

# (P-02-07) HLAノックアウトiPS細胞の 臨床応用を目指した作製条件検討 ～オン/オフターゲットの解析

<sup>1</sup>公益財団法人京都大学iPS細胞研究財団 細胞調製施設, <sup>2</sup>京都大学iPS細胞研究所

北野 優子<sup>1</sup>, 西村 紗也可<sup>1</sup>, 徐 淮耕<sup>2</sup>, 野村 真樹<sup>1</sup>, 加藤 智朗<sup>1</sup>, 上田 杏奈<sup>1</sup>, 梅景 雅史<sup>1</sup>,  
塚原 正義<sup>1</sup>, 堀田 秋津<sup>2</sup>, 高須 直子<sup>1</sup>



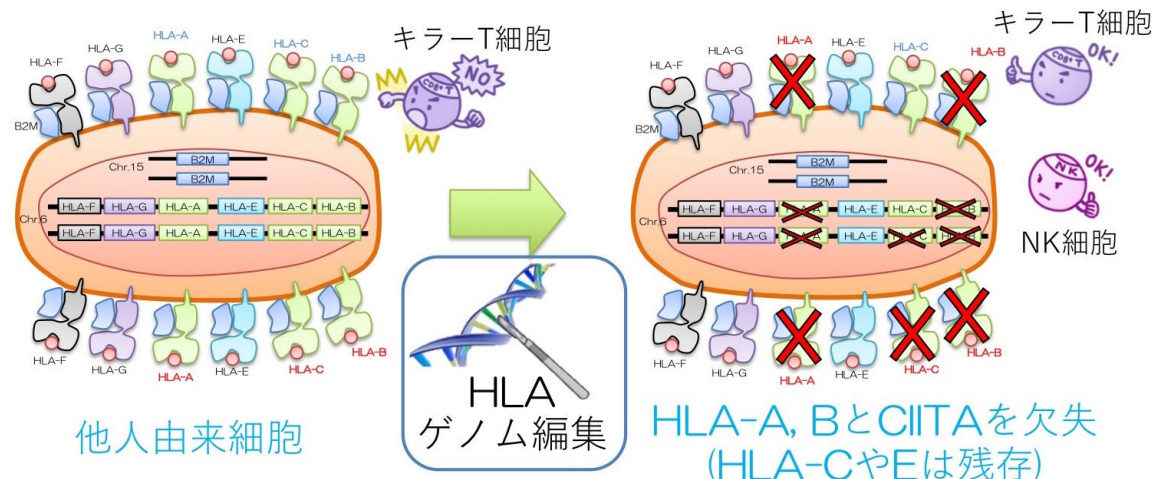
公益財団法人  
京都大学iPS細胞研究財団

CiRA堀田研究室の徐淮耕研究員らにより、ゲノム編集技術(CRISPR/Cas9)を用いて、他家移植の際に免疫拒絶のリスクを低減できるiPS細胞の取得方法が報告された。

(Xu H. et al., Cell Stem Cell, 2019,24:566-578)

