

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号

特許第7385281号

(P7385281)

(45)発行日 令和5年11月22日(2023.11.22)

(24)登録日 令和5年11月14日(2023.11.14)

(51)国際特許分類

F I

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 N 15/09 1 1 0

C 1 2 N 15/11 (2006.01)

C 1 2 N 15/11 Z Z N A

C 1 2 N 5/10 (2006.01)

C 1 2 N 5/10

請求項の数 9 (全89頁)

(21)出願番号 特願2020-500578(P2020-500578)
 (86)(22)出願日 平成31年2月15日(2019.2.15)
 (86)国際出願番号 PCT/JP2019/005524
 (87)国際公開番号 WO2019/160077
 (87)国際公開日 令和1年8月22日(2019.8.22)
 審査請求日 令和3年8月19日(2021.8.19)
 (31)優先権主張番号 特願2018-26421(P2018-26421)
 (32)優先日 平成30年2月16日(2018.2.16)
 (33)優先権主張国・地域又は機関
 日本国(JP)
 (出願人による申告)平成29年度、国立研究開発法人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 i P S 細胞研究中核拠点事業、「再生医療用 i P S 細胞ストック開発拠点」に係る委託業務、産業技術力強化法第19条の適用を受ける特許出願
 最終頁に続く

(73)特許権者 504132272
 国立大学法人京都大学
 京都府京都市左京区吉田本町36番地1
 (74)代理人 100165179
 弁理士 田▲崎▼ 聡
 (74)代理人 100188558
 弁理士 飯田 雅人
 (74)代理人 100175824
 弁理士 小林 淳一
 (74)代理人 100152272
 弁理士 川越 雄一郎
 (74)代理人 100181722
 弁理士 春田 洋孝
 (72)発明者 堀田 秋津
 京都府京都市左京区吉田本町36番地1
 最終頁に続く

(54)【発明の名称】 低抗原性細胞の製造方法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

H L A - A タンパク質及び H L A - B タンパク質を発現せず、少なくとも1種の H L A - C タンパク質を発現する細胞であって、前記 H L A - C タンパク質が、H L A - C * 0 1 : 0 2 アレル、H L A - C * 0 2 : 0 2 アレル、H L A - C * 0 3 : 0 3 アレル、H L A - C * 0 3 : 0 4 アレル、H L A - C * 0 4 : 0 1 アレル、H L A - C * 0 5 : 0 1 アレル、H L A - C * 0 6 : 0 2 アレル、H L A - C * 0 7 : 0 1 アレル、H L A - C * 0 7 : 0 2 アレル、H L A - C * 0 8 : 0 1 アレル、H L A - C * 1 2 : 0 2 アレル及び H L A - C * 1 6 : 0 1 アレルからなる群より選択される1種のアレルにコードされるタンパク質である、細胞。

【請求項2】

H L A - A アレル、H L A - B アレル、及び H L A - C アレルのうち少なくとも1種の H L A アレルがホモである、請求項1に記載の細胞。

【請求項3】

多能性幹細胞である、請求項1又は2に記載の細胞。

【請求項4】

C l a s s I I M a j o r H i s t o c o m p a t i b i l i t y C o m p l e x T r a n s a c t i v a t o r (C I I T A) アレル、R e g u l a t o r y F a c t o r X 5 (R F X 5) アレル、R e g u l a t o r y F a c t o r X A s s o c i a t e d P r o t e i n (R F X A P) アレル及び R e g u l a t o r y F a c t o

r X Associated Ankyrin Containing Protein (RFXANK) アレルのうち少なくとも1つのアレルが更に破壊又は改変されている、請求項1～3のいずれか一項に記載の細胞。

【請求項5】

ドナー細胞のHLA-Aアレル及びHLA-Bアレルをゲノム編集により破壊する工程を含む、請求項1～4のいずれか一項に記載の細胞の製造方法。

【請求項6】

前記ゲノム編集が、前記ドナー細胞に配列特異的DNA切断酵素を導入して行われる、請求項5に記載の製造方法。

【請求項7】

前記配列特異的DNA切断酵素がCRISPR-Casであり、前記ゲノム編集が、前記ドナー細胞にgRNA及びCRISPR-Casを導入して行われる、請求項6に記載の製造方法。

【請求項8】

前記ドナー細胞が多能性幹細胞である、請求項5～7のいずれか一項に記載の製造方法。

【請求項9】

前記gRNAが、

全HLAハプロタイプのゲノムDNAの塩基配列データに対してマッピングした場合に1つの標的とするHLAハプロタイプにしかマッピングされず、HLAアレル以外の全ゲノムDNAの塩基配列データに対してマッピングした場合にマッピングされない塩基配列を、標的塩基配列とするgRNAであって、前記標的塩基配列が、配列番号3、4、7、45～52のいずれかに記載の塩基配列、若しくは、配列番号3、4、7、45～52のいずれかに記載の塩基配列の5'末端において、1若しくは数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列からなるgRNAであるか、又は、

全HLAハプロタイプのゲノムDNAの塩基配列データに対してマッピングした場合に2つ以上の標的とするHLAハプロタイプにマッピングされ、HLAアレル以外の全ゲノムDNAの塩基配列データに対してマッピングした場合にマッピングされない塩基配列を、標的塩基配列とするgRNAであって、前記標的塩基配列が、配列番号53～55のいずれかに記載の塩基配列、若しくは、配列番号53～55のいずれかに記載の塩基配列の5'末端において、1若しくは数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列からなるgRNAである、請求項7に記載の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、低抗原性細胞の製造方法に関する。より具体的には、低抗原性細胞の製造方法、低抗原性細胞の検出用キット、細胞、gRNA、及び標的塩基配列の特定方法に関する。本願は、2018年2月16日に、日本に出願された特願2018-026421号に基づき優先権を主張し、その内容をここに援用する。

【背景技術】

【0002】

ドナーの細胞を他人であるレシピエント（患者）に移植する他家移植の場合、免疫反応により移植細胞が拒絶されてしまう。

【0003】

細胞の自己と非自己を見分けるために最も重要な役割を果たしているのがHLA（Human Leukocyte Antigen、ヒト白血球抗原）又は主要組織適合遺伝子複合体（Major histocompatibility complex、MHC）と呼ばれる細胞表面タンパク質である。

【0004】

HLAはクラスIとクラスIIに分類されている。クラスIのHLAタンパク質は体内のほとんどの種類の細胞で発現している。クラスIのHLAタンパク質はβ2-Micro

10

20

30

40

50

oglobulin (B2M) とヘテロダイマーを形成して細胞表面へ発現し、CD8 陽性細胞傷害性T細胞に対してペプチドを提示し活性化を誘導する機能を担っている。提示する抗原ペプチドは内因性のものであり、8～10アミノ酸の長さを持つものが多い。

【0005】

HLAクラスIに分類されるのは、HLA-A遺伝子、HLA-B遺伝子、HLA-C遺伝子、HLA-E遺伝子、HLA-F遺伝子、HLA-G遺伝子の主に6つの遺伝子である。この他に、多数の偽遺伝子(HLA-H、HLA-J、HLA-K、HLA-L、HLA-P、HLA-T、HLA-U、HLA-V、HLA-W、HLA-X、HLA-Y等)も知られている。これらの中で特に個人間での配列多様性が大きいのはHLA-A遺伝子、HLA-B遺伝子、HLA-C遺伝子の3つであり、移植免疫において自己と非自己を識別するのに主要な役割を果たしている。

10

【0006】

クラスIIのHLAタンパク質は、主に、マクロファージ、樹状細胞、活性化T細胞、B細胞等の免疫細胞で発現している。クラスIIのHLAタンパク質は、α鎖とβ鎖がヘテロダイマーを形成し、CD4ヘルパーT細胞に対してペプチドを提示し活性化を誘導する機能を担っている。提示する抗原ペプチドは外因性のものであり、15～24アミノ酸の長さを持つものが多い。

【0007】

HLAクラスIIに分類されるのは、HLA-DR(α鎖:HLA-DRA、β鎖:HLA-DRB)、HLA-DQ(α鎖:HLA-DQA1、β鎖:HLA-DQB1)、HLA-DP(α鎖:HLA-DPA1又はHLA-DPA2、β鎖:HLA-DPB1又はHLA-DPB2)である。この他に多数の偽遺伝子(HLA-DMA、HLA-DMB、HLA-DOA、HLA-DOB)が存在することも知られている。

20

【0008】

HLA遺伝子はその配列多様性によって、細胞レベルで自己と非自己の認識に関わっている。他家移植の際、HLAのマッチングは免疫拒絶を軽減するためにも非常に重要である。例えば、造血幹細胞移植において、HLA-A、HLA-B、HLA-C、HLA-DRの両アレル、すなわち合計8座のアレルにおける抗原性なるべく一致したドナーを見つけて出して移植することが推奨されている。

【0009】

また、腎臓移植等の生着率の成績を見ても、HLA抗原性の一致度が高い程、生着効率が有意に高いことが報告されている。

30

【0010】

一方で、細胞表面にHLA抗原が存在しないことによって誘導される免疫系も存在する。NK細胞は複数の抑制型受容体を発現している。例えば、HLA-Eを認識してNK細胞の働きを抑制するCD94とNKG2Aの複合受容体は、HLA-Eが存在しない細胞を見つけるとNK細胞の活性化を誘導し、攻撃することが知られている。また、KIR(Killer cell Immunoglobulin-like Receptor)と呼ばれる受容体ファミリーも存在し、細胞外ドメインの個数に応じて2Dと3Dに分類されるほか、細胞内ドメインの長さによって、L(ロング)とS(ショート)に分けられる。2DL1受容体はHLA-C2を、2DL2及び2DL3受容体はHLA-C1を、2DL4受容体はHLA-Gを、3DL1はHLA-Bw4を、3DL2はHLA-A3又はHLA-A11を認識してNK細胞の活性を抑制することが知られている。KIRには多型があり、例えば日本人のほぼすべて(98%以上)が2DL1、2DL3、3DL4を持つが、2DL2を持つのは15%程度と稀であると報告されている。

40

【0011】

ところで、iPS細胞やES細胞等の多能性幹細胞は、様々な細胞種へと分化可能な多能性を有することから、多能性幹細胞を各種細胞へと分化させたうえで患者に移植する、細胞治療や再生医療が注目されている。

【0012】

50

実際に、E S細胞から神経細胞へと分化させ、骨髄損傷患者に移植した例や、i P S細胞から網膜色素上皮細胞へと分化させ、加齢黄斑変性患者に移植した例等が報告されている。このような多能性幹細胞由来細胞を移植する際にも、移植する細胞と患者のH L A型を一致させることが重要であるとの報告がある。

【0013】

しかしながら、多能性幹細胞は樹立に多大のコストと時間が必要なため、H L A型が一致した細胞を患者ごとに用意することは困難であるという問題がある。この問題を解決する手段の一つとして、例えば、特許文献1には、クラスIのH L Aタンパク質の細胞表面提示に必要なB 2 M遺伝子を欠失させた細胞が記載されている。

【0014】

近年、C R I S P R - C a s 9及びガイドRNA (g R N A)を用いるゲノム編集技術により、g R N Aの標的塩基配列依存的にゲノムDNAに二本鎖DNA切断 (D o u b l e s t r a n d b r e a k、D S B)を誘導し、ゲノムDNAの一部を削除することや、二本鎖DNA切断誘導部位近辺と一部分相同配列を持つ鋳型DNAをC a s 9及びg R N Aと共導入することにより任意のDNA断片を挿入することが可能となった。

【0015】

しかしながら、ゲノム編集技術におけるD S B誘導は、標的配列に対して認識結合するg R N Aの20塩基程度のスペーサー塩基配列と3～5塩基程度のP A M配列と呼ばれる塩基配列によって決定される。このため、g R N Aの塩基配列が標的部位の塩基配列と一致しない限り、効率的なD S B誘導は困難である。

【0016】

また、標的部位の塩基配列とよく似た塩基配列、例えば1塩基だけ異なる塩基配列が、標的部位以外にも存在する場合、誤って標的部位以外の部位にもD S Bを誘導してしまい、望まないゲノム配列変異を誘導してしまうリスク、いわゆるオフターゲット変異リスクが知られている。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0017】

【文献】国際公開第2012/145384号

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0018】

特許文献1に記載された細胞は、B 2 M遺伝子を欠失しているため、クラスIのH L Aタンパク質が細胞表面に提示されない。このため、他家移植を行った場合の免疫反応が抑制されていると考えられる。しかしながら、H L Aタンパク質が細胞表面に提示されないと、細胞の抗原提示能力が失われてしまう。細胞が抗原提示能力を失うと、B 2 M欠損細胞がウイルス等の感染を受けた場合や腫瘍化した場合等に、ウイルスや腫瘍由来の抗原を提示できなくなり、結果的にウイルス及び腫瘍の増殖の手助けをしてしまう恐れがある。また、H L Aタンパク質が細胞表面に提示されていない細胞は、「m i s s i n g s e l f」を認識するN K細胞によって攻撃されてしまう。

【0019】

そこで、ゲノム編集技術を用いて任意のH L A遺伝子だけを選択的に破壊することが考えられる。しかしながら、H L A遺伝子は複数存在し、また多くの偽遺伝子を含め、お互いのH L A遺伝子の間で配列の相同性が高い。一方で、同じH L A遺伝子であっても、個人間での配列多様性が大きいため、あるH L A遺伝子配列にマッチする標的塩基配列を同定しても、それが別のドナー由来細胞でも使えるとは限らない。このため、ゲノム編集の適切な標的配列を決定することは容易ではない。また、従来のゲノム編集技術では、目的のゲノム編集がなされた細胞を探し出す手間が膨大であった。

【0020】

本発明は、レシピエントに他家移植した場合の拒絶反応が低減された低抗原性細胞を製

10

20

30

40

50

造する技術を提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0021】

本発明は以下の態様を含む。

[1] レシピエントに他家移植した場合の拒絶反応が低減された低抗原性細胞を、ドナー細胞から製造する製造方法であって、前記ドナー細胞及び前記レシピエントの Human Leukocyte Antigen (HLA) アレルをそれぞれ決定することと、前記レシピエントに存在せず前記ドナー細胞に存在する HLA アレルを特定することと、特定された前記 HLA アレルを破壊又は改変し、前記ドナー細胞に特異的な HLA タンパク質を発現しない細胞を含む細胞集団を得ることと、を含み、前記ドナー細胞に特異的な HLA タンパク質を発現しない細胞が前記低抗原性細胞である、製造方法。

10

[2] 前記ドナー細胞及び前記レシピエントの前記 HLA アレルをそれぞれ決定することにおいて決定される前記 HLA アレルが、HLA - A アレル、HLA - B アレル及び HLA - C アレルを含む、[1] に記載の製造方法。

[3] 前記ドナー細胞に特異的な HLA タンパク質を発現しない細胞を含む細胞集団を得ることの後に、前記細胞集団から前記ドナー細胞に特異的な HLA タンパク質を発現しない細胞を回収することを更に含み、前記回収することが、前記細胞集団に HLA タンパク質発現誘導剤を接触させることと、前記 HLA タンパク質発現誘導剤に接触した前記細胞集団における前記ドナー細胞に特異的な HLA タンパク質の発現を指標として、前記細胞集団から前記ドナー細胞に特異的な HLA タンパク質を発現しない細胞を回収することと、を含む、[1] 又は [2] に記載の製造方法。

20

[4] 前記 HLA タンパク質発現誘導剤が、インターフェロン (IFN) - γ 、IFN - α 、IFN - β 、インターロイキン (IL) - 4、Granulocyte Macrophage colony-stimulating Factor (GM-CSF)、Transforming growth factor (TGF) - α 又は TGF - β である、[3] に記載の製造方法。

[5] 前記低抗原性細胞が多能性幹細胞である、[1] ~ [4] のいずれかに記載の製造方法。

[6] HLA タンパク質発現誘導剤を含む、レシピエントに他家移植した場合の拒絶反応が低減された低抗原性細胞の検出用キット。

30

[7] 前記 HLA タンパク質発現誘導剤が、IFN - γ 、IFN - α 、IFN - β 、IL - 4、GM-CSF、TGF - α 又は TGF - β である、[6] に記載のキット。

[8] 前記低抗原性細胞が多能性幹細胞である、[6] 又は [7] に記載のキット。

[9] IFN - γ 、IFN - α 、IFN - β 、IL - 4、GM-CSF、TGF - α 又は TGF - β からなる HLA タンパク質発現誘導剤。

[10] 少なくとも 1 つの HLA アレルが破壊又は改変され、少なくとも 1 種の HLA タンパク質を発現可能な細胞。

[11] 前記 HLA アレルが、HLA - A アレル、HLA - B アレル又は HLA - C アレルを含む、[10] に記載の細胞。

[12] レシピエントに他家移植した場合の拒絶反応が低減された低抗原性細胞であり、破壊又は改変された前記 HLA アレルが、前記レシピエントに存在しない HLA アレルである、[10] 又は [11] に記載の細胞。

40

[13] 多能性幹細胞である、[10] ~ [12] のいずれかに記載の細胞。

[14] Class II Major Histocompatibility Complex Transactivator (CIITA) アレル、Regulatory Factor X5 (RFX5) アレル、Regulatory Factor X Associated Protein (RFXAP) アレル及び Regulatory Factor X Associated Ankyrin Containing Protein (RFXANK) アレルのうち少なくとも 1 つのアレルが更に破壊又は改変されている、[10] ~ [13] のいずれかに記載の細胞。

50

[1 5] H L A - A アレル及び H L A - B アレルが破壊され、少なくとも 1 種の H L A - C タンパク質を発現可能な、[1 0] ~ [1 4] のいずれかに記載の細胞。

[1 6] 前記 H L A - C タンパク質が、H L A - C * 0 1 : 0 2 アレル、H L A - C * 0 2 : 0 2 アレル、H L A - C * 0 3 : 0 3 アレル、H L A - C * 0 3 : 0 4 アレル、H L A - C * 0 4 : 0 1 アレル、H L A - C * 0 5 : 0 1 アレル、H L A - C * 0 6 : 0 2 アレル、H L A - C * 0 7 : 0 1 アレル、H L A - C * 0 7 : 0 2 アレル、H L A - C * 0 8 : 0 1 アレル、H L A - C * 1 2 : 0 2 アレル及び H L A - C * 1 6 : 0 1 アレルからなる群より選択される 1 種のアレルにコードされるタンパク質である、[1 5] に記載の細胞。

[1 7] レシピエントに他家移植した場合の拒絶反応が低減された低抗原性細胞を、ドナー細胞から製造する製造方法であって、前記ドナー細胞の C I I T A アレル、R F X 5 アレル、R F X A P アレル及び R F X A N K アレルのうち少なくとも 1 つ以上を含むアレルを破壊又は改変すること、を含み、前記 C I I T A アレル、R F X 5 アレル、R F X A P アレル又は R F X A N K アレルが破壊又は改変された細胞が前記低抗原性細胞である、製造方法。

10

[1 8] 前記低抗原性細胞が多能性幹細胞である、[1 7] に記載の細胞。

[1 9] C I I T A アレル、R F X 5 アレル、R F X A P アレル及び R F X A N K アレルのうち少なくとも 1 つ以上を含むアレルが破壊又は改変された細胞。

[2 0] 多能性幹細胞である、[1 9] に記載の細胞。

[2 1] 全 H L A ハプロタイプのゲノム DNA の塩基配列データに対してマッピングした場合に 1 つの標的とする H L A ハプロタイプにしかマッピングされず、H L A アレル以外の全ゲノム DNA の塩基配列データに対してマッピングした場合にマッピングされない塩基配列を、標的塩基配列とする g R N A 。

20

[2 2] 前記標的塩基配列が、配列番号 3、4、7、4 5 ~ 5 2、7 2 ~ 2 4 5 9 のいずれかに記載の塩基配列、又は配列番号 3、4、7、4 5 ~ 5 2、7 2 ~ 2 4 5 9 のいずれかに記載の塩基配列の 5 ' 末端において、1 若しくは数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列からなる、[2 1] に記載の g R N A 。

[2 3] 前記標的塩基配列が、配列番号 3、4、7、4 5 ~ 5 2 のいずれかに記載の塩基配列、又は配列番号 3、4、7、4 5 ~ 5 2 のいずれかに記載の塩基配列の 5 ' 末端において、1 若しくは数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列からなる、[2 1]

30

又は [2 2] に記載の g R N A 。

[2 4] 前記標的塩基配列が、H L A 遺伝子のエクソン 2 又は 3 にマッピングされる、[2 1] ~ [2 3] のいずれかに記載の g R N A 。

[2 5] 全 H L A ハプロタイプのゲノム DNA の塩基配列データに対してマッピングした場合に 2 つ以上の標的とする H L A ハプロタイプにマッピングされ、H L A アレル以外の全ゲノム DNA の塩基配列データに対してマッピングした場合にマッピングされない塩基配列を、標的塩基配列とする g R N A 。

[2 6] 前記標的塩基配列が、配列番号 5 3 ~ 5 5、2 4 6 0 ~ 8 0 1 3 のいずれかに記載の塩基配列、又は配列番号 5 3 ~ 5 5、2 4 6 0 ~ 8 0 1 3 のいずれかに記載の塩基配列の 5 ' 末端において、1 若しくは数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列からなる、[2 5] に記載の g R N A 。

40

[2 7] 前記標的塩基配列が、配列番号 5 3 ~ 5 5 のいずれかに記載の塩基配列、又は配列番号 5 3 ~ 5 5 のいずれかに記載の塩基配列の 5 ' 末端において、1 若しくは数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列からなる、[2 5] 又は [2 6] に記載の g R N A 。

[2 8] 前記標的塩基配列が、H L A 遺伝子のエクソン 2 又は 3 にマッピングされる、[2 5] ~ [2 7] のいずれかに記載の g R N A 。

[2 9] レシピエントに他家移植した場合の拒絶反応が低減された低抗原性細胞をゲノム編集により製造するための標的塩基配列の特定方法であって、全 H L A ハプロタイプのゲノム DNA の塩基配列データに対して、候補塩基配列をマッピングすることと、H L A ア

50

レル以外の全ゲノムDNAの塩基配列データに対して、前記候補塩基配列をマッピングすることと、全HLAハプロタイプのゲノムDNAの塩基配列データに対してマッピングした場合に1つの標的とするHLAハプロタイプにしかマッピングされず、HLAアレル以外の全ゲノムDNAの塩基配列データに対してマッピングした場合にマッピングされない前記候補塩基配列を、標的塩基配列として特定することと、を含む、方法。

【30】レシピエントに他家移植した場合の拒絶反応が低減された低抗原性細胞をゲノム編集により製造するための標的塩基配列の特定方法であって、全HLAハプロタイプのゲノムDNAの塩基配列データに対して、候補塩基配列をマッピングすることと、HLAアレル以外の全ゲノムDNAの塩基配列データに対して、前記候補塩基配列をマッピングすることと、全HLAハプロタイプのゲノムDNAの塩基配列データに対してマッピングした場合に2つ以上の標的とするHLAハプロタイプにマッピングされ、HLAアレル以外の全ゲノムDNAの塩基配列データに対してマッピングした場合にマッピングされない前記候補塩基配列を、標的塩基配列として特定することと、を含む、方法。

10

【発明の効果】

【0022】

本発明によれば、レシピエントに他家移植した場合の拒絶反応が低減された低抗原性細胞を製造する技術を提供することができる。

【図面の簡単な説明】

【0023】

【図1】(a)は、実験例1で抽出したsgRNAが標的とするHLAアレルをベン図で示したものである。(b)は、実験例1で同定したsgRNAが、HLA-Aアレル、HLA-Bアレル、HLA-Cアレルのどの場所を標的としているかを示した図である。

20

【図2】実験例2におけるフローサイトメトリーの結果を示すグラフである。

【図3】実験例3におけるフローサイトメトリーの結果を示すグラフである。

【図4】(a)は、実験例4におけるフローサイトメトリーの結果を示すグラフである。(b)は、実験例4における、iPS細胞のIFN- γ 処理とHLA-Aタンパク質の発現量の解析のスケジュールを示す図である。

【図5】(a)は、実験例6におけるsgRNAの標的部位及び標的塩基を示す図である。(b)は、実験例6におけるT7エンドヌクレアーゼIアッセイの結果を示す写真である。

30

【図6】(a)及び(b)は、実験例7におけるフローサイトメトリーの結果を示すグラフである。

【図7】実験例7における各クローンの塩基配列変異の割合を示すグラフである。

【図8】(a)及び(b)は、実験例8におけるフローサイトメトリーの結果を示すグラフである。

【図9】(a)及び(b)は、実験例8におけるフローサイトメトリーの結果を示すグラフである。

【図10】(a)は、実験例8において回収した各クローンの塩基変異パターンを示す図である。(b)は、実験例8において回収した代表例なクローンの塩基配列である。

【図11】実験例9におけるフローサイトメトリーの結果を示すグラフである。

40

【図12】(a)は、実験例9において回収した各クローンの塩基変異パターンを示す図である。(b)は、実験例9において回収した代表例なクローンの塩基配列である。

【図13】(a)及び(b)は、実験例10において回収した各クローンの塩基変異パターンを示す図である。(c)は、実験例10において回収した代表例なクローンの塩基配列である。

【図14】(a)は、実験例11において回収した各クローンの塩基変異パターンを示す図である。(b)は、実験例11において回収した代表例なクローンの塩基配列である。

【図15】(a)は、実験例11におけるフローサイトメトリーの結果を示すグラフである。(b)は、実験例11において回収した各クローンの塩基変異パターンを示す図である。(c)は、実験例11において回収した代表例なクローンの塩基配列である。

50

【図 16】(a) は、実験例 12 における s g R N A の標的部位を示す図である。(b) 及び(c) は、実験例 12 におけるフローサイトメトリーの結果を示すグラフである。

【図 17】(a) は、実験例 12 において回収したクローンの塩基変異パターンを示す図である。(b) は、実験例 12 において回収したクローンの塩基配列である。

【図 18】(a) は、実験例 13 におけるフローサイトメトリーの結果を示すグラフである。(b) 及び(d) は、実験例 13 において回収した各クローンの塩基変異パターンを示す図である。(c) 及び(e) は、実験例 13 において回収した代表例なクローンの塩基配列である。

【図 19】(a) 及び(b) は、実験例 14 におけるフローサイトメトリーの結果を示すグラフである。(c) は、実験例 14 において回収した各クローンの塩基変異パターンを示す図である。(d) は、実験例 14 において回収した代表例なクローンの塩基配列である。

10

【図 20】(a) は、実験例 15 における s g R N A の標的部位を示す図である。(b) 及び(c) は、実験例 15 におけるフローサイトメトリーの結果を示すグラフである。

【図 21】(a) 及び(b) は、実験例 16 における相同組換えを説明する模式図である。(c) は、実験例 15 におけるフローサイトメトリーの結果を示すグラフである。

【図 22】(a) 及び(b) は、実験例 16 における塩基配列の解析結果を示す図である。

【図 23】(a) 及び(b) は、実験例 17 におけるフローサイトメトリーの結果を示すグラフである。(c) は、実験例 17 における塩基配列の解析結果を示す図である。

【図 24】(a) は、実験例 18 におけるフローサイトメトリーの結果を示すグラフである。(b) は、実験例 18 における塩基配列の解析結果を示す図である。

20

【図 25】(a) ~ (e) は、実験例 19 におけるフローサイトメトリーの結果を示すグラフである。

【図 26】(a) ~ (f) は、実験例 20 におけるフローサイトメトリーの結果を示すグラフである。

【図 27】(a) ~ (e) は、実験例 21 におけるフローサイトメトリーの結果を示すグラフである。

【図 28】実験例 22 の手順を示す模式図である。

【図 29】(a) ~ (e) は、実験例 22 におけるフローサイトメトリーの結果を示すグラフである。

30

【図 30】実験例 23 の手順を示す模式図である。

【図 31】実験例 23 の結果を示すグラフである。

【図 32】実験例 24 の結果を示すグラフである。

【図 33】実験例 25 の結果を示すグラフである。

【図 34】(a) 及び(b) は実験例 26 におけるフローサイトメトリーの結果を示すグラフである。(c) は、実験例 26 の結果を示すグラフである。

【図 35】(a) ~ (g) は、実験例 27 におけるフローサイトメトリーの結果を示すグラフである。

【図 36】実験例 28 の結果を示すグラフである。

【図 37】(a) ~ (f) は、実験例 29 の結果を示す位相差顕微鏡写真である。

40

【図 38】(a) ~ (f) は、実験例 30 の結果を示す位相差顕微鏡写真である。

【図 39】(a) 及び(b) は、実験例 31 におけるフローサイトメトリーの結果を示すグラフである。(c) は、実験例 31 の結果を示すグラフである。

【図 40】(a) 及び(b) は、実験例 32 におけるフローサイトメトリーの結果を示すグラフである。(c) は、実験例 32 の結果を示すグラフである。

【図 41】(a) は、実験例 33 における実験スケジュールを説明した図である。(b) は、実験例 33 において E B 由来血球様細胞の蛍光を撮影した結果を示す写真である。(c) は、実験例 33 における E B 由来血球様細胞の生存率を示すグラフである。

【図 42】(a) は、実験例 34 におけるフローサイトメトリー解析の結果を示すグラフである。(b) は、実験例 34 の結果を示すグラフである。

50

【図 4 3】(a) は、実験例 3 5 におけるフローサイトメトリー解析の結果を示すグラフである。(b) は、実験例 3 5 の結果を示すグラフである。

【図 4 4】(a) 及び (b) は、実験例 3 6 におけるフローサイトメトリー解析の結果を示すグラフである。

【図 4 5】(a) は、実験例 3 7 における実験スケジュールを説明した図である。(b) は、実験例 3 7 において E B 由来血球様細胞の蛍光を撮影した結果を示す写真である。(c) は、実験例 3 7 における E B 由来血球様細胞の相対的生存率を示すグラフである。

【図 4 6】実験例 3 8 の結果を示すグラフである。

【図 4 7】(a) は、実験例 3 9 で使用した 5 8 5 A 1 - C 7 残存細胞の H L A ハプロタイプ、及び、実験例 3 9 で作製した、C I I T A 遺伝子をノックアウトした 5 8 5 A 1 - C 7 残存細胞の H L A ハプロタイプを示す表である。(b) は、実験例 3 9 で得られた各クローンの塩基変異パターンを示す図である。(c) は、実験例 3 9 で得られた代表例なクローンの塩基配列である。

10

【図 4 8】(a) ~ (d) は、実験例 4 0 におけるフローサイトメトリーの結果を示すグラフである。

【図 4 9】(a) ~ (c) は、実験例 4 1 におけるフローサイトメトリーの結果を示すグラフである。

【図 5 0】(a) ~ (c) は、実験例 4 2 の手順を説明する図である。

【図 5 1】(a) は実験例 4 2 におけるフローサイトメトリーの結果を示すグラフである。(b) は、実験例 4 2 で得られた各サブクローンの塩基変異パターンを示す図である。

20

【図 5 2】(a) 及び (b) は、実験例 4 2 で得られた各サブクローンの塩基変異パターンを示す図である。

【図 5 3】様々な人種における H L C - C アレルのアレル頻度を示す表である。

【図 5 4】実験例 4 3 で得られた各サブクローンの塩基変異パターンを示す図である。

【図 5 5】実験例 4 4 で得られた各サブクローンの塩基変異パターンを示す図である。

【図 5 6】(a) 及び (b) は、実験例 4 5 におけるフローサイトメトリーの結果を示すグラフである。

【図 5 7】実験例 4 6 におけるフローサイトメトリーの結果を示すグラフである。

【図 5 8】実験例 4 7 で得られた各サブクローンの塩基変異パターンを示す図である。

【図 5 9】実験例 4 8 で得られた各サブクローンの塩基変異パターンを示す図である。

30

【図 6 0】実験例 4 9 で得られた各サブクローンの塩基変異パターンを示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0024】

[拒絶反応が低減された低抗原性細胞の製造方法]

(第 1 実施形態)

第 1 実施形態の製造方法は、レシピエントに他家移植した場合の拒絶反応が低減された低抗原性細胞を、ドナー細胞から製造する製造方法であって、(a) 前記ドナー細胞及び前記レシピエントの H L A アレルをそれぞれ決定することと、(b) 前記レシピエントに存在せず前記ドナー細胞に存在する H L A アレルを特定することと、(c) 特定された前記 H L A アレルを破壊又は改変し、前記ドナー細胞に特異的な H L A タンパク質を発現しない細胞を含む細胞集団を得ることと、を含み、前記ドナー細胞に特異的な H L A タンパク質を発現しない細胞が前記低抗原性細胞である、製造方法である。

40

【0025】

実施例において後述するように、第 1 実施形態の製造方法によれば、レシピエントに他家移植した場合の拒絶反応(移植片対宿主病)が低減された低抗原性細胞を製造することができる。また、実施例において後述するように、第 1 実施形態の製造方法によって製造した低抗原性細胞は、レシピエントに他家移植した場合においても、レシピエントの N K 細胞によって攻撃されにくい。

【0026】

本明細書において、H L A 遺伝子座を「H L A アレル」といい、細胞表面に提示された

50

H L A タンパク質の抗原多様性を「H L A 型」という場合がある。以下、各工程について説明する。

【 0 0 2 7 】

(工 程 (a))

本工程において、ドナー細胞及びレシピエントのH L A アレルをそれぞれ決定する。ドナー細胞は、ヒト細胞であってもよく、非ヒト動物細胞であってもよい。また、ドナー細胞は多能性幹細胞であってもよいし、分化した細胞であってもよい。本明細書において、多能性幹細胞は、胚性幹細胞 (E S 細胞)、人工多能性幹細胞 (i P S 細胞) 等を意味する。

【 0 0 2 8 】

また、第 1 実施形態の製造方法により製造される低抗原性細胞は、ドナー細胞のH L A アレルを破壊又は改変した細胞である。したがって、低抗原性細胞はドナー細胞と同様の多能性幹細胞であってもよいし、分化した細胞であってもよい。

【 0 0 2 9 】

また、レシピエントは、低抗原性細胞と同種の動物であることが好ましい。レシピエントは、実際に移植が予定された患者であってもよいし、将来レシピエントとなりうる仮想的なH L A アレルを有するレシピエントであってもよい。

【 0 0 3 0 】

H L A アレルの決定は、P C R - r S S O 法 (P C R - r e v e r s e S e q u e n c e S p e c i f i c O l i g o n u c l o t i d e)、P C R - S S P (S e q u e n c e s p e c i f i c p r i m e r) 法、P C R - S B T (S e q u e n c e b a s e d t y p i n g) 法、次世代シーケンス法等の従来行われている方法により行うことができ、市販のH L A タイピングキット等を用いて行うことができる。また、全ゲノムシーケンス (W G S)、エクソームシーケンス (W E S)、R N A - s e q 等の次世代シーケンサーのシーケンスデータからH L A タイピングを行うソフトウェアとして、H L A r e p o r t e r、H L A - P R G、h l a - g e n o t y p e r、P H L A T、O p t i t y p e、n e X t t y p e、A t h l a t e s、H L A f o r e s t、S O A P - H L A、H L A m i n e r、s e q 2 H L A、G A T K H L A C a l l e r 等が知られている。

【 0 0 3 1 】

本工程において決定されるH L A アレルは、細胞移植を行った場合の拒絶反応に関連性が高いH L A アレルであることが好ましく、H L A - A アレル、H L A - B アレル及びH L A - C アレルを含むことが好ましい。

【 0 0 3 2 】

本工程において決定されるH L A アレルは、更にH L A - D R アレル、H L A - D Q アレル、H L A - D P アレルを含んでいてもよく、更に他のH L A アレルを含んでいてもよい。

【 0 0 3 3 】

(工 程 (b))

本工程において、レシピエントに存在せずドナー細胞に存在するH L A アレル (以下、「ドナー特異的H L A アレル」という場合がある。) を特定する。ドナー特異的H L A アレルは、ドナー細胞のH L A アレル及びレシピエントのH L A アレルを比較することにより特定することができる。

【 0 0 3 4 】

H L A アレルはゲノムD N A 上にコードされた塩基配列であり、H L A タンパク質をコードしている。H L A タンパク質の血清学的な分類をH L A 抗原型という。H L A 抗原型の特定方法としては、特定のH L A 抗原型を認識する血清や抗体との反応性を解析する方法や、H L A アレルのD N A 又はH L A アレルから転写されたR N A の塩基配列を、既存の対応表やI P D - I M G T データベース (<https://www.ebi.ac.uk/ipd/imgt/hla/>) 等と照合する方法等が挙げられる。

10

20

30

40

50

【 0 0 3 5 】

H L A 抗原型とは、一般的には H L A アレル表記 (<http://hla.alleles.org/nomenclature/naming.html>) の第 1 区域 (2 桁表記) の違いを指す場合もあるが、本明細書では、血清学的には同じ H L A 抗原型であってもアミノ酸配列が異なる場合 (非同義置換) には異なる H L A アレルであると判断する。

【 0 0 3 6 】

具体的には、H L A アレル表記の第 1 区域及び第 2 区域 (4 桁表記) の違いから同一の H L A アレルであるか、異なる H L A アレルであるかを判断する。そして、H L A アレル表記の第 1 区域及び第 2 区域が一致した H L A アレルは同一の H L A アレルであると判断する。また、ゲノム編集の標的配列を決定する場合等、ゲノムの塩基配列を区別する必要がある場合には、第 3 区域 (アミノ酸変異を伴わない翻訳領域内部の塩基置換) や第 4 区域 (翻訳領域外での塩基置換) の違いも考慮する場合がある。

10

【 0 0 3 7 】

(工程 (c))

レシピエントに存在しない H L A 抗原型の H L A タンパク質を有する細胞をレシピエントに他家移植すると、拒絶反応が生じて移植した細胞が拒絶されてしまう。そこで、本工程において、ドナー特異的 H L A アレルを破壊又は改変し、前記ドナー細胞に特異的な H L A タンパク質 (以下、「ドナー特異的 H L A タンパク質」という場合がある。) を発現しない細胞を含む細胞集団を得る。

【 0 0 3 8 】

ここで、ドナー特異的 H L A タンパク質を発現しない細胞とは、ドナー細胞の H L A アレルの破壊によって特定の H L A タンパク質の発現が陰性となった細胞、又はドナー細胞の H L A アレルの改変によって特定の H L A 型から別の H L A 型へと変化した細胞である。

