

博士論文

ヒト多能性幹細胞を起源とする
不死化赤芽球株の樹立

廣瀬 正一

目次

1. 緒言
2. ヒト多能性幹細胞を起源とする不死化赤芽球の樹立
 - 2-1. 緒言
 - 2-2. 材料と方法
 - 2-3. 結果
 - 2-4. 考察
3. 生体内における不死化赤芽球株の評価
 - 3-1. 緒言
 - 3-2. 材料と方法
 - 3-3. 結果
 - 3-4. 考察
4. 結語
5. 謝辞
6. 参考文献
7. 図表

1. 緒言

赤血球は血液を構成する細胞の一種である。生体内においてガス交換を行う役割を担っており、血流に乗って全身を循環し、肺から酸素を受け取った後に様々な組織へ酸素を供給する。また酸素を放出する際に各組織から二酸化炭素を受け取り、排出するという機能も有している。赤血球は核、ミトコンドリアやリボゾームを有しておらず、その細胞内は主にヘモグロビンで満たされており、酸素運搬体としての機能に特化した細胞である。ヘモグロビンはグロビン鎖が 4 量体を形成することで構成されており、各グロビン鎖が保持するヘムが酸素と結合することで、赤血球は酸素を運搬する機能を司っている¹⁾。また、赤血球は直径 $7-8\mu\text{m}$ と非常に小さく、形状はお碗 (Biconcave) 型という特徴を有している。赤血球は Biconcave 型であることによって、小さい体積であるにも関わらず大きな表面積を有しており、ガス交換効率に優れた形状であると考えられている。また、球状ではないために、変形する際に細胞膜にかかる圧力が小さくなり、細胞自身の直径よりも小さい毛細血管を通過できるという説も存在する。さらに、この細胞膜はスペクトリンに裏打ちされることで柔軟性に富み、変形しながら自身の直径の半分以下の毛細血管まで入り込んで、その周辺組織へ酸素を供給することが可能である²⁾。

赤血球の発生は、造血幹細胞 (Hematopoietic stem cells: HSCs) もしくは造血前駆細胞 (Hematopoietic progenitor cells: HPCs) を起源としている。胎生期において、羊膜に存在する血島や卵黄嚢周囲の血管から血球産生が始まり、この造血は 1 次造血 (Primitive hematopoiesis) と称される。1 次造血にて得られる赤血球は、通常の成体における赤血球とは異なり、有核且つ大型であり、胚性型のヘモグロビンを有することが知られている。また、一部の 1 次造血由来赤血球は血流を循環しながら脱核することも報告されている。1 次造血の後には、成体の発生に伴って造血の場は胎児の肝臓へと移行していき、生後は骨髄にて生涯に渡る造血が行われる。この造血は 2 次造血 (Definitive erythropoiesis) と称されており、ここから得られる赤血球は無核であり、成人型ヘモグロビンを保持すると考え

られている。^{3,4)}。また発生段階によって、その酸素運搬能には差異があり、胚性および胎性期の赤血球であるほど高酸素親和性を示すことが知られている。ヘモグロビンを構成するグロビン鎖は、16 番染色体上にコードされている ζ 鎖もしくは α 鎖と、11 番染色体上にコードされている ϵ 鎖、 γ 鎖もしくは β 鎖であり、発生が進むにつれて ζ 鎖から α 鎖、 ϵ 鎖から β 鎖と発現が推移していくグロビンスイッチングという現象が起こる。これらグロビン鎖が 4 量体となることでヘモグロビンは構成されており、胚性型 (Hbe : $\zeta 2 \epsilon 2$ 、 $\alpha 2 \epsilon 2$)、胎児型 (HbF : $\alpha 2 \gamma 2$)、成人型 (HbA : $\alpha 2 \beta 2$) に大別される³⁾。またヘモグロビンは、酸素との結合能を調整するアロステリックエフェクターとして 2,3-diphospho-glycerate (DPG) を有している。HbF は 2,3-DPG との結合能が HbA に比べると劣っており、その結果として高酸素親和性を示す。また生理学的には、母体中の胎児は低酸素状態に晒されていることから、効率的に酸素を供給するために胎生期の赤血球は高酸素親和性を有すると考えられている^{3,5)}。

形態学的には、巨核球・赤芽球共通前駆体 (Megakaryocyte-Erythrocyte progenitor; MEP) を介して直径 20~25 μ m 程の前赤芽球 (Proerythroblast) が産出され、細胞分裂を伴いながら好塩基性赤芽球 (Basophilic erythroblast) へと分化していく。前赤芽球、好塩基性赤芽球ともに、大きな核と塩基性の細胞質を有し、赤芽球の増幅はこの段階で主に行われると考えられている。続いて、直径 15 μ m 前後の多染性赤芽球 (Polychromatic erythroblast) へと分化していく。この段階ではヘモグロビンの合成が盛んに行われており、細胞質は赤褐色となる。続いて、核の濃縮が進行して正染性赤芽球 (Orthochromatic erythroblast) へと成熟していく。そして最終的には、核を放出して網状赤血球、変形能を有する成熟赤血球へと起伏に富む変化を伴いながら成熟していく (図 1A)⁶⁾。この赤芽球の増殖および成熟は、主にエリスロポイエチン (EPO) によって促される。EPO が細胞膜表面に発現している EPO 受容体に作用することで、JAK2/STAT5、PI3K/AKT および MAPK などのシグナルが活性化し、未熟な赤芽球は増幅ならびに成熟していく。また JAK2/STAT5 もしくは PI3K/AKT シグナルを阻害すると、赤芽球は急速にアポトーシスを起こして消失していくことが報告されており、この 2 つのシグナルは赤芽球の増殖および分化において、特に

重要な役割を果たしていると考えられる^{7,8)}。

この赤血球は、古くより輸血製剤としても扱われているが、大なり小なりのリスクが存在している。本邦における輸血医療は、ボランティアによる献血で賄われている。しかし、新生児出生率の低下と高齢化の急速な進行に伴い、将来的には血液製剤が不足することが危惧されており、2010年時点の日本赤十字社による推定では、2027年には血液製剤の不足量が100万人分を超えると見込まれている⁹⁾。また赤血球や血小板という細胞を有効成分とした血液製剤においては、ろ過や加熱処理に代表される病原菌の不活化処理が適応できないため、汚染リスクが少なからず存在する¹⁰⁾。現状では不活化処理が適応できないために、混入した病原菌を検出する手段が講じられており、ヒトB型、C型肝炎ウイルス(HBV、HCV)とヒト免疫不全ウイルス(HIV)に関しては、核酸増幅法(NAT法)を用いた高感度検査が行われている。しかし、不特定多数の供血者に依存する現行の輸血医療においては、未知の病原菌やインフルエンザウイルスなど、あらゆる病原菌のスクリーニングを行うことは不可能である。さらに、現状のスクリーニング技術では微量の病原菌を検出しきれないウィンドウ・ピリオドが存在し、2013年にHIVのすり抜け事故が確認されたことは記憶に新しい。

また世界における血液製剤の供給割合は、発展途上国が約4割を占めるとWHOより報告されているが¹¹⁾、ここでは有効性や安全性に関する課題が多数存在している。例として、供血者の栄養状態に依存してヘモグロビン濃度が薄い赤血球製剤が供給される場合がある¹²⁾。また、供血者の約3～5%がHIV陽性である地域¹³⁾、さらには病原菌のスクリーニングが行われずに血液製剤の出荷が行われている地域が存在することから¹⁴⁾、より安定的に、且つ安全な輸血医療の実現が望まれている。

現行の医療行為では対処しきれない課題の解決策として、ヒト胚性幹細胞(ES細胞)、ヒト人工多能性幹細胞(iPS細胞)をソースとして得られた分化細胞や組織を用いた再生医療に、近年は大きな期待が懸けられている。ヒトES細胞は、生体を構成するあらゆる細胞への分化能を有する幹細胞であり、1998年に樹立されて以来、再生医療の実現に向けた研究成果が蓄積されつつある¹⁵⁾。その一方で、ES細胞は発生初期の受精卵を破壊して作出さ

れるために、倫理的な問題を伴っている。この課題を解決するために、2007年にヒト人工多能性幹細胞（induced Pluripotent stem cells: iPS 細胞）の樹立に成功したとの報告がなされた¹⁶⁾。成人の皮膚より得られた体細胞に、*OCT3/4*、*KLF4*、*SOX2*、*c-MYC*を遺伝子導入することにより、三胚葉への分化能を有する iPS 細胞を得ることができる。iPS 細胞は受精卵を破壊するという行為を伴わないため、ES 細胞に付きまとっていた倫理面の懸念事項を回避できるソースと考えられる。新たな輸血医療の実現に向けて、ヒト多能性幹細胞をソースとして得られた赤血球や血小板は、血液製剤の有力な代替品候補となり得るであろう。例として、O 型 Rh-の細胞ソースから赤血球を量産することができれば、あらゆる患者に移植可能な赤血球製剤を作ることができる。さらに供給源となる細胞ソースに対して、あらゆる病原菌のスクリーニングを行うことで、より安全な輸血医療の提供が可能となる。以上の背景より、筆者はより安定的且つ安全な輸血医療を供給できるシステムを構築することを念頭におき、試験管内における赤血球の産出技術の確立を目指して研究に着手した。

2. ヒト多能性幹細胞を起源とする不死化赤芽球株の樹立

2-1. 緒言

これまでに、様々な研究グループがヒト ES/iPS 細胞や HPC をソースとして、赤血球の産出を試みている。2000 年代半ば頃は、臍帯血より得られた HPC を起源とした赤血球の産出に関する報告が多く存在する。代表的な例として、2002 年に Douay らの研究グループは、臍帯血に含まれる HPC を赤血球分化・成熟因子である EPO の存在下で赤芽球へ分化させる培養系を確立した。この培養系における脱核赤血球の割合はごくわずかであるが、免疫不全マウスへ赤芽球の投与を行ったところ、生体内において成熟が促進し、末梢血中に脱核赤血球が循環したことを示している¹⁷⁾。続いて 2005 年に Douay らのグループは、試験管内において臍帯血 HPC 由来赤芽球を脱核させることに成功したとの報告を行っている¹⁸⁾。また 2006 年に Miharada らも、臍帯血に含まれる HPC を赤芽球への分化させた後に、グルココルチコイドレセプターのアンタゴニストであるミフェプリストンを添加することで、脱核赤血球の作出に成功したとの報告を行っている¹⁹⁾。

2000 年代後半から現在にかけては、ヒト ES/iPS 細胞をソースとする赤血球の産出が多く報告されている。Ma らは、マウスの胎児肝臓由来のストローマ細胞をフィーダー細胞として用いることで、ヒト ES 細胞を起源とする赤血球系細胞の産出に成功している。得られた細胞集団は主に有核ではあるが、成人型グロビン鎖である β 鎖を発現することが示されている²⁰⁾。また Lanza らは、ヒト ES 細胞より得られた赤芽球をストローマ細胞株である OP9 と共培養することで、約 60% の赤芽球が脱核赤血球に分化することを報告している²¹⁾。Liu らも、ヒト胎児肝臓より得られた細胞をフィーダー細胞として用い、さらに胎児肝由来抽出物を培養系へ添加することで、ヒト ES 細胞から得られた赤芽球のうち、20~35% が脱核すると報告している²²⁾。以上のように、ヒト多能性幹細胞を由来とする赤血球系細胞の産出に関する報告も蓄積されつつあるが、その多くは異種由来のフィーダー細胞に依存する手法であり、安全性の観点から懸念が残る。一方、2010 年に Douay らの研究グループは、異種細胞には頼らずに、ヒト血清と多種のサイトカイン (SCF, TPO, FLT3L, BMP4,

VEGF-A165, IL-3, IL-6, EPO) を用いてヒト ES 細胞および iPS 細胞から赤血球系細胞を産出したことを報告している。このように、異種由来成分に依存せずに培養系を構築した報告も散見されつつあるが、最終的な脱核率は ES 細胞由来：50%、iPS 細胞由来：4～10% と非常に低い結果となっており、ES/iPS 細胞を起源とする際は、試験管内での最終成熟の達成も大きな課題として残っている²³⁾。続いて 2011 年、上述の Douay らはヒト成人末梢血より採取した HPC を網状赤血球まで分化させた後に、元のドナーに投与する臨床研究を実施した。有害事象もなく、投与された網状赤血球は生体内で成熟が促され、通常赤血球と同等の血中半減期を有するという成果が得られている²⁴⁾。一方で、大きな課題も残されている。上述した臨床研究で投与された細胞数は 10^{10} 個である一方で、治療に必要な赤血球数は $1 \sim 2.5 \times 10^{12}$ 個と見積もられており²⁰⁾、現状の技術で得られる細胞数では治療効果は期待できないと考えられる。

以上のように、試験管内での培養を介して得られた赤血球を臨床応用に用いる際の課題は、「1. 安全性の担保 2. 試験管内での分化制御 3. 治療に必要な細胞数の確保」に大別されると筆者は考えている。他のグループの報告より、異種由来成分を培養系から排除する手法には目途が付きつつあると考えられる。また、臍帯血や成体由来の HPC をソースとする際には、試験管内で脱核赤血球を得ることができるという報告が存在することから、脱核を制御するメカニズムは次第に明らかとされていき、それに伴って試験管内での分化制御技術も進んでいくであろう。そこで筆者は、他の課題に比べて進捗が遅れている「治療に必要な細胞数の確保」に注力し、研究を進めていくこととした。

成熟した赤血球や血小板は核を有さない、即ち分裂能が失われた細胞であるため、前駆体である赤芽球や巨核球の段階で大量に増幅させる必要がある。この課題を解決するために、筆者は前駆細胞の不死化技術の確立に取り組むこととした。赤芽球を不死化細胞株とすることで、赤血球を大量生産するというテーマである。筆者の報告に先立って、2008 年に Hiroyama らは、マウス ES 細胞より得られた血球前駆体を様々な添加材 (SCF、EPO、IL-3、Dexamethason) および OP9 の存在下で培養することにより、不死化赤芽球株を樹立できることを報告している。貧血を誘発したマウスに不死化赤芽球株を投与したところ、

生存率が大きく向上するという、実用化に向けて大きな期待が持てる結果が示されている²⁵⁾。続いて 2013 年、Hiroshima と同研究グループの Kurita らは、ヒトにおける不死化赤芽球株の樹立に成功したと報告している。マウス ES 細胞から不死化赤芽球株を樹立した際のプロトコルでは、ヒト不死化赤芽球株は樹立できなかったが、ヒト iPS 細胞および臍帯血から得られた HPC に、不死化遺伝子として知られる E6E7 を強制発現させることで赤芽球の不死化に成功したことが示されている²⁶⁾。この E6E7 は、ヒトパピローマウイルス由来の遺伝子であり、子宮頸ガンの原因因子として知られている。E6 がガン抑制作用を有する p53 をユビキチン化によって分解することや²⁷⁾、E7 が Cyclin A や Cyclin E を活性化させて細胞周期を乱してガン化を促進することが報告されており²⁸⁾、実用化にあたっては安全性の観点から大きな懸念が残る。そこで筆者は、上記の課題を解決するために、生体内の赤血球発生において重要な役割を果たす候補遺伝子を強制的に活性化させ、不死化赤芽球株を樹立することを目標として研究に着手した。

2-2. 材料と方法

2-2-1. 細胞株と試薬

別記したもの以外の試薬は、Sigma-Aldrich 社より購入した。ヒト ES 細胞株は、京都大学より KhES-3 を供与して頂いた。ヒト由来の試料の採取は、東京大学の倫理委員会の承認を得た後に実施した。ヒト由来の試料の扱いを含む全ての実験は、ヘルシンキ宣言を遵守して実施した。ヒト iPS 細胞株は、当研究室で樹立された株を用いた。iPS 細胞株クローンは、ヒト胎児線維芽細胞 (Lonza) に pMX レトロウイルスベクターを用いて 4 因子 (OCT3/4, SOX2, KLF4, c-MYC) を導入して樹立された 7F3955 と、ヒト臍帯血もしくは末梢血より得られた CD34+細胞 (Lonza) に、ディナベック社より供与いただいたセンダイウイルスベクターで 4 因子を導入して樹立された TkCB-SeV9、TkPB-SeV1、TkPB-SeV8 を用いた。使用したサイトカインおよび抗体一覧を表 1,2 に示した。

2-2-2. 細胞培養

全てのヒト多能性幹細胞の未分化維持培養は、50Gy にて放射線照射されたマウス胎仔由来線維芽細胞 (Mouse embryonic fibroblast: MEF) 上で行った。培地は 20% KSR (Invitrogen, 米国)、0.1mM 非必須アミノ酸 (NEAA; GIBCO, 日本)、0.11mM 2-メルカプトエタノール (GIBCO)、2mM L-グルタミン (GIBCO)、5ng/ml リコンビナントヒト bFGF (和光, 日本) を添加した DMEM/F12 Ham を用いた。培地交換は毎日行い、未分化状態を維持するために 7 日おきに継代し、37°C, 5% CO₂ インキュベーター内で培養した。継代時は 0.25%トリプシン、1mM 塩化カルシウム、20% KSR を用いて未分化コロニーを碎いた後に、新たな MEF 上に播種した。

後述する血球前駆体 (HPC) 分化培養に用いたマウス C3H10T1/2 細胞株は、理研 BioResource Center より購入した。Eagle Basal Medium (Invitrogen) に 10% FBS (Invitrogen)、2mM L-グルタミンを添加した培地を用いて培養し、継代は 3-4 日毎に行った。細胞形質を変化させないよう、継代回数 15 回以内にて使用した。

後述するウイルスベクターの産出に用いた 293T および 293gp 細胞株は、DMEM に 10% FBS (Invitrogen)、2mM L-グルタミン、100U ペニシリン、0.1 mg/mL ストレプトマイシンを添加した培地を用い、3-4 日毎に継代を行った。293gp はレトロウイルスの gag/pol、エンベロープタンパク質である VSV-G が 293T 細胞に導入された細胞株であり、マサチューセッツ工科大学 Richard Muligan 博士より供与いただいた²⁹⁾。VSV-G の発現は Tet-off システムによって制御されており、ウイルス非産生時はテトラサイクリンを培養系に添加することで VSV-G の発現は抑制されている。ウイルス回収時にテトラサイクリンを培養系から除くことで VSV-G が発現し、産出されたウイルスゲノムがエンベロープに内封されてレトロウイルスとなる。ウイルス産出時には、前述した培地に 1 μ g/ml テトラサイクリン、2 μ g/ml ピューロマイシンおよび 0.3mg/ml ネオマイシンを添加して用いた。

2-2-3. ヒト ES/iPS 細胞からの血球前駆体 (HPC) の分化誘導

Takayama らの報告に倣い、HPC 分化誘導を実施した³⁰⁾。培養液は、15% FBS (ICN Biomedicals, 米国)、10 μ g/ml インスリン、5.5 μ g/ml ヒトトランスフェリン、5ng/ml 亜セレン酸ナトリウム、2mM L-グルタミン、0.45mM モノチオグリセロール、50 μ g/ml アスコルビン酸を Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM) に添加して血球分化培地とした。適宜、血球分化培地に各サイトカインを添加して用いた。ゼラチンコーティングを行った 10cm 培養皿に、50Gy の放射線照射処理を行った C3H10T1/2 を 8×10^5 個播種し、フィーダー細胞とした。フィーダー細胞上に、未分化維持された ES/iPS 細胞コロニーを播種し、20 ng/mL VEGF を添加した血球分化培地で 14 日間培養し、ES/iPS-Sac 形成を促した。培地交換は、3-4 日毎に行った。Sac 内に産出した HPC は、機械的に Sac を崩して得られた培養上清を孔径 40 μ m セルストレイナーにてろ過して回収し、さらなる分化誘導実験に用いた。

2-2-4. ヒト ES/iPS 細胞由来 HPC の赤血球系分化

ゼラチンコーティングを行った 6well 培養皿に、50Gy の放射線照射処理を行った

C3H10T1/2 を 1.5×10^5 個/well として播種し、フィーダー細胞とした。Sac より得られた HPC を血球分化培地で懸濁し、 5×10^4 個/well として播種し、3 種類のサイトカインを組み合わせて赤血球系細胞への分化誘導を行った (図 3A)。Day 0~6 においては、6U/ml human EPO, 50ng/ml human SCF, 10ng/ml human TPO の存在下で培養を行った。Day 7~12 においては、3U/ml human EPO と 50ng/ml human SCF の存在下で培養を行った。Day 13 以降は、3U/ml human EPO の存在下で培養を行った。3~4 日毎に培養液の交換を行った。

2-2-5. レンチウイルスベクターの作製

Poly-L-Lysine でコーティングした 10cm 培養皿に、10% FBS を含有した DMEM で懸濁した 293T 細胞を 3×10^6 個播種し、37°C、10% CO₂ の環境下で一晩培養した。翌日、15 μ g レンチウイルスベクター、10 μ g gag/pol PRE、10 μ g VSV-G、200mM 塩化カルシウムを蒸留水にて混合して 500 μ L として、そこへ等量の Hepes を添加して 1mL とした。この溶液を 10cm 培養皿 1 枚当たりへ 1mL 添加し、37°C、CO₂ 3% の環境下にて約 16 時間インキュベートを行った。その翌日、10mM Forskolin と 10% FBS を含有した DMEM 5mL に培地を交換し、37°C、CO₂ 10% にてインキュベートを行った。その 2 日後に、培養上清を孔径 0.45 μ m のフィルターにてろ過して回収し、40000g で 2 時間の遠心処理を行った。遠心後、上清を除去し、適量の蒸留水にて沈渣を懸濁し、レンチウイルスベクター溶液とした。

2-2-6. レトロウイルスベクターの作製

Poly-L-Lysine でコーティングした 10cm 培養皿に、10% FBS を添加した DMEM 培地で懸濁した 293gp 細胞を 3.5×10^6 個播種し、37°C、10% CO₂ 環境下でインキュベートした。翌日、20 μ g レトロウイルスベクター、10 μ g VSV-G、200mM 塩化カルシウムを蒸留水にて混合して 500 μ L として、そこへ等量の Hepes を添加して 1mL とした。この溶液を 10cm 培養皿 1 枚当たり 1ml 添加し、37°C、3% CO₂ にて一晩インキュベートした。その翌

日、5 μ M Forskolin と 10% FBS を含有した DMEM 5mL に培地を交換し、37°C、CO₂ 10% にてインキュベートを行った。その 2 日後に、Poly-L-lysine コーティングした培養皿上でサブコンフルエントとなった 293gpg 細胞に、10ng/ml テトラサイクリンおよびプロタミンを含有した 293gp 細胞の培養上清を添加し、一晚培養した。その翌日、ブラストサイジン添加した同様の培地に交換し、遺伝子導入細胞のセレクションを行い、ウイルス産生 293gpg 細胞とした。

上述の工程を介して得られたウイルス産生 293gpg 細胞を、Poly-L-Lysine でコーティングした培養皿に播種した。サブコンフルエントとなった時点で、テトラサイクリンを除去した培地に交換し、ウイルス産生を促した。産生直後の培養上清は共雑物を多く含むため、3 日後に改めてテトラサイクリンを除去した培養液への交換を行い、ここから 24, 48, 72 時間目に培養上清を回収した。回収した培養上清を 6000g、4°C で 16 時間の遠心処理を行い、得られた沈残を適量の蒸留水で懸濁し、レトロウイルスベクター溶液とした。

2-2-7. HPC への遺伝子導入と imERYPC の樹立

ES/iPS-Sac より得られた HPC 5×10^4 個を、3 U/ml EPO、50ng/ml SCF および 10 μ g/ml プロタミン硫酸を添加した血球分化培地に懸濁し、フィーダー細胞（C3H10T1/2）に播種した。そこへ各ウイルスベクターを添加し、Takayama らの方法に倣い、スピニンフェクション（32°C、900rpm、60 分間の遠心処理）を行った³¹⁾。

imERYPC を樹立する際には、DOX 誘導性レンチウイルスベクターを用い、multiplicity of infection: MOI=20 にて *c-MYC* および *BCL-XL* をスピニンフェクションした後に、3U/ml EPO、50ng/ml SCF、1 μ g/ml DOX を添加した血球分化培地に細胞を分散させ、フィーダー細胞上で 12 日間の培養を行った。続いて、3.5cm 培養皿に 1 μ g/ml DOX を含有した半固形培地（MethoCult H4434; Veritas, 日本）を添加し、そこへ遺伝子が導入された血球細胞 1×10^4 個を播種して 12 日間培養し、単一細胞からコロニー形成を促した。各コロニーを顕微鏡下で採取し、3U/ml EPO、50ng/ml SCF、1 μ g/ml DOX を添加した血球分化培地を用いてフィーダー細胞上で培養を行い、imERYPC を樹立した。

2-2-8. imERYPC の凍結保存と融解方法

セルバンカー（タカラバイオ）を用いて $5 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7/\text{mL}$ の細胞懸濁液を調製した。バイアルに分注した後にバイセルに入れ、 -80°C にて凍結した。凍結操作翌日以降、液体窒素タンクにバイアルを移して保管した。凍結融解時は、 37°C に設定したウォーターバスにて急速融解した後に、 3U/ml EPO および $1\text{ }\mu\text{g/ml}$ DOX を添加した血球分化培地に細胞を懸濁して播種を行った。

2-2-9. 細胞表面抗原のフローサイトメーター解析

各抗体を添加した 3% FBS 含有 PBS に、各検討で得られた細胞を懸濁し、氷上で 30 分間の抗体反応処理を行った。抗体反応後、3% FBS 含有 PBS にて細胞の洗浄を行い、Aria (BD 社) を用いて解析およびソーティングを行った。

2-2-10. imERYPC の形態観察と O-dianisine 染色

3×10^4 個の細胞を用いてサイトスピンを行い、スライドガラスに細胞を接着させた。Hemacolor (Merck, ドイツ) を用い、各スライドガラスの染色を行った後に、顕微鏡下で形態観察を行った。ヘム陽性細胞率は、既報に倣い O-dianisine 染色を行って算出した³²⁾。まず、 2mg/ml O-dianisine を添加した 0.2%酢酸水と、30%過酸化水素を 10:1 の割合で混合し、染色溶液とした。細胞懸濁液 $200\text{ }\mu\text{l}$ に、染色溶液を $20\text{ }\mu\text{l}$ 添加して 1 分間の染色処理を行った後に、洗浄を行った。サイトスピンにてスライドガラスに細胞を接着させた後にメタノールで固定を行い、顕微鏡下でヘム陰性および陽性細胞の個数確認を行った。

2-2-11. ヘモグロビンの定量

imERYPC ペレットを液体窒素で急速凍結した後に融解して溶血させ、ヘモグロビンが含まれる上清を回収した。この上清を用いて、既報に倣い³³⁾、シアンメトヘモグロビン法にてヘモグロビン含量の測定を実施した。ヘモグロビン量が既知の成人赤血球を用いて検量

線を作成し、定量を行った。

2-2-12. 透過型電子顕微鏡 (TEM) による imERYPC の観察

0.5% グルタルアルデヒドと 2% パラホルムアルデヒドを含有する 0.1M リン酸バッファー (pH 7.4) に imERYPC を懸濁し、4℃にて 60 分間の固定処理を行った。固定した imERYPC をリン酸バッファーで洗浄した後に、1% 四酸化オスミウムを含有するリン酸バッファーに懸濁し、氷上で 60 分間の再固定処理を行った。脱水させた後にエポキシ樹脂に包埋し、60-80 nm の薄切切片を作製した。この切片を 2% 酢酸ウラニルを含有する 70% メタノールとレイノルズクエン酸鉛で染色した後に、透過型電子顕微鏡 (HT-7700, 日立, 日本) にて観察を行った。

2-2-13. Quantitative RT-PCR (qRT-PCR)

RNeasy Micro kit (Quiagen, 日本) を用いて全 RNA を回収した後に、oligo-dT primers (Invitrogen, USA) と RT-PCR system (Thermo Fisher Scientific K.K, 日本) を用いて cDNA への逆転写反応を行った。Real-time PCR は TaqMan Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems) もしくは SYBR Premix Dimer Eracer (Takara Bio, 日本) のプロトコールに従って検体を調製し、ABI 7900HT Real-Time PCR System (Life Technologies Corporation, USA) を用いて核酸の増幅シグナルを検出した。用いたプライマーセットは表 3 に記載した。

2-2-14. グロビン鎖の免疫染色

Ma らの報告に従って実施した¹⁸⁾。3×10⁴ 個の細胞を用いてサイトスピンを行い、スライドガラスに細胞を接着させた。4% パラホルムアルデヒドで固定を行った後に、5% スキムミルクと 0.1 % Triton を含む PBS にて膜透過処理を 30 分間行った。続いて、一次抗体 (mouse anti-human β , γ -globin mAbs; Santacruz Biotechnology. mouse anti-human ϵ -globin mAbs; Fitzgerald.) を添加し、4℃にて一晩反応を行った。翌日、

5% スキムミルクを含有した PBS にて 3 回洗浄を行った後に、2 次抗体を添加して 30 分間の反応を行った後に、DAPI で核染色を実施した。

2-2-15. 臍帯血 CD34+細胞を起源とした赤血球系細胞への分化誘導

血球分化培地に 3 種類のサイトカインを組み合わせて、臍帯血 CD34+を由来とする赤血球系細胞への分化誘導を行った。Day 0～6 においては、6U/ml human EPO, 50ng/ml human SCF, 10ng/ml human TPO の存在下で培養を行った。Day 7～12 においては、3U/ml human EPO と 50ng/ml human SCF の存在下で培養を行った。Day 13 以降は、3U/ml human EPO の存在下で培養を行った。3 日毎に培養液の交換を行った。qRT-PCR を行う際には、FACS Aria (BD) を用いて GPA+細胞をソーティングして RNA を抽出した。

2-2-16. 陽イオン交換 HPLC (CE-HPLC)

東ソー株式会社 (日本) に依頼し、HLC-723G8 を用いて imERYPC の HPLC 解析を実施した。測定モードは β -thalassemia mode とした。HbA (β グロビンと α グロビンの 4 量体) と HbF (γ グロビンと α グロビンの 4 量体) は、同等の保持時間を有する健常人末梢血とサラセミア患者末梢血を比較対象として検出した。HbA の前に出現したピークは、Douay らの報告を参考として、Hbe (ϵ グロビンと α グロビンの 4 量体) と推定した³⁴⁾。

2-2-17. 酸素解離曲線

Hemox analyzer (TCS Scientific Corporation, USA) を用いて、imERYPC、成人末梢血および臍帯血 CD34+由来赤芽球の酸素解離曲線を測定した。測定は、既報に倣って実施した³⁵⁾。各検体を Hemox-solution (TCS Scientific Corporation) にて懸濁し、pH 7.4 \pm 0.01、37℃に保持して測定を実施した。

2-2-18. 統計解析

全てのデータは平均値 \pm SEM で提示した。また、全ての統計解析は GraphPad Prism

Version4.0 を用いて行った。図 13D、図 15A、図 17A, B, D、図 18A-J は、one-way ANOVA 解析を行った後に、Bonferroni's multiple comparison test にて有意差検定を行った。図 4B, D, E, F は、Mann-Whitney test を用いて有意差検定を行った。 $P<0.05$ を有意差ありと判定した。

