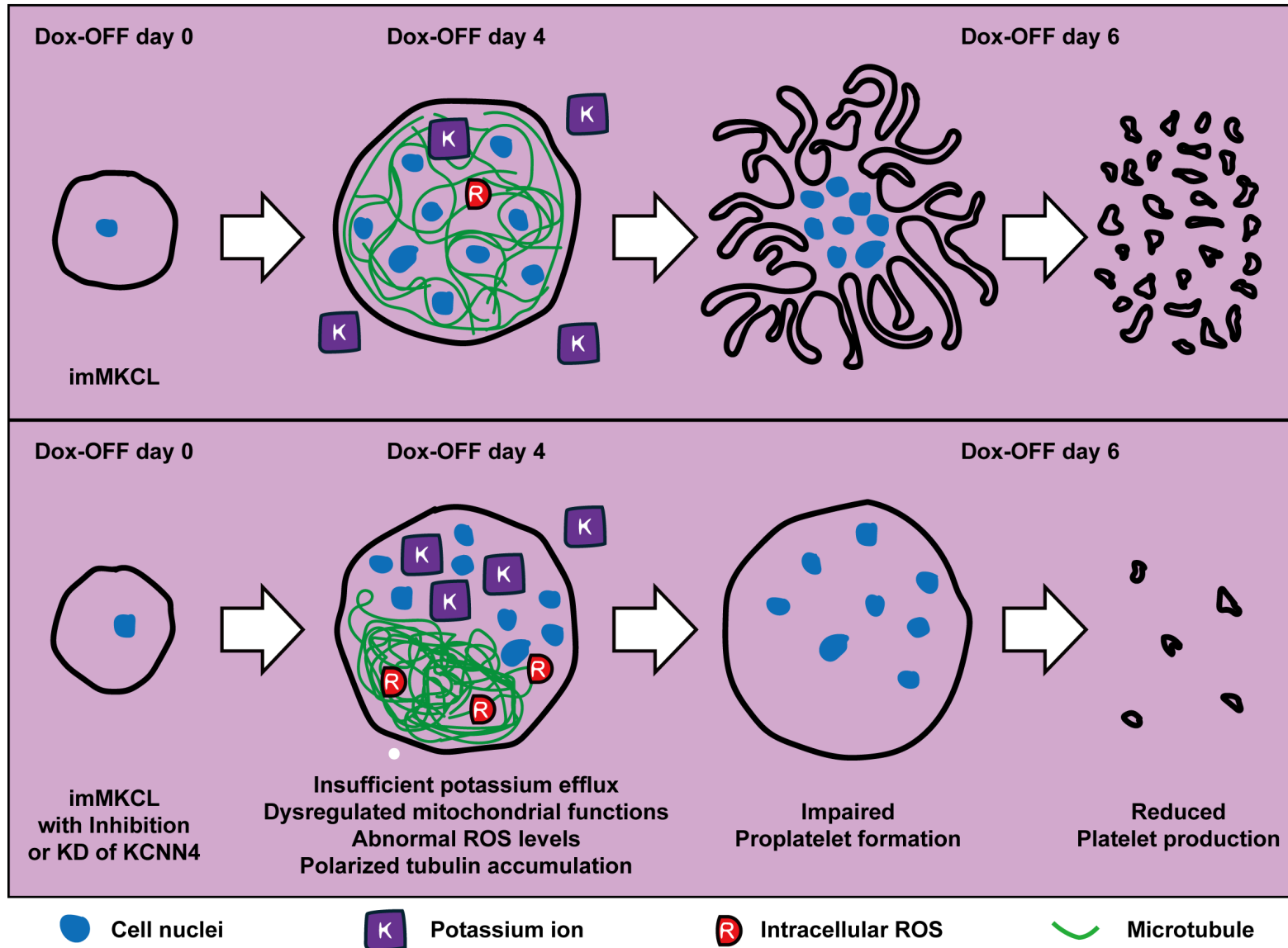
[Mg<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>



