
ゲノム編集技術を用いて iPS 細胞から “ユニバーサル”な血小板の作製に成功

ポイント

- 自分と異なる HLA クラス I^{注1)}を持つ血小板^{注2)}を拒絶してしまう血小板輸血不応症^{注3)}は、血小板輸血患者の 5%程度に起こり、HLA クラス I が合致する血小板の輸血が必要である。
- 既に臨床応用を進める事に成功している iPS 血小板 (iPS 細胞から作られる血小板) の研究を元に、HLA クラス I の型を問わずに輸血可能な HLA クラス I の発現を欠失させた iPS 血小板 (HLA 欠失 iPS 血小板) の開発に成功した。
- HLA 欠失 iPS 血小板は、抗 HLA 抗体^{注4)}、NK 細胞^{注5)} の何れからも攻撃されないことを、培養皿内のみならず、新たに確立した動物モデルの生体内で実証した。

1. 要旨

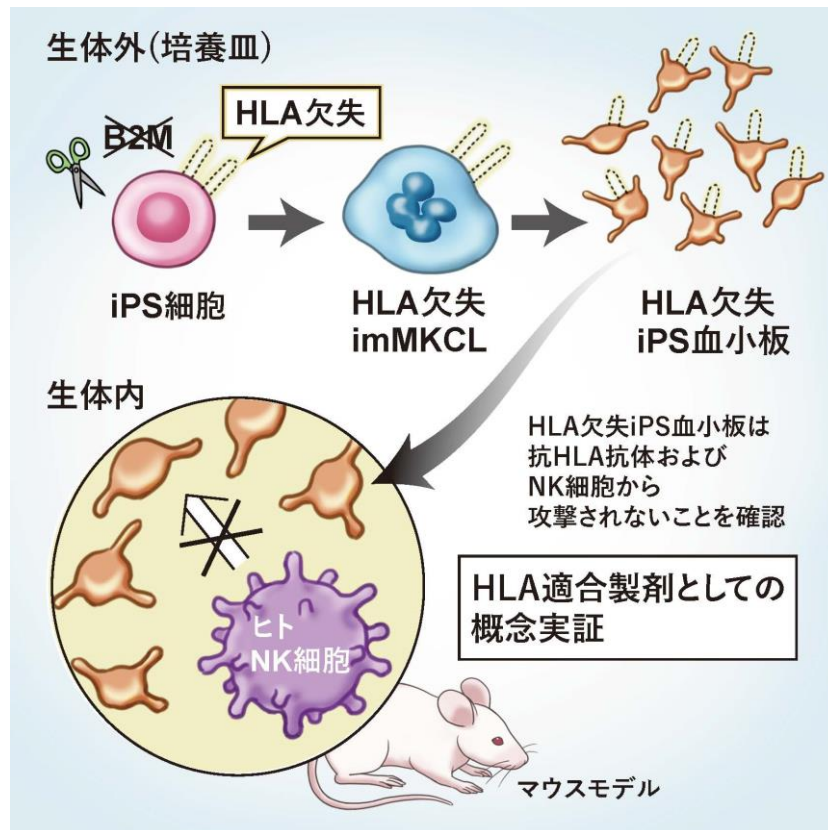
ヒト iPS 細胞を使った血小板作製技術は、ドナーに依存する献血を補完する生産システムとして臨床応用に向けた研究が進められています。しかし、HLA クラス I のミスマッチに起因する血小板輸血不応症の場合、HLA クラス I が合致する製剤が必要であり、日本人の約 9 割をカバーするには 140 種類の HLA クラス I が必要という課題がありました。

今回、鈴木大助 元京都大学院生 (現 千葉大学医学部 学部学生)、杉本直志 講師 (京都大学 CiRA)、堀田秋津 講師 (京都大学 CiRA) および江藤浩之 教授 (京都大学 CiRA、千葉大学再生治療学研究センター長) らは、ゲノム編集技術^{注6)}を用いて iPS 細胞から HLA クラス I を欠失させた巨核球株 (imMKCL)^{注7)} を作製し、HLA 欠失血小板を製造することに成功しました。HLA 欠失 iPS 血小板は、HLA クラス I の型を問わずに輸血可能な“ユニバーサル”製剤となります。

一方、HLA 欠失血小板は、血小板輸血不応症の原因となる抗 HLA 抗体に攻撃されないものの、HLA クラス I の発現が低下した細胞を攻撃することが知られている NK 細胞に影響を受けないかは分かっていませんでした。そこで、培養皿内での NK 細胞の反応性の検証に加え、熊本大学との共同研究を通じて、NK 細胞を含むヒト血球系を持つマウスモデルを確立し、実際に HLA クラス I 欠失血小板が免疫システムに排除されることなく体内を循環することを確認しました。

