

特別企画②

赤血球人工生産のためのヒト赤血球前駆細胞株の樹立

[特別企画②]

赤血球人工生産のためのヒト赤血球前駆細胞株の樹立

栗田 良

理化学研究所バイオリソースセンター細胞材料開発室

【研究背景】

不特定多数の献血者に依存する現行の赤血球輸血体制にはいくつかの問題点が内包されている。

(1) 献血者人口の減少に伴う慢性的な輸血用血液製剤の不足が深刻である。(2) 肝炎ウイルス、エイズウイルスなどの感染性ウイルスやプリオンなどの感染初期には検査にて感染者を完全に除外することは難しく、したがって、感染性ウイルス等を輸血によって伝搬する可能性がゼロではない。(3) きわめてまれな血液型 (Rh-null, -D- など) の患者に対する輸血用血液製剤不足は常に大きな問題となっている。以上のような問題点を解決する方法として、赤血球を試験管内で人工的に生産する方法が考えられる。このような背景の中、臍帯血中の血液幹細胞から脱核赤血球を生産する技術の開発や、ヒト胚性幹 (ES) 細胞から大量の赤血球を生産する技術の開発などが報告されてきた。これらの報告はいずれも非常に有益な研究成果と考えられるが、残念ながら輸血を目的とした純度の高い赤血球を恒久的に大量生産し続けることは難しい。

一方で、もし赤血球前駆細胞レベルで不死化細胞株を樹立でき、その細胞株が脱核赤血球を生産する能力を保有していれば、そうした細胞株は試験管内で脱核赤血球を人工生産するための極めて有用な材料となる。我々は2008年に、マウスES細胞から、脱核赤血球を生産する能力を有する不死化赤血球前駆細胞株の樹立に成功し発表した¹⁾。この細胞株は試験管内で脱核赤血球を生産する能力を有し、重症貧血マウスに移植した際には、マウスが貧血にて死亡することを防止する能力を有するものであった。この結果を受け、我々はヒト細胞においても同様な不死化赤血球前駆細胞株の樹立を試みた。

【結 果】

まず始めにマウス細胞株樹立法を基盤とし、ヒト人工多能性幹 (iPS) 細胞から赤血球前駆細胞株の樹立を試みた。しかし、マウスと同様の方法では目的とするようなヒト赤血球前駆細胞株の樹立には至らなかった。我々は、さらに数多くの樹立条件を検討した結果、①iPS細胞から赤血球を含む血液細胞への分化能が低い点、②ヒト細胞はマウス細胞よりも不死化しにくい点、に根本的な問題があることを見いだした。そこで前者に関しては、これまでにサルES細胞を用いて開発してきたTAL1遺伝子導入法²⁾により、また後者に関しては、強力ながん遺伝子であるGene-X (論文未発表データにつき秘匿させていただきます) を細胞株樹立の際に強制発現させることにより、この問題点を打開した。Gene-Xについては今後の分化誘導実験を考慮し、薬剤 (ドキシサイクリン ; DOX) の有無により発現の制御が可能となるように導入した。

このように樹立されたヒトiPS細胞由来赤血球前駆細胞株 (Human iPS cells-Derived Erythroid Progenitor cells ; HiDEP) は、エリスロポエチンとDOX依存的に増殖する濃赤色を呈する細胞株であった。フローサイトメーターを用いた表面マーカー解析では、赤血球マーカーであるCD71, Glycophorin A (GPA) 両陽性の赤血球株であることが明らかとなった。一方で、未分化な赤血球マーカーであるCD36やc-Kit, さらには白血球および巨核球マーカーの発現は見られなかった。以上のことから、HiDEP細胞株は分化段階後期の赤血球細胞株であることが示唆された。次に、こ

の細胞株から脱核赤血球を生産できるか調べるために分化誘導実験を行った。分化誘導後フローサイトメーターを用いて検証したところ、核染色液であるSYTO16陰性、GPA陽性の脱核赤血球を生産できることが明らかとなった。一般的に、試験管内で生産された初期の脱核赤血球は網状赤血球であることが知られているが、近年この網状赤血球を生体内の環境下にさらすと、両面中央が凹んだ円盤状の末梢血赤血球に成熟化することが報告されている。そこで、我々の細胞株から生産された網状赤血球においても同様の現象が見られるかを確認するために、蛍光ラベルしたHiDEP細胞を用いて免疫不全マウス体内へ移植実験を行った。その結果、移植した次の日に観察された脱核赤血球では中央が凹んだ円盤状の形態は確認できなかったが、移植後3日目の脱核赤血球では一部で中央が凹んだ成熟赤血球の形態が確認できた。以上のことから、HiDEP株は試験管内で脱核赤血球(網状赤血球)を生産可能で、さらにその脱核赤血球は生体内においてさらに成熟化が進行し、末梢血赤血球になることが明らかとなった。

さらに我々は、臍帯血CD34陽性細胞にGene-Xを導入し、同様に発現を制御することにより、ヒト臍帯血由来赤血球前駆細胞株(Human Umbilical cord blood-Derived Erythroid Progenitor cells; HUDEP)の樹立にも成功した。このHUDEP細胞株は、細胞形態・サイトカイン依存性・表面マーカー解析結果から、HiDEP細胞株に比べ全体的に未分化な表現型を有する細胞株であった。しかし、分化誘導後はHiDEP細胞株と同様に、赤血球分化特有の形態変化をおこし、さらにはヘモグロビン合成能や脱核赤血球生産能をもつ細胞株であった。

続いて、これらの細胞株のグロビン型を調べるために、定量PCR法を用いた発現解析を行った。その結果、多くの細胞株で胎児型のグロビンであ

る γ -グロビンを優位に発現していたが、HUDEP細胞株の1つでは成人型のグロビンである β -グロビンを主に発現していることが明らかとなった。このことから、細胞株を複数樹立することにより、成人型のヘモグロビンを有する細胞株も樹立できることが証明できた。さらに、HiDEPおよびHUDEP細胞株由来の赤血球が機能を有するかを調べるために、ヘモックスアナライザーを用いて酸素結合・解離能の解析を行ったところ、いずれも正常な酸素結合・解離能を示したことから、これらの細胞株由来赤血球は正しい機能を有することが明らかとなった。

最後に、近年ゲノム配列を人為的に改変する方法として注目を集めている人工ヌクレアーゼを用いて、樹立した赤血球前駆細胞株のRh抗原の改変を試みた。RhDおよびRhCE遺伝子の開始コドン近傍を切断のターゲットにした人工ヌクレアーゼをHiDEP細胞に導入したところ、ランダムな挿入・欠失変異が確認され、その一部でフレームシフトによるRhDあるいはRhCEタンパク質の消失が予想された。したがって、今後Rh抗体を指標にしたクローンソーティングを行うことにより、近い将来RhD⁻、-D⁻、Rh-nullという抗原性を有する脱核赤血球を生産可能な赤血球前駆細胞株が樹立できることが示された。

【総 括】

ヒトiPS細胞および臍帯血CD34陽性細胞から脱核赤血球を生産可能な赤血球前駆細胞株の樹立に成功した。本方法は再現性が高く、今後稀少血液型を含むさまざまな赤血球を恒久的に生産できる可能性が示された。しかし、脱核赤血球生産効率は依然として低く、また得られた赤血球が真の意味でどの程度末梢血赤血球と相同しているのかも現時点では不明であることから、今後さらなる研究が必要である。

文 献

- 1) Hiroyama T *et al.*, PLoS One. 2008 3: e1544.
- 2) Kurita R *et al.*, Stem Cells. 2006 24: 2014-22