[Na<sup>+</sup>]<sub>i</sub>



# 新規モデルの提案



起点  
増殖～成熟開始初期での  
KCNN4を介した  
カリウムイオン流出

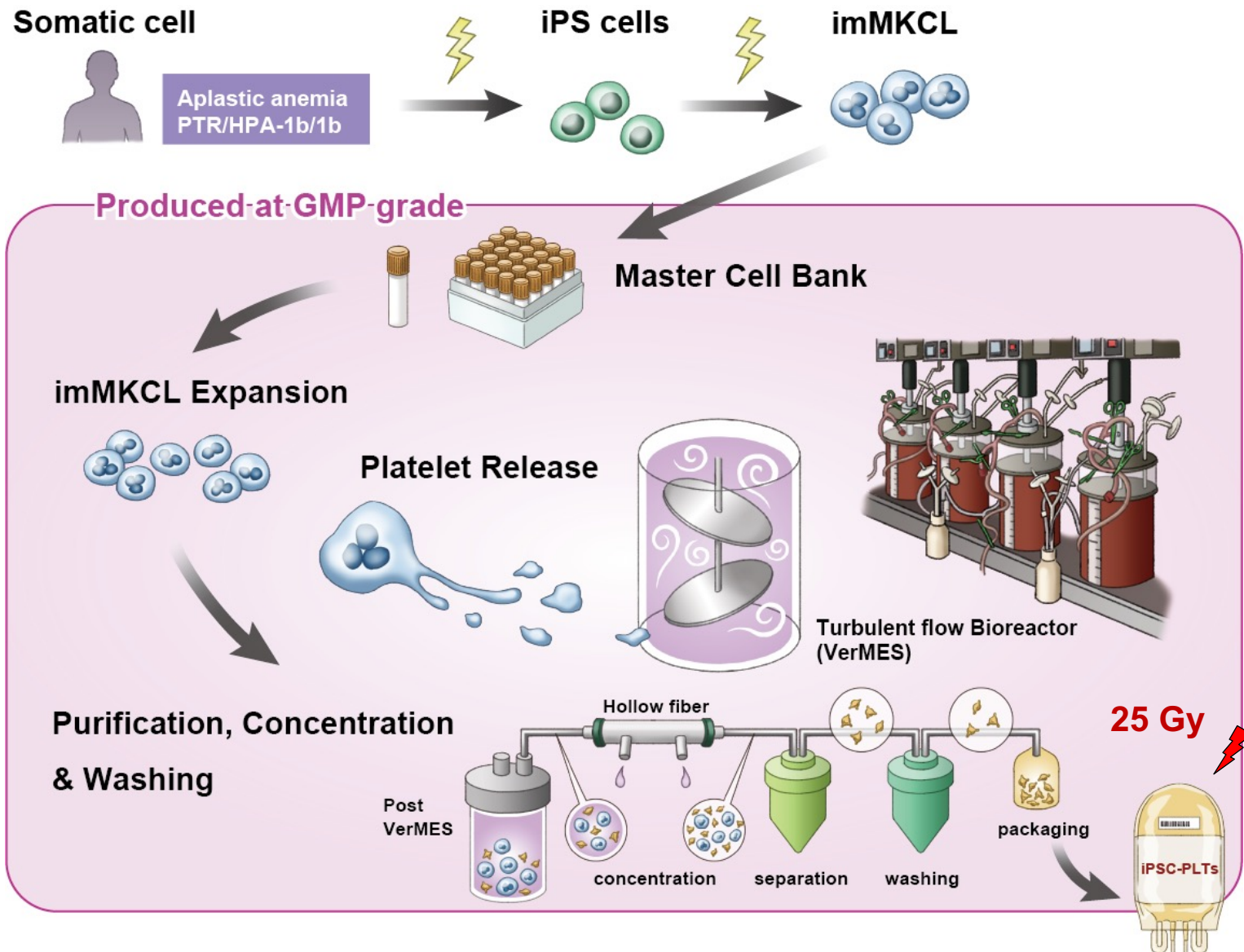


Microtubule依存的  
ミトコンドリア融合・分配  
システムが機能

# 自家iPS血小板の製造



# iPS血小板の全製造工程（臨床研究用）



マスターセルバンク(MCB)の樹立

2014-2015 患者iPS細胞

2015-2017 imMKCL MCB

iPS血小板の製造 (GMP準拠)

1. imMKCL 増幅培養 (Dox-ON): 23日

2. iPS血小板産生培養(DOX-Off): 6日

3. 分離・濃縮・洗浄とγ線照射

# GMPレベルでのVerMESによる血小板製造 (8L機器 x4)



# 品質と非臨床試験

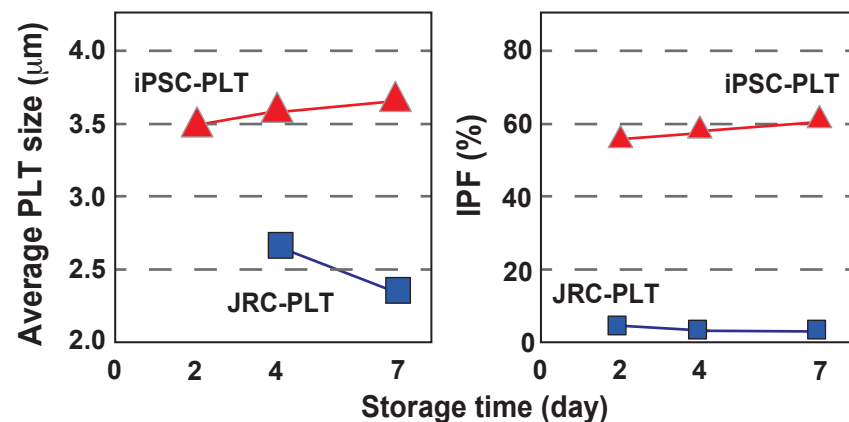
PMDA (Pharmaceuticals and Medical Devices Agency;  
医薬品医療機器総合機構)との薬事戦略相談を基  
にした、品質、安全性、有効性の評価試験



