明　細　書

発明の名称 ： 低免疫原性細胞

技術分野

[0001] 本開示は、免疫原性が極めて低い、遺伝子改変ヒト多能性幹細胞および当該細胞の製造方法に関する。

背景技術

[0002] 主要組織適合抗原(MHC)はヒトではヒト白血球抗原（Human leukocyte antigen：HLA）として知られほとんどの細胞や組織に発現している。HLAは主にA、B、C、DR、DQ、DPの6座抗原があり、さらにそれぞれが数十種類の異なるタイプ(アレル)の複雑な組み合わせで構成されており、その組み合わせは数万通り存在する。HLAはヒトの体内で重要な免疫機構を担っており、その主な役割は自他認識をするための抗原提示である。もし他人に自己以外の細胞または組織を移植（他家移植）した場合、このHLAが最も重要な抗原（異物）として細胞傷害性T細胞(CTL)などの免疫担当細胞に認識され、拒絶が成立し移植片が生着しなくなる。

したがって、現在上市されている細胞医薬品の多くは自家細胞製品であるが、細胞医薬品の普及には他家細胞の使用が不可欠となると考えられており、そのために免疫拒絶の問題をクリアする必要がある。

[0003] 京都大学iPS細胞研究所はHLAホモドナーから樹立したiPS細胞を数種類ストックすることでこの問題の解決を試みている。2019年の段階で既に日本人に多いタイプのHLA型4種類のiPS細胞を作成済みで、このストックiPS細胞により日本人の約40%をカバーできるとしている。しかしながらこの方法では万人をカバーする細胞を揃えることは極めて困難であるし、莫大な費用も要する。さらに免疫拒絶の可能性を完全に排除できるわけではない。

[0004] 一方、HLA遺伝子を欠損させることで低免疫原性の細胞を製造する試みは古くから行われている。たとえばセルジェネシス社は、少なくとも一つのMHC抗原を欠失した遺伝子改変細胞を開示している（特許文献１）。またMorphogen

esis社は、HLA-B遺伝子およびHLA-C遺伝子を欠損させたヒト幹細胞の製造方法を開示している（特許文献２）。

そして近年のゲノム編集技術などの急速な普及発展により、細胞の遺伝子改変が容易かつ正確に行えるようになったこと、あるいは再生医療・細胞医薬品に参入する企業が増加していること等から、低免疫原性の多能性幹細胞を製造する試みが急速に進行している。

[0005] ユニバーサルセル社（アステラス製薬が買収）およびワシントン大学は、多能性幹細胞におけるB2M遺伝子とRFXANK遺伝子を欠損させることで得られるユニバーサルドナー細胞を開発している（特許文献３および４）。またカリフォルニア大学は、B2M遺伝子とCIITA遺伝子を欠損させると共にCD47を過剰発現させた低免疫原性iPS細胞を開発している（非特許文献１）。

一方、ハーバード大学はB2M遺伝子またはCIITA遺伝子の欠失、あるいはPD-L1遺伝子やHLA-G遺伝子のノックインにより得られた治療用細胞を開示している（特許文献５）。また京都大学はHLA-AおよびHLA-B各遺伝子のみを個別に欠損させると共に、CIITA遺伝子を欠損させたヒトiPS細胞を製造している（非特許文献２）。

[0006] このようにHLA遺伝子をはじめとした様々な遺伝子を欠失させ、また導入することで様々な低免疫原性細胞が製造されている。しかしながらどのHLA遺伝子を欠失させると免疫拒絶に関与する他の遺伝子の発現にどのような影響があるかを詳細に解析した例はほとんどない。また、どの遺伝子をノックインするとより高機能な低免疫原性細胞が得られるかを解析した例もほとんどない。このような現状のもと、依然として、高機能な低免疫原性細胞が求められている。

先行技術文献

特許文献

[0007] 特許文献1：国際公開第1995/017911号公報

特許文献2：国際公開第98/42838号公報

特許文献3：国際公開第2016/183041号公報

特許文献4：国際公開第2012/145384号公報

特許文献5：国際公開第2013/158292号公報

非特許文献

[0008] 非特許文献1：Tobias Deuse et al., Nature Biotechnology, volume 37, pages 252-258, 2019

非特許文献2：Huaigeng Xu et al., Cell Stem Cell, 24, 1-13, 2019

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0009] 高機能な低免疫原性細胞が求められている。

課題を解決するための手段

[0010] 発明者らは、ストックiPS細胞に代わる低免疫原性細胞を製造することで、他家細胞医薬品の開発に貢献できると考え、ゲノム編集ツールを用いて様々な免疫拒絶反応に関与するタンパク質の組合せを検討した。

まず、発明者らはCTLによる免疫応答の回避を目的として、CTLのT細胞受容体(TCR)と結合するHLAクラスIa(HLA-A、HLA-BおよびHLA-C)の各α鎖をコードする内在性遺伝子を欠損させた。また、ヘルパーT細胞のTCRと結合するHLAクラスIIを欠失させるために、HLAクラスII遺伝子の転写制御因子の１つであるRFXANKをコードする内在性遺伝子を欠損させた。これらの各遺伝子を欠損した細胞は、通常、免疫によって拒絶されないと考えられた。ところが予想外にも上記細胞において、インタクトなHLAクラスIb（HLA-E）の発現まで失われていることが明らかとなった。HLAクラスIbを発現しない細胞はNK細胞による攻撃を受けるため移植用の細胞ソースとしての利用には不都合である。従って、HLAクラスIbをコードする遺伝子を導入する必要性が生じた。

発明者らは、上記必要性からHLAクラスIbをコードする遺伝子を導入するとともに、CTL上のPD-1およびPD-2に結合し、CTLに対して抑制的に働くPD-L1およびPD-L2をコードする各遺伝子を導入した。最終的には、さらにHLAクラスIaおよびHLAクラスIbの共通軽鎖β２ミクログロブリン(B2M)をコードする遺伝

子も導入することで、HLAクラスIの発現量を向上できることを明らかにした。

これらの結果として、ヒト多能性幹細胞においてHLAクラスIa分子であるHLA-A、HLA-BおよびHLA-Cの各α鎖をコードする内在性遺伝子を欠損させ、RFXANKをコードする内在性遺伝子を欠損させ、PD-L1およびPD-L2をコードする各外来性遺伝子、HLAクラスIb分子であるHLA-Eおよび/またはHLA-Gの各α鎖をコードする各外来性遺伝子、β２ミクログロブリンをコードする外来性遺伝子をゲノムに導入することで、高い安全性を有すると共に、分化誘導能を保持したヒト多能性幹細胞を製造できることを見出した。発明者らはこれらの発見に基づき、さらに鋭意研究を進めることで本発明を完成させた。

[0011] すなわち本発明は、以下を提供する。

［１］(1)ヒト白血球型抗原（HLA）クラスIaのα鎖をコードする内在性遺伝子を欠損し、

(2)HLAクラスIIまたはその発現制御因子をコードする内在性遺伝子を欠損し、

(3)HLAクラスIbのα鎖をコードする外来性遺伝子を含み、

(4)ヒトPD-L1をコードする外来性遺伝子を含み、および

(5)ヒトPD-L2をコードする外来性遺伝子を含む

低免疫原性ヒト細胞。

［２］内在性HLAクラスIbを細胞表面に発現しない、［１］に記載の細胞。

［３］HLAクラスIaのα鎖をコードする内在性遺伝子がHLA-Aのα鎖をコードする内在性遺伝子、HLA-Bのα鎖をコードする内在性遺伝子およびHLA-Cのα鎖をコードする内在性遺伝子である、［１］または［２］に記載の細胞。

［４］HLAクラスIIまたはその発現制御因子をコードする内在性遺伝子が以下の(a)または(b)である、［１］～［３］のいずれか１つに記載の細胞：

(a)HLA-DPのα鎖および/またはβ鎖をコードする内在性遺伝子、HLA-DQのα鎖および/またはβ鎖をコードする内在性遺伝子、HLA-DRのα鎖および/またはβ鎖をコードする内在性遺伝子、HLA-DMのα鎖および/またはβ鎖をコード

する内在性遺伝子、ならびにHLA-DOのα鎖および/またはβ鎖をコードする内在性遺伝子、

(b)ヒトRFXANKをコードする内在性遺伝子、ヒトRFX5をコードする内在性遺伝子、ヒトRFXAPをコードする内在性遺伝子またはヒトCIITAをコードする内在性遺伝子。

［５］HLAクラスIbのα鎖をコードする外来性遺伝子がHLA-Eのα鎖をコードする外来性遺伝子および/またはHLA-Gのα鎖をコードする外来性遺伝子である、［１］～［４］のいずれか１つに記載の細胞。

［６］(6)ヒトβ２ミクログロブリンをコードする外来性遺伝子を含む、［１］～［５］のいずれか１つに記載の細胞。

［７］(7)自殺遺伝子を含む、［１］～［６］のいずれか１つに記載の細胞。

［８］外来性遺伝子または自殺遺伝子が含まれる部位が、ゲノムのセーフハーバー領域である、［１］～［７］のいずれか１つに記載の細胞。

［９］セーフハーバー領域がAAVS1領域、CCR5領域またはROSA26領域である、［８］に記載の細胞。

［１０］低免疫原性ヒト細胞が多能性幹細胞またはその分化細胞である、［１］～［９］のいずれか１つに記載の細胞。

［１１］以下の工程を含む、低免疫原性ヒト細胞を製造する方法。

(i)ヒト親細胞のHLAクラスIaのα鎖をコードする内在性遺伝子を欠損させる工程、

(ii)ヒト親細胞からHLAクラスIIまたはその発現制御因子をコードする内在性遺伝子を欠損させる工程、

(iii)ヒト親細胞にHLAクラスIbのα鎖をコードする外来性遺伝子を導入する工程、

(iv)ヒト親細胞にヒトPD-L1をコードする外来性遺伝子を導入する工程、および

(v)ヒト親細胞にヒトPD-L2をコードする外来性遺伝子を導入する工程。

［１２］低免疫原性ヒト細胞が内在性HLAクラスIbを細胞表面に発現しない、

［１１］に記載の方法。

［１３］HLAクラスIaのα鎖をコードする内在性遺伝子がHLA-Aのα鎖をコードする内在性遺伝子、HLA-Bのα鎖をコードする内在性遺伝子およびHLA-Cのα鎖をコードする内在性遺伝子である、［１１］または［１２］に記載の方法。

［１４］HLAクラスIIまたはその発現制御因子をコードする内在性遺伝子が以下の(a)または(b)である、［１１］～［１３］のいずれか１つに記載の方法：

(a)HLA-DPのα鎖および/またはβ鎖をコードする内在性遺伝子、HLA-DQのα鎖および/またはβ鎖をコードする内在性遺伝子、HLA-DRのα鎖および/またはβ鎖をコードする内在性遺伝子、HLA-DMのα鎖および/またはβ鎖をコードする内在性遺伝子、ならびにHLA-DOのα鎖および/またはβ鎖をコードする内在性遺伝子、

(b)ヒトRFXANKをコードする内在性遺伝子、ヒトRFX5をコードする内在性遺伝子、ヒトRFXAPをコードする内在性遺伝子またはヒトCIITAをコードする内在性遺伝子。

［１５］HLAクラスIbのα鎖をコードする外来性遺伝子がHLA-Eのα鎖をコードする外来性遺伝子および／またはHLA-Gのα鎖をコードする外来性遺伝子である、［１１］～［１４］のいずれか１つに記載の方法。

［１６］さらに以下の工程を含む、［１１］～［１５］のいずれか１つに記載の方法。

(vi)ヒト親細胞にヒトβ２ミクログロブリンをコードする外来性遺伝子を導入する工程。

［１７］さらに以下の工程を含む、［１１］～［１６］のいずれか１つに記載の方法。

(vii)ヒト親細胞に自殺遺伝子を導入する工程。

［１８］外来性遺伝子または自殺遺伝子が導入される部位が、ゲノムのセーフハーバー領域である、［１１］～［１７］のいずれか１つに記載の方法。

［１９］セーフハーバー領域がAAVS1領域、CCR5領域またはROSA26領域である、［１８］に記載の方法。

［２０］ヒト親細胞が多能性幹細胞またはその分化細胞である、［１１］～［１９］のいずれか１つに記載の方法。

発明の効果

[0012] ヒト多能性幹細胞において、HLAクラスIaであるHLA-A、HLA-BおよびHLA-Cの各α鎖をコードする内在性遺伝子を欠損させ、HLAクラスIIの転写因子であるRFXANKをコードする内在性遺伝子を欠損させ、免疫チェックポイントタンパク質であるPD-L1およびPD-L2をコードする各外来性遺伝子をゲノムに導入し、内在性HLAクラスIbの発現不全を補完するためにHLA-Eおよび/またはHLA-Gの各α鎖をコードする各外来性遺伝子をゲノムに導入することで、分化誘導能を保持したヒト多能性幹細胞であって、低免疫原性の細胞を取得することができる。さらに発明者らは、敢えてB2Mをコードする外来性遺伝子を更にゲノムに導入することによってHLAクラスIbの発現量を向上せしめることができ、結果として細胞の低免疫原性を期待を超えて向上させられることを初めて発見した。そして発明者らはこのような知見に基づき本発明の低免疫原性細胞の製造に成功した。加えて、自殺遺伝子をゲノムに導入することによって任意に細胞をアポトーシスに導くことが可能になった。本発明により得られる低免疫原性細胞は依然として多能性を維持しており、任意の細胞に分化誘導することが可能であった。

[0013] 本発明により得られる低免疫原性細胞は、他家細胞医薬品の原料として用いることができる。この細胞を分化誘導して得られた細胞を移植してもレシピエント側からT細胞やNK細胞による拒絶反応を受けないか、免疫拒絶の程度が極めて低い。また、上記低免疫原性細胞は、B細胞、マクロファージ、単核球や樹状細胞といった抗原提示細胞群の活性化に抑制的にはたらく。

