

---

---

# ゲノム編集技術を用いて

## 拒絶反応のリスクが少ない iPS 細胞を作製

### ポイント

- 細胞移植の際、レシピエントとドナー<sup>注1)</sup>の HLA <sup>注2)</sup>型が一致しないと、移植したドナー細胞はレシピエントのキラーT 細胞<sup>注3)</sup>からの攻撃を受ける。また、ドナー細胞の HLA が消失していると、ドナー細胞はレシピエントの NK 細胞<sup>注4)</sup>からの攻撃を受ける。
- CRISPR-Cas9 ゲノム編集技術<sup>注5)</sup>を用い、キラーT 細胞と NK 細胞両方からの拒絶反応リスクが少ない iPS 細胞の作製法を開発した。
- 本手法を用いると、7 種類の iPS 細胞株<sup>注6)</sup>によって、日本人の 95%以上をカバーできると試算される。また、12 種類の iPS 細胞株によって世界的なカバー率の向上が可能と考えられる。

### 1. 要旨

病気の患者さん自身の細胞ではなく、他人の細胞を使った他家移植<sup>注7)</sup>による再生医療は、移植する細胞と移植される側の細胞の HLA 型が異なる場合、免疫拒絶反応が起こるリスクが避けられません。京都大学 iPS 細胞研究所 (CiRA) は、免疫拒絶反応を低減するために、HLA ホモ接合体<sup>注8)</sup>を有する健康な方 (ホモドナー) から提供された細胞から iPS 細胞を作製する、「再生医療用 iPS 細胞ストックプロジェクト<sup>注9)</sup>」を進めています。HLA ホモ接合体ドナーは非常に稀であり、日本人の約 9 割をカバーすることができるとされる 140 株<sup>注9)</sup>を集めるには、多くの時間と費用が必要となっています。

これまでの研究では、ゲノム編集技術を用いて、HLA 分子の存在に重要な  $\beta$ 2ミクログロブリン (B2M) 遺伝子や CIITA 遺伝子をノックアウト<sup>注10)</sup>させるという方法が開発されてきました。しかし、HLA 分子を失ったドナー細胞は抗原を提示する<sup>注11)</sup>能力が無くなってしまふことがわかっています。さらに、HLA 分子が消失したドナー細胞は、レシピエントの NK 細胞を抑制することができなくなり、攻撃されてしまうという問題があります。

徐 淮耕(ジョウ・カイコウ)大学院生(京都大学 CiRA)、王 博(オウ・ハク)研究員(京都大学 CiRA)および金子新 准教授(京都大学 CiRA、T-CiRA)、堀田 秋津 講師(京都大学 CiRA、T-CiRA)らの研究グループは、CRISPR-Cas9 ゲノム編集技術を用いて、他家移植の際に免疫拒絶のリスクが少ない iPS 細胞を作る2つの方法を開発しました。

一つ目の方法は、一般的な HLA ヘテロ接合体ドナー由来 iPS 細胞において、染色体<sup>注12)</sup>の片側の HLA 遺伝子部分を選択的に除去して、HLA 擬似ホモ接合体を作るという方法です(方法1)。二つ目の方法は、NK 細胞の反応を抑えるために、染色体片側の HLA-C を残し、HLA-A と HLA-B 遺伝子を壊すという方法です(方法2)。これらの手法で作製した iPS 細胞由来細胞は、仮想レシピエントのキラーT 細胞と NK 細胞の攻撃を受けにくくなることが確認されました。