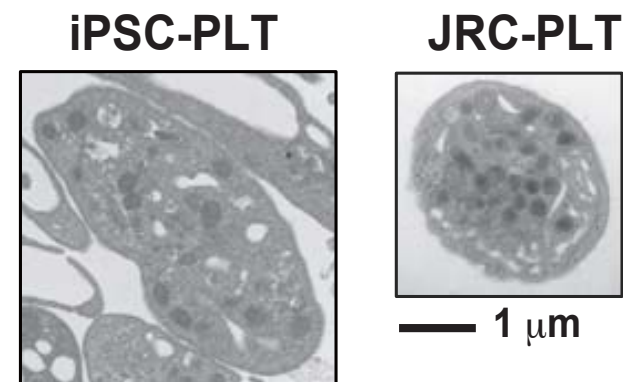
# 患者iPS血小板の外観・サイズ・形態



洗浄血小板と  
類似した外観

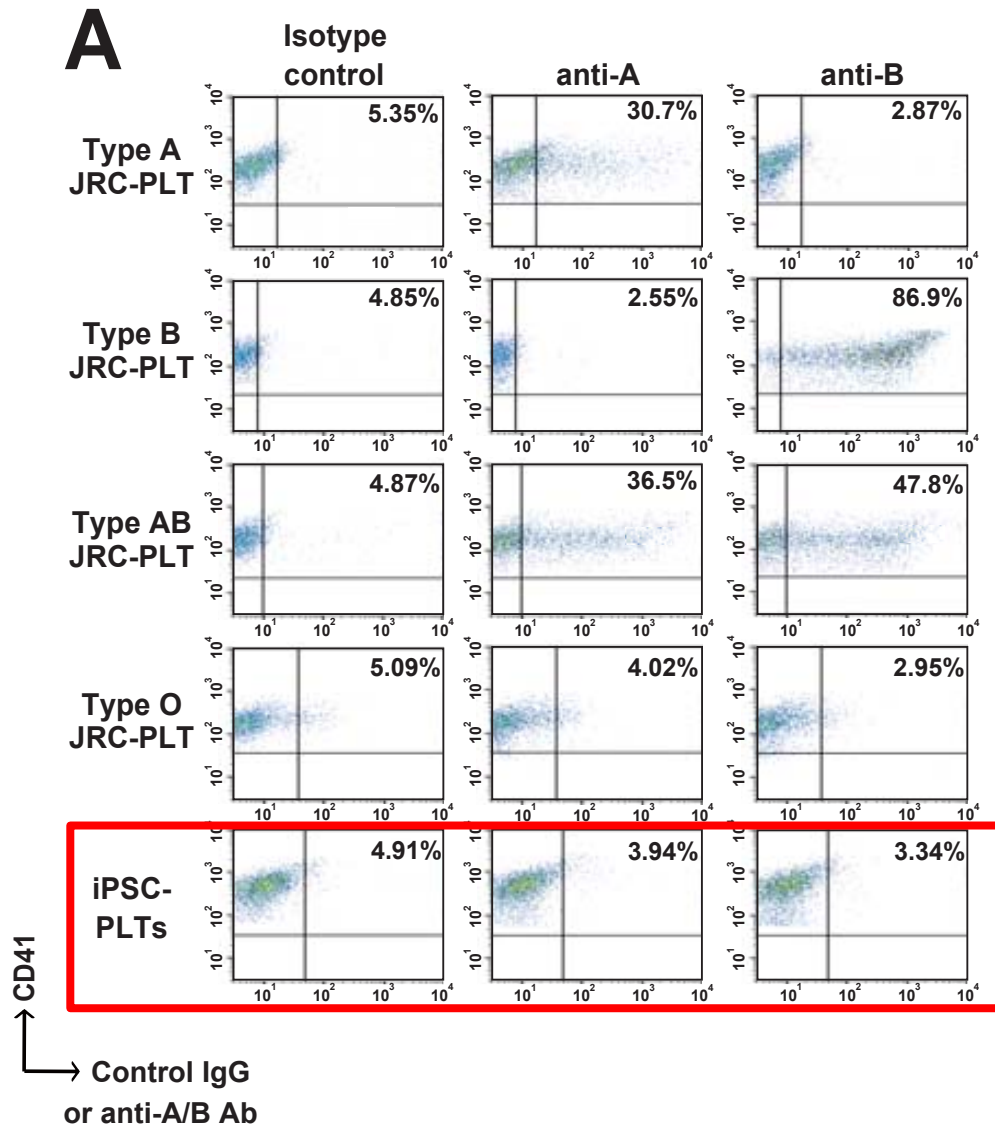


iPS血小板のサイズは大きく、  
