

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7649562号
(P7649562)

(45)発行日 令和7年3月21日(2025.3.21)

(24)登録日 令和7年3月12日(2025.3.12)

(51)国際特許分類		F I	
C 1 2 N	15/09 (2006.01)	C 1 2 N	15/09 1 1 0
C 1 2 N	15/12 (2006.01)	C 1 2 N	15/12 Z N A
C 1 2 N	15/90 (2006.01)	C 1 2 N	15/90 1 0 0 Z
C 1 2 N	1/15 (2006.01)	C 1 2 N	1/15
C 1 2 N	1/19 (2006.01)	C 1 2 N	1/19
請求項の数 14 (全55頁) 最終頁に続く			
(21)出願番号	特願2022-576241(P2022-576241)	(73)特許権者	504132272
(86)(22)出願日	令和2年9月14日(2020.9.14)		国立大学法人京都大学
(65)公表番号	特表2023-515907(P2023-515907		京都府京都市左京区吉田本町36番地1
	A)	(74)代理人	100165179
(43)公表日	令和5年4月14日(2023.4.14)		弁理士 田▲崎▼ 聡
(86)国際出願番号	PCT/JP2020/035368	(74)代理人	100188558
(87)国際公開番号	WO2021/166306		弁理士 飯田 雅人
(87)国際公開日	令和3年8月26日(2021.8.26)	(74)代理人	100175824
審査請求日	令和5年8月24日(2023.8.24)		弁理士 小林 淳一
(31)優先権主張番号	62/978,312	(74)代理人	100152272
(32)優先日	令和2年2月19日(2020.2.19)		弁理士 川越 雄一郎
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)	(74)代理人	100181722
	特許法第30条第2項適用 (1) 発行日 令和1年9	(72)発明者	弁理士 春田 洋孝
月15日 刊行物 EMBO/FEB S Lecture	最終頁に続く		ウォルツェン クヌート
			京都府京都市左京区吉田本町36番地1
			最終頁に続く

(54)【発明の名称】 ゲノム編集された細胞の製造方法及びそのためのキット

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

ゲノム編集された細胞（但し、ヒト生体内に存在している細胞、ヒト生殖細胞、ヒト胚細胞を除く。）の製造方法であって、

前記細胞の細胞周期を同調させることと、
前記細胞を、DNA修復経路を改変する薬剤で処理することと、
前記細胞にドナーDNAを導入することと、
前記ドナーDNAの存在下で前記細胞のゲノムDNAに配列特異的二本鎖切断を誘導し、その結果、前記二本鎖切断が前記ドナーDNAの塩基配列の全部又は一部に基づいて相同組換え修復経路又は同等の経路により修復され、ゲノムが編集された前記細胞が得られることと、

を含み、
前記細胞の細胞周期を同調させることが、前記細胞を25 から35 で24時間から72時間、インキュベートすること、及び、前記細胞をXL413（CAS番号：1169558-38-6）で処理することを含み、
DNA修復経路を改変する前記薬剤が、NU7441（CAS番号：503468-95-9）及びSCR7（CAS番号：14892-97-8）を含む、ゲノム編集された細胞の製造方法。

【請求項2】

前記配列特異的二本鎖切断が、Cas9及びgRNAを含むリボヌクレオタンパク質（

ribonucleoprotein、RNP)複合体によって誘導される、
請求項 1 に記載の製造方法。

【請求項 3】

前記ドナーDNAが、一本鎖ドナーオリゴヌクレオチドである、
請求項 1 又は 2 に記載の製造方法。

【請求項 4】

前記ドナーDNAが、プロトSpacer配列又はプロトSpacer隣接モチーフ(Protospacer Adjacent Motif、PAM)配列を改変するヌクレオチド配列を有する、

請求項 3 に記載の製造方法。

10

【請求項 5】

前記ドナーDNAが変異を有し、前記変異が一方又は両方のアレルに導入された細胞が得られる、

請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の製造方法。

【請求項 6】

前記ドナーDNAが、前記ゲノム上の同じ領域と対応する、複数種類のドナーDNAの組合せを含む、

請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の製造方法。

【請求項 7】

前記ドナーDNAが、第1ドナーDNAと第2ドナーDNAとの組合せを含み、

20

前記第1ドナーDNAが関心対象の変異を有し、前記第2ドナーDNAがプロトSpacer配列又はPAM配列を改変する変異を有し、

前記関心対象の変異が一方のアレルにしか導入されず、他方のアレルのプロトSpacer配列又はPAM配列が改変された細胞が得られる、

請求項 6 に記載の製造方法。

【請求項 8】

前記細胞が、人工多能性幹(induced pluripotent stem、iPS)細胞である、

請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の製造方法。

【請求項 9】

30

細胞(但し、ヒト生体内に存在している細胞、ヒト生殖細胞、ヒト胚細胞を除く。)のゲノムを編集する方法であって、

前記細胞の細胞周期を同調させることと、

前記細胞を、DNA修復経路を改変する薬剤で処理することと、

前記細胞にドナーDNAを導入することと、

前記ドナーDNAの存在下で前記細胞のゲノムDNAに配列特異的二本鎖切断を誘導し、その結果、前記二本鎖切断が前記ドナーDNAの塩基配列の全部又は一部に基づいて相同組換え又は同等の経路により修復され、ゲノムが編集された前記細胞が得られることと、
を含み、

前記細胞の細胞周期を同調させることが、前記細胞を 25 から 35 で 24 時間から 72 時間、インキュベートすること、及び、前記細胞を XL413 で処理することを含み、DNA修復経路を改変する前記薬剤が、NU7441 及びSCR7 を含む、細胞のゲノムを編集する方法。

40

【請求項 10】

一方又は両方のアレル上のゲノム編集を検出する方法であって、

ドナーDNAを細胞(但し、ヒト生体内に存在している細胞、ヒト生殖細胞、ヒト胚細胞を除く。)に導入することであって、前記細胞は、両方のアレル内に第1の蛍光を発する蛍光タンパク質をコードする遺伝子を有し、前記ドナーDNAは、前記蛍光タンパク質の第1の蛍光を第2の蛍光に改変する変異を有する、ドナーDNAを細胞に導入することと、

50

前記ドナーDNAの存在下で前記細胞のゲノムDNAに配列特異的二本鎖切断を誘導し、その結果、前記二本鎖切断が前記ドナーDNAの塩基配列の全部又は一部に基づいて相同組換え修復経路又は同等の経路により修復され、ゲノム編集された前記細胞が得られることと、

前記ゲノム編集された細胞の前記蛍光を分析することと、
を含み、結果として、

(i) 第1の蛍光が検出され、第2の蛍光が検出されない場合、

(i - 1) 前記蛍光タンパク質の遺伝子座の両方のアレルは変化しなかったこと、又は

(i - 2) 前記蛍光タンパク質の遺伝子座の一方のアレルは変化せず、他方のアレル内で挿入変異又は欠失変異が起きたことが示され、

10

(i i) 第1の蛍光が検出されず、第2の蛍光が検出される場合、

(i i - 1) 前記蛍光タンパク質の遺伝子座の両方のアレルは前記ドナーDNAの塩基配列の全部又は一部に基づいて相同組換え修復経路又は同等の経路により修復されたこと、又は

(i i - 2) 前記蛍光タンパク質の遺伝子座の一方のアレルは前記ドナーDNAの塩基配列の全部又は一部に基づいて相同組換え修復経路又は同等の経路により修復され、他方のアレル内で挿入変異又は欠失変異が起きたことが示され、

(i i i) 第1の蛍光も第2の蛍光も検出されない場合、前記蛍光タンパク質の遺伝子座の両方のアレル内で挿入変異又は欠失変異が起きたことが示され、

(i v) 第1の蛍光と第2の蛍光の両方が検出される場合、前記蛍光タンパク質の遺伝子座の一方のアレルは前記ドナーDNAの塩基配列の全部又は一部に基づいて相同組換え修復経路又は同等の経路により修復され、他方のアレルは変化しなかったことが示される、一方又は両方のアレル上のゲノム編集を検出する方法。

20

【請求項11】

第1の蛍光を発する前記蛍光タンパク質が緑色蛍光タンパク質 (Green Fluorescent Protein、GFP) であり、第2の蛍光を発する前記蛍光タンパク質が青色蛍光タンパク質 (Blue Fluorescent Protein、BFP) であって、前記ドナーDNAがGFPの66番目のチロシン残基をヒスチジン残基に置換してBFPに改変する変異を有する、

請求項10に記載の方法。

30

【請求項12】

XL413、NU7441、及びSCR7を含む、ゲノム編集用キット。

【請求項13】

配列特異的DNA切断酵素及びドナーDNAを更に含む、

請求項12に記載のゲノム編集用キット。

【請求項14】

前記ドナーDNAが、GFPの66番目のチロシン残基をヒスチジン残基に置換してBFPに改変する変異を有する、

請求項13に記載のゲノム編集用キット。

【発明の詳細な説明】

40

【技術分野】

【0001】

本発明は、ゲノム編集された細胞の製造方法及びそのためのキットに関する。より詳細には、本発明は、ゲノム編集された細胞の製造方法、細胞のゲノムを編集する方法、一方又は両方のアレル上の遺伝子編集を検出する方法、及びゲノム編集用キットに関する。本発明は、2020年2月19日に出願された米国仮特許出願第62/978,312号における優先権を主張するものであり、上記仮特許出願の内容は参照により本明細書に組み込まれる。

【背景技術】

【0002】

50

ヒト人工多能性幹 (induced pluripotent stem、iPS) 細胞は、連続継代を通じた正常な二倍体核型を維持し、複数の誘導細胞型に分化するその能力により、遺伝性疾患を含めたヒト疾患を研究するため広く採用されている。一般に、遺伝子のモデル化は、特定のDNA配列を欠失すること、挿入すること、又は置換することのいずれかにより標的部位を改変することで構成される。より詳細には、高精度の遺伝子編集は、一塩基部分で病原性バリエーションを修正又は再形成するためにゲノム内で改変を行うことを目的とする。CRISPR-Cas9システムは、後に内因性細胞DNA DSB修復経路によって回復されることとなる、ゲノム内での標的DNA二本鎖切断 (DNA double strand breaks、DSBs) を作成するために最も使用されるツールである。主に、非相同末端結合 (nonhomologous end joining、NHEJ) は挿入と欠失 (insertion and deletion、indel) の変異をもたらし、一方でマイクロホモロジー媒介末端結合 (microhomology-mediated end joining、MMEJ) は予測可能な欠失を起こす。NHEJとMMEJは、双方の修復アウトカムによりDNA配列の損失又は獲得がもたらされる可能性があることから、まとめて変異原性末端結合 (mutagenic end joining、MuteJ) と呼ばれる。一塩基変化や他のデザインされた改変を作り出すため、相同組換え修復 (homology directed repair、HDR) 経路は、PCR断片、ドナープラスミド、又は一本鎖ドナーオリゴヌクレオチド (single stranded donor oligonucleotide、ssODN) 等、カスタマイズされた一本鎖又は二本鎖のDNA修復鋳型との組合せで活用される。

10

20

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0003】

【文献】Howden S.E., et al., A Cas9 Variant for Efficient Generation of Indel-Free Knockin or Gene-Corrected Human Pluripotent Stem Cells, Stem Cell Reports, 7(3), 508-517, 2016.

【文献】Alewo Idoko-Akoh, et al., High fidelity CRISPR/Cas9 increases precise monoallelic and biallelic editing events in primordial germ cells, Sci Rep, 8(1):15126, 2018.

30

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

しかし、最近のアプローチは主として、直接選択が欠如していること、及び正確な修復よりもMuteJのアウトカムが支配的であることにより、効率性と適用性が限定されてきた (例えば、非特許文献1及び2を参照)。

【0005】

本発明は、ゲノム内の標的DNA二本鎖切断 (DSBs) が相同組換え修復 (HDR) 経路又は同等の経路 (代替経路) によって修復される、ゲノム編集された細胞を効率的に製造する技術を提供することを目的とする。

40

【課題を解決するための手段】

【0006】

本発明は、以下の態様を含む。

[1] ゲノム編集された細胞の製造方法であって、前記細胞の細胞周期を同調させることと、前記細胞を、DNA修復経路を改変する薬剤で処理することと、前記細胞にドナーDNAを導入することと、前記ドナーDNAの存在下で前記細胞のゲノムDNAに配列特異的二本鎖切断を誘導し、その結果、前記二本鎖切断が前記ドナーDNAの塩基配列の全部又は一部に基づいて相同組換え修復経路又は同等の経路により修復され、ゲノムが編集された前記細胞が得られることと、を含む、ゲノム編集された細胞の製造方法。

[2] 前記細胞の細胞周期を同調させることが、前記細胞を25 から35 で24時間

50

から 7 2 時間、インキュベートすることを含む、[1] に記載の製造方法。

[3] 前記細胞の細胞周期を同調させることが、前記細胞を *Cell Division Cycle 7 (CDC7)* 阻害剤で処理することを含む、[1] 又は [2] に記載の製造方法。

[4] DNA 修復経路を改変する前記薬剤が、DNA - PK 阻害剤又は DNA リガーゼ I V 阻害剤を含む、[1] ~ [3] のいずれかに記載の製造方法。

[5] DNA 修復経路を改変する前記薬剤が、DNA - PK 阻害剤と DNA リガーゼ I V 阻害剤との組合せを含む、[1] ~ [4] のいずれかに記載の製造方法。

[6] 前記配列特異的二本鎖切断が、Cas 9 及び gRNA を含みリボヌクレオタンパク質 (RNP) 複合体によって誘導される、[1] ~ [5] のいずれかに記載の製造方法。

[7] 前記ドナー DNA が、一本鎖ドナーオリゴヌクレオチドである、[1] ~ [6] のいずれかに記載の製造方法。

[8] 前記ドナー DNA が、プロトスペーサー配列又はプロトスペーサー隣接モチーフ (PAM) 配列を改変するヌクレオチド配列を有する、[7] に記載の製造方法。

[9] 前記ドナー DNA が変異を有し、前記変異が一方又は両方のアレルに導入された細胞が得られる、[1] ~ [8] のいずれかに記載の製造方法。

[10] 前記ドナー DNA が、前記ゲノム上の同じ領域と対応する、複数種類のドナー DNA の組合せを含む、[1] ~ [9] のいずれかに記載の製造方法。

[11] 前記ドナー DNA が、第 1 ドナー DNA と第 2 ドナー DNA との組合せを含み、前記第 1 ドナー DNA が関心対象の変異を有し、前記第 2 ドナー DNA がプロトスペーサー配列又は PAM 配列を改変する変異を有し、前記関心対象の変異が一方のアレルにしか導入されず、他方のアレルのプロトスペーサー配列又は PAM 配列が改変された細胞が得られる、[10] に記載の製造方法。

[12] 前記細胞が、人工多能性幹 (iPS) 細胞である、[1] ~ [11] のいずれかに記載の製造方法。

[13] 細胞のゲノムを編集する方法であって、前記細胞の細胞周期を同調させることと、前記細胞を、DNA 修復経路を改変する薬剤で処理することと、前記細胞にドナー DNA を導入することと、前記ドナー DNA の存在下で前記細胞のゲノム DNA に配列特異的二本鎖切断を誘導し、その結果、前記二本鎖切断が前記ドナー DNA の塩基配列の全部又は一部に基づいて相同組換え又は同等の経路により修復され、ゲノムが編集された前記細胞が得られることと、を含む、細胞のゲノムを編集する方法。

[14] 一方又は両方のアレル上のゲノム編集を検出する方法であって、ドナー DNA を細胞に導入することであって、前記細胞は、両方のアレル内に第 1 の蛍光を発する蛍光タンパク質をコードする遺伝子を有し、前記ドナー DNA は、前記蛍光タンパク質の第 1 の蛍光を第 2 の蛍光に改変する変異を有する、ドナー DNA を細胞に導入することと、前記ドナー DNA の存在下で前記細胞のゲノム DNA に配列特異的二本鎖切断を誘導し、その結果、前記二本鎖切断が前記ドナー DNA の塩基配列の全部又は一部に基づいて相同組換え修復経路又は同等の経路により修復され、ゲノム編集された前記細胞が得られることと、前記ゲノム編集された細胞の前記蛍光を分析することと、を含み、結果として、(i) 第 1 の蛍光が検出され、第 2 の蛍光が検出されない場合、(i - 1) 前記蛍光タンパク質の遺伝子座の両方のアレルは変化しなかったこと、又は (i - 2) 前記蛍光タンパク質の遺伝子座の一方のアレルは変化せず、他方のアレル内で挿入変異又は欠失変異が起きたことが示され、(i i) 第 1 の蛍光が検出されず、第 2 の蛍光が検出される場合、(i i - 1) 前記蛍光タンパク質の遺伝子座の両方のアレルは前記ドナー DNA の塩基配列の全部又は一部に基づいて相同組換え修復経路又は同等の経路により修復されたこと、又は (i i - 2) 前記蛍光タンパク質の遺伝子座の一方のアレルは前記ドナー DNA の塩基配列の全部又は一部に基づいて相同組換え修復経路又は同等の経路により修復され、他方のアレル内で挿入変異又は欠失変異が起きたことが示され、(i i i) 第 1 の蛍光も第 2 の蛍光も検出されない場合、前記蛍光タンパク質の遺伝子座の両方のアレル内で挿入変異又は欠失変異が起きたことが示され、(i v) 第 1 の蛍光と第 2 の蛍光の両方が検出される場合

10

20

30

40

50

、前記蛍光タンパク質の遺伝子座の一方のアレルは前記ドナーDNAの塩基配列の全部又は一部に基づいて相同組換え修復経路又は同等の経路により修復され、他方のアレルは変化しなかったことが示される、一方又は両方のアレル上のゲノム編集を検出する方法。

【15】第1の蛍光を発する前記蛍光タンパク質が緑色蛍光タンパク質（GFP）であり、第2の蛍光を発する前記蛍光タンパク質が青色蛍光タンパク質（BFP）であって、前記ドナーDNAがGFPの66番目のチロシン残基をヒスチジン残基に置換してBFPに改変する変異を有する、【14】に記載の方法。

【16】CDC7阻害剤、DNA-PK阻害剤、及びDNAリガーゼIⅤ阻害剤を含む、ゲノム編集用キット。

【17】配列特異的DNA切断酵素及びドナーDNAを更に含む、【16】に記載のゲノム編集用キット。 10

【18】前記ドナーDNAが、GFPの66番目のチロシン残基をヒスチジン残基に置換してBFPに改変する変異を有する、【17】に記載のゲノム編集用キット。

【発明の効果】

【0007】

本発明によれば、ゲノム内の標的DNA二本鎖切断（DSBs）が相同組換え修復（HDR）経路又は同等の経路によって修復される、ゲノム編集された細胞を効率的に製造するための技術を提供することができる。

【図面の簡単な説明】

【0008】 20

【図1A】図1A～図1Eは、ヒトiPS細胞内での蛍光DNA修復アッセイのDNA修復アウトカムの可視化及び定量化を示す図である。図1Aは、GFPレポーター標的部位の配列（配列番号：60及び61）及びBFPへの設計された改変を示す図である。gRNA GFP×199の配列（配列番号：62）、GFP蛍光残基p.Y66（配列番号：60）、及びBFP蛍光残基p.H66（配列番号：64）が示されている。ヌクレオチド変化がssODN配列（配列番号：63）に導入され、生じたBFP配列産物（配列番号：64）に導入される。

【0009】

【図1B】ヘテロ接合AAVS1-CAG::EGFP（GFP）iPS細胞株内でのGFP編集の予想アウトカムとそのFACSにおける分布の概略図である。 30

【0010】

【図1C】編集されていないヘテロ接合GFP iPS細胞株（コントロール）と、Cas9 RNPとY66H ssODN修復鋳型との同時導入（RNP+ssODN）後の蛍光変換アウトカムとの、共焦点顕微鏡画像を示す図である。スケールバーは100μmである。同様の結果を有する3つの独立した実験からの代表画像が示されている。

【0011】

【図1D】編集されていないGFP iPS細胞（上段）及びCas9 RNPとY66H ssODNとで処理された細胞（下段）の代表FACSプロット図である。

【0012】

【図1E】FACS分析によるHDR DNA修復アウトカム、MutEJ DNA修復アウトカム、又は非改変DNA修復アウトカムの定量化を示す図である。データは、各条件について独立したエレクトロポレーションの3つの技術的複製の平均値±S.D.として提示されている。 40

【0013】

【図2A】図2A～図2Fは、低温ショック及びXL413を用いた細胞周期同調化がiPS細胞内のHDR効率を改善することを示す図である。図2Aは、低温ショックなし【A】、及び第0日目のエレクトロポレーション（EP）後24時間の低温ショック【B】又はエレクトロポレーション（EP）後48時間の低温ショック【C】の実験タイムラインを示す図である（上段）。培養の48時間後にEdU/PI染色が実施され、第8日目にFACS分析が実施された。DNA修復アウトカム頻度に対する得られた効果を示す図 50

である（下段）。

【 0 0 1 4 】

【図 2 B】図 2 A で測定された HDR / Mut E J 修復アウトカムの比率を示す図である。統計学的有意性は独立両側 t 検定で計算され、P 値は $** p < 0.01$ 、 $*** p < 0.001$ で示される。低温ショックは HDR / Mut E J 比を有意に改善した。

【 0 0 1 5 】

【図 2 C】低温ショックなし [A] 又は E P 後 48 時間低温ショック [C] における、E P の 48 時間後の細胞周期定量化（中段左）の EdU / PI 染色の代表 FACS プロット（上段）及び S 期細胞の平均 EdU 強度（中段右）を示す図である。G2 / M 期での低温ショック停止を示す、細胞周期の概略図である（下段）。

10

【 0 0 1 6 】

【図 2 D】低温ショックなし [A] 又は低温ショックあり [C] における、E P 後 24 時間の XL - 413 誘導細胞周期停止の実験タイムラインを示す図である（上段）。培養の 24 時間後に EdU / PI 染色が実施され、第 8 日目に FACS 分析が実施された。XL 413 の非存在下又は存在下で定量化された修復アウトカムを示す図である（下段）。

【 0 0 1 7 】

【図 2 E】図 2 D で測定された HDR / Mut E J 修復アウトカムの比率を示す図である。統計学的有意性は独立両側 t 検定で計算され、P 値は $*** p < 0.001$ で示される。低温ショック及び XL 413 処理は HDR / Mut E J 比を有意に改善した。

【 0 0 1 8 】

【図 2 F】標準培養条件下 [A] での、未処理の細胞及び XL 413 で処理された細胞の E P の 24 時間後の EdU / PI 染色の代表 FACS プロット（上段）、ならびに細胞周期の定量化（中段左）及び S 期細胞の平均 EdU 強度（中段右）を示す図である。G1 / S 初期での XL 413 誘導細胞周期停止を示す概略図である（下段）。全てのデータは、各処理について 3 つの技術的複製の平均値 $\pm$ S . D . として提示されている。

