

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号
特表2025-501611
(P2025-501611A)

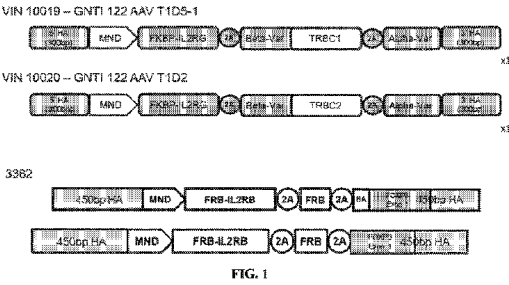
(43)公表日 令和7年1月22日(2025.1.22)

(51)国際特許分類			F I		テーマコード (参考)	
C 1 2 N	15/09	(2006.01)	C 1 2 N	15/09	Z Z N A	4 B 0 6 5
C 1 2 N	15/62	(2006.01)	C 1 2 N	15/62	Z	4 C 0 8 7
C 1 2 N	15/12	(2006.01)	C 1 2 N	15/12		
C 1 2 N	15/85	(2006.01)	C 1 2 N	15/85	Z	
C 1 2 N	15/31	(2006.01)	C 1 2 N	15/31		
			審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全271頁) 最終頁に続く
(21)出願番号	特願2024-538275(P2024-538275)		(71)出願人	515045617		
(86)(22)出願日	令和4年12月19日(2022.12.19)		(71)出願人	シアトル チルドレンズ ホスピタル デ		
(85)翻訳文提出日	令和6年8月21日(2024.8.21)			ィー／ビー／エイ シアトル チルドレン		
(86)国際出願番号	PCT/US2022/081929			ズ リサーチ インスティテュート		
(87)国際公開番号	WO2023/122532			アメリカ合衆国 9 8 1 0 1 ワシントン		
(87)国際公開日	令和5年6月29日(2023.6.29)			州, シアトル, ナインス アベニュー		
(31)優先権主張番号	63/292,125			1 9 0 0		
(32)優先日	令和3年12月21日(2021.12.21)			1 9 0 0 Ninth Ave. Sea		
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)			ttle, WA 9 8 1 0 1 U. S.		
(31)優先権主張番号	63/363,918		(71)出願人	A.		
(32)優先日	令和4年4月29日(2022.4.29)			516044923		
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)			ベナロヤ リサーチ インスティテュート		
(31)優先権主張番号	63/364,285			アット バージニア メイソン		
			アメリカ合衆国 ワシントン 9 8 1 0 1			
			, シアトル, ナインス アベニュー 1			
			最終頁に続く			
			最終頁に続く			

(54)【発明の名称】 糖尿病治療用 T r e g 細胞を組換えるための組成物および方法

(57)【要約】

糖尿病治療用のTreg細胞を作製するための組成物および方法について述べる。本明細書で提供される組換えTreg細胞は、二重編集されていてもよく（すなわち、細胞ゲノムの2つの異なる座位が編集されていてもよく）、編集される第1の座位はFOXP3座位であり、第2の座位はTRAC座位である。本明細書で提供される二重編集Treg細胞の組換え操作は、二重編集細胞においてIL-2のシグナル伝達を開始させ、かつ／またはこれを維持するリガンドを用いて、二重編集細胞を選択的に拡大増殖させることを含んでいてもよい。本明細書で提供される二重編集Treg細胞の組換え操作によって、FoxP3と外因性TCRを安定に発現させてもよい。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

遺伝子組換え細胞を製造する方法であって、

第 1 の核酸と第 2 の核酸を細胞に接触させる工程を含み、

(i) 第 1 の核酸が、

(a) 細胞ゲノムの TRAC 座位の第 1 の核酸配列に相同性を有する第 1 の 5' 相同アーム

；

(b) MND プロモーターである第 1 のプロモーター；

(c) (1) FK506 結合タンパク質 12 (FKBP) のラパマイシン結合ドメインを含む細胞外結合ドメインと、(2) IL-2R γ の膜貫通ドメインと、(3) IL-2R γ の細胞質内ドメインまたはその機能性断片を含む細胞内ドメインとを含む第 1 の化学誘導性シグナル伝達複合体 (CISC) 構成要素をコードするヌクレオチド配列；

(d) TCR β ポリペプチドまたはその機能性断片をコードするヌクレオチド配列；

(e) 1 型糖尿病 (T1D) 関連抗原に結合する TCR α ポリペプチドと TCR β ポリペプチドを含む T 細胞受容体 (TCR) に由来する TCR α の可変領域と TCR α の接合領域を含む TCR α ポリペプチドの少なくとも一部をコードするヌクレオチド配列；および

(f) 前記 TRAC 座位の第 1 の核酸配列の下流の TRAC 座位の第 2 の核酸配列に相同性を有する第 1 の 3' 相同アームを含む、

(ii) 第 2 の核酸が、

(a) 前記細胞ゲノムの FOXP3 座位の第 1 の核酸配列に相同性を有する第 2 の 5' 相同アーム；

(b) MND プロモーターである第 2 のプロモーター；

(c) (1) mTOR の FKBP-ラパマイシン結合 (FRB) ドメインを含む細胞外結合ドメインと、(2) IL-2R β の膜貫通ドメインと、(3) IL-2R β の細胞質内ドメインまたはその機能性断片とを含む第 2 の CISC 構成要素をコードするヌクレオチド配列；

(d) ラパマイシンに結合し、膜貫通ドメインを含んでいない細胞質ゾル内 FRB ドメインをコードするヌクレオチド配列；および

(e) 前記 FOXP3 座位の第 1 の核酸配列の下流かつ FOXP3 座位の Treg 特異的脱メチル化領域 (TSDR) の下流の FOXP3 座位の第 2 の核酸配列に相同性を有する第 2 の 3' 相同アーム

を含む、方法。

【請求項 2】

第 1 の核酸が、

前記第 1 の CISC 構成要素をコードするヌクレオチド配列と前記 TCR β ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列の間にインフレーションに挿入された、第 1 の 2A モチーフをコードするヌクレオチド配列と、

前記 TCR β ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列と前記 TCR α ポリペプチドの少なくとも一部をコードするヌクレオチド配列の間にインフレーションに挿入された、第 2 の 2A モチーフをコードするヌクレオチド配列と

をさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記第 1 の 2A モチーフをコードするヌクレオチド配列が、前記第 2 の 2A モチーフをコードするヌクレオチド配列と 90% 以下、80% 以下、70% 以下、60% 以下、または 55% 以下の配列同一性を有する、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

第 1 の 2A モチーフが、配列番号 222 のアミノ酸配列を含む T2A モチーフであり、第 2 の 2A モチーフが、配列番号 226 のアミノ酸配列を含む P2A モチーフである、請求項 2 または 3 に記載の方法。

【請求項 5】

10

20

30

40

50

前記第1の2Aモチーフをコードするヌクレオチド配列が、配列番号221のヌクレオチド配列と少なくとも70%の配列同一性を有し、前記第2の2Aモチーフをコードするヌクレオチド配列が、配列番号223のヌクレオチド配列と少なくとも70%の配列同一性を有する、請求項2~4のいずれか1項に記載の方法。

【請求項6】

第2の核酸が、

前記第2のCISC構成要素をコードするヌクレオチド配列と前記細胞質ゾル内FRBドメインポリペプチドをコードするヌクレオチド配列の間にインフレームに挿入された、第3の2Aモチーフをコードするヌクレオチド配列と、

前記細胞質ゾル内FRBドメインポリペプチドをコードするヌクレオチド配列と前記FoxP3またはその一部をコードするヌクレオチド配列の間にインフレームに挿入された、第4の2Aモチーフをコードするヌクレオチド配列とをさらに含む、請求項2~5のいずれか1項に記載の方法。

10

【請求項7】

第3の2Aモチーフが、配列番号227のアミノ酸配列を含むP2Aモチーフであり、第4の2Aモチーフが、配列番号228のアミノ酸配列を含むP2Aモチーフである、請求項6に記載の方法。

【請求項8】

前記第3の2Aモチーフをコードするヌクレオチド配列が、配列番号224のヌクレオチド配列と少なくとも70%の配列同一性を有し、前記第4の2Aモチーフをコードするヌクレオチド配列が、配列番号225のヌクレオチド配列と少なくとも70%の配列同一性を有する、請求項6または7に記載の方法。

20

【請求項9】

第1のCISC構成要素が、IL-2R γ の細胞外ドメインの一部をさらに含む、請求項1~8のいずれか1項に記載の方法。

【請求項10】

第2のCISC構成要素が、IL-2R β の細胞外ドメインの一部をさらに含む、請求項1~9のいずれか1項に記載の方法。

【請求項11】

第2のCISC構成要素が、配列番号236のアミノ酸配列を有する野生型mTORの2098番目のアミノ酸に相当する位置にスレオニンを含む、請求項1~10のいずれか1項に記載の方法。

30

【請求項12】

第1のCISC構成要素が、配列番号66のアミノ酸配列と少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または最大で100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項1~11のいずれか1項に記載の方法。

【請求項13】

第2のCISC構成要素が、配列番号71のアミノ酸配列と少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または最大で100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項1~12のいずれか1項に記載の方法。

40

【請求項14】

第1のCISC構成要素が、配列番号66のアミノ酸配列を含み、第2のCISC構成要素が、配列番号71のアミノ酸配列を含む、請求項1~13のいずれか1項に記載の方法。

【請求項15】

前記TCR α ポリペプチドの少なくとも一部をコードするヌクレオチド配列が、TCR α ポリペプチドの定常ドメインの少なくとも一部をコードする内因性ヌクレオチド配列とインフレームに挿入されており、第1のMNDプロモーターによって、TCR α の可変領域とTCR α の接合領域とTCR α の定常ドメインを含むTCR α ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列の転写が開始される、請求項1~14のいずれか1項に記載の方法。

【請求項16】

50

前記TCR β ポリペプチドが、

(i) (a) 配列番号4のアミノ酸配列を含むCDR1と、(b) 配列番号5のアミノ酸配列を含むCDR2と、(c) 配列番号6のアミノ酸配列を含むCDR3；

(ii) (a) 配列番号14のアミノ酸配列を含むCDR1と、(b) 配列番号15のアミノ酸配列を含むCDR2と、(c) 配列番号16のアミノ酸配列を含むCDR3；または

(iii) (a) 配列番号24のアミノ酸配列を含むCDR1と、(b) 配列番号25のアミノ酸配列を含むCDR2と、(c) 配列番号26のアミノ酸配列を含むCDR3を含む、請求項1～15のいずれか1項に記載の方法。

【請求項17】

前記TCR α ポリペプチドが、

(i) (a) 配列番号1のアミノ酸配列を含むCDR1と、(b) 配列番号2のアミノ酸配列を含むCDR2と、(c) 配列番号3のアミノ酸配列を含むCDR3；

(ii) (a) 配列番号11のアミノ酸配列を含むCDR1と、(b) 配列番号12のアミノ酸配列を含むCDR2と、(c) 配列番号13のアミノ酸配列を含むCDR3；または

(iii) (a) 配列番号21のアミノ酸配列を含むCDR1と、(b) 配列番号22のアミノ酸配列を含むCDR2と、(c) 配列番号23のアミノ酸配列を含むCDR3を含む、請求項1～16のいずれか1項に記載の方法。

【請求項18】

前記TCR α ポリペプチドが、配列番号7、17および27のいずれかに示されるアミノ酸配列を含む可変ドメインを含む、請求項1～17のいずれか1項に記載の方法。

【請求項19】

前記TCR β ポリペプチドが、配列番号8、18および28のいずれかに示されるアミノ酸配列を含む可変ドメインを含む、請求項1～18のいずれか1項に記載の方法。

【請求項20】

(i) 前記TCR α ポリペプチドが、配列番号1のアミノ酸配列を有する α CDR1と、配列番号2のアミノ酸配列を有する α CDR2と、配列番号3のアミノ酸配列を有する α CDR3を含み、かつ前記TCR β ポリペプチドが、配列番号4のアミノ酸配列を有するbCDR1と、配列番号5のアミノ酸配列を有するbCDR2と、配列番号6のアミノ酸配列を有するbCDR3を含むか；

(ii) 前記TCR α ポリペプチドが、配列番号11のアミノ酸配列を有する α CDR1と、配列番号12のアミノ酸配列を有する α CDR2と、配列番号13のアミノ酸配列を有する α CDR3を含み、かつ前記TCR β ポリペプチドが、配列番号14のアミノ酸配列を有するbCDR1と、配列番号15のアミノ酸配列を有するbCDR2と、配列番号16のアミノ酸配列を有するbCDR3を含むか；または

(iii) 前記TCR α ポリペプチドが、配列番号21のアミノ酸配列を有する α CDR1と、配列番号22のアミノ酸配列を有する α CDR2と、配列番号23のアミノ酸配列を有する α CDR3を含み、かつ前記TCR β ポリペプチドが、配列番号24のアミノ酸配列を有するbCDR1と、配列番号25のアミノ酸配列を有するbCDR2と、配列番号26のアミノ酸配列を有するbCDR3を含む、

請求項1～19のいずれか1項に記載の方法。

【請求項21】

(i) 前記TCR α ポリペプチドが、配列番号7のアミノ酸配列を含む可変ドメインを含み、かつ前記TCR β ポリペプチドが、配列番号8のアミノ酸配列を含む可変ドメインを含むか；

(ii) 前記TCR α ポリペプチドが、配列番号17のアミノ酸配列を含む可変ドメインを含み、かつ前記TCR β ポリペプチドが、配列番号18のアミノ酸配列を含む可変ドメインを含むか；または

(iii) 前記TCR α ポリペプチドが、配列番号27のアミノ酸配列を含む可変ドメインを含み、かつ前記TCR β ポリペプチドが、配列番号28のアミノ酸配列を含む可変ドメインを含む、

10

20

30

40

50

請求項1～20のいずれか1項に記載の方法。

【請求項22】

(i) 前記TCR α ポリペプチドが、配列番号9のアミノ酸配列を含み、かつ前記TCR β ポリペプチドが、配列番号10のアミノ酸配列を含むか；

(ii) 前記TCR α ポリペプチドが、配列番号19のアミノ酸配列を含み、かつ前記TCR β ポリペプチドが、配列番号20のアミノ酸配列を含むか；または

(iii) 前記TCR α ポリペプチドが、配列番号29のアミノ酸配列を含み、かつ前記TCR β ポリペプチドが、配列番号30のアミノ酸配列を含む、

請求項1～21のいずれか1項に記載の方法。

【請求項23】

第2の核酸を前記細胞ゲノムに挿入することによって、FOXP3座位の第1のコーディングエクソンの配列が組換えられる、請求項1～22のいずれか1項に記載の方法。

【請求項24】

第2の核酸を前記細胞ゲノムに挿入しても、FOXP3座位の第1のコーディングエクソンのヌクレオチド配列が変化しない、請求項1～22のいずれか1項に記載の方法。

【請求項25】

DNAエンドヌクレアーゼまたは該DNAエンドヌクレアーゼをコードする第3の核酸に前記細胞を接触させる工程をさらに含む、請求項1～24のいずれか1項に記載の方法。

【請求項26】

前記DNAエンドヌクレアーゼをコードする第3の核酸がRNAである、請求項25に記載の方法。

【請求項27】

前記DNAエンドヌクレアーゼをコードするRNAがmRNAである、請求項26に記載の方法。

【請求項28】

前記DNAエンドヌクレアーゼが、RNA誘導型DNAエンドヌクレアーゼである、請求項25～27のいずれか1項に記載の方法。

【請求項29】

前記RNA誘導型DNAエンドヌクレアーゼが、Casエンドヌクレアーゼである、請求項28に記載の方法。

【請求項30】

前記Casエンドヌクレアーゼが、Cas9エンドヌクレアーゼである、請求項29に記載の方法。

【請求項31】

TRAC座位内の配列に相補的なスペーサー配列を含むTRAC座位標的ガイドRNA (gRNA)、または該TRAC座位標的gRNAをコードする第4の核酸に、前記細胞を接触させる工程をさらに含む、請求項28～30のいずれか1項に記載の方法。

【請求項32】

第1の核酸の5'相同アームが、配列番号85と少なくとも90%の配列同一性を有する配列を含み、第1の核酸の3'相同アームが、配列番号93と少なくとも90%の配列同一性を有する配列を含む、請求項31に記載の方法。

【請求項33】

第1の核酸の5'相同アームが、配列番号96と少なくとも90%の配列同一性を有する配列を含み、第1の核酸の3'相同アームが、配列番号105と少なくとも90%の配列同一性を有する配列を含む、請求項31に記載の方法。

【請求項34】

第1の核酸の5'相同アームが、配列番号108と少なくとも90%の配列同一性を有する配列を含み、第1の核酸の3'相同アームが、配列番号116と少なくとも90%の配列同一性を有する配列を含む、請求項31に記載の方法。

【請求項35】

10

20

30

40

50

第1の核酸の5'相同アームが、配列番号119と少なくとも90%の配列同一性を有する配列を含み、第1の核酸の3'相同アームが、配列番号127と少なくとも90%の配列同一性を有する配列を含む、請求項31に記載の方法。

【請求項36】

第1の核酸の5'相同アームが、配列番号130と少なくとも90%の配列同一性を有する配列を含み、第1の核酸の3'相同アームが、配列番号138と少なくとも90%の配列同一性を有する配列を含む、請求項31に記載の方法。

【請求項37】

FOXP3座位内の配列に相補的なスペーサー配列を含むFOXP3座位標的ガイドRNA (gRNA)、または該FOXP3座位標的gRNAをコードする第4の核酸に、前記細胞を接触させる工程をさらに含む、請求項28～36のいずれか1項に記載の方法。

10

【請求項38】

第2の核酸の5'相同アームが、配列番号141と少なくとも90%の配列同一性を有する配列を含み、第2の核酸の3'相同アームが、配列番号149と少なくとも90%の配列同一性を有する配列を含む、請求項37に記載の方法。

【請求項39】

第2の核酸の5'相同アームが、配列番号152と少なくとも90%の配列同一性を有する配列を含み、第2の核酸の3'相同アームが、配列番号160と少なくとも90%の配列同一性を有する配列を含む、請求項37に記載の方法。

【請求項40】

20

第2の核酸の5'相同アームが、配列番号163と少なくとも90%の配列同一性を有する配列を含み、第2の核酸の3'相同アームが、配列番号171と少なくとも90%の配列同一性を有する配列を含む、請求項37に記載の方法。

【請求項41】

第2の核酸の5'相同アームが、配列番号174と少なくとも90%の配列同一性を有する配列を含み、第2の核酸の3'相同アームが、配列番号183と少なくとも90%の配列同一性を有する配列を含む、請求項37に記載の方法。

【請求項42】

第2の核酸の5'相同アームが、配列番号186と少なくとも90%の配列同一性を有する配列を含み、第2の核酸の3'相同アームが、配列番号194と少なくとも90%の配列同一性を有する配列を含む、請求項37に記載の方法。

30

【請求項43】

第2の核酸の5'相同アームが、配列番号197と少なくとも90%の配列同一性を有する配列を含み、第2の核酸の3'相同アームが、配列番号205と少なくとも90%の配列同一性を有する配列を含む、請求項37に記載の方法。

【請求項44】

第2の核酸の5'相同アームが、配列番号208と少なくとも90%の配列同一性を有する配列を含み、第2の核酸の3'相同アームが、配列番号217と少なくとも90%の配列同一性を有する配列を含む、請求項37に記載の方法。

【請求項45】

40

第1の核酸が第1のベクター内に含まれる、請求項1～44のいずれか1項に記載の方法。

【請求項46】

第1のベクターがアデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターである、請求項45に記載の方法。

【請求項47】

第1のベクターが、AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10またはAAV11の血清型のAAVに由来するAAVベクターである、請求項45または46に記載の方法。

【請求項48】

50

第2の核酸が第2のベクター内に含まれる、請求項1～47のいずれか1項に記載の方法。

【請求項49】

第2のベクターがアデノ随伴ウイルス（AAV）ベクターである、請求項48に記載の方法。

【請求項50】

第2のベクターが、AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10またはAAV11の血清型のAAVに由来するAAVベクターである、請求項48または49に記載の方法。

【請求項51】

第1の核酸が、第1の5'相同アームと第1の3'相同アームの間に、配列番号94、106、117、128および139のいずれかと少なくとも95%の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む、請求項1～50のいずれか1項に記載の方法。

【請求項52】

第2の核酸が、第1の5'相同アームと第1の3'相同アームの間に、配列番号150、161、172、184、195、206および218のいずれかと少なくとも95%の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む、請求項1～51のいずれか1項に記載の方法。

【請求項53】

第1の核酸が、配列番号95、107、118、129および140のいずれかと少なくとも95%の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む、請求項1～52のいずれか1項に記載の方法。

【請求項54】

第2の核酸が、配列番号151、162、173、185、196、207および219のいずれかと少なくとも95%の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む、請求項1～53のいずれか1項に記載の方法。

【請求項55】

前記1つ以上の相同アームの長さが100～2000ヌクレオチド長である、請求項1～54のいずれか1項に記載の方法。

【請求項56】

前記相同アームのそれぞれの長さが300～700ヌクレオチド長である、請求項1～55のいずれか1項に記載の方法。

【請求項57】

請求項1～56のいずれか1項に記載の方法により作製された遺伝子組換え細胞。

【請求項58】

遺伝子組換え細胞であって、

細胞ゲノムのTRAC座位に挿入された第1の核酸と、前記細胞ゲノムのFOXP3座位に挿入された第2の核酸とを含み、

(i) 第1の核酸が挿入された前記TRAC座位が、

(a) MNDプロモーターである第1のプロモーター；

(b) (1) FK506結合タンパク質12（FKBP）のラパマイシン結合ドメインを含む細胞外結合ドメインと、(2) IL-2R γ の膜貫通ドメインと、(3) IL-2R γ の細胞質内ドメインまたはその機能性断片を含む細胞内ドメインとを含む第1の化学誘導性シグナル伝達複合体（CISC）構成要素をコードする外因性ヌクレオチド配列；

(c) 外因性TCR β ポリペプチドまたはその機能性断片をコードする外因性ヌクレオチド配列；および

(d) 1型糖尿病（T1D）関連抗原に結合するTCR α ポリペプチドとTCR β ポリペプチドを含むT細胞受容体（TCR）に由来するTCR α の可変領域とTCR α の接合領域を含むTCR α ポリペプチドの少なくとも一部をコードする外因性ヌクレオチド配列を含み、

(ii) 第2の核酸が挿入された前記FOXP3座位が、

10

20

30

40

50

(a) MNDプロモーターである第2のプロモーター；

(b) (1) mTORのFKBP-ラパマイシン結合 (FRB) ドメインを含む細胞外結合ドメインと、(2) IL-2R β の膜貫通ドメインと、(3) IL-2R β の細胞質内ドメインまたはその機能性断片とを含む第2のCISC構成要素をコードするヌクレオチド配列；および

(c) ラパマイシンに結合し、膜貫通ドメインを含んでいない細胞質ゾル内FRBドメインをコードするヌクレオチド配列を含み、

第2のMNDプロモーターが、前記FOXP3座位のTreg特異的脱メチル化領域の下流に挿入されており、FoxP3またはその一部をコードする内因性ヌクレオチド配列の転写を開始する、細胞。

10

【請求項59】

第1の核酸が、

前記第1のCISC構成要素をコードするヌクレオチド配列と前記TCR β ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列の間にインフレーションに挿入された、第1の2Aモチーフをコードするヌクレオチド配列と、

前記TCR β ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列と前記TCR α ポリペプチドの少なくとも一部をコードするヌクレオチド配列の間にインフレーションに挿入された、第2の2Aモチーフをコードするヌクレオチド配列と

をさらに含む、請求項58に記載の細胞。

20

【請求項60】

前記第1の2Aモチーフをコードするヌクレオチド配列が、前記第2の2Aモチーフをコードするヌクレオチド配列と90%以下、80%以下、70%以下、60%以下、または55%以下の配列同一性を有する、請求項59に記載の細胞。

【請求項61】

第1の2Aモチーフが、配列番号222のアミノ酸配列を含むT2Aモチーフであり、第2の2Aモチーフが、配列番号226のアミノ酸配列を含むP2Aモチーフである、請求項58または59に記載の細胞。

【請求項62】

前記第1の2Aモチーフをコードするヌクレオチド配列が、配列番号221のヌクレオチド配列と少なくとも70%の配列同一性を有し、前記第2の2Aモチーフをコードするヌクレオチド配列が、配列番号223のヌクレオチド配列と少なくとも70%の配列同一性を有する、請求項59～61のいずれか1項に記載の細胞。

30

【請求項63】

第2の核酸が、

前記第2のCISC構成要素をコードするヌクレオチド配列と前記細胞質ゾル内FRBドメインポリペプチドをコードするヌクレオチド配列の間にインフレーションに挿入された、第3の2Aモチーフをコードするヌクレオチド配列と、

前記細胞質ゾル内FRBドメインポリペプチドをコードするヌクレオチド配列と前記FoxP3またはその一部をコードするヌクレオチド配列の間にインフレーションに挿入された、第4の2Aモチーフをコードするヌクレオチド配列と

40

をさらに含む、請求項59～62のいずれか1項に記載の細胞。

【請求項64】

第3の2Aモチーフが、配列番号227のアミノ酸配列を含むP2Aモチーフであり、第4の2Aモチーフが、配列番号228のアミノ酸配列を含むP2Aモチーフである、請求項63に記載の細胞。

【請求項65】

前記第3の2Aモチーフをコードするヌクレオチド配列が、配列番号224のヌクレオチド配列と少なくとも70%の配列同一性を有し、前記第4の2Aモチーフをコードするヌクレオチド配列が、配列番号225のヌクレオチド配列と少なくとも70%の配列同一性を有する、請求項63または64に記載の細胞。

50

【請求項 66】

第1のCISC構成要素が、IL-2R γ の細胞外ドメインの一部をさらに含む、請求項58～65のいずれか1項に記載の細胞。

【請求項 67】

第2のCISC構成要素が、IL-2R β の細胞外ドメインの一部をさらに含む、請求項58～66のいずれか1項に記載の細胞。

【請求項 68】

第2のCISC構成要素が、配列番号236のアミノ酸配列を有する野生型mTORの2098番目のアミノ酸に相当する位置にスレオニンを含む、請求項58～67のいずれか1項に記載の細胞。

10

【請求項 69】

第1のCISC構成要素が、配列番号66のアミノ酸配列と少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または最大で100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項58～68のいずれか1項に記載の細胞。

【請求項 70】

第2のCISC構成要素が、配列番号71のアミノ酸配列と少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または最大で100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項58～69のいずれか1項に記載の細胞。

【請求項 71】

第1のCISC構成要素が、配列番号66のアミノ酸配列を含み、第2のCISC構成要素が、配列番号71のアミノ酸配列を含む、請求項58～70のいずれか1項に記載の細胞。

20

【請求項 72】

前記TCR α ポリペプチドの少なくとも一部をコードするヌクレオチド配列が、TCR α ポリペプチドの定常ドメインの少なくとも一部をコードする内因性ヌクレオチド配列とインフレームに挿入されており、

第1のMNDプロモーターによって、TCR α の可変領域とTCR α の接合領域とTCR α の定常ドメインを含むTCR α ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列の転写が開始される、請求項58～71のいずれか1項に記載の細胞。

【請求項 73】

前記TCR β ポリペプチドが、

30

(i) (a) 配列番号4のアミノ酸配列を含むCDR1と、(b) 配列番号5のアミノ酸配列を含むCDR2と、(c) 配列番号6のアミノ酸配列を含むCDR3；

(ii) (a) 配列番号14のアミノ酸配列を含むCDR1と、(b) 配列番号15のアミノ酸配列を含むCDR2と、(c) 配列番号16のアミノ酸配列を含むCDR3；または

(iii) (a) 配列番号24のアミノ酸配列を含むCDR1と、(b) 配列番号25のアミノ酸配列を含むCDR2と、(c) 配列番号26のアミノ酸配列を含むCDR3を含む、請求項58～72のいずれか1項に記載の細胞。

【請求項 74】

前記TCR α ポリペプチドが、

40

(i) (a) 配列番号1のアミノ酸配列を含むCDR1と、(b) 配列番号2のアミノ酸配列を含むCDR2と、(c) 配列番号3のアミノ酸配列を含むCDR3；

(ii) (a) 配列番号11のアミノ酸配列を含むCDR1と、(b) 配列番号12のアミノ酸配列を含むCDR2と、(c) 配列番号13のアミノ酸配列を含むCDR3；または

(iii) (a) 配列番号21のアミノ酸配列を含むCDR1と、(b) 配列番号22のアミノ酸配列を含むCDR2と、(c) 配列番号23のアミノ酸配列を含むCDR3を含む、請求項58～73のいずれか1項に記載の細胞。

【請求項 75】

前記TCR α ポリペプチドが、配列番号7、17および27のいずれかに示されるアミノ酸配列を含む可変ドメインを含む、請求項58～74のいずれか1項に記載の細胞。

【請求項 76】

50

前記TCR β ポリペプチドが、配列番号8、18および28のいずれかに示されるアミノ酸配列を含む可変ドメインを含む、請求項58～75のいずれか1項に記載の細胞。

【請求項77】

(i) 前記TCR α ポリペプチドが、配列番号1のアミノ酸配列を有する α CDR1と、配列番号2のアミノ酸配列を有する α CDR2と、配列番号3のアミノ酸配列を有する α CDR3を含み、かつ前記TCR β ポリペプチドが、配列番号4のアミノ酸配列を有するbCDR1と、配列番号5のアミノ酸配列を有するbCDR2と、配列番号6のアミノ酸配列を有するbCDR3を含むか；

(ii) 前記TCR α ポリペプチドが、配列番号11のアミノ酸配列を有する α CDR1と、配列番号12のアミノ酸配列を有する α CDR2と、配列番号13のアミノ酸配列を有する α CDR3を含み、かつ前記TCR β ポリペプチドが、配列番号14のアミノ酸配列を有するbCDR1と、配列番号15のアミノ酸配列を有するbCDR2と、配列番号16のアミノ酸配列を有するbCDR3を含むか；または

(iii) 前記TCR α ポリペプチドが、配列番号21のアミノ酸配列を有する α CDR1と、配列番号22のアミノ酸配列を有する α CDR2と、配列番号23のアミノ酸配列を有する α CDR3を含み、かつ前記TCR β ポリペプチドが、配列番号24のアミノ酸配列を有するbCDR1と、配列番号25のアミノ酸配列を有するbCDR2と、配列番号26のアミノ酸配列を有するbCDR3を含む、

請求項58～76のいずれか1項に記載の細胞。

【請求項78】

(i) 前記TCR α ポリペプチドが、配列番号7のアミノ酸配列を含む可変ドメインを含み、かつ前記TCR β ポリペプチドが、配列番号8のアミノ酸配列を含む可変ドメインを含むか；

(ii) 前記TCR α ポリペプチドが、配列番号17のアミノ酸配列を含む可変ドメインを含み、かつ前記TCR β ポリペプチドが、配列番号18のアミノ酸配列を含む可変ドメインを含むか；または

(iii) 前記TCR α ポリペプチドが、配列番号27のアミノ酸配列を含む可変ドメインを含み、かつ前記TCR β ポリペプチドが、配列番号28のアミノ酸配列を含む可変ドメインを含む、

請求項58～77のいずれか1項に記載の細胞。

【請求項79】

(i) 前記TCR α ポリペプチドが、配列番号9のアミノ酸配列を含み、かつ前記TCR β ポリペプチドが、配列番号10のアミノ酸配列を含むか；

(ii) 前記TCR α ポリペプチドが、配列番号19のアミノ酸配列を含み、かつ前記TCR β ポリペプチドが、配列番号20のアミノ酸配列を含むか；または

(iii) 前記TCR α ポリペプチドが、配列番号29のアミノ酸配列を含み、かつ前記TCR β ポリペプチドが、配列番号30のアミノ酸配列を含む、

請求項58～78のいずれか1項に記載の細胞。

【請求項80】

第2の核酸を前記細胞ゲノムに挿入することによって、FOXP3座位の第1のコーディングエクソンの配列が組換えられる、請求項58～79のいずれか1項に記載の細胞。

【請求項81】

第2の核酸を前記細胞ゲノムに挿入しても、FOXP3座位の第1のコーディングエクソンのヌクレオチド配列が変化しない、請求項58～79のいずれか1項に記載の細胞。

【請求項82】

CD3+T細胞、CD4+T細胞および／またはCD8+T細胞である、請求項57～81のいずれか1項に記載の細胞。

【請求項83】

CD4+T細胞である、請求項57～82のいずれか1項に記載の細胞。

【請求項84】

10

20

30

40

50

Treg細胞である、請求項57～83のいずれか1項に記載の細胞。

【請求項85】

FoxP3+Treg細胞である、請求項57～84のいずれか1項に記載の細胞。

【請求項86】

CTLA-4+、LAG-3+、CD25+、CD39+、CD27+、CD70+、GITR+、ニューロピリン1+、ガレクチン1+および／またはIL-2Rα+である、請求項57～85のいずれか1項に記載の細胞。

【請求項87】

請求項58～86のいずれか1項に記載の遺伝子組換え細胞と薬学的に許容される添加剤を含む医薬組成物。

【請求項88】

請求項58～86のいずれか1項に記載の遺伝子組換え細胞または請求項87に記載の医薬組成物を対象に投与する工程を含む方法。

【請求項89】

前記遺伝子組換え細胞が、前記対象の自家細胞である、請求項88に記載の方法。

【請求項90】

前記遺伝子組換え細胞が、前記対象と同じ種に由来する細胞である、請求項88に記載の方法。

【請求項91】

前記対象が1型糖尿病（T1D）を有する、請求項88～90のいずれか1項に記載の方法。

【請求項92】

前記対象が、前記細胞を投与する前の6ヶ月以内、5ヶ月以内、4ヶ月以内、3ヶ月以内、3ヶ月以内、2ヶ月以内または1ヶ月以内に1型糖尿病（T1D）であると診断された対象である、請求項91に記載の方法。

【請求項93】

前記対象のインスリン用量調整ヘモグロビンA1c（IDAA1c）が9.0以下である、請求項88～92のいずれか1項に記載の方法。

【請求項94】

前記対象が1型糖尿病（T1D）であると診断された後の該対象のIDAA1cが、9.0を超える値から9.0以下に低下している、請求項93に記載の方法。

【請求項95】

前記細胞を投与する前の6ヶ月以内、5ヶ月以内、4ヶ月以内、3ヶ月以内、3ヶ月以内、2ヶ月以内または1ヶ月以内に、膵島細胞抗原、インスリン、グルタミン酸脱炭酸酵素、膵島チロシンホスファターゼ2および／または亜鉛トランスポーター8からなる群から選択される抗原に結合する自己抗体が前記対象において検出されている、請求項88～94のいずれか1項に記載の方法。

【請求項96】

前記対象が1型糖尿病（T1D）であると診断されていない、請求項88～90のいずれか1項に記載の方法。

【請求項97】

前記対象のヘモグロビンA1cが5.7～6.4である、請求項88～96のいずれか1項に記載の方法。

【請求項98】

前記対象のヘモグロビンA1cが6.5以上である、請求項88～96のいずれか1項に記載の方法。

【請求項99】

前記対象が、3歳以上かつ6歳未満であり、 1×10^8 個～ 6×10^8 個の前記細胞を含む用量が投与される、請求項88～98のいずれか1項に記載の方法。

【請求項100】

10

20

30

40

50

前記用量が、 2.4×10^8 個～ 3.6×10^8 個の前記細胞を含む、請求項99に記載の方法。

【請求項101】

前記用量が、約 3×10^8 個の前記細胞を含む、請求項100に記載の方法。

【請求項102】

前記対象が、6歳以上かつ12歳未満であり、 2×10^8 個～ 1×10^9 個の前記細胞を含む用量が投与される、請求項88～98のいずれか1項に記載の方法。

【請求項103】

前記用量が、 4×10^8 個～ 6×10^8 個の前記細胞を含む、請求項102に記載の方法。

【請求項104】

前記用量が、約 5×10^8 個の前記細胞を含む、請求項103に記載の方法。

10

【請求項105】

前記対象が、12歳以上かつ18歳未満であり、 5×10^8 個～ 2×10^9 個の前記細胞を含む用量が投与される、請求項88～98のいずれか1項に記載の方法。

【請求項106】

前記用量が、 8×10^8 個～ 1.2×10^9 個の前記細胞を含む、請求項105に記載の方法。

【請求項107】

前記用量が、約 10^9 個の前記細胞を含む、請求項106に記載の方法。

【請求項108】

前記対象が、18歳以上であり、 5×10^8 個～ 2×10^9 個の前記細胞を含む用量が投与される、請求項88～98のいずれか1項に記載の方法。

20

【請求項109】

前記対象が46歳未満である、請求項108に記載の方法。

【請求項110】

前記用量が、 8×10^8 個～ 1.2×10^9 個の前記細胞を含む、請求項108または109に記載の方法。

【請求項111】

前記用量が、約 10^9 個の前記細胞を含む、請求項110に記載の方法。

【請求項112】

前記対象の脾体積が、該対象の年齢から推定され、

(a) 推定された脾体積が約20mLである場合、 1×10^8 個～ 6×10^8 個の前記細胞を含む用量が前記対象に投与されるか；

30

(b) 推定された脾体積が約35mLである場合、 2×10^8 個～ 1×10^9 個の前記細胞を含む用量が前記対象に投与されるか；または

(c) 推定された脾体積が約60mL以上である場合、 5×10^8 個～ 2×10^9 個の前記細胞を含む用量が前記対象に投与される、請求項88～111のいずれか1項に記載の方法。

【請求項113】

(a) 推定された脾体積が約20mLである場合、 2.4×10^8 個～ 3.6×10^8 個の前記細胞を含む用量が前記対象に投与されるか；

(b) 推定された脾体積が約35mLである場合、 4×10^8 個～ 6×10^8 個の前記細胞を含む用量が前記対象に投与されるか；または

40

(c) 推定された脾体積が約60mL以上である場合、 8×10^8 個～ 1.2×10^9 個の前記細胞を含む用量が前記対象に投与される、請求項112に記載の方法。

【請求項114】

(a) 推定された脾体積が約20mLである場合、約 3×10^8 個の前記細胞を含む用量が前記対象に投与されるか；

(b) 推定された脾体積が約35mLである場合、約 5×10^8 個の前記細胞を含む用量が前記対象に投与されるか；または

(c) 推定された脾体積が60mL以上である場合、約 10^9 個の前記細胞を含む用量が前

50

記対象に投与される、
請求項113に記載の方法。

【請求項115】

前記対象の脾体積が、該対象の年齢から推定され、前記方法が、前記対象の実際の脾体積を測定する工程をさらに含み、

(a) 推定された脾体積が約20mLである場合、(対象の実際の脾体積：推定された脾体積の比率) × (1 × 10⁸個～6 × 10⁸個) の前記細胞を含む用量が前記対象に投与されるか；

(b) 推定された脾体積が約35mLである場合、(対象の実際の脾体積：推定された脾体積の比率) × (2 × 10⁸個～1 × 10⁹個) の前記細胞を含む用量が前記対象に投与されるか；または

(c) 推定された脾体積が約60mL以上である場合、(対象の実際の脾体積：推定された脾体積の比率) × (5 × 10⁸個～2 × 10⁹個) の前記細胞を含む用量が前記対象に投与される、

請求項88～111のいずれか1項に記載の方法。

【請求項116】

(a) 推定された脾体積が約20mLである場合、(対象の実際の脾体積：推定された脾体積の比率) × (2.4 × 10⁸個～3.6 × 10⁸個) の前記細胞を含む用量が前記対象に投与されるか；

(b) 推定された脾体積が約35mLである場合、(対象の実際の脾体積：推定された脾体積の比率) × (4 × 10⁸個～6 × 10⁸個) の前記細胞を含む用量が前記対象に投与されるか；または

(c) 推定された脾体積が約60mL以上である場合、(対象の実際の脾体積：推定された脾体積の比率) × (8 × 10⁸個～1.2 × 10⁹個) の前記細胞を含む用量が前記対象に投与される、

請求項115に記載の方法。

【請求項117】

(a) 推定された脾体積が約20mLである場合、(対象の実際の脾体積：推定された脾体積の比率) × (約3 × 10⁸個) の前記細胞を含む用量が前記対象に投与されるか；

(b) 推定された脾体積が約35mLである場合、(対象の実際の脾体積：推定された脾体積の比率) × (約5 × 10⁸個) の前記細胞を含む用量が前記対象に投与されるか；または

(c) 推定された脾体積が約60mL以上である場合、(対象の実際の脾体積：推定された脾体積の比率) × (約10⁹個) の前記細胞を含む用量が前記対象に投与される、

請求項116に記載の方法。

【請求項118】

前記対象がヒトである、請求項88～117のいずれか1項に記載の方法。

【請求項119】

第1の核酸と第2の核酸を含むシステムであって、

(i) 第1の核酸が、

(a) 細胞ゲノムのTRAC座位の第1の核酸配列に相同性を有する第1の5'相同アーム；

(b) MNDプロモーターである第1のプロモーター；

(c) (1) FK506結合タンパク質12 (FKBP) のラパマイシン結合ドメインを含む細胞外結合ドメインと、(2) IL-2R γ の膜貫通ドメインと、(3) IL-2R γ の細胞質内ドメインまたはその機能性断片を含む細胞内ドメインとを含む第1の化学誘導性シグナル伝達複合体 (CISC) 構成要素をコードするヌクレオチド配列；

(d) TCR β ポリペプチドまたはその機能性断片をコードするヌクレオチド配列；

(e) 1型糖尿病 (T1D) 関連抗原に結合するTCR α ポリペプチドとTCR β ポリペプチドを含むT細胞受容体 (TCR) に由来するTCR α の可変領域とTCR α の接合領域を含むT

10

20

30

40

50

CR α ポリペプチドの少なくとも一部をコードするヌクレオチド配列；および

(f) 前記TRAC座位の第1の核酸配列の下流のTRAC座位の第2の核酸配列に相同性を有する第1の3'相同アームを含む、

(ii) 第2の核酸が、

(a) 前記細胞ゲノムのFOXP3座位の第1の核酸配列に相同性を有する第2の5'相同アーム；

(b) MNDプロモーターである第2のプロモーター；

(c) (1) mTORのFKBP-ラパマイシン結合(FRB)ドメインを含む細胞外結合ドメインと、(2) IL-2R β の膜貫通ドメインと、(3) IL-2R β の細胞質内ドメインまたはその機能性断片とを含む第2のCISC構成要素をコードするヌクレオチド配列；

(d) ラパマイシンに結合し、膜貫通ドメインを含んでいない細胞質ゾル内FRBドメインをコードするヌクレオチド配列；および

(e) 前記FOXP3座位の第1の核酸配列の下流かつFOXP3座位のTreg特異的脱メチル化領域(TSDR)の下流のFOXP3座位の第2の核酸配列に相同性を有する第2の3'相同アーム

を含む、システム。

【請求項120】

第1の核酸が、

前記第1のCISC構成要素をコードするヌクレオチド配列と前記TCR β ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列の間にインフレーションに挿入された、第1の2Aモチーフをコードするヌクレオチド配列と、

前記TCR β ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列と前記TCR α ポリペプチドの少なくとも一部をコードするヌクレオチド配列の間にインフレーションに挿入された、第2の2Aモチーフをコードするヌクレオチド配列とをさらに含む、請求項119に記載のシステム。

【請求項121】

前記第1の2Aモチーフをコードするヌクレオチド配列が、前記第2の2Aモチーフをコードするヌクレオチド配列と90%以下、80%以下、70%以下、60%以下、または55%以下の配列同一性を有する、請求項120に記載のシステム。

【請求項122】

第1の2Aモチーフが、配列番号222のアミノ酸配列を含むT2Aモチーフであり、第2の2Aモチーフが、配列番号226のアミノ酸配列を含むP2Aモチーフである、請求項120または121に記載のシステム。

【請求項123】

前記第1の2Aモチーフをコードするヌクレオチド配列が、配列番号221のヌクレオチド配列と少なくとも70%の配列同一性を有し、前記第2の2Aモチーフをコードするヌクレオチド配列が、配列番号223のヌクレオチド配列と少なくとも70%の配列同一性を有する、請求項120～122のいずれか1項に記載のシステム。

【請求項124】

第2の核酸が、

前記第2のCISC構成要素をコードするヌクレオチド配列と前記細胞質ゾル内FRBドメインポリペプチドをコードするヌクレオチド配列の間にインフレーションに挿入された、第3の2Aモチーフをコードするヌクレオチド配列と、

前記細胞質ゾル内FRBドメインポリペプチドをコードするヌクレオチド配列と前記FoxP3またはその一部をコードするヌクレオチド配列の間にインフレーションに挿入された、第4の2Aモチーフをコードするヌクレオチド配列とをさらに含む、請求項120～123のいずれか1項に記載のシステム。

【請求項125】

第3の2Aモチーフが、配列番号227のアミノ酸配列を含むP2Aモチーフであり、第4

10

20

30

40

50

の2Aモチーフが、配列番号228のアミノ酸配列を含むP2Aモチーフである、請求項124に記載のシステム。

【請求項126】

前記第3の2Aモチーフをコードするヌクレオチド配列が、配列番号224のヌクレオチド配列と少なくとも70%の配列同一性を有し、前記第4の2Aモチーフをコードするヌクレオチド配列が、配列番号225のヌクレオチド配列と少なくとも70%の配列同一性を有する、請求項124または125に記載のシステム。

【請求項127】

第1のCISC構成要素が、IL-2R γ の細胞外ドメインの一部をさらに含む、請求項119～126のいずれか1項に記載のシステム。

【請求項128】

第2のCISC構成要素が、IL-2R β の細胞外ドメインの一部をさらに含む、請求項119～127のいずれか1項に記載のシステム。

【請求項129】

第2のCISC構成要素が、配列番号236のアミノ酸配列を有する野生型mTORの2098番目のアミノ酸に相当する位置にスレオニンを含む、請求項119～128のいずれか1項に記載のシステム。

【請求項130】

第1のCISC構成要素が、配列番号66のアミノ酸配列と少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または最大で100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項119～129のいずれか1項に記載のシステム。

【請求項131】

第2のCISC構成要素が、配列番号71のアミノ酸配列と少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または最大で100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項119～130のいずれか1項に記載のシステム。

【請求項132】

第1のCISC構成要素が、配列番号66のアミノ酸配列を含み、第2のCISC構成要素が、配列番号71のアミノ酸配列を含む、請求項119～131のいずれか1項に記載のシステム。

【請求項133】

前記TCR α ポリペプチドの少なくとも一部をコードするヌクレオチド配列が、前記3'相同アームにおいてTCR α ポリペプチドの定常ドメインの少なくとも一部をコードするヌクレオチド配列とインフレームに挿入されており、

第1のMNDプロモーターによって、TCR α の可変領域とTCR α の接合領域とTCR α の定常ドメインを含むTCR α ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列の転写が開始される、請求項119～132のいずれか1項に記載のシステム。

【請求項134】

前記TCR β ポリペプチドが、

(i) (a) 配列番号4のアミノ酸配列を含むCDR1と、(b) 配列番号5のアミノ酸配列を含むCDR2と、(c) 配列番号6のアミノ酸配列を含むCDR3；

(ii) (a) 配列番号14のアミノ酸配列を含むCDR1と、(b) 配列番号15のアミノ酸配列を含むCDR2と、(c) 配列番号16のアミノ酸配列を含むCDR3；または

(iii) (a) 配列番号24のアミノ酸配列を含むCDR1と、(b) 配列番号25のアミノ酸配列を含むCDR2と、(c) 配列番号26のアミノ酸配列を含むCDR3を含む、請求項119～133のいずれか1項に記載のシステム。

【請求項135】

前記TCR α ポリペプチドが、

(i) (a) 配列番号1のアミノ酸配列を含むCDR1と、(b) 配列番号2のアミノ酸配列を含むCDR2と、(c) 配列番号3のアミノ酸配列を含むCDR3；

(ii) (a) 配列番号11のアミノ酸配列を含むCDR1と、(b) 配列番号12のアミノ酸

10

20

30

40

50

配列を含むCDR2と、(c) 配列番号13のアミノ酸配列を含むCDR3；または

(iii) (a) 配列番号21のアミノ酸配列を含むCDR1と、(b) 配列番号22のアミノ酸配列を含むCDR2と、(c) 配列番号23のアミノ酸配列を含むCDR3を含む、請求項119～134のいずれか1項に記載のシステム。

【請求項136】

前記TCR α ポリペプチドが、配列番号7、17および27のいずれかに示されるアミノ酸配列を含む可変ドメインを含む、請求項119～135のいずれか1項に記載のシステム。

【請求項137】

前記TCR β ポリペプチドが、配列番号8、18および28のいずれかに示されるアミノ酸配列を含む可変ドメインを含む、請求項119～136のいずれか1項に記載のシステム。

【請求項138】

(i) 前記TCR α ポリペプチドが、配列番号1のアミノ酸配列を有する α CDR1と、配列番号2のアミノ酸配列を有する α CDR2と、配列番号3のアミノ酸配列を有する α CDR3を含み、かつ前記TCR β ポリペプチドが、配列番号4のアミノ酸配列を有するbCDR1と、配列番号5のアミノ酸配列を有するbCDR2と、配列番号6のアミノ酸配列を有するbCDR3を含むか；

(ii) 前記TCR α ポリペプチドが、配列番号11のアミノ酸配列を有する α CDR1と、配列番号12のアミノ酸配列を有する α CDR2と、配列番号13のアミノ酸配列を有する α CDR3を含み、かつ前記TCR β ポリペプチドが、配列番号14のアミノ酸配列を有するbCDR1と、配列番号15のアミノ酸配列を有するbCDR2と、配列番号16のアミノ酸配列を有するbCDR3を含むか；または

(iii) 前記TCR α ポリペプチドが、配列番号21のアミノ酸配列を有する α CDR1と、配列番号22のアミノ酸配列を有する α CDR2と、配列番号23のアミノ酸配列を有する α CDR3を含み、かつ前記TCR β ポリペプチドが、配列番号24のアミノ酸配列を有するbCDR1と、配列番号25のアミノ酸配列を有するbCDR2と、配列番号26のアミノ酸配列を有するbCDR3を含む、請求項119～137のいずれか1項に記載のシステム。

【請求項139】

(i) 前記TCR α ポリペプチドが、配列番号7のアミノ酸配列を含む可変ドメインを含み、かつ前記TCR β ポリペプチドが、配列番号8のアミノ酸配列を含む可変ドメインを含むか；

(ii) 前記TCR α ポリペプチドが、配列番号17のアミノ酸配列を含む可変ドメインを含み、かつ前記TCR β ポリペプチドが、配列番号18のアミノ酸配列を含む可変ドメインを含むか；または

(iii) 前記TCR α ポリペプチドが、配列番号27のアミノ酸配列を含む可変ドメインを含み、かつ前記TCR β ポリペプチドが、配列番号28のアミノ酸配列を含む可変ドメインを含む、請求項119～138のいずれか1項に記載のシステム。

【請求項140】

(i) 前記TCR α ポリペプチドが、配列番号9のアミノ酸配列を含み、かつ前記TCR β ポリペプチドが、配列番号10のアミノ酸配列を含むか；

(ii) 前記TCR α ポリペプチドが、配列番号19のアミノ酸配列を含み、かつ前記TCR β ポリペプチドが、配列番号20のアミノ酸配列を含むか；または

(iii) 前記TCR α ポリペプチドが、配列番号29のアミノ酸配列を含み、かつ前記TCR β ポリペプチドが、配列番号30のアミノ酸配列を含む、請求項119～139のいずれか1項に記載のシステム。

【請求項141】

第2の核酸を前記細胞ゲノムに挿入することによって、FOXP3座位の第1のコーディングエクソンの配列が組換えられる、請求項119～140のいずれか1項に記載のシステム。

10

20

30

40

50

【請求項 1 4 2】

第 2 の核酸を細胞ゲノムに挿入しても、FOXP3 座位の第 1 のコーディングエキソンのヌクレオチド配列が変化しない、請求項 119～140 のいずれか 1 項に記載のシステム。

【請求項 1 4 3】

DNA エンドヌクレアーゼまたは該 DNA エンドヌクレアーゼをコードする第 3 の核酸をさらに含む、請求項 119～142 のいずれか 1 項に記載のシステム。

【請求項 1 4 4】

前記 DNA エンドヌクレアーゼをコードする第 3 の核酸が RNA である、請求項 143 に記載のシステム。

【請求項 1 4 5】

前記 DNA エンドヌクレアーゼをコードする RNA が mRNA である、請求項 144 に記載のシステム。

【請求項 1 4 6】

前記 DNA エンドヌクレアーゼが、RNA 誘導型 DNA エンドヌクレアーゼである、請求項 143～145 のいずれか 1 項に記載のシステム。

【請求項 1 4 7】

前記 RNA 誘導型 DNA エンドヌクレアーゼが、Cas エンドヌクレアーゼである、請求項 146 に記載のシステム。

【請求項 1 4 8】

前記 Cas エンドヌクレアーゼが、Cas9 エンドヌクレアーゼである、請求項 147 に記載のシステム。

【請求項 1 4 9】

TRAC 座位内の配列に相補的なスペーサー配列を含む TRAC 座位標的ガイド RNA (gRNA)、または該 TRAC 座位標的 gRNA をコードする第 4 の核酸をさらに含む、請求項 146～148 のいずれか 1 項に記載のシステム。

【請求項 1 5 0】

第 1 の核酸の 5' 相同アームが、配列番号 85 と少なくとも 90% の配列同一性を有する配列を含み、第 1 の核酸の 3' 相同アームが、配列番号 93 と少なくとも 90% の配列同一性を有する配列を含む、請求項 149 に記載のシステム。

【請求項 1 5 1】

第 1 の核酸の 5' 相同アームが、配列番号 96 と少なくとも 90% の配列同一性を有する配列を含み、第 1 の核酸の 3' 相同アームが、配列番号 105 と少なくとも 90% の配列同一性を有する配列を含む、請求項 149 に記載のシステム。

【請求項 1 5 2】

第 1 の核酸の 5' 相同アームが、配列番号 108 と少なくとも 90% の配列同一性を有する配列を含み、第 1 の核酸の 3' 相同アームが、配列番号 116 と少なくとも 90% の配列同一性を有する配列を含む、請求項 149 に記載のシステム。

【請求項 1 5 3】

第 1 の核酸の 5' 相同アームが、配列番号 119 と少なくとも 90% の配列同一性を有する配列を含み、第 1 の核酸の 3' 相同アームが、配列番号 127 と少なくとも 90% の配列同一性を有する配列を含む、請求項 149 に記載のシステム。

【請求項 1 5 4】

第 1 の核酸の 5' 相同アームが、配列番号 130 と少なくとも 90% の配列同一性を有する配列を含み、第 1 の核酸の 3' 相同アームが、配列番号 138 と少なくとも 90% の配列同一性を有する配列を含む、請求項 149 に記載のシステム。

【請求項 1 5 5】

FOXP3 座位内の配列に相補的なスペーサー配列を含む FOXP3 座位標的ガイド RNA (gRNA)、または該 FOXP3 座位標的 gRNA をコードする第 4 の核酸をさらに含む、請求項 146～154 のいずれか 1 項に記載のシステム。

【請求項 1 5 6】

10

20

30

40

50

第2の核酸の5'相同アームが、配列番号141と少なくとも90%の配列同一性を有する配列を含み、第2の核酸の3'相同アームが、配列番号149と少なくとも90%の配列同一性を有する配列を含む、請求項155に記載のシステム。

【請求項157】

第2の核酸の5'相同アームが、配列番号152と少なくとも90%の配列同一性を有する配列を含み、第2の核酸の3'相同アームが、配列番号160と少なくとも90%の配列同一性を有する配列を含む、請求項155に記載のシステム。

【請求項158】

第2の核酸の5'相同アームが、配列番号163と少なくとも90%の配列同一性を有する配列を含み、第2の核酸の3'相同アームが、配列番号171と少なくとも90%の配列同一性を有する配列を含む、請求項155に記載のシステム。

【請求項159】

第2の核酸の5'相同アームが、配列番号174と少なくとも90%の配列同一性を有する配列を含み、第2の核酸の3'相同アームが、配列番号183と少なくとも90%の配列同一性を有する配列を含む、請求項155に記載のシステム。

【請求項160】

第2の核酸の5'相同アームが、配列番号186と少なくとも90%の配列同一性を有する配列を含み、第2の核酸の3'相同アームが、配列番号194と少なくとも90%の配列同一性を有する配列を含む、請求項155に記載のシステム。

【請求項161】

第2の核酸の5'相同アームが、配列番号197と少なくとも90%の配列同一性を有する配列を含み、第2の核酸の3'相同アームが、配列番号205と少なくとも90%の配列同一性を有する配列を含む、請求項155に記載のシステム。

【請求項162】

第2の核酸の5'相同アームが、配列番号208と少なくとも90%の配列同一性を有する配列を含み、第2の核酸の3'相同アームが、配列番号217と少なくとも90%の配列同一性を有する配列を含む、請求項155に記載のシステム。

【請求項163】

第1の核酸が第1のベクター内に含まれる、請求項119～162のいずれか1項に記載のシステム。

【請求項164】

第1のベクターがアデノ随伴ウイルス（AAV）ベクターである、請求項163に記載のシステム。

【請求項165】

第1のベクターが、AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10またはAAV11の血清型のAAVに由来するAAVベクターである、請求項163または164に記載のシステム。

【請求項166】

第2の核酸が第2のベクター内に含まれる、請求項119～165のいずれか1項に記載のシステム。

【請求項167】

第2のベクターがアデノ随伴ウイルス（AAV）ベクターである、請求項166に記載のシステム。

【請求項168】

第2のベクターが、AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10またはAAV11の血清型のAAVに由来するAAVベクターである、請求項166または167に記載のシステム。

【請求項169】

第1の核酸が、第1の5'相同アームと第1の3'相同アームの間に、配列番号94、106、117、128および139のいずれかと少なくとも95%の配列同一性を有するヌクレオチ

10

20

30

40

50

ド配列を含む、請求項119～168のいずれか1項に記載のシステム。

【請求項170】

第2の核酸が、第1の5'相同アームと第1の3'相同アームの間に、配列番号150、161、172、184、195、206および218のいずれかと少なくとも95%の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む、請求項119～169のいずれか1項に記載のシステム。

【請求項171】

第1の核酸が、配列番号95、107、118、129および140のいずれかと少なくとも95%の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む、請求項119～170のいずれか1項に記載のシステム。

【請求項172】

第2の核酸が、配列番号151、162、173、185、196、207および219のいずれかと少なくとも95%の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む、請求項119～171のいずれか1項に記載のシステム。

【請求項173】

前記1つ以上の相同アームの長さが100～2000ヌクレオチド長である、請求項119～172のいずれか1項に記載のシステム。

【請求項174】

前記相同アームのそれぞれの長さが300～700ヌクレオチド長である、請求項119～173のいずれか1項に記載のシステム。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願

本出願は、2021年12月21日に出願された米国仮特許出願第63/292,125号；2022年4月29日に出願された米国仮特許出願第63/363,918号；2022年5月6日に出願された米国仮特許出願第63/364,285号；2022年10月10日に出願された米国仮特許出願第63/378,928号；2022年11月23日に出願された米国仮特許出願第63/384,830号に基づく優先権を主張するものであり、これらの文献に記載の内容はその全体が参照により本明細書に援用される。

【0002】

電子形式の配列表の参照

電子形式の配列表（G097170024WO-SEQ-NTJ.xml；サイズ：365,549バイト；作成日：2022年12月8日）に記載の内容は、参照によりその全体が本明細書に援用される。

【背景技術】

【0003】

若年性糖尿病やインスリン依存型糖尿病とも呼ばれる1型糖尿病（T1D）は、膵臓からインスリンがほとんど生成されないか、全く生成されない慢性疾患である。制御性T細胞（Treg）を使用した細胞治療は、1型糖尿病を含む様々な種類の自己免疫疾患の治療に有用である可能性がある。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0004】

本明細書において、TRAC座位に挿入された第1の核酸とFOXP3座位に挿入された第2の核酸の2種の核酸が挿入された、1型糖尿病（T1D）の治療用の遺伝子組換え人工制御性T（EngTreg）細胞、ならびにEngTreg細胞を製造するための方法およびシステムを提供する。1型糖尿病は、世界の糖尿病症例の5%～10%を占めており、治療方法は存在しない。1型糖尿病は、どの年齢でも発症しうるが、平均診断年齢は8歳であり、思春期以降の男性に高い有病率を示す。世界的に1型糖尿病の発病率は、毎年3%～4%の水準で増加しており、2001年から2009年の間に、0～19歳の1型糖尿病患者が約20%増

10

20

30

40

50

加した。1型糖尿病は、インスリンを産生するβ細胞がTリンパ球により破壊されることによって発症する慢性自己免疫疾患であり、発症前期間が様々であり、最終的には高血糖を伴うインスリン欠乏症を引き起こすことを特徴とする。高血糖の抑制が不十分であると、全身性の多臓器損傷を起こすことがあり、このような多臓器損傷は不可逆的であることが多い。

【0005】

高血糖と、これに伴う臨床的徴候および臨床的症状を制御するには、生涯にわたる外因性インスリンの投与が必要とされる。連続的な血糖値モニタリングや、（正常血糖域の）TIR（time in range）を最大にするためのインスリン投与の自動化といった最近の進歩にもかかわらず、長期的な正常血糖域の制御は、治療学的に困難な課題となっている。血糖値の制御が不良であると、微小血管合併症や大血管合併症によって、顕著な後遺症が起こったり、生活の質が低下したりする。患者やその家族は、1型糖尿病自体の合併症に加えて、外因性インスリン療法により引き起こされる致命的な重度低血糖発作が起こる危険性に対処しなければならない。

10

【0006】

外因性インスリンは1型糖尿病の管理に有益であるが、疾患を治癒させるわけではなく、毎日の血糖値のモニタリングを必要とする。特に小児患者では、血糖値管理の負担が大きいことから、家族関連のストレスが発生したり、患者の生活の質に大きな影響が及ぶ。インスリン療法が最適化された患者であっても、依然として、様々な種類の評価を毎日実施することによって、日々の食物摂取の管理、身体活動量の考慮、必要なインスリン量に対する糖類の整合性、および血糖値のモニタリングを行うために大きな支援が必要である。したがって、患者の生活の質を維持しながら、血糖値の制御を管理することは、特に小児患者集団において、いまだに困難な課題になっている。

20

【0007】

新たに診断された1型糖尿病では、対象者は、外因性インスリン療法の開始直後に短期間の寛解を経験することが多い。そのような寛解は確実に起こるわけではなく、小児および若年層の約50%のみに一過性に見られるが、数週間から数ヶ月で血糖制御能が再度低下する。何らかの理論に拘束されることを望むものではないが、この寛解期の終了前の治療介入は、膵臓に対する自己免疫反応の進行を軽減するとともに、機能性膵島細胞の大部分を温存することができ、その結果、外因性インスリン療法の必要性が減少すると期待される。そのような治療介入の1つとして、本明細書では、膵島細胞の機能に有害な影響を及ぼす自己免疫反応を抑制するための、膵島細胞抗原に特異的な組換え制御性T細胞（EngTreg）を企図している。

30

【0008】

本明細書に記載のEngTregは、挿入された異種プロモーターにより、FK506結合タンパク質12（FKBP）細胞外ドメインおよびIL-2Rγの細胞内ドメインを含む化学誘導性シグナル伝達複合体（CISC）の第1の膜貫通タンパク質部分の転写が制御される組換えTRAC座位と、挿入された異種プロモーターにより、FKBP-ラパマイシン結合（FRB）ドメインおよびIL-2Rβの細胞内ドメインを含むCISCの第2の膜貫通タンパク質部分の転写が制御される組換えFOXP3座位とを含むことから、ラパマイシンに曝露されると、細胞においてIL-2のシグナル伝達が起こり、ラパマイシンの存在下でEngTregが増殖する。いくつかの実施形態において、挿入された異種プロモーターによって、内因性FOXP3遺伝子とCISCの第2の膜貫通タンパク質部分の転写が制御される。このような化学誘導性の二重編集細胞の増殖によって、両方の座位が組換えられて各CISC構成要素が挿入された細胞が効率的に選択されて、インビトロで拡大増殖する。具体的には、組換えTRAC座位は、挿入されたプロモーターの転写制御下で、異種TCRβ鎖と、異種可変ドメインを有するTCRα鎖をコードすることから、編集された細胞は、1型糖尿病関連抗原であるIGRPペプチドに特異的なTCRを発現する。さらに、組換えFOXP3座位は、挿入されたプロモーターの転写制御下で、細胞内ラパマイシンに結合する細胞質ゾル内FRBドメインをコードすることから、CISCを介したIL-2シグナル伝達誘導に対して、ラパマイシ

40

50

ンへの細胞曝露が及ぼす望ましくない効果（例えばmTORの阻害）を阻止する。さらに、組換えFOXP3座位の異種プロモーターは、FOXP3座位のTreg特異的脱メチル化領域（TSDR）の下流に挿入されていることから、この挿入されたプロモーターによって、炎症性環境で起こりうるTSDRのメチル化とは無関係に、内因性FOXP3のコード配列の転写が制御される。TSDRの下流にプロモーターが挿入されていることから、TSDRを介したFOXP3発現のサイレンシングをバイパスして、通常であれば、FOXP3の発現が抑制され、Treg細胞から炎症性エフェクターT細胞への分化転換が起こりうる炎症性環境であっても、細胞におけるFOXP3の安定な発現を維持することができる。したがって、本明細書に記載の二重編集細胞は、1型糖尿病関連抗原特異的Tregであり、炎症性環境（例えば炎症を起こした膵臓）において安定な抑制表現型を保持し、ラパマイシンの存在下で制御可能な方法で増殖させることができる。

10

【0009】

したがって、本開示のいくつかの態様は、遺伝子組換え細胞を製造する方法であって、第1の核酸と第2の核酸を細胞に接触させる工程を含み、

(i) 第1の核酸が、

(a) 細胞ゲノムのTRAC座位の第1の核酸配列に相同性を有する第1の5'相同アーム

；

(b) MNDプロモーターである第1のプロモーター；

(c) (1) FK506結合タンパク質12（FKBP）のラパマイシン結合ドメインを含む細胞外結合ドメインと、(2) IL-2R γ の膜貫通ドメインと、(3) IL-2R γ の細胞質内ドメインまたはその機能性断片を含む細胞内ドメインとを含む第1の化学誘導性シグナル伝達複合体（CISC）構成要素をコードするヌクレオチド配列；

20

(d) TCR β ポリペプチドまたはその機能性断片をコードするヌクレオチド配列；

(e) 1型糖尿病（T1D）関連抗原に結合するTCR α ポリペプチドとTCR β ポリペプチドを含むT細胞受容体（TCR）に由来するTCR α の可変領域とTCR α の接合領域を含むTCR α ポリペプチドの少なくとも一部をコードするヌクレオチド配列；および

(f) 前記TRAC座位の第1の核酸配列の下流のTRAC座位の第2の核酸配列に相同性を有する第1の3'相同アームを含み、

(ii) 第2の核酸が、

30

(a) 前記細胞ゲノムのFOXP3座位の第1の核酸配列に相同性を有する第2の5'相同アーム；

(b) MNDプロモーターである第2のプロモーター；

(c) (1) mTORのFKBP-ラパマイシン結合（FRB）ドメインを含む細胞外結合ドメインと、(2) IL-2R β の膜貫通ドメインと、(3) IL-2R β の細胞質内ドメインまたはその機能性断片とを含む第2のCISC構成要素をコードするヌクレオチド配列；

(d) ラパマイシンに結合し、膜貫通ドメインを含んでいない細胞質ゾル内FRBドメインをコードするヌクレオチド配列；および

(e) 前記FOXP3座位の第1の核酸配列の下流かつFOXP3座位のTreg特異的脱メチル化領域（TSDR）の下流のFOXP3座位の第2の核酸配列に相同性を有する第2の3'相同アーム

40

を含む、方法に関する。

【0010】

いくつかの実施形態において、第1の核酸は、

前記第1のCISC構成要素をコードするヌクレオチド配列と前記TCR β ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列の間にインフレーションに挿入された、第1の2Aモチーフをコードするヌクレオチド配列と、

前記TCR β ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列と前記TCR α ポリペプチドの少なくとも一部をコードするヌクレオチド配列の間にインフレーションに挿入された、第2の2Aモチーフをコードするヌクレオチド配列と

50

をさらに含む。

【0011】

いくつかの実施形態において、前記第1の2Aモチーフをコードするヌクレオチド配列は、前記第2の2Aモチーフをコードするヌクレオチド配列と90%以下、80%以下、70%以下、60%以下、または55%以下の配列同一性を有する。

【0012】

いくつかの実施形態において、第1の2Aモチーフは、配列番号222のアミノ酸配列を含むT2Aモチーフであり、第2の2Aモチーフは、配列番号226のアミノ酸配列を含むP2Aモチーフである。

【0013】

いくつかの実施形態において、前記第1の2Aモチーフをコードするヌクレオチド配列は、配列番号221のヌクレオチド配列と少なくとも70%の配列同一性を有し、前記第2の2Aモチーフをコードするヌクレオチド配列は、配列番号223のヌクレオチド配列と少なくとも70%の配列同一性を有する。

【0014】

いくつかの実施形態において、第2の核酸は、

前記第2のCISC構成要素をコードするヌクレオチド配列と前記細胞質ゾル内FRBドメインポリペプチドをコードするヌクレオチド配列の間にインフレーションに挿入された、第3の2Aモチーフをコードするヌクレオチド配列と、

前記細胞質ゾル内FRBドメインポリペプチドをコードするヌクレオチド配列と前記FoxP3またはその一部をコードするヌクレオチド配列の間にインフレーションに挿入された、第4の2Aモチーフをコードするヌクレオチド配列とをさらに含む。

【0015】

いくつかの実施形態において、第3の2Aモチーフは、配列番号227のアミノ酸配列を含むP2Aモチーフであり、第4の2Aモチーフは、配列番号228のアミノ酸配列を含むP2Aモチーフである。

【0016】

いくつかの実施形態において、前記第3の2Aモチーフをコードするヌクレオチド配列は、配列番号224のヌクレオチド配列と少なくとも70%の配列同一性を有し、前記第4の2Aモチーフをコードするヌクレオチド配列は、配列番号225のヌクレオチド配列と少なくとも70%の配列同一性を有する。

【0017】

いくつかの実施形態において、第1のCISC構成要素は、IL-2R γ の細胞外ドメインの一部をさらに含む。

【0018】

いくつかの実施形態において、第2のCISC構成要素は、IL-2R β の細胞外ドメインの一部をさらに含む。

【0019】

いくつかの実施形態において、第2のCISC構成要素は、配列番号236のアミノ酸配列を有する野生型mTORの2098番目のアミノ酸に相当する位置にスレオニンを含む。

【0020】

いくつかの実施形態において、第1のCISC構成要素は、配列番号66のアミノ酸配列と少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または最大で100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【0021】

いくつかの実施形態において、第2のCISC構成要素は、配列番号71のアミノ酸配列と少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または最大で100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【0022】

10

20

30

40

50

いくつかの実施形態において、第1のCISC構成要素は、配列番号66のアミノ酸配列を含み、第2のCISC構成要素は、配列番号71のアミノ酸配列を含む。

【0023】

いくつかの実施形態において、前記TCR α ポリペプチドの少なくとも一部をコードするヌクレオチド配列は、TCR α ポリペプチドの定常ドメインの少なくとも一部をコードする内因性ヌクレオチド配列とインフレームに挿入されており、第1のMNDプロモーターによって、TCR α の可変領域とTCR α の接合領域とTCR α の定常ドメインを含むTCR α ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列の転写が開始される。

【0024】

いくつかの実施形態において、前記TCR β ポリペプチドは、

10

(i) (a) 配列番号4のアミノ酸配列を含むCDR1と、(b) 配列番号5のアミノ酸配列を含むCDR2と、(c) 配列番号6のアミノ酸配列を含むCDR3；

(ii) (a) 配列番号14のアミノ酸配列を含むCDR1と、(b) 配列番号15のアミノ酸配列を含むCDR2と、(c) 配列番号16のアミノ酸配列を含むCDR3；または

(iii) (a) 配列番号24のアミノ酸配列を含むCDR1と、(b) 配列番号25のアミノ酸配列を含むCDR2と、(c) 配列番号26のアミノ酸配列を含むCDR3を含む。

【0025】

いくつかの実施形態において、前記TCR α ポリペプチドは、

(i) (a) 配列番号1のアミノ酸配列を含むCDR1と、(b) 配列番号2のアミノ酸配列を含むCDR2と、(c) 配列番号3のアミノ酸配列を含むCDR3；

20

(ii) (a) 配列番号11のアミノ酸配列を含むCDR1と、(b) 配列番号12のアミノ酸配列を含むCDR2と、(c) 配列番号13のアミノ酸配列を含むCDR3；または

(iii) (a) 配列番号21のアミノ酸配列を含むCDR1と、(b) 配列番号22のアミノ酸配列を含むCDR2と、(c) 配列番号23のアミノ酸配列を含むCDR3を含む。

【0026】

いくつかの実施形態において、前記TCR α ポリペプチドは、配列番号7、17および27のいずれかに示されるアミノ酸配列を含む可変ドメインを含む。

【0027】

30

いくつかの実施形態において、前記TCR β ポリペプチドは、配列番号8、18および28のいずれかに示されるアミノ酸配列を含む可変ドメインを含む。

【0028】

いくつかの実施形態において、

(i) 前記TCR α ポリペプチドは、配列番号1のアミノ酸配列を有する α CDR1と、配列番号2のアミノ酸配列を有する α CDR2と、配列番号3のアミノ酸配列を有する α CDR3を含み、かつ前記TCR β ポリペプチドは、配列番号4のアミノ酸配列を有するbCDR1と、配列番号5のアミノ酸配列を有するbCDR2と、配列番号6のアミノ酸配列を有するbCDR3を含むか；

40

(ii) 前記TCR α ポリペプチドは、配列番号11のアミノ酸配列を有する α CDR1と、配列番号12のアミノ酸配列を有する α CDR2と、配列番号13のアミノ酸配列を有する α CDR3を含み、かつ前記TCR β ポリペプチドは、配列番号14のアミノ酸配列を有するbCDR1と、配列番号15のアミノ酸配列を有するbCDR2と、配列番号16のアミノ酸配列を有するbCDR3を含むか；または

(iii) 前記TCR α ポリペプチドは、配列番号21のアミノ酸配列を有する α CDR1と、配列番号22のアミノ酸配列を有する α CDR2と、配列番号23のアミノ酸配列を有する α CDR3を含み、かつ前記TCR β ポリペプチドは、配列番号24のアミノ酸配列を有するbCDR1と、配列番号25のアミノ酸配列を有するbCDR2と、配列番号26のアミノ酸配列を有するbCDR3を含む。

【0029】

50

いくつかの実施形態において、

(i) 前記TCR α ポリペプチドは、配列番号7のアミノ酸配列を含む可変ドメインを含み、かつ前記TCR β ポリペプチドは、配列番号8のアミノ酸配列を含む可変ドメインを含むか；

(ii) 前記TCR α ポリペプチドは、配列番号17のアミノ酸配列を含む可変ドメインを含み、かつ前記TCR β ポリペプチドは、配列番号18のアミノ酸配列を含む可変ドメインを含むか；または

(iii) 前記TCR α ポリペプチドは、配列番号27のアミノ酸配列を含む可変ドメインを含み、かつ前記TCR β ポリペプチドは、配列番号28のアミノ酸配列を含む可変ドメインを含む。

10

いくつかの実施形態において、

(i) 前記TCR α ポリペプチドは、配列番号9のアミノ酸配列を含み、かつ前記TCR β ポリペプチドは、配列番号10のアミノ酸配列を含むか；

(ii) 前記TCR α ポリペプチドは、配列番号19のアミノ酸配列を含み、かつ前記TCR β ポリペプチドは、配列番号20のアミノ酸配列を含むか；または

(iii) 前記TCR α ポリペプチドは、配列番号29のアミノ酸配列を含み、かつ前記TCR β ポリペプチドは、配列番号30のアミノ酸配列を含む。

【0030】

いくつかの実施形態において、第2の核酸を前記細胞ゲノムに挿入することによって、FOXP3座位の第1のコーディングエキソンの配列が組換えられる。

20

【0031】

いくつかの実施形態において、第2の核酸を前記細胞ゲノムに挿入しても、FOXP3座位の第1のコーディングエキソンのヌクレオチド配列は変化しない。

【0032】

いくつかの実施形態において、前記方法は、DNAエンドヌクレアーゼまたは該DNAエンドヌクレアーゼをコードする第3の核酸に前記細胞を接触させる工程をさらに含む。

【0033】

いくつかの実施形態において、前記DNAエンドヌクレアーゼをコードする第3の核酸はRNAである。

【0034】

いくつかの実施形態において、前記DNAエンドヌクレアーゼをコードするRNAはmRNAである。

30

【0035】

いくつかの実施形態において、前記DNAエンドヌクレアーゼは、RNA誘導型DNAエンドヌクレアーゼである。

【0036】

いくつかの実施形態において、前記RNA誘導型DNAエンドヌクレアーゼは、Casエンドヌクレアーゼである。

【0037】

いくつかの実施形態において、前記Casエンドヌクレアーゼは、Cas9エンドヌクレアーゼである。

40

【0038】

いくつかの実施形態において、前記方法は、TRAC座位内の配列に相補的なスペーサー配列を含むTRAC座位標的ガイドRNA (gRNA)、または該TRAC座位標的gRNAをコードする第4の核酸に、前記細胞を接触させる工程をさらに含む。

【0039】

いくつかの実施形態において、第1の核酸の5'相同アームは、配列番号85と少なくとも90%の配列同一性を有する配列を含み、第1の核酸の3'相同アームは、配列番号93と少なくとも90%の配列同一性を有する配列を含む。

【0040】

50

いくつかの実施形態において、第1の核酸の5'相同アームは、配列番号96と少なくとも90%の配列同一性を有する配列を含み、第1の核酸の3'相同アームは、配列番号105と少なくとも90%の配列同一性を有する配列を含む。

【0041】

いくつかの実施形態において、第1の核酸の5'相同アームは、配列番号108と少なくとも90%の配列同一性を有する配列を含み、第1の核酸の3'相同アームは、配列番号116と少なくとも90%の配列同一性を有する配列を含む。

【0042】

いくつかの実施形態において、第1の核酸の5'相同アームは、配列番号119と少なくとも90%の配列同一性を有する配列を含み、第1の核酸の3'相同アームは、配列番号127と少なくとも90%の配列同一性を有する配列を含む。

【0043】

いくつかの実施形態において、第1の核酸の5'相同アームは、配列番号130と少なくとも90%の配列同一性を有する配列を含み、第1の核酸の3'相同アームは、配列番号138と少なくとも90%の配列同一性を有する配列を含む。

【0044】

いくつかの実施形態において、前記方法は、FOXP3座位内の配列に相補的なスパーサー配列を含むFOXP3座位標的ガイドRNA (gRNA)、または該FOXP3座位標的gRNAをコードする第4の核酸に、前記細胞を接触させる工程をさらに含む。

【0045】

いくつかの実施形態において、第2の核酸の5'相同アームは、配列番号141と少なくとも90%の配列同一性を有する配列を含み、第2の核酸の3'相同アームは、配列番号149と少なくとも90%の配列同一性を有する配列を含む。

【0046】

いくつかの実施形態において、第2の核酸の5'相同アームは、配列番号152と少なくとも90%の配列同一性を有する配列を含み、第2の核酸の3'相同アームは、配列番号160と少なくとも90%の配列同一性を有する配列を含む。

【0047】

いくつかの実施形態において、第2の核酸の5'相同アームは、配列番号163と少なくとも90%の配列同一性を有する配列を含み、第2の核酸の3'相同アームは、配列番号171と少なくとも90%の配列同一性を有する配列を含む。

【0048】

いくつかの実施形態において、第2の核酸の5'相同アームは、配列番号174と少なくとも90%の配列同一性を有する配列を含み、第2の核酸の3'相同アームは、配列番号183と少なくとも90%の配列同一性を有する配列を含む。

【0049】

いくつかの実施形態において、第2の核酸の5'相同アームは、配列番号186と少なくとも90%の配列同一性を有する配列を含み、第2の核酸の3'相同アームは、配列番号194と少なくとも90%の配列同一性を有する配列を含む。

【0050】

いくつかの実施形態において、第2の核酸の5'相同アームは、配列番号197と少なくとも90%の配列同一性を有する配列を含み、第2の核酸の3'相同アームは、配列番号205と少なくとも90%の配列同一性を有する配列を含む。

【0051】

いくつかの実施形態において、第2の核酸の5'相同アームは、配列番号208と少なくとも90%の配列同一性を有する配列を含み、第2の核酸の3'相同アームは、配列番号217と少なくとも90%の配列同一性を有する配列を含む。

【0052】

いくつかの実施形態において、第1の核酸は第1のベクター内に含まれる。

【0053】

10

20

30

40

50

いくつかの実施形態において、第1のベクターはアデノ随伴ウイルス（AAV）ベクターである。

【0054】

いくつかの実施形態において、第1のベクターは、AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10またはAAV11の血清型のAAVに由来するAAVベクターである。

【0055】

いくつかの実施形態において、第2の核酸は第2のベクター内に含まれる。

【0056】

いくつかの実施形態において、第2のベクターはアデノ随伴ウイルス（AAV）ベクターである。

【0057】

いくつかの実施形態において、第2のベクターは、AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10またはAAV11の血清型のAAVに由来するAAVベクターである。

【0058】

いくつかの実施形態において、第1の核酸は、第1の5'相同アームと第1の3'相同アームの間に、配列番号94、106、117、128および139のいずれかと少なくとも95%の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む。

【0059】

いくつかの実施形態において、第2の核酸は、第1の5'相同アームと第1の3'相同アームの間に、配列番号150、161、172、184、195、206および218のいずれかと少なくとも95%の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む。

【0060】

いくつかの実施形態において、第1の核酸は、配列番号95、107、118、129および140のいずれかと少なくとも95%の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む。

【0061】

いくつかの実施形態において、第2の核酸は、配列番号151、162、173、185、196、207および219のいずれかと少なくとも95%の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む。

【0062】

いくつかの実施形態において、前記1つ以上の相同アームの長さは100~2000ヌクレオチド長である。

【0063】

いくつかの実施形態において、前記相同アームのそれぞれの長さは300~700ヌクレオチド長である。

【0064】

本開示のいくつかの態様は、本明細書に記載の方法により作製された遺伝子組換え細胞に関する。

【0065】

本開示のいくつかの態様は、遺伝子組換え細胞であって、

細胞ゲノムのTRAC座位に挿入された第1の核酸と、前記細胞ゲノムのFOXP3座位に挿入された第2の核酸とを含み、

(i) 第1の核酸が挿入された前記TRAC座位が、

(a) MNDプロモーターである第1のプロモーター；

(b) (1) FK506結合タンパク質12（FKBP）のラパマイシン結合ドメインを含む細胞外結合ドメインと、(2) IL-2R γ の膜貫通ドメインと、(3) IL-2R γ の細胞質内ドメインまたはその機能性断片を含む細胞内ドメインとを含む第1の化学誘導性シグナル伝達複合体（CISC）構成要素をコードする外因性ヌクレオチド配列；

(c) 外因性TCR β ポリペプチドまたはその機能性断片をコードする外因性ヌクレオチ

10

20

30

40

50

ド配列；および

(d) 1型糖尿病 (T1D) 関連抗原に結合するTCR α ポリペプチドとTCR β ポリペプチドを含むT細胞受容体 (TCR) に由来するTCR α の可変領域とTCR α の接合領域を含むTCR α ポリペプチドの少なくとも一部をコードする外因性ヌクレオチド配列を含み、

(ii) 第2の核酸が挿入された前記FOXP3座位が、

(a) MNDプロモーターである第2のプロモーター；

(b) (1) mTORのFKBP-ラパマイシン結合 (FRB) ドメインを含む細胞外結合ドメインと、(2) IL-2R β の膜貫通ドメインと、(3) IL-2R β の細胞質内ドメインまたはその機能性断片とを含む第2のCISC構成要素をコードするヌクレオチド配列；および

(c) ラパマイシンに結合し、膜貫通ドメインを含んでいない細胞質ゾル内FRBドメインをコードするヌクレオチド配列を含み、

第2のMNDプロモーターが、前記FOXP3座位のTreg特異的脱メチル化領域の下流に挿入されており、FoxP3またはその一部をコードする内因性ヌクレオチド配列の転写を開始する、細胞に関する。

【0066】

いくつかの実施形態において、第1の核酸は、

前記第1のCISC構成要素をコードするヌクレオチド配列と前記TCR β ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列の間にインフレーションに挿入された、第1の2Aモチーフをコードするヌクレオチド配列と、

前記TCR β ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列と前記TCR α ポリペプチドの少なくとも一部をコードするヌクレオチド配列の間にインフレーションに挿入された、第2の2Aモチーフをコードするヌクレオチド配列と

をさらに含む。

【0067】

いくつかの実施形態において、前記第1の2Aモチーフをコードするヌクレオチド配列は、前記第2の2Aモチーフをコードするヌクレオチド配列と90%以下、80%以下、70%以下、60%以下、または55%以下の配列同一性を有する。

【0068】

いくつかの実施形態において、第1の2Aモチーフは、配列番号222のアミノ酸配列を含むT2Aモチーフであり、第2の2Aモチーフは、配列番号226のアミノ酸配列を含むP2Aモチーフである。

【0069】

いくつかの実施形態において、前記第1の2Aモチーフをコードするヌクレオチド配列は、配列番号221のヌクレオチド配列と少なくとも70%の配列同一性を有し、前記第2の2Aモチーフをコードするヌクレオチド配列は、配列番号223のヌクレオチド配列と少なくとも70%の配列同一性を有する。

【0070】

いくつかの実施形態において、第2の核酸は、

前記第2のCISC構成要素をコードするヌクレオチド配列と前記細胞質ゾル内FRBドメインポリペプチドをコードするヌクレオチド配列の間にインフレーションに挿入された、第3の2Aモチーフをコードするヌクレオチド配列と、

前記細胞質ゾル内FRBドメインポリペプチドをコードするヌクレオチド配列と前記FoxP3またはその一部をコードするヌクレオチド配列の間にインフレーションに挿入された、第4の2Aモチーフをコードするヌクレオチド配列とをさらに含む。

【0071】

いくつかの実施形態において、第3の2Aモチーフは、配列番号227のアミノ酸配列を含むP2Aモチーフであり、第4の2Aモチーフは、配列番号228のアミノ酸配列を含むP2

10

20

30

40

50

Aモチーフである。

【0072】

いくつかの実施形態において、前記第3の2Aモチーフをコードするヌクレオチド配列は、配列番号224のヌクレオチド配列と少なくとも70%の配列同一性を有し、前記第4の2Aモチーフをコードするヌクレオチド配列は、配列番号225のヌクレオチド配列と少なくとも70%の配列同一性を有する。

【0073】

いくつかの実施形態において、第1のCISC構成要素は、IL-2R γ の細胞外ドメインの一部をさらに含む。

【0074】

いくつかの実施形態において、第2のCISC構成要素は、IL-2R β の細胞外ドメインの一部をさらに含む。

【0075】

いくつかの実施形態において、第2のCISC構成要素は、配列番号236のアミノ酸配列を有する野生型mTORの2098番目のアミノ酸に相当する位置にスレオニンを含む。

【0076】

いくつかの実施形態において、第1のCISC構成要素は、配列番号66のアミノ酸配列と少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または最大で100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【0077】

いくつかの実施形態において、第2のCISC構成要素は、配列番号71のアミノ酸配列と少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または最大で100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【0078】

いくつかの実施形態において、第1のCISC構成要素は、配列番号66のアミノ酸配列を含み、第2のCISC構成要素は、配列番号71のアミノ酸配列を含む。

【0079】

いくつかの実施形態において、前記TCR α ポリペプチドの少なくとも一部をコードするヌクレオチド配列は、TCR α ポリペプチドの定常ドメインの少なくとも一部をコードする内因性ヌクレオチド配列とインフレーションに挿入されており、

第1のMNDプロモーターによって、TCR α の可変領域とTCR α の接合領域とTCR α の定常ドメインを含むTCR α ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列の転写が開始される。

【0080】

いくつかの実施形態において、前記TCR β ポリペプチドは、

(i) (a) 配列番号4のアミノ酸配列を含むCDR1と、(b) 配列番号5のアミノ酸配列を含むCDR2と、(c) 配列番号6のアミノ酸配列を含むCDR3；

(ii) (a) 配列番号14のアミノ酸配列を含むCDR1と、(b) 配列番号15のアミノ酸配列を含むCDR2と、(c) 配列番号16のアミノ酸配列を含むCDR3；または

(iii) (a) 配列番号24のアミノ酸配列を含むCDR1と、(b) 配列番号25のアミノ酸配列を含むCDR2と、(c) 配列番号26のアミノ酸配列を含むCDR3を含む。

【0081】

いくつかの実施形態において、前記TCR α ポリペプチドは、

(i) (a) 配列番号1のアミノ酸配列を含むCDR1と、(b) 配列番号2のアミノ酸配列を含むCDR2と、(c) 配列番号3のアミノ酸配列を含むCDR3；

(ii) (a) 配列番号11のアミノ酸配列を含むCDR1と、(b) 配列番号12のアミノ酸配列を含むCDR2と、(c) 配列番号13のアミノ酸配列を含むCDR3；または

(iii) (a) 配列番号21のアミノ酸配列を含むCDR1と、(b) 配列番号22のアミノ酸配列を含むCDR2と、(c) 配列番号23のアミノ酸配列を含むCDR3

10

20

30

40

50

を含む。

【0082】

いくつかの実施形態において、前記TCR α ポリペプチドは、配列番号7、17および27のいずれかに示されるアミノ酸配列を含む可変ドメインを含む。

【0083】

いくつかの実施形態において、前記TCR β ポリペプチドは、配列番号8、18および28のいずれかに示されるアミノ酸配列を含む可変ドメインを含む。

【0084】

いくつかの実施形態において、

(i) 前記TCR α ポリペプチドは、配列番号1のアミノ酸配列を有する α CDR1と、配列番号2のアミノ酸配列を有する α CDR2と、配列番号3のアミノ酸配列を有する α CDR3を含み、かつ前記TCR β ポリペプチドは、配列番号4のアミノ酸配列を有するbCDR1と、配列番号5のアミノ酸配列を有するbCDR2と、配列番号6のアミノ酸配列を有するbCDR3を含むか；

10

(ii) 前記TCR α ポリペプチドは、配列番号11のアミノ酸配列を有する α CDR1と、配列番号12のアミノ酸配列を有する α CDR2と、配列番号13のアミノ酸配列を有する α CDR3を含み、かつ前記TCR β ポリペプチドは、配列番号14のアミノ酸配列を有するbCDR1と、配列番号15のアミノ酸配列を有するbCDR2と、配列番号16のアミノ酸配列を有するbCDR3を含むか；または

(iii) 前記TCR α ポリペプチドは、配列番号21のアミノ酸配列を有する α CDR1と、配列番号22のアミノ酸配列を有する α CDR2と、配列番号23のアミノ酸配列を有する α CDR3を含み、かつ前記TCR β ポリペプチドは、配列番号24のアミノ酸配列を有するbCDR1と、配列番号25のアミノ酸配列を有するbCDR2と、配列番号26のアミノ酸配列を有するbCDR3を含む。

20

【0085】

いくつかの実施形態において、

(i) 前記TCR α ポリペプチドは、配列番号7のアミノ酸配列を含む可変ドメインを含み、かつ前記TCR β ポリペプチドは、配列番号8のアミノ酸配列を含む可変ドメインを含むか；

(ii) 前記TCR α ポリペプチドは、配列番号17のアミノ酸配列を含む可変ドメインを含み、かつ前記TCR β ポリペプチドは、配列番号18のアミノ酸配列を含む可変ドメインを含むか；または

30

(iii) 前記TCR α ポリペプチドは、配列番号27のアミノ酸配列を含む可変ドメインを含み、かつ前記TCR β ポリペプチドは、配列番号28のアミノ酸配列を含む可変ドメインを含む。

【0086】

いくつかの実施形態において、

(i) 前記TCR α ポリペプチドは、配列番号9のアミノ酸配列を含み、かつ前記TCR β ポリペプチドは、配列番号10のアミノ酸配列を含むか；

(ii) 前記TCR α ポリペプチドは、配列番号19のアミノ酸配列を含み、かつ前記TCR β ポリペプチドは、配列番号20のアミノ酸配列を含むか；または

40

(iii) 前記TCR α ポリペプチドは、配列番号29のアミノ酸配列を含み、かつ前記TCR β ポリペプチドは、配列番号30のアミノ酸配列を含む。

【0087】

いくつかの実施形態において、第2の核酸を前記細胞ゲノムに挿入することによって、FOXP3座位の第1のコーディングエキソンの配列が組換えられる。

【0088】

いくつかの実施形態において、第2の核酸を前記細胞ゲノムに挿入しても、FOXP3座位の第1のコーディングエキソンのヌクレオチド配列は変化しない。

【0089】

50

いくつかの実施形態において、前記遺伝子組換え細胞は、CD3+T細胞、CD4+T細胞および／またはCD8+T細胞である。

【0090】

いくつかの実施形態において、前記遺伝子組換え細胞は、CD4+T細胞である。

【0091】

いくつかの実施形態において、前記遺伝子組換え細胞は、Treg細胞である。

【0092】

いくつかの実施形態において、前記遺伝子組換え細胞は、FoxP3+Treg細胞である。

【0093】

いくつかの実施形態において、前記遺伝子組換え細胞は、CTLA-4+、LAG-3+、CD25+、CD39+、CD27+、CD70+、GITR+、ニューロピリン1+、ガレクチン1+および／またはIL-2Rα+である。

10

【0094】

本開示のいくつかの態様は、本明細書に記載の遺伝子組換え細胞と薬学的に許容される添加剤とを含む医薬組成物に関する。

【0095】

本開示のいくつかの態様は、本明細書に記載の医薬組成物または遺伝子組換え細胞を対象に投与する工程を含む方法に関する。

【0096】

いくつかの実施形態において、前記遺伝子組換え細胞は、前記対象の自家細胞である。

20

【0097】

いくつかの実施形態において、前記遺伝子組換え細胞は、前記対象と同じ種に由来する細胞である。

【0098】

いくつかの実施形態において、前記対象は1型糖尿病（T1D）を有する。

【0099】

いくつかの実施形態において、前記対象は、前記細胞を投与する前の6ヶ月以内、5ヶ月以内、4ヶ月以内、3ヶ月以内、3ヶ月以内、2ヶ月以内または1ヶ月以内に1型糖尿病（T1D）であると診断された対象である。

