



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 111757932 A

(43) 申请公布日 2020.10.09

(21) 申请号 201980012715.X

(22) 申请日 2019.02.15

(30) 优先权数据

2018-026421 2018.02.16 JP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2020.08.11

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/JP2019/005524 2019.02.15

(87) PCT国际申请的公布数据

W02019/160077 JA 2019.08.22

(71) 申请人 国立大学法人京都大学

地址 日本京都

(72) 发明人 堀田秋津 徐淮耕 金子新 王博

(74) 专利代理机构 北京派特恩知识产权代理有限公司 11270

代理人 金杨 李雪

(51) Int.Cl.

C12N 15/09 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

C12N 15/11 (2006.01)

C12Q 1/04 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

权利要求书3页 说明书61页
序列表(电子公布) 附图50页

(54) 发明名称

低抗原性细胞的制造方法

(57) 摘要

一种制造方法,所述制造方法是由供体细胞制造向受体进行同种异体移植时的排斥反应被降低的低抗原性细胞的方法,所述制造方法包括:分别确定上述供体细胞以及上述受体的人白细胞抗原(Human Leukocyte Antigen) (HLA) 等位基因;特定不存在于上述受体中而存在于上述供体细胞中的HLA等位基因;以及,对已特定的上述HLA等位基因进行破坏或改变,得到包含没有表达对上述供体细胞特异的HLA蛋白质的细胞的细胞群,没有表达对上述供体细胞特异的HLA蛋白质的细胞为上述低抗原性细胞。

1. 一种制造方法,所述制造方法是由供体细胞制造向受体进行同种异体移植时的排斥反应被降低的低抗原性细胞的方法,

所述制造方法包括:

分别确定所述供体细胞以及所述受体的人白细胞抗原 (HLA) 等位基因;

特定在所述受体中不存在、而所述供体细胞中存在的HLA等位基因;和

对已特定的所述HLA等位基因进行破坏或改变,得到包含没有表达对所述供体细胞特异的HLA蛋白质的细胞的细胞群,

没有表达对所述供体细胞特异的HLA蛋白质的细胞为所述低抗原性细胞。

2. 根据权利要求1所述的制造方法,其中,在分别确定所述供体细胞以及所述受体的所述HLA等位基因中所确定的所述HLA等位基因包括HLA-A等位基因、HLA-B等位基因以及HLA-C等位基因。

3. 根据权利要求1或2所述的制造方法,其中,在得到包含没有表达对所述供体细胞特异的HLA蛋白质的细胞的细胞群后,还包括:从所述细胞群中回收没有表达对所述供体细胞特异的HLA蛋白质的细胞,

所述回收包括:

使HLA蛋白质表达诱导剂与所述细胞群接触;和

将在已与所述HLA蛋白质表达诱导剂接触的所述细胞群中的对所述供体细胞特异的HLA蛋白质的表达作为指标,从所述细胞群中回收没有表达对所述供体细胞特异的HLA蛋白质的细胞。

4. 根据权利要求3所述的制造方法,其中,所述HLA蛋白质表达诱导剂为干扰素 (IFN)- γ 、IFN- α 、IFN- β 、白介素 (IL)-4、粒细胞巨噬细胞集落刺激因子 (GM-CSF)、转化生长因子 (TGF)- α 或TGF- β 。

5. 根据权利要求1~4中任一项所述的制造方法,其中,所述低抗原性细胞为多能干细胞。

6. 一种在向受体进行同种异体移植时的排斥反应被降低的低抗原性细胞的检测用试剂盒,其中,包含HLA蛋白质表达诱导剂。

7. 根据权利要求6所述的试剂盒,其中,所述HLA蛋白质表达诱导剂为IFN- γ 、IFN- α 、IFN- β 、IL-4、GM-CSF、TGF- α 或TGF- β 。

8. 根据权利要求6或7所述的试剂盒,其中,所述低抗原性细胞为多能干细胞。

9. 一种HLA蛋白质表达诱导剂,其由IFN- γ 、IFN- α 、IFN- β 、IL-4、GM-CSF、TGF- α 或TGF- β 构成。

10. 一种细胞,其中,至少一种HLA等位基因被破坏或改变,且所述细胞能够表达至少一种HLA蛋白质。

11. 根据权利要求10所述的细胞,其中,所述HLA等位基因包括HLA-A等位基因、HLA-B等位基因或HLA-C等位基因。

12. 根据权利要求10或11所述的细胞,其是在向受体进行同种异体移植时的排斥反应被降低的低抗原性细胞,已被破坏或改变的所述HLA等位基因为在该受体中不存在的HLA等位基因。

13. 根据权利要求10~12中任一项所述的细胞,其为多能干细胞。

14. 根据权利要求10~13中任一项所述的细胞, 其中, 进一步破坏或改变II类主要组织相容性复合物反式激活因子(CIITA)等位基因、调节因子X5(RFX5)等位基因、调节因子X相关蛋白(RFXAP)等位基因以及调节因子X相关锚蛋白(RFXANK)等位基因中至少一种等位基因。

15. 根据权利要求10~14中任一项所述的细胞, 其中, HLA-A等位基因以及HLA-B等位基因被破坏, 且所述细胞能够表达至少一种HLA-C蛋白质。

16. 根据权利要求15所述的细胞, 其中, 所述HLA-C蛋白质是由选自HLA-C*01:02等位基因、HLA-C*02:02等位基因、HLA-C*03:03等位基因、HLA-C*03:04等位基因、HLA-C*04:01等位基因、HLA-C*05:01等位基因、HLA-C*06:02等位基因、HLA-C*07:01等位基因、HLA-C*07:02等位基因、HLA-C*08:01等位基因、HLA-C*12:02等位基因以及HLA-C*16:01等位基因中的一种等位基因编码的蛋白质。

17. 一种制造方法, 所述制造方法是由供体细胞制造在向受体进行同种异体移植时的排斥反应被降低的低抗原性细胞的方法, 其中,

所述制造方法包括:

破坏或改变所述供体细胞的包含CIITA等位基因、RFX5等位基因、RFXAP等位基因以及RFXANK等位基因中至少一种以上的等位基因,

破坏或改变所述CIITA等位基因、RFX5等位基因、RFXAP等位基因或RFXANK等位基因后的细胞为所述低抗原性细胞。

18. 根据权利要求17所述的细胞, 其中, 所述低抗原性细胞为多能干细胞。

19. 一种细胞, 其中, 包含CIITA等位基因、RFX5等位基因、RFXAP等位基因以及RFXANK等位基因中至少一种以上的等位基因被破坏或改变。

20. 根据权利要求19所述的细胞, 其为多能干细胞。

21. 一种gRNA, 其将下述碱基序列作为目标碱基序列, 所述碱基序列为对全HLA单倍型的基因组DNA的碱基序列数据进行映射时只映射到一个作为目标的HLA单倍型上、且对HLA等位基因以外的全基因组DNA的碱基序列数据进行映射时未映射到的碱基序列。

22. 根据权利要求21所述的gRNA, 其中, 所述目标碱基序列由序列号3、4、7、45~52、72~2459中任一项所述的碱基序列构成、或者由在序列号3、4、7、45~52、72~2459中任一项所述的碱基序列的5'末端缺失、取代或添加1个或多个碱基而成的碱基序列构成。

23. 根据权利要求21或22所述的gRNA, 其中, 所述目标碱基序列由序列号3、4、7、45~52中任一项所述的碱基序列构成、或者由在序列号3、4、7、45~52中任一项所述的碱基序列的5'末端缺失、取代或添加1个或多个碱基而成的碱基序列构成。

24. 根据权利要求21~23中任一项所述的gRNA, 其中, 所述目标碱基序列映射至HLA基因的外显子2或3。

25. 一种gRNA, 其将下述碱基序列作为目标碱基序列, 所述碱基序列为对全HLA单倍型的基因组DNA的碱基序列数据进行映射时映射到二个以上作为目标的HLA单倍型、且对HLA等位基因以外的全基因组DNA的碱基序列数据进行映射时未映射到的碱基序列。

26. 根据权利要求25所述的gRNA, 其中, 所述目标碱基序列由序列号53~55、2460~8013中任一项所述的碱基序列构成、或者由在序列号53~55、2460~8013中任一项所述的碱基序列的5'末端缺失、取代或添加1个或多个碱基而成的碱基序列构成。

27. 根据权利要求25或26所述的gRNA, 其中, 所述目标碱基序列由序列号53~55中任一项所述的碱基序列构成、或者由在序列号53~55中任一项所述的碱基序列的5'末端缺失、取代或添加1个或多个碱基而成的碱基序列构成。

28. 根据权利要求25~27中任一项所述的gRNA, 其中, 所述目标碱基序列映射至HLA基因的外显子2或3。

29. 一种方法, 是用于通过基因组编辑来制造在向受体进行同种异体移植时的排斥反应被降低的低抗原性细胞的目标碱基序列的特定方法, 其中, 包括:

对全HLA单倍型的基因组DNA的碱基序列数据, 映射候选碱基序列;

对HLA等位基因以外的全基因组DNA的碱基序列数据, 映射所述候选碱基序列; 和

将对全HLA单倍型的基因组DNA的碱基序列数据进行映射时只被映射到一个作为目标的HLA单倍型上、且对HLA等位基因以外的全基因组DNA的碱基序列数据进行映射时未被映射到的所述候选碱基序列, 特定为目标碱基序列。

30. 一种方法, 是用于通过基因组编辑来制造在向受体进行同种异体移植时的排斥反应被降低的低抗原性细胞的目标碱基序列的特定方法, 其中, 包括:

对全HLA单倍型的基因组DNA的碱基序列数据, 映射候选碱基序列;

对HLA等位基因以外的全基因组DNA的碱基序列数据, 映射所述候选碱基序列; 和

将对全HLA单倍型的基因组DNA的碱基序列数据进行映射时被映射到二个以上作为目标的HLA单倍型、且对HLA等位基因以外的全基因组DNA的碱基序列数据进行映射时未被映射到的所述候选碱基序列, 特定为目标碱基序列。

低抗原性细胞的制造方法

技术领域

[0001] 本发明涉及低抗原性细胞的制造方法。更具体而言,涉及低抗原性细胞的制造方法、低抗原性细胞的检测用试剂盒、细胞、gRNA、以及目标碱基序列的特定方法。本申请基于2018年2月16日在日本申请的日本特愿2018-026421号主张优先权,在此引用其内容。

背景技术

[0002] 在将供体的细胞向他人即受体(患者)移植的同种异体移植时,由于免疫反应,移植细胞被排斥。

[0003] 为了区分细胞的自我与非自我而发挥最重要作用的是被称为HLA(Human Leukocyte Antigen、人白细胞抗原)或主要组织相容性基因复合体(Major histocompatibility complex、MHC)的细胞表面蛋白质。

[0004] HLA分为I类和II类。I类的HLA蛋白质在体内的大部分种类的细胞中表达。I类的HLA蛋白质与 $\beta 2$ -微球蛋白($\beta 2$ -Microglobulin)(B2M)形成异质二聚体(heterodimer),表达至细胞表面,具有将肽呈递至CD8阳性细胞毒性T细胞并诱导激活的功能。呈递的抗原肽是内源性的,多数具有8~10氨基酸的长度。

[0005] 分类为HLA I类的是以HLA-A基因、HLA-B基因、HLA-C基因、HLA-E基因、HLA-F基因、HLA-G基因为主的6个基因。此外,也已知多个假基因(HLA-H、HLA-J、HLA-K、HLA-L、HLA-P、HLA-T、HLA-U、HLA-V、HLA-W、HLA-X、HLA-Y等)。这些中,特别是在个人之间的序列多样性大的是HLA-A基因、HLA-B基因、HLA-C基因这三个,它们对在移植免疫中识别自我与非自我发挥主要的作用。

[0006] II类的HLA蛋白质主要在巨噬细胞、树突状细胞、活性化T细胞、B细胞等免疫细胞中表达。II类的HLA蛋白质的 α 链和 β 链形成异质二聚体,具有将肽呈递至CD4辅助T细胞进行诱导激活的功能。呈递的抗原肽是外因性的,多数具有15~24氨基酸的长度。

[0007] 分类为HLA II类的是HLA-DR(α 链:HLA-DRA、 β 链:HLA-DRB)、HLA-DQ(α 链:HLA-DQA1、 β 链:HLA-DQB1)、HLA-DP(α 链:HLA-DPA1或HLA-DPA2、 β 链:HLA-DPB1或HLA-DPB2)。此外,已知也存在多个假基因(HLA-DMA、HLA-DMB、HLA-DOA、HLA-DOB)。

[0008] HLA基因由于其序列多样性而在细胞水平上参与自我和非自我的识别。同种异体移植时,为了减轻免疫排斥,HLA的匹配也非常重要。例如,在造血干细胞移植中,推荐找出HLA-A、HLA-B、HLA-C、HLA-DR的两个等位基因、即总计8个等位基因中的抗原性尽可能一致的供体进行移植。

[0009] 另外有报道指出,从肾脏移植等的存活率的成绩来看,HLA抗原性的一致度越高,植入效率也明显高。

[0010] 另一方面,也存在由于在细胞表面不存在HLA抗原而诱导的免疫系统。NK细胞表达多个抑制性受体。例如,已知识别HLA-E并抑制NK细胞的作用的CD94与NKG2A的复合受体,在发现不存在HLA-E的细胞时,诱导NK细胞的激活进行攻击。另外,也存在被称为KIR(杀伤细胞免疫球蛋白样受体,Killer cell Immunoglobulin-like Receptor)的受体家族,根据胞

外域的个数,分类为2D和3D,除此之外,根据胞内域的长度,分成L(长)和S(短)。已知2DL1受体识别HLA-C2,2DL2以及2DL3受体识别HLA-C1,2DL4受体识别HLA-G,3DL1识别HLA-Bw4,3DL2识别HLA-A3或HLA-A11,从而抑制NK细胞的活性。KIR中具有多型,例如有报道指出日本人几乎全部(98%以上)具有2DL1、2DL3、3DL4,但具有2DL2很稀少,为15%左右。

[0011] 另外,iPS细胞、ES细胞等多能干细胞具有能够分化成各种细胞类型的多功能性,因此,在将多能干细胞分化成各种细胞后向患者移植的、细胞治疗和/或再生医疗备受瞩目。

[0012] 实际上,已报道了如下例:由ES细胞分化成神经细胞、并移植至骨髓损伤患者的例子;由iPS细胞分化成视网膜色素上皮细胞、并移植至老年性黄斑变性患者的例子,等。具有如下报道:将上述来自多能干细胞的细胞移植时,使移植的细胞与患者的HLA型一致也很重要。

[0013] 但是,多能干细胞的建立需要很大的成本和时间,因此具有难以对每个患者准备HLA型一致的细胞的问题。作为解决该方法的问题,例如在专利文献1中记载了一种细胞,该细胞使对I类的HLA蛋白质的细胞表面呈递所必要的B2M基因缺失。

[0014] 近年来,通过使用CRISPR-Cas9以及导向RNA(gRNA)的基因组编辑技术,gRNA的目标碱基序列依赖地在基因组DNA中诱导双链DNA切割(Double strand break、DSB),从而削除基因组DNA的一部分,或者,将与双链DNA切割诱导部位附近具有部分相同序列的模板DNA与Cas9以及gRNA共导入,从而能够插入任意的DNA片段。

[0015] 但是,基因组编辑技术中的DSB诱导,取决于如下碱基序列,该碱基序列为:对目标序列进行识别结合的gRNA的20碱基左右的间隔碱基序列和3~5碱基左右的PAM序列。因此,只要gRNA的碱基序列与目标部位的碱基序列不一致,则难以进行高效的DSB诱导。

[0016] 另外,在目标部位以外也存在与目标部位的碱基序列非常相似的碱基序列、例如仅仅1碱基不同的碱基序列时,已知存在错误地在目标部位以外的部位也诱导DSB、诱导不期望的基因组序列突变的风险,即,所谓的脱靶突变风险。

[0017] 现有技术文献

[0018] 专利文献

[0019] 专利文献1:国际公开第2012/145384号

发明内容

[0020] 发明所要解决的课题

[0021] 专利文献1中记载的细胞由于缺失B2M基因,所以I类的HLA蛋白质不能呈递在细胞表面。因此,可以认为进行同种异体移植时的免疫反应被抑制。但是,如果HLA蛋白质无法呈递至细胞表面,则细胞的抗原呈递能力丧失。细胞如果失去抗原呈递能力,则在B2M缺陷细胞受到病毒等的感染时或发生肿瘤时等,无法呈递来自病毒或肿瘤的抗原,结果有可能有助于病毒以及肿瘤的繁殖。另外,对于HLA蛋白质没有呈递至细胞表面的细胞,会被识别“失去自我(missing self)”的NK细胞攻击。

[0022] 因此,认为使用基因组编辑技术仅仅选择性地破坏任意的HLA基因。但是,HLA基因存在多个,另外包括很多假基因,在相互的HLA基因之间序列的相同性高。另一方面,即使是相同的HLA基因,个体间的序列多样性也大,因此,即使鉴定出与某HLA基因序列匹配的目标

碱基序列,其也不一定能在来自其他供体的细胞中使用。因此,确定基因组编辑的适当的目标序列并不容易。另外,以往的基因组编辑技术中,要花费大量的时间查找进行目标基因组编辑的细胞。

[0023] 本发明的目的在于,提供制造在向受体进行同种异体移植时的排斥反应被降低的低抗原性细胞的技术。

[0024] 用于解决课题的技术手段

[0025] 本发明包括以下方案。

[0026] [1]一种制造方法,该制造方法是由供体细胞制造在向受体进行同种异体移植时的排斥反应被降低的低抗原性细胞的方法,该制造方法包括:分别确定上述供体细胞以及上述受体的人白细胞抗原(Human Leukocyte Antigen)(HLA)等位基因;特定在上述受体中不存在、而上述供体细胞中存在的HLA等位基因;对已特定的上述HLA等位基因进行破坏或改变,得到包含没有表达对上述供体细胞特异的HLA蛋白质的细胞的细胞群,没有表达对上述供体细胞特异的HLA蛋白质的细胞为上述低抗原性细胞。

[0027] [2]根据[1]所述的制造方法,其中,在分别确定上述供体细胞以及上述受体的上述HLA等位基因中所确定的上述HLA等位基因包括HLA-A等位基因、HLA-B等位基因以及HLA-C等位基因。

[0028] [3]根据[1]或[2]所述的制造方法,其中,在得到包含没有表达对上述供体细胞特异的HLA蛋白质的细胞的细胞群后,还包括:从上述细胞群中回收没有表达对上述供体细胞特异的HLA蛋白质的细胞,

[0029] 上述回收包括:

[0030] 使HLA蛋白质表达诱导剂与上述细胞群接触;和

[0031] 将在已与上述HLA蛋白质表达诱导剂接触的上述细胞群中的对上述供体细胞特异的HLA蛋白质的表达作为指标,从上述细胞群中回收没有表达对上述供体细胞特异的HLA蛋白质的细胞。

[0032] [4]根据[3]所述的制造方法,其中,上述HLA蛋白质表达诱导剂为干扰素(IFN)- γ 、IFN- α 、IFN- β 、白介素(IL)-4、粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)、转化生长因子(TGF)- α 或TGF- β 。

[0033] [5]根据[1]~[4]中任一项所述的制造方法,其中,上述低抗原性细胞为多能干细胞。

[0034] [6]一种在向受体进行同种异体移植时的排斥反应被降低的低抗原性细胞的检测用试剂盒,其中,包含HLA蛋白质表达诱导剂。

[0035] [7]根据[6]所述的试剂盒,其中,上述HLA蛋白质表达诱导剂为IFN- γ 、IFN- α 、IFN- β 、IL-4、GM-CSF、TGF- α 或TGF- β 。

[0036] [8]根据[6]或[7]所述的试剂盒,其中,上述低抗原性细胞为多能干细胞。

[0037] [9]一种HLA蛋白质表达诱导剂,其由IFN- γ 、IFN- α 、IFN- β 、IL-4、GM-CSF、TGF- α 或TGF- β 构成。

[0038] [10]一种细胞,其中,至少一种HLA等位基因被破坏或改变,且该细胞能够表达至少一种HLA蛋白质。

[0039] [11]根据[10]所述的细胞,其中,上述HLA等位基因包括HLA-A等位基因、HLA-B等

位基因或HLA-C等位基因。

[0040] [12]根据[10]或[11]所述的细胞,其是在向受体进行同种异体移植时的排斥反应被降低的低抗原性细胞,已破坏或改变的上述HLA等位基因为在上述受体中不存在的HLA等位基因。

[0041] [13]根据[10]~[12]中任一项所述的细胞,其为多能干细胞。

[0042] [14]根据[10]~[13]中任一项所述的细胞,其中,进一步破坏或改变了II类主要组织相容性复合物反式激活因子(CIITA)等位基因、调节因子X5(RFX5)等位基因、调节因子X相关蛋白(RFXAP)等位基因以及调节因子X相关锚蛋白(RFXANK)等位基因中至少一种等位基因。

[0043] [15]根据[10]~[14]中任一项所述的细胞,其中,HLA-A等位基因以及HLA-B等位基因被破坏,且上述细胞能够表达至少一种HLA-C蛋白质。

[0044] [16]根据[15]所述的细胞,其中,上述HLA-C蛋白质是由选自HLA-C*01:02等位基因、HLA-C*02:02等位基因、HLA-C*03:03等位基因、HLA-C*03:04等位基因、HLA-C*04:01等位基因、HLA-C*05:01等位基因、HLA-C*06:02等位基因、HLA-C*07:01等位基因、HLA-C*07:02等位基因、HLA-C*08:01等位基因、HLA-C*12:02等位基因以及HLA-C*16:01等位基因中的一种等位基因编码的蛋白质。

[0045] [17]一种制造方法,该制造方法是由供体细胞制造在向受体进行同种异体移植时的排斥反应被降低的低抗原性细胞的方法,该制造方法包括:破坏或改变上述供体细胞的包含CIITA等位基因、RFX5等位基因、RFXAP等位基因以及RFXANK等位基因中至少一种以上的等位基因,破坏或改变上述CIITA等位基因、RFX5等位基因、RFXAP等位基因或RFXANK等位基因后的细胞为上述低抗原性细胞。

[0046] [18]根据权利要求17所述的细胞,其中,上述低抗原性细胞为多能干细胞。

[0047] [19]一种细胞,其中,包含CIITA等位基因、RFX5等位基因、RFXAP等位基因以及RFXANK等位基因中至少一种以上的等位基因被破坏或改变。

[0048] [20]根据[19]所述的细胞,其为多能干细胞。

[0049] [21]一种gRNA,其将下述碱基序列作为目标碱基序列,所述碱基序列为对全HLA单倍型的基因组DNA的碱基序列数据进行映射(mapping)时只映射到一个作为目标的HLA单倍型、且对HLA等位基因以外的全基因组DNA的碱基序列数据进行映射时没有映射的碱基序列。

[0050] [22]根据[21]所述的gRNA,其中,上述目标碱基序列由序列号3、4、7、45~52、72~2459中任一项所述的碱基序列构成、或者由在序列号3、4、7、45~52、72~2459中任一项所述的碱基序列的5'末端缺失、取代或添加1个或多个碱基而成的碱基序列构成。

[0051] [23]根据[21]或[22]所述的gRNA,其中,上述目标碱基序列由序列号3、4、7、45~52中任一项所述的碱基序列构成、或者由在序列号3、4、7、45~52中任一项所述的碱基序列的5'末端缺失、取代或添加1个或多个碱基而成的碱基序列构成。

[0052] [24]根据[21]~[23]中任一项所述的gRNA,其中,上述目标碱基序列映射至HLA基因的外显子2或3。

[0053] [25]一种gRNA,其将下述碱基序列作为目标碱基序列,所述碱基序列为对全HLA单倍型的基因组DNA的碱基序列数据进行映射时映射到二个以上作为目标的HLA单倍型、且对

HLA等位基因以外的全基因组DNA的碱基序列数据进行映射时没有映射的碱基序列。

[0054] [26]根据[25]所述的gRNA,其中,上述目标碱基序列由序列号53~55、2460~8013中任一项所述的碱基序列构成、或者由在序列号53~55、2460~8013中任一项所述的碱基序列的5'末端缺失、取代或添加1个或多个碱基后的碱基序列构成。

[0055] [27]根据[25]或[26]所述的gRNA,其中,上述目标碱基序列由序列号53~55中任一项所述的碱基序列构成、或者由在序列号53~55中任一项所述的碱基序列的5'末端缺失、取代或添加1个或多个碱基而成的碱基序列构成。

[0056] [28]根据[25]~[27]中任一项所述的gRNA,其中,上述目标碱基序列映射到HLA基因的外显子2或3。

[0057] [29]一种方法,是用于通过基因组编辑来制造在向受体进行同种异体移植时的排斥反应被降低的低抗原性细胞的目标碱基序列的鉴定方法,所述方法包括:

[0058] 对全HLA单倍型的基因组DNA的碱基序列数据,映射候选碱基序列;

[0059] 对HLA等位基因以外的全基因组DNA的碱基序列数据,映射上述候选碱基序列;和

[0060] 将对全HLA单倍型的基因组DNA的碱基序列数据进行映射时只被映射到一个作为目标的HLA单倍型上、且对HLA等位基因以外的全基因组DNA的碱基序列数据进行映射时未被映射到的上述候选碱基序列,特定为目标碱基序列。

[0061] [30]一种方法,是用于通过基因组编辑来制造在向受体进行同种异体移植时的排斥反应被降低的低抗原性细胞的目标碱基序列的鉴定方法,所述方法包括:

[0062] 对全HLA单倍型的基因组DNA的碱基序列数据,映射候选碱基序列;

[0063] 对HLA等位基因以外的全基因组DNA的碱基序列数据,映射上述候选碱基序列;和

[0064] 将对全HLA单倍型的基因组DNA的碱基序列数据进行映射时映射到二个以上作为目标的HLA单倍型上、且对HLA等位基因以外的全基因组DNA的碱基序列数据进行映射时未被映射的上述候选碱基序列,特定为目标碱基序列。

[0065] 发明效果

[0066] 根据本发明,能够提供制造在向受体进行同种异体移植时的排斥反应被降低的低抗原性细胞的技术。

附图说明

[0067] 图1中,(a)是将实验例1中提取的sgRNA作为目标的HLA等位基因用维恩图所示出的图;(b)是表示实验例1中鉴定的sgRNA将HLA-A等位基因、HLA-B等位基因、HLA-C等位基因的哪个部位作为目标的图。

[0068] 图2是表示实验例2中的流式细胞仪的结果的曲线图。

[0069] 图3是表示实验例3中的流式细胞仪的结果的曲线图。

[0070] 图4中,(a)是表示实验例4中的流式细胞仪的结果的曲线图;(b)是表示实验例4中的、iPS细胞的IFN- γ 处理和HLA-A蛋白质的表达量的分析的时间表的图。

[0071] 图5中,(a)是表示实验例6中的sgRNA的目标部位以及目标碱基的图;(b)是表示实验例6中的T7核酸内切酶I测定的结果的照片。

[0072] 图6中,(a)以及(b)是表示实验例7中的流式细胞仪的结果的曲线图。

[0073] 图7是表示实验例7中的各克隆的碱基序列突变的比例的曲线图。

- [0074] 图8中, (a) 以及 (b) 是表示实验例8中的流式细胞仪的结果的曲线图。
- [0075] 图9中, (a) 以及 (b) 是表示实验例8中的流式细胞仪的结果的曲线图。
- [0076] 图10中, (a) 是表示实验例8中回收的各克隆的碱基突变模式的图; (b) 是实验例8中回收的代表例的克隆的碱基序列。
- [0077] 图11是表示实验例9中的流式细胞仪的结果的曲线图。
- [0078] 图12中, (a) 是表示实验例9中回收的各克隆的碱基突变模式的图; (b) 是实验例9中回收的代表例的克隆的碱基序列。
- [0079] 图13中, (a) 以及 (b) 是表示实验例10中回收的各克隆的碱基突变模式的图。(c) 是实验例10中回收的代表例的克隆的碱基序列。
- [0080] 图14中, (a) 是表示实验例11中回收的各克隆的碱基突变模式的图; (b) 是实验例11中回收的代表例的克隆的碱基序列。
- [0081] 图15中, (a) 是表示实验例11中的流式细胞仪的结果的曲线图; (b) 是表示实验例11中回收的各克隆的碱基突变模式的图; (c) 是实验例11中回收的代表例的克隆的碱基序列。
- [0082] 图16中, (a) 是表示实验例12中的sgRNA的目标部位的图; (b) 以及 (c) 是表示实验例12中的流式细胞仪的结果的曲线图。
- [0083] 图17中, (a) 是表示实验例12中回收的克隆的碱基突变模式的图; (b) 是实验例12中回收的克隆的碱基序列。
- [0084] 图18中, (a) 是表示实验例13中的流式细胞仪的结果的曲线图; (b) 以及 (d) 是表示实验例13中回收的各克隆的碱基突变模式的图; (c) 以及 (e) 是实验例13中回收的代表例的克隆的碱基序列。
- [0085] 图19中, (a) 以及 (b) 是表示实验例14中的流式细胞仪的结果的曲线图; (c) 是表示实验例14中回收的各克隆的碱基突变模式的图; (d) 是实验例14中回收的代表例的克隆的碱基序列。
- [0086] 图20中, (a) 是表示实验例15中的sgRNA的目标部位的图; (b) 以及 (c) 是表示实验例15中的流式细胞仪的结果的曲线图。
- [0087] 图21中, (a) 以及 (b) 是说明实验例16中的同源重组的模式图; (c) 是表示实验例15中的流式细胞仪的结果的曲线图。
- [0088] 图22中, (a) 以及 (b) 是表示实验例16中的碱基序列的分析结果的图。
- [0089] 图23中, (a) 以及 (b) 是表示实验例17中的流式细胞仪的结果的曲线图; (c) 是表示实验例17中的碱基序列的分析结果的图。
- [0090] 图24中, (a) 是表示实验例18中的流式细胞仪的结果的曲线图; (b) 是表示实验例18中的碱基序列的分析结果的图。
- [0091] 图25中, (a) ~ (e) 是表示实验例19中的流式细胞仪的结果的曲线图。
- [0092] 图26中, (a) ~ (f) 是表示实验例20中的流式细胞仪的结果的曲线图。
- [0093] 图27中, (a) ~ (e) 是表示实验例21中的流式细胞仪的结果的曲线图。
- [0094] 图28是表示实验例22的步骤的模式图。
- [0095] 图29中, (a) ~ (e) 是表示实验例22中的流式细胞仪的结果的曲线图。
- [0096] 图30是表示实验例23的步骤的模式图。

- [0097] 图31是表示实验例23的结果的曲线图。
- [0098] 图32是表示实验例24的结果的曲线图。
- [0099] 图33是表示实验例25的结果的曲线图。
- [0100] 图34中, (a) 以及 (b) 是表示实验例26中的流式细胞仪的结果的曲线图; (c) 是表示实验例26的结果的曲线图。
- [0101] 图35中, (a) ~ (g) 是表示实验例27中的流式细胞仪的结果的曲线图。
- [0102] 图36是表示实验例28的结果的曲线图。
- [0103] 图37中, (a) ~ (f) 是表示实验例29的结果的相差显微镜照片。
- [0104] 图38中, (a) ~ (f) 是表示实验例30的结果的相差显微镜照片。
- [0105] 图39中, (a) 以及 (b) 是表示实验例31中的流式细胞仪的结果的曲线图; (c) 是表示实验例31的结果的曲线图。
- [0106] 图40中, (a) 以及 (b) 是表示实验例32中的流式细胞仪的结果的曲线图; (c) 是表示实验例32的结果的曲线图。
- [0107] 图41中, (a) 是说明实验例33中的实验时间表的图; (b) 是表示实验例33中拍摄EB衍生的血细胞样细胞的荧光的结果的照片; (c) 是表示实验例33中的EB衍生的血细胞样细胞的生存率的曲线图。
- [0108] 图42中, (a) 是表示实验例34中的流式细胞仪分析的结果的曲线图; (b) 是表示实验例34的结果的曲线图。
- [0109] 图43中, (a) 是表示实验例35中的流式细胞仪分析的结果的曲线图; (b) 是表示实验例35的结果的曲线图。
- [0110] 图44中, (a) 以及 (b) 是表示实验例36中的流式细胞仪分析的结果的曲线图。
- [0111] 图45中, (a) 是说明实验例37中的实验时间表的图; (b) 是表示实验例37中拍摄EB衍生的血细胞样细胞的荧光的结果的照片; (c) 是表示实验例37中的EB衍生的血细胞样细胞的相对生存率的曲线图。
- [0112] 图46是表示实验例38的结果的曲线图。
- [0113] 图47中, (a) 是表示实验例39中使用的585A1-C7残留细胞的HLA单倍型、以及实验例39中制作的、敲除CIITA基因后的585A1-C7残留细胞的HLA单倍型的表; (b) 是表示实验例39中得到的各克隆的碱基突变模式的图; (c) 是实验例39中得到的代表例的克隆的碱基序列。
- [0114] 图48中, (a) ~ (d) 是表示实验例40中的流式细胞仪的结果的曲线图。
- [0115] 图49中, (a) ~ (c) 是表示实验例41中的流式细胞仪的结果的曲线图。
- [0116] 图50中, (a) ~ (c) 是说明实验例42的步骤的图。
- [0117] 图51中, (a) 是表示实验例42中的流式细胞仪的结果的曲线图; (b) 是表示实验例42中得到的各亚克隆的碱基突变模式的图。
- [0118] 图52中, (a) 以及 (b) 是表示实验例42中得到的各亚克隆的碱基突变模式的图。
- [0119] 图53是表示各种人种中的HLC-C等位基因的等位基因频率的表。
- [0120] 图54是表示实验例43中得到的各亚克隆的碱基突变模式的图。
- [0121] 图55是表示实验例44中得到的各亚克隆的碱基突变模式的图。
- [0122] 图56中, (a) 以及 (b) 是表示实验例45中的流式细胞仪的结果的曲线图。

- [0123] 图57是表示实验例46中的流式细胞仪的结果的曲线图。
- [0124] 图58是表示实验例47中得到的各亚克隆的碱基突变模式的图。
- [0125] 图59是表示实验例48中得到的各亚克隆的碱基突变模式的图。
- [0126] 图60是表示实验例49中得到的各亚克隆的碱基突变模式的图。

具体实施方式

[0127] [排斥反应被降低的低抗原性细胞的制造方法]

[0128] (第1实施方式)

[0129] 第1实施方式的制造方法如下：该制造方法是由供体细胞制造在向受体进行同种异体移植时的排斥反应被降低的低抗原性细胞的方法，该制造方法包括：(a) 分别确定上述供体细胞以及上述受体的HLA等位基因；(b) 特定在上述受体中不存在、而上述供体细胞中存在的HLA等位基因；和(c) 对已特定的上述HLA等位基因进行破坏或改变，得到包含没有表达对上述供体细胞特异的HLA蛋白质的细胞的细胞群，没有表达对上述供体细胞特异的HLA蛋白质的细胞为上述低抗原性细胞。

[0130] 在实施例中如下所述，根据第1实施方式的制造方法，能够制造在向受体进行同种异体移植时的排斥反应(移植物抗宿主病)被降低的低抗原性细胞。另外，在实施例中如下所述，通过第1实施方式的制造方法制造的低抗原性细胞，即使向受体进行同种异体移植时，也难以被受体的NK细胞攻击。

[0131] 本说明书中，有时将HLA基因座称为“HLA等位基因”，将呈递至细胞表面的HLA蛋白质的抗原多样性称为“HLA型”。以下，对各工序进行说明。

[0132] (工序(a))

[0133] 本工序中，分别确定供体细胞以及受体的HLA等位基因。供体细胞可以为人细胞，也可以为非人动物细胞。另外，供体细胞可以为多能干细胞，或者也可以为分化后的细胞。本说明书中，多能干细胞是指胚胎干细胞(ES细胞)、人工多能干细胞(iPS细胞)等。

[0134] 另外，通过第1实施方式的制造方法制造的低抗原性细胞为破坏或改变了供体细胞的HLA等位基因的细胞。因此，低抗原性细胞可以为与供体细胞同样的多能干细胞，也可以为分化后的细胞。

[0135] 另外，受体优选为与低抗原性细胞同种的动物。受体可以为实际上计划移植的患者，也可以为将来能成为受体的假想的具有HLA等位基因的受体。

[0136] HLA等位基因的确定，可以通过PCR-rSSO法(PCR反向序列特异性寡核苷酸，PCR-reverse Sequence Specific Oligonucleotide)、PCR-SSP(序列特异性引物，Sequence specific primer)法、PCR-SBT(序列分型，Sequence based typing)法、新一代测序方法等以往进行的方法来进行，可以使用市售的HLA分型试剂盒等进行。另外，作为由全基因组序列(WGS)、外显子组序列(WES)、RNA-seq等新一代定序仪的序列数据进行HLA分型的软件，已知HLAreporter、HLA-PRG、hla-genotyper、PHLAT、Optitype、neXtype、Athlates、HLAforest、SOAP-HLA、HLAminer、seq2HLA、GATK HLA Caller等。

[0137] 本工序中确定的HLA等位基因优选为与进行细胞移植时的排斥反应关联性高的HLA等位基因，优选包含HLA-A等位基因、HLA-B等位基因以及HLA-C等位基因。

[0138] 本工序中确定的HLA等位基因还可以包含HLA-DR等位基因、HLA-DQ等位基因、HLA-

DP等位基因,也可以进一步包含其他HLA等位基因。

[0139] (工序(b))

[0140] 本工序中,特定在受体中不存在而供体细胞中存在的HLA等位基因(以下,有时称为“供体特异的HLA等位基因”)。供体特异的HLA等位基因通过将供体细胞的HLA等位基因以及受体的HLA等位基因进行比较来特定。

[0141] HLA等位基因是在基因组DNA上编码而成的碱基序列,编码HLA蛋白质。将HLA蛋白质的血清学的分类称为HLA抗原型。作为HLA抗原型的特定方法,可以列举出:对与识别特定的HLA抗原型的血清或抗体的反应性进行分析的方法;将HLA等位基因的DNA或由HLA等位基因转录的RNA的碱基序列与已知的对应表或IPD-IMGT数据库(<https://www.ebi.ac.uk/ipd/imgt/hla/>)等对照的方法等。

[0142] 对于HLA抗原型,通常情况下,虽然也有时是指HLA等位基因符号(<http://hla.alleles.org/nomenclature/naming.html>)的第1区域(2位数字符号)的区别,但本说明书中,即使在血清学上为相同的HLA抗原型,在氨基酸序列不同时(非同义取代)也判断为不同的HLA等位基因。

[0143] 具体而言,根据HLA等位基因符号的第1区域以及第2区域(4位数字符号)的区别判断是相同的HLA等位基因还是不同的HLA等位基因。另外,HLA等位基因符号的第1区域以及第2区域一致的HLA等位基因判断为相同的HLA等位基因。另外,确定基因组编辑的目标序列的情况等、需要区别基因组的碱基序列的情况下,有时也考虑第3区域(没有伴随氨基酸突变的翻译区域内部的碱基取代)、第4区域(在翻译区域外的碱基取代)的区别。

[0144] (工序(c))

[0145] 将具有在受体中不存在的HLA抗原型的HLA蛋白质的细胞向受体进行同种异体移植时,发生排斥反应,所移植的细胞被排斥。因此,本工序中,破坏或改变供体特异的HLA等位基因,得到包含没有表达对上述供体细胞特异的HLA蛋白质(以下,有时称为“供体特异的HLA蛋白质”)的细胞的细胞群。

[0146] 在此,没有表达供体特异的HLA蛋白质的细胞是指:由于供体细胞的HLA等位基因的破坏而特定的HLA蛋白质的表达成为阴性的细胞;或者,由于供体细胞的HLA等位基因的改变而从特定的HLA型变为其他HLA型的细胞。

[0147] 通过本工序得到的、没有表达供体特异的HLA蛋白质的细胞为低抗原性细胞。需要说明的是,不存在供体特异的HLA蛋白质时,不需要本工序。

[0148] 通过第1实施方式的制造方法制造的低抗原性细胞优选B2M基因没有被破坏。由此,I类的HLA蛋白质呈递至细胞表面,即使将低抗原性细胞向受体进行同种异体移植时,也难以被受体的NK细胞攻击。另外,仅仅一部分HLA被破坏,其余的HLA仍保持抗原呈递能力,因此,即使在该细胞发生病毒感染的情况下或产生肿瘤的情况下,也能够维持抗原呈递能力。

[0149] 〈基因组编辑〉

[0150] 在实施例中如下所述,供体细胞的HLA等位基因的破坏或改变,可以通过例如基因组编辑来进行。HLA等位基因的破坏可以通过特异性地切割HLA等位基因并诱导双链DNA切割(DSB)来进行。在DSB的修复过程中缺失或添加碱基而发生移码突变的情况下,HLA等位基因被破坏,HLA蛋白质不再表达。本说明书中,有时将HLA等位基因的破坏称为HLA等位基因

的敲除。

[0151] 另外,在供体DNA的存在下特异性地切割HLA等位基因来诱导DSB,由此能够在DSB的修复过程中诱导同源重组,而改变HLA等位基因。具体而言,例如,在实施例如下所述,能够将HLA-A*02:07等位基因改变为HLA-A*01:01等位基因,等。

[0152] 作为供体DNA,可以使用与包含基因组DNA的双链DNA切割位置前后的区域具有序列相同性、并且对期望的HLA等位基因进行编码的DNA。供体DNA可以为单链DNA,也可以为双链DNA。另外,供体DNA可以为具有单一碱基序列的DNA,也可以为具有多个碱基序列的DNA的混合物。

[0153] 在此,具有序列相同性是指:在供体DNA与包括作为目标的基因组DNA的双链切割位置的区域之间90%以上的碱基序列一致。供体DNA与包括基因组DNA的双链切割位置的区域,优选95%以上的碱基序列一致,更优选99%以上的碱基序列一致。

[0154] 供体DNA可以为50~5000碱基左右的单链DNA,也可以为50~5000碱基对左右的双链DNA。供体DNA为单链DNA的情况下,供体DNA可以与基因组DNA的双链中的任意链具有序列相同性。

[0155] 〈序列特异的DNA切割酶〉

[0156] 通常,对于为了诱导DSB进行基因组编辑而利用的序列特异的DNA切割酶,大致分为RNA诱导型核酸酶和人工核酸酶。序列特异的DNA切割酶可以为RNA诱导型核酸酶,也可以为人工核酸酶。

[0157] 序列特异的DNA切割酶,只要将基因组DNA进行目标序列特异地切割而形成双链切割,则没有特别限定。序列特异的DNA切割酶识别的目标序列的长度可以为例如10~60碱基左右。

[0158] 另外,对于序列特异的DNA切割酶,例如也可以为组合多个切口酶切割DNA的形态。在此,切口酶是指在双链DNA中的一条链上形成切口的酶。例如,在基因组DNA上的接近的位置处,在双链DNA的两条链上形成切口,由此能够形成双链切割。

[0159] RNA诱导型核酸酶是成为导向的短链RNA与目标序列结合并募集具有2个DNA切割结构域(核酸酶结构域)的核酸酶、从而诱导序列特异的切割的酶。作为RNA诱导型核酸酶,可以列举出CRISPR-Cas家族蛋白。CRISPR-Cas家族蛋白大致分类为1类和2类,1类中包括I型、III型以及IV型,2类中包括II型、V型以及VI型。

[0160] 作为CRISPR-Cas家族蛋白,可以列举出例如Cas9、Cpf1、CasX、CasY、Cas12、Cas13、C2C2等。RNA诱导型核酸酶可以为CRISPR-Cas家族蛋白的同系物,也可以为CRISPR-Cas家族蛋白被改变后的核酸酶。例如,也可以为将存在2个的野生型的核酸酶结构域中的一个改变为非活性型而成的、切口酶改变型的核酸酶。或者,也可以为目标特异性提高的Cas9-HF或HiFi-Cas9、eCas9等。

[0161] 对于Cas9,例如可以列举出来自化脓性链球菌、金黄色葡萄球菌、嗜热链球菌(*Streptococcus thermophilus*)、嗜热脂肪芽孢杆菌(*Geobacillus stearothermophilus*)等的Cas9。作为Cpf1,例如可以列举出来自氨基酸球菌属(*Acidaminococcus*)、毛螺菌属(*Lachnospira*)、衣藻属(*Chlamydomonas*)、新凶手弗朗西丝氏菌(*Francisella-tovomida*)等的Cpf1。

[0162] 人工核酸酶是具有以与目标序列特异性地结合的方式设计/制作的DNA结合结构

域、和核酸酶结构域(作为限制酶的FokI的DNA切割结构域等)的人工限制酶。作为人工核酸酶,可以列举出锌指核酸酶(ZFN)、转录激活因子样效应物核酸酶(TALEN)、兆碱基大范围核酸酶(Meganuclease)等,但不限于这些。

[0163] 〈序列特异的DNA切割酶的导入〉

[0164] 作为向供体细胞中导入的序列特异的DNA切割酶,例如在使用CRISPR-Cas的情况下,目标碱基序列由gRNA确定。关于gRNA的细节之后叙述。gRNA可以以RNA的形态导入供体细胞中,也可以以表达载体的形态导入供体细胞中,使其在细胞内表达。

[0165] 作为以RNA的形态制备gRNA的方法,可以列举出:构建在编码gRNA的核酸片段的上游添加T7等启动子的构建体、通过试验管内转录反应合成的方法、化学合成的方法等。化学合成gRNA的情况下,可以使用化学修饰后的RNA。

[0166] 作为表达载体,可以列举出:由H1启动子或U6启动子等Pol III启动子转录gRNA的质粒载体或病毒载体。使用表达载体使gRNA表达的情况下,可以使gRNA始终表达,也可以使其在表达诱导型启动子的控制下表达。

[0167] 接着,准备Cas9。Cas9可以以由Pol II启动子表达的载体的形态导入供体细胞中,也可以以精制蛋白质的形态导入供体细胞中。作为表达载体,可以列举出转座子载体、病毒载体、附加型载体(Episomal vector)、质粒载体等。

[0168] 对于gRNA以及Cas9向供体细胞中的导入,在gRNA以及Cas9为病毒载体的形态的情况下,可以仅仅添加到供体细胞的培养基中。作为病毒载体,可以列举出例如腺相关病毒载体、腺病毒载体、逆转录病毒载体、慢病毒载体、仙台病毒载体、杆状病毒载体等。

[0169] gRNA以及Cas9为转座子载体、附加型载体、质粒载体等的情况下,或gRNA为RNA、Cas9为精制蛋白质的情况下,可以通过转染试剂或电穿孔法导入供体细胞中。

[0170] 作为转染试剂,可以利用例如Lipofectamine 2000、Lipofectamine3000、CRISPRMAX、RNAMAX(均来自THERMO FISHER SCIENTIFIC公司)、FuGENE 6、FuGENE HD(均来自Promega公司)等。

[0171] 另外,电穿孔法可以利用NEPA21(Neppagene株式会社)、Neon(THERMO FISHER SCIENTIFIC公司)、4D-Nucleofector(Lonza公司)等设备来进行。

[0172] (工序(d))

[0173] 工序(c)中,可以得到包含没有表达供体特异的HLA蛋白质的、低抗原性细胞的细胞群。但是,工序(c)中得到的细胞群,除了作为目标的HLA等位基因被破坏或改变而成的细胞(低抗原性细胞)以外,有时还包括HLA等位基因没有发生破坏或改变的细胞、HLA等位基因没有完全发生破坏或改变的细胞等。因此,工序(c)后,也可以进一步实施工序(d),即,回收没有表达供体特异的HLA蛋白质的细胞(低抗原性细胞)。

