

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 1 日現在

機関番号：32644

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26290066

研究課題名(和文) 遺伝子工学による高汎用性iPS細胞の開発

研究課題名(英文) Developing the Universal iPS cell lines using genetic engineering system

研究代表者

木村 穰 (KIMURA, Minoru)

東海大学・医学部・教授

研究者番号：10146706

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,000,000円

研究成果の概要(和文)：iPS細胞ストック用いた他家移植では、移植細胞に対する免疫拒絶反応の制御が重大な問題となる。全HLAタイプを網羅するiPS細胞のストックを作成することは不可能であり、将来多くの患者に適用可能とするために様々なアプローチが必要である。CRISPR/Cas9によるゲノム編集技術を用い、容易にHLA遺伝子の一部を改変できたが、場合により改変を起こした細胞を選択するための選択ベクターの利用が有効と思われた。樹立したベータ2m欠損iPS細胞はNK細胞の標的となる可能性が危惧されたため、HLA-Aなど単座の欠失細胞の作成を行うとともにこれらのT,NK細胞への免疫原性を評価する系の開発が重要を指摘した。

研究成果の概要(英文)：When stocked iPSCs are utilized to allograft transplantation, immune responses to transplanted cells should be controlled. Since construction of stocked iPSCs covering all HLA allo-types are beyond the realm of possibility, various approaches to overcome the difficulty are to be explored. While we easily manipulated HLA gene locus by CRISPR/Cas9 system, it was suggested that some selection cassettes harboring PB sequences is useful to select genome-edited cells. It was raised the possibility that beta;2m-deficient iPSCs would be the target of NK cells. Therefore, instead of all HLA class I, deletion of single HLA gene locus, such as HLA-A, would be effective to apply stocked iPSCs to patients who share the HLA allo-type other than the deleted HLA-A gene locus. It is also important to establish the in vivo experimental system in which human immune cells are re-constructed and the reactions to iPSC-derived allo antigens are validated.

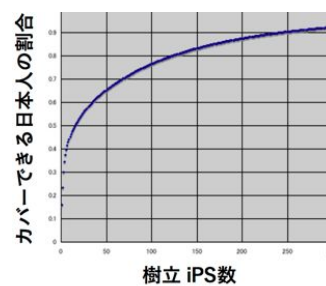
研究分野：分子生物学、実験動物学、発生工学、分子遺伝学

キーワード：iPS細胞 移植片拒絶回避 HLA遺伝子 遺伝子欠失 CRISPR/Cas9 遺伝子発現制御 NK細胞

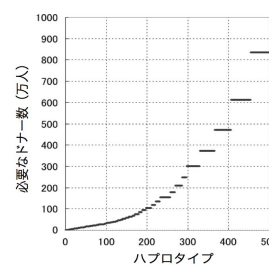
1. 研究開始当初の背景

iPS 細胞による再生医療への応用実現化の一步が踏み出され、多くの期待が集まっている。当初は患者自身に由来する iPS 細胞を樹立し、これより各種細胞を分化誘導させて患者に移植するという、いわゆるオーダーメイド医療が指向されていた。実際、本邦において加齢性黄斑変性患者に行われた iPS 細胞由来網膜色素上皮細胞移植の第 1 例は、患者自身の繊維芽細胞を初期化して得られた iPS 細胞より分化誘導したものが用いられた。その安全性を確認するためには、ゲノム情報、エピゲノム情報などの慎重な検査が行われた。高度に品質管理された iPS 細胞の樹立、確保は膨大な手間と費用を要する。このような状況を踏まえ現在では、ストックされた iPS 細胞を用いた他家移植を主要戦略とする方向にシフトしている。この場合、移植細胞に対する免疫拒絶反応の制御は、越えなければならない重大なハードルとなる。臓器移植に際しては免疫抑制剤が汎用されている現状とはいえ、移植片の長期生着には HLA タイプの一致が重要であることは論を待たない。データベース上には 2400 を大きく上回る HLA ハプロタイプが登録されており、これがさらに父方、母方由来の両アリルで発現することを考えると、すべての HLA ハプロタイプを網羅したストック iPS 細胞の構築がいかに困難であるかが理解できる。この点を踏まえて、HLA 遺伝子座ホモ接合ドナーから iPS 細胞を樹立しストック化する計画が発表されている。各ハプロタイプの頻度を考慮しつつ、HLA ホモ型のドナーを用いることは理にかなっている。ホモ型では、多型が問題となる遺伝子座位が半分になるからである。頻度の高いハプロタイプの高ホモ型ドナーから順番に iPS 細胞を樹立した場合、樹立株数と、これによりカバーされる日本人ハプロタイプの割合を試算し