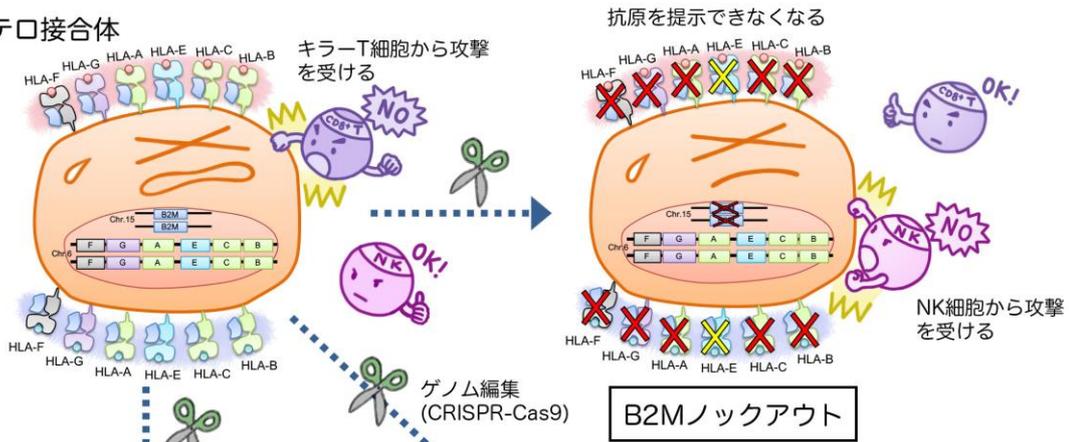
また、方法2を用いると、わずか 7 種類の iPS 細胞株によって、日本人の 95%以上をカバーできると試算され、12 種類の iPS 細胞株によって世界的なカバー率の向上が可能と考えられます。この研究成果は iPS 細胞を使った再生医療の普及に大きく貢献できる可能性を示しています。

**この研究成果は 2019 年 3 月 8 日午前 1 時 (日本時間) に米国科学誌「Cell Stem Cell」でオンライン公開されました。**

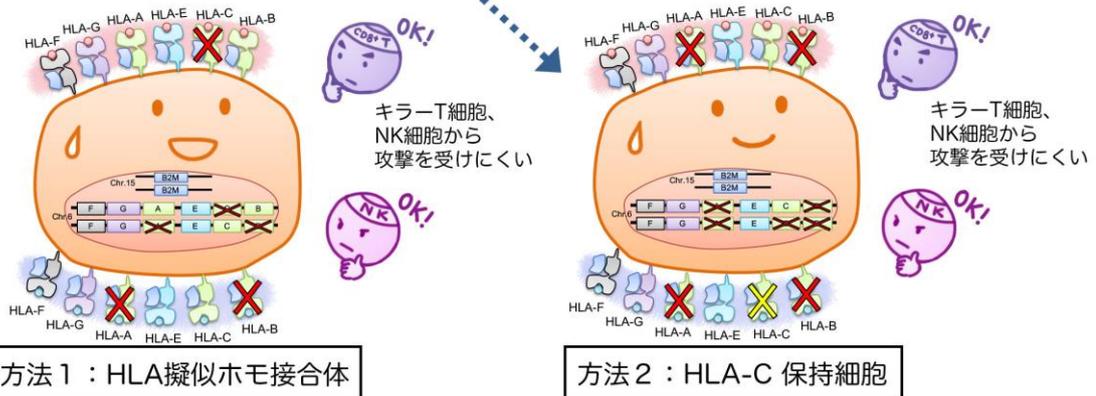
## HLAホモ接合体



## HLAヘテロ接合体



## 本研究



## 論文の概要図

## 2. 研究の背景

他家移植時の免疫拒絶反応を考えると、iPS 細胞を使った再生医療の理想の型は自家移植<sup>注7)</sup>です。現状では iPS 細胞を作製するのに時間と費用がかかることから、CiRA では他家移植が可能で再生医療用 iPS 細胞ストックとして、HLA ホモドナーから iPS 細胞を作製しています。しかし、ほとんどの方は HLA 型がヘテロであるため、90%以上の日本人をカバーできる HLA 型を 140 株以上揃えるには、15 万人以上の HLA 型を調べる必要があると試算されており、日本よりもゲノム多様性に富む国際社会ではそれ以上の人数を調べる必要があると考えられています。