20

【 0 0 1 9 】

【図 3 A】図 3 A ~ 図 3 J は、DNA 修復調節と細胞周期同調化とを組み合わせることによって、iPS 細胞内の HDR が相乗的に促進されることを示す図である。図 3 A は、分子標的に対する機能を記した試験化合物のリスト（左）、ならびに E P 処理前（4 時間）及び E P 処理後（48 時間）の化合物の実験タイムライン（右）を示す図である。

30

【 0 0 2 0 】

【図 3 B】DNA 修復アウトカム頻度についての効果を示す、低温ショック条件下 [C] での、未処理（-）コントロール及び DMSO 処理（DMSO）コントロールを含めた化合物のスクリーニングを示す図である。データは、3 つの生物学的複製の平均値 $\pm$ S . D . として提示されている。

【 0 0 2 1 】

【図 3 C】図 3 B で測定された HDR / Mut E J 修復アウトカムの比率を示す図である。

【 0 0 2 2 】

【図 3 D】低温ショック条件下 [C] での NU7441 と SCR7 との組合せ処理、及び修復アウトカム頻度についての効果とを示す図である。データは、N + S が 4 つの生物学的複製の平均値 $\pm$ S . D . として提示されていることを除いて、2 つの生物学的複製の平均値として提示されている。

40

【 0 0 2 3 】

【図 3 E】図 3 D で測定された HDR / Mut E J 修復アウトカムの比率を示す図である。

【 0 0 2 4 】

【図 3 F】標準培養条件下 [A] 又は低温ショック条件下 [C] での、E P 後（24 時間）の細胞周期阻害剤 XL 413（XL）と、E P 前（4 時間）及び E P 後（48 時間）の N + S との組合せ処理を示す図である。データは、各処理について 3 つの技術的複製の平均値 $\pm$ S . D . として提示されている。

【 0 0 2 5 】

50

【図 3 G】標準培養条件下 [A] 又は E P 後 4 8 時間の低温ショック条件下 [C] における、E P 後 2 4 時間の X L 4 1 3 (X L) と E P 前 4 時間及び E P 後 4 8 時間の N U 7 4 4 1 + S C R 7 (N + S) との組合せ処理をしたヘテロ接合 G F P i P S 細胞内での、H D R / M u t E J 修復アウトカムの比率を示す図である。統計学的有意性は独立両側 t 検定で計算され、P 値は $* * p < 0.01$ 、 $* * * p < 0.001$ で示される。単独処理及び組合せ処理は、未処理のコントロール (-) と比較して H D R / M u t E J 比を有意に改善した。

【 0 0 2 6 】

【図 3 H】相乗的編集に対応するための、単独処理対組合せ処理の統計分析を示す図である。統計学的有意性は独立両側 t 検定で計算され、P 値は $* p < 0.05$ 、 $* * p < 0.01$ 、 $* * * p < 0.001$ で示される。N E P A 2 1 エレクトロポレーションでは、X L + N + S 処理は X L 単独処理よりも有意に高かったが、N + S 単独処理よりは高くなかった。低温ショックと N + S との組合せ処理では、低温ショック処理単独と比較して有意に高かった。全ての条件を組み合わせた X L + N + S を用いた低温ショックは、低温ショック処理単独又は X L 処理単独と比較して有意な改善につながったが、N + S を用いた低温ショックと比較すると改善しなかった。

【 0 0 2 7 】

【図 3 I】F A C S 分析用に細胞を収集した、第 8 日目の図 3 G のサンプルを記録した細胞数を示す図である。各処理で細胞数の減少が観察されたが、高い変異性及びその結果としての低い統計学的有意性の原因となり得る追加的減少が組合せ処理条件で観察された。恐らく、N E P A 2 1 エレクトロポレーションとの組合せ処理、特に X L + N + S 組合せ処理から起こる低い生存率が、より高い複製変異性そして統計学的有意性のなさをもたらした可能性がある。これは細胞数が少ない場合に、クローン浮動を通して起きた可能性がある。

【 0 0 2 8 】

【図 3 J】図 3 F で試験された通り、標準条件下 [A] (左) 及び低温ショック条件下 [C] (右) における、X L 4 1 3 (X L) と N + S とを用いて処理された細胞の代表 F A C S プロット図である。

【 0 0 2 9 】

【図 4 A】図 4 A ~ 図 4 G は、i P S 細胞内での両アレル編集のアレル特異的 D N A 修復アウトカムを可視化及び定量化するためのホモ接合蛍光 D N A 修復アッセイを示す図である。図 4 A は、ホモ接合 A A V S 1 - C A G : : E G F P (G F P) i P S 細胞株内での G F P 編集の予想アウトカムとその F A C S における分布の概略図である。

【 0 0 3 0 】

【図 4 B】D N A 修復アウトカム頻度を示す、ヘテロ接合 G F P i P S 細胞及びホモ接合 G F P i P S 細胞内での、単一アレル編集と両アレル編集との比較を示す図である。H D R * は、ホモ接合 G F P i P S 細胞内でのヘテロ接合編集及び H D R 修復から生じたダブルポジティブ B F P / G F P 細胞を示す。

【 0 0 3 1 】

【図 4 C】図 4 B で測定された H D R / M u t E J 修復アウトカムの比率を示す図である。

【 0 0 3 2 】

【図 4 D】図 4 A で提示された可能な各 D N A 修復アウトカムに対する F A C S ゲーティングから得られた、ホモ接合 G F P i P S 細胞内両アレル修復アウトカムの定量化を示す図である。

【 0 0 3 3 】

【図 4 E】ホモ接合 G F P i P S 細胞内の修復アウトカム頻度について、低温ショックと薬剤処理との組合せの効果を示す図である。

【 0 0 3 4 】

【図 4 F】図 4 E で測定された H D R / M u t E J 修復アウトカムの比率を示す図である。

【 0 0 3 5 】

10

20

30

40

50

【図 4 G】図 4 E で提示された DNA 修復アウトカムから得られた、組合せ薬剤処理の存在下 (N + S) 又は非存在下 (-) での両アレル修復アウトカムを示す図である。全てのデータは、各処理について 3 つの技術的複製の平均値 $\pm$ S . D . として提示されている。

【 0 0 3 6 】

【図 5 A】図 5 A ~ 図 5 E は、ヘテロ接合変異の作成には一方のアレルを保護することが必要とされることを示す図である。図 5 A は、G F P レポーター内の標的配列 (配列番号 : 6 5 及び 6 6) と、ミスセンス Y 6 6 H 変異 (s s O D N M、配列番号 : 6 8 及び 6 9)、サイレント T 6 5 T 遮断変異 (s s O D N B、配列番号 : 7 0 及び 7 1)、又は変異なし (s s O D N W、配列番号 : 7 2 及び 7 3) を形成させる s s O D N 修復鑄型とを示す図である。s s O D N B T 6 5 T は HDR 修復により、保護された G F P (p G F P) アレルとなる。非改変アレル又は p G F P アレルを有する細胞は、F A C S による識別不能であり、累積的に G F P としてスコアされる。

10

【 0 0 3 7 】

【図 5 B】それぞれ単独での s s O D N M、s s O D N B、若しくは s s O D N W を用いた G F P 編集、又は M + B 組合せ及び M + W 組合せを用いた G F P 編集と、低温ショック条件下での DNA 修復アウトカム頻度に対する効果とを示す図である。HDR^{*} は、ヘテロ接合ダブルポジティブ B F P / G F P 修復アウトカムの頻度又は複合ヘテロ接合体ダブルポジティブ B F P / p G F P 修復アウトカムの頻度を示す。G F P ポジティブ細胞には、非改変細胞、及び HDR 媒介単一アレル p G F P / G F P 修復アウトカム、p G F P / 挿入欠失 () 修復アウトカム、又は両アレル p G F P / p G F P 修復アウトカムが含まれる。

20

【 0 0 3 8 】

【図 5 C】図 5 B で示された両アレル修復アウトカムの分布図である。

【 0 0 3 9 】

【図 5 D】図 5 C で測定された両アレル B F P / G F P 修復アウトカム頻度を示す図である。

【 0 0 4 0 】

【図 5 E】B F P 変換のみ (s s O D N M) 又は複合ヘテロ接合体 B F P / p G F P 変異 (s s O D N M + B) の代表 F A C S プロット図である。全てのデータは、各条件について独立したエレクトロポレーションの 3 つの技術的複製の平均値 $\pm$ S . D . として提示されている。

30

【 0 0 4 1 】

【図 6 A】図 6 A ~ 図 6 H は、内因性遺伝子座での相乗的遺伝子編集を示す図である。図 6 A は、4 0 9 B 2 遺伝的背景で産生された、ヘテロ接合 (H e t e r o) G F P i P S 細胞の DNA 修復アウトカムを示す図である。細胞は、標準培養条件下 (3 7) 又は低温ショック下 (3 2 、E P 後 4 8 時間) で、Y 6 6 H 変異体 s s O D N M のみ (s s O D N M) で標的にされ、単独で処理、又は E P 後 (2 4 時間) の細胞周期阻害剤 X L 4 1 3 (X L) と E P 前 (4 時間) 及び E P 後 (4 8 時間) の N + S との組合せとで処理された。

【 0 0 4 2 】

【図 6 B】M a x C y t e エレクトロポレーションを用いた、図 3 G と同じ処理条件でのヘテロ接合 G F P i P S 細胞内の HDR / M u t E J 修復アウトカムの比率を示す図である。統計学的有意性は独立両側 t 検定で計算され、P 値は * p < 0 . 0 5、** p < 0 . 0 1、*** p < 0 . 0 0 1 で示される。細胞生存率が一貫して高い M a x C y t e エレクトロポレーションでは、単独処理と比較して、X L + N + S 相乗条件と、低温ショックと N + S との相乗条件との両方が、有意に高い HDR / M u t E J 比を示した。このことにより、細胞周期と DNA 修復とを同時に調節する場合の相乗効果が存在するという知見が裏付けされる。

40

【 0 0 4 3 】

【図 6 C】4 0 9 B 2 遺伝的背景で産生されたホモ接合 (H o m o) G F P i P S 細胞

50

のDNA修復アウトカム及びHDR/MutEJ比を示す図である。細胞は、Y66H変異体ssODN Mのみ(ssODN M)で標的にされ、aに記載された通りに処理及び定量化された。HDR*は、ヘテロ接合ダブルポジティブBFP/GFPの頻度を示す。

【0044】

【図6D】図6Cで測定されたHDR/MutEJ修復アウトカムの比率を示す図である。

【0045】

【図6E】Y66H変異体ssODN MとT65Tサイレント遮断ssODN Bとの組合せ(ssODN M+B)で標的にされ、aに記載された通りに処理及び定量化されたホモ接合(Homo)GFP iPS細胞のDNA修復アウトカム及びHDR/MutEJ比を示す図である。ここでHDR*は、複合ヘテロ接合体ダブルポジティブBFP/pGFP修復アウトカムを示す。GFPポジティブ細胞は、非改変細胞、及びHDR媒介単一アレルpGFP/GFP修復アウトカム、pGFP/挿入欠失()修復アウトカム、又は両アレルpGFP/pGFP修復アウトカムからなる。

【0046】

【図6F】図6Eで測定されたHDR/MutEJ修復アウトカムの比率を示す図である。データは、各処理について3つの技術的複製の平均値±S.D.として提示されている。

【0047】

【図6G】標準条件下(-)、EP後(24時間)のXL413(XL)とEP前(4時間)及びEP後(48時間)のNU7441+SCR7(N+S)との相乗的細胞周期阻害剤(XL+N+S)、又は低温ショック(32℃、EP後48時間)とN+Sとの相乗的細胞周期阻害剤(CS+N+S)のいずれかで培養された単体クローン(表示されている通りn=32又は31)の409B2細胞内でのDNA修復アウトカム頻度を示す図である。HDRアウトカムは、一方又は両方のアレルに鋳型媒介の改変を受けたクローンを示している。つまり、MutEJアウトカムにはいずれか一方のアレルに変異原性挿入欠失を有する全てのクローンが含まれ、野生型アウトカムは両方が非改変であるアレルを有するクローンに対応している。各ターゲティングは、標的遺伝子と所望のミスセンス変異で標識されている。

【0048】

【図6H】同数量の単体クローン(表示されている通りn=32又は31)での、図6Gで定量化されたHDR/MutEJ比を示す図である。

【0049】

【図7】HDRアウトカムに適切な、相乗的遺伝子編集効果の概要を示す図である。HDRに許容的な細胞周期S期及びG2期への細胞の同調化及び遊離によってDNA修復阻害剤と相乗効果が生み出され、HDR比率が改善される。低温ショックの追加的な細胞周期非依存性効果も役割を果たすことができる。これらのメカニズムを活用しながら、ホモ接合変異は高効率で作成される一方、ヘテロ接合変異は変異体と遮断ssODN鋳型との組合せを使用することによって、挿入欠失なしで作成することができる。

【0050】

【図8A】図8A～図8Cは、GFP標的クローン産生を示す図である。図8Aは、CAG-GFPカセットでのターゲティング前(上段)と後(下段)の、AAVS1遺伝子座の概略図である。SphI切断からの予想断片サイズ、ならびにゲノムのサザンブロットプローブ位置又は内部遺伝子導入的サザンブロットプローブ位置(5'プローブ又はGFPプローブ)が記されている。灰色ボックスはPPP1R12Cエキソンに対応する。HA-L/R:左右ホモロジーアーム(left/right homology arms)、SA:スプライス受容体(splice acceptor)、T2A:Thosea asignaウイルス2Aペプチド(Thosea asigna virus 2A peptide)、pA:ウシ成長ホルモン又はウサギβグロブリンポリアデニル化シグナル(bovine growth hormone or rabbit b-globin polyadenylation signals)。

【0051】

10

20

30

40

50

【図 8 B】5'ゲノムプローブ（左）又は内部 GFP プローブ（右）を用いた、Sph I によって分解されたゲノム DNA のサザンブロット解析を示す図である。標的アレルは、3.5 kbp（5'プローブ）産物又は 6.9 kbp（GFP プローブ）産物の存在によって検出され、一方 6.5 kbp 産物を保持する通常のアレルは、5'プローブで検出された。予想され、8.5 kbp（5'プローブ）及び 7.9 kbp（GFP プローブ）で観察された、ドナーバックボーン組込みによる異常なバンド形成をもつクローンは、アスタリスク（*）で示されている。ヘテロ接合 073-1-3（#3）クローン及びホモ接合 073-1-2（#2）クローンはさらなる遺伝子編集実験用に選択された。サザンブロットは、1つの膜からで、1つの増加性照射を意味する。

【0052】

10

【図 8 C】非標的 1383D6 親 iPS 細胞株（上段）、GFP で標的にされたヘテロ接合細胞株（073-1-3、中段）、及び GFP で標的にされたホモ接合細胞株（073-1-2、下段）の AAVS1 遺伝子型（左）、明視野での蛍光顕微鏡画像（中央）、及び FACS による GFP 蛍光強度（右）を示す図である。スケールバーは 500 µm である。同様の結果を有する 3 つを超える独立した実験からの代表画像が示されている。

【0053】

【図 9 A】図 9 A ~ 図 9 C は、蛍光 DNA 修復アッセイの特性評価を示す図である。図 9 A は、Cas9 と GFP x199 を発現するプラスミドでのヘテロ接合 GFP iPS 細胞のターゲティング及び ssODN でのヘテロ接合 GFP iPS 細胞のターゲティング（上段中央）、ピューロマイシンでの 48 時間の選択、ならびに HDR DNA 修復アウトカム（BFP+、下段左）、MutEJ DNA 修復アウトカム（ダブルネガティブ、下段中央）、及び非改変 DNA 修復アウトカム（GFP+、下段右）の FACS 分類を示す図である。下側パネルの FACS は、増殖した細胞を分類した 1 週間後に実施された。コントロールは非標的ヘテロ接合 GFP iPS 細胞（上段左）を示す。

20

【0054】

【図 9 B】図 9 A で得られた、非標的（NT）コントロールアウトカム、ヘテロ接合 GFP（Hetero）コントロールアウトカム、及び HDR 分類、MutEJ 分類、非改変 DNA 分類のアウトカムについて、ssODN 媒介ターゲティングにより導入された NcoI 制限酵素部位の制限断片長多型（Fragment Length Polymorphism、RFLP）アッセイを示す図である。切断産物定量化により、HDR アウトカムの割合が示される。RFLP 分析は 1 回実施された。

30

【0055】

【図 9 C】分類されたヘテロ接合 MutEJ 細胞の模式図（上段左）及び配列（上段右）、ならびに得られた挿入欠失パターンを表す TIDE 分析（下段）を示す図である。

【0056】

【図 10 A】図 10 A ~ 図 10 H は、HDR 効率に対する細胞周期同調化の効果を示す図である。図 10 A は、低温ショックなし [A]、エレクトロポレーション（EP）後 24 時間の低温ショックあり [B] 若しくはエレクトロポレーション（EP）後 48 時間の低温ショックあり [C]、あるいは EP 前 24 時間の低温ショックのみ [D]、又は EP 前 24 時間の低温ショックに EP 後 24 時間の低温ショックあり [E] 若しくは EP 前 24 時間の低温ショックに EP 後 48 時間の低温ショックあり [F] の、実験タイムラインを示す図である（上段）。DNA 修復アウトカム頻度に対し得られた効果が条件ごとに示されている [D ~ F]（下段）。

40

【0057】

【図 10 B】図 10 A で測定された HDR / MutEJ 修復アウトカムの比率を示す図である。

【0058】

【図 10 C】G2/M 時でのノコダゾールを用いた細胞周期同調化は、iPS 細胞内の HDR 効率に影響を与えないことを示す図である。標準培養条件下 [A]、又は第 0 日目の EP 後の低温ショック条件下 [C] での、EP 前 16 時間のノコダゾール処理の実験タイ

50

ムラインを示す図である（上段）。E d U / P I 染色はE P 前に実施され、F A C S 分析は第8日目に実施された。D N A 修復アウトカム頻度に対する得られた効果を示す図である（下段）。

【0059】

【図10D】図10Cで測定されたH D R / M u t E J 修復アウトカムの比率を示す図である。

【0060】

【図10E】未処理の細胞及びノコダゾールで処理された細胞のE P 前E d U / P I 染色の代表F A C S プロット（上段）、細胞周期の定量化（中段左）、及びS期細胞の平均E d U 強度（中段右）を示す図である。ノコダゾールにより誘導されたG 2 / M 後期の細胞周期停止の概略図である（下段）。

10

【0061】

【図10F】X L 4 1 3 を用いたG 1 / S 境界域での細胞周期同調化がi P S 細胞内のH D R 効率を改善することを示す図である。標準培養条件下[A]又は低温ショック条件下[C]での、E P 前24時間(P r e)又はE P 後24時間(P o s t)のX L 4 1 3 処理の実験タイムラインを示す図である（上段）。D N A 修復アウトカム頻度に対する得られた効果を示す図である（下段）。

【0062】

【図10G】図10Fで測定されたH D R / M u t E J 修復アウトカムの比率を示す図である。

20

【0063】

【図10H】図10Fから得られた、未処理のコントロールを基準とした相対細胞数を示す図である。X L 4 1 3 前後処理は細胞死をもたらし、図10F及び図10Gにおいて検出不能な(n o n - d e t e c t a b l e , n d) 修復アウトカムとなった。全てのデータは、各処理について3つの技術的複製の平均値 $\pm$ S . D . として提示されている。

【0064】

【図11A】図11A～図11Fは、複合ヘテロ接合体変異がC a f s 9再切断を防止することを示す図である。図11Aは、ホモ接合G F P i P S 細胞内でY 6 6 H 変異体 s s O D N M (配列番号：77及び78) 及びT 6 5 T サイレント遮断 s s O D N B (配列番号：79及び80) を使用した、B F P / p G F P ダブルポジティブクローンの産生を示す図である。ダブルポジティブB F P / G F P 細胞はターゲティング後第8日目に分類され、クローンが採取され、分析された。

30

【0065】

【図11B】標準培養条件、低温ショック条件、及びN U 7 4 4 1 + S C R 7 組合せ(N + S) 処理下での編集B F P アレル及び保護G F P アレルのC a s 9 媒介再切断活性を測定するための、G F P x 1 9 9 g R N A で標的にされたB F P / p G F P クローンの実験タイムラインを示す図である（上段）。第8日目のF A C S 分析中の、標準培養下[A]、低温ショック下[C]、及びN + S 処理と組み合わせた低温ショック下(3 2 + N + S) での、非標的B F P / p G F P クローン(コントロール) と再ターゲティングB F P / p G F P クローンのF A C S プロット図である（下段）。

40

【0066】

【図11C】低温ショックとN + S 処理下での、s s O D N M、s s O D N B、若しくはs s O D N W 単独、又はM + B 組合せ及びM + W 組合せを用いたG F P 編集、ならびにD N A 修復アウトカムの頻度の効果を示す図である。H D R * は、ヘテロ接合ダブルポジティブB F P / G F P 修復アウトカムの頻度又は複合ヘテロ接合体ダブルポジティブB F P / p G F P 修復アウトカムの頻度を示す。G F P ポジティブ細胞には、非改変細胞、及びH D R 媒介単一アレルp G F P / G F P 修復アウトカム、p G F P / 挿入欠失() 修復アウトカム、又は両アレルp G F P / p G F P 修復アウトカムが含まれる。

【0067】

【図11D】図11Cで示された両アレル修復アウトカムの分布図である。

50

【 0 0 6 8 】

【 図 1 1 E 】 図 1 1 D で測定された両アレル B F P / G F P 修復アウトカム頻度を示す図である。

【 0 0 6 9 】

【 図 1 1 F 】 B F P 変換のみ (s s O D N M) 又は複合ヘテロ接合体 B F P / p G F P 変異 (s s O D N M + B) の代表 F A C S プロット図である。データは、各条件について独立したエレクトロポレーションの 3 つの技術的複製の平均値 $\pm$ S . D . として提示されている。

【 0 0 7 0 】

【 図 1 2 A 】 図 1 2 A ~ 図 1 2 F は、内因性遺伝子座でのヘテロ接合変異の作成を示す図である。図 1 2 A は、 p . Q 1 1 8 R 及び p . N 1 2 9 D 変異を発生させるための A T P 1 A 1 遺伝子座での標的配列及び編集戦略を示す図である。H D R 編集前後の A T P 1 A 1 遺伝子座のサンガー配列が示されている。

