

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局

(43) 国際公開日  
2022年1月27日(27.01.2022)



(10) 国際公開番号

WO 2022/019325 A1

(51) 国際特許分類:

A61K 35/12 (2015.01) C12N 5/10 (2006.01)  
A61P 17/00 (2006.01) C12N 15/63 (2006.01)  
C12N 5/071 (2010.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2021/027279

(22) 国際出願日: 2021年7月21日(21.07.2021)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:  
特願 2020-125620 2020年7月22日(22.07.2020) JP

(71) 出願人: 国立大学法人大阪大学 (OSAKA UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒5650871 大阪府吹田市山田丘1番1号 Osaka (JP).

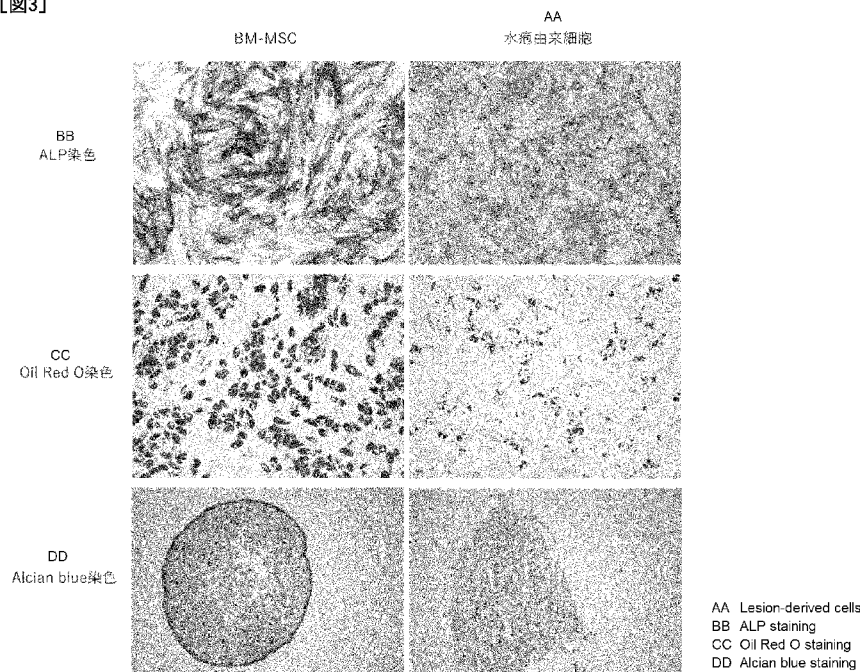
(72) 発明者: 玉井 克人(TAMAI, Katsuto); 〒5650871 大阪府吹田市山田丘1番1号 国立大学法人大阪大学内 Osaka (JP). 菊池 康(KIKUCHI, Yasushi); 〒5650871 大阪府吹田市山田丘1番1号 国立大学法人大阪大学内 Osaka (JP). 玉越 智樹(TAMAKOSHI, Tomoki); 〒5650871 大阪府吹田市山田丘1番1号 国立大学法人大阪大学内 Osaka (JP). 山崎 尊彦(YAMAZAKI, Takehiko); 〒5670085 大阪府茨木市彩都あさぎ7丁目7-15 彩都バイオインキュベータ3階 株式会社ステムリム内 Osaka (JP).

(74) 代理人: 山尾 憲人, 外 (YAMAO, Norihito et al.); 〒5300017 大阪府大阪市北区角田町8番1号 梅田阪急ビルオフィスタワー 青山特許事務所 Osaka (JP).

(54) Title: THERAPEUTIC AGENT FOR DYSTROPHIC EPIDERMOLYSIS BULLOSA

(54) 発明の名称: 栄養障害型表皮水疱症の治療薬

[図3]



(57) Abstract: Disclosed is a composition for treating dystrophic epidermolysis bullosa, the composition containing, among other things, a composition which includes cells that are derived from the lesions of dystrophic epidermolysis bullosa patients and that have been genetically engineered such as to produce type VII collagen.

(57) 要約: 本開示は、栄養障害型表皮水疱症の治療に用いるための組成物であって、VII型コラーゲンを産生するよう遺伝子改変された栄養障害型表皮水疱症患者の水疱由来細胞を含む組成物などを含む。

[続葉有]

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

- 国際調査報告 (条約第21条(3))
- 明細書の別個の部分として表した配列リスト (規則5.2(a))

## 明 細 書

発明の名称： 栄養障害型表皮水疱症の治療薬

### 技術分野

[0001] 本出願は、特願2020-125620号について優先権を主張するものであり、ここに参照することによって、その全体が本明細書中へ組み込まれるものとする。

本開示は、栄養障害型表皮水疱症の治療薬に関する。

### 背景技術

[0002] 表皮水疱症は、皮膚組織の接着を担っている接着構造分子が欠損または消失していることにより、皮膚に力が加わると、表皮が真皮から剥がれて水ぶくれ（水疱）や皮膚潰瘍を生じる疾患である。このうち、表皮が千切れて水疱ができる病型は単純型表皮水疱症、表皮と基底膜の間が剥がれて水疱ができる病型は接合部型表皮水疱症、基底膜と真皮の間が剥がれる病型は栄養障害型表皮水疱症と称される。

[0003] 栄養障害型表皮水疱症は表皮水疱症全体の約5割と最も多い病型であり、V型コラーゲンをコードするCOL7A1遺伝子の変異を原因とする遺伝性疾患である。皮膚の構造において、表皮の一番下にある表皮基底細胞は、基底膜と称されるシート様の構造体と結合している。VII型コラーゲンは、真皮内でアンカリングフィブリルという線維を形成し基底膜と真皮をつなげている。このため、VII型コラーゲン遺伝子に異常があると基底膜と真皮の接着機能が損なわれ基底膜と真皮の間で水疱ができる栄養障害型表皮水疱症となる。栄養障害型表皮水疱症のなかでも、重症劣性栄養障害型表皮水疱症は、生直後より全身熱傷様皮膚症状が続き、30歳前後より高率に皮膚有棘細胞癌（癬痕癌）が多発して死に至る、極めて重篤な遺伝性水疱性皮膚疾患である。

[0004] 表皮水疱症に対して、現在有効な治療法はなく、根治的に水疱形成を抑制する遺伝子治療法の開発が求められている。このような遺伝子治療として、患者の皮膚細胞を採取し、VII型コラーゲンを産生するよう遺伝子操作した後

、培養して皮膚シートを形成し、患者に移植する治療技術が開示されている（特許文献1参照）。また、VII型コラーゲンの活性が失活している間葉系幹細胞に対してゲノム編集を施し、VII型コラーゲンを産生可能となった間葉系幹細胞をケラチノサイトや線維芽細胞に分化させると共に、培養して皮膚シートを形成し、患者の治療に用いることが提案されている（特許文献2参照）。

## 先行技術文献

## 特許文献

[0005] 特許文献1：国際公開第2017/120147号公報

特許文献2：国際公開第2018/154413号公報

## 発明の概要

## 発明が解決しようとする課題

[0006] 皮膚シートは、高度な工程管理や培養技術が必要であることから製造の難易度が高く、高コストとなることから、より製造容易な治療薬が求められている。

## 課題を解決するための手段

[0007] ある態様において、本開示は、栄養障害型表皮水疱症の治療に用いるための組成物であって、VII型コラーゲンを産生するよう遺伝子改変された栄養障害型表皮水疱症患者の水疱由来細胞を含む組成物に関する。

## 発明の効果

[0008] 本開示により、栄養障害型表皮水疱症の治療薬が提供される。

## 図面の簡単な説明

[0009] [図1]図1は、培養開始20日後までの水疱由来細胞の外観を示す写真である。

[図2]図2は、水疱由来細胞とヒト骨髄由来間葉系幹細胞のFACS解析の結果を示す。

[図3]図3は、水疱由来細胞とヒト骨髄由来間葉系幹細胞を、骨芽細胞、脂肪細胞、軟骨細胞への分化誘導条件下で培養し、それぞれアルカリホスファタ

ーゼ（ALP）染色、オイルレッドO染色、アルシアンブルー染色を行った結果を示す。

[図4]図4は、図3とは別の栄養障害型表皮水疱症患者の水疱由来細胞とヒト骨髓由来間葉系幹細胞を、骨芽細胞、脂肪細胞、軟骨細胞への分化誘導条件下で培養し、それぞれALP染色、オイルレッドO染色、アルシアンブルー染色を行った結果を示す。

[図5]図5は、各種細胞のVII型コラーゲン発現量および分泌量を示す。図5（上）は、細胞のライセートに対して抗VII型コラーゲン抗体を用いてウエスタンブロットを行った結果を示す写真（左）および得られたバンドの濃さを定量化したグラフ（右）である。図5（下）は、細胞を培養した培地に対してウエスタンブロットを行った結果を示す写真（左）および得られたバンドの濃さを定量化したグラフ（右）である。「KC」はヒト表皮角化細胞を示す。「FB」はヒト皮膚線維芽細胞を示す。「MSC」はヒト骨髓由来間葉系幹細胞を示す。「BFC」は水疱由来細胞を示す。

[図6]図6は、設計したsgRNA（sgAAVS1-#1～#3）によるゲノムDNAの切断およびその切断効率を示す。

[図7]図7は、AAVS1領域にCOL7A1遺伝子を導入するゲノム編集の説明図である。HA-RおよびHA-Lは相同配列部分、SAはスプライスアクセプター配列、T2AはT2AペプチドをコードするT2A配列、Puroはピューロマイシン耐性遺伝子、CAGはCAGプロモーター配列を示す。野生型ゲノム（上）でのF2からR2までの長さは1952bp、COL7A1遺伝子が導入されたゲノム（下）でのF1からR1までの長さは1246bp、F2からR2までの長さは14249bpである。

[図8]図8は、各種細胞にCRISPR-Cas9でCOL7A1遺伝子を導入した後のVII型コラーゲンの発現および分泌量を示す。図8（上）は、細胞のライセートに対して抗VII型コラーゲン抗体を用いてウエスタンブロットを行った結果を示す写真（左）および得られたバンドの濃さを定量化したグラフ（右）である。図8（下）は、細胞を培養した培地に対してウエスタンブロットを行った結果を示す写真（左）および得られたバンドの濃さを定量化したグラフ（右）で

ある。「FB」はヒト皮膚線維芽細胞を示す。「MSC」はヒト骨髄由来間葉系幹細胞を示す。「BFC」は水疱由来細胞を示す。

[図9]図9は、表皮水疱症モデルマウスの作製の説明図である。右側の写真は、形成された水疱を示す。

[図10]図10は、水疱由来細胞を水疱内に注入した表皮水疱症モデルマウスの皮膚断層画像を示す。左側の写真はVII型コラーゲンに対する免疫染色の結果を示し、右側の写真はDAPI染色とVII型コラーゲンに対する免疫染色の結果を重ねたものである。「Control」は遺伝子改変していない水疱由来細胞を注入したマウス、「CAG-hCOL7」はCOL7A1遺伝子を導入した水疱由来細胞を注入したマウスの結果を示す。

[図11]図11は、ヒト骨髄由来間葉系幹細胞または水疱由来細胞を皮内または水疱内に注入した表皮水疱症モデルマウスの皮膚断層写真である。写真は、VII型コラーゲンの沈着部分を示す。上から、遺伝子改変していないヒト骨髄由来間葉系幹細胞を真皮内に注入したマウスの結果（hMSC皮内）、COL7A1遺伝子を導入したヒト骨髄由来間葉系幹細胞を真皮内に注入したマウスの結果（COL7-hMSC皮内）、遺伝子改変していないヒト骨髄由来間葉系幹細胞を水疱内に注入したマウスの結果（hMSC水疱内）、COL7A1遺伝子を導入したヒト骨髄由来間葉系幹細胞を水疱内に注入したマウスの結果（COL7-hMSC水疱内）、およびCOL7A1遺伝子を導入した水疱由来細胞を水疱内に注入したマウスの結果（COL7-BF水疱内）を示す。

[図12]図12左は、水疱内に投与した水疱由来細胞がどれだけ水疱内に定着するかを調べるための実験を説明する模式図である。図12右は、水疱内に細胞を投与してから30分後に水疱から採取した水疱内溶液のホタルルシフェラーゼ活性レベルを表したグラフである。

[図13]図13左は、生体内に投与した細胞の長期定着能を見るための実験を説明する模式図である。図13右は、水疱内に細胞を投与してから1日後および9か月後のホタルルシフェラーゼ活性レベルを測定した写真である。「MSC」は骨髄由来間葉系幹細胞、「BFC」は水疱由来細胞を示す。

[図14]図14左は、水疱内に細胞を投与した後のホタルルシフェラーゼ活性レベルの経時変化を示すグラフである。図14右は、水疱内に細胞を投与してから1か月後のホタルルシフェラーゼ活性レベルを示すグラフである。

[図15]図15は、各種細胞にGFPレンチウイルスベクターを感染させて72時間経過後の蛍光顕微鏡写真である。「GFP」は、細胞の緑色蛍光を示す写真である。「merge」は、「GFP」の写真に明視野の写真を重ね合わせたものである。「MOI 1」では、細胞にレンチウイルスベクターをMOI 1で感染させた。

「MOI 5」では、細胞にレンチウイルスベクターをMOI 5で感染させた。「BFC」は水疱由来細胞の写真であり、「MSC」はヒト骨髄由来間葉系幹細胞の写真であり、「NHDF」は正常成人皮膚線維芽細胞の写真である。

[図16]図16は、各細胞種にMOI 1でGFPレンチウイルスベクターを感染させて72時間経過後の細胞のGFP陽性率を示すグラフである。

[図17]図17は、プラスミドマップである。図17（左）は、本発明者が作成したプラスミド、pLVSIN-EF1 $\alpha$ -COL7A1の構造を示す。図17（右）は、本発明者が作成したプラスミド、pLVSIN-PGK-COL7A1の構造を示す。pLVSINベクターは、SIN (self-inactivating) 型のレンチウイルスベクタープラスミドで、EF1 $\alpha$ プロモーター（左）またはPGKプロモーターに（右）よって、ヒトV II型コラーゲン遺伝子を発現する。

[図18]図18は、本発明者が製造したレンチウイルスベクターの遺伝子構造を示す模式図である。図18（上）に示すLVSIN-EF1 $\alpha$ -COL7A1ベクターは、EF1 $\alpha$ プロモーターとCOL7A1遺伝子を発現カセットに備える。図18（下）に示すLVSIN-PGK-COL7A1ベクターは、PGKプロモーターとCOL7A1遺伝子を発現カセットに備える。本ベクターは、HIV-1 LTR（5'LTRおよび3'LTR/ $\Delta$ U3）とパッケージングシグナル（ $\psi$ ）に加えて、導入遺伝子の発現やウイルス力価などを向上させるためにWPRE（ウッドチャック肝炎ウイルス転写後調節エレメント）、cPPT/CTS（セントラルポリプリン配列/セントラルターミネーション配列）、およびRRE（Rev応答エレメント）を含む。

[図19]図19は、水疱由来細胞にEF1 $\alpha$ -COL7A1レンチウイルスベクターを感

染させて14日経過後に抗VII型コラーゲン抗体を用いて免疫染色した写真である。「DAPI」は、DAPI染色の写真である。「EF1a-C7」は、VII型コラーゲンに対する免疫染色の結果を示す写真である。「mock」では、細胞にレンチウイルスベクターを感染させなかった。「MOI 0.5」「MOI 1」「MOI 2」では、細胞にレンチウイルスベクターを、それぞれMOI 0.5, MOI 1, MOI 2で感染させた。

[図20]図20は、水疱由来細胞にPGK-COL7A1レンチウイルスベクターを感染させて14日経過後に抗VII型コラーゲン抗体を用いて免疫染色した写真である。「DAPI」は、DAPI染色の写真である。「PGK-C7」は、VII型コラーゲンに対する免疫染色の結果を示す写真である。「mock」では、細胞にレンチウイルスベクターを感染させなかった。「MOI 0.5」「MOI 1」「MOI 2」では、細胞にレンチウイルスベクターを、それぞれMOI 0.5, MOI 1, MOI 2で感染させた。

[図21]図21は、水疱由来細胞をVII型コラーゲン遺伝子搭載レンチウイルスベクターで感染させ、14日経過後に抗VII型コラーゲン抗体を用いてFACS解析した結果を示す。「EF1a-C7」では、EF1 $\alpha$ プロモーターとCOL7A1遺伝子を発現カセットに備えるレンチウイルスベクターで、水疱由来細胞を感染させた。「PGK-C7」では、PGKプロモーターとCOL7A1遺伝子を発現カセットに備えるレンチウイルスベクターで、水疱由来細胞を感染させた。「mock」では、細胞にレンチウイルスベクターを感染させなかった。「MOI 0.5」、「MOI 1」、および「MOI 2」では、細胞にレンチウイルスベクターを、それぞれMOI 0.5, MOI 1, およびMOI 2で感染させた。

[図22]図22は、図21に示すFACSデータを定量化したグラフである。図22（左）は、VII型コラーゲン陽性細胞率を示す棒グラフである。図22（右）は、VII型コラーゲン陽性細胞の平均蛍光強度を示す棒グラフである。

[図23]図23は、VII型コラーゲン遺伝子搭載レンチウイルスベクターを感染させた水疱由来細胞のゲノム中のベクターコピー数の経時変化を示すグラフである。

[図24]図24は、レンチウイルスベクターを用いてCOL7A1遺伝子を導入した水疱由来細胞を水疱内に注入した表皮水疱症モデルマウスの皮膚断層画像を示す。「DAPI」は、DAPI染色の写真である。「C7」は、VII型コラーゲンに対する免疫染色の結果を示す写真である。「merge」は、DAPI染色の結果とVII型コラーゲンに対する免疫染色の結果を重ねたものである。「未感染BFC」は、レンチウイルスベクターを感染させていない水疱由来細胞をマウスの水疱内に注入した結果を示す。「LVSIN-EF1a-C7感染BFC」は、レンチウイルスベクターによってCOL7A1遺伝子を導入した水疱由来細胞をマウスの水疱内に注入した結果を示す。

### 発明を実施するための形態

[0010] 特に具体的な定めのない限り、本開示で使用される用語は、有機化学、医学、薬学、分子生物学、微生物学等の分野における当業者に一般に理解されたとおりの意味を有する。以下にいくつかの本開示で使用される用語についての定義を記載するが、これらの定義は、本開示において、一般的な理解に優先する。

[0011] 栄養障害型表皮水疱症 (Dystrophic Epidermolysis Bullosa, DEB) は、VI型コラーゲンをコードするCOL7A1遺伝子の変異を原因とする遺伝性疾患であり、VII型コラーゲンが全く産生されないか、変異により機能の低下したVII型コラーゲンが産生されることが、その特徴として知られている。VII型コラーゲンは、真皮内でアンカリングフィブリルという線維を形成し、基底膜と真皮とをつないでいる。VII型コラーゲンは、N末端から、第一非コラーゲン領域、コラーゲン領域、および第二非コラーゲン領域を含み、グリシン-X-Yの繰り返し配列を特徴とするコラーゲン領域部分で3本鎖を形成し、C末端で2分子が結合し、N末端が基底膜に結合する。変異には、コラーゲン領域のグリシンが他のアミノ酸に置換される変異、タンパク質の翻訳が止まる終始コドン変異、スプライス部位変異などがある。変異は、対立遺伝子の一方にある場合と、両方にある場合がある。栄養障害型表皮水疱症には、優性栄養障害型と劣性栄養障害型とが含まれ、劣性栄養障害型には、重症汎発型と、比較

的症狀の軽いその他の汎発型が含まれる。本明細書における栄養障害型表皮水疱症は、いずれの病型の栄養障害型表皮水疱症であってもよく、また、如何なるCOL7A1遺伝子の変異を原因とするものであってもよい。

[0012] 水疱とは、表皮下に、体液、組織液等の液体が溜まったものをいう。好ましくは、水疱は、表皮が真皮から剥離することにより表皮と真皮との間に形成された空間に液体が溜まった形態の水疱である。より好ましくは、水疱は、表皮の基底膜が真皮から剥離することにより当該基底膜と真皮との間に形成された空間に液体が溜まった形態の水疱である。

[0013] 本開示において、栄養障害型表皮水疱症患者の水疱由来細胞とは、栄養障害型表皮水疱症患者の水疱内から採取される付着性の細胞をいい、本開示において「DEB患者水疱由来細胞」または「水疱由来細胞」とも称される。当該細胞は、栄養障害型表皮水疱症患者の水疱内容物を固相上で培養することによって得ることができる。一実施形態では、水疱内容物は、水疱内に溜まった液体であり、本明細書においてこの液体を「水疱内溶液」と称する。水疱内容物は、注射器等の手段により、栄養障害型表皮水疱症患者の水疱から採取することができる。例えば、水疱内溶液の場合、注射針を水疱内に穿刺し、注射針の先端を表皮と真皮との間に形成された空間内に位置させた状態で注射器の押し子を引くことで、注射器のシリンジ内に水疱内溶液を吸引することができる。一実施形態では、水疱由来細胞は、水疱内溶液をコラゲナーゼ、ディスパーゼ等の酵素で処理せず培地に播種して固相上で培養することにより、得ることができる。具体的には、水疱から採取した水疱内溶液を直接培地に播種し、当該培地を固相上で所定時間インキュベートした後、固相上に付着した細胞を水疱由来細胞とすることができる。このとき、固相上でコロニーを形成した細胞を取得することが好ましい。水疱内溶液は、採取後、3時間以内に培地に播種することが好ましく、2時間以内に播種することがより好ましく、1時間以内に播種することがさらに好ましい。本開示において、固相とは、細胞が接着できる固体の支持体を意味し、例えば、プラスチック製またはガラス製の、培養皿、フラスコ、マルチウェルプレートなどの培

養容器が含まれる。ある実施形態では、固相は、プラスチック製の培養容器である。固相はコーティングされていてもよく、コーティング用の物質としては、例えば、コラーゲンI、ラミニン、ビトロネクチン、フィブロネクチン、ポリL-リジン、ポリL-オルニチンなどが挙げられる。ある実施形態では、固相はコラーゲンIでコーティングされている。培養は、一般的なインキュベーター内で、「37℃、5%CO<sub>2</sub>」、「37℃、5%O<sub>2</sub>、5%CO<sub>2</sub>」などの条件下で行うことができる。培養用の培地は、動物細胞の培養に用いることができる培地であればよく、例えば、MEM、MEM $\alpha$ 、DMEM、GMEM、RPMI 1640、MesenCult™ (STEMCELL Technologies社)、Mesenchymal Stem Cell Growth Medium 2 (ProCell社)、MSCGM Mesenchymal Stem Cell Growth Medium (Lonza社)、Cellartis MSC Xeno-Free Culture Medium (タカラバイオ社)、およびこれらの混合培地などが挙げられる。その中でも、MesenCult™、Mesenchymal Stem Cell Growth Medium 2、MSCGM Mesenchymal Stem Cell Growth Medium、Cellartis MSC Xeno-Free Culture Medium等の間葉系幹細胞用培地が好ましく用いられる。また、培地は、無血清培地であることが好ましい。培養期間は、細胞が固相に接着するのに十分な期間であればよく、例えば、1日間～数カ月間（例えば、2、3または4カ月間）、1日間～1カ月間、1日間～数週間（例えば、2、3または4週間）、1日間～1週間でありうる。

[0014] ある実施形態において、DEB患者の水疱由来細胞は、以下の1)～6)から選択される1つ以上の特徴を有する：

- 1) 固相への接着性を有する、
- 2) CD73、CD105およびCD90からなる群より選択される一つ以上の表面マーカーが陽性である、
- 3) CD45、CD34、CD11b、CD79A、HLA-DRおよびCD31からなる群より選択される一つ以上の表面マーカーが陰性である、
- 4) 骨芽細胞への分化能を有しない、又は骨髓由来間葉系幹細胞と比較して当該分化能が低い、
- 5) 脂肪細胞への分化能を有しない、又は骨髓由来間葉系幹細胞と比較して

当該分化能が低い、

6)軟骨細胞への分化能を有しない、又は骨髓由来間葉系幹細胞と比較して当該分化能が低い。

本開示において、ある細胞が骨芽細胞、脂肪細胞または軟骨細胞への「分化能を有しない」とは、通常の分化誘導条件および検出方法（染色等）を用いて骨芽細胞、脂肪細胞または軟骨細胞への分化を検出できないことを意味する。

[0015] ある実施形態において、DEB患者水疱由来細胞は、CD73陽性、CD105陽性、且つCD90陽性の細胞である。別の実施形態において、DEB患者水疱由来細胞は、CD45陰性、CD34陰性、CD11b陰性、CD79A陰性、HLA-DR陰性、且つCD31陰性の細胞である。さらなる実施形態において、DEB患者水疱由来細胞は、骨芽細胞への分化能、脂肪細胞への分化能、および軟骨細胞への分化能がいずれも骨髓由来間葉系幹細胞と比較して低い細胞である。さらなる実施形態において、DEB患者水疱由来細胞は、骨芽細胞への分化能および脂肪細胞への分化能が骨髓由来間葉系幹細胞と比較して低く、且つ、軟骨細胞への分化能を有しない細胞である。

[0016] 本開示においては、VII型コラーゲンを産生するよう遺伝子改変された栄養障害型表皮水疱症患者の水疱由来細胞が用いられる。本開示における「VII型コラーゲンを産生するよう遺伝子改変された細胞」とは、機能的な（すなわち、アンカリングフィブリルを形成しうる）VII型コラーゲンを産生するよう遺伝子改変された細胞を意味する。

[0017] 本開示において、細胞の遺伝子改変とは、細胞のゲノムの遺伝子を改変することと、ゲノム外の核酸構築物（例えば、ベクター）から遺伝子を発現するよう細胞を改変することのいずれをも意味する。すなわち、「VII型コラーゲンを産生するよう遺伝子改変する」との表現には、ゲノム中のCOL7A1遺伝子からVII型コラーゲンを発現するよう細胞を改変すること、およびゲノム外の核酸構築物のCOL7A1遺伝子からVII型コラーゲンを発現するよう細胞を改変することが含まれる。また、「VII型コラーゲンを産生するよう遺伝子改変さ

れた細胞」には、ゲノム中のCOL7A1遺伝子からVII型コラーゲンを発現する細胞と、ゲノム外の核酸構築物のCOL7A1遺伝子からVII型コラーゲンを発現する細胞とが含まれる。

[0018] 細胞の遺伝子改変は、COL7A1遺伝子を導入することにより、またはゲノムのCOL7A1遺伝子の変異を修正することにより、行うことができる。COL7A1遺伝子の導入は、細胞のゲノムにCOL7A1遺伝子を導入することによっても、ゲノム外の核酸構築物からCOL7A1遺伝子を発現するよう、COL7A1遺伝子を含む核酸構築物を細胞内に存在させることによっても、行うことができる。COL7A1遺伝子を細胞のゲノムに導入する場合、特定の位置に導入してもよく、ランダムに導入してもよい。ある実施形態において、COL7A1遺伝子は、ゲノムのCOL7A1遺伝子座、またはAAVS1領域のようなセーフ・ハーバーに導入される。

[0019] DEB患者水疱由来細胞は、その細胞が投与される栄養障害型表皮水疱症患者の細胞（すなわち、自家細胞）であっても、その細胞の投与を受ける患者とは別の栄養障害型表皮水疱症患者の細胞（すなわち、他家細胞）であってよい。栄養障害型表皮水疱症患者の細胞には、VII型コラーゲンを産生しない細胞と、VII型コラーゲンを産生するが変異によりその機能が低下している細胞とがあるが、本開示における「栄養障害型表皮水疱症患者の細胞」は、そのいずれであってもよい。

[0020] DEB患者水疱由来細胞は、患者に投与された場合に表皮基底膜近傍でVII型コラーゲンを産生しうる細胞であればよい。

[0021] 本開示において、細胞は、必要に応じて増殖させたものを包含する意味で用いられる。細胞の増殖は、細胞を培養することによって行うことができる。例えば、「（栄養障害型表皮水疱症患者の）水疱由来細胞」は、患者から取得された後に増殖させたものを包含し、「遺伝子改変された細胞」は、遺伝子改変操作により得られた細胞を増殖させたものを包含する。遺伝子改変を行う場合、遺伝子改変に必要な量を得るまで、細胞を増殖させてもよい。また、遺伝子改変後に、治療に必要な量を得るまで、細胞を増殖させてもよい。

[0022] 本明細書において、「細胞」とは、文脈に応じて1個の細胞または複数個の細胞を意味する。また、細胞は、一種類の細胞からなる細胞集団であってもよく、複数種の細胞を含む細胞集団であってもよい。

[0023] 本明細書において、COL7A1遺伝子とは、VII型コラーゲンをコードする核酸配列を意味し、cDNAも、1以上のイントロンを含む配列（例えば、ゲノム配列またはミニジーン）も包含する意味で用いられる。ヒトCOL7A1遺伝子（cDNA）の代表的核酸配列を配列番号1に、ヒトVII型コラーゲンの代表的アミノ酸配列を配列番号2に示す。COL7A1遺伝子のcDNA配列はGenBank: NM\_000094.3に、ゲノム配列はGenBank: AC121252.4に開示されている。COL7A1遺伝子は、機能的な（すなわち、アンカリングフィブリルを形成する）VII型コラーゲンをコードするものであればよく、その配列は限定されない。

