

不死化細胞株からの希少血液型赤血球大量生産法の確立

熊本大学国際先端医学研究機構

三原田 賢一

【背景】

輸血は貧血の治療に加え、手術に伴う出血の対処や事故等に伴う救急治療などにとって不可欠な存在である。現在、輸血用の血液は献血に依存しており、その供給状態は各国の献血システムの整備状況によって左右されている。ところが日本を含む先進国では社会の高齢化が進み、被輸血者人口が増加しているのに対して献血者人口が減少しており、輸血用血液が慢性的に不足している状態が続いている。また、献血に頼る輸血システムには常に感染や汚染のリスクがつきまとい、供与された血液による二次感染被害等の問題が存在している。特に、近年世界中で問題となった新型コロナウイルスの蔓延のような状況下では公共サービスの停止という事態が起こりうる。これらの問題を解決するため、輸血に用いる血液を献血によって集めるのではなく、体外で製品として生産し使用することが考えられる。そのためには大量の赤血球を一定の品質管理下で安定的に、かつ安価に供給できるシステムが必要である。工業的に生産され、管理された赤血球製剤はウイルス感染などの危険性が限りなく低く、安心して使用することができる。また、希少な血液型であっても、生産管理によって大量の備蓄を行うことが可能である。申請者のグループは以前より、ヒト骨髄由来の造血幹細胞から赤血球の前駆細胞（赤芽球）を作り、ヒトパピローマウイルス（HPV）が持つE6/E7遺伝子を使って不死化させることで、半永久的に増え続ける「不死化ヒト赤芽球細胞株」を作製することに成功した（Kurita et al., *PLoS ONE*, 2013; Soboleva et al., *Hum Cell*, 2022; Xinhe et al., *in preparation*）。これらの細胞株から赤血球ができてくるとも確認しているが、核の放出（脱核）の効率が低く、また完成した赤血球も細胞膜の安定性に問題があることがわかった。これは、正常赤芽球と細胞株では分裂状態が大きく異なることや、HPV遺伝子による特殊な遺伝子発現制御が働いているためだと考えられる。さらに、現在用いている培地は非常に高額であり、今後臨床応用を見据えた場合は培養にかかるコストの大幅な低減が必要となる。

【目的】

そこで本研究では、培養条件の最適化及び低コスト化を検討した。

【結果】

(1) 大量培養を可能とするための安価な培地・条件の開発

これまで不死化ヒト赤芽球細胞株の培養に使用していたS社の培地は500 mLで15万円程（2024年末の時点）と非常に高額であった。この培地は無血清培地であり、臨床応用を見据えた場合は非ヒト由来タンパク質を含まないことは有益であるが、現在は原材料及び製造過程の追跡が可能であれば非ヒト由来タンパク質の使用が可能であるケースもあることから、ウシ血清由来アルブミン（BSA）を用いた培地を考案した。その結果、近年熊本大学で樹立した不死化ヒト赤芽球細胞株（KiECEL）を従来と遜色ない増

殖効率で維持できる培地の組成を発見した（図1）。本培地では増殖活性のみならず細胞の生存率も改善しており、より安定した培養が可能である。培養対象がヒト細胞であるため、ヒト血清由来アルブミン（HAS）に置換した培地とも比較したが、増殖・生存率共にBSA含有培地に劣る結果となった。BSAは製造元やロットによっても細胞に与える影響が異なることが報告されているため、今後混入因子も含めて有効成分の探索が必要となる。本培地は依然として高価であるが、計算上は70%のコストカットとなった。今後この培地を基準にしてさらなる高効率化・低コスト化を目指す方針である。

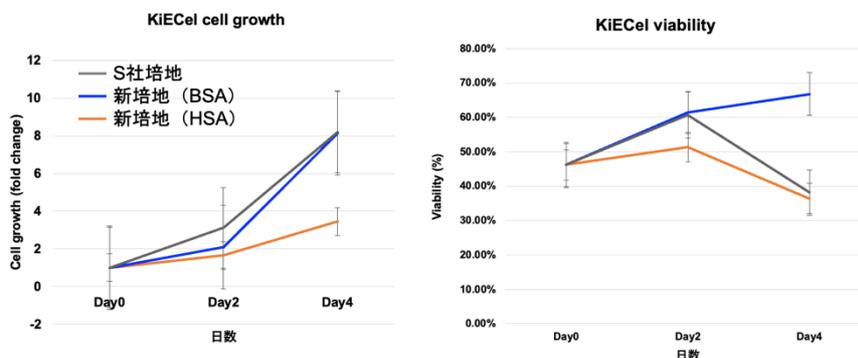


図1 新規開発培地による増殖効率および生存曲線

(2) 成熟過程における脱核誘導の高効率化

赤血球はその前駆細胞である赤芽球から分化・成熟する途中で核を放出（脱核）するが、その誘導がどのように行われているかは不明である。これまでに我々は基礎培地の改良（Miharada et al., *Nat Biotechnol.*, 2006）や化合物スクリーニングによる候補化合物の発見（Soboleva et al., *Commun Biol.*, 2021）などによってその効率改善に努めてきたが、依然としてその効率は低い。しかし、本研究期間中に発見した化合物Xによって、80%以上の細胞が脱核することがわかった（図2）。この反応は非常に速く、化合物X添加後24時間で脱核が起こる。しかしサイトスピン標本によって形態を観察すると多くの細胞で細胞膜が壊れており、非常に不安定であることがわかった。濃度の検討も行ったが、脱核効率と細胞膜の不安定化はトレードオフの関係となっており、別の方法によって細胞膜の崩壊を防ぐ必要があると考えられる。