よってこれらの細胞を安心して移植医療や、細胞治療に供することができる。

図面の簡単な説明

[0014] [図1]HLAクラスIa欠損iPS細胞クローン2E1の遺伝子編集結果を示す図である。

[図2]クローン2E1におけるHLAクラスIの細胞表面発現量を、フローサイトメトリー法を用いて解析した結果を示す図である。

[図3]クローン2E1におけるHLA-Eの細胞表面発現量を、フローサイトメトリー法を用いて解析した結果を示す図である。

[図4]クローン2E1における未分化マーカーの細胞表面発現量を、フローサイトメトリー法を用いて解析した結果を示す図である。

[図5]クローン2E1および第2候補クローン（2H3）におけるRNA発現パターンを解析した結果を示す図である。

[図6]HLAクラスIa＆II欠損iPS細胞クローン6B7の遺伝子編集結果を示す図である。

[図7]クローン6B7におけるHLAクラスIの細胞表面発現量を、フローサイトメトリー法を用いて解析した結果を示す図である。

[図8]クローン6B7におけるHLAクラスIIの細胞表面発現量を、フローサイトメトリー法を用いて解析した結果を示す図である。

[図9]クローン6B7におけるHLA-Eの細胞表面発現量を、フローサイトメトリー法を用いて解析した結果を示す図である。

[図10]クローン6B7における未分化マーカーの細胞表面発現量を、フローサイトメトリー法を用いて解析した結果を示す図である。

[図11]クローン6B7におけるRNA発現パターンを解析した結果を示す図である。

[図12]A：クローン6B7から分化した肝細胞の尿素合成量を解析した結果およびB：クローン6B7から分化した血管内皮細胞の脈管形成能を解析した結果をそれぞれ示す図である。

[図13]HLAクラスIa＆II欠損、かつPD-L1、PD-L2、HLA-G、B2MおよびiCasp9遺伝子導入iPS細胞クローン9G11におけるPD-L1、PD-L2、HLA-GおよびB2Mの細胞表面発現量を、フローサイトメトリー法を用いて解析した結果を示す図であ

る。

[図14]クローン9G11 iPS細胞由来血球系細胞におけるHLA-A、HLA-B、HLA-CおよびHLAクラスIIの細胞表面発現量を、フローサイトメトリー法を用いて解析した結果を示す図である。

[図15]クローン9G11 iPS細胞由来血球系細胞におけるPD-L1、PD-L2、HLA-GおよびB2Mの細胞表面発現量を、フローサイトメトリー法を用いて解析した結果を示す図である。

[図16]クローン9G11における未分化マーカーの細胞表面発現量を、フローサイトメトリー法を用いて解析した結果を示す図である。

[図17]クローン9G11における核型解析の結果を示す図である。

[図18]A：クローン9G11から分化した肝細胞の細胞形態を示す図と尿素合成量を解析した結果を示す図、およびB:6B7から分化した血管内皮細胞の細胞形態を示す図と脈管形成能を解析した結果を示す図である。

[図19]クローン9G11から分化したCD45陽性細胞に対するT細胞（CD4陽性細胞およびCD8陽性細胞）の増殖率を示す図である。

[図20]クローン9G11から分化したCD45陽性細胞に対するT細胞（CD8陽性細胞）の細胞傷害活性を示す図である。

[図21]クローン9G11に対するNK細胞の細胞傷害活性を示す図である。

[図22]クローン9G11の自殺遺伝子の機能を確認するための、ラパマイシン添加による細胞生存率の変化を示す図である。

[図23]外来性B2M遺伝子の強制発現がHLAクラスIa＆II欠損iPS細胞のHLA-G遺伝子の発現量を上昇させることを示す図である。

発明を実施するための形態

[0015] 以下、本発明の内容を詳細に説明する。

[0016] 本発明は、以下の(1)～(5)の特徴を有する、低免疫原性ヒト細胞（以下、本発明の低免疫原性ヒト細胞）を提供する。

(1)HLAクラスIaのα鎖をコードする内在性遺伝子を欠損している。

(2)HLAクラスIIまたはその発現制御因子をコードする内在性遺伝子を欠損し

ている。

(3)HLAクラスIbのα鎖をコードする外来性遺伝子を含む。

(4)ヒトPD-L1をコードする外来性遺伝子を含む。

(5)ヒトPD-L2をコードする外来性遺伝子を含む。

[0017] 本発明の低免疫原性ヒト細胞は、レシピエントの体内に導入した際に、レシピエントにより非自己と認識されることにより通常生じる免疫拒絶反応が開始されない、レシピエント側のT細胞やNK細胞による攻撃を受けない、抗原提示細胞群の活性化に抑制的にはたらく、あるいは免疫拒絶反応が起こったとしてもその反応性が著しく低い細胞をいう。換言すると、本発明の低免疫原性ヒト細胞はレシピエントの免疫機構に対し免疫寛容である細胞である。

本発明の低免疫原性ヒト細胞は、上記(1)および(2)の内在性遺伝子を欠損させ、上記(3)、(4)および(5)の外来性遺伝子を導入することで、レシピエントの免疫機構に対する免疫寛容を獲得しているので、本発明の低免疫原性ヒト細胞は、レシピエントに対する細胞医薬品となりうる。

[0018] 本発明の低免疫原性ヒト細胞は、上記(1)および(2)の内在性遺伝子を欠損させ、上記(3)、(4)および(5)の外来性遺伝子を導入できる細胞であれば特に制限されない。そのような細胞としては、多能性幹細胞が挙げられる。

多能性幹細胞としては、胚性幹細胞（embryonic stem cell：ES細胞）、人工多能性幹細胞（induced pluripotent stem cell：iPS細胞）、胚性腫瘍細胞（EC細胞）、胚性生殖幹細胞（EG細胞）が挙げられるが、好ましくはES細胞またはiPS細胞である。

[0019] 多能性幹細胞がES細胞である場合、自体公知の方法で作製することができる。ES細胞の作製方法としては、例えば、ヒトの胚盤胞ステージにおける内部細胞塊を培養する方法（例えば、Manipulating the Mouse Embryo：A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1994) を参照）、体細胞核移植によって作製された初期胚を培養する方法（Wilmut et al., Nature, 385, 810 (1997) ；Cibelli et al.,Science, 280, 1256 (1998) ；入谷明ら, 蛋白質核酸酵素, 44, 892 (1999) ；Baguisi et a

l., Nature Biotechnology, 17, 456 (1999) ; Wakayama et al., Nature, 394, 369 (1998) ; Wakayama et al., Nature Genetics, 22, 127 (1999) ; Wakayama et al., Proc.Natl. Acad. Sci. USA, 96, 14984 (1999) ; RideoutIII et al., Nature Genetics, 24,109 (2000)) などが挙げられるが、これらに限定されない。また、ES細胞は、所定の機関より入手でき、さらには市販品を購入することもできる。例えば、ヒトES細胞株は、H1、H7、H9、H13およびH14については米国のWiCell Research Institute、HES1～6についてはオーストラリアのES Cell International、SA002、SA181およびSA611についてはスウェーデンのCellartis AB、HUES1～17については米国のHUES Cell Facility、KhES-1～KhES-5については京都大学再生医科学研究所、SEES1～SEES7については国立成育医療研究センターより、それぞれ入手可能である。ES細胞を体細胞核移植により作製する場合、体細胞の種類や体細胞を採取するソースは下記iPS細胞作製の場合に準ずる。

[0020] 多能性幹細胞がiPS細胞である場合、iPS細胞は、体細胞に核初期化物質を導入することにより作製することができる。iPS細胞作製のための出発材料として用いることのできる体細胞は、ヒトの生殖細胞以外のいかなる細胞であってもよい。例えば、角質化する上皮細胞（例、角質化表皮細胞）、粘膜上皮細胞（例、舌表層の上皮細胞）、外分泌腺上皮細胞（例、乳腺細胞）、ホルモン分泌細胞（例、副腎髄質細胞）、代謝/貯蔵用の細胞（例、肝細胞）、境界面を構成する内腔上皮細胞（例、I型肺胞細胞）、内鎖管の内腔上皮細胞（例、血管内皮細胞）、運搬能をもつ繊毛のある細胞（例、気道上皮細胞）、細胞外マトリックス分泌用細胞（例、線維芽細胞）、収縮性細胞（例、平滑筋細胞）、血液と免疫系の細胞（例、Tリンパ球）、感覚に関する細胞（例、桿細胞）、自律神経系ニューロン（例、コリン作動性ニューロン）、感覚器と末梢ニューロンの支持細胞（例、随伴細胞）、中枢神経系の神経細胞とグリア細胞（例、星状グリア細胞）、色素細胞（例、網膜色素上皮細胞）、及びそれらの前駆細胞（組織前駆細胞）等が挙げられる。細胞の分化の程度に特に制限はなく、未分化な前駆細胞（体性幹細胞も含む）であっても、最

終分化した成熟細胞であっても、同様に本発明における体細胞の起源として使用することができる。ここで未分化な前駆細胞としては、例えば、脂肪由来間質（幹）細胞、神経幹細胞、造血幹細胞、間葉系幹細胞、歯髄幹細胞等の組織幹細胞（体性幹細胞）が挙げられる。

[0021] iPS細胞の作製のために体細胞に導入される核初期化物質としては、これまでに報告されている種々の初期化遺伝子の組合せ（例えば、WO2007/069666、Nature Biotechnology, 26, 101-106 (2008)、Cell, 126, 663-676 (2006)、Cell, 131, 861-872 (2007)、Nat. Cell Biol., 11, 197-203 (2009)、Nature, 451, 141-146 (2008)、Science, 318, 1917-1920 (2007)、Stem Cells, 26, 1998-2005 (2008)、Cell Research (2008) 600-603、Nature 454: 646-650 (2008)、Cell Stem Cell, 2: 525-528(2008)、WO2008/118820、Nat. Cell Biol., 11, 197-203 (2009)、Nat. Cell Biol., 11, 197-203 (2009)、Science, 324: 797-801 (2009)を参照）が挙げられる。また、上記初期化遺伝子によってコードされるタンパク質を、核初期化物質として体細胞に導入することもできる（Cell Stem Cell, 4: 381-384(2009)、Cell Stem Cell, doi:10.1016/j.stem.2009.05.005 (2009)）。

[0022] iPS細胞コロニーの選択は、薬剤耐性とレポーター活性を指標とする方法（Cell, 126, 663-676 (2006)、Nature, 448, 313-317 (2007)）や目視による形態観察による方法（Cell, 131, 861-872 (2007)）により行うことができる。iPS細胞であることの確認は、各種ES細胞特異的遺伝子の発現やテラトーマ形成を指標として行うことができる。

[0023] 現在、iPS細胞(iPSC)の作製方法にはさまざまなものがあり、山中らにより、マウス線維芽細胞にOct3/4、Sox2、Klf4、c-Mycの４因子を導入することにより、樹立されたiPSC（Takahashi K, Yamanaka S., Cell, (2006) 126: 663-676）の作製方法のほか、同様の４因子をヒト線維芽細胞に導入して樹立されたヒト細胞由来のiPSC（Takahashi K, Yamanaka S., et al. Cell, (2007) 131: 861-872.）、上記４因子導入後、Nanogの発現を指標として選別し、樹立したNanog-iPSC（Okita, K., Ichisaka, T., and Yamanaka, S. (2007). N

ature 448, 313-317.）、c-Mycを含まない方法で作製されたiPSC（Nakagawa M, Yamanaka S., et al. Nature Biotechnology, (2008) 26, 101 - 106）、ウイルスフリー法で6因子を導入して樹立されたiPSC（Okita K et al. Nat. Methods 2011 May;8(5):409-12, Okita K et al. Stem Cells. 31(3):458-66.）等の作製方法も用いることができる。また、Thomsonらにより作製されたOCT3/4、SOX2、NANOG、LIN28の４因子を導入して樹立されたiPSC（Yu J., Thomson JA. et al., Science (2007) 318: 1917-1920.）、Daleyらにより作製されたiPSC（Park IH, Daley GQ. et al., Nature (2007) 451: 141-146）、桜田らにより作製されたiPSC（特開2008/307007号）等の作製方法も用いることができる。

人工多能性幹細胞株としては、NIH、理研、京都大学等が樹立した各種ヒトiPSC株のいずれもが利用可能である。例えば、理研のHiPS-RIKEN-1A株、HiPS-RIKEN-2A株、HiPS-RIKEN-12A株、Nips-B2株等、京都大学の253G1株、253G4株、1201C1株、1205D1株、1210B2株、1383D2株、1383D6株、201B7株、409B2株、454E2株、606A1株、610B1株、648A1株、1231A31株、FfI-01s04株等が挙げられる。

[0024] 本発明の低免疫原性ヒト細胞はまた、上記(1)および(2)の内在性遺伝子を欠損し、上記(3)、(4)および(5)の外来性遺伝子を導入された前記の多能性幹細胞から分化した細胞であってもよい。多能性幹細胞は公知の方法に従って特定の細胞に分化させることができる。例えば、多能性幹細胞をT細胞（国際公開第2016/076415号または国際公開第2017/221975号）、角膜上皮細胞（国際公開第2016/114285号）、心筋細胞（国際公開第2007/126077号、国際公開第2016/049099号、国際公開第2016/175303号または国際公開第2017/108705号）、膵β細胞（国際公開第2019/208788号）、肝細胞（国際公開第2013/183571号または国際公開第2019/073951号）、骨格筋細胞（国際公開第2010/008100号、国際公開第2014/533491号または国際公開第2017/188458号）、網膜色素上皮細胞（国際公開第2015/053375号）などに分化させることができる。

[0025] 本発明の低免疫原性ヒト細胞は、HLAクラスIaのα鎖をコードする内在性遺

伝子を欠損している。

HLAクラスIaは、全ての有核細胞が保有する膜貫通タンパク質であり、数千以上の多様な多型を有することから、個体によって細胞表面に発現しているHLAクラスIaは非常に多様性に富んでいる。そしてこのような多様性が自己と非自己を識別するうえで最も重要な役割を果たす。細胞表面に提示されたHLAクラスIaは、CTL表面のT細胞受容体(TCR)によって認識される。認識されたHLAクラスIaを提示する細胞はCTLによって異物として認識され、免疫機構によって排除される。従って、HLAクラスIaが発現不全である細胞は、CTLによる認識を回避できるため、移植細胞ソースとして好適である。