最近の研究では、HLA ホモ接合体を有する iPS 細胞に代わるものとして、ゲノム編集技術等を用いて B2M 遺伝子や CIITA 遺伝子をノックアウトする方法が報告されています。B2M は HLA-A, HLA-B, HLA-C 遺伝子などで構成される HLA クラス 1 分子<sup>注8)</sup>を構成(細胞表面に提示)するのに重要なタンパク質で、CIITA は HLA-DP, HLA-DQ, HLA-DR 遺伝子などで構成される HLA クラス 2 分子の発現に必要です。B2M 遺伝子をノックアウトすると、全ての HLA クラス 1 タンパク質が細胞表面から消失します。HLA クラス 1 分子はキラーT 細胞に抗原を提示することで外来の細菌やウイルスを認識し、提示された抗原を含めた HLA クラス 1 の“型”が非自己と認識された場合のみ免疫反応を開始することから、ドナー細胞の HLA クラス 1 分子を消失させることでドナー細胞はレシピエントのキラーT 細胞からの攻撃を回避することができます。しかし、逆に HLA クラス 1 分子によって攻撃を抑制されていたレシピエントの NK 細胞が活性化され、ドナー細胞を攻撃するようになります。また、ドナー細胞の HLA クラス 1 の抗原提示能がなくなることによって、病原体に感染した移植細胞や、がん原性を得たりした移植細胞をレシピエントのキラーT 細胞が排除できなくなるリスクが想定されます。

そこで、本研究グループは、CRISPR-Cas9 ゲノム編集技術を用いて、HLA ヘテロ接合体の細胞から、他家移植の際に免疫拒絶のリスクの少ない iPS 細胞を作る2つの方法を開発しました。

## 3. 研究結果

### 1) 片側の HLA 遺伝子をゲノム編集した“HLA 擬似ホモ接合体”の作製 (方法1)。

これまでの研究で、他家移植の場合、HLA クラス 1 のうち HLA-A、HLA-B、そして HLA-C を合わせることが重要だということが分かっていました。そこで、HLA ヘテロ接合体の iPS 細胞を用い、片側の HLA-A、HLA-B、HLA-C をゲノム編集によって取り除くことによって、HLA 擬似ホモ接合体 iPS 細胞を作製しました。この iPS 細胞を血液細胞へと分化させ、キラーT 細胞の免疫反応を調べました。すると、ゲノム編集されていない HLA ヘテロ接合体の iPS 細胞(604B1-WT)から分化させた血液細胞と比べて、HLA 擬似ホモ接合体の血液細胞は仮想レシピエントのキラーT 細胞からの攻撃を受けにくいことが分かりました(図1)。

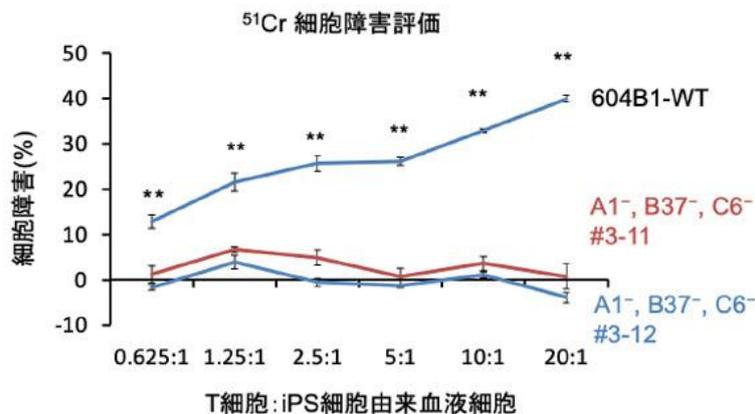


図1: HLA 擬似ホモ接合体(方法1で作製した iPS 細胞由来の血液細胞)に対するキラーT 細胞の活性

ゲノム編集されていない HLA ヘテロ接合体 iPS 細胞(604B1-WT)と HLA 擬似ホモ接合体 iPS 細胞(A1<sup>-</sup>, B37<sup>-</sup>, C6<sup>-</sup> #3-11 および #3-12)をそれぞれ血液細胞に分化させ、細胞内にクロム元素(<sup>51</sup>Cr)を取り込ませた。そこにキラーT 細胞を添加すると、攻撃を受けた iPS 細胞由来血液細胞は融解して培地中にクロム元素を放出するので、培養液中のクロム元素の濃度によってキラーT 細胞の攻撃(細胞障害)を定量化できる。右に行くほど添加したキラーT 細胞の割合が増えている。WT では培養液中のクロム元素の濃度が HLA 擬似ホモ iPS 細胞由来細胞と比較して高く、キラーT 細胞の攻撃を受けたことを示す。