[0174] 工序(d)包括:使HLA蛋白质的表达诱导剂(HLA蛋白质表达诱导剂)与包含低抗原性细胞的细胞群接触的工序;和将已与上述HLA蛋白质表达诱导剂接触的上述细胞群中的上述供体特异的HLA蛋白质的表达作为指标,从上述细胞群中回收没有表达上述供体特异的HLA蛋白质的细胞的工序。使HLA蛋白质表达诱导剂与细胞群接触的工序,例如可以通过在细胞群的培养基中添加HLA蛋白质表达诱导剂等来进行。

[0175] 本工序中,对于以供体特异的HLA蛋白质的表达作为指标、从上述细胞群中回收没有表达供体特异的HLA蛋白质的细胞,也可以是检测所表达的HLA蛋白质的存在,基于其存

在或不存在来回收没有表达供体特异的HLA蛋白质的细胞。

[0176] 作为HLA蛋白质表达诱导剂,可以列举出IFN- γ 、IFN- α 、IFN- β 、IL-4、GM-CSF、TGF- α 、TGF- β 等细胞因子。这些表达诱导剂可以单独使用一种,也可以混合使用二种以上。

[0177] 上述细胞因子在向人细胞中使用时优选为来自人的细胞因子。人IFN- γ 蛋白质的NCBI登记号为NP_000610.2等,人IFN- α 蛋白质的NCBI登记号为NP_076918.1、NP_000596.2、NP_066546.1等,人IFN- β 蛋白质的NCBI登记号为NP_002167.1等,人IL-4蛋白质的NCBI登记号为NP_000580.1、NP_758858.1、NP_001341919.1等,人GM-CSF蛋白质的NCBI登记号为NP_000749.2等,人TGF- α 蛋白质的NCBI登记号为NP_001093161.1、NP_003227.1、NP_001295088.1、NP_001295087.1等,人TGF- β 蛋白质的NCBI登记号为NP_000651.3、XP_011525544.1等。

[0178] 上述细胞因子只要具有诱导HLA蛋白质的表达的活性即可,也可以相对于上述各登记号中记载的氨基酸序列具有突变。更具体而言,也可以具有相对于上述各登记号中记载的氨基酸序列缺失、取代或添加1个或多个氨基酸而成的氨基酸序列。在此,1个或多个氨基酸可以为例如1~10个氨基酸、例如1~5个氨基酸、例如1~3个氨基酸。上述细胞因子还可以具有除去信号肽后的氨基酸序列。

[0179] 已知多能干细胞在通常未分化状态下在细胞表面上不表达HLA蛋白质,难以检测HLA蛋白质。为了呈递HLA蛋白质,需要进行分化诱导。但是,分化诱导工艺通常烦杂,也耗费时间。另外,一次分化诱导后的细胞不自发地恢复至未分化状态,因此,即使回收HLA蛋白质阴性的分化细胞群,其也不再是多能干细胞。

[0180] 针对于此,本发明的发明人们发现,通过使上述HLA蛋白质表达诱导剂作用于多能干细胞,能够在维持多能干细胞的的多能性的状态下诱导HLA蛋白质的表达。

[0181] 由此,能够诱导工序(d)中得到的细胞群中的HLA蛋白质的表达,高效地检测作为目标的HLA等位基因被破坏或改变的多能干细胞(低抗原性细胞)并进行回收。

[0182] 例如,诱导细胞中的HLA蛋白质的表达后,将细胞用抗HLA蛋白质抗体染色,由此可以通过流式细胞仪区别HLA表达细胞或非表达细胞,通过分选进行回收。

[0183] 或者,也可以使抗HLA蛋白质抗体吸附在磁珠上,使其与HLA蛋白质表达细胞接触,使用磁力,回收磁珠结合的细胞。

[0184] 或者,也可以将表达培养皿上的特定的HLA蛋白质的细胞用抗HLA蛋白质抗体等进行标识,通过抽吸或激光照射等除去不需要的目标外细胞,从而仅回收作为目标的低抗原性细胞。

[0185] 或者,也可以将识别目标外的HLA蛋白质的T细胞混合在培养皿上的HLA蛋白质表达细胞中,仅对表达目标外的HLA蛋白质的细胞进行攻击,将其除去,从而仅回收作为目标的低抗原性细胞。

[0186] 第1实施方式的制造方法还可以包含如下工序,即,进一步破坏或改变供体细胞的CIITA等位基因、RFX5等位基因、RFXAP等位基因以及RFXANK等位基因中至少一种等位基因的工序。CIITA基因是编码II类主要组织相容性复合物反式激活因子蛋白质的基因。另外,RFX5基因是编码调节因子X5蛋白质的基因。另外,RFXAP基因是编码调节因子X相关蛋白的基因。另外,RFXANK基因是编码调节因子X相关锚蛋白的基因。

[0187] CIITA基因与RFX5基因、RFXAP基因、RFXANK基因一起编码控制HLA II类的转录活

性化的转录因子。因此,CIITA等位基因、RFX5等位基因、RFXAP等位基因、RFXANK等位基因中至少一种被破坏后的细胞,不表达HLA II类蛋白质,向受体进行同种异体移植时的排斥反应被进一步降低。

[0188] 人CIITA基因的NCBI登记号为NM_000246.3、NM_001286402.1、NM_001286403.1等,人RFX5基因的NCBI登记号为NM_000449.3、NM_001025603.1等,人RFXAP基因的NCBI登记号为NM_000538.3等,人RFXANK基因的NCBI登记号为NM_001278727.1、NM_001278728.1、NM_003721.3、NM_134440.2等。

[0189] (第2实施方式)

[0190] 第2实施方式的制造方法,是由供体细胞制造在向受体进行同种异体移植时的排斥反应被降低的低抗原性细胞的制造方法,该制造方法包括:破坏或改变上述供体细胞的包含CIITA等位基因、RFX5等位基因、RFXAP等位基因以及RFXANK等位基因中至少一种以上的等位基因,上述包含CIITA等位基因、RFX5等位基因、RFXAP等位基因以及RFXANK等位基因中至少一种以上的等位基因被破坏或改变的细胞为上述低抗原性细胞。本实施方式的制造方法主要在不破坏HLA等位基因的方面与上述第1实施方式的制造方法不同。

[0191] 如上所述,已知CIITA基因、RFX5基因、RFXAP基因以及RFXANK基因的表达对II类的HLA蛋白质的表达是必须的。因此,CIITA等位基因、RFX5等位基因、RFXAP等位基因、RFXANK等位基因中至少一种被破坏后的细胞不表达HLA II类蛋白质,在向受体进行同种异体移植时的排斥反应被降低。

[0192] 第2实施方式的制造方法中,供体细胞可以为与上述同样的多能干细胞,也可以为分化后的细胞。

[0193] 另外,受体优选为与低抗原性细胞同种的动物。受体可以为实际上已计划移植的患者,也可以为希望将来成为受体的假想的具有HLA等位基因的受体。

[0194] 另外,如上所述,对于破坏了B2M等位基因的细胞,即使HLA等位基因为野生型也不表达HLA I类蛋白质。第2实施方式的制造方法还可以包含破坏供体细胞的B2M等位基因的工序。

[0195] 供体细胞的CIITA等位基因或B2M等位基因的破坏,可以通过例如基因组编辑进行。关于基因组编辑与上述同样。

[0196] [低抗原性细胞的检测用试剂盒]

[0197] 在一实施方式中,本发明提供一种向受体进行同种异体移植时的排斥反应被降低的低抗原性细胞的检测用试剂盒,其中,包含HLA蛋白质表达诱导剂。通过本实施方式的试剂盒,可以检测低抗原性细胞并进行回收。因此,本实施方式的试剂盒也可以称为低抗原性细胞的回收用试剂盒。

[0198] 本实施方式的试剂盒中,HLA蛋白质表达诱导剂与上述同样,可以列举出IFN- γ 、IFN- α 、IFN- β 、IL-4、GM-CSF、TGF- α 、TGF- β 等细胞因子。本实施方式的试剂盒可以包含这些表达诱导剂中的单独1种,也可以包含2种以上。

[0199] 在本实施方式的试剂盒中,低抗原性细胞也可以为多能干细胞。在实施例如下所述,利用本实施方式的试剂盒,即使在低抗原性细胞为多能干细胞的情况下,也可以在维持低抗原性细胞的多能性的状态下诱导HLA蛋白质的表达。

[0200] [细胞]

[0201] (第1实施方式)

[0202] 第1实施方式中的细胞是至少一种HLA等位基因被破坏或改变、且能够表达至少一种HLA蛋白质的细胞。第1实施方式的细胞可以为多能干细胞,也可以为分化后的细胞。第1实施方式的细胞中,被破坏或改变的至少一种HLA等位基因优选为I类HLA等位基因。

[0203] 多能干细胞通常HLA蛋白质的表达弱。在此,表达弱是指:例如在用抗HLA蛋白质抗体将细胞染色进行流式细胞仪分析的情况下,无法明确地检测HLA蛋白质的表达。

[0204] 但是,在实施例中如下所述,如果使HLA蛋白质表达诱导剂与多能干细胞接触,则HLA蛋白质的表达增强。第1实施方式的细胞中,所谓“能够表达至少一种HLA蛋白质”是指为如下细胞,即,即使细胞为多能干细胞等、通常HLA蛋白质的表达弱的细胞时,也可以通过例如使上述HLA蛋白质表达诱导剂接触而使得HLA蛋白质的表达增强。另外,第1实施方式的细胞也可以为进行分化、表达HLA蛋白质的细胞。

[0205] 在实施例中如下所述,例如,对于破坏了B2M等位基因的细胞,即使HLA等位基因为野生型也不表达HLA I类蛋白质。第1实施方式的细胞不包含这样的细胞。

[0206] 第1实施方式的细胞中,被破坏或改变的HLA等位基因优选包含I类HLA等位基因,优选包含HLA-A等位基因、HLA-B等位基因或HLA-C等位基因。

[0207] 第1实施方式的细胞表达至少一种I类HLA蛋白质,因此,即使向受体进行同种异体移植时,也难以被受体的NK细胞攻击。在此,作为至少一种I类HLA蛋白质,可以列举出HLA-C蛋白质、HLA-E蛋白质、HLA-G蛋白质等。第1实施方式的细胞,仅仅一部分HLA被破坏,其余HLA保持抗原呈递能力,因此,即使该细胞发生病毒感染时或产生肿瘤时,也能够维持抗原呈递能力。

[0208] 第1实施方式的细胞是在向受体进行同种异体移植时的排斥反应被降低的低抗原性细胞,被破坏或改变的上述HLA等位基因也可以为在上述受体中不存在的HLA等位基因。上述低抗原性细胞在向受体进行同种异体移植时的排斥反应降低。

[0209] 第1实施方式的低抗原性细胞优选为与受体同种的细胞,可以为人细胞,也可以为非人动物细胞。受体可以为实际上已经计划移植的患者,也可以为期望将来能成为受体的假想的具有HLA等位基因的受体。

[0210] 对于第1实施方式的细胞,包含CIITA等位基因、RFX5等位基因、RFXAP等位基因以及RFXANK等位基因中至少一种以上的等位基因也可以进一步被破坏或改变。如上所述,已知CIITA基因、RFX5基因、RFXAP基因以及RFXANK基因的表达对II类的HLA蛋白质的表达是必须的。因此,CIITA等位基因、RFX5等位基因、RFXAP等位基因、RFXANK等位基因中至少一种被破坏后的细胞不表达HLA II类蛋白质,向受体进行同种异体移植时的排斥反应进一步降低。

[0211] (第2实施方式)

[0212] 第2实施方式中的细胞是包含CIITA等位基因、RFX5等位基因、RFXAP等位基因以及RFXANK等位基因中至少一种以上的等位基因被破坏或改变的细胞。如上所述,包含CIITA等位基因、RFX5等位基因、RFXAP等位基因、RFXANK等位基因中至少一种以上的等位基因被破坏或改变的细胞,是不表达HLA II类蛋白质、向受体进行同种异体移植时的排斥反应降低的低抗原性细胞。

[0213] 第2实施方式中的细胞可以表达HLA I类蛋白质。第2实施方式的细胞存在对向受体

的同种异体移植有用的情况。

[0214] 第2实施方式的细胞可以为多能干细胞,也可以为分化后的细胞。另外,如上所述,破坏了B2M等位基因的细胞,即使HLA等位基因为野生型也不表达HLAI类蛋白质。对于第2实施方式的细胞而言,除了CIITA等位基因、RFX5等位基因、RFXAP等位基因、RFXANK等位基因中至少一种之外,还可以进一步破坏B2M等位基因。

[0215] 第2实施方式的低抗原性细胞优选为与受体同种的细胞,可以为人细胞,可以为非人动物细胞。受体可以为实际上已计划移植的患者,也可以为希望将来成为受体的假想的具有HLA等位基因的受体。

[0216] (低抗原性细胞的用途)

[0217] 上述第1实施方式以及第2实施方式的细胞是向受体进行同种异体移植时的排斥反应被降低的低抗原性细胞。因此,能够在细胞治疗、再生医疗中利用。

[0218] 低抗原性细胞为多能干细胞的情况下,例如,也可以在分化成神经细胞、肝细胞、胰岛细胞、心肌细胞、肾细胞、造血干细胞、细胞毒性T细胞等之后,向患者移植。

[0219] 另外,也可以向低抗原性细胞进行基因导入后,向患者移植。可以列举出例如:使多能干细胞分化成T细胞后,将嵌合抗原受体(CAR)进行基因导入,作为CAR-T细胞向癌症患者等移植等。

[0220] [目标碱基序列的特定方法]

[0221] (第1实施方式)

[0222] 在一实施方式中,本发明提供一种方法,该方法是目标碱基序列的特定方法,用于通过基因组编辑来制造向受体进行同种异体移植时的排斥反应被降低的低抗原性细胞,该方法包括:对全HLA单倍型的基因组DNA的碱基序列数据,映射候选碱基序列;对HLA等位基因以外的全基因组DNA的碱基序列数据,映射上述候选碱基序列;和,将对全HLA单倍型的基因组DNA的碱基序列数据进行映射时只映射到一个作为目标的HLA单倍型上、且对HLA等位基因以外的全基因组DNA的碱基序列数据进行映射时没有映射到的上述候选碱基序列,特定为目标碱基序列。

[0223] 通过第1实施方式的方法,能够特定下述第1实施方式的gRNA的目标碱基序列。如下所述,第1实施方式的gRNA能够以特定的HLA单倍型特异性地诱导DSB,脱靶突变导入的风险也低。

[0224] 如上所述,HLA基因具有多个假基因,彼此的HLA基因序列的相同性高,而且在个体间的序列多样性大。因此,使用序列特异的DNA切割酶的基因组编辑的适当目标碱基序列不容易确定。

[0225] 对于HLA基因特异的序列特异的DNA切割酶的目标碱基序列的特定,例如可以如下进行。首先,获得全HLA单倍型的基因组DNA的碱基序列数据(已知的全部HLA基因的碱基序列数据)。全部HLA基因的碱基序列数据可以从例如IPD-IMGT/HLA数据库(<https://www.ebi.ac.uk/ipd/imgt/hla/>)获得。本数据库中,截至2017年7月注册了12544件HLAI类基因的碱基序列和4622件的HLAII类基因的碱基序列。

[0226] 接着,从各HLA等位基因的碱基序列中提取所用的序列特异的DNA切割酶的目标碱基序列。例如,使用CRISPR-Cas作为序列特异的DNA切割酶的情况下,提取包含3~5碱基左右的PAM序列(例如,为来自化脓性链球菌的Cas9的情况下“NGG”、为来自氨基酸球菌属的

Cpf1的情况下“TTTN”)的、可作为gRNA的目标碱基序列使用的碱基序列,作为候选碱基序列。

[0227] 本实施方式的方法中,目标碱基序列包含PAM序列。包含PAM序列的目标碱基序列的长度根据序列特异的DNA切割酶而不同。例如,序列特异的DNA切割酶为来自化脓性链球菌Cas9时,包含PAM序列的目标碱基序列的长度优选为19~33碱基,更优选为20~24碱基。另外,序列特异的DNA切割酶为来自氨基酸球菌属的Cpf1时,包含PAM序列的目标碱基序列的长度优选为20~34碱基,更优选为约24碱基。

[0228] 接着,对全HLA单倍型的基因组DNA的碱基序列数据映射包含PAM序列的候选碱基序列。

[0229] 所谓映射是指如下操作,即,特定在参考碱基序列(在此是指全HLA单倍型的基因组DNA的碱基序列数据)上的、查询碱基序列(在此是指候选碱基序列)的序列相同性高的位置。查询碱基序列与参考碱基序列的序列相同性优选为90%以上,更优选为95%以上,进一步优选为99%以上,特别优选为100%。

[0230] 在此,查询碱基序列相对于参考碱基序列的序列相同性,例如可以如下求得。首先,对参考碱基序列以及查询碱基序列进行对比。接着,在参考碱基序列以及查询碱基序列中,计算出一致的碱基的碱基数,可以根据下述式(1)求出序列相同性。

[0231] 序列相同性(%) = 一致的碱基数/查询碱基序列的总碱基数 × 100 (1)

[0232] 在实施例中如下所述,映射可以使用例如Bowtie程序(<http://bowtie-bio.sourceforge.net/index.shtml>)来进行。另外,映射可以使用BWA、BLAST、BLAT、SOAP、Novoalign、TopHat等、Bowtie程序以外的序列相同性(序列同一性)检索程序进行。

[0233] 接着,对HLA等位基因以外的全基因组DNA的碱基序列数据映射上述候选碱基序列。作为全基因组DNA的碱基序列数据,可以使用参考·人基因组序列(Hg19)等。另外,映射中可以使用Bowtie程序、Bowtie程序以外的序列相同性检索程序。

[0234] 接着,将对全HLA单倍型的基因组DNA的碱基序列数据进行映射时只映射到一个目标HLA单倍型上、且对HLA等位基因以外的全基因组DNA的碱基序列数据进行映射时没有映射到的候选碱基序列,特定为目标碱基序列。在此,所谓目标HLA单倍型是指破坏或改变的对象HLA单倍型。

[0235] 在实施例中如下所述,将通过第1实施方式的方法特定的目标碱基序列作为目标碱基序列的gRNA(下述第1实施方式的gRNA),能够以作为目标的特定HLA单倍型特异性地诱导DSB,脱靶突变导入的风险也低。

[0236] HLA基因大多情况下由8个外显子构成,但目标碱基序列优选将HLA基因的蛋白质编码区域作为目标。对于目标碱基序列,优选将编码HLA蛋白质的胞外结构域的外显子1、2、3或4作为目标,特别优选将外显子2或3作为目标。

[0237] 或者,在2个部位设定目标碱基序列时,也能够大幅删除其之间的碱基序列。为了对其进行利用,可以设计2个以上目标碱基序列使其包含编码HLA基因的蛋白质的基因区域。

[0238] 另外,对于目标碱基序列,优选不将HLA基因以外的其他基因组区域或线粒体DNA作为目标。另外,即使允许数个碱基错配时,也优选选择将HLA基因以外的区域作为目标的部位少的目标碱基序列。

[0239] (第2实施方式)

[0240] 在一实施方式中,本发明提供一种方法,该方法为目标碱基序列的特定方法,用于通过基因组编辑来制造在向受体进行同种异体移植时的排斥反应被降低的低抗原性细胞,该方法包括:对全HLA单倍型的基因组DNA的碱基序列数据映射候选碱基序列;对HLA等位基因以外的全基因组DNA的碱基序列数据映射上述候选碱基序列;和,将对全HLA单倍型的基因组DNA的碱基序列数据进行映射时映射到二个以上的目标HLA单倍型上、且对HLA等位基因以外的全基因组DNA的碱基序列数据进行映射时没有映射到的上述候选碱基序列,特定为目标碱基序列。

[0241] 第2实施方式的方法主要在以下方面与上述第1实施方式的方法不同,即,将对全HLA单倍型的基因组DNA的碱基序列数据进行映射时映射到二个以上的目标HLA单倍型上的候选碱基序列特定为目标碱基序列。

[0242] 第2实施方式的方法中,关于候选碱基序列、全HLA单倍型的基因组DNA的碱基序列数据、全基因组DNA的碱基序列数据、映射,与上述第1实施方式的方法相同。

[0243] 通过本实施方式的方法,能够特定下述第2实施方式的gRNA的目标碱基序列。如下所述,第2实施方式的gRNA能够切割多个作为目标的HLA基因(或等位基因)。因此,能够减少在破坏或改变多个HLA基因时所必要的gRNA的种类。由此,能够减少制作gRNA的成本。另外,通过减少所使用的gRNA的种类,也能够减少脱靶突变导入的风险。

[0244] [gRNA]

[0245] (第1实施方式)

[0246] 在一实施方式中,本发明提供一种gRNA,该gRNA将下述碱基序列作为目标碱基序列,所述碱基序列在对全HLA单倍型的基因组DNA的碱基序列数据进行映射时只映射到一个目标HLA单倍型上、对HLA等位基因以外的全基因组DNA的碱基序列数据进行映射时没有映射到。

[0247] 第1实施方式的gRNA能够以特定的HLA单倍型特异性地诱导DSB,脱靶突变导入的风险也低。

[0248] 本实施方式中,gRNA可以为CRISPR RNA(crRNA)与反式活性化型CRISPR RNA(tracrRNA)的复合体,也可以为使tracrRNA与crRNA组合而成的单一的合成gRNA(sgRNA)。任意结构的gRNA都能够目标碱基序列特异性地诱导DSB。

[0249] 目标碱基序列优选为通过上述方法特定的序列。如上所述,本说明书中,目标碱基序列为包含PAM序列的碱基序列。因此,将从目标碱基序列中除去PAM序列后的碱基序列用于crRNA或sgRNA的间隔碱基序列。

[0250] 本实施方式的gRNA为sgRNA时,sgRNA的碱基序列可以为如下的碱基序列。

[0251] 首先,将从目标碱基序列中除去PAM序列后的碱基序列作为间隔碱基序列。接着,在间隔碱基序列的3'末端设计连结有Scaffold序列的碱基序列。作为Scaffold序列,可以使用例如序列号39所记载的碱基序列,但不限于此。

[0252] 序列号39所记载的碱基序列只要作为Scaffold序列发挥作用即可,也可以为在序列号39所记载的碱基序列中缺失、取代或添加1个或多个碱基而成的碱基序列。在此,1个或多个碱基可以为例如1~10碱基、例如1~5碱基、例如1~3碱基。

[0253] 设计的sgRNA可以通过化学合成等制备.sgRNA可以作为RNA制备直接导入供体细

胞中,也可以作为DNA制备,组入表达载体中,以表达载体的形态导入供体细胞中,使其在细胞内表达。

[0254] 使sgRNA在细胞内表达时,可以使用U6启动子、H1启动子等聚合酶III启动子。此时,为了使转录效率提高,也可以将sgRNA的5'末端的碱基序列变更为G或GG。即使将sgRNA的5'末端的碱基序列变更为G或GG,对Cas9的切割活性也几乎没有影响。

[0255] 例如,从目标碱基序列中除去PAM序列后的碱基序列为“5'-NNNNNNNNNNNNNNNNNN-3'”(序列号62)时,将目标碱基序列特异地切割的sgRNA的碱基序列可以为“5'-NNNNNNNNNNNNNNNNNNNGUUUUAGAGCUAGAAAAGCAAGUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUUUU-3'”(序列号63)。

[0256] 本实施方式的gRNA也可以为crRNA与tracrRNA的复合体。另外,crRNA以及tracrRNA可以直接导入供体细胞中,也可以以表达载体的形态导入供体细胞中,使其在细胞内表达。使crRNA以及tracrRNA在细胞内表达时,可以使用U6启动子、H1启动子等聚合酶III启动子。此时,为了使转录效率提高,也可以将crRNA或tracrRNA的5'末端的碱基序列变更为G或GG。即使将crRNA或tracrRNA的5'末端的碱基序列变更为G或GG,对Cas9的切割活性也几乎没有影响。

[0257] 本实施方式的gRNA为crRNA与tracrRNA的复合体时,crRNA以及tracrRNA的碱基序列可以为如下的碱基序列。

[0258] 首先,将从目标碱基序列中除去PAM序列后的碱基序列作为间隔碱基序列。接着,在间隔碱基序列的3'末端设计连接有Scaffold序列的碱基序列,制成crRNA的碱基序列。例如,从目标碱基序列中除去PAM序列后的碱基序列为“5'-NNNNNNNNNNNNNNNNNN-3'”(序列号62)时,crRNA的碱基序列可以为“5'-NNNNNNNNNNNNNNNNNNNGUUUUAGAGCUAUGCUGUUUUG-3'”(序列号64)。另外,tracrRNA的碱基序列可以为例如“5'-CAAAACAGCAUAGCAAGUAAAAUAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGC-3'”(序列号65)。

[0259] crRNA的碱基序列只要作为crRNA发挥作用即可,也可以相对于序列号64所记载的碱基序列具有突变。更具体而言,也可以为在序列号64所记载的碱基序列中缺失、取代或添加1个或多个碱基而成的碱基序列。在此,1个或多个碱基可以为例如1~10碱基、例如1~5碱基、例如1~3碱基。

[0260] 另外,tracrRNA的碱基序列只要作为tracrRNA发挥作用即可,也可以为在序列号65所记载的碱基序列中缺失、取代或添加1个或多个碱基而成的碱基序列。在此,1个或多个碱基可以为例如1~10碱基、例如1~5碱基、例如1~3碱基。

[0261] 设计的crRNA以及tracrRNA可以通过化学合成等制备。crRNA以及tracrRNA可以作为RNA制备,直接导入供体细胞中,也可以作为DNA制备,组入表达载体中,以表达载体的形态导入供体细胞中,使其在细胞内表达。

[0262] 作为具体的第1实施方式的gRNA,可以列举出:以序列号3、4、7、45~52、72~2459中任一项所述的碱基序列作为目标碱基序列的gRNA、或者以在序列号3、4、7、45~52、72~2459中任一项所述的碱基序列的5'末端上缺失、取代或添加1个或多个碱基而成的碱基序列作为目标碱基序列的gRNA。在此,1个或多个碱基可以为例如1~10碱基、例如1~5碱基、例如1~3碱基。例如,通过将间隔序列的5'末端缩短2~3碱基,能够降低对DNA的结合能力,提高CRISPR-Cas9的序列识别特异性。

[0263] 其中,优选以序列号3、4、7、45~52中任一项所述的碱基序列作为目标碱基序列的gRNA、或者以在序列号3、4、7、45~52中任一项所述的碱基序列的5'末端上缺失、取代或添加1个或多个碱基而成的碱基序列作为目标碱基序列的gRNA。在实施例如下所述,通过以这些碱基序列作为目标碱基序列的gRNA,能够HLA单倍型特异性地破坏或改变HLA等位基因,从而制造向受体进行同种异体移植时的排斥反应被降低的低抗原性细胞。

[0264] (第2实施方式)

[0265] 在一实施方式中,本发明提供一种gRNA,该gRNA将下述碱基序列作为目标碱基序列,所述碱基序列在对全HLA单倍型的基因组DNA的碱基序列数据进行映射时映射到二个以上目标HLA单倍型上、对HLA等位基因以外的全基因组DNA的碱基序列数据进行映射时没有映射到。

[0266] 作为具体的第2实施方式的gRNA,可以列举出:以序列号53~55、2460~8013中任一项所述的碱基序列作为目标碱基序列的gRNA、或者以在序列号53~55、2460~8013中任一项所述的碱基序列的5'末端上缺失、取代或添加1个或多个碱基而成的碱基序列作为目标碱基序列的gRNA。在此,1个或多个碱基可以为例如1~10碱基、例如1~5碱基、例如1~3碱基。例如,通过将间隔序列的5'末端缩短2~3碱基,能够降低对DNA的结合能力,提高CRISPR-Cas9的序列识别特异性。

[0267] 其中,优选以序列号53~55中任一项所述的碱基序列作为目标碱基序列的gRNA、或者以在序列号53~55中任一项所述的碱基序列的5'末端缺失、取代或添加1个或多个碱基而成的碱基序列作为目标碱基序列的gRNA。

[0268] 另外,如上所述,为了提高从聚合酶III启动子的转录效率,可以将gRNA的5'末端的碱基序列变更为G或GG。

[0269] 例如,在着眼于HLA-A等位基因的情况下,在HLA-A等位基因中存在来自父亲的HLA-A基因和来自母亲的HLA-A基因这2个基因,有时HLA-A基因各自不同,也有时相同。在想要保持HLA-A的抗原呈递能力等的情况下,需要切割仅仅一方的HLA-A基因诱导敲除,残留另一方的HLA-A基因。或者,在想要诱导完全敲除的情况下,需要切割双方的HLA-A基因。

[0270] 通常,在使2个基因为CRISPR-gRNA的目标的情况下,通常设计2个gRNA,分别诱导DNA切割。因此,认为在敲除多个HLA基因时使用针对各个HLA基因特异的gRNA。

[0271] 相对于此,在实施例如下所述,本发明的发明人们利用HLA基因彼此DNA序列相同性高的特征,搜索能够用1个gRNA切割诱导多个HLA基因(例如HLA-A基因的来自父亲的序列和来自母亲的序列二者、或者HLA-A基因和HLA-B基因)的gRNA,结果鉴定到多个这样的gRNA序列。

[0272] 在实施例中如下所述,通过利用第2实施方式的gRNA,能够减少在切割多个HLA基因(或等位基因)时所必要的gRNA的种类。由此,能够减少制作gRNA的成本。另外,通过减少所使用的gRNA的种类,脱靶突变导入的风险也能够减少。

[0273] [其他实施方式]

[0274] 在一实施方式中,本发明提供一种HLA蛋白质表达诱导剂,在维持多能干细胞的多能性的状态下诱导HLA蛋白质的表达,其以IFN- γ 、IFN- α 、IFN- β 、IL-4、GM-CSF、TGF- α 或TGF- β 作为有效成分。

[0275] 在一实施方式中,本发明提供一种方法,该方法在维持多能干细胞的多能性的状

态下诱导HLA蛋白质的表达,该方法具备:在多能干细胞的培养基中添加IFN- γ 、IFN- α 、IFN- β 、IL-4、GM-CSF、TGF- α 或TGF- β 的工序。

[0276] 实施例

[0277] 以下示出实施例,对本发明更加详细地进行说明,但本发明不限于以下的实施例。

[0278] [实施例1]

[0279] (gRNA的设计)

[0280] HLA基因的序列的个体差异大,另一方面,HLA基因间的相同性高,因此,难以设计仅仅切割特定的HLA单倍型的gRNA的碱基序列。具体而言,例如,难以设计下述gRNA序列,即,仅识别HLA-A*01:01等位基因、不识别其他HLA-A等位基因、HLA-A以外的HLA基因、其他基因组区域的gRNA序列。

[0281] 因此,通过如下方法,确定识别HLA-A等位基因、HLA-B等位基因以及HLA-C等位基因的gRNA的目标碱基序列。首先,从IPD-IMGT/HLA数据库(<https://www.ebi.ac.uk/ipd/imgt/hla/>)中,下载获得包括全HLA单倍型的基因组DNA的碱基序列的“hla_gen.fasta”文件。

[0282] 接着,从全HLA单倍型的基因组DNA的碱基序列中,提取与“NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNGG”(序列号40)一致的碱基序列作为SpCas9的gRNA(sgRNA)的目标碱基序列的候选。

[0283] 接着,使用Bowtie程序(<http://bowtie-bio.sourceforge.net/index.shtml>)向全HLA单倍型的碱基序列映射各候选的碱基序列,对各候选的碱基序列映射到几个HLA基因进行分析。需要说明的是,也可以使用Bowtie程序以外的序列相同性检索程序进行同样的操作。

[0284] 接着,基于Bowtie程序的结果,分为如下情况:各sgRNA仅仅结合至HLA-A等位基因、HLA-B等位基因或HLA-C等位基因中的任意一个上的情况;以及结合至HLA-A等位基因和HLA-B等位基因、HLA-A等位基因和HLA-C等位基因、HLA-B等位基因和HLA-C等位基因、HLA-A等位基因、HLA-B等位基因和HLA-C等位基因等2个以上HLA等位基因上的情况。

[0285] 接着,使用Bowtie向参考·人基因组序列(Hg19)映射全部候选的碱基序列,确认是否被映射到HLA等位基因以外的基因组区域。其结果,提取仅映射至HLA等位基因的候选碱基序列作为目标碱基序列。

[0286] 图1(a)是用维恩图表示本实验例中提取的目标碱基序列是否以HLA-A等位基因、HLA-B等位基因、HLA-C等位基因中的任意基因作为目标。图中的数字表示sgRNA的目标碱基序列的数目。其结果,确定了多个仅以HLA-A等位基因、HLA-B等位基因或HLA-C等位基因中的任意一个作为目标的sgRNA的目标碱基序列、以及以HLA-A等位基因以及HLA-B等位基因、HLA-A等位基因以及HLA-C等位基因、HLA-B等位基因以及HLA-C等位基因、HLA-A等位基因、HLA-B等位基因以及HLA-C等位基因等中的2个以上HLA等位基因作为目标的sgRNA的目标碱基序列。

[0287] 图1(b)是表示本实验例中鉴定的sgRNA的目标碱基序列以HLA-A等位基因、HLA-B等位基因、HLA-C等位基因的哪个部位作为目标的图。图1(b)中,用线连结的方框表示各HLA基因的外显子,HLA-A等位基因在左侧存在外显子1,HLA-B等位基因和HLA-C等位基因在右侧存在外显子1。另外,“[+]strand sgRNAs”表示以正链DNA作为目标的目标碱基序列,“[-]

strand sgRNAs”表示以负链DNA作为目标的目标碱基序列,“Unique k-mers”表示在人基因组上仅存在于一处的10~16mer的碱基序列(称为“k-mer序列”)的集合。

[0288] 结果表明,在Unique k-mers的峰高的部位能够发现多个sgRNA目标序列。需要说明的是,正链DNA或负链DNA均能够发现相当数量的目标碱基序列。

[0289] 在序列号3、4、7、45~52、72~2459中,示出了作为“对全HLA单倍型的基因组DNA的碱基序列数据进行映射时只映射到一个目标HLA单倍型上、对HLA等位基因以外的全基因组DNA的碱基序列数据进行映射时没有映射到的碱基序列”所提取到的碱基序列。另外,在下述表1中,作为一例,针对一部分碱基序列,示出作为目标的HLA等位基因的数目以及作为目标的HLA等位基因。

[0290] 表1

[0291]	序列号	作为目标的 HLA等位基因的数目	作为目标的HLA等位基因
	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

[0292] 另外,序列号53~55、2460~8013中,示出了作为“对全HLA单倍型的基因组DNA的碱基序列数据进行映射时映射到二个以上作为目标的HLA单倍型上、且对HLA等位基因以外的全基因组DNA的碱基序列数据进行映射时没有映射到的碱基序列”所提取到的碱基序列。另外,下述表2中,作为一例,针对一部分碱基序列,示出作为目标的HLA等位基因的数目以及作为目标的HLA等位基因。

[0293] 表2

[0294]

序列号	作为目标的 HLA等位基因的数目	作为目标的HLA等位基因
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

[0295] 另外,下述表3中,针对作为“对全HLA单倍型的基因组DNA的碱基序列数据进行映射时映射到二个以上作为目标的HLA单倍型上、且对HLA等位基因以外的全基因组DNA的碱基序列数据进行映射时没有映射到的碱基序列”所提取的目标碱基序列,示出作为目标的HLA等位基因的数目以及提取的目标碱基序列的数目。

[0296] 表3

[0297]

作为目标的HLA等位基因的数目	目标碱基序列的数目
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

[0298] [实施例2]

[0299] (通过iPS细胞的刺激进行的HLA蛋白质的表达诱导1)

[0300] 尝试刺激未分化iPS细胞来诱导HLA蛋白质的表达。具体而言,在iPS细胞的培养基中添加100ng/mL的脂多糖(LPS)、100ng/mL的TNF- α 、或50ng/mL的IFN- γ ,处理48小时后,使用抗HLA-ABC抗体(产品号:311418、BIOLEGEND公司),进行流式细胞仪分析,研究HLA蛋白质的表达。

[0301] 图2是表示流式细胞仪的结果的曲线图。其结果表明,如果添加IFN- γ ,则HLA蛋白质的表达提高。

[0302] [实施例3]

[0303] (通过iPS细胞的刺激进行的HLA蛋白质的表达诱导2)

[0304] 在iPS细胞的培养基中添加10ng/mL、50ng/mL、或100ng/mL的IFN- γ ,处理48小时后,使用抗HLA-ABC抗体(产品号:311418、BIOLEGEND公司),进行流式细胞仪分析,研究HLA蛋白质的表达。

[0305] 图3是表示流式细胞仪的结果的曲线图。其结果表明,如果添加IFN- γ ,则HLA蛋白质的表达提高。结果表明,以任意浓度添加IFN- γ 时,HLA蛋白质的表达均提高。

[0306] [实施例4]

[0307] (通过iPS细胞的刺激进行的HLA蛋白质的表达诱导3)

[0308] 在iPS细胞的培养基中添加50ng/mL的IFN- γ ,处理4小时、8小时、16小时、24小时以及48小时后,使用抗HLA-A2抗体(产品号:740082、BD公司),进行流式细胞仪分析,研究HLA-A2蛋白质的表达。

[0309] 图4(a)是表示流式细胞仪的结果的曲线图。另外,图4(b)是表示iPS细胞的IFN- γ 处理与HLA-A蛋白质的表达量的分析的时间表的图。其结果表明,越延长IFN- γ 处理时间,HLA蛋白质的表达越高。另外,进一步研究的结果表明,将iPS细胞用IFN- γ 处理48小时后,从培养基中除去IFN- γ ,7日后HLA蛋白质的表达仍继续。

[0310] [实施例5]

[0311] (细胞的HLA单倍型确定)

[0312] 通过以下方法,确定各细胞的HLA单倍型(从双亲继承的各HLA等位基因的对)。

[0313] 关于604B1 iPS细胞以及1383D2 iPS细胞,首先,基于604B1 iPS细胞的WES(Whole Exome Sequencing)分析结果以及1383D2 iPS细胞的WGS(Whole Genome Sequencing)分析结果,分别制作FASTQ序列文件。

[0314] 接着,向参考·人基因组序列(Hg19)映射各FASTQ序列文件,分别制作BAM文件。接着,使用软件(名称“HLA-genotyper”、<https://pypi.python.org/pypi/hla-genotyper/0.4.2b1>),分析上述各BAM文件,确定各细胞的HLA单倍型。

[0315] 另外,关于585A1 iPS细胞,将提取的基因组DNA送至HLA研究所(<http://hla.or.jp/>),利用荧光珠法(PCR-rSSO/Luminex法)进行HLA单倍型确定。另外,关于604B1 iPS细胞,也进行与585A1 iPS细胞同样的HLA单倍型确定。

[0316] 另外,关于外周血单核细胞(PBMC),使用销售商(CTL公司、Wako公司)提供HLA单倍型信息的细胞。

[0317] [实施例6]

[0318] (sgRNA的基因组切割活性的研究)

[0319] 从以实验例1中鉴定的目标碱基序列作为目标的sgRNA中,仅切割A*02:07等位基因,选择碱基序列与A*32:01等位基因不一致的sgRNA、即A0207-ex3-g1(将目标碱基序列示为序列号3)、A0207-ex3-g2(将目标碱基序列示为序列号4)以及A0207-ex3-g4(将目标碱基序列示为序列号7)。

[0320] 需要说明的是,以下的各实验例中使用的各sgRNA的碱基序列,是在从各个sgRNA的目标碱基序列中除去PAM序列后的碱基序列的3'侧连结序列号39所记载的Scaffold序列而成的碱基序列。例如,从目标碱基序列中除去PAM序列后的碱基序列为“5'-NNNNNNNNNNNNNNNNNNNN-3'”(序列号62)时,使用的sgRNA的碱基序列为“5'-NNNNNNNNNNNNNNNNNNNGUUUUAGAGCUAGAAUAGCAAGUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUUUUU-3'”(序列号63)。另外,以下的各实验例中,将各sgRNA以表达载体的形态导入细胞中,在细胞内使其表达后使用。

[0321] 图5(a)是表示在HLA-A的外显子3的区域发现的sgRNA的目标部位以及目标碱基的图。图5(a)中,方框表示HLA-A*02:07基因的外显子,箭头表示各sgRNA的目标碱基序列的位置。另外,图5(a)中也表示野生型的A*02:07等位基因的碱基序列以及野生型的A*32:01等位基因的碱基序列。将两等位基因中序列不同的部分用大写字母表示,将sgRNA的PAM序列用下划线表示。

[0322] 接着,将A0207-ex3-g1、A0207-ex3-g2以及A0207-ex3-g4与精制Cas9蛋白质一起分别转染至下述表4的具有HLA单倍型的1383D2 iPS细胞。转染使用市售的试剂盒(型号“CRISPR-MAX”、产品号:CMAX00003、THERMO FISHER SCIENTIFIC公司)进行。

[0323] 表4

[0324] 1383D2 iPS细胞的HLA单倍型

[0325]

	HLA-A		HLA-B		HLA-C	
HLA等位基因	A*02:07	A*32:01	B*15:02	B*51:01	C*08:01	C*14:02

[0326] 接着,提取基因组DNA后,通过T7核酸内切酶I(T7EI)分析,研究各细胞中的基因突变导入效率。T7EI分析如下进行。

[0327] 首先,使用特异性扩增HLA-A2区域的A*02:07等位基因的引物,进行Nested PCR。在Nested PCR中使用下述表5所示的引物。

[0328] 表5

[0329] 1st PCR用引物

[0330]	引物名	碱基序列	序列号
	1383D2-HLA-A-be-ex1-fwd	TTGGGGATTCCCCAACTCC	41
	HLA-A-in7-rev	GTCCACTGTTCCGCCCAA	42

[0331] 2nd PCR用引物

[0332]	引物名	碱基序列	序列号
	HLA-A0207-ex2-fwd	GGTCCGGAGTATTGGGACGG	43
	HLA-A0207-ex3-rev	TCTCAACTGCTCCGCCACAT	44

[0333] 接着,将PCR产物进行精制,在精制后的PCR产物(400ng)中添加1/10容量的10×NEBuffer2 (NEB公司)缓冲液,95℃下加热5分钟,将双链DNA热改性后,缓慢地降低温度,由此进行再次退火。更具体而言,以-2℃/秒从95℃冷却至85℃,以-0.1℃/秒从85℃冷却至25℃。

[0334] 接着,在再次退火后的PCR产物中添加10单位的T7核酸内切酶I (T7EI、Cat.No.M0302S、NEB公司),37℃下处理15分钟。接着,通过添加反应液量的1/10容量的0.25M EDTA溶液,使T7EI的活性停止,然后,样品保持低温(冰上)。

[0335] 接着,将T7EI处理后的PCR产物进行2%琼脂糖凝胶电泳,将切割带与未切割带的DNA信号强度用ImageJ软件定量。

[0336] 图5(b)是表示将使用各sgRNA时的基因组DNA突变导入效率用T7EI分析进行解析的结果。图5(b)中,“T7EI”表示T7核酸内切酶I,“-”表示没有添加,“+”表示添加。另外,“ex3-g1”表示为导入A0207-ex3-g1的结果,“ex3-g2”表示为导入A0207-ex3-g2的结果,“ex3-g4”表示为导入A0207-ex3-g4的结果,“DMD#1”表示导入了作为阳性对照使用的、对肌营养不良蛋白基因特异的sgRNA的结果。另外,箭头表示通过T7EI切割的带。

[0337] 结果表明,A0207-ex3-g4 sgRNA的基因组切割活性最高。

[0338] [实施例7]

[0339] (HLA等位基因特异的敲除1)

[0340] 〈HLA蛋白质的表达的确认〉

[0341] 为了确认HLA在细胞表面的表达,选择2株(1383D2株以及404C2株)具有HLA抗原型A2的iPS细胞株。另外,作为不具有HLA抗原型A2的iPS细胞株,选择604B1株。针对共计3株的未分化iPS细胞,在细胞因子未处理的情况下和用50ng/mL的IFN-γ处理48小时后的情况下,使用抗HLA-A2抗体(产品号:740082、BD公司)将细胞染色,进行流式细胞仪分析。

[0342] 图6(a)是表示流式细胞仪分析的结果的曲线图。其结果,通过IFN-γ处理,1383D2细胞以及404C2细胞中确认到HLA-A2的特异的表达。

[0343] 〈HLA等位基因特异的敲除〉

[0344] 接着,将作为上述sgRNA的、A0207-ex3-g1(目标碱基序列如序列号3所示)、A0207-ex3-g2(目标碱基序列如序列号4所示)以及A0207-ex3-g4(目标碱基序列如序列号7所示)与精制Cas9蛋白质一起分别转染到1383D2 iPS细胞上。转染使用市售的试剂盒(型号“CRISPR-MAX”、产品号:CMAX00003、THERMO FISHER SCIENTIFIC公司)进行。

[0345] 另外,作为没有破坏HLA基因的对照的sgRNA,使用将X染色体上的肌营养不良蛋白(DMD)基因作为靶的sgRNA-DMD#1(目标碱基序列如序列号61所示)。

[0346] 接着,将转染的iPS细胞分别在2个孔中传代,一个孔保持在细胞因子未处理的状

态下,另一个孔在培养基中添加50ng/mL的IFN- γ ,处理48小时。然后,使用抗HLA-A2抗体(产品号:740082、BD公司)进行流式细胞仪分析。

[0347] 图6(b)是表示流式细胞仪分析的结果的曲线图。其结果表明,使用基因组切割活性最大的A0207-ex3-g4 sgRNA的情况下,出现最多的HLA-A2抗原被破坏的细胞。

[0348] <sgRNA的目标部位的碱基序列的分析>

[0349] 接着,从导入了sgRNA(A0207-ex3-g4)的1383D2 iPS细胞中提取基因组DNA,使用特异性地扩增A*02:07等位基因、不扩增A*32:01等位基因的引物,进行Nested PCR,对sgRNA的靶部位进行扩增。Nested PCR中,使用下述表6所示的引物。

[0350] 表6

[0351] 1st PCR用引物

引物名	碱基序列	序列号
1383D2-HLA-A-be-ex1-fwd	TTGGGGATTCCCCAACTCC	41
HLA-A-in7-rev	GTCCACTGTTCCGCCCAA	42

[0353] 2nd PCR用引物

引物名	碱基序列	序列号
HLA-A0207-ex2-fwd	GGTCCGGAGTATTGGGACGG	43
HLA-A0207-ex3-rev	TCTCAACTGCTCCGCCACAT	44

[0355] 接着,通过TA克隆将PCR产物克隆至pGEM-T-Easy载体(Promega公司)。接着,回收大肠杆菌菌落21株,通过桑格测序(Sanger sequence),确定碱基序列。结果表明,11株具有野生型的碱基序列,但10株(缺失4株和插入6株)中产生一些插入缺失突变(Indel突变)。

[0356] 另外,将导入了sgRNA(A0207-ex3-g4)的1383D2 iPS细胞用抗HLA-A2抗体(产品号:740082、BD公司)染色,用流式细胞仪将HLA-A2抗原成为阴性的细胞进行分选。从分选后的iPS细胞中提取基因组DNA,分别使用将作为目标等位基因的A*02:07等位基因特异性地扩增的引物(上述),进行Nested PCR。另外,分别使用将不是目标的A*32:01等位基因特异性地扩增的引物,进行Nested PCR。A*32:01等位基因的Nested PCR中,使用下述表7所示的引物。

