

(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  
2024年10月3日(03.10.2024)



(10) 国際公開番号

WO 2024/204287 A1

(51) 国際特許分類:

C12N 15/11 (2006.01) C12N 15/09 (2006.01)  
C12N 5/10 (2006.01) C12Q 1/686 (2018.01)

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.

(21) 国際出願番号: PCT/JP2024/012128

(22) 国際出願日: 2024年3月26日(26.03.2024)

(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 2023-050681 2023年3月27日(27.03.2023) JP

(71) 出願人: 国立大学法人京都大学 (KYOTO  
UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒6068501 京都府京都市  
左京区吉田本町3番地1 Kyoto (JP).

(72) 発明者: 堀田 秋津(HOTTA, Akitsu); 〒6068501  
京都府京都市左京区吉田本町3番地1 国  
立大学法人京都大学内 Kyoto (JP). 小島 佑介  
(KOJIMA, Yusuke); 〒6068501 京都府京都市左  
京区吉田本町3番地1 国立大学法人京都大学  
内 Kyoto (JP). 北 悠人(KITA, Yuto); 〒6068501  
京都府京都市左京区吉田本町3番地1 国  
立大学法人京都大学内 Kyoto (JP).

(74) 代理人: 村岡 皓一郎, 外(MURAOKA, Koichiro  
et al.); 〒6008216 京都府京都市下京区烏丸  
通七条下ル東塩小路町735-1 京阪  
京都ビル8階 Kyoto (JP).

(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, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC,  
EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR,  
HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG,  
KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU,  
LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, MW, MX, MY,  
MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL,

(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, CV, GH, GM, KE, LR, LS,  
MW, MZ, NA, RW, SC, 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, ME, 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:

- 一 国際調査報告 (条約第21条(3))
- 一 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))

(54) Title: CRRNA HAVING MODIFIED NUCLEOTIDE

(54) 発明の名称: 修飾ヌクレオチドを有するc r R N A

(57) Abstract: The present invention is a pre-crRNA of a type I CRISPR-Cas system having a modified nucleotide, wherein, in a region consisting of the 5'arm region of the first repeat sequence, the 5'-side stem-forming region of the first repeat sequence, and the loop-forming region of the first repeat sequence, at least one nucleotide is the modified nucleotide.

(57) 要約: 本発明は、修飾ヌクレオチドを有するタイプ I C R I S P R - C a s システムの  
プレc r R N Aであって、第1リピート配列の5'アーム領域、第1リピート配列の5'側ス  
テム形成領域および第1リピート配列のループ形成領域からなる領域において、少なくと  
も1個のヌクレオチドが修飾ヌクレオチドである、プレc r R N A。



WO 2024/204287 A1

## 明 細 書

発明の名称：修飾ヌクレオチドを有するc r R N A

### 技術分野

[0001] 本発明は、修飾ヌクレオチドを有するプレc r R N Aに関する。より詳細には、特定の修飾が付されたプレcrRNA、アレルト異的プレcrRNA、およびこれらのプレcrRNAを用いて二本鎖DNA改変細胞を作製する方法などに関する。

### 背景技術

[0002] 近年、真正細菌や古細菌が持つ獲得免疫機構であるClustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat (CRISPR)およびCRISPR-associated (Cas)タンパク質を主な構成要素とするCRISPR-Casシステムを応用した技術は、ガイドRNAの標的配列を自在に設計することで、遺伝子破壊（ノックアウト）などをはじめとしたゲノム編集技術として開発され、広く用いられている。CRISPR-Casシステムは、ガイドRNA依存的にDNAを切断する過程で働くエフェクターが、複数のタンパク質が複合体を形成して機能するクラス1のCRISPR-Casシステムと、単一のタンパク質で機能するクラス2のCRISPR-Casシステムに大別される。このうち、クラス2タイプIIに属するCRISPR-Cas9システムは、その簡便さと応用範囲の広さから、現在最も良く使用されている。また、ゲノム編集に用いられるクラス2に属する他のCRISPR-Casシステムとして、タイプVのCRISPR-Cas12aシステムも知られている。

[0003] 一方、Casタンパク質およびCascade複合体を用いてDNAを切断する、クラス1のタイプI CRISPR-Casシステムを用いたゲノム編集の開発も進められている。例えば、大阪大学において開発されたタイプI-EのCRISPR-Cas3システム（特許文献1）、徳島大学において開発されたタイプI-DのCRISPR-Cas10（TiD）システム（特許文献2）などが知られている。また、本発明者らは以前、予期せぬ細胞ゲノムへの組み込みが生じ得るプラスミドDNAや、タンパク質の精製が必要となるRNP（Ribonucleoprotein）ではなくCasタンパク質およびCascade複合体をコードするRNAによるゲノム編集方法に着目することで、CRISPR

R-Cas3システムを用いてゲノムDNAの標的領域に100塩基超のヌクレオチドの欠損を導入することに成功している（特許文献3）。クラス1のCRISPR-Casシステムは複数のタンパク質が必要である一方で、クラス2のCRISPR-Casシステムとは違ったDNA切断機構を有しているため、ユニークなDNA欠損パターンを誘導できるなど、様々な場面でその有用性は高い。CRISPR-Cas3システムは、ガイドRNAの認識配列から数十ベースから数百ベース離れた箇所を起点として、一方向に数百ベースから百キロベース以上の長鎖DNA欠損を誘導することが知られている。また、CRISPR-Cas3のガイドRNAはCRISPR-Cas9システムのガイドRNAよりも認識配列が長いことから、高い特異性も示唆されている。

[0004] 生物・医学分野でよく使用される実験用癌細胞株は、HEK293T細胞など遺伝子導入効率が高い株が多くあり、しばしばゲノム編集のモデル株として使用される。しかしながら、再生医療などに実際に応用することを想定したiPS細胞や初代培養細胞株などは必ずしも遺伝子導入効率が高くなく、さらに臨床用に選定された細胞株は樹立数そのものが少なく、必ずしも毎回遺伝子導入に最適な株を選ぶことができるとは限らない。このような理由から、遺伝子導入効率が低い細胞株においても、安定的かつ効率的なゲノム編集が可能な方法の開発が求められている。これら安定的かつ効率的なゲノム編集の観点から、現状のクラス1のCRISPR-Casシステムの有用性をさらに高めることが重要である。

[0005] また、ゲノム編集を実用的な技術とするためには、その技術でどのようなDNAの変異を誘導することができるか、および変異(切断)誘導効率を正確に解析する必要がある。特に微小なDNA 2本鎖切断を誘導するCas9と違い、Cas3およびCas10は長さの異なるさまざまな長鎖欠損を誘導することが知られているが、どの長さの欠損変異がどの割合で生じるか簡便に解析する方法は未だ開発されていない。現状、欠損変異のパターンを解析する場合は標的部位をPCR等で増幅するという作業が必要である。しかしながら、PCRはその増幅産物の長さによって増幅効率が異なることや、そもそも増幅する範囲を超えた欠損変異(数十kb以上)は増幅することができず、結果として検出することはでき

ないため、欠損変異の長さとその効率を正確に反映しているとは言えない。次世代シーケンサーによる全ゲノム配列解析や標的近傍配列をプルダウンして配列解析を用いれば、ある程度の切断パターンを解析することができる(非特許文献1)が、解析コストが高価かつ大量のデータ解析にも技術と時間が必要となる。

## 先行技術文献

### 特許文献

[0006] 特許文献1：国際公開第2018/225858号

特許文献2：国際公開第2019/039417号

特許文献3：国際公開第2020/122104号

### 非特許文献

[0007] 非特許文献1：Morisaka H. et al., Nat Commun. 6;10(1):5302 (2019)

## 発明の概要

### 発明が解決しようとする課題

[0008] クラス1のCRISPR-Casシステムの有用性をさらに高め、より実用的な技術とするためには、例えば、ゲノム編集効率の低い細胞に対する編集効率を改善すること、該CRISPR-Casシステムが誘導するゲノム編集パターンを正確に把握すること、さらにさまざまな需要に合わせたゲノム編集の応用方法を拡大することが重要である。よって、本発明は、ゲノム編集における編集効率を改善し、またCRISPR-Casシステムによるゲノム編集パターンを解析する方法や、該方法に用いることができるツールを提供することを課題とする。

[0009] また、ゲノム編集を用いた遺伝子疾患の治療方法の開発も進められている。該疾患の中には、筋強直性ジストロフィーI型(DM1)のような、常染色体の一方のアレルの異常により発症する優性(顕性)遺伝形式の疾患もあるが、現在のゲノム編集技術では、基本的に、両方のアレルに対してゲノム編集が生じてしまい、標的アレル特異的なSNP配列を含む領域を標的とすることで標的アレルだけにゲノム編集を誘導しようとしても、ゲノム編集目的部位のす

ぐ近傍に適切なヘテロSNPが存在しないという問題も存在する。よって、ゲノム編集目的部位から離れたヘテロSNPを標的として一方のアレル特異的にゲノム編集を行う方法を提供することも課題とする。

### 課題を解決するための手段

[0010] 本発明者らは、上記課題を解決するために、プレcrRNA (pre-crRNA) の特定の領域に化学修飾を付すことで、細胞内外に存在するRNase等によるRNAの分解を抑制でき、その結果ゲノム編集効率を向上させることができるのではないかとこの着想を得た。一般的に、無修飾のRNAは細胞内ではヌクレアーゼの標的として素早く分解されることが知られており、RNAの修飾によってこれを防ぎ、安定化させることができる。しかし、RNAの修飾はRNAの物性や二次構造、タンパク質との相互作用を変化させ、本来の機能を失わせる可能性もあり、どの位置にどの修飾を導入するかは専門家でも予測不可能であるのが実情であった。実際、Cas9のガイドRNA (sgRNAまたはgRNA-crRNA) においても様々なRNA修飾が試されているが、どのような修飾や位置が最適かは予測が難しい。さらにE. coli CRISPR-Cas3システムのプレcrRNAは、それぞれ29塩基から成る2つのリピート配列と32塩基のスペーサー配列を含む計90塩基のRNAであるが(図3-1)、これを哺乳類細胞において使用する場合において化学修飾様式を検討した先例は無い。また、CRISPR-Cas3システムのプレcrRNAと、CRISPR-Cas9システムのガイドRNAとでは、配列、構造、および機能的特徴も一致しないため、どの位置の修飾が最適か参考にはできない。さらに、CRISPR-Cas3システムにおいては、Cas6によるプレcrRNAのプロセッシングが必要であることも生化学実験で報告されており、その機構の複雑さからも適切な修飾位置を予想することは困難である。

[0011] そこで、本発明者らは、化学修飾をCRISPR-Cas3システムのプレcrRNAに導入し、活性を向上させる修飾位置の探索を行なった。その結果、プレcrRNAの特定の領域に修飾を付すことで、crRNAの機能を失わせることなくゲノム編集効率が著しく向上することを見出した。意外なことに、プレcrRNAは左右対称に近い構造を有しているが、プレcrRNAによる修飾の効果には、左右の非対称

性が認められることが示唆された。また、プレcrRNAに、生体内でmRNAが施される修飾と同様の修飾を導入したところ、プレcrRNAの活性を向上できることも見出した。

[0012] さらに、CRISPR-Cas9システム用の一本鎖アニーリング(single-strand annealing; SSA)レポーターベクターを改変することで、タイプⅠのCRISPR-Casシステム用のSSAレポーターベクターの開発を試みた。具体的には、タイプⅠのCRISPR-CasシステムのDNAの改変パターンを踏まえ、CRISPR-Cas9システム用のSSAレポーターベクターのCas9により認識される配列を、より長い配列に置換することに着想した。また、Cas3が酵素としては1本鎖DNA切断酵素ニッケースであることに着目し、DNAダブルニッキングによって二本鎖切断を誘導するメカニズムをこのSSAレポーターベクターに応用することもできるのではないかとこの着想を得た。これらのSSAレポーターベクターを実際に構築し、実験を行ったところ、これらのSSAレポーターベクターを用いることで、タイプⅠのCRISPR-Casシステムが活性を発揮する細胞をモニターすることが可能となり、またCRISPR-Casシステムにより二本鎖DNAが改変された細胞を選別することに成功した。

[0013] また、本発明者らは、ドロプレットデジタルPCR (Droplet Digital PCR; ddPCR) の技術を応用することで、CRISPR-Casシステムによる欠損変異の長さ分布と割合を測定する技術を開発することを試みた。まず、標的配列周辺の様々な位置に複数のddPCRプローブを設計し、それぞれの位置のコピー数を、ゲノム編集を行なった細胞のゲノムDNAにおいて直接測定する方法に着想した。誠意検討を重ねた結果、ddPCRにより、ゲノム編集効率が変化する様子を捉えることに成功した。これらの知見に基づいてさらに研究を重ねた結果、本発明を完成するに至った。

[0014] すなわち、本発明は以下の通りのものである。

[1-1]

修飾ヌクレオチドを有するタイプⅠ CRISPR-CasシステムのプレcrRNAであって、

第1リピート配列の5' アーム領域、第1リピート配列の5' 側ステム形成領域および第1リピート配列のループ形成領域からなる領域において、少なくとも1個のヌクレオチドが修飾ヌクレオチドである、プレc rRNA。

[1-2]

第1リピート配列の5' アーム領域において、少なくとも1個のヌクレオチドが修飾ヌクレオチドである、[1-1]に記載のプレc rRNA。

[1-3]

5' 末端から1番目のヌクレオチドが修飾ヌクレオチドである、[1-1]または[1-2]に記載のプレc rRNA。

[1-4]

5' 末端から1番目～3番目のヌクレオチドが修飾ヌクレオチドである、[1-1]～[1-3]のいずれか1つに記載のプレc rRNA。

[1-5]

第1リピート配列の5' アーム領域の全てのヌクレオチドが修飾ヌクレオチドである、[1-1]～[1-4]のいずれか1つに記載のプレc rRNA。

[2-1]

第2リピート配列の3' アーム領域の少なくとも1個のヌクレオチドが修飾ヌクレオチドである、[1-1]～[1-5]のいずれか1つに記載のプレc rRNA。

[2-2]

3' 末端から2番目のヌクレオチドが修飾ヌクレオチドである、[2-1]に記載のプレc rRNA。

[2-3]

3' 末端から2番目～4番目のヌクレオチドが修飾ヌクレオチドである、[2-1]または[2-2]に記載のプレc rRNA。

[3]

5' 末端から1番目～3番目のヌクレオチド、および3' 末端から2番目

～4番目のヌクレオチドが修飾ヌクレオチドである、[1-1]～[2-3]のいずれか1つに記載のプレc rRNA。

[4-1]

第1リピート配列のループ形成領域のループ形成領域の少なくとも1個、任意により全てのヌクレオチド、が修飾ヌクレオチドである、[1-1]～[3]のいずれか1つに記載のプレc rRNA。

[4-2]

第2リピート配列のループ形成領域の少なくとも1個、任意により全てのヌクレオチド、が修飾ヌクレオチドである、[1-1]～[4-1]のいずれか1つに記載のプレc rRNA。

[4-3]

修飾ヌクレオチドの少なくとも1つ、任意により全て、が2'-O-メチルリボヌクレオチドである、[1-1]～[4-2]のいずれか1つに記載のプレc rRNA。

[4-4]

少なくとも1つのヌクレオシド間結合がホスホロチオエート結合である、[1-1]～[4-3]のいずれか1つに記載のプレc rRNA。

[4-5]

糖部に修飾を有する少なくとも1つまたは全てのヌクレオシドの3'側のヌクレオシド間結合が修飾ヌクレオシド間結合である、[1-1]～[4-4]のいずれか1つに記載のプレc rRNA。

[4-6]

ヌクレオシド間結合がホスホロチオエート結合である、[4-5]に記載のプレc rRNA。

[4-7]

第1リピート配列の3'側ステム形成領域および／または第2リピート配列のステム形成領域の全てがリボヌクレオチドである、[1-1]～[4-6]のいずれか1つに記載のプレc rRNA。

## [4-8]

第1リピート配列の3' アーム領域、第2リピート配列の5' アーム領域および／または第2リピート配列の5' 側ステム形成領域の全てがリボヌクレオチドである、[1-1] ~ [4-7] のいずれか1つに記載のプレc rRNA。

## [4-9]

第1リピート配列の3' 側ステム形成領域、第1リピート配列の3' アーム領域、第2リピート配列の5' アーム領域および第2リピート配列のステム形成領域の全てがリボヌクレオチドである、[1-1] ~ [4-8] のいずれか1つに記載のプレc rRNA。

## [4-10]

スペーサー配列が全てリボヌクレオチドである、[1-1] ~ [4-9] のいずれか1つに記載のプレc rRNA。

## [4-11]

Cas6またはCas5により切断される部位が未修飾である、[1-1] ~ [4-10] のいずれか1つに記載のプレc rRNA。

## [5-1]

5' 末端から1番目~3番目のヌクレオチド、および3' 末端から2番目~4番目のヌクレオチドが修飾ヌクレオチドであり、第1リピート配列の3' アーム領域、第2リピート配列の5' アーム領域およびスペーサー領域を構成する全てのヌクレオチドがリボヌクレオチドであり、かつCas6またはCas5により切断される部位が未修飾である、[1-1] ~ [4-11] のいずれか1つに記載のプレc rRNA。

## [5-2]

糖部に修飾を有する少なくとも1つまたは全てのヌクレオシドの3' 側のヌクレオシド間結合が修飾ヌクレオシド間結合である、[5-1] に記載のプレc rRNA。

## [5-3]

リボヌクレオシドの3'側の結合がホスホジエステル結合である、[5-1] または [5-2] に記載のプレc rRNA。

[6]

スペーサー領域を2つ以上有する、[1-1] ~ [5-3] のいずれか1つに記載の方法。

[7]

タイプI CRISPR-CasシステムがタイプI-EのCRISPR-Casシステム、任意により大腸菌に由来するCRISPR-Casシステム、である、[1-1] ~ [6] のいずれか1つに記載のプレc rRNA。

[8-1]

5' キャップおよびポリAを有する、タイプI CRISPR-Casシステムのプレc rRNA。

[8-2]

タイプI CRISPR-CasシステムがタイプI-EのCRISPR-Casシステム、任意により大腸菌に由来するCRISPR-Casシステム、である、[8-1] に記載のプレc rRNA。

[8-3]

5' キャップおよびポリAを有する、[1-1] ~ [7] のいずれか1つに記載のプレc rRNA。

[9-1]

アレル特異的なタイプI CRISPR-Casシステムのプレc rRNAを設計する方法であって、

プレc rRNAが標的とする配列に隣接するPAM配列の上流側に欠損標的的部位が存在し、かつ

該プレc rRNAが標的とする配列内であって、該PAM配列の下流側末端塩基から数えて6n（nは正の整数）番目を除く位置またはPAM配列上にアレル間で異なる少なくとも1塩基が存在する

配列を標的とするプレc rRNAを設計する工程を含む、方法。

## [ 9 - 2 ]

タイプ I C R I S P R - C a s システムがタイプ I - E の C R I S P R - C a s システム、任意により大腸菌に由来する C R I S P R - C a s システム、である、[ 9 - 1 ] に記載の方法。

## [ 1 0 ]

プレ c r R N A の長さ、任意によりプレ c r R N A のスペーサー配列の長さ、を調節する工程、および／またはプレ c r R N A 、任意によりプレ c r R N A のスペーサー配列、にミスマッチを導入する工程を含む、[ 9 - 1 ] または [ 9 - 2 ] に記載の方法。

## [ 1 1 - 1 ]

欠損標的部位がリピートを含む、[ 9 - 1 ] ～ [ 1 0 ] のいずれか 1 つに記載の方法。

## [ 1 1 - 2 ]

前記リピートがトリプレット・リピートである、[ 1 1 - 1 ] に記載の方法。

## [ 1 2 - 1 ]

以下の ( 1 ) および ( 2 ) を含む、タイプ I C R I S P R - C a s システム。

( 1 ) [ 1 - 1 ] ～ [ 8 - 3 ] のいずれか 1 つに記載のプレ c r R N A または [ 9 - 1 ] ～ [ 1 1 - 2 ] のいずれか 1 つに記載の方法により設計されたプレ c r R N A 、

( 2 ) C a s c a d e を構成するタンパク質群または該タンパク質群をコードする核酸

## [ 1 2 - 2 ]

さらに、( 3 ) C a s 3 および／もしくは C a s 1 0 d または C a s 3 および／もしくは C a s 1 0 d をコードする核酸を含む、[ 1 2 - 1 ] に記載の C R I S P R - C a s システム。

## [ 1 3 ]

タイプ I C R I S P R - C a s システムの活性を評価するための二本鎖核酸であって、一方の核酸鎖が、

(1) レポータータンパク質、任意により蛍光タンパク質、の一部をコードする配列、

(2) c r R N A が標的とする配列または該配列に相補的な配列を含む挿入配列、および

(3) レポータータンパク質の一部をコードする、(1) とは異なる配列をこの順で含み、

(1) と (3) とは重複配列を有しており、(1) の重複配列以外の配列と、重複配列と、(3) の重複配列以外の配列とが、レポータータンパク質全長をコードする配列を構成し、

(2) の挿入配列の塩基長が 1 0 0 ~ 3 0 0 0 である、  
二本鎖核酸。

[ 1 4 - 1 ]

タイプ I C R I S P R - C a s システムの活性を評価するための二本鎖核酸であって、一方の核酸鎖が、

(1) レポータータンパク質、任意により蛍光タンパク質、の一部をコードする配列、

(2) c r R N A が標的とする配列および該配列と相補的な配列を含む挿入配列、ならびに

(3) レポータータンパク質の一部をコードする、(1) とは異なる配列をこの順で含み、

(1) と (3) とは重複配列を有しており、(1) の重複配列以外の配列と、重複配列と、(3) の重複配列以外の配列とが、レポータータンパク質全長をコードする配列を構成する、  
二本鎖核酸。

[ 1 4 - 2 ]

[ 1 3 ] または [ 1 4 - 1 ] に記載の二本鎖核酸を含む発現ベクター。

## [ 1 5 - 1 ]

二本鎖DNAが改変された細胞を製造する方法であって、[ 1 2 - 1 ] または [ 1 2 - 2 ] に記載のCRISPR-Casシステムを細胞に導入する工程を含む、方法。

## [ 1 5 - 2 ]

細胞が有する二本鎖DNAを改変する方法であって、[ 1 2 - 1 ] または [ 1 2 - 2 ] に記載のCRISPR-Casシステムを細胞に導入する工程を含む、方法。

## [ 1 6 ]

CRISPR-Casシステムを細胞に導入する工程を複数回行う、[ 1 5 - 1 ] または [ 1 5 - 2 ] に記載の方法。

## [ 1 7 ]

[ 1 3 ] もしくは [ 1 4 - 1 ] に記載の二本鎖核酸、または [ 1 4 - 2 ] に記載の発現ベクターを細胞に導入する工程を含む、[ 1 5 - 1 ] ~ [ 1 6 ] のいずれか1つに記載の方法。

## [ 1 8 ]

導入される二本鎖核酸が2種類以上である、[ 1 7 ] に記載の方法。

## [ 1 9 ]

レポータータンパク質が発現する細胞を選別する工程を含む、[ 1 7 ] または [ 1 8 ] に記載の方法。

## [ 2 0 - 1 ]

前記細胞が多能性幹細胞、任意により人工多能性幹細胞、である、[ 1 5 - 1 ] ~ [ 1 9 ] のいずれか1つに記載の方法。

## [ 2 0 - 2 ]

前記細胞が哺乳類細胞、任意によりヒト細胞、である、[ 1 5 - 1 ] ~ [ 2 0 - 1 ] のいずれか1つに記載の方法。

## [ 2 1 - 1 ]

タイプI CRISPR-Casシステムによる二本鎖DNAの編集パター

ンを解析する方法であって、欠損標的部位に対する複数のPCRプローブを用いてデジタルPCRを行う工程を含む、方法。

[21-2]

タイプI CRISPR-CasシステムがタイプI-EのCRISPR-Casシステム、任意により大腸菌に由来するCRISPR-Casシステム、である、[21-1]に記載の方法。

[22-1]

タイプI CRISPR-Casシステムを複数回細胞に導入する工程を含む、欠損部位を伸長させる方法。

[22-2]

タイプI CRISPR-CasシステムがタイプI-EのCRISPR-Casシステム、任意により大腸菌に由来するCRISPR-Casシステム、である、[22-1]に記載の方法。

[23-1]

前記細胞が多能性幹細胞、任意により人工多能性幹細胞、である、[22-1]または[22-2]に記載の方法。

[23-2]

前記細胞が哺乳類細胞、任意によりヒト細胞、である、[22-1]～[23-1]のいずれか1つに記載の方法。

[24-1]

[12-1]または[12-2]のCRISPR-Casシステムを含む、二本鎖DNAの標的配列の改変剤。

[24-2]

[12-1]または[12-2]のCRISPR-Casシステムを含む、標的遺伝子の発現制御剤。

[25]

疾患の治療のための、[24-1]または[24-2]に記載の剤。

**発明の効果**

[0015] 本発明により、タイプⅠのCRISPR-Casシステムによるゲノム編集効率を改善でき、該システムによるゲノム編集パターンを解析することができる。また、ゲノム編集細胞を濃縮できるツールの提供や、一方のアレル特異的にゲノム編集を行うことも可能となる。

### 図面の簡単な説明

[0016] [図1]クラスⅠのCRISPR-CasシステムによるDNA切断の模式図を示す。Cas3はヘリカーゼ活性とDNAニッキング活性を有し、crRNAおよびCascade複合体が結合していない側のDNA鎖にニックを導入する。

[図2]mRNAによる、Cascade複合体を構成する各タンパク質（以下、「Cascadeタンパク質群」と称することがある。）の発現の動態を示す。iPS細胞株（I01s04またはI14s04）に、Lipofectamine Stemを用いてmRNAの形態（特許文献3の図29）またはプラスミドの形態（特許文献3の図9のd）でCascadeタンパク質群を導入した。NCはネガティブコントロールを示す。抗2A peptide抗体によって2xNLS-Cse2-P2A、2xNLS-Cas5-T2A、2xNLS-Cas6-T2A、2xNLS-Cas7-P2Aの発現をトランスフェクション後8、24、48時間後のサンプルについて解析した。

[図3-1]E. coli Cas3 プレcrRNAにおけるRNA修飾位置の検討結果の模式図を示す。\*を付したヌクレオチドは、2' -O-methyl 3' phosphorothioate (MS) 修飾を有する。MS修飾を有するヌクレオチドは、糖部の二位の水酸基がO-メチル基に置換されているのに加え、該ヌクレオチドの糖部と次のヌクレオチドの糖部の間の結合がホスホロチオエート結合（ホスホジエステル結合部位の酸素原子が硫黄原子(S)で置換されているもの）であり、以下の同様である。図中、プレcrRNAの塩基配列を配列番号168で示す。

[図3-2]E. coli Cas3 プレcrRNA以外のプレcrRNAのリピート構造を示す（出典：Zheng Y. et al., Front Bioeng Biotechnol. 2020 Mar 4;8:62）。図中、各リピート構造の塩基配列を、上から順に配列番号169～174で示す。

[図4-1]E. coli Cas3 プレcrRNAにおけるRNA修飾位置による活性の変化を示

す (Lipofectamine Stemによるリポフェクション)。グラフ中の丸数字は、図2-1の修飾位置における丸数字に対応する。I14s04及びI01s04 iPS細胞において、ヒトB2M遺伝子を標的とし、細胞表面のHLA-A/B/C染色によってゲノム編集(B2M遺伝子ノックアウト)効率を測定したところ、(1)および(4)の箇所の修飾により、高い活性が認められた。

[図4-2]E. coli Cas3 プレcrRNAにおけるRNA修飾位置による活性の変化を示す (4D-Nucleofectorによるエレクトロポレーション)。グラフ中の丸数字は、図2-1の修飾位置における丸数字に対応する。I01s04 iPS細胞において、ヒトB2M遺伝子を標的とし、HLA染色によってゲノム編集効率を測定したところ、(1)および(4)の箇所の修飾により、高い活性が認められた。

[図5-1]E. coli Cas3 プレcrRNAにおけるRNA修飾位置の追加検討結果の模式図を示す。\*を付したヌクレオチドは、2' -O-methyl 3' phosphorothioate (MS)修飾を有する。矢印は、Cas6による切断部位を示す。

[図5-2]E. coli Cas3 プレcrRNAにおけるRNA修飾位置の追加検討結果の模式図を示す。\*を付したヌクレオチドは、2' -O-methyl 3' phosphorothioate (MS)修飾を有する。矢印は、Cas6による切断部位を示す。

[図5-3]E. coli Cas3 プレcrRNAにおけるRNA修飾位置の追加検討結果の模式図を示す。\*を付したヌクレオチドは、2' -O-methyl 3' phosphorothioate (MS)修飾を有する。矢印は、Cas6による切断部位を示す。

[図5-4]E. coli Cas3 プレcrRNAにおけるRNA修飾位置の追加検討結果の模式図を示す。#を付したヌクレオチドは、2' -O-methyl (M)修飾を有し、\*を付したヌクレオチドは、2' -O-methyl 3' phosphorothioate (MS)修飾を有する。矢印は、Cas6による切断部位を示す。

[図6-1]E. coli Cas3 プレcrRNAにおける、図5-1～図5-4で示したRNA修飾位置による活性の変化を示す。I14s04 iPS細胞において、Lipofectamine Stemを用いてCas3及びCascadeタンパク質群をコードするmRNAとヒトB2M遺伝子を標的としたそれぞれのpre-crRNAをトランスフェクションし、HLA-A/B/C染色によってゲノム編集効率を測定した。○は活性上昇効果、Xは活性減少効

果、Nは活性への影響が軽微または無いことを示す。

[図6-2]異なるiPS細胞株(1383D2)における、crRNA(B2M#1)を用いたゲノム編集の結果を示す。Cas3及びCascadeタンパク質を発現させるmRNAとcrRNAをLipofectamine Stemによってトランスフェクションし、遺伝子欠損効率をddPCRによって測定した。n=2; エラーバー: 標準偏差。標的配列は、配列番号4で示される配列である。

[図6-3]E. coli Cas3 プレcrRNAにおける、図5-1~図5-4で示したRNA修飾位置による活性の変化を示す。1383D2 iPS細胞において、Lipofectamine Stemを用いてCas3及びCascadeタンパク質群をコードするmRNAとヒトジストロフィン(DMD)遺伝子のエクソン45(Ex45)を標的としたそれぞれのpre-crRNAをトランスフェクションし、ddPCRによってゲノム編集効率を測定した。標的配列は、配列番号55で示される配列である。

[図7]E. coli Cas3 プレcrRNAへの5'-Capアナログ及びポリAテールの付加の模式図を示す。プレcrRNAをコードするT7プロモーターを有するプラスミドからインビトロ転写(in vitro transcription; IVT)反応によりARCA(anti-reverse cap analog) capアナログを有するプレcrRNAを合成し、該RNAの3'末端にポリAを付加させた。

[図8]E. coli Cas3 プレcrRNAへの5'-Cap及びポリAテールを付加したプレcrRNAを用いたTapeStation解析の結果を示す。mMESSAGE mMACHINE T7 Ultra Transcription Kitを用いたpre-crRNA(B2M#1及びB2M#4)のIVT反応において、PolyA Rxn+は、E. coli Poly(A) Polymerase(E-PAP)とATPによってPolyA付加を行ったサンプル、PolyA Rxn-はPolyA付加を行う前のサンプルである。

[図9]HEK293T細胞におけるE. coli Cas3 プレcrRNAへの5'-Capアナログ及びポリAテールの付加による効果を示す。HEK293T細胞に、Lipofectamine 2000を用いてCas3及びCascadeタンパク質群を発現するmRNAとプレcrRNA(B2M#4)を導入した。5'-Capアナログ及びポリAテールを有するプレcrRNAでは、これらを有さないプレcrRNAと比較して、高いゲノム編集効果が認められた。

[図10]I14s04株におけるE. coli Cas3 プレcrRNAへの5'-Capアナログ及びポ

りAテールの付加による効果を示す。I14s04株に、Lipofectamine Stemを用いてCas3及びCascadeタンパク質群を発現するmRNAとプレcrRNA(B2M#1もしくはB2M#4)を導入した。5' -Capアナログ及びポリAテールを有するプレcrRNAでは、これらを有さないプレcrRNAと比較して、高いゲノム編集効果が認められた。

[図11]複数回のCas3ゲノム編集による効果の蓄積を示す。I01s04及びI14s04 iPS細胞においてLipofectamine Stem を用いてCas3及びCascadeタンパク質群を発現するmRNAとB2M遺伝子をターゲットとするPre-both3 pre-crRNA (図5-1) を複数回トランスフェクションした。HLA染色の結果、トランスフェクションの回数に相関して、ゲノム編集率が向上した。(I01s04: n=2、I14s04 n=3、Mean±SD)

[図12]ddPCRによるCas3の欠損誘導パターンの解析技術の模式図を示す。

[図13]ddPCRを用いてHEK293T細胞におけるCas3ゲノム編集パターンを解析した結果を示す。B2M遺伝子を標的とするpre-crRNAを発現するpPV-C1-crRNA(B2M#1)-EF1a-G2ABA piggyBacベクターとDOXによってCas3及びCascadeタンパク質群の発現が調節できるpPV-TRE3G-Bi(263+751)-EF1a-Tet3G-iPA piggyBacベクターがゲノムDNAに安定的に組み込まれたHEK293T細胞 (Stable株) を用い、DOXの濃度を変えて (0.1  $\mu$ M、0.3  $\mu$ Mまたは1  $\mu$ M)、DOX誘導によるCas3およびCascadeタンパク質群の発現を複数日(0日、1日、2日、3日または4日)行った場合の結果を示す。crRNA(B2M#1)標的配列から約-3.5kb、-1kb、1kb、10kb、35kb、50kb、70kbにおけるゲノムDNAコピー数をddPCRによって測定した (n=3、mean±SD)。DOX濃度に依存して、CRISPR-Cas3システムによるゲノム編集のパターンが変化することが示された。図中の「uM」は「 $\mu$ M」を意味する。以下同様である。

[図14]ddPCRを用いたiPS細胞におけるCas3ゲノム編集パターンの解析結果を示す。B2M遺伝子を標的とするpre-crRNAを発現するpPV-C1-crRNA(B2M#1)-EF1a-G2AZAベクターとDOXによってCas3及びCascadeタンパク質群の発現が調節できるpPV-TRE3G-Bi(263+751)-EF1a-Tet3G-iPAベクターがゲノムDNAに組み込ま

れたCiRA00213 iPS細胞 (Stable株) を用い、crRNA(B2M#1)から約1kb、10kb、50kb、70kbにおけるゲノムDNAコピー数をddPCRで測定した結果、9日間作用させたDOX濃度 (0、0.5、2  $\mu$ M) に依存して、CRISPR-Cas3システムによるゲノム編集のパターンが変化することが示された。

[図15]RNAによるCas3ゲノム編集を行なった場合の欠損誘導パターンを示す。上段のグラフは、I14s04 iPS細胞においてRNAの形態のCRISPR-Cas3システムを導入 (1、2又は3回) した場合の結果を示し (ddPCRによりcrRNA標的配列から約1kb、10kbにおけるコピー数をddPCRによって測定)、下段のグラフは、HEK293T細胞及びI14s04 iPS細胞においてDOX誘導によるCas3およびCascadeタンパク質群の発現を複数日 (0日、1日、2日、3日または4日)、もしくは違うDOX濃度 (0、0.5、2  $\mu$ M) 行った場合の結果を示す (比較のため図13、14から一部引用)。LF StemはLipofectamine Stemの略記である。図中の「ul」は「 $\mu$ l」を意味する。以下同様である。

[図16]ddPCR解析の応用例であり、Cas3とCas9による長鎖DNA欠失の誘導効率の比較結果を示す。A. 実験の概略図を表す。ジストロフィン遺伝子座において、異なる鎖上の2種類のCas3 crRNA (またはCas9 sgRNA) で挟まれる領域 (ターゲット領域) が (i) 1kb、(ii) 44kb、(iii) 95kbまたは (iv) 344kbとなるようにcrRNA (またはsgRNA) を設計し、各ターゲット領域の中央付近にddPCRプローブを設計した。B. (ii)～(iv)において、ターゲット領域の両端(crRNA付近)および中央付近の欠失頻度を解析した結果を表すグラフである (means  $\pm$  SD、n=4、\*:p < 0.05)。C. (i)～(iv)において、各中央付近の欠失頻度を表すグラフである (means  $\pm$  SD、n=4、\*:p < 0.05)。

[図17]ddPCR解析の応用例であり、2種類、4種類、11種類のcrRNA (またはCas9 sgRNA) を用いたCas3ゲノム編集における、各地点の遺伝子欠損割合の評価結果を示す。HEK293T細胞においてCas3ベクター (All-in-one-Puro) とcrRNAベクター (または、Cas9ベクター (Cas9-Puro) とsgRNAベクター) をLipofectamine 2000を用いてリポフェクションにより遺伝子導入した。ジストロフィン遺伝子のエクソン45-55領域におよそ等間隔になるようにddPCRのプローブを7箇所

設計し、欠失頻度を解析した (means $\pm$ SD、n=3、\*:p < 0.05)。

[図18]日本人第一位HLAホモドナー由来iPSC (I01s04及びI14s04) におけるHLA-A\*24:02、B\*52:01のゲノム編集方法の模式図を示す。AAG+32ntの配列を抽出し、該配列をAAG+XXXXXXNXXXXXXNXXXXXXNXXXXXXNXXXに変換した後、GGGenomeを用いてOff-target予測 (即ち、他に完全一致の部位があるもの、特に他のHLA遺伝子に一致が無いかの検討) を行った。その後、エクソン1~3のクラスターを削る様に距離と方向の絞り込みを行った。crRNA配列 (A24:02 F1/R2/R4、B52:01 F1/R5/R7) はその例である。ゲノム編集効率を測定するためのddPCRプローブ及びプライマーはそれぞれの遺伝子のエクソン2上に設計した。

[図19]PCRによる活性の測定結果を示す (HLA-A\*24:02を標的とするcrRNAの場合)。I14s04 iPSC細胞にLipofectamine Stemを用いてCas3及びCascadeタンパク質群を発現させるmRNAとcrRNA発現ベクター (pBSIIKS-U6-crRNAまたはpPV-C1-crRNA) を発現させ、得られたゲノムサンプルをPCR (LA Taq HS) によって解析した。7.7 kbよりも下のサイズに出ているバンドはCas3ゲノム編集による欠失が起きたものである。

[図20]ddPCRによるHLA-A\*24:02及びB\*52:01エクソン2欠損効率の測定結果を示す (シングルcrRNA)。I14s04 iPSC細胞において、Lipofectamine Stemを用いてCas3及びCascadeタンパク質群を発現するmRNAとB2M遺伝子、HLA-A\*24:02及びB\*52:01をターゲットとするPre-both3 pre-crRNA (図5-1) を複数回トランスフェクションし、回収したゲノムサンプルをddPCRによって解析した。crRNA(B2M#1)を用いた実験はコントロール実験である (左図)。

[図21]ddPCRによるエクソン2欠損効率の測定結果を示す (ダブルcrRNA)。図20に示す方法において、HLA-A\*24:02標的pre-both3 pre-crRNAとHLA-B\*52:01標的pre-both3 pre-crRNAの2種類を加えた。

[図22]一本鎖アニーリング (SSA) レポーターベクターの模式図を示す。Casが活性化した細胞では、該Casによる挿入配列の切断後に、SSAを介したDNA修復が生じ、その結果タンパク質活性を持ったレポーター遺伝子が発現する。

[図23]挿入配列の長さによるSSAレポーター活性の比較結果を示す。DOX添加によってCas3、Cascadeタンパク質群を発現誘導できるHEK293T細胞において、DOX添加を行うとともに、非標的crRNA (AAVS1#1)もしくは標的crRNA (DMPK DownSNP1T)と、標的となるDMPKの遺伝子配列 (DMPK DownSNP1T)を含んだmRFP-SSAベクター (SSAによりmRFPが発現する)を導入し、3日後にフローサイトメトリーによりmRFP陽性細胞の割合を測定した。標的配列を含むSSA挿入配列は約0.5、1、2 kbの長さを比較した。

[図24]Puro-SSAレポーターベクターによる、遺伝子欠損細胞の6倍程度の濃縮を示す。HEK293T細胞を用いて、Cas3及びCascadeタンパク質発現ベクターとしてpPV-Dual\_Promoter-EF1a-2xNLS-Cascade+Cas3(RD)-iCA (All-in-one-mCherry)を、crRNAとしてpPV-C1-crRNA(B2M#4)-EF1a-BAを、SSAレポーターベクターとしてpHL-EF1a-EGFP-IRES-Puro-SSA(B2M-1kb)-Aを用いた。2  $\mu$ g/mlのピューロマイシンをトランスフェクション後3日目～5日目に添加し (+Puroサンプル)、HLA-A2染色によってゲノム編集によるB2M欠失効率を測定した。-Puroサンプルはピューロマイシン処理をしていないものである。図中の「ug」は「 $\mu$ g」を意味する。以下同様である。

[図25]Puro-SSAレポーターベクターの特異性の確認結果を示す。HEK293T細胞にCas3及びCascadeタンパク質発現ベクターとしてAll-in-one-mCherry、crRNA発現ベクターとしてpPV-C1-crRNA(AAVS1#1)-EF1a-BA (コントロールcrRNA)もしくはpPV-C1-crRNA(B2M#1)-EF1a-BA、Puro-SSAレポーターベクターとしてpHL-EF1a-Puro-SSA(B2M-1kb)-Aをトランスフェクションし、2  $\mu$ g/mlのピューロマイシンをトランスフェクション後2日目～4日目に添加した。トランスフェクション6日後の写真と細胞数を測定したところ、Cas3の配列特異的な活性によってピューロマイシン耐性を獲得できることが示された。

[図26]Puro-SSAレポーターベクターにより、B2M欠損細胞を10倍程度濃縮できたことを示す。図25における細胞において、HLA染色によってB2M欠損が起きた割合を測定した。

[図27]2色SSAレポーター (SSA-EGFPおよびSSA-mRFP) 及びダブルニッキング

SSAレポーターベクターの模式図を示す。挿入配列として、長い配列（「長鎖配列」とも称する。）を用いたもの（左）と、ダブルニッキング挿入配列を用いたもの（右）を作製した。

[図28] 2色SSAレポーターベクター（SSA-EGFPおよびSSA-mRFP）の挿入配列の検討結果を示す。HEK293T細胞において、Cas3発現ベクター（All-in-one-Puro）とcrRNA発現ベクター（標的crRNAとしてDMDex45及び55、非標的crRNAとしてB2M#1を使用）をLipofectamine 2000を用いてリポフェクションにより遺伝子導入した。SSAレポーターベクターとして、SSAによりEGFPを発現するSSA-EGFPと、SSAによりmRFPを発現するSSA-mRFPを用いた。いずれの蛍光レポーターおよび標的配列を用いた場合でも、適切なcrRNAと共導入した場合には、高いオンターゲットシグナルであるEGFPおよびmRFPの蛍光が観察された。（means±SD、n=3、\*:p < 0.05）。

[図29] 2色SSAレポーターベクター（SSA-EGFPおよびSSA-mRFP）によるゲノム編集細胞の濃縮を示す。HEK293T細胞（左）およびDMD患者由来のiPS細胞（FF12020：右）いずれを用いた場合でも、ゲノム編集細胞を濃縮することが可能であった。HEK293T細胞においては、Cas3ベクター（All-in-one-Puro）とcrRNAベクター（DMDex45&55）、またはCas9ベクター（Cas9-Puro）とcrRNAベクター、およびSSAレポーターベクター（SSA-EGFPおよびSSA-mRFP）をLipofectamine 2000を用いてリポフェクションにより遺伝子導入した。DMD患者由来iPS細胞においては、Cas3ベクター（All-in-one-Puro）とcrRNAベクター（DMDex45&55）、およびSSAレポーターベクター（SSA-EGFPおよびSSA-mRFP）をLipofectamine Stemを用いてリポフェクションにより遺伝子導入した（means±SD、n=3、\*:p < 0.05）。EGFP、mRFP両陽性細胞をセルソーティングし、得られた細胞ゲノムについてDMD Ex45、Int51、Ex55の位置でddPCRを行った。

[図30] 2色SSAレポーターベクター（SSA-EGFPおよびSSA-mRFP）の細胞濃縮によって得られたDMD患者由来iPS細胞サブクローンのDNAをシーケンシングした結果を示す。DMD患者由来iPS細胞（FF12020：エクソン46, 47欠失、CiRA00458：エクソン51-53欠失、CiRA00646：エクソン48-52欠失）はLipofectamine St

emを用いたトランスフェクションの24時間後にPuromycinによって2日間薬剤選択され、その後セルソーターを用いてEGFP/mRFPダブルポジティブ細胞をソートし、サブクローンを取得した。ジェノタイピングはジストロフィン遺伝子エクソン45-55領域をPCRし、サンガーシーケンスにより欠失の有無を確認した。結果、エクソン45-55領域を削除されたiPS細胞のサブクローンが得られた。左図中の塩基配列を、上から順に配列番号175～177で示し、右図中の塩基配列を、上から順に配列番号178～180で示す。

[図31]従来の短い挿入配列を有するSSAレポーターベクターとのS/N比の比較結果を示す。HEK293T細胞において、Cas3ベクター(All-in-one-Puro)とcrRNAベクター(標的crRNAとしてDMDex45&55非標的crRNAとしてB2M#1)、SSAレポーターベクターとして、SSA-EGFPとSSA-mRFPをLipofectamine 2000を用いてリポフェクションにより遺伝子導入し、フローサイトメトリーによりEGFP及びmRFP陽性細胞の割合を測定した。SSA挿入配列の長さは0 kb(標的配列のみ)、0.5 kb、1.0 kb、1.7 kbである。

[図32]さまざまなDM1患者由来iPS細胞におけるCTGリピート周辺のヘテロSNPのリストを示す。下線配列が標的とする疾患アレルの配列である。ND: 未解析。

[図33]アレル特異的crRNAの設計方法の模式図を示す。標的配列の内、Xで示したものがcrRNAにより認識可能な配列である。

[図34]アレル特異的crRNA(DMPK CTGリピート上流: DM1\_DownSNP1C)の設計結果を示す。図中、塩基配列を上から順に配列番号181～184で示す。SNPが12塩基目にあるcrRNA(DM1\_DownSNP1C\_12nt)はアレル特異性を示さないコントロールcrRNA。

[図35]アレル特異的crRNA(DM1\_DownSNP1C/T及びDM1\_DownSNP1C\_12nt)の活性評価結果を示す。rs934739524のヘテロSNP(C/T)を持つDM1患者由来iPS細胞HPS1051においてCas3及びCascadeタンパク質群を発現するpPV-Dual\_Promoter-EF1a-2xNLS-Cascade+Cas3(RD)-iPAベクターとそれぞれのpre-crRNAを発現するpPV-C1-crRNA-EF11-G2ABAベクターをゲノムに組み込んだ(stable株)

。これらの細胞サンプルのゲノムをSNP特異的（アレル特異的）PCRで増幅し、TapeStationにより解析した。crRNA(DownSNP1C)を用い、疾患アレルを標的とした場合のヒストグラムを例として示す（右図）。

