

## ゲノム編集された末梢血幹細胞由来赤血球前駆細胞株は今までにない有用な不規則抗体同定用パネル血球になりうる

船戸 興自<sup>1)</sup> 菊地 豪<sup>2)</sup> 前原香名子<sup>1)</sup> 栗田 良<sup>1)</sup> 伊佐 和美<sup>1)</sup>  
宮崎 孔<sup>1)</sup> 奥田 誠<sup>3,4)</sup> 宮田 茂樹<sup>1,5)</sup> 佐竹 正博<sup>1)</sup> 谷 慶彦<sup>1)</sup>

不規則抗体のスクリーニングと同定検査は、溶血性輸血副反応の予防において重要である。これらの検査は、血漿中に存在する抗体と赤血球上の抗原との反応性を確認する血清学試験によって行われる。しかし、高頻度抗原に対する抗体や複数種の同種抗体が存在する場合には、抗体の同定は困難もしくは不十分となることがある。そのような場合、対応する抗原を欠く赤血球試薬を使用して同種抗体を同定することは可能であるが、入手が困難な例も存在する。そのため、本研究では抗体の同定を簡素化するために、赤血球前駆細胞株を使用して高頻度抗原を含む複数の血液型抗原を欠く抗体同定用パネル赤血球を作製することを目的とした。赤血球前駆細胞株にゲノム編集を行い、11種類の血液型抗原 (RhD, RhC/e, M/N/s, P1, Fy<sup>a</sup>, Jk<sup>a</sup>/Jk<sup>b</sup>, および Jr<sup>a</sup>) を削除することで最終的には上記の血液型抗原を欠く Di<sup>b</sup>発現株の作製に成功した。ゲノム編集後、削除した抗原に対する抗体は反応しない一方で、Di<sup>b</sup>抗原に関してはフローサイトメトリーと試験管法によって検出可能であった。この細胞株はゲノム編集後も正常に増殖し、濃い赤色を呈した後期赤芽球に分化した。これらの結果は、任意の血液型抗原に改変した人工パネル赤血球を作製できる可能性を強く示唆しており、輸血前検査の精度向上や血液型システムの研究の進展に貢献することが期待される。

キーワード：不規則抗体同定検査, パネル赤血球, 赤血球前駆細胞株, ゲノム編集

この論文記事は「Haematologica」誌に掲載された最初の報告 (Haematologica. 2025 Apr 10. doi: 10.3324/haematol.2024.287187. PMID: 40207710.) に基づいた二次掲載であり、原著の著作権は Ferrata Storti Foundation (Pavia, Italy) が有する。

### 背景

輸血検査における不規則抗体スクリーニングおよび抗体同定検査は、特定の抗原の組み合わせを持つ末梢血赤血球から調製した複数のパネル細胞を用いた血清学試験によって行われる<sup>1)~3)</sup>。しかし、高頻度抗原に対する抗体および複数種類の同種抗体の同定は、対応する抗原を欠失した赤血球を使用しない限り、困難な場合がある。こうした同種抗体の同定を簡素化するために、近年では人工多能性幹細胞 (iPS) や造血幹細胞に遺伝子改変を行い、特定の抗原を発現または欠失した血液細胞を作製する試みが開始されている<sup>4)~7)</sup>。一方で、我々はこれまでに、造血前駆細胞にヒトパピローマウイルス (HPV) E6/E7 遺伝子を導入し、その発現をテ

トラサイクリン誘導性プロモーター<sup>8)9)</sup>で制御することにより、不死化赤血球前駆細胞株の樹立に成功した。この赤血球前駆細胞株は無限増殖能と赤血球分化能を有し、高純度の赤芽球ならびに網赤血球に分化可能である。また、赤血球前駆細胞の段階で不死化していることから分化期間を10日間まで短縮することができる<sup>10)~12)</sup>。さらに、赤血球細胞はヘモグロビンを合成し、分化後に赤色を呈するため、目視判定を伴う血清学試験において有用である。我々は以前に、ヒト iPS 細胞由来赤血球前駆細胞株 (HiDEP) を用いた血清学試験への適用可能性を報告している<sup>13)</sup>。HiDEP の凝集感度は末梢血赤血球より劣るものの、凝集の程度によりスコア化することが可能であり、従来の方法で血清学試験

1) 日本赤十字社血液事業本部中央血液研究所  
2) 日本赤十字社関東甲信越ブロック血液センター  
3) 東邦大学医療センター大森病院  
4) 現 日本赤十字社血液事業本部所属  
5) 現 日本赤十字社関東甲信越ブロック血液センター所属  
連絡責任者：栗田 良, E-mail : r-kurita@jrc.or.jp  
〔受付日：2025年9月5日, 受理日：2025年12月4日〕

(フローサイトメトリーおよび試験管法による凝集試験)に使用可能であった<sup>13)</sup>。しかしながら HiDEP は、倫理申請上研究目的でのみ使用可能な細胞株であったため、本研究では検査目的での使用に関する同意を得たドナーから樹立した末梢血幹細胞由来赤血球前駆細胞株 (PBDEP-4) を使用した<sup>12)</sup>。本研究は、PBDEP-4 細胞に対して CRISPR/Cas9<sup>14)~16)</sup> によるゲノム編集技術を用いて主要血液型抗原 (Rh, MN, P1PK, Duffy, Kidd, JR) を欠損させた細胞株を作製し、抗体同定を簡素化することを目的とした。Diego 血液型については、*SLC4A1* 遺伝子の破壊により細胞が脆弱化する可能性があったため、本研究では対象から除外した<sup>17)18)</sup>。上記の主要血液型抗原の削除完了後、抗 Diego についてはこの改変 PBDEP 細胞を用いて、他の主要血液型抗原に対する抗体の有無を考慮することなく検出可能となることが期待される。本稿ではその成果を報告し、輸血前検査への適用可能性について考察する。

## 材料と方法

### 研究倫理

本研究は日本赤十字社の倫理審査委員会により承認を受け、関連法規・ヘルシンキ宣言に準拠して実施された。(倫理審査番号：2018-006, 2019-018, 2022-014, 2023-002)

### 維持培養

PBDEP-4 細胞は、StemSpan SFEM-II 培養液 (STEM-CELL Technologies, Vancouver, Canada) に、human stem cell factor (50ng/ml, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA)、ヒトエリスロポエチン (3U/ml, 協和キリン, 東京, 日本)、デキサメタゾン (10 $\mu$ M, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)、およびドキシサイクリン (1 $\mu$ g/ml, タカラバイオ, 滋賀, 日本) を添加した培養液にて維持培養した。細胞は、37 $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 存在下で培養し、3~4 日ごとに 1/20~1/10 の割合で継代した。

### 赤血球分化誘導

PBDEP-4 細胞の赤血球系分化は、Iscove 改変 Dulbecco 培養液 (IMDM, Sigma-Aldrich) を基礎培養液とし、ウシ胎児血清 (FBS, 2%, Clontech Laboratories, Mountain View, CA, USA)、ヒト AB 血漿 (3%, 国内ドナー由来)、インスリン (10 $\mu$ g/ml, 富士フイルム和光, 大阪, 日本)、ホロトランスフェリン (200 $\mu$ g/ml, 富士フイルム和光)、ヘパリン (3U/ml, 富士フイルム和光)、およびペニシリン・ストレプトマイシン・ゲルタミン (1%, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) を添加した赤血球分化用培養液 (Erythroid Differentiation Medium; EDM) にて実施した。分化開始日に、細胞を 5  $\times$  10<sup>5</sup> cells/ml の濃度に再懸濁し、ヒトエリス

ロポエチン (3U/ml) およびドキシサイクリン (1 $\mu$ g/ml) を添加した EDM にて培養を開始した。3 日目には細胞を 2  $\times$  10<sup>6</sup> cells/ml に再懸濁し、ヒトエリスロポエチン (3U/ml) を添加した EDM にて 7 日目まで培養を継続した。