2-3. 結果

2-3-1. ES/iPS 細胞由来 HPC の産出

Takayama らの報告を参考として得られたヒト ES/iPS-Sac 由来 HPC をソースとして³⁰⁾、赤芽球株の樹立を試みた。未分化状態の ES/iPS 細胞を、ストローマ細胞である C3H10T1/2 に播種し、血管内皮新生因子 (Vascular endothelial growth factor: VEGF) を含有した血球分化培地で培養することで、囊状の集合体を得られる (図 2A-B. ES/iPS-Sac と称する)。この囊状集合体は血管内皮と同様の細胞表面抗原である VEGFR2 や CD31 を有し、その内部には血球細胞の産生が確認できる。培養開始後 14 日目に Sac より回収された血球細胞は、主に CD34 もしくは CD43 陽性の幼若な血球細胞である (図 2C)。血球細胞において、CD43 は CD34 に次いで発現する抗原として報告されており、様々な血球細胞への分化能を有する HPC の指標となる³⁶⁾。

続いて、Sac より得られた HPC を、EPO を含有した血球分化培地で培養して赤芽球系細胞へ分化誘導を行った結果を示す (図 3A)。赤血球の表面抗原である Glycophorin (GPA) 陽性細胞の増殖曲線は、培養開始後 14 日目辺りで平衡状態に達した (図 3B)。フローサイトメトリー解析にて GPA およびトランスフェリンレセプターである CD71 の発現を確認したところ、大部分の細胞が GPA+/CD71+ であった (図 3C)。ギムザ染色にて形態を確認したところ、経時的な赤芽球の成熟が確認され、培養 17 日目の大部分の細胞は濃縮した核を有する正染性赤芽球まで分化していることが認められた (図 3D)。また、ES/iPS-Sac より得られた HPC は、赤血球以外にも様々な血球へと分化することが知られている。Takayama らは、Thrombopoietin (TPO) を含有した血球分化培地で HPC を培養すると、培養 11 日目には CD41a/CD42b 陽性の巨核球および血小板が得られることを示している³⁰⁾。また、T 細胞へ分化することも報告されている³⁷⁾。この ES/iPS-Sac より得られた HPC をソースとして、筆者は赤芽球株の作製を試みた。

2-3-2. 赤芽球の増殖亢進に関する検討

まず筆者が着目した遺伝子は *c-MYC* である。*c-MYC* は iPS 細胞の樹立に必要な因子³⁸⁾、あるいはガン遺伝子として広く知られているが³⁹⁾、生態の恒常性維持にも必須の因子である。例として、*c-MYC* ノックアウトマウスは赤血球の産生能が不十分であり、貧血によって胎性致死に至ることが知られている⁴⁰⁾。また、Jayapal らは *c-MYC* が赤芽球増殖に重要な役割を果たすことを示している⁴¹⁾。*c-MYC* は他の血球細胞の増殖にも関わることが報告されており、Takayama らはヒト ES/iPS-Sac より得られた HPC に、TPO の存在下で *c-MYC* を強制発現させることにより、巨核球の増殖が亢進することを見出している³¹⁾。巨核球と赤芽球は共通の前駆細胞である MEP から分化すると報告されていることから⁴²⁾、筆者は EPO の存在下で HPC に *c-MYC* を強制発現させることで、赤芽球の増殖を向上させることができると考え、検討に着手した。前述した Jayapal らの報告によると、*c-MYC* は赤芽球の増殖を促す一方で、最終成熟時にはその発現が減少していくことが示されている⁴¹⁾。そこで筆者は、ドキシサイクリン (DOX) 誘導性レンチウイルスベクターを用いて (図 5A i)⁴³⁾、検討を実施することとした。

KhES-3 由来の Sac を形成し、そこから得られた HPC に EPO の存在下で *c-MYC* を強制発現させた。その結果、GPA 陽性である赤芽球の増殖能亢進が確認されたが、一過性の現象であり、*c-MYC* 強制発現後 21 日目には大部分の赤芽球は消失してしまった (図 4A)。赤血球の分化過程において、抗アポトーシス遺伝子として知られる *BCL-XL* が重要な役割を果たすことが報告されているが^{44, 45)}、*c-MYC* はこの *BCL-XL* の発現を抑制するとの報告も存在する⁴¹⁾。そこで、quantitative RT-PCR (qRT-PCR) にて *BCL-XL* の発現を確認したところ、*c-MYC* の強制発現によって *BCL-XL* の発現が低下することが認められた (図 4B)。この結果より、*c-MYC* のみを強制発現させた赤芽球においては、アポトーシスの増加が起こると推察できる。そこで、*c-MYC* と同時に *BCL-XL* を強制発現させたところ、対数増殖を続ける GPA+赤芽球集団が得られることが確認された (図 4C)。加えて、*BCL-XL* の発現上昇が認められた (図 4D)。続いて、アポトーシスの検出を試みた。アポトーシスの検出には複数のマーカーが用いられている。例として、フォスファチジルセリン (PS)

はリン脂質として細胞膜の内側に局在しているが、アポトーシスの初期の段階で細胞表面に露出することが知られている⁴⁶⁾。また、ミトコンドリアの膜電位の低下に伴うチトクローム C の放出が起こり、アポトーシスが誘導されることが報告されている⁴⁷⁾。そこで筆者は、PS と高い親和性を有するリン脂質結合タンパク質である Annexin V と、ミトコンドリアの膜電位を検出するカチオン化シアニン色素である DiI C₁(5)を用い、フローサイトメトリーにてアポトーシスの解析を行った (図 4E-G)。*c-MYC* 単独発現に対し、*BCL-XL* を加えて強制発現させることで、Annexin V 陽性率の低下とミトコンドリア膜電位の低下抑制が確認された。この結果より、*c-MYC* に加えて *BCL-XL* を強制発現させることで、赤芽球はアポトーシスを免れて増殖を維持できることが示唆された。

2-3-3. ウイルスベクターとサイトカインの選定

効率的に赤芽球を増殖させることを目的として、最適なウイルスベクターおよび培養液に添加するサイトカインの選定を行った。用いたベクターは 2.3.2 項で使用した DOX 誘導性レンチウイルスベクターに加え、 β -estradiol 誘導性レトロウイルスベクターとした⁴⁸⁾ (図 5A i・ii)。レトロウイルスベクターに関しては、*c-MYC* と *BCL-XL* を単独で組み込んだベクターと、口蹄疫ウイルスが保持する 2A 配列を介して *c-MYC* と *BCL-XL* を組み込んだオールインワンベクターを作成した。この 2A 配列は、前後に組み込まれた遺伝子とともに単一 mRNA として転写された後、タンパク質に翻訳される際に特定部位で切断される、即ち前後に組み込まれた遺伝子が等しいモル比のタンパク質として発現するという特徴を有している⁴⁸⁾。サイトカインは、SCF+EPO、SCF+EPO+TPO+FLT-3L の 2 通りとした。結果を示す (図 5B)。レンチウイルスベクターを用いた場合には、いずれの試行回数においても対数増殖を示す GPA+細胞が得られた (図 5C)。一方、レトロウイルスベクターにおいては、*c-MYC*-2A-*BCL-XL* ベクターを用いた際に 1 度だけ対数増殖を示す GPA+細胞が得られたが、再現性が低く成功率は 10%であった。他のレトロウイルスベクターにおいては、GPA+細胞の大きな増殖は確認されなかった。以上の結果より、大きな増殖能を有する赤芽球集団を得るためには、レンチウイルスベクターが適していると判断し、検討を進め

ていくこととした。また、サイトカインの組み合わせは赤芽球増殖効率に大きな影響を及ぼさなかったため、SCF+EPO のみで十分であると判断した。

2-3-4. 赤芽球株のクローン化

2-3-2,3 項にて、HPC に *c-MYC* と *BCL-XL* を同時に強制発現させることで、アポトーシスによる細胞死誘導を抑制し、大きな増殖能を有する赤芽球を産生できることを示した。また、遺伝子導入ベクターおよび培養液に添加するサイトカインの選定を行った。その一方で、得られた赤芽球集団の培養を続けると、血球ではない接着細胞が出現し、赤芽球の増殖が阻害されるという大きな課題が発生した。代表例を示す (図 6A-C)。実験施行毎に、接着細胞が出現するタイミングは異なるが、いずれの施行においても接着細胞は出現し、遅くとも遺伝子導入後 40 日以降には、培養系の大部分が接着細胞で占められることが確認された。筆者は、ES-Sac から HPC を分取した際に、わずかに混入した非血球細胞に遺伝子が導入されることで接着細胞が出現すると推察し、以下の検討を実施することで赤芽球集団の純度を高めることを試みた。

2-3-4A. Pre-sorting trial

2-3-4B. Late-sorting trial

2-3-4C. Semisolid culture trial

2-3-4A. Pre-sorting trial

ES-Sac から得られた HPC に、フローサイトメーターを用いたソーティングを行って血球分画の純度を高めた後に、遺伝子導入を実施した。まず、HPC を CD34/CD43 で展開し、CD34+/CD43dull、CD34+/CD43high、CD34-/CD43high、CD34-/CD43- の 4 分画をソーティングした (図 7A)。それぞれの分画を CD45、GPA、CD41a で展開したところ、CD34+/CD43dull は CD45+ が大部分を占める集団、CD34+/CD43high は CD45+、GPA+、CD41a+ が混在する集団、CD34-/CD43high は GPA+ が大部分を占める集団、CD34-/CD43- は血球細胞がほとんど存在しない集団であった (図 7C)。この 4 分画に対し、*c-MYC* と

BCL-XL を強制発現させた結果を示す (図 7B)。遺伝子導入前に赤芽球系へ分化が進行していたと考えられる CD34-/CD43high 分画が、最も大きな増殖能を示した。また、遺伝子導入後に得られた血球細胞をフローサイトメーターによって解析し、GPA とベクターマーカである GFP で展開したところ、CD34-/CD43high 分画はほぼ全ての細胞に遺伝子が導入されていることが確認された。その一方、CD34+/CD43dull と CD34+/CD43high 分画への遺伝子導入効率は低く、それぞれ 4%と 32%であった。また、CD34-/CD43-分画からは、赤芽球の産生は確認されなかった (図 7D)。この結果より、大きな増殖能を有する赤芽球集団は、主に CD34-/CD43high 分画から産出されると推察できる。その一方で、CD34-/CD43high 分画から得られた赤芽球集団も、長期培養を行うと接着細胞の増殖が認められ、培養を維持するには至らなかった (データは示さない)。

2-3-4B. Late-sorting trial

ES-Sac より得られた HPC に *c-MYC* および *BCL-XL* を強制発現させて 15-17 日間培養を行った後に、フローサイトメーターを用いて GPA+/GFP+細胞のシングルセルソーティングを実施し、赤芽球のクローン化を試みた。施行は 2 回行い、合計 672 個の GPA+/GFP+細胞をシングルセルソーティングした。コロニーを形成するクローンが 14 個観察されたが、いずれも増殖は維持できなかった (図 8A-B)。

2-3-4C. Semisolid culture trial

培養細胞は、パラクライン作用と呼ばれる細胞間の相互作用によって、その生存率が維持されることが広く知られている⁴⁹⁾。シングルセルソーティングされた赤芽球が生存できなかった原因は、パラクライン作用が期待できない環境で培養されたことによると考えられる。そこで、細胞間のパラクライン作用が期待できる環境で、赤芽球のクローン化を試みた。ES-Sac より得られた HPC に *c-MYC* および *BCL-XL* を導入した後に、半固形培地にて単一細胞由来のコロニー形成を促した。その結果、播種細胞数に対してコロニー数が加速度的に増加することが確認された (図 9A-B)。この結果は、細胞間のパラクライン作

用が働くことで、単一細胞の増殖が促されたことを示唆していると考えられる。また、コロニーの形成は、*c-MYC*もしくは *BCL-XL* の単独発現では確認されず、*c-MYC*と *BCL-XL* を共に強制発現させることで認められた (図 9C)。続いて、各コロニーを採取し、EPO および SCF を添加した液体培地にて、赤芽球クローンの増殖を促した。各クローンの GPA の経時的な発現推移を示す (図 10)。解析開始時は、いずれのクローンも GPA+/GFP+の赤芽球系細胞であったが、No.7, 8, 16 を除くクローンは GPA-/GFP+の細胞へと変化していくことが確認された。また、GPA-/GFP+となったクローンの形態は、いずれも接着細胞であった。導入遺伝子を強制発現させた後に出現する接着細胞は、Sac からの HPC 採取時に混入した非血球細胞に由来するものと推察していたが、本結果より分化転換であることが示唆された。

GPA の発現を維持し続けたクローンの中で、特に増殖能が高い Clone No.8, 16 は対数増殖を続け (図 11A)、9 ヶ月以上に渡って増殖を続けることが確認されたことから、この細胞株を不死化赤芽球株 (Immortalized erythrocyte progenitor cells : imERYPC) と称することとした。imERYPC-8, 16 とともに、細胞ペレットは白く、細胞表面にトランスフェリンレセプターである CD71 を発現する幼若な赤芽球である (図 11B)。形態学的にも、前赤芽球もしくは好塩基性赤芽球であることが確認された (図 11C)。ここまでの過程で確立した imERYPC の樹立概要を図 11D に示した。また、以降の検討は imERYPC-8, 16 を用いて解析を進めることとした。

2-3-5. imERYPC の特性解析 1 (増殖能に関する評価)

imERYPC の増殖に必要なサイトカインの選定を実施した。樹立時に用いたサイトカインは EPO および SCF であったため、選定検討はサイトカインなし、SCF のみ、EPO のみ、SCF+EPO の 4 通りとした。その結果、imERYPC-8, 16 とともに、SCF は必要なく、EPO 依存性を示すことが確認された (図 12A)。続いて、血清の影響確認を実施したところ、血清非存在下では、増殖が維持できないことが明らかとなった (図 12B)。続いて、フィーダー細胞 (C3H10T1/2) との共培養が増殖能に与える影響確認を実施した。imERYPC-8 は、

フィーダー細胞が存在しなくとも、その増殖能には影響がないことが確認された。
imERYPC-16 は、フィーダー細胞との共培養条件下において増殖能が高くなる傾向であったが、フィーダー細胞が存在しなくとも、増殖し続けることが確認された (図 12C)。また、凍結保存後の融解操作が増殖能に与える影響確認を実施したところ、凍結融解作業は影響がないことが確認された (図 12D)。

2-3-6. imERYPC の特性解析 2 (導入遺伝子発現を OFF とした際の形態変化)

培養を介して得られた赤血球を臨床応用に用いる際には、試験管内で赤芽球を脱核赤血球まで成熟させることが理想的な目標となる。imERYPC の樹立によって、理論上は治療に必要な細胞数 ($1 \sim 2.5 \times 10^{12}$ 個) を確保することは可能となったが、実用化に向けて成熟度合いを高めていく必要もある。

imERYPC の樹立に用いた *c-MYC* は、赤芽球の増殖に重要な因子である一方で、成熟時には発現が低下していくことが報告されている⁴¹⁾。培養液から DOX を除去し (DOX(-) と記す)、導入遺伝子発現を OFF とした際の imERYPC の増殖能を示す (図 13A)。imERYPC-8、16 とともに、増殖能が停止することが確認された。また驚いたことに、細胞ペレットは赤褐色へと変化した (図 13B)。O-dianisine 染色を行ったところ、DOX(-) として 4 日目には、ほぼ 100% の imERYPC がヘムを有する赤芽球となることが確認された (図 13C-D)。DOX(-) として 7 日目における imERYPC のヘモグロビン含量を測定したところ、imERYPC-8 は 30.0 ± 3.0 pg/cell、imERYPC-16 は 37.4 ± 4.1 pg/cell であり、成人の末梢赤血球 (約 30 pg/cell) と同等量のヘモグロビンを含有していることが確認された。

ギムザ染色による形態観察結果を図に示す (図 14A-B)。DOX(+) の状態では、81-88% が前赤芽球、11-18% が好塩基性赤芽球であるのに対し、DOX(-) として 7 日後には、47-52% が多染性赤芽球、43-50% が正染性赤芽球まで成熟することが確認された。続いて、透過型電子顕微鏡 (Transmission electron microscopy; TEM) にて imERYPC の詳細な形態観察を実施した (図 14C)。赤芽球の成熟過程を TEM で観察した先行研究では、幼若な赤芽球では大きな核とミトコンドリアの散在が確認されており、成熟が進行するに従い、ミトコ

ンドリアの凝集およびエンドソーム小胞の出現が確認されている⁵⁰⁾。また脱核する間際になると、濃縮した核の下部にエンドソーム小胞が集積していくことが報告されている⁵¹⁾。
imERYPCにおいても、DOX(+)では大きな核とミトコンドリアの散在が確認された(図 14C i)。また、DOX(-)においてはミトコンドリアの凝集およびエンドソーム小胞の出現が認められ(図 14C ii)、より成熟が進行した imERYPC においては、核の濃縮と、核の下部へのエンドソーム小胞の集積が認められた(図 14C iii)。これらの変化は先行研究内容と一致するものであり、imERYPC の成熟は赤芽球の正常な分化を模倣していると考えられる。

2-3-7. imERYPC の特性解析 (グロビン鎖の発現解析)

ヒト多能性幹細胞由来の赤血球系細胞は様々なヘモグロビンを保持しており、胚型である HbE ($\alpha 2: \epsilon 2$)、胎児型である HbF ($\alpha 2: \gamma 2$)、成人型である HbA ($\alpha 2: \beta 2$) から構成され、特に HbF の発現が高いことが報告されている^{20, 23)}。臍帯血 CD34+由来赤芽球(培養条件は後述の図 19A に示す)を比較対照として、各グロビン鎖の qRT-PCR 解析を実施した結果を示す(図 15A)。imERYPC-8, 16 共に、DOX(-)とすることで各グロビン鎖の発現上昇が確認され、 γ -globin の発現量は臍帯血 CD34+由来赤芽球に近い値であった。また、 ϵ -globin と β -globin の発現も確認された。臍帯血 CD34+由来赤芽球と比べると ϵ -globin は高く、 β -globin は低い値であった。続いて、グロビン鎖の発現解析をより詳細に行うために、免疫染色および陽イオン交換高速液体クロマトグラフィー(Cation exchange high-performance liquid chromatography: CE-HPLC)を用いてタンパク質レベルの発現解析を実施した。免疫染色を用いて imERYPC-16 の β -globin、 γ -globin、 ϵ -globin を解析した結果を示す(図 15B)。qRT-PCR 結果と同様に、いずれのグロビン鎖も検出されたが、発現量は γ -globin が最も高く、 ϵ -globin が最も低い傾向であった。続いて、4 量体のヘモグロビン構造を保持しつつ、電荷状態の差異によって各ヘモグロビンを分離できる CE-HPLC を用いた解析を実施した(図 15C)。陽性対照として、成人末梢血(HbA の陽性対照)とサラセミア患者末梢血(HbF の陽性対照)を用いた。両クローンともに、主に 3 つのピークを有し、陽性対照と同様の保持時間を示すピークを HbF(保持時間 1 分)と HbA

(保持時間 2.3~2.4 分) と判定した。溶出時間 3.5~4 分のピークは、同様の解析を行って
いる Kobari らの報告では Hbe とされている³⁴⁾。加えて、qRT-PCR と免疫染色の結果にお
いても imERYPC は ϵ -globin を発現することが認められることから、Hbe と推察した。
imERYPC も前述した先行研究と同様に、様々な型のヘモグロビンを有する赤芽球であつた
が、その大部分は HbF であり、Hbe と HbA の含有率は小さい値であつた (imERYPC-8; HbA
4.5%, Hbe 18.4%, imERYPC-16; HbA 5.8%, Hbe 2.6%)。また、CE-HPLC 解析における
Hbe の発現は imERYPC-8 > imERYPC-16、HbA の発現は imERYPC-8 < imERYPC-16
であり、qRT-PCR にて確認された ϵ 鎖および β 鎖の発現と相関する結果であつた。

2-3-8. imERYPC の特性解析 (酸素解離曲線の測定)

ヘモグロビンの機能評価として、酸素解離曲線の解析が広く用いられている^{5,20)}。縦軸に
ヘモグロビンの酸素飽和度、横軸に血中酸素分圧をプロットした、酸素解離曲線の代表的
な例を示す (図 16A)⁴⁾。ヘモグロビンは、血中酸素分圧が高い領域では酸素と結合し、血
中酸素分圧が低い領域で、酸素を放出していくことが図 16A から読み取れる。また、HbA
に比べて、HbF の酸素解離曲線は左方偏移しており、高酸素親和性である。母体内におけ
る胎児は低酸素状態に晒されており、効率的に酸素供給を行うため、HbF は高酸素親和性
になると考えられている。また、p50 値 (ヘモグロビンの酸素飽和度が 50% となる際の血
中酸素分圧値) が酸素親和性を示す値として用いられており、HbA の p50: 約 26 mmHg、
HbF の p50: 約 20 mmHg と報告されている⁵⁾。

比較対照として成人末梢血 (HbA) と臍帯血 CD34+由来赤芽球 (HbF) を用い、imERYPC
の酸素解離曲線を測定した結果を示す (図 16B)。imERYPC-8, 16 とともに、酸素分圧が高
い領域では酸素と結合し、酸素分圧が低い領域では酸素を放出する、即ち酸素運搬体とし
て正常に機能することが確認された。また、p50 は成人末梢血: 27.2 mmHg、臍帯血 CD34+
由来赤芽球: 22.1 mmHg、imERYPC-8: 27.0 mmHg、imERYPC-16: 25.7 mmHg であ
つた。imERYPC のヘモグロビンは主に HbF であることから、大きく左方偏移した酸素解
離曲線を示すものと推察していたが、臍帯血 CD34+由来赤芽球よりも右方偏移した結果が

得られた。この原因は明らかとなっていないが、酸素親和性はヘモグロビンの型のみに影響を受けるわけではなく、pHなどの細胞内環境も大きく影響を与える因子であることが知られている。本測定に用いた imERYPC は核を有する赤芽球であり、脱核が達成できた際には細胞内環境が大きく変化し、臍帯血 CD34+由来赤芽球と同様の酸素解離曲線を描く可能性もあると考えられる。

2-3-9. imERYPC の成熟機構に関する解析

2-3-6.項にて、DOX(-)として導入遺伝子発現を OFF とすることで、imERYPC が正染赤芽球へと成熟していくことを示した。本項では、この成熟機構を明らかにするために、qRT-PCR にて imERYPC の成熟に関わる遺伝子の発現解析を実施した。

DOX(-)とした際の、導入遺伝子である *c-MYC* と *BCL-XL* の発現推移を示す(図 17A-B)。imERYPC-8, 16 共に、*c-MYC* の発現は DOX(-)とすることで 1/10 程度まで減少することが確認された(図 17A)。一方、驚いたことに DOX(-)とすることで *BCL-XL* の発現は 20 倍程度の上昇を示した(図 17B)。*BCL-XL* の発現推移を詳細に確認するために、外来性 *BCL-XL* と内在性 *BCL-XL* をそれぞれ認識するプライマーを作製し(図 17C)、別個に解析を行った。その結果、DOX(-)では内在性 *BCL-XL* の大きな発現上昇が確認された(図 17D)。一方で、外来性 *BCL-XL* は発現低下が認められた(図 17E)。この結果より、DOX(-)とした際の *BCL-XL* の発現上昇は、細胞が元来保有している内在性 *BCL-XL* に依存したものと捉えられる。

続いて、*BCL-XL* の上流における転写因子として報告されている *GATA-1*⁵²⁾ と、*BCL-XL* によって発現が促される *RAF-1*⁵³⁾ の qRT-PCR 解析を実施した(図 18C-D)。*GATA-1* は DOX(-)として早期の段階(2日目もしくは4日目)で発現上昇がピークとなることが確認された(図 18C)。また *RAF-1* の発現上昇は最も遅く、DOX(-)として7日目でピークに達することが認められ(図 18D)、他のグループの報告と関連すると考えられる。加えて、*GCN-5* の qRT-PCR 解析を実施した。*GCN-5* は、ヒストンアセチル化トランスフェラーゼ(Histone Acetyl Transferase: HAT)の1種として知られており、赤芽球の分化過程にお

いては前赤芽球の段階で高発現して核の濃縮を制御しており、成熟が進行するにつれて、その発現は減少していくことが報告されている⁴¹⁾。imERYPC の成熟過程においても、その報告と同様に、*GCN-5* の発現低下が確認された (図 18E)。この作用によって、imERYPC の核の濃縮も進行するものと推察できる。

上述した imERYPC の成熟過程における遺伝子発現の推移が、正常なヒト赤血球成熟と同様の過程を辿るのか確認するために、臍帯血 CD34+ を起源とした赤血球系への分化を行い、比較することとした。まず、CD34+ 由来赤芽球の分化プロトコールと GPA+ 細胞の増殖曲線を示す (図 19A-B)。GPA+ 細胞は培養開始後 10~11 日目にかけて対数増殖を示し、12 日目以降の増殖能は平衡状態に達した (図 19B)。また、フローサイトメトリー解析においては、GPA+/CD71+ の幼若な赤芽球が、GPA+/CD71- の赤芽球へと成熟していく様子が確認された (図 19C)。それぞれの時点において、GPA+ 細胞をソーティングにて分取し、ギムザ染色を行った代表例を示す (図 19D)。増殖能が旺盛な培養開始後 8 日目においては、大部分の細胞が前赤芽球であった。また、増殖能が平衡状態に達した 12 日目以降は赤芽球の段階的な成熟が進行し、17 日目には大部分の GPA+ 細胞が正染色赤芽球もしくは網状赤血球であることが認められた。これらの結果を受け、培養開始後 11 日目までを「増殖期」、12 日目以降を「成熟期」と定義した。続いて、qRT-PCR による遺伝子発現の解析結果を示す (図 18F-J)。増殖期においては、*c-MYC* および *GCN-5* の大きな発現が認められたが、成熟期になると *c-MYC* と *GCN-5* の発現は低下していき (図 18F, J)、その一方で *BCL-XL*、*GATA-1* および *RAF-1* は発現上昇を示すことが確認された (図 18G, H, I)。これらの mRNA 発現推移は、imERYPC 成熟時と非常に似通った挙動である。以上より、DOX(-)とした際の imERYPC の成熟過程は、正常な赤血球分化と同様の機構を有していると推察できる。

2-3-10. iPS 細胞を起源とする imERYPC の樹立

1998 年に生体を構成するあらゆる細胞への分化能を有するヒト ES 細胞が樹立されて以来、再生医療の実現に向けた研究成果が蓄積されつつある¹⁵⁾。その一方で、ES 細胞をソースとした医療の実現には、大きな課題も存在する。まず、ES 細胞は発生初期の胚盤胞から

得られる、即ち受精卵を破壊して作出されるために、倫理的な問題を伴っている。また、ES 細胞から分化誘導された細胞を移植に用いる際には、患者と同様のヒト白血球抗原 (Human leukocyte antigen: HLA) を保持する ES 細胞を選択し、拒絶反応を回避する必要がある。従って、ES 細胞をソースとした移植医療においては、治療を受けられる患者は必然的に限られてしまう。以上の課題の解決策として、皮膚細胞に 4 つの遺伝子を導入することで、三胚葉への多分化能を有するヒト人工多能性幹細胞 (induced Pluripotent stem cells: iPS 細胞) の樹立に成功したとの報告がなされた¹⁶⁾。iPS 細胞は皮膚細胞だけではなく、T 細胞など終末分化した様々な細胞より樹立できるため⁵⁴⁾、ES 細胞に付きまといいた倫理面の懸念事項を回避できるソースと考えられる。さらに、ES 細胞よりも簡便に樹立できることから、あらゆる HLA から構成されるセルバンクを構築してすることも可能であり、実用化への期待が日増しに高まっている。以上の背景より、筆者も iPS 細胞を起源とする imERYPC の樹立に取り組んだ。

iPS 細胞には由来となった細胞に起因する遺伝子刷り込みが残っており (エピジェネティックメモリーと称する)、分化指向性が株毎で異なると報告されている⁵⁵⁾。例として、血球細胞から作出された iPS 細胞は、血球細胞に分化しやすいと考えられている⁵⁶⁾。imERYPC の樹立効率も iPS 株間で異なると予想されるため、本検討では 4 株の iPS 細胞を用いて imERYPC の樹立検討を実施した。iPS-imERYPC の樹立検討は、ES 細胞使用時と同様の手順にて行った (図 11D)。結果一覧を示す (図 20A)。検討開始時は、エピジェネティックメモリーに起因して、血球を起源とする iPS 細胞から imERYPC が樹立されるものと想定していたが、血球からは長期間に渡って増殖を続ける赤芽球は得られなかった。代表例を示す (図 20B-C)。TkPB-SeV8 より得られた赤芽球クローンは、大きな増殖能を有さず、クローン化を試みて 1 カ月後には増殖低下が確認された。一方、検討開始時の予想に反し、長期間に渡って増殖を続ける imERYPC は皮膚細胞を起源とする iPS 細胞である 7F3955 から作出された。

樹立に成功した iPS-imERYPC の FACS 解析結果と増殖曲線を示す (図 20D-F)。GPA+ の細胞集団であり、ES 細胞由来の imERYPC に比べると増殖能が劣る株であったが、クロ

ーン化を試みてから 135 日辺りにて、治療に必要な細胞数 (1×10^{12} 個) を確保できることが確認された。続いて、DOX(-)とした際の形態変化を示す (図 20G)。大きな核と塩基性細胞質を有する幼若な赤芽球が、濃縮した核を有する多染性赤芽球～正染性赤芽球へと成熟していくことが確認された。以上の結果より、ヒト ES 細胞のみではなく、ヒト iPS 細胞からも同様な手法で imERYPC が作出可能であることが示された。

2-4. 考察

本研究では、現行赤血球製剤の代替品の開発に向けて、ヒト ES/iPS 細胞から赤血球を産出することを試みた。また、臨床応用に向けて大きなボトルネックとなっている「治療に必要な細胞数を如何にして確保するのか」といった点に注力して研究を進めた。赤血球は核を持たない、即ち増殖能が失われた細胞である。そこで筆者は、赤血球の前駆体である赤芽球を不死化細胞株として、細胞数を大量に増幅させることに着手した。Takayama らは、巨核球の増殖は、*c-MYC*の強制発現によって亢進することを見出した²⁴⁾。赤血球と巨核球は共通祖先である MEP から分化することが知られており、類似した遺伝子発現を有することが報告されている^{42, 57)}。そこで筆者は、ヒト ES/iPS 細胞より得られた HPC に EPO の存在下で *c-MYC*を強制発現させる検討を行ったが、アポトーシスが誘導されて大量の赤芽球を得ることはできなかった。そこで、*c-MYC*に加えてアポトーシス抑制遺伝子として知られる *BCL-XL* を強制発現させたところ、対数増殖を続ける赤芽球集団を得ることに成功した。*c-MYC*がアポトーシスを誘導する経路は様々な報告があるが、その中でミトコンドリアを介した代表的な経路を示す(図 21A)。*c-MYC*が直接的に⁵⁸⁾、もしくは p53 を介して間接的に *BAX*を活性化させる。活性化した *BAX*はミトコンドリアの膜透過性を亢進させることでチトクローム C の放出を促し、アポトーシスを誘導することが報告されている^{47, 59)}。*BCL-XL*は *BAX*に作用することで、赤芽球集団はアポトーシスを免れ、増殖を維持できたものと推察できる⁶⁰⁾。また、*c-MYC*は *BAX*のみならず、様々なアポトーシス誘発因子を活性化させることが知られている(図 21B)。本研究にて用いたアポトーシス抑制遺伝子は *BCL-XL*のみであったが、p53 や Apoptotic protease-activating factor1 (Apaf1) を抑制することを組み合わせて、将来的には赤芽球株の樹立効率や増幅効率をより高めることも期待できる。また、レトロウイルスおよびレンチウイルスベクターを用いて遺伝子導入検討を行った結果、赤芽球の増幅に最も効果的であったのはレンチウイルスベクターであった。レトロウイルスベクターが細胞に導入される際には、標的細胞の細胞分裂が必要となり、ある種の細胞においては導入効率が低いことが課題となっていた。一方、レンチウイルスベクターは前述した課題を解決するために開発されたウイルスベクターであり、