【0100】

いくつかの実施形態において、前記対象のインスリン用量調整ヘモグロビンA1c（IDA A1c）は9.0以下である。

30

【0101】

いくつかの実施形態において、前記対象が1型糖尿病（T1D）であると診断された後の該対象のIDA A1cは、9.0を超える値から9.0以下に低下している。

【0102】

いくつかの実施形態において、前記細胞を投与する前の6ヶ月以内、5ヶ月以内、4ヶ月以内、3ヶ月以内、3ヶ月以内、2ヶ月以内または1ヶ月以内に、膵島細胞抗原、インスリン、グルタミン酸脱炭酸酵素、膵島チロシンホスファターゼ2および／または亜鉛トランスporter 8 からなる群から選択される抗原に結合する自己抗体が前記対象において検出されている。

40

【0103】

いくつかの実施形態において、前記対象は1型糖尿病（T1D）であると診断されていない。

【0104】

いくつかの実施形態において、前記対象のヘモグロビンA1cは5.7～6.4である。

【0105】

いくつかの実施形態において、前記対象のヘモグロビンA1cは6.5以上である。

【0106】

いくつかの実施形態において、前記対象は、3歳以上かつ6歳未満であり、 1×10^8 個

50

～ 6×10^8 個の前記細胞を含む用量が投与される。

【0107】

いくつかの実施形態において、前記用量は、 2.4×10^8 個～ 3.6×10^8 個の前記細胞を含む。

【0108】

いくつかの実施形態において、前記用量は、約 3×10^8 個の前記細胞を含む。

【0109】

いくつかの実施形態において、前記対象は、6歳以上かつ12歳未満であり、 2×10^8 個～ 1×10^9 個の前記細胞を含む用量が投与される。

【0110】

いくつかの実施形態において、前記用量は、 4×10^8 個～ 6×10^8 個の前記細胞を含む。

【0111】

いくつかの実施形態において、前記用量は、約 5×10^8 個の前記細胞を含む。

【0112】

いくつかの実施形態において、前記対象は、12歳以上かつ18歳未満であり、 5×10^8 個～ 2×10^9 個の前記細胞を含む用量が投与される。

【0113】

いくつかの実施形態において、前記用量は、 8×10^8 個～ 1.2×10^9 個の前記細胞を含む。

【0114】

いくつかの実施形態において、前記用量は、約 10^9 個の前記細胞を含む。

【0115】

いくつかの実施形態において、前記対象は、18歳以上であり、 5×10^8 個～ 2×10^9 個の前記細胞を含む用量が投与される。

【0116】

いくつかの実施形態において、前記対象は46歳未満である。

【0117】

いくつかの実施形態において、前記用量は、 8×10^8 個～ 1.2×10^9 個の前記細胞を含む。

【0118】

いくつかの実施形態において、前記用量は、約 10^9 個の前記細胞を含む。

【0119】

いくつかの実施形態において、前記対象の脾体積は、該対象の年齢から推定され、

(a) 推定された脾体積が約20mLである場合、 1×10^8 個～ 6×10^8 個の前記細胞を含む用量が前記対象に投与されるか；

(b) 推定された脾体積が約35mLである場合、 2×10^8 個～ 1×10^9 個の前記細胞を含む用量が前記対象に投与されるか；または

(c) 推定された脾体積が約60mL以上である場合、 5×10^8 個～ 2×10^9 個の前記細胞を含む用量が前記対象に投与される。

【0120】

いくつかの実施形態において、

(a) 推定された脾体積が約20mLである場合、 2.4×10^8 個～ 3.6×10^8 個の前記細胞を含む用量が前記対象に投与されるか；

(b) 推定された脾体積が約35mLである場合、 4×10^8 個～ 6×10^8 個の前記細胞を含む用量が前記対象に投与されるか；または

(c) 推定された脾体積が約60mL以上である場合、 8×10^8 個～ 1.2×10^9 個の前記細胞を含む用量が前記対象に投与される。

【0121】

いくつかの実施形態において、

(a) 推定された脾体積が約20mLである場合、約 3×10^8 個の前記細胞を含む用量が

10

20

30

40

50

前記対象に投与されるか；

(b) 推定された脾体積が約35 mLである場合、約 5×10^8 個の前記細胞を含む用量が前記対象に投与されるか；または

(c) 推定された脾体積が60 mL以上である場合、約 10^9 個の前記細胞を含む用量が前記対象に投与される。

【0122】

いくつかの実施形態において、前記対象の脾体積は、該対象の年齢から推定され、前記方法は、前記対象の実際の脾体積を測定する工程をさらに含み、

(a) 推定された脾体積が約20 mLである場合、(対象の実際の脾体積：推定された脾体積の比率) $\times$ (1×10^8 個 $\sim 6 \times 10^8$ 個)の前記細胞を含む用量が前記対象に投与されるか；

10

(b) 推定された脾体積が約35 mLである場合、(対象の実際の脾体積：推定された脾体積の比率) $\times$ (2×10^8 個 $\sim 1 \times 10^9$ 個)の前記細胞を含む用量が前記対象に投与されるか；または

(c) 推定された脾体積が約60 mL以上である場合、(対象の実際の脾体積：推定された脾体積の比率) $\times$ (5×10^8 個 $\sim 2 \times 10^9$ 個)の前記細胞を含む用量が前記対象に投与される。

【0123】

いくつかの実施形態において、

(a) 推定された脾体積が約20 mLである場合、(対象の実際の脾体積：推定された脾体積の比率) $\times$ (2.4×10^8 個 $\sim 3.6 \times 10^8$ 個)の前記細胞を含む用量が前記対象に投与されるか；

20

(b) 推定された脾体積が約35 mLである場合、(対象の実際の脾体積：推定された脾体積の比率) $\times$ (4×10^8 個 $\sim 6 \times 10^8$ 個)の前記細胞を含む用量が前記対象に投与されるか；または

(c) 推定された脾体積が約60 mL以上である場合、(対象の実際の脾体積：推定された脾体積の比率) $\times$ (8×10^8 個 $\sim 1.2 \times 10^9$ 個)の前記細胞を含む用量が前記対象に投与される。

【0124】

いくつかの実施形態において、

(a) 推定された脾体積が約20 mLである場合、(対象の実際の脾体積：推定された脾体積の比率) $\times$ (約 3×10^8 個)の前記細胞を含む用量が前記対象に投与されるか；

30

(b) 推定された脾体積が約35 mLである場合、(対象の実際の脾体積：推定された脾体積の比率) $\times$ (約 5×10^8 個)の前記細胞を含む用量が前記対象に投与されるか；または

(c) 推定された脾体積が約60 mL以上である場合、(対象の実際の脾体積：推定された脾体積の比率) $\times$ (約 10^9 個)の前記細胞を含む用量が前記対象に投与される。

【0125】

いくつかの実施形態において、前記対象はヒトである。

【0126】

40

本開示のいくつかの態様は、第1の核酸と第2の核酸を含むシステムであって、

(i) 第1の核酸が、

(a) 細胞ゲノムのTRAC座位の第1の核酸配列に相同性を有する第1の5'相同アーム；

(b) MNDプロモーターである第1のプロモーター；

(c) (1) FK506結合タンパク質12 (FKBP) のラパマイシン結合ドメインを含む細胞外結合ドメインと、(2) IL-2R γ の膜貫通ドメインと、(3) IL-2R γ の細胞質内ドメインまたはその機能性断片を含む細胞内ドメインとを含む第1の化学誘導性シグナル伝達複合体 (CISC) 構成要素をコードするヌクレオチド配列；

(d) TCR β ポリペプチドまたはその機能性断片をコードするヌクレオチド配列；

50

(e) 1型糖尿病 (T1D) 関連抗原に結合するTCR α ポリペプチドとTCR β ポリペプチドを含むT細胞受容体 (TCR) に由来するTCR α の可変領域とTCR α の接合領域を含むTCR α ポリペプチドの少なくとも一部をコードするヌクレオチド配列; および

(f) 前記TRAC座位の第1の核酸配列の下流のTRAC座位の第2の核酸配列に相同性を有する第1の3'相同アームを含み、

(ii) 第2の核酸が、

(a) 前記細胞ゲノムのFOXP3座位の第1の核酸配列に相同性を有する第2の5'相同アーム;

(b) MNDプロモーターである第2のプロモーター;

(c) (1) mTORのFKBP-ラパマイシン結合 (FRB) ドメインを含む細胞外結合ドメインと、(2) IL-2R β の膜貫通ドメインと、(3) IL-2R β の細胞質内ドメインまたはその機能性断片とを含む第2のCISC構成要素をコードするヌクレオチド配列;

(d) ラパマイシンに結合し、膜貫通ドメインを含んでいない細胞質ゾル内FRBドメインをコードするヌクレオチド配列; および

(e) 前記FOXP3座位の第1の核酸配列の下流かつFOXP3座位のTreg特異的脱メチル化領域 (TSDR) の下流のFOXP3座位の第2の核酸配列に相同性を有する第2の3'相同アーム

を含む、システムに関する。

【0127】

いくつかの実施形態において、第1の核酸は、

前記第1のCISC構成要素をコードするヌクレオチド配列と前記TCR β ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列の間にインフレーションに挿入された、第1の2Aモチーフをコードするヌクレオチド配列と、

前記TCR β ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列と前記TCR α ポリペプチドの少なくとも一部をコードするヌクレオチド配列の間にインフレーションに挿入された、第2の2Aモチーフをコードするヌクレオチド配列と

をさらに含む。

【0128】

いくつかの実施形態において、前記第1の2Aモチーフをコードするヌクレオチド配列は、前記第2の2Aモチーフをコードするヌクレオチド配列と90%以下、80%以下、70%以下、60%以下、または55%以下の配列同一性を有する。

【0129】

いくつかの実施形態において、第1の2Aモチーフは、配列番号222のアミノ酸配列を含むT2Aモチーフであり、第2の2Aモチーフは、配列番号226のアミノ酸配列を含むP2Aモチーフである。

【0130】

いくつかの実施形態において、前記第1の2Aモチーフをコードするヌクレオチド配列は、配列番号221のヌクレオチド配列と少なくとも70%の配列同一性を有し、前記第2の2Aモチーフをコードするヌクレオチド配列は、配列番号223のヌクレオチド配列と少なくとも70%の配列同一性を有する。

【0131】

いくつかの実施形態において、第2の核酸は、

前記第2のCISC構成要素をコードするヌクレオチド配列と前記細胞質ゾル内FRBドメインポリペプチドをコードするヌクレオチド配列の間にインフレーションに挿入された、第3の2Aモチーフをコードするヌクレオチド配列と、

前記細胞質ゾル内FRBドメインポリペプチドをコードするヌクレオチド配列と前記FoxP3またはその一部をコードするヌクレオチド配列の間にインフレーションに挿入された、第4の2Aモチーフをコードするヌクレオチド配列と

をさらに含む。

10

20

30

40

50

【0132】

いくつかの実施形態において、第3の2Aモチーフは、配列番号227のアミノ酸配列を含むP2Aモチーフであり、第4の2Aモチーフは、配列番号228のアミノ酸配列を含むP2Aモチーフである。

【0133】

いくつかの実施形態において、前記第3の2Aモチーフをコードするヌクレオチド配列は、配列番号224のヌクレオチド配列と少なくとも70%の配列同一性を有し、前記第4の2Aモチーフをコードするヌクレオチド配列は、配列番号225のヌクレオチド配列と少なくとも70%の配列同一性を有する。

【0134】

いくつかの実施形態において、第1のCISC構成要素は、IL-2R γ の細胞外ドメインの一部をさらに含む。

【0135】

いくつかの実施形態において、第2のCISC構成要素は、IL-2R β の細胞外ドメインの一部をさらに含む。

【0136】

いくつかの実施形態において、第2のCISC構成要素は、配列番号236のアミノ酸配列を有する野生型mTORの2098番目のアミノ酸に相当する位置にスレオニンを含む。

【0137】

いくつかの実施形態において、第1のCISC構成要素は、配列番号66のアミノ酸配列と少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または最大で100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【0138】

いくつかの実施形態において、第2のCISC構成要素は、配列番号71のアミノ酸配列と少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または最大で100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【0139】

いくつかの実施形態において、第1のCISC構成要素は、配列番号66のアミノ酸配列を含み、第2のCISC構成要素が、配列番号71のアミノ酸配列を含む。

【0140】

いくつかの実施形態において、前記TCR α ポリペプチドの少なくとも一部をコードするヌクレオチド配列は、前記3'相同アームにおいてTCR α ポリペプチドの定常ドメインの少なくとも一部をコードするヌクレオチド配列とインフレームに挿入されており、

第1のMNDプロモーターによって、TCR α の可変領域とTCR α の接合領域とTCR α の定常ドメインを含むTCR α ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列の転写が開始される。

【0141】

いくつかの実施形態において、前記TCR β ポリペプチドは、

(i) (a) 配列番号4のアミノ酸配列を含むCDR1と、(b) 配列番号5のアミノ酸配列を含むCDR2と、(c) 配列番号6のアミノ酸配列を含むCDR3；

(ii) (a) 配列番号14のアミノ酸配列を含むCDR1と、(b) 配列番号15のアミノ酸配列を含むCDR2と、(c) 配列番号16のアミノ酸配列を含むCDR3；または

(iii) (a) 配列番号24のアミノ酸配列を含むCDR1と、(b) 配列番号25のアミノ酸配列を含むCDR2と、(c) 配列番号26のアミノ酸配列を含むCDR3を含む。

【0142】

いくつかの実施形態において、前記TCR α ポリペプチドは、

(i) (a) 配列番号1のアミノ酸配列を含むCDR1と、(b) 配列番号2のアミノ酸配列を含むCDR2と、(c) 配列番号3のアミノ酸配列を含むCDR3；

(ii) (a) 配列番号11のアミノ酸配列を含むCDR1と、(b) 配列番号12のアミノ酸

10

20

30

40

50

配列を含むCDR2と、(c) 配列番号13のアミノ酸配列を含むCDR3；または

(iii) (a) 配列番号21のアミノ酸配列を含むCDR1と、(b) 配列番号22のアミノ酸配列を含むCDR2と、(c) 配列番号23のアミノ酸配列を含むCDR3を含む。

【0143】

いくつかの実施形態において、前記TCR α ポリペプチドは、配列番号7、17および27のいずれかに示されるアミノ酸配列を含む可変ドメインを含む。

【0144】

いくつかの実施形態において、前記TCR β ポリペプチドは、配列番号8、18および28のいずれかに示されるアミノ酸配列を含む可変ドメインを含む。

【0145】

いくつかの実施形態において、

(i) 前記TCR α ポリペプチドは、配列番号1のアミノ酸配列を有する α CDR1と、配列番号2のアミノ酸配列を有する α CDR2と、配列番号3のアミノ酸配列を有する α CDR3を含み、かつ前記TCR β ポリペプチドは、配列番号4のアミノ酸配列を有するbCDR1と、配列番号5のアミノ酸配列を有するbCDR2と、配列番号6のアミノ酸配列を有するbCDR3を含むか；

(ii) 前記TCR α ポリペプチドは、配列番号11のアミノ酸配列を有する α CDR1と、配列番号12のアミノ酸配列を有する α CDR2と、配列番号13のアミノ酸配列を有する α CDR3を含み、かつ前記TCR β ポリペプチドは、配列番号14のアミノ酸配列を有するbCDR1と、配列番号15のアミノ酸配列を有するbCDR2と、配列番号16のアミノ酸配列を有するbCDR3を含むか；または

(iii) 前記TCR α ポリペプチドは、配列番号21のアミノ酸配列を有する α CDR1と、配列番号22のアミノ酸配列を有する α CDR2と、配列番号23のアミノ酸配列を有する α CDR3を含み、かつ前記TCR β ポリペプチドは、配列番号24のアミノ酸配列を有するbCDR1と、配列番号25のアミノ酸配列を有するbCDR2と、配列番号26のアミノ酸配列を有するbCDR3を含む。

【0146】

いくつかの実施形態において、

(i) 前記TCR α ポリペプチドは、配列番号7のアミノ酸配列を含む可変ドメインを含み、かつ前記TCR β ポリペプチドは、配列番号8のアミノ酸配列を含む可変ドメインを含むか；

(ii) 前記TCR α ポリペプチドは、配列番号17のアミノ酸配列を含む可変ドメインを含み、かつ前記TCR β ポリペプチドは、配列番号18のアミノ酸配列を含む可変ドメインを含むか；または

(iii) 前記TCR α ポリペプチドは、配列番号27のアミノ酸配列を含む可変ドメインを含み、かつ前記TCR β ポリペプチドは、配列番号28のアミノ酸配列を含む可変ドメインを含む。

【0147】

いくつかの実施形態において、

(i) 前記TCR α ポリペプチドは、配列番号9のアミノ酸配列を含み、かつ前記TCR β ポリペプチドは、配列番号10のアミノ酸配列を含むか；

(ii) 前記TCR α ポリペプチドは、配列番号19のアミノ酸配列を含み、かつ前記TCR β ポリペプチドは、配列番号20のアミノ酸配列を含むか；または

(iii) 前記TCR α ポリペプチドは、配列番号29のアミノ酸配列を含み、かつ前記TCR β ポリペプチドは、配列番号30のアミノ酸配列を含む。

【0148】

いくつかの実施形態において、第2の核酸を前記細胞ゲノムに挿入することによって、FOXP3座位の第1のコーディングエキソンの配列が組換えられる。

【0149】

10

20

30

40

50

いくつかの実施形態において、第2の核酸を細胞ゲノムに挿入しても、FOXP3座位の第1のコーディングエキソンのヌクレオチド配列は変化しない。

【0150】

いくつかの実施形態において、前記システムは、DNAエンドヌクレアーゼまたは該DNAエンドヌクレアーゼをコードする第3の核酸をさらに含む。

【0151】

いくつかの実施形態において、前記DNAエンドヌクレアーゼをコードする第3の核酸はRNAである。

【0152】

いくつかの実施形態において、前記DNAエンドヌクレアーゼをコードするRNAはmRNAである。

【0153】

いくつかの実施形態において、前記DNAエンドヌクレアーゼは、RNA誘導型DNAエンドヌクレアーゼである。

【0154】

いくつかの実施形態において、前記RNA誘導型DNAエンドヌクレアーゼは、Casエンドヌクレアーゼである。

【0155】

いくつかの実施形態において、前記Casエンドヌクレアーゼは、Cas9エンドヌクレアーゼである。

【0156】

いくつかの実施形態において、前記システムは、TRAC座位内の配列に相補的なスペーサー配列を含むTRAC座位標的ガイドRNA (gRNA)、または該TRAC座位標的gRNAをコードする第4の核酸をさらに含む。

【0157】

いくつかの実施形態において、第1の核酸の5'相同アームは、配列番号85と少なくとも90%の配列同一性を有する配列を含み、第1の核酸の3'相同アームは、配列番号93と少なくとも90%の配列同一性を有する配列を含む。

【0158】

いくつかの実施形態において、第1の核酸の5'相同アームは、配列番号96と少なくとも90%の配列同一性を有する配列を含み、第1の核酸の3'相同アームは、配列番号105と少なくとも90%の配列同一性を有する配列を含む。

【0159】

いくつかの実施形態において、第1の核酸の5'相同アームは、配列番号108と少なくとも90%の配列同一性を有する配列を含み、第1の核酸の3'相同アームは、配列番号116と少なくとも90%の配列同一性を有する配列を含む。

【0160】

いくつかの実施形態において、第1の核酸の5'相同アームは、配列番号119と少なくとも90%の配列同一性を有する配列を含み、第1の核酸の3'相同アームは、配列番号127と少なくとも90%の配列同一性を有する配列を含む。

【0161】

いくつかの実施形態において、第1の核酸の5'相同アームは、配列番号130と少なくとも90%の配列同一性を有する配列を含み、第1の核酸の3'相同アームは、配列番号138と少なくとも90%の配列同一性を有する配列を含む。

【0162】

いくつかの実施形態において、前記システムは、FOXP3座位内の配列に相補的なスペーサー配列を含むFOXP3座位標的ガイドRNA (gRNA)、または該FOXP3座位標的gRNAをコードする第4の核酸をさらに含む。

【0163】

いくつかの実施形態において、第2の核酸の5'相同アームは、配列番号141と少なく

10

20

30

40

50

とも90%の配列同一性を有する配列を含み、第2の核酸の3'相同アームは、配列番号149と少なくとも90%の配列同一性を有する配列を含む。

【0164】

いくつかの実施形態において、第2の核酸の5'相同アームは、配列番号152と少なくとも90%の配列同一性を有する配列を含み、第2の核酸の3'相同アームは、配列番号160と少なくとも90%の配列同一性を有する配列を含む。

【0165】

いくつかの実施形態において、第2の核酸の5'相同アームは、配列番号163と少なくとも90%の配列同一性を有する配列を含み、第2の核酸の3'相同アームは、配列番号171と少なくとも90%の配列同一性を有する配列を含む。

10

【0166】

いくつかの実施形態において、第2の核酸の5'相同アームは、配列番号174と少なくとも90%の配列同一性を有する配列を含み、第2の核酸の3'相同アームは、配列番号183と少なくとも90%の配列同一性を有する配列を含む。

【0167】

いくつかの実施形態において、第2の核酸の5'相同アームは、配列番号186と少なくとも90%の配列同一性を有する配列を含み、第2の核酸の3'相同アームは、配列番号194と少なくとも90%の配列同一性を有する配列を含む。

【0168】

いくつかの実施形態において、第2の核酸の5'相同アームは、配列番号197と少なくとも90%の配列同一性を有する配列を含み、第2の核酸の3'相同アームは、配列番号205と少なくとも90%の配列同一性を有する配列を含む。

20

【0169】

いくつかの実施形態において、第2の核酸の5'相同アームは、配列番号208と少なくとも90%の配列同一性を有する配列を含み、第2の核酸の3'相同アームは、配列番号217と少なくとも90%の配列同一性を有する配列を含む。

【0170】

いくつかの実施形態において、第1の核酸は第1のベクター内に含まれる。

【0171】

いくつかの実施形態において、第1のベクターはアデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターである。

30

【0172】

いくつかの実施形態において、第1のベクターは、AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10またはAAV11の血清型のAAVに由来するAAVベクターである。

【0173】

いくつかの実施形態において、第2の核酸は第2のベクター内に含まれる。

【0174】

いくつかの実施形態において、第2のベクターはアデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターである。

40

【0175】

いくつかの実施形態において、第2のベクターは、AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10またはAAV11の血清型のAAVに由来するAAVベクターである。

【0176】

いくつかの実施形態において、第1の核酸は、第1の5'相同アームと第1の3'相同アームの間に、配列番号94、106、117、128および139のいずれかと少なくとも95%の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む。

【0177】

いくつかの実施形態において、第2の核酸は、第1の5'相同アームと第1の3'相同ア

50

ームの間に、配列番号150、161、172、184、195、206および218のいずれかと少なくとも95%の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む。

【0178】

いくつかの実施形態において、第1の核酸は、配列番号95、107、118、129および140のいずれかと少なくとも95%の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む。

【0179】

いくつかの実施形態において、第2の核酸は、配列番号151、162、173、185、196、207および219のいずれかと少なくとも95%の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む。

【0180】

いくつかの実施形態において、前記1つ以上の相同アームの長さは100~2000ヌクレオチド長である。

【0181】

いくつかの実施形態において、前記相同アームのそれぞれの長さは300~700ヌクレオチド長である。

【図面の簡単な説明】

【0182】

以下の図面は、本願明細書の一部を構成するものであり、本開示の特定の態様をさらに実証するために記載されている。これらの態様は、本明細書に記載の特定の実施形態の詳細な説明とともに1つ以上の図面を参照することによって理解を深めることができる。図面に示すデータは、本開示の範囲を何ら限定するものではない。

【0183】

【図1】糖尿病の治療用として、(i) TRACハイジャック法により、MND、FKBP-IL2RG、およびT1D2 TCRの断片またはT1D5-1 TCRの断片を挿入し、かつ(ii) FOXP3座位に、MND、FRB-ILR β および裸の細胞質ゾル内FRBを挿入するために、Tregの組換えに使用したポリヌクレオチドの例を示す。このTRACハイジャック法は、内因性TCRのノックアウトを含んでいたが、この内因性TRAC配列を利用している。これら2つの座位に各挿入が行われた細胞を、「二重編集細胞」と呼ぶ。

【0184】

【図2】図1に示したポリヌクレオチドを用いたTregの組換え用の編集セットアップを示し、CD4+T細胞のドナー；使用した各AAVコンストラクト；二重編集に使用した出発細胞数；および最終産物の名称を記載している。Mock産物は、AAVドナーとヌクレアーゼを添加せずにエレクトロポレーションを実施することにより作製した。

【0185】

【図3】図1に示したポリヌクレオチドを挿入した3日後の細胞における最初の編集率を示す。TRAC座位を標的とするRNPとFOXP3座位を標的とするRNPを使用し、かつ1) VIN 10019-Genti 122 AAV T1D5-1+3362 AAV、または2) VIN 10020-Genti 122 AAV T1D2+3362 AAVを送達することによって、3人のドナー（2人の1型糖尿病対象と1人の健常ドナー）から得たCD4+T細胞を二重編集して、hT1D5-1 EngTregとhT1D2 EngTregをそれぞれ作製した。グラフは、本研究における最初の二重編集率が高かったことを示している。各フローサイトメトリープロットにおいて、二重編集細胞は四分割した右上の区画に存在する。FACS分析でCD3+/HA+の共発現を測定したところ、最初の二重編集率は10.1%~18.9%の範囲であった。二重編集細胞では、TRAC座位に膵島抗原特異的TCR (isTCR) の導入に成功したことからCD3の発現が回復し、HA染色からは、FOXP3座位の相同組換え修復による編集後に、HAタグ付加内因性FoxP3の発現に成功したことが示された。

【0186】

【図4】ラパマイシンを用いた二重編集細胞の拡大培養を含む、Treg細胞を組換えるためのプロトコルの一例を示す。細胞を遺伝子編集した3日後に、10nMのラパマイシンに細胞を播種して12日間拡大培養し、12日目に抗CD3/CD28ビーズによる刺激を再度

10

20

30

40

50

行った。播種した細胞の総数は、 $1.99 \times 10^6 \sim 2.72 \times 10^6$ 個の範囲であり、各ドナー／TCRごとに一覧に示している。

【0187】

【図5】図1に示したポリヌクレオチドを細胞に導入した15日後における二重編集細胞の濃縮を示す。19日目のCD3+/HA-FoxP3+二重陽性EngTregの割合は、81.1%~89.2%の範囲であったことから、1型糖尿病を有するドナーと健常対照ドナーのいずれでも、T1D2+/FoxP3+二重陽性細胞とT1D5-1+/FoxP3+二重陽性細胞が濃縮されたことが示された。この結果から、1) 予想したとおり、T1D2+/FoxP3+二重陽性EngTreg細胞とT1D5-1+/FoxP3+二重陽性EngTreg細胞は、ラパマイシンで濃縮することができ、2) 1型糖尿病を有するドナーから採取した細胞も、健常対照ドナーから採取した細胞と同様の方法で濃縮可能であることが示された。

10

【0188】

【図6A-6B】図1に示したポリヌクレオチドを挿入して、T1D2 TCR発現Treg (図6A) またはT1D5-1 TCR発現Treg (図6B) を製造することを含む二重編集により作製された組換えTregによる活性化Teff細胞の抑制を示す。Teff細胞は、抗原提示細胞 (APC) としての骨髄樹状細胞 (mDC) の存在下において、IGRP₃₀₅₋₃₂₄コグネイトペプチドで活性化するか、または抗CD3/CD28により活性化した。各ドナー由来のT1D2発現二重編集EngTregとT1D5-1発現二重編集EngTregはいずれも、下方の棒グラフにまとめたように、同じIGRPペプチドを標的とするTeff細胞に対して、強力な抑制活性 (80%を超える抑制) を示した。

20

【0189】

【図6C】抗原特異的な二重編集EngTregがバイスタンダー抑制を発揮するかどうかを評価するために構築し、実施したポリクローナル膵島抑制アッセイの結果を示す。このアッセイでは、IGRP、GAD65、PPI、ZNT8の4種の主要な膵島抗原に由来する膵島特異的ペプチドのプールでパルスしたAPC (mDC) を用いてインビトロで活性化した (同じ1型糖尿病対象に由来する) 自家Teff細胞のプールを使用した。

【0190】

FOXP3座位を標的とした編集とTRAC座位を標的とした編集を組み合わせることでT1D2発現EngTregまたはT1D5-1発現EngTregを作製し、同じ膵島特異的TCR (T1D2またはT1D5-1) をコードする配列を導入したレンチウイルス (LV) の送達により組換えTregと比較した。LVで編集したT1D2+/FoxP3+編集細胞とT1D5-1+/FoxP3+編集細胞は、TRAC座位とFOXP3座位を二重編集したEngTregと以下の点で様々に異なっていた。(i) LVで編集した細胞により発現された膵島特異的TCRは、ヒトTCRβ鎖ではなく、マウスTCRβ鎖を含んでいた。(ii) LVで編集した細胞はインタクトな内因性TDRを発現していた。(iii) LVで編集した細胞は、ラパマイシンの存在下でIL-2のシグナル伝達を起こす化学誘導性シグナル伝達複合体 (CISC) の構成要素を発現していなかった。試験の結果から、マウスLVで編集したmT1D2+/FoxP3+細胞とmT1D5-1+/FoxP3+細胞は、様々なTeff:DC比において、膵島特異的ペプチドプールで刺激されたTeff細胞混合集団の増殖を抑制したことが示された。左のグラフは抑制率を示し、右のグラフは、抗CD3/CD28ビーズアッセイの結果で正規化した抑制率を示す。これらの知見から、膵島特異的EngTregが、1型糖尿病を有する対象の体内に認められる膵島特異的自家Teffに対してバイスタンダー抑制を発揮することができるという概念が支持された。

30

40

【0191】

【図7A-7B】TRAC座位とFOXP3座位を標的とした編集により二重編集したEngTregの抑制機能と、レンチウイルスベクターによりT1D2 TCRのコード配列またはT1D5-1 TCRのコード配列を挿入することにより作製したTregの抑制機能を比較した。図7Aは、Teff:DC比を30:1とした試験のデータを示す。図6Cに示したアッセイを使用して、二重HDR編集hT1D2+/FoxP3+EngTregと二重HDR編集hT1D5-1+/FoxP3+EngTregによるバイスタンダー抑制を分析した。hT1D2+/FoxP3+EngTregまたはhT1D5-1+/FoxP3+EngTregの存在下または非存在下において、Teff:Treg比を1:1また

50

は1:0.5 (Treg1/2) として、膵島特異的ペプチドプール (3種のIGRPペプチド、5種のGAD65ペプチド、1種のPPIペプチド、および1種のZNT8ペプチドを含む) で刺激した膵島抗原特異的Teff細胞の増殖を測定した。hT1D2+/FoxP3+二重編集EngTregとhT1D5-1+/FoxP3+二重編集EngTregは、いずれも強力なバイスタンダー抑制活性を示した。本研究において、hT1D2二重編集細胞は、hT1D5-1二重編集細胞よりもわずかに高い抑制作用を示した。(hT1D2やhT1D5-1ではなく) T1D2という名称の細胞とT1D5-1という名称の細胞は、図6Cに示したLVで編集したTregを示しており、これらの細胞は、それぞれに対応するヒトTCRを発現する二重編集されたEngTregよりも抑制活性が低かった (例えば、T1D2とhT1D2の比較)。図7Bは、Teff:DC比を様々に変えたデータを示す。「T1D2」および「T1D5」は、内因性TCRをノックアウトせずに、マウスTCRをコードするレンチウイルスベクターを用いて組換えたTregを示す。これらのデータから、Teff:DC比を5:1、10:1、20:1および30:1としたときでも、ポリクローナルなバイスタンダー抑制が再現可能であることが示された。二重編集されたhT1D2+/FoxP3+EngTregとhT1D5-1+/FoxP3+EngTregは、同じ特異性を有するマウスTCRを発現するようにLVで編集したTregと比べて高い抑制活性を有していた (例えば、hT1D5-1とT1D5-1の比較)。

10

【0192】

【図8A-8C】二重編集により組換えたTregの表現型を示す。抗体を用いて、ヒトT1D2 (抗TCRVβ13.6) とヒトT1D5-1 (抗TCRVβ7.2) の発現を検出した。図8Aは、TCRBβタンパク質の発現を示す。図8Bは、TCR、FoxP3およびCD25の発現を示す。TCRVβ13.6染色は、hT1D2/FoxP3を標的とした二重編集細胞とLVで編集したT1D2細胞の両方で観察された。TCRVβ7.2染色は、hT1D5-1/FoxP3を標的とした二重編集細胞とLVで編集したT1D5-1細胞の両方で観察された。T1D2 TCR発現細胞とhT1D2 TCR発現細胞は、T1D5-1 TCR発現細胞またはhT1D5-1 TCR発現細胞のそれぞれと比べて高いシグナルが観察され、これは、TCRの発現量または抗TCRVβ7.2抗体による染色の有効性の違いによるものだと考えられた。FoxP3の発現とCD25の発現を測定したところ、hT1D2+/FoxP3+二重編集EngTreg細胞とhT1D5-1+/FoxP3+二重編集EngTreg細胞はTreg表現型を示した (上方の図および右下の図)。注目すべきことに、hT1D2+/FoxP3+二重編集EngTreg細胞とhT1D5-1+/FoxP3+二重編集EngTreg細胞は、いずれもそれぞれに対応するマウスTCRを発現するようにLVで編集した細胞よりもCD25の発現量が高かった (例えば、hT1D2二重編集とT1D2の比較)。図8Cは、hT1D2+/FoxP3+二重編集EngTreg細胞とhT1D5-1+/FoxP3+二重編集EngTreg細胞において、CD39とCD73の発現頻度を示しており、これら2種の細胞表面タンパク質は、アデノシンの生成に関連するとともに、HLA-DRの抑制とTregによるTeffの抑制に関与している。また、T1D2二重編集EngTreg細胞とT1D5-1二重編集EngTreg細胞は、それぞれに対応するマウスTCRを発現するようにLVで編集したTreg細胞と比べて、評価した3種のTregマーカー (CD39、CD73およびHLA-DR) のすべてを高頻度に発現していた (例えば、hT1D2二重編集とT1D2の比較)。

20

30

【0193】

【図9】T1D4 EngTreg細胞を調製するための最初の二重編集率のグラフを示す。

40

【0194】

【図10】ラパマイシンによる二重編集T1D4 EngTreg細胞の濃縮を示す。

【0195】

【図11】ラパマイシンによる濃縮前および濃縮後のT1D4 EngTreg細胞における編集率のグラフを示す。

【0196】

【図12】T1D4 EngTreg細胞におけるFoxP3、CD25およびCTLA-4の発現量をmock編集細胞と比較したグラフを示す。

【0197】

【図13】T1D4 EngTreg細胞におけるTNF-α、IFN-γおよびIL-2の相対産生量をm

50

ock編集細胞と比較したグラフを示す。

【0198】

【図14】T1D4 EngTreg細胞におけるTGF- β の相対発現量をmock編集細胞と比較したグラフを示す。

【0199】

【図15】抗CD3/CD28刺激またはAPC+IGRP₂₄₁₋₂₆₀刺激で刺激したT1D4 EngTreg細胞またはmock編集細胞によるT1D4 Teff細胞の相対抑制率のグラフを示す。

【0200】

【図16】T1D4 EngTreg細胞またはmock編集細胞と共培養したT1D4 Teff細胞におけるTNF- α 、IFN- γ およびIL-2の分泌を示すグラフを示す。

【0201】

【図17】PPIペプチドのみと抗原提示細胞の組み合わせ、またはPPIペプチドとIGRPペプチドの両方と抗原提示細胞の組み合わせで刺激したT1D4 EngTregまたはmock編集細胞と共培養したPPI特異的Teffの相対抑制率を示す。

【0202】

【図18】PPI₇₆₋₉₀ペプチドを添加したAPC、またはPPI₇₆₋₉₀ペプチドおよびIGRP₂₄₁₋₂₆₀ペプチドを添加したAPCと、T1D4 EngTreg細胞またはmock編集細胞とともに培養したPPI特異的Teffのサイトカイン分泌を示す。

【0203】

【図19A-19C】1型糖尿病の概要と、1型糖尿病の治療用の組換え制御性T細胞治療であるGNTI-122の機能を示す。図19Aは、1型糖尿病の発症機序を示し、具体的には、インスリンを産生する β 細胞のTリンパ球による殺傷を示している。図19Bは、GNTI-122組換えTreg細胞によるエフェクターT細胞の抑制と、その結果としての膵島細胞の保護を示す。図19Cは、GNTI-122の開発工程の模式図を示す。

【0204】

【図20】自家細胞からのGNTI-122組換えTregの製造方法を示す。

【0205】

【図21】製造方法におけるGNTI-122細胞の選択的な拡大増殖を示す。GNTI-122細胞の頻度は、フローサイトメトリーにより測定される。編集の3日後（左）と凍結保存時（右）のGNTI-122細胞とmock組換え細胞のFACS分析を示す。

【0206】

【図22A-22E】GNTI-122 Treg細胞およびmock組換え細胞に対するラパマイシン刺激の効果を示す。図22Aは、インビボ生着させたGNTI-122 Treg細胞に対するラパマイシン投与の効果を示す。図22Bは、培養において様々な用量のラパマイシンに回答したGNTI-122細胞またはmock組換え細胞におけるリン酸化STAT5 (pSTAT5) の蛍光強度の中央値 (MFI) を示す。細胞の種類、用量および相互作用については、反復測定分散分析を実施し ($p < 0.0001$)、各用量についてはSidakの多重比較検定を行った ($*p < 0.05$ 、 $***p < 0.001$)。エラーバーは、平均値 $\pm$ SEM (N=3のドナー) を示す。mock組換え細胞とGNTI-122細胞のいずれでも、CD3+CD4+生細胞集団にゲートをかけた。図22Cは、TCR刺激なしでの10mMラパマイシンの存在下での培養における（増殖倍率として測定した）細胞の生存率を示す。図22Dは、抗CD3/CD28ビーズでTCRを刺激した際の、10mMラパマイシンの存在下での培養における（増殖倍率として測定した）細胞の生存率を示す。図22Eは、0~30nMの濃度のラパマイシンの存在下においてTCRを刺激した際の増殖倍率を示す。二元配置分散分析とTukeyの多重比較検定を実施し、8日目の対応する条件での有意性を示す ($*p < 0.05$ 、 $**p < 0.01$ 、 $***p < 0.001$ 、 $****p < 0.0001$)。

【0207】

【図23A-23H】GNTI-122細胞およびmock組換え細胞によるTreg関連マーカーの発現とTエフェクター (Teff) 細胞の抑制を示す。GNTI-122細胞とこれに対応するmock対照を並行して作製し、解凍後に培地中で3日間休ませ、染色を行った。mock編

10

20

30

40

50

集細胞はCD4⁺細胞でゲートをかけ、GNTI-122細胞は、膵島特異的T細胞受容体 (isTCR)⁺FoxP3⁺細胞でゲートをかけた。図23Aおよび図23Bは、1人のドナーの代表的なデータを示し、6人の異なるドナーから独立して製造した細胞においても、この表現型が再現された。図23Cは、GNTI-122と同じTCRを発現するTeff細胞の直接的な抑制を示す。図23Dは、別の1型糖尿病関連抗原 (プレプロインスリン (PPI)) に特異的な別のTCRを発現するTeff細胞のバイスタンダー抑制を示す。図23Eは、1型糖尿病関連抗原の9種のコグネイトペプチドに特異的なTCRを発現するポリクローナルTeff細胞集団の抑制を示す。図23Fは、1型糖尿病を有する対象から作製したEngTregの編集効率を示す。図23Gは、1型糖尿病を有する対象から作製したEngTregの濃縮効率を示す。図23Hは、1型糖尿病を有する対象から作製したEngTregの表現型解析を示す。

10

【0208】

【図24A-24B】GNTI-122細胞のインビトロ特性を示す。図24Aは、PMA/イオノマイシン/モネンシンによる刺激または抗CD3/CD28ビーズによる刺激を与えた後の、mock組換え細胞、GNTI-122細胞のみ、またはラパマイシンと接触させたGNTI-122細胞によるサイトカインの産生およびTreg活性化マーカーの発現を示す。相対MFIレベルはmock細胞に正規化した。***または****は、二元配置分散分析による統計学的有意差を示す。代表的なドナーのデータを示しており、6人の独立したドナーでも同様のデータが再現された。図24Bは、mock組換え細胞またはGNTI-122細胞による、同じisTCRを発現するTeff細胞の抑制を示す。mock組換え細胞またはGNTI-122細胞は、isTCR⁺FoxP3⁻自家Teff細胞と共培養し、isTCRによって認識されるコグネイトペプチドを担持した単球由来樹状細胞で刺激した。抑制率は、Teffの活性化をフローサイトメトリーで分析することによって測定したTeffの抑制を示す。***または****は、二元配置分散分析による統計学的有意差を示す。代表的なドナーのデータを示しており、3人の独立したドナーでも同様のデータが再現された。

20

【0209】

【図25A-25C】養子移入1型糖尿病モデルにおけるマウス組換えTreg治療の実験計画と有効性を示す。図25Aは、実験のタイムラインを示す。図25B~25Cは、非肥満糖尿病 (NOD) マウスから得た脾細胞 (T1D脾細胞) を静脈内注射した後に、マウスBD C2.5組換え制御性T細胞 (mEngTreg) を静脈内注射した際の、T1D脾細胞投与の7日後または15日後におけるNOD.Cg-Prkdc^{scid} Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ (NSGTM) レシピエントマウスの糖尿病の発症なしでの生存率 (図25B) と血糖値 (図25C) を示す。

30

【0210】

【図26A-26B】インビボでのmEngTregの局在と抑制機能を示す。0日目に、T1D脾細胞をマウスに投与し、T1D脾細胞の投与の14日後にmEngTregで処置するか、処置を行わずに、22日目に安楽死させ、血液、骨髄、肝臓、膵臓および脾臓におけるmEngTreg細胞とCD8⁺Teffメモリー細胞を定量した。図26Aは、mEngTreg (isTCR⁺FoxP3⁺) の定量を示す。図26Bは、CD8⁺Tエフェクターメモリー (CD44⁺CD62L⁻) 細胞の定量を示す。

【0211】

【図27A-27C】膵島炎症の低下とβ細胞の保護を示す。図25A~25Cに示したマウスを、T1D脾細胞を投与した43日後に安楽死させ、膵臓の組織学的分析を行った。図27Aは、ヘマトキシリン・エオシン (H&E) 染色で定量した膵島炎症の重症度を示す。図27Bは、膵臓のインスリン染色によるβ細胞量の定量を示す。1匹のマウスにつき約20個の膵島を定量した。図27Cは、T1D脾細胞の投与の43日後における、T1D脾細胞のみまたはT1D脾細胞とmEngTregを投与したマウスから摘出した膵臓の代表的なH&E染色とインスリン染色を示す。

40

【0212】

【図28】糖尿病誘発性脾細胞の投与の7日後にmEngTregを投与したマウス研究を行ったことを示す。

【0213】

50

【図29A-29E】CD4+T細胞を編集して様々なTCRのうちの1つを発現させ、編集した細胞の表現型を評価した結果を示す。図29Aは、CD4+T細胞の編集、刺激および分析の概要を示す。図29Bは、刺激後に細胞表面マーカーであるCD69、CD137およびCD154の発現を評価するための代表的なゲート戦略を示す（8日目）。図29Cは、コグネイトペプチドであるIGRP 305-324またはIGRP 241-260でパルスしたHLA-DR発現K562細胞で20時間刺激後の細胞表面マーカー（CD69、CD137およびCD154）の発現を示す。図29Dは、刺激後にTNF- α とIFN- γ の産生を評価するための代表的なゲート戦略を示す（14日目）。図29Eは、コグネイトペプチドであるIGRP 305-324またはIGRP 241-260でパルスしたHLA-DR発現K562細胞で5時間刺激後のTNF- α とIFN- γ の産生を示す。

10

【0214】

【図30A-30B】IGRP 305-324ペプチドによる刺激に対するT1D TCR発現CD4+T細胞の用量反応を示す。HLA-DR4発現K562細胞の存在下で細胞を20時間培養し、フローサイトメトリーで分析した。図30Aは、CD154の細胞表面発現の強度から測定した用量反応を示す。図30Bは、CD137発現細胞の割合から測定した用量反応を示す。破線＝（ドナー由来の）各細胞集団の最大反応の50%。

【0215】

【図31A-31D】IGRP 305-324ペプチドにおける置換に対するT1D2の寛容性を示す。図31Aと図31Bは、アラニンで置換した様々なペプチドのうちの1つでパルスした抗原提示細胞の存在下において、CD154発現の強度（図31A）またはCD137発現細胞の割合（図31B）で測定したT1D2 TCR発現CD4+T細胞の活性化を示す。様々な位置でアラニンで置換した様々なペプチドのうちの1つまたはIGRP 305-324ペプチドでパルスしたHLA-DR4発現K562細胞の存在下でT細胞を20時間培養し、フローサイトメトリーで分析した。図31Cと図31Dは、ヒト関連病原体に由来する潜在的にオフターゲットな様々なペプチドのうちの1つでパルスした抗原提示細胞の存在下において、CD154の発現強度（図31C）またはCD137発現細胞の割合（図31D）で測定したT1D2 TCR発現CD4+T細胞の活性化を示す。「対照」は、ZNT266 TCRを発現するCD4+T細胞を示す。

20

【0216】

【図32】1型糖尿病であると最近診断された成人対象者および小児対象者においてGN TI-122細胞を評価するための第1/2相試験の試験デザインの概要を示す。

30

【0217】

【図33A】相同組換え修復を介したFOXP3遺伝子の編集とレンチウイルスベクターによるTCRの形質導入とによる腓島特異的EngTregの作製を示す。初代ヒトCD4+T細胞から腓島特異的EngTregを作製し、この腓島特異的EngTregを濃縮するための主な工程のタイムラインを示す。0日目に、CD3/CD28ビーズでT細胞を活性化し、1日目に、（腓島特異的TCRをコードする）レンチウイルスベクターで形質導入した。7日目に、フローサイトメトリーで、腓島特異的TCRとTregマーカーの発現を評価した（mTCR、CD25、CD127、CTLA-4およびICOS）。10日目に、LNGFR磁気ビーズで腓島特異的EngTregを濃縮した。

40

【0218】

【図33B】FOXP3座位の模式図を示す（上段）。エキソンを四角枠で示す。MNDプロモーター、切断型LNGFRのコード配列およびP2A（2A）配列が挿入されるように、AA V6ドナー鑄型（下段）を設計した。遺伝子編集が成功した場合、MNDプロモーターによってLNGFRとFOXP3の発現が誘導される。

【0219】

【図33C】代表的なフローサイトメトリープロット（7日目、遺伝子編集の4日後）を示す。左パネルに、遺伝子編集した細胞におけるFOXP3とLNGFRの共発現を示し、左パネルから右へ順に、LNGFR+FOXP3+細胞にゲートをかけたmTCR、CD25、CD127、CTLA-4およびICOSの発現を示す。

50

【0220】

【図33D】代表的なフローサイトメトリープロット（10日目、遺伝子編集の7日後）を示す。抗LNGFR磁気ビーズで濃縮した後のLNGFR+細胞の純度を示す。LNGFR+細胞の濃縮の際に、LNGFR-T細胞も回収して、インビトロ抑制アッセイの対照として使用した。

【0221】

【図33E】臍島TCRを形質導入したT細胞におけるTCRの発現と、このT細胞の抗原特異的な増殖を示す。ヒト臍島特異的TCRの可変領域（huV- α とhuV- β ）およびマウスTCRの定常領域（muV- α とmuV- β ）を含むレンチウイルス臍島特異的TCRの構造を示した模式図を示す。

10

【0222】

【図33F】臍島特異的TCRを形質導入したヒトCD4+T細胞における臍島特異的TCRの発現の確認を示す。CD4+T細胞を単離し、CD3/CD28ビーズで活性化し、臍島特異的TCRをコードする各レンチウイルスによる形質導入を行った。フローサイトメトリープロットは、形質導入の7日後に、マウスTCR定常領域に特異的な抗体を用いて、CD4+T細胞におけるmTCRの発現を分析した結果を示す。

【0223】

【図33G】各臍島TCRにより認識されるコグネイトペプチドとAPCの存在下における、各臍島TCRを形質導入したCD4+T細胞の増殖を示す。各TCRを形質導入したCD4+T細胞をcell trace violetで標識した後、各TCRにより認識されるコグネイトペプチド（または無関係なペプチド）およびAPC（放射線照射したPBMC）と4日間共培養した。フローサイトメトリープロットは、CTVの希釈を指標として測定した細胞増殖を示す。

20

【0224】

【図33H】図33Fに示した臍島特異的TCRを形質導入したCD4 T細胞におけるmTCRの発現量の比較を示す。

【0225】

【図34A】臍島特異的EngTregが、抗原により誘導されたTeffの増殖を抑制することを示す。Teffと同じ臍島抗原特異性を持つEngTregによるTeffの直接的な抑制を示した模式図を示す。この図に示すEngTregとTeffはいずれも、IGRP₃₀₅₋₃₂₄に特異的なT1D5-2 TCRを発現している。

30

【0226】

【図34B】抗CD3/CD28抗体コーティングビーズの存在下（上段）、またはコグネイトペプチド（IGRP₃₀₅₋₃₂₄）とAPCの存在下（下段）において、EF670で標識したEngTregまたは対照EngTregと共培養したT1D5-2 Teffの（CTVの希釈により測定した）増殖を示した代表的なヒストグラムを示す。各ヒストグラムは、EF670-細胞にゲートをかけたものである。

【0227】

【図34C】ポリEngTreg、LNGFR-T細胞、またはT1D5-2 TCR（左）、PPI76 TCR（中央）もしくはGAD65 TCR（右）を持つ臍島特異的EngTregによる、CD3/CD28ビーズで誘導されたTeffの増殖の抑制率を示す。

40

【0228】

【図34D】ポリEngTreg、LNGFR-T細胞、またはT1D5-2 TCR（左）、PPI76 TCR（中央）もしくはGAD65 TCR（右）を持つ臍島特異的EngTregによる、抗原により誘導されたTeffの増殖の抑制率を示す。T1D5-2 TCRにより認識されるコグネイトペプチドはIGRP₃₀₅₋₃₂₄であり、PPI76 TCRにより認識されるコグネイトペプチドはPPI76-90であり、GAD65 TCRにより認識されるコグネイトペプチドはGAD65₂₆₅₋₂₈₄であった。図34Cおよび図34Dにおいて、データは、3人の異なる健常ドナーから作製した細胞を用いた3つの独立した実験の平均値 $\pm$ SDとして示す。P値は、対応のある両側スチューデントt検定を用いて計算した（*P<0.05および**P<0.01）。

【0229】

50

【図34E】 臍島特異的なEngTregおよび臍島特異的なTeffの作製とインビトロ抑制アッセイの主な工程とそのタイムラインを示す。CD3/CD28ビーズでCD4⁺T細胞を活性化した後に、TCRを形質導入してTeffを作製した。Teffを拡大培養し、15日目に回収した。EngTregの作製手順は図109Aに示している。APC（放射線照射した自家PBMC）と様々なペプチドの存在下、またはCD3/CD28ビーズの存在下において、EngTregまたはLNGFR-T細胞とTeffを共培養するか、これらのT細胞を加えずにTeffを培養した。共培養を行う前に、Teffをcell trace violet（CTV）で標識し、EngTregおよびLNGFR-T細胞をEF670で標識した。3日間または4日間インキュベートした後、細胞を回収し、染色してフローサイトメトリーで分析した。

【0230】

【図34F】 CD3/CD28ビーズの存在下において、様々なTreg:Teff比でポリEngTregまたはT1D4 EngTregとT1D4 Teffを共培養した際の、T1D4 Teffの増殖を示した代表的なヒストグラムを示す。

【0231】

【図34G】 図34Fに示したCD3/CD28抑制アッセイと並行して行った、コグネイトペプチド（IGRP₂₄₁₋₂₆₀）とAPCの存在下におけるT1D4 Teffの増殖を示した代表的なヒストグラムを示す。

【0232】

【図34H】 ポリEngTregまたはT1D4 EngTregによる、CD3/CD28ビーズで誘導したTeffの増殖の抑制率を示す。

【0233】

【図34I】 ポリEngTregまたはT1D4 EngTregによる、抗原で誘導したTeffの増殖の抑制率を示す。図34Hおよび図34Iにおいて、データは、4人の異なる健常ドナーから作製した細胞を用いた5つの独立した実験の平均値±SDとして示す。P値は、対応のある多重t検定を用いて計算した（***P<0.005）。

【0234】

【図35A】 臍島特異的EngTregが、抗原により誘導されたTeffからのサイトカインの産生を抑制することを示す。抗原特異的抑制アッセイにおける、Teffからのサイトカインの産生（TNF- α 、IL-2およびIFN- γ ）とTeffの活性化（CD25の発現）を示した代表的なフローサイトメトリープロットを示す。T1D5-2 TCRにより認識されるコグネイトペプチドであるIGRP₃₀₅₋₃₂₄とAPCの存在下において、T1D5-2 Teffのみを培養するか、ポリクローナルEngTreg、LNGFR-T細胞またはT1D5-2 EngTregと共培養した。

【0235】

【図35B】 ポリEngTreg、LNGFR-T細胞または臍島特異的T1D5-2 EngTregによる、抗原により誘導されたT1D5-2 TeffからのTNF α （左）、IL-2（中央）およびIFN γ （右）の産生の抑制率を示す。

【0236】

【図35C】 ポリEngTreg、LNGFR-T細胞または臍島特異的T1D5-2 EngTregによる、抗原により誘導されたT1D5-2 TeffからのCD25の発現の抑制率を示す。図35Bおよび図35Cにおいて、データは、4人の異なる健常ドナーから作製した細胞を用いた4つの独立した実験の平均値±SDとして示す。P値は、対応のある両側スチューデントt検定を用いて計算した（*P<0.05、**P<0.01および***P<0.001）。

【0237】

【図36A】 臍島特異的EngTregが、バイスタンダーTeffの増殖を抑制することを示す。異なる臍島抗原特異性を持つEngTregによるTeffのバイスタンダー抑制を示した模式図を示す。この模式図では、IGRP₂₄₁₋₂₆₀に特異的なT1D4 TCRを発現するEngTregと、IGRP₃₀₅₋₃₂₄に特異的なT1D5-2 TCRを発現するTeffを示している。

【0238】

【図36B】 IGRP₃₀₅₋₃₂₄ペプチドのみとAPCの存在下（上段）、またはIGRP₃₀₅₋₃₂

10

20

30

40

50

4ペプチドとIGRP₂₄₁₋₂₆₀ペプチドの混合物とAPCの存在下（下段）において、T1D5-2 EngTreg、T1D4 EngTregまたはポリEngTregと共培養したT1D5-2 Teffの（CTVの希釈により測定した）増殖を示した代表的なヒストグラムを示す。EngTregはEF670で標識し、各ヒストグラムは、EF670-細胞でゲートしたものである。

【0239】

【図36C】IGRP₃₀₅₋₃₂₄ペプチドとIGRP₂₄₁₋₂₆₀ペプチドの混合物とAPCの存在下での、ポリEngTreg、T1D5-2 EngTregまたはT1D4 EngTregによるT1D5-2 Teffの増殖抑制率を示す。

【0240】

【図36D】IGRP₃₀₅₋₃₂₄ペプチドのみとAPCの存在下（上段）、またはIGRP₃₀₅₋₃₂₄ペプチドとGAD₂₆₅₋₂₈₄ペプチドの混合物とAPCの存在下（下段）において、ポリEngTregまたはGAD265 EngTregと共培養したT1D5-2 Teffの（CTVの希釈により測定した）増殖を示した代表的なヒストグラムを示す。EngTregはEF670で標識し、各ヒストグラムは、EF670-細胞でゲートしたものである。

【0241】

【図36E】IGRP₃₀₅₋₃₂₄ペプチドとGAD₂₆₅₋₂₈₄ペプチドの混合物とAPCの存在下での、ポリEngTregまたはGAD265 EngTregによるT1D5-2 Teffの増殖抑制率を示す。

【0242】

【図36F】IGRP₃₀₅₋₃₂₄ペプチドとIGRP₂₄₁₋₂₆₀ペプチドの混合物とAPCの存在下での、ポリEngTreg、T1D5-2 EngTregまたはT1D4 EngTregによる、T1D5-2 Teffからのサイトカインの産生の抑制率を示す。

【0243】

【図36G】IGRP₃₀₅₋₃₂₄ペプチドとIGRP₂₄₁₋₂₆₀ペプチドの混合物とAPCの存在下での、ポリEngTreg、T1D5-2 EngTregまたはT1D4 EngTregによる、T1D5-2 TeffからのCD25の発現の抑制率を示す。図36C、図36E、図36Fおよび図36Gにおいて、データは、3人の異なる健常ドナーから作製した細胞を用いた3つの独立した実験の平均値±SDとして示す。P値は、対応のある両側学生t検定を用いて計算した（*P<0.05、P<0.01およびP<0.005）。3つの実験のいずれでも、陰性対照として、T1D5-2 TCRまたはT1D4 TCRを有するLNGFR-T細胞を使用した。これらの陰性対照細胞は、有意な抑制を示さなかった。

【0244】

【図36H】CD3/CD28ビーズで誘導したTeffの増殖が、異なる種類の脾島特異的EngTregにより同程度に抑制されたことを示す。TCRを形質導入していないFOXP3編集細胞（-）、またはT1D4 TCRもしくはT1D5-2 TCRを形質導入したFOXP3編集細胞におけるmTCRの発現を示した代表的なフローサイトメトリープロットを示す。7日目に、編集細胞を染色し、生細胞、CD3+、CD4+、LNGFR+、FOXP3+にゲートをかけた。

【0245】

【図36I】図36Bおよび図36Cに示したバイスタンダー抑制アッセイと並行して実施したCD3/CD28ビーズ抑制アッセイにおけるT1D5-2 Teffの増殖を示した代表的なヒストグラムを示す。Tregの非存在下（-）、またはポリクローナルEngTreg、T1D5-2 EngTregもしくはT1D4 EngTregの存在下で、T1D5-2 TeffをCD3/CD28ビーズとインキュベートした。

【0246】

【図36J】図36Iに示した実験での、ポリEngTreg、T1D5-2 EngTregまたはT1D4 EngTregによる、CD3/CD28ビーズで誘導したT1D5-2 Teffの増殖の抑制率を示す。

【0247】

【図36K】図36Dおよび図36Eに示したバイスタンダー抑制アッセイと並行して実施したCD3/CD28ビーズ抑制アッセイにおけるT1D5-2 Teffの増殖を示した代表的なヒストグラムを示す。Tregの非存在下（-）、またはポリEngTregもしくはGAD265 En

10

20

30

40

50

gTregの存在下で、T1D5-2 TeffをCD3/CD28ビーズとインキュベートした。

【0248】

【図36L】図36Kに示した実験での、ポリEngTregまたはGAD265 EngTregによる、CD3/CD28ビーズで誘導したT1D5-2 Teffの増殖の抑制率を示す。図36Jおよび図36Lにおいて、データは、3人の異なる健常ドナーから作製した細胞を用いた3つの独立した実験の平均値±SDとして示す。P値は、対応のある両側スチューデントのt検定を用いて算出した。

【0249】

【図36M】膵島特異的EngTregによる、バースタンダーTeffからのサイトカインの産生の抑制を示した代表的なヒストグラムを示す。抗原特異的バースタンダー抑制アッセイにおける、T1D5-2 TeffからのTNF α の産生を示した代表的なヒストグラムを示す。各ヒストグラムの凡例は図36Mと同様である。

【0250】

【図36N】抗原特異的バースタンダー抑制アッセイにおける、T1D5-2 TeffからのIL-2の産生を示した代表的なヒストグラムを示す。各ヒストグラムの凡例は図36Mと同様である。

【0251】

【図36O】抗原特異的バースタンダー抑制アッセイにおける、T1D5-2 TeffからのIFN γ の産生を示した代表的なヒストグラムを示す。各ヒストグラムの凡例は図36Mと同様である。

【0252】

【図36P】抗原特異的バースタンダー抑制アッセイにおける、T1D5-2 TeffからのCD25の発現を示した代表的なヒストグラムを示す。各ヒストグラムの凡例は図36Mと同様である。図36M～36Pでは、IGRP₃₀₅₋₃₂₄ペプチドのみとAPCの存在下、またはIGRP₃₀₅₋₃₂₄ペプチドとIGRP₂₄₁₋₂₆₀ペプチドの混合物とAPCの存在下において、T1D5-2 TeffをTregなしで培養するか、ポリEngTreg、T1D5-2 EngTregまたはT1D4 EngTregと共培養した。

【0253】

【図37A】膵島特異的EngTregが、1型糖尿病ドナーから得られたPBMCに由来するポリクローナル膵島特異的Teffを抑制することを示す。1型糖尿病ドナーから得られたPBMCからの膵島特異的EngTreg、ポリクローナル膵島特異的Teffおよび単球由来DC (mDC) の製造と、インビトロ抑制アッセイのタイムラインと、それらの主な工程を示す。

【0254】

【図37B】CD3/CD28ビーズの存在下（上段）、または膵島特異的抗原（9種の膵島特異的ペプチドと単球由来DC (mDC) ）の存在下（下段）において、T1D2 EngTreg、4.13 EngTreg、LNGFR-T細胞またはポリEngTregと共培養したポリクローナル膵島特異的Teffの（CTVの希釈により測定した）増殖を示した代表的なヒストグラムを示す。EngTregはEF670で標識し、各ヒストグラムは、EF670-細胞にゲートをかけたものである。

【0255】

【図37C】T1D2 EngTreg、4.13 EngTreg、LNGFR-T細胞またはポリEngTregによる、CD3/CD28で誘導したポリクローナル膵島特異的Teffの増殖の抑制率を示す。

【0256】

【図37D】T1D2 EngTreg、4.13 EngTreg、LNGFR-T細胞またはポリEngTregによる、抗原で誘導したポリクローナル膵島特異的Teffの増殖の抑制率を示す。抗原による刺激は、mDCの存在下で9種の膵島特異的ペプチドプールにより行った。データは、3人の1型糖尿病ドナーから作製した細胞を用いた3つの独立した実験の平均値±SDとして示す。P値は、対応のある両側スチューデントt検定を用いて計算した（*P<0.05、**P<0.01および***P<0.0001）。陰性対照として、mDCおよびDMSOの存在下での共培養も行ったところ、Teffの有意な増殖は認められなかった。

10

20

30

40

50

【0257】

【図37E】1型糖尿病ドナーから得られたPBMC由来の、複数の特異性を持つ膵島特異的T細胞の拡大培養を示し、ペプチド刺激により膵島特異的T細胞を拡大培養するためのタイムラインと、その主な工程を示す。GAD65に特異的な膵島ペプチド（5種類）、IGRPに特異的な膵島ペプチド（3種類）およびPPIに特異的な膵島ペプチド（1種類）を含む、HLA-DR0401に拘束された9種の膵島ペプチドと、放射線照射した自家APC（CD4-CD25+）とで、1型糖尿病ドナーから単離したCD4+CD25-T細胞を刺激し、12～14日目にテトラマー染色を行った。IL-2を添加せずに7日目までT細胞を培養した後、2～3日ごとにIL-2を添加して拡大培養を行った。

【0258】

【図37F】個々の抗原性ペプチドに特異的なテトラマー陽性T細胞を示した代表的なフローサイトメトリープロットを示す。陰性染色として、テトラマーを使用せずに染色を行った。各細胞はCD4+T細胞にゲートをかけたものであり、各割合は、バックグラウンドに対するテトラマー染色の程度を示している。

【0259】

【図37G】3人の1型糖尿病ドナー由来のCD4+T細胞をインビトロで12～14日間ペプチド刺激した5つの異なる実験において、CD4+T細胞中のテトラマー陽性集団の割合を測定し、その結果を合わせたものを示す。各棒は、各膵島抗原性ペプチドに特異的なCD4+T細胞の割合を示す。各ドットは1つの実験を示す。

【0260】

【図37H】膵島特異的EngTregが、ポリクローナル膵島特異的Teffの抑制において、tTregよりも優れていることを示す。抗CD3/CD28抗体コーティングビーズの存在下（上段）または9種の膵島特異的ペプチドのプールとmDCの存在下（下段）におけるポリクローナル膵島特異的Teffの増殖を並行して測定した結果を示した代表的なヒストグラムを示す。ポリクローナル膵島特異的TeffをTregなし（-）で培養するか、T1D2 LNGFR-、T1D2 EngTregまたはtTregと共培養した。tTregは、CD4+CD25+CD127-で選別し、EngTregと同様にして培養した。CD3/CD28ビーズでtTregを2日間活性化し、拡大培養し、10日目に回収した。抑制アッセイに使用した細胞はいずれも1型糖尿病ドナーから調製した自家細胞であった。陰性対照として、単球由来DC（mDC）およびDMSOの存在下での共培養も行ったところ、Teffの有意な増殖は認められなかった。

【0261】

【図37I】T1D2 LNGFR-細胞、T1D2 EngTregまたはtTregによる、CD3/CD28ビーズで誘導したポリクローナル膵島特異的Teffの増殖の抑制率を示す。

【0262】

【図37J】T1D2 LNGFR-細胞、T1D2 EngTregまたはtTregによる、抗原で誘導したポリクローナル膵島特異的Teffの増殖の抑制率を示す。

【0263】

【図38A】膵島特異的EngTregがAPCの成熟を阻害し、細胞同士の接触に依存する機構と細胞同士の接触に依存しない機構の両方を利用してTeffを抑制することを示す。透過膜により分離された上部チャンバーと下部チャンバーを利用したトランスウェル抑制アッセイの模式図を示す。

【0264】

【図38B】CTVの希釈により測定した、下部チャンバー（左パネル）または上部チャンバー（右パネル）におけるポリクローナル膵島特異的Teffの増殖抑制率を示す。陽性対照として、ポリクローナル膵島特異的TeffをT1D2 EngTregと共培養した。データは、3人の1型糖尿病ドナーから作製した細胞を用いた3つの独立した実験の平均値±SEMとして示す。対応のあるt検定で求めた**P<0.001、*P<0.01、*P<0.05を示す。

【0265】

【図38C】DCの成熟とAPC調節アッセイのタイムラインと、その主な工程を示す。

10

20

30

40

50

【0266】

【図38D】mDCにおけるCD86の発現の正規化したMFIを示す。HLA-DR0401に拘束された成熟自家mDCを、IGRP₃₀₅₋₃₂₄ペプチドの存在下において、T1D2 EngTregまたはLNGFR-T細胞と2日間共培養した。DC上のCD86のMFIは、DCのみの条件で測定したMFIで正規化した。データは、3人の異なる健常ドナーから作製した細胞を用いた3つの独立した実験の平均値±SDとして示す。対応のあるt検定で求めた* $P < 0.05$ を示す。

【0267】

【図38E】T1D2 EngTregの存在下で、外因性ヒトIL2 (0.1IU/ml) を添加して、膵島特異的抗原 (IGRP₃₀₅₋₃₂₄を含む10種の抗原) およびmDCと共培養したポリクローナル膵島特異的Teffの増殖を示した代表的なヒストグラムを示す。共培養を行う前に、TeffをCTVで標識し、EngTregをEF670で標識し、CTVの希釈を測定して増殖を評価した。

10

【0268】

【図38F】図38Eに示したTeffの増殖抑制率を示す。この増殖抑制率は、外因性ヒトIL2の非存在下と外因性ヒトIL2の存在下とで別々に計算した。データは、3人の1型糖尿病ドナーから作製した細胞を用いた3つの独立した実験の平均値±SEMとして示す。N.s: 対応のあるt検定で求めた有意差なしを示す。

【0269】

【図38G】膵島特異的EngTregが、接触依存性のバイスタンダー抑制と接触非依存性のバイスタンダー抑制を示すことを示す。膵島特異的EngTregによるバイスタンダー抑制の機構を調べるために、ポリクローナル膵島特異的Teffを作製した。GAD₆₅₁₁₃₋₁₃₂、GAD₂₆₅₋₂₈₄、GAD₂₇₃₋₂₉₂、GAD₃₀₅₋₃₂₄、IGRP₁₇₋₃₆、IGRP₂₄₁₋₂₆₀、PPI₇₆₋₉₀またはZNT₈₂₆₆₋₂₈₅に特異的な膵島ペプチドを含む、HLA-DR0401に拘束された9種の膵島ペプチドと、放射線照射した自家APC (CD4-CD25+) とで、1型糖尿病ドナーから単離したCD4+CD25-T細胞を刺激し、14日目または15日目にテトラマー染色を行った。IGRP₃₀₅₋₃₂₄ペプチドに特異的なT1D2 TCRは、Teffの拡大培養から除外した。個々の抗原性ペプチドに特異的なテトラマー陽性T細胞を示した代表的なフローサイトメトリープロットを示す。陰性染色として、テトラマーを使用せずに染色を行った。各細胞はCD4+T細胞にゲートをかけたものであり、各割合は、バックグラウンドに対するテトラマー染色の程度を示している。

20

30

【0270】

【図38H】3人の1型糖尿病ドナー由来のCD4+T細胞をインビトロで14~15日間ペプチド刺激した後、該CD4+T細胞中のテトラマー陽性集団の割合を測定し、その結果を合わせたものを示す。各棒は、各膵島抗原性ペプチドに特異的なCD4+T細胞の割合を示す。各ドットは異なる1型糖尿病ドナーを示す。

【0271】

【図38I】下部ウェル（下段）または上部ウェル（上段）におけるポリクローナル膵島特異的Teffの増殖を示した代表的なヒストグラムを示す。膵島特異的ペプチドのプール (IGRP₃₀₅₋₃₂₄を含む10種の抗原) を負荷したmDCを、下部ウェルと上部ウェルに播種した。ポリクローナル膵島特異的Teffおよび／またはT1D2 EngTregを、グラフに示すように下部ウェルおよび／または上部ウェルに添加した。

40

【0272】

【図38J】樹状細胞におけるCD86の発現を膵島特異的EngTregが抑制することを示す。HLA-DR0401に拘束された自家単球を、GM-CSF/IL-4とIFN γ /CL075でDCに成熟させた。CTVで標識した膵島TCR発現EngTregまたは膵島TCR発現LNGFR-T細胞と成熟DCを、コグネイトペプチドの存在下で共培養した。2日間インキュベートした後、細胞を回収し、染色してフローサイトメトリーで分析した。

【0273】

【図38K】T1D2 EngTregまたはLNGFR-T細胞と共培養したDC上のCD86のMFIを

50

示した代表的なデータを示す。

【0274】

【図38L】IGRP₂₄₁₋₂₆₀ペプチドの存在下でT1D4 EngTregまたはLNGFR-T細胞と共培養したDCにおけるCD86の正規化した発現量（左のグラフ）と、PPI₇₆₋₉₀ペプチドの存在下で、PPI76 EngTregまたはLNGFR-T細胞と共培養したDCにおけるCD86の正規化した発現量（右のグラフ）を示した棒グラフを示す。

【0275】

【図38M】特異的TCRなし（ポリ）、T1D2 TCRまたは4.13 TCRを形質導入したFOX P3編集細胞におけるmTCRの発現を示す。7日目に、編集細胞を染色し、生細胞、CD3+、CD4+、LNGFR+にゲートをかけた。抗LNGFR磁気ビーズを用いて濃縮したLNGFR+細胞（EngTreg）とLNGFR-T細胞を、図194A～194Dに示した抑制アッセイで使用した。

10

【0276】

【図38N】CD3/CD28ビーズの存在下（上段）またはmDCと9種の膵島特異的ペプチドプールの存在下（下段）におけるポリクローナル膵島特異的Teffの増殖を並行して測定した結果を示した代表的なヒストグラムを示す。ポリクローナル膵島特異的Teffは、Tregなし（-）で培養するか、T1D2 LNGFR-細胞、T1D2 EngTregまたはtTregと共培養した。tTregは、CD4+CD25+CD127-で選別し、EngTregと同様にして培養した。CD3/CD28ビーズでtTregを2日間活性化し、拡大培養し、10日目に回収した。抑制アッセイに使用した細胞はいずれも1型糖尿病ドナーから調製した自家細胞であった。陰性対照として、単球由来DC（mDC）およびDMSOの存在下での共培養も行ったところ、有意なTeffの増殖は認められなかった（データ示さず）。

20

【0277】

【図38O】T1D2 LNGFR-細胞、T1D2 EngTregまたはtTregによる、CD3/CD28ビーズで誘導したポリクローナル膵島特異的Teffの増殖の抑制率を示す。

【0278】

【図38P】T1D2 LNGFR-細胞、T1D2 EngTregまたはtTregによる、抗原で誘導したポリクローナル膵島特異的Teffの増殖の抑制率を示す。このグラフでは、2つの独立した実験から得た代表的なデータを示している。

【0279】

【図39A】T1D2 TCR、T1D4 TCRまたはPPI76 TCRを発現するT細胞のペプチド用量反応を示したグラフを示す。T1D2 TCR、T1D4 TCRまたはPPI76 TCRを形質導入したCD4+T細胞を、各TCRにより認識される様々な濃度のコグネイトペプチド、すなわち、IGRP₃₀₅₋₃₂₄、IGRP₂₄₁₋₂₆₀、PPI₇₆₋₉₀のそれぞれの存在下において、APCと4日間共培養した。3つの独立した実験の代表的な結果を示す。

30

【0280】

【図39B】T1D2 EngTreg、T1D4 EngTregまたはPPI76 EngTregによる、抗原で誘導したポリクローナル膵島特異的Teffの増殖の抑制率を示す。データは、4人の異なる1型糖尿病ドナーから作製した細胞を用いた4つの独立した実験の平均値±SEMとして示す。P値は、対応のある両側スチューデントt検定を用いて計算した（*P<0.05および**P<0.01）。

40

【0281】

【図39C】T1D2 TCR、T1D5-1 TCRまたはT1D5-2 TCRを発現するT細胞のペプチド用量反応を示したグラフを示す。T1D2 TCR、T1D5-1 TCRまたはT1D5-2 TCRを形質導入したCD4+T細胞を、各TCRにより認識される様々な濃度のコグネイトペプチド（IGRP₃₀₅₋₃₂₄）の存在下において、APCと4日間共培養した。3つの独立した実験の代表的な結果を示す。図39Aと図39Cに示したT細胞の用量反応では、共培養を行う前にCTVでT細胞を標識し、CTVの希釈により細胞増殖を測定した。

【0282】

【図39D】T1D2 EngTreg、T1D5-1 EngTregまたはT1D5-2 EngTregによる、

50

抗原で誘導したポリクローナル腓島特異的Teffの増殖の抑制率を示す。データは、4人の異なる1型糖尿病ドナーから作製した細胞を用いた4つの独立した実験の平均値±SEMとして示す。P値は、対応のある両側スチューデントt検定を用いて計算した(*P<0.05)。図39Bと図39Dで示した抑制アッセイでは、CD3/CD28ビーズを用いて並行して実施した抑制アッセイで得られた抑制活性を用いてデータを正規化した。抑制活性は、抑制率(%) / 最も低い抑制率(%) として計算した。正規化した抗原特異的な抑制活性は、抗原特異的アッセイでの抑制率(%) / 抑制活性として計算した。

【0283】

【図39E】T1D2 TCR、T1D4 TCRまたはPPI76 TCRを形質導入したFOXP3編集細胞における各mTCRの発現を示した代表的なフローサイトメトリープロットを示す。

10

【0284】

【図39F】図39Eに示したmTCRの発現量の比較を示す。7日目に、編集細胞を染色し、生細胞、CD3+、CD4+、LNGFR+、FOXP3+にゲートをかけた。T1D2 TCR、T1D4 TCRまたはPPI76 TCRを発現する濃縮したLNGFR+細胞(EngTreg)を抑制アッセイに使用した。

【0285】

【図39G】腓島特異的抗原(10種の腓島特異的ペプチド+単球由来DC(mDC))と、T1D2 EngTreg、T1D4 EngTregまたはPPI76 EngTregとの存在下における、ポリクローナル腓島特異的Teffの増殖を示した代表的なヒストグラムを示す。

【0286】

20

【図39H】T1D2 TCR、T1D5-1 TCRまたはT1D5-2 TCRを形質導入したFOXP3編集細胞における各mTCRの発現を示した代表的なフローサイトメトリープロットを示す。

【0287】

【図39I】図39Hに示したmTCRの発現量の比較を示す。7日目に、編集細胞を染色し、生細胞、CD3+、CD4+、LNGFR+、FOXP3+にゲートをかけた。T1D2 TCR、T1D5-1 TCRまたはT1D5-2 TCRを発現する濃縮したLNGFR+細胞(EngTreg)を抑制アッセイに使用した。

【0288】

【図39J】腓島特異的抗原(10種の腓島特異的ペプチド+mDC)と、T1D2 EngTreg、T1D5-1 EngTregまたはT1D5-2 EngTregとの存在下における、ポリクローナル腓島特異的Teffの増殖を示した代表的なヒストグラムを示す。ポリクローナル腓島特異的TeffをCTVで標識し、各EngTregをEF670で標識し、CTVの希釈を指標として細胞の増殖を測定した。

30

【0289】

【図40A】BDC2.5 CD4+T細胞の遺伝子編集によるマウス腓島特異的EngTregの作製を示す。相同組換え修復を介したFOXP3の編集に使用するための、AAV5にパッケージングされたMND LNGFR p2Aノックインドナー鑄型の模式図を示す。エキソンは、付番した四角枠で示し、FOXP3相同アームも示している。遺伝子編集が成功した場合、MNDプロモーターによって、内因性マウスFOXP3タンパク質の発現とシス配置のLNGFRの細胞表面発現が誘導される。

40

【0290】

【図40B】FOXP3遺伝子の編集、細胞分析および編集されたLNGFR細胞の濃縮を行う実験のタイムラインを示した模式図を示す。

【0291】

【図40C】mock編集した対照細胞(左)、RNPとAAVドナー鑄型で編集した後にカラムで濃縮する前のLNGFR+細胞(中央)、またはカラムで濃縮した後のLNGFR+細胞(右)におけるLNGFRの発現を示した代表的なフローサイトメトリープロット(4つの独立した実験のうちの1つ)を示す。

【0292】

【図40D】グラフに示した細胞集団におけるTreg関連マーカーの発現を示した代表的

50

なフローサイトメトリーヒストグラム（2つの独立した実験のうちの1つ）を示す。

【0293】

【図40E】 EngTregまたはmock編集細胞におけるTreg関連マーカーのMFIを示した棒グラフを示す。エラーバーは±SDを示す。EngTregとmock編集細胞を比較するため、対応のないt検定を用いてP値を算出した。

【0294】

【図40F】 BDC2.5 CD4+Teff細胞と、mock対照細胞、BDC2.5 tTreg細胞またはEngTreg細胞とを用いて実施したインビトロ抑制アッセイの模式図を示す。

【0295】

【図40G】 刺激した4日後に、グラフに示した細胞と共培養したCTV標識BDC2.5 CD4+Teffを示した代表的なフローサイトメトリープロット（3つの独立した実験のうちの1つ）を示す。

10

【0296】

【図40H】 グラフに示したTregと様々なTeff：Treg比で共培養したBDC2.5 CD4+Teffの増殖抑制率を示したグラフを示す。抑制率 = $[100 - \text{正規化した抑制率}(\%)]$; 正規化した抑制率 (%) = $100 / (\text{Teffのみの条件での増殖}) \times (\text{Tregの存在下でのTeffの増殖})$ 。

【0297】

【図41A】 ポリクローナルEngTregはインビボの1型糖尿病の発症を予防することはできないが、脾臓特異的なEngTregはインビボの1型糖尿病の発症を予防できることを示す。マウス糖尿病予防研究を行うための実験のタイムラインを示した模式図を示す。

20

【0298】

【図41B】 脾臓特異的Teffとグラフに示した細胞集団を同時に移入した後のレシピエントNSGマウスにおける糖尿病発症なしでの生存率を示したグラフを示す。データは、2つの独立した実験の結果を合わせたものである。****, $P \leq 0.0001$ 、BDC2.5 tTreg群またはEngTreg群とmock編集対照群とを比較するため、ログランク検定（マンテル・コックス検定）を用いてP値を算出した。

【0299】

【図41C】 左パネルは、BDC2.5 CD4 Teffの注入後49日目に、糖尿病を発症していないNSGレシピエントマウスの脾臓から単離されたリンパ球の代表的なフローサイトメトリープロットを示す。上段のグラフは、BDC2.5 tTregのレシピエントマウスのデータを示し、下段のグラフは、BDC2.5 EngTregのレシピエントマウスのデータを示し、これらを比較している。各フローサイトメトリープロットにおいて、事前に行ったゲートを各プロットの上部に示している。右パネルは、各フローサイトメトリープロットの（色別に示した）各ゲートにおけるFOXP3発現のヒストグラムを示す。

30

【0300】

【図41D】 各プロット（枠の上部）に示した方法で遺伝子編集したNODマウス由来CD4 T細胞（ポリクローナル；上段）およびNOD BDC2.5マウス由来CD4 T細胞（脾臓特異的；下段）におけるLNGFRの発現を示した代表的なフローサイトメトリープロットを示す。

40

【0301】

【図41E】 mock編集細胞、ポリクローナルEngTreg細胞、ポリクローナルtTreg細胞、脾臓特異的EngTreg細胞または脾臓特異的tTreg細胞と脾臓特異的Teffを同時に移入した後のレシピエントNSGマウスにおける糖尿病発症なしでの生存率を示したグラフを示す。2つの独立した実験から得たデータをまとめた結果を示す。**** $P \leq 0.0001$ 、BDC2.5 tTregまたはBDC2.5 EngTregと、ポリクローナルtTregまたはポリクローナルEngTregとをそれぞれ比較するため、ログランク検定（マンテル・コックス検定）を用いてP値を算出した。すべてのフローサイトメトリープロットは、少なくとも2回の独立した実験の代表的な結果を示す。

【0302】

50

【図 4 1 F】糖尿病誘発性NOD脾細胞を用いた糖尿病予防研究の実験スキームを示す。

【0303】

【図 4 1 G】BDC2.5 EngTregの同時移入の存在下または非存在下における糖尿病誘発性NOD Teffの注入後のレシピエントNSGマウスの糖尿病発症なしでの生存率を示したグラフを示す。1つの実験から得たデータを示す。**、 $P \leq 0.005$ 、BDC2.5 EngTreg群と糖尿病誘発性NOD Teffのみのレシピエントの比較は、ログランク検定（マンテル・コックス検定）を用いて算出した。

【0304】

【図 4 1 H】代表的な1つの膵島のH&E染色（左パネル）、抗CD3染色（中央パネル）およびインスリン染色（右パネル）を示す代表的な組織学的画像を示す。結果は、糖尿病誘発性NOD脾細胞のみで処置したNSGマウス（上パネル：糖尿病の安楽死基準を満たした時点で摘出したマウス組織）と、糖尿病誘発性NOD脾細胞とBDC2.5 EngTregを同時送達したNSGマウス（中央パネル：高血糖を発症することなく試験終了時まで生存していたマウス6）の代表的な写真を示し、週齢を一致させた未処置の対照NSGマウス（マウス22、下パネル、試験終了時に摘出）と比較した。写真はいずれも20倍の画像であり、画像中のマーカーは80 μm を示す。

【0305】

【図 4 1 I】組織学的所見のまとめを示す。組織学的検査は、図に示した各実験処置群から2匹ずつ選択したマウスに対して行った。L1およびL2は、同じ組織ブロックからstep section法により作製した標本を示す。H&E染色した各切片のすべての膵島について、膵島の内部および／またはその周囲のリンパ球の蓄積から判定することにより、リンパ球性膵島炎の重症度を評価した。次に、各2枚の切片の個々の膵島に重症度分類（正常～重症膵島炎）を割り当て、膵島炎の重症度を表に示すとともに、膵臓切片の総面積あたりの（各膵島の）面積（ mm^2 ）を示す数値を（3～6番目の列に）示した。また、これらの標本の別の組織切片を用いて、免疫組織化学分析（IHC）によりインスリンの有無を評価し、各切片において陽性に染色された膵島の総数を、「IHCによるインスリン陽性膵島」の欄に示した（7番目の列）。各切片の面積は様々に異なっていたため、各分類に割り当てられた膵島の総数を、膵臓組織切片1 mm^2 あたりの膵島の個数として表すことによって、各マウスおよび各切片の膵島の個数を正規化した。膵臓の間質における炎症は、抗CD3染色した切片を用いて評価し、0（正常）～3+のスケール（他の切片に対する相対スケール）でグレード分類した（8番目の列）。

【発明を実施するための形態】

【0306】

本開示の態様は、組換えTreg細胞を製造するための方法および組成物に関し、この組換えTreg細胞は、(i)例えばFoxP3の発現の安定化などによる安定な抑制機能を有し、(ii)1型糖尿病（T1D）関連抗原に対する特異性を有し、(iii)ラパマイシンの存在下でIL-2様シグナル伝達を示す。本実施形態は、細胞ゲノムの標的座位への2種の核酸の挿入に関する。TRAC座位に挿入される第1の核酸は、強力な構成的プロモーター（例えばMNDプロモーター）の制御下において、(a)IL-2R γ の膜貫通ドメインと細胞質内ドメインに共有結合された細胞外FK506結合タンパク質12（FKBP）ドメインを含む、ラパマイシンの存在下で細胞内IL-2シグナル伝達を提供するヘテロ二量体化可能なタンパク質複合体の第1の構成要素と、(b)T1D関連ペプチドであるIGRPに特異的なTCRのTCR β 鎖と、(c)前記TCR β 鎖とインフレームな内因性TCR α の定常領域とをコードすることから、前記TCR α 鎖と前記TCR β 鎖が一緒になって形成されたIGRP特異的なTCRがTRAC座位から発現される。FOXP3座位のTreg特異的脱メチル化領域の下流に挿入される第2の核酸は、強力な構成的プロモーター（例えばMNDプロモーター）の制御下において、(a)IL-2R β の膜貫通ドメインと細胞質内ドメインに共有結合された細胞外FKBP-ラパマイシン結合（FRB）ドメインを含む、細胞内IL-2シグナル伝達を行うための前記ヘテロ二量体化可能なタンパク質複合体の第2の構成要素と、(b)細胞内ラパマイシンによるmTORの阻害を制限するために、細胞内ラパマイシンを吸着するための

可溶性FRBドメインと、(c) FOXP3の内因性の第1のコーディングエキソンの少なくとも一部とをコードすることから、TSDRを介した調節や内因性プロモーターとは無関係に、挿入されたプロモーターによりFoxP3の発現を制御することができる。したがって、本明細書に記載の二重編集細胞は、T1D関連抗原特異的Tregであり、炎症環境（例えば炎症を起こした膵臓）において安定な抑制性表現型を保持し、ラパマイシンの存在下で制御可能な方法で増殖させることができる。

【0307】

遺伝子組換え細胞の製造方法

本開示のいくつかの態様は、細胞に2種の核酸を導入することによって遺伝子組換え細胞を製造する方法であって、2種の核酸のうち的一方が前記細胞のTRAC座位に対して相同性を有し、もう一方が該細胞のFOXP3座位に対して相同性を有することから、各座位に各核酸を挿入することによって、両方の座位が編集されることを特徴とする方法に関する。TRAC座位を標的とする第1の核酸は、（例えば、ヌクレアーゼによりTRAC座位のDNA配列を切断した後に、相同組換え修復（HDR）を行うことによって）TRAC座位に該核酸を挿入するための指向性を付与する5'相同アームと3'相同アームを含む。FOXP3座位を標的とする第2の核酸は、（例えば、ヌクレアーゼによりFOXP3座位のDNA配列を切断した後に、相同組換え修復（HDR）を行うことによって）FOXP3座位に該核酸を挿入するための指向性を付与する5'相同アームと3'相同アームを含む。細胞の別々の座位に2種の核酸をそれぞれ挿入することによって、二重編集細胞（すなわち、2つの異なる座位に各核酸がそれぞれ挿入された細胞）が得られる。

【0308】

本明細書に記載の方法の実施形態において、TRAC座位への挿入を標的とする核酸は、

(i) (a) FK506結合タンパク質12（FKBP）を含む細胞外結合ドメイン、またはFK506結合タンパク質12（FKBP）に由来する細胞外結合ドメインと、(b) IL-2R γ の膜貫通ドメインを含む膜貫通ドメイン、またはIL-2R γ 膜貫通ドメインに由来する膜貫通ドメインと、(c) IL-2R γ の細胞質内ドメインを含む細胞内シグナル伝達ドメイン、またはIL-2R γ の細胞質内ドメインに由来する細胞内シグナル伝達ドメインとを含む第1の化学誘導性シグナル伝達複合体（CISC）構成要素をコードするヌクレオチド配列；

(ii) 全長TCR β 鎖をコードするヌクレオチド配列；および

(iii) TCR α 鎖の少なくとも一部をコードするヌクレオチド配列

に作動可能に連結されたプロモーターを含む。

異種TCR α をコードする前記ヌクレオチド配列は、内因性TCR α の一部（例えばTCR α の定常ドメイン）をコードする内因性配列とインフレームに挿入されることによって、発現されたmRNAが翻訳されて、異種TCR β 鎖と会合するTCR α 鎖が生成され、TCRが形成される。TCR α 鎖の抗原結合領域は、挿入された核酸によってコードされることから、TCRの特異性は、挿入されたこの核酸によって決まる。本明細書に記載の方法において、挿入された核酸によってコードされるTCRは、T1D関連抗原に結合する。TRAC座位に各配列とプロモーターを挿入することによって、プロモーターに作動可能に連結された各配列の転写が、このプロモーターによって開始され（これにより発現が促されて）、挿入された核酸によってコードされる異種配列の一部を含む異種TCR β 鎖と異種TCR α 鎖により形成されたT1D関連抗原特異的TCRとFKBP-IL2R γ CISC構成要素がTRAC座位から発現される。

【0309】

本明細書に記載の方法の実施形態において、FOXP3座位への挿入を標的とする核酸は、

(i) (a) mTORのFKBP-ラパマイシン結合（FRB）ドメインを含む細胞外結合ドメイン、またはmTORのFKBP-ラパマイシン結合（FRB）ドメインに由来する細胞外結合ドメインと、(b) IL-2R β の膜貫通ドメインを含む膜貫通ドメイン、またはIL-2R β の膜貫通ドメインに由来する膜貫通ドメインと、(c) IL-2R β の細胞質内ドメインを含む細胞内シグナル伝達ドメイン、またはIL-2R β の細胞質内ドメインに由来する細胞内シグ

ナル伝達ドメインとを含む第1の化学誘導性シグナル伝達複合体(CISC)構成要素をコードするヌクレオチド配列；

(ii) 膜貫通ドメインを持たない細胞質ゾル内FRBドメインをコードするヌクレオチド配列；および

(iii) FOXP3座位においてTreg特異的脱メチル化領域の下流にある配列に対して相同性を有する3'相同アーム(例えば、FOXP3遺伝子の第1のコーディングエキソンであるエキソン2の上流の2,000ヌクレオチド以内に含まれる配列またはこの2,000ヌクレオチドまでの配列に対して相同性を有する3'相同アーム)に作動可能に連結されたプロモーターを含む。

このような方法により、炎症状態においてFOXP3の発現を不安定化するTSDRの下流に、各配列とプロモーターを挿入することによって、TSDRの上流にある内因性FOXP3プロモーターとは無関係に、挿入されたプロモーターによって、FoxP3をコードするmRNAの転写を開始することができる。FOXP3座位に各配列とプロモーターを挿入することによって、プロモーターに作動可能に連結された各配列の転写が、このプロモーターによって開始されて、FRB-IL2Rβ CISC構成要素と細胞質ゾル内FRB構成要素とFoxP3がFOXP3座位から発現される。

【0310】

前記2種の核酸のうち、一方をTRAC座位に挿入し、もう一方をFOXP3座位に挿入することによって二重編集された細胞は、(i) ラパマイシンの存在下でヘテロ二量体を形成して、IL-2Rβの細胞質内ドメインとIL-2Rγの細胞内ドメインの二量体化によりIL-2Rシグナル伝達を行う第1のCISC構成要素と第2のCISC構成要素；(ii) 細胞内ラパマイシンに結合して、mTORと細胞内ラパマイシンの相互作用を阻止する細胞質ゾル内FRBドメイン；(iii) 安定なTreg表現型を提供するFoxP3；および(iv) T1D関連抗原特異的TCRを安定に発現する。したがって、本明細書に記載の方法は、T1D関連抗原に対して特異性を有する安定なTreg細胞を提供し、このTreg細胞は、ラパマイシンを用いて増殖を誘導することができる。さらに、第1のCISC構成要素をコードするヌクレオチド配列と第2のCISC構成要素をコードするヌクレオチド配列を別々の核酸に分けていることから、ラパマイシンを利用することによって、両方のCISC構成要素を発現する細胞(すなわち、両方の核酸が挿入されたことから、T1D抗原特異的TCRとFoxP3を発現する細胞)の増殖を選択的に誘導することができる。したがって、二重編集細胞を容易に選択し、インビトロで増殖させて、1型糖尿病の治療用のT1D関連抗原に特異的な安定なTreg細胞集団を製造することができる。さらに、このような安定なTreg細胞のインビボでの生着と増殖を、対象へのラパマイシンの投与により支持してもよい。

【0311】

プロモーター

本明細書に記載の方法による細胞ゲノムへの標的化された挿入用の各核酸は、各核酸上の1つ以上のヌクレオチド配列に作動可能に連結されたプロモーターを含む。プロモーターは、(例えば、RNAポリメラーゼを動員することによって)作動可能に連結されている配列の転写を開始することができれば、その配列に「作動可能に連結」されている。第1の核酸および第2の核酸のプロモーターは、当技術分野で公知のプロモーターであれば、どのようなものであってもよい。いくつかの実施形態において、導入された核酸上の異種プロモーターは活性を有し、炎症状態であっても、RNAの転写を促進する。いくつかの実施形態において、前記プロモーターは、構成的プロモーターである。構成的プロモーターは、内因性プロモーターよりも高効率に転写を促進する強力なプロモーターであってもよく、強力なプロモーターや内因性プロモーターよりも低効率に転写を促進する弱いプロモーターであってもよい。いくつかの実施形態において、前記構成的プロモーターは強力なプロモーターである。いくつかの実施形態において、前記異種プロモーターは、誘導型プロモーターである。誘導型プロモーターは、活性化シグナルの存在または抑制性シグナルの不在に応答して、作動可能に連結された配列の転写を促進する。いくつかの実施形態において、前記誘導型プロモーターは、薬物またはステロイドによって誘導可能である

