

令和 3 年 5 月 25 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K19448

研究課題名(和文) 相同組換えを利用したHLAホモ化iPS細胞バンク創出、及び病因領域特定技術の構築

研究課題名(英文) generation of HLA homogenized iPS cell bank using induced homologous recombination method

研究代表者

吉村 康秀 (YOSHIMURA, YASUhide)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：60263307

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,900,000円

研究成果の概要(和文)：我々はiPS細胞を用いて、染色体の狙った領域のみで染色体交差に伴う相同組換えを誘発させるシステムの開発に成功した。システムはAAVS1領域の存在する19番染色体をモデルとして、ブルーム遺伝子の発現を制御する形で開発された。次に、作出される細胞の再生医療への応用を睨んで、システムはブルーム蛋白を低分子化合物で阻害する事によっても成し遂げられた。このシステムを6番染色体のHLA領域に適用し、HLA領域のホモ化にも成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々はゲノム編集技術と、低分子化合物によるブルーム蛋白の一過性に阻害により、染色体上の狙った領域のみで相同組換えを生じさせる技術を開発した。この技術をHLA領域に適用する事により、免疫原性を低減させた移植用iPS細胞の作出に繋げる事が可能であり、この社会的意義は大きいものがあると考えられる。また本技術は、近年の解析技術の向上により割り出されたゲノムワイド関連解析によって見出された病因因子の表現型との関連解析にも役立つ事が期待され高い学術的意義を示すと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Here, we developed a region-specific LOH-inducing system based on mitotic crossover in human induced pluripotent stem cells (hiPSCs). We first tested our system on chromosome 19. To detect homozygous clones generated by LOH, a positive selection cassette was inserted at the AASV1 locus of chromosome 19. LOHs were generated by the combination of allele-specific double-stranded DNA breaks introduced by CRISPR/Cas9 and suppression of Bloom syndrome (BLM) gene expression by the Tet-Off system. The BLM protein inhibitor ML216 exhibited a similar crossover efficiency and distribution of crossover sites. We next applied this system to the short arm of chromosome 6, where human leukocyte antigen (HLA) loci are located. Genotyping and flow cytometric analysis demonstrated that LOHs associated with chromosomal crossover occurred at the expected positions.