非分裂細胞にも効率よく導入されることが報告されている⁶¹⁾。レンチウイルスベクターを用いることで効率的に赤芽球の増幅が効率的に促された一因として、この導入効率が高いことが起因していると考えられる。また 2A ベクターを用いた際には、成功率は 10%と非常に低い、対数増殖を示す赤芽球を 1 度だけ得ることができた。詳細は本項にて後述するが、樹立に成功した imERYPC の *BCL-XL* の発現量は、決して高いものではないことが確認されている。おそらく、赤芽球として増殖し続けるためには、*c-MYC* と *BCL-XL* の発現バランスが重要な因子となるのであろう。2A ベクターを介して強制発現させた遺伝子は、等モル比のタンパク質として発現するという特徴を有しているが、赤芽球としての増殖を維持させる目的には、適していなかったと考えられる。

*c-MYC*に加えて *BCL-XL*を強制発現させることで、対数増殖を続ける赤芽球集団を得ることに成功したが、血球以外の接着細胞も増幅してしまう事象が確認された。この課題を解決するために、様々な方法を用いて赤芽球の純化を試みた。まず、接着細胞の増加は ES/iPS-Sac より HPC を分取する際に混入した血球以外の細胞であると考え、ソーティングにて血球の純度を高めた後に遺伝子導入を実施したが、接着細胞の増殖は抑制することができなかった。ソーティングによるクローン化は成功しなかった一方で、Sac より分種した HPC の中でも CD34-/CD43^{high} 分画より、大きな増殖能を有する赤芽球集団が得られることが確認された。この CD34-/CD43^{high} 分画の細胞表面抗原は主に GPA+であり、遺伝子導入前に赤血球系へ分化が進行している分画より、特に大きな増殖能を有する赤芽球集団が得られると推察できる。以上の検討をさらに深め、imERYPC の元となる細胞分画を詳細に特定することで、樹立効率はさらに高められると期待できる。

続いて、筆者は赤芽球のクローン化を試み、遺伝子導入後にシングルセルソーティングもしくは半固形培地を用いた培養を行った。その結果、シングルセルソーティングでは細胞の増殖が確認できなかった一方で、半固形培地中では個々の赤芽球が増殖し、コロニーを形成することが確認された。半固形培地に播種した細胞数に対して、得られるコロニー数は加速度的な増大を示すことから、細胞間のパラクライン作用が、赤芽球の生存維持に重要な役割を果たすことが示唆された。この半固形培地より採取したコロニーを液体

培地にて改めて増殖させることで、長期間に渡って増殖を続ける imERYPC の樹立に成功した。また、半固形培地より採取した各クローンは、培養を継続することで、大部分が接着細胞となる現象が確認された。本結果より、接着細胞の増殖は Sac より混入した非血球細胞によるものではなく、分化転換であることが示唆された。*c-MYC* は赤芽球の増殖に必須の因子である一方で^{40, 41)}、iPS 細胞の樹立を促す初期化因子として知られるなど、多様な機能を有している³⁸⁾。例として、*c-MYC* が HAT の発現を上昇させることでクロマチン構造が開放状態となり、様々な転写因子が働く環境を作り出すことが報告されている⁶²⁾。筆者が確認している imERYPC の増殖期間は 9 カ月程度であるが、実用化にあたっては、さらに長い期間に渡って増殖し続けることが望まれる。*c-MYC* の発現量が一定に維持されつづけられるのかが、重要なポイントとなると考えられる。

樹立に成功した imERYPC は、いずれもフィーダー細胞の非存在下で増殖可能であり、増殖に必要なサイトカインは EPO のみであった。また、凍結融解後もその増殖能に変化は確認されなかった。本結果は、培養赤血球を臨床応用に用いるにあたり、非常に意義のある結果と捉えている。EPO は医薬品として認可され、大量生産されているためにコストが非常に小さく、imERYPC の増殖を維持する培養液を調製するにあたり必要となる費用は 2.3 円/mL である (3U/mL として算出)。近年ではジェネリック医薬品の量産も開始されているため、将来的にはより安価に使用できるものと期待できる。一方で、他のサイトカインは研究用試薬として販売されており、安全性が担保されていないものが多い。また、コストが非常に大きく、例として SCF は 100 円/mL 以上となる (50ng/mL として算出)。多くの患者に培養赤血球製剤を届けるためには、製造コストを削減することは至上命題であり、高価なサイトカインを用いなくとも増殖を促せる imERYPC は、実用化に適した細胞株であると捕らえられる。また、再生医療製品を実用化する際には、異種由来成分による安全性への懸念が常に存在する。血球細胞を *in vitro* で増殖させる際には、フィーダー細胞を用いることが常套手段となっているが^{22, 63)}、異種細胞に頼らずに増殖を促せる imERYPC は、安全性の担保に向けて大きなメリットを有している。さらに、培養系は浮遊細胞のみで簡便に構築できるため、大量培養に適していると考えられる。また、株間で差

異はあるが、増殖能が高い imERYPC-8 の倍化時間は約 35 時間であり、1 週間の培養で 30 倍程度の細胞数が得られる。細胞数 10^8 個から培養を開始した場合、約 3 週間で 1 単位分の赤血球を確保できる。さらに培養を続けることで、その翌週には 30 単位、翌々週には 900 単位と、大量に細胞を増殖させていくことが可能である。凍結保存後にも特性は維持されることから、大量に増殖させた後に半永久的に凍結保存することも可能である。本邦における赤血球製剤の有効期限は採血後 21 日であることを考慮すると、将来的にはより安定した赤血球製剤の供給源になり得ると期待できる。

高い増殖能を有する imERYPC は、形態的には前赤芽球～好塩基性赤芽球であり、細胞表面抗原は GPA+/CD71+ の幼若な赤芽球であった。DOX(-)として導入遺伝子発現を OFF とすると増殖は停止し、赤褐色の正染色赤芽球まで成熟することが認められた。この状態のヘモグロビン含量と酸素解離曲線の p50 は、それぞれ 30.0～37.4 pg/cell と 25.7～27.0 mmHg であり、正常な成人赤血球と同等であることが確認された。試験管内での脱核が達成されておらず、成熟が不十分であるという大きな課題が残されているが、酸素を運搬するという機能面においては、大きな期待が持てる結果が得られた。また、グロビン鎖は胎児型である γ 鎖が主体であった。通常、 γ 鎖を有するヘモグロビンは高酸素親和性を有することから、成人赤血球と比べて左方偏移した酸素解離曲線を示すものと推察していたが、臍帯血 CD34+由来赤芽球よりも右方偏移した結果が得られた。酸素親和性は、ヘモグロビンの型のみに影響を受けるわけではなく、pH などの細胞内環境も大きく影響を与える因子であることが知られている。本測定に用いた imERYPC は核を有する赤芽球であり、脱核が達成できた際には細胞内環境が大きく変化し、臍帯血 CD34+由来赤芽球と同様の酸素解離曲線を描く可能性もあると考えられる。実用化にあたっては、胎児型のヘモグロビンはほとんど生体内には存在しないため、投与後の安全性に関する懸念が存在する。FDA は鎌状赤血球貧血患者の治療薬として、ヒドロキシウレアを承認している⁶⁴⁾。このヒドロキシウレアは、グアニル酸シクラーゼおよびサイクリックグアノシンーリン酸に依存したシグナルを伝達して胎児型ヘモグロビンの発現を上昇させる作用を有しており⁶⁵⁾、ヒドロキシウレアを投与された患者の体内には、胎児型ヘモグロビンを保持した赤血球が循環するこ

となり、生体内を循環する赤血球の約 25%が胎児型ヘモグロビンを保持することが報告されている⁴¹⁾。このヒドロキシウレアの投与実績が積み重なっていくことで、安全性に関する情報は蓄積されていくであろう。現時点で行うべきことは、継続した情報収集に努めることと考えられる。

続いて筆者は、qRT-PCR を用いて imERYPC が成熟する際の遺伝子発現解析を行い、成熟機構の考察を行った。驚いたことに、DOX(-)とすることで、導入遺伝子である *c-MYC* の発現は減少することが認められたのに対して、*BCL-XL* の発現は 20 倍程度まで増加することが確認された。この原因を詳細に解析したところ、*BCL-XL* の発現上昇は内在性 *BCL-XL*、即ち細胞が元来保有していた *BCL-XL* に由来したものと確認された。赤血球系細胞の分化において *BCL-XL* は重要な役割を担うことが、多くの研究グループより報告されている。例として、赤血球分化の後期の段階において *BCL-XL* の発現が上昇し、アポトーシスを免れることによって赤血球は成熟していくことが報告されている^{44, 45)}。また、血球前駆細胞に *BCL-XL* を強制発現させることで、分化指向性が赤血球系へと促されることも示唆されている⁶⁶⁾。以上の報告と照らし合わせると、DOX(-)として imERYPC が成熟していく際に確認された内在性 *BCL-XL* の発現上昇は、正常な現象であると捉える事ができる。続いて、赤芽球の成熟において有用な役割を果たす *GATA-1* は、*c-MYC* の作用によって発現が抑制されることが報告されている⁴¹⁾。また、*GATA-1* は *BCL-XL* のプロモーターに結合してその発現を促し⁵²⁾。*BCL-XL* の下流では *RAF-1* の発現上昇が起こり、ヘムの合成が促されることが示唆されている⁵³⁾。そこで、*GATA-1* と *RAF-1* の発現解析を行ったところ、いずれも DOX(-)とすることで、大きな発現上昇が確認された。このカスケードにより、赤芽球のヘム合成が促進すると考えられる。また Jayapal らは、赤血球の分化過程において、*c-MYC* の発現低下に伴って HAT の 1 種である *GCN-5* の発現低下も起こり、その結果として赤芽球の核の濃縮が促されて、正染色赤芽球へと成熟していくことをマウスレベルにて明らかにしている⁴¹⁾。imERYPC の成熟過程においても、Jayapal らの報告と同様に、*GCN-5* の発現低下が確認された (図 18E)。この作用によって、imERYPC の核の濃縮も進行するものと推察できる。また、この一連の遺伝子発現推移は、臍帯血 CD34+由来赤芽球分化にお

ける遺伝子発現推移と同様の挙動を示したことから、imERYPC の成熟は正常な赤血球発生を模倣していると推察できる。

qRT-PCR 解析結果より、imERYPC・DOX(+)の *BCL-XL* の発現量は、成熟時に比べて低いことが確認された。*BCL-XL* は赤芽球の成熟を促進させるとの報告が数多く存在することと、樹立に成功した imERYPC はいずれもヘム合成前の未熟な前赤芽球が主体となる細胞集団であることから、*BCL-XL* の過剰な発現は、imERYPC の樹立の妨げになると推察できる。図 10 に示したように、*c-MYC* および *BCL-XL* を導入した赤芽球細胞のクローン化を実施した際には、単離初期の段階から細胞ペレットが赤い、ヘムを有する細胞集団も確認されていた (Clone No.1,7)。これらの集団の増殖能は非常に小さく、長期に渡る培養は行えなかった。これらの集団には *BCL-XL* が多く導入され、その結果として赤血球系への分化が促されて高い増殖能を獲得できなかったものと考えられる。また、本検討は *c-MYC* と *BCL-XL* とともに MOI=20 にて遺伝子導入を行ったが、*BCL-XL* の感染価のみを低減させることで、樹立効率を高められる可能性があるかと期待できる。これまでの知見より考察した imERYPC の増殖と成熟機構を図 22 に示す。

試験管内で、imERYPC は正染性赤芽球まで成熟することは確認された一方で、脱核率が非常に低いことは臨床応用に向けた課題として残っている。赤芽球の成熟を促進すると報告されている因子は他にも多々挙げられている。例として、マウスから採取した赤芽球を用いた報告となるが、ヒストン脱アセチル化酵素 (Histone Deacetylase: HDAC) の 1 種である HDAC2 は赤芽球の成熟に伴い発現上昇して核の濃縮を促進しており、HDAC 阻害剤であるバルプロ酸やトリコスタチン A を培養系に添加することで、脱核が抑制されることが報告されている⁶⁷⁾。また、こちらもマウスから採取した赤芽球を用いた報告であるが、miR-191 が脱核に関与することを示唆する報告も存在する⁶⁸⁾。imERYPC の成熟過程において、これら因子の発現レベルを網羅的に解析し、正常な赤芽球成熟と異なる点をスクリーニングすることで、将来的には試験管内において imERYPC の脱核を促進できる因子を発見できると期待できる。

本研究では、ヒト ES 細胞のみではなく、ヒト iPS 細胞からも imERYPC の樹立を試み

た。iPS 細胞は、由来となる細胞のエピジェネティックメモリーが残っており、分化指向性に影響を与えることが報告されている。また株毎に初期化状態が異なるためか、同一の細胞由来の iPS 細胞であっても、株毎によって分化指向性が異なることが知られている^{55, 56)}。そこで筆者は、複数の iPS 細胞株を用いて imERYPC の樹立を試みた。その結果、血球由来 iPS 細胞からは、長期間に渡って増殖を続ける imERYPC の作出は確認されず、増殖能も低いものであった。これらの細胞は、DOX(+)として増殖を促す段階においても赤褐色の状態であった。血球由来 iPS 細胞より imERYPC が作出できない原因の一つとして、血球細胞のエピジェネティックメモリーにより、分化が進行しやすい状態となっており、未熟な前赤芽球としての増殖が維持できない可能性が考えられる。一方で、皮膚細胞由来の iPS 細胞より imERYPC が樹立できることが示された(それぞれ、ES-imERYPC および iPS-imERYPC と表記する)。この技術を応用して O 型 Rh-のドナーより iPS-imERYPC を樹立することができれば、あらゆる患者に移植可能な赤血球製剤の提供が期待できる。一方で、作出効率は ES 細胞に比べると低く、iPS 細胞の株間によっても差異が確認された。また、増殖能も ES-imERYPC より劣る結果であった。今後の課題として、どのような特性を有する iPS 細胞を用いることで、imERYPC の樹立効率を高めることができるのか、さらには増殖能が旺盛な imERYPC を如何にして作出できるのか、突き詰めていく必要性があると考えられる。

3. 生体内における不死化赤芽球株の評価

3-1. 緒言 1 赤芽球の脱核機構

2-3-6.項にて、imERYPC は in vitro において正染性赤芽球まで成熟することが示された。脱核した網状赤血球の存在も確認されたが、その存在割合はごくわずかであり、0.36%であった。将来的に、現行赤血球製剤の代替物として imERYPC を用いることを想定すると、in vitro における脱核率が低い点は大きな課題である。赤血球の脱核機構は未だに不明な点が多く、様々な説が存在するが、そのメカニズムに関する研究報告が徐々に蓄積されつつあるので、以下に紹介する。

1958 年、Bessis らは骨髓切片を TEM で観察したところ、マクロファージの周辺に赤芽球が集積していることを発見し、この細胞集団は erythroblastic island と名付けられた⁶⁹⁾。Erythroblastic island では、赤芽球が放出した核をマクロファージが貪食する様子が確認されたことから、マクロファージが赤芽球の脱核に関与することを明らかにしようとする研究報告が相次ぎ、マクロファージが脱核を制御する因子であることが一般的な考えになりつつある。例として、赤芽球およびマクロファージが有する Erythrocyte macrophage protein (EMP)が、赤血球の脱核に重要な役割を果たすことが示唆されている。胎児肝臓由来のマクロファージの EMP は細胞内に局在しており、成熟が進行していくと EMP の局在は細胞表面に移って赤芽球と接着することや、抗 EMP 抗体の存在下で赤芽球を培養すると、その増殖能と脱核率が低下することが報告されている^{70,71)}。さらに、EMP KO マウスにおいては、有核赤血球の循環率増加が認められている⁷²⁾。また、赤芽球が有する Integrin $\alpha 4 \beta 1$ と ICAM-4 が、マクロファージが有する VCAM-1 と Integrin αv に結合し、erythroblastic island を形成することが知られている⁷³⁻⁷⁶⁾。他にも、様々な因子が赤芽球とマクロファージによる erythroblastic island の形成に関与することが示唆されている(表4)。実際に、Fujimi らは in vitro において臍帯血由来 CD34+細胞を赤芽球まで分化させた後に、マクロファージと共培養することで脱核率が向上したことを報告している⁷⁷⁾。その一方で、マクロファージは赤芽球の脱核を直接的には亢進しないことを示唆する報告も蓄積されつ

つある。Miharada らは、臍帯血由来 CD34+細胞から分化誘導した赤芽球を、マクロファージの非存在下で脱核させる培養系を報告している¹⁹⁾。さらに近年、Hebibuchi らは *in vitro* においてヒト赤芽球が脱核する様子を動画として記録し、マクロファージが赤芽球の脱核に関与しないことを報告している⁷⁸⁾。さらに同研究グループの Ubukawa らは、赤芽球の脱核機構の解析をより詳細に突き詰めており、細胞骨格の一種である Myosin II B が脱核の中心的な役割を担うと言及している⁷⁹⁾。同様に、近年は赤芽球の内因性因子が脱核を制御しているという報告が散見される。他の例として、マウス赤芽球を用いた報告となるが、Rac GTPase とその下流に存在する mDia2 の発現が上昇することによって、アクチンの集合体である収縮環の形成が促され、赤芽球は自発的に脱核をすることが報告されている⁸⁰⁾。さらに同研究グループはヒストンの脱アセチル化によって脱核が進行することを見出し、HAT の一種である GCN-5⁴¹⁾や、HDAC の一種である HDAC2 が脱核に関わることを報告している⁶⁷⁾。また Keerthivasan らは赤芽球の形態変化を観察することで脱核に関与する因子のスクリーニングを実施し、細胞内に形成されたエンドソーム小胞が核の下部に集積することによって、脱核が促進すると報告している^{51, 81)}。さらに近年、Toda らは、脱核した核を有する小細胞である Pyrenocyte は細胞膜表面に PS を有しており、MerTK 受容体と Protein S の複合体を介してマクロファージに貪食される分子機構を明らかにしている⁸²⁾。これらの報告より、マクロファージは脱核を促進する因子ではなく、単に pyrenocyte を除去する役割を担っているだけと考えることもできる。以上の報告より得られた情報をまとめた図を示す (図 23A・B)。脱核に関与すると考えられる因子の報告は数多くあがってきているが、その正確なメカニズムは未だ議論の余地がある。筆者も過去の報告を参考とし、*in vitro* における脱核促進検討を実施したが、いずれの検討においても良好な結果は得られていない (データは示さない)。また、「ES/iPS 細胞を由来とする赤芽球は、そもそも脱核するのか」といった根本的な疑問も存在する。ES/iPS 細胞から得られた赤芽球のヘモグロビンは主に HbF から構成されているが、Hbe と HbA も混在しており、これは一次造血より得られた赤芽球 (Primitive erythroblast) の特徴であることが示唆されている⁸³⁾。Primitive erythroblast は血中を循環する間に脱核することが報告されているが、主に有核赤血球とし

て存在することが古くから知られており⁸⁴⁾、ES/iPS 細胞から得られた imERYPC は脱核能をほとんど有していない可能性も考えられる。そこで筆者は、imERYPC が脱核するポテンシャルを持っているのか確認することを目的として、研究に着手した。図 23 に示したように、脱核の促進候補となる因子は無数に存在する。おそらく、これらの因子が複合的に作用することで、脱核という複雑な分化が成立するのであろう。この複合的な環境を、最も効率よく再現できるのは生体内であると考えられる。そこで筆者は、重度の複合型免疫不全を呈する NOD/Shi-scid, IL-2R γ null (NOG マウス)⁸⁵⁾に imERYPC を移植し、その動態を確認することとした。

3-2. 緒言 2 マウス生体内におけるヒト赤血球の評価

これまでの造血研究より、マウスの生体内においてヒト赤血球の評価を行うことは困難であると考えられてきた。例として、ヒト造血幹細胞が生着したマウスの末梢血には、ヒトリンパ球等の循環は認められる一方で、ヒト赤血球の循環は認められないことが報告されている⁸⁶⁾。In vitro における培養を介して得られた赤芽球を投与した場合にも、末梢血への循環は認められないことが複数のグループより報告されており、筆者が研究に着手した時点において、マウス生体内におけるヒト培養赤血球の評価に成功した研究グループは、Douay らの研究グループのみであった。Douay らは、ヒト培養赤血球はマウスの細網内皮系に捕われてしまって末梢血中に循環できないと想定し、ヒト培養赤血球を投与する前に、Decoy として成人ヒト赤血球を投与し、マウスの細網内皮系を飽和させた。続いて、大量のヒト培養赤血球 ($4\sim 5\times 10^9$ 個) を投与し、3 日間という短期間ではあるが生体内における評価に成功した¹⁸⁾。また、マラリアの治療方法を研究している複数のグループは、以前からマウス体内にヒト赤血球が循環するモデルの作出を試みており、マウス生体内におけるヒト赤血球の生存率を高めるために、脾臓の摘出や抗 CD122 抗体の投与が試されている⁸⁷⁾。長期間に渡る循環成功例は見当たらないが、大量の成人赤血球 (5×10^9 個) を連日投与することによって、ヒト赤血球の循環に成功したとの報告も存在し、この結果もマウスの細網内皮系を飽和させた効果によるものと考えられる⁸⁸⁾。

近年になり、マウスの細網内皮系がヒト赤血球の循環を抑制することは、他の研究グループからも報告されており、細網内皮系の中でも特にマクロファージがヒト赤血球を特異的に貪食することが示唆されている。クロドロン酸を内封したリポソーム (クロドロネートリポソーム) は迅速にマクロファージに取り込まれた後に、リソソーム内で分解されてクロドロン酸を放出し、マクロファージのアポトーシスを誘発することが知られている⁸⁹⁾。このクロドロネートリポソームを予めマウスに投与することにより、成人ヒト赤血球の末梢循環率が向上したとの報告がなされている⁹⁰⁾。続いて Hu らは、ヒト造血幹細胞が生着したマウスのマクロファージをクロドロネートリポソームで不活化することで、造血幹細胞から分化したヒト赤血球の末梢循環が確認できたことを報告している⁹¹⁾。

以上の先行研究を参考とし、筆者はマウス生体内における imERYPC の動態観察に関する研究に着手することとした。

3-2. 材料と方法

3-2-1. 動物と試薬

別記したもの以外の試薬は、Sigma-Aldrich 社より購入した。NOD/Shi-scid, IL-2R γ null (NOG)マウスは、公共財団法人実験動物中央研究所（日本）より購入した。

3-2-2. imERYPC の CSFE 染色

5 μ M の CellTrace CSFE (Invitrogen) を添加した 3% FBS 含有 PBS にて imERYPC を懸濁し、37°C にて 10 時間のインキュベーションを行った。その後、遠心洗浄を行った。

3-2-3. NOG マウスへの移植実験

2Gy の放射線照射を行い、貧血状態となったマウスを用いた。放射線照射から 14 日後に、 1×10^9 個のヒト成人赤血球を腹腔内投与して評価を実施した。放射線照射を行ってから 13 日後に、Decoy として 2×10^9 個のヒト成人赤血球の腹腔内投与と 1mg/body クロドロネートリポソーム（片山化学工業，日本）の静脈投与を行った。その 24 時間後に、CSFE にて標識を行った 1×10^9 個の imERYPC-8 (DOX(-)-day5) を腹腔内投与した。経時的に末梢血を採取し、図 24 に示す評価方法に従って、末梢循環した imERYPC の定量を行った。循環した CSFE+細胞は FACS Aria(BD)を用いてソーティングし、ギムザ染色を実施して形態観察を行った。

3-2-4. imERYPC 由来脱核赤血球の定量

5g/ml Hoechst と 40g/ml verapamil を含有した PBS を用いて、マウスより採取した末梢血検体の染色反応（37°C、40 分間）を行った後に、FACS Aria (BD) を用いて解析を行った。

3-2-5. 統計解析

全てのデータは平均値±SEM で提示した。また、全ての統計解析は GraphPad Prism Version4.0 を用いて行った。図 27C,F は、Mann-Whitney test を用いて有意差検定を行った。P<0.05 を有意差ありと判定した。

3-3. 結果

3-3-1. マウス生体内におけるヒト赤血球の評価法の確立

これまでの造血研究より、マウスの生体内においてヒト赤血球の評価を行うことは困難であると考えられており、ヒト造血幹細胞が生着したマウスの末梢血には、ヒト赤血球の循環はほとんど認められないことが報告されている⁸⁶⁾。まず筆者は、実際にヒト赤血球がマウス体内を循環しないのか確認するために、ヒト成人赤血球のマウスへの移植実験を実施した。T、B、NK 細胞を欠損した免疫不全マウスである NOG マウス⁸⁵⁾に、成人ヒト赤血球を静脈投与した後に、末梢血をサンプリングした。サンプリングした検体に GPA 抗体を添加して染色を行った後、フローサイトメトリー解析を実施した。その結果、他の研究グループの報告と同様に、マウス末梢血への GPA+ のヒト赤血球の循環はほとんど確認されなかった (図 24Ai)。一方、GPA 抗体で染色した検体を詳細に確認すると、フローサイトメーターによって吸引されない大きさの凝集塊の存在が確認された。筆者は、この凝集塊はヒト赤血球であり、GPA 染色の過程で凝集が起こると想定し、染色手順の変更検討を実施した (図 24A ii)。その結果、染色後の遠心洗浄操作を省略することで凝集塊の出現は確認されなくなった。さらにフローサイトメトリーにて未洗浄検体を測定したところ、GPA+ ヒト赤血球が存在することが確認された (図 24A ii)。この手法が妥当な測定方法であることを検証するために、試験管内でマウス赤血球とヒト赤血球を任意の割合で混合し、FACS を用いて解析を行った (図 24B)。ヒト赤血球の混合比と FACS にて算出された GPA 陽性率の相関性は非常に高く (相関係数 $R=0.999$)、真度および直線性が高い測定方法であることが示された。また、Ter-119 抗体は、ヒト赤血球へ非特異的な結合を示すことが確認された。洗浄を行うことで非特異的な結合は抑制できるが、マウス赤血球の存在割合の低下が起きることが確認されたことから、Ter-119 の染色は行わないこととした (データは示さない)。以降の検討は、本測定方法を用いて実施することとした。

3-3-2. マウス生体内におけるヒト赤血球および imERYPC の循環評価

3-3-1.項にて設定した方法を用いて、マウスに移植したヒト成人赤血球の評価を実施した。NOG マウスの腹腔内に、 1×10^9 個のヒト成人赤血球を投与した後に、経時的に末梢血を採取して FACS 解析を行った結果を示す (図 25)。大きな循環率ではないが、投与後一日目にはヒト赤血球の循環が明確に確認され、循環率は 0.43%であった。しかしヒト赤血球の循環率は急速に低下していき、投与後 2 日目には 0.088%、3 日目には 0.003%となった。続いて、imERYPC の投与実験を行ったが、マウス末梢への imERYPC の循環は、ほとんど確認されなかった (データは示さない)。フローサイトメトリー解析における検体調製方法を変更することで、マウス生体内におけるヒト赤血球の動態を詳細に確認できるようにはなったが、本検討結果より、実際にヒト赤血球はマウス生体内で急速に排除されてしまうことが示された。imERYPC の生体内における挙動を確認するには、より循環効率を高める必要があると考えられる。

3-3-3. マウス生体内における imERYPC の循環率向上に関する検討

3-2 項で述べたように、マウス体内においてヒト赤血球が循環不良となる機構に関する報告が散見されてきており、マウスの細網内皮系がヒト赤血球の循環を抑制することが明らかになりつつある。Giarratana らは、Decoy として成人ヒト赤血球を投与してマウスの細網内皮系を飽和させた後に、大量のヒト培養赤血球を投与することで、生体内における培養ヒト赤血球の評価に成功している¹⁸⁾。また、細網内皮系の中でも、特にマクロファージがヒト赤血球を特異的に貪食することが明らかとなっており、マクロファージを不活化する薬剤であるクロドロネートリポソームを投与することで、マウス生体内におけるヒト赤血球の循環が確認されたとの報告もなされている^{89, 90)}。他の事例としては、週齢の老いたマウスを用いることで、ヒト赤血球の循環効率が向上することが示唆されている⁹²⁾。また、ヒト赤血球に特化した報告ではないが、マウスの性差がヒト造血幹細胞の生着率に影響を与えることも示されており⁹³⁾、ヒト赤血球の循環率にも影響を及ぼす可能性があると考えられる。そこで筆者は、マウスのマクロファージ、週齢および性差に着目し、

imERYPC の循環率向上を目的として検討を行った。

マクロファージの影響確認は、imERYPC を NOG マウスに移植する前日に、1mg/body のクロドロネートリポソームを静脈投与して行った。週齢の影響確認は、12 週齢と 46 週齢の NOG マウスを用いて実施した。性差の確認は、週齢を 12 週に合わせた雄および雌の NOG マウスを用いて実施した。いずれの検討も、imERYPC を移植する 2 週間前に 2Gy の放射線照射を施して、貧血状態とした NOG マウスを用いた。また、ヒト成人赤血球 2×10^9 個を腹腔内投与して細網内皮系を飽和させた翌日に、DOX(-)として 5 日目の imERYPC-8 を CSFE にて染色し、 1×10^9 個を腹腔内投与した。imERYPC を移植後、翌日にマウスより末梢血を採取し、フローサイトメトリー解析を行った結果を示す(図 26)。週齢および性差には、大きな差異は確認されなかった(図 26A-D)。クロドロネートリポソームの投与によるマクロファージの不活化は有効であり、10 倍程度の imERYPC の循環率向上が確認された(図 26E-F)。以上の結果より、imERYPC の体内動態確認は、NOG マウスのマクロファージを不活化させて、データを蓄積していくこととした。

3-3-4. マウス生体内における imERYPC の成熟

マウス生体内における imERYPC の経時的な変化を確認した。実験プロトコルを図 28A に示す。imERYPC を投与する 2 週間前に、NOG マウスに 2Gy の放射線を照射して貧血状態とした。続いて、imERYPC を投与する前日に、Decoy として 2×10^9 個のヒト成人赤血球およびクロドロネートリポソームを投与した (Clo(+))群と称する)。この時、マクロファージは赤芽球の脱核を促進するとの報告が多数存在するため、クロドロネートリポソームを投与しない群のデータも蓄積することとした (Clo(-))群と称する)。続いて、CSFE にて標識を行った 1×10^9 個の imERYPC-8 (DOX(-)として 5 日目)を投与し、その翌日からマウスの末梢血を採取し、GPA/Hoechst 染色を行った後にフローサイトメトリー解析を実施した。代表的な FACS 解析結果および imERYPC の循環率の推移を示す(図 27B-C)。いずれの解析時においても、Clo(+))群の循環率は有意に向上していることが確認された。また Clo(+))群における imERYPC の循環率は投与後 7 日目にてピークに達し、最大で 0.22%

