

京都大学	博士（医学）	氏名	徐 淮耕
論文題目	Targeted Disruption of HLA genes via CRISPR-Cas9 generates iPSCs with Enhanced Immune Compatibility (CRISPR-Cas9 を用いた個別 HLA 遺伝子破壊による免疫適合性の向上した iPSC 細胞の作製)		
<p>(論文内容の要旨)</p> <p>【背景と目的】 他家 iPSC 細胞を用いた再生医療は既に臨床治験の段階まで来ているが、移植片と患者との間に HLA(ヒト白血球抗原)のミスマッチがあると拒絶の原因となりえることが知られている。HLA ホモドナー由来の iPSC 細胞を用いることにより HLA 適合性を上げる方法があるが、日本人の 90%以上をカバーするには HLA-A,B,DR のホモストックを 140 株用意する必要があるが、HLA 型がホモである人は稀少であり、ドナー勧誘が律速となっている。</p> <p>一方で、全ての HLA クラス I の細胞表面提示に必要な B2M 遺伝子を破壊することで、細胞表面に提示させない方法も報告されている。この方法では CD8 陽性 T 細胞の拒絶を免れることはできるが、HLA クラス I を介した抑制がなくなってしまうため、NK 細胞に攻撃されることが知られている。加えて、HLA クラス I 完全欠失細胞は抗原提示能も欠失するため、感染源となるリスク及び腫瘍化時に免疫系に排除されないリスクも存在し、新たな方法が必要と考えた。</p> <p>【戦略】 まず HLA ヘテロドナー由来の iPSC 細胞において古典的 HLA クラス I(HLA-A,B,C)の片アレルのみを破壊し、擬似的な HLA ホモ株の作製を試みた。まず CRISPR-Cas9 を用いて、HLA アレルに特異的な gRNA をデザインし、標的アレルのみを破壊できることをサンガーシーケンスで確認した。その過程で、未分化 iPSC 細胞でも IFN-γ で刺激すれば HLA を細胞表面発現することを突き止め、HLA アレル特異的な抗体を用いて HLA アレル破壊に成功した細胞のみを生細胞染色およびソーティングにより濃縮する技術を開発した。これらの技術を用いて、HLA-A,B 及び HLA-A,B,C の片アレルノックアウト株を作製した。さらに、ゲノム編集前後の iPSC 細胞を血球細胞及び心筋細胞に分化させ、ゲノム編集後にのみ HLA 型が一致する仮想レシピエント由来の末梢血 CD8 陽性 T 細胞と混合した結果、ゲノム編集前の細胞と比較して HLA 編集株は有意に T 細胞の攻撃を回避できることが示された。</p> <p>さらに、古典的 HLA クラス I の中で NK 細胞の抑制に最も重要な HLA-C の片アレルと非古典的 HLA(HLA-E,F,G)を残存させた”HLA-C 残存細胞”を作製した。この方法では、まず HLA-A,B を両アレル破壊後に、HLA-C の片アレルを特異的に CRISPR-Cas9 を用いてノックアウトした。この HLA-C 残存株を、残存した HLA-C のみ HLA 型が一致する仮想レシピエント由来の CD8 陽性 T 細胞と混合した結果、HLA-C 残存細胞は HLA 編集前の細胞と比較して有意に T 細胞の攻撃を回避できることが示された。続いて、仮想レシピエント由来の NK 細胞と混合した結果、HLA-C 残存細胞は B2M 破壊細胞と比較して有意に NK 細胞の攻撃を回避できることが示された。</p> <p>さらに、HLA クラス II の転写制御因子である CIITA 破壊を組み合わせると”HLA-C 残存 + クラス II 欠損細胞”を作製し、仮想レシピエント由来の末梢血と混合した結果、CD8 陽性 T 細胞、CD4 陽性 T 細胞、NK 細胞のいずれも活性化させないことが示された。</p>			

【結論、考察】

ゲノム編集を用いた二つの戦略により、iPS 細胞の免疫学的適合性の向上に有効であることを示した。特に後者の”HLA-C 残存 + クラス II 欠損細胞”の HLA-C アレルを適切に選択すれば、6 株で日本人の 9 割以上を、12 株で世界人口の 9 割以上をカバーできる計算となるため、ゲノム編集を用いた iPS 細胞ストックとして有効であると考えられる。

(論文審査の結果の要旨)

iPS 細胞移植において、ドナーレシピエント間の HLA 型の不一致は、T 細胞による拒絶の原因となりうる。近年、B2M 遺伝子の破壊により HLA クラス I の発現を消失させる報告があるが、クラス I の発現低下を感知する NK 細胞の活性化や、移植細胞のウイルス感染や癌化に際して T 細胞の監視から逃れてしまう可能性が指摘されている。本研究では、移植細胞の T 細胞と NK 細胞による拒絶を回避し、かつ抗原提示能をある程度維持した iPSC 細胞株の樹立を目指した。まず、クラス I 遺伝子座のうち HLA-A, B の両アレルを破壊し、さらに NK 細胞の抑制に重要な HLA-C を片アレルのみ残した HLA-C 残存 iPSC 細胞をゲノム編集により作製した。次に血球様細胞に分化させ、残存した HLA-C のみ HLA 型が一致する CD8 陽性 T 細胞及び NK 細胞と共培養した結果、どちらの細胞傷害活性も回避できることが明らかになった。加えて HLA クラス II を欠損させることで、CD4 陽性 T 細胞の活性化も回避可能であった。本研究の HLA-C 残存 HLA クラス II 欠損細胞を移植に用いる際、HLA-C 型のみが一致していれば良く、より多くのレシピエントに移植可能な iPSC 細胞株の樹立に成功したものと言える。

以上の研究は HLA ゲノム編集技術により移植細胞の免疫適合性を向上できることを示す成果であり、今後の iPSC 細胞の臨床応用の促進に寄与するところが多い。

したがって、本論文は博士（医学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成 31 年 3 月 6 日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。