本研究の成果は NK 細胞に攻撃されにくいという血小板のユニークな免疫特性を明らかにするとともに、HLA 欠失 iPS 血小板が、血小板輸血不応症の場合にも有用なユニバーサルな製剤となることを実証し、iPS 血小板の産業化に向けた基盤となります。

この研究成果は 2019 年 12 月 26 日午前 11 時 (米国時間 : 日本時間 12 月 27 日午前 1 時) に米国科学誌「Stem Cell Reports」でオンライン公開されました。



論文の概要図

iPS 細胞から、ゲノム編集によって HLA クラス I が欠失した巨核球株を作製し、血小板を製造した。この血小板は培養皿内で NK 細胞に攻撃されないことに加え、新たに確立したマウスモデルにおいて問題なく循環することを実証した。HLA クラス I 欠失 iPSC 血小板は万人に輸血可能な“ユニバーサル”製剤として期待ができる。

2. 研究の背景

血小板輸血患者の 5%程度に起こる、免疫反応が関与する血小板輸血不応症では、血小板の型が合致しないと拒絶されてしまうため献血可能なドナーが限られ、供給が不足するリスクは高くなります。このような血小板輸血不応症は、妊娠や血小板輸血を通じて、自分と異なる HLA クラス I に対する抗体ができてしまうのが主因となっています。そのため HLA クラス I を欠失させることにより、抗 HLA クラス I 抗体に拒絶されない“ユニバーサル”な血小板製剤の開発が検討されていました。

江藤教授、杉本講師らのグループは、2010 年にヒト iPS 細胞から血小板が生産できることを発表しましたが、輸血に必要なスケールでの血小板作製技術を開発するため、血小板を生み出す巨核球に着目して研究を進めてきました。2014 年に、ヒト iPS 細胞から自己複製が可能な巨核球を誘導することに成功し、生体外で凍結保存も可能な不死化巨核球株(imMKCL)として作製する方法を確立しました(中村ら 2014)。2018 年には、巨核球から血小板が出来るには「乱流」が重要なことを見出し、乱流が生じるバイオリクター機を開発し、良質の血小板を効率よく作ることで、輸血に必要な量を製造することに成功しました(伊東、中村ら 2018)。

この imMKCL から作られる血小板が HLA クラス I を発現しないように遺伝子操作をすれば、血小板輸血不応症にも有効な血小板製剤が、実際に輸血製剤スケールに対応可能なシステムで作れることとなります。一方、血小板に限らず HLA クラス I が欠失した細胞を輸血あるいは移植しても NK 細胞に拒絶されないかの検証はこれまで十分には行われていませんでした。NK 細胞は、ウイルス感染細胞や腫瘍細胞な

どを含む HLA クラス I の発現が低下した細胞を攻撃することが知られていますが、ヒト NK 細胞を有し、HLA 欠失細胞が拒絶される動物モデルは確立されていませんでした。

3. 研究結果

1) ゲノム編集技術を用いて HLA クラス I 欠失 iPS 血小板の製造に成功

まず、HLA クラス I を発現しない血小板を作るため、iPS 細胞から HLA クラス I の構成分子である β マイクログロブリン (B2M)^{注8)} をゲノム編集により欠失させました。この B2M 欠失 iPS 細胞から imMKCL を作製し、HLA クラス I を発現しない血小板 (HLA 欠失 iPS 血小板) を製造することに成功しました。

HLA 欠失 iPS 血小板は、HLA 欠失操作を行っていない iPS 血小板 (野生型 iPS 血小板) と比較して、産生性やサイズ、血小板表面分子の発現や形状において、また、品質と機能面において、同等であることを確認しました。

2) HLA 欠失 iPS 血小板は NK 細胞に攻撃されない

次に、HLA クラス I の発現を失った細胞を攻撃することが知られている NK 細胞が血小板を攻撃しないかの検証を行うため、ヒト NK 細胞と培養皿での共培養実験を行いました。10 人以上の健常人ボランティアの血液から単離した NK 細胞は、HLA クラス I の発現が欠失した白血病細胞株 K562 に対しては攻撃活性の指標である CD107a の発現がはっきりと上昇していましたが、iPS 血小板に関しては HLA の有無によらず CD107a の発現上昇は全く見られませんでした (図 1)。