であった。循環した imERYPC をソーティングして、ギムザ染色を行った結果を示す（図 27D）。Clo(+)群においては、大部分の imERYPC が脱核した成熟赤血球に分化していることが確認された。その一方で、Clo(-)においては、驚いたことに、脱核赤血球の割合が経過的に減少していくことが観察された。Hoechst 染色にて脱核率の定量を行ったところ（図 27E-F）、投与後 7 日目において Clo(+)では約 90%の imERYPC が脱核していたのに対し、Clo(-)群では 50%以上の imERYPC が有核の状態で循環したことが示された。この結果より、マウスのマクロファージは、脱核した赤血球を特異的に貪食すると考えられる。

ホストマウスのマクロファージを不活化することで、生体内に移植された imERYPC は脱核赤血球へと成熟し、末梢血を循環することが確認された。その一方で、循環率は最大で 0.22%であり、決して大きな値ではなかった。Hod らは、保管期間が長い赤血球製剤は活性が低下しており、生体内で急速に除去されてしまうことを報告している⁹⁴⁾。移植実験に用いた imERYPC も長期間培養された細胞であり、その活性が低下して循環率を保てないことが危惧される。そこで、NOG マウスに新鮮なヒト成人赤血球および imERYPC を等量投与して比較することとした。プロトコルを図 28A に示す。投与する imERYPC は、これまでの検討と同様に、DOX(-)として 5 日目の imERYPC-8 を CSFE 染色して用いた。Hod らの報告を受けて、末梢血の解析は投与後初期の 1 時間後から実施した。その結果、imERYPC の循環率は、ヒト成人赤血球の約 1/10 倍であった（図 28B i）。imERYPC は赤芽球の状態で投与された後に、成熟が進行して末梢血に現れるため、循環率は低いものと捉えている。一方で循環動態は、投与後早期の段階で除去されることはなく、経時的な上昇が確認された。この結果より、imERYPC の循環率が低い原因は、長期培養によって細胞の活性が低下したわけではなく、単に赤芽球の状態で投与したことによると考えられる。また、新鮮なヒト成人赤血球と良く似た挙動を示すことから（図 28B ii）、脱核した imERYPC は現行の赤血球製剤の代替物になり得ると期待できる。

3-4. 考察

imERYPC の樹立に成功したが、脱核した赤血球へ分化する割合は極めて小さく、試験管内における成熟促進が実用化へ向けた大きな課題として残っている。また、ヒト ES/iPS 細胞は一次造血を模倣していると考えられるため、そもそも脱核するポテンシャルが著しく低い可能性も存在する。そこで本研究では、imERYPC が脱核赤血球まで成熟できるのか確認することを目的とした。3-1.項にて述べたように、脱核のメカニズムに関する報告は数多く存在し、様々な因子が複合的に絡み合うことによって脱核は達成されと考えられる。そこで、あらゆる因子を提供できる環境下、即ちマウスの生体内にて imERYPC が脱核赤血球へと成熟するのか確認することを試みた。

これまでに、様々な研究グループが培養赤血球の生体内評価にチャレンジしてきたが、大半はポジティブな結果を得られないと報告している。筆者が研究に着手した段階で、生体内において培養を介して得られた赤芽球もしくは赤血球を用いた評価に成功した研究グループは、Douay らの研究グループのみであった¹⁸⁾。また、マラリアの治療方法を研究しているグループらは、マウス生体内においてヒト成人赤血球を循環させてマラリアモデルを作製することに注力しており、最近になってヒト赤血球の循環に成功したとの報告が散見されてきている^{89, 92)}。これらの報告を参考として、様々な角度から、マウス生体内における imERYPC の評価を実施していくこととした。

筆者が先ず注目した点は、マウス末梢血におけるヒト赤血球の評価方法である。解析対象となる細胞群の存在割合を確認する手法としては、抗原抗体反応にて解析対象細胞を染色した後に、FACS を用いて解析を行うことが常套手段である。筆者も、ヒト成人赤血球を投与したマウスの末梢血を採取し、ヒト GPA 抗体で染色を行った後に FACS 解析を行った。検体を抗体で染色した後、一般的には抗体の非特異結合を抑制するために検体の遠心洗浄を実施するが、この遠心洗浄操作を省略することにより、ヒト赤血球が検出できることが明らかとなった。GPA は負に帯電した糖鎖であり、赤血球同士の凝集を抑制する作用があると報告されている⁹⁵⁾。GPA 抗体にて染色を行った後に遠心洗浄を行うことで、細胞表面

電荷が減衰した赤血球同士の凝集が起こり、FACS 解析結果に反映されなかったものと推察できる。

NOG マウスにヒト成人赤血球を投与した後に、本評価方法を用いてマウス末梢血の解析を行ったが、投与後 2 日目となると、ヒト成人赤血球の循環はほとんど確認されなかった(図 25)。本評価方法によって、マウス体内におけるヒト赤血球動態を詳細に確認できるようになったが、先行研究グループが報告しているように、ヒト赤血球はマウス体内で急速に排除されてしまうと考えられる。そこで、先行研究グループが赤芽球および赤血球のマウス生体内評価において有効であると報告している手法を参考として、循環率を高める検討を実施した。検討項目は、マウスのマクロファージ、週齢および性差とした。その結果、マクロファージの不活性化が有効であった。予めマウスにヒト成人赤血球を投与して細網内皮系を飽和させる方法と併用して、クロドロネートリポソームによってマクロファージを不活化させることで、imERYPC の循環率が 10 倍ほど増加することが認められた。この手法によって循環した imERYPC は、7 日間に渡ってマウス末梢血を循環し、脱核赤血球まで成熟していることが示された。また、imERYPC は赤芽球の段階で投与しているためか、循環率は新鮮なヒト成人赤血球には大きく劣る値であった一方で、循環した imERYPC 由来脱核赤血球は、新鮮なヒト成人赤血球とよく似た体内動態を示すことが確認された。これらは、imERYPC が機能的な赤血球となる能力を有することを示す結果と捉えている。

本検討においては、マクロファージが imERYPC の脱核を促進する可能性もあることを考慮し、クロドロネートリポソームを投与しない Clo(-)群の評価も実施した。Decoy としてヒト成人赤血球を予め NOG マウスに投与することで、Clo(-)群においても、ごく僅かではあるが imERYPC の末梢循環が確認された。imERYPC 投与後 1 日目においては、大部分の imERYPC が脱核していることが確認されたが、投与後 3 日目以降においては、予想に反して脱核率の急激な低下が認められた。この結果より、マウスのマクロファージが脱核したヒト赤血球を、特異的に貪食したことが示唆された。Bell らは、脱核赤血球と Pyrenocyte の表面抗原発現は異なることを確認していることから、ヒト脱核赤血球特異的に発現している何らかの細胞表面抗原が、マクロファージに認識されている可能性がある

96)。今後、この抗原を特定し、ノックダウン等の処置を施すことで、マウス生体内におけるヒト赤血球の動態評価を、より深めることができると期待できる。また、従来からマクロファージが赤芽球の脱核を促進するとの報告が数多く存在するが、本結果は、少なくともマウスの生体内においてマクロファージはヒト赤芽球の脱核を促進せず、むしろヒト脱核赤血球を特異的に排除することを示唆するものである。Ishikawa や Hayakawa らは、ヒト造血幹細胞が生着した免疫不全マウスを詳細に解析し、ヒト赤血球の末梢循環はほとんど確認できない一方で、骨髄にはヒト赤芽球が生着していることを確認している^{97, 98)}。さらに、骨髄より採取したヒト赤芽球を試験管内で培養すると、その増殖および分化が促されることを確認している⁹⁸⁾。この報告より、ヒト赤芽球はマウス生体内に生着可能であるが、脱核が抑制される、もしくは脱核赤血球が迅速に排除される機構が存在すると推察できる。

本検討より、マクロファージを不活化することで、マウス生体内において imERYPC が脱核赤血球まで成熟することが確認された。どのようにして、imERYPC の成熟が進行したのかは明らかとなっていないが、本モデルは赤芽球の脱核機構の解明ツールにもなり得ると考えられる。実用化に向けて、理想的には「試験管内で脱核赤血球を産出する」ことが目標であり、赤芽球の脱核機構が解明されていくことで、近い将来、効率的な脱核赤血球の産出も可能になると期待できる。一方で、試験管内での最終分化が達成できない場合には、本研究で示したように、赤芽球の段階で生体内に移植し、その環境下に分化誘導を委ねるという手法も考慮できる。現行の赤血球製剤は、混入した白血球の副作用を防ぐことを目的として、紫外線照射を施された製剤も上市されている。本研究で樹立された imERYPC も、正染赤芽まで試験管内で作製した段階で、紫外線照射によって腫瘍化を抑制して投与するという方法もあり得るであろう。

4. 結語

再生医療の実現に向けた期待は日増しに高まっており、様々な機能的細胞の創出が相次いで報告されている。その一方で、患者の治療に必要な細胞数を如何にして確保するのか、生体を構成する複雑な 3 次元構造の臓器をどのように構築するのか、腫瘍化の危険性をどのように排除するのかといった多くのハードルが立ちはだかっている。筆者は、3 次元組織を構築する必要がなく、核も持たない赤血球は、上記の課題を早期に解決できるモデルになり得ると考えており、ヒト ES/iPS 細胞から効率的に赤血球を産出する研究に着手した。まず治療に必要となる細胞数を確保することを目的とし、赤血球の前駆体である赤芽球の不活化細胞株化に取り組み、ヒト ES/iPS 細胞より得られた HPC に *c-MYC* および *BCL-XL* を強制発現させることで、不活化赤芽球株 (Immortalized erythrocyte progenitor cell: imERYPC) の樹立に成功した。imERYPC は前赤芽球の状態を増幅し続け、導入遺伝子発現を OFF とすることで、試験管内で正染色赤芽球となる分化能を有し、ヒト成人赤血球と同等の酸素解離曲線を描くことが確認された。従来の赤血球産出方法では、ES/iPS 細胞から HPC への分化誘導効率が低いために、1 単位の赤血球を作るにあたり数千 L スケールの培養槽が必要となるが、imERYPC を用いることで、100L スケールの培養槽までスケールダウン可能となる。また、未分化維持されたヒト ES/iPS 細胞を出発原料とした場合と比べて、培養期間の大幅な短縮も期待できる。

本研究成果より、治療に必要な細胞数を確保するといった目標は理論上達成可能となった。一方で、100L スケールの培養を実施するためには、数 100~1000 万円のコストがかかる。本邦における赤血球製剤の薬価は 1 単位あたり 8000 円程度であり、実用化に向けては、よりコストを下げていく必要がある。また、培養細胞には変異が生じるため、永久に同一の細胞株を維持しつづけるのは技術上不可能である。従って、同等の imERYPC を樹立する必要も生じる。本検討で得られた imERYPC は、いずれも良く似た挙動を示すが、増殖能や分化効率が株毎によって異なっている。今後は、より一定した特性を有する imERYPC の樹立方法も模索していくべきであろう。また、試験管内での脱核赤血球産出という分化

制御に関する課題も、実用化に向けた大きな障壁として残っている。本研究では、imERYPCをマウスに投与することにより、脱核赤血球が得られることを明らかとした。今後は、本モデルを用いて、脱核機構が解明されていくものと期待できる。また、赤芽球の段階で患者に投与し、その環境下にて脱核を促すといった治療方法も考えられる。有効性、安全性および製造コストを加味して、どのような方法で培養赤血球を治療薬として用いるべきか、見極めていく必要があると考えられる。

5. 謝辞

本稿を終えるにあたり、研究の機会を与えてくださり、御指導、御鞭撻を賜りました東京大学医科学研究所 幹細胞治療研究センター 幹細胞治療分野教授 中内啓光博士に心より御礼申し上げます。研究を進めるにあたり、親身な御指導ならびに御助言を賜りました京都大学 iPS 細胞研究所 臨床応用研究部門 江藤研究室教授 江藤浩之 博士、オノタリオ癌研究所 高山直也 博士に謹んで感謝の意を表します。また研究を行うにあたって御協力いただいた、東京大学医科学研究所幹細胞治療研究センター 幹細胞治療分野 山口智之 博士、山崎聡 博士、正木英樹博士、村上都湖 氏、辻嘉代子 博士、頼貞儀博士、水野直彬 氏、ならびに東京大学医科学研究所幹細胞治療研究センター FACS コアラボ 石井有実子 氏、藤田梓 氏、京都大学 iPS 細胞研究所 江藤研究室 中村荘 氏、平田真治 氏、越智清聖 氏、早稲田大学 先端生命医科学センター 先進理工学研究科 加藤尚志 博士、永澤和道 氏、宮崎大学医学部解剖学講座 澤口朗 博士、高橋伸育 博士、東ソー株式会社 丹羽祐基 氏に深く感謝申し上げます。NOG マウスを提供していた、実験動物中央研究所 伊藤守 博士に深く御礼申し上げます。

本研究をまとめるにあたり、貴重なご助言を賜りました東京大学医科学研究所幹細胞治療研究センター 幹細胞治療部門 津久井弘子 氏、東京大学医科学研究所 幹細胞治療研究センター 幹細胞プロセッシング分野 大津真 博士、東京大学医科学研究所幹細胞治療研究センター ステムセルバンク 渡会浩志 博士、京都大学 iPS 細胞研究所 金子新博士、遠藤大 氏、小池朋 氏、大西椋子 氏、テルモ株式会社 研究開発本部 鮫島正氏、佐野進弥 氏をはじめとした皆様に、御礼申し上げます。

本研究のために命を失ったマウスたちに追悼の意を捧げます。

最後に、精神的援助をしていただいた家族、友人に深く感謝いたします。

6. 参考文献

1. Alan N. Schechter. Hemoglobin research and the origins of molecular medicine. *Blood*. 2008; 112: 3927-3938.
2. Aleksander Czogalla, Aleksander F. Sikorski. Do we already know spectrin attracts ankyrin? *Cellular and Molecular Life Science*. 2010; 67: 2679-2683.
3. Asterios S. Tsiftoglou, Ioannis S. Vizirianakis, John Strouboulis. Erythropoiesis: Model systems, molecular regulators, and developmental programs. *IUBMB Life*. 2009; 61: 800-830.
4. James Palis. Primitive and definitive erythropoiesis in mammals. *Frontiers in Physiology*. 2014; 5.
5. Thomas Bittain. Molecular aspects of embryonic hemoglobin function. *Molecular Aspects of Medicine*. 2002; 23: 293-342
6. Peng Ji, Maki Murata-Hori, Harvey F. Lodish. Formation of mammalian erythrocytes: chromatin condensation and enucleation. *Trends in Cell Biology*. 2011; 21: 409-415.
7. Don M. Wojchowski, Pradeep Sathyanarayana, Arvind Dev. Erythropoietin receptor response circuits. *Current opinion in hematology*. 2010; 17: 169-176.
8. Harvey Lodish, Johan Flygare, Song Chou. From stem cell to erythroblast: Regulation of red cell production at multiple levels by multiple hormones. *IUBMB Life*. 2010; 67: 492-496.
9. 血液製剤調査機構だより. 2010. 120 号.
10. Eriko Uchida, Teruhide Yamaguchi. Viral safety of biological: Evaluation of hepatitis C virus (HCV) nucleic acid amplification test (NAT) assay and development of concentration method of HCV for sensitive detection by NAT. *Yakugaku Zasshi*. 2010; 130: 163-169.

11. Tapko J. B, Paul Mainuka, Diarra-Nama. Status of blood safety in the WHO African region. Report of the 2006 survey.
12. Rajab J.A, Muchina W.P, Orinda D.A, et al. Blood donor haematology parameters in two regions of Kenya. *East African Medical Journal*. 2005; 82: 123-127.
13. Tagny C.T, Owusu-Ofori S, Mbanya D, et al. The blood donor in sub-Saharan Africa: a review. *Transfusion Medicine*. 2010; 20: 1-10.
14. Candotti D, Temple J, Owusu-Ofori S, et al. Multiplex real-time quantitative RT-PCR assay for hepatitis B virus, hepatitis C virus, and human immunodeficiency virus type 1. *Journal of Virological Methods*. 2004; 118: 39-47.
15. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*. 1998; 282: 1145-1147.
16. Kazutoshi Takahashi, Koji Tanabe, Mari Ohnuki, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*. 2007; 131: 861-872.
17. Thi My Anh Neildez-Nguyen, Henri Wajcman, Michael C. Marden, et al. Human erythroid cells produced ex vivo at large scale differentiate into red blood cells in vivo. *Nature biotechnology*. 2002; 20: 467-472.
18. Marie-Catherine Giarratana, Ladan Kobari, Helene Lapillonne, et al. Ex vivo generation of fully mature human red blood cells from hematopoietic stem cells. *Nature biotechnology*. 2005; 23: 69-74.
19. Kenichi Miharada, Takashi Hiroyama, Kazuhiro Sudo, et al. Efficient enucleation of erythroblasts differentiated in vitro from hematopoietic stem and progenitor cells. *Nature biotechnology*. 2006; 24: 1255-1256.
20. Feng Ma, Yasuhiro Ebihara, Katsutsugu Umeda, et al. Generation of functional erythrocytes from human embryonic stem cell-derived definitive hematopoiesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2008; 105: 13087-13092.
21. Shi-Jiang Lu, Qiang Feng, Jennifer S. Park, et al. Biologic properties and

- enucleation of red blood cells from human embryonic stem cells. *Blood*. 2008; 112: 4475-4484.
22. Yu-xiao Liu, Wen Yue, Lei Ji, et al. Production of erythroid cells from human embryonic stem cells by fetal liver cell extract treatment. *BMC Developmental Biology*. 2010; 10: 85.
 23. Helene Lapillonne, Ladan Kobari, Christelle Mazurier, et al. Red blood cells generation from human induced pluripotent stem cells: perspective for transfusion medicine. *Haematologica*. 2010; 95: 1651-1659.
 24. Marie-Catherine Giarratana, Helene Rouard, Agnes Dumont, et al. Proof of principle for transfusion of in vitro-generated red blood cells. *Blood*. 2011; 118: 5069-5070.
 25. Takashi Hiroyama, Kenichi Miharada, Kazuhiro Sudo, et al. Establishment of mouse embryonic stem cell-derived erythroid progenitor cell lines able to produce functional red blood cells. *PLoS ONE*. 2008; 3: e1544.
 26. Ryo Kurita, Norio Suda, Kazuhiro Sudo, et al. Establishment of immortalized human erythroid progenitor cell lines able to produce enucleated red blood cells. *PLOS ONE*. 2013; 8: e59890.
 27. Werness, B. A., Levine, A. J., Howley, P. M. Association of human papillomavirus type 16 and 18 E6 proteins with p53. *Science*. 1990; 248: 76-79.
 28. Zerfass K, Schulze A, Spitkovsky D, et al. Sequential activation of cyclin E and cyclin A gene expression by human papillomavirus type 16 E7 through sequences necessary for transformation. *Journal of virology*. 1995; 69: 6389-6399.
 29. Ory DS, Neugeboren BA, Mulligan RC. A stable human-derived packaging cell line for production of high titer retrovirus/vesicular stomatitis virus G pseudotypes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996; 93: 11400-11406.
 30. Naoya Takayama, Hidekazu Nishikii, Joichi Usui, et al. Generation of functional

- platelets from human embryonic stem cells in vitro via ES-sacs, VEGF-promoted structures that concentrate hematopoietic progenitors. *Blood*. 2008; 111: 5298-5306.
31. Naoya Takayama, Satoshi Nishimura, Sou Nakamura, et al. *Journal of Experimental Medicine*. 2010; 207: 2817-2830.
 32. Hajimu Morioka, Yuzuru Etoh, Issei Horino, et al. Production and isolation of cosmomycins A, B, C and D: New differentiation inducers of friend cell F5-5. *Agricultural and Biological Chemistry*. 1985; 49: 1951-1958.
 33. Eilers RJ. Notification of final adoption of an international method and standard solution for hemoglobinometry specifications for preparation of standard solution. *American Journal of Clinical Pathology*. 1967; 47: 212-214.
 34. Ladan Kobari, Frank Yates, Noufissa Oudrhiri, et al. Human induced pluripotent stem cells can reach complete terminal maturation: in vivo and in vitro evidence in the erythropoietic differentiation model. *Haematologica*. 2012; 97: 1795-1803.
 35. Hiromi Sakai, Pedro Cabrales, Amy G. Tasai, et al. Oxygen release from low and normal p50 Hb vesicles in transiently occluded arterioles of the hamster window model. *American Journal of Physiology*. 2005; 288: 2897-2903.
 36. Maxim A. Vodyanik, James A. Thomson, Igor I. Slukvin. Leukosialin (CD43) defines hematopoietic progenitors in human embryonic stem cell differentiation culture. *Blood*. 2006; 108: 2095-2105.
 37. Toshinobu Nishimura, Shin Kaneko, Ai Kawana-Tachikawa, et al. Generation of rejuvenated antigen-specific T cells by reprogramming to pluripotency and redifferentiation. *Cell Stem Cell*. 2013; 12: 114-126.
 38. Kazutoshi Takahashi, Shinya Yamanaka. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. 2006; 126: 663-676.
 39. Chi V. Dang. *MYC* on the path to cancer. *Cell*. 2012; 149: 22-35.

40. Nicole C. Dubois, Christelle Adolphe, Armin Ehninger, et al. Placental rescue reveals a sole requirement for c-Myc in embryonic erythroblast survival and hematopoietic stem cell function. *Development*. 2008; 135: 2455-2465.
41. Senthil Raja Jayapal, Kian Leong Lee, Peng Ji, et al. Downregulation of Myc is essential for terminal erythroid maturation. *The Journal of Biological Chemistry*. 2010; 285: 40252-40265.
42. Olena Klimchenko, Marcella Mori, Antonio DiStefano, et al. A common bipotent progenitor generates the erythroid and megakaryocyte lineages in embryonic stem cell-derived primitive hematopoiesis. *Blood*. 2009; 114: 1506-1517.
43. Tomoyuki Yamaguchi, Sanae Hamanaka, Akihide Kamiya, et al. Development of an all-in-one inducible lentiviral vector for gene specific analysis of reprogramming. *PLOS ONE*. 2012; 7: e41007.
44. Helmut Dolznig, Bianca Habermann, Katharina Stangl, et al. Apoptosis protection by the Epo target Bcl-X_L allows factor-independent differentiation of primary erythroblasts. *Current Biology*. 2002; 12: 1076-1085.
45. Melissa M. Rhodes, Prapaporn Kopsombut, Maurice C. Bondurant, et al. Bcl-X_L prevents apoptosis of late-stage erythroblasts but does not mediate the antiapoptotic effect of erythropoietin. *Blood*. 2005; 106: 1857-1863.
46. Kodi S. Ravichandran. Beginnings of a good apoptotic meal: the find-me and eat-me signaling pathways. *Immunity*. 2011; 35: 445-455.
47. Stella Pelengaris, Mike Khan, Gerard Evan. c-MYC: more than just a matter of life and death. *Nature Reviews Cancer*. 2002; 2: 764-776.
48. Ken Ohmine, Jun Ota, Masuzu Ueda, et al. Characterization of stage progression in chthonic myeloid leukemia by DNA microarray with purified hematopoietic stem cells. *Oncogene*. 2001; 20: 8249-8257.
49. Judith Leatherman. Stem cells supporting other stem cells. *Frontiers in Genetics*.

- 2013; 4: 257.
50. Simpson C. F, Kling. The mechanism of denucleation in circulating erythroblasts. *The Journal of Cell Biology*. 1967; 35: 237-245.
 51. Ganesan Keerthivasan, Sara Small, Hui Liu, et al. Vesicle trafficking plays a novel role in erythroblast enucleation. 2010; 116: 3331-3340.
 52. Yuan-Yeh Kuo, Zee-Fen Chang. GATA-1 and Gfi-1B interplay to regulate Bcl-X_L transcription. *Molecular and Cellular Biology*. 2007; 27: 4261-4272.
 53. Khalid Hafid-Medheb, Yvette Augery-Bourget, Marie-Nathalie Minatchy, et al. Bcl-X_L is required for heme synthesis during the chemical induction of erythroid differentiation of murine erythroleukemia cells independently of its antiapoptotic function. *Blood*. 2003; 101: 2575-2583.
 54. Tomohisa Seki, Shinsuke Yuasa, Mayumi Oda, et al. Generation of induced pluripotent stem cells from human terminally differentiated circulating T cells. *Cell Stem Cell*. 2010; 7: 11-14.
 55. Kitai Kim, Rui Zhao, Akiko Doi, et al. Donor cell type can influence the epigenome and differentiation potential of human induced pluripotent stem cells. *Nature Biotechnology*. 2011; 29: 1117-1119.
 56. Jose M. Polo, Susanna Liu, Maria Eugenia Figueroa, et al. Cell type of origin influences the molecular and functional Properties of mouse induced pluripotent stem cells. *Nature Biotechnology*. 2010; 28: 848-855.
 57. Shinji Hirata, Naoya Takayama, Ryoko Jono-Ohnishi, et al. Congenital amegakaryocytic thrombocytopenia iPS cells exhibit defective MPL-mediated signaling. *The Journal of Clinical Investigation*. 2013; 123: 3802-3814.
 58. Philippe Juin, Abigail Hunt, Trevor Littlewood, et al. c-Myc functionally cooperates with Bax to induce apoptosis. *Molecular and Cellular Biology*. 2002; 22: 6158-6169.
 59. Zakir Khan, Prakash S. Bisen. Oncoapoptotic signaling and deregulated target

- genes in cancers: Special reference to oral cancer. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2013; 1836: 123-145.
60. Lieven P. Billen, Candis L. Kokoski, Jonathan F. Lovell, et al. Bcl-XL inhibits membrane permeabilization by competing with Bax. *PLoS Biology*. 2008; 6: e147.
 61. Naldini L, Blomer U, Gallay P, et al. In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science*. 1996; 272: 263-267.
 62. Paul S. Knoepfler, Xiao-yong Zhang, Pei Feng Cheng, et al. Myc influences global chromatin structure. *EMBO Journal*. 2006; 25: 2723-2734.
 63. Jessica Dias, Marina Gumenyuk, HyunJun Kang, et al. Generation of red blood cells from human induced pluripotent stem cells. *Stem Cells and Development*. 2011; 9: 1639-1947.
 64. Ugo Testa. Fetal hemoglobin chemical inducers for treatment of hemoglobinopathies. *Annals of hematology*. 2009; 88: 505-528.
 65. Tohru Ikuta, Sabrina Ausenda, Maria D. Cappellini. Mechanism for fetal globin gene expression: role of the soluble guanylate cyclase-cGMP dependent protein kinase pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2001; 98: 1847-1852.
 66. Lorelee Haughn, Robert G. Hawley, Deborah K. Morisson, et al. BCL-2 and BCL-XL restrict lineage choice during hematopoietic differentiation. *The Journal of Biological Chemistry*. 2003; 278: 25258-25165.
 67. Peng Ji, Victor Yeh, Tzutzy Ramirez, et al. Histone deacetylase 2 is required for chromatin condensation and subsequent enucleation of cultured mouse fetal erythroblasts. *Haematologica*. 2010; 95: 2013-2021.
 68. Lingbo Zhang, Johan Flygate, Piu Wong, et al. miR-191 regulates mouse erythroblast enucleation by down-regulating Riok3 and Mxi1. *Genes & Development*. 2011; 25: 119-124.

69. Joel Anne Chasis, Narla Mohandas. Erythroblastic islands: niches for erythropoiesis. *Blood*. 2008; 112: 470-478..
70. Manjit Hanspal, Yva Smockova, Quang Uong. Molecular identification and functional characterization of a novel protein that mediates the attachment of erythroblasts to macrophage. *Blood*. 1998; 92: 2940-2950.
71. Hivani Soni, Shashi Bala, Ajay Kumar, et al. Changing pattern of the subcellular distribution of erythroblast macrophage protein (Emp) during macrophage differentiation. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*. 2007; 38: 25-31.
72. Shivani Soni, Shashi Bala, Babette Gwynn, et al. Absence of erythroblast macrophage protein (EMP) leads to failure of erythroblast nuclear extrusion. *Journal of Biological Chemistry*. 2006; 281: 20181-20189.
73. Yoshito Sadahira, Tadashi Yoshino, Yasumasa Monobe. Very late activation antigen 4-vascular cell adhesion molecule 1 interaction is involved in the formation of erythroblastic islands. *Journal of Experimental Medicine*. 1995; 181: 411-415.
74. Kathleen E. McGrath, Paul D. Kingsley, Anne D. Koniski, et al. Eucleation of primitive erythroid cells generates a transient population of “pyrenocytes” in the mammalian fetus. *Blood*. 2008; 111: 2409–2417.
75. Gloria Lee, Annie Lo, Sarah A. Short, et al. Targeted gene deletion demonstrates that the cell adhesion molecule ICAM-4 is critical for erythroblastic island formation. *Blood*. 2006; 108: 2064–2071.
76. Gloria Lee, Frances A. Spring, Stephen F. Parsons, et al. Novel secreted isoform of adhesion molecule ICAM-4: potential regulator of membrane-associated ICAM-4 interactions. *Blood*. 2003; 101: 1790–1797.
77. Akihito Fujimi, Takuya Matsunaga, Masayoshi Kobune, et al. Ex vivo large-scale generation of human red blood cells from cord blood CD34+ cells by co-culturing with macrophages. *International Journal of Hematology*. 2008; 87: 339-350.

78. Miwa Hebibuchi, Makoto Hirokawa, Yong-Mei Guo, et al. Dynamics of human erythroblast enucleation. *International Journal of Hematology*. 2008; 88: 498-507.
79. Kumi Ubukawa, Yong-Mei Guo, Masayuki Takahashi, et al. Enucleation of human erythroblasts involves non-muscle myosin IIB. *Blood*. 2012; 119: 1036-1044.
80. Peng Ji, Senthil Raja Jayapal, Harvey F. Lodish. Enucleation of cultured mouse fetal erythroblasts requires Rac GTPases and mDia2. *Nature Cell Biology*. 2008; 10: 314-321.
81. Ganesan Keerthivasan, hui Liu, Jacob M. Gump, et al. A novel role for survivin in erythroblast enucleation. *Haematologica*. 2012; 97: 1471-1479.
82. Satoshi Toda, Katsumori Segawa, Shigekazu, Nagata. MerTK-mediated engulfment of pyrenocytes by central macrophages in erythroblastic islands. 2014; Epub ahead of print.
83. Tolleiv Trimborn, Joost Gribnau, Frank Grosveld, et al. Mechanisms of developmental control of transcription in the murine α - and β -globin loci. *Genes & Development*. 1999; 13: 112-124.
84. Paul D. Kingsley, Jeffrey Malik, Katherine A. Fantauzzo, et al. Yolk sac-derived primitive erythroblasts enucleate during mammalian embryogenesis. *Blood*. 2004; 104: 19-25.
85. Mamoru Ito, Hidefumi Hiramatsu, Kimio Kobayashi, et al. NOD/SCID/gamma(c) (null) mouse: an excellent recipient mouse model for engraftment of human cells. *Blood*. 2002; 100: 3175-3182.
86. Jun Hayakawa, Matthew M. Hsieh, Naoya Uchida, et al. Busulfan produces efficient human cell engraftment in NOD/LtSz-scid IL2R γ null mice. *Stem Cells*. 2009; 27: 175-182.
87. Erin A. Kimbrel, Robert Lanza. Stomping out barriers for hRBC mouse models. *Blood*. 2011; 118. 5719-5720.