[図36]アレル特異的crRNA（DMPK CTGリピート下流）を用いることで、疾患アレルでのみCTGリピートが削除されたサブクローン取得できたことを示す。図35で作製した細胞群をシングルセルクローニングし、ジェノタイピングを行った。結果、疾患アレル（DownSNP1C）のみでCTGリピート領域が欠損されているサブクローン#9、#19、#20、#33、#84を取得した。

[図37]アレル特異的crRNA（DMPK CTGリピート上流）の設計結果を示す。図中、塩基配列を上から順に配列番号185～188（rs915915：UpSNP3）および配列番号189～193（rs635299：UpSNP1）で示す。

[図38]アレル特異的crRNA（DMPK CTGリピート上流）の活性評価結果の概要を示す。rs915915（UpSNP3T/G）及びrs635299（UpSNP1T/G）のヘテロSNPを持つDM1患者由来iPS細胞CiRA00213において図37に示したDMPK CTGリピートを標的とするpre-crRNAを発現するpPV-C1-crRNA-EF1a-BAベクターとDOXによってCas3及びCascadeタンパク質群の発現を誘導できるpPV-TRE3G-Bi(263+751)-EF1a-Tet3G-iPAベクターがゲノムDNAに組み込まれたCiRA00213 iPS細胞（Stable株）を作製し、ゲノム編集後のゲノムサンプルをアレル特異的なNested PCR及びサンガーシーケンスによって解析した。

[図39]crRNA(UpSNP1T-2)を用いた結果の詳細（プラスミドベースのゲノム編集）。アレル特異的Nested PCRで得られたバンドをサンガーシーケンスにより解析した。参照配列（上段）とゲノム編集が起きたサンプルの配列（下段）のアラインメントを行った結果、伸長したCTGリピート及び約2.2 kbのその他の配列が欠損されていることが分かった。この時、UpSNP1(rs635299)の配列が「T」であることから、これは疾患アレルにおいてゲノム編集が生じたことを示す。

[図40]crRNA(UpSNP1T)を用いた結果の詳細。プラスミドベースのゲノム編集を行い、アレル特異的Nested PCRで得られたバンドをサンガーシーケンスに

より解析した。

[図41]crRNA(UpSNP3T)を用いた結果の詳細。プラスミドベースのゲノム編集を行い、アレル特異的Nested PCRで得られたバンドをサンガーシーケンスにより解析した。

[図42]crRNA(UpSNP1T)を用いた結果の詳細。RNAベースのCas3ゲノム編集を行い、アレル特異的Nested PCRで得られたバンドをサンガーシーケンスにより解析した。

[図43]crRNA(UpSNP3T)を用いた結果の詳細。RNAベースのCas3ゲノム編集を行い、約10細胞/ウェルとなるように細胞を分離し、それらサンプルからアレル特異的PCRで得られたバンドをサンガーシーケンスにより解析した（UpSNP3T ウェル#62）。

[図44]アレル特異的dual-Cas3によるCTGリピート除去の結果を示す（例1）。RNAベースのCas3ゲノム編集を行い、アレル特異的Nested PCRで得られたバンドをサンガーシーケンスにより解析した。

[図45]アレル特異的dual-Cas3によるCTGリピート除去の結果を示す（例2）。RNAベースのCas3ゲノム編集を行い、アレル特異的Nested PCRで得られたバンドをサンガーシーケンスにより解析した。

[図46]アレル特異的dual-Cas3によるCTGリピート除去の結果を示す（例2）。プラスミドベースのCas3ゲノム編集を行い、アレル特異的Nested PCRで得られたバンドをサンガーシーケンスにより解析した。

[図47]アレル特異的dual-Cas3によるCTGリピート除去の結果を示す（例3）。RNAベースのCas3ゲノム編集を行い、約10細胞/ウェルとなるように細胞を分離し、それらサンプルからアレル特異的PCRで得られたバンドをサンガーシーケンスにより解析した（UpSNP3T x AGG DownSNP2Cウェル#57）。

[図48]2色SSAレポーターベクターを用いたアレル特異性の評価方法の模式図（左）および解析結果（右）を示す。DOXによってCas3、Cascadeタンパク質群が発現できるHEK293T Stable細胞において1  $\mu$ M DOXの添加を行い、crRNA発現ベクターpPV-C1-crRNA-EF1a-BA（非標的：DMD#20、標的：DownSNP1-C/T

）、mRFP SSAベクター（pPV-EF1a-mRxxFP-iPA）及びEGFP SSAベクター（pPV-EF1a-EGxxFP-iPA）をLipofectamine 2000を用いて同時にトランスフェクションし、3日後にフローサイトメトリーによりmRFP及びEGFP陽性細胞の割合を測定した。SSAベクターの挿入配列にはDownSNP1-T/C（rs934739524ヘテロSNP）を含む配列を用いた。

[図49]アレル特異的crRNAの特異性向上方法の模式図を示す。

[図50]crRNA長さによる特異性を調節できることを示す。DOXによってCas3、Cascadeタンパク質群が発現できるHEK293T Stable細胞において、1  $\mu$ M DOXの添加を行い、crRNA発現ベクターpPV-C1-crRNA-EF1a-BA（非標的：AAVS1#1、標的：DownSNP1-C）、mRFP SSAベクター（pPV-EF1a-mRxxFP-iPA）及びEGFP SSAベクター（pPV-EF1a-EGxxFP-iPA）をLipofectamine 2000を用いて同時にトランスフェクションし、3日後にフローサイトメトリーによりmRFP及びEGFP陽性細胞の割合を測定した。mRFP SSAベクターにはDownSNP1-T（rs934739524ヘテロSNP-T）、EGFP SSAベクターにはDownSNP1-Cを含む挿入配列を用いた。crRNA(DownSNP1-C 32nt)は通常のcrRNA(DownSNP1-C)と同配列。

[図51]意図的なミスマッチの導入により特異性を調節できることを示す。実験条件は図50と同じ。crRNA(DownSNP1-C 0MM)は通常のcrRNA(DownSNP1-C)と同配列。図50と同バッチでの測定のため、crRNA(AAVS1#1)、crRNA(DownSNP1-C 0MM)のデータは図50を引用した。

[図52]タンパク質構造を元にした、E. coli Cas3 プレcrRNAにおけるRNA修飾位置の追加検討結果の模式図を示す。#を付したヌクレオチドは、2' -O-methyl (M)修飾を有し、+を付したヌクレオチドは、3' phosphorothioate (PS)修飾を有し、\*を付したヌクレオチドは、2' -O-methyl 3' phosphorothioate (MS)修飾を有する。矢印は、Cas6による切断部位を示す。

[図53]E. coli Cas3 プレcrRNAにおける、図52で示したRNA修飾位置による活性の変化を示す。I14s04 iPS細胞において、Cas3及びCascadeタンパク質を発現するmRNA、B2M#1 crRNA（それぞれ図52に対応する化学修飾を有する）をトランスフェクションし、B2M遺伝子のKO効率をHLA-A、B、Cの染色によっ

て測定した。「Both edges3」は、Pre-both3と同じ修飾を有するプレcrRNAである。以下同様。

[図54]E. coli Cas3 プレcrRNAにおける、図52で示したRNA修飾位置による活性の変化を示す。I14s04 iPS細胞において、Cas3及びCascadeタンパク質を発現するmRNA、B2M#1 crRNA（それぞれ図52に対応する化学修飾を有する）をトランスフェクションし、B2M遺伝子のK0効率をddPCRによって測定した。

[図55]タンパク質構造を元にした、E. coli Cas3 プレcrRNAにおけるRNA修飾位置の追加検討結果の模式図を示す。#を付したヌクレオチドは、2' -O-methyl (M)修飾を有し、+を付したヌクレオチドは、3' phosphorothioate (PS)修飾を有し、\*を付したヌクレオチドは、2' -O-methyl 3' phosphorothioate (MS)修飾を有する。矢印は、Cas6による切断部位を示す。

[図56]E. coli Cas3 プレcrRNAにおける、図52で示したRNA修飾位置による活性の変化を示す。I14s04 iPS細胞において、Cas3及びCascadeタンパク質を発現するmRNA、B2M#1 crRNA（それぞれ図52に対応する化学修飾を有する）をトランスフェクションし、B2M遺伝子のK0効率をHLA-A、B、Cの染色によって測定した。

[図57]I14s04 iPS細胞において、Lipofectamine Stemを用いてCas3及びCascadeタンパク質群を発現するmRNAとHLA-A\*24:02及びB\*52:01をターゲットとするPre-both3 pre-crRNA（図5-1）を複数回トランスフェクションし、回収したゲノムサンプルをddPCRによって解析した。「Dual A24 F1 & B52 R5」は、両末端3塩基をMS修飾したタンデムpre-crRNAを示す。

[図58]タンデムpre-crRNAの化学修飾例の模式図を示す。Cas3 pre-crRNAはCas6によるプロセッシングを受けるため、図に示すようにタンデムに標的認識配列を2個以上繋げることができる。この場合も両末端3塩基などの修飾を施すことが可能である。

[図59]1383D4 iPS細胞におけるPuro-SSAベクターの効果の評価結果を示す。1.5x10<sup>5</sup>の細胞を12-well plateに撒き、Cas3及びCascadeタンパク質を発現するmRNA、B2M#1 crRNA（両末端3塩基MS修飾）、Puro-SSAレポーターベクターと

してpHL-EF1a-Puro-SSA(B2M#1)-AまたはpHL-EF1a-Puro-SSA(B2M#1)-2A-EGFP-Aをトランスフェクションした。Puroによる選択はトランスフェクション後2日目～3日目に0.3または0.5  $\mu\text{g/ml}$ の濃度にて行い、細胞のリカバリー後にHLA-A、B、C染色によりHLA-A、B、C陰性細胞の割合を測定した。代表的なフローサイトメトリーの結果と定量グラフ (n=2) を示す。結果として2～4倍程度、B2Mノックアウト細胞を濃縮することができた。

## 発明を実施するための形態

### [0017] 1. 修飾ヌクレオチドを有するプレcrRNA

本発明は、修飾ヌクレオチドを有するタイプI CRISPR-CasシステムのプレcrRNA (pre-crRNA) を提供する。具体的には、第1リピート配列の5' アーム領域、第1リピート配列のステム形成領域の5' 側領域（以下、「5' 側ステム形成領域」とも称することがある。）および第1リピート配列のループ形成領域からなる領域において、少なくとも1個(例：2、3、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個またはそれ以上)のヌクレオチドが修飾ヌクレオチドである、プレcrRNA（以下、「本発明の修飾型crRNA」と称することがある。）を提供する。

[0018] また、下述の実施例で示されるとおり、プレcrRNAを、mRNAが生体内の修飾様式と同様に、5' 末端にキャップまたはキャップアナログを付加し、また3' 末端にポリA配列を付加することで、ゲノム編集効率を向上させることができることが示された。よって、本発明の別の態様において、5' キャップおよびポリAを有する、タイプIのCRISPR-CasシステムのプレcrRNA（以下、「本発明の5' キャップ型crRNA」と称することがある。）が提供される。以下では、「本発明の修飾型crRNA」および「本発明の5' キャップ型crRNA」を総称して、「本発明のcrRNA」という用語を用いることがある。

[0019] タイプI CRISPR-Casシステムには、A～Fまでの6つのタイプが知られており、アーム領域およびステムループ形成領域を有するものであれば、いずれのタイプのシステムにおいても、本発明のcrRNAとして使用することができる。中でも、タイプI-E(特に、大腸菌由来のタイプI-E)またはタイプI-D(特に、

*Microcystis aeruginosa*由来のタイプI-D)のプレcrRNAが好ましい。CRISPRの近傍には、Cas1、Cas2、Cascade複合体を構成するタンパク質などのCas(CRISPR-associated)タンパク質をコードするcasオペロンが存在する。タイプI-A～I-Fのcasオペロン中、ヌクレアーゼ／ヘリカーゼであるCas3（ただし、タイプI-DのCas3はこれらの活性を有さず、Cas10dがヌクレアーゼ／ヘリカーゼとして機能する）ならびに免疫獲得の際の外来遺伝子切断に関与するCas1、Cas2およびCas4を除くタンパク質群が、Cascade複合体を構成する。Cascade複合体にCas3（またはCas3とCas10dとの複合体）が加わって、タイプII CRISPR-CasシステムにおけるCas9またはCas12aと同様のDNA認識・切断機能を発揮している。

[0020] タイプI-A、I-B及びI-Dは古細菌、タイプI-C、I-E及びI-Fは真正細菌に相対的に多く分布しており、タイプI-Aは*S. solfataricus*、*T. tenax*等、タイプI-Bは*Haloferax volcanii*等、タイプI-Cは*B. halodurans*等、タイプI-Dは*M. aeruginosa*等、タイプI-Eは大腸菌等、タイプI-Fは*P. aeruginosa*、大腸菌、*P. atropeteticum*等で解析がなされている。タイプI-Eでは、1分子のcrRNAに対して、Cse1(別名：CasA、Cas8e)、Cse2(別名：CasB、Cas11)、Cas7(別名：CasC、Cas4)、Cas5(別名：CasD)及びCas6(別名：CasE)がそれぞれ1:2:6:1:1分子でCascade複合体を形成する。タイプI-Dでは、1分子のcrRNAに対して、Cas7、Cas5(Csc1)及びCas6がそれぞれ6:1:1分子でCascade複合体を形成する。タイプI-DのCRISPR-Casシステムでは、プロトスペーサー隣接モチーフ(protospacer adjacent motif; PAM)配列としてGTA、GTC、GTTなどを用いることができ、タイプI-EのCRISPR-Casシステムでは、ATG、AAG、AGG、GAG、TAG、AAAなどを用いることができる。また、タイプI-AのCRISPR-CasシステムではTCN(NはA、T、GまたはC)などを、タイプI-BのCRISPR-Casシステムでは、TTC、ACT、TAA、TAT、TAG、CACなどを、タイプI-CのCRISPR-CasシステムではNTTC(NはA、T、GまたはC)を、タイプI-FのCRISPR-CasシステムではCなどを用いることができる。本明細書において、特に断らない限り、塩基配列は5'から3'の方向に表記するものとする。

[0021] タイプI-AのCRISPR-Casシステムでは、Cascade複合体として、Cas8a1、Csa5 (Cas11)、Cas5、Cas6、及びCas7を構成要素とし、タイプI-BのCRISPR-Casシステムでは、Cascade複合体としてCas8b1、Cas5、Cas6、およびCas7を構成要素とし、タイプI-CのCRISPR-Casシステムでは、Cascade複合体としてCas8c、Cas5、およびCas7を構成要素とし、タイプI-FのCRISPR-Casシステムでは、Cascade複合体としてCsy1 (Cas8f)、Csy2 (Cas5)、Cas6、およびCsy3 (Cas7) を構成要素とし、タイプI-GのCRISPR-Casシステムでは、Cascade複合体としてCst1 (Cas8a1)、Cas5、Cas6、およびCst2 (Cas7) を構成要素とする。以下では、Cas3、Cas10dおよびCascadeタンパク質群を、「Casタンパク質」と総称することがある。

[0022] タイプIのCRISPR-Casシステムでは、図3-1に示されるようなリピート配列と標的認識領域（スペーサー領域）の繰り返しからなる構造を有するプレcrRNA（スペーサー配列が複数の場合、リピート、スペーサー1、リピート、スペーサー2、リピート、（以下繰り返し）となる）がCas6（タイプI-A、B、D～Eの場合）またはCas5（タイプI-Cの場合）により切断され、成熟crRNAとなる。本明細書において、「プレcrRNA」とは、少なくとも、リピート、スペーサー1、リピートを有し、細胞内でCas6またはCas5によって切断されて機能的なcrRNAとなるRNAを意味する。図3-1は、リピート、スペーサー1およびリピートからなる、大腸菌のタイプI-EのプレcrRNAを示す。その他の種類のプレcrRNAのリピート構造を、図3-2に例示する（出典：Zheng Y. et al., Front Bioeng Biotechnol. 2020 Mar 4;8:62）。標的認識領域の配列（以下、「スペーサー配列」と称することがある。）は、本来は、自然界のアダプテーションの過程において取り込まれた、外来DNA由来の配列であるが、該配列を標的DNAの配列に基づき設計することができる。スペーサー領域が1つの場合のプレcrRNAは、典型的には、第1リピート配列の5' アーム領域（図3-1の1～5番目のヌクレオチドGUGUUからなる領域に相当する）、第1リピート配列のステムループ形成領域（図3-1の6～21番目のヌクレオチドCCCCGCGCCAGCGGGG（配列番号1）からなる領域に相当する）、第1リ

ピート配列の3' アーム領域（図3-1の22～29番目のヌクレオチドAUAAACCGからなる領域に相当する）、スペーサー領域（図3-1の30～61番目のヌクレオチドXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXからなる領域に相当する）、第2リピート配列の5' アーム領域（図3-1の62～66番目のヌクレオチドGUGUUからなる領域に相当する）、第2リピート配列のステムループ形成領域（図3-1の67～82番目のヌクレオチドCCCCGCGCCAGCGGGGからなる領域に相当する）、第2リピート配列の3' アーム領域（図3-1の83～90番目のヌクレオチドAUAAACCGからなる領域に相当する）を含む。また、スペーサー領域が2つの場合のプレcrRNAの一例を図58に示す。図58では、第1リピート配列の5' アーム領域、第1リピート配列のステムループ形成領域、第1リピート配列の3' アーム領域、第1スペーサー領域（標的配列1）、第2リピート配列の5' アーム領域、第2リピート配列のステムループ形成領域、第2リピート配列の3' アーム領域に加え、第2スペーサー領域（標的配列2）、第3リピート配列の5' アーム領域、第3リピート配列のステムループ形成領域および第3リピート配列の3' アーム領域を含むプレcrRNAが示されている。このように複数のスペーサー領域を有するプレcrRNAを用いる場合には、スペーサー領域の配列をそれぞれ異なるものとするにより、1つのプレcrRNAにより、複数の領域の改変が可能となる。

[0023] タイプIのCascade複合体は、crRNAと複合体（以下、「Cascade-crRNA複合体」と称することがある。）を形成する。続いて、Cascade-crRNA複合体は、PAM配列及び標的配列を含む二本鎖DNAを部分的にほどき、Rループと呼ばれる構造を形成して結合する。この時、Cascade-crRNA複合体自身も構造変化を起こし、Cas3タンパク質（タイプI-Dの場合はCas3とCas10dの複合体）と結合する。Cas3タンパク質（タイプI-Dの場合はCas10d）は、DNAニッカーゼ活性及びDNAヘリカーゼ活性を有しており、非標的鎖（crRNAの標的認識領域が相補結合（ハイブリダイズ）していない鎖）にニックを導入する。タイプIのCRISPR-Cas3システムにおいて、PAMは非標的鎖上に存在しており、典型的には、非標的鎖のPAM配列の上流（5'側）部位にニックが導入され、その後ヘリカ

一ぜによる巻き取り反応により、PAM配列の上流側に欠損が生じる。よって、本明細書において、特に断らない限り、「標的配列」とは、プレcrRNA、crRNAまたはガイドRNAが標的とする配列であり、プロトスペーサー配列とも呼ばれ、PAMの存在している非標的鎖上の該PAMの3'側に隣接している配列を意味する。標的配列は、crRNAに存在する標的配列認識領域の配列（「スペーサー配列」と称することがある。）と相同な配列（ただし、RNAの配列におけるUは、DNAの配列ではTと読み替えるものとする。）となる。

[0024] タイプIのCRISPR-Casシステムでは、6塩基毎にcrRNAが標的配列上の塩基を認識せず配列特異性に寄与しない塩基が存在する。crRNAの標的配列認識に寄与しない部位の塩基をX、標的配列認識に寄与する塩基をN（A、T、GまたはC）とすると、例えば、5'-NNNNNXNNNNNXNNNNNXNNNNNXNNNNXNN-3'を標的配列とすることができる。crRNAのスペーサー配列と標的配列とは、配列が100%一致していなくても結合してCas3またはCas10dを介した標的DNA切断は起こり得るため、上記Nで表される塩基配列部分において、少なくとも1個（例：2個、3個、4個、5個またはそれ以上）の塩基が置換、欠失、付加および／または挿入された配列をスペーサー配列として有するcrRNAも本発明に用いることができる。このように、対象の配列（例えば、標的配列等）に対して完全に同一な配列だけでなく、少なくとも1個（例：2個、3個、4個、5個またはそれ以上）の塩基が置換、欠失、付加および／または挿入されている配列も、「相同な配列」に含まれるものとする。

[0025] 標的配列は、目的に応じて適宜選択することができる。具体的な標的配列としては、例えば、 $\beta$ 2-ミクログロブリン（B2M）遺伝子およびその制御領域の配列（例えば、配列番号4または5で示される配列）、Human Leukocyte Antigen（HLA）遺伝子およびその制御領域の配列（例えば、配列番号6～38のいずれかで示される配列）、ジストロフィン（DMD）遺伝子およびその制御領域の配列（例えば、配列番号55～68のいずれかで示される配列）、DMPK遺伝子およびその制御領域の配列（例えば、配列番号39～53のいずれかで示される配列）、AAVS1（Adeno-associated virus integration site 1

）領域の配列（例えば、配列番号 54 で示される配列）、リピート配列およびその近傍の配列などが挙げられる。HLA 遺伝子とは、例えば、HLA-A 遺伝子、HLA-B 遺伝子、HLA-C 遺伝子、HLA-E 遺伝子、HLA-F 遺伝子、HLA-G 遺伝子、HLA-DRA 遺伝子、HLA-DRB 遺伝子、HLA-DPA 遺伝子、HLA-DPB 遺伝子、HLA-DQA 遺伝子、HLA-DQB 遺伝子などが挙げられる。それぞれの HLA 遺伝子は配列多様性を持つことが知られており、例えば HLA-A 遺伝子には、そのアミノ酸配列や塩基配列の違いから、HLA-A\*02 や HLA-A\*27 等の多数の HLA 型が存在する。リピート配列とは、例えば“CTG”の 3 塩基が繰り返した配列、“CGG”の 3 塩基が繰り返した配列、“CAG”の 3 塩基が繰り返した配列、“GAA”の 3 塩基が繰り返した配列、“CCTG”の 4 塩基が繰り返した配列、“TTTCA”の 5 塩基が繰り返した配列、などが挙げられる。

[0026] 本発明の別の態様において、配列番号 4～68 のいずれかで示される配列を標的とするプレcrRNAも提供される。これらのプレcrRNAは、標的遺伝子や標的エクソンが同じ複数のプレcrRNAを組み合わせることもできる。また、これらのプレcrRNAは、野生型プレcrRNAであってもよく、野生型以外のプレcrRNAであってもよい。これらのプレcrRNAは、キットや剤（例：治療剤、試剤等）の形態で提供されてもよい。

[0027] 修飾ヌクレオチドを導入する前のプレcrRNAは、野生型プレcrRNAであってもよく、標的配列の認識能力およびCascadeをリクルートする能力が維持される限り、第 1 リピート配列の 5' アーム領域、第 1 リピート配列のステムループ形成領域、第 1 リピート配列の 3' アーム領域（成熟crRNAの 5' ハンドルに相当する領域）、スペーサー領域、第 2 リピート配列の 5' アーム領域、第 2 リピート配列のステムループ形成領域および第 2 リピート配列の 3' アーム領域の少なくともいずれかの領域（例えば、第 1 リピート配列の 5' アーム領域および／または第 2 リピート配列の 3' アーム領域）において、野生型プレcrRNAと比較して、少なくとも 1 個（例：2 個、3 個、4 個、5 個またはそれ以上）の塩基が置換、欠失、付加および／または挿入されていてもよく、このようなプレcrRNAを本明細書では「変異型プレcrRNA」とも称することがある。ス

ペーサー領域を2つ以上有する場合にも、上記以外の領域（例えば、第2スペーサー領域（標的配列2）、第3リピート配列の5'アーム領域、第3リピート配列のステムループ形成領域および第3リピート配列の3'アーム領域など）の少なくともいずれかにおいて、野生型プレcrRNAと比較して、少なくとも1個（例：2個、3個、4個、5個またはそれ以上）の塩基が置換、欠失、付加および／または挿入されていてもよい。かかるプレcrRNAも、「変異型プレcrRNA」に包含される。各ステムループ形成領域におけるステム形成領域に塩基の付加や欠失等が行われる場合には、ステム構造が維持されるように（典型的には、相補結合する2塩基単位で）、塩基の付加や欠失等が行われることが好ましい。

[0028] タイプ1のCRISPR-Casシステムのスペーサー配列および標的配列の長さは、特に限定されないが、例えば30～45ヌクレオチドが挙げられ、タイプI-C、I-E及びI-Fの場合は、好ましくは32～33ヌクレオチド、タイプI-A、I-BおよびI-Dの場合は、好ましくは34～44ヌクレオチドである。

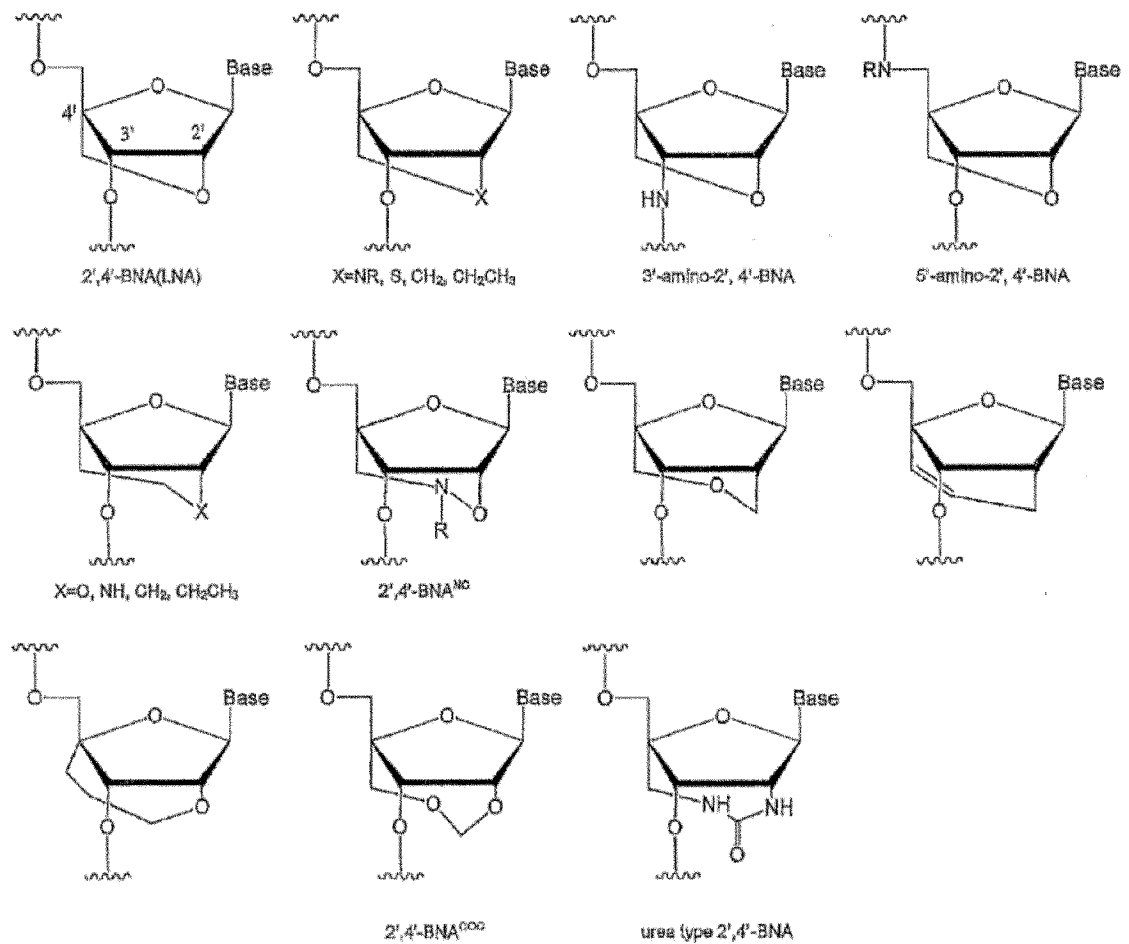
[0029] 本明細書において、「修飾ヌクレオチド」とは、リボヌクレオチドの構成要素の少なくとも1つが修飾されている、リボヌクレオチド以外のヌクレオチドを意味する。ヌクレオチドの構成要素として、糖部（例：リボース）、塩基及びリン酸基を含み、修飾ヌクレオチドは、糖部、塩基およびリン酸基の少なくとも1箇所（特に、糖部）に修飾を有する。また、糖部および塩基の少なくとも1箇所に修飾を有するヌクレオシドを「修飾ヌクレオチド」とも称し、本明細書において、「修飾ヌクレオチド」を適宜「修飾ヌクレオシド」と読み替えることもできる。また、「修飾」には、例えば、該構成要素及び／又はヌクレオシド間結合における置換、付加及び／又は欠失、前記構成要素及び／又はヌクレオシド間結合における原子及び／又は官能基の置換、付加及び／又は欠失が挙げられる。本明細書において、修飾ヌクレオチドには、天然ヌクレオチドであるデオキシリボヌクレオチドも含まれるものとする。本発明の修飾型crRNAに含まれる修飾ヌクレオチドは、1種のみであってもよく、複数種類であってもよい。

[0030] 天然塩基として、アデニン、シトシン、グアニン、チミン及びウラシルが挙げられる。また、該塩基に修飾が施された修飾塩基として、例えば、5-メチルシトシン、5-フルオロシトシン、5-ブロモシトシン、5-ヨードシトシン又はN4-メチルシトシン； N6-メチルアデニン又は8-ブロモアデニン； ならびにN2-メチルグアニン又は8-ブロモグアニンが挙げられるが、これらに限定されない。

[0031] 糖部の修飾としては、例えば、糖部の2' -O-メトキシエチル修飾、糖部の2' -O-メチル修飾、糖部の2' フルオロ修飾、糖部の2' 位と4' 位との架橋（該架橋構造を有するヌクレオチドが、BNAである）などが挙げられる。中でも、糖部の2' -O-メチル修飾が好ましく、この場合において、本発明の修飾型c rRNAに含まれるヌクレオチドは、一部（例えば、1個、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個またはそれ以上）が2' -O-メチル修飾を有するヌクレオチド（即ち、2' -O-メチルリボヌクレオチド）であってもよく、全てが2' -O-メチルリボヌクレオチドであってもよい。BNAとしては、例えば、ロックト人工核酸（LNA：Locked Nucleic Acid）、2' -O, 4' -C-エチレン架橋核酸（ENA：2' -O, 4' -C-Ethylenebridged Nucleic Acid）などが挙げられる。BNAとして、より具体的には、下記ヌクレオシド構造を有するものが挙げられる。

[0032]

## [化1]



[0033] (式中、Rは、水素原子、分岐または環を形成していてもよい炭素数1から7のアルキル基、分岐または環を形成していてもよい炭素数2から7のアルケニル基、ヘテロ原子を含んでもよい炭素数3から12のアリール基、ヘテロ原子を含んでもよい炭素数3から12のアリール部分を有するアラルキル基、または核酸合成のアミノ基の保護基を表す。好ましくは、Rは、水素原子、メチル基、エチル基、n-プロピル基、イソプロピル基、フェニル基、またはベンジル基であり、より好ましくは、Rは、水素原子またはメチル基である。Baseは、天然塩基又は修飾塩基である。)

[0034] 本発明の修飾型crRNAは、存在する一部（例えば、1個、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個またはそれ以上）または全部のヌクレオシド間結合がホスホジエステル結合以外の結合であってもよい。ホスホジエステル結合以外の結合（以下、「修飾ヌクレオシド間結合」と称することがある

。)としては、例えば、ホスホロチオエート結合、ホスホロジチオエート結合、ホスホトリエステル結合、メチルホスホネート結合、メチルチオホスホネート結合、ボラノホスフェート結合、ホスホロアミデート結合などが挙げられるが、これらに限定されない。一態様において、糖部に修飾（例えば、2'-O-メチル修飾）を有する一部（例えば、1個、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個またはそれ以上）または全てのヌクレオシドの3'側および／または5'側のヌクレオシド間結合（好ましくは、3'側のヌクレオシド間結合）が修飾ヌクレオシド間結合（好ましくは、ホスホロチオエート結合）であることが好ましい。本発明の好適な実施態様において、全ての修飾ヌクレオシドの3'側のホスホジエステル結合がホスホロチオエート結合であるプレcrRNAが提供される。本発明の修飾型crRNAに含まれる修飾ヌクレオシド間結合は、1種のみであってもよく、複数種類であってもよい。

[0035] 本発明の修飾型crRNAの一態様において、修飾ヌクレオチドの少なくとも1個（例：2個、3個、4個、5個またはそれ以上）は、第1リピート配列の5'アーム領域に存在することが好ましく、該5'アーム領域の全てのヌクレオチドが修飾ヌクレオチドであってもよい。この場合において、第2リピート配列の3'アーム領域の少なくとも1個（例：2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個またはそれ以上）のヌクレオチドが修飾ヌクレオチドであり得る。好ましい態様において、本発明の修飾型crRNAは、5'末端から1番目のヌクレオチドが修飾ヌクレオチドであり、かつ3'末端から2番目のヌクレオチドも修飾ヌクレオチドである。中でも、5'末端から1番目～3番目のヌクレオチド（図3-1のGUGに相当する。）が全て修飾ヌクレオチドであり、かつ3'末端から2番目～4番目のヌクレオチド（図3-1のACCに相当する。）が全て修飾ヌクレオチドであるプレcrRNAがより好ましい。また、第1リピート配列および第2リピート配列の各ループ形成領域において、少なくとも1個（例：2個、3個、4個またはそれ以上）、または全てのヌクレオチドが修飾ヌクレオチドであってもよい。本明細書において、5'末端からM番目(Mは正の整数)のヌクレオチドとは、図3-1において5'末端に位置するヌクレオチドを1番目として

、3' 末端方向にM番目のヌクレオチドを意味する。また、プレcrRNAの5' 側にはリーダー配列を付与する場合があるが、その場合には、該リーダー配列を除いた配列に基づき位置を規定することとする。同様に、3' 末端からM番目(Mは正の整数)のヌクレオチドとは、3' 末端に位置するヌクレオチドを1番目として、5' 末端方向にM番目のヌクレオチドを意味する。

[0036] 実施例で示される通り、第1リピート配列のステム形成部分の3' 側領域(「3' 側ステム形成領域」とも称する。)、および第2リピート配列のステム形成部分については、修飾ヌクレオチドの導入によるゲノム編集の向上効果は認められなかった。よって、これらの領域については、修飾ヌクレオチドが含まれていてもよく、含まれていなくともよいが、費用面からは、修飾ヌクレオチドが含まれていない(即ち、全てリボヌクレオチドである)ことが好ましい。また、意外にも、第1リピート配列の3' アーム領域、ならびに第2リピート配列の5' アーム領域および第2リピート配列の5' 側ステム形成領域では、修飾ヌクレオチドの導入により、ゲノム編集効率が低下することが示された。よって、これらの領域には、修飾ヌクレオチドが含まれていないことが好ましい。従って、本発明の一実施態様において、本発明の修飾型crRNAは、第1リピート配列の3' アーム領域、第2リピート配列の5' アーム領域および第2リピート配列の5' 側ステム形成領域は、リボヌクレオチドのみで構成されており、さらに、第1リピート配列の3' 側ステム形成領域、および第2リピート配列のステム形成領域もリボヌクレオチドのみで構成されていてもよい。スペーサー配列については、少なくとも1個(例:2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個またはそれ以上)のヌクレオチドが修飾ヌクレオチドであってもよいが、一態様において、全てがリボヌクレオチドである。また、本発明の修飾型crRNAは、典型的には、リボヌクレオチドの3' 側の結合はホスホジエステル結合である。

[0037] タイプI-EのCRISPR-Casシステムでは、ゲノム編集には細胞内でプレcrRNAが切断されて成熟crRNAとなることがその活性化に重要となり得る。よって、Cas6またはCas5により切断される部位(具体的には、第1リピート配列のス

テム形成領域の3' 末端ヌクレオシドと第1リピート配列の3' アーム領域の5' 末端ヌクレオシドとの間のホスホジエステル結合、第2リピート配列のステム形成領域の3' 末端ヌクレオシドと第2リピート配列の3' アーム領域の5' 末端ヌクレオシドとの間のホスホジエステル結合)、および／またはこれら部位に隣接するヌクレオシド（特に、3' 側のヌクレオシド）には、修飾が施されないことが好ましい。

[0038] 本明細書において、5' キャップには、天然のmRNAで認められる7-methyl guanosine (m<sup>7</sup>G) だけでなく、そのアナログ（例えば、m<sup>7</sup>Gの糖の3' 位のOH基がメチル化されたARCA(anti-reverse cap analog)も含まれるものとする。本発明のcrRNAに付与されるポリAの長さは特に限定されないが、哺乳動物では通常200～250個のアデニンからなるポリAが付加されるため、典型的には、10個以上(例：20個、30個、40個、50個またはそれ以上)、300個以下(例：250個、240個、230個、220個、210個、200個またはそれ以下)のポリAを有し得る。

[0039] 本発明のcrRNAには、1個以上(例：1、2、3、4個又はそれ以上)の機能性分子が結合していてもよい。前記機能性分子は、典型的には、5' 末端および／または3' 末端に結合し得る。また、本発明のcrRNAと機能性分子との間の結合は、直接結合であってもよいし、別の物質によって介在される間接結合であってもよい。しかしながら、機能性分子は、共有結合、イオン性結合、水素結合などを介してオリゴヌクレオチドに直接結合されていることが好ましく、またより安定した結合を得ることができるという点からは、共有結合がより好ましい。機能性分子はまた、切断可能な連結基を介してcrRNAに結合されていてもよい。例えば、機能性分子は、ジスルフィド結合を介して連結されていてもよい。また、機能性分子は、1種のみを用いてもよく、複数種類を組み合わせ用いてもよい。

[0040] 上記機能性分子は、本発明のcrRNAに所望の機能を与える限り、「機能性分子」の構造について特定の限定はない。所望の機能としては、例えば、標識機能、精製機能、送達機能などが挙げられる。標識機能を与える分子の例と

しては、例えば、蛍光色素（Cy3、Alexaなど）、蛍光タンパク質、ルシフェラーゼなどの化合物が挙げられる。精製機能を与える部分の例としては、例えば、ビオチン、アビジン、Hisタグペプチド、GSTタグペプチド、FLAGタグペプチドなどの化合物が挙げられる。送達機能を与える分子としては、例えば、アルギニンリッチペプチドP007及びBペプチド（HaiFang Yinら、Human Molecular Genetics, Vol. 17(24), 3909-3918 (2008))、m3G-CAP(Pedro M. D. Morenoら、Nucleic Acids Res., Vol. 37, 1925-1935 (2009))、TATペプチド、N-アセチルガラクトサミン（N-Acetylgalactosamine ; GalNAc）、コレステロールおよび脂肪酸などの脂質（例えば、ビタミンE（トコフェロール、トコトリエノール）、ビタミンA、及びビタミンD）；ビタミンKなどの脂溶性ビタミン（例えば、アシルカルニチン）；アシル-CoAなどの中間代謝産物；糖脂質、グリセリド、及びそれらの誘導体もしくは類縁体が挙げられる。

[0041] 本発明のcrRNAは、化学合成により作製してもよく、またインビトロ転写反応（IVT）法により作製することもできる。あるいは、生物内（大腸菌や哺乳類培養細胞）で発現させたものを精製することもできる。化学合成方法としては、例えば、ヌクレオシドホスホロアミダイトと固相担体を用いた方法などが挙げられる。また、化学修飾が導入されたヌクレオシドホスホロアミダイト（例えば、糖部の2'-O-メチル化ホスホロアミダイト、GalNAcホスホロアミダイトなど）を用いることで、crRNA配列の任意の塩基部位に修飾ヌクレオチドを導入することができる。

[0042] IVT法では、例えば、T7プロモーター制御下に連結されたプレcrRNAをコードするDNAから、T7 RNAポリメラーゼにより、一本鎖RNAを合成することができるが、反応液に5' キャップを含めることことで、5' キャップ構造を有するプレcrRNAを合成することができる。さらに、反応液に修飾ヌクレオシド三リン酸を含めることで、修飾ヌクレオチドを含むプレcrRNAを合成することもできる。また、前記crRNAにポリAポリメラーゼを反応させることで、ポリAを付加することができる。あるいは、上記プレcrRNAをコードするDNAに、ポリTを連結しておくことでも、IVT反応によりポリAが付加されたプレcrRNAを合成

することもできる。

[0043] 化学合成により、プレcrRNAに5' キャップを付加することもできる。例えば、Abe N. et al., ACS Chem Biol. 17(6):1308-1314 (2022)に記載のように、化学合成により作製したpre-crRNAに、m<sup>7</sup>Gジリン酸のイミダゾール活性化体を有機溶媒（例えば、ジメチルスルホキシド）中で反応させることにより、プレcrRNAに5' キャップを付加することができる。よって、本発明の修飾型crRNAに、さらに5' キャップおよびポリAを付加したプレcrRNAもまた好適に用いることができる。あるいは、塩基配列ならびに修飾部位もしくは種類を指定して、製造業者に注文することで、所望のプレcrRNAを入手することもできる。以下では、本発明のcrRNAのように、変異ヌクレオチド、5' キャップ構造、3' ポリAなどを含む、野生型以外のプレcrRNAを「人工プレcrRNA」とも称する。人工プレcrRNAは、野生型のプレcrRNAでは認められない領域が付加されたものであってもよい。

[0044] プレcrRNAをコードするDNAは、例えば、標的配列に対して相同な塩基配列（即ち、スペーサー配列）を含む、プレcrRNAをコードする配列を設計し、DNA/RNA合成機を用いて、化学的に合成することができる。

[0045] 2. アレル特異的なプレcrRNAの設計方法

図33に示すとおり、タイプIのCRISPR-Casシステムでは、標的配列の内6塩基毎にcrRNAにより認識できない塩基（図33のNで示した塩基）が存在するため、該塩基以外の標的配列上にヘテロSNPが存在することとなる配列を標的とするプレcrRNAを設計することができる。この場合には、ヘテロSNPの位置は、PAMは配列に近いことが好ましく、シード（Seed）領域またはその近傍に存在することがより好ましい。シード領域とは、crRNAのスペーサー配列と相同性の高い（典型的には完全に相同な）領域であり、大腸菌のCRISPR-Cas 3システムでは、PAM配列の下流（3'）側末端塩基から数えて1番目から8番目の領域であり（非特許文献1）、シード領域の近傍とは、典型的には、PAM配列の下流（3'）側末端塩基から数えて9番目～11番目の領域である。また、PAM配列上にヘテロSNPが存在することとなる配列を標的とするプレcrRNAを

設計してもよい。この場合には、欠損の導入を所望するアレル（標的アレル）上に有効なPAM配列（タイプI-EのCRISPR-Casシステムを例にすれば、例えば、ATG）が存在し、もう一方のアレル上の対応する配列が無効なPAM配列（例えば、CTG）となるような配列を標的とするcrRNAを設計する。このように設計したcrRNAを、「アレル特異的なcrRNA」とも称し、アレル特異的なcrRNAを含むCRISPR-Casシステムを用いることで、標的アレルでPAM配列の上流（5'側）に欠損部位を導入することができる。また、かかるシステムの標的となる欠損部位を欠損標的部位とも称する。

[0046] 従って、本発明の別の態様において、アレル特異的なプレcrRNAを設計する方法が提供される。具体的には、標的配列に隣接するPAM配列の上流（5'）側に欠損標的部位が存在し、かつ該標的配列内であって、該PAM配列の下流（3'）側末端塩基から数えて6n（nは正の整数）番目を除く位置またはPAM配列上にアレル間で異なる少なくとも1塩基（例：1塩基、2塩基、3塩基、4塩基、5塩基またはそれ以上の塩基）が存在する配列を標的とするプレcrRNAを設計する工程を含む、アレル特異的なタイプI CRISPR-CasシステムのプレcrRNAを設計する方法（以下、「本発明の設計方法」と称することがある。）が提供される。本発明の設計方法で設計されるプレcrRNAは、タイプIのCRISPR-Casシステムを構成するcrRNAであれば特に限定されないが、好ましくはタイプI-E（特に、大腸菌由来のタイプI-E）またはタイプI-D（特に、*Microcystis aeruginosa*由来のタイプI-D）のプレcrRNAであり、タイプI-EのプレcrRNAがより好ましい。

[0047] 1つの遺伝子座につき、遺伝子の種類が複数（通常2コピー）存在する場合、これら一つ一つはアレル（対立遺伝子）と呼ばれる。本明細書において、「アレル特異的」とは、一方のアレル（通常は、疾患の原因となるアレル）のみを標的とすることを意味する。また、「一方のアレルのみを標的」には、もう一方のアレルは全く標的としない（または全く標的としないと予測される）態様だけでなく、もう一方のアレルでのゲノム編集効率が、標的のアレルの遺伝子のゲノム編集効率よりも低い（または低いと予測される）態様

も含まれるものとする。

[0048] 「一塩基多型(single nucleotide polymorphism: SNP)」は、通常、ある生物種集団のゲノム塩基配列中に多く（例えば、1%以上の頻度で）認められる一塩基が変異した多様性を意味するが、本明細書においては、アレル間で異なる少なくとも1塩基（「ヘテロSNP」とも称する。）を意味する。ヘテロSNPが2塩基以上の場合には、全ての塩基がPAM配列の下流側末端塩基から数えて6n（nは正の整数）番目を除く位置またはPAM配列上に存在してもよく、一部の塩基のみが該位置またはPAM配列上に存在してもよい。ヘテロSNPの同定は、例えば、SNPデータベース上で頻度の高いSNPを検索し、ヒットしたSNPについて、疾患患者由来の細胞でも該SNPが存在するか否か確認することなどにより行うことができる。上記SNPデータベースとしては、例えば、dbSNP、Kavir, SNPedia、OMIM database、dbSNP、The Human Gene Mutation Database、The International HapMap Project、GWAS Centralなどが挙げられる。

[0049] 本発明の設計方法で対象となるアレルとしては、特に限定されないが、例えば、特定の塩基配列の繰り返し配列（リピート配列）が異常に伸長することに起因するリピート病の原因となるアレルなどが挙げられる。リピート数の異常により、遺伝子産物（タンパク質もしくはRNA）の機能喪失(loss of function)、機能獲得(gain of function)、液-液相分離形成異常、あるいは非古典的翻訳などの機構を介して、疾患が発症すると考えられている。リピート病の中でも、三塩基の繰り返し配列が異常伸長する疾患はトリプレット病として知られる。典型的には、トリプレット・リピートが20リピート以上（典型的には35リピート以上）であるとき、トリプレット病が発症することが知られている。かかる異常伸長リピートの短縮は、塩基認識とDNA切断がほぼ同じ箇所で行われるCRISPR-Cas9システムでは、離れた位置のヘテロSNPを利用してアレル特異的にリピート配列を削除することは困難であった。しかしながら、CRISPR-Cas3システムであれば、欠損を誘導して異常伸長リピートを短縮することにより、トリプレット病を治療し得る。よって、本発明の一態様において、欠損標的部位は、トリプレット・リピートを含む領域である。