経時変化が少ない



日赤血小板と同等の  
構造を有する

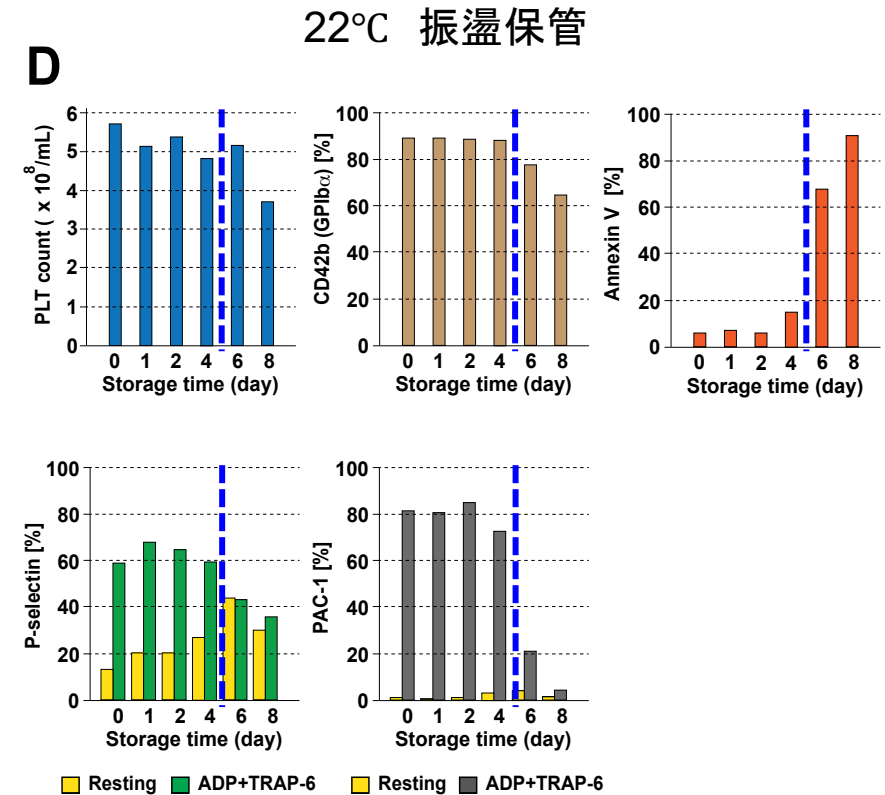
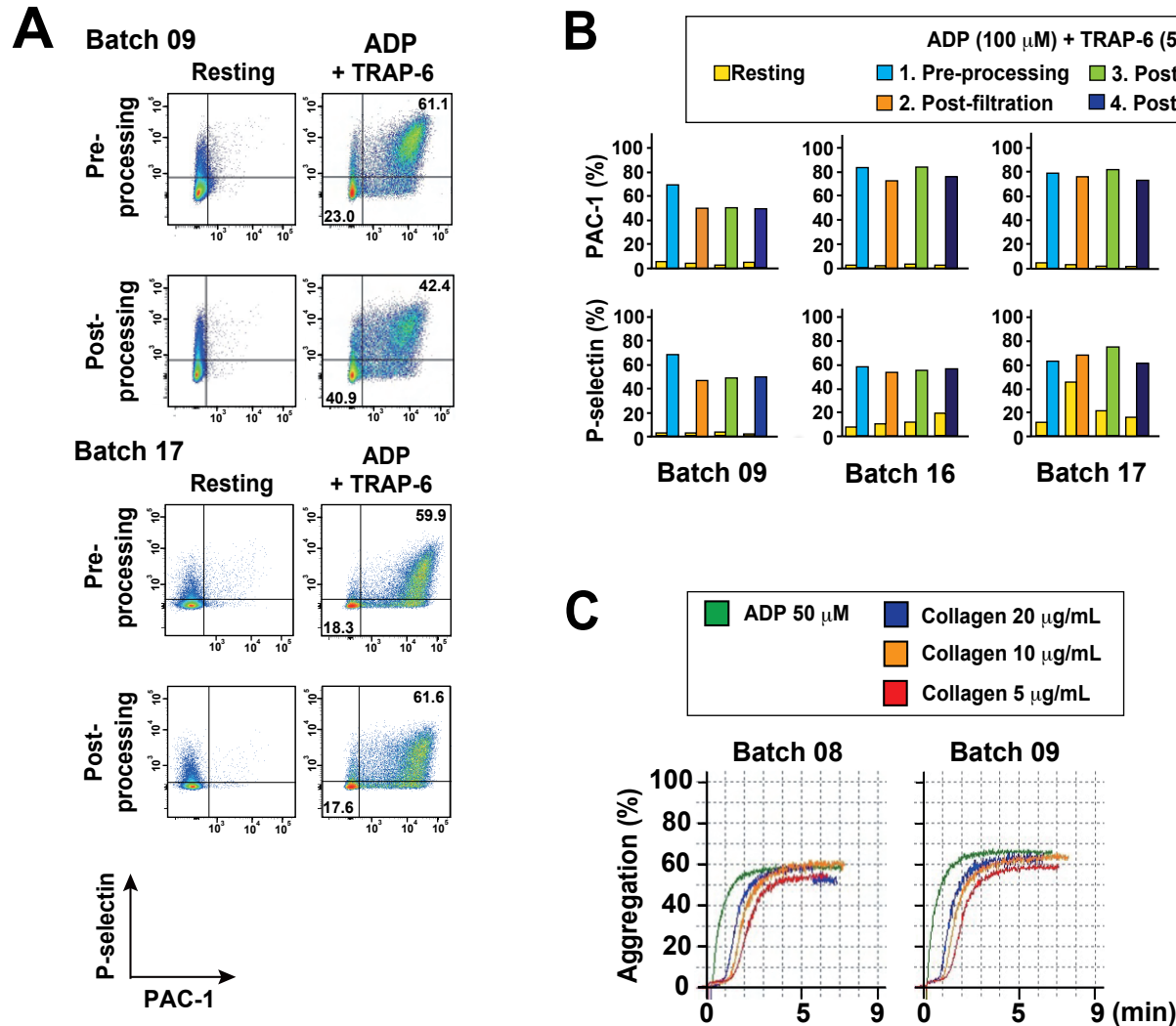
# 患者iPS血小板のAB抗原発現 (FCM)