88. Maria Belen Jimenez-Diaz, Teresa Mulet, Sara Viera, et al. Improved murine model of malaria using *Plasmodium falciparum* competent strains and non-myelodepleted NOD-scid IL2R γ null mice engrafted with human erythrocytes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2009; 53: 4533-4536.
89. Makoto Naito, Hirotaka Nagai, Sunao Kawano, et al. Liposome-encapsulated dichloromethylene diphosphonate induces macrophage apoptosis in vivo and in vitro. *Journal of Leukocyte Biology*. 1996; 60: 337-344.
90. Ludovic Arnold, Rajeev Kumar Tyagi, Pedro Meija, et al. Analysis of innate defences against *Plasmodium falciparum* in immunodeficient mice. *Malaria Journal*. 2010; 9: 197.
91. Zheng Hu, Nico Van Rooijen, Yong-Guang Yang. Macrophages prevent human red blood cell reconstitution in immunodeficient mice. 2011; 118: 5938-5946.
92. Ludovic Arnold, Rajeev Kumar Tyagi, Pedro Meija, et al. Further improvements of *P. falciparum* humanized mouse model. *PLOS ONE*. 2011; 6: e18045.
93. Faiyaz Notta, Sergei Doulatov, John E. Dick. Engraftment of human hematopoietic stem cells is more efficient in female NOD/SCID/IL-2Rgc-null recipients. *Blood*. 2010; 115: 3704-3707.
94. Eldad A. Hod, Ning Zhang, Set A. Sokol, et al. Transfusion of red blood cells after prolonged storage produces harmful effects that are mediated by iron and inflammation. *Blood*. 2010; 115: 4284-4292.
95. J. Poole. Red cell antigens on band 3 and glycophorin A. *Blood Reviews*. 2000; 14: 31-43.
96. Amanda J. Bell, Timothy J. Satchwell, Kate J. Heesom, et al. Protein distribution during human erythroblast enucleation in vitro. *PLOS ONE*. 2013; 8: e60300.
97. Fumihiko Ishikawa, Masaki Yasukawa, Bonnie Lyons, et al. Development of functional human blood and immune systems in NOD/SCID/IL2 receptor γ

- chain^{null} mice. *Blood*. 2005; 106: 1565-1573.
98. Jun Hayakawa, Matthew M Hsieh, D Eric Anderson, et al. The assessment of human erythroid output in NOD/SCID mice reconstituted with human hematopoietic stem cells. *Cell Transplantation*. 2010; 19: 1465-1473.
 99. Crocker PR, Werb Z, Gordon S, Bainton DF, et al. Ultrastructural localization of a macrophage-restricted sialic acid binding hemagglutinin, SER, in macrophage-hematopoietic cell clusters. *Blood*. 1990; 76: 1131–1138.
 100. Babs O. Fabriek, Machteld M. J. Polfliet, Rianka P. M. Vloet, et al. The macrophage CD163 surface glycoprotein is an erythroblast adhesion receptor. *Blood*. 2007; 109: 5223–5229.
 101. Hideyuki Yoshida, Kohki Kawane, Masato Koike, et al. Phosphatidylserine-dependent engulfment by macrophages of nuclei from erythroid precursor cells. *Nature*. 2005; 437: 754–758.
 102. Oldenburg PA, Zheleznyak A, Fang YF, et al. Role of CD47 as a marker of self on red blood cells. *Science*. 2000; 288: 2051-2054.
 103. Kawane K, Fukuyama H, Kondoh G, et al. Requirement of DNase II for definitive erythropoiesis in the mouse fetal liver. *Science*. 2001; 292: 1546–1549.
 104. Moshe J. Leimberg, Eugenia Prus, Abraham M. Konjin, et al. Macrophages function as a ferritin iron source for cultured human erythroid precursors. *Journal of Cellular Biochemistry*. 2008; 103: 1211–1218.
 105. Benjamin T. Spike, Benjamin C. Dibling, Kay F. Macleod. Hypoxic stress underlies defects in erythroblast islands in the Rb-null mouse. *Blood*. 2007; 110: 2173–2181.
 106. Xue-Song Liu, Xi-Hua Li, Yi Wang, et al. Disruption of palladin leads to defects in definitive erythropoiesis by interfering with erythroblastic island formation in mouse fetal liver. *Blood*. 2007; 110: 870–876.

表1. 本研究に用いたサイトカイン一覧

Cytokine	Maker
Human Vascular endothelial growth factor (VEGF)	R&D Systems
Human Erythropoietin (EPO)	Kirin
Human Stem cell factor (SCF)	R&D Systems
Human Thorombopoietin (TPO)	R&D Systems
Human FMS-related tyrosine kinase 3 ligand (FLT-3L)	Pepro Tech

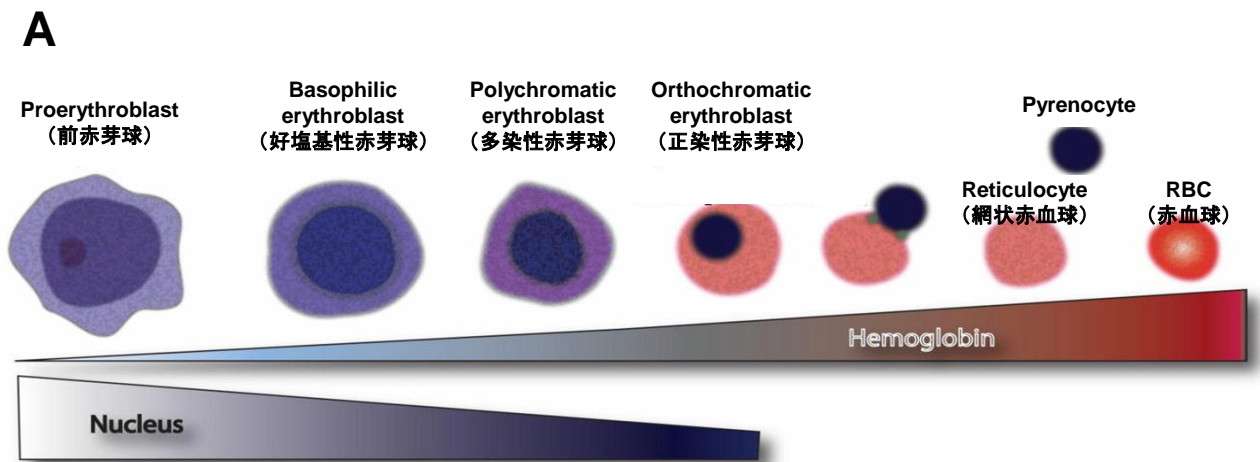
表2. 本研究に用いた抗体一覧

Anti-body	Color	Maker
Anti-human CD235ab (GPA)	Pacific blue	Biolegend
Anti-human CD235ab (GPA)	PE	Dako
Anti-human CD71	PE	BD
Anti-human CD34	FITC	BD
Anti-human CD43	PE	eBioscience
Anti-human CD41a	APC	Biolegend
Anti-human CD45	PE-Cy7	Biolegend
Annexin V	Pacific blue	BD
MitoProbe Dilc ₁ (5)	APC	Invitrogen
Anti-mouse Ter119	APC	Biolegend
Anti-human Hemoglobin β		Santa Cruz Biotechnology
Anti-human Hemoglobin γ		Santa Cruz Biotechnology
Anti-human Hemoglobin (epsilon chain)		Fitzgerald

表3. 本研究に用いたプライマー一覧

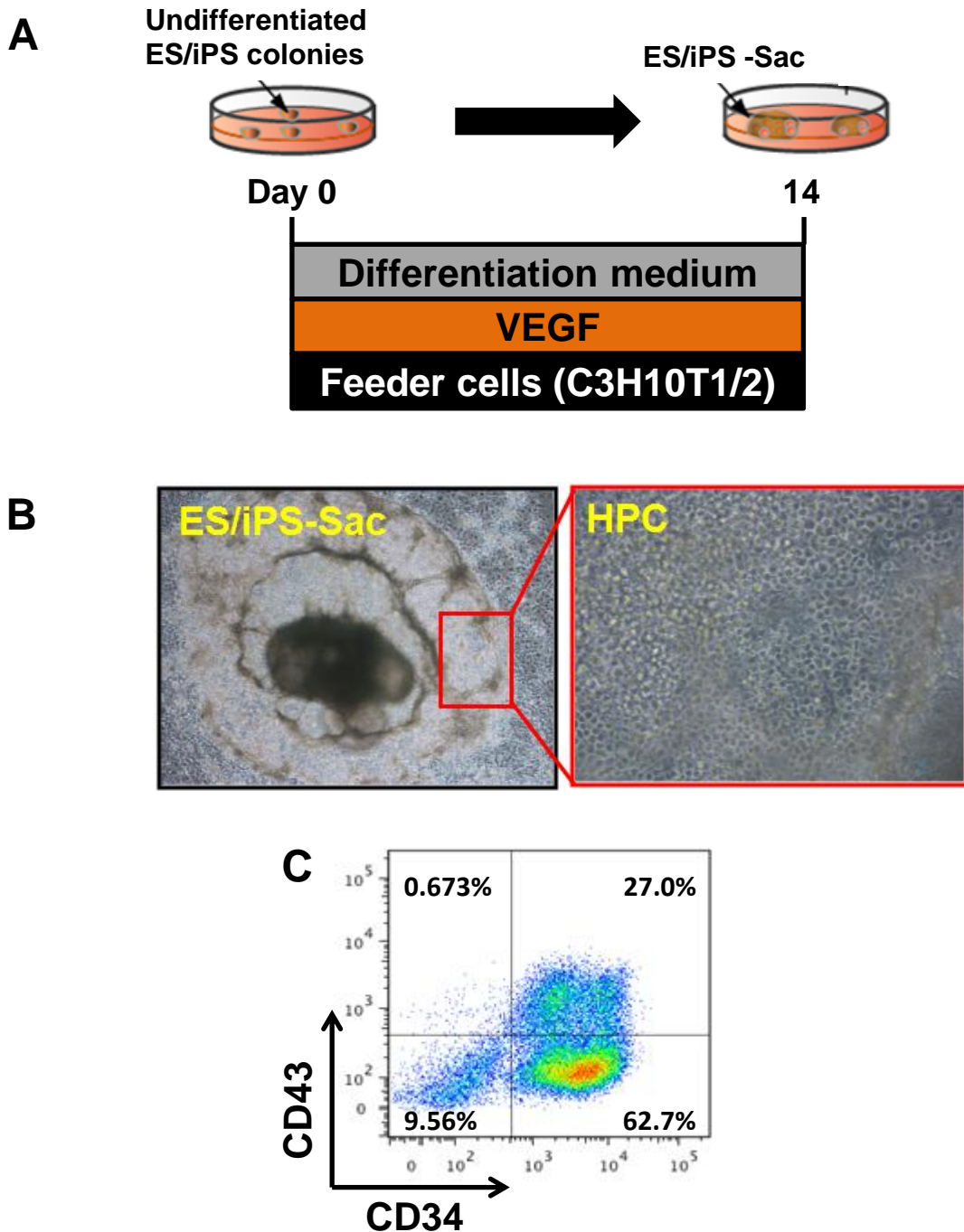
Gene	Primer sequence (5' → 3')	qRT-PCR kit	Probe
Total c-MYC	CAC CAG CAG CGA CTC TGA GAT CCA GAC TCT GAC CTT TTG C	TaqMan Gene Expression Master Mix	No. 34
Total BCLXL	AGC CTT GGA TCC AGG AGA A AGC GGT TGA AGC GTT CCT	TaqMan Gene Expression Master Mix	No. 66
Endogenous BCLXL	GCT GAG TTA CCG GCA TCC TTC TGA AGG GAG AGA AAG AGA TTC	TaqMan Gene Expression Master Mix	No. 10
GATA1	AGC AGC TTC CTC CAC TGC TGG GTA CAC CTG AAA GAC TGG	TaqMan Gene Expression Master Mix	No. 76
RAF1	AAC CCC AGA GCA ATT CCA G GAA TGT TCA CAT GCC GTG TT	TaqMan Gene Expression Master Mix	No. 83
GCN5	TCC TCA CTC ACT TCC CCA AA TTG GAG AGT TTG CCC CAT AG	TaqMan Gene Expression Master Mix	No. 63
Exogenous BCLXL	TTAGTGAACCGTCAGATCGC GTCTCCATCTCCGATTCAGT	SYBR Premix Dimer Eracer	
β-globin	GTC CTT TGG GGA TCT GT GAG CCA GGC CAT CAC TAA A	SYBR Premix Dimer Eracer	
γ-globin	CAC AAA GCA CCT GGA TGA TCT AAA CGG TCA CCA GCA CAT TT	SYBR Premix Dimer Eracer	
ε-globin	TAT TAA AAA CAT GGA CAA CCT GAA TAA TCA CCA TCA CGT TA	SYBR Premix Dimer Eracer	
GAPDH	AGC CAC ATC GCT CAG ACA C GCC CAA TAC GAC CAA ATC C	TaqMan Gene Expression Master Mix	No.60

図1. 赤芽球から赤血球への成熟



- A. 参考文献6より引用した。赤芽球は、ヘモグロビンの生成と核の濃縮を伴いながら、脱核した赤血球へと成熟していく。

図2. ヒトES/iPS細胞を起源とした造血前駆細胞(HPC)の産出



A. ヒトES/iPS-Sacの誘導プロトコール

C3H10T1/2上にES/iPSの未分化コロニーを播種し、VEGFの存在下で培養する。
7日目頃より各コロニーの隆起が確認され、ES/iPS-Sacが形成されていく。

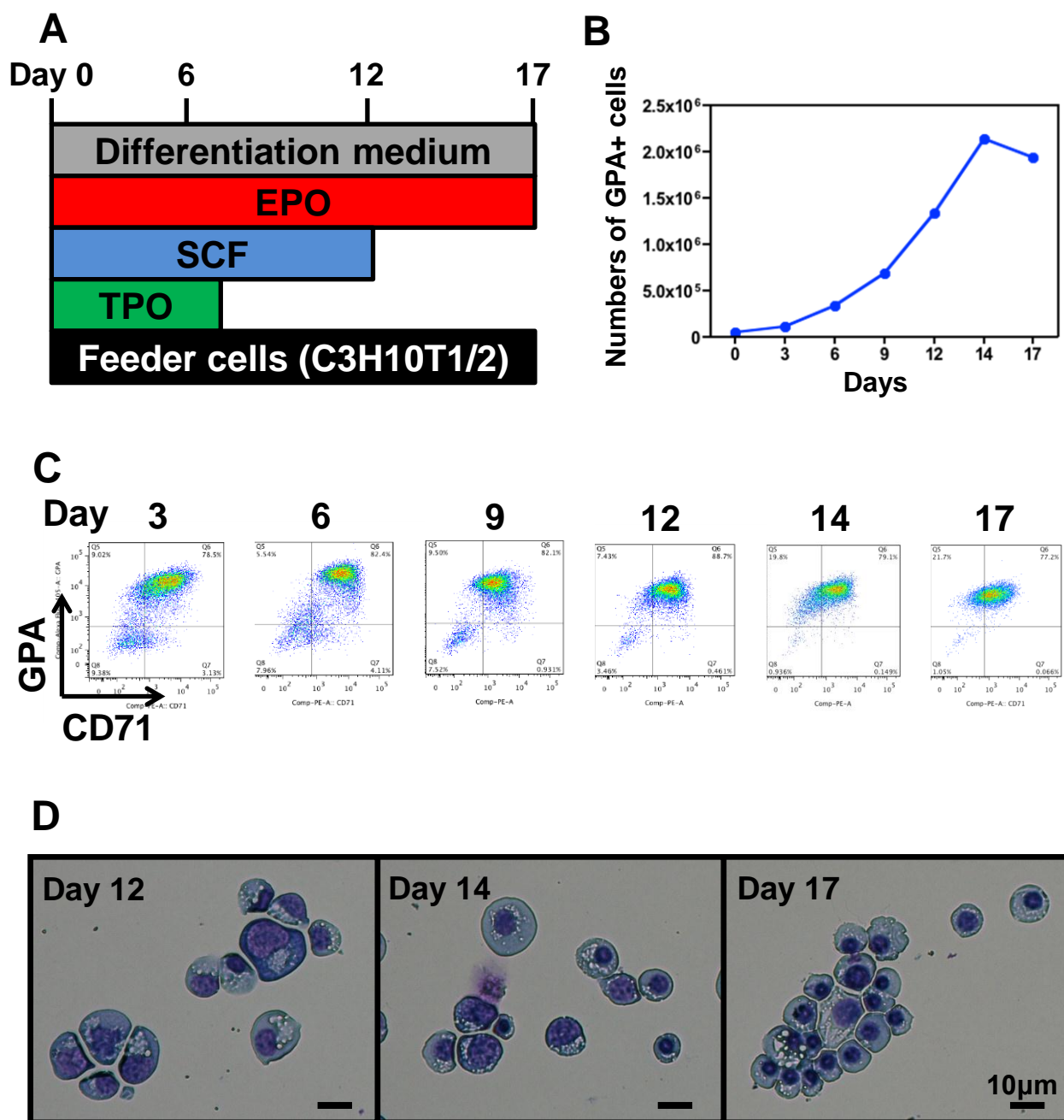
B. 播種後14日目のKhES3-Sac

Sac内部に、HPCの存在が認められる。

C. KhES3-Sacより採取したHPCのFacs解析結果

大部分が、CD34⁺もしくはCD43⁺の幼若な血球であることが確認できる。

図3. ヒトES/iPS由来HPCの赤血球/巨核球分化誘導



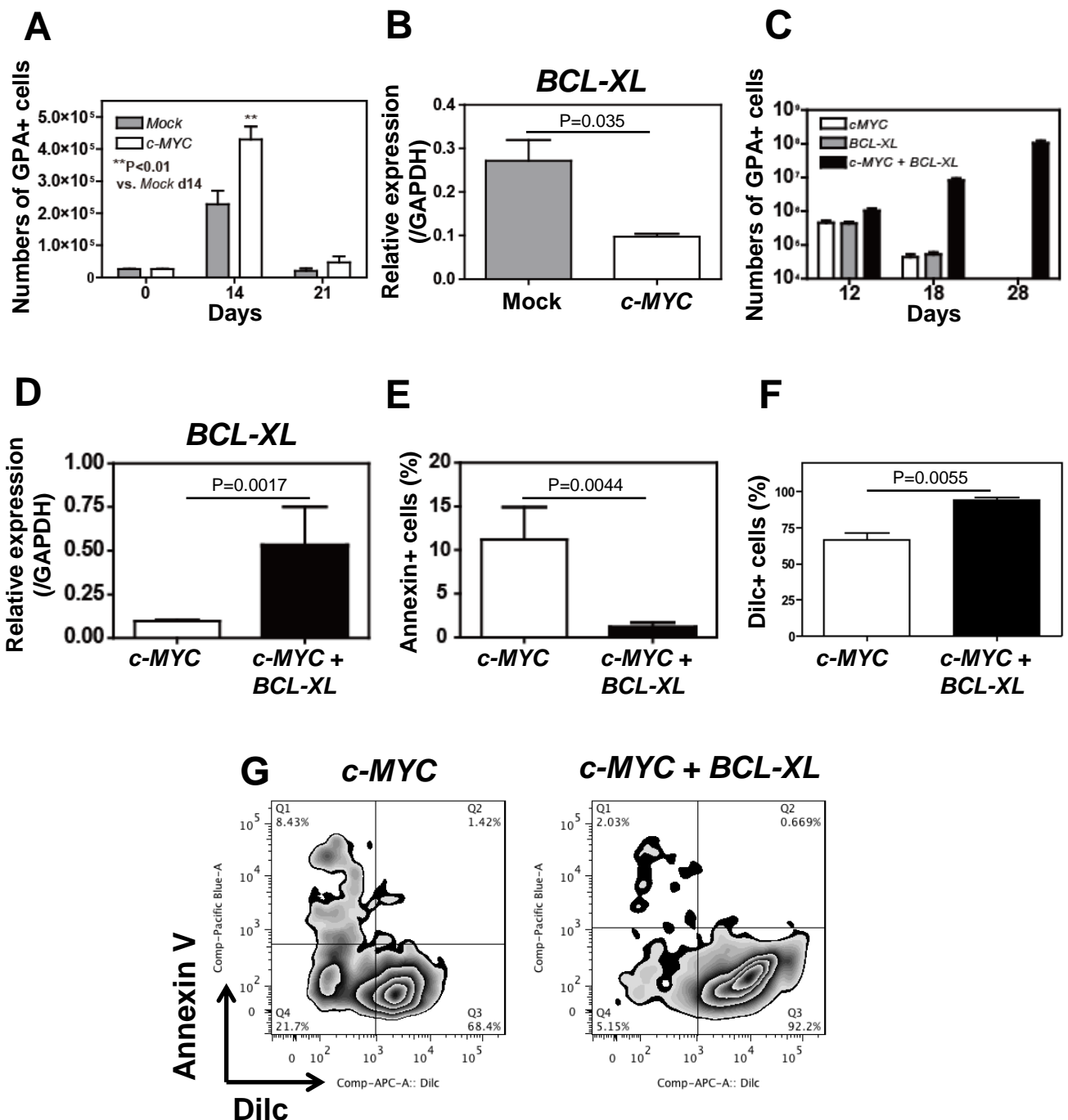
A. 赤血球系への分化誘導プロトコール

B. KhES3由来HPCを赤血球系へ分化誘導した際の細胞増殖曲線

C. KhES3由来HPCを赤血球系へ分化誘導した際のFACS解析結果
最終的に、100%近くの細胞がGPA+の赤血球系細胞となる。また、大部分はCD71+であり、成熟が不十分である。

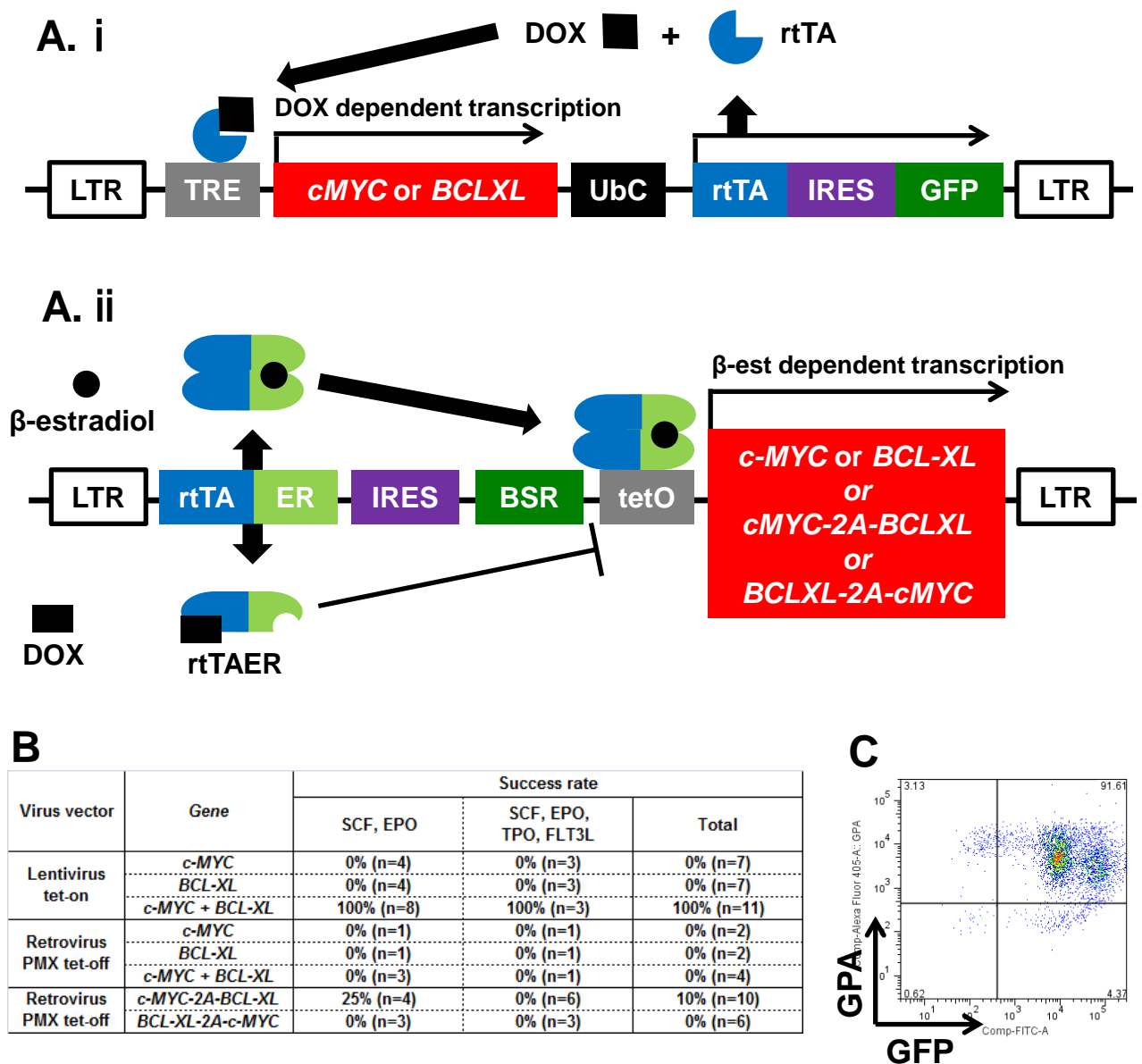
D. KhES3由来HPCを赤血球系へ分化誘導した際のギムザ染色による形態観察
好塩基性～多染性赤芽球集団が、最終的には濃縮した核を有する、正染色性赤芽球まで分化している。

図4. *c-MYC*強制発現によるアポトーシスの増大



- A. HPCに*c-MYC*を強制発現させた際のGPA+細胞の増殖能。
 B. *c-MYC*を強制発現させた際の*BCL-XL*のmRNA発現。
 C. *c-MYC*単独、*BCL-XL*単独、および*c-MYC* + *BCL-XL*を強制発現させた際のGPA+細胞の増殖能。
 D-E. *c-MYC*単独、*c-MYC* + *BCL-XL*を強制発現させた際の*BCL-XL*のmRNA発現(D)と、Annexin VおよびDilc陽性細胞率(E)。
 F. Annexin V / DilcのFACS解析結果の代表例。

図5. 赤芽球増殖に適したウイルスベクターの選定



A. tet-on レンチウイルスベクター (i) と PMX tet-off レトロウイルスベクター (ii)

LTR; Long terminal repeat, : プロモーター活性を有する末端反復配列

LTRを利用して、ウイルスゲノムは宿主ゲノムに組み込まれる

TRE; tet-responsive element : rtTAが結合し、下流に組み込まれた遺伝子の発現が促される

UbC; Ubiquitin C promoter : 下流に組み込まれた配列は、常に発現する

rtTA; Reverse tet-transactivator : テトラサイクリンとの反応性を有するrtTAをコードした配列

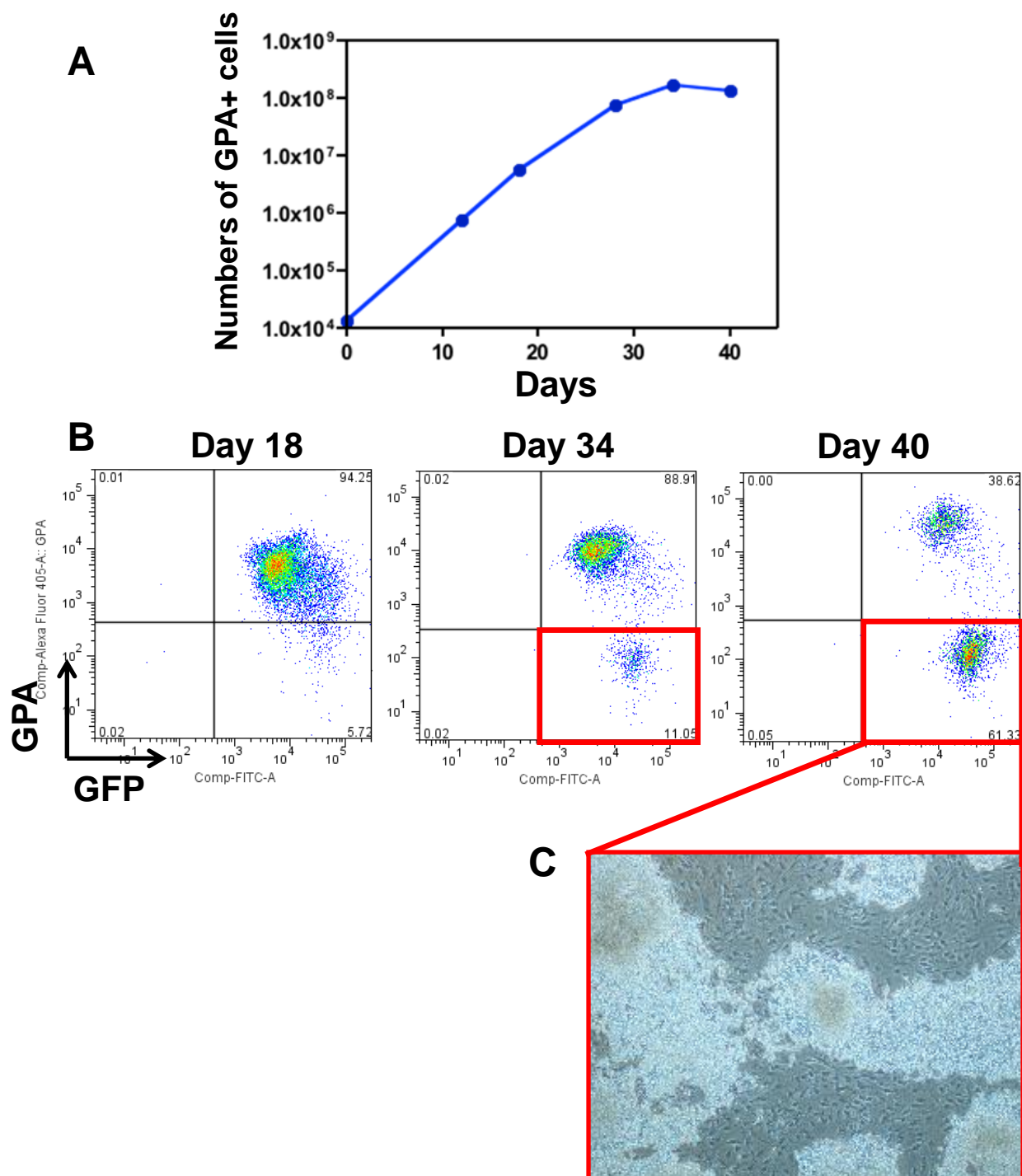
IRES; Internal ribosomal entry site : mRNAが転写された際に、前後の配列が切り離される

