

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

W02019/160077

発行日 令和3年3月18日 (2021.3.18)

(43) 国際公開日 令和1年8月22日 (2019.8.22)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/09	1 1 O 4 B O 6 3
C 1 2 N 15/11 (2006.01)	C 1 2 N 15/11	Z N A Z 4 B O 6 5
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10	
C 1 2 Q 1/04 (2006.01)	C 1 2 Q 1/04	
G O 1 N 33/53 (2006.01)	G O 1 N 33/53	M
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 96 頁)		

出願番号	特願2020-500578 (P2020-500578)	(71) 出願人	504132272
(21) 国際出願番号	PCT/JP2019/005524		国立大学法人京都大学
(22) 国際出願日	平成31年2月15日 (2019.2.15)		京都府京都市左京区吉田本町36番地1
(31) 優先権主張番号	特願2018-26421 (P2018-26421)	(74) 代理人	100106909
(32) 優先日	平成30年2月16日 (2018.2.16)		弁理士 棚井 澄雄
(33) 優先権主張国・地域又は機関	日本国 (JP)	(74) 代理人	100188558
			弁理士 飯田 雅人
		(74) 代理人	100181722
			弁理士 春田 洋孝
		(74) 代理人	100192773
			弁理士 土屋 亮
		(74) 代理人	100154852
			弁理士 酒井 太一
		(74) 代理人	100140774
			弁理士 大浪 一徳

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 低抗原性細胞の製造方法

(57) 【要約】

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。

【特許請求の範囲】

【請求項 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、を含む、

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。

【請求項 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、請求項 1 に記載の製造方法。

【請求項 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む、

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、

請求項 1 又は 2 に記載の製造方法。

【請求項 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、請求項 3 に記載の製造方法。

【請求項 5】

前記低抗原性細胞が多能性幹細胞である、請求項 1～4 のいずれか一項に記載の製造方法。

【請求項 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。

【請求項 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、請求項 6 に記載のキット。

【請求項 8】

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

【請求項 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。

【請求項 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。

【請求項 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、請求項10に記載の細胞。

【請求項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、請求項10又は11に記載の細胞。

【請求項13】

多能性幹細胞である、請求項10～12のいずれか一項に記載の細胞。

【請求項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、請求項10～13のいずれか一項に記載の細胞。

10

【請求項15】

HLA-Aアレル及びHLA-Bアレルが破壊され、少なくとも1種のHLA-Cタンパク質を発現可能な、請求項10～14のいずれか一項に記載の細胞。

【請求項16】

20

前記HLA-Cタンパク質が、HLA-C*01:02アレル、HLA-C*02:02アレル、HLA-C*03:03アレル、HLA-C*03:04アレル、HLA-C*04:01アレル、HLA-C*05:01アレル、HLA-C*06:02アレル、HLA-C*07:01アレル、HLA-C*07:02アレル、HLA-C*08:01アレル、HLA-C*12:02アレル及びHLA-C*16:01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、請求項15に記載の細胞。

【請求項17】

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、

30

前記ドナー細胞の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つ以上を含むアレルを破壊又は改変すること、を含み、

前記CIITAアレル、RFX5アレル、RFXAPアレル又はRFXANK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。

【請求項18】

前記低抗原性細胞が多能性幹細胞である、請求項17に記載の細胞。

【請求項19】

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つ以上を含むアレルが破壊又は改変された細胞。

【請求項20】

40

多能性幹細胞である、請求項19に記載の細胞。

【請求項21】

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。

【請求項22】

前記標的塩基配列が、

配列番号3、4、7、45～52、72～2459のいずれかに記載の塩基配列、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'

50

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、請求項21に記載のgRNA。

【請求項23】

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、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からなる、請求項21又は22に記載のgRNA。

【請求項24】

前記標的塩基配列が、HLA遺伝子のエクソン2又は3にマッピングされる、請求項21～23のいずれか一項に記載のgRNA。

10

【請求項25】

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。

【請求項26】

前記標的塩基配列が、

配列番号53～55、2460～8013のいずれかに記載の塩基配列、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からなる、請求項25に記載のgRNA。

20

【請求項27】

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、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からなる、請求項25又は26に記載のgRNA。

【請求項28】

前記標的塩基配列が、HLA遺伝子のエクソン2又は3にマッピングされる、請求項25～27のいずれか一項に記載のgRNA。

30

【請求項29】

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。

40

【請求項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

50

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。

【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。

10

【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】

20

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 β 2-Microglobulin（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。

30

【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】

40

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。

【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

50

見つけ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。

【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。

【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】

実際に、ES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、iPS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HLA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、HLA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HLAタンパク質の細胞表面提示に必要なB2M遺伝子を欠失させた細胞が記載されている。

【0014】

近年、CRISPR-Cas9及びガイドRNA (gRNA) を用いるゲノム編集技術により、gRNAの標的塩基配列依存的にゲノムDNAに二本鎖DNA切断 (Double strand break、DSB) 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Cas9及びgRNA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DSB誘導は、標的配列に対して認識結合するgRNAの20塩基程度のスパーサー塩基配列と3～5塩基程度のPAM配列と呼ばれる塩基配列によって決定される。このため、gRNA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DSB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DSB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】

10

20

30

40

50

【特許文献1】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、B2M遺伝子を欠失しているため、クラスIのHLA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、HLA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、B2M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、HLAタンパク質が細胞表面に提示されていない細胞は、「missing self」を認識するNK細胞によって攻撃されてしまう。

10

【0019】

そこで、ゲノム編集技術を用いて任意のHLA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、HLA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HLA遺伝子の間で配列の相同性が高い。一方で、同じHLA遺伝子であっても、個人間での配列多様性が大きい。あるHLA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。

20

【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。

30

〔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。

40

〔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。

50

〔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。

〔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。 10

〔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。

〔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。 20

〔15〕HLA-Aアレル及びHLA-Bアレルが破壊され、少なくとも1種のHLA-Cタンパク質を発現可能な、〔10〕～〔14〕のいずれかに記載の細胞。

〔16〕前記HLA-Cタンパク質が、HLA-C*01:02アレル、HLA-C*02:02アレル、HLA-C*03:03アレル、HLA-C*03:04アレル、HLA-C*04:01アレル、HLA-C*05:01アレル、HLA-C*06:02アレル、HLA-C*07:01アレル、HLA-C*07:02アレル、HLA-C*08:01アレル、HLA-C*12:02アレル及びHLA-C*16:01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、〔15〕に記載の細胞。 30

〔17〕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つ以上を含むアレルを破壊又は改変すること、を含み、前記CIITAアレル、RFX5アレル、RFXAPアレル又はRFXANK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。

〔18〕前記低抗原性細胞が多能性幹細胞である、〔17〕に記載の細胞。

〔19〕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つ以上を含むアレルが破壊又は改変された細胞。 40

〔20〕多能性幹細胞である、〔19〕に記載の細胞。

〔21〕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。

〔22〕前記標的塩基配列が、配列番号3、4、7、45～52、72～2459のいずれかに記載の塩基配列、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からなる、〔21〕に記載のgRNA。

〔23〕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 50

配列、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からなる、[21] 又は [22] に記載の gRNA。

[24] 前記標的塩基配列が、HLA 遺伝子のエクソン 2 又は 3 にマッピングされる、[21]～[23] のいずれかに記載の gRNA。

[25] 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。

[26] 前記標的塩基配列が、配列番号 53～55、2460～8013 のいずれかに記載の塩基配列、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からなる、[25] に記載の gRNA。

[27] 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、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からなる、[25] 又は [26] に記載の gRNA。

[28] 前記標的塩基配列が、HLA 遺伝子のエクソン 2 又は 3 にマッピングされる、[25]～[27] のいずれかに記載の gRNA。

[29] 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 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。

【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。

【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。

【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。

【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。

【図16】(a)は、実験例12におけるsgRNA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。

【図20】(a)は、実験例15におけるsgRNA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。

【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。

10

20

30

40

50

【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。

【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。

10

【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。

【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 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。(c) は、実験例 33 における EB 由来血球様細胞の生存率を示すグラフである。

20

【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。

【図 43】(a) は、実験例 35 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 35 の結果を示すグラフである。

【図 44】(a) 及び (b) は、実験例 36 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 45】(a) は、実験例 37 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 37 において 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。(c) は、実験例 37 における EB 由来血球様細胞の相対的生存率を示すグラフである。

30

【図 46】実験例 38 の結果を示すグラフである。

【図 47】(a) は、実験例 39 で使用した 585A1-C7 残存細胞の HLA ハプロタイプ、及び、実験例 39 で作製した、CITTA 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。(b) は、実験例 39 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 39 で得られた代表例なクローンの塩基配列である。

【図 48】(a) ~ (d) は、実験例 40 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 49】(a) ~ (c) は、実験例 41 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 50】(a) ~ (c) は、実験例 42 の手順を説明する図である。

【図 51】(a) は実験例 42 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 42 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 52】(a) 及び (b) は、実験例 42 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 53】様々な人種における HLC-C アレルのアレル頻度を示す表である。

【図 54】実験例 43 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 55】実験例 44 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 56】(a) 及び (b) は、実験例 45 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。

50

【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。

【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。

【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 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。

【0027】

(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。

【0028】

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。

【0029】

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。

【0030】

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 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。

【0031】

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。

【0032】

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。

【0033】

(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。

【0034】

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。

【0035】

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。

【0036】

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。

【0037】

(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。

【0038】

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。

【0039】

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

10

20

30

40

50

ある。

【0040】

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、B2M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HLA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NK細胞によって攻撃されにくくなる。また、一部のHLAが破壊されただけであり、残りのHLA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。

【0041】

《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HLA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。HLAアレルの破壊は、HLAアレルを特異的に切断して二本鎖DNA切断(DSB)を誘導することにより行うことができる。DSB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、HLAアレルが破壊されて、HLAタンパク質が発現しなくなる。本明細書において、HLAアレルの破壊をHLAアレルのノックアウトという場合がある。

【0042】

また、ドナーDNAの存在下でHLAアレルを特異的に切断してDSBを誘導することにより、DSBの修復過程で相同組換えを誘導し、HLA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、HLA-A*02:07アレルをHLA-A*01:01アレルに改変すること等が可能である。

【0043】

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HLAアレルをコードするものを使用するとよい。ドナーDNAは、一本鎖DNAでもよいし、二本鎖DNAでもよい。また、ドナーDNAは、単一の塩基配列を有するDNAであってもよいし、複数の塩基配列を有するDNAの混合物であってもよい。

【0044】

ここで、配列同一性を有するとは、ドナーDNAと標的となるゲノムDNAの二本鎖切断の位置を含む領域との間で90%以上の塩基配列が一致することを意味する。ドナーDNAは、ゲノムDNAの二本鎖切断の位置を含む領域と95%以上の塩基配列が一致することが好ましく、99%以上の塩基配列が一致することがより好ましい。

【0045】

ドナーDNAは、50～5,000塩基程度の一本鎖DNAであってもよいし、50～5,000塩基対程度の二本鎖DNAであってもよい。ドナーDNAが一本鎖DNAである場合、ドナーDNAは、ゲノムDNA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。

【0046】

《配列特異的DNA切断酵素》

一般的に、DSB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DNA切断酵素は、RNA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DNA切断酵素はRNA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。

【0047】

配列特異的DNA切断酵素は、ゲノムDNA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DNA切断酵素が認識する標的配列の長さは、例えば、10～60塩基程度であってよい。

【0048】

また、配列特異的DNA切断酵素は、例えばニッカーゼを複数組み合わせることでDNA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DNA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DNA上の近接した位置において、二本

10

20

30

40

50

鎖DNA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。

【0049】

RNA誘導型ヌクレアーゼとは、ガイドとなる短鎖RNAが標的配列に結合し、2つのDNA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。RNA誘導型ヌクレアーゼとしては、CRISPR-Casファミリータンパク質が挙げられる。CRISPR-Cas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III及びタイプIVが含まれ、クラス2の中にはタイプII、タイプV及びタイプVIが含まれる。

10

【0050】

CRISPR-Casファミリータンパク質としては、例えば、Cas9、Cpf1、CasX、CasY、Cas12、Cas13、C2C2等が挙げられる。RNA誘導型ヌクレアーゼは、CRISPR-Casファミリータンパク質のホモログであってもよく、CRISPR-Cas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クアーゼ改変型のヌクレアーゼであってもよい。あるいは、標的特異性の向上したCas9-HFやHiFi-Cas9、eCas9等であってもよい。

【0051】

Cas9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。Cpf1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。

20

【0052】

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DNA結合ドメインと、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。

30

【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。

【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。

40

【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。

【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

50

、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、パキユロウイルスベクター等が挙げられる。

【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電穿孔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ュ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。

【0060】

また、電穿孔法は、NEPA 21（ネッパジーン株式会社）、Neon（サーモフィッシュ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、目的とするHLA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、HLAアレルの破壊又は改変が行われなかった細胞、HLA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HLA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HLAタンパク質の発現誘導剤（HLAタンパク質発現誘導剤）を接触させる工程と、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特異的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特異的HLA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HLA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HLA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。

【0063】

本工程において、ドナー特異的HLA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HLAタンパク質を発現しない細胞を回収するとは、発現したHLA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HLA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】

HLAタンパク質発現誘導剤としては、IFN- γ 、IFN- α 、IFN- β 、IL-4、GM-CSF、TGF- α 、TGF- 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。

【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IFN- γ タンパク質のNCBIアクセッション番号はNP_000610.2等であり、ヒトIFN- α タンパク質のNCBIアクセッション番号はNP_0

10

20

30

40

50

76918. 1、NP_000596. 2、NP_066546. 1等であり、ヒトIFN- β タンパク質のNCBIアクセッション番号はNP_002167. 1等であり、ヒトIL-4タンパク質のNCBIアクセッション番号はNP_000580. 1、NP_758858. 1、NP_001341919. 1等であり、ヒトGM-CSFタンパク質のNCBIアクセッション番号はNP_000749. 2等であり、ヒトTGF- α タンパク質のNCBIアクセッション番号はNP_001093161. 1、NP_003227. 1、NP_001295088. 1、NP_001295087. 1等であり、ヒトTGF- β タンパク質のNCBIアクセッション番号はNP_000651. 3、XP_011525544. 1等である。

【0066】

上記のサイトカインは、HLAタンパク質の発現を誘導する活性を有している限り、上記の各アクセッション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、上記の各アクセッション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。

【0067】

多能性幹細胞は、一般的に未分化状態において、HLAタンパク質を細胞表面に発現しておらずHLAタンパク質の検出が困難であることが知られている。HLA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、HLA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HLAタンパク質発現誘導剤を多能性幹細胞に作用させることにより、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。

【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。

【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

10

20

30

40

50

る工程を更に含んでいてもよい。C I I T A 遺伝子は、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 タンパク質をコードする遺伝子である。また、R F X 5 遺伝子は、R e g u l a t o r y F a c t o r X 5 タンパク質をコードする遺伝子である。また、R F X A P 遺伝子は、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 をコードする遺伝子である。また、R F X A N K 遺伝子は、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 A n k y r i n C o n t a i n i n g P r o t e i n をコードする遺伝子である。

【0075】

C I I T A 遺伝子は、R F X 5 遺伝子、R F X A P 遺伝子、R F X A N K 遺伝子と共に、H L A クラス I I 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、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。

【0076】

ヒト C I I T A 遺伝子の N C B I アクセッション番号は N M _ 0 0 0 2 4 6 . 3、N M _ 0 0 1 2 8 6 4 0 2 . 1、N M _ 0 0 1 2 8 6 4 0 3 . 1 等であり、ヒト R F X 5 遺伝子の N C B I アクセッション番号は N M _ 0 0 0 4 4 9 . 3、N M _ 0 0 1 0 2 5 6 0 3 . 1 等であり、ヒト R F X A P 遺伝子の N C B I アクセッション番号は N M _ 0 0 0 5 3 8 . 3 等であり、ヒト R F X A N K 遺伝子の N C B I アクセッション番号は N M _ 0 0 1 2 7 8 7 2 7 . 1、N M _ 0 0 1 2 7 8 7 2 8 . 1、N M _ 0 0 3 7 2 1 . 3、N M _ 1 3 4 4 4 0 . 2 等である。