たグラフが以下に示すものである(図1)。ここに見られるように、50 株樹立でおよそ 65%、250 株樹立で 90%、ほぼ 100%とするには 1000 株以上の iPS 細胞が必要という計算になる。また、希少なハプロタイプであればあるほど、ホモ型ドナーが見つかりにくいという点も見逃すことのできない重大な問題である。日本人において最も高頻度のハプロタイプは(A*24:02, B*52:01, DRB1*15:02)であるが、これをホモで持つ人の割合はおよそ 150 人に一人である。頻度 20 位のハプロタイプ(A*24:02, B*40:02, DRB1*15:02)では 53,000 人に一人となる(図2)。図に示されるように、下順位になるほど頻度は飛躍的に少なくなり、500 位では 830 万人、1000 位では 1 億人に一人という計算になる。カバー率を向上させるためには、iPS 細胞の樹立数を増やすだけでなく、ドナーを探す手間も増大することになる。希少なハプロタイプを持つ患者を除外する不公平はもとより望ましいこととはいえ、iPS 細胞という大きな技術革新を国民全員で享受できるようにするためには、様々な方向からのアプローチがなされなければならない。



(図1)



(図2)

2. 研究の目的

本研究では最新の遺伝子工学的手法を用いて HLA 関連遺伝子座に改変を施し、希少な HLA 型を持つ患者にも適用できる「高汎用性 iPS 細胞」を作成する技術、および関連基盤技術の開発と評価を行うことを目指した。

3. 研究の方法

バクテリアの獲得免疫システムである CRISPR/Cas9 システムは、極めて効率よく、かつ安価に細胞のゲノム配列を改変することのできる、画期的な技術である。そこで HLA 遺伝子の一部を CRISPR/Cas9 を用いたゲノム編集技術で破壊した iPS 細胞を樹立を試みるとともに NK 細胞による攻撃に対する *in vitro* の評価を行った。

4. 研究成果

HLA 分子は T 細胞の標的となる一方、NK 細胞による攻撃を回避するためには、HLA クラス I のすべてを破壊することは望ましくない。一方、HLA の一部不一致が T 細胞による拒絶反応を誘起して長期生着の妨げとなるリスクも避けたい。そこで単座 HLA 遺伝子のみを破壊した iPS 細胞の樹立が有効と考えられた。HLA-A24 を含むホモ型 iPS 細胞から HLA-A24 を欠失させると、少なくとも従来より 15 倍のハプロタイプに移植が適用できるようになる。試算上は、50 株の iPS 細胞作成で日本人の約 42%カバーにとどまるのに対し、単座欠失 iPS 細胞では同数で約 80%の日本人をカバーできることとなる。

CRISPR/Cas9 によるゲノム編集は極めて高効率であるが、欠失に成功した細胞の選別は行わなければならない。β2m 欠損の場合は pan-HLA class I 抗体による染色・フローサイトメーターによる分離で容易であったが、単座欠失細胞の場合、当該アロ

タイプを認識する優れた抗体が利用できないケースもあり得る。そこで、標的遺伝子部位の相同組換えを起こした細胞を選択し、選択後、不要配列を痕跡なく除去するシステムの開発を行った。これには PiggyBac(PB)システムが用いられた。700-1000bp の arm に pCAG-GFP-(IRES)-PuroR を挿入したコンストラクトを持つ PB ベクターを作成、CRISPR/Cas9 適用時に共存させ、薬剤選択により相同組み換えを起こした細胞を選択。続いて PB transposase の導入により、痕跡なく不要配列を除去した細胞を得ることができた。

免疫抑制剤の進歩により、昨今では HLA 型の一致に拘泥せず臓器移植が行われる傾向にある。しかし、HLA 型の一致は明らかに長期生着に有効で、移植後の QOL 維持の観点からも、不要な拒絶反応の可能性はあらかじめ除外することが望ましい。拒絶反応の中心プレーヤーが T 細胞であると考えた場合には、β2m 欠損 iPS 細胞は一定の改善を約束するものと思われる。しかし、この細胞は NK 細胞による攻撃の標的となる可能性がある。現在これらのリスクは試験管内の反応のみで評価せざるをえないが、ヒト T 細胞、NK 細胞を完全に再現するヒト化マウスの作成が行われれば、より生理的な条件で評価をすることが可能となるであろう。このようなモデル動物の開発が、今後の展開のために重要な方向性と考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 5 件) 全て査読あり。

1. Shingo Suzuki, Takehito Sato, Hisako Akatsuka, Minoru Kimura and Takashi Shiina: Identification of a novel HLA-C allele, HLA-C*03:313, in a Japanese individual. HLA(Tissue Antigen)