10

【 0 0 7 1 】

【 図 1 2 B 】 低温ショック選択、複合処理選択、及びウアバイン選択を含めた、A T P 1 A 1 編集のための実験タイムラインを示す図である (上段) 。低温ショック [C] と N + S 薬剤処理との組合せを用いた H D R コロニー形成の定量化を示す図である (下段) 。データは、各処理について 4 つの技術的複製の平均値 $\pm$ S . D . として提示されている。

【 0 0 7 2 】

【 図 1 2 C 】 K C N H 2 遺伝子座の標的配列と、低温ショックと N + S 処理との組合せを利用して、ミスセンス変異をコードする s s O D N (s s O D N M) 又はサイレント遮断をコードする s s O D N (s s O D N B) を用いてヘテロ接合 p . N 5 8 8 K 病原性変異に再形成させるための戦略とを示す図である。混合 s s O D N 修復鋳型を用いた H D R 編集前後の K C N H 2 遺伝子座のサンガー配列が示されている。

20

【 0 0 7 3 】

【 図 1 2 D 】 P S M B 8 遺伝子座の標的配列と、ヘテロ接合 p . G 2 0 1 V 病原性変異に再形成させるための戦略とを示す図である。同様に、混合 s s O D N 修復鋳型を用いた H D R 編集前後の P S M B 8 遺伝子座のサンガー配列も示されている。

【 0 0 7 4 】

【 図 1 2 E 】 s s O D N M (n = 9 6) 又は s s O D N M + B (n = 9 2) を用いた編集のクローン分析から得られた、複合ヘテロ接合変異、ホモ接合変異、及びヘテロ接合変異の編集効率定量化を示す図である。

30

【 0 0 7 5 】

【 図 1 2 F 】 s s O D N デザイン及び定量化は、s s O D N M (n = 9 1) 又は s s O D N M + B (n = 9 5) を用いた場合での、図 1 2 E と類似することを示す図である。

【 0 0 7 6 】

【 図 1 3 A 】 図 1 3 A ~ 図 1 3 H は、M a x C y t e エレクトロポレーションを用いた編集効率の増加を示す図である。図 1 3 A は、M a x C y t e エレクトロポレーション装置を使用した D N A 修復アウトカム頻度を示す図である。標準培養条件 (3 7) 、低温ショック条件 (3 2 、 E P 後 4 8 時間) 、又は N + S 処理と組み合わせた低温ショック条件下で、1 3 8 3 D 6 遺伝的背景で産生したヘテロ接合 (H e t e r o) G F P i P S 細胞及びホモ接合 (H o m o) G F P i P S 細胞が Y 6 6 H 変異 s s O D N M のみ (s s O D N M) で標的にされ、ホモ接合 G F P i P S 細胞が Y 6 6 H 変異体 s s O D N M と T 6 5 T サイレント遮断 s s O D N B (s s O D N M + B) との組合せで標的にされた。H D R * は、ヘテロ接合ダブルポジティブ B F P / G F P 修復アウトカムの頻度及び複合ヘテロ接合体ダブルポジティブ B F P / p G F P 修復アウトカムの頻度を示す。s s O D N M + B で標的にされたホモ接合 G F P i P S 細胞の場合、G F P ポジティブ細胞には、非改変細胞修復アウトカム、及び H D R 媒介単一アレル p G F P / G F P 修復アウトカム、H D R 媒介単一アレル p G F P / 挿入欠失 () 修復アウトカム、又は H D R 媒介両アレル p G F P / p G F P 修復アウトカムが含まれる。

40

50

【 0 0 7 7 】

【 図 1 3 B 】 図 1 3 A で測定された H D R / M u t E J 修復アウトカムの比率を示す図である。

【 0 0 7 8 】

【 図 1 3 C 】 4 0 9 B 2 遺伝的背景で産生したヘテロ接合及びホモ接合 G F P i P S 細胞を用いた場合での、図 1 3 A と同様の実験の結果を示す図である。

【 0 0 7 9 】

【 図 1 3 D 】 4 0 9 B 2 遺伝的背景で産生したヘテロ接合及びホモ接合 G F P i P S 細胞を用いた場合での、図 1 3 B と同様の実験の結果を示す図である。

【 0 0 8 0 】

【 図 1 3 E 】 図 1 3 A から得られた、標準培養条件、低温ショック条件、又は N + S 処理と組み合わせた低温ショック条件下で s s O D N M で標的にされた 1 3 8 3 D 6 遺伝的背景のホモ接合 G F P i P S 細胞の両アレル修復アウトカム頻度を示す図である。

【 0 0 8 1 】

【 図 1 3 F 】 標準培養条件、低温ショック条件、又は N + S 処理と組み合わせた低温ショック条件下での、s s O D N M + B で標的にされた 1 3 8 3 D 6 遺伝的背景のホモ接合 G F P i P S 細胞の図 1 3 E と同様の実験の結果と、両アレル B F P / B F P 効率に対する効果及び複合ヘテロ接合体 B F P / p G F P 効率に対する効果とを示す図である。

【 0 0 8 2 】

【 図 1 3 G 】 4 0 9 B 2 遺伝的背景で産生したホモ接合 G F P i P S 細胞を用いた場合での、図 1 3 E と同様の実験の結果を示す図である。全てのデータは、各処理について 3 つの技術的複製の平均値 ± S . D . として提示されている。

【 0 0 8 3 】

【 図 1 3 H 】 4 0 9 B 2 遺伝的背景で産生したホモ接合 G F P i P S 細胞を用いた場合での、図 1 3 F と同様の実験の結果を示す図である。全てのデータは、各処理について 3 つの技術的複製の平均値 ± S . D . として提示されている。

【 0 0 8 4 】

【 図 1 4 A 】 図 1 4 A ~ 図 1 4 D は、M a x C y t e エレクトロポレーションを用いた相乗的遺伝子編集を示す図である。図 1 4 A は、標準培養条件下で細胞周期阻害剤 X L 4 1 3 (X L) 及び N + S を用いた単独処理又は組合せ処理中に s s O D N M で標的にされたホモ接合 G F P i P S 細胞から得られた両アレル修復アウトカム頻度を示す図である。

【 0 0 8 5 】

【 図 1 4 B 】 図 1 4 A と同様の、しかし低温ショック条件下での実験の結果を示す図である。

【 0 0 8 6 】

【 図 1 4 C 】 標準培養条件下で s s O D N M + B で標的にされたホモ接合 G F P i P S 細胞から得られた両アレル修復アウトカム頻度を示す図である。

【 0 0 8 7 】

【 図 1 4 D 】 図 1 4 C と同様の、しかし低温ショック条件下での実験の結果を示す図である。全てのデータは、各処理について 3 つの技術的複製の平均値 ± S . D . として提示されている。

【 0 0 8 8 】

【 図 1 5 A 】 図 1 5 A ~ 図 1 5 J は、相乗的遺伝子編集と M a x C y t e エレクトロポレーションとを用いて標的にされた内因性遺伝子座の配列デザインを示す図である。g R N A 鋳型配列及び s s O D N 鋳型配列、ならびに作成されているミスセンス変異を含めた、全部で 1 0 のターゲティング実験のための標的配列及び編集戦略である。図 1 5 A は、K C N H 1 D 8 5 N 遺伝子編集のための配列デザインを示す図である。

【 0 0 8 9 】

【 図 1 5 B 】 K C N H 2 N 4 5 D 遺伝子編集のための配列デザインを示す図である。

【 0 0 9 0 】

10

20

30

40

50

【図 1 5 C】 S C N 5 A A 1 4 2 8 S 遺伝子編集のための配列デザインを示す図である。

【 0 0 9 1 】

【図 1 5 D】 K C N H 2 N 5 8 8 D 遺伝子編集のための配列デザインを示す図である。

【 0 0 9 2 】

【図 1 5 E】 K C N H 2 N 5 8 8 K 遺伝子編集のための配列デザインを示す図である。

【 0 0 9 3 】

【図 1 5 F】 A P R T M 1 3 6 T 遺伝子編集のための配列デザインを示す図である。

【 0 0 9 4 】

【図 1 5 G】 H E S 7 R 2 5 W 遺伝子編集のための配列デザインを示す図である。

【 0 0 9 5 】

【図 1 5 H】 P S M B 8 G 2 0 1 V 遺伝子編集のための配列デザインを示す図である。

【 0 0 9 6 】

【図 1 5 I】 K C N J 1 1 T 2 9 3 N 遺伝子編集のための配列デザインを示す図である。

【 0 0 9 7 】

【図 1 5 J】 K C N J 1 1 T 2 9 4 M 遺伝子編集のための配列デザインを示す図である。

【発明を実施するための形態】

【 0 0 9 8 】

[ゲノム編集された細胞の製造方法]

一実施形態において、本発明は、ゲノム編集された細胞の製造方法であって、前記細胞の細胞周期を同調させることと、前記細胞を、DNA修復経路を改変する薬剤で処理することと、前記細胞にドナーDNAを導入することと、前記ドナーDNAの存在下で前記細胞のゲノムDNAに配列特異的二本鎖切断を誘導し、その結果、前記二本鎖切断が前記ドナーDNAの塩基配列の全部又は一部に基づいて相同組換え修復経路又は同等の経路により修復され、ゲノムが編集された前記細胞が得られることと、を含む、ゲノム編集された細胞の製造方法を提供する。

【 0 0 9 9 】

実施例で後述される通り、本出願の発明者らは、本実施形態の製造方法が、相同組換え修復経路又は同等の経路の効率を改善すること、及び正確なゲノム編集を実施することができることを明らかにした。

【 0 1 0 0 】

ゲノム編集のための標的細胞は、ヒト細胞又は非ヒト動物細胞でよい。非ヒト動物は特に限定されず、その例には、マウス、ラット、ウサギ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、ウシ、サル等が含まれる。

【 0 1 0 1 】

細胞は体細胞でもよいし、幹細胞でもよい。幹細胞の例には、多能性幹細胞及び組織幹細胞が含まれる。多能性幹細胞の例には、胚性幹細胞（ES細胞）及び人工多能性幹細胞（iPS細胞）が含まれる。組織幹細胞の例には、造血幹細胞、間葉系幹細胞、神経幹細胞、筋幹細胞（サテライト細胞）、皮膚の幹細胞等が含まれる。細胞は、培養細胞であってもよく、動物の胚を構成する細胞であってもよく、生体を構成する細胞であってもよい。

【 0 1 0 2 】

本実施形態の製造方法では、ドナーDNAは、直鎖状又は環状、二本鎖又は一本鎖のいかなるDNAであってもよく、単離されたものであってもよく、合成されたものであってもよく、酵素学的に作製されたものであってもよい。より具体的には、PCR断片、プラスミド、一本鎖オリゴヌクレオチド、二本鎖オリゴヌクレオチドがドナーDNAとして使用されてよい。これらの中では、一本鎖ドナーオリゴヌクレオチド（ssODN）が好ましい。一本鎖ドナーオリゴヌクレオチドの長さは、約数十から数百塩基であってよく、約100塩基であってよい。

【 0 1 0 3 】

細胞のゲノムDNA内での配列特異的二本鎖切断を誘導するステップは、配列特異的DNA切断酵素を細胞に導入することによって実施されることが好ましい。配列特異的DN

10

20

30

40

50

A 切断酵素については後述する。

【0104】

ドナーDNA及び配列特異的DNA切断酵素は、遺伝子導入試薬又はエレクトロポレーション法によって細胞に導入してよい。

【0105】

遺伝子導入試薬として、例えば、Lipofectamine 2000、Lipofectamine 3000、CRISPRMAX及びRNAMAX（いずれもサーモフィッシャーサイエンティフィック）、FuGENE 6及びFuGENE HD（いずれもプロメガ）等を使用することが可能である。

【0106】

エレクトロポレーション法は、NEPA 21（ネッパジーン株式会社）、MaxCyte STX（MaxCyte）、Neon（サーモフィッシャーサイエンティフィック）、及び4D-Nucleofector（ロンザ社）等の機器を使用して実施することができる。

【0107】

前記細胞の細胞周期を同調させるステップには、前記細胞を25 から35 、好ましくは約32 で24時間から72時間、好ましくは約48時間インキュベートすることが含まれることが好ましい。（以下、このプロセスは「低温ショック」と呼ぶことがある。）

【0108】

低温ショックは、ドナーDNA及び配列特異的DNA切断酵素の細胞への導入直後に実施されることが好ましい。低温ショックは、細胞周期を同調させるだけでなく、他の未知の効果により、相同組換え修復経路又は同等の経路の効率を改善する効果を有する。

【0109】

前記細胞の細胞周期を同調させるステップには、好ましくは、細胞をCell Division Cycle 7（CDC7）阻害剤で処理することが含まれる。CDC7阻害剤の例には、XL413（CAS番号：1169558-38-6）が含まれる。

【0110】

XL413は、最終濃度1から100 μM、好ましくは約33 μMで細胞培養培地に添加されることが好ましい。XL413は、ドナーDNA及び配列特異的DNA切断酵素の細胞への導入直後に培地に添加されることが好ましい。XL413は、細胞と約24時間インキュベートされることが好ましい。

【0111】

細胞の細胞周期を同調させるステップは、低温ショックをCDC7阻害剤と組み合わせで利用することによって実施されることがより好ましい。

【0112】

DNA修復経路を改変する薬剤には、DNA-PK阻害剤又はDNAリガーゼIV阻害剤が含まれることが好ましい。DNA修復経路を改変する薬剤には、DNA-PK阻害剤とDNAリガーゼIV阻害剤との組合せが含まれることがより好ましい。

【0113】

DNA-PK阻害剤の例には、NU7441（CAS番号：503468-95-9）が含まれる。NU7441は、終濃度100 nMから10 μM、好ましくは約2 μMで細胞培養培地に添加されることが好ましい。

【0114】

DNAリガーゼIV阻害剤の例には、SCR7（CAS番号：14892-97-8）が含まれる。SCR7は、終濃度100 nMから10 μM、好ましくは約1 μMで細胞培養培地に添加されることが好ましい。

【0115】

DNA修復経路を改変する薬剤は、前記細胞へのドナーDNA及び配列特異的DNA切断酵素の導入前約4時間から導入後約48時間まで前記細胞とインキュベートされることが好ましい。

10

20

30

40

50

【0116】

一般的に、ゲノム編集を実施するためにDSBを誘導するのに使用される配列特異的DNA切断酵素は、おおまかにRNA誘導型ヌクレアーゼと人工ヌクレアーゼとに分類される。配列特異的DNA切断酵素は、RNAヌクレアーゼ又は人工ヌクレアーゼであってもよい。

【0117】

配列特異的DNA切断酵素は、ゲノムDNAを標的配列特異的に切断して二本鎖切断を形成するものであれば特に限定されない。配列特異的DNA切断酵素によって認識される標的配列の長さは、例えば約10塩基から60塩基とすることができる。

【0118】

また、配列特異的DNA切断酵素は、例えば、複数のニッカーゼが結合してDNAを切断する形態でもよい。ニッカーゼとは、二本鎖DNAの単鎖にニックを形成する酵素を意味する。例えば、二本鎖DNAの両鎖で、ゲノムDNA上の近接する位置でニックを形成させることにより、二本鎖切断を形成することができる。

【0119】

RNA誘導型ヌクレアーゼは、ガイドとしての短鎖RNAが標的配列に結合し、2つのDNA切断ドメイン(ヌクレアーゼドメイン)を有するヌクレアーゼを動員して、配列特異的切断を誘導する酵素である。RNA誘導型ヌクレアーゼの例には、CRISPR-Casファミリータンパク質がある。

【0120】

CRISPR-Casファミリータンパク質の例には、Cas9、Cas12(Cpf1)、Cas13(C2c2)、CasX、CasY等が含まれる。RNA誘導型ヌクレアーゼは、CRISPR-Casファミリータンパク質のホモログ又は改変CRISPR-Casファミリータンパク質でもよい。例えば、2つ存在する野生型のヌクレアーゼドメインの一方を不活性型に改変した、ニッカーゼ改変型のヌクレアーゼでもよい。あるいは、改善された標的特異性を有する、Cas9-HF、HiFi-Cas9、eCas9等でもよい。

【0121】

Cas9の例には、化膿性レンサ球菌、黄色ブドウ球菌、ストレプトコッカス・サーモフィルス、ゲオバチルス・ステアロサーモフィルス等から由来するものが含まれる。Cpf1の例には、アシダミノコッカス、クラスノピラ、クラミドモナス、フランシセラ・ノビスイダ等に由来するものが含まれる。

【0122】

人工ヌクレアーゼは、標的配列に特異的に結合するように設計・作製されたDNA結合ドメインと、ヌクレアーゼドメイン(制限酵素であるFokIのDNA切断ドメイン等)とを有する人工制限酵素である。人工ヌクレアーゼの例には、ジンクフィンガーヌクレアーゼ(ZFN)、転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ(TALEN)、メガヌクレアーゼ等が含まれる。

【0123】

本実施形態の製造方法では、配列特異的DNA切断酵素は、Cas9とgRNAとを含有するリボヌクレオタンパク質(RNP)複合体が好ましい。

【0124】

細胞に導入される配列特異的DNA切断酵素として、CRISPR-Casが使用される場合、標的塩基配列はgRNAによって決定される。gRNAは、RNAの形態で細胞に導入してもよいし、発現ベクターの形態で細胞に導入し、細胞内で発現させてもよい。

【0125】

gRNAをRNAの形態で調製する方法の例には、gRNAをコードする核酸断片の上流にT7等のプロモーターを付加したコンストラクトを作製してインビトロ転写反応で合成する方法、化学合成する方法等が含まれる。gRNAを化学合成する場合、化学的に改変されたRNAを使用してよい。

10

20

30

40

50

【0126】

発現ベクターの例には、H1プロモーター又はU6プロモーター等のPol IIIプロモーターからgRNAを転写するプラスミドベクター又はウイルスベクターが含まれる。発現ベクターを使用してgRNAが発現される場合、gRNAは恒常的に発現されてもよいし、発現誘導性プロモーターの制御のもとで発現されてもよい。

【0127】

部位特異的二本鎖切断部位は、相補的に標的配列に結合する、約20塩基のgRNAのプロトスペーサー配列及び約3塩基から5塩基のプロトスペーサー隣接モチーフ(PAM)によって決定される。

【0128】

gRNAは、CRISPR RNA(crRNA)とトランス活性化CRISPR RNA(tracrRNA)との複合体でもよいし、tracrRNAとcrRNAとの組合せである単一の合成gRNA(sgRNA)でもよい。

【0129】

ドナーDNAの存在下での細胞のゲノムDNA内の配列特異的二本鎖切断の誘導は、ドナーDNA配列の全て若しくは一部にしたがった相同組換え修復経路若しくは同等の経路による二本鎖切断の修復をもたらす、又はこの配列特異的二本鎖切断は、挿入変異若しくは欠失変異を伴う経路によって修復される。相同組換え修復と同等の経路には、一本鎖アニリング(SSA)及びSynthesis-Dependent Strand Annealing(SDSA)等が含まれてもよい。

【0130】

本実施形態の製造方法では、ドナーDNAは、プロトスペーサー配列又はプロトスペーサー隣接モチーフ(PAM)配列を改変するヌクレオチド配列を有してもよい。

【0131】

Cas9とgRNAとを含有するRNP複合体によって形成された二本鎖切断が、プロトスペーサー配列又はプロトスペーサー隣接モチーフ(PAM)配列を改変する変異を有するドナーDNAの全て又は一部のヌクレオチド配列にしたがって相同組換え修復経路又は同等の経路により修復される場合、アレルを前記RNP複合体による再切断から防止することが可能である。つまり、標的部位がRNP複合体に再度切断されて、再度の修復時に挿入変異又は欠失変異が導入されることを抑制することができる。

【0132】

本実施形態の製造方法では、ドナーDNAは変異を有してよく、この変異が一方又は両方のアレルに導入された細胞が得られてもよい。変異は天然に発生する変異又は設計された変異でよい。天然に発生する変異とは、遺伝子多型又はバリエーション等に対応する変異であり、いいかえると、ヒト集団内で検出される良性、病原性、又は未知の機能をもつ既存の変種である。設計された変異とは、人工的にデザインされた変異である。

【0133】

ドナーDNAは、ゲノム上の同じ領域に対応する複数種類のドナーDNAの組合せを含んでよい。例えば、ドナーDNAには第1ドナーDNAと第2ドナーDNAとの組合せが含まれ、第1ドナーDNAは関心対象の変異を有し、第2ドナーDNAはプロトスペーサー配列又はPAM配列を改変する変異を有し、関心対象の変異は1つのアレルにしか導入されず、もう1つのアレルのプロトスペーサー配列又はPAM配列が改変される細胞を得ることができる。

【0134】

第1ドナーDNAは、関心対象の変異を有する。関心対象の変異とは、着目した変異のことであり、いいかえれば、細胞に導入することが目的である変異である。関心対象の変異の例には、疾患を引き起こす変異を野生型に戻す変異が含まれる。

【0135】

配列特異的二本鎖切断が第2ドナーDNAの核酸配列の全て又は一部にしたがって相同組換え修復経路又は同等の経路により修復される場合、アレルはRNP複合体による再切

10

20

30

40

50

断から保護される。

【 0 1 3 6 】

ドナーDNAが第1ドナーDNAと第2ドナーDNAとの組合せを含む場合、第1ドナーDNAによって一方のアレルに関心対象の変異が導入され、他方のアレルが第2ドナーDNAによって保護されることにより、ヘテロ接合変異体の製造が容易となる。

【 0 1 3 7 】

[細胞のゲノムを編集する方法]

一実施形態では、本発明は、細胞のゲノムを編集する方法であって、前記細胞の細胞周期を同調させることと、前記細胞を、DNA修復経路を改変する薬剤で処理することと、前記細胞にドナーDNAを導入することと、前記ドナーDNAの存在下で前記細胞のゲノムDNAに配列特異的二本鎖切断を誘導し、その結果、前記二本鎖切断が前記ドナーDNAの塩基配列の全部又は一部に基づいて相同組換え又は同等の経路により修復され、ゲノムが編集された前記細胞が得られることと、を含む、細胞のゲノムを編集する方法を提供する。

10

【 0 1 3 8 】

実施例で後述される通り、本出願の発明者らは、本実施形態の製造方法が、相同組換え修復経路又は同等の経路の効率を改善すること、及び正確なゲノム編集を実施することができることを明らかにした。

【 0 1 3 9 】

本実施形態の方法において、ゲノム編集を受ける細胞、ドナーDNA、細胞の細胞周期を同調させるステップ、DNA修復経路を改変する薬剤、ドナーDNAの存在下で細胞のゲノムDNAに配列特異的二本鎖切断を誘導するステップ等は、上に記載されたものと同じである。