【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 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 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低減されている。

【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いてもよい。

【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。

【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。

【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。

【0087】

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。

【0088】

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。

【0089】

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。

【0090】

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。

【0091】

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NK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

10

20

30

40

50

ーCタンパク質、HLA-Eタンパク質、HLA-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HLAが破壊されたただけであり、残りのHLA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。

【0092】

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。

【0093】

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HLAアレルを有するレシピエントであってもよい。

【0094】

第1実施形態の細胞は、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、CIITA遺伝子、RFX5遺伝子、RFXAP遺伝子及びRFXANK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。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。

【0095】

(第2実施形態)

第2実施形態に係る細胞は、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つ以上を含むアレルが破壊又は改変された細胞である。上述したように、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つ以上を含むアレルが破壊又は改変された細胞は、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、HLA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、B2Mアレルを破壊した細胞は、HLAアレルが野生型であってもHLA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、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つに加えてB2Mアレルが更に破壊されていてもよい。

【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HLA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)

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(CAR)を遺伝子導入し、CAR-T細胞として癌患者等に移植すること等が挙げられる。

【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を含む方法を提供する。

【0103】

第1実施形態の方法により、後述する第1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。

【0104】

上述したように、HLA遺伝子は多くの偽遺伝子を持ち、お互いのHLA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】

HLA遺伝子特異的な配列特異的DNA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HLAハプロタイプのゲノムDNAの塩基配列データ(既知の全HLA遺伝子の塩基配列データ)を入手する。全HLA遺伝子の塩基配列データは、例えば、IPD-IMG/HLA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HLAクラスI遺伝子の塩基配列と4,622件のHLA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HLAアレルの塩基配列から、使用する配列特異的DNA切断酵素の標的となる塩基配列を抽出する。例えば、CRISPR-Casを配列特異的DNA切断酵素として用いる場合、3~5塩基程度のPAM配列(例えば、化膿性レンサ球菌由来Cas9の場合「NGG」、アシダミノコッカス由来のCpf1の場合「TTTN」)を含む、gRNA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PAM配列を含むものとする。PAM配列を含む標的塩基配列の長さは、配列特異的DNA切断酵素により異なる。例えば、配列特異的DNA切断酵素が化膿性レンサ球菌由来Cas9である場合、PAM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DNA切断酵素がアシダミノコッカス由来のCpf1である場合、PAM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HLAハプロタイプのゲノムDNAの塩基配列データに対して、PAM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HLAハプロタイプのゲノムDNA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、Bowtie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、BWA、BLAST、BLAT、SOAP、Novoalign、Tophat等の、Bowtie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、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。全ゲノムDNA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（Hg19）等を用いることができる。また、マッピングには、Bowtie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。

【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。

【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

10

20

30

40

50

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、H L A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、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ことと、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。

10

【0119】

第2実施形態の方法は、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。

【0120】

第2実施形態の方法において、候補塩基配列、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、全ゲノムD N A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。

20

【0121】

本実施形態の方法により、後述する第2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2実施形態のg R N Aは、複数の標的とするH L A遺伝子(又はアレル)を切断することができる。このため、複数のH L A遺伝子を破壊又は改変する場合に必要なg R N Aの種類を減らすことができる。これにより、g R N Aを製作するコストを減らすことができる。また、使用するg R N A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。

30

【0122】

[g R N A]

(第1実施形態)

1実施形態において、本発明は、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を、標的塩基配列とするg R N Aを提供する。

【0123】

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。

40

【0124】

本実施形態において、g R N Aは、C R I S P R RNA (c r R N A)とトランス活性化型C R I S P R RNA (t r a c r R N A)との複合体であってもよいし、t r a c r R N Aとc r R N Aを組み合わせた単一の合成g R N A (s g R N A)であってもよい。いずれの構造のg R N Aであっても標的塩基配列特異的にD S Bを誘導することができる。

【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、P A M配列を含む塩基配列である。そこで、標的塩基配列からP A M配列を除いた塩基配列をc r R N A又はs g R N Aのスペーサー塩

50

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パーサー塩基配列とする。続いて、スパーサー塩基配列の 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。

【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。

【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'-NNNNNNNNNNNNNNNNNNNN-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'-NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNGUUUUAGAGCUAGAAUAGCAAGUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGUGCUUUUUU-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ない。

【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パーサー塩基配列とする。続いて、スパーサー塩基配列の 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'-NNNNNNNNNNNNNNNNNNNN-3'」（配列番号 62）である場合、crRNA の塩基配列は「5'-NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNGUUUUAGAGCUAUGCUGUUUG-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'-CAAACAGCAUAGCAAGUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGUGC-3'」（配列番号 65）とすることができる。

10

20

30

40

50

【0135】

c r R N A の塩基配列は、c r R N A として機能する限り、配列番号 6 4 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 6 4 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 ～ 1 0 塩基、例えば 1 ～ 5 塩基、例えば 1 ～ 3 塩基であってよい。

【0136】

また、t r a c r R N A の塩基配列は、t r a c r R N A として機能する限り、配列番号 6 5 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 ～ 1 0 塩基、例えば 1 ～ 5 塩基、例えば 1 ～ 3 塩基であってよい。

10

【0137】

設計した c r R N A 及び t r a c r R N A は、化学合成等により調製することができる。c r R N A 及び t r a c r R N A は R N A として調製して直接ドナー細胞に導入してもよいし、D N A 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。

【0138】

具体的な第 1 実施形態の g R N A としては、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を標的塩基配列とする g R N A、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を標的塩基配列とする g R N A 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 ～ 1 0 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 D N A への結合能力を下げ、C R I S P R - C a s 9 の配列認識特異性を高めることができる。

20

【0139】

中でも、配列番号 3、4、7、4 5 ～ 5 2 のいずれかに記載の塩基配列を標的塩基配列とする g R N A、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を標的塩基配列とする g R N A 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 g R N A により、H L A ハプロタイプ特異的に H L A 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。

30

【0140】

(第 2 実施形態)

1 実施形態において、本発明は、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を、標的塩基配列とする g R N A を提供する。

【0141】

具体的な第 2 実施形態の g R N A としては、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を標的塩基配列とする g R N A、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を標的塩基配列とする g R N A 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 ～ 1 0 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 D N A への結合能力を下げ、C R I S P R - C a s 9 の配列認識特異性を高めることができる。

40

【0142】

中でも、配列番号 5 3 ～ 5 5 のいずれかに記載の塩基配列を標的塩基配列とする g R N

50

A、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。

【0143】

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。

【0144】

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。

【0145】

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。

【0146】

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配列相同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。

【0147】

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。

【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】

〔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遺伝子間の相同性が高いことから、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。

【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。 10

【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。

【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。 20

【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Bowtieを用いてマッピングし、HLA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、HLA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。

【0157】

図1（a）は、本実験例で抽出した標的塩基配列が、HLA-Aアレル、HLA-Bアレル、HLA-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、sgRNAの標的塩基配列の数を示す。その結果、HLA-Aアレル、HLA-Bアレル又はHLA-Cアレルのいずれか1つのみを標的とするsgRNAの標的塩基配列、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アレルを標的とするsgRNAの標的塩基配列を多数決定することができた。 30

【0158】

図1（b）は、本実験例で同定したsgRNAの標的塩基配列が、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。図1（b）中、線で連結されたボックスは各HLA遺伝子のエクソンを示し、HLA-Aアレルは左側にエクソン1が、HLA-BアレルとHLA-Cアレルは右側にエクソン1が存在する。また、「[+] strand sgRNAs」はプラス鎖DNAを標的とする標的塩基配列を示し、「[-] strand sgRNAs」はマイナス鎖DNAを標的とする標的塩基配列を示し、「Unique k-mers」はヒトゲノム上で一箇所しか存在しない10～16merの塩基配列（「k-mer配列」という。）の集合を示す。 40

【0159】

この結果、Unique k-mersのピークが高い部位に、多数のsgRNA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 50

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。

【0160】

配列番号3、4、7、45～52、72～2459に、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HLAアレルの数及び標的とするHLAアレルを示す。

【0161】

【表1】

10

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

【0162】

また、配列番号53～55、2460～8013に、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HLAアレルの数及び標的とするHLAアレルを示す。

20

【0163】

【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

【0164】

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。

10

20

30

40

50

【0165】

【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]

(iPS細胞の刺激によるHLAタンパク質の発現誘導1)

未分化iPS細胞を刺激してHLAタンパク質の発現を誘導することを試みた。具体的には、iPS細胞の培地に100ng/mLのリボポリサッカライド(LPS)、100ng/mLのTNF- α 、又は50ng/mLのIFN- γ を添加して48時間処理後、抗HLA-ABC抗体(品番:311418、BIOLEGEND社)を用いてフローサイトメトリー解析を行い、HLA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、IFN- γ を添加するとHLA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]

(iPS細胞の刺激によるHLAタンパク質の発現誘導2)

iPS細胞の培地に10ng/mL、50ng/mL、又は100ng/mLのIFN- γ を添加して48時間処理後、抗HLA-ABC抗体(品番:311418、BIOLEGEND社)を用いてフローサイトメトリー解析を行い、HLA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、IFN- γ を添加するとHLA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、IFN- γ を添加するとHLA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]

(iPS細胞の刺激によるHLAタンパク質の発現誘導3)

iPS細胞の培地に50ng/mLのIFN- γ を添加し、4時間、8時間、16時間、24時間、及び48時間処理後、抗HLA-A2抗体(品番:740082、BD社)を用いてフローサイトメトリー解析を行い、HLA-A2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、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。その結果、IFN- γ 処理時間を長くするほどHLA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、iPS細胞をIFN- γ で48時間処理した後、培地からIFN- γ を除去して7日後においてもHLA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。

50

【0172】

[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。

10

【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。

20

【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。

30

【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'-NNNNNNNNNNNNNNNNNN-3'」(配列番号62)であった場合、使用したsgRNAの塩基配列は「5'-NNNNNNNNNNNNNNNNNNNGUUUAGAGCUAGAAUAGCAAGUUAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGUGCUUUUUU-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。

40

【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

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。

【0181】

【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

【0182】

10

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。

【0183】

まず、HLA-A 2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。

【0184】

【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

20

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

【0185】

30

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×NEBuffer 2（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により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。

【0186】

続いて、再アニール後の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。

40

【0187】

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。

【0188】

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

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 1 により切断されたバンドを示す。

【0189】

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。

【0190】

[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。

【0191】

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。

【0192】

《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 、サーモフィッシュサイエンティフィック社) を用いて行った。

【0193】

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。

【0194】

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。

【0195】

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。

【0196】

《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 D N A 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。

【0197】

【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。

【0212】

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。

【0213】

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

【0214】

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。

【0215】

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

【0216】

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

30

【0217】

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、サーモフィッシュャーサイエンティフィック社）を用いて行った。

【0218】

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

【0219】

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

【0220】

また、HLA-A1タンパク質及びHLA-B7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sgRNAであるA0101-ex3-g2の標的部位（エクソン3）を含む領域、及びB0702-ex2-g1の標的部位（エクソン2）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。

【0221】

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、「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。例えば「-5bp」は5塩基の欠損を有していたことを示し、「+18bp」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。

【0222】

その結果、15株中11株のクローンにおいて、A*01:01アレル及びB*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。

【0223】

[実験例9]

(HLAアレル特異的ノックアウト3)

下記表10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11に示す仮想的なHLA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HLAハプロタイプは、末梢血単核球細胞（PBMC、型式「2010113203」、Wako社）のHLAハプロタイプである。

【0224】

表10及び表11に示すように、585A1 iPS細胞にはB*07:02アレル、C*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B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。

【0225】

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HLAアレルである、B*07:02アレルとC*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。

【0226】

【表10】

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

【0227】

【表11】

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

【0228】

sgRNAとして、B*07:02アレル特異的なB0702-ex2-g1（標的塩

10

20

30

40

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50ng/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であるB0702-ex2-g1の標的部位(エクソン2)を含む領域、及びC0702-ex3-g3の標的部位(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

【0237】

【表12】

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

【0238】

【表13】

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

【0239】

sgRNA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。

【0240】

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

【0241】

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、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。

【0242】

続いて、C*12:02アレルがノックアウトされた#1細胞に、sgRNA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

【0243】

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。

【0244】

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、sgRNA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

【0245】

[実験例11]

(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と同様にして、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の標的部位（エクソン3）を含む領域、及びC0602-ex3-g1の標的部位（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

【0254】

続いて、iPS細胞を50ng/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。

【0255】

図15(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15(a)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、「B-ex2-g1」は、このsgRNAを導入してHLA-Bアレル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。

10

【0256】

また、HLA-B7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、12株のサブクローン（クローン#3-1～#3-12）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であるB-ex2-g1の標的部位（エクソン2）を含む領域の、標的としたB*37:01アレル及び標的としなかったB*07:02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。

【0257】

図15(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15(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15(c)では、B*37:01アレルのみにIndel変異が生じたクローンの中から、2株（クローン#3-11及び#3-12）を代表例として塩基配列を示す。

20

【0258】

[実験例12]

(HLAアレル特異的ノックアウト6)

下記表16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、HLA-Bアレル、HLA-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16(a)は本実験例で使用したsgRNAの標的部位を示す図である。

30

【0259】

【表16】

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

【0260】

sgRNAとして、HLA-Bアレル及びHLA-Cアレルの双方を標的とすることができるBC-ex2-g1（標的塩基配列を配列番号54に示す。）を用いて、実験例9と同様にして、604B1 iPS細胞のB*07:02アレル、B*37:01アレル、C*06:02アレル及びC*07:02アレルをノックアウトした。

40

【0261】

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-Bタンパク質及びHLA-Cタンパク質の発現を検討した。図16(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16(b)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、「BC-ex2-g1」は、このsgRNAを導入してHLA-Bアレ

50

ル、HLA-C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。

【0262】

続いて、HLA-Bタンパク質及びHLA-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、HLA-A遺伝子の両アレルを標的とすることができるA-ex3-g1（標的塩基配列を配列番号55に示す。）を導入し、A*01:01アレル及びA*24:02アレルをノックアウトした。

【0263】

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タンパク質、HLA-Bタンパク質及びHLA-Cタンパク質の発現を検討した。図16(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16(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 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、「A-ex3-g1」は、このsgRNAを導入してHLA-Aアレル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。

【0264】

続いて、HLA-Aタンパク質、HLA-Bタンパク質及びHLA-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。

【0265】

図17(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17(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*01:01アレル、A*24:02アレル、B*07:02アレル、B*37:01アレル、C*06:02アレル及びC*07:02アレルの全てに挿入欠失変異（Indel変異）が生じたクローンが得られたことが確認された。図17(b)は、クローン#1の各HLAアレルの塩基配列を示す。図17(b)中、「WT」は野生型の塩基配列を示す。

【0266】

[実験例13]

(HLAアレル特異的ノックアウト7)

下記表17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、HLA-Aアレル及びHLA-Bアレルがノックアウトされており、HLA-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。

【0267】

【表17】

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

【0268】

sgRNAとして、HLA-Aアレルを標的とすることができるA-ex3-g1（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-ex2-g1（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、585A1 iPS細胞のA*24:02アレル、B*07:02アレル及びB*52:01アレルをノックアウトした。

【0269】

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-A24抗原、HLA-B7抗原の発現を検討した。図18（

a) はフローサイトメトリーの結果を示すグラフである。

【0270】

続いて、HLA-A24抗原及びHLA-B7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。

【0271】

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*24:02アレル、B*07:02アレル及びB*52:01アレルの全てに挿入欠失変異(Indel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。