[0050] 上記リピート病としては、例えば、脆弱X症候群（リピート：CGC、原因遺伝子：FMR1）、脆弱XE症候群（リピート：CCG、原因遺伝子：AFF2）、フリードライヒ失調症（リピート：GAA、原因遺伝子：FXN）、ハンチントン病（リピート：CAG、原因遺伝子：HTT）、球脊髄性筋萎縮症（リピート：CAG、原因遺伝子：AR）、脊髄小脳失調症1型（リピート：CAG、原因遺伝子：ATXN1）、脊髄小脳失調症2型（リピート：CAG、原因遺伝子：ATXN2）、脊髄小脳失調症3型（リピート：CAG、原因遺伝子：ATXN3）、脊髄小脳失調症6型（リピート：CAG、原因遺伝子：CACNA1A）、脊髄小脳失調症7型（リピート：CAG、原因遺伝子：ATXN7）、脊髄小脳失調症17型（リピート：CAG、原因遺伝子：TBP）、歯状核赤核淡蒼球ルイ体変性症（リピート：CAG、原因遺伝子：DRPLA）、筋強直性ジストロフィー1型（リピート：CTG、原因遺伝子：DMPK）、脆弱X関連振戦/運動失調症候群（リピート：CGC、原因遺伝子：FMR1）、脊髄小脳失調症8型（リピート：CTG、原因遺伝子：ATXN8）、脊髄小脳失調症12型（リピート：CAG、原因遺伝子：PPP2R2B）、ハンチントン病類縁疾患2型（リピート：CTG、原因遺伝子：JPH3）などが挙げられる。

[0051] 一実施態様において、本発明の設計方法で対象となるリピート病は、トリプレット病の一つとして知られる筋強直性ジストロフィー1型（DM1）である。DM1は、DMPK遺伝子の3' -UTR領域にあるCTGリピートが片方のアレルのみで異常に伸長する事が原因で発症する優性遺伝子形式の遺伝子疾患である。DM1のヘテロSNPとしては、例えば、dbSNPのデータベースにおける、SNP ID：rs16939（リピートからの距離：2.5 kb）、SNP ID：rs915915（リピートからの距離：1.5 kb）、SNP ID：rs558794490（リピートからの距離：0.8 kb）、SNP ID：rs635299（リピートからの距離：0.6 kb）、SNP ID：rs934739524（リピートからの距離：1.6 kb）、SNP ID：rs3745802（リピートからの距離：2.3 kb）などが挙げられる。

[0052] 本発明の設計方法で作製されたプレcrRNAが標的とする配列（即ち、標的配列）としては、例えば、SNP ID:rs934739524を標的配列に含む配列番号39、40および42～47のいずれかで示される配列、SNP ID:rs635299を標的

配列に含む配列番号 48～50 のいずれかで示される配列、SNP ID:rs915915 を標的配列に含む配列番号 51 または 52 で示される配列、SNP ID : rs3745802 を標的配列に含む配列番号 53 で示される配列などが挙げられる。

[0053] また、本発明の設計方法により設計された crRNA は、スペーサー配列によって活性や特異性が異なり得る。そのため、該 crRNA を調整し、非標的アレルの活性を下げることで、標的アレル特異性を高めてもよい。かかる調整方法として、例えば、crRNA の長さを短くする方法（例えば、1 個、2 個、3 個、4 個、5 個、6 個、7 個、8 個、9 個、10 個またはそれ以上のヌクレオチドを欠失させる方法）や、PAM から遠い位置に意図的に塩基ミスマッチを導入する方法などが挙げられる。実際に、下述の実施例において、上記 SNP ID No: rs934739524 SNP の “C” を標的とする crRNA に対して、crRNA の長さを短くすることや、意図的なミスマッチを PAM に遠い位置から近づけるに従って標的アレルでの活性は徐々に低下するが、非標的アレルでの活性低下が上回る場合には特異性を高められることが実証された。よって、本発明の設計方法には、プレ crRNA の長さ（一態様において、スペーサー配列の長さ）を調節する工程、および／またはプレ crRNA（一態様において、スペーサー配列）にミスマッチを導入する工程を含んでいてもよい。導入されるミスマッチの個数として、例えば、1 ないし数個（例：2、3、4、5 個又はそれ以上）が挙げられる。プレ crRNA にミスマッチを導入する工程では、ミスマッチを導入する位置を調節することで、アレル特異性のさらなる調節をしてもよい。

[0054] 本発明の設計方法では、プレ crRNA を実際に合成することまでは要さず、頭の中でイメージすることで十分である。しかしながら、典型的には、該イメージされた核酸は、電子計算機上で機能するプログラム（例：核酸設計用ソフトウェア、グラフィックデザインツール、オフィスソフト等）上や紙面上で具体化される。また、設計したプレ crRNA を実際に合成してもよく、該合成したプレ crRNA のアレル特異性やゲノム編集活性を評価してもよい。

[0055] 本発明の設計方法で設計される crRNA は、野生型プレ crRNA でもよく、変異型プレ crRNA を含む人工プレ crRNA であってもよい。変異ヌクレオチド、5' キ

ャップ構造、3' ポリAの定義や種類、各プレcrRNAの定義や作製方法等は、上記「1. 修飾ヌクレオチドを有するプレcrRNA」で記載した内容がすべて援用される。

[0056] 3. タイプI CRISPR-Casシステムおよびその用途

本発明のさらに別の態様において、本発明のcrRNAを含む、タイプI CRISPR-Casシステムが提供される。具体的には、(1) 本発明のcrRNA、および(2) Cascadeタンパク質群(タイプI-Eの場合、Cse1、Cse2、Cas7、Cas5およびCas6)または該タンパク質群をコードする核酸を含む、タイプI CRISPR-Casシステム(以下、「本発明のCRISPR-Casシステム」と称することがある。)が提供される。本発明のCRISPR-Casシステムには、(3) Cas3タンパク質または該タンパク質をコードする核酸が含まれていてもよい。また、タイプI CRISPR-CasシステムがタイプI-Dのシステムである場合には、本発明のCRISPR-Casシステムは、Cas3タンパク質または該タンパク質をコードする核酸、ならびにCas10dタンパク質または該タンパク質をコードする核酸を含んでいてもよい。Casタンパク質をコードする核酸は、RNAでもよく、DNAでもよい。本発明のCRISPR-Casシステムは、タイプIのCRISPR-Casシステムであるが、好ましくはタイプI-E(特に、大腸菌由来のタイプI-E)またはタイプI-D(特に、*Microcystis aeruginosa*由来のタイプI-D)のCRISPR-Casシステムであり、タイプI-EのCRISPR-Casシステムがより好ましい。タイプIのCRISPR-Casの種類や定義等は、「1. 修飾ヌクレオチドを有するプレcrRNA」で記載した通りである。

[0057] 本発明のCRISPR-Casシステムは、細胞が有する二本鎖DNAの改変に用いることができる。よって、一態様において、本発明のCRISPR-Casシステムを細胞に導入する工程を含む、該細胞が有する二本鎖DNAの改変方法または二本鎖DNAが改変された細胞を製造する方法(以下、「本発明の方法」と称することがある。)が提供される。細胞が有する二本鎖DNAとしては、例えば、染色体DNA、ミトコンドリアDNA、葉緑体DNA(以下、これらを包括して「ゲノムDNA」とも称する。)、外来性のDNA(例: プラスミドDNA、ウイルスのDNA)などが挙げられるが、ゲノムDNA、特に染色体DNAが好ましい。また、本明細書にお

いて、「改変」とは、DNA鎖上のあるヌクレオチドもしくはヌクレオチド配列が、欠損すること、他のヌクレオチドおよび／もしくはヌクレオチド配列に置換されること、ならびに／またはDNA鎖上のある領域にヌクレオチドもしくはヌクレオチド配列が挿入されることを意味する。また、ゲノムDNA上での改変を、「ゲノム編集」と称することもある。

[0058] Cas3、Cas10d、およびCascadeタンパク質は、所望の酵素活性を有する異種タンパク質との融合タンパク質であってもよい。かかる異種タンパク質の酵素活性としては、例えば、デアミナーゼ活性（例えば、シチジンデアミナーゼ活性、アデノシンデアミナーゼ活性）、メチル基転移酵素活性、脱メチル化酵素活性、ヒストンアセチル基転移酵素活性、ヒストン脱アセチル化酵素活性、アクチベーター活性、転写リプレッサー活性、DNA修復活性、DNA損傷活性、ジスムターゼ活性、アルキル化活性、脱プリン活性、酸化活性、ピリミジンダイマー形成活性、インテグラーゼ活性、トランスポサナーゼ活性、リコンビナーゼ活性、ポリメラーゼ活性、リガーゼ活性、光回復酵素活性、およびグリコシラーゼ活性が含まれるが、これらに制限されない。この場合、必ずしも、Cas3およびCas10dのヌクレアーゼ活性やヘリカーゼ活性は必要がないことから、CasおよびCas10dを用いなくともよく、あるいはこれら活性の一部もしくは全部を欠失させた変異体（例えば、DドメインH74Aの変異体（dnCas3）、SF2ドメインモチーフ1のK320Nの変異体（dhCas3）、およびSF2ドメインモチーフ3のS483A／T485Aのダブルの変異体（dh2Cas3））を利用することもできる。

[0059] 例えば、Cas3のヌクレアーゼ活性の一部または全部を消失させた変異体とデアミナーゼとの融合タンパク質を本発明のCRISPR-Cas3システムの構成要素とすることにより、標的部位における大きな欠失を生じさせることなく、塩基を置換することにより、精密なゲノム編集が可能となる。例えば、W02017/043573に記載のように、Cas3は用いずに、Cascadeタンパク質（例えば、Cas6）とデアミナーゼ（例えば、hAID、PmCDA1等）とを融合することで、ピンポイントな塩基の改変も可能である。また、メチル基転移酵素活性を有するタ

ンパク質（例：DNAメチル基転移酵素、ヒストンメチル基転移酵素等）、脱メチル化酵素活性を有するタンパク質（例：DNAデメチラーゼ、ヒストンデメチラーゼ等）、ヒストンアセチル基転移酵素、またはヒストン脱アセチル化酵素を用いることで、塩基配列の変化を伴わないDNAの修飾（即ち、エピゲノム編集）も可能となる。

[0060] Casタンパク質をコードするDNAは、典型的には、該DNAを含む発現ベクターの形態で提供される。発現ベクターとしては、例えば、レトロウイルス、レンチウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、ヘルペスウイルス、センダイウイルスなどのウイルスベクター、プラスミドベクター、エピソーマルベクター、人工染色体ベクター、トランスポゾンベクター(piggyBac, piggyBat, TolII)などが挙げられる。

[0061] 発現ベクターにおいて使用されるプロモーターとしては、例えば、EF1 $\alpha$ プロモーター、ACTBプロモーター、UbqCプロモーター、PGKプロモーター、CAGプロモーター、SR $\alpha$ プロモーター、SV40プロモーター、LTRプロモーター、CMV（サイトメガロウイルス）プロモーター、RSV（ラウス肉腫ウイルス）プロモーター、MoMuLV（モロニーマウス白血病ウイルス）LTR、HIV LTR、HSV-TK（単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ）プロモーターなどが用いられる。なかでも、EF1 $\alpha$ プロモーター、ACTBプロモーター、UbqCプロモーター、PGKプロモーター、CAGプロモーター、SR $\alpha$ プロモーターなどが好ましい。

[0062] 発現ベクターは、プロモーターの他に、所望により、エンハンサー、ターミネーター、IRES、2Aコード配列エンハンサー、ポリA付加シグナル、SV40複製起点、選択マーカー遺伝子などを含有していてもよい。選択マーカー遺伝子としては、例えば、薬剤耐性遺伝子、蛍光タンパク質遺伝子などが挙げられる。

[0063] 発現ベクターは、CRISPR-Casシステムの各構成要素（例えば、タイプI-Eの場合、Cse1タンパク質、Cse2タンパク質、Cas7タンパク質、Cas5タンパク質、Cas6タンパク質、Cas3タンパク質、crRNAの各因子）を1つずつ発現可能な個別の発現ベクターの組み合わせであってもよいし、1つの発現ベクターが

これらの因子の複数を発現可能に調製されていてもよいし、1つの発現ベクターが、これらの因子のすべてを発現可能に調製されていてもよい。

[0064] 1つの発現ベクターがこれらの因子の複数を発現する場合、CRISPR-Casシステムの各構成要素は、自己切断を誘導する2A配列や、リボソーム結合サイトを有するIRES (Internal Ribosome Entry Site) 配列等で連結されていてもよい。2A配列としては、例えば、Porcine teschovirus由来のP2A配列、Thomson's signet ring virus由来のT2A配列、foot-and-mouth disease virus由来のF2A配列、equine rhinitis A virus由来のE2A配列などが挙げられる。IRES配列は、Encephalomyocarditisウイルス、Foot-and-mouth diseaseウイルス等のウイルス由来の配列であってもよいし、細胞中のmRNA由来の配列であってもよい。これにより、単一のmRNAから2つ以上の複数のタンパク質を個別に発現させることができる。

[0065] 本発明者らは以前、(1) Cse1遺伝子、Cse2遺伝子、Cas7遺伝子、Cas5遺伝子、Cas6遺伝子及びCas3遺伝子のうちの3遺伝子ずつが1つのプロモーターでドライブされる2種類の発現ベクター、(2) プレcrRNAの発現ベクター、の3種類の発現ベクターを導入した場合、多能性幹細胞においてもゲノム編集を効率よく誘導できることを明らかにした。よって、Cascadeタンパク質群を発現ベクターの形態で幹細胞に導入する態様では、2~4個のCascade複合体を構成するタンパク質の遺伝子ごとに1つのプロモーターで発現させる態様が好ましく、さらに好ましくは3構成タンパク質の遺伝子ごとに1つのプロモーターで発現させる態様である。

[0066] また、発明者らは以前、(1) Cse1タンパク質、Cse2タンパク質、Cas7タンパク質、Cas5タンパク質、Cas6タンパク質及びCas3タンパク質のうちの3構成タンパク質ずつを個別に発現させる2種類のmRNA、(2) 野生型プレcrRNA、の3種類のRNAを導入した場合、多能性幹細胞においてもゲノム編集を高効率で行うことができることを明らかにした。よって、Cascadeタンパク質群をmRNAの形態で幹細胞に導入する態様では、例えば、2~4のCascadeを構成するタンパク質をポリシストロニックにコードするmRNAを用いてもよく、3構成タ

ンパク質をポリシストロニックにコードするmRNAを用いてもよい。

[0067] 本発明者らはさらに、（１）プロモーターを2つ有し、Cse1遺伝子、Cse2遺伝子、Cas7遺伝子、Cas5遺伝子、Cas6遺伝子及びCas3遺伝子のうちの3遺伝子ずつが1つのプロモーターでドライブされる単一の発現ベクター、（２）プレcrRNAの発現ベクター、の2種類の発現ベクターを導入してゲノム編集を行う態様において、前記2つのプロモーターの転写方向の向きが同じ方向である場合（Uni-directional promoter）と、逆向きである場合（Bi-directional promoter）とで、多能性幹細胞におけるゲノム編集効率が大きく異なることを以前明らかにした。そして、2つのプロモーターが逆向きである場合に、最もゲノム編集効率が高いことを明らかにした。よって、Cascadeタンパク質群を発現ベクターの形態で幹細胞（特に多能性幹細胞）に導入する態様では、3遺伝子ずつ1つのプロモーター（合計2つのプロモーター）で発現させる発現カセット態様が特に好ましく、当該2つの発現カセットは同一の発現ベクター上にあってもよく、異なる発現ベクター上にあってもよい。最も好ましくは、3遺伝子を搭載した発現カセットが2つ、同一の発現ベクター上に逆向きに配置されている態様（Bi-directional promoter）である。

[0068] Casタンパク質を発現させるプロモーターは、発現誘導型プロモーターであってもよい。発現誘導型プロモーターとしては、例えば、培地への発現制御物質の添加又は除去、光照射、温度変化等により発現を誘導することができるプロモーターを用いることができる。発現誘導型プロモーターは、発現制御物質を培地に添加することにより、タンパク質の発現が誘導されるものであってもよいし、発現制御物質を培地から除去することにより、タンパク質の発現が誘導されるものであってもよい。具体的には、発現誘導型プロモーターとして、例えば、Tet-ON／Tet-OFF系プロモーター（テトラサイクリン又はその誘導体（例：ドキシサイクリン）の添加又は除去で誘導）、メタロチオネインプロモーター（重金属イオンで誘導）、ヒートショックタンパク質プロモーター（ヒートショックで誘導）、ステロイド応答性プロモーター（ステロイドホルモン又はその誘導体で誘導）などが挙げられるが、これらに

限定されない。

[0069] 核酸（例えば、本発明のcrRNA）、該核酸を含む発現ベクターまたはタンパク質（例えば、Cas3、Cas10d、Cascade複合体を構成するタンパク質（以下、「Cascadeタンパク質」とも称する。）など）の細胞への導入は、公知の種々の方法によって行うことができる。かかる方法として、例えば、リン酸カルシウム仲介性トランスフェクション、エレクトロポレーション、リポソームトランスフェクション、リポフェクション、遺伝子銃、マイクロインジェクション、ウイルスベクター法、ウイルス様粒子法、アグロバクテリウム法、アグロインフィルトレーション法、PEG-カルシウム法、ソノポレーション法、脂質ナノ粒子法などが挙げられる。

[0070] 本発明のCRISPR-Casシステムの細胞への導入は、複数回行ってもよい。一般的なCRISPR-Cas9システムを用いたゲノム編集実験では、標的配列に欠損や変異が入るため、またオフターゲットのリスクも高いため、1回の導入が基本である。しかしタイプIのCRISPR-Casシステムでは標的配列のPAM配列側に巨大欠損が導入されるが、crRNAが標的とする配列（即ち、標的配列）は保存されることが多いため、同じ細胞に複数回同じcrRNAを導入することで、欠損効率を向上させること、また欠損部位を伸長（蓄積）させることが可能となる。タイプIのCRISPR-Casシステムでは、オフターゲット効率がタイプIIのCRISPR-Casシステムよりも低いことが知られているため、導入される回数も特に限定されないが、典型的には、2～10回（例：2、3、4回）行われる。また、導入する間隔も特に限定されないが、典型的には、1～15日の間隔で、好ましくは、1日、2日、3日、4日、5日、6日、7日、8日、9日または10日毎にCRISPR-Casシステム導入が導入される。また、CRISPR-Casシステムを導入した細胞を凍結保存しておき、数日～数年後に細胞を融解させてから、再びCRISPR-Casシステムを細胞に導入してもよい。

[0071] 本発明のCRISPR-Casシステムにおいて、本発明のcrRNAではなく野生型プレcrRNAを用いたCRISPR-Casシステムを用いた場合にも、同様に欠損効率を向上させること、また欠損部位を伸長（蓄積）させることが可能である。よって

、さらに別の態様において、タイプIのCRISPR-Casシステムを複数回細胞に導入する工程を含む、欠損部位を伸長させる方法が提供される。かかるCRISPR-Casシステムには、典型的には、(I) 野生型プレcrRNA、(II) Cas3タンパク質または該タンパク質をコードする核酸、および(III) Cascadeタンパク質群または該タンパク質群をコードする核酸を含が含まれる。CRISPR-Casシステムは、好ましくはタイプI-E(特に、大腸菌由来のタイプI-E)またはタイプI-D(特に、*Microcystis aeruginosa*由来のタイプI-D)のCRISPR-Casシステムであり、タイプI-EのCRISPR-Casシステムがより好ましい。また、タイプI-Dである場合には、CRISPR-Casシステムは、Cas10dタンパク質または該タンパク質をコードする核酸をさらに含んでいてもよい。タイプIのCRISPR-Casの種類や定義等は、「1. 修飾ヌクレオチドを有するプレcrRNA」に記載した通りである。

[0072] Casタンパク質をコードするDNAは、例えば、上記の菌種由来のゲノムDNAを鋳型にして、casオペロンからゲノムPCRにより、所望のCasタンパク質のORFを含む領域をそれぞれ単離することにより、取得することができる。また、Casタンパク質をコードするDNAは、使用するタンパク質のcDNA配列情報やアミノ酸配列情報(例えば、NCBI GenBank等のデータベースの情報)をもとにオリゴDNAプライマーを合成し、当該タンパク質を産生する細胞より調製した全RNAもしくはmRNA画分を鋳型として用い、RT-PCR法によって増幅することにより、クローニングすることができる。大腸菌由来のタイプI-Eに属するCse1タンパク質のNCBIアクセッション番号としては、例えば、NP\_417240.1などが挙げられる。Cse2タンパク質のNCBIアクセッション番号としては、NP\_417239.1などが挙げられる。Cas7タンパク質のNCBIアクセッション番号としては、NP\_417238.1等が挙げられる。Cas5タンパク質のNCBIアクセッション番号としては、NP\_417237.2などが挙げられる。Cas6タンパク質のNCBIアクセッション番号としては、NP\_417236.1などが挙げられる。また、Cas3タンパク質のNCBIアクセッション番号としては、NP\_417241.1などが挙げられる。その他のCasタンパクも、NCBI GenBankやその他のデータベースから取得可能である。また、

メタゲノム解析などにより得られた微生物ゲノムデータからBLASTプログラムを利用することで、新規の微生物種からの配列取得も可能である。

[0073] Casタンパク質は、該タンパク質の機能を保持したものであれば、上述のアクセッション番号に記載されるアミノ酸配列に対して、1若しくは数個（例：2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個またはそれ以上）のアミノ酸が置換、欠失、付加および／または挿入されたものであってもよい。また、上述のアクセッション番号に記載されるアミノ酸配列と70%以上、好ましくは80%以上、より好ましくは90%以上、さらにより好ましくは95%以上（例：96%、97%、98%、99%またはそれ以上）の同一性を有するアミノ酸配列からなるCasタンパク質であってもよい。アミノ酸配列の同一性は、相同性計算アルゴリズムのNCBI BLAST (National Center for Biotechnology Information Basic Local Alignment Search Tool) を用いて計算することができる。

[0074] クローン化されたDNAは、そのまま、または所望により制限酵素で消化するか、適当なリンカー及び／又は核移行シグナル（目的の二本鎖DNAがミトコンドリアや葉緑体DNAの場合は、各オルガネラ移行シグナル）をコードする配列を付加した後に、Cas3、Cas10dまたはCascadeタンパク質とライゲーションして、融合タンパク質をコードするDNAを調製することができる。核移行シグナルを含むオルガネラ移行シグナルは、1つだけ付加されていてもよく、複数付加されていてもよい（例えば、タンパク質のN末端およびC末端の両方に付加される等）。プレcrRNAをコードするDNAの作製方法は、上記「1. 修飾ヌクレオチドを有するプレcrRNA」で記載した通りである。

[0075] Cas3、Cas10dまたはCascadeタンパク質をコードするRNAは、例えば、Cas3、Cas10dまたはCascadeタンパク質をコードするDNAを鋳型として、IVT反応により合成することができる。

[0076] Cas3、Cas10dまたはCascadeタンパク質は、インビトロ翻訳システムにより作製することもできる。あるいは、発現ベクターなどを用いて細胞内でタンパク質を発現させ、細胞からタンパク質を単離および精製することによって入手することもできる。

[0077] 本発明の方法に用いる細胞として、例えば、エシェリヒア属菌、バチルス属菌、酵母、昆虫細胞、昆虫、動物細胞、植物細胞などが用いられる。

エシェリヒア属菌としては、例えば、エシェリヒア・コリ (*Escherichia coli*) K12・DH1 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 60, 160 (1968)] , エシェリヒア・コリJM103 [Nucleic Acids Research, 9, 309 (1981)] , エシェリヒア・コリJA221 [Journal of Molecular Biology, 120, 517 (1978)] , エシェリヒア・コリHB101 [Journal of Molecular Biology, 41, 459 (1969)] , エシェリヒア・コリC600 [Genetics, 39, 440 (1954)] などが用いられる。

バチルス属菌としては、例えば、バチルス・サブチルス (*Bacillus subtilis*) MI114 [Gene, 24, 255 (1983)] , バチルス・サブチルス207-21 [Journal of Biochemistry, 95, 87 (1984)] などが用いられる。

酵母としては、例えば、サッカロマイセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) AH22, AH22R-, NA87-11A, DKD-5D, 20B-12、シゾサッカロマイセス・ポンベ (*Schizosaccharomyces pombe*) NCYC1913, NCYC2036, ピキア・パストリス (*Pichia pastoris*) KM71などが用いられる。

[0078] 昆虫細胞としては、例えば、夜盗蛾の幼虫由来株化細胞 (*Spodoptera frugiperda* cell ; Sf細胞) 、*Trichoplusia ni*の中腸由来のMG1細胞、*Trichoplusia ni*の卵由来のHigh Five™細胞、*Mamestra brassicae*由来の細胞、*Estigmene acrea*由来の細胞、蚕由来株化細胞 (*Bombyx mori* N 細胞 ; BmN細胞) などが用いられる。前記Sf細胞としては、例えば、Sf9細胞 (ATCC CRL1711) 、Sf21細胞 [以上、In Vivo, 13, 213-217 (1977)] などが用いられる。

[0079] 植物細胞としては、種々の植物 (例えば、イネ、コムギ、トウモロコシ等の穀物、トマト、キュウリ、ナス等の商品作物、カーネーション、トルコギキョウ等の園芸植物、タバコ、シロイヌナズナ等の実験植物など) から調製した懸濁培養細胞、カルス、プロトプラスト、葉切片、根切片などが用いられる。

[0080] 動物細胞としては、例えば、生体から単離した細胞、生体内の細胞、サルC OS-7細胞、サルVero細胞、チャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞、マウス

L細胞、マウスAtT-20細胞、マウスミエローマ細胞、ラットGH3細胞、HeLa細胞、ヒトFL細胞などの細胞株、ヒト及び他の哺乳動物（マウス、ラット、イヌ、サル等）の多能性幹細胞（pluripotent stem cell）、種々の組織から調製した初代培養細胞が用いられる。さらには、ゼブラフィッシュ胚、アフリカツメガエル卵母細胞なども用いることができる。本発明の方法で用いる動物細胞としては、哺乳動物が好ましく、かかる哺乳動物としては、マウス、ラット、ハムスター、モルモットなどのげっ歯類動物、ヒト、アカゲザル、カニクイザル、ニホンザル、チンパンジーなどの霊長類動物、ウシ、ウマ、イヌ、ネコなどが挙げられる。

[0081] 本発明の方法により、従来ではゲノム編集効率が低かった多能性幹細胞においても、高いゲノム編集効果が期待できる。よって、本発明の方法に用いる細胞として多能性幹細胞が好ましい。

[0082] 本明細書において、「多能性幹細胞」とは、生体の種々の異なった形態や機能を持つ組織や細胞に分化でき、三胚葉（内胚葉、中胚葉、外胚葉）のどの系統の細胞にも分化し得る能力を有する幹細胞を指す。本発明に用いる多能性幹細胞としては、例えば、人工多能性幹細胞（induced pluripotent stem cell：iPS細胞）、胚性幹細胞（embryonic stem cell：ES細胞）、核移植により得られるクローン胚由来の胚性幹細胞（nuclear transfer Embryonic stem cell：ntES細胞）、多能性生殖幹細胞（multipotent germline stem cell）（「mGS細胞」）、胚性生殖幹細胞（EG細胞）が挙げられるが、好ましくはiPS細胞（より好ましくはヒトiPS細胞）およびES細胞（より好ましくはヒトES細胞）である。上記多能性幹細胞がES細胞又はヒト胚に由来する任意の細胞である場合、その細胞は胚を破壊して作製された細胞であっても、胚を破壊することなく作製された細胞であってもよいが、好ましくは、胚を破壊することなく作製された細胞である。

[0083] ES細胞は、ヒトやマウスなどの哺乳動物の（初期）胚（例えば、胚盤胞）の内部細胞塊から樹立された、多能性と自己複製による増殖能を有する幹細胞である。ES細胞は、マウスで1981年に発見され（M. J. Evans and M. H. Kau

fman (1981), Nature 292:154-156)、その後、ヒト、サルなどの霊長類でもES細胞株が樹立された(J.A. Thomson et al. (1998), Science 282:1145-1147; J.A. Thomson et al. (1995), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92:7844-7848; J.A. Thomson et al. (1996), Biol. Reprod., 55:254-259; J.A. Thomson and V.S. Marshall (1998), Curr. Top. Dev. Biol., 38:133-165)。ES細胞は、対象動物の受精卵の胚盤胞から内部細胞塊を取出し、内部細胞塊を線維芽細胞のフィーダー上で培養することによって樹立することができる。あるいは、ES細胞は、胚盤胞期以前の卵割期の胚の単一割球のみを用いて樹立することもできるし(Chung Y. et al. (2008), Cell Stem Cell 2: 113-117)、発生停止した胚を用いて樹立することもできる(Zhang X. et al. (2006), Stem Cells 24: 2669-2676.)。

[0084] 本発明で用いるES細胞株としては、マウスES細胞であれば、例えば、inGenious targeting laboratory社、理研(理化学研究所)等が樹立した各種マウスES細胞株が利用可能であり、ヒトES細胞株であれば、例えば、ウィスコンシン大学、NIH、理研、京都大学、国立成育医療研究センター及びCellartis社などが樹立した各種ヒトES細胞株が利用可能である。具体的には、例えば、ヒトES細胞株としては、ESI Bio社が分譲するCHB-1~CHB-12株、RUES1株、RUES2株、HUES1~HUES28株等、WiCell Researchが分譲するH1株、H9株等、理研が分譲するKhES-1株、KhES-2株、KhES-3株、KhES-4株、KhES-5株、SSES1株、SSES2株、SSES3株などが挙げられる。

[0085] iPS細胞は、哺乳動物体細胞又は未分化幹細胞に、特定の因子(核初期化因子)を導入して再プログラミングすることにより得られる細胞である。現在、iPS細胞にはさまざまなものがあり、山中らにより、マウス線維芽細胞にOct3/4・Sox2・Klf4・c-Mycの4因子を導入することにより、樹立されたiPSC(Takahashi K, Yamanaka S., Cell, (2006) 126: 663-676)のほか、同様の4因子をヒト線維芽細胞に導入して樹立されたヒト細胞由来のiPSC(Takahashi K, Yamanaka S., et al. Cell, (2007) 131: 861-872.)、上記4因子導入後、Nanogの発現を指標として選別し、樹立したNanog-iPSC(Okita, K., Ichisak

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

[0086] 人工多能性幹細胞株としては、NIH、理研、京都大学等が樹立した各種iPSC株が利用可能である。例えば、ヒトiPSC株であれば、理研のHiPS-RIKEN-1A株、HiPS-RIKEN-2A株、HiPS-RIKEN-12A株、Nips-B2株等、京都大学の253G1株、253G4株、1201C1株、1205D1株、1210B2株、1383D2株、1383D4株、1383D6株、201B7株、409B2株、454E2株、606A1株、610B1株、648A1株、1231A3株、Ff-I01s04株、Ff-I14s04株などが挙げられる。

[0087] CIRSPR-Casシステムを導入した細胞は、細胞の種類に応じ、公知の方法に従って培養することができる。

例えば、大腸菌またはバチルス属菌を培養する場合、培養に使用される培地としては液体培地が好ましい。また、培地は、形質転換体の生育に必要な炭素源、窒素源、無機物などを含有することが好ましい。ここで、炭素源としては、例えば、グルコース、デキストリン、可溶性澱粉、ショ糖などが；窒素源としては、例えば、アンモニウム塩類、硝酸塩類、コーンスチープ・リカー、ペプトン、カゼイン、肉エキス、大豆粕、バレイショ抽出液などの無機または有機物質が；無機物としては、例えば、塩化カルシウム、リン酸二水素ナトリウム、塩化マグネシウムなどがそれぞれ挙げられる。また、培地には、酵母エキス、ビタミン類、生長促進因子などを添加してもよい。培地のpHは、好ましくは約5～約8である。

大腸菌を培養する場合の培地としては、例えば、グルコース、カザミノ酸を含むM9培地 [Journal of Experiments in Molecular Genetics, 431-433, Cold Spring Harbor Laboratory, New York 1972] やLB培地が好ましい。必要により、プロモーターを効率よく働かせるために、例えば、 $3\beta$ -インドリルアクリル酸のような薬剤を培地に添加してもよい。大腸菌の培養は、通常約15～約43℃で行なわれる。必要により、通気や攪拌を行ってもよい。

バチルス属菌の培養は、通常約30～約40℃で行なわれる。必要により、通気や攪拌を行ってもよい。

酵母を培養する場合の培地としては、例えば、バークホルダー (Burkholder) 最小培地 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, 4505 (1980)] や0.5%カザミノ酸を含有するSD培地 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 5330 (1984)] などが挙げられる。培地のpHは、好ましくは約5～約8である。培養は、通常約20℃～約35℃で行なわれる。必要に応じて、通気や攪拌を行ってもよい。

[0088] 昆虫細胞または昆虫を培養する場合の培地としては、例えばGrace's Insect Medium [Nature, 195, 788 (1962)] に非働化した10%ウシ血清等の添加物を適宜加えたものなどが用いられる。培地のpHは、好ましくは約6.2～約6.4である。培養は、通常約27℃で行なわれる。必要に応じて通気や攪拌を行ってもよい。

動物細胞を培養する場合の培地としては、例えば、約5～約20%の胎児ウシ血清を含む最小必須培地 (MEM) [Science, 122, 501 (1952)] , ダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM) [Virology, 8, 396 (1959)] , RPMI 1640培地 [The Journal of the American Medical Association, 199, 519 (1967)] , 199培地 [Proceeding of the Society for the Biological Medicine, 73, 1 (1950)] などが用いられる。ヒトiPS細胞などの多能性幹細胞を培養する培地としては、mTeSR培地、Essential-8培地、StemFit AK03N培地などが用いられる。培地のpHは、好ましくは約6～約8である。培養は、通常約30℃～約40℃で行なわれる。必要に応じて通気や攪拌を行ってもよい。

植物細胞を培養する培地としては、MS培地、LS培地、B5培地などが用いられる。培地のpHは好ましくは約5～約8である。培養は、通常約20℃～約30℃で行なわれる。必要に応じて通気や攪拌を行ってもよい。

[0089] さらに別の態様において、本発明のCRISPR-Casシステムを含む、二本鎖DNAの標的配列の改変剤、および標的遺伝子の発現制御剤（以下、「本発明の剤」とも称する。）も提供される。これらの剤は、哺乳動物の疾患（例えば、上記のリピート病など）の治療または予防に用いることもできる。かかる哺乳動物としては、マウス、ラット、ハムスター、モルモットなどのげっ歯類動物、ヒト、アカゲザル、カニクイザル、ニホンザル、チンパンジーなどの霊長類動物、ウシ、ウマ、イヌ、ネコなどが挙げられる。

[0090] 哺乳動物への本発明の剤の投与は、経口的にまたは非経口的（例えば、皮下注射、筋肉注射、静脈内注入、局所注入（局所外用、局所塗布）、脳室内投与、髄腔内投与、腹腔内投与など）に行うことが可能である。経口投与のための剤としては、固体または液体の剤形、具体的には錠剤（糖衣錠、フィルムコーティング錠を含む）、丸剤、顆粒剤、散剤、カプセル剤（ソフトカプセル剤を含む）、シロップ剤、乳剤、懸濁剤等が挙げられる。一方、非経口投与のための剤としては、例えば、外用剤（例：軟膏、クリーム剤、外用液剤等）、注射剤、坐剤等が用いられ、注射剤は静脈注射剤、皮下注射剤、皮内注射剤、筋肉注射剤、点滴注射剤等の剤形を包含しても良い。

[0091] 本発明のCRISPR-Casシステムは、任意の担体、例えば薬理学上許容される担体とともに、製剤化してもよい。薬理学上許容される担体としては、例えば、ショ糖、デンプン等の賦形剤、セルロース、メチルセルロース等の結合剤、デンプン、カルボキシメチルセルロース等の崩壊剤、ステアリン酸マグネシウム、エアロジル等の滑剤、クエン酸、メントール等の芳香剤、安息香酸ナトリウム、亜硫酸水素ナトリウム等の保存剤、クエン酸、クエン酸ナトリウム等の安定剤、メチルセルロース、ポリビニルピロリド等の懸濁剤、界面活性剤等の分散剤、水、生理食塩水等の希釈剤、ベースワックス等が挙げられるが、これらに限定されるものではない。

[0092] 本発明の剤の有効成分が核酸の形態である場合に、該核酸の標的細胞内への導入を促進するために、本発明の剤は更に核酸導入用試薬を含んでいてもよい。該核酸導入用試薬としては、例えば、塩化カルシウム、Calcium enrichment試薬、アテロコラーゲン；リポソーム；ナノパーティクル；リポフェクチン、リポフェクタミン（lipofectamine）、DOGS（トランスフェクタム）、DOPE、DOTAP、DDAB、DHDEAB、HDEAB、ポリブレン、あるいはポリ（エチレンジアミン）（PEI）等の陽イオン性脂質等を用いることができる。

[0093] 4. 一本鎖アニーリング（SSA）レポーター核酸およびその用途

本発明の別の態様において、タイプI CRISPR-Casシステム用のSSAレポーター核酸が提供される。具体的には、タイプIのCRISPR-Casシステムの活性を評価するための二本鎖核酸であって、一方の核酸鎖が、

（1）レポータータンパク質の一部をコードする配列（即ち、レポーター遺伝子（「選択マーカー遺伝子」とも称される。）の一部の配列）、

（2）crRNAが標的とする配列または該配列と相補的な配列を含む挿入配列、および

（3）レポータータンパク質の一部をコードする、（1）とは異なる配列をこの順で含み、

（1）と（3）とは重複配列を有しており、（1）の重複配列以外の配列と、重複配列と、（3）の重複配列以外の配列とが、レポータータンパク質全長をコードする配列を構成し、

（2）の挿入配列の塩基長が100～3000である、  
二本鎖核酸（以下、「本発明の長鎖配列挿入型核酸」と称することがある。）が提供される。

[0094] あるいは、タイプIのCRISPR-Casシステムの活性を評価するための二本鎖核酸であって、一方の核酸鎖が、

（1）レポータータンパク質の一部をコードする配列、

（1-1）crRNAが標的とする配列および該配列と相補的な配列を含む挿入配列、ならびに

(111) レポータータンパク質の一部をコードする、(1)とは異なる配列をこの順で含み、

(1)と(111)とは重複配列を有しており、(1)の重複配列以外の配列と、重複配列と、(111)の重複配列以外の配列とが、レポータータンパク質全長をコードする配列を構成する、二本鎖核酸（以下、「本発明のダブルニッキング型核酸」と称することがある。）が提供される。以下では、「本発明の長鎖配列挿入型核酸」および「本発明のダブルニッキング型核酸」を総称して、「本発明のSSAレポーター核酸」という用語を用いることがある。

[0095] 本発明のSSAレポーター核酸では、タイプIのCRISPR-Casシステムにより標的配列近傍でDNA切断が生じ、次いで単鎖DNA領域が形成される。(1)と(3)、または(1)と(111)とは重複配列を有しており、該重複配列間でアニーリング反応が生じ、SSAレポーター核酸に生じたDNA損傷が修復される。その結果、SSAレポーター核酸には、レポータータンパク質全長をコードする配列が生じ、該タンパク質が発現される。即ち、レポータータンパク質の発現の有無やその発現量を指標とすることで、細胞内でのタイプIのCRISPR-Casシステムの活性の有無や程度を評価することができる。本発明のSSAレポーター核酸は、タイプIのCRISPR-Casシステムに適用可能であるが、好ましくはタイプI-E(特に、大腸菌由来のタイプI-E)またはタイプI-D(特に、*Microcystis aeruginosa*由来のタイプI-D)のCRISPR-Casシステムであり、タイプI-EのCRISPR-Casシステムがより好ましい。タイプIのCRISPR-Casの種類や定義等は、「1. 修飾ヌクレオチドを有するプレcrRNA」に記載した通りである。

[0096] 本発明のSSAレポーター核酸に用いるレポータータンパク質としては、例えば、蛍光タンパク質、発光酵素、発色酵素、薬剤耐性タンパク質などが挙げられるが、これらに限定されない。蛍光タンパク質としては、例えば、Sirius、TagBFP、EBFP等の青色蛍光タンパク質、mTurquoise、TagCFP、AmCyan、mTFP1、MidoriishiCyan、CFP等のシアン蛍光タンパク質、TurboGFP、AcGFP、TagGFP、Azami-Green(例：hmAG1等)、GFP、ZsGreen、EmGFP、EGFP、GFP2、HyPe

r等の緑色蛍光タンパク質、TagYFP、EYFP、Venus、YFP、PhiYFP、PhiYFP-m、TurboYFP、ZsYellow、mBanana等の黄色蛍光タンパク質、KusabiraOrange(例：hmK02等)、mOrange等の橙色蛍光タンパク質、TurboRFP、DsRed-Express、DsRed2、TagRFP、DsRed-Monomer、AsRed2、mStrawberry等の赤色蛍光タンパク質、TurboFP602、mRFP、JRed、KillerRed、mCherry、HcRed、KeimaRed(例：hdKeimaRed等)、mRaspberry、mPlum等の近赤外蛍光タンパク質が挙げられるが、これらに限定されない。発光酵素として、例えば、ホタルルシフェラーゼ、バクテリアルシフェラーゼ、合成ウミシイタケルシフェラーゼ、トゲオキヒオドシエビ (*Oplophorus gracilirostris*) ルシフェラーゼ(例：NanoLuc(登録商標)等)、分泌型のルシフェラーゼなどが挙げられる。発色酵素としては、例えば、 $\beta$ ガラクトシターゼ、 $\beta$ グルクロニダーゼ、アルカリフォスファターゼなどが挙げられる。薬剤耐性タンパク質として、例えば、カナマイシン耐性タンパク質、アンピシリン耐性タンパク質、ネオマイシン耐性タンパク質、ピューロマイシン耐性タンパク質、ブラストサイジン耐性タンパク質、ゼオシン耐性タンパク質などが挙げられる。

[0097] 本発明の長鎖配列挿入型核酸において、挿入配列の長さは、典型的には、100塩基長以上(例：200塩基長、300塩基長、400塩基長、500塩基長またはそれ以上)であり、3000塩基長以下(例：2500塩基長、2000塩基長、1900塩基長、1800塩基長、1700塩基長またはそれ以下)であり、500塩基長～2000塩基長であることが好ましく、1000塩基長～1700塩基長であることがより好ましい。一態様において、挿入配列の長さは1000塩基長である。図27の左に長鎖配列挿入型核酸の一例の模式図を示す。

[0098] 本発明のダブルニッキング型核酸において、挿入配列には、crRNAが標的とする配列(即ち、標的配列)および該配列と相補的な配列が含まれる。これにより、二本鎖核酸の両方の鎖に、標的配列が含まれることとなるので、2つの標的配列が回分配列状に配置されるといえる。各鎖にCRISPR-Casシステムが作用してDNA切断(DNAニック等)が生じ、それによりSSAを介したDNA修復反応が生じることとなる。また、上記crRNAの標的配列の3'末端塩基と該配

列と相補的な配列の5'末端塩基との間に、スペーサーとなる配列（以下、「SSA用スペーサー配列」と称することがある。）が存在してもしなくともよいが、存在しないことが好ましい。SSA用スペーサー配列が存在する場合、その長さは特に限定されないが、典型的には、1塩基長～100塩基長であり、好ましくは1塩基長～50塩基長であり、より好ましくは15～35塩基長である。よって、本発明の一実施態様において、ダブルニッキング型核酸には、(11)のcrRNAの標的配列の3'末端塩基と該配列と相補的な配列の3'末端塩基との間に、SSA用スペーサー配列（典型的には1塩基長～100塩基長）が存在する。図27の右にダブルニッキング型核酸の一例の模式図を示す。ダブルニッキング型核酸の場合に、挿入配列の長さは特に制限されないが、典型的には、64塩基長以上（例：100塩基長、150塩基長、200塩基長またはそれ以上）であり、1000塩基長以下（例：800塩基長、600塩基長、400塩基長またはそれ以下）である。

[0099] 本明細書において、「相補的」とは、核酸塩基同士が水素結合を介して、いわゆるワトソン-クリック塩基対(天然型塩基対)又は非ワトソン-クリック塩基対(フーグスティーン型塩基対、ゆらぎ塩基対 (Wobble base pair) など)を形成し得る関係を意味する。従って、「相補的な配列」には、対象の配列（例えば、crRNAの標的配列等）に対して、完全相補的な（即ち、ミスマッチなくハイブリダイズする）配列のみならず、ストリンジェントな条件下で、あるいは哺乳動物細胞の生理的条件下で標的配列とハイブリダイズし得る限り、1ないし数個（例：2、3、4、5個又はそれ以上）のミスマッチを含む配列をも含む意味で用いられる。即ち、相補鎖にミスマッチが含まれることが許容される。例えば、対象の配列に対して完全相補的な配列と、80%以上（例：85%以上、90%以上、95%以上、96%以上、97%以上、98%以上、99%以上）、最も好ましくは100%の同一性を有する配列が挙げられる。本明細書における塩基配列の同一性は、相同性計算アルゴリズムNCBI BLASTを用いて計算することができる。

[0100] 上述の通り、本発明のSSAレポーター核酸を用いて、タイプIのCRISPR-Cas

システムの活性の程度を評価することができる。よって、別の態様において、（A）タイプIのCRISPR-Casシステムの活性の評価対象の細胞に、本発明のSSAレポーター核酸を導入する工程、および（B）工程（A）でSSAレポーター核酸が導入された細胞における、レポータータンパク質の発現を検出または測定する工程により、タイプIのCRISPR-Casシステムの活性の程度を評価する工程を含む、タイプIのCRISPR-Casシステムの活性の程度を評価する方法（以下、「本発明の評価方法」と称することがある。）が提供される。

[0101] 工程（A）におけるタイプI CRISPR-Casシステムが導入された細胞は、予め、タイプI CRISPR-Casシステム（即ち、プレcrRNAまたは該RNAをコードする核酸、各Casタンパク質または該タンパク質をコードする核酸）が導入された細胞でもよく、工程（A）と同時に、タイプI CRISPR-Casシステムを導入した細胞であってもよく、また工程（A）の後に、タイプI CRISPR-Casシステムを導入した細胞であってもよい。タンパク質をコードする核酸は、RNAでもよく、DNAでもよい。あるいは、工程（A）におけるタイプI CRISPR-Casシステムが導入された細胞は、発現誘導型プロモーターの制御下にCasタンパク質が連結された核酸を有する細胞であってもよい。この場合には、各プロモーターに対応した発現誘導因子を培地に添加または除去することにより、所望のタイミングでタイプI CRISPR-Casシステムを発現させることが可能となる。

[0102] 工程（B）は、レポータータンパク質が蛍光タンパク質、発光酵素または発色酵素であれば、公知の方法により、細胞の蛍光強度、発光強度または発色強度を検出または測定することにより、行うことができる。また、レポータータンパク質が薬剤耐性タンパク質である場合には、対応する薬剤を添加した培地中で生存するか否か、または培地中の薬剤の濃度を調節することなどにより、行うことができる。あるいは、タンパク質を特異的に認識する抗体を用いて、ウエスタンブロット、免疫染色、酵素免疫測定法（例：EIA、ELISA）などにより検出又は測定することもできる。