臨床用iPS細胞株製造へ発展させるために必要な品質評価項目や基準を定めるため、また想定されるリスクを検証する目的で、ラボ製造株を作製した。

得られた複数株についての品質評価結果から見てきた課題について、オン/オフターゲット領域の両面から議論したい。



<https://www.cira.kyoto-u.ac.jp/hotta/research.html>

## 日本人第1位のHLA型ホモドナー由来iPS細胞

QHJI(末梢血由来)研究用株

- Ff-I01s04
- Ff-I14s04

YZWJ(臍帯血由来)研究用株

- Ff-WJs513
- Ff-WJs524

HLA-A24



HLA-B52



HLA-C12



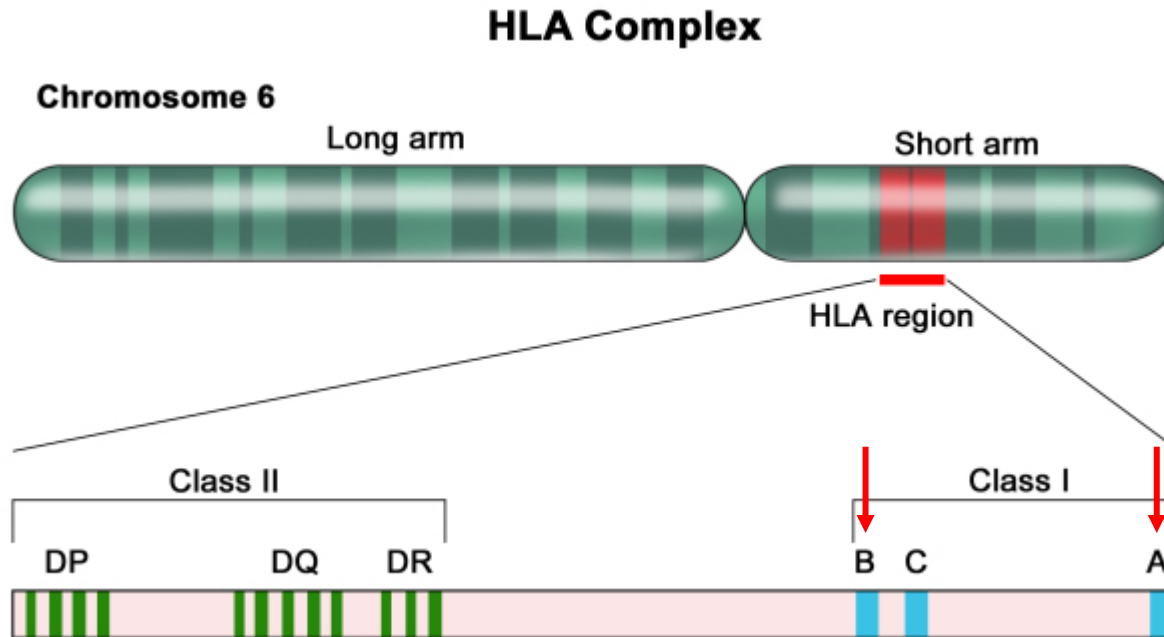
CIITA



日本人カバー率 約22%



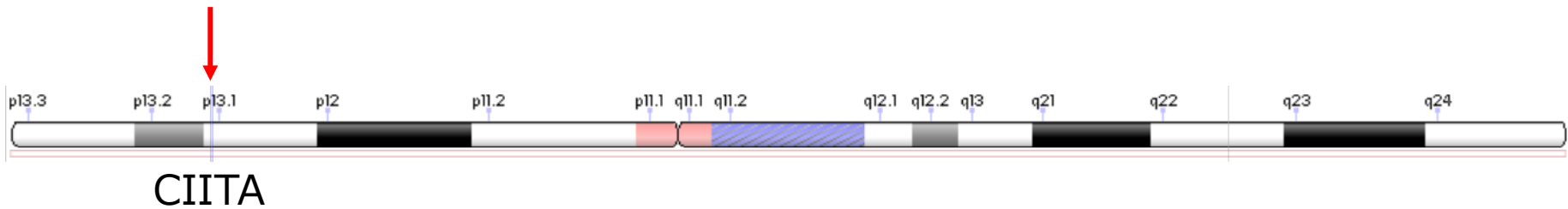
## 6番染色体



・・・ゲノム編集箇所

## 16番染色体

[https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK84260/figure/CDR0000700000\\_\\_119/](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK84260/figure/CDR0000700000__119/)



[https://www.ncbi.nlm.nih.gov/variation/view/?q=4261%5Bgeneid%5D&asm=GCF\\_000001405.25](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/variation/view/?q=4261%5Bgeneid%5D&asm=GCF_000001405.25)

# 手法

エレクトロポレーション(P0)

FACS(P2)

Stock/FACS(P5)

バルク

クローニング・拡大培養

品質評価

96well plate(P3)



約9日後

12well plate(P4)

約7日後

6well plate(P5)

・ SangerSeq

・ WGS

・ ゲノム構造異常

・ 発現解析

・ 分化能評価

etc.