【0272】

続いて、クローン#3に、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。)を導入し、C*12:02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*07:02アレル及びC*12:02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。

【0273】

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*07:02アレルが残存しており、C*12:02アレルに挿入欠失変異(Indel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。

【0274】

[実験例14]

(HLA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。

【0275】

【表18】

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

【0276】

sgRNAとして、HLA-Aアレルを標的とすることができるA-ex3-g1(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-ex2-g1(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*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。

【0277】

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-A24抗原及びHLA-B7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 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 t

10

20

30

40

50

ransfection」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、「A-ex2-g1」及び「B-ex2-g1」は、これらのsgRNAを導入してHLA-Aアレル、HLA-B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。

【0278】

続いて、HLA-A24抗原及びHLA-B7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、HLA-A1抗原の発現を検討した。図19(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19(b)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、「HLA-A24, B7(-) sorted」はソートしたHLA-A24抗原及びHLA-B7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

【0279】

続いて、HLA-A1抗原が陰性である細胞集団をソーティングして回収し、23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7株の塩基配列を解析した。

【0280】

図19(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19(c)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、A*01:01アレル、A*24:02アレル、B*07:02アレル及びB*37:01アレルの全てに挿入欠失変異(Indel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19(d)に示す。

20

【0281】

[実験例15]

(HLAアレル特異的ノックアウト9)

下記表19のHLAハプロタイプを持つ1383D2 iPS細胞のHLAアレルを破壊することにより、HLA-Aアレル、HLA-Bアレル、HLA-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20(a)は本実験例で使用したsgRNAの標的部位を示す図である。

30

【0282】

【表19】

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

【0283】

sgRNAとして、HLA-Bアレル及びHLA-Cアレルの双方を標的とすることができるBC-ex2-g1(標的塩基配列を配列番号54に示す。)を用いて、実験例9と同様にして、1383D2 iPS細胞のB*15:02アレル、B*51:01アレル、C*08:01アレル及びC*14:02アレルをノックアウトした。

40

【0284】

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-Bタンパク質及びHLA-Cタンパク質の発現を検討した。図20(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20(b)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、「BC-ex2-g1」は、このsgRNAを導入してHLA-Bアレル、HLA-C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。

50

【0285】

続いて、HLA-Bタンパク質及びHLA-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、HLA-A遺伝子の両アレルを標的とすることができるA-ex3-g1（標的塩基配列を配列番号55に示す。）を導入し、A*02:07アレル及びA*32:01アレルをノックアウトした。

【0286】

続いて、iPS細胞を50 ng/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タンパク質、HLA-Bタンパク質及びHLA-Cタンパク質の発現を検討した。

【0287】

図20(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 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、「A-ex3-g1」は、このsgRNAを導入してHLA-Aアレル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。その結果、HLA-Aタンパク質、HLA-Bタンパク質及びHLA-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。

【0288】

[実験例16]

(HLAアレルの改変)

下記表20のHLAハプロタイプを持つ1383D2 iPS細胞のA*02:07アレルを、ゲノム編集によりA*01:01アレルに改変する検討を行った。

【0289】

【表20】

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

【0290】

まず、いずれもpiggyBacトランスポゾンベクターである、二重制御型Cas9発現ベクター及びsgRNA発現ベクターを、1383D2 iPS細胞に導入し、終濃度1~15 µg/mLのピューロマイシン(Cat. No. 29455-54、ナカライテスク)又は終濃度100~200 µg/mLハイグロマイシンB(Cat. No. 10687-010、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。

【0291】

二重制御型Cas9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Cas9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(Dox)を細胞の培地に添加することにより、Cas9タンパク質とグルコシルコリド受容体(GR)との融合タンパク質(以下、「Cas9-GR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(Dex)を添加することにより、Cas9-GRを核内に移行させることができる二重制御型Cas9発現ベクターを使用した。また、sgRNAとしては、A0207-ex3-g1(標的塩基配列を配列番号3に示す。)を使用した。

【0292】

図21(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*01:01アレルのエクソン1~3を含む領域をコードする一本鎖DNA(標的塩基配列を配列番号56に示す。)を作製した。

【0293】

具体的には、まず、604B1 iPS細胞のゲノムDNAを鋳型として、A*01:01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塩基の部分を、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	gtctagatatctcgaTCATCAGTATTCGAGGGATCGTCT	58

10

【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。

20

【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。

30

【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。

40

【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

50

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]

(B2MノックアウトiPS細胞の作製1)

1383D2 iPS細胞にCas9を発現するプラスミドベクターとB2M特異的なsgRNAをトランスフェクションした。sgRNAとしては、B2M-g1(標的塩基配列を配列番号59に示す。)及びB2M-g2(標的塩基配列を配列番号60に示す。)を使用した。

【0304】

続いて、50ng/mLのIFN-γで48時間刺激した細胞を抗HLA-ABC抗体で染色し、フローサイトメトリー解析を行った。

【0305】

図23(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23(a)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、「B2M-g1」、「B2M-g2」は、このsgRNAを導入してB2Mアレル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。

【0306】

その結果、HLA-Aタンパク質、HLA-Bタンパク質及びHLA-Cタンパク質の全てが陰性である細胞集団の割合は、sgRNAとしてB2M-g1(標的塩基配列を配列番号59に示す。)を使用した場合、2.8%であった。また、sgRNAとしてB2M-g2(標的塩基配列を配列番号60に示す。)を使用した場合、6.9%であった。

【0307】

続いて、B2M-g2 sgRNAの導入により得られた、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及び#2の2株のサブクローンを得た。

【0308】

得られた2株のサブクローンを再びIFN-γで48時間刺激してフローサイトメトリー解析を行った。図23(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23(b)中、「B2M-KO#1」はクローン#1の結果であることを示し、「B2M-KO#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、HLA-A、HLA-B及びHLA-Cの全てが陰性であることが確認された。

【0309】

続いて、クローン#1のB2M遺伝子をPCR増幅して塩基配列を確認し、挿入欠失変異(Indel変異)が導入されたことを確認した。図23(c)にクローン#1のB2Mアレルの塩基配列を示す。図23(c)中「WT」は野生型の塩基配列を示す。

【0310】

[実験例18]

(B2MノックアウトiPS細胞の作製2)

604B1 iPS細胞に対し、実験例17と同様の操作を行い、B2Mアレルをノックアウトした。sgRNAとしては、B2M-g2(標的塩基配列を配列番号60に示す。)を使用した。

【0311】

続いて、50ng/mLのIFN-γで48時間刺激した細胞を抗HLA-ABC抗体で染色し、フローサイトメトリー解析を行った。

【0312】

図24(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24(a)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、「B2M-g2」は、このsgRNAを導入してB2Mアレルをノッ

10

20

30

40

50

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。

【0313】

続いて、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、#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。

10

【0315】

[実験例19]

(T細胞活性化試験1)

(1) 下記表22のH L A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H L A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。

20

【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

30

【0318】

続いて、下記表24のH L A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

40

【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H L A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】

50

[実験例 20]

(T細胞活性化試験 2)

(1) 下記表 25 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 アレル及び 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) 下記表 26 の H L A ハプロタイプを持つ 1 3 8 3 D 2 i P S 細胞、(6) 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。

【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

20

【0324】

続いて、下記表 27 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。) からソーティングにより回収した C D 8 陽性 T 細胞を C F S E (ケイマンケミカル社) で染色し、I L - 2 及び I F N - γ の存在下で上記の (1) ~ (6) の各細胞から分化させた E B 由来血球様細胞と 8 日間共培養した。

【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

30

【0326】

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 2 6 (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 2 6 (a) ~ (f) は、それぞれ、上記 (1) ~ (6) の各細胞から分化させた E B 由来血球様細胞と共培養した C D 8 陽性 T 細胞の結果である。その結果、各 i P S 細胞の H L A 抗原を特異的に認識する T 細胞集団が増殖し、C F S E が陰性となったことが確認された。

【0327】

[実験例 21]

(T細胞活性化試験 3)

(1) 下記表 28 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 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 アレル及び 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、(4) 下記表 29 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誘導した。

【0328】

40

【表 2 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 3 2 9】

【表 2 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

10

【0 3 3 0】

続いて、下記表 3 0 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」、C T L 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 C D 8 陽性 T 細胞を C F S E（ケイマンケミカル社）で染色し、I L - 2 及び I F N - γ の存在下で上記の（1）～（5）の各細胞から分化させた E B 由来血球様細胞と 8 日間共培養した。

【0 3 3 1】

【表 3 0】

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

20

【0 3 3 2】

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 2 7 （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 2 7 （a）～（e）は、それぞれ、上記（1）～（5）の各細胞から分化させた E B 由来血球様細胞と共培養した C D 8 陽性 T 細胞の結果である。その結果、各 i P S 細胞の H L A 抗原を特異的に認識する T 細胞集団が増殖し、C F S E が陰性となったことが確認された。

【0 3 3 3】

[実験例 2 2]

（H L A 抗原反応性 C D 8 陽性 T 細胞の調製）

6 0 4 B 1 i P S 細胞の H L A 抗原に反応性を有する C D 8 陽性 T 細胞を調製した。末梢血単核球細胞（P B M C）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、6 0 4 B 1 i P S 細胞の H L A 抗原に反応性を有する C D 8 陽性 T 細胞を刺激して増殖させ、回収した。

30

【0 3 3 4】

図 2 8 は本実験例の手順を示す模式図である。図 2 8 に示すように、まず、6 0 4 B 1 i P S 細胞を E B 由来血球様細胞に分化させた。E B 由来血球様細胞は C D 4 5 陽性白血球細胞を含む。続いて、P B M C に含まれる C D 8 陽性 T 細胞を C F S E（ケイマンケミカル社）で染色し、I L - 2 及び I F N - γ の存在下で 6 0 4 B 1 i P S 細胞から分化させた E B 由来血球様細胞と 8 日間共培養した。

40

【0 3 3 5】

続いて、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 2 9 （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。

【0 3 3 6】

図 2 9 （a）は P B M C 細胞集団を他家（アロ）である P B M C 細胞集団と共培養した結果を示し、図 2 9 （b）は P B M C 細胞集団を 6 0 4 B 1 i P S 細胞から分化させた E B 由来血球様細胞と共培養した結果を示し、図 2 9 （c）は P B M C 細胞集団のみを培養した結果を示し、図 2 9 （d）は P B M C 細胞集団からソーティングにより回収した C

50

D 8 陽性 T 細胞を 6 0 4 B 1 i P S 細胞から分化させた E B 由来血球様細胞と共培養した結果を示し、図 2 9 (e) は P B M C 細胞集団からソーティングにより回収した C D 8 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 H L A 抗原を特異的に認識する T 細胞集団が増殖し、C F S E が陰性となったことが確認された。

【 0 3 3 7 】

続いて、図 2 9 (d) に示す、C F S E が陰性となった C D 8 陽性 T 細胞をソーティングして回収し、6 0 4 B 1 i P S 細胞の H L A 抗原に反応性を有する T 細胞を得た。

【 0 3 3 8 】

[実験例 2 3]

(T 細胞傷害性試験 1)

図 3 0 は、本実験例の手順を示す模式図である。まず、(1) 下記表 3 1 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) 実験例 1 7 で作製した、B 2 M をノックアウトした 1 3 8 3 D 2 i P S 細胞 (クローン # 1) を、それぞれ心筋細胞に分化誘導した。

【 0 3 3 9 】

【 表 3 1 】

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 4 0 】

続いて、各心筋細胞を I F N - γ で刺激し、H L A 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。

【 0 3 4 1 】

続いて、各心筋細胞の培地に、実験例 2 2 で調製した 6 0 4 B 1 i P S 細胞の H L A 抗原に反応性を有する C D 8 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 2 2 で調製した H L A 抗原反応性 C D 8 T 細胞を、ターゲット細胞として上述した i P S 細胞由来心筋細胞を使用した。添加する C D 8 陽性 T 細胞数の割合は、心筋細胞 1 に対して、0 . 6 2 5、1 . 2 5、2 . 5、5、1 0 とした。

【 0 3 4 2 】

心筋細胞が C D 8 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 % S p e c i f i c L y s i s と定義し、界面活性剤 (T r i t o n - 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 1 0 0 % S p e c i f i c L y s i s と定義した。

【 0 3 4 3 】

図 3 1 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 3 1 中、「 * 」は、 $P < 0.05$ 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心筋細胞の結果であることを示し、「 A 1 - B 7 - # 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、「 A 1 - B 7 - # 1 0 」は、上記 (3) のクローン # 1 0 から分化誘導した心筋細胞の結果であることを示し、「 1 3 8 3 D 2 - B 2 M - # 1 」は、上記 (4) の B 2 M をノックアウトした 1 3 8 3 D 2 i P S 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。

10

【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。

【0348】

[実験例24]

(T細胞傷害性試験2)

20

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。

【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。

30

【0351】

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。

40

【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。

【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

50

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。

【0355】

また、上記の(2)～(4)の各iPS細胞をEB由来血球様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。

【0356】

[実験例25]

(T細胞傷害性試験3)

実験例24とは異なるiPS細胞を用いた点以外は実験例24と同様の検討を行った。まず、(1)下記表32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アレルおよびC*07:02アレルをノ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)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。

【0357】

【表32】

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

【0358】

続いて、各EB由来血球様細胞の培地に、下記表33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。)由来のエフェクター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。エフェクター細胞として、実験例20の図26(a)に示す、CFSEが陰性となったPBMC中のCD8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。

【0359】

【表33】

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

【0360】

図33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33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、「B7-C7-#2」は、上記(2)のクローン#2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、「B7-C7-#11」は、上記(3)のクローン#11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、「B

10

20

30

40

50

「604B1-B2M-#1」は、上記(4)のクローン#26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-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。

【0361】

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。

【0362】

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、585A1-iPS細胞のB*07:02アレル及びC*07:02アレルをノックアウトした、クローン#2、#11及び#26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。

【0363】

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。

【0364】

また、上記の(2)～(5)の各iPS細胞をEB由来血球様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。

【0365】

[実験例26]

(T細胞傷害性試験4)

下記表34のHLAハプロタイプを持つ604B1-iPS細胞、及び、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、下記表35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。)をCFSE(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。

【0366】

【表34】

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

【0367】

【表35】

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

【0368】

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34(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34(a)及び(b)中、「604B1-B2M-#1」は、B2Mをノックアウトした604B1-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、「604B1」は、604B1-iPS細胞と共培養したPBMCの結果であることを示す。

【0369】

その結果、図34(a)に示すように、B2Mをノックアウトした604B1-iPS

10

20

30

40

50

細胞（クローン#1）と共培養したPBM Cには、CD8陽性、CSFE陰性のT細胞が11.3%含まれていた。また、図34（b）に示すように、604B1 iPS細胞と共培養したPBM Cには、CD8陽性、CSFE陰性のT細胞が21.3%含まれていた。続いて、図34（b）に示す、604B1 iPS細胞と共培養したPBM C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。

【0370】

続いて、（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アレルおよびC*06:02アレルをノックアウトしたクローン#3-11、（3）同クローン#3-12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。

10

【0371】

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）～（3）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。

【0372】

図34（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34（c）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-B37-C6-#3-11」は、上記（2）のクローン#3-11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-B37-C6-#3-12」は、上記（3）のクローン#3-12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

【0373】

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。

【0374】

これに対し、604B1 iPS細胞のA*01:01アレル、B*37:01アレルおよびC*06:02アレルをノックアウトした、クローン#3-11及び#3-12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

【0375】

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。

【0376】

また、上記の（2）～（3）の各iPS細胞をEB由来血球様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。

40

【0377】

[実験例27]

(NK細胞反応性試験1)