### 試験管法による凝集試験

分化誘導後の PBDEP-4 細胞を計数し、0.2% ウシ血清アルブミン (BSA, 富士フイルム和光) を添加したリン酸緩衝生理食塩水 (PBS; Sigma-Aldrich) で 2 回洗浄後、0.2% BSA-PBS 中に 2  $\times$  10<sup>8</sup> cells/ml の濃度で再懸濁した。空の試験管にモノクローナル抗体またはドナー由来血漿を各 100 $\mu$ l 分注し、次いで細胞懸濁液 50  $\mu$ l (1  $\times$  10<sup>7</sup> cells) を添加した。陰性対象には抗体の代わりに PBS (100 $\mu$ l) を添加した。その後、O.A.E.S. 液 (100 $\mu$ l, Ortho Clinical Diagnostics, Raritan, NJ, USA) を添加して試験管を振盪し、37 $^{\circ}$ C で 15 分間インキュベートした。1.035 $\times$ g, 45 秒遠心後、PBS で洗浄し、この操作を 3 回繰り返した。3 回目の遠心後には上清を除去し、ウサギ抗ヒト IgG (Ortho Clinical Diagnostics) を試験管に添加した。再度よく振盪し、1.035 $\times$ g, 15 秒間遠心した。遠心後、日本輸血・細胞治療学会が定める血清学試験の基準 (輸血のための検査マニュアル Ver.1.3.2) に基づき、凝集の程度を評価・スコアリングした。使用した抗体は補足表 1 に記載している。

### 血液型タイピング

PBDEP-4 の遺伝子型判定は、既報の方法<sup>13)19)</sup> に従い、PCR-SSP (PCR-sequence specific primer) およびサンガーシーケンシングにより実施した。

### 細胞形態の観察

Cytospin4 (Thermo Fisher Scientific) を用いてスライド標本を作製し、Diff-Quik<sup>TM</sup> 染色液 (シスメックス株式会社, 兵庫, 日本) で染色を行った。画像は、BZ-X800 (KEYENCE, 大阪, 日本) オールインワン蛍光顕微鏡で撮影した。

### CRISPR/Cas9 ベクターの調製

ゲノム編集には、plentiCRISPR-v2 および PX458 プラスミドを使用した。plentiCRISPR-v2 プラスミドは、オリゴヌクレオチドのライゲーションを必要とせずそのままトランスフェクション可能であり、対象遺伝子と標的領域を指定して Genscript のウェブサイトから購入した。一部の標的遺伝子 (*ACKR1*, *ABCG2*, *SLC14A1*) は、plentiCRISPR-v2 を用いて編集した。pSpCas9 (BB)-2A-GFP (PX458) プラスミドは Addgene (<https://www.addgene.org/>, プラスミド #48138) より購入した。残りの標的遺伝子 (*RHD/CE*, *A4GALT*, *GPA/GPB*) に対しては、設計したオリゴヌクレオチド配列をベクターにライゲーションして用いた。プロトコルは PrecisionX Cas9 Smart Nuclease Vector System (System

Biosciences, Palo Alto, CA, USA)に添付のものを使用した。プラスミドベクターの模式図は補足図1に、標的配列は補足表2に記載した。

#### エレクトロポレーション

エレクトロポレーションは、Cell Line Nucleofector<sup>®</sup> Kit V (Lonza, Basel, Switzerland)を用いて実施した。1 × 10<sup>6</sup> cellsの細胞を、90 μl の Solution V, 20 μl の Supplement 1, および 5 μg の CRISPR プラスミドを含む 110 μl のトランスフェクション試薬に懸濁した。懸濁液をキュベットに移し、T-018 プログラムでトランスフェクションを行った。トランスフェクション後の細胞は、37°C, 5% CO<sub>2</sub>維持培養条件下で維持した。

#### 蛍光活性化セルソーティング (FACS)

細胞を 0.2% BSA-PBS で洗浄し、0.2% BSA-PBS に再懸濁した。FACS は、SH800 セルソーター (ソニー株式会社, 東京, 日本) を用いて実施した。FSC/SSC および FSC-H/FSC-W パラメータにより、生細胞および単一細胞領域にゲートを設定して EGFP (enhanced green fluorescent protein) ソーティングを実施した。ソーティングした細胞は 1 細胞ずつ 96 ウェルプレート 2 枚以上に分取し、細胞増殖が確認出来たウェルは順次スケールアップを行った。

#### フローサイトメトリー

細胞を 0.2% BSA-PBS で洗浄し、0.2% BSA-PBS に再懸濁した。一次抗体またはアイソタイプコントロール 10 μl を細胞懸濁液に添加し、37°C で 30 分間インキュベートした。インキュベート後、細胞を 2 回洗浄し、0.2% BSA-PBS に再懸濁した。続いて、蛍光標識二次抗体 0.5 mg を添加し、4°C で 30 分間インキュベートした。その後、細胞を洗浄し、0.2% BSA-PBS に再懸濁した後、DxFLEX フローサイトメーター (Beckman Coulter, Brea, CA, USA) を用いて解析を行った。生存率測定の際は細胞を 0.2% BSA-PBS で洗浄し、0.2% BSA-PBS に再懸濁した。7-AAD 10 μl と抗 CD233 (Band3) 0.5 μl を細胞懸濁液に添加し、室温で 15 分間インキュベートした。インキュベート後、洗浄・再懸濁し、解析を行った。使用した抗体は補足表1に記載した。

#### ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR)

サンプル DNA は、QIAamp<sup>®</sup> DNAm mini kit (QIAGEN, Hilden, Germany) を用いて抽出および精製した。PCR には KOD Fx neo (TOYOBO, 大阪, 日本) を用いた。使用した PCR プライマーは補足表3に記載した。

#### サンガーシーケンシング

DNA とシーケンスプライマー (補足表4) の混合サンプルは、ユーロフィンジェノミクス株式会社 (東京, 日本) に外注し、シーケンシング解析を行った。得られた配列データと参照配列のアライメント解析は、A plasmid editor (ApE) を用いて実施した。

#### 分化 PBDEP-Di<sup>b</sup> 細胞の冷蔵保存

分化 PBDEP-Di<sup>b</sup> 細胞を計数し、10% FBS-IMDM で洗浄した。遠心後、上清を除去し、細胞を 1 × 10<sup>8</sup> cells/ml の濃度となるように同培養液に再懸濁した。懸濁細胞は 4°C で 14 日または 28 日間保存し、使用前に 0.2% BSA-PBS で洗浄した後、2 × 10<sup>8</sup> cells/ml の濃度で再懸濁し、血清学試験に使用した。

## 結 果

### PBDEP-4 の性状解析

維持培養条件下の PBDEP-4 細胞を分化誘導条件に移行し、7 日間の分化誘導を行った (図 1A)。7 日間の分化誘導後、PBDEP-4 細胞は赤色を呈し、赤血球分化が進行していた (図 1B)。分化細胞の大部分は後期赤芽球であり、ごく一部 (1.2 ± 0.7%) が脱核細胞であった (図 1C, 補足図 2)。また抗原削除に先立ち、PBDEP-4 の血液型を PCR-SSP またはサンガーシーケンシングによって確認した (表 1 上段, PBDEP-4)。同細胞の血液型は日本人集団においては典型的なものであった。本研究では Rh (RHD/CE), MNS (GPA/GPB), P1PK (A4GALT), Duffy (ACKR1), Kidd (SLC14A1), Jr (ABCG2) 血液型抗原を標的として、PBDEP-4 細胞からこれらの抗原の削除を試みた。

