

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：13701

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670799

研究課題名(和文) 遺伝子工学的手法によるHLAタイプ改変iPS細胞の作製技術開発

研究課題名(英文) Genetic Modulation of iPS Cells in HLA Loci Using Zinc Finger Nucleases

研究代表者

手塚 建一 (Tezuka, Ken-ichi)

岐阜大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：50236973

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,500,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト白血球抗原(HLA)は、免疫系が自己と非自己を区別する上で重要な役割を果たしている。我々はHLA-A、B、DRB1の3ローカスにおいてホモ接合を呈する歯髄細胞を収集している。このようなHLAローカスホモの細胞は、他家移植において拒絶されにくいと考えられる。岐阜大学では約300名の提供者から歯髄細胞採取を行い、3ローカスホモ歯髄細胞を3種類得た。しかし、日本人の7割以上をカバーする細胞を発見するのは困難である。そのため、Zinc Finger Nuclease (ZFN)を用いて、HLA遺伝子に変異を導入することにより、疑似的な3ローカスホモの細胞を作製することを試みた。

研究成果の概要(英文)：Human leukocyte antigen (HLA) plays an important role in rejection of tissues and cells transplanted from allogenic donors. In recent days, tissue transplantation is conducted without complete matching of HLA because of shortage of the donors. Instead of matching HLA types, immunosuppressants are frequently used to prevent immune reaction; however, when the immune system is suppressed, there is an increased susceptibility to infectious diseases and cancers. To solve this problem, usage of HLA haplotype-homo (HHH) donors has been considered in iPS cell therapy. HHH donors have a couple of identical HLA gene sets, resulting in presentation of HLA molecules half in the variation. Therefore, iPS cells derived from HHH donors are expected to be successfully transplanted to many patients with less possibility of rejection. In this study, we tried to generate iPS cells, phenotypically similar to HHH cells, by directly modulating HLA loci of non-HHH cells with Zinc Finger Nucleases (ZFNs).

研究分野：再生医科学

キーワード：HLA iPS細胞 歯髄細胞 再生医療 他家移植 ゲノム編集 次世代シーケンサー

1. 研究開始当初の背景

2007年に京都大学の山中伸弥教授らによって、ヒト皮膚線維芽細胞からiPS細胞が誘導された (Takahashi et al. Cell 2007)。ヒトiPS細胞は、ヒト胚性幹細胞 (ES細胞) と、ほぼ同等の多分化能を持ち、神経、心筋、網膜など、様々な組織を形成する細胞を得ることができる。それゆえ、次世代の医療である、再生医療において、中心的な役割を果たす事が期待されている。

われわれは、性別や年齢の異なるドナーから採取し、HLAタイプが決定された300人以上のヒト歯髄細胞コレクションを有している。将来の再生医療を支えるのは、良質の細胞資源であることは明白であり、幅広いバックグラウンドを持ったドナー細胞を使える点は、われわれの持つ最大の強みである。

通常 HLA は、両親から異なる遺伝子を受け継ぐため、われわれは免疫拒絶に重要な A, B, DR の3ローカスだけでも6種類の抗原を持っている。しかし、まれに両親から同じタイプの HLA を受け継いだ、3種類の抗原のみを持った子供が生まれる。これを HLA ハプロタイプホモドナーと呼ぶ。われわれは、37000人をスクリーニングすれば、75種類のハプロタイプホモ iPS細胞を得る事ができ、これだけで日本人の80%に移植可能になると試算している (Okita et al. Nature Methods 2011)。

2. 研究の目的

本研究の目的は、75種類で日本人の8割に適合する HLA ハプロタイプホモ iPS細胞を、ゲノム編集技術によって作り出すことである。HLA ハプロタイプホモドナーは、大規模なスクリーニングによって発見することが可能だが、稀な HLA タイプがホモになる確率は極めて低い。そのため、近年進歩が著しいゲノム編集技術を用い、HLA ハプロタイプがヘテロなドナー細胞を使って、擬似的な HLA ハプロタイプホモ細胞を作り出すことを試みた。

3. 研究の方法

HLAタイプが HLA-A\*02,33; B\*44,-;DRB1\*13,- の歯髄細胞 (DP144) の HLA-A\*02 ローカスの遺伝子を Zinc Finger Nuclease (ZFN) によって不活化することによって、HLA-A\*33,-;B\*44,-;DRB1\*13,- という、見かけ上日本人出現頻度2位のハプロタイプホモ細胞と同様の表現型を持つ細胞を作り出した (図1)。DP144細胞にエレクトロポレーション法によって、HLA-A\*02を切断するが、HLA-A\*33を切断しないZFNペアを導入後、抗 HLA-A\*02 特異的なモノクローナル抗体 (One Lambda FH00037) で染色後、FACS-Aria で HLA-A\*02 陰性画分をソーティングした。この濃縮工程を二回繰り返した後に、ディナベッ