。

【0312】

いくつかの実施形態において、細胞に送達される第1の核酸のプロモーターと第2の核酸のプロモーターは、異なるプロモーターである。別の実施形態において、第1の核酸と第2の核酸は、同じプロモーターを含む。いくつかの実施形態において、第1の核酸と第2の核酸はいずれもMNDプロモーターを含む。第1の核酸と第2の核酸が同じプロモーターを含む実施形態において、これらの核酸のプロモーター配列は同じであってもよい。あるいは、第1の核酸のプロモーター配列は、第2の核酸のプロモーター配列と比較して1つ以上の変異（例えば、挿入、欠失、置換）を含んでいてもよい。いくつかの実施形態において、第1の核酸および／または第2の核酸のMNDプロモーターは、配列番号220の核酸配列と少なくとも90%の配列同一性を有する。いくつかの実施形態において、第1の核酸および／または第2の核酸のMNDプロモーターは、配列番号220の核酸配列と少なくとも95%の配列同一性を有する。いくつかの実施形態において、第1の核酸と第2核酸のそれぞれが、配列番号220の核酸配列を有するMNDプロモーターを含む。

10

20

【0313】

いくつかの実施形態において、TRAC座位への挿入用の第1の核酸上のプロモーターの最初の5個のヌクレオチドの上流またはその5個のヌクレオチドのいずれかに終止コドンが存在する。いくつかの実施形態において、FOXP3座位への挿入用の第2の核酸上のプロモーターの最初の5個のヌクレオチドの上流またはその5個のヌクレオチドのいずれかに終止コドンが存在する。プロモーターの最初の5個のヌクレオチドの上流、その5個のヌクレオチドのいずれか、またはその5個のヌクレオチドと重複して終止コドンが存在することによって、組換えたTRAC座位またはFOXP3座位の内因性プロモーターの上流から転写されうるmRNAの翻訳を停止させて、内因性プロモーターの制御下の挿入されたコード配列（例えば、CISC構成要素、異種TCR β 鎖もしくはTCR α 鎖またはFoxP3をコードする配列）の発現を抑制することができると期待される。いくつかの実施形態において、終止コドンは、その上流の1つ以上の開始コドンとインフレームであることから、上流の内因性プロモーターからの転写により生じたmRNAが、終止コドン以降は翻訳されなくなる。

【0314】

化学誘導性シグナル伝達複合体（CISC）

本明細書に記載の遺伝子組換え細胞を製造する方法の実施形態において、細胞ゲノムに挿入される各核酸は、化学誘導性シグナル伝達複合体（CISC）の構成要素をコードするヌクレオチド配列を含み、各CISC構成要素は、ラパマイシンに結合する細胞外ドメインと、膜貫通ドメインと、インターロイキン2受容体（IL-2R）の細胞質内ドメインを含む細胞内ドメイン、またはIL-2Rの細胞質内ドメインに由来する細胞内ドメインとを含む。いくつかの実施形態において、（TRAC座位への挿入用の）第1の核酸は、（i）FK506結合タンパク質12（FKBP）ドメインを含む細胞外結合ドメインと、（ii）IL-2R γ の膜貫通ドメインを含む膜貫通ドメイン、またはIL-2R γ の膜貫通ドメインに由来する膜貫通ドメインと、（iii）IL-2R γ の細胞質内ドメインを含む細胞内ドメイン、またはIL-2R γ の細胞質内ドメインに由来する細胞内ドメインとを含む第1のCISC構成要素をコードし、（FOXP3座位への挿入用の）第2の核酸は、（i）FKBP-ラパマイシン結合ドメインを含む細胞外結合ドメインと、（ii）IL-2R β の膜貫通ドメインを含む膜貫通ドメイン、またはIL-2R β の膜貫通ドメインに由来する膜貫通ドメインと、（iii）IL-2R β の細胞質内ドメインを含む細胞内ドメイン、またはIL-2R β の細胞質内ドメインに由来する細胞内ドメインとを含む第1のCISC構成要素をコードする。CISC構成要素のドメイン（例えば、第1のCISC構成要素の膜貫通ドメイン）は、IL-2Rポリペプチド（例えばIL-2R γ ）の特定のドメイン（例えば、天然のIL-2R γ の膜貫通ドメイン）の野生型（天然）のアミノ酸配列と少なくとも90%の配列同一性を有する場合、そのIL-2Rポリペプチドのそのドメインに「由来する」ものである。

30

40

【0315】

50

細胞においてCISC構成要素を発現させ、ラパマイシンの有無および／またはその濃度を操作することによって、その細胞においてIL-2のシグナル伝達を選択的に誘導することができる。このようにして、シグナル伝達を制御可能に誘導することによって、例えば、IL-2のシグナル伝達事象によって細胞増殖が誘導されて、両方のCISC構成要素を発現する細胞を選択的に増殖させることができる。異なるCISC構成要素をコードする2種の核酸が細胞に導入されるいくつかの実施形態では、一方のCISC構成要素のみを含む細胞をラパマイシンと接触させても、もう一方のCISC構成要素が存在しないことから、二量体化は誘導されず、IL-2のシグナル伝達も誘導されないため、このような選択的な増殖によって、両方の核酸を含む細胞を選択することが可能となる。

【0316】

10

細胞内シグナル伝達ドメインの例として、IL-2R β の細胞質内ドメインおよびIL-2R γ の細胞質内ドメインならびにその機能性誘導体が挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態において、第1のCISC構成要素の細胞内シグナル伝達ドメインは、IL-2R γ ドメインまたはその機能性誘導体を含み、第2のCISC構成要素の細胞内シグナル伝達ドメインは、IL-2R β 細胞質内ドメインまたはその機能性誘導体を含む。いくつかの実施形態において、第1のCISC構成要素と第2のCISC構成要素が二量体化することによって、細胞におけるJAK1、JAK3および／またはSTAT5のリン酸化が誘導される。いくつかの実施形態において、第1のCISC構成要素と第2のCISC構成要素が二量体化することによって、細胞増殖が誘導される。

【0317】

20

膜貫通ドメインの例として、IL-2R β の膜貫通ドメインおよびIL-2R γ の膜貫通ドメインならびにその機能性誘導体が挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態において、CISC構成要素の膜貫通ドメインは、そのCISC構成要素の細胞内シグナル伝達ドメインが由来するタンパク質と同じタンパク質に由来する（例えば、IL-2R β の細胞内ドメインを含むCISC構成要素は、IL-2R β の膜貫通ドメインを含む）。いくつかの実施形態において、一方のCISC構成要素はIL-2R β の膜貫通ドメインを含み、もう一方のCISC構成要素はIL-2R γ の膜貫通ドメインを含む。

【0318】

ラパマイシンに結合することができる細胞外結合ドメインの例としては、FK506結合タンパク質（FKBP）ドメインおよびFKBP-ラパマイシン結合（FRB）ドメインが挙げられるが、これらに限定されない。FKBPドメインとFRBドメインは、後述するようなラパマイシンに結合して、ヘテロ二量体を形成することができる。いくつかの実施形態において、一方のCISC構成要素の細胞外結合ドメインはFKBPドメインを含み、他方のCISC構成要素の細胞外結合ドメインはFRBドメインを含む。いくつかの実施形態において、これらのCISC構成要素は、ラパマイシンの存在下においてヘテロ二量体を形成する。いくつかの実施形態において、FRBドメインは、配列番号236のアミノ酸配列を有する野生型mTORの2098番目のアミノ酸に相当する位置にスレオニンを含む。このアミノ酸変異によって、ラパマイシンに関連する構造を有する化合物に対するmTORの親和性が増加するが、ラパマイシン自体へのmTORの親和性は減少する。したがって、この位置にスレオニンが存在することによって、ラパマイシンに対するmTORの結合能が維持される。野生型mTORの2098番目のアミノ酸「に相当する」CISC構成要素またはFRBドメインのアミノ酸は、（例えば、当技術分野で公知のBLASTアライメントアルゴリズムまたは別のアライメントアルゴリズムによって）CISC構成要素またはFRBドメインの候補配列を配列番号236にアライメントすることによって決定してもよく、配列番号236の2098番目のアミノ酸にアライメントされるアミノ酸は、配列番号236の2098番目のアミノ酸「に相当する」アミノ酸である。

【0319】

本明細書に記載のCISC構成要素の細胞外結合ドメイン、膜貫通ドメインおよび細胞内シグナル伝達ドメインは、それぞれリンカーを介してそのCISC構成要素の別のドメインに接続されていてもよい。リンカーは当技術分野で公知である。いくつかの実施形態にお

50

いて、リンカーは、1個、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個もしくは10個のアミノ酸（例えばグリシン）、多数のアミノ酸（例えばグリシン）、またはこれらの数値のいずれか2つを上下限とする範囲内の個数のアミノ酸を含む。いくつかの実施形態において、グリシンスペーサーは、少なくとも3個のグリシンを含む。いくつかの実施形態において、グリシンスペーサーは、GSG、GGGS（配列番号229）、GGGSGGG（配列番号230）またはGGGで示される配列を含む。いくつかの実施形態において、グリシンスペーサーはアミノ酸配列GSGを含む。

【0320】

細胞外結合ドメインは、ヒンジドメインを介して膜貫通ドメインに接続されていてもよい。「ヒンジ」は、細胞外結合ドメインを膜貫通ドメインに連結し、それによって細胞外結合ドメインに柔軟性を付与してもよいドメインを指す。いくつかの実施形態では、ヒンジドメインによって細胞外結合ドメインを細胞膜の近傍に配置し、抗体またはその結合断片によって認識される可能性を最小限に抑える。いくつかの実施形態では、細胞外結合ドメインは、ヒンジドメインのN末端側に位置する。いくつかの実施形態では、ヒンジドメインは天然のものであってもよく、合成されたものであってもよい。

【0321】

いくつかの実施形態において、第1のCISC構成要素と第2のCISC構成要素は、ラパマイシンの存在下においてヘテロ二量体を形成する。いくつかの実施形態において、第1のCISC構成要素と第2のCISC構成要素は、ラパログの代謝によりインビボで生成される化合物の存在下でヘテロ二量体を形成する。いくつかの実施形態において、インビボでのラパログの代謝によって生成される化合物はラパマイシンである。ラパログの例として、エペロリムス、CCI-779、C20-メタリルラパマイシン、C16-(S)-3-メチルインドールラパマイシン、C16-iRap、C16-(S)-7-メチルインドールラパマイシン、AP21967、C16-(S)-ブチルスルホンアミドラパマイシン、AP23050、ミコフェノール酸ナトリウム、塩酸ベニジピン、AP1903およびAP23573、ならびにこれらの代謝産物および誘導体が挙げられるが、これらに限定されない。

【0322】

いくつかの実施形態において、第2のCISC構成要素（FRB-IL2R β ）をコードする核酸は、ラパマイシンに結合することができる第3のCISC構成要素をコードするヌクレオチド配列をさらに含む。このようなCISC構成要素は、例えば、細胞内ラパマイシンに結合させるのに有用であり、これによって、CISC構成要素に結合したラパマイシンがその他の細胞内分子や細胞内構造と相互作用することを阻止することができる（例えば、ラパマイシンがmTORと相互作用することを阻止することができる）。いくつかの実施形態において、第3のCISC構成要素は、膜貫通ドメインを含んでいない可溶性タンパク質である。いくつかの実施形態において、第3のCISC構成要素は、細胞内FRBDメインを含む。いくつかの実施形態において、第3のCISC構成要素は、FRBDメインを含むが膜貫通ドメインを含んでいない可溶性タンパク質である。

【0323】

第1のCISC構成要素をコードする核酸、第2のCISC構成要素をコードする核酸、および／または第3のCISC構成要素をコードする核酸は、1つ以上のベクターに含まれていてもよい。いくつかの実施形態において、第1のCISC構成要素をコードする核酸は、第2のCISC構成要素をコードする核酸を含むベクターとは別のベクターに含まれる。いくつかの実施形態において、第3のCISC構成要素をコードする核酸は、第2のCISC構成要素をコードする核酸が含まれるベクターと同じベクターに含まれる。いくつかの実施形態において、1つ以上のベクターはウイルスベクターである。いくつかの実施形態において、前記1つ以上のベクターはアデノ随伴ウイルス（AAV）ベクターである。いくつかの実施形態において、前記1つ以上のAAVベクターは、AAV1ベクター、AAV2ベクター、AAV3ベクター、AAV4ベクター、AAV5ベクター、AAV6ベクター、AAV7ベクター、AAV8ベクター、AAV9ベクター、AAV10ベクターまたはAAV11ベクターである。いくつかの実施形態において、前記1つ以上のAAVベクターはAAV5ベクターである。いく

つかの実施形態において、前記 1 つ以上の AAV ベクターは AAV6 ベクターである。

【0324】

いくつかの実施形態において、CISC 構成要素は、配列番号 66 または 71 に示されるアミノ酸配列と少なくとも 80%、少なくとも 90%、少なくとも 91%、少なくとも 92%、少なくとも 93%、少なくとも 94%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、または最大で 100% の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態において、1 つ以上の CISC 構成要素は、シグナルペプチドをさらに含む。シグナルペプチドは、当技術分野で公知の、翻訳された CISC 構成要素を細胞膜に輸送するシグナルペプチドであれば、どのようなものであってもよい。いくつかの実施形態において、第 1 の CISC 構成要素と第 2 の CISC 構成要素は、いずれも LC N2 のシグナルペプチドを含む。いくつかの実施形態において、第 1 の CISC 構成要素と第 2 の CISC 構成要素は、いずれも配列番号 61 のアミノ酸配列を含むシグナルペプチドを含む。

10

【0325】

いくつかの実施形態において、一方の CISC 構成要素は、配列番号 66 に示されるアミノ酸配列と少なくとも 80%、少なくとも 90%、少なくとも 91%、少なくとも 92%、少なくとも 93%、少なくとも 94%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、または最大で 100% の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、他方の CISC 構成要素は、配列番号 71 に示されるアミノ酸配列と少なくとも 80%、少なくとも 90%、少なくとも 91%、少なくとも 92%、少なくとも 93%、少なくとも 94%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、または最大で 100% の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態において、各 CISC 構成要素はシグナルペプチドをさらに含み、これらのシグナルペプチドのアミノ酸配列は同じであってもよく、異なってもよい。これらのシグナルペプチドは、当技術分野で公知の、翻訳された CISC 構成要素を細胞膜に輸送するシグナルペプチドであれば、どのようなものであってもよい。

20

【0326】

いくつかの実施形態において、第 3 の CISC 構成要素は、配列番号 72 に示されるアミノ酸配列と少なくとも 80%、少なくとも 90%、少なくとも 91%、少なくとも 92%、少なくとも 93%、少なくとも 94%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、または最大で 100% の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態において、第 3 の CISC 構成要素は、配列番号 72 に示されるアミノ酸配列と少なくとも 80%、少なくとも 90%、少なくとも 91%、少なくとも 92%、少なくとも 93%、少なくとも 94%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、または最大で 100% の配列同一性を有するアミノ酸配列からなる。いくつかの実施形態において、第 3 の CISC 構成要素は、配列番号 72 のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態において、第 3 の CISC 構成要素は、シグナルペプチドを含んでいない。いくつかの実施形態において、第 3 の CISC 構成要素は、膜貫通ドメインを含んでいない。

30

40

【0327】

T 細胞受容体 (TCR)

本明細書に記載の方法のいくつかの実施形態において、TCR β タンパク質の全長をコードするヌクレオチド配列と TCR α タンパク質の少なくとも一部をコードするヌクレオチド配列に作動可能に連結されたプロモーターを含む核酸を挿入することによって、細胞の TRAC 座位が編集され、この TCR α タンパク質の少なくとも一部は、例えば、抗原特異性を担う TCR α タンパク質の一部を形成する TCR α 可変領域および TCR α 接合 (TRAJ) 領域である。いくつかの実施形態において、TCR α の可変領域と接合領域をコードするヌクレオチド配列は、TCR α の定常ドメインの一部をコードする内因性ヌクレオチド配列にインフレーションに挿入されることによって、挿入された異種プロモーターにより、異種

50

TCR β タンパク質をコードする配列と、異種TRAV/TRAJアミノ酸配列および内因性TCR α 定常ドメインを含むTCR α タンパク質をコードする配列の転写が開始される。この実施形態では、内因性TRAC座位の内因性3'調節領域を利用する。

【0328】

本明細書に記載の方法により製造された遺伝子組換え細胞は、1型糖尿病(T1D)に特異的なT細胞受容体を発現する。本明細書において、「T細胞受容体(TCR)」は、可変結合ドメイン、定常ドメイン、膜貫通領域および短い細胞質尾部を有する免疫グロブリンスーパーファミリーのメンバーを指す。例えば、Janeway et al., Immunobiology: The Immune System in Health and Disease, 3rd Ed., Current Biology Publications, p. 433, 1997を参照されたい。TCRは、主要組織適合遺伝子複合体(MHC)にコードされた受容体に結合した抗原ペプチドに特異的に結合することができる。TCRは、T細胞の表面に見られるが、可溶性の形態で細胞外環境に放出されることもあり、通常、 α 鎖および β 鎖(TCR α およびTCR β としても知られている)を有するヘテロ二量体、または γ 鎖および δ 鎖(TCR γ およびTCR δ としても知られている)を有するヘテロ二量体で構成されており、 α 鎖、 β 鎖、 γ 鎖および δ 鎖はいずれも定常(C)ドメインと高度な多様性のある可変(V)ドメインとを有し、各可変(V)ドメインは、TCRによる特異的な抗原の認識と結合の大部分を担う3つの相補性決定領域(CDR)を含んでいる。特定の実施形態において、TCRをコードする核酸は、例えば、免疫系細胞、造血幹細胞、T細胞、初代T細胞、T細胞株、NK細胞、ナチュラルキラーT細胞などの特定の宿主細胞における発現を向上させるためにコドン最適化することができる。例えば、Scholten et al., Clin Immunol. 2006. 119:135を参照されたい。

【0329】

TCR鎖(例えば、TCR α 鎖およびTCR β 鎖)の細胞外ドメインは、免疫グロブリンスーパーファミリーのその他の抗原結合メンバー(例えば、抗体)と同様に、N末端の可変ドメイン(例えば、 α 鎖可変ドメイン(V α)、 β 鎖可変ドメイン(V β);通常、Kabatのナンバリング(Kabat et al., "Sequences of Proteins of Immunological Interest", US Dept. Health and Human Services, Public Health Service National Institutes of Health, 1991, 5th ed.)に基づいた1~116番目のアミノ酸からなる)と、細胞膜に隣接した1つの定常ドメイン(例えば、 α 鎖定常ドメイン(C α)、通常、Kabatのナンバリングに基づいた117~259番目のアミノ酸からなる; β 鎖定常ドメイン(C β)、通常、Kabatのナンバリングに基づいた117~295番目のアミノ酸からなる)の2つの免疫グロブリンドメインを含んでいる。さらに、免疫グロブリンと同様に、可変ドメインは、フレームワーク領域(FR)により互いに隔てられた複数の相補性決定領域(CDR)を含んでいる(例えば、Jores et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 87:9138, 1990; Chothia et al., EMBO J. 7:3745, 1988を参照されたい; さらにLefranc et al., Dev. Comp. Immunol. 27:55, 2003を参照されたい)。本開示において使用されるTCRは、ヒト、非ヒト霊長類、マウス、ラット、ウサギ、その他の哺乳動物などの様々な種類の動物から得られたものであってもよい。

【0330】

「可変領域」または「可変ドメイン」は、免疫グロブリンスーパーファミリー結合タンパク質(例えばTCR)の抗原への特異的結合に関与する、免疫グロブリンスーパーファミリー結合タンパク質の構造ドメイン(例えば、TCRの α 鎖もしくは β 鎖(または γ δ TCRの γ 鎖および δ 鎖))を指す。天然のTCRの α 鎖の可変ドメイン(V α)と β 鎖の可変ドメイン(V β)は、通常、類似した構造を有しており、各可変ドメインは、全般に保存された4つのフレームワーク領域(FR)と3つのCDRを含む。V α ドメインは、可変遺伝子セグメントと接合遺伝子セグメント(V-J)という2つの別々のDNAセグメントによってコードされており、V β ドメインは、可変遺伝子セグメントと多様性遺伝子セグメントと接合遺伝子セグメント(V-D-J)という3つの別々のDNAセグメントによってコードされている。抗原結合特異性を付与する際に、単一のV α ドメインまたはV β ドメインのみで十分な場合もある。さらに、特定の抗原に結合するTCRのV α ドメインまたはV

βドメインを使用して、VαドメインまたはVβドメインの相補性決定領域のライブラリーをそれぞれスクリーニングして、前記特定の抗原に結合するTCRを単離してもよい。

【0331】

「相補性決定領域」および「CDR」という用語は、「超可変領域」または「HVR」と同じ意味で使用され、抗原特異性および／または結合親和性を付与する免疫グロブリン（例えばTCR）可変領域内のアミノ酸配列を指すことが当技術分野において知られており、一次アミノ酸配列では、複数のCDRがフレームワーク領域により互いに隔てられている。通常、各TCRα鎖可変領域には3つのCDR（αCDR1、αCDR2、αCDR3）が存在し、各TCRβ鎖可変領域には3つのCDR（βCDR1、βCDR2、βCDR3）が存在する。TCRでは、MHCに結合したペプチド抗原の認識を担う主要なCDRは、CDR3であると考えられている。通常、CDR1およびCDR2が主にMHCと相互作用するか、CDR1およびCDR2のみがMHCと相互作用する。

10

【0332】

CDR1およびCDR2は、TCRの可変ドメインをコードする配列の可変遺伝子セグメント内にコードされており、CDR3は、Vαの可変セグメントから接合セグメントに及ぶ領域（V-J）、またはVβの可変セグメントから多様性セグメントおよび接合セグメントに及ぶ領域（V-D-J）によりコードされている。したがって、Vαの可変遺伝子セグメントまたはVβの可変遺伝子セグメントが同定されている場合、例えば、本明細書で述べるナンバリングスキームに従って、これらに対応するCDR1およびCDR2の配列を推定することができる。CDR3は、通常、組換え工程におけるヌクレオチドの付加および／または欠失により、CDR1やCDR2よりも有意に多様性が高い。

20

【0333】

TCRの可変ドメイン配列は、例えば、ANARCIソフトウェアツール（2016, Bioinformatics 15:298-300）などを使用して、ナンバリングスキーム（例えば、Kabat、Chothia、EU、IMGT、Enhanced ChothiaおよびAho）によりアライメントして、同じ残基位置のアノテーション付け、および異なる分子の比較を行うことができる。ナンバリングスキームを利用することによって、TCR可変ドメインのフレームワーク領域およびCDRの標準化された定義が可能となる。特定の実施形態において、本開示のCDRは、IMGTのナンバリングスキームに従って同定される（Lefranc et al., Dev. Comp. Immunol. 27:55, 2003; imgt.org/IMGTindex/V-QUEST.php）。

30

【0334】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載の核酸は、TCRβ鎖とTCRα鎖の少なくとも一部をコードし、このTCRβ鎖とTCRα鎖の少なくとも一部は、組み合わせて発現されて、IGRP（305-234）ペプチドに結合するT1D2 TCRを形成する。別の実施形態において、本明細書に記載の核酸によってその一部がコードされる全長TCRα鎖とTCRβ鎖は、IGRP（241-260）ペプチドに結合するT1D4 TCRを形成する。別の実施形態において、本明細書に記載の核酸によってその一部がコードされる全長TCRα鎖とTCRβ鎖は、IGRP（305-324）ペプチドに結合するT1D5-1 TCRを形成する。いくつかの実施形態において、IGRP（305-324）ペプチドは、HLA-DRB1*0401に結合した場合に認識される。いくつかの実施形態において、IGRP（241-260）ペプチドは、HLA-DRB1*0401に結合した場合に認識される。

40

【0335】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載の核酸によってコードされるTCRβ鎖とTCRα鎖（の少なくとも一部）から形成されるTCRは、αCDR1、αCDR2、αCDR3の3つの相補性決定領域（CDR）を有するTCRα可変（Vα）ドメインと、βCDR1、βCDR2、βCDR3の3つのCDRを有するTCRβ可変（Vβ）ドメインとを含む。本明細書に記載のTCRのCDRの代表的なアミノ酸を表1に示し、本明細書に記載のTCRのCDRをコードするヌクレオチド配列を表2に示している。いくつかの実施形態において、(i) αCDR1は配列番号1を含み、(ii) αCDR2は配列番号2を含み、(iii) αCDR3は配列番号3を含み、(iv) βCDR1は配列番号4を含み、(v) βCDR2は配列番号5を含み

50

、(vi) β CDR3は配列番号6を含む。いくつかの実施形態において、(i) α CDR1は配列番号11を含み、(ii) α CDR2は配列番号12を含み、(iii) α CDR3は配列番号13を含み、(iv) β CDR1は配列番号14を含み、(v) β CDR2は配列番号15を含み、(vi) β CDR3は配列番号16を含む。いくつかの実施形態において、(i) α CDR1は配列番号21を含み、(ii) α CDR2は配列番号22を含み、(iii) α CDR3は配列番号23を含み、(iv) β CDR1は配列番号24を含み、(v) β CDR2は配列番号25を含み、(vi) β CDR3は配列番号26を含む。別の実施形態において、 α CDR1、 α CDR2、 α CDR3、 β CDR1、 β CDR2および β CDR3からなる各セットは、前記アミノ酸配列の組み合わせのいずれかに示される各アミノ酸配列と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%または少なくとも99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を有していてもよい。

10

【0336】

いくつかの実施形態において、 $V\alpha$ は配列番号7を含み、 $V\beta$ は配列番号8を含む。いくつかの実施形態において、 $V\alpha$ は配列番号17を含み、 $V\beta$ は配列番号18を含む。いくつかの実施形態において、 $V\alpha$ は配列番号27を含み、 $V\beta$ は配列番号28を含む。別の実施形態において、 $V\alpha$ と $V\beta$ からなる各ペアは、前記アミノ酸配列の組み合わせのいずれかに示される各アミノ酸配列と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%または少なくとも99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を有していてもよい。

20

【0337】

いくつかの実施形態において、TCR α 鎖は配列番号9を含み、TCR β 鎖は配列番号10を含む。いくつかの実施形態において、TCR α 鎖は配列番号19を含み、TCR β 鎖は配列番号20を含む。いくつかの実施形態において、TCR α 鎖は配列番号29を含み、TCR β 鎖は配列番号30を含む。別の実施形態において、TCR α 鎖とTCR β 鎖からなる各ペアは、前記アミノ酸配列の組み合わせのいずれかに示される各アミノ酸配列と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%または少なくとも99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を有していてもよい。

30

【0338】

FOXP3座位の組換え

本明細書に記載の方法のいくつかの実施形態において、内因性FoxP3タンパク質の一部をコードするヌクレオチド配列に作動可能に連結されたプロモーターを含む核酸を挿入することによって、細胞のFOXP3座位が編集される。挿入されるプロモーターは、FOXP3座位のTreg特異的脱メチル化領域(TSDR)の下流のゲノムに導入される。組換えが行われていない細胞では、TSDRが、エピジェネティックにFoxP3の発現を調節することによって、炎症状態に曝露された細胞のFoxP3の生成を抑制するが、その結果、FoxP3の発現が喪失して、非組換えTreg細胞がTエフェクター(Teff)表現型に変換される。TSDRの下流にプロモーターを挿入することによって、TSDRを介したFOXP3の発現調節をバイパスすることにより、炎症状態であっても、FoxP3の安定な生成が可能になる。

40

【0339】

異種プロモーターは、FOXP3のコード配列の内因性プロモーターの下流(例えばTSDRの下流)、かつ第1のコーディングエキソンの上流または第1のコーディングエキソン内であれば、どの位置に挿入してもよい。当技術分野において、この第1のコーディングエキソンは、内因性FOXP3プロモーターから転写されるpre-mRNAに存在する第2のエキソンであることからエキソン2として知られており、野生型のFoxP3の翻訳を開始する開始コドンを含むエキソン1(FOXP3をコードするpre-mRNAの第1のエキソン)ではないことから、第1のコーディングエキソンとして知られている。いくつかの実施形態に

50

において、異種プロモーターは、FOXP3座位のTSDRの1~10,000ヌクレオチド下流、10~1,000ヌクレオチド下流、10~100ヌクレオチド下流、10~5,000ヌクレオチド下流、20~4,000ヌクレオチド下流、30~3,000ヌクレオチド下流、40~2,000ヌクレオチド下流、50~1,000ヌクレオチド下流、60~750ヌクレオチド下流、70~500ヌクレオチド下流、80~400ヌクレオチド下流、90~300ヌクレオチド下流、100~200ヌクレオチド下流、1~1,000ヌクレオチド下流、1,000~2,000ヌクレオチド下流、2,000~3,000ヌクレオチド下流、3,000~4,000ヌクレオチド下流、4,000~5,000ヌクレオチド下流、5,000~6,000ヌクレオチド下流、6,000~7,000ヌクレオチド下流、7,000~8,000ヌクレオチド下流、8,000~9,000ヌクレオチド下流、または9,000~10,000ヌクレオチド下流に挿入される。いくつかの実施形態において、異種プロモーターは、FOXP3コード配列の第1のコーディングエキソンの1~10,000ヌクレオチド上流、10~1,000ヌクレオチド上流、10~100ヌクレオチド上流、10~5,000ヌクレオチド上流、20~4,000ヌクレオチド上流、30~3,000ヌクレオチド上流、40~2,000ヌクレオチド上流、50~1,000ヌクレオチド上流、60~750ヌクレオチド上流、70~500ヌクレオチド上流、80~400ヌクレオチド上流、90~300ヌクレオチド上流、100~200ヌクレオチド上流、1~1,000ヌクレオチド上流、1,000~2,000ヌクレオチド上流、2,000~3,000ヌクレオチド上流、3,000~4,000ヌクレオチド上流、4,000~5,000ヌクレオチド上流、5,000~6,000ヌクレオチド上流、6,000~7,000ヌクレオチド上流、7,000~8,000ヌクレオチド上流、8,000~9,000ヌクレオチド上流、または9,000~10,000ヌクレオチド上流に挿入される。いくつかの実施形態において、異種プロモーターは、第1のコーディングエキソンに挿入されて合成の第1のコーディングエキソンが作製され、この合成の第1のコーディングエキソンは、内因性の第1のコーディングエキソンとは異なるものであるが、下流のFOXP3エキソンをコードするFOXP3配列とインフレーションな開始コドンを含んでいる。

10

20

【0340】

2Aモチーフおよびリンカー

複数のポリペプチドまたはその一部をコードする本明細書に記載の核酸のいくつかの実施形態は、2Aモチーフをコードする介在ヌクレオチド配列を含んでもよい。2Aモチーフは当技術分野で公知であり、1つのヌクレオチド配列から複数のポリペプチドを翻訳して、その生成を促すのに有用である。例えば、Kim et al., PLoS ONE, 2011, 6:e18556を参照されたい。いくつかの実施形態において、2Aモチーフが翻訳され、この翻訳によりポリペプチドの自己切断が起こり、別々のポリペプチドが放出される。別の実施形態では、2Aモチーフをコードするヌクレオチド配列が存在することから、リボソームがmRNAに沿って翻訳を進行する際に、コードされている2Aモチーフのアミノ酸を読み飛ばすことによって、第1のポリペプチド（例えば第1のFKBP-IL2R γ CISC構成要素）が放出された後に、第2のポリペプチド（例えばTCR β 鎖）の翻訳が開始される。

30

【0341】

いくつかの実施形態では、各ペアの核酸配列において、2Aモチーフをコードするヌクレオチド配列は、(i) 第1の(FKBP-IL2R γ) CISC構成要素をコードするヌクレオチド配列と、(ii) TCR β 鎖をコードするヌクレオチド配列と、(iii) TCR α 鎖またはその一部をコードするヌクレオチド配列の間にインフレーションに配置される。したがって、異種プロモーター（例えばMNDプロモーター）によって、CISC構成要素、TCR β 鎖およびTCR α 鎖のそれぞれをコードし、かつ介在する2Aモチーフを含む単一のmRNAの転写が開始されると、CISC構成要素、TCR β 鎖、TCR α 鎖のそれぞれが別々のポリペプチドとして生成される。いくつかの実施形態では、各ペアの核酸配列において、2Aモチーフをコードするヌクレオチド配列は、(i) 第2の(FKBP-IL2R γ) CISC構成要素をコードするヌクレオチド配列と、(ii) 細胞質ゾル内FRBドメインをコードするヌクレオチド配列と、(iii) FoxP3をコードするヌクレオチド配列の間にインフレーションに配置される。したがって、異種プロモーター（例えばMNDプロモーター）によって、CISC構成要素、細胞質ゾル内FRBドメインおよびFoxP3のそれぞれをコードし、かつ介在する2Aモチー

40

50

フを含む単一のmRNAの転写が開始されると、CISC構成要素、細胞質ゾル内FRBドメイン、FoxP3のそれぞれが別々のポリペプチドとして生成される。

【0342】

各ペアの核酸配列において、2つのポリペプチドをコードするヌクレオチド配列の間（例えば、FKBP-IL2R γ CISC構成要素をコードする配列とTCR β 鎖をコードする配列の間；およびTCR β 鎖をコードする配列とTCR α 鎖の一部をコードする配列の間）に配置されたヌクレオチド配列によってコードされる2Aモチーフは、当技術分野で公知の2Aモチーフであれば、どのようなものであってもよい。いくつかの実施形態において、各ペアの核酸配列において、別々のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列の間にコードされている2Aモチーフは、F2A、P2A、T2AおよびE2Aからなる群から独立して選択してもよい。いくつかの実施形態において、1つの核酸上にコードされている第1の2Aモチーフと第2の2Aモチーフは、異なる種類の2Aモチーフである。挿入される1つの核酸において異なる種類の2Aモチーフを使用することによって、内部組換えが発生する確率を低減することができる。内部組換えが発生すると、再結合した2Aモチーフの間のヌクレオチド配列が染色体から切除されることがある。いくつかの実施形態において、1つの核酸上の第1の2Aモチーフをコードするヌクレオチド配列は、その核酸上の第2の2Aモチーフをコードするヌクレオチド配列と90%以下の配列同一性を有する。いくつかの実施形態において、1つの核酸上の第1の2Aモチーフをコードするヌクレオチド配列は、その核酸上の第2の2Aモチーフをコードするヌクレオチド配列と80%以下の配列同一性を有する。いくつかの実施形態において、1つの核酸上の第1の2Aモチーフをコードするヌクレオチド配列は、その核酸上の第2の2Aモチーフをコードするヌクレオチド配列と70%以下の配列同一性を有する。いくつかの実施形態において、1つの核酸上の第1の2Aモチーフをコードするヌクレオチド配列は、その核酸上の第2の2Aモチーフをコードするヌクレオチド配列と60%以下の配列同一性を有する。いくつかの実施形態において、1つの核酸上の第1の2Aモチーフをコードするヌクレオチド配列は、その核酸上の第2の2Aモチーフをコードするヌクレオチド配列と50%以下の配列同一性を有する。いくつかの実施形態において、第1の2AモチーフはT2Aモチーフであり、第2のモチーフはP2Aモチーフである。

【0343】

別の実施形態において、1つの核酸上のヌクレオチド配列によってコードされる第1の2Aモチーフと第2の2Aモチーフは、同じ種類の2Aモチーフである。いくつかの実施形態において、1つの核酸は、第1のP2Aモチーフをコードするヌクレオチド配列と、第2のP2Aモチーフをコードする第2のヌクレオチド配列を含み、第1のP2Aモチーフをコードするヌクレオチド配列は、第2のP2Aモチーフをコードするヌクレオチド配列と少なくとも80%の配列同一性を有する。いくつかの実施形態において、第1のP2Aモチーフをコードする第1のヌクレオチド配列と第2のP2Aモチーフをコードする第2のヌクレオチド配列は、同じヌクレオチド配列を含む。

【0344】

いくつかの実施形態において、TRAC座位への挿入用の核酸は、(i) 第1のCISC構成要素をコードする配列とTCR β 鎖をコードする配列の間に、T2Aモチーフをコードする配列を含み、かつ(ii) TCR β 鎖をコードする配列と異種TCR α 鎖の一部をコードする配列の間に、P2Aモチーフをコードする配列を含む。

【0345】

いくつかの実施形態において、FOX P3座位への挿入用の核酸は、(i) 第2のCISC構成要素をコードする配列と細胞質ゾル内FRBドメインをコードする配列の間に、P2Aモチーフをコードする配列を含み、かつ(ii) 細胞質ゾル内FRBドメインをコードする配列とFoxP3をコードする配列の間に、第2のP2Aモチーフをコードする第2の配列を含む。

【0346】

いくつかの実施形態において、細胞ゲノムへの挿入用の核酸によってコードされるポリペプチド（例えば、CISC構成要素および／またはTCR β 鎖）は、C末端リンカーを含む

。C末端リンカーを組み込むことによって、例えば、2Aモチーフにおける切断効率を向上させてもよく、かつ／またはコードされているCISC構成要素のアミノ酸またはTCRβ鎖のアミノ酸が、2Aモチーフの切断により切除されるのを阻止してもよい。いくつかの実施形態において、コードされている第1のCISC構成要素は、C末端リンカーを含む。いくつかの実施形態において、コードされている第2のCISC構成要素は、C末端リンカーを含む。いくつかの実施形態において、コードされている細胞質ゾル内FRBDメイン構成要素は、C末端リンカーを含む。いくつかの実施形態において、コードされているTCRβ鎖は、C末端リンカーを含む。

【0347】

コードされているポリペプチドのC末端リンカーは、当技術分野で公知のリンカーであれば、どのようなものであってもよい。いくつかの実施形態において、C末端リンカーは、1個、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個もしくは10個のアミノ酸（例えばグリシン）、多数のアミノ酸（例えばグリシン）、またはこれらの数値のいずれか2つを上下限とする範囲内の個数のアミノ酸を含む。いくつかの実施形態において、C末端リンカーは、少なくとも3個のグリシンを含む。いくつかの実施形態において、C末端リンカーは、GSG、GGGS（配列番号229）、GGGSGGG（配列番号230）またはGGGで示される配列を含む。いくつかの実施形態において、C末端リンカーはアミノ酸配列GSGを含む。いくつかの実施形態において、第1のCISC構成要素、第2のCISC構成要素、細胞質ゾル内FRBDメインおよびTCRβ鎖は、いずれもアミノ酸配列GSGを有するC末端リンカーを含む。

【0348】

ベクター

TRAC座位への挿入用の第1の核酸および／またはFOXP3座位への挿入用の第2の核酸は、1つ以上のベクターに含まれていてもよい。いくつかの実施形態において、TRAC座位を標的とする第1の核酸は、第1のベクターに含まれており、FOXP3座位を標的とする核酸は、第2のベクターに含まれている。場合によっては、これらのベクターは、細胞に対して感染能力を有するウイルスにパッケージされている（例えば、ベクターはウイルスベクターである）。典型的なウイルスとして、アデノウイルス、レトロウイルス、レンチウイルス、アデノ随伴ウイルス、ならびに当技術分野で公知のその他のウイルス、および本明細書に開示されたその他のウイルスが挙げられる。

【0349】

「ベクター」という用語は、宿主細胞にコード情報を移入するために使用されるあらゆる分子（例えば核酸やプラスミド）または分子の配置（例えばウイルス）について言及する際に使用される。「発現ベクター」は、宿主細胞への導入に適したベクターを指し、導入された異種核酸配列の発現を誘導する核酸配列、および／またはこの異種核酸配列の発現を制御する核酸配列を含んでいる。発現には、転写、翻訳、RNAスプライシング（イントロンが存在する場合）などのプロセスが含まれるが、これらに限定されない。ベクターの例として、人工染色体、ミニ遺伝子、コスミド、プラスミド、ファージミドおよびウイルスベクターが挙げられるが、これらに限定されない。ウイルスベクターの例として、レンチウイルスベクター、レトロウイルスベクター、ヘルペスウイルスベクター、アデノウイルスベクターおよびアデノ随伴ウイルスベクターが挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態において、本明細書で提供される方法において使用するための、核酸を含む1つ以上のベクターは、レンチウイルスベクターである。いくつかの実施形態において、前記1つ以上のベクターはアデノウイルスベクターである。いくつかの実施形態において、前記1つ以上のベクターはアデノ随伴ウイルス（AAV）ベクターである。いくつかの実施形態において、前記1つ以上のAAVベクターは、AAV1ベクター、AAV2ベクター、AAV3ベクター、AAV4ベクター、AAV5ベクター、AAV6ベクター、AAV7ベクター、AAV8ベクター、AAV9ベクター、AAV10ベクターまたはAAV11ベクターである。いくつかの実施形態において、TRAC座位への挿入用の核酸を含むベクターは、AAV1ベクター、AAV2ベクター、AAV3ベクター、AAV4ベクター、AAV5ベクター

、AAV6ベクター、AAV7ベクター、AAV8ベクター、AAV9ベクター、AAV10ベクターまたはAAV11ベクターである。いくつかの実施形態において、FOXP3座位への挿入用の核酸を含むベクターは、AAV1ベクター、AAV2ベクター、AAV3ベクター、AAV4ベクター、AAV5ベクター、AAV6ベクター、AAV7ベクター、AAV8ベクター、AAV9ベクター、AAV10ベクターまたはAAV11ベクターである。

【0350】

いくつかの実施形態において、前記1つ以上のAAVベクターはAAV5ベクターである。いくつかの実施形態において、前記1つ以上のAAVベクターはAAV6ベクターである。いくつかの実施形態において、第1の核酸と第2の核酸はそれぞれ別々のAAV5ベクターに含まれている。いくつかの実施形態において、第1の核酸と第2の核酸はそれぞれ別々のAAV6ベクターに含まれている。

10

【0351】

いくつかの実施形態において、TRAC座位への挿入用の核酸は、5'相同アームと3'相同アームの間に、配列番号94、106、117、128および139のいずれかと少なくとも90%の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態において、前記ヌクレオチド配列は、配列番号94、106、117、128および139のいずれかと少なくとも95%の配列同一性を有する。いくつかの実施形態において、前記ヌクレオチド配列は、配列番号94、106、117、128および139のいずれかを含む。いくつかの実施形態において、前記核酸は、配列番号94のヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態において、前記核酸は、配列番号106のヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態において、前記核酸は、配列番号117のヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態において、前記核酸は、配列番号128のヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態において、前記核酸は、配列番号139のヌクレオチド配列を含む。

20

【0352】

いくつかの実施形態において、TRAC座位への挿入用の核酸は、配列番号95、107、118、129および140のいずれかに示されるヌクレオチド配列と少なくとも90%の配列同一性を有する。いくつかの実施形態において、前記核酸は、配列番号95、107、118、129および140のいずれかに示されるヌクレオチド配列と少なくとも95%の配列同一性を有する。いくつかの実施形態において、前記核酸は、配列番号95、107、118、129および140のいずれかに示されるヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態において、前記核酸は、配列番号95のヌクレオチド配列と少なくとも95%の配列同一性を有する。いくつかの実施形態において、前記核酸は、配列番号107のヌクレオチド配列と少なくとも95%の配列同一性を有する。いくつかの実施形態において、前記核酸は、配列番号118のヌクレオチド配列と少なくとも95%の配列同一性を有する。いくつかの実施形態において、前記核酸は、配列番号129のヌクレオチド配列と少なくとも95%の配列同一性を有する。いくつかの実施形態において、前記核酸は、配列番号140のヌクレオチド配列と少なくとも95%の配列同一性を有する。

30

【0353】

いくつかの実施形態において、前記核酸は、配列番号95のヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態において、前記核酸は、配列番号107のヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態において、前記核酸は、配列番号118のヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態において、前記核酸は、配列番号129のヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態において、前記核酸は、配列番号140のヌクレオチド配列を含む。

40

【0354】

いくつかの実施形態において、FOXP3座位への挿入用の核酸は、5'相同アームと3'相同アームの間に、配列番号150、161、172、184、195、206および218のいずれかと少なくとも90%の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態において、前記ヌクレオチド配列は、配列番号150、161、172、184、195、206および218のいずれかと少なくとも95%の配列同一性を有する。いくつかの実施形態において、前記ヌクレオチド配列は、配列番号150、161、172、184、195、206および

50

218のいずれかを含む。いくつかの実施形態において、前記核酸は、配列番号150のヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態において、前記核酸は、配列番号161のヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態において、前記核酸は、配列番号172のヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態において、前記核酸は、配列番号184のヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態において、前記核酸は、配列番号195のヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態において、前記核酸は、配列番号206のヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態において、前記核酸は、配列番号218のヌクレオチド配列を含む。

【0355】

いくつかの実施形態において、FOXP3座位への挿入用の核酸は、配列番号151、162、173、185、196、207および219のいずれかに示されるヌクレオチド配列と少なくとも90%の配列同一性を有する。いくつかの実施形態において、前記核酸は、配列番号151、162、173、185、196、207および219のいずれかに示されるヌクレオチド配列と少なくとも95%の配列同一性を有する。いくつかの実施形態において、前記核酸は、配列番号151、162、173、185、196、207および219のいずれかに示されるヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態において、前記核酸は、配列番号151のヌクレオチド配列と少なくとも95%の配列同一性を有する。いくつかの実施形態において、前記核酸は、配列番号162のヌクレオチド配列と少なくとも95%の配列同一性を有する。いくつかの実施形態において、前記核酸は、配列番号173のヌクレオチド配列と少なくとも95%の配列同一性を有する。いくつかの実施形態において、前記核酸は、配列番号185のヌクレオチド配列と少なくとも95%の配列同一性を有する。いくつかの実施形態において、前記核酸は、配列番号196のヌクレオチド配列と少なくとも95%の配列同一性を有する。いくつかの実施形態において、前記核酸は、配列番号207のヌクレオチド配列と少なくとも95%の配列同一性を有する。いくつかの実施形態において、前記核酸は、配列番号219のヌクレオチド配列と少なくとも95%の配列同一性を有する。

【0356】

いくつかの実施形態において、前記核酸は、配列番号151のヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態において、前記核酸は、配列番号162のヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態において、前記核酸は、配列番号173のヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態において、前記核酸は、配列番号185のヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態において、前記核酸は、配列番号196のヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態において、前記核酸は、配列番号207のヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態において、前記核酸は、配列番号219のヌクレオチド配列を含む。

【0357】

相同アーム

本明細書に記載の方法におけるTRAC座位への挿入用の核酸とFOXP3の座位への挿入用の核酸は、二本鎖切断の導入後の相同組換え修復によるTRAC座位またはFOXP3座位への核酸の挿入をそれぞれ標的とした5'相同アームと3'相同アームをそれぞれ含む。核酸のコード鎖（すなわち、CISC構成要素、TCR鎖およびFoxP3を含むポリペプチドをコードするリーディングフレームを含む核酸鎖）を考慮した場合、通常、5'相同アームは核酸の5'末端にある相同アームを指し、3'相同アームは核酸の3'末端にある別の相同アームを指す。5'相同アームは、標的座位の第1の配列と相同性を有し、3'相同アームは、前記標的座位の第1の配列の下流の第2の配列と相同性を有することから、標的化された方法でその座位に核酸が挿入される。核酸の挿入後、改変された標的座位は、第1の配列と第2配列の代わりに、5'相同アームと3'相同アームを含み、標的座位の第1の配列と第2配列の間に存在していた配列の代わりに、前記核酸上で相同アーム間に存在していた配列を含む。5'相同アームと3'相同アームは、同じ長さであってもよく、同程度の長さであってもよく（それぞれの長さの差が100bp以内であってもよく）、異なる長さであってもよい。いくつかの実施形態において、5'相同アームと3'相同アームの一方または両方の長さは、100～2,000bp、200～2,000bp、400～1,500bp、または500～

1,000bpである。いくつかの実施形態において、5'相同アームと3'相同アームの一方または両方の長さは、約100bp、約200bp、約300bp、約400bp、約500bp、約600bp、約700bp、約800bp、約900bp、約1,000bp、約1,100bp、約1,200bp、約1,300bp、約1,400bp、約1,500bp、約1,600bp、約1,700bp、約1,800bp、約1,900bpまたは約2,000bpである。いくつかの実施形態において、両方の相同アームの長さは、100~2,000ヌクレオチド長である。いくつかの実施形態において、両方の相同アームの長さは、300~1,000ヌクレオチド長である。いくつかの実施形態において、両方の相同アームの長さは、300~700ヌクレオチド長である。いくつかの実施形態において、両方の相同アームの長さは、500~700ヌクレオチド長である。いくつかの実施形態において、両方の相同アームの長さは、700~1,000ヌクレオチド長である。

10

【0358】

標的とするゲノム座位への挿入用の核酸の相同アームは、その標的座位において、ヌクレアーゼにより切断される標的部位の上流および／または下流にある相同配列に基づいて選択してもよい。例えば、標的座位の特定の位置（切断部位）の切断後に相同組換え修復を行うことにより核酸を挿入するいくつかの実施形態では、挿入用の核酸の5'相同アームは、この切断部位の上流の配列と同一性を有し、この挿入用の核酸の3'相同アームは、この切断部位の下流の配列と同一性を有する。いくつかの実施形態において、5'相同アームは、切断部位の25~5,000ヌクレオチド上流、50~3,000ヌクレオチド上流、75~2,000ヌクレオチド上流、100~1,000ヌクレオチド上流または150~500ヌクレオチド上流で終端する100~2,000ヌクレオチド長の配列と同一性を有する。いくつかの実施形態において、5'相同アームは、RNA誘導型ヌクレアーゼによって切断されるPAM配列の25~5,000ヌクレオチド上流、50~3,000ヌクレオチド上流、75~2,000ヌクレオチド上流、100~1,000ヌクレオチド上流または150~500ヌクレオチド上流で終端する100~2,000ヌクレオチド長の配列と同一性を有する。いくつかの実施形態において、5'相同アームは、gRNAのスペーサー配列に相補的なゲノム配列の25~5,000ヌクレオチド上流、50~3,000ヌクレオチド上流、75~2,000ヌクレオチド上流、100~1,000ヌクレオチド上流または150~500ヌクレオチド上流で終端する100~2,000ヌクレオチド長の配列と同一性を有する。いくつかの実施形態において、5'相同アームは、切断部位の150~500ヌクレオチド上流の位置で終端する100~2,000ヌクレオチド長の配列と同一性を有する。いくつかの実施形態において、5'相同アームは、RNA誘導型ヌクレアーゼによって切断されるPAM配列の150~500ヌクレオチド上流の位置で終端する100~2,000ヌクレオチド長の配列と同一性を有する。いくつかの実施形態において、5'相同アームは、gRNAのスペーサー配列に相補的なゲノム配列の150~500ヌクレオチド上流の位置で終端する100~2,000ヌクレオチド長の配列と同一性を有する。

20

30

【0359】

いくつかの実施形態において、3'相同アームは、切断部位の25~5,000ヌクレオチド上流、50~3,000ヌクレオチド上流、75~2,000ヌクレオチド上流、100~1,000ヌクレオチド上流または150~500ヌクレオチド上流で終端する100~2,000ヌクレオチド長の配列と同一性を有する。いくつかの実施形態において、3'相同アームは、RNA誘導型ヌクレアーゼによって切断されるPAM配列の25~5,000ヌクレオチド上流、50~3,000ヌクレオチド上流、75~2,000ヌクレオチド上流、100~1,000ヌクレオチド上流または150~500ヌクレオチド上流で終端する100~2,000ヌクレオチド長の配列と同一性を有する。いくつかの実施形態において、3'相同アームは、gRNAのスペーサー配列に相補的なゲノム配列の25~5,000ヌクレオチド上流、50~3,000ヌクレオチド上流、75~2,000ヌクレオチド上流、100~1,000ヌクレオチド上流または150~500ヌクレオチド上流で終端する100~2,000ヌクレオチド長の配列と同一性を有する。いくつかの実施形態において、3'相同アームは、切断部位の150~500ヌクレオチド上流の

40

50

位置で終端する100～2,000ヌクレオチド長の配列と相同性を有する。いくつかの実施形態において、3'相同アームは、RNA誘導型ヌクレアーゼによって切断されるPAM配列の150～500ヌクレオチド上流の位置で終端する100～2,000ヌクレオチド長の配列と相同性を有する。いくつかの実施形態において、3'相同アームは、gRNAのスペーサー配列に相補的なゲノム配列の150～500ヌクレオチド上流の位置で終端する100～2,000ヌクレオチド長の配列と相同性を有する。

【0360】

いくつかの実施形態において、本発明の方法が、スペーサー配列を含むgRNAを含む場合、ゲノムへの挿入用の核酸の5'相同アームと3'相同アームは、このスペーサー配列に相補的な配列を含んでいない。そのような実施形態では、ドナー鑄型上に相補的な配列が存在しないことから、gRNAがドナー鑄型に結合してドナー鑄型を切断する可能性を低減することができ、このようなgRNAによるドナー鑄型の切断は、ゲノムへの挿入効率を低下させることがある。いくつかの実施形態において、ドナー鑄型は、スペーサー配列に相補的な配列を含んでいない。標的化切断用のgRNAを必要としない別の種類のヌクレアーゼが使用される実施形態では、ドナー鑄型は、ヌクレアーゼによって切断される配列を含んでいない。

10

【0361】

いくつかの実施形態において、TRAC座位への挿入用の核酸は、配列番号85のヌクレオチド配列と少なくとも90%の配列同一性を有する5'相同アームと、配列番号93のヌクレオチド配列と少なくとも90%の配列同一性を有する3'相同アームとを含む。いくつかの実施形態において、前記5'相同アームは、配列番号85のヌクレオチド配列と少なくとも95%の配列同一性を有し、前記3'相同アームは、配列番号93のヌクレオチド配列と少なくとも95%の配列同一性を有する。いくつかの実施形態において、前記5'相同アームは、配列番号85のヌクレオチド配列を含み、前記3'相同アームは、配列番号93のヌクレオチド配列を含む。

20

【0362】

いくつかの実施形態において、TRAC座位への挿入用の核酸は、配列番号96のヌクレオチド配列と少なくとも90%の配列同一性を有する5'相同アームと、配列番号105のヌクレオチド配列と少なくとも90%の配列同一性を有する3'相同アームとを含む。いくつかの実施形態において、前記5'相同アームは、配列番号96のヌクレオチド配列と少なくとも95%の配列同一性を有し、前記3'相同アームは、配列番号105のヌクレオチド配列と少なくとも95%の配列同一性を有する。いくつかの実施形態において、前記5'相同アームは、配列番号96のヌクレオチド配列を含み、前記3'相同アームは、配列番号105のヌクレオチド配列を含む。

30

【0363】

いくつかの実施形態において、TRAC座位への挿入用の核酸は、配列番号108のヌクレオチド配列と少なくとも90%の配列同一性を有する5'相同アームと、配列番号116のヌクレオチド配列と少なくとも90%の配列同一性を有する3'相同アームとを含む。いくつかの実施形態において、前記5'相同アームは、配列番号108のヌクレオチド配列と少なくとも95%の配列同一性を有し、前記3'相同アームは、配列番号116のヌクレオチド配列と少なくとも95%の配列同一性を有する。いくつかの実施形態において、前記5'相同アームは、配列番号108のヌクレオチド配列を含み、前記3'相同アームは、配列番号116のヌクレオチド配列を含む。

40

【0364】

いくつかの実施形態において、TRAC座位への挿入用の核酸は、配列番号119のヌクレオチド配列と少なくとも90%の配列同一性を有する5'相同アームと、配列番号127のヌクレオチド配列と少なくとも90%の配列同一性を有する3'相同アームとを含む。いくつかの実施形態において、前記5'相同アームは、配列番号119のヌクレオチド配列と少なくとも95%の配列同一性を有し、前記3'相同アームは、配列番号127のヌクレオチド配列と少なくとも95%の配列同一性を有する。いくつかの実施形態において、前記5'相同

50

アームは、配列番号119のヌクレオチド配列を含み、前記3'相同アームは、配列番号127のヌクレオチド配列を含む。

【0365】

いくつかの実施形態において、TRAC座位への挿入用の核酸は、配列番号130のヌクレオチド配列と少なくとも90%の配列同一性を有する5'相同アームと、配列番号138のヌクレオチド配列と少なくとも90%の配列同一性を有する3'相同アームとを含む。いくつかの実施形態において、前記5'相同アームは、配列番号130のヌクレオチド配列と少なくとも95%の配列同一性を有し、前記3'相同アームは、配列番号138のヌクレオチド配列と少なくとも95%の配列同一性を有する。いくつかの実施形態において、前記5'相同アームは、配列番号130のヌクレオチド配列を含み、前記3'相同アームは、配列番号138のヌクレオチド配列を含む。

10

【0366】

いくつかの実施形態において、FOXP3座位への挿入用の核酸は、配列番号141のヌクレオチド配列と少なくとも90%の配列同一性を有する5'相同アームと、配列番号149のヌクレオチド配列と少なくとも90%の配列同一性を有する3'相同アームとを含む。いくつかの実施形態において、前記5'相同アームは、配列番号141のヌクレオチド配列と少なくとも95%の配列同一性を有し、前記3'相同アームは、配列番号149のヌクレオチド配列と少なくとも95%の配列同一性を有する。いくつかの実施形態において、前記5'相同アームは、配列番号141のヌクレオチド配列を含み、前記3'相同アームは、配列番号149のヌクレオチド配列を含む。

20

【0367】

いくつかの実施形態において、FOXP3座位への挿入用の核酸は、配列番号152のヌクレオチド配列と少なくとも90%の配列同一性を有する5'相同アームと、配列番号160のヌクレオチド配列と少なくとも90%の配列同一性を有する3'相同アームとを含む。いくつかの実施形態において、前記5'相同アームは、配列番号152のヌクレオチド配列と少なくとも95%の配列同一性を有し、前記3'相同アームは、配列番号160のヌクレオチド配列と少なくとも95%の配列同一性を有する。いくつかの実施形態において、前記5'相同アームは、配列番号152のヌクレオチド配列を含み、前記3'相同アームは、配列番号160のヌクレオチド配列を含む。

30

【0368】

いくつかの実施形態において、FOXP3座位への挿入用の核酸は、配列番号163のヌクレオチド配列と少なくとも90%の配列同一性を有する5'相同アームと、配列番号171のヌクレオチド配列と少なくとも90%の配列同一性を有する3'相同アームとを含む。いくつかの実施形態において、前記5'相同アームは、配列番号163のヌクレオチド配列と少なくとも95%の配列同一性を有し、前記3'相同アームは、配列番号171のヌクレオチド配列と少なくとも95%の配列同一性を有する。いくつかの実施形態において、前記5'相同アームは、配列番号163のヌクレオチド配列を含み、前記3'相同アームは、配列番号171のヌクレオチド配列を含む。

40

【0369】

いくつかの実施形態において、FOXP3座位への挿入用の核酸は、配列番号174のヌクレオチド配列と少なくとも90%の配列同一性を有する5'相同アームと、配列番号183のヌクレオチド配列と少なくとも90%の配列同一性を有する3'相同アームとを含む。いくつかの実施形態において、前記5'相同アームは、配列番号174のヌクレオチド配列と少なくとも95%の配列同一性を有し、前記3'相同アームは、配列番号183のヌクレオチド配列と少なくとも95%の配列同一性を有する。いくつかの実施形態において、前記5'相同アームは、配列番号174のヌクレオチド配列を含み、前記3'相同アームは、配列番号183のヌクレオチド配列を含む。

50

【0370】

いくつかの実施形態において、FOXP3座位への挿入用の核酸は、配列番号186のヌクレオチド配列と少なくとも90%の配列同一性を有する5'相同アームと、配列番号194の

ヌクレオチド配列と少なくとも90%の配列同一性を有する3'相同アームとを含む。いくつかの実施形態において、前記5'相同アームは、配列番号186のヌクレオチド配列と少なくとも95%の配列同一性を有し、前記3'相同アームは、配列番号194のヌクレオチド配列と少なくとも95%の配列同一性を有する。いくつかの実施形態において、前記5'相同アームは、配列番号186のヌクレオチド配列を含み、前記3'相同アームは、配列番号194のヌクレオチド配列を含む。

【0371】

いくつかの実施形態において、FOXP3座位への挿入用の核酸は、配列番号197のヌクレオチド配列と少なくとも90%の配列同一性を有する5'相同アームと、配列番号205のヌクレオチド配列と少なくとも90%の配列同一性を有する3'相同アームとを含む。いくつかの実施形態において、前記5'相同アームは、配列番号197のヌクレオチド配列と少なくとも95%の配列同一性を有し、前記3'相同アームは、配列番号205のヌクレオチド配列と少なくとも95%の配列同一性を有する。いくつかの実施形態において、前記5'相同アームは、配列番号197のヌクレオチド配列を含み、前記3'相同アームは、配列番号205のヌクレオチド配列を含む。

【0372】

いくつかの実施形態において、FOXP3座位への挿入用の核酸は、配列番号208のヌクレオチド配列と少なくとも90%の配列同一性を有する5'相同アームと、配列番号217のヌクレオチド配列と少なくとも90%の配列同一性を有する3'相同アームとを含む。いくつかの実施形態において、前記5'相同アームは、配列番号208のヌクレオチド配列と少なくとも95%の配列同一性を有し、前記3'相同アームは、配列番号217のヌクレオチド配列と少なくとも95%の配列同一性を有する。いくつかの実施形態において、前記5'相同アームは、配列番号208のヌクレオチド配列を含み、前記3'相同アームは、配列番号217のヌクレオチド配列を含む。

【0373】

遺伝子組換え細胞

本開示のいくつかの態様は、細胞ゲノムの別々の座位にそれぞれ導入された2種の核酸を含む遺伝子組換え細胞に関し、一方の核酸をTRAC座位に挿入し、他方の核酸をFOXP3座位に挿入することによって二重編集された細胞（すなわち、2つの異なる座位に各核酸がそれぞれ挿入された細胞）である。正確な挿入位置は、それぞれの座位を標的とする核酸上の相同アームに応じて様々に異なる。TRAC座位を標的とする第1の核酸は、（例えば、ヌクレアーゼによりTRAC座位のDNA配列を切断した後に、相同組換え修復（HDR）を行うことによって）TRAC座位に該核酸を挿入するための指向性を付与する5'相同アームと3'相同アームを含む。FOXP3座位を標的とする第2の核酸は、（例えば、ヌクレアーゼによりFOXP3座位のDNA配列を切断した後に、相同組換え修復（HDR）を行うことによって）FOXP3座位に該核酸を挿入するための指向性を付与する5'相同アームと3'相同アームを含む。細胞の別々の座位に2種の核酸をそれぞれ挿入することによって、二重編集細胞（すなわち、2つの異なる座位に各核酸がそれぞれ挿入された細胞）が得られる。

【0374】

本明細書に記載の細胞の実施形態において、組換えTRAC座位には、

(i) (a) FK506結合タンパク質12 (FKBP) を含む細胞外結合ドメイン、またはFK506結合タンパク質12 (FKBP) に由来する細胞外結合ドメインと、(b) IL-2R γ の膜貫通ドメインを含む膜貫通ドメイン、またはIL-2R γ 膜貫通ドメインに由来する膜貫通ドメインと、(c) IL-2R γ の細胞質内ドメインを含む細胞内シグナル伝達ドメイン、またはIL-2R γ の細胞質内ドメインに由来する細胞内シグナル伝達ドメインとを含む第1の化学誘導性シグナル伝達複合体 (CISC) 構成要素をコードするヌクレオチド配列；

(ii) 全長TCR β 鎖をコードするヌクレオチド配列；および

(iii) 異種TCR α 鎖の少なくとも一部をコードするヌクレオチド配列に作動可能に連結されたプロモーターが挿入されている。

異種TCR α 鎖をコードする前記ヌクレオチド配列は、内因性TCR α の一部（例えばTCR α の定常ドメイン）をコードする内因性配列とインフレームに挿入されることによって、発現されたmRNAが翻訳されて、異種TCR β 鎖と会合するTCR α 鎖が生成され、TCRが形成される。TCR α 鎖の抗原結合領域は、挿入された核酸によってコードされることから、TCRの特異性は、挿入されたこの核酸によって決まる。本明細書に記載の細胞において、挿入された核酸によってコードされるTCRは、T1D関連抗原に結合する。したがって、組換えTRAC座位において、挿入されたプロモーターに作動可能に連結された各配列の転写が、このプロモーターによって開始され、挿入された核酸によってコードされる異種配列の一部を含む異種TCR β 鎖と異種TCR α 鎖により形成されたT1D関連抗原特異的TCRとFKBP-IL2R γ CISC構成要素が組換えTRAC座位から発現される。

10

【0375】

本明細書に記載の細胞の実施形態において、組換えFOXP3座位には、

(i) (a) mTORのFKBP-ラパマイシン結合 (FRB) ドメインを含む細胞外結合ドメイン、またはmTORのFKBP-ラパマイシン結合 (FRB) ドメインに由来する細胞外結合ドメインと、(b) IL-2R β の膜貫通ドメインを含む膜貫通ドメイン、またはIL-2R β の膜貫通ドメインに由来する膜貫通ドメインと、(c) IL-2R β の細胞質内ドメインを含む細胞内シグナル伝達ドメイン、またはIL-2R β の細胞質内ドメインに由来する細胞内シグナル伝達ドメインとを含む第1の化学誘導性シグナル伝達複合体 (CISC) 構成要素をコードするヌクレオチド配列；

(ii) 膜貫通ドメインを持たない細胞質ゾル内FRBドメインをコードするヌクレオチド配列；および

20

(iii) FoxP3をコードするヌクレオチド配列

に作動可能に連結されたプロモーターが挿入されている。

プロモーターは、FOXP3座位のTreg特異的脱メチル化領域の下流に挿入されている（例えば、FOXP3遺伝子の第1のコーディングエキソンであるエキソン2の上流の2,000ヌクレオチド以内に含まれる配列またはこの2,000ヌクレオチドまでの配列に対して相対性を有する相同アームを利用して挿入されている）。炎症状態においてFOXP3の発現を不安定化するTSDRの下流にプロモーターを挿入することによって、TSDRの上流にある内因性FOXP3プロモーターとは無関係に、挿入されたプロモーターによって、FoxP3をコードするmRNAの転写を開始することができる。したがって、組換えFOXP3座位において、挿入されたプロモーターに作動可能に連結された各配列の転写が、このプロモーターによって開始されて、FRB-IL2R β CISC構成要素と細胞質ゾル内FRB構成要素とFoxP3がFOXP3座位から発現される。

30

【0376】

前節で述べたように、TRAC座位とFOXP3座位を組換えることによって得られた二重編集細胞は、(i) ラパマイシンの存在下でヘテロ二量体を形成して、IL-2R β の細胞質内ドメインとIL-2R γ の細胞内ドメインの二量体化によりIL-2Rシグナル伝達を行う第1のCISC構成要素と第2のCISC構成要素；(ii) 細胞内ラパマイシンに結合して、mTORと細胞内ラパマイシンの相互作用を阻止する細胞質ゾル内FRBドメイン；(iii) 安定なTreg表現型を提供するFoxP3；および(iv) T1D関連抗原特異的TCRを安定に発現する。したがって、本明細書に記載の細胞は、T1D関連抗原に対して特異性を有する安定なTreg細胞であり、このTreg細胞は、ラパマイシンを用いて増殖を誘導することができる。さらに、第1のCISC構成要素をコードするヌクレオチド配列と第2のCISC構成要素をコードするヌクレオチド配列を別々の座位に分けて挿入していることから、ラパマイシンを利用することによって、両方のCISC構成要素を発現する細胞（すなわち、両方の座位が組換えられていることから、T1D抗原特異的TCRとFoxP3を発現する細胞）の増殖を選択的に誘導することができる。したがって、二重編集細胞を容易に選択し、インビトロで増殖させて、1型糖尿病の治療用のT1D関連抗原に特異的な安定なTreg細胞集団を製造することができる。さらに、このような安定なTreg細胞のインビボでの生着と増殖を、対象へのラパマイシンの投与により支持してもよい。

40

50

【0377】

プロモーター

本明細書に記載の遺伝子組換え細胞のゲノムに挿入されている核酸は、いずれも、FOXP3座位またはTRAC座位に挿入された1つ以上のヌクレオチド配列に作動可能に連結されたプロモーターを含んでいる。プロモーターは、（例えば、RNAポリメラーゼを動員することによって）作動可能に連結されている配列の転写を開始することができれば、その配列に「作動可能に連結」されている。組換えられたTRAC座位とFOXP3座位に挿入されているプロモーターは、当技術分野で公知のプロモーターであれば、どのようなものであってもよい。いくつかの実施形態において、挿入された異種プロモーターは活性を有し、炎症状態であっても、RNAの転写を促進する。いくつかの実施形態において、前記プロモーターは、構成的プロモーターである。構成的プロモーターは、内因性プロモーターよりも高効率に転写を促進する強力なプロモーターであってもよく、強力なプロモーターや内因性プロモーターよりも低効率に転写を促進する弱いプロモーターであってもよい。いくつかの実施形態において、前記構成的プロモーターは強力なプロモーターである。いくつかの実施形態において、前記異種プロモーターは、誘導型プロモーターである。誘導型プロモーターは、活性化シグナルの存在または抑制性シグナルの不在に応答して、作動可能に連結された配列の転写を促進する。いくつかの実施形態において、前記誘導型プロモーターは、薬物またはステロイドによって誘導可能である。

10

【0378】

いくつかの実施形態において、前記細胞のTRAC座位とFOXP3座位に挿入されたプロモーターは、異なるプロモーターである。別の実施形態において、TRAC座位とFOXP3座位は、同じプロモーターを含む。いくつかの実施形態において、TRAC座位とFOXP3座位は、いずれもMNDプロモーターを含む。TRAC座位とFOXP3座位が同じプロモーターを含む実施形態において、これらのTRAC座位とFOXP3座位のプロモーター配列は同じであってもよい。あるいは、組換えられたTRAC座位のプロモーター配列は、FOXP3座位のプロモーター配列と比較して1つ以上の変異（例えば、挿入、欠失、置換）を含んでいてもよい。いくつかの実施形態において、TRAC座位および／またはFOXP3座位のMNDプロモーターは、配列番号220のヌクレオチド配列と少なくとも90%の配列同一性を有する。いくつかの実施形態において、TRAC座位および／またはFOXP3座位のMNDプロモーターは、配列番号220のヌクレオチド配列と少なくとも95%の配列同一性を有する。いくつかの実施形態において、TRAC座位とFOXP3座位のそれぞれが、配列番号220のヌクレオチド配列を有するMNDプロモーターを含む。

20

30

【0379】

いくつかの実施形態において、TRAC座位に挿入されたプロモーターの最初の5個のヌクレオチドの上流またはその5個のヌクレオチドのいずれかに終止コドンが存在する。いくつかの実施形態において、FOXP3座位に挿入されたプロモーターの最初の5個のヌクレオチドの上流またはその5個のヌクレオチドのいずれかに終止コドンが存在する。プロモーターの最初の5個のヌクレオチドの上流、その5個のヌクレオチドのいずれか、またはその5個のヌクレオチドと重複して終止コドンが存在することによって、組換えたTRAC座位またはFOXP3座位の内因性プロモーターの上流から転写されうるmRNAの翻訳を停止させて、内因性プロモーターの制御下の挿入されたコード配列（例えば、CISC構成要素、異種TCRβ鎖もしくはTCRα鎖またはFoxP3をコードする配列）の発現を抑制することができる。いくつかの実施形態において、終止コドンは、その上流の1つ以上の開始コドンとインフレームであることから、上流の内因性プロモーターからの転写により生じたmRNAが、終止コドン以降は翻訳されなくなる。

40

【0380】

化学誘導性シグナル伝達複合体（CISC）

本明細書に記載の遺伝子組換え細胞の実施形態は、ゲノムのTRAC座位とFOXP3座位のそれぞれに、化学誘導性シグナル伝達複合体（CISC）の構成要素をコードするヌクレオチド配列を含み、各CISC構成要素は、ラパマイシンに結合する細胞外ドメインと、膜

50

貫通ドメインと、インターロイキン2受容体 (IL-2R) の細胞質内ドメインを含む細胞内ドメイン、またはIL-2Rの細胞質内ドメインに由来する細胞内ドメインとを含む。いくつかの実施形態において、前記TRAC座位は、(i) FK506結合タンパク質12 (FKBP) ドメインを含む細胞外結合ドメインと、(ii) IL-2R γ の膜貫通ドメインを含む膜貫通ドメイン、またはIL-2R γ の膜貫通ドメインに由来する膜貫通ドメインと、(iii) IL-2R γ の細胞質内ドメインを含む細胞内ドメイン、またはIL-2R γ の細胞質内ドメインに由来する細胞内ドメインとを含む第1のCISC構成要素をコードし、前記FOXP3座位は、(i) FKBP-ラパマイシン結合ドメインを含む細胞外結合ドメインと、(ii) IL-2R β の膜貫通ドメインを含む膜貫通ドメイン、またはIL-2R β の膜貫通ドメインに由来する膜貫通ドメインと、(iii) IL-2R β の細胞質内ドメインを含む細胞内ドメイン、またはIL-2R β の細胞質内ドメインに由来する細胞内ドメインとを含む第1のCISC構成要素をコードする。CISC構成要素のドメイン (例えば、第1のCISC構成要素の膜貫通ドメイン) は、IL-2Rポリペプチド (例えばIL-2R γ) の特定のドメイン (例えば、天然のIL-2R γ の膜貫通ドメイン) の野生型 (天然) のアミノ酸配列と少なくとも90%の配列同一性を有する場合、そのIL-2Rポリペプチドのそのドメインに「由来する」ものである。

10

【0381】

細胞においてCISC構成要素を発現させ、ラパマイシンの有無および／またはその濃度を操作することによって、その細胞においてIL-2のシグナル伝達を選択的に誘導することができる。このようにして、シグナル伝達を制御可能に誘導することによって、例えば、IL-2のシグナル伝達事象によって細胞増殖が誘導されて、両方のCISC構成要素を発現する細胞を選択的に増殖させることができる。2つの座位を組換えるいくつかの実施形態では、異なるCISC構成要素をコードするヌクレオチドが各座位に挿入されているため、一方のCISC構成要素のみを含む細胞をラパマイシンと接触させても、もう一方のCISC構成要素が存在しないことから、二量体化は誘導されず、IL-2のシグナル伝達も誘導されないため、このような選択的な増殖によって、両方の座位が組み換えられた細胞を選択することが可能となる。

20

【0382】

細胞内シグナル伝達ドメインの例として、IL-2R β の細胞質内ドメインおよびIL-2R γ の細胞質内ドメインならびにその機能性誘導体が挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態において、第1のCISC構成要素の細胞内シグナル伝達ドメインは、IL-2R γ ドメインまたはその機能性誘導体を含み、第2のCISC構成要素の細胞内シグナル伝達ドメインは、IL-2R β 細胞質内ドメインまたはその機能性誘導体を含む。いくつかの実施形態において、第1のCISC構成要素と第2のCISC構成要素が二量体化することによって、細胞におけるJAK1、JAK3および／またはSTAT5のリン酸化が誘導される。いくつかの実施形態において、第1のCISC構成要素と第2のCISC構成要素が二量体化することによって、細胞増殖が誘導される。

30

【0383】

膜貫通ドメインの例として、IL-2R β の膜貫通ドメインおよびIL-2R γ の膜貫通ドメインならびにその機能性誘導体が挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態において、CISC構成要素の膜貫通ドメインは、そのCISC構成要素の細胞内シグナル伝達ドメインが由来するタンパク質と同じタンパク質に由来する (例えば、IL-2R β の細胞内ドメインを含むCISC構成要素は、IL-2R β の膜貫通ドメインを含む)。いくつかの実施形態において、一方のCISC構成要素はIL-2R β の膜貫通ドメインを含み、もう一方のCISC構成要素はIL-2R γ の膜貫通ドメインを含む。

40

【0384】

ラパマイシンに結合することができる細胞外結合ドメインの例としては、FK506結合タンパク質 (FKBP) ドメインおよびFKBP-ラパマイシン結合 (FRB) ドメインが挙げられるが、これらに限定されない。FKBPドメインとFRBドメインは、後述するようなラパマイシンに結合して、ヘテロ二量体を形成することができる。いくつかの実施形態において、一方のCISC構成要素の細胞外結合ドメインはFKBPドメインを含み、他方のCISC構

50

成要素の細胞外結合ドメインはFRBドメインを含む。いくつかの実施形態において、これらのCISC構成要素は、ラパマイシンの存在下においてヘテロ二量体を形成する。いくつかの実施形態において、FRBドメインは、配列番号236のアミノ酸配列を有する野生型mTORの2098番目のアミノ酸に相当する位置にスレオニンを含む。このアミノ酸変異によって、ラパマイシンに関連する構造を有する化合物に対するmTORの親和性が増加するが、ラパマイシン自体へのmTORの親和性は減少する。したがって、この位置にスレオニンが存在することによって、ラパマイシンに対するmTORの結合能が維持される。野生型mTORの2098番目のアミノ酸「に相当する」CISC構成要素またはFRBドメインのアミノ酸は、（例えば、当技術分野で公知のBLASTアライメントアルゴリズムまたは別のアライメントアルゴリズムによって）CISC構成要素またはFRBドメインの候補配列を配列番号236にアライメントすることによって決定してもよく、配列番号236の2098番目のアミノ酸にアライメントされるアミノ酸は、配列番号236の2098番目のアミノ酸「に相当する」アミノ酸である。

10

【0385】

本明細書に記載のCISC構成要素の細胞外結合ドメイン、膜貫通ドメインおよび細胞内シグナル伝達ドメインは、それぞれリンカーを介してそのCISC構成要素の別のドメインに接続されていてもよい。リンカーは当技術分野で公知である。いくつかの実施形態において、リンカーは、1個、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個もしくは10個のアミノ酸（例えばグリシン）、多数のアミノ酸（例えばグリシン）、またはこれらの数値のいずれか2つを上下限とする範囲内の個数のアミノ酸を含む。いくつかの実施形態において、グリシンスペーサーは、少なくとも3個のグリシンを含む。いくつかの実施形態において、グリシンスペーサーは、GSG、GGGS（配列番号229）、GGGSGGG（配列番号230）またはGGGで示される配列を含む。いくつかの実施形態において、グリシンスペーサーはアミノ酸配列GSGを含む。

20

【0386】

細胞外結合ドメインは、ヒンジドメインを介して膜貫通ドメインに接続されていてもよい。「ヒンジ」は、細胞外結合ドメインを膜貫通ドメインに連結し、それによって細胞外結合ドメインに柔軟性を付与してもよいドメインを指す。いくつかの実施形態では、ヒンジドメインによって細胞外結合ドメインを細胞膜の近傍に配置し、抗体またはその結合断片によって認識される可能性を最小限に抑える。いくつかの実施形態では、細胞外結合ドメインは、ヒンジドメインのN末端側に位置する。いくつかの実施形態では、ヒンジドメインは天然のものであってもよく、合成されたものであってもよい。

30

【0387】

いくつかの実施形態において、第1のCISC構成要素と第2のCISC構成要素は、ラパマイシンの存在下においてヘテロ二量体を形成する。いくつかの実施形態において、第1のCISC構成要素と第2のCISC構成要素は、ラパログの代謝によりインビボで生成される化合物の存在下でヘテロ二量体を形成する。いくつかの実施形態において、インビボでのラパログの代謝によって生成される化合物はラパマイシンである。ラパログの例として、エベロリムス、CCI-779、C20-メタリルラパマイシン、C16-(S)-3-メチルインドールラパマイシン、C16-iRap、C16-(S)-7-メチルインドールラパマイシン、AP21967、C16-(S)-ブチルスルホンアミドラパマイシン、AP23050、ミコフェノール酸ナトリウム、塩酸ベニジピン、AP1903およびAP23573、ならびにこれらの代謝産物および誘導体が挙げられるが、これらに限定されない。

40

【0388】

いくつかの実施形態において、前記FOX P3座位は、ラパマイシンに結合する第3のCISC構成要素をコードするヌクレオチド配列をさらに含む。このようなCISC構成要素は、例えば、細胞内ラパマイシンに結合させるのに有用であり、これによって、CISC構成要素に結合したラパマイシンがその他の細胞内分子や細胞内構造と相互作用することを阻止することができる（例えば、ラパマイシンがmTORと相互作用することを阻止することができる）。いくつかの実施形態において、第3のCISC構成要素は、膜貫通ドメインを

50

含んでいない可溶性タンパク質である。いくつかの実施形態において、第3のCISC構成要素は、細胞内FRBドメインを含む。いくつかの実施形態において、第3のCISC構成要素は、FRBドメインを含むが膜貫通ドメインを含んでいない可溶性タンパク質である。

【0389】

いくつかの実施形態において、CISC構成要素は、配列番号66または71に示されるアミノ酸配列と少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または最大で100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態において、1つ以上のCISC構成要素は、シグナルペプチドをさらに含む。シグナルペプチドは、当技術分野で公知の、翻訳されたCISC構成要素を細胞膜に輸送するシグナルペプチドであれば、どのようなものであってもよい。いくつかの実施形態において、第1のCISC構成要素と第2のCISC構成要素は、いずれもLCN2のシグナルペプチドを含む。いくつかの実施形態において、第1のCISC構成要素と第2のCISC構成要素は、いずれも配列番号73のアミノ酸配列を含むシグナルペプチドを含む。

10

【0390】

いくつかの実施形態において、一方のCISC構成要素は、配列番号66に示されるアミノ酸配列と少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または最大で100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、他方のCISC構成要素は、配列番号71に示されるアミノ酸配列と少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または最大で100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態において、各CISC構成要素はシグナルペプチドをさらに含み、これらのシグナルペプチドのアミノ酸配列は同じであってもよく、異なってもよい。これらのシグナルペプチドは、当技術分野で公知の、翻訳されたCISC構成要素を細胞膜に輸送するシグナルペプチドであれば、どのようなものであってもよい。

20

【0391】

いくつかの実施形態において、第3のCISC構成要素は、配列番号72に示されるアミノ酸配列と少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または最大で100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態において、第3のCISC構成要素は、配列番号72に示されるアミノ酸配列と少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または最大で100%の配列同一性を有するアミノ酸配列からなる。いくつかの実施形態において、第3のCISC構成要素は、配列番号72のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態において、第3のCISC構成要素は、シグナルペプチドを含んでいない。いくつかの実施形態において、第3のCISC構成要素は、膜貫通ドメインを含んでいない。

30

40

【0392】

T細胞受容体 (TCR)

本明細書に記載の細胞のいくつかの実施形態において、TCR β タンパク質の全長をコードするヌクレオチド配列とTCR α タンパク質の少なくとも一部をコードするヌクレオチド配列に作動可能に連結されたプロモーターを含む核酸を挿入することによって、TRAC座位が編集されており、このTCR α タンパク質の少なくとも一部は、例えば、抗原特異性を担うTCR α タンパク質の一部を形成するTCR α 可変領域およびTCR α 接合 (TRAJ) 領域である。いくつかの実施形態において、TCR α の可変領域と接合領域をコードす

50

る挿入されたヌクレオチド配列は、TCR α の定常ドメインの一部をコードする内因性ヌクレオチド配列にインフレームであることから、挿入された異種プロモーターにより、異種TCR β タンパク質をコードする配列と、異種TRAV/TRAJアミノ酸配列および内因性TCR α 定常ドメインを含むTCR α タンパク質をコードする配列の転写が開始される。この実施形態では、内因性TRAC座位の内因性3'調節領域を利用する。

【0393】

本明細書に記載の遺伝子組換え細胞は、1型糖尿病（T1D）に特異的なT細胞受容体を発現する。本明細書に記載の遺伝子組換え細胞により発現されるT細胞受容体は、「遺伝子組換え細胞の製造方法」という見出しの節と、「T細胞受容体（TCR）」という小見出しの節において述べている。特定の実施形態において、細胞ゲノムにおいてTCRをコードする配列は、例えば、免疫系細胞、造血幹細胞、T細胞、初代T細胞、T細胞株、NK細胞、ナチュラルキラーT細胞などの特定の宿主細胞における発現を向上させるためにコドン最適化することができる。例えば、Scholten et al., Clin Immunol. 2006, 119:135を参照されたい。

【0394】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載の遺伝子組換え細胞の組換えTRAC座位は、TCR β 鎖とTCR α 鎖の少なくとも一部をコードし、このTCR β 鎖とTCR α 鎖の少なくとも一部は、組み合わせて発現されて、IGRP（305-234）ペプチドに結合するT1D2 TCRを形成する。別の実施形態において、本明細書に記載の組換えTRAC座位によってその一部がコードされる全長TCR α 鎖とTCR β 鎖は、IGRP（241-260）ペプチドに結合するT1D4 TCRを形成する。別の実施形態において、本明細書に記載の挿入されたヌクレオチド配列によってその一部がコードされる全長TCR α 鎖とTCR β 鎖は、IGRP（305-324）ペプチドに結合するT1D5-1 TCRを形成する。いくつかの実施形態において、IGRP（305-324）ペプチドは、HLA-DRB1*0401に結合した場合に認識される。いくつかの実施形態において、IGRP（241-260）ペプチドは、HLA-DRB1*0401に結合した場合に認識される。

【0395】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載の遺伝子組換え細胞の組換えTRAC座位によってコードされるTCR β 鎖とTCR α 鎖（の少なくとも一部）から形成されるTCRは、 α CDR1、 α CDR2、 α CDR3の3つの相補性決定領域（CDR）を有するTCR α 可変（V α ）ドメインと、 β CDR1、 β CDR2、 β CDR3の3つのCDRを有するTCR β 可変（V β ）ドメインを含む。本明細書に記載のTCRのCDRの代表的なアミノ酸を表1に示し、本明細書に記載のTCRのCDRをコードするヌクレオチド配列を表2に示している。いくつかの実施形態において、(i) α CDR1は配列番号1を含み、(ii) α CDR2は配列番号2を含み、(iii) α CDR3は配列番号3を含み、(iv) β CDR1は配列番号4を含み、(v) β CDR2は配列番号5を含み、(vi) β CDR3は配列番号6を含む。いくつかの実施形態において、(i) α CDR1は配列番号11を含み、(ii) α CDR2は配列番号12を含み、(iii) α CDR3は配列番号13を含み、(iv) β CDR1は配列番号14を含み、(v) β CDR2は配列番号15を含み、(vi) β CDR3は配列番号16を含む。いくつかの実施形態において、(i) α CDR1は配列番号21を含み、(ii) α CDR2は配列番号22を含み、(iii) α CDR3は配列番号23を含み、(iv) β CDR1は配列番号24を含み、(v) β CDR2は配列番号25を含み、(vi) β CDR3は配列番号26を含む。別の実施形態において、 α CDR1、 α CDR2、 α CDR3、 β CDR1、 β CDR2および β CDR3からなる各セットは、前記アミノ酸配列の組み合わせのいずれかに示される各アミノ酸配列と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%または少なくとも99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を有していてもよい。

【0396】

いくつかの実施形態において、V α は配列番号7を含み、V β は配列番号8を含む。いくつかの実施形態において、V α は配列番号17を含み、V β は配列番号18を含む。いくつ

かの実施形態において、V α は配列番号27を含み、V β は配列番号28を含む。別の実施形態において、V α とV β からなる各ペアは、前記アミノ酸配列の組み合わせのいずれかに示される各アミノ酸配列と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%または少なくとも99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を有していてもよい。

【0397】

いくつかの実施形態において、TCR α 鎖は配列番号9を含み、TCR β 鎖は配列番号10を含む。いくつかの実施形態において、TCR α 鎖は配列番号19を含み、TCR β 鎖は配列番号20を含む。いくつかの実施形態において、TCR α 鎖は配列番号29を含み、TCR β 鎖は配列番号30を含む。別の実施形態において、TCR α 鎖とTCR β 鎖からなる各ペアは、前記アミノ酸配列の組み合わせのいずれかに示される各アミノ酸配列と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%または少なくとも99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を有していてもよい。

【0398】

FOXP3座位の組換え

本明細書に記載の遺伝子組換え細胞のいくつかの実施形態において、FOXP3座位は、内因性FoxP3タンパク質の少なくとも一部をコードするヌクレオチド配列に作動可能に連結されたプロモーターが挿入されている。挿入されるプロモーターは、FOXP3座位のTreg特異的脱メチル化領域（TSDR）の下流のゲノムに導入される。組換えが行われていない細胞では、TSDRが、エピジェネティックにFoxP3の発現を調節することによって、炎症状態に曝露された細胞のFoxP3の生成を抑制するが、その結果、FoxP3の発現が喪失して、非組換えTreg細胞がTエフェクター（Teff）表現型に変換される。TSDRの下流にプロモーターを挿入することによって、TSDRを介したFOXP3の発現調節をバイパスすることにより、炎症状態であっても、FoxP3の安定な生成が可能になる。

【0399】

異種プロモーターは、FOXP3のコード配列の内因性プロモーターの下流（例えばTSDRの下流）、かつ第1のコーディングエキソンの上流または第1のコーディングエキソン内であれば、どの位置に挿入してもよい。当技術分野において、この第1のコーディングエキソンは、内因性FOXP3プロモーターから転写されるpre-mRNAに存在する第2のエキソンであることからエキソン2として知られており、野生型のFoxP3の翻訳を開始する開始コドンを含むエキソン1（FOXP3をコードするpre-mRNAの第1のエキソン）ではないことから、第1のコーディングエキソンとして知られている。いくつかの実施形態において、異種プロモーターは、FOXP3座位のTSDRの1~10,000ヌクレオチド下流、10~1,000ヌクレオチド下流、10~100ヌクレオチド下流、10~5,000ヌクレオチド下流、20~4,000ヌクレオチド下流、30~3,000ヌクレオチド下流、40~2,000ヌクレオチド下流、50~1,000ヌクレオチド下流、60~750ヌクレオチド下流、70~500ヌクレオチド下流、80~400ヌクレオチド下流、90~300ヌクレオチド下流、100~200ヌクレオチド下流、1~1,000ヌクレオチド下流、1,000~2,000ヌクレオチド下流、2,000~3,000ヌクレオチド下流、3,000~4,000ヌクレオチド下流、4,000~5,000ヌクレオチド下流、5,000~6,000ヌクレオチド下流、6,000~7,000ヌクレオチド下流、7,000~8,000ヌクレオチド下流、8,000~9,000ヌクレオチド下流、または9,000~10,000ヌクレオチド下流に挿入される。いくつかの実施形態において、異種プロモーターは、FOXP3コード配列の第1のコーディングエキソンの1~10,000ヌクレオチド上流、10~1,000ヌクレオチド上流、10~100ヌクレオチド上流、10~5,000ヌクレオチド上流、20~4,000ヌクレオチド上流、30~3,000ヌクレオチド上流、40~2,000ヌクレオチド上流、50~1,000ヌクレオチド上流、60~750ヌクレオチド上流、70~500ヌクレオチド上流、80~400ヌクレオチド上流、90~300ヌクレオチド上流、100~200ヌクレオチド上流、1~1,000ヌクレオチド上流、1,000~2,000ヌク

レオチド上流、2,000～3,000ヌクレオチド上流、3,000～4,000ヌクレオチド上流、4,000～5,000ヌクレオチド上流、5,000～6,000ヌクレオチド上流、6,000～7,000ヌクレオチド上流、7,000～8,000ヌクレオチド上流、8,000～9,000ヌクレオチド上流、または9,000～10,000ヌクレオチド上流に挿入される。いくつかの実施形態において、異種プロモーターは、第1のコーディングエキソンに挿入されて合成の第1のコーディングエキソンが作製され、この合成の第1のコーディングエキソンは、内因性の第1のコーディングエキソンとは異なるものであるが、下流のFOXP3エキソンをコードするFOXP3配列とインフレームな開始コドンを含んでいる。

【0400】

2Aモチーフおよびリンカー

本明細書に記載の遺伝子組換え細胞の、複数のポリペプチドまたはその一部をコードする組換えTRAC座位および／または組換えFOXP3座位のいくつかの実施形態は、2Aモチーフをコードする介在ヌクレオチド配列を含んでもよい。2Aモチーフは当技術分野で公知であり、1つのヌクレオチド配列から複数のポリペプチドを翻訳して、その生成を促すのに有用である。例えば、Kim et al., PLoS ONE. 2011. 6:e18556を参照されたい。いくつかの実施形態において、2Aモチーフが翻訳され、この翻訳によりポリペプチドの自己切断が起こり、別々のポリペプチドが放出される。別の実施形態では、2Aモチーフをコードするヌクレオチド配列が存在することから、リボソームがmRNAに沿って翻訳を進行する際に、コードされている2Aモチーフのアミノ酸を読み飛ばすことによって、第1のポリペプチド（例えば第1のFKBP-IL2R γ CISC構成要素）が放出された後に、第2のポリペプチド（例えばTCR β 鎖）の翻訳が開始される。

【0401】

いくつかの実施形態では、各ペアの核酸配列において、2Aモチーフをコードするヌクレオチド配列は、(i) 第1の(FKBP-IL2R γ) CISC構成要素をコードするヌクレオチド配列と、(ii) TCR β 鎖をコードするヌクレオチド配列と、(iii) TCR α 鎖またはその一部をコードするヌクレオチド配列の間にインフレームに配置される。したがって、異種プロモーター（例えばMNDプロモーター）によって、CISC構成要素、TCR β 鎖およびTCR α 鎖のそれぞれをコードし、かつ介在する2Aモチーフを含む単一のmRNAの転写が開始されると、CISC構成要素、TCR β 鎖、TCR α 鎖のそれぞれが別々のポリペプチドとして生成される。いくつかの実施形態では、各ペアの核酸配列において、2Aモチーフをコードするヌクレオチド配列は、(i) 第2の(FKBP-IL2R γ) CISC構成要素をコードするヌクレオチド配列と、(ii) 細胞質ゾル内FRBDメインをコードするヌクレオチド配列と、(iii) FoxP3をコードするヌクレオチド配列の間にインフレームに配置される。したがって、異種プロモーター（例えばMNDプロモーター）によって、CISC構成要素、細胞質ゾル内FRBDメインおよびFoxP3のそれぞれをコードし、かつ介在する2Aモチーフを含む単一のmRNAの転写が開始されると、CISC構成要素、細胞質ゾル内FRBDメイン、FoxP3のそれぞれが別々のポリペプチドとして生成される。

【0402】

各ペアの核酸配列において、2つのポリペプチドをコードするヌクレオチド配列の間（例えば、FKBP-IL2R γ CISC構成要素をコードする配列とTCR β 鎖をコードする配列の間；およびTCR β 鎖をコードする配列とTCR α 鎖の一部をコードする配列の間）に配置されたヌクレオチド配列によってコードされる2Aモチーフは、当技術分野で公知の2Aモチーフであれば、どのようなものであってもよい。いくつかの実施形態において、各ペアの核酸配列において、別々のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列の間にコードされている2Aモチーフは、F2A、P2A、T2AおよびE2Aからなる群から独立して選択してもよい。いくつかの実施形態において、1つの組換えTRAC座位および／または1つの組換えFOXP3座位にコードされている第1の2Aモチーフと第2の2Aモチーフは、異なる種類の2Aモチーフである。1つの組換えTRAC座位および／または1つの組換えFOXP3座位において異なる種類の2Aモチーフを使用することによって、内部組換えが発生する確率を低減することができる。内部組換えが発生すると、再結合した2Aモチーフの間の