BSR; Blasticidin S-resistant marker protein : プラストサイジン耐性遺伝子

B. KhES3由来HPCに各ウイルスベクターを用いて*c-MYC*, *BCL-XL*, *c-MYC + BCL-XL*を強制発現させた。3週間以上に渡って、赤芽球の対数増殖が認められた場合、成功とした。

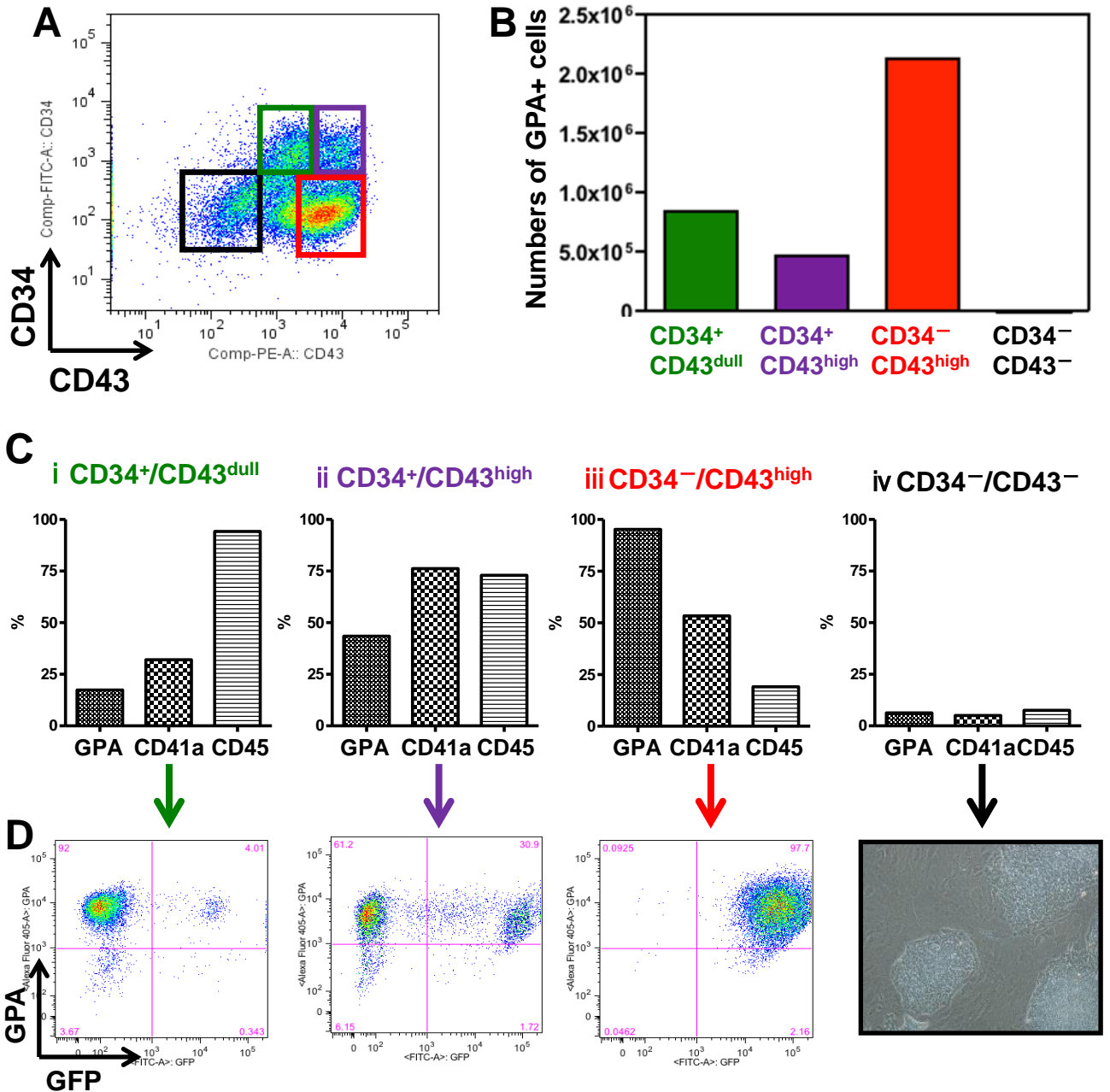
C. tet-onレンチウイルスベクターにて*c-MYC + BCL-XL*を強制発現させた際の、Facs解析結果の代表例。

図6. 長期培養時における赤血球系細胞の増殖阻害



- A. HPCにc-MYC + BCL-XLを強制発現させた際の、GPA+細胞の増殖曲線の代表例。培養開始後30日を過ぎた辺りから、増殖能がプラトーとなる。
- B-C. FACS解析結果(B)。34日目以降で、GPA-/GFP+の細胞集団の増幅が起ることが確認された。この細胞集団は血球ではなく、接着細胞であった(C)。

図7. Pre-sorting trial



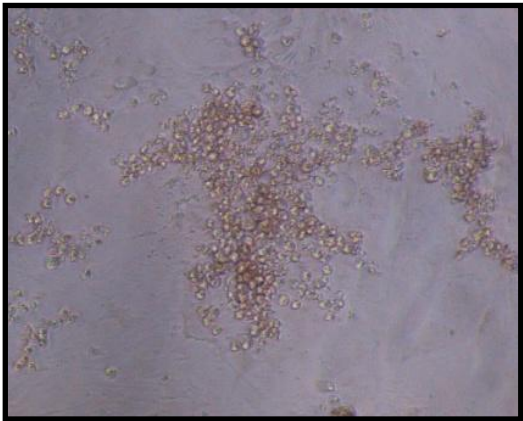
- A. ES-Sacより採取したHPCのFACS解析結果。4分画をそれぞれソーティングし、c-MYC + BCL-XLを強制発現させた。
- B. C-MYC + BCL-XLを強制発現後、17日目のGPA+細胞の増殖能。
- C. 各HPC分画をソーティングした際の、GPA、CD41a、CD45の陽性率。
- D. c-MYC + BCL-XLを強制発現させて17日目における、FACS解析結果。
iv は血球の増殖が確認できなかったため、顕微鏡下における観察結果を示した。

図8. Late-sorting trial

A

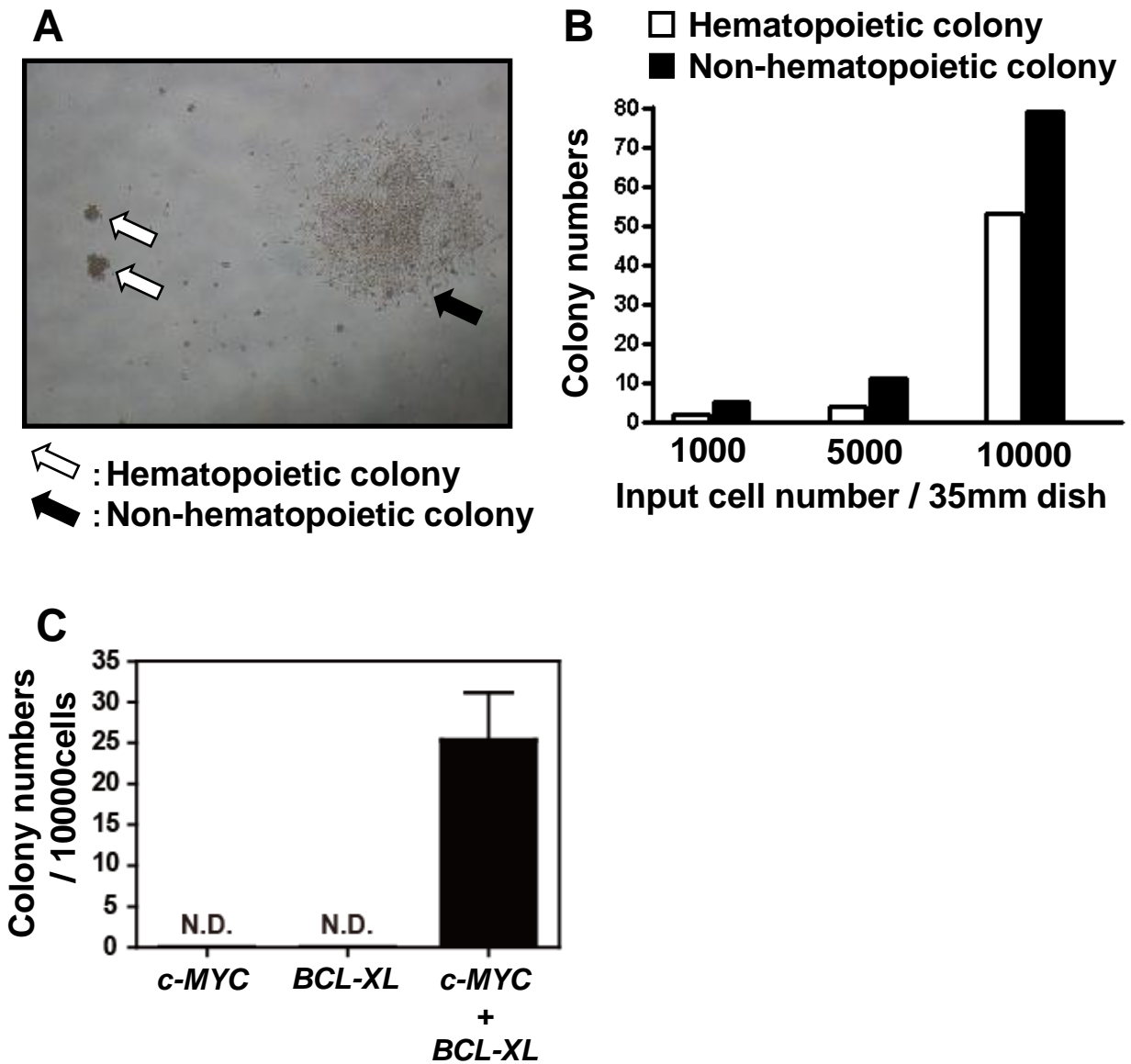
Experimental No.	Sorting marker	Sorting cell number	Hematopoietic colony number	Hematopoietic colony (%)
1	GPA ⁺ /GFP ⁺	288	7	2.4
2	GPA ⁺ /GFP ⁺	384	7	1.8
	Total	672	14	2.1

B



- A. HPCにc-MYC + BCL-XLを強制発現させて15日後(ExperimentalNo.1)と17日後(Experimental No. 2)に、GPA⁺/GFP⁺細胞のシングルセルソーティングを行った。ソーティング後、15日後にコロニー形成の有無を確認した。100個以上の細胞集団が確認できた場合、コロニーと判断した。各コロニーを採取して増殖を促したが、いずれも大きな細胞増殖は確認されなかった。
- B. コロニーの代表例。

図9. Semisolid culture trial



- A. HPCにc-MYC + BCL-XLを強制発現させて、12日後にMethocultに再播種を行った。血球様コロニーと非血球コロニーの形成が確認された。
- B. Methocultで培養を開始してから12日目に、コロニー数を確認した。播種細胞数に対して2次関数的なコロニー数の増加が認められた。
- C. HPCにc-MYC単独、BCL-XL単独、およびc-MYC + BCL-XLを強制発現させ、Methocultに播種した際のコロニー数。

図10. 各赤芽球クローンの経時的推移

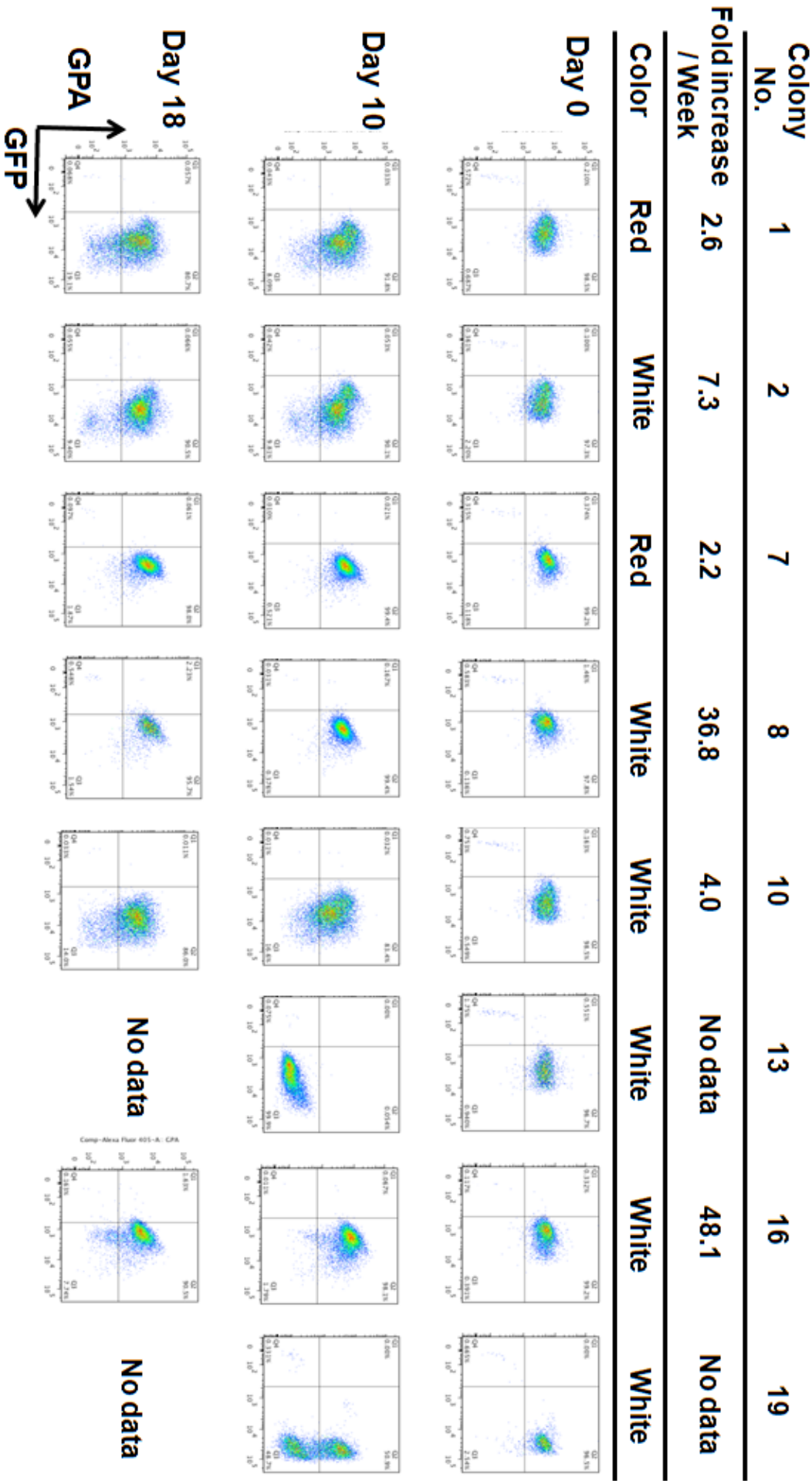
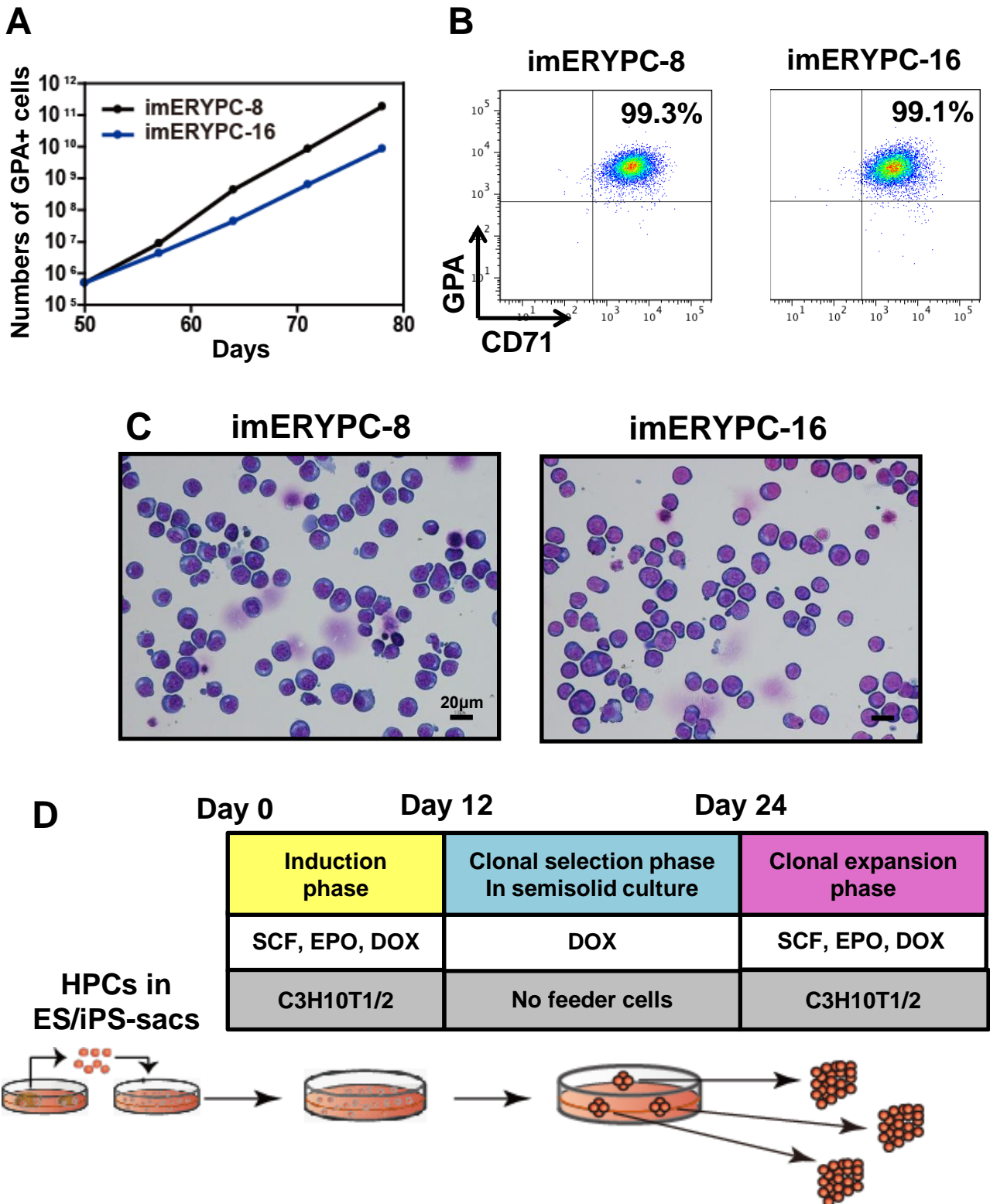
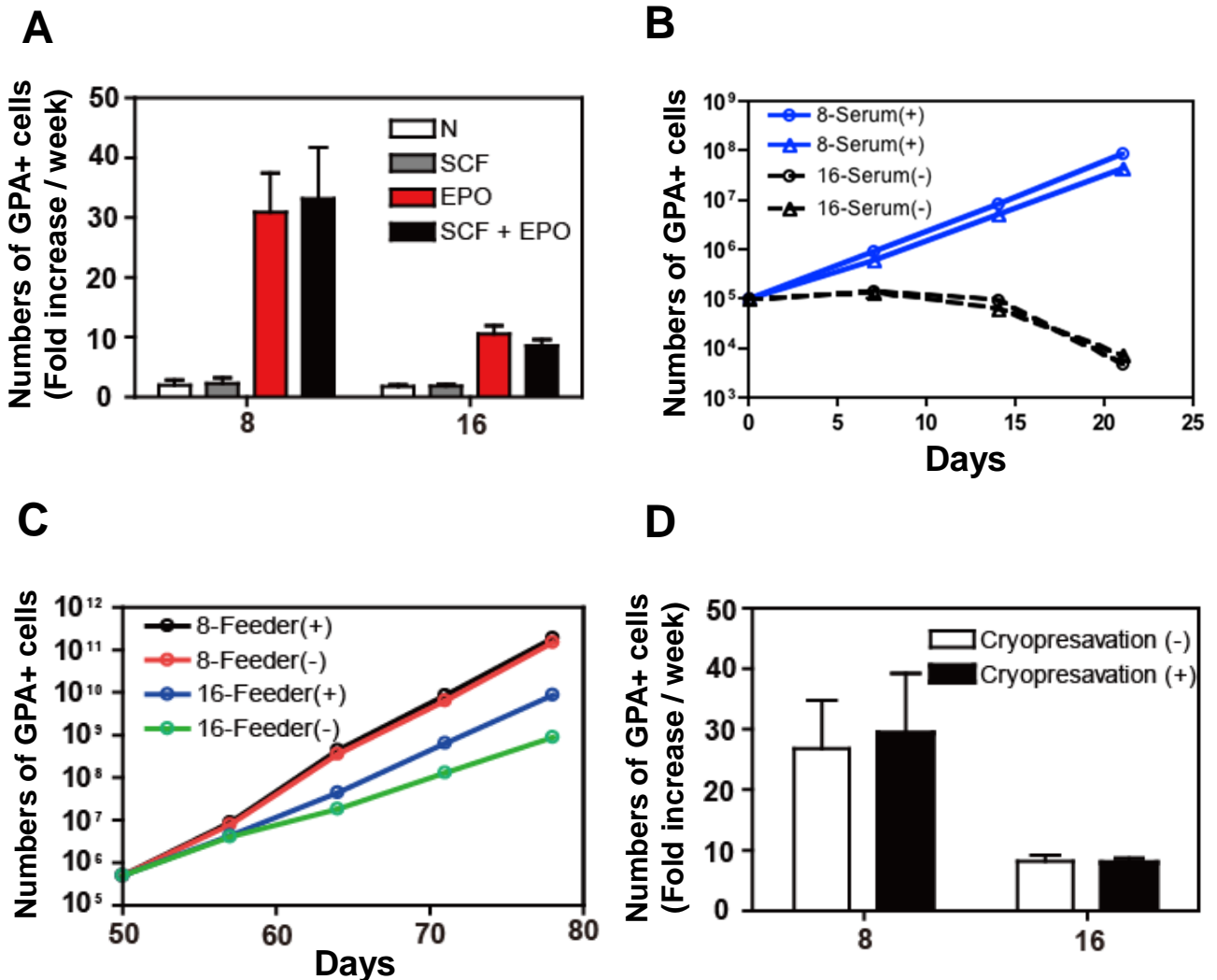


図11. 不死化赤芽球株(imERYPC)の樹立



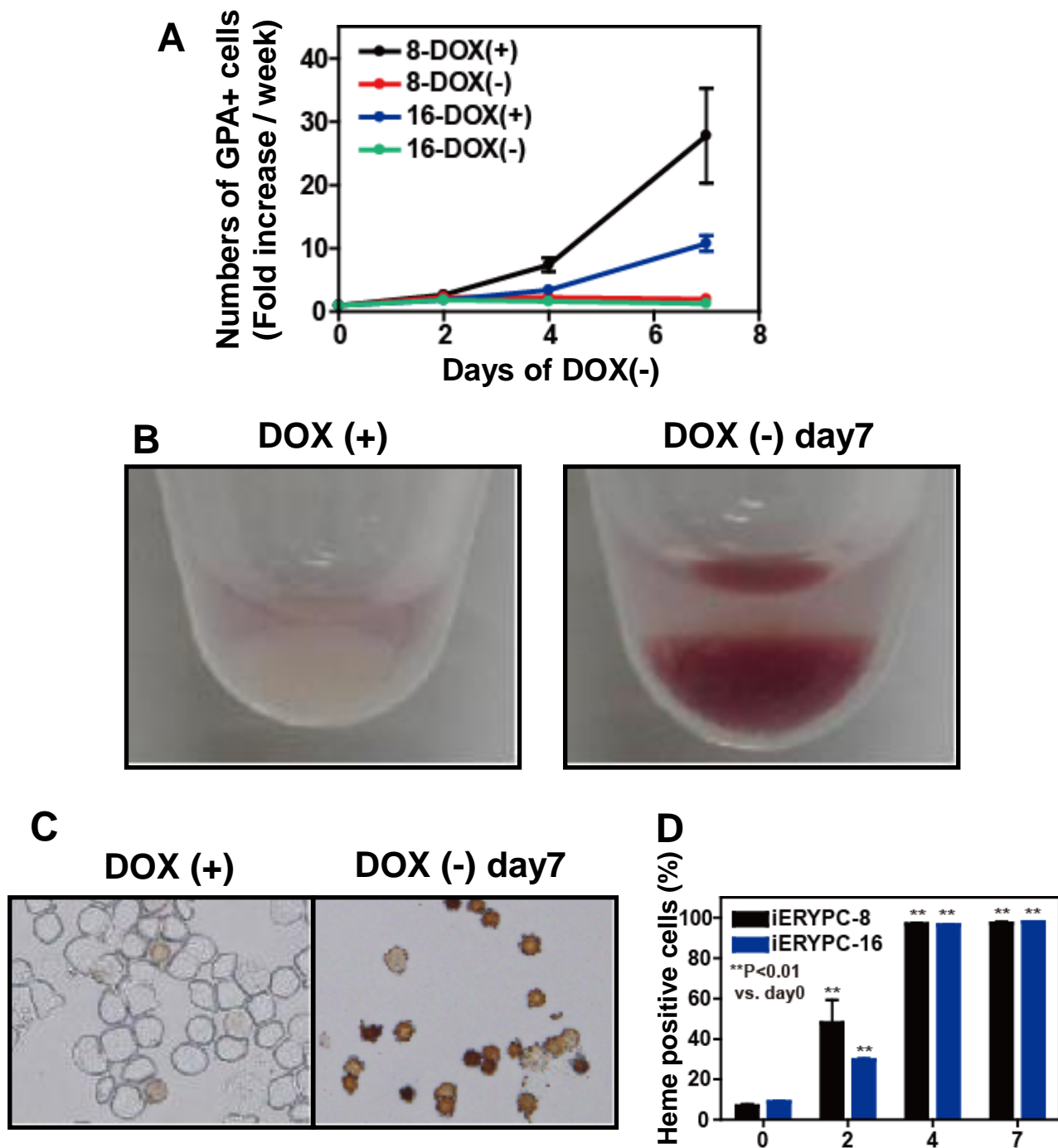
- A. クローン株化に成功したimERYPC-8, 16の細胞増殖曲線。
- B-C. imERYPC-8, 16のFACS解析結果(B)とギムザ染色写真(C)。
細胞表面抗原、形態ともに、幼若な赤芽球であった。
- D. imERYPCの樹立プロトコル。

図12. imERYPCの特性解析
増殖能に関する評価



- A. SCF、EPO存在下におけるimERYPCの増殖能。
いずれのクローンも、EPO依存性であった。
- B. 無血清下におけるimERYPCの増殖能。
いずれのクローンも、無血清下での増殖は確認されなかった。
- C. Feeder細胞の影響確認。
Feeder細胞非依存的なimERYPCの増殖が確認された。
- D. 凍結保存後のimERYPCの増殖能。
凍結融解後も、増殖能に差異は確認されなかった。

図13. imERYPCの特性解析 導入遺伝子発現をOFFとした際の形態変化1

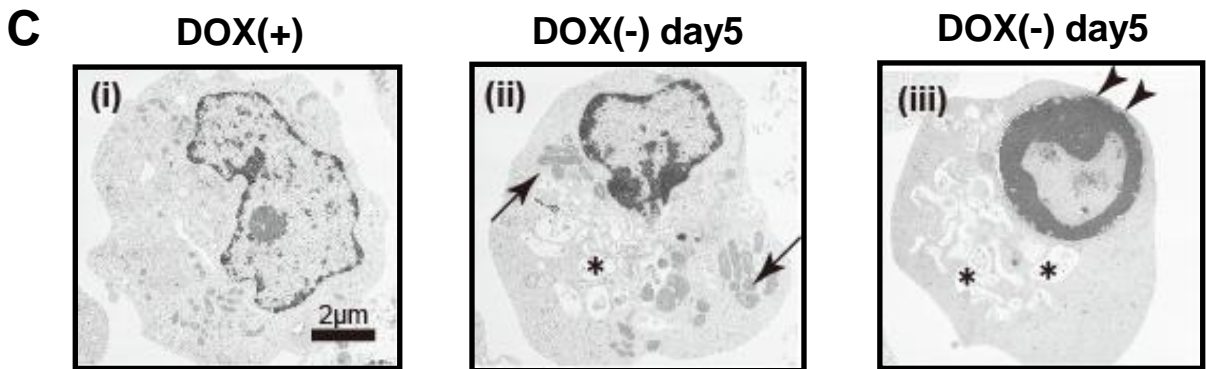
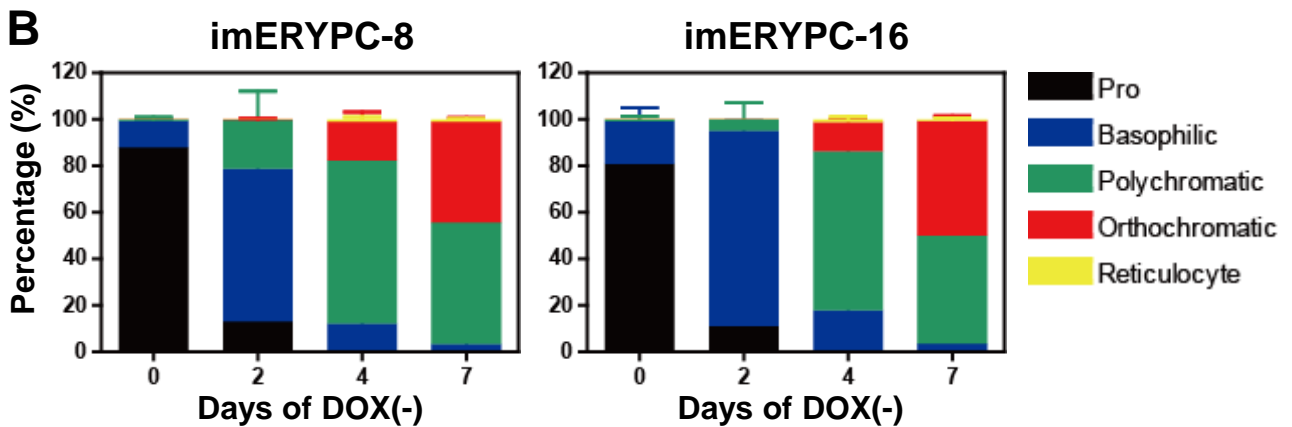
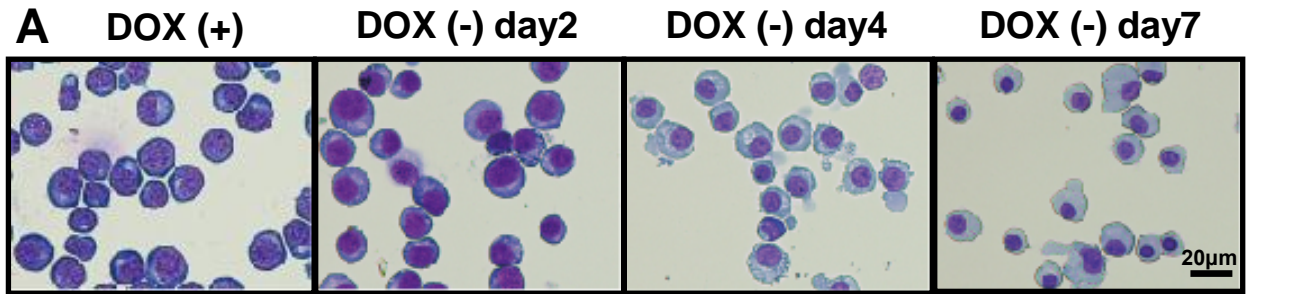