ヒトCOL7A1遺伝子のcDNA配列（8835 bp）（配列番号1）

```
ATGACGCTGCGGCTTCTGGTGGCCGCGCTCTGCGCCGGGATCCTGGCAGAGGCGCCCCGAGTGCAGGCC
CAGCACAGGGAGAGAGTGCCTGCACGCGCCTTTACGCCGCTGACATTGTGTTCTTACTGGATGGCTCC
TCATCCATTGGCCGAGCAATTTCCGCGAGGTCCGCAGCTTTCTCGAAGGGCTGGTGCTGCCTTTCTCT
GGAGCAGCCAGTGCACAGGGTGTGCGCTTTGCCACAGTGCAGTACAGCGATGATCCACGGACAGAGTTC
GGCCTGGATGCACTTGGCTCTGGGGGTGATGTGATCCGCGCCATCCGTGAGCTTAGCTACAAGGGGGGC
AACACTCGCACAGGGGCTGCAATTCTCCATGTGGCTGACCATGTCTTCCTGCCCCAGCTGGCCCCGACCT
GGTGTCCCCAAGGTCTGCATCCTGATCACAGACGGGAAGTCCCAGGACCTGGTGGACACAGCTGCCAA
AGGCTGAAGGGGCAGGGGGTCAAGCTATTTGCTGTGGGGATCAAGAATGCTGACCCTGAGGAGCTGAAG
CGAGTTGCCTCACAGCCCACAGTGACTTCTTCTTCTTCGTCAATGACTTCAGCATCTTGAGGACACTA
CTGCCCCCTCGTTTTCCCGGAGAGTGTGCACGACTGCTGGTGGCGTGCCTGTGACCCGACCTCCGGATGAC
TCGACCTCTGCTCCACGAGACCTGGTGCTGTCTGAGCCAAGCAGCCAATCCTTGAGAGTACAGTGGACA
GCGGCCAGTGGCCCTGTGACTGGCTACAAGGTCCAGTACACTCCTCTGACGGGGCTGGGACAGCCACTG
CCGAGTGAGCGGCAGGAGGTGAACGTCCCAGCTGGTGAGACCAGTGTGCGGCTGCGGGGTCTCCGGCCA
CTGACCGAGTACCAAGTGACTGTGATTGCCCTCTACGCCAACAGCATCGGGGAGGCTGTGAGCGGGACA
GCTCGGACCACTGCCCTAGAAGGGCCGGAAGTACCATCCAGAATACCACAGCCCACAGCCTCCTGGTG
GCCTGGCGGAGTGTGCCAGGTGCCACTGGCTACCGTGTGACATGGCGGGTCCTCAGTGGTGGGCCACACA
```

CAGCAGCAGGAGCTGGGCCCTGGGCAGGGTTCAGTGTTGCTGCGTGACTTGGAGCCTGGCACGGACTAT  
GAGGTGACCGTGAGCACCCCTATTTGGCCGAGTGTTGGGGCCCGCCACTTCCCTGATGGCTCGCACTGAC  
GCTTCTGTTGAGCAGACCCTGCGCCCGGTCATCCTGGGCCCCACATCCATCCTCCTTTCTGGAACCTG  
GTGCCTGAGGCCCCGTGGCTACCGGTTGGAATGGCGGCGTGAGACTGGCTTGGAGCCACCGCAGAAGGTG  
GTA CTGCCCTCTGATGTGACCCGCTACCA GTTGGATGGGCTGCAGCCGGGCACTGAGTACCGCCTCACA  
CTCTACACTCTGCTGGAGGGCCACGAGGTGGCCACCCCTGCAACCGTGGTTCCCACTGGACCAGAGCTG  
CCTGTGAGCCCTGTAACAGACCTGCAAGCCACCGAGCTGCCCGGGCAGCGGGTGCAGTGTCTGGAGC  
CCAGTCCCTGGTGCCACCCAGTACCGCATCATTGTGCGCAGCACCCAGGGGGTTGAGCGGACCCTGGTG  
CTTCTGGGAGTCAGACAGCATTGACTTGGATGACGTTCAAGGCTGGGCTTAGCTACACTGTGCGGGTG  
TCTGCTCGAGTGGGTCCCCGTGAGGGCAGTGCCAGTGTCTCACTGTCCGCCGGGAGCCGAACTCCA  
CTTGCTGTTCCAGGGCTGCGGGTTGTGGTGTGAGATGCAACGCGAGTGAGGGTGGCTGGGGACCCGTC  
CCTGGAGCCAGTGGATTTCCGATTAGCTGGAGCACAGGCAGTGGTCCGGAGTCCAGCCAGACACTGCCC  
CCAGACTCTACTGCCACAGACATCACAGGGCTGCAGCCTGGAACCACCTACCAGGTGGCTGTGTGCGTA  
CTGCGAGGCAGAGAGGAGGGCCCTGCTGCAGTCATCGTGGCTCGAACGGACCCACTGGGCCAGTGAGG  
ACGGTCCATGTGACTCAGGCCAGCAGCTCATCTGTCAACATTACCTGGACCAGGGTTCCTGGCGCCACA  
GGATACAGGGTTTCTGGCACTCAGCCCACGGCCCAGAGAAATCCCAGTTGGTTTCTGGGGAGGCCACG  
GTGGCTGAGCTGGATGGA CTGGAGCCAGATACTGAGTATACGGTGCATGTGAGGGCCCATGTGGCTGGC  
GTGGATGGGCCCCCTGCCTCTGTGGTTGTGAGGACTGCCCTGAGCCTGTGGGTGCTGTGTGAGGCTG  
CAGATCCTCAATGCTTCCAGCGACGTTCTACGGATCACCTGGGTAGGGGTCACTGGAGCCACAGCTTAC  
AGACTGGCCTGGGGCCGGAGTGAAGGCGGGCCCATGAGGCACCAGATACTCCCAGGAAACACAGACTCT  
GCAGAGATCCGGGGTCTCGAAGGTGGAGTCAGCTACTCAGTGCGAGTGACTGCACTTGTGGGGACCGC  
GAGGGCACACCTGTCTCCATTGTTGTCACTACGCCGCCTGAGGCTCCGCCAGCCCTGGGGACGCTTCAC  
GTGGTGCAGCGCGGGGAGCACTCGCTGAGGCTGCGCTGGGAGCCGGTGCCAGAGCGCAGGGCTTCCTT  
CTGCACTGGCAACCTGAGGGTGGCCAGGAACAGTCCCGGGTCTGGGGCCCCGAGCTCAGCAGCTATCAC  
CTGGACGGGCTGGAGCCAGCGACACAGTACCGCGTGAGGCTGAGTGTCTAGGGCCAGCTGGAGAAGGG  
CCCTCTGCAGAGGTGACTGCGCGCACTGAGTCACCTCGTGTCCAAGCATTGAACTACGTGTGGTGGAC  
ACCTCGATCGACTCGGTGACTTTGGCCTGGA CTCCAGTGTCCAGGGCATCCAGCTACATCCTATCCTGG  
CGGCCACTCAGAGGCCCTGGCCAGGAAGTGCCTGGGTCCCCGCAGACACTTCCAGGGATCTCAAGCTCC

CAGCGGGTGACAGGGCTAGAGCCTGGCGTCTCTTACATCTTCTCCCTGACGCCTGTCCTGGATGGTGTG  
CGGGGTCTGAGGCATCTGTCACACAGACGCCAGTGTGCCCCGTGGCCTGGCGGATGTGGTGTTCCTA  
CCACATGCCACTCAAGACAATGCTCACCGTGCGGAGGCTACGAGGAGGGTCCTGGAGCGTCTGGTGTG  
GCACTTGGGCCTCTTGGGCCACAGGCAGTTCAGGTTGGCCTGCTGTCTTACAGTCATCGGCCCTCCCCA  
CTGTTCCCACTGAATGGCTCCCATGACCTTGGCATTATCTTGCAAAGGATCCGTGACATGCCCTACATG  
GACCCAAGTGGGAACAACCTGGGCACAGCCGTGGTCACAGCTCACAGATACATGTTGGCACCAGATGCT  
CCTGGGCGCCGCCAGCACGTACCAGGGGTGATGGTTCTGCTAGTGGATGAACCCTTGAGAGGTGACATA  
TTCAGCCCCATCCGTGAGGCCAGGCTTCTGGGCTTAATGTGGTGATGTTGGGAATGGCTGGAGCGGAC  
CCAGAGCAGCTGCGTCGCTTGGCGCCGGGTATGGA CTCTGTCCAGACCTTCTTCGCCGTGGATGATGGG  
CCAAGCCTGGACCAGGCAGTCAGTGGTCTGGCCACAGCCCTGTGTCAGGCATCCTTCACTACTCAGCCC  
CGGCCAGAGCCCTGCCAGTGTATTGTCAAAGGGCCAGAAGGGGGAACCTGGAGAGATGGGCCTGAGA  
GGACAAGTTGGCCTCCTGGCGACCCTGGCCTCCCGGGCAGGACCGGTGCTCCCGGCCCCCAGGGGCCC  
CCTGGAAGTGCCACTGCCAAGGGCGAGAGGGGCTTCCCTGGAGCAGATGGGCGTCCAGGCAGCCCTGGC  
CGCGCCGGGAATCCTGGGACCCCTGGAGCCCCTGGCCTAAAGGGCTCTCCAGGGTTGCCTGGCCCTCGT  
GGGGACCCGGGAGAGCGAGGACCTCGAGGCCCAAAGGGGGAGCCGGGGGCTCCCGGACAAGTCATCGGA  
GGTGAAGGACCTGGGCTTCTGGGCGGAAAGGGGACCCTGGACCATCGGGCCCCCTGGACCTCGTGGA  
CCACTGGGGGACCCAGGACCCCGTGGCCCCCAGGGCTTCTGGAACAGCCATGAAGGGTGACAAAGGC  
GATCGTGGGAGCGGGGTCCCCCTGGACCAGGTGAAGGTGGCATTGCTCCTGGGGAGCCTGGGCTGCCG  
GGTCTTCCCGGAAGCCCTGGACCCCAAGGCCCGTTGGCCCCCTGGAAAGAAAGGAGAAAAAGGTGAC  
TCTGAGGATGGAGCTCCAGGCCTCCAGGACAACCTGGGTCTCCGGGTGAGCAGGGCCCACGGGGACCT  
CCTGGAGCTATTGGCCCCAAAGGTGACCGGGGCTTTCCAGGGCCCCTGGGTGAGGCTGGAGAGAAGGGC  
GAACGTGGACCCCAAGGCCAGCGGGATCCCGGGGGCTGCCAGGGGTTGCTGGACGTCCTGGAGCCAAG  
GGTCTGAAGGGCCACCAGGACCCACTGGCCGCCAAGGAGAGAAGGGGGAGCCTGGTCGCCCTGGGGAC  
CCTGCAGTGGTGGGACCTGCTGTTGCTGGACCCAAAGGAGAAAAGGGAGATGTGGGGCCCGCTGGGCCC  
AGAGGAGCTACCGGAGTCCAAGGGGAACGGGGCCCCACCCGGCTTGGTTCTTCTGAGACCCTGGCCCC  
AAGGGAGACCCTGGAGACCGGGGTCCCATTGGCCTTACTGGCAGAGCAGGACCCCCAGGTGACTCAGGG  
CCTCCTGGAGAGAAGGGAGACCCTGGGCGGCCTGGCCCCCAGGACCTGTTGGCCCCCAGGACGAGAT  
GGTGAAGTTGGAGAGAAAGGTGACGAGGGTCCTCCGGGTGACCCGGGTTTGCCTGGAAAAGCAGGCGAG

CGTGGCCTTCGGGGGGCACCTGGAGTTCGGGGGCCTGTGGGTGAAAAGGGAGACCAGGGAGATCCTGGA  
GAGGATGGACGAAATGGCAGCCCTGGATCATCTGGACCCAAGGGTGACCGTGGGGAGCCGGGTCCCCCA  
GGACCCCCGGGACGGCTGGTAGACACAGGACCTGGAGCCAGAGAGAAGGGAGAGCCTGGGGACCGCGGA  
CAAGAGGGTCTCGAGGGCCCAAGGGTGATCCTGGCCTCCCTGGAGCCCCTGGGGAAAGGGGCATTGAA  
GGGTTTCGGGGACCCCCAGGCCACAGGGGGACCCAGGTGTCCGAGGCCCAGCAGGAGAAAAGGGTGAC  
CGGGGTCCCCCTGGGCTGGATGGCCGGAGCGGACTGGATGGGAAACCAGGAGCCGCTGGGCCCTCTGGG  
CCGAATGGTGCTGCAGGCAAAGCTGGGGACCCAGGGAGAGACGGGCTTCCAGGCCTCCGTGGAGAACAG  
GGCCTCCCTGGCCCCCTCTGGTCCCCCTGGATTACCGGGAAAGCCAGGCGAGGATGGCAAACCTGGCCTG  
AATGGAAAAACGGAGAACCTGGGGACCCCTGGAGAAGACGGGAGGAAGGGAGAGAAAAGGAGATTCAGGC  
GCCTCTGGGAGAGAAGGTCTGTATGGCCCCAAGGGTGAGCGTGGAGCTCCTGGTATCCTTGGACCCAG  
GGGCCTCCAGGCCTCCAGGGCCAGTGGGCCCTCCTGGCCAGGGTTTTCTGGTGTCCAGGAGGCACG  
GGCCCCAAGGGTGACCGTGGGGAGACTGGATCCAAAGGGGAGCAGGGCCTCCCTGGAGAGCGTGGCCTG  
CGAGGAGAGCCTGGAAGTGTGCCAATGTGGATCGGTTGCTGGAAACTGCTGGCATCAAGGCATCTGCC  
CTGCGGGAGATCGTGGAGACCTGGGATGAGAGCTCTGGTAGCTTCCTGCCTGTGCCCCAACGGCGTCGA  
GGCCCCAAGGGGGACTCAGGCGAACAGGGCCCCCAGGCAAGGAGGGCCCCATCGGCTTTCCTGGAGAA  
CGCGGGCTGAAGGGCGACCGTGGAGACCCTGGCCCTCAGGGGCCACCTGGTCTGGCCCTTGGGGAGAGG  
GGCCCCCCCCGGCCTTCCGGCCTTGCCGGGGAGCCTGGAAAGCCTGGTATTCCCGGGCTCCAGGCAGG  
GCTGGGGGTGTGGGAGAGGCAGGAAGGCCAGGAGAGAGGGGAGAACGGGGAGAGAAAGGAGAACGTGGA  
GAACAGGGCAGAGATGGCCCTCCTGGACTCCCTGGAACCCCTGGGCCCCCGGACCCCTGGCCCCAAG  
GTGTCTGTGGATGAGCCAGGTCTGGA CTCTCTGGAGAACAGGGACCCCTGGA CTCAAGGGTGCTAAG  
GGGGAGCCGGGCAGCAATGGTGACCAAGGTCCCAAAGGAGACAGGGGTGTGCCAGGCATCAAAGGAGAC  
CGGGGAGAGCCTGGACCGAGGGGTGAGGACGGCAACCCGGGTCTACCAGGAGAGCGTGGTATGGCTGGG  
CCTGAAGGGAAGCCGGGTCTGCAGGGTCCAAGAGGGCCCCCTGGCCCAGTGGGTGGTCATGGAGACCCT  
GGACCACCTGGTGCCCCGGGTCTTGCTGGCCCTGCAGGACCCCAAGGACCTTCTGGCCTGAAGGGGGAG  
CCTGGAGAGACAGGACCTCCAGGACGGGGCCTGACTGGACCTACTGGAGCTGTGGGACTTCTGGACCC  
CCCGGCCCTTCAAGCCTTGTGGGTCCACAGGGGTCTCCAGGTTTGCCTGGACAAGTGGGGGAGACAGGG  
AAGCCGGGAGCCCCAGGTGAGATGGTGCCAGTGGAAAAGATGGAGACAGAGGGAGCCCTGGTGTGCCA  
GGGTCAACAGGTCTGCCTGGCCCTGTGCGACCTAAAGGAGAACCTGGCCCCACGGGGGGCCCTGGACAG

GCTGTGGTCGGGCTCCCTGGAGCAAAGGGAGAGAAGGGAGCCCCTGGAGGCCTTGCTGGAGACCTGGTG  
GGTGAGCCGGGAGCCAAAGGTGACCGAGGACTGCCAGGGCCGCGAGGCGAGAAGGGTGAAGCTGGCCGT  
GCAGGGGAGCCCGGAGACCCTGGGAAGATGGTCAGAAAGGGGCTCCAGGACCCAAAGTTTCAAGGGT  
GACCCAGGAGTCGGGGTCCCGGGCTCCCCTGGGCCTCCTGGCCCTCCAGGTGTGAAGGGAGATCTGGGC  
CTCCCTGGCCTGCCCCGTGCTCCTGGTGTTGTTGGGTTCCCGGGTCAGACAGGCCCTCGAGGAGAGATG  
GGTCAGCCAGGCCCTAGTGGAGAGCGGGGTCTGGCAGGCCCCCAGGGAGAGAAGGAATCCCAGGACCC  
CTGGGGCCACCTGGACCACCGGGGTGAGTGGGACCACCTGGGGCCTCTGGACTCAAAGGAGACAAGGGA  
GACCCTGGAGTAGGGCTGCCTGGGCCCCGAGGCGAGCGTGGGGAGCCAGGCATCCGGGGTGAAGATGGC  
CGCCCCGGCCAGGAGGGACCCCGAGGACTCACGGGGCCCCCTGGCAGCAGGGGAGAGCGTGGGGAGAAG  
GGTGATGTTGGGAGTGCAGGACTAAAGGGTGACAAGGGAGACTCAGCTGTGATCCTGGGGCCTCCAGGC  
CCACGGGGTGCCAAGGGGGACATGGGTGAACGAGGGCCTCGGGGCTTGATGGTGACAAAGGACCTCGG  
GGAGACAATGGGACCCCTGGTGACAAGGGCAGCAAGGGAGAGCCTGGTGACAAGGGCTCAGCCGGGTTG  
CCAGGACTGCGTGGA CTCTGGGACCCAGGGTCAACCTGGTGAGCAGGGATCCCTGGTGACCCGGGA  
TCCCCAGGAAAGGATGGAGTGCCTGGTATCCGAGGAGAAAAAGGAGATGTTGGCTTCATGGGTCCCCGG  
GGCCTCAAGGGTGAACGGGGAGTGAAGGGAGCCTGTGGCCTTGATGGAGAGAAGGGAGACAAGGGAGAA  
GCTGGTCCCCCAGGCCGCCCGGGCTGGCAGGACACAAAGGAGAGATGGGGGAGCCTGGTGTGCCGGGC  
CAGTCGGGGGCCCTGGCAAGGAGGGCCTGATCGGTCCCAAGGGTGACCGAGGCTTTGACGGGCAGCCA  
GGCCCCAAGGGTGACCAGGGCGAGAAAGGGGAGCGGGGAACCCAGGAATTGGGGGCTTCCAGGCCCC  
AGTGGAATGATGGCTCTGCTGGTCCCCCAGGGCCACCTGGCAGTGTGGTCCCAGAGGCCCCGAAGGA  
CTTCAGGGCCAGAAGGGTGAGCGAGGTCCCCCGGAGAGAGAGTGGTGGGGGCTCCTGGGGTCCCTGGA  
GCTCCTGGCGAGAGAGGGGAGCAGGGGCGGCCAGGGCCTGCCGGTCCCTCGAGGCGAGAAGGGAGAAGCT  
GCACTGACGGAGGATGACATCCGGGGCTTTGTGCGCCAAGAGATGAGTCAGCACTGTGCCTGCCAGGGC  
CAGTTCATCGCATCTGGATCACGACCCCTCCCTAGTTATGCTGCAGACACTGCCGGCTCCCAGCTCCAT  
GCTGTGCCTGTGCTCCGCGTCTCTCATGCAGAGGAGGAAGAGCGGGTACCCCTGAGGATGATGAGTAC  
TCTGAATACTCCGAGTATTCTGTGGAGGAGTACCAGGACCCTGAAGCTCCTTGGGATAGTGATGACCCC  
TGTTCCCTGCCACTGGATGAGGGCTCCTGCACTGCCTACACCCTGCGCTGGTACCATCGGGCTGTGACA  
GGCAGCACAGAGGCCTGTCACCCTTTTGTCTATGGTGGCTGTGGAGGGAATGCCAACCGTTTTGGGACC  
CGTGAGGCCTGCGAGCGCGCTGCCACCCCGGGTGGTCCAGAGCCAGGGGACAGGTA CTGCCAGGAC

TGA

ヒトVII型コラーゲンのアミノ酸配列 (2944 AA) (配列番号 2)

MTLRLLVAALCAGILAEAPRVRAQHRERVCTRLYAADIVFLLDGSSSIGRSNFREVRSFLEGLVLPFS  
GAASAQGVRFATVQYSDDPRTEFGLDALGSGGDVIRAIRESYKGGNTRTGAAILHVADHVFLPQLARP  
GVPKVCILITDGKSQDLVDTAAQRLKGQGVKLFVAVGIKNADPEELKRVASQPTSDFFFFVNDFSILRTL  
LPLVSRVCTTAGGVPVTRPPDDSTSAPRDLVLEPSSQSLRVQWTAASGPVTGYKVQYTPLTGLGQPL  
PSERQEVNVPAGETSVRLRGLRPLTEYQVTVIALYANSIGEAVSGTARTTALEGPELTIQNTTAHSLLV  
AWRSVPGATGYRVTWVLSGGPTQQQELGPGQGSVLLRDLEPGTDYEVTVSTLFGRSVGPATSLMARTD  
ASVEQTLRPVILGPTSILLSWNLVPEARGYRLEWRRETGLEPPQKVVLPSDVTRYQLDGLQPGTEYRLT  
LYTLLEGHEVATPATVVPTGPELPVSPVTDLQATELPGQVRVSWSPVPGATQYRIIVRSTQGVERTLV  
LPGSQTAFLDDVQAGLSYTVRV SARVGPREGSASVLTVRREPETPLAVPGLRVVSDATRVRVAWGPV  
PGASGFRISWSTGSGPESSQTLPPDSTATDITGLQPGTTYQVAVSVLRGREGPAAVIVARTDPLGPVR  
TVHVTQASSSVTITWTRVPGATGYRVSWHSAHGPEKSQLVSGEATVAELDGLEPDTEYTVHVRAHVAG  
VDGPPASVVVRTAPEPVGRVSRLQILNASSDVLRTWVGVTGATAYRLAWGRSEGGPMRHQILPGNTDS  
AEIRGLEGGVSYSVRVTALVGDRGTPVSIVVTTPEAPPALGTLHVVRGEHSLRLRWEVPVRAQGFL  
LHWQPEGQEQSRVLGPELSSYHLDGLEPATQYRVRLSVLGPAGEGPSAEVTARTESPRVPSIELRVVD  
TSIDSVTLAWTPVSRASSYILSWRPLRGPGQEVPGSPQTLPGISSSQRTGLEPGVSYIFSLTPVLDGV  
RGPEASVTQTPVCPRGLADVFLPHATQDNAHRAEATRRVLRLVLALGPLGPQAVQVGLLSYSHRPS  
LFPLNGSHDLGIILQIRIDMPYMDPSGNNLGTAVVTAHRYMLAPDAPGRRQHVPVGMVLLVDEPLRGDI  
FSPIREAQASGLNVVMLGMAGADPEQLRRLAPGMDSVQTFFAVDDGPSLDQAVSGLATALCQASFTTQP  
RPEPCPVYCPKGQKGEPEGEMGLRGQVGPPGDPGLPGRTGAPGPQGPPTSATAKGERGFPGADGRPGSPG  
RAGNPGTPGAPGLKGSPGLPGPRGDPGERGPRGPKGEPGAPGQVIGGEGPGLPGRKGDGPGSGPPGPRG  
PLGDPGRGPPGLPGTAMKGDKGDRGERGPPGPGEGGIAPGEPGLPGLPGSPGPQGPVGPVGGKKEKGD  
SEDGAPGLPGQPGSPGEQGRGPPGAIGPKGDRGFPGPLGEAGEKGERGPPGPAGSRGLPGVAGRPGAK  
GPEGPPGPTGRQGEKGEPRGPDPAVVGPAVAGPKGEKGDVGPAGPRGATGVQGERGPPGLVLPDGP  
KGDPGDRGPIGLTGRAGPPGDSGPPGEKGDGPRGPPGPVGPGRDGEVGEKGDGPPGDPGLPGKAGE  
RGLRGAPGVRGPVGEKGDQGDGDRNGSPGSSGPKGDRGEPGPPGPPGRLVDTGPGAREKGEPRGDRG  
QEGPRGPKGDPGLPGAPGERGIEGFRGPPGPQGDGPVGRGPAGEKGDGPPGLDGRSGLDGKPGAAGPSG

PNGAAGKAGDPGRDGLPGLRGEQGLPGPSGPPGLPGKPGEDGKPGLNKNGEPGDPGEDGRKGEKGDSDG  
ASGREGRDGPKEGGERGAPGILGPQGPPGLPGVGPFGQGFPGVPGGTGPKGDRGETGSKGEQGLPGERGL  
RGEPGSVPNVDRLLLETAGIKASALREIVETWDESSGSFLVPERRRGPKGDSGEQGPPEGKEGPIGFPGE  
RGLKGDRGDPGPQGPPGLALGERGPPGPSGLAGEPGKPGIPGLPGRAGGVGEAGRPGERGERGEKGERG  
EQGRDGPPGLPGTPGPPGPPGPKVSVDEPGPLSGEQGPPGLKGAKGEPGSNGDQGPKGDRGVPGIKGD  
RGEPGPRGQDGNPGLPGERGMAGPEGKPGQLQGPRGPPGPVGGHGDPPGAPGLAGPAGPQGPSGLKGE  
PGETGPPGRGLTGPTGAVGLPGPPGPSGLVGPQGSPGLPGQVGETGKPGAPGRDGASGKDGRGSPGVP  
GSPGLPGPVGPKGEPGPTGAPGQAVVGLPGAKGEKGAPGGLAGDLVGEPGAAGDRGLPGPRGEKGEAGR  
AGEPGDPGEDGQKGAPGPKGFKGDPGVGVPGSPGPPGPPGVKGDGLPGLPGAPGVVGFPGQTGPRGEM  
GQPGPSGERGLAGPPGREGIPGLPGPPGPPGSVPPGASGLKGDKGDPGVGLPGRGERGEPGIRGEDG  
RPGQEGPRGLTGPPGSRGERGEKGDVGSAGLKGDKGDSSAVILGPPGPRGAKGDMGERGPRGLDGDKGPR  
GDNGDPGDKGSKGEPGDKGSAGLPGLRGLLGPQGQPGAAGIPGDPGSPGKDGVPGIRGEKGDVGFMGPR  
GLKGERGVKGACGLDGEKGDKEAGPPGRPLAGHKGEMGEPGVPGQSGAPGKEGLIGPKGDRGFDGQP  
GPKGDQGEKGERGTPGIGGFPGPSGNDGSAGPPGPPGSVGPGRGPEGLQGQKGERGPPGERVVGAPGVPG  
APGERGEQGRPGPAGPRGEKGEAALTEDDIRGFVRQEMSQHCACQGQFIASGSRPLPSYAADTAGSQLH  
AVPVLRVSHAEERVPPEDEYSEYSEYSVEEYQDPEAPWDSDDPCSLPLDEGSCTAYTLRWYHRAVT  
GSTEACHPFVYGGCGGNANRFGTREACERRCPRRVVQSQGTGTAQD\*

[0024] ある実施形態において、COL7A1遺伝子は、配列番号1の核酸配列と70%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%または99%以上の配列同一性を有する核酸配列を含むか、前記核酸配列からなる。別の実施形態において、COL7A1遺伝子は、配列番号1の核酸配列において1〜30個、1〜20個、1〜10個、1〜5個、1〜3個、1〜2個または1個の塩基が挿入、欠失、置換、または付加された核酸配列を含むか、前記核酸配列からなる。さらなる実施形態において、COL7A1遺伝子は、配列番号1の核酸配列を含むか、配列番号1の核酸配列からなる。

[0025] ある実施形態において、VII型コラーゲンは、配列番号2のアミノ酸配列と70%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%または99%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むか、前記アミノ酸配列からなる。別の実施形

態において、VII型コラーゲンは、配列番号2のアミノ酸配列において1～30個、1～20個、1～10個、1～5個、1～3個、1～2個または1個のアミノ酸残基が挿入、欠失、置換、または付加されたアミノ酸配列を含むか、前記アミノ酸配列からなる。さらなる実施形態において、VII型コラーゲンは、配列番号2のアミノ酸配列を含むか、配列番号2のアミノ酸配列からなる。