[0026] HLAクラスIaは、HLAクラスIaの各遺伝子にコードされるα鎖とβ２ミクログロブリンであるβ鎖からなる二量体である。ここで、β２ミクログロブリンは、HLAクラスIaのα鎖のみならずHLAクラスIbのα鎖とも会合する共通のコンポーネントである。HLAクラスIaを発現不全にするためにβ２ミクログロブリンをコードする内在性遺伝子を欠損させることは他の低免疫原性細胞で行われているが、HLAクラスⅠbをも発現不全にすることになり、不都合である。従って、本発明の低免疫原性ヒト細胞においては、HLAクラスIaのみを発現不全とするべくHLAクラスIaのα鎖をコードする内在性遺伝子を欠損させている。

[0027] 本発明の低免疫原性ヒト細胞において欠損しているHLAクラスIaのα鎖をコードする内在性遺伝子としては、HLA-Aのα鎖をコードする内在性遺伝子、HLA-Bのα鎖をコードする内在性遺伝子およびHLA-Cのα鎖をコードする内在性遺伝子からなる群から選択される少なくとも１つの遺伝子、好ましくは、HLA-Aのα鎖をコードする内在性遺伝子、HLA-Bのα鎖をコードする内在性遺伝子およびHLA-Cのα鎖をコードする内在性遺伝子が挙げられる。

[0028] 本明細書において内在性遺伝子を欠損させるとは、内在性遺伝子を破壊したり、除去したりすることにより完全なmRNAを産生不能にすることを意味する。

内在性遺伝子を欠損させる具体的な手段としては、内在性遺伝子を欠損さ

せる対象細胞由来のゲノムDNAを常法に従って単離し、例えば、（1）内在性遺伝子のエキソン部分やプロモーター領域に他のDNA断片（例えば、薬剤耐性遺伝子やレポーター遺伝子等）を挿入することによりエキソンもしくはプロモーターの機能を破壊するか、（2）Cre-loxP系やFlp-frt系を用いて内在性遺伝子の全部または一部を切り出して該遺伝子を欠失させるか、（3）タンパク質コード領域内へ終止コドンを挿入して完全なタンパク質の翻訳を不能にするか、あるいは（4）転写領域内部へ遺伝子の転写を終結させるDNA配列（例えば、poly A付加シグナルなど）を挿入して、完全なmRNAの合成を不能にすることによって、結果的に遺伝子を不活性化するように構築したDNA配列を有するDNA鎖（以下、遺伝子欠損用ターゲッティングベクターと略記する）を、相同組換えにより対象細胞の内在性遺伝子座に組み込ませる方法などが好ましく用いられ得る。

[0029] 該相同組換え細胞は、例えば、対象細胞への上記ターゲッティングベクターの導入により取得することができる。

[0030] 例えば、遺伝子欠損用ターゲッティングベクターが、内在性遺伝子のエキソン部分やプロモーター領域に他のDNA断片を挿入することにより、該エキソンもしくはプロモーターの機能を破壊すべく設計されたものである場合、当該ベクターは、例えば、以下のような構成をとることができる。

[0031] まず、相同組換えにより、内在性遺伝子のエキソンもしくはプロモーター部分に他のDNA断片が挿入されるために、遺伝子欠損用ターゲッティングベクターは、当該他のDNA断片の5’上流および3’下流に、それぞれ標的部位と相同な配列（5’アームおよび3’アーム）を含む必要がある。

[0032] 挿入される他のDNA断片は特に制限はないが、薬剤耐性遺伝子やレポーター遺伝子を用いると、遺伝子欠損用ターゲッティングベクターが染色体へ組み込まれた対象細胞を、薬剤耐性もしくはレポーター活性を指標として選択することができる。ここで薬剤耐性遺伝子としては、例えば、ネオマイシンホスホトランスフェラーゼII（nptII）遺伝子、ハイグロマイシンホスホトランスフェラーゼ（hpt）遺伝子などが、レポーター遺伝子としては、例えば、β

－ガラクトシダーゼ（lacZ）遺伝子、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ（cat）遺伝子などがそれぞれ挙げられるが、それらに限定されない。

[0033] 薬剤耐性もしくはレポーター遺伝子は、対象細胞内で機能し得る任意のプロモーターの制御下にあることが好ましい。例えば、SV40由来初期プロモーター、サイトメガロウイルス（CMV）ロングターミナルリピート（LTR）、ラウス肉腫ウイルス（RSV）LTR、マウス白血病ウイルス（MoMuLV）LTR、アデノウイルス（AdV）由来初期プロモーター等のウイルスプロモーター、並びにβ-アクチン遺伝子プロモーター、PGK遺伝子プロモーター、トランスフェリン遺伝子プロモーター等が挙げられる。しかしながら、薬剤耐性もしくはレポーター遺伝子がHLAクラスI遺伝子の内在性プロモーターの制御下におかれるように内在性遺伝子内に挿入される場合は、遺伝子欠損用ターゲッティングベクター中に該遺伝子の転写を制御するプロモーターは必要でない。

[0034] また、遺伝子欠損用ターゲッティングベクターは、薬剤耐性もしくはレポーター遺伝子の下流に、該遺伝子からのmRNAの転写を終結させる配列（ポリアデニレーション（poly A）シグナル、ターミネーターとも呼ばれる）を有していることが好ましく、例えば、ウイルス遺伝子由来、あるいは各種哺乳動物または鳥類の遺伝子由来のターミネーター配列を用いることができる。好ましくは、SV40由来のターミネーターなどが用いられる。

[0035] 通常、細胞における遺伝子組換えは大部分が非相同的であり、導入されたDNAは染色体の任意の位置にランダムに挿入される。したがって、薬剤耐性やレポーター遺伝子の発現を検出するなどの選択（ポジティブ選択）によっては標的部位に相同組換えが生じたクローンのみを効率よく選択することができず、選択されたすべてのクローンについてサザンハイブリダイゼーション法もしくはPCR法による組込み部位の確認が必要となる。そこで、遺伝子欠損用ターゲッティングベクターの標的部位と相同な配列の外側に、例えば、ガンシクロビル感受性を付与する単純ヘルペスウイルス由来チミジンキナーゼ（HSV-tk）遺伝子を連結しておけば、該ベクターがランダムに挿入された細

胞はHSV-tk遺伝子を有するため、ガンシクロビル含有培地では生育できないが、相同組換えにより内在性遺伝子座にターゲッティングされた細胞はHSV-tk遺伝子を有しないので、ガンシクロビル耐性となり選択される（ネガティブ選択）。あるいは、HSV－tk遺伝子の代わりに、例えばジフテリア毒素遺伝子を連結すれば、該ベクターがランダムに挿入された細胞は自身の産生する該毒素によって死滅するので、薬剤非存在下で相同組換え体を選択することもできる。

[0036] 対象細胞への遺伝子欠損用ターゲッティングベクターの導入には、リン酸カルシウム共沈殿法、電気穿孔（エレクトロポレーション）法、リポフェクション法、レトロウイルス感染法、凝集法、顕微注入（マイクロインジェクション）法、遺伝子銃（パーティクルガン）法、DEAE-デキストラン法などのいずれも用いることができるが、上述のように、細胞における遺伝子組換えは大部分が非相同的であり、相同組換え体が得られる頻度は低いので、簡便に多数の細胞を処理できること等の点からエレクトロポレーション法が一般的に選択される。エレクトロポレーションには通常の動物細胞への遺伝子導入に使用されている条件をそのまま用いればよく、例えば、対数増殖期にある対象細胞をトリプシン処理して単一細胞に分散させた後、10^6～10^8細胞/mlとなるように培地に懸濁してキュベットに移し、遺伝子欠損用ターゲッティングベクターを10～100μg添加し、200～600V/cmの電気パルスを印加することにより行なうことができる。

[0037] 遺伝子欠損用ターゲッティングベクターが組み込まれた対象細胞は、単一細胞を培養して得られるコロニーから分離抽出した染色体DNAをサザンハイブリダイゼーションまたはPCR法によりスクリーニングすることによっても検定することができるが、他のDNA断片として薬剤耐性遺伝子やレポーター遺伝子を使用した場合は、それらの発現を指標として細胞段階で形質転換体を選択することができる。例えば、ポジティブ選択用マーカー遺伝子としてnptII遺伝子を含むベクターを用いた場合、遺伝子導入処理後の対象細胞をG418などのネオマイシン系抗生物質を含有する培地中で培養し、出現した耐性コロニ

ーをトランスフォーマントの候補として選択する。また、ネガティブ選択用マーカー遺伝子として、HSV-tk遺伝子を含むベクターを用いた場合、ガンシクロビルを含有する培地中で培養し、出現した耐性コロニーを相同組換え細胞の候補として選択する。得られたコロニーをそれぞれ培養プレートに移してトリプシン処理、培地交換を繰り返した後、一部を培養用として残し、残りをPCRもしくはサザンハイブリダイゼーションにかけて導入DNAの存在を確認する。

[0038] また、遺伝子欠損用ターゲッティングベクターとしてウイルスを用いる場合、ポジティブ選択用マーカー遺伝子が5’および3’アームの間に挿入され、該アームの外側にネガティブ選択用マーカー遺伝子を含むDNAを含むウイルスで、対象細胞を感染させる方法が挙げられる。例えば、レトロウイルスやレンチウイルスを用いる場合、ディッシュなどの適当な培養器に細胞を播き、培養液にウイルスベクターを加えて（所望によりポリブレンを共存させてもよい）、1～2日間培養後、上述のように選択薬剤を添加して培養を続け、ベクターが組み込まれた細胞を選択する。

[0039] 内在性遺伝子を欠損させるための別の好ましい一実施態様としては、CRISPR-Cas9 (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats CRISPR-Associated proteins 9) システムが挙げられる。CRISPR-Cas9システムによれば、ゲノムDNA切断酵素であるCas9とゲノム上の狙った箇所を認識するRNA分子であるsgRNAを使用し、ゲノムDNA上の任意の領域を切断することによって遺伝子変異を導入することができる。ゲノムDNAの切断に伴う生体内における修復過程で生じる塩基のin/delによって、アミノ酸をコードするDNAのフレームシフトが生じ、ターゲットの内在性遺伝子が欠損される。

[0040] Cas9はDNA中のプロトスペーサー隣接モチーフ（PAM）配列を認識して、その上流で切断するエンドヌクレアーゼとして機能する。Cas9は、エンドヌクレアーゼ活性を有する機能ドメインを２つ含むため、二本鎖DNAを平滑末端になるように切断することができる。例えば具体的には、Cas9は、内在性遺伝子に特異的に結合する塩基配列(CRISPR-RNA（crRNA）)を含む一本鎖核酸（sg

RNA）と複合体を形成し、内在性遺伝子にあるPAMの５’側において2本鎖切断（DSB）を生じさせる。従って、本発明においてCas9は、ガイドRNAと複合体を形成し、二本鎖DNA切断活性を有するタンパク質を意味する。

[0041] Cas9としては、例えば、ストレプトコッカス・ピオゲネス（Streptococcus pyogenes）に由来するSpCas9、ストレプトコッカス・サーモフィラス（Streptococcus thermophilus）に由来するStCas9、ナイセリア・メニンギチジス（Neisseria meningitidis）に由来するNmCas9等が挙げられ、これらに限定されない。

[0042] また、Cas9は変異Cas9であってもよい。変異Cas9は、ガイドRNAとの複合体の形成能を維持しつつ、かつ、Cas9に含まれる２つのエンドヌクレアーゼ活性を有する機能ドメインのうち１つが不活性化されている変異を有するタンパク質であれば、特に制限されない。そのような変異Cas9としては、例えば、Cas9の10番目アスパラギン酸がアラニンに置換される変異（D10A変異）、840番目ヒスチジンがアラニンに置換される変異（H840A変異）、および/または863番目アスパラギンがアラニンに置換される変異（N863A変異）からなる群から選択される１つの変異を有するCas9が挙げられる。

[0043] crRNAは、内在性遺伝子と相補的な塩基配列であって、内在性遺伝子におけるPAMの5’側に隣接している塩基配列であれば特に制限されない。crRNAの塩基配列の長さは内在性遺伝子への特異性を確保できる限り特に制限されないが、通常、10塩基長から30塩基長、好ましくは、15塩基長から25塩基長、より好ましくは、20塩基長が挙げられる。

[0044] PAMは、Cas9の種類によって異なるが、例えばストレプトコッカス・ピオゲネス（Streptococcus pyogenes）由来のCas9（SpCas9）が用いられる場合NGG（NはA、G、T又はC。以下同じ）、ストレプトコッカス・サーモフィラス（Streptococcus thermophilus）由来のCas9（StCas9）が用いられる場合NNAGAAW、ナイセリア・メニンギチジス（Neisseria meningitidis）由来のCas9（NmCas9）が用いられる場合NNNNGATT等が挙げられる。

[0045] 内在性遺伝子に特異的に結合する塩基配列を含む一本鎖核酸（sgRNA）は、

さらにCas9のリクルートに必要な塩基配列（trans-activating RNA（tracrRNA））を含んでもよい。tracrRNAの塩基配列は公知の塩基配列を用いることができる。tracrRNAはcrRNAの３’端に直接連結されてもよいし、スペーサー配列を間に挟んでもよい。

[0046] あるいはcrRNAとtracrRNAは、相補的な結合を介して会合していてもよい（すなわち、二本鎖核酸となっていてもよい）。なおこのような二本鎖核酸を用いて遺伝子編集する場合であっても、以下に記載する対象細胞への導入方法は一本鎖核酸を導入する場合と同様である。

[0047] Cas9とsgRNAの対象細胞への導入は、公知の手段に従って実施することができる。例えば、Cas9をコードする核酸配列およびsgRNAを転写する核酸配列を適当な発現ベクターに挿入した後、発現ベクターを対象細胞に導入することによって、Cas9およびsgRNAを対象細胞に導入することができる。

[0048] Cas9をコードする核酸配列としては、ゲノムDNA、合成DNAなどが挙げられる。Cas9をコードするゲノムDNAであれば、前記微生物より調製したゲノムDNA画分を鋳型として用い、cas9遺伝子に相補的なプライマーセットによるPolymerase Chain Reaction（以下、「PCR法」と略称する）によって直接増幅することができる。また、sgRNAを転写する核酸配列は、DNA合成とPCR法によって作製することができる。