[0103] タイプIのCRISPR-Casシステムの活性に比例して、ゲノム編集効率が向上す

ると推測されるため、本発明のSSAレポーター核酸を用いて、ゲノム編集が生じた細胞を濃縮することも可能である。よって、さらに別の態様において、  
(a) 対象の細胞に、本発明のSSAレポーター核酸を導入する工程、および  
(b) 工程(a)でSSAレポーター核酸が導入された細胞から、レポータータンパク質を発現する細胞を選別する工程を含む、細胞の選別方法（以下、「本発明の細胞選別方法」と称することがある。）が提供される。

[0104] 工程(b)は、レポータータンパク質を発現する細胞を選別できれば特に限定されないが、レポータータンパク質が蛍光タンパク質であれば、該蛍光を指標にFACS (Fluorescence-Activated Cell Soter) などのセルソーターを用いて、細胞を選別することができる。あるいは、レポータータンパク質が細胞表面に存在する場合、レポータータンパク質に結合する物質(抗体など)を磁気ビーズやアガロースビーズに連結することで、レポータータンパク質を発現する細胞群を選別することができる。また、レポータータンパク質が薬剤耐性タンパク質であれば、培地に薬剤を添加して、生存した細胞を選別することにより行うことができる。

[0105] 本発明のSSAレポーター核酸は、典型的には、該核酸を含む発現ベクターの形態で提供される。発現ベクターの種類や該ベクターにおいて使用されるプロモーター（発現誘導型プロモーターを含む）やその他の構成要素の種類や説明、本発明のSSAレポーター核酸、該核酸を含む発現ベクターまたはCasタンパク質の細胞への導入方法、および本発明に用いる細胞の種類や細胞の培養方法等は、上記「1. 修飾ヌクレオチドを有するプレcrRNA」および「3. タイプI CRISPR-Casシステムおよびその用途」で記載した内容がすべて援用される。

[0106] 本発明の評価方法および本発明の選別方法において、本発明のSSAレポーター核酸は、1種類のみ用いてもよく、2種類以上用いてもよい。2種類以上用いる場合、例えば、crRNAの標的配列およびレポータータンパク質をコードする配列が異なるSSAレポーター核酸を用いることで、一度の操作で複数のcrRNAの標的認識能力を評価することや、複数の標的部位で同時にゲノム編集が生

じた細胞のみを選別することなどができる。これらの場合に、レポータータンパク質としては、異なる蛍光色の組合せ（例：EGFPなどの緑色蛍光タンパク質とmRFPなどの赤色蛍光タンパク質との組み合わせ等）や、異なる種類のレポータータンパク質の組合せ（例：蛍光タンパク質と薬剤耐性タンパク質の組合せ等）を用いることが好ましい。

[0107] あるいは、本発明の設計方法で設計されたcrRNAの評価に、本発明のSSAレポーター核酸を2種類以上用いることで、crRNAの特異性を評価することも可能である。例えば、レポータータンパク質としてEGFPまたはmRFPを発現する2種類のSSAベクターにおいて、crRNAの標的配列に1塩基の違いを有する挿入配列を用い、EGFPとmRFPのどちらが優位にシグナルを発するか解析できる。下述の実施例で示される通り、EGFPを有するSSAレポーター核酸にはrs934739524の“C”、mRFPを有するSSAレポーター核酸には“T”のSNP配列を挿入し、それぞれを標的にするcrRNAでゲノム編集を行なった場合、“C”を標的にしたcrRNAではEGFPシグナルが、“T”を標的にしたcrRNAではmRFPシグナルが優位に観察されることが示された。

[0108] 本発明のSSAレポーター核酸は、キットの形態で提供されてもよい。キットには、本発明のSSAレポーター核酸を、1種類のみが含まれていてもよく、複数種類含まれていてもよい。また、キットには、細胞選別用の薬剤、細胞培養用の培地、細胞、核酸やタンパク質導入用の試薬、本発明の評価方法や細胞選別方法の手順を記載した説明書などを含んでいてもよい。

[0109] 5. CRISPR-Casシステムによる編集パターンの解析方法

下述の実施例で示される通り、標的配列周辺の様々な位置に複数のドロブレットデジタルPCR（ddPCR）プローブを設計し、それぞれの位置のDNAコピー数を、ゲノム編集を行なった細胞のゲノムDNAにおいて直接測定することで、ゲノム編集効率が変化する様子を捉えられた。よって、本発明の別の態様において、欠損標的部位に対する複数のPCRプローブを用いてデジタルPCRを行う工程を含む、タイプⅠのCRISPR-Casシステムによる二本鎖DNAの編集パターンを解析する方法（以下、「本発明の解析方法」と称することがある。）が

提供される。本発明の解析方法により、二本鎖DNAの編集パターン、例えばどの程度の長さの欠損変異がどの程度の割合で生じるか、を簡便に解析することができる。

[0110] 上述の通り、タイプI-EのCRISPR-Casシステムでは、典型的には、標的配列の5'側に長鎖欠損が導入され、タイプI-DのCRISPR-Casシステムでは、典型的には、標的部位やその近傍へのindel (insertion/deletion) の導入、および標的配列の5'側および3'側に長鎖欠損が導入されることが知られている。クラス1のCRISPR-Casシステムとしては、好ましくはタイプI-E(特に、大腸菌由来のタイプI-E)またはタイプI-D(特に、*Microcystis aeruginosa*由来のタイプI-D)のCRISPR-Casシステムであり、タイプI-EのCRISPR-Casシステムがより好ましい。

[0111] 本明細書において、「欠損標的部位」とは、導入されたCRISPR-Casシステムにより欠損されることが予想される部位を意味する。タイプI CRISPR-Casシステムでは、PAM配列の上流側および／または下流側の100個以上(例: 1000個、10000個またはそれ以上)のヌクレオチドからなる領域を欠損させることが可能なため、これらの領域に対するプローブとプライマーのペアを設計することができる。また、複数のプレcrRNAまたはガイドRNAを用いる場合には、これらRNAの標的領域で囲まれた領域も、欠損標的部位となる。

[0112] プローブは、間隔を狭くしてプローブの標的となる配列に配置することで緻密な解析が可能と一方で、設計するプローブの数も増大となる。解析の目的により、プローブの間隔は適宜調節できるが、典型的には、100塩基長～200000塩基長間隔でプローブがセットされ、例えば1000塩基長～100000塩基長間隔、3000塩基長～70000塩基長間隔などでセットされる。また、各プローブは、典型的には、5塩基長～40塩基長であり、好ましくは10塩基長～35塩基長、より好ましくは18～30塩基長である。

[0113] 各プローブには蛍光色素を結合させることができる。かかる蛍光色素は、種々のものが市販されており、例えば、6-FAM(フルオレセイン)、HEX、TE、Quasar 670、Quasar 570、Quasar 705、Pulsar 650、TET、HEX、VIC、JOE

、CAL Fluor Orange、CAL Fluor Gold、CAL Fluor Red、Texas Red、Cy、Cy5などが挙げられる。また、各プローブは、さらに蛍光色素からの蛍光を消光できるクエンチャーが結合されていることが好ましい。クエンチャーとしては、蛍光色素からの蛍光を消光できるものであれば特に制限されず、蛍光色素であっても非蛍光色素であってもよいが、検出の精度の観点から非蛍光色素が好ましい。具体的なクエンチャーとしては、例えば、Black Hole Quencher 1 (BHQ1)、6-カルボキシテトラメチルローダミン (TAMRA)、6-カルボキシ-X-ローダミン (ROX)、Eclipse Dark Quencher、Iowa black FQ (IBFQ)、minor groove binder (MGB)、非蛍光クエンチャー (NFQ) などが挙げられる。蛍光色素とクエンチャーとの組合せとしては、例えば、6-FAMとBHQ1との組み合わせ、HEXとBHQ1との組み合わせなどが挙げられるが、これらに限定されない。好ましい態様において、各プローブの5' または3' 末端に蛍光色素が結合され、反対側の末端にクエンチャーが結合される。

[0114] 本発明に用いるデジタルPCR法としては、例えば、ドロプレットデジタルPCR (ddPCR) 法、チップベースのデジタルPCR (Chip-based digital PCR; cdPCR) 法などが挙げられる。デジタルPCRは、例えば、次の手順により行われる。デジタルPCR装置に、プローブセット、DNAサンプル、PCRプライマーセット及びDNAポリメラーゼを含む反応溶液をセットする。ここで各反応液成分の混合比率は、公知の範囲で適宜選択し、最適化することができ、使用するプライマーセットやプローブセット等に応じて適宜変更することができる。

[0115] 反応溶液はddPCRの場合、水-油エマルジョンによって微小ドロプレット化され（例えばナノリットルサイズ）、cdPCRの場合は、デジタルPCR装置によりチップに設けられた数千から数万という多数の微小な反応ウェル（例えば開口の大きさが数十 $\mu\text{m}$ ）に分配される。このように微小に画分された反応ミックスにはDNA上の測定したい領域が含まれる状態（好ましくは1コピー程度）と含まれない状態となるよう、DNAサンプル量を調節し、PCRを実施する。この時、測定DNA領域が存在する反応ドロプレットもしくはウェルでは、PCR増幅反応が起き、その際に、DNAポリメラーゼのヌクレアーゼ活性によ

り、標的部位に結合したプローブが切断され蛍光色素がクエンチャーから乖離し、蛍光を発する。デジタルPCR装置のリーダーにより、蛍光が検出されたドロップレット数、またはウェルの数を計測することで、全ドロップレット数またはウェル数から統計的計算によってDNAコピー数の定量を行うことができる。また、2種類以上のプローブ蛍光色素を同時に使用することで（例えば6-FAMとHEX）2ヶ所以上のDNA領域について、同サンプルを用いてコピー数の比較（例えば、DNA欠損が起きると予想される領域と起きないと予想される領域の比較）を行うことができる。

[0116] このようにしてcrRNAやガイドRNAからの距離におけるDNAの欠損率を算出することができる。具体的には、例えば遺伝子XにおけるCas3の欠損誘導パターンを解析する場合、crRNA標的配列から進行方向に向かって約1kb、10kb、20kb、進行方向とは逆に1kb（-1kb）、3.5kb（-3.5kb）のようにデジタルPCRプローブおよびプライマーを設計し、比較対象としてCas3によるゲノム編集の範囲ではないと考えられる領域（例えば別遺伝子Y上）にもデジタルPCRプローブおよびプライマーを設計する。遺伝子Xが常染色体上の遺伝子の場合、細胞は2コピーを保持しているので、ゲノム編集が行われていない場合はどの位置で測定してもおおよそ2コピーの測定結果が得られる。しかし、Cas3によって欠損変異が誘導された場合、比較対象（遺伝子Y）のコピー数は依然おおよそ2コピーであるが、遺伝子Xのコピー数はその位置によってコピー数が減少する（例えばcrRNAから1kb離れた位置のコピー数が1.5コピーの場合、25%のコピー数減少、すなわち1kb以上の長さの欠損が25%起きていることを示す）。遺伝子X上のどの位置のコピー数がどの程度減少するかは、Cas3がcrRNA標的配列からどのような切断パターンを示すかに依存するため、Cas3の欠損変異誘導パターンを測定することができる。

[0117] デジタルPCRに用いることができるプライマーとしては、具体的には、例えば、ヒトB2M遺伝子用の配列番号103、104、106、107、109、110、112、113、115、116、118、119、121、122、124および125のいずれかで示される配列を含むプライマー、ヒトH

LA遺伝子用の配列番号127、128、130および131のいずれかで示される配列を含むプライマー、ヒトDMD遺伝子用の配列番号132、133、135、136、138、139、141、142、144、145、147、148、150、151、153、154、156、157、159、160、162、163、165および166のいずれかで示される配列を含むプライマーなどが挙げられる。これらのプライマーは、適宜フォワードプライマーとリバースプライマーを組み合わせる用いることができる。

[0118] デジタルPCRに用いることができるプローブとしては、具体的には、例えば、ヒトB2M遺伝子用の配列番号102、105、108、111、114、117、120および123のいずれかで示される配列を含むプローブ、ヒトHLA遺伝子用の配列番号126または129で示される配列を含むプローブ、ヒトDMD遺伝子用の配列番号134、137、140、143、146、149、152、155、158、161、164および167のいずれかで示される配列を含むプローブなどが挙げられる。これらのプローブは、2種類以上を組み合わせる用いることもできる。

[0119] 本発明の別の態様において、配列番号103、104、106、107、109、110、112、113、115、116、118、119、121、122、124、125、127、128、130、131、132、133、135、136、138、139、141、142、144、145、147、148、150、151、153、154、156、157、159、160、162、163、165および166のいずれかで示される配列を含むプライマー、ならびに／または配列番号102、105、108、111、114、117、120、123、126、129、134、137、140、143、146、149、152、155、158、161、164および167のいずれかで示される配列を含むプローブも提供される。これらのプライマーおよびプローブは、キットや剤（例：治療剤、試剤等）の形態で提供されてもよい。

[0120] 以下に実施例を挙げて本発明をより具体的に説明するが、本発明はこれら

に何ら限定されるものではない。

## 実施例

### [0121] <材料および方法>

#### 倫理的承認

患者由来のiPSCの樹立と使用は、京都大学大学院医学研究科および京都大学医学部附属病院の倫理委員会によって承認された（承認番号R0091およびG259）。すべての患者情報は匿名に保たれ、書面によるインフォームドコンセントが得られた。

### [0122] 化学修飾が施されたプレcrRNAの作製

Intergrated DNA Technologies (IDT)社への修飾核酸(RNA)合成依頼により作製した。

### [0123] 5' キャップおよびポリAが付加されたプレcrRNAの作製

Invitrogen mMMESSAGE mMACHINE T7 Ultra Transcription Kitを用い、5' Capアナログ (ARCA) とPolyAテールを含むプレcrRNA配列をin vitro転写 (IVT) により合成した。IVTの鋳型はT7プロモーター配列を含むPCRフォワードプライマー (GAAATTAATACGACTCACTATAGGATGTGTTGTTTGTGTGATACTA ; 配列番号 2) とリバースプライマー (CCCGGGCtgcaggaattc ; 配列番号 3) を用い、プレcrRNA配列 (B 2 M# 1 またはB 2 M# 4) を含むプラスミド (pPV-C1-crRNA-EF1a-G2ABA) を鋳型としてPCRによって用意した。5' CapアナログはT7ポリメラーゼによる転写の際にCapアナログ : GTP = 4 : 1 が混合されていることで取り込まれ、PolyAテールは転写後、E. coli Poly(A) Polymerase (E-PAP) の反応によって付加した。最終的なpre-crRNA配列の5' にはリーダー配列が含まれていた。

[0124] 本実施例で用いたプレcrRNAが標的とする配列（標的配列）は以下の通りである。

[0125]

[表1-1]

| 名称             | 配列(5' →3' )                       | 配列番号 |
|----------------|-----------------------------------|------|
| B2M#1          | GCCACGGAGCGAGACATCTCGGCCCGAATGCT  | 4    |
| B2M#4          | AGAGAGTAGCGCGAGCACAGCTAAGGCCACGG  | 5    |
| A24-be-ex1-cr1 | GCTGGGACTCCCCAATCCATACACCGCCTTCG  | 6    |
| A24-ex1-cr1    | CCAATCAGTGTCGTCGCGGTCGCTGTTCTAAA  | 7    |
| A24-ex2-cr1    | TGAAGGCCCCACTCACAGACTGACCGAGAGAAC | 8    |
| A24-ex2-cr2    | GCCCCACTCACAGACTGACCGAGAGAACCTGCG | 9    |
| A24-ex3-cr1    | GATTACATCGCCCTGAAAGAGGACCTGCGCTC  | 1 0  |
| A24-ex3-cr2    | TGGGAGGCGGCCCATGTGGCGGAGCAGCAGAG  | 1 1  |
| A24-ex3-cr3    | GAGACGCTGCAGCGCACGGGTACCAGGGGCCA  | 1 2  |
| A24-ex3-cr4    | CGCCCGTCCGACCCACGTCGCAGCCAAACAT   | 1 3  |
| A24-ex3-cr5    | AGGACCTGCGCTCTTGACC GCGGCGGACATG  | 1 4  |
| HLA-A24:02 F1  | AAACTGCGGAGTTGGGGAATCCCCAAGGCTGG  | 1 5  |
| HLA-A24:02 R2  | ATGGCCACATGCATGCTGGTGGAGTGTCCTAT  | 1 6  |
| HLA-A24:02 R3  | ATTATCCCAGGTGCCTGTGTCCAGGCTGGTGT  | 1 7  |
| HLA-A24:02 R4  | TCGCTGTTCCCTCCTCAGGGAATAGAAGATTA  | 1 8  |
| HLA-B52:01 F1  | GCTCTCGGAGCCTGAGACCCTGAGAGCCCCGC  | 1 9  |
| HLA-B52:01 R5  | AGGAGGAAAATGGGATCAGCGCTAGAATGTCG  | 2 0  |
| HLA-B52:01 R7  | AGCAGAGATACACATGCCATGTACAGCATGAG  | 2 1  |
| HLA-A24:02 F3  | GACCCTACATAGGTTGGGAGAGGGAGAAAAGA  | 2 2  |
| HLA-A24:02 F4  | AAGGACCCTACATAGGTTGGGAGAGGGAGAAA  | 2 3  |
| HLA-A24:02 R0  | GGGTGAAGGGTGGGGTCTGAGATTCTTGTCT   | 2 4  |
| HLA-A24:02 R3  | ATTATCCCAGGTGCCTGTGTCCAGGCTGGTGT  | 2 5  |
| HLA-A24:02 R9  | ACGATCCCTCGAATACTGATGACTGGTTCCT   | 2 6  |

[表1-2]

| 名称                                          | 配列 (5' → 3' )                      | 配列番号 |
|---------------------------------------------|------------------------------------|------|
| HLA-A24:02 R10                              | GGATAAAATCTCTGACGGAATGACGGAAAGAC   | 2 7  |
| HLA-A24:02 R11                              | GAGGGGAGACAATTGGGACCAACACTAGAATA   | 2 8  |
| HLA-B52:01 F2                               | TGAAACTCGTGGGAGTGGGGAATCCCCAACGC   | 2 9  |
| HLA-B52:01 F3                               | AAGTGAAACTCGTGGGAGTGGGGAATCCCCAA   | 3 0  |
| HLA-B52:01 F4                               | GACCCGACATAGGTTGGGAGAAGAAGTGAAAC   | 3 1  |
| HLA-B52:01 F7                               | AAGGACCCGACATAGGTTGGGAGAAGAAGTGA   | 3 2  |
| HLA-B52:01 R4                               | ATTACATCGCCCTGAACGAGGACCTGAGCTCC   | 3 3  |
| HLA-B52:01 R6                               | CGCCTGAATTTTCTGACTCTTCCCATCAGACC   | 3 4  |
| HLA-B52:01 R8                               | GAGGGGGATGAGGGGTCATATCTTCTCAGG     | 3 5  |
| HLA-B52:01 R9                               | GGATGACGTCTCTGAGGAAATGGAGGGGAAGA   | 3 6  |
| HLA-B52:01 R10                              | TCCCTGTTCCCCGCTCAGAGACTCGAACTTTC   | 3 7  |
| HLA-B52:01 R11                              | AGCTCAGGTAGGGAAGGGGTGAGGGGTGGGGT   | 3 8  |
| DMPK DownSNP1C<br>(図 34 上)<br>(図 50 の 32nt) | gcegettecgaaCegceccacgggeectcegett | 3 9  |
| DMPK DownSNP1T                              | gcegettecgaaTegceccacgggeectcegett | 4 0  |
| DMPK DownSNP1<br>12nt<br>(図 34 下)           | cegettecgaaCegceccacgggeectcegett  | 4 1  |
| DMPK DownSNP1C<br>30nt<br>(図 50 の 30nt)     | gcegettecgaaCegceccacgggeectcegc   | 4 2  |

[表1-3]

| 名称                                      | 配列(5' →3' )                        | 配列番号 |
|-----------------------------------------|------------------------------------|------|
| DMPK DownSNP1C<br>28nt<br>(図 50 の 28nt) | gccgcttccgaaCcgcccacgggcctcc       | 4 3  |
| DMPK DownSNP1C<br>26nt<br>(図 50 の 26nt) | gccgcttccgaaCcgcccacgggcct         | 4 4  |
| DMPK DownSNP1C<br>1MM<br>(図 51 の 1MM)   | gccgcttccgaaCcgcccacgggcctccgctG   | 4 5  |
| DMPK DownSNP1C<br>2MM<br>(図 51 の 2MM)   | gccgcttccgaaCcgcccacgggcctccgcGt   | 4 6  |
| DMPK DownSNP1C<br>4MM<br>(図 51 の 4MM)   | gccgcttccgaaCcgcccacgggcctccActt   | 4 7  |
| DMPK UpSNP1T                            | cgggtggcaaggggcgggtggagcgcggggcg   | 4 8  |
| DMPK UpSNP1T-2                          | cgcagctaagcgggtggcaaggggcgggtgga   | 4 9  |
| DMPK UpSNP1T-3                          | tgccagctaagcgggtggcaaggggcgggtg    | 5 0  |
| DMPK UpSNP3T                            | ggatgccaaagggttgccaccggcccgcatecc  | 5 1  |
| DMPK UpSNP3T-2                          | gggatgccaaagggttgccaccggcccgcatecc | 5 2  |
| DMPK AGG<br>DownSNP2C                   | tcctcggacatctcccgggaccagctcacaat   | 5 3  |
| AAVS1#1                                 | gtggtcccagctcggggacacaggatccctgg   | 5 4  |

[表1-4]

| 名称                         | 配列 (5' →3' )                      | 配列番号 |
|----------------------------|-----------------------------------|------|
| DMD#20<br>(出願済み明細書<br>に記載) | ctgacagtagaccccagtagatgcttccctaaa | 5 5  |
| DMD#23<br>(出願済み明細書<br>に記載) | tcttggtgagaatcatattctgtagtacaagg  | 5 6  |
| DMDexon46_1                | actccatctcaaatacatacatatagctac    | 5 7  |
| DMDexon47_1                | gaaactgagacaaaggggttaataaccagctc  | 5 8  |
| DMDexon48_1                | attgtaaaaggaagtcacctcatgtacaagga  | 5 9  |
| DMDexon49_1                | cttattattttattaatgagtcaaacaggcctt | 6 0  |
| DMDexon50_1                | ttcatgcctttccccaggcagccctcattcag  | 6 1  |
| DMD#25 (Ex51 を標<br>的とする)   | ttggcatttatgcaatgccatgttcaaataaa  | 6 2  |
| DMDexon52_1                | acccatctgactagacgctgtgcataattcttt | 6 3  |
| DMDexon53_1                | atcacttcaaaattggtatacgtatttatgta  | 6 4  |
| DMDexon54_1                | ccttgatccttattataacctctcttgatctc  | 6 5  |
| DMDex45_1kb<br>(図 16)      | cctgaatctgcgggtggcaggaggtctgcaaac | 6 6  |
| DMDex45_40kb<br>(図 16)     | ctcaagcagacaaatctccagtggaataaaggt | 6 7  |
| DMDex45_95kb<br>(図 16)     | acaaaataattacttggttaaagtggtgaagga | 6 8  |

[0129] CRISPR-Cas3およびCRISPR-Cas9の形質導入

iPSCの形質導入のために、iMatrix-511またはiMatrix-511 silkでコーティ

ングされた12ウェルプレートのウェルに $1.5 \sim 3 \times 10^5$ 個の細胞を播種した。翌日、細胞に計1000 ~2000ngのプラスミドDNAもしくはRNAを2 ~4  $\mu$ LのLipofectamine Stem(サーモフィッシャーサイエンティフィック)によりトランスフェクトした。HEK293T細胞の形質導入の場合は、 $2 \times 10^5$ 個の細胞を12 ウェルプレート、もしくは $1 \times 10^6$ 個の細胞を6 ウェルプレートのウェルに播種し、翌日、4 ~8  $\mu$ LのLipofectamine 2000 (サーモフィッシャーサイエンティフィック)を用いて計1000~2000ngのプラスミドDNAもしくはRNAをトランスフェクトした。CRISPR-Cas3及びCascadeタンパク質群発現プラスミドはpPV-Dual\_promoter-EF1 $\alpha$ -2xNLS-Cascade+Cas3 (RD) -iPA (Puromycin耐性遺伝子を発現)、pPV-Dual\_promoter-EF1 $\alpha$ -2xNLS-Cascade+Cas3 (RD) -iZA (Zeocin耐性遺伝子を発現)、pPV-Dual\_promoter-EF1 $\alpha$ -2xNLS-Cascade+Cas3 (RD) -iCA (mCherryを発現)、pPV-TRE3G-Bi(263+751)-EF1 $\alpha$ -Tet3G-iPA (DOX誘導型、Puromycin耐性遺伝子を発現)を用いた。crRNA発現プラスミドはU6プロモーターでプレcrRNAが発現するpBSIIKS-U6-crRNAまたはpPV-C1-crRNAベクター(EF1 $\alpha$ によりEGFPや薬剤耐性遺伝子を同時発現させるものも含む)を用いた。SSAレポーター選別を適用する場合、適切な標的配列を含むpPV-EF1 $\alpha$ -EGxxFP-iPA、pPV-EF1 $\alpha$ -EGxxFP-iBA、pPV-EF1 $\alpha$ -mRxxFP-iPA、pHL-EF1 $\alpha$ -EGxxFP-iPA、pHL-EF1 $\alpha$ -mRxxFP-iPA、pHL-EF1 $\alpha$ -Puro-SSA-A、またはpHL-EF1 $\alpha$ -EGFP-IRES-Puro-SSA-Aを用いた。薬剤選択(Puromycin、Blasticidin、Zeocin)を行う場合、トランスフェクションの1~3日後に、任意の濃度の薬剤を含む培地で培養を行った。細胞はゲノムDNA、タンパク質の抽出またはFACS(蛍光活性化セルソーティング)分析のために回収した。エレクトロポレーションによりRNA導入をする場合、 $3 \times 10^5$ 個の細胞を4D-Nucleofector (LONZA) のP4 Primary Cell 4D-Nucleofector X Kit Sを用い、エレクトロポレーションプログラムCA-189を用いて行った。

[0130] トランスフェクションを複数回行う場合には、上記の方法でトランスフェクションを行った後、その時の細胞毒性に応じて数日培養し、上記細胞の播種からトランスフェクションを繰り返した。トランスフェクションの間隔は

細胞の増殖速度やトランスフェクションの条件、トランスフェクションに対する感受性を考慮して、大凡3日から15日の間で調節した。また、複数トランスフェクションの過程の途中で細胞を一度凍結保存し、融解後にトランスフェクションを再開する場合もあった。

[0131] PCRによるゲノム編集の有無の判定及びHLA染色による編集効率の測定

Cas3による欠損変異の誘導の有無はPCRによって判定した。HLA-A\*24:02遺伝子については通常のPCR（図19）、DMPK遺伝子についてはヘテロSNP上に設計したアレルト異的プライマーを用いてアレルト異的PCRを行った（図35、36）。また、検出感度向上のためNested PCRも用いた（図38～47）。PCR酵素はLA Taq HS（TaKaRa）やKOD One（TOYOBO）を使用した。使用したPCRプライマーは下記表2に示す。

[0132] ヒトB2M遺伝子をゲノム編集の対象にした場合、遺伝子ノックアウト効率は細胞表面のHLA-A/B/C染色によって算出した。ゲノム編集後、細胞をしばらく培養し（好ましくはHLA分子が細胞表面から無くなる3～4日間以上）、細胞をトリプシン（TrypLE Selectなどトリプシン代替試薬も含む）で単離・回収した。回収した細胞はPBSで洗浄し、2% FBS/PBSに50～100倍希釈した抗HLA-A/B/C抗体（iPS細胞：BioLegend Pacific Blue anti-human HLA-A,B,C Antibody、HEK293T細胞：BD BV421 Mouse anti-human HLA-A2）で染色を行った（氷上30分）。HLA染色した細胞はフローサイトメトリーにより解析し、HLA染色ネガティブな細胞%を算出した。

[0133]

[表2]

| 名称                                                                | 配列                           | 配列番号 |
|-------------------------------------------------------------------|------------------------------|------|
| HLA-A24_4kb_F5<br>(HLA-A24 遺伝子用)                                  | GAGTGTGGCTTGGACTTAATGAGG     | 6 9  |
| HLA-A24_Rev2                                                      | AGCTCAGTGCACCATGAAGTTG       | 7 0  |
| DM1_HPS1051_5kb_fwd1<br>(HPS1051 細胞用)                             | ccctggctcacacgtgtactgacac    | 7 1  |
| HPS1051_SNP_C_rev_1mm                                             | aagcggaggcccggtggAcgG        | 7 2  |
| HPS1051_SNP_T_rev_1mm                                             | aagcggaggcccgltggAcgA        | 7 3  |
| UpSNP4G_1mm_F<br>(CiRA00213iPS 細胞用<br>Nested 1 <sup>st</sup> PCR) | ggccagaagttctggttctccaccGgag | 7 4  |
| DownSNP2C_R                                                       | cgggcgcctgagattgGgag         | 7 5  |
| UpSNP3_T_1mm_dir2                                                 | cgggccggtggcaacccttgacaT     | 7 6  |
| DMPK-CTG-3' -Rev                                                  | ACCAGTTGCTGACCTGCGTG         | 7 7  |
| DownSNP2C_R2                                                      | cgcgggcgcctgagattgGgag       | 7 8  |
| DownSNP2C_R3                                                      | cgcgggcgcctgagattgtAag       | 7 9  |

[0134] TapeStation解析

DNAサンプルはHigh Sensitivity D5000 ScreenTape/試薬キットを用いて、Agilent 2200 TapeStationまたはAgilent 4200 TapeStationにて解析した。欠損変異を持つDNAの割合はTapeStation softwareの機能によって400～3700 bpのサイズのDNAの割合として算出した。

[0135] SSAレポーターベクターの構築方法

レポーター遺伝子EGFP、mRFP、Puro<sup>R</sup>を2つに分割し、互いに150～350 bp程度の相同配列を持つように配列を加え、さらに標的配列の挿入のための2つの制限酵素サイト（AfeIまたはEsp3Iサイト）を加えた。これら分割したレポーター遺伝子はpHL-EF1aまたはpPV-EF1aをバックボーンとするベクターに挿

入した。任意の長さのcrRNA標的配列は、分割したレポーター遺伝子の間に制限酵素による切断及びIn-Fusion反応によって挿入した。

[0136] SSAレポーターベクターを介した細胞選別

SSAレポーターベクターによる細胞選別を行う場合、細胞にCas3及びCascadeタンパク質群を発現するベクター、crRNAを発現するベクターに加え、SSAレポーターベクターをトランスフェクションした。SSAベクターのレポーター遺伝子にPuro-SSAベクターを用いる場合、Puromycin含有培地により培養することで細胞の選別を行った。レポーター遺伝子にEGFPやmRFPの蛍光タンパク質を用いる場合は、トランスフェクション後、細胞をトリプシン（もしくはトリプシン代替試薬）を用いて細胞を回収し、BD FACSAria II (BD)セルソーターを用いてEGFP及びmRFP陽性細胞の分離を行った。

[0137] シングルセルクローニング

ゲノム編集が起きたiPS細胞のサブクローンを分離するために、限界希釈法またはコロニーピッキング法を使用した（図36）。EGFP、mRFPの蛍光タンパク質を用いるSSAベクターを用いる場合は、EGFPとmRFP両陽性細胞のセルソーティングの際にiMatrix-511 silkでプレコートした96ウェルプレートのウェルに単一細胞ソーティングを実行した。単離された細胞を拡大培養し、凍結保存とゲノムDNA抽出用に回収した。ターゲット領域は、表2または下記表3のプライマーを使用してジェノタイピングのためにPCR増幅した。欠損パターンを分析するために、サンガーシーケンシングを実行した。

[0138]

[表3]

| 名称                           | 配列(5' →3' )                        | 配列番号  |
|------------------------------|------------------------------------|-------|
| crRNA_DMDexon45check_rev     | acatctgatgtgtgcccacgc              | 8 0   |
| crRNA_DMDexon55check_dir     | cgcaaatgttgaggttttcagagge          | 8 1   |
| crRNA_DMDexon55check_rev     | ggatttggctgaaaatcacattgtctcg       | 8 2   |
| crRNA_DMDexon51check_dir     | gaggetataaaagccaagaactgacaatg      | 8 3   |
| crRNA_DMDexon51check_rev     | catttgccagtcagccctgggtgtctgc       | 8 4   |
| crRNA_DMDexon45check_rev2    | ctatggtatacatctgatgtgtgcccacgc     | 8 5   |
| crRNA_DMDexon45check_rev3    | cttctggcctaccatttgttgatcacc        | 8 6   |
| DMDexon45-55check_dir1       | cctaccatagctgatgggtaaaatgtaaac     | 8 7   |
| DMDexon45-55check_dir2       | gaagcttgcagtttcttgagattagaaatagag  | 8 8   |
| DMDexon45-55check_rev1       | gactgggtgtctctattactaagcaatgactgtc | 8 9   |
| DMDexon45-55check_rev2       | gcaaatgcttactgaaaccttccatgcac      | 9 0   |
| DMDexon45 (45-55) check_rev3 | gactccatggtgatgatgagcc             | 9 1   |
| DMDexon45 (45-55) check_rev4 | ctctccgctcctctcttttactg            | 9 2   |
| DMDexon45 (45-55) check_rev5 | caccacaggctttaacttctgcg            | 9 3   |
| DMDexon55 (45-55) check_dir3 | ggttlaagccactggacaaaaacg           | 9 4   |
| DMDexon55 (45-55) check_dir4 | gagtagcctgatcgacactggac            | 9 5   |
| DMDexon55 (45-55) check_dir6 | CCTGAAGTACAAGGACGACGG              | 9 6   |
| DMDexon55 (45-55) check_dir7 | CTTCAGAATTAATCCGTGCGCC             | 9 7   |
| DMDexon55 (45-55) check_dir8 | cacacacaAACCACCGaaccacaaag         | 9 8   |
| DMDexon45 (45-55) check_rev6 | gtagacttagaatggaattctgggc          | 9 9   |
| DMDexon45 (45-55) check_rev7 | gaatgggtccctgggtgctgtgcttagc       | 1 0 0 |
| DMDexon45 (45-55) check_rev8 | ccgcggtatctgttgttcgc               | 1 0 1 |

[0139] ddPCRアッセイによるゲノム欠損の定量化

ゲノムDNAのコピー数を測定するために、Primer3Plus (<https://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>)ソフトウェアを使用して、ddPCRプローブとプライマーペアを設計した。ターゲットのゲノム領域(B 2M遺伝子、ジストロフィンエクソン44-55の遺伝子座など)を検出するために、5' -6-FAMフルオロフォア、3' -BHQ1で標識されたDNAプローブを使用した。リファレンスプローブは5' -HEXフルオロフォア、3' -BHQ1で標識されたプライマーを用いた。すべてのプライマーペアとプローブを、下記表4に示す。

[0140]

[表4-1]

| 名称                           | 配列 (5' →3' )                | 配列番号  |
|------------------------------|-----------------------------|-------|
| ddPCR_B2M_behind_3.5kb_probe | CCCAACCCCAGGCAGGGCAGC       | 1 0 2 |
| ddPCR_B2M_behind_3.5kb_fwd   | AGCTGAGCTGGTATCCAATG        | 1 0 3 |
| ddPCR_B2M_behind_3.5kb_rev   | ATTCCTGGGTAAGTCCTGGT        | 1 0 4 |
| ddPCR_B2M_behind_1kb_probe   | CCACCACCACGAAATGGCGGCACC    | 1 0 5 |
| ddPCR_B2M_behind_1kb_fwd     | GACTTCCAAGATCTCTGCCC        | 1 0 6 |
| ddPCR_B2M_behind_1kb_rev     | TAAACATGACAGGCAGACCC        | 1 0 7 |
| ddPCR_B2M_1kb_probe          | CCACAGGGCCCATGCCGCCC        | 1 0 8 |
| ddPCR_B2M_1kb_fwd1           | ACACAGGGGATAAATGGCAG        | 1 0 9 |
| ddPCR_B2M_1kb_rev1           | GAAACAACCAGGCAAAGAGC        | 1 1 0 |
| ddPCR_B2M_10kb_probe         | GGCGTGAGCCACCGTGCCTGC       | 1 1 1 |
| ddPCR_B2M_10kb_fwd1          | TTAACTCTTCACCTGGCTGC        | 1 1 2 |
| ddPCR_B2M_10kb_rev1          | CTGCTCACCTTGACTTTCCA        | 1 1 3 |
| ddPCR_B2M_10kb_probe2        | TGTGCCCTGAGTGCTTCTCCCTGGC   | 1 1 4 |
| ddPCR_B2M_10kb_fwd2          | AGCAGGTCATTTCAGTAGCC        | 1 1 5 |
| ddPCR_B2M_10kb_rev2          | ACTAAGGCATGCTCCAAAGG        | 1 1 6 |
| ddPCR_B2M_35kb_probe         | ACCCCATCCTGTTGGCCACAACCCA   | 1 1 7 |
| ddPCR_B2M_35kb_fwd           | TCTATGAGGAAGGACTGCCA        | 1 1 8 |
| ddPCR_B2M_35kb_rev           | TTGTTCTGTACCAGGGCTTG        | 1 1 9 |
| ddPCR_B2M_50kb_probe         | GTGAGACTCTGTCCCACCCTCCCACCA | 1 2 0 |
| ddPCR_B2M_50kb_fwd2          | TGGGGTAGTCCATGGTAGTT        | 1 2 1 |
| ddPCR_B2M_50kb_rev2          | GAGTTGAGATGCACCACTGT        | 1 2 2 |

[0141]

[表4-2]

| 名称                   | 配列 (5' → 3' )                | 配列番号  |
|----------------------|------------------------------|-------|
| ddPCR_B2M_71kb_probe | TCCCCAGGGAAGCCTTCTCATCCAGCA  | 1 2 3 |
| ddPCR_B2M_71kb_fwd   | TGCTCCACCTGCTACTAAGA         | 1 2 4 |
| ddPCR_B2M_71kb_rev   | GAGGACAGGTGTGATTACGG         | 1 2 5 |
| A24_ddPCR_probe      | CCTCTGGCTCGCGGCGTCGC         | 1 2 6 |
| A24_ddPCR_F          | CTCCCACTCCATGAGGTATT         | 1 2 7 |
| A24_ddPCR_R3         | CCTTCACTTTCCCTGTCTCC         | 1 2 8 |
| B52_ddPCR_probe      | CCTCGGACTCGCGGCGTCGC         | 1 2 9 |
| B52_ddPCR_F          | ATTTCTACACCGCCATGTCC         | 1 3 0 |
| B52_ddPCR_R2         | GCAGGTTCTCTCGGTAAGTC         | 1 3 1 |
| DMDexon7_ddPCR_F     | tgtgtttTAGGCCAGACC           | 1 3 2 |
| DMDexon7_ddPCR_R     | AGCAGTGGTAGTCCAGAA           | 1 3 3 |
| DMDexon7_probe       | AGTCGTTGTGTGGCTGACTGCTGGCA   | 1 3 4 |
| DMDex45_ddPCR_F      | ggaactccaggatggcattgg        | 1 3 5 |
| DMDex45_ddPCR_R      | gacagctgtttgcagacct          | 1 3 6 |
| DMDexon45_probe      | tgggaagcctgaatctgcggtgcea    | 1 3 7 |
| DMDin50_ddPCR_F      | ccccaggaagggcattaag          | 1 3 8 |
| DMDin50_ddPCR_R      | agttcagatgttgteccc           | 1 3 9 |
| DMDin50_probe        | cccccatgaccccacacttccgt      | 1 4 0 |
| DMDin47_ddPCR_F      | ctgacttccccctcttggtgac       | 1 4 1 |
| DMDin47_ddPCR_R      | caggaatgagcatgtgacct         | 1 4 2 |
| DMDintron47_probe    | tggcctgaagccgtttcagaaccacaca | 1 4 3 |
| DMDin48_ddPCR_F      | tgcagctttactccacac           | 1 4 4 |
| DMDin48_ddPCR_R      | ggcagttcaagatttgctgg         | 1 4 5 |

[0142] [表4-3]

| 名称                      | 配列 (5' → 3' )                | 配列番号  |
|-------------------------|------------------------------|-------|
| DMDintron48_probe       | cccaggaccctagcggaagagcagc    | 1 4 6 |
| DMDin51_ddPCR_F         | ctgttgctggatactttcgc         | 1 4 7 |
| DMDin51_ddPCR_R         | cgactcactctctctctcat         | 1 4 8 |
| DMDintron51_probe       | cccaggaccctagcggaagagcagc    | 1 4 9 |
| DMDex53_ddPCR_F         | caatggctggaagctaagga         | 1 5 0 |
| DMDex53_ddPCR_R         | tgtatagggaccctccttcc         | 1 5 1 |
| DMDexon53_probe         | agcaggctcttaggacaggccagagcca | 1 5 2 |
| DMDex55_ddPCR_F         | ggctgctttggaagaaactc         | 1 5 3 |
| DMDex55_ddPCR_R         | cagctcttttactcccttgg         | 1 5 4 |
| DMDexon55_probe         | actgcaacagtlcccccggacctgga   | 1 5 5 |
| ddPCR_ex45_16kb_fwd     | cccagcttggtcaagcataa         | 1 5 6 |
| ddPCR_ex45_16kb_rev     | agactgcaacttttaggccag        | 1 5 7 |
| ddPCR_ex45_16kb_probe   | tcagtaacggtggagacctaggcggca  | 1 5 8 |
| ddPCR_ex45_38kb_fwd     | tcaccacttcagcctctact         | 1 5 9 |
| ddPCR_ex45_38kb_rev     | aggacgglatgaaaagccac         | 1 6 0 |
| ddPCR_ex45_38kb_probe   | accaacaccaagtlcccacaccccc    | 1 6 1 |
| ddPCR_ex45_90kb_fwd     | tggttaggaagatgagctggt        | 1 6 2 |
| ddPCR_ex45_90kb_rev     | agtatgggggatacctcttcc        | 1 6 3 |
| ddPCR_ex45_90kb_probe   | ccccacatgtcaagggtggagccagg   | 1 6 4 |
| ddPCR_ex45_Neg1kb_fwd   | acgttgccctcaagttctctg        | 1 6 5 |
| ddPCR_ex45_Neg1kb_rev   | agtgaagaggatgagcggag         | 1 6 6 |
| ddPCR_ex45_Neg1kb_probe | cccaggcccccaatatacaccgagggc  | 1 6 7 |

[0143] 単離したゲノムDNAを、まずEcoRI制限酵素(TaKaRa)によって37℃で一晩切

断した。次に、ddPCR反応液を、11  $\mu$ LのddPCR Supermix for Probes (No dUTP) (バイオラッドラボラトリーズ)、1  $\mu$ Lの20  $\mu$ Mターゲットのフォワードプライマーとリバースプライマーのペア、および0.6  $\mu$ Lの10  $\mu$ Mターゲットプローブ、1  $\mu$ Lの20  $\mu$ Mリファレンスのフォワードプライマーとリバースプライマーのペア、および0.6  $\mu$ Lの10  $\mu$ Mリファレンスプローブ、EcoRIでダイジェストしたゲノムDNAを混合することで調製し、および総量が22  $\mu$ Lとなるように超純水で調整した。ドロップレットは、QX200 Droplet GeneratorまたはQX200 Automated Droplet Generator (バイオラッドラボラトリーズ)を使用して生成し、PCR反応をC1000 Thermal Cycler (バイオラッドラボラトリーズ)で実行した。ddPCR反応は、次の3ステップの熱条件下で実行した。ステップ1、95°Cで10分間、ステップ2、94°Cで30秒間、ステップ3、55〜60°Cで1〜2分間、ステップ2と3を40回繰り返し、ステップ4、98°Cで10分間、ステップ5、4°Cで保存。PCR反応後、ドロップレットの蛍光をQX200 Droplet reader (バイオラッドラボラトリーズ)で測定し、Bio-Rad QuantaSoftソフトウェアで分析した。

#### [0144] 統計解析

2つのグループの統計解析は、Prism 8ソフトウェアを用い、Studentのt検定 (two-tailed, unpaired) により計算した。

#### [0145] 実施例 1 : RNAによるCas3ゲノム編集におけるcrRNAの化学修飾

生物・医学分野でよく使用される実験用癌細胞株は、HEK293T細胞など遺伝子導入効率が高い株が多くあり、しばしばゲノム編集のモデル株として使用される。しかし、再生医療などに実際に応用することを想定したiPS細胞や初代培養細胞株などは必ずしも遺伝子導入効率が高くなく、さらに臨床用に選定された細胞株は樹立数そのものが少なく、必ずしも毎回遺伝子導入に最適な株を選ぶことができるとは限らない。このような理由から、遺伝子導入効率が低い細胞株においても、安定的かつ効率的なゲノム編集が可能な方法を開発することは重要である。そこで、本発明者らは、crRNAに化学修飾を付し、該修飾によるゲノム編集効率の検証を行った。まず、計6種のタンパク質

(Cas3、Cse1、Cse2、Cas5、Cas6、Cas7)を発現させるmRNAは、複数のタンパク質を1つのmRNAから発現させることのできる2Aペプチドを用い、Cse2-P2A-Cas6-T2A-Cas3及びCas7-P2A-Cas5-T2A-Cse1として2本のmRNAにまとめた。このmRNAは5' キャップとポリAテールに加え、自然免疫反応による細胞毒性を抑制し、また、翻訳効率を高めるため、5-methyl-cytosineとpseudo-uracilの塩基修飾を施した（特許文献3の実施例でも使用：TriLink）。次にこれらのmRNAについて、iPS細胞におけるタンパク質の発現レベルと発現時間について解析するため、I01s04及びI14s14 iPS細胞株にLipofectamine Stem Reagentによる遺伝子導入を行った。比較として、6種の全てのタンパク質を発現できるpPV-Dual\_Promoter-EF1a-2xNLS-Cascade+Cas3(RD)-iPAプラスミドベクター（前特許でも使用）を同様にLipofectamine Stem Reagentにより遺伝子導入した。タンパク質は抗2A peptide抗体を用いてウエスタンブロッティングにより解析した（Cse2、Cas5、Cas6、Cas7が検出される）。結果として、プラスミドベクターを用いたものと比較して発現レベルが高いことが見出された（図2）。ただし、発現時間は導入後8hr(時間)～24hrでピークを迎え、48hr後には収束していることが分かる。以上から、iPS細胞においてmRNAを用いた場合には、Cas3及びCascadeタンパク質群を短時間ではあるが高強度に発現させることができることが明らかとなった。

[0146] 次に、crRNAについて、以前、インビトロ転写反応で合成した無修飾のcrRNAを細胞に導入し、活性の評価を行なった（特許文献3）。しかしながら、mRNAによるCas3、Cascadeタンパク質群の高発現にも関わらずゲノム編集効率は数%であり、導入したcrRNAがうまく機能していないことが示唆された。そこで、プレcrRNAの特定の領域に化学修飾を付すことで、RNaseによるRNAの分解を抑制でき、その結果ゲノム編集効率を向上させることができるのではないかと考えた。しかしながら、RNAの修飾はRNAの物性や二次構造、タンパク質との相互作用を変化させ、本来の機能を失わせる可能性もあり、どの位置にどの修飾を導入するかは専門家でも予測不可能であるのが実情であった。そこで、本発明者らは、2' -O-methyl 3' phosphorothioate修飾（MS修飾）をE