（1）下記表36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37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させた。なお、EB由来血球様細胞はCD45陽性白血球細胞を含む。

50

【0378】

【表36】

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

【0379】

【表37】

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

10

【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。

【0381】

20

【表38】

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。

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。

40

【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。

【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、

50

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)50ng/mLのIFN- γ で48時間処理した直後、及び(3)50ng/mLのIFN- γ で48時間処理してから5日後、の各細胞をそれぞれ用意し、mRNAを抽出した。続いて、Rever Tra Ase qPCR RT Master Mix (Toyobo社)を用いてcDNAを合成後、多能性幹細胞で特異的に発現しているヒトNANOG cDNAを増幅するプライマー、及び、mRNA総量のコントロールとして、ヒトACTB cDNAを増幅するプライマーを用いて、定量PCRを行った。

10

【0387】

ヒトNANOG cDNAの増幅に用いたプライマー、及び、ヒトACTB cDNAの増幅に用いたプライマーを下記表39に示す。

【0388】

【表39】

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

20

【0389】

図36はNANOG遺伝子の発現量を測定した定量PCRの結果を示すグラフである。NANOG遺伝子の発現量を、「未処理」の1383D2細胞における、ACTB遺伝子に対するNANOG遺伝子の発現量を1とした相対値として示した。

【0390】

図36中、「未処理」はIFN- γ で処理せず、通常の未分化維持条件で培養したiPS細胞の結果であることを示し、「IFN直後」はIFN- γ で48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IFN- γ で48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。

30

【0391】

その結果、多能性マーカーとして広く用いられているNANOGの発現量は、iPS細胞をIFN- γ で48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、iPS細胞をIFN- γ で処理しても多能性が維持されることを示す。

【0392】

[実験例29]

(多能性確認試験2)

(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。

40

【0393】

未分化維持条件での培養は、培地にAK03N培地(StemFit、Ajinomoto社)を用い、細胞マトリックスに、型式「iMatrix-511」(Nippi社)を用いて行った。

50

【0394】

図37(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1mmである。

【0395】

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、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、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。

【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。

【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、サーモフィッシュサイエンティフィック社)、GlutaMax-I(サーモフィッシュ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(サーモフィッシュ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。

【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。

【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。

【0401】

【表 4 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 4 0 2】

【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

10

【0 4 0 3】

【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

【0 4 0 4】

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39(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39(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。

20

【0 4 0 5】

その結果、図39(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39(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24.4%含まれていた。続いて、図39(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。

30

【0 4 0 6】

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。

【0 4 0 7】

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。

40

【0 4 0 8】

図39(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39(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

50

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。

【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。

【0410】

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。

【0411】

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。

【0412】

[実験例32]

(T細胞傷害性試験6)

(1) 実験例17で作製した、下記表43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44のHLAハプロタイプを持つ585A1 iPS細胞を、下記表45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。

【0413】

【表43】

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

【0414】

【表44】

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

【0415】

【表45】

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

【0416】

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。

【0417】

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。

【0418】

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。

10

【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。

20

【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。

【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。

30

【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。

【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。

40

【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。

【0425】

50

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^{tm1}Mom1l2rg^{tm1}Wj1/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、I V I S イメージングシステム（商品名「I V I S Spectrum」、SPI社）を用いて、ルシフェ

10

【0427】

図41（a）は実験スケジュールを説明した図である。また、図41（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41（c）は、エフェクターCD8陽性T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、T細胞注射前の蛍光強度を100%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。

【0428】

図41（b）及び（c）中、「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、「Mock」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（PBMC、型式「LP_329」、CTL社）由来のエフェクターCD8陽性T細胞を投与した結果であることを示す。

20

【0429】

その結果、図41（c）に示すように、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細胞の投与後生存率が低下することが確認された。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

30

【0430】

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。

【0431】

〔実験例34〕

（NK細胞反応性試験2）

（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46に585A1 iPS細胞のHLAハプロタイプを示し、下記表47に1383D2 iPS細胞のHLAハプロタイプを示す。

40

【表46】

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

50

【0432】

【表47】

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

【0433】

また、下記表48のHLAハプロタイプを持つPBMC（型式「LP_275」、CTL社）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、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解析を行い、活性化したNK細胞の割合を測定した。

10

【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。

20

【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。

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K5

40

50

62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。

【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

10

20

30

40

50

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、⁵ ¹ Cr 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。

【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。

【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)

(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 5 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 4 5 2】

【表 5 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

10

【0 4 5 3】

また、下記表 5 4 の H L A ハプロタイプを持つ P B M C（型式「L P _ 1 1 8」、C T L 社）及び下記表 5 5 の H L A ハプロタイプを持つ P B M C（型式「L P _ 2 6 6」、C T L 社）から C D 3 陰性 C D 5 6 陽性細胞（N K 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 N K 細胞を、抗 C D 1 0 7 a 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、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 N K 細胞の割合を測定した。

【0 4 5 4】

20

【表 5 4】

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

【0 4 5 5】

【表 5 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 4 5 6】

図 4 4（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 4 4（a）は上記表 5 4 の H L A ハプロタイプを持つ P B M C（型式「L P _ 1 1 8」、C T L 社）由来の N K 細胞の結果を示し、図 4 4（b）は上記表 5 5 の H L A ハプロタイプを持つ P B M C（型式「L P _ 2 6 6」、C T L 社）由来の N K 細胞の結果を示す。図 4 4（a）及び（b）中、「**」は $P < 0.01$ で有意差が存在することを示し、「W T」は上記（1）の 5 8 5 A 1 i P S 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 の結果であることを示し、「B 2 M⁻」は上記（3）の 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の結果であることを示し、「K 5 6 2」は上記（4）の K 5 6 2 細胞の結果であることを示す。

40

【0 4 5 7】

その結果、B 2 M アレルをノックアウトした細胞と比較して、5 8 5 A 1 i P S 細胞及びクローン # 3 - 1 では、N K 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。

【0 4 5 8】

[実験例 3 7]

(細胞移植実験 2)

（1）5 8 5 A 1 i P S 細胞の B 2 M 遺伝子をノックアウトした細胞、（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

50

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。

10

【0460】

【表56】

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、IIVISイメージングシステム（商品名「IIVIS Spectrum」、SPI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。

20

【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）

30

【0463】

図45（b）及び（c）中、「B2M⁻」は上記（1）の585A1 iPS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。

40

【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 iPS細胞、（2）実験例13で作製した、585A1 iPS細胞

50

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、それぞれEB由来血球様細胞に分化誘導した。

【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。

10

【0468】

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EB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、EB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、EB由来血球様細胞1に対して、0.33、1、3とした。

【0469】

図46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、「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EB由来血球様細胞の結果であることを示す。

20

【0470】

その結果、各EB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EB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EB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EB由来血球様細胞のみが傷害を受けることが確認された。

30

【0472】

また、各EB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EB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EB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EB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。

40

【0474】

[実験例39]

(CIITA遺伝子ノックアウトiPS細胞の作製)

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。上述したように、CIITA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。

50

【0475】

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CIIITA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CIIITA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。CIIITA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。

10

【0477】

具体的には、585A1-C7残存細胞に、精製Cas9タンパク質と共に、CIIITAアレルを切断するsgRNAである、CIIITA-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CIIITA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。

20

【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CIIITA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)

健常人ボランティア#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。

30

【0481】

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CIIITA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+CIIITA-#3-1-3」は上記(3)の585A1-C7残存細胞のCIIITA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。

40

【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、C

50

D 4 陽性 T 細胞は活性化されないことが明らかとなった。

【0484】

また、図 48 (b) に示すように、健常人ボランティア # 21 由来の C D 4 陽性 T 細胞と 585A1 i P S 細胞を共培養すると 45.6% 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。

【0485】

また、図 48 (c) に示すように、健常人ボランティア # 21 由来の C D 4 陽性 T 細胞と 585A1-C7 残存細胞を共培養すると 49.2% 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。

【0486】

また、図 48 (d) に示すように、健常人ボランティア # 21 由来の C D 4 陽性 T 細胞と 585A1-C7 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) を共培養しても、C D 4 陽性 T 細胞は活性化されないことが明らかとなった。

【0487】

[実験例 41]

(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「LP_329」、CTL 社) を C F S E (ケイマシケミカル社) で染色した。下記表 57 に P B M C (型式「LP_329」、CTL 社) の H L A ハプロタイプを示す。

【0488】

[表 57]

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

【0489】

続いて、上記の P B M C を、(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 (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 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。

【0490】

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 49 (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 49 (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、「585A1-WT」は上記 (1) の 585A1 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、「585A1-C7 # 3-1」は上記 (2) の 585A1-C7 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、「585A1-C7+C I I T A- # 3-1-3」は上記 (3) の 585A1-C7 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、「585A1-C7+C I I T A- # 3-1-6」は上記 (4) の 585A1-C7 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。

【0491】

その結果、図 49 (a) に示すように、C D 8 陽性 T 細胞は、585A1 i P S 細胞

10

20

30

40

50

から分化誘導したEB由来血球様細胞に反応し、51.0%のCD8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。これに対し、585A1-iPS細胞から分化誘導したEB由来血球様細胞以外の細胞と共培養しても、2%以下のCD8陽性T細胞しか活性化されないことが明らかとなった。

【0492】

また、図49(b)に示すように、CD4陽性T細胞は、585A1-iPS細胞から分化誘導したEB由来血球様細胞及び585A1-C7残存細胞から分化誘導したEB由来血球様細胞に反応し、それぞれ49.2%及び26.7%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。これに対し、その他の細胞と共培養しても、2%以下のCD4陽性T細胞しか活性化されないことが明らかとなった。

10

【0493】

また、図49(c)に示すように、NK細胞は、K562細胞に反応し、79.2%のNK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。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]

(HLA-C7残存CIIITA欠損iPS細胞の作製)

日本人において、第3位のHLAアレル頻度をホモに有するiPSストック細胞(Ff-Xt-28s05-iPS細胞)から、HLA-Aアレル、HLA-Bアレル及びCIIITA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Ff-Xt-28s05-iPS細胞のHLAハプロタイプを示す。

20

【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、HLA-Aアレル、HLA-Bアレル及びCIIITA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、HLA-Aアレル、HLA-Bアレル及びCIIITA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。

30

【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、Ff-Xt-28s05-iPS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、CIIITAアレルを標的とすることができるsgRNAであるCIIITA-ex3-g5(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。

40

【0498】

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-A24抗原及びHLA-B7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、「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 TF」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、「HLA-A-ex3-g1」は、A-ex3-g1(標的塩基配列を配列番号55に示す。)を導入

50

した結果であることを示し、「HLA-B-ex 2 g 1」は、B-ex 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、CIITA-ex 3 g 5（標的塩基配列を配列番号8017に示す。）はCIITA-ex 3 g 5を導入した結果であることを示す。

【0499】

続いて、HLA-A24抗原及びHLA-B7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HLA-A24アレル、HLA-B7アレル及びCIITA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、「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「ABTo」は、HLA-Aアレル、HLA-Bアレル及びCIITAアレルをノックアウトしたことを意味する。

10

【0500】

その結果、図51（b）に示すように、HLA-Aアレル、HLA-Bアレル、CIITA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-28 s 05 i PS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-ex 3-g 1（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-ex 2-g 1（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。

20

【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。

30

【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CIITAアレルを標的とすることができるsgRNAであるCIITA-ex 3 g 5（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。

40

【0505】

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

50

ブクローニングした後、C I I T A 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、C I I T A 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 (I n d e l 変異) が検出された、クローン#14-3、#14-4、#14-6、#14-12を得た。

【0507】

図53は、様々な人種におけるH L A - C アレルのアレル頻度を示す表である。図53中、「J P N」は日本人を示し、「E U R」は欧州系アメリカ人を示し、「A F A」はアフリカ系アメリカ人を示し、「A P I」はアジア人を示し、「H I S」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。

10

【0508】

図53に示すように、H L A - C * 0 1 : 0 2、H L A - C * 0 2 : 0 2、H L A - C * 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よい。

20

【0510】

[実験例43]

(B2MノックアウトiPS細胞の作製3)

実験例41でも使用したiPSストック細胞(F f - X t - 2 8 s 0 5 i P S 細胞)から、B2Mアレルをノックアウトした。

30

【0511】

F f - X t - 2 8 s 0 5 i P S 細胞に、B2Mアレルを標的とすることができるsgRNAであるB2M-g2(標的塩基配列を配列番号60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、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「4D-Nucleofector」、型式「V4XP-4032」、ロンザ社)を用いて行った。

【0512】

続いて、各サブクローンのゲノムのB2M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、B2Mアレルをノックアウトしたことを意味する。

40

【0513】

その結果、図54に示すように、B2M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]

(B2M及びC I I T A ノックアウトiPS細胞の作製)

実験例41でも使用したiPSストック細胞(F f - X t - 2 8 s 0 5 i P S 細胞)

50

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。

【0516】

続いて、各サブクロンのゲノムの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。

10

【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。

20

【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 - 2 8 s 0 5 - 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 - 2 8 s 0 5 - M T o # 2 i P S細胞を50 n g / m L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。

30

【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 - 2 8 s 0 5 - M T o # 2」はF f - X t - 2 8 s 0 5 - 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 - 2 8 s 0 5 - 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。

40

【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、50 n g / m L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

50

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、「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 TF」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、「B2M-g2」は、このsgRNAを導入してB2Mアレル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。

【0526】

その結果、HLA-Aタンパク質、HLA-Bタンパク質及びHLA-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、B2M-g2 sgRNAの導入により得られた、HLA-A、HLA-B及びHLA-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]

(HLAアレル特異的ノックアウト10)

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を作製した。具体的には、実験例13で作製した、585A1 iPS細胞のA*24:02アレル、B*07:02アレル及びB*52:01アレルをノックアウトした細胞(クローン#3)に、精製Cas9タンパク質、C*07:02アレル特異的なsgRNA及びC*12:02アレル特異的なsgRNAをトランスフェクションした。

【0528】

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。また、C*12:02アレル特異的なsgRNAとして、C1202-ex3-g1(標的塩基配列を配列番号50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。

【0529】

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DNAを抽出した。続いて、HLA-C*07:02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。

【0530】

図58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58中、「Clone ID」はサブクローン名を示し、「HLA-C07」はHLA-C*07:02アレルを示し、「HLA-C12」はHLA-C*12:02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、HLA-Cの両アレルがノックアウトされたことが確認された。

【0531】

[実験例48]

(HLAアレル特異的ノックアウト11)

実験例13で作製した、585A1 iPS細胞のA*24:02アレル、B*07:02アレル及びB*52:01アレルをノックアウトした細胞(クローン#3)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。

【0532】

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。

10

20

30

40

50

【0533】

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DNAを抽出した。続いて、HLA-C*07:02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。

【0534】

図59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59中、「Clone ID」はサブクローン名を示し、「HLA-C07」はHLA-C*07:02アレルを示し、「HLA-C12」はHLA-C*12:02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す。その結果、クローン#3-1、#3-2、#3-3、#3-5、#3-6は、HLA-C*07:02アレルがノックアウトされ、HLA-C*12:02アレルのみ残存したクローンであることが確認された。