10

20

30

40

50

ヌクレオチド配列が染色体から切除されることがある。いくつかの実施形態において、1つの組換えTRAC座位および／または1つの組換えFOXP3座位において第1の2Aモチーフをコードするヌクレオチド配列は、その組換えTRAC座位および／またはその組換えFOXP3座位の第2の2Aモチーフをコードするヌクレオチド配列と90%以下の配列同一性を有する。いくつかの実施形態において、1つの組換えTRAC座位および／または1つの組換えFOXP3座位において第1の2Aモチーフをコードするヌクレオチド配列は、その組換えTRAC座位および／またはその組換えFOXP3座位の第2の2Aモチーフをコードするヌクレオチド配列と80%以下の配列同一性を有する。いくつかの実施形態において、1つの組換えTRAC座位および／または1つの組換えFOXP3座位において第1の2Aモチーフをコードするヌクレオチド配列は、その組換えTRAC座位および／またはその組換えFOXP3座位の第2の2Aモチーフをコードするヌクレオチド配列と70%以下の配列同一性を有する。いくつかの実施形態において、1つの組換えTRAC座位および／または1つの組換えFOXP3座位において第1の2Aモチーフをコードするヌクレオチド配列は、その組換えTRAC座位および／またはその組換えFOXP3座位の第2の2Aモチーフをコードするヌクレオチド配列と60%以下の配列同一性を有する。いくつかの実施形態において、1つの組換えTRAC座位および／または1つの組換えFOXP3座位において第1の2Aモチーフをコードするヌクレオチド配列は、その組換えTRAC座位および／またはその組換えFOXP3座位の第2の2Aモチーフをコードするヌクレオチド配列と50%以下の配列同一性を有する。いくつかの実施形態において、第1の2AモチーフはT2Aモチーフであり、第2のモチーフはP2Aモチーフである。

10

20

【0403】

別の実施形態において、1つの組換えTRAC座位および／または1つの組換えFOXP3座位においてヌクレオチド配列によってコードされる第1の2Aモチーフと第2の2Aモチーフは、同じ種類の2Aモチーフである。いくつかの実施形態において、1つの組換えTRAC座位および／または1つの組換えFOXP3座位は、第1のP2Aモチーフをコードするヌクレオチド配列と、第2のP2Aモチーフをコードする第2のヌクレオチド配列を含み、第1のP2Aモチーフをコードするヌクレオチド配列は、第2のP2Aモチーフをコードするヌクレオチド配列と少なくとも80%の配列同一性を有する。いくつかの実施形態において、第1のP2Aモチーフをコードする第1のヌクレオチド配列と第2のP2Aモチーフをコードする第2のヌクレオチド配列は、同じヌクレオチド配列を含む。

30

【0404】

いくつかの実施形態において、組換えTRAC座位は、(i) 第1のCISC構成要素をコードする配列とTCR β 鎖をコードする配列の間に、T2Aモチーフをコードする配列を含み、かつ(ii) TCR β 鎖をコードする配列と異種TCR α 鎖の一部をコードする配列の間に、P2Aモチーフをコードする配列を含む。

【0405】

いくつかの実施形態において、組換えFOXP3座位は、(i) 第2のCISC構成要素をコードする配列と細胞質ゾル内FRBDメインをコードする配列の間に、P2Aモチーフをコードする配列を含み、かつ(ii) 細胞質ゾル内FRBDメインをコードする配列とFoxP3をコードする配列の間に、第2のP2Aモチーフをコードする第2の配列を含む。

40

【0406】

いくつかの実施形態において、組換えTRAC座位または組換えFOXP3座位に挿入されるヌクレオチド配列によってコードされるポリペプチド（例えば、CISC構成要素および／またはTCR β 鎖）は、C末端リンカーを含む。C末端リンカーを組み込むことによって、例えば、2Aモチーフにおける切断効率を向上させてもよく、かつ／またはコードされているCISC構成要素のアミノ酸またはTCR β 鎖のアミノ酸が、2Aモチーフの切断により切除されるのを阻止してもよい。いくつかの実施形態において、コードされている第1のCISC構成要素は、C末端リンカーを含む。いくつかの実施形態において、コードされている第2のCISC構成要素は、C末端リンカーを含む。いくつかの実施形態において、コードされている細胞質ゾル内FRBDメイン構成要素は、C末端リンカーを含む。いく

50

つかの実施形態において、コードされているTCR β 鎖は、C末端リンカーを含む。

【0407】

コードされているポリペプチドのC末端リンカーは、当技術分野で公知のリンカーであれば、どのようなものであってもよい。いくつかの実施形態において、C末端リンカーは、1個、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個もしくは10個のアミノ酸（例えばグリシン）、多数のアミノ酸（例えばグリシン）、またはこれらの数値のいずれか2つを上下限とする範囲内の個数のアミノ酸を含む。いくつかの実施形態において、C末端リンカーは、少なくとも3個のグリシンを含む。いくつかの実施形態において、C末端リンカーは、GSG、GGGS（配列番号229）、GGSGGG（配列番号230）またはGGGで示される配列を含む。いくつかの実施形態において、C末端リンカーはアミノ酸配列GSGを含む。いくつかの実施形態において、第1のCISC構成要素、第2のCISC構成要素、細胞質ゾル内FRBDメインおよびTCR β 鎖は、いずれもアミノ酸配列GSGを有するC末端リンカーを含む。

10

【0408】

いくつかの実施形態において、組換えTRAC座位は、配列番号94、106、117、128および139のいずれかと少なくとも90%の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態において、前記ヌクレオチド配列は、配列番号94、106、117、128および139のいずれかと少なくとも95%の配列同一性を有する。いくつかの実施形態において、前記ヌクレオチド配列は、配列番号94、106、117、128および139のいずれかを含む。いくつかの実施形態において、組換えTRAC座位は、配列番号94のヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態において、組換えTRAC座位は、配列番号106のヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態において、組換えTRAC座位は、配列番号117のヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態において、組換えTRAC座位は、配列番号128のヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態において、組換えTRAC座位は、配列番号139のヌクレオチド配列を含む。

20

【0409】

いくつかの実施形態において、組換えFOXP3座位は、配列番号150、161、172、184、195、206および218のいずれかと少なくとも90%の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態において、前記ヌクレオチド配列は、配列番号150、161、172、184、195、206および218のいずれかと少なくとも95%の配列同一性を有する。いくつかの実施形態において、前記ヌクレオチド配列は、配列番号150、161、172、184、195、206および218のいずれかを含む。いくつかの実施形態において、組換えFOXP3座位は、配列番号150のヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態において、組換えFOXP3座位は、配列番号161のヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態において、組換えFOXP3座位は、配列番号172のヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態において、組換えFOXP3座位は、配列番号184のヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態において、組換えFOXP3座位は、配列番号195のヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態において、組換えFOXP3座位は、配列番号206のヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態において、組換えFOXP3座位は、配列番号218のヌクレオチド配列を含む。

30

40

【0410】

遺伝子組換え細胞を製造するためのシステム

本開示のいくつかの態様は、2種の核酸を含む遺伝子組換え細胞を製造するためのシステムであって、2種の核酸のうち的一方が前記細胞のTRAC座位に対して相同性を有し、もう一方が該細胞のFOXP3座位に対して相同性を有することから、各座位に各核酸を挿入することによって、両方の座位が編集されていてもよいことを特徴とするシステムに関する。TRAC座位を標的とする第1の核酸は、（例えば、ヌクレアーゼによりTRAC座位のDNA配列を切断した後に、相同組換え修復（HDR）を行うことによって）TRAC座位に該核酸を挿入するための指向性を付与する5'相同アームと3'相同アームを含む。FOXP3座位を標的とする第2の核酸は、（例えば、ヌクレアーゼによりFOXP3座位のDNA配

50

列を切断した後に、相同組換え修復（HDR）を行うことによって）FOXP3座位に該核酸を挿入するための指向性を付与する5'相同アームと3'相同アームを含む。細胞の別々の座位に2種の核酸をそれぞれ挿入することによって、二重編集細胞（すなわち、2つの異なる座位に各核酸がそれぞれ挿入された細胞）が得られる。

【0411】

本明細書に記載のシステムの実施形態において、TRAC座位への挿入を標的とする核酸は、

(i) (a) FK506結合タンパク質12（FKBP）を含む細胞外結合ドメイン、またはFK506結合タンパク質12（FKBP）に由来する細胞外結合ドメインと、(b) IL-2R γ の膜貫通ドメインを含む膜貫通ドメイン、またはIL-2R γ 膜貫通ドメインに由来する膜貫通ドメインと、(c) IL-2R γ の細胞質内ドメインを含む細胞内シグナル伝達ドメイン、またはIL-2R γ の細胞質内ドメインに由来する細胞内シグナル伝達ドメインとを含む第1の化学誘導性シグナル伝達複合体（CISC）構成要素をコードするヌクレオチド配列；

10

(ii) 全長TCR β 鎖をコードするヌクレオチド配列；および

(iii) TCR α 鎖の少なくとも一部をコードするヌクレオチド配列に作動可能に連結されたプロモーターを含む。

異種TCR α をコードする前記ヌクレオチド配列は、内因性TCR α の一部（例えばTCR α の定常ドメイン）をコードする内因性配列とインフレームに挿入されることによって、発現されたmRNAが翻訳されて、異種TCR β 鎖と会合するTCR α 鎖が生成され、TCRが形成される。TCR α 鎖の抗原結合領域は、挿入された核酸によってコードされることから、TCRの特異性は、挿入されたこの核酸によって決まる。本明細書に記載のシステムにおいて、挿入された核酸によってコードされるTCRは、T1D関連抗原に結合する。TRAC座位に各配列とプロモーターを挿入することによって、プロモーターに作動可能に連結された各配列の転写が、このプロモーターによって開始され（これにより発現が促されて）、挿入された核酸によってコードされる異種配列の一部を含む異種TCR β 鎖と異種TCR α 鎖により形成されたT1D関連抗原特異的TCRとFKBP-IL2R γ CISC構成要素がTRAC座位から発現される。

20

【0412】

本明細書に記載のシステムの実施形態において、FOXP3座位への挿入を標的とする核酸は、

30

(i) (a) mTORのFKBP-ラパマイシン結合（FRB）ドメインを含む細胞外結合ドメイン、またはmTORのFKBP-ラパマイシン結合（FRB）ドメインに由来する細胞外結合ドメインと、(b) IL-2R β の膜貫通ドメインを含む膜貫通ドメイン、またはIL-2R β の膜貫通ドメインに由来する膜貫通ドメインと、(c) IL-2R β の細胞質内ドメインを含む細胞内シグナル伝達ドメイン、またはIL-2R β の細胞質内ドメインに由来する細胞内シグナル伝達ドメインとを含む第1の化学誘導性シグナル伝達複合体（CISC）構成要素をコードするヌクレオチド配列；

(ii) 膜貫通ドメインを持たない細胞質ゾル内FRBドメインをコードするヌクレオチド配列；および

(iii) FOXP3座位においてTreg特異的脱メチル化領域の下流にある配列に対して相同性を有する3'相同アーム（例えば、FOXP3遺伝子の第1のコーディングエキソンであるエキソン2の上流の2,000ヌクレオチド以内に含まれる配列またはこの2,000ヌクレオチドまでの配列に対して相同性を有する3'相同アーム）に作動可能に連結されたプロモーターを含む。

40

このような方法により、炎症状態においてFOXP3の発現を不安定化するTSDRの下流に、各配列とプロモーターを挿入することによって、TSDRの上流にある内因性FOXP3プロモーターとは無関係に、挿入されたプロモーターによって、FoxP3をコードするmRNAの転写を開始することができる。FOXP3座位に各配列とプロモーターを挿入することによって、プロモーターに作動可能に連結された各配列の転写が、このプロモーターによって開始されて、FRB-IL2R β CISC構成要素と細胞質ゾル内FRB構成要素とFoxP3が

50

FOXP3座位から発現される。

【0413】

前記2種の核酸のうち、一方をTRAC座位に挿入し、もう一方をFOXP3座位に挿入することによって二重編集された細胞は、(i) ラパマイシンの存在下でヘテロ二量体を形成して、IL-2R β の細胞質内ドメインとIL-2R γ の細胞内ドメインの二量体化によりIL-2Rシグナル伝達を行う第1のCISC構成要素と第2のCISC構成要素；(ii) 細胞内ラパマイシンに結合して、mTORと細胞内ラパマイシンの相互作用を阻止する細胞質ゾル内FRBドメイン；(iii) 安定なTreg表現型を提供するFoxP3；および(iv) T1D関連抗原特異的TCRを安定に発現する。したがって、本明細書に記載のシステムは、T1D関連抗原に対して特異性を有する安定なTreg細胞を提供し、このTreg細胞は、ラパマイシンを用いて増殖を誘導することができる。さらに、第1のCISC構成要素をコードするヌクレオチド配列と第2のCISC構成要素をコードするヌクレオチド配列を別々の核酸に分けていることから、ラパマイシンを利用することによって、両方のCISC構成要素を発現する細胞（すなわち、両方の核酸が挿入されたことから、T1D抗原特異的TCRとFoxP3を発現する細胞）の増殖を選択的に誘導することができる。したがって、二重編集細胞を容易に選択し、インビトロで増殖させて、1型糖尿病の治療用のT1D関連抗原に特異的な安定なTreg細胞集団を製造することができる。さらに、このような安定なTreg細胞のインビボでの生着と増殖を、対象へのラパマイシンの投与により支持してもよい。

10

【0414】

プロモーター

20

本明細書に記載のシステムを使用した細胞ゲノムへの標的化された挿入用の各核酸は、各核酸上の1つ以上のヌクレオチド配列に作動可能に連結されたプロモーターを含む。プロモーターは、（例えば、RNAポリメラーゼを動員することによって）作動可能に連結されている配列の転写を開始することができれば、その配列に「作動可能に連結」されている。第1の核酸および第2の核酸のプロモーターは、当技術分野で公知のプロモーターであれば、どのようなものであってもよい。いくつかの実施形態において、導入された核酸上の異種プロモーターは活性を有し、炎症状態であっても、RNAの転写を促進する。いくつかの実施形態において、前記プロモーターは、構成的プロモーターである。構成的プロモーターは、内因性プロモーターよりも高効率に転写を促進する強力なプロモーターであってもよく、強力なプロモーターや内因性プロモーターよりも低効率に転写を促進する弱いプロモーターであってもよい。いくつかの実施形態において、前記構成的プロモーターは強力なプロモーターである。いくつかの実施形態において、前記異種プロモーターは、誘導型プロモーターである。誘導型プロモーターは、活性化シグナルの存在または抑制性シグナルの不在に応答して、作動可能に連結された配列の転写を促進する。いくつかの実施形態において、前記誘導型プロモーターは、薬物またはステロイドによって誘導可能である。

30

【0415】

いくつかの実施形態において、細胞ゲノムへの挿入用の第1の核酸のプロモーターと第2の核酸のプロモーターは、異なるプロモーターである。別の実施形態において、第1の核酸と第2の核酸は、同じプロモーターを含む。いくつかの実施形態において、第1の核酸と第2の核酸はいずれもMNDプロモーターを含む。第1の核酸と第2の核酸が同じプロモーターを含む実施形態において、これらの核酸のプロモーター配列は同じであってもよい。あるいは、第1の核酸のプロモーター配列は、第2の核酸のプロモーター配列と比較して1つ以上の変異（例えば、挿入、欠失、置換）を含んでいてもよい。いくつかの実施形態において、第1の核酸および／または第2の核酸のMNDプロモーターは、配列番号220の核酸配列と少なくとも90%の配列同一性を有する。いくつかの実施形態において、第1の核酸および／または第2の核酸のMNDプロモーターは、配列番号220の核酸配列と少なくとも95%の配列同一性を有する。いくつかの実施形態において、第1の核酸と第2核酸のそれぞれが、配列番号220の核酸配列を有するMNDプロモーターを含む。

40

50

【0416】

いくつかの実施形態において、TRAC座位への挿入用の第1の核酸上のプロモーターの最初の5個のヌクレオチドの上流またはその5個のヌクレオチドのいずれかに終止コドンが存在する。いくつかの実施形態において、FOXP3座位への挿入用の第2の核酸上のプロモーターの最初の5個のヌクレオチドの上流またはその5個のヌクレオチドのいずれかに終止コドンが存在する。プロモーターの最初の5個のヌクレオチドの上流、その5個のヌクレオチドのいずれか、またはその5個のヌクレオチドと重複して終止コドンが存在することによって、組換えたTRAC座位またはFOXP3座位の内因性プロモーターの上流から転写されうるmRNAの翻訳を停止させて、内因性プロモーターの制御下の挿入されたコード配列（例えば、CISC構成要素、異種TCR β 鎖もしくはTCR α 鎖またはFoxP3をコードする配列）の発現を抑制することができると期待される。いくつかの実施形態において、終止コドンは、その上流の1つ以上の開始コドンとインフレームであることから、上流の内因性プロモーターからの転写により生じたmRNAが、終止コドン以降は翻訳されなくなる。

10

【0417】

化学誘導性シグナル伝達複合体（CISC）

本明細書に記載の遺伝子組換え細胞を製造するためのシステムの実施形態において、細胞ゲノムへの挿入用の各核酸は、化学誘導性シグナル伝達複合体（CISC）の構成要素をコードするヌクレオチド配列を含み、各CISC構成要素は、ラパマイシンに結合する細胞外ドメインと、膜貫通ドメインと、インターロイキン2受容体（IL-2R）の細胞質内ドメインを含む細胞内ドメイン、またはIL-2Rの細胞質内ドメインに由来する細胞内ドメインとを含む。いくつかの実施形態において、（TRAC座位への挿入用の）第1の核酸は、（i）FK506結合タンパク質12（FKBP）ドメインを含む細胞外結合ドメインと、（ii）IL-2R γ の膜貫通ドメインを含む膜貫通ドメイン、またはIL-2R γ の膜貫通ドメインに由来する膜貫通ドメインと、（iii）IL-2R γ の細胞質内ドメインを含む細胞内ドメイン、またはIL-2R γ の細胞質内ドメインに由来する細胞内ドメインとを含む第1のCISC構成要素をコードし、（FOXP3座位への挿入用の）第2の核酸は、（i）FKBP-ラパマイシン結合ドメインを含む細胞外結合ドメインと、（ii）IL-2R β の膜貫通ドメインを含む膜貫通ドメイン、またはIL-2R β の膜貫通ドメインに由来する膜貫通ドメインと、（iii）IL-2R β の細胞質内ドメインを含む細胞内ドメイン、またはIL-2R β の細胞質内ドメインに由来する細胞内ドメインとを含む第1のCISC構成要素をコードする。CISC構成要素のドメイン（例えば、第1のCISC構成要素の膜貫通ドメイン）は、IL-2Rポリペプチド（例えばIL-2R γ ）の特定のドメイン（例えば、天然のIL-2R γ の膜貫通ドメイン）の野生型（天然）のアミノ酸配列と少なくとも90%の配列同一性を有する場合、そのIL-2Rポリペプチドのそのドメインに「由来する」ものである。

20

30

【0418】

細胞においてCISC構成要素を発現させ、ラパマイシンの有無および／またはその濃度を操作することによって、その細胞においてIL-2のシグナル伝達を選択的に誘導することができる。このようにして、シグナル伝達を制御可能に誘導することによって、例えば、IL-2のシグナル伝達事象によって細胞増殖が誘導されて、両方のCISC構成要素を発現する細胞を選択的に増殖させることができる。異なるCISC構成要素をコードする2種の核酸が細胞に導入されるいくつかの実施形態では、一方のCISC構成要素のみを含む細胞をラパマイシンと接触させても、もう一方のCISC構成要素が存在しないことから、二量体化は誘導されず、IL-2のシグナル伝達も誘導されないため、このような選択的な増殖によって、両方の核酸を含む細胞を選択することが可能となる。

40

【0419】

細胞内シグナル伝達ドメインの例として、IL-2R β の細胞質内ドメインおよびIL-2R γ の細胞質内ドメインならびにその機能性誘導体が挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態において、第1のCISC構成要素の細胞内シグナル伝達ドメインは、IL-2R γ ドメインまたはその機能性誘導体を含み、第2のCISC構成要素の細胞内シグナル

50

伝達ドメインは、IL-2R β 細胞質内ドメインまたはその機能性誘導体を含む。いくつかの実施形態において、第1のCISC構成要素と第2のCISC構成要素が二量体化することによって、細胞におけるJAK1、JAK3および／またはSTAT5のリン酸化が誘導される。いくつかの実施形態において、第1のCISC構成要素と第2のCISC構成要素が二量体化することによって、細胞増殖が誘導される。

【0420】

膜貫通ドメインの例として、IL-2R β の膜貫通ドメインおよびIL-2R γ の膜貫通ドメインならびにその機能性誘導体が挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態において、CISC構成要素の膜貫通ドメインは、そのCISC構成要素の細胞内シグナル伝達ドメインが由来するタンパク質と同じタンパク質に由来する（例えば、IL-2R β の細胞内ドメインを含むCISC構成要素は、IL-2R β の膜貫通ドメインを含む）。いくつかの実施形態において、一方のCISC構成要素はIL-2R β の膜貫通ドメインを含み、もう一方のCISC構成要素はIL-2R γ の膜貫通ドメインを含む。

【0421】

ラパマイシンに結合することができる細胞外結合ドメインの例としては、FK506結合タンパク質（FKBP）ドメインおよびFKBP-ラパマイシン結合（FRB）ドメインが挙げられるが、これらに限定されない。FKBPドメインとFRBドメインは、後述するようなラパマイシンまたはラパログに結合して、ヘテロ二量体を形成することができる。いくつかの実施形態において、一方のCISC構成要素の細胞外結合ドメインはFKBPドメインを含み、他方のCISC構成要素の細胞外結合ドメインはFRBドメインを含む。いくつかの実施形態において、これらのCISC構成要素は、ラパマイシンの存在下においてヘテロ二量体を形成する。いくつかの実施形態において、FRBドメインは、配列番号236のアミノ酸配列を有する野生型mTORの2098番目のアミノ酸に相当する位置にスレオニンを含む。このアミノ酸変異によって、ラパマイシンに関連する構造を有する化合物に対するmTORの親和性が増加するが、ラパマイシン自体へのmTORの親和性は減少する。したがって、この位置にスレオニンが存在することによって、ラパマイシンに対するmTORの結合能が維持される。野生型mTORの2098番目のアミノ酸「に相当する」CISC構成要素またはFRBドメインのアミノ酸は、（例えば、当技術分野で公知のBLASTアライメントアルゴリズムまたは別のアライメントアルゴリズムによって）CISC構成要素またはFRBドメインの候補配列を配列番号236にアライメントすることによって決定してもよく、配列番号236の2098番目のアミノ酸にアライメントされるアミノ酸は、配列番号236の2098番目のアミノ酸「に相当する」アミノ酸である。

【0422】

本明細書に記載のCISC構成要素の細胞外結合ドメイン、膜貫通ドメインおよび細胞内シグナル伝達ドメインは、それぞれリンカーを介してそのCISC構成要素の別のドメインに接続されていてもよい。リンカーは当技術分野で公知である。いくつかの実施形態において、リンカーは、1個、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個もしくは10個のアミノ酸（例えばグリシン）、多数のアミノ酸（例えばグリシン）、またはこれらの数値のいずれか2つを上下限とする範囲内の個数のアミノ酸を含む。いくつかの実施形態において、グリシンスペーサーは、少なくとも3個のグリシンを含む。いくつかの実施形態において、グリシンスペーサーは、GSG、GGGS（配列番号229）、GGGSGGG（配列番号230）またはGGGで示される配列を含む。いくつかの実施形態において、グリシンスペーサーはアミノ酸配列GSGを含む。

【0423】

細胞外結合ドメインは、ヒンジドメインを介して膜貫通ドメインに接続されていてもよい。「ヒンジ」は、細胞外結合ドメインを膜貫通ドメインに連結し、それによって細胞外結合ドメインに柔軟性を付与してもよいドメインを指す。いくつかの実施形態では、ヒンジドメインによって細胞外結合ドメインを細胞膜の近傍に配置し、抗体またはその結合断片によって認識される可能性を最小限に抑える。いくつかの実施形態では、細胞外結合ドメインは、ヒンジドメインのN末端側に位置する。いくつかの実施形態では、ヒンジドメ

インは天然のものであってもよく、合成されたものであってもよい。

【0424】

いくつかの実施形態において、第1のCISC構成要素と第2のCISC構成要素は、ラパマイシンの存在下においてヘテロ二量体を形成する。いくつかの実施形態において、第1のCISC構成要素と第2のCISC構成要素は、ラパログの代謝によりインビボで生成される化合物の存在下でヘテロ二量体を形成する。いくつかの実施形態において、インビボでのラパログの代謝によって生成される化合物はラパマイシンである。ラパログの例として、エベロリムス、CCI-779、C20-メタリルラパマイシン、C16-(S)-3-メチルインドールラパマイシン、C16-iRap、C16-(S)-7-メチルインドールラパマイシン、AP21967、C16-(S)-ブチルスルホンアミドラパマイシン、AP23050、ミコフェノール酸ナトリウム、塩酸ベニジピン、AP1903およびAP23573、ならびにこれらの代謝産物および誘導体が挙げられるが、これらに限定されない。

10

【0425】

いくつかの実施形態において、第2のCISC構成要素(FRB-IL2R β)をコードする核酸は、ラパマイシンに結合することができる第3のCISC構成要素をコードするヌクレオチド配列をさらに含む。このようなCISC構成要素は、例えば、細胞内ラパマイシンに結合させるのに有用であり、これによって、CISC構成要素に結合したラパマイシンがその他の細胞内分子や細胞内構造と相互作用することを阻止することができる(例えば、ラパマイシンがmTORと相互作用することを阻止することができる)。いくつかの実施形態において、第3のCISC構成要素は、膜貫通ドメインを含んでいない可溶性タンパク質である。いくつかの実施形態において、第3のCISC構成要素は、細胞内FRBドメインを含む。いくつかの実施形態において、第3のCISC構成要素は、FRBドメインを含むが膜貫通ドメインを含んでいない可溶性タンパク質である。

20

【0426】

第1のCISC構成要素をコードする核酸、第2のCISC構成要素をコードする核酸、および/または第3のCISC構成要素をコードする核酸は、1つ以上のベクターに含まれていてもよい。いくつかの実施形態において、第1のCISC構成要素をコードする核酸は、第2のCISC構成要素をコードする核酸を含むベクターとは別のベクターに含まれる。いくつかの実施形態において、第3のCISC構成要素をコードする核酸は、第2のCISC構成要素をコードする核酸が含まれるベクターと同じベクターに含まれる。いくつかの実施形態において、1つ以上のベクターはウイルスベクターである。いくつかの実施形態において、前記1つ以上のベクターはアデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターである。いくつかの実施形態において、前記1つ以上のAAVベクターは、AAV1ベクター、AAV2ベクター、AAV3ベクター、AAV4ベクター、AAV5ベクター、AAV6ベクター、AAV7ベクター、AAV8ベクター、AAV9ベクター、AAV10ベクターまたはAAV11ベクターである。いくつかの実施形態において、前記1つ以上のAAVベクターはAAV5ベクターである。いくつかの実施形態において、前記1つ以上のAAVベクターはAAV6ベクターである。

30

【0427】

いくつかの実施形態において、CISC構成要素は、配列番号66または71に示されるアミノ酸配列と少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または最大で100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態において、1つ以上のCISC構成要素は、シグナルペプチドをさらに含む。シグナルペプチドは、当技術分野で公知の、翻訳されたCISC構成要素を細胞膜に輸送するシグナルペプチドであれば、どのようなものであってもよい。いくつかの実施形態において、第1のCISC構成要素と第2のCISC構成要素は、いずれもLCN2のシグナルペプチドを含む。いくつかの実施形態において、第1のCISC構成要素と第2のCISC構成要素は、いずれも配列番号61のアミノ酸配列を含むシグナルペプチドを含む。

40

【0428】

50

いくつかの実施形態において、一方のCISC構成要素は、配列番号66に示されるアミノ酸配列と少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または最大で100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、他方のCISC構成要素は、配列番号71に示されるアミノ酸配列と少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または最大で100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態において、各CISC構成要素はシグナルペプチドをさらに含み、これらのシグナルペプチドのアミノ酸配列は同じであってもよく、異なってもよい。これらのシグナルペプチドは、当技術分野で公知の、翻訳されたCISC構成要素を細胞膜に輸送するシグナルペプチドであれば、どのようなものであってもよい。

10

【0429】

いくつかの実施形態において、第3のCISC構成要素は、配列番号72に示されるアミノ酸配列と少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または最大で100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態において、第3のCISC構成要素は、配列番号72に示されるアミノ酸配列と少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または最大で100%の配列同一性を有するアミノ酸配列からなる。いくつかの実施形態において、第3のCISC構成要素は、配列番号72のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態において、第3のCISC構成要素は、シグナルペプチドを含んでいない。いくつかの実施形態において、第3のCISC構成要素は、膜貫通ドメインを含んでいない。

20

【0430】

T細胞受容体 (TCR)

本明細書に記載のシステムのいくつかの実施形態において、TCR β タンパク質の全長をコードするヌクレオチド配列とTCR α タンパク質の少なくとも一部をコードするヌクレオチド配列に作動可能に連結されたプロモーターを含む核酸を挿入することによって、細胞のTRAC座位が編集され、このTCR α タンパク質の少なくとも一部は、例えば、抗原特異性を担うTCR α タンパク質の一部を形成するTCR α 可変領域およびTCR α 接合 (TRAJ) 領域である。いくつかの実施形態において、TCR α の可変領域と接合領域をコードするヌクレオチド配列は、TCR α の定常ドメインの一部をコードする内因性ヌクレオチド配列にインフレームに挿入されることによって、挿入された異種プロモーターにより、異種TCR β タンパク質をコードする配列と、異種TRAV/TRAJアミノ酸配列および内因性TCR α 定常ドメインを含むTCR α タンパク質をコードする配列の転写が開始される。この実施形態では、内因性TRAC座位の内因性3'調節領域を利用する。

30

【0431】

本明細書に記載のシステムにより製造された遺伝子組換え細胞は、1型糖尿病 (T1D) に特異的なT細胞受容体を発現する。本明細書に記載の遺伝子組換え細胞により発現されるT細胞受容体は、「遺伝子組換え細胞の製造方法」という見出しの節と、「T細胞受容体 (TCR)」という小見出しの節において述べている。特定の実施形態において、TCRをコードする核酸は、例えば、免疫系細胞、造血幹細胞、T細胞、初代T細胞、T細胞株、NK細胞、ナチュラルキラーT細胞などの特定の宿主細胞における発現を向上させるためにコドンが最適化されている。例えば、Scholten et al., Clin Immunol. 2006, 119:135を参照されたい。

40

【0432】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載の核酸は、TCR β 鎖とTCR α 鎖の少な

50

くとも一部をコードし、このTCR β 鎖とTCR α 鎖の少なくとも一部は、組み合わせて発現されて、IGRP (305-234) ペプチドに結合するT1D2 TCRを形成する。別の実施形態において、本明細書に記載の核酸によってその一部がコードされる全長TCR α 鎖とTCR β 鎖は、IGRP (241-260) ペプチドに結合するT1D4 TCRを形成する。別の実施形態において、本明細書に記載の核酸によってその一部がコードされる全長TCR α 鎖とTCR β 鎖は、IGRP (305-324) ペプチドに結合するT1D5-1 TCRを形成する。いくつかの実施形態において、IGRP (305-324) ペプチドは、HLA-DRB1*0401に結合した場合に認識される。いくつかの実施形態において、IGRP (241-260) ペプチドは、HLA-DRB1*0401に結合した場合に認識される。

【0433】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載の核酸によってコードされるTCR β 鎖とTCR α 鎖（の少なくとも一部）から形成されるTCRは、 α CDR1、 α CDR2、 α CDR3の3つの相補性決定領域（CDR）を有するTCR α 可変（V α ）ドメインと、 β CDR1、 β CDR2、 β CDR3の3つのCDRを有するTCR β 可変（V β ）ドメインとを含む。本明細書に記載のTCRのCDRの代表的なアミノ酸を表1に示し、本明細書に記載のTCRのCDRをコードするヌクレオチド配列を表2に示している。いくつかの実施形態において、(i) α CDR1は配列番号1を含み、(ii) α CDR2は配列番号2を含み、(iii) α CDR3は配列番号3を含み、(iv) β CDR1は配列番号4を含み、(v) β CDR2は配列番号5を含み、(vi) β CDR3は配列番号6を含む。いくつかの実施形態において、(i) α CDR1は配列番号11を含み、(ii) α CDR2は配列番号12を含み、(iii) α CDR3は配列番号13を含み、(iv) β CDR1は配列番号14を含み、(v) β CDR2は配列番号15を含み、(vi) β CDR3は配列番号16を含む。いくつかの実施形態において、(i) α CDR1は配列番号21を含み、(ii) α CDR2は配列番号22を含み、(iii) α CDR3は配列番号23を含み、(iv) β CDR1は配列番号24を含み、(v) β CDR2は配列番号25を含み、(vi) β CDR3は配列番号26を含む。別の実施形態において、 α CDR1、 α CDR2、 α CDR3、 β CDR1、 β CDR2および β CDR3からなる各セットは、前記アミノ酸配列の組み合わせのいずれかに示される各アミノ酸配列と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%または少なくとも99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を有していてもよい。

【0434】

いくつかの実施形態において、V α は配列番号7を含み、V β は配列番号8を含む。いくつかの実施形態において、V α は配列番号17を含み、V β は配列番号18を含む。いくつかの実施形態において、V α は配列番号27を含み、V β は配列番号28を含む。別の実施形態において、V α とV β からなる各ペアは、前記アミノ酸配列の組み合わせのいずれかに示される各アミノ酸配列と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%または少なくとも99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を有していてもよい。

【0435】

いくつかの実施形態において、TCR α 鎖は配列番号9を含み、TCR β 鎖は配列番号10を含む。いくつかの実施形態において、TCR α 鎖は配列番号19を含み、TCR β 鎖は配列番号20を含む。いくつかの実施形態において、TCR α 鎖は配列番号29を含み、TCR β 鎖は配列番号30を含む。別の実施形態において、TCR α 鎖とTCR β 鎖からなる各ペアは、前記アミノ酸配列の組み合わせのいずれかに示される各アミノ酸配列と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%または少なくとも99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を有していてもよい。

【0436】

FOXP3座位の組換え

本明細書に記載のシステムのいくつかの実施形態において、FOXP3座位への標的化された挿入用の核酸は、プロモーターを含み、このプロモーターは、この核酸の挿入後に、内因性FoxP3タンパク質の一部をコードするヌクレオチド配列に作動可能に連結される。挿入されるプロモーターは、FOXP3座位のTreg特異的脱メチル化領域（TSDR）の下流のゲノムに導入される。組換えが行われていない細胞では、TSDRが、エピジェネティックにFoxP3の発現を調節することによって、炎症状態に曝露された細胞のFoxP3の生成を抑制するが、その結果、FoxP3の発現が喪失して、非組換えTreg細胞がTエフェクター（Teff）表現型に変換される。TSDRの下流にプロモーターを挿入することによって、TSDRを介したFOXP3の発現調節をバイパスすることにより、炎症状態であっても、FoxP3の安定な生成が可能になる。

10

【0437】

異種プロモーターは、FOXP3のコード配列の内因性プロモーターの下流（例えばTSDRの下流）、かつ第1のコーディングエキソンの上流または第1のコーディングエキソン内であれば、どの位置に挿入してもよい。当技術分野において、この第1のコーディングエキソンは、内因性FOXP3プロモーターから転写されるpre-mRNAに存在する第2のエキソンであることからエキソン2として知られており、野生型のFoxP3の翻訳を開始する開始コドンを含むエキソン1（FOXP3をコードするpre-mRNAの第1のエキソン）ではないことから、第1のコーディングエキソンとして知られている。いくつかの実施形態において、異種プロモーターは、FOXP3座位のTSDRの1～10,000ヌクレオチド下流、10～1,000ヌクレオチド下流、10～100ヌクレオチド下流、10～5,000ヌクレオチド下流、20～4,000ヌクレオチド下流、30～3,000ヌクレオチド下流、40～2,000ヌクレオチド下流、50～1,000ヌクレオチド下流、60～750ヌクレオチド下流、70～500ヌクレオチド下流、80～400ヌクレオチド下流、90～300ヌクレオチド下流、100～200ヌクレオチド下流、1～1,000ヌクレオチド下流、1,000～2,000ヌクレオチド下流、2,000～3,000ヌクレオチド下流、3,000～4,000ヌクレオチド下流、4,000～5,000ヌクレオチド下流、5,000～6,000ヌクレオチド下流、6,000～7,000ヌクレオチド下流、7,000～8,000ヌクレオチド下流、8,000～9,000ヌクレオチド下流、または9,000～10,000ヌクレオチド下流に挿入される。いくつかの実施形態において、異種プロモーターは、FOXP3コード配列の第1のコーディングエキソンの1～10,000ヌクレオチド上流、10～1,000ヌクレオチド上流、10～100ヌクレオチド上流、10～5,000ヌクレオチド上流、20～4,000ヌクレオチド上流、30～3,000ヌクレオチド上流、40～2,000ヌクレオチド上流、50～1,000ヌクレオチド上流、60～750ヌクレオチド上流、70～500ヌクレオチド上流、80～400ヌクレオチド上流、90～300ヌクレオチド上流、100～200ヌクレオチド上流、1～1,000ヌクレオチド上流、1,000～2,000ヌクレオチド上流、2,000～3,000ヌクレオチド上流、3,000～4,000ヌクレオチド上流、4,000～5,000ヌクレオチド上流、5,000～6,000ヌクレオチド上流、6,000～7,000ヌクレオチド上流、7,000～8,000ヌクレオチド上流、8,000～9,000ヌクレオチド上流、または9,000～10,000ヌクレオチド上流に挿入される。いくつかの実施形態において、異種プロモーターは、第1のコーディングエキソンに挿入されて合成の第1のコーディングエキソンが作製され、この合成の第1のコーディングエキソンは、内因性の第1のコーディングエキソンとは異なるものであるが、下流のFOXP3エキソンをコードするFOXP3配列とインフレームな開始コドンを含んでいる。

20

30

40

【0438】

2Aモチーフおよびリンカー

複数のポリペプチドまたはその一部をコードする本明細書に記載の核酸のいくつかの実施形態は、2Aモチーフをコードする介在ヌクレオチド配列を含んでいてもよい。2Aモチーフは当技術分野で公知であり、1つのヌクレオチド配列から複数のポリペプチドを翻訳して、その生成を促すのに有用である。例えば、Kim et al., PLoS ONE. 2011. 6:e18556を参照されたい。いくつかの実施形態において、2Aモチーフが翻訳され、この翻訳によりポリペプチドの自己切断が起こり、別々のポリペプチドが放出される。別の実施

50

形態では、2Aモチーフをコードするヌクレオチド配列が存在することから、リボソームがmRNAに沿って翻訳を進行する際に、コードされている2Aモチーフのアミノ酸を読み飛ばすことによって、第1のポリペプチド（例えば第1のFKBP-IL2R γ CISC構成要素）が放出された後に、第2のポリペプチド（例えばTCR β 鎖）の翻訳が開始される。

【0439】

いくつかの実施形態では、各ペアの核酸配列において、2Aモチーフをコードするヌクレオチド配列は、(i) 第1の(FKBP-IL2R γ) CISC構成要素をコードするヌクレオチド配列と、(ii) TCR β 鎖をコードするヌクレオチド配列と、(iii) TCR α 鎖またはその一部をコードするヌクレオチド配列の間にインフレームに配置される。したがって、異種プロモーター（例えばMNDプロモーター）によって、CISC構成要素、TCR β 鎖およびTCR α 鎖のそれぞれをコードし、かつ介在する2Aモチーフを含む単一のmRNAの転写が開始されると、CISC構成要素、TCR β 鎖、TCR α 鎖のそれぞれが別々のポリペプチドとして生成される。いくつかの実施形態では、各ペアの核酸配列において、2Aモチーフをコードするヌクレオチド配列は、(i) 第2の(FKBP-IL2R γ) CISC構成要素をコードするヌクレオチド配列と、(ii) 細胞質ゾル内FRBDメインをコードするヌクレオチド配列と、(iii) FoxP3をコードするヌクレオチド配列の間にインフレームに配置される。したがって、異種プロモーター（例えばMNDプロモーター）によって、CISC構成要素、細胞質ゾル内FRBDメインおよびFoxP3のそれぞれをコードし、かつ介在する2Aモチーフを含む単一のmRNAの転写が開始されると、CISC構成要素、細胞質ゾル内FRBDメイン、FoxP3のそれぞれが別々のポリペプチドとして生成される。

【0440】

各ペアの核酸配列において、2つのポリペプチドをコードするヌクレオチド配列の間（例えば、FKBP-IL2R γ CISC構成要素をコードする配列とTCR β 鎖をコードする配列の間；およびTCR β 鎖をコードする配列とTCR α 鎖の一部をコードする配列の間）に配置されたヌクレオチド配列によってコードされる2Aモチーフは、当技術分野で公知の2Aモチーフであれば、どのようなものであってもよい。いくつかの実施形態において、各ペアの核酸配列において、別々のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列の間にコードされている2Aモチーフは、F2A、P2A、T2AおよびE2Aからなる群から独立して選択してもよい。いくつかの実施形態において、1つの核酸上にコードされている第1の2Aモチーフと第2の2Aモチーフは、異なる種類の2Aモチーフである。挿入される1つの核酸において異なる種類の2Aモチーフを使用することによって、内部組換えが発生する確率を低減することができる。内部組換えが発生すると、再結合した2Aモチーフの間のヌクレオチド配列が染色体から切除されることがある。いくつかの実施形態において、1つの核酸上の第1の2Aモチーフをコードするヌクレオチド配列は、その核酸上の第2の2Aモチーフをコードするヌクレオチド配列と90%以下の配列同一性を有する。いくつかの実施形態において、1つの核酸上の第1の2Aモチーフをコードするヌクレオチド配列は、その核酸上の第2の2Aモチーフをコードするヌクレオチド配列と80%以下の配列同一性を有する。いくつかの実施形態において、1つの核酸上の第1の2Aモチーフをコードするヌクレオチド配列は、その核酸上の第2の2Aモチーフをコードするヌクレオチド配列と70%以下の配列同一性を有する。いくつかの実施形態において、1つの核酸上の第1の2Aモチーフをコードするヌクレオチド配列は、その核酸上の第2の2Aモチーフをコードするヌクレオチド配列と60%以下の配列同一性を有する。いくつかの実施形態において、1つの核酸上の第1の2Aモチーフをコードするヌクレオチド配列は、その核酸上の第2の2Aモチーフをコードするヌクレオチド配列と50%以下の配列同一性を有する。いくつかの実施形態において、第1の2AモチーフはT2Aモチーフであり、第2のモチーフはP2Aモチーフである。

【0441】

別の実施形態において、1つの核酸上のヌクレオチド配列によってコードされる第1の2Aモチーフと第2の2Aモチーフは、同じ種類の2Aモチーフである。いくつかの実施形態において、1つの核酸は、第1のP2Aモチーフをコードするヌクレオチド配列と、第

2のP2Aモチーフをコードする第2のヌクレオチド配列を含み、第1のP2Aモチーフをコードするヌクレオチド配列は、第2のP2Aモチーフをコードするヌクレオチド配列と少なくとも80%の配列同一性を有する。いくつかの実施形態において、第1のP2Aモチーフをコードする第1のヌクレオチド配列と第2のP2Aモチーフをコードする第2のヌクレオチド配列は、同じヌクレオチド配列を含む。

【0442】

いくつかの実施形態において、TRAC座位への挿入用の核酸は、(i)第1のCISC構成要素をコードする配列とTCR β 鎖をコードする配列の間に、T2Aモチーフをコードする配列を含み、かつ(ii)TCR β 鎖をコードする配列と異種TCR α 鎖の一部をコードする配列の間に、P2Aモチーフをコードする配列を含む。

10

【0443】

いくつかの実施形態において、FOXP3座位への挿入用の核酸は、(i)第2のCISC構成要素をコードする配列と細胞質ゾル内FRBDメインをコードする配列の間に、P2Aモチーフをコードする配列を含み、かつ(ii)細胞質ゾル内FRBDメインをコードする配列とFoxP3をコードする配列の間に、第2のP2Aモチーフをコードする第2の配列を含む。

【0444】

いくつかの実施形態において、細胞ゲノムへの挿入用の核酸によってコードされるポリペプチド(例えば、CISC構成要素および/またはTCR β 鎖)は、C末端リンカーを含む。C末端リンカーを組み込むことによって、例えば、2Aモチーフにおける切断効率を向上させてもよく、かつ/またはコードされているCISC構成要素のアミノ酸またはTCR β 鎖のアミノ酸が、2Aモチーフの切断により切除されるのを阻止してもよい。いくつかの実施形態において、コードされている第1のCISC構成要素は、C末端リンカーを含む。いくつかの実施形態において、コードされている第2のCISC構成要素は、C末端リンカーを含む。いくつかの実施形態において、コードされている細胞質ゾル内FRBDメイン構成要素は、C末端リンカーを含む。いくつかの実施形態において、コードされているTCR β 鎖は、C末端リンカーを含む。

20

【0445】

コードされているポリペプチドのC末端リンカーは、当技術分野で公知のリンカーであれば、どのようなものであってもよい。いくつかの実施形態において、C末端リンカーは、1個、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個もしくは10個のアミノ酸(例えばグリシン)、多数のアミノ酸(例えばグリシン)、またはこれらの数値のいずれか2つを上下限とする範囲内の個数のアミノ酸を含む。いくつかの実施形態において、C末端リンカーは、少なくとも3個のグリシンを含む。いくつかの実施形態において、C末端リンカーは、GSG、GGGS(配列番号229)、GGGSGGG(配列番号230)またはGGGで示される配列を含む。いくつかの実施形態において、C末端リンカーはアミノ酸配列GSGを含む。いくつかの実施形態において、第1のCISC構成要素、第2のCISC構成要素、細胞質ゾル内FRBDメインおよびTCR β 鎖は、いずれもアミノ酸配列GSGを有するC末端リンカーを含む。

30

【0446】

ベクター

40

TRAC座位への挿入用の第1の核酸および/またはFOXP3座位への挿入用の第2の核酸は、1つ以上のベクターに含まれていてもよい。いくつかの実施形態において、TRAC座位を標的とする第1の核酸は、第1のベクターに含まれており、FOXP3座位を標的とする核酸は、第2のベクターに含まれている。場合によっては、これらのベクターは、細胞に対して感染能力を有するウイルスにパッケージされている(例えば、ベクターはウイルスベクターである)。典型的なウイルスとして、アデノウイルス、レトロウイルス、レンチウイルス、アデノ随伴ウイルス、ならびに当技術分野で公知のその他のウイルス、および本明細書に開示されたその他のウイルスが挙げられる。

【0447】

「ベクター」という用語は、宿主細胞にコード情報を移入するために使用されるあらゆる

50

る分子（例えば核酸やプラスミド）または分子の配置（例えばウイルス）について言及する際に使用される。「発現ベクター」は、宿主細胞への導入に適したベクターを指し、導入された異種核酸配列の発現を誘導する核酸配列、および／またはこの異種核酸配列の発現を制御する核酸配列を含んでいる。発現には、転写、翻訳、RNAスプライシング（イントロンが存在する場合）などのプロセスが含まれるが、これらに限定されない。ベクターの例として、人工染色体、ミニ遺伝子、コスミド、プラスミド、ファージミドおよびウイルスベクターが挙げられるが、これらに限定されない。ウイルスベクターの例として、レンチウイルスベクター、レトロウイルスベクター、ヘルペスウイルスベクター、アデノウイルスベクターおよびアデノ随伴ウイルスベクターが挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態において、本明細書で提供されるシステムにおいて使用するための、核酸を含む1つ以上のベクターは、レンチウイルスベクターである。いくつかの実施形態において、前記1つ以上のベクターはアデノウイルスベクターである。いくつかの実施形態において、前記1つ以上のAAVベクターは、AAV1ベクター、AAV2ベクター、AAV3ベクター、AAV4ベクター、AAV5ベクター、AAV6ベクター、AAV7ベクター、AAV8ベクター、AAV9ベクター、AAV10ベクターまたはAAV11ベクターである。いくつかの実施形態において、TRAC座位への挿入用の核酸を含むベクターは、AAV1ベクター、AAV2ベクター、AAV3ベクター、AAV4ベクター、AAV5ベクター、AAV6ベクター、AAV7ベクター、AAV8ベクター、AAV9ベクター、AAV10ベクターまたはAAV11ベクターである。いくつかの実施形態において、FOXP3座位への挿入用の核酸を含むベクターは、AAV1ベクター、AAV2ベクター、AAV3ベクター、AAV4ベクター、AAV5ベクター、AAV6ベクター、AAV7ベクター、AAV8ベクター、AAV9ベクター、AAV10ベクターまたはAAV11ベクターである。

10

20

30

40

50

【0448】

いくつかの実施形態において、前記1つ以上のAAVベクターはAAV5ベクターである。いくつかの実施形態において、前記1つ以上のAAVベクターはAAV6ベクターである。いくつかの実施形態において、第1の核酸と第2の核酸はそれぞれ別々のAAV5ベクターに含まれている。いくつかの実施形態において、第1の核酸と第2の核酸はそれぞれ別々のAAV6ベクターに含まれている。

【0449】

いくつかの実施形態において、TRAC座位への挿入用の核酸は、5'相同アームと3'相同アームの間に、配列番号94、106、117、128および139のいずれかと少なくとも90%の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態において、前記ヌクレオチド配列は、配列番号94、106、117、128および139のいずれかと少なくとも95%の配列同一性を有する。いくつかの実施形態において、前記ヌクレオチド配列は、配列番号94、106、117、128および139のいずれかを含む。いくつかの実施形態において、前記核酸は、配列番号94のヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態において、前記核酸は、配列番号106のヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態において、前記核酸は、配列番号117のヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態において、前記核酸は、配列番号128のヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態において、前記核酸は、配列番号139のヌクレオチド配列を含む。

【0450】

いくつかの実施形態において、TRAC座位への挿入用の核酸は、配列番号95、107、118、129および140のいずれかに示されるヌクレオチド配列と少なくとも90%の配列同一性を有する。いくつかの実施形態において、前記核酸は、配列番号95、107、118、129および140のいずれかに示されるヌクレオチド配列と少なくとも95%の配列同一性を有する。いくつかの実施形態において、前記核酸は、配列番号95、107、118、129および140のいずれかに示されるヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態において、前記核酸は、配列番号95のヌクレオチド配列と少なくとも95%の配列同一性を有する。いくつかの実施形態において、前記核酸は、配列番号107のヌクレオチド配列と少

なくとも95%の配列同一性を有する。いくつかの実施形態において、前記核酸は、配列番号118のヌクレオチド配列と少なくとも95%の配列同一性を有する。いくつかの実施形態において、前記核酸は、配列番号129のヌクレオチド配列と少なくとも95%の配列同一性を有する。いくつかの実施形態において、前記核酸は、配列番号140のヌクレオチド配列と少なくとも95%の配列同一性を有する。いくつかの実施形態において、前記核酸は、配列番号95のヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態において、前記核酸は、配列番号107のヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態において、前記核酸は、配列番号118のヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態において、前記核酸は、配列番号129のヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態において、前記核酸は、配列番号140のヌクレオチド配列を含む。

10

【0451】

いくつかの実施形態において、FOXP3座位への挿入用の核酸は、5'相同アームと3'相同アームの間に、配列番号150、161、172、184、195、206および218のいずれかと少なくとも90%の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態において、前記ヌクレオチド配列は、配列番号150、161、172、184、195、206および218のいずれかと少なくとも95%の配列同一性を有する。いくつかの実施形態において、前記ヌクレオチド配列は、配列番号150、161、172、184、195、206および218のいずれかを含む。いくつかの実施形態において、前記核酸は、配列番号150のヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態において、前記核酸は、配列番号161のヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態において、前記核酸は、配列番号172のヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態において、前記核酸は、配列番号184のヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態において、前記核酸は、配列番号195のヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態において、前記核酸は、配列番号206のヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態において、前記核酸は、配列番号218のヌクレオチド配列を含む。

20

【0452】

いくつかの実施形態において、FOXP3座位への挿入用の核酸は、配列番号151、162、173、185、196、207および219のいずれかに示されるヌクレオチド配列と少なくとも90%の配列同一性を有する。いくつかの実施形態において、前記核酸は、配列番号151、162、173、185、196、207および219のいずれかに示されるヌクレオチド配列と少なくとも95%の配列同一性を有する。いくつかの実施形態において、前記核酸は、配列番号151、162、173、185、196、207および219のいずれかに示されるヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態において、前記核酸は、配列番号151のヌクレオチド配列と少なくとも95%の配列同一性を有する。いくつかの実施形態において、前記核酸は、配列番号162のヌクレオチド配列と少なくとも95%の配列同一性を有する。いくつかの実施形態において、前記核酸は、配列番号173のヌクレオチド配列と少なくとも95%の配列同一性を有する。いくつかの実施形態において、前記核酸は、配列番号185のヌクレオチド配列と少なくとも95%の配列同一性を有する。いくつかの実施形態において、前記核酸は、配列番号196のヌクレオチド配列と少なくとも95%の配列同一性を有する。いくつかの実施形態において、前記核酸は、配列番号207のヌクレオチド配列と少なくとも95%の配列同一性を有する。いくつかの実施形態において、前記核酸は、配列番号219のヌクレオチド配列と少なくとも95%の配列同一性を有する。いくつかの実施形態において、前記核酸は、配列番号151のヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態において、前記核酸は、配列番号162のヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態において、前記核酸は、配列番号173のヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態において、前記核酸は、配列番号185のヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態において、前記核酸は、配列番号196のヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態において、前記核酸は、配列番号207のヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態において、前記核酸は、配列番号219のヌクレオチド配列を含む。

30

40

【0453】

50

相同アーム

本明細書に記載のシステムを使用した、TRAC座位への挿入用の核酸とFOXP3の座位への挿入用の核酸は、二本鎖切断の導入後の相同組換え修復によるTRAC座位またはFOXP3座位への核酸の挿入をそれぞれ標的とした5'相同アームと3'相同アームをそれぞれ含む。核酸のコード鎖（すなわち、CISC構成要素、TCR鎖およびFoxP3を含むポリペプチドをコードするリーディングフレームを含む核酸鎖）を考慮した場合、通常、5'相同アームは核酸の5'末端にある相同アームを指し、3'相同アームは核酸の3'末端にある別の相同アームを指す。5'相同アームは、標的座位の第1の配列と相同性を有し、3'相同アームは、前記標的座位の第1の配列の下流の第2の配列と相同性を有することから、標的化された方法でその座位に核酸が挿入される。核酸の挿入後、改変された標的座位は、第1の配列と第2配列の代わりに、5'相同アームと3'相同アームを含み、標的座位の第1の配列と第2配列の間に存在していた配列の代わりに、前記核酸上で相同アーム間に存在していた配列を含む。5'相同アームと3'相同アームは、同じ長さであってもよく、同程度の長さであってもよく（それぞれの長さの差が100bp以内であってもよく）、異なる長さであってもよい。いくつかの実施形態において、5'相同アームと3'相同アームの一方または両方の長さは、100～2,000bp、400～1,500bp、または500～1,000bpである。いくつかの実施形態において、5'相同アームと3'相同アームの一方または両方の長さは、約100bp、約200bp、約300bp、約400bp、約500bp、約600bp、約700bp、約800bp、約900bp、約1,000bp、約1,100bp、約1,200bp、約1,300bp、約1,400bp、約1,500bp、約1,600bp、約1,700bp、約1,800bp、約1,900bpまたは約2,000bpである。いくつかの実施形態において、両方の相同アームの長さは、100～2,000ヌクレオチド長である。いくつかの実施形態において、両方の相同アームの長さは、300～1,000ヌクレオチド長である。いくつかの実施形態において、両方の相同アームの長さは、300～700ヌクレオチド長である。いくつかの実施形態において、両方の相同アームの長さは、300～500ヌクレオチド長である。いくつかの実施形態において、両方の相同アームの長さは、500～700ヌクレオチド長である。いくつかの実施形態において、両方の相同アームの長さは、700～1,000ヌクレオチド長である。

【0454】

標的とするゲノム座位への挿入用の核酸の相同アームは、その標的座位において、ヌクレアーゼにより切断される標的部位の上流および／または下流にある相同配列に基づいて選択してもよい。例えば、標的座位の特定の位置（切断部位）の切断後に相同組換え修復を行うことにより核酸を挿入するいくつかの実施形態では、挿入用の核酸の5'相同アームは、この切断部位の上流の配列と相同性を有し、この挿入用の核酸の3'相同アームは、この切断部位の下流の配列と相同性を有する。いくつかの実施形態において、5'相同アームは、切断部位の25～5,000ヌクレオチド上流、50～3,000ヌクレオチド上流、75～2,000ヌクレオチド上流、100～1,000ヌクレオチド上流または150～500ヌクレオチド上流で終端する100～2,000ヌクレオチド長の配列と相同性を有する。いくつかの実施形態において、5'相同アームは、RNA誘導型ヌクレアーゼによって切断されるPAM配列の25～5,000ヌクレオチド上流、50～3,000ヌクレオチド上流、75～2,000ヌクレオチド上流、100～1,000ヌクレオチド上流または150～500ヌクレオチド上流で終端する100～2,000ヌクレオチド長の配列と相同性を有する。いくつかの実施形態において、5'相同アームは、gRNAのスペーサー配列に相補的なゲノム配列の25～5,000ヌクレオチド上流、50～3,000ヌクレオチド上流、75～2,000ヌクレオチド上流、100～1,000ヌクレオチド上流または150～500ヌクレオチド上流で終端する100～2,000ヌクレオチド長の配列と相同性を有する。いくつかの実施形態において、5'相同アームは、切断部位の150～500ヌクレオチド上流の位置で終端する100～2,000ヌクレオチド長の配列と相同性を有する。いくつかの実施形態において、5'相同アームは、RNA誘導型ヌクレアーゼによって切断されるPAM配列の150～500ヌクレオチド上流の位置で終端する100～2,000ヌクレオチド長の配列と相同性を有する。いくつかの実施形態において、5'相同アームは、gRNAのスペーサー配列に相補的なゲノム配列の150～500

ヌクレオチド上流の位置で終端する100~2,000ヌクレオチド長の配列と相同性を有する。

【0455】

いくつかの実施形態において、3'相同アームは、切断部位の25~5,000ヌクレオチド上流、50~3,000ヌクレオチド上流、75~2,000ヌクレオチド上流、100~1,000ヌクレオチド上流または150~500ヌクレオチド上流で終端する100~2,000ヌクレオチド長の配列と相同性を有する。いくつかの実施形態において、3'相同アームは、RNA誘導型ヌクレアーゼによって切断されるPAM配列の25~5,000ヌクレオチド上流、50~3,000ヌクレオチド上流、75~2,000ヌクレオチド上流、100~1,000ヌクレオチド上流または150~500ヌクレオチド上流で終端する100~2,000ヌクレオチド長の配列と相同性を有する。いくつかの実施形態において、3'相同アームは、gRNAのスペーサー配列に相補的なゲノム配列の25~5,000ヌクレオチド上流、50~3,000ヌクレオチド上流、75~2,000ヌクレオチド上流、100~1,000ヌクレオチド上流または150~500ヌクレオチド上流で終端する100~2,000ヌクレオチド長の配列と相同性を有する。いくつかの実施形態において、3'相同アームは、切断部位の150~500ヌクレオチド上流の位置で終端する100~2,000ヌクレオチド長の配列と相同性を有する。いくつかの実施形態において、3'相同アームは、RNA誘導型ヌクレアーゼによって切断されるPAM配列の150~500ヌクレオチド上流の位置で終端する100~2,000ヌクレオチド長の配列と相同性を有する。いくつかの実施形態において、3'相同アームは、gRNAのスペーサー配列に相補的なゲノム配列の150~500ヌクレオチド上流の位置で終端する100~2,000ヌクレオチド長の配列と相同性を有する。

10

20

【0456】

いくつかの実施形態において、本発明のシステムが、スペーサー配列を含むgRNAを含む場合、ゲノムへの挿入用の核酸の5'相同アームと3'相同アームは、このスペーサー配列に相補的な配列を含んでいない。そのような実施形態では、ドナー鋳型上に相補的な配列が存在しないことから、gRNAがドナー鋳型に結合してドナー鋳型を切断する可能性を低減することができ、このようなgRNAによるドナー鋳型の切断は、ゲノムへの挿入効率を低下させることがある。いくつかの実施形態において、ドナー鋳型は、スペーサー配列に相補的な配列を含んでいない。標的化切断用のgRNAを必要としない別の種類のヌクレアーゼが使用される実施形態では、ドナー鋳型は、ヌクレアーゼによって切断される配列を含んでいない。

30

【0457】

いくつかの実施形態において、TRAC座位への挿入用の核酸は、配列番号85のヌクレオチド配列と少なくとも90%の配列同一性を有する5'相同アームと、配列番号93のヌクレオチド配列と少なくとも90%の配列同一性を有する3'相同アームとを含む。いくつかの実施形態において、前記5'相同アームは、配列番号85のヌクレオチド配列と少なくとも95%の配列同一性を有し、前記3'相同アームは、配列番号93のヌクレオチド配列と少なくとも95%の配列同一性を有する。いくつかの実施形態において、前記5'相同アームは、配列番号85のヌクレオチド配列を含み、前記3'相同アームは、配列番号93のヌクレオチド配列を含む。

40

【0458】

いくつかの実施形態において、TRAC座位への挿入用の核酸は、配列番号96のヌクレオチド配列と少なくとも90%の配列同一性を有する5'相同アームと、配列番号105のヌクレオチド配列と少なくとも90%の配列同一性を有する3'相同アームとを含む。いくつかの実施形態において、前記5'相同アームは、配列番号96のヌクレオチド配列と少なくとも95%の配列同一性を有し、前記3'相同アームは、配列番号105のヌクレオチド配列と少なくとも95%の配列同一性を有する。いくつかの実施形態において、前記5'相同アームは、配列番号96のヌクレオチド配列を含み、前記3'相同アームは、配列番号105のヌクレオチド配列を含む。

【0459】

50

10

20

30

40

配列と少なくとも95%の配列同一性を有する。いくつかの実施形態において、前記5'相同アームは、配列番号163のヌクレオチド配列を含み、前記3'相同アームは、配列番号171のヌクレオチド配列を含む。

【0465】

いくつかの実施形態において、FOXP3座位への挿入用の核酸は、配列番号174のヌクレオチド配列と少なくとも90%の配列同一性を有する5'相同アームと、配列番号183のヌクレオチド配列と少なくとも90%の配列同一性を有する3'相同アームとを含む。いくつかの実施形態において、前記5'相同アームは、配列番号174のヌクレオチド配列と少なくとも95%の配列同一性を有し、前記3'相同アームは、配列番号183のヌクレオチド配列と少なくとも95%の配列同一性を有する。いくつかの実施形態において、前記5'相同アームは、配列番号174のヌクレオチド配列を含み、前記3'相同アームは、配列番号183のヌクレオチド配列を含む。

10

【0466】

いくつかの実施形態において、FOXP3座位への挿入用の核酸は、配列番号186のヌクレオチド配列と少なくとも90%の配列同一性を有する5'相同アームと、配列番号194のヌクレオチド配列と少なくとも90%の配列同一性を有する3'相同アームとを含む。いくつかの実施形態において、前記5'相同アームは、配列番号186のヌクレオチド配列と少なくとも95%の配列同一性を有し、前記3'相同アームは、配列番号194のヌクレオチド配列と少なくとも95%の配列同一性を有する。いくつかの実施形態において、前記5'相同アームは、配列番号186のヌクレオチド配列を含み、前記3'相同アームは、配列番号194のヌクレオチド配列を含む。

20

【0467】

いくつかの実施形態において、FOXP3座位への挿入用の核酸は、配列番号197のヌクレオチド配列と少なくとも90%の配列同一性を有する5'相同アームと、配列番号205のヌクレオチド配列と少なくとも90%の配列同一性を有する3'相同アームとを含む。いくつかの実施形態において、前記5'相同アームは、配列番号197のヌクレオチド配列と少なくとも95%の配列同一性を有し、前記3'相同アームは、配列番号205のヌクレオチド配列と少なくとも95%の配列同一性を有する。いくつかの実施形態において、前記5'相同アームは、配列番号197のヌクレオチド配列を含み、前記3'相同アームは、配列番号205のヌクレオチド配列を含む。

30

【0468】

いくつかの実施形態において、FOXP3座位への挿入用の核酸は、配列番号208のヌクレオチド配列と少なくとも90%の配列同一性を有する5'相同アームと、配列番号217のヌクレオチド配列と少なくとも90%の配列同一性を有する3'相同アームとを含む。いくつかの実施形態において、前記5'相同アームは、配列番号208のヌクレオチド配列と少なくとも95%の配列同一性を有し、前記3'相同アームは、配列番号217のヌクレオチド配列と少なくとも95%の配列同一性を有する。いくつかの実施形態において、前記5'相同アームは、配列番号208のヌクレオチド配列を含み、前記3'相同アームは、配列番号217のヌクレオチド配列を含む。

40

【0469】

ヌクレアーゼおよびガイドRNA

本開示のいくつかの態様は、細胞ゲノムの核酸に二本鎖切断を導入して所望の座位のゲノムを編集するための（例えば、相同組換え修復により、所望の座位へのドナー鋳型の挿入を促進するための）、ヌクレアーゼの使用に関する。1つ以上のゲノム座位（例えばTRACおよび／またはFOXP3）の編集を達成するために、多数の遺伝子編集方法、遺伝子編集システム、ゲノム編集方法、ゲノム編集システムのうち、どのような方法またはシステムでも使用することができる。遺伝子編集方法の例として、RNA誘導型ヌクレアーゼ（例えばCasヌクレアーゼ（例えばCas9ヌクレアーゼ））、ジンクフィンガーヌクレアーゼ（ZFN）、転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ（TALEN）、メガヌクレアーゼなどのDNAエンドヌクレアーゼの使用；トランスポゾンを経た遺伝子編集；セリ

50

ンインテグラーゼを介した遺伝子編集；およびレンチウイルスを介した遺伝子編集が挙げられるが、これらに限定されない。

【0470】

特定の実施形態において、染色体遺伝子のノックアウトまたは染色体遺伝子のノックイン（例えば挿入）は、宿主細胞の染色体を編集することにより行われる。染色体の編集は、例えば、エンドヌクレアーゼを使用して行うことができる。本明細書において、「エンドヌクレアーゼ」は、ポリヌクレオチド鎖内のリン酸ジエステル結合の切断を触媒することができる酵素を指す。「DNAエンドヌクレアーゼ」は、DNAポリヌクレオチド内のリン酸ジエステル結合の切断を触媒することができるエンドヌクレアーゼを指す。いくつかの実施形態において、エンドヌクレアーゼは、標的座位の核酸配列を切断して、相同組換えによる標的座位への外因性核酸配列の挿入を促進することができる。エンドヌクレアーゼは、天然のエンドヌクレアーゼ、組換えエンドヌクレアーゼ、遺伝子組換えエンドヌクレアーゼ、融合エンドヌクレアーゼのいずれであってもよい。遺伝子編集において使用されるエンドヌクレアーゼの例として、ジンクフィンガーヌクレアーゼ（ZFN）、TALEヌクレアーゼ（TALEN）、RNA誘導型ヌクレアーゼ、CRISPR-Casヌクレアーゼ、メガヌクレアーゼ、およびmegaTALが挙げられる。

10

【0471】

エンドヌクレアーゼによって引き起こされる核酸鎖の切断は、通常、二本鎖切断（DSB）であり、この切断は、相同遺伝子組換えによる相同組換え修復（HDR）または非相同末端結合（NHEJ）という2つの異なる機構によって修復されることが多い（NHEJ: Gh Ezraoui et al., 2014 Mol Cell 55(6):829-842; HDR: Jasin and Rothstein, 2013 Cold Spring Harb Perspect Biol 5(11):a012740, PMID 24097900）。相同組換え修復（HDR）すなわち相同遺伝子組換えにおいては、ドナー核酸分子を使用してドナー遺伝子を「ノックイン」してもよく、ドナー核酸分子を使用して標的遺伝子を「ノックアウト」してもよく、あるいは、ドナー核酸分子を使用したドナー遺伝子のノックインまたは標的遺伝子のノックアウトにより、標的遺伝子を不活性化してもよい。非相同末端結合（NHEJ）は、エラーを起こしやすい修復方法であり、DNA配列の切断部位に、例えば、少なくとも1個のヌクレオチドの置換、欠失または付加といった変化を起こすことが多い。非相同末端結合（NHEJ）を使用して、標的遺伝子の「ノックアウト」を行ってもよい。二本鎖切断が起きた場合、ドナー鋳型が存在することによって、相同組換え修復（HDR）が促される。

20

30

【0472】

本明細書において、「ジンクフィンガーヌクレアーゼ（ZFN）」は、ジンクフィンガーDNA結合ドメインを、非特異的なDNA切断ドメイン（Fok Iエンドヌクレアーゼなど）に融合させた融合タンパク質を指す。約30アミノ酸長の各ジンクフィンガーモチーフは、約3塩基対のDNAに結合し、特定のアミノ酸残基を変化させて、トリプレット配列の特異性を変化させることができる（例えば、Desjarlais et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 90:2256-2260, 1993; Wolfe et al., J. Mol. Biol. 285:1917-1934, 1999を参照されたい）。複数のジンクフィンガーモチーフを連結することによって、所望のDNA配列（例えば、約9～18塩基対の長さの領域）に特異的に結合させることが可能となる。この技術は、ZFNが、ゲノムにおいて部位特異的なDNA二本鎖切断（DSB）の形成を触媒することによりゲノム編集に関与し、次に、ゲノム中の二本鎖切断部位に相同な隣接配列を含む導入遺伝子が、相同組換え修復（HDR）によりこの切断部位に標的化されて挿入されるということに基づく。別の方法では、ZFNにより形成された二本鎖切断が、非相同末端結合（NHEJ）による修復を介して、標的遺伝子のノックアウトを生じることがあるが、非相同末端結合は、エラーを起こしやすい細胞修復経路であり、切断部位においてヌクレオチドの挿入または欠失を生じる。特定の実施形態において、遺伝子のノックアウトまたは不活性化は、ZFN分子を使用して導入された挿入、欠失、変異またはその組み合わせを含む。

40

【0473】

50

本明細書において、「転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ (TALEN)」は、TALE DNA結合ドメインとDNA切断ドメイン (Fok Iエンドヌクレアーゼなど) を含む融合タンパク質を指す。「TALE DNA結合ドメイン」または「TALE」は、1つ以上のTALEリピートドメイン／ユニットを含み、各TALEリピートドメインは、通常、33～35アミノ酸残基の高度に保存された配列を有しており、12番目と13番目のアミノ酸は可変性が高い。このTALEリピートドメインは、標的DNA配列へのTALEの結合に関与している。可変性のアミノ酸残基は、RVD (Repeat Variable Di-residue) と呼ばれ、特異的なヌクレオチドの認識に関係している。TALEがDNAを認識する際の天然の (標準的な) コードは判明しており、TALEの12番目と13番目がHD配列 (ヒスチジン-アスパラギン酸) である場合、TALEはシトシン (C) に結合し、TALEの12番目と13番目がNG (アスパラギン-グリシン) の場合、TALEはTヌクレオチドに結合し、TALEの12番目と13番目がNI (アスパラギン-イソロイシン) の場合、TALEはAヌクレオチドに結合し、TALEの12番目と13番目がNN (アスパラギン-アスパラギン) の場合、TALEはGヌクレオチドまたはAヌクレオチドに結合し、TALEの12番目と13番目がNG (アスパラギン-グリシン) の場合、TALEはTヌクレオチドに結合する。非標準的な (非定型の) RVDも知られている (例えば、米国特許公開第2011/0301073号を参照されたい; この文献に記載の非定型RVDは、参照によりその全体が本明細書に援用される)。TALENを使用することにより、T細胞ゲノムにおいて部位特異的な二本鎖切断 (DSB) を誘導することができる。非相同末端結合 (NHEJ) では、二本鎖切断部位の両端のDNA同士が連結されるが、その際、アニーリングのための配列の重複がほとんど存在しないか、まったく存在しないため、遺伝子発現をノックアウトさせるエラーが導入される。別の方法として、相同組換え修復 (HDR) では、導入遺伝子を含むドナー鋳型が相同な配列で挟まれている場合に、この導入遺伝子を二本鎖切断部位に導入することができる。特定の実施形態において、遺伝子のノックアウトは、TALEN分子を使用して導入された挿入、欠失、変異またはその組み合わせを含む。

10

20

30

40

50

【0474】

本明細書に記載の遺伝子編集システムおよび遺伝子編集方法は、ウイルス性または非ウイルス性のベクターまたはカセットと、部位特異的または座位特異的に遺伝子編集を行うことができるヌクレアーゼとを利用してよい。このようなヌクレアーゼとして、RNA誘導型ヌクレアーゼ、Casヌクレアーゼ (例えば、Cpf1ヌクレアーゼやCas9ヌクレアーゼ)、メガヌクレアーゼ、TALENまたはZFNが挙げられる。本明細書で提供されるいくつかの実施形態に有用な特定のRNA誘導型ヌクレアーゼは、米国特許第11,162,114号に開示されている (この文献は参照によりその全体が本明細書に明示的に援用される)。Casヌクレアーゼの例として、SpCas9、SaCas9、CjCas9、xCas9、C2c1、Cas13a/C2c2、C2c3、Cas13b、Cpf1およびこれらのバリエーションが挙げられるが、これらに限定されない。本明細書で提供されるいくつかの実施形態に有用な特定の核酸配列は、WO2019/210057に開示されている (この文献は参照によりその全体が本明細書に明示的に援用される)。

【0475】

本明細書において、「clustered regularly interspaced short palindromic repeats/Cas (CRISPR/CasまたはCas)」ヌクレアーゼシステムは、CRISPR RNA (crRNA) 誘導型Casヌクレアーゼを使用したシステムを指し、相補的な標的配列の3'末端の直後に、保存された短いプロトスペーサー関連モチーフ (PAM) が存在する場合、塩基対の相補性を利用してゲノム内の標的配列 (プロトスペーサーとして知られている) を認識し、DNAを切断する。CRISPR/Casシステムは、Casヌクレアーゼの配列およびその構造に基づいて、いくつかの種類 (例えば、I型、II型、III型およびV型) に分類される。I型およびIII型のcrRNA誘導型監視複合体は、複数のCasサブユニットを必要とする。最も研究されているII型のCRISPR/Casシステムは、RNA誘導型Cas9ヌクレアーゼ、crRNAおよびトランス活性化型crRNA (tracrRNA) という少なくとも3つの構成要素を含む。tracrRNAは二本鎖形成領域を含む。crRNAとtracrRNAは、Cas9ヌク

レアーゼと相互作用することができる二本鎖を形成し、crRNA上のスパーサーとPAMの上流の標的DNA上のプロトスパーサーとの間のワトソン・クリック型塩基対を介して、Cas9/crRNA:tracrRNA複合体が標的DNAの特定部位に誘導される。このcrRNAスパーサーにより定義された領域内において、Cas9ヌクレアーゼにより二本鎖が切断される。非相同末端結合（NHEJ）による修復では、標的座位への挿入および／または欠失により、標的座位の発現が破壊される。別の方法として、相同組換え修復（HDR）では、ドナー鋳型において相同な配列に挟まれた導入遺伝子を二本鎖切断部位に導入することができる。crRNAとtracrRNAから単鎖ガイドRNA（sgRNAまたはgRNAとも呼ばれる）を作製することができる（例えば、Jinek et al., Science 337:816-21, 2012を参照されたい）。さらに、所望の配列を標的とすることができるように、標的部位に相補的なガイドRNAの領域を変更またはプログラムすることができる（Xie et al., PLOS One 9: e100448, 2014；米国特許出願公開第2014/0068797号；米国特許出願公開第2014/0186843号；米国特許第8,697,359号；およびPCT公開WO 2015/071474；これらの文献はいずれも参照により本明細書に援用される）。CRISPR/Casヌクレアーゼの例として、Cas9、SaCas9、CjCas9、xCas9、C2C1、Cas13a/C2c2、C2c3、Cas13b、Cpf1およびこれらのバリエーションが挙げられるが、これらに限定されない。さらに、本明細書に記載の遺伝子編集方法および遺伝子編集システムでは、DNAの標的配列に相補的なスパーサー配列を含むガイドRNAの存在下において、このDNA上の標的配列に隣接するPAM配列で切断することによって、DNAに二本鎖切断を導入することができるその他のRNA誘導型ヌクレアーゼを使用してもよい。いくつかの実施形態において、RNA誘導型ヌクレアーゼは、5'-NNNNCC-3'で示されるプロトスパーサー隣接モチーフ（PAM）配列を有するヌクレアーゼ（すなわち、PAM配列でdsDNAを切断するヌクレアーゼ）である。NNNNCCで示されるPAM配列を有する典型的なRNA誘導型ヌクレアーゼは、例えば、PCT公開WO2019/236566として公開されている国際出願PCT/US2019/035373に記載されている（これらの文献は参照によりその全体が本明細書に援用される）。いくつかの実施形態において、RNA誘導型ヌクレアーゼは、配列番号237のヌクレオチド配列を有するgRNAの存在下において、標的配列のDNAに局在化されて、NGGで示されるPAM配列においてDNAを切断し、配列番号237のポリN部分は、標的DNA配列に相補的なプロトスパーサー配列である。いくつかの実施形態において、RNA誘導型ヌクレアーゼは、配列番号238のヌクレオチド配列を有するgRNAの存在下において、標的配列のDNAに局在化されて、NNNNCCで示されるPAM配列においてDNAを切断し、配列番号238のポリN部分は、標的DNA配列に相補的なプロトスパーサー配列である。いくつかの実施形態において、RNA誘導型ヌクレアーゼは、配列番号239のヌクレオチド配列を有するgRNAの存在下において、標的配列のDNAに局在化されて、NNNNCCで示されるPAM配列においてDNAを切断し、配列番号239のポリN部分は、標的DNA配列に相補的なプロトスパーサー配列である。

【0476】

いくつかの実施形態において、遺伝子のノックアウトまたは不活性化は、RNA誘導型ヌクレアーゼを使用して導入された挿入、欠失、変異またはその組み合わせを含む。免疫細胞のタンパク質をコードする内因性遺伝子をノックアウトするための典型的なgRNA配列およびこの配列を使用した方法には、Ren et al., Clin Cancer Res. 2017. 23(9):2255-2266に記載されているものが含まれ、この文献に記載のgRNA、Cas9 DNA、ベクターおよび遺伝子ノックアウト技術は、いずれも参照によりその全体が本明細書に明示的に援用される。

【0477】

いくつかの実施形態において、遺伝子組換えは、外因性核酸配列（例えば、異種プロモーター、導入遺伝子および／またはその組み合わせ）を細胞ゲノムに挿入することを含み、RNA誘導型ヌクレアーゼが、細胞ゲノムに二本鎖切断を導入し、外因性核酸配列が、相同組換え修復により細胞ゲノムに導入される。

【0478】

いくつかの実施形態において、遺伝子組換えは、細胞ゲノムのTRAC座位に外因性核酸（例えばドナー鑄型）を挿入することを含み、このドナー鑄型は、5'相同アームと3'相同アームを含み、各相同アームは、TRAC座位のヌクレオチド配列に相同性を有していることから、TRAC座位に二本鎖切断が導入された後に、外因性核酸がTRAC座位へと挿入される。いくつかの実施形態において、gRNAの存在下において、RNA誘導型ヌクレアーゼにより、NGGで示されるPAM配列に二本鎖切断が導入される。いくつかの実施形態において、gRNAの存在下において、RNA誘導型ヌクレアーゼにより、NNNNCCで示されるPAM配列に二本鎖切断が導入される。

【0479】

いくつかの実施形態において、5'相同アームは、配列番号85の核酸配列と少なくとも90%の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含み、3'相同アームは、配列番号93の核酸配列と少なくとも90%の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態において、5'相同アームは、配列番号85の核酸配列を含み、3'相同アームは、配列番号93の核酸配列を含む。

10

【0480】

いくつかの実施形態において、5'相同アームは、配列番号96の核酸配列と少なくとも90%の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含み、3'相同アームは、配列番号105の核酸配列と少なくとも90%の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態において、5'相同アームは、配列番号96の核酸配列を含み、3'相同アームは、配列番号105の核酸配列を含む。

20

【0481】

いくつかの実施形態において、5'相同アームは、配列番号108の核酸配列と少なくとも90%の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含み、3'相同アームは、配列番号116の核酸配列と少なくとも90%の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態において、5'相同アームは、配列番号108の核酸配列を含み、3'相同アームは、配列番号116の核酸配列を含む。

【0482】

いくつかの実施形態において、5'相同アームは、配列番号119の核酸配列と少なくとも90%の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含み、3'相同アームは、配列番号127の核酸配列と少なくとも90%の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態において、5'相同アームは、配列番号119の核酸配列を含み、3'相同アームは、配列番号127の核酸配列を含む。

30

【0483】

いくつかの実施形態において、5'相同アームは、配列番号130の核酸配列と少なくとも90%の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含み、3'相同アームは、配列番号138の核酸配列と少なくとも90%の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態において、5'相同アームは、配列番号130の核酸配列を含み、3'相同アームは、配列番号138の核酸配列を含む。

【0484】

いくつかの実施形態において、遺伝子組換えは、細胞ゲノムのFOXP3座位に外因性核酸（例えばドナー鑄型）を挿入することを含み、このドナー鑄型は、5'相同アームと3'相同アームを含み、各相同アームは、FOXP3座位のヌクレオチド配列に相同性を有していることから、FOXP3座位に二本鎖切断が導入された後に、外因性核酸がFOXP3座位へと挿入される。いくつかの実施形態において、gRNAの存在下において、RNA誘導型ヌクレアーゼにより、NGGで示されるPAM配列に二本鎖切断が導入される。いくつかの実施形態において、gRNAの存在下において、RNA誘導型ヌクレアーゼにより、NNNNCCで示されるPAM配列に二本鎖切断が導入される。

40

【0485】

いくつかの実施形態において、5'相同アームは、配列番号141の核酸配列と少なくとも90%の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含み、3'相同アームは、配列番号149

50

の核酸配列と少なくとも90%の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態において、5'相同アームは、配列番号141の核酸配列を含み、3'相同アームは、配列番号149の核酸配列を含む。

【0486】

いくつかの実施形態において、5'相同アームは、配列番号152の核酸配列と少なくとも90%の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含み、3'相同アームは、配列番号160の核酸配列と少なくとも90%の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態において、5'相同アームは、配列番号152の核酸配列を含み、3'相同アームは、配列番号160の核酸配列を含む。

【0487】

いくつかの実施形態において、5'相同アームは、配列番号163の核酸配列と少なくとも90%の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含み、3'相同アームは、配列番号171の核酸配列と少なくとも90%の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態において、5'相同アームは、配列番号163の核酸配列を含み、3'相同アームは、配列番号171の核酸配列を含む。

【0488】

いくつかの実施形態において、5'相同アームは、配列番号174の核酸配列と少なくとも90%の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含み、3'相同アームは、配列番号183の核酸配列と少なくとも90%の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態において、5'相同アームは、配列番号174の核酸配列を含み、3'相同アームは、配列番号183の核酸配列を含む。

【0489】

いくつかの実施形態において、5'相同アームは、配列番号186の核酸配列と少なくとも90%の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含み、3'相同アームは、配列番号194の核酸配列と少なくとも90%の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態において、5'相同アームは、配列番号186の核酸配列を含み、3'相同アームは、配列番号194の核酸配列を含む。

【0490】

いくつかの実施形態において、5'相同アームは、配列番号197の核酸配列と少なくとも90%の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含み、3'相同アームは、配列番号205の核酸配列と少なくとも90%の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態において、5'相同アームは、配列番号197の核酸配列を含み、3'相同アームは、配列番号205の核酸配列を含む。

【0491】

いくつかの実施形態において、5'相同アームは、配列番号208の核酸配列と少なくとも90%の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含み、3'相同アームは、配列番号217の核酸配列と少なくとも90%の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態において、5'相同アームは、配列番号208の核酸配列を含み、3'相同アームは、配列番号217の核酸配列を含む。

【0492】

細胞の種類

遺伝子組換え細胞を製造する方法およびシステム（例えば、インビトロまたはエキスピボでの遺伝子編集によって遺伝子組換え細胞を製造する方法およびシステム）の実施形態では、例えば、核酸、ベクターおよび／または組成物を導入するための材料として、当技術分野で公知の細胞であれば、どのような種類の細胞を使用してもよい。CD4+細胞の遺伝子操作を含む本明細書に記載の方法は、その他の種類の細胞（例えばCD8+細胞）にも適用することができる。いくつかの実施形態において、本明細書に記載の方法は、免疫細胞を編集することを含む。免疫細胞の例としては、B細胞、T細胞およびNK細胞が挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態において、本明細書で提供される方法は、CD3+細胞を編集して、CD4+Treg細胞やCD8+Treg細胞などの編集されたCD

10

20

30

40

50

3+細胞を製造することを含む。いくつかの実施形態において、前記方法は、CD4+T細胞を編集することによって、CD4+Treg細胞を製造することを含む。いくつかの実施形態において、前記方法は、CD8+T細胞を編集することによって、CD8+Treg細胞を製造することを含む。いくつかの実施形態において、前記方法は、NK1.1+T細胞を編集することによって、NK1.1+Treg細胞を製造することを含む。

【0493】

いくつかの実施形態において、前記方法は、幹細胞を編集することを含む。いくつかの実施形態において、前記方法は、多能性幹細胞を編集することを含む。いくつかの実施形態において、前記方法は、CD34+造血幹細胞（HSC）を編集することを含む。いくつかの実施形態において、前記方法は、人工多能性幹細胞（iPSC）を編集することを含む。編集した幹細胞をインビトロで成熟させて、Treg細胞を製造してもよい。編集した幹細胞を成熟させて、CD3+Treg細胞、CD4+Treg細胞、CD8+Treg細胞、NK1.1+Treg細胞またはこれらの組み合わせを得てもよい。

【0494】

いくつかの実施形態において、本発明の方法はT細胞を編集することを含む。T細胞すなわちTリンパ球は、胸腺において成熟し、T細胞受容体（TCR）を産生する免疫系細胞であり、このTCRは、例えば、通常、 $\alpha\beta$ ヘテロ二量体または $\gamma\delta$ ヘテロ二量体で構成される抗原特異的ヘテロ二量体からなる細胞表面受容体である。特定のクローン性のT細胞は、通常、主要組織適合遺伝子複合体によりコードされた決定因子を介して同系の抗原提示細胞によって提示された特定の抗原エピトープを認識する単クローン型のTCRのみを発現する。T細胞は、ナイーブT細胞（「T_N」；抗原に曝露されていないT細胞；（本明細書で述べるように）T_{CM}と比較して、CD62L、CCR7、CD28、CD3、CD127およびCD45RAの発現が増加しており、CD45ROの発現が減少しているか、CD45ROの発現が認められない）、メモリーT細胞（T_M）（抗原を経験し、長い寿命を有するT細胞）（幹細胞メモリーT細胞を含む）、エフェクター細胞（抗原を経験し、細胞傷害性を有するT細胞）のいずれであってもよい。T_Mは、セントラルメモリーT細胞（T_{CM}）サブセット（CD62L、CCR7、CD28、CD95、CD45ROおよびCD127を発現するT細胞）と、エフェクターメモリーT細胞（T_{EM}）サブセット（CD45ROを発現し、CD62L、CCR7、CD28およびCD45RAの発現が減少しているT細胞）にさらに分類することができる。エフェクターT細胞（T_{eff}）は、抗原を経験したCD8+細胞傷害性Tリンパ球を指し、CD45RAを発現し、T_{CM}と比較して、CD62L、CCR7およびCD28の発現が減少しており、グランザイムおよびパーフォリンが陽性である。ヘルパーT細胞（T_H）は、サイトカインを放出することにより他の免疫細胞の活性に影響を与えるCD4+細胞である。CD4+T細胞は、適応免疫応答を活性化または抑制することができ、これら2つの機能のどちらが誘導されるのかは、他の細胞および他のシグナルの存在に左右される。T細胞は、公知の技術を使用して回収することができ、例えば、1つ以上のT細胞表面表現型マーカーを特異的に認識する抗体などを使用した公知の技術、例えば、抗体への親和性結合、フローサイトメトリー、蛍光活性化セルソーティング（FACS）、または免疫磁性ビーズによる選択により、様々な亜集団またはその組み合わせを濃縮したり除去したりすることができる。その他の典型的なT細胞として、CD4+CD25+（Foxp3+）制御性T細胞やTreg17細胞などの制御性T細胞（Treg）（サプレッサーT細胞としても知られている）、ならびにTr1細胞、Th3細胞、CD8+CD28-細胞、またはQa-1拘束性T細胞が挙げられる。いくつかの実施形態において、前記細胞は、CD3+、CD4+、および／またはCD8+のT細胞である。いくつかの実施形態において、前記細胞はCD3+T細胞である。いくつかの実施形態において、前記細胞は、CD4+CD8-T細胞である。いくつかの実施形態において、前記細胞は、CD4-CD8+T細胞である。いくつかの実施形態において、前記細胞は、制御性T細胞（Treg）である。Treg細胞の例として、Tr1細胞、Th3細胞、CD8+CD28-細胞およびQa-1拘束性T細胞が挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態において、前記Treg細胞はFOXP3+Treg細胞である。いくつかの実施形態において、Treg細胞は、CTLA-4、LAG-3、CD25、CD39、CD27、C

10

20

30

40

50

CD70、CD357 (GITR)、ニューロピリン1、ガレクチン1、および／またはIL-2R α をその表面上に発現している。

【0495】

いくつかの実施形態において、前記細胞はヒト細胞である。いくつかの実施形態において、本明細書に記載の細胞は、生体試料から単離された細胞である。生体試料は、対象（例えばヒト対象）から得られた試料であってもよく、研究室において（例えば細胞培養により）製造された組成物であってもよい。対象から得られた生体試料は、液体試料（例えば、血液もしくはその画分、気管支洗浄液、脳脊髄液または尿）であってもよく、固体試料（例えば組織片）であってもよい。いくつかの実施形態において、前記細胞は、末梢血から得られた細胞である。いくつかの実施形態において、前記細胞は、臍帯血から得られた細胞である。いくつかの実施形態において、前記細胞は、末梢血細胞を選別して、所望の細胞集団（例えばCD3+細胞）を選択することによって得られ、選別した細胞集団に含まれる1種以上の細胞を本明細書に記載の方法によって組換える。さらに、本明細書では、本明細書に記載の方法によって製造された細胞も企図されている。

10

【0496】

本明細書に記載の遺伝子組換え細胞の実施形態はTreg細胞である。Treg細胞の例として、Tr1細胞、Th3細胞、CD8+CD28-細胞およびQa-1拘束性T細胞が挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態において、前記細胞は、NK-T細胞（例えば、FoxP3+NK-T細胞）である。いくつかの実施形態において、前記細胞は、CD4+T細胞（例えば、FoxP3+CD4+T細胞）またはCD8+細胞（例えば、FoxP3+CD8+T細胞）である。いくつかの実施形態において、前記細胞はCD25-T細胞である。いくつかの実施形態において、前記Treg細胞はFoxP3+Treg細胞である。いくつかの実施形態において、Treg細胞は、CTLA-4、LAG-3、CD25、CD39、CD27、CD70、CD357 (GITR)、ニューロピリン1、ガレクチン1、および／またはIL-2R α をその表面上に発現している。いくつかの実施形態において、前記Treg細胞はCTLA-4+である。いくつかの実施形態において、前記Treg細胞はLAG-3+である。いくつかの実施形態において、前記Treg細胞はCD25+である。いくつかの実施形態において、前記Treg細胞はCD39+である。いくつかの実施形態において、前記Treg細胞はCD27+である。いくつかの実施形態において、前記Treg細胞はCD70+である。いくつかの実施形態において、前記Treg細胞はCD357+である。いくつかの実施形態において、前記Treg細胞はIL-2R α +である。いくつかの実施形態において、前記Treg細胞は、その表面上にIL-2R β およびIL-2R γ を発現している。いくつかの実施形態において、前記Treg細胞は、その表面上にニューロピリン1を発現している。いくつかの実施形態において、前記Treg細胞は、その表面上にガレクチン1を発現している。

20

30

【0497】

ポリヌクレオチド、ポリペプチドおよび配列同一性

本開示の態様は、（例えば、ある方法またはシステムにおける）細胞ゲノムへの挿入用の核酸、および挿入された核酸を含む遺伝子組換え細胞に関する。当業者であれば容易に理解できるように、核酸には、タンパク質、ポリペプチド、ペプチドなどを発現するか、これらを発現するように改変された、ゲノム配列、プラスミドによりコードされるゲノム外配列、および小さな人工遺伝子セグメントが含まれていてもよい。そのようなセグメントは、当業者により自然界から単離されたものであってもよく、合成的に改変されたものであってもよい。

40

【0498】

さらに、当業者であれば容易に理解できるように、ポリヌクレオチドは、一本鎖（コード鎖もしくはアンチセンス鎖）または二本鎖であってもよく、DNA分子（ゲノムDNA、cDNAもしくは合成DNA）またはRNA分子であってもよい。RNA分子には、HnRNA分子（イントロンを含み、DNA分子と1対1で対応する）およびmRNA分子（イントロンを含んでいない）が含まれていてもよい。別のコード配列または非コード配列は、本開示によるポリヌクレオチド内に存在していてもよいが、本開示によるポリヌクレオチド内に

50

必ずしも存在していなくてもよく、また、ポリヌクレオチドは、別の分子および／または担体材料に結合されていてもよいが、別の分子や担体材料に必ずしも結合されていなくてもよい。ポリヌクレオチドは、天然の配列を含んでいてもよく、天然の配列のバリエーションまたは誘導体をコードする配列を含んでいてもよい。

【0499】

いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチドのバリエーションは、本明細書で述べる免疫調節性ポリペプチドをコードする参照ポリヌクレオチド配列と実質的な同一性を有していてもよい。例えば、ポリヌクレオチドは、本明細書に記載の方法（例えば、標準的なパラメータを使用した後述のBLAST分析）を使用して測定した場合に、参照ポリヌクレオチド配列（本明細書に記載の抗体をコードする配列など）と比較して、少なくとも70%の配列同一性、好ましくは、少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%もしくは99%以上の配列同一性、またはこれらの割合のいずれか2つを上下限とする範囲内の配列同一性を有するポリヌクレオチドであってもよい。当業者であれば、コドンの縮重、アミノ酸の類似性、リーディングフレームの位置などを考慮に入れて、各パラメータを適切に調節し、2つのヌクレオチド配列によってコードされるタンパク質同士の同一性を決定できることを容易に理解できるであろう。

【0500】

通常、ポリヌクレオチドのバリエーションは、1つ以上の置換、付加、欠失および／または挿入を含むが、ポリヌクレオチドのバリエーションによってコードされ、別の分子と特異的に結合して相互作用することができ、ポリペプチドに由来するポリペプチドのバリエーションは、このような1つ以上の置換、付加、欠失および／または挿入が含まれていても、本明細書で具体的に示されたポリヌクレオチド配列によってコードされるポリペプチドと比べて、その結合親和性を実質的に低下していないことが好ましい。