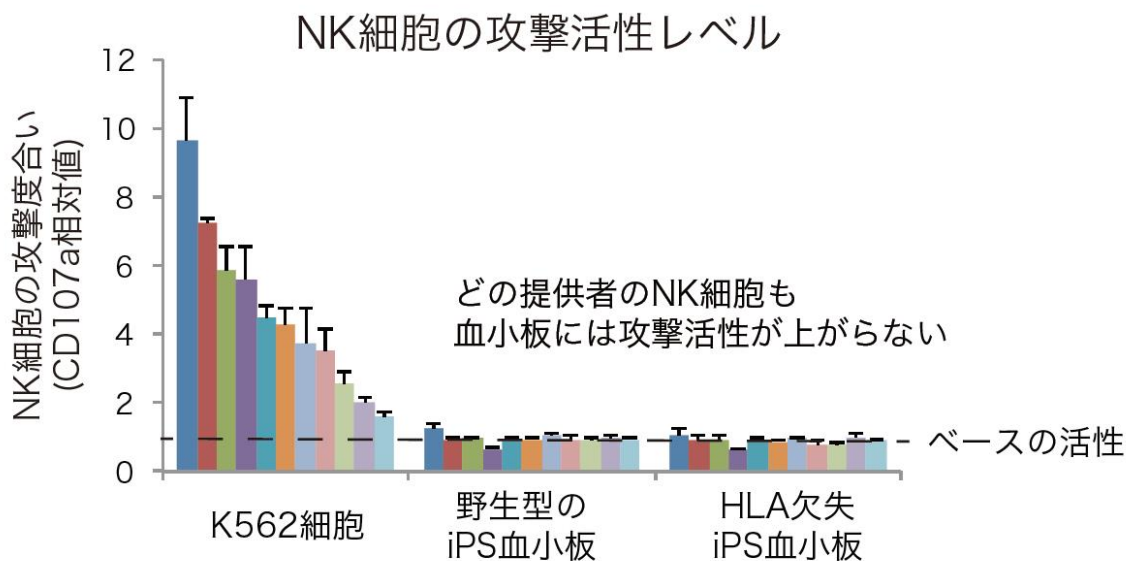


図 1: NK 細胞の攻撃活性レベルを示したグラフ
iPS 血小板は NK 細胞の攻撃活性を誘導しない

また、なぜ血小板が攻撃されないかの原因を探るため、NK 細胞を活性化したり、逆に抑制する分子の発現を検証しました。フローサイトメトリー法^{注9)}で細胞表面の分子の発現を解析したところ、K562 細胞に発現しているような、NK 細胞を活性化する分子発現は認めませんでした。他方、NK 細胞を抑制する分子などが血小板に発現していることもありませんでした。これらのことから、血小板が NK 細胞に攻撃されないのは、積極的に抑制することはないものの、活性化する分子を発現しないことが一因と示唆されました。

3) NK 細胞も含めたヒト免疫細胞を持ったマウスを確立し、HLA 欠失 iPS 血小板の循環を動物モデルで実証

さらに、HLA 欠失 iPS 血小板が実際に生体内で NK 細胞にも攻撃されずに循環するかを検証しました。熊本大学との共同研究により、まずヒト免疫細胞を持つマウスモデルの作出を行いました。このマウスにヒト臍帯血由来の造血幹細胞を移入することによりヒト造血をマウスの体内で行えるようにし、NK 細胞増殖促進因子を投与してヒト NK 細胞を増やしました。次に、血小板輸血不応症の状態を再現するため、抗 HLA クラス I 抗体を投与した状態で、HLA 欠失型と野生型の iPS 血小板を混ぜて投与して iPS 血小板の循環実験を行いました。投与した抗体が HLA を認識しないコントロール抗体の場合は、iPS 血小板の HLA 欠失型と野生型の比率は時間が経っても変わりませんでした。抗 HLA クラス I 抗体を投与した場合には、iPS 血小板投与 30 分後の野生型の比率が減少し、3 時間後以降は HLA 欠失型のみが循環していました(図 2)。これらのことから、HLA 欠失 iPS 血小板は、高い NK 細胞数が保たれている免疫応答状態でも、HLA クラス I による血小板輸血不応症の状態でも有効であることが動物モデルで実証されました。