2)HLA-C を保持したまま HLA-A と HLA-B を壊した “HLA-C 保持細胞”の作製 (方法2)。

方法1によって、さまざまな HLA 型において疑似ホモ接合体を作製することができますが、多様な HLA 型それぞれに適合する細胞をストックする場合、さまざまな型の HLA-A/B/C の組合せを揃える必要があります。

そこで、本研究では、HLA-A,-B,-C のうち、基本1種類の HLA-C だけを保持し、HLA-A および HLA-B の遺伝子を完全に壊すという方法で iPS 細胞を複数作製しました(方法2)。方法2で作製した細胞をドナー細胞として用いる場合、拒絶反応のリスクを少なくするには HLA-C の型のみを合わせればよいので、方法1よりもさらに少ない数のドナーで人口の多くをカバーできると考えられます。また、HLA-C は NK 細胞の働きを抑制するのに大切であることが知られています。

方法2で作製した iPS 細胞を血液細胞へと分化させ、クロム元素を用いて(HLA 型ミスマッチ<sup>注2)</sup>)キラーT 細胞から攻撃を受ける度合いを調べると、方法1の場合や B2M ノックアウトの細胞と同等にキラーT 細胞の攻撃を回避できることが分かりました(図2a)。さらに、NK 細胞の活性を測定すると、HLA-A、HLA-B、HLA-C の遺伝子を全てノックアウトした細胞や B2M ノックアウトした細胞は、NK 細胞の攻撃を受けていることが示されましたが、方法2で作製した HLA-C を1種類残した細胞は比較的攻撃を受けにくいことが分かりました(図2b)。