研究分野：幹細胞生物学、遺伝学

キーワード：相同組換え iPS細胞 再生医療 免疫拒絶

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

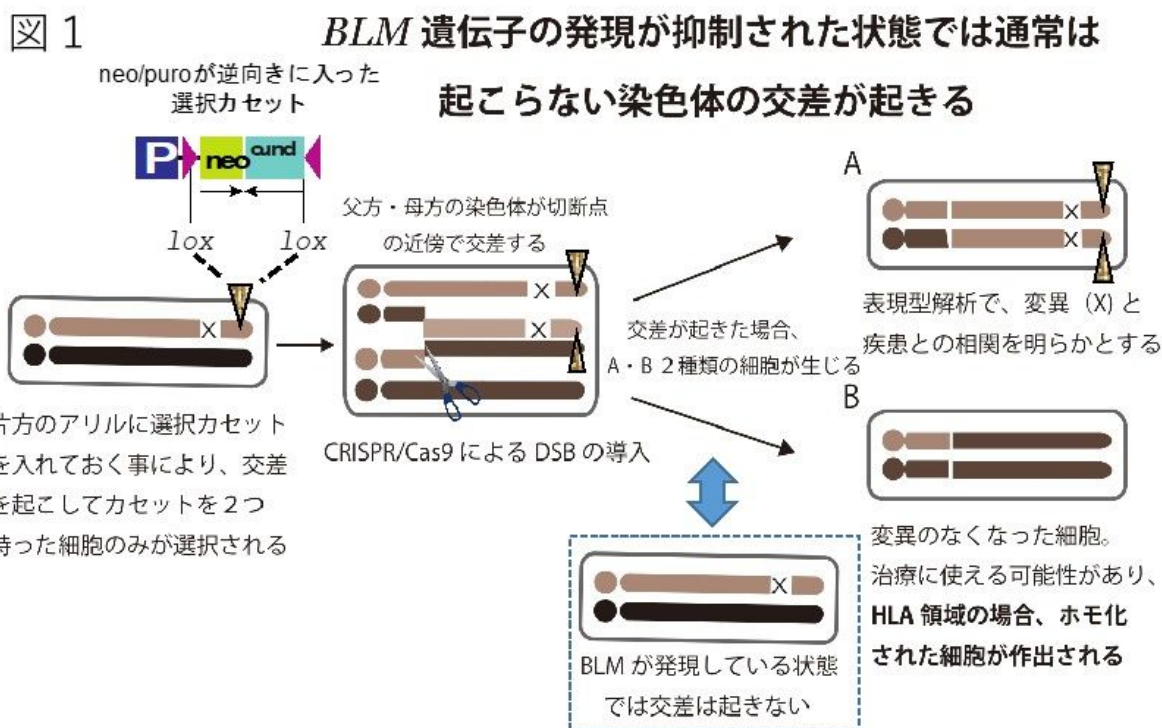
### 1. 研究開始当初の背景

iPS 細胞を再生医療に用いる際の免疫拒絶を回避するため、拒絶反応で重要な HLA 3 座 (A、B、DR) にホモ接合体を持つ人からの iPS 細胞のバンク化が行われている。しかし、これでは全ての人にはカバーできず、また 3 座だけでは理想的な適合は難しい。我々はゲノム編集技術を活用し、ブルーム蛋白インヒビターとトランスポゾンベクターだけを用いて『ゲノムに全く変異を与えることなく』、既存の iPS 細胞バンクから、全ての HLA 座位に関してホモ接合体を作製する手法を確立する。

### 2. 研究の目的

本手法は、iPS 細胞において意図的な相同組換えを誘導し、染色体上の特定の領域に LOH (Loss Of Heterozygosity) を生じさせる技術を基盤としている。このため、連鎖解析などで特定の領域に病因因子の存在が疑われた場合、その領域を“狙って” LOH を起こさせ表現型を解析することを可能とする (下図 1)。この際、反対の染色体にカセットが入った場合、病因因子のなくなった細胞も得られるが、これは治療に使える可能性がある。

このように、染色体の狙った領域に相同組換えを起こさせる技術を確認し、それを様々な医療応用に活かす手法を樹立してゆくことを本研究の目的とする。



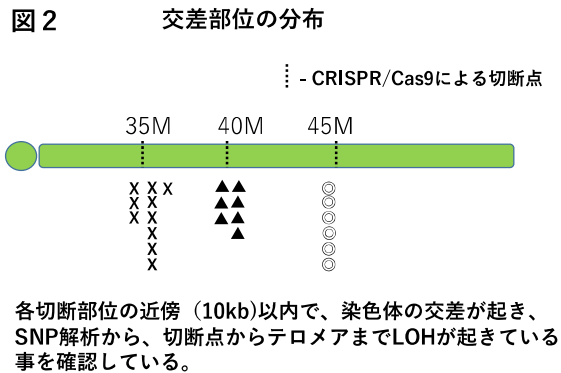
### 3. 研究の方法

#### 3 - 1. 概要

我々は 19 番染色体をモデルとして、CRISPR/Cas9 の切断で相同組換えを起こしたクローン (LOH クローン) を、35M・40M・45M の 3 ヶ所それぞれにおいて複数個得ることに成功していた (図 2 参照)。これは、ブルーム遺伝子を Tet-off システムで発現調節を行い得られたデータである。

しかし、細胞株毎のブルーム遺伝子に対して Tet-off カセットを挿入するのでは効率が悪

悪い。また、トランスポゼースによりゲノムからの除去が可能な選択カセットとは違い、Tet-off カセットは、トランスポゾンベクターに組み込んで、後から抜くのは技術的に困難があった。このため我々は、再生医療への応用を視野に入れ、ブルーム蛋白のインヒビターを用いた同様の実験を行い、その至適な条件を検討した。これはモデルとしての 19 番染色体、さらには実際の応用を狙って HLA 領域の存在する 6 番染色体をターゲットとして行った。