、coli CRISPR-Cas3システムのプレcrRNAに導入し、活性を向上させる修飾位置の探索を行なった。その結果、プレcrRNAにおいて両末端3塩基をM S修飾することでその機能を失わせることなくゲノム編集効率が著しく向上することを発見した（図3-1～4-2）。これはI01s04、I14s04両iPS細胞株、また、遺伝子の導入方法もリポフェクション（Lipofectamine Stem Reagent）やエレクトロポレーション（4D-Nucleofector）に依らないことも確認された。驚くべきことに、プレcrRNAがCas6によって切断された後に生じるmature-crRNAにおける末端である(2)や(3)に修飾すると、無修飾と同等または活性の低下が観察された（図4-1、4-2）。このことから、修飾はどの位置でもいいわけではなく、活性が上昇する修飾位置は限られると言える。

[0147] 次に、修飾位置による活性の変化をさらに詳細に検討した。図5-1～5-4で示した位置に修飾を有するプレcrRNAを準備し、上記と同様にリポフェクションにより細胞に導入した。その結果、両端領域（Both Edges）および両ステムループ形成領域のループ部分では、修飾の導入によりゲノム編集効率が向上するが、中心部（即ち、第1リピート配列の3'側ステム形成領域（Left Right stem）、第1リピート配列の3'アーム領域（Left Right arm）、第2リピート配列の5'アーム領域（Right left arm）、第2リピート配列の5'側ステム形成領域（Right left stem））については、修飾の導入によりゲノム編集効率が低下するか、あるいはほとんど変化が認められない傾向にあった（図6-1）。また、Cas6による切断部位は、修飾を導入することで顕著なゲノム編集効率の低下が認められた。意外なことに、プレcrRNAは左右対称に近い構造を有しているが、5'側部分（具体的には、5'端領域（Pre-5'）、第1リピート配列の5'アーム領域（Left left arm）、第1リピート配列の5'側ステム形成領域（Left left stem）、第1リピート配列のループ形成領域（Left loop））、第2リピート配列の3'アーム領域（Right right arm）では修飾の導入によりゲノム編集効率が向上する傾向にあり、一方で3'側部分（具体的には、3'端領域（Pre-3'）、第2リピート配列の3'側ステム形成領域（Right right stem））は、修飾の導入によりゲノム編集

効率がほとんど影響を受けない傾向となった。すなわち、プレcrRNAによる修飾の効果には、左右の非対称性が認められることが示唆された。また、プレcrRNAは、Cas6により切断されると、プレcrRNAの第1リピートの3' アーム領域が、切断後の（成熟な）crRNAの5' 末端となるが、該アーム領域への修飾の導入によっては、ゲノム編集効率の向上が認められなかった。すなわち、プレcrRNAと、成熟なcrRNAとの間にも、修飾導入による影響に差が認められた。

[0148] 別の種類のiPS細胞（1383D2）におけるプレcrRNA修飾効果の検証を行った。B2M（図6-2）またはDMD EX45（図6-3）を標的とするプレcrRNAを用いて、ddPCRによりゲノム編集効率を評価した。これらの結果より、iPS細胞種やゲノム編集のターゲット遺伝子を変えてもプレcrRNA修飾パターンの効果が再現されることが示された。また、スペーサー領域のヌクレオチドへの修飾の導入によりゲノム編集効率が低下することが示された（図6-3の「Target」）。

[0149] 次に、RNA塩基及び骨格の化学修飾以外の方法でプレcrRNAの活性を向上できるか検討した。そこでmRNAと同様に5' -capアナログ（ARCA）とポリAテールをプレcrRNAに付加させることを試みた（図7、8）。HEK293T細胞（図9）及びI14s04 iPS細胞（図10）における結果では、5' -CapとポリAテール付加によってもプレcrRNAの活性を向上できることが見出された。さらに、遺伝子導入操作に対して感受性の高い細胞株は一度のゲノム編集では望むゲノム編集効率を得られない事も多い。この場合、繰り返し遺伝子導入を行うことで、ゲノム編集の効果を蓄積することも可能であった（図11）。一般的なCRISPR-Cas9システムを用いたゲノム編集実験では、標的配列に欠損や変異が導入される、1回の導入が基本であるが、CRISPR-Cas3システムでは標的配列のPAM配列側に巨大欠損が導入されるが、crRNAの標的配列は保存されることが多いため、同じ細胞に複数回同じcrRNAを導入することで、切断効率を向上させることが可能であったと推測される。

[0150] 実施例2：ddPCRを用いた欠損変異パターンの解析

ゲノム編集を実用的な技術とするためには、その技術でどのようなDNAの変異を誘導することができるか、および変異(切断)誘導効率を正確に解析する必要がある。特に微小なDNA 2本鎖切断を誘導するCas9と違い、Cas3は長さの異なるさまざまな長鎖欠損を誘導することが知られているが、どの長さの欠損変異がどの割合で生じるか簡便に解析する方法は未だ開発されていない。そこで本発明者らは、Droplet Digital PCR (ddPCR) の技術を応用することで、Cas3による欠損変異の長さ分布と割合を測定する技術を開発することを試みた。まず、標的配列周辺の様々な位置に複数のddPCRプローブを設計し、それぞれの位置のコピー数を、ゲノム編集を行なった細胞のゲノムDNAにおいて直接測定する方法に着想した(図12)。この方法によって、使用したcrRNAが実際の標的ゲノム配列でどの長さの変異をどの割合で誘導するか解析することができ、crRNAを設計する際や活性向上検討などに非常に有用である。実際、Cas3とCascadeタンパク質群の発現をDoxycycline (DOX) によって制御できるHEK293T細胞を用いて、B2M遺伝子(crRNAとしてB2M#1を用いた)におけるゲノム編集を行なった。その結果、DOXの濃度や作用時間によって編集効率が変わる様子を捉えることができた(図13)。この解析から、一定の割合でCas3の進行方向(crRNAのPAM側)とは逆の向きにも欠損変異が一部導入されることが明らかとなった。さらに同様の実験を、CiRA00213 iPS細胞においても行い、欠損パターンの解析を行うことに成功した(図14)。また興味深いことに、RNAの形態のCRISPR-Cas3システムを用いたゲノム編集を行なった場合(図15上)は、DOX誘導によるCas3およびCascadeタンパク質群の発現を複数日行った場合(図15下)よりも、10kb以上の長鎖欠損の割合が少ないことが観察された。図2で示したように、mRNAによってタンパク質を発現させる場合はその発現時間は短いため、長い発現時間を維持できる他の方法との差が現れたと推測される。

[0151] Cas3はそのゲノム編集パターンの複雑さから、複数のcrRNAを用いた場合どのような欠損パターンが起きることが想定されるか予測が難しい。本ddPCRを用いた測定技術は、1つのcrRNAを使用したゲノム編集だけでなく、複数のcr

RNAを使用した場合にどのような欠損変異のパターンを示すか解析をすることも可能であった。例えば、ジストロフィン遺伝子上に2つのcrRNAを向き合うように配置した時、その中間点のコピー数がどの程度減少するかなどを解析することも可能であった（図16）。さらに複雑な場合では、4～11個のcrRNAを配置した場合の7位置におけるコピー数の変化も測定することができた（図17）。また、新しいcrRNAを設計する場合の活性を評価し、標的遺伝子の任意の領域がどの程度欠損されるかの評価にも有用である。I14s04 iPS細胞におけるHLA-A（A\*24:02）及びB（B\*52:01）のノックアウトを行う場合、機能として重要なエクソン1～3（特にエクソン2）を欠損させることが理想である（図18）。これを達成するためのcrRNAは様々に設計できるが、ゲノム編集後の解析として、標的領域における従来のPCR法では活性の有無は確認することができるものの、活性の強弱までは分からない場合が多い。特に設計したcrRNAが様々な位置、様々な方向である場合、Cas3によって誘導される欠損変異の位置も長さも様々であり、PCRによって欠損を表すラダーバンドの見え方が変化し、定量性を失うからである（図19：Lipofectamine Stemを用い、Cas3及びCascadeタンパク質群はmRNAで、crRNAはプラスミドにより発現させた）。本発明者らはHLA-A及びB遺伝子のエクソン2上にddPCRプローブ/プライマーを設計し、エクソン2の欠損効率をいくつかのcrRNAについて測定することで活性の強さを解析することとした。I14s04 iPS細胞に対し、Lipofectamine Stemを用いてCas3及びCascadeタンパク質群のmRNAと両末端3塩基をMS修飾したpre-crRNA（図5-1 Pre-both3）を3回トランスフェクションし、まず、既に活性があることが示されているコントロールcrRNA（B2M#1）によるゲノム編集が成功していることを確認した（図20、左）。次にHLA-A、Bそれぞれ3つのPre-both3 pre-crRNA（A24 F1、R2、R4及びB52 F1、R5、R7）について、ddPCRによって活性を測定した。結果として、どのcrRNAも活性自体は観察されたが、活性の強弱に差があることが明らかとなった（図20、右）。この活性の差は従来のPCR法による方法では判定できないものである（図19）。さらに、HLA-AとB遺伝子の両方を同時にノックアウトするた

め、HLA-A24、B52それぞれを標的とするcrRNAを2つ同時に使用してゲノム編集を行った。この場合もHLA-A、Bそれぞれのエクソン2の欠損効率を測定することができた（図21）。

[0152] このように、本測定技術は、ddPCRのプローブの位置を目的に応じて変えることで欠損パターンの解析、設計したcrRNAの活性の評価、目的の方向とは逆の変異が誘導される割合の測定など様々な評価に有用である。

[0153] 実施例3：CRISPR-Cas3システム用SSAレポーターベクターによるゲノム編集細胞群の濃縮

タイプIのCRISPR-Cas3システムをゲノム編集ツールとして利用するにあたり、その必要因子の多さから（6タンパク質とcrRNAの合計7因子）、1因子でも細胞内の発現が不十分であるとゲノム編集が起こらないことは効率的なゲノム編集を実現する観点で問題である。そこで本発明者らは、これら必要因子が十分に発現した結果、Cas3が活性化されている細胞群を特異的に濃縮させる技術の開発を行なった。Cas9においては、Single Strand Annealing（SSA）によるDNA修復機構を利用したレポーターベクターを用い、Cas9が活性化された細胞をソーティングすることでゲノム編集された細胞を濃縮することが報告されている。しかしながら、単純なDNA2本鎖切断を起こすCas9とは違い長鎖DNA切断を起こすCas3には、それに適したレポーターベクターの設計が必要である。

[0154] そこで本発明者らは、蛍光タンパク質（EGFPやmRNPなど）及び薬剤耐性遺伝子（Puro<sup>R</sup>など）を元にしたSSAレポーターベクターを設計し（図22）、CRISPR-Cas3システムに最適な挿入配列の探索を行なった。まず、Cas3が一方向に長鎖欠損を引き起こすことから、crRNAによる認識配列だけなどごく短い配列を挿入した場合、Cas3によってレポーター遺伝子まで欠損させてしまう可能性が考えられた。そこで、0.5 kb、1 kbまたは2 kbの比較的長い挿入配列を組み込んだCRISPR-Cas3システム用のSSAベクターについてその活性を評価することとした。この時、レポーター遺伝子はmRFPとした。DOXによりCas3及びCascadeタンパク質群が発現誘導できるHEK293T安定発現株を用い、Lipofec

tamine 2000によってcrRNA発現ベクター（非標的：AAVS1#1、標的：DownSNP1 T）と、mRFP SSAベクター（DownSNP1Tを標的挿入配列として持ち、その挿入配列の長さが0.5~2kb：pPV-EF1a-mRxxFP-iPA）をトランスフェクションし、3日後にフローサイトメトリーによりmRFP陽性細胞の割合を解析した結果、非標的crRNAを用いた場合と比較して、標的crRNAを用いた場合、高いレポーターシグナルを得ることができた（図23）。バックグラウンドシグナルは、挿入配列が長いほど低くなる傾向が見られたが、2 kbの挿入配列ではオンターゲットシグナルの低下も同時に観察された。S/N比の値からも分かるように、この実験の場合は1 kb程度の挿入配列がCas3には適していると言える。

[0155] このCRISPR-Cas3システム用に開発したSSAベクターを用い、次に実際にゲノム編集が起きた細胞を濃縮することができるか検討を行なった。Puro<sup>R</sup>をレポーターとしたSSAベクター（pHL-EF1a-EGFP-IRES-Puro-SSA(B2M 1kb)-Aベクター）を用い、Cas3が活性化した細胞ではPuromycin耐性になるように設計した。HEK293T細胞においてB2M遺伝子を標的としたゲノム編集を行うこととし（pPV-Dual\_Promoter-EF1a-2xNLS-Cascade+Cas3(RD)-iCAとpPV-C1-crRNA(B2M #4)-EF1a-BAベクターのトランスフェクション）、この時、上記Puro-SSAベクターを同時に導入し、トランスフェクション後にPuromycin選択を行った（2  $\mu$ g/ml、トランスフェクション後3~5日の間）。そのサンプルをHLA染色によってゲノム編集効率を測定した結果、Puromycin選択を行わなかったものに比べ著しく高い（6倍程度）ゲノム編集の効率が観察された（図24）。このことから、CRISPR-Cas3システム用のSSAベクターによってゲノム編集が起きた細胞を濃縮することができることが証明された。次に、Puro-SSAベクターの特異性を検証した。HEK293T細胞にCas3およびCascadeタンパク質群発現ベクター（上記と同じ）、crRNA発現ベクター（非標的：AAVS1#1、標的：B2M #1のpPV-C1-crRNA-EF1a-BAベクター）、及びB2M#1の標的配列を有するPuro-SSAベクター（pHL-EF1a-Puro-SSA(B2M 1kb)-A）をLipofectamine 2000により導入し、導入後2日目~4日目に、2  $\mu$ g/ml Puromycinで2日間処理した。ベクター導入後6日目に、細胞数をカウントした結果、crRNA(B2M#1)を導入した

細胞で著しくPuro耐性細胞が増えていることが確認でき、Puro-SSAベクターのcrRNAに対する特異性が確認された（図25）。また、これらサンプルにおけるB2Mのノックアウト効率を測定した結果、Puro選択をすることでゲノム編集された細胞を10倍程度濃縮することができた（図26）。

[0156] このSSAベクターは違うレポーター遺伝子を複数組合せて用いることも可能であり（EGFPとmRFPなど）、複数のcrRNAを同時に用いるゲノム編集に応用することも可能であった（図27）。例えば、ディシェンヌ型筋ジストロフィーの治療をモデルとしてヒトdystrophin (DMD)遺伝子のエクソン45～55（約340 kb）領域を欠損させるマルチエクソスキッピング誘導の場合、2つのcrRNAを向かい合わせに設計したとしても（Ex45、Ex55を標的としたcrRNA）その削除範囲の広さからおおよそその中間点のコピー数から予想される欠損効率は低い（図29：SSA unsorted）。しかし、これら2つの標的配列を含むEGFPとmRFPベースのSSAベクターを同時に用いて、EGFP/mRFP両陽性細胞群をソーティングする事で、約340 kbの欠損が起きた細胞を濃縮することも可能であった。まず、HEK293T細胞において標的挿入配列の長さを変えた実験では、図23の実験と同様に挿入配列が長くなると共に特異的シグナル、非特異的シグナルが減少していくことが確認された（図28左1～6レーン）。以降は、特異的シグナルを減らさず、非特異的シグナルをできるだけ抑えることができる約1kbの挿入配列を持つSSAベクターを用いることとした。次に1 kb挿入配列を持つ2色SSAベクターを使用して実際にEGFP・mRFP両陽性細胞をソーティングし、ddPCRにより約340 kbのおおよそ中間点のコピー数の欠損効率を測定した。結果としてソーティングをしないものと比べ、HEK293Tでは約6%から約40%、F12020 iPS細胞においても約0%から約30%もの割合にて、コピー数の減少が確認できた（図29左1～3レーン）。比較として微小な2本鎖切断しか誘導できないCas9を使用した場合は細胞の濃縮効率は悪く（図29左6～9レーン）、長い挿入配列を有するこのSSAベクターが長い欠損を誘導できるCas3に適したものであることがわかる。さらにこの2色SSAベクターシステムを使い、さまざまなiPS細胞株（FF12020、CiRA00458、CiRA00

646) からゲノム編集された細胞を濃縮することができ、約340 kbの欠損変異の入った複数のサブクローンを取得することも成功している（図30）。このエクソン45-55領域を削除するマルチエクソンスキッピング方法は、ジストロフィンタンパク質の読み枠を回復させることができることが知られており、デュシェンヌ型筋ジストロフィーに対する治療法としても有用である。

[0157] 最後に、従来の短い挿入配列を有するSSAベクターとのS/N比の比較を行った。HEK293T細胞において上記のようにDMD遺伝子の約340 kbをCas3によって削除する場合を想定し、crRNA(DMD20)とcrRNA(DMD23)を同時に用いた場合、SSAベクターの挿入配列の長さを0 kb（即ち、標的配列のみ）、0.5 kb、1 kb、1.7 kbと伸ばしていった場合、長い挿入配列の方が非特異的なシグナルが著しく減少することが見られた（図31）。一方、挿入配列が長くなると、オンターゲットシグナルも減少することも観察された。これらの結果より、S/N比は挿入配列が1～1.7 kb程度の時に最大になることが分かった。

[0158] この長い挿入配列を利用するものに加え、Cas3が酵素としては1本鎖DNA切断酵素ニッケースであることに着目することで、DNAダブルニッキングによって2本鎖切断を誘導するメカニズムをこのSSAベクターに応用することもできるのではないかとこの着想を得た（図27右）。このSSAベクターでは、2つのcrRNA認識配列を回分配列状に配置し、その2つの認識配列の間には、Cas3及びCascade結合における立体障害を考慮し、0～35bpのスペーサー配列を挿入することとした。上記と同様にDMD Ex45、Ex55をターゲットとする2つのcrRNAを用い（非標的コントロールとしてB2M#1）、その標的配列を持つ2色のダブルニックSSAベクター（EGFP: Ex45、mRFP: Ex55）を用いて実験したところ、結果として、非標的crRNAを用いた時と比べ高いオンターゲットシグナルであるEGFPおよびmRFPの蛍光が観察された（図28レーン7～10）。これらのうち、スペーサーを持たないダブルニックSSAベクターについて、EGFP、mRFP両陽性細胞をソーティングし、同様にddPCRによってコピー数減少を測定したところ、ソーティングしていないサンプルと比較して約5%から約40%にコピー数減少の割合が大きくなることがわかった（図29左レーン4～6）

。

[0159] 以上の結果から、本SSAベクター（長い挿入配列及びダブルニック用挿入配列）を用いることで、Cas3/crRNAが活性を有する細胞をモニターあるいは濃縮することができることが明らかとなった。

[0160] 実施例4：CRISPR-Cas3システムによるアレルト異的ゲノム編集技術

常染色体上の遺伝子は通常対になる2コピーで構成されるが、遺伝子疾患の治療などでは片方のアレルの遺伝子のみを標的とするアレルト異的なゲノム編集技術も重要である。例えば筋強直性ジストロフィーI型（DM1）はDMPK遺伝子の3'-UTR領域にあるCTGリピートが片方のアレルのみで異常に伸長する事が原因で発症する遺伝子疾患であり、ゲノム編集によって治療する場合、問題のないアレル（健常アレル）には触れず、この伸長したアレル（疾患アレル）のリピート配列のみを編集できることが望ましい。そこで本発明者らは、ヘテロな一塩基多型（SNP）に着目し、疾患アレルのみで伸長したCTGリピートを削除できるCRISPR-Cas3システムの技術開発を行った。まず、SNPデータベース上でアレル存在頻度の高いSNPを検索し、同時に複数のDM1患者由来iPS細胞において実際にそれらSNPが存在するか確認を行なった（図32）。

[0161] 次に、これらのSNP上で設計することができるcrRNAの絞り込みを行った。Protospacer Adjacent Motif (PAM)配列として、AAG、ATG、TAG、AGG、GAG、AAC、AAT、AAA、GTG、TTG、GGGを用い、ヘテロSNP配列がcrRNAの認識可能配列上にあり（PAM配列の3'末端塩基から数えて6n（nは正の整数）塩基目を除く位置）、かつ、CTGリピートに向かってCas3が進行する方向のものである（図33）。このように設計されたcrRNAの実例の実施例として、DM1患者由来細胞株HPS1051 iPS細胞株で見られたCTGリピート下流のrs934739524 SNP（C：疾患アレル、T：健常アレル）に対してcrRNAを設計した（図34）。ヘテロSNPがcrRNAの12塩基目に存在するものはアレルを区別しない（しにくい）コントロールcrRNAである。DM1患者由来iPS細胞HPS1051株においてこのcrRNAを用いたゲノム編集の結果（Cas3、Cascadeタンパク質群、crRNA発現ベクターを

発現する安定発現株)、標的アレルで優位に欠損変異を起こすことに成功した(図35)。また、実際に標的アレルにおけるゲノム編集が起きているか確認するため、この細胞群から細胞サブクローニングを行ったところ、実際に疾患アレルでのみCTGリピートが削除された株を多数取得することができた(図36:クローン#9、19、20、33、84)。さらに別の例として、DM1患者由来iPS細胞CiRA00213細胞株で見られたCTGリピート上流SNP rs635299及びrs915915に対するcrRNAを設計することができ(図37)、RNAを用いたゲノム編集(mRNAとPre-both3 pre-crRNA)、プラスミドを用いたゲノム編集の両方において、アレル特異的なPCR、またはNested PCRで得られたPCR産物をサンガーシーケンスで解析した結果、CTGリピートを削除または短縮できることが確認された(プラスミドベースゲノム編集:図38~41、RNAベース:42、43)。また、このアレル特異的ゲノム編集は2つのヘテロSNPを利用し、標的配列を挟んで向かい合うcrRNAペアを用いても可能であり(アレル特異的dual-Cas3)、CiRA00213株において、例えば、CTGリピート上流rs635299に設計したcrRNAと下流rs3745802に設計したcrRNAを用いたもの(RNAベース編集:図44)、リピート上流rs915915上のcrRNAと下流rs3745802上のcrRNAを用いたもの(RNAベース編集:図45、47、プラスミドベース編集:図46)でもゲノム編集を行う事が可能であった。

[0162] このように、crRNA認識配列部位にヘテロSNPを配置する事でアレル特異的crRNAを設計する事ができるが、その活性や特異性はSSAレポーターベクターを用いて確認することができる(図48左)。例えば、EGFPとmRFP2色のSSAベクターにおいて、crRNAに対する標的配列に1塩基の違いを有する挿入配列を用い、EGFPとmRFPのどちらが優位にシグナルを発するか解析できる。crRNAとしてrs934739524の“C”を標的とするもの(crRNA-C)、“T”を標的とするもの(crRNA-T)、非標的のもの(NT crRNA)を用い、EGFP SSAベクター、ベクターそれぞれに“C”または“T”のSNP配列を含む配列を挿入し、蛍光を測定したところ、crRNAが標的とするSSAベクターの蛍光が優位に観察された(図48右)。これらのSSAベクターはセルソーティングと組み合わせること

で、ゲノム編集活性をもつ細胞の濃縮にも利用可能であると期待される。

[0163] 設計されたアレル特異的crRNAはその配列によって活性や特異性が異なる事が予想されるが、それらはある程度調整する事もできる。その方法として、crRNAの長さを短くすることやPAMから遠い位置に意図的にミスマッチを導入する方法が挙げられる（図49）。例えば、上記rs934739524 SNPの“C”を標的とするcrRNAに対してEGFP SSAは“C”、mRFP SSAは“T”の標的を有する実験の場合、crRNAの長さを短くしたり（図50）、意図的なミスマッチをPAMに遠い位置から近づける（図51）に従って活性は徐々に低下するが、非特異的な活性（mRFPシグナル）の低下も同時に見られ、このcrRNAの場合、30ntのcrRNA認識配列を有するもの、crRNA認識配列3'から2塩基目にミスマッチを有するものは標的に対する活性を保持したまま非特異的な活性の減少に成功している。このように、crRNAの認識配列の長さの調整や意図的なミスマッチの導入は、アレル特異的なcrRNAの活性と特異性の調節に有効であるといえる。

[0164] 実施例5：タンパク質構造を基にしたcrRNAの化学修飾

E. coli Cascade/crRNAの結晶構造（Zhao et al. Nature, vol. 515, 147-150 (2014), Jackson et al. Science, 345(6203), 1473-1479 (2014)）を元に、図52で示すように2'-O-Me (M) またはPhosphorothioate (PS) 修飾ができる可能性のある部位を修飾した（Structure-guided: SG）。また、pre-crRNAの両端3塩基は修飾しても問題無いことがわかっているので、SGに追加してこれを加えた（SG+Edges3）。また、すべての塩基についてPSまたはMを行った場合（PS all, M all）や、少なくともCas6によるプロセッシングサイトをPS修飾しないもの（PS except for cleavage site）も用意した。

[0165] 上記pre-crRNAを用いて、I14s04 iPS細胞においてゲノム編集活性を測定した。1.5x10<sup>5</sup>の細胞を12-well plateに撒き、Cas3及びCascadeタンパク質を発現するmRNA、B2M#1 crRNA（それぞれ図52に対応する化学修飾を有する）をトランスフェクションし、B2M遺伝子のKO効率をHLA-A、B、C染色（図53）またはddPCR（図54）によって測定した。ddPCRはB2M\_1kb/PATL2プローブを

用いた。結果として、結晶構造によってCascade複合体と相互作用する部位が分かっているにもかかわらず、化学修飾可能なpre-crRNAの位置を予測することは困難であることが分かる。

[0166] 図5-3および5-4において活性が確認されなかったSG+Edges3 crRNAにおいて、どの部位の修飾が活性に悪影響を与えるのかを中心に更なる修飾パターンの検討をした。pre-crRNAにおいて、Cas6によるプロセッシングサイト近傍の修飾を除去したもの（SG+Edges3-A）、さらに標的配列認識部位を除去したもの（SG+Edges3-A-Target）、SG+Edges3-Aから内側のアーム部分の修飾を除去したもの（SG+Edges3-A-Inner arm）、SG+Edges3-Aから内側のアーム部分及び標的配列認識部位の修飾を除去したもの（SG+Edges3-A-Center）、活性を高める効果がある両末端3塩基、両ループ及び左リピートの左ステム配列を同時に修飾したもの（Edge3+Loops+Left Stem）、両末端3塩基修飾に標的配列認識部位の修飾を加えたもの（Edge3+Target）をそれぞれ作製した。これらをI14s04 iPS細胞において同様にトランスフェクションを行い、B2M遺伝子のKO効率をHLA-A、B、C染色によって測定した。結果として、内側のアーム部分及び標的配列認識部位に修飾を入れることが活性に悪影響を及ぼすことが示された。

[0167] 実施例6：ddPCRによるHLA-A\*24:02及びB\*52:01エクソン2欠損効率の測定

I14s04 iPS細胞において、Lipofectamine Stemを用いてCas3及びCascadeタンパク質群を発現するmRNAとHLA-A\*24:02及びB\*52:01をターゲットとするPre-both3 pre-crRNA（図5-1）を複数回トランスフェクションし、回収したゲノムサンプルをddPCRによって解析した。「Dual A24 F1 & B52 R5」は、両末端3塩基をMS修飾したタンデムpre-crRNAを示す。本実施例で用いたcrRNAの標的配列情報を、表5に示す。

[0168]

[表5]

| 名称          | 配列 (5' →3' )                     | 配列番号 |
|-------------|----------------------------------|------|
| A*24:02 F3  | GACCCTACATAGGTTGGGAGAGGGAGAAAAGA | 2 2  |
| A*24:02 F4  | AAGGACCCTACATAGGTTGGGAGAGGGAGAAA | 2 3  |
| A*24:02 R0  | GGGTGAAGGGTGGGGTCTGAGATTTCTTGTCT | 2 4  |
| A*24:02 R9  | ACGATCCCTCGAATACTGATGACTGGTTCCCT | 2 6  |
| A*24:02 R10 | GGATAAAATCTCTGACGGAATGACGGAAGAC  | 2 7  |
| A*24:02 R11 | GAGGGGAGACAATTGGGACCAACACTAGAATA | 2 8  |
| B*52:01 F2  | TGAAACTCGTGGGAGTGGGGAATCCCCAACGC | 2 9  |
| B*52:01 F3  | AAGTGAAACTCGTGGGAGTGGGGAATCCCCAA | 3 0  |
| B*52:01 F4  | GACCCGACATAGGTTGGGAGAAGAAGTGAAAC | 3 1  |
| B*52:01 F7  | AAGGACCCGACATAGGTTGGGAGAAGAAGTGA | 3 2  |
| B*52:01 R6  | CGCCTGAATTTTCTGACTCTTCCCATCAGACC | 3 4  |
| B*52:01 R8  | GAGGGGGATGAGGGGTATATCTCTTCTCAGG  | 3 5  |
| B*52:01 R9  | GGATGACGTCTCTGAGGAAATGGAGGGGAAGA | 3 6  |
| B*52:01 R10 | TCCCTGTTCCCCGCTCAGAGACTCGAACTTTC | 3 7  |
| B*52:01 R11 | AGCTCAGGTAGGGAAGGGGTGAGGGGTGGGGT | 3 8  |

#### [0169] 実施例 7 : 1383D4 iPS細胞におけるPuro-SSAベクターの効果の評価

1.5x10<sup>5</sup>の細胞を12-well plateに撒き、Cas3及びCascadeタンパク質を発現するmRNA、B2M#1 crRNA（両末端3塩基MS修飾）、Puro-SSAレポーターベクターとしてpHL-EF1a-Puro-SSA(B2M#1)-AまたはpHL-EF1a-Puro-SSA(B2M#1)-2A-E GFP-Aをトランスフェクションした。Puroによる選択はトランスフェクション後2日目～3日目に0.3または0.5 μg/mlの濃度にて行い、細胞のリカバリー後にHLA-A、B、C染色によりHLA-A、B、C陰性細胞の割合を測定した。代表的なフローサイトメトリーの結果と定量グラフ（n=2）を図59に示す。結果として2～4倍程度、B2Mノックアウト細胞を濃縮することができた。

#### 産業上の利用可能性

[0170] 本発明により、タイプIのCRISPR-Casシステムによるゲノム編集効率を改善でき、該システムによるゲノム編集パターンを解析することができる。また、ゲノム編集細胞を濃縮できるツールや、一方のアレル特異的にゲノム編集を行うことも可能となる。よって、従来の方法では困難であった多能性幹

細胞へのゲノム編集等に特に有用である。

[0171] 本出願は、日本で出願された特願 2023-050681（出願日：2023年3月27日）を基礎としており、その内容は本明細書に全て包含されるものである。

## 請求の範囲

- [請求項1] 修飾ヌクレオチドを有するタイプⅠ CRISPR-CasシステムのプレcrRNAであって、  
第1リピート配列の5' アーム領域、第1リピート配列の5' 側ステム形成領域および第1リピート配列のループ形成領域からなる領域において、少なくとも1個のヌクレオチドが修飾ヌクレオチドである、プレcrRNA。
- [請求項2] 第2リピート配列の3' アーム領域の少なくとも1個のヌクレオチドが修飾ヌクレオチドである、請求項1に記載のプレcrRNA。
- [請求項3] 5' 末端から1番目～3番目のヌクレオチド、および3' 末端から2番目～4番目のヌクレオチドが修飾ヌクレオチドである、請求項1または2に記載のプレcrRNA。
- [請求項4] 第1リピート配列のループ形成領域および／または第2リピート配列のループ形成領域の全てのヌクレオチドが修飾ヌクレオチドである、請求項1～3のいずれか1項に記載のプレcrRNA。
- [請求項5] 5' 末端から1番目～3番目のヌクレオチド、および3' 末端から2番目～4番目のヌクレオチドが修飾ヌクレオチドであり、第1リピート配列の3' アーム領域、第2リピート配列の5' アーム領域およびスペーサー領域を構成する全てのヌクレオチドがリボヌクレオチドであり、かつCas6またはCas5により切断される部位が未修飾である、請求項1～4のいずれか1項に記載のプレcrRNA。
- [請求項6] スペーサー領域を2つ以上有する、請求項1～5のいずれか1項に記載の方法。
- [請求項7] タイプⅠ CRISPR-CasシステムがタイプⅠ-EのCRISPR-Casシステムである、請求項1～6のいずれか1項に記載のプレcrRNA。
- [請求項8] 5' キャップおよびポリAを有する、タイプⅠ CRISPR-CasシステムのプレcrRNA。

- [請求項9]           アレル特異的なタイプⅠ CRISPR-Cas システムのプレ crRNA を設計する方法であって、
- プレ crRNA が標的とする配列に隣接する PAM 配列の上流側に欠損標的部位が存在し、かつ
- 該プレ crRNA が標的とする配列内であって、該 PAM 配列の下流側末端塩基から数えて  $6n$  ( $n$  は正の整数) 番目を除く位置または PAM 配列上にアレル間で異なる少なくとも 1 塩基が存在する配列を標的とするプレ crRNA を設計する工程を含む、方法。
- [請求項10]           プレ crRNA の長さを調節する工程、および／またはプレ crRNA にミスマッチを導入する工程を含む、請求項 9 に記載の方法。
- [請求項11]           欠損標的部位がリピートを含む、請求項 9 または 10 に記載の方法。
- [請求項12]           以下の (1) および (2) を含む、タイプⅠ CRISPR-Cas システム。
- (1) 請求項 1～8 のいずれか 1 項に記載のプレ crRNA または請求項 9～11 のいずれか 1 項に記載の方法により設計されたプレ crRNA、
- (2) Cascade を構成するタンパク質群または該タンパク質群をコードする核酸
- [請求項13]           タイプⅠ CRISPR-Cas システムの活性を評価するための二本鎖核酸であって、一方の核酸鎖が、
- (1) レポータータンパク質の一部をコードする配列、
- (2) crRNA が標的とする配列または該配列に相補的な配列を含む挿入配列、および
- (3) レポータータンパク質の一部をコードする、(1) とは異なる配列
- をこの順で含み、
- (1) と (3) とは重複配列を有しており、(1) の重複配列以外

の配列と、重複配列と、（３）の重複配列以外の配列とが、レポータータンパク質全長をコードする配列を構成し、

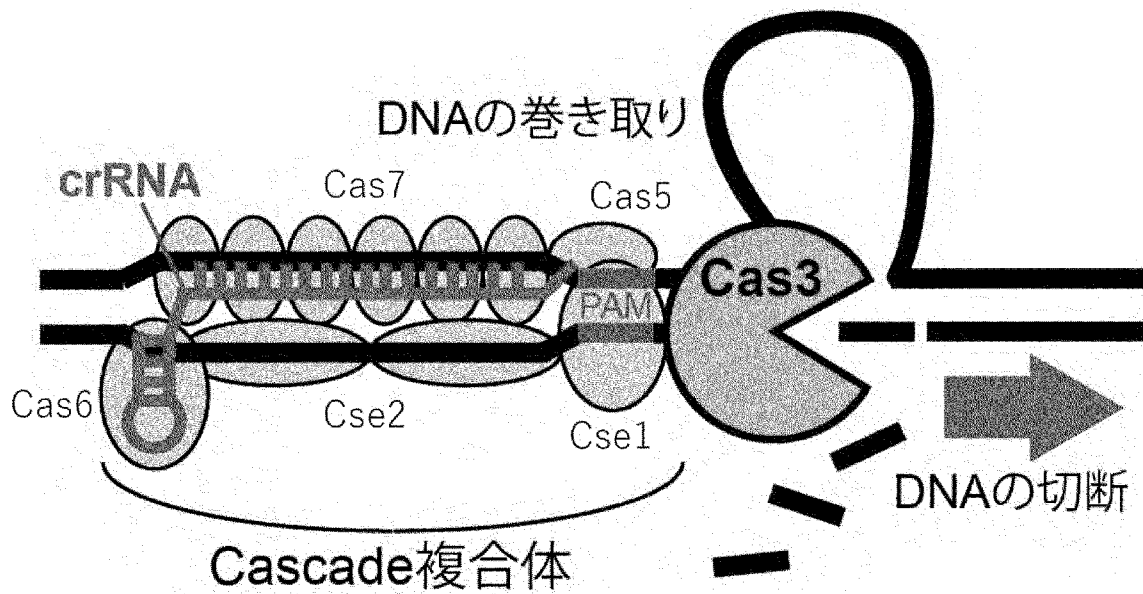
（２）の挿入配列の塩基長が１００～３０００である、二本鎖核酸。

- [請求項14]      タイプⅠ CRISPR-Casシステムの活性を評価するための二本鎖核酸であって、一方の核酸鎖が、
- （１）レポータータンパク質の一部をコードする配列、
- （２）crRNAが標的とする配列および該配列と相補的な配列を含む挿入配列、ならびに
- （３）レポータータンパク質の一部をコードする、（１）とは異なる配列
- をこの順で含み、
- （１）と（３）とは重複配列を有しており、（１）の重複配列以外の配列と、重複配列と、（３）の重複配列以外の配列とが、レポータータンパク質全長をコードする配列を構成する、二本鎖核酸。
- [請求項15]      二本鎖DNAが改変された細胞を製造する方法であって、請求項１２に記載のCRISPR-Casシステムを細胞に導入する工程を含む、方法。
- [請求項16]      CRISPR-Casシステムを細胞に導入する工程を複数回行う、請求項１５に記載の方法。
- [請求項17]      請求項１３または１４に記載の二本鎖核酸を細胞に導入する工程を含む、請求項１５または１６に記載の方法。
- [請求項18]      導入される二本鎖核酸が２種類以上である、請求項１７に記載の方法。
- [請求項19]      レポータータンパク質が発現する細胞を選別する工程を含む、請求項１７または１８に記載の方法。
- [請求項20]      前記細胞が多能性幹細胞である、請求項１５～１９のいずれか１項

に記載の方法。

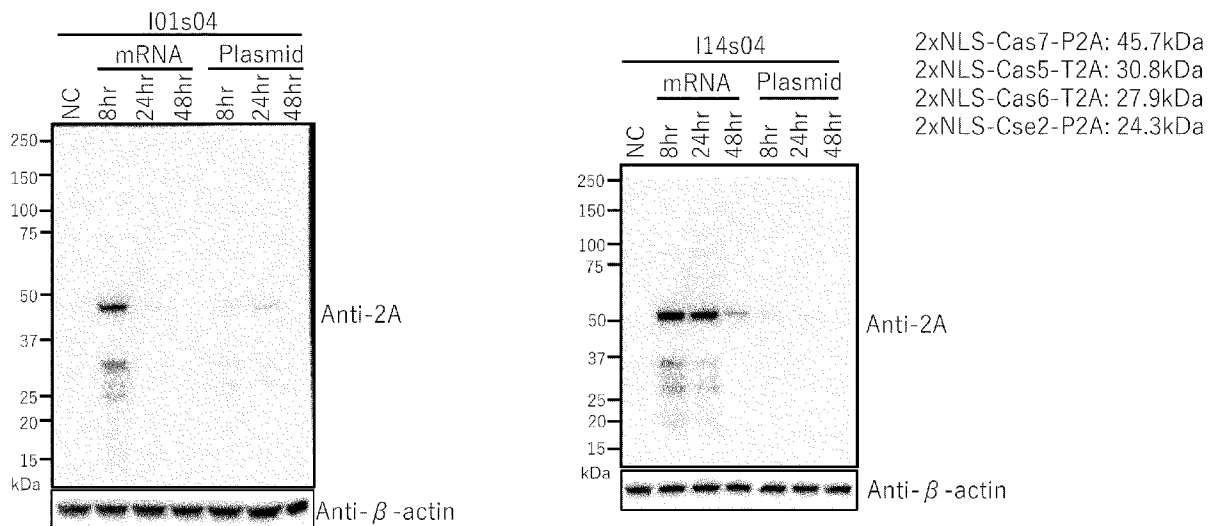
[請求項21]      タイプⅠ CRISPR-Casシステムによる二本鎖DNAの編集パターンを解析する方法であって、欠損標的部位に対する複数のPCRプローブを用いてデジタルPCRを行う工程を含む、方法。

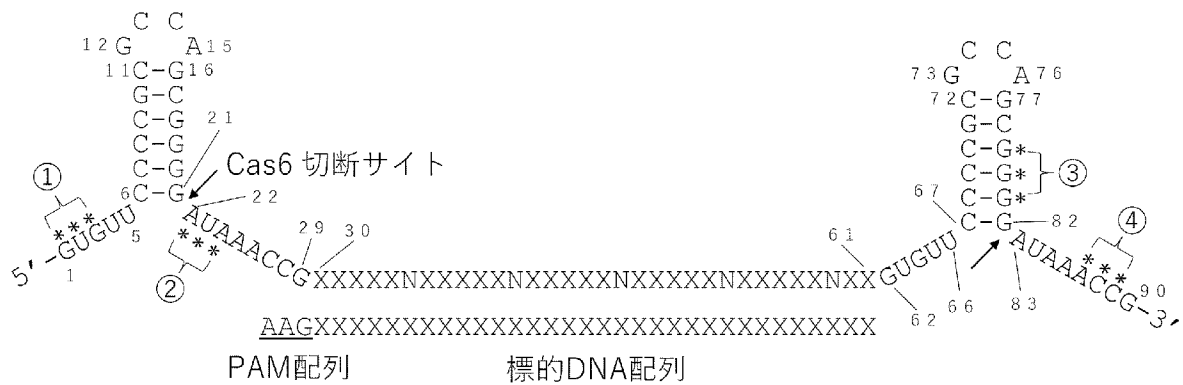
[図1]

*E. coli* Cas3: Class 1 (Type I-E) CRISPR-Cas

- ヘリカーゼ活性
- DNAニッキング活性

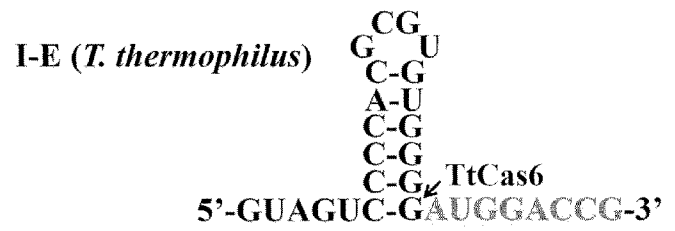
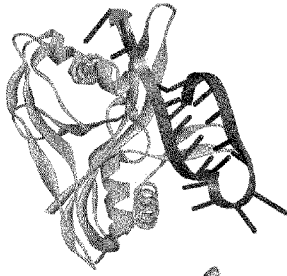
[図2]



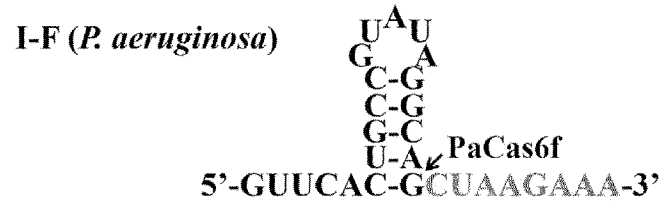
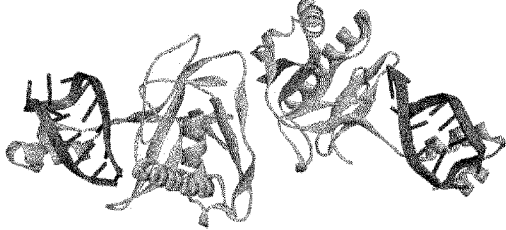


[図3-2]

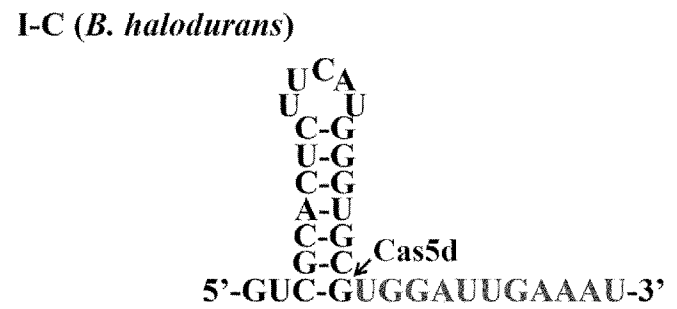
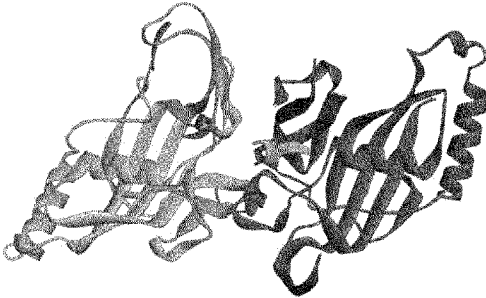
A



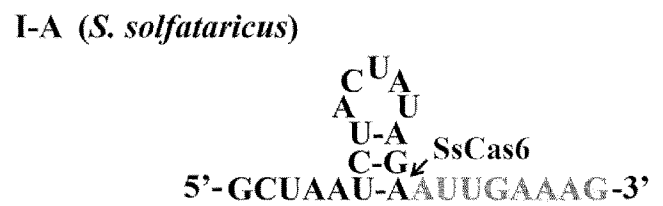
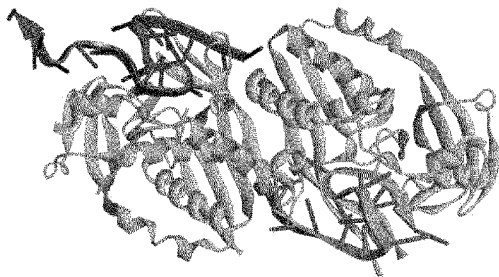
B



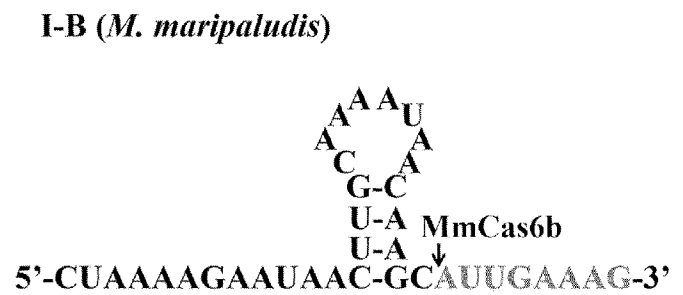
C



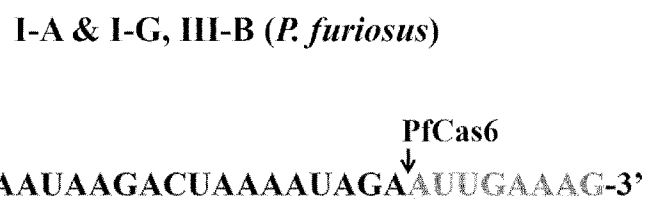
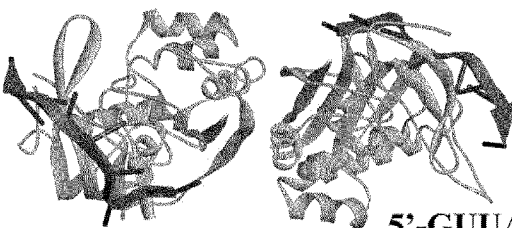
D