A. 培養系からDOXを除去し、導入遺伝子発現をOFFとした際のimERYPCの増殖能。増殖停止が確認された。

B. 導入遺伝子発現をOFFとして7日目の、細胞沈澱観察。imERYPCの赤褐色化が認められた。

C-D. O-dianisine染色によるヘモグロビン陽性細胞の染色(C)。DOX(-)として4日目には、ほぼ100%のimERYPCがヘモグロビン陽性であった(D)。

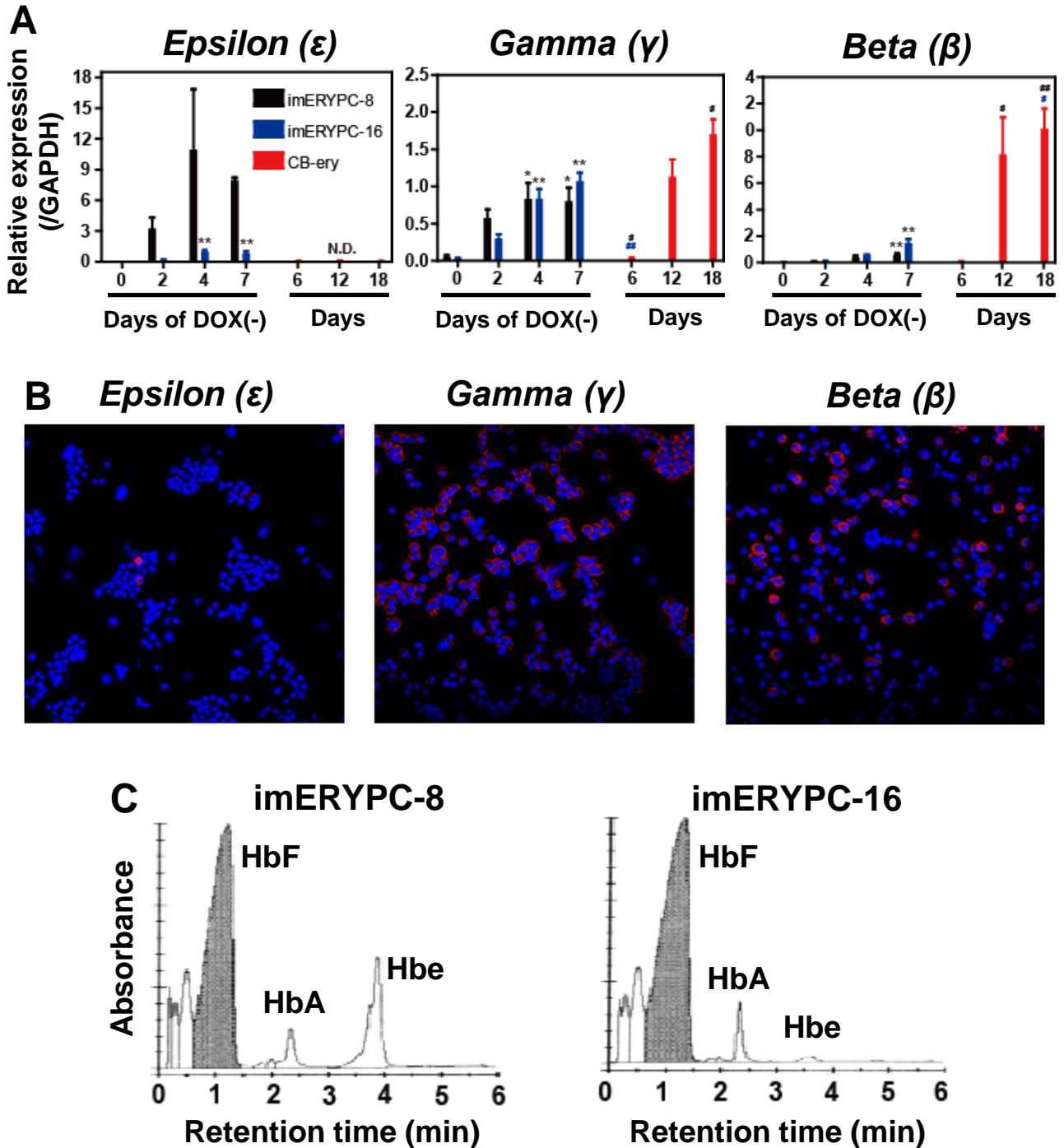
図14. imERYPCの特性解析 導入遺伝子発現をOFFとした際の形態変化2



A-B. ギムザ染色による形態観察結果。大きな核と塩基性の細胞質を有する前赤芽球が、導入遺伝子発現をOFFとすることで、濃縮した核を有する正染性赤芽球へと分化することが確認された。

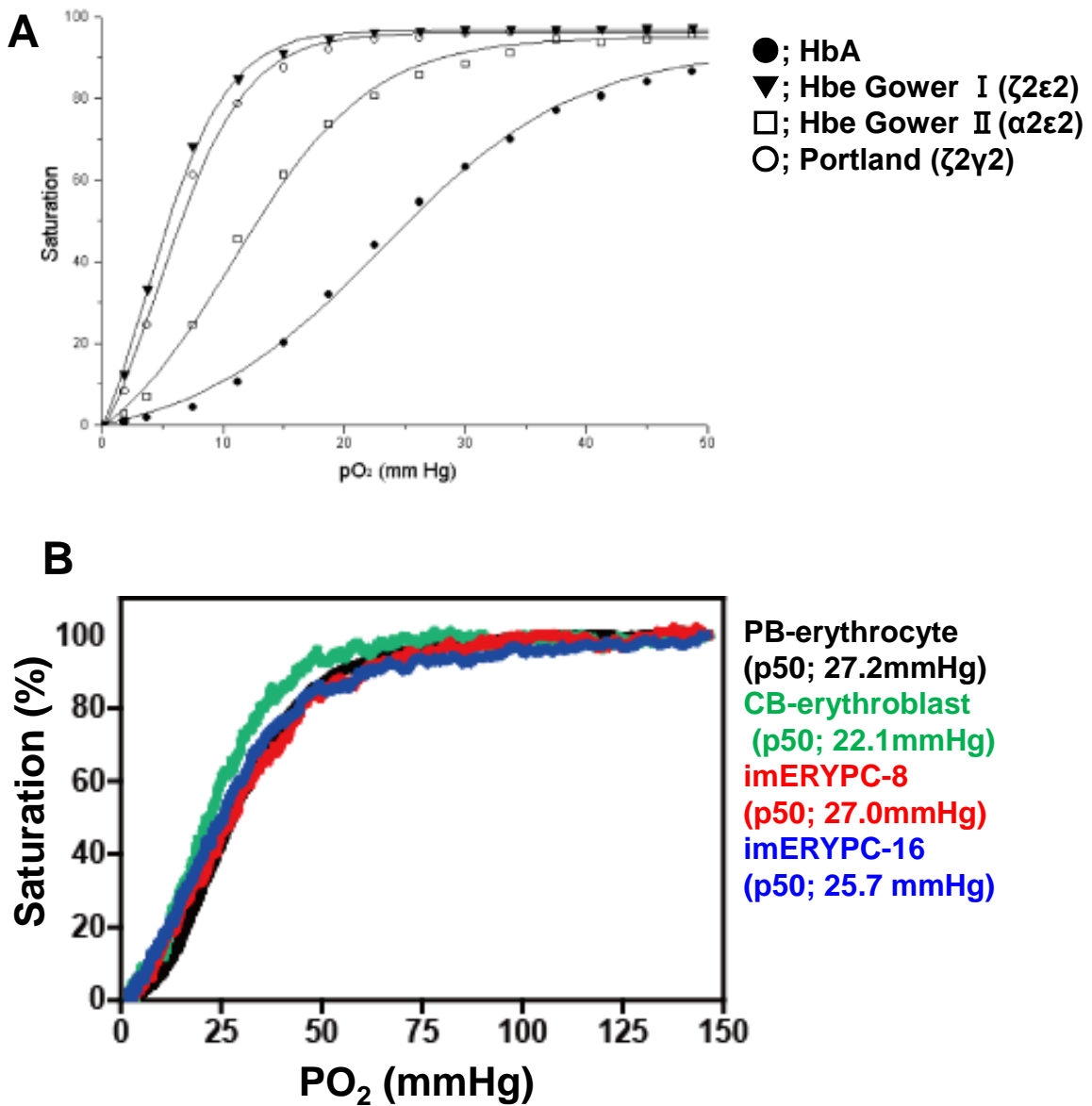
C. 導入遺伝発現をOFFとした際の分化過程を、SEMにて観察した。
 →: ミトコンドリアを示す。成熟に伴い、凝集と消失が認められた。
 ▼: 核を示す。成熟に伴う濃縮が認められた。
 *: 空胞を示す。成熟が進行するに従い、核の下部に空胞が集積することが確認された。

図15. imERYPCの特性解析
グロビン鎖の発現



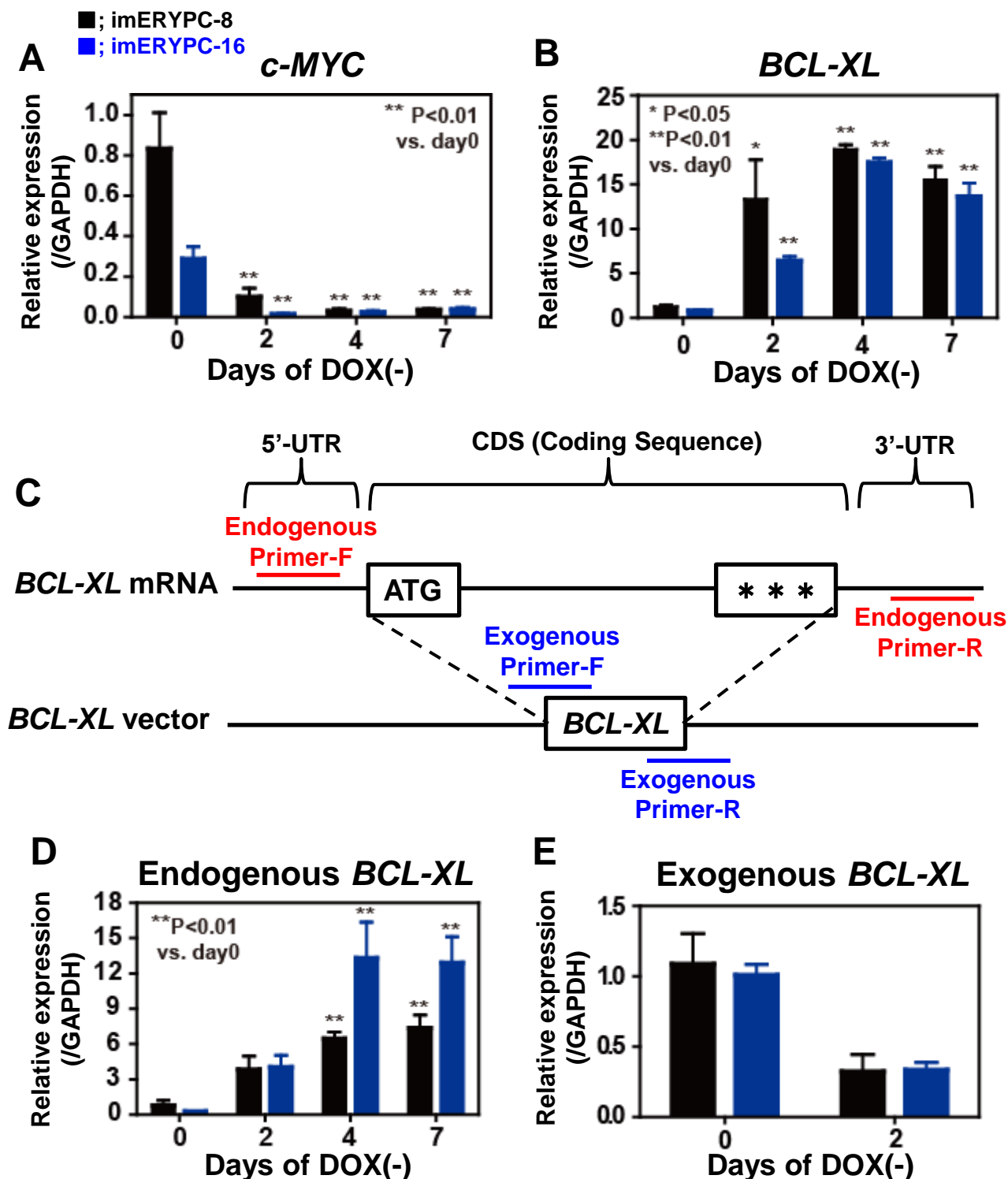
- A. 各グロビン鎖mRNAのqPCR解析結果。
- B. DOX(-)として7日目におけるimERYPC-16のグロビン鎖の免疫染色。
- C. DOX(-)として5日目における、imERYPCが含有するヘモグロビンのCE-HPLC解析結果。 γ 鎖が主体であることが確認された。

図16. imERYPCの特性解析
酸素解離曲線



- A. 赤血球の酸素解離曲線の代表例。
参考文献4より引用した。
- B. 成人末梢血、臍帯血CD34由来赤芽球およびimERYPCの
酸素解離曲線。

図17. imERYPCの成熟機構に関する解析1



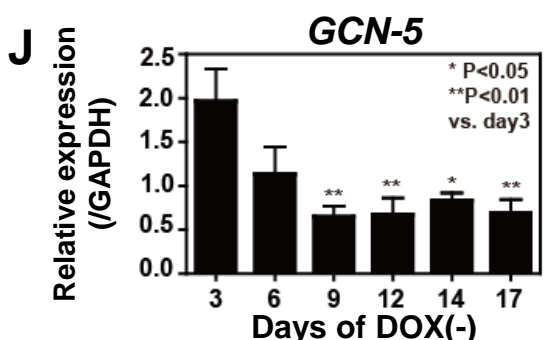
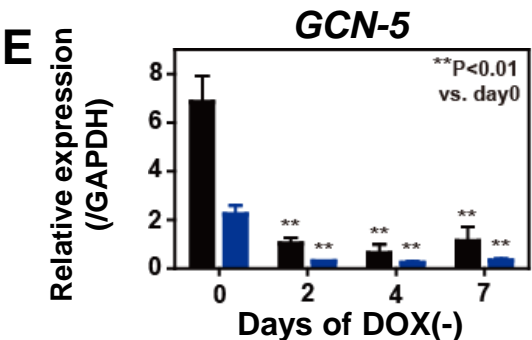
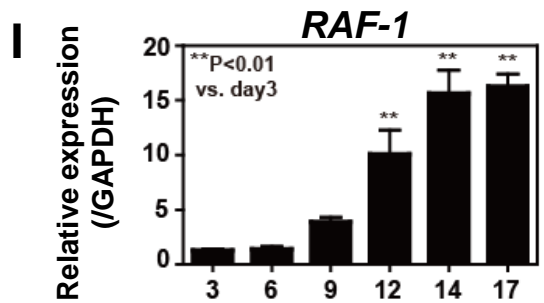
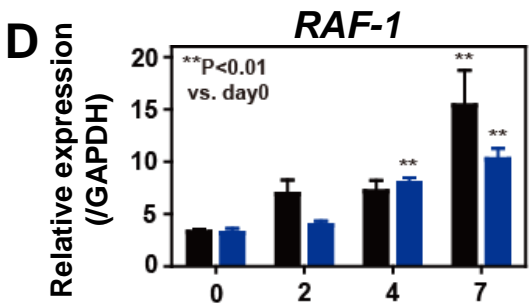
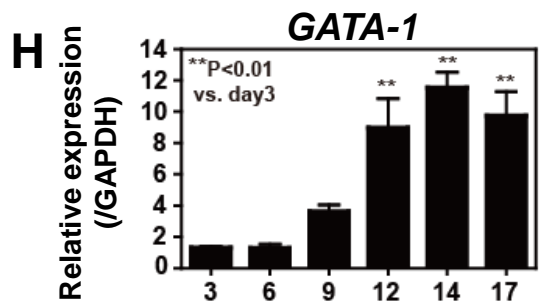
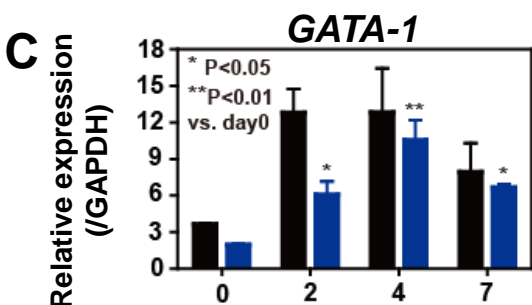
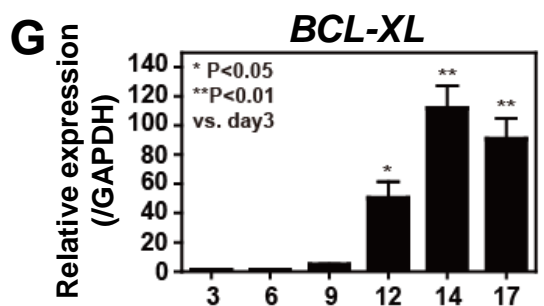
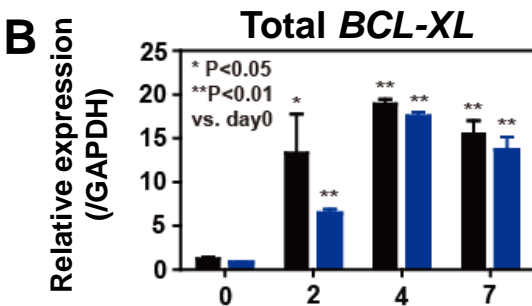
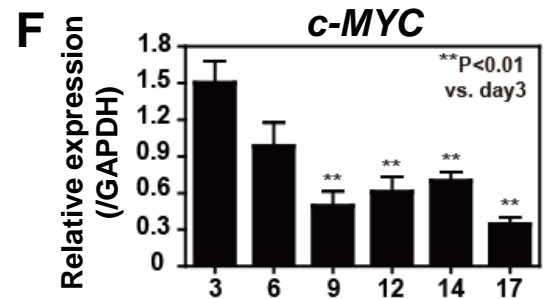
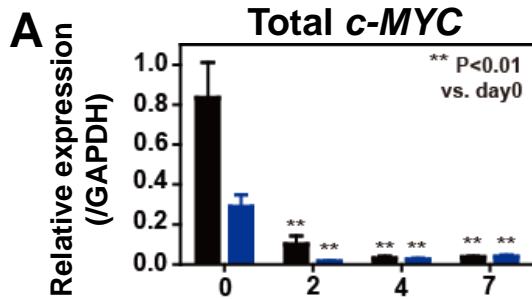
DOX(-)とした際のimERYPCのmRNA発現推移をqRT-PCRで解析した。

- A. *c-MYC*の発現推移。DOX(-)として、発現減少が確認された。
- B. *BCL-XL*の発現推移。DOX(-)とすると、発現上昇が認められた。
- C. *BCL-XL*の発現解析を詳細に行うために、内在性および外来性*BCL-XL*を検出できるプライマーの設計を行った。
- D-E. 内在性*BCL-XL* (D)および外来性*BCL-XL* (E)の発現解析結果。DOX(-)とすることで、内在性*BCL-XL*の大きな発現上昇が観察された。

図18. imERYPCの成熟機構に関する解析2

<imERYPC> ■; imERYPC-8
■; imERYPC-16

<CB-erythrocyte>



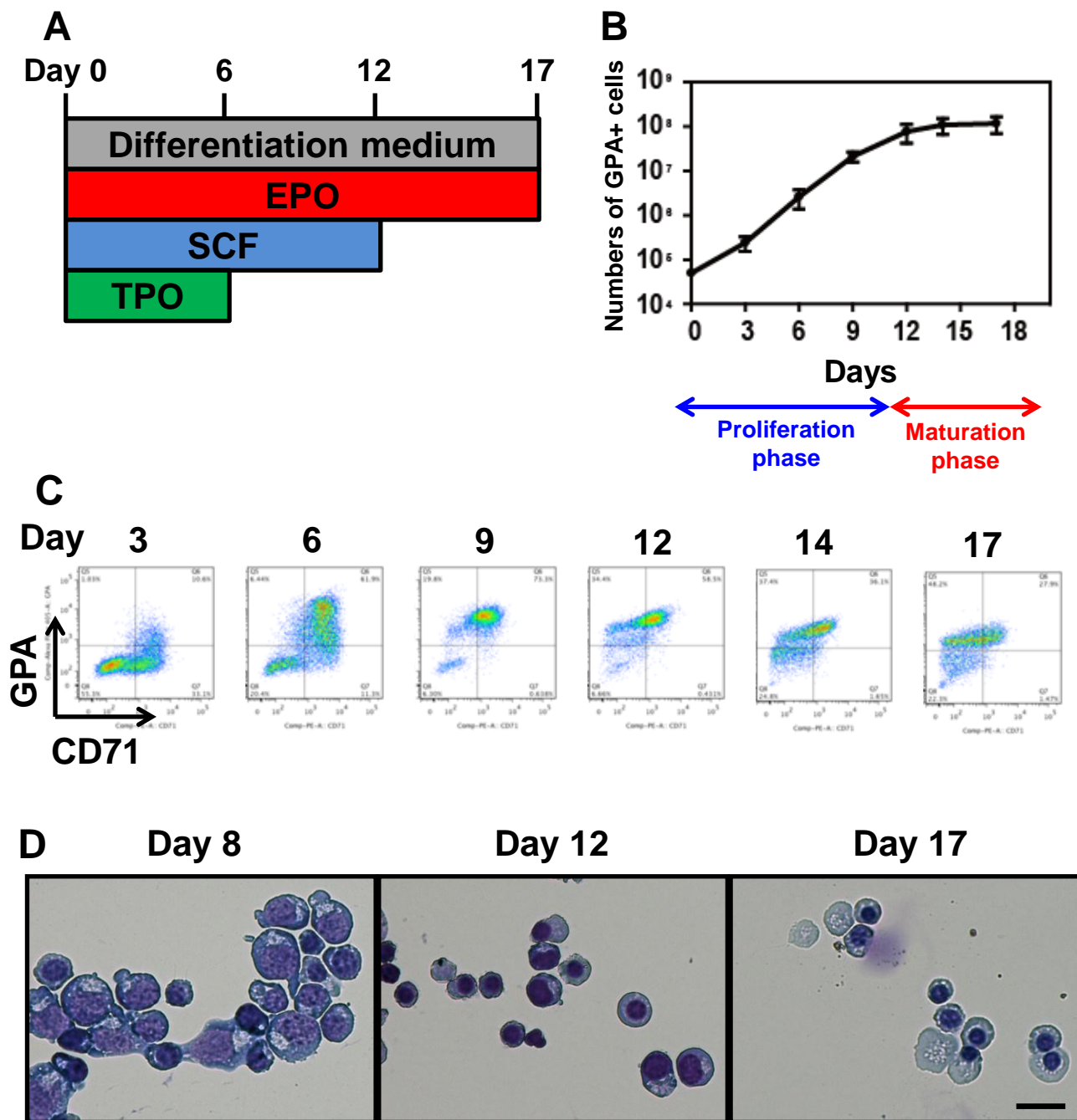
RT-qPCRにて*c-MYC*, *BCL-XL*, *GATA-1*, *RAF-1*および*GCN-5*のmRNA発現解析を実施した。

A-E. imERYPC成熟時の遺伝子発現推移。

F-J. 臍帯血CD34由来赤芽球成熟時の遺伝子発現推移。
対数増殖を示すDay11までを増殖期、増殖能が平衡に達するDay12以降を成熟期と定義した。

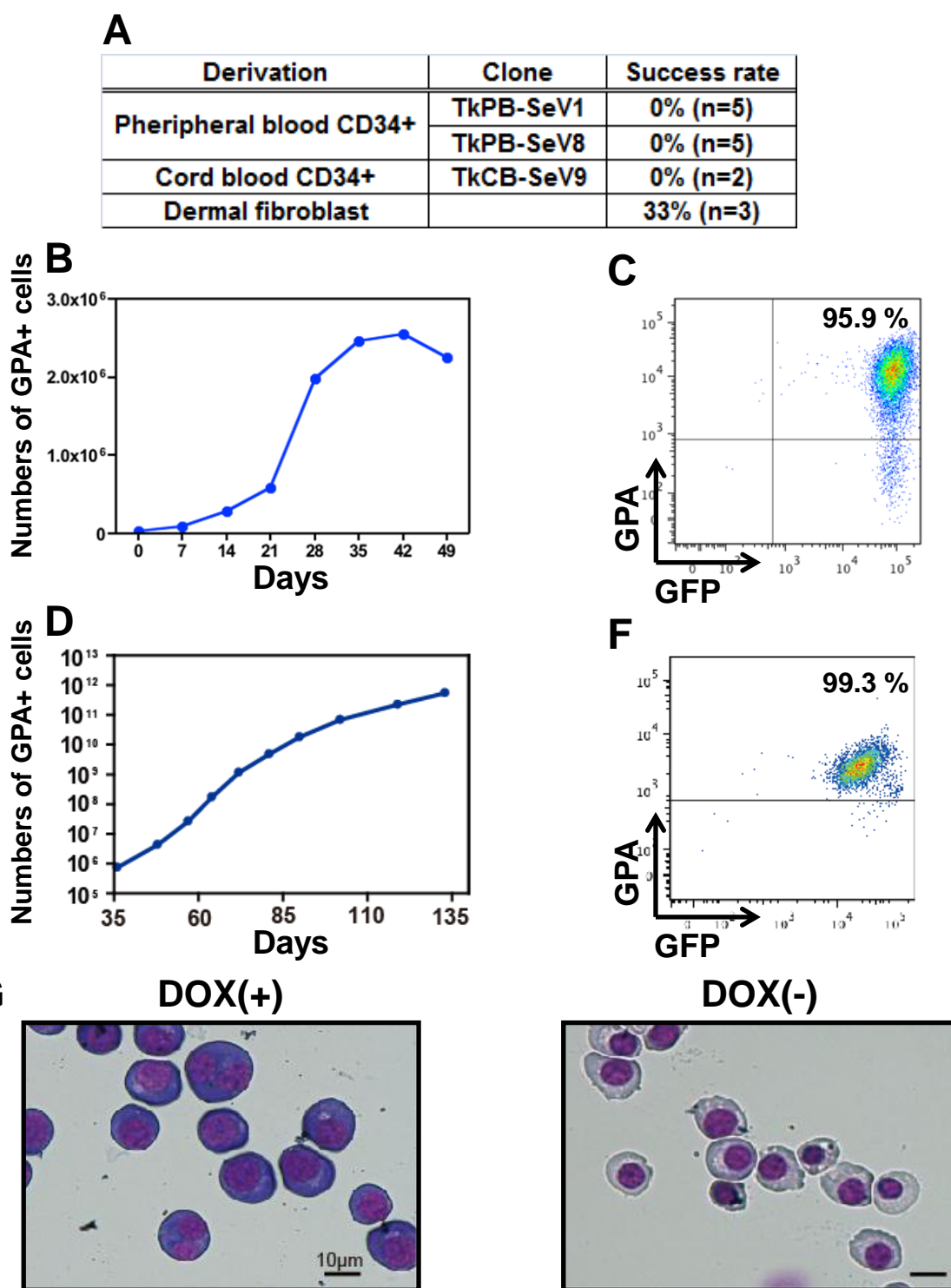
← Proliferation phase → Maturation phase →

図19. 臍帯血CD34+を起源とした赤血球系分化誘導



- 赤血球系への分化誘導プロトコール。
- CD34+由来HPCの赤血球系増殖曲線。培養開始後、12日目以降に増殖曲線は平衡状態となる。対数増殖を示すday 0-12を増殖期、day12以降を成熟期と定義した。
- FACS解析結果。
- ギムザ染色の観察。増殖期においては、未熟な赤芽球が大部分を占める一方で、成熟期以降は、成熟が進行した正染色赤芽球や脱核赤血球が確認された。エラーバーは20 μ mを示す。

図20. ヒトiPS細胞を起源としたimERYPCの樹立

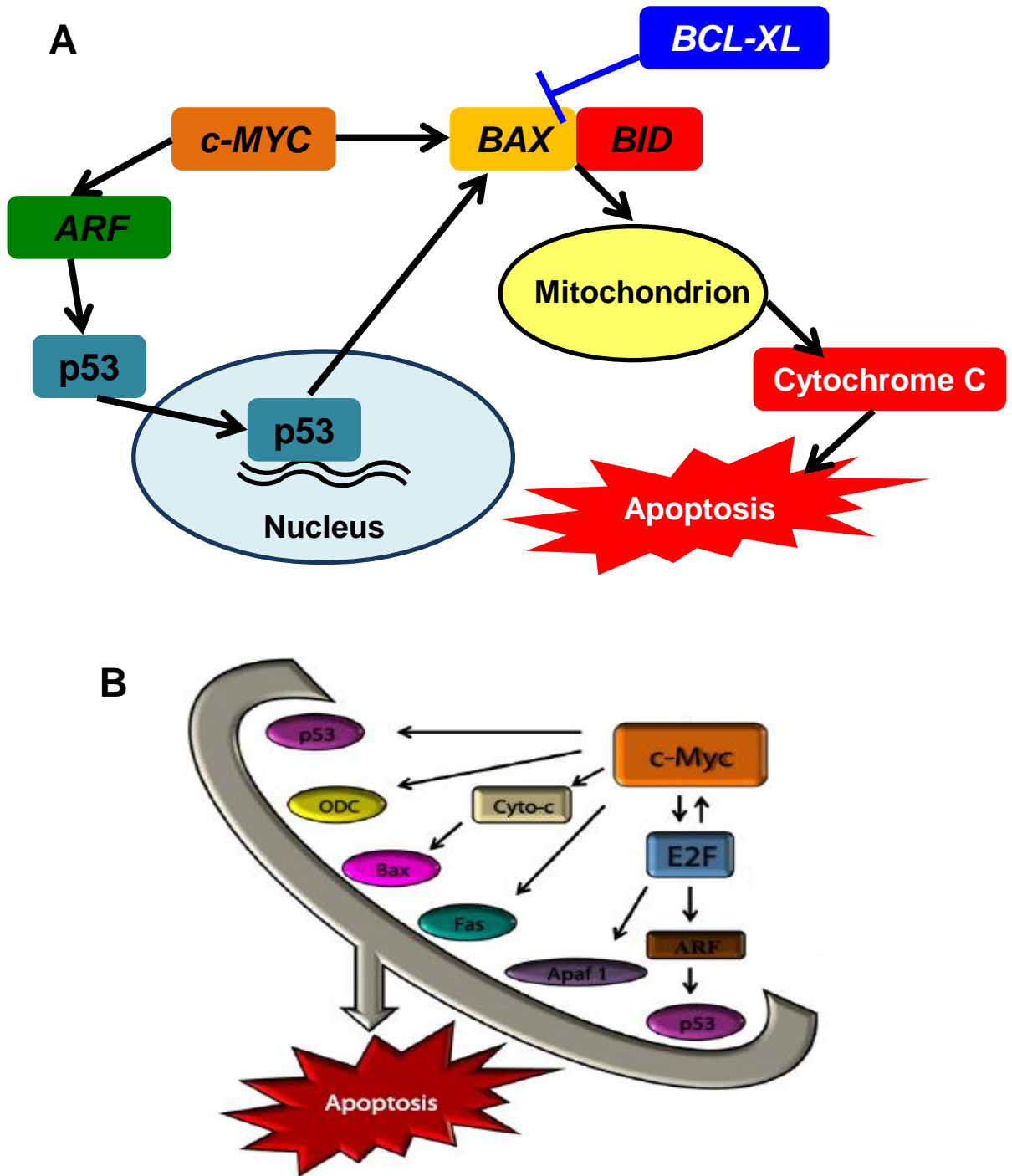


A. imERYPCの作製検討に用いたヒトiPS細胞一覧。

B-C. TkCB-SeV8を起源としたimERYPCの増殖曲線(B)とFacs解析結果(C)。
半固形培地より血球コロニーを採取した日をDay0とした。大きな増殖は確認されず、培養開始後1カ月頃には増殖低下が確認された。