【0501】

本明細書に記載の核酸配列のいくつかの実施形態（例えば、核酸上の配列、ベクター、または細胞内の配列）は、細胞での発現用にコドン最適化されている。宿主細胞内に存在する遺伝子もしくはコード配列、または宿主細胞に導入された遺伝子もしくはコード配列に関する「コドン最適化された」および「コドン最適化」は、遺伝子またはコード配列によってコードされるアミノ酸配列を変化させることなく、宿主細胞に典型的なコドン使用頻度を反映させるための、遺伝子またはコード配列におけるコドンの変更を指す。このような最適化には、その生物の遺伝子において使用頻度の高い1つ以上のコドンで、少なくとも1つのコドン、2つ以上のコドン、または非常に多数の数のコドンを置換することが含まれる。コドンの使用頻度を示した表は、例えば、www.kazusa.or.jpにおいて利用可能な「Codon Usage Database」から容易に入手することができる。当業者であれば、各生物におけるコドン使用頻度またはコドン嗜好性に関する知識を利用して、そのコドン使用頻度を、特定のアミノ酸配列を有するポリペプチドに適用して、元のアミノ酸配列を有する元のポリペプチドをコードするが、その生物種（例えばヒト）に最適なコドンが使用された、コドン最適化されたコード配列を作製することができる。コドン最適化されたコード領域は、当業者に公知の様々な方法で設計することができる。

【0502】

本明細書で述べるポリヌクレオチドまたはその断片は、コード配列自体の長さに関係なく、プロモーター、ポリアデニル化シグナル、追加の制限酵素部位、マルチクロニング部位、その他のコードセグメントなどの別のDNA配列と組み合わせてもよく、その全長は大幅に変動してもよい。したがって、ほぼどのような長さの核酸断片でも使用可能であると想定され、その全長は、調製の容易さと、使用する組換えDNAプロトコルによる制限を受けることが好ましい。例えば、一例として、その全長が、10,000塩基対、5000塩基対、3000塩基対、2,000塩基対、1,000塩基対、500塩基対、200塩基対、100塩基対、50塩基対など、または約10,000塩基対、約5000塩基対、約3000塩基対、約2,000塩基対、約1,000塩基対、約500塩基対、約200塩基対、約100塩基対、約50塩基対など（あらゆる中間の長さを含む）のポリヌクレオチドセグメントが有用であると想

定される。

【0503】

ポリヌクレオチド配列同士または核酸配列同士の比較において、後述するように、最大限に一致するように2つの配列をアライメントしたときに、この2つの配列のヌクレオチド配列が同じであった場合、この2つの配列は「同一」とであると言う。2つの配列同士の比較は、通常、比較ウィンドウ内の配列同士を比較して配列相同性が見られる局所領域を同定し、これらを比較することによって行われる。本明細書において、「比較ウィンドウ」は、基準配列と特定の配列のアライメントを最適化した後、これらの2つの配列を同じ数の連続した位置で比較するための、連続した少なくとも20個または少なくとも約20個（通常30～75個または40～50個）の位置からなるセグメントを指す。

10

【0504】

比較を行うための配列の最適なアライメントは、バイオインフォマティクスソフトウェアのLasergeneスイートに含まれるMegalignプログラム（DNASTAR社、ウイスコンシン州マディソン）をデフォルトパラメーターで使用して行ってもよい。このプログラムは、様々な文献に記載のいくつかのアライメントスキームに使用されており、これらの文献として、Dayhoff, M.O. (ed.) Atlas of Protein Sequence and Structure, National Biomedical Research Foundation, Washington DC Vol. 5, Suppl. 3, pp. 345-358に掲載のDayhoff, M.O. (1978) A model of evolutionary change in proteins - Matrices for detecting distant relationships.; Hein J., Unified Approach to Alignment and Phylogenesis, pp. 626-645 (1990); Enzymology vol. 183, Academic Press, Inc., San Diego, CAに記載の方法; Higgins, D.G. and Sharp, P.M., CABIOS 5:151-153 (1989); Myers, E.W. and Muller W., CABIOS 4:11-17 (1988); Robinson, E.D., Comb. Theor 11:105 (1971); Santou, N. Nes, M., Mol. Biol. Evol. 4:406-425 (1987); Sneath, P. H.A. and Sokal, R.R., Numerical Taxonomy - the Principles and Practice of Numerical Taxonomy, Freeman Press, San Francisco, CA (1973); Wilbur, W.J. and Lipman, D.J., Proc. Natl. Acad., Sci. USA 80:726-730 (1983)が挙げられる。

20

【0505】

別の方法として、比較を行うための配列の最適なアライメントは、Smith and Waterman, Add. APL. Math 2:482 (1981)に記載の局所的同一性アルゴリズム、Needleman and Wunsch, J. Mol. Biol. 48:443 (1970)に記載の同一性アライメントアルゴリズム、Pearson and Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 2444 (1988)に記載の類似性探索方法、コンピューターに実装されたこれらのアルゴリズム（Genetics Computer Group (GCG) 社（ウイスコンシン州マディソン、サイエンスドライブ575）のWisconsin Genetics Software Packageに収録されているGAP、BESTFIT、BLAST、FASTAおよびTFASTA）、または綿密な調査によって行ってもよい。

30

【0506】

配列同一性および配列相同性の決定に適した好ましいアルゴリズムの一例として、Altschul et al., Nucl Acids Res. 1977. 25:3389-3402に記載のBLASTアルゴリズムおよびAltschul et al., J Mol Biol. 1990. 215:403-410に記載のBLAST 2.0アルゴリズムがある。例えば、本明細書に記載のパラメーターを用いてBLASTまたはBLAST 2.0を使用することにより、2つ以上のポリヌクレオチド同士の配列同一性を決定することができる。BLAST分析を行うためのソフトウェアは、米国国立生物工学情報センター（National Center for Biotechnology Information）から公的に利用可能である。説明のための一例として、ヌクレオチド配列に対するパラメーターとして、M（マッチした1組の残基のリワードスコア；常に>0）およびN（ミスマッチ残基のペナルティスコア；常に<0）を使用することによって、累積スコアを算出することができる。ヒットしたワードの両方向への伸長は、累積アライメントスコアが最大値からXの値分だけ低下し始めたとき、負のスコアを有する1個以上の残基のアライメントが蓄積して累積

40

50

スコアが0以下になったとき、または一方の配列の末端に到達したときに停止させる。BLASTアルゴリズムのパラメーターであるW、TおよびXにより、アライメントの感度と速度が決まる。(ヌクレオチド配列を比較するための)BLASTNプログラムでは、デフォルトパラメーターとして、ワード長(W)=11、期待値(E)=10、BLOSUM62スコア行列(Henikoff and Henikoff, Proc Natl Acad Sci U S A. 1989. 89:10915を参照されたい)を使用したアライメント、(B)=50、期待値(E)=10、M=5、N=-4、および両鎖の比較を使用している。

【0507】

特定の実施形態において、「配列同一性(%)」は、少なくとも20個の位置を含む比較ウィンドウ内の最適化されたアライメントにおいて2つの配列を比較することによって決定され、比較ウィンドウ内のポリヌクレオチド配列の一部は、これら2つの配列の最適化されたアラインメントの基準配列(付加や欠失を含まない)と比較して、20%以下(通常、5~15%または10~12%)の付加または欠失(すなわちギャップ)を含んでいてもよい。配列同一性(%)は、両方の配列において同一の核酸塩基が存在する位置の数を決定して、核酸塩基がマッチする位置の数を算出し、マッチした位置の数を基準配列の位置の総数(すなわち比較ウィンドウのサイズ)で割り、得られた結果に100を掛けることにより配列同一性(%)が求められる。

【0508】

標準的な技術を使用して、DNAの組換え、オリゴヌクレオチドの合成、組織培養および形質転換(例えば、エレクトロポレーションやリポフェクションなど)を行ってもよい。酵素反応および精製技術は、製造業者の説明書に従って行ってもよく、当技術分野において一般的な方法によって行ってもよく、本明細書に記載に従って行ってもよい。これらの技術および操作ならびに関連する技術および操作は、通常、当技術分野でよく知られている従来の方法に従って行ってもよく、本明細書において引用または検討された様々な一般的な参考文献またはより詳細な参考文献の記載に従って行ってもよい。特定の定義が記載されていない限り、本明細書に記載の分子生物学、分析化学、有機合成化学および医薬化学に関連して使用される命名法、検査法および検査技術は、当技術分野において一般的に使用される公知のものである。また、標準的な技術を使用して、組換え技術、分子生物学的合成、微生物学的合成、化学的合成、化学分析、医薬品の調製、製剤化および送達、ならびに患者の治療を行ってもよい。

【0509】

医薬組成物

本開示のいくつかの態様は、本明細書に記載の細胞、ベクターまたは核酸と、薬学的に許容される添加剤または担体とを含む医薬組成物に関する。このような医薬組成物は、例えば、全身投与用または標的組織への投与用に製剤化される。「許容される」とは、添加剤(担体)が、医薬組成物中の有効成分と適合し、(かつ、好ましくは、有効成分を安定化させることができ)、治療を受ける対象に有害であってはならないことを意味する。薬学的に許容される添加剤、担体、緩衝剤、安定剤、等張化剤、保存剤もしくは酸化防止剤またはその他の材料は、当業者によく知られている。そのような材料は無毒でなくてはならず、有効成分の有効性に影響を及ぼしてはならない。担体またはその他の材料の正確な特性は、例えば、非経口投与、筋肉内投与、皮内投与、舌下投与、頬側投与、眼内投与、鼻腔内投与、皮下投与、髄腔内投与、腫瘍内投与、経口投与、腔内投与、直腸投与などの投与経路に応じて左右されてもよい。例えば、Remington: The Science and Practice of Pharmacy 20th Ed. (2000) Lippincott Williams and Wilkins, Ed. K. E. Hooverを参照されたい。また、インビボ投与用に使用される医薬組成物は、生物学的作用(例えば免疫抑制)の達成に使用される細胞、ウイルスおよび/またはウイルスベクターを除いて、滅菌されていなくてはならない。この滅菌は、例えば、滅菌濾過膜を通した濾過によって容易に達成することができる。本明細書に記載の医薬組成物は、例えば、皮下注射針で貫通可能なストッパーを有する静脈用注射液バッグまたは静脈用注射液バイアルなどの、滅菌されたアクセスポートを有する容器に入れられていてもよい。

【0510】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載の医薬組成物は、筋肉内注射用、静脈内注射用、皮内注射用または皮下注射用に製剤化することができる。

【0511】

本明細書で企図される方法において使用される本明細書に記載の医薬組成物は、凍結乾燥製剤または水溶液の形態の、薬学的に許容される担体、緩衝剤、添加剤、塩または安定剤を含んでいてもよい。例えば、Remington: The Science and Practice of Pharmacy 20th Ed. (2000) Lippincott Williams and Wilkins, Ed. K. E. Hooverを参照されたい。許容される担体、添加剤または安定剤は、使用される用量および濃度において、レシピエントに対して無毒であり、リン酸塩、クエン酸塩、その他の有機酸塩などの緩衝剤；アスコルビン酸やメチオニンなどの酸化防止剤；保存剤（オクタデシルジメチルベンジルアンモニウムクロリド；塩化ヘキサメトニウム；塩化ベンザルコニウム、塩化ベンゼトニウム；フェノール、ブチルアルコールもしくはベンジルアルコール；メチルパラベンやプロピルパラベンなどのアルキルパラベン類；カテコール；レゾルシノール；シクロヘキサノール；3-ペンタノール；m-クレゾールなど）；低分子量ポリペプチド（約10残基未満）；血清アルブミン、ゼラチン、免疫グロブリンなどのタンパク質；ポリビニルピロリドンなどの親水性ポリマー；グリシン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、アルギニン、リシンなどのアミノ酸；グルコース、マンノース、デキストランなどの単糖、二糖類およびその他の糖類；EDTAなどのキレート剤；スクロース、マンニトール、トレハロース、ソルビトールなどの糖類；ナトリウムなどの、塩を生じる対イオン；金属錯体（例えばZn-タンパク質錯体）；および／またはTWEENTM、PLURONICTM、ポリエチレングリコール（PEG）などの非イオン性界面活性剤を含んでいてもよい。

【0512】

本明細書に記載の医薬組成物は、経口投与用、非経口投与用もしくは直腸投与用、または吸入投与用もしくは吹送投与用の、錠剤、丸剤、カプセル剤、粉末剤、顆粒剤、液剤もしくは懸濁剤、または坐剤などの単位剤形であってもよい。

【0513】

錠剤などの固体組成物を調製するには、例えば、トウモロコシデンプン、ラクトース、スクロース、ソルビトール、タルク、ステアリン酸、ステアリン酸マグネシウム、リン酸ニカルシウム、ガムなどの慣用の錠剤原料や、その他の医薬希釈剤（例えば水）などの医薬担体に主要な有効成分を混合して、本発明の化合物または薬学的に許容されるその無毒な塩の均一な混合物を含む固体のプレフォーミュレーション組成物を形成することができる。このようなプレフォーミュレーション組成物を「均一」とであると表現する場合、この用語は、有効成分が組成物全体に均一に分散していることから、この組成物を、錠剤、丸剤、カプセル剤などの有効な単位剤形に容易に均等に分割できることを意味する。次に、得られた固体のプレフォーミュレーション組成物を、0.1～約500mgの本発明の有効成分を含む前述の種類の単位剤形に分割する。本発明の新規組成物の錠剤または丸剤は、コーティングして、または組成物化して、持続作用という利点を得られる剤形を提供することができる。例えば、錠剤または丸剤は、内側の投与成分と外側の投与成分とを含むことができ、外側の投与成分で内側の投与成分が包まれていてもよい。この2種の成分は、腸溶層で隔てることができ、この腸溶層によって、胃での崩壊を抑制して、内側の成分を損なうことなく、十二指腸を通過させたり、その放出を遅延させたりすることができる。様々な種類の材料を使用して、このような腸溶層または腸溶コーティングを形成することができ、このような材料としては、セラック、セチルアルコール、酢酸セルロースなどの材料を含む様々な種類のポリマー酸およびその混合物が挙げられる。

【0514】

吸入用または吹送用の医薬組成物として、薬学的に許容される水性溶媒、有機溶媒もしくはその混合物中の液剤もしくは懸濁剤、または粉末剤が挙げられる。液体組成物または固体組成物は、前述の好適な薬学的に許容される添加剤を含んでいてもよい。いくつかの実施形態において、この組成物は、経口経路または経鼻・呼吸器経路を介して投与されて

【 0 5 1 5 】

【 0 5 1 6 】

10

【 0 5 1 8 】

20

30

40

50

6×10^6 個/kg、約 5.5×10^6 個/kg、約 5.6×10^6 個/kg、約 5.7×10^6 個/kg、約 5.8×10^6 個/kg、約 5.9×10^6 個/kg、約 6.0×10^6 個/kg、約 6.1×10^6 個/kg、約 6.2×10^6 個/kg、約 6.3×10^6 個/kg、約 6.4×10^6 個/kg、約 6.5×10^6 個/kg、約 6.6×10^6 個/kg、約 6.7×10^6 個/kg、約 6.8×10^6 個/kg、約 6.9×10^6 個/kg、約 7.0×10^6 個/kg、約 7.1×10^6 個/kg、約 7.2×10^6 個/kg、約 7.3×10^6 個/kg、約 7.4×10^6 個/kg、約 7.5×10^6 個/kg、約 7.6×10^6 個/kg、約 7.7×10^6 個/kg、約 7.8×10^6 個/kg、約 7.9×10^6 個/kg、約 8.0×10^6 個/kg、約 8.1×10^6 個/kg、約 8.2×10^6 個/kg、約 8.3×10^6 個/kg、約 8.4×10^6 個/kg、約 8.5×10^6 個/kg、約 8.6×10^6 個/kg、約 8.7×10^6 個/kg、約 8.8×10^6 個/kg、約 8.9×10^6 個/kg、約 9.0×10^6 個/kg、約 9.1×10^6 個/kg、約 9.2×10^6 個/kg、約 9.3×10^6 個/kg、約 9.4×10^6 個/kg、約 9.5×10^6 個/kg、約 9.6×10^6 個/kg、約 9.7×10^6 個/kg、約 9.8×10^6 個/kg、約 9.9×10^6 個/kg、約 1.0×10^7 個/kg、約 1.1×10^7 個/kg、約 1.2×10^7 個/kg、約 1.3×10^7 個/kg、約 1.4×10^7 個/kg、約 1.5×10^7 個/kg、約 1.6×10^7 個/kg、約 1.7×10^7 個/kg、約 1.8×10^7 個/kg、約 1.9×10^7 個/kg、約 2.0×10^7 個/kg、約 2.1×10^7 個/kg、約 2.2×10^7 個/kg、約 2.3×10^7 個/kg、約 2.4×10^7 個/kg、約 2.5×10^7 個/kg、約 2.6×10^7 個/kg、約 2.7×10^7 個/kg、約 2.8×10^7 個/kg、約 2.9×10^7 個/kg、約 3.0×10^7 個/kg、約 3.1×10^7 個/kg、約 3.2×10^7 個/kg、約 3.3×10^7 個/kg、約 3.4×10^7 個/kg、約 3.5×10^7 個/kg、約 3.6×10^7 個/kg、約 3.7×10^7 個/kg、約 3.8×10^7 個/kg、約 3.9×10^7 個/kg、約 4.0×10^7 個/kg、約 4.1×10^7 個/kg、約 4.2×10^7 個/kg、約 4.3×10^7 個/kg、約 4.4×10^7 個/kg、約 4.5×10^7 個/kg、約 4.6×10^7 個/kg、約 4.7×10^7 個/kg、約 4.8×10^7 個/kg、約 4.9×10^7 個/kg、約 5.0×10^7 個/kg、約 5.1×10^7 個/kg、約 5.2×10^7 個/kg、約 5.3×10^7 個/kg、約 5.4×10^7 個/kg、約 5.5×10^7 個/kg、約 5.6×10^7 個/kg、約 5.7×10^7 個/kg、約 5.8×10^7 個/kg、約 5.9×10^7 個/kg、約 6.0×10^7 個/kg、約 6.1×10^7 個/kg、約 6.2×10^7 個/kg、約 6.3×10^7 個/kg、約 6.4×10^7 個/kg、約 6.5×10^7 個/kg、約 6.6×10^7 個/kg、約 6.7×10^7 個/kg、約 6.8×10^7 個/kg、約 6.9×10^7 個/kg、約 7.0×10^7 個/kg、約 7.1×10^7 個/kg、約 7.2×10^7 個/kg、約 7.3×10^7 個/kg、約 7.4×10^7 個/kg、約 7.5×10^7 個/kg、約 7.6×10^7 個/kg、約 7.7×10^7 個/kg、約 7.8×10^7 個/kg、約 7.9×10^7 個/kg、約 8.0×10^7 個/kg、約 8.1×10^7 個/kg、約 8.2×10^7 個/kg、約 8.3×10^7 個/kg、約 8.4×10^7 個/kg、約 8.5×10^7 個/kg、約 8.6×10^7 個/kg、約 8.7×10^7 個/kg、約 8.8×10^7 個/kg、約 8.9×10^7 個/kg、約 9.0×10^7 個/kg、約 9.1×10^7 個/kg、約 9.2×10^7 個/kg、約 9.3×10^7 個/kg、約 9.4×10^7 個/kg、約 9.5×10^7 個/kg、約 9.6×10^7 個/kg、約 9.7×10^7 個/kg、約 9.8×10^7 個/kg、約 9.9×10^7 個/kg、または約 1.0×10^8 個/kg の用量の細胞を含む。

【0521】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載の医薬組成物は、対象における1型糖尿病の治療に有用な1つ以上の追加の薬剤をさらに含む。

【0522】

使用方法

本開示のいくつかの態様は、本明細書に記載の遺伝子組換え細胞を対象に投与する方法に関する。いくつかの実施形態において、この方法は、本明細書に記載の遺伝子組換え細胞のいずれかを対象に投与する工程を含む。いくつかの実施形態において、前記方法は、投与を受ける対象から事前に得られた細胞を、該対象に投与する工程を含む（すなわち、この細胞は自家細胞である）。いくつかの実施形態において、前記方法は、

(i) 対象から細胞を単離する工程；

(ii) 本明細書に記載の方法（例えば、遺伝子編集および／またはベクターの導入）で前記細胞を処理する工程；および

(iii) 処理した細胞を前記対象に投与する工程を含む。

いくつかの実施形態において、前記方法は、投与を受ける対象とは異なる対象から事前

に得られた細胞を、投与を受ける対象に投与する工程を含む（すなわち、この細胞は同種細胞である）。いくつかの実施形態において、前記方法は、

（i）第1の対象から細胞を単離する工程；

（ii）本明細書に記載の方法（例えば、遺伝子編集またはベクターの導入）で前記細胞を処理する工程；および

（iii）処理した細胞を第2の対象に投与する工程を含む。

【0523】

本明細書に記載の方法、細胞、システムおよび組成物のいくつかの実施形態は、医薬品として使用するための、本明細書に記載の細胞、ベクター、核酸または脂質ナノ粒子を含む。いくつかの実施形態において、本明細書に記載の細胞、ベクター、核酸または脂質ナノ粒子は、対象において1型糖尿病を予防、治療、抑制または緩和する方法において使用するものである。

【0524】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載の細胞は、対象において1型糖尿病を予防、治療、抑制または緩和する方法において使用するための細胞である。いくつかの実施形態において、前記細胞は、対象から得られた自家細胞である（すなわち、対象に由来する細胞である）。別の実施形態において、前記細胞は対象と同種の細胞である（すなわち、異なる対象に由来する細胞である）。

【0525】

いくつかの実施形態において、前記細胞は、1型糖尿病に関連する抗原に特異的な抗原特異的受容体（例えばT細胞受容体（TCR））を発現する。いくつかの実施形態において、前記TCRは、HLA-DRB1*0401拘束性にIGRP（305-324）ペプチドに結合するT1D2 TCRである。いくつかの実施形態において、前記TCRは、HLA-DRB1*0401拘束性にIGRP（241-260）ペプチドに結合するT1D4 TCRである。いくつかの実施形態において、前記TCRは、HLA-DRB1*0401拘束性にIGRP（305-324）ペプチドに結合するT1D5-1 TCRである。

【0526】

投与

いくつかの実施形態において、遺伝子組換え細胞は、30日間の期間中に1～14日間投与してもよい。いくつかの実施形態において、60日間の期間中に、1日、2日間、3日間、4日間、5日間、6日間、7日間、8日間、9日間、10日間、11日間、12日間、13日間または14日間投与してもよい。前述のように投与する場合、適切な投与量は、症状の変化もしくは緩和を検出することができる化合物の量、または1型糖尿病の指標のうちの少なくとも1つを、基礎状態（例えば未処置状態）と比較して統計学的に有意に少なくとも10～50%低下させる化合物の量であり、前記症状の変化もしくは緩和または前記指標は、特定の血液成分の量を測定することによりモニターすることができ、例えば、検出可能な循環免疫細胞および／もしくはその他の炎症性細胞の数、ならびに／または炎症促進性サイトカインなどの、検出可能な可溶性炎症性メディエーターの量を測定することによりモニターすることができる。

【0527】

いくつかの実施形態において、細胞の投与前、細胞の投与と同時、かつ／または細胞の投与後に、ラパマイシンまたはラパログを前記対象に投与する。細胞の表面上のCISC構成要素の二量体化を誘導することができるラパマイシンを投与することによって、インビボにおいてIL-2のシグナル伝達を維持することができ、それによって、IL-2の投与による望ましくない効果（例えば、その他のT細胞の活性化など）を引き起こすことなく、CISCを発現する細胞の生存および増殖を促進することができる。同様に、インビボでのラパログの代謝により、ラパマイシンを生成させるか、または細胞の表面でCISC構成要素のヘテロ二量体化を誘導することが可能な類似した構造の分子を生成させることによって、組換え細胞においてインビボのIL-2シグナル伝達を発生させ、これにより、組換え細

10

20

30

40

50

胞の生存と増殖を促進することができる。いくつかの実施形態において、インビボでのラパログの代謝によって生成される化合物はラパマイシンである。いくつかの実施形態において、投与されるラパログは、エベロリムス、CCI-779、C20-メタリルラパマイシン、C16-(S)-3-メチルインドールラパマイシン、C16-iRap、C16-(S)-7-メチルインドールラパマイシン、AP21967、C16-(S)-ブチルスルホンアミドラパマイシン、AP23050、ミコフェノール酸ナトリウム、塩酸ベニジピン、AP1903、AP23573、またはこれらの代謝産物もしくは誘導体である。いくつかの実施形態において、ラパマイシンまたはラパログは、0.001mg/kg~10mg/kgの用量、または対象の体重あたり0.001mg/kg~10mg/kgの用量で投与される。いくつかの実施形態において、ラパマイシンまたはラパログは、0.001mg/kg~0.01mg/kg、0.01mg/kg~0.1mg/kg、0.1mg/kg~1mg/kgまたは1mg/kg~10mg/kgの用量で投与される。いくつかの実施形態において、ラパマイシンまたはラパログは、前記組換え細胞とは別個の組成物の形態で投与される。いくつかの実施形態において、ラパマイシンまたはラパログは、複数回投与される。いくつかの実施形態において、ラパマイシンまたはラパログは、1日、2日間、3日間、4日間、5日間、6日間、7日間、8日間、9日間、10日間、11日間、12日間、13日間もしくは14日間またはそれ以上の日数にわたって投与される。いくつかの実施形態において、ラパマイシンまたはラパログは、1週間、2週間、3週間、4週間、5週間、6週間、7週間、8週間、9週間、10週間、11週間、12週間、13週間、14週間、15週間、16週間、17週間、18週間、19週間もしくは20週間またはそれ以上の週にわたって投与される。いくつかの実施形態において、前記対象はヒトである。いくつかの実施形態において、ラパマイシンまたはラパログを投与することによって、ラパマイシンやラパログを投与していない対象と比べて、投与された細胞を長期間にわたり生存させることができる。いくつかの実施形態において、ラパマイシンまたはラパログを投与することによって、ラパマイシンやラパログを投与していない対象と比べて、対象の末梢血中の循環組換え細胞の頻度を増加させることができる。

10

20

30

40

50

【0528】

通常、適切な投与量および治療計画とすることによって、治療的利点および／または予防的利点を得るのに十分な量の本発明の組換え細胞を提供することができる。そのような投与に対する反応は、治療を行った対象において、治療を行っていない対象と比べて臨床転帰に改善が認められること（例えば、寛解、完全寛解もしくは部分寛解がより頻繁に認められること、または無病生存期間が長いこと）によってモニターすることができる。本明細書に記載の1型糖尿病に関連する抗原に対する既存の免疫応答の低下（例えば、関連する対照と比べたときの統計学的に有意な低下）は、通常、臨床転帰の改善と相関する。そのような免疫応答は、通常、標準的な白血球表面マーカーおよび／もしくはリンパ球表面マーカー、サイトカインの発現、細胞増殖、細胞傷害性、または放出されたサイトカインを分析することによって評価してもよく、このような分析は当技術分野において日常的に行われており、治療の前後で対象から採取した試料を使用して行ってもよい。

【0529】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載の組換え細胞は、1型糖尿病の1つ以上の徴候または危険因子の存在を同定した後に対象に投与してもよい。末梢血中における抗膵島自己抗体の発現は、膵臓に対する自己免疫プロセスの存在を示すマーカーとして最も信頼性が高い。具体的には、この自己抗体は、免疫系によるβ細胞のターゲティングを反映する。対象が1型糖尿病を有しているか、1型糖尿病を発症しているか、または1型糖尿病の発症のリスクがあるのかを判断するために測定してもよい自己抗体の例として、膵島細胞に結合する抗体、インスリンに結合する抗体、グルタミン酸脱炭酸酵素に結合する抗体、膵島チロシンホスファターゼ2に結合する抗体、および／または亜鉛トランスポーター8に結合する抗体が挙げられるが、これらに限定されない。1型糖尿病に関連する複数の自己抗体を有する小児では、その約70%が、10年間のフォローアップ期間において臨床的1型糖尿病へと進行することが判明しており、これに対して、抗膵島自己抗体を持たない小児では、そのうちの1%未満しか臨床的1型糖尿病に進行せず、臨床的1型糖尿

病の発症のリスクの増加は、3歳になる前に複数の自己抗体を有する小児で見られる。Ziegler et al., JAMA. 2013. 309(23):2473-2479を参照されたい。いくつかの実施形態において、膵島細胞抗原に特異的な抗体、インスリンに特異的な抗体、グルタミン酸脱炭酸酵素に特異的な抗体、膵島チロシンホスファターゼ2に特異的な抗体、および／または亜鉛トランスポーター8に特異的な抗体のうちの1つ以上が検出された後に、対象に組換え細胞を投与する。

【0530】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載の組換え細胞が投与される対象は、本明細書に記載の組換え細胞の投与の6ヶ月前よりも以前に、1型糖尿病の診断を受けていない。1型糖尿病の発症の直後、または1型糖尿病の発症前だが1型糖尿病の発症を示す1つ以上の危険因子（例えば自己抗体）の検出後に、本明細書に記載のEngTregを投与すると有用であり、いくつかの実施形態では、膵島細胞の大半または大部分が障害を受けたり、排除されたりする前に、膵臓に対する自己免疫反応を軽減することによって膵機能を保護するのに有用である。いくつかの実施形態において、対象は、本明細書に記載の組換え細胞の投与の5ヶ月前よりも以前、4ヶ月前よりも以前、3ヶ月前よりも以前、2ヶ月前よりも以前、または1ヶ月前よりも以前に、1型糖尿病の診断を受けていない。いくつかの実施形態において、対象は、1型糖尿病の診断を受けてから6ヶ月以内に、組換え細胞が投与される。いくつかの実施形態において、対象は、1型糖尿病の診断を受けてから5ヶ月以下、4ヶ月以下、3ヶ月以下、2ヶ月以下または1ヶ月以下に、組換え細胞が投与される。対象は、1型糖尿病の診断を一切受けていなくてもよいが、膵島細胞抗原、インスリン、グルタミン酸脱炭酸酵素、膵島チロシンホスファターゼ2、および／または亜鉛トランスポーター8から選択される1種、2種、3種、4種または5種の抗原に特異的な自己抗体が検出された後に、本明細書に記載の組換え細胞が投与されてもよい。いくつかの実施形態において、対象は、1型糖尿病の診断を受けていないが、膵島細胞抗原に特異的な自己抗体、インスリンに特異的な自己抗体、グルタミン酸脱炭酸酵素に特異的な自己抗体、膵島チロシンホスファターゼ2に特異的な自己抗体、および／または亜鉛トランスポーター8に特異的な自己抗体が血清中に検出された後に、組換え細胞が投与される。いくつかの実施形態において、対象は、膵島細胞抗原に特異的な自己抗体、インスリンに特異的な自己抗体、グルタミン酸脱炭酸酵素に特異的な自己抗体、膵島チロシンホスファターゼ2に特異的な自己抗体、および／または亜鉛トランスポーター8に特異的な自己抗体が最初に検出されてから6ヶ月以内に、組換え細胞が投与される。いくつかの実施形態において、対象は、膵島細胞抗原に特異的な自己抗体が血清中に最初に検出されてから、6ヶ月以内、5ヶ月以内、4ヶ月以内、3ヶ月以内、2ヶ月以内、または1ヶ月以内に、組換え細胞が投与される。いくつかの実施形態において、対象は、インスリンに特異的な自己抗体が血清中に最初に検出されてから、6ヶ月以内、5ヶ月以内、4ヶ月以内、3ヶ月以内、2ヶ月以内、または1ヶ月以内に、組換え細胞が投与される。いくつかの実施形態において、対象は、グルタミン酸脱炭酸酵素に特異的な自己抗体が血清中に最初に検出されてから、6ヶ月以内、5ヶ月以内、4ヶ月以内、3ヶ月以内、2ヶ月以内、または1ヶ月以内に、組換え細胞が投与される。いくつかの実施形態において、対象は、膵島チロシンホスファターゼ2に特異的な自己抗体が血清中に最初に検出されてから、6ヶ月以内、5ヶ月以内、4ヶ月以内、3ヶ月以内、2ヶ月以内、または1ヶ月以内に、組換え細胞が投与される。いくつかの実施形態において、対象は、亜鉛トランスポーター8に特異的な自己抗体が血清中に最初に検出されてから、6ヶ月以内、5ヶ月以内、4ヶ月以内、3ヶ月以内、2ヶ月以内、または1ヶ月以内に、組換え細胞が投与される。

【0531】

いくつかの実施形態において、EngTregは、糖尿病が寛解した対象に投与してもよい。寛解の一形態は、一般に、外因性インスリン療法を開始した直後に起こり、その寛解期間中は、外因性インスリンの必要性は低下することがある。組換え細胞が投与される対象は、臨床的部分寛解にある対象であってもよく、臨床的部分寛解は、インスリン用量調整ヘモグロビンA1c (HbA1c) (IDAA1c) が9以下であることにより定義される。HbA1

cの測定方法、およびインスリン用量調整HbA1cの計算方法は、当技術分野で公知である。例えば、Mortensen et al., 2009を参照されたい。いくつかの実施形態において、対象は、以下の式： $IDA1c = HbA1c (\%) + 4 \times \text{インスリン用量 [IU/kg/24時間]}$ により計算されたインスリン用量調整HbA1cが9以下である。いくつかの実施形態において、EngTregは、対象が糖尿病の寛解に入ってから、6ヶ月以内、5ヶ月以内、4ヶ月以内、3ヶ月以内、2ヶ月以内または1ヶ月以内に投与される。いくつかの実施形態において、EngTregは、対象が1型糖尿病であると診断され、対象のインスリン用量調整HbA1cが9.0以下に低下した後に投与される。いくつかの実施形態において、対象のインスリン用量調整HbA1cは、9.0未満に低下しており、インスリン用量調整HbA1cが9.0未満に低下してから、9.0を超えるインスリン用量調整HbA1cが検出されていない。いくつかの実施形態において、対象のインスリン用量調整HbA1cは、1型糖尿病の診断後に9.0以下に低下しており、組換え細胞の投与時の対象のインスリン用量調整HbA1cは9.0以下である。いくつかの実施形態において、対象のインスリン用量調整HbA1cは、9以下、8.9以下、8.8以下、8.7以下、8.6以下、8.5以下、8.4以下、8.3以下、8.2以下、8.1以下、8.0以下、7.9以下、7.8以下、7.7以下、7.6以下、7.5以下、7.4以下、7.3以下、7.2以下、7.1以下、7.0以下、6.9以下、6.8以下、6.7以下、6.6以下、6.5以下、6.4以下、6.3以下、6.2以下、6.1以下、6.0以下、5.9以下、5.8以下、5.7以下、5.6以下、または5.5以下である。

10

【0532】

また、本明細書に記載の組換え細胞は、糖尿病前症を示すHbA1c値を有する対象に投与してもよい。いくつかの実施形態において、対象は、未調整HbA1cが5.7～6.4である場合に糖尿病前症であると考えられる。いくつかの実施形態において、インスリン用量調整を行っていない、対象のHbA1cは、5.7～6.4である。いくつかの実施形態において、インスリン用量調整を行っていない、対象のHbA1cは、5.7、5.8、5.9、6.0、6.1、6.2、6.3または6.4である。

20

【0533】

さらに、本発明の組換え細胞は、糖尿病を示すHbA1c値を有する対象に投与してもよい。いくつかの実施形態において、対象は、未調整HbA1cが6.5以上（例えば6.5～10）である場合に糖尿病であると考えられる。いくつかの実施形態において、インスリン用量調整を行っていない、対象のHbA1cは、6.5～10.0である。いくつかの実施形態において、インスリン用量調整を行っていない、対象のHbA1cは、6.5～10.0である。いくつかの実施形態において、インスリン用量調整を行っていない、対象のHbA1cは、6.5、6.6、6.7、6.8、6.9、7.0、7.1、7.2、7.3、7.4、7.5、7.6、7.7、7.8、7.9、8.0、8.1、8.2、8.3、8.4、8.5、8.6、8.7、8.8、8.9、9.0、9.1、9.2、9.3、9.4、9.5、9.6、9.7、9.8、9.9または10である。

30

【0534】

いくつかの実施形態において、適切な用量および治療計画は、対象の年齢、予想される脾体積および／または実際の脾体積に基づいて決定される。対象の年齢、予想される脾体積および／または実際の脾体積に基づく数の細胞を投与することによって、対象の脾臓に生着すると予想される組換え細胞の数を正規化することができる。例えば、発達過程にある脾臓を有する対象が若いほど、年長の小児または成人よりも小さな脾体積を有すると予想され、したがって、脾体積に対して特定の数の細胞を生着させるにあたり、少ない用量で十分である。

40

【0535】

いくつかの実施形態において、対象は3～6歳であり、この年齢の健常対象の平均脾体積は約20mLである。いくつかの実施形態において、3～6歳の対象に、 3×10^8 個の用量を投与する。いくつかの実施形態において、3～6歳の対象に、 $1 \times 10^8 \sim 6 \times 10^8$ 個の用量を投与する。いくつかの実施形態において、3～6歳の対象に、 $1 \times 10^8 \sim 2 \times 10^8$ 個、 $2 \times 10^8 \sim 3 \times 10^8$ 個、 $3 \times 10^8 \sim 4 \times 10^8$ 個、 $4 \times 10^8 \sim 5 \times 10^8$ 個、または $5 \times 10^8 \sim 6 \times 10^8$ 個の用量を投与する。

50

【0536】

いくつかの実施形態において、対象は6～12歳であり、この年齢の健常対象の平均脾体積は約35mLである。いくつかの実施形態において、6～12歳を対象に、 5×10^8 個の用量を投与する。いくつかの実施形態において、6～12歳を対象に、 $2 \times 10^8 \sim 1 \times 10^9$ 個の用量を投与する。いくつかの実施形態において、6～12歳を対象に、 $2 \times 10^8 \sim 3 \times 10^8$ 個、 $3 \times 10^8 \sim 4 \times 10^8$ 個、 $4 \times 10^8 \sim 5 \times 10^8$ 個、 $5 \times 10^8 \sim 6 \times 10^8$ 個、 $6 \times 10^8 \sim 7 \times 10^8$ 個、 $7 \times 10^8 \sim 8 \times 10^8$ 個、 $8 \times 10^8 \sim 9 \times 10^8$ 個、または $9 \times 10^8 \sim 1 \times 10^9$ 個の用量を投与する。

【0537】

いくつかの実施形態において、対象は12～18歳であり、この年齢の健常対象の平均脾体積は約60mLである。いくつかの実施形態において、12～18歳を対象に、 1×10^9 個の用量を投与する。いくつかの実施形態において、12～18歳を対象に、 $5 \times 10^8 \sim 2 \times 10^9$ 個の用量を投与する。いくつかの実施形態において、12～18歳を対象に、 $5 \times 10^8 \sim 6 \times 10^8$ 個、 $6 \times 10^8 \sim 7 \times 10^8$ 個、 $7 \times 10^8 \sim 8 \times 10^8$ 個、 $8 \times 10^8 \sim 9 \times 10^8$ 個、 $9 \times 10^8 \sim 1 \times 10^9$ 個、 $1 \times 10^9 \sim 1.1 \times 10^9$ 個、 $1.1 \times 10^9 \sim 1.2 \times 10^9$ 個、 $1.2 \times 10^9 \sim 1.3 \times 10^9$ 個、 $1.3 \times 10^9 \sim 1.4 \times 10^9$ 個、 $1.4 \times 10^9 \sim 1.5 \times 10^9$ 個、 $1.5 \times 10^9 \sim 1.6 \times 10^9$ 個、 $1.6 \times 10^9 \sim 1.7 \times 10^9$ 個、 $1.7 \times 10^9 \sim 1.8 \times 10^9$ 個、 $1.8 \times 10^9 \sim 1.9 \times 10^9$ 個、または $1.9 \times 10^9 \sim 2.0 \times 10^9$ 個の用量を投与する。

【0538】

いくつかの実施形態において、対象は18～46歳であり、この年齢の健常対象の平均脾体積は約70mLである。いくつかの実施形態において、18～46歳を対象に、 1×10^9 個の用量を投与する。いくつかの実施形態において、対象は少なくとも46歳であり、 10^9 個の用量を投与する。いくつかの実施形態において、12～18歳を対象に、 $5 \times 10^8 \sim 2 \times 10^9$ 個の用量を投与する。いくつかの実施形態において、12～18歳を対象に、 $5 \times 10^8 \sim 6 \times 10^8$ 個、 $6 \times 10^8 \sim 7 \times 10^8$ 個、 $7 \times 10^8 \sim 8 \times 10^8$ 個、 $8 \times 10^8 \sim 9 \times 10^8$ 個、 $9 \times 10^8 \sim 1 \times 10^9$ 個、 $1 \times 10^9 \sim 1.1 \times 10^9$ 個、 $1.1 \times 10^9 \sim 1.2 \times 10^9$ 個、 $1.2 \times 10^9 \sim 1.3 \times 10^9$ 個、 $1.3 \times 10^9 \sim 1.4 \times 10^9$ 個、 $1.4 \times 10^9 \sim 1.5 \times 10^9$ 個、 $1.5 \times 10^9 \sim 1.6 \times 10^9$ 個、 $1.6 \times 10^9 \sim 1.7 \times 10^9$ 個、 $1.7 \times 10^9 \sim 1.8 \times 10^9$ 個、 $1.8 \times 10^9 \sim 1.9 \times 10^9$ 個、または $1.9 \times 10^9 \sim 2.0 \times 10^9$ 個の用量を投与する。

【0539】

いくつかの実施形態において、対象は3～6歳であり、 3×10^8 個の80%～120% ($2.4 \times 10^8 \sim 3.6 \times 10^8$ 個)の用量が投与される。いくつかの実施形態において、対象は6～12歳であり、 5×10^8 個の80%～120% ($4 \times 10^8 \sim 6 \times 10^8$ 個)の用量が投与される。いくつかの実施形態において、対象は12～18歳であり、 1×10^9 個の80%～120% ($8 \times 10^8 \sim 1.2 \times 10^9$ 個)の用量が投与される。いくつかの実施形態において、対象は18～46歳であり、 1×10^9 個の80%～120% ($8 \times 10^8 \sim 1.2 \times 10^9$ 個)の用量が投与される。いくつかの実施形態において、対象は少なくとも46歳であり、 1×10^9 個の80%～120% ($8 \times 10^8 \sim 1.2 \times 10^9$ 個)の用量が投与される。

【0540】

いくつかの実施形態において、対象の実際の脾体積を測定して、投与する細胞の用量を計算する。いくつかの実施形態において、対象の実際の脾体積は、例えば、MRIスキャンやCTスキャン、さらには、例えば、Qiu et al., *Pediatr Radiol*. 2022. doi: 10.1007/s00247-022-05405-8に記載されているような画像解析などの、当技術分野で公知の方法のいずれか1つを使用して推定される。いくつかの実施形態において、投与される細胞の用量は、同程度の年齢の健常対象の平均脾臓体積に対する対象の実際の脾体積の比率に比例して調節される。例えば、年齢が18～46歳であり、脾体積が49mLの対象は、同程度の年齢の健常対象の平均脾体積が70mLである場合、予想される脾体積に対する実際の脾体積の割合が、70% ($49/70$) であり、したがって、70mLの予想脾体積に基づいて使用される細胞数の約70%の用量 (7×10^8 個；予想脾体積に基づく用量である 10^9 個の細胞の70%) が投与される。

【0541】

いくつかの実施形態において、前記対象はヒトである。いくつかの実施形態において、前記対象は動物である。いくつかの実施形態において、前記動物は研究動物である。いくつかの実施形態において、前記動物は家畜である。いくつかの実施形態において、前記動物はげっ歯類である。いくつかの実施形態において、前記げっ歯類は、マウス、ラット、モルモット、チンチラまたはハムスターである。いくつかの実施形態において、前記動物は、イヌ、ネコ、ウサギ、モルモット、ハムスターまたはフェレットである。いくつかの実施形態において、前記動物は、ウシ、ブタ、ラマ、アルパカ、ヒツジまたはヤギである。

【0542】

以下の刊行物で開示されている特定の態様は、本明細書で提供される方法、組成物およびシステムの実施形態に有用である。米国特許公開第2019/0247443号；米国特許公開第2020/0123224号；米国特許公開第2021/0340573号；米国特許公開第2021/0253652号；米国特許公開第2021/0054376号；WO2020/264039；およびWO2022/140354（これらの文献は参照によりその全体が本明細書に援用される）。

【実施例】

【0543】

実施例1：1型糖尿病の治療に使用するための、ヒトT1D2 TCRまたはヒトT1D5-1 TCRを発現する二重相同組換え修復（HDR）編集EngTregの作製とその免疫抑制能の評価

二重相同組換え修復を利用した遺伝子編集によって、1型糖尿病（T1D）の予防および／または治療用にヒト対象で使用するための組換えTreg細胞（EngTreg）産物を作製した。2種の核酸を、細胞ゲノムの別々の座位にそれぞれ挿入した。

【0544】

TRAC座位に挿入した第1の核酸は、(i) IL-2R γ の膜貫通ドメインと細胞内ドメインに連結されたFKBP細胞外ドメインを有する、ラパマイシン誘導型IL-2シグナル伝達用の第1の膜貫通タンパク質；(ii) 脾島抗原IGRPペプチドに特異的な、T1D2 TCRまたはT1D5-1 TCRのヒトTCR β 鎖；および(iii) T1D2 TCRまたはT1D5-1 TCRのTCR α 鎖の一部をコードする配列に作動可能に連結されたMNDプロモーターを含んでいた（すなわち、TRAC座位に挿入された核酸は、T1D2のTCR β 鎖とT1D2のTCR α 鎖の一部、またはT1D5-1のTCR β 鎖とT1D5-1のTCR α 鎖の一部をコードしていた）。この核酸がTRAC座位に挿入されたことによって、（抗原特異性を決定する可変ドメインを含む）TCR α 鎖の一部をコードする挿入された配列が、（定常ドメインを含む）TCR α 鎖の残りの部分をコードする内因性配列とインフレームになり、挿入されたMNDプロモーターの制御下でTRAC座位からTCR α 鎖の全長が発現され、（別の特異性を有する）内因性TCR α 鎖の発現は破壊された。

【0545】

Treg特異的脱メチル化領域（TSDR）の下流のFOXP3座位に挿入した第2の核酸は、(i) IL-2R β の膜貫通ドメインおよび細胞内ドメインに連結されたFRB細胞外ドメインを有する、ラパマイシン誘導型IL-2シグナル伝達用の第2の膜貫通タンパク質；(ii) 細胞内ラパマイシンを吸着してmTORの阻害を制限するための細胞質ゾル内FRBドメイン；および(iii) 内因性開始コドンを含む、エキソン2から始まる内因性FOXP3コード配列をコードする配列に作動可能に連結されたMNDプロモーターを含んでいた。

【0546】

2種の核酸を挿入することによって作製された二重編集細胞は、MNDプロモーターの制御下において、(i) ラパマイシンの存在下でヘテロ二量体化して、IL-2シグナル伝達を提供することにより、細胞増殖を誘導する両方のラパマイシン誘導型シグナル伝達複合体構成要素；(ii) IGRPに特異的なヒトTCR；(iii) FoxP3；および(iv) ラパマイシンの存在下のmTORの阻害を軽減する細胞質ゾル内FRBドメインを安定に発現した。

【0547】

二重遺伝子編集に使用したAAVドナーコンストラクト（ポリヌクレオチド）を図1に示

10

20

30

40

50

す。CRISPRを利用した遺伝子編集により、1型糖尿病を有する2人の対象者（Xbp674、Xbp632）または健常対照ドナー（R003852）から単離したCD4⁺T細胞を編集した（図2）。hT1D5-1を発現するEngTregを作製するため、VIN 10019-Genti 122 AAV T1D5-1ドナーと3362 AAVドナーを用いて細胞を二重編集した。また、hT1D2を発現するEngTregを作製するため、VIN 10020-Genti 122 AAV T1D2ドナーと3362 AAVドナーで細胞を二重編集した。

【0548】

最初のFOXP3/TRAC二重編集では、10.1～18.9%の二重編集率が達成された（図3）。図4に示した方法を使用して、二量体化剤（ラパマイシン）の存在下で二重編集細胞を培養することによって、二重編集細胞集団を選択的に増殖させて、81%を超える純度に濃縮することができた。FOXP3と膵島抗原特異的TCRの発現をフローサイトメトリーで分析することにより測定を行った（図5および図8A）。

【0549】

濃縮した細胞の凍結保存に成功し（凍結保存した各ドナー由来の二重編集TCR細胞産物の総数を示した表9を参照されたい）、解凍後に行った機能分析では、二重編集された抗原特異的なT1D2 EngTregまたはT1D5-1 EngTregが、非特異的なTCRの活性化（CD3/CD28）または特異的なTCRの活性化（IGRP₃₀₅₋₃₂₄ペプチド）に応答して、認識ペプチドの種類を一致させた膵島抗原特異的TCRを発現するT1D2 Teff細胞またはT1D5-1 Teff細胞の増殖を強力に抑制したことが示された。この知見から、本発明のEngTregによる強力な直接的かつ抗原特異的なTeffの抑制が実証された（図6Aおよび6B）。さらに、バイスタンダー抑制表現型が観察された。具体的には、1型糖尿病対象に由来する抗原特異的なT1D2 TCR発現EngTregまたはT1D5-1 TCR発現EngTregは、IGRP、GAD65、PPI、ZNT8の4種の主要な膵島抗原に由来する膵島特異的ペプチドのプールでパルスしたAPC（mDC）を用いてインビトロで活性化した同じ1型糖尿病対象に由来する自家Teff細胞のプールの増殖を効率的に抑制することができる（図6C）。

【表1】

表 9

ドナー	遺伝子編集	総細胞数
Xpb674	3362/T1D2	6.98×10 ⁶
Xpb674	3362/T1D5-1	8.19×10 ⁶
Xpb674	Mock	8.36×10 ⁶
Xpb632	3362/T1D2	6.05×10 ⁶
Xpb632	3362/T1D5-1	3.25×10 ⁶
Xpb632	Mock	1.51×10 ⁷
R003852	3362/T1D2	5.50×10 ⁶
R003852	3362/T1D5-1	5.50×10 ⁶
R003852	Mock	1.65×10 ⁷

【0550】

さらに、このポリクローナルTeffアッセイにおいて、二重HDR編集したT1D2 EngTregまたはT1D5-1 EngTregは、FOXP3の編集とレンチウイルス（LV）による膵島特異的TCRの送達を組み合わせることで作製したT1D2 EngTregまたはT1D5-1 EngTregよりも

優れた性能を示したことから（図7Aおよび図7B）、二重編集プラットフォームを利用することによって、最適な抑制活性を有する抗原特異的EngTregが得られることが示された。これらの知見から（図6C、図7Aおよび図7B）、二重HDR編集したT1D2 EngTregまたはT1D5-1 EngTregは、非常に広範囲のTCR特異性を含むTeffを含む、1型糖尿病対象由来のTeffに対して強力なバイスタンダー抑制を発揮することが示された。

【0551】

さらに、二重編集した抗原特異的EngTregは、FOXP3、CD25、CD39、CD73およびHLA-DRの高発現を含む堅牢なTreg免疫表現型を示した（図8Aおよび8B）。

【0552】

以上の知見から、二重HDR編集した抗原特異的EngTregは、1型糖尿病用の細胞治療の実施を可能にする抑制機能を有することが示された。

【0553】

実施例2：1型糖尿病治療に使用するための、ヒトT1D4を発現する二重相同組換え修復（HDR）編集EngTregの作製とその免疫抑制能の評価

2人のドナー由来の細胞を使用して二重編集方法を実施し、T1D4-EngTregを作製した。5×10⁶個の細胞のCD3/CD28刺激を3日間行った後、FOXP3ガイドRNAとTRACガイドRNAを用いて遺伝子編集を実施し、AAVでカセットをノックインした。遺伝子編集の数日後、ラパマイシンによる濃縮を開始して、二重陽性のCISCのみの集団を選択した。

【0554】

FOXP3をノックインしたTCRβ可変領域5.1に付加されたHAタグの発現を検出する抗体を用いて、最初の編集率を評価した（図9）。2人のドナー間において、最初の二重陽性群は細胞集団全体の2%~6%のみしか存在しなかったが、ラパマイシンを添加した培地中で培養することによって、この集団を80~85%まで増加させることができた（図10）。2回目の編集率の定量として、ddPCRアッセイを実施して各座位での相同組換え修復を検出した（図11）。

【0555】

次の最終産物の分析では、堅牢なTreg免疫表現型と、炎症促進性サイトカインから免疫抑制性サイトカインへのセクレトームの変化が示された。EngTregにおける表現型プロファイルの変化をmock編集集団と比較した。FoxP3、CD25およびCTLA4の発現が増加したことから、Treg表現型が模倣されていることが観察された（図12）。さらに、セクレトームとしてのサイトカインの差異を観察するため、細胞を刺激した。EngTregは、mock集団と比較して、炎症性サイトカインであるTNF-α、IFN-γおよびIL-2の産生量が顕著に低下していた（図13）。また、二重編集細胞では、mockと比べて、活性化に応答した免疫抑制性サイトカインTGF-βの増加が観察された（図14）。

【0556】

次に、抗原特異性を一致させたT1D4 TCRを有するTエフェクター細胞を抑制する機能能力についてEngTregを調べた。T1D4特異的Tエフェクター細胞は、T1D4と一致させた抗原IGRP 241-260を提示する抗原提示細胞またはCD3/CD28刺激ビーズを添加したmock編集細胞または二重編集細胞とともに培養するか、単独で培養した。Teff細胞をmock編集集団と共培養した場合、CD3/CD28による刺激では約40%の抑制が観察されたが、抗原特異的な刺激ではわずかな抑制機能しか認められなかった（図15）。一方、二重編集engTregは、全体的な刺激を与えた後でも、抗原特異的な刺激を与えた後でも、抗原特異性を一致させた抗原特異的Teffを強力に抑制することができた。次に、二重編集細胞を抗原提示細胞およびIGRPとともに共培養することによって、Teffからの炎症促進性サイトカインの分泌に対する抑制能について二重編集細胞を調べた。Teff細胞のみで培養した場合やmock編集細胞と共培養した場合と比較して、二重編集細胞と共培養した場合に、Teff細胞からのTNF-α、IFN-γおよびIL-2の分泌が急激に減少したことから、EngTregによる強力な抑制活性が示された（図16）。

【0557】

10

20

30

40

50

次に、異なる抗原特異性のTCRを持つTeff細胞に対する二重編集細胞の抑制能力を調べた。プレプロインスリン（PPI）は、1型糖尿病患者において増加する膵臓抗原であることが知られているインスリン前駆体である。抗原提示細胞およびPPIのみと共培養した場合、EngTregの抑制作用は最小限まで低下したが、共培養にIGRPを含めた場合、PPI特異的Teff細胞のほぼ60%が抑制された（図17）。

【0558】

次に、PPI特異的刺激のみで培養した場合のTeff細胞によるサイトカインの分泌を調べた。mock編集細胞を加えた場合と二重編集細胞を培養に加えた場合では、類似した炎症促進性セクレトームの分泌が観察された。しかし、T1D4特異的抗原であるIGRPと培養した場合、炎症促進性サイトカインの分泌は二重編集細胞により抑制されなかった（図18）。

10

【0559】

実施例3：1型糖尿病用の組換えヒト制御性T細胞治療であるGNTI-122の開発とその特性評価

1型糖尿病（T1D）は、インスリンを産生するβ細胞がTリンパ球により殺傷されることによって引き起こされる自己免疫疾患であり、最終的には制御不能な高血糖を起し、インスリン投与を生涯にわたり継続しなければならない。

【0560】

1型糖尿病の治療用の組換え制御性T細胞（Treg）であるGNTI-122は、膵臓および所属リンパ節にホーミングし、バースタンダー抑制および感染性寛容（infectious tolerance）を含む機構を介して病原性のエフェクターT細胞（Teff）を抑制することによって、膵島細胞を保護するように設計されている。GNTI-122細胞は、ヌクレアーゼを介した遺伝子編集により、（i）TSDRメチル化によるエピジェネティックな転写サイレンシングをバイパスすることによって、FOXP3の発現の安定化させるために、FOXP3遺伝子のTSDRの下流かつ第1のコーディングエキソンの上流に挿入されるMNDプロモーター；（ii）抗原特異性を付与するためにTRAC座位に挿入される、膵島抗原特異的T細胞受容体（isTCR）をコードする配列；および（iii）ラパマイシンにより活性化される合成IL-2シグナル伝達受容体（CISC）の構成要素をコードする配列を導入することによって、CD4+自家T細胞から作製してもよい。ラパマイシンの誘導によりCISCを介してIL-2シグナル伝達を発生させることによって、編集後のGNTI-122細胞のインビボでの濃縮が可能になりインビボでの細胞の生着を補助することができる。

20

30

【0561】

GNTI-122組換え自家Tregの製造方法を図20に示す。この製造方法に従って、まず、院内のアフェレーシス施設において、白血球アフェレーシス法により採取したPBMCを単離し、CD4⁺T細胞を磁気濃縮した。次に、FOXP3座位とTRAC座位で細胞ゲノムを切断するための標的化ヌクレアーゼを使用して、CD4⁺細胞を遺伝子組換えし、相同組換え修復によって、アデノ随伴ウイルス（AAV）ベクターの導入遺伝子をノックインした。GNTI-122細胞（isTCRとFoxP3の両方を発現する）の頻度をフローサイトメトリーで測定した。FACS分析により、遺伝子編集の3日後の凍結保存の直前に、isTCR⁺FoxP3⁺細胞の増殖が示された（図21）。次に、増殖させた細胞を、対象への将来的な注入に備えて凍結保存した。

40

【0562】

インビボにおいてCISCがGNTI-122細胞の生着を促すことができるかどうかを評価するため、Prkdc^{scid}変異により機能性Il2rg遺伝子と成熟B細胞および成熟T細胞を欠失している非肥満糖尿病免疫不全（NOD）マウス（NOD.Cg-Prkdc^{scid} Il2rg^{tm1Wjl/szJ}（NSGTM））に、編集したGNTI-122細胞を投与した。さらに、移植の2日前から移植の2週間後まで（1～17日目）、様々な用量のいずれか1つを用いてラパマイシンをマウスに投与した。GNTI-122細胞によるCISC受容体の発現と、ラパマイシンの投与によって、用量依存的な様式で、インビボでの組換えTregの選択的な拡大増殖と濃縮が可能になった（図22A）。

50

【0563】

次に、インビトロでのGNTI-122細胞集団の拡大培養に対するCISC刺激の効果を評価するため、様々な濃度のラパマイシンの存在下において、編集したGNTI-122細胞とmock組換え細胞を培養した（図22B）。

【0564】

さらに、2人の異なるドナー由来のGNTI-122編集細胞を、抗CD3/CD28ビーズによるTCRの刺激あり（図22C）または刺激なしで（図22D）、10nMラパマイシンの存在下で8日間培養した。TCR刺激なしの条件の場合、ラパマイシンの添加とCISCによる刺激により、GNTI-122細胞集団の生存率が増加したが、GNTI-122細胞集団はベースラインと比べて増殖しなかった（図22C）。一方、ラパマイシンの存在下とTCR刺激ありの条件の場合、GNTI-122細胞集団は約2倍の増殖を達成した（図22D）。さらに、0～30nMの濃度範囲のラパマイシンの存在下において、抗CD3/CD28ビーズによるTCR刺激ありの条件で細胞を培養した（図22E）。図22Eに示した結果から、GNTI-122細胞が、TCR刺激ありの条件でラパマイシンの濃度依存的に生存を維持し拡大増殖したことが示された。

【0565】

制御性マーカーの発現、サイトカインプロファイルおよび抑制機能のインビトロ分析から、GNTI-122細胞がTreg表現型を示すことが示された。具体的には、GNTI-122細胞を解凍し、3日間培養して休ませ、フローサイトメトリー染色を行ったところ、GNTI-122細胞が、CD25、CD27、CTLA-4、Eos、TNFR1IおよびTIGITを含むTreg関連マーカーを発現することが示された（図23Aおよび図23B）。この表現型は、6人の独立した細胞ドナーから調製した異なる細胞集団において一貫して認められた。さらに、GNTI-122細胞は（GNTI-122細胞のみ、またはラパマイシンと接触させたGNTI-122細胞のいずれでも）、PMA/イオノマイシン/モネンシンまたは抗CD3/CD28ビーズで刺激した場合に、mock組換え細胞と比べて、炎症性サイトカイン（IFN- γ 、TNF- α およびIL-2）の産生量が大幅に少なかったことから、炎症活性が低減されていることが示された（図24A）。さらに、GNTI-122細胞は、同様の刺激を与えたところ、mock組換え細胞と比べて、Treg活性化マーカーであるLAPおよびGARPの発現量が高かった（図24B）。また、機能性の点では、GNTI-122細胞は、インビトロ抑制アッセイにおいて、同じisTCRを発現するFoxP3⁺Teff細胞の増殖を抑制した（図24B）。

【0566】

さらに、GNTI-122細胞およびmock組換え細胞をインビトロで分析して、様々なTeff細胞集団に対するEngTregsの抑制能力を評価した。GNTI-122細胞およびmock組換え細胞をそれぞれ別々に、1型糖尿病を有するドナーから得られた自家Teff細胞と、抗原提示細胞（APC）としての単球由来樹状細胞と共培養した。直接的な抑制作用を評価するための1つ目の実験では、Teff細胞は、GNTI-122細胞（T1D2）と同じTCRを発現するものであり、APCには、IGRPコグネイトペプチドを担持させた（図23C）。バイスタンダー抑制を評価するための2つ目の実験では、Teff細胞は、別の種類の1型糖尿病関連抗原としてプレプロインスリン（PPI）に特異的な別のTCRを発現するものであった（図23D）。3つ目の実験では、T1D関連抗原の9種のペプチドのいずれかに特異的なTeff細胞を単離してポリクローナルTeff集団を調製し、これらの9種のコグネイトペプチドのプールをAPCに担持させた（図23E）。いずれの場合でも、GNTI-122細胞は、モノクローナルTeff細胞に対して強力な直接的な抑制（図23C）と強力なバイスタンダー抑制（図23D）を示し、ポリクローナルTeff細胞に対しても強力な抑制を示した（図23E）。

【0567】

健常ドナーのT細胞から作製した前述のGNTI-122細胞を、1型糖尿病患者のT細胞から作製したGNTI-122細胞で再現した。健常ドナー由来のGNTI-122細胞で得られた結果と一致して、1型糖尿病患者のT細胞から作製したGNTI-122細胞は、同程度の最初の二重編集率を示し、濃縮したFOXP3⁺isTCR⁺細胞が85%を超え、Treg様表現型を

獲得した（図23F～23H）。

【0568】

前述のGNTI-122組換え手法の有効性をインビボで評価するため、類似した組換え手法を利用して、(i) FOXP3を安定に発現させるためのMNDプロモーター；(ii) マウス脾臓特異的TCR；および(iii) ラパマイシン誘導型のIL-2シグナル伝達を可能にするCISCを、マウス細胞に導入することによって、マウス組換えTreg (mEngTreg) を作製した。糖尿病誘発性脾細胞（1型糖尿病（T1D）脾細胞）をNSGTMマウスに静脈内注射し、T1D脾細胞の投与の7日後または15日後にmEngTregを静脈内注射し、1型糖尿病を発症するまでの時間と血糖値をモニターした（図25A）。T1D脾細胞の投与から40日以内に、50%を超える対照マウスが1型糖尿病を発症したが、15日以内にmEngTregを投与したところ、1型糖尿病の発症が大幅に抑制され、7日以内にmEngTregを投与したところ、1型糖尿病の発症が完全に阻止された（図25B）。mEngTregの投与によって1型糖尿病の発症が遅延したという結果と一致して、mEngTregを投与したマウスでは、T1D脾細胞のみを投与したマウスと比べて、血糖値が良好に制御された（図25C）。また、複数の臓器においてT細胞の存在量を評価したところ、mEngTregが脾臓に局在していたことが明らかになった（図26A）。さらに、mEngTregの投与後に、脾臓と脾臓においてTeffメモリー細胞の存在量が減少したことが示されたことから、mEngTregの投与によって、局所でのTeff反応と全身性のTeff反応が抑制されたことが示された（図26B）。さらに、T1D脾細胞の投与の43日後に行った脾臓の組織学的分析の結果、mEngTregで処置したマウスにおける「正常な」脾臓の割合が、対照マウスよりも高かったことから、T1D脾細胞の投与により誘導された脾臓炎がmEngTregにより抑制されたことが明らかになった（図27A）。この脾臓炎の抑制は、β細胞量の定量結果により裏付けられ、β細胞量の定量では、T1D脾細胞の投与のすぐ後（7日後）にmEngTregを投与したマウスのβ細胞量は、ナীবマウスのβ細胞量と同程度であったが、mEngTregを投与せずにT1D脾細胞のみを投与したマウスでは、β細胞量は極めて少なかった（図27A）。さらに、mEngTregを投与したマウスの脾臓では、T1D脾細胞のみを投与したマウスよりもインスリン染色領域が多く認められた（図27C）。

【0569】

新鮮なmEngTregおよび凍結保存したmEngTregの強力な持続性と有効性を示すために、糖尿病誘発性脾細胞の投与の7日後にmEngTregを投与することによる類似したマウス研究を行った。新鮮なmEngTregで処置したマウスと凍結保存したmEngTregで処置したマウスのいずれにおいても、正常な血糖値と脾臓におけるmEngTregの維持が示された（図28）。

【0570】

これらの結果から、この組換え手法は、T細胞が多く含まれる供給源（例えばバルクCD4⁺T細胞）を出発材料として用いて、ラパマイシンの存在下でIL-2増殖シグナル伝達を発生する組換え受容体で編集細胞を特異的に濃縮することによる別のTreg細胞の調製方法（例えば、ヒト細胞を選別してTregを単離する方法）ではスケールアップが困難であるという問題を克服できることが示された。さらに、このような組換え細胞のインビボでの生着を、ラパマイシンの投与により支持してもよい。また、このような組換え細胞は、インビトロにおいて、Treg関連マーカー、サイトカインを産生する表現型、および抑制機能を示す。さらに、同様の方法で組換えた脾臓抗原特異的マウスEngTregは、進行中の脾臓炎を抑制することによって、脾臓を保護して、1型糖尿病の発症を阻止したことから、この細胞工学的手法のインビボでの有効性が実証された。

【0571】

実施例4：isTCR+FoxP3+二重編集EngTregの細胞表現型および抑制表現型

CD4⁺細胞を解凍し、抗CD3/CD28ダイナビーズを用いてインビトロで刺激した（0日目）。解凍後1日目に、T1D2 TCR、T1D5-1 TCRまたはT1D4 TCRをコードするレンチウイルスを細胞に接種した（1日目）。解凍後3日目に、ダイナビーズを除去した。これと並列して、IGRP 305-324またはIGRP 241-260を提示できるHLA-DR4をコード

するレンチウイルスで形質導入したK562細胞により人工抗原提示細胞を作製した。解凍後7日目に、形質導入したK562細胞の存在下において、特定の量のIGRPコグネイトペプチドを添加し、一晚培養することによって、形質導入したCD4+T細胞を刺激した。解凍後8日目に、活性化関連マーカーであるCD69、CD137およびCD154の発現を測定した（図29B）。この刺激による結果を図29Cに示す。T1D2 TCR、T1D4 TCRまたはT1D5-1 TCRを発現するCD4+T細胞は、コグネイトペプチドによる刺激後、機能性マーカーであるCD154、CD69およびCD137を用量依存的にアップレギュレートした（図29C）。細胞表面マーカーを最大限発現させるのに必要なコグネイトペプチドの濃度は、T1D5-1 TCR発現細胞よりも、T1D2 TCRまたはT1D4 TCRを発現する細胞の方が低かった（図29C）。

10

【0572】

14日目に、形質導入したK562細胞の存在下において、形質導入したCD4+T細胞をIGRPコグネイトペプチドで5時間刺激し、サイトカイン（IFN- γ およびTNF- α ）の産生を測定して、T細胞の活性化を評価した（図29D）。この刺激による結果を図29Eに示す。細胞表面マーカーの発現と同様に、T1D2 TCR、T1D4 TCRまたはT1D5-1 TCRを発現するCD4+T細胞は、コグネイトペプチドによる刺激後、IFN- γ およびTNF- α を用量依存的に産生した（図29E）。

【0573】

別の実験において、前節に記載の方法と同様にして、T1D2 TCRまたは対照TCR（ZNT266）をコードするレンチウイルスで形質導入したCD4+T細胞を、様々な濃度のIGRP 305-324ペプチドでパルスしたK562細胞と3：1の比率で培養した。20時間の共培養後、細胞表面マーカーであるCD154とCD137の発現をフローサイトメトリーで分析して、コグネイトペプチドであるIGRP 305-324に対するT1D2 TCR発現細胞の感受性を定量した。この刺激による結果を図30Aおよび図30Bに示す。T1D2を発現する細胞は、ZNT266 TCRを発現する細胞よりも、コグネイトペプチドであるIGRP 305-324による刺激に対して感受性が大幅に高く、CD154の発現のEC₅₀は、IGRP 305-324で0.1～0.3 $\mu\text{g/mL}$ であり（FIG 30C）、CD137発現細胞の割合のEC₅₀は、IGRP 305-324で0.03～0.1 $\mu\text{g/mL}$ であった（図30D）。

20

【0574】

別の実験において、前節に記載の方法と同様にして、T1D2 TCRまたは対照TCR（ZNT266）をコードするレンチウイルスで形質導入したCD4+T細胞を、1 $\mu\text{g/mL}$ のIGRP 305-324ペプチドまたは11個の位置のいずれかにアラニン置換を含むバリエーションでパルスしたK562細胞と3：1の比率で培養した。これらのペプチドバリエーションを表E4-1に示す。

30

40

50

【表 2】

表 E4-1: アラニン置換 IGRP 305-324 ペプチド

ペプチド	アミノ酸配列 (置換位置に下線を引いている)	配列番号
IGRP 305	QLYHFLQIPTHEEHLYFYVLS	231
P1	QLYAFLQIPTHEEHLYFYVLS	245
P2	QLYHALQIPTHEEHLYFYVLS	246
P3	QLYHFAQIPTHEEHLYFYVLS	247
P4	QLYHFLAIPTHEEHLYFYVLS	248
P5	QLYHFLQAPTTHEEHLYFYVLS	249
P6	QLYHFLQIATTHEEHLYFYVLS	250
P7	QLYHFLQIPAHEEHLYFYVLS	251
P8	QLYHFLQIPTAEHEHLYFYVLS	252
P9	QLYHFLQIPTHAEHLYFYVLS	253
P10	QLYHFLQIPTHEAHLFYVLS	254
P11	QLYHFLQIPTHEEALFYVLS	255

10

20

【0575】

20時間の共培養後、(CD3+CD4+細胞中の)細胞表面マーカーCD154とCD137の発現をフローサイトメトリーで分析して、T1D2 TCR発現細胞の潜在的なオフターゲットな活性化を定量した。この刺激による結果を図31Aおよび図31Bに示す。活性化の大部分は、変更していないIGRP 305-324ペプチドとの培養において観察されたが、活性化の一部は、P1ペプチド、P4ペプチド、P7ペプチドまたはP11ペプチドとの培養でも観察された(図31Aおよび図31B)。これらの位置での置換に対するT1D2 TCRの寛容性に基づいて、ヒトに関連する病原体に存在する配列から潜在的なオフターゲットエピトープを多数作製した。この様々なエピトープの配列を表E4-2に示す。

30

40

50

【表 3】

表 E4-2：潜在的なオフターゲットエピトープペプチド

ペプチド	説明	由来	配列	配列番号
IGRP305_324_path_2	TPA: ホスホペントムターゼ [レジオネラ属]	<i>Legionella sp.</i>	SDSVLQIAAHEEHFG	256
IGRP305_324_path_5	DUF4435 ドメイン含有タンパク質 [Bacillus toyonensis]	<i>Bacillus toyonensis</i>	YDEVLQIPTHQENTQ	257
IGRP305_324_path_9	UDP-N - アセチルグルコサミン-N-アセチルムラミル-(ペンタペプチド)ピロホスホリル-ウンデカプレノール N - アセチルグルコサミントランスフェラーゼ [トレポネーマ属]	<i>Treponema sp.</i>	AASFLHIPYFTHCED	258
IGRP305_324_path_10	TPA: UDP-N - アセチルグルコサミン-N-アセチルムラミル-(ペンタペプチド)ピロホスホリル-ウンデカプレノール N - アセチルグルコサミントランスフェラーゼ [トレポネーマ属]	<i>Treponema sp.</i>	AARFLHIPYYTHCED	259
IGRP305_324_path_11	ウンデカプレニルジホスホ-ムラモイルペンタペプチド β -N-アセチルグルコサミントランスフェラーゼ [トレポネーマ属]	<i>Treponema sp.</i>	AAKFLHIPVFTHECD	260
IGRP305_324_path_12	エキソデオキシリボヌクレアゼ V サブユニット β [クラミジア・キャピエ]	<i>Chlamydia caviae</i>	CSPFLQIPSYEPIEY	261
IGRP305_324_path_15	仮想タンパク質 V495_01361 [Pseudogymnoascus sp. VKM F-4514 (FW-929)]	<i>Pseudogymnoascus sp. VKM F-4514 (FW-929)</i>	SAMFLDIPTHPEEHS	262
IGRP305_324_path_16	仮想タンパク質 GX51_07420 [Blastomyces parvus]	<i>Blastomyces parvus</i>	KYEFLPIPTYEEATS	263
IGRP305_324_path_17	仮想タンパク質 T551_03071 [ニューモシスチス・イロベチイ RU7]	<i>Pneumocystis jirovecii</i> RU7	FTDFLNIPSYEELND	264
IGRP305_324_path_18	仮想タンパク質 KMI_05g09430 [Encephalitozoon hellem]	<i>Encephalitozoon hellem</i>	LSEFLKIPNHEITLL	265
IGRP305_324_path_19	仮想タンパク質 ECU05_1220 [エンセファリトゾーン・クニクリ GB-M1]	<i>Encephalitozoon cuniculi</i> GB-M1	QQKFLKNIDTHEEAE	267
IGRP305_324_path_20	WD ドメイン、G- β 反復含有タンパク質 [トキソプラズマ・ゴンディ ARI]	<i>Toxoplasma gondii</i> ARI	ESLFLQLSTHTEASA	268
IGRP305_324_path_23	ATP 依存 DNA ヘリカーゼ [Legionella lansingensis]	<i>Legionella lansingensis</i>	DQLFLALPAHEERIS	269

【0576】

表 E4-2 に挙げたいずれのペプチドでも、T1D2 TCR 発現細胞の反応は、DMSO 非刺激対照と同程度であった（図 31C および図 31D）。これらの結果から、T1D2 TCR は、ヒト病原体に由来する予測された潜在的なオフターゲットペプチドを認識しないことが示された。

【0577】

実施例 5：1 型糖尿病であると最近診断された成人患者および小児患者における GNTI-122 の安全性、有効性および細胞動態に関する第 1/2 相非盲検試験

本実施例は、1 型糖尿病（T1D）であると最近診断された成人対象者および小児対象

10

20

30

40

50

者に静脈内（IV）投与されたGNTI-122の安全性、有効性および細胞動態（CK）を評価するための、第1/2相非盲検多施設共同試験について述べる。GNTI-122は、相同組換え修復により標的座位に2種の核酸が挿入された組換え自家Treg細胞製品である。TRAC座位に挿入された第1の核酸は、第1の化学誘導性シグナル伝達複合体の構成要素であるFKBP-IL2R γ ；異種TCR β 鎖；および内因性TCR α 定常ドメインの一部とインフレーションな異種TCR α 鎖の一部を、MNDプロモーターの制御下でコードすることから、TRAC座位から発現されたTCR α 鎖とTCR β 鎖が、膵島抗原IGRPペプチドに特異的なTCRを形成する。FOXP3座位に挿入された第2の核酸は、第2の化学誘導性シグナル伝達複合体の構成要素であるFRB-IL2R β ；および細胞質ゾル内FRBドメインを、MNDプロモーターの制御下でコードし、これらのFRB-IL2R β と細胞質ゾル内FRBドメインは、いずれも内因性FOXP3のコード配列の一部とインフレーションであることから、Treg特異的脱メチル化領域（TSDR）の下流に挿入されたMNDプロモーターによって、内因性プロモーターや、TSDRのメチル化を介したエピジェネティックな調節とは無関係にFoxP3の発現が制御される。

10

【0578】

本試験の主要目的および関連するエンドポイントには以下のものが含まれる。

第1相

目的：

1型糖尿病を有する成人対象者において、ラパマイシンの存在下または非存在下でGNTI-122の安全性と忍容性を評価すること。

20

エンドポイント：

最後の成人対象者が12週目に到達した後の、身体検査、バイタルサイン、臨床検査測定値、およびその他の臨床的評価における累積的な有害事象／重度有害事象および臨床的に有意な異常。

第2相

目的：

1型糖尿病を有する小児対象者において、ラパマイシンの存在下でGNTI-122の有効性を評価すること。

エンドポイント：

パートB（コホート3およびコホート4）の小児対象者での、刺激時のCペプチドの曲線下面積（AUC）におけるベースラインから12週目、24週目および52週目までの変化。

30

【0579】

本試験のその他の目的および関連するエンドポイントには以下のものが含まれる。

第1相および第2相

目的（第1相）：

1型糖尿病を有する成人対象者において、ラパマイシンの存在下または非存在下でGNTI-122の細胞動態を評価すること。

目的（第2相）：

1型糖尿病を有する小児対象者において、ラパマイシンの存在下でGNTI-122の細胞動態を評価すること。

40

エンドポイント（第1相および第2相）：

52週目までの予定された時点での細胞動態のサンプリングを含む循環EngTregの測定。

第2相

目的：

1型糖尿病を有する小児対象者において、ラパマイシンの存在下でGNTI-122の安全性と忍容性を評価すること。

エンドポイント：

最後の対象者が12週目に到達した後の、パートB（コホート3およびコホート4）の小児対象者の身体検査、バイタルサイン、臨床検査測定値、およびその他の臨床的評価にお

50

ける累積的な有害事象／重度有害事象および臨床的に有意な異常。

【0580】

試験デザイン

本試験は、1型糖尿病（T1D）であると最近診断された成人対象者および小児対象者に静脈内（IV）投与されたGNTI-122の安全性、有効性および細胞動態（CK）を評価するための、第1/2相非盲検多施設共同試験である。

【0581】

同意／アセントが得られた1型糖尿病を有する成人対象者および小児対象者に、GNTI-122細胞製品のT細胞受容体（TCR）に特異的な反応性を示すDRB1*04:01ハプロタイプの遺伝子検査を行う。このアレルの検査結果が陽性の対象者には、残りのスクリーニング手順を引き続き行ってもよい。

【0582】

すべての適格基準を満たした対象者を、スクリーニング時の年齢に基づいて順次投与コホートに入れ、評価スケジュールに従って治験薬を投与する（表E5-4および表E5-5）。本実施例全体を通して、「治験薬」は、別段の記載がない限り、GNTI-122とラパマイシンを指す。

【0583】

安全性

安全性を最大限にするため、すべてのコホートに対してセンチネル対象者法を採用する。具体的には、各コホートの最初の対象者にGNTI-122を投与した後、そのコホートの他の対象者にも投与する前に、少なくとも7日間の間隔を空ける。

【0584】

さらに、コホート間で時間差での投与方法を使用する。具体的には、先行コホートのすべての対象者のGNTI-122の注入を完了させ、安全性評価を完了してから、次のコホートの対象者に投与を行う。コホート間で各安全性評価を行うため（図32参照）、先に試験を行ったコホートから得られた利用可能なすべての安全性データ、忍容性データおよび細胞動態データを評価して、試験を進めても安全かどうかを判断する。先行コホートの最後の対象者にGNTI-122を投与してから少なくとも7日間が経過するまでは、この安全性評価は行わない。この7日間という最短期間は、注入後に発現しうるキメラ抗原受容体（CAR）T細胞治療に関連する有害事象（AE）（例えば、サイトカイン放出症候群〔CRS〕または神経学的症候群、例えば、CAR T細胞関連脳症症候群〔CRES〕または免疫エフェクター細胞関連神経毒性症候群〔ICANS〕など）の発現日の中央値が、それぞれ注入の2日後または4日後であるという知見に基づいて選択した。最後の成人コホートから最初の小児コホートへの移行時には、この観察期間がさらに延長される。この場合、最後の成人対象者にGNTI-122を注入してから少なくとも28日間が経過するまでは、安全性評価は行わない。

【0585】

GNTI-122細胞の生着と持続性に必要な刺激シグナルを提供するには、低用量のラパマイシンで十分であると予測されたため、断続的な投与計画（1ヶ月あたり約1週間）を使用し、可能な限り最も低い用量を標的とすることによって、ラパマイシンへの曝露を最小限に抑えた。承認された適応におけるラパマイシンの目標トラフ濃度範囲は4～20 ng/mLである。本試験での目標トラフ濃度は、各投与サイクルで4 ng/mLである。

【0586】

用量の選択

GNTI-122－成人への投与

ポリクローナル制御性T細胞（Treg）の安全な投与は、 $0.05 \sim 26 \times 10^8$ 個の用量範囲で院内において先例が確立されており、用量を増加させても安全性リスクが顕著に増加しないことが確認されている。

【0587】

GNTI-122の開始用量は、 1×10^8 個を超えない用量であり、この用量は、ポリクロー

10

20

30

40

50

ナルTregで安全に試験が行われた用量範囲内である。内因性TCRをロックアウトしてGNTI-122に組み込んだ脾臓抗原特異的TCRは、過去に患者に投与されたTCR特異性を持たないポリクローナルTregのTCRよりも、GNTI-122製品の潜在的な安全性をさらに向上させるものであると考えられることには注目されたい。

【0588】

GNTI-122の臨床用量は、過去にポリクローナルTregで利用した用量に基づいて選択し、安全域を加えた用量とした。このGNTI-122の開始用量は、以下の事項を考慮に入れて選択した。

【0589】

1. 過去の試験でのヒトへのポリクローナルTregの安全な投与は、 $0.05 \sim 26 \times 10^8$ 個の用量範囲で先例が確立されており、細胞の用量を増加させても安全性リスクが顕著に増加しないことが確認されている。GNTI-122プロトコルでは、 1×10^8 個の開始用量で生きた組換えTreg (EngTreg) を投与することで、過去に試験したポリクローナルTregの最も高い用量の約25分の1の用量に安全域を設定しており、GNTI-122に組み込まれた脾臓抗原特異性と組織ターゲティングという利点がある。

【0590】

2. 提案された最も高い用量のGNTI-122 (1×10^9 個) では、ヒト成人の体内における天然の内因性Tregの総数 (約 13×10^9 個と推定) の少なくとも10分の1の用量に安全域を設定している。

【0591】

ラパマイシン—成人への投与

インビトロデータを用いて構築した曝露反応モデルから、ラパマイシンの市販品が適用される際の下限濃度であるトラフ濃度において、ラパマイシンがGNTI-122の生着および持続性を有意に増強することが予測されている。

【0592】

本試験では、GNTI-122細胞にインターロイキン2 (IL-2) 経路のシグナル伝達が誘導されるラパマイシン曝露をシミュレーションすることによって、ラパマイシンの用量と投与スケジュールを決定した。約 4 ng/mL の目標トラフ濃度であれば、インビトロおよびインビボ生着においてGNTI-122の活性化を支持できることが示された。

【0593】

小児への投与量の調整

小児対象者へのGNTI-122の用量は、年齢に応じた平均脾臓体積に基づいて調整して (表E5-1)、本試験の第1相で試験した最も高い成人用量と等しくした。成人において、この用量の安全性と忍容性を先に確立してから、小児用量を提案する。

【0594】

脾臓体積に応じて用量を調整するという方法は、GNTI-122が、脾臓抗原に特異的なTCRを発現することを論理的根拠としており、つまり、GNTI-122が、末梢血中の限られた循環量で脾臓に移動できるように設計されている。したがって、この投与方法は、対象者間でほぼ同数のGNTI-122細胞が脾臓とその所属リンパ節に局所的に生着して、刺激されて、免疫調節効果を媒介するという効果を確実に得ることを目標としている。

【0595】

ラパマイシンは、52週目までの月1回の投与サイクルで、対象者においてプロトコルの目標トラフ濃度 (4 ng/mL) が得られるように投与する。ラパマイシンの添付文書によれば、体重が少なくとも 40 kg の13歳以上の対象者には、ラパマイシンの成人用量を投与し、それ以外の対象者には、体表面積に基づいた投与量を投与するとされている。小児対象者における実際のラパマイシンの投与データとラパマイシン濃度のモデル化/シミュレーションに関する公開学術文献に基づいて、本試験では、体重が少なくとも 40 kg の13歳以上の対象者の経口ラパマイシンの開始用量として 2 mg/日 という用量が決定され (表E5-2)、その他のすべての対象者の開始用量としては、 $1.2 \text{ mg/m}^2/\text{日}$ という用量が決定された。

10

20

30

40

50

【0596】

試験コホート

パートA：適格基準を満たす成人対象者（スクリーニング時に18歳～46歳未満）を、順次用量増加コホートに登録して、GNTI-122の安全性、忍容性および細胞動態の評価を行う。コホート1aとコホート1bには、GNTI-122（ 1×10^8 個）の用量1を投与し、コホート2aとコホート2bには、GNTI-122（ 1×10^9 個）の用量2を投与する。コホート1bとコホート2bの対象者には、ラパマイシンを同時に投与する。

【0597】

パートB：適格基準を満たす小児対象者（12歳～18歳未満および6歳～12歳未満）を、順次年齢低下コホート（それぞれコホート3およびコホート4）に登録して、GNTI-122の有効性、安全性、忍容性および細胞動態の評価を行う。安全性を最大限にするため、パートAの最後の成人対象者にGNTI-122を注入してから少なくとも28日経過した後に、試験チームが、パートAのすべての成人対象者の累積的な安全性データ、忍容性データおよび細胞動態データを調査するまでは、小児対象者にGNTI-122の注入を行わない。コホート3およびコホート4の小児対象者には、年齢に応じた平均臍体積に基づいて、GNTI-122の用量2P（成人の用量2に一致するように調整した小児の用量）と、ラパマイシン（小児対象者用に調整した用量）を投与する（表E5-1）。

【0598】

パートC：適格基準を満たす小児対象者（6歳～18歳未満および3歳～6歳未満）を、拡大コホート（それぞれコホート5～8およびコホート9）に登録して、GNTI-122の有効性、安全性、忍容性および細胞動態に関する追加のデータを収集する。これらの拡大コホートでは、GNTI-122および／またはラパマイシンの投与計画は、初期コホートのデータに基づいて低減してもよい。

【0599】

表E5-3は、コホートと用量レベルのまとめを示す（試験デザインについては図E5-1も参照されたい）。

【0600】

全体的では、以下の約60人の対象者を計画に入れる。

パートA、成人対象者：n=12（それぞれ3人の対象者からなる4つのコホート、18歳～46歳未満）。

パートB、小児対象者：n=16（8人の対象者からなる1つのコホート、12歳～18歳未満；および8人の対象者からなる1つのコホート、6歳～12歳未満）。

パートC、小児対象者：n=32（それぞれ6人の対象者からなる4つのコホート、6歳～18歳未満；および8人の対象者からなる1つのコホート、3歳～6歳未満）。

【0601】

12週目の来院を完了する前に、（治験薬に関連しない理由で）治験への参加を中止したパートAまたはパートBの対象者がいれば、別の対象者で置き換えてもよい。

【0602】

選択基準

1. 遅くとも同意を得る78週間前に診断を受けた、米国糖尿病学会（ADA）の基準（例えば、空腹時血糖値が 6.9 mmol/L を超えるか、または2時間経口ブドウ糖負荷試験〔OGTT〕の血漿血糖値が 11.0 mmol/L を超える）を満たしている1型糖尿病（T1D）の診断を受けた18歳～46歳未満の成人の対象者；または遅くとも同意／アセントを得る12週間前に診断を受けた、ADAの基準を満たしている1型糖尿病の診断を受けた以下の年齢の小児対象者。

コホート3：12歳～18歳未満

コホート4：6歳～12歳未満

コホート5～8：6歳～18歳未満

コホート9：3歳～6歳未満

【0603】

2. 成人対象者は、独立倫理委員会（IEC）／治験審査委員会（IRB）によって承認された書面でのインフォームド・コンセントを提出することができ、その提出を承諾している。成人対象者は直接同意を得なければならない。それ以外の人物または保護者が、成人対象者のために、本試験に対する同意をしてはならない。

【0604】

3. 小児対象者は、アセント文書を提出することができ、その提出を承諾しており、親または法的保護者が、IEC/IRBによって承認された書面でのインフォームド・コンセントを提出できる。

【0605】

4. 同意／アセントを得る前の3週間以内またはスクリーニング期間中に、糖尿病性ケトアシドーシス（DKA）を呈していない。

【0606】

5. 対象者は、同意文書／アセント文書の署名時に、インスリン療法を必要としており、インスリン療法を受けている。注：成人対象者は、診断を受けてから最初の6ヶ月以内に、インスリン依存状態である必要がある。

【0607】

6. 対象者は、DRB1*04:01（DR4）ハプロタイプが陽性である。本治験にインフォームド・コンセント／アセントを提出した時点で、すべての対象者は、ヒト白血球抗原（HLA）ハプロタイプの遺伝子検査を行う許可を与えていることになる。この遺伝子検査は、その他のスクリーニング手順を継続する前に行うこととする。DRB1*04:01（DR4）ハプロタイプを有する対象者のみについてスクリーニングを継続する。

【0608】

7. 対象者は、白血球アフェレーシスを受けるのに十分な血管アクセスを有しており、これに対する禁忌がないことが判明しており、中心静脈カテーテルの設置（対象者の一部で必要となる場合がある）および／または麻酔（必要に応じて）に対する禁忌もないことが判明している。

【0609】

8. 妊娠の可能性のある女性の対象者は、スクリーニング時に血清妊娠検査が陰性でなければならない、避妊の使用に合意する必要がある。

【0610】

9. 生殖能を有する男性の対象者は、避妊の使用に合意する必要がある。

【0611】

10. 対象者は、スクリーニング期間中にβ細胞の機能が残っている。混合食負荷試験（MMTT）により刺激されたCペプチドが0.2 nmol/Lを超える場合に、β細胞の機能が残っていると定義する。注：刺激時のCペプチド検査が、糖尿病性ケトアシドーシス発作の3週間以内に行われ、この基準に達しなかった場合は、刺激時のCペプチド検査を再度行ってもよい。

【0612】

11. 成人の対象のみ：ヘモグロビンA1c（HgbA1c）が、スクリーニング期間中に9%以下である。小児対象者では、診断とスクリーニングの間の間隔が短いことから、HgbA1cに関する制限事項はない。

【0613】

12. スクリーニング時のボディマス指数が、36未満（成人対象者）またはその年齢に応じて95パーセンタイル未満（小児対象者）である。体重は、スクリーニング時に6歳以上の対象者で少なくとも15kgであり、スクリーニング時に3歳～6歳未満の対象者で少なくとも10kgである。

【0614】

13. 腎機能は、スクリーニング時に、治験責任医師の判断による正常範囲内にある必要がある。

【0615】

10

20

30

40

50

14. 対象者は、病歴、身体検査、臨床検査、およびスクリーニング期間中のその他の評価に基づいて、（治験責任医師の判断により）1型糖尿病以外は全般的に良好な健康状態にある。

【0616】

15. 対象者は、治験手順と治験来院のスケジュールの遵守に快諾し、これらを遵守することができる。

【0617】

GNTI-122の作製および注入とフォローアップ

GNTI-122の作製の自家T細胞を得るため、適格基準を満たす対象者は、認定を受けた白血球アフェレーシス採取センターにおいて白血球アフェレーシスを受ける。対象者から得た白血球アフェレーシス試料を、製造施設に送付して、処理を行って、GNTI-122製品を作製する。次に、GNTI-122製品の検査を行って、製品の品質を確認し、対象者に対するリリース試験を行う。リリース試験の終了後、GNTI-122製品を試験施設に送付して、投与を実施する。白血球アフェレーシスの採取から試験施設へのGNTI-122の発送までにかかる時間は、対象者につき約8～10週間であると予想される。

【0618】

試験施設に再度来院した対象者に、GNTI-122の単回IV注入を行う（注入日を0日目とする）。最短で4時間の観察期間の終了後に、治験責任医師により健康状態が評価されたら、対象者は試験施設から退出してもよい。

【0619】

0日目の来院後に、対象者は再度試験施設に来院し、評価スケジュール（表E5-4および表E5-5）に従って定期的に予定されたフォローアップを受ける。

【0620】

GNTI-122の各用量は、試験対象者から得られた白血球アフェレーシスにより得られた自家CD4+T細胞から作製する。すべての対象者は、0日目にGNTI-122の単回IV注入を受ける。成人対象者には、 1×10^8 個の用量（用量1）または 1×10^9 個の用量（用量2）を投与し、小児対象者には、年齢に応じた平均臍体積に基づく用量（用量2P）を投与する（表E5-1参照）。

【0621】

すべての対象者に対して、治験薬計画の一部として、経口ラパマイシン（錠剤または液体の形態）を断続的に低用量で月1回のサイクルで投与する（ラパマイシンを投与せずにGNTI-122を投与するコホート1aおよびコホート2aの対象者は除く）。対象者へのラパマイシンの初回投与は、1日1回投与を行う14日間のコースの一部として、0日目のGNTI-122の注入が終了してから行う。この初回投与サイクルの後、対象者は、1日1回7日間のラパマイシンの摂取を52週目まで4週間ごとに行う。治験責任医師は、トラフ濃度をモニターして、次の投与サイクルの対象者のラパマイシン用量を調整する必要があるかどうかを判断する。

【0622】

成人対象者（コホート1a、1b、2aおよび2b）は、3日目にも治験来院して、追加の血液試料を採取する。小児対象者（コホート3～9）は、3日目の来院は必要とされない。

【0623】

本試験の期間および終了

すべての対象者は、経口ラパマイシンの投与サイクルの存在下または非存在下で、自家GNTI-122の単回IV注入を受けるように割り当てられる。対象者は、76週目の来院時または早期終了（ET）の来院時のいずれかが先に到来した時点で、予定されている評価を終了した場合に、主要な試験を終了したと見なされる。

【0624】

主要な試験の終了は、最後の対象者が最後に来院した日付（76週目またはET来院時）として定義される。76週間という期間は、GNTI-122の持続性と、注入後の臨床的有効性の持続性を長期にわたって評価する目的で選択した。

