

再生医療学会シンポジウム27 iPS細胞研究が目指す未来
2022 年 3 月18日（金） 15:50～17:50
演題番号：SY-27-5

臨床用HLAゲノム編集iPS細胞株の製造と技術的課題

塚原 正義、高須 直子



公益財団法人
京都大学 iPS細胞研究財団

臨床用HLAゲノム編集iPS細胞株の製造と技術的課題

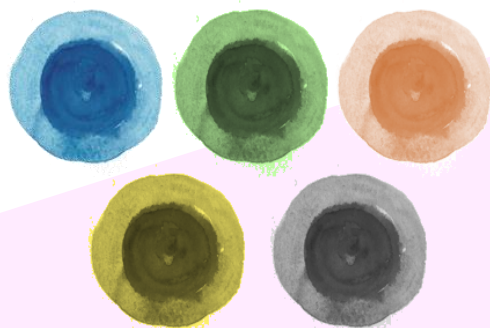
京都大学iPS細胞研究財団
塚原 正義

筆頭演者は、過去1年間（1月～12月）において、
本演題の発表に関して開示すべきCOIはありません。

臨床用iPS細胞：3つの戦略

2015年～

HLAホモ



iPS細胞ストック

7ドナー
27株
臨床用
研究用

日本人の40%
をカバー

2020年～

ゲノム編集

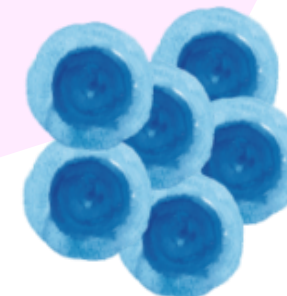


HLA破壊
iPS細胞ストック

日本人残り60%
世界の大半

2025年～

自家移植



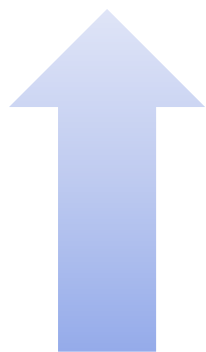
マイiPS細胞

患者さん自身の
iPS細胞



研究用/臨床用ゲノム編集株の作製

臨床用HLAゲノム編集株



- 製造手順の確立
- QC試験
- スクリーニング手順・頻度
- 技術課題の洗い出し

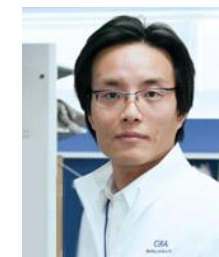


研究用のHLAゲノム編集



- HLA-A/B/C II TA

CiRA堀田先生の技術 (Xu et.al., *Cell Stem Cell*, 2019)