D-G. 7F3955由来imERYPCの増殖曲線(D)、Facs解析結果(F)、ギムザ染色(G)。
半固形培地より血球コロニーを採取した日をDay0とした。培養開始後135日にて、治療に必要な細胞数を確保するに至った。培養系からDOXを除去すると、成熟の進行が確認された。

図21. *c-MYC*とアポトーシス



- A. ミトコンドリアを介したアポトーシスの代表的な経路。
参考文献47を参照し、図を作成した。
- B. *c-MYC*が誘発するアポトーシスには、様々な経路が存在する。
参考文献59より、図を引用した。

図22. imERYPCの増殖と成熟機構

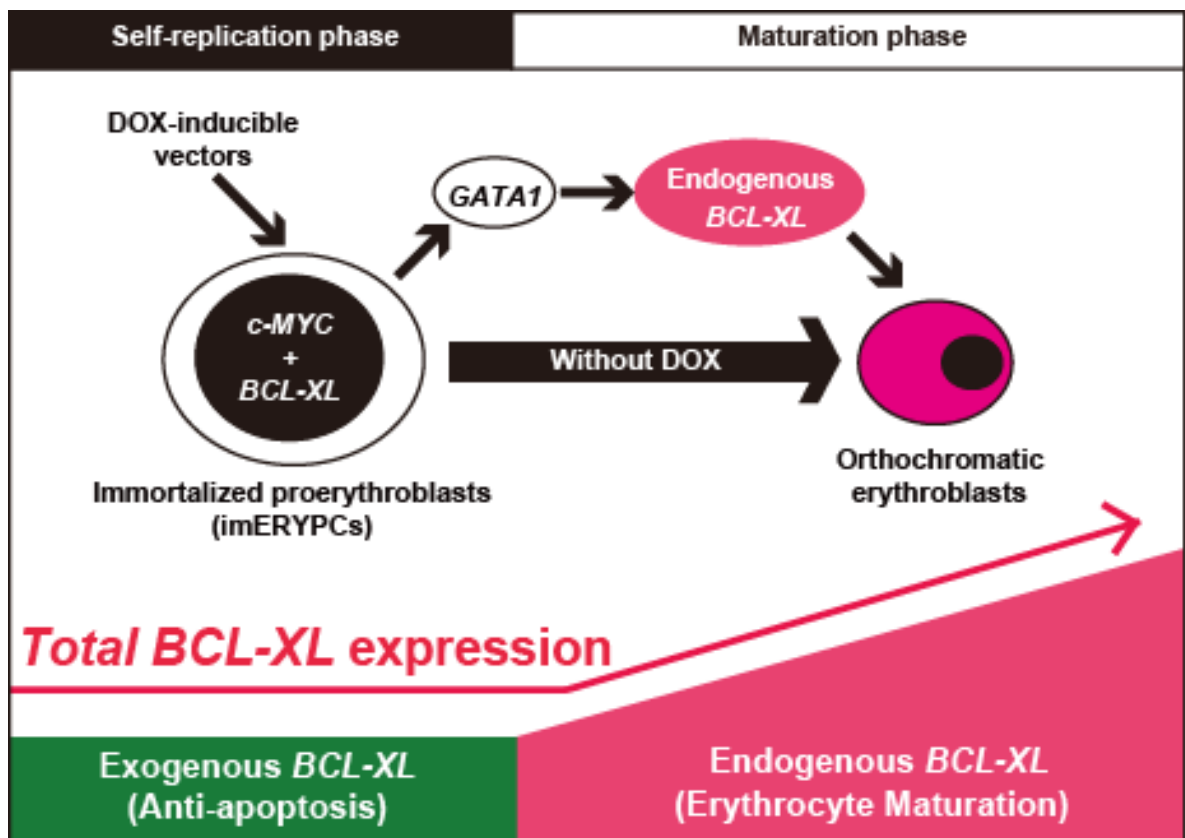
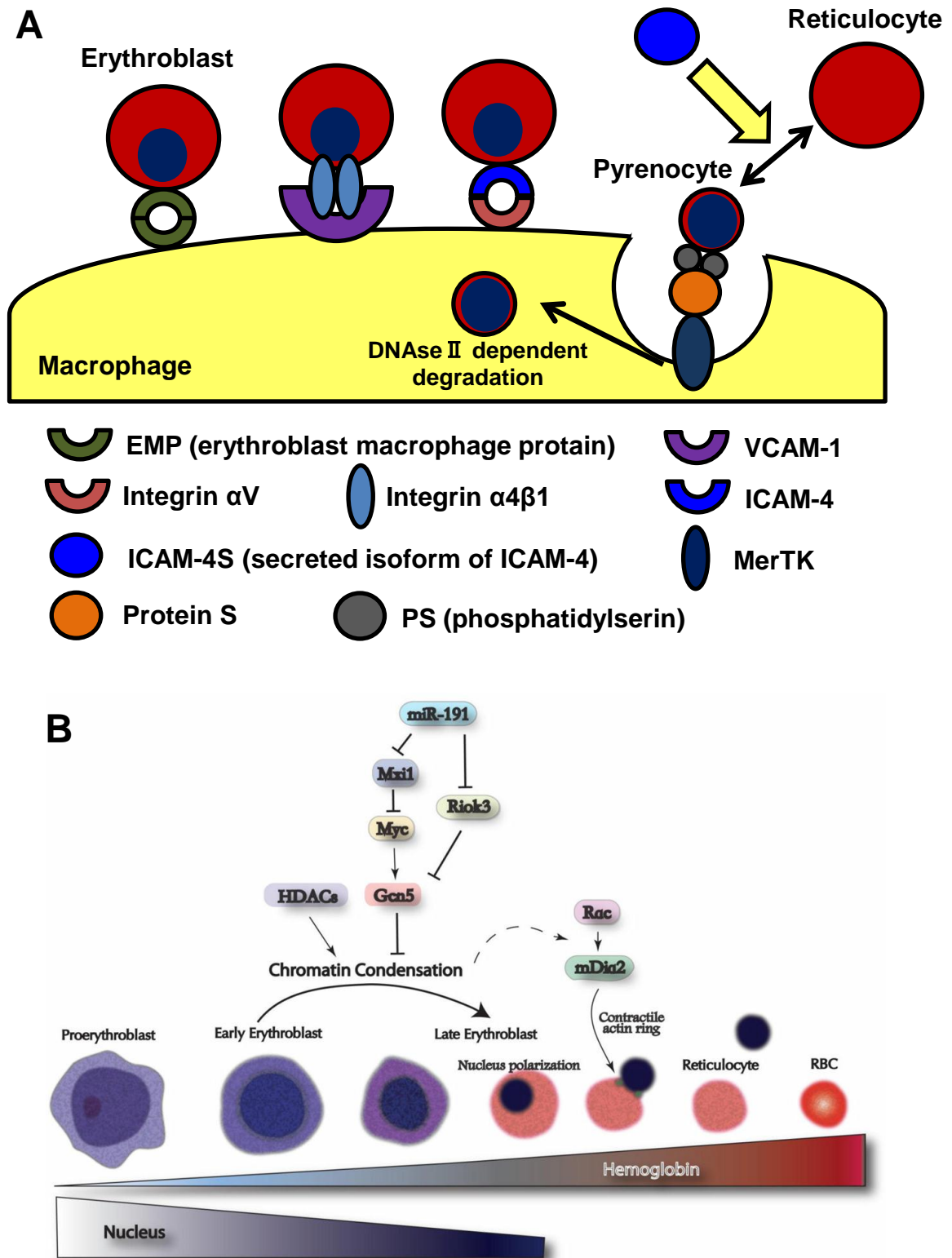


表4. マクロファージの脱核への関与を示唆する文献一覧

Ref No.	Jornal	Author	Factor	Summary
70	Blood (1998)	Hanspal M. et al	Emp	Emp抗体の添加もしくはマクロファージを培養から除くと、赤芽球の増殖および脱核が抑制される。アポトーシスが6倍増える。
71	Blood Cells Mol Dis (2007)	Soni S. et al	Emp	胎児肝マクロファージをin vitro培養。Empは細胞内に局在しているが、成熟が進むと、細胞表面にEmpが出てくる。未成熟なマクロファージは赤芽球と接着しない。
72	JBC (2006)	Soni S. et al	Emp	Emp KOマウスでは、有核赤血球の増加、循環が認められる。 Erythroblastic islandの消失や、赤血球内アクチンの重合不良が確認される。
73	JEM (1995)	Sadahira Y. et al	$\alpha 4 \beta 1$ integrin (ery) VCAM1 (M)	抗体添加によって $\alpha 4 \beta 1$ とVCAM1の結合を阻害すると、erythroblastic islandが消滅。
84	Blood (2004)	Kingsley PD, et al	$\alpha 4$	Primitiveな赤芽球には有核状態で循環し、胎生期14.5-16.5日で胎児肝のマクロファージと接触し、脱核する。A4抗体の添加によってerythroblastic islandが減少。
74	Blood (2008)	Magrath KE, et al	$\alpha 4$	
75	Blood (2006)	Lee G, et al	ICAM4 (ery) αv (M)	ICAM4 KOおよび αv ペプチド添加により、erythroblastic islandが70%減少。
76	Blood (2003)	Lee G, et al	ICAM4S	赤血球の最終成熟時にICAM4Sが発現。ICAM4と αv の結合を阻害し、網状赤血球が末梢へ循環すると想定される。
99	Blood (1990)	Crocker PR, et al	sialoadherin (CD69)	マクロファージのCD69は、赤芽球細胞膜上のシアル酸と結合。
100	Blood (2007)	Fabrick BO, et al	ED2 (CD163)	マクロファージと赤芽球の結合様式は不明だが、マクロファージはハトグロビンをクリアランスするシテラターとして働く。
101	Nature (2005)	Yoshida H, et al	Phosphatidylserin (PS)	胎児肝マクロファージに、PS陽性赤芽球が食食される。
102	Science (2000)	Oldenborg PA. et al	CD47	脱核赤血球はCD47(Don't eat me signal)を発現し、マクロファージに食食されない。
103	Science (2001)	Kawane K, et al	Dnase II	マクロファージはDnase IIを介して、取り込んだ赤芽球核酸を破壊する。 Dnase II KOではマクロファージ内に赤芽球由来核酸が残る。
104	JCB (2008)	Leinberg MJ, et al	-	Transferrin freeにてマクロファージと赤芽球を共培養。 マクロファージにて鉄が合成され、赤芽球に供給される。
105	Blood (2007)	Spike BT, et al	Retinoblastoma tumor suppressor(Rb)	Rb欠損マクロファージは成熟が不十分。脱核赤血球も出現しなくなる。
106	Blood (2007)	Liu XS, et al	Paradin	Palladinはactinの重合に関わる。Palladin欠損により、erythroblastic islandがなくなる。

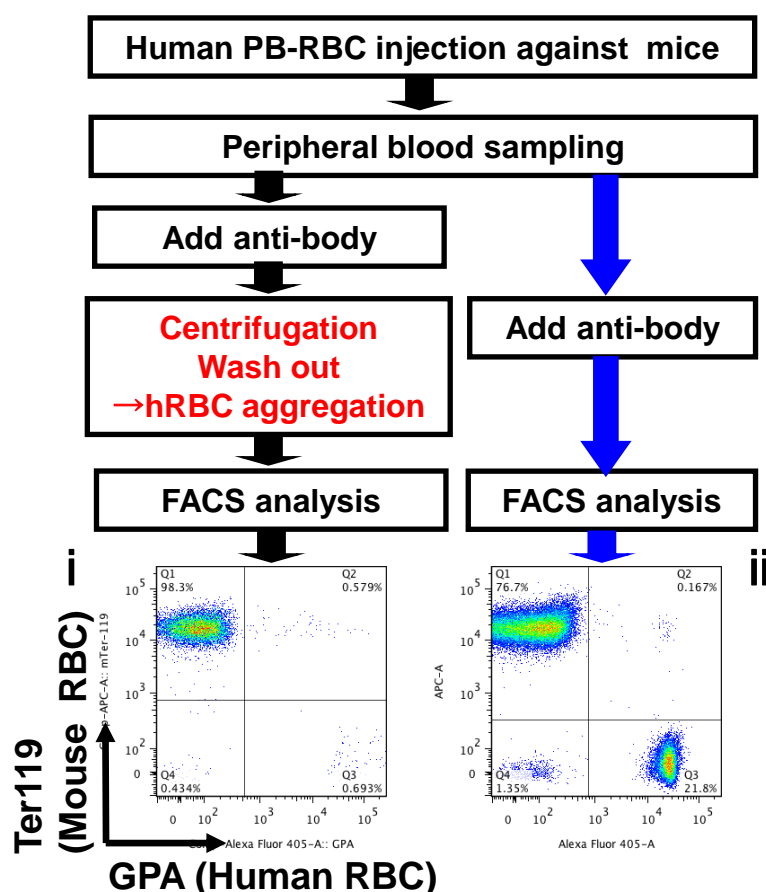
図23. 赤芽球の脱核機構



- A. マクロファージ依存型の脱核機構。参考文献69, 82を参照し、図を作成した。
- B. マクロファージ非依存型の脱核機構。図は参考文献6より引用した。

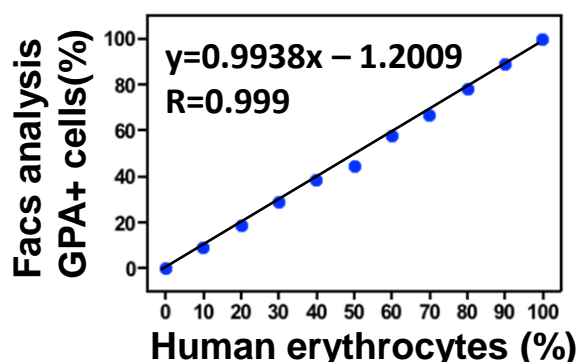
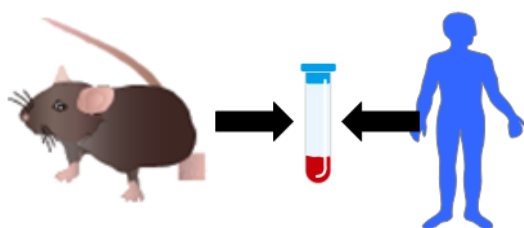
図24. マウス生体内におけるヒト赤血球の評価方法

A i . Conventional method ii . New method



B

Mix mouse RBCs and human RBCs



A i - ii . 従来の検体調整法では、マウス末梢においてヒト赤血球の循環は認められなかった(i)。一方、新規染色方法においては、ヒト赤血球の循環が認められた(ii)。

B. マウス赤血球とヒト赤血球を試験管内で混合し、新規染色方法のバリデーションを実施した。

図25. マウス生体内におけるヒト赤血球およびimERYPCの循環評価

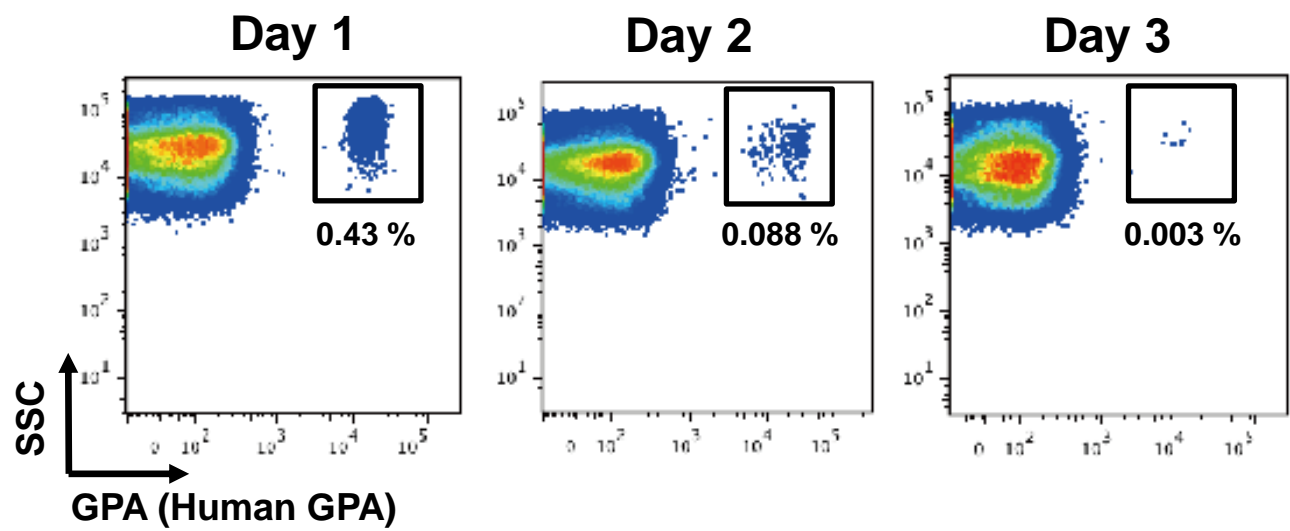
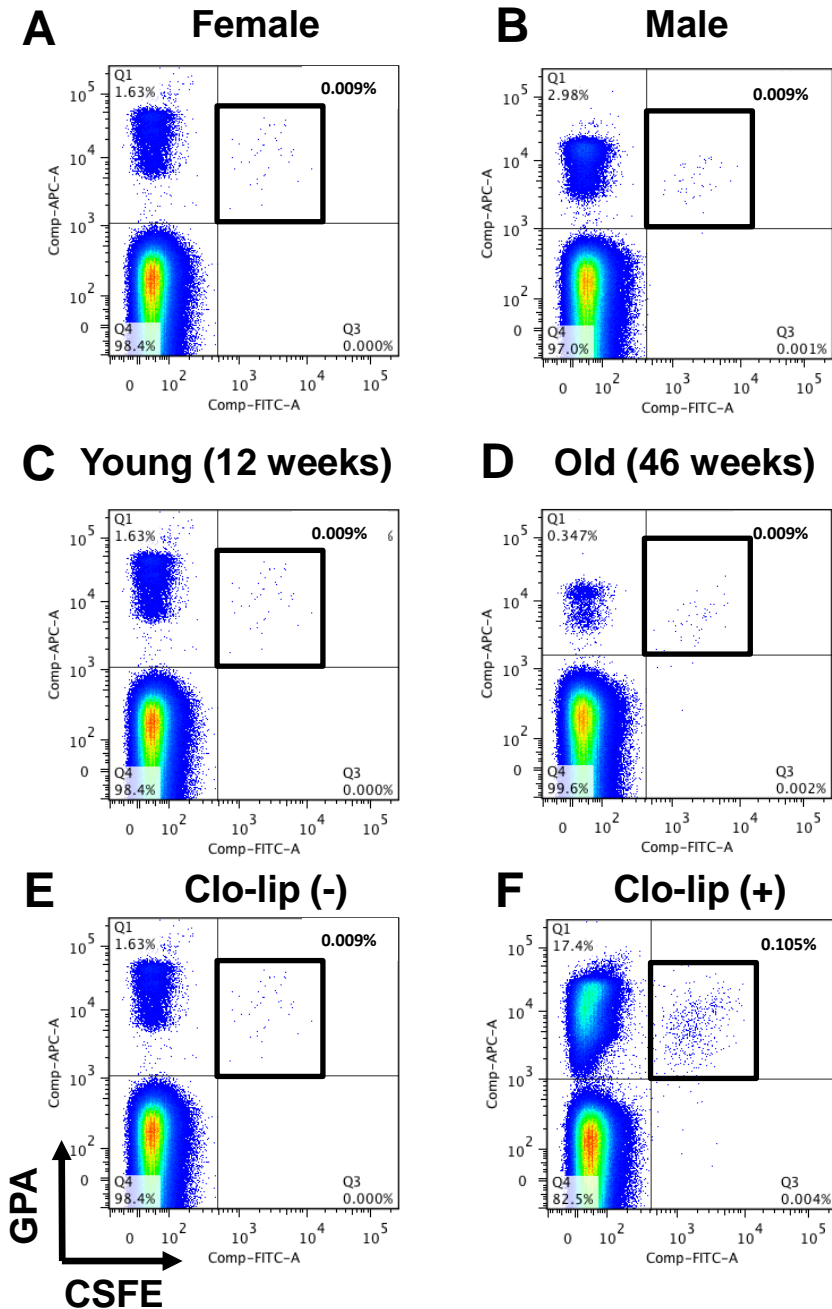


図24にて設定した方法を用いて、マウスに投与されたヒト赤血球の評価を実施した。投与後1日目にはヒト赤血球の明らかな循環が確認できた一方で、ヒト赤血球は急速に排除されることが確認された。

図26. マウス生体内におけるimERYPCの循環率向上に関する検討



放射線照射したNOGマウスにDecoyとしてヒト赤血球を投与した。その翌日、imERYPC-8 1×10^9 個を腹腔内投与し、24時間後にマウス末梢血を採取して解析を行った。GPA+/CSFE+が循環したimERYPCである。

- A-B. 性差がヒト赤血球循環に与える影響確認。差異は確認されなかった。
- C-D. マウス週齢がヒト赤血球循環に与える影響確認。差異は確認されなかった。
- E-F. マウスの細網内皮系がヒト赤血球循環に与える影響確認。
 クロドロネートリポソーム投与にてマウスの細網内皮系を不活化させることで、ヒト赤血球の循環率向上が確認された。

図27. マウス生体内におけるimERYPCの成熟

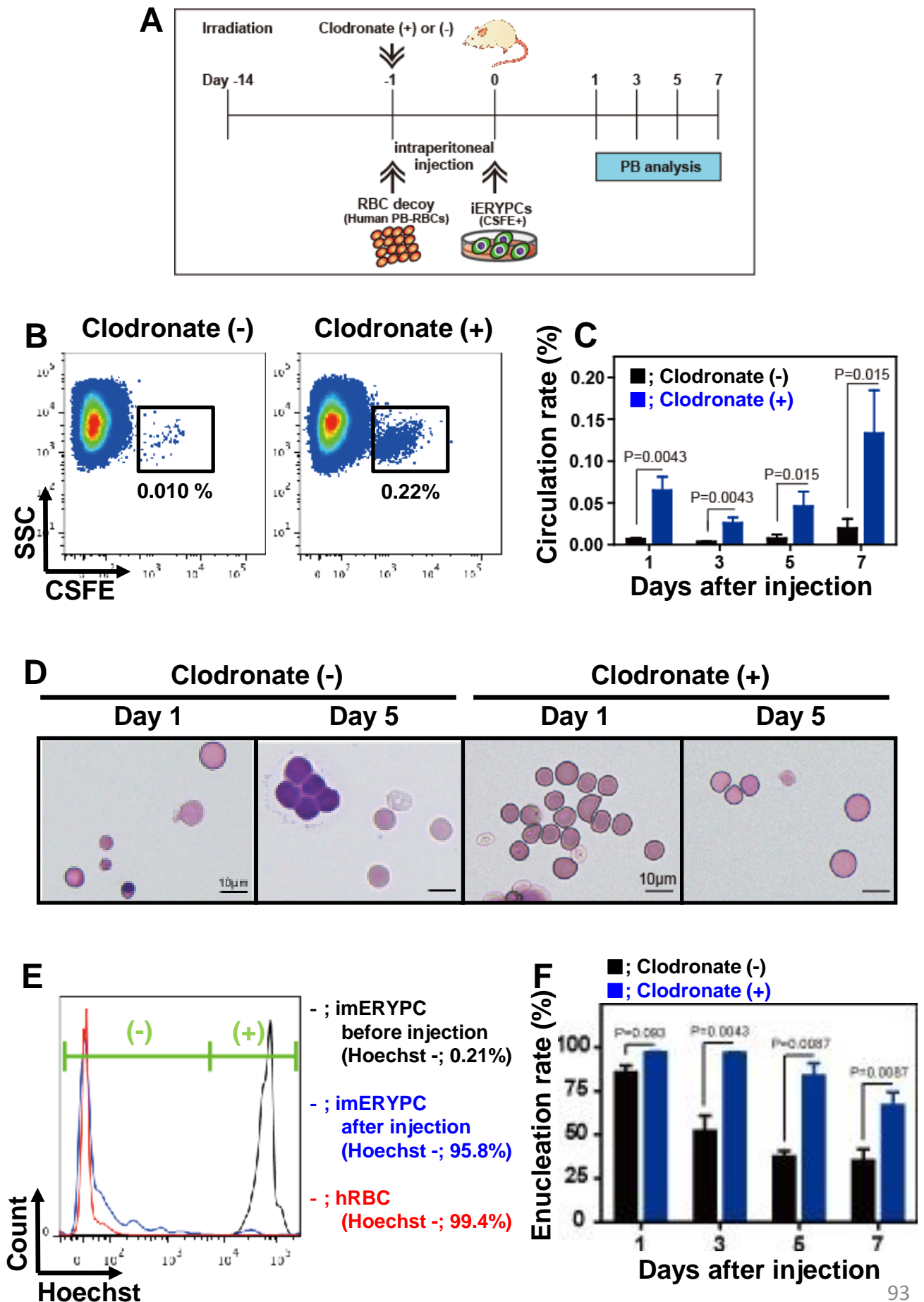
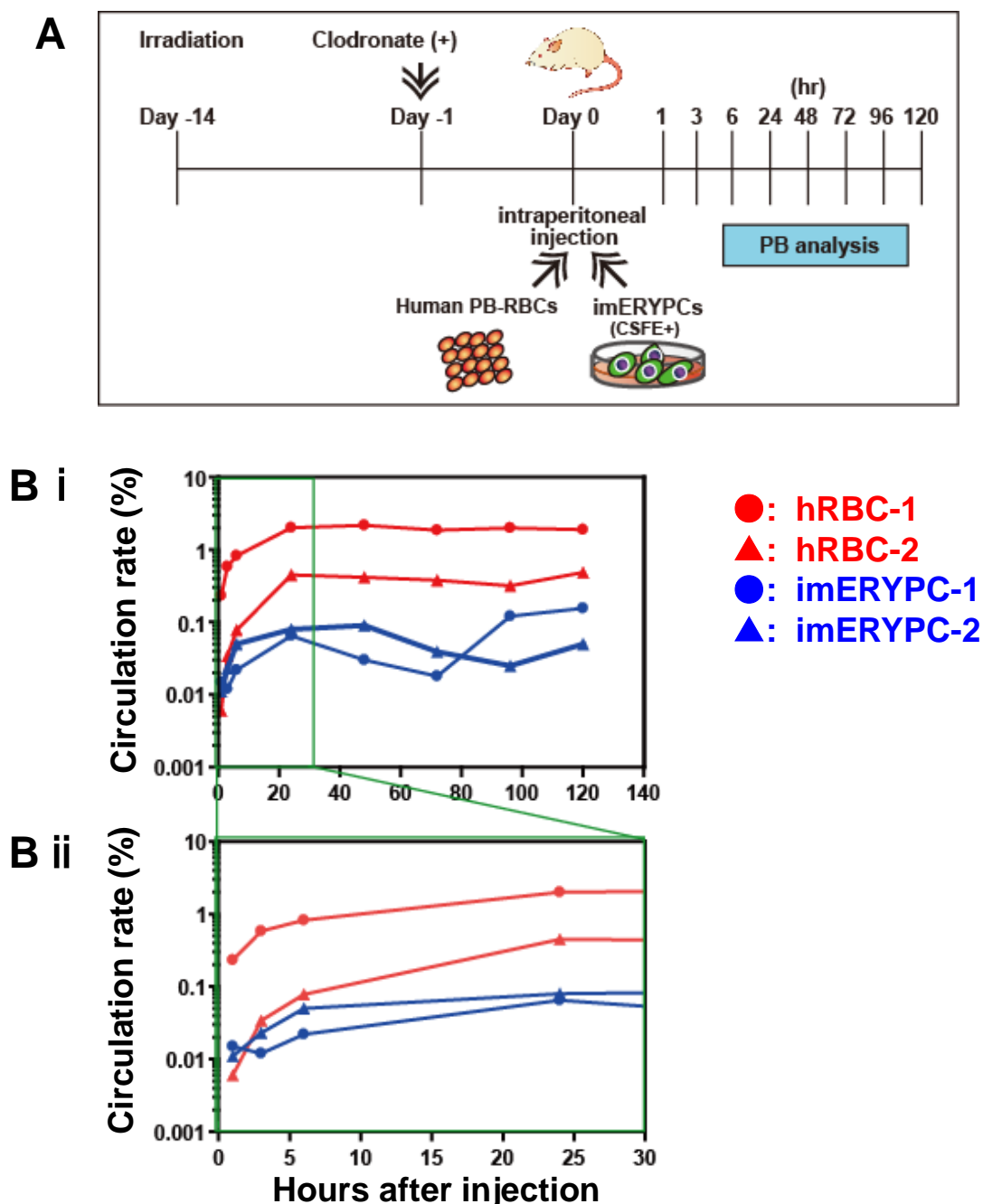


図27

NOGマウスにimERYPCを移植し、生体内における挙動評価を実施した。

- A. NOGマウスへのimERYPC移植プロトコル。2Gyの放射線照射を施し、マウスを貧血状態とした。続いて、マウスの細網内皮系を不活化さえるために、Decoyとして 2×10^9 個の成人ヒト赤血球とクロドロネートリポソームの投与を行った翌日に、CSFEにて染色を行ったimERYPC-8(Dox(-)-day5)を 1×10^9 個投与した。投与後24時間よりマウス末梢血を採血し、解析を実施した。
- B-C. マウス末梢血のFacs解析結果の代表例(B)とimERYPC循環率の経時的な推移(B)。Clodronateを投与することで、imERYPCの大幅な循環率向上が確認された。
- D-F. 循環したimERYPCをソーティングして、ギムザ染色を行ったところ、Clodronate(+)群においては、ほとんどのimERYPCが脱核赤血球に成熟したことが確認された(D)。Hoechst染色による脱核率定量の代表例(E)。Clodronate(+)群においては脱核赤血球の循環が維持されていた一方で、Clodronate(-)群においては脱核赤血球の循環が維持できないことが認められた(F)。

図28. 投与初期におけるimERYPCの体内動態確認



NOGマウスへの移植直後におけるimERYPCの挙動を確認した。

- A. 移植プロトコル。等量 (1×10^9) のimERYPC-8(DOX(-)-day5)とヒト赤血球を腹腔内投与した。投与後1時間より、マウスの末梢血を採取して解析を行った。
- B. 末梢血の解析結果。ヒト赤血球に対して、imERYPC由来脱核赤血球の循環率は大きく劣るが、よく似た体内挙動を示した。またimERYPCは投与初期に排除されることなく、経時的な循環率向上が確認された。