10

【0535】

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。

20

【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】

[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。

30

【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。

【0539】

その後、サブクローニングを行い、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。

40

【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、H

50

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。

【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。

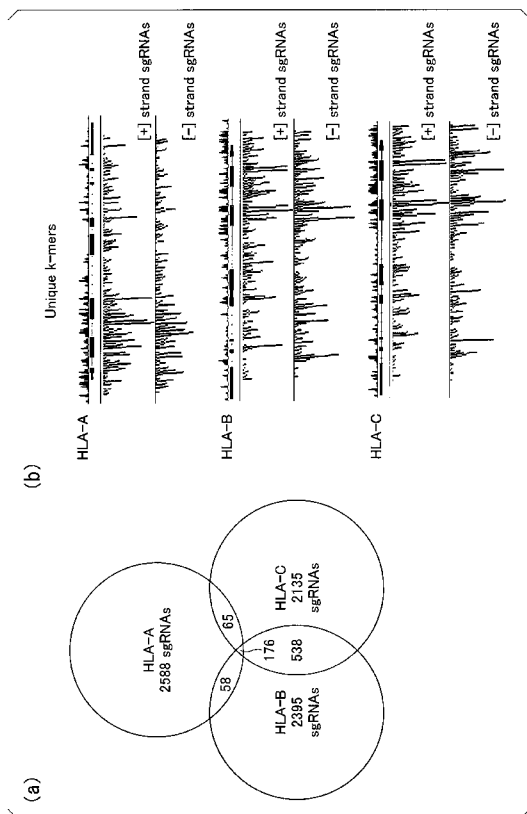
【産業上の利用可能性】

【0543】

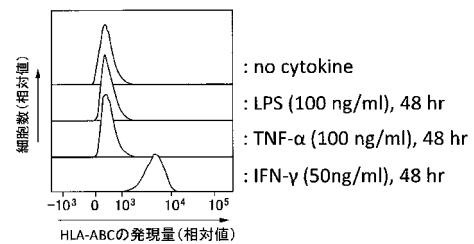
本発明によれば、レシピエントに他家移植した場合の拒絶反応が低減された低抗原性細胞を製造する技術を提供することができる。

10

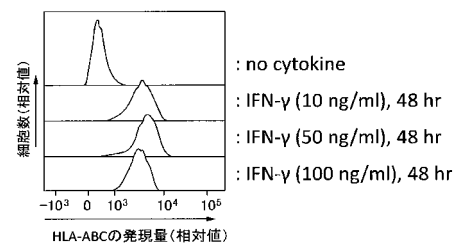
【図1】



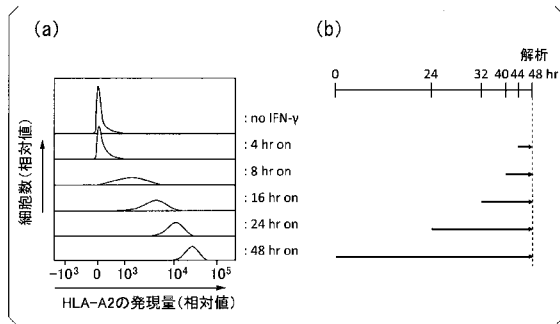
【図2】



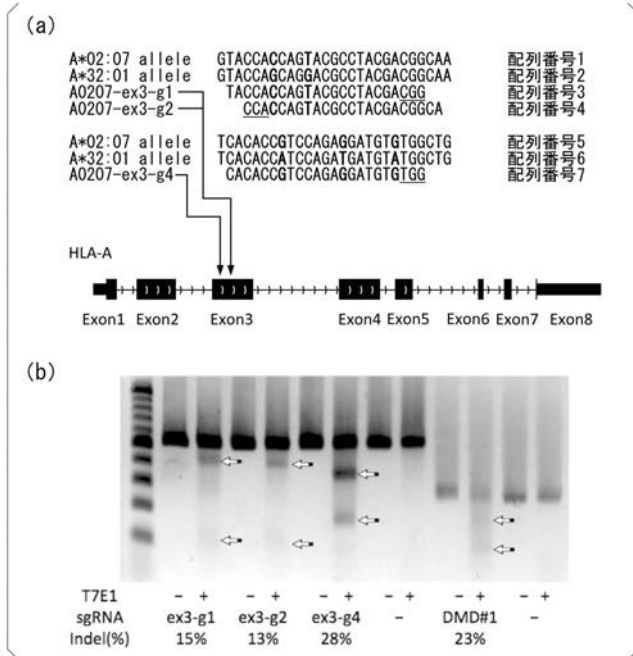
【図3】



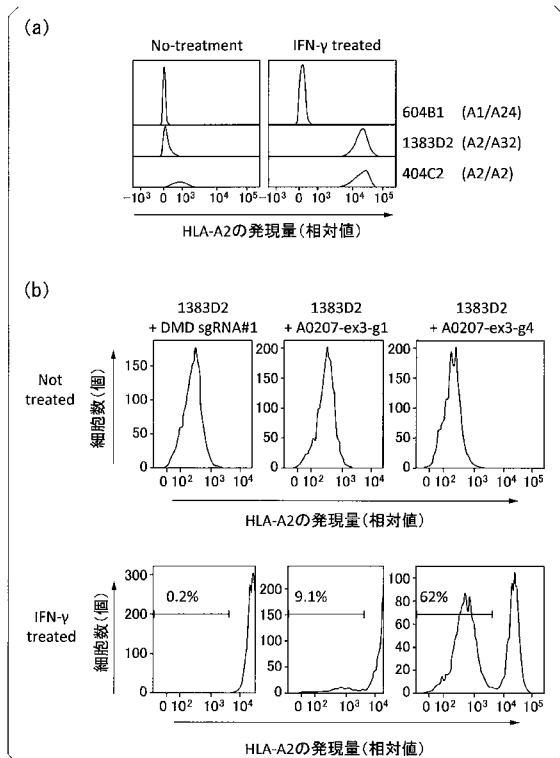
【図 4】



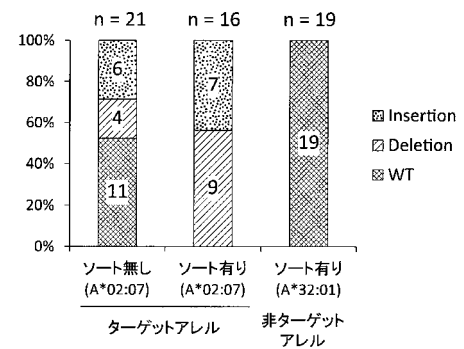
【図 5】



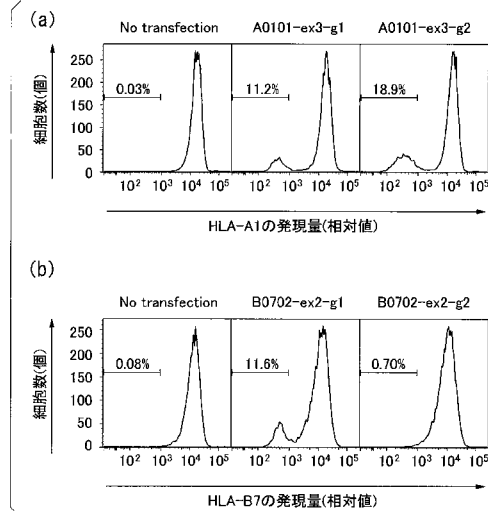
【図 6】



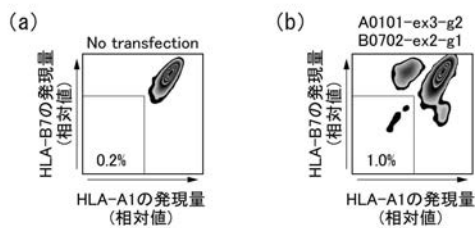
【図 7】



【図 8】



【図 9】



【図 12】

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

クローン番号	HLA-B*07:02	HLA-C*07:02
WT	AAGGCCAG	GGACACC
#2	A-----AG	GGACACC
		(AA)
#11	A-----CCCAG	GGACACC
		(A)
#26	AA-----CCCAG	GGACACC
		(A)

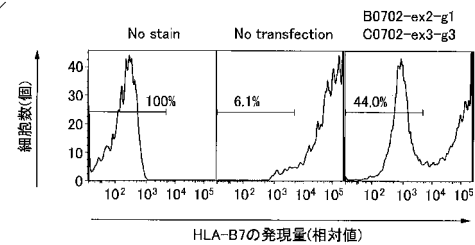
【図 10】

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

クローン番号	HLA-A*01:01	配列番号8
WT	GGGTACCGGCAGGCGCT	
#8	GGGTACCGG-----CCGCGCT	
#10	GG-----CCT	

クローン番号	HLA-B*07:02	配列番号10	配列番号11
WT	ACAAGGCCAGGACACA		
#8	ACAA-----CCCAGGACACA		
#10	ACA-----CA		

【図 11】



【図 13】

クローン番号	HLA-C12
#1	-1 bp
#2	-3 bp
#3	-28 bp
#4	-28 bp
#5	-3 bp
#6	-28 bp
#7	-1 bp
#8	-9 bp
#9	-2 bp
#10	-40 bp
#11	-28 bp
#12	+1 bp
#13	-1 bp
#14	-3 bp
#16	-3 bp
#17	-1 bp

クローン番号	HLA-B52
#1-1	Mut
#1-2	-12 bp
#1-3	WT
#1-4	WT
#1-5	WT
#1-6	Mut
#1-7	WT
#1-8	WT
#1-9	WT
#1-10	-11 bp
#1-11	WT
#1-12	WT

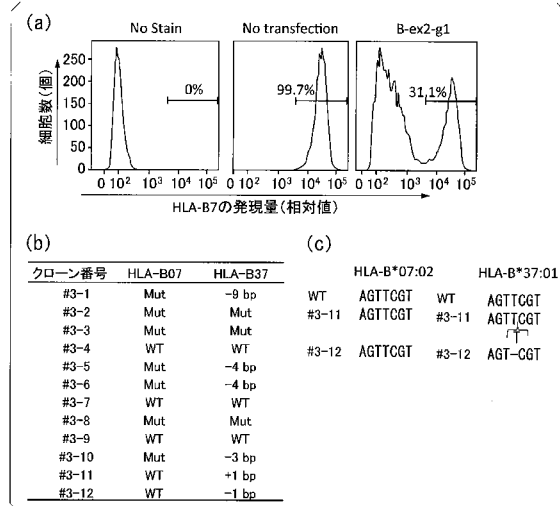
クローン番号	HLA-C*12:02	HLA-B*52:02
WT	GAGGATG	GCATAAC
#1-1	GAG-ATG	GTATGAC

【図 14】

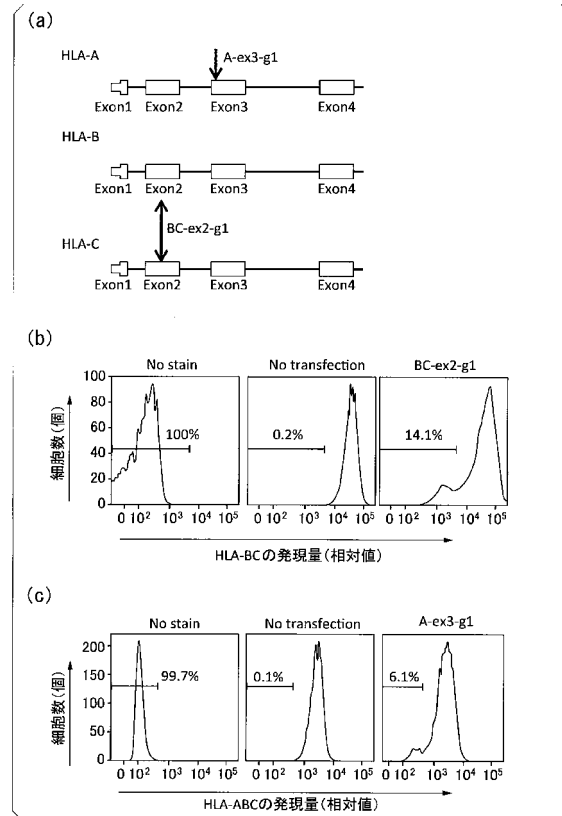
クローン番号	HLA-A01	HLA-C06
#3	-8 bp	+8 bp
#4	WT	WT
#6	-24 bp	-28 bp
#7	-8 bp	-4 bp
#9	WT	WT

クローン番号	A*01:01	配列番号12	C*06:02	配列番号13
#3	GGCAGGACGCCTA		GGATGT	
	GGC-----TA		GGATGT	
			TGTGAGAG	