20

【 0 1 4 0 】

[一方又は両方のアレル上の遺伝子編集を検出する方法]

一実施形態では、本発明は、一方又は両方のアレル上の遺伝子編集を検出する方法であって、ドナーDNAを細胞に導入することであって、前記細胞は、両方のアレル内に第1の蛍光を発する蛍光タンパク質をコードする遺伝子を有し、前記ドナーDNAは、前記蛍光タンパク質の第1の蛍光を第2の蛍光に改変する変異を有する、ドナーDNAを細胞に導入することと、前記ドナーDNAの存在下で前記細胞のゲノムDNAに配列特異的二本鎖切断を誘導し、その結果、前記二本鎖切断が前記ドナーDNAの塩基配列の全部又は一部に基づいて相同組換え修復経路又は同等の経路により修復され、ゲノム編集された前記細胞が得られることと、前記ゲノム編集された細胞の前記蛍光を分析することと、を含み、結果として、(i) 第1の蛍光が検出され、第2の蛍光が検出されない場合、(i - 1) 前記蛍光タンパク質の遺伝子座の両方のアレルは変化しなかったこと、又は(i - 2) 前記蛍光タンパク質の遺伝子座の一方のアレルは変化せず、他方のアレル内で挿入変異又は欠失変異が起きたことが示され、(i i) 第1の蛍光が検出されず、第2の蛍光が検出される場合、(i i - 1) 前記蛍光タンパク質の遺伝子座の両方のアレルは前記ドナーDNAの塩基配列の全部又は一部に基づいて相同組換え修復経路又は同等の経路により修復されたこと、又は(i i - 2) 前記蛍光タンパク質の遺伝子座の一方のアレルは前記ドナーDNAの塩基配列の全部又は一部に基づいて相同組換え修復経路又は同等の経路により修復され、他方のアレル内で挿入変異又は欠失変異が起きたことが示され、(i i i) 第1の蛍光も第2の蛍光も検出されない場合、前記蛍光タンパク質の遺伝子座の両方のアレル内で挿入変異又は欠失変異が起きたことが示され、(i v) 第1の蛍光と第2の蛍光の両方が検出される場合、前記蛍光タンパク質の遺伝子座の一方のアレルは前記ドナーDNAの塩基配列の全部又は一部に基づいて相同組換え修復経路又は同等の経路により修復され、他方のアレルは変化しなかったことが示される、一方又は両方のアレル上のゲノム編集を検出する方法を提供する。

30

40

【 0 1 4 1 】

本実施形態の方法によれば、一方のアレル又は両方のアレルを標的としたゲノム編集に

50

おけるDNA修復が、相同組換え修復経路又は同等の経路によって実施されたのか、あるいは挿入又は欠失が起きたのかを可視化し、定量的に分析することが容易となる。

【0142】

例えば、本実施形態の方法を被験物質の存在下で実施することによって、相同組換え修復の効率を増加又は減少させる物質をスクリーニングすることができる。

【0143】

本実施形態の方法において、第1の蛍光を発する蛍光タンパク質が緑色蛍光タンパク質(GFP)であり、第2の蛍光を発する蛍光タンパク質が青色蛍光タンパク質(BFP)であり、ドナーDNAがGFPの66番目のチロシン残基をヒスチジン残基に置換してBFPに改変する変異を有するものであってもよい。

10

【0144】

この場合、細胞によって発せられる蛍光がGFPの蛍光か、BFPの蛍光かを検出することによって、どの種類のDNA修復が実施されたかを可視化し、定量的に分析することが可能である。

【0145】

あるいは、第1の蛍光を発する前記蛍光タンパク質がGFPであり、第2の蛍光を発する蛍光タンパク質がシアン蛍光タンパク質(Cyan Fluorescent Protein、CFP)であり、ドナーDNAがGFPの66番目のチロシン残基をトリプトファン残基に置換してCFPに改変する変異を有するものであってもよい。

【0146】

20

この場合、細胞によって発せられる蛍光がGFPの蛍光か、CFPの蛍光かを検出することによって、どの種類のDNA修復が実施されたかを可視化し、定量的に分析することが可能である。

【0147】

[ゲノム編集用キット]

一実施形態では、本発明は、CDC7阻害剤、DNA-PK阻害剤、及びDNAリガーゼIV阻害剤を含む、ゲノム編集用キットを提供する。

【0148】

本実施形態のキットは、上に記載された通り、ゲノム編集された細胞の製造方法及び細胞のゲノムを編集する方法のために好適に使用することができる。本実施形態のキットを使用することによって、相同組換え修復経路又は同等の経路の効率を改善することができ、正確なゲノム編集を実施することができる。

30

【0149】

本実施形態のキットにおいて、CDC7阻害剤、DNA-PK阻害剤、DNAリガーゼIV阻害剤は、上に記載されたものと同じである。

【0150】

本実施形態のキットには、配列特異的DNA切断酵素及びドナーDNAが更に含まれてもよい。配列特異的DNA切断酵素及びドナーDNAは、上に記載されたものと同じである。

【0151】

40

本実施形態のキットにおいて、ドナーDNAが、GFPの66番目のチロシン残基をヒスチジン残基に置換してBFPに改変する変異を有するものであってもよい。

【0152】

この場合、両方のアレル内にGFPをコードする遺伝子を有する細胞の、一方又は両方のアレル内のゲノム編集を検出する上記の方法を実行することによって、一方のアレル又は両方のアレルを標的にするゲノム編集でのDNA修復が、相同組換え修復経路又は同等の経路によって実施されたのか、あるいは挿入又は欠失が起きたのかに関わりなく可視化し、定量的に分析することが容易となる。

【実施例】

【0153】

50

次に、本発明について実施例を参照しながらより詳細に記述するが、本発明は次の実施例に限定されない。

【0154】

[方法]

(ヒトiPS細胞培養)

ヒト人工多能性幹(iPS細胞)細胞株、すなわち409B2(理化学研究所バイオリソース研究センター(RIKENBRC) #HPS0076)及び1383D6(理化学研究所バイオリソース研究センター #HPS1006)を、0.5mg/mLの*silkiMatrix-511*、*Recombinant Human Laminin-511 E8 Fragment*(ニッピ、Cat. No. 892021)でコーティングした細胞培養プレートで、市販の*StemFit AK02N*培地(味の素、Cat. No. R C A K 0 2 N)内で、37℃、5%のCO₂、毎日培地を交換して維持した。維持している間は細胞継代を7日ごとに実施した。最初に細胞を*Accumax (Innovative Cell Technologies)*、Cat. No. AM105-500)で分離し、37℃、10分のインキュベーションの後、10μMのROCK阻害剤Y-27632(和光、Cat. No. 253-00513)を補充した*StemFit AK02N*培地中で洗浄し、密度 1×10^3 細胞/cm²で*iMatrix-511*でコーティングされたプレート上に播種し、播種後48時間はROCK阻害剤を補充した*StemFit AK02N*培地内で、その後はROCK阻害剤なしで培養した。全ての細胞株をマイコプラズマ混入について陰性かどうか定期的に検査した。

【0155】

(AAVS1ターゲティング)

CAG-driven GFPカセットでヘテロ接合的又はホモ接合的にAAVS1安全領域(*safe-harbor*)遺伝子座を標的にした細胞株を、2つの明確に異なるヒトiPS細胞遺伝的背景、409B2及び1383D6で樹立した。409B2親iPS細胞株内で産生させたGFPヘテロ接合(317-A4)クローン及びGFPホモ接合(317-D6)クローンについては、すでに報告した43。ネオマイシン(E182)ドナーベクター及びTALEヌクレアーゼを用いて、GFPヘテロ接合(073-1-3)クローン及びGFPホモ接合(073-1-2)クローンを、すでに記載した通り43、1383D6親iPS細胞株内で産生させた。ゲノムDNAのSphI切断、内部遺伝子導入DIG標識プローブ又はゲノムDIG標識プローブ(GFPプローブ又は5'プローブ)、及び2.5時間の化学発光検出を利用したサザンブロット法で、標的クローン内で遺伝子型判定を実施した。

【0156】

(iPS細胞遺伝子編集)

等モル量のcrRNA配列とtracrRNA配列とを(IDT、Alt-R CRISPR-Cas9 crRNAとtracrRNA)、95℃で5分間ハイブリダイズさせ、機能性crRNA:tracrRNA二本鎖(gRNA)を形成させた。各エレクトロポレーション(EP)については、30.5pmolのgRNAを30.5pmolのCas9ヌクレアーゼ(IDT、Alt-R S.p. Cas9 Nuclease V3)と混合して(1:1のgRNA:Cas9比)RNP複合体を形成させ、この複合体を室温(RT)で30分間インキュベートした。複合ヘテロ接合変異体を産生させる場合、EPの直前に82pmolのssODN修復鋳型(IDT、Ultramer DNA Oligonucleotides)又は計82pmolとなる等量の混合ssODN修復鋳型を、先に形成させたRNP複合体に添加した。gRNA配列及びssODN配列はそれぞれ表1から表4にリストで記載した。細胞をAccumaxで収集し、洗浄し、計数し、Opti-MEM I血清なし培地(ライフテクノロジーズ、Cat. No. 31985-062)に密度 5×10^5 細胞/100μLで再懸濁した。5×10⁵個の細胞をRNP複合体とssODNとの混合物に添加し、総量25μLの懸濁液をNEPA21エレクトロポーター(ネッパジーン)装置を使用してNepa Electroporati

on Cuvette 1mm gap (ネッパジーン、Cat. No. EC-001) 内で電気穿孔した (ポアパルス: 125 V 電圧、パルス長 2.5 ms、パルスギャップ 50 ms、2 パルス方式、10 % パルス減衰 (pulse decay)、+ 配向、転送パルス: 20 V 電圧、パルス長 50 ms、パルスギャップ 50 ms、5 パルス方式、40 % パルス減衰、± 配向)。次に、電気穿孔した細胞を iMatrix-511 でコーティングしたプレートに、ROCK 阻害剤を補充した StemFit AK02N 培地に移し、37 °C でインキュベート、又は低温ショック処理のための 32 °C、48 時間のインキュベート後に 37 °C でインキュベートした。培地交換は 48 時間後に ROCK 阻害剤なしの StemFit AK02N で実施し、細胞を第 8 日目の FACS 分析まで通常通りに維持した。409B2 iPS 細胞内の内因性遺伝子座を編集する場合、61 pmol の gRNA と 61 pmol の Cas9 とを使用して (1:1 の gRNA:Cas9 比を維持) RNP 複合体を形成させ、EP 前に 82 pmol の等量での ssODN 修復鋳型をこの RNP 複合体に添加、あるいは複合ヘテロ接合変異体を産生する場合は、いずれかの混合 ssODN 修復鋳型 41 pmol を添加した。その後、 1×10^6 個の細胞を RNP 複合体と ssODN との混合物に添加し、総量 40 μ l の懸濁液を Nepa Electroporation Cuvette 1mm gap 内で、上に述べた概要と同じ電圧ポレーション条件下で電気穿孔した。

【0157】

【表 1】

gRNA

遺伝子	標的	名称	配列	配列番号:
EGFP	c. 196T>C	GFPx199	GCTGAAGCACTGCACGCCGT	3
ATP1A1	RD	ATP1A1x356	GTTCTCTTCTGTAGCAGCT	4
KCNH2	c. 1764C>A	KCNH2x1763	ATCGGCTGGCTGCACAACCT	5
PSMB8	c. 602G>T	PSMB8x601	ATAAGTGTCCCACTACCCG	6
KCNE1	c. 253G>A	KCNE1x255	TCTACATCGAGTCCGATGCC	7
KCNH2	c. 133A>G	KCNH2x134	GCCGTCATCTACTGCAACGA	8
SCN5A	c. 4282G>T	SCN5Ax4282	GGACATTATGTATGCAGCTG	9
KCNH2	c. 1762A>G	KCNH2x1763	ATCGGCTGGCTGCACAACCT	10
APRT	c. 407T>C	APRTx400	GGCAGCGTTCATGGTTCCTG	11
HES7	c. 73C>T	HES7x70	GCTTGTGGAGAAGCGGCGCC	12
KCNJ11	c. 878C>A	KCNJ11x878	GAAGGCGTGGTGGAAACCAC	13
KCNJ11	c. 881C>T	KCNJ11x878	GAAGGCGTGGTGGAAACCAC	14

【0158】

10

20

30

40

50

【表 2】

s s O D N 鋳型

遺伝子	標的部位	名称	配列	配列番号：
EGFP	c. 196T>C	GFPc. 196C-50/50-t	CGGCAAGCTGCCCCTGCCCTGGCCCACCCTCGTGACCACCCTG AGCCATGGGGTGCAGTGCTTCAGCCGCTACCCCGACCACATGA AGCAGCACGACTTC	15
	c. 195C>G	GFP-50/50-b-t	CGGCAAGCTGCCCCTGCCCTGGCCCACCCTCGTGACCACCCTG ACGTACGGCGTGCAGTGCTTCAGCCGCTACCCCGACCACATGA AGCAGCACGACTTC	16
	c. 196T	GFP-50/50-t	CGGCAAGCTGCCCCTGCCCTGGCCCACCCTCGTGACCACCCTG ACCTACGGCGTGCAGTGCTTCAGCCGCTACCCCGACCACATGA AGCAGCACGACTTC	17
ATP1A1	RD	ATP1A1-RD	CAATGTTACTGTGGATTGGAGCGATTCTTTGTTTCTTGCTTA TAGCATCAGAGCTGTACAGAAGAGGAACCTCAAACGATGAC GTGAGTTCTGTAATTCAGCATATCGATTTGTAGTACACATCAG ATATCTT	18
KCNH2	c. 1764C>A	KCNH2-N588K-50/50-t	GGCCGCCAGGCCGCTGCTGTTGTAGGGTTTGCCTATCTGGTC GCCCAAGTTTGTGCAGCCAGCCGATGCGTGAGTCCATGTGTGGC TGCTCCATGTTGCC	19
	c. 1765C>T	KCNH2-L589L-50/50-t	GGCCGCCAGGCCGCTGCTGTTGTAGGGTTTGCCTATCTGGTC GCCCAAGTTTGTGCAGCCAGCCGATGCGTGAGTCCATGTGTGGC TGCTCCATGTTGCC	20
PSMB8	c. 602G>T	PSMB8-G201V-50/50-t	CTACGTGGATGAACATGGGACTCGGCTCTCAGGAAATATGTTT TCCACGGTTAGTGGGAACACTTATGCCTACGGGGTCATGGACA GTGGCTATCGGCCT	21
	c. 600G>T	PSMB8-T200T-50/50-t	CTACGTGGATGAACATGGGACTCGGCTCTCAGGAAATATGTTT TCCACTGGTAGTGGGAACACTTATGCCTACGGGGTCATGGACA GTGGCTATCGGCCT	22

10

20

30

40

50

【表 3】

s s O D N 鋳型 (続き)

KCNE1	c. 253G>A	KCNE1-D85N-50/50-t	CTCTCCAGGACCCGGGCTGGACATAGGCCTTGTCTTCTCTT GCCAGGCATTGGACTCGATGTAGACGTTGAATGGGTCGTTTCCA GTGCTCCAGCTTCT	23	
	c. 255T>C	KCNE1-D85D-50/50-nt	AGAAGCTGGAGCACTCGAACGACCCATTCAACGTCTACATCGA GTCCGACGCCTGGCAAGAGAAGGACAAGGCCTATGTCCAGGCC CGGGTCCTGGAGAG	24	
KCNH2	c. 133A>G	KCNH2-N45D-50/50-t	GCTGCATCACCTCGGCCCGGAGTAGCCGCACAGCTCGCAGAA GCCGTCGTCGCAGTAGATGACGGCGCAGTTCTCCACCGAGCG TTGGCGATGATGAA	25	10
	c. 135C>T	KCNH2-N45N-50/50-nt	TTCATCATCGCCAACGCTCGGGTGGAGAACTGCGCCGTCATCT ACTGCAATGACGGCTTCTGCGAGCTGTGCGGCTACTCGCGGGC CGAGGTGATGCAGC	26	
SCN5A	c. 4282G>T	SCN5AA1428S-50/50-t	GACTTGGTGAAGAAGCCACTGTGGCAACCTACCCCTGGAG TCCACAGATGCATACATAATGTCCATCCAGCCTTTAAATGTTG CCTGGGAGGAAAAG	27	
	c. 4287G>T	SCN5AV1429V-50/50-nt	CTTTTCTCCAGGCAACATTTAAAGGCTGGATGGACATTATG TATGCAGCTGTTGACTCCAGGGGGTAGGTTGCCACAGTGGCT TCTTCCACCAAGTC	28	
KCNH2	c. 1762A>G	KCNH2-N588D-50/50-t	GGCCGCCAGGCCGCTGCTGTTGTAGGGTTTGCCTATCTGGTC GCCCAGGTGCTGCAGCCAGCCGATGCGTGAGTCCATGTGTGGC TGCTCCATGTTGCC	29	20
	c. 1765C>T	KCNH2-L589L-50/50-t	GGCCGCCAGGCCGCTGCTGTTGTAGGGTTTGCCTATCTGGTC GCCCAAGTTGTGCAGCCAGCCGATGCGTGAGTCCATGTGTGGC TGCTCCATGTTGCC	30	

【表 4】

s s O D N 鋳型 (続き)

APRT	c. 407T>C c. 402A>T	APRT-M136T-50/50-t	CTGCTCTCTGCAGCCAGGCCAACTGGGACCTCACCTCCCA TCCCCAGGTACCACGAACGCTGCCTGTGAGCTGCTGGGCCGCC TGCAGGCTGAGGTC	31	30
HES7	c. 73C>T	HES7-R25W-50/50-nt	CTCCTTTTCTCGCTGGTCGCAGATGCTCAAGCCGCTTGTGGAG AAGCGGCCTGGGACCGCATCAACCGCAGCCTGGAAGAGCTGA GGCTGCTGCTGCTG	32	
KCNJ11	c. 878C>A	KCNJ11-T293N-50/50-t	GGATCTCATCGGCCAGGTAGGAGGTGCGGGCCTGGGTGGTGAT GCCCGTGTTCACACGCCTTCCAGGATGACGATGATCTCG AGGTCCTGGTGGTG	33	40
KCNJ11	c. 881C>T	KCNJ11-T294M-50/50-t	GGATCTCATCGGCCAGGTAGGAGGTGCGGGCCTGGGTGGTGAT GCCCATGGTTTCACACGCCTTCCAGGATGACGATGATCTCG AGGTCCTGGTGGTG	34	

【 0 1 5 9 】

プラスミド利用デリバリーの場合では、標的特異的 g R N A 配列 (G F P x 1 9 9 g R N A : caccGCTGAAGCACTGCACGCCGT (配列番号: 1) センス及びaaacACGGCGTGCAGTGCTTCAGC (配列番号: 2) アンチセンスオリゴヌクレオチド) は、p X 4 5 9 v 2 ベクター内でクローン化した (a g i f t f r o m F . Z h a n g , A d d g e n e # 6 2 9 8 8) 7 0 。次に、3 μ g のターゲティングベクターと3 μ g (9 8 p m o l) の s s O D N 修復鋳型とを混合し、この混合物に O p t i - M E M 中で再懸濁した

10

20

30

40

50

1 × 10⁶ 個の細胞を添加し、総量 100 μl の混合懸濁液を Nepa Electroporation Cuvette 2mm gap (ネッパジーン、Cat. No. EC-002) 内で、NEPA 21 エレクトロポーターを使用して電気穿孔した (ポアパルス: 125 V 電圧、パルス長 5 ms、パルスギャップ 50 ms、2 パルス方式、10 % パルス減衰 (pulse decay)、+ 配向、転送パルス: 20 V 電圧、パルス長 50 ms、パルスギャップ 50 ms、5 パルス方式、40 % パルス減衰、± 配向)。次に、電気穿孔した細胞を、iMatrix 511 でコーティングしたプレートに、ROCK 阻害剤を補充した StemFit AK02N 培地に移し、EP 後 24 時間からの 48 時間、1 μg/ml のピューロマイシン (メルク、Cat. No. P7255-25 MG) で処理した。次に、培地交換を、ROCK 阻害剤なしの StemFit AK02N を使用して実施し、細胞を第 8 日目の FACS 分析まで標準通り維持した。

10

【0160】

MaxCyte STX (MaxCyte) 装置で実施する遺伝子編集実験のために、製造者の説明書で推奨される通り、最初に細胞を EP の 1 日前に収集し、密度 1.5 × 10⁶ 細胞で、ROCK 阻害剤を補充した StemFit AK02N 培地中、iMatrix-511 でコーティングした 6 ウェルプレート上にプレATINGした。エレクトロポレーション日に、61 pmol の Cas9 ヌクレアーゼを有する 61 pmol の gRNA (1:1 の gRNA: Cas9 比) と 328 pmol の ssODN 修復鋳型とを混合することにより、RNP 複合体を個別の 1.5 ml チューブ内で形成させた。細胞を収集し、計数し、2 × 10⁶ 細胞 / 100 μL の密度で MaxCyte バッファー (MaxCyte、Cat. No. EPB-1) で再懸濁した。次に 1 × 10⁶ 個の細胞を RNP と ssODN との混合物に添加し、総量 50 μl を、MaxCyte STX の OC-100 (MaxCyte、Cat. No. SOC-1) 内又は OC-100 × 2 (MaxCyte、Cat. No. SOC-1 × 2) プロセッシングアセンブリ内で電気穿孔した (最適化プロトコル 8)。電気穿孔後、プロセッシングアセンブリを 37 °C で 20 分間インキュベートし、次に電気穿孔した細胞を iMatrix-511 でコーティングしたプレートの、ROCK 阻害剤を補充した StemFit AK02N 培地に移し、37 °C、又は低温ショック処理のための 32 °C でインキュベートした。培地交換は 48 時間後に ROCK 阻害剤なしの StemFit AK02N で実施し、第 8 日目の FACS 分析まで細胞を標準通り維持した。

20

30

【0161】

(小分子処理)