20

【 0 0 3 9 】

本工程により得られた、ドナー特異的 H L A タンパク質を発現しない細胞が低抗原性細胞である。なお、ドナー特異的 H L A タンパク質が存在しない場合には、本工程は不要である。

【 0 0 4 0 】

第 1 実施形態の製造方法により製造される低抗原性細胞は、B 2 M 遺伝子が破壊されていないことが好ましい。これにより、クラス I の H L A タンパク質が細胞表面に提示され、低抗原性細胞をレシピエントに他家移植した場合においても、レシピエントの N K 細胞によって攻撃されにくくなる。また、一部の H L A が破壊されただけであり、残りの H L A が抗原提示能力を保持しているため、当該細胞がウイルス感染した場合や腫瘍化した場合であっても、抗原提示能力を維持することが可能である。

30

【 0 0 4 1 】

《ゲノム編集》

実施例において後述するように、ドナー細胞の H L A アレルの破壊又は改変は、例えばゲノム編集により行うことができる。H L A アレルの破壊は、H L A アレルを特異的に切断して二本鎖 DNA 切断 (D S B) を誘導することにより行うことができる。D S B の修復過程で塩基が欠失又は付加されてフレームシフト変異が生じた場合、H L A アレルが破壊されて、H L A タンパク質が発現しなくなる。本明細書において、H L A アレルの破壊を H L A アレルのノックアウトという場合がある。

40

【 0 0 4 2 】

また、ドナー DNA の存在下で H L A アレルを特異的に切断して D S B を誘導することにより、D S B の修復過程で相同組換えを誘導し、H L A アレルを改変することができる。具体的には、例えば、実施例において後述するように、H L A - A * 0 2 : 0 7 アレルを H L A - A * 0 1 : 0 1 アレルに改変すること等が可能である。

【 0 0 4 3 】

ドナー DNA としては、ゲノム DNA の二本鎖 DNA 切断の位置の前後を含む領域と配列同一性を有し、且つ所望の H L A アレルをコードするものを使用するとよい。ドナー D

50

N A は、一本鎖 D N A でもよいし、二本鎖 D N A でもよい。また、ドナー D N A は、単一の塩基配列を有する D N A であってもよいし、複数の塩基配列を有する D N A の混合物であってもよい。

【 0 0 4 4 】

ここで、配列同一性を有するとは、ドナー D N A と標的となるゲノム D N A の二本鎖切断の位置を含む領域との間で 9 0 % 以上の塩基配列が一致することを意味する。ドナー D N A は、ゲノム D N A の二本鎖切断の位置を含む領域と 9 5 % 以上の塩基配列が一致することが好ましく、9 9 % 以上の塩基配列が一致することがより好ましい。

【 0 0 4 5 】

ドナー D N A は、5 0 ~ 5 , 0 0 0 塩基程度の一本鎖 D N A であってもよいし、5 0 ~ 5 , 0 0 0 塩基対程度の二本鎖 D N A であってもよい。ドナー D N A が一本鎖 D N A である場合、ドナー D N A は、ゲノム D N A の二本鎖のうちのいずれの鎖と配列同一性を有していてもよい。

10

【 0 0 4 6 】

《配列特異的 D N A 切断酵素》

一般的に、D S B を誘導してゲノム編集を行うために利用する配列特異的 D N A 切断酵素は、R N A 誘導型ヌクレアーゼと人工ヌクレアーゼに大別される。配列特異的 D N A 切断酵素は R N A 誘導型ヌクレアーゼであってもよく、人工ヌクレアーゼであってもよい。

【 0 0 4 7 】

配列特異的 D N A 切断酵素は、ゲノム D N A を標的配列特異的に切断して二本鎖切断を形成するものであれば特に制限されない。配列特異的 D N A 切断酵素が認識する標的配列の長さは、例えば、1 0 ~ 6 0 塩基程度であってもよい。

20

【 0 0 4 8 】

また、配列特異的 D N A 切断酵素は、例えばニッカーゼを複数組み合わせさせて D N A を切断する態様であってもよい。ここで、ニッカーゼとは、二本鎖 D N A のうちの一本鎖にニックを形成する酵素を意味する。例えば、ゲノム D N A 上の近接した位置において、二本鎖 D N A の双方の鎖にニックを形成することにより、二本鎖切断を形成することができる。

【 0 0 4 9 】

R N A 誘導型ヌクレアーゼとは、ガイドとなる短鎖 R N A が標的配列に結合し、2 つの D N A 切断ドメイン (ヌクレアーゼドメイン) を有するヌクレアーゼをリクルートして配列特異的な切断を誘導する酵素である。R N A 誘導型ヌクレアーゼとしては、C R I S P R - C a s ファミリータンパク質が挙げられる。C R I S P R - C a s ファミリータンパク質は大きくクラス 1 とクラス 2 に分類されており、クラス 1 の中にはタイプ I 、タイプ I I I 及びタイプ I V が含まれ、クラス 2 の中にはタイプ I I 、タイプ V 及びタイプ V I が含まれる。

30

【 0 0 5 0 】

C R I S P R - C a s ファミリータンパク質としては、例えば、C a s 9 、C p f 1 、C a s X 、C a s Y 、C a s 1 2 、C a s 1 3 、C 2 C 2 等が挙げられる。R N A 誘導型ヌクレアーゼは、C R I S P R - C a s ファミリータンパク質のホモログであってもよく、C R I S P R - C a s ファミリータンパク質が改変されたものであってもよい。例えば、2 つ存在する野生型のヌクレアーゼドメインの一方を不活性型に改変したニッカーゼ改変型のヌクレアーゼであってもよい。あるいは、標的の特異性の向上した C a s 9 - H F や H i F i - C a s 9 、e C a s 9 等であってもよい。

40

【 0 0 5 1 】

C a s 9 は、例えば、化膿性レンサ球菌、黄色ブドウ球菌、ストレプトコッカス・サーモフィルス、ゲオバチルス・ステアロサーモフィルス等に由来するものが挙げられる。C p f 1 としては、例えば、アシダミノコッカス、ラクノスピラ、クラミドモナス、フランシセラ・ノビサイダ等に由来するものが挙げられる。

【 0 0 5 2 】

人工ヌクレアーゼは、標的配列に特異的に結合するように設計・作製された D N A 結合

50

ドメインと、ヌクレアーゼドメイン（制限酵素であるFokIのDNA切断ドメイン等）とを有する人工制限酵素である。人工ヌクレアーゼとしては、Zinc finger nuclease (ZFN)、Transcription activator-like effector nuclease (TALEN)、メガヌクレアーゼ等が挙げられるがこれらに限定されない。

【0053】

《配列特異的DNA切断酵素の導入》

ドナー細胞に導入する配列特異的DNA切断酵素として、例えば、CRISPR-Casを用いる場合、標的塩基配列はgRNAによって決定される。gRNAの詳細については後述する。gRNAは、RNAの形態でドナー細胞に導入してもよいし、発現ベクター

10

【0054】

gRNAをRNAの形態で調製する方法としては、gRNAをコードする核酸断片の上流にT7等のプロモーターを付加したコンストラクトを作製して試験管内転写反応で合成する方法、化学合成する方法等が挙げられる。gRNAを化学合成する場合、化学修飾されたRNAを用いてもよい。

【0055】

発現ベクターとしては、H1プロモーター又はU6プロモーター等のPol IIIプロモーターからgRNAを転写するプラスミドベクターやウイルスベクターが挙げられる。発現ベクターを用いてgRNAを発現させる場合には、gRNAを恒常的に発現させてもよいし、発現誘導型プロモーターの制御下で発現させてもよい。

20

【0056】

続いて、Cas9を用意する。Cas9は、Pol IIIプロモーターから発現する発現ベクターの形態でドナー細胞に導入してもよいし、精製タンパク質の形態でドナー細胞に導入してもよい。発現ベクターとしては、トランスポゾンベクター、ウイルスベクター、エピソードベクター、プラスミドベクター等が挙げられる。

【0057】

gRNA及びCas9のドナー細胞への導入は、gRNA及びCas9がウイルスベクターの形態である場合にはドナー細胞の培地に添加するだけよい。ウイルスベクターとしては、例えば、アデノ随伴ウイルスベクター、アデノウイルスベクター、レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクター、センダイウイルスベクター、バキュロウイルスベクター等が挙げられる。

30

【0058】

gRNA及びCas9が、トランスポゾンベクター、エピソードベクター、プラスミドベクター等である場合や、gRNAがRNAであり、Cas9が精製タンパク質である場合には、トランスフェクション試薬やエレクトロポレーション法によりドナー細胞に導入すればよい。

【0059】

トランスフェクション試薬としては、例えば、Lipofectamine 2000、Lipofectamine 3000、CRISPRMAX、RNAMAX（いずれもサーモフィッシャーサイエンティフィック社）、FuGENE 6、FuGENE HD（いずれもプロメガ社）等を利用することができる。

40

【0060】

また、エレクトロポレーション法は、NEPA 21（ネッパジーン株式会社）、Neon（サーモフィッシャーサイエンティフィック社）、4D-Nucleofector（ロンザ社）等の機器を利用して行うことができる。

【0061】

（工程（d））

工程（c）において、ドナー特異的HLAタンパク質を発現しない、低抗原性細胞を含む細胞集団を得ることができる。しかしながら、工程（c）で得られる細胞集団は、目的

50

とする H L A アレルの破壊又は改変が行われた細胞（低抗原性細胞）以外にも、H L A アレルの破壊又は改変が行われなかった細胞、H L A アレルの破壊又は改変が不完全に行われた細胞等を含んでいる場合がある。そこで、工程（c）の後に、ドナー特異的 H L A タンパク質を発現しない細胞（低抗原性細胞）を回収する工程（d）を更に実施してもよい。
【0062】

工程（d）は、低抗原性細胞を含む細胞集団に H L A タンパク質の発現誘導剤（H L A タンパク質発現誘導剤）を接触させる工程と、前記 H L A タンパク質発現誘導剤に接触した前記細胞集団における前記ドナー特異的 H L A タンパク質の発現を指標として、前記細胞集団から前記ドナー特異的 H L A タンパク質を発現しない細胞を回収する工程とを含む。細胞集団に H L A タンパク質発現誘導剤を接触させる工程は、例えば細胞集団の培地に H L A タンパク質発現誘導剤を添加すること等により行うことができる。

10

【0063】

本工程において、ドナー特異的 H L A タンパク質の発現を指標として前記細胞集団からドナー特異的 H L A タンパク質を発現しない細胞を回収するとは、発現した H L A タンパク質の存在を検出し、その存在又は不存在に基づいてドナー特異的 H L A タンパク質を発現しない細胞を回収することであってよい。

【0064】

H L A タンパク質発現誘導剤としては、I F N - γ 、I F N - α 、I F N - β 、I L - 4、G M - C S F、T G F - α 、T G F - β 等のサイトカインが挙げられる。これらの発現誘導剤は、1種を単独で使用してもよいし、2種以上を混合して使用してもよい。

20

【0065】

上記のサイトカインは、ヒト細胞へ用いる場合にはヒト由来のサイトカインであることが好ましい。ヒト I F N - γ タンパク質の N C B I アクセス番号は N P__000610.2 等であり、ヒト I F N - α タンパク質の N C B I アクセス番号は N P__076918.1、N P__000596.2、N P__066546.1 等であり、ヒト I F N - β タンパク質の N C B I アクセス番号は N P__002167.1 等であり、ヒト I L - 4 タンパク質の N C B I アクセス番号は N P__000580.1、N P__758858.1、N P__001341919.1 等であり、ヒト G M - C S F タンパク質の N C B I アクセス番号は N P__000749.2 等であり、ヒト T G F - α タンパク質の N C B I アクセス番号は N P__001093161.1、N P__003227.1、N P__001295088.1、N P__001295087.1 等であり、ヒト T G F - β タンパク質の N C B I アクセス番号は N P__000651.3、X P__011525544.1 等である。

30

【0066】

上記のサイトカインは、H L A タンパク質の発現を誘導する活性を有している限り、上記の各アクセス番号に記載されるアミノ酸配列に対して変異を有していてもよい。より具体的には、上記の各アクセス番号に記載されるアミノ酸配列に対し、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を有していてもよい。ここで、1若しくは数個のアミノ酸とは、例えば1～10アミノ酸、例えば1～5アミノ酸、例えば1～3アミノ酸であってよい。上記のサイトカインは、更に、シグナルペプチドが除去されたアミノ酸配列を有していてもよい。

40

【0067】

多能性幹細胞は、一般的に未分化状態において、H L A タンパク質を細胞表面に発現しておらず H L A タンパク質の検出が困難であることが知られている。H L A タンパク質を提示させるためには分化誘導を行う必要がある。しかしながら、分化誘導プロセスは一般的に煩雑であり時間もかかる。また、一度分化誘導させた細胞は自発的に未分化状態に戻らないため、H L A タンパク質陰性の分化細胞集団を回収したとしても、それはもはや多能性幹細胞ではない。

【0068】

これに対し、発明者らは、上述した H L A タンパク質発現誘導剤を多能性幹細胞に作用

50

させることにより、多能性幹細胞の多能性を維持したまま、HLAタンパク質の発現を誘導することができることを明らかにした。

【0069】

これにより、工程(d)で得られた細胞集団におけるHLAタンパク質の発現を誘導し、目的とするHLAアレルの破壊又は改変が行われた多能性幹細胞(低抗原性細胞)を効率よく検出し、回収することができる。

【0070】

例えば、細胞におけるHLAタンパク質の発現を誘導させた後、細胞を抗HLAタンパク質抗体で染色することにより、フローサイトメーターでHLA発現細胞又は非発現細胞を区別してソーティングにて回収することができる。

10

【0071】

あるいは、抗HLAタンパク質抗体を磁気ビーズに吸着させて、HLAタンパク質発現細胞に接触させ、磁気ビーズが結合した細胞を、磁力を用いて回収することもできる。

【0072】

あるいは、培養皿上の特定のHLAタンパク質を発現する細胞を抗HLAタンパク質抗体等で標識し、不要な目的外細胞を吸引又はレーザー照射等により除去し、目的とする低抗原性細胞のみを回収してもよい。

【0073】

あるいは、培養皿上のHLAタンパク質発現細胞に、目的外のHLAタンパク質を認識するT細胞を混合し、目的外のHLAタンパク質を発現している細胞だけを攻撃して除去し、目的とする低抗原性細胞のみを回収してもよい。

20

【0074】

第1実施形態の製造方法は、ドナー細胞のCIITAアレル、RFX5アレル、RFXAPアレル及びRFXANKアレルのうち少なくとも1つのアレルを更に破壊又は改変する工程を更に含んでもよい。CIITA遺伝子は、Class II Major Histocompatibility Complex Transactivatorタンパク質をコードする遺伝子である。また、RFX5遺伝子は、Regulatory Factor X5タンパク質をコードする遺伝子である。また、RFXAP遺伝子は、Regulatory Factor X Associated Proteinをコードする遺伝子である。また、RFXANK遺伝子は、Regulatory Factor X Associated Ankyrin Containing Proteinをコードする遺伝子である。

30

【0075】

CIITA遺伝子は、RFX5遺伝子、RFXAP遺伝子、RFXANK遺伝子と共に、HLAクラスIIの転写活性化を制御する転写因子をコードしている。したがって、CIITAアレル、RFX5アレル、RFXAPアレル、RFXANKアレルのうち少なくとも1つが破壊された細胞は、HLAクラスIIタンパク質を発現せず、レシピエントに他家移植した場合の拒絶反応が更に低減されている。

【0076】

ヒトCIITA遺伝子のNCBIアクセッション番号はNM_000246.3、NM_001286402.1、NM_001286403.1等であり、ヒトRFX5遺伝子のNCBIアクセッション番号はNM_000449.3、NM_001025603.1等であり、ヒトRFXAP遺伝子のNCBIアクセッション番号はNM_000538.3等であり、ヒトRFXANK遺伝子のNCBIアクセッション番号はNM_001278727.1、NM_001278728.1、NM_003721.3、NM_134440.2等である。

40

【0077】

(第2実施形態)

第2実施形態の製造方法は、レシピエントに他家移植した場合の拒絶反応が低減された低抗原性細胞を、ドナー細胞から製造する製造方法であって、前記ドナー細胞のCIIT

50

A アレル、R F X 5 アレル、R F X A P アレル及びR F X A N K アレルのうち少なくとも1つ以上を含むアレルを破壊又は改変すること、を含み、前記C I I T A アレル、R F X 5 アレル、R F X A P アレル及びR F X A N K アレルのうち少なくとも1つ以上を含むアレルが破壊又は改変された細胞が前記低抗原性細胞である、製造方法である。本実施形態の製造方法は、H L A アレルを破壊しない点で上述した第1実施形態の製造方法と主に異なる。

【0078】

上述したように、C I I T A 遺伝子、R F X 5 遺伝子、R F X A P 遺伝子及びR F X A N K 遺伝子の発現は、クラスIIのH L A タンパク質の発現に必須であることが知られている。したがって、C I I T A アレル、R F X 5 アレル、R F X A P アレル、R F X A N K アレルのうち少なくとも1つが破壊された細胞は、H L A クラスIIタンパク質を発現せず、レシピエントに他家移植した場合の拒絶反応が低減されている。

10

【0079】

第2実施形態の製造方法において、ドナー細胞は上述したものと同様の多能性幹細胞であってもよいし、分化した細胞であってもよい。

【0080】

また、レシピエントは、低抗原性細胞と同種の動物であることが好ましい。レシピエントは、実際に移植が予定された患者であってもよいし、将来レシピエントとなりうる仮想的なH L A アレルを有するレシピエントであってもよい。

【0081】

また、上述したように、B 2 M アレルを破壊した細胞は、H L A アレルが野生型であってもH L A クラスI タンパク質を発現しない。第2実施形態の製造方法は、ドナー細胞のB 2 M アレルを破壊する工程を更に含んでもよい。

20

【0082】

ドナー細胞のC I I T A アレル又はB 2 M アレルの破壊は、例えばゲノム編集により行うことができる。ゲノム編集については上述したものと同様である。

【0083】

[低抗原性細胞の検出用キット]

1実施形態において、本発明は、H L A タンパク質発現誘導剤を含む、レシピエントに他家移植した場合の拒絶反応が低減された低抗原性細胞の検出用キットを提供する。本実施形態のキットにより低抗原性細胞を検出して回収することができる。したがって、本実施形態のキットは、低抗原性細胞の回収用キットであるということもできる。

30

【0084】

本実施形態のキットにおいて、H L A タンパク質発現誘導剤は、上述したものと同様であり、I F N - γ 、I F N - α 、I F N - β 、I L - 4、G M - C S F、T G F - α 、T G F - β 等のサイトカインが挙げられる。本実施形態のキットは、これらの発現誘導剤のうち1種を単独で含んでもよいし、2種以上を含んでもよい。

【0085】

本実施形態のキットにおいて、低抗原性細胞は多能性幹細胞であってもよい。実施例において後述するように、本実施形態のキットによれば、低抗原性細胞が多能性幹細胞である場合においても、低抗原性細胞の多能性を維持したまま、H L A タンパク質の発現を誘導することができる。

40

【0086】

[細胞]

(第1実施形態)

第1実施形態に係る細胞は、少なくとも1つのH L A アレルが破壊又は改変され、少なくとも1種のH L A タンパク質を発現可能な細胞である。第1実施形態の細胞は多能性幹細胞であってもよいし、分化した細胞であってもよい。第1実施形態の細胞において、破壊又は改変された少なくとも1つのH L A アレルはクラスI H L A アレルであることが好ましい。

50

【 0 0 8 7 】

多能性幹細胞は、通常 H L A タンパク質の発現が弱い。ここで、発現が弱いとは、例えば、抗 H L A タンパク質抗体で細胞を染色してフローサイトメトリー解析を行った場合に、H L A タンパク質の発現を明確に検出できないことを意味する。

【 0 0 8 8 】

しかしながら、実施例において後述するように、多能性幹細胞に H L A タンパク質発現誘導剤を接触させると、H L A タンパク質の発現が増強される。第 1 実施形態の細胞において、「少なくとも 1 種の H L A タンパク質を発現可能」とは、細胞が、多能性幹細胞等の、通常 H L A タンパク質の発現が弱い細胞である場合であっても、例えば、上述した H L A タンパク質発現誘導剤を接触させることにより、H L A タンパク質の発現が増強される細胞であることを意味する。また、第 1 実施形態の細胞は、分化し、H L A タンパク質を発現した細胞であってもよい。

10

【 0 0 8 9 】

実施例において後述するように、例えば、B 2 M アレルを破壊した細胞は、H L A アレルが野生型であっても H L A クラス I タンパク質を発現しない。第 1 実施形態の細胞はこのような細胞を含まないものとする。

【 0 0 9 0 】

第 1 実施形態の細胞において、破壊又は改変された H L A アレルは、クラス I H L A アレルを含むことが好ましく、H L A - A アレル、H L A - B アレル又は H L A - C アレルを含むことが好ましい。

20

【 0 0 9 1 】

第 1 実施形態の細胞は、少なくとも 1 種のクラス I H L A タンパク質を発現するため、レシピエントに他家移植した場合においても、レシピエントの N K 細胞によって攻撃されにくくなる。ここで、少なくとも 1 種のクラス I H L A タンパク質としては、H L A - C タンパク質、H L A - E タンパク質、H L A - G タンパク質等が挙げられる。第 1 実施形態の細胞は、一部の H L A が破壊されただけであり、残りの H L A が抗原提示能力を保持しているため、当該細胞がウイルス感染した場合や腫瘍化した場合であっても、抗原提示能力を維持することが可能である。

【 0 0 9 2 】

第 1 実施形態の細胞は、レシピエントに他家移植した場合の拒絶反応が低減された低抗原性細胞であり、破壊又は改変された前記 H L A アレルが、前記レシピエントに存在しない H L A アレルであってもよい。上記の低抗原性細胞は、レシピエントに他家移植した場合の拒絶反応が低減されている。

30

【 0 0 9 3 】

第 1 実施形態の低抗原性細胞は、レシピエントと同種の細胞であることが好ましく、ヒト細胞であってもよく非ヒト動物細胞であってもよい。レシピエントは、実際に移植が予定された患者であってもよいし、将来レシピエントとなりうる仮想的な H L A アレルを有するレシピエントであってもよい。

【 0 0 9 4 】

第 1 実施形態の細胞は、C I I T A アレル、R F X 5 アレル、R F X A P アレル及び R F X A N K アレルのうち少なくとも 1 つ以上を含むアレルが更に破壊又は改変されていてもよい。上述したように、C I I T A 遺伝子、R F X 5 遺伝子、R F X A P 遺伝子及び R F X A N K 遺伝子の発現はクラス I I の H L A タンパク質の発現に必須であることが知られている。したがって、C I I T A アレル、R F X 5 アレル、R F X A P アレル、R F X A N K アレルのうち少なくとも 1 つが破壊された細胞は、H L A クラス I I タンパク質を発現せず、レシピエントに他家移植した場合の拒絶反応が更に低減されている。

40

【 0 0 9 5 】

(第 2 実施形態)

第 2 実施形態に係る細胞は、C I I T A アレル、R F X 5 アレル、R F X A P アレル及び R F X A N K アレルのうち少なくとも 1 つ以上を含むアレルが破壊又は改変された細胞

50

である。上述したように、C I I T A アレル、R F X 5 アレル、R F X A P アレル、R F X A N K アレルのうち少なくとも1つ以上を含むアレルが破壊又は改変された細胞は、H L A クラス I タンパク質を発現せず、レシピエントに他家移植した場合の拒絶反応が低減された低抗原性細胞である。

【0096】

第2実施形態に係る細胞は、H L A クラス I タンパク質を発現していてもよい。第2実施形態の細胞が、レシピエントへの他家移植に有用な場合がある。

【0097】

第2実施形態の細胞は多能性幹細胞であってもよいし、分化した細胞であってもよい。また、上述したように、B 2 M アレルを破壊した細胞は、H L A アレルが野生型であってもH L A クラス I タンパク質を発現しない。第2実施形態の細胞は、C I I T A アレル、R F X 5 アレル、R F X A P アレル、R F X A N K アレルのうち少なくとも1つに加えてB 2 M アレルが更に破壊されていてもよい。

10

【0098】

第2実施形態の低抗原性細胞は、レシピエントと同種の細胞であることが好ましく、ヒト細胞であってもよく非ヒト動物細胞であってもよい。レシピエントは、実際に移植が予定された患者であってもよいし、将来レシピエントとなりうる仮想的なH L A アレルを有するレシピエントであってもよい。

【0099】

(低抗原性細胞の用途)

20

上述した、第1実施形態及び第2実施形態の細胞は、レシピエントに他家移植した場合の拒絶反応が低減された低抗原性細胞である。そこで、細胞治療や再生医療に利用することができる。

【0100】

低抗原性細胞が多能性幹細胞である場合には、例えば、神経細胞、肝細胞、膵島細胞、心筋細胞、腎細胞、造血幹細胞、細胞傷害性T細胞等に分化させたうえで、患者に移植してもよい。

【0101】

また、低抗原性細胞に遺伝子導入を行ったうえで患者に移植してもよい。例えば、多能性幹細胞をT細胞に分化させたうえでキメラ抗原受容体(C A R)を遺伝子導入し、C A R - T細胞として癌患者等に移植すること等が挙げられる。

30

【0102】

[標的塩基配列の特定方法]

(第1実施形態)

1実施形態において、本発明は、レシピエントに他家移植した場合の拒絶反応が低減された低抗原性細胞をゲノム編集により製造するための標的塩基配列の特定方法であって、全H L A ハプロタイプのゲノムDNAの塩基配列データに対して、候補塩基配列をマッピングすることと、H L A アレル以外の全ゲノムDNAの塩基配列データに対して、前記候補塩基配列をマッピングすることと、全H L A ハプロタイプのゲノムDNAの塩基配列データに対してマッピングした場合に1つの標的とするH L A ハプロタイプにしかマッピングされず、H L A アレル以外の全ゲノムDNAの塩基配列データに対してマッピングした場合にマッピングされない前記候補塩基配列を、標的塩基配列として特定することを含む方法を提供する。

40

【0103】

第1実施形態の方法により、後述する第1実施形態のg R N Aの標的塩基配列を特定することができる。後述するように、第1実施形態のg R N Aは、特定のH L A ハプロタイプ特異的にD S Bを誘導することができ、オフターゲット変異導入のリスクも低い。

【0104】

上述したように、H L A 遺伝子は多くの偽遺伝子を持ち、お互いのH L A 遺伝子配列の相同性が高いうえ、個人間での配列多様性が大きい。このため、配列特異的DNA切断酵

50

素を用いたゲノム編集の適切な標的塩基配列を決定することは容易ではない。

【0105】

H L A 遺伝子特異的な配列特異的 D N A 切断酵素の標的塩基配列の特定は、例えば、次のようにして行うことができる。まず、全 H L A ハプロタイプのゲノム D N A の塩基配列データ（既知の全 H L A 遺伝子の塩基配列データ）を入手する。全 H L A 遺伝子の塩基配列データは、例えば、I P D - I M G T / H L A データベース（<https://www.ebi.ac.uk/ipd/imgt/hla/>）から入手することができる。本データベースには、2017年7月現在、12,544件のH L AクラスI遺伝子の塩基配列と4,622件のH L AクラスII遺伝子の塩基配列が登録されている。

【0106】

続いて、各H L A アレルの塩基配列から、使用する配列特異的 D N A 切断酵素の標的となる塩基配列を抽出する。例えば、C R I S P R - C a s を配列特異的 D N A 切断酵素として用いる場合、3～5塩基程度のP A M配列（例えば、化膿性レンサ球菌由来C a s 9の場合「N G G」、アシダミノコッカス由来のC p f 1の場合「T T T N」）を含む、g R N Aの標的塩基配列として利用可能な塩基配列を抽出し、候補塩基配列とする。

【0107】

本実施形態の方法において、標的塩基配列はP A M配列を含むものとする。P A M配列を含む標的塩基配列の長さは、配列特異的 D N A 切断酵素により異なる。例えば、配列特異的 D N A 切断酵素が化膿性レンサ球菌由来C a s 9である場合、P A M配列を含む標的塩基配列の長さは、19～33塩基であることが好ましく、20～24塩基であることがより好ましい。また、配列特異的 D N A 切断酵素がアシダミノコッカス由来のC p f 1である場合、P A M配列を含む標的塩基配列の長さは、20～34塩基であることが好ましく、約24塩基であることがより好ましい。

【0108】

続いて、全H L A ハプロタイプのゲノム D N A の塩基配列データに対して、P A M配列を含む候補塩基配列をマッピングする。

【0109】

マッピングとは、リファレンス塩基配列（ここでは全H L A ハプロタイプのゲノム D N A の塩基配列データを意味する。）上の、クエリー塩基配列（ここでは候補塩基配列を意味する。）の配列同一性が高い位置を特定する操作である。クエリー塩基配列とリファレンス塩基配列との配列同一性は、90%以上であることが好ましく、95%以上であることがより好ましく、99%以上であることが更に好ましく、100%であることが特に好ましい。

【0110】

ここで、リファレンス塩基配列に対する、クエリー塩基配列の配列同一性は、例えば次のようにして求めることができる。まず、リファレンス塩基配列及びクエリー塩基配列をアラインメントする。続いて、リファレンス塩基配列及びクエリー塩基配列において、一致した塩基の塩基数を算出し、下記式（1）にしたがって、配列同一性を求めることができる。

$$\text{配列同一性（\%）} = \text{一致した塩基数} / \text{クエリー塩基配列の総塩基数} \times 100 \quad (1)$$

【0111】

実施例において後述するように、マッピングは、例えば、B o w t i e プログラム（<http://bowtie-bio.sourceforge.net/index.shtml>）を用いて行うことができる。また、マッピングは、B W A、B L A S T、B L A T、S O A P、N o v o a l i g n、T o p H a t 等の、B o w t i e プログラム以外の配列相同性（配列同一性）検索プログラムを用いて行ってもよい。

【0112】

続いて、H L A アレル以外の全ゲノム D N A の塩基配列データに対して、前記候補塩基配列をマッピングする。全ゲノム D N A の塩基配列データとしては、リファレンス・ヒトゲノム配列（H g 19）等を用いることができる。また、マッピングには、B o w t i e

10

20

30

40

50

プログラムや、Bowtieプログラム以外の配列相同性検索プログラムを用いることができる。

【0113】

続いて、全HLAハプロタイプのゲノムDNAの塩基配列データに対してマッピングした場合に1つの標的とするHLAハプロタイプにしかマッピングされず、HLAアレル以外の全ゲノムDNAの塩基配列データに対してマッピングした場合にマッピングされない候補塩基配列を、標的塩基配列として特定する。ここで、標的とするHLAハプロタイプとは、破壊又は改変する対象のHLAハプロタイプを意味する。

【0114】

実施例において後述するように、第1実施形態の方法により特定した標的塩基配列を標的塩基配列とするgRNA（後述する第1実施形態のgRNA）は、標的とする特定のHLAハプロタイプ特異的にDSBを誘導することができ、オフターゲット変異導入のリスクも低い。

10

【0115】

HLA遺伝子は8つのエクソンで構成されていることが多いが、標的塩基配列は、HLA遺伝子のタンパク質コード領域を標的とすることが好ましい。標的塩基配列は、HLAタンパク質の細胞外ドメインをコードするエクソン1、2、3又は4を標的とすることが好ましく、エクソン2又は3を標的とすることが特に好ましい。

【0116】

あるいは、標的塩基配列を2箇所に設定すると、その間の塩基配列を大きく削除することも可能である。これを利用するために、HLA遺伝子のタンパク質をコードする遺伝子領域を含むように、2つ以上の標的塩基配列を設計してもよい。

20

【0117】

また、標的塩基配列は、HLA遺伝子以外の別のゲノム領域やミトコンドリアDNAを標的としないものであることが好ましい。また、数塩基のミスマッチを許容した場合においても、HLA遺伝子以外の領域を標的とする箇所が少ない標的塩基配列を選択することが好ましい。

【0118】

（第2実施形態）

1実施形態において、本発明は、レシピエントに他家移植した場合の拒絶反応が低減された低抗原性細胞をゲノム編集により製造するための標的塩基配列の特定方法であって、全HLAハプロタイプのゲノムDNAの塩基配列データに対して、候補塩基配列をマッピングすることと、HLAアレル以外の全ゲノムDNAの塩基配列データに対して、前記候補塩基配列をマッピングすることと、全HLAハプロタイプのゲノムDNAの塩基配列データに対してマッピングした場合に2つ以上の標的とするHLAハプロタイプにマッピングされ、HLAアレル以外の全ゲノムDNAの塩基配列データに対してマッピングした場合にマッピングされない前記候補塩基配列を、標的塩基配列として特定することを含む方法を提供する。

30

【0119】

第2実施形態の方法は、全HLAハプロタイプのゲノムDNAの塩基配列データに対してマッピングした場合に2つ以上の標的とするHLAハプロタイプにマッピングされる候補塩基配列を標的塩基配列として特定する点において、上述した第1実施形態の方法と主に異なる。

40

【0120】

第2実施形態の方法において、候補塩基配列、全HLAハプロタイプのゲノムDNAの塩基配列データ、全ゲノムDNAの塩基配列データ、マッピングについては、上述した第1実施形態の方法と同様である。

【0121】

本実施形態の方法により、後述する第2実施形態のgRNAの標的塩基配列を特定することができる。後述するように、第2実施形態のgRNAは、複数の標的とするHLA遺

50

伝子（又はアレル）を切断することができる。このため、複数のHLA遺伝子を破壊又は改変する場合に必要なgRNAの種類を減らすことができる。これにより、gRNAを製作するコストを減らすことができる。また、使用するgRNAの種類を減らすことにより、オフターゲット変異導入のリスクも減らすことができる。

【0122】

[gRNA]

（第1実施形態）

1実施形態において、本発明は、全HLAハプロタイプのゲノムDNAの塩基配列データに対してマッピングした場合に1つの標的とするHLAハプロタイプにしかマッピングされず、HLAアレル以外の全ゲノムDNAの塩基配列データに対してマッピングした場合にマッピングされない塩基配列を、標的塩基配列とするgRNAを提供する。

10

【0123】

第1実施形態のgRNAは、特定のHLAハプロタイプ特異的にDSBを誘導することができ、オフターゲット変異導入のリスクも低い。

【0124】

本実施形態において、gRNAは、CRISPR RNA (crRNA) とトランス活性化型CRISPR RNA (tracrRNA) との複合体であってもよいし、tracrRNAとcrRNAを組み合わせた単一の合成gRNA (sgRNA) であってもよい。いずれの構造のgRNAであっても標的塩基配列特異的にDSBを誘導することができる。

20

【0125】

標的塩基配列は、上述した方法により特定されたものであることが好ましい。上述したように、本明細書では、標的塩基配列は、PAM配列を含む塩基配列である。そこで、標的塩基配列からPAM配列を除いた塩基配列をcrRNA又はsgRNAのスペーサー塩基配列に用いる。

【0126】

本実施形態のgRNAがsgRNAである場合、sgRNAの塩基配列は次の塩基配列とすることができる。

【0127】

まず、標的塩基配列からPAM配列を除いた塩基配列をスペーサー塩基配列とする。続いて、スペーサー塩基配列の3'末端に、スキャフォールド配列を連結した塩基配列を設計する。スキャフォールド配列としては、例えば配列番号39に記載の塩基配列を使用することができるがこれに限定されない。

30

【0128】

配列番号39に記載の塩基配列は、スキャフォールド配列として機能する限り、配列番号39に記載の塩基配列において1若しくは数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列であってもよい。ここで、1若しくは数個の塩基とは、例えば1～10塩基、例えば1～5塩基、例えば1～3塩基であってもよい。

【0129】

設計したsgRNAは化学合成等により調製することができる。sgRNAは、RNAとして調製して直接ドナー細胞に導入してもよいし、DNAとして調製して発現ベクターに組み込み、発現ベクターの形態でドナー細胞に導入し、細胞内で発現させてもよい。

40

【0130】

sgRNAを細胞内で発現させる場合、U6プロモーターやH1プロモーター等のポリメラーゼIIIプロモーターを用いることができる。この場合、転写効率を向上させるために、sgRNAの5'末端の塩基配列をG又はGGに変更してもよい。sgRNAの5'末端の塩基配列をG又はGGに変更しても、Cas9の切断活性にはほとんど影響がでない。

【0131】

例えば、標的塩基配列からPAM配列を除いた塩基配列が「5'-NNNNNNNNNNNNNNNNNN

50

NNNNNN-3'」(配列番号62)である場合、標的塩基配列を特異的に切断するsgRNAの塩基配列は「5'-NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUUUUU-3'」(配列番号63)とすることができる。

【0132】

本実施形態のgRNAは、crRNAとtracrRNAとの複合体であってもよい。また、crRNA及びtracrRNAは、直接ドナー細胞に導入してもよいし、発現ベクターの形態でドナー細胞に導入し、細胞内で発現させてもよい。crRNA及びtracrRNAを細胞内で発現させる場合、U6プロモーターやH1プロモーター等のポリメラーゼIIIプロモーターを用いることができる。この場合、転写効率を向上させるために、crRNA又はtracrRNAの5'末端の塩基配列をG又はGGに変更してもよい。crRNA又はtracrRNAの5'末端の塩基配列をG又はGGに変更しても、Cas9の切断活性にはほとんど影響がでない。

10

【0133】

本実施形態のgRNAがcrRNAとtracrRNAとの複合体である場合、crRNA及びtracrRNAの塩基配列は次の塩基配列とすることができる。

【0134】

まず、標的塩基配列からPAM配列を除いた塩基配列をスペーサー塩基配列とする。続いて、スペーサー塩基配列の3'末端に、スキャフォールド配列を連結した塩基配列を設計し、crRNAの塩基配列とする。例えば、標的塩基配列からPAM配列を除いた塩基配列が「5'-NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN-3'」(配列番号62)である場合、crRNAの塩基配列は「5'-NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNGUUUUAGAGCUAUGCUGUUUUG-3'」(配列番号64)とすることができる。また、tracrRNAの塩基配列は、例えば、「5'-CAAAACAGCAUAGCAAGUUAUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGC-3'」(配列番号65)とすることができる。

20

【0135】

crRNAの塩基配列は、crRNAとして機能する限り、配列番号64に記載の塩基配列に対して変異を有していてもよい。より具体的には、配列番号64に記載の塩基配列において1若しくは数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列であってもよい。ここで、1若しくは数個の塩基とは、例えば1~10塩基、例えば1~5塩基、例えば1~3塩基であってよい。