## iPS細胞由来血小板の特徴

- ・A,B抗原ともに陰性（患者はB型）

# 患者iPS血小板の前臨床機能評価 (in vitro)



- In vitro でのアゴニストに対する活性化・凝集良好
- 4日目まで安定、6日目以降明らかに劣化

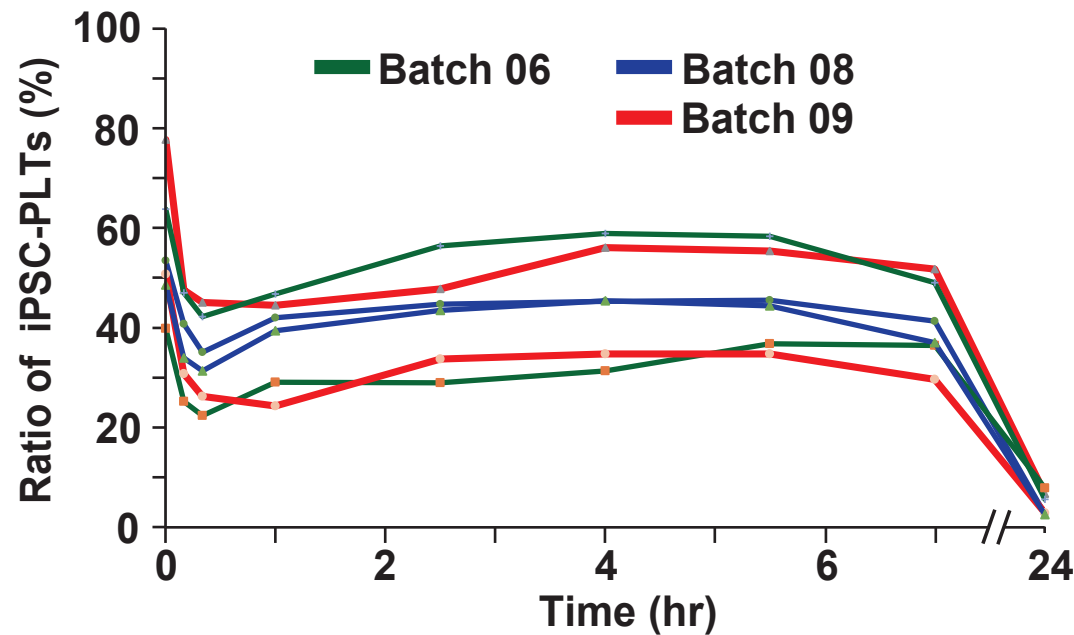
# 患者iPS血小板の前臨床機能評価(ウサギモデル)