[0026] ある実施形態において、COL7A1遺伝子は、配列番号2のアミノ酸配列と70%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%または99%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列をコードする核酸配列を含むか、前記核酸配列からなる。別の実施形態において、COL7A1遺伝子は、配列番号2のアミノ酸配列において1～30個、1～20個、1～10個、1～5個、1～3個、1～2個または1個のアミノ酸残基が挿入、欠失、置換、または付加されたアミノ酸配列をコードする核酸配列を含むか、前記核酸配列からなる。

[0027] 本明細書における、核酸配列またはアミノ酸配列に関する「配列同一性」とは、比較対象の配列の全領域にわたって最適な状態に（一致が最大となる状態に）アラインメントされた2つの配列間で一致する塩基またはアミノ酸残基の割合を意味する。ここで、比較対象の配列は、2つの配列の最適なアラインメントにおいて、挿入、付加または欠失（例えばギャップ等）を有していてもよい。配列同一性は、公共のデータベース（例えば、DDBJ (<http://www.ddbj.nig.ac.jp>)）で提供されるFASTA、BLAST、CLUSTAL W等のプログラムを用いて算出することができる。あるいは、市販の配列解析ソフトウェア（例えば、Vector NTI（登録商標）ソフトウェア、GENETYX（登録商標） ver. 12）を用いて求めることもできる。

[0028] 細胞を遺伝子改変する方法は、特に限定されない。ある実施形態において、細胞は、CRISPRシステム（例えば、CRISPR/Cas9、CRISPR/Cpf1）、TALEN、ZFNなどのゲノム編集により、遺伝子改変される。別の実施形態において、細胞は、レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクターなどのウイルスベクターにより、遺伝子改変される。さらなる実施形態において、細胞は、CRISPR/Cas9により遺

伝子改変される。さらなる実施形態において、細胞は、レトロウイルスベクターまたはレンチウイルスベクターにより遺伝子改変される。

[0029] ゲノム編集による場合、ゲノムに切断を生じさせるとともに、目的の配列を含むドナーベクターを細胞に導入することにより、当該配列をゲノムの切断部位に挿入することができる。ゲノムに挿入する配列は、COL7A1遺伝子、またはCOL7A1遺伝子の変異を含む部位と置換するための配列（例えば、COL7A1遺伝子の部分配列）でありうる。ドナーベクターは、目的の配列に加えて、目的の配列の発現を制御するプロモーターやエンハンサーなどの調節配列や細胞選択のための薬剤耐性遺伝子などの他の要素を含んでよく、その両端にゲノムの挿入部位の両端に相同な配列を含んでもよい。ドナーベクターは、非相同性末端結合または相同組み換えにより、所望の部位に導入されうる。ドナーベクターとしては、プラスミドや、アデノ随伴ウイルスベクター、インテグラーゼ欠損型レンチウイルスベクターなどのウイルスベクターを使用することができる。

[0030] CRISPRシステムでは、Cas9またはCas12（例えば、Cas12a（Cpf1ともいう）、Cas12b、Cas12e）などのエンドヌクレアーゼが、特定の塩基配列であるPAM配列を認識し、エンドヌクレアーゼの作用によって標的DNAの二本鎖を切断する。エンドヌクレアーゼがCas9であれば、PAM配列の約3-4塩基上流を切断する。エンドヌクレアーゼとしては、*S. pyogenes*、*S. aureus*、*N. meningitidis*、*S. thermophilus*、または*T. denticola*のCas9、*L. bacterium* ND2006または*Acidaminococcus* sp. BV3L6のCpf1などが挙げられる。PAM配列はエンドヌクレアーゼに依存し、例えば、*S. pyogenes*のCas9のPAM配列はNGGである。gRNAは、PAM配列の上流約20塩基の配列（標的配列）またはこれに相補的な配列を5'末端側に含み、標的配列にエンドヌクレアーゼを動員する役割を果たす。gRNAのうち、標的配列（またはこれに相補的な配列）以外の部分の配列は、使用するエンドヌクレアーゼに応じて当業者が適宜決定しうる。gRNAは、標的配列またはそれに相補的な配列を含みgRNAの配列特異性を担うcrRNA（CRISPR RNA）と、二本鎖を形成してCas9との複合体形成に寄与するtracrRNA

(Trans-activating crRNA) とを含み得る。crRNAとtracrRNAとは、別の分子として存在してもよい。エンドヌクレアーゼがCpf1の場合、crRNAのみでgRNAとして機能する。本明細書において、gRNAの機能に必要な要素を一本鎖上を含むgRNAを特にsgRNAと記載する場合がある。gRNAの配列は、CRISPRdirect (<https://crispr.dbcls.jp/>)など、標的配列の選択およびgRNAの設計に利用可能なツールにより決定することができる。

[0031] 細胞に、gRNAをコードする核酸配列とエンドヌクレアーゼをコードする核酸配列とを含むベクターを導入し発現させてもよく、細胞外で作製したgRNAとエンドヌクレアーゼのタンパク質とを細胞に導入してもよい。なお、エンドヌクレアーゼは核移行シグナルを備えていてもよい。gRNAをコードする核酸配列とエンドヌクレアーゼをコードする核酸配列とは、別のベクター上に存在してもよい。ベクター、gRNA、およびエンドヌクレアーゼは、リポフェクション、エレクトロポレーション、マイクロインジェクション、リン酸カルシウム法、DEAE-デキストラン法などにより細胞に導入することができるが、これらの方法に限定されない。

[0032] ある実施形態において、COL7A1遺伝子のゲノムへの導入に用いることができるgRNAは、配列番号3～5のいずれかの配列またはこれに相補的な配列を含む。

[0033] ウイルスベクターによる場合、インテグラーゼ活性を有するレトロウイルスベクターまたはレンチウイルスベクターを用いると、COL7A1遺伝子を細胞のゲノムに導入することができる。レトロウイルスベクターおよびレンチウイルスベクターは、インテグラーゼ欠損型であってもよい。インテグラーゼ欠損型ベクターは、例えば、インテグラーゼ遺伝子の変異によりインテグラーゼ活性を欠く。インテグラーゼ欠損型ベクターや、アデノウイルスベクターまたはアデノ随伴ウイルスベクターを用いると、通常、ベクターに組み込まれた配列は細胞のゲノムに導入されない。例えば、インテグラーゼ欠損型レンチウイルスベクターや、アデノウイルスベクターにCOL7A1遺伝子を組み込んだ場合は、細胞内(核内)に存在するベクターのCOL7A1遺伝子からVII型コ

ラーゲンが発現される。

[0034] ウイルスベクターは、COL7A1遺伝子をコードする配列を含み、COL7A1遺伝子の発現を制御するプロモーターやエンハンサーなどの調節配列や細胞選択のための薬剤耐性遺伝子などの他の要素を含んでよい。ウイルスベクターは、当業界に知られるいずれの方法で作製してもよい。例えば、レトロウイルスベクターおよびレンチウイルスベクターは、両端のLTR配列（5'LTRおよび3'LTR）、パッケージングシグナル、および目的の配列を含むウイルスベクタープラスミドを、Gag、Pol、Envなどのウイルスの構造タンパク質を発現する1以上のプラスミドベクターとともにパッケージング細胞に導入することにより、またはこれら構造タンパク質を発現するパッケージング細胞に導入することにより、作製することができる。パッケージング細胞としては、293T細胞、293細胞、HeLa細胞、COS1細胞、COS7細胞などが挙げられるが、これらに限定されない。ウイルスベクターは、シュードタイプ化されていてもよく、例えば、水疱性口内炎ウイルスGタンパク質（VSV-G）などのエンベロープタンパク質を発現してもよい。作製されたウイルスベクターを標的細胞に感染させることで、目的の配列を標的細胞に導入することができる。

[0035] ある実施形態において、ウイルスベクターは、レンチウイルスベクターである。レンチウイルスベクターとしては、HIV (human immunodeficiency virus)（例えば、HIV-1およびHIV-2）、SIV (simian immunodeficiency virus)、FIV (feline immunodeficiency virus)、MVV (Maedi-Visna virus)、EV1 (Maedi-Visna-like virus)、EIAV (equine infectious anemia virus)、およびCAEV (caprine arthritis encephalitis virus) が挙げられるが、これらに限定されない。ある実施形態において、レンチウイルスベクターは、HIVである。

[0036] 一例として、レンチウイルスベクターは、下記のように製造することができる。まず、ウイルスゲノムをコードするウイルスベクタープラスミドと、Gag、Pol、およびRev（および場合によりTat）を発現する1以上のプラスミドベクターおよびVSV-Gなどのエンベロープタンパク質を発現する1以上のプラ

スミドベクターとを、パッケージング細胞に導入する。ウイルスベクタープラスミドは、両端のLTR配列（5' LTRおよび3' LTR）、パッケージングシグナル、並びにCOL7A1遺伝子およびその発現を制御するプロモーター（例えば、CMVプロモーター、CAGプロモーター、EF1 $\alpha$ プロモーター、PGKプロモーター、またはhCEFプロモーター）を含む。5' LTRは、ウイルスRNAゲノムの転写を誘導するプロモーターとして機能するが、RNAゲノムの発現を高めるため、CMVプロモーターなどの別のプロモーターに置換されていてもよい。細胞内で、ベクタープラスミドからウイルスRNAゲノムが転写され、パッケージングされて、ウイルスコアが形成される。ウイルスコアは、パッケージング細胞の細胞膜に輸送され、細胞膜に封入されて、パッケージング細胞からウイルス粒子として放出される。放出されたウイルス粒子は、パッケージング細胞の培養上清から回収することができる。例えば、ウイルス粒子は、遠心分離、フィルターろ過、カラム精製などの通常の精製方法により、回収することができる。また、レンチウイルスベクターは、Lentiviral High Titer Packaging Mix、Lenti-X™ Packaging Single Shots（Takara Bio Inc.）、ViraSafe™ レンチウイルスコンプリート発現システム（Cell Biolabs Inc.）などのキットを用いて製造することができる。アデノ随伴ウイルスベクターは、AAVpro（登録商標）Helper Free System（Takara Bio Inc.）などのキットを用いて製造することができる。

[0037] ある態様において、本開示は、レンチウイルスベクターの製造に用いられるプラスミドであって、EF1 $\alpha$ プロモーターと、前記EF1 $\alpha$ プロモーターの下流に配置されたCOL7A1遺伝子とを有するプラスミドを提供する。さらなる態様において、本開示は、EF1 $\alpha$ プロモーターと、前記EF1 $\alpha$ プロモーターの下流に配置されたCOL7A1遺伝子とを有するレンチウイルスベクターを提供する。

[0038] EF1 $\alpha$ プロモーターの代表的配列を配列番号6に示す。

EF1 $\alpha$ プロモーター（配列番号6）

GTGAGGCTCCGGTGCCCGTCAGTGGGCAGAGCGCACATCGCCACAGTCCCCGAGAAGTTGGGGGGAGG

GGTCGGCAATTGAACCGGTGCCTAGAGAAGGTGGCGCGGGGTAAACTGGGAAAGTGATGTCGTGTA CTG  
GCTCCGCCTTTTTCCCGAGGGTGGGGGAGAACCGTATATAAGTGCAGTAGTCGCCGTGAACGTTCTTTT  
TCGCAACGGGTTTGCCGCCAGAACACAGGTAAGTGCCGTGTGTGGTTCCCGCGGGCCTGGCCTCTTTAC  
GGGTTATGGCCCTTGCGTGCCTTGAATTACTTCCACGCCCTGGCTGCAGTACGTGATTCTTGATCCCG  
AGCTTCGGGTTGGAAGTGGGTGGGAGAGTTCGAGGCCTTGCGCTTAAGGAGCCCCCTTCGCCTCGTGCTT  
GAGTTGAGGCCTGGCTTGGGCGCTGGGGCCGCCGCGTGCGAATCTGGTGGCACCTTCGCGCCTGTCTCG  
CTGCTTTGATAAGTCTCTAGCCATTTAAATTTTTGATGACCTGCTGCGACGCTTTTTTTCTGGCAAG  
ATAGTCTTGTAATGCGGGCCAAGATCTGCACACTGGTATTTTCGGTTTTTGGGGCCGCGGGCGGCGACG  
GGGCCCCTGCGTCCCAGCGCACATGTTCCGGCAGGCGGGGCCTGCGAGCGCGGCCACCGAGAATCGGAC  
GGGGGTAGTCTCAAGCTGGCCGGCCTGCTCTGGTGCCTGGCCTCGCGCCGCCGTGTATCGCCCCGCCCT  
GGGCGGCAAGGCTGGCCCGGTCCGGCACCAGTTGCGTGAGCGGAAAGATGGCCGCTTCCCGGCCCTGCTG  
CAGGGAGCTCAAAATGGAGGACGCGGCGCTCGGGAGAGCGGGCGGGTGAGTCACCCACACAAAGGAAAA  
GGGCCTTTCCGTCCTCAGCCGTGCTTCATGTGACTCCACGGAGTACCGGGCGCCGTCCAGGCACCTCG  
ATTAGTTCTCGAGCTTTTGGAGTACGTGCTCTTTAGGTTGGGGGAGGGGTTTTATGCGATGGAGTTTC  
CCCACACTGAGTGGGTGGAGACTGAAGTTAGGCCAGCTTGGCACTTGATGTAATTCTCCTTGGAATTTG  
CCCTTTTTGAGTTTGGATCTTGGTTCATTCTCAAGCCTCAGACAGTGGTTCAAAGTTTTTTCTTCCAT  
TTCAGGTGTCGTGAA

ある実施形態において、EF1 $\alpha$ プロモーターは、配列番号6の核酸配列と70%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%または99%以上の配列同一性を有する核酸配列を含むか、前記核酸配列からなる。別の実施形態において、EF1 $\alpha$ プロモーターは、配列番号6の核酸配列において1~30個、1~20個、1~10個、1~5個、1~3個、1~2個または1個の塩基が挿入、欠失、置換、または付加された核酸配列を含むか、前記核酸配列からなる。さらなる実施形態において、EF1 $\alpha$ プロモーターは、配列番号6の核酸配列を含むか、配列番号6の核酸配列からなる。

[0039] 目的の配列が導入された細胞は、サザンブロッティングやPCRにより確認することができる。目的の配列は、対立遺伝子の少なくとも一方に導入されていればよい。

[0040] 本開示の組成物のある実施形態では、DEB患者水疱由来細胞が、組成物に含まれる細胞で最も多い細胞である。さらなる実施形態では、DEB患者水疱由来細胞が、組成物に含まれる細胞の、70%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98または99%以上を占める。さらなる実施形態において、本開示の組成物は、実質的にDEB患者水疱由来細胞以外の細胞を含まない。「実質的にDEB患者水疱由来細胞以外の細胞を含まない」とは、本明細書に記載されるDEB患者水疱由来細胞の取得方法と実質的に同じ方法により得られた細胞のみを含むことを意味する。

[0041] 組成物に含まれる細胞の数は、所望の効果の発揮に必要な量（本明細書において、有効量とも称する）であり、当業者は、患者の年齢、体重、および病状、並びに細胞の種類および遺伝子改変方法などの因子を考慮して、適宜決定することができる。細胞数は、限定されないが、例えば、1細胞～ $1 \times 10^7$ 細胞、 $1 \times 10^6$ 細胞～ $1 \times 10^7$ 細胞、 $1 \times 10^2$ 細胞～ $1 \times 10^7$ 細胞、 $1 \times 10^3$ 細胞～ $1 \times 10^7$ 細胞、 $1 \times 10^4$ 細胞～ $1 \times 10^7$ 細胞、 $1 \times 10^5$ 細胞～ $1 \times 10^7$ 細胞、 $1 \times 10^5$ 細胞～ $5 \times 10^6$ 細胞、 $5 \times 10^5$ 細胞～ $1 \times 10^6$ 細胞、または $1 \times 10^5$ 細胞～ $1 \times 10^6$ 細胞である。組成物は、細胞に加えて、医薬上許容される媒体および/または添加物を含んでもよい。医薬上許容される媒体としては、水、培地、生理食塩水、ブドウ糖、D-ソルビトール、またはD-マンニトールなどを含む輸液、リン酸緩衝生理食塩水（PBS）などが挙げられる。添加物としては、溶解補助剤、安定剤、防腐剤などが挙げられる。組成物の剤形は、特に限定されないが、非経口投与製剤、例えば注射剤である。注射剤には、溶液性注射剤、懸濁性注射剤、乳濁性注射剤、用時調製型注射剤が含まれる。組成物は、凍結されていてもよく、DMSO、グリセロール、ポリビニルピロリドン、ポリエチレングリコール、デキストラン、スクロースなどの凍結保護剤を含んでもよい。

[0042] 本開示の組成物は、全身に、または局所的に投与されうる。ある実施形態において、組成物は、栄養障害型表皮水疱症患者の患部に投与される。本明細書において、患部とは、水疱またはその近傍の領域を意味する。さらなる

実施形態において、組成物は、水疱部分の皮内または水疱内に投与される。

さらなる実施形態において、組成物は、水疱内に投与される。本明細書において、水疱内に投与するとは、水疱部分の表皮下の空間に投与することを意味する。組成物は、好ましくは、表皮が真皮から剥離することにより表皮と真皮との間に形成された空間内に投与する。組成物は、より好ましくは、表皮の基底膜が真皮から剥離することにより当該基底膜と真皮との間に形成された空間内に投与する。例えば、組成物をシリンジ内に備える注射器の注射針を水疱に穿刺し、注射針の先端を表皮と真皮との間に形成された空間内に位置させた状態で組成物を吐出することにより、組成物を水疱内に投与することができる。水疱は、表皮水疱症の病態として自然に形成されたものであっても、人為的に形成させたものであってもよい。表皮水疱症患者において、例えば患者の皮膚をつまんだり擦ったりすることにより、水疱を人為的に形成させることができる。水疱内への投与により、皮内または皮下への投与と比較して、患者の苦痛を軽減することができ、また、VII型コラーゲンを基底膜近傍にて良好に発現させることができる。一箇所あたりに投与される細胞の数は、所望の効果の発揮に必要な量（有効量）であり、当業者は、患者の年齢、体重、および病状、並びに細胞の種類および遺伝子改変方法などの因子を考慮して、適宜決定することができる。細胞数は、限定はされないが、例えば、1細胞～ $1 \times 10^7$ 細胞、 $1 \times 10^2$ 細胞～ $1 \times 10^7$ 細胞、 $1 \times 10^3$ 細胞～ $1 \times 10^7$ 細胞、 $1 \times 10^4$ 細胞～ $1 \times 10^7$ 細胞、 $1 \times 10^5$ 細胞～ $1 \times 10^7$ 細胞、 $1 \times 10^5$ 細胞～ $5 \times 10^6$ 細胞、 $5 \times 10^5$ 細胞～ $1 \times 10^6$ 細胞、または $1 \times 10^5$ 細胞～ $1 \times 10^6$ 細胞である。ある実施形態では、水疱1つあたり、1細胞～ $1 \times 10^7$ 細胞、 $1 \times 10^2$ 細胞～ $1 \times 10^7$ 細胞、 $1 \times 10^3$ 細胞～ $1 \times 10^7$ 細胞、 $1 \times 10^4$ 細胞～ $1 \times 10^7$ 細胞、 $1 \times 10^5$ 細胞～ $1 \times 10^7$ 細胞、 $1 \times 10^5$ 細胞～ $5 \times 10^6$ 細胞、 $5 \times 10^5$ 細胞～ $1 \times 10^6$ 細胞、または $1 \times 10^5$ 細胞～ $1 \times 10^6$ 細胞が投与される。水疱1つあたりの投与量は、水疱を円形近似した場合の直径が7～8mmであるものを標準的な水疱とし、上記投与量を、その大きさに応じて調整してもよい。細胞

を水疱内に投与する場合、好ましい投与量は水疱の面積1 cm<sup>2</sup>あたり $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^7$ 細胞であり、より好ましい投与量は水疱の面積1 cm<sup>2</sup>あたり $5 \times 10^5 \sim 5 \times 10^6$ 細胞である。

[0043] 本発明の例示的な実施形態を以下に記載する。

[0044] [1]

栄養障害型表皮水疱症の治療に用いるための組成物であって、VII型コラーゲンを産生するよう遺伝子改変された栄養障害型表皮水疱症患者の水疱由来細胞を含む、組成物。

[2]

水疱由来細胞が、COL7A1遺伝子を導入することにより遺伝子改変されている、前記1に記載の組成物。

[3]

水疱由来細胞のゲノムにCOL7A1遺伝子が導入されている、前記2に記載の組成物。

[4]

COL7A1遺伝子が、配列番号1の核酸配列と70%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%または99%以上の配列同一性を有する核酸配列を含むか、配列番号2のアミノ酸配列と70%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%または99%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列をコードする核酸配列を含む、前記2または3に記載の組成物。

[5]

水疱由来細胞が、以下の1)～6)から選択される1つ以上の特徴を有するものである、前記1～4のいずれかに記載の組成物：

- 1)固相への接着性を有する、
- 2)CD73、CD105およびCD90からなる群より選択される一つ以上の表面マーカーが陽性である、
- 3)CD45、CD34、CD11b、CD79A、HLA-DRおよびCD31からなる群より選択される一つ以上の表面マーカーが陰性である、

4)骨芽細胞への分化能を有しない、又は骨髓由来間葉系幹細胞と比較して当該分化能が低い、

5)脂肪細胞への分化能を有しない、又は骨髓由来間葉系幹細胞と比較して当該分化能が低い、

6)軟骨細胞への分化能を有しない、又は骨髓由来間葉系幹細胞と比較して当該分化能が低い。

[ 6 ]

水疱由来細胞が、栄養障害型表皮水疱症患者の水疱内容液に由来する、前記 1 ～ 5 のいずれかに記載の組成物。

[ 7 ]

水疱由来細胞が、組成物に含まれる細胞で最も多い細胞である、前記 1 ～ 6 のいずれかに記載の組成物。

[ 8 ]

水疱由来細胞が、組成物に含まれる細胞の70%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98または99%以上を占める、前記 1 ～ 7 のいずれかに記載の組成物。

[ 9 ]

組成物が、実質的に水疱由来細胞以外の細胞を含まない、前記 1 ～ 8 のいずれかに記載の組成物。

[ 1 0 ]

患部に投与される、前記 1 ～ 9 のいずれかに記載の組成物。

[ 1 1 ]

水疱内に投与される、前記 1 ～ 1 0 のいずれかに記載の組成物。

[ 1 2 ]

ゲノム編集により水疱由来細胞が遺伝子改変されている、前記 1 ～ 1 1 のいずれかに記載の組成物。

[ 1 3 ]

ゲノム編集が、CRISPR/Cas9による、前記 1 2 に記載の組成物。

[ 1 4 ]

ウイルスベクターにより水疱由来細胞が遺伝子改変されている、前記 1 ～ 1 1 のいずれかに記載の組成物。

[ 1 5 ]

ウイルスベクターが、レトロウイルスベクターまたはレンチウイルスベクターである、前記 1 4 に記載の組成物。

[ 1 6 ]

ウイルスベクターが、レンチウイルスベクターである、前記 1 4 または 1 5 に記載の組成物。

[0045] [ 1 7 ]

栄養障害型表皮水疱症の治療に使用するための組成物の製造方法であって、

VII型コラーゲンを産生するよう栄養障害型表皮水疱症患者の水疱由来細胞を遺伝子改変すること、および

該遺伝子改変された水疱由来細胞を含む組成物を調製することを含む方法。

[ 1 8 ]

栄養障害型表皮水疱症を治療するための方法であって、VII型コラーゲンを産生するよう遺伝子改変された栄養障害型表皮水疱症患者の水疱由来細胞を含む組成物を前記患者に投与することを含む方法。

[ 1 9 ]

水疱由来細胞が、COL7A1遺伝子を導入することにより遺伝子改変されている、前記 1 8 に記載の方法。

[ 2 0 ]

水疱由来細胞のゲノムにCOL7A1遺伝子が導入されている、前記 1 9 に記載の方法。

[ 2 1 ]

COL7A1遺伝子が、配列番号 1 の核酸配列と70%、80%、85%、90%、95%

、96%、97%、98%または99%以上の配列同一性を有する核酸配列を含むか、配列番号2のアミノ酸配列と70%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%または99%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列をコードする核酸配列を含む、前記19または20に記載の方法。

[22]

ゲノム編集により水疱由来細胞が遺伝子改変されている、前記18～21のいずれかに記載の方法。

[23]

ゲノム編集が、CRISPR/Cas9による、前記22に記載の方法。

[24]

ウイルスベクターにより水疱由来細胞が遺伝子改変されている、前記18～21のいずれかに記載の方法。

[25]

ウイルスベクターが、レトロウイルスベクターまたはレンチウイルスベクターである、前記24に記載の方法。

[26]

ウイルスベクターが、レンチウイルスベクターである、前記24または25に記載の方法。

[27]

患者への投与に先立ち、VII型コラーゲンを産生するよう水疱由来細胞を遺伝子改変することをさらに含む、前記18～26のいずれかに記載の方法。

[28]

COL7A1遺伝子を導入することにより水疱由来細胞を遺伝子改変する、前記17または27に記載の方法。

[29]

水疱由来細胞のゲノムにCOL7A1遺伝子を導入する、前記28に記載の方法。

[30]

COL7A1遺伝子が、配列番号1の核酸配列と70%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%または99%以上の配列同一性を有する核酸配列を含むか、配列番号2のアミノ酸配列と70%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%または99%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列をコードする核酸配列を含む、前記28または29に記載の方法。

[31]

ゲノム編集により水疱由来細胞を遺伝子改変する、前記17および27～30のいずれかに記載の方法。

[32]

ゲノム編集が、CRISPR/Cas9による、前記31に記載の方法。

[33]

ウイルスベクターにより水疱由来細胞を遺伝子改変する、前記17および27～30のいずれかに記載の方法。

[34]

ウイルスベクターが、レトロウイルスベクターまたはレンチウイルスベクターである、前記33に記載の方法。

[35]

ウイルスベクターが、レンチウイルスベクターである、前記33または34に記載の方法。

[36]

遺伝子改変に先立ち、栄養障害型表皮水疱症患者の水疱から細胞を得ることをさらに含む、前記17および27～35のいずれかに記載の方法。

[37]

水疱由来細胞が、栄養障害型表皮水疱症患者の水疱内容液に由来する、前記17～36のいずれかに記載の方法。

[38]

水疱由来細胞が、組成物に含まれる細胞で最も多い細胞である、前記17～37のいずれかに記載の方法。

[ 3 9 ]

水疱由来細胞が、組成物に含まれる細胞の70%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98または99%以上を占める、前記 1 7 ～ 3 8 のいずれかに記載の方法。

[ 4 0 ]

組成物が、実質的に水疱由来細胞以外の細胞を含まない、前記 1 7 ～ 3 9 のいずれかに記載の方法。

[ 4 1 ]

組成物が、患部に投与される、前記 1 8 ～ 4 0 のいずれかに記載の方法。

[ 4 2 ]

組成物が、水疱内に投与される、前記 1 8 ～ 4 1 のいずれかに記載の方法。  
。

[0046] [ 4 3 ]

栄養障害型表皮水疱症を治療するための医薬の製造のための、VII型コラーゲンを産生するよう遺伝子改変された栄養障害型表皮水疱症患者の水疱由来細胞を含む組成物の使用。

[ 4 4 ]

組成物が水疱内に投与されるものである、前記 4 3 に記載の使用。

[ 4 5 ]

水疱由来細胞が、栄養障害型表皮水疱症患者の水疱内容液に由来する、前記 4 3 または 4 4 に記載の使用。

[0047] [ 4 6 ]

栄養障害型表皮水疱症を治療するための、VII型コラーゲンを産生するよう遺伝子改変された栄養障害型表皮水疱症患者の水疱由来細胞を含む組成物の使用。

[ 4 7 ]

組成物が水疱内に投与されるものである、前記 4 6 に記載の使用。

[ 4 8 ]

水疱由来細胞が、栄養障害型表皮水疱症患者の水疱内容液に由来する、前記 46 または 47 に記載の使用。

[0048] [49]

栄養障害型表皮水疱症の治療における使用のための、VII型コラーゲンを産生するよう遺伝子改変された栄養障害型表皮水疱症患者の水疱由来細胞。

[50]

水疱内に投与されるものである、前記 49 に記載の細胞。

[51]

栄養障害型表皮水疱症患者の水疱内容液に由来する細胞である、前記 49 または 50 に記載の細胞。

[0049] [52]

配列番号 3～5 のいずれかの配列またはこれに相補的な配列を含む、gRNA。

[53]

前記 52 のgRNAをコードする核酸配列を含むベクター。

[0050] [54]

栄養障害型表皮水疱症患者の水疱内容物を固相上で培養する工程を含む、細胞の製造方法。

[55]

水疱内容物が、水疱内容液である、前記 54 に記載の方法。

[56]

患者の水疱から採取した水疱内容物を、酵素処理することなく培地に播種し、固相上で培養する、前記 54 または 55 に記載の方法。

[57]

前記 54～56 のいずれかに記載の方法によって製造される細胞。

[58]