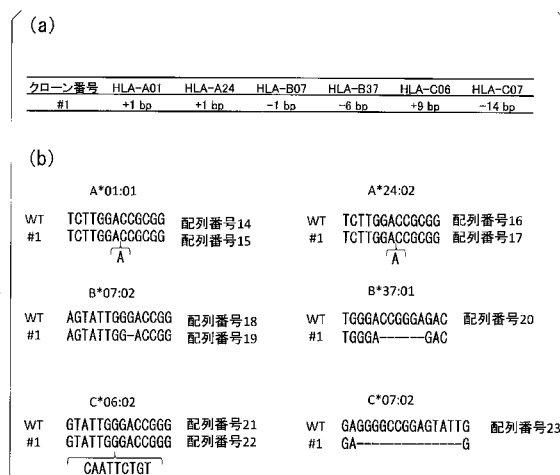
【図 15】



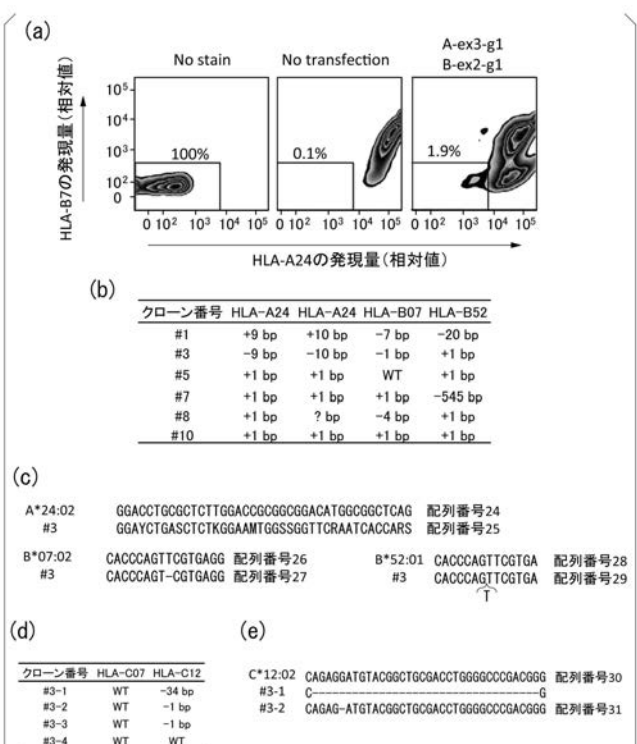
【図 16】



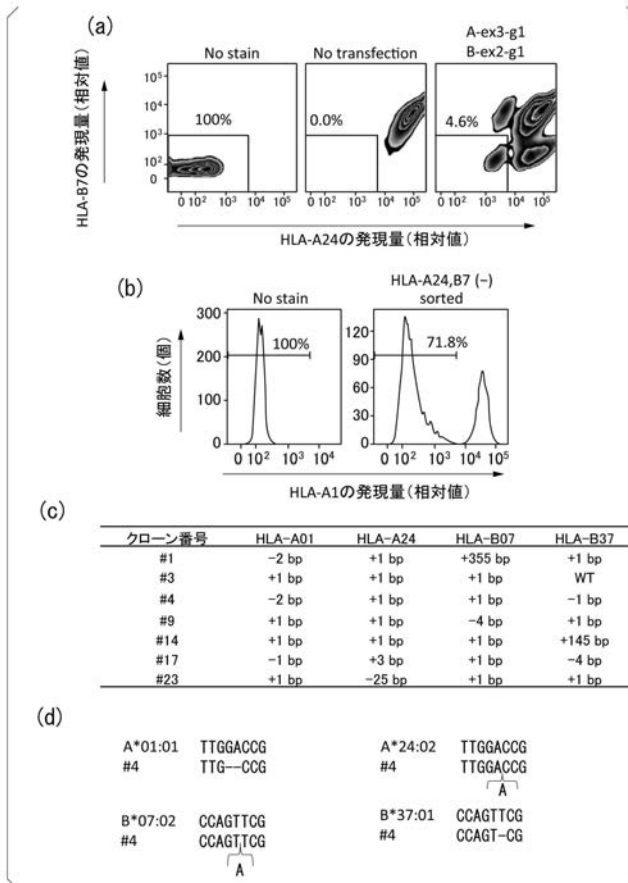
【図 17】



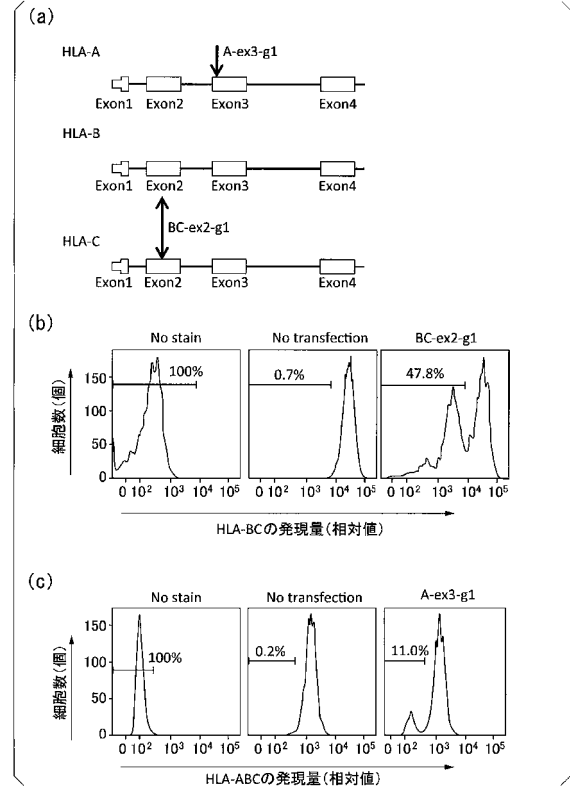
【図 18】



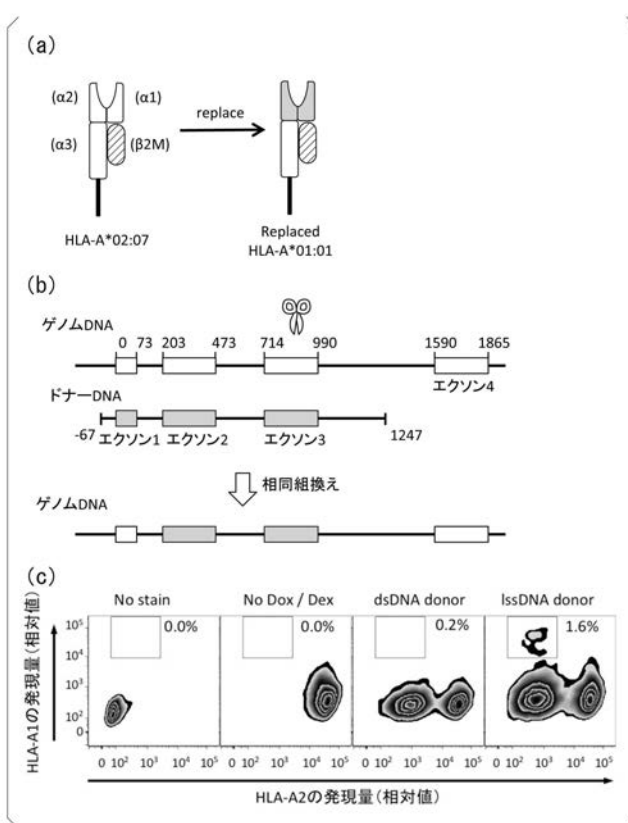
【図 19】



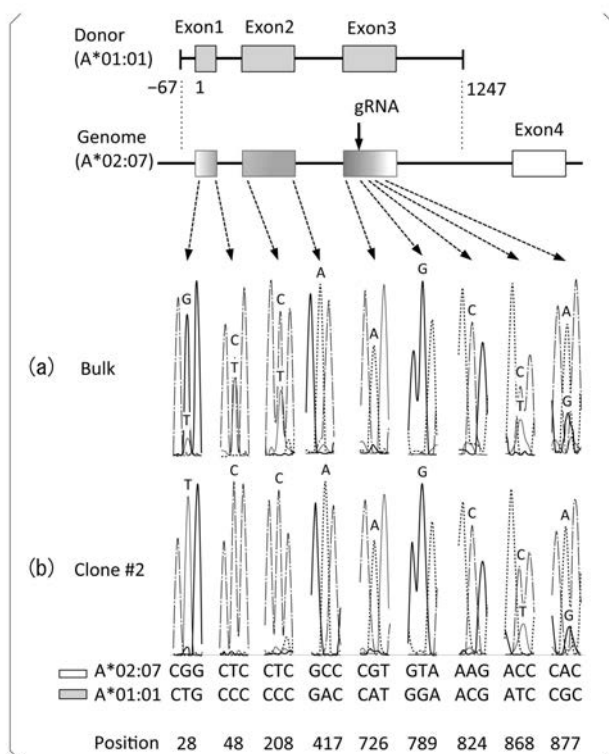
【図 20】



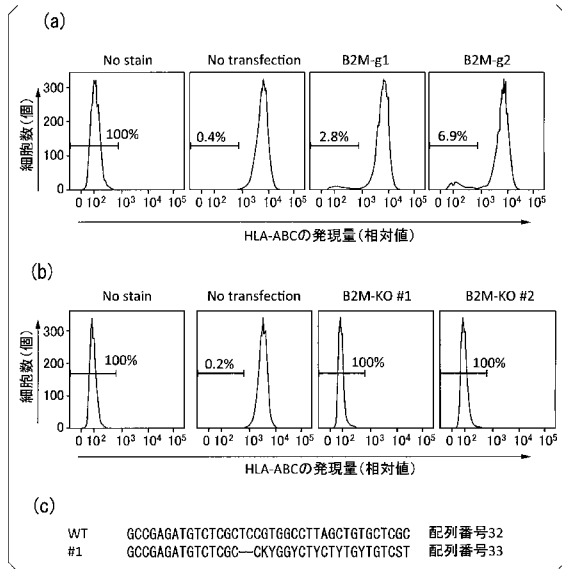
【図 21】



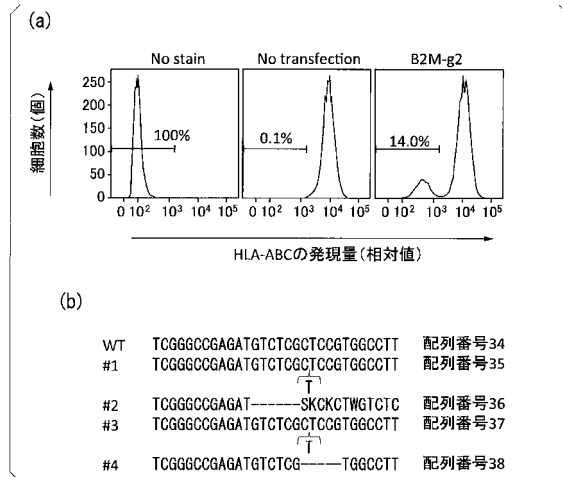
【図 22】



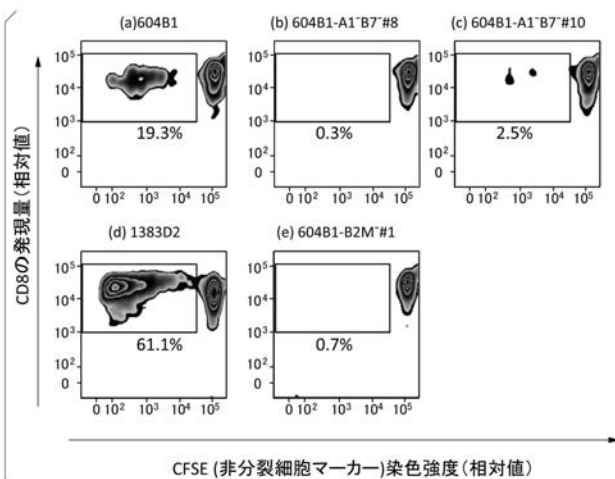
【図 2 3】



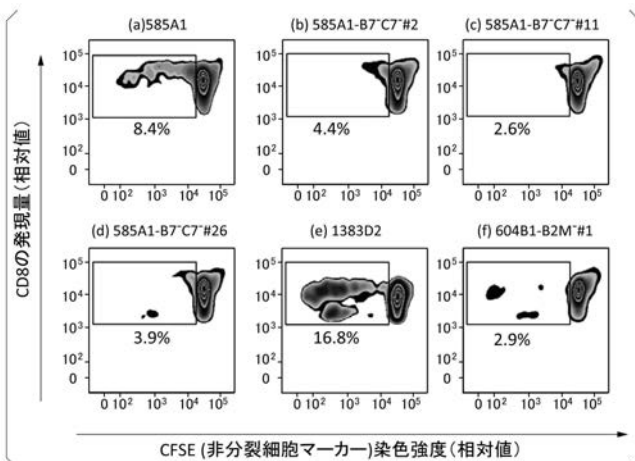
【図 2 4】



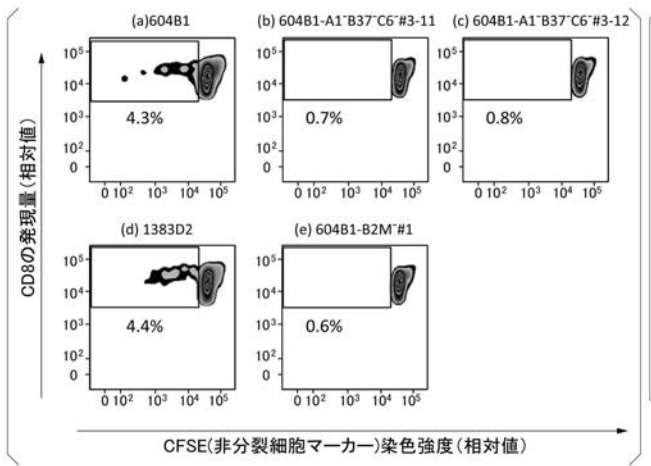
【図 2 5】



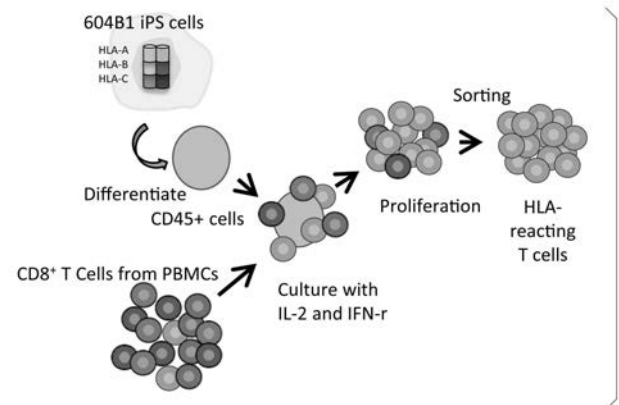
【図 2 6】



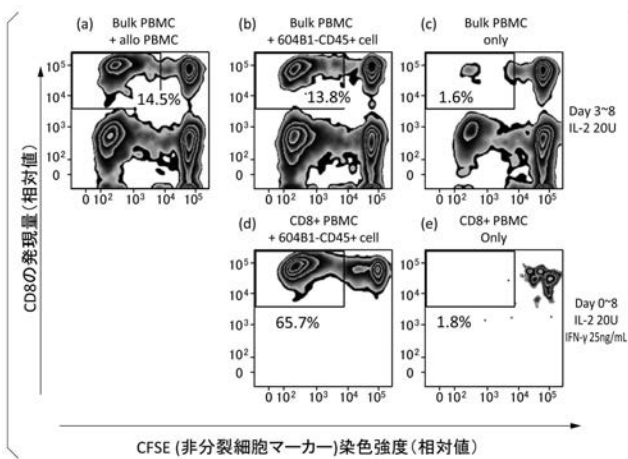
【図 27】



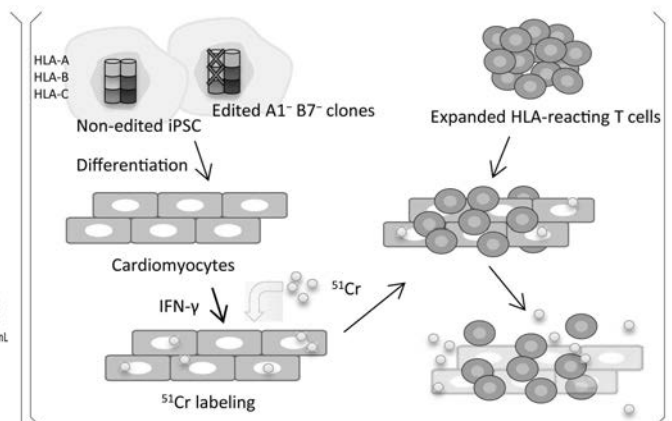
【図 28】



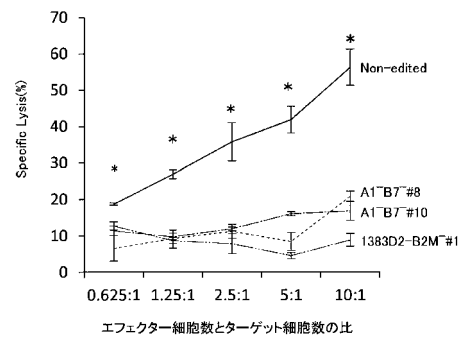
【図 29】



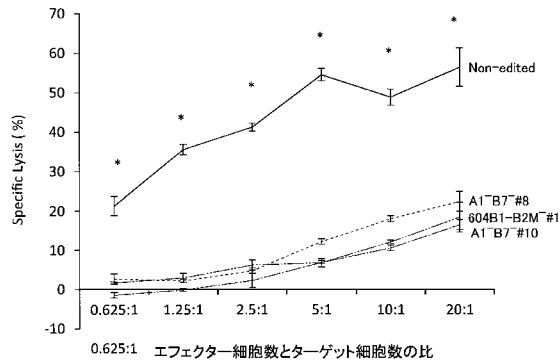
【図 30】



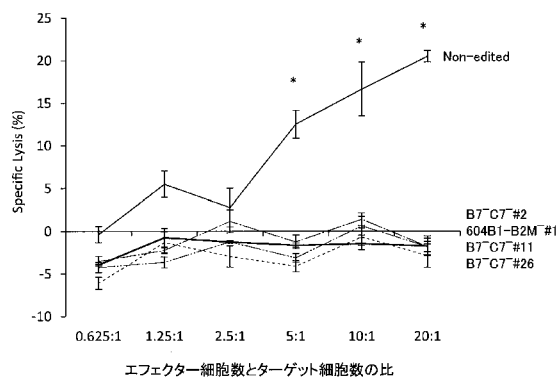
【図 31】



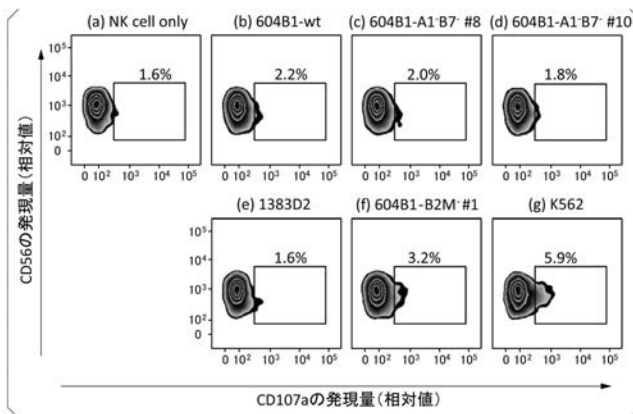