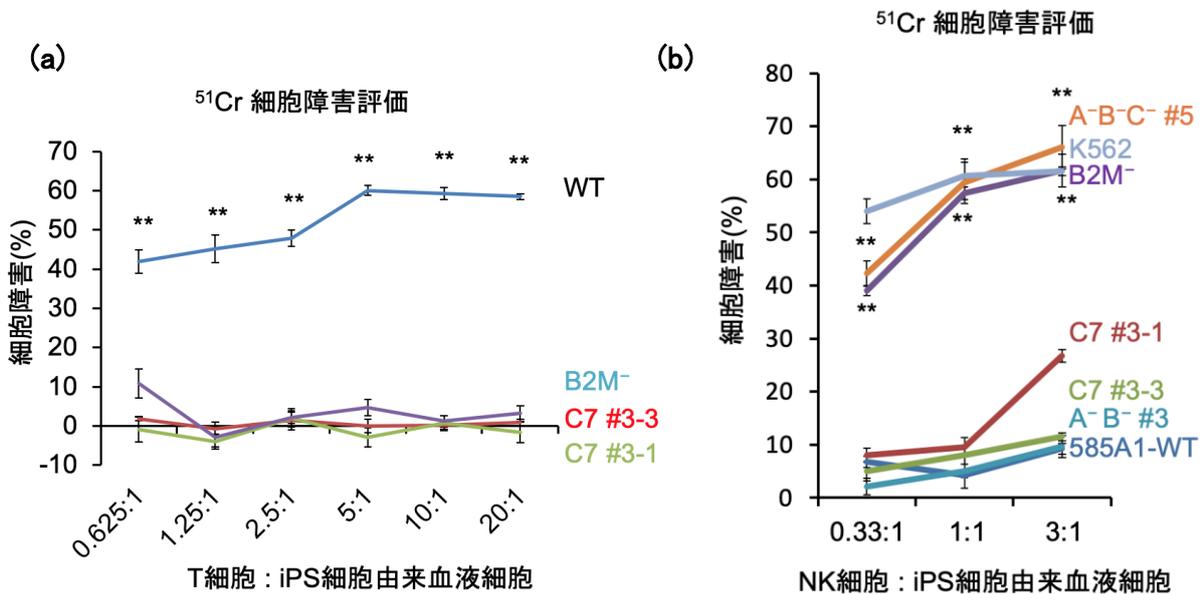


図2:HLA-C 保持細胞(方法2で作製した iPS 細胞由来の血液細胞)に対するキラーT 細胞と NK 細胞の活性

- (a) キラーT 細胞の活性。WT:ゲノム編集しない HLA ヘテロ接合体、B2M<sup>-</sup>:B2M ノックアウトした細胞、C7: 方法2によって作製した HLA-C 保持細胞
- (b) NK 細胞の活性。A<sup>-</sup>B<sup>-</sup>C<sup>-</sup>:HLA-A、HLA-B、HLA-C を全て除去したもの(HLA-E は残存)、K562: 陽性対照群(白血病細胞株)、B2M<sup>-</sup>:B2M ノックアウトした細胞、C7: 方法2によって作製した HLA-C 保持細胞、A<sup>-</sup>B<sup>-</sup>:HLA-C 両アレルを残存し、HLA-A、HLA-B を除去したもの、585A1-WT:ゲノム編集しない HLA ヘテロ接合体

また、本研究で作製した細胞の生体内での生存率を調べるため、方法2で作製した iPS 細胞由来の血液細胞と、ミスマッチ HLA 型に反応するヒトキラーT 細胞を免疫不全マウス<sup>注13)</sup>に移植して1週間観察し、移植した細胞の生存率を調べました。すると、方法2で作製した細胞は、ゲノム編集していない細胞に比べて生存率が高く、キラーT 細胞に攻撃されにくいことが確認されました(図3)。

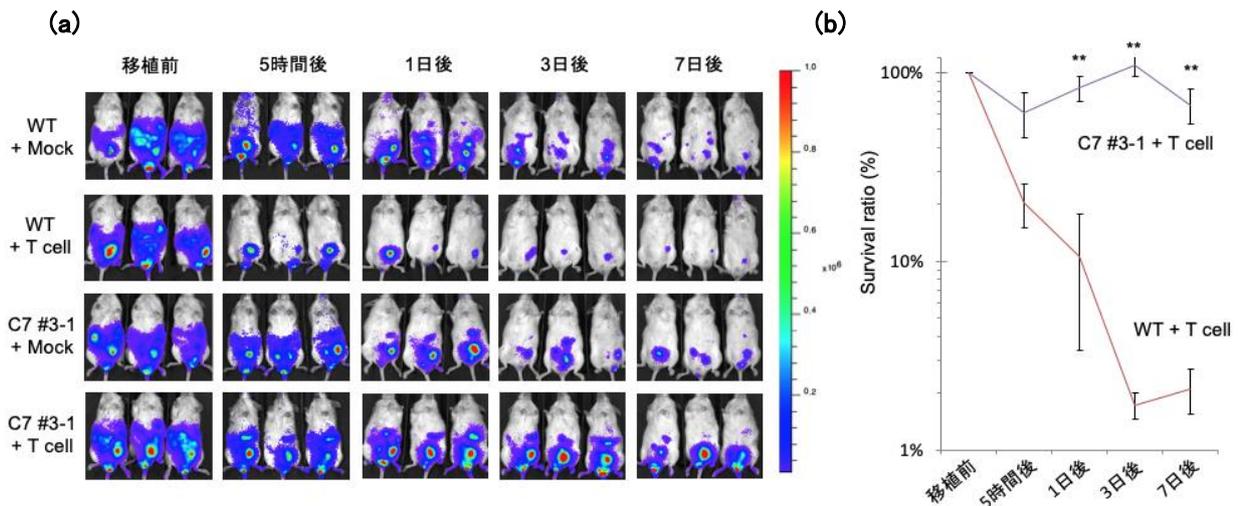


図3: HLA-C 保持細胞(方法2で作製された iPS 細胞由来の血液細胞)とキラーT 細胞を免疫不全マウスに移植したときの HLA-C 保持細胞の生存率

- (a) 移植後の各時点で、マウス体内で生存している移植細胞。WT:ゲノム編集していない細胞、C7:方法2で作製した細胞。色のついている部分が生きている移植細胞を示す。
- (b) 移植後の各時点における移植細胞の生存率。C7 は WT に比べ、移植細胞の生存率が高いことが確認された。