以下の1)～6)から選択される1つ以上の特徴を有する、前記 57 に記載の細胞：

- 1) 固相への接着性を有する、
- 2) CD73、CD105およびCD90からなる群より選択される一つ以上の表面マーカーが陽性である、
- 3) CD45、CD34、CD11b、CD79A、HLA-DRおよびCD31からなる群より選択される一つ以上の表面マーカーが陰性である、
- 4) 骨芽細胞への分化能を有しない、又は骨髓由来間葉系幹細胞と比較して当該分化能が低い、
- 5) 脂肪細胞への分化能を有しない、又は骨髓由来間葉系幹細胞と比較して当該分化能が低い、
- 6) 軟骨細胞への分化能を有しない、又は骨髓由来間葉系幹細胞と比較して当該分化能が低い。

[0051] [ 5 9 ]

以下の工程を含む、細胞の製造方法：

- 1) 栄養障害型表皮水疱症患者の水疱内容物を固相上で培養する工程、
- 2) 培養工程1)によって得られた細胞を、VII型コラーゲンを産生するよう遺伝子改変する工程。

[ 6 0 ]

水疱内容物が、水疱内容液である、前記 5 9 に記載の方法。

[ 6 1 ]

患者の水疱から採取した水疱内容物を、酵素処理することなく培地に播種し、固相上で培養する、前記 5 9 または 6 0 に記載の方法。

[ 6 2 ]

前記 5 9 ～ 6 1 のいずれかに記載の方法によって製造される細胞。

[ 6 3 ]

VII型コラーゲンを産生するよう遺伝子改変された、栄養障害型表皮水疱症患者の水疱由来細胞。

[ 6 4 ]

栄養障害型表皮水疱症患者の水疱内容液に由来する細胞である、前記 6 3

に記載の細胞。

[ 6 5 ]

COL7A1遺伝子を導入することにより遺伝子改変されている、前記 6 2 ～ 6 4 のいずれかに記載の細胞。

[ 6 6 ]

細胞のゲノムにCOL7A1遺伝子が導入されている、前記 6 5 に記載の細胞。

[ 6 7 ]

COL7A1遺伝子が、配列番号 1 の核酸配列と70%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%または99%以上の配列同一性を有する核酸配列を含むか、配列番号 2 のアミノ酸配列と70%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%または99%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列をコードする核酸配列を含む、前記 6 6 に記載の細胞。

[ 6 8 ]

ゲノム編集により遺伝子改変されている、前記 6 2 ～ 6 7 のいずれかに記載の細胞。

[ 6 9 ]

ゲノム編集が、CRISPR/Cas9による、前記 6 8 に記載の細胞。

[ 7 0 ]

ウイルスベクターにより遺伝子改変されている、前記 6 2 ～ 6 7 のいずれかに記載の細胞。

[ 7 1 ]

ウイルスベクターが、レトロウイルスベクターまたはレンチウイルスベクターである、前記 7 0 に記載の細胞。

[ 7 2 ]

ウイルスベクターが、レンチウイルスベクターである、前記 7 0 または 7 1 に記載の細胞。

[ 7 3 ]

以下の1)～6)から選択される 1 つ以上の特徴を有する、前記 6 2 ～ 7 2 の

いずれかに記載の細胞：

- 1) 固相への接着性を有する、
- 2) CD73、CD105およびCD90からなる群より選択される一つ以上の表面マーカーが陽性である、
- 3) CD45、CD34、CD11b、CD79A、HLA-DRおよびCD31からなる群より選択される一つ以上の表面マーカーが陰性である、
- 4) 骨芽細胞への分化能を有しない、又は骨髓由来間葉系幹細胞と比較して当該分化能が低い、
- 5) 脂肪細胞への分化能を有しない、又は骨髓由来間葉系幹細胞と比較して当該分化能が低い、
- 6) 軟骨細胞への分化能を有しない、又は骨髓由来間葉系幹細胞と比較して当該分化能が低い。

[0052] [ 7 4 ]

レンチウイルスベクターの製造に用いられるプラスミドであって、  
EF1 $\alpha$ プロモーターと、  
前記EF1 $\alpha$ プロモーターの下流に配置されたCOL7A1遺伝子と、  
を有するプラスミド。

[ 7 5 ]

EF1 $\alpha$ プロモーターと、  
前記EF1 $\alpha$ プロモーターの下流に配置されたCOL7A1遺伝子と、  
を有するレンチウイルスベクター。

[0053] 以下、実施例により本発明をさらに詳細に説明するが、本発明は以下に記載される態様に限定されるものではない。

## 実施例

[0054] 1. 水疱由来細胞の取得

栄養障害型表皮水疱症患者の水疱内容液を採取し、300gで 5分遠心した。  
得られた沈殿を培地 (Mesenchymal Stem Cell Growth Medium 2 (PromoCell  
社、C-28009) にペニシリンおよびストレプトマイシンをそれぞれ終濃度100un

it/mLおよび100  $\mu$ g/mLとなるよう添加したもの)で懸濁してコラーゲンIコート 6-well plateに播種し、37°C、5%CO<sub>2</sub>で培養することにより、付着性の細胞を得た。なお、水疱内溶液の採取から培地への播種までの所要時間は、患者によって異なるが、18分～1時間の範囲内であった。その後、適宜培地交換と継代を行って所望の細胞数まで増殖させた(培養開始20日後までの培養経過を図1に示す)。かかる方法によって得た細胞を、以下において「水疱由来細胞」とも称する。下記表面マーカー解析と分化誘導の実験には3継代目の細胞、遺伝子導入には3～4継代目の細胞をそれぞれ用いた。また、上記の培地に代えてMesenchymal Stem Cell Growth Medium 2 (PromoCell社、C-28009)とMSCGM Mesenchymal Stem Cell Growth Medium (Lonza社、PT-3001)の等量混合培地や、Cellartis MSC Xeno-Free Culture Medium (タカラバイオ社、Y50200)を用いた場合でも同等の水疱由来細胞が得られることを確認した。予備検討として、水疱内容液を患者の水疱内から採取してから培地に播種するまでの時間と培養後にプレートに形成されたコロニー数との相関を調べたところ、水疱内溶液を採取後1時間以内に播種すると多数のコロニーが得られ、採取後3時間を超えてから播種すると極めて少数のコロニーしか得られない、あるいはほとんどコロニーが得られないという結果であった。

## [0055] 2. 水疱由来細胞の特徴決定

### a) 表面マーカー解析 (FACS)

上記1. で得られた水疱由来細胞と、ヒト骨髓由来間葉系幹細胞(以下、BM-MSCとも称する)[PromoCell社(Heidelberg, Germany)またはLonza社(Basel, Switzerland)より購入]について、以下の手順で表面マーカー解析を行った: 細胞をAccutase-Solution (PromoCell社、C-41310)を用いてプレートから剥がし、培地で洗浄した後、細胞数の計測結果を基に、2本のチューブに細胞を10万個ずつ分取した。細胞をFlow Cytometry Staining Buffer (1X) (R&D Systems社、FC001)で1回洗浄し、100  $\mu$ lのFlow Cytometry Staining Buffer (1X)に再懸濁した。Fc受容体のブロッキングを行うため、Human TruStain FcX™ (BioLegend社、422301)を5  $\mu$ l加えて、氷上で10分間反応させた。1本

のチューブには、Human Mesenchymal Stem Cell Verification Flow Kit (R&D Systems社、FMC020)に含まれるCD73-CFS Mouse IgG2B、CD90-APC Mouse IgG2A、およびNegative Marker Cocktail (CD45-PE Mouse IgG1、CD34-PE Mouse IgG1、CD11b-PE Mouse IgG2B、CD79A-PE Mouse IgG1、HLA-DR-PE Mouse IgG1)をそれぞれ10 $\mu$ lずつ加え、さらにBrilliant Violet 421™ anti-human CD105 Antibody (BioLegend社、323219)を5 $\mu$ l加えて、室温・遮光下で30分間反応させた。もう1本のチューブは陰性コントロールとして使用するため、それぞれのアイソタイプコントロール抗体を同量加えて、室温・遮光下で30分間反応させた。細胞を2mlのFlow Cytometry Staining Buffer (1X)で1回洗浄し、300 $\mu$ lのFlow Cytometry Staining Buffer (1X)に再懸濁した後、BD FACSAria(BD社)で解析した。また、CD31についても以下の手順でFACS解析を行い、水疱由来細胞およびヒトBM-MScにおける発現有無を確認した：細胞をAccutase-Solution (PromoCell社、C-41310)を用いてプレートから剥がし、培地で洗浄した後、細胞数の計測結果を基に、2本のチューブに細胞を10万個ずつ分取した。細胞を2%FBS含有PBSで洗浄し、100 $\mu$ lの2%FBS含有PBSに再懸濁した。Fc受容体のブロッキングを行うため、Human TruStain FcX™ (BioLegend社、422301)を5 $\mu$ l加えて、氷上で10分間反応させた。1本のチューブには、APC anti-human CD31 Antibody (BioLegend社、303116)を5 $\mu$ l(タンパク質量0.4 $\mu$ g)加えて、氷上・遮光下で60分間反応させた。もう1本のチューブは陰性コントロールとして使用するため、APC Mouse IgG1,  $\kappa$  Isotype Ctrl Antibody (BioLegend社、400120)を2 $\mu$ l(タンパク質量0.4 $\mu$ g)加えて、氷上・遮光下で60分間反応させた。細胞を2mlの2%FBS含有PBSで1回洗浄した後、300 $\mu$ lの2%FBS含有PBSに再懸濁し、BD FACSAria(BD社)で解析した。

[0056] FACS解析の結果、水疱由来細胞とBM-MScはいずれも、CD73、CD105およびCD90が陽性であり、CD45、CD34、CD11b、CD79A、HLA-DRおよびCD31が陰性であった(図2)。

[0057] b) 分化誘導(骨芽細胞、脂肪細胞および軟骨細胞)

上記1. で得られた水疱由来細胞とBM-MScについて、下記の条件で骨芽細胞

、脂肪細胞および軟骨細胞への分化誘導を行った。

骨芽細胞への分化誘導：

細胞を、 $0.1\mu\text{M}$  Dexamethasone、 $0.2\text{mM}$  Ascorbic acid 2-phosphate、 $10\text{mM}$  Glycerol 2-phosphate（数値はいずれも終濃度）を含む培地で、 $37^{\circ}\text{C}$ 、 $5\%\text{CO}_2$ の条件下、3週間培養（週2回培地交換）して骨芽細胞への分化を誘導した。T RACP & ALP Assay Kit（タカラバイオ社、MK301）を製品マニュアル通りに用いて、アルカリホスファターゼ（ALP）染色を行った。

脂肪細胞への分化誘導：

細胞を、 $1\mu\text{M}$  Dexamethasone、 $0.5\text{mM}$  3-Isobutyl-1-methylanthine（IBMX）、 $10\mu\text{g/mL}$  Insulin、 $100\mu\text{M}$  Indomethacin（数値はいずれも終濃度）を含む培地で、 $37^{\circ}\text{C}$ 、 $5\%\text{CO}_2$ の条件下、3週間培養（週2回培地交換）して脂肪細胞への分化を誘導した。リピットアッセイキット（コスモ・バイオ社、AK09F）を製品マニュアル通りに用いて、細胞のオイルレッドO染色を行った。

軟骨細胞への分化誘導：

Human Mesenchymal Stem Cell (hMSC) Chondrogenic Differentiation Medium Bullet Kit(tm) (Lonza社、PT-3003)の構成品を指示通りに混合して、軟骨分化誘導培地(不完全培地)を調製した。これにRecombinant Human TGF-beta 3 Protein (R&D Systems社、243-B3)を、最終濃度 $10\text{ng/mL}$ になるように添加して、軟骨分化誘導培地(完全培地)を使用毎に調製した。第三継代細胞をAccutase-Solution PromoCell社、C-41310)で剥がし、培地で洗浄した後、細胞数の計測結果を基に、 $250,000$ 個の細胞を $15\text{mL}$ ポリプロピレンコニカルチューブに分取した。細胞を軟骨分化誘導培地(不完全培地)で2回洗浄し、上清を除去した後、 $500\mu\text{L}$ の軟骨分化誘導培地(完全培地)で懸濁した。 $150\text{g}$ で5分間遠心して細胞のペレットを形成させ、ふたを緩めて $\text{CO}_2$ インキュベーターに静置し（ $37^{\circ}\text{C}$ 、 $5\%\text{CO}_2$ ）、その後2～3日毎に培地(完全培地)を交換した。3週間経過後にペレットを取り出して $4\%$ パラホルムアルデヒドで固定し、凍結切片を作成してアルシアンブルー染色により軟骨細胞由来のプロテオグリカンを染色した。ポジティブコントロールとしてヒト骨髄由来間葉系幹細胞について

も同様の分化誘導操作を行った。

[0058] 上記分化誘導実験の結果、BM-MScはALP染色、オイルレッドO染色、およびアルシアンブルー染色の全てにおいて陽性であった。一方、水疱由来細胞は、ALP染色が陽性（但し、BM-MScより染色強度は低い）、オイルレッドO染色が陽性（但し、BM-MScより染色強度は低い）、アルシアンブルー染色が陰性であった（図3）。また、別の栄養障害型表皮水疱症患者から採取された水疱内容液から得られた水疱由来細胞に対しても、同様の分化誘導実験を行った。その結果を図4に示す。図3の結果と同様に、BM-MScはALP染色、オイルレッドO染色、およびアルシアンブルー染色の全てにおいて陽性であった。一方、この栄養障害型表皮水疱症患者の水疱由来細胞は、ALP染色が陽性（但し、BM-MScより染色強度は低い）、オイルレッドO染色が陽性（但し、BM-MScより染色強度は低い）、アルシアンブルー染色が陽性（但し、BM-MScより染色強度は低い）であった。

[0059] c) VII型コラーゲンの発現能力および分泌能力の評価

水疱由来細胞がどの程度VII型コラーゲンを発現しているか、そして分泌しているかを、ウエスタンブロットで調べた。この実験では、VII型コラーゲンを発現するが、アミノ酸変異により発現したVII型コラーゲンが殆ど機能していないと考えられる患者から得られた水疱由来細胞を用いた。まず、ヒト表皮角化細胞（以下KCと称する）、ヒト皮膚線維芽細胞（以下FBと称する）、ヒト骨髓由来間葉系幹細胞（以下、MSCと称する）、及び表皮水疱症患者の水疱由来細胞（以下BFC; blister fluid cellとも称する）を、下記表1に示す培地でそれぞれ培養した。

[表1]

| 細胞                                                                             | 培地                                                                                                                            |
|--------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| KC : Human Epidermal Keratinocyte (NB)* (KURABOU社、KK-4009)<br>*(NBはNew Bornの略) | Humedia-KG2 (KURABO社、KK-2150S)                                                                                                |
| FB : Normal Human Dermal Fibroblasts – Adult (Lonza社、CC-2511)                  | Fibroblast Growth Medium-2 BulletKit (Lonza社、CC-3132)                                                                         |
| MSC : hMSC – Human Mesenchymal Stem Cells (Lonza社、PT-2501)                     | MSCGM Mesenchymal Stem Cell Growth Medium (Lonza社、PT-3001)                                                                    |
| BFC : 水疱由来細胞 (表皮水疱症患者の水疱内溶液から採取)                                               | Mesenchymal Stem Cell Growth Medium 2 (PromoCell社、C-28009)とMSCGM Mesenchymal Stem Cell Growth Medium (Lonza社、PT-3001) の等量混合培地 |

[0060] 細胞が90-95%コンフルエントに到達したら、D-PBS(-)で洗浄し、アスコルビン酸 (nacalai tesque社、13048-42、終濃度50 ug/ml) とプロテアーゼ阻害剤カクテル (SIGMA社、P1860-1ML、1/400倍希釈) を添加したそれぞれの培地 (サプリメント未添加) を加え、CO<sub>2</sub>インキュベーターで24時間培養した。培養後、培地はメタノール・クロロホルム沈殿法を用いて濃縮した。また、RIPA buffer(nacalai tesque社、08714-04)を用いて、細胞から細胞ライセートを調製した。それぞれのライセートをタンパク質濃度をもとに補正し、LDS sample buffer、sample reducing agent (それぞれInvitrogen社、NP0007、NP0009) を用いて、電気泳動用サンプルを調製した。3-8% NuPAGEゲル (Invitrogen社、EA0375BOX) を用いて電気泳動を行った後、PVDF膜 (Millipore社、IPVH07850) に転写し、一次抗体にAnti-Col7 (Atlas社、HPA042420)、二次抗体にAnti-Rabbit IgG-HRP (GE healthcare社、NA9340-1ML) を用いて抗体反応を行った。そして、Chemi-lumi-one ultra (nacalai tesque社、11644-40)、Chemi DOC (BioRad社、17001402JA)を用いてバンドを検出し、Image Lab software (BioRad社、1709690) で解析、定量化した。また、濃縮した培地に対しても同様にウエスタンブロットを行い、VII型コラーゲンの濃度を定量化した。

[0061] 結果を図5に示す。図5 (上) に示すように、細胞ライセートに対してウ

エスタンプロットを行った結果、水疱由来細胞のCOL7A発現量は、皮膚線維芽細胞および骨髄由来間葉系幹細胞よりも高く、表皮角化細胞と遜色ないレベルであった。また、図5（下）に示すように、細胞を培養した培地の濃縮物に対してウエスタンプロットを行った結果、水疱由来細胞からのCOL7A分泌量は、どの細胞よりも多かった。以上の結果から、水疱由来細胞は、遺伝子を導入してVII型コラーゲンを発現させる細胞として、至適であると推察される。

### [0062] 3. ゲノム編集の設計

ヒトゲノム内のAAVS1 (Adeno-associated virus integration site 1) 領域においてCRISPR-Cas9システムによる切断効率が良好な位置を選択するため、3種類のsgRNAを作製した。AAVS1領域は、遺伝子導入による影響を受けにくい安全領域（セーフ・ハーバー／safe harbor）である。CRISPR-Cas9システムは「NGG」の塩基配列を認識し、その3塩基上流を切断することから、末端に「GG」が配置される領域を選択し、「NGG」の上流20塩基の標的配列を含むsgRNA (sgAAVS1-#1～#3) を設計した（図6、上；表2）。

[表2]

| sgRNA      | 標的配列                 | 配列番号 |
|------------|----------------------|------|
| sgAAVS1-#1 | ACCCCACAGTGGGGCCACTA | 3    |
| sgAAVS1-#2 | GTCACCAATCCTGTCCCTAG | 4    |
| sgAAVS1-#3 | GGGGCCACTAGGGACAGGAT | 5    |

[0063] 配列番号3～5のいずれかの配列からなるオリゴヌクレオチドとその相補鎖をアニーリングした後にeSpCas9(1.1) (Addgene plasmid # 71814)のBbs1サイトにクローニングすることにより、Cas9タンパク質とsgRNAを発現するプラスミドを作成した（それぞれ、eSpCas9(1.1)-sgAAVS1-#1、eSpCas9(1.1)-sgAAVS1-#2、eSpCas9(1.1)-sgAAVS1-#3）。このプラスミド（2.5  $\mu$ g）を、6ウェルディッシュに播種したHEK293細胞（ヒト胎児腎細胞株）にLipofectamin 3000 (Thermo Fisher Scientific)により導入した。トランスフェクションの48時間後、細胞からゲノムDNAを抽出し、標的部位を含む領域をPCRで増幅

した。PCR増幅断片は熱処理により一本鎖にし、ゆっくり冷却することでアニーリングさせた後に、ミスマッチ部位特異的エンドヌクレアーゼで処理した。これを電気泳動で分画し、ゲノム切断によって導入された挿入または欠失変異の程度をバンドの濃さで測定し、以下の計算式によりゲノム編集効率を算出した(式中、aは消化されなかったバンド濃度、b, cは切断されたバンド濃度を示す)。

$$\text{Indel (\%)} = 100 \times (1 - \sqrt{1 - f_{\text{cut}}}), \quad f_{\text{cut}} = (b+c) / (a+b+c)$$

[0064] sgAAVS1-#1～#3のいずれのsgRNAによってもコントロールとは異なる短いDNA断片が生じ、二重鎖切断が生じることが確認された(図6、下)。以下の実験では、最も切断効率の高かったsgAAVS1-#3を使用した。

[0065] 4. 水疱由来細胞へのCOL7A1遺伝子の導入

AAVS1領域へのCOL7A1遺伝子の導入のため、CAGプロモーターの制御下にCOL7A1遺伝子を発現するプラスミドを設計した(図7)。COL7A1 cDNAは、Flexi ORF sequence-verified clone (Promega, Madison, WI, USA)より得た。COL7A1 cDNAをpENTR1Aプラスミド(Thermo Fisher Scientific, A10462)にサブクローニングし、pENTR1A-COL7A1を得た。LRリコンビナーゼ(Thermo Fisher Scientific)を用いたGateway反応によってpENTR1A-COL7A1からpAAVS1-P-CAG-DEST (Addgene plasmid # 80490)へCOL7A1 cDNAを導入し、ドナープラスミドpAAVS1-P-CAG-COL7A1を得た。

[0066] 上記1. で得られた水疱由来細胞をNeonトランスフェクションシステム(Thermo Fisher Scientific)の専用バッファーで懸濁し、Cas9-sgRNA発現プラスミド(eSpCas9(1.1)-sgAAVS1-#3)およびドナープラスミド(pAAVS1-P-CAG-COL7A1)と以下のように混合した。

[表3]

|                          |                       |
|--------------------------|-----------------------|
| 水疱由来細胞                   | $1 \times 10^5$ cells |
| eSpCas9 (1.1)-sgAAVSI-#3 | 0.5 $\mu$ g           |
| pAAVSI-P-CAG-COL7A1      | 0.25 $\mu$ g          |

[0067] Neonトランスフェクションシステムを用い、1,200 V, 20 ms, 2 pulsesの条件でエレクトロポレーションにより上記プラスミドを水疱由来細胞に導入した後、6-wellプレートに播種して培養した。培地は、Mesenchymal Stem Cell Growth Medium 2 (PromoCell社、C-28009)とMSCGM Mesenchymal Stem Cell Growth Medium (Lonza社、PT-3001)の等量混合培地を使用した。トランスフェクションの48時間後にpuromycinを最終濃度0.5  $\mu$ g/mLになるよう添加し、約2週間培養して選択された細胞を下記「5. 遺伝子改変水疱由来細胞のマウスへの移植」でのマウスへの移植実験に使用した。

[0068] また、PGKプロモーターの制御下にCOL7A1遺伝子を発現するドナープラスミドを作成し、このプラスミドを水疱由来細胞を含む各種細胞に導入した。そして、改変した細胞のCOL7A1の発現量及び分泌量を、上記「2. 水疱由来細胞の特徴決定」の「c) VII型コラーゲンの発現能力および分泌能力の評価」と同様にしてウエスタンブロットを行い、評価した。この実験では、VII型コラーゲンを発現していない患者から得られた水疱由来細胞を用いた。結果を図8に示す。図8（上）に示すように、水疱由来細胞のライセートからは、線維芽細胞のライセートよりも、VII型コラーゲンが多く検出された。同様に、図8（下）に示すように、水疱由来細胞を培養した培地からも、線維芽細胞を培養した培地よりも、VII型コラーゲンが多く検出された。以上の結果から、COL7A1遺伝子をCRISPR-Cas9で細胞に導入すると、水疱由来細胞は線維芽細胞よりもVII型コラーゲンを多く発現し、かつ、多く分泌することが分かった。（EF1 $\alpha$ プロモーターを用いたCOL7A1遺伝子ドナープラスミドで水疱由来細胞を遺伝子改変した場合でもVII型コラーゲンを発現および分泌する細胞が得られることを、免疫染色および培養上清のウエスタンブロッティングにより

確認している。)

[0069] 5. 遺伝子改変水疱由来細胞のマウスへの移植

水疱形成を示すCol7A1遺伝子ノックアウトマウス (Col7a1<sup>-/-</sup>) の新生児の全層皮膚を切除し、免疫不全マウス (NOD-SCID) の背部に移植した。移植直後に皮膚表面をつまみ、かつ擦ることで水疱を形成させ、直ちに表皮下の空間 (水疱内) に上記4. で作成した $1.0 \times 10^6$ 個の遺伝子改変水疱由来細胞を注入し (図9)、フィルムドレッシング材で密封した (対照群のマウスには、遺伝子改変していない水疱由来細胞を $1.0 \times 10^6$ 個注入した)。4週間後に皮膚を採取し、抗VII型コラーゲン抗体(clone LH7.2; Sigma Aldrich, C6805)を用いた免疫染色により、VII型コラーゲン基底膜への沈着を確認した。その結果、遺伝子改変水疱由来細胞を水疱内に注入したマウスの基底膜近傍にVII型コラーゲンの沈着が認められた (図10)。

[0070] 6. 遺伝子導入細胞を移植したマウスにおけるVII型コラーゲンの沈着

表皮水疱症モデルマウスにおけるVII型コラーゲンの沈着を、水疱由来細胞と間葉系幹細胞とで比較した。まず、免疫不全マウス (NOD-SCID) の背部にCol7A1遺伝子ノックアウトマウスの新生児の全層皮膚を移植した。そして、その真皮内 (皮内) あるいは表皮下の空間 (水疱内) に、以下の細胞を $1.0 \times 10^6$ 個注入した。

- ・ hMSC: 遺伝子改変していないヒト骨髄由来間葉系幹細胞
- ・ COL7-hMSC: 遺伝子改変 (VII型コラーゲン過剰発現) ヒト骨髄由来間葉系幹細胞、上記「4. 水疱由来細胞へのCOL7A1遺伝子の導入」と同じ方法で、ヒト骨髄由来間葉系幹細胞 (hMSC) [Lonza社 (Basel, Switzerland)より購入] にCOL7A1遺伝子を導入したもの
- ・ COL7-BF: 上記「4. 水疱由来細胞へのCOL7A1遺伝子の導入」で作成した遺伝子改変水疱由来細胞

4週間後に皮膚を採取し、抗VII型コラーゲン抗体(clone LH7.2; Sigma Aldrich, C6805)を用いて免疫染色を行い、染色画像を撮影した。そして、画像解析ソフトを用いて、VII型コラーゲンの染色部分が正確に一致するように複

数の写真を重ね合わせ、1枚の画像を合成した。

[0071] その結果を図11に示す。図11の「hMSC」と「hMSC水疱内」の対比、および「COL7-hMSC皮内」と「COL7-hMSC水疱内」の対比によって示されるように、皮内に間葉系幹細胞を注入した場合よりも、水疱内に注入した場合の方が、基底膜近傍にVII型コラーゲンが多く検出された。また、図11の「COL7-hMSC水疱内」と「COL7-BF水疱内」の対比によって示されるように、COL7A1遺伝子が導入された水疱由来細胞を水疱内に注入したマウスでは、COL7A1遺伝子が導入された間葉系幹細胞を水疱内に注入したマウスよりも、より多くのVII型コラーゲンが基底膜近傍に検出された。これにより、COL7A1遺伝子が導入された細胞を水疱内に注入した方が、皮内に注入するよりも、VII型コラーゲンがより良好に皮膚内に沈着することが判明した。また、水疱由来細胞を用いた方が、基底膜近傍により多くのVII型コラーゲンが沈着できることも判明した。

[0072] 7. 水疱由来細胞を水疱内に移植するのに必要な細胞数

どれくらいの数の水疱由来細胞を水疱内に移植すれば必要な効果が得られるのかを調べた。図12左に示すように、まず、水疱形成を示すCol7A1遺伝子ノックアウトマウス (Col7a1<sup>-/-</sup>) の新生児の全層皮膚を切除し、免疫不全マウス (NOD) の背部に移植した。移植直後に皮膚表面をつまみ、かつ擦ることで直径約1cmの水疱を形成させた。直ちに表皮下の空間 (水疱内) に、CAGプロモーターで制御されるホタルルシフェラーゼ遺伝子ドナープラスミドで遺伝子改変した水疱由来細胞を、 $1.0 \times 10^6$ 、 $0.5 \times 10^6$ 、 $0.25 \times 10^6$ または $0.1 \times 10^6$ 個、別個体にそれぞれ注入した。30分後水疱内溶液を回収し、Luciferase assay system (Promega社、E2510)でホタルルシフェラーゼのレベルを測定し、真皮上に定着せず水疱内の液中に残存した余剰細胞の数を評価した。

[0073] 図12右にその結果を示す。同図に示すように、 $0.25 \times 10^6$ 個または $0.1 \times 10^6$ 個の細胞を移植した群ではシグナル強度にほとんど差がなかった。一方、 $0.5 \times 10^6$ 個または $1.0 \times 10^6$ 個の細胞を移植した群では、細胞数の増大に比例して、シグナルも増加した。この結果から、直径1cm (=約 $0.8\text{cm}^2$ ) の水疱あたり0.