循環能

2-6時間で安定した循環

D

Circulation



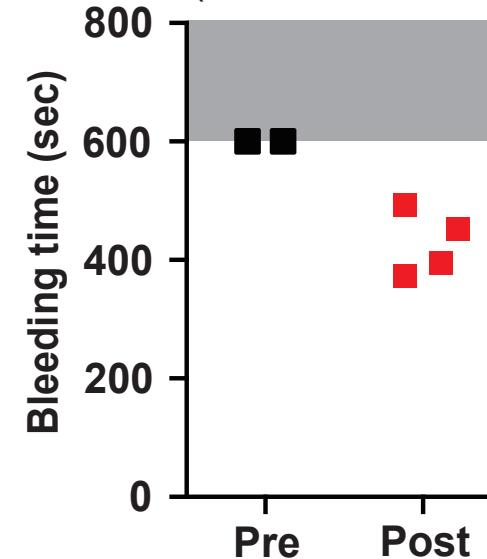
止血能

4箇所全てで止血

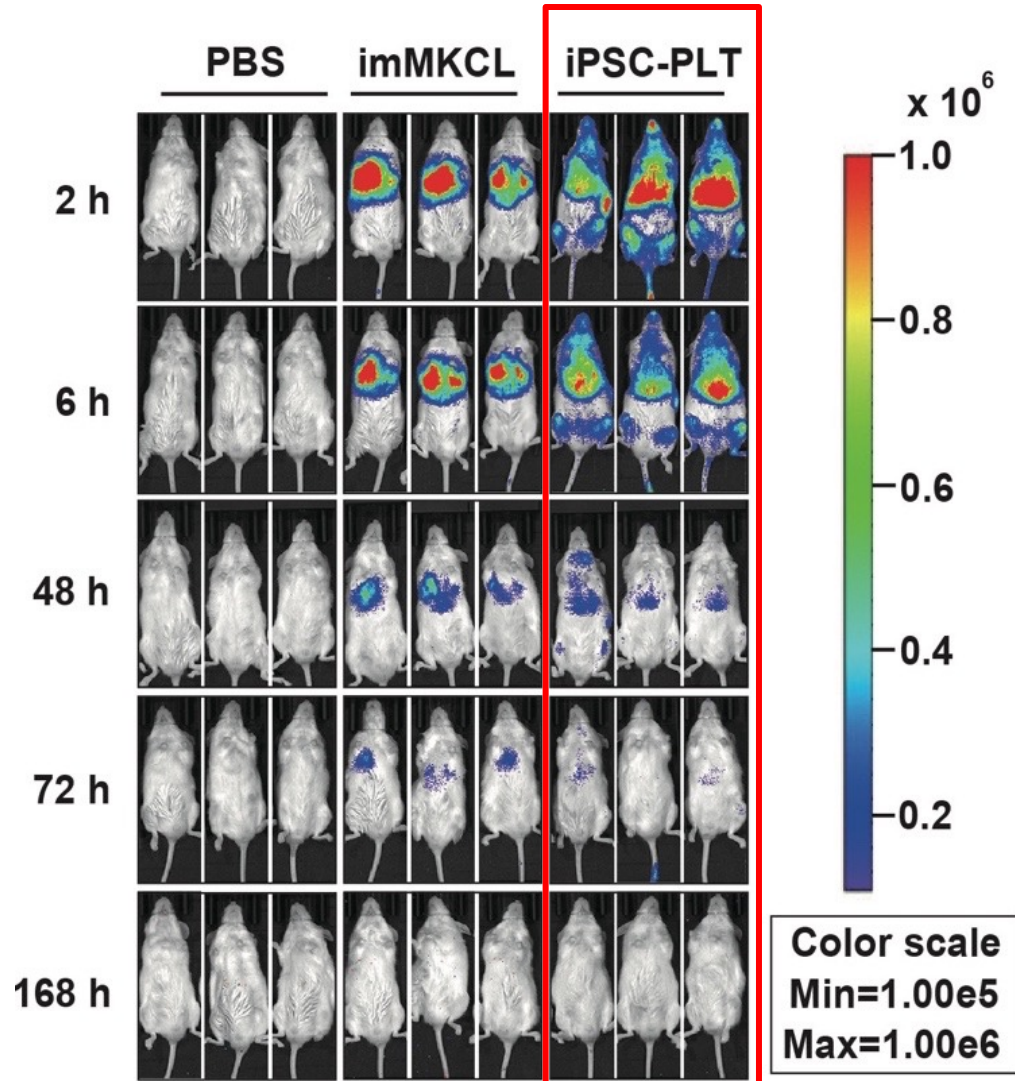
E

Hemostasis

(Limit = 600 sec)



# IVISによる蛍光標識発現iPS血小板のマウスでの循環検証



pcDNA3 Venus-Akalucベクターは文部科学省/AMEDナショナルバイオリソースプロジェクトを介して理研BRCより提供

- imMKCLs は肺に局限
- **iPS血小板は全身への循環および、肺、脾臓、肝臓に分布**  
(血小板の既報に合致)