30

【0136】

また、tracrRNAの塩基配列は、tracrRNAとして機能する限り、配列番号65に記載の塩基配列において1若しくは数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列であってもよい。ここで、1若しくは数個の塩基とは、例えば1~10塩基、例えば1~5塩基、例えば1~3塩基であってよい。

【0137】

設計したcrRNA及びtracrRNAは、化学合成等により調製することができる。crRNA及びtracrRNAはRNAとして調製して直接ドナー細胞に導入してもよいし、DNAとして調製して発現ベクターに組み込み、発現ベクターの形態でドナー細胞に導入し、細胞内で発現させてもよい。

40

【0138】

具体的な第1実施形態のgRNAとしては、配列番号3、4、7、45~52、72~2459のいずれかに記載の塩基配列を標的塩基配列とするgRNA、又は、配列番号3、4、7、45~52、72~2459のいずれかに記載の塩基配列の5'末端において、1若しくは数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列を標的塩基配列とするgRNAが挙げられる。ここで、1若しくは数個の塩基とは、例えば1~10塩基、例えば1~5塩基、例えば1~3塩基であってよい。例えば、スペーサー配列の5'末端を2~3塩基短くすることでDNAへの結合能力を下げ、CRISPR-Cas9の配列認識特異性を高めることができる。

50

【 0 1 3 9 】

中でも、配列番号 3、4、7、45～52 のいずれかに記載の塩基配列を標的塩基配列とする gRNA、又は、配列番号 3、4、7、45～52 のいずれかに記載の塩基配列の 5' 末端において、1 若しくは数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列を標的塩基配列とする gRNA が好ましい。実施例において後述するように、これらの塩基配列を標的塩基配列とする gRNA により、HLA ハプロタイプ特異的に HLA アレルを破壊又は改変し、レシピエントに他家移植した場合の拒絶反応が低減された低抗原性細胞を製造することができる。

【 0 1 4 0 】

(第 2 実施形態)

1 実施形態において、本発明は、全 HLA ハプロタイプのゲノム DNA の塩基配列データに対してマッピングした場合に 2 つ以上の標的とする HLA ハプロタイプにマッピングされ、HLA アレル以外の全ゲノム DNA の塩基配列データに対してマッピングした場合にマッピングされない塩基配列を、標的塩基配列とする gRNA を提供する。

【 0 1 4 1 】

具体的な第 2 実施形態の gRNA としては、配列番号 53～55、2460～8013 のいずれかに記載の塩基配列を標的塩基配列とする gRNA、又は、配列番号 53～55、2460～8013 のいずれかに記載の塩基配列の 5' 末端において、1 若しくは数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列を標的塩基配列とする gRNA が挙げられる。ここで、1 若しくは数個の塩基とは、例えば 1～10 塩基、例えば 1～5 塩基、例えば 1～3 塩基であってよい。例えば、スパーサー配列の 5' 末端を 2～3 塩基短くすることで DNA への結合能力を下げ、CRISPR-Cas9 の配列認識特異性を高めることができる。

【 0 1 4 2 】

中でも、配列番号 53～55 のいずれかに記載の塩基配列を標的塩基配列とする gRNA、又は、配列番号 53～55 のいずれかに記載の塩基配列の 5' 末端において、1 若しくは数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列を標的塩基配列とする gRNA が好ましい。

【 0 1 4 3 】

また、上述したように、ポリメラーゼ III プロモーターからの転写効率を向上させるために、gRNA の 5' 末端の塩基配列を G 又は GG に変更してもよい。

【 0 1 4 4 】

例えば HLA - A アレルに着目した場合、HLA - A アレルには父親由来の HLA - A 遺伝子と母親由来の HLA - A 遺伝子の 2 つの遺伝子が存在し、それぞれ HLA - A 遺伝子が異なる場合もあれば同一の場合もある。HLA - A の抗原提示能力等を保持したい場合、一方の HLA - A 遺伝子だけを切断してノックアウトを誘導し、反対側の HLA - A 遺伝子は残す必要がある。あるいは、完全ノックアウトを誘導したい場合には、双方の HLA - A 遺伝子を切断する必要がある。

【 0 1 4 5 】

一般的に、2 つの遺伝子を CRISPR - gRNA の標的にする場合、2 つの gRNA をデザインして別々に DNA 切断を誘導することが一般的である。このため、複数の HLA 遺伝子をノックアウトする場合、それぞれの HLA 遺伝子に特異的な gRNA を用いることが考えられる。

【 0 1 4 6 】

これに対し、実施例において後述するように、発明者らは、HLA 遺伝子が相互に DNA 配列相溶性が高いという特徴を利用して、1 つの gRNA で複数の HLA 遺伝子（例えば HLA - A 遺伝子の父親由来配列と母親由来配列の両方、あるいは、HLA - A 遺伝子と HLA - B 遺伝子）の切断誘導が可能な gRNA を探索した所、このような gRNA 配列を複数同定することができた。

【 0 1 4 7 】

10

20

30

40

50

実施例において後述するように、第2実施形態のgRNAを利用することにより、複数のHLA遺伝子（又はアレル）を切断する場合に必要なgRNAの種類を減らすことができる。これにより、gRNAを作製するコストを減らすことができる。また、使用するgRNAの種類を減らすことにより、オフターゲット変異導入のリスクも減らすことができる。

【0148】

[その他の実施形態]

1実施形態において、本発明は、IFN- γ 、IFN- α 、IFN- β 、IL-4、GM-CSF、TGF- α 又はTGF- β を有効成分とする、多能性幹細胞の多能性を維持したままHLAタンパク質の発現を誘導する、HLAタンパク質発現誘導剤を提供する。

10

【0149】

1実施形態において、本発明は、多能性幹細胞の多能性を維持したままHLAタンパク質の発現を誘導する方法であって、多能性幹細胞の培地にIFN- γ 、IFN- α 、IFN- β 、IL-4、GM-CSF、TGF- α 又はTGF- β を添加する工程を備える方法を提供する。

【実施例】

【0150】

次に実施例を示して本発明を更に詳細に説明するが、本発明は以下の実施例に限定されるものではない。

【0151】

20

[実験例1]

(gRNAの設計)

HLA遺伝子は配列の個人差が大きく、一方でHLA遺伝子間の相溶性が高いことから、特定のHLAハプロタイプだけを切断するgRNAの塩基配列を設計することは困難であった。具体的には、例えば、HLA-A*01:01アレルだけを認識するgRNAであって、他のHLA-AアレルやHLA-A以外のHLA遺伝子、他のゲノム領域を認識しないgRNA配列を設計することは困難であった。

【0152】

そこで、次の方法により、HLA-Aアレル、HLA-Bアレル及びHLA-Cアレルを認識するgRNAの標的塩基配列を決定した。まず、IPD-IMGT/HLAデータベース (<https://www.ebi.ac.uk/ipd/imgt/hla/>) から、全HLAハプロタイプのゲノムDNAの塩基配列を含む「hla_gen.fasta」ファイルをダウンロードして入手した。

30

【0153】

続いて、全HLAハプロタイプのゲノムDNAの塩基配列から、「NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNGG」（配列番号40）と一致する塩基配列を、SpCas9のgRNA（sgRNA）の標的塩基配列の候補として抽出した。

【0154】

続いて、各候補の塩基配列を全HLAハプロタイプの塩基配列に対してBowtieプログラム (<http://bowtie-bio.sourceforge.net/index.shtml>) を用いてマッピングし、各候補の塩基配列がどのHLA遺伝子に何カ所マッピングするかを解析した。なお、同様の操作はBowtieプログラム以外の配列相同性検索プログラムを用いて行うこともできる。

40

【0155】

続いて、Bowtieプログラムの結果をもとに、各sgRNAが、HLA-Aアレル、HLA-Bアレル又はHLA-Cアレルのいずれか1つのみに結合する場合、並びに、HLA-Aアレル及びHLA-Bアレル、HLA-Aアレル及びHLA-Cアレル、HLA-Bアレル及びHLA-Cアレル、HLA-Aアレル、HLA-Bアレル及びHLA-Cアレル等の2つ以上のHLAアレルに結合する場合に分類した。

【0156】

続いて、全ての候補の塩基配列をリファレンス・ヒトゲノム配列（Hg19）に対して

50

B o w t i eを用いてマッピングし、H L Aアレル以外のゲノム領域へとマッピングされるかどうかの確認を行った。その結果、H L Aアレルのみにマッピングされる候補の塩基配列を目的の標的塩基配列として抽出した。

【 0 1 5 7 】

図 1 (a) は、本実験例で抽出した標的塩基配列が、H L A - Aアレル、H L A - Bアレル、H L A - Cアレルのいずれを標的とするかをベン図で示したものである。図中の数字は、s g R N Aの標的塩基配列の数を示す。その結果、H L A - Aアレル、H L A - Bアレル又はH L A - Cアレルのいずれか 1 つのみを標的とする s g R N Aの標的塩基配列、並びに、H L A - Aアレル及びH L A - Bアレル、H L A - Aアレル及びH L A - Cアレル、H L A - Bアレル及びH L A - Cアレル、H L A - Aアレル、H L A - Bアレル及びH L A - Cアレル等の 2 つ以上のH L Aアレルを標的とする s g R N Aの標的塩基配列を多数決定することができた。

10

【 0 1 5 8 】

図 1 (b) は、本実験例で同定した s g R N Aの標的塩基配列が、H L A - Aアレル、H L A - Bアレル、H L A - Cアレルのどの場所を標的としているかを示した図である。図 1 (b) 中、線で連結されたボックスは各H L A遺伝子のエクソンを示し、H L A - Aアレルは左側にエクソン 1 が、H L A - BアレルとH L A - Cアレルは右側にエクソン 1 が存在する。また、「[+] s t r a n d s g R N A s」はプラス鎖DNAを標的とする標的塩基配列を示し、「[-] s t r a n d s g R N A s」はマイナス鎖DNAを標的とする標的塩基配列を示し、「U n i q u e k - m e r s」はヒトゲノム上で一箇所しか存在しない 1 0 ~ 1 6 m e rの塩基配列(「k - m e r 配列」という。)の集合を示す。

20

【 0 1 5 9 】

この結果、U n i q u e k - m e r sのピークが高い部位に、多数の s g R N A標的配列を見出すことができたことが明らかとなった。なお、プラス鎖DNA又はマイナス鎖DNAのどちらにも相当数の標的塩基配列を見出すことができた。

【 0 1 6 0 】

配列番号 3、4、7、4 5 ~ 5 2、7 2 ~ 2 4 5 9 に、全H L AハプロタイプのゲノムDNAの塩基配列データに対してマッピングした場合に 1 つの標的とするH L Aハプロタイプにしかマッピングされず、H L Aアレル以外の全ゲノムDNAの塩基配列データに対してマッピングした場合にマッピングされない塩基配列として抽出された塩基配列を示す。また、下記表 1 に、一例として、一部の塩基配列について、標的とするH L Aアレルの数及び標的とするH L Aアレルを示す。

30

【 0 1 6 1 】

【表 1】

配列番号	標的とする HLAアレルの数	標的とするHLAアレル
72	1	A*11:01:01:02
73	1	A*11:05
74	1	A*11:01:01:02
75	1	A*02:43N
76	1	B*73:01

40

【 0 1 6 2 】

また、配列番号 5 3 ~ 5 5、2 4 6 0 ~ 8 0 1 3 に、全H L AハプロタイプのゲノムDNAの塩基配列データに対してマッピングした場合に 2 つ以上の標的とするH L Aハプロタイプにマッピングされ、H L Aアレル以外の全ゲノムDNAの塩基配列データに対してマッピングした場合にマッピングされない塩基配列として抽出された塩基配列を示す。また、下記表 2 に、一例として、一部の塩基配列について、標的とするH L Aアレルの数及び標的とするH L Aアレルを示す。

50

【 0 1 6 3 】

【 表 2 】

配列番号	標的とする HLAアレルの数	標的とするHLAアレル
2460	44	A*02:01:01:01, A*02:01:01:02L, A*02:01:01:03, A*02:01:01:04, A*02:01:01:05, A*02:01:01:06, A*02:01:120, A*02:01:121, A*02:02:01:01, A*02:02:01:02, A*02:03:01, A*02:03:03, A*02:05:01, A*02:06:01:01, A*02:06:01:02, A*02:06:01:03, A*02:06:22, A*02:07:01, A*02:10, A*02:193, A*02:251, A*02:259, A*02:264, A*02:265, A*02:266, A*02:269, A*02:279, A*02:32N, A*02:376, A*02:43N, A*02:455, A*02:48, A*02:51, A*02:533, A*02:53N, A*02:602, A*02:603, A*02:60:01, A*02:68, A*02:77, A*02:81, A*02:89, A*02:95, A*69:01
2461	2	A*80:01:01:01, A*80:01:01:02
2462	138	A*01:01:01:01, A*01:01:01:02N, A*01:01:38L, A*01:01:71, A*01:01:73, A*01:02, A*01:03, A*01:04N, A*01:09, A*01:11N, A*01:14, A*01:16N, A*01:194, A*01:20, A*02:57, A*02:65, A*03:01:01:01, A*03:01:01:02N, A*03:01:01:03, A*03:01:01:04, A*03:01:01:05, A*03:01:01:06, A*03:02:01, A*03:11N, A*03:213, A*03:218, A*03:21N, A*03:224, A*03:231, A*03:234Q, A*03:36N, A*03:89:02, A*11:01:01:01, A*11:01:18, A*11:02:01, A*11:05, A*11:110, A*11:183, A*11:190, A*11:210N, A*11:25:01, A*11:50Q, A*11:60, A*11:69N, A*11:74, A*11:75, A*11:77, A*23:01:01, A*23:09, A*23:17, A*23:19N, A*23:38N, A*24:02:01:01, A*24:02:01:02L, A*24:02:01:03, A*24:02:01:04, A*24:02:01:05, A*24:02:03Q, A*24:02:10, A*24:03:01, A*24:07:01, A*24:08, A*24:09N, A*24:10:01, A*24:11N, A*24:152, A*24:20, A*24:215, A*24:252N, A*24:293, A*24:56, A*24:61, A*24:86N, A*25:01:01, A*26:01:01:01, A*26:01:01:02, A*26:01:39, A*26:04, A*26:07:02, A*26:107N, A*26:115, A*26:11N, A*26:15, A*26:50, A*29:01:01:01, A*29:01:01:02N, A*29:02:01:01, A*29:02:01:02, A*29:02:01:03, A*29:02:17, A*29:03, A*29:46, A*31:01:02:01, A*31:01:02:02, A*31:01:02:03N, A*31:01:04, A*31:01:23, A*31:01:24, A*31:04, A*31:14N, A*31:36, A*31:46, A*32:01:01, A*32:06, A*32:69, A*33:01:01, A*33:03:01, A*33:07, A*34:01:01, A*34:02:01, A*34:14, A*36:01, A*43:01, A*66:01:01, A*66:17, A*68:01:01:01, A*68:01:01:02, A*68:01:02:01, A*68:01:02:02, A*68:01:02:03, A*68:02:01:01, A*68:02:01:02, A*68:02:01:03, A*68:02:02, A*68:03:01, A*68:07, A*68:08:01, A*68:139, A*68:140, A*68:17, A*68:18N, A*68:22, A*68:71, A*74:01:01, A*74:01:02, A*74:01:03, A*74:02:01:01, A*74:02:01:02
2463	2	A*80:01:01:01, A*80:01:01:02
2464	7	A*30:01:01, A*30:01:11, A*30:02:01:01, A*30:02:01:02, A*30:02:01:03, A*30:04:01, A*30:89

10

20

30

40

【 0 1 6 4 】

また、下記表 3 に、全 H L A ハプロタイプのゲノム D N A の塩基配列データに対してマッピングした場合に 2 つ以上の標的とする H L A ハプロタイプにマッピングされ、H L A アレル以外の全ゲノム D N A の塩基配列データに対してマッピングした場合にマッピングされない塩基配列として抽出された標的塩基配列について、標的とする H L A アレルの数及び抽出された標的塩基配列の数を示す。

【 0 1 6 5 】

【表 3】

標的とするHLAアレルの数	標的塩基配列の数
2	378
3	115
4	88
5～10	537
11～100	2604
101～200	926
201～300	547
301～400	173
401～500	65
501以上	121

10

【0166】

[実験例 2]

(i P S 細胞の刺激による H L A タンパク質の発現誘導 1)

未分化 i P S 細胞を刺激して H L A タンパク質の発現を誘導することを試みた。具体的には、i P S 細胞の培地に 1 0 0 n g / m L のリボポリサッカライド (L P S)、1 0 0 n g / m L の T N F - α、又は 5 0 n g / m L の I F N - γ を添加して 4 8 時間処理後、抗 H L A - A B C 抗体 (品番 : 3 1 1 4 1 8、B I O L E G E N D 社) を用いてフローサイトメトリー解析を行い、H L A タンパク質の発現を検討した。

20

【0167】

図 2 は、フローサイトメトリーの結果を示すグラフである。その結果、I F N - γ を添加すると H L A タンパク質の発現が上昇することが明らかとなった。

【0168】

[実験例 3]

(i P S 細胞の刺激による H L A タンパク質の発現誘導 2)

i P S 細胞の培地に 1 0 n g / m L、5 0 n g / m L、又は 1 0 0 n g / m L の I F N - γ を添加して 4 8 時間処理後、抗 H L A - A B C 抗体 (品番 : 3 1 1 4 1 8、B I O L E G E N D 社) を用いてフローサイトメトリー解析を行い、H L A タンパク質の発現を検討した。

30

【0169】

図 3 は、フローサイトメトリーの結果を示すグラフである。その結果、I F N - γ を添加すると H L A タンパク質の発現が上昇することが明らかとなった。その結果、いずれの濃度においても、I F N - γ を添加すると H L A タンパク質の発現が上昇することが明らかとなった。

【0170】

[実験例 4]

(i P S 細胞の刺激による H L A タンパク質の発現誘導 3)

i P S 細胞の培地に 5 0 n g / m L の I F N - γ を添加し、4 時間、8 時間、1 6 時間、2 4 時間、及び 4 8 時間処理後、抗 H L A - A 2 抗体 (品番 : 7 4 0 0 8 2、B D 社) を用いてフローサイトメトリー解析を行い、H L A - A 2 タンパク質の発現を検討した。

40

【0171】

図 4 (a) は、フローサイトメトリーの結果を示すグラフである。また、図 4 (b) は、i P S 細胞の I F N - γ 処理と H L A - A タンパク質の発現量の解析のスケジュールを示す図である。その結果、I F N - γ 処理時間を長くするほど H L A タンパク質の発現が高くなることが明らかとなった。また、更なる検討の結果、i P S 細胞を I F N - γ で 4 8 時間処理した後、培地から I F N - γ を除去して 7 日後においても H L A タンパク質の発現が持続していることが明らかとなった。

【0172】

50

[実験例 5]

(細胞のHLAハプロタイプ決定)

以下の方法により、各細胞のHLAハプロタイプ(両親から受け継いだ各HLAアレルの対)を決定した。

【0173】

604B1 iPS細胞及び1383D2 iPS細胞については、まず、604B1 iPS細胞のWES(Whole Exome Sequencing)解析結果、及び、1383D2 iPS細胞のWGS(Whole Genome Sequencing)解析結果に基づいて、それぞれFASTQ配列ファイルを作成した。

【0174】

続いて、各FASTQ配列ファイルをリファレンス・ヒトゲノム配列(Hg19)に対してマッピングし、BAMファイルをそれぞれ作成した。続いて、ソフトウェア(名称「HLA-genotyper」、<https://pypi.python.org/pypi/hla-genotyper/0.4.2b1>)を用いて上記の各BAMファイルを解析し、各細胞のHLAハプロタイプを決定した。

【0175】

また、585A1 iPS細胞については、抽出したゲノムDNAをHLA研究所(<http://hla.or.jp/>)に送付し、蛍光ビーズ法(PCR-rSSO/Luminex法)によるHLAハプロタイプ決定を行った。また、604B1 iPS細胞については、585A1 iPS細胞と同様のHLAハプロタイプ決定も行った。

【0176】

また、末梢血単核細胞(PBMC)については、販売先(CTL社、Wako社)がHLAハプロタイプ情報を提供しているものを使用した。

【0177】

[実験例 6]

(sgRNAのゲノム切断活性の検討)

実験例1で同定した標的塩基配列を標的とするsgRNAの中から、A*02:07アレルだけを切断し、A*32:01アレルとは塩基配列が一致しないsgRNAである、A0207-ex3-g1(標的塩基配列を配列番号3に示す。)、A0207-ex3-g2(標的塩基配列を配列番号4に示す。)及びA0207-ex3-g4(標的塩基配列を配列番号7に示す。)を選択した。

【0178】

なお、以下の各実験例で使用した各sgRNAの塩基配列は、それぞれのsgRNAの標的塩基配列からPAM配列を除いた塩基配列の3'側に、配列番号39に記載のスキフォールド配列を連結した塩基配列であった。例えば、標的塩基配列からPAM配列を除いた塩基配列が「5'-NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN-3'」(配列番号62)であった場合、使用したsgRNAの塩基配列は「5'-NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNGUUUUAGAGCUAGAAUAGCAAGUUAUAAUAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUUUUUU-3'」(配列番号63)であった。また、以下の各実験例では、各sgRNAを発現ベクターの形態で細胞に導入し、細胞内で発現させて使用した。

【0179】

図5(a)はHLA-Aのエクソン3の領域に見出されたsgRNAの標的部位及び標的塩基を示す図である。図5(a)中、ボックスはHLA-A*02:07遺伝子のエクソンを示し、矢印は各sgRNAの標的塩基配列の位置を示す。また、図5(a)には野生型のA*02:07アレルの塩基配列、及び野生型のA*32:01アレルの塩基配列も示す。両アレルで配列が異なる部分を大文字で示し、sgRNAのPAM配列を下線で示す。

【0180】

続いて、A0207-ex3-g1、A0207-ex3-g2及びA0207-ex3-g4を、精製Cas9タンパク質と共に下記表4のHLAハプロタイプを持つ138

10

20

30

40

50

3 D 2 i P S 細胞にそれぞれトランスフェクションした。トランスフェクションは市販のキット（型式「C R I S P R - M A X」、品番：C M A X 0 0 0 0 3、サーモフィッシャーサイエンティフィック社）を用いて行った。

【 0 1 8 1 】

【表 4】

1383D2 iPS細胞のHLAハプロタイプ

	HLA-A		HLA-B		HLA-C	
HLAアレル	A*02:07	A*32:01	B*15:02	B*51:01	C*08:01	C*14:02

【 0 1 8 2 】

続いて、ゲノムDNAを抽出後、T7エンドヌクレアーゼI（T7EI）アッセイにより、各細胞における遺伝子変異導入効率を検討した。T7EIアッセイは次のようにして行った。

【 0 1 8 3 】

まず、HLA-A2領域のA*02:07アレルを特異的に増幅するプライマーを用いてNested PCRを行った。Nested PCRには、下記表5に示すプライマーを使用した。

【 0 1 8 4 】

【表 5】

1st PCR用プライマー

プライマー名	塩基配列	配列番号
1383D2-HLA-A-be-ex1-fwd	TTGGGGATTCCCCAACTCC	41
HLA-A-in7-rev	GTCCACTGTTCCGCCCAA	42

2nd PCR用プライマー

プライマー名	塩基配列	配列番号
HLA-A0207-ex2-fwd	GGTCCGGAGTATTGGGACGG	43
HLA-A0207-ex3-rev	TCTCAACTGCTCCGCCACAT	44

【 0 1 8 5 】

続いて、PCR産物を精製し、精製後のPCR産物（400ng）に1/10容量の10×NEBuffer2（NEB社）バッファーを添加し、95℃で5分間加熱して二本鎖DNAを熱変性した後、徐々に温度を下げることで再アニーリングした。より具体的には、95℃から85℃まで-2℃/秒で冷却し、85℃から25℃まで-0.1℃/秒で冷却した。

【 0 1 8 6 】

続いて、再アニーリング後のPCR産物に10単位のT7エンドヌクレアーゼI（T7EI、Cat.No.M0302S、NEB社）を添加し、37℃で15分間処理した。続いて、反応液量の1/10容量の0.25M EDTA溶液を添加することによりT7EIの活性を停止させ、その後サンプルは低温（氷上）を維持した。

【 0 1 8 7 】

続いて、T7EI処理したPCR産物を2%アガロースゲル電気泳動し、切断バンドと未切断バンドのDNAシグナル強度をImageJソフトウェアで定量した。

【 0 1 8 8 】

図5（b）は各sgRNAを用いた場合のゲノムDNA変異導入効率をT7EIアッセイで解析した結果を示す。図5（b）中、「T7EI」はT7エンドヌクレアーゼIを示し、「-」は添加しなかったことを示し、「+」は添加したことを示す。また、「ex3-g1」はA0207-ex3-g1を導入した結果であることを示し、「ex3-g2」はA0207-ex3-g2を導入した結果であることを示し、「ex3-g4」はA0207-ex3-g4を導入した結果であることを示し、「DMD#1」は陽性対照と

10

20

30

40

50

して使用した、ジストロフィン遺伝子に特異的な s g R N A を導入した結果であることを示す。また、矢頭は T 7 E I により切断されたバンドを示す。

【 0 1 8 9 】

その結果、A 0 2 0 7 - e x 3 - g 4 s g R N A が最もゲノム切断活性が高いことが明らかとなった。

【 0 1 9 0 】

[実験例 7]

(H L A アレル特異的ノックアウト 1)

《 H L A タンパク質の発現の確認 》

H L A の細胞表面での発現を確認するために、H L A 抗原型 A 2 を持つ i P S 細胞株を 2 株 (1 3 8 3 D 2 株及び 4 0 4 C 2 株) 選択した。また、H L A 抗原型 A 2 を持たない i P S 細胞株として 6 0 4 B 1 株を選択した。合計 3 株の未分化 i P S 細胞に対して、サイトカイン未処理の場合と 5 0 n g / m L の I F N - γ で 4 8 時間処理した場合において、抗 H L A - A 2 抗体 (品番 : 7 4 0 0 8 2 、 B D 社) を用いて細胞を染色し、フローサイトメトリー解析を行った。

10

【 0 1 9 1 】

図 6 (a) はフローサイトメトリー解析の結果を示すグラフである。その結果、I F N - γ 処理によって、1 3 8 3 D 2 細胞及び 4 0 4 C 2 細胞において H L A - A 2 の特異的な発現が確認できた。

【 0 1 9 2 】

20

《 H L A アレル特異的ノックアウト 》

続いて、上述した s g R N A である、A 0 2 0 7 - e x 3 - g 1 (標的塩基配列を配列番号 3 に示す。) 、 A 0 2 0 7 - e x 3 - g 2 (標的塩基配列を配列番号 4 に示す。) 及び A 0 2 0 7 - e x 3 - g 4 (標的塩基配列を配列番号 7 に示す。) を、精製 C a s 9 タンパク質と共に 1 3 8 3 D 2 i P S 細胞にそれぞれトランスフェクションした。トランスフェクションは市販のキット (型式「 C R I S P R - M A X 」、品番 : C M A X 0 0 0 0 3 、サーモフィッシャーサイエンティフィック社) を用いて行った。

【 0 1 9 3 】

また、H L A 遺伝子を破壊しないコントロールの s g R N A として、X 染色体上のジストロフィン (D M D) 遺伝子をターゲットとする s g R N A - D M D # 1 (標的塩基配列を配列番号 6 1 に示す。) を用いた。

30

【 0 1 9 4 】

続いて、トランスフェクションした各 i P S 細胞をそれぞれ 2 つのウェル中で継代し、一方のウェルはサイトカイン未処理のまま維持し、もう一方のウェルは培地に 5 0 n g / m L の I F N - γ を添加して 4 8 時間処理した。その後、抗 H L A - A 2 抗体 (品番 : 7 4 0 0 8 2 、 B D 社) を用いてフローサイトメトリー解析を行った。

【 0 1 9 5 】

図 6 (b) はフローサイトメトリー解析の結果を示すグラフである。その結果、ゲノム切断活性が最も大きかった A 0 2 0 7 - e x 3 - g 4 s g R N A を用いた場合に、最も多くの H L A - A 2 抗原が破壊された細胞が出現することが明らかとなった。

40

【 0 1 9 6 】

《 s g R N A の標的部位の塩基配列の解析 》

続いて、s g R N A (A 0 2 0 7 - e x 3 - g 4) を導入した 1 3 8 3 D 2 i P S 細胞からゲノム DNA を抽出し、A * 0 2 : 0 7 アレルを特異的に増幅し、A * 3 2 : 0 1 アレルを増幅しないプライマーを用いて N e s t e d P C R を行い s g R N A のターゲット部位を増幅した。N e s t e d P C R には、下記表 6 に示すプライマーを使用した。

【 0 1 9 7 】

【表 6】

1st PCR用プライマー

プライマー名	塩基配列	配列番号
1383D2-HLA-A-be-ex1-fwd	TTGGGGATTCCCCAACTCC	41
HLA-A-in7-rev	GTCCACTGTTCCGCCCAA	42

2nd PCR用プライマー

プライマー名	塩基配列	配列番号
HLA-A0207-ex2-fwd	GGTCCGGAGTATTGGGACGG	43
HLA-A0207-ex3-rev	TCTCAACTGCTCCGCCACAT	44

10

【0198】

続いて、PCR産物をTAクローニングでpGEM-T-Easyベクター(Promega社)にクローニングした。続いて、大腸菌コロニーを21株回収し、サンガーシーケンスにより塩基配列を決定した。その結果、11株は野生型の塩基配列を有していたが、10株(欠損4株と挿入6株)には何らかの挿入欠失変異(Indel変異)を生じたことが明らかとなった。

【0199】

また、sgRNA(A0207-ex3-g4)を導入した1383D2 iPS細胞を、抗HLA-A2抗体(品番:740082、BD社)で染色し、フローサイトメーターにてHLA-A2抗原が陰性となった細胞をソートした。ソートしたiPS細胞からゲノムDNAを抽出し、標的アレルであるA*02:07アレルを特異的に増幅するプライマー(上述)をそれぞれ用いてのNested PCRを行った。また、標的ではないA*32:01アレルを特異的に増幅するプライマーをそれぞれ用いてNested PCRを行った。A*32:01アレルのNested PCRには、下記表7に示すプライマーを使用した。

20

【0200】

【表 7】

1st PCR用プライマー

プライマー名	塩基配列	配列番号
1383D2-HLA-A-be-ex1-fwd	TTGGGGATTCCCCAACTCC	41
HLA-A-in7-rev	GTCCACTGTTCCGCCCAA	42

30

2nd PCR用プライマー

プライマー名	塩基配列	配列番号
HLA-A3201-ex2-fwd	GGGCCGGAGTATTGGGACCA	70
HLA-A3201-ex3-rev	CTCAACTGCTCCGCCACAT	71

【0201】

続いて、PCR産物をTAクローニングでpGEM-T-Easyベクター(Promega社)にクローニングした。大腸菌コロニーを16株(A*02:07アレル)及び19株(A*32:01アレル)回収し、サンガーシーケンスにより塩基配列を決定した。続いて、決定した塩基配列に基づいて、配列に欠損があるクローン数、挿入があるクローン数、そして配列変化の無かったクローン数を計測した。

40

【0202】

その結果、A*02:07アレルには、16株の全てのサブクローンにおいて、何らかの挿入欠失変異(Indel変異)が生じていた。一方、A*32:01アレルは、19株の全てのサブクローンにおいて野生型の塩基配列であることが確認された。

【0203】

図7は、iPS細胞1383D2株にsgRNAを導入してゲノム編集を誘導した後、HLA-A2抗原発現によるソーティングを行わなかった場合と、HLA-A2抗原発現

50

が陰性となった細胞群をソーティングした場合のゲノムDNA変異導入効率を示すグラフである。

【0204】

その結果、HLA抗原陰性細胞を分取することにより、A*02:07ターゲットアレルがゲノム編集された細胞の割合が上昇することが明らかとなった。また、非ターゲットアレルであるHLA-A*32:01アレルには、全く変異が導入されていないことが確認された。

【0205】

[実験例 8]

(HLAアレル特異的ノックアウト2)

下記表8のHLAハプロタイプを持つ604B1 iPS細胞のHLAアレルを破壊することにより、下記表9に示す仮想的なHLAハプロタイプを持つレシピエントAに他家移植を行う場合の拒絶反応が低減された低抗原性細胞を作製した。なお、下記表9に示すHLAハプロタイプは、末梢血単核球細胞(PBMC、型式「LP_194」、CTL社)のHLAハプロタイプである。

【0206】

表8及び表9に示すように、604B1 iPS細胞にはA*01:01アレル、B*07:02アレルが存在する。そして、これらのHLAアレルは、レシピエントAには存在しない。このため、604B1 iPS細胞又は604B1 iPS細胞から分化誘導された細胞をレシピエントに移植すると、レシピエントAの持つT細胞によって攻撃されて免疫拒絶が起こってしまう。

【0207】

そこで、拒絶反応を低減するためには、レシピエントAに存在せずドナー細胞に存在するHLAアレルである、A*01:01アレルとB*07:02アレルを破壊して、ドナー細胞に特異的なHLAタンパク質を発現しないようにすればよい。

【0208】

【表8】

604B1 iPS細胞のHLAハプロタイプ

HLA-A		HLA-B		HLA-C	
A*01:01	A*24:02	B*07:02	B*37:01	C*06:02	C*07:02

【0209】

【表9】

仮想レシピエントAのHLAハプロタイプ(PBMC「LP_194」、CTL社)

HLA-A		HLA-B		HLA-C	
A*24:02	A*24:02	B*37:01	B*39:06	C*06:02	C*07:02

【0210】

上記の実験例1で同定したsgRNAの中から、A*01:01アレルだけを切断し、A*24:02アレルとは塩基配列が一致しないsgRNA2つ(A0101-ex3-g1(標的塩基配列を配列番号45に示す。))及びA0101-ex3-g2(標的塩基配列を配列番号46に示す。))と、B*07:02アレルだけを切断し、B*37:01アレルとは配列が一致しないsgRNA2つ(B0702-ex2-g1(標的塩基配列を配列番号47に示す。))、B0702-ex2-g2(標的塩基配列を配列番号48に示す。))を選択した。

【0211】

続いて、上記各sgRNAをインビトロ転写反応により合成し、精製Cas9タンパク質と共に604B1 iPS細胞にそれぞれトランスフェクションした。トランスフェクションは市販のキット(型式「CRISPR-MAX」、品番:CMAX00003、サーモフィッシャーサイエンティフィック社)を用いて行った。

【 0 2 1 2 】

s g R N A の導入により A * 0 1 : 0 1 アレル又は B * 0 7 : 0 2 アレルが切断され、その修復の過程で遺伝子変異が生じると、A * 0 1 : 0 1 アレル又は B * 0 7 : 0 2 アレルがノックアウトされ、H L A - A 1 タンパク質又は H L A - B 7 タンパク質を欠失した細胞が得られる。

【 0 2 1 3 】

続いて、各 i P S 細胞を 5 0 n g / m L の I F N - γ で 4 8 時間刺激し、H L A タンパク質を発現誘導した。続いて、各 i P S 細胞を、抗 H L A - A 1 抗体（型式「a b 3 3 8 8 3」、a b c a m 社）又は抗 H L A - B 7 抗体（型式「M C A 9 8 6」、B i o - R a d 社）で染色し、フローサイトメトリーで H L A タンパク質陰性細胞の割合を解析した。

10

【 0 2 1 4 】

図 8 (a) 及び (b) は、フローサイトメトリー解析の結果を示すグラフである。図 8 (a) は、A * 0 1 : 0 1 アレルを破壊した i P S 細胞における H L A - A 1 タンパク質の発現量を測定した結果であり、図 8 (b) は、B * 0 7 : 0 2 アレルを破壊した i P S 細胞における H L A - B 7 タンパク質の発現量を測定した結果である。図 8 (a) 及び (b) 中、「N o t r a n s f e c t i o n」は s g R N A を導入しなかった i P S 細胞の結果を示す。

【 0 2 1 5 】

その結果、s g R N A として A 0 1 0 1 - e x 3 - g 1（標的塩基配列を配列番号 4 5 に示す。）を使用した場合、1 1 . 2 % の細胞が H L A - A 1 タンパク質を欠失したことが明らかとなった。また、s g R N A として A 0 1 0 1 - e x 3 - g 2（標的塩基配列を配列番号 4 6 に示す。）を使用した場合、1 8 . 9 % の細胞が H L A - A 1 タンパク質を欠失したことが明らかとなった。この結果から、A 0 1 0 1 - e x 3 - g 2 がよりノックアウト効率の高い s g R N A であることが明らかとなった。

20

【 0 2 1 6 】

また、s g R N A として B 0 7 0 2 - e x 2 - g 1（標的塩基配列を配列番号 4 7 に示す。）を使用した場合、1 1 . 6 % の細胞が H L A - B 7 タンパク質を欠失したことが明らかとなった。また、s g R N A として B 0 7 0 2 - e x 2 - g 2（標的塩基配列を配列番号 4 8 に示す。）を使用した場合、0 . 7 % の細胞が H L A - B 7 タンパク質を欠失したことが明らかとなった。この結果から、B 0 7 0 2 - e x 2 - g 1 がよりノックアウト効率の高い s g R N A であることが明らかとなった。

30

【 0 2 1 7 】

この結果から、ノックアウト効率の高かった A 0 1 0 1 - e x 3 - g 2 と B 0 7 0 2 - e x 2 - g 1 を選択し、A * 0 1 : 0 1 アレル及び B * 0 7 : 0 2 アレルの双方のノックアウトを行った。具体的には、6 0 4 B 1 i P S 細胞に、選択した 2 種類の s g R N A を精製 C a s 9 タンパク質と共にトランスフェクションした。トランスフェクションは市販のキット（型式「C R I S P R - M A X」、品番：C M A X 0 0 0 0 3、サーモフィッシュアサイエンティフィック社）を用いて行った。

【 0 2 1 8 】

続いて、i P S 細胞を 5 0 n g / m L の I F N - γ で 4 8 時間刺激し、H L A タンパク質を発現誘導した。続いて、i P S 細胞を抗 H L A - A 1 抗体（型式「a b 3 3 8 8 3」、a b c a m 社）及び抗 H L A - B 7 抗体（型式「M C A 9 8 6」、B i o - R a d 社）で染色し、フローサイトメトリーで解析した。