[0357] 表7

[0358] 1st PCR用引物

引物名	碱基序列	序列号
1383D2-HLA-A-be-ex1-fwd	TTGGGGATTCCCCAACTCC	41
HLA-A-in7-rev	GTCCACTGTTCCGCCCAA	42

[0360] 2nd PCR用引物

引物名	碱基序列	序列号
HLA-A3201-ex2-fwd	GGGCCGGAGTATTGGGACCA	70
HLA-A3201-ex3-rev	CTCAACTGCTCCGCCACAT	71

[0362] 接着,通过TA克隆将PCR产物克隆至pGEM-T-Easy载体(Promega公司)。回收大肠杆菌菌落16株(A*02:07等位基因)以及19株(A*32:01等位基因),通过桑格测序确定碱基序列。接着,基于所确定的碱基序列,计测在序列中存在缺失的克隆数、存在插入的克隆数、以

及无序列变化的克隆数。

[0363] 其结果, A*02:07等位基因中, 在16株全部亚克隆中, 发生一些插入缺失突变(Indel突变)。另一方面确认, A*32:01等位基因在19株全部亚克隆中均为野生型的碱基序列。

[0364] 图7是表示下述情况下的基因组DNA突变导入效率的曲线图, 即, 在iPS细胞1383D2株中导入sgRNA诱导基因组编辑后、没有基于HLA-A2抗原表达进行分选的情况下的、以及将HLA-A2抗原表达为阴性的细胞群进行分选的情况下的基因组DNA突变导入效率。

[0365] 结果表明, 通过采集HLA抗原阴性细胞, A*02:07靶等位基因进行基因组编辑后的细胞的比例上升。另外确认, 作为非靶等位基因的HLA-A*32:01等位基因中完全没有导入突变。

[0366] [实施例8]

[0367] (HLA等位基因特异的敲除2)

[0368] 通过破坏下述表8的具有HLA单倍型的604B1 iPS细胞的HLA等位基因, 制作对受体A(具有下述表9所示的假想HLA单倍型)进行同种异体移植时的排斥反应被降低的低抗原性细胞。需要说明的是, 下述表9所示的HLA单倍型为外周血单核细胞(PBMC、型号“LP_194”、CTL公司)的HLA单倍型。

[0369] 如表8以及表9所示, 在604B1 iPS细胞中存在A*01:01等位基因、B*07:02等位基因。另外, 这些HLA等位基因在受体A中不存在。因此, 将由604B1 iPS细胞或604B1 iPS细胞分化诱导而得到的细胞向受体移植时, 被受体A具有的T细胞攻击, 引起免疫排斥。

[0370] 因此, 为了降低排斥反应, 可以破坏在受体A中不存在、而在供体细胞中存在的HLA等位基因、即A*01:01等位基因和B*07:02等位基因, 从而不表达对供体细胞特异的HLA蛋白质。

[0371] 表8

[0372] 604B1 iPS细胞的HLA单倍型

[0373]

HLA-A		HLA-B		HLA-C	
A*01:01	A*24:02	B*07:02	B*37:01	C*06:02	C*07:02

[0374] 表9

[0375] 假想受体A的HLA单倍型(PBMC“LP_194”、CTL公司)

[0376]

HLA-A		HLA-B		HLA-C	
A*24:02	A*24:02	B*37:01	B*39:06	C*06:02	C*07:02

[0377] 从在上述实验例1中鉴定的sgRNA中, 选择2个仅切割A*01:01等位基因、碱基序列与A*24:02等位基因不一致的sgRNA(A0101-ex3-g1(目标碱基序列如序列号45所示)以及A0101-ex3-g2(目标碱基序列如序列号46所示))、和2个仅切割B*07:02等位基因、序列与B*37:01等位基因不一致的sgRNA(B0702-ex2-g1(目标碱基序列如序列号47所示)、B0702-ex2-g2(目标碱基序列如序列号48所示))。

[0378] 接着, 通过体外转录反应合成上述各sgRNA, 与精制Cas9蛋白质一起分别转染至604B1 iPS细胞。转染使用市售的试剂盒(型号“CRISPR-MAX”、产品号: CMAX00003、THERMO FISHER SCIENTIFIC公司)。

[0379] 通过sgRNA的导入,切割A*01:01等位基因或B*07:02等位基因,如果在其修复的过程中发生基因突变,则敲除A*01:01等位基因或B*07:02等位基因,得到缺失HLA-A1蛋白质或HLA-B7蛋白质的细胞。

[0380] 接着,将各iPS细胞用50ng/mL的IFN- γ 刺激48小时,表达诱导HLA蛋白质。接着,将各iPS细胞用抗HLA-A1抗体(型号“ab33883”、abcam公司)或抗HLA-B7抗体(型号“MCA986”、Bio-Rad公司)染色,通过流式细胞仪分析HLA蛋白质阴性细胞的比例。

[0381] 图8(a)以及(b)是表示流式细胞仪分析的结果的曲线图。图8(a)是测定在破坏了A*01:01等位基因的iPS细胞中的HLA-A1蛋白质的表达量的结果,图8(b)是测定在破坏了B*07:02等位基因的iPS细胞中的HLA-B7蛋白质的表达量的结果。图8(a)以及(b)中,“无转染”表示没有导入sgRNA的iPS细胞的结果。

[0382] 其结果表明,作为sgRNA使用A0101-ex3-g1(目标碱基序列如序列号45所示)的情况下,11.2%的细胞缺失HLA-A1蛋白质。另外表明,作为sgRNA使用A0101-ex3-g2(目标碱基序列如序列号46所示)的情况下,18.9%的细胞缺失HLA-A1蛋白质。该结果表明,A0101-ex3-g2是敲除效率更高的sgRNA。

[0383] 另外表明,作为sgRNA使用B0702-ex2-g1(目标碱基序列如序列号47所示)的情况下,11.6%的细胞缺失HLA-B7蛋白质。另外表明,作为sgRNA使用B0702-ex2-g2(目标碱基序列如序列号48所示)的情况下,0.7%的细胞缺失HLA-B7蛋白质。该结果表明,B0702-ex2-g1为敲除效率更高的sgRNA。

[0384] 基于该结果,选择敲除效率高的A0101-ex3-g2和B0702-ex2-g1,进行A*01:01等位基因以及B*07:02等位基因二者的敲除。具体而言,将所选择的2种sgRNA与精制Cas9蛋白质一起转染至604B1 iPS细胞。转染使用市售的试剂盒(型号“CRISPR-MAX”、产品号:CMAX00003、THERMO FISHER SCIENTIFIC公司)进行。

[0385] 接着,将iPS细胞用50ng/mL的IFN- γ 进行48小时刺激,表达诱导HLA蛋白质。接着,将iPS细胞用抗HLA-A1抗体(型号“ab33883”、abcam公司)以及抗HLA-B7抗体(型号“MCA986”、Bio-Rad公司)染色,用流式细胞仪进行分析。

[0386] 图9(a)以及(b)是表示流式细胞仪分析的结果的曲线图。图9(a)中,“无转染”表示为没有导入sgRNA的iPS细胞的分析结果。另外,图9(b)中,“A0101-ex3-g2”以及“B0702-ex2-g1”表示将这些2个sgRNA共导入、并敲除A*01:01等位基因以及B*07:02等位基因二者后的iPS细胞的分析结果。

[0387] 另外,从HLA-A1蛋白质以及HLA-B7蛋白质二者为阴性的细胞群中进行单细胞分选,回收15株亚克隆。接着,从各亚克隆中提取基因组DNA。接着,进行PCR反应(将包含所使用的sgRNA即A0101-ex3-g2的目标部位(外显子3)的区域、以及包含B0702-ex2-g1的目标部位(外显子2)的区域分别进行扩增),然后,通过桑格测序对碱基序列进行分析。

[0388] 图10(a)是表示所回收的各克隆的碱基突变模式的图。图10(a)中,“WT”表示为野生型的碱基序列,“-”表示具有缺失突变,“+”表示具有插入突变。例如“-5bp”表示具有5碱基的缺失,“+18bp”表示具有18碱基的插入。图10(b)中,作为代表例,示出2株(#8以及#10)的碱基序列。

[0389] 其结果表明,在15株中的11株的克隆中,在A*01:01等位基因以及B*07:02等位基因二者中发生一些插入缺失突变(Indel突变)。从发生了Indel突变的11株克隆中,选择产

生了移码突变的2株(#8以及#10),用于以下实验。

[0390] [实施例9]

[0391] (HLA等位基因特异的敲除3)

[0392] 通过破坏具有下述表10的HLA单倍型的585A1 iPS细胞的HLA等位基因,制作在向受体B(具有下述表11所示的假想的HLA单倍型)进行同种异体移植时的排斥反应被降低的低抗原性细胞。需要说明的是,下述表11所示的HLA单倍型为外周血单核细胞(PBMC、型号“2010113203”、Wako公司)的HLA单倍型。

[0393] 如表10以及表11所示,在585A1 iPS细胞中存在B*07:02等位基因、C*07:02等位基因。另外,这些HLA等位基因在受体B中不存在。因此,将585A1 iPS细胞或由585A1 iPS细胞分化诱导的细胞移植至受体时,被受体B具有的T细胞攻击,引起免疫排斥。

[0394] 因此,为了降低排斥反应,可以破坏在受体B中不存在、而供体细胞中存在的HLA等位基因、即B*07:02等位基因和C*07:02等位基因,从而不表达供体细胞特异的HLA蛋白质。

[0395] 表10

[0396] 585A1 iPS细胞的HLA单倍型

HLA-A		HLA-B		HLA-C	
A*24:02	A*24:02	B*07:02	B*52:01	C*07:02	C*12:02

[0398] 表11

[0399] 假想受体B的HLA单倍型(PBMC“2010113203”、Wako公司)

HLA-A		HLA-B		HLA-C	
A*24:02	A*24:02	B*40:06	B*52:01	C*08:01	C*12:02

[0401] 作为sgRNA,使用B*07:02等位基因特异的B0702-ex2-g1(目标碱基序列如序列号47所示)以及C*07:02等位基因特异的C0702-ex3-g3(目标碱基序列如序列号49所示)。另外,转染中除了使用市售的试剂盒(商品名“4D-Nucleofector”、型号“V4XP-4032”、Lonza公司)以外,还与实验例7同样地进行585A1 iPS细胞的B*07:02等位基因以及C*07:02等位基因二者的敲除。

[0402] 接着,将iPS细胞用50ng/mL的IFN- γ 进行48小时刺激,表达诱导HLA蛋白质。接着,将iPS细胞用抗HLA-B7抗体(型号“MCA986”、Bio-Rad公司)染色,用流式细胞仪进行分析。

[0403] 图11是表示流式细胞仪分析的结果的曲线图。图11中,“无染色”表示为没有用抗体染色的iPS细胞的分析结果,“无转染”表示为没有导入sgRNA的iPS细胞的分析结果,“B0702-ex2-g1”以及“C0702-ex3-g3”表示为导入这些sgRNA、将B*07:02等位基因以及C*07:02等位基因二者敲除后的iPS细胞的分析结果。

[0404] 另外,从HLA-B7蛋白质为阴性的细胞群中进行单细胞分选,回收28株亚克隆。接着,从各亚克隆中提取基因组DNA。接着,进行PCR反应(将包含所使用的sgRNA即B0702-ex2-g1的目标部位(外显子2)的区域、以及包含C0702-ex3-g3的目标部位(外显子3)的区域分别扩增),然后,通过桑格测序对碱基序列进行分析。

[0405] 图12是表示所回收的各克隆的碱基突变模式的图。图12(a)中,“WT”表示为野生型的碱基序列,“-”表示具有缺失突变,“+”表示具有插入突变。图12(b)中,作为代表例,示出3株(#2、#11以及#26)碱基序列。

[0406] 其结果表明,多个克隆中,在B*07:02等位基因以及C*07:02等位基因二者中发生一些插入缺失突变(Indel突变)。从发生了Indel突变的克隆中,选择3株(#2、#11以及#26),用于以下的实验。

[0407] [实施例10]

[0408] (HLA等位基因特异的敲除4)

[0409] 通过破坏具有下述表12的HLA单倍型的585A1 iPS细胞的HLA等位基因,制作在向受体C(具有下述表13所示的假想的HLA单倍型)进行同种异体移植时的排斥反应被降低的低抗原性细胞。需要说明的是,下述表13所示的HLA单倍型为外周血单核细胞(PBMC、型号“LP_266”、CTL公司)的HLA单倍型。

[0410] 如表12、13所示,在585A1 iPS细胞中存在B*52:01等位基因、C*12:02等位基因。而且,这些HLA等位基因在受体C中不存在。因此,将585A1 iPS细胞或由585A1 iPS细胞分化诱导的细胞移植至受体C时,被受体C具有的T细胞攻击,引起免疫排斥。

[0411] 因此,为了降低排斥反应,可以破坏在受体C中不存在而供体细胞中存在的HLA等位基因、即B*52:01等位基因和C*12:02等位基因,从而不表达供体细胞特异的HLA蛋白质。

[0412] 表12

[0413] 585A1 iPS细胞的HLA单倍型

[0414]

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13

[0416] 假想受体C的HLA单倍型(PBMC“LP_266”、CTL公司)

[0417]

HLA-A		HLA-B		HLA-C	
A*03:01	A*24:02	B*07:02	B*40:02	C*03:05	C*07:02

[0418] 作为sgRNA使用C*12:02等位基因特异的C1202-ex3-g1(目标碱基序列如序列号50所示),不进行细胞分选,除此以外,与实验例9同样操作,进行585A1 iPS细胞的C*12:02等位基因的敲除,得到17株亚克隆。需要说明的是,不进行细胞分选是由于无法获得抗HLA-C12的等位基因特异的抗体。

[0419] 接着,从各亚克隆中提取基因组DNA。接着,进行PCR反应(将包含所使用的sgRNA即C1202-ex3-g1的目标部位(外显子3)的区域扩增),然后,通过桑格测序对碱基序列进行分析。

[0420] 图13(a)是表示回收的各克隆的碱基突变模式的图。图13(a)中,“-”表示具有缺失突变,“+”表示具有插入突变。其结果表明,在sgRNA的目标部位附近发生一些插入缺失突变(Indel突变)。从发生了Indel突变的克隆中,选择发生了移码突变的#1细胞。

[0421] 接着,在敲除C*12:02等位基因后的#1细胞中,导入B*52:01等位基因特异的B5201-ex3-g2(目标碱基序列如序列号51所示)作为sgRNA,进行B*52:01等位基因的敲除,得到12株亚克隆(克隆#1-1~#1-12)。需要说明的是,没有进行细胞分选是由于没有获得抗HLA-B52的等位基因特异的抗体。

[0422] 接着,从各亚克隆中提取基因组DNA。接着,进行PCR反应(将包含所使用的sgRNA即B5201-ex3-g2的目标部位(外显子3)的区域扩增),然后,通过桑格测序对碱基序列进行分

析。

[0423] 图13 (b) 是表示回收的各克隆的碱基突变模式的图。图13 (b) 中,“Mut”表示具有取代突变,“WT”表示为野生型的碱基序列,“-”表示具有缺失突变。其结果表明,在sgRNA的目标部位附近发生一些突变。图13 (c) 中,作为代表例,示出株#1-1的碱基序列。

[0424] [实施例11]

[0425] (HLA等位基因特异的敲除5)

[0426] 通过破坏具有下述表14的HLA单倍型的604B1 iPS细胞的HLA等位基因,制作在向受体C(具有下述表15所示的假想的HLA单倍型)进行同种异体移植时的排斥反应被降低的低抗原性细胞。需要说明的是,下述表15所示的HLA单倍型为外周血单核细胞(PBMC、型号“LP_266”、CTL公司)的HLA单倍型。

[0427] 如表14、15所示,604B1 iPS细胞中,存在A*01:01等位基因、B*37:01等位基因以及C*06:02等位基因。而且,这些HLA等位基因在受体C中不存在。因此,将604B1 iPS细胞或由604B1 iPS细胞分化诱导的细胞移植至受体时,被受体具有的T细胞攻击,引起免疫排斥。

[0428] 因此,为了降低排斥反应,可以破坏在受体C中不存在而在供体细胞中存在的HLA等位基因、即A*01:01等位基因、B*37:01等位基因以及C*06:02等位基因,从而不表达供体细胞特异的HLA蛋白质。

[0429] 表14

[0430] 604B1 iPS细胞的HLA单倍型

[0431]

HLA-A		HLA-B		HLA-C	
A * 01 : 01	A * 24 : 02	B * 07 : 02	B * 37 : 01	C * 06 : 02	C * 07 : 02

[0432] 表15

[0433] 假想受体C的HLA单倍型(PBMC“LP_266”,CTL公司)

[0434]

HLA-A		HLA-B		HLA-C	
A * 03 : 01	A * 24 : 02	B * 07 : 02	B * 40 : 02	C * 03 : 05	C * 07 : 02

[0435] 作为sgRNA,使用A*01:01等位基因特异的A0101-ex3-g2(目标碱基序列如序列号46所示),与实验例9同样操作,敲除604B1 iPS细胞的A*01:01等位基因。接着,在该细胞中导入C*06:02等位基因特异的sgRNA即C0602-ex3-g1(目标碱基序列如序列号52所示),进行C*06:02等位基因的敲除,得到9株亚克隆。

[0436] 接着,从各亚克隆中提取基因组DNA。接着,进行PCR反应(将包含所使用的sgRNA即A0101-ex3-g2的目标部位(外显子3)的区域、以及包含C0602-ex3-g1的目标部位(外显子3)的区域分别扩增),然后,通过桑格测序对碱基序列进行分析。

[0437] 图14 (a) 是表示回收的各克隆的碱基突变模式的图。图14 (a) 中,“WT”表示为野生型的碱基序列,“-”表示具有缺失突变,“+”表示具有插入突变。其结果,得到在sgRNA的目标部位附近发生一些插入缺失突变(Indel突变)的克隆。图14 (b) 中,从发生了Indel突变的克隆中,以发生了移码突变的克隆#3作为代表例,示出碱基序列。

[0438] 接着,在敲除A*01:01等位基因以及C*06:02等位基因后的克隆#3中,导入HLA-B等位基因特异的B-ex2-g1(目标碱基序列如序列号53所示)作为sgRNA,尝试获取仅敲除了B*37:01等位基因的克隆。需要说明的是,B-ex2-g1是将B*37:01等位基因以及B*07:02等位基

因二者作为目标的sgRNA。

[0439] 接着,将iPS细胞用50ng/mL的IFN- γ 进行48小时刺激,表达诱导HLA蛋白质。接着,将iPS细胞用抗HLA-B7抗体(型号“MCA986”、Bio-Rad公司)染色,用流式细胞仪进行分析。

[0440] 图15(a)是表示流式细胞仪分析的结果的曲线图。图15(a)中,“无染色”表示为没有用抗体染色的iPS细胞的分析结果,“无转染”表示为没有导入sgRNA的iPS细胞的分析结果,“B-ex2-g1”表示为导入该sgRNA、将HLA-B等位基因敲除后的iPS细胞的分析结果。

[0441] 另外,从HLA-B7蛋白质为阳性的细胞群中进行单细胞分选,回收12株亚克隆(克隆#3-1~#3-12)。接着,从各亚克隆中提取基因组DNA。接着,进行PCR反应(将包含所使用的sgRNA即B-ex2-g1的目标部位(外显子2)的区域的、作为目标的B*37:01等位基因以及没有作为目标的B*07:02等位基因分别进行扩增),然后,通过桑格测序对碱基序列进行分析。

[0442] 图15(b)是表示回收的各克隆的碱基突变模式的图。图15(b)中,“Mut”表示具有取代突变,“WT”表示为野生型的碱基序列,“-”表示具有缺失突变,“+”表示具有插入突变。其结果,得到在sgRNA的目标部位附近发生一些插入缺失突变(Indel突变)的克隆。图15(c)中,从仅仅在B*37:01等位基因上发生了Indel突变的克隆中,以2株(克隆#3-11以及#3-12)作为代表例,示出碱基序列。

[0443] [实施例12]

[0444] (HLA等位基因特异的敲除6)

[0445] 通过破坏具有下述表16的HLA单倍型的604B1 iPS细胞的HLA等位基因,制作将HLA-A等位基因、HLA-B等位基因、HLA-C等位基因的3基因座全部敲除后的细胞。图16(a)是表示本实验例中使用的sgRNA的目标部位的图。

[0446] 表16

[0447] 604B1 iPS细胞的HLA单倍型

[0448]

HLA-A		HLA-B		HLA-C	
A*01:01	A*24:02	B*07:02	B*37:01	C*06:02	C*07:02

[0449] 作为sgRNA,使用能够以HLA-B等位基因以及HLA-C等位基因二者作为目标的BC-ex2-g1(目标碱基序列如序列号54所示),与实验例9同样操作,敲除604B1 iPS细胞的B*07:02等位基因、B*37:01等位基因、C*06:02等位基因以及C*07:02等位基因。

[0450] 接着,将iPS细胞用50ng/mL的IFN- γ 刺激48小时,进行流式细胞仪分析,研究HLA-B蛋白质以及HLA-C蛋白质的表达。图16(b)是表示流式细胞仪的结果的曲线图。图16(b)中,“无染色”表示为没有用抗体染色的iPS细胞的分析结果,“无转染”表示为没有导入sgRNA的iPS细胞的分析结果,“BC-ex2-g1”表示为导入该sgRNA、并敲除HLA-B等位基因、HLA-C等位基因二者后的iPS细胞的分析结果。

[0451] 接着,分选出HLA-B蛋白质以及HLA-C蛋白质二者为阴性的细胞群进行回收。接着,在回收的细胞群中导入能够以HLA-A基因的两等位基因作为目标的A-ex3-g1(目标碱基序列如序列号55所示),敲除A*01:01等位基因以及A*24:02等位基因。

[0452] 接着,将iPS细胞用50ng/mL的IFN- γ 刺激48小时,进行流式细胞仪分析,研究HLA-A蛋白质、HLA-B蛋白质以及HLA-C蛋白质的表达。图16(c)是表示流式细胞仪的结果的曲线图。图16(c)中,“无染色”表示为没有用抗体染色的iPS细胞的分析结果,“无转染”表示为没有导入sgRNA的iPS细胞的分析结果,“A-ex3-g1”表示为导入该sgRNA、并敲除HLA-A等位基

因后的iPS细胞的分析结果。

[0453] 接着,进行HLA-A蛋白质、HLA-B蛋白质以及HLA-C蛋白质全部为阴性的细胞群的单细胞分选,回收8株亚克隆。接着,从各亚克隆中提取基因组DNA。接着,进行PCR反应(将包含所使用的sgRNA的目标部位的区域分别扩增),然后,通过桑格测序对碱基序列进行分析。

[0454] 图17(a)是表示回收的克隆中的1个(克隆#1)碱基突变模式的图。图17(a)中,“-”表示具有缺失突变,“+”表示具有插入突变。其结果确认,得到A*01:01等位基因、A*24:02等位基因、B*07:02等位基因、B*37:01等位基因、C*06:02等位基因以及C*07:02等位基因全部发生插入缺失突变(Indel突变)的克隆。图17(b)是表示克隆#1的各HLA等位基因的碱基序列。图17(b)中,“WT”表示野生型的碱基序列。

[0455] [实施例13]

[0456] (HLA等位基因特异的敲除7)

[0457] 通过破坏具有下述表17的HLA单倍型的585A1 iPS细胞的HLA等位基因,制造敲除了HLA-A等位基因以及HLA-B等位基因、且仅敲除HLA-C等位基因之一后的细胞。

[0458] 表17 585A1 iPS细胞的HLA单倍型

[0459]

HLA-A		HLA-B		HLA-C	
A*24:02	A*24:02	B*07:02	B*52:01	C*07:02	C*12:02

[0460] 作为sgRNA,使用能够以HLA-A等位基因作为目标的A-ex3-g1(目标碱基序列如序列号55所示)、和能够以HLA-B等位基因作为目标的B-ex2-g1(目标碱基序列如序列号53所示),与实验例9同样操作,敲除585A1 iPS细胞的A*24:02等位基因、B*07:02等位基因以及B*52:01等位基因。

[0461] 接着,将iPS细胞用50ng/mL的IFN- γ 刺激48小时,进行流式细胞仪分析,研究HLA-A24抗原、HLA-B7抗原的表达。图18(a)是表示流式细胞仪的结果的曲线图。

[0462] 接着,进行HLA-A24抗原以及HLA-B7抗原二者为阴性的细胞群的单细胞分选,回收10株亚克隆。接着,从各亚克隆中提取基因组DNA。接着,进行PCR反应(将包含所使用的sgRNA的目标部位的区域分别扩增)后,通过桑格测序对碱基序列进行分析。

[0463] 图18(b)是表示回收的各克隆的碱基突变模式的图。图18(b)中,“WT”表示为野生型的碱基序列,“-”表示具有缺失突变,“+”表示具有插入突变,“?”表示无法确定。其结果,选择出已明确在A*24:02等位基因、B*07:02等位基因以及B*52:01等位基因上全部发生了插入缺失突变(Indel突变)的克隆#3。图18(c)表示克隆#3的碱基序列。

[0464] 接着,在克隆#3中导入C*12:02等位基因特异的C1202-ex3-g1(目标碱基序列如序列号50所示),敲除C*12:02等位基因。接着,回收4株亚克隆(克隆#3-1~#3-4)。接着,从各亚克隆中提取基因组DNA。接着,进行PCR反应(将C*07:02等位基因以及C*12:02等位基因分别扩增)后,通过桑格测序对碱基序列进行分析。

[0465] 图18(d)是表示所回收的各克隆的碱基突变模式的图。图18(d)中,“WT”表示为野生型的碱基序列,“-”表示具有缺失突变。其结果确认,能够得到3株残存有C*07:02等位基因、在C*12:02等位基因上发生了插入缺失突变(Indel突变)的克隆(克隆#3-1、#3-2、以及#3-3)。图18(e)中,作为代表例,示出克隆#3-1的碱基序列。

[0466] [实施例14]

[0467] (HLA等位基因特异的敲除8)

[0468] 通过破坏具有下述表18的HLA单倍型的604B1 iPS细胞的HLA等位基因,制作敲除HLA-A等位基因以及将HLA-B等位基因后的细胞。

[0469] 表18

[0470] 604B1 iPS细胞的HLA单倍型

[0471]	HLA-A		HLA-B		HLA-C	
	A*01:01	A*24:02	B*07:02	B*37:01	C*06:02	C*07:02

[0472] 作为sgRNA,使用能够以HLA-A等位基因作为目标的A-ex3-g1(目标碱基序列如序列号55所示)、能够以HLA-B等位基因作为目标的B-ex2-g1(目标碱基序列如序列号53所示),与实验例9同样操作,敲除604B1 iPS细胞的A*01:01等位基因、A*24:02等位基因、B*07:02等位基因以及B*37:01等位基因。

[0473] 接着,将iPS细胞用50ng/mL的IFN- γ 刺激48小时,进行流式细胞仪分析,研究HLA-A24抗原以及HLA-B7抗原的表达。图19(a)是表示流式细胞仪的结果的曲线图。图19(a)中,“无染色”表示为没有用抗体染色的iPS细胞的分析结果,“无转染”表示为没有导入sgRNA的iPS细胞的分析结果,“A-ex2-g1”以及“B-ex2-g1”表示为导入这些sgRNA、且敲除HLA-A等位基因、HLA-B等位基因二者后的iPS细胞的分析结果。

[0474] 接着,将HLA-A24抗原以及HLA-B7抗原二者为阴性的细胞群分选进行回收,进一步研究HLA-A1抗原的表达。图19(b)是表示流式细胞仪的结果的曲线图。图19(b)中,“无染色”表示为没有用抗体染色的iPS细胞的分析结果,“HLA-A24,B7(-)sorted”表示为分选后的HLA-A24抗原以及HLA-B7抗原二者为阴性的细胞群的分析结果。

[0475] 接着,将HLA-A1抗原为阴性的细胞群分选进行回收,回收23株亚克隆。接着,从各亚克隆中提取基因组DNA。接着,进行PCR反应(将包含所使用的sgRNA的目标部位的区域分别扩增)后,通过桑格测序对7株碱基序列进行分析。

[0476] 图19(c)是表示所回收的各克隆的碱基突变模式的图。图19(c)中,“WT”表示为野生型的碱基序列,“-”表示具有缺失突变,“+”表示具有插入突变。其结果表明,能够得到6株在A*01:01等位基因、A*24:02等位基因、B*07:02等位基因以及B*37:01等位基因上全部发生了插入缺失突变(Indel突变)的克隆。作为代表例,将克隆#4的碱基序列示于图19(d)。

[0477] [实施例15]

[0478] (HLA等位基因特异的敲除9)

[0479] 通过破坏具有下述表19的HLA单倍型的1383D2 iPS细胞的HLA等位基因,制作将HLA-A等位基因、HLA-B等位基因、HLA-C等位基因这3基因座全部敲除后的细胞。图20(a)是表示本实验例中使用的sgRNA的目标部位的图。

[0480] 表191383D2 iPS细胞的HLA单倍型

[0481]	HLA-A		HLA-B		HLA-C	
	A*02:07	A*32:01	B*15:02	B*51:01	C*08:01	C*14:02

[0482] 作为sgRNA,使用能够以HLA-B等位基因以及HLA-C等位基因二者作为目标的BC-ex2-g1(目标碱基序列如序列号54所示),与实验例9同样操作,敲除1383D2 iPS细胞的B*15:02等位基因、B*51:01等位基因、C*08:01等位基因以及C*14:02等位基因。

[0483] 接着,将iPS细胞用50ng/mL的IFN- γ 刺激48小时,进行流式细胞仪分析,研究HLA-

B蛋白质以及HLA-C蛋白质的表达。图20 (b) 是表示流式细胞仪的结果的曲线图。图20 (b) 中, “无染色”表示为没有用抗体染色的iPS细胞的分析结果, “无转染”表示为没有导入sgRNA的iPS细胞的分析结果, “BC-ex2-g1”表示为导入该sgRNA、且敲除HLA-B等位基因、HLA-C等位基因二者后的iPS细胞的分析结果。

[0484] 接着, 将HLA-B蛋白质以及HLA-C蛋白质二者为阴性的细胞群分选进行回收。接着, 在回收的细胞群中导入能够以HLA-A基因的两等位基因作为目标的A-ex3-g1 (目标碱基序列如序列号55所示), 敲除A*02:07等位基因以及A*32:01等位基因。

[0485] 接着, 将iPS细胞用50ng/mL的IFN- γ 刺激48小时, 进行流式细胞仪分析, 研究HLA-A蛋白质、HLA-B蛋白质以及HLA-C蛋白质的表达。

[0486] 图20 (c) 是表示流式细胞仪的结果的曲线图。图20 (c) 中, “无染色”表示为没有用抗体染色的iPS细胞的分析结果, “无转染”表示为没有导入sgRNA的iPS细胞的分析结果, “A-ex3-g1”表示为导入该sgRNA、且敲除HLA-A等位基因后的iPS细胞的分析结果。其结果, 确认了存在HLA-A蛋白质、HLA-B蛋白质以及HLA-C蛋白质全部为阴性的细胞群。

[0487] [实施例16]

[0488] (HLA等位基因的改变)

[0489] 将具有下述表20的HLA单倍型的1383D2 iPS细胞的A*02:07等位基因通过基因组编辑改变为A*01:01等位基因进行研究。

[0490] 表20

[0491] 1383D2 iPS细胞的HLA单倍型

[0492]

HLA-A		HLA-B		HLA-C	
A * 02:07	A * 32:01	B * 15:02	B * 51:01	C * 08:01	C * 14:02

[0493] 首先, 将均为piggyBac转座子载体的、双控型Cas9表达载体以及sgRNA表达载体导入1383D2 iPS细胞中, 通过使用终浓度1~15 μ g/mL的嘌呤霉素 (Cat.No.29455-54、Nacalai Tesque) 或终浓度100~200 μ g/mL潮霉素B (Cat.No.10687-010、THERMO FISHER SCIENTIFIC 公司) 的约5日的药剂选择, 得到染色体稳定导入细胞群。

[0494] 双控型Cas9表达载体为能够控制表达诱导以及亚细胞定位二者的Cas9的表达载体 (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)。本实验例中, 使用双控型Cas9表达载体, 其通过在细胞的培养基中添加强力霉素 (Dox), 能够诱导Cas9蛋白质与糖皮质激素受体 (GR) 的融合蛋白 (以下, 称为“Cas9-GR蛋白质”) 的表达, 通过在细胞的培养基中添加地塞米松 (Dex), 能够使Cas9-GR转移到核内。另外, 作为sgRNA, 使用A0207-ex3-g1 (目标碱基序列如序列号3所示)。

[0495] 图21 (a) 以及 (b) 是说明利用本实验例进行的同源重组的模式图。接着, 为了诱导同源重组, 制作对包含A*01:01等位基因的外显子1~3的区域进行编码的单链DNA (目标碱基序列如序列号56所示)。

[0496] 具体而言, 首先, 以604B1 iPS细胞的基因组DNA作为模板, 通过使用下述表21所示引物的PCR, 将从A*01:01等位基因的外显子1的上游67碱基至外显子3的下游1247碱基的部分进行扩增, 整合到pENTR质粒中, 制作pENTR载体。

[0497] 表21

[0498]	引物名	碱基序列	序列号
	604B1-HLA-A-be-ex1+15bp-fwd	ccaattcagtcgacgGTCGCGGTCGCTGTCTAA	57
	604B1-HLA-A-in3+15bp-rev	gtctagatatctcgaTCATCAGTATTCGAGGGATCGTCT	58

[0499] 接着,将该质粒DNA用切口核酸内切酶Nb.BsrDI酶(型号“R0648S”、New England Biolabs公司)进行处理,在甲酰胺改性条件下进行琼脂糖电泳,切割相当的DNA带并进行精制,制备目标的单链DNA供体(1ssDNA donor、序列号56)。

[0500] 接着,在1383D2 iPS细胞中,分别导入为双链DNA状态的pENTR载体(dsDNA donor)或所制备的单链DNA(1ssDNA donor、序列号56),分别以终浓度2 μ M以及1 μ M添加Dox以及Dex,诱导利用基因组编辑进行的同源重组。

[0501] 接着,将各iPS细胞用50ng/mL的IFN- γ 刺激48小时,进行流式细胞仪分析,研究HLA-A2抗原以及HLA-A1抗原的表达。

[0502] 图21(c)是表示流式细胞仪的结果的曲线图。图20(c)中,“无染色”表示为没有用抗体染色的iPS细胞的分析结果,“No Dox/Dex”表示为没有诱导Cas9表达的iPS细胞的分析结果,“dsDNA donor”表示为导入双链DNA的供体、诱导同源重组的iPS细胞的分析结果,“1ssDNA donor”表示为导入单链DNA的供体、诱导同源重组的iPS细胞的分析结果。

[0503] 其结果,A2抗原为阴性且A1抗原为阳性的比例,在使用双链DNA作为供体的情况下为0.2%,相对于此,使用单链DNA作为供体的情况下为1.6%。

[0504] 接着,将通过使用单链DNA供体的同源重组使A2抗原为阴性、且A1抗原为阳性的细胞群,通过流式细胞仪进行分选,针对细胞群的状态、以及单细胞分选后的亚克隆,对HLA-A基因座的碱基序列进行分析。

[0505] 图22(a)是表示以细胞群状态对碱基序列进行分析的结果的图。图22(a)中,“Bulk”表示以细胞群状态进行分析的结果。其结果表明,混合存在A*02:07基因座的一部分(特别是外显子2和外显子3的5'侧)改变成A*01:01基因的细胞。

[0506] 另外,图22(b)是表示针对单细胞分选后的代表的亚克隆(克隆#2)分析碱基序列的结果的图。结果表明,A*02:07基因座的一部分改变成A*01:01基因。

[0507] [实施例17]

[0508] (B2M敲除iPS细胞的制作1)

[0509] 在1383D2 iPS细胞上转染表达Cas9的质粒载体和B2M特异的sgRNA。作为sgRNA,使用B2M-g1(目标碱基序列如序列号59所示)以及B2M-g2(目标碱基序列如序列号60所示)。

[0510] 接着,将用50ng/mL的IFN- γ 刺激了48小时的细胞用抗HLA-ABC抗体染色,进行流式细胞仪分析。

[0511] 图23(a)是表示流式细胞仪的结果的曲线图。图23(a)中,“无染色”表示为没有用抗体染色的iPS细胞的分析结果,“无转染”表示为没有导入sgRNA的iPS细胞的分析结果,“B2M-g1”、“B2M-g2”表示为导入该sgRNA、且敲除了B2M等位基因后的iPS细胞的分析结果。

[0512] 其结果,对于HLA-A蛋白质、HLA-B蛋白质以及HLA-C蛋白质全部为阴性的细胞群的比例,在使用B2M-g1(目标碱基序列如序列号59所示)作为sgRNA的情况下为2.8%。另外,在使用B2M-g2(目标碱基序列如序列号60所示)作为sgRNA的情况下为6.9%。

[0513] 接着,从通过B2M-g2 sgRNA导入而得到的、HLA-A、HLA-B以及HLA-C全部为阴性的细胞群中,通过单细胞分选,得到克隆#1以及#2的2株亚克隆。

[0514] 将所得到的2株亚克隆再次用IFN- γ 刺激48小时,进行流式细胞仪分析。图23(b)是表示流式细胞仪的结果的曲线图。图23(b)中,“B2M-K0#1”表示为克隆#1的结果,“B2M-K0#2”表示为克隆#2的结果。其结果确认,在所有克隆中HLA-A、HLA-B以及HLA-C全部为阴性。

[0515] 接着,将克隆#1的B2M基因进行PCR扩增,确认碱基序列,确认已导入了插入缺失突变(Indel突变)。图23(c)中示出克隆#1的B2M等位基因的碱基序列。图23(c)中“WT”表示野生型的碱基序列。

[0516] [实施例18]

[0517] (B2M敲除iPS细胞的制作2)

[0518] 对于604B1 iPS细胞,与实验例17进行同样的操作,敲除B2M等位基因。作为sgRNA,使用B2M-g2(目标碱基序列如序列号60所示)。

[0519] 接着,将用50ng/mL的IFN- γ 刺激了48小时的细胞用抗HLA-ABC抗体进行染色,进行流式细胞仪分析。

[0520] 图24(a)是表示流式细胞仪的结果的曲线图。图24(a)中,“无染色”表示为没有用抗体染色的iPS细胞的分析结果,“无转染”表示为没有导入sgRNA的iPS细胞的分析结果,“B2M-g2”表示导入该sgRNA、敲除了B2M等位基因。其结果表明,能够得到HLA-A蛋白质、HLA-B蛋白质以及HLA-C蛋白质全部为阴性的细胞群。

[0521] 接着,从HLA-A、HLA-B以及HLA-C全部为阴性的细胞群中通过单细胞分选,得到克隆#1、#2、#3以及#4的4株亚克隆。

[0522] 接着,将这些亚克隆的B2M基因进行PCR扩增,确认碱基序列。图24(b)是表示碱基序列的分析结果的图。其结果确认,在所有亚克隆中均导入了插入缺失突变(Indel突变)。

[0523] [实施例19]

[0524] (T细胞活性化试验1)

[0525] 将(1)具有下述表22的HLA单倍型的604B1 iPS细胞、(2)实验例8中制作的、敲除604B1 iPS细胞的A*01:01等位基因以及B*07:02等位基因后的克隆#8、(3)相同克隆#10、(4)具有下述表23的HLA单倍型的1383D2 iPS细胞、(5)实验例18中制作的、敲除B2M等位基因后的604B1 iPS细胞(克隆#1),分别分化诱导成胚状体(EB)衍生的血细胞样细胞。

[0526] 表22

[0527] 604B1 iPS细胞的HLA单倍型

HLA-A		HLA-B		HLA-C	
A*01:01	A*24:02	B*07:02	B*37:01	C*06:02	C*07:02

[0529] 表23

[0530] 1383D2 iPS细胞的HLA单倍型

HLA-A		HLA-B		HLA-C	
A*02:07	A*32:01	B*15:02	B*51:01	C*08:01	C*14:02

[0532] 接着,将通过分选从具有下述表24的HLA单倍型的外周血单核细胞(PBMC、型号“LP_194”、CTL公司、相当于上述受体A)中回收的CD8阳性T细胞用CFSE(Cayman Chemical公司)染色,在IL-2以及IFN- γ 的存在下,与从上述(1)~(5)的各细胞分化的EB衍生的血细胞

样细胞共培养8日。

[0533] 表24

[0534] PBMC的HLA单倍型 (LP_194、CTL公司)

[0535]	HLA-A		HLA-B		HLA-C	
	A * 24 : 02	A * 24 : 02	B * 37 : 01	B * 39 : 06	C * 06 : 02	C * 07 : 02

[0536] 在共培养后进行流式细胞仪分析,研究CFSE的荧光。图25 (a) ~ (e) 是表示流式细胞仪的结果的曲线图。图25 (a) ~ (e) 分别是与从上述 (1) ~ (5) 的各细胞分化的EB衍生的血细胞样细胞共培养的CD8阳性T细胞的结果。其结果确认,仅有特异地识别各iPS细胞的HLA抗原的T细胞群增殖,CFSE成为阴性。

[0537] [实施例20]

[0538] (T细胞活性化试验2)

[0539] 将 (1) 具有下述表25的HLA单倍型的585A1 iPS细胞、(2) 实验例9中制作的、敲除585A1 iPS细胞的B*07:02等位基因以及C*07:02等位基因后的克隆#2、(3) 相同克隆#11、(4) 相同克隆#26、(5) 具有下述表26的HLA单倍型的1383D2iPS细胞、(6) 实验例18中制作的、敲除B2M后的604B1 iPS细胞(克隆#1),分别分化诱导成EB衍生的血细胞样细胞。

[0540] 表25

[0541] 585A1 iPS细胞的HLA单倍型

[0542]	HLA-A		HLA-B		HLA-C	
	A * 24 : 02	A * 24 : 02	B * 07 : 02	B * 52 : 01	C * 07 : 02	C * 12 : 02

[0543] 表26

[0544] 1383D2 iPS细胞的HLA单倍型

[0545]	HLA-A		HLA-B		HLA-C	
	A * 02 : 07	A * 32 : 01	B * 15 : 02	B * 51 : 01	C * 08 : 01	C * 14 : 02

[0546] 接着,将通过分选从具有下述表27的HLA单倍型的外周血单核细胞(PBMC、型号“2010113203”、Wako公司、相当于上述受体B)中回收的CD8阳性T细胞,用CFSE (Cayman Chemical公司)染色,在IL-2以及IFN- γ 的存在下,与从上述 (1) ~ (6) 的各细胞分化的EB衍生的血细胞样细胞共培养8日。

[0547] 表27

[0548] PBMC的HLA单倍型 (“2010113203”、Wako公司)

[0549]	HLA-A		HLA-B		HLA-C	
	A * 24 : 02	A * 24 : 02	B * 40 : 06	B * 52 : 01	C * 08 : 01	C * 12 : 02

[0550] 在共培养后进行流式细胞仪分析,研究CFSE的荧光。图26 (a) ~ (f) 是表示流式细胞仪的结果的曲线图。图26 (a) ~ (f) 分别是与从上述 (1) ~ (6) 的各细胞分化的EB衍生的血细胞样细胞共培养的CD8阳性T细胞的结果。其结果确认,特异地识别各iPS细胞的HLA抗原的T细胞群增殖,CFSE成为阴性。

[0551] [实施例21]

[0552] (T细胞活性化试验3)

[0553] 将 (1) 具有下述表28的HLA单倍型的604B1 iPS细胞、(2) 实验例11中制作的、敲除

604B1 iPS细胞的A*01:01等位基因、B*37:01等位基因以及C*06:02等位基因后的克隆#3-11、(3) 相同克隆#3-12、(4) 具有下述表29的HLA单倍型的1383D2 iPS细胞、(5) 实验例18中制作的、敲除B2M后的604B1 iPS细胞(克隆#1), 分别分化诱导成EB衍生的血细胞样细胞。

[0554] 表28

[0555] 604B1 iPS细胞的HLA单倍型

HLA-A		HLA-B		HLA-C	
A*01:01	A*24:02	B*07:02	B*37:01	C*06:02	C*07:02

[0557] 表29

[0558] 1383D2 iPS细胞的HLA单倍型

HLA-A		HLA-B		HLA-C	
A*02:07	A*32:01	B*15:02	B*51:01	C*08:01	C*14:02

[0560] 接着, 将通过分选从具有下述表30的HLA单倍型的外周血单核细胞(PBMC、型号“LP_266”、CTL公司、相当于上述受体C) 中回收的CD8阳性T细胞, 用CFSE (Cayman Chemical 公司) 染色, 在IL-2以及IFN- γ 的存在下, 与从上述(1)~(5)的各细胞中分化的EB衍生的血细胞样细胞共培养8日。

[0561] 表30

[0562] PBMC的HLA单倍型(LP_266、CTL公司)

HLA-A		HLA-B		HLA-C	
A*03:01	A*24:02	B*07:02	B*40:02	C*03:05	C*07:02

[0564] 在共培养后进行流式细胞仪分析, 研究CFSE的荧光。图27(a)~(e) 是表示流式细胞仪的结果的曲线图。图27(a)~(e) 分别是与从上述(1)~(5)的各细胞中分化的EB衍生的血细胞样细胞共培养的CD8阳性T细胞的结果。其结果确认, 特异地识别各iPS细胞的HLA抗原的T细胞群增殖, CFSE成为阴性。

[0565] [实施例22]

[0566] (HLA抗原反应性CD8阳性T细胞的制备)

[0567] 制备对604B1 iPS细胞的HLA抗原具有反应性的CD8阳性T细胞。在来自外周血单核细胞(PBMC) 的T细胞中, 混合存在有识别多样的抗原的T细胞。刺激这些T细胞中对604B1 iPS细胞的HLA抗原具有反应性的CD8阳性T细胞, 使其增殖, 进行回收。

[0568] 图28是表示本实验例的步骤的模式图。如图28所示, 首先, 使604B1 iPS细胞分化成EB衍生的血细胞样细胞。EB衍生的血细胞样细胞包含CD45阳性白细胞。接着, 将PBMC中包含的CD8阳性T细胞用CFSE (Cayman Chemical 公司) 染色, 在IL-2以及IFN- γ 的存在下与从604B1 iPS细胞中分化的EB衍生的血细胞样细胞共培养8日。

[0569] 接着, 在共培养后进行流式细胞仪分析, 研究CFSE的荧光。图29(a)~(e) 是表示流式细胞仪的结果的曲线图。

[0570] 图29(a) 表示将PBMC细胞群与作为异体的PBMC细胞群共培养的结果, 图29(b) 表示将PBMC细胞群与从604B1 iPS细胞中分化的EB衍生的血细胞样细胞共培养的结果, 图29(c) 表示仅培养PBMC细胞群的结果, 图29(d) 表示将通过分选从PBMC细胞群中回收的CD8阳性T细胞与从604B1 iPS细胞中分化的EB衍生的血细胞样细胞共培养的结果, 图29(e) 表示仅仅

培养通过分选从PBMC细胞群中回收的CD8阳性T细胞的结果。其结果确认,特异地识别不适合的HLA抗原的T细胞群增殖,CFSE成为阴性。

[0571] 接着,将图29(d)所示的、CFSE成为阴性的CD8阳性T细胞进行分选回收,得到对604B1 iPS细胞的HLA抗原具有反应性的T细胞。

[0572] [实施例23]

[0573] (T细胞毒性试验1)

[0574] 图30是表示本实验例的步骤的模式图。首先,将(1)具有下述表31的HLA单倍型的604B1 iPS细胞、(2)实验例8中制作的、敲除604B1 iPS细胞的A*01:01等位基因以及B*07:02等位基因后的克隆#8、(3)相同克隆#10、(4)实验例17中制作的、敲除B2M后的1383D2 iPS细胞(克隆#1),分别分化诱导成心肌细胞。