スクリーニング及び最適化目的のために、より多い量の Cas9 はより高い編集効率をもたらすはするが、5 μg の Cas9 (30.5 pmol) を標準編集条件として設定した。全ての小分子を、水に溶解した XL413 以外は、製造者の説明書で推奨される通りにジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解した。滴定曲線及びコロニー計算によって定義された、48 時間処理後の iPS 細胞内の最大無毒性濃度である、KU-55933 (Selleck Chemicals、Cat. No. S1092) 3 μM、VE-821 (Selleck Chemicals、Cat. No. S8007) 1 μM、NU7441 (Tocris Bioscience、Cat. No. 3712) 2 μM、Mirin (Sigma-Aldrich、Cat. No. M9948-5 MG) 3 μM、PFM01 (Sigma-Aldrich、Cat. No. SML1735-5 MG) 10 μM、TDR1-505 (Calbiochem、Cat. No. 530535) 20 μM、RS-1 (Sigma-Aldrich、Cat. No. R9782-5 MG) 10 μM、SCR7 (Xcess Bioscience、Cat. No. M60082-2 S) 1 μM、及び L755507 (Sigma-Aldrich、Cat. No. SML1362-5 MG) 5 μM という最終濃度で、小分子を StemFit AK02N 培地に補充した。XL413 (Sigma-Aldrich、Cat. No. SML1401-5 MG) を最終濃度 33 μM で、及びノコダゾール (Sigma-Aldrich、Cat. No. M1404-2 MG) を最終濃度 100 ng/ml で補充した。いくつかの

40

50

小分子を組み合わせる場合、濃度は単独処理と等価とした。DMSOコントロールは、処理条件で使用される小分子単独又は小分子組合せでの最大量と等量で補充した。遺伝子編集については、細胞をEP前に各小分子で4時間、前処理をしてEP後48時間、処理をし(pre)、又は指定された場合は、前処理なしでEP後48時間のみ処理をした(post)。前処理した細胞を収集し、細胞計数中は小分子を補充した培地に再懸濁、その後エレクトロポレーションのためにOpti-MEM培地に再懸濁した。EP後、細胞をiMatrix-511でコーティングしたプレートに、ROCK阻害剤及び小分子を補充したStemFit AK02N培地に移し、37℃でインキュベート、又は32℃、48時間の低温ショック処理後に37℃でインキュベートした。培地交換をEPの48時間後にStemFit AK02N培地で実施し、細胞を第8日目のFACS分析まで標準通り維持した。細胞周期同調化及び遺伝子編集のために、XL413処理をEP後24時間実施し、ROCK阻害剤を補充したStemFit AK02N培地に入れ替えて24時間処理し、その後ROCK阻害剤なしのStemFit AK02N培地に入れ替えた。EPの16時間前にノコダゾール処理を施し、細胞収集及び計数の間はノコダゾールを補充し、EP後はROCK阻害剤を補充したStemFit AK02N培地に入れ替えた。

【0162】

(細胞周期分析)

小分子又は培養条件の試験に追加して、Click-iT EdU Alexa Fluor 647 Flow Cytometry Assay Kit (サーモフィッシャーサイエンティフィック、Cat. No. C10424)を使用して、細胞を最初に10µMの5-エチニル-2'-デオキシウリジン(EdU)を用いて2時間15分間、インキュベートした。次に、細胞を収集し、計数し、同数の細胞を新規の1.5mlチューブに移した。製造者の説明書にしたがって、細胞を1%BSAの1X DPBS溶液で洗浄し、Click-iT固定液(4%パラホルムアルデヒドのDPBS溶液)で固定し、室温(RT)及び遮光下で15分間インキュベートし、1%BSAのDPBS溶液で洗浄した。次に、細胞を1X Click-iTサポニン系透過処理剤及び洗浄試薬で透過処理した。Alexa Fluor 647アジ化蛍光色素と、2mMのCuSO₄と、1X Click-iT EdUバッファー添加剤との混合物をサンプルに添加し、この反応混合物を室温及び遮光下で30分間インキュベートし、その後サンプルを1X Click-iTサポニン系透過処理剤及び洗浄試薬で洗浄及び再懸濁することにより、Click-iT標識化反応を実施した。最後に、最終濃度0.1%のTriton-X 100(ナカライテスク、Cat. No. 282-29)、0.2mg/mLのRNase A(インビトロジェン、Cat. No. 12091-021)、及び20µg/mLのヨウ化プロピジウム(PI)のDPBS溶液からなるヨウ化プロピジウム(PI)(和光、Cat. No. 169-26281)染色液をサンプルと混合し、室温、遮光下で30分間インキュベートした。

【0163】

(フローサイトメトリー及び細胞分類)

FACSバッファー(2%FBSのDPBS溶液)で再懸濁した 5×10^5 個の細胞を使用して、BD FACS Divaソフトウェア(BDバイオサイエンス)を用いたBD LSRFortessa Cell Analyzer(BDバイオサイエンス)で蛍光強度の測定を実施し、生データをFlowJo(FlowJo LLC)で分析した。GFP⁺細胞内での編集実験のため、Pacific Blue(450/50nm)及びFITC(530/30nm)フィルターを使用して細胞を取得した。EdU及びPIで染色した細胞は、Alexa Fluor 647(660/20nm)及びPE-Tx-Red-GRフィルターを使用して取得した。DNA修復アウトカムの特性評価については、編集ヘテロ接合GFP⁺細胞からBFP⁺群、BFP⁻/GFP⁻群、及びGFP⁺群を分類し、複合ヘテロ接合体のクローン単離については、混合ssODN修復template/catesで標的にした編集ホモ接合GFP⁺細胞からBFP⁺/G

F P + 群を分類した。細胞を、密度 1×10^6 細胞 / ml で F A C S バッファー内に収集し、分離のためセルストレーナーでろ過した。一重線用に分類ゲートを設置し、所望の集団を B D F A C S A r i a I I c e l l s o r t e r (B D バイオサイエンス) で収集し、 $10 \mu\text{M} \sim 20 \mu\text{M}$ の R O C K 阻害剤を含有する S t e m F i t A K 0 2 N 培地に入れた。

【 0 1 6 4 】

(H D R 定量化アッセイ)

ウアバイン八水和物 (S i g m a - A l d r i c h 、 C a t . N o . O 3 1 2 5 - 2 5 0 M G) を水で溶解した。H D R によって編集されるコロニーを選択的に得るために、A T P 1 A 1 遺伝子座を標的とし、小分子又は培養条件用に試験している細胞を、E P の 4 8 時間後から 1 mM ウアバインの R O C K 阻害剤含有 S t e m F i t A K 0 2 N 培地溶液で第 6 日目まで処理した。次に、細胞を、S t e m F i t A K 0 2 N 培地で第 1 3 日目まで通常通り維持し、形成しているコロニーをクリスタルバイオレットで染色した。細胞培養プレートを氷の上に置き、氷冷 $1 \times \text{DPBS}$ で洗浄し、氷冷メタノールで 10 分間固定し、その後細胞を氷から取り出し、 $0.05 \sim 0.1 \%$ クリスタルバイオレット (ナカライ、C a t . N o . 0 9 8 0 4 - 5 2) の $25 \sim 100 \%$ メタノール溶液で 10 分間、室温でインキュベートした。過剰クリスタルバイオレットを水で洗浄することにより除去し、手作業でコロニーを計数するためにプレートを撮影した。

【 0 1 6 5 】

(クローン分析)

単体クローンの D N A 修復アウトカムの特性評価のために、細胞を E P 後第 7 日目に収集し、ゲノム D N A 抽出用に 5×10^5 個の細胞を使用した (下に記載) 。S T E M - C E L L B A N K E R G M P g r a d e (タカラバイオ、C a t . N o . C B 0 4 7) に再懸濁した 5×10^5 個の細胞をそれぞれに有する 2 つの低温貯蔵チューブを、総集団保存用に凍結し、細胞 $300 \sim 600$ 個を i M a t r i x - 5 1 1 でコーティングした 6 cm ディッシュにプレーティングした。プレーティング後 10 日に、直径約 1 mm のコロニーを顕微鏡下で採取して $5 \mu\text{l}$ の培地に入れ、96 ウエル P C R プレートに移した。その後、Q u i c k E x t r a c t D N A E x t r a c t i o n S o l u t i o n (E p i c e n t e r 、 C a t . N o . Q E 0 9 0 5 0) を $10 \mu\text{l}$ 添加し、プレートを 65 で 6 分間、次に 98 で 2 分間、インキュベートし、 -30 で保管した。

【 0 1 6 6 】

(遺伝子型判定)

ゲノム抽出のために、密度 $0.5 \sim 1 \times 10^6$ 個の細胞を $1 \times \text{DPBS}$ で洗浄し、製造者の説明書で推奨される通りに D N e a s y B l o o d \& T i s s u e K i t (キアゲン、C a t . N o . 6 9 5 0 6) を使用して D N A を精製し、精製した D N A を $100 \mu\text{l}$ の水に再懸濁した。製造者の説明書にしたがって、K A P A H i F i H S R e a d y M i x (K a p a バイオシステムズ、C a t . N o . K K 2 6 0 2) ポリメラーゼ連鎖反応 (P C R) を利用して標的配列を増幅し、E x o S A P - I T E x p r e s s r e a g e n t (サーマフィッシャーサイエンティフィック、C a t . N o . 7 5 0 0 1) で酵素的 P C R 産物精製を実施し、B i g D y e T e r m i n a t o r v 3 . 1 C S K i t (サーマフィッシャーサイエンティフィック、C a t . N o . 4 3 3 7 4 5 6) を使用してサンガー配列決定法を実施した。遺伝子型判定プライマーを表 5 及び表 6 にリストで記載した。次に、反応物をエタノール沈殿により精製し、 $3130 \times 1 \text{ Genet ic A n a l y z e r}$ (アプライドバイオシステムズ) で取得した。配列アライメントを S n a p g e n e (G S L B i o t e c h L L C) で分析し、信頼度の低いベースコールの配列トレースファイルは分析から除外した。

【 0 1 6 7 】

10

20

30

40

50

【表 5】

遺伝子型判定プライマー

遺伝子	標的部位	名称	配列	配列番号：
EGFP	c. 196T>C	dna549	AGCAAGGGCGAGGAGCTGTT	35
		dna649	GCCGTTCTTCTGCTTGTGCGG	36
ATP1A1	RD	dna2778-ATP1A1_Fwd	TATTGCAACCGTCCAGCTAC	37
		dna2779-ATP1A1_Rev	GAATGGCCACCAAGCATTTC	38
KCNH2	c. 1764C>A	dna2093-HERG-Exon8, 9-F	CTCTGTCCCAAAGCTAGCAC	39
		dna2094-HERG-Exon8, 9-R	GGGTCCTTACTACTGACTGTGA	40
PSMB8	c. 602G>T	dna3253-PSMB8 p. G201V-R	GGATAAGAAGGTGGGTGCTCT	41
		dna3252-PSMB8 p. G201V-F	AAACCATATGACTGGGCCTTTA	42
KCNE1	c. 253G>A	dna463-kcne1. 3F3	AAACCAAAATGCACACATGCAACC	43
		dna508-hKCNE1. 3R_4696-4669	TGAAATGTCATGCCCTTAGGTTCAAGTC	44
		dna005-kcne1F3	GTTCAAGCAGGGTGGCAACAT	45
KCNH2	c. 133A>G	dna2081-HERG-Exon2-F	CTGTGTGAGTGGAGAATGTGG	46
		dna2082-HERG-Exon2-R	GTCACACCCACAGAAC	47
SCN5A	c. 4282G>T	dna3177-SCN5A-RP	CCTTCTTGGGGCATCTTCTC	48
		dna3176-SCN5A-FP	CCAGAGGTGGGTAGGGATAG	49
KCNH2	c. 1762A>G	dna2093-HERG-Exon8, 9-F	CTCTGTCCCAAAGCTAGCAC	50
		dna2094-HERG-Exon8, 9-R	GGGTCCTTACTACTGACTGTGA	51

10

20

【0168】

【表 6】

遺伝子型判定プライマー（続き）

APRT	c. 407T>C	dna1711-hAPRT-T7F5	GTCGTGGATGATCTGCTGG	52
		dna1712-hAPRT-T7R5	TGCCAAGGCTGATATTTCCC	53
HES7	c. 73C>T	dna2227-HES7-Exon2+3-F	GCGAGCTACAGAACTGATCT	54
		dna2228-HES7-Exon2+3-R	GGGAGAAAATGAGGGAGACAC	55
KCNJ11	c. 878C>A	dna3116-KCNJ11-FP	GTGGTACGCAAGACCACCAG	56
		dna3117-KCNJ11-RP	GGGCTACATACCACATGGTCC	57
KCNJ11	c. 881C>T	dna3116-KCNJ11-FP	GTGGTACGCAAGACCACCAG	58
		dna3117-KCNJ11-RP	GGGCTACATACCACATGGTCC	59

30

【0169】

(RFLP分析)

GFP標的配列のssODN媒介の改変を、新規に形成させたサイレント制限酵素部位の制限断片長多型(Restriction Fragment Length Polymorphism、RFLP)によって確認した。KAPA HiFi HS Ready Mixを使用して、精製gDNAから標的配列を増幅し、次に増幅産物をFast Digest NcoI (サーモフィッシャーサイエンティフィック、Cat. No. FD0573) 制限酵素のFast Digest Buffer (サーモフィッシャーサイエンティフィック、Cat. No. B64) 溶液で切断し、37℃で30分間インキュベートした。次に、切断した増幅産物をゲル電気泳動で分離して、AE-9000N E-Graph (Atto) ゲルドキュメンテーションシステムで取得し、ImageJソフトウェアで定量化した。

40

【0170】

50

(T I D E 分析)

<https://tide.nki.nl/71> のオンラインツールを使用して、T I D E 分析を混合配列で実施した。参考として 4 0 9 B 2 由来ヘテロ接合 G F P i P S 細胞からの配列データを使用した。欠失サイズウィンドウはより大きい欠失を可視化するために 5 0 b p まで拡張した一方、他のパラメータはデフォルトのままにした。

【 0 1 7 1 】

(蛍光顕微鏡観察)

S t e m F i t A K 0 2 N 培地のある、i M a t r i x - 5 1 1 でコーティングした 6 ウエルプレートにプレーティングした細胞を、L S M 7 1 0 (Z E I S S) 共焦点顕微鏡及び L S M ソフトウェア Z E N 2 0 0 9 (Z E I S S) を使用して直接、画像化した。画像を $\times 10$ 対物レンズで得て、適切なゲインと露光時間で G F P 及び D A P I フィルターを得た。

10

【 0 1 7 2 】

[結果]

(ヒト i P S 細胞における蛍光 D N A 修復アッセイ)

蛍光レポーターによって、遺伝子編集アウトカムを可視化して定量化する方法が提供される。G F P と B F P は高い配列相同性を有し、フルオロフォア領域内のチロシンからヒスチジン (Y 6 6 H) への単独アミノ酸変更は、G F P 蛍光発光から B F P 蛍光発光へ転換するのに十分である 4 2。我々が先に公開した方法にしたがって、1 3 8 3 D 6 親株遺伝的背景で、安定に発現する G F P 蛍光レポーターで A A V S 1 遺伝子座をヘテロ接合的に標的とされた i P S 細胞株を産生させた (図 8 A ~ 図 8 C)。G F P から B F P (Y 6 6 H) への変換と、C a s 9 再切断を防止して B F P タンパク質 (T 6 5 S) を安定化するための P A M 遮断変異の挿入と、及び制限断片長多型 (R F L P) による遺伝子型判定のための N c o I 制限酵素部位の構築とをもたらす、4 つのヌクレオチド変化を起こすようデザインされた 1 0 0 b p の s s O D N 鋳型を使用して、G F P 内の C a s 9 媒介 D S B を修復した (図 1 A)。

20

【 0 1 7 3 】

3 つの可能な蛍光の結果は D N A 修復選択を反映しており、B F P、蛍光の喪失 ()、及び G F P は、それぞれ H D R、M u t E J、及び非改変アレルに対応している (図 1 B)。A A V S 1 遺伝子座からのレポーターの均一な発現によって、これら 3 つの結果は明確に区別することができ、ヌクレアーゼ処理後に定量化することができた (図 1 C ~ 図 1 E、図 9 A ~ 図 9 C)。

30

【 0 1 7 4 】

(細胞周期コントロールは H D R アウトカムに好都合である)

細胞周期と D N A 修復経路選択との関連性を考慮して、我々は様々な培養条件及び化学的阻害剤を使用して細胞を同調させることを目指した。軽度の低温はインビトロでの細胞周期停止及び緩徐な細胞代謝をもたらすことを示してきた 4 4。我々はエレクトロポレーション (E P) 直後に 3 2、4 8 時間の低温ショックを施すことは、通常の 3 7 での培養条件と比較して、先に公開した結果を裏付ける、H D R 頻度を 1 . 4 倍 (3 0 . 1 % 対 2 1 . 3 %)、H D R / M u t E J 比を 1 . 6 倍改善したことを観察した (図 2 A、図 2 B、図 1 0 A、図 1 0 B)。

40

【 0 1 7 5 】

i P S 細胞への低温ショックの効果を解明するため、我々はヨウ化プロピジウム (P I) 染色と組み合わせた 5 - エチニル - 2 ' - デオキシウリジン (E d U) 増殖アッセイを D N A 全量に対し使用して細胞周期分析を実施し、E P 処理及び低温ショック処理後の細胞周期を定量化した (図 2 C)。E P 後 4 8 時間の低温ショックを経験した細胞は、通常の培養条件下での 6 . 0 % と比較して G 2 / M 期で 2 5 . 5 % の細胞周期蓄積を示した。加えて、E d U 取込みの平均強度は、低温ショック中の S 期細胞において 2 . 4 倍低下し、D N A 合成率が低下したことを示した。我々は、細胞を E P 前の 1 6 時間、ノコダゾールで前処理することにより後期 G 2 / M 期での細胞周期同調化の効果を試験したが、先のレ

50

ポートと一致せず、HDR効率の増加は観察されなかった(図10C~図10E)。これはヌクレアーゼ存在下での細胞周期進行の減速の方が、G2/M期同調化ヌクレアーゼ前処理よりも重要であることを示唆するだろう。ノコダゾールは、微小管重合を阻害し、紡錘体形成チェックポイントを活性化し、細胞を分裂前中期で停止させ、おそらくノコダゾール放出直後に細胞に有糸分裂を即時に完了させる。

【0176】

HDRはS/G2期で最も活動的であるため、我々は、S期進行を中断させてG1/S期の核型的に正常な細胞を停止させるCDC7阻害剤XL413を使用した細胞同調化の効果を調査した45、46。予想通り、EdU/PI染色は、EP後のXL413での24時間処理後、90%超のG1期及びS前期の細胞の蓄積を明らかにした(図2D~図2F)。XL413は、未処理のコントロールと比較して、HDR頻度を1.7倍(33.7%対19.4%)及びHDR/MutEJ比を2.2倍増加させた。24時間のXL413処理を48時間の低温ショックと組み合わせた場合、HDR頻度は更に2倍(39.4%対19.4%)、及びHDR/MutEJ比は2.7倍(0.86対0.32)増加し、その結果、HDRイベントはMutEJとほぼ同じくらいの頻度となった。興味深いことに、EP前のXL413での細胞の前処理は、HDRを改善しなかった(図10F~図10H)。これらの結果は、細胞周期同調化及び進行を調節する化学的、環境的因子は、より高いHDRアウトカムに向けたDNA修復経路選択に単独で、及び相乗的に影響を与えることを示している。

【0177】

(HDRアウトカムにバイアスをかけるためのDNA修復経路調節)

正確な遺伝子編集をより改善するため、我々は、ある特定のDNA修復経路構成要素を阻害すると報告されている様々な小分子KU-5593347、VE-82148、NU744149、Mirin50、PFM0151、TDRL-50552、及びSCR753、又はHDR比率を高めると報告されている小分子RS-154及びL75550755で細胞を処理した(図3A)。ヒトiPS細胞を、48時間の低温ショックに加えて、EP前4時間及びEP後48時間、小分子で処理した。スクリーニングした化合物の中で、NU7441(DNA-PKcs阻害剤)及びSCR7(リガーゼIV阻害剤)がHDR頻度を1.6倍及び1.4倍増加させ(35.5%及び32.3%対22.6%、図3B)、この2つの化合物のみがHDR/MutEJ比が0.5超であった。興味深いことに、NU7441と比較すると、SCR7で処理されたサンプルはより大きな割合のMutEJも示し、結果としてHDRの割合が類似しているにもかかわらず、HDR/MutEJ比の増分は減少した(1.4倍対NU7441の2.2倍)(図3C)。

【0178】

組み合わせた場合、NU7441+SCR7(N+S)は更に、HDR頻度を1.8倍(49.6%対27.3%)及び未処理のコントロールと比較してHDR/MutEJ比を2.7倍改善し(1.11対0.41)、結果としてHDRイベントの大部分となり、累積的な効果をもたらした(図3D、図3E)。その一方で、すでに報告されているRS-1及びL755507等のHDRエンハンサーは、HDR頻度にわずかな変化しか示さなかった。これらのデータは、NHEJ修復経路内のいくつかの分子標的を阻害することによって、相加的效果をもたらすことができることを示唆し、DSB修復のためにHDRの利用を更に推奨する。

【0179】

我々は次に、HDR比率を改善する相加的效果の可能性を確認するため、XL413を用いた化学的細胞周期同調化と、N+S処理を用いたNHEJ抑制とを組み合わせた(図3F~図3J)。通常の培養条件下において、XL413(XL)単独又はN+S単独での処理は、未処理のコントロールと比較すると、HDR頻度をそれぞれ1.8倍及び2.3倍(30.5%及び39%対17%)増加させ、一方でXL413とN+Sとを組み合わせることにより、HDR頻度を更に2.7倍(45.7%対17%)増加させた。低温ショック条件下では、比較できる変化がHDR頻度において単独処理に観察されたが、X

L 4 1 3 と N + S との組合せでは、H D R 頻度に N + S 処理単独と比較して改善は示されなかった。手短に述べると、我々は、D N A 修復の調節と低温ショックとを組み合わせる場合、又は D N A 修復の調節と G 1 / S 期での細胞周期同調化とを組み合わせる場合、H D R アウトカム頻度を高める相乗的遺伝子編集の存在のエビデンスを示している。

【 0 1 8 0 】

(高効率両アレル遺伝子編集)

