

論文の内容の要旨

論文題目 ヒト多能性幹細胞を起源とする不死化赤芽球株の樹立

氏名 廣瀬 正一

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いる。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、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。ヒト HBV、HCV および HIV に関しては、NAT 法を用いた高感度検査が行われているが、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、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インドウ・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。また発展途上国においては、有効性や安全性に関する課題も多数存在している。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ことや、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しており、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。

新たな輸血医療の実現に向けて、ヒト ES/iPS 細胞や造血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。現在、様々な研究グループがヒト ES/iPS 細胞や造血幹細胞をソースとして、赤血球の産出を試みているが、「治療に必要な細胞数を如何にして確保するか」という課題には答えが出ていない。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、筆者は赤芽球を不死化細胞株として増幅させる研究に着手してきた。

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、あるいはガン遺伝子として広く知られているが、他にも様々な機能を有しており、生体の恒常性維持に必須の因子である。例として、*c-MYC* を欠損したマウスは赤血球の産生能が不十分であり、耐性致死に至ることから、赤芽球増殖にも関与することが知られている。ヒト ES/iPS-Sac より得られた造血前駆細胞に DOX 誘導性レンチウイルスベクターを用いて *c-MYC* を強制発現させたところ、一過性ながら赤芽球の増殖能亢進を観察した。しかし、この増殖の維持は難しく、*c-MYC* の強制発現によってアポトーシスによる細胞死が誘発されることが確認された。このアポトーシスを回避するために、赤血球の成熟因子としても知られている *BCL-XL* を同時に強制発現させた。その結果、*c-MYC* によるアポトーシス作用は抑制され、対数増殖を続ける赤芽球集団を効率的に得られることが確認された。また、メチルセルロースを含有する半固形培地中にて単一細胞由来のコロニー形成を促し、長期に渡って増殖し続ける赤芽球クローン (immortalized erythrocyte progenitor cell; imERYPC) の樹立に成功した。

樹立に成功した imERYPC は、いずれも赤血球表面抗原である Glycophorin A (GPA) を発現しているが、細胞ペレットは白く、形態学的には前赤芽球であった。*c-MYC* は赤芽球の増殖に必須である一方で、成熟が進行するにつれ、その発現は減少していくことが知られている。そこで培養液から DOX を除去し、導入遺伝子発現を OFF とした際の imERYPC の挙動を確認すると、驚いたことに細胞増殖能は停止し、ヘムの合成が進行して細胞ペレットが赤褐色へと変化することが観察された。DOX を除去して7日目には、大部分の imERYPC が濃縮した核を有する正染色赤芽球へと成熟することが認められた。成熟が進行した imERYPC が保持するヘモグロビンは、主に胎児型ではあるが正常な4量体から構成されることが示唆され、その含量は成人赤血球と同等以上であった(30~37 pg/cell)。さらに、酸素解離曲線の測定を行ったところ、成人赤血球と同等の酸素親和性を有することが確認された(p50: 25~27mmHg)。

続いて、qRT-PCR 法を用いて imERYPC の成熟メカニズムを遺伝子発現レベルで解析した。導入遺伝子発現を OFF にすると、*c-MYC* の発現低下が認められた一方で、*BCL-XL* の発現は 20 倍まで上昇することが確認された。*BCL-XL* の発現推移を詳細に解析すると、この発現上昇は内在性、即ち細胞が元来保有している *BCL-XL* に依存することが確認された。*BCL-XL* は抗アポトーシ

ス作用のみならず、*GATA-1* および *RAF-1* を介して赤血球のヘム合成を促すことが報告されている。*imERYPC* の成熟においても同様に、*GATA-1*、*BCL-XL*、*RAF-1* の発現上昇が確認された。加えて、赤芽球の核の濃縮に関わる *GCN-5* の発現上昇も確認された。これらの遺伝子発現レベルの変化は、臍帯血 CD34 陽性細胞を起源とした赤血球系分化過程と同様の推移を示しており、*imERYPC* の成熟は正常な赤血球発生を模倣していることが示唆された。

imERYPC の樹立に成功した一方で、試験管内で *imERYPC* が脱核赤血球まで成熟する割合は 1% 以下であり、実用化に向けては、最終分化・成熟の達成が大きな課題として残っている。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、*imERYPC* が脱核する能力を持っているのか確認することを目的として、NOG マウスに *imERYPC* を移植し、その動態確認を行った。まず、マウスのマクロファージの不活化を目的として、クロドロネートリポソームの投与を行った。その際、マウスの細網内皮系を飽和させるために、合わせてヒト成人赤血球を投与した。翌日に、導入遺伝子発現を OFF とした *imERYPC* (1×10^9 個) を移植し、経時的に末梢血を採取し、フローサイトメーターを用いて *imERYPC* の動態確認を行った。その結果、1 週間に渡って *imERYPC* の循環が確認され、マウス全血に対する循環率は最大で 0.2% であった。この循環率は決して大きい値ではないが、マクロファージを含む細網内皮系を不活化させることで、従来に比べて 10 倍以上の効率で循環率を保つことに成功した。加えて、驚くべきことに末梢循環した *imERYPC* の大部分は脱核赤血球に成熟しており、新鮮な成人赤血球と良く似た体内挙動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している。

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有用となる可能性がある。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考慮すべきであろう。また、従来の赤血球産出方法では、ヒト 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。臨床応用の実現に向けて、より生産効率を高めていくことは必須であるが、本研究内容は実用化に向けた有用性を呈示する結果と捉えている。