[0575] 表31

[0576] 604B1 iPS细胞的HLA单倍型

[0577]	HLA-A		HLA-B		HLA-C	
	A*01:01	A*24:02	B*07:02	B*37:01	C*06:02	C*07:02

[0578] 接着,用IFN- γ 刺激各心肌细胞,诱导HLA蛋白质的表达。接着,为了进行后述的 ^{51}Cr 释放分析,在培养基中添加 ^{51}Cr (铬),并整合到各心肌细胞中。

[0579] 接着,在各心肌细胞的培养基中,以各种比例添加实验例22中制备的对604B1 iPS细胞的HLA抗原具有反应性的CD8阳性T细胞,研究各心肌细胞是否被攻击。即,作为效应细胞,使用实验例22中制备的HLA抗原反应性CD8T细胞,作为靶细胞,使用上述的来自iPS细胞的心肌细胞。相对于心肌细胞1,添加的CD8阳性T细胞数的比例设为0.625、1.25、2.5、5、10。

[0580] 心肌细胞被CD8阳性细胞攻击时,细胞受到损伤,从细胞内释放 ^{51}Cr 。因此,通过测定被释放至培养基中的 ^{51}Cr ,可以判断各心肌细胞是否被攻击。将其称为 ^{51}Cr 释放分析。将用 ^{51}Cr 标记后、没有任何处理的心肌细胞的上清液中所包含的 ^{51}Cr 的量,定义为0%特异性裂解(Specific Lysis),并将如下值定义为100%特异性裂解,即,从在用表面活性剂(Triton-X)将用 ^{51}Cr 标记的心肌细胞进行处理使其死亡时所释放到上清液中的 ^{51}Cr 的量中、减去在通常的培养基中培养 ^{51}Cr 标记心肌细胞时所释放到上清液中的 ^{51}Cr 的量而得到的值。

[0581] 图31是表示各心肌细胞受到损伤而溶解的比例的曲线图。图31中,“*”表示 $P < 0.05$ 、存在显著差异,“Non-edited”表示为由上述(1)的604B1 iPS细胞分化诱导的心肌细胞的结果,“A1-B7-#8”表示为由上述(2)的克隆#8分化诱导的心肌细胞的结果,“A1-B7-#10”表示为由上述(3)的克隆#10分化诱导的心肌细胞的结果,“1383D2-B2M-#1”表示为由上述(4)的敲除B2M后的1383D2 iPS细胞(克隆#1)分化诱导的心肌细胞的结果。

[0582] 其结果表明,由604B1 iPS细胞分化诱导的心肌细胞,如果使效应CD8阳性T细胞的比例上升,则损伤的程度上升。

[0583] 相对于此,明确了由敲除B2M后的1383D2 iPS细胞分化诱导的心肌细胞,即使使效应CD8阳性T细胞的比例上升,也不会受到损伤。同样地表明,由敲除604B1 iPS细胞的A*01:01等位基因以及B*07:02等位基因后的、克隆#8以及#10分化诱导的心肌细胞,即使使效应CD8阳性T细胞的比例上升,也不会受到损伤。

[0584] 该结果表示,通过破坏iPS细胞的HLA等位基因,进行分化诱导,能够使进行同种异

体移植时的排斥反应降低。

[0585] 另外,能够使上述(2)~(4)的各iPS细胞分化诱导为心肌细胞表示:通过IFN- γ 处理,能够在维持多能干细胞的多能性的状态下诱导HLA蛋白质的表达。

[0586] [实施例24]

[0587] (T细胞毒性试验2)

[0588] 将与实验例23同样的(1)~(4)的iPS细胞分化诱导成EB衍生的血细胞样细胞,进行 ^{51}Cr 释放分析。

[0589] 首先,将(1)604B1 iPS细胞、(2)实验例7中制作的、敲除604B1 iPS细胞的A*01:01等位基因以及B*07:02等位基因后的克隆#8、(3)相同克隆#10、(4)实验例18中制作的、敲除B2M后的604B1 iPS细胞(克隆#1),分别分化诱导成EB衍生的血细胞样细胞。需要说明的是,EB衍生的血细胞样细胞包含血细胞。

[0590] 接着,在各EB衍生的血细胞样细胞的培养基中,以各种比例添加实验例22中制备的对604B1 iPS细胞的HLA抗原具有反应性的CD8阳性T细胞,研究各EB衍生的血细胞样细胞是否被攻击。即,作为效应细胞,使用实验例21中制备的HLA抗原反应性CD8T细胞,作为靶细胞,使用上述各EB衍生的血细胞样细胞。相对于EB衍生的血细胞样细胞1,添加的CD8阳性T细胞数的比例设为0.625、1.25、2.5、5、10、20。

[0591] 图32是表示各EB衍生的血细胞样细胞受到损伤而溶解的比例的曲线图。图32中,“*”表示 $P<0.05$ 、存在显著差异,“Non-edited”表示为由上述(1)的604B1 iPS细胞分化诱导的EB衍生的血细胞样细胞的结果,“A1-B7-#8”表示为由上述(2)的克隆#8分化诱导的EB衍生的血细胞样细胞的结果,“A1-B7-#10”表示为由上述(3)的克隆#10分化诱导的EB衍生的血细胞样细胞的结果,“604B1-B2M-#1”表示为由上述(4)的敲除B2M后的604B1 iPS细胞(克隆#1)分化诱导的EB衍生的血细胞样细胞的结果。

[0592] 其结果表明,由604B1 iPS细胞分化诱导的EB衍生的血细胞样细胞,如果使效应CD8阳性T细胞的比例上升,则损伤的程度上升。

[0593] 相对于此,明确了:由敲除B2M后的604B1 iPS细胞分化诱导的EB衍生的血细胞样细胞,即使使效应CD8阳性T细胞的比例上升,也不会受到损伤。同样地明确了:由敲除604B1 iPS细胞的A*01:01等位基因以及B*07:02等位基因后的、克隆#8以及#10分化诱导的EB衍生的血细胞样细胞,即使使效应CD8阳性T细胞的比例上升,也不会受到损伤。

[0594] 该结果表示:通过破坏iPS细胞的HLA等位基因,进行分化诱导,能够使进行同种异体移植时的排斥反应降低。

[0595] 另外,能够使上述(2)~(4)的各iPS细胞分化诱导为EB衍生的血细胞样细胞表示:通过IFN- γ 处理,能够在维持多能干细胞的多能性的状态下诱导HLA蛋白质的表达。

[0596] [实施例25]

[0597] (T细胞毒性试验3)

[0598] 除了使用与实验例24不同的iPS细胞这一点以外,进行与实验例24同样的研究。首先,将(1)具有下述表32的HLA单倍型的585A1 iPS细胞、(2)实验例9中制作的、敲除585A1 iPS细胞的B*07:02等位基因以及C*07:02等位基因后的克隆#2、(3)相同克隆#11、(4)相同克隆#26、(5)实验例18中制作的、敲除B2M后的604B1 iPS细胞(克隆#1),分别分化诱导成EB衍生的血细胞样细胞。需要说明的是,EB衍生的血细胞样细胞包含血细胞。

[0599] 表32

[0600] 585A1 iPS细胞的HLA单倍型

[0601]	HLA-A		HLA-B		HLA-C	
	A * 24:02	A * 24:02	B * 07:02	B * 52:01	C * 07:02	C * 12:02

[0602] 接着,在各EB衍生的血细胞样细胞的培养基中,以各种比例添加效应CD8阳性T细胞,该效应CD8阳性T细胞来自具有下述表33的HLA单倍型的外周血单核细胞(PBMC、型号“2010113203”、Wako公司、相当于上述受体B),研究各EB衍生的血细胞样细胞是否被攻击。作为效应细胞,将实验例20的图26(a)所示的、CFSE成为阴性的PBMC中的CD8阳性T细胞进行分选使用。另外,靶细胞为上述各EB衍生的血细胞样细胞。相对于EB衍生的血细胞样细胞1,添加的效应CD8阳性T细胞数的比例为0.625、1.25、2.5、5、10、20。

[0603] 表33

[0604] PBMC的HLA单倍型(“2010113203”、Wako公司)

[0605]	HLA-A		HLA-B		HLA-C	
	A * 24:02	A * 24:02	B * 40:06	B * 52:01	C * 08:01	C * 12:02

[0606] 图33是表示各EB衍生的血细胞样细胞受到损伤而溶解的比例的曲线图。图33中,“*”表示 $P < 0.05$ 、存在显著差异,“Non-edited”表示为由上述(1)的585A1 iPS细胞分化诱导的EB衍生的血细胞样细胞的结果,“B7-C7-#2”表示为由上述(2)的克隆#2分化诱导的EB衍生的血细胞样细胞的结果,“B7-C7-#11”表示为由上述(3)的克隆#11分化诱导的EB衍生的血细胞样细胞的结果,“B7-C7-#26”表示为由上述(4)的克隆#26分化诱导的EB衍生的血细胞样细胞的结果,“604B1-B2M-#1”表示为由上述(5)的敲除B2M后的604B1 iPS细胞(克隆#1)分化诱导的EB衍生的血细胞样细胞的结果。

[0607] 结果表明,由585A1 iPS细胞分化诱导的EB衍生的血细胞样细胞,如果使效应CD8阳性T细胞的比例上升,则损伤的程度上升,。

[0608] 相对于此,明确了:对于由敲除B2M后的604B1 iPS细胞分化诱导的EB衍生的血细胞样细胞,即使使效应CD8阳性T细胞的比例上升,也不会受到损伤。同样地明确了,对于由敲除585A1 iPS细胞的B*07:02等位基因以及C*07:02等位基因后的、克隆#2、#11以及#26分化诱导的EB衍生的血细胞样细胞,即使使效应CD8阳性T细胞的比例上升,也不会受到损伤。

[0609] 该结果表示:通过破坏iPS细胞的HLA等位基因,进行分化诱导,能够使进行同种异体移植时的排斥反应降低。

[0610] 另外,能够使上述(2)~(5)的各iPS细胞分化诱导为EB衍生的血细胞样细胞表示:通过IFN- γ 处理,能够在维持多能干细胞的多能性的状态下诱导HLA蛋白质的表达。

[0611] [实施例26]

[0612] (T细胞毒性试验4)

[0613] 将具有下述表34的HLA单倍型的604B1 iPS细胞、以及实验例18中制作的、敲除B2M后的604B1 iPS细胞(克隆#1),与用CFSE(Cayman Chemical公司)将具有下述表35的HLA单倍型的外周血单核细胞(PBMC、型号“LP_266”、CTL公司、相当于上述受体C)标签化后的细胞进行混合,共培养7日。

[0614] 表34

[0615] 604B1 iPS细胞的HLA单倍型

[0616]	HLA-A		HLA-B		HLA-C	
	A*01:01	A*24:02	B*07:02	B*37:01	C*06:02	C*07:02

[0617] 表35

[0618] PBMC的HLA单倍型 (LP_266、CTL公司)

[0619]	HLA-A		HLA-B		HLA-C	
	A*03:01	A*24:02	B*07:02	B*40:02	C*03:05	C*07:02

[0620] 在共培养后进行流式细胞仪分析,研究CFSE的荧光。图34 (a) 以及 (b) 是表示流式细胞仪的结果的曲线图。图34 (a) 以及 (b) 中,“604B1-B2M-#1”表示与敲除B2M后的604B1 iPS细胞 (克隆#1) 共培养的PBMC的结果,“604B1”表示与604B1 iPS细胞共培养的PBMC的结果。

[0621] 其结果,如图34 (a) 所示,在与敲除B2M后的604B1 iPS细胞 (克隆#1) 共培养的PBMC中,含有11.3%的CD8阳性、CFSE阴性的T细胞。另外,如图34 (b) 所示,在与604B1 iPS细胞共培养的PBMC中,含有21.3%的CD8阳性、CFSE阴性的T细胞。接着,从图34 (b) 所示的、与604B1 iPS细胞共培养的PBMC中,分选CD8阳性并且CFSE阴性的细胞,作为效应CD8阳性T细胞进行回收。

[0622] 接着,将 (1) 604B1 iPS细胞、(2) 实验例11中制作的、敲除604B1 iPS细胞的A*01:01等位基因、B*37:01等位基因以及C*06:02等位基因后的克隆#3-11、(3) 相同克隆#3-12,分别分化诱导成EB衍生的血细胞样细胞。需要说明的是,EB衍生的血细胞样细胞包含血细胞。

[0623] 接着,在各EB衍生的血细胞样细胞的培养基中,以各种比例添加所回收的效应CD8阳性T细胞,研究各EB衍生的血细胞样细胞是否被攻击。即,靶细胞为由上述 (1) ~ (3) 的各细胞分化诱导的EB衍生的血细胞样细胞。相对于EB衍生的血细胞样细胞1,添加的效应CD8阳性T细胞数的比例为0.625、1.25、2.5、5、10、20。

[0624] 图34 (c) 是表示各EB衍生的血细胞样细胞受到损伤而溶解的比例的曲线图。图34 (c) 中,“*”表示 $P < 0.05$ 、存在显著差异,“Non-edited”表示为由上述 (1) 的604B1 iPS细胞分化诱导的EB衍生的血细胞样细胞的结果,“A1-B37-C6-#3-11”表示为由上述 (2) 的克隆#3-11分化诱导的EB衍生的血细胞样细胞的结果,“A1-B37-C6-#3-12”表示为由上述 (3) 的克隆#3-12分化诱导的EB衍生的血细胞样细胞的结果。

[0625] 其结果表明,对于由604B1 iPS细胞分化诱导的EB衍生的血细胞样细胞,如果使效应CD8阳性T细胞的比例上升,则损伤的程度上升。

[0626] 相对于此,明确了:对于由敲除604B1 iPS细胞的A*01:01等位基因、B*37:01等位基因以及C*06:02等位基因后的、克隆#3-11以及#3-12分化诱导的EB衍生的血细胞样细胞,即使使效应CD8阳性T细胞的比例上升,也未受到损伤。

[0627] 该结果表示,通过破坏iPS细胞的HLA等位基因,发生分化诱导,能够使进行同种异体移植时的排斥反应降低。

[0628] 另外,能够使上述 (2) ~ (3) 的各iPS细胞分化诱导为EB衍生的血细胞样细胞表示:通过IFN- γ 处理能够在维持多能干细胞的多能性的状态下诱导HLA蛋白质的表达。

[0629] [实施例27]

[0630] (NK细胞反应性试验1)

[0631] 将(1)具有下述表36的HLA单倍型的604B1 iPS细胞、(2)实验例8中制作的、敲除604B1 iPS细胞的A*01:01等位基因以及B*07:02等位基因后的克隆#8、(3)相同克隆#10、(4)具有下述表37的HLA单倍型的1383D2 iPS细胞、(5)实验例18中制作的、敲除B2M后的604B1 iPS细胞(克隆#1),分别分化为EB衍生的血细胞样细胞。需要说明的是,EB衍生的血细胞样细胞包含CD45阳性白血细胞。

[0632] 表36

[0633] 604B1 iPS细胞的HLA单倍型

HLA-A		HLA-B		HLA-C	
A*01:01	A*24:02	B*07:02	B*37:01	C*06:02	C*07:02

[0635] 表37

[0636] 1383D2 iPS细胞的HLA单倍型

HLA-A		HLA-B		HLA-C	
A*02:07	A*32:01	B*15:02	B*51:01	C*08:01	C*14:02

[0638] 另外,通过分选从具有下述表38的HLA单倍型的PBMC(型号“LP_194”、CTL公司、相当于上述受体A。)中回收CD56阳性细胞(NK细胞)。接着,将回收的NK细胞在抗CD107a抗体的存在下与已分化的各CD45阳性白细胞共培养。结果,NK细胞进行活性化时,成为CD107a阳性。在共培养后进行流式细胞仪分析,测定已活性化的NK细胞的比例。

[0639] 表38

[0640] PBMC的HLA单倍型(LP_194、CTL公司)

HLA-A		HLA-B		HLA-C	
A*24:02	A*24:02	B*37:01	B*39:06	C*06:02	C*07:02

[0642] 图35(a)~(g)是表示流式细胞仪分析的结果的曲线图。图35(a)是仅培养NK细胞并进行分析的结果。图35(b)是对NK细胞(该NK细胞与由604B1 iPS细胞分化诱导的EB衍生的血细胞样细胞共培养)进行分析的结果。图35(c)是对NK细胞(该NK细胞与由敲除604B1 iPS细胞的A*01:01等位基因以及B*07:02等位基因后的克隆#8分化诱导的EB衍生的血细胞样细胞共培养)进行分析的结果。图35(d)是对与由相同克隆#10分化诱导的EB衍生的血细胞样细胞共培养的NK细胞进行分析的结果。图35(e)是对与由1383D2 iPS细胞分化诱导的EB衍生的血细胞样细胞共培养的NK细胞进行分析的结果。图35(f)是对与由敲除B2M后的604B1 iPS细胞分化诱导的EB衍生的血细胞样细胞共培养的NK细胞进行分析的结果。图35(g)是作为阳性对照、对与已知没有表达HLA抗原的K562细胞共培养的NK细胞进行分析的结果。

[0643] 其结果表明,对于与K562细胞共培养的NK细胞,有5.9%发生活活化。另外明确,对于与没有表达HLA抗原的、由敲除B2M后的604B1 iPS细胞分化诱导的EB衍生的血细胞样细胞共培养的NK细胞,有3.2%发生活活化。

[0644] 相对于此,明确了:在敲除604B1 iPS细胞的A*01:01等位基因以及B*07:02等位基因后的克隆#8以及#10中,其余的A*24:02等位基因和B*37:01等位基因的表达残存,对于与由其分化诱导的EB衍生的血细胞样细胞共培养的NK细胞,活性化被抑制。

[0645] 即,明确了:敲除B2M后的细胞显著地受到NK细胞攻击,相对于此,使一部分HLA等位基因残存的细胞能够避免由NK细胞带来的攻击。

[0646] [实施例28]

[0647] (多能性确认试验1)

[0648] 关于1383D2 iPS细胞以及604B1 iPS细胞,分别准备(1)未处理的状态、(2)用50ng/mL的IFN- γ 刚刚处理48小时后、以及(3)用50ng/mL的IFN- γ 处理48小时后的5日后、的各细胞,提取mRNA。接着,使用Rever Tra Ase qPCR RTMaster Mix(Toyobo社),合成cDNA后,使用对在多能干细胞中特异性表达的人NANOG cDNA进行扩增的引物、以及作为mRNA总量的对照使用扩增人ACTB cDNA的引物,进行定量PCR。

[0649] 用于人NANOG cDNA扩增的引物、以及用于人ACTB cDNA扩增的引物,如下述表39所示。

[0650] 表39

引物名	碱基序列	序列号
hNANOG (+4835) -fwd	CTTCACTTCCCAGGTGCAA	66
hNANOG (+4835) -rev	AGGCTAGCCAACATGAGGAA	67
hACTB-Fwd	CCAACCGCGAGAAGATGA	68
hACTB-Rev	CCAGAGGCGTACAGGGATAG	69

[0652] 图36是表示测定NANOG基因的表表达的定量PCR的结果的曲线图。对于NANOG基因的表表达量,以将“未处理”的1383D2细胞中的、NANOG基因相对于ACTB基因的的表表达量作为1的相对值示出。

[0653] 图36中,“未处理”表示为没有用IFN- γ 处理、在通常的未分化保持条件下培养的iPS细胞的结果,“刚刚IFN后”表示为刚刚用IFN- γ 处理48小时后的细胞的结果,“5日后”表示为用IFN- γ 处理48小时后的5日后的细胞的结果。

[0654] 其结果表明,对于作为多能性标记广泛应用的NANOG的表表达量,即使将iPS细胞用IFN- γ 处理48小时也不会降低。该结果表示即使将iPS细胞用IFN- γ 处理也保持多能性。

[0655] [实施例29]

[0656] (多能性确认试验2)

[0657] 将(1)604B1 iPS细胞、(2)实验例11中制作的破坏604B1 iPS细胞的A*01:01等位基因、B*37:01等位基因、C*06:02等位基因后的克隆#3-11、(3)相同克隆#3-12、(4)实验例18中制作的破坏604B1 iPS细胞的B2M基因后的克隆#1、(5)1383D2 iPS细胞、(6)实验例17中制作的破坏1383D2 iPS细胞的B2M基因后的克隆#1,分别在未分化保持条件下培养,通过相差显微镜观察各细胞的形态。

[0658] 关于未分化保持条件下的培养,培养基使用AK03N培养基(StemFit、Ajinomoto公司),细胞矩阵使用型号“iMatrix-511”(Nippi公司)来进行。

[0659] 图37(a)~(f)分别是用相差显微镜拍摄上述(1)~(5)的各细胞的照片。比例尺为1mm。

[0660] 其结果表明,对于破坏HLA等位基因、B2M等位基因、进行IFN- γ 处理后的iPS细胞,也形成未分化多能干细胞特征的扁平菌落,进行增殖。该结果表示即使将iPS细胞用IFN- γ 处理也保持多能性。另外,该结果表示即使破坏iPS细胞的HLA等位基因、B2M等位基因,也保

持多能性。

[0661] [实施例30]

[0662] (多能性确认试验3)

[0663] 将(1) 604B1 iPS细胞、(2) 实验例11中制作的破坏604B1 iPS细胞的A*01:01等位基因、B*37:01等位基因、C*06:02等位基因后的克隆#3-11、(3) 相同克隆#3-12、(4) 实验例18中制作的破坏604B1 iPS细胞的B2M基因后的克隆#1、(5) 1383D2 iPS细胞、(6) 实验例17中制作的破坏1383D2 iPS细胞的B2M基因后的克隆#1,分别在血细胞分化诱导条件下培养,通过相差显微镜观察EB衍生的血细胞样细胞的形态。

[0664] iPS细胞的血细胞分化诱导如下进行、首先,将未分化iPS细胞接种至超低粘附培养板(Corning公司),在包含Y-27633的AK03N培养基中使EB(胚状体)形成2日。接着,在包含人bFGF(ORIENTAL YEAST公司)、人VEGF(R&D Systems公司)、ITS(Insulin-Transferrin-Selenium、THERMO FISHER SCIENTIFIC公司)、GlutaMax-I(THERMO FISHER SCIENTIFIC公司)、L-ascorbic acid 2-phosphate sesquimagnesium salt hydrate(Sigma公司)、1-Thioglycerol(MTG、Nacalai Tesque社)以及人BMP4(R&D Systems公司)的StemPro-34 SFM培养基(THERMO FISHER SCIENTIFIC公司)中,进一步培养3日后,除去人BMP4,添加人SCF,培养2日。接着,加入人Flt3-Ligand(Peprotech公司)以及人TP0(Peprotech公司)进行培养。其结果,生成EB衍生的血细胞样细胞。

[0665] 图38(a)~(f)分别是将分化诱导第22日的上述(1)~(5)的各EB衍生的血细胞样细胞用相差显微镜拍摄所得的照片。比例尺为1mm。

[0666] 其结果表明,对于破坏HLA等位基因、B2M等位基因、进行IFN- γ 处理的iPS细胞,也能够分化诱导成血细胞样细胞。该结果表示即使将iPS细胞用IFN- γ 处理也可以保持多能性。另外,该结果表示即使破坏iPS细胞的HLA等位基因、B2M等位基因也可以保持多能性。

[0667] [实施例31]

[0668] (T细胞毒性试验5)

[0669] 将(1) 实验例17中制作的、敲除具有下述表40的HLA单倍型的1383D2 iPS细胞的B2M等位基因后的细胞(克隆#1)、(2) 具有下述表41的HLA单倍型的585A1 iPS细胞,用CFSE(Cayman Chemical公司)染色,与具有下述表42的HLA单倍型的外周血单核细胞(PBMC、型号“LP_275”、CTL公司)共培养7日。

[0670] 表40

[0671] 1383D2 iPS细胞的HLA单倍型

HLA-A		HLA-B		HLA-C	
A*02:07	A*32:01	B*15:02	B*51:01	C*08:01	C*14:02

[0673] 表41

[0674] 585A1 iPS细胞的HLA单倍型

HLA-A		HLA-B		HLA-C	
A*24:02	A*24:02	B*07:02	B*52:01	C*07:02	C*12:02

[0676] 表42

[0677] PBMC的HLA单倍型(LP_275、CTL公司)

[0678]	HLA-A		HLA-B		HLA-C	
	A*02:06	A*33:03	B*40:01	B*58:01	C*03:02	C*07:02

[0679] 在共培养后进行流式细胞仪分析,研究CFSE的荧光。图39(a)以及(b)是表示流式细胞仪的结果的曲线图。图39(a)以及(b)中,“1383D2 B2M-K0#1”表示为与敲除B2M后的1383D2 iPS细胞(克隆#1)共培养的PBMC的结果,“585A1-WT”表示为与585A1 iPS细胞共培养的PBMC的结果。

[0680] 其结果,如图39(a)所示,与敲除B2M后的1383D2 iPS细胞(克隆#1)共培养的PBMC中,不存在CD8阳性、CSFE阴性的T细胞。另外,如图39(b)所示,与585A1 iPS细胞共培养的PBMC中,发生活活化、且成为CSFE阴性的CD8阳性T细胞含有24.4%。接着,从图39(b)所示的、与585A1 iPS细胞共培养的PBMC中,分选CD8阳性并且CSFE阴性的细胞作为效应CD8阳性T细胞进行回收。

[0681] 接着,将(1)585A1 iPS细胞、(2)实验例13中制作的、敲除585A1 iPS细胞的A*24:02等位基因、B*07:02等位基因、B*52:01等位基因以及C*12:02等位基因后的克隆#3-1、(3)相同克隆#3-3、(4)后述实验例46中制作的、敲除585A1 iPS细胞的B2M等位基因后的细胞(没有亚克隆的大部分细胞),分别分化诱导成EB衍生的血细胞样细胞。需要说明的是,EB衍生的血细胞样细胞包含血细胞。

[0682] 接着,在各EB衍生的血细胞样细胞的培养基中,以各种比例添加所回收的效应CD8阳性T细胞,研究各EB衍生的血细胞样细胞是否被攻击。即,靶细胞为由上述(1)~(4)的各细胞分化诱导的EB衍生的血细胞样细胞。相对于EB衍生的血细胞样细胞1,添加的效应CD8阳性T细胞数的比例为0.625、1.25、2.5、5、10、20。

[0683] 图39(c)是表示各EB衍生的血细胞样细胞受到损伤而溶解的比例的曲线图。图39(c)中,“**”表示 $P<0.01$ 、存在显著差异,“WT”表示为由上述(1)的585A1 iPS细胞分化诱导的EB衍生的血细胞样细胞的结果,“C7#3-1”表示为由上述(2)的克隆#3-1分化诱导的EB衍生的血细胞样细胞的结果,“C7#3-3”表示为由上述(3)的克隆#3-3分化诱导的EB衍生的血细胞样细胞的结果,“B2M-”表示为由上述(4)的细胞(即,敲除585A1 iPS细胞的B2M等位基因后的细胞)分化诱导的EB衍生的血细胞样细胞的结果。

[0684] 其结果表明,对于由585A1 iPS细胞分化诱导的EB衍生的血细胞样细胞,如果使效应CD8阳性T细胞的比例上升,则损伤的程度上升。

[0685] 相对于此,明确了:对于由敲除585A1 iPS细胞的A*24:02等位基因、B*07:02等位基因、B*52:01等位基因以及C*12:02等位基因后的、克隆#3-1以及#3-3分化诱导的EB衍生的血细胞样细胞、以及由敲除585A1 iPS细胞的B2M等位基因后的细胞分化诱导的EB衍生的血细胞样细胞,即使使效应CD8阳性T细胞的比例上升,也不会受到损伤。

[0686] 该结果进一步支持:通过破坏iPS细胞的HLA等位基因,发生分化诱导,能够使进行同种异体移植时的排斥反应降低。

[0687] [实施例32]

[0688] (T细胞毒性试验6)

[0689] 将(1)实验例17中制作的、敲除1383D2 iPS细胞(具有下述表43的HLA单倍型)的B2M等位基因后的细胞(克隆#1)、(2)具有下述表44的HLA单倍型的585A1 iPS细胞,与用CFSE(Cayman Chemical公司)将具有下述表45的HLA单倍型的外周血单核细胞(PBMC、型号

“LP_329”、CTL公司)染色而得的细胞,进行共培养7日。

[0690] 表43

[0691] 1383D2 iPS细胞的HLA单倍型

HLA-A		HLA-B		HLA-C	
A*02:07	A*32:01	B*15:02	B*51:01	C*08:01	C*14:02

[0693] 表44

[0694] 585A1 iPS细胞的HLA单倍型

HLA-A		HLA-B		HLA-C	
A*24:02	A*24:02	B*07:02	B*52:01	C*07:02	C*12:02

[0696] 表45

[0697] PBMC的HLA单倍型 (LP329、CTL公司)

HLA-A		HLA-B		HLA-C	
A*29:02	A*68:01	B*39:06	B*40:02	C*03:05	C*07:02

[0699] 在共培养后进行流式细胞仪分析,研究CFSE的荧光。图40(a)以及(b)是表示流式细胞仪的结果的曲线图。图40(a)以及(b)中,“1383D2 B2M-K0#1”表示为与敲除B2M后的1383D2 iPS细胞(克隆#1)共培养的PBMC的结果,“585A1-WT”表示为与585A1 iPS细胞共培养的PBMC的结果。

[0700] 其结果,如图40(a)所示,在与敲除B2M后的1383D2 iPS细胞(克隆#1)共培养的PBMC中,不存在CD8阳性、CSFE阴性的T细胞。另外,如图40(b)所示,与585A1 iPS细胞共培养的PBMC中,发生活活化且成为CSFE阴性的CD8阳性T细胞含有11.7%。接着,从图40(b)所示的、与585A1 iPS细胞共培养的PBMC中,分选出CD8阳性并且CSFE阴性的细胞作为效应CD8阳性T细胞,进行回收。

[0701] 接着,将(1)585A1 iPS细胞、(2)实验例13中制作的、敲除585A1 iPS细胞的A*24:02等位基因、B*07:02等位基因、B*52:01等位基因以及C*12:02等位基因后的克隆#3-1、(3)相同克隆#3-3、(4)下述实验例46中制作的、敲除585A1 iPS细胞的B2M等位基因后的细胞(没有亚克隆的大部分细胞),分别分化诱导成EB衍生的血细胞样细胞。需要说明的是,EB衍生的血细胞样细胞包含血细胞。

[0702] 接着,在各EB衍生的血细胞样细胞的培养基中,以各种比例添加所回收的效应CD8阳性T细胞,研究各EB衍生的血细胞样细胞是否被攻击。即,靶细胞为由上述(1)~(4)的各细胞分化诱导的EB衍生的血细胞样细胞。相对于EB衍生的血细胞样细胞1,添加的效应CD8阳性T细胞数的比例为0.625、1.25、2.5、5、10、20。

[0703] 图40(c)是表示各EB衍生的血细胞样细胞受到损伤而溶解的比例的曲线图。图40(c)中,“**”表示 $P<0.01$ 、存在显著差异,“WT”表示为由上述(1)的585A1 iPS细胞分化诱导的EB衍生的血细胞样细胞的结果,“C7#3-1”表示为由上述(2)的克隆#3-1分化诱导的EB衍生的血细胞样细胞的结果,“C7#3-3”表示为由上述(3)的克隆#3-3分化诱导的EB衍生的血细胞样细胞的结果,“B2M”表示为由上述(4)的敲除585A1 iPS细胞的B2M等位基因后的细胞分化诱导的EB衍生的血细胞样细胞的结果。

[0704] 其结果表明,对于由585A1 iPS细胞分化诱导的EB衍生的血细胞样细胞,如果使效

应CD8阳性T细胞的比例上升,则损伤的程度上升。

[0705] 相对于此,明确了:对于由敲除585A1 iPS细胞的A*24:02等位基因、B*07:02等位基因、B*52:01等位基因以及C*12:02等位基因后的、克隆#3-1以及#3-3分化诱导的EB衍生的血细胞样细胞、以及由敲除1383D2 iPS细胞的B2M等位基因后的细胞分化诱导的EB衍生的血细胞样细胞,即使使效应CD8阳性T细胞的比例上升,也不会受到损伤。

[0706] 该结果进一步支持:通过破坏iPS细胞的HLA等位基因,发生分化诱导,能够使进行同种异体移植时的排斥反应降低。

[0707] [实施例33]

[0708] (细胞移植实验1)

[0709] 将(1)585A1 iPS细胞、(2)实验例13中制作的、敲除585A1 iPS细胞的A*24:02等位基因、B*07:02等位基因、B*52:01等位基因以及C*12:02等位基因后的克隆#3-1,分别分化诱导成EB衍生的血细胞样细胞。接着,将各EB衍生的血细胞样细胞用荧光素酶标记。

[0710] 接着,在实验开始的1小时前,通过腹腔内给药,向免疫缺陷小鼠(NOD.Cg-Rag1^{tm1Mom}Il2rg^{tm1Wj1}/SzJ(NRG)、The Jackson Laboratory公司)中分别移植各细胞。接着,实验开始时,将与实验例32同样操作制备的、来自外周血单核细胞(PBMC、型号“LP_329”、CTL公司)的效应CD8阳性T细胞或培养基(对照)进一步进行腹腔内给药。

[0711] 接着,在细胞移植时(T细胞注射前)、实验开始后的5小时后、1日后、3日后、7日后,对各小鼠给与荧光素酶的基质即萤光素,使用IVIS成像系统(商品名“IVIS Spectrum”、SPI公司),拍摄用荧光素酶标记的EB衍生的血细胞样细胞的荧光,测定所移植的细胞的生存率。

[0712] 图41(a)是说明实验时间表的图。另外,图41(b)是表示对各小鼠中的EB衍生的血细胞样细胞的荧光进行拍摄的结果的照片。另外,图41(c)是相对的生存曲线的曲线图,表示以T细胞注射前的荧光强度为100%、对向小鼠给与效应CD8阳性T细胞时的各EB衍生的血细胞样细胞的生存率进行计算所得的结果。

[0713] 图41(b)以及(c)中,“WT”表示为由上述(1)585A1 iPS细胞分化诱导的EB衍生的血细胞样细胞的结果,“C7#3-1”表示为由上述(2)的克隆#3-1分化诱导的EB衍生的血细胞样细胞的结果,“Mock”表示为作为对照给与培养基的结果,“T细胞”表示为给与来自外周血单核细胞(PBMC、型号“LP_329”、CTL公司)的效应CD8阳性T细胞的结果。

[0714] 其结果确认,如图41(c)所示,由585A1 iPS细胞分化诱导的EB衍生的血细胞样细胞在给与效应CD8阳性T细胞后生存率降低。相对于此,明确了:对于由敲除585A1 iPS细胞的A*24:02等位基因、B*07:02等位基因、B*52:01等位基因以及C*12:02等位基因后的克隆#3-1分化诱导的EB衍生的血细胞样细胞,即使在给与效应CD8阳性T细胞后,也保持高生存率。

[0715] 该结果进一步支持:通过破坏iPS细胞的HLA等位基因,发生分化诱导,能够使进行同种异体移植时的排斥反应降低。

[0716] [实施例34]

[0717] (NK细胞反应性试验2)

[0718] 准备(1)585A1 iPS细胞、(2)实验例13中制作的、敲除585A1 iPS细胞的A*24:02等位基因、B*07:02等位基因、B*52:01等位基因以及C*12:02等位基因后的克隆#3-1、(3)下述

实验例46中制作的、敲除585A1 iPS细胞的B2M等位基因后的细胞(没有亚克隆的大部分细胞)。下述表46表示585A1 iPS细胞的HLA单倍型,下述表47表示1383D2 iPS细胞的HLA单倍型。

[0719] 表46

[0720] 585A1 iPS细胞的HLA单倍型

[0721]	HLA-A		HLA-B		HLA-C	
	A*24:02	A*24:02	B*07:02	B*52:01	C*07:02	C*12:02

[0722] 表47

[0723] 1383D2 iPS细胞的HLA单倍型

[0724]	HLA-A		HLA-B		HLA-C	
	A*02:07	A*32:01	B*15:02	B*51:01	C*08:01	C*14:02

[0725] 另外,通过分选从具有下述表48的HLA单倍型的PBMC(型号“LP_275”、CTL公司)中回收CD56阳性细胞(NK细胞)。接着,将回收的NK细胞在抗CD107a抗体的存在下与上述(1)~(3)的各细胞共培养。结果,NK细胞发生活活化时,成为CD107a阳性。在共培养后进行流式细胞仪分析,测定发生活活化后的NK细胞的比例。

[0726] 表48

[0727] PBMC的HLA单倍型(LP_275、CTL公司)

[0728]	HLA-A		HLA-B		HLA-C	
	A*02:06	A*33:03	B*40:01	B*58:01	C*03:02	C*07:02

[0729] 图42(a)是表示流式细胞仪分析的结果的曲线图。图42(a)中,“*”表示 $P<0.01$ 、存在显著差异,“WT”表示为上述(1)的585A1 iPS细胞的结果,“C7#3-1”表示为上述(2)的克隆#3-1的结果,“B2M”表示为上述(3)的敲除585A1 iPS细胞的B2M等位基因后的细胞的结果。

[0730] 其结果表明,与敲除B2M等位基因后的细胞进行比较,585A1 iPS细胞以及克隆#3-1中,能够显著地抑制NK细胞的活性化。接着,将在敲除B2M等位基因后的细胞中活性化的NK细胞进行分选,从而回收。

[0731] 接着,向(4)已知没有表达HLA抗原的K562细胞、(5)下述实验例46中制作的、敲除585A1 iPS细胞的B2M等位基因后的细胞(没有亚克隆的大部分细胞)、(6)下述实验例47中制作的、敲除585A1 iPS细胞的HLA-A等位基因、HLA-B等位基因以及HLA-C等位基因后的细胞(克隆#3-5、HLA-E、F、G等位基因残存)、(7)实验例13中制作的、敲除585A1 iPS细胞的A*24:02等位基因、B*07:02等位基因、B*52:01等位基因以及C*12:02等位基因后的克隆#3-1、(8)相同克隆#3-3、(9)实验例13中制作的、敲除585A1 iPS细胞的HLA-A等位基因以及将HLA-B等位基因后的细胞(克隆#3、HLA-C、E、F、G等位基因残存。)、(10)585A1 iPS细胞的各细胞中,以各种比例添加已活性化的NK细胞,进行 ^{51}Cr 释放分析。

[0732] 即,作为效应细胞使用上述活化后的NK细胞,作为靶细胞使用上述(4)~(10)的各细胞。添加的NK细胞数的比例相对于靶细胞1为0.33、1、3。

[0733] 图42(b)是表示上述(4)~(10)的各细胞受到损伤而溶解的比例的曲线图。图42(b)中,“*”表示 $P<0.05$ 、存在显著差异,“**”表示 $P<0.01$ 、存在显著差异,“K562”表示为上述

(4)的K562细胞的结果,“B2M”表示为上述(5)的敲除585A1 iPS细胞的B2M等位基因后的细胞的结果,“A-B-C-#5”表示为上述(6)的敲除HLA-A等位基因、HLA-B等位基因以及HLA-C等位基因后的细胞(克隆#3-5)的结果,“C7#3-1”表示为上述(7)的克隆#3-1的结果,“C7#3-3”表示为上述(8)的克隆#3-3的结果,“A-B-#3”表示为上述(9)的敲除HLA-A等位基因以及HLA-B等位基因后的细胞(克隆#3)的结果,“585A1-WT”表示为上述(10)的585A1 iPS细胞的结果。

[0734] 其结果表明,与敲除B2M后的细胞以及敲除HLA-A等位基因、HLA-B等位基因以及HLA-C等位基因后的细胞进行比较,使HLA-C等位基因残存的细胞能够显著避免由NK细胞带来的攻击。

[0735] [实施例35]

[0736] (NK细胞反应性试验3)

[0737] 准备(1)585A1 iPS细胞、(2)实验例13中制作的、敲除585A1 iPS细胞的A*24:02等位基因、B*07:02等位基因、B*52:01等位基因以及C*12:02等位基因后的克隆#3-1、(3)下述实验例46中制作的、敲除585A1 iPS细胞的B2M等位基因后的细胞(没有亚克隆的大部分细胞)。下述表49中示出585A1 iPS细胞的HLA单倍型,下述表50中示出1383D2 iPS细胞的HLA单倍型。

[0738] 表49

[0739] 585A1 iPS细胞的HLA单倍型

[0740]	HLA-A		HLA-B		HLA-C	
	A * 24:02	A * 24:02	B * 07:02	B * 52:01	C * 07:02	C * 12:02

[0741] 表50

[0742] 1383D2 iPS细胞的HLA单倍型

[0743]	HLA-A		HLA-B		HLA-C	
	A * 02:07	A * 32:01	B * 15:02	B * 51:01	C * 08:01	C * 14:02

[0744] 另外,通过分选从具有下述表51的HLA单倍型的PBMC(型号“LP_329”、CTL公司)中回收CD3阴性CD56阳性细胞(NK细胞)。接着,将回收的NK细胞在抗CD107a抗体的存在下与上述(1)~(3)的各细胞共培养。结果,NK细胞发生活活化时,成为CD107a阳性。在共培养后进行流式细胞仪分析,测定活化后的NK细胞的比例。

[0745] 表51

[0746] PBMC的HLA单倍型(LP_329、CTL公司)

[0747]	HLA-A		HLA-B		HLA-C	
	A * 29:02	A * 68:01	B * 39:06	B * 40:02	C * 03:05	C * 07:02

[0748] 图43(a)是表示流式细胞仪分析的结果的曲线图。图43(a)中,“*”表示 $P < 0.01$ 、存在显著差异,“WT”表示为上述(1)的585A1 iPS细胞的结果,“C7#3-1”表示为上述(2)的克隆#3-1的结果,“B2M”表示为上述(3)的敲除585A1 iPS细胞的B2M等位基因后的细胞的结果。

[0749] 其结果表明,与敲除B2M等位基因后的细胞相比,585A1 iPS细胞以及克隆#3-1中能够显著地抑制NK细胞的活化。接着,将在敲除B2M等位基因后的细胞中活化的NK细胞

进行分选、回收。

[0750] 接着,向(4)已知没有表达HLA抗原的K562细胞、(5)下述实验例46中制作的、敲除585A1 iPS细胞的B2M等位基因后的细胞(没有亚克隆的大部分细胞)、(6)下述实验例47中制作的、敲除585A1 iPS细胞的HLA-A等位基因、HLA-B等位基因以及HLA-C等位基因后的细胞(克隆#3-5、HLA-E、F、G等位基因残存)、(7)实验例13中制作的、敲除585A1 iPS细胞的A*24:02等位基因、B*07:02等位基因、B*52:01等位基因以及C*12:02等位基因后的克隆#3-1、(8)相同克隆#3-3、(9)实验例13中制作的、敲除585A1 iPS细胞的HLA-A等位基因以及HLA-B等位基因后的细胞(克隆#3、HLA-C、E、F、G等位基因残存)、(10)585A1 iPS细胞的各细胞中,以各种比例添加已活性化的NK细胞,进行⁵¹Cr释放分析。

[0751] 即,作为效应细胞使用上述已活性化的NK细胞,作为靶细胞使用上述(4)~(10)的各细胞。添加的NK细胞数的比例相对于靶细胞1为0.33、1、3。

[0752] 图43(b)是表示上述(4)~(10)的各细胞受到损伤而溶解的比例的曲线图。图43(b)中,“**”表示P<0.01、存在显著差异,“K562”表示为上述(4)的K562细胞的结果,“B2M”表示为上述(5)的敲除585A1 iPS细胞的B2M等位基因后的细胞的结果,“A-B-C-#5”表示为上述(6)的敲除HLA-A等位基因、HLA-B等位基因以及HLA-C等位基因后的细胞(克隆#5)的结果,“C7#3-1”表示为上述(7)的克隆#3-1的结果,“C7#3-3”表示为上述(8)的克隆#3-3的结果,“A-B-#3”表示为上述(9)的敲除HLA-A等位基因以及HLA-B等位基因后的细胞(克隆#3)的结果,“585A1-WT”表示为上述(10)的585A1 iPS细胞的结果。

[0753] 其结果表明,与敲除B2M后的细胞以及敲除HLA-A等位基因、HLA-B等位基因以及HLA-C等位基因后的细胞相比,使HLA-C等位基因残存的细胞能够显著避免由NK细胞带来的攻击。

[0754] [实施例36]

[0755] (NK细胞反应性试验4)

[0756] 准备(1)585A1 iPS细胞、(2)实验例13中制作的、敲除585A1 iPS细胞的A*24:02等位基因、B*07:02等位基因、B*52:01等位基因以及C*12:02等位基因后的克隆#3-1、(3)下述实验例46中制作的、敲除585A1 iPS细胞的B2M等位基因后的细胞(没有亚克隆的大部分细胞)、(4)已知没有表达HLA抗原的K562细胞。下述表52中示出585A1 iPS细胞的HLA单倍型,下述表53示出1383D2 iPS细胞的HLA单倍型。

[0757] 表52

[0758] 585A1 iPS细胞的HLA单倍型

[0759]	HLA-A		HLA-B		HLA-C	
	A * 24 : 02	A * 24 : 02	B * 07 : 02	B * 52 : 01	C * 07 : 02	C * 12 : 02

[0760] 表53

[0761] 1383D2 iPS细胞的HLA单倍型

[0762]	HLA-A		HLA-B		HLA-C	
	A * 02 : 07	A * 32 : 01	B * 15 : 02	B * 51 : 01	C * 08 : 01	C * 14 : 02

[0763] 另外,通过分选从具有下述表54的HLA单倍型的PBMC(型号“LP_118”、CTL公司)以及具有下述表55的HLA单倍型的PBMC(型号“LP_266”、CTL公司)分别回收CD3阴性CD56阳性细胞(NK细胞)。接着,将回收的NK细胞在抗CD107a抗体的存在下与上述(1)~(4)的各细胞

共培养。结果,NK细胞发生活活化时,成为CD107a阳性。在共培养后进行流式细胞仪分析,测定活化后的NK细胞的比例。

[0764] 表54

[0765] PBMC的HLA单倍型 (LP118、CTL公司)

[0766]	HLA-A		HLA-B		HLA-C	
	A*03:01	A*24:02	B*07:02	B*35:01	C*07:02	C*07:02

[0767] 表55

[0768] PBMC的HLA单倍型 (LP_266、CTL公司)

[0769]	HLA-A		HLA-B		HLA-C	
	A*03:01	A*24:02	B*07:02	B*40:02	C*03:05	C*07:02

[0770] 图44 (a) 以及 (b) 是表示流式细胞仪分析的结果的曲线图。图44 (a) 表示来自具有上述表54的HLA单倍型的PBMC (型号“LP_118”、CTL公司) 的NK细胞的结果,图44 (b) 表示来自具有上述表55的HLA单倍型的PBMC (型号“LP_266”、CTL公司) 的NK细胞的结果。图44 (a) 以及 (b) 中,“**”表示 $P<0.01$ 、存在显著差异,“WT”表示为上述 (1) 的585A1 iPS细胞的结果,“C7#3-1”表示为上述 (2) 的克隆#3-1的结果,“B2M”表示为上述 (3) 的敲除585A1 iPS细胞的B2M等位基因后的细胞的结果,“K562”表示为上述 (4) 的K562细胞的结果。

[0771] 其结果表明,与敲除B2M等位基因后的细胞相比,585A1 iPS细胞以及克隆#3-1中能够显著地抑制NK细胞的活性化。

[0772] [实施例37]