$5 \times 10^6$ 個以上の細胞 ( $=0.6 \times 10^6$ 細胞/cm<sup>2</sup>以上) を水疱内に投与すれば、治療効果が得られるのに十分な数の細胞が、基底膜に定着する可能性が示唆される。

[0074] 8. 移植細胞の長期生着能

マウスの皮内に投与した水疱由来細胞がどれくらいの期間投与部位で生存するのかを調べた。まず、図13左に示すように、免疫不全マウス (NOG) の背部の左右に、CAGプロモーターで制御されるホタルルシフェラーゼ遺伝子ドナープラスミドで遺伝子改変した骨髓由来間葉系幹細胞または水疱由来細胞を、 $1.0 \times 10^6$ 個皮内注にて投与した。定期的に30mg/mlのluciferin (Promega社、P1042) を100  $\mu$ l腹腔内注にて投与し、IVIS Lumina II Imaging System (Caliper社)にて観察した。

[0075] その結果を図13右および図14に示す。図13右および図14左に示すように、発光シグナル強度は水疱由来細胞、骨髓由来間葉系幹細胞共に最初の1カ月間は減衰していき、その後ほぼ一定となり、9カ月以上の長期にわたり持続した。1カ月間経過後の各個体のシグナル強度の平均値を用いて解析した結果、図14右に示すように、水疱由来細胞と骨髓由来間葉系幹細胞との間で、発光シグナル強度に有意な差は認められなかった。以上の結果から、水疱由来細胞は、骨髓由来間葉系幹細胞に匹敵する高い生着能を有することが分かった。

[0076] 9. 水疱由来細胞に対するレンチウイルスの感染効率

水疱由来細胞に対するレンチウイルスの感染効率を解析した。この実験で用いた細胞、および細胞の培養に用いた培地を、下記表4に示す。

[表4]

| 細胞                                                        | 培地                                                                                                                                                                             |
|-----------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| BFC：水疱由来細胞（表皮水疱症患者の水疱内溶液から採取）                             | Mesenchymal Stem Cell Growth Medium 2 [ PromoCell社 (Heidelberg, Germany), C-28009 ]とMSCGM Mesenchymal Stem Cell Growth Medium [ Lonza社 (Basel, Switzerland), PT-3001 ] の等量混合培地 |
| MSC：ヒト骨髓由来間葉系幹細胞 [ Lonza社 (Basel, Switzerland), PT-2501 ] | Mesenchymal Stem Cell Growth Medium [ Lonza社 (Basel, Switzerland), PT-3001 ]                                                                                                   |
| NHDF：正常成人皮膚線維芽細胞 [ Lonza社 (Basel, Switzerland), CC-2511 ] | FGM <sup>TM</sup> -2 Fibroblast Growth Medium-2 BulletKit <sup>TM</sup> [ Lonza社 (Basel, Switzerland), CC-3132 ]                                                               |

[0077] レトロネクチンコーティングプレートの作製： レトロネクチン[タカラバイオ社（滋賀，日本），T100B] を40 $\mu$ g/mLとなるようにPBS（ダルベッコリン酸緩衝生理食塩水(Ca, Mg不含)）[ ナカライテスク社（京都，日本），14249-95 ] で希釈し、表面処理なしの 96-well plate [ Corning社(東京，日本)，3370 ] に100 $\mu$ L/wellとして加えた。その後、プレートを4℃で一晩静置した。プレートを使用する前にレトロネクチン溶液を取り除き、PBSで2度洗浄し、以下の操作を実施した。

細胞の播種・レンチウイルス感染： 水疱由来細胞をAccutase-Solution [ PromoCell社(Heidelberg, Germany), C-41310 ]、ヒト骨髓由来間葉系幹細胞をTrypsin/EDTA for Mesenchymal Stem Cells [ Lonza社 (Basel, Switzerland), CC-3232 ]、正常成人皮膚線維芽細胞をTrypsin/EDTA Solution [ Lonza社 (Basel, Switzerland), CC-5012 ]、を用いてプレートから剥がし、それぞれの細胞の培地を用いて回収した。回収した細胞の細胞数を測定し、2500個/wellとなるように上述のレトロネクチンコーティング96-well plateに播種した。その後、GFP遺伝子搭載レンチウイルス：pLenti-C-mGFP [ ORIGENE社(Rockville, USA), PS100071 ]をMOI 1またはMOI 5となるように各ウェルに加え、細胞をCO<sub>2</sub>インキュベーターで72時間培養した。

GFP陽性細胞の検出： GFP陽性細胞率の検出は、蛍光顕微鏡 [ キーエンス

社(東京, 日本), BZ-X710]で行った。その結果を、図15に示す。

[0078] また、MOI 1で感染させた各細胞種のGFP陽性細胞を次の方法で定量した。まず、視野内の全細胞数に対するGFP陽性細胞数の割合をGFP陽性細胞率とした。この計測を3回繰り返し、統計処理を行った (\*:  $P < 0.05$ , Dunnett's test)。結果を図16に示す。

[0079] 図15に示すように、水疱由来細胞は、間葉系幹細胞や線維芽細胞と比較して、GFP陽性細胞率及びGFPの蛍光強度が高いことが明らかとなった。さらには、図16に示すように、間葉系幹細胞や線維芽細胞と比較して、水疱由来細胞のGFP陽性細胞率が有意に高いことが明らかとなった。これらの結果は、水疱由来液細胞は、間葉系幹細胞や線維芽細胞と比較して、レンチウイルスによる遺伝子送達効率が高いことを示唆している。

[0080] 10. VII型コラーゲン遺伝子を搭載したレンチウイルスベクタープラスミドの作製

図17(左)に示すような、EF1 $\alpha$ プロモーターとCOL7A1遺伝子を発現カセットに備えるレンチウイルスのベクタープラスミドを作成した。まず、COL7A1 cDNAを含むFlexi ORF sequence-verified clone (Promega社) から、対合配列を生じるSpe I とXba I 処理によってCOL7A1 cDNAを切り出し、Xba I で処理したpLVSIN-EF1 $\alpha$  Puro (タカラバイオ社)にライゲーションすることでpLVSIN-EF1 $\alpha$ -C7 Puroを作製した。これを更にNot I およびMlu I で処理することでPGK-Puroカセットを取り除き、pLVSIN-EF1 $\alpha$ -COL7A1を作製した。

[0081] さらに、図17(右)に示すような、PGKプロモーターとCOL7A1遺伝子を発現カセットに備えるレンチウイルスのベクタープラスミドを作成した。pLVSIN-EF1 $\alpha$ -Col7A1をCla I とSwa I で処理してEF1 $\alpha$ プロモーター領域を切り出し、AAVS1 hPGK-PuroR-pA donorプラスミド (addgene #22072) を鋳型にPCRで増幅したPGKプロモーター領域 (501 bp) をGibson assemblyで組み込むことで、pLVSIN-PGK-COL7A1を作製した。PGKプロモーターの増幅には、KOD One (東洋紡社)を用いた。Gibson assemblyには、NEBuilder HiFi DNA Assemblyキット (New England Biolabs社)を用いた。

## [0082] 11. VII型コラーゲン遺伝子を搭載したレンチウイルスベクターの製造

図18に示される、COL7A1遺伝子を搭載したレンチウイルスベクターを製造した。

レンチウイルス用プラスミドを用いたトランスフェクション： 図17に示したプラスミドを、レンチウイルスのベクタープラスミドとして用いた。また、パッケージングプラスミドには、Lentiviral High Titer Packaging Mix[タカラバイオ社(滋賀, 日本), 6194]を用いた。まず、レンチウイルスパッケージング用細胞株であるLenti-X 293T細胞[タカラバイオ社(滋賀, 日本), 632180]を 100mm dish[コーニング社(NewYork, USA), 353003] に5000000 cells/dishとなるように播種し、一晩CO<sub>2</sub>インキュベーターで培養した。Lenti-X 293T細胞の培地には、10%FBSおよびペニシリン, ストレプトマイシン(それぞれ終濃度100unit/mLおよび100 $\mu$ g/mLとなるよう添加したもの)を含むDMEM[ナカライ社(京都, 日本), 08457-55]を用いた。次に、ポリエチレンジオキシンを用いてベクタープラスミドおよびパッケージングプラスミドをトランスフェクションした。トランスフェクションした細胞を一晩CO<sub>2</sub>インキュベーターで培養した後、培地交換を行った。トランスフェクション試薬には、OPTI-MEM [Thermo Fisher Science社 (東京, 日本), 31985062]および、PEI-MAX [Polysciences社(Warrington, USA), 24765-100]を用いた。トランスフェクションのプロトコルは、PEI-MAXの推奨プロトコルに従った。また、ベクタープラスミドとパッケージングプラスミドの混合比については、Lentiviral High Titer Packaging Mixの推奨プロトコルに従った。

レンチウイルスベクターの回収および精製： トランスフェクション後72時間が経過したLenti-X 293T細胞の培養上清を回収し、300g, 5min で粗遠心することで、Cell debrisを除去した。その上清を0.45 $\mu$ m フィルター[メルク社(東京, 日本), SLHVR33RS]を用いてろ過し、Cell debrisをさらに除去した。次に、ろ過済みの上清を遠心 (6000g, 4 $^{\circ}$ C, 20hr) し、レンチウイルスベクターを沈殿させ、ペレットを1.5mLのPBSで再懸濁した。次に超遠心用チューブ[ベックマン・コールター社(東京, 日本), 344058]内に、55%スクロー

ス/PBS溶液(1mL), 20%スクロース/PBS溶液(2.5mL), レンチウイルスベクター液(1.5mL) の層を作り、超遠心(41000rpm, 4°C, 2hr)した。超遠心機は [ベックマン・コールター社(東京, 日本), L-90K]を、ローターは [ベックマン・コールター社(東京, 日本), SW55Ti]を用いた。超遠心後、55%スクロース/PBS溶液と20%スクロース/PBS溶液の間に現れるレンチウイルスベクターの層を回収し、PBSを用いて1mLとなるように希釈した。次に、超遠心用チューブ内に20%スクロース/PBS溶液(4mL)およびレンチウイルスベクター液(1mL)の層を作り、再び超遠心(41000rpm, 4°C, 2hr)した。沈殿したレンチウイルスベクターのペレットを400  $\mu$ LのDMEMでよく懸濁し、レンチウイルスベクター溶液とした。

[0083] レンチウイルスベクターの力価を、以下のようにして測定した。

レトロネクチンコーティングプレートの作製： レトロネクチン[タカラバイオ社(滋賀, 日本), T100B] を100  $\mu$ g/mLとなるようにPBSで希釈し、表面処理なしの平底48-well plate[IWAKI(東京, 日本), 1830-048]に100  $\mu$ L/wellとして加えた。その後、プレートを4°Cで一晩静置した。プレートを使用する前に、レトロネクチン溶液を取り除いて2%FBS含有PBSで30分間室温にてブロッキングし、以下の操作を実施した。

細胞の播種およびレンチウイルス感染： レトロネクチンでコーティングした48-well plateに、LVSIN-EF1 $\alpha$ -COL7A1レンチウイルスベクターまたはLVSIN-PGK-COL7A1レンチウイルスベクター(図18参照)を、任意のウイルス液量で各ウェルに加え、2000g、32°Cで2時間遠心した。その後、ウイルス液を取り除き、PBSで1回洗浄した。次に、水疱由来細胞をAccutase-Solutionを用いてプレートから剥がし、培地を用いて回収した。回収した細胞の細胞数を測定し、12500個/wellとなるように、上述のレトロネクチンコーティング48-well plateに播種した。感染後14日目の細胞を、Accutase-Solutionを用いてプレートから剥がし、培地を用いて回収した。次に、Maxwell(登録商標) RSC Instrument[ Promega社(東京, 日本), AS4500 ] およびMaxwell(登録商標) RSC Blood DNA Kit [ Promega社(東京, 日本), AS1400 ] を用いて、回収し

た細胞からゲノムDNAを抽出した。Lenti-X™ Provirus Quantitation Kit [タカラバイオ社(滋賀, 日本), 631239]を用いて、回収したゲノムDNAからVCN (Vector Copy Number) を算出した。VCNとウイルス感染時のウイルス液量からウイルス力価(TU/mL, TU : Transduction Unit)を計算した。計算式は以下の通りである。

$$\text{ウイルス力価 (TU/mL)} = \frac{\text{VCN(copies/cell)} \times \text{感染時の細胞数 (cell)}}{\text{感染時のウイルス液量 (\mu L)}} \times \frac{1000\mu\text{L}}{1\text{mL}}$$

このようにして得られたウイルス力価をもとに、レンチウイルス感染実験において多重感染度(MOI: Multiplicity of Infection)の設定に必要なウイルス液量を計算した。

#### [0084] 12. 免疫染色によるVII型コラーゲン遺伝子導入効率の解析

水疱由来細胞に対するレンチウイルスベクターによるVII型コラーゲン遺伝子導入効率を解析した。

レトロネクチンコーティングプレートの作製： 上記「11. VII型コラーゲン遺伝子を搭載したレンチウイルスベクターの製造」と同様にして、プレートをレトロネクチンでコートした。

細胞の播種およびレンチウイルス感染： レトロネクチンでコーティングした48-well plateに、LVSIN-EF1 $\alpha$ -COL7A1レンチウイルスベクターまたはLVSIN-PGK-COL7A1レンチウイルスベクター(図18参照)を、MOI 0.5、MOI 1、またはMOI 2となるように各ウェルに加え、2000g、32℃で2時間遠心した。その後、ウイルス液を取り除き、PBSで1回洗浄した。次に、水疱由来細胞をAccutase-Solutionを用いてプレートから剥がし、培地を用いて回収した。回収した細胞の細胞数を測定し、12500個/wellとなるように、上述のレトロネクチンコーティング48-well plateに播種した。

免疫染色： レンチウイルス感染後14日経過した水疱由来細胞をAccutase-Solutionを用いてプレートから剥がし、培地を用いて回収した。回収した細胞の細胞数を測定し、50000個/wellとなるようにCC2コーティングチェンバースライド[Thermo Fisher Science社(東京, 日本), 154852]に播種し、CO<sub>2</sub>イン

キュベーターで培養した。24時間後、抗VII型コラーゲン抗体(clone LH7.2)[Sigma Aldrich社(東京, 日本), C6805], および Alexa488[Thermo Fisher Science社(東京, 日本), A-11001) を用いて免疫染色した。そして、VII型コラーゲンの発現を、共焦点蛍光顕微鏡[Nikon社(東京, 日本), Nikon A1R HD25]により解析した。

[0085] 結果を図19および図20に示す。EF1 $\alpha$ プロモーターおよびPGKプロモーター搭載レンチウイルスのいずれのベクターで細胞を感染させても、VII型コラーゲンの発現はMOI依存的に増加した。最もVII型コラーゲン陽性細胞率が高かったのはいずれの細胞においてもMOI 2で感染させたものであり、LVSIN-EF1 $\alpha$ -COL7A1レンチウイルスベクターでは約30%、LVSIN-PGK-COL7A1レンチウイルスベクターでは約16%であった。また、概して、LVSIN-EF1 $\alpha$ -COL7A1レンチウイルスベクターで感染させた水疱由来細胞の方が、LVSIN-PGK-COL7A1レンチウイルスベクターで感染させた水疱由来細胞に比べて、VII型コラーゲン陽性細胞率が高く、かつ染色強度が強かった。

[0086] 13. フローサイトメトリー(FACS)によるVII型コラーゲン遺伝子導入効率の解析

水疱由来細胞に対するレンチウイルスベクターによるVII型コラーゲン遺伝子導入効率を解析した。

レンチウイルス感染細胞の作成： 上記「12. 免疫染色によるVII型コラーゲン遺伝子導入効率の解析」と同様の手順で行った。

FACS解析： レンチウイルス感染後14日経過した水疱由来細胞を、Accutase-Solutionを用いてプレートから剥がし、培地を用いて回収した。回収した細胞の細胞数を測定し、300000個/sampleとなるように分取し、eBioscience™ Permeabilization Buffer [Thermo Fisher Science社(東京, 日本), 00-8333-56]を用いて透過処理を行った。その後、抗VII型コラーゲン抗体(clone LH7.2) [Sigma Aldrich社(東京, 日本), C6805], および Alexa488 [Thermo Fisher Science社(東京, 日本), A-11001)を用いた免疫染色を行い、VII型コラーゲンの発現をフローサイトメーター(BD FACSCanto™ II) [日本ベクトン・

ディッキンソン社(東京, 日本)] により解析した。

[0087] 結果を図 2 1 に示す。また、各FACSデータ中の枠で囲った部分に含まれる細胞の割合を、図 2 2 (左) に、VII型コラーゲン陽性細胞率として示す。さらに、枠で囲った領域内の平均蛍光強度(MFI: Mean Fluorescence Intensity)を、VII型コラーゲン陽性細胞の平均蛍光強度として、図 2 2 (右) に示す。図 2 1 および図 2 2 (左) に示すように、VII型コラーゲン陽性細胞率はMOI 依存的に増加した。最もVII型コラーゲン陽性細胞率が高かったのは、いずれもMOI 2で感染させたものであり、EF1 $\alpha$ -COL7A1レンチウイルスでは約18%、PGK-COL7A1レンチウイルスでは約12%であった。また、図 2 2 (右) に示すように、EF1 $\alpha$ -COL7A1レンチウイルス感染細胞のMFIは、PGK-COL7A1レンチウイルス感染細胞のMFIよりも、約2.2倍高かった。このことから、レンチウイルスベクターで遺伝子導入された水疱由来細胞では、EF1 $\alpha$ プロモーターの方が、PGKプロモーターよりも、より多量のCOL7A1を発現させると考えられる。

[0088] また、予備検討として、水疱由来細胞、ヒト骨髄由来間葉系幹細胞、および正常成人皮膚線維芽細胞にEF1 $\alpha$ -COL7A1レンチウイルスベクターまたはPGK-COL7A1レンチウイルスベクターを感染させ、上記と同様の方法で免疫染色およびフローサイトメトリー(FACS)を行い、VII型コラーゲン陽性細胞率を測定した。その結果、水疱由来細胞では、ヒト骨髄由来間葉系幹細胞および正常成人皮膚線維芽細胞よりもVII型コラーゲン陽性細胞率が高かった。

[0089] 14. レンチウイルス感染水疱由来細胞のVCN (Vector Copy Number)

VII型コラーゲン搭載レンチウイルスベクターで感染した水疱由来細胞のVCNを解析した。まず、前記「12. 免疫染色によるVII型コラーゲン遺伝子導入効率の解析」と同様の手順で、水疱由来細胞にレンチウイルスベクターを感染させた。感染後7、14、21、および28日目の細胞を、Accutase-Solutionを用いてプレートから剥がし、培地を用いて回収した。次に、Maxwell (登録商標) RSC Instrument [ Promega社(東京, 日本), AS4500 ] およびMaxwell (登録商標) RSC Blood DNA Kit [ Promega社(東京, 日本), AS1400 ] を用いて、回収した細胞からゲノムDNAを抽出した。Lenti-X™ Provirus Quantitation Kit [タ

カラバイオ社(滋賀, 日本), 631239 ]を用いて、回収したゲノムDNAからVNCを算出した。

[0090] 結果を図23に示す。同図に示すように、VCNはMOI依存的に増加した。また、感染日数が経過するごとにVCNは低下したが、感染後21日以降はVCNが安定した。この結果は、レンチウイルスベクターによって水疱由来細胞のゲノム内に挿入されたVII型コラーゲン遺伝子は、長期間ゲノム内に存続可能であることを示唆する。

[0091] 15. レンチウイルスベクターにより遺伝子改変した水疱由来細胞を移植したマウスにおけるVII型コラーゲンの沈着

レンチウイルスベクターによってVII型コラーゲン遺伝子が導入された水疱由来細胞が表皮水疱症モデルマウスの基底膜にVII型コラーゲンを供給するか調べた。まず、Col7A1遺伝子ノックアウトマウス新生児の全層皮膚を、免疫不全マウスの背部に移植した。移植直後に皮膚表面をつまみ、かつ擦ることによって水疱を形成させた。そして、直ちに表皮下の空間（水疱内）に、前記「12. 免疫染色によるVII型コラーゲン遺伝子導入効率の解析」で作成した細胞の中から、MOI 5 でLVSIN-EF1 $\alpha$ -COL7A1レンチウイルスベクターを感染させた水疱由来細胞を、 $1.0 \times 10^6$ 個注入した。また、対照群のマウスには、レンチウイルスベクターを感染させていない水疱由来細胞を、 $1.0 \times 10^6$ 個水疱内に注入した。1カ月後に皮膚を採取して抗VII型コラーゲン抗体(clone LH7.2; Sigma Aldrich, C6805)を用いて免疫染色を行い、VII型コラーゲンの基底膜への沈着を調べた。

[0092] その結果を図24に示す。同図に示すように、LVSIN-EF1 $\alpha$ -COL7A1レンチウイルスベクターを感染させた水疱由来細胞を水疱内に注入したマウスでは、基底膜近傍にVII型コラーゲンの沈着が認められた。一方、レンチウイルスベクターを感染させていない水疱由来細胞を水疱内に注入したマウスでは、VII型コラーゲンの沈着が認められなかった。この結果から、レンチウイルスベクターによってVII型コラーゲンが導入された水疱由来細胞は、水疱内に投与後、投与部位付近に定着し、真皮と基底膜との接着部位にVII型コラーゲン

を供給することが推察される。

[0093] 以上の結果から、COL7A1遺伝子を導入した水疱由来細胞は、栄養障害型表皮水疱症の遺伝子治療において、骨髓由来間葉系幹細胞や線維芽細胞よりも高い治療効果を発揮することが期待される。

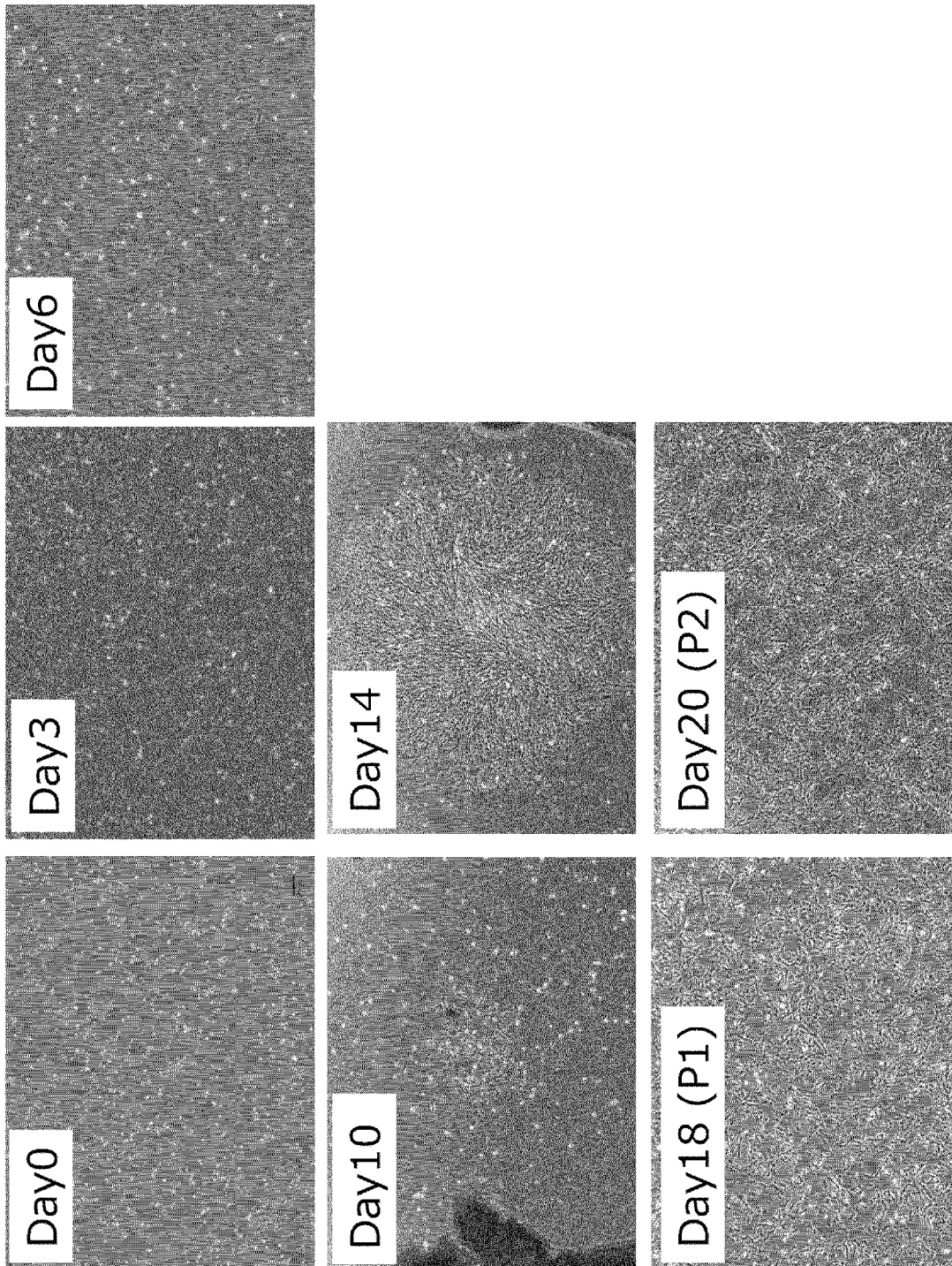
## 請求の範囲

- [請求項1] 栄養障害型表皮水疱症の治療に用いるための組成物であって、VII型コラーゲンを産生するよう遺伝子改変された栄養障害型表皮水疱症患者の水疱由来細胞を含む、組成物。
- [請求項2] 水疱由来細胞が、COL7A1遺伝子を導入することにより遺伝子改変されている、請求項1に記載の組成物。
- [請求項3] COL7A1遺伝子が、配列番号1の核酸配列と90%以上の配列同一性を有する核酸配列を含むか、配列番号2のアミノ酸配列と90%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列をコードする核酸配列を含む、請求項2に記載の組成物。
- [請求項4] 水疱由来細胞が、以下の1)～6)から選択される1つ以上の特徴を有するものである、請求項1～3のいずれかに記載の組成物：
- 1)固相への接着性を有する、
  - 2)CD73、CD105およびCD90からなる群より選択される一つ以上の表面マーカーが陽性である、
  - 3)CD45、CD34、CD11b、CD79A、HLA-DRおよびCD31からなる群より選択される一つ以上の表面マーカーが陰性である、
  - 4)骨芽細胞への分化能を有しない、又は骨髓由来間葉系幹細胞と比較して当該分化能が低い、
  - 5)脂肪細胞への分化能を有しない、又は骨髓由来間葉系幹細胞と比較して当該分化能が低い、
  - 6)軟骨細胞への分化能を有しない、又は骨髓由来間葉系幹細胞と比較して当該分化能が低い。
- [請求項5] 水疱由来細胞が、栄養障害型表皮水疱症患者の水疱内容液に由来する、請求項1～4のいずれかに記載の組成物。
- [請求項6] 水疱内に投与される、請求項1～5のいずれかに記載の組成物。
- [請求項7] 栄養障害型表皮水疱症患者の水疱内容物を固相上で培養する工程を含む、細胞の製造方法。