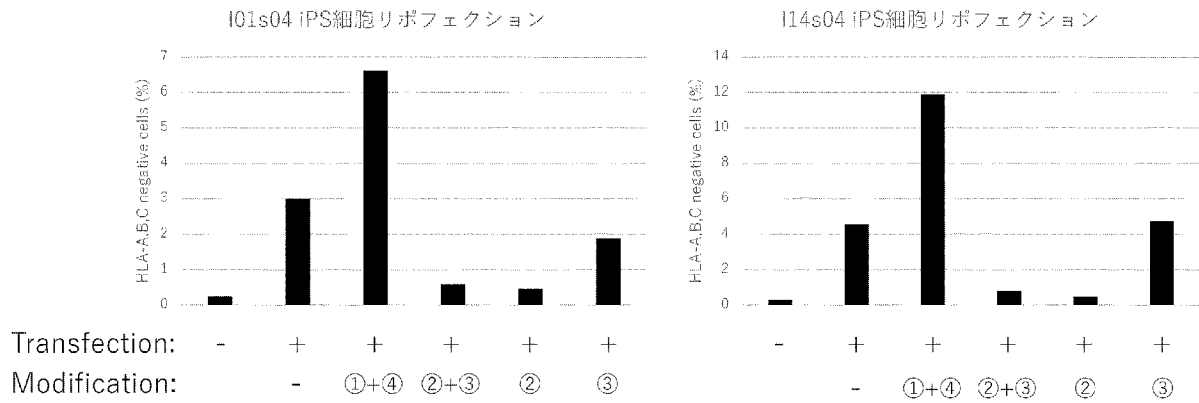
E



F



[図4-1]



[図4-2]

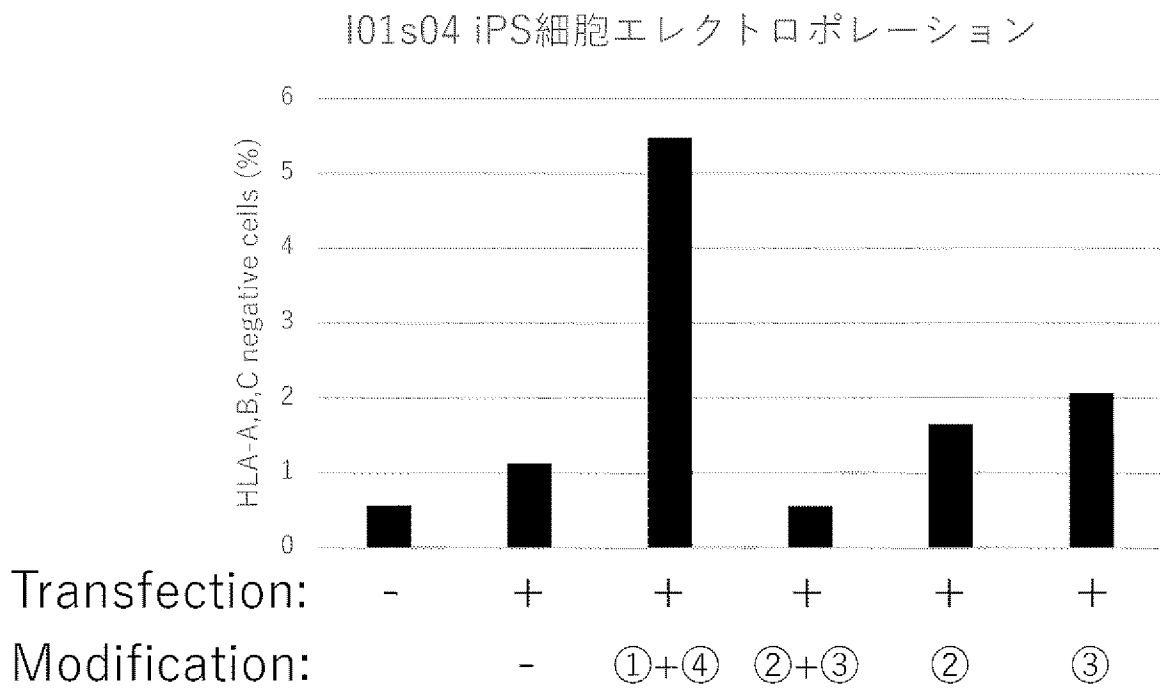
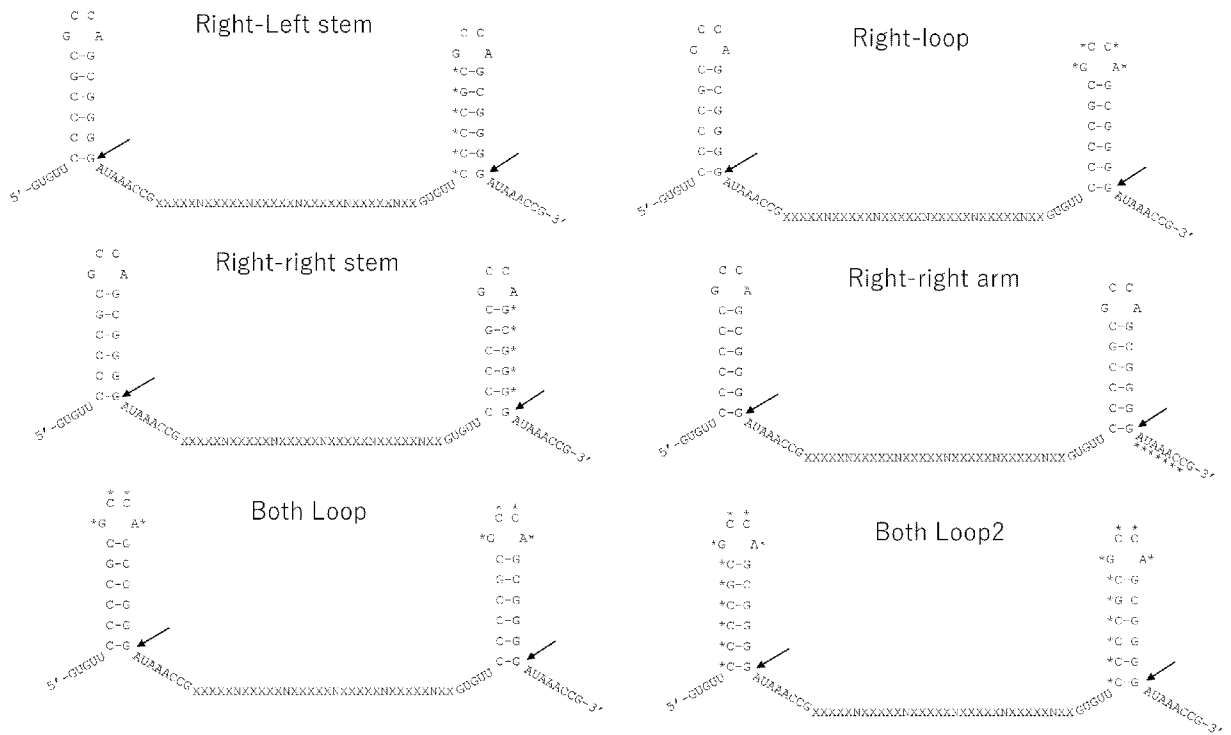
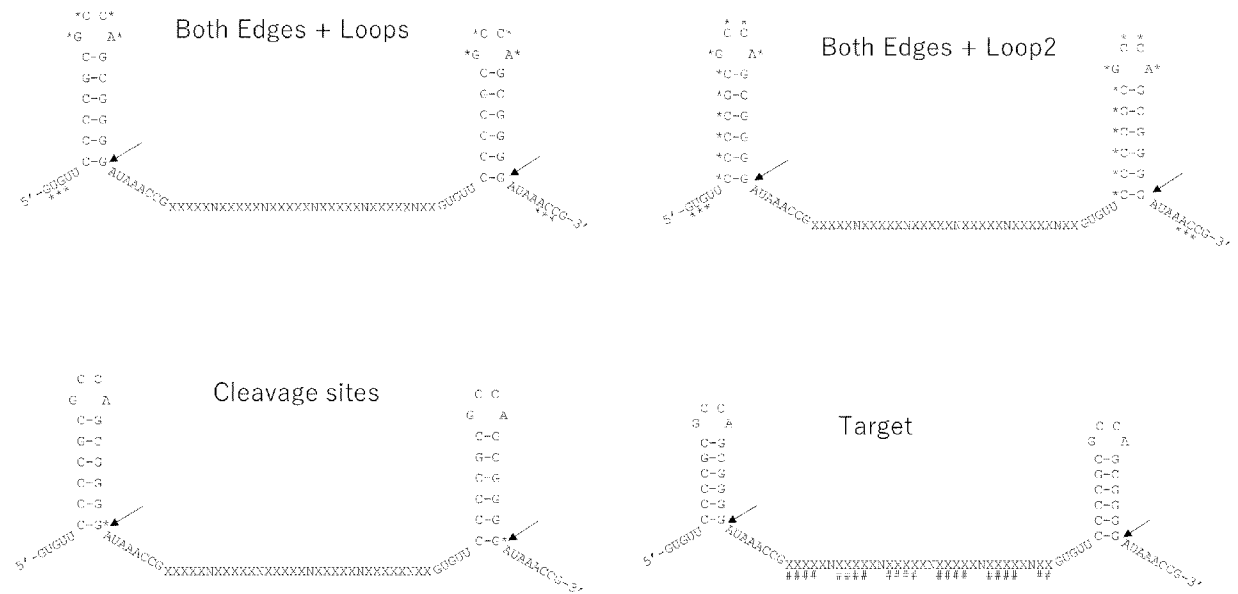


Figure 1 illustrates the tertiary structure of the 16S rRNA molecule, showing its various structural elements and the positions of the 5' and 3' ends. The structure is composed of several arms and loops, including the Left-Left arm, Left-Left stem, Left loop, Left-right loop, Left-right arm, Right-Left arm, and Right-Right arm. The 5' end is labeled 5'-GUGUU and the 3' end is labeled AUAACCG-3'. The sequence is shown in a schematic manner, with base pairing indicated by lines. The 5' end is labeled 5'-GUGUU and the 3' end is labeled AUAACCG-3'.

[図5-3]

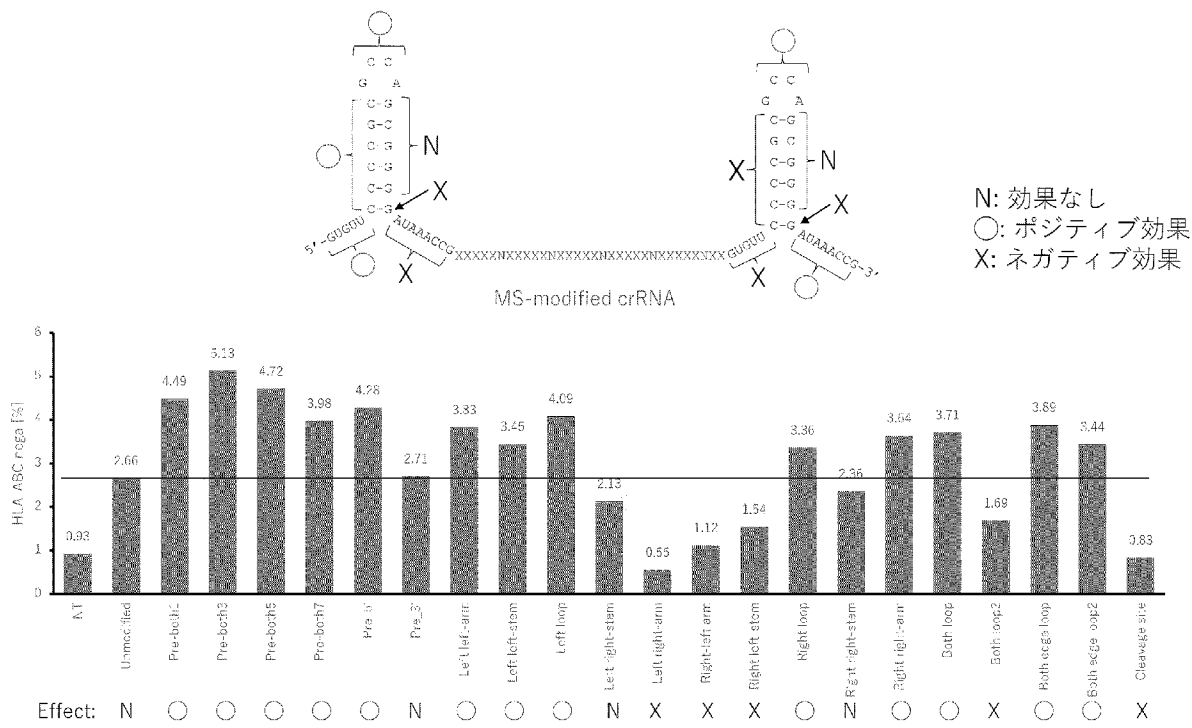


[図5-4]

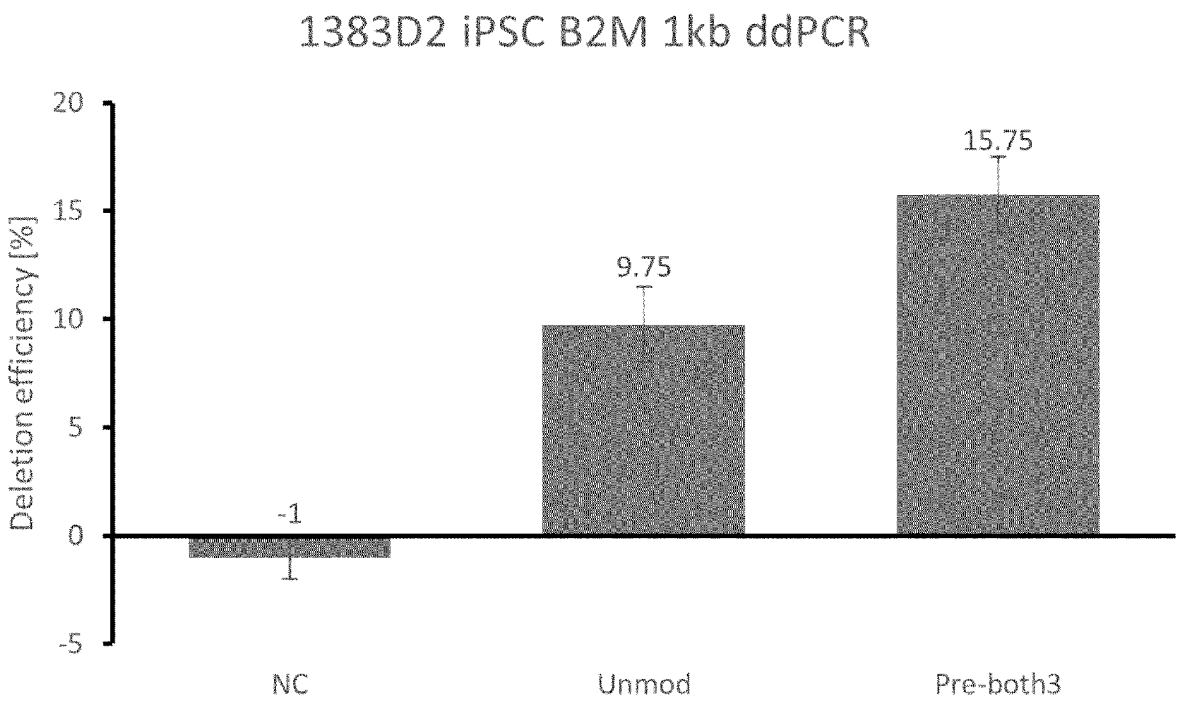


Target

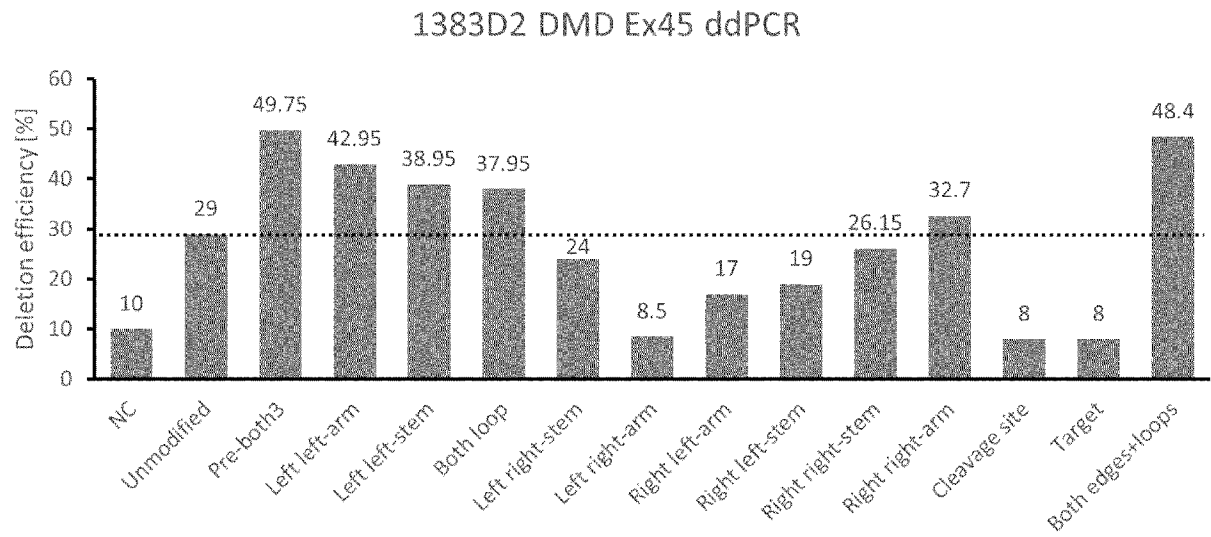
[図6-1]



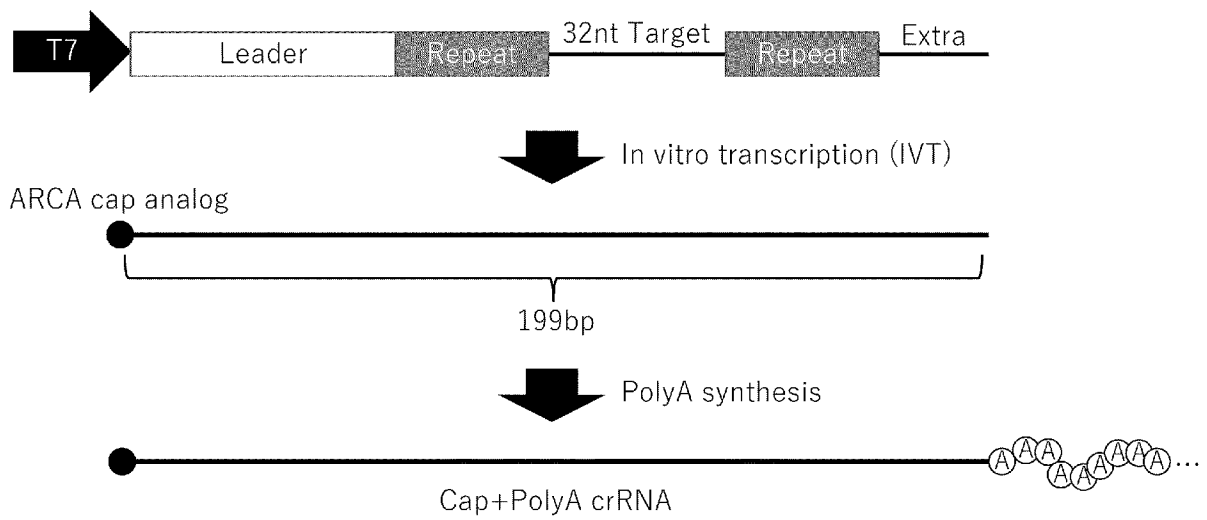
[図6-2]



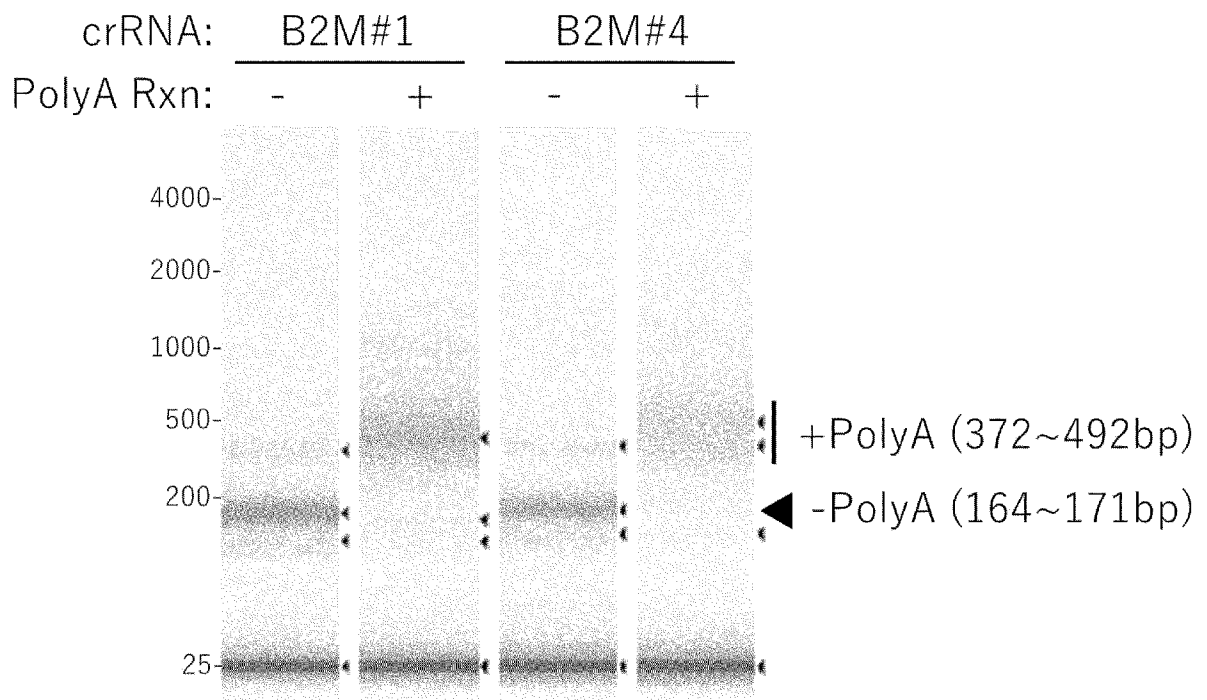
[図6-3]



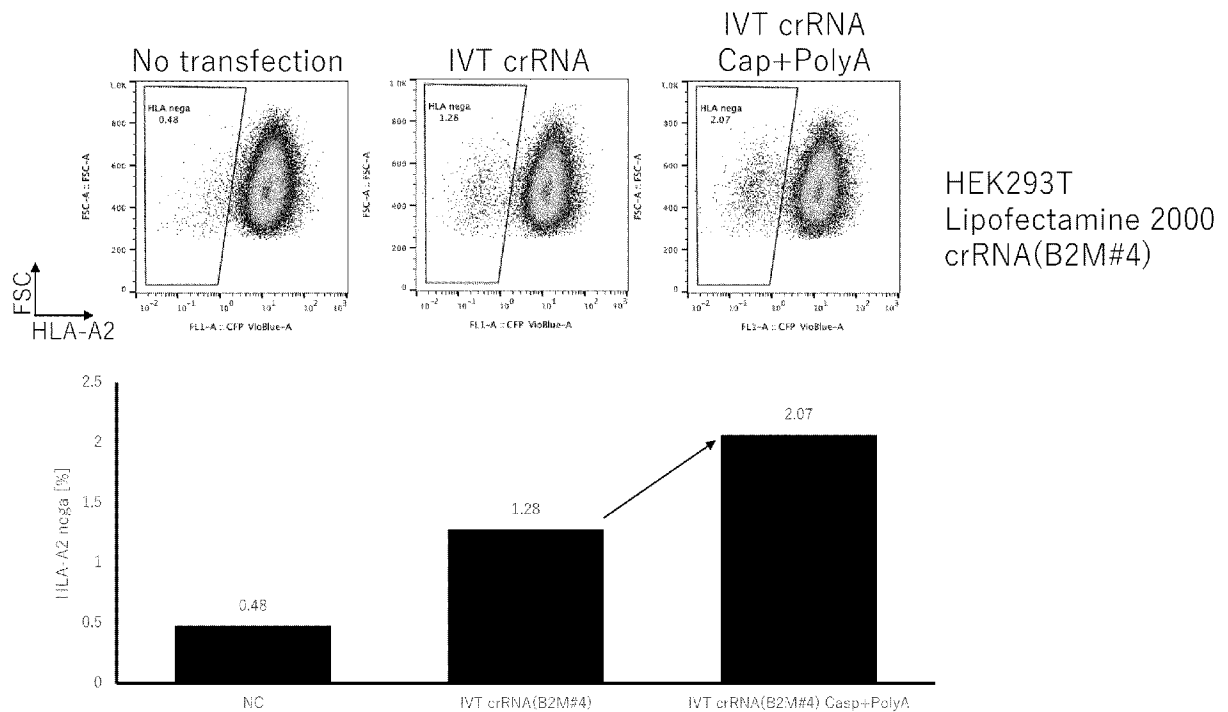
[図7]



[図8]

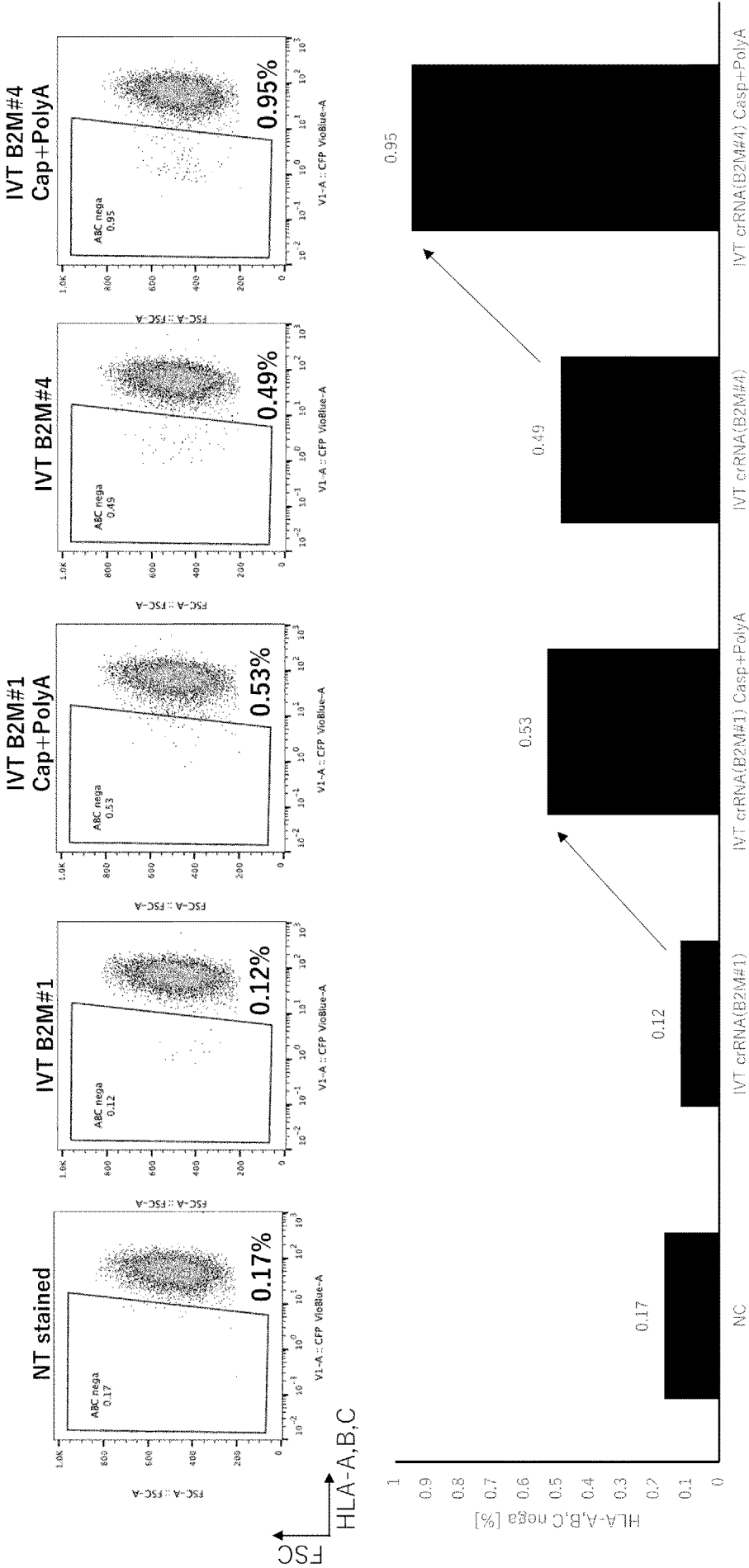


[図9]

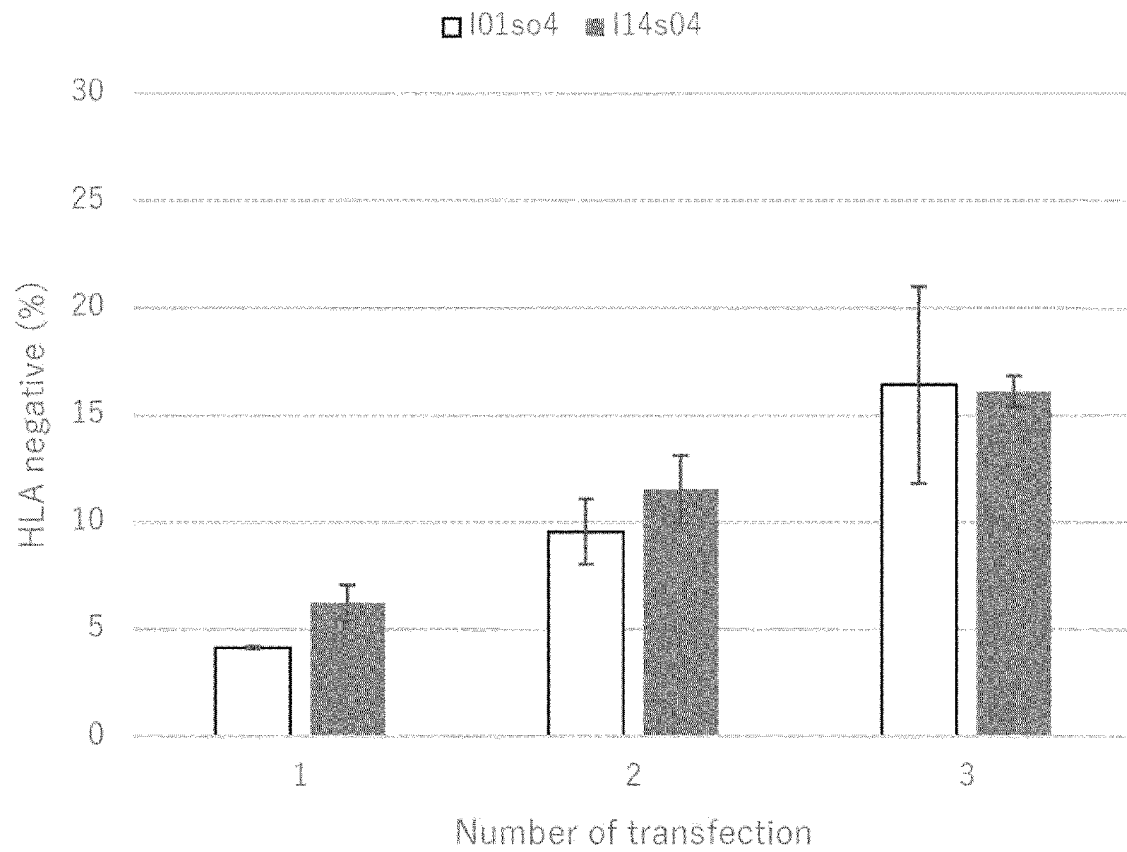


[ 10 ]

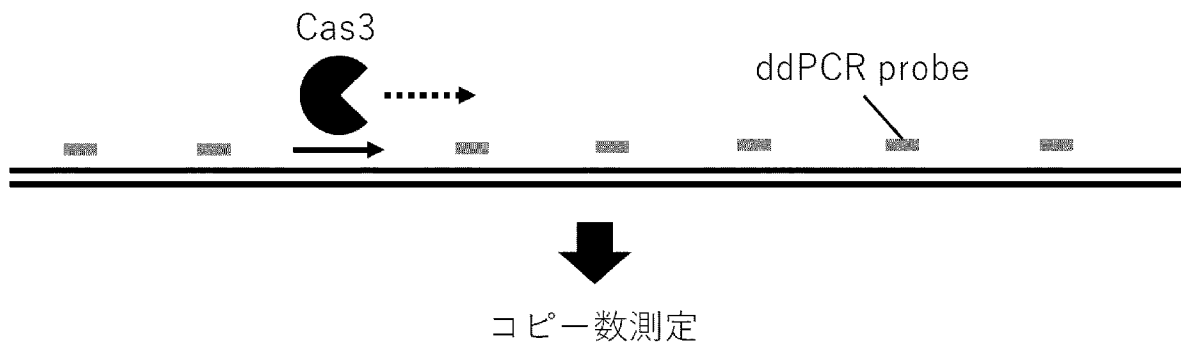
I14s04  
Lipofectamine Stem



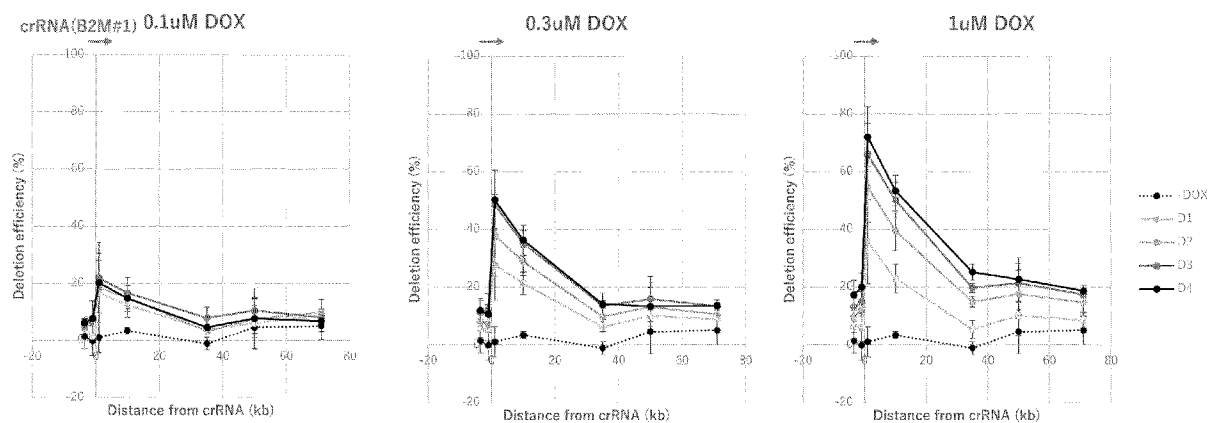
[図11]



[図12]

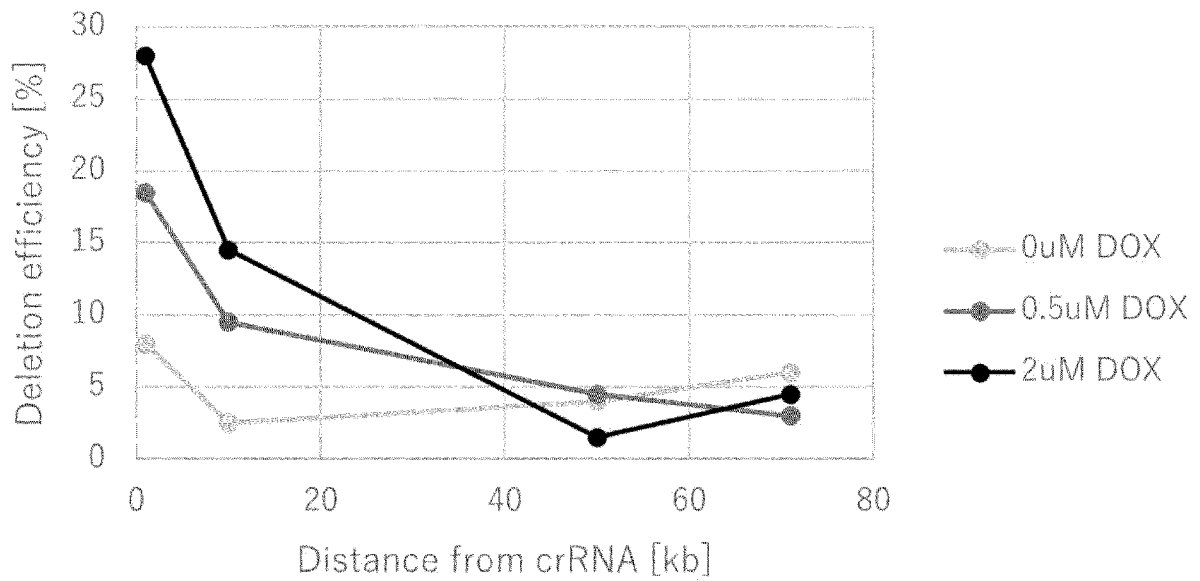


[図13]

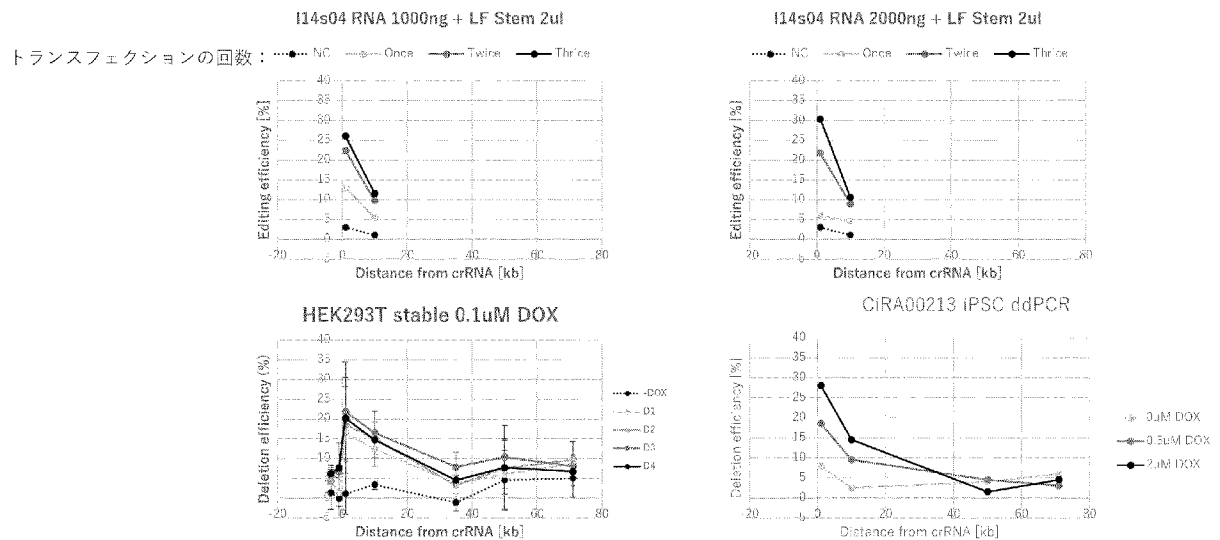


[図14]

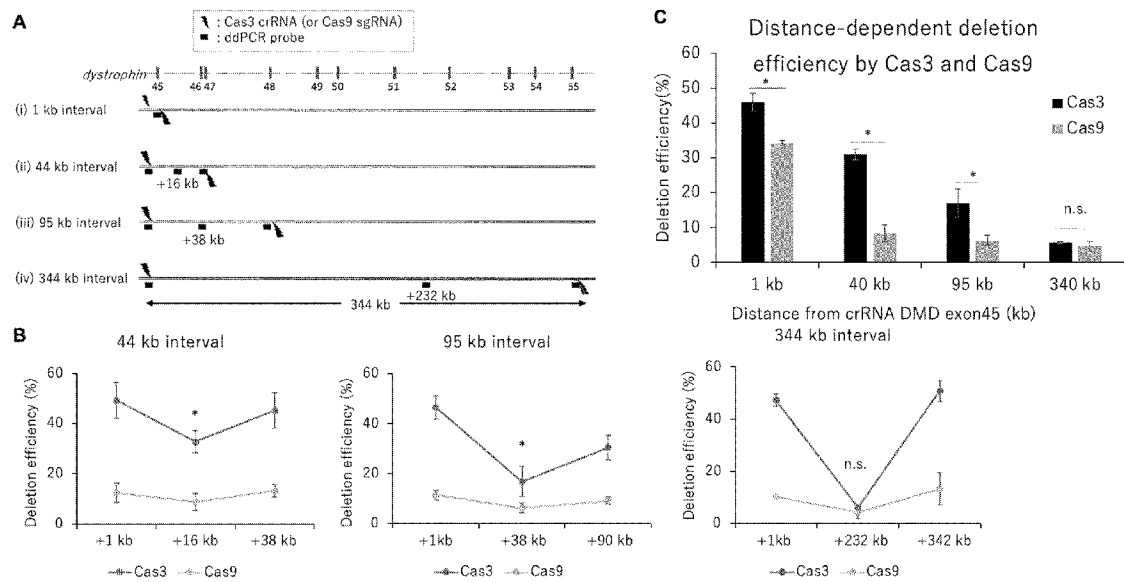
## CiRA00213 iPSC ddPCR



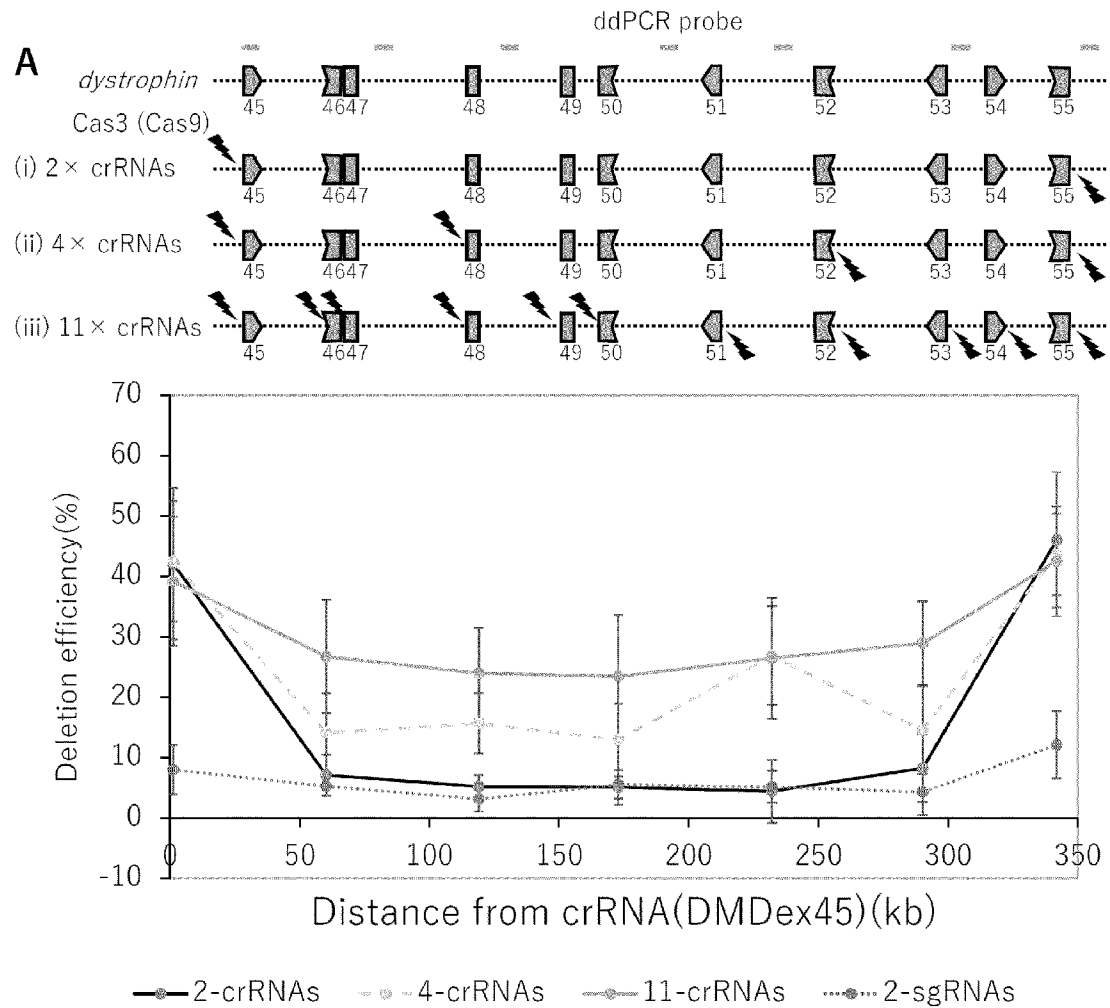
[図15]



[図16]

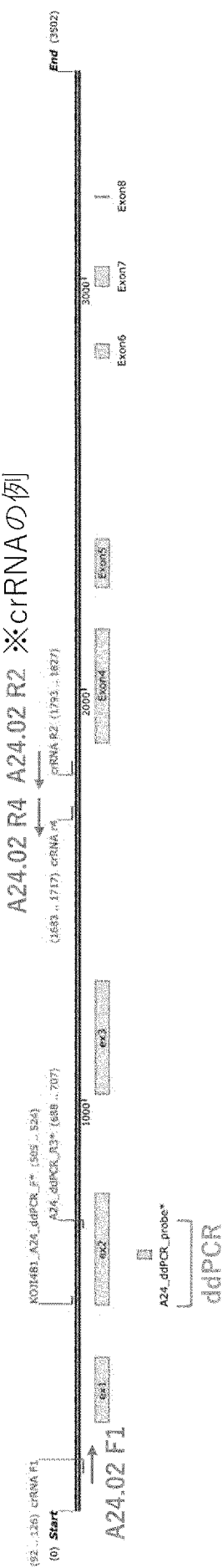


[図17]

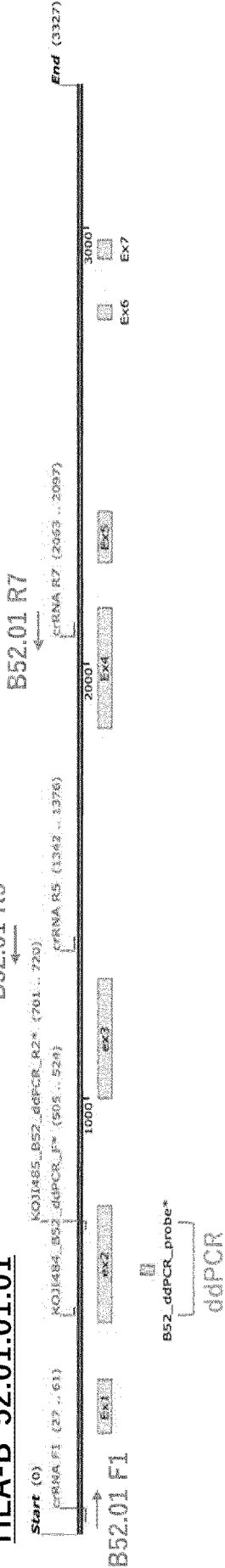


[図18]