【図 3 2】



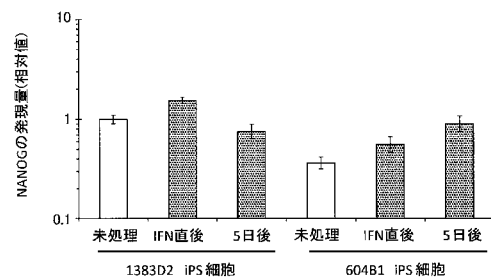
【図 3 3】



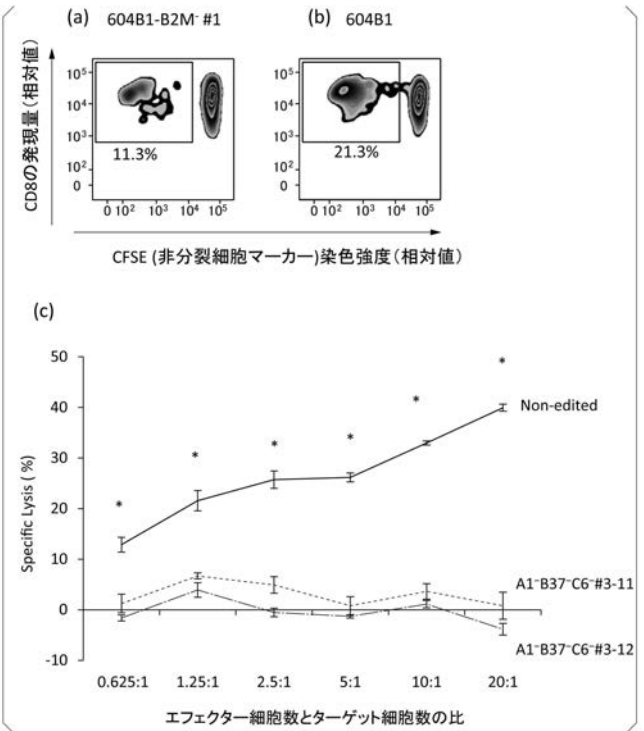
【図 3 5】



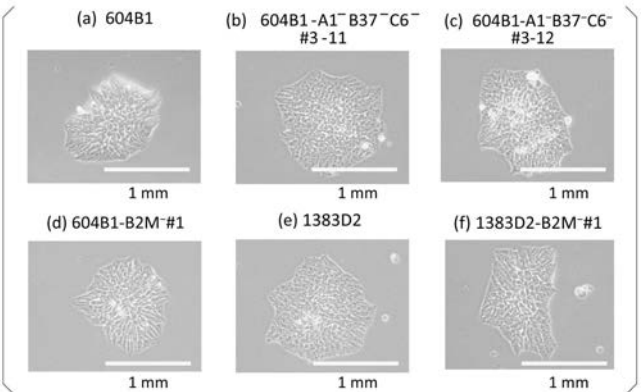
【図 3 6】



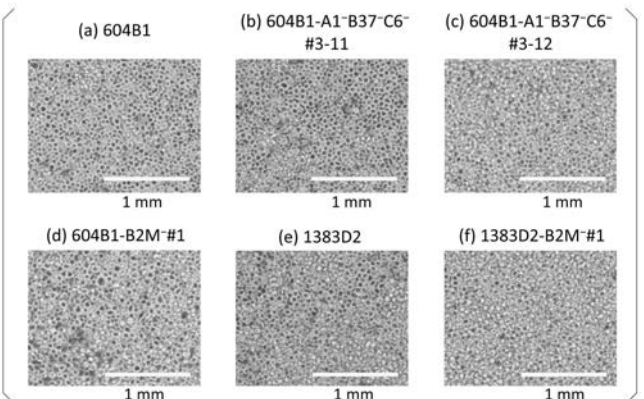
【図 3 4】



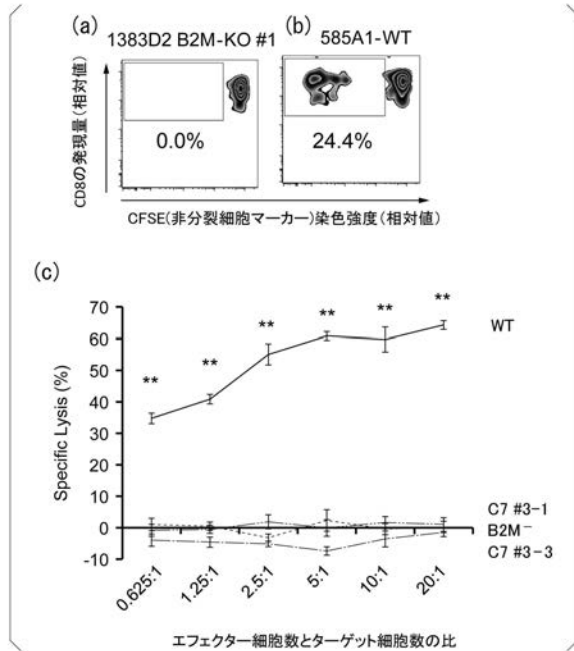
【図 3 7】



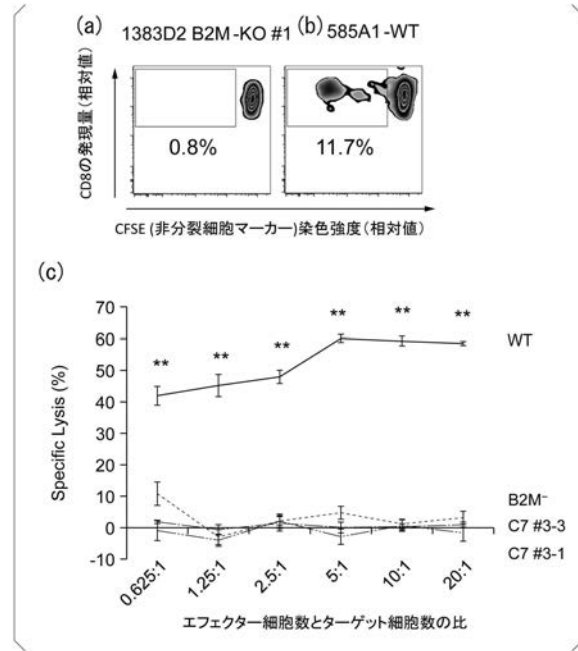
【図 3 8】



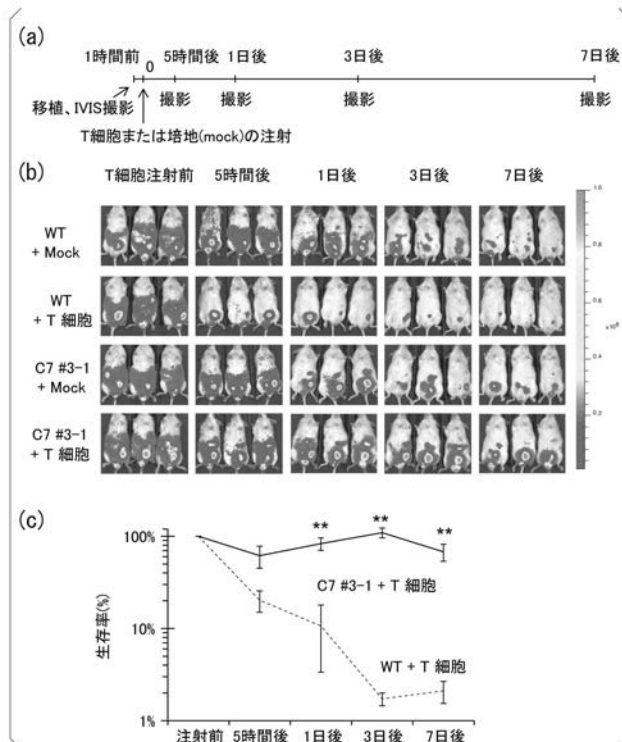
【図 39】



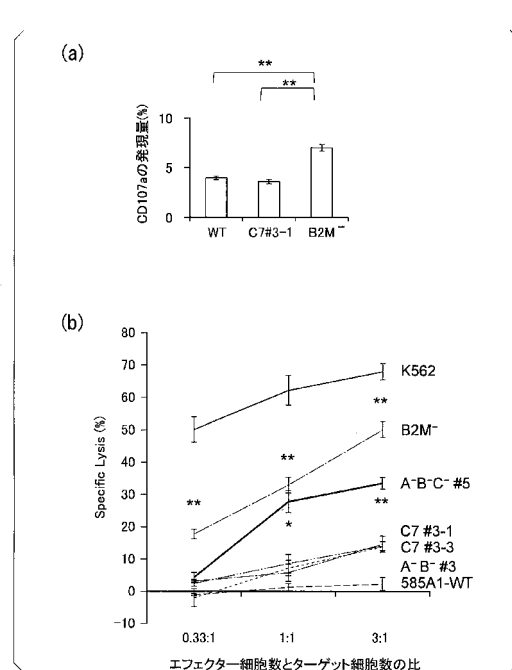
【図 40】



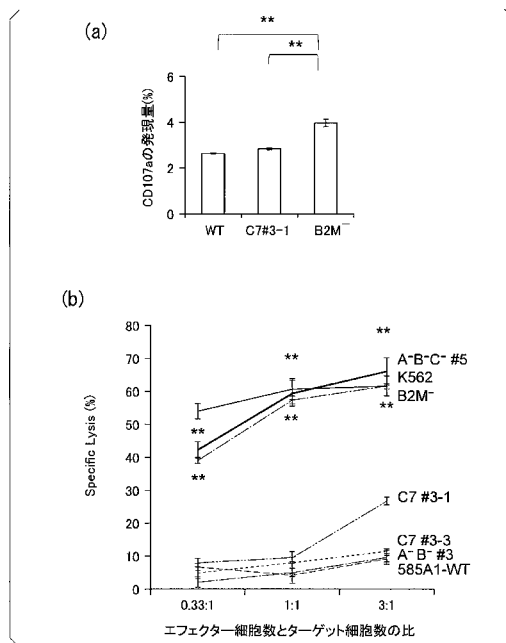
【図 41】



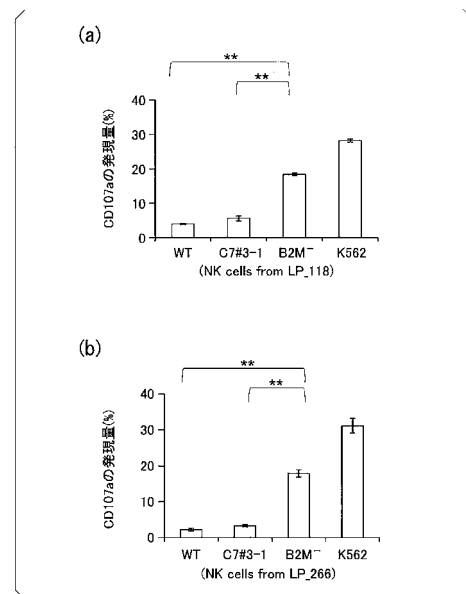
【図 42】



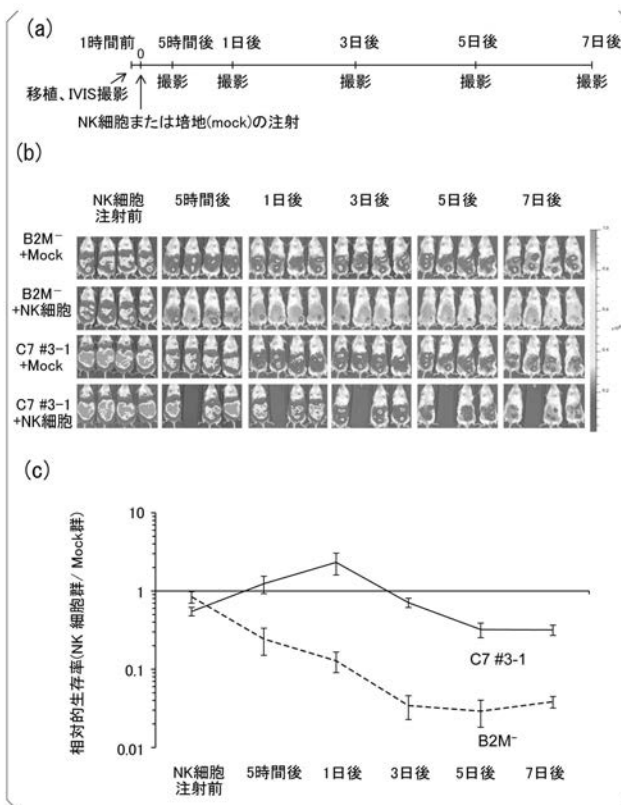
【図 4 3】



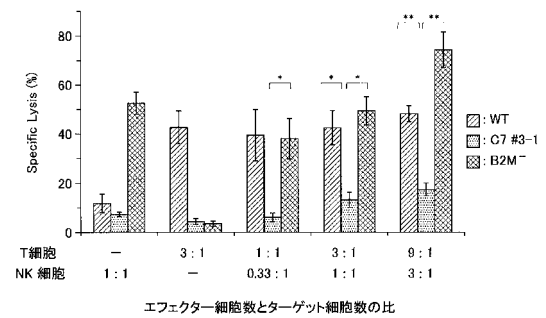
【図 4 4】



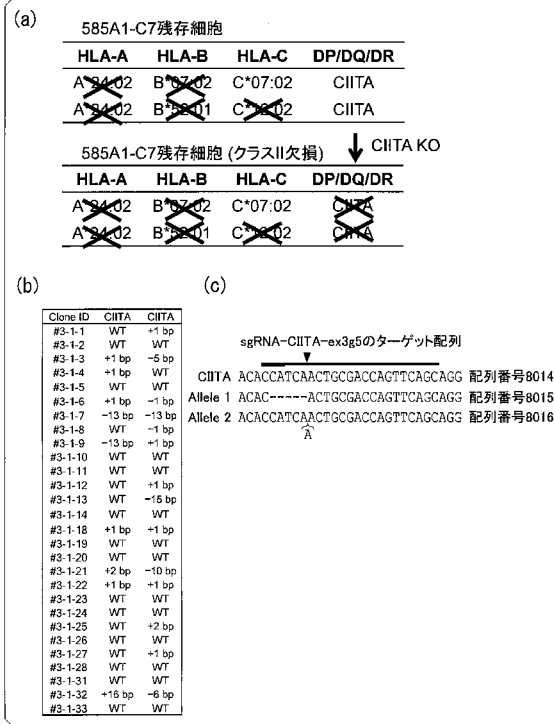
【図 4 5】



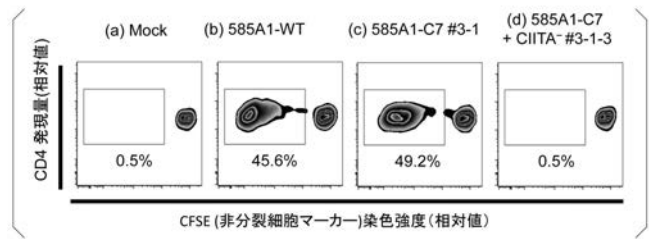
【図 4 6】



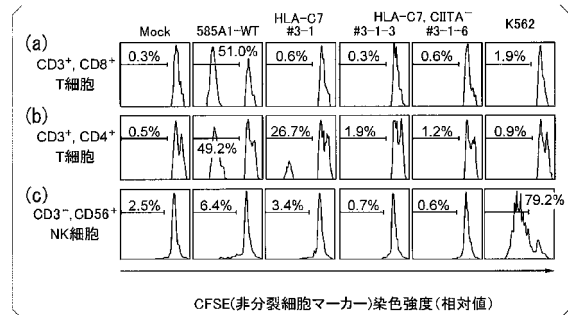
【図 47】



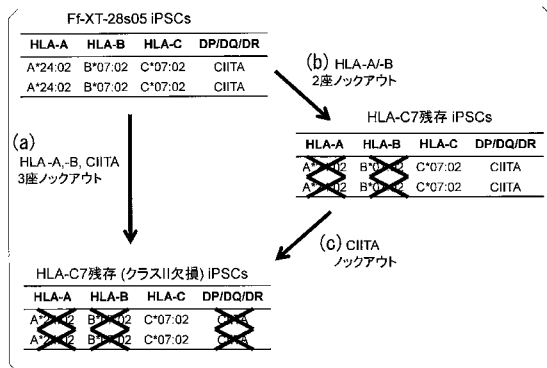
【図 48】



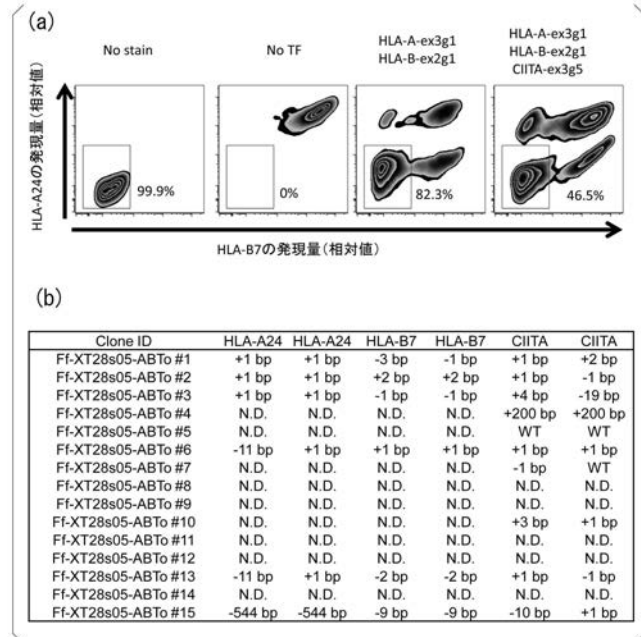
【図 49】



【図 50】



【図 51】



【図 5 2】

(a)