研究用/臨床用ゲノム編集株の作製

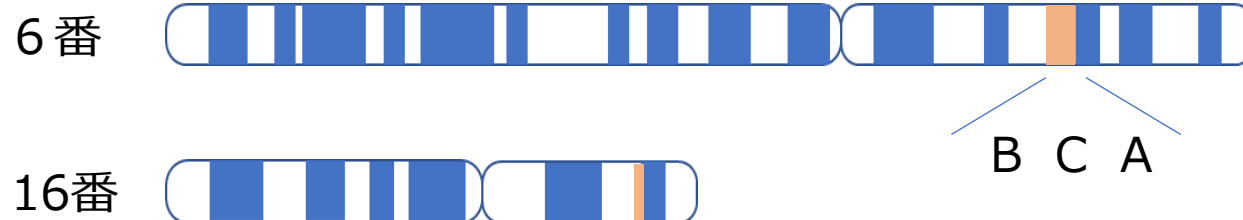
日本人第1位のHLA型ホモドナー由来iPS細胞

QHJI（末梢血）研究用株

- ・Ff-I01s04
- ・Ff-I14s04

YZWJ（臍帯血）研究用株

- ・Ff-WJs513
- ・Ff-WJs524

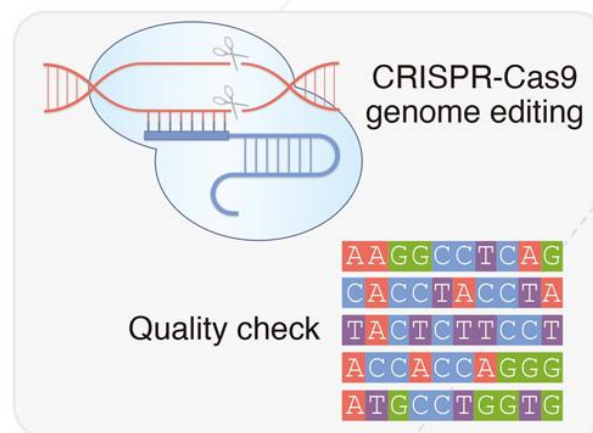
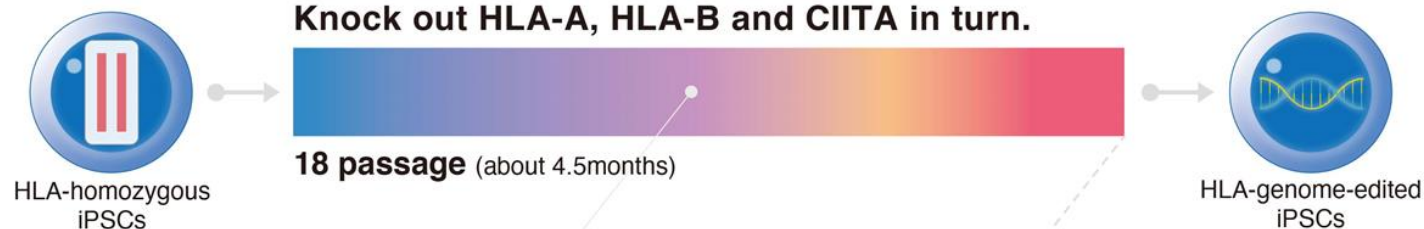


HLA-A24 . . . } 共通のgRNA
HLA-B52 . . .
HLA-C12

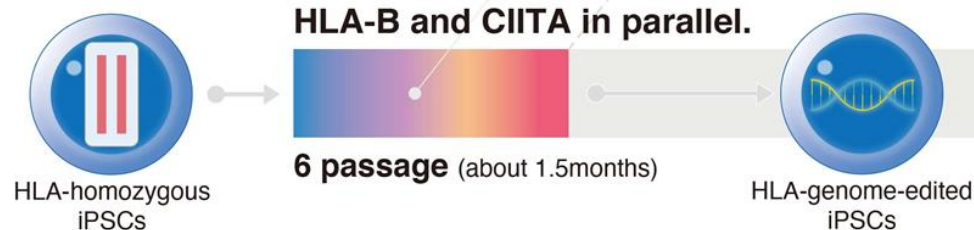
C II TA → HLA Class2

ゲノム編集株の作製手順

Sequential KO



Triple KO



3遺伝子を順番に編集

○ 確実

× 継代数増加



同時に編集

× 変異リスク

◎ 継代数最小

ゲノム編集株の作製手順

iPS細胞凍結バイアル解凍

拡大培養

エレクトロポレーション

クローン化

スクリーニング

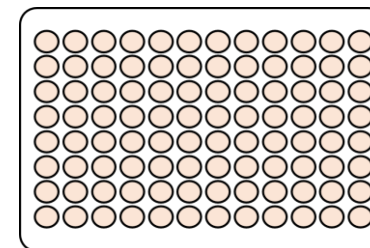
合格株

HLA-A24
HLA-B52
C II TA } 共通

2種のgRNA/Cas9タンパク質

限界希釈、目視確認

QC試験



1cell/well

スクリーニング : FCM

FCM解析
(HLA-A⁻/C⁺)

SangerSeq

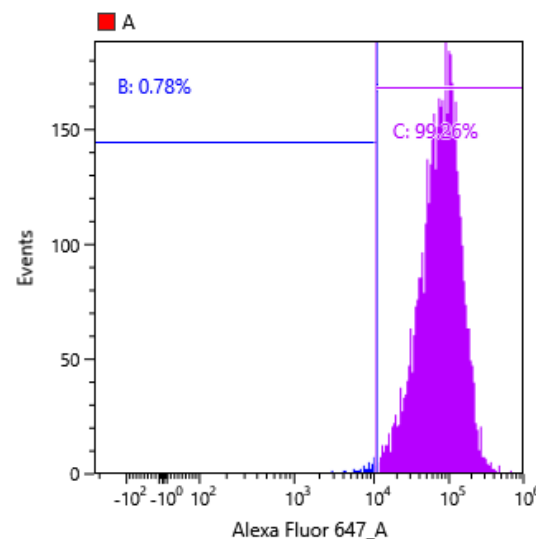
核型解析

全ゲノム解析

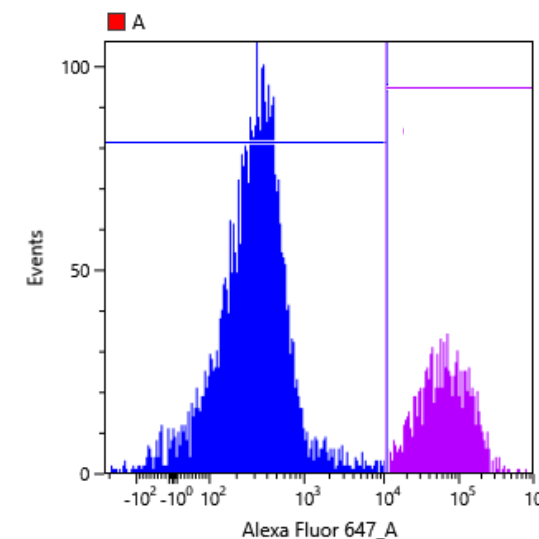
分化能評価
(心筋)