二倍体 i P S 細胞では、父方アレルと母方アレルとの両方が編集候補である。このシナリオを再現するため、我々は、ホモ接合 G F P レポーター i P S 細胞株を 1 3 8 3 D 6 父方遺伝的背景で産生させ (図 8 A ~ 図 8 C)、両アレル遺伝子ターゲティング結果を評価した (図 4 A)。最初に我々は、ヘテロ接合 G F P レポーター株とホモ接合 G F P レポーター株との間で、単一アレル及び両アレルのターゲティング効率と D N A 修復アウトカム頻度とを比較し (図 4 B)、比較できるような H D R 頻度が両株にあることを発見した (2 4 . 3 % 及び 2 9 . 2 %)。ホモ接合状況では、我々は少なくとも 1 つの B F P アレルを有する細胞を H D R アウトカムとして、少なくとも 1 つの G F P アレルを有する細胞を非改変としてゲーティングし、その結果、M u t E J 細胞の割合が減少し、ヘテロ接合細胞株と比較して H D R / M u t E J 比が 1 . 4 倍高くなった (図 4 C)。驚くべきことに、H D R * と呼ばれる、1 つの H D R アレル (B F P) と 1 つの非改変アレル (G F P) を有するヘテロ接合変異体を意味するダブルポジティブ群で (図 4 A)、検出可能なものはなかった。この原因を更に解明するために、我々は全ての可能な両アレル修復アウトカムをデコンボリューションし、それぞれのアレル修復効率を見積もった (図 4 D)。ここで我々は、1 6 . 1 % の正確な B F P / B F P 両アレル編集と、B F P / (1 3 . 1 %) 修復アウトカム、 / (4 4 %) 修復アウトカム、及び G F P / (2 . 1 %) 修復アウトカムに渡って分布する、顕著な割合の M u t E J アレルとを得た。要約すると、このデータによって、G F P / (2 . 1 %) 及び B F P / G F P (0 . 3 %) 修復アウトカムでの単一アレルが低頻度であることから示される通り、両方のアレルは、大部分が共に編集されるか改変されないかであることが明らかになった。

【 0 1 8 1 】

我々は更に、低温ショック処理下で N U 7 4 4 1、S C R 7、及び N + S をホモ接合 G F P 株に施し、未処理のコントロールと比較し、4 倍の H D R 頻度の増加 (4 8 . 9 % 対 1 2 . 2 %) 及び 3 . 7 倍の H D R / M u t E J 比の増加 (1 . 7 3 対 0 . 4 9) を観察した (図 4 E、図 4 F)。両アレル修復アウトカムのデコンボリューションは、N + S 処理を利用した場合、未処理条件 (5 . 3 %) より 5 . 7 倍高い、3 0 . 5 % の B F P / B F P 両アレル修復アウトカムを示した (図 4 G)。これらの結果は、低温ショック処理と D N A 修復経路阻害剤とを組み合わせした場合、一塩基改変を含有するホモ接合変異体の効果的な産生をもたらす、高効率の両アレルターゲティングを実証した。興味深いことに、我々が試験した条件下では、ヘテロ接合 B F P / G F P アウトカムの割合は一貫して低く (N + S 処理ありとなしで 0 . 7 % と 0 . 5 %)、ホモ接合アウトカムが高頻度であっても、ヘテロ接合変異体を効率的に産生させるためには別のターゲティング戦略が要求されるだろうことを示している。

【 0 1 8 2 】

(ヘテロ接合変異の作成)

高い総 H D R 頻度を保持しながら低い単一アレル編集率を解決するため、我々は、混合 s s O D N 修復鋳型戦略を採用した。ここで我々は、高い両アレル改変率を活用して、サイレント遮断変異を有する 1 つの編集アレルと 1 つの保護アレルからなる H D R 媒介複合ヘテロ接合変異を作成し、それによって後の標的部位での C a s 9 再切断と挿入欠失形成を防止した (図 5 A)。Y 6 6 H 変異体 s s O D N (s s O D N ' M ') と併せて、我々は、サイレント T 6 5 T 遮断変異 (s s O D N ' B ') を有する s s O D N、及びコントロールとして G F P 標的配列 (s s O D N ' W ') と一致する野生型 (W T) s s O D N をデザインした。s s O D N B を用いた T 6 5 T の H D R 媒介編集は、標的部位の P A M 配列を破壊し、C a s 9 から保護された G F P アレル (p G F P) となる (図 1 1 A、図 1 1

B)。ssODN Wを組み入れているアレルは、再切断されやすいと予想される。両アレルHDR修復アウトカムは、ホモ接合BFP/BFP細胞及びpGFP/pGFP細胞、ならびにHDR*と呼ばれるわずかな所望複合ヘテロ接合BFP/pGFP細胞の産生となると予想される。

【0183】

単一ssODN鋳型及びssODN組合せを試験した(図5B、図5C)。ssODN M(39.1%)と比較して、ssODN Bは、HDRによるpGFPアレルの産生を示唆する1.5倍のGFPポジティブ細胞の増加(57.2%)を示し、一方ssODN Wは、HDRを通じて産生されたWT GFPアレルが予想通り再切断を受けやすいことを示唆する1.8倍の減少(22.2%)を示した。ssODN M+BとssODN M+Wとの組合せは、同様の合計修復頻度を生じた。それでもなお、全てのssODN条件の中で、ssODN MとssODN Bとの組合せのみが、ssODN M単独で使用する(0.3%)よりも12倍高く、ssODN MとssODN Wとの組合せを使用する(0.18%)よりも20倍高い、3.6%の効率を有する(図5D、図5E)、一群のヘテロ接合BFP/GFPダブルポジティブ細胞をもたらした。低温ショックに加えてN+S処理を施した場合、複合ヘテロBFP/pGFP産生の効率は、ssODN M単独(12.4倍)又はssODN M+W(16.2倍)単独に対し同様の倍数の集積を保持したが、群全体では11.2%まで増加した(図11C~図11F)。これらの結果は、高いHDR効率条件下では、ヘテロ接合変異体アレルを第2アレル内の変異原性挿入欠失なしで得るためには、1つのアレルにCas9媒介再切断に対する保護が必要と

【0184】

結果として、我々は内因性遺伝子座に対するこのアプローチの適用性を確認した。最初に、我々は、Q118R及びN129Dミスセンス変異を導入する場合に、インフレーム挿入欠失変異を起こす場合と比較して、細胞障害性阻害剤ウアバインに対し2000倍の主要細胞抵抗力の増加を起こすと知られるATP1A1(図12A)を標的とした56。高ウアバイン濃度下でのHDRクローンを選択すると、低温ショックとN+S処理との組合せで、一内因性遺伝子座での頻度の相乗的増加を示す、1.8倍のコロニー数増加が観察された(図12B)。次に、我々は選択不可能な内因性遺伝子座を編集することを目指した。変異を有するssODN(ssODN M)、又はssODN Mとサイレント遮断変異を有するssODNとの組合せ(ssODN M+B)をどちらにも使用して、KC NH2内でN588K(c.1764C>A)変異及びPSMB8内でG201V(c.602 G>T)変異を独立に作成し、クローン分析を実施した(図12C、図12D)。両アレルHDRイベントに対応して、至適低温ショック及び薬剤処理下で、KC NH2又はPSMB8 ssODN Mのみを使用した場合、我々は、KC NH2で編集された96個のホモ接合クローンから14個、及びPSMB8で編集された91個のホモ接合クローンから18個を得た(図12E、図12F)。さらに、同族アレルに変異体ssODN M及びサイレント遮断ssODN Bを組み入れている両アレルHDRイベントに対応して、ssODN M+B組合せを使用した場合で、我々は、複合ヘテロ接合クローンしかKC NH2(4/92)又はPSMB8(4/95)で得ることができなかった。これらの結果により、我々のアプローチは、ヒトiPS細胞内内因性遺伝子座でのホモ接合クローンとヘテロ接合クローンとの両方を産生するのに非常に有効であることが裏付けられた。

【0185】

(相乗的遺伝子編集は内因性遺伝子座でのHDRを促進する)

最後に、細胞治療のための遺伝子編集iPS細胞の適用を考えるにあたって、我々はGMP細胞用途として承認された遺伝子導入装置を使用して我々の定義した条件を分析した。異なる2つのドナー遺伝的背景で産生されたヘテロ接合及びホモ接合のGFP iPS細胞株における、通常培養条件、低温ショック条件、及び低温ショックとN+Sとの組合せ条件でのDNA修復アウトカム頻度を比較した(図13A~図13H)。1383D6遺伝的背景ではHDR効率は、未処理のコントロールと比較して、低温ショックで1.2

倍、低温ショックとN + S処理との組合せで1.6倍、共にヘテロ接合細胞株(59.1%及び75.6%対47.9%)及びホモ接合細胞株(64.6%及び84.1%対52.9%)内で増加した。ホモ接合GFP-iPS細胞をssODN-M及びssODN-Bで編集した場合、複合ヘテロBFP/pGFP編集の効率は低温ショックで1.5倍、低温ショックとN + S処理との組合せで2.5倍増加した(14.4%から24.1%対9.8%)。同様の結果は、409B2遺伝的背景でも得られた。

【0186】

さらに、XL413を用いた同調化とN + S処理を用いたDNA修復調節もやはり、相乗的遺伝子編集によるHDR頻度を高めるエビデンスを示した(図6A~図6H)。意外なことに、HDRアウトカムは、84.8%の両アレルHDR編集アウトカムを含め、低温ショック条件下でXL413とN + S処理とを組み合わせた場合、ヘテロ接合GFP-iPS細胞の単一アレル編集に83.3%に到達し(図6A、図6B)、ホモ接合GFP-iPS細胞の両アレル編集に96.6%に到達した(図6C、図6D、図14A、図14B)。さらに、ホモ接合GFP-iPS細胞をssODN-MとssODN-Bとの混合修復鋳型で編集した場合、32.2%の細胞が複合ヘテロ接合体となった(図6E、図6F、図14C、図14D)。最終的に我々は、未処理(-)のベースラインHDR水準と比較した、XL413とN + Sとの組合せ(XL + N + S)又は低温ショックとN + Sとの組合せ(32 + N + S)を利用して(図6G、図6H)、内因性遺伝子座での相乗的遺伝子編集のHDR頻度を確認した(図15A~図15J)。HDRアウトカムには、一方又は両方のアレルに鋳型媒介修復イベントを有するクローンが含まれ、一方MutE Jアウトカムには、少なくとも1つのアレルに挿入欠失を有するクローンが含まれた。全体として、相乗的遺伝子編集によって、全ての標的遺伝子座に数倍のHDR頻度の増加がもたらされ、ヒトゲノムを標的とするこの戦略の広範な適用性を裏付けた(図6G)。我々は、5つの遺伝子座(KCNH2 N588D/N588K、APRT M136T、HES7 R25W、及びPSMB8 G201V)で、総HDR効率56%~72%を意味する、HDRアレルを有する32個のクローンから18個~23個のクローンをXL + N + S処理下で得た。興味深いことに、XL413での細胞周期停止は、N + S処理と組み合わせた場合、低温ショックよりも強い効果をHDR比率にもたらした。他の5つの遺伝子座(KCNE1 D85N、KCNH2 N45D、SCN5A A1428S、及びKCNJ11 T293N/T294M)では、非改変野生型クローンの割合がより高いことから示される通り、総編集効率は低く、gRNA活性が貧弱であることを示唆している。この場合、32個のHDRクローンのうち0~8個、又はHDR効率0~25%を達成した。同様に、HDR/MutE J比は相乗的遺伝子編集で改善され、ほとんどの場合で低温ショックと比較して、XL413でより強い効果が観察された(図6H)。要約すると、これらの結果は、細胞周期同調化及びDNA修復経路調節を介した相乗的遺伝子編集がエレクトロポレーション装置間で、また他のiPS細胞株に移転可能であり、複数の内因性遺伝子座でのホモ接合変異及び複合ヘテロ変異の効率的なクローン産生をもたらすことを裏付ける。

【0187】

(考察)

この研究において、我々は化学的介入及び培養条件的介入を利用して、ヒトiPS細胞内でのssODN媒介の遺伝子編集に、DNA修復アウトカムにHDRになるようにバイアスをかけようとした(図7)。低温ショックは、重度(4~16)、中程度(16~25)、及び軽度(25~35)の低温下で、細胞機能に代謝減速、アポトーシス経路の活性化、遺伝子発現の変化、及び細胞周期停止等様々な影響を与えることが示された。32の中程度の低温ショックは、様々な内因性ストレス及び環境ストレスに対する細胞保護の重要な機能を有する寒冷誘導性RNA結合タンパク質(CIRP)及びRNA結合モチーフタンパク質3(RBM3)のピーク水準を特徴とする。遺伝子編集という観点から、低温ショックは、そのメカニズムは不明であるが、HDR効率を改善することが示された。ここで我々は、低温ショックが細胞周期進行を遅らせ、G2/M期で細胞を蓄

積させ、DNA合成率を低減させたことを示した。あるいは、低温ショックは、ヌクレアーゼ安定性、gRNA関連動態又はDNA切断動態、修復中間体安定化、翻訳後調節安定化、及び細胞生存率安定化等、他の細胞周期非依存的効果を通じて顕在化しているとも言える。低温ショックのこれら追加的効果から、G1/S期でのXL413誘導細胞周期停止との組合せで観察された相乗作用を説明することができる。

【0188】

DNA修復及び遺伝子編集の領域において、細胞周期の調節は進行中の関心対象分野である。S期でのCDK活性増大は、CtIP等鍵となるHDRタンパク質のリン酸化を刺激し、DSB末端切除及びHDRを促進すると提唱されてきた。アフィディコリンでのG1/S境界、及びノコダゾールでのG2/M後期での細胞周期同調化は、HDR頻度を高めることが示された。さらに、サイクリンD1(CCND1)過剰発現によるG1/S移行とノコダゾールでのG2/M期中の細胞周期同調化とを同時促進することが、HDR効率を更に改善すると報告された。ここで我々は、iPS細胞におけるCDC7阻害剤XL413による遺伝子編集促進を報告する。XL413は、我々のiPS細胞での観察と一致しているが、癌細胞株のS/G2/M期で細胞を蓄積させると報告された一方46、G1/S前期での停止は核型的に正常な細胞で報告された45。ヒトiPS細胞はまた、胚性幹(ES)細胞と同様に、約2.5時間の短縮されたG1期を有し、G2/M期でのノコダゾール誘導同調化の約4時間後にS期に入ることが知られている。CRISP-Cas9ターゲティングの間、RNP活性は、デリバリーから4時間以内に開始し、約24時間後にRNP分解64によりほとんど終了するため、S/G2期でのDSB形成とHDR経路の動員のためには限られた時間枠しか残されていない。したがって、ヌクレアーゼ活性が高い時のG2/Mでの細胞周期遅延又はG1/S前期での細胞周期同調化は、急速なS期への細胞周期移行を確実にするかもしれない、このことはどのような場合でも、iPS細胞において支配的な細胞周期状態であり、HDR修復に好都合である。ノコダゾールが我々の実験においてiPS細胞遺伝子編集を促進できなかったことは興味深い、XL413はさらなる探索を保証する、明らかな積極的効果を有した。

【0189】

我々は、NHEJ阻害剤であるNU7441及びSCR7が、独立にiPS細胞内のHDR効率を改善し、組み合わせた場合は更にHDR効率を改善することを発見した。DNA-PKcsは、DSB形成時に特異的に活性化され、DNAエンドを連結する作用をするDNAリガーゼIVを含めた、NHEJ経路のタンパク質成分を動員する。我々は、NU7441を用いたDNA-PKcsの阻害によって、NHEJ複合体構造が回避され、代替のDNA修復経路選択がなされるかもしれない一方、SCR7を用いたDNAリガーゼIVの下流阻害については、細胞はすでにNHEJ修復又は何か代替のMutEJ修復に傾倒しているのではないかと推測する。これによって、SCR7処理と比較してNU7441での高いHDR効率を説明することができる。興味深いことに、RS-1又はL755507によるHDRの促進は観察されなかった。我々が誘導しようと目指した特定のタイプのHDRに関して最近の報告書は、ssODN媒介のDSB修復が、RAD51に依存しないプロセスであり、したがって我々のシステムでの、HDRエンハンサー、RS-1とおそらくL755507の限られた効果を説明するであろう、synthesis dependent strand annealing (SDSA)を経ると推測する。

【0190】

細胞周期同調化をNHEJ阻害剤と組み合わせようと試みた過去の研究はしかし、単独条件と比較して、HDR効率の改善は観察されなかった。これは、HEK293T細胞のような核型的に異常な細胞株の使用によるものか、又は多能性幹細胞内でのSCR7阻害剤単独の効率性の低さのためとすることができる。加えてHDR活性は、核型的に正常な細胞のS期半ばでピークとなりG2期で低下し、これは我々がノコダゾールによるG2後期/M期の同調化でのiPS細胞内で観察した、限定された効率を意味するだろう。総合すると、これらの結果は、細胞周期とDNA修復経路選択とを同時に調節する別の条件が、HDR頻度を相乗的に改善することを示す。我々の知るところでは、正確な遺伝子編集

10

20

30

40

50

に対する細胞周期同調化とDNA修復経路調節との相乗的効果を報告したのは我々が最初である。

【0191】

このアプローチを利用して、我々は、ホモ接合変異を作成した場合、84.8%の両アレルHDR編集を得たことを含め、両アレル編集中に最大96.6%のHDRアレルを有する細胞を得た。驚くべきことに、高編集効率は、ほとんど非存在のヘテロ接合変異体細胞と関連した。過去の報告書と一致しているが、正確な単一アレル編集によって形成された単体HDRアレルは、大部分が第2アレルの挿入欠失と対になった。

【0192】

したがって、我々は、Cas9による再切断から保護される複合ヘテロ接合変異体アレルを形成するために混合ssODN戦略を採用し、GFPレポーターに最大32.2%の複合ヘテロ接合変異体を産生させた。疾患モデルのための内因性標的を考慮して、我々は複数の遺伝子座でホモ接合変異及び複合ヘテロ接合変異を作成し、相乗的遺伝子編集ベースラインHDR水準と比較して、一貫してHDRアウトカム頻度を数倍改善することを実証した。結局のところ、第2アレルを保護するサイレント変異なしでヘテロ接合変異を得ることは、2回目の編集、又は二段階ドナーベクターターゲティングの使用及びMhAX法等の切除プロセスの使用が必要となる可能性がある。他の戦略は、単一アレル編集へとバイアスをかけるためにハプロタイプ特異性、変換系、又はヌクレアーゼ滴定を活用することはできるだろうが、これらのアプローチは遺伝子座依存的となり、低編集効率という代償を払うことになるだろう。我々は、相乗的遺伝子編集が、二段階ターゲティングを利用して遮断変異を導入し除去するssODNに基づいた戦略を改善するであろうと期待する。結論として、我々はアレル特異的DNA修復アウトカムを解決する能力のある両アレルレポーターシステムを樹立し、低温ショック、細胞周期同調化、及びDNA修復調節を利用してHDR比及びHDR/MutEJ比を改善する相乗的遺伝子編集条件を定義した。高効率両アレル改変を活用して、我々は複合ヘテロ接合iPS細胞株を産生する戦略を実証した。我々は両アレル編集アウトカムの信頼性を改善することが、ヒトiPS細胞を使用した顕性及び潜性の遺伝性疾患モデルの作成ならびに場合によっては治療の確立をも大きく促進するであろうと期待する。

【産業上の利用可能性】

【0193】

本発明によれば、ゲノム内の標的DNA二本鎖切断(DSBs)が相同組換え修復(HDR)経路又は同等の経路によって修復される、ゲノム編集された細胞を効率的に製造するための技術を提供することができる。