[0049] Cas9をコードする核酸配列およびsgRNAを転写する核酸配列を含む発現ベクターは、例えば、Cas9をコードする核酸配列断片およびsgRNAを転写する核酸配列断片を適当な発現ベクター中のプロモーターの下流に連結することにより製造することができる。

発現ベクターとしては、動物細胞発現プラスミド（例：pA1-11、pXT1、pRc/CMV、pRc/RSV、pcDNAI/Neo）；レトロウイルス、レンチウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルスなどの動物ウイルスベクターなどが用いられる。

プロモーターとしては、遺伝子の発現に用いる宿主に対応して適切なプロモーターであればいかなるものでもよい。

例えば、SRαプロモーター、SV40プロモーター、LTRプロモーター、CMV（サイトメガロウイルス）プロモーター、RSV（ラウス肉腫ウイルス）プロモーター、MoMuLV（モロニーマウス白血病ウイルス）LTR、HSV-TK（単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ）プロモーターなどが用いられる。なかでも、CMVプロモーター、SRαプロモーターなどが好ましい。

[0050] 発現ベクターとしては、上記の他に、所望によりエンハンサー、ポリA付加シグナル、選択マーカー、SV40複製起点（以下、SV40 oriと略称する場合がある）などを含有しているものを用いることができる。選択マーカーとしては、例えば、ジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子（以下、dhfrと略称する場合がある、メソトレキセート（MTX）耐性）、ネオマイシン耐性遺伝子（以下、neorと略称する場合がある、G418耐性）等が挙げられる。

[0051] 上記したCas9をコードする核酸配列およびsgRNAを転写する核酸配列を含む発現ベクターを対象細胞に導入し、培養することによって、対象細胞内においてCas9とsgRNAが複合体を形成し、sgRNAの標的となる内在性遺伝子を切断する。Cas9によって切断された内在性遺伝子は、非相同末端結合（NHEJ）経路によるDSBの修復中に内在性遺伝子に小さな挿入及び/又は欠失（in/dels）が導入され、フレームシフトが生じ、内在性遺伝子の部位特異的な変異又は破壊が生じる。

[0052] またCas9としては上記で例示したような発現ベクターを用いずに、Cas9タンパク質そのものを用いてもよい。Cas9タンパク質をsgRNAと組み合わせて複合体を形成させ、これを対象細胞に導入することによっても、sgRNAの標的となる内在性遺伝子を切断することができる。

以上の通り、本発明の低免疫原性ヒト細胞は、HLAクラスIaのα鎖をコードする内在性遺伝子を欠損する。

[0053] HLAクラスIIは、マクロファージ、樹状細胞やB細胞といった抗原提示細胞のみに見られる膜貫通タンパク質である。

HLAクラスIIは、食作用などで免疫細胞が取り込んだ細胞外病原体のタンパク質を含めた細胞外タンパク質由来のペプチド抗原を細胞表面上に提示する

。HLAクラスIIによって提示されたペプチド抗原がCD4陽性ヘルパーT細胞のTCRと相互作用し、CD4陽性ヘルパーT細胞を活性化する。活性化されたT細胞は、同様にHLAクラスIIによってペプチド抗原を提示するB細胞を認識し、活性化することによって食細胞の動員、局所炎症、体液性応答、CTLの活性化などのイベントが引き起こされる。従って、HLAクラスIIが発現不全である細胞は、上記のイベントの発生を回避できるため、移植細胞ソースとして好適である。

[0054] HLAクラスIIは、２つの相同のサブユニットであるα鎖とβ鎖とからなる二量体である。従って、本発明の低免疫原性ヒト細胞においては、HLAクラスIIを発現不全とするべく一実施態様としてHLAクラスIIのα鎖および/またはβ鎖をコードする内在性遺伝子を欠損させている。本発明の低免疫原性ヒト細胞において欠損しているHLAクラスIIをコードする内在性遺伝子としては、HLA-DPのα鎖および/またはβ鎖をコードする内在性遺伝子、HLA-DQのα鎖および/またはβ鎖をコードする内在性遺伝子、HLA-DRのα鎖および/またはβ鎖をコードする内在性遺伝子、HLA-DMのα鎖および/またはβ鎖をコードする内在性遺伝子ならびにHLA-DOのα鎖および/またはβ鎖をコードする内在性遺伝子からなる群から選択される少なくとも１つの内在性遺伝子、好ましくは、HLA-DPのα鎖および/またはβ鎖をコードする内在性遺伝子、HLA-DQのα鎖および/またはβ鎖をコードする内在性遺伝子、HLA-DRのα鎖および/またはβ鎖をコードする内在性遺伝子、HLA-DMのα鎖および/またはβ鎖をコードする内在性遺伝子ならびにHLA-DOのα鎖および/またはβ鎖をコードする内在性遺伝子が挙げられる。

[0055] また、HLAクラスIIの各遺伝子の発現はその発現制御因子によって制御されている。発現制御のメカニズムは特に限定されず、ターゲット遺伝子に直接結合してその発現（例えば、転写）を制御してもよいし、間接的に結合することによってその発現（例えば、転写）を制御してもよい。たとえばRFXANKは、DNAに直接結合することでターゲット遺伝子であるHLAクラスII各遺伝子の転写を制御する。従って、本発明の低免疫原性ヒト細胞においては、HLAク

ラスIIを発現不全とする別の実施態様としてHLAクラスIIの発現制御因子をコードする内在性遺伝子を欠損している。HLAクラスIIの発現制御因子をコードする内在性遺伝子としては、たとえばRFXANKをコードする内在性遺伝子、RFX5をコードする内在性遺伝子、RFXAPをコードする内在性遺伝子またはCIITAをコードする内在性遺伝子、好ましくは、RFXANKをコードする内在性遺伝子が挙げられる。

[0056] HLAクラスIIまたはその発現制御因子をコードする内在性遺伝子を欠損させる具体的な手段としては、上記のHLAクラスIaをコードする内在性遺伝子を欠損させる手段と同一であってよい。

[0057] 本発明の低免疫原性ヒト細胞は、HLAクラスIbのα鎖をコードする外来性遺伝子を含む。

[0058] HLAクラスIbは、多種多様な機能を有する。そのような機能としては、たとえば特殊な抗原の提示、NK細胞の活性の制御、Fcレセプターとしての役割が挙げられる。またB細胞、マクロファージ、単核球や樹状細胞といった抗原提示細胞群の活性化を抑制する機能なども挙げられる。

上記の通り、本発明の低免疫原性ヒト細胞においては、HLAクラスIaのα鎖をコードする内在性遺伝子およびHLAクラスIIまたはその発現制御因子をコードする内在性遺伝子を欠損させているが、β２ミクログロブリンをコードする内在性遺伝子を欠損させていない。つまり内在性β２ミクログロブリンは発現不全でなく、当然に内在性HLAクラスIbも発現不全でないと考えられた。ところが、上記細胞の製造過程においてインタクトなHLAクラスIb（HLA-E）の発現まで失われていることが明らかとなった。HLAクラスIb（HLA-E）を発現しない細胞は、NK細胞によって拒絶されるため移植用の細胞ソースとしての利用には不都合である。従って、内在性のHLAクラスIbの発現を補完するべく、本発明の低免疫原性ヒト細胞はHLAクラスIbのα鎖をコードする外来性遺伝子を含む。

[0059] 本発明の低免疫原性ヒト細胞において導入されるHLAクラスIbのα鎖をコードする外来性遺伝子としては、HLA-Eのα鎖をコードする外来性遺伝子、HLA-

Fのα鎖をコードする外来性遺伝子およびHLA-Gのα鎖をコードする外来性遺伝子からなる群から選択される少なくとも１つの遺伝子、好ましくは、HLA-Eのα鎖をコードする外来性遺伝子および/またはHLA-Gのα鎖をコードする外来性遺伝子が挙げられる。さらに、HLA-Gのα鎖のシグナルペプチドが、HLA-Eの膜表面の発現に重要であることから、本発明の低免疫原性ヒト細胞において導入されるHLAクラスIbのα鎖をコードする外来性遺伝子としては、HLA-Eのα鎖をコードする外来性遺伝子およびHLA-Gのα鎖をコードする外来性遺伝子が最も好ましい。なお、本発明の低免疫原性ヒト細胞を移植用細胞ソースとして使用する場合、導入されるHLAクラスIbのα鎖をコードする外来性遺伝子は、レシピエントのHLAクラスIbのアリルのα鎖をコードする遺伝子と同一であることが好ましい。

[0060] 本明細書において外来性遺伝子を導入するとは、外来性遺伝子をゲノムの標的部位に導入することにより外来性遺伝子を対象細胞において発現可能な状態にすることを意味する。

外来性遺伝子を導入する具体的な手段としては、外来性遺伝子のDNAを常法に従って単離し、例えば、対象細胞の標的部位に外来性遺伝子のDNA断片を挿入することによって、結果的に外来性遺伝子が対象細胞内で発現するように構築したDNA配列を有するDNA鎖（以下、遺伝子導入用ターゲッティングベクターと略記する）を、相同組換えにより対象細胞の標的部位に組み込ませる方法などが好ましく用いられ得る。相同組換え法によれば遺伝子挿入位置が固定されるので、ランダムインテグレーションが無ければ、クローン間での発現量の差、および、他遺伝子への影響が少ないことが期待される。

[0061] 該相同組換え細胞は、例えば、対象細胞への上記ターゲッティングベクターの導入により取得することができる。

[0062] 例えば、遺伝子導入用ターゲッティングベクターが、標的部位に外来性遺伝子のDNA断片を挿入することにより、該外来性遺伝子が対象細胞内で発現すべく設計されたものである場合、当該ベクターは、例えば、以下のような構成をとることができる。

[0063] まず、相同組換えにより、標的部位に外来性遺伝子のDNA断片が挿入されるために、遺伝子導入用ターゲッティングベクターは、当該外来性遺伝子のDNA断片の5’上流および3’下流に、それぞれ標的部位と相同な配列（5’アームおよび3’アーム）を含む必要がある。

[0064] 遺伝子導入用ターゲッティングベクターが染色体へ組み込まれた対象細胞を選択するためには、挿入される外来性遺伝子の他に、薬剤耐性遺伝子やレポーター遺伝子が遺伝子導入用ターゲッティングベクターに含まれていることが好ましい。ここで薬剤耐性遺伝子およびレポーター遺伝子としては、遺伝子欠損用ターゲッティングベクターに使用されるものと同一であってよい。

[0065] 薬剤耐性もしくはレポーター遺伝子は、対象細胞内で機能し得る任意のプロモーターの制御下にあることが好ましい。ここでプロモーターとしては、遺伝子欠損用ターゲッティングベクターに使用されるものと同一であってよい。

[0066] また、遺伝子導入用ターゲッティングベクターは、薬剤耐性もしくはレポーター遺伝子の下流にpolyAシグナルを有していることが好ましく、遺伝子欠損用ターゲッティングベクターに使用されるものと同一であってよい。

[0067] また、遺伝子導入用ターゲッティングベクターの標的部位と相同な配列の外側に、HSV-tk遺伝子またはジフテリア毒素遺伝子を連結しておけば、相同組換えにより標的部位にターゲッティングされた細胞を選択できるため好ましい。

[0068] 対象細胞への遺伝子導入用ターゲッティングベクターの導入には、遺伝子欠損用ターゲッティングベクターに使用される方法と同一の方法が使用されてよい。

[0069] 遺伝子導入用ターゲッティングベクターが組み込まれた相同組換え細胞は、遺伝子欠損用ターゲッティングベクターが組み込まれた相同組換え細胞を選抜する方法と同一の方法で選抜されてよい。

[0070] また、遺伝子導入用ターゲッティングベクターとしてウイルスを用いる場

合、外来性遺伝子およびポジティブ選択用マーカー遺伝子が5’および3’アームの間に挿入され、該アームの外側にネガティブ選択用マーカー遺伝子を含むDNAを含むウイルスで、対象細胞を感染させる方法が挙げられる。ウイルス、細胞の感染方法、ベクターが組み込まれた細胞の選択方法等は、遺伝子欠損用ターゲッティングベクターで使用されるウイルス、方法と同一であってよい。

[0071] 遺伝子導入用ターゲッティングベクターの標的部位は、外来性遺伝子を対象細胞において発現可能な状態にすることができる限り特に制限されないが、そのような部位としては、ゲノム内のセーフハーバー領域を挙げることができる。ここで、セーフハーバー領域とは、外来性遺伝子が組み込まれても表現型の変化が生じない部位であり、医薬品として用いられる細胞に外来性遺伝子を組み込むための標的部位として選択される。低免疫原性ヒト細胞において外来性遺伝子このようなセーフハーバー領域としては、AAVS1 (Adeno-associated virus integration site 1) 領域、CCR5(C-C chemokine receptor5)領域、ROSA26領域などが挙げられる。セーフハーバー領域以外の部位に外来性遺伝子を導入した場合、導入された部位の遺伝子が破壊されることにより期待しない表現型が導出される、または導入した外来性遺伝子の発現が抑制される場合があるため好ましくない。セーフハーバー領域に外来性遺伝子を導入した場合、外来性遺伝子の組み込み位置が固定されるので、取得される相同組み換え体間での外来性遺伝子の発現量の差および他遺伝子への影響が少ないことが期待される。

[0072] 外来性遺伝子を導入するための別の好ましい一実施態様としては、PiggyBac法が挙げられる。PiggyBac法では外来性遺伝子を含むDNA断片が組み込まれたトランスポゾンベクターおよびトランスポザーゼを発現するランスポザーゼ発現ベクターが用いられる。トランスポゾンベクターおよびトランスポザーゼ発現ベクターに含まれる遺伝子等は、上記の別々のベクターに分けて存在してもよいし、単一のベクターに含まれていてもよい。トランスポゾンベクターおよびトランスポザーゼ発現ベクターは、例えば、以下のような構成

をとることができる。

[0073] トランスポザーゼにより外来性遺伝子を含むDNA断片をトランスポゾンベクターから切り出すために、トランスポゾンベクターは、当該外来性遺伝子を含むDNA断片の5’上流および3’下流に、末端逆位反復配列（Terminal Inverted Repeat）を含む。トランスポザーゼは、トランスポゾンベクターに含まれる末端逆位反復配列を認識し、末端逆位反復配列に挟まれた外来性遺伝子を含むDNA断片をトランスポゾンベクターから切り出す。