研究用株 : Ff-I14s04

HLA-A 編集効率 : 73%

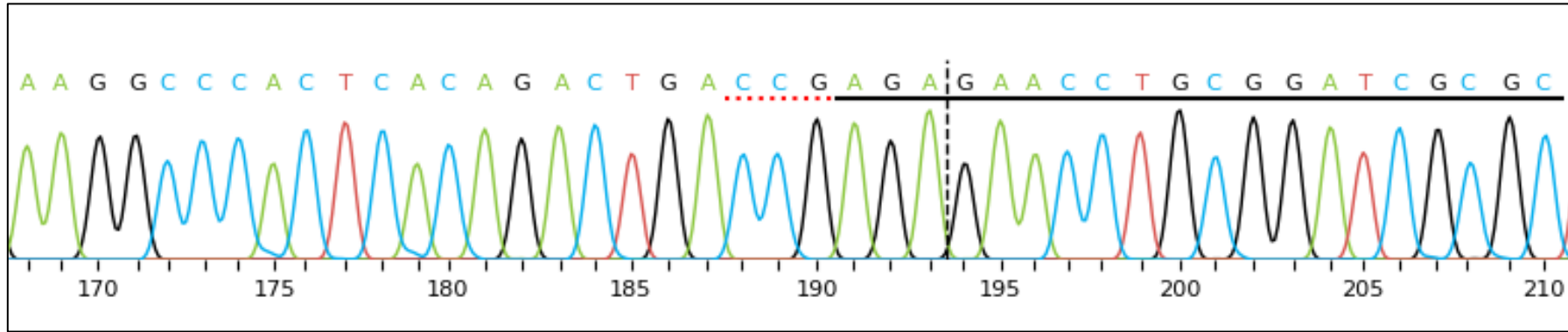


編集前

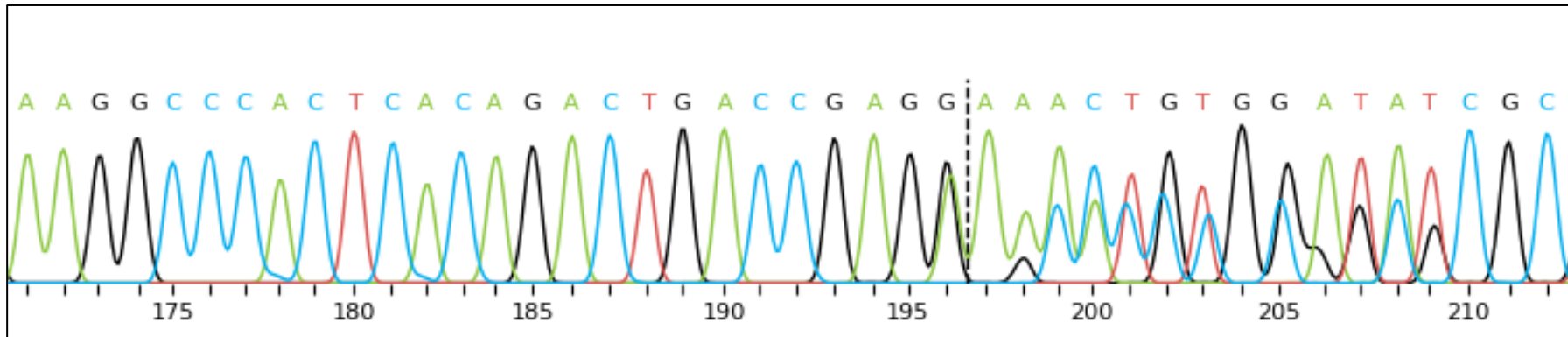


編集後

スクリーニング : Sanger Sequencing



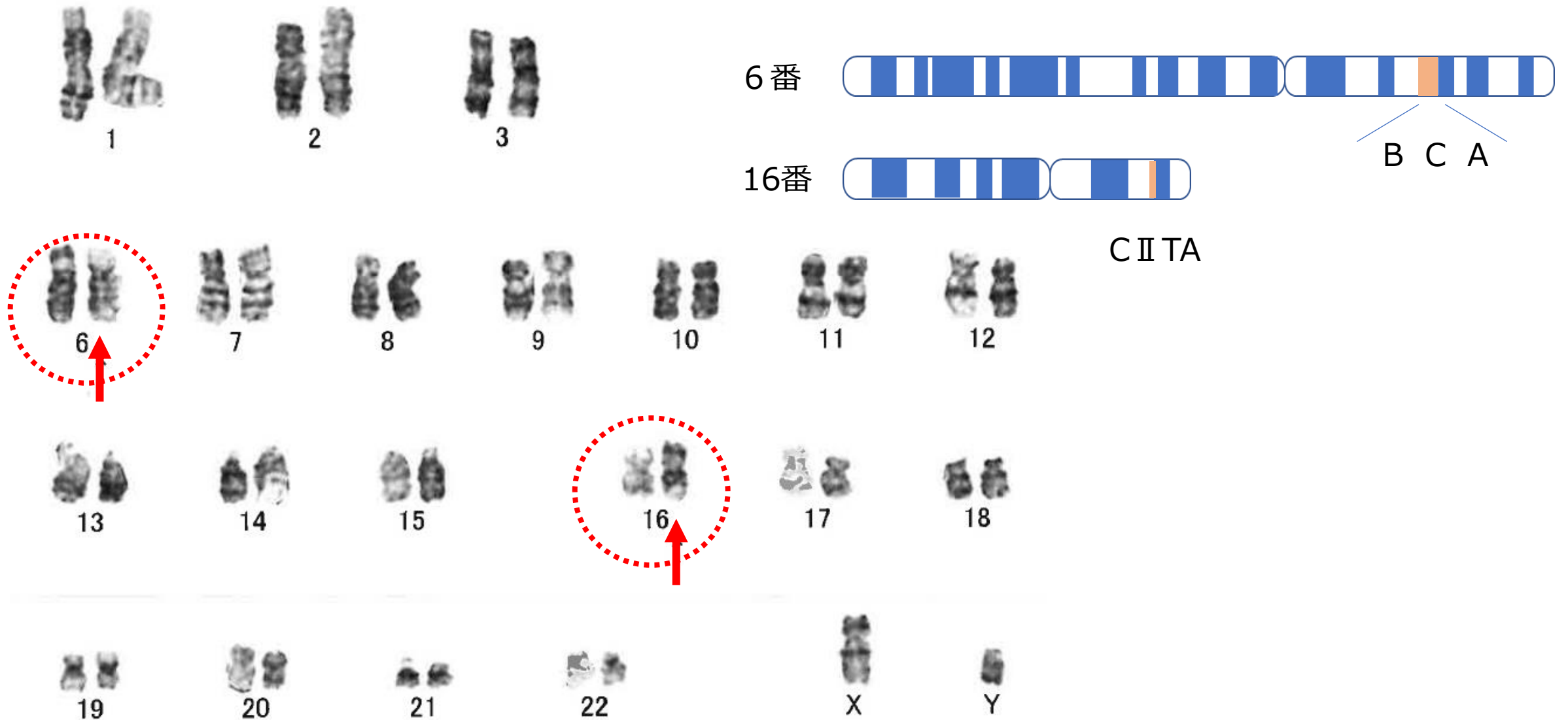