### PBDEP-Di<sup>b</sup> 細胞の作製と性状解析

PBDEP-4 細胞に CRISPR/Cas9 発現ベクター (補足図 1) をエレクトロポレーションで導入し、導入後の細胞を 1 細胞ずつ 96 ウェルプレート、2 枚以上に分取した。分取後の細胞はそのまま拡大培養を行い、顕微鏡観察により 40~70% コンフルエントに増殖したウェルから順次、ゲノム DNA の抽出、切断部位近傍の DNA 断片増幅及びシーケンス確認を行い、目的変異が導入されたクローンを取得した。この操作を RHD, RHCE, GPA, GPB, A4GALT, ACKR1, SLC14A1, ABCG2 の 8 つの遺伝子について実施した。

ゲノム編集後に確認した各標的遺伝子の変異は表 2 の通りとなった。ACKR1 を除くすべての標的遺伝子においてフレームシフト変異が生じ、短縮型タンパク質へ置換され、標的抗原の発現消失が示唆された。ACKR1 についてはインフレーム変異が生じていたが、過去に欠失が報告された変異<sup>20</sup>と類似性の高い変異が確認された。そこで、対応する抗原の発現をフローサイトメトリーにより評価した。その結果、すべての標的抗原の発現消失を改めて確認した。最終的には 8 つの標的遺伝子のノックアウトに成功し、抗 RhD, C, e, M, N, s, P1, Fy<sup>a</sup>, Jk<sup>a</sup>, Jk<sup>b</sup>, Jr<sup>a</sup> と反応しない PBDEP-Di<sup>b</sup> 細胞の樹立に成功した (図 2A および表 1 下段, PBDEP-4-Di<sup>b</sup>)。PBDEP-Di<sup>b</sup> の倍加時間はわずかに延長し (図 2B, 19 時間 vs 22.3 時間)、一方で分化過程においては細

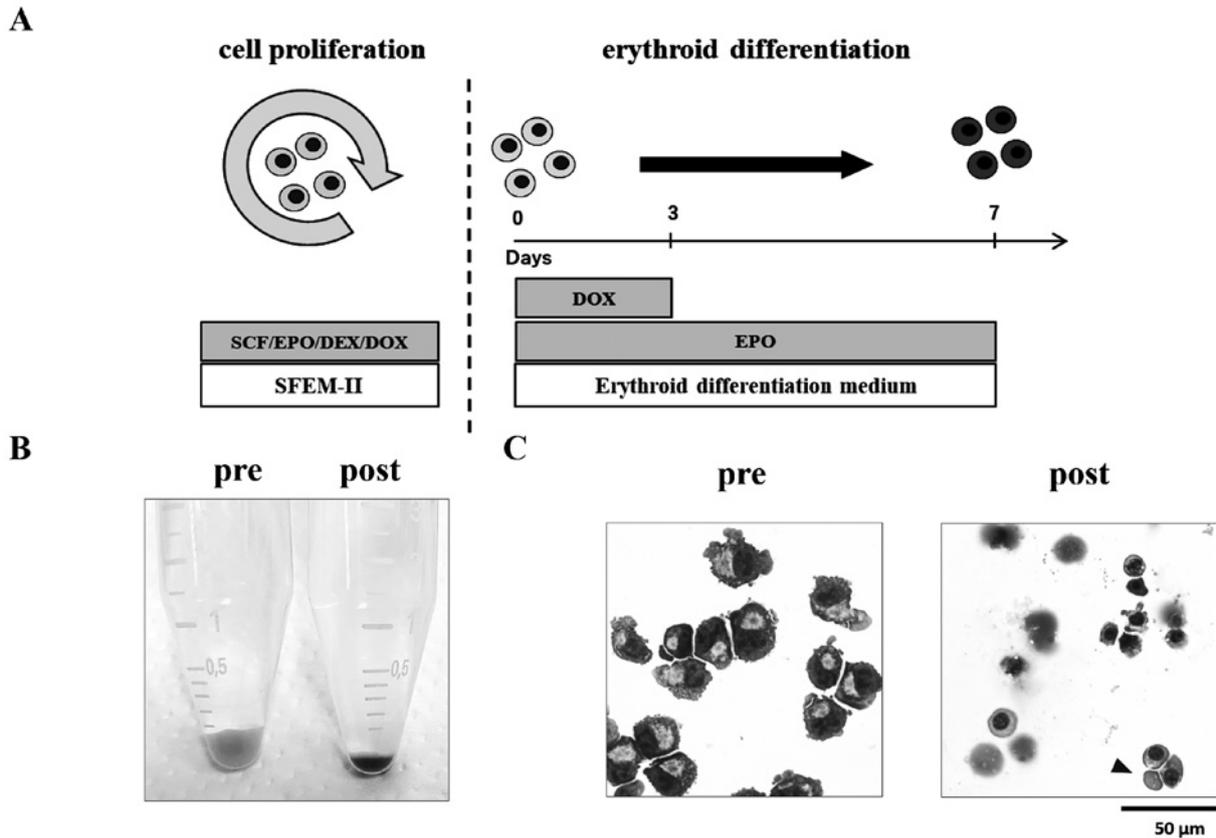


図1 末梢血由来赤血球前駆細胞 (PBDEP-4) を用いた赤血球分化  
 (A) PBDEP-4 細胞の培養および赤血球分化の概略図. SCF: human stem cell factor, EPO: ヒトエリスロポエチン, DEX: デキサメタゾン, DOX: ドキシサイクリン (B) 分化前 (pre) および分化後 (post) の PBDEP-4 細胞ペレットの外観. (C) 分化前 (pre) および分化後 (post) の PBDEP 細胞の形態. 黒の矢頭は脱核赤血球を示している. スケールバー: 50 μm.

表1 ゲノム編集前後の PBDEP-4 細胞の表現型

Cell Line	Rh					MNSs			P	Diego		Duffy		Kidd		JR	
	D	C	c	E	e	M	N	S	s	Pl	Di <sup>a</sup>	Di <sup>b</sup>	Fy <sup>a</sup>	Fy <sup>b</sup>	Jk <sup>a</sup>	Jk <sup>b</sup>	Jr <sup>a</sup>
PBDEP-4	+	+	0	0	+	+	+	0	+	+	0	+	+	0	+	+	+
PBDEP-Di <sup>b</sup>	KO	KO	KO	KO	KO	KO	KO	KO	KO	KO	0	+	KO	KO	KO	KO	KO

+ : 抗原あり 0 : 抗原なし KO : 削除された抗原

表2 ゲノム編集後の PBDEP-4 に導入されたアミノ酸変異

Gene	Amino acid replacement	Remarks
RHD	p.Gly61Alafs*37	frameshift mutation
RHCE	p.Leu60Ilefs*38	frameshift mutation
GPA	p.Leu11Valfs*12	frameshift mutation
GPB	p.Leu11Cysfs*4	frameshift mutation
A4GALT	p.Pro16Glnfs*21	frameshift mutation
ACKR1	p.Gly72_Leu74del p.Val70_Gly72del	in-frame deletion
SLC14A1	p.Val230Serfs*7	frameshift mutation
ABCG2	p.Leu28*	frameshift mutation

胞増殖が促進される傾向を示した(図 2C). また, 赤血球分化後の細胞形態にも異常は見られなかった(図 2

D および 2E). 脱核率は  $2.2 \pm 0.6\%$  で, PBDEP 細胞よりも高くなる傾向を示したが, 有意差は無かった(補足図 2).