10

20

30

40

50

【0625】

評価

評価は、評価スケジュール（表E5-4および表E5-5）に指定の時点で行う。

安全性と忍容性

身体検査、バイタルサイン、臨床検査およびその他の評価／手順において見出された有害事象および臨床的に有意な異常をまとめて、安全性の評価に使用する。

【0626】

細胞動態（薬物動態）

細胞動態を調査するため、末梢血試料を採取し、EngTreg細胞の生着および持続性と、ラパマイシンの影響を評価する。

【0627】

有効性

血糖管理、HgbA1cの連続測定値、低血糖発作または高血糖発作の発生、刺激時のCペプチド値の変化、および1日あたりのインスリンの必要量を含む、1型糖尿病のアウトカムに関連する臨床測定値を評価する。

【0628】

薬力学

末梢血試料を採取して、血清サイトカインやその他の炎症性メディエーターなどのバイオマーカーの評価（ただし、これらに限定されない）、末梢血単核細胞のフローサイトメトリーによるエビジェネティックな評価、ならびに自己抗体レベルの評価を行う。これらのデータを利用して、臨床安全性アウトカムおよび有効性アウトカムとの相関性を評価してもよい。

【0629】

免疫原性

末梢血試料を採取して、注入前の抗GNTI-122 EngTreg抗体と、治療により生じた抗GNTI-122 EngTreg抗体を評価する。これらのデータから、有効性と安全性のアウトカムとの相関性を評価する。

【0630】

患者報告アウトカム

糖尿病治療満足度質問表（DTSQ）およびDTSQ-Teen；Audit of Diabetes-Dependent Quality of Life（ADDQoL）およびADDQoL-Teen；ならびに／またはEuroQoL 5-Dimension（EQ-5D）およびEQ-5D-Yに基づいて、対象者および／またはその親／法的保護者（該当する場合）から報告を受ける。

【0631】

統計分析

成人患者と小児患者から得た安全性データおよび有効性データは、それぞれ別個に一覧にし、要約し、分析する。適切な解析法を用いて、群間での安全性および／または有効性を比較するための推測統計を必要に応じて行ってもよい。成人患者の試験を先に行うため、データ解析または中間解析により、成人集団を先に評価する。

【0632】

糖尿病に関連する臨床的評価は、1型糖尿病を有するすべての対象者について行うが、小児集団（18歳未満）の臨床アウトカムデータを、主要有効性エンドポイントに利用し、成人（18歳以上）のデータとは別に評価する。MMTTにより刺激されたCペプチドの曲線下面積（AUC）を、ベースラインからの変化とともに各時点ごとに要約し、年齢群および対象者ごとに一覧にする。個々のCペプチド値および要約プロットを、治療群から経時的に得る。CペプチドのAUCとベースラインからの変化の要約統計値を、治療群から来院時／経時的に得る。さらに、治療群から得たインスリンの平均毎日投与量の記述統計を経時的に要約する。

【0633】

特段の記載がない限り、分析は、一覧表および記述的な要約に基づく記述統計である。

10

20

30

40

50

連続変数は、観測数、平均値、標準偏差、中央値、最小値および最大値を用いて要約する。さらに、平均値プロット、スパゲッティプロット、箱ひげ図、棒グラフなどのグラフ要約を提供してもよい。各カテゴリーからの観測数、数値およびパーセンテージを用いてカテゴリー変数を要約する。

【0634】

すべての分析セットにおいて、対象者が受けた試験手順／治療に応じて対象者を分析する。

【0635】

完全分析セットには、いずれかの試験手順を開始したすべての対象者が含まれる。

【0636】

安全性分析セットには、いずれかの試験薬を投与したすべての対象者が含まれる。

【0637】

薬力学（PD）分析セットには、いずれかの試験治療を受けており、薬力学データが利用可能であり、薬力学データに影響を及ぼすプロトコルからの逸脱のないすべての対象者が含まれる。

【表4】

表 E5-1: 年齢に基づく平均臍体積に応じた GNTI-122 の用量

群 (年齢)	健常成人および健常小児における臍体積の近似平均値 (mL)	GNTI-122 の用量 2 (細胞数)
成人 (18 歳以上～46 歳未満)	70	1×10^9
小児 (12 歳以上～18 歳未満)	60	1×10^9
小児 (6 歳以上～12 歳未満)	35	5×10^8
小児 (3 歳以上～6 歳未満)	20	3×10^8

【表5】

表 E5-2: 生着を支持するためのラパマイシンの用量

群	最初の GNTI-122 の生着を支持するラパマイシンの用量
13 歳以上かつ体重 40kg 以上の対象者	2 mg/m^2 (経口) × 14 日間
13 歳未満かつ/または体重 40kg 未満の対象者	1.2 mg/m^2 (経口) × 14 日間

10

20

30

40

50

【表 6】

表 E5-3:コホートおよび用量レベルのまとめ

治験相	試験パート	コホート No.	対象者数	スクリーニング時 の年齢 (年齢)	GNTI-122 の用量	ラパマイシン
1	A (成人)	1a	3	18～46 歳未満	1	なし
		1b	3			あり
		2a	3		2	なし
		2b	3			あり
2	B (小児)	3	8	12～18 歳未満	2P	あり
		4	8	6～12 歳未満	2P	
	C (小児)	5	6	6～18 歳未満	2P	あり
		6	6			
		7	6			
		8	6			
		9	8	3～6 歳未満	2P	

10

20

【0638】

用量2Pは、成人用量2に一致するように調整したGNTI-122の小児用量を指す（表E5-1参照）。

30

40

50

【表 7】

表 E5-4:スクリーニングから 24 週目までの評価スケジュール

治験来院	HLA スクリーニング a	主要なスクリーニング a	白血球アフェレーシス a	BL	D0	D3 ^b	D7	D14	W4	W8	W12	W16	W20	W24
試験日±許容日数 (日)	最長で白血球アフェレーシスの 28 日前		--	-7~ D0	0	± 1	± 1	± 2	28 ± 2	56 ± 2	84 ± 3	112 ± 3	140 ± 3	168 ± 3
HLA 型判定に対するインフォームド・コンセント/インフォームド・アセント	X													
HLA 型判定用の試料採取	X													
患者背景		X												
適格性 (選択/除外)		X												
病歴/外科手術歴と家族歴/社会歴		X												
ボディマス指数		X												
身長 ^c (cm) (裸足)		X										Peds		X ^c
体重(kg)		X	X		X				X		Peds			Peds
治験参加前の使用薬剤および併用薬剤		X	X		X		X	X	X	X	X	X	X	X
HLA 型判定の確認		X												
試験全体に対するインフォームド・コンセント/インフォームド・アセント		X												
静脈の評価		X												
12 誘導心電図と院内での読み取り		X												
CGM の開始と、最初のセンサーの装着		X												
下位試験としての任意の遺伝子検査のインフォームドコンセントと血液試料採取		X ^d												
TSH、尿酸、LDH、CPK		X												
T1D 自己抗体およびその他の自己抗体		X												
脂質パネル (注：絶食の場合)		X												

10

20

30

40

50

治験来院	HLA スクリーニング a	主要なスクリーニング a	白血球アフェレーシス a	BL	D0	D3 ^b	D7	D14	W4	W8	W12	W16	W20	W24
試験日±許容日数 (日)	最長で白血球アフェレーシスの 28 日前		--	-7~ D0	0	± 1	± 1	± 2	28 ± 2	56 ± 2	84 ± 3	112 ± 3	140 ± 3	168 ± 3
感染症検査 e		X												
TB スクリーニング (QuantiFERO N)		X												
現地のガイドラインに従って TB スクリーニングが必要な場合の胸部 X 線		X												
MMTT により刺激した C ペプチド測定		X		X							X			X
指示によるインスリン使用 日誌の交付		X	X		X		X	X	X	X	X	X	X	X
インスリン使用日誌の回収			X		X		X	X	X	X	X	X	X	X
探索的バイオマーカー/MoA を調査するための採血 (PBMC、血清、血漿)f		X		X		X	X	X	X		X			X
妊娠検査		S	U ^g		U ^g				U	U	U	U	U	U
尿分析(異常ありの場合、顕微鏡検査による再検査)		X		X					X			X		
全血球算定および白血球分画		X		X					X		X		X	
白血球アフェレーシスの計算用の CD4 リンパ球数		X												
化学的検査		X		X					X		X		X	
HgbA1c		X		X							X			X
バイタルサイン (HR、RR、BP、体温)		X	X	X	X ^h	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Tanner の分類 (18 歳未満の場合、来院時) i		X		X							X			X
身体検査(完全/F または指示あり/D)		F	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D
白血球アフェレーシス			X											

10

20

30

40

50

治験来院	HLA スクリーニング a	主要なスクリーニング a	白血球アフェレーション a	BL	D0	D3 ^b	D7	D14	W4	W8	W12	W16	W20	W24
試験日土 許容日数 (日)	最長で白血球アフェレーションの 28 日前		--	-7~ D0	0	± 1	± 1	± 2	28 ± 2	56 ± 2	84 ± 3	112 ± 3	140 ± 3	168 ± 3
ラパマイシン 濃度(コホート 1a とコホート 2a 以外)				X				X		X	X	X	X	X
GNTI-122 の 細胞動態(分子 レベル)および 細胞の持続性 (フローサイト メトリー)を調 査するための 採血				X		X	X	X	X	X	X	X	X	X
免疫原性を調 査するための 採血				X				X	X		X			X
GNTI-122 の IV 注入					X									
注入の 4 時間 後の観察期間 (対象者は研究 施設に滞在)					X									
注入後の採血 (血清/血漿)					X									
ラパマイシン の投与サイク ル j (コホート 1a およびコホ ート 2a 以外)					X					X	X	X	X	X
ラパマイシン 分包の調剤(コ ホート 1a お よびコホート 2a 以外)					X				X	X	X	X	X	X
ラパマイシン の管理(コホー ト 1a および コホート 2a 以外)							X	X		X	X	X	X	X
患者報告アウ トカム (ADDQoL、 DTSQ、EQ- 5D) k		X			X				X					X
有害事象の収 集		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X

ADDQoL : Audit of Diabetes-Dependent Quality of Life ; BL : ベースライン ; BP : 血圧 ; CGM : 連続的な
血糖値のモニタリング ; CK : 細胞動態 ; CMV : サイトメガロウイルス ; CPK : クレアチンホスホキナーゼ ;
D : 指示による身体検査 ; D[No.] : 日[数] ; DTSQ : 糖尿病治療満足度質問表 ; EBV : エプスタイン・バーウ
イルス ; ECG : 心電図 ; EQ-5D : EuroQoL 5-Dimension ; EQ-5D-Y : EuroQoL 5-Dimension-Youth ; F : 完
全な身体検査 ; HBsA : B型肝炎表面抗原 ; Hep B : B型肝炎 ; Hep C : C型肝炎 ; HgbA1c : ヘモグロビン
A1c ; HLA : ハプロタイプ ; HR : 心拍数 ; HTLV : ヒトTリンパ球向性ウイルス ; IV : 静脈内 ; LDH : 乳酸
脱水素酵素 ; MMTT : 混合食負荷試験 ; MoA : 作用機序 ; PA : 胸部X線後前像 ; PBMC : 末梢血単核細胞 ;
Peds : 小児対象者 ; PRO : 患者報告アウトカム ; QD : 1日1回 ; RR : 呼吸数 ; S : 血清 ; T1D : 1型糖尿病 ;
TB : 結核 ; TSH : 甲状腺刺激ホルモン ; U : 尿 ; W[No.] : 週[数]。

10

20

30

40

50

^a DRB1*04:01(DR4)ハプロタイプを有する対象のみについてスクリーニングを継続する。HLAスクリーニングと主要なスクリーニングの許容日数は、白血球アフェレーシスに関するものである。ベースライン評価の許容日数は0日目に関するものである。

^b 3日目の評価は、成人対象者のみに行う(コホート1a、2a、1bおよび2b)。

^c 18歳未満の対象者の身長測定は約6ヶ月ごとに治験来院時に行う。

^d 任意のゲノム下位試験用の血液試料は、同意/アセントが適切に得られている限り、本試験のスクリーニング時またはその他の時点で採取してもよい。

^e HIV、HBsA、Hep Bコア抗体、Hep CウイルスRNA、梅毒、HTLV、EBVおよびCMVの感染症検査。

^f 検査室での評価の詳細の全体およびスケジュールについては、検査室のマニュアルを参照する。

^g 妊娠検査の陰性結果は、白血球アフェレーシスの前と0日目の注入前に文書に記録する必要がある。

^h バイタルサインは、0日目の治験薬の投与の前後に収集する必要がある。

ⁱ Tannerの分類は、対象者およびその保護者に配布する採点カードを使用して自己申告する。

^j 治験来院日(例えば0日目や7日目など)の対象者によるラパマイシンの毎日用量の摂取は、現場スタッフによる用量摂取の指示があるまで待機する。ラパマイシンの初回投与は、0日目のGNTI-122の注入後に行う。

^k 小児対象者(18歳未満)は、若年者用の患者報告アウトカムとして、ADDQoL-TeenおよびDTSQ-Teen(13~17歳)およびEQ-5D-Youth(8~17歳)を完了させる。

10

20

30

40

50

【表 8】

表 E5-5: 28～76 週目(主要な試験の終了まで)の評価スケジュール

試験来院 (週)	28	32	36	40	44	48	52	58	64	70	76	早期終了	予定外
試験日±許容日数 (日)	196 ± 4	224 ± 4	252 ± 4	280 ± 4	308 ± 4	336 ± 4	364 ± 4	406 ± 4	448 ± 4	490 ± 4	532 ± 4		N/A
脂質パネル (注：絶食の場合)							X						
TB スクリーニング QuantiFERON (現地の ガイドラインに従う)							X ^a						
現地のガイドラインに 従って TB スクリーニング が必要な場合の 胸部 X 線							X ^a						
MMTT により刺激した C ペプチド測定			X				X		X		X	X ^b	
指示によるインスリン 使用日誌の交付	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X			
インスリン使用日誌の 回収	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
試験参加前の使用薬剤 および併用薬剤	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
探索的バイオマーカー /MoA を調査するための 採血 (PBMC、血清、血漿) ^c			X				X				X		
妊娠検査 (妊娠の可能性 のある対象者)	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U ^d	U ⁴
尿分析(異常ありの場 合、顕微鏡検査による 再検査)	X			X			X				X		
全血球算定および 白血球分画	X		X		X		X		X		X		
化学的検査	X		X		X		X		X		X		

10

20

30

40

50

治験来院 (週)	28	32	36	40	44	48	52	58	64	70	76	早期終了	予定外
試験日±許容日数 (日)	196 ± 4	224 ± 4	252 ± 4	280 ± 4	308 ± 4	336 ± 4	364 ± 4	406 ± 4	448 ± 4	490 ± 4	532 ± 4		N/A
HgbA1c			X			X			X		X	X ⁵	X ^e
バイタルサイン (HR、RR、BP、体温)	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Tanner の分類(18 歳未満の場合、来院時) f			X			X		X		X			
身体検査(完全/F、指示あり/D)	D	D	D	D	D	D	F	D	D	D	D	D	D
身長(cm)(裸足)							Peds				Peds	Peds	Peds
体重(kg)			Peds				All				Peds	All	All
ラパマイシン濃度(コホート 1a とコホート 2a 以外)	X	X	X	X	X	X	X					X ^b	
GNTI-122 の細胞動態(分子レベル)および細胞の持続性(フローサイトメトリー)を調査するための採血	X		X				X		X		X	X ^b	
免疫原性を調査するための採血			X				X				X	X ^b	
ラパマイシン分包の調剤(コホート 1a およびコホート 2a 以外)	X	X	X	X	X	X							
ラパマイシンの投与サイクル g (コホート 1a およびコホート 2a 以外)	X	X	X	X	X	X	X						
ラパマイシンの管理(コホート 1a およびコホート 2a 以外)	X	X	X	X	X	X	X					X	
患者報告アウトカム (ADDQoL、DTSQ、EQ-5D) h			X				X			X			
有害事象の収集	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X

ADDQoL : Audit of Diabetes-Dependent Quality of Life ; All : 成人対象者および小児対象者 ; BP : 血圧 ; CBC : 全血球算定 ; CK : 細胞動態 ; D : 指示による身体検査 ; DTSQ : 糖尿病治療満足度質問表 ; ET : 早期終了 ; EQ-5D : EuroQoL 5-Dimension ; F : 完全な身体検査 ; HgbA1c : ヘモグロビンA1c ; HR : 心拍数 ; MMTT : 混合食負荷試験 ; MoA : 作用機序 ; N/A : 適用外 ; PA : 胸部X線後前像 ; PBMC : 末梢血単核細胞 ; Peds : 小児対象者 ; PRO : 患者報告アウトカム ; RR : 呼吸数 ; TB : 結核 ; U : 尿 ; W : 週。

^a 52週目に、治験責任医師の判断/現地の標準治療に基づいてTBのスクリーニングを行う。

^b 先の検査が10週以上早く終わった場合。

^c 検査室での評価の詳細の全体およびスケジュールについては、検査室のマニュアルを参照する。

^d 過去の検査結果が来院の4週以上前に得たものであった場合、早期終了の来院時または予定外の来院時に尿妊娠検査を行うべきである。

^e 過去の検査結果が来院の10週以上前に得たものであった場合、早期終了の来院時または予定外の来院時にHgbA1c検査を行うべきである。

^f Tannerの分類は、対象者およびその保護者に配布する採点カードを使用して自己申告する。

^g 治験来院日 (例えば0日目や7日目など) の対象者によるラパマイシンの毎日用量の摂取は、現場スタッ

フによるラパマイシンの摂取の指示があるまで待機する。

^h 小児対象者 (18歳未満) は、若年者用の患者報告アウトカムとして、ADDQoL-TeenおよびDTSQ-Teen (13~17歳) およびEQ-5D-Youth (8~17歳) を完了させる。

【 0 6 3 9 】

実施例 6 : 1 型糖尿病モデルにおける膵島特異的組換え Treg による強力な抗原特異的免疫抑制とバイスタンダー免疫抑制 序 論

10

20

30

40

50

制御性T細胞（Treg）の養子移入によって、1型糖尿病（T1D）マウスモデルを治療することができる。注目すべきことに、膵島特異的Tregは、疾患の予防という点において、ポリクローナルTregよりも有効性が高い。しかし、天然の抗原特異的Tregの頻度は極めて低く、エクスピボでの拡大培養によって不安定になることから、制御性表現型からエフェクター表現型に転換することがある。本明細書では、相同組換え修復によるFOXP3の編集とレンチウイルスによるTCRの送達とを組み合わせることによって初代ヒトCD4+T細胞から作製された耐久性のある抗原特異的組換え（Eng）Tregを開示する。1型糖尿病マウス由来のクローン培養したCD4+T細胞から得られたTCRを用いて、エフェクターT細胞（Teff）の増殖とサイトカインの産生を抑制することができる膵島特異的EngTregを作製した。このEngTregは、可溶性メディエーターの産生と直接的な機構および間接的な機構とを介して、自身が認識する膵島抗原と同じ膵島抗原を認識するTeffだけでなく、別の膵島抗原を認識するバイスタンダーTeffも抑制した。マウス膵島特異的EngTregを養子移入したところ、レシピエントマウスにおいて、マウス膵島特異的EngTregが膵臓にホーミングし、膵島特異的Teffまたは糖尿病誘発性ポリクローナルTeffにより誘発される糖尿病を予防した。これらのデータから、抗原特異的EngTregを標的治療として使用することによって、1型糖尿病を治療または予防できることが示された。

10

20

30

40

50

【0640】

1型糖尿病は、自己反応性T細胞が、インスリンを産生する膵島β細胞を標的とすることにより、内因性インスリンがほとんど産生されなくなる臓器特異的自己免疫疾患である（1,2）。フォークヘッドボックス転写因子（FoxP3）の発現を特徴とする制御性T細胞（Treg）は、末梢性寛容の維持と、過剰な免疫応答および自己免疫の阻止に重要である。ヒトでは、FOXP3遺伝子に機能喪失変異が起こると、Treg不全を起こし、「多腺性内分泌不全症および腸疾患を伴うX連鎖性免疫調節障害（IPEX）症候群」と呼ばれる重度の自己免疫性多臓器炎症性疾患を発症する。IPEX症候群において見られる様々な自己免疫疾患のうち、1型糖尿病は初期に発症することから、膵島特異的免疫寛容の維持にFOXP3⁺Tregが重要な役割を果たしていることが示されている（1,3）。いくつかの研究では、Treg数の減少またはTregの機能不全が1型糖尿病の発症機序において中心的な役割を果たしていることが示唆されている（1,2,4,5）。以上のことから、Tregの数またはその機能活性を増加させることが、IPEX症候群の治療および予防のための治療的介入として有望視されている（6,7）。

【0641】

様々な臓器移植の前臨床モデルおよび自己免疫疾患の前臨床モデルにおいて、Tregの治療有効性が示されている（8）。拡大培養したポリクローナルTregの養子移入が臨床活性を有することが示されているが（8）、1型糖尿病、多発性硬化症、大腸炎、関節リウマチ、移植などの多くの前臨床試験において、抗原特異的TregがポリクローナルTregよりも効果的であることが示されている（9-15）。例えば、1型糖尿病のマウスモデルにおいて、膵島抗原に特異的なTregは、1型糖尿病の進行の予防においてポリクローナルTregよりも効果的であり、1型糖尿病が回復することも認められた（9,16,17）。さらに、ポリクローナルTregは、複数の特異性を有することから、広範な免疫抑制を誘導する可能性がある（18）。これに対して、抗原特異的Tregは、抗原が提示されている標的組織や局所リンパ系コンパートメントに蓄積することから、オフターゲットな免疫抑制のリスクを低下させ、ポリクローナルTregよりも効果的かつ安全に養子細胞療法を行うことができる。

【0642】

ヒトでは、末梢血リンパ球中に含まれる循環Tregの割合はわずか1~2%しかなく（19-22）、血液中の膵島抗原特異的Tregの頻度はさらに低い。このようにまれな細胞の単離は難しく、このような細胞を臨床的に意義のある数にまで拡大培養できたことは、これまでに報告されていない。このような課題を動機として、公知の特異性を持つTCRをTregに形質導入することによって抗原特異的Tregが開発された（8）。TCRが形質導入されたTregは、標的とする組織に選択的に局在し、抗原特異的な抑制とバイスタンダー抑制

を発揮することができる（11,13,14,23）。しかし、このアプローチは、血液中のTregが全体的に不足していることから、治療用途としては制限がある。さらに、血液から単離されたTreg画分は、自己免疫性の炎症状態に使用すると不安定になり（24-27）、広範に増殖してFOXP3の発現を喪失し、エフェクター表現型に逆戻りしてしまうという懸念がある（8,28,29）。

【0643】

本明細書では、初代CD4⁺T細胞においてFOXP3を強制発現させるように設計された遺伝子編集方法を開示している（30）。相同組換え修復（HDR）を介した遺伝子編集によって、強力なプロモーターエレメントであるMNDを内因性FOXP3座位に導入することにより、ヒトCD4⁺T細胞においてFOXP3を安定に発現させ、これによって、Treg表現型と抑制機能を備えた組換え細胞（EngTreg）を強力に産生させることができた。本明細書で開示するように、この新規な治療プラットフォームは、FOXP3遺伝子の編集とヒトTCR遺伝子の移入とを組み合わせることによって、通常の初代CD4⁺T細胞から抗原特異的EngTregを作製することができるという顕著な発展を遂げている。また、本明細書で開示するように、この抗原特異的細胞製品は、様々なインビトロ機構およびインビボ機構を介して、直接的なTeffの応答とバイスタンダーなTeffの応答を抑制することが実証された。

10

結果

相同組換え修復を介したFOXP3座位の編集とレンチウイルスベクターによるTCRの形質導入による膵島特異的EngTregの作製

20

膵島特異的TCRをコードするレンチウイルスベクター（LV）と、本明細書に開示された相同組換え修復に基づく遺伝子編集によるFOXP3発現誘導方法とを併用して、ヒト膵島特異的EngTregを作製した（30）。表E6-1は、この研究で使用した、1型糖尿病を有する別々の個体から単離したTeffに由来する6種の膵島特異的TCRを示す。

【表9】

表 E6-1:膵島特異的 TCR

TCR	膵島抗原	エピトープの位置	エピトープの配列	配列番号
T1D2	IGRP	305-324	QLYHFLQIPTHEEHLFYVLS	231
T1D4	IGRP	241-260	KWCANPDWIHIDTTPFAGLV	232
T1D5-1	IGRP	305-324	QLYHFLQIPTHEEHLFYVLS	231
T1D5-2	IGRP	305-324	QLYHFLQIPTHEEHLFYVLS	231
4.13	GAD65	553-572	KVNFFRMVISNPAATHQDID	233
GAD265	GAD65	265-284	KGMAALPRLIAFTSEHSHFS	234
PPI76	プレプロインスリン	76-90	SLQPLALEGSLQKRG	235

30

40

【0644】

注目すべきことに、これらの膵島特異的TCRはいずれもHLA-DR0401に拘束されており、異なる抗原を標的としていた。3種の膵島特異的TCRは、膵島特異的グルコース-6-ホスファターゼ関連タンパク質（IGRP）を認識し、2種の膵島特異的TCRは、グルタミン酸脱炭酸酵素（GAD65）を認識し、1種の膵島特異的TCRは、プレプロインスリン（PPI）を認識するものであった（31および未発表データ）。重要な点として、このように様々な特異性のTCRを利用することによって、様々なシナリオで膵島特異的Tregによ

50

るTeff応答の抑制を評価することができた。臍島特異的TregによるTeff応答の抑制のシナリオとして、TregのTCRとTeffのTCRが、同じペプチド-MHC複合体に拘束される場合；TregのTCRとTeffのTCRが、1つの抗原内の異なるペプチドに拘束される場合；およびTregのTCRとTeffのTCRが、異なる抗原特異性を有する場合が含まれる。各TCRの α 鎖可変領域と β 鎖可変領域を含む発現カセットとマウスTCRの定常領域とをレンチウイルス骨格にクローニングすることによって、トランスジェニックTCRの α 鎖と β 鎖の間のペアリングの特異性を確保し、かつ抗体を用いて外因性TCRが検出できるようにした（図33E、図33F）。レンチウイルスベクター（LV）でTCRを形質導入したT細胞の抗原特異性は、色素を用いた増殖アッセイを用いて確認した。この増殖アッセイでは、コグネイトペプチドが存在する場合にのみ増殖が認められた（図33G）。次に、図33Aに概要を示した手順に従って、臍島特異的TCRをコードするLVを用いて、臍島特異的組換えTreg（臍島特異的EngTreg）を作製した。簡潔に述べると、初代ヒトCD4⁺T細胞をCD3/CD28ビーズで24時間活性化した後、臍島特異的TCRをコードするLVで形質導入した。LVで形質導入した2日後に、過去の報告に従ってCRISPR/Cas9とAAV6ドナー鋳型を用いて、相同組換え修復を介したFOXP3座位の編集を行った（30）。このドナーカセットの一部として、シス配置の切断型LNGFRのコード配列（細胞質内ドメイン欠損型）（32）をエキソン1に導入し、P2A配列を挿入することによって翻訳の際にリボソームスキッピングを誘導した（図33B）。LNGFRを導入することによって、遺伝子編集した細胞の追跡と濃縮を可能にした。形質導入と遺伝子編集により得られたT細胞のうち、25～40%が細胞内FOXP3と細胞表面LNGFRを共発現し、そのうちの70～95%が、形質導入された臍島特異的TCRを発現した（図33C）。さらに、形質導入され遺伝子編集された細胞は、CD25⁺CD127⁻であり、CTLA-4とICOSの発現がアップレギュレートされており、この表現型は、Treg様の表現型と一致していた（30, 33-35）。以下の研究では、この細胞を臍島特異的EngTregと呼ぶ。

10

20

【0645】

Teffの増殖およびサイトカインの産生に対する臍島特異的EngTregによる抗原特異的な抑制

臍島特異的EngTregの抑制機能を評価するため、インビトロ抑制アッセイにおいて、臍島特異的EngTregが発現する臍島特異的TCRと同じTCRを発現する自家Teffの増殖に対する該臍島特異的EngTregの効果を評価した。まず、LNGFR抗体親和性ビーズを用いて、臍島特異的EngTregを、85%を超える純度にまで濃縮した（図33D）。次に、臍島特異的EngTregが発現する臍島TCRと同じTCRを発現するLVを初代ヒトCD4⁺T細胞に形質導入して、自家Teffを調製した（図34E）。対照として、内因性ポリクローナルTCRを発現する非形質導入EngTreg（以降、ポリEngTregと呼ぶ）と、LV TCRで形質導入したLNGFR⁻T細胞（LNGFR親和性ビーズでの濃縮時に結合しなかった画分；図33D）（以降、臍島特異的LNGFR⁻T細胞と呼ぶ）を使用した。CD3/CD28ビーズの存在下において、臍島特異的EngTregを、cell trace violet（CTV）で標識したTeffと共培養し、CTVの希釈を指標としてTeffの増殖を測定した（図34A、図34B）。抑制能力の試験に使用した臍島特異的TCRは、IGRP₃₀₅₋₃₂₄に特異的なT1D5-2 TCR；PPI₇₆₋₉₀に特異的なPPI76 TCR；およびGAD₆₅₂₆₅₋₂₈₄に特異的なGAD265 TCRであった。これらの臍島特異的EngTregは、CD3/CD28ビーズで誘導されたTeffの増殖をポリEngTregと同程度にまで抑制できたことが確認された（図34B、図34C）。これに対して、臍島特異的LNGFR⁻T細胞は、CD3/CD28ビーズで誘導されたTeffの増殖に対して効果を示さなかったことから、FOXP3座位の編集によって抑制能力が発揮されたことが示された（図34B、図34C）。次に、コグネイトペプチドとAPCの存在下で培養することによって、臍島特異的EngTregがTeffの増殖を抗原特異的に抑制するのかどうかを調べた。臍島特異的EngTregは、抗原により誘導されたTeffの増殖を有意に抑制したが、ポリEngTregおよび臍島特異的LNGFR⁻T細胞は、抗原により誘導されたTeffの増殖を抑制しなかった（図34B、図34D）。注目すべきことに、3種の臍島特異的TCRのいずれでも同様の結果が認められた（図34B、図34C、図34D）。さらに、臍島特異的EngTreg

30

40

50

の抑制活性とポリEngTregの抑制活性を直接比較したTreg：Teff滴定実験を行った。IGRP₂₄₁₋₂₆₀に特異的なT1D4 TCR 140を発現する腓島特異的EngTregを使用して、CD3/CD28で誘導したTeffの増殖に対する抑制と、抗原で誘導したTeffの増殖に対する抑制を並行して評価した。この実験の結果、腓島特異的EngTregは、抗原で誘導したTeffの増殖の抑制において、ポリEngTregよりも強力であることが示されたが、CD3/CD28で誘導したTeffの増殖に対してはポリEngTregと同程度の抑制しか有していなかった（図34F～34I）。

【0646】

Tregは、Teffによるサイトカインの産生も抑制することが報告されていることから（36-39）、腓島特異的EngTregがTeffによるサイトカインの産生も抑制するのかどうかをさらに調べた。この実験を行うため、EngTregとTeffにT1D5-2 TCRを発現させ、IGRP₃₀₅₋₃₂₄コグネイトペプチドとAPCの存在下でEngTregとTeffを共培養した。細胞内サイトカイン染色によって、TeffによるTNF α 、IL-2およびIFN γ の産生を測定した。腓島特異的EngTregは、ポリEngTregや腓島特異的LNGFR-T細胞と比べて、抗原により誘導されたTeffからのTNF α 、IL-2およびIFN γ の産生を有意に抑制したが、ポリEngTregおよび腓島特異的LNGFR-T細胞では、有意な効果は認められなかった（図35A、図35B）。さらに、腓島特異的EngTregは、Teffにおける早期活性化マーカーCD25の発現も抑制した（図35A、図35C）。以上の結果をまとめると、抗原特異的な抑制を行うには、FOXP3座位の編集による抑制能力だけでなく、抗原で刺激された特異的TCRも必要であることが示された。腓島特異的EngTregは、Teffの増殖とサイトカインの産生の両方に対して抗原特異的な抑制能力を示した。

【0647】

腓島特異的EngTregによる抗原特異的バイスタンダー抑制

Tregの活性化は抗原特異的である。しかし、Tregが一度活性化されれば、バイスタンダー抑制を発揮することができる（8, 40）。この特徴は、複数の組織抗原を標的とする自己反応性により引き起こされる自己免疫の治療を行う際に特に重要である。腓島特異的EngTregがバイスタンダー抑制を発揮することができるかどうかを確認するため、T1D4 TCRを発現する腓島特異的EngTregが、T1D5-2 TCRを発現するTeffを抑制できるかどうかを調べた（図36A）。T1D4 TCRとT1D5-2 TCRはそれぞれ異なるIGRPエпитープを認識し、具体的には、T1D4 TCRはIGRP₂₄₁₋₂₆₀を認識し、T1D5-2 TCRはIGRP₃₀₅₋₃₂₄を認識することには留意されたい。T1D5-2 TCRにより認識されるコグネイトペプチド（IGRP₃₀₅₋₃₂₄）のみでパルスしたAPCの存在下、またはT1D4 TCRにより認識されるコグネイトペプチド（IGRP₂₄₁₋₂₆₀）とIGRP₃₀₅₋₃₂₄の混合物でパルスしたAPCの存在下において、T1D4腓島特異的EngTregをT1D5-2 Teffと共培養した。対照Tregとして、ポリEngTregとT1D5-2腓島特異的EngTregを使用した。重要な点として、遺伝子編集細胞におけるTCRの発現量は、T1D4とT1D5-2とで同程度であり（図36H）、いずれのEngTregも、TCRの種類に関わらず、CD3/CD28ビーズの刺激に応答したTeffの増殖を同程度に抑制した（図36I、図36J）。予想された通り、図34A～図34Dに示した結果と一致して、T1D5-2 Teffの増殖は、IGRP₃₀₅₋₃₂₄コグネイトペプチドのみの存在下でも、両方のペプチドの存在下でも、T1D5-2腓島特異的EngTregによって抑制された（図36B、図36C）。これに対して、T1D5-2 Teffの増殖は、IGRP₂₄₁₋₂₆₀ペプチドとIGRP₃₀₅₋₃₂₄ペプチドの両方が存在していた場合にのみ、T1D4腓島特異的EngTregによって抑制され（図36B、図36C）、このことから、バイスタンダー抑制が発揮されたことが示された。これに対して、腓島特異的LNGFR-T細胞は、そのTCRにより認識されるコグネイトペプチドで活性化されたが、Teffの増殖に対して直接的な抑制も、バイスタンダー抑制も示さなかった（データ示さず）。重要な点として、このバイスタンダー抑制は、IGRP特異的TCRを持つEngTregのみに限定されなかった。GAD265 TCRを発現するEngTregでもバイスタンダー抑制が検出され、GAD265 TCRを発現するEngTregは、GAD₂₆₅₋₂₈₄ペプチドとIGRP₃₀₅₋₃₂₄ペプチドの両方が存在した場合に、T1D5-2 Teffの増殖を抑制した（図36D、図36E）。また、ポリE

ngTregでは、CD3/CD28ビーズで誘導したT1D5-2 Teffの増殖に対して、GAD265 膵島特異的EngTregと同程度の抑制が示されたものの、バイスタンダー抑制は観察されなかった（図36K、図36L）。並行して行った研究において、T1D4膵島特異的EngTregとT1D5-2 Teffを用いて、Teffによるサイトカイン産生を調べることにより、バイスタンダー抑制を評価した。バイスタンダー抑制を示す同様の証拠が示された。すなわち、T1D4 TCRにより認識されるコグネイトペプチドであるIGRP₂₄₁₋₂₆₀がIGRP₃₀₅₋₃₂₄と共存していた場合にのみ、T1D5-2 TeffによるIGRP₃₀₅₋₃₂₄特異的なサイトカインの産生とCD25の発現が、T1D4膵島特異的EngTregにより抑制された（図36F～36Q）。これに対して、T1D5-2 Teffによるサイトカインの産生およびCD25の発現は、IGRP₃₀₅₋₃₂₄のみが存在していた場合でも、IGRP₃₀₅₋₃₂₄とIGRP₂₄₁₋₂₆₀とが共存していた場合でも、T1D5-2 EngTregにより抑制された（図36F～36Q）。以上の知見をまとめると、膵島特異的EngTregは、Teffの増殖とサイトカインの産生を抑制するバイスタンダー抑制を発揮できることが示された。

10

【0648】

1型糖尿病を有する対象から得られた複数の特異性を有するポリクローナル膵島特異的T細胞の膵島特異的EngTregによる抑制

膵島特異的EngTregの抑制能力を評価した最初の研究では、TCRをコードするLVを形質導入したTeffを用いて抗原特異的な方法を実施した。しかし、最終的な治療目標は、1型糖尿病のリスクがある個体または1型糖尿病を有する個体において、ポリクローナル膵島特異的T細胞を抑制することである。これを踏まえて、1型糖尿病を有する対象のPBMCに由来する内因性膵島特異的Teffに対する膵島特異的EngTregの活性を評価できるように実験方法を設計した。1型糖尿病ドナーから得たPBMCを用いて、a) APCとして使用するための単球由来DC (mDC) ; b) ポリクローナル膵島特異的Teff ; および c) EngTregを並行して作製した（図37 A）。膵島特異的Teffの作製では、9種の膵島特異的ペプチドのプールと放射線照射した自家APCの存在下でCD4⁺CD25⁻細胞を12～14日間培養した（図37 A、図37 E～37 G）。HLA-DR0401に提示されることが知られており、HLAクラスIIテトラマーが利用可能であったIGRP、GAD65およびPPIに由来するペプチドを選択した（31,41-45）。この方法では、1型糖尿病を有する複数の個体からTeffを濃縮して、目的の膵島特異性を持つ混合物を得ることができ、この膵島特異性はテトラマー染色により確認することができる。複数のドナーにおいて、テトラマー陽性細胞が様々な頻度で観察され、GAD₁₁₃₋₁₃₂特異的T細胞とIGRP₂₄₁₋₂₆₀特異的T細胞は、その他の特異性T細胞よりも高い頻度で検出された（図37 F、図37 G）。

20

30

【0649】

これと並行して、同じ複数の1型糖尿病ドナーから得たCD4⁺T細胞から、IGRP₃₀₅₋₃₂₄に拘束されたTCRを有するT1D2膵島特異的自家EngTregと、GAD65₅₅₃₋₅₇₃に拘束されたTCRを有する4.13膵島特異的自家EngTregを作製した。IGRP₃₀₅₋₃₂₄ペプチドとGAD65₅₅₃₋₅₇₃ペプチドは、ポリクローナルTeffの刺激に用いた膵島特異的ペプチドプールに含まれていた（図37 E～37 G）。抗原に依存しない抑制能力を試験した対照実験では、CD3/CD28で誘導したTeffの増殖に対する抑制能力は、ポリクローナル自家EngTregとT1D2膵島特異的自家EngTregと4.13膵島特異的自家EngTregとで同程度であった（図37B、図37C）。抗原で刺激した条件では、9種の膵島特異的ペプチドの混合物とmDCの存在下において、ポリクローナル膵島特異的Teffが増殖した（図37B、図37D）。ポリEngTregと膵島特異的LNGFR⁺T細胞は、それらのTCRの種類に関係なく、濃縮したポリクローナル膵島特異的Teffを抑制することはできなかった。驚くべきことに、膵島特異的ペプチドに特異的な1型糖尿病由来Teffの増殖は、T1D2膵島特異的EngTregでも4.13膵島特異的EngTregでも特異的に抑制された（図37B、図37D）。膵島特異的な刺激下では、膵島特異的EngTregが優れた抑制能力を有することが確認されたが、拡大培養した天然／胸腺由来Treg (tTreg) では、顕著なTeffの抑制は認められなかった（図37H～37J）。これらの知見をまとめると、1型糖尿病を有する個体から作製された膵島特異的EngTregは、自己反応性の膵島特異的自家Teffに対して、抗

40

50

原特異的な抑制能力もバイスタンダーな抑制能力も発揮することが直接的に示された。

【0650】

接触依存的抑制機構と接触非依存的抑制機構の両方を利用するEngTreg

Tregは、可溶性抗炎症メディエーターの発現、APCの成熟の阻害、IL-2の消費などの複数の機構を介して抑制を行う(8,46)。これらの機構は、脾島特異的ヒトEngTregにおいても利用されていると考えられる。接触依存的機構および接触非依存的機構について調べるため、トランスウェルを利用したアッセイを実施して、EngTregにより産生される可溶性因子の役割を評価した(図38A)(47,48)。前述と同様にして、図38G~38Iに示したように、1型糖尿病を有する対象から得たCD4⁺CD25⁻T細胞からポリクローナル脾島特異的Teffを作製した。トランスウェルの上部チャンバーには、T1D2脾島特異的EngTregを単独で播種するか、ポリクローナル脾島特異的Teffと共培養し、下部チャンバーにはポリクローナル脾島特異的Teffを播種した。ペプチド負荷したmDCを上部チャンバーと下部チャンバーに播種し、この際、上部チャンバーと下部チャンバーとで細胞数が等しくなるように調整した(図38A)。Teffなしで上部チャンバーに播種したT1D2脾島特異的EngTregは、下部チャンバーに播種したポリクローナル脾島特異的Teffの増殖を有意に抑制した(図38Bの左のグラフ、図38I)。したがって、脾島特異的EngTregは、恐らくはトランスウェルを透過する可溶性因子の産生を介して、非接触性に抑制を行うことができると考えられた。しかし、非接触性の抑制は十分なものではなく、この非接触性の抑制は、脾島特異的EngTregとポリクローナル脾島特異的Teffを直接接触させた陽性対照よりも低かった(図38Bの左のグラフ、図38I)。さらに、細胞同士の近さも実験結果に影響を及ぼした。EngTregは、最も距離が近いTeffを優先的に抑制した。上部チャンバーと下部チャンバーの両方にTeffを播種したところ、上部チャンバーに播種したT1D2脾島特異的EngTregは、上部チャンバーのTeffの増殖を抑制したが、下部チャンバーのTeffには効果を示さなかった(図38Bの左のグラフ、図38I)。

10

20

【0651】

脾島特異的EngTregがAPCの成熟を抑制できるのかどうかを調べるため、APCのCD80およびCD86の発現に対するT1D2脾島特異的EngTregの効果を評価した。このアッセイでは、HLA-DR0401に拘束された自家単球をDCに成熟させ、T1D2 TCRにより認識されるコグネイトペプチドであるIGRP₃₀₅₋₃₂₄の存在下において、この単球由来DC(mDC)とT1D2脾島特異的EngTregを2日間共培養した(図38C)。mDCからのCD86の発現の低下が測定されたことから、DCのみを培養した場合や、T1D2脾島特異的LNGFR⁺T細胞と共培養した場合と比べて、T1D2脾島特異的EngTregが、mDCの活性化を抑制できたことが示された(図38D;図38J)。しかし、TregがAPCからのCD80の発現も抑制できることが示された過去の研究とは異なり(49,50)、脾島特異的EngTregは、CD80の発現に影響を及ぼさなかった(図38K)。T1D4脾島特異的EngTregでも、PPI76脾島特異的EngTregでも、同様の結果が観察され、mDC上のCD86の発現を抑制する能力が示されたが、CD80の発現に対しては効果は認められなかった(図38M~38P)。

30

【0652】

次に、EngTregを介した抑制にIL-2の消費が寄与している可能性を調べた。マウスでは、TregがIL-2を消費することによって、サイトカインが除去されてTeffのアポトーシスが起こる(51)。しかし、この機構がヒトTregでも機能しているのかどうかは不明なままであり、いくつかの研究では、IL-2の消費はTregの抑制能力に必要とされないことが報告されている(46,52)。さらに、過剰量のIL-2によってEngTregの抑制作用を回復させることができるかどうかを調査したところ、外因性のIL-2を添加しても、ポリクローナル脾島特異的Teffの増殖の抑制に対して有意な効果はないことが分かった(図38E、図38F)。

40

【0653】

低い機能性アビディティを有する脾島特異的EngTregの優れた抑制活性

本研究の一部として、本研究で使用した別の複数のIGRP特異的TCRの機能性アビディ

50

ティが様々に異なることが観察された。このことから、このユニークな特徴を利用して、
 腓島特異的EngTregの機能に対してTCRの親和性が及ぼす影響を調査した。まず、mTCR
 の発現量が同程度だが（図33Hおよび図39F）、機能性アビディティが様々に異なる（
 図39A）T1D2 TCR、T1D4 TCRおよびPPI76 TCRを比較した。PPI76 TCRまたはT
 1D4 TCRを形質導入したCD4⁺T細胞は、それらのコグネイトペプチドの最大濃度にお
 いて、同程度の増殖に到達したが、PPI76 TCRは、0.01 μg/mlのペプチド濃度で20%
 を超える増殖を示したことから、T1D4 TCRよりも高い機能性アビディティを示し、一
 方で、T1D4 TCRを形質導入したCD4⁺T細胞は、その10倍の0.1 μg/mlのペプチド濃
 度においてPPI76 TCRを形質導入したCD4⁺T細胞と同程度の増殖を示した。T1D2 T
 CRは、3種のTCRの中で機能性アビディティが最も低かった（図39A）。次に、各腓島
 特異的TCRを発現するEngTregの相対的な抑制能力の対照比較を行ったところ、同程度
 のmTCRの発現が示された（図39E、図39F）。次に、腓島特異的ペプチドと、mDCと
 、T1D2 TCR、T1D4 TCRまたはPPI76 TCRを有するEngTregの存在下において、ポ
 リクローナル腓島特異的Teffの増殖を測定した。CD3/CD28ビーズを用いて並行して実
 施した抑制アッセイで得られた抑制活性を用いてデータを正規化した（図39G）。この
 抑制アッセイは、EngTregの機能の基準となる対照であり、この活性化方法は、TCRの
 アビディティによる影響を受けない。驚くべきことに、T1D2 TCR腓島特異的EngTreg
 は、最も低い機能性アビディティを有していたものの、最も高い抑制率を示し、T1D4 T
 CR腓島特異的EngTregの抑制率がその次に高く、PPI76 TCR腓島特異的EngTregの抑
 制率が最も低かった（図39B；図39G）。次に、HLA DR0401の拘束下で同じペプチ
 ド（IGRP305-324）を認識するT1D2 TCR、T1D5-1 TCRおよびT1D5-2 TCRを比較
 した（表E6-1）（31）。図39Cに示すように、用量反応実験において細胞の増殖を測定
 したところ、これらのTCRは、コグネイトペプチドに応答して異なる機能性アビディ
 ティを示し、これらの機能性アビディティはmTCRの発現量に依存していなかった（図33
 E～33H）。T1D5-2 TCRは、最も高い機能性アビディティを有しており、0.1 μg/ml
 のペプチド濃度で約70%の増殖を示した。T1D5-1 TCRが、その次に高い機能性アビ
 ティ有し、1.0 μg/mlのペプチド濃度でT1D5-2 TCRと同程度の増殖を示した。T1D
 2 TCRは、最も低い機能性アビディティを有し、3 μg/mlのペプチド濃度のみで増殖を
 示した。さらに、上記と同様にして、T1D2 TCR、T1D5-1 TCRまたはT1D5-2 TCR
 を発現するEngTregが、腓島特異的ペプチドに応答して、ポリクローナル腓島特異的Te
 ff細胞の増殖を抑制する能力を測定した。上記の結果と一貫して、最も低い機能性アビ
 ティを有していたT1D2 TCR腓島特異的EngTregが、最も高い抑制率を示し、その次
 にT1D5-1 TCR腓島特異的EngTregの抑制率が高く、T1D5-2 TCR腓島特異的EngTr
 egの抑制率が最も低かった（図39D；図39J）。以上のデータから、TCRの機能性アビ
 ティと抗原特異的Tregの抑制能力の間で逆相関の関係があることが示唆された。

10

20

30

40

50

【0654】

マウス腓島特異的EngTregの作製およびインビトロ特性評価

インビボでの腓島特異的EngTregの有効性を評価するため、マウス腓島特異的EngTr
 egの作製方法を確認し、インビトロにおいて、このマウス腓島特異的EngTregの機能活
 性を試験した。ヒト腓島特異的EngTregの作製方法と同様に、CRISPR-Cas9を利用し
 た相同組換え修復を介した遺伝子編集方法を用いて、Foxp3の第1のコーディングエキ
 ソンにMNDプロモーターを導入し、Foxp3の上流に切断型LNGFRのコード配列を導入
 した（図40A、図40B）。NOD.Cg-Tg(TcraBDC2.5,TcrbBDC2.5)1Doi/DoiJ（NO
 D BDC2.5）トランスジェニックマウスから単離したCD4⁺T細胞を、マウス腓島特異的
 EngTregの原材料として使用した。このトランスジェニックマウスから単離されたCD4⁺
 T細胞は、腓島特異的TCRを発現し、非糖尿病NODマウスに移入すると、急速に糖尿病
 を誘発する（53-56）。陰性対照として、RNPなしでエレクトロポレーションを行った
 後に、AAV5ドナー鑄型を含む培地中で培養したmock編集NOD BDC2.5 CD4⁺T細胞
 を使用した。RNPとAAVで処理したNOD BDC2.5 CD4⁺T細胞は、mock編集細胞とは
 異なり、LNGFRの発現が維持されていた。カラムを用いたLNGFRのアフィニティ精製を

行ったところ、LNGFR⁺細胞が全体の約75%を占めていた（図40C）。得られたこのLNGFR⁺細胞を、以降、BDC2.5脾島特異的EngTregと呼ぶ。濃縮したBDC2.5脾島特異的EngTregは、mock編集細胞と比べて、LNGFR、FOXP3およびCTLA-4の発現が増加しており、CD25の発現が同程度であるか、CD25の発現が高かった（図40D、図40E）。

【0655】

BDC2.5脾島特異的EngTregが、活性化された脾島特異的NOD BDC2.5 CD4⁺Teff細胞（以降、脾島特異的Teffと略記する）の増殖を、インビトロにおいて抗原依存的に抑制する能力について試験した。ヒト細胞を用いた研究と同様に、CTVの希釈により増殖を評価し、BDC2.5-EngTreg、BDC2.5-tTregおよびmock編集細胞の抑制能力を比較した（図40F）。BDC2.5-tTregとBDC2.5脾島特異的EngTregはいずれも、mock編集細胞と比べて、BDC2.5-CD4⁺Teffの増殖を用量依存的に抑制した（図40G、図40H）。tTregはEngTregよりもわずかに良好なインビトロ抑制機能を示したが、これは恐らく、TeffからEngTregへの転換と比べて、胸腺でのtTregの選択および／またはプログラミングの影響を反映していると考えられた。

【0656】

脾島特異的EngTregの脾臓への移動、糖尿病の予防およびインビボでの安定な生存維持

BDC2.5-CD4⁺Teffで1型糖尿病を誘発した1型糖尿病モデルを用いて、BDC2.5脾島特異的EngTregがインビボで糖尿病を予防することができるのかどうかを調べた。このモデルは、免疫不全非肥満性糖尿病の(NOD)-scid-IL2r γ ^{NULL} (NSG) マウスにBDC2.5-CD4⁺Teffを養子移入することによって糖尿病の発症を急速に促進させたものであり、糖尿病の発症は、血糖値の分析により測定される（57）。 5×10^4 個または 1×10^5 個のBDC2.5脾島特異的EngTreg、 5×10^4 個のBDC2.5-tTreg（CD4⁺CD25^{hi}細胞、EngTregと条件を合わせるため、カラム濃縮した後に活性化したもの）またはmock編集対照細胞を、 5×10^4 個のBDC2.5-CD4⁺Teffと混合し（Teff:Tregの比率=1:1または1:2）、8~10週齢の雄性レシピエントNSGマウスに注射した（図41A）。細胞を移入した後、血糖値を最長で49日間モニターした。マウスが糖尿病を発症した場合（連続した2日間の血糖値が250mg/dL以上だった場合）に殺した。糖尿病を発症しなかったマウスは、49日目にすべて安楽死させ、組織分析および細胞分析を行った。BDC2.5脾島特異的EngTregまたはBDC2.5脾島特異的tTregを移入したマウスは、大部分が糖尿病を発症しなかったが、mock編集対照細胞を投与したマウスはいずれも、Teffを移入した後9~15日以内に糖尿病を発症した（図41B）。脾島特異的EngTregはいずれの用量でも糖尿病の発症を予防した。したがって、BDC2.5脾島特異的EngTregは、この1型糖尿病マウスモデルにおける糖尿病の発症の抑制において、BDC2.5-tTregと同程度に効果的であった。したがって、BDC2.5脾島特異的EngTregは、この1型糖尿病マウスモデルにおける糖尿病の発症の抑制において、BDC2.5-tTregと同様の機能を発揮した。

【0657】

治療用Tregを有益なものにするには、この治療用Tregが標的組織にホーミングし、そこで生存し続け、安定な表現型を維持する必要がある。脾島特異的EngTregが、脾臓にホーミングして生存を維持するのかどうかを調べるため、49日目に酵素消化により脾臓リンパ球を単離し、フローサイトメトリーを行ってドナー由来のBDC2.5-CD4⁺T細胞（TCR γ β 4⁺）を検出して、LNGFRとFOXP3の発現を評価した（図41C）。49日目において、TCR γ β 4⁺EngTregとTCR γ β 4⁺tTregとが、糖尿病を発症していないマウスの脾臓内に認められた。LNGFR⁺細胞は、EngTregを投与したマウスにおいてのみ検出され（図41C）、これらの脾島特異的LNGFR⁺EngTreg（CD4⁺TCR γ β 4⁺LNGFR⁺）は、FOXP3の高発現を維持していた。特に、Tregレシピエントコホートにおいて、LNGFR⁺EngTregは、tTreg（CD4⁺TCR γ β 4⁺FOXP3⁺細胞）と同程度の発現量の細胞内FOXP3を発現し、CD4⁺TCR γ β 4⁺FOXP3⁻細胞は、Teff細胞が残留していたことを示していた（図41C）。以上のデータから、BDC2.5脾島特異的EngTregは、BDC2.5-tT

regと同様に、膵臓へとホーミングし、膵島特異的Teffが依然として存在していても、FOXP3⁺の発現を維持することが証明された。

【0658】

過去の複数の報告において、ポリクローナルtTregは、1型糖尿病マウスモデルの糖尿病の予防に効果的ではないが、膵島特異的tTregは、1型糖尿病マウスモデルの糖尿病の予防に効果的であることが示されている(9,10,17)。本発明者らのEngTregでもこれが当てはまるのかどうかを確認するため、前述と同じ方法でポリクローナルEngTregとtTregをNODマウスから作製し(図41D)、1型糖尿病NODモデルにおいて、これらのポリクローナルEngTregとtTregを、BDC2.5膵島特異的EngTregおよびBDC2.5膵島特異的tTregと直接比較した。1×10⁵個のポリクローナルEngTregもしくはポリクローナルtTreg、またはBDC2.5-EngTregもしくはBDC2.5-tTreg、またはmock編集対照細胞を、5×10⁴個のBDC2.5-CD4⁺Teffと混合し、8~10週齢の雄性NSGマウスに注射した(図41E)。レシピエントマウスの糖尿病の発症を最長で49日間モニターした。過去の報告と一致して、1型糖尿病の発症の予防に対するポリクローナルtTregの効果は極めて低く、糖尿病の発症が抑えられたマウスはわずか20%程度であった。同様に、ポリクローナルEngTregを投与したレシピエントマウスでも、限定的な保護効果しか観察されなかった。これに対して、BDC2.5膵島特異的EngTregまたはBDC2.5膵島特異的tTregを投与したほぼすべてのマウス(約95%)が糖尿病を発症しなかった(図41E)。

10

【0659】

次に、膵島特異的EngTregのバイスタンダー抑制能のインビボでの評価を試みた。NODマウスの糖尿病誘発性TCRレパトアをNSGマウスに付与するため、糖尿病NODドナーから得た分画していない2.25×10⁶個の脾細胞と1×10⁵個のBDC2.5 EngTregを、11週齢の雌性NSGマウスに同時送達した(図41F)。レシピエントマウスの糖尿病の発症を最長で33日間モニターした。膵島特異的ヒトEngTregが広範なバイスタンダー抑制を発揮できることが示された本発明者らのインビトロデータと一致して、BDC2.5 EngTregを投与したマウスはいずれも糖尿病の発症から保護された(図41G)。この観察結果と一致して、糖尿病誘発性NOD脾細胞のみを投与したマウスから摘出した膵臓の組織学的検査を行ったところ、膵島の内部とその周囲の間質組織内に顕著なCD3⁺単核細胞の浸潤が認められ(図41H、図41I)、このCD3⁺単核細胞の浸潤は、β細胞のインスリン染色の完全な喪失またはほぼ完全な喪失との相関性が認められた。EngTregを同時送達することによって、リンパ球性膵島炎の重症度が大幅に低下し、その結果、未処置対照マウスとほぼ同程度の膵島の保護とインスリンの発現が得られた。以上の知見から、膵島特異的EngTregがインビボの1型糖尿病の発症を強力に予防でき、tTregを用いた過去の研究と一致して、膵島特異的TCRの発現によりEngTregの効力が大幅に向上することが示された。

20

30

【0660】

考察

前述したように、FOXP3座位を編集したPBMC由来抗原特異的T細胞が、抗原特異的にその機能を発揮することが実証された(30)。この方法は、技術的には実施可能であったものの、自己免疫に関連していくつかの制限事項があった。末梢血中に存在する自己抗原特異的T細胞の数は極めて少なく、治療用途に必要なとされる程度にまで細胞数を増やし、その純度を高めることは困難であり、時間も要する。したがって、本明細書に開示したように、1型糖尿病を有する対象から得られた膵島特異的TCRの効率的な送達(31)および未発表データ)と、相同組換え修復を介した遺伝子編集とを組み合わせることに注目して本研究を進めた。この複合的なアプローチにより、出発材料としてのPBMCから単離したCD4⁺T細胞の数の10倍にまで組換えTregの数を増加させることができ(データ示さず)、400ccの血液から10⁹個もの組換えEngTregが得られ、これは、ポリクローナルTregの臨床試験において使用されているtTregの拡大培養によって得られる個数と同程度であった(6)。重要な点として、抗原特異的な刺激下において膵島特異的Eng

40

50

Tregが抑制能力を発揮することが示され、このような抑制能力は、ポリクローナルEng TregやtTregでは認められなかった。これを踏まえて行った本明細書に開示した1型糖尿病マウスモデルを用いた研究では、膵島特異的Teffにより誘発された糖尿病が、膵島抗原特異的EngTregによって阻止されたことが示されたが、ポリクローナルEngTregでは糖尿病の進行を止めることはできなかった。

【0661】

組織特異的ペプチドを認識するTCRを発現するTregは、標的組織に選択的に蓄積すると見られ、その標的組織において自己抗原により活性化されて、バイスタンダー抑制を発揮できることが示唆された(58)。本明細書に開示したマウス研究では、養子移入された膵島特異的EngTregが膵臓に局在して、膵島特異的Teffにより誘発された糖尿病を効果的に抑制したことが示された。ポリクローナルTregが病原体に対する免疫応答を妨害する可能性があることを考慮に入れると、標的組織へのホーミングは、効率的なオンターゲット免疫抑制と、全身性免疫を損なうリスクの抑制に極めて重要であると考えられる(8,14)。さらに、ヒト細胞を用いたインビトロ実験のデータから、膵島特異的EngTregが、様々な特異性のバイスタンダーTeffを抑制することが示された。膵島特異的EngTregは、このような広範囲なバイスタンダー抑制を発揮することから、標的自己抗原が不明なTeffの反応も抑制することによって、様々な特異性を有する病原性Teffを局所的に抑制できると予測される。したがって、膵島特異的TCRを有するEngTregの標的組織へのホーミングとバイスタンダー抑制能力とを組み合わせることによって、自己免疫性糖尿病を治療し制御することが可能な、より効率的かつより安全な方法を提供することができると考えられる(59)。

【0662】

抗原特異的ヒトTregの機能研究の大部分は、インビトロの抑制アッセイにより行われており、これらのアッセイがインビボでの機能を正確に予測しているのかどうかは依然として不明なままである。膵島特異的EngTregに関連するTCRを形質導入したTeffを用いたモデル系において、膵島特異的EngTregがこのTeffに対して効率的な抑制活性を発揮することが示されたものの、このモデル系では、単一の特異性を有するTeffしか試験できなかった。1型糖尿病を有する対象の病原性自己反応性T細胞が多様性を持つことを踏まえて、膵島特異的EngTregが、1型糖尿病に関連する幅広いTCR特異性の内因性Teffも抑制するのかどうかを調べた。この実験により得られたデータは、この分野での大きな進歩を示すものであった。1型糖尿病を有する対象から得られた膵島特異的Teffを抗原で濃縮したプール(様々な抗原を持つ複数の種類の膵島特異的ペプチドで刺激した膵島特異的Teffのプール)を用いて実験を行ったところ、単一の膵島抗原特異性を持つ膵島特異的EngTregによって、ポリクローナルTeff集団を抑制できることが示された。これらの知見から、膵島特異的EngTregが、1型糖尿病を有する対象の体内に認められる膵島特異的自家Teffに対して抗原特異的な抑制とバイスタンダー抑制を発揮することができるという概念が支持された。

【0663】

TregによるCD4 T細胞の抑制には、複数の機構が関与することがこれまでに示されており、APC上の共刺激受容体の調節、可溶性因子の産生(CD39/CD73、IL-10、TGF- β およびIL-35を介したATPの転換によるアデノシンの産生など)およびIL-2の消費が関与していることが報告されている(8,46,60)。本研究では、1型糖尿病を有する対象由来のCD4細胞を、膵島抗原に対する特異性により濃縮して得られたCD4自家Tエフェクター細胞を用いて抗原特異的な抑制を評価することによって、膵島特異的EngTregが機能する機構を調査した。このアプローチでは、IL-2の消費はこの条件での抑制の誘導因子ではないが、EngTregによりAPCの活性化を下方制御できることが示された。さらに、トランスウェルを用いた分析から、非接触性の抑制活性と接触性の抑制活性への寄与が観察された。このデータから、EngTregから分泌された可溶性因子が、Teffの抑制に対して重要な役割を果たしていることが支持された。さらに、上部ウェルでEngTregと共培養したTeffは抑制されたのに対して、下部ウェルのTeffは抑制されなかったこと

から、EngTregから分泌された可溶性因子が、恐らくは、最も近傍のTeffにより消費されたと考えられた。この知見は、Kimらによって報告されたデータとは異なっており、Kimらによるデータでは、隣接するエフェクターT細胞によって産生されたIL-2がTregを活性化することによって、隣接するウェルのエフェクターT細胞が、接触に依存せずに抑制されたことが報告されている(23)。一方、IL-2の消費と、接触性の抑制および非接触性の抑制における役割に関する本発明者らの知見は、tTregを使用した公表された他の研究との一貫性が見られた(37,52,60,61)。さらに、本発明者らによる研究は、共培養アッセイのAPCにおいてCD86がわずかしき変化しなかったという知見の点で他の研究による結果とは異なっていた(49,50,52)。このような結果の違いは、恐らくは、マウスTregとヒトTregの間の違いを反映したもの(46,49,51,52)であると考えられ、かつ／または本発明者らによる研究では、APCの非存在下で非特異的な刺激を使用したこと、様々な種類のAPCを使用したこと、もしくはポリクローナル抗原特異的T細胞と比較するために単一の特異性のエフェクター細胞を使用したことも反映していると考えられる(23,48,50)。さらに、CD4エフェクターT細胞からEngTregを派生させ、FOXP3を構成的に比較的高発現するように遺伝子編集したことからも、tTregとは異なる機能特性を有していたと考えられる。

10

【0664】

注目すべきことに、同じMHCペプチド拘束性を有するが機能性アビディティが異なるTCR同士を比較した場合に、低いアビディティのTCRを発現するEngTregの方が抑制活性が高いことが観察された。TregにおいてCARまたはTRuC受容体を用いた研究では、シグナルの特性がTregの機能に重要な役割を果たしうることが示されている(50,62)。トランスジェニックTCRを用いたマウスモデルにおける研究では、機能性アビディティの高いTregの方が強力であることが示唆されている(63,64)。しかし、ポリクローナルNODモデルにおいて、低親和性のTregが一定の役割を果たしていることも示されている(65)。この研究では、低親和性のTregは、高親和性Tregと競合して、炎症部位に蓄積することができ、低いアビディティのTregと高いアビディティのTregが共存することによって糖尿病に対する保護効果をさらに高めることができた(65)。

20

【0665】

BDC2.5 TCRマウスを用いた研究では、低用量のペプチドにより、mTOR経路を介してFOXP3+Tregの有意な拡大増殖が誘導されること、および低用量の抗原を添加して拡大培養したBDC2.5 T細胞を、糖尿病NODマウス由来の脾細胞とともに養子移入したところ、NOD-SCIDレシピエントにおいて糖尿病が予防されたが、高用量の抗原を添加して拡大培養したBDC2.5 T細胞と脾細胞を養子移入したマウスは糖尿病を発症したことが示された(66,67)。形質導入したヒトTregの研究はそれほど多く報告されていない。クラスI拘束性の低親和性TCRをTregに形質導入することによって、強力な抗原特異的な抑制活性を付与することができ、高いアビディティを有するCD8+T細胞の増殖を妨害することができる(68)。GAD₅₅₅₋₅₆₇に特異的なTCRとして4.13 TCRまたはR164 TCRを発現するTreg(4.13 TCRは低親和性であり、R164 TCRは高親和性である)に関する研究では、各TCRにより制御機能を付与できることが示された。しかし、R164 T細胞の方が高い抑制活性を示したことから、高いアビディティを有するTCRの方が有利であることが提唱された(69)。本発明者らによる研究では、ポリクローナル脾島特異的Teffプールと、特異性の異なる外因性TCRを同レベルで発現する様々なEngTreg、または同じMHCペプチド複合体に拘束された3種類のTCRをそれぞれ発現するEngTregとを採用した。いずれの設定でも、機能性アビディティの最も低いTCRが、最も高い抑制活性を示した。本発明者らによる知見は、標的Teffの種類、培養条件、および／またはEngTregによる抑制に必要とされる機構の違いから、先行研究での知見とは異なっていた可能性がある。

30

40

【0666】

以上の結果から、本明細書では、相同組換え修復を介したFOXP3座位の編集とLVによるTCRの移入を組み合わせることによって、初代CD4+T細胞から抗原特異的EngTreg

50

を効率的に作製する方法について述べてきた。膵島特異的TCRを発現するEngTregは、抗原特異的エフェクターTeffとバイスタンダーエフェクターTeffの増殖とサイトカイン産生の両方を抑制できることが示されている。さらに、膵島特異的EngTregは、1型糖尿病患者から得られたPBMCから増殖させた病原性自家ポリクローナルT細胞を抑制することができる。これらの知見と一致して、養子移入した膵島特異的EngTregは、インビボのレシピエントマウスにおいて、膵臓に蓄積し、糖尿病誘発性の膵島特異的TeffまたはポリクローナルTeffにより誘発される糖尿病を予防した。以上の知見から、1型糖尿病の治療や、恐らくはその他の臓器特異的な自己免疫疾患または炎症性疾患の治療において抗原特異的EngTregを将来的に適用できる可能性が強く支持された。

【0667】

まとめると、本明細書では、相同組換え修復を介したFOXP3座位の編集とLVによるTCRの移入を組み合わせることによって、初代CD4⁺T細胞から抗原特異的EngTregを効率的に作製する方法について述べてきた。膵島特異的TCRを発現するEngTregは、抗原特異的エフェクターTeffとバイスタンダーエフェクターTeffの増殖とサイトカイン産生の両方を抑制したことが示された。さらに、膵島特異的EngTregは、1型糖尿病患者から得られたPBMCから増殖させた病原性自家ポリクローナルT細胞を抑制した。これらの知見と一致して、養子移入した膵島特異的EngTregは、インビボのレシピエントマウスにおいて膵臓に選択的に蓄積し、膵島特異的Teffにより誘発された糖尿病を予防した。以上の知見から、1型糖尿病およびその他の臓器特異的な自己免疫疾患または炎症性疾患の治療において、抗原特異的EngTregを使用できることが強く支持された。

【0668】

材料と方法

研究デザイン

本研究の目的は、相同組換え修復を介したFOXP3の編集とレンチウイルスによるTCRの送達とを組み合わせた遺伝子編集方法によって、耐久性のある抗原特異的EngTregを作製することができるかどうかを試験することであった。ヒト膵島特異的EngTregがTeffの増殖とTeffによるサイトカインの産生を抑制する能力を、コグネイト抗原の存在下または無関係な抗原の存在下においてインビトロで評価した。BDC2.5-CD4⁺Teffを用いて1型糖尿病を誘発した1型糖尿病マウスモデルにおいて、マウス膵島特異的EngTregが、膵臓に移動し、糖尿病を予防し、インビボで安定に生存を維持する能力を評価した。研究者への治療の盲検は行わなかった。図面の凡例には、サンプル数、生物学的反復の回数、独立した実験の回数および統計学的手法を明示している。

【0669】

初代ヒトT細胞

ヒトPBMCは、Benaroya Research Institute (BRI) Registry and Repositoryから入手し、BRIの施設内審査委員会による承認を受けた (IRB No.07109-588)。健常対照者は、自己免疫疾患の病歴や家族歴を有していなかった。健常対照者と1型糖尿病対象はいずれもHLA DRB1*0401であった。

【0670】

レンチウイルスベクター (LV) による形質導入とFoxp3座位の編集

磁気ビーズCD4⁺T細胞単離キット (ミルテニー社) を用いて、PBMCからCD4⁺T細胞を単離し、20%ヒト血清とペニシリン/ストレプトマイシンを添加したRPMI1640培地で培養した。0日目に、ビーズ：細胞=1：1の比率になるように加えたCD3/CD28活性化ビーズ、50ng/ml組換えヒトIL-2、5ng/ml組換えヒトIL-7および5ng/ml組換えヒトIL-15でT細胞を活性化させた。24時間活性化させた後、濃縮したLVの上清と10μg/mlのポリブレンを添加することによって、GAD65特異的TCR、IGRP特異的TCRまたはPPI特異的TCRをコードする各LVベクターによる形質導入を行った。24時間インキュベートした後にビーズを除去し、細胞を16~24時間休ませてから遺伝子編集を行うか、IL-2 (20ng/ml) を添加した培地中で14日目または15日目まで拡大培養してTeff細胞として使用した。Foxp3座位の編集では、Cas9とガイドRNAからなるRNP複合体を

エレクトロポレーションにより細胞にトランスフェクトした後、AAV鑄型を形質導入した。遺伝子編集の20～24時間後に、IL-2 (100ng/ml) を添加した培地中で10日目まで細胞を拡大培養させ、LNGFR磁気ビーズで脾臓特異的LNGFR⁺EngTregを濃縮した。LNGFR⁺細胞の濃縮の際にLNGFR⁻T細胞も回収して、抑制アッセイの対照として使用した。

【0671】

PBMC由来脾臓特異的T細胞のインビトロでの拡大培養およびテトラマー染色

ペプチド刺激により脾臓特異的T細胞の拡大培養を行うため、PBMCからCD4⁺T細胞 (CD4⁺CD25⁻) を単離し、放射線照射した自家CD4⁻CD25⁺細胞および5 μg/mlの脾臓特異的ペプチドプール (GAD65₁₁₃₋₁₃₂、GAD65₂₆₅₋₂₈₄、GAD65₂₇₃₋₂₉₂、GAD65₃₀₅₋₃₂₄、GAD65₅₅₃₋₅₇₂、IGRP₁₇₋₃₆、IGRP₂₄₁₋₂₆₀、IGRP₃₀₅₋₃₂₄およびPPI₇₆₋₉₀) とインキュベートした。7日間インキュベートした後、7日目の脾臓特異的TeffとしてT細胞の一部を回収し、残りのT細胞は、20ng/mlのIL-2を添加した培地中で拡大培養した。2～3日ごとにIL-2を添加し、14日目の脾臓特異的Teffとして14日目の細胞を回収した。拡大培養した脾臓特異的T細胞集団を確認するため、14日目のTeffをPE標識テトラマーと1時間インキュベートした後、細胞表面染色を行った。抑制機構に関する実験 (トランスウェル抑制アッセイ、IL-2の消費およびTCRのアビディティ) では、T1D2 EngTregに特異的なIGRP₃₀₅₋₃₂₄を除く、9種の脾臓特異的ペプチドのプール (GAD65₁₁₃₋₁₃₂、GAD₂₆₅₋₂₈₄、GAD65₂₇₃₋₂₉₂、GAD65₃₀₅₋₃₂₄、GAD65₅₅₃₋₅₇₂、IGRP₁₇₋₃₆、IGRP₂₄₁₋₂₆₀、PPI₇₆₋₉₀およびZNT8₂₆₆₋₂₈₅) を添加してポリクローナル脾臓特異的T細胞を拡大培養させて、バイスタンダー抑制を測定した。

10

20

【0672】

CD3/CD28ビーズを用いたインビトロ抑制アッセイ

96ウェルプレートにおいて、CD3/CD28ビーズの存在下で、 2×10^4 個のTeffのみを培養するか、EngTregまたはLNGFR⁻T細胞と1:1の比率で共培養した。3日間の培養では、ビーズとTeffの比率を1:28とし、4日間の培養では、ビーズとTeffの比率を1:32とした。共培養を行う前に、TeffをCell Trace Violet (インビトロジェン社) で標識し、EngTregまたはLNGFR⁻T細胞をEF670 (サーモフィッシャー社) で標識した。Cell Trace Violet (CTV) の希釈からTeffの増殖を測定し、 $(a - b) / a \times 100$ (式中、aは、Tregの非存在下でのTeffの増殖率であり、bは、Tregの存在下でのTeffの増殖率である) として抑制率を計算した。

30

【0673】

抗原特異的抑制アッセイ

自家PBMCに5,000radの放射線を照射し、TCRを形質導入したTeffを用いた抑制アッセイのAPCとして使用した。DMSOまたは各TCRに関連するペプチドとAPCの存在下において、CTVで標識したTeffとEF670で標識したEngTregまたは脾臓特異的LNGFR⁻T細胞を1:1の比率で共培養した。細胞を4日間インキュベートし、染色して、Teffの増殖を測定した。Teffにより産生された細胞内サイトカインを測定するため、細胞を3日間培養し、プレフェルジンAを添加してさらに4時間インキュベートし、細胞内染色を行った。

40

【0674】

1型糖尿病ドナーから得たPBMC由来のポリクローナル脾臓特異的Teffを用いた抗原特異的抑制アッセイ

1型糖尿病ドナーから得た6000万個のPBMCから、CD14⁺細胞、CD4⁺CD25⁻細胞およびCD4⁻CD25⁺細胞を単離した。CD14マイクロビーズ (ミルテニー社) を用いて単離したCD14⁺細胞を、800U/mlのGM-CSFおよび1,000U/mlのIL-4を添加した培地中で7日間培養して、単球由来DC (mDC) に分化させた。得られたCD4⁺CD25⁻細胞を分割して、前述したように、一部をEngTregの作製に使用し、残りの細胞は、9種の脾臓特異的ペプチドと放射線照射した自家CD4⁻CD25⁺細胞を用いたポリクローナル脾臓特

50

異的Teffのインビトロ拡大培養に使用した。抑制アッセイでは、DMSOまたは9種の膵島特異的ペプチドと自家mDCの存在下において、7日目または14日目に回収したポリクローナル膵島特異的Teffを、Tregなしで4日間培養するか、ポリEngTreg、T1D2 EngTreg、4.13 EngTregまたはLNGFR⁺T細胞と4日間共培養した。共培養を行う前に、各EngTregまたはLNGFR⁺T細胞はEF670で標識し、ポリクローナル膵島特異的TeffはCTVで標識した。

【0675】

トランスウェル抑制アッセイ

10種の膵島特異的ペプチドのプール（GAD65₁₁₃₋₁₃₂、GAD₂₆₅₋₂₈₄、GAD65₂₇₃₋₂₉₂、GAD65₃₀₅₋₃₂₄、GAD65₅₅₃₋₅₇₂、IGRP₁₇₋₃₆、IGRP₂₄₁₋₂₆₀、IGRP₃₀₅₋₃₂₄、PPI₇₆₋₉₀、ZNT8₂₆₆₋₂₈₅）とmDCを1時間プレインキュベートし、洗浄した後、0.4 μMの孔径の96ウェルトランスウェルプレート（Corning社）の上部チャンバーと下部チャンバーに播種した。図に示すように、9種の膵島特異的ペプチド（GAD65₁₁₃₋₁₃₂、GAD₂₆₅₋₂₈₄、GAD65₂₇₃₋₂₉₂、GAD65₃₀₅₋₃₂₄、GAD65₅₅₃₋₅₇₂、IGRP₁₇₋₃₆、IGRP₂₄₁₋₂₆₀、PPI₇₆₋₉₀、ZNT8₂₆₆₋₂₈₅）で刺激して作製したポリクローナル膵島特異的TeffとT1D2 EngTregを播種した。抑制能力を評価する細胞集団を上部チャンバーで培養した。共培養を行う前に、ポリクローナル膵島特異的TeffをCTVで標識し、T1D2 EngTregをEF670で標識した。4日間培養した後、上部チャンバーと下部チャンバーから細胞を回収し、染色してFACS分析を行った。CTVの希釈を測定して、Teffの増殖を評価した。

【0676】

APC成熟抑制アッセイ

PBMCからCD14⁺単球を単離し、GM-CSFとIL-4の存在下で7日間培養して、mDCに分化させた。培養終了の16～18時間前に、IFN-γとCL075を添加してmDCを成熟させた。IGRP₃₀₅₋₃₂₄ペプチドの存在下において、成熟mDCとCTVで標識したT1D2自家EngTreg（またはLNGFR⁺T細胞）を、mDC:EngTreg/LNGFR⁺T細胞=1:2の比率で2日間共培養した。細胞を回収し、DC上の細胞表面マーカーの発現（CD86またはCD80）を分析した。mDCのCD86/CD80のMFIは、mDCのみの条件で測定したMFIで正規化した。データは、DC+EngTregまたはDC+LNGFR⁺のMFIを、DCのみのMFIで割ることによって正規化した。

【0677】

マウス

NODマウスおよびNOD BDC2.5マウスは、ジャクソン研究所から購入し、Seattle Children's Research Institute (SCRI) のSPF施設で飼育して、本明細書に記載の実験での使用を目的としたマウスを作製した。実験用NSGマウスはジャクソン研究所から購入し、実験を行う前に、1～2週間SCRIにおいて順化させた。マウスの実験、飼育および取り扱い、SCRIの動物実験委員会により承認されたプロトコルを用いて、米国国立衛生研究所の実験動物の管理と使用に関する指針に従って行った。

【0678】

初代マウスT細胞の単離、培養、遺伝子編集および濃縮

遺伝子編集用のCD4⁺T細胞を得るため、8～12週齢のNOD BDC2.5マウスおよびNODマウスの脾臓およびリンパ節からマウスリンパ球を単離し、混合した。EasySepマウスCD4⁺T細胞濃縮キット（STEMCELL Technologies社）を用いたネガティブ選択によって、リンパ球からCD4⁺T細胞を精製した後、20%FBS（Omega Scientific社、カタログNo.FB-11）、HEPES、Glutamax、β-メルカプトエタノールおよび50 ng/mLマウスIL-2（Peprotech社）を含むRPMI培地中において、マウス特異的抗CD3/CD28コーティングビーズ（Gibco社）を用いて約40時間活性化させた。活性化させた後、細胞からビーズを分離し、培地中で約10時間さらに培養し、PBSで2回洗浄し、25×10⁶個/mLの密度でBuffer R（Neonキット、インビトロジェン社）に再懸濁した。Ca²⁺ 20 pmol（IDT）とマウスFoxp3特異的gRNA 50 pmolをBuffer R中で混合して

、室温で25分間反応させることによって、RNPを調製した。Neonシステム（サーモフィッシャーサイエンティフィック社）を用いてエレクトロポレーション（1550V、10ミリ秒で3回パルス）を行うことによって、マウス細胞にRNPを送達し、マウスFoxp3の相同配列を有するドナー鑄型を含むAAV5と37℃で約20～24時間インキュベートした。IL-2を含む新鮮培地を細胞に加えて（2倍希釈）、新しい組織培養ディッシュに移して、さらに約16時間インキュベートし、最終的な分析と濃縮を行った。遺伝子編集の2日後に、遺伝子編集した細胞を回収し、計数し、過去の報告に従って、ビオチン標識抗LINGFR抗体（ミルテニーバイオテック社）で染色し、抗ビオチンマイクロビーズ（ミルテニーバイオテック社）を用いて濃縮した（67）。

【0679】

抗原特異的TeffおよびtTregの単離および濃縮

実験に用いたマウスエフェクターCD4⁺T細胞は、CD4⁺CD25⁻細胞であり、NOD BDC2.5マウスの脾臓およびリンパ節から得たリンパ球を混合した単一細胞懸濁液から、CD4とCD25のネガティブ選択（ミルテニーバイオテック社）により濃縮したものであった。実験ごとに新鮮なマウスCD4⁺Teffを調製した。抗原特異的NOD BDC2.5マウスおよびポリクローナルNODマウスから得られたCD4⁺CD25⁺tTregは、製造業者の説明書に従って、マウスTreg濃縮キット（ミルテニーバイオテック社）を用いて濃縮した。濃縮した（≥90%）tTregは、EngTregの培養に使用したのと同じ培地中で、EngTregの活性化状態と実験のタイムラインに一致するように活性化した。活性化したtTregの免疫表現型解析を行った後、液体窒素（LN₂）中で凍結保存した。注射を行う前に、tTregを解凍し、IL-2含有培地で一晩休ませた。また、注射を行う前に、フローサイトメトリーにより、生存率とCD4⁺CD25⁺FOXP3⁺の表現型を確認した。

【0680】

糖尿病NOD脾細胞659の単離

糖尿病NODマウスは、尿分析（AimStrip US-G；Germaine Laboratories社）を毎週行って同定した後、バイエル社製Contour血糖値モニターシステム（バイエル社）を用いて、高血糖症であることを確認した。2日連続で糖尿病の基準（>250mg/dl）を満たしたマウスは、安楽死させ、手で細胞を1個ずつに解離させて脾細胞を単離し、ACKバッファーで赤血球を溶解し、PBSで洗浄した後、無血清培地（CryoStor CS10）中で凍結保存した。

【0681】

糖尿病の誘発とモニタリング

糖尿病予防研究に登録する前に、正常な血糖値を有する8～10週齢の雄性NSGマウスを事前にスクリーニングした。5×10⁴個の膵島特異的Teff細胞と、5×10⁴個のmock編集対照、tTregまたはEngTregとを（1：1で）組み合わせてマウスに注射した。いくつかの条件では、1×10⁵個のTregを注射した（Teff：Treg=1：2）。細胞は、眼窩静脈叢から送達した。NOD脾細胞により糖尿病を誘発させる研究を行うため、2.25×10⁶個の脾細胞を眼窩静脈叢からマウスに注射し、1×10⁵個のEngTregを尾静脈から静脈内投与した。バイエル社製Contour血糖値モニターシステム（バイエル社）を用いて、末梢血を採取して糖尿病をモニターした。血糖値が24時間以内に250mg/dLを2回上回った場合、または400mg/dLを超えた場合に、マウスが糖尿病を発症したと見なして安楽死させた。

【0682】

免疫組織化学分析研究

脱パラフィン組織切片においてインスリンおよびCD3を検出するための免疫組織化学分析は、ライカ社製Bond自動免疫染色装置（ライカマイクロシステムズ社）を用いて、ワシントン大学のHistology and Imaging Coreにおいて行った。ウサギポリクローナル抗インスリン抗体（ab63820）はAbcam社から購入し、クエン酸バッファーで抗原賦活化処理を行い、1：1000に希釈して使用した。CD3の検出では、ラットモノクローナル抗体（MCA1477）をAbD Serotec社（バイオ・ラッド社）から購入し、EDTA

10

20

30

40

50

で抗原賦活化処理を行い、1：100に希釈して使用した。その他のすべての試薬は、ライカ社製免疫染色装置の専用試薬としてライカ社から入手したものであった。脾組織の検査は、施設内審査委員会の承認を受けた、げっ歯類組織の評価に熟達した獣医病理学者によって実施し、治療群の盲検化を行った。個々の脾臓パラフィン切片の総面積は、ニコン社製のNIS-Elementsソフトウェア（Nikon Microscopy社）を使用して測定した。脾島の総数は、20倍の対物レンズ用いて計数した。

【0683】

統計分析

すべての統計分析は、GraphPad Prismバージョン8を用いて行った。使用した統計学的試験の詳細は、各図面の凡例に示している。外れ値は除外しなかった。

参考文献と注釈

1. M. Wallberg, et al. Trends in Immunology 34, 583-591 (2013).
2. A. Pugliese, et al. J Clin Invest 127, 2881-2891 (2017).
3. C. M. Hull, et al. Diabetologia 60, 1839-1850 (2017).
4. A. Ferraro, et al. Diabetes 60, 2903-2913 (2011).
5. S. Lindley, et al. Diabetes 54, 92-99 (2005).
6. J. A. Bluestone, et al. Sci Transl Med 7, 315ra189 (2015).
7. J. H. Esensten, et al. The Journal of allergy and clinical immunology 142, 1710-1718 (2018).
8. C. Raffin, et al. Nat Rev Immunol 20, 158-172 (2020).
9. Q. Tang, et al. The Journal of experimental medicine 199, 1455-1465 (2004).
10. K. V. Tarbell, et al. The Journal of experimental medicine 199, 1467-1477 (2004).
11. L. A. Stephens, et al. Eur J Immunol 39, 1108-1117 (2009).
12. P. Zhou, et al. J Immunol 172, 1515-1523 (2004).
13. K. Fujio, et al. J Immunol 177, 8140-8147 (2006).
14. G. P. Wright, et al. Proc Natl Acad Sci U S A 106, 19078-19083 (2009).
15. J. Y. Tsang, et al. J Clin Invest 118, 3619-3628 (2008).
16. E. L. Masteller, et al. J Immunol 175, 3053-3059 (2005).
17. K. V. Tarbell, et al. The Journal of experimental medicine 204, 191-201 (2007).
18. C. G. Brunstein, et al. Blood 117, 1061-1070 (2011).
19. S. Sakaguchi, et al. Cell 133, 775-787 (2008).
20. K. L. Hippen, et al. Sci Transl Med 3, 83ra41 (2011).
21. C. Baecher-Allan, et al. J Immunol 167, 1245-1253 (2001).
22. J. A. Bluestone, et al. Science 362, 154-155 (2018).
23. Y. C. Kim, et al. J Autoimmun 92, 77-86 (2018).
24. Z. Zhang, et al. J Immunol 198, 2612-2625 (2017).
25. D. V. Sawant, et al. Immunol Rev 259, 173-191 (2014).
26. N. Komatsu, et al. Proc Natl Acad Sci U S A 106, 1903-1908 (2009).
27. X. Zhou, et al. Nat Immunol 10, 1000-1007 (2009).
28. S. L. Bailey-Bucktrout, et al. Immunity 39, 949-962 (2013).
29. N. Komatsu, et al. Nat. Med. 20, 62-68 (2014).
30. Y. Honaker, et al. Sci Transl Med 12, (2020).
31. K. Cerosaletti, et al. J Immunol 199, 323-335 (2017).
32. B. Fehse, et al. Hum Gene Ther 8, 1815-1824 (1997).
33. B. D. Singer, et al. Frontiers in immunology 5, 46 (2014).
34. A. E. Herman, et al. The Journal of experimental medicine 199, 1479-1489 (2004).

10

20

30

40

50

35. K. Wing, et al. *Science* 322, 271-275 (2008).
36. D. K. Sojka, et al. *J Immunol* 175, 7274-7280 (2005).
37. N. Oberle, et al. *J Immunol* 179, 3578-3587 (2007).
38. A. Schmidt, et al. *Science signaling* 4, ra90 (2011).
39. A. Schmidt, et al. *Frontiers in immunology* 3, 51 (2012).
40. E. M. Shevach, et al. *Frontiers in immunology* 9, 1048 (2018).
41. N. A. Danke, et al. *J. Autoimmun.* 25, 303-311 (2005).
42. J. Yang, et al. *J. Immunol.* 176, 2781-2789 (2006).
43. J. Yang, et al. *J. Autoimmun.* 31, 30-41 (2008).
44. S. A. Long, et al. *Eur. J. Immunol.* 39, 612-620 (2009).
45. J. Yang, et al. *Immunology* 138, 269-279 (2013).
46. D. A. et al. *Nat.Rev.Immunol.* 8, 523-532 (2008).
47. A. M. Thornton, et al. *The Journal of experimental medicine* 188, 287-296 (1998).
48. L. W. Collison, et al. *J.Immunol.* 182, 6121-6128 (2009).
49. Y. Onishi, et al. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 10113-10118 (2008).
50. N. A. J. Dawson, et al. *Sci Transl Med* 12, (2020).
51. P. Pandiyan, et al. *Nat Immunol* 8, 1353-1362 (2007).
52. D. Q. Tran, et al. *J Immunol* 182, 2929-2938 (2009).
53. J. D. Katz, et al. *Cell* 74, 1089-1100 (1993).
54. M. S. Anderson, et al. *Annu Rev Immunol* 23, 447-485 (2005).
55. K. Haskins, et al. *Diabetes* 45, 1299-1305 (1996).
56. K. Haskins, et al. *Science* 249, 1433-1436 (1990).
57. M. Presa, et al. *J Immunol* 195, 3011-3019 (2015).
58. Q. Tang, et al. *Nat.Immunol.* 9, 239-244 (2008).
59. J. L. McGovern, et al. *Frontiers in immunology* 8, 1517 (2017).
60. T. Maj, et al. *Nat Immunol* 18, 1332-1341 (2017).
61. L. Schmidleithner, et al. *Immunity* 50, 1232-1248.e1214 (2019).
62. J. Rana, et al. *Molecular therapy: the journal of the American Society of Gene Therapy* 29, 2660-2676 (2021).
63. J. Y. Tsang, et al. *Am J Transplant* 11, 1610-1620 (2011).
64. M. Bettini, et al. *J Immunol* 193, 571-579 (2014).
65. M. L. Sprouse, et al. *J Immunol* 200, 909-914 (2018).
66. M. S. Turner, et al. *J Immunol* 183, 4895-4903 (2009).
67. M. S. Turner, et al. *Diabetologia* 57, 1428-1436 (2014).
68. G. Plesa, et al. *Blood* 119, 3420-3430 (2012).
69. W. I. Yeh, et al. *Frontiers in immunology* 8, 1313 (2017).
70. S. Nair, et al. *Curr Protoc Immunol Chapter 7, Unit7.32* (2012).
71. R. Gastpar, et al. *J Immunol* 172, 972-980 (2004).