40

【 0 2 1 9 】

図 9 (a) 及び (b) は、フローサイトメトリー解析の結果を示すグラフである。図 9 (a) 中、「N o t r a n s f e c t i o n」は s g R N A を導入しなかった i P S 細胞の解析結果であることを示す。また、図 9 (b) 中、「A 0 1 0 1 - e x 3 - g 2」及び「B 0 7 0 2 - e x 2 - g 1」は、これらの 2 つの s g R N A を共導入して A * 0 1 : 0 1 アレル及び B * 0 7 : 0 2 アレルの双方をノックアウトした i P S 細胞の解析結果であることを示す。

50

【 0 2 2 0 】

また、H L A - A 1 タンパク質及びH L A - B 7 タンパク質の双方が陰性である細胞集団から単細胞ソーティングを行い、15株のサブクローンを回収した。続いて、各サブクローンからゲノムDNAを抽出した。続いて、使用したs g R N AであるA 0 1 0 1 - e x 3 - g 2の標的部位（エクソン3）を含む領域、及びB 0 7 0 2 - e x 2 - g 1の標的部位（エクソン2）を含む領域をそれぞれ増幅するP C R反応を行った後、サンガーシーケンスにより塩基配列を解析した。

【 0 2 2 1 】

図10(a)は、回収した各クローンの塩基変異パターンを示す図である。図10(a)中、「W T」は野生型の塩基配列であったことを示し、「-」は欠失変異を有していたことを示し、「+」は挿入変異を有していたことを示す。例えば「- 5 b p」は5塩基の欠損を有していたことを示し、「+ 18 b p」は18塩基の挿入を有していたことを示す。図10(b)では、代表例として2株（# 8及び# 10）の塩基配列を示す。

10

【 0 2 2 2 】

その結果、15株中11株のクローンにおいて、A * 0 1 : 0 1 アレル及びB * 0 7 : 0 2 アレルの双方に何らかの挿入欠失変異（I n d e l 変異）が生じたことが明らかとなった。I n d e l 変異が生じた11株のクローンの中から、フレームシフト変異を生じた2株（# 8及び# 10）を選択し、以下の実験に使用した。

【 0 2 2 3 】

[実験例 9]

20

（H L A アレル特異的のノックアウト 3）

下記表10のH L A ハプロタイプを持つ585A1 i P S細胞のH L A アレルを破壊することにより、下記表11に示す仮想的なH L A ハプロタイプを持つレシピエントBに他家移植を行う場合の拒絶反応が低減された低抗原性細胞を作製した。なお、下記表11に示すH L A ハプロタイプは、末梢血単核球細胞（P B M C、型式「2010113203」、W a k o 社）のH L A ハプロタイプである。

【 0 2 2 4 】

表10及び表11に示すように、585A1 i P S細胞にはB * 0 7 : 0 2 アレル、C * 0 7 : 0 2 アレルが存在する。そして、これらのH L A アレルは、レシピエントBには存在しない。このため、585A1 i P S細胞又は585A1 i P S細胞から分化誘導された細胞をレシピエントに移植すると、レシピエントBの持つT細胞によって攻撃されて免疫拒絶が起こってしまう。

30

【 0 2 2 5 】

そこで、拒絶反応を低減するためには、レシピエントBに存在せずドナー細胞に存在するH L A アレルである、B * 0 7 : 0 2 アレルとC * 0 7 : 0 2 アレルを破壊して、ドナー細胞に特異的なH L A タンパク質を発現しないようにすればよい。

【 0 2 2 6 】

【 表 1 0 】

585A1 iPS細胞のHLAハプロタイプ

HLA-A		HLA-B		HLA-C	
A * 24:02	A * 24:02	B * 07:02	B * 52:01	C * 07:02	C * 12:02

40

【 0 2 2 7 】

【 表 1 1 】

仮想レシピエントBのHLAハプロタイプ(PBMC「2010113203」、Wako社)

HLA-A		HLA-B		HLA-C	
A * 24:02	A * 24:02	B * 40:06	B * 52:01	C * 08:01	C * 12:02

【 0 2 2 8 】

s g R N Aとして、B * 0 7 : 0 2 アレル特異的なB 0 7 0 2 - e x 2 - g 1（標的塩

50

基配列を配列番号 47 に示す。) 及び C*07:02 アレル特異的な C0702-ex3-g3 (標的塩基配列を配列番号 49 に示す。) を用いた。また、トランスフェクションに市販のキット (商品名「4D-Nucleofector」、型式「V4XP-4032」、ロンザ社) を使用した以外は実験例 7 と同様にして、585A1 iPS 細胞の B*07:02 アレル及び C*07:02 アレルの双方のノックアウトを行った。

【0229】

続いて、iPS 細胞を 50 ng/mL の IFN- γ で 48 時間刺激し、HLA タンパク質を発現誘導した。続いて、iPS 細胞を抗 HLA-B7 抗体 (型式「MCA986」、Bio-Rad 社) で染色し、フローサイトメトリーで解析した。

【0230】

図 11 はフローサイトメトリー解析の結果を示すグラフである。図 11 中、「No stain」は抗体で染色しなかった iPS 細胞の解析結果であることを示し、「No transfection」は sgRNA を導入しなかった iPS 細胞の解析結果であることを示し、「B0702-ex2-g1」及び「C0702-ex3-g3」は、これらの sgRNA を導入して B*07:02 アレル及び C*07:02 アレルの双方をノックアウトした iPS 細胞の解析結果であることを示す。

【0231】

また、HLA-B7 タンパク質が陰性である細胞集団から単細胞ソーティングを行い、28 株のサブクローン回収した。続いて、各サブクローンからゲノム DNA を抽出した。続いて、使用した sgRNA である B0702-ex2-g1 の標的領域 (エクソン 2) を含む領域、及び C0702-ex3-g3 の標的領域 (エクソン 3) を含む領域をそれぞれ増幅する PCR 反応を行った後、サンガーシーケンスにより塩基配列を解析した。

【0232】

図 12 は、回収した各クローンの塩基変異パターンを示す図である。図 12 (a) 中、「WT」は野生型の塩基配列であったことを示し、「-」は欠失変異を有していたことを示し、「+」は挿入変異を有していたことを示す。図 12 (b) では、代表例として 3 株 (#2、#11 及び #26) の塩基配列を示す。

【0233】

その結果、複数のクローンにおいて、B*07:02 アレル及び C*07:02 アレルの双方に何らかの挿入欠失変異 (Indel 変異) が生じたことが明らかとなった。Indel 変異が生じたクローンの中から、3 株 (#2、#11 及び #26) を選択し、以下の実験に使用した。

【0234】

[実験例 10]

(HLA アレル特異的ノックアウト 4)

下記表 12 の HLA ハプロタイプを持つ 585A1 iPS 細胞の HLA アレルを破壊することにより、下記表 13 に示す仮想的な HLA ハプロタイプを持つレシピエント C に他家移植を行う場合の拒絶反応が低減された低抗原性細胞を作製した。なお、下記表 13 に示す HLA ハプロタイプは、末梢血単核球細胞 (PBMC、型式「LP_266」、CTL 社) の HLA ハプロタイプである。

【0235】

表 12、13 に示すように、585A1 iPS 細胞には B*52:01 アレル、C*12:02 アレルが存在する。そして、これらの HLA アレルは、レシピエント C には存在しない。このため、585A1 iPS 細胞又は 585A1 iPS 細胞から分化誘導された細胞をレシピエント C に移植すると、レシピエント C の持つ T 細胞によって攻撃されて免疫拒絶が起こってしまう。

【0236】

そこで、拒絶反応を低減するためには、レシピエント C に存在せずドナー細胞に存在する HLA アレルである、B*52:01 アレルと C*12:02 アレルを破壊して、ドナー細胞に特異的な HLA タンパク質を発現しないようにすればよい。

10

20

30

40

50

【 0 2 3 7 】

【表 1 2】

585A1 iPS細胞のHLAハプロタイプ

HLA-A		HLA-B		HLA-C	
A*24:02	A*24:02	B*07:02	B*52:01	C*07:02	C*12:02

【 0 2 3 8 】

【表 1 3】

仮想レシピエントCのHLAハプロタイプ(PBMC「LP__266」、CTL社)

HLA-A		HLA-B		HLA-C	
A*03:01	A*24:02	B*07:02	B*40:02	C*03:05	C*07:02

10

【 0 2 3 9 】

s g R N Aとして、C*12:02アレル特異的なC1202-ex3-g1(標的塩基配列を配列番号50に示す。)を用いた点と、細胞のソーティングを行わなかった点以外は実験例9と同様にして、585A1 iPS細胞のC*12:02アレルのノックアウトを行い、17株のサブクローンを得た。なお、細胞のソーティングを行わなかったのは、抗HLA-C12のアレル特異的抗体が入手できなかったためである。

【 0 2 4 0 】

続いて、各サブクローンからゲノムDNAを抽出した。続いて、使用したs g R N AであるC1202-ex3-g1の標的部位(エクソン3)を含む領域を増幅するPCR反応を行った後、サンガーシーケンスにより塩基配列を解析した。

20

【 0 2 4 1 】

図13(a)は、回収した各クローンの塩基変異パターンを示す図である。図13(a)中、「-」は欠失変異を有していたことを示し、「+」は挿入変異を有していたことを示す。その結果、s g R N Aの標的部位付近に何らかの挿入欠失変異(Indel変異)が生じたことが明らかとなった。Indel変異が生じたクローンの中から、フレームシフト変異を生じた#1細胞を選択した。

【 0 2 4 2 】

続いて、C*12:02アレルがノックアウトされた#1細胞に、s g R N AとしてB*52:01アレル特異的なB5201-ex3-g2(標的塩基配列を配列番号51に示す。)を導入してB*52:01アレルのノックアウトを行い、12株のサブクローン(クローン#1-1~#1-12)を得た。なお、細胞のソーティングを行わなかったのは、抗HLA-B52のアレル特異的抗体が入手できなかったためである。

30

【 0 2 4 3 】

続いて、各サブクローンからゲノムDNAを抽出した。続いて、使用したs g R N AであるB5201-ex3-g2の標的部位(エクソン3)を含む領域を増幅するPCR反応を行った後、サンガーシーケンスにより塩基配列を解析した。

【 0 2 4 4 】

図13(b)は、回収した各クローンの塩基変異パターンを示す図である。図13(b)中、「Mut」は置換変異を有していたことを示し、「WT」は野生型の塩基配列であったことを示し、「-」は欠失変異を有していたことを示す。その結果、s g R N Aの標的部位付近に何らかの変異が生じたことが明らかとなった。図13(c)では、代表例として株#1-1の塩基配列を示す。

40

【 0 2 4 5 】

[実験例 1 1]

(HLAアレル特異的ノックアウト5)

下記表14のHLAハプロタイプを持つ604B1 iPS細胞のHLAアレルを破壊することにより、下記表15で示す仮想的なHLAハプロタイプを持つレシピエントCに他家移植を行う場合の拒絶反応が低減された低抗原性細胞を作製した。なお、下記表15

50

に示すHLAハプロタイプは、末梢血単核球細胞（PBMC、型式「LP__266」、CTL社）のHLAハプロタイプである。

【0246】

表14、15に示すように、604B1 iPS細胞には、A*01:01アレル、B*37:01アレル及びC*06:02アレルが存在する。そして、これらのHLAアレルは、レシピエントCには存在しない。このため、604B1 iPS細胞又は604B1 iPS細胞から分化誘導された細胞をレシピエントに移植すると、レシピエントの持つT細胞によって攻撃されて免疫拒絶が起こってしまう。

【0247】

そこで、拒絶反応を低減するためには、レシピエントCに存在せずドナー細胞に存在するHLAアレルである、A*01:01アレル、B*37:01アレル及びC*06:02アレルを破壊して、ドナー細胞に特異的なHLAタンパク質を発現しないようにすればよい。

【0248】

【表14】

604B1 iPS細胞のHLAハプロタイプ

HLA-A		HLA-B		HLA-C	
A*01:01	A*24:02	B*07:02	B*37:01	C*06:02	C*07:02

【0249】

【表15】

仮想レシピエントCのHLAハプロタイプ(PBMC「LP__266」、CTL社)

HLA-A		HLA-B		HLA-C	
A*03:01	A*24:02	B*07:02	B*40:02	C*03:05	C*07:02

【0250】

sgRNAとして、A*01:01アレル特異的なA0101-ex3-g2（標的塩基配列を配列番号46に示す。）を用いて、実験例9と同様に、604B1 iPS細胞のA*01:01アレルをノックアウトした。続いて、この細胞に、C*06:02アレル特異的なsgRNAであるC0602-ex3-g1（標的塩基配列を配列番号52に示す。）を導入してC*06:02アレルのノックアウトを行い、9株のサブクローンを得た。

【0251】

続いて、各サブクローンからゲノムDNAを抽出した。続いて、使用したsgRNAであるA0101-ex3-g2の標的部（エクソン3）を含む領域、及びC0602-ex3-g1の標的部（エクソン3）を含む領域をそれぞれ増幅するPCR反応を行った後、サンガーシーケンスにより塩基配列を解析した。

【0252】

図14(a)は、回収した各クローンの塩基変異パターンを示す図である。図14(a)中、「WT」は野生型の塩基配列であったことを示し、「-」は欠失変異を有していたことを示し、「+」は挿入変異を有していたことを示す。その結果、sgRNAの標的部位付近に何らかの挿入欠失変異（Indel変異）が生じたクローンが得られた。図14(b)では、Indel変異が生じたクローンの中から、フレームシフト変異を生じたクローン#3を代表例として塩基配列を示す。

【0253】

続いて、A*01:01アレル及びC*06:02アレルがノックアウトされたクローン#3に、sgRNAとしてHLA-Bアレル特異的なB-ex2-g1（標的塩基配列を配列番号53に示す。）を導入してB*37:01アレルのみがノックアウトされたクローンの取得を試みた。なお、B-ex2-g1はB*37:01アレル及びB*07:02アレルの両方を標的とするsgRNAである。

10

20

30

40

50

【 0 2 5 4 】

続いて、i P S 細胞を 5 0 n g / m L の I F N - γ で 4 8 時間刺激し、H L A タンパク質を発現誘導した。続いて、i P S 細胞を抗 H L A - B 7 抗体（型式「M C A 9 8 6」、B i o - R a d 社）で染色し、フローサイトメトリーで解析した。

【 0 2 5 5 】

図 1 5 (a) はフローサイトメトリー解析の結果を示すグラフである。図 1 5 (a) 中、「N o s t a i n」は抗体で染色しなかった i P S 細胞の解析結果であることを示し、「N o t r a n s f e c t i o n」は s g R N A を導入しなかった i P S 細胞の解析結果であることを示し、「B - e x 2 - g 1」は、この s g R N A を導入して H L A - B アレルをノックアウトした i P S 細胞の解析結果であることを示す。

10

【 0 2 5 6 】

また、H L A - B 7 タンパク質が陽性である細胞集団から単細胞ソーティングを行い、1 2 株のサブクローン（クローン # 3 - 1 ~ # 3 - 1 2）を回収した。続いて、各サブクローンからゲノム D N A を抽出した。続いて、使用した s g R N A である B - e x 2 - g 1 の標的部位（エクソン 2）を含む領域の、標的とした B * 3 7 : 0 1 アレル及び標的としなかった B * 0 7 : 0 2 アレルをそれぞれ増幅する P C R 反応を行った後、サンガーシーケンスにより塩基配列を解析した。

【 0 2 5 7 】

図 1 5 (b) は、回収した各クローンの塩基変異パターンを示す図である。図 1 5 (b) 中、「M u t」は置換変異を有していたことを示し、「W T」は野生型の塩基配列であったことを示し、「-」は欠失変異を有していたことを示し、「+」は挿入変異を有していたことを示す。その結果、s g R N A の標的部位付近に何らかの挿入欠失変異（I n d e l 変異）が生じたクローンが得られた。図 1 5 (c) では、B * 3 7 : 0 1 アレルのみに I n d e l 変異が生じたクローンの中から、2 株（クローン # 3 - 1 1 及び # 3 - 1 2）を代表例として塩基配列を示す。

20

【 0 2 5 8 】

[実験例 1 2]

(H L A アレル特異的ノックアウト 6)

下記表 1 6 の H L A ハプロタイプを持つ 6 0 4 B 1 i P S 細胞の H L A アレルを破壊することにより、H L A - A アレル、H L A - B アレル、H L A - C アレルの 3 遺伝子座全てをノックアウトした細胞を作製した。図 1 6 (a) は本実験例で使用した s g R N A の標的部位を示す図である。

30

【 0 2 5 9 】

【表 1 6】

604B1 iPS細胞のHLAハプロタイプ

HLA-A		HLA-B		HLA-C	
A*01:01	A*24:02	B*07:02	B*37:01	C*06:02	C*07:02

【 0 2 6 0 】

s g R N A として、H L A - B アレル及び H L A - C アレルの双方を標的とすることができる B C - e x 2 - g 1（標的塩基配列を配列番号 5 4 に示す。）を用いて、実験例 9 と同様に、6 0 4 B 1 i P S 細胞の B * 0 7 : 0 2 アレル、B * 3 7 : 0 1 アレル、C * 0 6 : 0 2 アレル及び C * 0 7 : 0 2 アレルをノックアウトした。

40

【 0 2 6 1 】

続いて、i P S 細胞を 5 0 n g / m L の I F N - γ で 4 8 時間刺激してフローサイトメトリー解析を行い、H L A - B タンパク質及び H L A - C タンパク質の発現を検討した。図 1 6 (b) はフローサイトメトリーの結果を示すグラフである。図 1 6 (b) 中、「N o s t a i n」は抗体で染色しなかった i P S 細胞の解析結果であることを示し、「N o t r a n s f e c t i o n」は s g R N A を導入しなかった i P S 細胞の解析結果であることを示し、「B C - e x 2 - g 1」は、この s g R N A を導入して H L A - B アレル、

50

H L A - C アレルの双方をノックアウトした i P S 細胞の解析結果であることを示す。

【 0 2 6 2 】

続いて、H L A - B タンパク質及び H L A - C タンパク質の双方が陰性である細胞集団をソーティングして回収した。続いて、回収した細胞集団に、H L A - A 遺伝子の両アレルを標的とすることができる A - e x 3 - g 1 (標的塩基配列を配列番号 5 5 に示す。) を導入し、A * 0 1 : 0 1 アレル及び A * 2 4 : 0 2 アレルをノックアウトした。

【 0 2 6 3 】

続いて、i P S 細胞を 5 0 n g / m L の I F N - γ で 4 8 時間刺激してフローサイトメトリー解析を行い、H L A - A タンパク質、H L A - B タンパク質及び H L A - C タンパク質の発現を検討した。図 1 6 (c) はフローサイトメトリーの結果を示すグラフである。図 1 6 (c) 中、「N o s t a i n」は抗体で染色しなかった i P S 細胞の解析結果であることを示し、「N o t r a n s f e c t i o n」は s g R N A を導入しなかった i P S 細胞の解析結果であることを示し、「A - e x 3 - g 1」は、この s g R N A を導入して H L A - A アレルをノックアウトした i P S 細胞の解析結果であることを示す。

【 0 2 6 4 】

続いて、H L A - A タンパク質、H L A - B タンパク質及び H L A - C タンパク質の全てが陰性である細胞集団の単細胞ソーティングを行い、8 株のサブクローンを回収した。続いて、各サブクローンからゲノム D N A を抽出した。続いて、使用した s g R N A の標的部位を含む領域をそれぞれ増幅する P C R 反応を行った後、サンガーシーケンスにより塩基配列を解析した。

【 0 2 6 5 】

図 1 7 (a) は、回収したクローンのうちの 1 つ (クローン # 1) の塩基変異パターンを示す図である。図 1 7 (a) 中、「 - 」は欠失変異を有していたことを示し、「 + 」は挿入変異を有していたことを示す。その結果、A * 0 1 : 0 1 アレル、A * 2 4 : 0 2 アレル、B * 0 7 : 0 2 アレル、B * 3 7 : 0 1 アレル、C * 0 6 : 0 2 アレル及び C * 0 7 : 0 2 アレルの全てに挿入欠失変異 (I n d e l 変異) が生じたクローンが得られたことが確認された。図 1 7 (b) は、クローン # 1 の各 H L A アレルの塩基配列を示す。図 1 7 (b) 中、「W T」は野生型の塩基配列を示す。

【 0 2 6 6 】

[実験例 1 3]

(H L A アレル特異的ノックアウト 7)

下記表 1 7 の H L A ハプロタイプを持つ 5 8 5 A 1 i P S 細胞の H L A アレルを破壊することにより、H L A - A アレル及び H L A - B アレルがノックアウトされており、H L A - C アレルの一方のみがノックアウトされた細胞を作製した。

【 0 2 6 7 】

【表 1 7】

585A1 iPS細胞のHLAハプロタイプ

HLA-A		HLA-B		HLA-C	
A * 24:02	A * 24:02	B * 07:02	B * 52:01	C * 07:02	C * 12:02

【 0 2 6 8 】

s g R N A として、H L A - A アレルを標的とすることができる A - e x 3 - g 1 (標的塩基配列を配列番号 5 5 に示す。) と、H L A - B アレルを標的とすることができる B - e x 2 - g 1 (標的塩基配列を配列番号 5 3 に示す。) を用いて、実験例 9 と同様にし、5 8 5 A 1 i P S 細胞の A * 2 4 : 0 2 アレル、B * 0 7 : 0 2 アレル及び B * 5 2 : 0 1 アレルをノックアウトした。

【 0 2 6 9 】

続いて、i P S 細胞を 5 0 n g / m L の I F N - γ で 4 8 時間刺激してフローサイトメトリー解析を行い、H L A - A 2 4 抗原、H L A - B 7 抗原の発現を検討した。図 1 8 (a) はフローサイトメトリーの結果を示すグラフである。

【 0 2 7 0 】

続いて、HLA - A 2 4 抗原及びHLA - B 7 抗原の双方が陰性である細胞集団の単細胞ソーティングを行い、10株のサブクローンを回収した。続いて、各サブクローンからゲノムDNAを抽出した。続いて、使用したsgRNAの標的部位を含む領域をそれぞれ増幅するPCR反応を行った後、サンガーシーケンスにより塩基配列を解析した。

【 0 2 7 1 】

図18 (b) は、回収した各クローンの塩基変異パターンを示す図である。図18 (b) 中、「WT」は野生型の塩基配列であったことを示し、「-」は欠失変異を有していたことを示し、「+」は挿入変異を有していたことを示し、「？」は確定できなかったことを示す。その結果、A * 2 4 : 0 2 アレル、B * 0 7 : 0 2 アレル及びB * 5 2 : 0 1 アレルの全てに挿入欠失変異 (I n d e l 変異) が生じたことが明らかとなったクローン # 3 を選択した。図18 (c) に、クローン # 3 の塩基配列を示す。

10

【 0 2 7 2 】

続いて、クローン # 3 に、C * 1 2 : 0 2 アレル特異的なC 1 2 0 2 - e x 3 - g 1 (標的塩基配列を配列番号50に示す。) を導入し、C * 1 2 : 0 2 アレルをノックアウトした。続いて、4株のサブクローン (クローン # 3 - 1 ~ # 3 - 4) を回収した。続いて、各サブクローンからゲノムDNAを抽出した。続いて、C * 0 7 : 0 2 アレル及びC * 1 2 : 0 2 アレルをそれぞれ増幅するPCR反応を行った後、サンガーシーケンスにより塩基配列を解析した。

【 0 2 7 3 】

20

図18 (d) は、回収した各クローンの塩基変異パターンを示す図である。図18 (d) 中、「WT」は野生型の塩基配列であることを示し、「-」は欠失変異を有することを示す。その結果、C * 0 7 : 0 2 アレルが残存しており、C * 1 2 : 0 2 アレルに挿入欠失変異 (I n d e l 変異) が生じたクローンが3株 (クローン # 3 - 1、# 3 - 2、及び # 3 - 3) 得られたことが確認された。図18 (e) に、代表例としてクローン # 3 - 1 の塩基配列を示す。

【 0 2 7 4 】

[実験例 1 4]

(H L A アレル特異的ノックアウト 8)

下記表18のHLAハプロタイプを持つ604B1 iPS細胞のHLAアレルを破壊することにより、HLA - Aアレル及びHLA - Bアレルをノックアウトした細胞を作製した。

30

【 0 2 7 5 】

【 表 1 8 】

604B1 iPS細胞のHLAハプロタイプ

HLA-A		HLA-B		HLA-C	
A * 01:01	A * 24:02	B * 07:02	B * 37:01	C * 06:02	C * 07:02

【 0 2 7 6 】

sgRNAとして、HLA - Aアレルを標的とすることができるA - e x 3 - g 1 (標的塩基配列を配列番号55に示す。) と、HLA - Bアレルを標的とすることができるB - e x 2 - g 1 (標的塩基配列を配列番号53に示す。) を用いて、実験例9と同様にし、604B1 iPS細胞のA * 0 1 : 0 1 アレル、A * 2 4 : 0 2 アレル、B * 0 7 : 0 2 アレル及びB * 3 7 : 0 1 アレルをノックアウトした。

40

【 0 2 7 7 】

続いて、iPS細胞を50ng / mLのIFN - γで48時間刺激してフローサイトメトリー解析を行い、HLA - A 2 4 抗原及びHLA - B 7 抗原の発現を検討した。図19 (a) はフローサイトメトリーの結果を示すグラフである。図19 (a) 中、「No s t a i n」は抗体で染色しなかったiPS細胞の解析結果であることを示し、「No t r a n s f e c t i o n」はsgRNAを導入しなかったiPS細胞の解析結果であるこ

50

とを示し、「A - e x 2 - g 1」及び「B - e x 2 - g 1」は、これらの s g R N A を導入して H L A - A アレル、H L A - B アレルの双方をノックアウトした i P S 細胞の解析結果であることを示す。

【 0 2 7 8 】

続いて、H L A - A 2 4 抗原及び H L A - B 7 抗原の双方が陰性である細胞集団をソーティングして回収し、更に、H L A - A 1 抗原の発現を検討した。図 1 9 (b) はフローサイトメトリーの結果を示すグラフである。図 1 9 (b) 中、「N o s t a i n」は抗体で染色しなかった i P S 細胞の解析結果であることを示し、「H L A - A 2 4 , B 7 (-) s o r t e d」はソートした H L A - A 2 4 抗原及び H L A - B 7 抗原の双方が陰性である細胞集団の解析結果であることを示す。

10

【 0 2 7 9 】

続いて、H L A - A 1 抗原が陰性である細胞集団をソーティングして回収し、2 3 株のサブクローンを回収した。続いて、各サブクローンからゲノム D N A を抽出した。続いて、使用した s g R N A の標的部位を含む領域をそれぞれ増幅する P C R 反応を行った後、サンガーシーケンスにより 7 株の塩基配列を解析した。

【 0 2 8 0 】

図 1 9 (c) は、回収した各クローンの塩基変異パターンを示す図である。図 1 9 (c) 中、「W T」は野生型の塩基配列であったことを示し、「-」は欠失変異を有していたことを示し、「+」は挿入変異を有していたことを示す。その結果、A * 0 1 : 0 1 アレル、A * 2 4 : 0 2 アレル、B * 0 7 : 0 2 アレル及び B * 3 7 : 0 1 アレルの全てに挿入欠失変異 (I n d e l 変異) が生じたクローンが 6 株得られたことが明らかとなった。代表例としてクローン # 4 の塩基配列を図 1 9 (d) に示す。

20

【 0 2 8 1 】

[実験例 1 5]

(H L A アレル特異的ノックアウト 9)

下記表 1 9 の H L A ハプロタイプを持つ 1 3 8 3 D 2 i P S 細胞の H L A アレルを破壊することにより、H L A - A アレル、H L A - B アレル、H L A - C アレルの 3 遺伝子座全てをノックアウトした細胞を作製した。図 2 0 (a) は本実験例で使用した s g R N A の標的部位を示す図である。

【 0 2 8 2 】

30

【表 1 9】

1383D2 iPS細胞のHLAハプロタイプ

HLA-A		HLA-B		HLA-C	
A*02:07	A*32:01	B*15:02	B*51:01	C*08:01	C*14:02

【 0 2 8 3 】

s g R N A として、H L A - B アレル及び H L A - C アレルの双方を標的とすることができる B C - e x 2 - g 1 (標的塩基配列を配列番号 5 4 に示す。) を用いて、実験例 9 と同様にして、1 3 8 3 D 2 i P S 細胞の B * 1 5 : 0 2 アレル、B * 5 1 : 0 1 アレル、C * 0 8 : 0 1 アレル及び C * 1 4 : 0 2 アレルをノックアウトした。

40

【 0 2 8 4 】

続いて、i P S 細胞を 5 0 n g / m L の I F N - γ で 4 8 時間刺激してフローサイトメトリー解析を行い、H L A - B タンパク質及び H L A - C タンパク質の発現を検討した。図 2 0 (b) はフローサイトメトリーの結果を示すグラフである。図 2 0 (b) 中、「N o s t a i n」は抗体で染色しなかった i P S 細胞の解析結果であることを示し、「N o t r a n s f e c t i o n」は s g R N A を導入しなかった i P S 細胞の解析結果であることを示し、「B C - e x 2 - g 1」は、この s g R N A を導入して H L A - B アレル、H L A - C アレルの双方をノックアウトした i P S 細胞の解析結果であることを示す。

【 0 2 8 5 】

続いて、H L A - B タンパク質及び H L A - C タンパク質の双方が陰性である細胞集団

50

をソーティングして回収した。続いて、回収した細胞集団に、H L A - A 遺伝子の両アレルを標的とすることができる A - e x 3 - g 1 (標的塩基配列を配列番号 5 5 に示す。) を導入し、A * 0 2 : 0 7 アレル及び A * 3 2 : 0 1 アレルをノックアウトした。

【 0 2 8 6 】

続いて、i P S 細胞を 5 0 n g / m L の I F N - γ で 4 8 時間刺激してフローサイトメトリー解析を行い、H L A - A タンパク質、H L A - B タンパク質及び H L A - C タンパク質の発現を検討した。

【 0 2 8 7 】

図 2 0 (c) はフローサイトメトリーの結果を示すグラフである。図 2 0 (c) 中、「No s t a i n」は抗体で染色しなかった i P S 細胞の解析結果であることを示し、「No t r a n s f e c t i o n」は s g R N A を導入しなかった i P S 細胞の解析結果であることを示し、「A - e x 3 - g 1」は、この s g R N A を導入して H L A - A アレルをノックアウトした i P S 細胞の解析結果であることを示す。その結果、H L A - A タンパク質、H L A - B タンパク質及び H L A - C タンパク質の全てが陰性である細胞集団の存在が確認された。

10

【 0 2 8 8 】

[実験例 1 6]

(H L A アレルの改変)

下記表 2 0 の H L A ハプロタイプを持つ 1 3 8 3 D 2 i P S 細胞の A * 0 2 : 0 7 アレルを、ゲノム編集により A * 0 1 : 0 1 アレルに改変する検討を行った。

20

【 0 2 8 9 】

【表 2 0 】

1383D2 iPS細胞のHLAハプロタイプ

HLA-A		HLA-B		HLA-C	
A * 02:07	A * 32:01	B * 15:02	B * 51:01	C * 08:01	C * 14:02

【 0 2 9 0 】

まず、いずれも p i g g y B a c トランスポゾンベクターである、二重制御型 C a s 9 発現ベクター及び s g R N A 発現ベクターを、1 3 8 3 D 2 i P S 細胞に導入し、終濃度 1 ~ 1 5 μ g / m L のピューロマイシン (C a t . N o . 2 9 4 5 5 - 5 4、ナカライテスク) 又は終濃度 1 0 0 ~ 2 0 0 μ g / m L ハイグロマイシン B (C a t . N o . 1 0 6 8 7 - 0 1 0、サーモフィッシュサイエンティフィック社) を用いた約 5 日間の薬剤選択により、染色体安定導入細胞集団を得た。

30

【 0 2 9 1 】

二重制御型 C a s 9 発現ベクターは、発現誘導及び細胞内局在の双方を制御することができる C a s 9 の発現ベクターである (Ishida et al., Site-specific randomization of the endogenous genome by a regulatable CRISPR-Cas9 piggyBac system in human cells, Sci. Rep., 8: 310, 2018)。本実験例では、ドキシサイクリン (D o x) を細胞の培地に添加することにより、C a s 9 タンパク質とグルコシルコリド受容体 (G R) との融合タンパク質 (以下、「C a s 9 - G R タンパク質」という。) の発現を誘導することができ、細胞の培地にデキサメタゾン (D e x) を添加することにより、C a s 9 - G R を核内に移行させることができる二重制御型 C a s 9 発現ベクターを使用した。また、s g R N A としては、A 0 2 0 7 - e x 3 - g 1 (標的塩基配列を配列番号 3 に示す。) を使用した。

40

【 0 2 9 2 】

図 2 1 (a) 及び (b) は、本実験例による相同組換えを説明する模式図である。続いて、相同組換えを誘導するために、A * 0 1 : 0 1 アレルのエクソン 1 ~ 3 を含む領域をコードする一本鎖 D N A (標的塩基配列を配列番号 5 6 に示す。) を作製した。

【 0 2 9 3 】

具体的には、まず、6 0 4 B 1 i P S 細胞のゲノム D N A を鋳型として、A * 0 1 :

50

01 アレルのエクソン1の上流67塩基からエクソン3の下流1247塩基の部分、下記表21に示すプライマーを用いたPCRで増幅し、pENTRプラスミドへと組み込み、pENTRベクターを作製した。

【0294】

【表21】

プライマー名	塩基配列	配列番号
604B1-HLA-A-be-ex1+15bp-fwd	ccaattcagtcgacgGTCGCGGTCGCTGTTCTAA	57
604B1-HLA-A-in3+15bp-rev	gtctagatatctcgaTCATCAGTATTTCGAGGGATCGTCT	58

【0295】

続いて、このプラスミドDNAをニッキングエンドヌクレアーゼNb.BsrDI酵素（型番「R0648S」、New England Biolabs社）で処理し、ホルムアミド変性条件下でアガロース電気泳動を行い、相当するDNAバンドを切り出して精製し、目的の一本鎖DNAドナー（lssDNA donor、配列番号56）を調製した。

【0296】

続いて、1383D2 iPS細胞に、二本鎖DNA状態であるpENTRベクター（dsDNA donor）又は調製した一本鎖DNA（lssDNA donor、配列番号56）をそれぞれ導入し、Dox及びDexを、それぞれ終濃度2μM及び1μMで添加し、ゲノム編集による相同組換えを誘導した。

【0297】

続いて、各iPS細胞を50ng/mLのIFN-γで48時間刺激してフローサイトメトリー解析を行い、HLA-A2抗原及びHLA-A1抗原の発現を検討した。

【0298】

図21(c)は、フローサイトメトリーの結果を示すグラフである。図20(c)中、「No stain」は抗体で染色しなかったiPS細胞の解析結果であることを示し、「No Dox/Dex」はCas9発現を誘導しなかったiPS細胞の解析結果であることを示し、「dsDNA donor」は、二本鎖DNAのドナーを導入して相同組換えを誘導したiPS細胞の解析結果であることを示し、「lssDNA donor」は、一本鎖DNAのドナーを導入して相同組換えを誘導したiPS細胞の解析結果であることを示す。

【0299】

その結果、A2抗原が陰性でA1抗原が陽性となった割合は、二本鎖DNAをドナーとして用いた場合は0.2%であったのに対し、一本鎖DNAをドナーとして用いた場合には1.6%であった。

【0300】

続いて、一本鎖DNAドナーを用いた相同組換えによりA2抗原が陰性となり、かつA1抗原が陽性となった細胞集団をフローサイトメトリーでソーティングし、細胞集団のまま、及び単細胞ソーティング後のサブクローンについて、HLA-A遺伝子座の塩基配列を解析した。

【0301】

図22(a)は、細胞集団のまま塩基配列を解析した結果を示す図である。図22(a)中、「Bulk」は細胞集団のまま解析した結果であることを示す。その結果、A*02:07遺伝子座の一部（特にエクソン2とエクソン3の5'側）がA*01:01遺伝子に改変された細胞が混在していることが明らかとなった。

【0302】

また、図22(b)は、単細胞ソーティングした代表的なサブクローン（クローン#2）について塩基配列を解析した結果を示す図である。その結果、A*02:07遺伝子座の一部がA*01:01遺伝子に改変されたことが明らかとなった。

【0303】

[実験例17]

10

20

30

40

50

(B 2 M ノックアウト i P S 細胞の作製 1)

1 3 8 3 D 2 i P S 細胞に C a s 9 を発現するプラスミドベクターと B 2 M 特異的な s g R N A をトランスフェクションした。 s g R N A としては、 B 2 M - g 1 (標的塩基配列を配列番号 5 9 に示す。) 及び B 2 M - g 2 (標的塩基配列を配列番号 6 0 に示す。) を使用した。

【 0 3 0 4 】

続いて、 5 0 n g / m L の I F N - γ で 4 8 時間刺激した細胞を抗 H L A - A B C 抗体で染色し、フローサイトメトリー解析を行った。

【 0 3 0 5 】

図 2 3 (a) はフローサイトメトリーの結果を示すグラフである。図 2 3 (a) 中、「 N o s t a i n 」は抗体で染色しなかった i P S 細胞の解析結果であることを示し、「 N o t r a n s f e c t i o n 」は s g R N A を導入しなかった i P S 細胞の解析結果であることを示し、「 B 2 M - g 1 」、「 B 2 M - g 2 」は、この s g R N A を導入して B 2 M アレルをノックアウトした i P S 細胞の解析結果であることを示す。

10

【 0 3 0 6 】

その結果、 H L A - A タンパク質、 H L A - B タンパク質及び H L A - C タンパク質の全てが陰性である細胞集団の割合は、 s g R N A として B 2 M - g 1 (標的塩基配列を配列番号 5 9 に示す。) を使用した場合、 2 . 8 % であった。また、 s g R N A として B 2 M - g 2 (標的塩基配列を配列番号 6 0 に示す。) を使用した場合、 6 . 9 % であった。

【 0 3 0 7 】

20

続いて、 B 2 M - g 2 s g R N A の導入により得られた、 H L A - A 、 H L A - B 及び H L A - C の全てが陰性である細胞集団から単細胞ソーティングにより、クローン # 1 及び # 2 の 2 株のサブクローンを得た。