最後に、方法1や方法2によって作製した iPS 細胞を使う場合、HLA クラス1のみを考慮した場合、人口をカバーするのにどれほどの細胞株が必要になるかを、HLA 型が入手可能なエスニックグループ別に試算しました。その結果、方法1(片側 HLA-A/B/C を取り除いた擬似ホモ接合体 iPS 細胞)の場合、日本人の 95%以上をカバーするのに 73 株が必要であると試算されました。一方、方法2(HLA-C を保持した iPS 細胞)の場合、HLA-C の型の種類が比較的少ないため、日本人の 95%以上をカバーするのに 7 株が必要ということが試算されました(図4)。

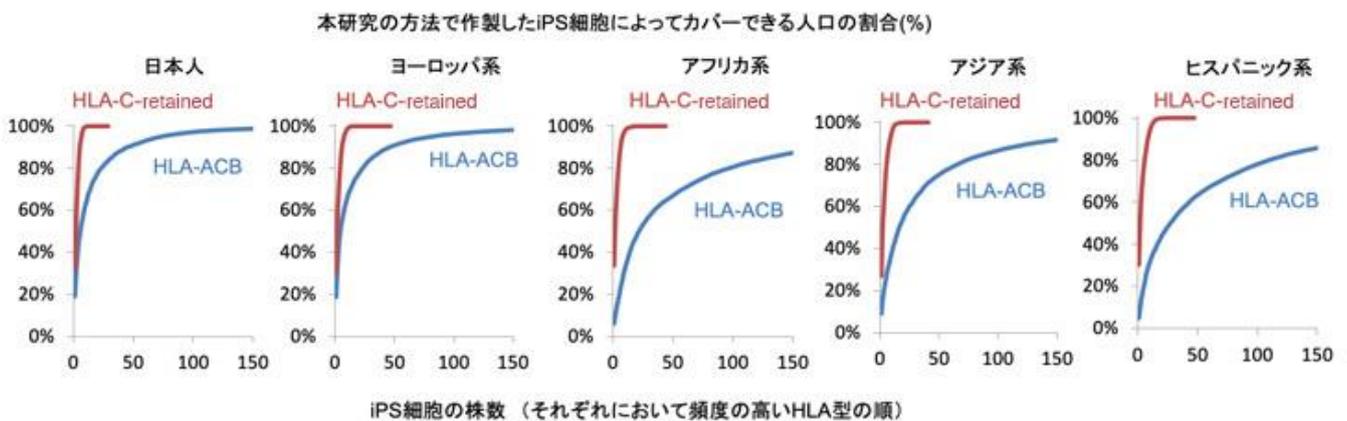


図4: 本研究の手法で作製した iPS 細胞によってカバーできる各地域の人口の割合

HLA-ACB(方法 1): 人口の 95%をカバーするのに、日本人では 73 株、ヨーロッパ系で 82 株、アフリカ系で 282 株、アジア系で 213 株、ヒスパニック系で 308 株が必要と試算される。

HLA-C-retained (方法 2): 人口の 95%をカバーするのに、日本人では 7 株、ヨーロッパ系で 8 株、アフリカ系で 9 株、アジア系で 10 株、ヒスパニック系で 11 株が必要と試算される。

※ヨーロッパ系、アフリカ系、アジア系、ヒスパニック系の米国のサンプルを用いて試算した。

#### 4. 本研究の意義と今後の展望

本研究で開発した HLA ゲノム編集細胞は、他家移植の際にレシピエントのキラーT 細胞と NK 細胞の両方からの攻撃を回避し免疫拒絶反応を抑制することができます。

特に、方法2を用いた場合、日本人をカバーするのに必要な iPS 細胞の種類を大幅に減らすことができ、次世代 iPS 細胞ストックの構築に向けた重要な技術になると期待されます。

本手法だけでは全ての NK 細胞の活性を抑制できない場合(C1/C2 ヘテロや Bw4 の場合)もあるため、今後さらに研究を進める必要があります。国内では CRISPR-Cas9 ゲノム編集技術を用いた臨床応用例はまだないため、オフターゲット変異リスク<sup>注14)</sup>を厳密に調べる必要もあります。また、ゲノム編集で作成された iPS 細胞が、確実に目的の治療用細胞へと分化できるかどうか確認する必要があります。さらに、再生医療用の iPS 細胞ストックでは、ゲノム編集を起因としたものに限らず、発がんの可能性のあるゲノム変異を持った細胞を取り除かなければなりません。より安全性の高い iPS 細胞の医療応用に貢献すべく、引き続き慎重に研究を進めていきます。