動物モデルでは循環に問題はない

# MCBのウイルス等安全性試験

| 試験項目                                                                                                                                                                   | 試験方法                                                                                       | 判定基準                             | 試験結果                             |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|
| 1. 無菌試験(真菌、細菌)<br>2. マイコプラズマ否定試験                                                                                                                                       | 直接培養試験法(JP、USP、EP対応)<br>Agar及びnon agar培養法(JP、USP、EP対応)                                     | 陰性<br>陰性                         | 陰性<br>陰性                         |
| 3. ウイルス混入否定試験<br>General In vitroウイルス試験<br>General In vivoウイルス試験                                                                                                       | 28日間の細胞培養試験法(Vero、MRC、BHK、Hela、NIH3T3)<br>マウスと乳仔マウス、発育鶏卵投与試験法                              | 陰性<br>陰性                         | 陰性<br>陰性                         |
| マウス由来外来ウイルス試験<br>ラット由来外来ウイルス試験<br>ハムスター由来外来ウイルス試験                                                                                                                      | マウス抗体産生試験<br>ラット抗体産生試験法<br>ハムスター抗体産生試験法                                                    | 陰性<br>陰性<br>陰性                   | 陰性<br>陰性<br>陰性                   |
| ヒト病原性ウイルス試験                                                                                                                                                            | qPCR(HIV1*と2, HTLV1と2, HAV, HBV, HCV, HHV-6, HHV-7, HHV-8, hCMV, EBV, SV40, B19の14種)       | 陰性                               | 陰性                               |
| ウシ/ブタ由来ウイルス試験<br>Circovirus試験<br>Bovine Parvovirus試験<br>ブタ由来ウイルス試験<br>Swine hepatitis E virus試験<br>Torque Teno virus試験<br>マウス内在性ウイルス試験<br>逆転写酵素活性試験<br>透過型電子顕微鏡法(TEM法) | FDA9CRF試験<br>qPCR法<br>qPCR法<br>qPCR法<br>qPCR法<br>qPCR法<br>F-PERT高感度逆転写酵素活性測定法<br>200個の細胞観察 | 陰性<br>陰性<br>陰性<br>陰性<br>陰性<br>陰性 | 陰性<br>陰性<br>陰性<br>陰性<br>陰性<br>陰性 |
| S+L-ミンクフォーカス試験<br>増殖性レンチウイルス否定試験                                                                                                                                       | 異種間増殖レトロウイルス否定試験<br>細胞中の複製可能レンチウイルスの検出                                                     | 陰性<br>陰性                         | 陰性<br>陰性                         |
| トリ病原性ウイルス否定試験                                                                                                                                                          | qPCR法(Adenovirus, Chicken parvovirus, AEV, CAV, Reovirus)                                  | 陰性                               | 陰性                               |
| ウマ由来ウイルス否定試験                                                                                                                                                           | FDA 9CFR法                                                                                  | 陰性                               | 陰性                               |
| 昆虫細胞関連ウイルス否定試験                                                                                                                                                         | qPCR法(Flock house virus, Nodamura virus, Boolarra virus, Pariacoto virus)                  | 陰性                               | 陰性                               |
| 4. In vitro造腫瘍性試験                                                                                                                                                      | γ線照射後のコロニー形成能試験                                                                            | 適合                               | 適合                               |

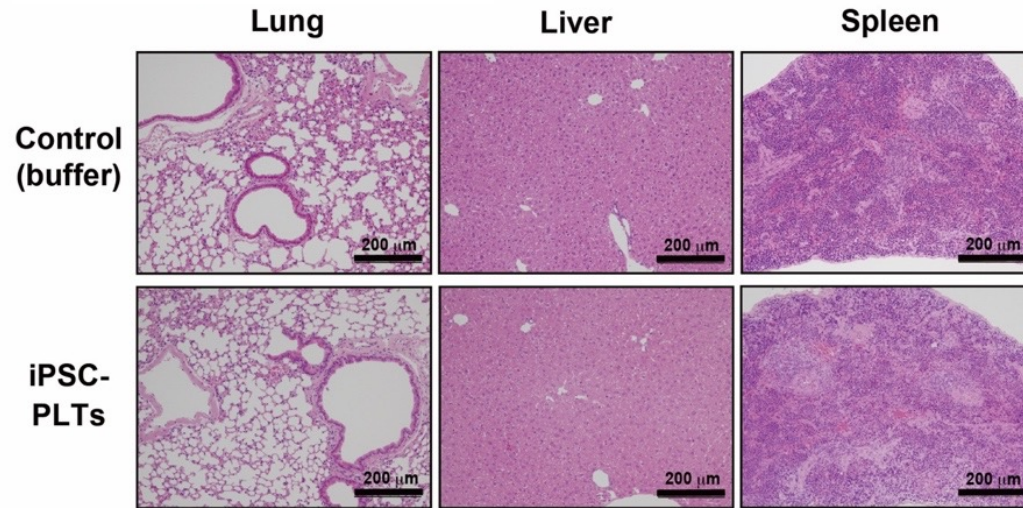
使用される異種由来  
原材料に混入しうる  
ウイルス等あらゆる  
病原微生物が陰性で  
あることを確認。