【 0 3 0 8 】

得られた 2 株のサブクローンを再び I F N - γ で 4 8 時間刺激してフローサイトメトリー解析を行った。図 2 3 (b) はフローサイトメトリーの結果を示すグラフである。図 2 3 (b) 中、「 B 2 M - K O # 1 」はクローン # 1 の結果であることを示し、「 B 2 M - K O # 2 」はクローン # 2 の結果であることを示す。その結果、いずれのクローンにおいても、 H L A - A 、 H L A - B 及び H L A - C の全てが陰性であることが確認された。

【 0 3 0 9 】

30

続いて、クローン # 1 の B 2 M 遺伝子を P C R 増幅して塩基配列を確認し、挿入欠失変異 (I n d e l 変異) が導入されたことを確認した。図 2 3 (c) にクローン # 1 の B 2 M アレルの塩基配列を示す。図 2 3 (c) 中「 W T 」は野生型の塩基配列を示す。

【 0 3 1 0 】

[実験例 1 8]

(B 2 M ノックアウト i P S 細胞の作製 2)

6 0 4 B 1 i P S 細胞に対し、実験例 1 7 と同様の操作を行い、 B 2 M アレルをノックアウトした。 s g R N A としては、 B 2 M - g 2 (標的塩基配列を配列番号 6 0 に示す。) を使用した。

【 0 3 1 1 】

40

続いて、 5 0 n g / m L の I F N - γ で 4 8 時間刺激した細胞を抗 H L A - A B C 抗体で染色し、フローサイトメトリー解析を行った。

【 0 3 1 2 】

図 2 4 (a) はフローサイトメトリーの結果を示すグラフである。図 2 4 (a) 中、「 N o s t a i n 」は抗体で染色しなかった i P S 細胞の解析結果であることを示し、「 N o t r a n s f e c t i o n 」は s g R N A を導入しなかった i P S 細胞の解析結果であることを示し、「 B 2 M - g 2 」は、この s g R N A を導入して B 2 M アレルをノックアウトしたことを示す。その結果、 H L A - A タンパク質、 H L A - B タンパク質及び H L A - C タンパク質の全てが陰性である細胞集団が得られたことが明らかとなった。

【 0 3 1 3 】

50

続いて、HLA-A、HLA-B及びHLA-Cの全てが陰性である細胞集団から単細胞ソーティングにより、クローン#1、#2、#3及び#4の4株のサブクローンを得た。

【0314】

続いて、これらのサブクローンのB2M遺伝子をPCR増幅して塩基配列を確認した。図24(b)は塩基配列の解析結果を示す図である。その結果、いずれのサブクローンにおいても挿入欠失変異(Indel変異)が導入されたことが確認された。

【0315】

[実験例19]

(T細胞活性化試験1)

(1) 下記表22のHLAハプロタイプを持つ604B1 iPS細胞、(2) 実験例8で作製した、604B1 iPS細胞のA*01:01アレル及びB*07:02アレルをノックアウトしたクローン#8、(3) 同クローン#10、(4) 下記表23のHLAハプロタイプを持つ1383D2 iPS細胞、(5) 実験例18で作製した、B2Mアレルをノックアウトした604B1 iPS細胞(クローン#1)を、それぞれ胚様体(EB)由来血球様細胞に分化誘導した。

【0316】

【表22】

604B1 iPS細胞のHLAハプロタイプ

HLA-A		HLA-B		HLA-C	
A*01:01	A*24:02	B*07:02	B*37:01	C*06:02	C*07:02

【0317】

【表23】

1383D2 iPS細胞のHLAハプロタイプ

HLA-A		HLA-B		HLA-C	
A*02:07	A*32:01	B*15:02	B*51:01	C*08:01	C*14:02

【0318】

続いて、下記表24のHLAハプロタイプを持つ末梢血単核球細胞(PBMC、型式「LP_194」、CTL社、上述したレシピエントAに相当する。)からソーティングにより回収したCD8陽性T細胞をCFSE(ケイマンケミカル社)で染色し、IL-2及びIFN-γの存在下で上記の(1)~(5)の各細胞から分化させたEB由来血球様細胞と8日間共培養した。

【0319】

【表24】

PBMCのHLAハプロタイプ(LP_194、CTL社)

HLA-A		HLA-B		HLA-C	
A*24:02	A*24:02	B*37:01	B*39:06	C*06:02	C*07:02

【0320】

共培養後にフローサイトメトリー解析を行い、CFSEの蛍光を検討した。図25(a)~(e)はフローサイトメトリーの結果を示すグラフである。図25(a)~(e)は、それぞれ、上記(1)~(5)の各細胞から分化させたEB由来血球様細胞と共培養したCD8陽性T細胞の結果である。その結果、各iPS細胞のHLA抗原を特異的に認識するT細胞集団だけが増殖し、CFSEが陰性となったことが確認された。

【0321】

[実験例20]

(T細胞活性化試験2)

(1) 下記表25のHLAハプロタイプを持つ585A1 iPS細胞、(2) 実験例9で作製した、585A1 iPS細胞のB*07:02アレル及びC*07:02アレ

ルをロックアウトしたクローン# 2、(3)同クローン# 11、(4)同クローン# 26、(5)下記表26のHLAハプロタイプを持つ1383D2 iPS細胞、(6)実験例18で作製した、B2Mをロックアウトした604B1 iPS細胞(クローン# 1)を、それぞれEB由来血球様細胞に分化誘導した。

【0322】

【表25】

585A1 iPS細胞のHLAハプロタイプ

HLA-A		HLA-B		HLA-C	
A*24:02	A*24:02	B*07:02	B*52:01	C*07:02	C*12:02

10

【0323】

【表26】

1383D2 iPS細胞のHLAハプロタイプ

HLA-A		HLA-B		HLA-C	
A*02:07	A*32:01	B*15:02	B*51:01	C*08:01	C*14:02

【0324】

続いて、下記表27のHLAハプロタイプを持つ末梢血単核球細胞(PBMC、型式「2010113203」、Wako社、上述したレシピエントBに相当する。)からソーティングにより回収したCD8陽性T細胞をCFSE(ケイマンケミカル社)で染色し、IL-2及びIFN- γ の存在下で上記の(1)~(6)の各細胞から分化させたEB由来血球様細胞と8日間共培養した。

20

【0325】

【表27】

PBMCのHLAハプロタイプ(「2010113203」、Wako社)

HLA-A		HLA-B		HLA-C	
A*24:02	A*24:02	B*40:06	B*52:01	C*08:01	C*12:02

【0326】

共培養後にフローサイトメトリー解析を行い、CFSEの蛍光を検討した。図26(a)~(f)はフローサイトメトリーの結果を示すグラフである。図26(a)~(f)は、それぞれ、上記(1)~(6)の各細胞から分化させたEB由来血球様細胞と共培養したCD8陽性T細胞の結果である。その結果、各iPS細胞のHLA抗原を特異的に認識するT細胞集団が増殖し、CFSEが陰性となったことが確認された。

30

【0327】

[実験例21]

(T細胞活性化試験3)

(1)下記表28のHLAハプロタイプを持つ604B1 iPS細胞、(2)実験例11で作製した、604B1 iPS細胞のA*01:01アレル、B*37:01アレル及びC*06:02アレルをロックアウトしたクローン#3-11、(3)同クローン#3-12、(4)下記表29のHLAハプロタイプを持つ1383D2 iPS細胞、(5)実験例18で作製した、B2Mをロックアウトした604B1 iPS細胞(クローン#1)を、それぞれEB由来血球様細胞に分化誘導した。

40

【0328】

【表28】

604B1 iPS細胞のHLAハプロタイプ

HLA-A		HLA-B		HLA-C	
A*01:01	A*24:02	B*07:02	B*37:01	C*06:02	C*07:02

【0329】

50

【表 29】

1383D2 iPS細胞のHLAハプロタイプ

HLA-A		HLA-B		HLA-C	
A*02:07	A*32:01	B*15:02	B*51:01	C*08:01	C*14:02

【0330】

続いて、下記表30のHLAハプロタイプを持つ末梢血単核球細胞（PBMC、型式「LP__266」、CTL社、上述したレシピエントCに相当する。）からソーティングにより回収したCD8陽性T細胞をCFSE（ケイマンケミカル社）で染色し、IL-2及びIFN- γ の存在下で上記の（1）～（5）の各細胞から分化させたEB由来血球様細胞と8日間共培養した。

10

【0331】

【表 30】

PBMCのHLAハプロタイプ(LP__266、CTL社)

HLA-A		HLA-B		HLA-C	
A*03:01	A*24:02	B*07:02	B*40:02	C*03:05	C*07:02

【0332】

共培養後にフローサイトメトリー解析を行い、CFSEの蛍光を検討した。図27（a）～（e）はフローサイトメトリーの結果を示すグラフである。図27（a）～（e）は、それぞれ、上記（1）～（5）の各細胞から分化させたEB由来血球様細胞と共培養したCD8陽性T細胞の結果である。その結果、各iPS細胞のHLA抗原を特異的に認識するT細胞集団が増殖し、CFSEが陰性となったことが確認された。

20

【0333】

[実験例 22]

（HLA抗原反応性CD8陽性T細胞の調製）

604B1 iPS細胞のHLA抗原に反応性を有するCD8陽性T細胞を調製した。末梢血単核球細胞（PBMC）由来のT細胞には、多様な抗原を認識するT細胞が混在している。これらのT細胞のうち、604B1 iPS細胞のHLA抗原に反応性を有するCD8陽性T細胞を刺激して増殖させ、回収した。

30

【0334】

図28は本実験例の手順を示す模式図である。図28に示すように、まず、604B1 iPS細胞をEB由来血球様細胞に分化させた。EB由来血球様細胞はCD45陽性白血球細胞を含む。続いて、PBMCに含まれるCD8陽性T細胞をCFSE（ケイマンケミカル社）で染色し、IL-2及びIFN- γ の存在下で604B1 iPS細胞から分化させたEB由来血球様細胞と8日間共培養した。

【0335】

続いて、共培養後にフローサイトメトリー解析を行い、CFSEの蛍光を検討した。図29（a）～（e）はフローサイトメトリーの結果を示すグラフである。

【0336】

40

図29（a）はPBMC細胞集団を他家（アロ）であるPBMC細胞集団と共培養した結果を示し、図29（b）はPBMC細胞集団を604B1 iPS細胞から分化させたEB由来血球様細胞と共培養した結果を示し、図29（c）はPBMC細胞集団のみを培養した結果を示し、図29（d）はPBMC細胞集団からソーティングにより回収したCD8陽性T細胞を604B1 iPS細胞から分化させたEB由来血球様細胞と共培養した結果を示し、図29（e）はPBMC細胞集団からソーティングにより回収したCD8陽性T細胞のみを培養した結果を示す。その結果、不適合であるHLA抗原を特異的に認識するT細胞集団が増殖し、CFSEが陰性となったことが確認された。

【0337】

続いて、図29（d）に示す、CFSEが陰性となったCD8陽性T細胞をソーティン

50

グして回収し、604B1 iPS細胞のHLA抗原に反応性を有するT細胞を得た。

【0338】

[実験例23]

(T細胞傷害性試験1)

図30は、本実験例の手順を示す模式図である。まず、(1)下記表31のHLAハプロタイプを持つ604B1 iPS細胞、(2)実験例8で作製した、604B1 iPS細胞のA*01:01アレル及びB*07:02アレルをノックアウトしたクローン#8、(3)同クローン#10、(4)実験例17で作製した、B2Mをノックアウトした1383D2 iPS細胞(クローン#1)を、それぞれ心筋細胞に分化誘導した。

【0339】

【表31】

604B1 iPS細胞のHLAハプロタイプ

HLA-A		HLA-B		HLA-C	
A*01:01	A*24:02	B*07:02	B*37:01	C*06:02	C*07:02

【0340】

続いて、各心筋細胞をIFN- γ で刺激し、HLAタンパク質の発現を誘導した。続いて、後述する ^{51}Cr リリースアッセイを行うために、培地に ^{51}Cr (クロム)を添加して各心筋細胞に取り込ませた。

【0341】

続いて、各心筋細胞の培地に、実験例22で調製した604B1 iPS細胞のHLA抗原に反応性を有するCD8陽性T細胞を様々な割合で添加し、各心筋細胞が攻撃されたか否かを検討した。すなわち、エフェクター細胞として実験例22で調製したHLA抗原反応性CD8T細胞を、ターゲット細胞として上述したiPS細胞由来心筋細胞を使用した。添加するCD8陽性T細胞数の割合は、心筋細胞1に対して、0.625、1.25、2.5、5、10とした。

【0342】

心筋細胞がCD8陽性細胞に攻撃されると、細胞が傷害を受け、細胞内から ^{51}Cr が放出される。そこで、培地中に放出された ^{51}Cr を測定することにより、各心筋細胞が攻撃されたか否かを判断することができる。これを ^{51}Cr リリースアッセイという。 ^{51}Cr でラベル後、何も処理しなかった心筋細胞の上清に含まれる ^{51}Cr の量を0% Specific Lysisと定義し、界面活性剤(Triton-X)によって ^{51}Cr でラベルした心筋細胞を処理して死滅させた際に上清中に放出された ^{51}Cr の量から、通常の培地で ^{51}Cr ラベル心筋細胞を培養した際に上清中に放出された ^{51}Cr の量引いた値を100% Specific Lysisと定義した。

【0343】

図31は、各心筋細胞が傷害を受けて溶解した割合を示すグラフである。図31中、「*」は、 $P < 0.05$ で有意差が存在することを示し、「Non-edited」は、上記(1)の604B1 iPS細胞から分化誘導した心筋細胞の結果であることを示し、「A1-B7-#8」は、上記(2)のクローン#8から分化誘導した心筋細胞の結果であることを示し、「A1-B7-#10」は、上記(3)のクローン#10から分化誘導した心筋細胞の結果であることを示し、「1383D2-B2M-#1」は、上記(4)のB2Mをノックアウトした1383D2 iPS細胞(クローン#1)から分化誘導した心筋細胞の結果であることを示す。

【0344】

その結果、604B1 iPS細胞から分化誘導した心筋細胞は、エフェクターCD8陽性T細胞の割合を上昇させると傷害の程度が上昇することが明らかとなった。

【0345】

これに対し、B2Mをノックアウトした1383D2 iPS細胞から分化誘導した心筋細胞は、エフェクターCD8陽性T細胞の割合を上昇させても傷害を受けないことが明

10

20

30

40

50

らかとなった。同様に、604B1 iPS細胞のA*01:01アレル及びB*07:02アレルをノックアウトした、クローン#8及び#10から分化誘導した心筋細胞は、エフェクターCD8陽性T細胞の割合を上昇させても傷害を受けないことが明らかとなった。

【0346】

この結果は、iPS細胞のHLAアレルを破壊することにより、分化誘導して他家移植した場合の拒絶反応を低減させることができることを示す。

【0347】

また、上記の(2)～(4)の各iPS細胞を心筋細胞に分化誘導できたことは、IFN- γ 処理により、多能性幹細胞の多能性を維持したまま、HLAタンパク質の発現を誘導することができることを示す。

10

【0348】

[実験例24]

(T細胞傷害性試験2)

実験例23と同様の(1)～(4)のiPS細胞をEB由来血球様細胞に分化誘導し、⁵¹Crリリースアッセイを行った。

【0349】

まず、(1)604B1 iPS細胞、(2)実験例7で作製した、604B1 iPS細胞のA*01:01アレル及びB*07:02アレルをノックアウトしたクローン#8、(3)同クローン#10、(4)実験例18で作製した、B2Mをノックアウトした604B1 iPS細胞(クローン#1)を、それぞれEB由来血球様細胞に分化誘導した。なお、EB由来血球様細胞は血球細胞を含む。

20

【0350】

続いて、各EB由来血球様細胞の培地に、実験例22で調製した604B1 iPS細胞のHLA抗原に反応性を有するCD8陽性T細胞を様々な割合で添加し、各EB由来血球様細胞が攻撃されたか否かを検討した。すなわち、エフェクター細胞として実験例21で調製したHLA抗原反応性CD8T細胞を、ターゲット細胞として上述した各EB由来血球様細胞を使用した。添加するCD8陽性T細胞数の割合は、EB由来血球様細胞1に対して、0.625、1.25、2.5、5、10、20とした。

【0351】

30

図32は、各EB由来血球様細胞が傷害を受けて溶解した割合を示すグラフである。図32中、「*」は、 $P < 0.05$ で有意差が存在することを示し、「Non-edited」は、上記(1)の604B1 iPS細胞から分化誘導したEB由来血球様細胞の結果であることを示し、「A1-B7-#8」は、上記(2)のクローン#8から分化誘導したEB由来血球様細胞の結果であることを示し、「A1-B7-#10」は、上記(3)のクローン#10から分化誘導したEB由来血球様細胞の結果であることを示し、「604B1-B2M-#1」は、上記(4)のB2Mをノックアウトした604B1 iPS細胞(クローン#1)から分化誘導したEB由来血球様細胞の結果であることを示す。

【0352】

その結果、604B1 iPS細胞から分化誘導したEB由来血球様細胞は、エフェクターCD8陽性T細胞の割合を上昇させると傷害の程度が上昇することが明らかとなった。

40

【0353】

これに対し、B2Mをノックアウトした604B1 iPS細胞から分化誘導したEB由来血球様細胞は、エフェクターCD8陽性T細胞の割合を上昇させても傷害を受けないことが明らかとなった。同様に、604B1 iPS細胞のA*01:01アレル及びB*07:02アレルをノックアウトした、クローン#8及び#10から分化誘導したEB由来血球様細胞は、エフェクターCD8陽性T細胞の割合を上昇させても傷害を受けないことが明らかとなった。

【0354】

この結果は、iPS細胞のHLAアレルを破壊することにより、分化誘導して他家移植

50

した場合の拒絶反応を低減させることができることを示す。

【 0 3 5 5 】

また、上記の (2) ~ (4) の各 i P S 細胞を E B 由来血球様細胞に分化誘導できたことは、I F N - γ 処理により、多能性幹細胞の多能性を維持したまま、H L A タンパク質の発現を誘導することができることを示す。

【 0 3 5 6 】

[実験例 2 5]

(T 細胞傷害性試験 3)

実験例 2 4 とは異なる i P S 細胞を用いた点以外は実験例 2 4 と同様の検討を行った。まず、(1) 下記表 3 2 の H L A ハプロタイプを持つ 5 8 5 A 1 i P S 細胞、(2) 実験例 9 で作製した、5 8 5 A 1 i P S 細胞の B * 0 7 : 0 2 アレルおよび C * 0 7 : 0 2 アレルをノックアウトしたクローン # 2、(3) 同クローン # 1 1、(4) 同クローン # 2 6、(5) 実験例 1 8 で作製した、B 2 M をノックアウトした 6 0 4 B 1 i P S 細胞 (クローン # 1) を、それぞれ E B 由来血球様細胞に分化誘導した。なお、E B 由来血球様細胞は血球細胞を含む。

【 0 3 5 7 】

【表 3 2】

585A1 iPS細胞のHLAハプロタイプ

HLA-A		HLA-B		HLA-C	
A * 24:02	A * 24:02	B * 07:02	B * 52:01	C * 07:02	C * 12:02

【 0 3 5 8 】

続いて、各 E B 由来血球様細胞の培地に、下記表 3 3 の H L A ハプロタイプを持つ末梢血単核球細胞 (P B M C、型式「2 0 1 0 1 1 3 2 0 3」、W a k o 社、上述したレシピエント B に相当する。) 由来のエフェクター C D 8 陽性 T 細胞を様々な割合で添加し、各 E B 由来血球様細胞が攻撃されたか否かを検討した。エフェクター細胞として、実験例 2 0 の図 2 6 (a) に示す、C F S E が陰性となった P B M C 中の C D 8 陽性 T 細胞をソーティングして用いた。また、ターゲット細胞が上述した各 E B 由来血球様細胞である。添加するエフェクター C D 8 陽性 T 細胞数の割合は、E B 由来血球様細胞 1 に対して、0 . 6 2 5、1 . 2 5、2 . 5、5、1 0、2 0 とした。

【 0 3 5 9 】

【表 3 3】

PBMCのHLAハプロタイプ(「2010113203」、Wako社)

HLA-A		HLA-B		HLA-C	
A * 24:02	A * 24:02	B * 40:06	B * 52:01	C * 08:01	C * 12:02

【 0 3 6 0 】

図 3 3 は、各 E B 由来血球様細胞が傷害を受けて溶解した割合を示すグラフである。図 3 3 中、「*」は、 $P < 0 . 0 5$ で有意差が存在することを示し、「Non - e d i t e d」は、上記 (1) の 5 8 5 A 1 i P S 細胞から分化誘導した E B 由来血球様細胞の結果であることを示し、「B 7 - C 7 - # 2」は、上記 (2) のクローン # 2 から分化誘導した E B 由来血球様細胞の結果であることを示し、「B 7 - C 7 - # 1 1」は、上記 (3) のクローン # 1 1 から分化誘導した E B 由来血球様細胞の結果であることを示し、「B 7 - C 7 - # 2 6」は、上記 (4) のクローン # 2 6 から分化誘導した E B 由来血球様細胞の結果であることを示し、「6 0 4 B 1 - B 2 M - # 1」は、上記 (5) の B 2 M をノックアウトした 6 0 4 B 1 i P S 細胞 (クローン # 1) から分化誘導した E B 由来血球様細胞の結果であることを示す。

【 0 3 6 1 】

その結果、5 8 5 A 1 i P S 細胞から分化誘導した E B 由来血球様細胞は、エフェクター C D 8 陽性 T 細胞の割合を上昇させると傷害の程度が上昇することが明らかとなった。

【 0 3 6 2 】

これに対し、B 2 Mをロックアウトした6 0 4 B 1 i P S細胞から分化誘導したE B由来血球様細胞は、エフェクターC D 8陽性T細胞の割合を上昇させても傷害を受けないことが明らかとなった。同様に、5 8 5 A 1 i P S細胞のB * 0 7 : 0 2アレル及びC * 0 7 : 0 2アレルをロックアウトした、クローン# 2、# 1 1及び# 2 6から分化誘導したE B由来血球様細胞は、エフェクターC D 8陽性T細胞の割合を上昇させても傷害を受けないことが明らかとなった。

【 0 3 6 3 】

この結果は、i P S細胞のH L Aアレルを破壊することにより、分化誘導して他家移植した場合の拒絶反応を低減させることができることを示す。

10

【 0 3 6 4 】

また、上記の(2) ~ (5)の各i P S細胞をE B由来血球様細胞に分化誘導できたことは、I F N - γ処理により、多能性幹細胞の多能性を維持したまま、H L Aタンパク質の発現を誘導することができることを示す。

【 0 3 6 5 】

[実験例 2 6]

(T細胞傷害性試験 4)

下記表 3 4のH L Aハプロタイプを持つ6 0 4 B 1 i P S細胞、及び、実験例 1 8で作製した、B 2 Mをロックアウトした6 0 4 B 1 i P S細胞(クローン# 1)を、下記表 3 5のH L Aハプロタイプを持つ末梢血単核球細胞(P B M C、型式「 L P __ 2 6 6」、CTL社、上述したレシピエントCに相当する。)をC F S E(ケイマンケミカル社)でラベリングしたものと混合し、7日間共培養した。

20

【 0 3 6 6 】

【表 3 4】

604B1 iPS細胞のHLAハプロタイプ

HLA-A		HLA-B		HLA-C	
A*01:01	A*24:02	B*07:02	B*37:01	C*06:02	C*07:02

【 0 3 6 7 】

【表 3 5】

PBMCのHLAハプロタイプ(LP__266、CTL社)

HLA-A		HLA-B		HLA-C	
A*03:01	A*24:02	B*07:02	B*40:02	C*03:05	C*07:02

30

【 0 3 6 8 】

共培養後にフローサイトメトリー解析を行い、C F S Eの蛍光を検討した。図 3 4 (a) 及び (b) はフローサイトメトリーの結果を示すグラフである。図 3 4 (a) 及び (b) 中、「6 0 4 B 1 - B 2 M - # 1」は、B 2 Mをロックアウトした6 0 4 B 1 i P S細胞(クローン# 1)と共培養したP B M Cの結果であることを示し、「6 0 4 B 1」は、6 0 4 B 1 i P S細胞と共培養したP B M Cの結果であることを示す。

40

【 0 3 6 9 】

その結果、図 3 4 (a) に示すように、B 2 Mをロックアウトした6 0 4 B 1 i P S細胞(クローン# 1)と共培養したP B M Cには、C D 8陽性、C S F E陰性のT細胞が1 1 . 3 %含まれていた。また、図 3 4 (b) に示すように、6 0 4 B 1 i P S細胞と共培養したP B M Cには、C D 8陽性、C S F E陰性のT細胞が2 1 . 3 %含まれていた。続いて、図 3 4 (b) に示す、6 0 4 B 1 i P S細胞と共培養したP B M Cから、C D 8陽性かつC S F E陰性の細胞を、エフェクターC D 8陽性T細胞としてソーティングして回収した。

【 0 3 7 0 】

続いて、(1) 6 0 4 B 1 i P S細胞、(2) 実験例 1 1で作製した、6 0 4 B 1 i

50

P S細胞のA * 0 1 : 0 1 アレル、B * 3 7 : 0 1 アレルおよびC * 0 6 : 0 2 アレルをノックアウトしたクローン# 3 - 1 1、(3) 同クローン# 3 - 1 2を、それぞれE B由来血球様細胞に分化誘導した。なお、E B由来血球様細胞は血球細胞を含む。

【 0 3 7 1 】

続いて、各E B由来血球様細胞の培地に、回収したエフェクターC D 8陽性T細胞を様々な割合で添加し、各E B由来血球様細胞が攻撃されたか否かを検討した。すなわち、ターゲット細胞が上記(1) ~ (3) の各細胞から分化誘導したE B由来血球様細胞である。添加するエフェクターC D 8陽性T細胞数の割合は、E B由来血球様細胞1に対して、0 . 6 2 5、1 . 2 5、2 . 5、5、1 0、2 0とした。

【 0 3 7 2 】

図3 4 (c) は、各E B由来血球様細胞が傷害を受けて溶解した割合を示すグラフである。図3 4 (c) 中、「 * 」は、P < 0 . 0 5で有意差が存在することを示し、「N o n - e d i t e d」は、上記(1) の6 0 4 B 1 i P S細胞から分化誘導したE B由来血球様細胞の結果であることを示し、「A 1 - B 3 7 - C 6 - # 3 - 1 1」は、上記(2) のクローン# 3 - 1 1から分化誘導したE B由来血球様細胞の結果であることを示し、「A 1 - B 3 7 - C 6 - # 3 - 1 2」は、上記(3) のクローン# 3 - 1 2から分化誘導したE B由来血球様細胞の結果であることを示す。

【 0 3 7 3 】

その結果、6 0 4 B 1 i P S細胞から分化誘導したE B由来血球様細胞は、エフェクターC D 8陽性T細胞の割合を上昇させると傷害の程度が上昇することが明らかとなった。

【 0 3 7 4 】

これに対し、6 0 4 B 1 i P S細胞のA * 0 1 : 0 1 アレル、B * 3 7 : 0 1 アレルおよびC * 0 6 : 0 2 アレルをノックアウトした、クローン# 3 - 1 1及び# 3 - 1 2から分化誘導したE B由来血球様細胞は、エフェクターC D 8陽性T細胞の割合を上昇させても傷害を受けないことが明らかとなった。

【 0 3 7 5 】

この結果は、i P S細胞のH L Aアレルを破壊することにより、分化誘導して他家移植した場合の拒絶反応を低減させることができることを示す。

【 0 3 7 6 】

また、上記の(2) ~ (3) の各i P S細胞をE B由来血球様細胞に分化誘導できたことは、I F N - γ処理により、多能性幹細胞の多能性を維持したまま、H L Aタンパク質の発現を誘導することができることを示す。

【 0 3 7 7 】

[実験例 2 7]

(N K細胞反応性試験 1)

(1) 下記表3 6のH L Aハプロタイプを持つ6 0 4 B 1 i P S細胞、(2) 実験例8で作製した、6 0 4 B 1 i P S細胞のA * 0 1 : 0 1 アレル及びB * 0 7 : 0 2 アレルをノックアウトしたクローン# 8、(3) 同クローン# 1 0、(4) 下記表3 7のH L Aハプロタイプを持つ1 3 8 3 D 2 i P S細胞、(5) 実験例1 8で作製した、B 2 Mをノックアウトした6 0 4 B 1 i P S細胞(クローン# 1) を、それぞれE B由来血球様細胞に分化させた。なお、E B由来血球様細胞はC D 4 5陽性白血球細胞を含む。

【 0 3 7 8 】

【 表 3 6 】

604B1 iPS細胞のHLAハプロタイプ

HLA-A		HLA-B		HLA-C	
A * 01:01	A * 24:02	B * 07:02	B * 37:01	C * 06:02	C * 07:02

【 0 3 7 9 】

10

20

30

40

50

【表 3 7】

1383D2 iPS細胞のHLAハプロタイプ

HLA-A		HLA-B		HLA-C	
A*02:07	A*32:01	B*15:02	B*51:01	C*08:01	C*14:02

【0380】

また、下記表38のHLAハプロタイプを持つPBMC（型式「LP__194」、CTL社、上述したレシピエントAに相当する。）からCD56陽性細胞（NK細胞）をソーティングにより回収した。続いて、回収したNK細胞を、抗CD107a抗体の存在下で、分化させた各CD45陽性白血球細胞と共培養した。この結果、NK細胞が活性化するとCD107a陽性となる。共培養後にフローサイトメトリー解析を行い、活性化したNK細胞の割合を測定した。

10

【0381】

【表 3 8】

PBMCのHLAハプロタイプ(LP__194、CTL社)

HLA-A		HLA-B		HLA-C	
A*24:02	A*24:02	B*37:01	B*39:06	C*06:02	C*07:02

【0382】

図35(a)～(g)は、フローサイトメトリー解析の結果を示すグラフである。図35(a)はNK細胞のみを培養して解析した結果である。図35(b)は604B1 iPS細胞から分化誘導したEB由来血球様細胞と共培養したNK細胞を解析した結果である。図35(c)は604B1 iPS細胞のA*01:01アレル及びB*07:02アレルをノックアウトしたクローン#8から分化誘導したEB由来血球様細胞と共培養したNK細胞を解析した結果である。図35(d)は同クローン#10から分化誘導したEB由来血球様細胞と共培養したNK細胞を解析した結果である。図35(e)は1383D2 iPS細胞から分化誘導したEB由来血球様細胞と共培養したNK細胞を解析した結果である。図35(f)はB2Mをノックアウトした604B1 iPS細胞から分化誘導したEB由来血球様細胞と共培養したNK細胞を解析した結果である。図35(g)は、陽性対照として、HLA抗原を発現していないことが知られているK562細胞と共培養したNK細胞を解析した結果である。

20

30

【0383】

その結果、K562細胞と共培養したNK細胞は、5.9%が活性化したことが明らかとなった。また、HLA抗原を発現していない、B2Mをノックアウトした604B1 iPS細胞から分化誘導したEB由来血球様細胞と共培養したNK細胞は、3.2%が活性化したことが明らかとなった。

【0384】

これに対し、604B1 iPS細胞のA*01:01アレル及びB*07:02アレルをノックアウトしたクローン#8及び#10では、もう片方のA*24:02アレルとB*37:01アレルの発現が残っており、そこから分化誘導したEB由来血球様細胞と共培養したNK細胞は、活性化が抑制されたことが明らかとなった。

40

【0385】

すなわち、B2Mをノックアウトした細胞は、NK細胞に有意に攻撃されるのに対し、一部のHLAアレルを残存させた細胞は、NK細胞による攻撃を回避することができることが明らかとなった。

【0386】

[実験例28]

(多能性確認試験1)

1383D2 iPS細胞及び604B1 iPS細胞について、(1)未処理の状態、(2)50 ng/mLのIFN-γで48時間処理した直後、及び(3)50 ng/mL

50

の I F N - γ で 4 8 時間処理してから 5 日後、の各細胞をそれぞれ用意し、m R N A を抽出した。続いて、Rever Tra A se q P C R R T Master Mix (T o y o b o 社) を用いて c D N A を合成後、多能性幹細胞で特異的に発現しているヒト N A N O G c D N A を増幅するプライマー、及び、m R N A 総量のコントロールとして、ヒト A C T B c D N A を増幅するプライマーを用いて、定量 P C R を行った。

【 0 3 8 7 】

ヒト N A N O G c D N A の増幅に用いたプライマー、及び、ヒト A C T B c D N A の増幅に用いたプライマーを下記表 3 9 に示す。

【 0 3 8 8 】

【表 3 9 】

プライマー名	塩基配列	配列番号
hNANOG(+4835)-fwd	CTTCACTTCCCAGGTGCAA	66
hNANOG(+4835)-rev	AGGCTAGCCAACATGAGGAA	67
hACTB-Fwd	CCAACCGCGAGAAGATGA	68
hACTB-Rev	CCAGAGGCGTACAGGGATAG	69

【 0 3 8 9 】

図 3 6 は N A N O G 遺伝子の発現量を測定した定量 P C R の結果を示すグラフである。N A N O G 遺伝子の発現量を、「未処理」の 1 3 8 3 D 2 細胞における、A C T B 遺伝子に対する N A N O G 遺伝子の発現量を 1 とした相対値として示した。

【 0 3 9 0 】

図 3 6 中、「未処理」は I F N - γ で処理せず、通常の未分化維持条件で培養した i P S 細胞の結果であることを示し、「I F N 直後」は I F N - γ で 4 8 時間処理した直後の細胞の結果であることを示し、「5 日後」は I F N - γ で 4 8 時間処理してから 5 日後の細胞の結果であることを示す。

【 0 3 9 1 】

その結果、多能性マーカーとして広く用いられている N A N O G の発現量は、i P S 細胞を I F N - γ で 4 8 時間処理しても低下しないことが明らかとなった。この結果は、i P S 細胞を I F N - γ で処理しても多能性が維持されることを示す。

【 0 3 9 2 】

[実験例 2 9]

(多能性確認試験 2)

(1) 6 0 4 B 1 i P S 細胞、(2) 実験例 1 1 で作製した 6 0 4 B 1 i P S 細胞の A * 0 1 : 0 1 アレル、B * 3 7 : 0 1 アレル、C * 0 6 : 0 2 アレルを破壊したクローン # 3 - 1 1、(3) 同クローン # 3 - 1 2、(4) 実験例 1 8 で作製した 6 0 4 B 1 i P S 細胞の B 2 M 遺伝子を破壊したクローン # 1、(5) 1 3 8 3 D 2 i P S 細胞、(6) 実験例 1 7 で作製した 1 3 8 3 D 2 i P S 細胞の B 2 M 遺伝子を破壊したクローン # 1 を、それぞれ未分化維持条件下で培養し、各細胞の形態を位相差顕微鏡で観察した。

【 0 3 9 3 】

未分化維持条件での培養は、培地に A K 0 3 N 培地 (S t e m F i t、A j i n o m o t o 社) を用い、細胞マトリックスに、型式「i M a t r i x - 5 1 1」(N i p p i 社) を用いて行った。

【 0 3 9 4 】

図 3 7 (a) ~ (f) は、それぞれ上記 (1) ~ (5) の各細胞を位相差顕微鏡で撮影した写真である。スケールバーは 1 m m である。

【 0 3 9 5 】

その結果、H L A アレルや B 2 M アレルを破壊し、I F N - γ 処理を行った i P S 細胞も、未分化多能性幹細胞に特徴的な扁平コロニーを形成して増殖することが明らかとなった。この結果は、i P S 細胞を I F N - γ で処理しても多能性が維持されていることを示す。この結果はまた、i P S 細胞の H L A アレルや B 2 M アレルを破壊しても多能性が維

10

20

30

40

50

持されていることを示す。

【0396】

[実験例30]

(多能性確認試験3)

(1) 604B1 iPS細胞、(2) 実験例11で作製した604B1 iPS細胞のA*01:01アレル、B*37:01アレル、C*06:02アレルを破壊したクローン#3-11、(3) 同クローン#3-12、(4) 実験例18で作製した604B1 iPS細胞のB2M遺伝子を破壊したクローン#1、(5) 1383D2 iPS細胞、(6) 実験例17で作製した1383D2 iPS細胞のB2M遺伝子を破壊したクローン#1を、それぞれ血球分化誘導条件下で培養し、EB由来血球様細胞の形態を位相差顕微鏡で観察した。

10

【0397】

iPS細胞の血球分化誘導は次のようにして行った、まず、未分化iPS細胞を超低接着培養プレート(Corning社)に播種し、Y-27633を含むAK03N培地でEB(胚葉体)を2日間形成させた。続いて、ヒトbFGF(オリエンタル酵母社)、ヒトVEGF(R&D Systems社)、ITS(Insulin-Transferrin-Selenium、サーモフィッシャーサイエンティフィック社)、GlutaMax-I(サーモフィッシャーサイエンティフィック社)、L-ascorbic acid 2-phosphate sesquimagnesium salt hydrate(Sigma社)、1-Thioglycerol(MTG、ナカライテスク社)及びヒトBMP4(R&D Systems社)を含むStemPro-34 SFM培地(サーモフィッシャーサイエンティフィック社)で更に3日間培養した後、ヒトBMP4を除去し、ヒトSCFを添加して2日間培養した。続いて、ヒトFlt3-Ligand(Peprotech社)及びヒトTPO(Peprotech社)を加えて培養した。その結果、EB由来血球様細胞が生成された。

20

【0398】

図38(a)~(f)は、それぞれ分化誘導22日目の上記(1)~(5)の各EB由来血球様細胞を位相差顕微鏡で撮影した写真である。スケールバーは1mmである。

【0399】

その結果、HLAアレルやB2Mアレルを破壊し、IFN-γ処理を行ったiPS細胞も、血球様細胞へと分化誘導が可能であることが明らかとなった。この結果は、iPS細胞をIFN-γで処理しても多能性が維持されていることを示す。この結果はまた、iPS細胞のHLAアレルやB2Mアレルを破壊しても多能性が維持されていることを示す。

30

【0400】

[実験例31]

(T細胞傷害性試験5)

(1) 実験例17で作製した、下記表40のHLAハプロタイプを持つ1383D2 iPS細胞のB2Mアレルをノックアウトした細胞(クローン#1)、(2) 下記表41のHLAハプロタイプを持つ585A1 iPS細胞を、CFSE(ケイマンケミカル社)で染色し、下記表42のHLAハプロタイプを持つ末梢血単核球細胞(PBMC、型式「LP_275」、CTL社)と7日間共培養した。