ゲノム編集・前



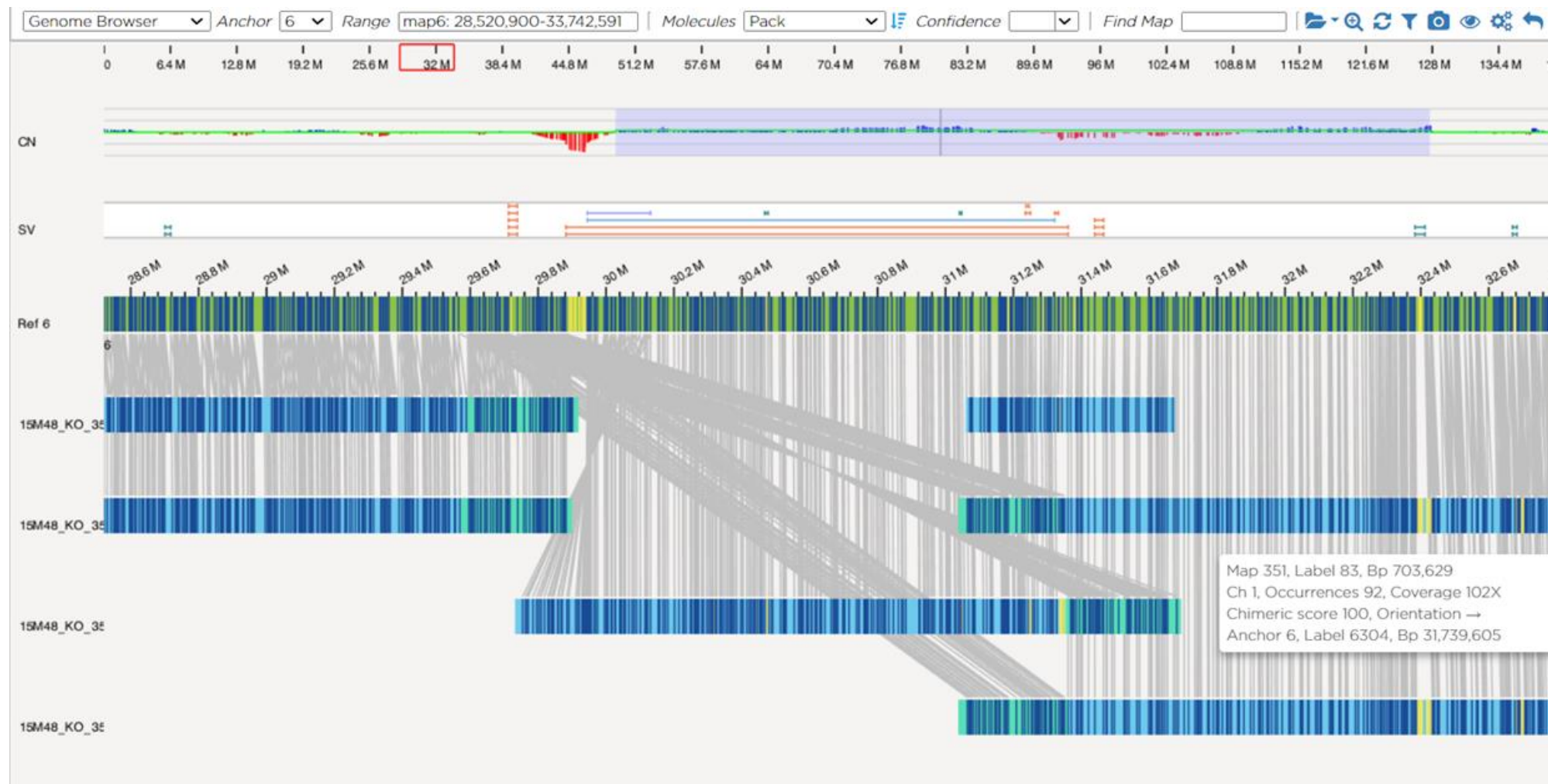
ゲノム編集・後

HLA-Aターゲット部位：一塩基挿入/一塩基欠損

スクリーニング：核型解析



スクリーニング : Optical Genome Mapping



chr6:29910309-29913647