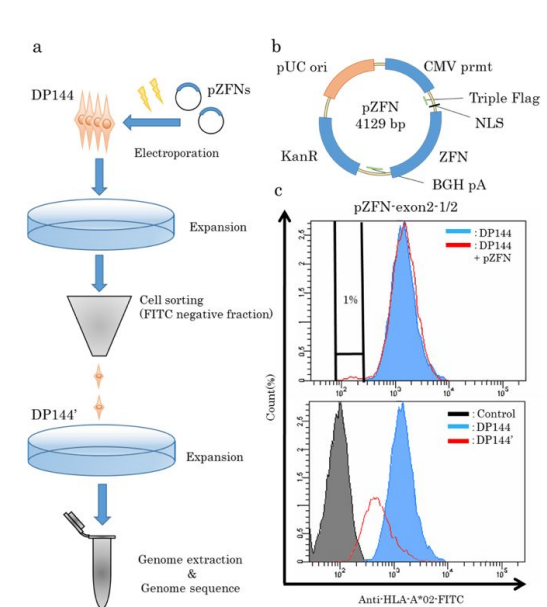


図1 ZFNによるHLA-A\*02領域への変異導入

ク社 Cytotune-iPS2.0 を用いて iPS細胞を誘導した。

得られた iPS細胞クローン (iPS-DP144'-2)よりゲノムDNAを抽出し、Exon3を挟むプライマーによってPCRをおこない、キャピラリーシーケンサーにより変異位置の同定を試みた。また、変異前の DP144細胞のDNAとともに、他からバイオに送付し、illumina社のMiSeqシーケンサーにてHLA領域の塩基配列をディープシーケンスし、Conexio Assign v1.0 TruSight HLA Analysis SoftwareおよびOmixon社のHLA-Twinにて解析を行った。

4. 研究成果

ZFNの導入後、2回の濃縮によって、ZFN-exon3-3/4のペアを用いた群で、ほとんどの細胞が HLA-A\*02 陰性となった (図2)。この陰性画分細胞に山中因子を導入して、得られた iPS細胞クローン (iPS-DP144'-2) を、解析に用いた。

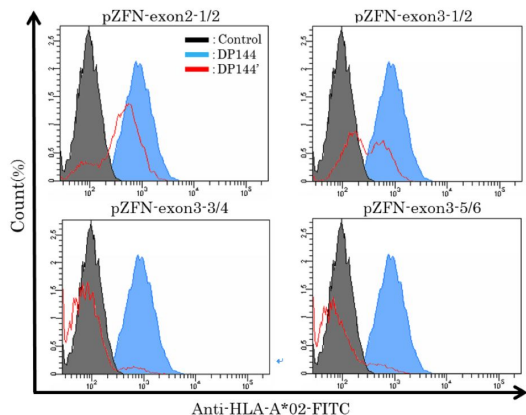


図2 FACS Ariaを用いて2回濃縮後のHLA-A\*02の発現量

キャピラリーシーケンサーによって得られた HLA-A領域の塩基配列からは、HLA-A\*02と HLA-A\*33が相同組換え修復をしたと思

れる結果が得られた。しかし、ZFN によって切断された領域の塩基配列に不可思議な点が見受けられたため、次世代シーケンサ (NGS) を用いて、より詳細な解析を行った。

2 種類の HLA ソフトウェアは、ともに iPS-DP144 ' -2 クローンの HLA タイプは HLA-A\*33, -; B\*44, -; DRB1\*13, - のホモと診断した。しかし HLA-Twin では片方のアリルについて疑義を提示し再解析の必要性を示唆していた。そこで、汎用ゲノム解析ソフトによって、HLA-A\*02 の変異領域の解析を試みたが、HLA-A\*02 由来と思われるリードが特定できず、変異部位を解析することができなかった。特に HLA-A 領域のリードが iPS-DP144 ' -2 では HLA-A\*33 に偏っていたことに注目し、コントロールの DP144 とのカバレッジ比を取ったところ、ZFN のターゲットサイトを含む HLA-A の Exon3 部分およびその下流の intron3 領域のカバレッジが DP144 の約半分以下に低下していた (図 3)。このことから、ZFN によって Exon3 近辺に HLA-A\*02 特異的に大規模な欠失変異が生じた可能性があり、その結果として Exon3 を挟むプライマーによって PCR をしても HLA-A 領域の変異部位が同定できなかったのではないかと考えられた。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)



図3 HLA-A\*02領域のカバレッジ比。矢印はZFNの切断部位を示す

#### [雑誌論文](計2件)

- (1) Tomoko Takeda-Kawaguchi, Ken Sugiyama, Shunji Chikusa, Kazuki Iida, Hitomi Aoki, Naritaka Tamaoki, Daijiro Hatakeyama, Takahiro Kunisada, Toshiyuki Shibata, Noemi Fusaki, Ken-ichi Tezuka: Derivation of iPSCs after Culture of Human Dental Pulp Cells under Defined Conditions. PLoS ONE 査読有、9, 2014, e115392
- (2) Naritaka Tamaoki, Kazutoshi Takahashi, Hitomi Aoki, Kazuki Iida, Tomoko Kawaguchi, Daijiro Hatakeyama, Masatoshi Inden, Naoyuki Chosa, Akira Ishisaki, Takahiro Kunisada, Toshiyuki Shibata, Naoki Goshima, Shinya Yamanaka, and Ken-ichi Tezuka: The homeobox gene DLX4 promotes generation of human induced pluripotent stem cells. Sci. Rep. 査