40

【0401】

【表40】

1383D2 iPS細胞のHLAハプロタイプ

HLA-A		HLA-B		HLA-C	
A*02:07	A*32:01	B*15:02	B*51:01	C*08:01	C*14:02

【0402】

【表 4 1】

585A1 iPS細胞のHLAハプロタイプ

HLA-A		HLA-B		HLA-C	
A*24:02	A*24:02	B*07:02	B*52:01	C*07:02	C*12:02

【0403】

【表 4 2】

PBMCのHLAハプロタイプ(LP_275、CTL社)

HLA-A		HLA-B		HLA-C	
A*02:06	A*33:03	B*40:01	B*58:01	C*03:02	C*07:02

10

【0404】

共培養後にフローサイトメトリー解析を行い、C F S E の蛍光を検討した。図 3 9 (a) 及び (b) はフローサイトメトリーの結果を示すグラフである。図 3 9 (a) 及び (b) 中、「1383D2 B2M-KO#1」は、B2Mをノックアウトした1383D2 iPS細胞(クローン#1)と共培養したPBMCの結果であることを示し、「585A1-WT」は、585A1 iPS細胞と共培養したPBMCの結果であることを示す。

【0405】

その結果、図 3 9 (a) に示すように、B2Mをノックアウトした1383D2 iPS細胞(クローン#1)と共培養したPBMCには、CD8陽性、C S F E 陰性のT細胞が存在しなかった。また、図 3 9 (b) に示すように、585A1 iPS細胞と共培養したPBMCには、活性化されてC S F E 陰性となったCD8陽性T細胞が24.4%含まれていた。続いて、図 3 9 (b) に示す、585A1 iPS細胞と共培養したPBMCから、CD8陽性かつC S F E 陰性の細胞を、エフェクターCD8陽性T細胞としてソーティングして回収した。

20

【0406】

続いて、(1)585A1 iPS細胞、(2)実験例13で作製した、585A1 iPS細胞のA*24:02アレル、B*07:02アレル、B*52:01アレル、及びC*12:02アレルをノックアウトしたクローン#3-1、(3)同クローン#3-3、(4)後述する実験例46で作製した、585A1 iPS細胞のB2Mアレルをノックアウトした細胞(サブクローニングしていないバルクの細胞)を、それぞれEB由来血球様細胞に分化誘導した。なお、EB由来血球様細胞は血球細胞を含む。

30

【0407】

続いて、各EB由来血球様細胞の培地に、回収したエフェクターCD8陽性T細胞を様々な割合で添加し、各EB由来血球様細胞が攻撃されたか否かを検討した。すなわち、ターゲット細胞が上記(1)~(4)の各細胞から分化誘導したEB由来血球様細胞である。添加するエフェクターCD8陽性T細胞数の割合は、EB由来血球様細胞1に対して、0.625、1.25、2.5、5、10、20とした。

【0408】

図 3 9 (c) は、各EB由来血球様細胞が傷害を受けて溶解した割合を示すグラフである。図 3 9 (c) 中、「**」は $P < 0.01$ で有意差が存在することを示し、「WT」は上記(1)の585A1 iPS細胞から分化誘導したEB由来血球様細胞の結果であることを示し、「C7#3-1」は上記(2)のクローン#3-1から分化誘導したEB由来血球様細胞の結果であることを示し、「C7#3-3」は上記(3)のクローン#3-3から分化誘導したEB由来血球様細胞の結果であることを示し、「B2M-」は上記(4)の585A1 iPS細胞のB2Mアレルをノックアウトした細胞から分化誘導したEB由来血球様細胞の結果であることを示す。

40

【0409】

その結果、585A1 iPS細胞から分化誘導したEB由来血球様細胞は、エフェクターCD8陽性T細胞の割合を上昇させると傷害の程度が上昇することが明らかとなった。

50

【 0 4 1 0 】

これに対し、585A1 iPS細胞のA*24:02アレル、B*07:02アレル、B*52:01アレル、及びC*12:02アレルをノックアウトした、クローン#3-1及び#3-3から分化誘導したEB由来血球様細胞、及び、585A1 iPS細胞のB2Mアレルをノックアウトした細胞から分化誘導したEB由来血球様細胞は、エフェクターCD8陽性T細胞の割合を上昇させても傷害を受けないことが明らかとなった。

【 0 4 1 1 】

この結果は、iPS細胞のHLAアレルを破壊することにより、分化誘導して他家移植した場合の拒絶反応を低減させることができることを更に支持するものである。

【 0 4 1 2 】

[実験例 3 2]

(T細胞傷害性試験 6)

(1) 実験例 1 7 で作製した、下記表 4 3 のHLAハプロタイプを持つ1383D2 iPS細胞のB2Mアレルをノックアウトした細胞(クローン#1)、(2) 下記表 4 4 のHLAハプロタイプを持つ585A1 iPS細胞を、下記表 4 5 のHLAハプロタイプを持つ末梢血単核球細胞(PBMC、型式「LP_329」、CTL社)をCFSE(ケイマンケミカル社)で染色したものと7日間共培養した。

【 0 4 1 3 】

【表 4 3】

1383D2 iPS細胞のHLAハプロタイプ

HLA-A		HLA-B		HLA-C	
A*02:07	A*32:01	B*15:02	B*51:01	C*08:01	C*14:02

【 0 4 1 4 】

【表 4 4】

585A1 iPS細胞のHLAハプロタイプ

HLA-A		HLA-B		HLA-C	
A*24:02	A*24:02	B*07:02	B*52:01	C*07:02	C*12:02

【 0 4 1 5 】

【表 4 5】

PBMCのHLAハプロタイプ(LP_329, CTL社)

HLA-A		HLA-B		HLA-C	
A*29:02	A*68:01	B*39:06	B*40:02	C*03:05	C*07:02

【 0 4 1 6 】

共培養後にフローサイトメトリー解析を行い、CFSEの蛍光を検討した。図40(a)及び(b)はフローサイトメトリーの結果を示すグラフである。図40(a)及び(b)中、「1383D2 B2M-KO#1」はB2Mをノックアウトした1383D2 iPS細胞(クローン#1)と共培養したPBMCの結果であることを示し、「585A1-WT」は585A1 iPS細胞と共培養したPBMCの結果であることを示す。

【 0 4 1 7 】

その結果、図40(a)に示すように、B2Mをノックアウトした1383D2 iPS細胞(クローン#1)と共培養したPBMCには、CD8陽性、CSFE陰性のT細胞が存在しなかった。また、図40(b)に示すように、585A1 iPS細胞と共培養したPBMCには、活性化されてCSFE陰性となったCD8陽性T細胞が11.7%含まれていた。続いて、図40(b)に示す、585A1 iPS細胞と共培養したPBMCから、CD8陽性かつCSFE陰性の細胞を、エフェクターCD8陽性T細胞としてソーティングして回収した。

【 0 4 1 8 】

10

20

30

40

50

続いて、(1) 585A1 iPS細胞、(2) 実験例13で作製した、585A1 iPS細胞のA*24:02アレル、B*07:02アレル、B*52:01アレル、及びC*12:02アレルをノックアウトしたクローン#3-1、(3) 同クローン#3-3、(4) 後述する実験例46で作製した、585A1 iPS細胞のB2Mアレルをノックアウトした細胞(サブクローニングしていないバルクの細胞)を、それぞれEB由来血球様細胞に分化誘導した。なお、EB由来血球様細胞は血球細胞を含む。

【0419】

続いて、各EB由来血球様細胞の培地に、回収したエフェクターCD8陽性T細胞を様々な割合で添加し、各EB由来血球様細胞が攻撃されたか否かを検討した。すなわち、ターゲット細胞が上記(1)~(4)の各細胞から分化誘導したEB由来血球様細胞である。添加するエフェクターCD8陽性T細胞数の割合は、EB由来血球様細胞1に対して、0.625、1.25、2.5、5、10、20とした。

10

【0420】

図40(c)は、各EB由来血球様細胞が傷害を受けて溶解した割合を示すグラフである。図40(c)中、「**」は $P < 0.01$ で有意差が存在することを示し、「WT」は上記(1)の585A1 iPS細胞から分化誘導したEB由来血球様細胞の結果であることを示し、「C7#3-1」は上記(2)のクローン#3-1から分化誘導したEB由来血球様細胞の結果であることを示し、「C7#3-3」は上記(3)のクローン#3-3から分化誘導したEB由来血球様細胞の結果であることを示し、「B2M⁻」は上記(4)の585A1 iPS細胞のB2Mアレルをノックアウトした細胞から分化誘導したEB由来血球様細胞の結果であることを示す。

20

【0421】

その結果、585A1 iPS細胞から分化誘導したEB由来血球様細胞は、エフェクターCD8陽性T細胞の割合を上昇させると傷害の程度が上昇することが明らかとなった。

【0422】

これに対し、585A1 iPS細胞のA*24:02アレル、B*07:02アレル、B*52:01アレル、及びC*12:02アレルをノックアウトした、クローン#3-1及び#3-3から分化誘導したEB由来血球様細胞、及び、1383D2 iPS細胞のB2Mアレルをノックアウトした細胞から分化誘導したEB由来血球様細胞は、エフェクターCD8陽性T細胞の割合を上昇させても傷害を受けないことが明らかとなった。

30

【0423】

この結果は、iPS細胞のHLAアレルを破壊することにより、分化誘導して他家移植した場合の拒絶反応を低減させることができることを更に支持するものである。

【0424】

[実験例33]

(細胞移植実験1)

(1) 585A1 iPS細胞、(2) 実験例13で作製した、585A1 iPS細胞のA*24:02アレル、B*07:02アレル、B*52:01アレル、及びC*12:02アレルをノックアウトしたクローン#3-1を、それぞれEB由来血球様細胞に分化誘導した。続いて、各EB由来血球様細胞をルシフェラーゼでラベルした。

40

【0425】

続いて、実験開始の1時間前に、腹腔内投与により、免疫不全マウス(NOD.Cg-Rag1^{tm1Mom}Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ(NRG)、The Jackson Laboratory社)に各細胞をそれぞれ移植した。続いて、実験開始時に、実験例32と同様にして調製した、末梢血単核球細胞(PBMC、型式「LP_329」、CTL社)由来のエフェクターCD8陽性T細胞又は培地(対照)を更に腹腔内投与した。

【0426】

続いて、細胞移植時(T細胞注射前)、実験開始から5時間後、1日後、3日後、7日後に、各マウスにルシフェラーゼの基質であるルシフェリンを投与し、IVISイメージングシステム(商品名「IVIS Spectrum」、SPI社)を用いて、ルシフェ

50

レーザーでラベルした E B 由来血球様細胞の蛍光を撮影し、移植した細胞の生存率を測定した。

【 0 4 2 7 】

図 4 1 (a) は実験スケジュールを説明した図である。また、図 4 1 (b) は、各マウスにおける E B 由来血球様細胞の蛍光を撮影した結果を示す写真である。また、図 4 1 (c) は、エフェクター C D 8 陽性 T 細胞をマウスに投与した場合の各 E B 由来血球様細胞の生存率を、T 細胞注射前の蛍光強度を 1 0 0 % として算出した結果を示す相対的生存曲線のグラフである。

【 0 4 2 8 】

図 4 1 (b) 及び (c) 中、「 W T 」は上記 (1) の 5 8 5 A 1 i P S 細胞から分化誘導した E B 由来血球様細胞の結果であることを示し、「 C 7 # 3 - 1 」は上記 (2) のクローン # 3 - 1 から分化誘導した E B 由来血球様細胞の結果であることを示し、「 M o c k 」は対照として培地を投与した結果であることを示し、「 T 細胞」は末梢血単核球細胞 (P B M C 、型式「 L P _ 3 2 9 」、 C T L 社) 由来のエフェクター C D 8 陽性 T 細胞を投与した結果であることを示す。

【 0 4 2 9 】

その結果、図 4 1 (c) に示すように、5 8 5 A 1 i P S 細胞から分化誘導した E B 由来血球様細胞は、エフェクター C D 8 陽性 T 細胞の投与後生存率が低下することが確認された。これに対し、5 8 5 A 1 i P S 細胞の A * 2 4 : 0 2 アレル、B * 0 7 : 0 2 アレル、B * 5 2 : 0 1 アレル、及び C * 1 2 : 0 2 アレルをノックアウトした、クローン # 3 - 1 から分化誘導した E B 由来血球様細胞は、エフェクター C D 8 陽性 T 細胞の投与後でも高い生存率を維持することが明らかとなった。

【 0 4 3 0 】

この結果は、i P S 細胞の H L A アレルを破壊することにより、分化誘導して他家移植した場合の拒絶反応を低減させることができることを更に支持するものである。

【 0 4 3 1 】

[実験例 3 4]

(N K 細胞反応性試験 2)

(1) 5 8 5 A 1 i P S 細胞、(2) 実験例 1 3 で作製した、5 8 5 A 1 i P S 細胞の A * 2 4 : 0 2 アレル、B * 0 7 : 0 2 アレル、B * 5 2 : 0 1 アレル、及び C * 1 2 : 0 2 アレルをノックアウトしたクローン # 3 - 1、(3) 後述する実験例 4 6 で作製した、5 8 5 A 1 i P S 細胞の B 2 M アレルをノックアウトした細胞 (サブクローニングしていないバルクの細胞) を用意した。下記表 4 6 に 5 8 5 A 1 i P S 細胞の H L A ハプロタイプを示し、下記表 4 7 に 1 3 8 3 D 2 i P S 細胞の H L A ハプロタイプを示す。

【 表 4 6 】

585A1 iPS細胞のHLAハプロタイプ

HLA-A		HLA-B		HLA-C	
A * 24:02	A * 24:02	B * 07:02	B * 52:01	C * 07:02	C * 12:02

【 0 4 3 2 】

【 表 4 7 】

1383D2 iPS細胞のHLAハプロタイプ

HLA-A		HLA-B		HLA-C	
A * 02:07	A * 32:01	B * 15:02	B * 51:01	C * 08:01	C * 14:02

【 0 4 3 3 】

また、下記表 4 8 の H L A ハプロタイプを持つ P B M C (型式「 L P _ 2 7 5 」、 C T L 社) から C D 5 6 陽性細胞 (N K 細胞) をソーティングにより回収した。続いて、回収した N K 細胞を、抗 C D 1 0 7 a 抗体の存在下で、上述の (1) ~ (3) の各細胞と共培養した。この結果、N K 細胞が活性化すると C D 1 0 7 a 陽性となる。共培養後にフロー

サイトメトリー解析を行い、活性化したNK細胞の割合を測定した。

【0434】

【表48】

PBMCのHLAハプロタイプ(LP_275, CTL社)

HLA-A		HLA-B		HLA-C	
A*02:06	A*33:03	B*40:01	B*58:01	C*03:02	C*07:02

【0435】

図42(a)は、フローサイトメトリー解析の結果を示すグラフである。図42(a)中、「**」は $P < 0.01$ で有意差が存在することを示し、「WT」は上記(1)の585A1 iPS細胞の結果であることを示し、「C7#3-1」は上記(2)のクローン#3-1の結果であることを示し、「B2M⁻」は上記(3)の585A1 iPS細胞のB2Mアレルをノックアウトした細胞の結果であることを示す。

10

【0436】

その結果、B2Mアレルをノックアウトした細胞と比較して、585A1 iPS細胞及びクローン#3-1では、NK細胞の活性化を有意に抑制することができたことが明らかとなった。続いて、B2Mアレルをノックアウトした細胞で活性化したNK細胞をソーティングして回収した。

【0437】

続いて、(4)HLA抗原を発現していないことが知られているK562細胞、(5)後述する実験例46で作製した、585A1 iPS細胞のB2Mアレルをノックアウトした細胞(サブクローニングしていないバルクの細胞)、(6)後述する実験例47で作製した、585A1 iPS細胞のHLA-Aアレル、HLA-Bアレル及びHLA-Cアレルをノックアウトした細胞(クローン#3-5、HLA-E、F、Gアレルは残存している。)、(7)実験例13で作製した、585A1 iPS細胞のA*24:02アレル、B*07:02アレル、B*52:01アレル、及びC*12:02アレルをノックアウトしたクローン#3-1、(8)同クローン#3-3、(9)実験例13で作製した、585A1 iPS細胞のHLA-Aアレル及びHLA-Bアレルをノックアウトした細胞(クローン#3、HLA-C、E、F、Gアレルは残存している。)、(10)585A1 iPS細胞の各細胞に対し、活性化したNK細胞を様々な割合で添加し、⁵¹Crリリースアッセイを行った。

20

30

【0438】

すなわち、エフェクター細胞として上述の活性化したNK細胞を、ターゲット細胞として上述の(4)～(10)の各細胞を使用した。添加するNK細胞数の割合は、ターゲット細胞1に対して、0.33、1、3とした。

【0439】

図42(b)は上述の(4)～(10)の各細胞が傷害を受けて溶解した割合を示すグラフである。図42(b)中、「*」は $P < 0.05$ で有意差が存在することを示し、「**」は $P < 0.01$ で有意差が存在することを示し、「K562」は上記(4)のK562細胞の結果であることを示し、「B2M⁻」は上記(5)の585A1 iPS細胞のB2Mアレルをノックアウトした細胞の結果であることを示し、「A⁻B⁻C⁻#5」は上記(6)のHLA-Aアレル、HLA-Bアレル及びHLA-Cアレルをノックアウトした細胞(クローン#3-5)の結果であることを示し、「C7#3-1」は上記(7)のクローン#3-1の結果であることを示し、「C7#3-3」は上記(8)のクローン#3-3の結果であることを示し、「A⁻B⁻#3」は上記(9)のHLA-Aアレル及びHLA-Bアレルをノックアウトした細胞(クローン#3)の結果であることを示し、「585A1-WT」は上記(10)の585A1 iPS細胞の結果であることを示す。

40

【0440】

その結果、HLA-Cアレルを残存させた細胞は、B2Mをノックアウトした細胞及びHLA-Aアレル、HLA-Bアレル及びHLA-Cアレルをノックアウトした細胞と比

50

較して、NK細胞による攻撃を有意に回避することができることが明らかとなった。

【0441】

[実験例35]

(NK細胞反応性試験3)

(1) 585A1 iPS細胞、(2) 実験例13で作製した、585A1 iPS細胞のA*24:02アレル、B*07:02アレル、B*52:01アレル、及びC*12:02アレルをノックアウトしたクローン#3-1、(3) 後述する実験例46で作製した、585A1 iPS細胞のB2Mアレルをノックアウトした細胞(サブクローニングしていないバルクの細胞)を用意した。下記表49に585A1 iPS細胞のHLAハプロタイプを示し、下記表50に1383D2 iPS細胞のHLAハプロタイプを示す。

【表49】

585A1 iPS細胞のHLAハプロタイプ

HLA-A		HLA-B		HLA-C	
A*24:02	A*24:02	B*07:02	B*52:01	C*07:02	C*12:02

【0442】

【表50】

1383D2 iPS細胞のHLAハプロタイプ

HLA-A		HLA-B		HLA-C	
A*02:07	A*32:01	B*15:02	B*51:01	C*08:01	C*14:02

【0443】

また、下記表51のHLAハプロタイプを持つPBMC(型式「LP_329」、CTL社)からCD3陰性CD56陽性細胞(NK細胞)をソーティングにより回収した。続いて、回収したNK細胞を、抗CD107a抗体の存在下で、上述の(1)~(3)の各細胞と共培養した。この結果、NK細胞が活性化するとCD107a陽性となる。共培養後にフローサイトメトリー解析を行い、活性化したNK細胞の割合を測定した。

【0444】

【表51】

PBMCのHLAハプロタイプ(LP_329、CTL社)

HLA-A		HLA-B		HLA-C	
A*29:02	A*68:01	B*39:06	B*40:02	C*03:05	C*07:02

【0445】

図43(a)は、フローサイトメトリー解析の結果を示すグラフである。図43(a)中、「**」は $P < 0.01$ で有意差が存在することを示し、「WT」は上記(1)の585A1 iPS細胞の結果であることを示し、「C7#3-1」は上記(2)のクローン#3-1の結果であることを示し、「B2M-」は上記(3)の585A1 iPS細胞のB2Mアレルをノックアウトした細胞の結果であることを示す。

【0446】

その結果、B2Mアレルをノックアウトした細胞と比較して、585A1 iPS細胞及びクローン#3-1では、NK細胞の活性化を有意に抑制することができたことが明らかとなった。続いて、B2Mアレルをノックアウトした細胞で活性化したNK細胞をソーティングして回収した。

【0447】

続いて、(4)HLA抗原を発現していないことが知られているK562細胞、(5)後述する実験例46で作製した、585A1 iPS細胞のB2Mアレルをノックアウトした細胞(サブクローニングしていないバルクの細胞)、(6)後述する実験例47で作製した、585A1 iPS細胞のHLA-Aアレル、HLA-Bアレル及びHLA-Cアレルをノックアウトした細胞(クローン#3-5、HLA-E、F、Gアレルは残存し

10

20

30

40

50

ている。)、(7)実験例13で作製した、585A1 iPS細胞のA*24:02アレル、B*07:02アレル、B*52:01アレル、及びC*12:02アレルをノックアウトしたクローン#3-1、(8)同クローン#3-3、(9)実験例13で作製した、585A1 iPS細胞のHLA-Aアレル及びHLA-Bアレルをノックアウトした細胞(クローン#3、HLA-C、E、F、Gアレルは残存している。)、(10)585A1 iPS細胞の各細胞に対し、活性化したNK細胞を様々な割合で添加し、⁵¹Cr リリースアッセイを行った。

【0448】

すなわち、エフェクター細胞として上述の活性化したNK細胞を、ターゲット細胞として上述の(4)～(10)の各細胞を使用した。添加するNK細胞数の割合は、ターゲット細胞1に対して、0.33、1、3とした。

10

【0449】

図43(b)は上述の(4)～(10)の各細胞が傷害を受けて溶解した割合を示すグラフである。図43(b)中、「**」は $P < 0.01$ で有意差が存在することを示し、「K562」は上記(4)のK562細胞の結果であることを示し、「B2M⁻」は上記(5)の585A1 iPS細胞のB2Mアレルをノックアウトした細胞の結果であることを示し、「A⁻B⁻C⁻#5」は上記(6)のHLA-Aアレル、HLA-Bアレル及びHLA-Cアレルをノックアウトした細胞(クローン#5)の結果であることを示し、「C7#3-1」は上記(7)のクローン#3-1の結果であることを示し、「C7#3-3」は上記(8)のクローン#3-3の結果であることを示し、「A⁻B⁻#3」は上記(9)のHLA-Aアレル及びHLA-Bアレルをノックアウトした細胞(クローン#3)の結果であることを示し、「585A1-WT」は上記(10)の585A1 iPS細胞の結果であることを示す。

20

【0450】

その結果、HLA-Cアレルを残存させた細胞は、B2Mをノックアウトした細胞及びHLA-Aアレル、HLA-Bアレル及びHLA-Cアレルをノックアウトした細胞と比較して、NK細胞による攻撃を有意に回避することができることが明らかとなった。

【0451】

[実験例36]

(NK細胞反応性試験4)

30

(1)585A1 iPS細胞、(2)実験例13で作製した、585A1 iPS細胞のA*24:02アレル、B*07:02アレル、B*52:01アレル、及びC*12:02アレルをノックアウトしたクローン#3-1、(3)後述する実験例46で作製した、585A1 iPS細胞のB2Mアレルをノックアウトした細胞(サブクローニングしていないバルクの細胞)、(4)HLA抗原を発現していないことが知られているK562細胞を用意した。下記表52に585A1 iPS細胞のHLAハプロタイプを示し、下記表53に1383D2 iPS細胞のHLAハプロタイプを示す。

【表52】

585A1 iPS細胞のHLAハプロタイプ

HLA-A		HLA-B		HLA-C	
A*24:02	A*24:02	B*07:02	B*52:01	C*07:02	C*12:02

40

【0452】

【表53】

1383D2 iPS細胞のHLAハプロタイプ

HLA-A		HLA-B		HLA-C	
A*02:07	A*32:01	B*15:02	B*51:01	C*08:01	C*14:02

【0453】

また、下記表54のHLAハプロタイプを持つPBMC(型式「LP__118」、CT

50

L社)及び下記表55のHLAハプロタイプを持つPBMC(型式「LP__266」、CTL社)からCD3陰性CD56陽性細胞(NK細胞)をソーティングによりそれぞれ回収した。続いて、回収したNK細胞を、抗CD107a抗体の存在下で、上述の(1)~(4)の各細胞と共培養した。この結果、NK細胞が活性化するとCD107a陽性となる。共培養後にフローサイトメトリー解析を行い、活性化したNK細胞の割合を測定した。

【0454】

【表54】

PBMCのHLAハプロタイプ(LP__118、CTL社)

HLA-A		HLA-B		HLA-C	
A*03:01	A*24:02	B*07:02	B*35:01	C*07:02	C*07:02

10

【0455】

【表55】

PBMCのHLAハプロタイプ(LP__266、CTL社)

HLA-A		HLA-B		HLA-C	
A*03:01	A*24:02	B*07:02	B*40:02	C*03:05	C*07:02

【0456】

図44(a)及び(b)は、フローサイトメトリー解析の結果を示すグラフである。図44(a)は上記表54のHLAハプロタイプを持つPBMC(型式「LP__118」、CTL社)由来のNK細胞の結果を示し、図44(b)は上記表55のHLAハプロタイプを持つPBMC(型式「LP__266」、CTL社)由来のNK細胞の結果を示す。図44(a)及び(b)中、「**」は $P < 0.01$ で有意差が存在することを示し、「WT」は上記(1)の585A1 iPS細胞の結果であることを示し、「C7#3-1」は上記(2)のクローン#3-1の結果であることを示し、「B2M⁻」は上記(3)の585A1 iPS細胞のB2Mアレルをノックアウトした細胞の結果であることを示し、「K562」は上記(4)のK562細胞の結果であることを示す。

20

【0457】

その結果、B2Mアレルをノックアウトした細胞と比較して、585A1 iPS細胞及びクローン#3-1では、NK細胞の活性化を有意に抑制することができたことが明らかとなった。

30

【0458】

[実験例37]

(細胞移植実験2)

(1)585A1 iPS細胞のB2M遺伝子をノックアウトした細胞、(2)実験例13で作製した、585A1 iPS細胞のA*24:02アレル、B*07:02アレル、B*52:01アレル、及びC*12:02アレルをノックアウトしたクローン#3-1を、それぞれEB由来血球様細胞に分化誘導した。続いて、各EB由来血球様細胞をルシフェラーゼでラベルした。

【0459】

続いて、実験開始の1時間前に、腹腔内投与により、免疫不全マウス(NOD.Cg-Rag1^{tm1Mom}Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ(NRG)、The Jackson Laboratory社)に各細胞をそれぞれ移植した。続いて、実験開始時に、実験例34、35と同様にして調製した、末梢血単核球細胞(PBMC、型式「LP__329」、CTL社)由来の活性化NK細胞又は培地(対照)を更に腹腔内投与した。下記表56にPBMC(型式「LP__329」、CTL社)のHLAハプロタイプを示す。

40

【0460】

50

【表 5 6】

PBMCのHLAハプロタイプ(LP_329、CTL社)

HLA-A		HLA-B		HLA-C	
A*29:02	A*68:01	B*39:06	B*40:02	C*03:05	C*07:02

【0461】

続いて、細胞移植時（NK細胞注射前）、実験開始から5時間後、1日後、3日後、5日後、7日後に、各マウスにルシフェラーゼの基質であるルシフェリンを投与し、I V I S イメージングシステム（商品名「I V I S S p e c t r u m」、S P I社）を用いて、ルシフェラーゼでラベルしたEB由来血球様細胞の蛍光を撮影し、移植した細胞の生存率を測定した。

10

【0462】

図45（a）は実験スケジュールを説明した図である。また、図45（b）は、各マウスにおけるEB由来血球様細胞の蛍光を撮影した結果を示す写真である。また、図45（c）は、NK細胞をマウスに投与した場合の各EB由来血球様細胞の生存率を、NK細胞注射前の蛍光強度を100%として算出し、更に各測定時間における相対的生存率を下記式（F1）により算出した結果を示すグラフである。図45（c）中、縦軸の単位は（%）である。

相対的生存率（%）＝NK細胞投与群の生存率（%）／対照群の生存率（%）×100
...（F1）

20

【0463】

図45（b）及び（c）中、「B2M⁻」は上記（1）の585A1 i P S細胞のB2M遺伝子をノックアウトした細胞から分化誘導したEB由来血球様細胞の結果であることを示し、「C7#3-1」は上記（2）のクローン#3-1から分化誘導したEB由来血球様細胞の結果であることを示し、「Mock」は対照として培地を投与した結果であることを示し、「NK細胞」は末梢血単核球細胞（PBMC、型式「LP_329」、CTL社）由来の活性化NK細胞を投与した結果であることを示す。

【0464】

その結果、図45（c）に示すように、B2M遺伝子をノックアウトした細胞から分化誘導したEB由来血球様細胞は、NK細胞の投与後生存率が低下することが確認された。これに対し、クローン#3-1から分化誘導したEB由来血球様細胞は、活性化NK細胞の投与後でも、より高い生存率を維持する傾向が認められた。

30

【0465】

この結果は、HLAアレルを一部残存させることにより、他家移植した場合のNK細胞による攻撃を低減させることができることを更に支持するものである。

【0466】

[実験例38]

（T細胞及びNK細胞による傷害性試験）

（1）585A1 i P S細胞、（2）実験例13で作製した、585A1 i P S細胞のA*24:02アレル、B*07:02アレル、B*52:01アレル、及びC*12:02アレルをノックアウトしたクローン#3-1、（3）後述する実験例46で作製した、585A1 i P S細胞のB2Mアレルをノックアウトした細胞（サブクローニングしていないバルクの細胞）を、それぞれEB由来血球様細胞に分化誘導した。

40

【0467】

続いて、各EB由来血球様細胞の培地に、実験例31と同様にして、末梢血単核球細胞（PBMC、型式「LP_275」、CTL社）からソーティングして回収したエフェクターCD8陽性T細胞及び実験例34と同様にしてPBMC（型式「LP_275」、CTL社）からソーティングして回収した活性化NK細胞を様々な割合で添加し、⁵¹Cr リリースアッセイを行った。

【0468】

50

すなわち、ターゲット細胞が上記(1)～(3)の各細胞から分化誘導したE B由来血球様細胞であり、エフェクター細胞が上述のCD8陽性T細胞及び活性化NK細胞である。添加するエフェクターCD8陽性T細胞数の割合は、E B由来血球様細胞1に対して、1、3、9とした。また、添加する活性化NK細胞数の割合は、E B由来血球様細胞1に対して、0.33、1、3とした。

【0469】

図46は、各E B由来血球様細胞が傷害を受けて溶解した割合を示すグラフである。図46中、「*」は $P < 0.05$ で有意差が存在することを示し、「**」は $P < 0.01$ で有意差が存在することを示し、「WT」は上記(1)の585A1 iPS細胞から分化誘導したE B由来血球様細胞の結果であることを示し、「C7#3-1」は上記(2)のクローン#3-1から分化誘導したE B由来血球様細胞の結果であることを示し、「B2M⁻」は上記(3)の585A1 iPS細胞のB2Mアレルをノックアウトした細胞から分化誘導したE B由来血球様細胞の結果であることを示す。

10

【0470】

その結果、各E B由来血球様細胞にエフェクターCD8陽性T細胞を単独で混合すると、585A1 iPS細胞から分化誘導したE B由来血球様細胞のみが傷害を受けることが確認された。

【0471】

また、各E B由来血球様細胞に活性化NK細胞を単独で混合すると、B2Mアレルをノックアウトした細胞から分化誘導したE B由来血球様細胞のみが傷害を受けることが確認された。

20

【0472】

また、各E B由来血球様細胞に、エフェクターCD8陽性T細胞及び活性化NK細胞の双方を混合すると、585A1 iPS細胞から分化誘導したE B由来血球様細胞及びB2Mアレルをノックアウトした細胞から分化誘導したE B由来血球様細胞の双方が傷害を受けるが、C7#3-1細胞から分化誘導したE B由来血球様細胞は傷害の程度が有意に抑制されたことが明らかとなった。

【0473】

この結果は、ドナー細胞に存在し、レシピエント細胞に存在しないHLAアレルを破壊し且つドナー細胞とレシピエント細胞で一致するHLAアレルを残存させることにより、エフェクターCD8陽性T細胞及び活性化NK細胞の双方による傷害をいずれも低減させることができることを示すものである。

30

【0474】

[実験例39]

(C I I T A 遺伝子ノックアウトiPS細胞の作製)

C I I T A 遺伝子は、Class II Major Histocompatibility Complex Transactivatorタンパク質をコードする遺伝子である。上述したように、C I I T A 遺伝子の発現はクラスIIのHLAタンパク質の発現に必須であることが知られている。

【0475】

40

実験例13で作製した、585A1 iPS細胞のA*24:02アレル、B*07:02アレル、B*52:01アレル、及びC*12:02アレルをノックアウトしたクローン#3-1(以下、「585A1-C7残存細胞」という場合がある。)のC I I T A 遺伝子をノックアウトした。

【0476】

図47(a)は、585A1-C7残存細胞及びC I I T A 遺伝子をノックアウトした585A1-C7残存細胞のHLAハプロタイプを示す表である。C I I T A 遺伝子をノックアウトすることにより、クラスIIのHLAタンパク質である、HLA-DP、HLA-DQ、HLA-DR等を欠損させることができる。

【0477】

50

具体的には、585A1-C7残存細胞に、精製Cas9タンパク質と共に、CIITAアレルを切断するsgRNAである、CIITA-ex3g5(標的塩基配列を配列番号8017に示す。)をトランスフェクションし、28株のサブクローンを得た。トランスフェクションは市販のキット(商品名「4D-Nucleofector」、型式「V4XP-4032」、ロンザ社)を用いて行った。

【0478】

続いて、各サブクローンのゲノムのCIITAアレルの塩基配列を解析した。図47(b)は、各サブクローンの塩基変異パターンを示す図である。図47(b)中、「Clone ID」はサブクローン名を示し、「WT」は野生型の塩基配列であったことを示し、「-」は欠失変異を有していたことを示し、「+」は挿入変異を有していたことを示す。

10

【0479】

その結果、図47(b)に示すように、28株のサブクローンのうち15株に、少なくとも一方のCIITAアレルに欠失変異又は挿入変異が導入されたことが確認された。図47(c)では、代表例としてクローン#3-1-3の塩基配列を示す。

【0480】

[実験例40]

(CD4陽性T細胞活性化試験)

健康人ボランティア#21由来の末梢血単核球細胞(PBMC)からソーティングによりCD4陽性T細胞を回収し、CFSE(ケイマンケミカル社)で染色した。

【0481】

20

続いて、上記のCD4陽性T細胞を、(1)585A1 iPS細胞、(2)実験例13で作製した、585A1 iPS細胞のA*24:02アレル、B*07:02アレル、B*52:01アレル、及びC*12:02アレルをノックアウトしたクローン#3-1(以下、「585A1-C7残存細胞」という場合がある。)、(3)実験例39で作製した、585A1-C7残存細胞のCIITA遺伝子をノックアウトした細胞(クローン#3-1-3)を混合して1週間共培養した。また、比較のために、(4)上記のCD4陽性T細胞のみを単独で1週間培養した群も用意した。

【0482】

共培養後にフローサイトメトリー解析を行い、CFSEの蛍光を検討した。図48(a)~(d)はフローサイトメトリーの結果を示すグラフである。図48(a)~(d)中、「Mock」は上記(4)のCD4陽性T細胞のみを単独で培養した結果であることを示し、「585A1-WT」は上記(1)の585A1 iPS細胞の結果であることを示し、「585A1-C7#3-1」は上記(2)の585A1-C7残存細胞の結果であることを示し、「585A1-C7+CIITA-#3-1-3」は上記(3)の585A1-C7残存細胞のCIITA遺伝子をノックアウトした細胞(クローン#3-1-3)の結果であることを示す。

30

【0483】

その結果、図48(a)に示すように、CD4陽性T細胞のみを単独で培養しても、CD4陽性T細胞は活性化されないことが明らかとなった。

【0484】

40

また、図48(b)に示すように、健康人ボランティア#21由来のCD4陽性T細胞と585A1 iPS細胞を共培養すると45.6%のCD4陽性T細胞が活性化されてCFSE陰性となったことが明らかとなった。

【0485】

また、図48(c)に示すように、健康人ボランティア#21由来のCD4陽性T細胞と585A1-C7残存細胞を共培養すると49.2%のCD4陽性T細胞が活性化されてCFSE陰性となったことが明らかとなった。

【0486】

また、図48(d)に示すように、健康人ボランティア#21由来のCD4陽性T細胞と585A1-C7残存細胞のCIITA遺伝子をノックアウトした細胞(クローン#3

50

- 1 - 3) を共培養しても、C D 4 陽性 T 細胞は活性化されることが明らかとなった。

【 0 4 8 7 】

[実験例 4 1]

(C D 4 陽性 T 細胞、C D 8 陽性 T 細胞及び N K 細胞の活性化試験)

末梢血単核球細胞 (P B M C、型式「 L P __ 3 2 9」、C T L 社) を C F S E (ケイマ
ンケミカル社) で染色した。下記表 5 7 に P B M C (型式「 L P __ 3 2 9」、C T L 社)
の H L A ハプロタイプを示す。

【 0 4 8 8 】

【表 5 7】

PBMCのHLAハプロタイプ(LP__329、CTL社)

HLA-A		HLA-B		HLA-C	
A * 29 : 02	A * 68 : 01	B * 39 : 06	B * 40 : 02	C * 03 : 05	C * 07 : 02

10

【 0 4 8 9 】

続いて、上記の P B M C を、(1) 5 8 5 A 1 i P S 細胞、(2) 実験例 1 3 で作製
した、5 8 5 A 1 i P S 細胞の A * 2 4 : 0 2 アレル、B * 0 7 : 0 2 アレル、B * 5
2 : 0 1 アレル、及び C * 1 2 : 0 2 アレルをノックアウトしたクローン # 3 - 1 (以下
、「5 8 5 A 1 - C 7 残存細胞」という場合がある。)、(3) 実験例 3 9 で作製した、
5 8 5 A 1 - C 7 残存細胞の C I I T A 遺伝子をノックアウトした細胞 (クローン # 3 -
1 - 3)、(4) 同クローン # 3 - 1 - 6 の各細胞から分化させた E B 由来血球様細胞、
及び、(5) H L A 抗原を発現していないことが知られている K 5 6 2 細胞を混合して 1
週間共培養した。また、比較のために、(6) 上記の P B M C のみを単独で 1 週間培養し
た群も用意した。