約1.5カ月

約2カ月～

# スクリーニング

**FCM解析  
(HLA-A<sup>-</sup>/C<sup>+</sup>)**

HLA-A陰性、HLA-C陽性  
が確認できること。

**SangerSeq  
G-Band**

切断予想部位に変異の  
導入が確認できること。  
核型異常のないこと。

**全ゲノム解析**

切断予想部位において、  
SangerSeqと同じ変異  
が確認できること。

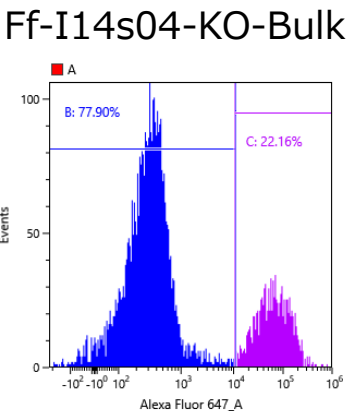
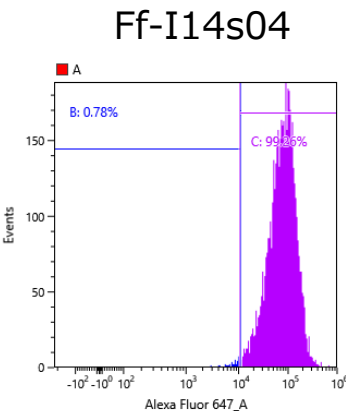
**分化能評価  
(心筋)**

**選定**

# FCM解析

バルク評価(P2)

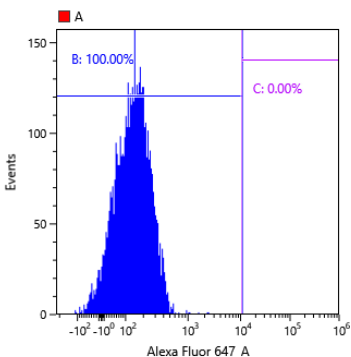
HLA-A<sup>-</sup>



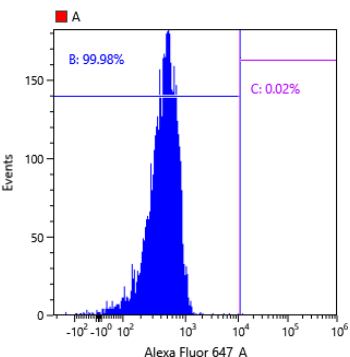
クローン評価(P5)

Ff-I14s04-AB II -KO-7

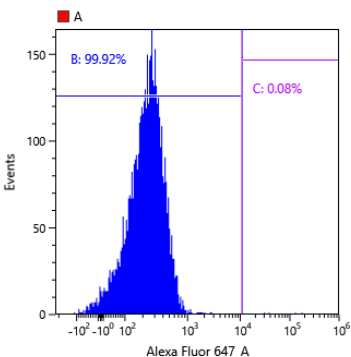
HLA-A<sup>-</sup>



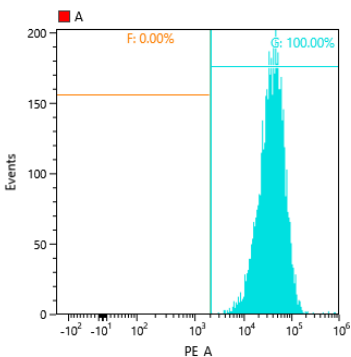
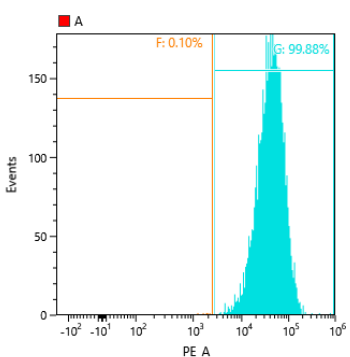
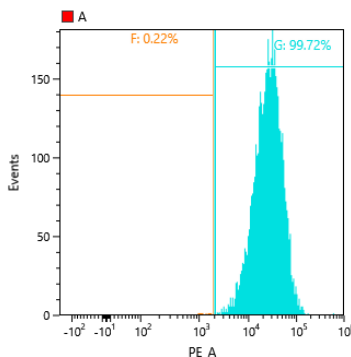
Ff-I14s04-AB II -KO-13