#### 分化 PBDEP- Di<sup>b</sup> 細胞を用いた血清学試験

ゲノム編集を行っていない Di<sup>b</sup> 抗原については, フローサイトメトリーで高発現状態を維持していることが確認された(図 3A). 凝集感度については, 抗 Di<sup>b</sup> (モノクローナル抗体) および抗 Di<sup>b</sup> 血漿を用いた試験管法により, 凝集像に基づきスコア化が可能であったが, 特に高希釈 ( $\times 2,048$ ) 条件下では, Di<sup>b</sup>/Di<sup>b</sup> 型赤血球と比較して検出感度は低かった(図 3B). さらに, 冷蔵保存後の凝集感度を評価するために試験管法による血清学試験を行った. 保存 14 日後の細胞は分化直後の細胞と

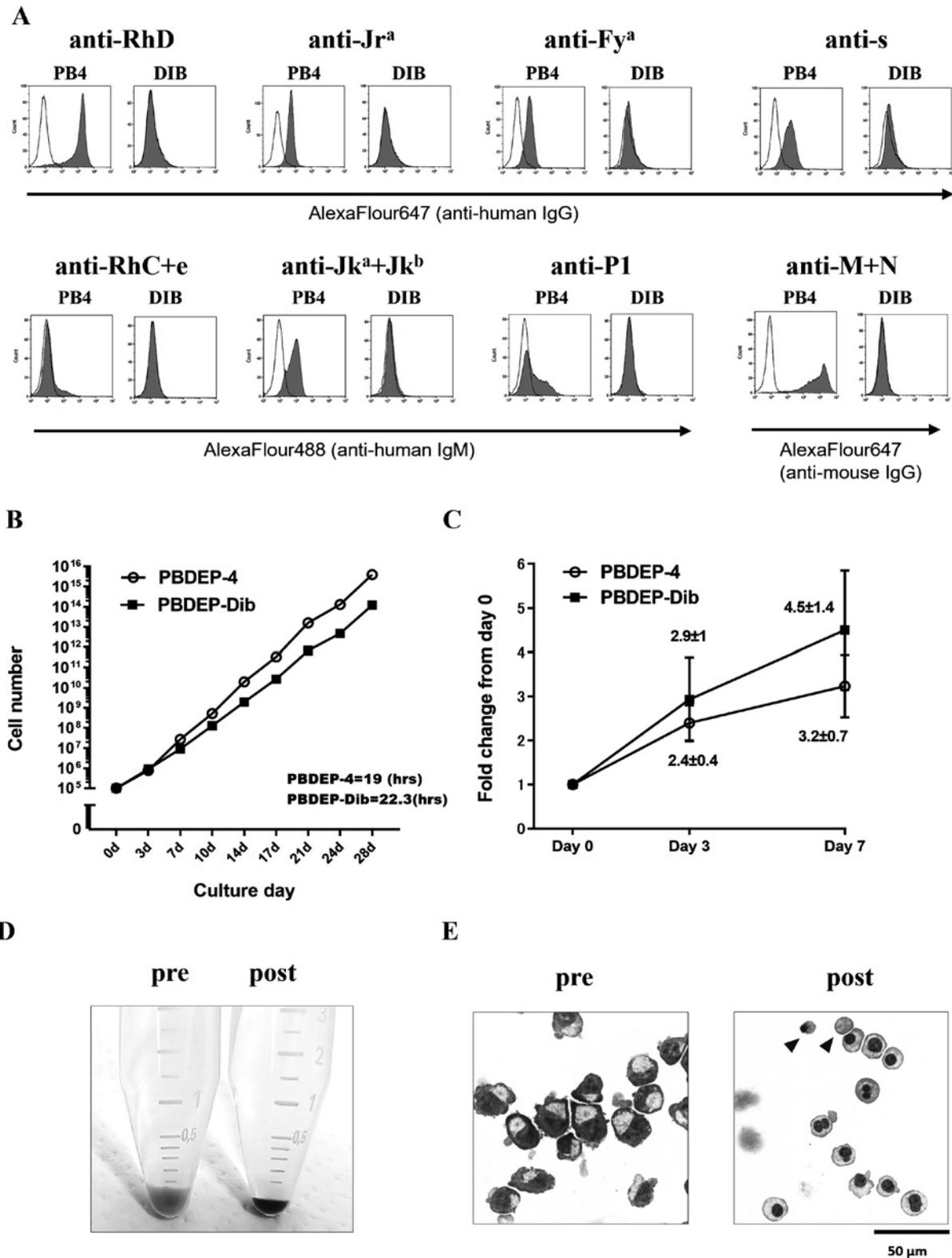


図2 PBDEP-4細胞とPBDEP-Di<sup>b</sup>細胞の性状比較

(A)今回削除対象とした抗原(Di<sup>b</sup>を除く)に対する抗体を用いたPBDEP細胞(PB4,ゲノム編集前)とPBDEP-Di<sup>b</sup>細胞(DIB,ゲノム編集後)のフローサイトメトリー解析.抗体染色サンプルのヒストグラムはアイソタイプコントロールと重ねて示した.  
 (B)28日間維持培養したPBDEP-4およびPBDEP-Di<sup>b</sup>細胞の増殖曲線.倍加時間は0日目および28日目の細胞数を用いた以下の式で算出した:倍加時間=培養期間×ln(2)/ln[最終濃度/初期濃度](C)分化期間中の細胞数の増殖率.実験は3回実施し,グラフは平均値で示され,エラーバーは標準偏差を示している.  
 (D)分化前(pre)および分化後(post)のPBDEP-Di<sup>b</sup>細胞ペレットの外観.(E)分化前(pre)および分化後(post)のPBDEP-Di<sup>b</sup>細胞の形態.黒の矢頭は脱核赤血球を示している.スケールバー:50μm.