- (2016) Mar;87(3):186-7. doi: 10.1111/tan.12750. Epub 2016 Feb 22. 2.137
2. Takehito Sato, Hisako Akatsuka, Yoshiaki Yamaguchi, Kyoko Miyashita, Masafumi Tanaka, Tetsuro Tamaki, Masato Ohtsuka, Minoru Kimura: Establishment of β -2 microglobulin deficient human iPS cells using CRISPR/Cas9 system. (in press) Integrative Molecular Medicine (2015) doi: 10.15761/IMM.1000171 Volume 2(6): 373-377
 3. Ohtsuka, M., Miura, H., Mochida, K., Hirose, M., Hasegawa, A., Ogura, A., Mizutani, R., Kimura, M., Isotani, A., Ikawa, M., Sato, M. and Gurumurthy, CB : One-step generation of multiple transgenic mouse lines using an improved Pronuclear Injection-based Targeted Transgenesis (i-PITT). BMC Genomics. 2015 Apr 9;16:274. doi: 10.1186/s12864-015-1432-5
 4. Miura, H., Inoko, H., Tanaka, M., Nakaoka, H., Kimura, M., Gurumurthy, CB, Sato, M. and Ohtsuka, M. : Assessment of artificial miRNA architectures for higher knockdown efficiencies without the undesired effects in mice. PLoS One (2015) Aug.18; 10(8) e0135919.
 5. Ken-ichi Aoyama; Yoshihide Ota, Kagemasa Kajiwara, Noriaki Hirayama, and Minoru Kimura: Frequent mutations in NOTCH1 ligand-binding regions in Japanese oral squamous cell carcinoma. Biochemical and Biophysical Research Communications (2014) Oct 3;452(4):980-5. doi: 10.1016/j.bbrc.2014.09.021. Epub 2014 Sep 16. 2.297
- 〔学会発表〕(計6件)
1. 木村穰、加藤明、本杉奈美、大久保朋一、畑中朋美、坂部貢、田中正史: ヒト Neuropathy Target Esterase 遺伝子導入マウスを用いたシックハウス症候群関連化学物質の生体影響の解析 第39回日本分子生物学会年会 2016.11.30-12.2 (11.30)パシフィコ横浜(横浜)
 2. 赤塚尚子、大塚正人、木村穰、井ノ上逸朗、佐藤健人 コーデン症候群患者由来iPS細胞の樹立と解析 第38回日本分子生物学会年会 2015.12.1-4 神戸国際会議場(神戸)
 3. 渡部聡、桜井敬之、中村伸吾、梶原景正、木村穰、佐藤正宏 EndoGalCと targeted toxinの組み合わせを用いたCRISPR系でノックアウトされた遺伝子改変細胞濃縮法の開発 第37回日本分子生物学会年会 2014.11.25-27 パシフィコ横浜(横浜)
 4. Ohtsuka, M., Miura, H., Kimura, M., Isotani, A., Ikawa, M., Sato, M and Gurumurthy, C. : Concorrent production of multiple targeted transgenic mouse lines with C57BL/6N genetic background by improved PITT. 12th Transgenic Technology Meeting(TT2014) Oct. 1., 2014 Barcelona(Spain)
 4. Miura, H., Kimura, M., Sato, M and Ohtsuka, M., : Presence/absence of a marker gene in artificial microRNA expression constructs affects knockdown efficiencies in a targeted transgenic system. 12th

Transgenic Technology

Meeting(TT2014) Oct. 2014

Barcelona(Spain)

5. 木村穰、加賀谷徹、本杉奈美、割田貴之、三浦浩美、大塚正人、大久保朋坂部貢 Neuropathy Target Esterase (神経障害標的エステラーゼ) 遺伝子導入マウスの特徴 第23回日本臨床環境医学会学術集会 2014年6月14-15日 京都大学(京都)
6. 大塚正人、三浦浩美、磯谷綾子、伊川正人、佐藤正宏、木村穰 : C57BL/6N を遺伝子背景に持つターゲットトランスジェネシス用種マウスの作製と評価 第61回日本実験動物学会総会 2014年5月15-17日 札幌コンベンションセンター(札幌)

〔図書〕なし

〔産業財産権〕なし

〔その他〕なし

ホームページ等

<http://www.med.u-tokai.ac.jp/daigakuin/web/hasseikougaku.html> など

6. 研究組織

(1) 研究代表者

木村 穰 (KIMURA Minoru)

東海大学・医学部・教授

研究者番号：10146706

(2) 研究分担者

佐藤 健人 (SATO Takehito)

東海大学・医学部・准教授

研究者番号：50235363

(3) 研究協力者

椎名 隆 (SHIINA Takashi)

東海大学・医学部・准教授

研究者番号：00317744