Ff-I14s04-AB II -KO-24



HLA-C<sup>+</sup>



# SangerSeq

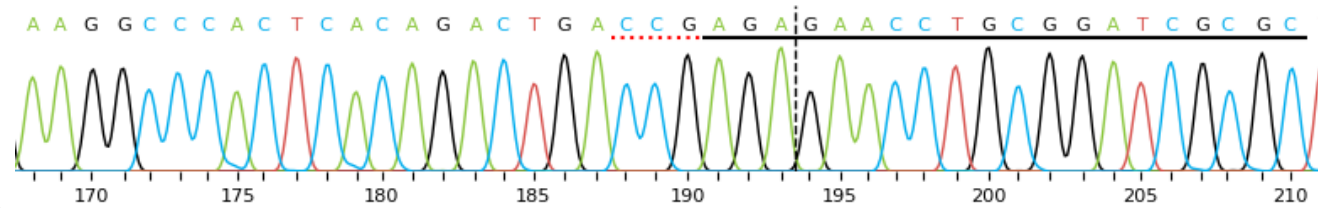
Ff-I14s04

HLA-A領域

(赤点線：PAM配列

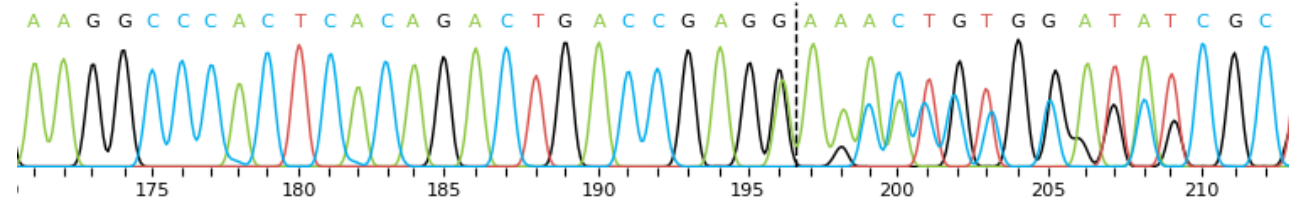
黒点線：切断予想部位

黒実線：gRNA設計配列)



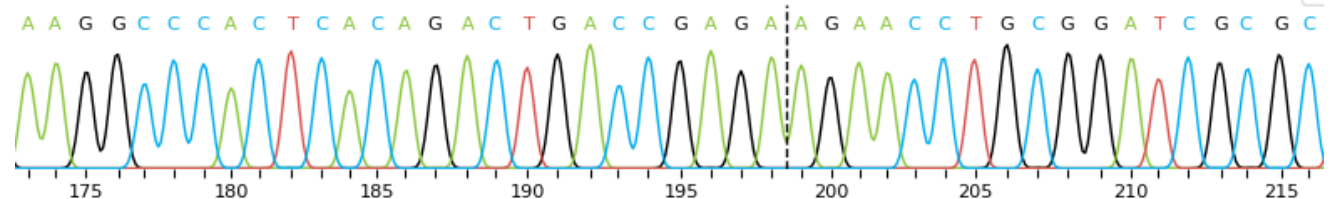
Ff-I14s04-AB II -KO-7

HLA-A領域(+ A/-A)



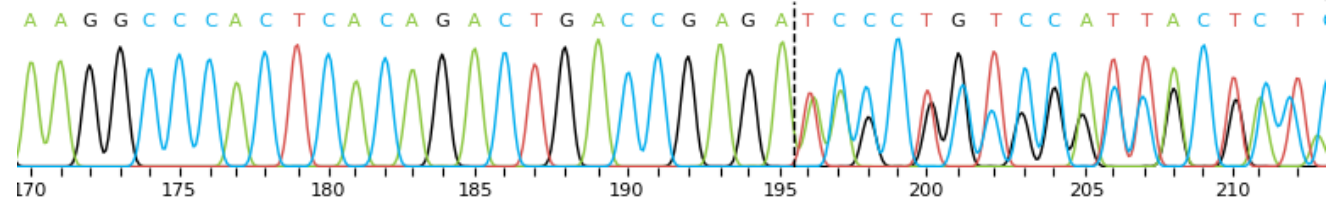
Ff-I14s04-AB II -KO-13

HLA-A領域(+ A)