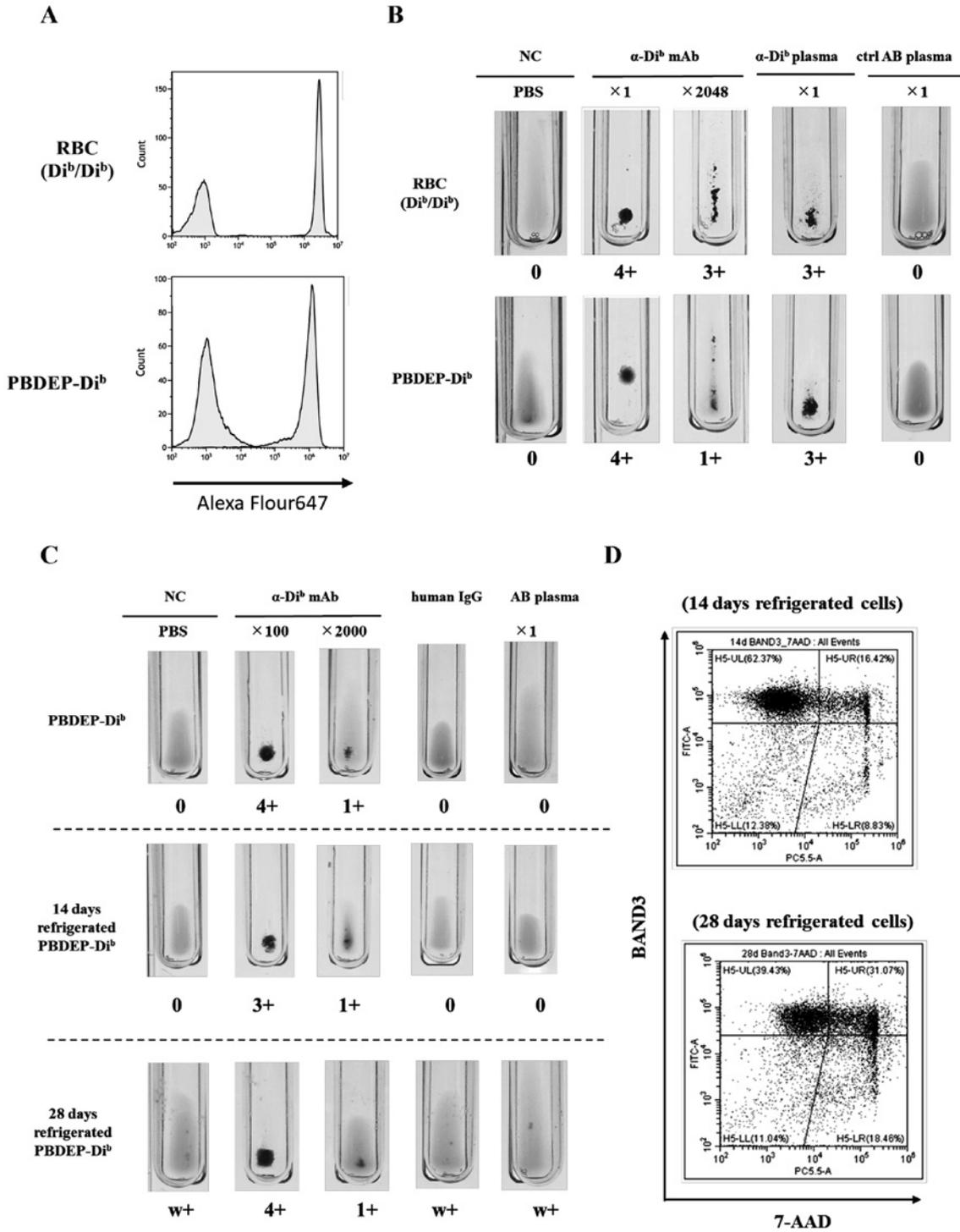


図3 分化PBDEP-Di<sup>b</sup>細胞と抗Di<sup>b</sup>との反応性

(A) 末梢赤血球 (Di<sup>b</sup>/Di<sup>b</sup>) および分化PBDEP-Di<sup>b</sup>細胞における Di<sup>b</sup>抗原の発現を、抗 Di<sup>b</sup>モノクローナル抗体を用いたフローサイトメトリーで解析した。ヒストグラムはアイソタイプコントロール (左端の黒線) と重ねて示した。

(B) 抗 Di<sup>b</sup>モノクローナル抗体、抗 Di<sup>b</sup>血漿、およびヒト AB 型血漿を用いた試験管法における末梢赤血球 (Di<sup>b</sup>/Di<sup>b</sup>) および分化PBDEP-Di<sup>b</sup>細胞の凝集像。希釈倍率および凝集スコアは、それぞれ画像の上部および下部に示した。

(C) 4℃で14日および28日間保存した分化PBDEP-4細胞の凝集感度 (保存期間0, 14, 28日後)。抗 Di<sup>b</sup>モノクローナル抗体、ヒト IgG (アイソタイプコントロール)、および AB 型血漿を用いた試験管法による凝集像を示した。画像上部に抗 Di<sup>b</sup>の希釈倍率、下部には凝集スコアもそれぞれ示した。

(D) 4℃で14日および28日間保存した分化PBDEP-4細胞の生存率。FSC/SSCパラメータにより全細胞集団をゲーティングし、Band3と7-AADの染色性によって細胞集団をBand3+/7-AAD- (生細胞) Band3-/7-AAD+ ならびにBand3+/7-AAD+ (死細胞)、Band3-/7-AAD- (細胞デブリ) の3つに分類した。

比較すると高濃度の抗体使用時に感度がわずかに劣るものの、十分に抗体有無の判定が可能であった。一方で、28日保存後では、PBS・アイソタイプコントロール・同種抗体を含まないAB型血漿（血漿コントロール）使用条件下においても凝集が認められた（図3C）。そこで凝集形成の理由を推定するため、14日および28日保存後の細胞を用いて死細胞とBand3発現細胞の割合をフローサイトメトリーで測定した。冷蔵14日後の条件では、全細胞のうち25.3%が死細胞（Band3-/7-AAD+およびBand3+/7-AAD+）、62.4%が生細胞（Band3+/7-AAD-）であった。冷蔵28日後においては、死細胞の割合は49.5%、生細胞は39.4%であり、非特異的な凝集が見られる状況では死細胞の割合が多いことが確認された（図3D）。

## 考 察

血清学試験、特に試験管法やゲルカラム法を用いた凝集試験は、同種抗体の存在を簡便かつ迅速に確認する方法である。輸血に伴う溶血性副反応を防止するためにも、血清学試験により同種抗体の有無を正確に判定することは極めて重要である。しかしながら、あらゆる不規則抗体の同定が可能なパネル赤血球を日常的に準備することは困難である。そこで我々は複数の血液型抗原の削除を試み、Di<sup>b</sup>抗原以外の主要血液型抗原を欠くPBDEP-Di<sup>b</sup>細胞株の作製に成功した。興味深いことに、PBDEP-Di<sup>b</sup>細胞株は、数多くの主要抗原を欠失しているにもかかわらず、親株と大きく変わらない倍加時間を示し（図2B）、さらに、ヘモグロビン合成能（図1Bと図2D）や分化誘導中の形態変化（図1Cと図2E）にも異常が観察されず、赤血球分化の阻害は見られなかった。

このように、主要な血液型抗原を数多く欠く細胞株が、大きな支障をきたすことなく増殖及び分化可能な理由の一つとして、培養細胞株が有する特別な形態維持機構が存在する可能性が示唆される。実際に、末梢血Rh-null赤血球は膜脆弱性や形態異常を示し、溶血しやすいことが知られている<sup>21)~23)</sup>が、先行研究では培養細胞株由来Rh-null赤血球に関する形態異常の明確な記載は少なく、培養赤血球におけるRhDおよびRhCE抗原の欠失は、即時的な溶血を引き起こすほどの深刻な異常ではない可能性が示唆されている<sup>4)7)</sup>。また、5種類の血液型抗原が欠失した細胞株由来赤血球においても、通常の赤血球と同様に、血清学試験に使用可能であったとの報告もある<sup>20)</sup>。このように細胞株由来の赤血球においては、形態維持に重要な血液型タンパク質が欠失した場合においても、比較的安定的にその形態を保持できる可能性がある。加えて、本研究で使用した分化PBDEP-4細胞はほとんど脱核しないため、残存

している核と、核周囲の細胞骨格タンパク質が物理的に細胞の安定性に寄与している可能性がある。ここに、今回ゲノム編集の対象から除外したBand3も膜構造の安定性に寄与していると考えられる。

血液型抗原は膜構造への寄与に加えて細胞機能にも関与しており、例えば本研究で削除対象としたABCG2 (Jr) およびSLC14A1 (Kidd) は尿素/尿酸輸送体として機能し、ABCG2の変異は高尿酸血症や痛風の発症リスクを上昇させることが報告されている<sup>24)~28)</sup>。また、A4GALT (P1PK) およびACKR1 (Duffy) は、それぞれパルボウイルスおよびマラリア原虫の感染に関連しており<sup>29)~34)</sup>、PBDEP-Di<sup>b</sup>ではP/P1抗原およびDuffy抗原の欠失により、これら病原体に対する感染抵抗性を有していると考えられる。従ってPBDEP-Di<sup>b</sup>細胞は、血液型の責任遺伝子が関与する疾患の研究や感染症研究における細胞材料としても利用可能であると考えられる。

試験管法による凝集試験において、PBDEP-4の凝集感度は抗原により異なり、末梢血赤血球よりも低い感度を示すことがあったが、少なくとも一部の抗原については、抗原責任遺伝子の強制発現により凝集感度が高められることも確認している。一例として、Fy(a+b-)のPBDEP-4細胞にFy<sup>b</sup>型ACKR1を導入したところ、フローサイトメトリーおよび試験管法でFy<sup>b</sup>抗原の発現と、凝集試験で抗Fy<sup>b</sup>を検出可能であることが確認された（補足図3）。これらの結果は、赤血球前駆細胞株に遺伝子改変技術を適用することにより、任意の血液型抗原を発現するパネル細胞を人工的に作出可能であることを示唆する一例と言える。

保存期間に関しては、10% FBS-IMDM 培養液を使用してPBDEP-Di<sup>b</sup>細胞は約2週間の冷蔵保存が可能であることが示されたが、4週間保存後には約半数の細胞が細胞死を起こしていた。有核赤血球の保存条件は最適化されておらず、末梢血赤血球と同等の品質を保つためには更なる検討が必要である。現時点では、冷蔵条件下で14日以内の保存が血清学試験への使用に適しており、今後は死細胞の発生を極力抑えるような保存条件への改良が必要である。上記の課題に加え、本研究の将来的な検討課題として、現行の培養コストが非常に高いことが挙げられる。これは維持培養液の価格が高価であるためであり、培養プロトコルの改良を進めているが、現段階では最適化には至っていない。今後安価な培養液や効率的な培養法が確立されれば、培養コストに関しては大幅に削減可能である。さらに、ゲルカラム法をはじめとしたハイスループットな検査法への適用可能性についても今後の検討が必要である。これまで、有核赤血球はゲルカラムを通過しないと考えられていたが、Anらの研究グループでは日本では市