10

20

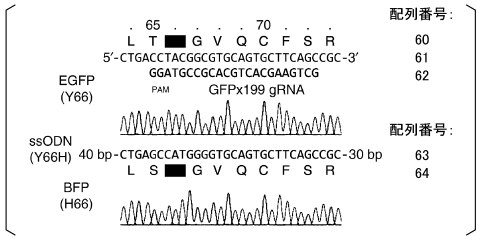
30

40

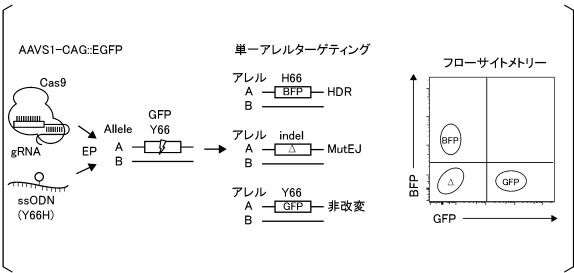
50

【図面】

【図 1 A】

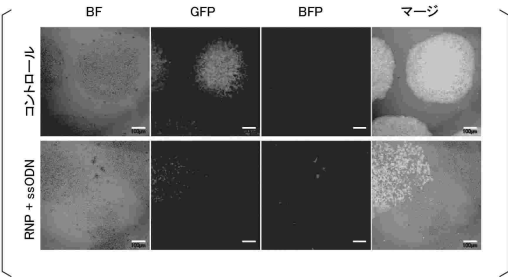


【図 1 B】

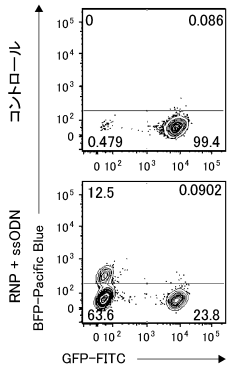


10

【図 1 C】

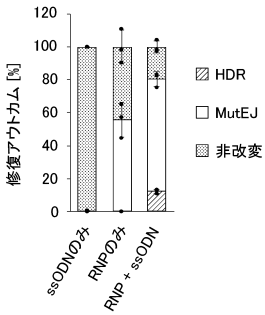


【図 1 D】

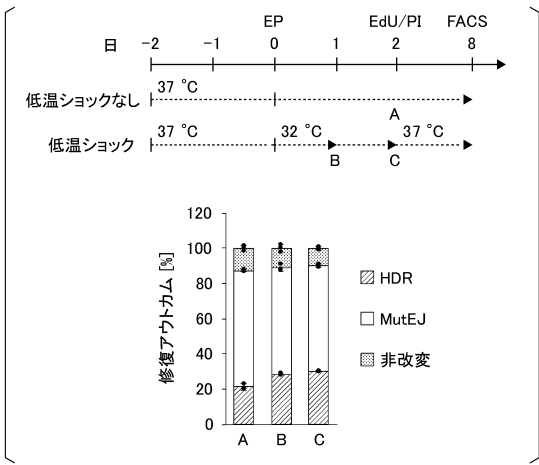


20

【図 1 E】



【図 2 A】

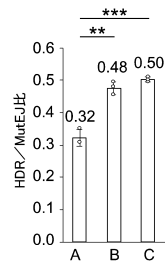


30

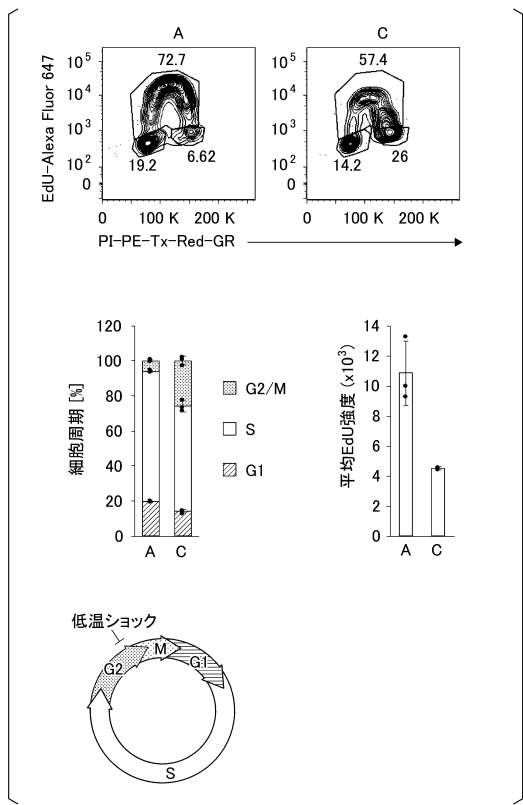
40

50

【図 2 B】



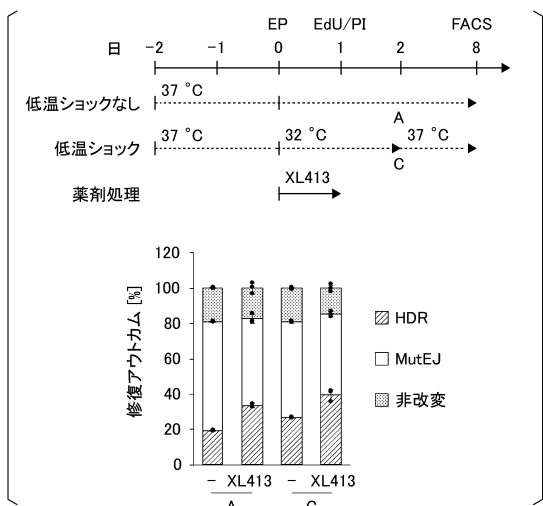
【図 2 C】



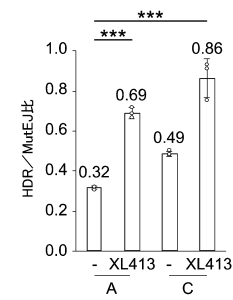
10

20

【図 2 D】



【図 2 E】

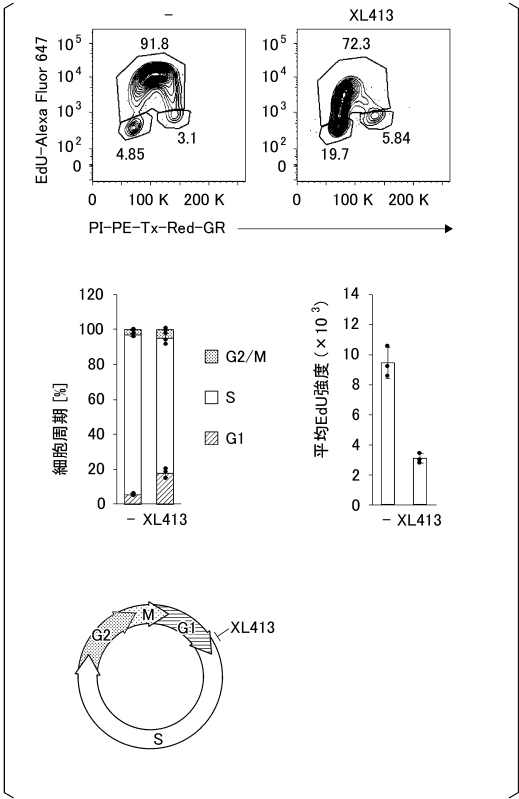


30

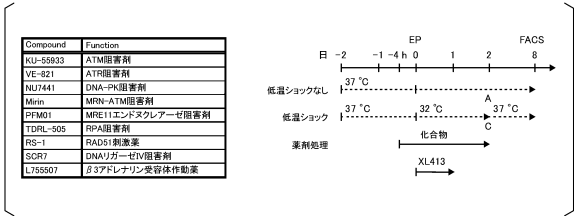
40

50

【図 2 F】



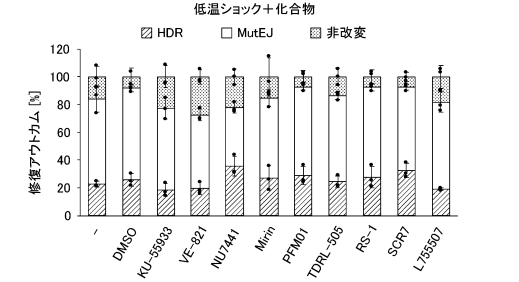
【図 3 A】



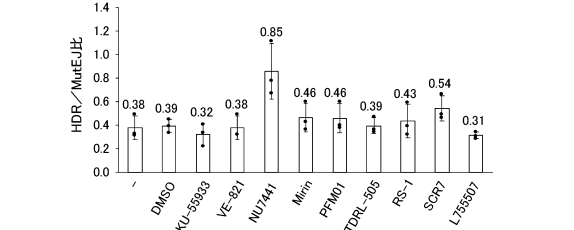
10

20

【図 3 B】



【図 3 C】

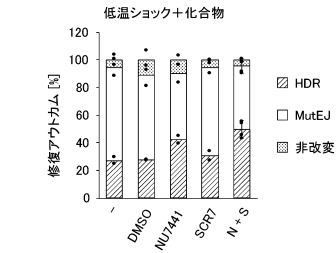


30

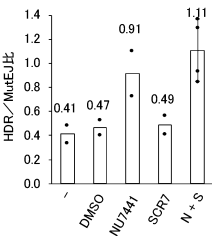
40

50

【図 3 D】

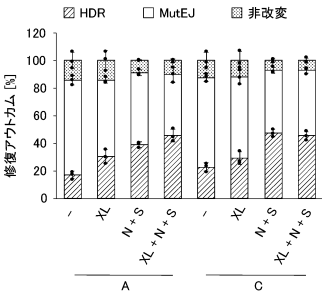


【図 3 E】

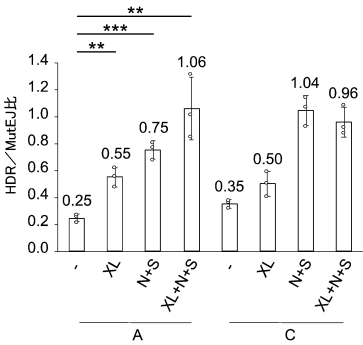


10

【図 3 F】

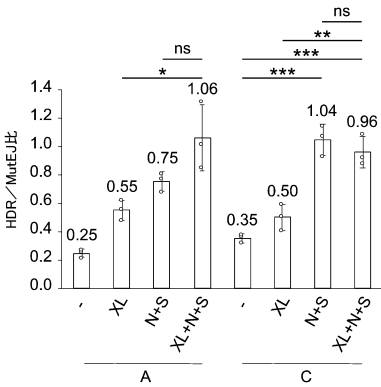


【図 3 G】

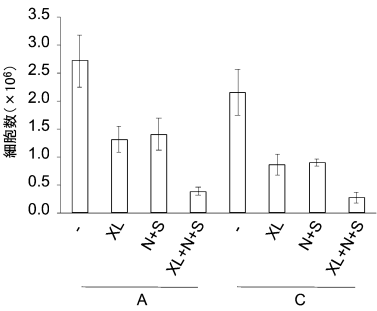


20

【図 3 H】



【図 3 I】

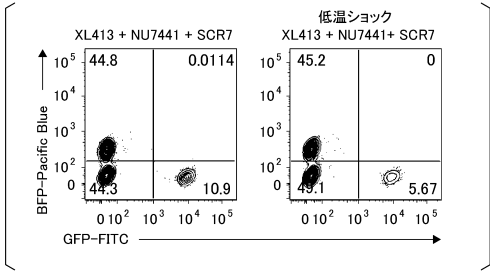


30

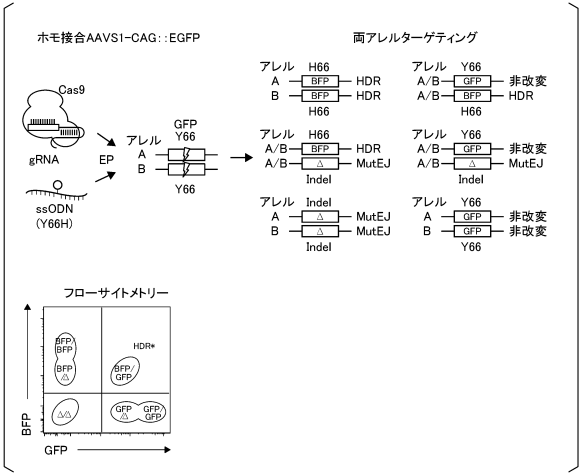
40

50

【図 3 J】

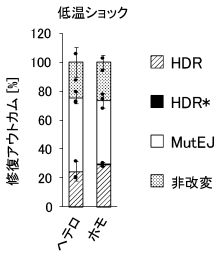


【図 4 A】

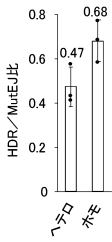


10

【図 4 B】

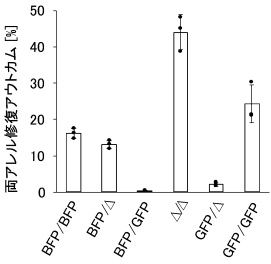


【図 4 C】

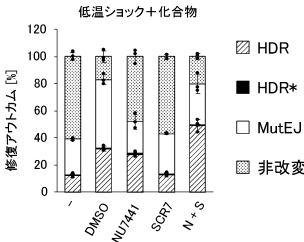


20

【図 4 D】



【図 4 E】

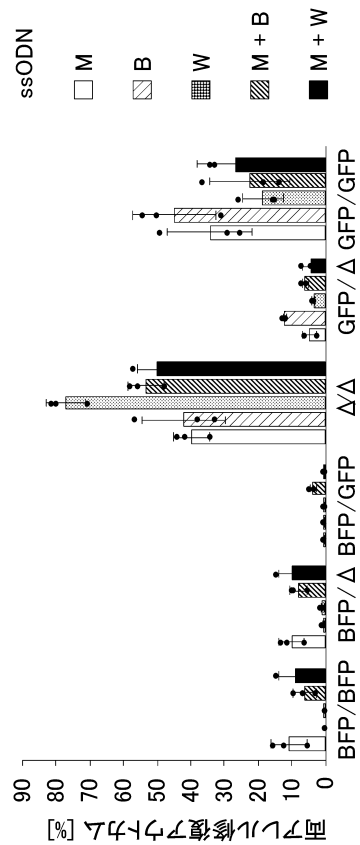


30

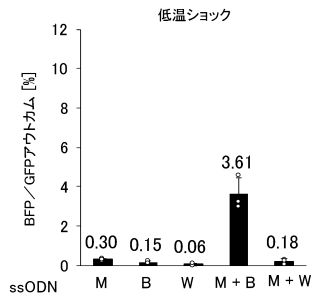
40

50

【図 5 C】



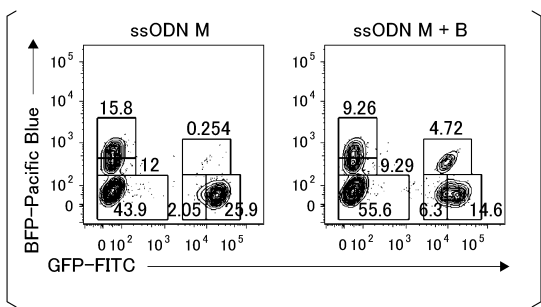
【図 5 D】



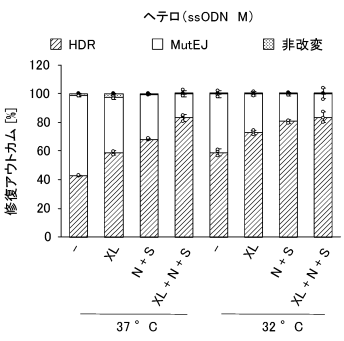
10

20

【図 5 E】



【図 6 A】

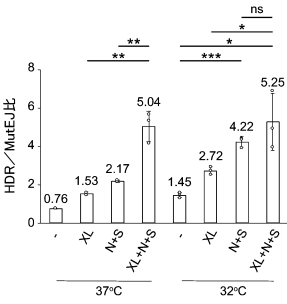


30

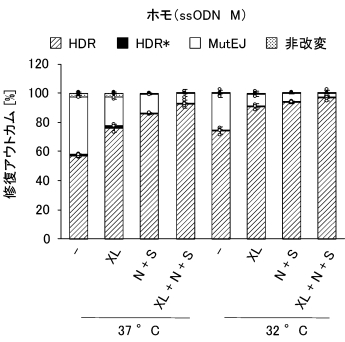
40

50

【図 6 B】

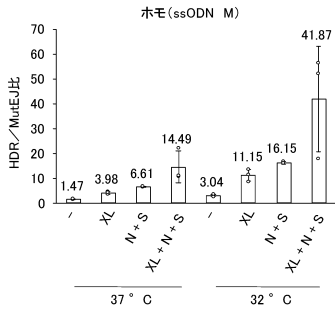


【図 6 C】

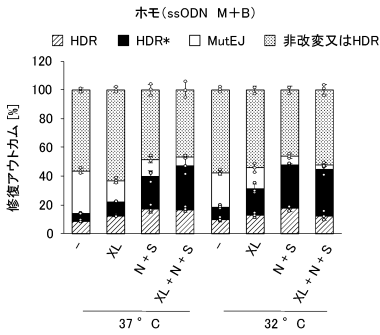


10

【図 6 D】



【図 6 E】



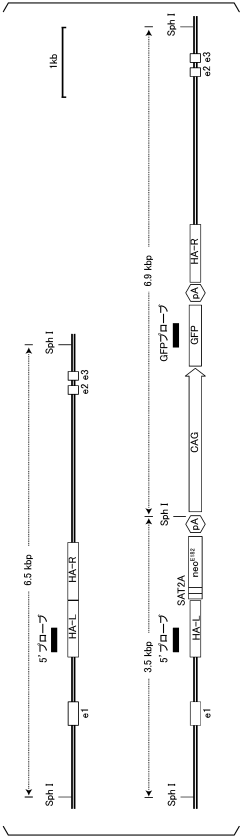
20

30

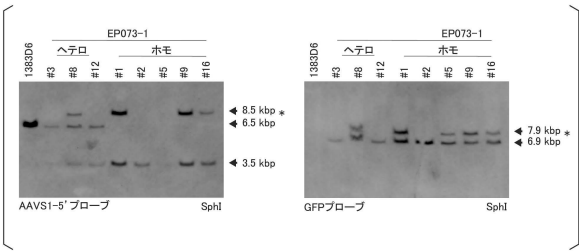
40

50

【図 8 A】



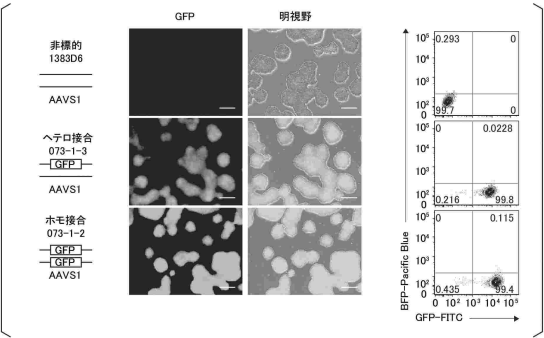
【図 8 B】



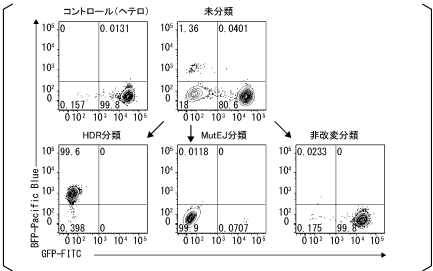
10

20

【図 8 C】



【図 9 A】

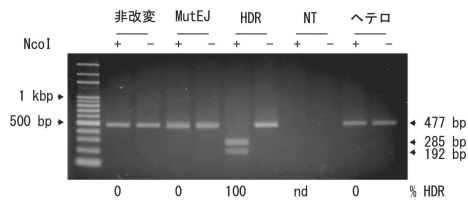


30

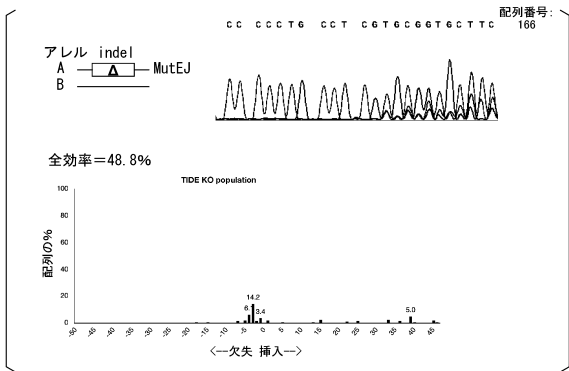
40

50

【図 9 B】

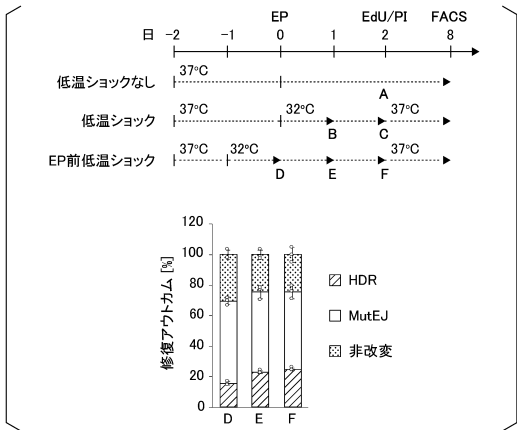


【図 9 C】

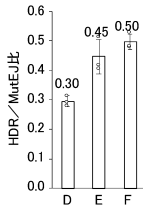


10

【図 10 A】

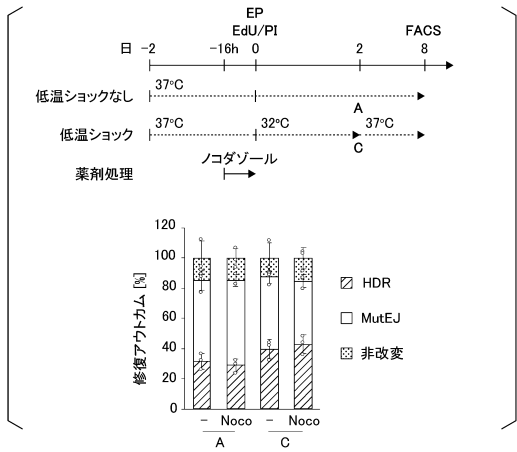


【図 10 B】

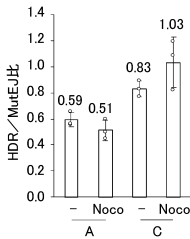


20

【図 10 C】



【図 10 D】

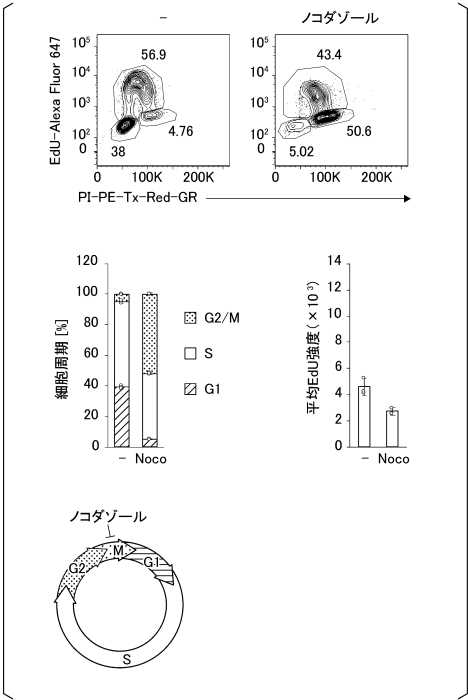


30

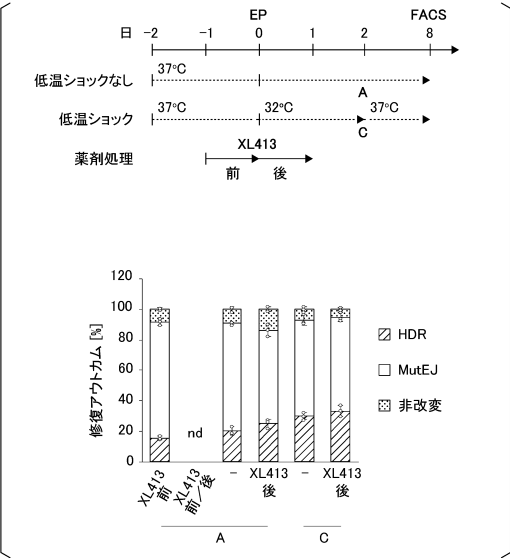
40

50

【図 10 E】



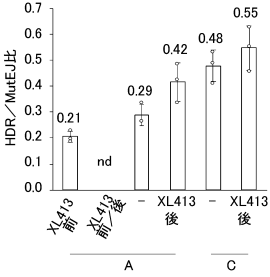
【図 10 F】



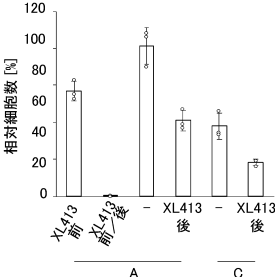
10

20

【図 10 G】



【図 10 H】

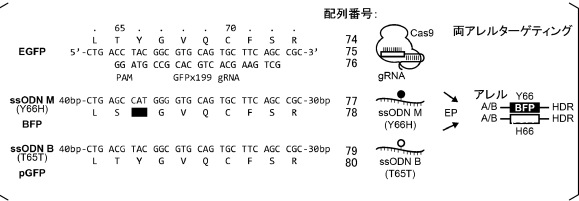


30

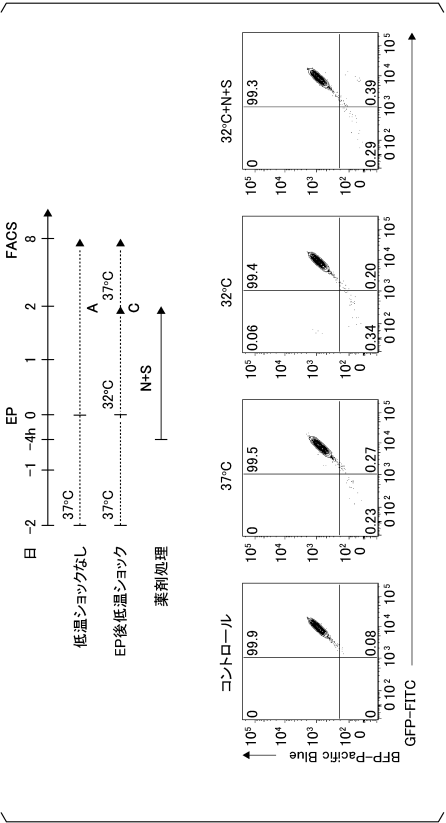
40

50

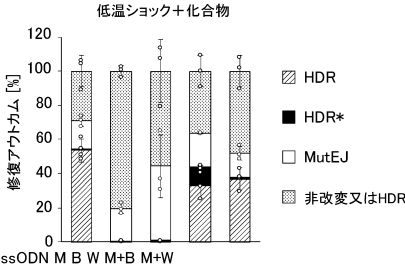
【図 1 1 A】



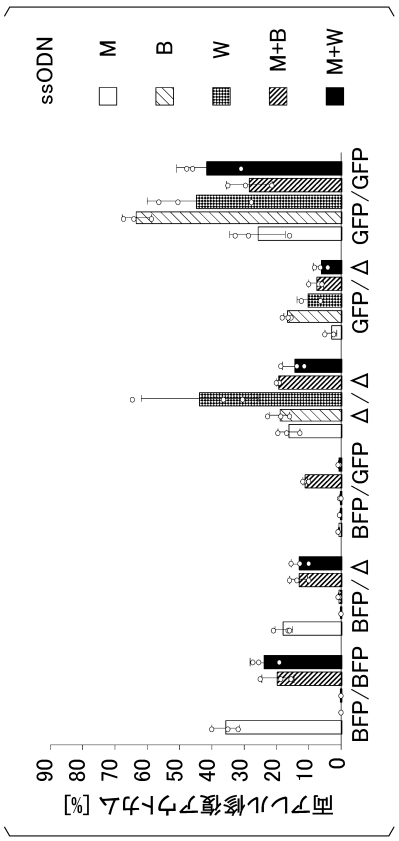
【図 1 1 B】



【図 1 1 C】



【図 1 1 D】



10

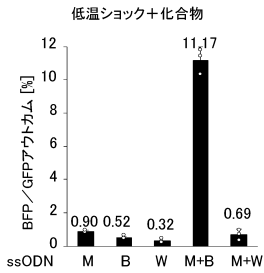
20

30

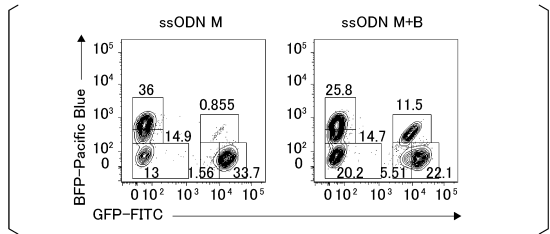
40

50

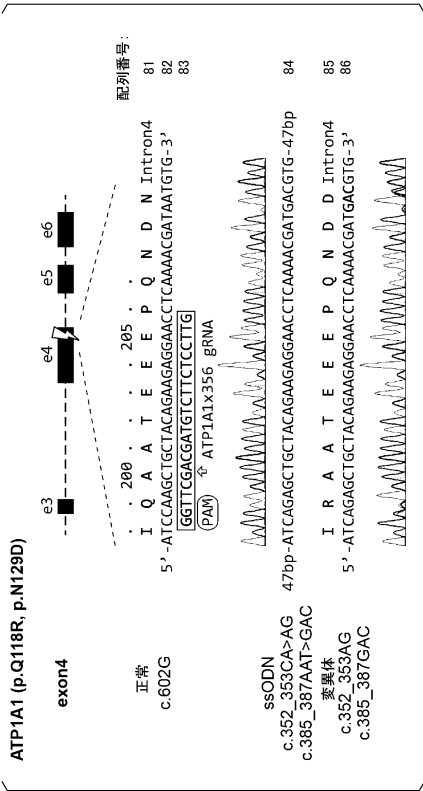
【図 1 1 E】



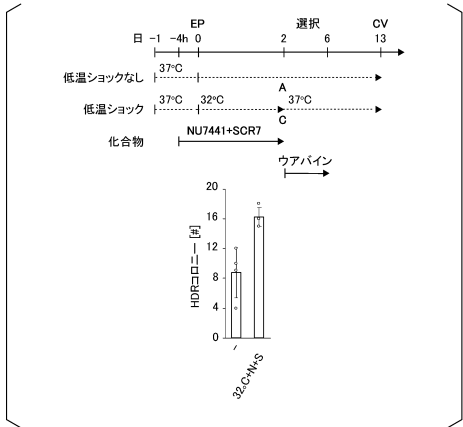
【図 1 1 F】



【図 1 2 A】



【図 1 2 B】



10

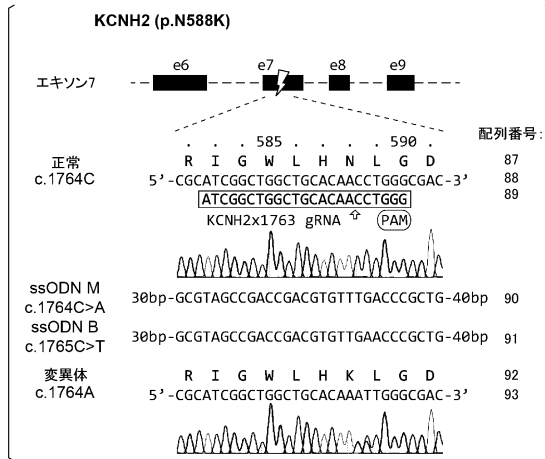
20

30

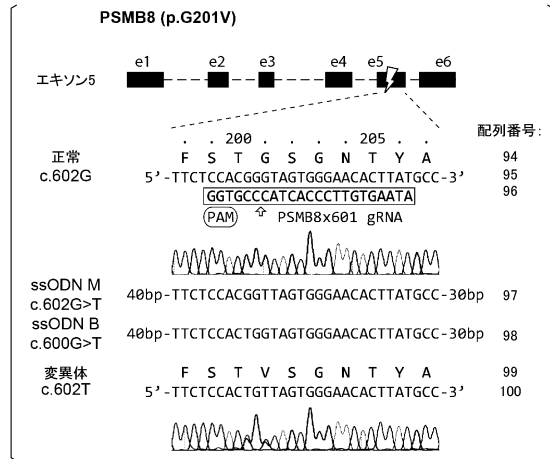
40

50

【図 1 2 C】

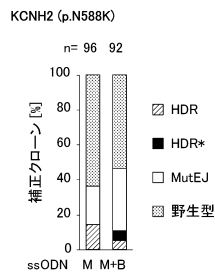


【図 1 2 D】

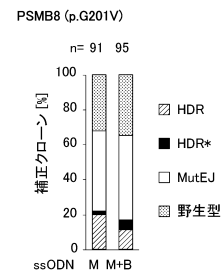


10

【図 1 2 E】

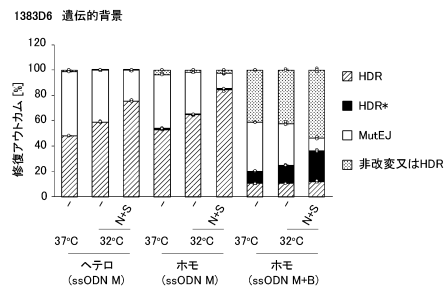


【図 1 2 F】

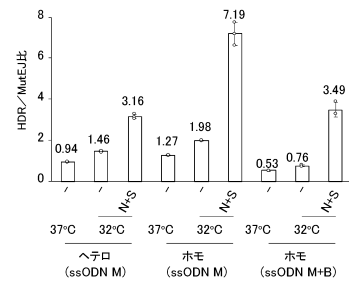


20

【図 1 3 A】



【図 1 3 B】

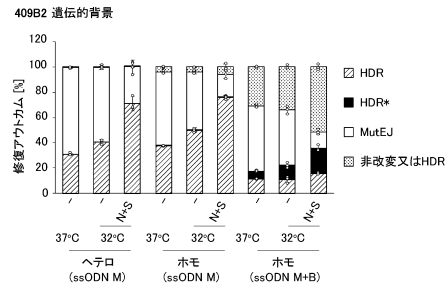


30

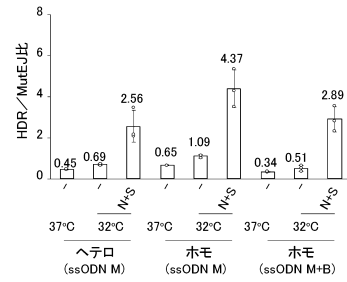
40

50

【図 1 3 C】



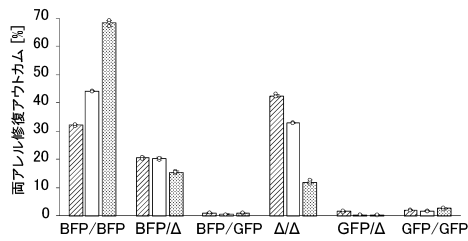
【図 1 3 D】



10

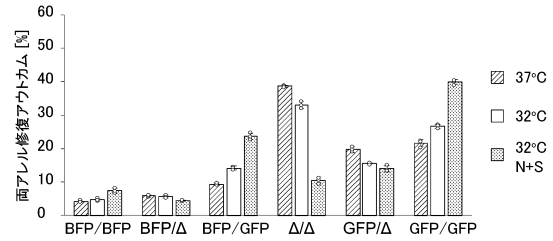
【図 1 3 E】

1383D6 遺伝的背景ホモ (ssODN M)



【図 1 3 F】

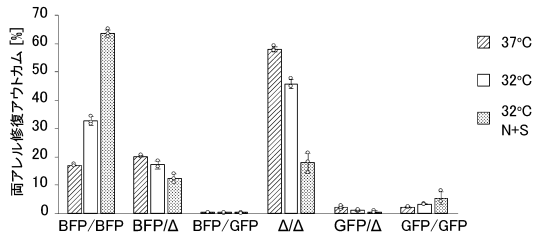
1383D6 遺伝的背景ホモ (ssODN M+B)



20

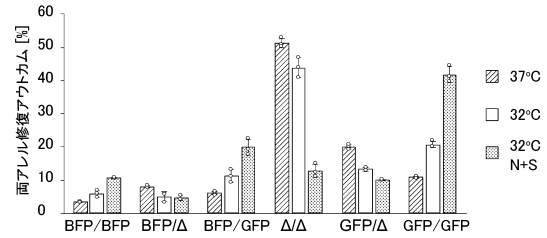
【図 1 3 G】

409B2 遺伝的背景ホモ (ssODN M)



【図 1 3 H】

409B2 遺伝的背景ホモ (ssODN M+B)



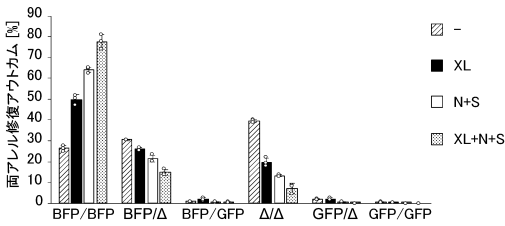
30

40

50

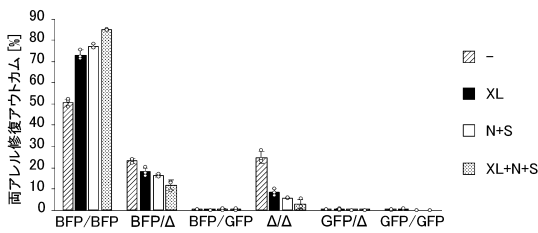
【図 1 4 A】

ホモ(ssODN M)低温ショックなし



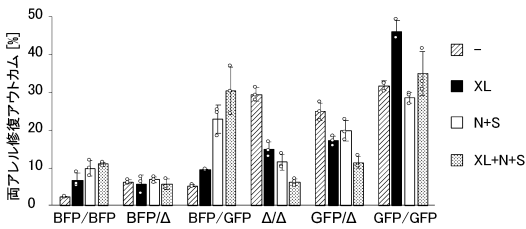
【図 1 4 B】

ホモ(ssODN M)低温ショック



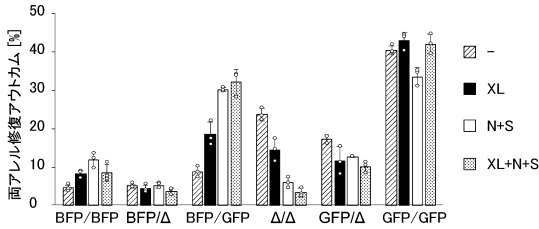
【図 1 4 C】

ホモ(ssODN M+B)低温ショックなし



【図 1 4 D】

ホモ(ssODN M+B)低温ショック



【図 1 5 A】

KCNE1 (p.D85N)		80	85	配列番号:
正常	N V Y I E S D A W Q			101
c.253G	5'-AACGTCTACATCGAGTCCGATGCCTGGCAA-3'			102
	TCTACATCGAGTCCGATGCCTGG			103
ssODN M	KCNE1x255 gRNA PAM			
c.253G>A	29bp-TTGCAGATTGAGTCAGGTTACGGACCGTT-41bp			104
ssODN B	29bp-AACGTCTACATCGAGTCCGATGCCTGGCAA-41bp			105
c.255T>C				
変異体	N V Y I E S N A W Q			106
c.253A	5'-AACGTCTACATCGAGTCCGATGCCTGGCAA-3'			107

【図 1 5 B】

KCNH2 (p.N45D)		80	85	配列番号:
正常	C A V I Y C N D F G			108
c.133A	5'-TGCGCCGTCTACTGCAACGACGGCTTC-3'			109
	GCGGTCTCTACTGCAACGACGG			110
ssODN M	KCNH2x134 gRNA PAM			
c.133A>G	30bp-ACGCGGCAGTAGATGACGCTGCTGCCGAAG-40bp			111
ssODN B	30bp-TGCGCCGTCTACTGCAATGACGGCTTC-40bp			112
c.135C>T				
変異体	C A V I Y C D D F G			113
c.133G	5'-TGCGCCGTCTACTGCGATGACGGCTTC-3'			114

【図 1 5 C】

SCN5A (p.A1428S)		1425	1430	配列番号:
正常	M D I M Y A A V D S			115
c.4282G	5'-ATGGACATTATGTATGCAGCTGTGGACTCC-3'			116