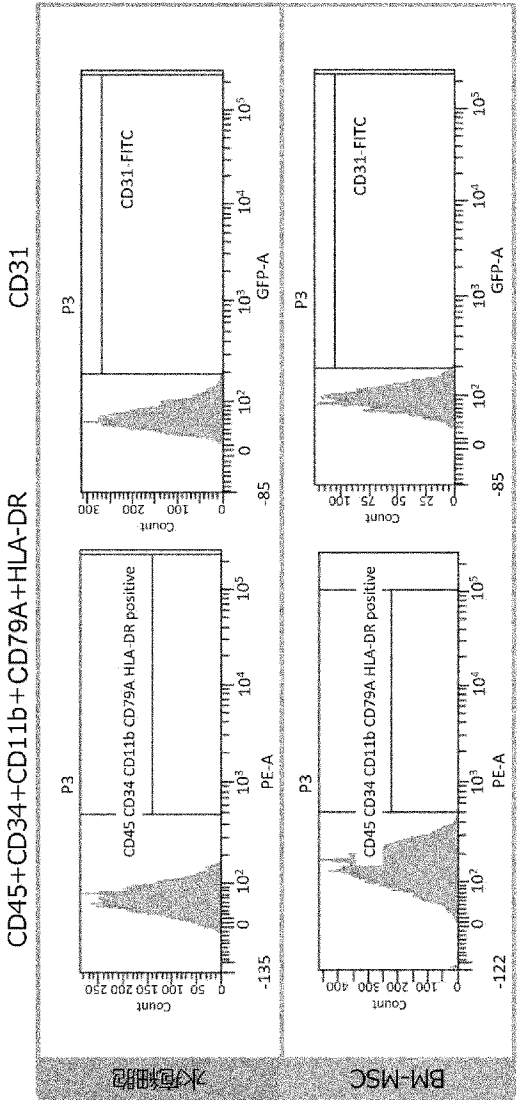
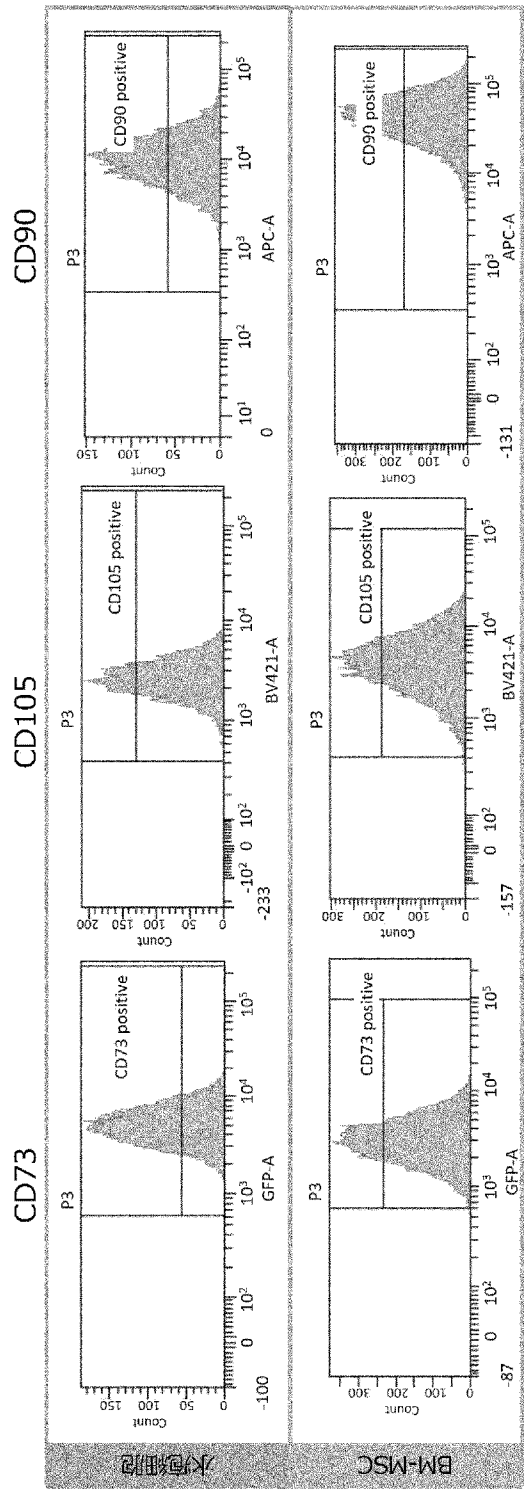
- [請求項8] 請求項7に記載の方法によって製造される細胞。
- [請求項9] 以下の1)～6)から選択される1つ以上の特徴を有する、請求項8に記載の細胞：
- 1) 固相への接着性を有する、
  - 2) CD73、CD105およびCD90からなる群より選択される一つ以上の表面マーカーが陽性である、
  - 3) CD45、CD34、CD11b、CD79A、HLA-DRおよびCD31からなる群より選択される一つ以上の表面マーカーが陰性である、
  - 4) 骨芽細胞への分化能を有しない、又は骨髓由来間葉系幹細胞と比較して当該分化能が低い、
  - 5) 脂肪細胞への分化能を有しない、又は骨髓由来間葉系幹細胞と比較して当該分化能が低い、
  - 6) 軟骨細胞への分化能を有しない、又は骨髓由来間葉系幹細胞と比較して当該分化能が低い。
- [請求項10] 以下の工程を含む、細胞の製造方法：
- 1) 栄養障害型表皮水疱症患者の水疱内容物を固相上で培養する工程、
  - 2) 培養工程1)によって得られた細胞を、VII型コラーゲンを産生するよう遺伝子改変する工程。
- [請求項11] 患者の水疱から採取した水疱内容物を、酵素処理することなく培地に播種し、固相上で培養する、請求項10に記載の方法。
- [請求項12] 請求項10または11に記載の方法によって製造される細胞。
- [請求項13] VII型コラーゲンを産生するよう遺伝子改変された、栄養障害型表皮水疱症患者の水疱由来細胞。
- [請求項14] レンチウイルスベクターの製造に用いられるプラスミドであって、EF1 $\alpha$ プロモーターと、  
前記EF1 $\alpha$ プロモーターの下流に配置されたCOL7A1遺伝子と、  
を有するプラスミド。
- [請求項15] EF1 $\alpha$ プロモーターと、

前記EF1 $\alpha$ プロモーターの下流に配置されたCOL7A1遺伝子と、  
を有するレンチウイルスベクター。

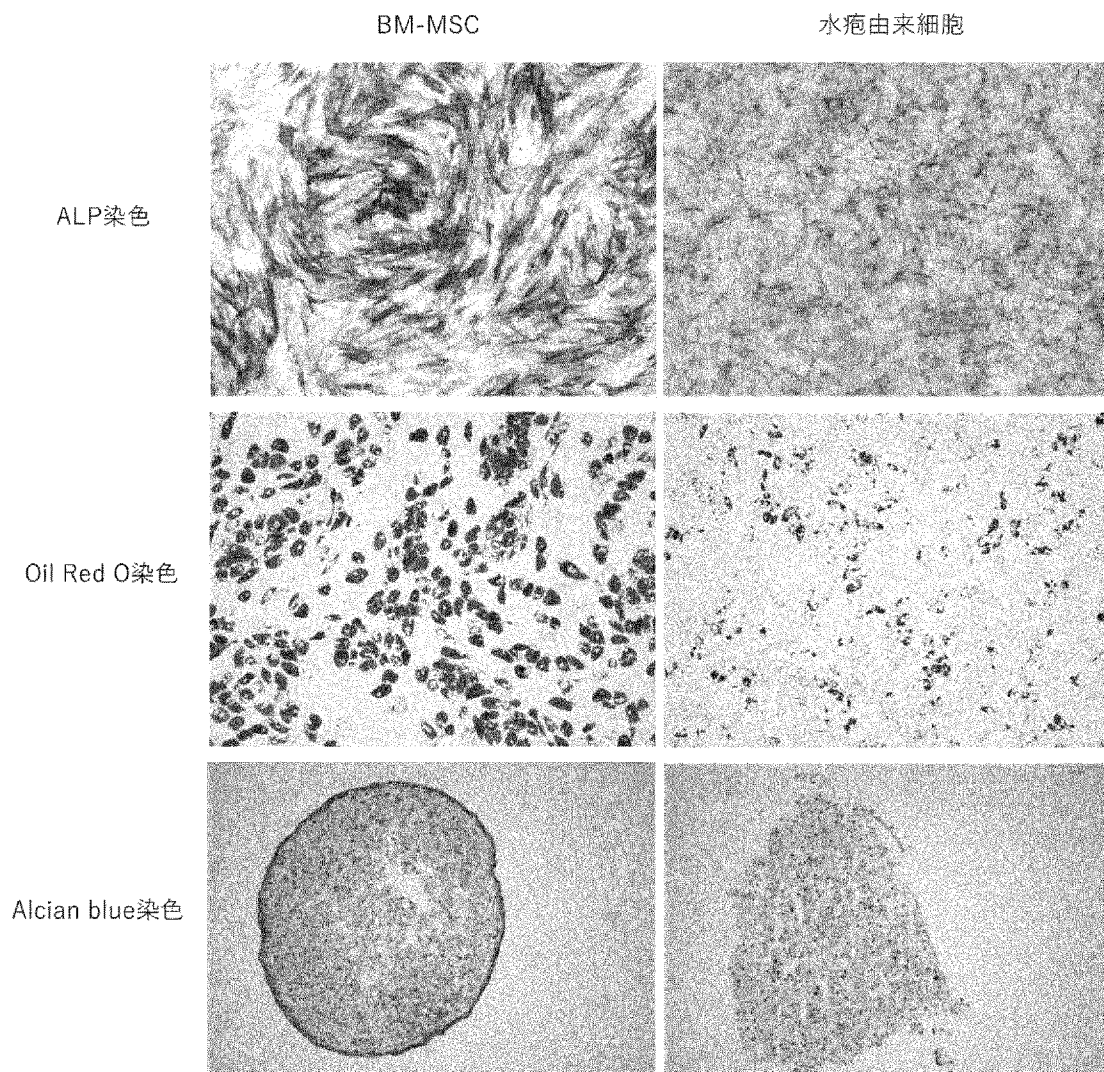
[図1]



[図2]

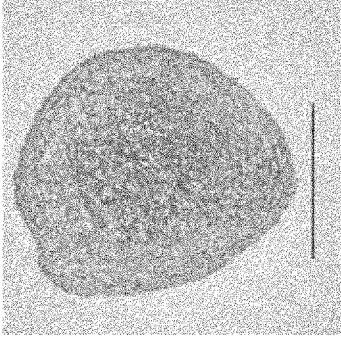
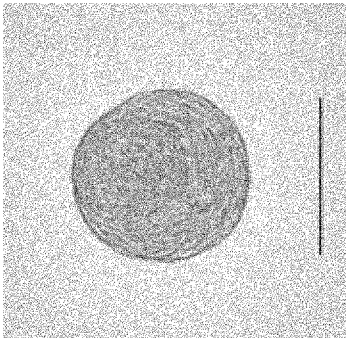


[図3]

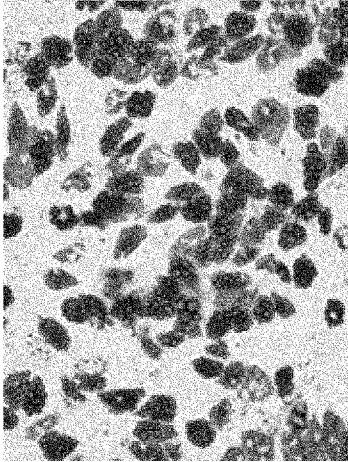
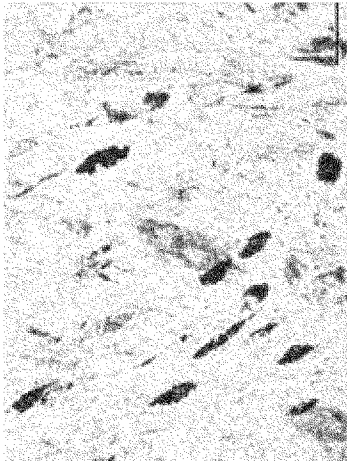


[図4]

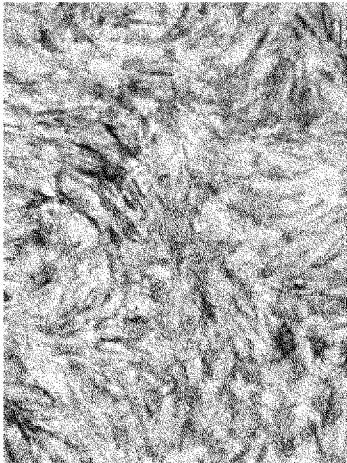
Alcian blue  
(軟骨細胞)



Oil red O  
(脂肪細胞)



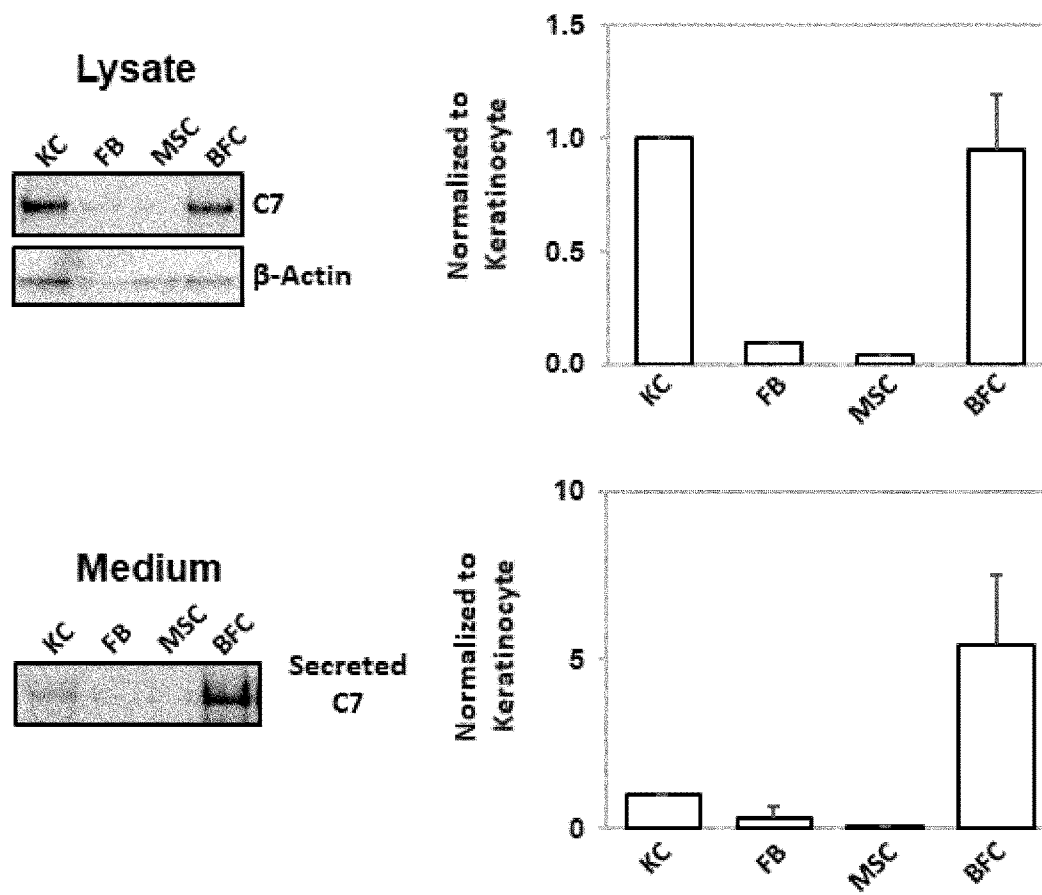
Alkaline phosphatase  
(骨芽細胞)



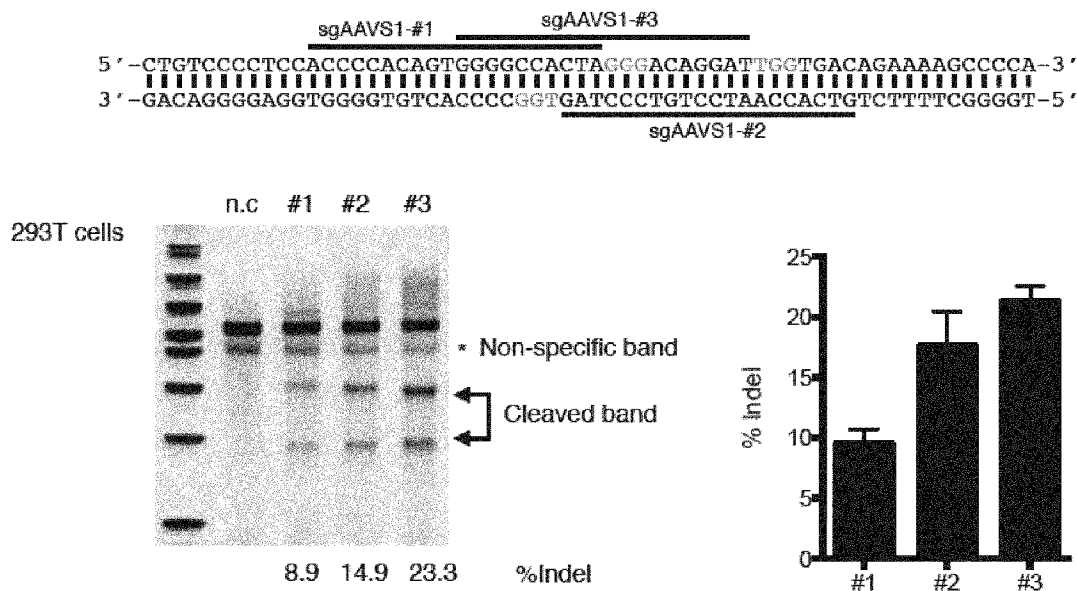
水疱由来細胞

BM-MSC

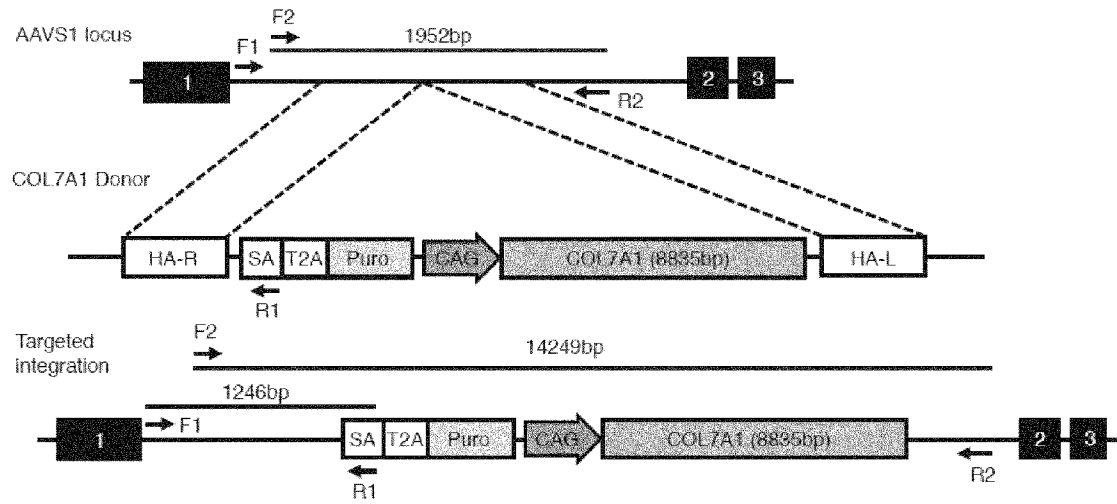
[図5]



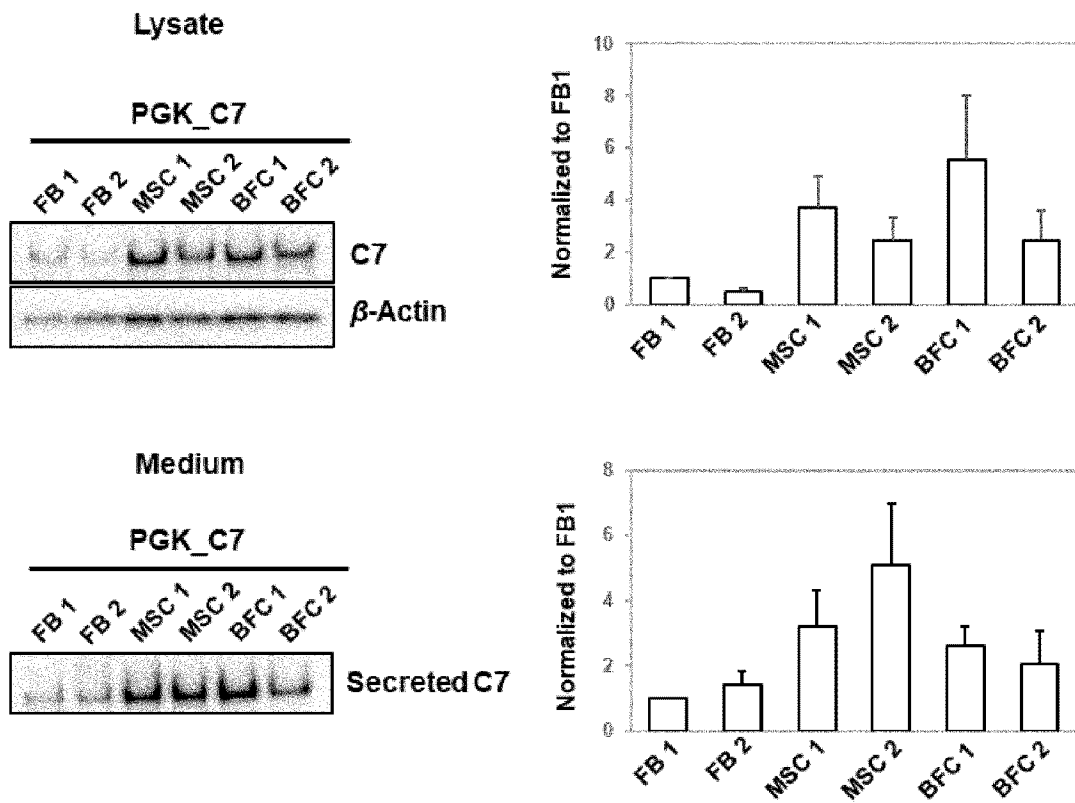
[図6]



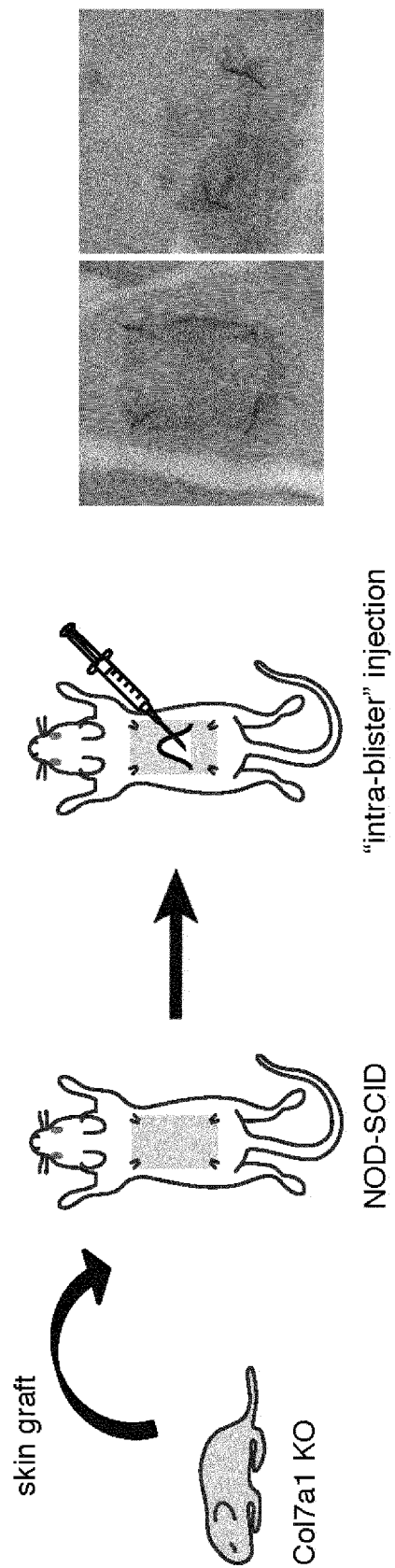
[図7]



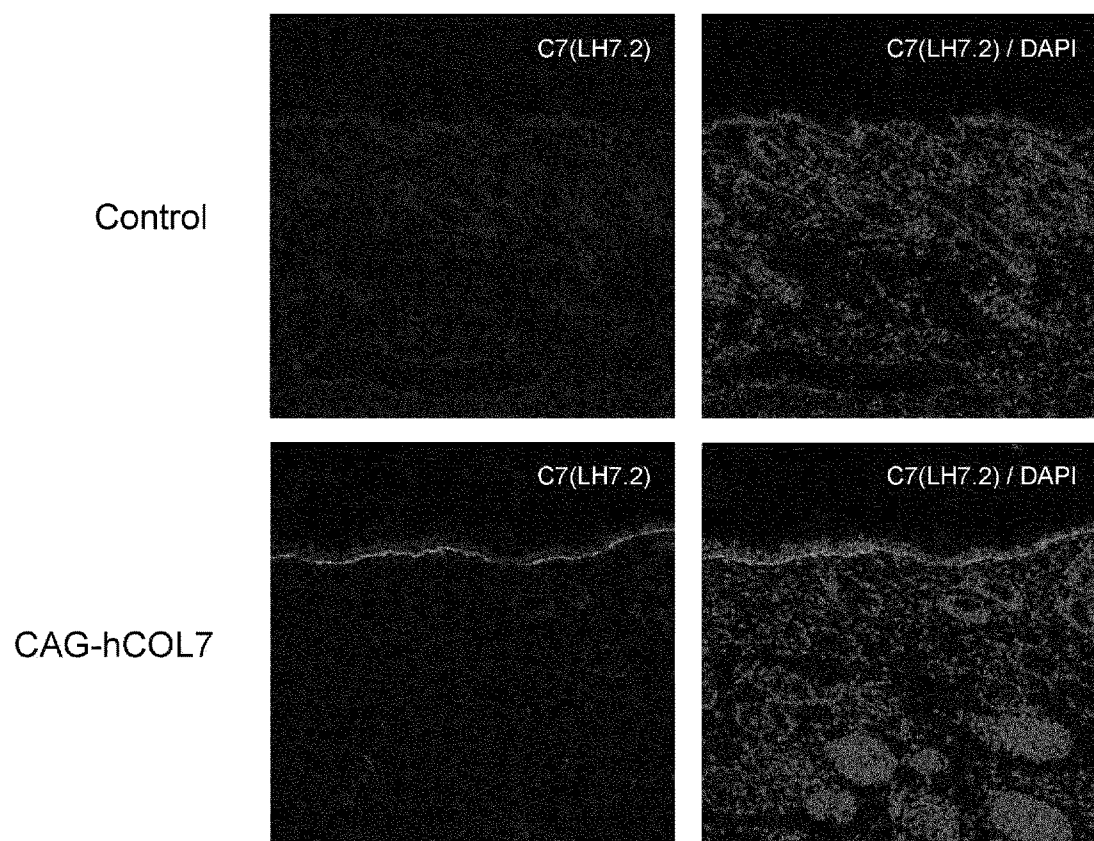
[図8]



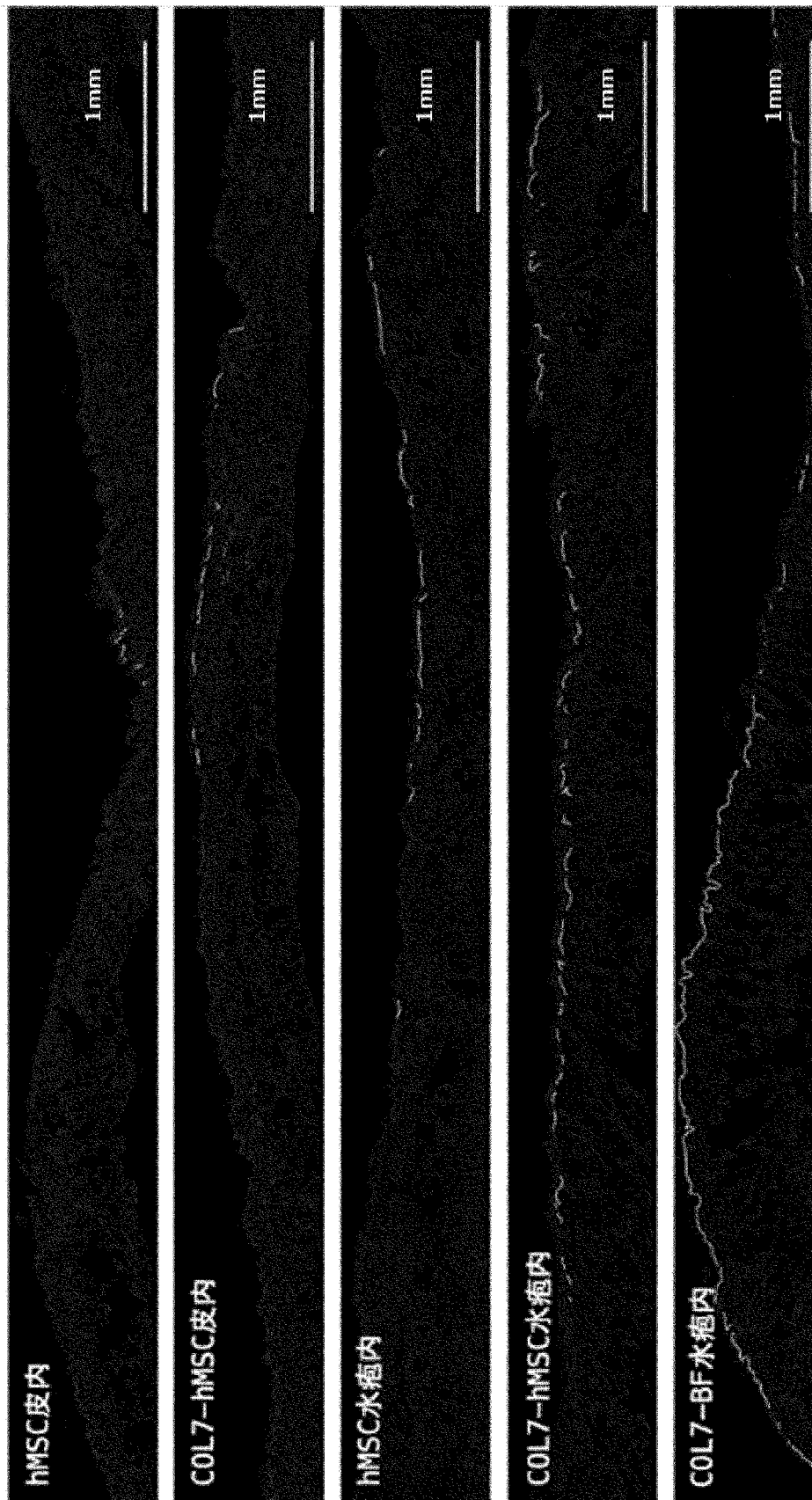
[図9]