販されていない特定のゲルカラムを用いることで抗原改変後の有核赤血球による抗体検出に成功している<sup>7)</sup>。将来的には、入手可能な類似のゲルカラムを用いることでPBDEP-4細胞がゲルカラム法にも適用可能となることが期待される。

結論として、PBDEP-4細胞とCRISPR/Cas9システムの併用により、抗原の編集が可能な人工パネル赤血球の作製が可能であった。PBDEP-4細胞は、O型ドナー由来末梢血CD34+細胞から樹立された赤血球前駆細胞株であり、我々は同細胞株から11種類の主要血液型抗原を削除することによりPBDEP-Di<sup>b</sup>細胞の作製に成功した。このゲノム編集されたPBDEP-Di<sup>b</sup>細胞は正常な増殖能と分化能を保持し、フローサイトメトリーや従来の試験管法による血清学試験に適用可能だった。本手法は、他の血液型抗原の改変にも応用可能であり、ドナー血液および患者血液検体中の同種抗体の迅速な同定を可能とする人工パネル細胞の作製に貢献するものである。また、本研究の成果は輸血前検査の精度向上のみならず、血液型システムの基礎研究にも大きく貢献することが期待される。

著者のCOI開示：著者のうち、船戸興自、菊地豪、前原香名子、栗田良、伊佐和美、宮崎孔、宮田茂樹、佐竹正博、谷慶彦は原著論文発表時に日本赤十字社の職員である。

謝辞：モノクローナル抗体をご提供いただいた関東甲信越ブロック血液センター（東京都）ならびに抗Di<sup>b</sup>血漿をご提供いただいた北海道ブロック血液センター（北海道）に感謝申し上げます。

## 文 献

- 1) Evanovitch D: A primer in pretransfusion testing. *Transfus Apher Sci*, 46 (3): 281—286, 2012.
- 2) British Committee for Standards in Haematology, Milkins C, Berryman J, et al: Guidelines for pretransfusion compatibility procedures in blood transfusion laboratories [published correction appears in *Transfus Med*. 32 (1): 91]. 2022.
- 3) White J: Pre-transfusion testing. *ISBT Science Series*, 4 (1): 37—44, 2009.
- 4) Cambot M, Mazurier C, Canoui-Poitaine F, et al: In vitro generated Rh (null) red cells recapitulate the in vivo deficiency: a model for rare blood group phenotypes and erythroid membrane disorders. *Am J Hematol*, 88 (5): 343—349, 2013.
- 5) Pandey P, Zhang N, Curtis BR, et al: Generation of 'designer erythroblasts' lacking one or more blood group systems from CRISPR/Cas9 gene-edited human-induced pluripotent stem cells. *J Cell Mol Med*, 25 (19): 9340—9349, 2021.
- 6) Petazzi P, Miquel-Serra L, Huertas S, et al: ABO gene editing for the conversion of blood type A to universal type O in Rhnull donor-derived human-induced pluripotent stem cells. *Clin Transl Med*, 12 (10): e1063, 2022.
- 7) An HH, Gagne AL, Maguire JA, et al: The use of pluripotent stem cells to generate diagnostic tools for transfusion medicine. *Blood*, 140 (15): 1723—1734, 2022.
- 8) Orth P, Schnappinger D, Hillen W, et al: Structural basis of gene regulation by the tetracycline inducible Tet repressor-operator system. *Nat Struct Biol*, 7 (3): 215—219, 2000.
- 9) Berens C, Hillen W: Gene regulation by tetracyclines. Constraints of resistance regulation in bacteria shape TetR for application in eukaryotes. *Eur J Biochem*, 270 (15): 3109—3121, 2003.
- 10) Kurita R, Suda N, Sudo K, et al: Establishment of immortalized human erythroid progenitor cell lines able to produce enucleated red blood cells. *PLoS One*, 8 (3): e59890, 2013.
- 11) Kurita R, Funato K, Abe T, et al: Establishment and characterization of immortalized erythroid progenitor cell lines derived from a common cell source. *Exp Hematol*, 69: 11—16, 2019.
- 12) Ito S, Kaito S, Miyazaki T, et al: A new antigen SUMI carried on glycophorin A encoded by the GYPA\*<sup>M</sup> with c.91A>C (p.Thr31Pro) belongs to the MNS blood group system. *Transfusion*, 60 (6): 1287—1293, 2020.
- 13) Kikuchi G, Kurita R, Ogasawara K, et al: Application of immortalized human erythroid progenitor cell line in serologic tests to detect red blood cell alloantibodies. *Transfusion*, 58 (11): 2675—2682, 2018.
- 14) Jinek M, East A, Cheng A, et al: RNA-programmed genome editing in human cells. *Elife*, 2: e00471, 2013.
- 15) Mali P, Yang L, Esvelt KM, et al: RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science*, 339 (6121): 823—826, 2013.
- 16) Cho SW, Kim S, Kim JM, et al: Targeted genome engineering in human cells with the Cas9 RNA-guided endonuclease. *Nat Biotechnol*, 31 (3): 230—232, 2013.
- 17) Jarolim P, Murray JL, Rubin HL, et al: Characterization of 13 novel band 3 gene defects in hereditary spherocytosis with band 3 deficiency. *Blood*, 88 (11): 4366—4374, 1996.
- 18) Tanner MJ: The structure and function of band 3 (AE1): recent developments (review). *Molecular membrane biology*, 14 (4): 155—165, 1997.

- 19) Ogasawara K, Suzuki Y, Sasaki K, et al: Molecular basis for D- Japanese: identification of novel DEL and D- alleles. *Vox Sang*, 109 (4): 359—365, 2015.
- 20) Hawksworth J, Satchwell TJ, Meinders M, et al: Enhancement of red blood cell transfusion compatibility using CRISPR-mediated erythroblast gene editing. *EMBO Mol Med*, 10 (6): e8454, 2018.
- 21) Sturgeon P: Hematological observations on the anemia associated with blood type Rhnull. *Blood*, 36 (3): 310—320, 1970.
- 22) Ballas SK, Clark MR, Mohandas N, et al: Red cell membrane and cation deficiency in Rh null syndrome. *Blood*, 63 (5): 1046—1055, 1984.
- 23) Avent ND, Reid ME: The Rh blood group system: a review. *Blood*, 95 (2): 375—387. Erratum in: *Blood*, 95 (7): 2197, 2000.
- 24) Woodward OM, Köttgen A, Coresh J, et al: Identification of a urate transporter, ABCG2, with a common functional polymorphism causing gout. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106 (25): 10338—10342, 2009.
- 25) Stewart G: The emerging physiological roles of the SLC14A family of urea transporters. *Br J Pharmacol*, 164 (7): 1780—1792, 2011.
- 26) Hoque KM, Dixon EE, Lewis RM, et al: The ABCG2 Q141K hyperuricemia and gout associated variant illuminates the physiology of human urate excretion. *Nat Commun*, 11 (1): 2767, 2020.
- 27) Toyoda Y, Pavelcová K, Bohatá J, et al: Identification of two dysfunctional variants in the ABCG2 urate transporter associated with pediatric-onset of familial hyperuricemia and early-onset gout. *Int J Mol Sci*, 22 (4): 1935, 2021.
- 28) Leask MP, Crişan TO, Ji A, et al: The pathogenesis of gout: molecular insights from genetic, epigenomic and transcriptomic studies. *Nat Rev Rheumatol*, 20 (8): 510—523, 2024.
- 29) Brown KE, Anderson SM, Young NS: Erythrocyte P antigen: Cellular receptor for B19 parvovirus. *Science*, 262 (5130): 114—117, 1993.
- 30) Brown KE, Hibbs JR, Gallinella G, et al: Resistance to parvovirus B19 infection due to lack of virus receptor (erythrocyte P antigen). *N Engl J Med*, 330 (17): 1192—1196, 1994.
- 31) Miller LH, Mason SJ, Dvorak JA, et al: Erythrocyte receptors for (*Plasmodium knowlesi*) malaria: Duffy blood group determinants. *Science*, 189 (4202): 561—563, 1975.
- 32) Haynes JD, Dalton JP, Klotz FW, et al: Receptor-like specificity of a *Plasmodium knowlesi* malarial protein that binds to Duffy antigen ligands on erythrocytes. *J Exp Med*, 167 (6): 1873—1881, 1988.
- 33) Horuk R, Chitnis CE, Darbonne WC, et al: A receptor for the malarial parasite *Plasmodium vivax*: The erythrocyte chemokine receptor. *Science*, 261 (5125): 1182—1184, 1993.
- 34) Chitnis CE, Miller LH: Identification of the erythrocyte binding domains of *Plasmodium vivax* and *Plasmodium knowlesi* proteins involved in erythrocyte invasion. *J Exp Med*, 180 (2): 497—506, 1994.