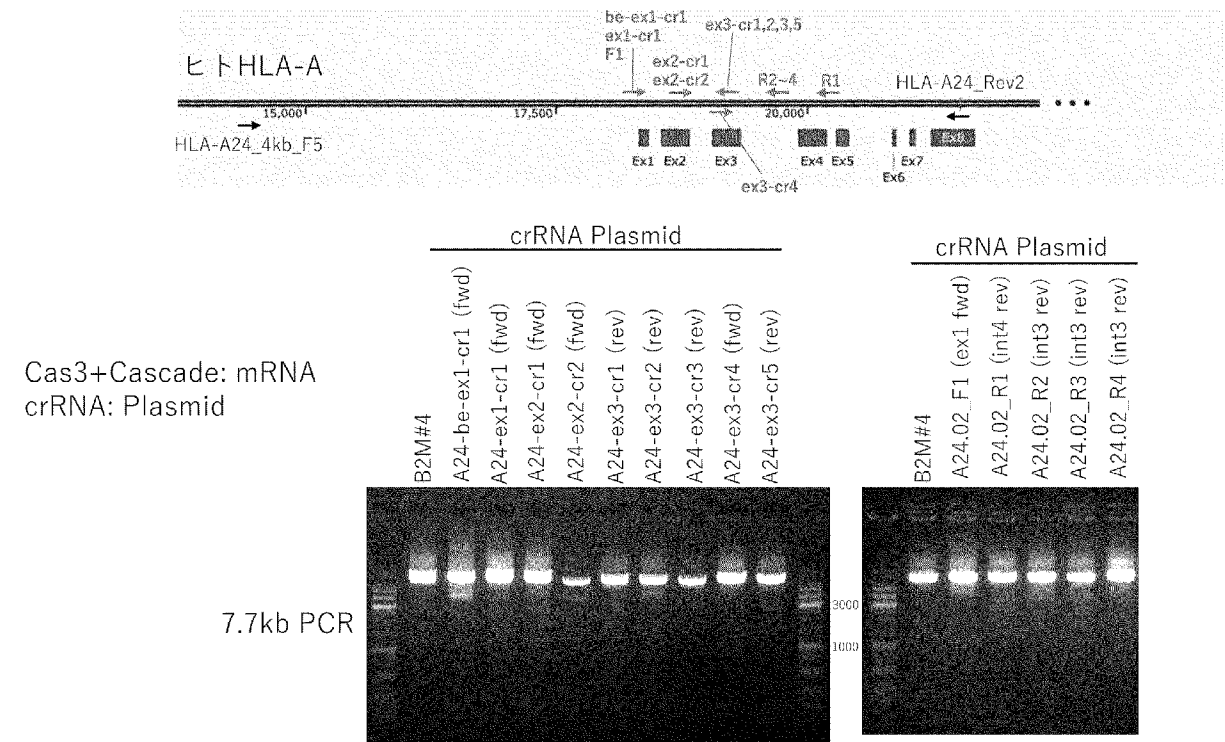
HLA-A\*24.02.01.01



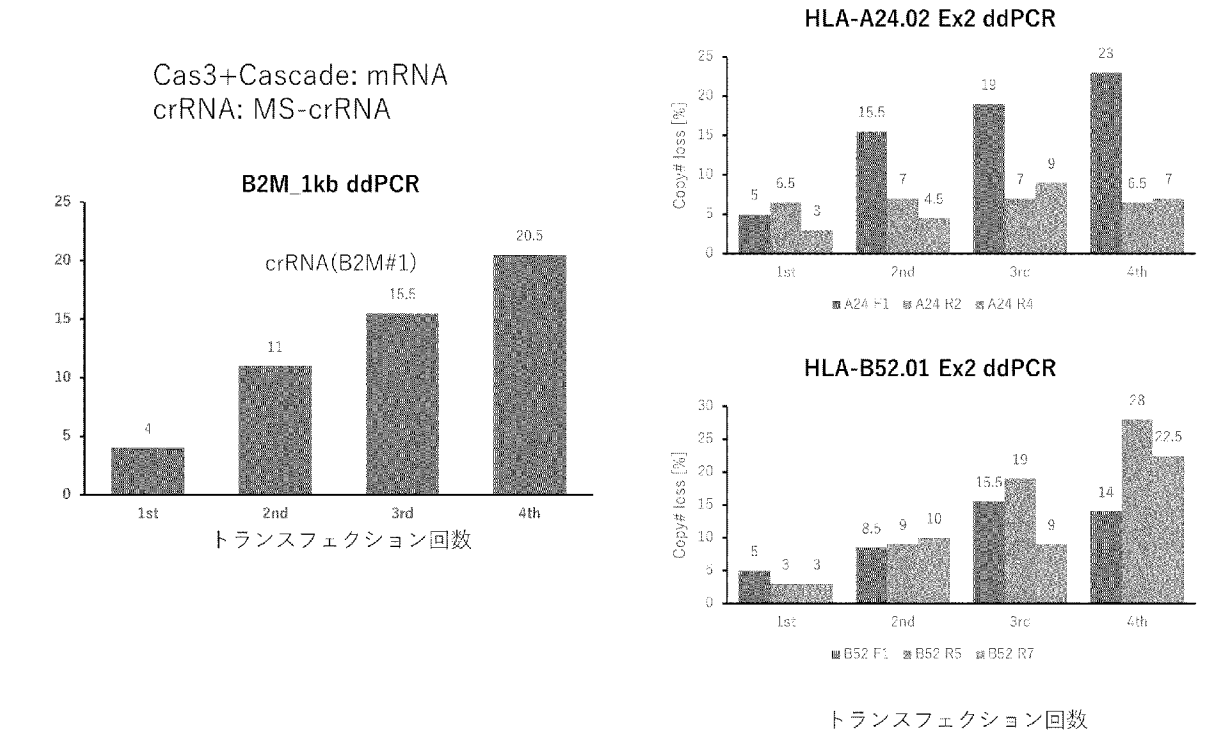
HLA-B\*52.01.01.01



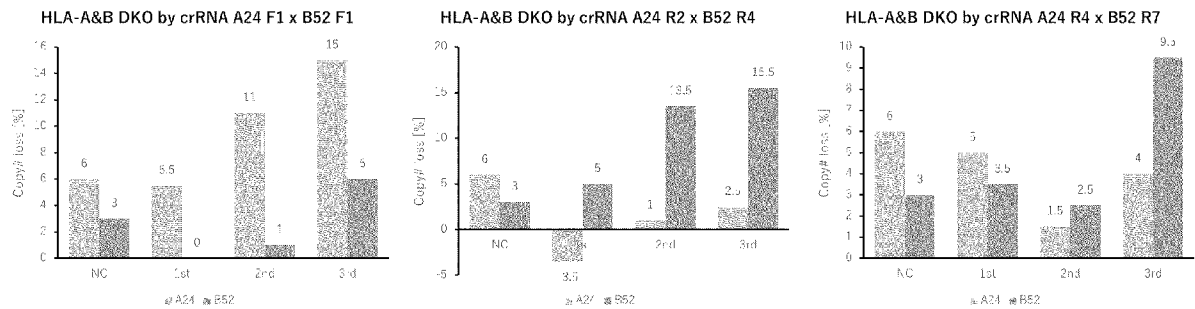
[図19]



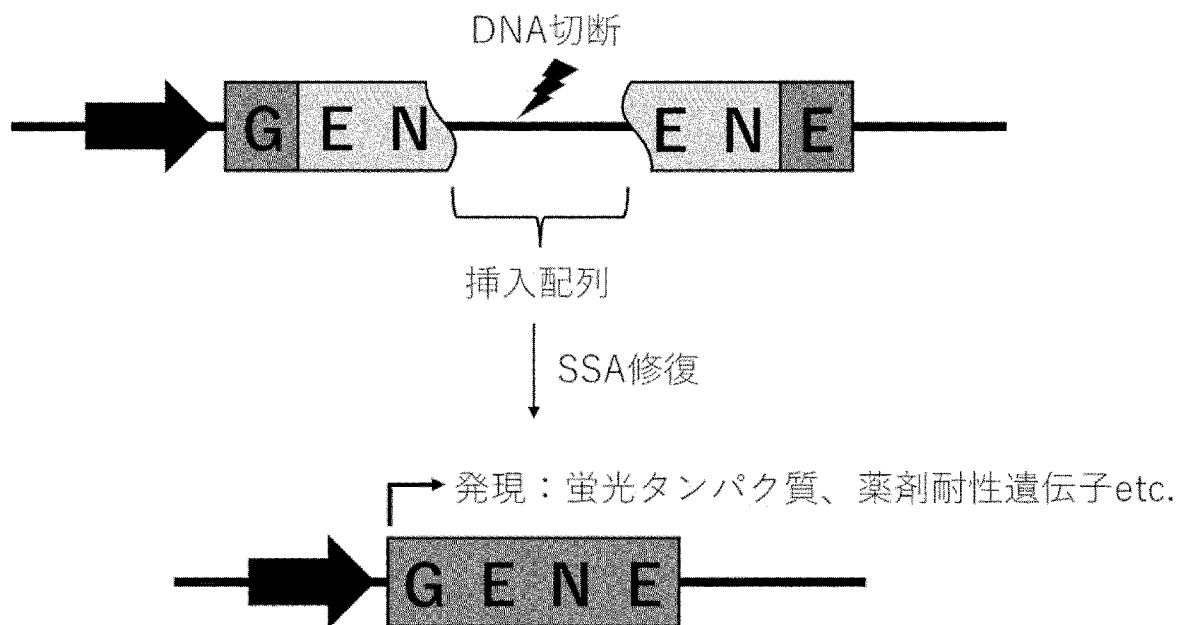
[図20]



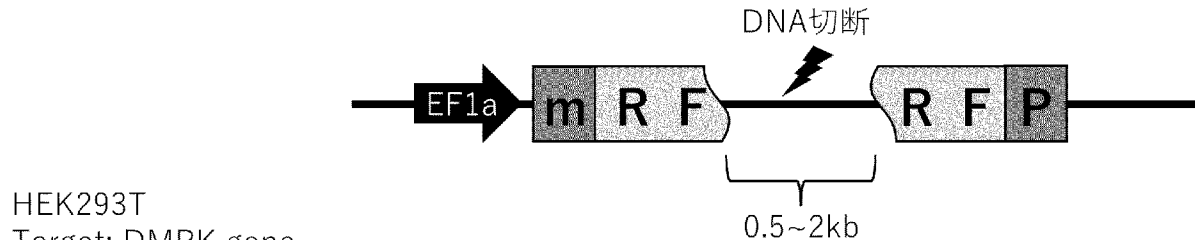
[図21]



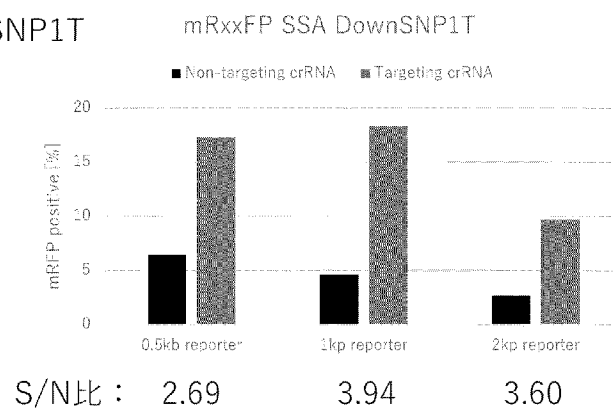
[図22]



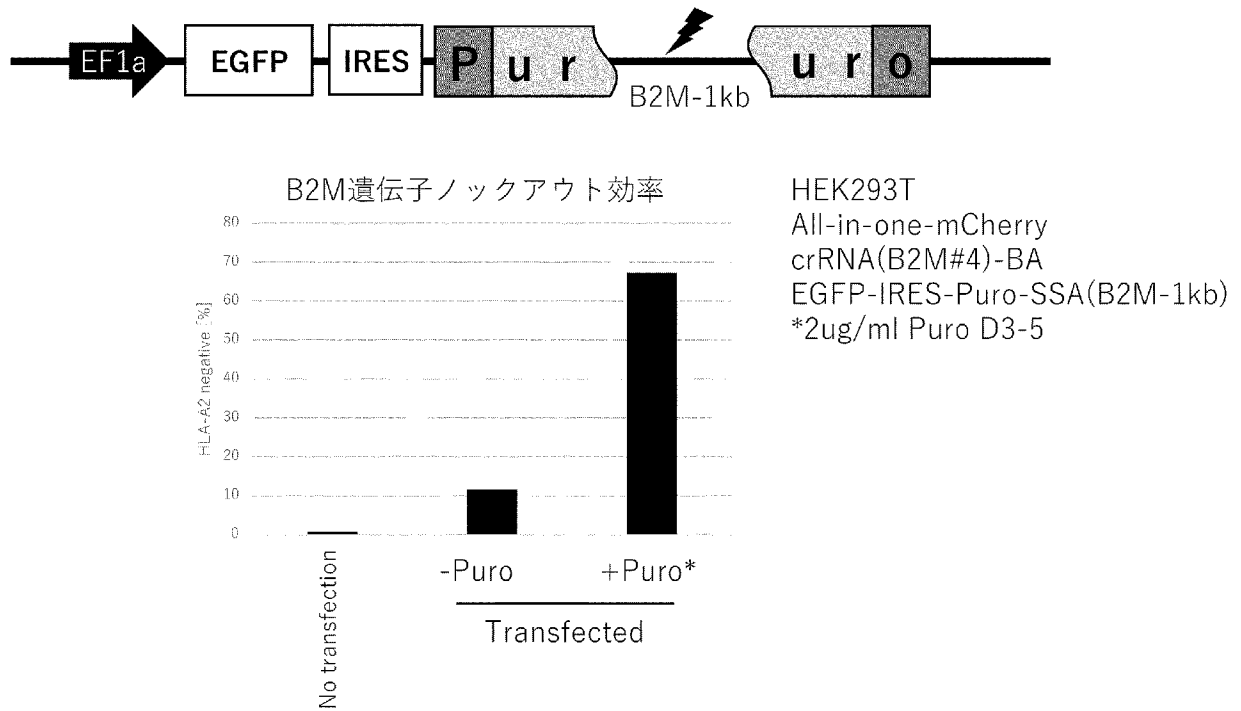
[図23]



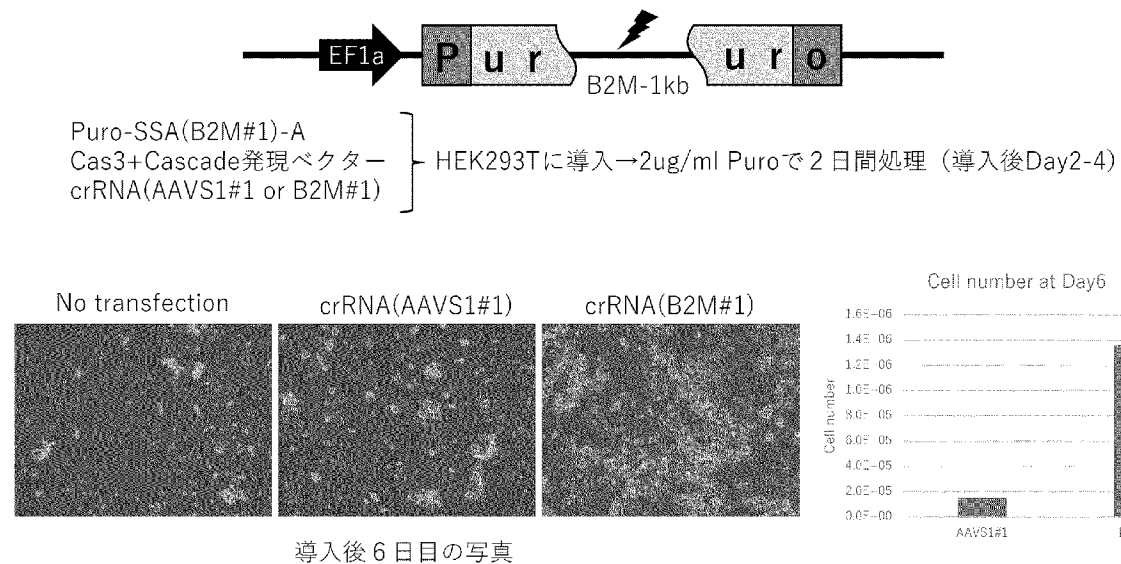
HEK293T  
Target: DMPK gene  
Non-targeting crRNA: AAVS1  
Targeting crRNA: DMPK DownSNP1T



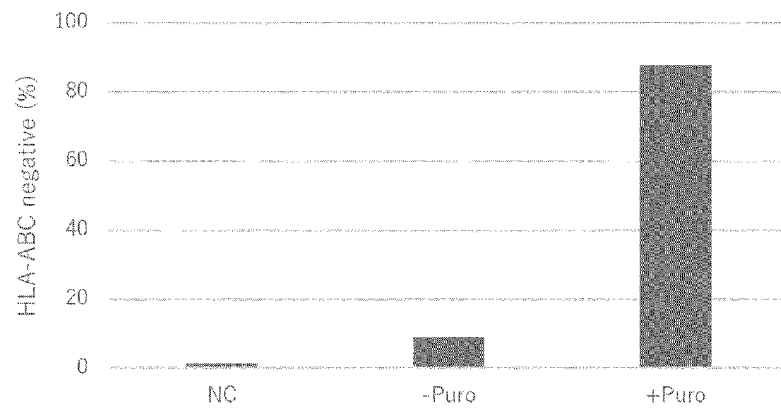
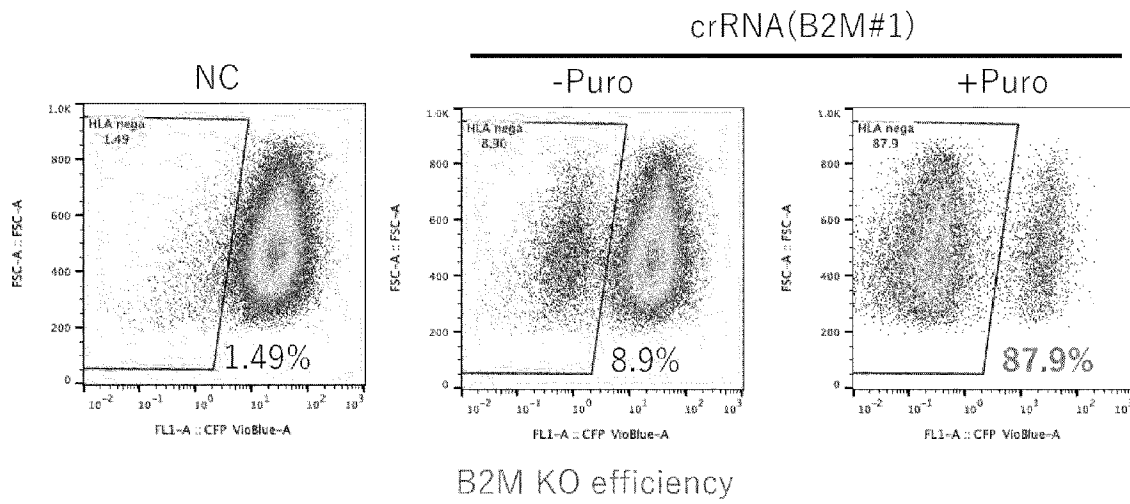
[図24]



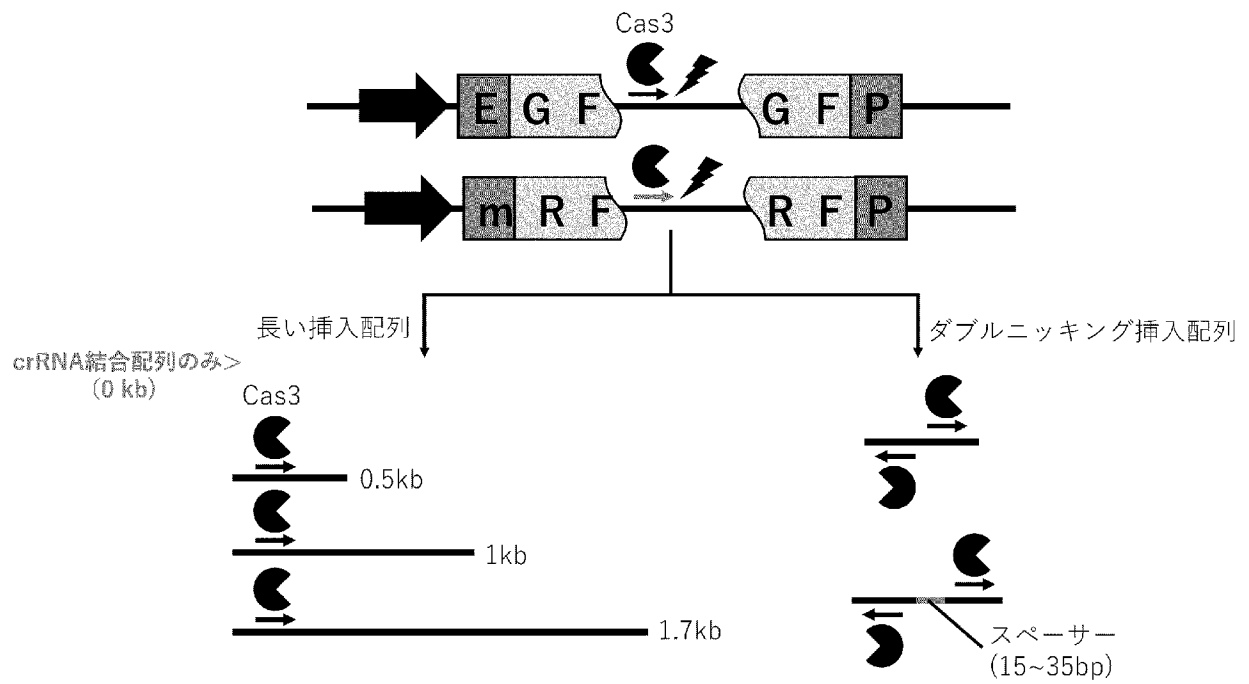
[図25]



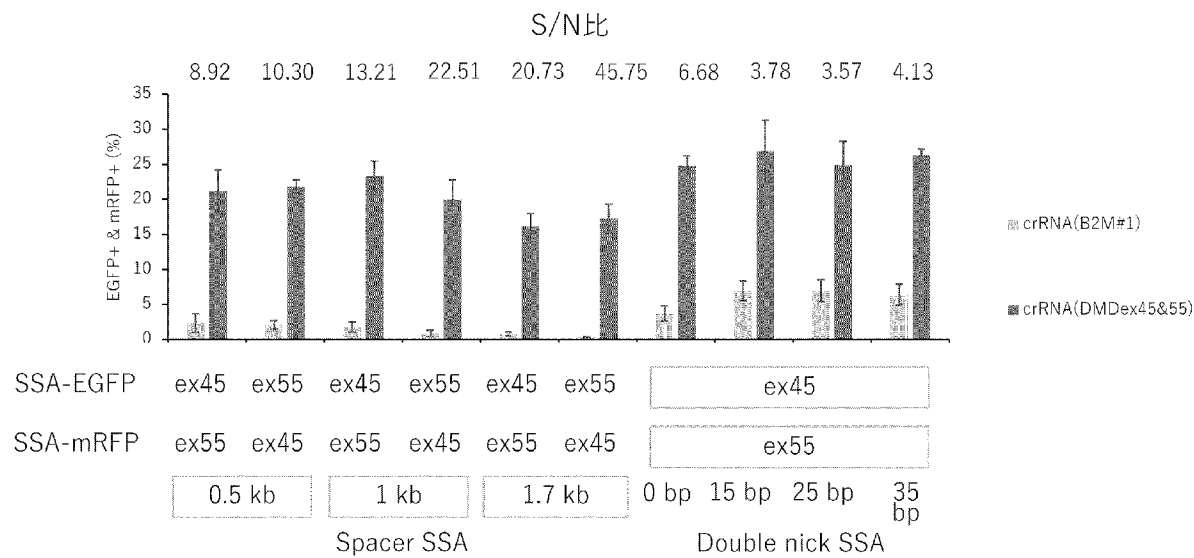
[図26]



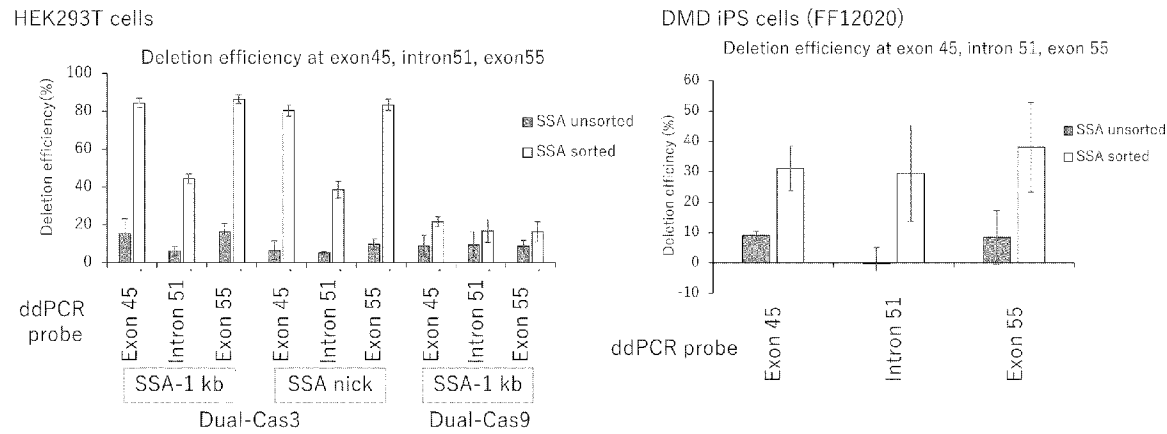
[図27]



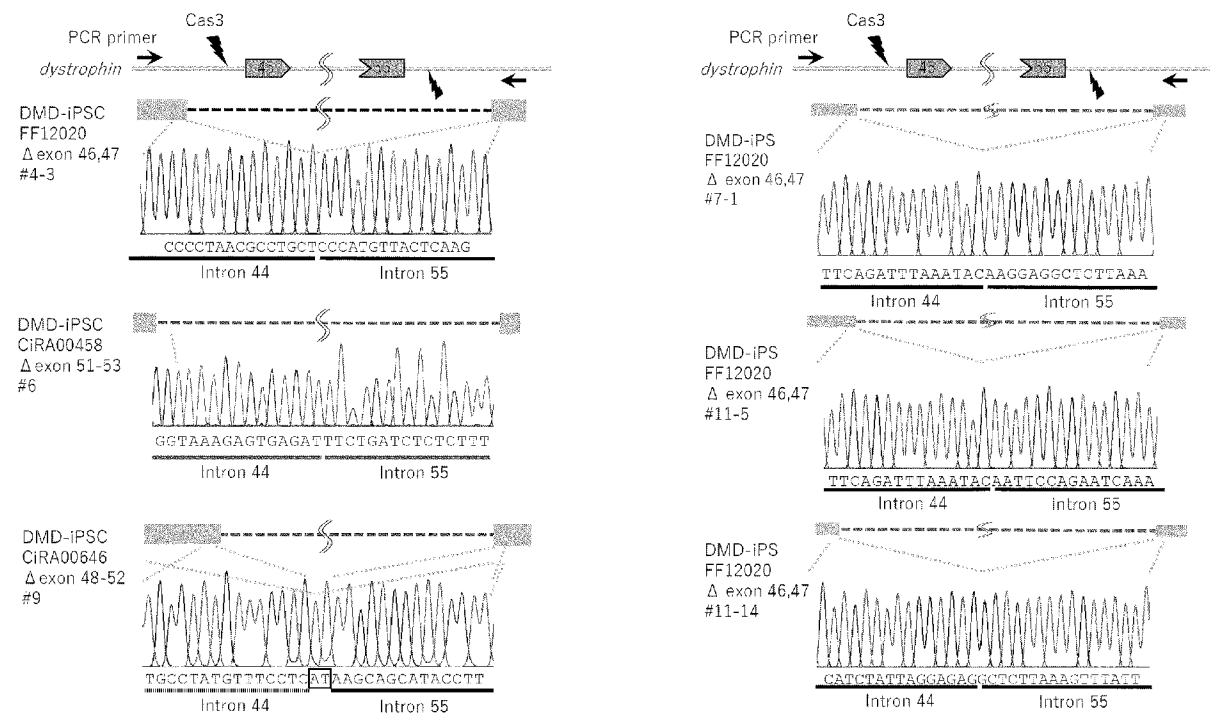
[図28]



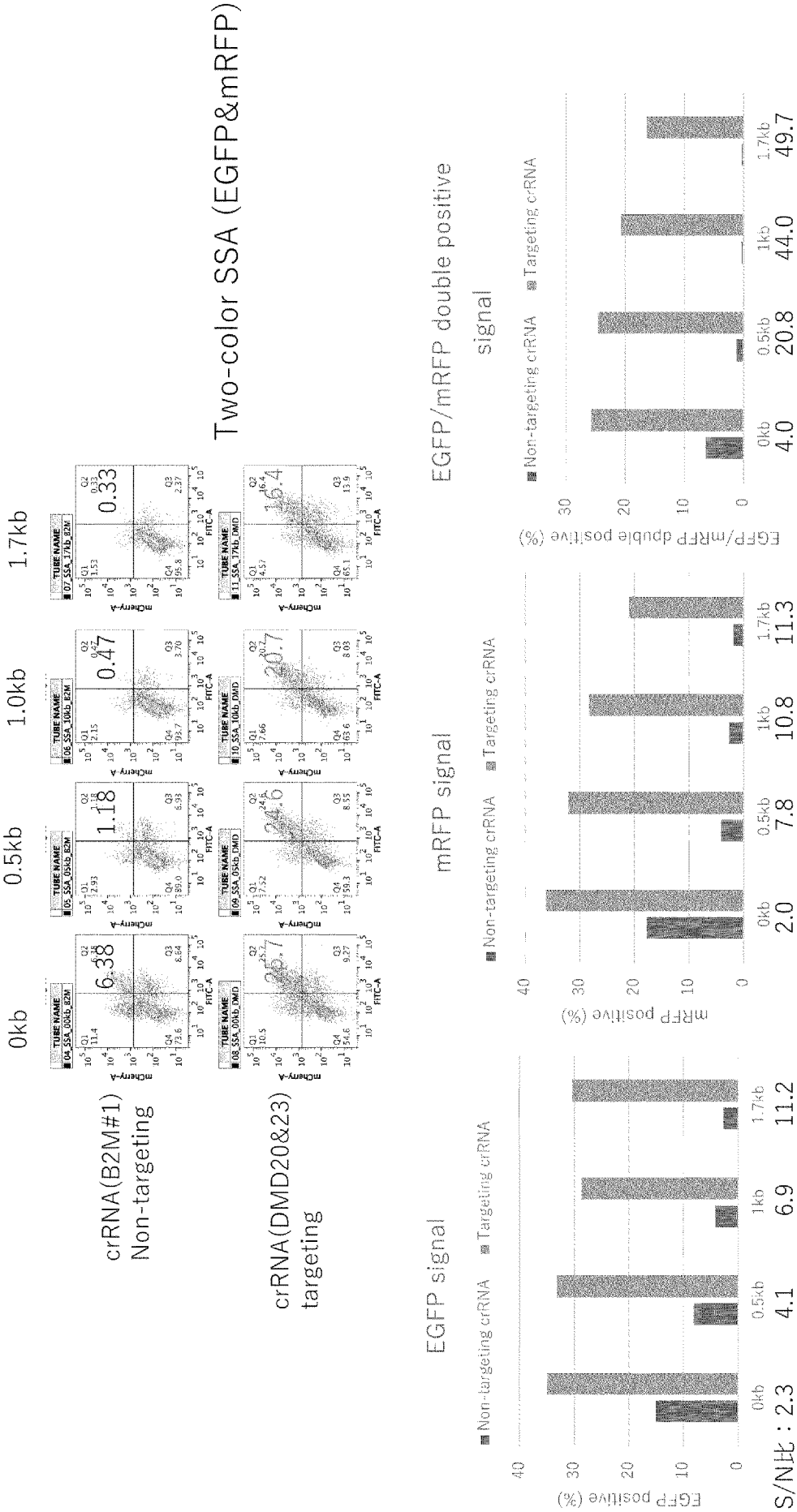
[図29]



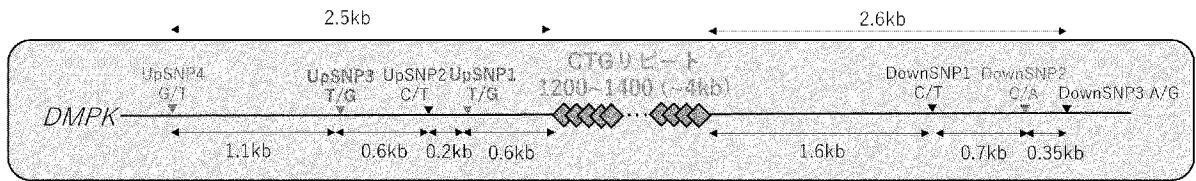
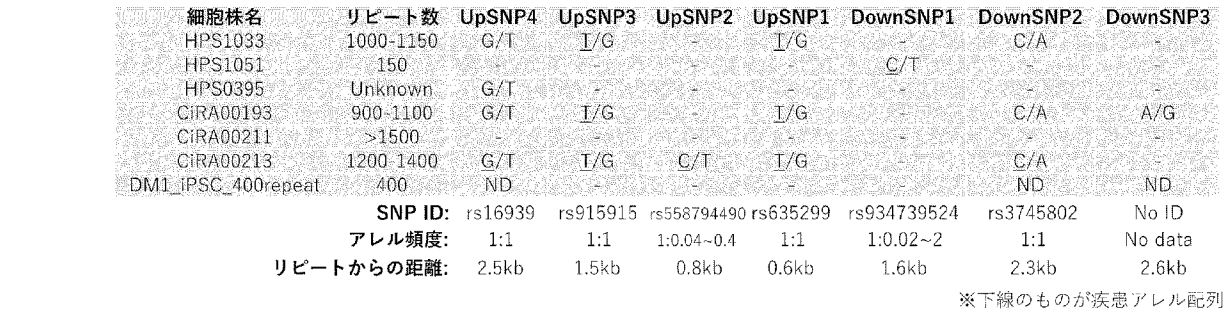
[図30]



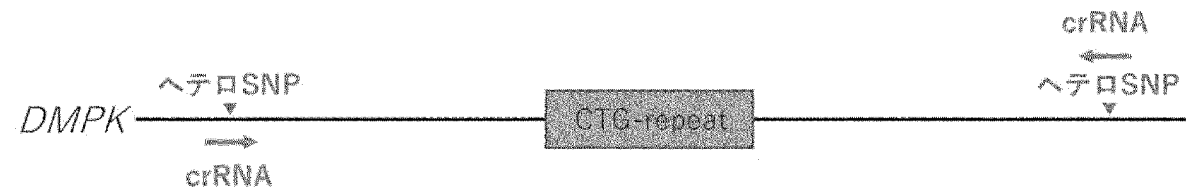
[図31]



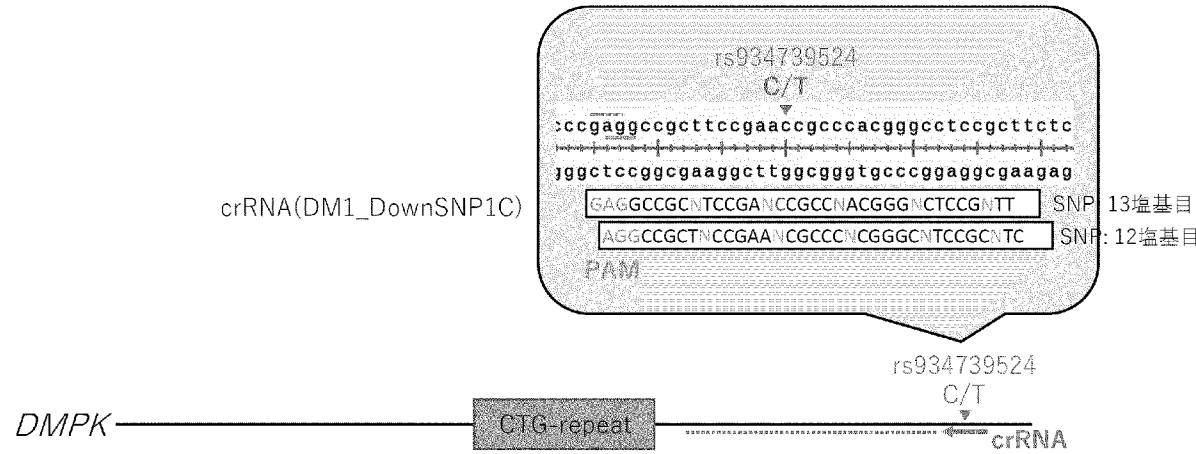
[図32]



[図33]

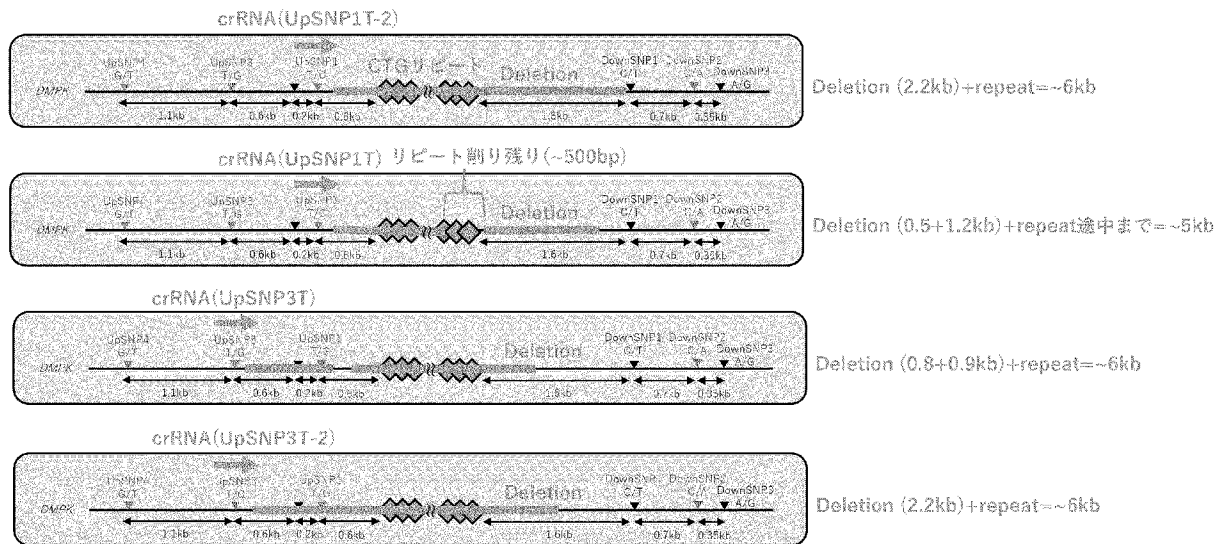


[図34]

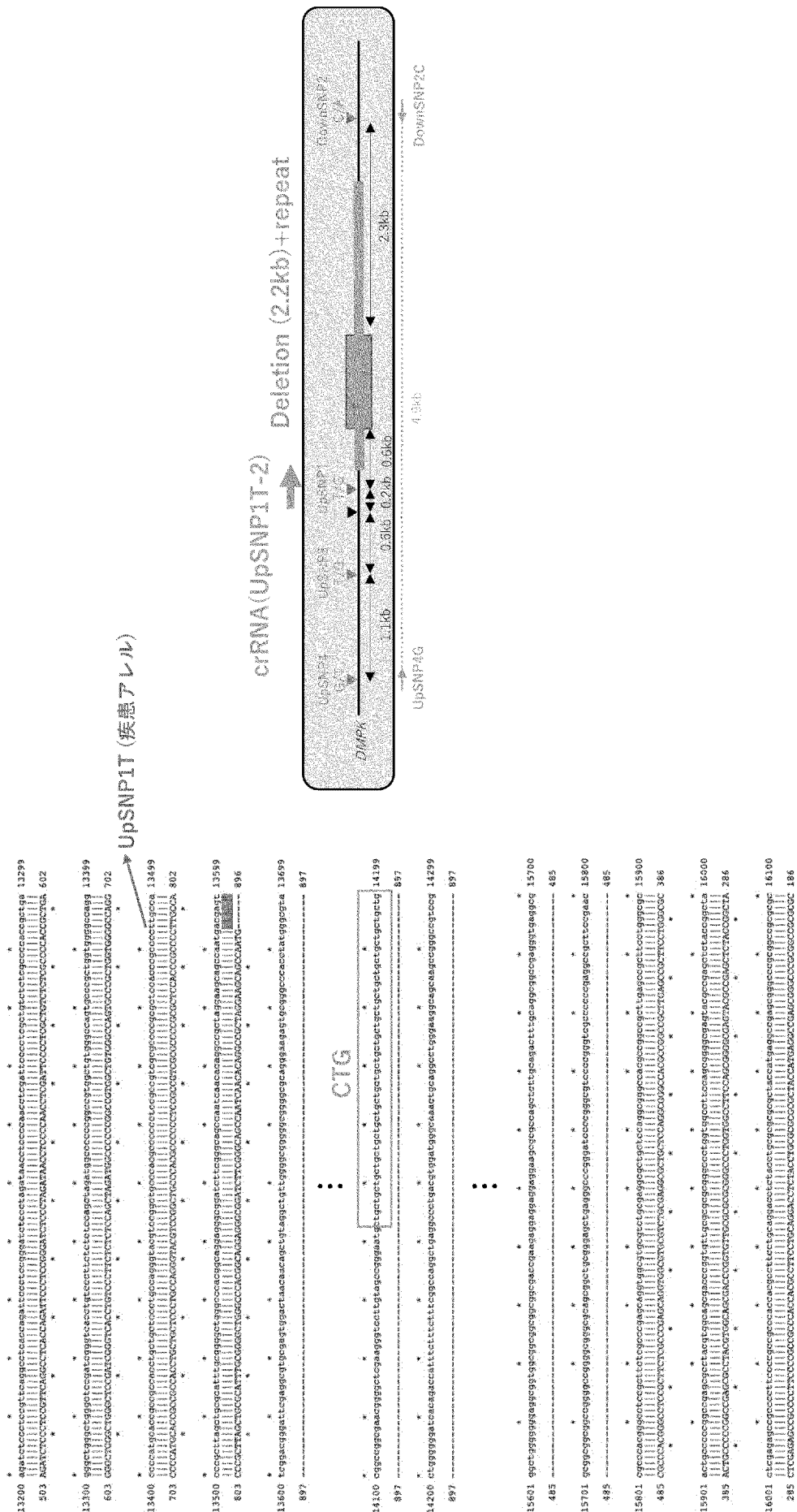




[図38]



[図39]



Deletion (0.5+1.2kb)+repeat途中まで=5kb



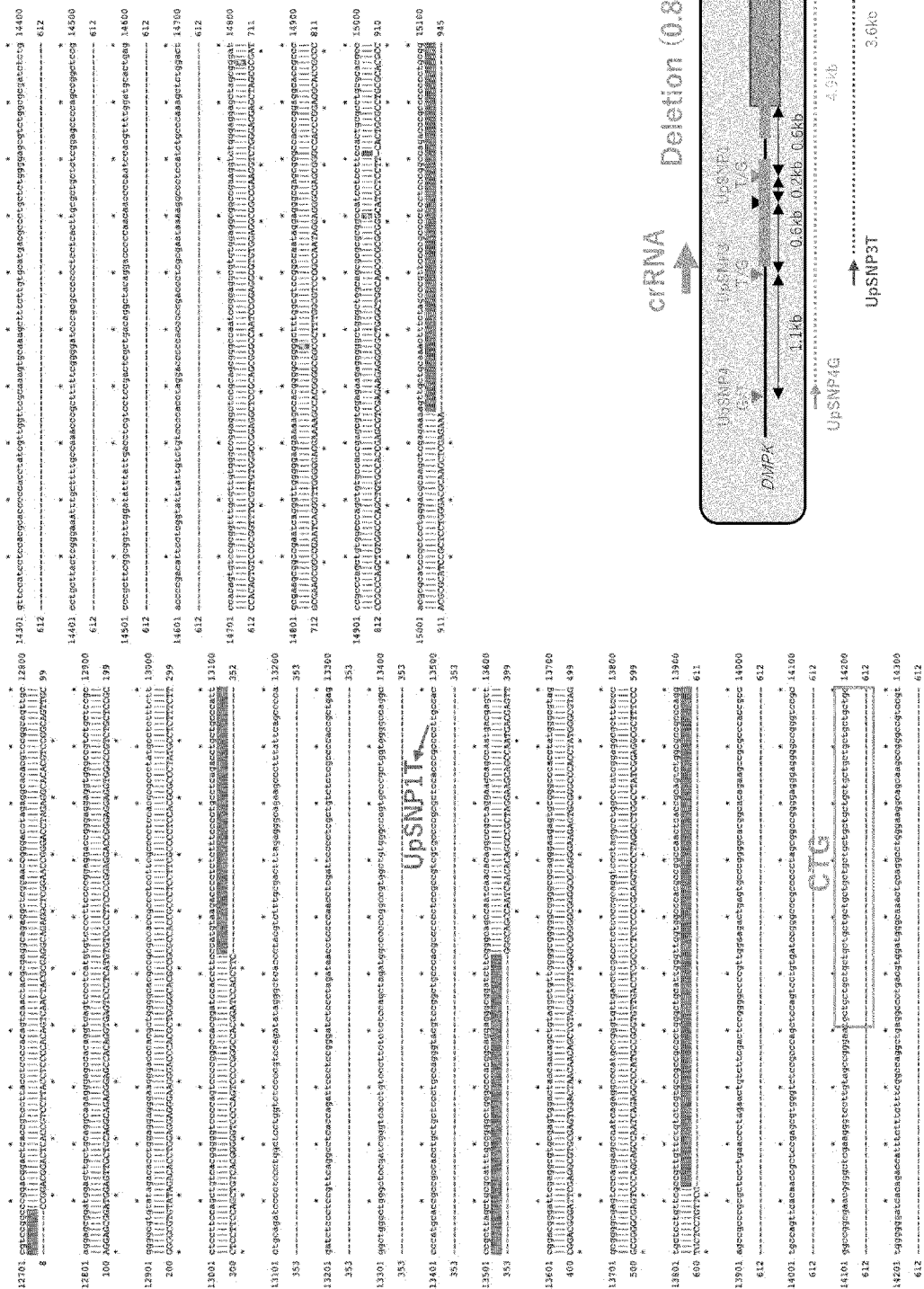
# CTG repeat number was reduced?