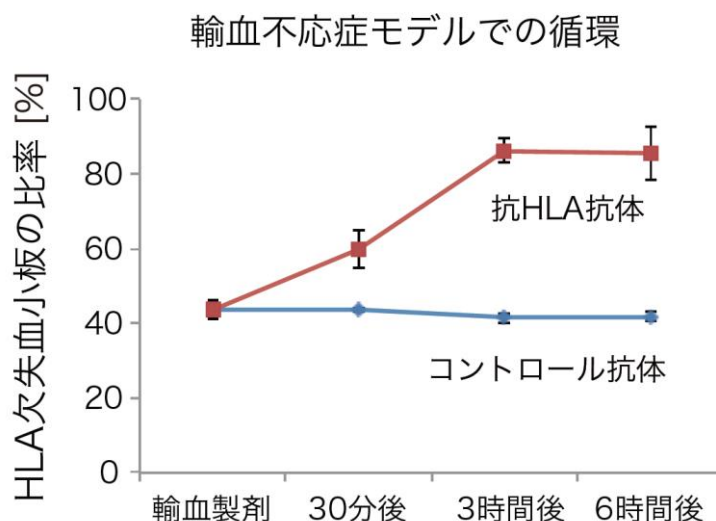


図 2: HLA 欠失 iPS 血小板のマウスモデルでの検証

4. 本研究の意義と今後の展望

本研究では、臨床応用が進められている iPS 血小板システムに HLA クラス I 欠失技術を組み込むことに成功し、NK 細胞を含めた培養皿での実験と動物モデルを用いた免疫反応の検証を行い、HLA 欠失 iPS 血小板が抗 HLA 抗体、NK 細胞の何れからも攻撃されないことを確認しました。この成果は、HLA 欠失 iPS 血小板が“ユニバーサル”な HLA 適合製剤として使用できる概念実証(POC: proof-of-concept)に当たります。HLA 欠失 iPS 血小板の臨床応用は、HLA クラス I の不適合に由来する血小板輸血不応症の方の供給リスクの解消と、iPS 血小板のコスト低減にも繋がると期待されます(図 3)。

さらに本研究は、血小板が HLA クラス I を発現していなくても生体内のヒト NK 細胞に攻撃されないというユニークな特性を突き止めました。このような免疫的な性質、そして imMKCL マスターセルから無菌的に均一な製剤を製造が出来ることから、HLA 欠失 iPS 血小板は、創傷部位の再生やドラッグ・デリバリー・システム^{注 10)}など、血小板の様々な新しい用途にも有用と考えられます。

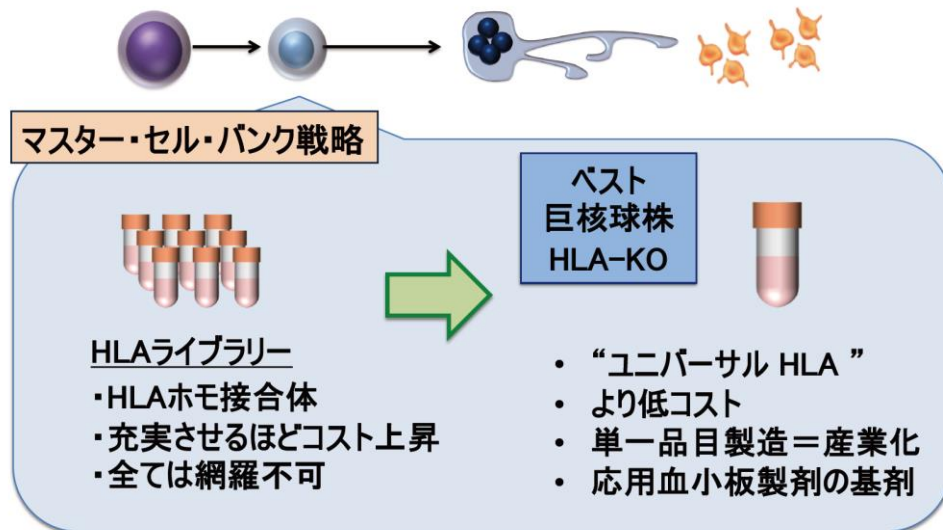


図 3:HLA 欠失 iPS 血小板製の展望

従来の巨核球株マスターセルバンク戦略では、HLA クラス I を適合させるには多くのライブラリーを取り揃える必要があるが、HLA 欠失 iPS 血小板であれば最適な株から“ユニバーサル”単一製剤として製造が可能であり、産業化につながる。また均一な品質は血小板の応用治療の器材としても適している。

5. 論文名と著者

○ 論文名

“iPSC-derived platelets depleted of HLA class-I are inert to anti-HLA class-I and NK cell immunity”