【 0 6 8 4 】

引用された文献は、いずれも参照によりその全体が援用される。

10

20

30

40

50

【表 10】

配列

表 1: TCR 鎖およびその一部のアミノ酸配列の例

TCR	抗原	領域名、 ドメイン名 または 配列名	アミノ酸配列	配列 番号
T1D2	IGRP(305-324)	αCDR1	NSMFDY	1
		αCDR2	ISSIKDK	2
		αCDR3	CAATRTSGTYKYIF	3
		βCDR1	MNHNY	4
		βCDR2	SVGAGI	5
		βCDR3	CASSPWGAGGTDQYF	6
		Vα	MAMLLGASVLILWLQPDWVNSQQKNDDQQVKQNSPSLSVQ EGRISILNCDYTNSMFDYFLWYKKYPAEGPTFLISSIKDKNE DGRFTVFLNKSARKHLHLHIVPSQPGDSAVYFCAATRTSGTYK YIFGTGTRLKVL	7
		Vβ	MSISLLCCAAFPLLWAGPVNAGVTQTPKFRILKIGQSMTLQC TQDMNHNYMYWYRQDPGMLKLIYSSVGAGITDKGEVPNG YNVSRSTTEDFPLRLELAAPSQTSVYFCASS	8
		TCRα (全長)	MAMLLGASVLILWLQPDWVNSQQKNDDQQVKQNSPSLSVQ EGRISILNCDYTNSMFDYFLWYKKYPAEGPTFLISSIKDKNE DGRFTVFLNKSARKHLHLHIVPSQPGDSAVYFCAATRTSGTYK YIFGTGTRLKVLANIQNPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFD SQTNVSQSKSDVYITDKTVLDMRSMDFKSN SAVAWSNKS DFACANAFNNSIIPEDTFFPSPGKGSFGAFAGCFLASGMARF CPELWSMMSKTPLIGGLG	9
		TCRβ (全長)	MSISLLCCAAFPLLWAGPVNAGVTQTPKFRILKIGQSMTLQC TQDMNHNYMYWYRQDPGMLKLIYSSVGAGITDKGEVPNG YNVSRSTTEDFPLRLELAAPSQTSVYFCASSPWGAGGTDQ YFGPGTRLTVLEDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCL ATGFYPDHVELSWWVNGKEVHSGVSTDPQPLKEQPALNDS RYCLSSRLRVSATFWQNP RNHFRCQVQFYGLSENDEWTQD RAKPVTQIVSAEAWGRADCGFTSESYQQGVLSATILYEILLG KATLYAVLV SALVLMAMVKRKDSRG	10
T1D4	IGRP(241-260)	αCDR1	VS NAYN	11
		αCDR2	GSKP	12
		αCDR3	CAVEDLNQAGTALIF	13
		βCDR1	SGHRS	14
		βCDR2	YFSETQ	15
		βCDR3	CASSLALGQGNQQFF	16
		Vα	MKSLRVLLVILWLQLSWVWSQKDQVFQPSVASSEGAVVEIF CNHSVSNAYNFFWYLHFGCAPRLLVKGSKPSQQGRYNMT YERFSSSLILQVREADAAVYCAVEDLNQAGTALIFGKGTTL SVSS	17
		Vβ	MGSRLLCWVLLCCLGAGPVKAGVTQTPRYLIKTRGQQVTLS CSPISGHRSVSWYQQTPGQGLQLFEYFSETQRNKGNFPG RFSGRQFSNSRSEMNVTLELGDSALYLCASSLALGQGNQ QFFGPGTRLTVLEDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCL LATGFYPDHVELSWWVNGKEVHSGVSTDPQPLKEQPALND SRYCLSSRLRVSATFWQNP RNHFRCQVQFYGLSENDEWTQ DRAKPVTQIVSAEAWGRADCGFTSESYQQGVLSATILYEILL GKATLYAVLV SALVLMAMVKRKDSRG	18
		TCRα (全長)	MKSLRVLLVILWLQLSWVWSQKDQVFQPSVASSEGAVVEIF CNHSVSNAYNFFWYLHFGCAPRLLVKGSKPSQQGRYNMT YERFSSSLILQVREADAAVYCAVEDLNQAGTALIFGKGTTL	19

10

20

30

40

50

TCR	抗原	領域名、 ドメイン名 または 配列名	アミノ酸配列	配列 番号
			SVSSNIQNPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQS KDSDEVYITDKTVLDMRSMDFKSNSAWAWSNKSDFACANAFN NSIIPEDTFFPSPGKGSFGAFAGCFLASGMARFCPELWSMM SKTPLIGGLG	
		TCRβ (全長)	MGSRLLCWVLLCLLGAGPVKAGVTQTPRYLIKTRGQQVTL CSPISGHRVSVWYQQTPGQGLQFLFEYFSETQRNKGNFPG RFSGRQFSNSRSEMNVTLELGDSALYLCASSALGQGNQ QFFGPGTRLTVLEDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVC LATGFYDPDHVELSWVNGKEVHSGVSTDPQPLKEQPALND SRYCLSSRLRVSATFWQNPРНHFRСQVQFYGLSENDEWTQ DRAKPVTQIVSAEAWGRADCGFTSESYQQGVLSATILYEILL GKATLYAVLVLSALVLMAMVKRKDSRG	20
T1D5- 1	IGRP(305- 324)	αCDR1	TTLSN	21
		αCDR2	LVKSGEV	22
		αCDR3	CAGQTGANNLFF	23
		βCDR1	LGHNA	24
		βCDR2	YSLEER	25
		βCDR3	CASSQEVGTVPNQPQHF	26
		Vα	MLLITSMVLVWMQLSQVNGQQVMQIPQYQHVQEGEDFTTY CNSSTTLSNIQWYKQRPGGHPVFLIQLVKSGEVKKQKRLTF QFGEAKKNSSLHITATQTTDVGTYFCAGQTGANNLFFGTGT RLTVIP	27
		Vβ	MGCRLCCAVLCLLGAVPMETGVTQTPRHLVGMTNKKSLK CEQHLGHNAMEYWKQSAKKPLELMFVYSLEERVENNSVPS RFSPECNSSLHLFLHLHTLQPEDSALYLCASSQEVGTVPNQ PQHFGDGTLSIL	28
		TCRα (全長)	MLLITSMVLVWMQLSQVNGQQVMQIPQYQHVQEGEDFTTY CNSSTTLSNIQWYKQRPGGHPVFLIQLVKSGEVKKQKRLTF QFGEAKKNSSLHITATQTTDVGTYFCAGQTGANNLFFGTGT RLTVIPYIQNPDPVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQ SKDSDEVYITDKTVLDMRSMDFKSNSAWAWSNKSDFACANAF NNSIIPEDTFFPSPGKGSFGAFAGCFLASGMARFCPELWSM MSKTPLIGGLG	29
		TCRβ (全長)	MGCRLCCAVLCLLGAVPMETGVTQTPRHLVGMTNKKSLK CEQHLGHNAMEYWKQSAKKPLELMFVYSLEERVENNSVPS RFSPECNSSLHLFLHLHTLQPEDSALYLCASSQEVGTVPNQ PQHFGDGTLSILEDLNKVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLV CLATGFFPDHVELSWVNGKEVHSGVSTDPQPLKEQPALN DSRYCLSSRLRVSATFWQNPРНHFRСQVQFYGLSENDEWT QDRAKPVTQIVSAEAWGRADCGFTSVSYQQGVLSATILYEIL LGKATLYAVLVLSALVLMAMVKRKDF	30

10

20

30

40

50

【表 1 1】

表 2: TCR 鎖およびその一部をコードする核酸配列の例

TCR	抗原	領域名、 ドメイン名 または 配列名	ヌクレオチド配列	配列 番号
T1D2		αCDR1	AACAGCATGTTTGATTAT	31
		αCDR2	ATAAGTTCCATTAAGGATAAA	32
		αCDR3	TGTGCAGCAACCCGTACCTCAGGAACCTACAAATACATCT TT	33
		βCDR1	ATGAACCATAACTAC	34
		βCDR2	TCAGTTGGTGCTGGTATC	35
		βCDR3	TGTGCCAGCAGTCCGTGGGGGGCAGGCGGCACAGATAC GCAGTATTTT	36
		Vα	ATGGCCATGCTCCTGGGGGCATCAGTGCTGATTCTGTGG CTTCAGCCAGACTGGGTAAACAGTCAACAGAAGAATGAT GACCAGCAAAGTTAAGCAAAATTCACCATCCCTGAGCGTC CAGGAAGGAAGAATTTCTATTCTGAACTGTGACTATACTA ACAGCATGTTTGATTATTTCTATGGTACAAAAATACCCT GCTGAAGGTCCTACATTCTGATATCTATAAGTTCCATTAA GGATAAAATGAAGATGGAAGATTCAGTGTCTTCTTAAAC AAAAGTGCCAAGCACCTCTCTCTGCACATTGTGCCCTCC CAGCCTGGAGACTCTGCAGTGACTTCTGTGCAGCAACC CGTACCTCAGGAACCTACAAATACATCTTTGGAACAGGCA CCAGGCTGAAGGTTTTAGCAA	37
		Vβ	ATGAGCATCAGCCTCCTGTGCTGTGCAGCCTTCTCTCTC CTGTGGGCAGGTCCAGTGAATGCTGGTGTCACTCAGAC CCCAAAATTCGCATCCTGAAGATAGGACAGAGCATGAC ACTGCAGTGTAACCCAGGATATGAACCATAACTACATGTAC TGGTATCGACAAGACCCAGGCATGGGGCTGAAGCTGATT TATTATTCAGTTGGTGCTGGTATCACTGATAAAGGAGAAG TCCCGAATGGCTACAACGTCTCCAGATCAACCACAGAGG ATTTCCCGCTCAGGCTGGAGTTGGCTGCTCCCTCCCAGA CATCTGTGTACTTCTGTGCCAGCAGTCCGTGGGGGGCA GGCGGCACAGATACGAGTATTTTGGCCAGGCACCCG GCTGACAGTGCTC	38
		TCRα (全長)	ATGGCCATGCTCCTGGGGGCATCAGTGCTGATTCTGTGG CTTCAGCCAGACTGGGTAAACAGTCAACAGAAGAATGAT GACCAGCAAAGTTAAGCAAAATTCACCATCCCTGAGCGTC CAGGAAGGAAGAATTTCTATTCTGAACTGTGACTATACTA ACAGCATGTTTGATTATTTCTATGGTACAAAAATACCCT GCTGAAGGTCCTACATTCTGATATCTATAAGTTCCATTAA GGATAAAATGAAGATGGAAGATTCAGTGTCTTCTTAAAC AAAAGTGCCAAGCACCTCTCTCTGCACATTGTGCCCTCC CAGCCTGGAGACTCTGCAGTGACTTCTGTGCAGCAACC CGTACCTCAGGAACCTACAAATACATCTTTGGAACAGGCA CCAGGCTGAAGGTTTTAGCAAATATCCAGAACCCTGACC CTGCAGTATATCAGCTGAGAGACTCTAAATCCAGTGACAA GTCTGTCTGCCTATTACCCGATTTTGATTCTCAAACAAAT GTGTCACAAAGTAAGGATTCTGATGTGTATATCACAGACA AACTGTGCTAGACATGAGGTCTATGGACTTCAAGAGCA ACAGTGCTGTGGCCTGGAGCAACAAATCTGACTTTGCAT GTGCAACGCCTTCAACAACAGCATTATTCAGAAGACA CCTTCTTCCCAGGCCAGGTAAGGGCAGCTTTGGTGCCT	39

10

20

30

40

50

TCR	抗原	領域名、 ドメイン名 または 配列名	ヌクレオチド配列	配列 番号
			TCGCAGGCTGTTTCCTTGCTTCAGGAATGGCCAGGTTCT GCCCAGAGCTCTGGTCAATGATGTCTAAACTCCTCTGAT TGGTGGTCTCGGC	
		TCRβ (全長)	ATGAGCATCAGCCTCCTGTGCTGTGCAGCCTTCCTCTC CTGTGGGCAGGTCCAGTGAATGCTGGTGTCACTCAGAC CCCAAAATCCGCATCCTGAAGATAGGACAGAGCATGAC ACTGCAGTGATACCCAGGATATGAACCATAACTACATGTAC TGGTATCGACAAGACCCAGGCATGGGGCTGAAGCTGATT TATTATTCAGTTGGTGTGCTGGTATCACTGATAAAGGAGAAG TCCCGAATGGCTACAACGTCTCCAGATCAACCACAGAGG ATTCCTCGCTCAGGCTGGAGTTGGCTGCTCCCTCCAGA CATCTGTGTACTTCTGTGCCAGCAGTCCGTGGGGGGCA GGCGGCACAGATACGCAGTATTTTGGCCAGGCACCCG GCTGACAGTGCTCGAGGACCTAAGAATGTGTTCCCTCC CGAGGTGGCTGTCTTGAACCAAGCGAAGCCGAGATCT CTCACACACAAAAGGCTACTCTCGTGTGTCTGGCAACGG GTTTTTACCCTGATCATGTAGAGTTGTCTTGGTGGGTAA CGGCAAAGAAGTACACTCCGGTGTAAGCACCGATCCTCA GCCACTTAAGGAACAACCCGCACTCAACGACTCCAGATA CTGTTTGAGTTCTAGGCTGAGAGTCTCAGCGACGTTTTG GCAGAACCCACGGAATCATTTAGATGTCAGGTCCAGTT TTACGGGTTGAGCGAGAACGACGAGTGGACACAGGATC GGGCTAAACCAAGTACCCAGATTGTATCAGCCGAAGCAT GGGGAAGGGCAGATTGCGGCTTTACCTCAGAGTCATATC AACAGGGCGTTTTGTCTGCAACAATCCTTTATGAGATCCT GCTTGGAAGGCGACTCTGTATGCCGTGCTTGTAGTGC CCTGGTTCTGATGGCAATGGTAAAAAGAAAGGACTCTAG GGGA	40
T1D4		αCDR1	GTGTCCAACGCCTACAAT	41
		αCDR2	GGCTCTAAGCCC	42
		αCDR3	TGTGCCGTGGAGGATCTGAATCAGGCCGGCACAGCCCT GATTTTC	43
		βCDR1	TCCGGACACCGCTCC	44
		βCDR2	TATTTCTCTGAGACACAG	45
		βCDR3	TGCGCAAGCTCCCTGGCCCTGGGACAGGGGAATCAGCA GTTTTTC	46
		Vα	ATGAAGAGCCTGCGCGTGCTGCTGGTCACTCCTGTGGCT GCAATTGAGTTGGGTGTGGAGCCAGAAGGACCAGGTGT TTCAGCCTAGCACTGTCGCATCATCAGAGGGGGCCGTC GTGGAAATCTTTTGAATCACAGCGTGTCCAACGCCTACA ATTTCTTTTGGTATCTGCACTTCCCAGGATGCGCACCTAG	47

10

20

30

40

50

TCR	抗原	領域名、 ドメイン名 または 配列名	ヌクレオチド配列	配列 番号
			GCTGCTGGTGAAGGGCTCTAAGCCCAGCCAGCAGGGCC GGTACAACATGACCTATGAGCGGTTGAGCTCCTCTCTGC TGATCCTGCAGGTGCGGGAGGCAGACGCAGCCGTGTAC TATTGTGCCGTGGAGGA	
		Vβ	ATGGGATCAAGACTGCTGTGCTGGGTGCTGCTGTGCCT GCTGGGAGCCGGACCTGTGAAAGCCGGGGTGACTCAG ACTCCACGATACCTGATCAAGACCAGGGGCCAGCAGGT GACACTGTCTTGACGCCAATCTCCGGACACCGCTCCGT GTCTTGGTACCAGCAGACCCCTGGACAGGGACTGCAGT TCCTGTTTGAGTATTTCTCTGAGACACAGCGGAACAAGG GCAATTTCCCGGCCGGTTTAGCGGCAGACAGTTTAGCA ACTCCAGGTCTGAGATGAATGTGAGCACCCCTGGAGCTG GGCGACTCCGCCCTGTACCTGTGCGCAAGCTCCCTGGC CCTGGGACAGGGGAATCAGCAGTTTTTCGGACCCGGAA CAAGGCTGACCGTGCTGG	48
		TCRα (全長)	ATGAAGAGCCTGCGCGTGCTGCTGGTGCCTGTGGCT GCAATTGAGTTGGGTGTGGAGCCAGAAGGACCAGGTGT TTCAGCCTAGCACTGTCGCATCATCAGAGGGGGCCGCT GTGGAAATCTTTTGTAAACACAGCGTGTCCAACGCCTACA ATTTCTTTTGGTATCTGCACTTCCCAGGATGCGCACCTAG GCTGCTGGTGAAGGGCTCTAAGCCCAGCCAGCAGGGCC GGTACAACATGACCTATGAGCGGTTGAGCTCCTCTCTGC TGATCCTGCAGGTGCGGGAGGCAGACGCAGCCGTGTAC TATTGTGCCGTGGAGGATCTGAATCAGGCCGGCACAGCC CTGATTTTCGGCAAAGGAACAACCCTGAGCGTGAGCAG CAATATCCAGAACCCTGACCCTGCAGTATATCAGCTGAGA GACTCTAAATCCAGTGACAAGTCTGTCTGCCTATTACCG ATTTTGATTCTCAAACAAATGTGTCAAAAGTAAGGATTCT GATGTGTATATCACAGACAAAAGTGTGCTAGACATGAGGT CTATGGACTTCAAGAGCAACAGTGCTGTGGCCTGGAGCA ACAAATCTGACTTTGCATGTGCAAACGCCTTCAACAACA GCATTATCCAGAAGACACCTTCTTCCCGAGCCAGGTA AGGGCAGCTTTGGTGCCTTCGCAGGCTGTTTCCTTGCTT CAGGAATGCCAGGTTCTGCCAGAGCTCTGGTCAATG ATGTCTAAAAGTCTCTGATTGGTGGTCTCGGC	49
		TCRβ (全長)	ATGGGATCAAGACTGCTGTGCTGGGTGCTGCTGTGCCT GCTGGGAGCCGGACCTGTGAAAGCCGGGGTGACTCAG ACTCCACGATACCTGATCAAGACCAGGGGCCAGCAGGT GACACTGTCTTGACGCCAATCTCCGGACACCGCTCCGT GTCTTGGTACCAGCAGACCCCTGGACAGGGACTGCAGT TCCTGTTTGAGTATTTCTCTGAGACACAGCGGAACAAGG GCAATTTCCCGGCCGGTTTAGCGGCAGACAGTTTAGCA ACTCCAGGTCTGAGATGAATGTGAGCACCCCTGGAGCTG GGCGACTCCGCCCTGTACCTGTGCGCAAGCTCCCTGGC CCTGGGACAGGGGAATCAGCAGTTTTTCGGACCCGGAA CAAGGCTGACCGTGCTGGAGGACCTTAAGAATGTGTTCC CTCCCGAGGTGGCTGTCTTCAACCAAGCGAAGCCGAG ATCTCTCACACAAAAGGCTACTCTCGTGTGTCTGGCA ACGGGTTTTTACCCTGATCATGTAGAGTTGTCTTGGTGG GTAAACGGCAAAGAAGTACACTCCGGTGTATCTACCGATC	50

10

20

30

40

50

TCR	抗原	領域名、 ドメイン名 または 配列名	ヌクレオチド配列	配列 番号
			CTCAGCCACTTAAGGAACAACCCGCACTCAACGACTCCA GATACTGTTTGAGTTCTAGGCTGAGAGTCTCAGCGACGT TTTGGCAGAACCCACGGAATCATTTTCAGATGTCAGGTCC AGTTTTACGGGTTGAGCGAGAACGACGAGTGGACACAG GATCGGGCTAAACCAAGTGACCCAGATTGTATCAGCCGAA GCATGGGGAAGGGCAGATTGCGGCTTTACCTCAGAGTC ATATCAACAGGGCGTTTTGTCTGCAACAATCCTTTATGAG ATCCTGCTTGGTAAGGCGACTCTGTATGCCGTGCTTGTA GTGCCCTGGTTCTGATGGCAATGGTAAAAAGAAAGGACT CTAGGGGA	
T1D5 -1		α CDR1	ACTACTTTAAGCAAT	51
		α CDR2	TTAGTGAAGAGTGGAGAAGTG	52
		α CDR3	TGTGCAGGTCAAACCTGGGGCAAACAACCTCTTCTTT	53
		β CDR1	CTGGGTCATAACGCT	54
		β CDR2	TACAGTCTTGAAGAACGG	55
		β CDR3	TGCGCCAGCAGCCAAGAAGTAGGTACAGTCCCCAATCAG CCCCAGCATTTT	56
		V α	ATGCTACTCATCACATCAATGTTGGTCTTATGGATGCAATT GTCACAGGTGAATGGACAACAGGTAATGCAAATTCCTCA GTACCAGCATGTACAAGAAGGAGAGGACTTCACCACGTA CTGCAATTCCTCAACTACTTTAAGCAATATACAGTGGTATA AGCAAAGGCCTGGTGGACATCCCGTTTTTTTGATACAGTT AGTGAAGAGTGGAGAAGTGAAGAAGCAGAAAAGACTGA CATTTTCAGTTTGGAGAAGCAAAAAAGAACAGCTCCCTGC ACATCACAGCCACCCAGACTACAGATGTAGGAACCTACT TCTGTGCAGGTCAAACCTGGGGCAAACAACCTCTTCTTTG GGAAGTGAACGAGACTCACCGTTATTCCCT	57
		V β	ATGGGCTGCAGGCTGCTCTGCTGTGCGGTTCTCTGTCTC CTGGGAGCGGTCCCCATGGAAACGGGAGTTACGCAGAC ACCAAGACACCTGGTCATGGGAATGACAAATAAGAAGTC TTTGAAATGTGAACAACATCTGGGTCATAACGCTATGTATT GGTACAAGCAAAGTGCTAAGAAGCCACTGGAGCTCATGT TTGTCTACAGTCTTGAAGAACGGGTTGAAAACAACAGTG TGCCAAGTCGCTTCTCACCTGAATGCCCCAACAGCTCTC ACTTATTCCTTCACCTACACACCCTGCAGCCAGAAGACTC GGCCCTGTATCTCTGCGCCAGCAGCCAAGAAGTAGGTAC AGTCCCCAATCAGCCCCAGCATTTTGGTGATGGGACTCG ACTCTCCATCCTAG	58

10

20

30

40

50

TCR	抗原	領域名、 ドメイン名 または 配列名	ヌクレオチド配列	配列 番号
		TCR α (全長)	ATGCTACTCATCACATCAATGTTGGTCTTATGGATGCAATT GTCACAGGTGAATGGACAACAGGTAATGCAAATTCCTCA GTACCAGCATGTACAAGAAGGAGAGGACTTCACCACGTA CTGCAATTCCTCAACTACTTTAAGCAATATACAGTGGTATA AGCAAAGGCCTGGTGGACATCCCGTTTTTTTGATACAGTT AGTGAAGAGTGGAGAAGTGAAGAAGCAGAAAAGACTGA CATTTTCAGTTTGGAGAAGCAAAAAAGAACAGCTCCCTGC ACATCACAGCCACCCAGACTACAGATGTAGGAACCTACT TCTGTGCAGGTCAAACCTGGGGCAAACAACCTCTTCTTTG GGACTGGAACGAGACTCACCGTTATTCCCTATATCCAGAA CCCTGACCCTGCAGTATATCAGCTGAGAGACTCTAAATCC AGTGACAAGTCTGTCTGCCTATTACCGATTTTGATTCTC AAACAAATGTGTACAAAGTAAGGATTCTGATGTGTATATC ACAGACAAAACCTGTGCTAGACATGAGGTCTATGGACTTC AAGAGCAACAGTGTGTGGCCTGGAGCAACAAATCTGA CTTTGCATGTGCAAACGCCTTCAACAACAGCATTATTCCA GAAGACACCTTCTTCCCAGCCCAGGTAAGGGCAGCTTT GGTGCCTTCGCAGGCTGTTTCCTTGCTTCAGGAATGGCC AGGTTCTGCCCAGAGCTCTGGTCAATGATGTCTAAAACT CCTCTGATTGGTGGTCTCGGC	59
		TCR β (全長)	ATGGGCTGCAGGCTGCTCTGCTGTGCGGTTCTCTGTCTC CTGGGAGCGGTCCCCATGGAAACGGGAGTTACGCAGAC ACCAAGACACCTGGTCATGGGAATGACAAATAAGAAGTC TTTGAAATGTGAACAACATCTGGGTCTAATCGCTATGTATT GGTACAAGCAAAGTGCTAAGAAGCCACTGGAGCTCATGT TTGTCTACAGTCTTGAAGAACGGGTTGAAAACAACAGTG TGCCAAGTCGCTTCTCACCTGAATGCCCCAACAGCTCTC ACTTATTCCTTACCTACACACCCTGCAGCCAGAAGACTC GGCCCTGTATCTCTGCGCCAGCAGCCAAGAAGTAGGTAC AGTCCCCAATCAGCCCCAGCATTGTTGGTGATGGGACTCG ACTCTCCATCCTAGAGGACCTTAATAAGGTGTTCCCTCCC GAGGTGGCTGTCTTGAACCAAGCGAAGCCGAGATCTC TCACACACAAAAGGCTACTCTCGTGTGTCTGGCAACGGG TTTTTTCCCTGATCATGTAGAGTTGTCTTGGTGGGTTAAC GGCAAAGAAGTACACTCCGGTGTAAGCACCGATCCTCAG CCACTTAAGGAACAACCCGCACTCAACGACTCCAGATAC TGTTTGAGTTCTAGGCTGAGAGTCTCAGCGACGTTTTGG CAGAACCCACGGAATCATTTTCAGATGTCAGGTCCAGTTTT ACGGGTTGAGCGAGAACGACGAGTGGACACAGGATCGG GCTAAACCAGTGACCCAGATTGTATCAGCCGAAGCATGG GGAAGGGCAGATTGCGGCTTACCTCAGTTTCATATCAA CAGGGCGTTTTGTCTGCAACAATCCTTTATGAGATCCTGC TTGGTAAGGCGACTCTGTATGCCGTGCTTGTAGTGCCC TGGTTCTGATGGCAATGGTAAAAAGAAAGGACTTT	60

10

20

30

40

【表 1 2】

表 3: CISC 構成要素およびその一部のアミノ酸配列の例

CISC 構成要素	ドメイン名または配列名	アミノ酸配列	配列番号
シグナルペプチド	LCN2	MPLGLLWLGLALLGALHAQA	61
FKBP-IL2Rg	細胞外結合(FKBP)ドメイン	GVQVETISPGDGRTFPKRGQTCVVHYTGMLEDGKKFD SSRDRNKPFKFMLGKQEVIRGWEEGVAQMSVGQRAKL TISPDYAYGATGHPGIIPPHATLVFDVELLKLGE	62
	IL-2Rg 細胞外ドメイン断片	GSNTSKENPFLFALEA	63
	IL-2Rg 膜貫通ドメイン	VVISVGSMGLIISLLCVYFWL	64
	IL-2Rg 細胞質内ドメイン	ERTMPRIPTLKNLEDLVTEYHGNFSAWSGVSKGLAESL QPDYSERLCLVSEIPPKGALGEGPGASPCNQHSPYW APPCYTLKPET	65
	FKBP-IL2Rg (全長)	GVQVETISPGDGRTFPKRGQTCVVHYTGMLEDGKKFD SSRDRNKPFKFMLGKQEVIRGWEEGVAQMSVGQRAKL TISPDYAYGATGHPGIIPPHATLVFDVELLKLGE GSNTSKENPFLFALEAVVISVGSMGLIISLLCVYFWL ERTMPRIPTLKNLEDLVTEYHGNFSAWSGVSKGLAESL QPDYSERLCLVSEIPPKGALGEGPGASPCNQHSPYW APPCYTLKPET	66
FRB-IL2Rb	細胞外結合(FRB)ドメイン	EMWHEGLEEASRLYFGERNVKGMFEVLEPLHAMMERG PQTLKETSFNQAYGRDLMEAEQWCRKYMKSGNVKDLT QAWDLYYHVFRISK	67
	IL-2Rb 細胞外ドメイン断片	GKDT	68
	IL-2Rb 膜貫通ドメイン	IPWLGHLLVGLSGAFGFILVYLLI	69
	IL-2Rb 細胞質内ドメイン	NCRNTGPWLKKVLKNTDPDSKFFSQLSSEHGSDVQK WLSSPFPSSSFSPGGLAPEISPLEVLERDKVTQLLQD KVPEPASLSSNHSLSCTFNQGYFFFHLPDALEIEACQV YFTYDPYSEEDPDEGVAGAPTGSSPQLQPLSGEDDAY CTFPSRDDLLFSPSLLGGPSPPSTAPGGSGAGEERMP PSLQERVPRDWDQPPLGPPTPGVPDLVDFQPPPELVLR EAGEEVPDAGPREGVSPFWSRPPGQGEFRALNARLPL NTDAYLSLQELQGQDPTHLV	70

10

20

30

40

50

CISC 構成要素	ドメイン名または 配列名	アミノ酸配列	配列 番号
	FRB-IL2Rb (全長)	EMWHEGLEEEASRLYFGERNVKGMFEVLEPLHAMMERG PQTLKETSFNQAYGRDLMEAEWCRKYMKSGNVKDLT QAWDLYYHVFRRISKGKDTIPWLGHLLVGLSGAFGFILV YLLINCRNTGPWLKKVLKCNTDPDSKFFSQLSSEHGGD VQKWLSSPFPSSSFSPGGLAPEISPLEVLERDKVTQLLL QQDKVPEPASLSSNHSLSCTFNQGYFFHLPDALEIEA CQVYFTYDPYSEEDPDEGVAGAPTGSSPQPLQPLSGE DDAYCTFPSRDDLLLFSPSLLGGPSPPSTAPGGSGAGE ERMPPSLQERVPRDWDQPPLGPPTPGVPDLVDFQPPP ELVLREAGEEVPDAGPREGVSFPWSRPPGQGEFRALN ARLPLNTDAYLSLQELQGQDPTHLV	71
細胞質ゾル内 FRB ドメイン	細胞質ゾル内 FRB ドメイン	EMWHEGLEEEASRLYFGERNVKGMFEVLEPLHAMMERG PQTLKETSFNQAYGRDLMEAEWCRKYMKSGNVKDLT QAWDLYYHVFRRISK	72

10

20

30

40

50

【表 13】

表 4: CISC 構成要素およびその一部をコードする核酸配列の例

CISC 構成要素	ドメイン名または配列名	ヌクレオチド配列	配列番号
シグナルペプチド	LCN2	ATGCCTCTGGGCCTGCTGTGGCTGGGCCTGGCCCTGCTGGGCGCCCTGCACGCCAGGCC	73
FKBP-IL2Rg	細胞外結合 (FKBP) ドメイン	GGCGTGCAGGTGGAGACAATCTCCCAGGCGACGGACGCACATTCCCTAAGCGGGGCCAGACCTGCGTGGTGCCTATACAGGCATGCTGGAGGATGGCAAGAAGTTTGACAGCTCCCGGGATAGAAACAAGCCATTCAAGTTTATGCTGGGCAAGCAGGAAGTGATCAGAGGCTGGGAGGAGGGCGTGGCCCAGATGTCTGTGGGCCAGAGGGCCAAGCTGACCATCAGCCCAGACTACGCCTATGGAGCAACAGGCCACCCAGGAATCATCCACCTCACGCCACCCTGGTGTTCGATGTGGAGCTGCTGAAGCTGGGCGAG	74
	IL-2Rg 細胞外ドメイン断片	GGATCCAACACATCAAAAGAGAACCCCTTTCTGTTCCGATTGGAGGCC	75
	IL-2Rg 膜貫通ドメイン	GTAGTCATATCTGTTGGATCCATGGGACTTATTATCTCCCTGTTGTGTGTGTACTTCTGGCTG	76
	IL-2Rg 細胞質内ドメイン	GAACGGACTATGCCAGGATCCCCACGCTCAAGAATCTGGAAGATCTCGTCACAGAATACCATGGTAATTTCAGCGCCTGGAGCGGAGTCTCTAAGGGTCTGGCCGAATCCCTCCAACCCGATTATTCTGAACGGTTGTGCCTCGTATCCGAAATACCACAAAAGGCGGGGCTCTGGGTGAGGGCCCAGGGGCGAGTCCGTGCAATCAACACAGCCCGTATTGGGCCCTCCTTGTATACGTTGAAGCCGAAACT	77
	FKBP-IL2Rg (全長)	GGCGTGCAGGTGGAGACAATCTCCCAGGCGACGGACGCACATTCCCTAAGCGGGGCCAGACCTGCGTGGTGCCTATACAGGCATGCTGGAGGATGGCAAGAAGTTTGACAGCTCCCGGGATAGAAACAAGCCATTCAAGTTTATGCTGGGCAAGCAGGAAGTGATCAGAGGCTGGGAGGAGGGCGTGGCCCAGATGTCTGTGGGCCAGAGGGCCAAGCTGACCATCAGCCCAGACTACGCCTATGGAGCAACAGGCCACCCAGGAATCATCCACCTCACGCCACCCTGGTGTTCGATGTGGAGCTGCTGAAGCTGGGCGAGGGATCCAACACATCAAAAGAGAACCCCTTTCTGTTCCGATTGGAGGCCGTAGTCATATCTGTTGGATCCATGGGACTTATTATCTCCCTGTTGTGTGTGTACTTCTGGCTGGAACGGACTATGCCAGGATCCCCACGCTCAAGAATCTGGAAGATCTCGTCACAGAATACCATGGTAATTTCAGCGCCTGGAGCGGAGTCTCTAAGGGTCTGGCCGAATCCCTCCAACCCGATTATTCTGAACGGTTGTGCCTCGTATCCGAAATACCACAAAAGGCGGGGCTCTGGGTGAGGGCCCAGGGGCGAGTCCGTGCAATCAACACAGCCCGTATTGGGCCCTCCTTGTATACGTTGAAGCCGAAACT	78
FRB-IL2Rb	細胞外結合 (FRB) ドメイン	GAGATGTGGCACGAGGGCCTGGAGGAGGCCAGCAGGCTGTATTTTGGCGAGCGCAACGTGAAGGGCATGTTGAGGTGCTGGAGCCTCTGCACGCCATGATGGAGAGAGGCCACAGACCCTGAAGGAGACATCCTTTAACCAGGCCTATGGACGGGACCTGATGGAGGCACAGGAGTGGTGCAGAAAGTACATGAAGTCTGGCAATGTGAAGGACC	79

10

20

30

40

50

CISC 構成要素	ドメイン名または配列名	ヌクレオチド配列	配列番号
		TGACGCAGGCCTGGGATCTGTACTATCACGTGTTTCG GAGAATCTCCAAG	
	IL-2Rb 細胞外ドメイン断片	GGCAAAGACACG	80
	IL-2Rb 膜貫通ドメイン	ATTCCGTGGCTTGGGCATCTGCTCGTTGGGCTGAGT GGTGCGTTTGTTTCATCATCTTGGTCTATCTCTTGAT C	81
	IL-2Rb 細胞質内ドメイン	AATTGCAGAAATACAGGCCCTTGGCTGAAAAAAGTGC TCAAGTGTAATACCCCCGACCCAAGCAAGTTCTTCTC CCAGCTTTCTTCAGAGCATGGAGGCGATGTGCAGAAA TGGCTCTCTTCACCTTTTCCCTCCTCAAGTTTCTCCCC GGGAGGGCTGGCGCCCGAGATTTACCTCTTGAGGT ACTTGAACGAGACAAGGTTACCCAACCTCTCCTTCAA CAGGATAAGGTACCCGAACCTGCGAGCCTTAGCTCCA ACCACTCTCTTACGAGCTGCTTCACCAATCAGGGATA CTTCTTTTCCACCTTCCCGATGCGCTGGAAATCGAA GCATGTCAAGTTTACTTTACCTATGATCCATATAGCGAG GAAGATCCCGACGAAGGAGTCGCCGGTGCGCCAC GGGTTCTCACCCEAACCTCTCCAGCCTCTCTCAGG AGAAGATGATGCTTATTGCACTTTTCCCAGTAGAGACG ATCTCCTCCTCTTTTCTCCATCTCTTTGGGGGGACCT TCCCCCCTTCTACGGCACCTGGCGGGTCTGGTGCT GGCGAGGAGCGGATGCCGCCGTCCCTCCAGGAGCG AGTACCACGAGATTGGGATCCCCAGCCACTTGGACCA CCAATCCAGGCGTACCTGACCTTGTCGATTTTCAAC CTCCCCCTGAATTGGTGCTGCGAGAGGCTGGGGAGG AAGTTCCGGACGCTGGGCCGAGGGAGGGCGTGTCC TTTCCATGGAGTAGGCCTCCAGGTCAAGGCGAGTTTA GGGCTCTCAACGCGCGGCTGCCGTTGAATACAGACG CTTATCTCTCACTGCAGGAAGTCAAGGTCAGGACCC AACACATCTTGTA	82

10

20

30

40

50

CISC 構成要素	ドメイン名または配列名	ヌクレオチド配列	配列番号
	FKBP-IL2Rg (全長)	GAGATGTGGCACGAGGGCCTGGAGGAGGCCAGCAG GCTGTATTTTGGCGAGCGCAACGTGAAGGGCATGTTT GAGGTGCTGGAGCCTCTGCACGCCATGATGGAGAGA GGCCACAGACCCTGAAGGAGACATCCTTTAACCAG GCCTATGGACGGGACCTGATGGAGGCACAGGAGTGG TGCAGAAAGTACATGAAGTCTGGCAATGTGAAGGACC TGACGCAGGCCTGGGATCTGTACTATCACGTGTTTCG GAGAATCTCCAAGGGCAAAGACACGATTCCGTGGCTT GGGCATCTGCTCGTTGGGCTGAGTGGTGCGTTTGGT TTCATCATCTTGGTCTATCTCTTGATCAATTGCAGAAAT ACAGGCCCTTGGCTGAAAAAAGTGCTCAAGTGTAATA CCCCCGACCCAAGCAAGTTCTTCTCCAGCTTTCTTC AGAGCATGGAGGCGATGTGCAGAAATGGCTCTCTTCA CCTTTTCCCTCCTCAAGTTTCTCCCCGGGAGGGCTG GCGCCCGAGATTTACCTCTTGAGGTACTTGAACGAG ACAAGGTTACCCAACCTTCTCCTTCAACAGGATAAGGTA CCCGAACCTGCGAGCCTTAGCTCCAACCACTCTCTTA CGAGCTGCTTCACCAATCAGGGATACTTCTTTTCCAC CTTCCCGATGCGCTGGAATCGAAGCATGTCAAGTTT ACTTTACCTATGATCCATATAGCGAGGAAGATCCCGAC GAAGGAGTCGCCGGTGCGCCACGGGTTCTCACC CCAACCTCTCCAGCCTCTCTCAGGAGAAGATGATGCT TATTGCACTTTTCCCAGTAGAGACGATCTCCTCCTCTT TTCTCCATCTCTTTTGGGGGGACCTTCCCCCCTTCT ACGGCACCTGGCGGGTCTGGTGCTGGCGAGGAGCG GATGCCGCCGTCCCTCCAGGAGCGAGTACCACGAGA TTGGGATCCCCAGCCACTTGGACCACCAACTCCAGG CGTACCTGACCTTGTCGATTTTCAACCTCCCCCTGAAT TGGTGCTGCGAGAGGCTGGGGAGGAAGTTCCGGAC GCTGGGCCGAGGGAGGGCGTGTCTTTCCATGGAGT AGGCCTCCAGGTCAAGGCGAGTTTAGGGCTCTCAAC GCGCGGCTGCCGTTGAATACAGACGCTTATCTCTCAC TGCAGGAAGTGAAGGTGAGGACCAACACATCTTGT A	83
細胞質ゾル内 FRB ドメイン	細胞質ゾル内 FRB ドメイン	GAAATGTGGCACGAAGGACTCGAGGAAGCCAGTCGG CTGTATTTTGGCGAGCGGAATGTGAAAGGGATGTTTG AAGTGCTCGAGCCTCTCCACGCTATGATGGAACGGG GACCCAGACTCTCAAAGAAACCAGCTTTAATCAGGC TTACGGACGCGACCTCATGGAAGCTCAAGAATGGTGT AGAAAGTATATGAAGAGTGGCAACGTGAAAGATCTGA CACAAGCCTGGGATCTCTATTATCACGTGTTACAGACG CATCAGCAAA	84

10

20

30

40

50

【表 1 4】

表 5: TRAC 座位への挿入用の核酸の例

核酸 No.	コードされている配列名	ヌクレオチド配列	配列番号
T1D2_v1	5' 相同アーム	CCTATTAATAAAAGAATAAGCAGTATTATTAAGTAGCCCTGCA TTTCAGGTTTCCTTGAGTGGCAGGCCAGGCCTGGCCGTGA ACGTTCACTGAAATCATGGCCTCTTGGCCAAGATTGATAGCT TGTGCCCTGTCCCTGAGTCCCAGTCCATCACGAGCAGCTGGT TTCTAAGATGCTATTTCCCGTATAAAGCATGAGACCGTGACTT GCCAGCCCCACAGAGCCCCGCCCTTGTCCATCACTGGCAT CTGGACTCCAGCCTGGGTTGGGGCAAAGAGGGAAATGAGA TCATGTCTAACCCCTGATCCTCTTGTCCACAGATATCCAGA ACCCTGACCCTGCC	85
	介在配列	TA	
	MND プロモーター	GAACAGAGAAACAGGAGAATATGGGCCAAACAGGATATCTG TGGTAAGCAGTTCTGCCCGGCTCAGGGCCAAGAACAGT TGGAACAGCAGAATATGGGCCAAACAGGATATCTGTGGTAA GCAGTTCTGCCCGGCTCAGGGCCAAGAACAGATGGTCC CCAGATGCGGTCCC GCCCTCAGCAGTTTCTAGAGAACCATC AGATGTTTCCAGGGTGCCCCAAGGACCTGAAATGACCCTGT GCCTTATTTGAACTAACCAATCAGTTCGCTTCTCGCTTCTGTT CGCGCGCTTCTGCTCCCCGAGCTCTATATAAGCAGAGCTCG TTAGTGAACCGTCAGATC	86
	介在配列 (FKBP- IL2Rg の LCN2 シ グナルペプチド に下線を引いて いる	GCCTGGAGACGCCATCCACGCTGTTTTGACTTCCATAGAAG GATCTCGCCGCCACCATGCCTCTGGGCCTGCTGTGGCTGG <u>GCCTGGCCCTGCTGGGCGCCCTGCACGCCCAGGCC</u>	87
	FKBP-IL2Rg	GGCGTGCAAGGTGGAGACAATCTCCCCAGGCGACGGACGCA CATTCCCTAAGCGGGGCCAGACCTGCGTGGTGCACTATACA GGCATGCTGGAGGATGGCAAGAAGTTTGACAGCTCCCGGG ATAGAAACAAGCCATTCAAGTTTATGCTGGGCAAGCAGGAAG TGATCAGAGGCTGGGAGGAGGGCGTGGCCCAGATGTCTGT GGGCCAGAGGGCCAAGCTGACCATCAGCCCAGACTACGCC TATGGAGCAACAGGCCACCCAGGAATCATCCACCTCACGC CACCCCTGGTGTTGATGTGGAGCTGCTGAAGCTGGGCGAG GGATCCAACACATCAAAAGAGAACCCCTTTCTGTTGCGATTG GAGGCCGTAGTCATATCTGTTGGATCCATGGGACTTATTATCT CCCTGTTGTGTGTACTTCTGGCTGGAACGGAATATGCCC AGGATCCCCACGCTCAAGAATCTGGAAGATCTCGTCACAGA ATACCATGGTAATTTAGCGCCTGGAGCGGAGTCTCTAAGG GTCTGGCCGAATCCCTCCAACCCGATTATTCTGAACGGTTGT GCCTCGTATCCGAAATACCACCAAAGGCGGGGCTCTGGGT GAGGGCCCAGGGGCGAGTCCGTGCAATCAACACAGCCCGT ATTGGGCCCCCTCCTTGTATACGTTGAAGCCCGAAACT	88
	GSG リンカー	GGATCCGGC	

10

20

30

40

50

核酸 No.	コードされている配列名	ヌクレオチド配列	配列番号
	T2A	GAGGGCAGAGGAAGTCTGCTAACATGCGGTGACGTCGAGGAGAATCCTGGACCT	89
	T1D2 TCRβ	ATGAGCATCAGCCTCCTGTGCTGTGCAGCCTTTCCTCTCCTGTGGGCAGGTCCAGTGAATGCTGGTGTCACTCAGACCCCAAAATCCGCATCCTGAAGATAGGACAGAGCATGACACTGCA GTGTACCCAGGATATGAACCATAACTACATGTACTGGTATCGA CAAGACCCAGGCATGGGGCTGAAGCTGATTTATTATTCAGTT GGTGCTGGTATCACTGATAAAGGAGAAGTCCCGAATGGCTA CAACGTCTCCAGATCAACCACAGAGGATTTCCCGCTCAGGC TGGAGTTGGCTGCTCCCTCCCAGACATCTGTGTACTTCTGT GCCAGCAGTCCGTGGGGGGCAGGCGGCACAGATACGCAGT ATTTTGGCCCAGGCACCCGGCTGACAGTGCTCGAGGACCT TAAGAATGTGTTCCCTCCCGAGGTGGCTGTCTTGAACCAA GCGAAGCCGAGATCTCTCACACACAAAAGGCTACTCTCGTG TGTCTGGCAACGGGTTTTTACCCTGATCATGTAGAGTTGTCT TGGTGGGTAAACGGCAAAGAAGTACACTCCGGTGTAAAGCAC CGATCCTCAGCCACTTAAGGAACAACCCGCACTCAACGACT CCAGATACTGTTTGAGTTCTAGGCTGAGAGTCTCAGCGACG TTTTGGCAGAACCCACGGAATCATTTAGATGTCAGGTCCA GTTTTACGGGTTGAGCGAGAACGACGAGTGGACACAGGATC GGGCTAAACCAAGTGACCCAGATTGTATCAGCCGAAGCATGG GGAAGGGCAGATTGCGGCTTTACCTCAGAGTCATATCAACA GGGCGTTTTGTCTGCAACAATCCTTTATGAGATCCTGCTTGG TAAGGCGACTCTGTATGCCGTGCTTGTAGTGCCCTGGTTCT GATGGCAATGGTAAAAAGAAAGGACTCTAGGGGA	90
	GSG リンカー	GGTTCTGGC	
	P2A	GCTACTAACTTCAGCCTGCTGAAGCAGGCTGGAGACGTGGA GGAGAACCCTGGACCT	91
	T1D2 TCR α V α ドメインと C ドメインの一部	ATGGCCATGCTCCTGGGGGCATCAGTGCTGATTCTGTGGCT TCAGCCAGACTGGGTAAACAGTCAACAGAAGAATGATGACC AGCAAGTTAAGCAAAATTCACCATCCCTGAGCGTCCAGGAA GGAAGAATTTCTATTCTGAAGTGTACTATACTAACAGCATGT TTGATTATTTCTATGGTACAAAAATACCCTGCTGAAGGTCC TACATTCTGATATCTATAAGTTCCATTAAGGATAAAATGAAG ATGGAAGATTCACTGTCTTCTTAAACAAAAGTGCCAAGCACC TCTCTGTCACATTGTGCCCTCCCAGCCTGGAGACTCTGCA GTGTACTTCTGTGCAGCAACCCGTACCTCAGGAACCTACAA ATACATCTTTGGAACAGGCACCAGGCTGAAGGTTTTAGCAAA TATCCAGAACCCTGACCTGCAGTATAT	92
	3' 相同アーム	CAGCTGAGAGACTCTAAATCCAGTGACAAGTCTGTCTGCCT ATTCACCGATTTTGATTCTCAACAAATGTGTACAAAGTAAG GATTCTGATGTGTATATCACAGACAAAAGTGTCTAGACATGA GGTCTATGGACTTCAAGAGCAACAGTGCTGTGGCCTGGAGC AACAAATCTGACTTTGCATGTGCAACGCCTTCAACAACAGC ATTATCCAGAAGACACCTTCTTCCCAGCCCAGGTAAGGG CAGCTTTGGTGCCTTCGAGGCTGTTTCCCTTGCTTCAGGAA	93

10

20

30

40

40

核酸 No.	コードされている配列名	ヌクレオチド配列	配列番号
		CAGATTGCGGCTTTACCTCAGAGTCATATCAACAGGGCGTTT TGTCTGCAACAATCCTTTATGAGATCCTGCTTGGTAAGGCGA CTCTGTATGCCGTGCTTGTAGTGCCCTGGTTCTGATGGCAA TGGTAAAAAGAAAGGACTCTAGGGGAGGTTCTGGCGCTACT AACTTCAGCCTGCTGAAGCAGGCTGGAGACGTGGAGGAGA ACCCTGGACCTATGGCCATGCTCCTGGGGGCATCAGTGCTG ATTCTGTGGCTTCAGCCAGACTGGGTAAACAGTCAACAGAA GAATGATGACCAGCAAGTTAAGCAAAATTCACCATCCCTGAG CGTCCAGGAAGGAAGAATTTCTATTCTGAAGTGTGACTATAC TAACAGCATGTTTGATTATTTCTATGGTACAAAAAATACCCT GCTGAAGGTCCTACATTCTGATATCTATAAGTTCCATTAAGG ATAAAATGAAGATGGAAGATTCAGTGTCTTTAAACAAAAG TGCCAAGCACCTCTCTGACATTGTGCCCTCCCAGCCTG GAGACTCTGCAGTGACTTCTGTGCAGCAACCCGTACCTCA GGAACCTACAAATACATCTTTGGAACAGGCACCAGGCTGAA GGTTTTAGCAAAATATCCAGAACCCTGACCCTGCAGTATAT	10
	全長ドナー鑄型	CCTATTAAATAAAAGAATAAGCAGTATTATTAAGTAGCCCTGCA TTTCAGGTTTCCTTGAGTGGCAGGCCAGGCCTGGCCGTGA ACGTTCACTGAAATCATGGCCTCTTGGCCAAGATTGATAGCT TGTGCCGTGTCCCTGAGTCCCAGTCCATCACGAGCAGCTGGT TTCTAAGATGCTATTTCCCGTATAAAGCATGAGACCGTGACTT GCCAGCCCCACAGAGCCCCGCCCTTGTCCATCACTGGCAT CTGGACTCCAGCCTGGGTTGGGGCAAAGAGGGAAATGAGA TCATGTCCTAACCCCTGATCCTCTTGTCCCACAGATATCCAGA ACCCCTGACCCTGCCTAGAACAGAGAAACAGGAGAATATGGG CCAAACAGGATATCTGTGGTAAGCAGTTCTGCCCCGGCTC AGGGCCAAGAACAGTTGGAACAGCAGAATATGGGCCAAACA GGATATCTGTGGTAAGCAGTTCTGCCCCGGCTCAGGGCCA AGAACAGATGGTCCCCAGATGCGGTCCCCGCCCTCAGCAGTT TCTAGAGAACCATCAGATGTTTCCAGGGTGCCCCAAGGACC TGAAATGACCCTGTGCCCTTATTTGAACTAACCAATCAGTTCT CTTCTCGCTTCTGTTGCGCGCTTCTGCTCCCCGAGCTCTA TATAAGCAGAGCTCGTTTAGTGAACCGTCAGATCGCCTGGA GACGCCATCCACGCTGTTTTGACTTCCATAGAAGGATCTCG CCGCCACCATGCCTCTGGGCCTGCTGTGGCTGGGCCTGGC CCTGCTGGGCGCCCTGCACGCCCAGGCCGGCTGCAGGT GGAGACAATCTCCCCAGGCGACGGACGCACATTCCCTAAGC GGGGCCAGACCTGCGTGGTGCACTATACAGGCATGCTGGA GGATGGCAAGAAGTTTGACAGCTCCCGGGATAGAAACAAGC CATTCAAGTTTATGCTGGGCAAGCAGGAAGTGATCAGAGGC TGGGAGGAGGGCGTGCCCGAGATGTCTGTGGGCCAGAGG GCCAAGCTGACCATCAGCCAGACTACGCCTATGGAGCAAC AGGCCACCCAGGAATCATCCACCTCACGCCACCCTGGTGT TCGATGTGGAGCTGCTGAAGCTGGGCGAGGGATCCAACAC ATCAAAGAGAACCCTTTCTGTTGCGATTGGAGGCCGTAG TCATATCTGTTGGATCCATGGGACTTATTATCTCCCTGTTGTG TGTGTACTTCTGGCTGGAACGGACTATGCCCAGGATCCCCA CGCTCAAGAATCTGGAAGATCTCGTCACAGAATACCATGGTA ATTTACGCGCTGGAGCGGAGTCTTAAGGTCTGGCCGAA TCCCTCCAACCCGATTATTCTGAACGGTTGTGCCCTCGTATCC GAAATACCACCAAAAGGCGGGGCTCTGGGTGAGGGCCAG GGGCGAGTCCGTGCAATCAACACAGCCCGTATTGGGCCCC TCCTTGTTATACGTTGAAGCCCGAACTGGATCCGGCGAGG	95

10

20

30

40

40

核酸 No.	コードされている配列名	ヌクレオチド配列	配列番号
		CGTATAAAGCATGAGACCGTGACTTGCCAGCCCCACAGAGC CCCCCCCTTGTCCCACTGGCATCTGGACTCCAGCCTGGG TTGGGGCAAAGAGGGAAATGAGATCATGCTCAACCCTGAT CCTCTTGTCCCACAGATATCCAGAACCCCTGACCCTGCCGTG	
	介在配列	TAGCAGCTTAGATAC	97
	MND プロモーター	GAACAGAGAAACAGGAGAATATGGGCCAAACAGGATATCTG TGGTAAGCAGTTCTGCCCCGGCTCAGGGCCAAGAACAGT TGGAACAGCAGAATATGGGCCAAACAGGATATCTGTGGTAA GCAGTTCTGCCCCGGCTCAGGGCCAAGAACAGATGGTCC CCAGATGCGGTCCC GCCCTCAGCAGTTTCTAGAGAACCATC AGATGTTTCCAGGGTGCCCCAAGGACCTGAAATGACCCTGT GCCTTATTTGAACTAACCAATCAGTTTCGCTTCTCGCTTCTGTT CGCGCGCTTCTGCTCCCCGAGCTCTATATAAGCAGAGCTCG TTTAGTGAACCGTCAGATC	98
	介在配列 (FKBP- IL2Rg の LCN2 シ グナルペプチド に下線を引いて いる	GCCTGGAGACGCCATCCACGCTGTTTTGACTTCCATAGAAG GATCTCGCGCCACCATGCCTCTGGGCCTGCTGTGGCTGG <u>GCCTGGCCCTGCTGGGCGCCCTGCACGCCCAGGCC</u>	99
	FKBP-IL2Rg	GGCGTGAGGTGGAGACAATCTCCCCAGGCGACGGACGCA CATTCCCTAAGCGGGGCCAGACCTGCGTGGTGCACTATACA GGCATGCTGGAGGATGGCAAGAAGTTTGACAGCTCCCGGG ATAGAAACAAGCCATTCAAGTTTATGCTGGGCAAGCAGGAAG TGATCAGAGGCTGGGAGGAGGGCGTGGCCAGATGTCTGT GGCCAGAGGGCCAAGCTGACCATCAGCCCAGACTACGCC TATGGAGCAACAGGCCACCCAGGAATCATCCACCTCACGC CACCTGGTGTTTCGATGTGGAGCTGCTGAAGCTGGGCGAG GGATCCAACACATCAAAAGAGAACCCCTTTCTGTTTCGCATTG GAGGCCGTAGTCATATCTGTTGGATCCATGGGACTTATTATCT CCCTGTTGTGTGTACTTCTGGCTGGAACGGACTATGCCC AGGATCCCCACGCTCAAGAATCTGGAAGATCTCGTCACAGA ATACCATGGTAATTTACGCGCCTGGAGCGGAGTCTCTAAGG GTCTGGCCGAATCCCTCCAACCCGATTATTCTGAACGGTTGT GCCTCGTATCCGAAATACCAAAAAGGCGGGGCTCTGGGT GAGGGCCCAGGGGCGAGTCCGTGCAATCAACACAGCCCGT ATTGGGCCCTCCTTGTTATACGTTGAAGCCCAGAACT	100
	GSG リンカー	GGATCCGGC	
	T2A	GAGGGCAGAGGAAGTCTGCTAACATGCGGTGACGTCGAGG AGAACTCTGGACCT	101
	T1D2 TCRβ	ATGAGCATCAGCCTCCTGTGCTGTGCAGCCTTTCCTCTCCT GTGGGCAGGTCCAGTGAATGCTGGTGTCACTCAGACCCCA AAATCCGCATCCTGAAGATAGGACAGAGCATGACACTGCA GTGTACCCAGGATATGAACCATAACTACATGTACTGGTATCGA CAAGACCCAGGCATGGGGCTGAAGCTGATTATTATTCAGTT	102

10

20

30

40

50

核酸 No.	コードされている配列名	ヌクレオチド配列	配列番号
		GGTGCTGGTATCACTGATAAAGGAGAAGTCCCGAATGGCTA CAACGTCTCCAGATCAACCACAGAGGATTCCCGCTCAGGC TGGAGTTGGCTGCTCCCTCCCAGACATCTGTGACTTCTGT GCCAGCAGTCCGTGGGGGGCAGGCGGCACAGATACGCAGT ATTTTGGCCCAGGCACCCGGCTGACAGTGCTCGAGGACCT TAAGAATGTGTTCCCTCCCGAGGTGGCTGTCTTGAACCAA GCGAAGCCGAGATCTCTCACACACAAAAGGCTACTCTCGTG TGCTTGGAACGGGTTTTTACCCTGATCATGTAGAGTTGTCT TGGTGGGTAAACGGCAAAGAAGTACACTCCGGTGTAAGCAC CGATCCTCAGCCACTTAAGGAACAACCCGCACTCAACGACT CCAGATACTGTTTGAGTTCTAGGCTGAGAGTCTCAGCGACG TTTTGGCAGAACCCACGGAATCATTTAGATGTCAGGTCCA GTTTTACGGGTTGAGCGAGAACGACGAGTGGACACAGGATC GGGCTAAACCAGTGACCCAGATTGTATCAGCCGAAGCATGG GGAAGGGCAGATTGCGGCTTTACCTCAGAGTCATATCAACA GGGCGTTTTGTCTGCAACAATCCTTTATGAGATCCTGCTTGG TAAGGCGACTCTGTATGCCGTGCTTGTAGTGCCCTGGTTCT GATGGCAATGGTAAAAAGAAAGGACTCTAGGGGA	
	GSG リンカー	GGTTCCTGGC	
	P2A	GCTACTAACTTCAGCCTGCTGAAGCAGGCTGGAGACGTGGA GGAGAACCCCTGGACCT	103
	T1D2 TCRαVα ドメインと C ドメインの一部	ATGGCCATGCTCCTGGGGGCATCAGTGCTGATTCTGTGGCT TCAGCCAGACTGGGTAAACAGTCAACAGAAGAATGATGACC AGCAAGTTAAGCAAAATTCACCATCCCTGAGCGTCCAGGAA GGAAGAATTTCTATTCTGAACTGTGACTATACTAACAGCATGT TTGATTATTTCTATGGTACAAAAATACCCTGCTGAAGGTCC TACATTCTGATATCTATAAGTTCCATTAAAGGATAAAAATGAAG ATGGAAGATTCACTGTCTTCTTAAACAAAAGTGCCAAGCACCC TCTCTCTGCACATTGTGCCCTCCCAGCCTGGAGACTCTGCA GTGTACTTCTGTGCAGCAACCCGTACCTCAGGAACCTACAA ATACATCTTTGGAACAGGCACCAGGCTGAAGGTTTTAGCAAA TATCCAGAACCCCTGACCCTGCAGTATATCAGCTGAGAGAC	104
	3' 相同アーム	TCTAAATCCAGTGACAAGTCTGTCTGCCTATTCACCGATTTT GATTCTCAAACAAATGTGTACAAAGTAAGGATTCTGATGTG TATATCACAGACAAAATGTGCTAGACATGAGGTCTATGGAC TTCAAGAGCAACAGTGCTGTGGCCTGGAGCAACAAATCTGA CTTTGCATGTGCAACGCTTCAACAACAGCATTATTCCAGA AGACACCTTCTCCCCAGCCCAGGTAAGGGCAGCTTTGGTG CCTTCGCAGGCTGTTTCTTCTTCTCAGGAATGGCCAGGTTT TGCCAGAGCTCTGGTCAATGATGTCTAAACTCCTCTGATT GGTGGTCTCGGCCTTATCCATTGCCACCAAAACCCTCTTTT ACTAAGAAACAGTGAGCCTTGTCTGGCAGTCCAGAGAATG ACACGGGAAAAAAGCAGATGAAGAGAAGGTGGCAGGAGAG GGCACGTGGCCCAGCCTCAGTCTCTCCAAGTGAAGTTCTG CCTG	105

10

20

30

40

50

核酸 No.	コードされている配列名	ヌクレオチド配列	配列番号
	相同アームの間	TAGCAGCTTAGATACGAACAGAGAAACAGGAGAATATGGGC CAAACAGGATATCTGTGTAAGCAGTTCTGCCCCGGCTCA GGGCCAAGAACAGTTGGAACAGCAGAATATGGGCCAAACAG GATATCTGTGTAAGCAGTTCTGCCCCGGCTCAGGGCCAA GAACAGATGGTCCCCAGATGCGGTCCCGCCCTCAGCAGTTT CTAGAGAACCATCAGATGTTTCCAGGGTGCCCCAAGGACCT GAAATGACCCTGTGCCTTATTTGAACTAACCAATCAGTTCGC TTCTCGCTTCTGTTGCGCGCTTCTGCTCCCCGAGCTCTATA TAAGCAGAGCTCGTTTAGTGAACCGTCAGATCGCTGGAGA CGCCATCCACGCTGTTTTGACTTCCATAGAAGGATCTCGCC GCCACCATGCCTCTGGGCCTGCTGTGGCTGGGCCTGGCCC TGCTGGGCGCCCTGCACGCCCAGGCCGGCGTGCAGGTGG AGACAATCTCCCCAGGCGACGGACGCACATTCCTAAGCGG GGCCAGACCTGCGTGGTGCACTATACAGGCATGCTGGAGG ATGGCAAGAAGTTTGACAGCTCCCGGGATAGAAACAAGCCA TTCAAGTTTATGCTGGGCAAGCAGGAAGTGATCAGAGGCTG GGAGGAGGGCGTGGCCAGATGTCTGTGGGCCAGAGGGC CAAGCTGACCATCAGCCCAGACTACGCCTATGGAGCAACAG GCCACCCAGGAATCATCCACCTCACGCCACCTGGTGTTC GATGTGGAGCTGCTGAAGCTGGGCGAGGGATCCAACACAT CAAAAGAGAACCCCTTTCTGTTGCGATTGGAGGCCGTAGTC ATATCTGTTGGATCCATGGGACTTATTATCTCCCTGTTGTG TGTACTTCTGGCTGGAACGGACTATGCCCAGGATCCCCACG CTCAAGAATCTGGAAGATCTCGTCACAGAATACCATGGAAT TTCAGCGCTGGAGCGGAGTCTCTAAGGGTCTGGCCGAAT CCCTCCAACCCGATTATTCTGAACGGTTGTGCCTCGTATCCG AAATACCACCAAAAGCGGGGCTCTGGGTGAGGGCCAGG GGCAGTCCGTGCAATCAACACAGCCCGTATTGGGCCCTC CTTGTTATACGTTGAAGCCCGAAACTGGATCCGGCGAGGGC AGAGGAAGTCTGCTAACATGCGGTGACGTCGAGGAGAATCC TGGACCTATGAGCATCAGCCTCCTGTGCTGTGCAGCCTTTC CTCTCCTGTGGGCAGGTCCAGTGAATGCTGGTGTCACTCAG ACCCCAAAATTCCGCATCCTGAAGTAGGACAGAGCATGAC ACTGCAGTGTACCCAGGATATGAACCATACTACATGTA GTATCGACAAGACCCAGGCATGGGGCTGAAGCTGATTATTA TTCAGTTGGTGCTGGTATCACTGATAAAGGAGAAGTCCCGA ATGGCTACAACGTCTCCAGATCAACCACAGAGGATTTCCCG CTCAGGCTGGAGTTGGCTGCTCCCTCCCAGACATCTGTGTA CTTCTGTGCCAGCAGTCCGTGGGGGGCAGGCGGCACAGAT ACGCAGTATTTTGGCCCAGGCACCCGGCTGACAGTGCTCGA GGACCTTAAGAATGTGTTCCCTCCCGAGGTGGCTGTCTTCG AACCAAGCGAAGCCGAGATCTCTCACACAAAAGGCTACT CTCGTGTGCTGGCAACGGGTTTTTACCCTGATCATGTAGAG TTGTCTTGGTGGGTTAACGGCAAAGAAGTACACTCCGGTGT AAGCACCGATCCTCAGCCACTTAAGGAACAACCCGCACTCA ACGACTCCAGATACTGTTTGAGTTCTAGGCTGAGAGTCTCA GCGACGTTTTTGGCAGAACCCACGGAATCATTTCAGATGTCA GGTCAGTTTTACGGGTTGAGCGAGAACGACGAGTGGACA CAGGATCGGGCTAAACCAGTGACCCAGATTGTATCAGCCGA AGCATGGGGAAGGGCAGATTGCGGCTTACCTCAGAGTCAT ATCAACAGGGCGTTTTGTCTGCAACAATCCTTTATGAGATCC TGCTTGGTAAGGCGACTCTGTATGCCGTGCTTGTAGTGCC CTGGTTCTGATGGCAATGGTAAAAAGAAAGGACTCTAGGGG	10 20 106 30 40

10

20

30

40

核酸 No.	コードされている配列名	ヌクレオチド配列	配列番号
		AGGTTCTGGCGCTACTAACTTCAGCCTGCTGAAGCAGGCTG GAGACGTGGAGGAGAACCCTGGACCTATGGCCATGCTCCT GGGGGCATCAGTGCTGATTCTGTGGCTTCAGCCAGACTGG GTAAACAGTCAACAGAAGAATGATGACCAGCAAGTTAAGCAA AATTCACCATCCCTGAGCGTCCAGGAAGGAAGAATTTCTATT CTGAACTGTGACTATACTAACAGCATGTTTGATTATTTCTAT GGTACAAAAATACCCTGCTGAAGGTCCTACATTCTGATAT CTATAAGTTCCATTAAGGATAAAAAATGAAGATGGAAGATTCAC TGCTTTCTTAAACAAAAGTGCCAAGCACCTCTCTCTGCACAT TGTGCCCTCCAGCCTGGAGACTCTGCAGTGACTTCTGTG CAGCAACCCGTACCTCAGGAACCTACAAATACATCTTTGGAA CAGGCACCAGGCTGAAGGTTTTAGCAAATATCCAGAACCCT GACCTGCAGTATATCAGCTGAGAGAC	10
	全長ドナー鑄型	AACATACCATAAACCTCCCATTCTGCTAATGCCAGCCTAAGT TGGGGAGACCACTCCAGATTCCAAGATGTACAGTTTGCTTT GCTGGGCCTTTTTCCCATGCCTGCCTTTACTCTGCCAGAGTT ATATTGCTGGGGTTTTGAAGAAGATCCTATTAATAAAAGAAT AAGCAGTATTATTAAGTAGCCCTGCATTTCAAGTTTCCTTGAG TGGCAGGCCAGGCCTGGCCGTGAACGTTCACTGAAATCATG GCCTCTTGGCCAAGATTGATAGCTTGTGCCTGTCCCTGAGT CCAGTCCATCACGAGCAGCTGGTTTCTAAGATGCTATTTCC CGTATAAAGCATGAGACCGTGACTTGCCAGCCCCACAGAGC CCCGCCTTGTCCATCACTGGCATCTGGACTCCAGCCTGGG TTGGGGCAAAGAGGGAAATGAGATCATGCTCAACCTGAT CCTCTTGTCCACAGATATCCAGAACCCTGACCTGCGCTG TAGCAGCTTAGATACGAACAGAGAAACAGGAGAATATGGGC CAAACAGGATATCTGTGGTAAGCAGTTCCTGCCCCGGCTCA GGGCAAGAACAGTTGGAACAGCAGAATATGGGCAAAACAG GATATCTGTGGTAAGCAGTTCCTGCCCCGGCTCAGGGCCAA GAACAGATGGTCCCCAGATGCGGTCCCGCCCTCAGCAGTTT CTAGAGAACCATCAGATGTTTCCAGGGTGCCCCAAGGACCT GAAATGACCCTGTGCCTTATTTGAACTAACCAATCAGTTCGC TTCTCGTTCTGTTCGCGCGCTTCTGCTCCCCGAGCTCTATA TAAGCAGAGCTCGTTTAGTGAACCGTCAGATCGCCTGGAGA CGCCATCCACGCTGTTTGACTTCCATAGAAGGATCTCGCC GCCACCATGCCTCTGGGCCTGCTGTGGCTGGGCCTGGCCC TGCTGGGCGCCCTGCACGCCAGGCCGGCGTGCAGGTGG AGACAATCTCCCCAGGCGACGGACGCACATTCCCTAAGCGG GGCCAGACCTGCGTGGTGACTATACAGGCATGCTGGAGG ATGGCAAGAAAGTTTGACAGCTCCCGGGATAGAAACAAGCCA TTCAAGTTTATGCTGGGCAAGCAGGAAGTGATCAGAGGCTG GGAGGAGGGCGTGGCCAGATGTCTGTGGCCAGAGGGC CAAGCTGACCATCAGCCCAGACTACGCCTATGGAGCAACAG GCCACCCAGGAATCATCCACCTCACGCCACCCTGGTGTTT GATGTGGAGCTGCTGAAGCTGGGCGAGGGATCCAACACAT CAAAAGAGAACCCCTTTCTGTTGCGATTGGAGGCCGTAGTC ATATCTGTTGGATCCATGGGACTTATTATCTCCCTGTTGTGTG TGTAATTCTGGCTGGAACGGAATATGCCAGGATCCCCACG CTCAAGAATCTGGAAGATCTCGTCACAGAATACCATGGTAAT TTCAGCGCCTGGAGCGGAGTCTTAAGGGTCTGGCCGAAT CCCTCCAACCCGATTATTCTGAACGGTTGTGCCTCGTATCCG AAATACCACAAAAGCGGGGCTCTGGGTGAGGGCCAGG GGCGAGTCCGTGCAATCAACACAGCCCGTATTGGGCCCCTC	107

10

20

30

40

50

40

核酸 No.	コードされている配列名	ヌクレオチド配列	配列番号
T1D2_v3	5' 相同アーム	AGCAATCTCCTGGTAATGTGATAGATTTCCCAACTTAATGCCA ACATACCATAAACCTCCCATTCTGCTAATGCCAGCCTAAGTT GGGGAGACCACTCCAGATTCCAAGATGTACAGTTTGCTTTG CTGGGCCTTTTTCCCATGCCCTGCCCTTACTCTGCCAGAGTTA TATTGCTGGGGTTTTGAAGAAGATCCTATTAAATAAAAGAATA AGCAGTATTATTAAGTAGCCCTGCATTTTCAGGTTTCCTTGAGT GGCAGGCCAGGCCTGGCCGTGAACGTTCACTGAAATCATG GCCTCTTGGCCAAGATTGATAGCTTGTGCCTGTCCCTGAGT CCCAGTCCATCACGAGCAGCTGGTTTCTAAGATGCTATTTCC CGTATAAAGCATGAGACCGTGACTTGCCAGCCCCACAGAGC CCCGCCCTTGTCCATCACTGGCATCTGGACTCCAGCCTGGG TTGGGGCAAAGAGGGAAATGAGATCATGTCCTAACCTGA	108
	介在配列	TA	
	MND プロモーター	GAACAGAGAAACAGGAGAATATGGGCCAAACAGGATATCTG TGGAAGCAGTTCTGCCCGGGCTCAGGGCCAAGAACAGT TGGAACAGCAGAATATGGGCCAAACAGGATATCTGTGGTAA GCAGTTCCTGCCCGGGCTCAGGGCCAAGAACAGATGGTCC CCAGATGCGGTCCCGCCCTCAGCAGTTTCTAGAGAACCATC AGATGTTTCCAGGGTGCCCCAAGGACCTGAAATGACCCTGT GCCTTATTTGAACTAACCAATCAGTTCGCTTCTCGCTTCTGTT CGCGCGCTTCTGCTCCCCGAGCTCTATATAAGCAGAGCTCG TTAGTGAACCGTCAGATC	109
	介在配列 (FKBP- IL2Rg の LCN2 シ グナルペプチド に下線を引いて いる)	GCCTGGAGACGCCATCCACGCTGTTTTGACTTCCATAGAAG GATCTCGCCGCCACCATGCCTCTGGGCCTGCTGTGGCTGG <u>GCCTGGCCCTGCTGGGCGCCCTGCACGCCCAGGCC</u>	110
	FKBP-IL2Rg	GGCGTGCAAGTGGAGACAATCTCCCCAGGCGACGGACGCA CATTCCCTAAGCGGGGCCAGACCTGCGTGGTGCACTATACA GGCATGCTGGAGGATGGCAAGAAGTTTGACAGCTCCCGGG ATAGAAACAAGCCATTCAAGTTTATGCTGGGCAAGCAGGAAG TGATCAGAGGCTGGGAGGAGGGCGTGGCCAGATGTCTGT GGGCCAGAGGGCCAAGCTGACCATCAGCCCAGACTACGCC TATGGAGCAACAGGCCACCCAGGAATCATCCACCTCACGC CACCTGGTGTTTCGATGTGGAGCTGCTGAAGCTGGGCGAG GGATCCAACACATCAAAAGAGAACCCTTTCTGTTGCGATTG GAGGCCGTAGTCATATCTGTTGGATCCATGGGACTTATTATCT CCCTGTTGTGTGTACTTCTGGCTGGAACGGAATATGCC AGGATCCCCACGCTCAAGAATCTGGAAGATCTCGTCACAGA ATACCATGGTAATTTAGCGCCTGGAGCGGAGTCTCTAAGG GTCTGGCCGAATCCCTCCAACCCGATTATTCTGAACGTTGT GCCTCGTATCCGAAATACCACCAAAAGGCGGGGCTCTGGGT GAGGGCCCAGGGGCGAGTCCGTGCAATCAACACAGCCCGT ATTGGGCCCTCCTTGTATACGTTGAAGCCCGAACT	111
	GSG リンカー	GGATCCGGC	

10

20

30

40

50

核酸 No.	コードされている配列名	ヌクレオチド配列	配列番号
	T2A	GAGGGCAGAGGAAGTCTGCTAACATGCGGTGACGTGAGG AGAATCCTGGACCT	112
	T1D2 TCRβ	ATGAGCATCAGCCTCCTGTGCTGTGCAGCCTTCCTCTCCT GTGGGCAGGTCCAGTGAATGCTGGTGTCACTCAGACCCCA AAATTCCGCATCCTGAAGATAGGACAGAGCATGACACTGCA GTGTACCCAGGATATGAACCATAACTACATGTAAGTATCGA CAAGACCCAGGCATGGGGCTGAAGCTGATTTATTATTAGTT GGTGTGGTATCACTGATAAAGGAGAAGTCCCGAATGGCTA CAACGTCTCCAGATCAACCACAGAGGATTTCCCGCTCAGGC TGGAGTTGGCTGCTCCCTCCAGACATCTGTGTACTTCTGT GCCAGCAGTCCGTGGGGGGCAGGCGGCACAGATACGCAGT ATTTTGGCCAGGCACCCGGCTGACAGTGTCTCGAGGACCT TAAGAATGTGTTCCCTCCCGAGGTGGCTGTCTTGAACCAA GCGAAGCCGAGATCTCTCACACACAAAAGGCTACTCTCGTG TGTCTGGCAACGGGTTTTTACCCTGATCATGTAGAGTTGTCT TGGTGGGTTAACGGCAAAGAAGTAACTCCGGTGAAGCAC CGATCTCAGCCACTTAAGGAACAACCCGCACTCAACGACT CCAGATACTGTTTGAGTTCTAGGCTGAGAGTCTCAGCGACG TTTTGGCAGAACCACGGAATCATTTAGATGTCAGGTCCA GTTTTACGGGTTGAGCGAGAACGACGAGTGGACACAGGATC GGGCTAAACAGTGACCCAGATTGTATCAGCCGAAGCATGG GGAAGGGCAGATTGCGGCTTTACCTCAGAGTCATATCAACA GGGCGTTTTGTCTGCAACAATCCTTTATGAGATCCTGCTTGG TAAGGCGACTCTGTATGCCGTGCTTGTAGTGCCCTGGTTCT GATGGCAATGGTAAAAAGAAAGGACTCTAGGGGA	113
	GSG リンカー	GGTTCTGGC	
	P2A	GCTACTAACTTCAGCCTGCTGAAGCAGGCTGGAGACGTGGA GGAGAACCCTGGACCT	114
	T1D2 TCRα Va ドメイン	ATGGCCATGCTCCTGGGGGCATCAGTGCTGATTCTGTGGCT TCAGCCAGACTGGGTAAACAGTCAACAGAAGAATGATGACC AGCAAGTTAAGCAAAATTCACCATCCCTGAGCGTCCAGGAA GGAAGAATTTCTATTCTGAAGTGTGACTATACTAACAGCATGT TTGATTATTTCCATGGTACAAAAATACCCTGCTGAAGGTCC TACATTCTGATATCTATAAGTTCCATTAAGGATAAAATGAAG ATGGAAGATTCACTGTCTTCTTAAACAAAAGTGCCAAGCACCC TCTCTCTGCACATTGTGCCCTCCAGCCTGGAGACTCTGCA GTGTACTTCTGTGCAGCAACCCGTACCTCAGGAACCTACAA ATACATCTTTGGAACAGGCACCAGGCTGAAGGTTTTAGCAA	115
	3' 相同アーム	ATATCCAGAACCCCTGACCCTGCCGTGTACCAGCTGAGAGAC TCTAAATCCAGTGACAAGTCTGTCTGCCTATTACCGATTTT GATTCTCAACAAATGTGTCACAAAGTAAGGATTCTGATGTG TATATCACAGACAAAATGTGCTAGACATGAGGTCTATGGAC TTCAAGAGCAACAGTGCTGTGGCCTGGAGCAACAAATCTGA CTTTGCATGTGCAACGCCTTCAACAACAGCATTATTCAGA AGACACCTTCTTCCCGAGCCAGGTAAGGGCAGCTTTGGTG CCTTCGAGGCTGTTTCCTTGCTTCAGGAATGGCCAGGTTC	116

10

20

30

40

50

核酸 No.	コードされている配列名	ヌクレオチド配列	配列番号
		TGCCCAGAGCTCTGGTCAATGATGTCTAAACTCCTCTGATT GGTGGTCTCGGCCTTATCCATTGCCACCAAACCCTCTTTTT ACTAAGAAACAGTGAGCCTTGTTCTGGCAGTCCAGAGAATG ACACGGGAAAAAGCAGATGAAGAGAAGGTGGCAGGAGAG GGC	
	相同アームの間	TAGAACAGAGAAACAGGAGAATATGGGCCAAACAGGATATCT GTGGTAAGCAGTTCTGCCCGGCTCAGGGCCAAGAACAG TTGGAACAGCAGAATATGGGCCAAACAGGATATCTGTGGTAA GCAGTTCTGCCCGGCTCAGGGCCAAGAACAGATGGTCC CCAGATGCGGTCCCGCCCTCAGCAGTTTCTAGAGAACCATC AGATGTTTCCAGGGTGCCCAAGGACCTGAAATGACCCTGT GCCTTATTTGAACTAACCAATCAGTTCGCTTCTCGCTTCTGTT CGCGCGCTTCTGCTCCCGAGCTCTATATAAGCAGAGCTCG TTAGTGAAACCGTCAGATCGCCTGGAGACGCCATCCACGCT GTTTTGACTTCCATAGAAGGATCTCGCCGCCACCATGCCTCT GGGCCTGCTGTGGCTGGGCCTGGCCCTGCTGGGCGCCCT GCACGCCCAGGCCGGCGTGACAGGTGGAGACAATCTCCCA GGCAGCGGACGCACATTCCTAAGCGGGGCCAGACCTGCG TGGTGCACTATACAGGCATGCTGGAGGATGGCAAGAAGTTT GACAGCTCCCGGGATAGAAACAAGCCATTCAAGTTTATGCTG GGCAAGCAGGAAGTGATCAGAGGCTGGGAGGAGGGCGTG GCCAGATGTCTGTGGGCCAGAGGGCCAAGCTGACCATCA GCCAGACTACGCCTATGGAGCAACAGGCCACCCAGGAATC ATCCACCTCACGCCACCCTGGTGTTCGATGTGGAGCTGCT GAAGCTGGGCGAGGGATCCAACACATCAAAAGAGAACCCT TTCTGTTGCGATTGGAGGCCGTAGTCATATCTGTTGGATCCA TGGGACTTATTATCTCCCTGTTGTGTGTACTTCTGGCTGG AACGGACTATGCCAGGATCCCCACGCTCAAGAATCTGGAA GATCTCGTCACAGAATACCATGGTAATTCAGCGCCTGGAGC GGAGTCTCTAAGGGTCTGGCCGAATCCCTCCAACCCGATTA TTCTGAACGGTTGTGCCTCGTATCCGAAATACCACCAAAAGG CGGGGCTCTGGGTGAGGGCCCAAGGGCGAGTCCGTGCAA TCAACACAGCCCGTATTGGGCCCTCCTTGTTATACGTTGAA GCCCGAAACTGGATCCGGCGAGGGCAGAGGAAGTCTGCTA ACATGCGGTGACGTCGAGGAGAATCCTGGACCTATGAGCAT CAGCCTCCTGTGCTGTGCAGCCTTCTCTCCTGTGGGCAG GTCCAGTGAATGCTGGTGTCACTCAGACCCCAAAATTCGCG ATCCTGAAGATAGGACAGAGCATGACACTGCAGTGATCCCA GGATATGAACCATAACTACATGTAAGTATCGACAAGACCC AGGCATGGGGCTGAAGCTGATTATTATTAGTTGGTGCTGG TATCACTGATAAAGGAGAAGTCCCGAATGGCTACAACGTCTC CAGATCAACCACAGAGGATTTCCCGCTCAGGCTGGAGTTGG CTGCTCCCTCCCAGACATCTGTGTACTTCTGTGCCAGCAGT CCGTGGGGGGCAGGCGGCACAGATACGCAGTATTTTGGCC CAGGCACCCGGCTGACAGTGCTCGAGGACCTTAAGAATGT GTTCCCTCCCAGGTGGCTGTCTTGAACCAAGCGAAGCC GAGATCTCTCACACAAAAAGGCTACTCTCGTGTGTCTGGC AACGGGTTTTTACCCTGATCATGTAGAGTTGTCTTGGTGGGT TAACGGCAAAGAAGTACACTCCGGTGAAGCACCGATCCTC AGCCACTTAAGGAACAACCCGCACTCAACGACTCCAGATAC TGTTTGAGTTCTAGGCTGAGAGTCTCAGCGACGTTTTGGCA GAACCCACGGAATCATTTAGATGTCAGGTCCAGTTTTACGG GTTGAGCGAGAACGACGAGTGACACAGGATCGGGCTAA	117

10

20

30

40

核酸 No.	コードされている配列名	ヌクレオチド配列	配列番号
		CCAGTGACCCAGATTGTATCAGCCGAAGCATGGGGAAGGG CAGATTGCGGCTTTACCTCAGAGTCATATCAACAGGGCGTTT TGTCTGCAACAATCCTTTATGAGATCCTGCTTGGAAGGCGA CTCTGTATGCCGTGCTTGTAGTGCCCTGGTCTGATGGCAA TGGTAAAAAGAAAGGACTCTAGGGGAGGTTCTGGCGCTACT AACTTCAGCCTGCTGAAGCAGGCTGGAGACGTGGAGGAGA ACCCTGGACCTATGGCCATGCTCCTGGGGGCATCAGTGCTG ATTCTGTGGCTTCAGCCAGACTGGGTAAACAGTCAACAGAA GAATGATGACCAGCAAGTTAAGCAAAATTCACCATCCCTGAG CGTCCAGGAAGGAAGAATTTCTATTCTGAAGTGTGACTATAC TAACAGCATGTTTGATTATTTCTATGGTACAAAAAATACCT GCTGAAGGTCCTACATTCCTGATATCTATAAGTTCCATTAAGG ATAAAAATGAAGATGGAAGATTCACTGTCTTTAAACAAAAG TGCCAAGCACCTCTCTGACATTGTGCCCTCCCAGCCTG GAGACTCTGCAGTGACTTCTGTGCAGCAACCCGTACCTCA GGAACCTACAAATACATCTTTGGAACAGGCACCAGGCTGAA GGTTTTAGCAA	10
	全長ドナー鋳型	AGCAATCTCCTGGTAATGTGATAGATTTCCCACTTAATGCCA ACATACCATAAACCTCCCATTCTGCTAATGCCAGCCTAAGTT GGGGAGACCACTCCAGATTCAGATGTACAGTTTGCTTTG CTGGGCTTTTTCCCATGCCTGCCTTTACTCTGCCAGAGTTA TATTGCTGGGGTTTTGAAGAAGATCCTATTAATAAAAAGATA AGCAGTATTATTAAGTAGCCCTGCATTCAGGTTTCCTTGAGT GGCAGGCCAGGCCTGGCCGTGAACGTTCACTGAAATCATG GCCTCTTGGCCAAGATTGATAGCTTGTGCCTGTCCCTGAGT CCCAGTCCATCACGAGCAGCTGGTTTCTAAGATGCTATTTCC CGTATAAAGCATGAGACCGTGACTTGCCAGCCCCACAGAGC CCCGCCCTTGTCCATCACTGGCATCTGGACTCCAGCCTGGG TTGGGGCAAAGAGGGAAATGAGATCATGTCCTAACCTGATA GAACAGAGAAACAGGAGAATATGGGCCAAACAGGATATCTG TGGTAAGCAGTTCTGCCCCGGCTCAGGGCCAAGAACAGT TGGAACAGCAGAATATGGGCCAAACAGGATATCTGTGGTAA GCAGTTCTGCCCCGGCTCAGGGCCAAGAACAGATGGTCC CCAGATGCGGTCCCGCCCTCAGCAGTTTCTAGAGAACCATC AGATGTTTCCAGGCTGCCCCAAGGACCTGAAATGACCCTGT GCCTTATTTGAACTAACCAATCAGTTCGCTTCTCGCTTCTGTT CGCGCGCTTCTGCTCCCCGAGCTCTATATAAGCAGAGCTCG TTTAGTGAACCGTCAGATCGCTGGAGACGCCATCCACGCT GTTTTGACTTCCATAGAAGGATCTCGCCGCCACCATGCCTCT GGGCCTGCTGTGGCTGGGCCTGGCCCTGCTGGGCGCCCT GCACGCCCAGGCCGGCGTGCAGGTGGAGACAATCTCCCCA GGCGACGGACGCACATTCCCTAAGCGGGGCCAGACCTGCG TGGTGCATATACAGGCATGCTGGAGGATGGCAAGAAGTTT GACAGCTCCCGGGATAGAAACAAGCCATTCAAGTTTATGCTG GGCAAGCAGGAAGTGATCAGAGGCTGGGAGGAGGGCGTG GCCCAGATGTCTGTGGGCCAGAGGGCCAAGCTGACCATCA GCCCAGACTACGCTATGGAGCAACAGGCCACCCAGGAATC ATCCCACCTCACGCCACCCTGGTGTTTCGATGTGGAGCTGCT GAAGCTGGGCGAGGGATCCAACACATCAAAGAGAACCCCT TTCTGTTTCGATTGGAGGCCGTAGTCATATCTGTTGGATCCA TGGGACTTATTATCTCCCTGTTGTGTGTACTTCTGGCTGG AACGGACTATGCCAGGATCCCCACGCTCAAGAATCTGGAA GATCTCGTCACAGAATACCATGGTAATTCAGCGCCTGGAGC	118 20 30 40

10

20

30

40

40

核酸 No.	コードされている配列名	ヌクレオチド配列	配列番号
T1D4	5' 相同アーム	CCTATTAAATAAAAGAATAAGCAGTATTATTAAGTAGCCCTGCA TTTCAGGTTTCCTTGAGTGGCAGGCCAGGCCTGGCCGTGA ACGTTCACTGAAATCATGGCCTCTTGGCCAAGATTGATAGCT TGTGCCTGTCCCTGAGTCCCAGTCCATCACGAGCAGCTGGT TTCTAAGATGCTATTTCCCGTATAAAGCATGAGACCGTGACTT GCCAGCCCCACAGAGCCCCGCCCTTGTCATCACTGGCAT CTGGACTCCAGCCTGGGTTGGGGCAAAGAGGGAAATGAGA TCATGTCCTAACCTGATCCTCTTGTCACAGATATCCAGA ACCCTGACCCTGCC	119
	介在配列	TA	
	MND プロモーター	GAACAGAGAAACAGGAGAATATGGGCCAAACAGGATATCTG TGGTAAGCAGTTCCCGCCCGGCTCAGGGCCAAAGAACAGT TGGAACAGCAGAATATGGGCCAAACAGGATATCTGTGGTAA GCAGTTCCCGCCCGGCTCAGGGCCAAAGAACAGATGGTCC CCAGATGCGGTCCCGCCCTCAGCAGTTTCTAGAGAACCATC AGATGTTTCCAGGGTGCCCAAGGACCTGAAATGACCCTGT GCCTTATTTGAACATAACCAATCAGTTCGCTTCTCGCTTCTGTT CGCGCGCTTCTGCTCCCCGAGCTCTATATAAGCAGAGCTCG TTTAGTGAACCGTCAGATC	120
	介在配列 (FKBP- IL2Rg の LCN2 シ グナルペプチド に下線を引いて いる	GCCTGGAGACGCCATCCACGCTGTTTGGACTTCCATAGAAG GATCTCGCCGCCACCATGCCTCTGGGCCTGCTGTGGCTGG <u>GCCTGGCCCTGCTGGGCGCCCTGCACGCCCAGGCC</u>	121
	FKBP-IL2Rg	GGCGTGCAGGTGGAGACAATCTCCCCAGGCGACGGACGCA CATTCCCTAAGCGGGGCCAGACCTGCGTGGTGCATATACA GGCATGCTGGAGGATGGCAAGAAGTTTGACAGCTCCCGGG ATAGAAACAAGCCATTCAAGTTTATGCTGGGCAAGCAGGAAG TGATCAGAGGCTGGGAGGAGGGCGTGGCCAGATGTCTGT GGGCCAGAGGGCCAAGCTGACCATCAGCCCAGACTACGCC TATGGAGCAACAGGCCACCCAGGAATCATCCACCTCACGC CACCTGGTGTTCGATGTGGAGCTGCTGAAGCTGGGCGAG GGATCCAACACATCAAAAGAGAACCCCTTCTGTTTCGCATTG GAGGCCGTAGTCATATCTGTTGGATCCATGGGACTTATTATCT CCCTGTTGTGTGTACTTCTGGCTGGAACGGACTATGCCC AGGATCCCCACGCTCAAGAATCTGGAAGATCTCGTCACAGA ATACCATGGTAATTTAGCGCCTGGAGCGGAGTCTCTAAGG GTCTGGCCGAATCCCTCCAACCCGATTATTCTGAACGGTTGT GCCTCGTATCCGAAATACCAACAAAAGCGGGGCTCTGGGT GAGGGCCCAGGGGCGAGTCCGTGCAATCAACACAGCCCGT ATTGGGCCCTCCTTGTTATACGTTGAAGCCCGAAACT	122
	GSG リンカー	GGATCCGGC	
	T2A	GAGGGCAGAGGAAGTCTGCTAACATGCGGTGACGTCGAGG AGAATCCTGGACCT	123

10

20

30

40

50

核酸 No.	コードされている配列名	ヌクレオチド配列	配列番号
	T1D4 TCRβ	ATGGGATCAAGACTGCTGTGCTGGGTGCTGCTGTGCCTGCT GGGAGCCGGACCTGTGAAAGCCGGGGTGAAGTCAAGTCCA CGATACCTGATCAAGACCAGGGGCCAGCAGGTGACACTGTC TTGCAGCCCAATCTCCGGACACCGCTCCGTGTCTTGGTACC AGCAGACCCCTGGACAGGGACTGCAGTTCCTGTTTGAAGTAT TTCTCTGAGACACAGCGGAACAAGGGCAATTTCCCGGCC GGTTTAGCGGCAGACAGTTTAGCAACTCCAGGTCTGAGATG AATGTGAGCACCCTGGAGCTGGGCGACTCCGCCCTGTACC TGTGCGCAAGCTCCCTGGCCCTGGGACAGGGGAATCAGCA GTTTTTCGGACCCGGAACAAGGCTGACCGTGCTGGAGGAC CTTAAGAATGTGTTCCCTCCCGAGGTGGCTGTCTTCGAACC AAGCGAAGCCGAGATCTCTCACACACAAAAGGCTACTCTCG TGTGCTGGCAACGGGTTTTTACCCTGATCATGTAGAGTTGT CTTGGTGGGTTAACGGCAAAGAAGTACACTCCGGTGTATCTA CCGATCCTCAGCCACTTAAGGAACAACCCGCACTCAACGAC TCCAGATACTGTTTGAATCTAGGCTGAGAGTCTCAGCGAC GTTTTTGGCAGAACCCACGGAATCATTTCAGATGTCAGGTCC AGTTTTACGGGTTGAGCGAGAACGACGAGTGGACACAGGAT CGGGCTAAACCAGTGACCCAGATTGTATCAGCCGAAGCATG GGGAAGGGCAGATTGCGGCTTTACCTCAGAGTCATATCAAC AGGGCGTTTTGTCTGCAACAATCCTTTATGAGATCCTGCTTG GTAAGCGACTCTGTATGCCGTGCTTGTAGTGCCCTGGTT CTGATGGCAATGGTAAAAAGAAAGGACTCTAGGGGA	124
	GSG リンカー	GGTTCTGGC	
	P2A	GCTACTAACTTCAGCCTGCTGAAGCAGGCTGGAGACGTGGA GGAGAACCCTGGACCT	125
	T1D4 TCRα Va ドメインと C ドメインの一部	ATGAAGAGCCTGCGCGTGCTGCTGGTCATCCTGTGGCTGCA ATTGAGTTGGGTGTGGAGCCAGAAGGACCAGGTGTTTCAG CCTAGCACTGTCGCATCATCAGAGGGGGCCGTCGTGGAAAT CTTTTGAATCACAGCGTGTCCAACGCCTACAATTTCTTTTG GTATCTGCACTTCCCAGGATGCGCACCTAGGCTGCTGGTGA AGGGCTCTAAGCCAGCCAGCAGGGCCGGTACAACATGAC CTATGAGCGGTTCACTCCTCTCTGCTGATCCTGCAGGTGC GGGAGGCAGACGCAGCCGTGACTATTGTGCCGTGGAGGA TCTGAATCAGGCCGGCACAGCCCTGATTTTCGGCAAAGGAA CAACCCTGAGCGTGAGCAGCAATATCCAGAACCCTGACCCT GCAGTATAT	126
	3' 相同アーム	CAGCTGAGAGACTCTAAATCCAGTGACAAGTCTGTCTGCCT ATTACCCGATTTTGATTCTCAAACAAATGTGTCACAAAGTAAG GATTCTGATGTGTATATCACAGACAAAAGTGTGCTAGACATGA GGTCTATGGACTTCAAGAGCAACAGTGCTGTGGCCTGGAGC AACAAATCTGACTTTGCATGTGCAACGCCTTCAACAACAGC ATTATTCCAGAAGACACCTTCTTCCCAGCCCAGGTAAGGG CAGCTTTGGTGCCCTTCGCAGGCTGTTTCCTTGCTTCAGGAA TGGCCAGGTTCTGCCAGAGCTCTGGTCAATGATGTCTAAA ACTCCTCTGATTGGTGGTCTCGGC	127

10

20

30

40

40

核酸 No.	コードされている配列名	ヌクレオチド配列	配列番号
		TAACTTCAGCCTGCTGAAGCAGGCTGGAGACGTGGAGGAG AACCTGGACCTATGAAGAGCCTGCGCGTGTGCTGGTCAT CCTGTGGCTGCAATTGAGTTGGGTGTGGAGCCAGAAGGAC CAGGTGTTTCAGCCTAGCACTGTGCGATCATCAGAGGGGCG CGTCGTGGAATCTTTTGTATCACAGCGTGTCCAACGCCTA CAATTTCTTTTGGTATCTGCACTTCCCAGGATGCGCACCTAG GCTGCTGGTGAAGGGCTCTAAGCCCAGCCAGCAGGGCCGG TACAACATGACCTATGAGCGGTTACGCTCCTCTCTGCTGATC CTGCAGGTGCGGGAGGCAGACGCAGCCGTGTACTATTGTG CCGTGGAGGATCTGAATCAGGCCGGCACAGCCCTGATTTTC GGCAAAGGAACAACCCTGAGCGTGAGCAGCAATATCCAGAA CCTGACCCTGCAGTATAT	10
	全長ドナー鋳型	CCTATTAATAAAAAGAATAAGCAGTATTATTAAGTAGCCCTGCA TTTTCAGGTTTCCTTGAGTGGCAGGCCAGGCCCTGGCCGTGA ACGTTCACTGAAATCATGGCCTCTTGGCCAAGATTGATAGCT TGTGCCTGTCCCTGAGTCCCAGTCCATCACGAGCAGCTGGT TTCTAAGATGCTATTTCCCGTATAAAGCATGAGACCGTGACTT GCCAGCCCCACAGAGCCCCGCCCTTGTCCATCACTGGCAT CTGGACTCCAGCCTGGGTTGGGGCAAAGAGGGAATGAGA TCATGTCCTAACCTGATCCTCTTGTCCCACAGATATCCAGA ACCCTGACCCTGCCTAGAACAGAGAAACAGGAGAATATGGG CCAAACAGGATATCTGTGGTAAGCAGTTCTGCCCGGGCTC AGGGCCAAGAACAGTTGGAACAGCAGAATATGGGCCAAACA GGATATCTGTGGTAAGCAGTTCTGCCCGGGCTCAGGGCCA AGAACAGATGGTCCCCAGATGCGGTCCCCGCCCTCAGCAGTT TCTAGAGAACCATCAGATGTTTCCAGGGTGCCCCAAGGACC TGAATGACCCTGTGCCTTATTTGAACTAACCAATCAGTTCTG CTTCTCGCTTCTGTTGCGCGCTTCTGCTCCCCGAGCTCTA TATAAGCAGAGCTCGTTTAGTGAACCGTCAGATCGCCTGGA GACGCCATCCACGCTGTTTTGACTTCCATAGAAGGATCTCG CCGCCACCATGCCTCTGGGCCTGCTGTGGCTGGGCCTGGC CCTGCTGGGCGCCCTGCACGCCAGGCCGGCGTGACAGGT GGAGACAATCTCCCCAGGCGACGGACGCACATTCCCTAAGC GGGGCCAGACCTGCGTGGTGCACTATACAGGCATGCTGGA GGATGGCAAGAAGTTTGACAGCTCCCGGGATAGAAACAAGC CATTCAAGTTTATGCTGGGCAAGCAGGAAGTGATCAGAGGC TGGGAGGAGGGCGTGGCCAGATGTCTGTGGGCCAGAGG GCCAAGCTGACCATCAGCCCAGACTACGCCTATGGAGCAAC AGGCCACCCAGGAATCATCCACCTCACGCCACCCTGGTGT TCGATGTGGAGCTGCTGAAGCTGGGCGAGGGATCCAACAC ATCAAAGAGAACCCTTTCTGTTTCGATTGGAGGCCGTAG TCATATCTGTTGGATCCATGGGACTTATTATCTCCCTGTTGTG TGTGTACTTCTGGCTGGAACGGACTATGCCAGGATCCCCA CGCTCAAGAATCTGGAAGATCTCGTCACAGAATACCATGGTA ATTTACAGCGCCTGGAGCGGAGTCTTAAGGGTCTGGCCGAA TCCCTCCAACCCGATTATTCTGAACGGTTGTGCCTCGTATCC GAAATACCACCAAAAGGCGGGGCTCTGGGTGAGGGCCAG GGGCGAGTCCGTGCAATCAACACAGCCCGTATTGGGCCCC TCCTTGTTATACGTTGAAGCCCGAACTGGATCCGGCGAGG GCAGAGGAAGTCTGCTAACATGCGGTGACGTGAGGAGAAT CCTGGACCTATGGGATCAAGACTGCTGTGCTGGGTGCTGCT GTGCCTGCTGGGAGCCGGACCTGTGAAAGCCGGGGTGACT CAGACTCCACGATACCTGATCAAGACCAGGGGCCAGCAGGT	129