	GGACATTATGTATGCAGCTGTGG			117
ssODN M	SCN5Ax4282 gRNA PAM			
c.4282G>T	31bp-TACCTGTAAATACATACGTAGACACCTGAGG-39bp			118
ssODN B	31bp-ATGGACATTATGTATGCAGCTGTGACTCC-39bp			119
c.4287G>T				
変異体	M D I M Y A S V D S			120
c.4282T	5'-ATGGACATTATGTATGCATCTGTTGACTCC-3'			121

【図 1 5 D】

KCNH2 (p.N588D)		585	590	配列番号:
正常	R I G W L H N L G D			122
c.1762A	5'-CGCATCGGCTGGCTGCACAACTGGGCGAC-3'			123
	ATCGGCTGGCTGCACAACTGGG			124
ssODN M	KCNH2x1763 gRNA PAM			
c.1762A>G	30bp-GCGTAGCCGACCGACGTGCTGGACCCGCTG-40bp			125
ssODN B	30bp-GCGTAGCCGACCGACGTGTTGAACCCGCTG-40bp			126
c.1765C>T				
変異体	R I G W L H D L G D			127
c.1762G	5'-CGCATCGGCTGGCTGCACGACTTGGGCGAC-3'			128

10

20

30

40

50

【図 15 E】

		配列番号:
KCNH2 (p.N588K)		
正常	R I G W L H N L G D	129
c.1764C	5'-CGCATCGGCTGGCTGCACAACCTGGGCAC-3'	130
	ATCGGCTGGCTGCACAACCTGGG	131
ssODN M	KCNH2x1763 gRNA PAM	
c.1764C>A	30bp-GCGTAGCCGACCGACGTGTTTGACCCGCTG-40bp	132
ssODN B	30bp-GCGTAGCCGACCGACGTGTTGAACCCGCTG-40bp	133
c.1765C>T		
変異体	R I G W L H K L G D	134
c.1764A	5'-CGCATCGGCTGGCTGCACAAATTGGGCAC-3'	135

【図 15 F】

		配列番号:
APRT (p.M136T)		
正常	Intron4 G T M N A A C	136
c.407T	5'-CCATCCCCAGGAACCATGAACGCTGCCTGT-3'	137
	GGGGTCCTTGGTACTTGCACGG	138
ssODN MB	PAM APRTx400 gRNA	
c.407T>C	40bp-CCATCCCCAGGTACCACGAACGCTGCCTGT-30bp	139
c.402A>T		
変異体	Intron4 G T T N A A C	140
c.407C	5'-CCATCCCCAGGTACCACGAACGCTGCCTGT-3'	141

【図 15 G】

		配列番号:
HES7 (p.R25W)		
正常	P L V E K R R R D R	142
c.73C	5'-CCGCTTGTGGAGAAGCGGCGCGGGACCGC-3'	143
	GCTTGTGGAGAAGCGGCGCGGG	144
ssODN M	HES7x70 gRNA PAM	
c.73C>T	31bp-CCGCTTGTGGAGAAGCGGCGCTGGGACCGC-39bp	145
変異体	P L V E K R R W D R	146
c.73T	5'-CCGCTTGTGGAGAAGCGGCGCTGGGACCGC-3'	147

【図 15 H】

		配列番号:
PSMB8 (p.G201V)		
正常	F S T G S G N T Y A	148
c.602G	5'-TTCTCCACGGGTAGTGGGAACACTTATGCC-3'	149
	GGTGCCCATCACCTTGTGAATA	150
ssODN M	PAM PSMB8x601 gRNA	
c.602G>T	40bp-TTCTCCACGGTTAGTGGGAACACTTATGCC-30bp	151
変異体	F S T V S G N T Y A	152
c.602T	5'-TTCTCCACGGTTAGTGGGAACACTTATGCC-3'	153

10

【図 15 I】

		配列番号:
KCNJ11 (p.T293N)		
正常	L E G V V E T T G I	154
c.878C	5'-CTGGAAGGCGTGGTGGAAACACGGGCATC-3'	155
	GAAGGCGTGGTGGAAACACGGG	156
ssODN M	KCNJ11x878 gRNA PAM	
c.878C>A	30bp-GACCTTCGCAACCACTTTGTGCCGTAG-40bp	157
変異体	L E G V V E N T G I	158
c.878A	5'-CTGGAAGGCGTGGTGGAAACACGGGCATC-3'	159

【図 15 J】

		配列番号:
KCNJ11 (p.T294M)		
正常	L E G V V E T T G I	160
c.881C	5'-CTGGAAGGCGTGGTGGAAACACGGGCATC-3'	161
	GAAGGCGTGGTGGAAACACGGG	162
ssODN M	KCNJ11x878 gRNA PAM	
c.881C>T	30bp-GACCTTCGCAACCACTTTGTACCCGTAG-40bp	163
変異体	L E G V V E T M G I	164
c.881T	5'-CTGGAAGGCGTGGTGGAAACCATGGGCATC-3'	165

20

【配列表】

0007649562000001.app

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

C 1 2 N	1/21 (2006.01)	C 1 2 N	1/21	
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/10	
C 1 2 Q	1/02 (2006.01)	C 1 2 Q	1/02	
C 1 2 Q	1/68 (2018.01)	C 1 2 Q	1/68	
C 1 2 N	15/55 (2006.01)	C 1 2 N	15/55	
C 1 2 N	9/22 (2006.01)	C 1 2 N	9/22	
G 0 1 N	33/542 (2006.01)	G 0 1 N	33/542	A

Course Hydra XIV European Summer School on Stem Cell Biology and Regenerative Medicine 15 - 22 September 2019

、要旨集

特許法第30条第2項適用 (2) 公開日 令和1年9月18日 集会名、開催場所 EMBO / FEBS Lecture Course Hydra XIV European Summer School on Stem Cell Biology and Regenerative Medicine 15 - 22 September 2019、Hydra、ギリシャ、発表番号42 ポスター発表

特許法第30条第2項適用 (3) 発行日 令和1年9月26日 刊行物 ISSCR / KSSCR International Symposium 26 - 27 September 2019、要旨集

特許法第30条第2項適用 (4) 公開日 令和1年9月26日 集会名、開催場所: ISSCR / KSSCR International Symposium 26 - 27 September 2019、ソウル、韓国、発表番号P - 801 ポスター発表

特許法第30条第2項適用 (5) 発行日 令和1年11月20日 刊行物 第42回 日本分子生物学会年会 要旨集

特許法第30条第2項適用 (6) 公開日 令和1年12月3日 集会名、開催場所: 第42回 日本分子生物学会年会、福岡、発表番号2P - 0637 ポスター発表

特許法第30条第2項適用 (7) 発行日 令和2年6月8日 刊行物 Maurissen T. L. and Woltjen K., Synergistic gene editing in human iPS cells via cell cycle and DNA repair modulation, NATURE COMMUNICATIONS, 11: 2876, 2000.

特許法第30条第2項適用 (8) ウェブサイトの掲載日 令和2年6月9日 ウェブサイトのアドレス <https://www.cira.kyoto-u.ac.jp/e/pressrelease/news/200609-160000.html> <https://www.cira.kyoto-u.ac.jp/j/pressrelease/news/200609-160000.html>

(出願人による申告) 平成31年度(令和元年度)、国立研究開発法人日本医療研究開発機構、「再生医療実現拠点ネットワークプログラム 疾患特異的iPS細胞の利活用促進・難病研究加速プログラム」「日本人健康人集団由来iPS細胞株の構築」委託研究開発、産業技術力強化法第17条の適用を受ける特許出願 国立大学法人京都大学内

(72)発明者 モーリセン トーマス ルーク

京都府京都市左京区吉田本町36番地1 国立大学法人京都大学内

審査官 野村 英雄

(56)参考文献

特表2019-521139(JP, A)

特表2016-509063(JP, A)

"Cold-shock and the mammalian cell cycle.", [online], INTERNET, PUBMED, 2002年, PMID 12429927, RIEDER, C.L., et al., CELL CYCLE, 2002, Vol.1, No.3, pp.169-175, [検索日 2024年8月14日]

WAN, L., et al., "Chemical inactivation of cdc7 kinase in budding yeast results in a reversible arrest that allows efficient cell synchronization prior to meiotic recombination.", GENETICS, 2006年12月, Vol.174, No.4, pp.1767-1774, DOI: 10.1534/genetics.106.034303, [Epub 2006 Oct 22]

KOLTUN, E.S., et al., "Discovery of XL413, a potent and selective CDC7 inhibitor.", BIOORGANIC & MEDICINAL CHEMISTRY LETTERS, 2012年06月01日, Vol.22, No.11, pp.3727-

3731 , DOI: 10.1016/j.bmcl.2012.04.024
(58)調査した分野 (Int.Cl. , D B 名)
C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0
C 1 2 N 1 / 0 0 - 7 / 0 8
C 1 2 Q 1 / 0 0 - 3 / 0 0
C 0 7 K 1 / 0 0 - 1 9 / 0 0
J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)
P u b M e d