・ヒト、齧歯類、ウシ、ブ  
タ、トリ、ウマ、昆虫など

# 一般毒性試験と造腫瘍性試験

(PMDA助言に従う)

## A マウス単回投与試験



## B マウス・ラット投与試験のまとめ

| Animal    | Test type | Number / group | Infused iPSC-PLTs                               | Analysis         | Results                                  |
|-----------|-----------|----------------|-------------------------------------------------|------------------|------------------------------------------|
| NOG mouse | single    | 10M<br>10F     | $2 \times 10^8$<br>(2.5 times dose)             | day 14<br>day 28 | no effect of test substances             |
| Rat       | single    | 5M<br>5F       | 40 mL/kg( $16 \times 10^9$ )<br>(10 times dose) | day 14           | no effect of test substances             |
| Rat       | repeated  | 5M<br>5F       | 20 mL/kg( $8 \times 10^9$ )<br>(5 times dose)   | day 14           | no unexpected effect of test substances* |

Observation / analysis of general condition, body weight, food intake, blood count, blood biochemical test and autopsy with organ weight and histopathological tests

\*Spleen enlargement of approximately 1.2 fold was observed in iPSC-PLT group.

**iPS血小板特異的な異常所見は認めず**

## In vitro 造腫瘍性試験

i) 患者由来 imMKCLおよびT1 患者由来 iPSC clone, HL-60 白血病細胞株

$1 \times 10^8$  imMKCL (製剤に含まれる以上の数) **25 Gy 照射**で増殖コロニーを観察せず (下表参照)。

ii) 患者由来 iPS血小板**25 Gy 照射**後には浮遊条件でも接着培養条件でも増殖コロニーを形成せず。

| コロニー数    |                           |                       |
|----------|---------------------------|-----------------------|
| 細胞種      | imMKCL                    |                       |
| 照射線量     | <b>25 Gy</b>              |                       |
| 播種細胞数    | $1 \times 10^7$ cells/培養皿 |                       |
| 播種培養皿数   | 10                        | 3                     |
| 添加非照射細胞数 | 0                         | 100 cells/培養皿         |
| 検出コロニー数  | <b>0</b>                  | <b>127 cells/培養皿*</b> |

\* 3枚の平均

# 新規化合物の安全性試験

| 化合物     |                         | 残留濃度<br>[ng/mL]<br>(Batch 02~06) | 残留濃度<br>[ng/mL]<br>(Batch 07~09) | Ames試験 | 染色体異常<br>試験 |
|---------|-------------------------|----------------------------------|----------------------------------|--------|-------------|
| TA-316  | TPO受容体作動薬               | 6.0~72.9                         | 6.0~72.9                         | 陰性     | 境界域*        |
| Y-39983 | ROCK阻害剤<br>imMKCL成熟促進   | <2.0~6.5                         | <2.0~6.5                         | 陰性     | 陽性*         |
| GNF-351 | AhR競合剤<br>imMKCL成熟促進    | < 2.0                            | < 2.0                            | 陰性     | 陰性          |
| KP-457  | ADAM17 阻害剤<br>GPIbα切断防止 | n.d.~36.6                        | n.d.~36.6                        | 陰性     | 陰性          |

n.d.: not detected.

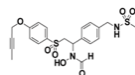
1. 残留量: 検出限界以下またはICH M7のLTLの閾値120 µg/日以下
2. 化合物は全て遺伝毒性陰性 (TA-316、Y-39983は小核試験とコメット試験がともに陰性であった)

# iPS細胞由来血小板の非臨床試験一覧



## 巨核球(imMKCL)マスターセル

1. 感染病原体等(ウイルスなど)の安全性試験
2. 造腫瘍性



## 添加化合物

1. 最終製剤の残留濃度
2. 許容範囲濃度を超えた場合の毒性・変異原性のin vitroおよび動物試験



## 最終血小板製剤

1. 一般毒性動物試験
2. 品質: サイズ、機能的に重要な血小板表面分子の発現(CD42b等)、アネキシンV結合率、電顕観察
3. In vitro機能試験: リガンドによるCD62P発現・PAC-1結合、PF4や $\beta$ TG分泌、spreading、凝集、血餅退縮
4. In vivo循環試験: マウスやウサギモデル
5. In vivo止血試験: マウスやウサギモデル