[0773] (细胞移植实验2)

[0774] 将 (1) 敲除585A1 iPS细胞的B2M基因后的细胞、(2) 实验例13中制作的、敲除585A1 iPS细胞的A*24:02等位基因、B*07:02等位基因、B*52:01等位基因以及C*12:02等位基因后的克隆#3-1,分别分化诱导成EB衍生的血细胞样细胞。接着,将各EB衍生的血细胞样细胞用荧光素酶标记。

[0775] 接着,在实验开始的1小时前,通过腹腔内给药,向免疫缺陷小鼠 (NOD.Cg-Rag1^{tm1Mom}Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ (NRG)、The Jackson Laboratory公司) 中分别移植各细胞。接着,在实验开始时,进一步腹腔内给与与实验例34、35同样制备的、来自外周血单核细胞 (PBMC、型号“LP_329”、CTL公司) 的活性化NK细胞或培养基 (对照)。下述表56中示出PBMC (型号“LP_329”、CTL公司) 的HLA单倍型。

[0776] 表56

[0777] PBMC的HLA单倍型 (LP_329、CTL公司)

[0778]	HLA-A		HLA-B		HLA-C	
	A*29:02	A*68:01	B*39:06	B*40:02	C*03:05	C*07:02

[0779] 接着,在细胞移植时 (NK细胞注射前)、实验开始后的5小时后、1日后、3日后、5日后、7日后,对各小鼠给与荧光素酶的基质即萤光素,使用IVIS成像系统 (商品名“IVIS Spectrum”、SPI公司),拍摄用荧光素酶标记的EB衍生的血细胞样细胞的荧光,测定所移植的细胞的生存率。

[0780] 图45 (a) 是说明实验时间表的图。另外,图45 (b) 是表示对各小鼠中的EB衍生的血

细胞样细胞的荧光进行拍摄的结果的照片。另外,图45(c)是曲线图,表示:以NK细胞注射前的荧光强度为100%、计算出向小鼠给与NK细胞时的各EB衍生的血细胞样细胞的生存率、进一步通过下述式(F1)计算各测定时间下的相对的生存率的结果。图45(c)中,纵轴的单位为(%)。

[0781] 相对的生存率(%)=NK细胞给与组的生存率(%) /对照组的生存率(%) × 100…
(F1)

[0782] 图45(b)以及(c)中,“B2M”表示为由上述(1)的敲除585A1 iPS细胞的B2M基因后的细胞分化诱导的EB衍生的血细胞样细胞的结果,“C7#3-1”表示为由上述(2)的克隆#3-1分化诱导的EB衍生的血细胞样细胞的结果,“Mock”表示为作为对照给与培养基的结果,“NK细胞”表示为给与来自外周血单核细胞(PBMC、型号“LP_329”、CTL公司)的活性化NK细胞的结果。

[0783] 其结果确认了,如图45(c)所示,对于由敲除B2M基因后的细胞分化诱导的EB衍生的血细胞样细胞,在NK细胞给与后生存率降低。相对于此,确认了,对于由克隆#3-1分化诱导的EB衍生的血细胞样细胞,即使在活性化NK细胞的给与后,也保持更高的生存率的倾向。

[0784] 该结果进一步支持:通过使一部分HLA等位基因残存,能够使进行同种异体移植时的由NK细胞带来的攻击降低。

[0785] [实施例38]

[0786] (由T细胞以及NK细胞导致的损伤性试验)

[0787] 将(1) 585A1 iPS细胞、(2) 实验例13中制作的、敲除585A1 iPS细胞的A*24:02等位基因、B*07:02等位基因、B*52:01等位基因以及C*12:02等位基因后的克隆#3-1、(3) 下述实验例46中制作的、敲除585A1 iPS细胞的B2M等位基因后的细胞(没有亚克隆的大部分细胞),分别分化诱导成EB衍生的血细胞样细胞。

[0788] 接着,在各EB衍生的血细胞样细胞的培养基中,以各种比例添加与实验例31同样地从外周血单核细胞(PBMC、型号“LP_275”、CTL公司)中分选回收的效应CD8阳性T细胞、以及与实验例34同样地从PBMC(型号“LP_275”、CTL公司)中分选回收的活性化NK细胞,进行⁵¹Cr释放分析。

[0789] 即,靶细胞为由上述(1)~(3)的各细胞分化诱导的EB衍生的血细胞样细胞,效应细胞为上述CD8阳性T细胞以及活性化NK细胞。对于添加的效应CD8阳性T细胞数的比例,相对于EB衍生的血细胞样细胞1设为1、3、9。另外,对于添加的活性化NK细胞数的比例,相对于EB衍生的血细胞样细胞1设为0.33、1、3。

[0790] 图46是表示各EB衍生的血细胞样细胞受到损伤而溶解的比例的曲线图。图46中,“*”表示P<0.05、存在显著差异,“**”表示P<0.01、存在显著差异,“WT”表示为由上述(1)的585A1 iPS细胞分化诱导的EB衍生的血细胞样细胞的结果,“C7#3-1”表示为由上述(2)的克隆#3-1分化诱导的EB衍生的血细胞样细胞的结果,“B2M”表示为由上述(3)的敲除585A1 iPS细胞的B2M等位基因后的细胞分化诱导的EB衍生的血细胞样细胞的结果。

[0791] 其结果确认,在各EB衍生的血细胞样细胞中单独地混合效应CD8阳性T细胞时,仅仅由585A1 iPS细胞分化诱导的EB衍生的血细胞样细胞受到损伤。

[0792] 另外确认,在各EB衍生的血细胞样细胞中单独地混合活性化NK细胞时,仅仅由敲除B2M等位基因后的细胞分化诱导的EB衍生的血细胞样细胞受到损伤。

[0793] 另外明确了,在各EB衍生的血细胞样细胞中混合效应CD8阳性T细胞以及活性化NK细胞二者时,由585A1 iPS细胞分化诱导的EB衍生的血细胞样细胞以及由敲除B2M等位基因后的细胞分化诱导的EB衍生的血细胞样细胞二者受到损伤,但由C7#3-1细胞分化诱导的EB衍生的血细胞样细胞显著抑制了损伤的程度。

[0794] 该结果表明:通过破坏在供体细胞中存在而在受体细胞中不存在的HLA等位基因、并且使在供体细胞和受体细胞中一致的HLA等位基因残存,能够使由效应CD8阳性T细胞以及活性化NK细胞二者导致的损伤均降低。

[0795] [实施例39]

[0796] (CIITA基因敲除iPS细胞的制作)

[0797] CIITA基因是编码II类主要组织相容性复合物反式激活因子蛋白质的基因。如上所述,已知CIITA基因的表达对II类的HLA蛋白质的表达是必须的。

[0798] 将实验例13中制作的、敲除585A1 iPS细胞的A*24:02等位基因、B*07:02等位基因、B*52:01等位基因以及C*12:02等位基因后的克隆#3-1(以下,有时称为“585A1-C7残留细胞”)的CIITA基因敲除。

[0799] 图47(a)是表示585A1-C7残留细胞以及敲除CIITA基因后的585A1-C7残留细胞的HLA单倍型的表。通过敲除CIITA基因,可以使作为II类的HLA蛋白质的、HLA-DP、HLA-DQ、HLA-DR等缺失。

[0800] 具体而言,与精制Cas9蛋白质一起,将切割CIITA等位基因的sgRNA即CIITA-ex3g5(目标碱基序列如序列号8017所示)转染至585A1-C7残留细胞中,得到28株亚克隆。转染使用市售的试剂盒(商品名“4D-Nucleofector”、型号“V4XP-4032”、Lonza公司)进行。

[0801] 接着,对各亚克隆的基因组的CIITA等位基因的碱基序列进行分析。图47(b)是表示各亚克隆的碱基突变模式的图。图47(b)中,“Clone ID”表示亚克隆名,“WT”表示为野生型的碱基序列,“-”表示具有缺失突变,“+”表示具有插入突变。

[0802] 其结果,如图47(b)所示,确认了在28株亚克隆中的15株中向至少一个CIITA等位基因导入了缺失突变或插入突变。图47(c)中,作为代表例,示出克隆#3-1-3的碱基序列。

[0803] [实施例40]

[0804] (CD4阳性T细胞活性化试验)

[0805] 通过分选来自健康志愿者#21的外周血单核细胞(PBMC)中回收CD4阳性T细胞,用CFSE(Cayman Chemical公司)染色。

[0806] 接着,将上述CD4阳性T细胞与(1)585A1 iPS细胞、(2)实验例13中制作的、敲除585A1 iPS细胞的A*24:02等位基因、B*07:02等位基因、B*52:01等位基因以及C*12:02等位基因后的克隆#3-1(以下,有时称为“585A1-C7残留细胞”)、(3)实验例39中制作的、敲除585A1-C7残留细胞的CIITA基因后的细胞(克隆#3-1-3)进行混合,共培养一周。另外,为了比较,也准备仅将(4)上述CD4阳性T细胞单独培养1周后的细胞群。

[0807] 在共培养后进行流式细胞仪分析,研究CFSE的荧光。图48(a)~(d)是表示流式细胞仪的结果的曲线图。图48(a)~(d)中,“Mock”表示为仅将上述(4)的CD4阳性T细胞单独培养的结果,“585A1-WT”表示为上述(1)的585A1 iPS细胞的结果,“585A1-C7#3-1”表示为上述(2)的585A1-C7残留细胞的结果,“585A1-C7+CIITA-#3-1-3”表示为上述(3)的敲除585A1-C7残留细胞的CIITA基因后的细胞(克隆#3-1-3)的结果。

[0808] 其结果表明,如图48(a)所示,即使仅仅将CD4阳性T细胞单独培养,CD4阳性T细胞也没有被活性化。

[0809] 另外,如图48(b)所示,明确了将来自健康志愿者#21的CD4阳性T细胞与585A1 iPS细胞共培养时,45.6%的CD4阳性T细胞被活性化,成为CFSE阴性。

[0810] 另外,如图48(c)所示,明确了将来自健康志愿者#21的CD4阳性T细胞与585A1-C7残留细胞共培养时,49.2%的CD4阳性T细胞被活性化,成为CFSE阴性。

[0811] 另外,如图48(d)所示,明确了即使将来自健康志愿者#21的CD4阳性T细胞与敲除585A1-C7残留细胞的CIITA基因后的细胞(克隆#3-1-3)共培养,CD4阳性T细胞也没有发生活性化。

[0812] [实施例41]

[0813] (CD4阳性T细胞、CD8阳性T细胞以及NK细胞的活性化试验)

[0814] 将外周血单核细胞(PBMC、型号“LP_329”、CTL公司)用CFSE(Cayman Chemical公司)染色。在下述表57中示出PBMC(型号“LP_329”、CTL公司)的HLA单倍型。

[0815] 表57

[0816] PBMC的HLA单倍型(LP_329、CTL公司)

[0817]	HLA-A		HLA-B		HLA-C	
	A*29:02	A*68:01	B*39:06	B*40:02	C*03:05	C*07:02

[0818] 接着,将(1)585A1 iPS细胞、(2)实验例13中制作的、敲除585A1 iPS细胞的A*24:02等位基因、B*07:02等位基因、B*52:01等位基因以及C*12:02等位基因后的克隆#3-1(以下,有时称为“585A1-C7残留细胞”)、(3)实验例39中制作的、敲除585A1-C7残留细胞的CIITA基因后的细胞(克隆#3-1-3)、(4)由相同克隆#3-1-6的各细胞分化的EB衍生的血细胞样细胞、以及(5)已知没有表达HLA抗原的K562细胞,与上述PBMC进行混合,共培养一周。另外,为了比较,也准备仅将(6)上述PBMC单独培养1周得到的细胞群。

[0819] 在共培养后进行流式细胞仪分析,研究CFSE的荧光。图49(a)~(c)是表示流式细胞仪的结果的曲线图。图49(a)~(c)中,“Mock”表示为仅将上述(6)的PBMC单独培养的结果,“585A1-WT”表示为由上述(1)的585A1 iPS细胞分化诱导的EB衍生的血细胞样细胞的结果,“585A1-C7#3-1”表示为由上述(2)的585A1-C7残留细胞分化诱导的EB衍生的血细胞样细胞的结果,“585A1-C7+CIITA-#3-1-3”表示为由上述(3)的敲除585A1-C7残留细胞的CIITA基因后的细胞(克隆#3-1-3)分化诱导的EB衍生的血细胞样细胞的结果,“585A1-C7+CIITA-#3-1-6”表示为由上述(4)的敲除585A1-C7残留细胞的CIITA基因后的细胞(克隆#3-1-6)分化诱导的EB衍生的血细胞样细胞的结果,“K562”表示为上述(5)的K562细胞的结果。

[0820] 其结果表明,如图49(a)所示,CD8阳性T细胞与由585A1 iPS细胞分化诱导的EB衍生的血细胞样细胞反应,51.0%的CD8阳性T细胞发生活活化,成为CFSE阴性。相对于此,明确了:即使与由585A1 iPS细胞分化诱导的EB衍生的血细胞样细胞以外的细胞共培养,仅仅2%以下的CD8阳性T细胞发生活活化。

[0821] 另外,如图49(b)所示,明确了CD4阳性T细胞与由585A1 iPS细胞分化诱导的EB衍生的血细胞样细胞以及由585A1-C7残留细胞分化诱导的EB衍生的血细胞样细胞反应,分别有49.2%以及26.7%的CD4阳性T细胞发生活活化,成为CFSE阴性。相对于此,明确了即使与其他细胞共培养,也仅有2%以下的CD4阳性T细胞发生活活化。

[0822] 另外,如图49(c)所示,明确了NK细胞与K562细胞反应,79.2%的NK细胞发生活性化,成为CFSE阴性。相对于此,明确了即使与其他细胞共培养,也仅有7%以下的NK细胞发生活性化。

[0823] [实施例42]

[0824] (HLA-C7残存CIITA缺失iPS细胞的制作)

[0825] 日本人中,从均质(homo)地具有第3位的HLA等位基因频率的iPS Stock细胞(Ff-Xt-28s05 iPS细胞)敲除HLA-A等位基因、HLA-B等位基因以及CIITA等位基因。敲除分别通过1阶段以及2阶段的基因组编辑进行。下述表58中示出Ff-Xt-28s05 iPS细胞的HLA单倍型。

[0826] 表58

[0827] Ff-Xt-28s05 iPS细胞的HLA单倍型

[0828]	HLA-A		HLA-B		HLA-C	
	A*24:02	A*24:02	B*07:02	B*07:02	C*07:02	C*07:02

[0829] 图50(a)~(c)是说明本实验例的步骤的图。图50(a)是说明通过1阶段敲除HLA-A等位基因、HLA-B等位基因以及CIITA等位基因的步骤的图。另外,图50(b)以及(c)是说明通过2阶段敲除HLA-A等位基因、HLA-B等位基因以及CIITA等位基因的步骤的图。

[0830] 通过1阶段的敲除中,首先,如图50(a)所示,将能够以HLA-A等位基因作为目标的sgRNA即A-ex3-g1(目标碱基序列如序列号55所示)、能够以HLA-B等位基因作为目标的sgRNA即B-ex2-g1(目标碱基序列如序列号53所示)、以及能够以CIITA等位基因作为目标的sgRNA即CIITA-ex3g5(目标碱基序列如序列号8017所示)以及精制Cas9蛋白质,转染至Ff-Xt-28s05 iPS细胞。转染使用市售的试剂盒(商品名“4D-Nucleofector”、型号“V4XP-4032”、Lonza公司)进行。

[0831] 接着,将iPS细胞用50ng/mL的IFN- γ 刺激48小时,进行流式细胞仪分析,研究HLA-A24抗原以及HLA-B7抗原的表达。图51(a)是表示流式细胞仪的结果的曲线图。图51(a)中,“无染色”表示为没有用抗体染色的iPS细胞的分析结果,“No TF”表示为没有导入sgRNA的iPS细胞的分析结果,“HLA-A-ex3g1”表示导入A-ex3-g1(目标碱基序列如序列号55所示)的结果,“HLA-B-ex2g1”表示导入B-ex2-g1(目标碱基序列如序列号53所示)的结果,CIITA-ex3g5(目标碱基序列如序列号8017所示)表示导入CIITA-ex3g5的结果。

[0832] 接着,将HLA-A24抗原以及HLA-B7抗原二者为阴性的细胞群分选进行回收,得到15株亚克隆。接着,对各亚克隆的基因组的HLA-A24等位基因、HLA-B7等位基因以及CIITA等位基因的碱基序列进行分析。图51(b)是表示各亚克隆的碱基突变模式的图。图51(b)中,“Clone ID”表示亚克隆名,“WT”表示为野生型的碱基序列,“-”表示具有缺失突变,“+”表示具有插入突变,“N.D.”表示没有确定碱基序列。另外,亚克隆名中的“ABTo”是指敲除HLA-A等位基因、HLA-B等位基因以及CIITA等位基因。

[0833] 其结果,如图51(b)所示,得到在HLA-A等位基因、HLA-B等位基因、CIITA等位基因中全部检测到插入缺失突变(Indel突变)的、克隆#1、#2、#3、#6、#13、#15。

[0834] 通过2阶段的敲除中,首先,如图50(b)所示,将能够以HLA-A等位基因作为目标的sgRNA即A-ex3-g1(目标碱基序列如序列号55所示)、能够以HLA-B等位基因作为目标的sgRNA即B-ex2-g1(目标碱基序列如序列号53所示)以及精制Cas9蛋白质,转染至Ff-Xt-

28s05 iPS细胞,得到17株亚克隆。转染使用市售的试剂盒(商品名“4D-Nucleofector”、型号“V4XP-4032”、Lonza公司)进行。

[0835] 接着,对各亚克隆的基因组的HLA-A24等位基因以及HLA-B7等位基因的碱基序列进行分析。图52(a)是表示各亚克隆的碱基突变模式的图。图52(a)中,“Clone ID”表示亚克隆名,“WT”表示为野生型的碱基序列,“-”表示具有缺失突变,“+”表示具有插入突变,“Mut.”表示具有取代突变。另外,亚克隆名中的“ABo”是指敲除了HLA-A等位基因以及将HLA-B等位基因。

[0836] 其结果,如图52(a)所示,得到在HLA-A等位基因、HLA-B等位基因二者中检测到插入缺失突变(Indel突变)的、克隆#14。

[0837] 接着,如图50(c)所示,将能够以CIITA等位基因作为目标的sgRNA即CIITA-ex3g5(目标碱基序列如序列号8017所示)以及精制Cas9蛋白质转染至所得到的克隆#14,得到12株亚克隆。转染使用市售的试剂盒(商品名“4D-Nucleofector”、型号“V4XP-4032”、Lonza公司)进行。

[0838] 接着,对各亚克隆的基因组的CIITA等位基因的碱基序列进行分析。图52(b)是表示各亚克隆的碱基突变模式的图。图52(b)中,“Clone ID”表示亚克隆名,“WT”表示为野生型的碱基序列,“-”表示具有缺失突变,“+”表示具有插入突变,“N.D.”表示没有确定碱基序列。另外,亚克隆名中的“ABo_To”是指:敲除HLA-A等位基因以及HLA-B等位基因进行一次亚克隆后、敲除CIITA等位基因。

[0839] 其结果,如图52(b)所示,得到在CIITA二者的等位基因中检测到成为移码突变的插入缺失突变(Indel突变)的、克隆#14-3、#14-4、#14-6、#14-12。

[0840] 图53是表示各种人种中的HLC-C等位基因的等位基因频率的表。图53中,“JPN”表示日本人,“EUR”表示欧洲裔美国人,“AFA”表示非洲裔美国人,“API”表示亚洲人,“HIS”表示西班牙裔。另外,“等位基因频率”表示各人种中的等位基因的频率(%),“等级(rank)”表示从高频率开始的顺序。

[0841] 如图53所示,制作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的12种细胞时,在上述所有人种中均可以覆盖93%以上的人口。

[0842] 即,缺失HLA-A等位基因以及HLA-B等位基因、具有上述12种中任意一种HLA-C等位基因的细胞、或者缺失HLA-A等位基因、HLA-B等位基因以及CIITA等位基因、具有上述12种中任意一种HLA-C等位基因的细胞,作为细胞治疗或再生医疗用的细胞非常有用。在此,细胞只要是用于细胞治疗的细胞,则没有特别限定,可以为多能干细胞,也可以为分化后的细胞。具体而言,例如可以为iPS细胞、T细胞、造血干细胞、间充质干细胞等。

[0843] [实施例43]

[0844] (B2M敲除iPS细胞的制作3)

[0845] 从实验例41中也使用的iPS Stock细胞(Ff-Xt-28s05 iPS细胞)中,敲除B2M等位基因。

[0846] 将能够以B2M等位基因作为目标的sgRNA即B2M-g2(目标碱基序列如序列号60所示)以及精制Cas9蛋白质转染至Ff-Xt-28s05 iPS细胞,得到5株亚克隆。转染使用市售的试剂盒(商品名“4D-Nucleofector”、型号“V4XP-4032”、Lonza公司)进行。

[0847] 接着,对各亚克隆的基因组的B2M等位基因的碱基序列进行分析。图54是表示各亚克隆的碱基突变模式的图。图54中,“Clone ID”表示亚克隆名,“WT”表示为野生型的碱基序列,“-”表示具有缺失突变,“+”表示具有插入突变。另外,亚克隆名中的“Mo”是指敲除了B2M等位基因。

[0848] 其结果,如图54所示,得到在B2M等位基因中产生移码突变的克隆#1以及#3。

[0849] [实施例44]

[0850] (B2M以及CIITA敲除iPS细胞的制作)

[0851] 从实验例41中也使用的iPS Stock细胞(Ff-Xt-28s05 iPS细胞)中,同时敲除B2M等位基因以及CIITA等位基因。

[0852] 将能够以B2M等位基因作为目标的sgRNA即B2M-g2(目标碱基序列如序列号60所示)、能够以CIITA等位基因作为目标的sgRNA即CIITA-ex3g5(目标碱基序列如序列号8017所示)以及精制Cas9蛋白质,转染至Ff-Xt-28s05 iPS细胞,得到19株亚克隆。转染使用市售的试剂盒(商品名“4D-Nucleofector”、型号“V4XP-4032”、Lonza公司)进行。

[0853] 接着,对各亚克隆的基因组的B2M等位基因以及CIITA等位基因的碱基序列进行分析。图55是表示各亚克隆的碱基突变模式的图。图55中,“Clone ID”表示亚克隆名,“WT”表示为野生型的碱基序列,“-”表示具有缺失突变,“+”表示具有插入突变。另外,亚克隆名中的“MTo”是指通过1阶段敲除了B2M等位基因以及CIITA等位基因。

[0854] 其结果,如图55所示,得到在B2M等位基因以及CIITA等位基因二者中产生移码突变的克隆#8。

[0855] 另外,明确了克隆#2仅敲除一个B2M等位基因、并敲除了两个CIITA等位基因。因此,作为实质上仅敲除了CIITA等位基因的细胞株,得到克隆#2。

[0856] [实施例45]

[0857] (B2M以及CIITA敲除iPS细胞中的HLA蛋白质的表达的研究)

[0858] 研究实验例44中制作的、Ff-Xt-28s05-MTo#2iPS细胞中的HLA-ABC蛋白质的表达。

[0859] 首先,将Ff-Xt-28s05-MTo#2iPS细胞用50ng/mL的IFN- γ 刺激48小时后,用抗HLA-ABC抗体(产品号:311418、BIOLEGEND公司)染色,进行流式细胞仪分析,研究HLA-A蛋白质、HLA-B蛋白质以及HLA-C蛋白质的表达。

[0860] 图56(a)以及(b)是表示流式细胞仪的结果的曲线图。图56(a)中,“无染色”表示为没有用抗体染色的iPS细胞的分析结果。另外,图16(b)中,“Ff-Xt-28s05-MTo#2”表示为Ff-Xt-28s05-MTo#2iPS细胞的分析结果。

[0861] 其结果表明,Ff-Xt-28s05-MTo#2iPS细胞保持有HLA-A蛋白质、HLA-B蛋白质以及HLA-C蛋白质的表达能力。

[0862] [实施例46]

[0863] (B2M敲除iPS细胞的制作4)

[0864] 将表达Cas9的质粒载体和B2M特异的sgRNA转染至585A1 iPS细胞。作为sgRNA,使用B2M-g2(目标碱基序列如序列号60所示)。

[0865] 接着,将用50ng/mL的IFN- γ 刺激了48小时的细胞用抗HLA-ABC抗体染色,进行流式细胞仪分析。

[0866] 图57表示流式细胞仪的结果的曲线图。图57中,“无染色”表示为没有用抗体染色

的iPS细胞的分析结果,“No TF”表示为没有导入sgRNA的iPS细胞的分析结果,“B2M-g2”表示为导入该sgRNA、且敲除B2M等位基因后的iPS细胞的分析结果。

[0867] 其结果,HLA-A蛋白质、HLA-B蛋白质以及HLA-C蛋白质全部为阴性的细胞群的比例为27.0%。接着,将通过导入B2M-g2 sgRNA而得到的、HLA-A、HLA-B以及HLA-C全部为阴性的细胞群通过分选进行回收。在此,没有进行亚克隆。

[0868] [实施例47]

[0869] (HLA等位基因特异的敲除10)

[0870] 制作敲除585A1 iPS细胞的HLA-A等位基因、HLA-B等位基因以及HLA-C等位基因后的细胞。具体而言,在实验例13中制作的、敲除585A1 iPS细胞的A*24:02等位基因、B*07:02等位基因以及B*52:01等位基因后的细胞(克隆#3)上,转染精制Cas9蛋白质、C*07:02等位基因特异的sgRNA以及C*12:02等位基因特异的sgRNA。

[0871] 作为C*07:02等位基因特异的sgRNA,使用C0702-ex3-g3(目标碱基序列如序列号49所示)。另外,作为C*12:02等位基因特异的sgRNA,使用C1202-ex3-g1(目标碱基序列如序列号50所示)。转染中,使用市售的试剂盒(商品名“4D-Nucleofector”、型号“V4XP-4032”、Lonza公司)。

[0872] 然后,进行亚克隆,得到6株亚克隆。接着,从各亚克隆中提取基因组DNA。接着,通过桑格测序,分析HLA-C*07:02等位基因以及HLA-C*12:02等位基因的碱基序列。

[0873] 图58是表示所回收的各克隆的碱基突变模式的图。图58中,“Clone ID”表示亚克隆名,“HLA-C07”表示HLA-C*07:02等位基因,“HLA-C12”表示HLA-C*12:02等位基因,“WT”表示为野生型的碱基序列,“-”表示具有缺失突变,“+”表示具有插入突变。其结果确认,克隆#3-4、#3-5、#3-6、#3-7中,敲除了HLA-C的两等位基因。

[0874] [实施例48]

[0875] (HLA等位基因特异的敲除11)

[0876] 在实验例13中制作的、敲除585A1 iPS细胞的A*24:02等位基因、B*07:02等位基因以及B*52:01等位基因后的细胞(克隆#3)上,转染精制Cas9蛋白质以及C*07:02等位基因特异的sgRNA。

[0877] 作为C*07:02等位基因特异的sgRNA,使用C0702-ex3-g3(目标碱基序列如序列号49所示)。转染中,使用市售的试剂盒(商品名“4D-Nucleofector”、型号“V4XP-4032”、Lonza公司)。

[0878] 然后,进行亚克隆,得到6株亚克隆。接着,从各亚克隆中提取基因组DNA。接着,通过桑格测序分析HLA-C*07:02等位基因以及HLA-C*12:02等位基因的碱基序列。

[0879] 图59是表示所回收的各克隆的碱基突变模式的图。图59中,“Clone ID”表示亚克隆名,“HLA-C07”表示HLA-C*07:02等位基因,“HLA-C12”表示HLA-C*12:02等位基因,“WT”表示为野生型的碱基序列,“+”表示具有插入突变。其结果确认,克隆#3-1、#3-2、#3-3、#3-5、#3-6是敲除HLA-C*07:02等位基因、仅HLA-C*12:02等位基因残存的克隆。

[0880] 参考图53的同时,如上所述准备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的12种细胞时,在日本人、欧州裔美国人、非洲裔美国人、亚洲人、西班牙裔所有人种中均可以覆盖93%以上的人口。

[0881] 本实验例中制作的细胞可以作为上述12种细胞中的一种使用。

[0882] [实施例49]

[0883] (HLA等位基因特异的敲除12)

[0884] 在实验例14中制作的、敲除604B1 iPS细胞的A*01:01等位基因、A*24:02等位基因、B*07:02等位基因以及B*37:01等位基因后的细胞(克隆#4)上,转染精制Cas9蛋白质以及C*07:02等位基因特异的sgRNA。

[0885] 作为C*07:02等位基因特异的sgRNA,使用C0702-ex3-g3(目标碱基序列如序列号49所示)。转染中,使用市售的试剂盒(商品名“4D-Nucleofector”、型号“V4XP-4032”、Lonza公司)。

[0886] 然后,进行亚克隆,得到11株亚克隆。接着,从各亚克隆中提取基因组DNA。接着,通过桑格测序分析HLA-C*06:02等位基因以及HLA-C*12:02等位基因的碱基序列。

[0887] 图60是表示所回收的各克隆的碱基突变模式的图。图60中,“Clone ID”表示亚克隆名,“HLA-C06”表示HLA-C*06:02等位基因,“HLA-C07”表示HLA-C*07:02等位基因,“WT”表示为野生型的碱基序列,“-”表示具有插入突变,“+”表示具有插入突变。其结果确认,克隆#4-2、#4-6、#4-10、#4-11是敲除HLA-C*07:02等位基因、仅残存HLA-C*06:02等位基因的克隆。

[0888] 参考图53的同时,如上所述准备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的12种细胞时,在日本人、欧州裔美国人、非洲裔美国人、亚洲人、西班牙裔的所有人种中均可以覆盖93%以上的人口。

[0889] 本实验例中制作的细胞可以作为这12种细胞中的一种使用。

[0890] 产业上的可利用性

[0891] 根据本发明,能够提供制造在向受体进行同种异体移植时的排斥反应被降低的低抗原性细胞的技术。

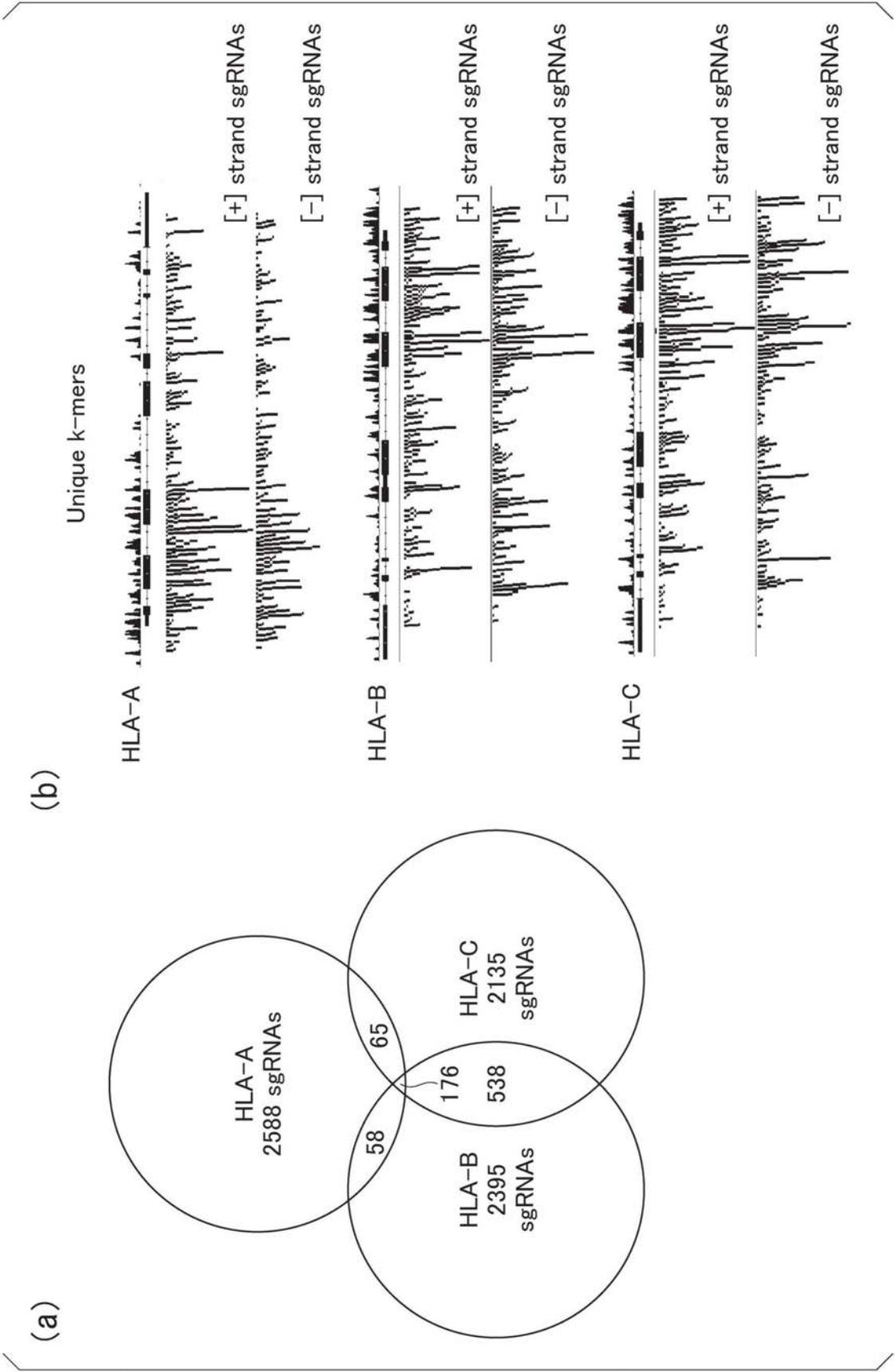


图1

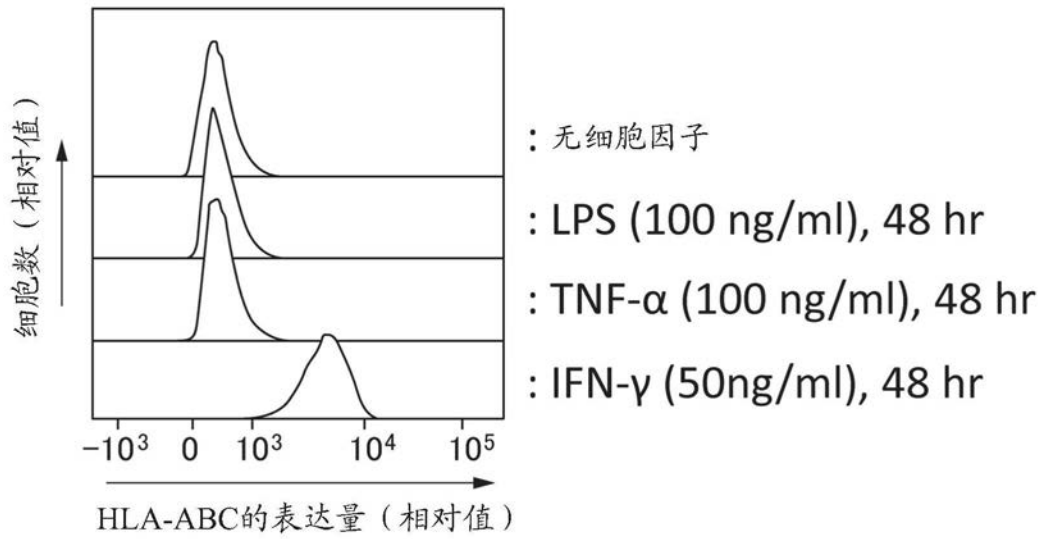


图2

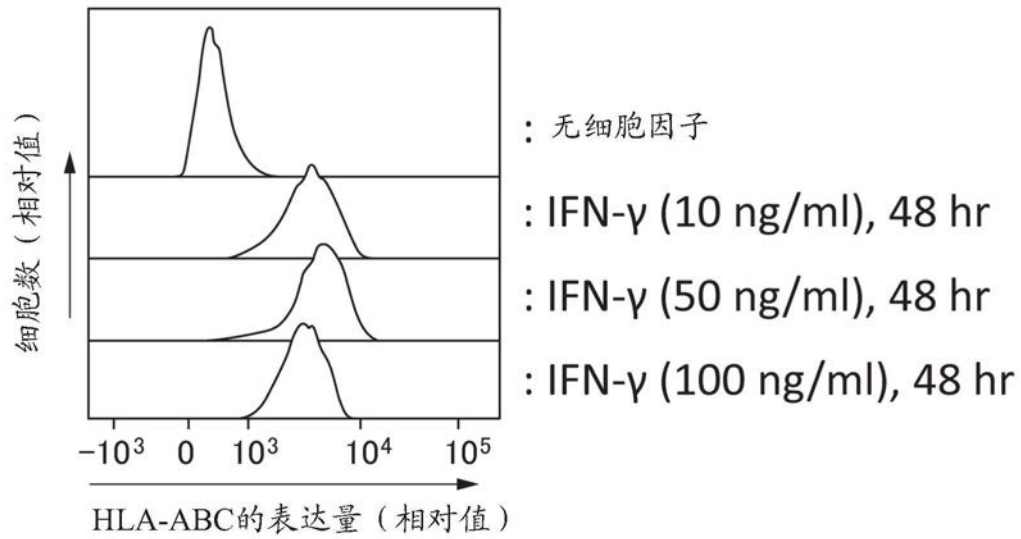


图3

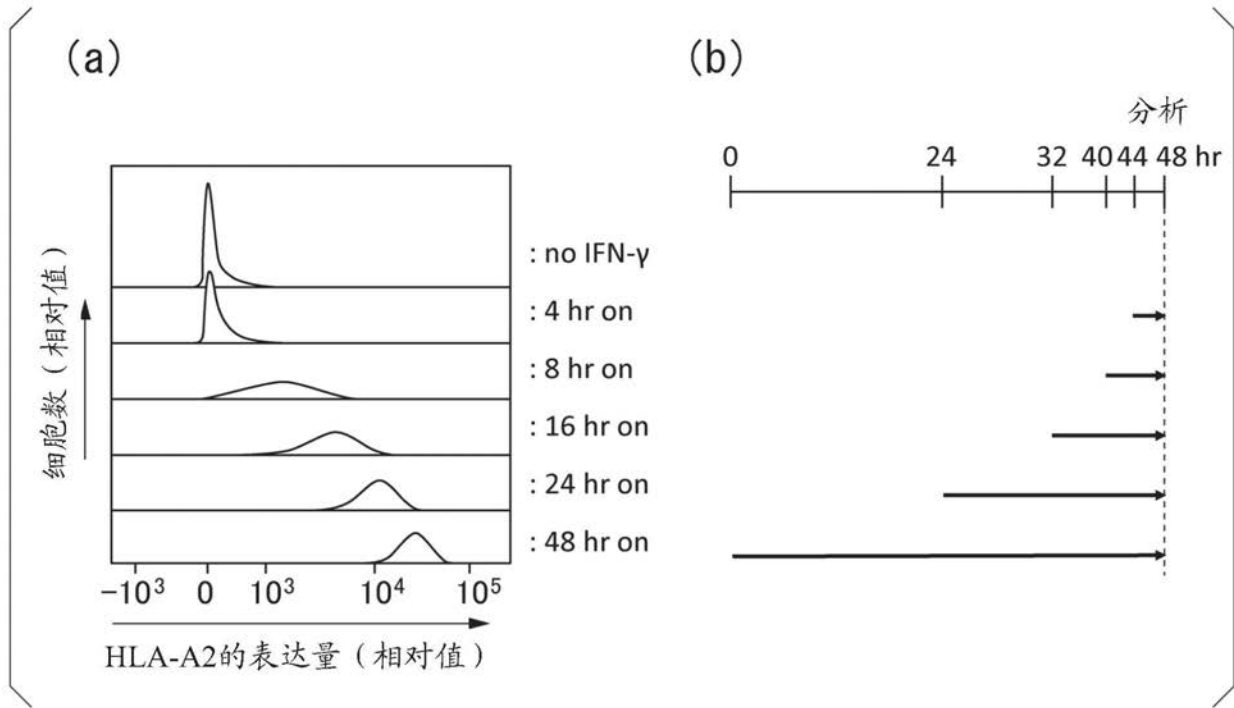
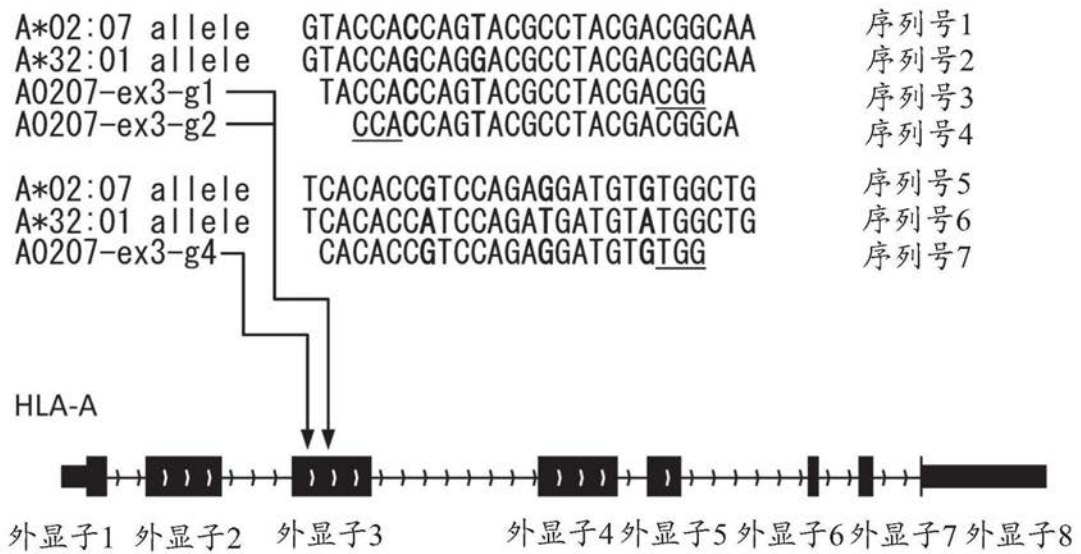


图4

(a)



(b)

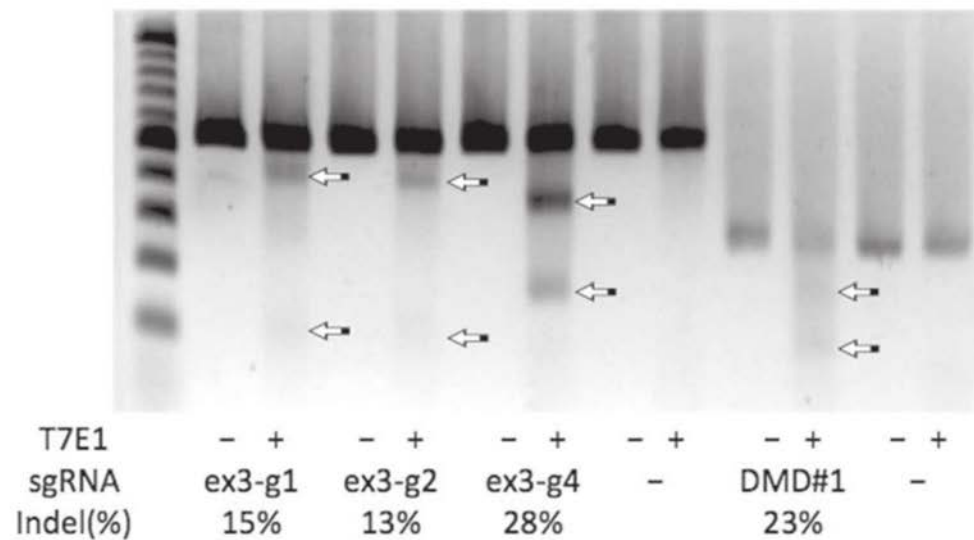
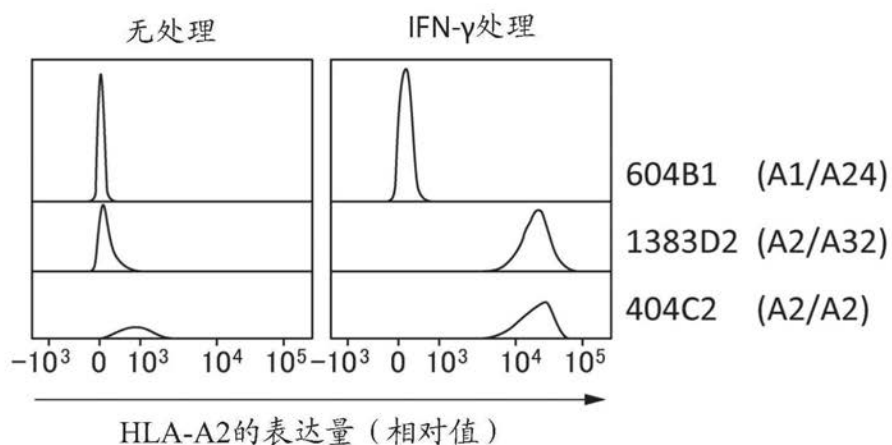


图5

(a)



(b)