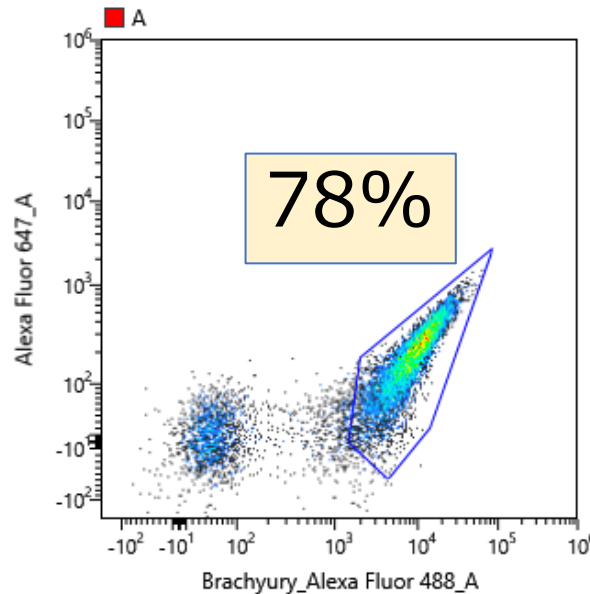
HLA-A

chr6:31321652-31324956

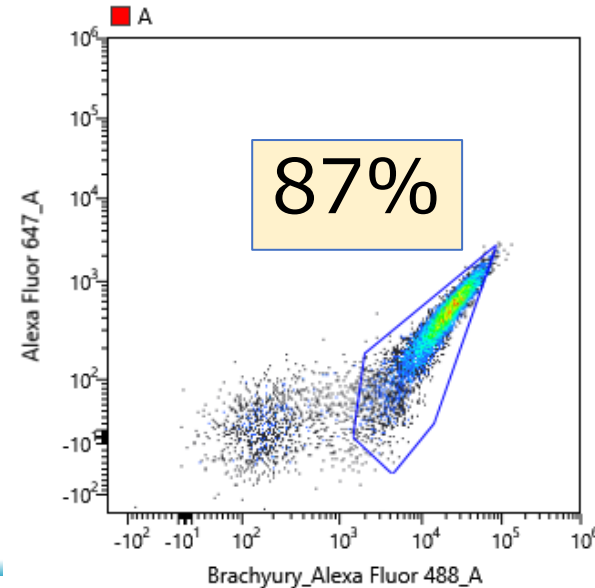
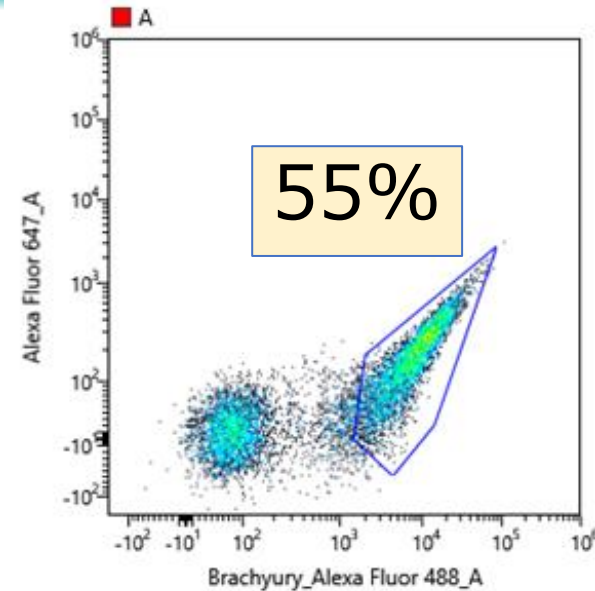
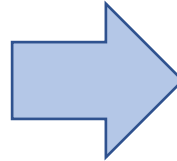
HLA-B