[0074] 外来性遺伝子が標的部位へ組み込まれた対象細胞を選択するためには、外来性遺伝子を含むDNA断片に、薬剤耐性遺伝子やレポーター遺伝子がトランスポゾンベクターに含まれていることが好ましい。ここで薬剤耐性遺伝子およびレポーター遺伝子としては、遺伝子導入用ターゲッティングベクターに使用されるものと同一であってよい。

[0075] 薬剤耐性およびレポーター遺伝子は、対象細胞内で機能し得る任意のプロモーターの制御下にあることが好ましい。ここでプロモーターとしては、遺伝子導入用ターゲッティングベクターに使用されるものと同一であってよい。

[0076] また、トランスポゾンベクターは、薬剤耐性もしくはレポーター遺伝子の下流にpolyAシグナルを有していることが好ましく、遺伝子導入用ターゲッティングベクターに使用されるものと同一であってよい。

[0077] また、トランスポザーゼ発現ベクターは、トランスポザーゼをコードする遺伝子の他に、薬剤耐性遺伝子、レポーター遺伝子、プロモーター、polyAシグナルなどを含んでよい。薬剤耐性遺伝子、レポーター遺伝子、プロモーター、polyAシグナルはトランスポゾンベクターに含まれるものと同一であってよい。

[0078] 対象細胞へのトランスポゾンベクターおよびトランスポザーゼ発現ベクターの導入には、遺伝子導入用ターゲッティングベクターに使用される方法と同一の方法が使用されてよい。

[0079] 外来性遺伝子が標的部位へ組み込まれた細胞は、遺伝子導入用ターゲッテ

ィングベクターが組み込まれた相同組換え細胞を選抜する方法と同一の方法で選抜されてよい。

[0080] 以上の通りに導入された外来性遺伝子のDNA断片を組み込んだトランスポゾンベクターとトランスポザーゼ発現ベクターによって対象細胞のゲノムのトランスポザーゼ標的配列TTAAに該外来性遺伝子のDNA断片を組み込ませることができる。この方法では上記の遺伝子導入用ターゲッティングベクターを用いた相同組換え法と異なり標的配列はTTAAであるため外来性遺伝子を組み込む部位を限定できないが、事後的にトランスポザーゼを発現させることでゲノムに組み込んだ外来性遺伝子を痕跡を残すことなく除去することも可能である。

[0081] 本発明の低免疫原性ヒト細胞はまた、ヒトPD-L1をコードする外来性遺伝子およびヒトPD-L2をコードする外来性遺伝子をそれぞれ含む。

[0082] PD-L1およびPD-L2は、イムノグロブリンスーパーファミリーに属する膜貫通型タンパク質であり、免疫寛容因子として知られる。具体的には、PD-L1およびPD-L2は、末梢の免疫活性を抑制的に制御するため、自己免疫の寛容や過剰な免疫、炎症応答におけるチェックポイントとして重要な役割を果たす。PD-L1およびPD-L2を構成的に発現する細胞は、T細胞の増殖や傷害機能を抑制し、免疫反応を回避することが可能となる。従って、本発明の低免疫原性ヒト細胞は、ヒトPD-L1をコードする外来性遺伝子およびヒトPD-L2をコードする外来性遺伝子をそれぞれ含む。

[0083] PD-L1をコードする外来性遺伝子およびPD-L2をコードする外来性遺伝子を導入する具体的な手段としては、上記のHLAクラスIbのα鎖をコードする外来性遺伝子を導入する手段と同一であってよい。

[0084] 以上の通りにして、本発明の低免疫原性ヒト細胞を取得することができる。上記の通り、本発明の低免疫原性ヒト細胞は、免疫応答を回避することができる。また、本発明の低免疫原性ヒト細胞は、親細胞の特徴を維持している。例えば、上記(1)および(2)の内在性遺伝子を欠損させ、上記(3)、(4)および(5)の外来性遺伝子を導入する細胞がヒト多能性幹細胞である場合、得ら

れる本発明の低免疫原性ヒト細胞は元のヒト多能性幹細胞と同様に、未分化マーカーの発現が維持され、全遺伝子発現パターンも類似する。さらに本発明の低免疫原性ヒト細胞は、元のヒト多能性幹細胞と同様に、様々な細胞への分化能も維持されている。

[0085] 次に、発明者らはβ２ミクログロブリンをコードする外来性遺伝子を更に導入した本発明の低免疫原性ヒト細胞を分析した。

本発明の低免疫原性ヒト細胞においては、本来β２ミクログロブリンをコードする内在性遺伝子は発現不全ではないため、当初、HLAクラスIbの本発明の低免疫原性ヒト細胞の細胞表面への発現にβ２ミクログロブリンをコードする外来性遺伝子の導入は特段影響しないと考えられた。事実、HLAクラスIbのα鎖をコードする外来性遺伝子のみを導入した細胞の例や、β２ミクログロブリンをコードする遺伝子を欠損させてHLAクラスIの発現を不全とした細胞においてHLAクラスIbのα鎖とβ鎖（β２ミクログロブリン）とを連結し単一分子として発現させた例は報告されているものの、内在性β２ミクログロブリンを有する細胞に敢えてさらにβ２ミクログロブリンをコードする外来性遺伝子まで導入するという着想に至ることはなく、実際そのような例は全く報告されていなかった。しかし予想外にも、β２ミクログロブリンをコードする外来性遺伝子を更に導入した本発明の低免疫原性ヒト細胞において、細胞表面におけるHLAクラスIbのα鎖およびβ２ミクログロブリンの分子数が増加することが判明した。

従って、細胞表面のHLAクラスIbの分子数を増加させることで本発明の低免疫原性ヒト細胞の低免疫原性をより高めるために、本発明の低免疫原性ヒト細胞は、ヒトβ２ミクログロブリンをコードする外来性遺伝子をさらに含んでよい。このような外来性ヒトβ２ミクログロブリンをコードする外来性遺伝子をさらに含む低免疫原性ヒト細胞はこれまで全く報告がなく、このような構成に至るには当業者に過度の試行錯誤を要求されるものであるといえる。

以上のことから、本発明の低免疫原性ヒト細胞は従来の発想からは成し得

ないまったく新しい低免疫原性細胞であるといえる。したがって、β２ミクログロブリンをコードする外来性遺伝子を更に導入した本発明の低免疫原性ヒト細胞は、細胞表面のHLAクラスIの分子数を増加させることによって、導入前より高い低免疫原性を期待できる。

[0086] なおβ２ミクログロブリンは、HLAクラスⅠであるHLAクラスⅠaおよびHLAクラスⅠbのα鎖と会合する共通のコンポーネントである。β２ミクログロブリンをコードする外来性遺伝子を導入する具体的な手段としては、上記のHLAクラスIbのα鎖をコードする外来性遺伝子を導入する手段と同一であってよい。

[0087] 本発明の低免疫原性ヒト細胞はまた、自殺遺伝子を含んでよい。特に上記(1)および(2)の内在性遺伝子を欠損させ、上記(3)、(4)および(5)の外来性遺伝子を導入する細胞がヒト多能性幹細胞である場合、得られる本発明の低免疫原性ヒト細胞が有する造腫瘍性などのリスクを回避するために、自殺遺伝子を導入することが望ましい。これにより本発明の低免疫原性ヒト細胞が移植後にがん化するなど望ましくない副作用が生じる場合、本発明の低免疫原性ヒト細胞だけを除去することが可能になる。

[0088] 本発明の低免疫原性ヒト細胞に導入される自殺遺伝子としては、例えばHSV-tk遺伝子やその変異体（たとえば、HSV-TK、HSV-TK39など）や、iCaspase9（たとえば、AP1903結合型、Rapamycin結合型など）が挙げられるが、特に限定されない。自殺遺伝子を導入する具体的な手段としては、上記のHLAクラスIbのα鎖をコードする外来性遺伝子を導入する手段と同一であってよい。但し、本発明の低免疫原性ヒト細胞に導入された自殺遺伝子は任意に発現を操作される。従って、自殺遺伝子の導入するための自殺遺伝子導入用ターゲッティングベクターにおいて、自殺遺伝子は条件付きプロモーターに連結される。条件付きプロモーターとしては、TetオペレーターDNA配列（tetO）を含むプロモーターが挙げられる。TetオペレーターDNA配列（tetO）を含むプロモーターは、リバーステトラサイクリン制御性トランス活性化因子（rtTA）とドキシサイクリン(Dox)の複合体によって駆動される。

[0089] 本発明はまた、以下の(i)～(v)の工程を含む、低免疫原性ヒト細胞を製造する方法（以下、本発明の低免疫原性ヒト細胞の製造方法）を提供する。

(i)ヒト親細胞のHLAクラスIaのα鎖をコードする内在性遺伝子を欠損させる工程、

(ii)ヒト親細胞からHLAクラスIIまたはその発現制御因子をコードする内在性遺伝子を欠損させる工程、

(iii)ヒト親細胞にHLAクラスIbのα鎖をコードする外来性遺伝子を導入する工程、

(iv)ヒト親細胞にヒトPD-L1をコードする外来性遺伝子を導入する工程、および

(v)ヒト親細胞にヒトPD-L2をコードする外来性遺伝子を導入する工程。

[0090] 本発明の低免疫原性ヒト細胞の製造方法において、(i)～(v)の各工程で使用されるヒト親細胞は、本発明の低免疫原性ヒト細胞の作製における(1)および(2)の内在性遺伝子を欠損させ、(3)、(4)および(5)の外来性遺伝子を導入できる細胞と同一であってよい。

[0091] 本発明の低免疫原性ヒト細胞の製造方法において、(i)～(v)の各工程で欠損される内在性遺伝子および導入される外来性遺伝子は、本発明の低免疫原性ヒト細胞において欠損される内在性遺伝子および導入される外来性遺伝子と同一であってよい。また、本発明の低免疫原性ヒト細胞の製造方法において、(i)～(v)の各工程で内在性遺伝子を欠損させる具体的な手段および外来性遺伝子を導入する具体的手段は、本発明の低免疫原性ヒト細胞において内在性遺伝子を欠損させる具体的な手段および外来性遺伝子を導入する具体的手段と同一であってよい。本発明の低免疫原性ヒト細胞の製造方法において、(iii)～(v)の各工程で外来性遺伝子を導入する標的部位もまた、本発明の低免疫原性ヒト細胞において外来性遺伝子が導入される標的部位と同一であってよい。なお、本発明の低免疫原性ヒト細胞の製造方法において、(i)～(v)の各工程は、本発明の低免疫原性ヒト細胞が取得できる限り、任意の順序で行われてよい。

[0092] 以上の通りにして得られる低免疫原性ヒト細胞は、本発明の低免疫原性ヒト細胞と同様に、免疫応答を回避し、ヒト親細胞の特徴を維持している。例えば、ヒト親細胞がヒト多能性幹細胞である場合、得られる低免疫原性ヒト細胞は親株のヒト多能性幹細胞と同様に、未分化マーカーの発現量が維持されており、全遺伝子発現パターンも非常に似通っており、様々な細胞への分化能も維持されている。

[0093] 本発明の低免疫原性ヒト細胞の製造方法は、(vi)ヒト親細胞にヒトβ２ミクログロブリンをコードする外来性遺伝子を導入する工程をさらに含んでもよい。本発明の低免疫原性ヒト細胞の製造方法において、工程(vi)で使用されるヒト親細胞、導入されるヒトβ２ミクログロブリンをコードする外来性遺伝子、外来性遺伝子を導入する具体的手段、外来性遺伝子を導入する標的部位等は、本発明の低免疫原性ヒト細胞の作製における記載と同一であってよい。

[0094] 以上の通りにして得られるβ２ミクログロブリンをコードする外来性遺伝子を更に導入した本発明の低免疫原性ヒト細胞は、細胞表面のHLAクラスIの分子数を増加させることでより高い低免疫原性を期待できる。

[0095] 本発明の低免疫原性ヒト細胞の製造方法はまた、(vii)ヒト親細胞に自殺遺伝子を導入する工程をさらに含んでもよい。本発明の低免疫原性ヒト細胞の製造方法において、工程(vii)で使用されるヒト親細胞、導入される自殺遺伝子、自殺遺伝子を導入する具体的手段、自殺遺伝子を導入する標的部位等は、本発明の低免疫原性ヒト細胞の作製における記載と同一であってよい。

[0096] 以上の通りにして得られる自殺遺伝子を更に導入した本発明の低免疫原性ヒト細胞は、移植後にがん化するなど望ましくない副作用が生じる場合、本発明の低免疫原性ヒト細胞だけを除去することが可能になる。

[0097] 本発明はまた、本発明の低免疫原性ヒト細胞を含む医薬（以下、本発明の医薬）を提供する。本発明の低免疫原性ヒト細胞は、免疫応答を回避しうるため、移植用の細胞ソースとして使用可能である。従って、本発明の低免疫原性ヒト細胞を含む医薬は、再生治療用医薬として使用することができる。

[0098] 本発明の医薬は、非経口的に対象に投与して用いることが好ましい。非経口的な投与方法としては、静脈内、動脈内、筋肉内、腹腔内、および皮下投与などの方法が挙げられる。投与量は、対象の状態、体重、年齢等に応じて適宜選択されるが、通常、細胞数として、体重60 kgの対象に対し、1回当り、通常1×10^{6}～1×10^{10}個 となるように投与される。また、1回で投与してもよく、複数回にわたって投与してもよい。本発明の医薬は、非経口投与に適した公知の形態、例えば、注射または注入剤とすることができる。また、本発明の医薬は、細胞を安定に維持するために、生理食塩水、リン酸緩衝生理食塩水（PBS）、培地等を含んでもよい。また該医薬には医薬的に許容される担体（例：ヒト血清アルブミン）、保存剤等が安定化の目的で添加されていてもよい。

実施例

[0099] 以下、実施例により本開示をさらに詳細に説明するが、これらは例示的なものであって、本開示はこれら実施例に制限されるものではない。

[0100] ［実施例１］HLAクラスIa欠損iPS細胞の製造

HLAミスマッチに起因するT細胞の免疫拒絶応答を回避するために、HLAクラスIaに属するHLA-A、HLA-B、HLA-Cそれぞれのα鎖遺伝子を欠損させた。遺伝子欠損にはCRISPR-Cas9法を用いた。