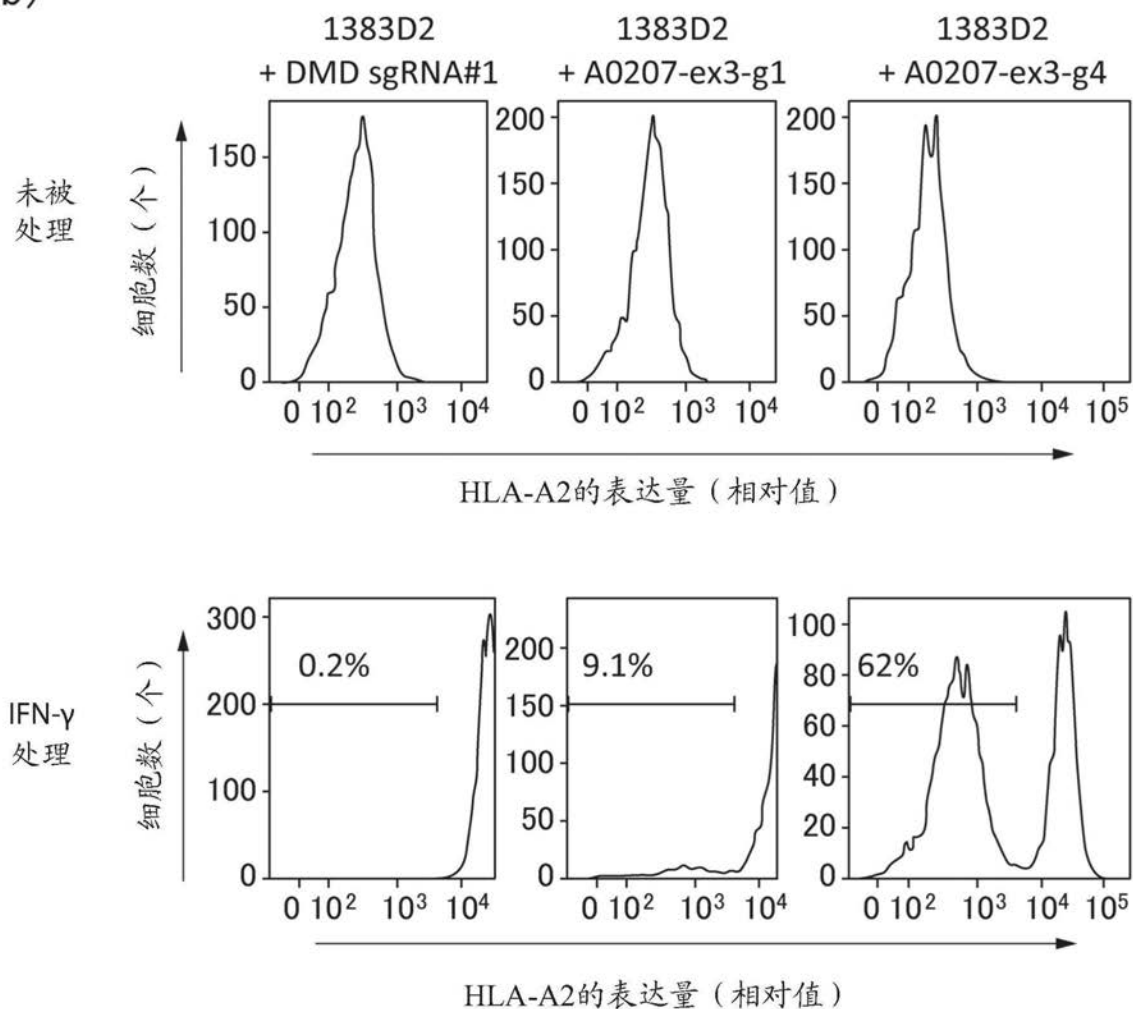


图6

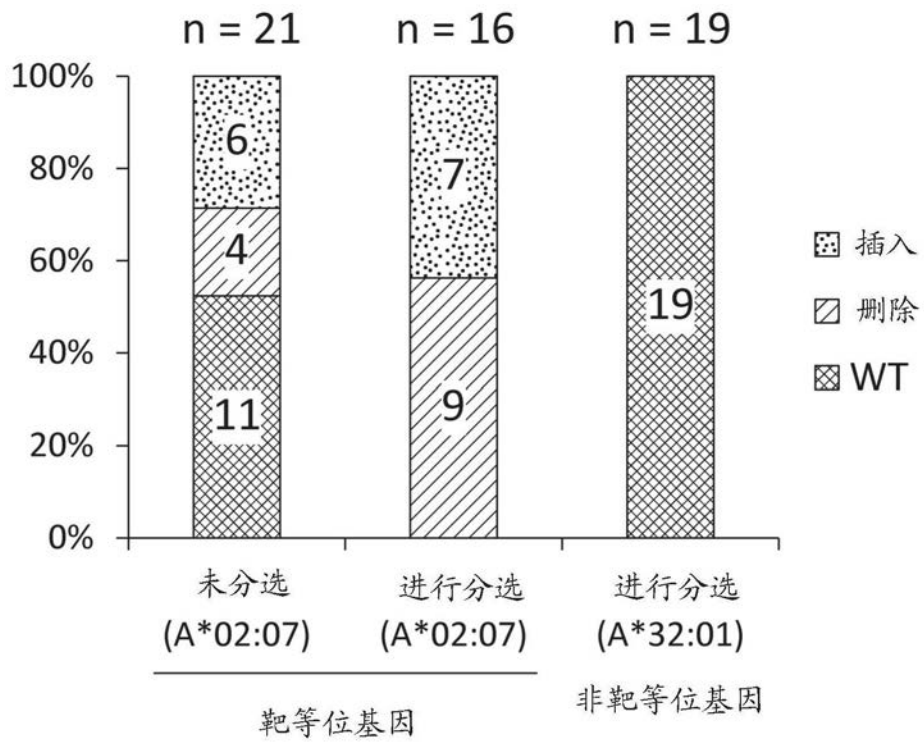


图7

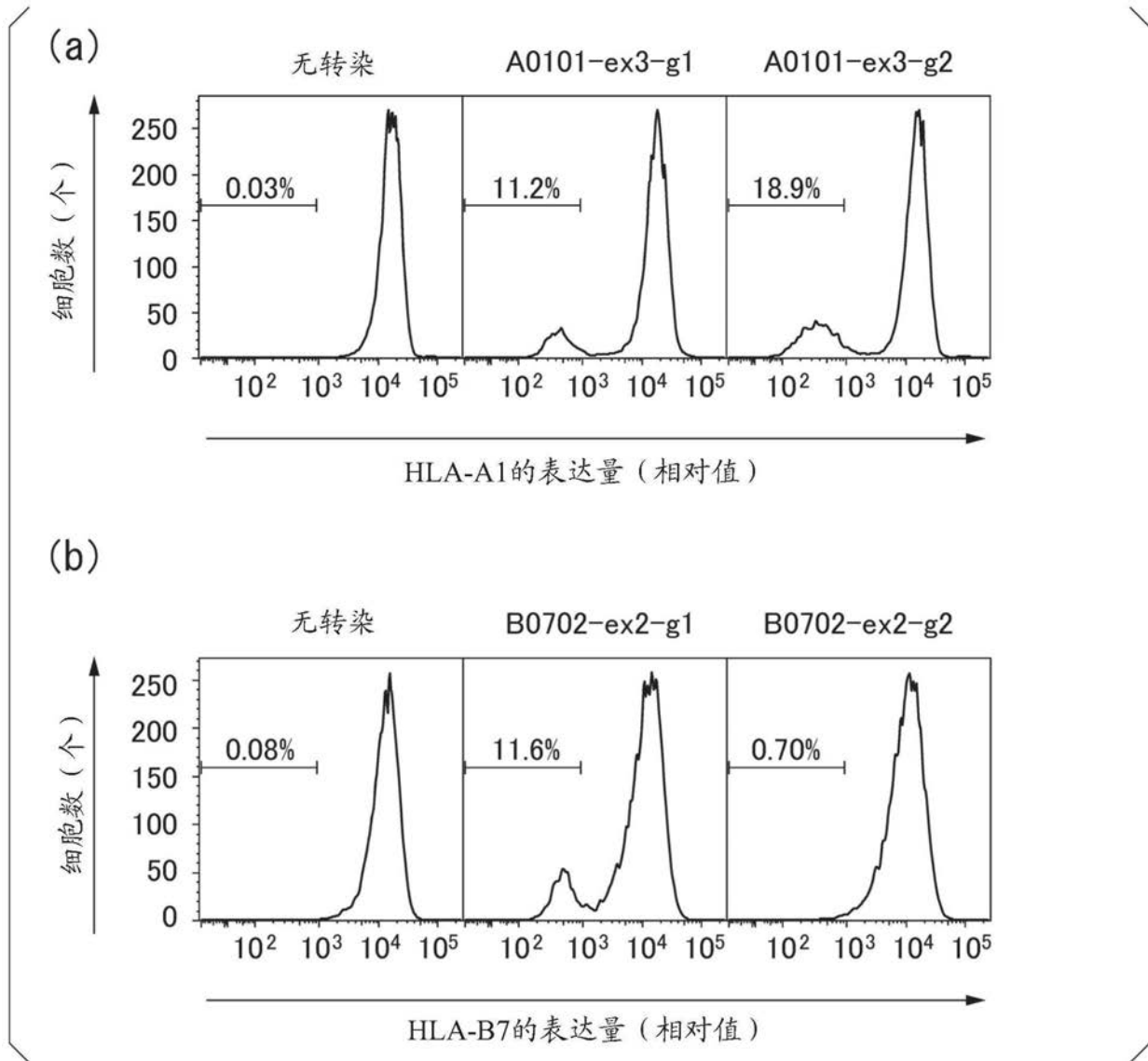


图8

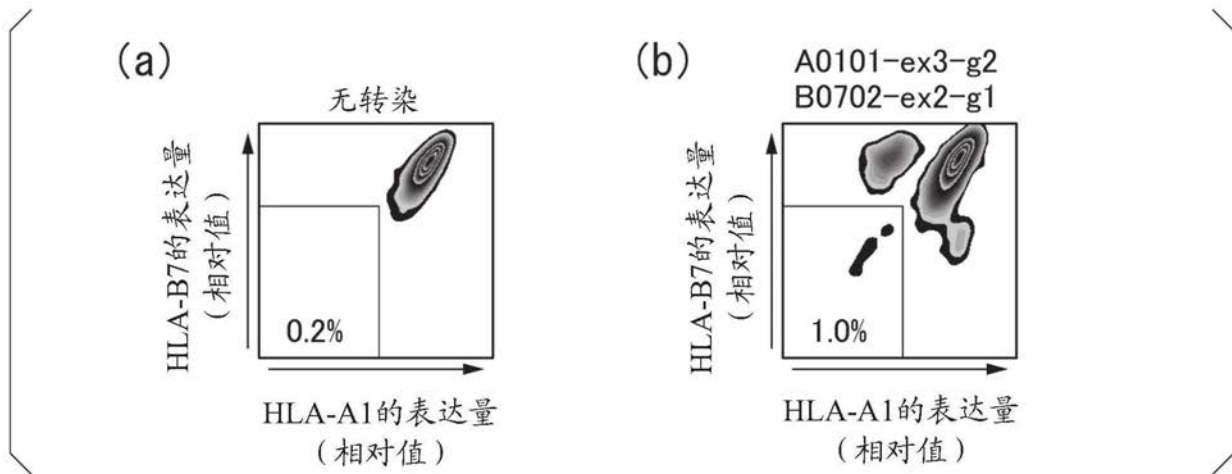


图9

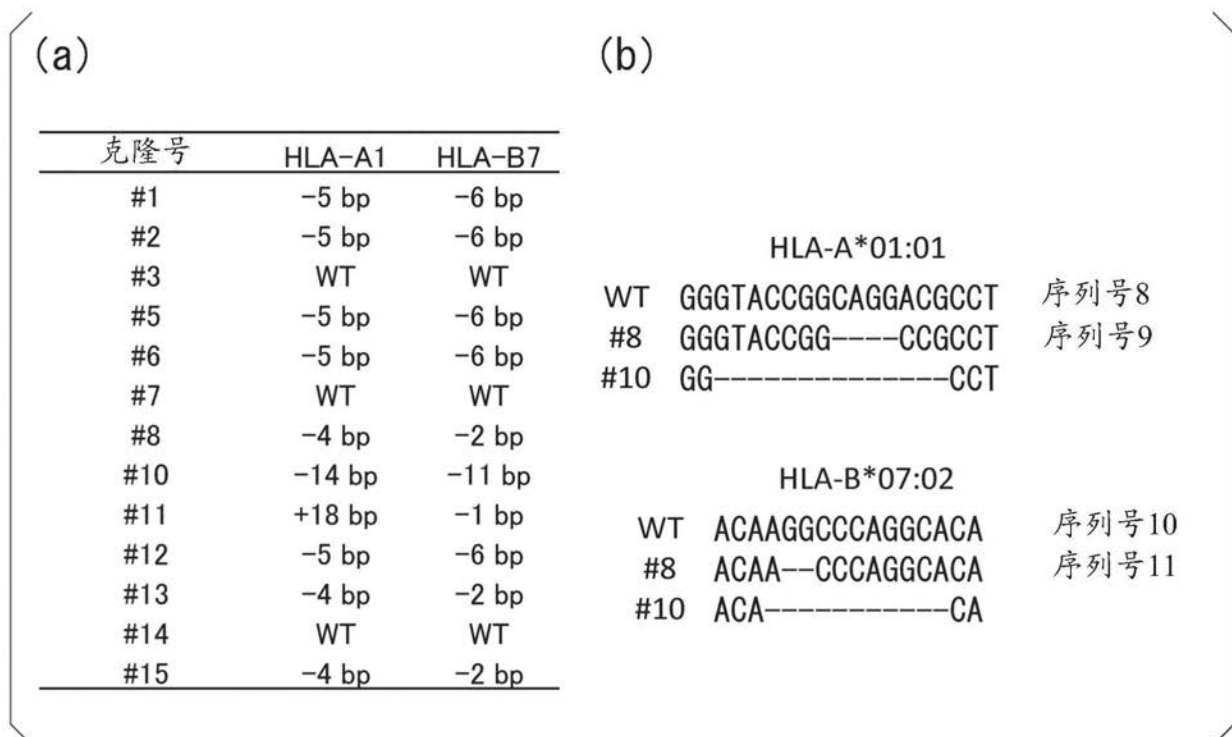


图10

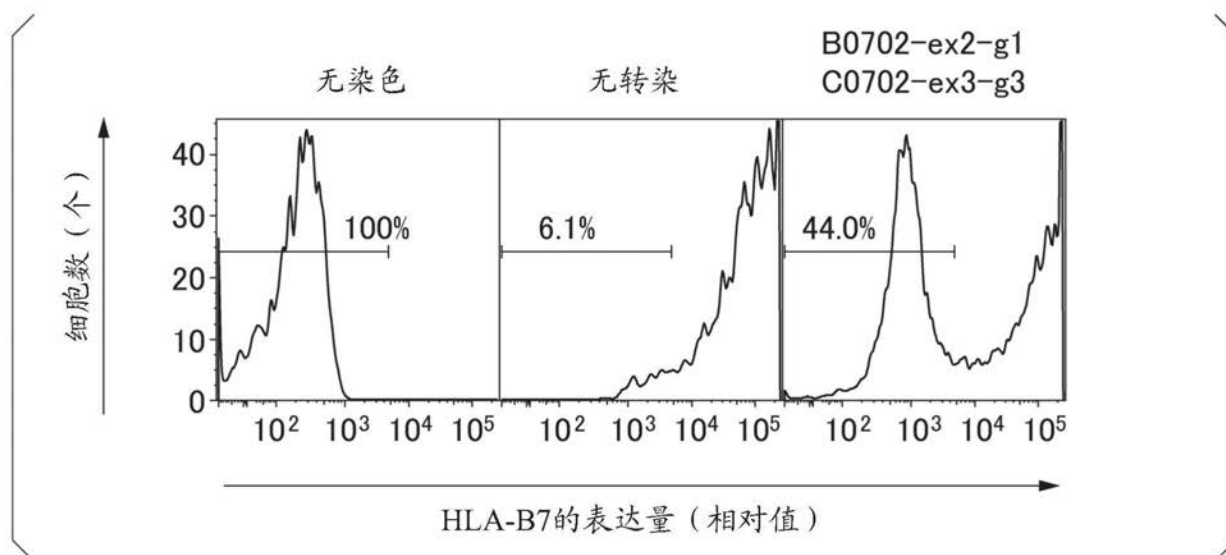


图11

(a)			(b)		
克隆号	HLA-B7	HLA-C7		HLA-B*07:02	HLA-C*07:02
#1	-6 bp	-9 bp			
#2	-6 bp	+2 bp	WT	AAGGCCCAG	GGACACC
#3	-6 bp	WT	#2	A-----AG	GGACACC
#4	-6 bp	WT			AA
#5	-6 bp	-9 bp	#11	A---CCCAG	GGACACC
#6	-6 bp	WT			A
#7	-6 bp	WT	#26	AA---CCCAG	GGACACG
#8	-6 bp	WT			A
#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			

图12

(a)

克隆号	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

(b)

克隆号	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

(c)

	HLA-C*12:02	HLA-B*52:02
WT	GAGGATG	GCATAAC
#1-1	GAG-ATG	GTATGAC

图13

(a)

克隆号	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

(b)

A*01:01	GGCAGGACGCCTA	序列号12	C*06:02	GGATGT	
#3	GGC-----TA		#3	GGATGT	序列号13
				TGTGAGAG	

图14

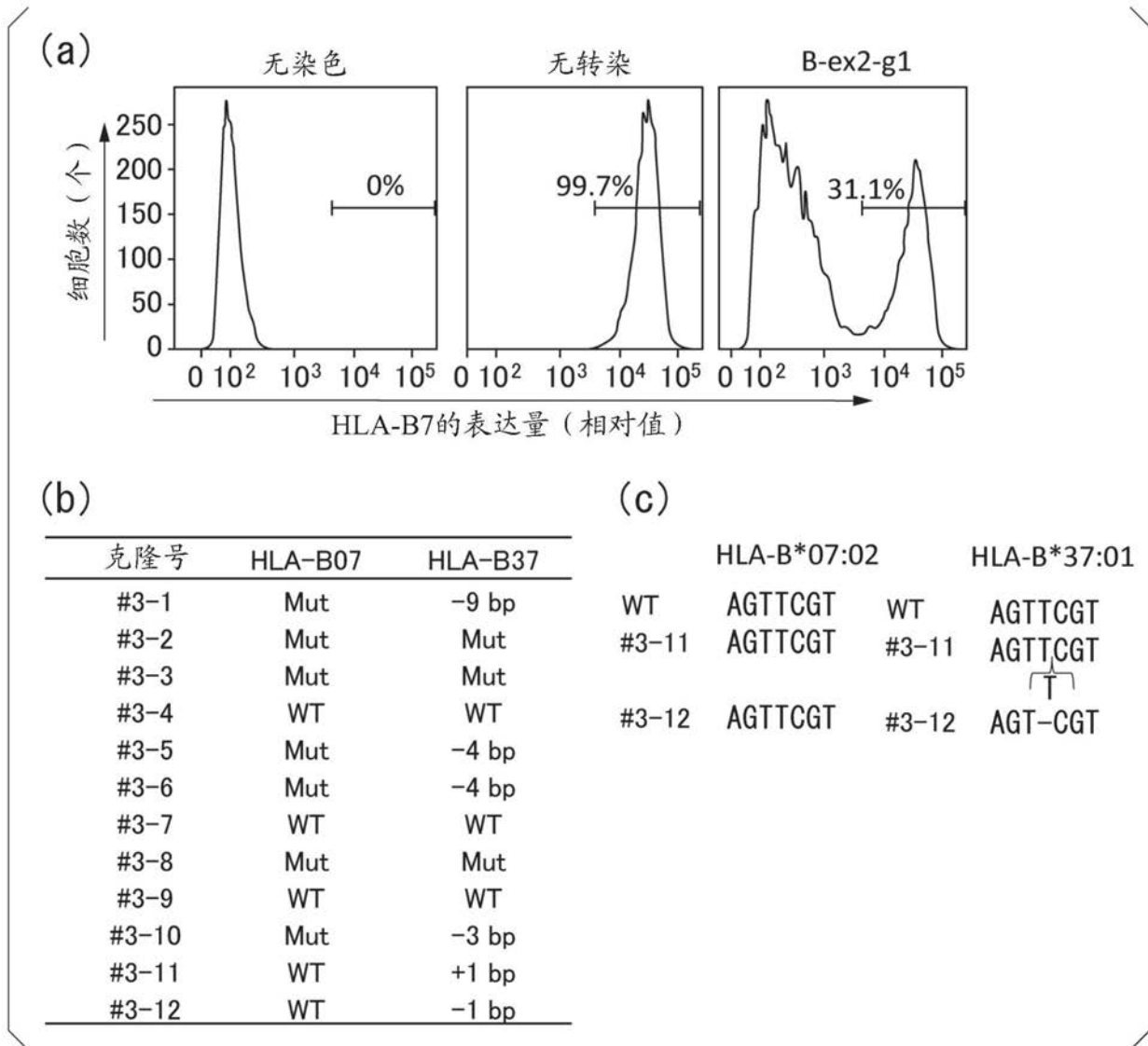
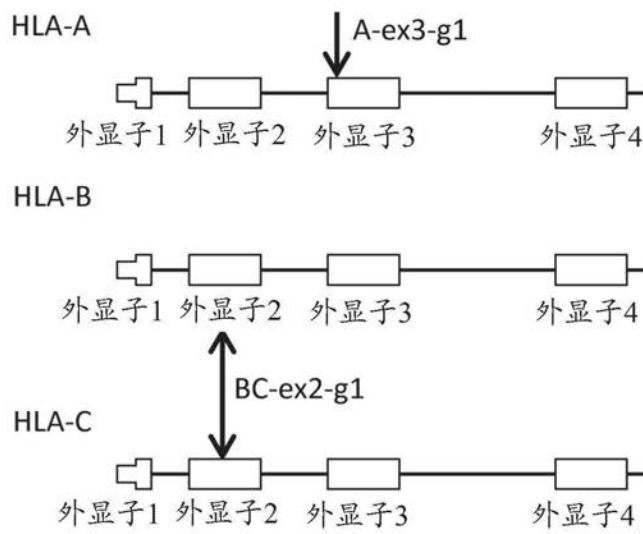
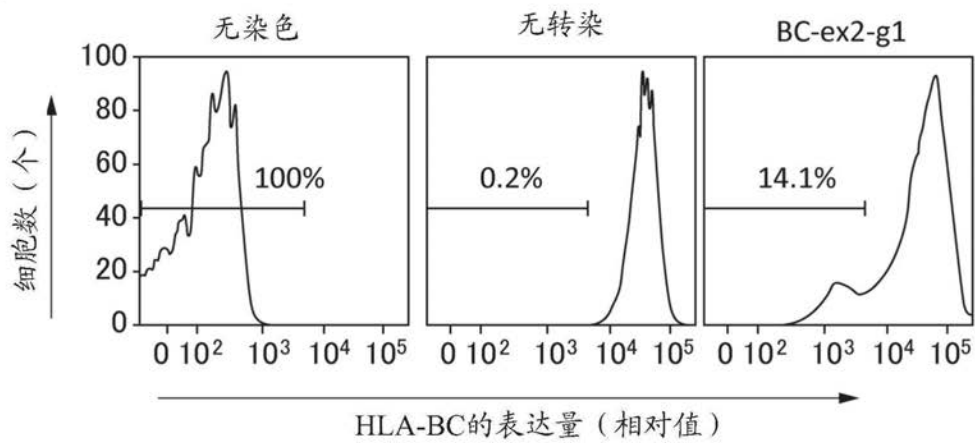


图15

(a)



(b)



(c)

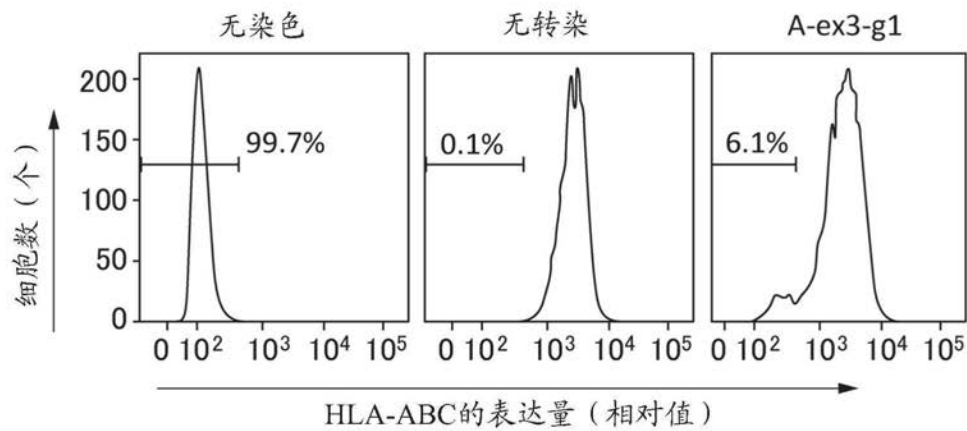


图16

(a)

克隆号	HLA-A01	HLA-A24	HLA-B07	HLA-B37	HLA-C06	HLA-C07
#1	+1 bp	+1 bp	-1 bp	-6 bp	+9 bp	-14 bp

(b)

A*01:01			A*24:02		
WT	TCTTGGACCGCGG	序列号 14	WT	TCTTGGACCGCGG	序列号 16
#1	TCTTGGACCGCGG	序列号 15	#1	TCTTGGACCGCGG	序列号 17
	A			A	
B*07:02			B*37:01		
WT	AGTATTGGGACCGG	序列号 18	WT	TGGGACCGGGAGAC	序列号 20
#1	AGTATTGG-ACCGG	序列号 19	#1	TGGGA-----GAC	
C*06:02			C*07:02		
WT	GTATTGGGACCGGG	序列号 21	WT	GAGGGGCCGGAGTATTG	序列号 23
#1	GTATTGGGACCGGG	序列号 22	#1	GA-----G	
	CAATTCTGT				

图17

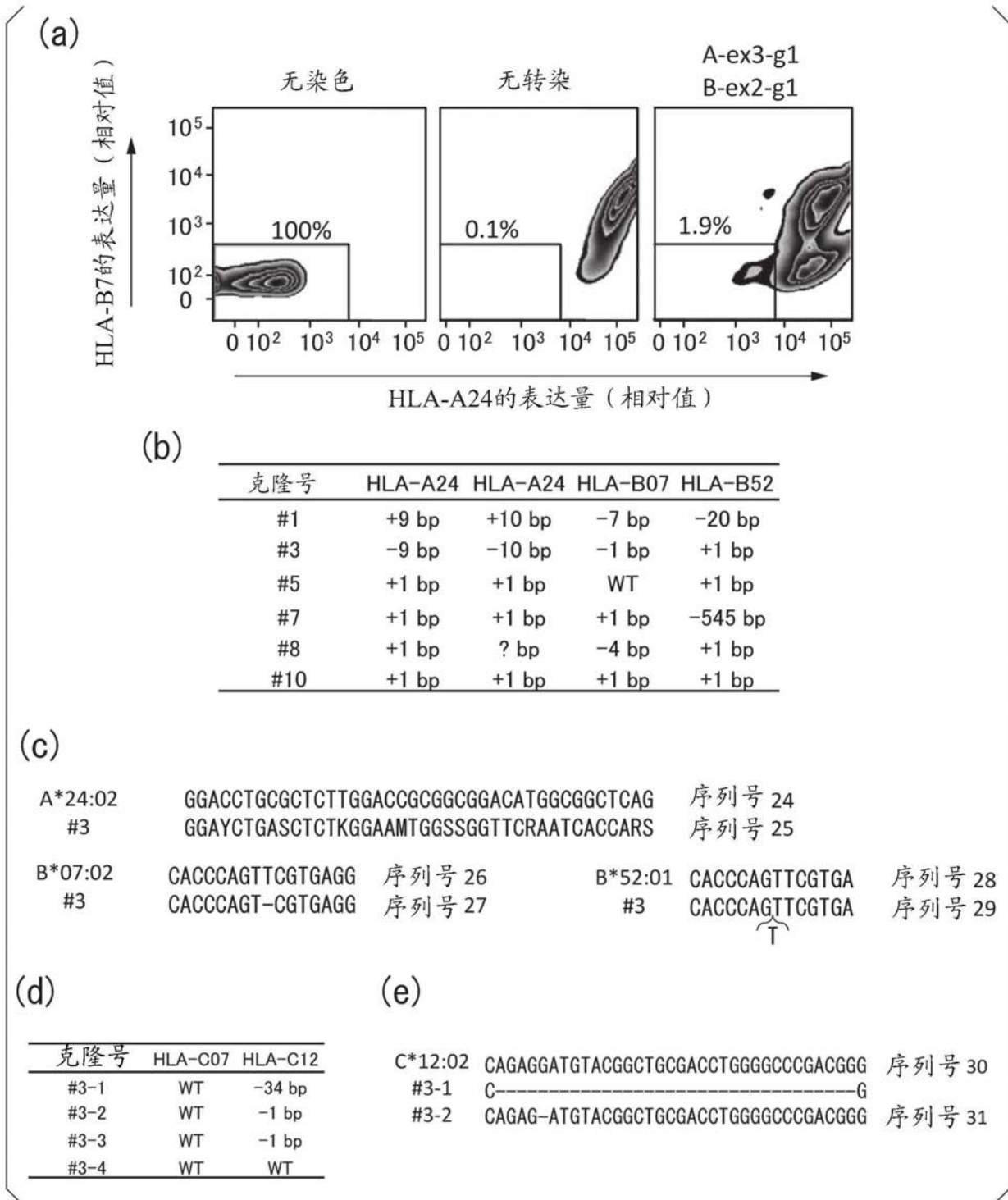


图18

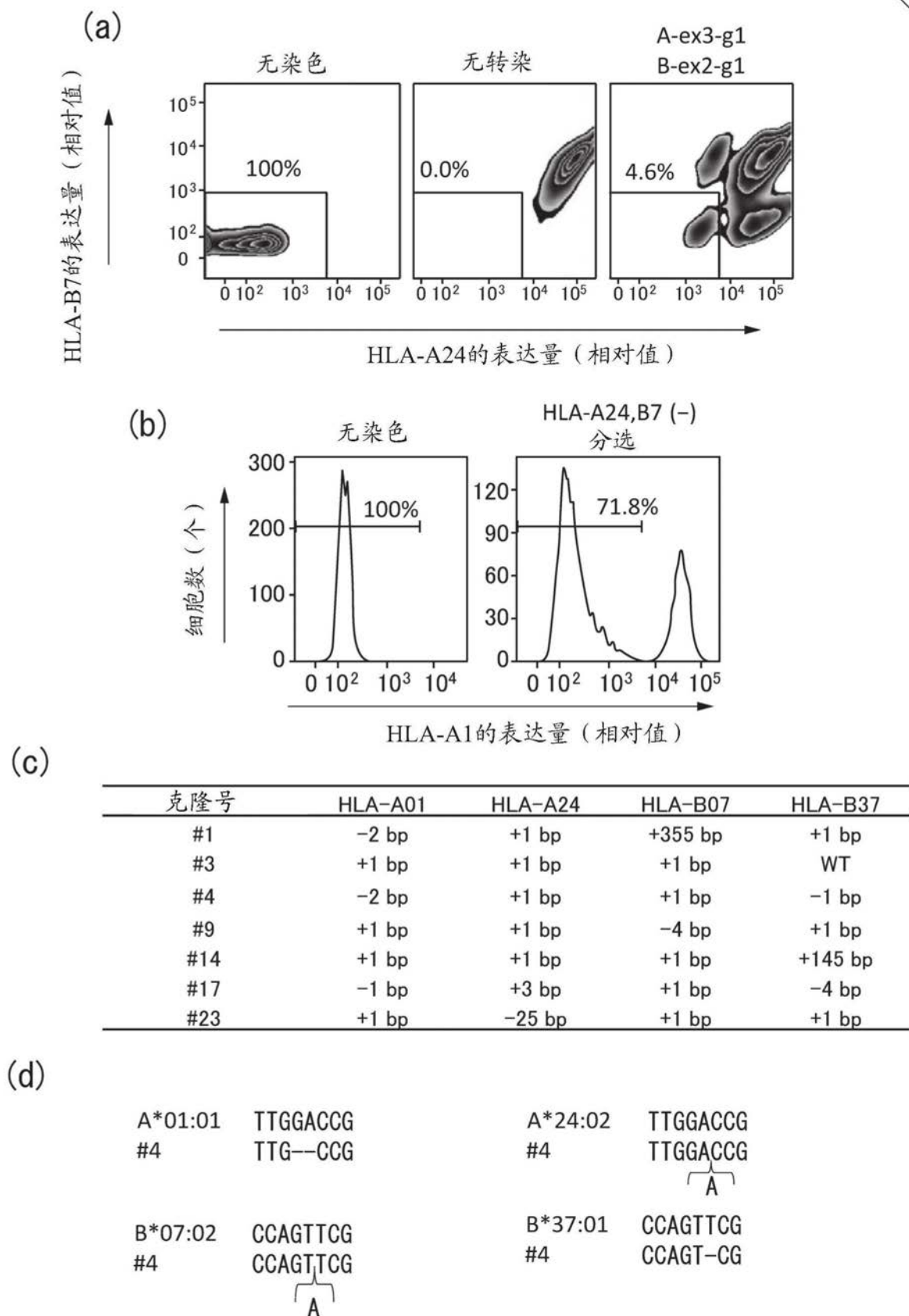
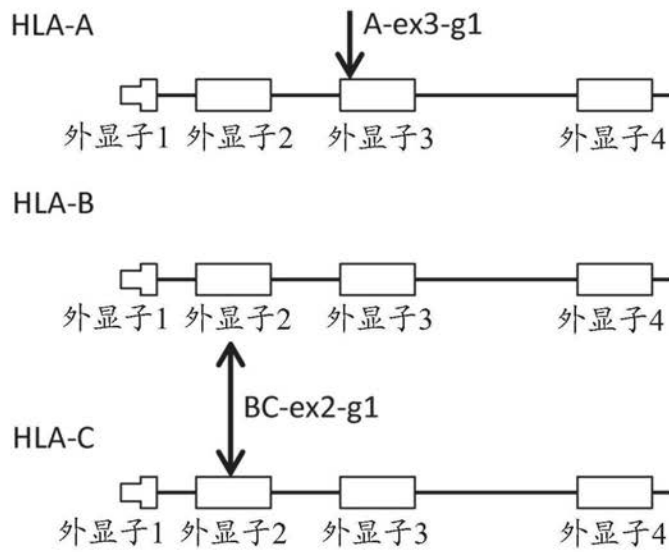
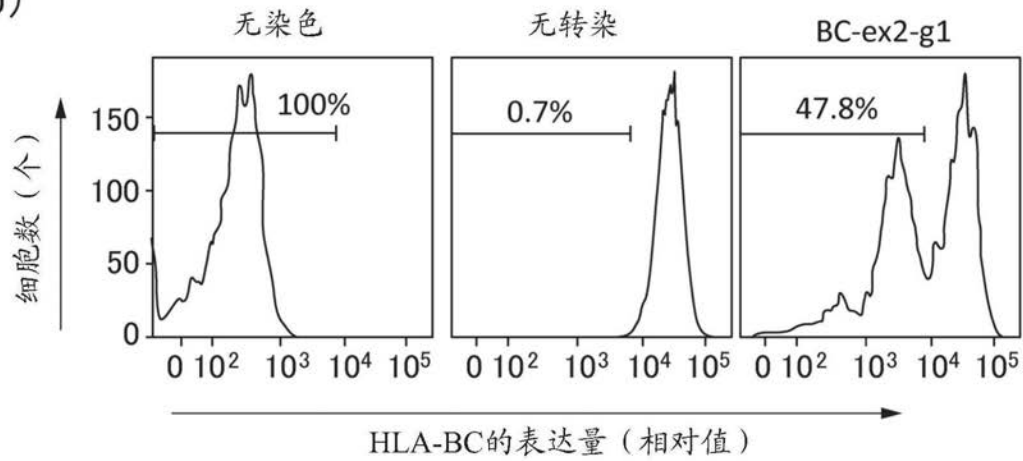


图19

(a)



(b)



(c)

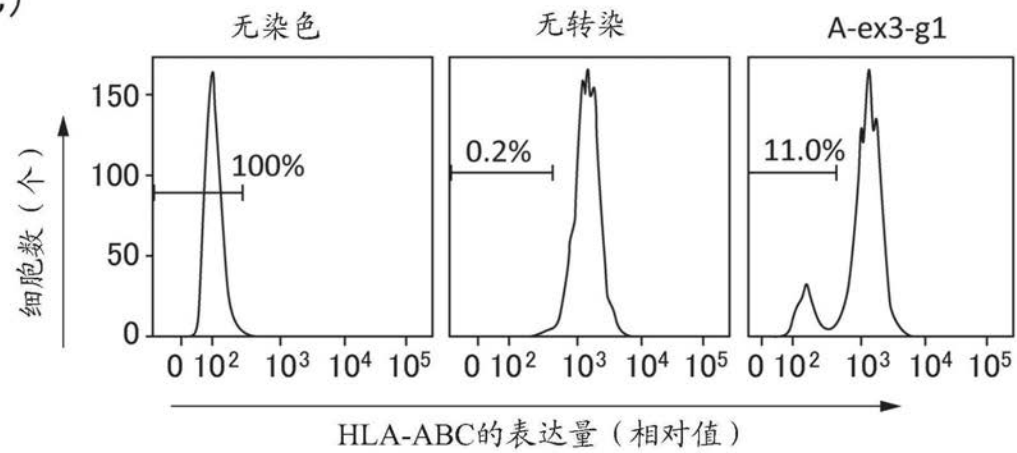
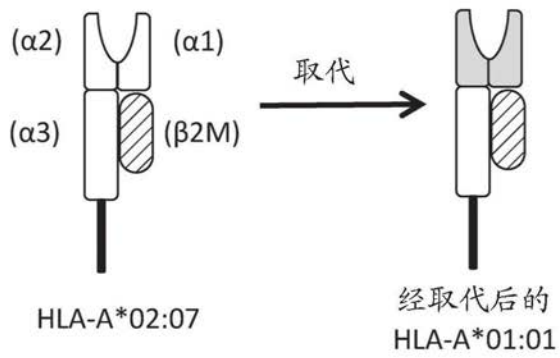
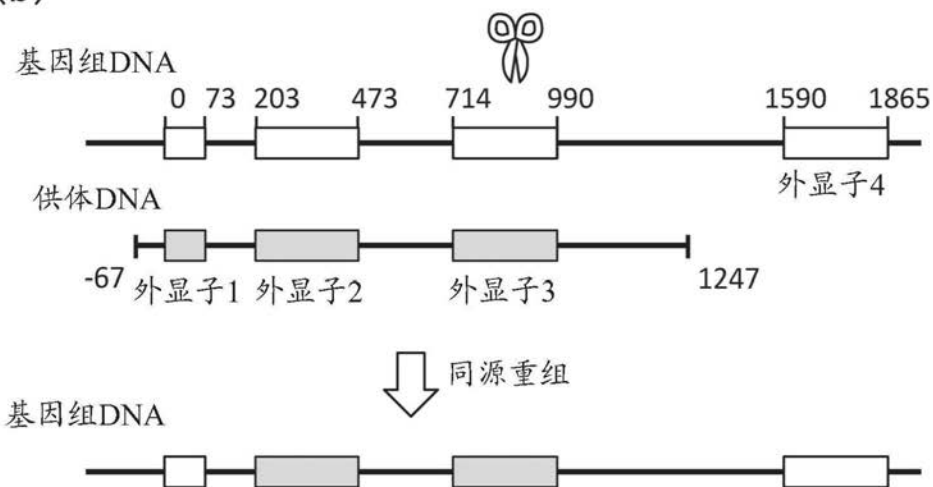


图20

(a)



(b)



(c)