Ff-I14s04-AB II -KO-24

HLA-A領域(-G/-11bp)



# 核型解析(G-Band)

解析した7/30株でHLA-A/B～CIITA領域間と思われる転座を確認した。

〈核 型〉

46, XY, t(6;16)(p21;p13.1)[20]



# 全ゲノム解析

Illumina社製のNovaSeq6000を用いた  
全ゲノム解析（平均深度70×、リード長2×151 bp）

ゲノム編集前後の株を比較して、変異（SNV; Single Nucleotide Variants  
Indel; Insertion/deletion CNV; Copy Number Variations）の有無に関する評価の実施。

- ・ がんゲノム変異データベースのCosmic Cancer Gene Census及びShibata Listに変異がないこと。
- ・ コーディング領域にかかる大規模なCNVがないこと。

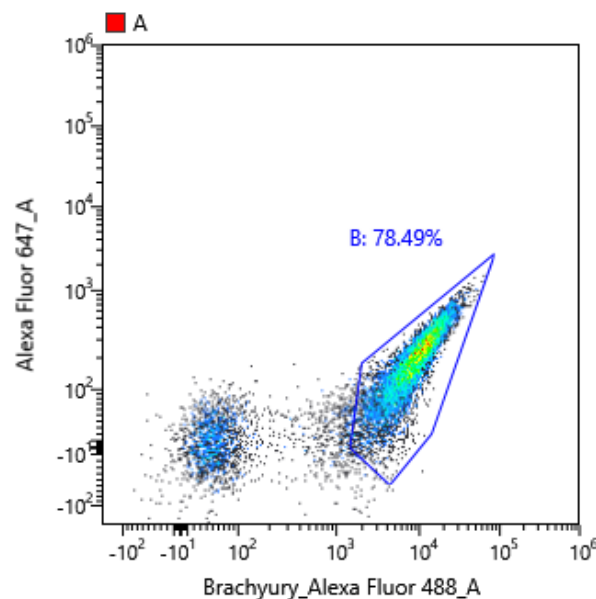
3/11株で上記に属する目的外の変異がないことを確認し、合格株とした。

# 心筋分化

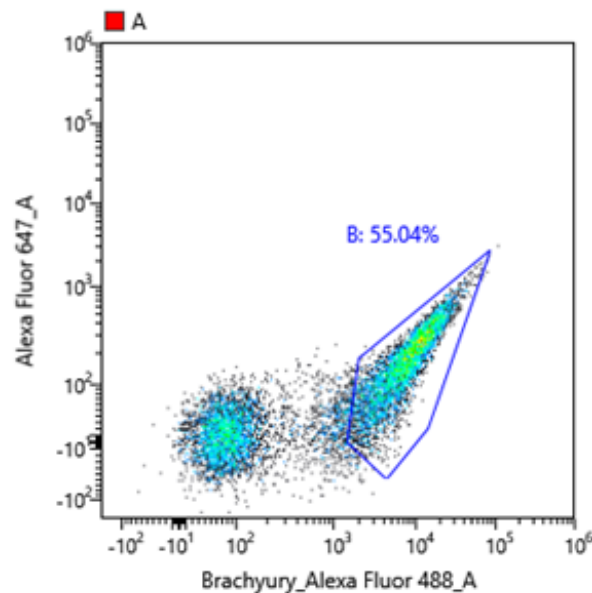
## TnT陽性率で判定

「Funakoshi et al., 2016, Sci Rep.」  
(一部改変)

