

シンポジウム3

不死化細胞株を用いた赤血球の人工生産と検査用血球試薬作製の試み

栗田 良(日本赤十字社血液事業本部中央血液研究所)

【はじめに】

近年、細胞培養技術を用いて試験管内で赤血球を生産しようとする試みが世界中で行われている。もしこのような赤血球生産技術が十分に開発され、恒常に赤血球を生産できるようになれば、献血に依存しない新しい血液製剤作製法の開発にも道が開かれ、より安定した血液供給が可能になると考えられる。また、不規則抗体検査用の血球試薬としての利用も考えられ、検査分野への応用も期待できる。

我々はこれまでに、造血幹細胞や多能性幹(iPS)細胞に代わる新しい赤血球生産ソースとして、無限増殖能と赤血球への分化能を同時に有する不死化赤血球前駆細胞株(以下、不死化細胞株)の開発に成功した。この不死化細胞株は造血幹細胞やiPS細胞のもつ優れた特徴に加え、取り扱いが容易でスケールアップがしやすいなどの利点をもっている。

今回は、この不死化細胞株を用いた赤血球人工生産の現状(赤血球製剤作製に向けた取り組み)と検査用血球試薬作製の試みについて言及する。

【赤血球人工生産の現状(赤血球製剤作製に向けた取り組み)】

不死化細胞株から赤血球を大量生産し、赤血球製剤を作製するためには、以下3点の研究開発が必須である。すなわち、①不死化細胞株から高効率に赤血球を生産する方法の開発、②得られた赤血球(以下、培養赤血球)の詳細な特性解析と安全性試験の実施、そして③安価な高密度大量培養法の開発、である。また将来的には、得られた培養赤血球に新しい機能を付加させるなどこれまでにない価値を加える検討なども必要となるかもしれない。

そこでここからは上述①～③の研究開発進捗状況について報告する。

①不死化細胞株を用いた高効率赤血球生産法の開発状況について

赤血球は、最終分化過程において、遺伝子情報の源である核を放出(脱核)し、成熟化することが知られている。しかし、この脱核を試験管内において人為的に誘導することは難しく、このため細胞株から赤血球を生産する効率は非常に低いことが長年の課題であった。実際に、我々が初めて細胞株の樹立に成功した5年前においては、脱核効率は最大でもわずか数%程度であった。そこでまず我々は、不死化細胞株を用いた脱核効率の改善について取り組み、同細胞株の樹立法や培養法の改良、さらには分化能の高い細胞株の選別を行うことにより、最大45%程度まで脱核効率を高めることに成功した。このように年を追うごとに、不死化細胞株を用いた脱核(赤血球生産)効率は上昇しており、今後さらにその効率を高めていく必要がある。

②得られた培養赤血球の特性解析について

試験管内において生産した培養赤血球は白血球除去フィルターにより精製することができる。上述したように近年では赤血球生産効率が上昇してきたため、精製した赤血球の特性解析を開始した。一般的に、脱核した赤血球は、核を放出したばかりの未熟な網赤血球と完全に分化の進んだ成熟赤血球とに大別することができる。今回解析した培養赤血球は、現状の生産法では、その多くが未熟な網赤血球であり、その大きさも通常の成熟赤血球と比べ1～2μm程度大きいことが明らかとなった。一方で、ヘモグロビン型に関しては、これまで胎児型の赤血球しか生産することができなかったが、現在ではこちらについても改善が進められ、ほぼ成人型の赤血球が生産できるようになった。生産した網赤血球は生体内環境に晒すことにより速やかに成熟化が進み通常の赤血球と同様の形態と大きさに変化することが報告されているが、より高い安全性を担保するためにも今後は

試験管内においてさらに成熟化を進める検討が必要となるかもしれない。

③安価な高密度大量培養法の開発状況について

最近になり、ようやく高密度大量培養法の検討にも着手するに至った。まず現状の培養法における最高到達細胞密度を調べるために、4つの異なる方法で不死化細胞株の培養を試みた。その結果、最大で 1.7×10^7 cells/mLの密度まで培養できることが明らかとなった。一般的な培養細胞と比較すると、我々の不死化細胞株は比較的高密度で培養可能であると言えるが、末梢血中に含まれる赤血球の密度は 10^9 オーダーであることを考慮すると、現状では数百倍もの密度の乖離がある。今後、低コスト化を実現するためにも培養スケールを極力減らすことは重要であり、現状よりもより高密度な培養法の開発が必須である。今後、本格的な検討・開発が必要である。

以上のように、数年前と比較し、不死化細胞株を用いた赤血球生産効率は大幅に上昇した。しかし、培養赤血球を大量生産するためには、さらなる生産効率の改善や超高密度大量培養法の開発が必須であり、まだまだ道半ばである。引き続き、努力が必要である。

【検査用血球試薬作製の試み】

我々は不死化細胞株を用いて不規則抗体検査に使用する血球試薬を作製する試みも行っている。血清中に含まれる不規則抗体を検出・同定するためには、特定の血型抗原を有するさまざまな赤血球（血球試薬）が必要となるが、このさまざまな血液型の赤血球を不死化細胞株から作製しようとする試みである。もし不死化細胞株からこのような血球試薬を人工生産できるようになれば、①稀血を含む同じ血液型の赤血球を恒常に生産することが可能、②抗原量等が均一な“標準試薬”を作製

することが可能、③遺伝子操作を用いて、より利便性の高い試薬の作製が可能、となり、そのメリットは非常に大きいと考えられる。

そこで我々は、血球試薬作製の可否を調べるための予備検討から実験を開始した。赤血球関連検査の場合、赤血球のもつ色調の強さは重要な要素となることから、まず不死化細胞株の色調の検証を行った。その結果、不死化細胞株を未分化な状態のまま使用するのではなく、試験管内で分化段階を進めることで、通常の赤血球に近い赤い色調をもたせることに成功した。また、抗体の検出感度を検証するために、用手法による間接抗グロブリン試験を行ったところ、通常の赤血球とほぼ同等の検出感度を有することが明らかとなった。そこで次に、最大のメリットの一つと考えられる赤血球抗原の人工変更を試みた。今回使用した不死化細胞株のDiego式血液型はDi^b/Di^bであったため、レンチウイルスベクターを用いてDi^a遺伝子の強制発現実験およびゲノム編集実験をおこなったところ、Di^a抗原の付加とDi^b抗原の削除にそれぞれ成功した。

このように、これまでに行った予備検討では、不死化細胞株は検査試薬として十分な視認性と検出感度を有すること、また遺伝子操作により抗原の付加・削除・変更が可能であること、が明らかとなり、不規則抗体検査用の血球試薬として使用し得る可能性が示唆された。現在、これらの知見をもとに実際に使用する不規則抗体スクリーニング・同定用血球試薬を作製中である。

以上、今回の発表では、不死化細胞株を用いた赤血球人工生産の現状（赤血球製剤作製に向けた取り組み）と検査用血球試薬作製の試みについて言及させていただいた。不死化細胞株はいずれの目的に対しても非常に大きな可能性を秘めており、今後より一層研究を進めていく必要がある。