[0101] HLAクラスIaのα鎖遺伝子それぞれに対するガイドRNA(gRNA)として下記のcrRNA配列を用いた。下線はPAM配列である。

#HLA-A: ACAGCGACGCCGCGAGCCAGAGG（配列番号1）

#HLA-B: CCTCCTCCGCGGGTATGACCAGG（配列番号2）

#HLA-C: AGCGACGCCGCGAGTCCAAGAGG（配列番号3）

[0102] 各crRNA配列を含むgRNAを合成し、tracrRNA(Thermo Fisher Scientific)と混和し、二本鎖gRNAを作製した。この二本鎖gRNAをCas9タンパク質（Alt-R S.p. HiFi Cas9 Nuclease V3、Integrated DNA Technologies）と混和し、Cas9-gRNA複合体を作製した。以下それぞれ“HLAA-gRNA-Cas9複合体”、“HLAB-gRNA-Cas9複合体”および“HLAC-gRNA-Cas9複合体”とする。それぞれの複合

体は、iPS細胞への導入直前に混和し使用した。

[0103] iPS細胞の親株としては、iPS細胞クローン06E(TC-1133HKK_06E_MCB)を用いた。この親株は以下、“未編集iPS細胞”とする。はじめにiPS細胞懸濁液とHLAB-gRNA-Cas9複合体を混和し、エレクトロポレーション法(Neon Transfection System、Thermo Fisher Scientific)を用いて未編集iPS細胞にHLAB-gRNA-Cas9複合体を導入し、5日間培養した。5日後、HLAC-gRNA-Cas9複合体を導入し、さらに5日間培養した。その後、HLAA-gRNA-Cas9複合体を導入し、さらに5日間培養した。このgRNA-Cas9複合体導入iPS細胞よりシングルセルクローニングを行い、遺伝子編集済み細胞を単離した。

[0104] シングルセルクローニングは下記の方法で行った。3種のgRNA-Cas9複合体を導入して５日後に、96-wellプレートの各wellに計算値で１細胞が含まれるように細胞を播種した。96-wellプレートに播種してから12日後に、238クローンの細胞を24-wellプレートおよび96-wellプレートの各wellに継代した。この96-wellプレートの細胞はスクリーニングに使用した。一方、24-wellプレートの細胞は培養を継続し、播種して1週間に、スクリーニングの結果に基づき候補クローンのみ9cm dishに継代した。9cm dish上で培養した細胞は凍結保存をした。

[0105] スクリーニングは下記の方法で行った。96-wellプレートから別の96-wellプレートに播種した2日後に、238個のクローンに対して抗HLA-A/B/C抗体（クローンW6/32）を用いて免疫染色を行い、大幅にシグナルが減少していた53クローンを選択した。この53クローンの固定済みかつ染色済みの細胞よりゲノムを抽出し、In vitro Cas9 Cleavage Assay法により、ゲノム上の変異の有無を解析した。具体的には、まず細胞を培養した96-wellプレートの各wellをPBS溶液で洗浄した。PBS除去後、Lysis Buffer100μLに対して1μLのProteinase Kを混合した溶液(TAKARA、Lysis Buffer for PCR、9170A)101μLを加えた。Lysis Buffer with Proteinase Kで溶解した細胞を0.2mL PCRチューブに移し、サーマルサイクラーを用いて、60℃で5分間反応させ、細胞を完全に溶解した。次いで、98℃で２分間反応させ、Proteiase Kを失活させた。22℃ま

で温度を下げてこの反応を終結させ、ゲノム抽出溶液を取得した。次に、このゲノムを鋳型としてPCR法によりHLA-A、HLA-BおよびHLA-Cに対するgRNAターゲット配列付近のDNA断片を増幅した。次いで、このPCR断片とそれぞれの遺伝子に対するgRNA-Cas9複合体を混合し、37℃で60分間反応させた。その後、アガロースゲル電気泳動を行い、DNA断片の長さを解析した。ゲノム編集されたPCR断片は、gRNA-Cas9複合体で切断されないため、1本のDNA断片が観察される。一方、ゲノム編集されていないPCR断片は、gRNA-Cas9複合体で切断されるため、2本のDNA断片が観察される。2本のゲノム両方が遺伝子編集されて塩基挿入もしくは欠失(Insertion or Deletion、In/Del)が起きている細胞からは、1本のDNA断片が観察される。片方のゲノムでIn/Delが起き、もう片方のゲノムで未編集の場合には、3本のDNA断片が観察される。2本のゲノム両方が未編集の場合には、2本のDNA断片が観察される。HLA-B遺伝子座、および、HLA-C遺伝子座に関しても同様に解析した。

[0106] 免疫染色でHLAクラスIタンパク質の発現が減少している53個の1細胞由来コロニーをIn vitro Cas9 Cleavage Assay法により解析した結果、HLA-A、HLA-B、HLA-C、3つ全ての遺伝子座において2本の遺伝子鎖ともに遺伝子変異が起きたもの（合計6か所の遺伝子変異）は、観察同定されなかった。そこで、合計5か所の遺伝子変異が起きている6クローンを単離した。

次いで、この6個の候補クローンから、gRNAのターゲット配列付近を含むDNA断片をPCR法により増幅し、その塩基配列をサンガーシーケンスにより解析した。2本のゲノムが異なる配列の場合、gRNAのターゲット配列付近からサンガーシーケンスの波形が重なり不明瞭となる。この2重に重なったサンガーシーケンスの波形をオンラインソフトウェア(TIDE)(https://tide.deskgen.com/)、および目視で解析し、それぞれの遺伝子鎖の配列を解読し、実際の遺伝子挿入／欠失を確認した。この6クローンの内2クローン(18B12および17E10)が、5ヵ所でフレームシフトを伴う変異をもつことを確認した。

[0107] HLA-A(-/+):HLA-B(-/-):HLA-C(-/-)細胞クローン18B12の遺伝子編集結果を下に示す。

#HLA-A: +1nt/変異無し

#HLA-B: -10nt/-1+17nt

#HLA-C: +1nt/-13nt

[0108] gRNAのターゲット配列付近を含むDNA断片をPCR法により増幅するために、下記のプライマーを使用した。

#HLA-A、Fwd: AATCAGTGTCGTCGCGGTCG（配列番号4）

#HLA-A、Rev: AGTCTGTGAGTGGGCCTTCAC（配列番号5）

#HLA-B、Fwd: GAGACACAGATCTCCAAGACCAACA（配列番号6）

#HLA-B、Rev: CCTGAGAGGAAAAGTCACGGTTC（配列番号7）

#HLA-C、Fwd: AGGGAAACGGCCTCTGCGGA（配列番号8）

#HLA-C、Rev: TCTGTGCCTGGCGCTTGTAC（配列番号9）

上記プライマーを用いた際のPCR産物の長さは以下の通りである。

#HLA-A: 497bp

#HLA-B: 889bp

#HLA-C: 329bp

[0109] HLA-A(-/+):HLA-B(-/-):HLA-C(-/-)iPS細胞クローン18B12で変異が導入されなかったHLA-A遺伝子に変異を導入するために、HLAA-gRNA-Cas9複合体を再導入し、上記と同様にシングルセルクローニングとスクリーニングを行い、HLA-A(-/-): HLA-B(-/-): HLA-C(-/-)iPS細胞を単離した。

[0110] HLAA-gRNA-Cas9複合体導入4日後に、96-wellプレートの各wellに計算値で1細胞が含まれるように細胞を播種した。96-wellプレートに播種してから12日後に、細胞を24-wellプレートおよび96-wellプレートの各wellに継代した。

この96-wellプレートの細胞は継代翌日に回収し、ゲノムDNAを抽出した。抽出したゲノムDNAを用いてIn vitro Cas9 Cleavage Assay法により、ゲノム上の変異の有無を解析した。75個の1細胞由来コロニー（クローン）を解析した結果、11個のクローンのHLA-A遺伝子において1本のDNA断片が観察されたため、ゲノムDNAの両鎖が遺伝子編集された候補クローンとした。次いで、この11個の候補クローンから、gRNAのターゲット配列付近を含むDNA断片をPCR法

により増幅し、その塩基配列をサンガーシーケンス法により解析した。単離した全てのHLA-A遺伝子の両鎖でフレームシフトを伴う変異が導入されたことを確認した。ここで単離した、HLA-A(-/-):HLA-B(-/-):HLA-C(-/-)細胞を、以下“HLAクラスIa欠損iPS細胞(HGEC-0006細胞)”とする。

[0111] 得られた11クローンのうち、HLAクラスIa欠損iPS細胞クローン2E1の遺伝子編集結果を下に示す（図１）。

#HLA-A: -13nt/+1nt

#HLA-B: -10nt/-1+17nt

#HLA-C: +1nt/-13nt

[0112] HLAクラスIa欠損iPS細胞クローン2E1におけるHLAクラスIaタンパク質の細胞表面発現量を、フローサイトメトリー法を用いて解析した。200,000個のiPS細胞懸濁液を、HLAクラスIを認識する抗体（クローンG46-2.6）と混合し、20μLの溶液量で氷上において30分間反応させた。その後、2%BSA混合PBS溶液1mLを加えて未結合の抗体を溶液中に拡散させ、遠心操作後ペレットのみを回収することにより、抗体が結合した細胞のみを回収した。抗体として蛍光標識抗体を用いることにより、フローサイトメトリー(BD FACSVerse)を用いて、抗体が結合するタンパク質の細胞表面発現量を解析した。その結果、クラスIタンパク質の細胞表面発現量の大幅な減少が確認された（図２）。

[0113] 次に、HLA-A、HLA-B、HLA-Cタンパク質の欠損がHLAクラスIbの発現にどのような影響を与えるのかを確認する目的で、クラスIa欠損iPS細胞クローン2E1におけるHLA-Eの細胞表面発現を、フローサイトメトリー法を用いて解析した。HLA-Eに対する抗体としては、抗HLA-E抗体（クローン3D2）を用いた。その結果、HLA-Eの発現は確認できたが未編集iPS細胞に比べて半分程度に減少していた（図３）。

[0114] HLA-A、HLA-B、HLA-Cタンパク質の欠損によりiPS細胞の未分化性に変化が生じたか確認するために、フローサイトメトリー法を用いて、HLAクラスIa欠損iPS細胞クローン2E1における、未分化マーカーの発現を解析した。未分化マーカーに対する抗体として、抗SSEA-4抗体（クローンMC813-70）および抗T

RA-1-60抗体（クローンTRA-1-60）を用いた。その結果、HLAクラスIa欠損iPS細胞クローン2E1における未分化マーカーの発現量は、親株である未編集iPS細胞とほぼ同等であることが確認された（図４）。

[0115] HLA-A、HLA-B、HLA-Cタンパク質の欠損によりiPS細胞の全遺伝子発現パターンに変化が生じたか確認するために、トランスクリプトーム解析（タカラバイオ社、Agilent Array発現受託解析）を行った。このヒトSurePrint G3 Human Gene Expression 8x60K v3は、26,083 Entrez gene RNA、および、30,606 lncRNAsをカバーするプローブを搭載する。HLAクラスIa欠損iPS細胞クローン2E1およびHLAクラスIa欠損iPS細胞クローン2H3（第２候補クローン）、および、対照群として未編集iPS細胞を、それぞれ6cm dishに培養した。この培養容器に直接Buffer RLT with 2-ME(QIAGEN)600μLを加えて細胞を溶解し、1.5mLチューブに移した。ピペッティングによりさらに細胞を溶解し、マイナス80℃で凍結した。このサンプルに対しAgilent Microarray発現受託解析を行った結果、HLAクラスIa欠損iPS細胞クローン2E1におけるRNA発現パターンが親株である未編集iPS細胞クローン06Eとほぼ同等であることを確認した（図５）。第２候補クローン2H3のRNA発現パターンもまた、未編集iPS細胞クローン06Eに近かった。

[0116] ［実施例２］HLAクラスIa＆II欠損iPS細胞の製造

HLAミスマッチに起因するT細胞の免疫拒絶応答を抑制するために、実施例１で得られたHLAクラスIa欠損iPS細胞クローン2E1において、さらにRFXANK遺伝子を欠損させた。RFXANK遺伝子はHLAクラスII遺伝子群の発現を制御する転写因子であるため、RFXANK遺伝子の欠損により、HLAクラスII遺伝子群の大幅な発現量減少が期待される。遺伝子欠損には、CRISPR-Cas9法を用いた。

[0117] RFXANK遺伝子に対するガイドRNA(gRNA)として下記のcrRNA配列を用いた。下線はPAM配列である。

#RFXANK: TGAGACCGTTCGCTTCCTGCTGG（配列番号10）

[0118] RFXANKに対するcrRNA配列を含むgRNAを合成し、tracrRNA（Thermo Fisher Scientific）と混和し、二本鎖gRNAを作製した。この二本鎖gRNAをCas9タン

パク質（Alt-R S.p. HiFi Cas9 Nuclease V3、Integrated DNA Technologies）と混和し、Cas9-gRNA複合体を作製した。以下“RFXANK-gRNA-Cas9複合体”とする。この複合体をiPS細胞への導入直前に混和し、使用した。

[0119] HLAクラスIa欠損iPS細胞クローン2E1に、エレクトロポレーション法（Neon Transfection System、Thermo Fisher Scientific）を用いて、RFXANK-gRNA-Cas9複合体を導入した。実施例１と同様の方法を用いてシングルセルクローニングとスクリーニングを行い、HLA-A(-/-):HLA-B(-/-):HLA-C(-/-):RFXANK(-/-)iPS細胞を単離した。

[0120] RFXANK-gRNA-Cas9複合体導入4日後に、96-wellプレートの各wellに計算値で1細胞が含まれるように細胞を播種した。96-wellプレートに播種してから12日後に、細胞を24-wellプレートおよび96-wellプレートの各wellに継代した。この96-wellプレートの細胞を播種翌日に回収し、ゲノムを抽出した。抽出したゲノムを用いて、In vitro Cas9 Cleavage Assay法により、ゲノム上の変異の有無を解析した。一方、24-wellプレートの細胞は培養を継続し、播種して1週間に、スクリーニングの結果に基づき候補クローンのみを9cm dishに継代した。9cm dish上で培養した細胞は凍結保存をした。