1.2kb deletion

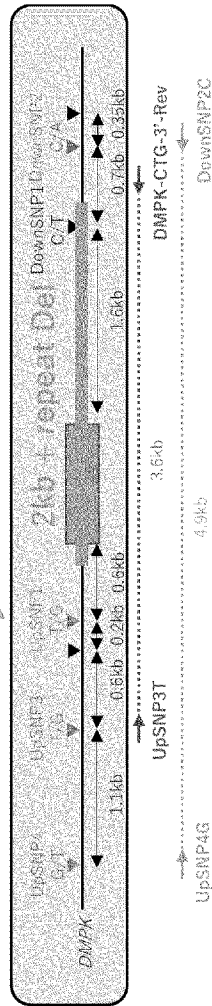
UpSNP1T (疾患アレル)

13801 cyaaaggaattcagagccatcgagcttggcctaaacacacgtatgggctcttggccgagggggcgagcagagagatgctgcggccacacattatggcgtatg 13700  
901 ccaagcgaggttcgaagcgtctcgagctcgagcggcgaacacacagctcttggcgttcg 948

[図41]

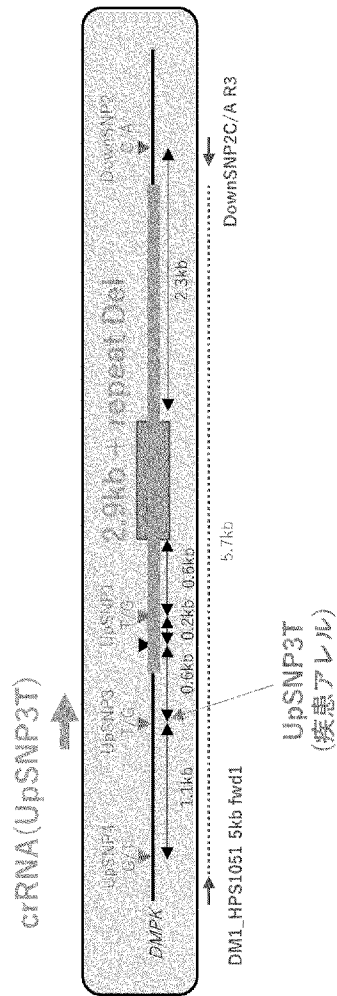


(疾患アール)



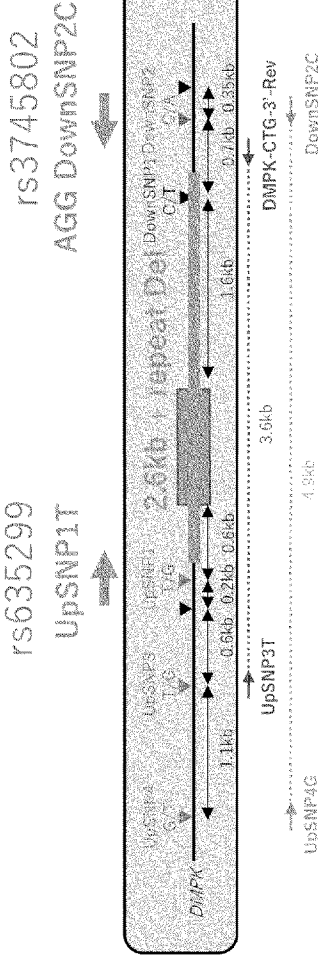
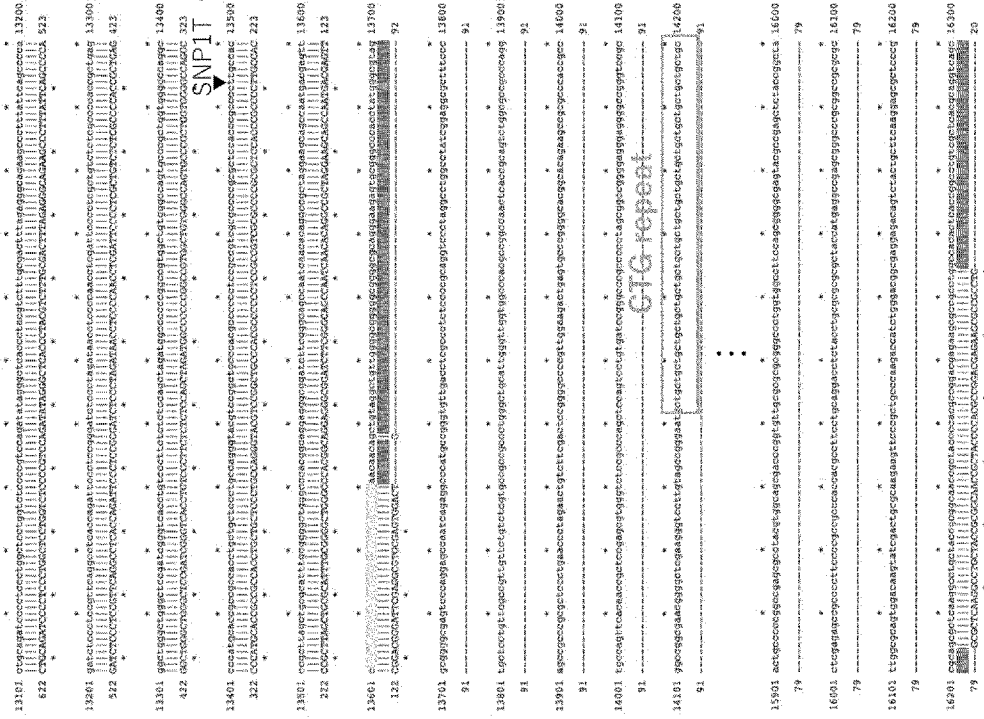
3T well#62

（六）

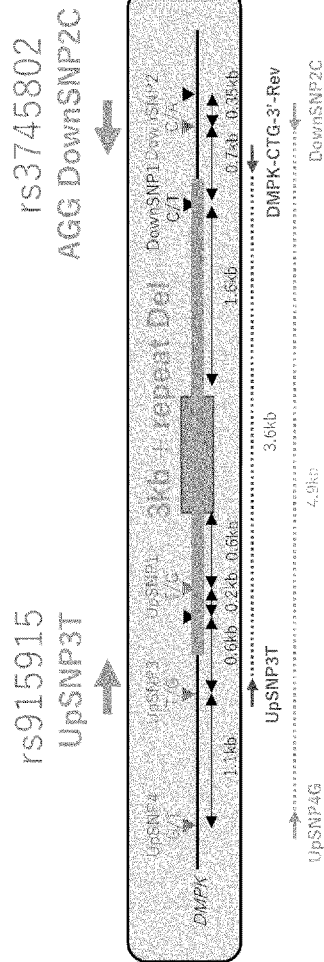


[図44]

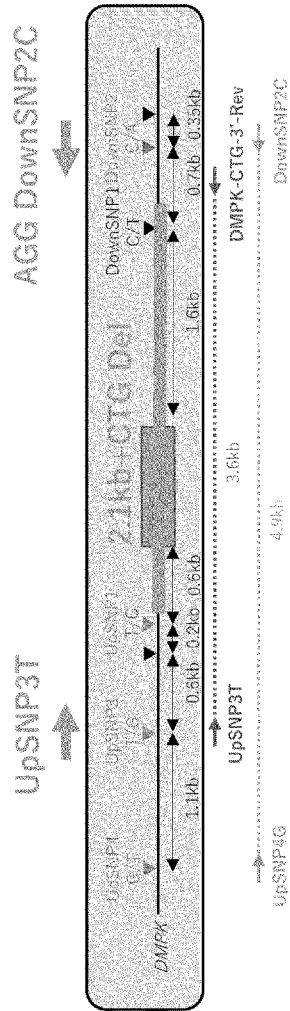
crRNA(UpSNP1T x AGG DownSNP2C) Nested sample Sangar



crRNA(UpSNP3T x AGG DownSNP2C) Nested sample Sangar

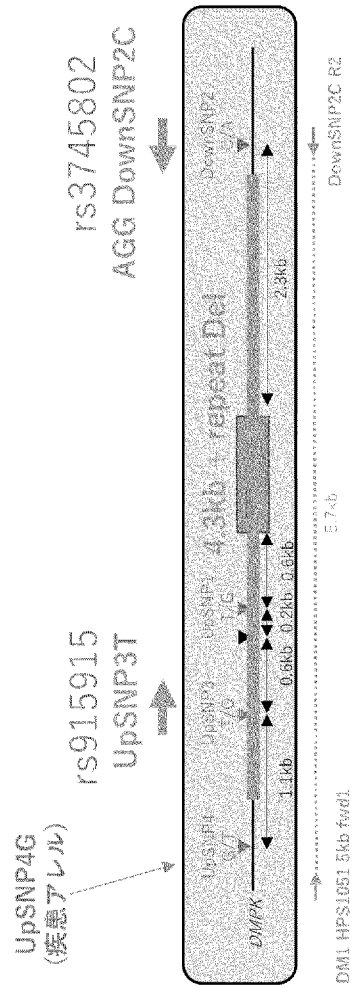
[illegible]

(疾患了ル)

[illegible]

crRNA(UpSNP3T x AGG DownSNP2C) PCR sample Sangar

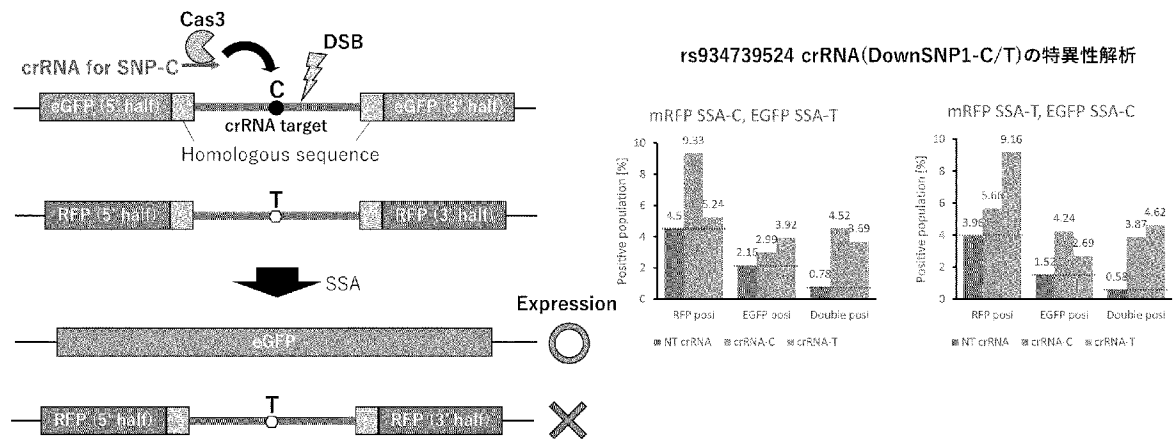
~10 cells/wellのwell sample (#57)



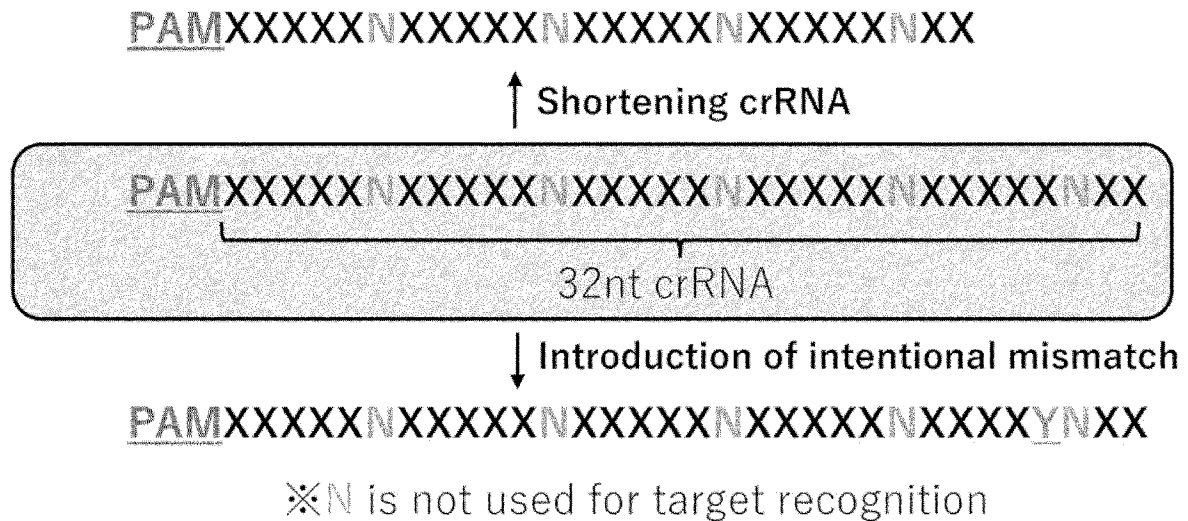
CTG (~14000 position)

[illegible]

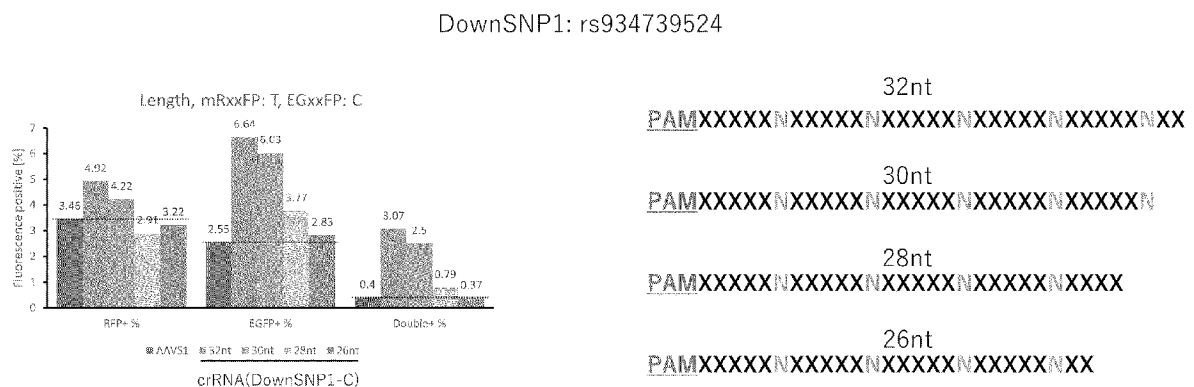
[図48]



[図49]

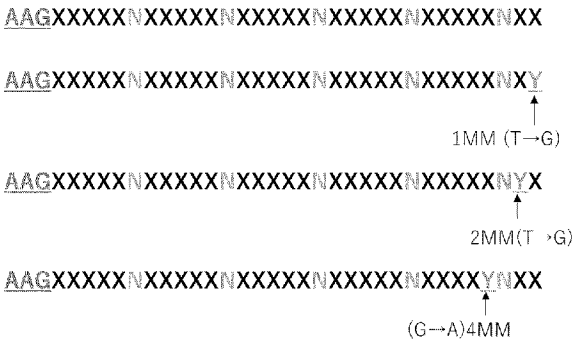
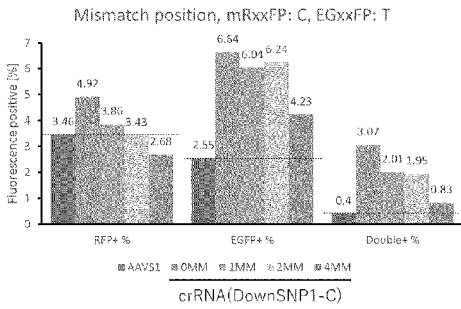


[図50]

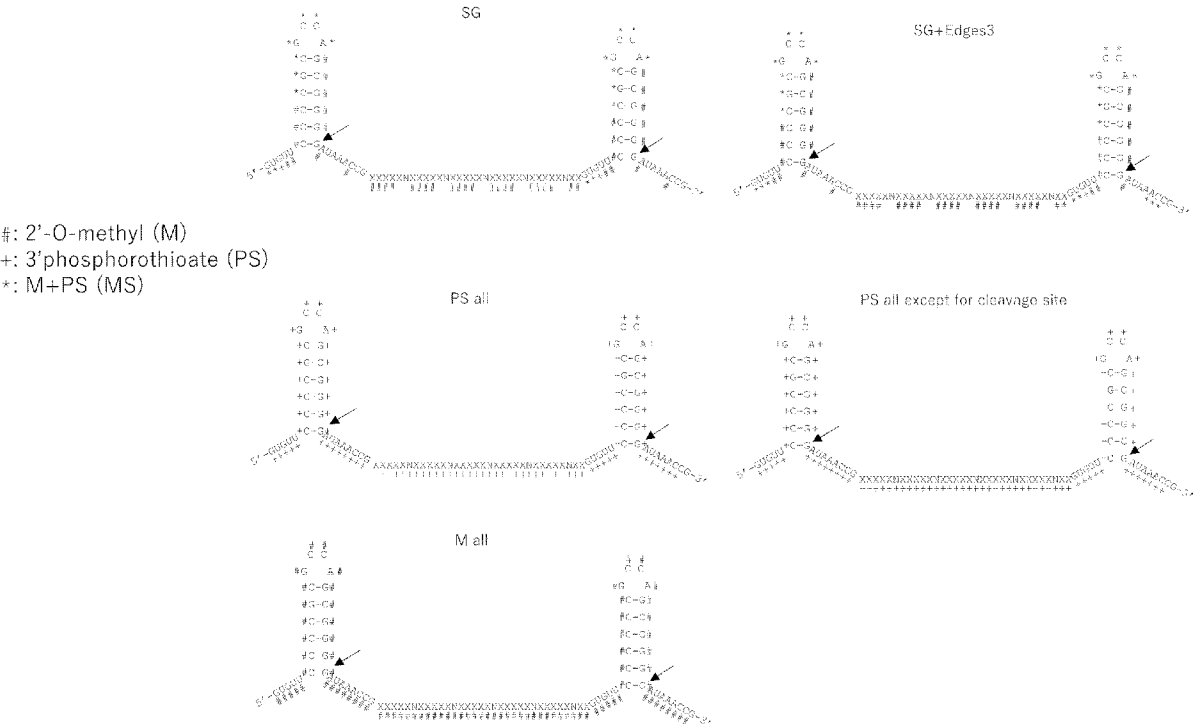


[51]

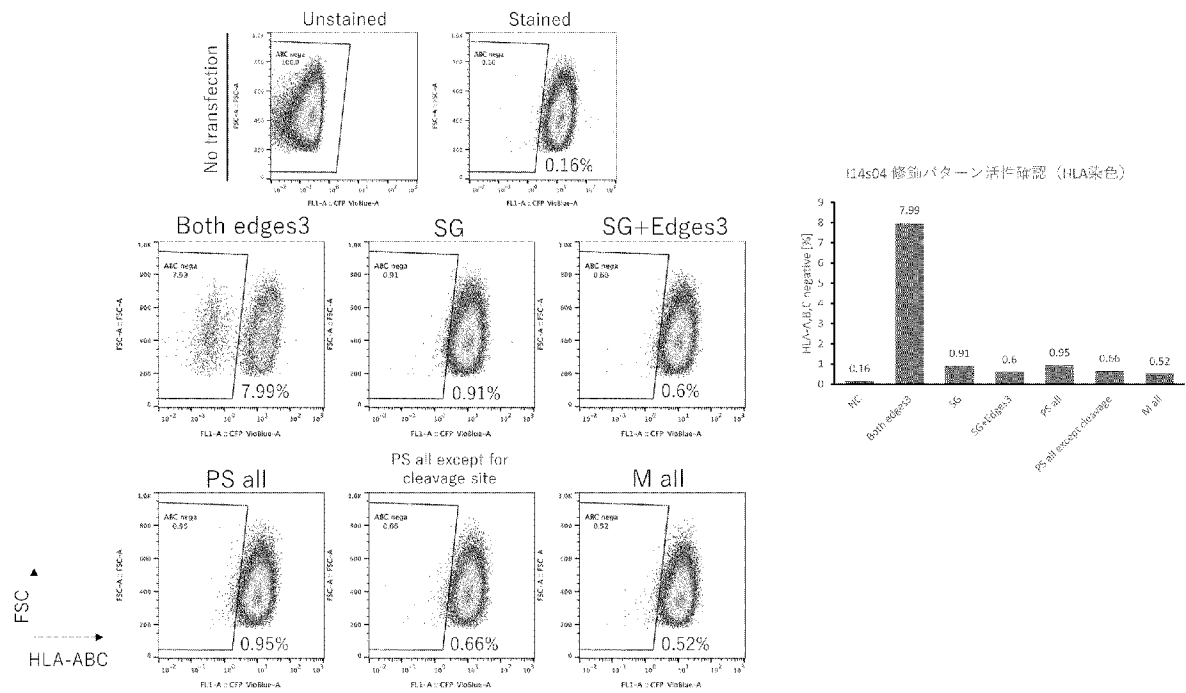
※crRNA targets “C” allele



[52]

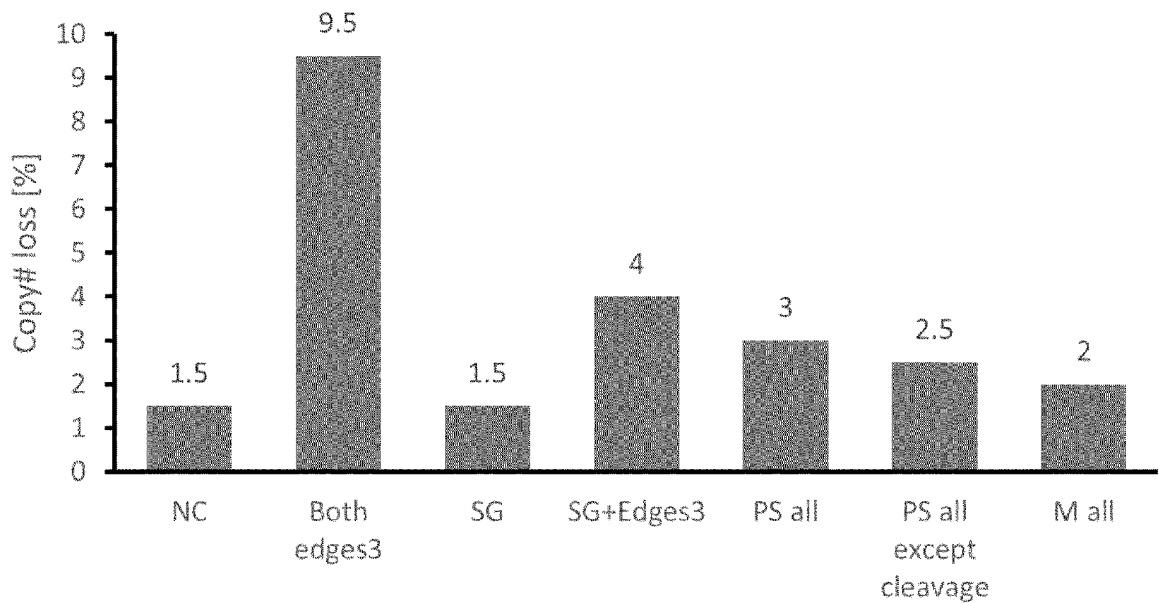


[図53]

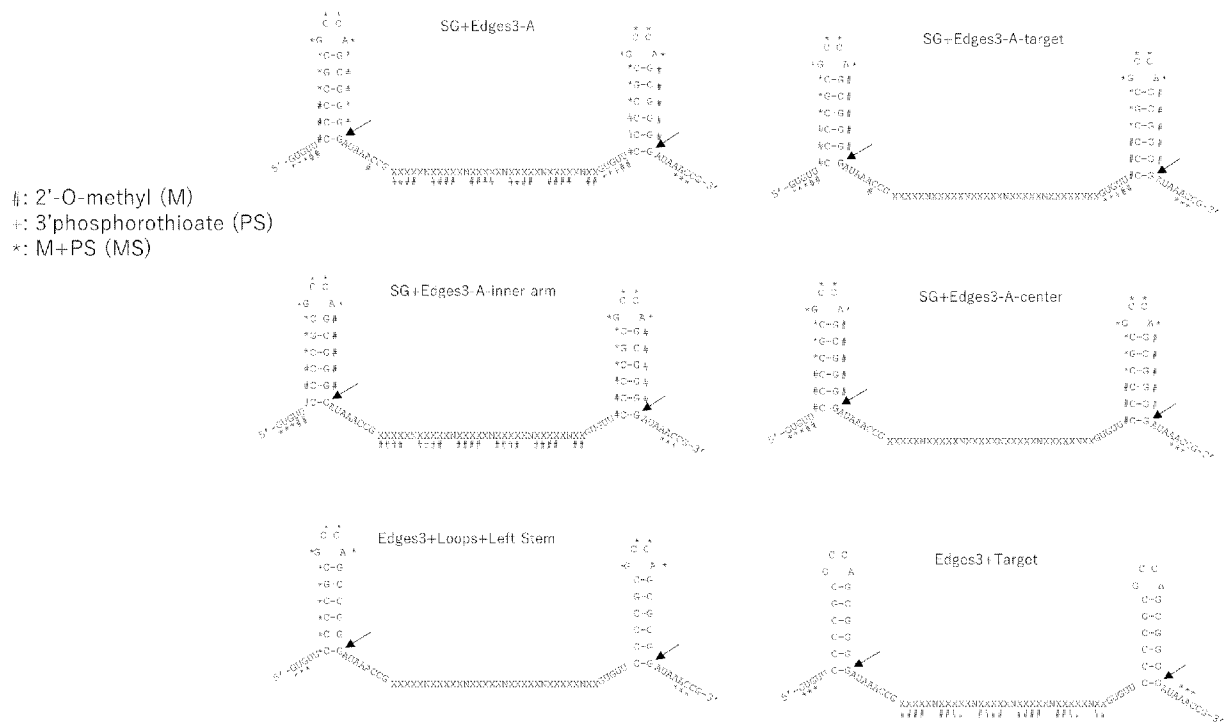


[図54]

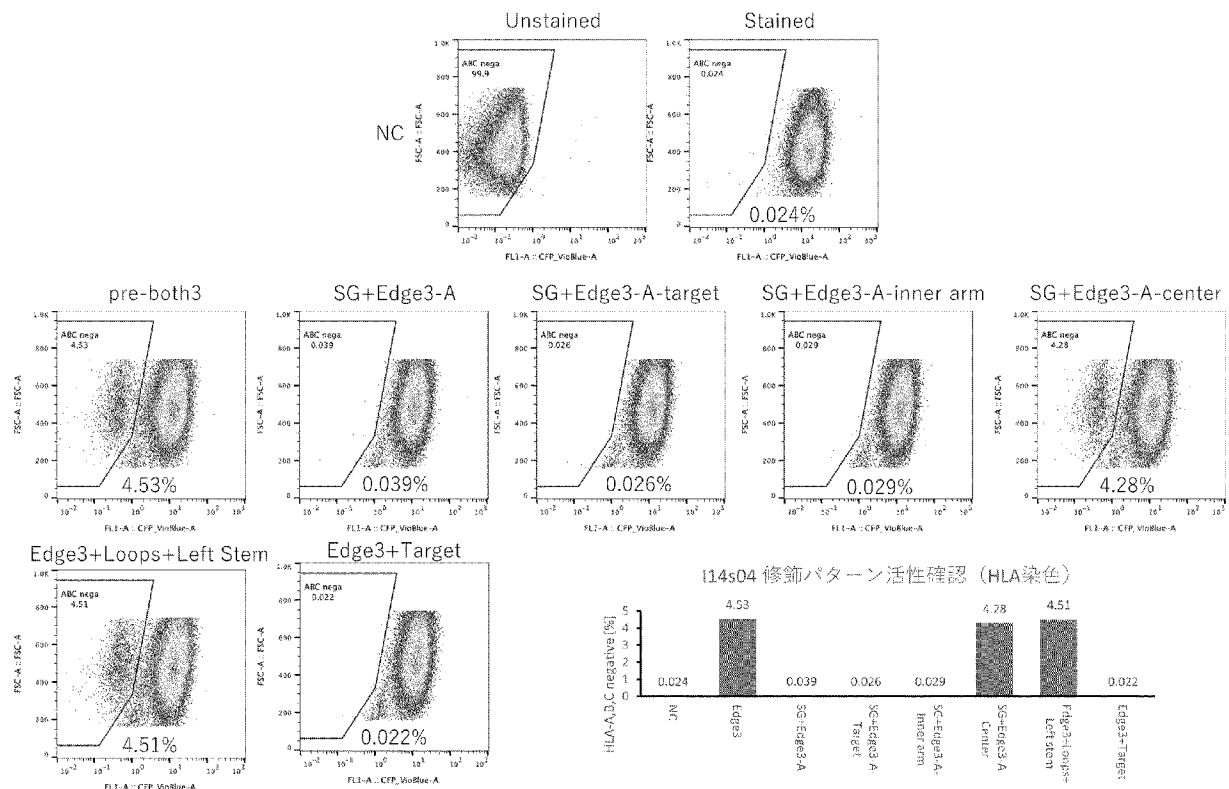
## I14s04 修飾パターン活性確認 (ddPCR)



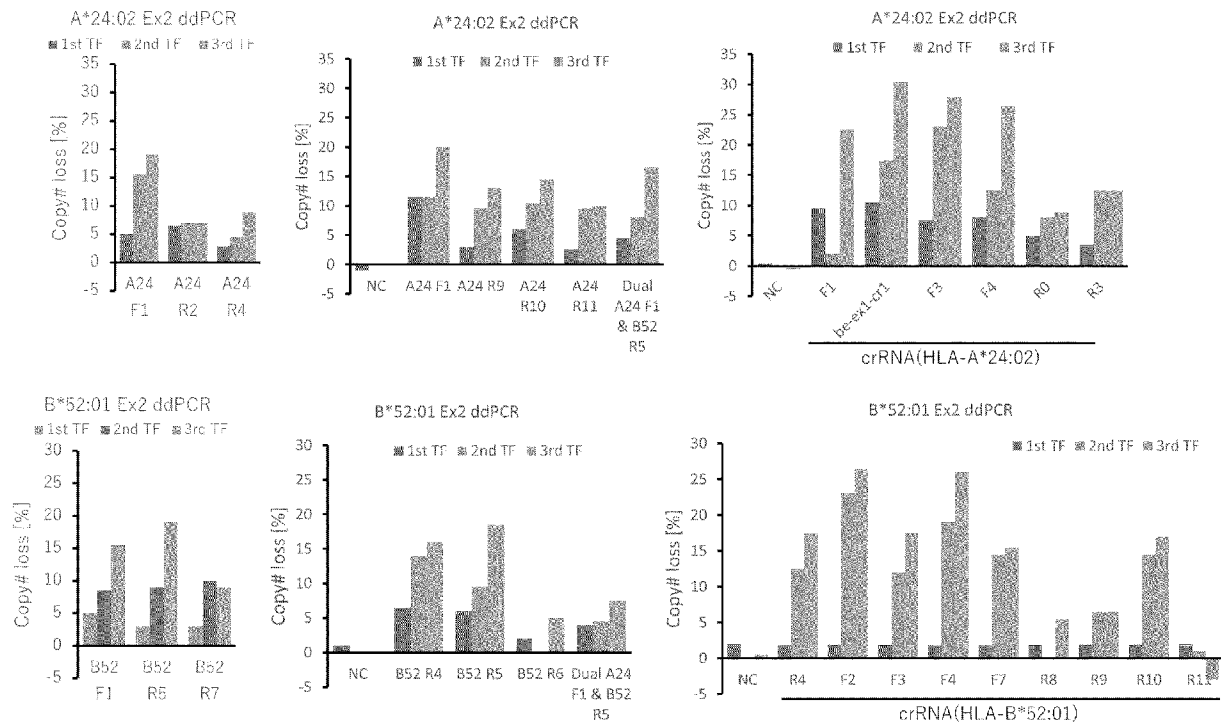
[図55]



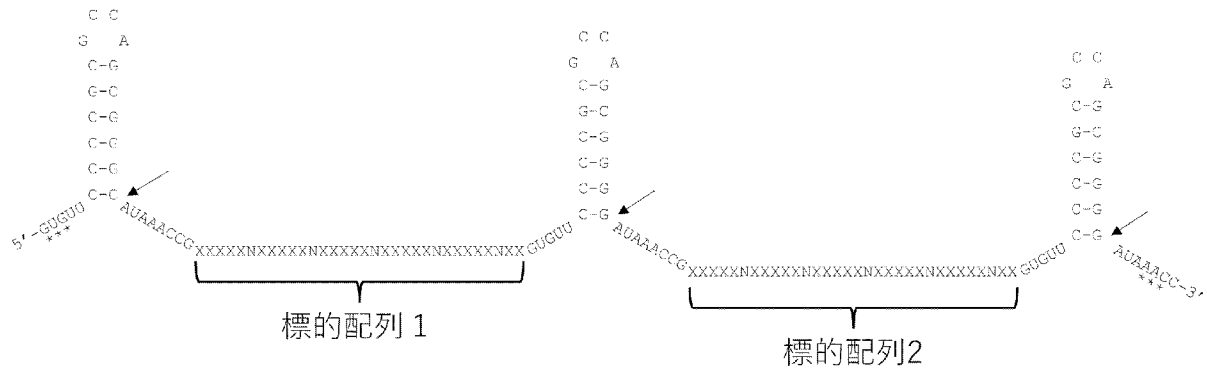
[図56]



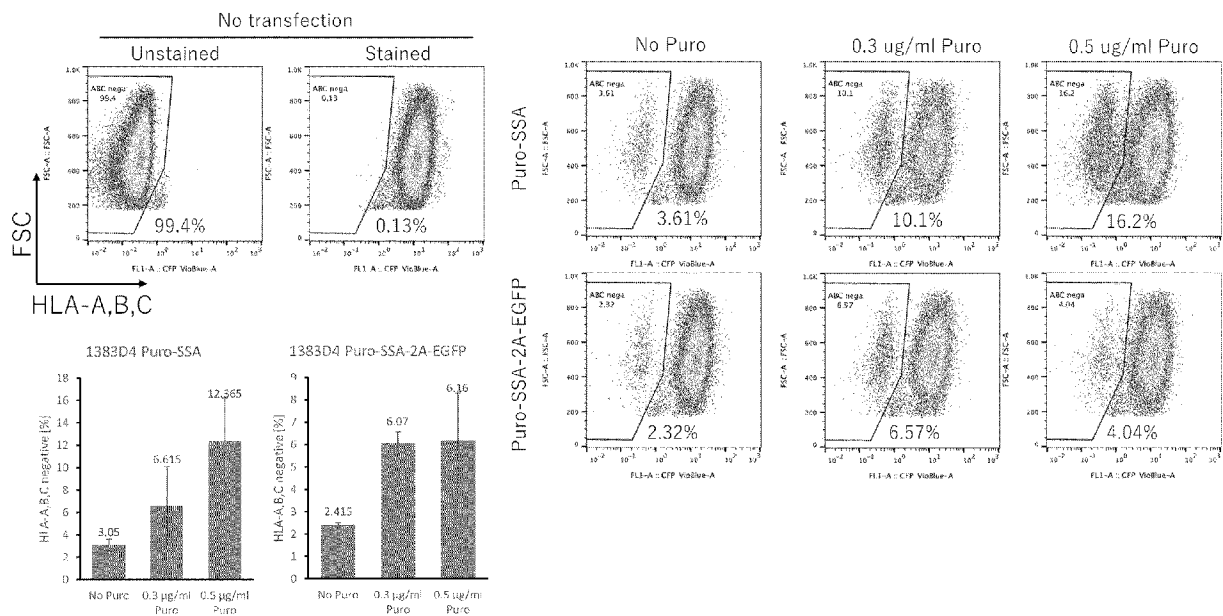
[図57]



[図58]



[図59]



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2024/012128

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER***C12N 15/11*(2006.01)i; *C12N 5/10*(2006.01)i; *C12N 15/09*(2006.01)i; *C12Q 1/686*(2018.01)i

FI: C12N15/11 Z ZNA; C12N5/10; C12N15/09 110; C12Q1/686 Z

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)

C12N15/11; C12N5/10; C12N15/09; C12Q1/686

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 1971-2024  
Registered utility model specifications of Japan 1996-2024  
Published registered utility model applications of Japan 1994-2024

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. |
|-----------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| X         | WO 2020/122104 A1 (KYOTO UNIVERSITY) 18 June 2020 (2020-06-18)<br>claims, paragraph [0056], examples                                                                                                            | 1-7, 12, 15-16, 20    |
| Y         |                                                                                                                                                                                                                 | 17-20                 |
| Y         | WO 2020/111229 A1 (KYOTO UNIVERSITY) 04 June 2020 (2020-06-04)<br>paragraphs [0104], [0141], [0163], examples 1-4, fig. 1                                                                                       | 17-20                 |
| A         | WO 2018/225858 A1 (OSAKA UNIVERSITY) 13 December 2018 (2018-12-13)<br>claims                                                                                                                                    | 1-7, 12, 15-20        |
| A         | CHEN, Y. et al. Repurposing type I-F CRISPR-Cas system as a transcriptional activation tool in human cells. NATURE COMMUNICATIONS. 2020, vol. 11, no. 3136, pp. 1-14, ISSN:2041-1723<br>in particular, abstract | 1-7, 12, 15-20        |
| A         | LIU, T. Y. et al. Chemistry of class 1 CRISPR-Cas effectors: binding, editing, and regulation. J. Biol. Chem. 2020, vol. 295, no. 42, pp. 14473-14487, ISSN:0021-9258<br>particularly, abstract                 | 1-7, 12, 15-20        |

☐ 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  
“D” document cited by the applicant in the international application  
“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

12 June 2024

Date of mailing of the international search report

25 June 2024

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/JP2024/012128**

## 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.
  - b. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)),  
☐ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.
2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.
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:

(i) The number of inventions included in the claims is

5

(ii) Claim numbers of claims classified into each invention

Invention 1: Claims 1-7 and parts referring to claims 1-7 in claims 12 and 15-20

Invention 2: Claim 8 and parts referring to claim 8 in claims 12 and 15-20

Invention 3: Claims 9-11 and parts referring to claims 9-11 in claims 12 and 15-20

Invention 4: Claims 13-14

Invention 5: Claim 21

(iii) Reasons for determining that the unity of invention is not complied with

Claims are classified into the following five inventions.

(Invention 1)

Claim 1 has the special technical features of a pre-crRNA of type I CRISPR-Cas system, wherein "in the region comprising the 5' arm region of the first repeat sequence, the 5' side stem forming region of the first repeat sequence and the loop forming region of the first repeat sequence, at least one nucleotide is a modified nucleotide". Therefore, claim 1 is classified as invention 1.

In addition, claims 2-7 and parts referring to claims 1-7 in claims 12 and 15-20 are inventively related to claim 1, and are thus classified as invention 1.

(Invention 2)

It cannot be said that claim 8 has a special technical feature identical or corresponding to that of the invention classified as invention 1. Furthermore, claim 8 is not substantially identical to or similarly closely related to any of the parts classified as invention 1. Therefore, claim 8 cannot be classified as invention 1.

Thus, claim 8 is classified as invention 2. Parts referring to claim 8 in claims 12 and 15-20 are inventively related to claim 8, and are thus classified as invention 2.

(Invention 3)

It cannot be said that claim 9 has a special technical feature identical or corresponding to that of the invention classified as inventions 1-2. Also, claim 9 is not substantially identical to or similarly closely related to any of the parts classified as inventions 1-2. Thus, claim 9 cannot be classified as inventions 1-2.

Therefore, claim 9 is classified as invention 3. Claims 10-11 and parts referring to claim 9-11 in claims 12 and 15-20 are inventively related to claim 9, and are thus classified as invention 3.

(Invention 4)

It cannot be said that claim 13 has a special technical feature identical or corresponding to that of the invention classified as inventions 1-3. Also, claim 13 is not substantially identical to or similarly closely related to any of the parts classified as invention 1-3. Therefore, claim 13 cannot be classified as invention 1-3.

Thus, claim 13 is classified as invention 4. Claims 14 is inventively related to claim 13, and are thus classified as invention 4.

(Invention 5)

It cannot be said that claim 21 has a special technical feature identical or corresponding to that of the invention classified as inventions 1-4. Also, claim 21 is not substantially identical to or similarly closely related to any of the parts classified as invention 4. Thus, claim 21 cannot be classified as either invention 1-4.

Thus, claim 21 is classified as invention 5.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2024/012128

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

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.: **Claims 1-7 and parts referring to claims 1-7 in claims 12 and 15-20**

## 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/JP2024/012128**

| Patent document<br>cited in search report |             |    | Publication date<br>(day/month/year) | Patent family member(s)                                    |                 |    | Publication date<br>(day/month/year) |
|-------------------------------------------|-------------|----|--------------------------------------|------------------------------------------------------------|-----------------|----|--------------------------------------|
| WO                                        | 2020/122104 | A1 | 18 June 2020                         | US                                                         | 2022/0017888    | A1 |                                      |
|                                           |             |    |                                      | claims, paragraph [0116],<br>examples                      |                 |    |                                      |
|                                           |             |    |                                      | EP                                                         | 3896158         | A1 |                                      |
| -----                                     |             |    |                                      |                                                            |                 |    |                                      |
| WO                                        | 2020/111229 | A1 | 04 June 2020                         | US                                                         | 2022/0023207    | A1 |                                      |
|                                           |             |    |                                      | paragraphs [0277], [0366],<br>[0411], examples 1-4, fig. 1 |                 |    |                                      |
|                                           |             |    |                                      | EP                                                         | 3888693         | A1 |                                      |
|                                           |             |    |                                      | CN                                                         | 113195003       | A  |                                      |
|                                           |             |    |                                      | KR                                                         | 10-2021-0097122 | A  |                                      |
| -----                                     |             |    |                                      |                                                            |                 |    |                                      |
| WO                                        | 2018/225858 | A1 | 13 December 2018                     | US                                                         | 2020/0102580    | A1 |                                      |
|                                           |             |    |                                      | claims                                                     |                 |    |                                      |
|                                           |             |    |                                      | EP                                                         | 3636753         | A1 |                                      |
|                                           |             |    |                                      | CN                                                         | 110770342       | A  |                                      |
|                                           |             |    |                                      | KR                                                         | 10-2020-0015700 | A  |                                      |
| -----                                     |             |    |                                      |                                                            |                 |    |                                      |

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））  
C12N 15/11(2006.01)i; C12N 5/10(2006.01)i; C12N 15/09(2006.01)i; C12Q 1/686(2018.01)i  
FI: C12N15/11 Z ZNA; C12N5/10; C12N15/09 110; C12Q1/686 Z

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））  
C12N15/11; C12N5/10; C12N15/09; C12Q1/686

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  
日本国実用新案公報 1922-1996年  
日本国公開実用新案公報 1971-2024年  
日本国実用新案登録公報 1996-2024年  
日本国登録実用新案公報 1994-2024年

国際調査で使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）  
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); Cplus/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     |
|-----------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------|
| X               | WO 2020/122104 A1 (国立大学法人京都大学) 18.06.2020 (2020 - 06 - 18)<br>請求の範囲、[0056]、実施例                                                                                                                   | 1-7, 12, 15-16, 20 |
| Y               |                                                                                                                                                                                                  | 17-20              |
| Y               | WO 2020/111229 A1 (国立大学法人京都大学) 04.06.2020 (2020 - 06 - 04)<br>[0104]、[0141]、[0163]、実施例1-4、図1                                                                                                     | 17-20              |
| A               | WO 2018/225858 A1 (国立大学法人大阪大学) 13.12.2018 (2018 - 12 - 13)<br>請求の範囲                                                                                                                              | 1-7, 12, 15-20     |
| A               | CHEN Y., et al., Repurposing type I-F CRISPR-Cas system as a transcriptional<br>activation tool in human cells, NATURE COMMUNICATIONS, 2020, Vol.11,<br>No.3136, pp.1-14, ISSN:2041-1723<br>特に要約 | 1-7, 12, 15-20     |
| A               | LIU T.Y., et al., Chemistry of class 1 CRISPR-Cas effectors: binding,<br>editing, and regulation, J. Biol. Chem., 2020, Vol.295, No.42,<br>pp.14473-14487, ISSN:0021-9258<br>特に要約                | 1-7, 12, 15-20     |

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☒ 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  
“A” 特に関連のある文献ではなく、一般的技术水準を示すもの  
“D” 国際出願で出願人が先行技術文献として記載した文献  
“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  
公表されたもの  
“I” 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  
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  
付す）  
“O” 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
“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  
後に公表された文献

“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  
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  
用するもの  
“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  
又は進歩性がないと考えられるもの  
“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  
いと考えられるもの  
“&” 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日  
12.06.2024

国際調査報告の発送日  
25.06.2024

名称及びあて先  
日本国特許庁(ISA/JP)  
〒100-8915  
日本国  
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）  
藤澤 雅樹 4B 5802  
電話番号 03-3581-1101 内線 3448

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
- b. ☐ 国際出願日後に、国際調査のために提出された配列表（PCT規則13の3.1(a)）  
☐ 配列表が出願時の国際出願の開示の範囲を超えるものではない旨の陳述書が添付されていた。
2. ☐ 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、この国際調査報告は、WIPO標準ST.26に準拠する配列表なしで有意義な国際調査をすることができる限度において作成された。
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。

(i) 請求の範囲に含まれる発明の数

5

(ii) 各発明に区分した請求項の番号

発明1：請求項1－7、及び請求項12、15－20のうち請求項1－7を引用する部分

発明2：請求項8、及び請求項12、15－20のうち請求項8を引用する部分

発明3：請求項9－11、及び請求項12、15－20のうち請求項9－11を引用する部分

発明4：請求項13－14

発明5：請求項21

(iii) 発明の単一性を満たさないと判断した理由

請求の範囲は、以下の5つの発明に区分される。

(発明1)

請求項1に、タイプI CRISPR-CasシステムのプレcrRNAについて、「第1リピート配列の5'アーム領域、第1リピート配列の5'側ステム形成領域および第1リピート配列のループ形成領域からなる領域において、少なくとも1個のヌクレオチドが修飾ヌクレオチドである」、という特別な技術的特徴が発見された。したがって、請求項1を発明1に区分する。

請求項2－7、請求項12、15－20のうち請求項1－7を引用する部分は、請求項1に対して発明の連関を有しているので、発明1に区分する。

(発明2)

請求項8は、発明1に区分された上記発明と同一の又は対応する特別な技術的特徴を有しているとはいえない。また、請求項8は、発明1に区分されたいずれの部分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8は発明1に区分できない。

よって、請求項8を、発明2に区分する。請求項12、15－20のうち請求項8を引用する部分は、請求項8に対して発明の連関を有しているので、発明2に区分する。

(発明3)

請求項9は、発明1－2に区分された上記発明と同一の又は対応する特別な技術的特徴を有しているとはいえない。また、請求項9は、発明1－2に区分されたいずれの部分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9は発明1－2に区分できない。

よって、請求項9を、発明3に区分する。請求項10－11、請求項12、15－20のうち請求項9－11を引用する部分は、請求項9に対して発明の連関を有しているので、発明3に区分する。

(発明4)

請求項13は、発明1－3に区分された上記発明と同一の又は対応する特別な技術的特徴を有しているとはいえない。また、請求項13は、発明1－3に区分されたいずれの部分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13は発明1－3に区分できない。

よって、請求項13を、発明4に区分する。請求項14は、請求項13に対して発明の連関を有しているので、発明4に区分する。

(発明5)

請求項21は、発明1－4に区分された上記発明と同一の又は対応する特別な技術的特徴を有しているとはいえない。また、請求項21は、発明4に区分されたいずれの部分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21は発明1－4に区分できない。

よって、請求項21を、発明5に区分する。

## 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）

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。 請求項1－7、及び請求項12、15－20のうち請求項1－7を引用する部分

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/JP2024/012128

| 引用文献 |             |    | 公表日        | パテントファミリー文献                                                                                                     | 公表日 |
|------|-------------|----|------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| WO   | 2020/122104 | A1 | 18.06.2020 | US 2022/0017888 A1<br>請求の範囲、[0116]、実施例<br>EP 3896158 A1                                                         |     |
| WO   | 2020/111229 | A1 | 04.06.2020 | US 2022/0023207 A1<br>[0277]、[0366]、[0411]、実施例1-4、図1<br>EP 3888693 A1<br>CN 113195003 A<br>KR 10-2021-0097122 A |     |
| WO   | 2018/225858 | A1 | 13.12.2018 | US 2020/0102580 A1<br>請求の範囲<br>EP 3636753 A1<br>CN 110770342 A<br>KR 10-2020-0015700 A                          |     |