○ ジャーナル名

Stem Cell Reports

○ 著者

Daisuke Suzuki¹, Charlotte Flahou¹, Norihide Yoshikawa¹, Ieva Stirblyte¹, Yoshikazu Hayashi², Akira Sawaguchi³, Marina Akasaka¹, Sou Nakamura¹, Natsumi Higashi¹, Huaigeng Xu¹, Takuya Matsumoto¹, Kosuke Fujio^{1,4}, Markus G Manz⁵, Akitsu Hotta¹, Hitoshi Takizawa², Koji Eto^{1,6,*}, Naoshi Sugimoto^{1,*}

○ 著者の所属機関

1. 京都大学 iPS 細胞研究所 (CiRA)
2. 熊本大学 国際先端医学研究機構 (IRCMS)
3. 宮崎大学医学部 解剖学講座
4. 大塚製薬株式会社 先端創薬研究所
5. University and University Hospital Zurich, Switzerland
6. 千葉大学 再生治療学研究センター

*:共同責任著者

6. 本研究への支援

本研究は、下記機関より支援を受けて実施されました。

-
-
- AMED 再生医療実現拠点ネットワークプログラム 再生医療の実現化ハイウェイ「iPS 細胞技術を基盤とする血小板製剤の開発と臨床試験」
 - AMED 再生医療実現拠点ネットワークプログラム(技術開発個別課題)「HLA クラス I 欠失ユニバーサル血小板の産業化導出に向けた研究開発」
 - AMED 再生医療実現拠点ネットワークプログラム iPS 細胞研究中核拠点
 - 日本学術振興会 基盤研究
 - 日本学生支援機構第一種奨学金
 - 日本政府(文部科学省)奨学金(国費外国人留学生)

7. 用語説明

注 1)HLA クラス I

HLA はヒトの主要組織適合遺伝子複合体(MHC)であるヒト白血球型抗原(Human Leukocyte Antigen)の略で、HLA クラス I は本来病原体成分タンパクなどの一部を乗せて T リンパ球に示すことで強力な免疫反応を引き起こすが、免疫システムは自己と異なる HLA に対しては病原体タンパクの有無によらず強く反応する。HLA の型は非常に多様で、A 座(HLA-A)、B 座(HLA-B)などと呼ばれる組み合わせで構成されており、各座に数十種類の型があるため、あわせて数万通りの組み合わせがある。細胞や組織が移植されて起こる拒絶反応の最大の要因は、HLA の型が異なっていることによる。

注 2)血小板

血液に含まれる細胞成分であり、出血の際、血小板の活性化が起こって血小板どうしが凝集して傷口を塞ぐ働きをする。骨髄にいる巨核球から分離して作られる。

注 3)血小板輸血不応症

血小板を輸血しても、血小板数が想定よりも増えない状態。

注 4)抗 HLA 抗体

自分と異なる HLA に反応する抗体。血小板には HLA クラス I が発現しており、妊娠や血小板輸血を契機に抗 HLA 抗体が出来ると、血小板輸血不応症になる。

注 5)NK 細胞

免疫においてはたらく細胞の一種。NK 細胞は HLA に提示される抗原特異的な免疫反応を示さず、非特異的に細胞を障害するといった免疫反応(自然免疫)を示す。ただし、主に自己の HLA クラス I により活動が抑制されることが分かっている

注 6)ゲノム編集技術

ゲノム編集技術とは、ゲノムの特定標的部位に DNA 損傷を誘導することで DNA 配列を編集する技術の一つ。CRISPR(Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat)-Cas9 という DNA 切断酵素と、切断させたい場所へと Cas9 を誘導するガイド RNA を使うことで、任意の場所の DNA を切断することができる。切断された DNA が修復する際にゲノム DNA の一部が欠失するため、遺伝子の機能(タンパク質発現)をノックアウトすることができる。

注 7)巨核球株(imMKCL)

巨核球は造血幹細胞から作られ、血小板を生み出す細胞。巨核球は成熟すると核分裂はするが細胞分裂はしないという特殊な分裂を行い、大型で多核の細胞になる。imMKCL は、iPS 細胞から出来る巨核球に遺伝子導入をすることにより樹立された、増幅と成熟の切り替えが可能な細胞株。

注 8) $\beta 2$ マイクログロブリン(B2M)

HLA クラス I の構成成分の一つで、B2M の遺伝子を欠失させると HLA クラス I を発現しなくなる。

注 9) フローサイトメトリー解析

流動細胞計測法。レーザー光を用いて光散乱や蛍光測定を行うことにより、水流の中を通過する単一細胞の大きさ、DNA 量など、細胞の生物学的特徴を解析することができる。

注 10) ドラッグ・デリバリー・システム

体内の薬物分布を量的・空間的・時間的に制御し、コントロールする薬物伝達システムのことである。血小板は薬剤を運ぶキャリアーとしても研究がされている。