20

【 0 4 9 0 】

共培養後にフローサイトメトリー解析を行い、C F S E の蛍光を検討した。図 4 9 (a)
~ (c) はフローサイトメトリーの結果を示すグラフである。図 4 9 (a) ~ (c) 中
、「M o c k」は上記 (6) の P B M C のみを単独で培養した結果であることを示し、「
5 8 5 A 1 - W T」は上記 (1) の 5 8 5 A 1 i P S 細胞から分化誘導した E B 由来血
球様細胞の結果であることを示し、「5 8 5 A 1 - C 7 # 3 - 1」は上記 (2) の 5 8 5
A 1 - C 7 残存細胞から分化誘導した E B 由来血球様細胞の結果であることを示し、「5
8 5 A 1 - C 7 + C I I T A - # 3 - 1 - 3」は上記 (3) の 5 8 5 A 1 - C 7 残存細胞
の C I I T A 遺伝子をノックアウトした細胞 (クローン # 3 - 1 - 3) から分化誘導した
E B 由来血球様細胞の結果であることを示し、「5 8 5 A 1 - C 7 + C I I T A - # 3 -
1 - 6」は上記 (4) の 5 8 5 A 1 - C 7 残存細胞の C I I T A 遺伝子をノックアウトし
た細胞 (クローン # 3 - 1 - 6) から分化誘導した E B 由来血球様細胞の結果であること
を示し、「K 5 6 2」は上記 (5) の K 5 6 2 細胞の結果であることを示す。

30

【 0 4 9 1 】

その結果、図 4 9 (a) に示すように、C D 8 陽性 T 細胞は、5 8 5 A 1 i P S 細胞
から分化誘導した E B 由来血球様細胞に反応し、5 1 . 0 % の C D 8 陽性 T 細胞が活性化
されて C F S E 陰性となったことが明らかとなった。これに対し、5 8 5 A 1 i P S 細胞
から分化誘導した E B 由来血球様細胞以外の細胞と共培養しても、2 % 以下の C D 8 陽
性 T 細胞しか活性化されることが明らかとなった。

40

【 0 4 9 2 】

また、図 4 9 (b) に示すように、C D 4 陽性 T 細胞は、5 8 5 A 1 i P S 細胞から
分化誘導した E B 由来血球様細胞及び 5 8 5 A 1 - C 7 残存細胞から分化誘導した E B 由
来血球様細胞に反応し、それぞれ 4 9 . 2 % 及び 2 6 . 7 % の C D 4 陽性 T 細胞が活性化
されて C F S E 陰性となったことが明らかとなった。これに対し、その他の細胞と共培養
しても、2 % 以下の C D 4 陽性 T 細胞しか活性化されることが明らかとなった。

【 0 4 9 3 】

また、図 4 9 (c) に示すように、N K 細胞は、K 5 6 2 細胞に反応し、7 9 . 2 % の

50

NK細胞が活性化されてC F S E 陰性となったことが明らかとなった。これに対し、その他の細胞と共培養しても、7 %以下のNK細胞しか活性化されないことが明らかとなった。

【0494】

[実験例42]

(H L A - C 7 残存 C I I T A 欠損 i P S 細胞の作製)

日本人において、第3位のH L A アレル頻度をホモに有する i P S ストック細胞 (F f - X t - 2 8 s 0 5 i P S 細胞) から、H L A - A アレル、H L A - B アレル及びC I I T A アレルをノックアウトした。ノックアウトは1段階及び2段階のゲノム編集によりそれぞれ行った。下記表58にF f - X t - 2 8 s 0 5 i P S 細胞のH L A ハプロタイプを示す。

【0495】

【表58】

Ff-Xt-28s05 iPS細胞のHLAハプロタイプ

HLA-A		HLA-B		HLA-C	
A*24:02	A*24:02	B*07:02	B*07:02	C*07:02	C*07:02

【0496】

図50(a)～(c)は、本実験例の手順を説明する図である。図50(a)は、H L A - A アレル、H L A - B アレル及びC I I T A アレルを1段階でノックアウトした手順を説明する図である。また、図50(b)及び(c)は、H L A - A アレル、H L A - B アレル及びC I I T A アレルを2段階でノックアウトした手順を説明する図である。

【0497】

1段階でのノックアウトでは、まず、図50(a)に示すように、F f - X t - 2 8 s 0 5 i P S 細胞に、H L A - A アレルを標的とすることができる s g R N A である A - e x 3 - g 1 (標的塩基配列を配列番号55に示す。)、H L A - B アレルを標的とすることができる s g R N A である B - e x 2 - g 1 (標的塩基配列を配列番号53に示す。)、及び、C I I T A アレルを標的とすることができる s g R N A である C I I T A - e x 3 g 5 (標的塩基配列を配列番号8017に示す。) 及び精製 C a s 9 タンパク質をトランスフェクションした。トランスフェクションは市販のキット (商品名「4D - N u c l e o f e c t o r」、型式「V4XP-4032」、ロンザ社) を用いて行った。

【0498】

続いて、i P S 細胞を50 n g / m L の I F N - γ で48時間刺激してフローサイトメトリー解析を行い、H L A - A 24 抗原及びH L A - B 7 抗原の発現を検討した。図51(a)はフローサイトメトリーの結果を示すグラフである。図51(a)中、「N o s t a i n」は抗体で染色しなかった i P S 細胞の解析結果であることを示し、「N o T F」は s g R N A を導入しなかった i P S 細胞の解析結果であることを示し、「H L A - A - e x 3 g 1」は、A - e x 3 - g 1 (標的塩基配列を配列番号55に示す。) を導入した結果であることを示し、「H L A - B - e x 2 g 1」は、B - e x 2 - g 1 (標的塩基配列を配列番号53に示す。) を導入した結果であることを示し、C I I T A - e x 3 g 5 (標的塩基配列を配列番号8017に示す。) は C I I T A - e x 3 g 5 を導入した結果であることを示す。

【0499】

続いて、H L A - A 24 抗原及びH L A - B 7 抗原の双方が陰性である細胞集団をソーティングして回収し、15株のサブクローンを得た。続いて、各サブクローンのゲノムのH L A - A 24 アレル、H L A - B 7 アレル及びC I I T A アレルの塩基配列を解析した。図51(b)は、各サブクローンの塩基変異パターンを示す図である。図51(b)中、「C l o n e I D」はサブクローン名を示し、「W T」は野生型の塩基配列であったことを示し、「-」は欠失変異を有していたことを示し、「+」は挿入変異を有していたことを示し、「N . D .」は塩基配列を決定しなかったことを示す。また、サブクローン名における「A B T o」は、H L A - A アレル、H L A - B アレル及びC I I T A アレル

10

20

30

40

50

をノックアウトしたことを意味する。

【0500】

その結果、図51(b)に示すように、HLA-Aアレル、HLA-Bアレル、CIIITAアレルの全てに挿入欠失変異(Indel変異)が検出された、クローン#1、#2、#3、#6、#13、#15を得た。

【0501】

2段階でのノックアウトでは、まず、図50(b)に示すように、Ff-Xt-28s05 iPSC細胞に、HLA-Aアレルを標的とすることができるsgRNAであるA-ex3-g1(標的塩基配列を配列番号55に示す。)、HLA-Bアレルを標的とすることができるsgRNAであるB-ex2-g1(標的塩基配列を配列番号53に示す。)及び精製Cas9タンパク質をトランスフェクションし、17株のサブクローンを得た。トランスフェクションは市販のキット(商品名「4D-Nucleofector」、型式「V4XP-4032」、ロンザ社)を用いて行った。

10

【0502】

続いて、各サブクローンのゲノムのHLA-A24アレル及びHLA-B7アレルの塩基配列を解析した。図52(a)は、各サブクローンの塩基変異パターンを示す図である。図52(a)中、「Clone ID」はサブクローン名を示し、「WT」は野生型の塩基配列であったことを示し、「-」は欠失変異を有していたことを示し、「+」は挿入変異を有していたことを示し、「Mut .」は置換変異を有していたことを示す。また、サブクローン名における「ABO」は、HLA-Aアレル及びHLA-Bアレルをノックアウトしたことを意味する。

20

【0503】

その結果、図52(a)に示すように、HLA-Aアレル、HLA-Bアレルの双方に挿入欠失変異(Indel変異)が検出された、クローン#14を得た。

【0504】

続いて、図50(c)に示すように、得られたクローン#14にCIIITAアレルを標的とすることができるsgRNAであるCIIITA-ex3g5(標的塩基配列を配列番号8017に示す。)及び精製Cas9タンパク質をトランスフェクションし、12株のサブクローンを得た。トランスフェクションは市販のキット(商品名「4D-Nucleofector」、型式「V4XP-4032」、ロンザ社)を用いて行った。

30

【0505】

続いて、各サブクローンのゲノムのCIIITAアレルの塩基配列を解析した。図52(b)は、各サブクローンの塩基変異パターンを示す図である。図52(b)中、「Clone ID」はサブクローン名を示し、「WT」は野生型の塩基配列であったことを示し、「-」は欠失変異を有していたことを示し、「+」は挿入変異を有していたことを示し、「N.D .」は塩基配列を決定しなかったことを示す。また、サブクローン名における「ABO__To」は、HLA-Aアレル及びHLA-Bアレルをノックアウトして一度サブクローニングした後、CIIITAアレルをノックアウトしたことを意味する。

【0506】

その結果、図52(b)に示すように、CIIITAの双方のアレルにフレームシフト変異となる挿入欠失変異(Indel変異)が検出された、クローン#14-3、#14-4、#14-6、#14-12を得た。

40

【0507】

図53は、様々な人種におけるHLA-Cアレルのアレル頻度を示す表である。図53中、「JPN」は日本人を示し、「EUR」は欧州系アメリカ人を示し、「AFR」はアフリカ系アメリカ人を示し、「API」はアジア人を示し、「HIS」はヒスパニックを示す。また、「アレル頻度」は、各人種におけるアレルの頻度(%)を示し、「ランク」は頻度の高い順からの順番を示す。

【0508】

図53に示すように、HLA-C*01:02、HLA-C*02:02、HLA-C

50

* 0 3 : 0 3、H L A - C * 0 3 : 0 4、H L A - C * 0 4 : 0 1、H L A - C * 0 5 : 0 1、H L A - C * 0 6 : 0 2、H L A - C * 0 7 : 0 1、H L A - C * 0 7 : 0 2、H L A - C * 0 8 : 0 1、H L A - C * 1 2 : 0 2、H L A - C * 1 6 : 0 1の12種類の細胞を作製すれば、上記のいずれの人種においても93%以上の人口をカバーすることができる。

【0509】

すなわち、H L A - Aアレル及びH L A - Bアレルを欠失し、上記の12種類のいずれかのH L A - Cアレルを有する細胞、あるいは、H L A - Aアレル、H L A - Bアレル及びC I I T Aアレルを欠失し、上記の12種類のいずれかのH L A - Cアレルを有する細胞は、細胞治療や再生医療用の細胞として非常に有用である。ここで、細胞は、細胞治療に用いられる細胞であれば特に限定されず、多能性幹細胞であってもよいし、分化した細胞であってもよい。具体的には、例えば、i P S細胞、T細胞、造血幹細胞、間葉系幹細胞等であってもよい。

10

【0510】

[実験例43]

(B 2 Mノックアウトi P S細胞の作製3)

実験例41でも使用したi P Sストック細胞(F f - X t - 2 8 s 0 5 i P S細胞) から、B 2 Mアレルをノックアウトした。

【0511】

F f - X t - 2 8 s 0 5 i P S細胞に、B 2 Mアレルを標的とすることができるs g R N AであるB 2 M - g 2 (標的塩基配列を配列番号60に示す。) 及び精製C a s 9タンパク質をトランスフェクションし、5株のサブクローンを得た。トランスフェクションは市販のキット(商品名「4 D - N u c l e o f e c t o r」、型式「V 4 X P - 4 0 3 2」、ロンザ社) を用いて行った。

20

【0512】

続いて、各サブクローンのゲノムのB 2 Mアレルの塩基配列を解析した。図54は、各サブクローンの塩基変異パターンを示す図である。図54中、「C l o n e I D」はサブクローン名を示し、「W T」は野生型の塩基配列であったことを示し、「-」は欠失変異を有していたことを示し、「+」は挿入変異を有していたことを示す。また、サブクローン名における「M o」は、B 2 Mアレルをノックアウトしたことを意味する。

30

【0513】

その結果、図54に示すように、B 2 Mアレルにフレームシフト変異を生じたクローン# 1及び# 3を得た。

【0514】

[実験例44]

(B 2 M及びC I I T Aノックアウトi P S細胞の作製)

実験例41でも使用したi P Sストック細胞(F f - X t - 2 8 s 0 5 i P S細胞) から、B 2 Mアレル及びC I I T Aアレルを同時にノックアウトした。

【0515】

F f - X t - 2 8 s 0 5 i P S細胞に、B 2 Mアレルを標的とすることができるs g R N AであるB 2 M - g 2 (標的塩基配列を配列番号60に示す。)、C I I T Aアレルを標的とすることができるs g R N AであるC I I T A - e x 3 g 5 (標的塩基配列を配列番号8017に示す。) 及び精製C a s 9タンパク質をトランスフェクションし、19株のサブクローンを得た。トランスフェクションは市販のキット(商品名「4 D - N u c l e o f e c t o r」、型式「V 4 X P - 4 0 3 2」、ロンザ社) を用いて行った。

40

【0516】

続いて、各サブクローンのゲノムのB 2 Mアレル及びC I I T Aアレルの塩基配列を解析した。図55は、各サブクローンの塩基変異パターンを示す図である。図55中、「C l o n e I D」はサブクローン名を示し、「W T」は野生型の塩基配列であったことを示し、「-」は欠失変異を有していたことを示し、「+」は挿入変異を有していたことを

50

示す。また、サブクローン名における「M T o」は、B 2 M アレル及びC I I T A アレルを1段階でノックアウトしたことを意味する。

【0517】

その結果、図55に示すように、B 2 M アレル及びC I I T A アレルの双方にフレームシフト変異を生じたクローン#8を得た。

【0518】

また、クローン#2は、B 2 M アレルの片方のみがノックアウトされ、C I I T A アレルは両方ノックアウトされていることが明らかとなった。そこで、実質的にC I I T A アレルのみがノックアウトされた細胞株としてクローン#2を得た。

【0519】

[実験例45]

(B 2 M 及びC I I T A ノックアウトi P S 細胞におけるH L A タンパク質の発現の検討)

実験例44で作製した、F f - X t - 28s05 - M T o # 2 i P S 細胞におけるH L A - A B C タンパク質の発現を検討した。

【0520】

まず、F f - X t - 28s05 - M T o # 2 i P S 細胞を50ng/mLのI F N - γで48時間刺激した後、抗H L A - A B C 抗体(品番: 311418、B I O L E G E N D 社)で染色してフローサイトメトリー解析を行い、H L A - A タンパク質、H L A - B タンパク質及びH L A - C タンパク質の発現を検討した。

【0521】

図56(a)及び(b)は、フローサイトメトリーの結果を示すグラフである。図56(a)中、「N o s t a i n」は抗体で染色しなかったi P S 細胞の解析結果であることを示す。また、図16(b)中、「F f - X t - 28s05 - M T o # 2」はF f - X t - 28s05 - M T o # 2 i P S 細胞の解析結果であることを示す。

【0522】

その結果、F f - X t - 28s05 - M T o # 2 i P S 細胞は、H L A - A タンパク質、H L A - B タンパク質及びH L A - C タンパク質の発現能を維持していることが明らかとなった。

【0523】

[実験例46]

(B 2 M ノックアウトi P S 細胞の作製4)

585A1 i P S 細胞にC a s 9を発現するプラスミドベクターとB 2 M 特異的なs g R N A をトランスフェクションした。s g R N A としては、B 2 M - g 2 (標的塩基配列を配列番号60に示す。) を使用した。

【0524】

続いて、50ng/mLのI F N - γで48時間刺激した細胞を抗H L A - A B C 抗体で染色し、フローサイトメトリー解析を行った。

【0525】

図57はフローサイトメトリーの結果を示すグラフである。図57中、「N o s t a i n」は抗体で染色しなかったi P S 細胞の解析結果であることを示し、「N o T F」はs g R N A を導入しなかったi P S 細胞の解析結果であることを示し、「B 2 M - g 2」は、このs g R N A を導入してB 2 M アレルをノックアウトしたi P S 細胞の解析結果であることを示す。

【0526】

その結果、H L A - A タンパク質、H L A - B タンパク質及びH L A - C タンパク質の全てが陰性である細胞集団の割合は27.0%であった。続いて、B 2 M - g 2 s g R N A の導入により得られた、H L A - A、H L A - B 及びH L A - C の全てが陰性である細胞集団をソーティングにより回収した。ここではサブクローニングは行わなかった。

【0527】

[実験例47]

10

20

30

40

50

(H L A アレル特異的ノックアウト 1 0)

5 8 5 A 1 i P S 細胞の H L A - A アレル、H L A - B アレル及び H L A - C アレルをノックアウトした細胞を作製した。具体的には、実験例 1 3 で作製した、5 8 5 A 1 i P S 細胞の A * 2 4 : 0 2 アレル、B * 0 7 : 0 2 アレル及び B * 5 2 : 0 1 アレルをノックアウトした細胞 (クローン # 3) に、精製 C a s 9 タンパク質、C * 0 7 : 0 2 アレル特異的な s g R N A 及び C * 1 2 : 0 2 アレル特異的な s g R N A をトランスフェクションした。

【 0 5 2 8 】

C * 0 7 : 0 2 アレル特異的な s g R N A として、C 0 7 0 2 - e x 3 - g 3 (標的塩基配列を配列番号 4 9 に示す。) を使用した。また、C * 1 2 : 0 2 アレル特異的な s g R N A として、C 1 2 0 2 - e x 3 - g 1 (標的塩基配列を配列番号 5 0 に示す。) を使用した。トランスフェクションには、市販のキット (商品名「 4 D - N u c l e o f e c t o r」、型式「 V 4 X P - 4 0 3 2」、ロンザ社) を使用した。

10

【 0 5 2 9 】

その後、サブクローニングを行い、6 株のサブクローンを得た。続いて、各サブクローンからゲノム D N A を抽出した。続いて、H L A - C * 0 7 : 0 2 アレル及び H L A - C * 1 2 : 0 2 アレルの塩基配列を、サンガーシーケンスにより解析した。

【 0 5 3 0 】

図 5 8 は、回収した各クローンの塩基変異パターンを示す図である。図 5 8 中、「 C l o n e I D 」はサブクローン名を示し、「 H L A - C 0 7 」は H L A - C * 0 7 : 0 2 アレルを示し、「 H L A - C 1 2 」は H L A - C * 1 2 : 0 2 アレルを示し、「 W T 」は野生型の塩基配列であったことを示し、「 - 」は欠失変異を有していたことを示し、「 + 」は挿入変異を有していたことを示す。その結果、クローン # 3 - 4、# 3 - 5、# 3 - 6、# 3 - 7 では、H L A - C の両アレルがノックアウトされたことが確認された。

20

【 0 5 3 1 】

[実験例 4 8]

(H L A アレル特異的ノックアウト 1 1)

実験例 1 3 で作製した、5 8 5 A 1 i P S 細胞の A * 2 4 : 0 2 アレル、B * 0 7 : 0 2 アレル及び B * 5 2 : 0 1 アレルをノックアウトした細胞 (クローン # 3) に、精製 C a s 9 タンパク質及び C * 0 7 : 0 2 アレル特異的な s g R N A をトランスフェクションした。

30

【 0 5 3 2 】

C * 0 7 : 0 2 アレル特異的な s g R N A として、C 0 7 0 2 - e x 3 - g 3 (標的塩基配列を配列番号 4 9 に示す。) を使用した。トランスフェクションには、市販のキット (商品名「 4 D - N u c l e o f e c t o r」、型式「 V 4 X P - 4 0 3 2」、ロンザ社) を使用した。

【 0 5 3 3 】

その後、サブクローニングを行い、6 株のサブクローンを得た。続いて、各サブクローンからゲノム D N A を抽出した。続いて、H L A - C * 0 7 : 0 2 アレル及び H L A - C * 1 2 : 0 2 アレルの塩基配列を、サンガーシーケンスにより解析した。

40

【 0 5 3 4 】

図 5 9 は、回収した各クローンの塩基変異パターンを示す図である。図 5 9 中、「 C l o n e I D 」はサブクローン名を示し、「 H L A - C 0 7 」は H L A - C * 0 7 : 0 2 アレルを示し、「 H L A - C 1 2 」は H L A - C * 1 2 : 0 2 アレルを示し、「 W T 」は野生型の塩基配列であったことを示し、「 + 」は挿入変異を有していたことを示す。その結果、クローン # 3 - 1、# 3 - 2、# 3 - 3、# 3 - 5、# 3 - 6 は、H L A - C * 0 7 : 0 2 アレルがノックアウトされ、H L A - C * 1 2 : 0 2 アレルのみ残存したクローンであることが確認された。

【 0 5 3 5 】

図 5 3 を参照しながら上述したように、H L A - C * 0 1 : 0 2、H L A - C * 0 2 :

50

02、HLA-C*03:03、HLA-C*03:04、HLA-C*04:01、HLA-C*05:01、HLA-C*06:02、HLA-C*07:01、HLA-C*07:02、HLA-C*08:01、HLA-C*12:02、HLA-C*16:01の12種類の細胞を用意すれば、日本人、欧州系アメリカ人、アフリカ系アメリカ人、アジア人、ヒスパニックのいずれの人種においても93%以上の人口をカバーすることができる。

【0536】

本実験例で作製した細胞は、これらの12種類の細胞の1つとして使用することができる。

【0537】

10

[実験例49]

(HLAアレル特異的ノックアウト12)

実験例14で作製した、604B1 iPS細胞のA*01:01アレル、A*24:02アレル、B*07:02アレル及びB*37:01アレルをノックアウトした細胞(クローン#4)に、精製Cas9タンパク質及びC*07:02アレル特異的なsgRNAをトランスフェクションした。

【0538】

C*07:02アレル特異的なsgRNAとして、C0702-ex3-g3(標的塩基配列を配列番号49に示す。)を使用した。トランスフェクションには、市販のキット(商品名「4D-Nucleofector」、型式「V4XP-4032」、ロンザ社)を使用した。

20

【0539】

その後、サブクロニングを行い、11株のサブクローンを得た。続いて、各サブクローンからゲノムDNAを抽出した。続いて、HLA-C*06:02アレル及びHLA-C*12:02アレルの塩基配列を、サンガーシーケンスにより解析した。

【0540】

図60は、回収した各クローンの塩基変異パターンを示す図である。図60中、「Clone ID」はサブクローン名を示し、「HLA-C06」はHLA-C*06:02アレルを示し、「HLA-C07」はHLA-C*07:02アレルを示し、「WT」は野生型の塩基配列であったことを示し、「-」は挿入変異を有していたことを示し、「+」は挿入変異を有していたことを示す。その結果、クローン#4-2、#4-6、#4-10、#4-11は、HLA-C*07:02アレルがノックアウトされ、HLA-C*06:02アレルのみ残存したクローンであることが確認された。

30

【0541】

図53を参照しながら上述したように、HLA-C*01:02、HLA-C*02:02、HLA-C*03:03、HLA-C*03:04、HLA-C*04:01、HLA-C*05:01、HLA-C*06:02、HLA-C*07:01、HLA-C*07:02、HLA-C*08:01、HLA-C*12:02、HLA-C*16:01の12種類の細胞を用意すれば、日本人、欧州系アメリカ人、アフリカ系アメリカ人、アジア人、ヒスパニックのいずれの人種においても93%以上の人口をカバーすることができる。

40

【0542】

本実験例で作製した細胞は、これらの12種類の細胞の1つとして使用することができる。

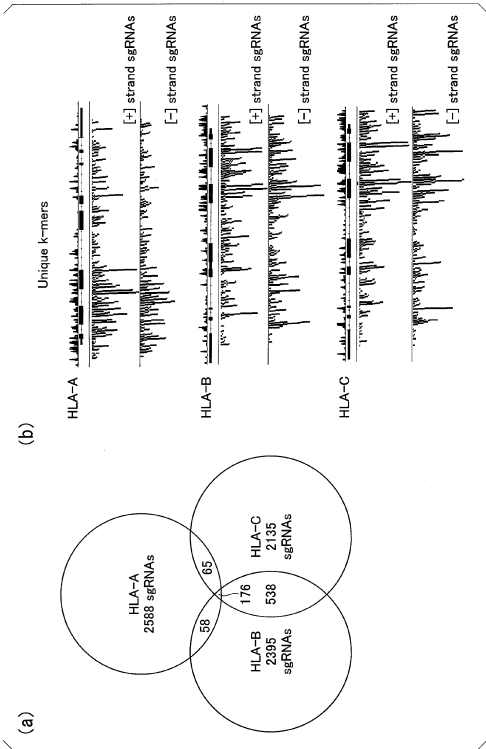
【産業上の利用可能性】

【0543】

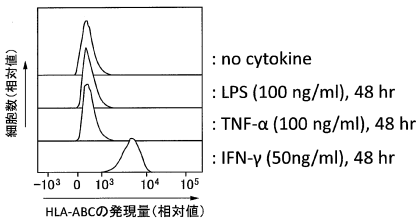
本発明によれば、レシピエントに他家移植した場合の拒絶反応が低減された低抗原性細胞を製造する技術を提供することができる。

【図面】

【図 1】



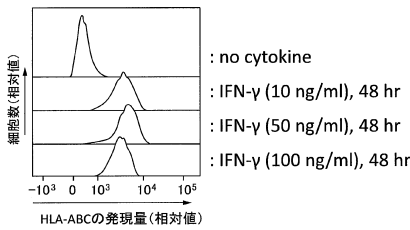
【図 2】



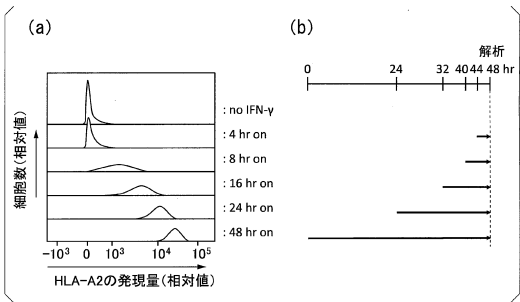
10

20

【図 3】



【図 4】

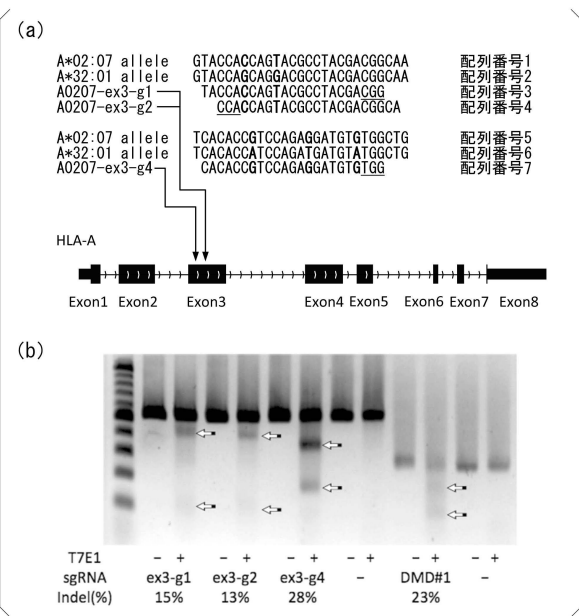


30

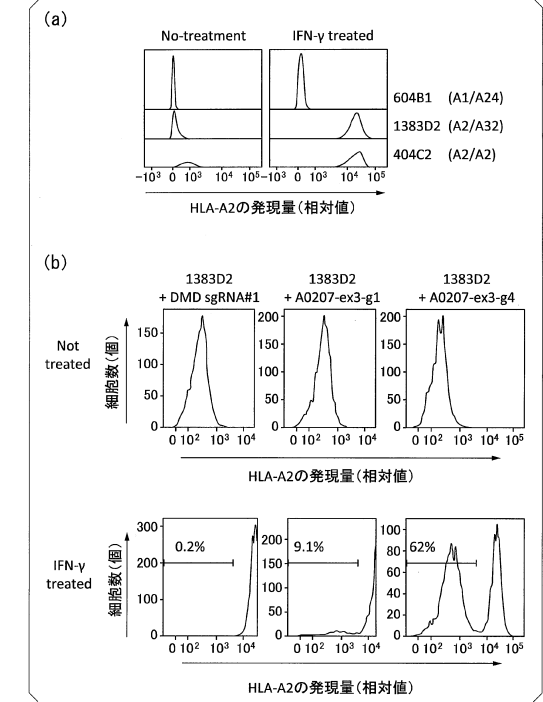
40

50

【図 5】



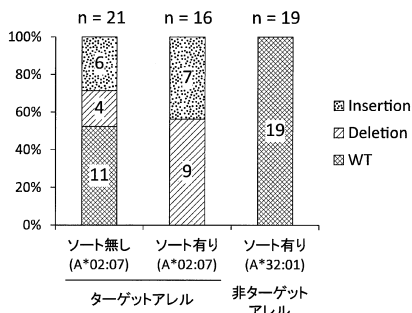
【図 6】



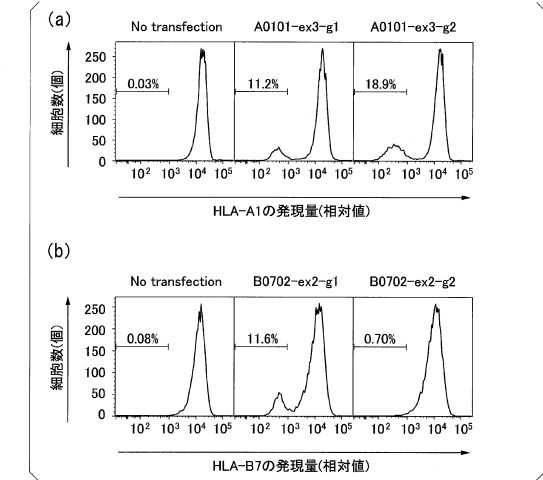
10

20

【図 7】



【図 8】

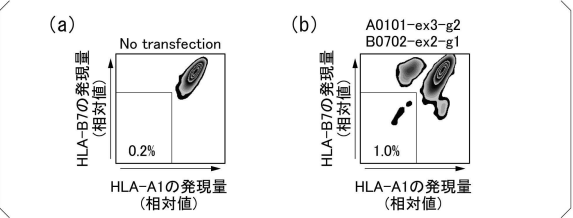


30

40

50

【図 9】



【図 10】

(a)

クローン番号	HLA-A1	HLA-B7
#1	-5 bp	-6 bp
#2	-5 bp	-6 bp
#3	WT	WT
#5	-5 bp	-6 bp
#6	-5 bp	-6 bp
#7	WT	WT
#8	-4 bp	-2 bp
#10	-14 bp	-11 bp
#11	+18 bp	-1 bp
#12	-5 bp	-6 bp
#13	-4 bp	-2 bp
#14	WT	WT
#15	-4 bp	-2 bp

(b)

HLA-A*01:01

WT GGGTACCGGCGAGCGCCT 配列番号8

#8 GGGTACCGG—CCGCCT 配列番号9

#10 GG—CCT

HLA-B*07:02

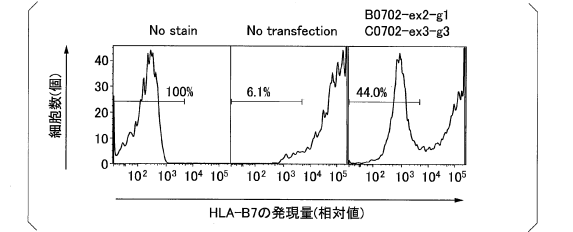
WT ACAAGGGCCAGGCGACA 配列番号10

#8 ACA—CCGAGGCGACA 配列番号11

#10 ACA—CA

10

【図 11】



【図 12】

(a)

クローン番号	HLA-B7	HLA-C7
#1	-6 bp	-9 bp
#2	-6 bp	+2 bp
#3	-6 bp	WT
#4	-6 bp	WT
#5	-6 bp	-9 bp
#6	-6 bp	WT
#7	-6 bp	WT
#8	-6 bp	WT
#9	-6 bp	+2 bp
#10	-3 bp	+1 bp
#11	-3 bp	+1 bp
#12	-6 bp	WT
#13	-3 bp	+1 bp
#14	-3 bp	+1 bp
#16	-6 bp	WT
#17	-6 bp	+2 bp
#18	-6 bp	+2 bp
#19	-6 bp	+2 bp
#20	-6 bp	+2 bp
#21	-6 bp	+2 bp
#22	-6 bp	+2 bp
#23	-6 bp	+2 bp
#24	-6 bp	+2 bp
#25	-6 bp	+2 bp
#26	-2 bp	+1 bp
#27	-6 bp	+2 bp
#28	-6 bp	+2 bp

(b)