## GENOME-EDITED PERIPHERAL BLOOD STEM CELL-DERIVED ERYTHROID PROGENITOR-4 CELL LINE AS THE UNIQUE AND BENEFICIAL PANEL CELL FOR ANTIBODY IDENTIFICATION

*Koji Funato*<sup>1)</sup>, *Go Kikuchi*<sup>2)</sup>, *Kanako Maebara*<sup>1)</sup>, *Ryo Kurita*<sup>1)</sup>, *Kazumi Isa*<sup>1)</sup>, *Toru Miyazaki*<sup>1)</sup>, *Makoto Okuda*<sup>3)4)</sup>, *Shigeki Miyata*<sup>1)5)</sup>, *Masahiro Satake*<sup>1)</sup> and *Yoshihiko Tani*<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>Central Blood Institute, Blood Service Headquarters, Japanese Red Cross Society

<sup>2)</sup>Kanto-Koshinetsu Block Blood Center, Japanese Red Cross Society

<sup>3)</sup>Toho University Omori Medical Center

<sup>4)</sup>Present address: Blood Service Headquarters, Japanese Red Cross Society

<sup>5)</sup>Present address: Kanto-Koshinetsu Block Blood Center, Japanese Red Cross Society

### Keywords:

antibody identification, panel cell, erythroid progenitor cell line, genome editing

補足表1 使用した抗体一覧

Primary antibody	Reactivity	Remarks
HIRO-3	RhD	human IgG, produced in-house
HIRO-222	RhC	human IgM, produced in-house
HIRO-38	Rhe	human IgM, produced in-house
HIRO-59	P1	human IgM, produced in-house
Anti-Fy <sup>a</sup> serum	Fy <sup>a</sup>	Ortho, human IgG
HIRO-133	Jr <sup>a</sup>	human IgG, produced in-house
HIRO-183	Jk <sup>a</sup>	human IgM, produced in-house
Anti-Jk <sup>b</sup>	Jk <sup>b</sup>	Ortho, human IgM
CBC-3	M (GPA)	mouse IgG, produced in-house
CBC-14	N (GPA)	mouse IgG, produced in-house
Anti-little s serum	little s (GPB)	Ortho, human IgG
HIRO-58	Di <sup>b</sup>	human IgG, produced in-house
human IgG	Isotype control	Jackson, isotype ctrl
Human IgM	Isotype control	Thermo, isotype ctrl
Mouse IgG	Isotype control	Jackson, isotype ctrl
Secondary antibody and staining dye	Reactivity	Remarks
Alexa488 anti-human IgG	human IgG	Jackson
Alexa647 anti-human IgG	human IgG	Jackson
Alexa488 anti-human IgM	human IgM	Jackson
Alexa647 anti-mouse IgG	mouse IgG	Jackson
BRIC6-FITC*	CD233 (Band3)	IBGRL
7-amino actinomycinD (7-AAD)	dead cell	Beckman

\*生細胞染色に使用

補足表2 血液型遺伝子の標的配列と使用したプラスミドベクター

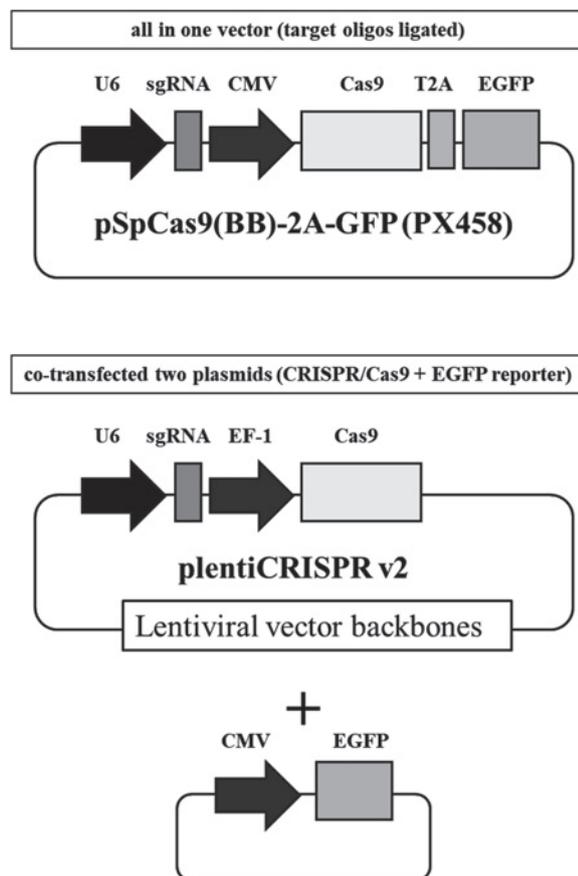
Gene	DNA sequences	Plasmid vector
<i>RHD/RHCE</i>	CGTGATGGCGCCATTGGCT	pSpCas9 (BB) -2A-GFP (PX458)
<i>GYP A/GYPB</i>	ATCTTTGTATTACTATTGTC	pSpCas9 (BB) -2A-GFP (PX458)
<i>A4GALT</i>	GGCTGCTCCGGGCGCCCA	pSpCas9 (BB) -2A-GFP (PX458)
<i>ACKR1</i>	TGCTGCTAGCTAGGATACCC	plentiCRISPR v2-crRNA2
<i>SLC14A1</i>	GTGGGAGTTGGTCAGATCTA	plentiCRISPR v2-crRNA5
<i>ABCG2</i>	GACAGCTTCCAATGACCTGA	plentiCRISPR v2-crRNA2

補足表3 PCRに用いたプライマー配列

Primer	Sequences (5 → 3)	Remarks
<i>RHD</i> -Fw	CCCTATTTAACAGACAAGAACA	PCR primer, forward
<i>RHD</i> -Rev	ACCGCGCTGGCTAAAACCTGT	PCR primer, reverse
<i>RHCe</i> -Fw	GTTGGTGATTATTGATAAGAAG	PCR primer, forward
<i>RHCe</i> -Rev	TGCCAGGTGAGTCCTTAAGCTA	PCR primer, reverse
<i>GPA</i> -Fw	GATACTTATCTCCATCTTTCTCC	PCR primer, forward
<i>GPA</i> -Rev	TAATAACCCTATGATATTTTC	PCR primer, reverse
<i>GPB</i> -Fw	TTGTTCTGTCTCCCTTTAATGTC	PCR primer, forward
<i>GPB</i> -Rev	CATTTTACTTTGTTTCTGGCATCGC	PCR primer, reverse
<i>A4GALT</i> -Fw	CTGTTGTCTAGAAGGCCCGG	PCR primer, forward
<i>A4GALT</i> -Rev	GCCACCAGGAAAGAGAGGTC	PCR primer, reverse
<i>ACKR1</i> -Fw	GAGTGTAGTCCCAACCAGCC	PCR primer, forward
<i>ACKR1</i> -Rev	AGAAACCACCCGCTTCACAA	PCR primer, reverse
<i>SLC14A1</i> -Fw	TCACCTCAACACTGATGGA	PCR primer, forward
<i>SLC14A1</i> -Rev	GGGACGTCACCTTGTCCTGTT	PCR primer, reverse
<i>ABCG2</i> -Fw	ACTGCAGACTTGATATCCCAGAT	PCR primer, forward
<i>ABCG2</i> -Rev	ACCACACCTGGCTAACTTTTGT	PCR primer, reverse