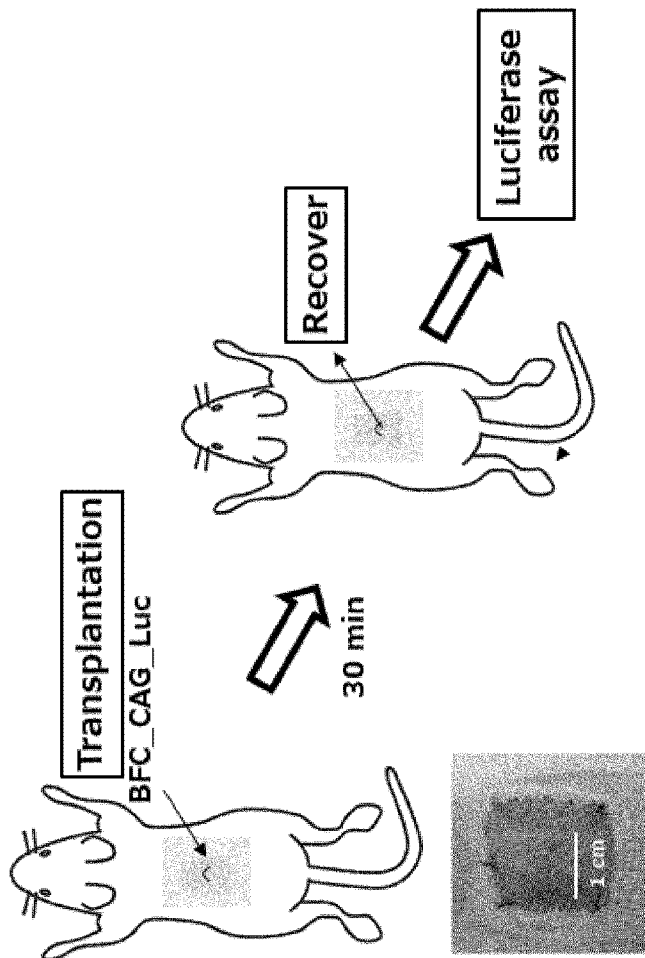
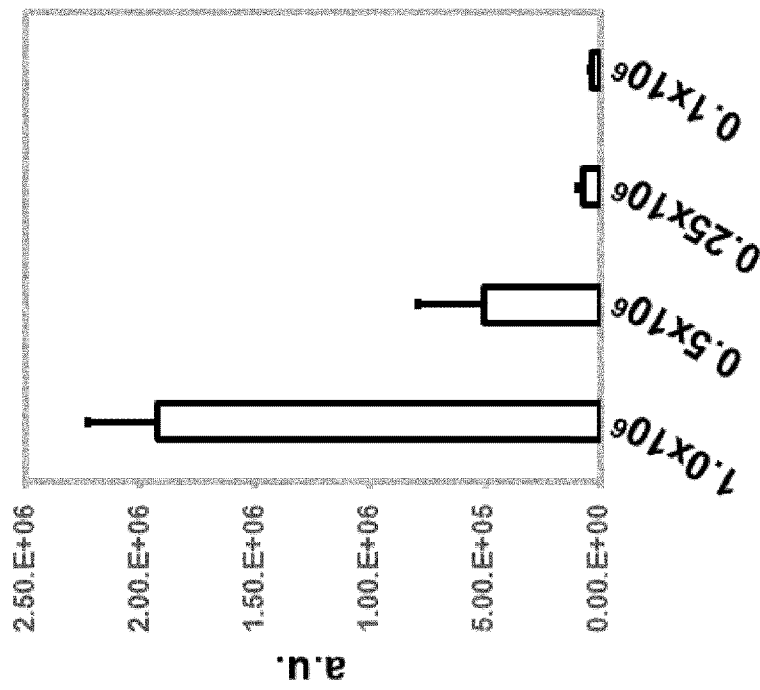
[図10]



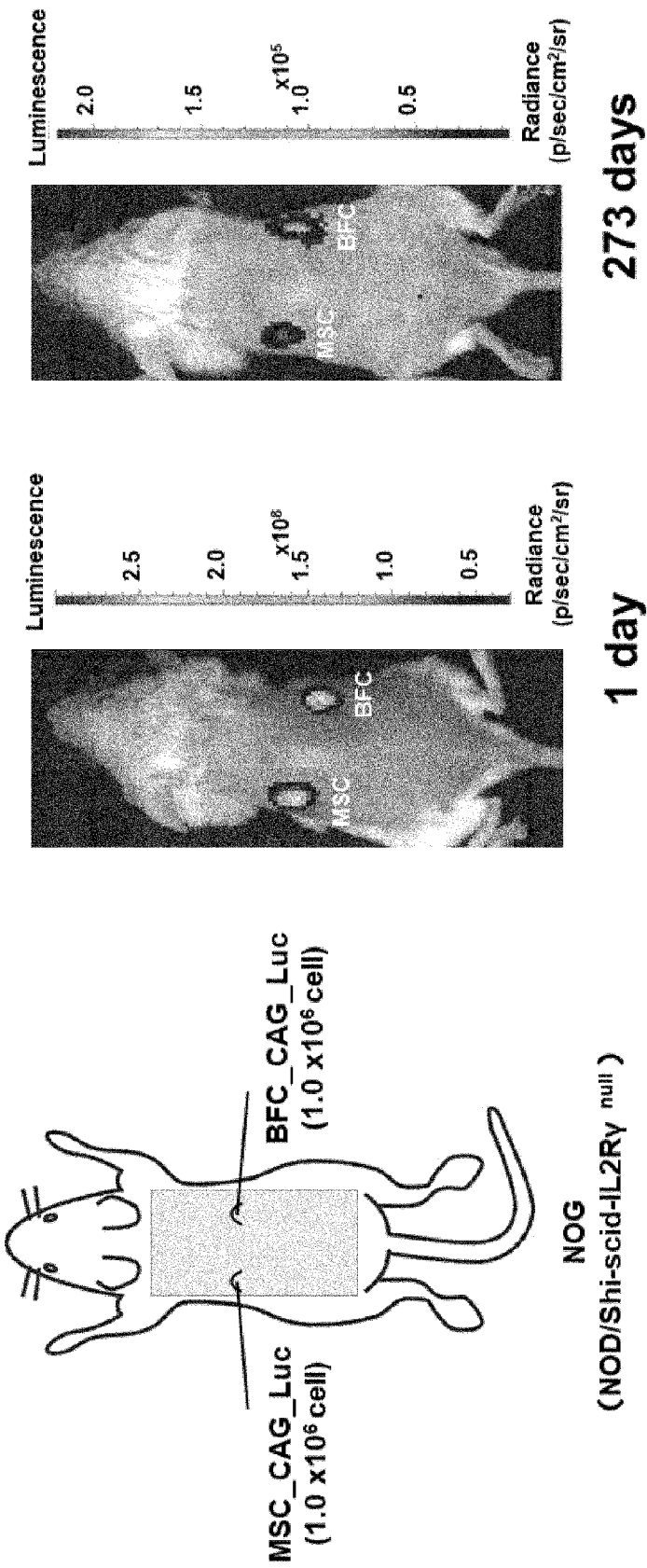
[図11]



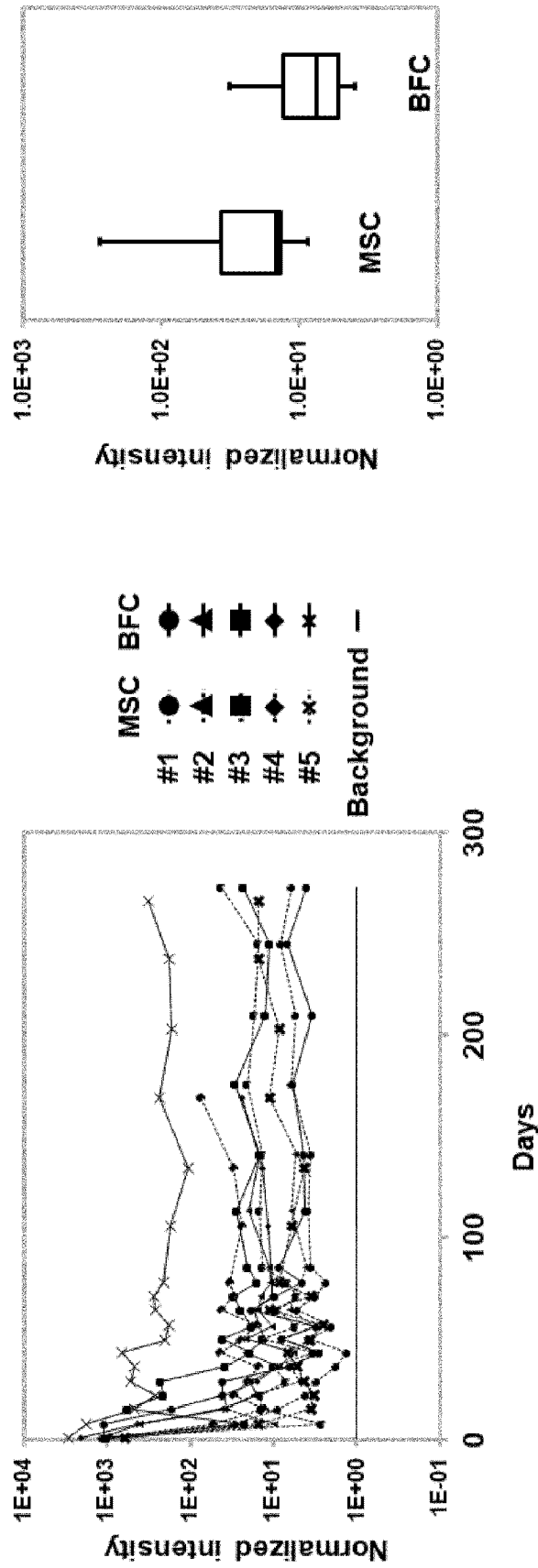
[図12]



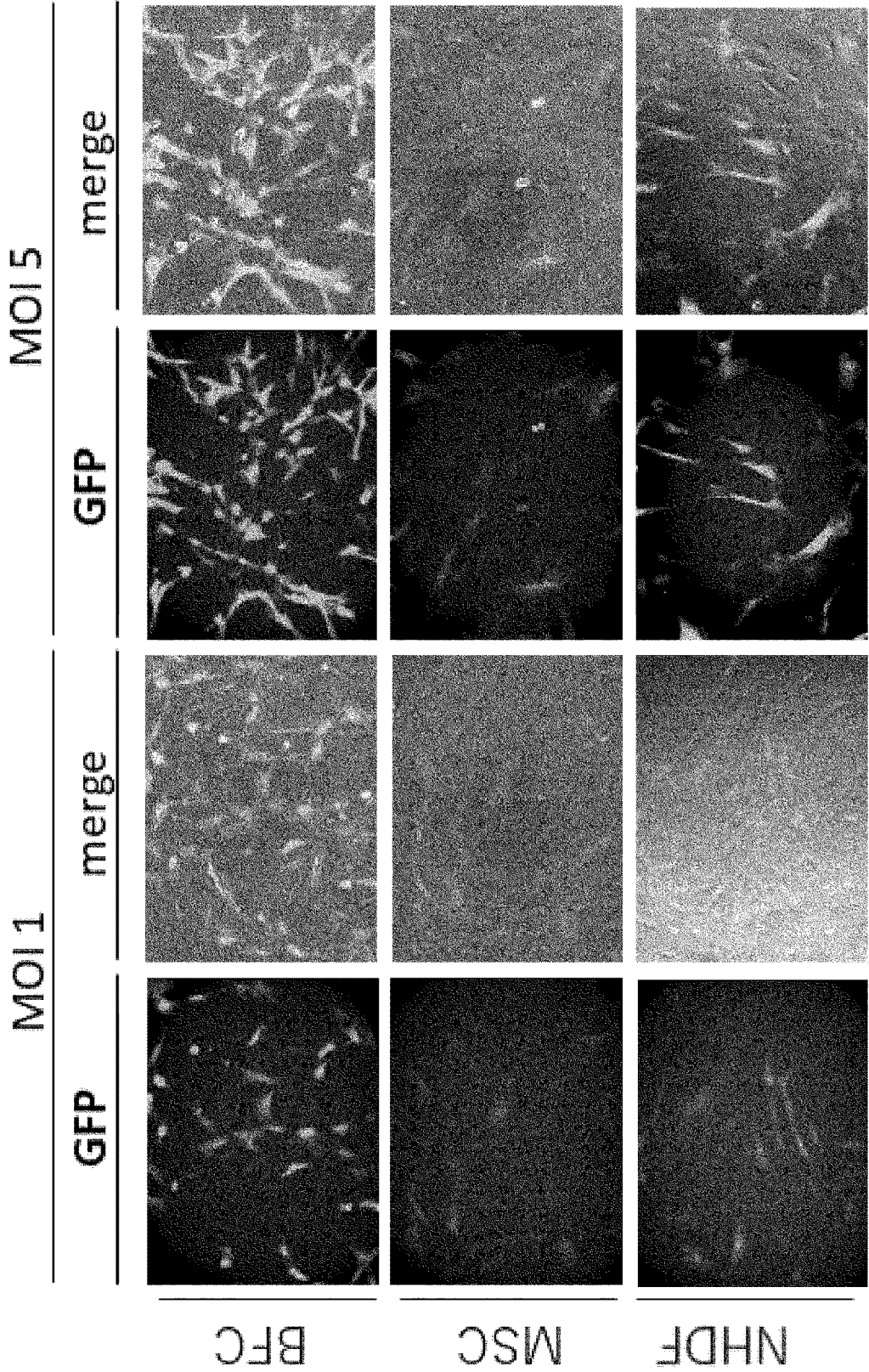
[図13]



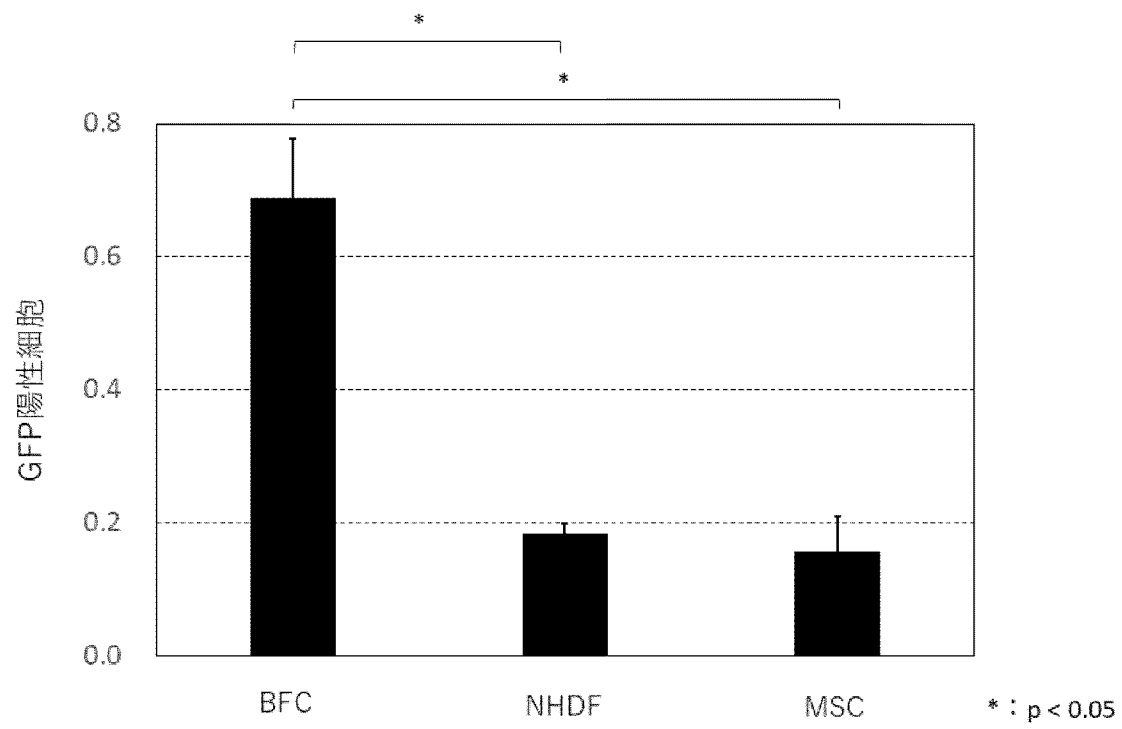
[図14]



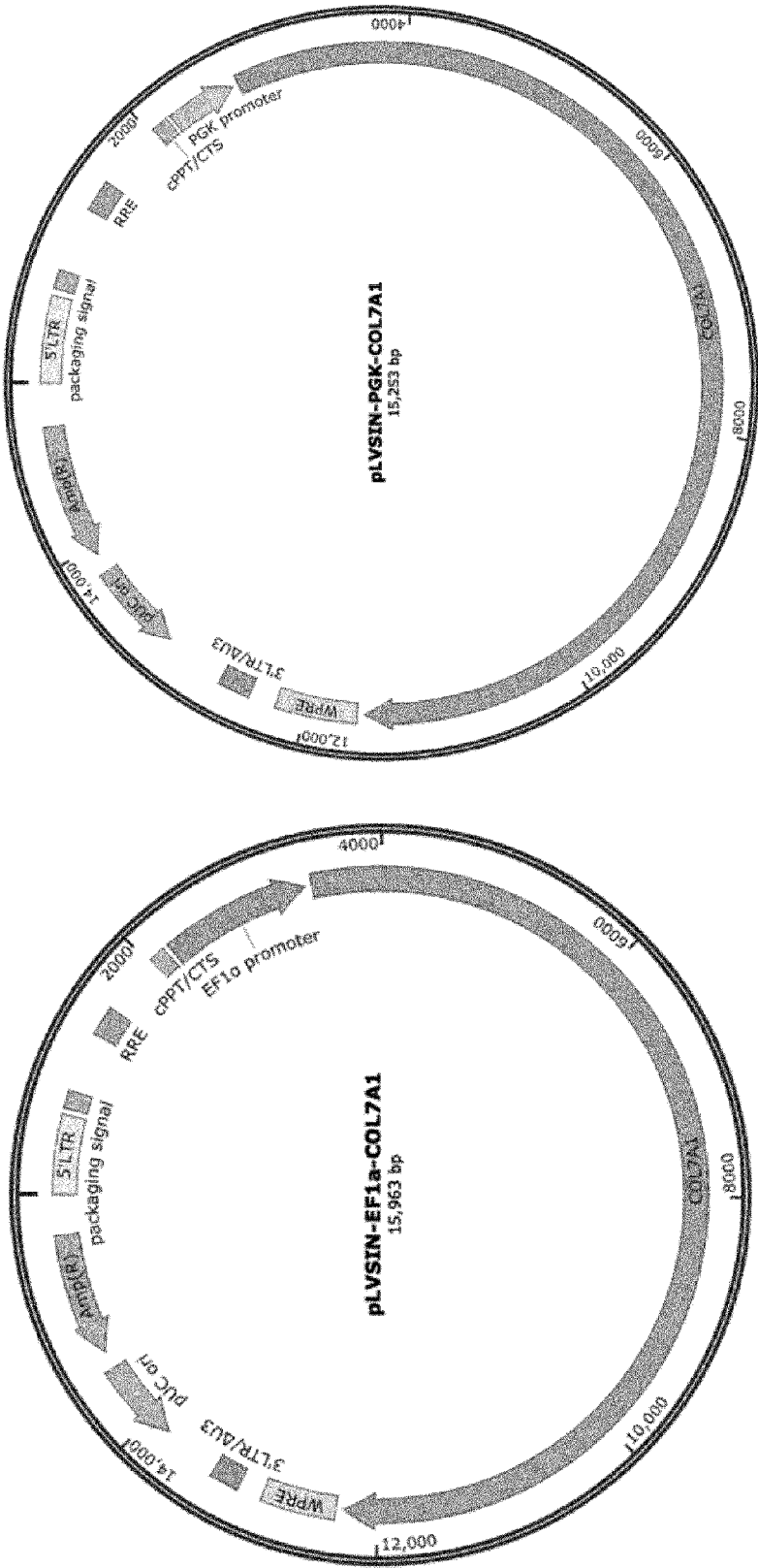
[図15]



[図16]



[図17]



[18]

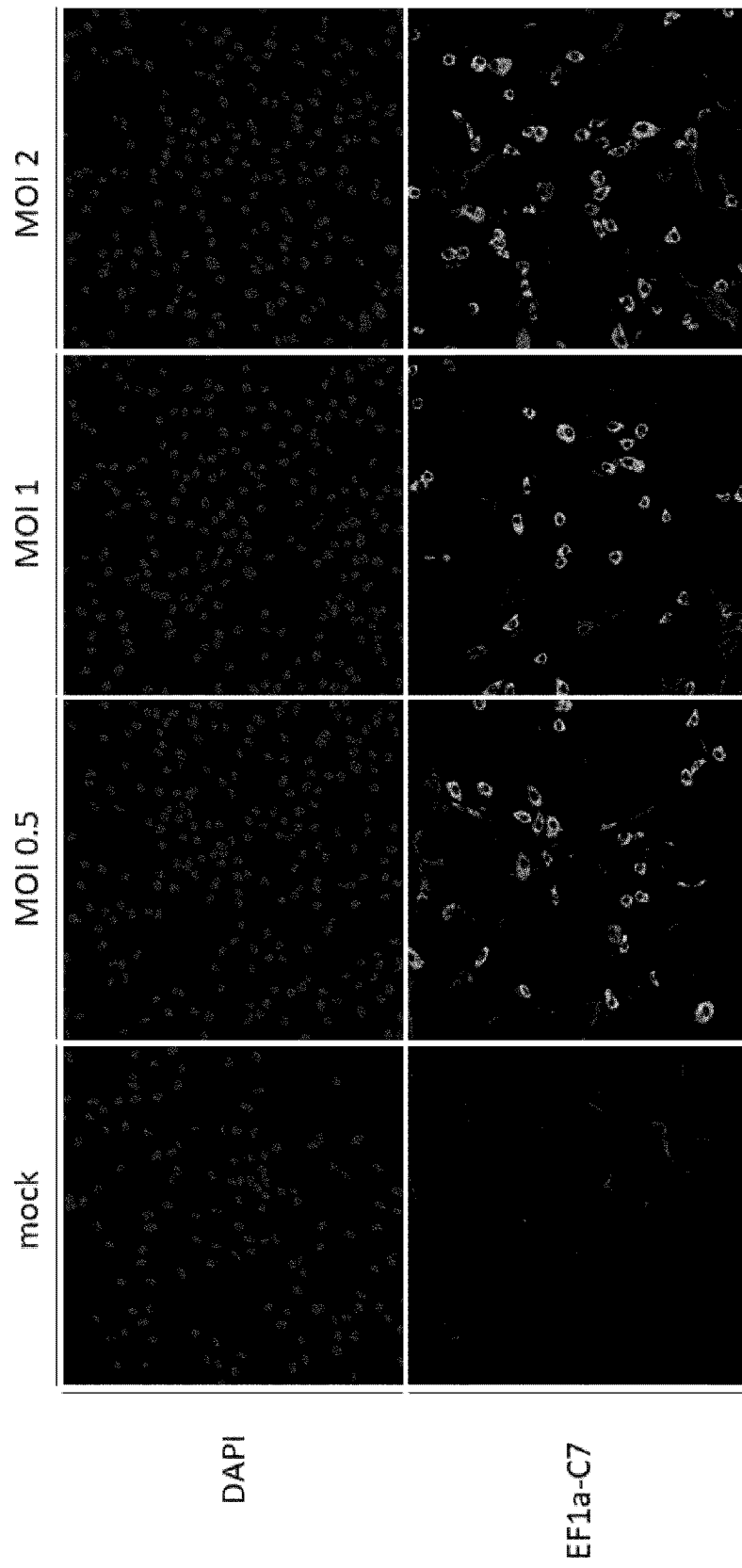
LVSIN-EF1α-COL7A1

|        |   |     |              |       |        |      |                |
|--------|---|-----|--------------|-------|--------|------|----------------|
| 5' LTR | ψ | RRE | CPPT<br>/CTS | pEF1α | COL7A1 | WPRE | 3' LTR<br>/ΔU3 |
|--------|---|-----|--------------|-------|--------|------|----------------|

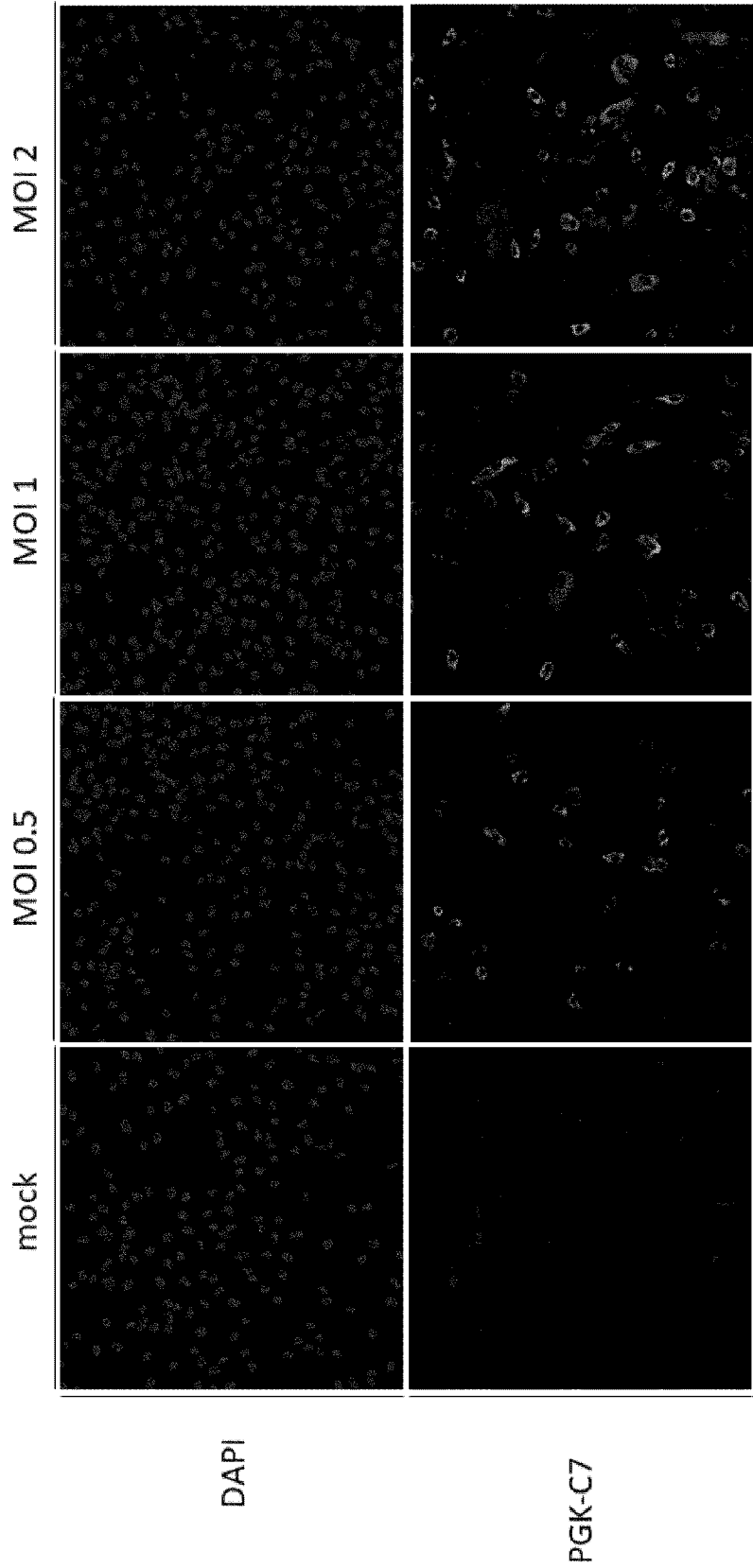
LVSIN-PGK-COL7A1

|        |   |     |              |      |        |      |                |
|--------|---|-----|--------------|------|--------|------|----------------|
| 5' LTR | ψ | RRE | CPPT<br>/CTS | pPGK | COL7A1 | WPRE | 3' LTR<br>/ΔU3 |
|--------|---|-----|--------------|------|--------|------|----------------|