HLA-B*07:02

WT AAGGCCAG

#2 A—AG

HLA-C*07:02

GGACCC

GGACCC

AA

#11 A—CCCAG

GGACCC

A

#26 AA—CCCAG

GGACAG

A

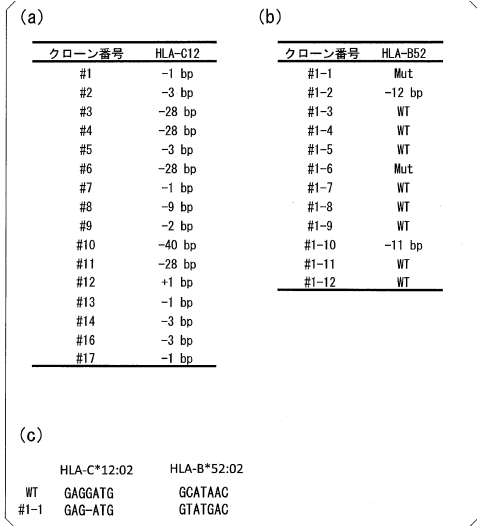
20

30

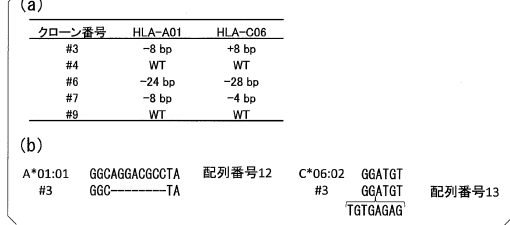
40

50

【図 13】

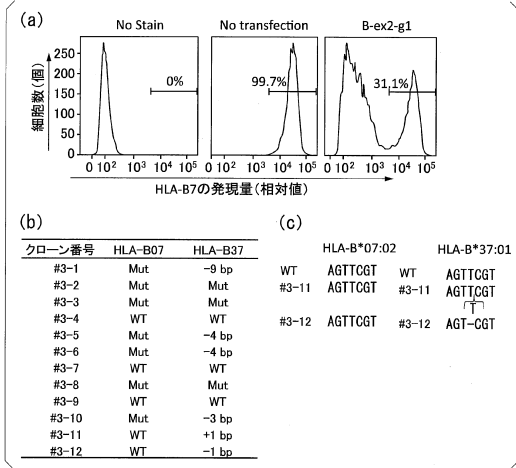


【図 14】

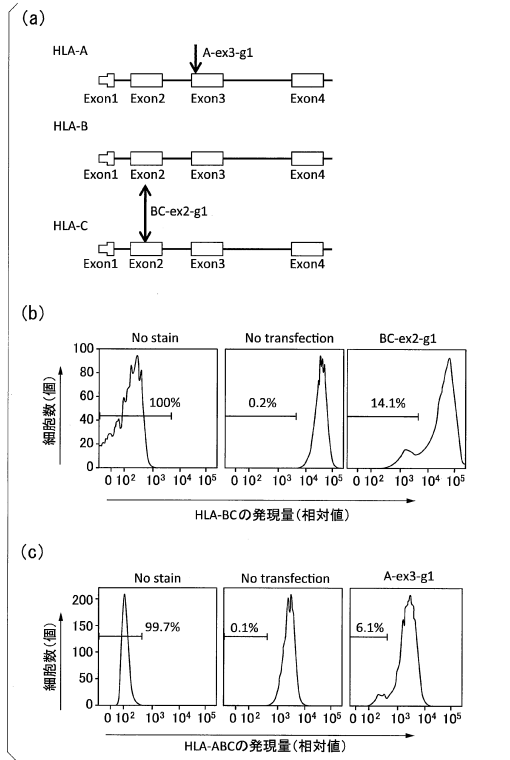


10

【図 15】



【図 16】



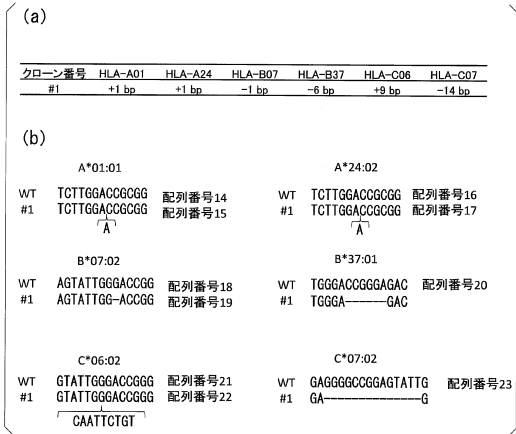
20

30

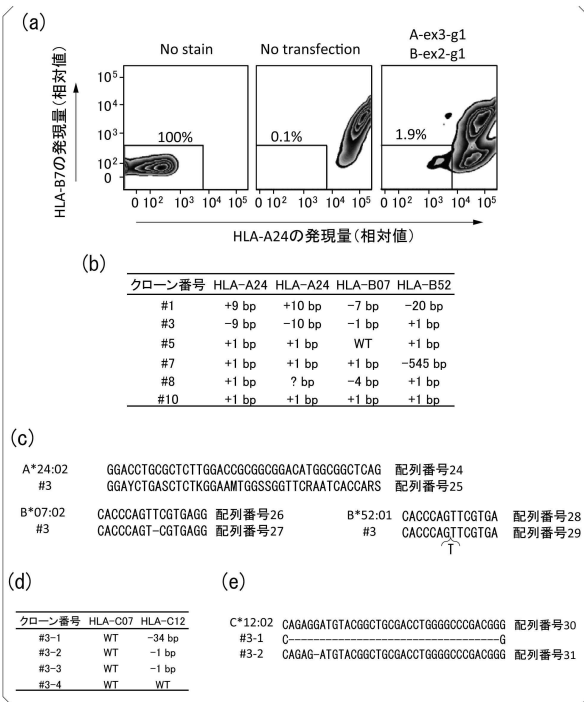
40

50

【図 17】



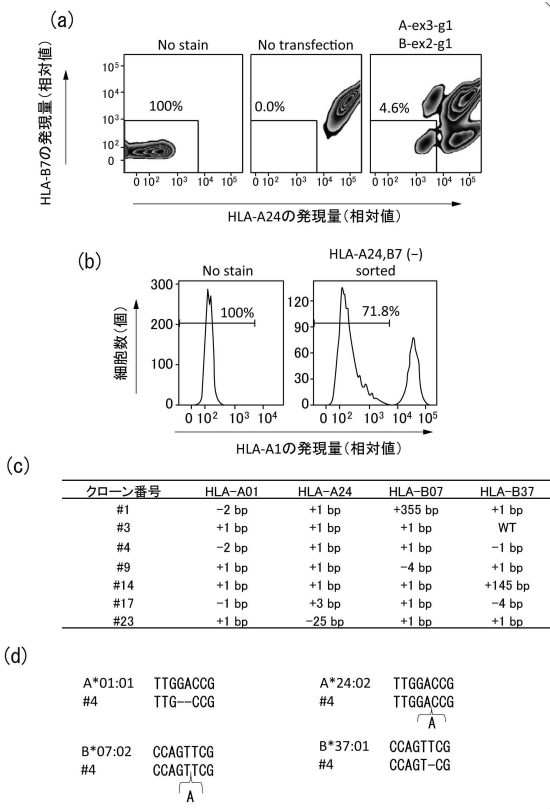
【図 18】



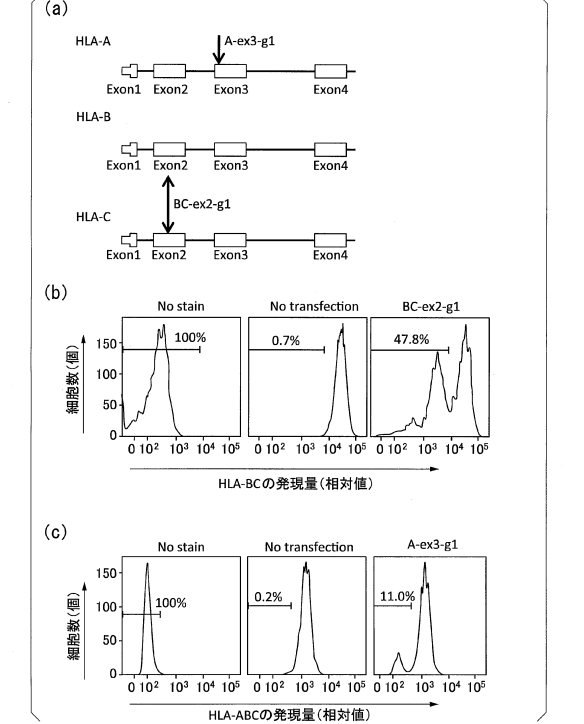
10

20

【図 19】



【図 20】

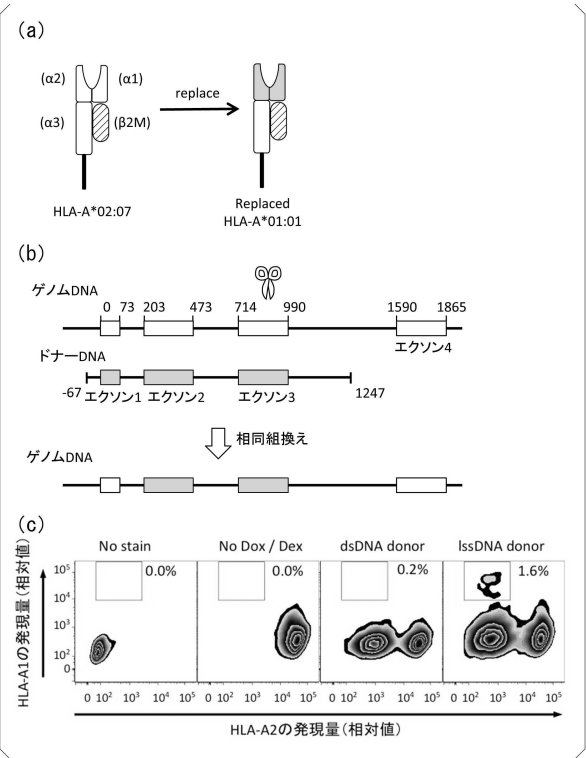


30

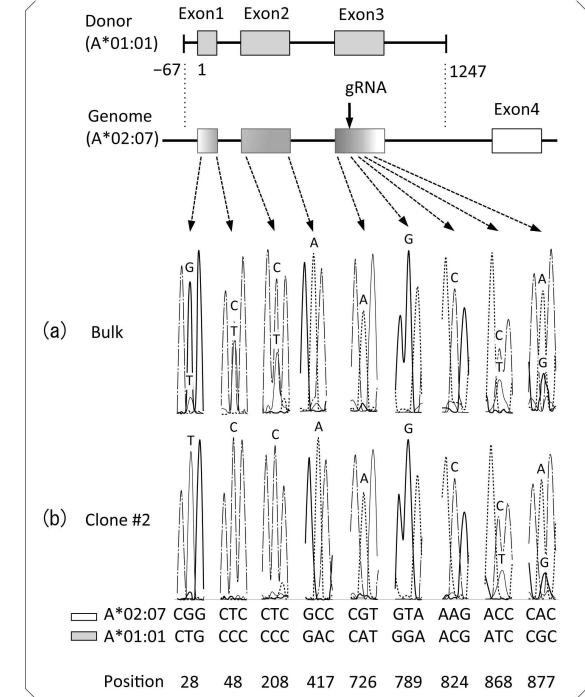
40

50

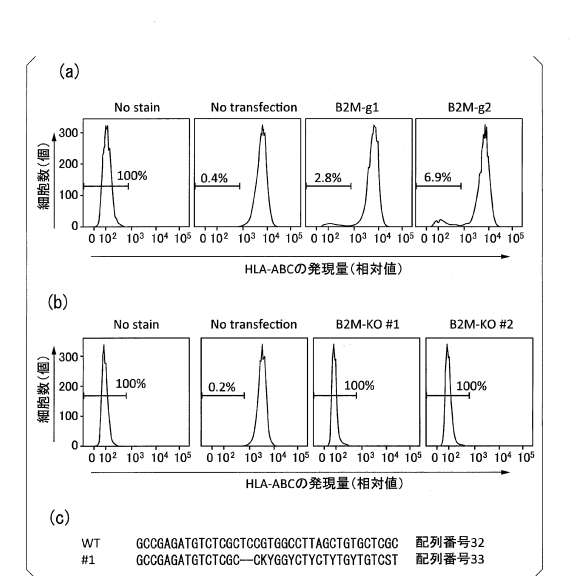
【図 2 1】



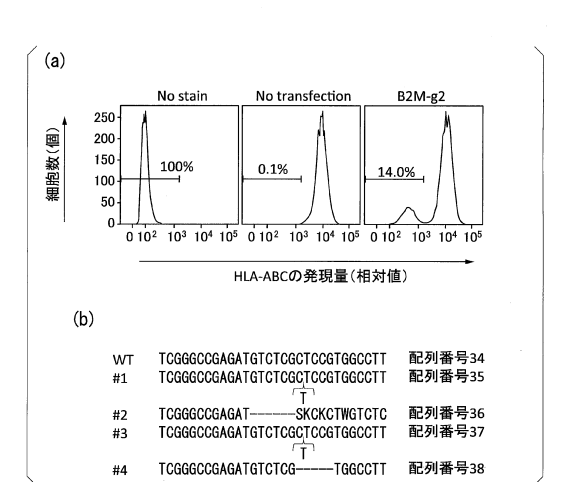
【図 2 2】



【図 2 3】



【図 2 4】



10

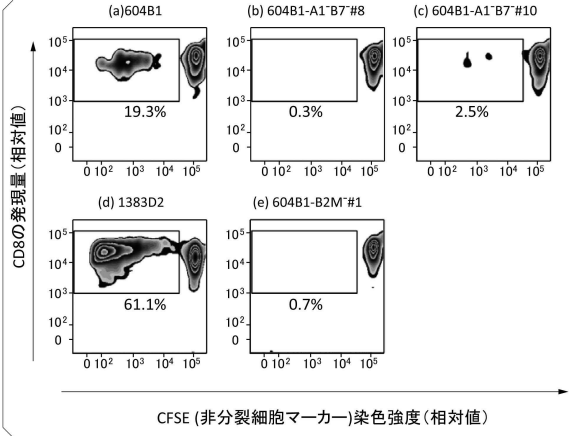
20

30

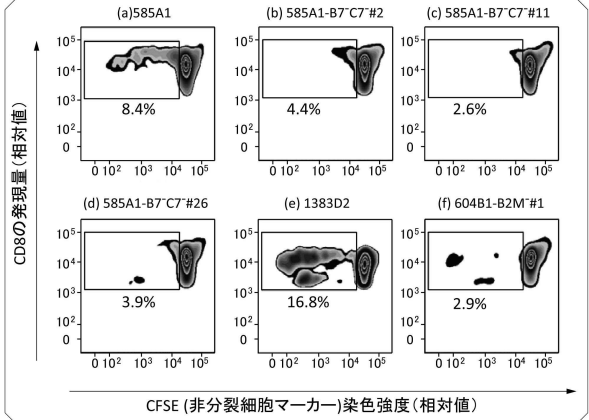
40

50

【図 2 5】

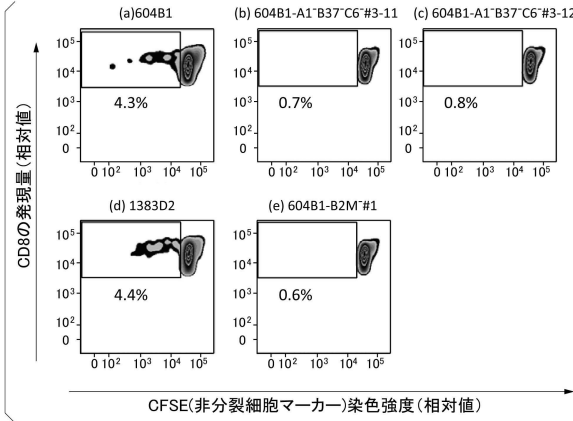


【図 2 6】

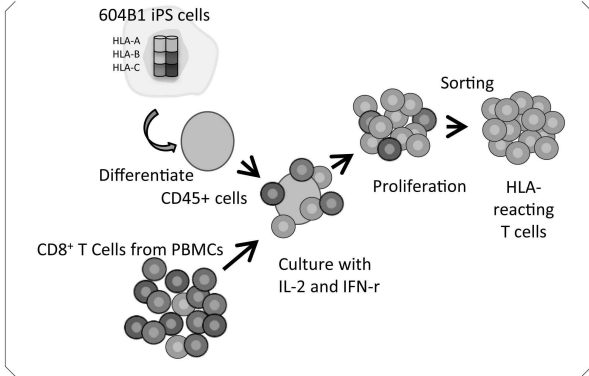


10

【図 2 7】



【図 2 8】



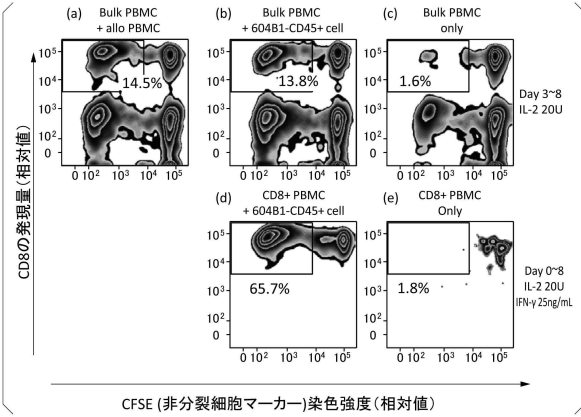
20

30

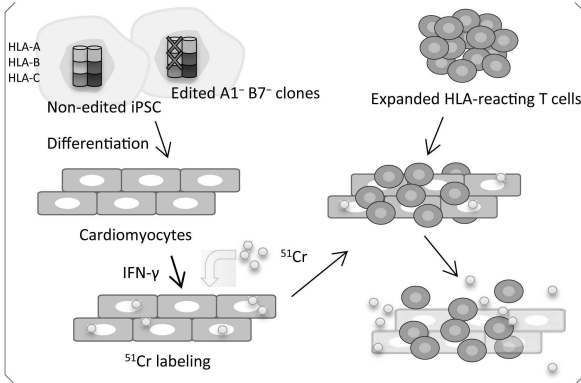
40

50

【図 29】

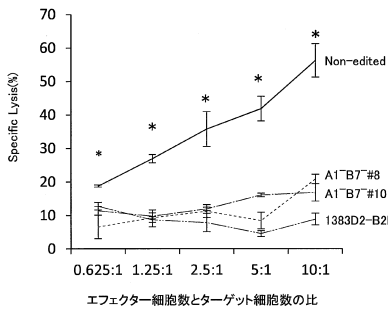


【図 30】

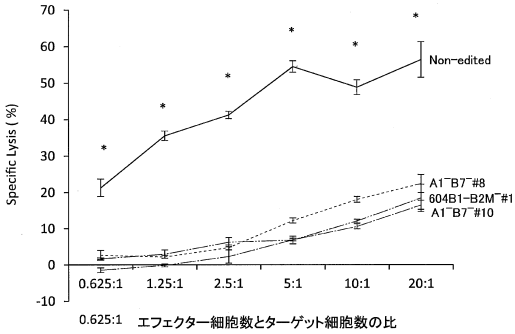


10

【図 31】



【図 32】



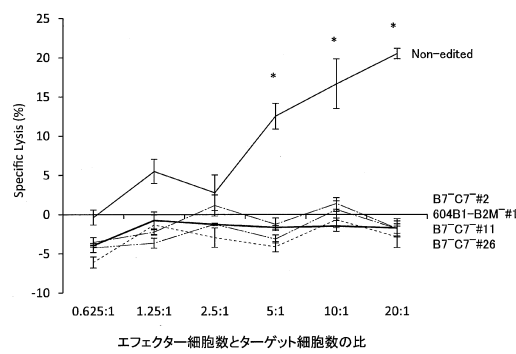
20

30

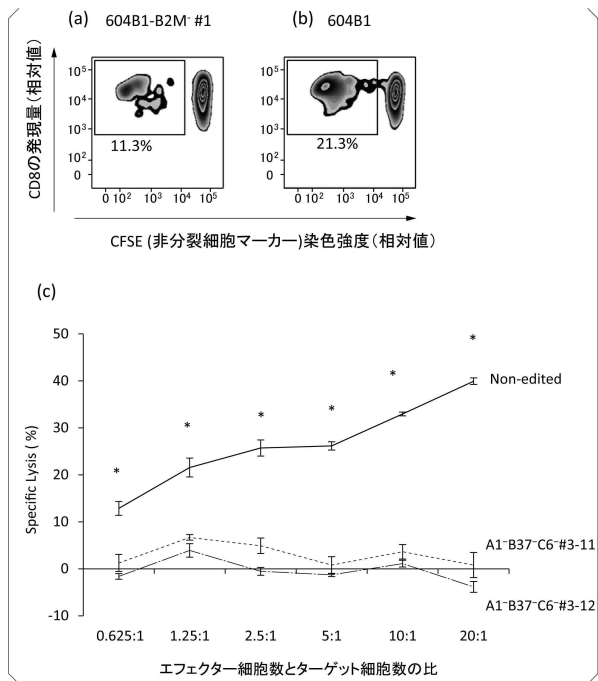
40

50

【図 3 3】



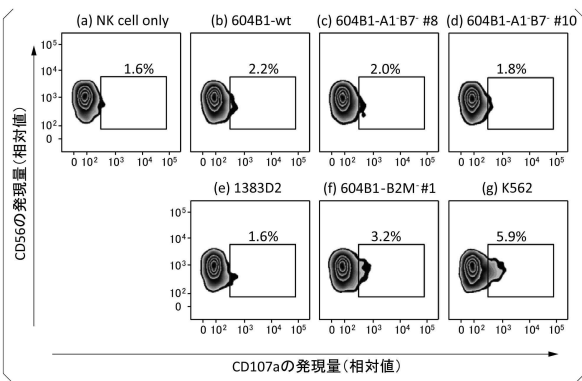
【図 3 4】



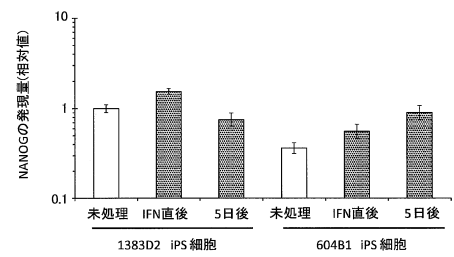
10

20

【図 3 5】



【図 3 6】

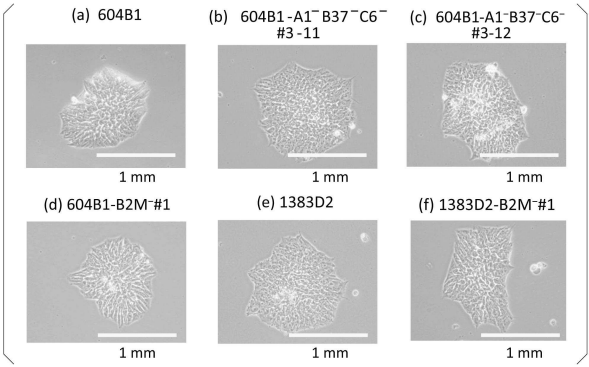


30

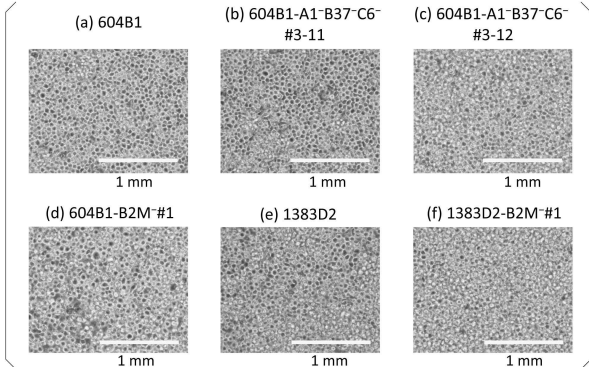
40

50

【図 3 7】

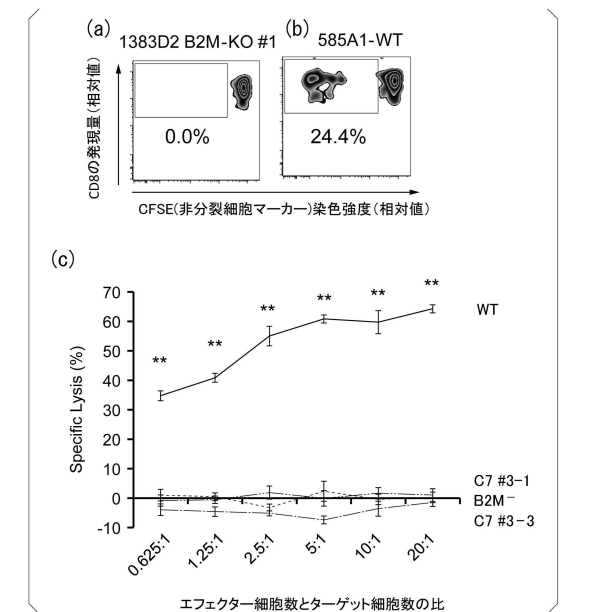


【図 3 8】

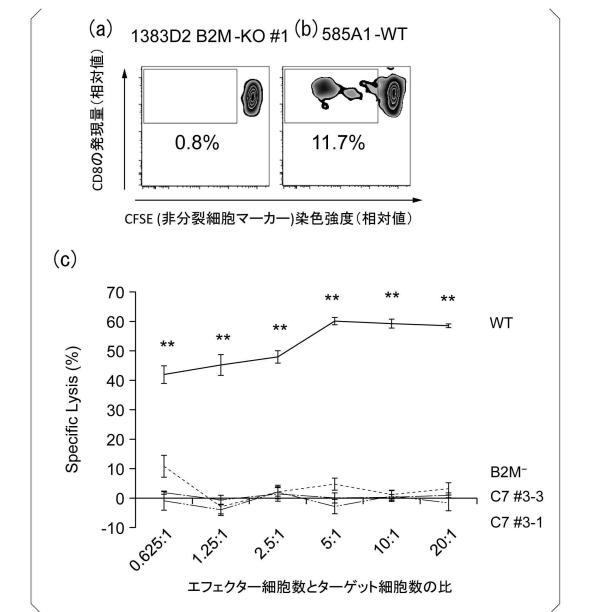


10

【図 3 9】



【図 4 0】



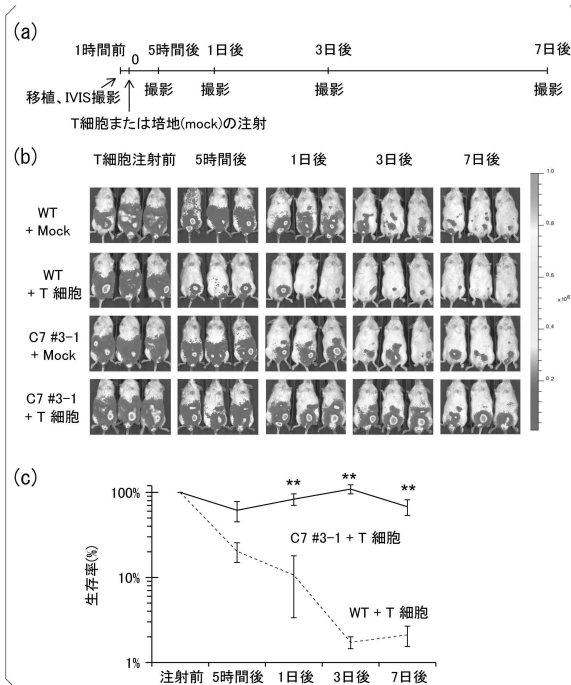
20

30

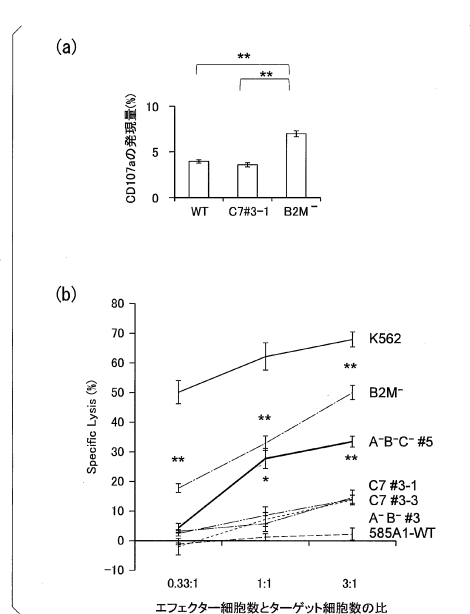
40

50

【図 4 1】



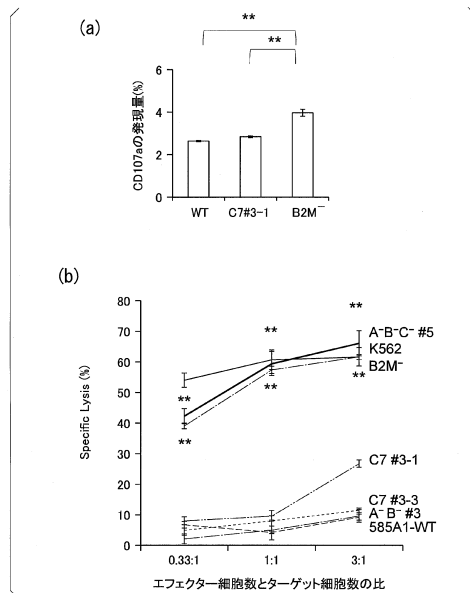
【図 4 2】



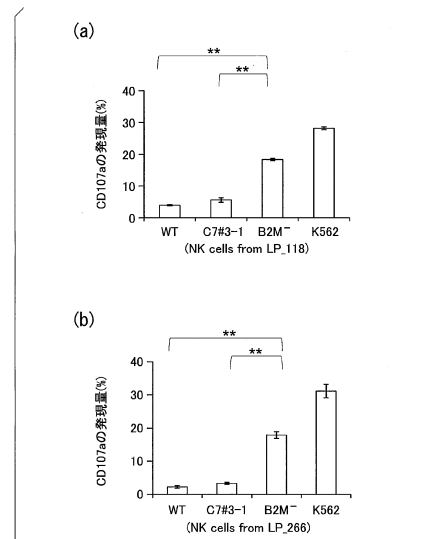
10

20

【図 4 3】



【図 4 4】

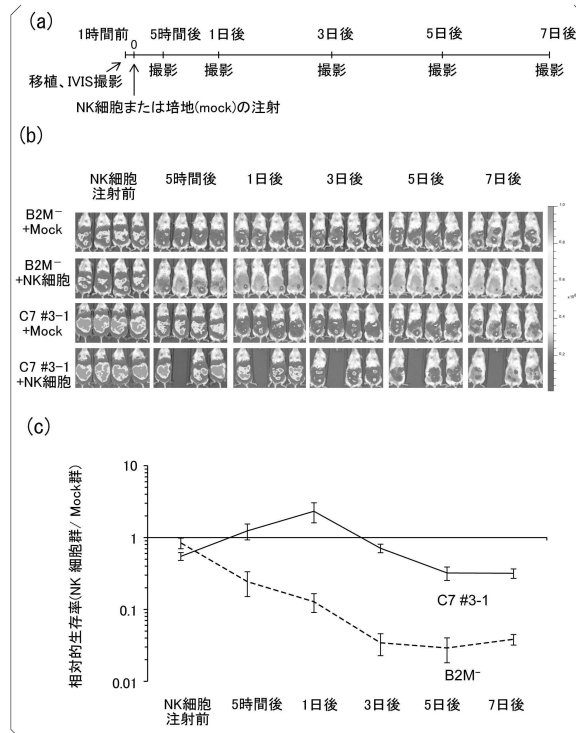


30

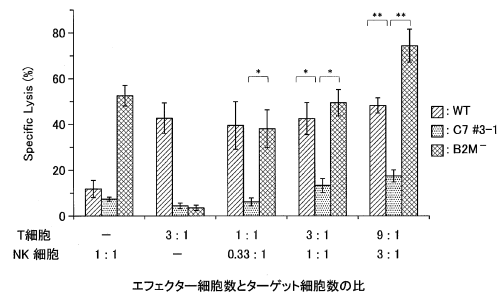
40

50

【図 4 5】



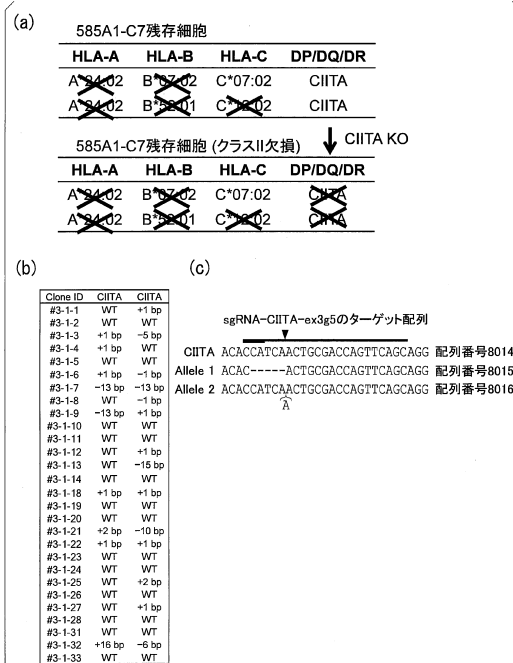
【図 4 6】



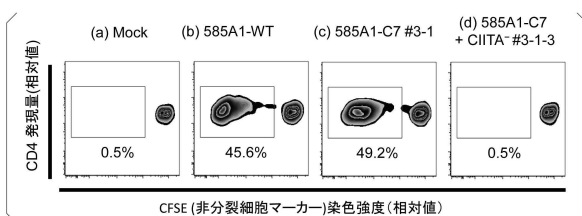
10

20

【図 4 7】



【図 4 8】

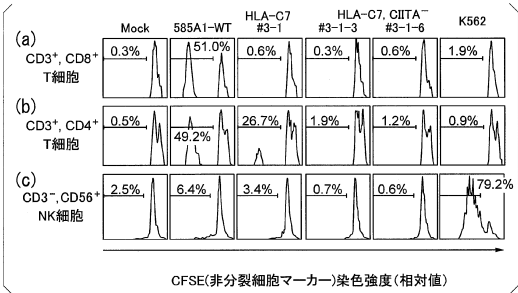


30

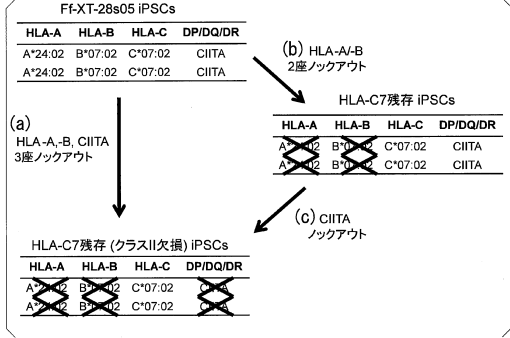
40

50

【図 49】

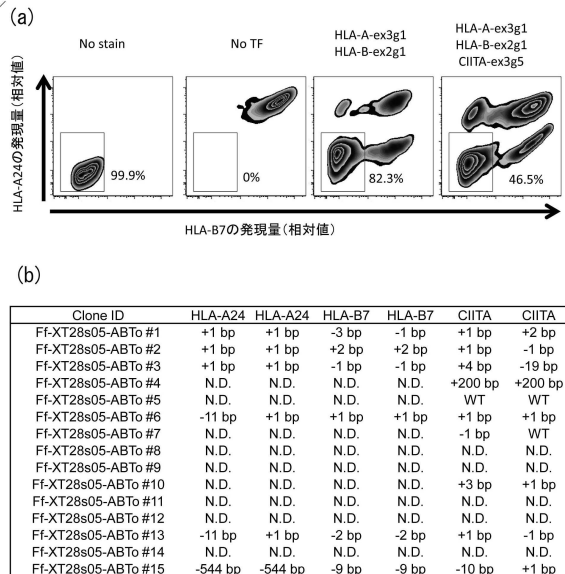


【図 50】

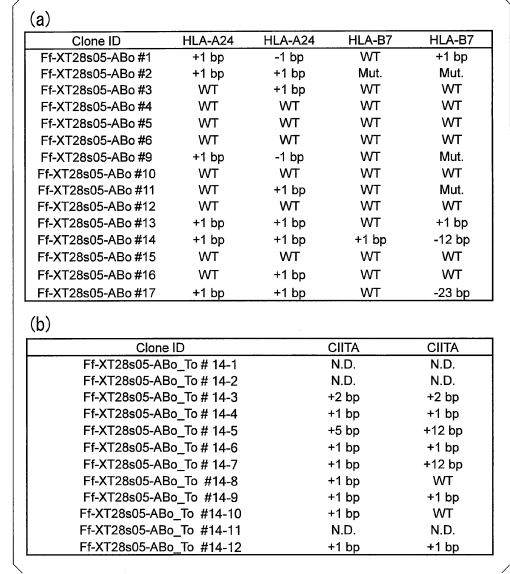


10

【図 51】



【図 52】



20

30

40

50

【図 5 3】

HLA-C アレル	JPN ランク	JPN アレル頻度 %	EUR ランク	EUR アレル頻度 %	AFA ランク	AFA アレル頻度 %	API ランク	API アレル頻度 %	HIS ランク	HIS アレル頻度 %
*01:02	1	17.555%	12	2.822%	19	0.850%	2	13.375%	7	4.927%
*02:02	19	0.025%	10	3.725%	5	8.461%	21	0.395%	10	4.227%
*03:03	2	13.115%	7	5.457%	16	1.182%	8	5.023%	12	3.402%
*03:04	4	12.451%	6	8.215%	8	5.330%	3	8.352%	4	6.978%
*04:01	9	4.441%	3	10.534%	1	18.457%	4	8.070%	1	16.508%
*05:01	15	0.376%	5	9.136%	10	3.526%	18	0.847%	9	4.652%
*06:02	13	0.797%	4	9.301%	4	8.655%	6	6.518%	5	5.878%
*07:01	18	0.076%	1	16.658%	2	12.401%	12	3.894%	3	10.355%
*07:02	3	12.634%	2	15.006%	7	6.968%	1	14.560%	2	11.281%
*08:01	6	7.370%	47	0.006%	24	0.124%	5	7.985%	14	2.826%
*12:02	5	11.142%	16	0.934%	23	0.145%	11	4.485%	17	1.301%
*16:01	N/A	0.000%	11	3.539%	3	9.789%	25	0.169%	6	5.053%
アレル頻度合計		79.985%		85.437%		76.087%		73.674%		77.388%
合計カパー率		95.994%		97.879%		94.282%		93.069%		94.887%

【図 5 4】

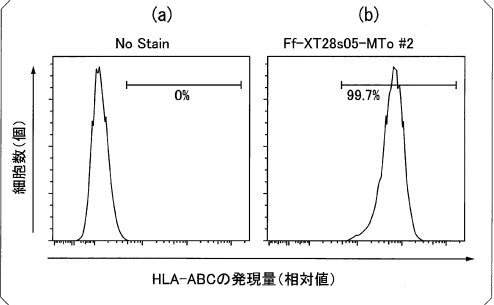
Clone ID	B2M	B2M
Ff-XT28s05-Mo #1	+1 bp	-1 bp
Ff-XT28s05-Mo #2	-8 bp	-15 bp
Ff-XT28s05-Mo #3	+1 bp	+1 bp
Ff-XT28s05-Mo #4	WT	WT
Ff-XT28s05-Mo #5	+1 bp	+6 bp

10

【図 5 5】

Clone ID	B2M	B2M	CIITA	CIITA
Ff-XT28s05-MTo #1	-21 bp	-2 bp	WT	WT
Ff-XT28s05-MTo #2	+1 bp	WT	+1 bp	+1 bp
Ff-XT28s05-MTo #3	+1 bp	WT	WT	WT
Ff-XT28s05-MTo #4	+1 bp	WT	WT	-13 bp
Ff-XT28s05-MTo #5	+1 bp	+1 bp	-15 bp	+1 bp
Ff-XT28s05-MTo #6	+1 bp	+1 bp	+1 bp	WT
Ff-XT28s05-MTo #7	+1 bp	+1 bp	+1 bp	WT
Ff-XT28s05-MTo #8	+1 bp	+1 bp	-7 bp	+1 bp
Ff-XT28s05-MTo #9	+1 bp	WT	-20 bp	WT
Ff-XT28s05-MTo #10	+1 bp	+1 bp	+1 bp	WT
Ff-XT28s05-MTo #11	+1 bp	-1 bp	+1 bp	WT
Ff-XT28s05-MTo #12	+1 bp	+1 bp	+1 bp	WT
Ff-XT28s05-MTo #13	+1 bp	+1 bp	-1 bp	WT
Ff-XT28s05-MTo #14	+1 bp	+1 bp	+1 bp	WT
Ff-XT28s05-MTo #15	+1 bp	+1 bp	-18 bp	-27 bp
Ff-XT28s05-MTo #16	WT	WT	WT	WT
Ff-XT28s05-MTo #17	-13 bp	-8 bp	WT	WT
Ff-XT28s05-MTo #18	+1 bp	+1 bp	-29 bp	WT
Ff-XT28s05-MTo #19	+1 bp	+1 bp	-1 bp	WT

【図 5 6】

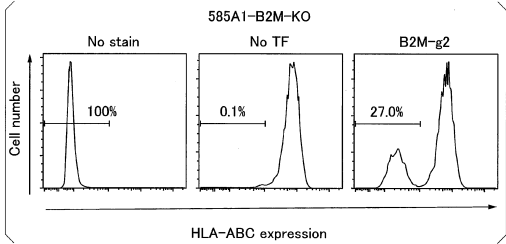


30

40

50

【 5 7 】



【 5 8 】

Clone ID	HLA-C07	HLA-C12
#3-2	WT	-3 bp
#3-3	WT	+198 bp
#3-4	-2 bp	+197 bp
#3-5	+1 bp	-21 bp
#3-6	+1 bp	-7 bp
#3-7	+2 bp	-7 bp

10

【 5 9 】

Clone ID	HLA-C07	HLA-C12
#3-1	+1 bp	WT
#3-2	+1 bp	WT
#3-3	+1 bp	WT
#3-4	WT	WT
#3-5	+1 bp	WT
#3-6	+1 bp	WT

【 6 0 】

Clone ID	HLA-C06	HLA-C07
#4-1	WT	WT
#4-2	WT	-4 bp
#4-3	WT	WT
#4-4	WT	WT
#4-5	WT	WT
#4-6	WT	+1 bp
#4-7	WT	WT
#4-8	WT	WT
#4-10	WT	+1 bp
#4-11	WT	+1 bp
#4-12	WT	WT

20

【 配列表 】

0007385281000001.app

30

40

50

フロントページの続き

前置審査

国立大学法人京都大学内

(72)発明者 徐 淮耕

京都府京都市左京区吉田本町 3 6 番地 1 国立大学法人京都大学内

(72)発明者 金子 新

京都府京都市左京区吉田本町 3 6 番地 1 国立大学法人京都大学内

(72)発明者 王 博

京都府京都市左京区吉田本町 3 6 番地 1 国立大学法人京都大学内

審査官 牧野 晃久

(56)参考文献 国際公開第 2 0 1 6 / 2 0 1 0 4 7 (W O , A 1)

国際公開第 2 0 1 6 / 1 8 3 0 4 1 (W O , A 2)

特表 2 0 1 6 - 5 1 3 4 6 0 (J P , A)

特表 2 0 1 7 - 5 2 3 8 1 3 (J P , A)

(58)調査した分野 (Int.Cl. , D B 名)

C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)

C A p l u s / R E G I S T R Y / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)