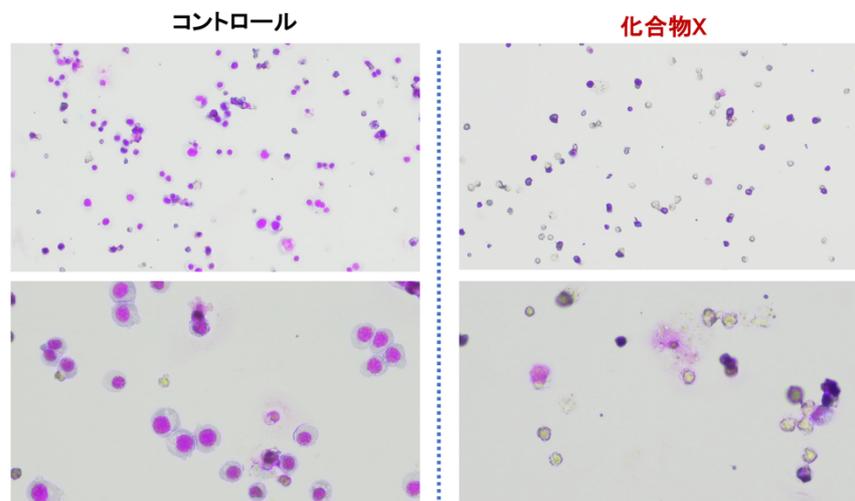


図2 化合物X添加による脱核誘導

(3) 脱核完了赤血球の安定化

体外培養で脱核させた赤血球は正常な赤芽球から誘導した場合であっても細胞膜が不安定であり、以前の研究ではマンニトール等の添加による保護が奏功した例がある (Miharada et al., *Nat Biotechnol.*, 2006)。しかし、化合物スクリーニングによって同定したヒストン脱メチル化酵素阻害剤 (HDACi) (Soboleva et al., *Commun Biol.*, 2021) や今回発見した化合物Xを含め、不死化ヒト赤芽球細胞株の場合は脱核後の細胞膜保護が困難であった。今回、前述の通りBSAの使用が細胞増殖・分化誘導に効果的であったことから、化合物Xを用いた分化誘導時にBSAとは別のアルブミン製剤 (AlbuMax) を添加した。その結果、細胞膜が安定化した細胞が観察された (図3)。一方で全ての細胞の崩壊を防ぐことはできておらず、今後さらなる検討が必要であると考えられる。

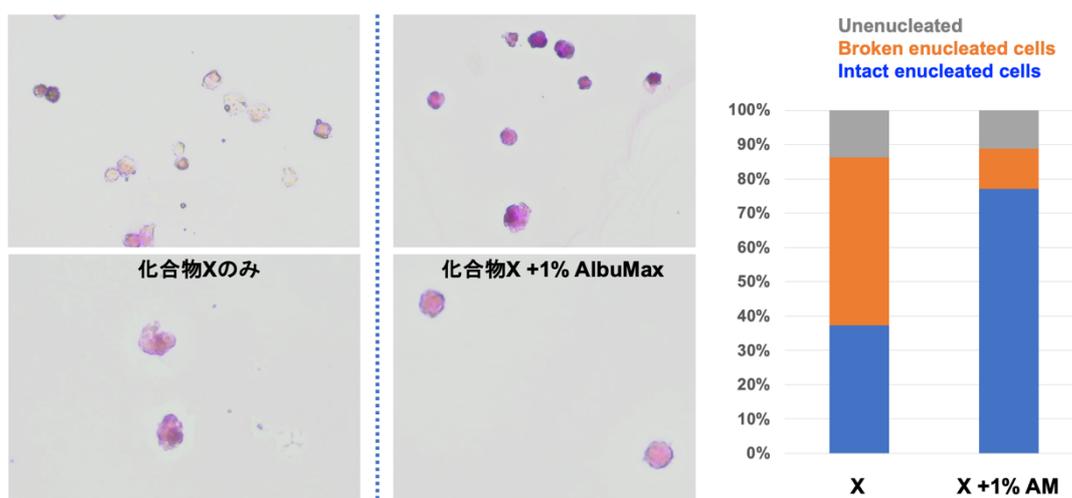


図3 アルブミン製剤の添加による細胞膜保護

【まとめ】

以上のように、従来法よりも低コストで培養でき、高効率に脱核を誘導できる条件を発見した。しかし脱核後の細胞は依然として正常赤血球より不安定であり、さらなる検討が必要である。現在、HPV-E6/E7に追加して遺伝子を発現させた改良型細胞株の樹立およびより大規模な培地の改良を行っている。