#### 5. 論文名と著者

##### ○ 論文名

“Targeted Disruption of HLA genes via CRISPR-Cas9 generates iPSCs with Enhanced Immune Compatibility”

##### ○ ジャーナル名

Cell Stem Cell

##### ○ 著者

Huaigeng Xu<sup>\*</sup>, Bo Wang<sup>1\*</sup>, Miyuki Ono<sup>1,2</sup>, Akihiro Kagita<sup>1</sup>, Kaho Fujii<sup>1</sup>, Noriko Sasakawa<sup>1,2</sup>, Tatsuki Ueda<sup>1</sup>, Peter Gee<sup>1,2</sup>, Misato Nishikawa<sup>1</sup>, Masaki Nomura<sup>1</sup>, Fumiyo Kitaoka<sup>1</sup>, Tomoko Takahashi<sup>1</sup>, Keisuke Okita<sup>1</sup>, Yoshinori Yoshida<sup>1</sup>, Shin Kaneko<sup>1\*\*</sup>, and Akitsu Hotta<sup>1,2\*\*</sup>

##### ○ 著者の所属機関

1. 京都大学 iPS 細胞研究所 (CiRA)
  2. 日本医療研究開発機構 再生医療実現拠点ネットワークプログラム iPS 細胞研究中核拠点
- \*:共著者、\*\*:責任共著者

#### 6. 本研究への支援

本研究は、下記機関より支援を受けて実施されました。

- 国立研究開発法人日本医療研究開発機構 (AMED) 再生医療実現拠点ネットワークプログラム iPS 細胞研究中核拠点 [JP18bm0104001]
- 日本学術振興会 (JSPS) 科研費 [15H05581]

※今回作製された iPS 細胞の染色体解析部分については株式会社 chromocenter の協力を得ています。

#### 7. 用語説明

##### 注1)レシピエントとドナー

組織や細胞の移植において、受け入れる側をレシピエント、移植する組織や細胞を提供する側をドナーという。

##### 注2)HLA

---

---

ヒトの主要組織適合遺伝子複合体(MHC)であるヒト白血球型抗原(Human Leukocyte Antigen)の略で、細胞の自他を区別する型。ヒトの免疫に関わる重要な分子として働く。自身の持っている型と異なる(ミスマッチという)HLA 型の人から細胞や臓器の移植を受けると、T 細胞が「異物」と認識し、免疫拒絶反応が起こる。そのため、細胞や臓器を移植する際には HLA 型をできるだけ合わせて行われている。

HLA の型は非常に多様で、A 座(HLA-A)、B 座(HLA-B)、C 座(HLA-C)などと呼ばれる抗原<sup>注11)</sup>の組み合わせで構成されており、各抗原に数十種類の型があるため、あわせて数万通りの組み合わせがある。そのため、自分と完全に一致する HLA 型の人、数百～数万人に 1 人の確率でしか存在しないといわれる。

### 注3)キラーT 細胞

免疫においてはたらく細胞の一種。主に HLA クラス1分子に提示された抗原ペプチドや、非自己の HLA 型を認識すると活性化して増殖し、異物及び病的な細胞を傷害して排除する。

### 注4)NK 細胞 (ナチュラルキラー細胞)

免疫においてはたらく細胞の一種。NK 細胞は抗原特異的な免疫反応を示さず、非特異的に細胞を障害するといった免疫反応(自然免疫)。ただし、主に自己 HLA の C 座(HLA-C)、E 座(HLA-E)、G 座(HLA-G)の存在によって、活動が抑制されることが分かっている。

### 注5)CRISPR-Cas9 ゲノム編集技術

ゲノム編集技術とは、ゲノムの特定標的部位に DNA 損傷を誘導することで DNA 配列を編集する技術の一つ。CRISPR(Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat)-Cas9 という DNA 切断酵素と、切断させたい場所へと Cas9 を誘導するガイド RNA を使うことで、任意の場所の DNA を切断することができる。切断された DNA が修復する際にゲノム DNA の一部が欠失するため、遺伝子の機能(タンパク質発現)をノックアウトすることができる。