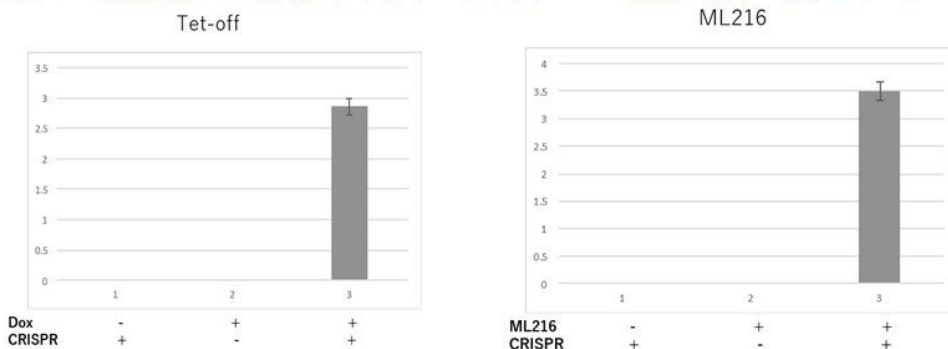
### 3 - 2 . 実験の方法

- 1 .トランスポゾンベクターに neomycin/puromycin が挿入された選択カセットの、“片アリル” への導入
- 2 . 標的領域近傍の片アリル切断 (ブルーム蛋白インヒビター存在下)
- 3 . neomycin/puromycin によるダブルセレクション  
(neomycin/puromycin は tail to tail になっており、相同組換えが生じて選択カセットが両方の染色体に存在するクローンのみが、Cre リコンビナーゼにより、各染色体で片方ずつ発現するため、選択される)

### 4 . 研究成果

相同組換え誘発システムは、先ず 19 番染色体長腕においてブルーム遺伝子への Tet-off の導入による従来システムの構築を行った。次に、ゲノムに大幅なゲノム編集を施さねばならない Tet-off の代わりに、実際に再生医療に適用するため、低分子化合物であるブルーム蛋白のインヒビター (ML216) を用いて、効率よく相同組換え生じさせる条件を見出した (図3)。直接、ブルーム蛋白を阻害する本技術の方が、ゲノムを修飾する Tet-off よりもホモ化効率が上昇しており、ゲノムを修飾す

図3 . 19 番染色体 35M領域におけるポジティブクローン取得の効率に関するデータ



Tet-offでは、 $1 \times 10^6$ あたり3回の平均で2.8個だったポジティブクローンを得られる効率が、ブルーム蛋白インヒビターを用いると、3.5個/ $1 \times 10^6$ と効率が向上した