[0121] スクリーニングは下記の方法で行った。前述のIn vitro Cas9 Cleavage Assay法を用いて、256個の1細胞由来コロニー（クローン）を解析した結果、4個のクローンにおいて1本のDNA断片が観察されたため、2本のゲノム両方が遺伝子編集された候補クローンとした。次いで、この4個の候補クローンから、gRNAのターゲット配列付近を含むDNA断片をPCRで増幅し、その塩基配列をサンガーシーケンス解析した。この候補4クローンの内、2クローンで2つのRFXANK遺伝子座でフレームシフトを伴う遺伝子欠損変異をもつことを確認した。ここで単離した、HLA-A(-/-):HLA-B(-/-):HLA-C(-/-):RFXANK(-/-)細胞を、以下“HLAクラスIa＆II欠損iPS細胞(HGEC-0009細胞)”とする。

[0122] 得られた2クローンのうち、HLAクラスIa＆II欠損iPS細胞クローン6B7の遺伝子編集結果を下に示す（図６）。

#HLA-A: -13nt/+1nt

#HLA-B: -10nt/-17+1nt

#HLA-C: +1nt/-13nt

#RFXANK: -11nt/-10nt

[0123] gRNAのターゲット配列付近を含むDNA断片をPCR法により増幅するため、下記のプライマーを使用した。

#RFXANK、Fwd: ATACCCACTCATGACGTGACCTG（配列番号11）

#RFXANK、Rev: CAGCCGCATCTCAAAGACAAG（配列番号12）

上記プライマーを用いた際のPCR産物の長さは以下の通りである。

#RFXANK: 410bp

[0124] HLAクラスIa＆II欠損iPS細胞クローン6B7におけるHLAクラスIaタンパク質の細胞表面発現量を、フローサイトメトリー法を用いて、実施例1と同様に解析した。その結果、HLAクラスIa＆II欠損iPS細胞クローン6B7において、実施例１で得られた細胞と同様に、HLAクラスIタンパク質の細胞表面発現量の大幅な減少が確認された（図７）。

[0125] HLAクラスIa＆II欠損iPS細胞クローン6B7におけるHLAクラスIIタンパク質の細胞表面発現量の確認には、当該iPS細胞をHLAクラスII発現細胞に分化誘導する必要がある。そこでそのようなHLAクラスII発現細胞として、iPS細胞由来の樹状細胞様細胞を含む血球系細胞を利用することにした。iPS細胞から血球系前駆細胞への分化は文献（Biochem Biophys Res Commun. 2019 Jul 12;515(1):1-8.）に従った。血球系分化細胞から樹状細胞様細胞を含む血球系細胞への分化誘導を行うために、iPS細胞由来の血球系前駆細胞をOP9フィーダー細胞上に播種し、100ng/mL FLT3L、20ng/mL SCF、20ng/mL GM-CSFを添加し、4-7日間培養した。樹状細胞様細胞の出現を検出するために、樹状細胞マーカーを認識する抗体、抗CD11c抗体（クローンREA618、MiltenyBiotec、130-114-110）および抗CD11b抗体（クローンICRF44、BD Pharmingen、558123）を使用した。

[0126] RFXANK欠損によるHLAクラスIIタンパク質の発現量減少を確認するために、上記方法によりiPS細胞から樹状細胞を含む血球系細胞に分化させた後、フロ

ーサイトメトリー法を用いてHLAクラスIa＆II欠損iPS細胞クローン6B7由来樹状細胞様細胞におけるHLAクラスIIタンパク質の細胞表面発現量を解析した。樹状細胞マーカーを認識する抗体としては、抗CD11c抗体（クローンREA618、MiltenyBiotec、130-114-110）および抗CD11b抗体（クローンICRF44、BD Pharmingen、558123）を使用した。またHLAクラスIIを認識する抗体としては、抗HLA-DR/DQ/DP（クローンTu39、BD Pharmingen、557715）を使用した（図８）。

[0127] 次に、HLA-A、HLA-B、HLA-Cタンパク質の欠損に加えてRFXANKを欠損させた場合におけるHLAクラスIbの発現を確認する目的で、HLAクラスIa＆II欠損iPS細胞クローン6B7におけるHLA-Eの細胞表面発現を、実施例１と同様にフローサイトメトリー法により解析した。HLA-Eを検出する抗体として抗HLA-E抗体（クローン3D2）を用いた。その結果、HLAクラスIa＆II欠損iPS細胞クローン6B7においてHLA-Eの発現は検出できなかった（図９）。

[0128] HLA-A、HLA-B、HLA-Cタンパク質の欠損に加えてRFXANKの欠損によりiPS細胞の未分化性に変化が生じたか確認するために、HLAクラスIa＆II欠損iPS細胞クローン6B7における未分化マーカーの細胞表面発現を、実施例１と同様のフローサイトメトリー法を用いて解析した。その結果、HLAクラスIa＆II欠損iPS細胞クローン6B7における未分化マーカーの発現量は、親株である未編集iPS細胞クローン06Eとほぼ同等であることが確認された（図１０）。

[0129] HLA-A、HLA-B、HLA-Cタンパク質の欠損に加えてRFXANKの欠損によりiPS細胞の全遺伝子発現パターンに変化が生じたかを、実施例１と同様の方法により解析した。その結果、HLAクラスIa＆II欠損iPS細胞クローン6B7におけるRNA発現パターンは、親株である未編集iPS細胞クローン06Eと同等であることが確認された（図１１）。

[0130] HLAクラスIa＆II欠損iPS細胞クローン6B7が多系統への分化能を保持していることを確認した。具体的には、血管内皮細胞への分化誘導、血球系細胞への分化誘導、肝臓細胞への分化誘導をそれぞれ実施し、分化誘導が正常になされることを確認した。各細胞への分化誘導法は下記に示す。

iPS細胞から血球系前駆細胞への分化誘導は文献（Biochem Biophys Res Commun. 2019 Jul 12;515(1):1-8.）に従った。血球系前駆細胞への分化能評価のひとつとして、血球系前駆細胞特異的タンパク質の細胞表面発現をフローサイトメトリー法により測定した。血球系前駆細胞のマーカーとして、抗CD45抗体（クローンHI30、BD Pharmingen、563880）、抗CD43抗体（クローン1G10、BD Pharmingen、555475）、抗CD34抗体（クローン8G12、BD Pharmingen、340441）を用いた。

iPS細胞から肝細胞への分化は文献（PNAS. 2012 Jul 31;109(31):12538-43（前半のDE誘導まで）、ならびにHepatology, 2010 Jan; 51(1): 297-305およびStembook, Cai J. et al., Protocol for directed differentiation of human pluripoteit stem cells toward a hepatocyte fate（後半のHCMを使用））に従った。肝細胞への分化能評価として、肝特異的機能のひとつである尿素合成能を評価した（図１２A）。結果、クローン6B7における尿素合成能は、未編集iPS細胞クローン06Eとほぼ同等であった。

iPS細胞から血管内皮細胞への分化は文献（Nat Cell Biol. 2015 Aug; 17(8): 994-1003）に従った。血管内細胞のマーカーとして、抗CD31抗体（クローンWM59、BD PharmingenD、555445）および抗CD144抗体（クローン55-7H1、BD Pharmingen、560410）を用いた。血管内細胞への分化能評価のひとつとして、脈管形成能を評価した（図１２B）。結果、クローン6B7における脈管形成能は、未編集iPS細胞クローン06Eとほぼ同等であった。

以上の結果から、HLAクラスIa＆II欠損iPS細胞クローン6B7の分化能は、未編集iPS細胞クローン06Eと同程度であることが確認された。

[0131] ［実施例３］ユニバーサルドナーiPS細胞の製造

≪免疫回避機能を強化する遺伝子の強制発現≫

T細胞やNK細胞による免疫拒絶反応を抑制するために、実施例２で得られたHLAクラスIa＆II欠損iPS細胞クローン6B7に、下記因子を強制発現させることでユニバーサルドナーiPS細胞を製造した。遺伝子導入法としては，PiggyBac法を用いた。また、各因子のcDNA強制発現には、常時活性型のEF1alphaプロ

モーター領域を用いた。

[0132] PiggyBac法による遺伝子導入に用いるベクターとして、以下のベクターを準備した。なおPD-L1とPD-L2はP2A配列で連結され、一つのベクターで同時に発現させた。

#PB_PD-L1_P2A_PD-L2_Puro_Vector

#PB_B2M_Puro_Vector

#PB_HLAG_Puro_Vector

#PB_iCasp9_Puro_Vector

またPiggyBac転移酵素として、次のベクターを準備した。

#hPBase_Hygro_Vector

[0133] PiggyBac法による遺伝子導入に用いた各ベクターは以下の方法で構築した。PiggyBacの3’ITR配列（配列番号13）-制限酵素のMCS-PiggyBacの5’ITR配列（配列番号14）を人工合成し、それをpHSG298プラスミドのPstIとEcoRI制限酵素サイトに入れた。MCSに、EF1Aプロモーター（PCRによりpBApo-EF1a Pur DNAプラスミドから増幅）、各目的遺伝子（PD-L1-P2A-PD-L2：配列番号15、HLAG：配列番号16、B2M：配列番号17、iCasp9のCDS（人工合成）：配列番号19）、およびIRES-Puro-hGHpolyA（人工合成）：配列番号23を入れることで、各目的遺伝子を発現するPB_CDS_Puro_Vectorを構築した。

[0134] またhPBase_Hygro_Vectorは以下の方法で構築した。pHSG298プラスミドのSalIとKpnI制限酵素サイトに、EF1Aプロモーター（PCRにより増幅）、Human codon-optimizedしたPBase（人工合成、配列番号18）、およびIRES-Hygro-hGHpolyA（人工合成）：配列番号24を入れることで、hPBaseベクターを構築した。

[0135] そして実施例２で得られたHLAクラスIa＆II欠損iPS細胞クローン6B7に、上記5種類のプラスミドDNAを、エレクトロポレーション法（Neon Transfection System、Thermo Fisher Scientific）を用いて導入した。ここで遺伝子導入した細胞を“HGEC-0012細胞”と名付けた。

[0136] プラスミドDNA導入翌日にPuromycinおよびHygromycin入りの液体培地に交

換し、薬剤耐性細胞の選別を開始した。エレクトロポレーション2日後から5日後まで毎日、Puromycin入りの液体培地に交換し、薬剤選択を続けた。エレクトロポレーション6日後に薬剤なしの液体培地に交換し、細胞培養を継続した。エレクトロポレーション7日後に96-wellプレートの1wellあたり計算値で１細胞が含まれるように細胞を播種し、培養を継続した。96-wellプレートに播種してから12日後に細胞を24-wellプレートおよび96-wellプレートの各wellに継代した。1wellあたり計算値で1細胞が含まれるように96-wellプレートに播種してから12+1日後の96-wellプレート上の細胞は継代翌日に回収し、定量RT-PCR法により各導入因子の発現量を解析することにより、全ての導入因子が過剰発現するクローンをスクリーニングした。

[0137] 定量RT-PCR法による1次スクリーニングは、下記の方法で行った。96-wellプレート上の細胞を解析するために逆転写反応を行った（SuperPrep Cell Lysis and RT Kit for qPCR、TOYOBO、SCQ-401）。この逆転写産物を鋳型に定量PCR（StepOne PlusリアルタイムPCRシステム、ThermoFisher Scientific）を行い、導入遺伝子の発現量を解析した。PCR反応には、THUNDERBIRD Probe qPCR Mix（TOYOBO、QPS-101）、もしくは、TaqMan Fast Advanced Master Mix（ThermoFisher Scientific、4444557）、いずれかの試薬を用いた。各因子の検出にはTaqMan Gene Expression Assay（FAMおよび/またはVIC）（ThermoFisher Scientific）を用いた；GAPDH（Hs02758991_g1）、PD-L1（Hs00204257_m1）、PD-L2（Hs00228839_m1）、HLAG（Hs00365950_g1）、B2M（Hs00187842_m1）。iCasp9を検出するための蛍光プローブおよびプライマーは人工合成した（配列は下記参照）。

[0138] 人工合成した蛍光プローブ（FAM）およびプライマーの配列を以下に示す。

#iCasp9-fwd: GAACTGCTGAAGCTGGAATC（配列番号20）

#iCasp9-rev: CATTTCCTCTCAGGCTTTCCAG（配列番号21）

#iCasp9-probe(5’6-FAM, 3’BHQ1):ATCTGGCGTTGACGGCTTTGGAGATGTG（配列番号22）

[0139] 96-wellプレート２０枚から２４２個の単細胞由来クローンを単離して、１

つのクローンを「24-well プレート－継続培養用」および「96-well プレート－スクリーニング用」の２つのウェルに播種した。「96-well プレート－スクリーニング用」の細胞を播種1日後に回収し、上記の逆転写定量PCR法により解析した結果、１８個のクローンで、PD-L1、HLA-G、B2MおよびiCasp9 mRNAの過剰発現を確認した。比較対象としては、遺伝子導入をしていないHLAクラスIa＆II欠損iPS細胞クローン6B7を用いた。一方、「24-well プレート－継続培養用」に播種した細胞は、播種1週間後に上記１８個のクローンについてのみ9cm dish 2枚に継代した。播種6日後に、9cm ディッシュ1枚の細胞を用いてフローサイトメトリー法によりタンパク質の表面発現を定量することにより、2次スクリーニングを行った。残りの９ｃｍディッシュ1枚の細胞は培養後凍結保存した。

[0140] フローサイトメトリー法による2次スクリーニングは、下記の方法で行った。細胞をディッシュから剥離後、細胞懸濁液を蛍光標識抗体と混合し、細胞表面に発現しているタンパク質の発現量を、FACSVerseフローサイトメーター（BD）を用いて定量解析した。使用した抗体を下記に記載する；抗PD-L1抗体-APC標識（クローンMIH1、Invitrogen、12-5888-42）、抗B2M抗体-PECy7標識（クローン2M2、BioLegend、316318）、抗HLAG抗体-PE標識（クローンMEM-G/9、Abcam、ab24384）。この結果、18個全てのクローンで、PD-L1, HLA-GおよびB2Mの細胞表面への高発現を確認した。上記の方法で、ユニバーサルドナーiPS細胞クローンを単離した。