スクリーニング：心筋分化誘導

TroponinT陽性率で判定

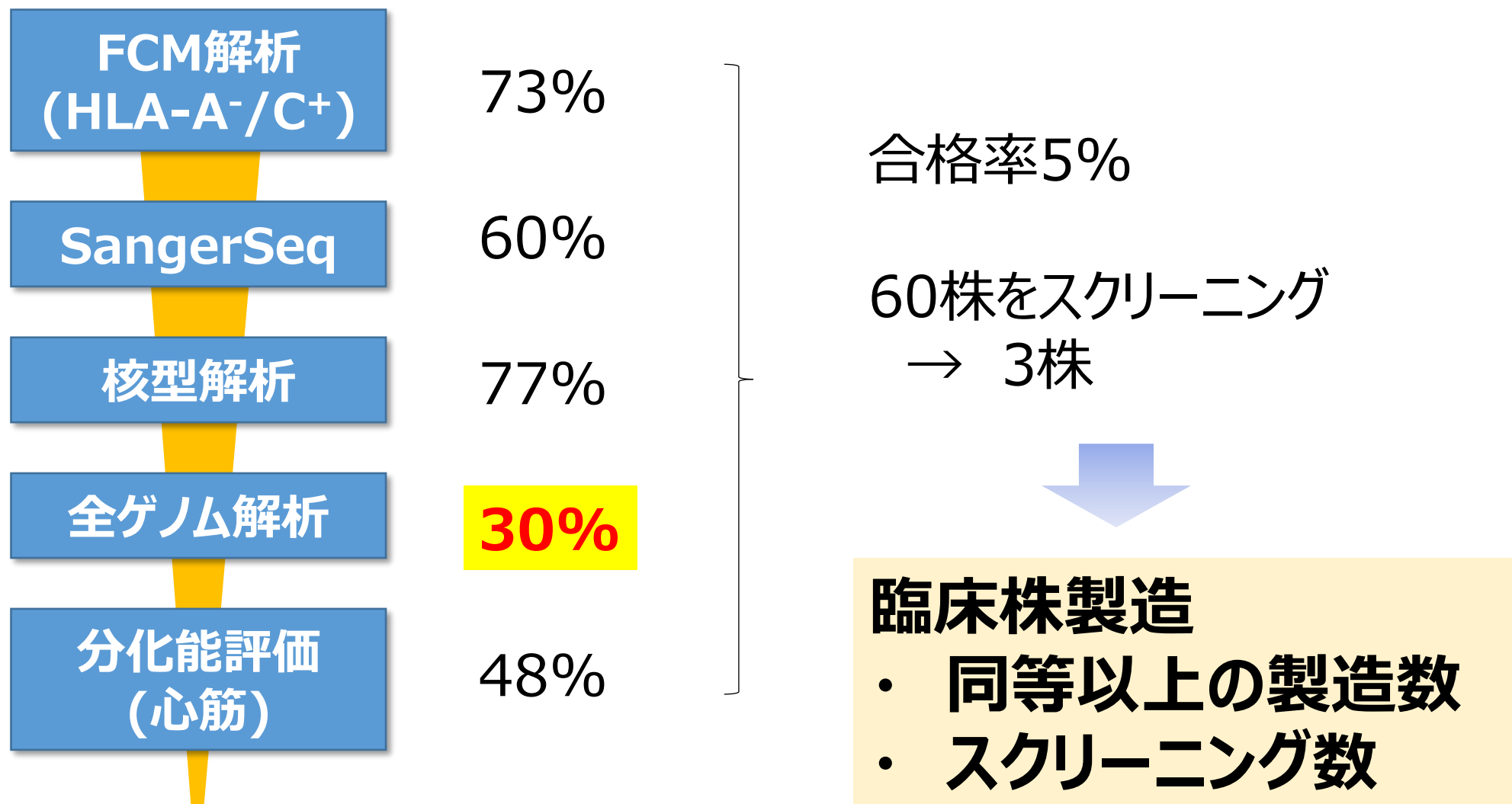


ゲノム編集

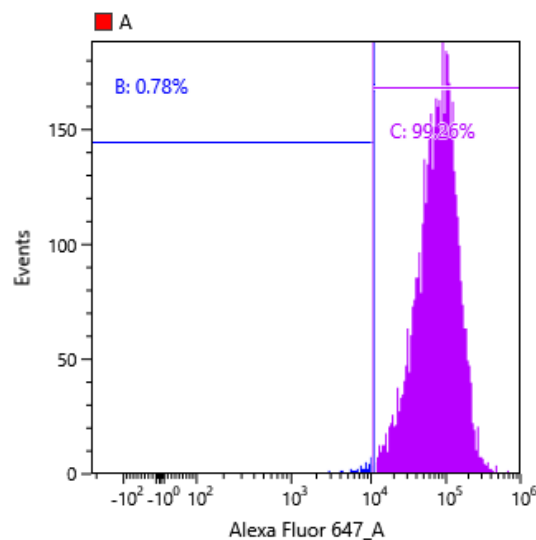


心筋誘導法:
Funakoshi S. et al, 2016

研究用株スクリーニング結果：まとめ

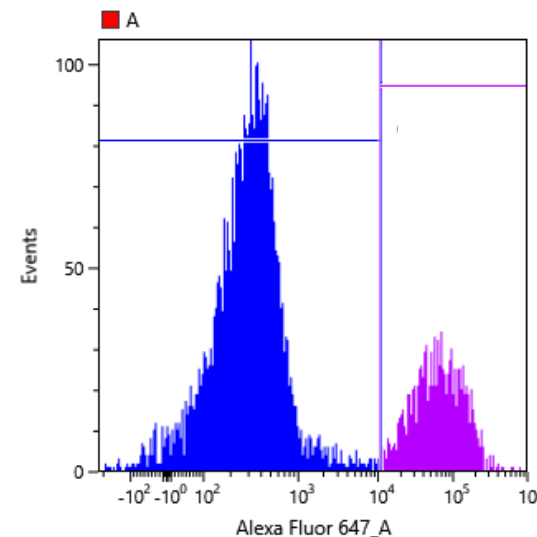


臨床株の製造：FCM（HLA-A）



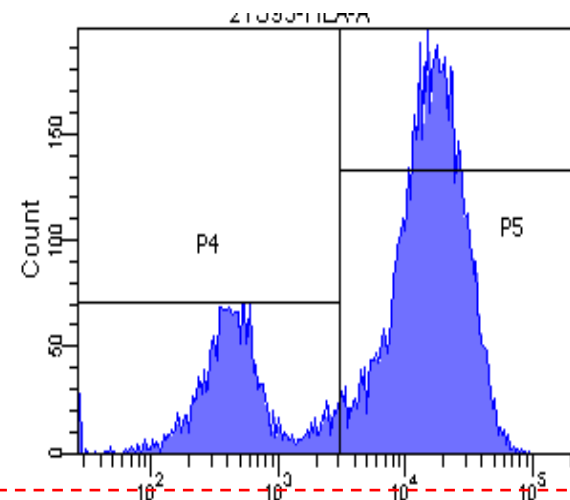
編集前

研究用



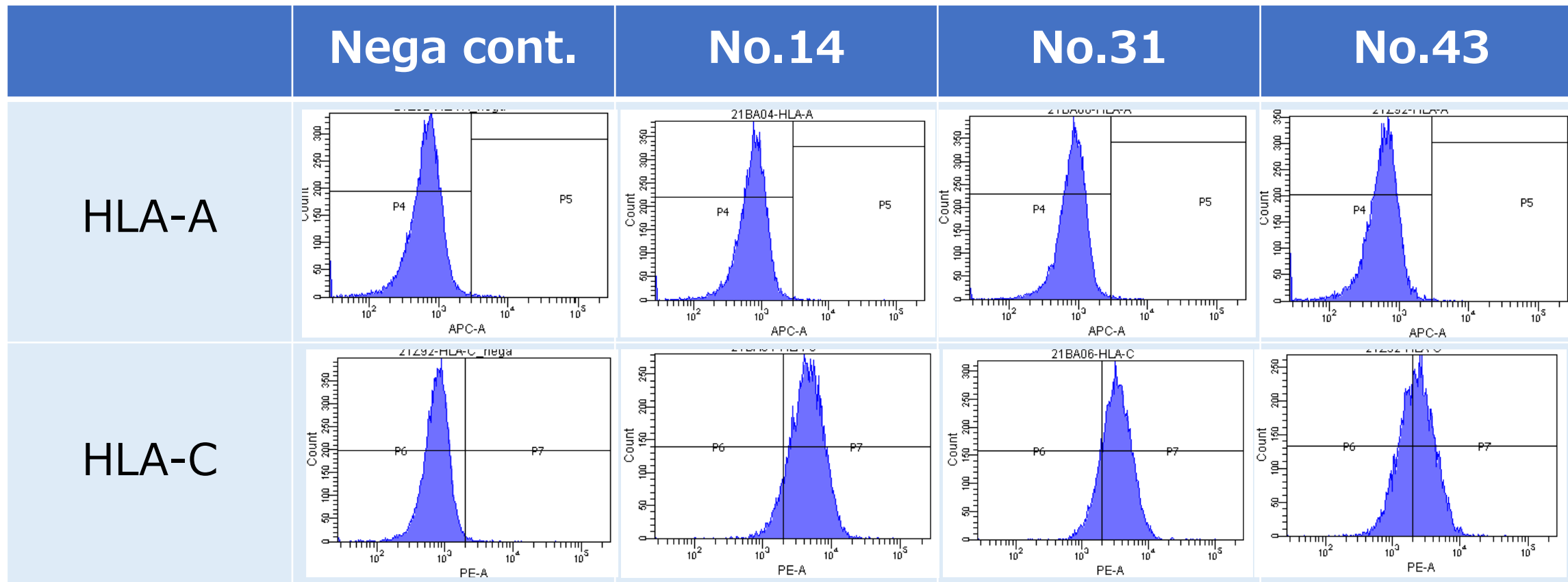
陰性率
73%

臨床用製造



陰性率
22%

臨床株の製造：FCM&ゲノム解析



ゲノム異常