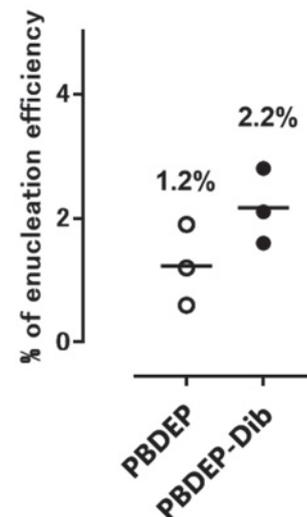
補足表4 シークエンスに用いたプライマー配列

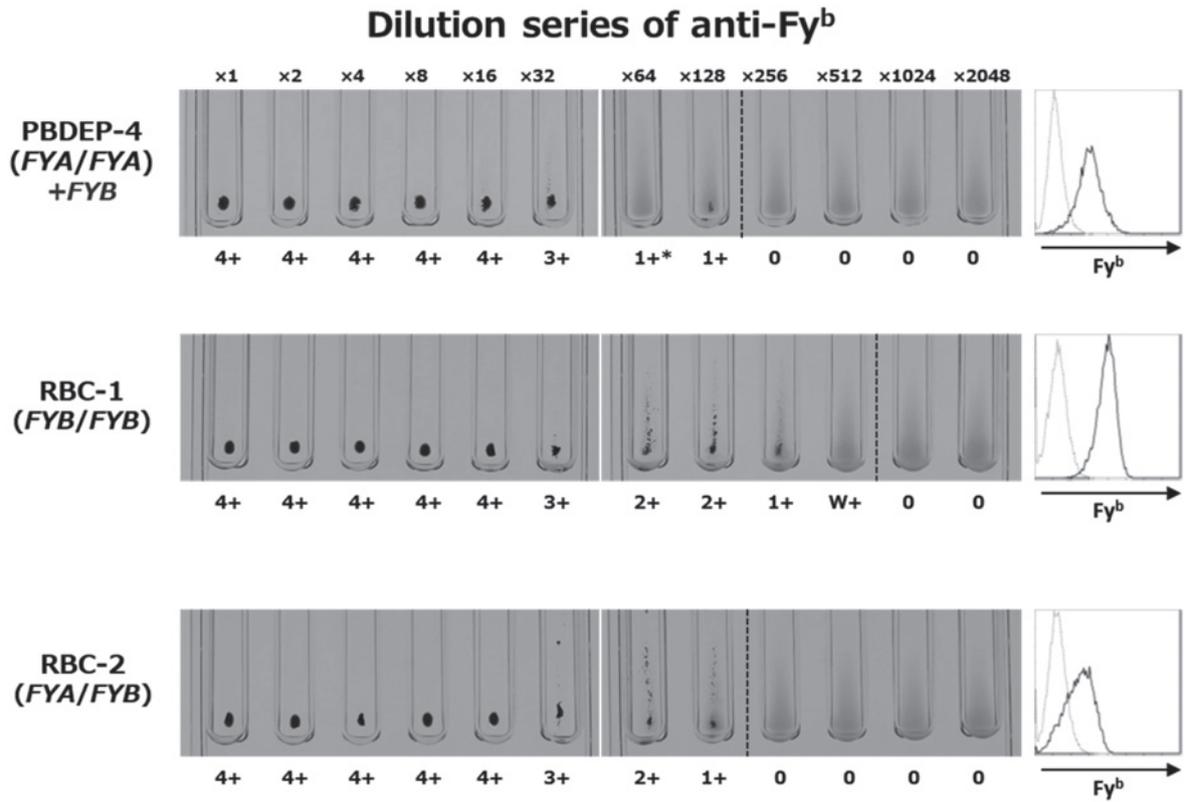
Primer	Sequences (5 → 3)	Remarks
<i>RHD/RHCe</i> seq-Fw	TGAGGCTCAAAGAGGCAAAG	sequence primer, forward
<i>RHD/RHCe</i> seq-Rev	TTCTGGAACCTGCCTTTTCG	sequence primer, reverse
<i>GPA</i> seq-Fw	CCTGGAAGATAACAGCTAGC	sequence primer, forward
<i>GPA</i> seq-Rev	TGTGCCATTTCCCCACATT	sequence primer, reverse
<i>GPB</i> seq-Fw	CAGGCGCTTAACAACCTGCA	sequence primer, forward
<i>GPB</i> seq-Rev	ACTAGAAAACCTGGATTCGGCCA	sequence primer, reverse
<i>A4GALT</i> seq-Fw	GACTCCACCGAGCACATGAA	sequence primer, forward
<i>A4GALT</i> seq-Rev	TTGTGGATCGGGAATGCCAA	sequence primer, reverse
<i>ACKR1</i> seq-Fw	GCCTCTCTGGGTATGTCCT	sequence primer, forward
<i>ACKR1</i> seq-Rev	GCTGAGCCATACCAGACACA	sequence primer, reverse
<i>SLC14A1</i> seq-Fw	AGGGAAGGGCTGGTGTATCT	sequence primer, forward
<i>SLC14A1</i> seq-Rev	GCCCTGATTTTTTCATGCAGT	sequence primer, reverse
<i>ABCG2</i> seq-Fw	TGAGAGTCAAACATATACCT	sequence primer, forward
<i>ABCG2</i> seq-Rev	CAAGCCAGACAAGTCTAACCT	sequence primer, reverse



補足図1 ゲノム編集に用いた CRISPR/Cas9 ベクターの模式図

本研究で用いた2種類の CRISPR/Cas9 ベクターの模式図. PX458 はプラスミド内に EGFP レポーター遺伝子を含む (上). EGFP レポーターを含まない plentiCRISPR v2 を使用する際は, EGFP 発現プラスミドを共導入した (下)

補足図2 PBDEP-4 細胞と PBDEP-Di<sup>b</sup> 細胞の脱核率  
7 日間分化誘導した PBDEP-4 細胞と PBDEP-Di<sup>b</sup> 細胞の脱核率 (脱核細胞数/全細胞数). n=3.



補足図3 分化誘導したPBDEP-Fy<sup>b</sup>細胞を用いた試験管法による凝集試験

分化誘導したPBDEP-Fy<sup>b</sup>細胞および赤血球(RBC)を用いた試験管法による抗Fy<sup>b</sup>(HIRO-299, IgM)を用いた凝集像。フローサイトメトリーのヒストグラムをその右隣に示した。PBDEP-Fy<sup>b</sup>細胞は、親株であるPBDEP-4(Fy<sup>a</sup>/Fy<sup>a</sup>)には発現していないFYB型のACKR1遺伝子を導入することで樹立された。RBC-1およびRBC-2はPBDEP-4のドナー由来ではなく、それぞれFy<sup>b</sup>/Fy<sup>b</sup>およびFy<sup>a</sup>/Fy<sup>b</sup>の遺伝子型を有する別ドナー由来の赤血球である。抗Fy<sup>b</sup>の希釈倍率は画像の上部に、凝集スコアは下部に示されている。