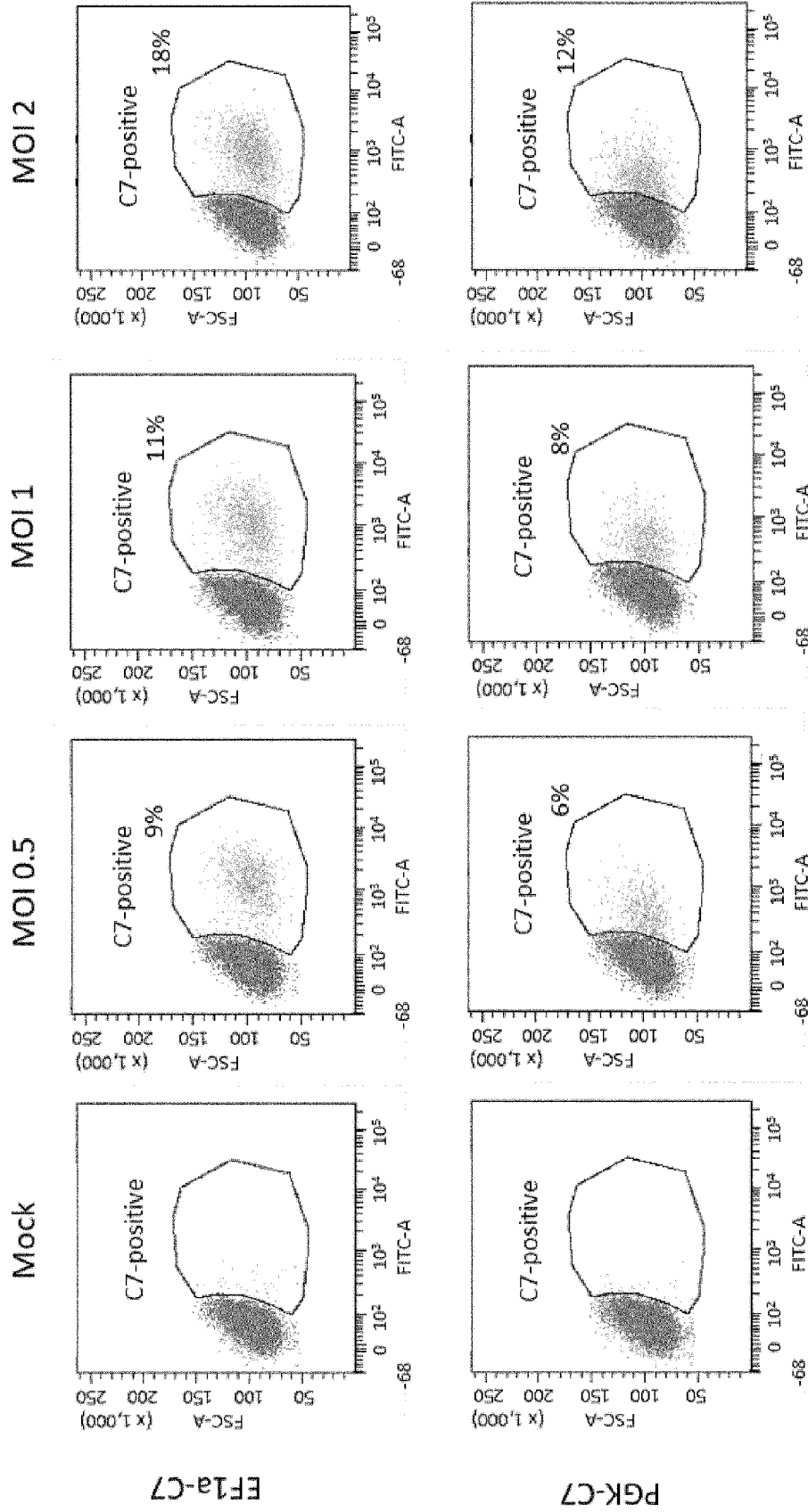
[図19]



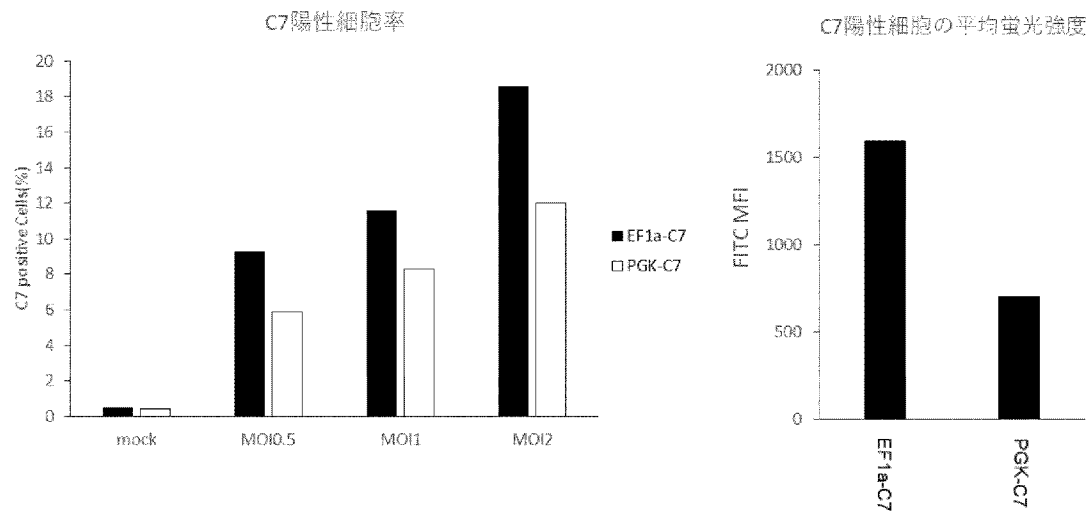
[図20]



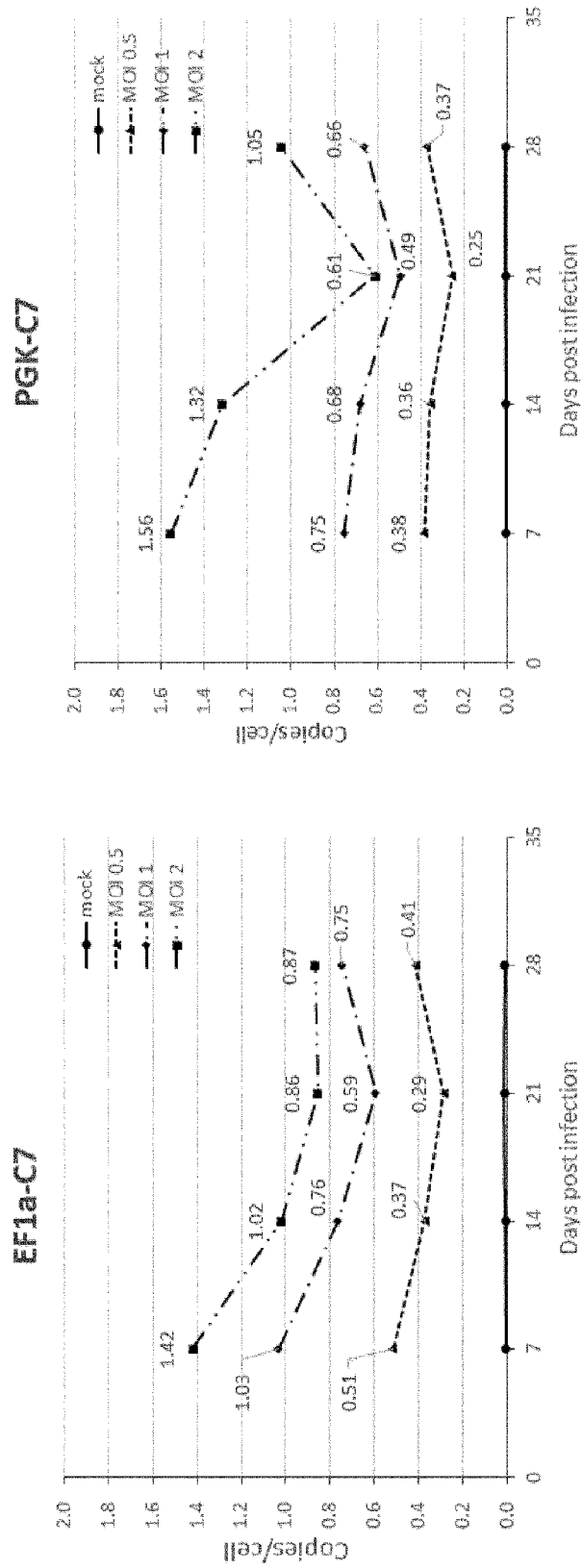
[図21]



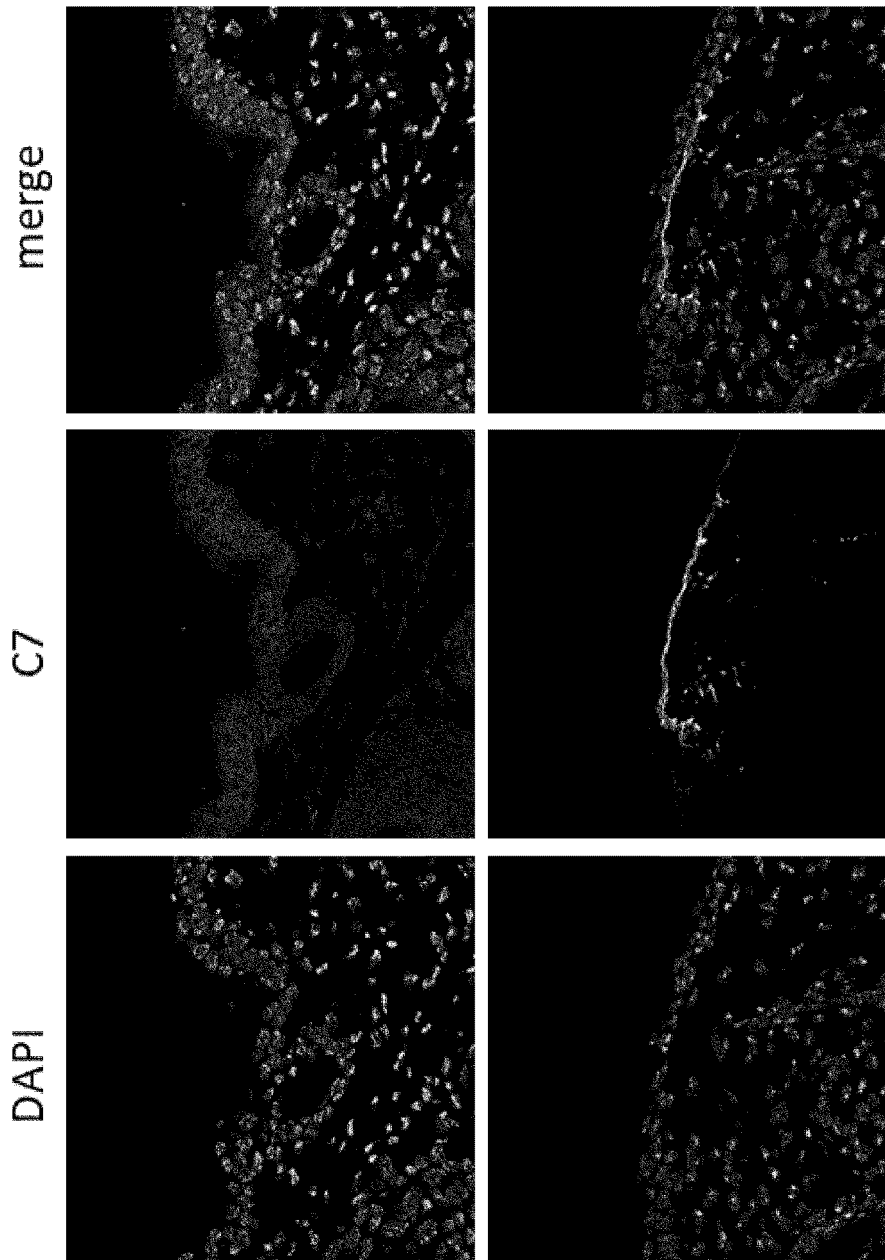
[図22]



[図23]



[図24]



未感染BFC

LVSIN-EF1a-C7  
感染BFC

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2021/027279

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**

**A61K 35/12**(2015.01)i; **A61P 17/00**(2006.01)i; **C12N 5/071**(2010.01)i; **C12N 5/10**(2006.01)i; **C12N 15/63**(2006.01)i  
 FI: A61K35/12 ZNA; A61P17/00; C12N5/071; C12N5/10; C12N15/63

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K35/12; A61P17/00; C12N5/071; C12N5/10; C12N15/63

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Published examined utility model applications of Japan 1922-1996  
 Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2021  
 Registered utility model specifications of Japan 1996-2021  
 Published registered utility model applications of Japan 1994-2021

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); Cplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                              | Relevant to claim No. |
|-----------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| A         | JP 2019-508454 A (INTREXON CORP.) 28 March 2019 (2019-03-28)<br>Whole Document                                                                                                                                  | 1-15                  |
| A         | JP 2019-506925 A (THE BOARD OF TRUSTEES OF STANFORD UNIVERSITY) 14 March 2019 (2019-03-14)<br>Whole Document                                                                                                    | 1-15                  |
| P, X      | WO 2020/149395 A1 (OSAKA UNIVERSITY) 23 July 2020 (2020-07-23)<br>paragraph [0038]                                                                                                                              | 14,15                 |
| P, A      |                                                                                                                                                                                                                 | 1-13                  |
| Y         | GEORGIADIS C. et al., Lentiviral engineered fibroblasts expressing codon-optimized COL7A1 restore anchoring fibrils in RDEB, Journal of Investigative Dermatology, 2016, Vol.136, pp. 284-292<br>p. 290, fig. 1 | 14,15                 |
| A         |                                                                                                                                                                                                                 | 1-13                  |



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date

“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

“&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

16 September 2021

Date of mailing of the international search report

28 September 2021

Name and mailing address of the ISA/JP

Japan Patent Office (ISA/JP)  
 3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915  
 Japan

Authorized officer

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2021/027279

| C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT |                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |                       |
|----------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| Category*                              | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                                                                                                                        | Relevant to claim No. |
| Y                                      | TITEUX M. et al., SIN retroviral vectors expressing COL7A1 under human promoters for ex vivo gene therapy of recessive dystrophic epidermolysis bullosa, Molecular Therapy, 2010, Vol.18, pp. 1509-1518<br>fig. 1                                                                                         | 14,15                 |
| A                                      |                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | 1-13                  |
| Y                                      | ALSHEHRI F.et al., A comparison of minicircle vectors expressing COL7A1 under the control of human promoters for the treatment of recessive dystrophic epidermolysis bullosa, Journal of Investigative Dermatology, 2017, Vol. 137, No. 10, Suppl. 2, S227, Abs 200<br>Whole Document                     | 14,15                 |
| A                                      |                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | 1-13                  |
| Y                                      | ABDUL-WAHAB A.et al., Characterization and selection of a patient cohort for a phase III study of ex vivo gene therapy for recessive dystrophic epidermolysis bullosa (GENEGRAFT), British Journal of Dermatology, 2015, Vol. 173, Suppl. S1, pp. 80, BG07<br>Whole Document                              | 14,15                 |
| A                                      |                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | 1-13                  |
| A                                      | ITOH M.et al., Footprint-free gene mutation correction in induced pluripotent stem cell (iPSC) derived from recessive dystrophic epidermolysis bullosa (RDEB) using the CRISPR/Cas9 and piggyBac transposon system, Journal of Dermatological Science, April 2020, vol. 98, pp. 163-172<br>Whole Document | 1-15                  |
| A                                      | JP 2019-142819 A (JUNTENDO UNIVERSITY) 29 August 2019 (2019-08-29)                                                                                                                                                                                                                                        | 1-15                  |
| A                                      | WO 2018/235834 A1 (HOKKAIDO UNIVERSITY) 27 December 2018 (2018-12-27)                                                                                                                                                                                                                                     | 1-15                  |
| A                                      | WO 2019/060719 A1 (UNIVERSITY OF MIAMI) 28 March 2019 (2019-03-28)                                                                                                                                                                                                                                        | 1-15                  |

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2021/027279

**Box No. I** Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
  - a. ☒ forming part of the international application as filed:
    - ☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
    - ☐ on paper or in the form of an image file.
  - b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13*ter*.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
  - c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
    - ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13*ter*.1(a)).
    - ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

**Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

**(Invention 1) Claims 1-13**

Claims 1-13 have a special technical feature pertaining to “blister-derived cells of a dystrophic epidermolysis bullosa patient”, and are therefore classified as Invention 1.

**(Invention 2) Claims 14 and 15**

Claims 14 and 15 have in common with claim 1 classified as Invention 1 the technical feature of genetically modifying so as to produce type VII collagen. However, this technical feature does not make a contribution over the prior art in the light of the content described in document 1 (claim 1, etc.) or document 2 (claim 1, etc.), and thus this technical feature cannot be said to be a special technical feature. Moreover, no other identical or corresponding special technical feature exists between these inventions.

In addition, claims 14 and 15 are not dependent claims of claim 1. Furthermore, claims 14 and 15 are not substantially identical to or similarly closely related to any of the claims classified as Invention 1.

As such, claims 14 and 15 cannot be classified as Invention 1.

Claims 14 and 15 do have the special technical feature of a “an EF1 $\alpha$  promoter, and a COL7A gene that has been arranged downstream of the EF1 $\alpha$  promoter”, and are therefore classified as Invention 2.

Document 1: JP 2019-508454 A (INTREXON CORP.) 28 March 2019 (2019-03-28)

Document 2: JP 2019-506925 A (THE BOARD OF TRUSTEES OF STANFORD UNIVERSITY) 14 March 03 (2019-03-14)

1. ☒ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest**

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☒ No protest accompanied the payment of additional search fees.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
**Information on patent family members**

International application No.

**PCT/JP2021/027279**

| Patent document<br>cited in search report |             |    | Publication date<br>(day/month/year) | Patent family member(s) |                 |    | Publication date<br>(day/month/year) |
|-------------------------------------------|-------------|----|--------------------------------------|-------------------------|-----------------|----|--------------------------------------|
| JP                                        | 2019-508454 | A  | 28 March 2019                        | US                      | 2019/0192636    | A1 |                                      |
|                                           |             |    |                                      | WO                      | 2017/161180     | A1 |                                      |
|                                           |             |    |                                      | EP                      | 3429609         | A1 |                                      |
|                                           |             |    |                                      | KR                      | 10-2018-0118795 | A  |                                      |
|                                           |             |    |                                      | CN                      | 109257926       | A  |                                      |
| JP                                        | 2019-506925 | A  | 14 March 2019                        | US                      | 2019/0382724    | A1 |                                      |
|                                           |             |    |                                      | WO                      | 2017/120147     | A1 |                                      |
|                                           |             |    |                                      | EP                      | 3400287         | A1 |                                      |
|                                           |             |    |                                      | CN                      | 108473952       | A  |                                      |
|                                           |             |    |                                      | KR                      | 10-2018-0093967 | A  |                                      |
| WO                                        | 2020/149395 | A1 | 23 July 2020                         | (Family: none)          |                 |    |                                      |
| JP                                        | 2019-142819 | A  | 29 August 2019                       | (Family: none)          |                 |    |                                      |
| WO                                        | 2018/235834 | A1 | 27 December 2018                     | US                      | 2020/0206272    | A1 |                                      |
|                                           |             |    |                                      | EP                      | 3643316         | A1 |                                      |
|                                           |             |    |                                      | KR                      | 10-2020-0016298 | A  |                                      |
|                                           |             |    |                                      | CN                      | 110831607       | A  |                                      |
| WO                                        | 2019/060719 | A1 | 28 March 2019                        | JP                      | 2020-534344     | A  |                                      |
|                                           |             |    |                                      | US                      | 2018/0104186    | A1 |                                      |
|                                           |             |    |                                      | EP                      | 3684336         | A1 |                                      |
|                                           |             |    |                                      | CN                      | 111182890       | A  |                                      |
|                                           |             |    |                                      | KR                      | 10-2020-0088799 | A  |                                      |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |                                                                                                                                                                                                                    |                                                                       |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------|
| A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））<br>A61K 35/12(2015.01)i; A61P 17/00(2006.01)i; C12N 5/071(2010.01)i; C12N 5/10(2006.01)i;<br>C12N 15/63(2006.01)i<br>FI: A61K35/12 ZNA; A61P17/00; C12N5/071; C12N5/10; C12N15/63                                                                                                                                                                                                                                                                               |                                                                                                                                                                                                                    |                                                                       |
| B. 調査を行った分野                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |                                                                                                                                                                                                                    |                                                                       |
| 調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC））<br>A61K35/12; A61P17/00; C12N5/071; C12N5/10; C12N15/63                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |                                                                                                                                                                                                                    |                                                                       |
| 最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの<br>日本国実用新案公報 1922-1996年<br>日本国公開実用新案公報 1971-2021年<br>日本国実用新案登録公報 1996-2021年<br>日本国登録実用新案公報 1994-2021年                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |                                                                                                                                                                                                                    |                                                                       |
| 国際調査で利用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）<br>JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CAlplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |                                                                                                                                                                                                                    |                                                                       |
| C. 関連すると認められる文献                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |                                                                                                                                                                                                                    |                                                                       |
| 引用文献の<br>カテゴリー*                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示                                                                                                                                                                                  | 関連する<br>請求項の番号                                                        |
| A                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | JP 2019-508454 A (イントレキソン コーポレーション) 28.03.2019 (2019-03-28)<br>Whole Document                                                                                                                                      | 1-15                                                                  |
| A                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | JP 2019-506925 A (ザ ボード オブ トラスティーズ オブ ザ レランド スタン<br>フォード ジュニア ユニバーシティー) 14.03.2019 (2019-03-14)<br>Whole Document                                                                                                  | 1-15                                                                  |
| P, X                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | WO 2020/149395 A1 (国立大学法人大阪大学) 23.07.2020 (2020-07-23)<br>[0038]                                                                                                                                                   | 14, 15                                                                |
| P, A                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |                                                                                                                                                                                                                    | 1-13                                                                  |
| Y                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | GEORGIADIS C. et al., Lentiviral engineered fibroblasts expressing codon-<br>optimized COL7A1 restore anchoring fibrils in RDEB, Journal of Investigative<br>Dermatology, 2016, Vol.136, pp.284-292<br>p. 290, 図 1 | 14, 15                                                                |
| A                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |                                                                                                                                                                                                                    | 1-13                                                                  |
| <input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input checked="" type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |                                                                                                                                                                                                                    |                                                                       |
| * 引用文献のカテゴリー<br>“A” 特に関連のある文献ではなく、一般的な技術水準を示すもの<br>“E” 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に<br>公表されたもの<br>“L” 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若し<br>くは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を<br>付す）<br>“O” 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献<br>“P” 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の<br>後に公表された文献<br>“T” 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と抵<br>触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引<br>用するもの<br>“X” 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性<br>又は進歩性がないと考えられるもの<br>“Y” 特に関連のある文献であって、当該文献と他の 1 以上の文<br>献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がな<br>いと考えられるもの<br>“&” 同一パテントファミリー文献 |                                                                                                                                                                                                                    |                                                                       |
| 国際調査を完了した日<br>16.09.2021                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |                                                                                                                                                                                                                    | 国際調査報告の発送日<br>28.09.2021                                              |
| 名称及びあて先<br>日本国特許庁(ISA/JP)<br>〒100-8915<br>日本国<br>東京都千代田区霞が関三丁目 4 番 3 号                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |                                                                                                                                                                                                                    | 権限のある職員（特許庁審査官）<br><br>深草 亜子 4U 9548<br><br>電話番号 03-3581-1101 内線 3439 |

## C. 関連すると認められる文献

| 引用文献の<br>カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示                                                                                                                                                                                                                                                                    | 関連する<br>請求項の番号 |
|-----------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------|
| Y               | TITEUX M.et al., SIN retroviral vectors expressing COL7A1 under human promoters for ex vivo gene therapy of recessive dystrophic epidermolysis bullosa, Molecular Therapy, 2010, Vol.18, pp.1509-1518<br>図 1                                                                                         | 14, 15         |
| A               |                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | 1-13           |
| Y               | ALSHEHRI F.et al., A comparison of minicircle vectors expressing COL7A1 under the control of human promoters for the treatment of recessive dystrophic epidermolysis bullosa, Journal of Investigative Dermatology , 2017, Vol.137, No.10, Supp.2, S227, Abs200<br>Whole Document                    | 14, 15         |
| A               |                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | 1-13           |
| Y               | ABDUL-WAHAB A.et al., Characterization and selection of a patient cohort for a phase I/II study of ex vivo gene therapy for recessive dystrophic epidermolysis bullosa (GENEGRAFT), British Journal of Dermatology, 2015, Vol.173, Suppl.S1, pp.80, BG07<br>Whole Document                           | 14, 15         |
| A               |                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | 1-13           |
| A               | ITOH M.et al., Footprint-free gene mutation correction in induced pluripotent stem cell (iPSC) derived from recessive dystrophic epidermolysis bullosa (RDEB) using the CRISPR/Cas9 and piggyBac transposon system, Journal of Dermatological Science, 2020.04, Vol.98, pp.163-172<br>Whole Document | 1-15           |
| A               | JP 2019-142819 A (学校法人順天堂) 29.08.2019 (2019 - 08 - 29)                                                                                                                                                                                                                                               | 1-15           |
| A               | WO 2018/235834 A1 (国立大学法人北海道大学) 27.12.2018 (2018 - 12 - 27)                                                                                                                                                                                                                                          | 1-15           |
| A               | WO 2019/060719 A1 (UNIVERSITY OF MIAMI) 28.03.2019 (2019 - 03 - 28)                                                                                                                                                                                                                                  | 1-15           |

## 第 I 欄          ヌクレオチド又はアミノ酸配列（第 1 ページの 1. c の続き）

1. この国際出願で開示されたヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、以下の配列表に基づき国際調査を行った。

- a. ☒ 出願時における国際出願の一部を構成する配列表  
    ☒ 附属書C/ST.25テキストファイル形式  
    ☐ 紙形式又はイメージファイル形式
- b. ☐ 国際出願とともに、PCT規則13の3.1(a)に基づき国際調査のためにのみ提出された、附属書C/ST.25テキストファイル形式の配列表
- c. ☐ 国際出願日後に、国際調査のためにのみ提出された配列表  
    ☐ 附属書C/ST.25テキストファイル形式(PCT規則13の3.1(a))  
    ☐ 紙形式又はイメージファイル形式(PCT規則13の3.1(b)及びPCT実施細則第713号)

2. ☐ さらに、複数の版の配列表又は配列表の写しが提出され、変更後の配列表又は追加の写しに記載された情報が、出願時における配列表と同一である旨、又は出願時における国際出願の開示の範囲を超えない旨の陳述書の提出があった。

3. 補足意見:

## 第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

（発明1）請求項1－13

請求項1－13は、「栄養障害型表皮水疱症患者の水疱由来細胞」に関するという特別な技術的特徴を有しているので、発明1に区分する。

（発明2）請求項14、15

請求項14、15は、発明1に区分された請求項1と、V I I型コラーゲンを産生するように遺伝子改変するという共通の技術的特徴を有している。しかしながら、当該技術的特徴は、文献1（請求項1等）又は文献2（請求項1等）の開示内容に照らして、先行技術に対する貢献をもたらすものではないから、当該技術的特徴は、特別な技術的特徴であるとはいえない。また、これらの発明の間には、他に同一の又は対応する特別な技術的特徴は存在しない。

さらに、請求項14、15は、請求項1の従属請求項ではない。また、請求項14、15は、発明1に区分されたいずれの請求項に対しても実質同一又はそれに準ずる関係にはない。

したがって、請求項14、15は発明1に区分できない。

そして、請求項14、15は、「E F 1  $\alpha$  プロモーターと、前記E F 1  $\alpha$  プロモーターの下流に配置されたC O L 7 A遺伝子」という特別な技術的特徴を有しているので、発明2に区分する。

文献1：JP 2019-508454 A（イントレキソン コーポレーション）28.03.2019(2019-03-28)

文献2：JP 2019-506925 A（ザ ボード オブ トラスティーズ オブ ザ レランド スタンフォード ジュニア ユニバーシティー）14.03.2019(2019-03-14)

1. ☒ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求項について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求項について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求項のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求項について作成した。

追加調査手数料の異議の  
申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。
- ☒ 追加調査手数料の納付はあったが、異議申立てはなかった。

国際調査報告  
 パテントファミリーに関する情報

国際出願番号

PCT/JP2021/027279

| 引用文献 |             |    | 公表日        | パテントファミリー文献 |                 |    | 公表日 |
|------|-------------|----|------------|-------------|-----------------|----|-----|
| JP   | 2019-508454 | A  | 28.03.2019 | US          | 2019/0192636    | A1 |     |
|      |             |    |            | WO          | 2017/161180     | A1 |     |
|      |             |    |            | EP          | 3429609         | A1 |     |
|      |             |    |            | KR          | 10-2018-0118795 | A  |     |
|      |             |    |            | CN          | 109257926       | A  |     |
| JP   | 2019-506925 | A  | 14.03.2019 | US          | 2019/0382724    | A1 |     |
|      |             |    |            | WO          | 2017/120147     | A1 |     |
|      |             |    |            | EP          | 3400287         | A1 |     |
|      |             |    |            | CN          | 108473952       | A  |     |
|      |             |    |            | KR          | 10-2018-0093967 | A  |     |
| WO   | 2020/149395 | A1 | 23.07.2020 | (ファミリーなし)   |                 |    |     |
| JP   | 2019-142819 | A  | 29.08.2019 | (ファミリーなし)   |                 |    |     |
| WO   | 2018/235834 | A1 | 27.12.2018 | US          | 2020/0206272    | A1 |     |
|      |             |    |            | EP          | 3643316         | A1 |     |
|      |             |    |            | KR          | 10-2020-0016298 | A  |     |
|      |             |    |            | CN          | 110831607       | A  |     |
| WO   | 2019/060719 | A1 | 28.03.2019 | JP          | 2020-534344     | A  |     |
|      |             |    |            | US          | 2018/0104186    | A1 |     |
|      |             |    |            | EP          | 3684336         | A1 |     |
|      |             |    |            | CN          | 111182890       | A  |     |
|      |             |    |            | KR          | 10-2020-0088799 | A  |     |