ゲノム異常

臨床株の製造：No.31株の詳細解析

遺伝子	編集		編集	
HLA-A	−3bp	アミノ酸欠損	−27bp	アミノ酸欠損
HLA-B	−6bp	終止コドン	+194bp	フレームシフト
CⅡTA	+1bp	フレームシフト	+1bp	フレームシフト

- **HLA-A：ゲノム編集は認められたが、機能欠損に至らず**
- **HLA-B/CⅡTA：機能欠損**

研究と製造における技術的な橋渡しの困難さを改めて認識

- 製造プロセスの改善
 - 製造手順書の改訂/教育訓練（Cas9/gRNAの混合）
 - 手技→自動化・機械化（シングルセル播種機）
- スクリーニング試験の迅速化
 - HLA誘導 = IFN添加 ⇒ 簡易アッセイ法
- ssDNAの利用
 - stop codonへの置換（検討中）

臨床用株の再製造は今年6月開始（配布は来年3月）

ゲノム編集株作製の技術課題・留意点

- Cas9タンパク質とgRNAの混合：編集効率
- シングルセルからのクローン増殖・生存率
- 多重ゲノム編集：大規模ゲノム異常 ⇔ 継代数
元株との乖離
- off-target：gRNA設計
- Cas9（平滑末端）⇒ Cpf1（突出末端）
- スクリーニング：簡易化・自動化

謝辞

本研究はAMED再生医療実現拠点ネットワークプログラムの支援を受けて実施しました。



京都大学iPS細胞研究所

- 堀田 秋津
- 徐 淮耕
- 吉田 善紀

京都大学iPS細胞研究財団

- 北野 優子
- 西村 紗也可
- 加藤 智朗
- 上田 杏奈
- 中島 義基
- 梅景 雅史
- 高須 直子
- 一阪 朋子
- 美濃部 隼
- 金井 仁美
- 小倉 安加
- 川上 文音
- 野村 真樹
- 細胞調製施設関係者