### 注6)株

1 つの細胞から分裂して増えた、遺伝子が同じ細胞集団をクローンという。そのクローンを半永久的に継代培養することが可能になった状態の細胞を株という。

### 注7)他家移植と自家移植

ある個体から取り出した組織や細胞を別の同種の個体に移植することを他家移植(同種移植)という。一方、ある個体から取り出した組織や細胞を同じ個体に移植することを自家移植という。

### 注8) HLA ホモ接合体

父親と母親から同じ HLA 型を受け継いだ子の細胞を「HLA ホモ接合体」と言う。例えば A 座について、A1、A2、A3……と数十種類の型があるが、両親それぞれから 2 つの同じ型を受け継ぎ、A1A1、A2A2、A3A3 のような組み合わせをもつ細胞を「HLA ホモ接合体」と言い、細胞移植においては、A1A1 の細胞であれば A1A2 や A1A3 組み合わせをもつ人(「HLA ヘテロ接合体」の人)に移植しても拒絶反応が起こりにくいと考えられる。

また、HLA が持つタンパク質は、タンパク質の構造および機能の違いから、クラス 1(HLA-A、-B、-C、-E、-F、-G)、とクラス 2(HLA-DR、-DQ、-DP など)に分類される。クラス 1 はキラーT 細胞に抗原を提示し、クラス 2 はヘルパーT 細胞に抗原を提示する。クラス 2 は主にマクロファージや B 細胞などの免疫担当細胞だけで発現しているのに対し、クラス1は体中のほぼ全ての細胞で発現している。一般的な臓器移植医療では、HLA-A、-B、-C、-DR の HLA 型を調べて、なるべく型の一致するドナーを見つけて移植を行っている。

---

---

#### 注9)再生医療用 iPS 細胞ストックプロジェクト

HLA ホモ接合体の細胞を有する健康なドナーから iPS 細胞を作製し、あらかじめ様々な品質評価を行った上で、再生医療に使用可能な iPS 細胞株を保存するプロジェクト。平成 25 年に開始し、10 年間で日本人の大部分をカバーできる医療用 iPS 細胞の製造を目標としており、本研究成果を取り入れた HLA ゲノム編集 iPS 細胞の製造についても検討を開始している。

CiRA では、3座ホモ接合体(HLA-A、HLA-B、HLA-DR の3座で父方由来と母方由来の遺伝子が同一)の HLA を持つ人から iPS 細胞を樹立しており、HLA3座ホモ接合体の iPS 細胞が 140 株あれば、日本人の約 9 割への細胞移植が可能という試算している。

#### 注10)ノックアウト

ゲノム編集技術において、標的の遺伝子を破壊する(タンパク質が発現しないようにする)ことをノックアウトという。これに対し、標的ゲノム部位に外来遺伝子を挿入することをノックインという。

#### 注11)抗原提示

細胞内部のタンパク質は、細かいペプチド断片(ペプチド)へと分解され、いずれかの HLA タンパク質と結合して細胞表面に提示される。この細かい断片(ペプチド)のことを抗原と呼び、HLA を介して細胞表面に提示することを抗原提示と呼ぶ。自己由来の抗原と HLA 型に結合する T 細胞は胸腺で排除されるが、非自己の抗原(ウイルスや細菌由来の抗原、及びがん細胞由来の抗原を含む)や非自己の HLA 型を認識する T 細胞は絶えず体内を監視しており、抗原や HLA 型の不一致が認識されると、免疫拒絶反応が起こる。

#### 注12)染色体

長い鎖状の DNA がヒストンに巻き付いた構造体。父方と母方から 1 組ずつ、合計 2 組が細胞内に存在する。HLA 遺伝子群は6番染色体に搭載されている。

#### 注13)免疫不全動物

免疫機能が低下している動物。このような動物は異種の細胞を移植しても拒絶反応を起こさず体内に生着するため、動物実験に用いられる。ヒトの細胞を免疫不全動物に移植し、動物の体内でヒト由来細胞の機能などを研究することを可能にしている。

#### 注14)オフターゲット変異リスク

ゲノム編集において、標的遺伝子以外への部位へ意図しない変異が起きるリスクのこと。