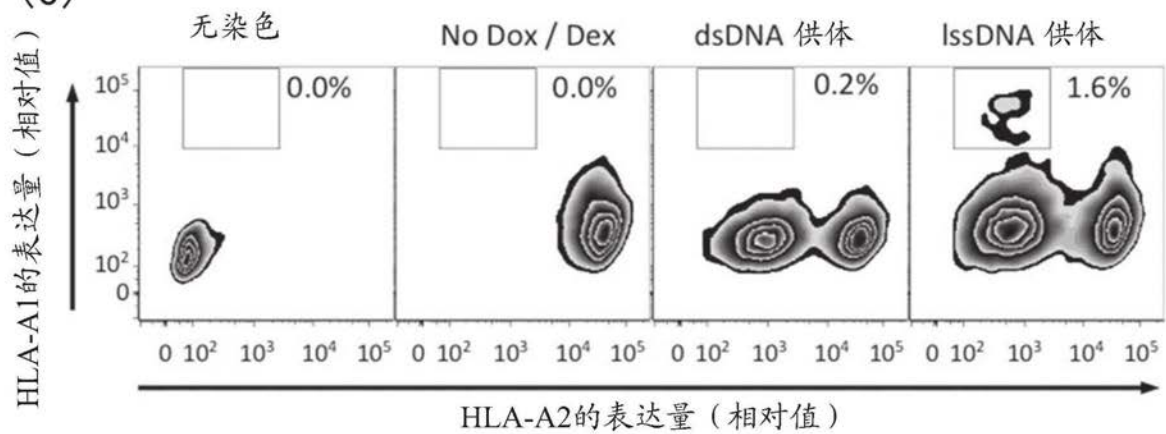


图21

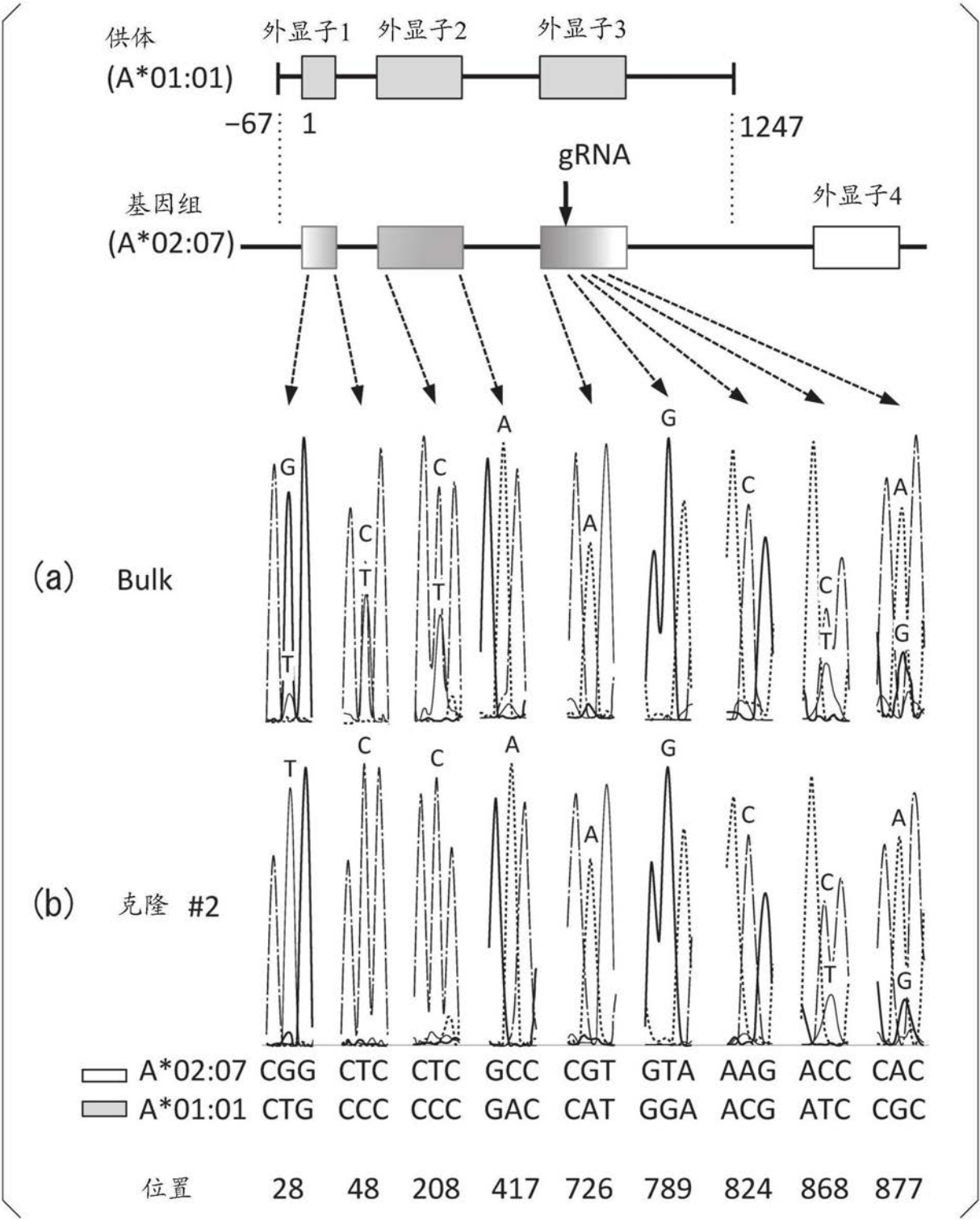


图22

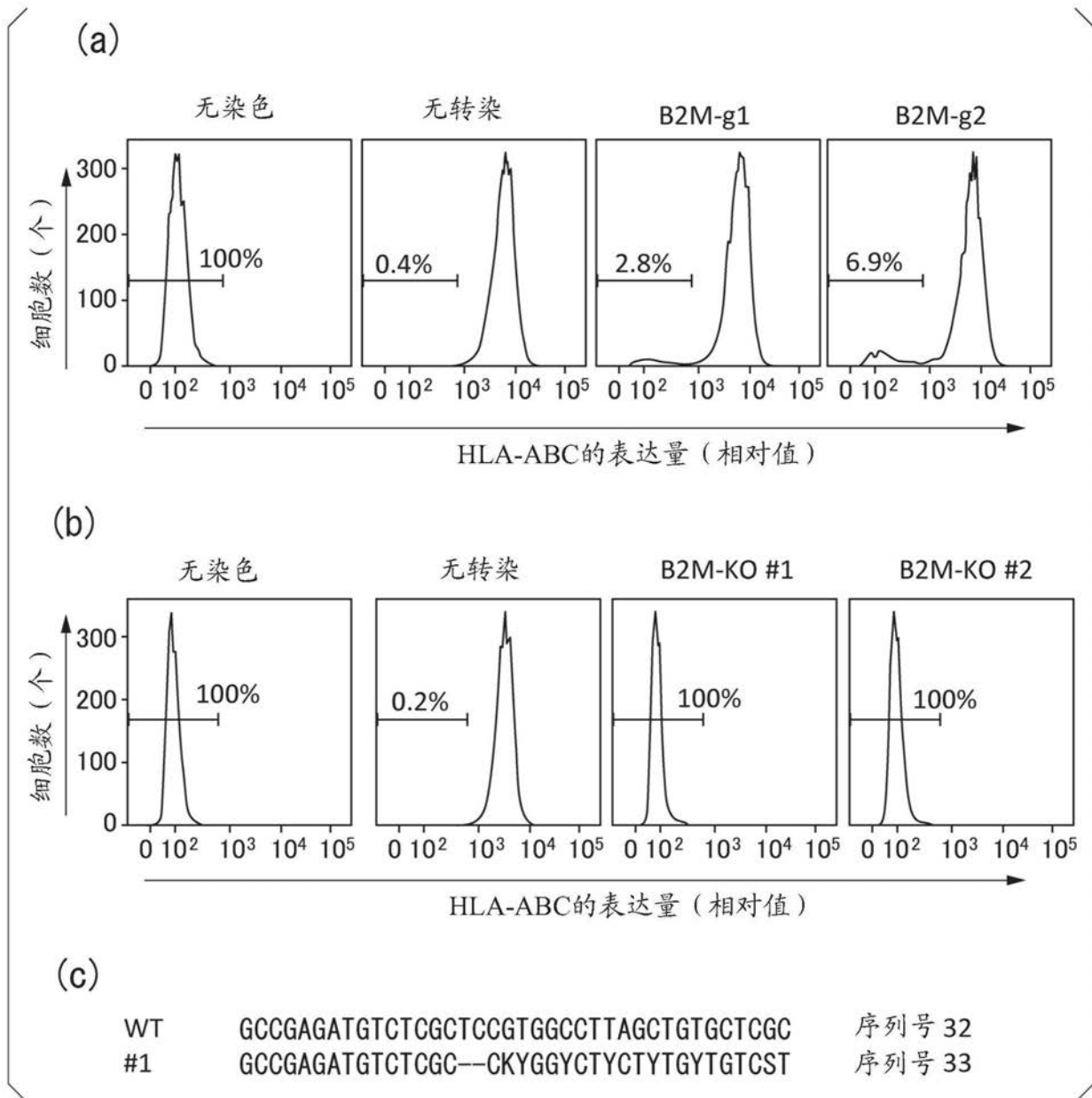


图23

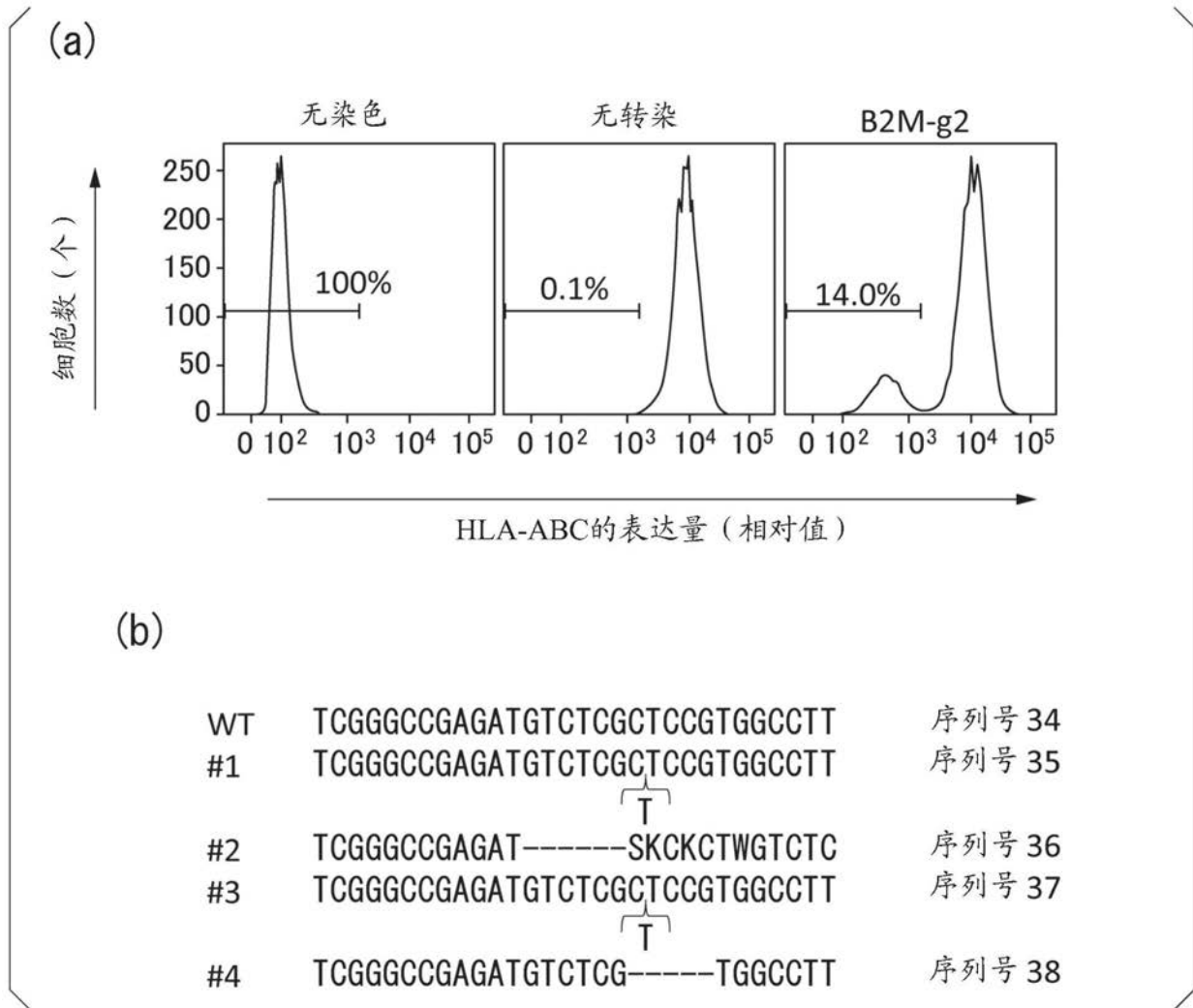


图24

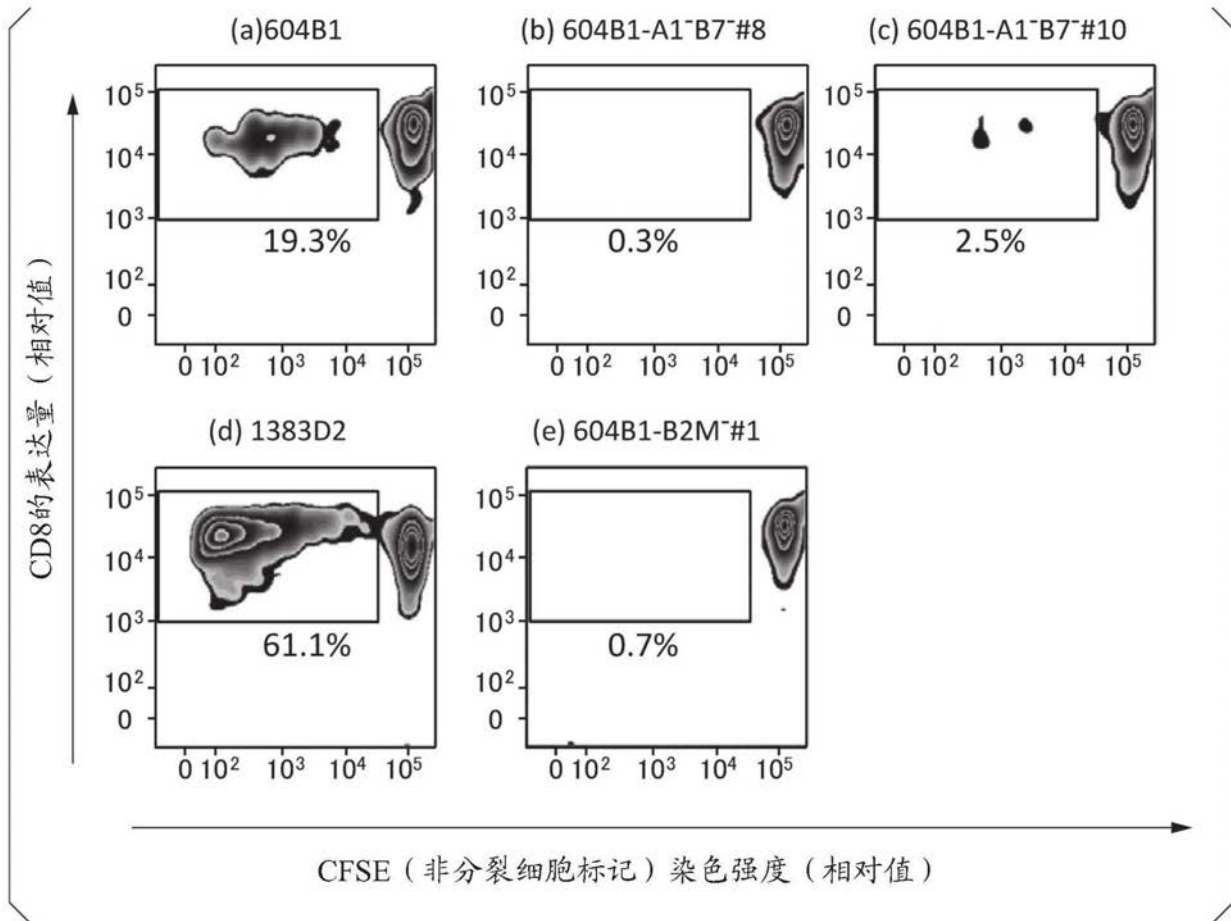


图25

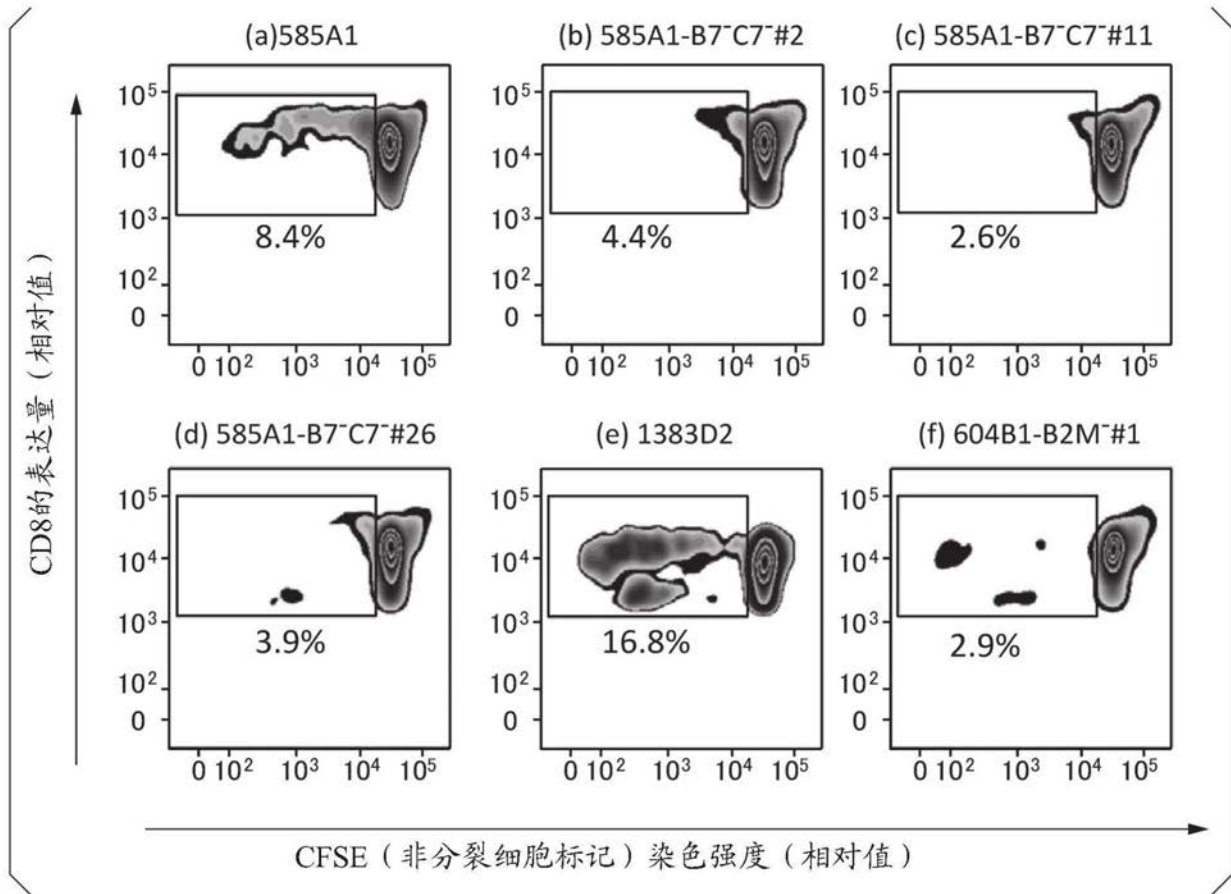


图26

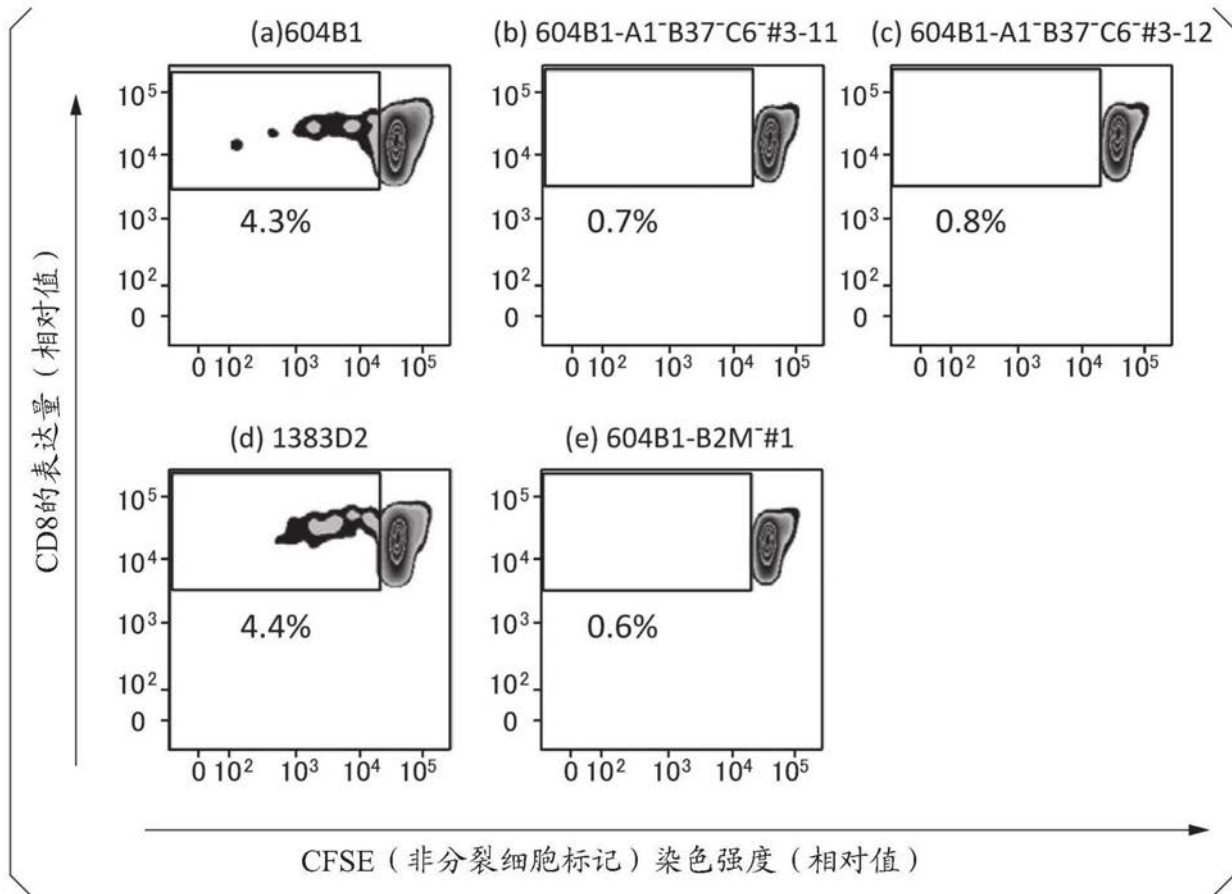


图27

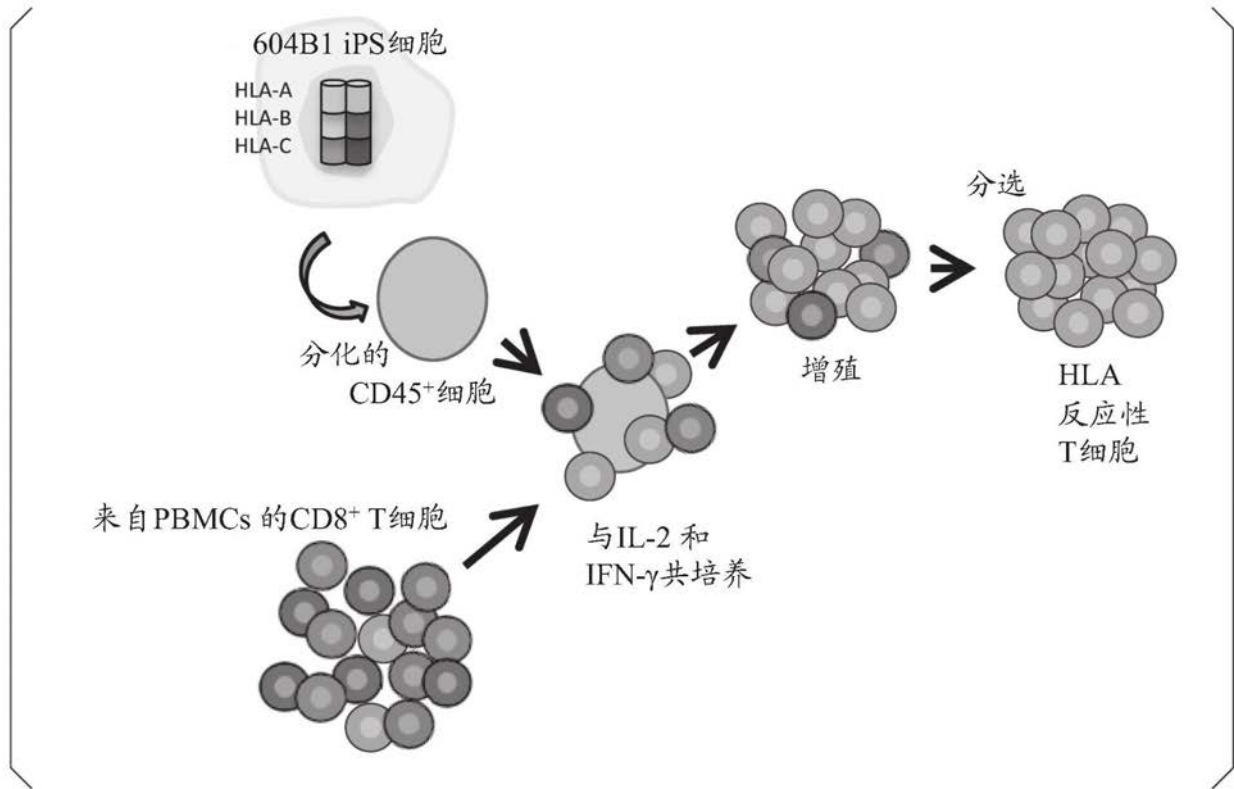


图28

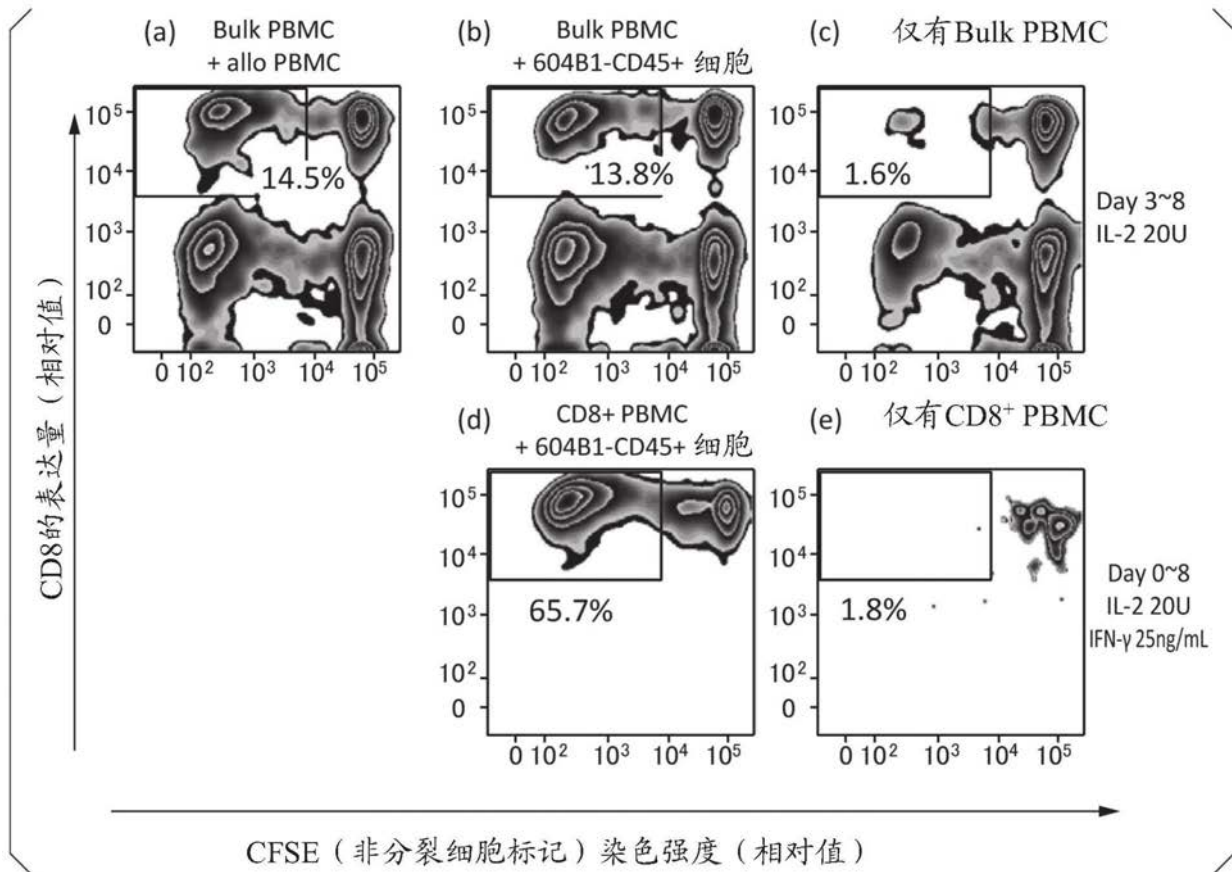


图29

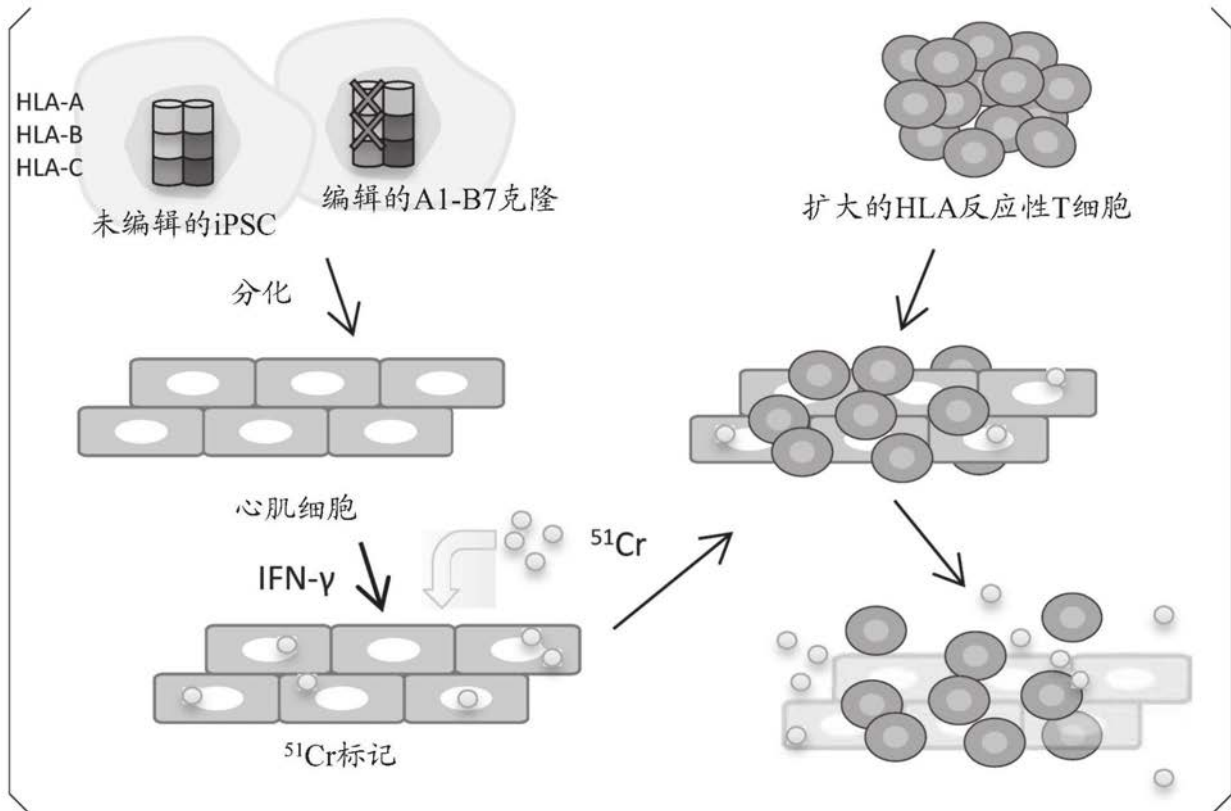


图30

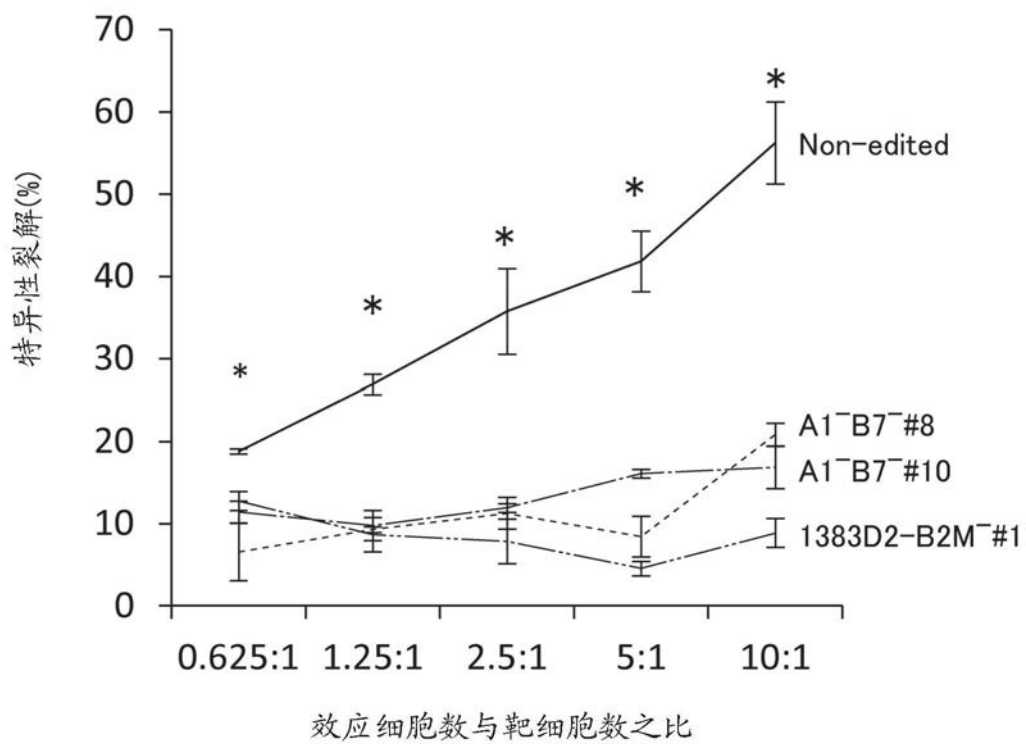


图31

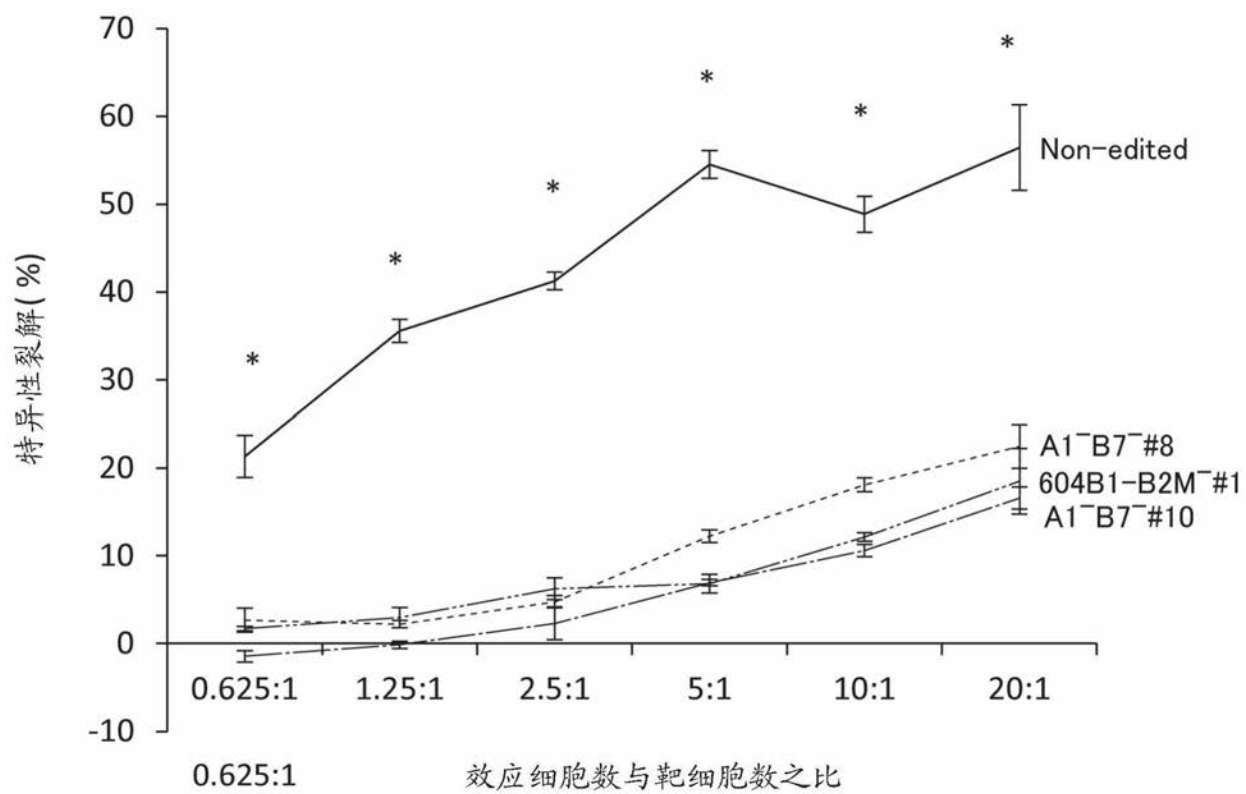


图32

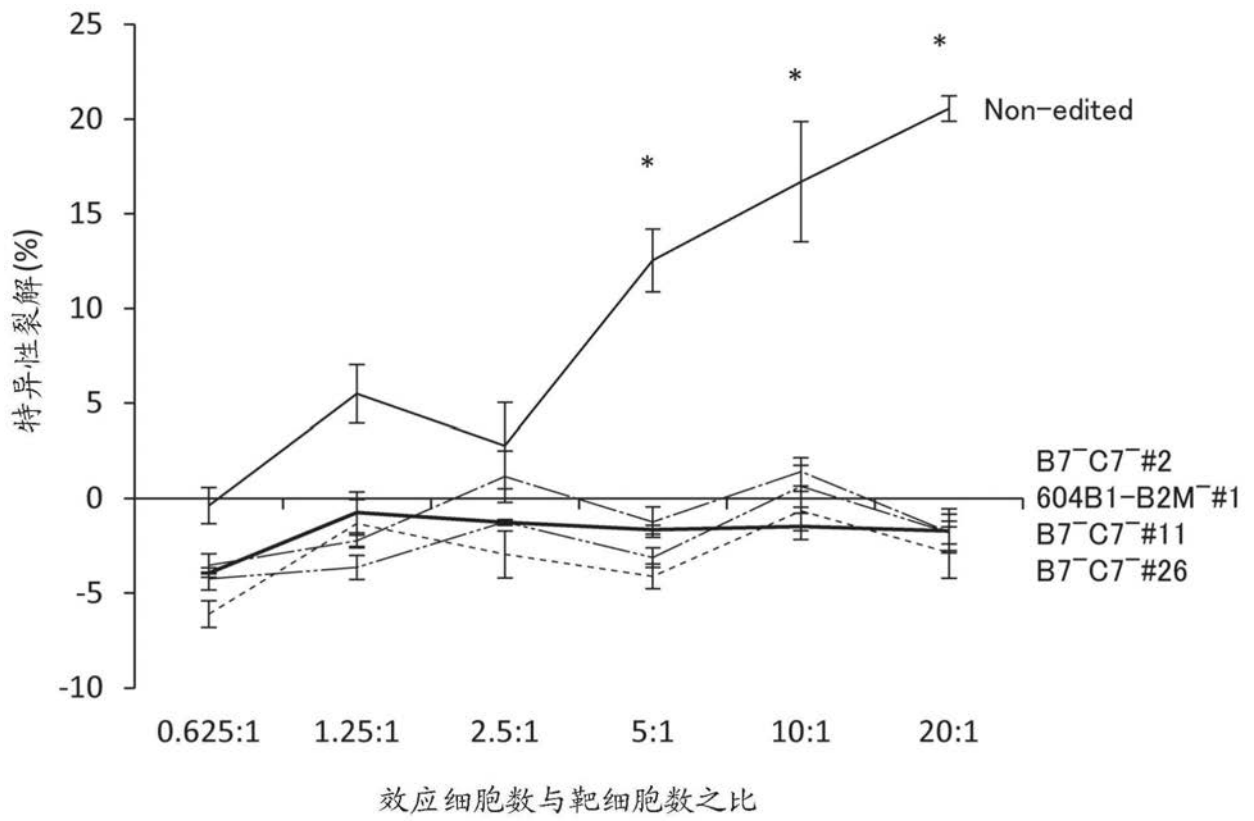


图33

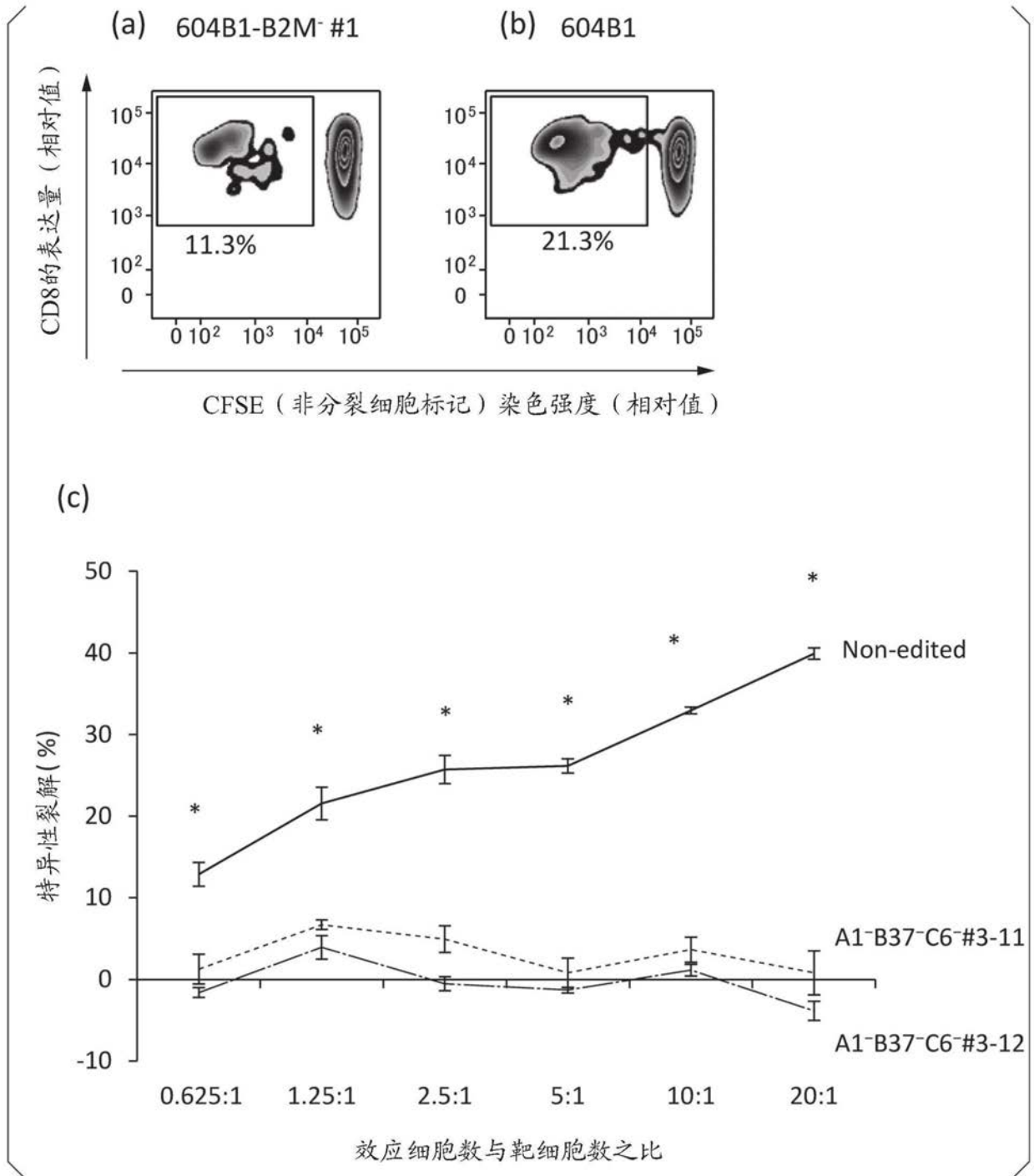


图34

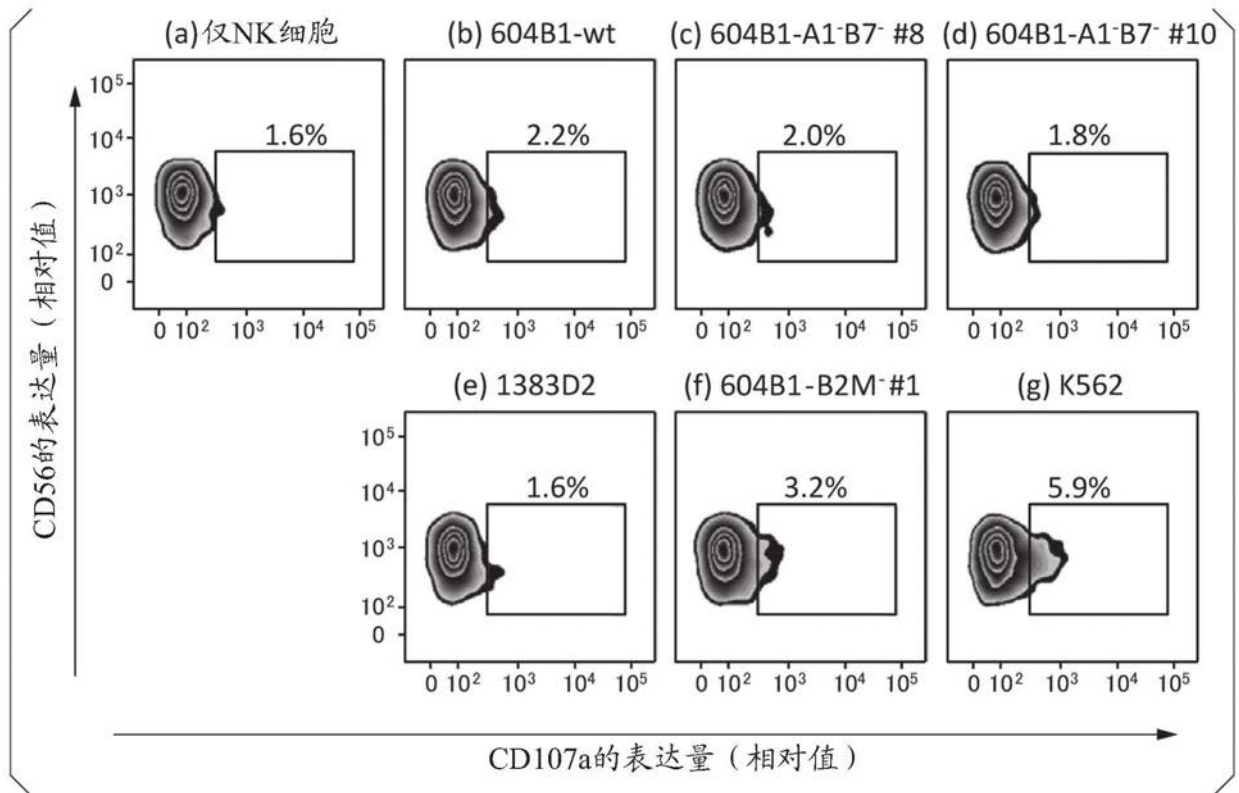


图35

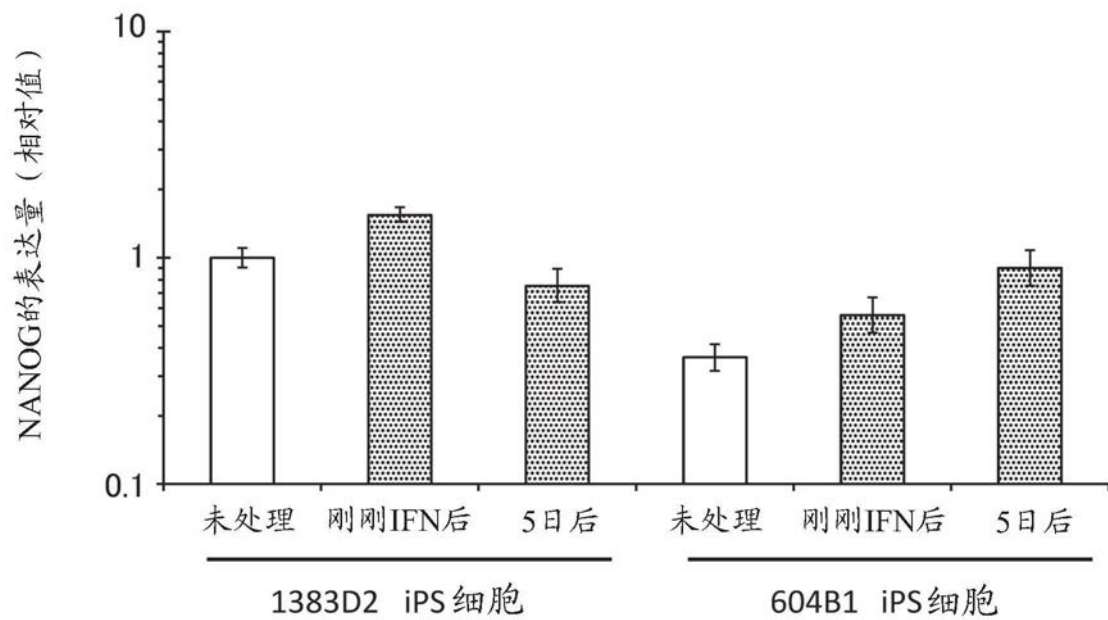


图36

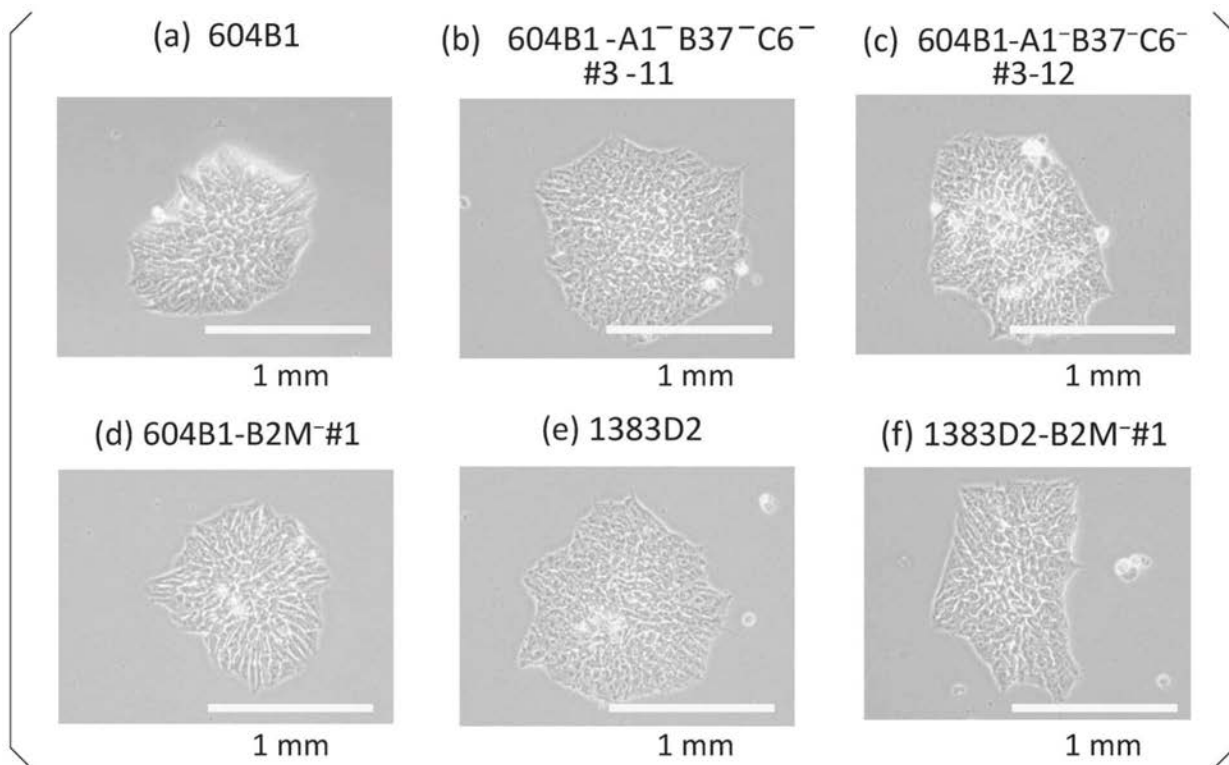


图37

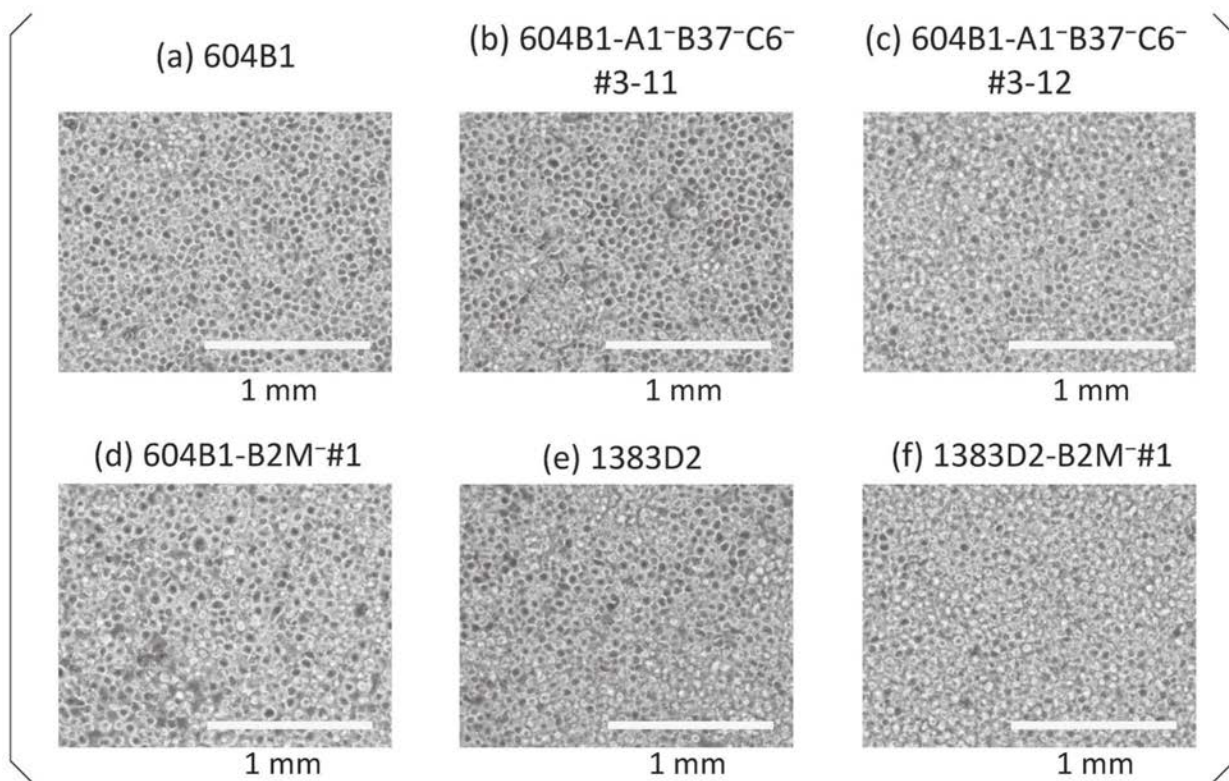


图38

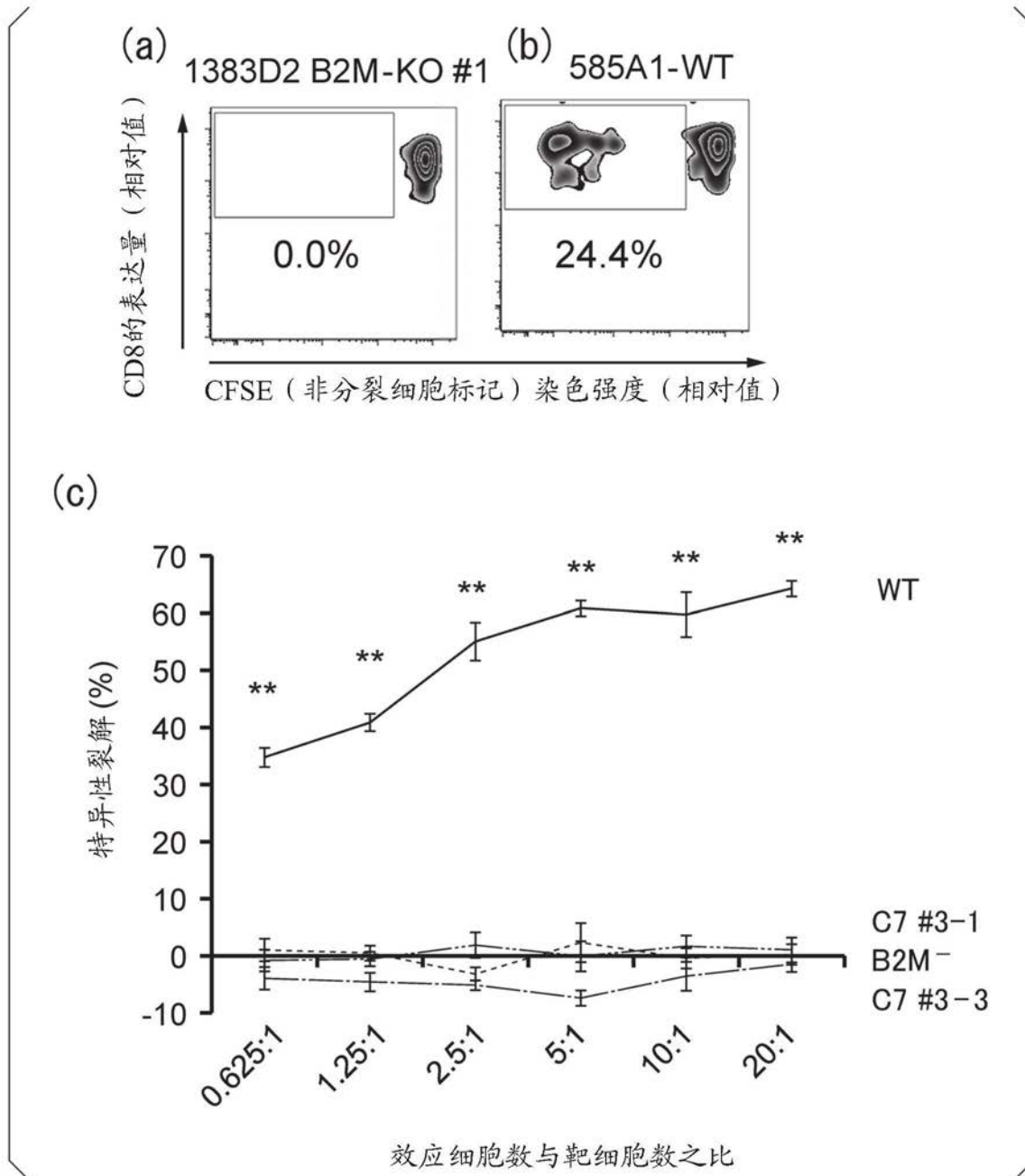


图39

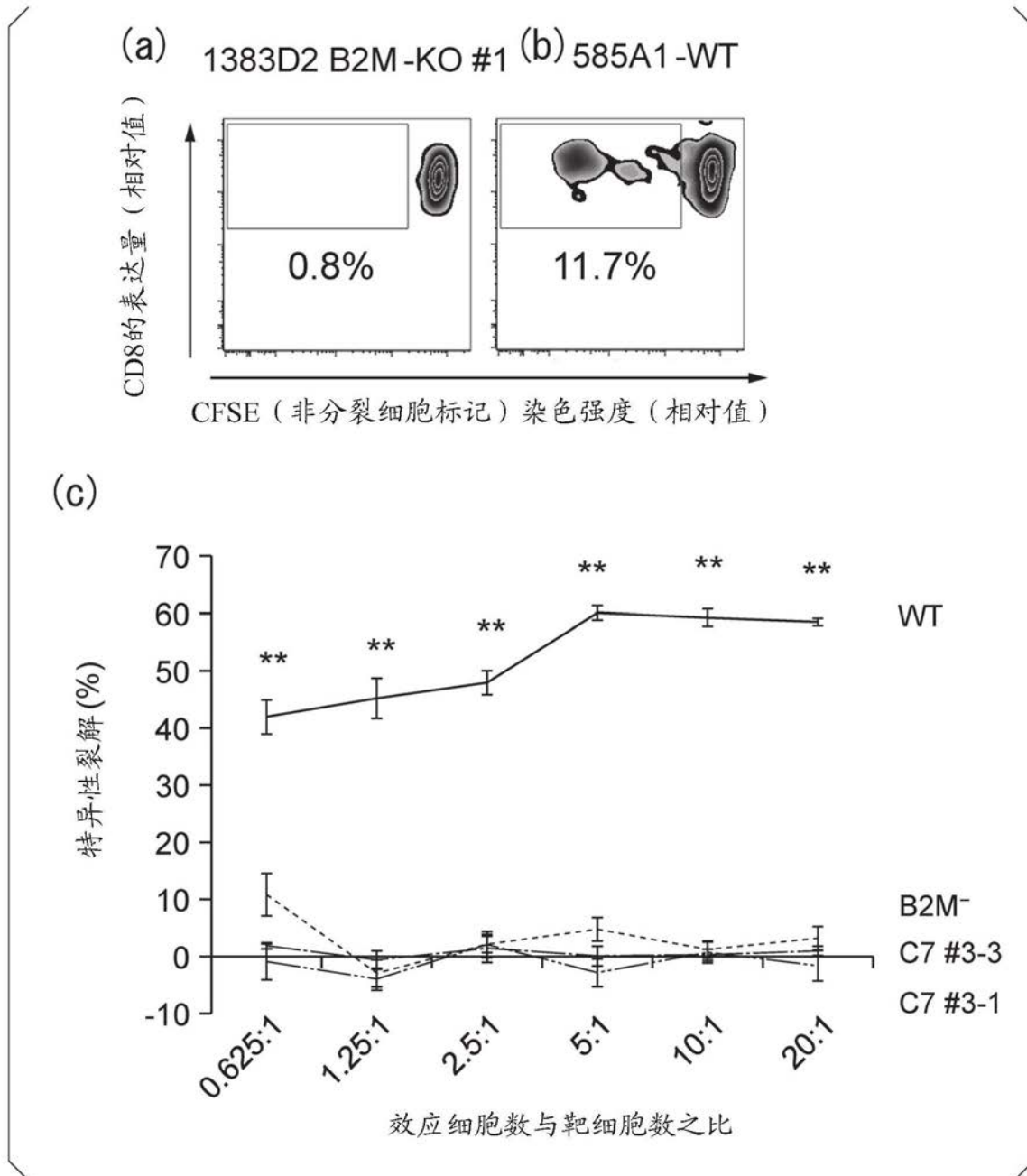


图40

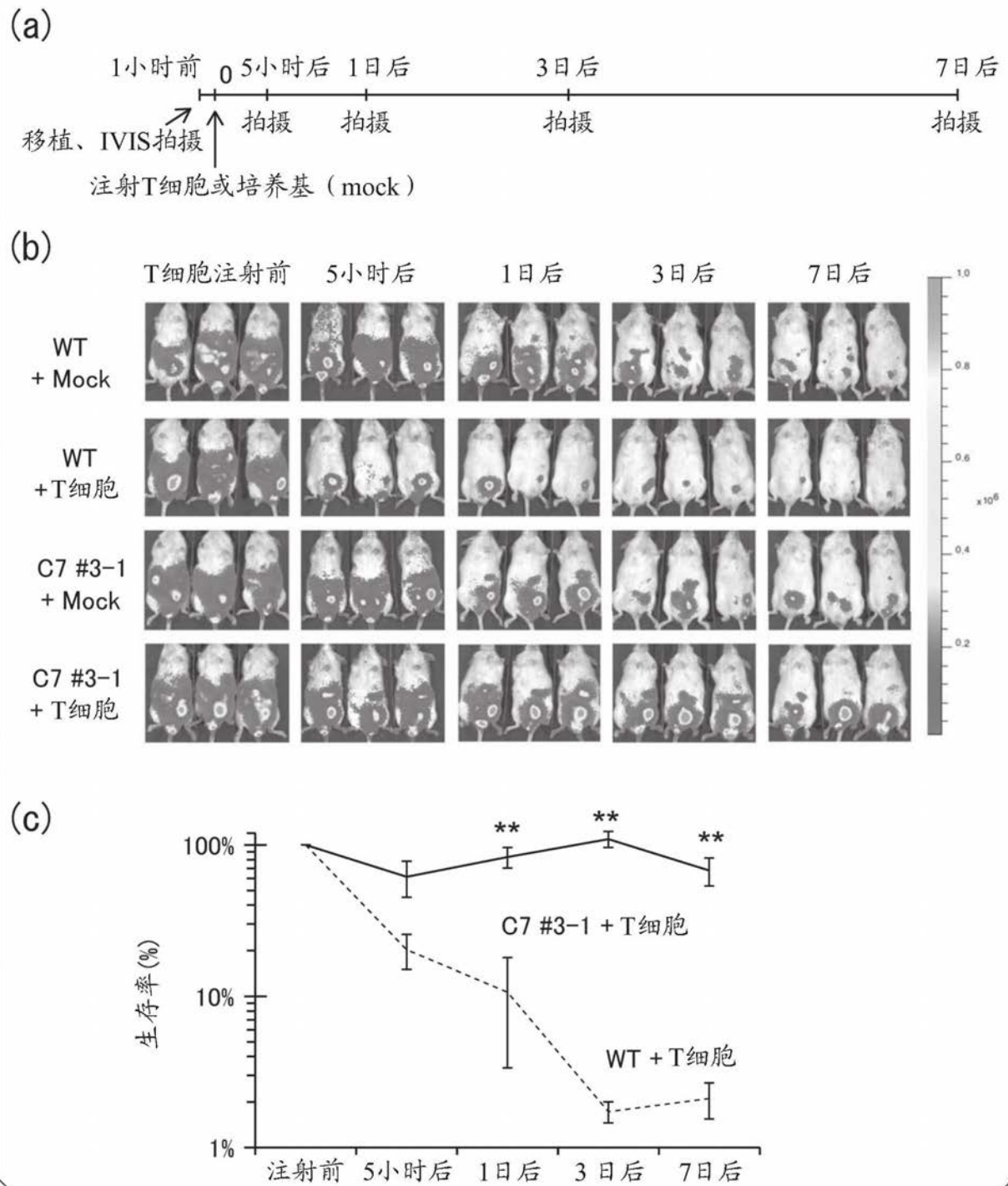


图41

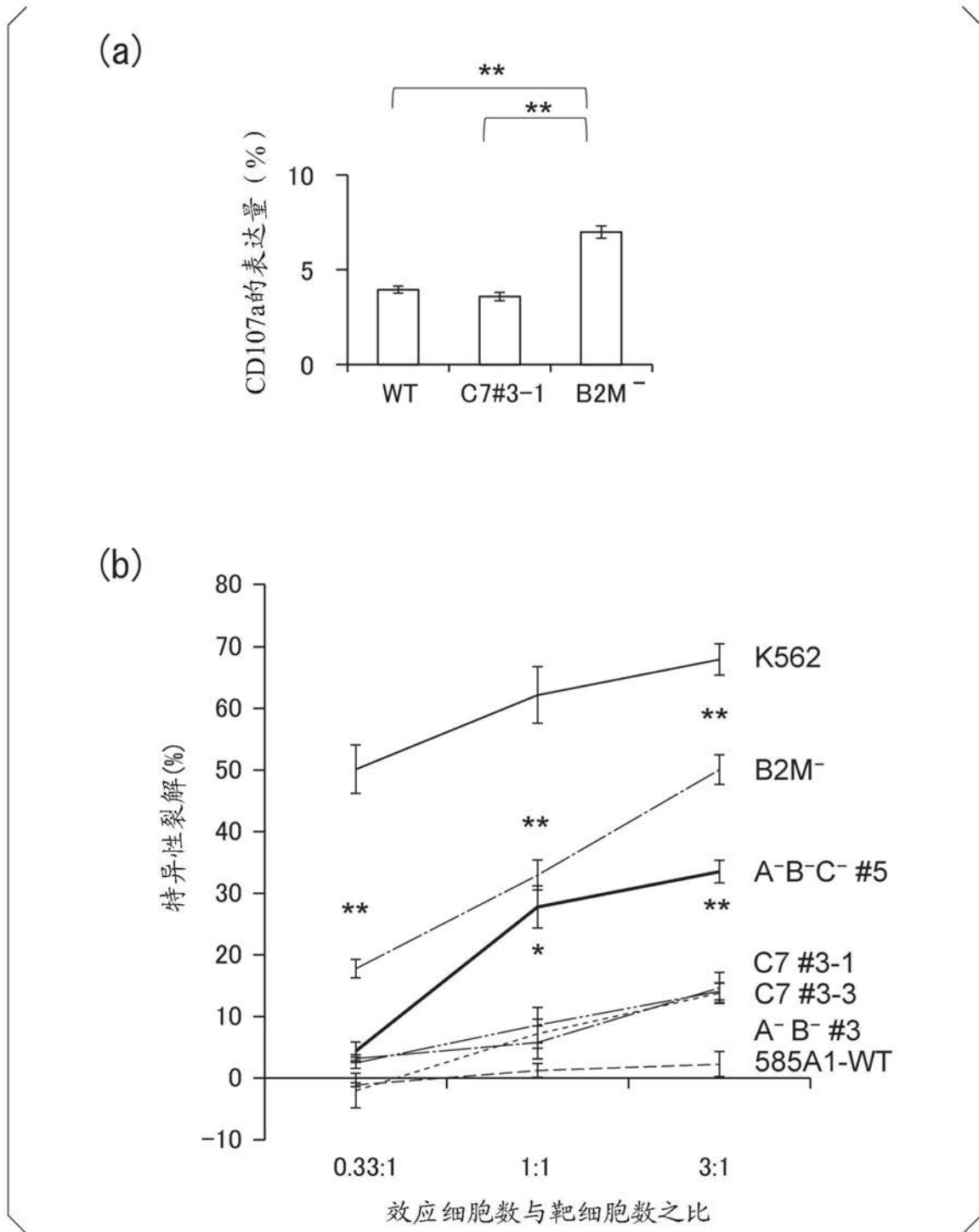


图42

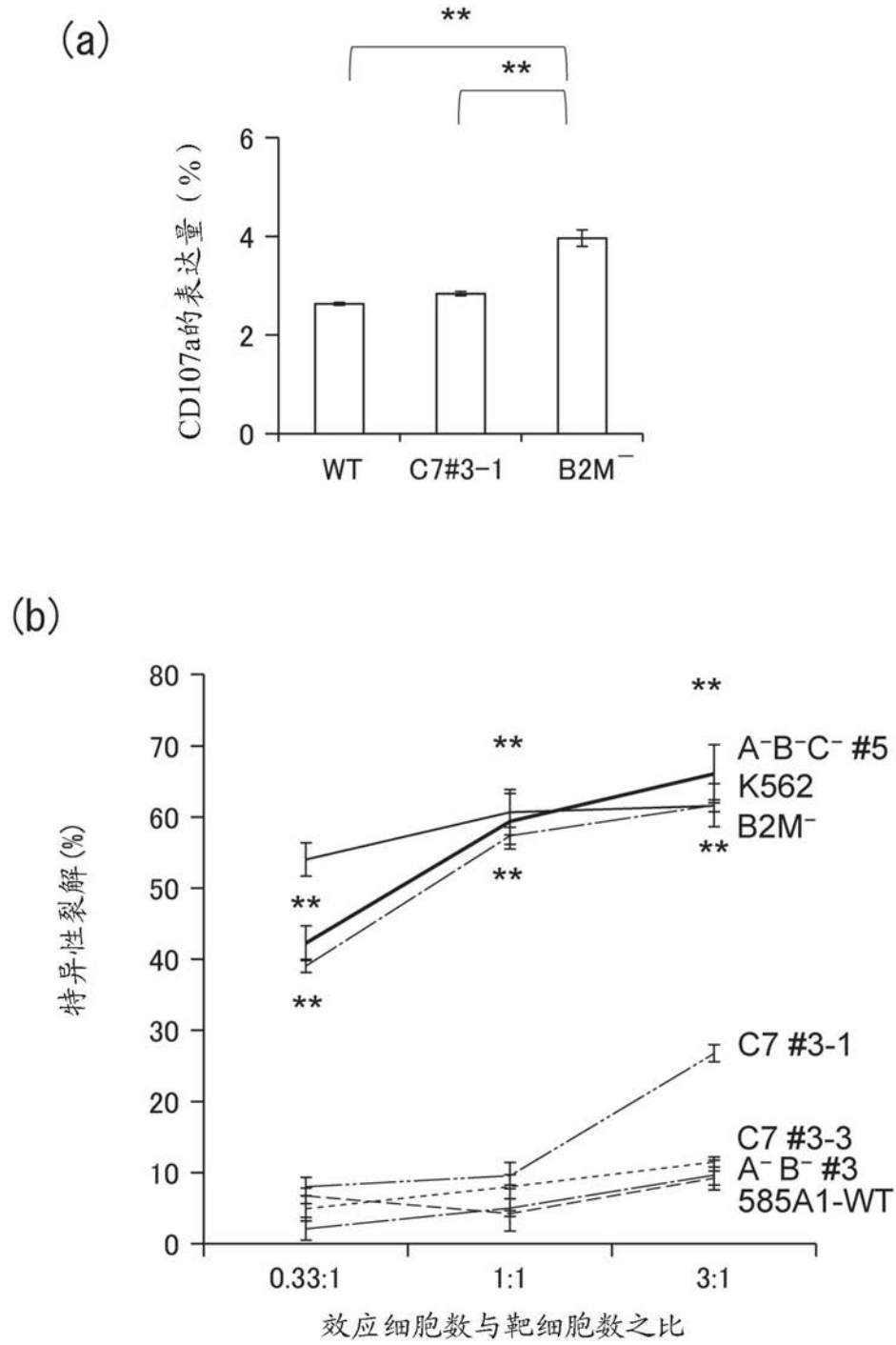


图43

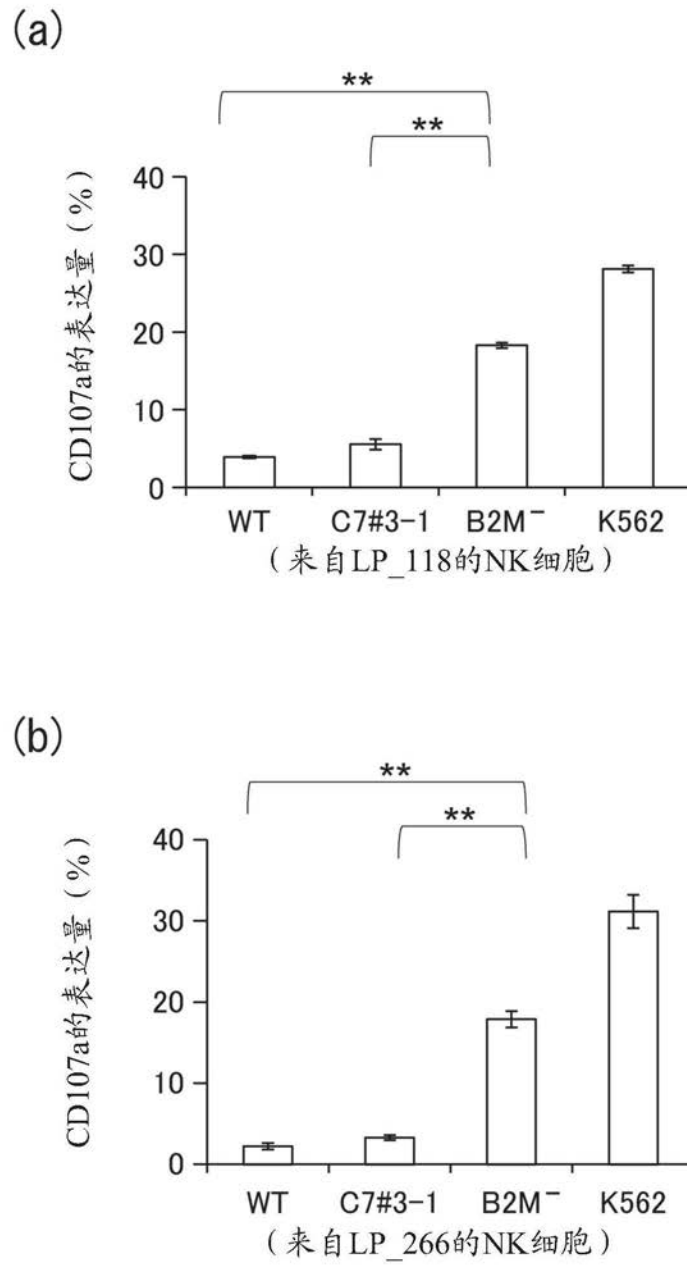


图44

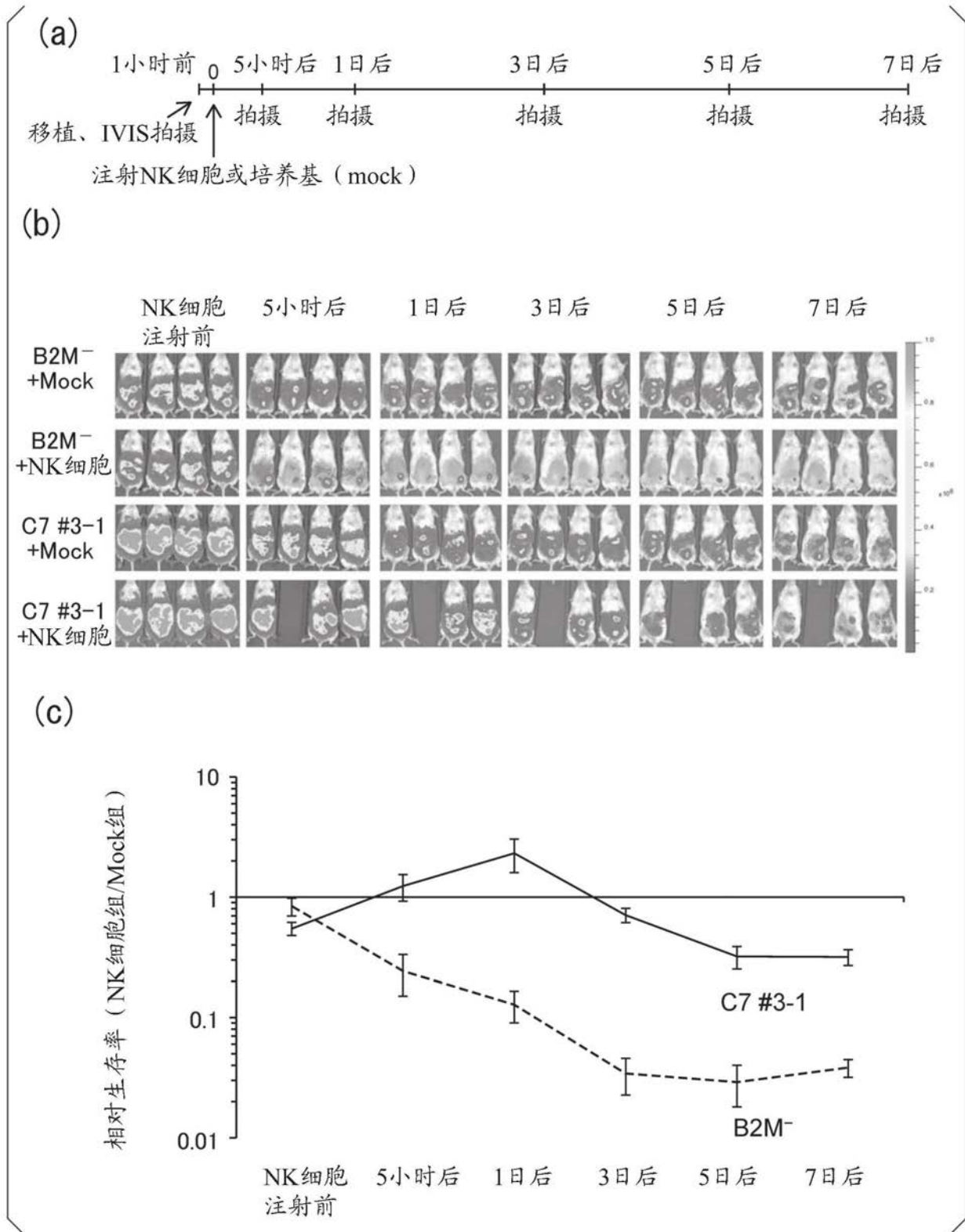


图45

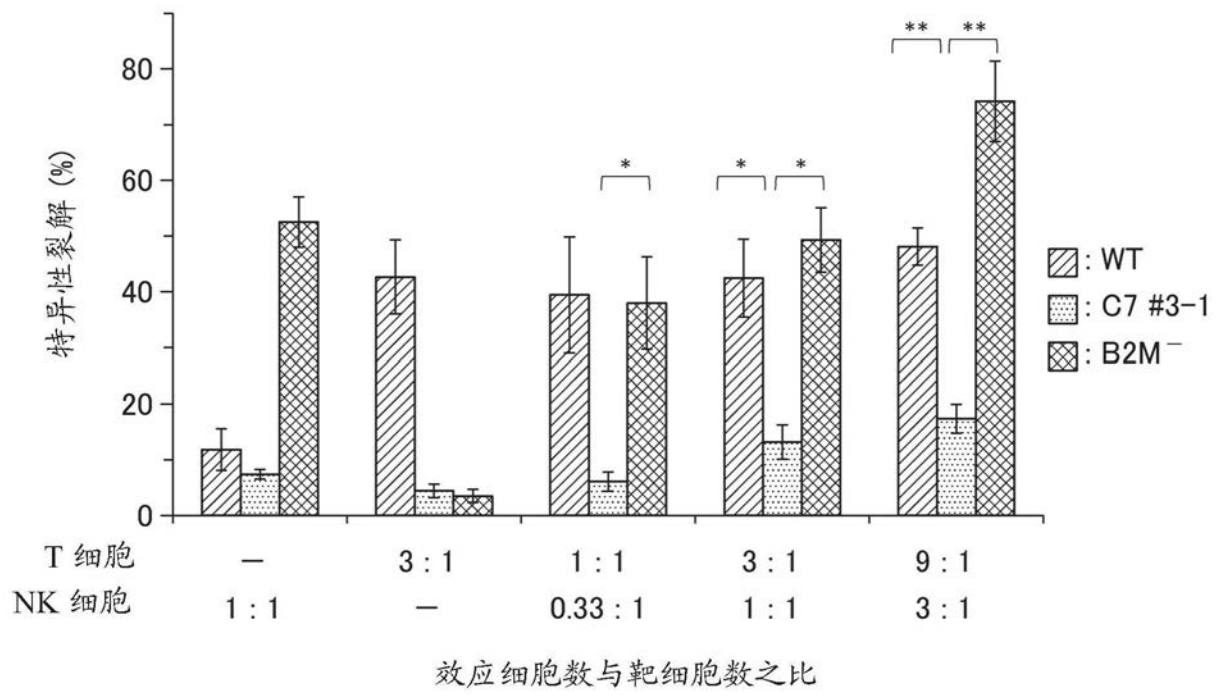


图46

(a)

585A1-C7 残存细胞

HLA-A	HLA-B	HLA-C	DP/DQ/DR
~~A*24:02~~	~~B*07:02~~	C*07:02	CIITA
~~A*24:02~~	~~B*52:01~~	~~C*12:02~~	CIITA

585A1-C7 残存细胞 (II类缺失)

↓ CIITA KO

HLA-A	HLA-B	HLA-C	DP/DQ/DR
~~A*24:02~~	~~B*07:02~~	C*07:02	~~CIITA~~
~~A*24:02~~	~~B*52:01~~	~~C*12:02~~	~~CIITA~~

(b)

克隆 ID	CIITA	CIITA
#3-1-1	WT	+1 bp
#3-1-2	WT	WT
#3-1-3	+1 bp	-5 bp
#3-1-4	+1 bp	WT
#3-1-5	WT	WT
#3-1-6	+1 bp	-1 bp
#3-1-7	-13 bp	-13 bp
#3-1-8	WT	-1 bp
#3-1-9	-13 bp	+1 bp
#3-1-10	WT	WT
#3-1-11	WT	WT
#3-1-12	WT	+1 bp
#3-1-13	WT	-15 bp
#3-1-14	WT	WT
#3-1-18	+1 bp	+1 bp
#3-1-19	WT	WT
#3-1-20	WT	WT
#3-1-21	+2 bp	-10 bp