読有、4, 2014, 7283

#### [学会発表](計10件)

- (1) 第15回日本再生医療学会総会 (2016/3/17, 大阪国際会議場, 大阪府大阪市) 杉山 健, 飯田 一規, 川口 知子, 畠山大二郎, 柴田 敏之, 手塚建一: 脊髄損傷治療を目的としたヒト歯髄細胞の FGF2 に対するドナー個人差の検討
- (2) 第16回運動器科学研究会 (2015/9/11-12, みなみホール, 鹿児島県鹿児島市) 杉山 健, 川口 知子, 手塚建一: 脊髄損傷治療を目的としたヒト歯髄細胞の FGF2 に対する応答性の検討
- (3) 第1回岐阜大学しずい細胞プロジェクト研究会 (2015/12/2, 岐阜大学サテライトキャンパス, 岐阜県岐阜市) 手塚 建一 親知らずの細胞で日本人の iPS 細胞を (主催)
- (4) 第60回日本口腔外科学会学術集会 (2015/10/17, 名古屋国際会議場, 愛知県名古屋市) 手塚 建一 HLA ハプロタイプ資源としての歯髄細胞
- (5) 27th European Conference on Biomaterials (2015/8/30-9/3, ICE Krakow Congress Center, ポーランドクラクフ市) Ken-ichi Tezuka, Shunji Chikusa, Shota Ishii, Ken Sugiyama, Tomoko Kawaguchi-Takeda: Genome Editing of HLA Locus Using Zinc Finger Nucleases.
- (6) 第33回日本骨代謝学会学術集会 (2015/7/23, 京王プラザホテル, 東京都新宿区) 手塚 建一 骨特異的遺伝子の分子クローニング
- (7) 第33回日本骨代謝学会学術集会 (2015/7/23, 京王プラザホテル, 東京都新宿区) 杉山 健, 川口 知子, 手塚 建一 脊髄損傷治療を目的としたヒト歯髄細胞の FGF2 に対する応答性の検討
- (8) 第30回老化促進マウス (SAM) 研究協議会 (2015/7/5, 岐阜大学サテライトキャンパス, 岐阜県岐阜市) 手塚 建一 HLA ハプロタイプホモ歯髄細胞による再生医療
- (9) 第32回日本骨代謝学会学術集会 (2015/7/25, 大阪国際会議場, 大阪府大阪市) 千種 俊士, 武田 知子, 手塚 建一 Zinc Finger Nuclease を用いたヒト歯髄細胞における HLA-A2 の遺伝子改変
- (10) 第68回日本口腔科学会シンポジウム「口腔組織に由来する幹細胞の医科への応用」(2015/5/8, 京王プラザホテル, 東京都新宿区) 手塚 建一 岐阜歯髄細胞コレクション 未来の再生医療を支える医療資源

#### [図書](計2件)

- (1) 手塚建一: 季刊 腎と骨代謝 「特集」

歯の細胞生物学 HLA ハプロタイプホモ  
歯髄細胞の収集と再生医療への応用  
vol.29 p.59-67, 2016 日本メディカル  
センター

- (2) 手塚建一：骨ペディア 骨疾患・骨代謝  
キーワード辞典 p.157-158「カテプシン  
K」 羊土社 2015/5/15 初版

〔産業財産権〕

出願状況（計 1 件）

名称：人工多能性幹細胞の作製方法

発明者：手塚建一、玉置也剛、川口知子、青  
木仁美、國貞隆弘、柴田敏之、五島  
直樹

権利者：岐阜大学、産業技術総合研究所

種類：国際出願

番号：PCT/2014/072564

出願年月日：2014/8/28

国内外の別： 国外

取得状況（計 3 件）

名称：効率的な人口多能性幹細胞の樹立方法

発明者：手塚建一、柴田敏之、國貞隆弘、玉  
置也剛、武田知子、山中伸弥、高橋  
和利

権利者：岐阜大学、京都大学

種類：特許

番号：特許第 5553178 号

取得年月日：平成 26 年 6 月 6 日

国内外の別： 国内

名称：Efficient method for establishing  
induced pluripotent stem cells.

発明者：Tezuka K, Shibata T, Kunisada T,  
Tamaoki N, Takeda T, Yamanaka S,  
Takahashi K

権利者：岐阜大学、京都大学

種類：国際特許（韓国）

番号：Korea Patent 2011-7003453

取得年月日：2014/3/4

国内外の別： 国外

名称：Efficient method for establishing  
induced pluripotent stem cells.

発明者：Tezuka K, Shibata T, Kunisada T,  
Tamaoki N, Takeda T, Yamanaka S,  
Takahashi K

権利者：岐阜大学、京都大学

種類：国際特許（カナダ）

番号：Canadian Patent 2,732,401

取得年月日：2014/8/5

国内外の別： 国外

〔その他〕

ホームページ等

<http://tezukalab.private.coocan.jp/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

手塚 建一 (TEZUKA, Ken-ichi)

岐阜大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：50236973