ことなく、効率よく特定領域ホモ化細胞が得られる技術が確立された。

図 4

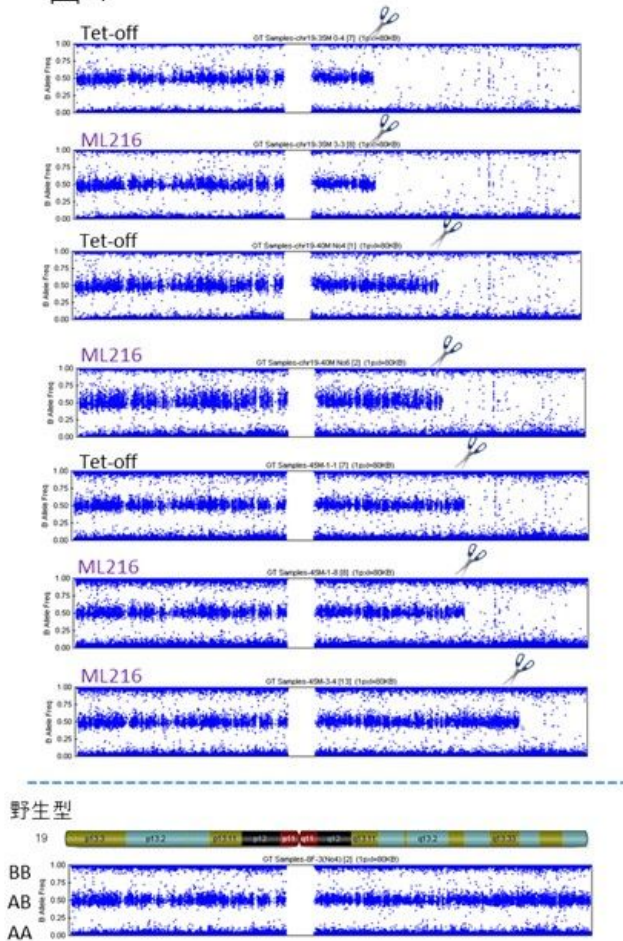


図 4 . に示した通り、インヒビター(ML216)の使用により、染色体上の組換わりの位置もTeo-offと変わらない結果が得られた。これにより、本技術をヒトの組織適合性抗原である HLA 領域( 6 番染色体・短腕)に適用することで HLA ホモの株の作出により、免疫原性を低下させた細胞の作製を行った( 図 5 )。

作出された HLA ホモ株は、高額な費用がかかるため普及していない、個人個人が持つと有用とされる iPS 細胞や臍帯血細胞についても、HLA ホモ化により親族のうち一人で賄えることになり、費用や価値といった部分で概念が大きく変わる可能性があり、その汎用性に幅を持たせ

られる可能性があると考えている。

\*それぞれのデータの真ん中の太い線状の帯がヘテロ状態を示す SNP の集合データ。真ん中がなくなっているのは、LOH が生じたこと(ホモ化)を示している。

図 5 .

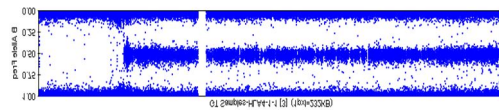
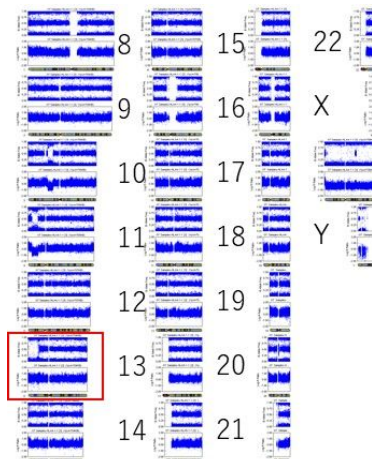


図 5 は 6 番染色体短腕における HLA 領域のホモ化の例。

なお、この領域以外の全染色体においてはこのようなゲノムの変化は生じていない( 図 6 )。

図 6 .



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yoshimura Y, Yamanishi A, Kamitani T, Kim JS, Takeda J.	4. 巻 5;14(12)
2. 論文標題 Generation of targeted homozygosity in the genome of human induced pluripotent stem cells.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLoS One	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0225740. eCollection 2019. PMID: 31805151	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yoshimura Y.	4. 巻 11
2. 論文標題 Increased error-free DNA repair gene expression through reprogramming in human iPS cells.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Regenerative Therapy	6. 最初と最後の頁 101-105
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.reth.2019.06.003. eCollection 2019 Dec. PMID: 31304203	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yoshimura Y, Okuzaki D	4. 巻 29
2. 論文標題 Error-free and error-prone DNA repair gene expression data through reprogramming and passage in human iPS cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Data in Brief	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.dib.2020.105228.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 吉村 康秀
2. 発表標題 未分化性維持の指標としてのDNA修復関連遺伝子群
3. 学会等名 日本分子生物学会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計2件

産業財産権の名称 ホモ接合型細胞の作製方法	発明者 吉村 康秀、竹田 潤二	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2019/018379	出願年 2019年	国内・外国の別 外国

産業財産権の名称 ホモ接合型細胞の作製方法	発明者 吉村 康秀、竹田 潤二	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2018- 89779	出願年 2018年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------