Clone ID	HLA-A24	HLA-A24	HLA-B7	HLA-B7
Ff-XT28s05-ABo #1	+1 bp	-1 bp	WT	+1 bp
Ff-XT28s05-ABo #2	+1 bp	+1 bp	Mut.	Mut.
Ff-XT28s05-ABo #3	WT	+1 bp	WT	WT
Ff-XT28s05-ABo #4	WT	WT	WT	WT
Ff-XT28s05-ABo #5	WT	WT	WT	WT
Ff-XT28s05-ABo #6	WT	WT	WT	WT
Ff-XT28s05-ABo #9	+1 bp	-1 bp	WT	Mut.
Ff-XT28s05-ABo #10	WT	WT	WT	WT
Ff-XT28s05-ABo #11	WT	+1 bp	WT	Mut.
Ff-XT28s05-ABo #12	WT	WT	WT	WT
Ff-XT28s05-ABo #13	+1 bp	+1 bp	WT	+1 bp
Ff-XT28s05-ABo #14	+1 bp	+1 bp	+1 bp	-12 bp
Ff-XT28s05-ABo #15	WT	WT	WT	WT
Ff-XT28s05-ABo #16	WT	+1 bp	WT	WT
Ff-XT28s05-ABo #17	+1 bp	+1 bp	WT	-23 bp

(b)

Clone ID	CIITA	CIITA
Ff-XT28s05-ABo_To # 14-1	N.D.	N.D.
Ff-XT28s05-ABo_To # 14-2	N.D.	N.D.
Ff-XT28s05-ABo_To # 14-3	+2 bp	+2 bp
Ff-XT28s05-ABo_To # 14-4	+1 bp	+1 bp
Ff-XT28s05-ABo_To # 14-5	+5 bp	+12 bp
Ff-XT28s05-ABo_To # 14-6	+1 bp	+1 bp
Ff-XT28s05-ABo_To # 14-7	+1 bp	+12 bp
Ff-XT28s05-ABo_To # 14-8	+1 bp	WT
Ff-XT28s05-ABo_To # 14-9	+1 bp	+1 bp
Ff-XT28s05-ABo_To # 14-10	+1 bp	WT
Ff-XT28s05-ABo_To # 14-11	N.D.	N.D.
Ff-XT28s05-ABo_To # 14-12	+1 bp	+1 bp

【図 5 3】

HLA-C	JPN	JPN	EUR	EUR	AFA	AFA	API	API	HIS	HIS
アレル	アレル	アレル	アレル	アレル	アレル	アレル	アレル	アレル	アレル	アレル
*01:02	1	17.558%	12	2.922%	19	0.850%	2	13.375%	7	4.927%
*02:02	19	0.025%	10	3.728%	5	8.461%	21	0.385%	10	4.227%
*03:03	2	13.116%	7	5.457%	16	1.182%	8	5.023%	12	3.402%
*04:01	4	12.451%	3	8.215%	8	5.330%	3	8.352%	4	6.978%
*05:01	9	4.441%	3	10.634%	1	18.457%	4	8.070%	1	16.508%
*06:02	13	0.376%	5	9.136%	10	3.526%	18	0.847%	5	4.652%
*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	2.928%
*12:02	5	11.422%	16	0.634%	23	0.145%	11	4.488%	17	1.301%
*16:01	N/A	0.000%	11	3.539%	3	9.788%	25	0.169%	6	5.055%
アレル頻度合計		79.986%		85.437%		76.087%		73.674%		94.887%
合計カバー率		95.994%		97.879%		94.282%		93.069%		94.887%

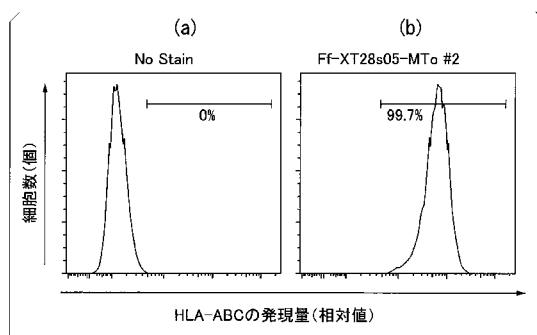
【図 5 4】

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

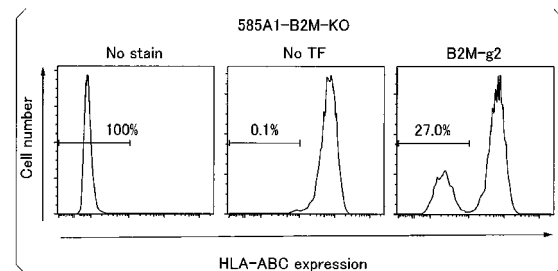
【図 5 5】

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】



【図 5 7】



【図 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

【図 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

【図 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

【配列表】

2019160077000001.app

【手続補正書】

【提出日】令和2年12月23日(2020.12.23)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

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。

【請求項 2】

前記 H L A アレルが、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、請求項 1 に記載の細胞。

【請求項 3】

前記 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 2 に記載の細胞。

【請求項 4】

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 アレルである、請求項 1 ～ 3 のいずれか一項に記載の細胞。

【請求項 5】

多能性幹細胞である、請求項 1 ～ 4 のいずれか一項に記載の細胞。

【請求項 6】

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、請求項 1 ～ 5 のいずれか一項に記載の細胞。

【請求項 7】

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、請求項 1 ～ 6 のいずれか一項に記載の細胞。

【請求項 8】

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、請求項 7 に記載の細胞。

【請求項 9】

ドナー細胞の H L A アレルをゲノム編集により破壊又は改変する工程を含む、請求項 1 ～ 8 のいずれか一項に記載の細胞の製造方法。

【請求項 10】

前記ゲノム編集が、前記ドナー細胞に配列特異的 D N A 切断酵素を導入して行われる、請求項 9 に記載の製造方法。

【請求項 11】

前記配列特異的 D N A 切断酵素が C R I S P R - C a s であり、前記ゲノム編集が、前記ドナー細胞に g R N A 及び C R I S P R - C a s を導入して行われる、請求項 10 に記載の製造方法。

【請求項 12】

前記ドナー細胞が多能性幹細胞である、請求項 9 ～ 11 のいずれか一項に記載の製造方法。

【請求項 13】

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 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 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を、標的塩基配列とする g R N A。

【請求項 14】

前記標的塩基配列が、
配列番号 3、4、7、45 ～ 52、72 ～ 2459 のいずれかに記載の塩基配列、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からなる、請求項 13 に記載の g R N A。

【請求項 15】

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、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からなる、請求項 13 又は 14 に記載の g R N A。

【請求項 16】

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、請求項 1

3～15のいずれか一項に記載の g R N A。

【請求項 17】

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を、標的塩基配列とする g R N A。

【請求項 18】

前記標的塩基配列が、
配列番号 53～55、2460～8013 のいずれかに記載の塩基配列、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からなる、請求項 17 に記載の g R N A。

【請求項 19】

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、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からなる、請求項 17 又は 18 に記載の g R N A。

【請求項 20】

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、請求項 17～19 のいずれか一項に記載の g R N A。

【請求項 21】

前記 g R N A が請求項 13～20 のいずれか一項に記載された g R N A である、請求項 11 に記載の製造方法。

【請求項 22】

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 D N A 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 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ことと、

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 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 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。

【請求項 23】

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 D N A 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 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ことと、

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。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP2019/005524															
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER Int.Cl. C12N15/09(2006.01)i, C12N5/10(2006.01)i, C12N15/11(2006.01)i, C12Q1/04(2006.01)i, G01N33/53(2006.01)i According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC																	
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) Int.Cl. C12N15/09, C12N5/10, C12N15/11, C12Q1/04, G01N33/53 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Published examined utility model applications of Japan 1922-1996 Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2019 Registered utility model specifications of Japan 1996-2019 Published registered utility model applications of Japan 1994-2019 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), CAPplus/REGISTRY (STN), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq																	
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT <table border="1"> <thead> <tr> <th>Category*</th> <th>Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th>Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td>WO 2016/201047 A1 (EDITAS MEDICINE, INC.) 15 December 2016, claims, page 176, examples & JP 2018-523977 A & US 2018/0296603 A1 & EP 3307887 A1 & KR 10-2018-0031671 A & CN 108026526 A</td> <td>1-2, 5, 10-13, 15, 21, 24-25, 29-30</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td></td> <td>1-30</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>WO 2016/183041 A2 (PRESIDENT AND FELLOWS OF HARVARD COLLEGE) 17 November 2016, claims, examples & JP 2018-515139 A & EP 3294342 A2 & CN 107921148 A</td> <td>6-13, 17-21, 25</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td></td> <td>1-30</td> </tr> </tbody> </table>			Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	X	WO 2016/201047 A1 (EDITAS MEDICINE, INC.) 15 December 2016, claims, page 176, examples & JP 2018-523977 A & US 2018/0296603 A1 & EP 3307887 A1 & KR 10-2018-0031671 A & CN 108026526 A	1-2, 5, 10-13, 15, 21, 24-25, 29-30	Y		1-30	X	WO 2016/183041 A2 (PRESIDENT AND FELLOWS OF HARVARD COLLEGE) 17 November 2016, claims, examples & JP 2018-515139 A & EP 3294342 A2 & CN 107921148 A	6-13, 17-21, 25	Y		1-30
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.															
X	WO 2016/201047 A1 (EDITAS MEDICINE, INC.) 15 December 2016, claims, page 176, examples & JP 2018-523977 A & US 2018/0296603 A1 & EP 3307887 A1 & KR 10-2018-0031671 A & CN 108026526 A	1-2, 5, 10-13, 15, 21, 24-25, 29-30															
Y		1-30															
X	WO 2016/183041 A2 (PRESIDENT AND FELLOWS OF HARVARD COLLEGE) 17 November 2016, claims, examples & JP 2018-515139 A & EP 3294342 A2 & CN 107921148 A	6-13, 17-21, 25															
Y		1-30															
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.																	
<table border="0"> <tr> <td> * Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed </td> <td> "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family </td> </tr> </table>			* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family													
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family																
Date of the actual completion of the international search 23 April 2019 (23.04.2019)		Date of mailing of the international search report 14 May 2019 (14.05.2019)															
Name and mailing address of the ISA/ Japan Patent Office 3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915, Japan		Authorized officer Telephone No.															

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2019/005524

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	JP 2016-513460 A (SANGAMO BIOSCIENCES, INC.) 16 May 2016, example 8 & WO 2014/165177 A1, example 8 & US 2015/0037304 A1 & EP 2970886 A1 & CN 105283539 A	6-13 1-30
X Y	JP 2017-523813 A (COLLEGE OF MEDICINE POCHON CHA UNIVERSITY INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION) 24 August 2017, claims, examples & WO 2016/021972 A1, claims, examples & US 2017/0327795 A1 & EP 3194578 A1 & KR 10-2016-0018425 A & CN 106536721 A	10-13, 15, 1-30

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 9 / 0 0 5 5 2 4									
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C12N15/09(2006.01)i, C12N5/10(2006.01)i, C12N15/11(2006.01)i, C12Q1/04(2006.01)i, G01N33/53(2006.01)i											
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C12N15/09, C12N5/10, C12N15/11, C12Q1/04, G01N33/53											
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922-1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971-2019年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2019年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2019年</td> </tr> </table>				日本国実用新案公報	1922-1996年	日本国公開実用新案公報	1971-2019年	日本国実用新案登録公報	1996-2019年	日本国登録実用新案公報	1994-2019年
日本国実用新案公報	1922-1996年										
日本国公開実用新案公報	1971-2019年										
日本国実用新案登録公報	1996-2019年										
日本国登録実用新案公報	1994-2019年										
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), CAPUS/REGISTRY (STN), CAPUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS (STN), GenBank/EMBL/DBJ/GeneSeq											
C. 関連すると認められる文献											
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号									
X	WO 2016/201047 A1 (EDITAS MEDICINE, INC.) 2016.12.15, 特許請求の範囲, 第176頁, 実施例 & JP 2018-523977 A & US 2018/0296603 A1 & EP 3307887 A1 & KR 10-2018-0031671 A & CN 108026526 A	1-2, 5, 10-13, 15, 21, 24-25, 28-30									
Y		1-30									
X	WO 2016/183041 A2 (PRESIDENT AND FELLOWS OF HARVARD COLLEGE) 2016.11.17, 特許請求の範囲, 実施例 & JP 2018-515139 A & EP 3294342 A2 & CN 107921148 A	6-13, 17-21, 25									
Y		1-30									
☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。 ☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。											
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願											
の日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献											
国際調査を完了した日 23.04.2019		国際調査報告の発送日 14.05.2019									
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 木原 啓一郎 電話番号 03-3581-1101 内線 3448	4B 4867								

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 9 / 0 0 5 5 2 4
C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X Y	JP 2016-513460 A (サンガモ バイオサイエンシーズ, インコーポレイテッド) 2016.05.16, 実施例 8 & WO 2014/165177 A1, Example 8 & US 2015/0037304 A1 & EP 2970886 A1 & CN 105283539 A	6-13 1-30
X Y	JP 2017-523813 A (カレッジ オブ メディシン ポチョン チャユニバーシティ インダストリー-アカデミック コーオペレーション ファウンデーション) 2017.08.24, 特許請求の範囲, 実施例 & WO 2016/021972 A1, Claims, Examples & US 2017/0327795 A1 & EP 3194578 A1 & KR 10-2016-0018425 A & CN 106536721 A	10-13, 15, 25 1-30

フロントページの続き

(81)指定国・地域 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1. T R I T O N

(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

(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 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36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36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36番地1 国立大学法人京都大学内

Fターム(参考) 4B063 QA08 QA18 QQ08 QQ79 QQ96 QR48 QR66 QR77 QS03 QS12

QS36 QS39 QX02

4B065 AA93X AA93Y AB01 AC20 BA02 CA44 CA46

(注) この公表は、国際事務局(WIPO)により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願(日本語実用新案登録出願)の国際公開の効果は、特許法第184条の10第1項(実用新案法第48条の13第2項)により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。