#3-1-22	+1 bp	+1 bp
#3-1-23	WT	WT
#3-1-24	WT	WT
#3-1-25	WT	+2 bp
#3-1-26	WT	WT
#3-1-27	WT	+1 bp
#3-1-28	WT	WT
#3-1-31	WT	WT
#3-1-32	+16 bp	-6 bp
#3-1-33	WT	WT

(c)

sgRNA-CIITA-ex3g5 的靶序列

CIITA ACACCATCAACTGCGACCAGTTCAGCAGG 序列号 8014
 等位基因1 ACAC-----ACTGCGACCAGTTCAGCAGG 序列号 8015
 等位基因2 ACACCATCAACTGCGACCAGTTCAGCAGG 序列号 8016

A

图47

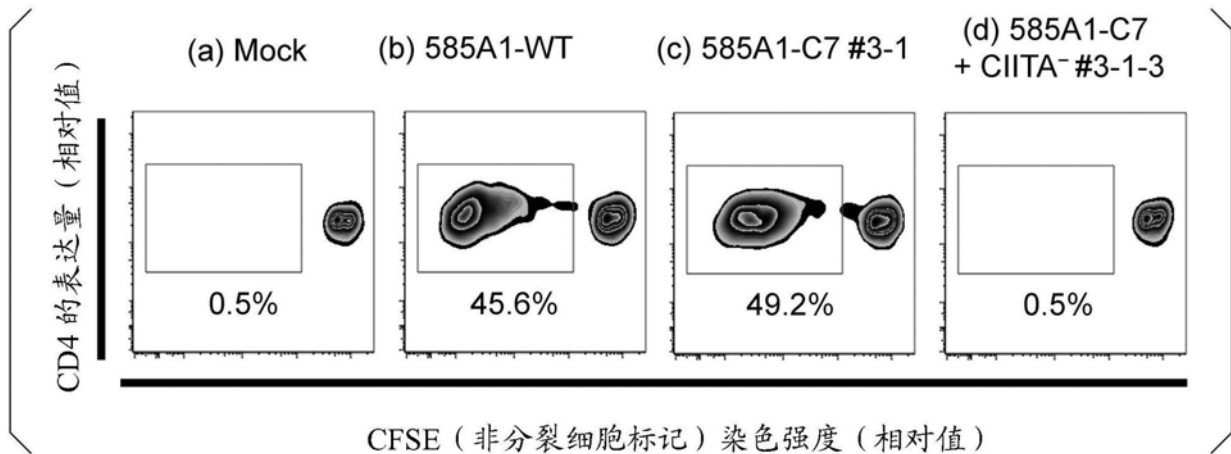


图48

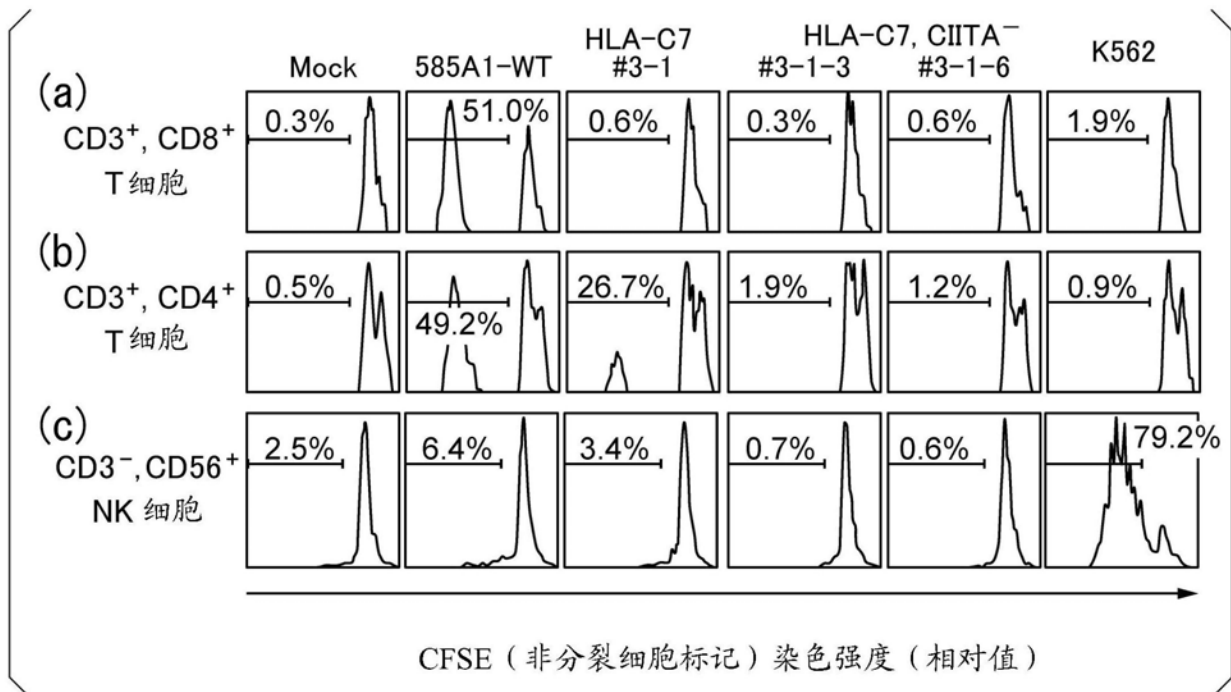


图49

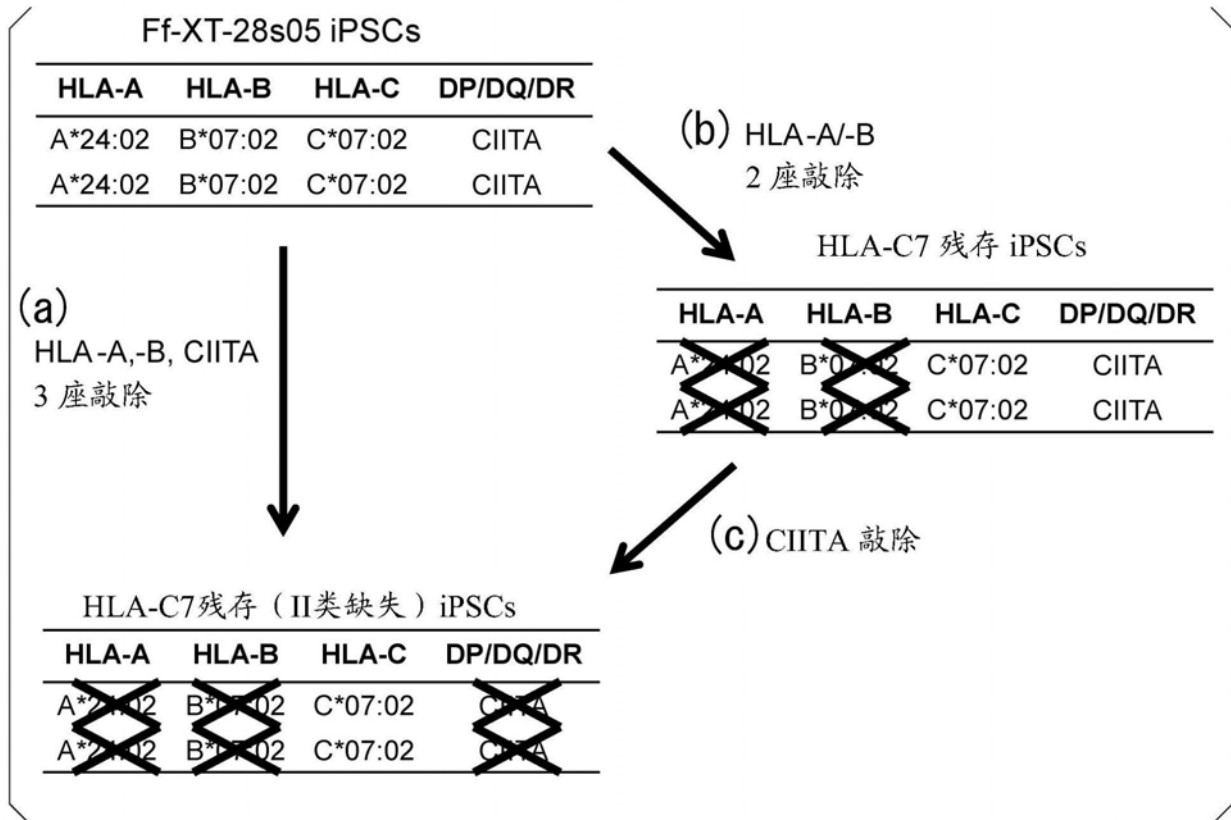


图50

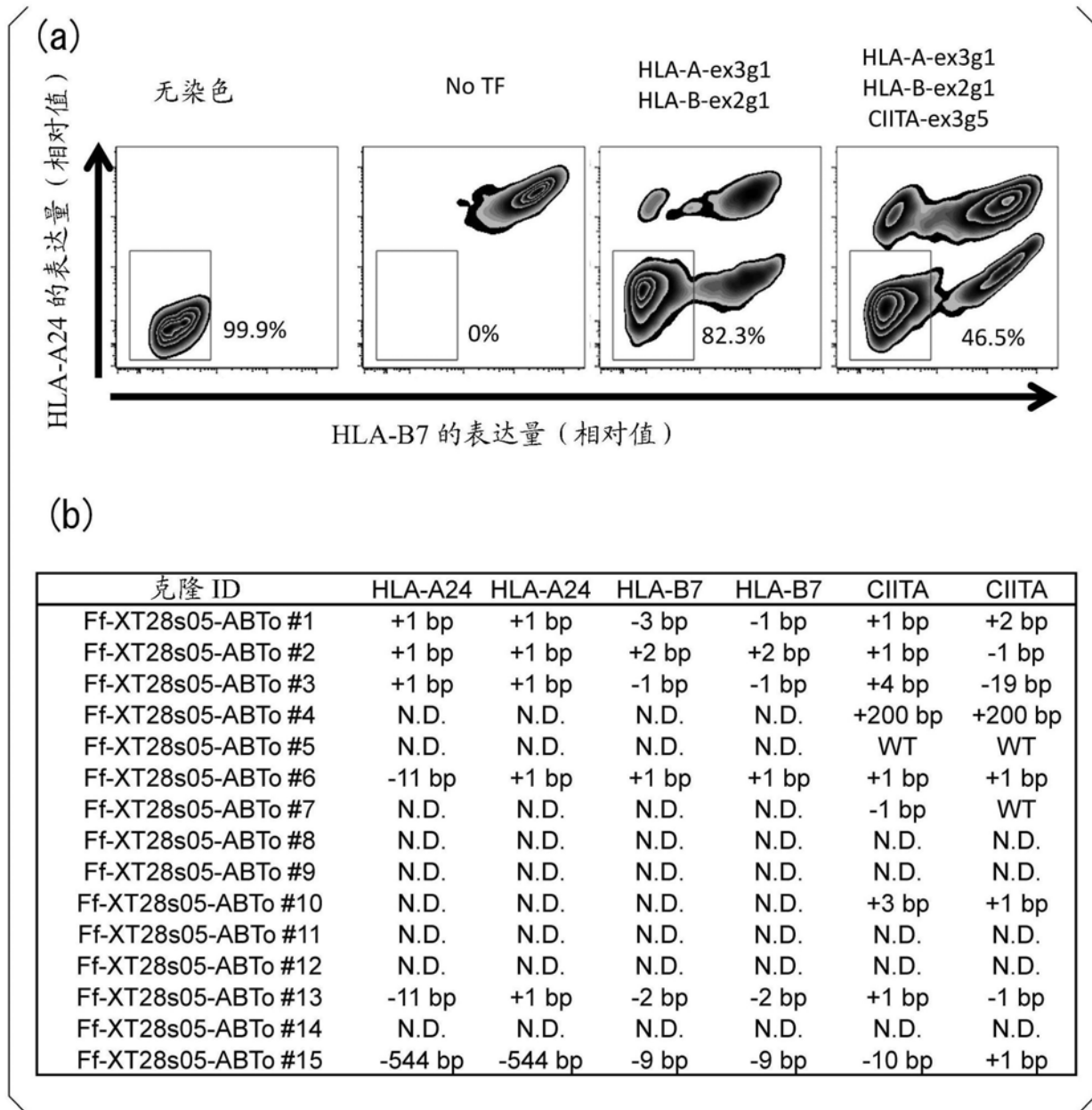


图51

(a)

克隆 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)

克隆 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

图52

HLA-C 等位基因	JPN 等级	JPN 等位基因频率	EUR 等级	EUR 等位基因频率	AFA 等级	AFA 等位基因频率	API 等级	API 等位基因频率	HIS 等级	HIS 等位基因频率
*01:02	1	17.558%	12	2.922%	19	0.850%	2	13.375%	7	4.927%
*02:02	19	0.025%	10	3.729%	5	8.461%	21	0.395%	10	4.227%
*03:03	2	13.116%	7	5.457%	16	1.182%	8	5.023%	12	3.402%
*03:04	4	12.451%	6	8.215%	8	5.330%	3	8.352%	4	6.978%
*04:01	9	4.441%	3	10.534%	1	18.457%	4	8.070%	1	16.508%
*05:01	15	0.376%	5	9.136%	10	3.526%	18	0.847%	9	4.652%
*06:02	13	0.797%	4	9.301%	4	8.855%	6	6.518%	5	5.878%
*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	2.826%
*12:02	5	11.142%	16	0.934%	23	0.145%	11	4.486%	17	1.301%
*16:01	N/A	0.000%	11	3.539%	3	9.788%	25	0.169%	6	5.053%
等位基因频率总计		79.986%		85.437%		76.087%		73.674%		77.388%
总计覆盖率		95.994%		97.879%		94.282%		93.069%		94.887%

图53

克隆 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

图54

克隆 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

图55

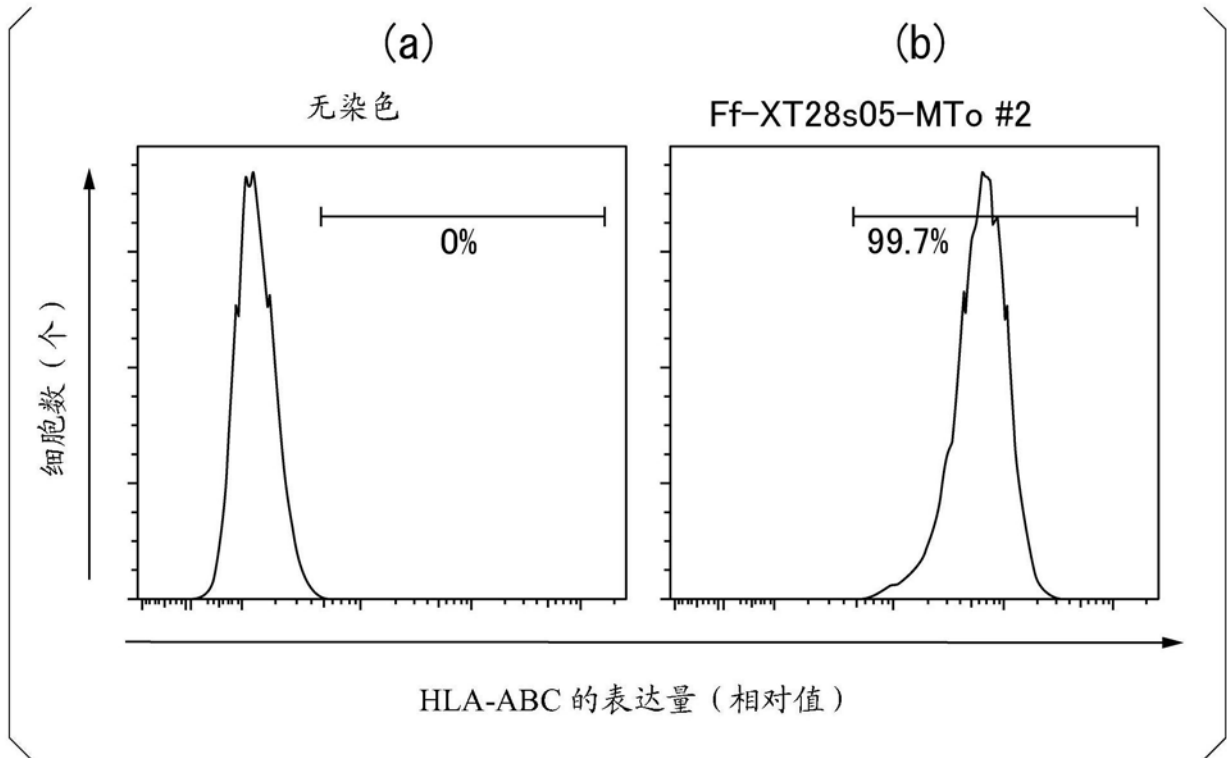


图56

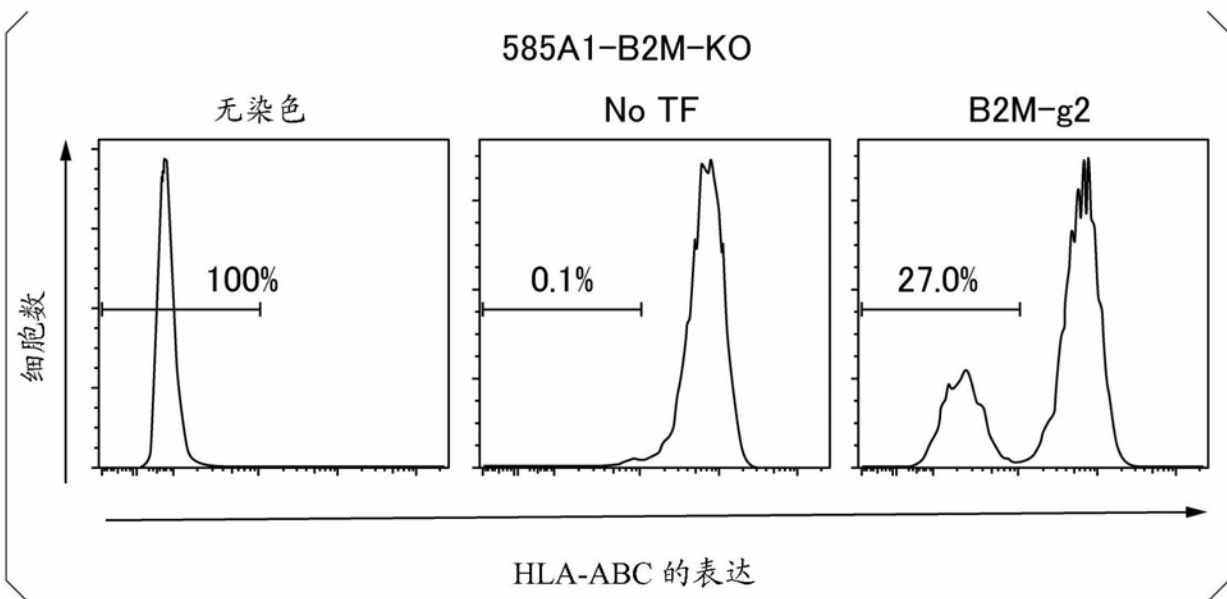


图57

克隆 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

图58

克隆 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

图59

克隆 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

图60