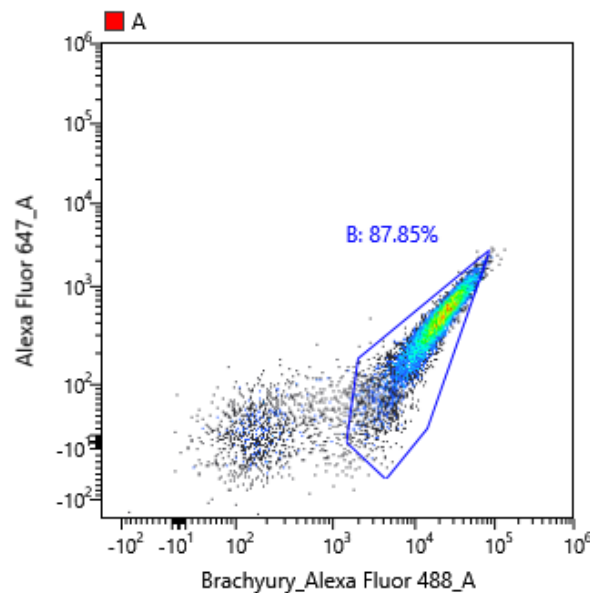
Ff-I14s04



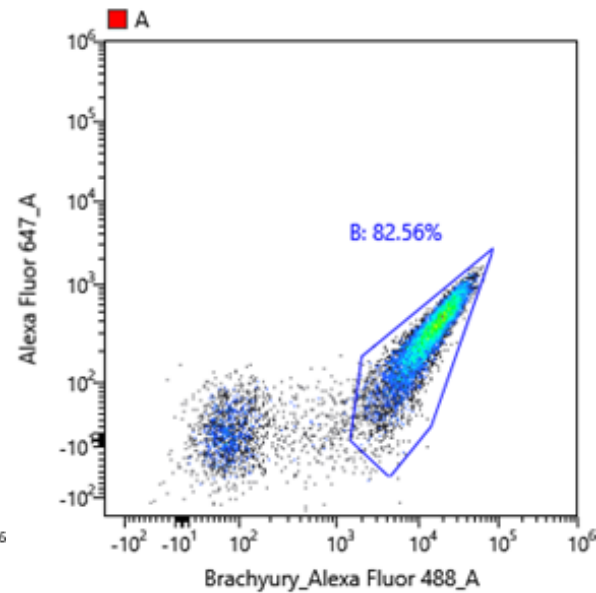
Ff-I14s04-AB II -KO-7



Ff-I14s04-AB II -KO-13



Ff-I14s04-AB II -KO-24



# 作製状況\_Ff-I14s04-AB II -KO

| 試験項目                                      | サンプル数 | 合格数 | %  |
|-------------------------------------------|-------|-----|----|
| FCM<br>HLA-A <sup>-</sup> /C <sup>+</sup> | 41    | 30  | 73 |
| SangerSeq                                 | 30    | 18  | 60 |
| 核型解析                                      | 30    | 23  | 77 |
| 心筋分化                                      | 21    | 10  | 48 |
| WGS                                       | 11    | 3   | 30 |

|              | Ff-I14s04-AB II -KO        |       |                  |
|--------------|----------------------------|-------|------------------|
|              | #7                         | #13   | #24              |
| FACS(A)陰性率   | 100                        | 99.98 | 99.92            |
| FACS(C)陽性率   | 99.72                      | 99.88 | 100              |
| Sanger-A     | +A/-A                      | +A    | -G, -11          |
| Sanger-B     | +T, -7                     | +A    | +A, -8           |
| Sanger-CIITA | +A                         | +A    | +A               |
| Sanger-C     | 変異なし                       |       |                  |
| 心筋           | 54.23                      | 87.36 | 80.63            |
| 核型解析         | normal                     |       |                  |
| 全ゲノム         | CNVなし                      |       | loss (CIITA 1kb) |
| 無菌           | 陰性                         |       |                  |
| マイコ          | 陰性                         |       |                  |
| エンド          | 陰性                         |       |                  |
| STR          | ドナーPBMCと同一                 |       |                  |
| 形態           | ES細胞様の形態である<br>元株と同等の形態である |       |                  |