[0141] ≪得られた細胞の評価≫

ユニバーサルドナーiPS細胞クローン9G11における、HLA-G、B2M、PD-L1およびPD-L2の細胞表面への過剰発現レベルを上記と同様の方法で確認した。使用した抗体を以下に記載する；抗PD-L1抗体-APC標識（クローンMIH1、Invitrogen、12-5888-42）、抗PD-L2抗体-PE標識（クローンMIH18, Invitrogen、17-5983-42）、抗HLAG抗体-PE標識（クローンMEM-G/9、Abcam、ab24384）。この結果、HLA-G、B2M、PD-L1、および、PD-L2の細胞表面への高発現を確認した（図１３）。

[0142] ユニバーサルドナーiPS細胞クローン9G11を、造血前駆細胞を含む血球系細胞集団（CD45陽性細胞）に分化後、HLAクラスIaタンパク質の細胞表面発現を実施例１と同様にフローサイトメトリー法により解析し、発現レベルを確認した。なおユニバーサルドナーiPS細胞から血球系前駆細胞への分化は、実施例２と同様に実施した。この結果、HLA-A、HLA-BおよびHLA-Cタンパク質の細胞表面発現量の大幅な減少が確認された（図１４）。またHLAクラスIIタンパク質の細胞表面発現レベルを、実施例２と同様にフローサイトメトリー法により解析した。この結果、HLAクラスIIタンパク質（HLA-DR、DP、DQ）の細胞表面発現量の大幅な減少が確認された（図１４）。さらにHLA-G、PD-L1、および、PD-L2の細胞表面への過剰発現レベルを上記と同様の方法で確認した。使用した抗体を以下に記載する；抗PD-L1抗体-APC標識（クローンMIH1、Invitrogen、12-5888-42）、抗PD-L2抗体-PE標識（クローンMIH18, Invitrogen、17-5983-42）、抗B2M抗体-PECy7標識（クローン2M2、BioLegend、316318）、抗HLAG抗体-PE標識（クローンMEM-G/9、Abcam、ab24384）。この結果、HLA-Gの細胞表面への高発現を確認した。PD-L1およびPD-L2に関しては、内在性発現も観察されたものの、若干の発現上昇を確認した（図１５）。

[0143] HLA-A、HLA-B、HLA-C、RFXANKタンパク質の欠損に加えてHLA-G、B2M、PD-L1、PD-L2、iCasp9の強制発現によりiPS細胞の未分化性に変化が生じたか確認するために、ユニバーサルドナーiPS細胞クローン9G11におけるiPS細胞未分化マーカーの発現を、実施例１と同様にフローサイトメトリー法により解析した。細胞表面の未分化マーカーに対する抗体として、抗TRA-1-81抗体（クローンTRA-1-81）、抗SSEA-4抗体（クローンMC813-70）および抗TRA-1-60抗体（クローンTRA-1-60）を用いた。また、細胞内Oct3/4タンパク質の発現を、フローサイトメトリー法を用いて解析した。細胞内のタンパク質を染色するために、細胞懸濁液をPermeabilization Buffer (BD)で処理したのちに、抗Oct3/4抗体（クローンC30A3）で染色した。その結果、ユニバーサルドナーiPS細胞クローン9G11は、各未分化マーカーをしっかりと発現していることが確認された（図１６）。未分化マーカーの発現確認は、免疫染色法において

も同様に確認された。さらに未分化性に影響が出ていないことを、アルカリフォスファターゼ染色法により確認した。

[0144] 遺伝子編集前後で遺伝子発現パターンが大きく変化していないことを確認するために、ユニバーサルドナーiPS細胞クローン9G11と未編集iPS細胞を用いたRNA-seq比較解析を実施した。その結果、遺伝子編集の前後で遺伝子発現パターンは大きく変化していないことが確認された。

また遺伝子編集とクローニングのための培養過程において、がん化リスクを増大させる可能性のある既知の遺伝子変異の有無を調べるために、QIAseq Targeted DNA Panel (Comprehensive Cancer Panel) を用いた高感度なゲノム変異解析を、ユニバーサルドナーiPS細胞クローン9G11において実施した。その結果、遺伝子編集とクローニングのための培養過程でがん化リスクの高くなることが知られている既知の変異は起きていないことが確認された。

[0145] 遺伝子編集とクローニングのための培養過程において、核型異常の有無を調べるために、核型解析を行った。その結果、ユニバーサルドナーiPS細胞クローン9G11において、核型異常は検出されなかった（図１７）。

[0146] HLA-A、HLA-B、HLA-C、RFXANKタンパク質の欠損に加えてHLA-G、B2M、PD-L1、PD-L2、iCasp9の強制発現によりiPS細胞の多系統への分化能保持に変化が生じたか確認するために、ユニバーサルドナーiPS細胞クローン9G11の複数系統への分化誘導を試みた。多分化能を保持していることを、実施例２と同様の方法で確認した（図１８）。

[0147] 実施例４：ユニバーサルドナーiPS細胞の免疫回避機構および安全装置の評価

≪T細胞の応答≫

ユニバーサルドナーiPS細胞クローンは、その遺伝子編集の結果T細胞による免疫応答を回避しやすくなっている事が期待される。ユニバーサルドナーiPS細胞クローン9G11に対して、HLAミスマッチに起因するT細胞の応答が減弱している事を確認するために、T細胞の増殖を指標にフローサイトメトリー法による解析を実施した。ターゲット細胞としては、ユニバーサルドナーiPS細胞（クローン9G11）由来造血前駆細胞を含む細胞集団（CD45陽性細胞）を用

いた。ユニバーサルドナーiPS細胞から血球系前駆細胞への分化は、実施例２と同様に実施した。T細胞とターゲット細胞を5日又は7日間共培養し、EdU試薬を用いてT細胞の増殖を評価した。T細胞はCD4陽性細胞及びCD8陽性細胞それぞれのEdU陽性率を各細胞の増殖率として算出した。また、試験系のポジティブコントロールとして、ターゲット細胞にTHP-1細胞を用いてT細胞の増殖を評価した。

[0148] 結果を図１９に示す。T細胞単独では、細胞増殖はほとんど観察されなかった（EdUを取り込んでいなかった）。陽性対称であるTHP-1もしくは未編集iPS細胞由来CD45陽性細胞（06E）と共培養すると、T細胞は応答して細胞増殖を示した（EdUを取り込んだ）。これに対して、ユニバーサルドナーiPS細胞クローン9G11は共培養した際のT細胞の応答は著しく減少していた（EdU取り込みが減少していた）。この結果より、遺伝子編集操作により、ユニバーサルドナーiPS細胞クローン由来の分化細胞は、T細胞による免疫応答を回避しやすくなっている事が確認された。

[0149] ≪T細胞による細胞障害活性の回避≫

ユニバーサルドナーiPS細胞クローン9G11に対するT細胞の傷害活性が減弱している事を確認するために、フローサイトメトリー法による細胞傷害アッセイを実施した。エフェクター細胞としてはCD8陽性細胞を、ターゲット細胞としてはiPS細胞（クローン9G11、および、未編集細胞）由来造血前駆細胞を含む細胞集団（CD45陽性細胞）を用いた。CD45陽性細胞を50 ng / mL IFNγ存在下で2日間培養し、終濃度5 μMのCell Tracer Violet (Thermo Fisher Scientific) を用いて生細胞を染色した。プライミングしたCD8陽性細胞を細胞数比率を変えて混合して3時間共培養した後に、傷害を受けたターゲット細胞を標識するために、死細胞マーカーであるSYTOXで0.1μM SYTOX溶液を250 μL添加した。その後、フローサイトメーター (Miltenyi Biotec MACSQuant) でCell Tracer Violet及びSYTOXの蛍光を測定した。

全ターゲット細胞中（Cell Tracer Violet陽性）における、死細胞（SYTOX陽性）の割合を計測し、細胞傷害活性の指標とした。プライミングしていな

いT細胞を陰性対称反応として試験を実施し、バックグラウンドの値として差し引いた。

その結果、未編集細胞はプライミングしたCD8陽性細胞により傷害を受けたのに比べて、ユニバーサルドナーiPS細胞クローン9G11は、予想通り傷害を受けにくくなっていることが確認できた（図２０）。

[0150] ≪NK細胞による細胞障害活性の回避≫

次に、NK細胞によるiPS細胞に対する細胞傷害活性を次の方法で評価した。ユニバーサルドナーiPS細胞クローンは、その遺伝子編集の結果NK細胞による免疫応答を回避しやすくなっている事が期待される。ユニバーサルドナーiPS細胞クローン9G11に対して、NK細胞の応答が減弱している事を確認するために、NK細胞の増殖を指標にフローサイトメトリー法による解析を実施した。ターゲット細胞としては、未編集iPS細胞クローン06E；HLAクラスIa＆II欠損iPS細胞クローン6B7；ユニバーサルドナーiPS細胞クローン9G11をそれぞれ用いた。

[0151] まずターゲット細胞を生細胞マーカーであるカルセインで標識するために、ターゲット細胞の懸濁液（100,000cells/100μL）に0.03mM Calcein-AM溶液をK562には終濃度500nM、iPS細胞には終濃度1500nMになるよう加えた。37℃5%CO_2インキュベーターで30分間静置した。5mLのPBSを添加し、200xgで4分間遠心後上清を除去した。エフェクター細胞（NK細胞）250,000個もしくは500,000個とターゲット細胞50,000個を混合し、37℃5%CO_2インキュベーターで2時間静置した。0.25%BSA-PBS溶液を添加し、300xgで5分間遠心後上清を除去した。次いで、傷害を受けたターゲット細胞を標識するために、死細胞マーカーである0.1nM SYTOX溶液を250μL添加した。その後、フローサイトメーター（Miltenyi Biotec MACSQuant）でカルセイン及びSYTOXの蛍光を測定した。全ターゲット細胞中（カルセイン陽性）における、死細胞（SYTOX陽性）の割合を計測し、細胞傷害活性の指標とした。数値の計算には適切な陰性対称反応を実施し、バックグラウンドの値として差し引いた。

[0152] NK細胞による細胞傷害活性を測定した結果、HLAクラスIタンパク質を細胞

表面に発現している未編集iPS細胞に比べて、HLAクラスIa＆II欠損iPS細胞クローン6B7は、上述の通りHLAクラスIタンパク質を細胞表面にほとんど発現しておらず、予想通り未編集iPS細胞より多くの細胞がNK細胞により傷害された。ユニバーサルドナーiPS細胞クローン9G11においては、HLA-GおよびB2Mを強制発現させたことにより、上述の通りHLAクラスIタンパク質が多く細胞表面に発現しており、期待通りに未編集iPS細胞と同程度もしくはそれ以下の細胞のみがNK細胞により傷害された（図２１）。よって本発明の細胞は、NK細胞による細胞障害活性に対する回避能が高い細胞であることが明らかとなった。

[0153] ≪自殺遺伝子の機能評価≫

次に、導入した自殺遺伝子が機能するかを確認する実験を行った。安全装置としてユニバーサルドナーiPS細胞に導入した自殺遺伝子iCaspase9の機能を確認するために、in vitroでラパマイシン添加による細胞死誘導を確認した。細胞死誘導効率を評価するにあたり、細胞生存性の指標であるATP量に基づき細胞生存率を発光測定するCellTiter Gloアッセイキット（プロメガ）を使用した。上記iCaspase9導入細胞（clone B）、および、iCaspase9を含まない未編集細胞（Parental）を、各ラパマイシン濃度（0 nM ・ 0.003 nM ・ 0.01 nM ・ 0.03 nM ・ 0.1 nM ・ 0.3 nM ・ 1 nM）条件下にて24時間培養した後の生細胞率を測定した結果、ラパマイシン濃度0.1 nM以上では、 iCaspase9導入細胞の細胞生存率が未編集細胞と比べて著しく低下することが明らかとなった（図２２）。本結果より、0.1nM以上のラパマイシン濃度条件下において、iCaspase9による細胞死が誘導されていることを確認できた。

[0154] ［実施例５］B2Mの有無によるHLAクラスIbの発現

実施例３において本発明の細胞に導入した外来性B2Mが、本発明の細胞の製造において必要であるか否かを検討するために、外来性B2Mを除いた場合にHLAクラスIbの発現が維持されるか否かを比較試験した。

「組合せ１」

#PB_B2M_Puro_Vector

#PB_HLAG_Puro_Vector

「組合せ２」

#PB_HLAG_Puro_Vector

[0155] 実施例２で得られたHLAクラスIa＆II欠損iPS細胞に、上記「組合せ１」もしくは「組合せ２」のPiggyBac遺伝子発現ベクターを、エレクトロポレーション法を用いて導入した。薬剤選択は実施例３に記載の方法で行った。エレクトロポレーション6日後以降は、薬剤なしの液体培地に交換し、細胞培養を継続した。この状態の細胞を、以下「プール細胞」と呼ぶ。

[0156] 強制発現因子の細胞表面発現は、フローサイトメトリー法により解析した。細胞をDishから剥離後、蛍光標識抗体と混合し、細胞表面に発現しているタンパク質の発現量を、フローサイトメーター（BD FACSVerse）を用いて定量解析した。使用した抗体を下記に記載する；抗B2M抗体-PECy7標識（クローン2M2、BioLegend、316318）、抗HLA-G抗体-PE標識（クローンMEM-G/9、Abcam、ab24384）。

プール細胞において、上記2種類の組み合わせを比較した結果、B2Mを導入することにより（組合せ１）、より高発現のHLA-GおよびB2Mを細胞表面に確認できた（図２３）。B2Mありの方が、総HLAクラスI量（B2Mの細胞表面発現により推測される）は多くなるため、B2Mを導入することで本発明の細胞がより高機能化することが期待された。

産業上の利用可能性

[0157] 本開示に係る細胞は、例えば、再生医療の分野に有用である。本出願は、日本で出願された特願2020-091787（出願日：令和2年5月26日）を基礎としており、その内容はすべて本明細書に包含されるものとする。