# オンターゲット詳細解析\_Saphyr

## Circos plot visualization

Ff-I01s04 vs Ff-I01s04-AB II -KO-35

### Samples

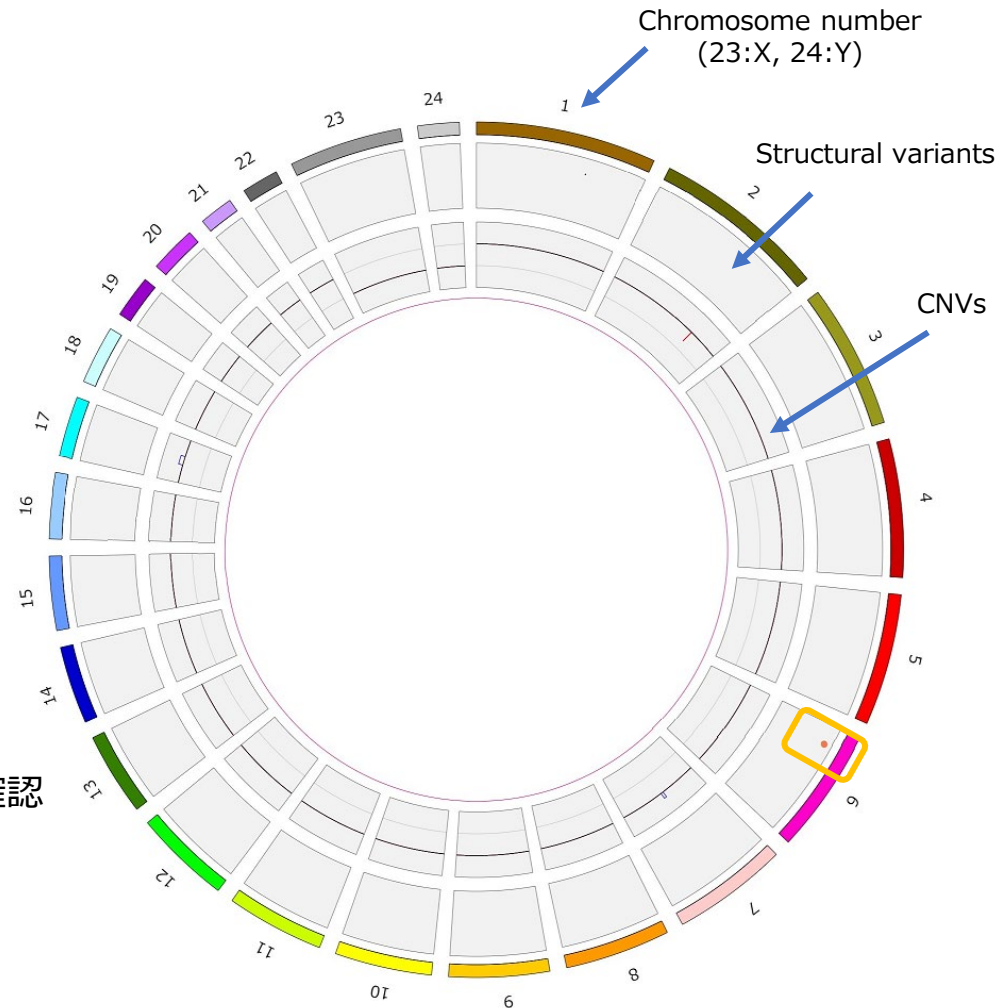
Reference:

15M48\_KO\_cont-VA-c35\_sv

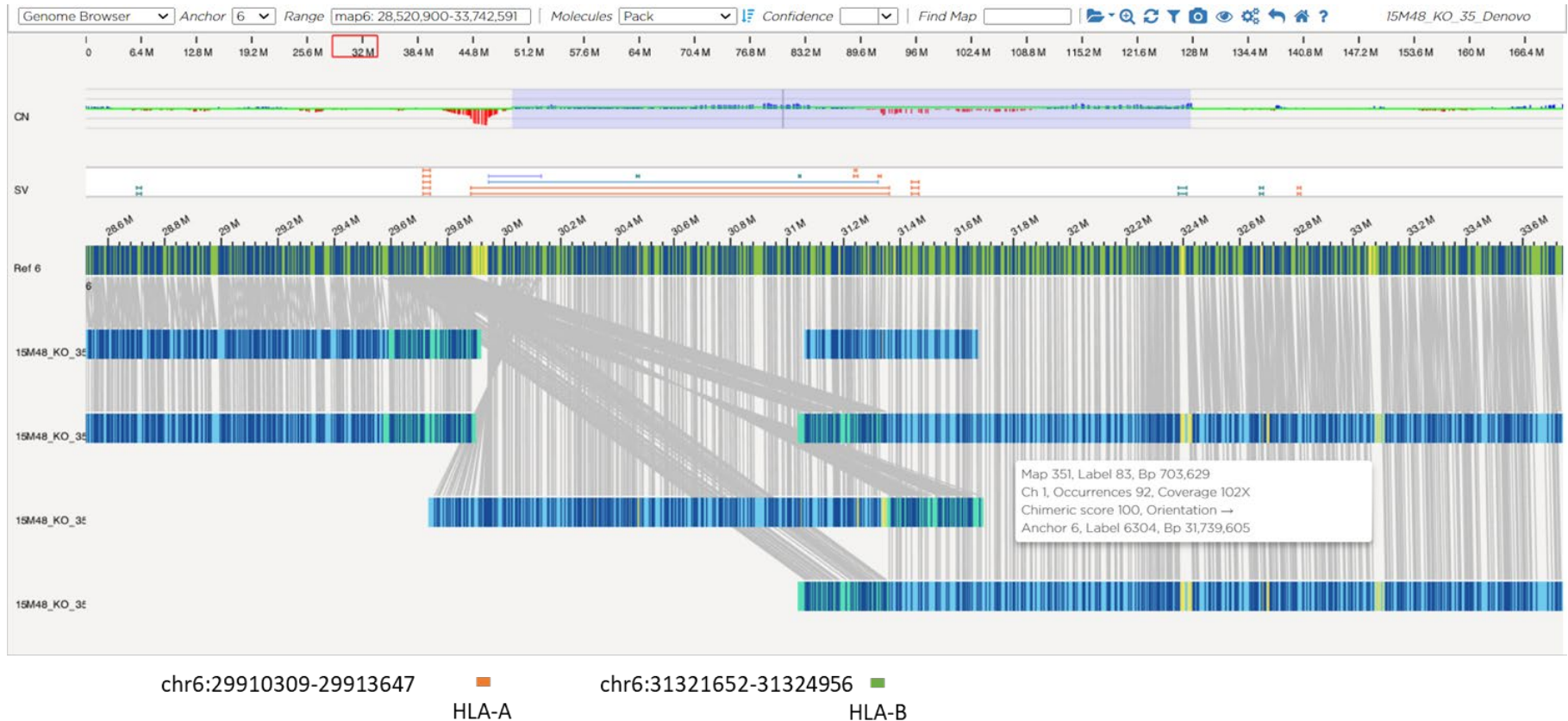
|                       | Count |
|-----------------------|-------|
| ● Insertion           | 0     |
| ● Deletion            | 2     |
| ● Inversion           | 0     |
| ● Duplication         | 0     |
| ● Intra-Translocation | 0     |
| ● Inter-Translocation | 0     |
| ● CNV Gain Segment    | 2     |
| ● CNV Loss Segment    | 1     |

Ff-I01s04-AB II -KO-35 :  
SangerSeq, WGSでHLA-A/Bの混在する配列を確認

ここでは、6番染色体のDeletionに注目した。



# Genome Browser visualization



- HLA-A/B間において、ショートリードシーケンスでは判断できなかった逆位・重複・欠失を確認することができた。
- 同一染色体内の狭い領域（～数Mbp）においてのゲノム構造異常検出ツールとして、Bionano genome mapping システム Saphyr®は有用であると評価した。

- 目的とするHLA-A/B/CIITAの3座6か所にゲノム編集が起きた細胞株を取得することができた。
- 品質評価項目としては、FCM解析、サンガーシーケンス、核型解析(G-Band)、全ゲノム解析を実施した。
- 分化能や遺伝子発現解析を実施し、ノックアウト前のiPS細胞株と同等のキャラクターを持つ株を優先的に選定した。
- 全ゲノム解析の結果から、コーディング領域においてオフターゲットとみられる変異は見つからなかった。
- 多重ノックアウト実施時には、オンターゲット間でのゲノム構造異常が起きる可能性を考慮する必要があることが分かった。

# HLAノックアウトiPS細胞の臨床応用を目指した 作製条件検討～オン/オフターゲットの解析

iPS細胞研究財団  
北野 優子

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。