10

20

30

40

核酸 No.	コードされている配列名	ヌクレオチド配列	配列番号
	介在配列	TA	
	MND プロモーター	GAACAGAGAAACAGGAGAATATGGGCCAAACAGGATATCTG TGGTAAGCAGTTCTGCCCCGGCTCAGGGCCAAGAACAGT TGGAACAGCAGAATATGGGCCAAACAGGATATCTGTGGTAA GCAGTTCTGCCCCGGCTCAGGGCCAAGAACAGATGGTCC CCAGATGCGGTCCCCGCCCTCAGCAGTTTCTAGAGAACCATC AGATGTTTCCAGGGTGCCCCAAGGACCTGAAATGACCCTGT GCCTTATTTGAACTAACCAATCAGTTCTGCTTCTCGCTTCTGTT CGCGCGCTTCTGCTCCCCGAGCTCTATATAAGCAGAGCTCG TTTAGTGAACCGTCAGATC	131
	介在配列 (FKBP- IL2Rg の LCN2 シ グナルペプチド に下線を引いて いる	GCCTGGAGACGCCATCCACGCTGTTTTGACTTCCATAGAAG GATCTCGCCGCCACCATGCCTCTGGGCCCTGCTGTGGCTGG <u>GCCTGGGCCCTGCTGGGCGCCCTGCACGCCCAGGCC</u>	132
	FKBP-IL2Rg	GGCGTGCAAGGTGGAGACAATCTCCCCAGGCGACGGACGCA CATTCCCTAAGCGGGGCCAGACCTGCGTGGTGCACTATACA GGCATGCTGGAGGATGGCAAGAAAGTTTGACAGCTCCCGGG ATAGAAACAAGCCATTCAAGTTTATGCTGGGCAAGCAGGAAG TGATCAGAGGCTGGGAGGAGGCGTGGCCAGATGTCTGT GGGCCAGAGGGCCAAGCTGACCATCAGCCAGACTACGCC TATGGAGCAACAGGCCACCCAGGAATCATCCACCTCACGC CACCTGGTGTTTCGATGTGGAGCTGCTGAAGCTGGGCGAG GGATCCAACACATCAAAGAGAACCCCTTTCTGTTGCGATTG GAGGCCGTAGTCATATCTGTTGGATCCATGGGACTTATTATCT CCCTGTTGTGTGTGTAATCTGGCTGGAACGGACTATGCC AGGATCCCCACGCTCAAGAATCTGGAAGATCTCGTCACAGA ATACCATGGTAATTTAGCGCCTGGAGCGGAGTCTCTAAGG GTCTGGCCGAATCCCTCCAACCCGATTATTCTGAACGGTTGT GCCTCGTATCCGAAATACCACAAAAGCGGGGCTCTGGGT GAGGGCCAGGGGCGAGTCCGTGCAATCAACACAGCCCGT ATTGGGCCCTCCTTGTATACGTTGAAGCCCGAACT	133
	GSG リンカー	GGATCCGGC	
	T2A	GAGGGCAGAGGAAGTCTGCTAACATGCGGTGACGTCGAGG AGAATCCTGGACCT	134
	T1D5-1 TCRβ	ATGGGCTGCAGGCTGCTCTGCTGTGCGGTTCTCTGTCTCCT GGGAGCGGTCCCCATGGAAACGGGAGTTACGCAGACACCA AGACACCTGGTCATGGGAATGACAAATAAGAAAGTCTTTGAAA TGTAACAACATCTGGGTCATAACGCTATGTATTGGTACAAG CAAAGTGCTAAGAAGCCACTGGAGCTCATGTTTGTCTACAGT CTTGAAGAACGGGTTGAAAACAACAGTGTGCCAAGTCGCTT CTCACCTGAATGCCCCAACAGCTCTCACTTATTCTTCACCT ACACACCTGCAGCCAGAAAGACTCGGCCCTGTATCTCTGCG CCAGCAGCCAAGAAGTAGGTACAGTCCCCAATCAGCCCCAG CATTTTGGTGATGGGACTCGACTCTCCATCCTAGAGGACCTT	135

10

20

30

40

50

核酸 No.	コードされて いる配列名	ヌクレオチド配列	配列 番号
		AATAAGGTGTTCCCTCCCGAGGTGGCTGTCTTGAACCAAG CGAAGCCGAGATCTCTCACACACAAAAGGCTACTCTCGTGT GTCTGGCAACGGGTTTTTCCCTGATCATGTAGAGTTGTCTT GGTGGGTTAACGGCAAAGAAGTACACTCCGGTGTAAACACC GATCCTCAGCCACTTAAGGAACAACCCGCACTCAACGACTC CAGATACTGTTTGAGTTCTAGGCTGAGAGTCTCAGCGACGT TTTGGCAGAACCCACGGAATCATTTTCAGATGTCAGGTCCAG TTTTACGGGTTGAGCGAGAACGACGAGTGGACACAGGATCG GGCTAAACCAGTGACCCAGATTGTATCAGCCGAAGCATGGG GAAGGGCAGATTGCGGCTTTACCTCAGTTTCATATCAACAGG GCGTTTTGTCTGCAACAATCCTTTATGAGATCCTGCTTGGTA AGGCGACTCTGTATGCCGTGCTTGTAGTGCCCTGGTTCTG ATGGCAATGGTAAAAAGAAAGGACTTT	10
	GSG リンカー	GGTTCTGGC	
	P2A	GCTACTAACTTCAGCCTGCTGAAGCAGGCTGGAGACGTGGA GGAGAACCCTGGACCT	136
	T1D5-1 TCRα Va ドメインと C ド メインの一部	ATGCTACTCATCACATCAATGTTGGTCTTATGGATGCAATTGT CACAGGTGAATGGACAACAGGTAATGCAAATTCCTCAGTACC AGCATGTACAAGAAGGAGAGGACTTCAACCACGTAAGTCAAT TCCTCAACTACTTTAAGCAATATACAGTGGTATAAGCAAAGGC CTGGTGGACATCCCGTTTTTTTGATACAGTTAGTGAAGAGTG GAGAAAGTGAAGAAGCAGAAAAGACTGACATTTTCAGTTTGA GAAGCAAAAAAGAACAGCTCCCTGCACATCACAGCCACCCA GACTACAGATGTAGGAACCTACTTCTGTGCAGGTCAAACG GGGCAAAACACCTCTTCTTTGGGACTGGAACGAGACTCACC GTTATTCCTATATCCAGAACCCTGACCCTGCAGTATAT	137
	3' 相同アーム	CAGCTGAGAGACTCTAAATCCAGTGACAAGTCTGTCTGCCT ATTCACCGATTTTGATTCTCAAACAAATGTGTCACAAAGTAAG GATTCTGATGTGTATATCACAGACAAACTGTGCTAGACATGA GGTCTATGGACTTCAAGAGCAACAGTGCTGTGGCCTGGAGC AACAAATCTGACTTTGCATGTGCAAACGCCTTCAACAACAGC ATTATTCAGAAGACACCTTCTTCCCCAGCCAGGTAAGGG CAGCTTTGGTGCCTTCGCAGGCTGTTTCCTTGCTTCAGGAA TGGCCAGGTTCTGCCAGAGCTCTGGTCAATGATGTCTAAA ACTCCTCTGATTGGTGGTCTCGGC	138
	相同アームの間	TAGAACAGAGAAACAGGAGAATATGGGCCAAACAGGATATCT GTGGTAAGCAGTTCTGCCCGGCTCAGGGCCAAGAAGCAG TTGGAACAGCAGAATATGGGCCAAACAGGATATCTGTGGTAA GCAGTTCTGCCCGGCTCAGGGCCAAGAAGCAGATGGTCC CCAGATGCGGTCCCGCCCTCAGCAGTTTCTAGAGAACCATC AGATGTTTCCAGGGTGCCCCAAGGACCTGAAATGACCCTGT GCCTTATTTGAACTAACCAATCAGTTTCGCTTCTCGCTTCTGTT CGCGCGCTTCTGCTCCCCGAGCTCTATATAAGCAGAGCTCG TTTAGTGAACCGTCAGATCGCTGGAGACGCCATCCACGCT GTTTTGACTTCCATAGAAGGATCTCGCCGCCACCATGCCTCT GGGCCTGCTGTGGCTGGGCCTGGCCCTGCTGGGCGCCCT GCACGCCAGGCCGCGGTGCAGGTGGAGACAATCTCCCA GGCGACGGACGCACATTCCCTAAGCGGGGCCAGACCTGCG	139

10

20

30

40

50

40

40

【表 16】

表 7: FOXP3 座位への挿入用の核酸の例

核酸 No.	コードされている配列名	ヌクレオチド配列	配列番号
FoxP3_v1	5' 相同アーム	ACTTGCCAGGACTGTTACAATAGCCTCCTCACTAGCCCCACT CACAGCAGCCAGATGAATCTTTTGTAGTCCATGCCTAGTCACT GGGGCAAATAGGACTCCGAGGAGAAAGTCCGAGACCAGC TCCGGCAAGATGAGCAAACACAGCCTGTGCAGGGTGCAGG GAGGGCTAGAGGCCTGAGGCTTGAAACAGCTCTCAAGTGG AGGGGGAAACAACCATTGCCCTCATAGAGGACACATCCACA CCAGGGCTGTGCTAGCGTGGGCAGGCAAGCCAGGTGCTG GACCTCTGCACGTGGGGCATGTGTGGGTATGTACATGTACC TGTGTTCTTGGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTG TCTAGAGCTGGGGTGCAACTATGGGGCCCCCTGGGACATGT CCCAGCCAATGCCTGCTTTGACCAGAGGAGTGTCCACGTG GCTCAGGTGGTCGAGTATCTCATACCGCCCTAGCACACGTG TGACTCCTTTCCCCTATTGTCTACGCAGCCTGCCCTTGGACA AGGACCCGATGCCCCAACCCAGGCCTGGCAAGCCCTCGGC CCCTTCCTTGGCCCTTGGCCCATCCCCAGGA	141
	介在配列	T	
	MND プロモーター	GAACAGAGAAACAGGAGAATATGGGCCAAACAGGATATCTG TGGTAAGCAGTTCTGCCCGGCTCAGGGCCAAGAACAGT TGGAACAGCAGAATATGGGCCAAACAGGATATCTGTGGTAA GCAGTTCTGCCCGGCTCAGGGCCAAGAACAGATGGTCC CCAGATGCGGTCCCGCCCTCAGCAGTTTCTAGAGAACCATC AGATGTTTCCAGGGTGCCCCAAGGACCTGAAATGACCCTGT GCCTTATTTGAACTAACCAATCAGTTCGCTTCTCGCTTCTGTT CGCGCGCTTCTGCTCCCCGAGCTCTATATAAGCAGAGCTCG TTTAGTGAACCGTCAGATC	142
	介在配列 (FRB- IL2Rb の LCN2 シ グナルペプチドに 下線を引いてい る)	GCCTGGAGACGCCATCCACGCTGTTTTGACTTCCATAGAAG GATCTCGAGGCCACCATGCCTCTGGGCCTGCTGTGGCTGG <u>GCCTGGCCCTGCTGGGCGCCCTGCACGCCCAGGCC</u>	143
	FRB-IL2Rb	GAGATGTGGCACGAGGGCCTGGAGGAGGCCAGCAGGCTG TATTTTGGCGAGCGCAACGTGAAGGGCATGTTGAGGTGCT GGAGCCTCTGCACGCCATGATGGAGAGAGGCCACAGACC CTGAAGGAGACATCCTTTAACCAGGCCTATGGACGGGACCT GATGGAGGCACAGGAGTGGTGCAGAAAGTACATGAAGTCTG GCAATGTGAAGGACCTGACGCAGGCCTGGGATCTGTACTAT CACGTGTTTCGGAGAATCTCCAAGGGCAAAGACACGATTCC GTGGCTTGGGCATCTGCTCGTTGGGCTGAGTGGTGCGTTT GGTTTCATCATCTTGGTCTATCTCTTGATCAATTGCAGAAATA CAGGCCCTTGGCTGAAAAAAGTGCTCAAGTGTAAATACCCC GACCCAAGCAAGTTCTTCTCCCAGCTTCTTTCAGAGCATGG AGGCGATGTGCAGAAATGGCTCTTTCACCTTTTCCCTCCTC AAGTTTCTCCCGGGAGGGCTGGCGCCCGAGATTTCACCT CTTGAGGTACTTGAACGAGACAAGGTTACCCAACCTTCTCCTT CAACAGGATAAGGTACCCGAACCTGCGAGCCTTAGCTCCAA CCTCTCTTACGAGCTGCTTACCAATCAGGGATACTTCTT TTTCCACCTTCCCGATGCGCTGGAAATCGAAGCATGTCAAG	144

10

20

30

40

50

核酸 No.	コードされている配列名	ヌクレオチド配列	配列番号
		TTTACTTTACCTATGATCCATATAGCGAGGAAGATCCCGACGA AGGAGTCGCCGGTGCGCCACGGGTTCCTCACCCCAACCT CTCCAGCCTCTCTCAGGAGAAGATGATGCTTATTGCACTTTT CCCAGTAGAGACGATCTCCTCCTCTTTTCTCCATCTCTTTTG GGGGGACCTTCCCCCCTTCTACGGCACCTGGCGGGTCTG GTGCTGGCGAGGAGCGGATGCCGCCGTCCCTCCAGGAGC GAGTACCACGAGATTGGGATCCCCAGCCACTTGGACCACCA ACTCCAGGCGTACCTGACCTTGTGATTTTCAACCTCCCCCT GAATTGGTGCTGCGAGAGGCTGGGGAGGAAGTTCCGGACG CTGGGCCGAGGGAGGGCGTGTCTTTCCATGGAGTAGGCC TCCAGGTCAAGGCGAGTTTAGGGCTCTCAACGCGCGGCTG CCGTTGAATACAGACGCTTATCTCTACTGCAGGAAGTCAA GGTCAGGACCCAAACACATCTTGTA	
	GSG リンカー	GGATCCGGC	
	P2A	GCCACCAACTTTAGTCTGCTCAAGCAAGCCGGGGACGTCG AGGAAAATCCTGGGCCA	145
	細胞質ゾル内 FRB	GAAATGTGGCAGCAAGGACTCGAGGAAGCCAGTCGGCTGT ATTTTGGCGAGCGGAATGTGAAAGGGATGTTTGAAGTGCTC GAGCCTCTCCACGCTATGATGGAACGGGGACCCAGACTCT CAAAGAAACCAGCTTTAATCAGGCTTACGGACGCGACCTCA TGGAAGCTCAAGAATGGTGAGAAAGTATATGAAGAGTGGCA ACGTGAAAGATCTGACACAAGCCTGGGATCTCTATTATCAG TGTTTCAGACGCATCAGCAA	146
	GSG リンカー	GGCAGCGGC	
	第 2 の P2A	GCCACAAATTTCTCCCTGCTGAAACAGGCCGGCGACGTGG AAGAGAATCCCGACCT	147
	FoxP3 部分	ATGCCCAATCCTAGACCTGGCAAGCCCAGCGCTCCTTCTCT TGCTCTTGGACCTTCTCCTGGTGCA	148
	3' 相同アーム	TCGCCCAGCTGGAGGGCTGCACCCAAAGCCTCAGACCTGC TGGGGGCCCGGGGCCAGGGGAACCTTCCAGGGCCGAG ATCTTCGAGGCGGGGCCATGCCTCCTCTTCTTCTTGAAC CCCATGCCACCATCGCAGCTGCAGGTGAGGCCCTGGGCCC AGGATGGGGCAGGCAGGGTGGGGTACCTGGACCTACAGGT GCCGACCTTTACTGTGGCACTGGGCGGGAGGGGGCTGG CTGGGGCACAGGAAGTGTTTCTGGGTCCCAGGCAAGTCT GTGACTTATGCAGATGTTGCAGGGCCAAGAAAATCCCCACC TGCCAGGCCTCAGAGATTGAGGCTCTCCCCGACCTCCCA ATCCCTGTCTCAGGAGAGGAGGAGGCCGTATTGTAGTCCCA TGAGCATAGCTATGTGTCCCATCCCATGTGACAAGAGAAG AGGACTGGGGCCAAGTAGGTGAGGTGACAGGGCTGAGGC	149

10

20

30

40

50

40

40

核酸 No.	コードされている配列名	ヌクレオチド配列	配列番号
FoxP3_v2	5' 相同アーム	CGAGTACCACGAGATTGGGATCCCCAGCCACTTGGACCACC AACTCCAGGCGTACCTGACCTTGTGATTTTCAACCTCCCC CTGAATTGGTGCTGCGAGAGGCTGGGGAGGAAGTTCCGGA CGCTGGGCCGAGGGAGGGCGTGTCTTTCCATGGAGTAGG CCTCCAGGTCAAGGCGAGTTTAGGGCTCTCAACGCGCGGC TGCCGTTGAATACAGACGCTTATCTCTACTGCAGGAAGTGC AAGGTCAGGACCCAACACATCTTGTAGGATCCGGCGCCACC AACTTTAGTCTGCTCAAGCAAGCCGGGGACGTCGAGGAAAA TCCTGGGCCAGAAATGTGGCACGAAGGACTCGAGGAAGCC AGTCGGCTGTATTTTGGCGAGCGGAATGTGAAAGGGATGTT TGAAGTGCTCGAGCCTCTCCACGCTATGATGGAACGGGGAC CCCAGACTCTCAAAGAAACCAGCTTTAATCAGGCTTACGGA CGCGACCTCATGGAAGCTCAAGAATGGTGTAGAAAGTATATG AAGAGTGGCAACGTGAAAGATCTGACACAAGCCTGGGATCT CTATTATCAGTGTTTACAGCGCATCAGCAAAGGCAGCGGCG CCACAAATTTCTCCCTGCTGAAACAGGCCGGCGACGTGGAA GAGAATCCCGGACCTATGCCAATCCTAGACCTGGCAAGCC CAGCGCTCCTTCTCTTGTCTTGGACCTTCTCCTGGTGAT CGCCAGCTGGAGGGCTGCACCCAAAGCCTCAGACCTGCT GGGGGCCCGGGGCCAGGGGGAACCTTCCAGGGCCGAGA TCTTCGAGGCGGGGCCCATGCCTCCTTCTTCCCTTGAACC CCATGCCACCATCGCAGCTGCAGGTGAGGCCCTGGGCCCA GGATGGGGCAGGCAGGGTGGGGTACCTGGACCTACAGGTG CCGACCTTTACTGTGGCACTGGGCGGGAGGGGGGCTGGCT GGGGCACAGGAAGTGGTTTCTGGGTCCAGGCAAGTCTGT GACTTATGCAGATGTTGCAGGGCCAAGAAAATCCCCACCTG CCAGGCCTCAGAGATTGGAGGCTCTCCCCGACCTCCCAATC CCTGTCTCAGGAGAGGAGGAGGCCGTATTGTAGTCCCATGA GCATAGCTATGTGTCCCCATCCCCATGTGACAAGAGAAGAG GACTGGGGCCAAGTAGGTGAGGTGACAGGGCTGAGGCCA GCTCTGCAACTTATTAGCTGTTTGATCTTTAAAAAGTTACTCG ATCTCCATGAGCCTCAGTTTCCATACGTGAAAAGGGGGATG ATCATAGCATCTACCATGTGGGCTTGCAGTG	10
	介在配列	ACGATGT	40

10

20

30

40

50

核酸 No.	コードされている配列名	ヌクレオチド配列	配列番号
	MND プロモーター	GAACAGAGAAACAGGAGAATATGGGCCAAACAGGATATCTG TGGAAGCAGTTCTGCCCCGGCTCAGGGCCAAGAACAGT TGGAACAGCAGAATATGGGCCAAACAGGATATCTGTGGTAA GCAGTTCTGCCCCGGCTCAGGGCCAAGAACAGATGGTCC CCAGATGCGGTCCCGCCCTCAGCAGTTTCTAGAGAACCATC AGATGTTTCCAGGGTGCCCCAAGGACCTGAAATGACCCTGT GCCTTATTTGAACTAACCAATCAGTTCGCTTCTCGCTTCTGTT CGCGCGCTTCTGCTCCCCGAGCTCTATATAAGCAGAGCTCG TTTAGTGAACCGTCAGATC	153
	介在配列 (FRB-IL2Rb の LCN2 シグナルペプチドに下線を引いている)	GCCTGGAGACGCCATCCACGCTGTTTTGACTTCCATAGAAG GATCTCGAGGGCCACC <u>ATGCCTCTGGGCCTGCTGTGGCTGG</u> <u>GCCTGGCCCTGCTGGGCGCCCTGCACGCCCAGGCC</u>	154
	FRB-IL2Rb	GAGATGTGGCACGAGGGCCTGGAGGAGGCCAGCAGGCTG TATTTTGGCGAGCGCAACGTGAAGGGCATGTTGAGGTGCT GGAGCCTCTGCACGCCATGATGGAGAGAGGCCACAGACC CTGAAGGAGACATCCTTTAACAGGCCATGGACGGGACCT GATGGAGGCACAGGAGTGGTGCAGAAAGTACATGAAGTCTG GCAATGTGAAGGACCTGACGCAGGCCTGGGATCTGTACTAT CACGTGTTTCGGAGAATCTCCAAGGGCAAAGACACGATTCC GTGGCTTGGGCATCTGCTCGTTGGGCTGAGTGGTGCCTTT GGTTTCATCATCTTGGTCTATCTCTTGATCAATTGCAGAAATA CAGGCCCTTGGCTGAAAAAAGTCTCAAGTGAATACCCCC GACCAAGCAAGTTCTTCTCCAGCTTTCTTCAGAGCATGG AGGCGATGTGCAGAAATGGCTCTCTTCACCTTTTCCCTCCTC AAGTTTCTCCCCGGGAGGGCTGGCGCCCGAGATTTACCT CTTGAGGTACTTGAACGAGACAAGGTTACCCAACCTCTCCTT CAACAGGATAAGGTACCCGAACCTGCGAGCCTTAGCTCCAA CCACTCTCTTACGAGCTGCTTACCAATCAGGGATACTTCTT TTTCCACCTTCCCGATGCGCTGGAAATCGAAGCATGTCAAG TTTACTTTACCTATGATCCATATAGCGAGGAAGATCCCGACGA AGGAGTCGCCGGTGCGCCACGGGTTCTCACCCCAACCT CTCCAGCCTCTCTCAGGAGAAGATGATGCTTATTGCATTTT CCCAGTAGAGACGATCTCCTCCTCTTTTCTCCATCTCTTTTG GGGGGACCTTCCCCCCTTCTACGGCACCTGGCGGGTCTG GTGCTGGCGAGGAGCGGATGCCGCCGTCCCTCCAGGAGC GAGTACCACGAGATTGGGATCCCCAGCCACTTGACCACCA ACTCCAGGCGTACCTGACCTTGTCGATTTTCAACCTCCCCCT GAATTGGTGTGCTGCGAGAGGCTGGGGAGGAAGTTCCGGACG CTGGGCCGAGGGAGGGCGTGTCTTTCCATGGAGTAGGCC TCCAGGTCAAGGCGAGTTTAGGGCTCTCAACGCGCGGCTG CCGTTGAATACAGACGCTTATCTCTCACTGCAGGAAGTCAA GGTCAGGACCCAACACATCTTGTA	155
	GSG リンカー	GGATCCGGC	
	P2A	GCCACCAACTTTAGTCTGCTCAAGCAAGCCGGGGACGTG AGGAAAATCCTGGGCCA	156

10

20

30

40

50

核酸 No.	コードされている配列名	ヌクレオチド配列	配列番号
	細胞質ゾル内 FRB	GAAATGTGGCACGAAGGACTCGAGGAAGCCAGTCGGCTGT ATTTTGGCGAGCGGAATGTGAAAGGGATGTTTGAAGTGCTC GAGCCTCTCCACGCTATGATGGAACGGGGACCCAGACTCT CAAAGAAACCAGCTTTAATCAGGCTTACGGACGCGACCTCA TGGAAGCTCAAGAATGGTGTAGAAAAGTATATGAAGAGTGGCA ACGTGAAAGATCTGACACAAGCCTGGGATCTCTATTATCACG TGTTGACACGCATCAGCAAA	157
	GSG リンカー	GGCAGCGGC	
	第 2 の P2A	GCCACAAATTTCTCCCTGCTGAAACAGGCCGGCGACGTGG AAGAGAATCCCGGACCT	158
	FoxP3 部分	ATGCCAAATCCT	159
	3' 相同アーム	AGGCCTGGCAAGCCCTCGGCCCTTCTTGGCCCTTGGCC CATCCCCAGGAGCCTCGCCCAGCTGGAGGGCTGCACCCAA AGCCTCAGACCTGCTGGGGGCCCGGGGCCAGGGGGAAC CTTCCAGGGCCGAGATCTTCGAGGCGGGGCCCATGCCTCC TCTTCTTCTTGAACCCCATGCCACCATCGCAGCTGCAGGT GAGGCCCTGGGCCAGGATGGGGCAGGCAGGGTGGGGTA CCTGGACCTACAGGTGCCGACCTTTACTGTGGCACTGGGC GGGAGGGGGGCTGGCTGGGGCACAGGAAGTGTTTCTGG GTCCCAGGCAAGTCTGTGACTTATGCAGATGTTGCAGGGCC AAGAAAATCCCCACCTGCCAGGCCTCAGAGATTGGAGGCTC TCCCCGACCTCCCAATCCCTGTCTCAGGAGAGGAGGAGGC CGTATTGTAGTCCCATGAGCATAGCTATGTGTCCCCATCCCC ATGTGACAAGAGAAGAGGACTGGGGCCAAGTAGGTGAGGT GACAGGGCTGAGGCCAGCTCTGCAACTTATTAGCTGTTTGA TCTTTAAAAAGTTACTCGATCTCCATGAGCCTCAGTTTCCATA CGTGTAAGAGGGGATGATCATAGCATCTACCATGTGGGCTT GC	160
	相同アームの間	ACGATGTGAACAGAGAAACAGGAGAATATGGGCCAAACAGG ATATCTGTGGTAAGCAGTTTCTGCCCGGGCTCAGGGCCAAG AACAGTTGGAACAGCAGAATATGGGCCAAACAGGATATCTGT GGTAAGCAGTTCTTGCCCCGGCTCAGGGCCAAGAACAGAT GGTCCCCAGATGCGGTCCCGCCCTCAGCAGTTTCTAGAGAA CCATCAGATGTTTCCAGGGTGCCCCAAGGACCTGAAATGAC CCTGTGCCCTTATTTGAACTAACCAATCAGTTCGCTTCTCGCT TCTGTTGCGCGCTTCTGCTCCCCGAGCTCTATATAAGCAGA GCTCGTTTAGTGAACCGTCAGATCGCCTGGAGACGCCATCC ACGCTGTTTTGACTTCCATAGAAGGATCTCGAGGCCACCAT GCCTCTGGGCCTGCTGTGGCTGGGCCTGGCCCTGCTGGG CGCCCTGCACGCCAGGCCGAGATGTGGCACGAGGGCCT GGAGGAGGCCAGCAGGCTGTATTTGGCGAGCGCAACGTG AAGGGCATGTTGAGGTGCTGGAGCCTCTGCACGCCATGAT GGAGAGAGGCCACAGACCCTGAAGGAGACATCCTTTAACC AGGCCTATGGACGGGACCTGATGGAGGCACAGGAGTGGTG CAGAAAGTACATGAAGTCTGGCAATGTGAAGGACCTGACGC	161

10

20

30

40

50

40

40

核酸 No.	コードされている配列名	ヌクレオチド配列	配列番号
		CTCCTCTTCTTCTTGAACCCCATGCCACCATCGCAGCTGC AGGTGAGGCCCTGGGCCAGGATGGGGCAGGCAGGGTGG GGTACCTGGACCTACAGGTGCCGACCTTACTGTGGCACTG GGCGGGAGGGGGGCTGGCTGGGGCACAGGAAGTGGTTTC TGGGTCCCAGGCAAGTCTGTGACTTATGCAGATGTTGCAGG GCCAAGAAAATCCCCACCTGCCAGGCCTCAGAGATTGGAG GCTCTCCCCGACCTCCAATCCCTGTCTCAGGAGAGGAGG AGGCCGTATTGTAGTCCCATGAGCATAGCTATGTGTCCCAT CCCCATGTGACAAGAGAAGAGGACTGGGGCCAAGTAGGTG AGGTGACAGGGCTGAGGCCAGCTCTGCAACTTATTAGCTGT TTGATCTTTAAAAAGTTACTCGATCTCCATGAGCCTCAGTTTC CATACGTGTAAGGGGGATGATCATAGCATCTACCATGTGG GCTTGC	10
FoxP3_v3	5' 相同アーム	ACTGCCACCAGCCCATTCTGTGCCAGCATCATCACTTGCCA GGACTGTTACAATAGCCTCCTCACTAGCCCCACTCACAGCA GCCAGATGAATCTTTTGAAGTCCATGCCTAGTCACTGGGGCA AAATAGGACTCCGAGGAGAAAGTCCGAGACCAGCTCCGGC AAGATGAGCAAACACAGCCTGTGCAGGGTGACGGGAGGGC TAGAGGCCCTGAGGCTTGAAACAGCTCTCAAGTGGAGGGGG AAACAACCATTGCCCTCATAGAGGACACATCCACACCAGGG CTGTGCTAGCGTGGGCAGGCAAGCCAGGTGCTGGACCTCT GCACGTGGGGCATGTGTGGGTATGTACATGTACCTGTGTTT TTGGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTCTAGAG CTGGGGTGCAACTATGGGGCCCCCTCGGGACATGTCCCAGC CAATGCCCTGCTTTGACCAGAGGAGTGTCCACGTGGCTCAG GTGGTCGAGTATCTCATACCGCCCTAGCACACGTGTGACTC CTTTCCCTATTGTCTACGCAGCCTGCCCTTGACAAGGAC CCGATGCCCAACCCCAGGCCTGGCAAGCCCTCGGCCCTT CCTTGGCCCTTGGCCCATCCCAGGAGCCTCGCCAGCTG GAG	163
	介在配列	AGCTGCAT	
	MND プロモーター	GAACAGAGAAACAGGAGAATATGGGCCAAACAGGATATCTG TGGTAAGCAGTTCTGCCCCGGCTCAGGGCCAAGAACAGT TGGAACAGCAGAATATGGGCCAAACAGGATATCTGTGGTAA GCAGTTCTGCCCCGGCTCAGGGCCAAGAACAGATGGTCC CCAGATGCGGTCCCGCCCTCAGCAGTTTCTAGAGAACCATC AGATGTTTCCAGGGTGCCCCAAGGACCTGAAATGACCCTGT GCCTTATTTGAACATAACCAATCAGTTTCGTTCTCGCTTCTGTT CGCGCGCTTCTGCTCCCCGAGCTCTATATAAGCAGAGCTCG TTTAGTGAACCGTCAGATC	164
	介在配列 (FRB-IL2Rb の LCN2 シグナルペプチドに下線を引いている)	GCCTGGAGACGCCATCCACGCTGTTTTGACTTCCATAGAAG GATCTCGAGGCCACCATGCCTCTGGGCCTGCTGTGGCTGG <u>GCCTGGCCCTGCTGGGGCCCTGCACGCCCAGGCC</u>	165
	FRB-IL2Rb	GAGATGTGGCACGAGGGCCTGGAGGAGGCCAGCAGGCTG TATTTTGGCGAGCGCAACGTGAAGGGCATGTTTCGAGGTGCT GGAGCCTCTGCACGCCATGATGGAGAGAGGGCCACAGACC CTGAAGGAGACATCCTTTAACCAGGCCTATGGACGGGACCT GATGGAGGCACAGGAGTGGTGCAGAAAGTACATGAAGTCTG	166

10

20

30

40

核酸 No.	コードされている配列名	ヌクレオチド配列	配列番号
		GCAATGTGAAGGACCTGACGCAGGCCTGGGATCTGTACTAT CACGTGTTTCGGAGAATCTCCAAGGGCAAAGACACGATTCC GTGGCTTGGGCATCTGCTCGTTGGGCTGAGTGGTGCGTTT GGTTTCATCATCTTGGTCTATCTCTTGATCAATTGCAGAAATA CAGGCCCTTGGCTGAAAAAAGTGCTCAAGTGAATACCCCC GACCCAAGCAAGTTCTTCTCCCAGCTTTCTTCAGAGCATGG AGGCGATGTGCAGAAATGGCTCTTTCACCTTTTCCCTCCTC AAGTTTCTCCCCGGGAGGGCTGGCGCCCCGAGATTTACCT CTTGAGGTACTTGAACGAGACAAGGTTACCCAACCTTCTCCTT CAACAGGATAAGGTACCCGAACCTGCGAGCCTTAGCTCCAA CCACTCTTTACGAGCTGCTTCACCAATCAGGGATACTTCTT TTTCCACCTTCCCGATGCGCTGGAAATCGAAGCATGTCAAG TTTACTTTACCTATGATCCATATAGCGAGGAAGATCCCGACGA AGGAGTCGCCGGTGCGCCCCACGGGTTCTCACCCTAACCT CTCCAGCCTCTCTCAGGAGAAGATGATGCTTATTGCACTTTT CCAGTAGAGACGATCTCCTCCTCTTTTCTCCATCTCTTTG GGGGACCTTCCCCCTTCTACGGCACCTGGCGGGTCTG GTGCTGGCGAGGAGCGGATGCCGCCGTCCCTCCAGGAGC GAGTACCACGAGATTGGGATCCCCAGCCACTTGGACCACCA ACTCCAGGCGTACCTGACCTTGTCGATTTTCAACCTCCCCCT GAATTGGTGCTGCGAGAGGCTGGGGAGGAAGTTCCGGACG CTGGGCCGAGGGAGGGCGTGTCTTTCCATGGAGTAGGCC TCCAGGTCAAGGCGAGTTTAGGGCTCTCAACGCGCGGGCTG CCGTTGAATACAGACGCTTATCTCTCACTGCAGGAAGTCAA GGTCAGGACCCAACACATCTTGTA	10
	GSG リンカー	GGATCCGGC	
	P2A	GCCACCAACTTTAGTCTGCTCAAGCAAGCCGGGGACGTG AGGAAAATCCTGGGCCA	167
	細胞質ゾル内 FRB	GAAATGTGGCACGAAGGACTCGAGGAAGCCAGTCGGCTGT ATTTTGGCGAGCGGAATGTGAAAGGGATGTTTGAAGTGCTC GAGCCTCTCCACGCTATGATGGAACGGGGACCCAGACTCT CAAAGAAACCAGCTTTAATCAGGCTTACGGACGCGACCTCA TGGAAGCTCAAGAATGGTGTAGAAAGTATATGAAGAGTGGCA ACGTGAAAGATCTGACACAAGCCTGGGATCTCTATTATCAG TGTTACAGCGCATCAGCAAA	168
	GSG リンカー	GGCAGCGGC	
	第 2 の P2A	GCCACAAATTTCTCCCTGCTGAAACAGGCCGGCGACGTGG AAGAGAATCCCGGACCT	169
	FoxP3 部分	ATGCCCAATCCTAGACCTGGCAAGCCCAGCGCTCCTTCTCT TGCTCTTGACCTTCTCCTGGTGCAAGTCCATCTTGGCGAG CAGCTCCAAAGGCT	170

10

20

30

40

50

核酸 No.	コードされている配列名	ヌクレオチド配列	配列番号
	3' 相同アーム	TCAGACCTGCTGGGGGCCCCGGGGCCCAGGGGGAACCTTC CAGGGCCGAGATCTTCGAGGCGGGGCCCATGCCTCCTCTT CTTCCTTGAACCCCATGCCACCATCGCAGCTGCAGGTGAGG CCCTGGGCCCAGGATGGGGCAGGCAGGGTGGGGTACCTG GACCTACAGGTGCCGACCTTTACTGTGGCACTGGGCGGGA GGGGGGCTGGCTGGGGCACAGGAAGTGGTTTCTGGGTCC CAGGCAAGTCTGTGACTTATGCAGATGTTGCAGGGCCAAGA AAATCCCCACCTGCCAGGCCTCAGAGATTGGAGGCTCTCCC CGACCTCCCAATCCCTGTCTCAGGAGAGGAGGAGGCCGTAT TGTAAGTCCCATGAGCATAGCTATGTGTCCCATCCCCATGTG ACAAGAGAAGAGGACTGGGGCCAAGTAGGTGAGGTGACAG GGCTGAGGCCAGCTCTGCAACTTATTAGCTGTTTGATCTTTA AAAAGTTACTCGATCTCCATGAGCCTCAGTTTCCATACGTGT AAAAGGGGGATGATCATAGCATCTACCATGTGGGCTTGCACT GCAGAGTATTTGAATTAGACACAGAACAGTGAGGATCAGGAT GGCCTCTCACCCACCTGCCTTTCTGCCCAGCTGCCACA	171
	相同アームの間	AGCTGCATGAACAGAGAAACAGGAGAATATGGGCCAAACAG GATATCTGTGGTAAGCAGTTCCTGCCCCGGCTCAGGGCCAA GAACAGTTGGAACAGCAGAATATGGGCCAAACAGGATATCT GTGGTAAGCAGTTCCTGCCCCGGCTCAGGGCCAAGAACAG ATGGTCCCCAGATGCGGTCCCGCCCTCAGCAGTTTCTAGAG AACCATCAGATGTTTCCAGGGTGCCCCAAGGACCTGAAATG ACCCTGTGCCTTATTTGAACTAACCAATCAGTTCGCTTCTCG CTTCTGTTGCGCGCTTCTGCTCCCCGAGCTCTATATAAGCA GAGCTCGTTTAGTGAACCGTCAGATCGCCTGGAGACGCCAT CCACGCTGTTTGGACTTCCATAGAAGGATCTCAGGGCCACC ATGCCTCTGGGCCTGCTGTGGCTGGGCCTGGCCCTGCTGG GCGCCCTGCACGCCCAGGCCGAGATGTGGCACGAGGGCC TGGAGGAGGCCAGCAGGCTGTATTTGGCGAGCGCAACGT GAAGGGCATGTTGAGGTGCTGGAGCCTCTGCACGCCATG ATGGAGAGAGGCCACAGACCCTGAAGGAGACATCCTTTAA CCAGGCCTATGGACGGGACCTGATGGAGGCACAGGAGTG TGCAGAAAGTACATGAAGTCTGGCAATGTGAAGGACCTGAC GCAGGCCTGGGATCTGTACTATCACGTGTTTCCGAGAATCT CCAAGGGCAAGACACGATTCCGTGGCTTGGGCATCTGCTC GTTGGGCTGAGTGGTGCCTTTGGTTTCATCATCTTGGTCTAT CTCTTGATCAATTGCAGAAATACAGGCCCTTGGCTGAAAAA GTGCTCAAGTGTAATACCCCCGACCCAAGCAAGTTCTTCTC CCAGCTTTCTTCAGAGCATGGAGGCATGTGCAGAAATGGC TCTCTTACCTTTTCCCTCCTCAAGTTTCTCCCCGGGAGGG CTGGCGCCCGAGATTTACCTCTTGAGGTACTTGAACGAGA CAAGGTTACCCAACCTCTCCTTCAACAGGATAAGGTACCCGA ACCTGCGAGCCTTAGCTCCAACCACTCTTACGAGCTGCT TCACCAATCAGGGATACTTCTTTTCCACCTTCCCGATGCGC TGGAATCGAAGCATGTCAAGTTTACTTTACCTATGATCCATA TAGCGAGGAAGATCCCGACGAAGGAGTCGCCGGTGCGCCC ACGGGTTCTCACCCCAACCTCTCCAGCCTCTCTCAGGAGA AGATGATGCTTATTGCACTTTTCCAGTAGAGACGATCTCCT CCTCTTTTCTCCATCTCTTTGGGGGGACCTTCCCCCCTTC TACGGCACCTGGCGGGTCTGGTGTGGCGAGGAGCGGATG CCGCCGTCCCTCCAGGAGCGAGTACCACGAGATTGGGATC CCCAGCCACTTGGACCACCACTCCAGGCGTACCTGACCTT GTCGATTTCAACCTCCCCCTGAATTGGTGCTGCGAGAGGC	172

10

20

30

40

50

核酸 No.	コードされている 配列名	ヌクレオチド配列	配列 番号
		TGGGGAGGAAGTTCCGGACGCTGGGCCGAGGGAGGGCGT GTCCTTTCCATGGAGTAGGCCTCCAGGTCAAGGCGAGTTTA GGGCTCTCAACGCGCGGCTGCCGTTGAATACAGACGCTTAT CTCTCACTGCAGGAAGTCAAGGTCAGGACCCAACACATCT TGTAGGATCCGGCGCCACCAACTTTAGTCTGCTCAAGCAAG CCGGGGACGTCGAGGAAAATCCTGGGCCAGAAATGTGGCA CGAAGGACTCGAGGAAGCCAGTCGGCTGTATTTTGGCGAG CGGAATGTGAAAGGGATGTTTGAAGTGCTCGAGCCTCTCCA CGCTATGATGGAACGGGGACCCAGACTCTCAAAGAAACCA GCTTTAATCAGGCTTACGGACGCGACCTCATGGAAGCTCAA GAATGGTGTAGAAAGTATATGAAGAGTGGAACGTGAAAGAT CTGACACAAGCCTGGGATCTCTATTATCACGTGTTAGACGC ATCAGCAAAGGCAGCGGCGCCACAAATTTCTCCCTGCTGAA ACAGGCCGCGCAGCTGGAAGAGAAATCCCGGACCTATGCCC AATCCTAGACCTGGCAAGCCCAGCGCTCCTTCTTTGCTCT TGGACCTTCTCCTGGTGCAAGTCCATCTTGGCGAGCAGCTC CAAAGGCT	10
	全長ドナー鋳型	ACTGCCACCAGCCCATTCTGTGCCAGCATCATCACTTGCCA GGACTGTTACAATAGCCTCCTCACTAGCCCCACTCACAGCA GCCAGATGAATCTTTTGAGTCCATGCCTAGTCACTGGGGCA AAATAGGACTCCGAGGAGAAAGTCCGAGACCAGCTCCGGC AAGATGAGCAAACACAGCCTGTGCAGGGTGCAGGGAGGGC TAGAGGCCTGAGGCTTGAAACAGCTCTCAAGTGAGGGGG AAACAACCATTGCCCTCATAGAGGACACATCCACACCAGGG CTGTGCTAGCGTGGGCAGGCAAGCCAGGTGCTGGACCTCT GCACGTGGGGCATGTGTGGGTATGTACATGTACCTGTGTTT TTGGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTCTAGAG CTGGGGTGCAACTATGGGGCCCCTCGGGACATGTCCCAGC CAATGCCTGCTTTGACCAGAGGAGTGTCCACGTGGCTCAG GTGGTCGAGTATCTCATACCGCCCTAGCACACGTGTGACTC CTTTCCCCTATTGTCTACGCAGCCTGCCCTTGACAAGGAC CCGATGCCCAACCCCAGGCCTGGCAAGCCCTCGGCCCTT CCTTGGCCCTTGGCCCATCCCCAGGAGCCTCGCCCAGCTG GAGAGCTGCATGAACAGAGAAACAGGAGAATATGGGCCAAA CAGGATATCTGTGGTAAGCAGTTCTGCCCCGGCTCAGGGC CAAGAACAGTTGGAACAGCAGAATATGGGCCAAACAGGATA TCTGTGGTAAGCAGTTCTGCCCCGGCTCAGGGCCAAGAA CAGATGGTCCCCAGATGCGGTCCCGCCCTCAGCAGTTTCTA GAGAACCATCAGATGTTTCCAGGGTGCCCCAAGGACCTGAA ATGACCCTGTGCCTTATTTGAACTAACCAATCAGTTGCTTCT CGCTTCTGTTGCGCGCTTCTGCTCCCCGAGCTCTATATAAG CAGAGCTCGTTTAGTGAACCGTCAGATCGCCTGGAGACGCC ATCCACGCTGTTTTGACTTCCATAGAAGGATCTCGAGGCCAC CATGCCTCTGGGCCTGCTGTGGCTGGGCCTGGCCCTGCTG GGCGCCCTGCACGCCAGGCCGAGATGTGGCACGAGGGC CTGGAGGAGGCCAGCAGGCTGTATTTGGCGAGCGCAACG TGAAGGGCATGTTGAGGTGCTGGAGCCTCTGCACGCCAT GATGGAGAGAGGCCACAGACCCTGAAGGAGACATCCTTTA ACCAGGCCTATGGACGGGACCTGATGGAGGCACAGGAGTG GTGCAGAAAGTACATGAAGTCTGGCAATGTGAAGGACCTGA CGCAGGCCCTGGGATCTGTACTATCACGTGTTTCGGAGAATC TCCAAGGGCAAAGACACGATTCCGTGGCTTGGGCATCTGCT CGTTGGGCTGAGTGGTGCGTTTGGTTTCATCATCTTGGTCTA	173

10

20

30

40

40

核酸 No.	コードされている配列名	ヌクレオチド配列	配列番号
FoxP3_v4	5' 相同アーム	ACTTGCCAGGACTGTTACAATAGCCTCCTCACTAGCCCCACT CACAGCAGCCAGATGAATCTTTTGTAGTCCATGCCTAGTCACT GGGGCAAATAGGACTCCGAGGAGAAAGTCCGAGACCAGC TCCGGCAAGATGAGCAAACACAGCCTGTGCAGGGTGCAGG GAGGGCTAGAGGCCTGAGGCTTGAAACAGCTCTCAAGTGG AGGGGGAACAACCATTTGCCCTCATAGAGGACACATCCACA CCAGGGCTGTGCTAGCGTGGGCAGGCAAGCCAGGTGCTG GACCTCTGCACGTGGGGCATGTGTGGGTATGTACATGTACC TGTGTTCTTGGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGT TCTAGAGCTGGGGTGCAACTATGGGGCCCTCGGGACATGT CCCAGCCAATGCCTGCTTTGACCAGAGGAGTGTCCACGTG GCTCAGGTGGTCGAGTATCTCATACCGCCCTAGCACACGTG TGACTCCTTTCCCTATTGTCTACGCAGCCTGCCCTTGGACA AGGACCCGATGCCAACCCCAAGGCTGGCAAGCCCTCGGC CCCTTCTTGGCCCTTGGCCCATCCCAGGAGCCTCGCCC AGCTGGAGGGCTGCACCCAAAGCCTCAGACCTGCTGGGGG CCCGGGG	174
	介在配列	ACCAGGTGGAACATTCT	175
	MND プロモーター	GAACAGAGAAACAGGAGAATATGGGCCAAACAGGATATCTG TGGAAGCAGTTCTGCCCGGGCTCAGGGCCAAGAACAGT TGGAACAGCAGAATATGGGCCAAACAGGATATCTGTGGTAA GCAGTTCTTGCCCGGGCTCAGGGCCAAGAACAGATGGTCC CCAGATGCGGTCCCGCCCTCAGCAGTTTCTAGAGAACCATC AGATGTTTCCAGGGTGCCCCAAGGACCTGAAATGACCCTGT GCCTTATTTGAACTAACCAATCAGTTCGCTTCTCGCTTCTGTT CGCGCGCTTCTGCTCCCCGAGCTCTATATAAGCAGAGCTCG TTTAGTGAACCGTCAGATC	176
	介在配列 (FRB-IL2Rb の LCN2 シグナルペプチドに下線を引いている)	GCCTGGAGACGCCATCCACGCTGTTTTGACTTCCATAGAAG GATCTCGAGGCCACCATGCCTCTGGGCCTGCTGTGGCTGG <u>GCCTGGCCCTGCTGGGCGCCCTGCACGCCCAGGCC</u>	177
	FRB-IL2Rb	GAGATGTGGCACGAGGGCCTGGAGGAGGCCAGCAGGCTG TATTTTGGCGAGCGCAACGTGAAGGGCATGTTTCAGGTGCT GGAGCCTCTGCACGCCATGATGGAGAGAGGCCACAGACC CTGAAGGAGACATCCTTTAACCAGGCCTATGGACGGGACCT GATGGAGGCACAGGAGTGGTGCAAAAGTACATGAAGTCTG GCAATGTGAAGGACCTGACGCAGGCCTGGGATCTGTACTAT CACGTGTTTCGGAGAATCTCCAAGGGCAAAGACACGATTCC GTGGCTTGGGCATCTGCTCGTTGGGCTGAGTGGTGCGTTT GGTTTCATCATCTTGGTCTATCTTTGATCAATTGCAGAAATA CAGGCCCTTGGCTGAAAAAAGTCTCAAGTGTAAATACCCC GACCCAAGCAAGTTCTTCTCCAGCTTTCTTCAGAGCATGG AGGCGATGTGCAGAAATGGCTCTTTACCTTTTCCCTCCTC AAGTTTCTCCCCGGGAGGGCTGGCGCCCGAGATTTACCT CTTGAGGTACTTGAACGAGACAAGGTTACCCAACTTCTCCTT CAACAGGATAAGGTACCCGAACCTGCGAGCCTTAGCTCCAA CCACTCTTTACGAGCTGCTTACCAATCAGGGATACTTCTT TTTCCACCTTCCCGATGCGCTGGAATCGAAGCATGTCAAG TTTACTTTACCTATGATCCATATAGCGAGGAAGATCCCGACGA	178

10

20

30

40

50

核酸 No.	コードされている配列名	ヌクレオチド配列	配列番号
		AGGAGTCGCCGGTGCGCCACGGGTTCTCACCCCAACCTCTCCAGCCTCTCTCAGGAGAAGATGATGCTTATTGCACTTTTCCAGTAGAGACGATCTCCTCCTCTTTTCTCCATCTCTTTTGGGGGACCTTCCCCCCTTCTACGGCACCTGGCGGGTCTGTGCTGGCGAGGAGCGGATGCCGCCGTCCCTCCAGGAGCGAGTACCACGAGATTGGGATCCCCAGCCACTTGGACCACCAACTCCAGGCGTACCTGACCTTGTCGATTTTCAACCTCCCCCTGAATTGGTGCTGCGAGAGGCTGGGGAGGAAGTTCCGGACGCTGGGCCGAGGGAGGGCGTGCTCTTCCATGGAGTAGGCCGCCAGGTCAAGGCGAGTTTAGGGCTCTCAACGCGCGGCTGCCGTTGAATACAGACGCTTATCTCTCACTGCAGGAAGTGCAAGGTCAGGACCCAACACATCTTGTA	
	GSG リンカー	GGATCCGGC	
	P2A	GCCACCAACTTTAGTCTGCTCAAGCAAGCCGGGGACGTCGAGGAAAATCCTGGGCCA	179
	細胞質ゾル内 FRB	GAAATGTGGCACGAAGGACTCGAGGAAGCCAGTCGGCTGTATTTGGCGAGCGGAATGTGAAAGGGATGTTTGAAGTGCTGAGCCTCTCCACGCTATGATGGAACGGGGACCCAGACTCTCAAAGAAACCAGCTTTAATCAGGCTTACGGACGCGACCTCATGGAAGCTCAAGAATGGTGAGAAAGTATATGAAGAGTGGCAACGTGAAAGATCTGACACAAGCCTGGGATCTCTATTATCAGTGTTTCAGACGCATCAGCAA	180
	GSG リンカー	GGCAGCGGC	
	第 2 の P2A	GCCACAAATTTCTCCCTGCTGAAACAGGCCGGCGACGTGGAAGAGAATCCCGGACCT	181
	FoxP3 部分	ATGCCCAATCCTAGACCTGGCAAGCCCAGCGCTCCTTCTCTTGCTCTTGACCTTCTCCTGGTGCAAGTCCATCTTGCGGAGCAGCTCCAAAGGCTAGTGATCTTCTCGGAGCTAGAGGTCCTGGAGGCACATTTTCAGGGA	182
	3' 相同アーム	CGAGATCTTCGAGGCGGGGCCCATGCCTCCTCTTCTCCTTGAACCCATGCCACCATCGCAGCTGCAGGTGAGGCCCTGGGCCAGGATGGGGCAGGCAGGGTGGGGTACCTGGACCTACAGGTGCCGACCTTTACTGTGGCACTGGGCGGGAGGGGGCTGGCTGGGGCACAGGAAGTGGTTTCTGGGTCCAGGCAA GTCTGTGACTTATGCAGATGTTGCAGGGCCAAGAAAATCCC CACCTGCCAGGCCTCAGAGATTGGAGGCTCTCCCCGACCTCCCAATCCCTGTCTCAGGAGAGGAGGAGGCCGTATTGTAGTCCCATGAGCATAGCTATGTGTCCCCATCCCCATGTGACAAGA GAAGAGGACTGGGGCCAAGTAGGTGAGGTGACAGGGCTGAGGCCAGCTCTGCAACTTATTAGCTGTTTGATCTTTAAAAAGTT ACTCGATCTCCATGAGCCTCAGTTTCCATACGTGTAAAAGGG GGATGATCATAGCATCTACCATGTGGGCTTGCAGTGCAGAGT	183

10

20

30

40

50

核酸 No.	コードされている 配列名	ヌクレオチド配列	配列 番号
		ATTTGAATTAGACACAGAACAGTGAGGATCAGGATGGCCTCT CACCCACCTGCCTTTCTGCCCAGCTGCCCACACTGCCCTA GTCATGGTGGCACCCCTCCGGGGCACGGCTGGGCCCT	
	相同アームの間	ACCAGGTGGAACATTCTGAACAGAGAAACAGGAGAATATGG GCCAAACAGGATATCTGTGGTAAGCAGTTCCTGCCCCGGCT CAGGGCCAAGAACAGTTGGAACAGCAGAATATGGGCCAAAC AGGATATCTGTGGTAAGCAGTTCCTGCCCCGGCTCAGGGCC AAGAACAGATGGTCCCAGATGCGGTCCCGCCCTCAGCAG TTTCTAGAGAACCATCAGATGTTTCCAGGGTGCCCCAAGGA CCTGAAATGACCCTGTGCCTTATTTGAACTAACCAATCAGTT CGCTTCTCGCTTCTGTTGCGCGCTTCTGCTCCCCGAGCTC TATATAAGCAGAGCTCGTTTAGTGAACCGTCAGATCGCCTGG AGACGCCATCCACGCTGTTTTGACTTCCATAGAAGGATCTCG AGGCCACCATGCCTCTGGGCCTGCTGTGGCTGGGCCTGGC CCTGCTGGGCGCCCTGCACGCCAGGCCGAGATGTGGCAC GAGGGCCTGGAGGAGGCCAGCAGGCTGTATTTTGGCGAGC GCAACGTGAAGGGCATGTTGAGGTGCTGGAGCCTCTGCA CGCCATGATGGAGAGAGGCCACAGACCCTGAAGGAGACA TCCTTTAACCAGGCCTATGGACGGGACCTGATGGAGGCACA GGAGTGGTGCAGAAAGTACATGAAGTCTGGCAATGTGAAGG ACCTGACGCAGGCCTGGGATCTGTACTATCACGTGTTTCGG AGAATCTCCAAGGGCAAAGACACGATTCCGTGGCTTGGGCA TCTGCTCGTTGGGCTGAGTGGTGCCTTGGTTTCATCATCTT GGTCTATCTCTTGATCAATTGCAGAAATACAGGCCCTTGGCT GAAAAAAGTGCTCAAGTGTAATACCCCGACCCAAGCAAGT TCTTCTCCAGCTTTCTTCAGAGCATGGAGGCGATGTGCAG AAATGGCTCTCTTACCTTTTCCCTCCTCAAGTTTCTCCCCG GGAGGGCTGGCGCCCGAGATTCACCTCTTGAGGTAATTGA ACGAGACAAGGTTACCCAACCTCTCCTTCAACAGGATAAGGT ACCCGAACCTGCGAGCCTTAGCTCCAACCACTCTCTTACGA GCTGCTTCACCAATCAGGGATACTTCTTTTCCACCTTCCCG ATGCGCTGGAAATCGAAGCATGTCAAGTTTACTTTACCTATG ATCCATATAGCGAGGAAGATCCCGACGAAGGAGTCGCCGGT GCGCCACGGGTTCCCTACCCCAACCTCTCCAGCCTCTCTC AGGAGAAGATGATGCTTATTGCATTTTCCAGTAGAGACGA TCTCCTCCTCTTTTCTCCATCTCTTTTGGGGGACCTTCCCC CCCTTCTACGGCACCTGGCGGGTCTGGTGCTGGCGAGGAG CGGATGCCGCCGTCCCTCCAGGAGCGAGTACCACGAGATT GGGATCCCCAGCCACTTGGACCACCAACTCCAGGCGTACCT GACCTTGTGATTTTCAACCTCCCCCTGAATTGGTGCTGCG AGAGGCTGGGGAGGAAGTTCCGGACGCTGGGCCGAGGGA GGGCGTGCTTTTCCATGGAGTAGGCCTCCAGGTCAAGGC GAGTTTAGGGCTCTCAACGCGCGGCTGCCGTTGAATACAGA CGCTTATCTCTCACTGCAGGAAGTCAAGGTCAGGACCCAA CACATCTTGTAGGATCCGGCGCCACCAACTTTAGTCTGCTCA AGCAAGCCGGGGACGTCGAGGAAAATCCTGGGCCAGAAAT GTGGCACGAAGGACTCGAGGAAGCCAGTCGGCTGTATTTG GCGAGCGGAATGTGAAAGGGATGTTTGAAGTGCTCGAGCCT CTCCACGCTATGATGGAACGGGGACCCAGACTCTCAAAGA AACCAGCTTTAATCAGGCTTACGGACGCGACCTCATGGAAG CTAAGAATGGTGTAGAAAGTATATGAAGAGTGGAACGTGA AAGATCTGACACAAGCCTGGGATCTCTATTATCACGTGTTCA	184

10

20

30

40

50

40

核酸 No.	コードされている配列名	ヌクレオチド配列	配列番号
		CCTTGGCCCTTGGCCCATCCCCAGGAGCCTCGCCCAGCTG GAGGGCTGCACCCAAAGCCTCAGACCTGCTGGGGGCCCG GGGCCAGGGGAACCTTCCAGGGCCGAGATCTTCGAGGC GGGGC	
	介在配列	TCATGCAT	
	MND プロモーター	GAACAGAGAAACAGGAGAATATGGGCCAAACAGGATATCTG TGGTAAGCAGTTCCTGCCCCGGCTCAGGGCCAAGAACAGT TGGAACAGCAGAATATGGGCCAAACAGGATATCTGTGGTAA GCAGTTCTGCCCCGGCTCAGGGCCAAGAACAGATGGTCC CCAGATGCGGTCCC GCCCTCAGCAGTTTCTAGAGAACCATC AGATGTTTCCAGGGTGCCCCAAGGACCTGAAATGACCCTGT GCCTTATTTGAACTAACCAATCAGTTCGCTTCTCGCTTCTGTT CGCGCGCTTCTGCTCCCCGAGCTCTATATAAGCAGAGCTCG TTAGTGAACCGTCAGATC	187
	介在配列 (FRB-IL2Rb の LCN2 シグナルペプチドに下線を引いている)	GCCTGGAGACGCCATCCACGCTGTTTTGACTTCCATAGAAG GATCTCGAGGCCACCATGCCTCTGGGCCCTGCTGTGGCTGG <u>GCCTGGCCCTGCTGGGGCCCTGCACGCCCAGGCC</u>	188
	FRB-IL2Rb	GAGATGTGGCACGAGGGCTGGAGGAGGCCAGCAGGCTG TATTTTGGCGAGCGCAACGTGAAGGGCATGTTTCGAGGTGCT GGAGCCTCTGCACGCCATGATGGAGAGAGGCCACAGACC CTGAAGGAGACATCCTTTAACCAGGCCATGGACGGGACCT GATGGAGGCACAGGAGTGGTGCAGAAAGTACATGAAGTCTG GCAATGTGAAGGACCTGACGCAGGCCTGGGATCTGTACTAT CACGTGTTTCGGAGAATCTCCAAGGGCAAAGACACGATTCC GTGGCTTGGGCATCTGCTCGTTGGGCTGAGTGGTGCCTTT GGTTTCATCATCTTGGTCTATCTTTGATCAATTGCAGAAATA CAGGCCCTTGGCTGAAAAAAGTCTCAAGTGAATACCCCC GACCAAGCAAGTTCTTCTCCAGCTTTCTTCAGAGCATGG AGGCGATGTGCAGAAATGGCTCTCTTACCTTTTCCCTCCTC AAGTTTCTCCCCGGGAGGGCTGGCGCCCGAGATTTACCT CTTGAGGTACTTGAACGAGACAAGGTTACCCAACCTTCTCCTT CAACAGGATAAGGTACCCGAACCTGCGAGCCTTAGCTCCAA CCTCTCTTACGAGCTGCTTACCAATCAGGATACTTCTT TTTCCACCTTCCCGATGCGCTGGAATCGAAGCATGTCAAG TTTACTTTACCTATGATCCATATAGCGAGGAAGATCCCGACGA AGGAGTCGCCGGTGCGCCACGGGTTCTCACCCCAACCT CTCCAGCCTCTCTCAGGAGAAGATGATGCTTATTGCACTTTT CCCAGTAGAGACGATCTCCTCCTCTTTTCTCCATCTCTTTT GGGGGACCTTCCCCCCTTCTACGGCACCTGGCGGGTCTG GTGCTGGCGAGGAGCGGATGCCGCCGTCCCTCCAGGAGC GAGTACCACGAGATTGGGATCCCCAGCCACTTGGACCACCA ACTCCAGGCGTACCTGACCTTGTCGATTTTCAACCTCCCCCT GAATTGGTGCTGCGAGAGGCTGGGGAGGAAGTCCGGACG CTGGGCCGAGGGAGGGCGTGTCTTTCCATGGAGTAGGCC TCCAGGTCAAGGCGAGTTTAGGGCTCTCAACGCGCGGCTG CCGTTGAATACAGACGCTTATCTCTCACTGCAGGAACGCAA GGTCAGGACCCAACACATCTTGTA	189

10

20

30

40

50

核酸 No.	コードされている配列名	ヌクレオチド配列	配列番号
	GSG リンカー	GGATCCGGC	
	P2A	GCCACCAACTTTAGTCTGCTCAAGCAAGCCGGGGACGTCG AGGAAAATCCTGGGCCA	190
	細胞質ゾル内 FRB	GAAATGTGGCACGAAGGACTCGAGGAAGCCAGTCGGCTGT ATTTTGGCGAGCGGAATGTGAAAGGGATGTTTGAAGTGCTC GAGCCTCTCCACGCTATGATGGAACGGGGACCCAGACTCT CAAAGAAACCAGCTTTAATCAGGCTTACGGACGCGACCTCA TGGAAGCTCAAGAATGGTGTAGAAAGTATATGAAGAGTGGCA ACGTGAAAGATCTGACACAAGCCTGGGATCTCTATTATCACG TGTTGACAGGCATCAGCAA	191
	GSG リンカー	GGCAGCGGC	
	第 2 の P2A	GCCACAAATTTCTCCCTGCTGAAACAGGCCGGCGACGTGG AAGAGAATCCCGACCT	192
	FoxP3 部分	ATGCCCAATCCTAGACCTGGCAAGCCCAGCGCTCCTTCTCT TGCTCTTGGACCTTCTCCTGGTGCAAGTCCATCTTGGCGAG CAGCTCCAAAGGCTAGTGATCTTCTCGGAGCTAGAGGTCCT GGAGGCACATTTCAAGGTAGAGACTTGAGGGGAGGTGCTC ACGCT	193
	3' 相同アーム	TCCTCTTCTCCTTGAACCCCATGCCACCATCGCAGCTGCA GGTGAGGCCCTGGGCCAGGATGGGGCAGGCAGGGTGGG GTACCTGGACCTACAGGTGCCGACCTTTACTGTGGCACTGG GCGGGAGGGGGCTGGCTGGGGCACAGGAAGTGGTTTCT GGGTCCCAGGCAAGTCTGTGACTTATGCAGATGTTGCAGGG CCAAGAAAATCCCCACCTGCCAGGCCTCAGAGATTGGAGGC TCTCCCCGACCTCCCAATCCCTGTCTCAGGAGAGGAGGAG GCCGTATTGTAGTCCCATGAGCATAGCTATGTGTCCCCATCC CCATGTGACAAGAGAAGAGGACTGGGGCCAAGTAGGTGAG GTGACAGGGCTGAGGCCAGCTCTGCAACTATTAGCTGTTT GATCTTTAAAAAGTTACTCGATCTCCATGAGCCTCAGTTTCCA TACGTGTAAGGGGGATGATCATAGCATCTACCATGTGGGC TTGCAGTGCAAGTATTTGAATTAGACACAGAACAGTGAGGA TCAGGATGGCCTCTACCCACCTGCCTTTCTGCCAGCTGC CCACACTGCCCCTAGTCATGGTGGCACCTCCGGGGCAGC GCTGGGCCCCCTTGCCCCACTTACAGGCACTCCTCCAG	194
	相同アームの間	TCATGCATGAACAGAGAAACAGGAGAATATGGGCCAAACAG GATATCTGTGGTAAGCAGTTCTGCCCCGGCTCAGGGCCAA GAACAGTTGGAACAGCAGAATATGGGCCAAACAGGATATCT GTGGTAAGCAGTTCTGCCCCGGCTCAGGGCCAAGAACAG ATGGTCCCCAGATGCGGTCCCGCCCTCAGCAGTTTCTAGAG AACCATCAGATGTTTCCAGGGTGCCCCAAGGACCTGAAATG ACCCTGTGCCTTATTTGAACTAACCAATCAGTTCGCTTCTCG CTTCTGTTGCGCGCTTCTGCTCCCCGAGCTCTATATAAGCA	195

10

20

30

40

50

40

核酸 No.	コードされている配列名	ヌクレオチド配列	配列番号
		TGGCACGAAGGACTCGAGGAAGCCAGTCGGCTGTATTTTGG CGAGCGGAATGTGAAAGGGATGTTTGAAGTGCTCGAGCCTC TCCACGCTATGATGGAACGGGGACCCCAGACTCTCAAAGAA ACCAGCTTTAATCAGGCTTACGGACGCGACCTCATGGAAGC TCAAGAATGGTGTAGAAAGTATATGAAGAGTGGCAACGTGAA AGATCTGACACAAGCCTGGGATCTCTATTATCACGTGTTTCA ACGCATCAGCAAAGGCAGCGGCGCCACAAATTTCTCCCTGC TGAAACAGGCCGGCGACGTGGAAGAGAATCCCGGACCTAT GCCCAATCCTAGACCTGGCAAGCCCAGCGCTCCTTCTTTG CTCTTGGACCTTCTCCTGGTGAAGTCCATCTTGGCGAGCA GCTCCAAAGGCTAGTGATCTTCTCGGAGCTAGAGGTCCTGG AGGCACATTTCAAGGTAGAGACTTGAGGGGAGGTGCTCACG CTTCCTCTTCTTCTTGAACCCCATGCCACCATCGCAGCTGC AGGTGAGGCCCTGGGCCAGGATGGGGCAGGCAGGGTGG GGTACCTGGACCTACAGGTGCCGACCTTTACTGTGGCACTG GGCGGGAGGGGGGCTGGCTGGGGCACAGGAAGTGGTTTC TGGGTCCCAGGCAAGTCTGTGACTTATGCAGATGTTGCAGG GCCAAGAAAATCCCCACCTGCCAGGCCTCAGAGATTGGAG GCTCTCCCCGACCTCCCAATCCCTGTCTCAGGAGAGGAGG AGGCCGTATTGTAGTCCCATGAGCATAGCTATGTGTCCCAT CCCCATGTGACAAGAGAAGAGGACTGGGGCCAAGTAGGTG AGGTGACAGGGCTGAGGCCAGCTCTGCAACTATTAGCTGT TTGATCTTTAAAAAGTTACTCGATCTCCATGAGCCTCAGTTTC CATACGTGTAAGGGGGATGATCATAGCATCTACCATGTGG GCTTGCAGTGCAGAGTATTTGAATTAGACACAGAACAGTGA GGATCAGGATGGCCTCTACCCACCTGCCCTTCTGCCCAGC TGCCCACTGCCCCTAGTCATGGTGGCACCTCCGGGGC ACGGCTGGGCCCTTGCCCCACTTACAGGCACTCCTCCAG	10
FoxP3_v6	5' 相同アーム	CACTCACAGCAGCCAGATGAATCTTTTGAGTCCATGCCTAGT CACTGGGGCAAAATAGGACTCCGAGGAGAAAAGTCCGAGAC CAGCTCCGGCAAGATGAGCAAACACAGCCTGTGCAGGGTG CAGGGAGGGCTAGAGGCCTGAGGCTTGAACAGCTCTCAA GTGGAGGGGGAAACAACCATTGCCCTCATAGAGGACACATC CACACCAGGGCTGTGCTAGCGTGGGCAGGCAAGCCAGGTG CTGGACCTCTGCACGTGGGCATGTGTGGGTATGTACATGT ACCTGTGTTCTTGGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGT GTGTCTAGAGCTGGGGTGCAACTATGGGGCCCCTCGGGAC ATGTCCAGCCAATGCCTGCTTTGACCAGAGGAGTGTCCAC GTGGCTCAGGTGGTCGAGTATCTCATACCGCCCTAGCACAC GTGTGACTCCTTTCCCCTATTGTCTACGCAGCCTGCCCTTG GACAAGGACCCGATGCCCAACCCAGGCCTGGCAAGCCCT CGGCCCTTCTTGCCCTTGCCCCATCCCCAGGAGCCTC GCCAGCTGGAGGGCTGCACCCAAAGCCTCAGACCTGCTG GGGGCCCGGGGCCAGGGGGAACCTTCCAGGGCCGAGAT CTT	197
	介在配列	AGGT	
	MND プロモーター	GAACAGAGAAACAGGAGAATATGGGCCAAACAGGATATCTG TGGTAAGCAGTTCTGCCCCGGCTCAGGGCCAAGAACAGT TGGAACAGCAGAATATGGGCCAAACAGGATATCTGTGGTAA GCAGTTCCTGCCCCGGCTCAGGGCCAAGAACAGATGGTCC	198

10

20

30

40

50

核酸 No.	コードされている配列名	ヌクレオチド配列	配列番号
		CCAGATGCGGTCCCGCCCTCAGCAGTTTCTAGAGAACCATC AGATGTTTCCAGGGTGCCCCAAGGACCTGAAATGACCCTGT GCCTTATTTGAACTAACCAATCAGTTCGCTTCTCGCTTCTGTT CGCGCGCTTCTGCTCCCCGAGCTCTATATAAGCAGAGCTCG TTTAGTGAACCGTCAGATC	
	介在配列 (FRB-IL2Rb の LCN2 シグナルペプチドに下線を引いている)	GCCTGGAGACGCCATCCACGCTGTTTTGACTTCCATAGAAG GATCTCGAGGCCACCATGCCTCTGGGCCTGCTGTGGCTGG <u>GCCTGGCCCTGCTGGGCGCCCTGCACGCCCAGGCC</u>	199
	FRB-IL2Rb	GAGATGTGGCACGAGGGCCTGGAGGAGGCCAGCAGGCTG TATTTTGGCGAGCGCAACGTGAAGGGCATGTTTCGAGGTGCT GGAGCCTCTGCACGCCATGATGGAGAGAGGCCACAGACC CTGAAGGAGACATCCTTTAACGAGGCCATGGACGGGACCT GATGGAGGCACAGGAGTGGTGCAGAAAGTACATGAAGTCTG GCAATGTGAAGGACCTGACGCAGGCCTGGGATCTGTACTAT CACGTGTTTCGGAGAATCTCCAAGGGCAAAGACACGATTCC GTGGCTTGGGCATCTGCTCGTTGGGCTGAGTGGTGCCTTT GGTTTCATCATCTTGGTCTATCTCTTGATCAATTGCAGAAATA CAGGCCCTTGGCTGAAAAAAGTGCTCAAGTGTAATACCCCC GACCAAGCAAGTTCTTCTCCAGCTTTCTTCAGAGCATGG AGGCGATGTGCAGAAATGGCTCTCTTACCTTTTCCCTCCTC AAGTTTCTCCCCGGGAGGGCTGGCGCCCGAGATTTACCT CTTGAGGTACTTGAACGAGACAAGTTACCCAATTCTCCTT CAACAGGATAAGGTACCCGAACCTGCGAGCCTTAGCTCCAA CCACTCTCTTACGAGCTGCTTACCAATCAGGGATACTTCTT TTTCCACCTTCCCGATGCGCTGGAAATCGAAGCATGTCAAG TTTACTTTACCTATGATCCATATAGCGAGGAAGATCCCGACGA AGGAGTCGCCGGTGCGCCACGGGTTCTCACCCCAACCT CTCCAGCCTCTCTCAGGAGAAGATGATGCTTATTGCACTTTT CCCAGTAGAGACGATCTCCTCCTTTTTCTCCATCTCTTTTG GGGGGACCTTCCCCCCTTCTACGGCACCTGGCGGGTCTG GTGCTGGCGAGGAGCGGATGCCGCCGTCCCTCCAGGAGC GAGTACCACGAGATTGGGATCCCCAGCCACTTGGACCACCA ACTCCAGGCGTACCTGACCTTGTGATTTTCAACCTCCCCCT GAATTGGTGCTGCGAGAGGCTGGGGAGGAAGTTCCGGACG CTGGGCCGAGGGAGGGCGTGTCTTTCCATGGAGTAGGCC TCCAGGTCAAGGCGAGTTTAGGGCTCTCAACGCGCGGCTG CCGTTGAATACAGACGCTTATCTCTCACTGCAGGAAGTGCAA GGTCAGGACCCAACACATCTTGTA	200
	GSG リンカー	GGATCCGGC	
	P2A	GCCACCAACTTTAGTCTGCTCAAGCAAGCCGGGGACGTGCG AGGAAAATCCTGGGCCA	201
	細胞質ゾル内 FRB	GAAATGTGGCACGAAGGACTCGAGGAAGCCAGTCGGCTGT ATTTTGGCGAGCGGAATGTGAAAGGGATGTTTGAAGTGCTC GAGCCTCTCCACGCTATGATGGAACGGGGACCCAGACTCT CAAAGAAACAGCTTTAATCAGGCTTACGGACGCGACCTCA TGGAAGCTCAAGAATGGTGTAGAAAGTATATGAAGAGTGGCA	202

10

20

30

40

50

核酸 No.	コードされている配列名	ヌクレオチド配列	配列番号
		ACGTGAAAGATCTGACACAAGCCTGGGATCTCTATTATCAGC TGTTTCAGACGCATCAGCAAA	
	GSG リンカー	GGCAGCGGC	
	第 2 の P2A	GCCACAAATTTCTCCCTGCTGAAACAGGCCGGCGACGTGG AAGAGAATCCCGGACCT	203
	FoxP3 部分	ATGCCCAATCCTAGACCTGGCAAGCCCAGCGCTCCTTCTCT TGCTCTTGACCTTCTCCTGGTGCAAGTCCATCTTGCGGAG CAGCTCCAAAGGCTAGTGATCTTCTCGGAGCTAGAGGTCCT GGAGGCACATTTCAAGGTAGGGACTTGCGTGGAGGT	204
	3' 相同アーム	GCCCATGCCTCCTCTTCTTCCCTTGAACCCCATGCCACCATC GCAGCTGCAGGTGAGGCCCTGGGCCCAGGATGGGGCAGG CAGGGTGGGGTACCTGGACCTACAGGTGCCGACCTTTACTG TGGCACTGGGCGGGAGGGGGGCTGGCTGGGGCACAGGAA GTGGTTTCTGGGTCCCAGGCAAGTCTGTGACTTATGCAGAT GTTGCAGGGCCAAGAAAATCCCCACCTGCCAGGCCTCAGA GATTGGAGGCTCTCCCCGACCTCCCAATCCCTGTCTCAGGA GAGGAGGAGGCCGTATTGTAGTCCCATGAGCATAGCTATGT GTCCCCATCCCCATGTGACAAGAGAAGAGGACTGGGGCCA AGTAGGTGAGGTGACAGGGCTGAGGCCAGCTCTGCAACTT ATTAGCTGTTTGATCTTTAAAAAGTTACTCGATCTCCATGAGC CTCAGTTTCCATACGTGTAAAAGGGGGATGATCATAGCATCT ACCATGTGGGCTTGCAGTGCAGAGTATTTGAATTAGACACAG AACAGTGAGGATCAGGATGGCCTCTCACCCACCTGCCTTTC TGCCAGCTGCCACACTGCCCTAGTCATGGTGGCACCCCT CCGGGGCACGGCTGGGCCCTTGCCCCACTTACAGGCA	205
	相同アームの間	AGGTGAACAGAGAAACAGGAGAATATGGGCCAAACAGGATA TCTGTGGTAAGCAGTTCCTGCCCCGGCTCAGGGCCAAGAA CAGTTGGAACAGCAGAATATGGGCCAAACAGGATATCTGTG GTAAGCAGTTCCTGCCCCGGCTCAGGGCCAAGAACAGATG GTCCCCAGATGCGGTCCCGCCCTCAGCAGTTTCTAGAGAAC CATCAGATGTTTCCAGGGTGCCCCAAGGACCTGAAATGACC CTGTGCCTTATTTGAACAAACCAATCAGTTCGCTTCTCGCTT CTGTTGCGCGCTTCTGCTCCCCGAGCTCTATATAAGCAGA GCTCGTTTAGTGAACCGTCAGATCGCCTGGAGACGCCATCC ACGCTGTTTGACTTCCATAGAAGGATCTCGAGGCCACCAT GCCTCTGGGCCTGCTGTGGCTGGGCCTGGCCCTGCTGGG CGCCCTGCACGCCAGGCCGAGATGTGGCACGAGGGCCT GGAGGAGGCCAGCAGGCTGTATTTGGCGAGCGCAACGTG AAGGGCATGTTGAGGTGCTGGAGCCTCTGCACGCCATGAT GGAGAGAGGCCACAGACCCTGAAGGAGACATCCTTTAACC AGGCCTATGGACGGGACCTGATGGAGGCACAGGAGTGGTG CAGAAAGTACATGAAGTCTGGCAATGTGAAGGACCTGACGC AGGCCTGGGATCTGTACTATCACGTGTTTCGGAGAATCTCCA AGGGCAAAGACACGATTCCGTGGCTTGGGCATCTGCTCGTT GGGCTGAGTGGTGCGTTTGGTTTCATCATCTTGCTATCTC	206

10

20

30

40

50

核酸 No.	コードされている 配列名	ヌクレオチド配列	配列 番号
		TTGATCAATTGCAGAAATACAGGCCCTTGGCTGAAAAAAGTG CTCAAGTGTAAATACCCCGACCCAAGCAAGTTCTTCTCCCA GCTTTCCTCAGAGCATGGAGGCGATGTGCAGAAATGGCTCT CTTACCTTTTCCCTCCTCAAGTTTCTCCCCGGGAGGGCTG GCGCCCGAGATTTACCTCTTGAGGTACTTGAACGAGACAA GGTTACCCAACCTTCTCCTTCAACAGGATAAGGTACCCGAACC TGCAGGCCTTAGCTCCAACCACTCTCTTACGAGCTGCTTCA CCAATCAGGGATACTTCTTTTCCACCTTCCCGATGCGCTGG AAATCGAAGCATGTCAAGTTTACTTTACCTATGATCCATATAG CGAGGAAGATCCCGACGAAGGAGTCGCCGGTGCGCCAC GGGTTCTCACCCTCAACCTCTCCAGCCTCTCTCAGGAGAAG ATGATGCTTATTGCACTTTTCCAGTAGAGACGATCTCCTCC TCTTTTCTCCATCTCTTTTGGGGGGACCTTCCCCCCTTCTA CGGCACCTGGCGGGTCTGGTGCTGGCGAGGAGCGGATGC CGCCGTCCCTCCAGGAGCGAGTACCACGAGATTGGGATCC CCAGCCACTTGGACCACCAACTCCAGGCGTACCTGACCTTG TCGATTTTCAACCTCCCCCTGAATTGGTGCTGCGAGAGGCT GGGGAGGAAGTTCCGGACGCTGGGCCGAGGGAGGGCGTG TCCTTTCCATGGAGTAGGCCTCCAGGTCAAGGCGAGTTTAG GGCTCTCAACGCGCGGCTGCCGTTGAATACAGACGCTTATC TCTCACTGCAGGAAGTCAAGGTGAGACCCAACACATCTT GTAGGATCCGGCGCCACCAACTTTAGTCTGCTCAAGCAAGC CGGGGACGTCGAGGAAAATCCTGGGCCAGAAATGTGGCAC GAAGGACTCGAGGAAGCCAGTCGGCTGTATTTGGCGAGC GGAATGTGAAAGGGATGTTTGAAGTGCTCGAGCCTCTCCAC GCTATGATGGAACGGGACCCAGACTCTCAAAGAAACCAG CTTTAATCAGGCTTACGGACGCGACCTCATGGAAGCTCAAG AATGGTGTAGAAAGTATATGAAGAGTGGCAACGTGAAAGATC TGACACAAGCCTGGGATCTCTATTATCACGTGTTACAGCGCA TCAGCAAAGGCAGCGCGCCACAAATTTCTCCCTGCTGAAA CAGGCCGGCGACGTGGAAGAGAATCCCGGACCTATGCCCA ATCCTAGACCTGGCAAGCCAGCGCTCCTTCTCTTGCTCTT GGACCTTCTCCTGGTGCAAGTCCATCTTGGCGAGCAGCTCC AAAGGCTAGTGATCTTCTCGGAGCTAGAGGTCTGGAGGCA CATTTCAAGGTAGGGACTTGCGTGAGGT	10
	全長ドナー鋳型	CACTCACAGCAGCCAGATGAATCTTTTGAAGTCCATGCCTAGT CACTGGGGCAAATAGGACTCCGAGGAGAAAAGTCCGAGAC CAGCTCCGGCAAGATGAGCAAACACAGCCTGTGCAGGGTG CAGGGAGGGCTAGAGGCCTGAGGCTTGAACAGCTCTCAA GTGGAGGGGGAAACAACCATTGCCCTCATAGAGGACACATC CACACCAGGGCTGTGCTAGCGTGGGCAGGCAAGCCAGGTG CTGGACCTCTGCACGTGGGGCATGTGTGGGTATGTACATGT ACCTGTGTTCTTGGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGT GTGTCTAGAGCTGGGGTGCAACTATGGGGCCCCTCGGGAC ATGTCCCAGCCAATGCCTGCTTTGACCAGAGGAGTGCCAC GTGGCTCAGGTGGTCGAGTATCTCATACCGCCCTAGCACAC GTGTGACTCCTTTCCCCTATTGTCTACGCAGCCTGCCCTTG GACAAGGACCCGATGCCCAACCCAGGCCTGGCAAGCCCT CGGCCCCCTTCTTGGCCCTTGGCCCATCCCCAGGAGCCTC GCCCAGCTGGAGGGCTGCACCCAAAGCCTCAGACCTGCTG GGGGCCCGGGGCCAGGGGGAACCTTCCAGGGCCGAGAT CTTAGGTGAACAGAGAAACAGGAGAATATGGGCCAAACAGG ATATCTGTGGTAAGCAGTTCCTGCCCCGGCTCAGGGCCAAG	207

10

20

30

40

40

核酸 No.	コードされている配列名	ヌクレオチド配列	配列番号
		TCTTCTTCCTTGAACCCCATGCCACCATCGCAGCTGCAGGT GAGGCCCTGGGCCCAGGATGGGGCAGGCAGGGTGGGGTA CCTGGACCTACAGGTGCCGACCTTTACTGTGGCACTGGGC GGGAGGGGGGCTGGCTGGGGCACAGGAAGTGGTTTCTGG GTCCCAGGCAAGTCTGTGACTTATGCAGATGTTGCAGGGCC AAGAAAATCCCCACCTGCCAGGCCTCAGAGATTGGAGGCTC TCCCCGACCTCCCAATCCCTGTCTCAGGAGAGGAGGAGGC CGTATTGTAGTCCCATGAGCATAGCTATGTGTCCCATCCCC ATGTGACAAGAGAAGAGGACTGGGGCCAAGTAGGTGAGGT GACAGGGCTGAGGCCAGCTCTGCAACTTATTAGCTGTTTGA TCTTTAAAAAGTTACTCGATCTCCATGAGCCTCAGTTTCCATA CGTGTAAGGGGGATGATCATAGCATCTACCATGTGGGCTT GCAGTGCAGAGTATTTGAATTAGACACAGAACAGTGAGGATC AGGATGGCCTCTACCCACCTGCCTTTCTGCCAGCTGCCC ACACTGCCCCCTAGTCATGGTGGCACCCCTCCGGGGCACGGC TGGGCCCCCTTGGCCCACTTACAGGCA	
FoxP3_v7	5' 相同アーム	ACTTGCCAGGACTGTTACAATAGCCTCCTCACTAGCCCCACT CACAGCAGCCAGATGAATCTTTTGAGTCCATGCCTAGTCACT GGGGCAAATAGGACTCCGAGGAGAAAGTCCGAGACCAGC TCCGGCAAGATGAGCAAACACAGCCTGTGCAGGGTGCAGG GAGGGCTAGAGGCCTGAGGCTTGAAACAGCTCTCAAGTGG AGGGGGAAACAACCATGCCCCTCATAGAGGACACATCCACA CCAGGGCTGTGCTAGCGTGGGCAGGCAAGCCAGGTGCTG GACCTCTGCACGTGGGGCATGTGTGGGTATGTACATGTACC TGTGTTCTTGGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTG TCTAGAGCTGGGGTGCAACTATGGGGCCCCCTCGGGACATGT CCCAGCCAATGCCTGCTTTGACCAGAGGAGTGTCCACGTG GCTCAGGTGGTCGAGTATCTCATACCGCCCTAGCACACGTG TGACTCCTTTCCCCTATTGTCTACGCAGCCTGCCCTTGGACA AGGACCCGATGCCCAACCCAGGCCTGGCAAGCCCTCGGC CCCTTCCTTGGCCCTTGGCCCATCCCCAGGAGCCTCGCCC AGCTGGAGGGCTGCACCCAAAGCCTCAGACCTGCTGGGGG CCCGGGG	208
	介在配列	CCCAGGGGGAACCTTCCAGT	209
	MND プロモーター	GAACAGAGAAACAGGAGAATATGGGCCAAACAGGATATCTG TGGAAGCAGTTCTGCCCCGGCTCAGGGCCAAGAACAGT TGGAACAGCAGAATATGGGCCAAACAGGATATCTGTGGTAA GCAGTTCTGCCCCGGCTCAGGGCCAAGAACAGATGGTCC CCAGATGCGGTCCCGCCCTCAGCAGTTTCTAGAGAACCATC AGATGTTTCCAGGGTGCCCAAGGACCTGAAATGACCCTGT GCCTTATTTGAACTAACCAATCAGTTCGCTTCTCGCTTCTGTT CGCGCGCTTCTGCTCCCCGAGCTCTATATAAGCAGAGCTCG TTTAGTGAACCGTCAGATC	210
	介在配列 (FRB- IL2Rb の LCN2 シ グナルペプチドに 下線を引いてい る)	GCCTGGAGACGCCATCCACGCTGTTTTGACTTCCATAGAAG GATCTCGCCGCCACCATGCCTCTGGGCCTGCTGTGGCTGG <u>GCCTGGCCCTGCTGGGCGCCCTGCACGCCCAGGCC</u>	211

10

20

30

40

50

核酸 No.	コードされている配列名	ヌクレオチド配列	配列番号
	FRB-IL2Rb	GAGATGTGGCACGAGGGCCTGGAGGAGGCCAGCAGGCTG TATTTTGGCGAGCGCAACGTGAAGGGCATGTTTCGAGGTGCT GGAGCCTCTGCACGCCATGATGGAGAGAGGGCCACAGACC CTGAAGGAGACATCCTTTAACCAGGCCTATGGACGGGACCT GATGGAGGCACAGGAGTGGTGCAGAAAGTACATGAAGTCTG GCAATGTGAAGGACCTGACGCAGGCCTGGGATCTGTACTAT CACGTGTTTCGGAGAATCTCCAAGGGCAAAGACACGATTCC GTGGCTTGGGCATCTGCTCGTTGGGCTGAGTGGTGCCTTT GGTTTCATCATCTTGGTCTATCTCTTGATCAATTGCAGAAATA CAGGCCCTTGGCTGAAAAAAGTGCTCAAGTGAATACCCCC GACCCAAGCAAGTTCTTCTCCCAGCTTCTTCAGAGCATGG AGGCGATGTGCAGAAATGGCTCTCTTACCTTTTCCCTCCTC AAGTTTCTCCCCGGGAGGGCTGGCGCCCGAGATTTACCT CTTGAGGTACTTGAACGAGACAAGGTTACCCAATTCTCCTT CAACAGGATAAGGTACCCGAACCTGCGAGCCTTAGCTCCAA CCTCTCTTACGAGCTGCTTACCAATCAGGGATACTTCTT TTTCCACCTTCCCGATGCGCTGGAAATCGAAGCATGTCAAG TTTACTTTACCTATGATCCATATAGCGAGGAAGATCCCGACGA AGGAGTCGCCCGGTGCGCCACACGGGTTCTCACCCCAACCT CTCCAGCCTCTCTCAGGAGAAGATGATGCTTATTGCACTTTT CCCAGTAGAGACGATCTCCTCCTCTTTTCTCCATCTCTTTTG GGGGGACCTTCCCCCCTTCTACGGCACCTGGCGGGTCTG GTGCTGGCGAGGAGCGGATGCCGCCGTCCCTCCAGGAGC GAGTACCACGAGATTGGGATCCCCAGCCACTTGACCACCA ACTCCAGGCGTACCTGACCTTGTGATTTTCAACCTCCCCCT GAATTGGTGCTGCGAGAGGCTGGGGAGGAAGTTCCGGACG CTGGGCCGAGGGAGGGCGTGTCTTTCCATGGAGTAGGCC TCCAGGTCAAGGCGAGTTTAGGGCTCTCAACGCGCGGCTG CCGTTGAATACAGACGCTTATCTCTCACTGCAGGAAGTCAAA GGTCAGGACCCAACACATCTTGTA	212
	GSG リンカー	GGATCCGGC	
	P2A	GCCACCAACTTTAGTCTGCTCAAGCAAGCCGGGGACGTGCG AGGAAAATCCTGGGCCA	213
	細胞質ゾル内 FRB	GAAATGTGGCACGAAGGACTCGAGGAAGCCAGTCGGCTGT ATTTTGGCGAGCGGAATGTGAAAGGGATGTTTGAAGTGCTC GAGCCTCTCCACGCTATGATGGAACGGGGACCCAGACTCT CAAAGAAACCAGCTTTAATCAGGCTTACGGACGCGACCTCA TGGAAGCTCAAGAATGGTGTAGAAAGTATATGAAGAGTGGCA ACGTGAAAGATCTGACACAAGCCTGGGATCTCTATTATCACG TGTTTCAGACGCATCAGCAAA	214
	GSG リンカー	GGCAGCGGC	

10

20

30

40

50

核酸 No.	コードされている配列名	ヌクレオチド配列	配列番号
	第 2 の P2A	GCCACAAATTTCTCCCTGCTGAAACAGGCCGGCGACGTGG AAGAGAATCCCGGACCT	215
	FoxP3 部分	ATGCCCAATCCTAGACCTGGCAAGCCCAGCGCTCCTTCTCT TGCTCTTGACCTTCTCCTGGTGCAAGTCCATCTTGCGGAG CAGCTCCAAAGGCTAGTGATCTTCTCGGAGCTAGAGGTCCT GGAGGCACATTTGGA	216
	3' 相同アーム	CGAGATCTTCGAGGCGGGGCCCATGCCTCCTTCTTCTCTT GAACCCCATGCCACCATCGCAGCTGCAGGTGAGGCCCTGG GCCCAGGATGGGGCAGGCAGGGTGGGGTACCTGGACCTAC AGGTGCCGACCTTTACTGTGGCACTGGGCGGGAGGGGGG CTGGCTGGGGCACAGGAAGTGGTTTCTGGGTCCAGGCAA GTCTGTGACTTATGCAGATGTTGCAGGGCCAAGAAAATCCC CACCTGCCAGGCCTCAGAGATTGGAGGCTCTCCCCGACCT CCCAATCCCTGTCTCAGGAGAGGAGGAGGCCGTATTGTAGT CCCATGAGCATAGCTATGTGTCCCCATCCCCATGTGACAAGA GAAGAGGACTGGGGCCAAGTAGGTGAGGTGACAGGGCTGA GGCCAGCTCTGCAACTATTAGCTGTTTGATCTTTAAAAAGTT ACTCGATCTCCATGAGCCTCAGTTTCCATACGTGTAAGGG GGATGATCATAGCATCTACCATGTGGGCTTGCAGTGACAGAT ATTTGAATTAGACACAGAACAGTGAGGATCAGGATGGCCTCT CACCCACCTGCCTTTCTGCCAGCTGCCACACTGCCCTA GTCTGTTGGCACCTCCGGGGCACGCTGGGCCCCCT	217
	相同アームの間	CCCAGGGGGAACCTTCCAGTGAACAGAGAAACAGGAGAATA TGGGCCAAACAGGATATCTGTGTAAGCAGTTCTGCCCGG GCTCAGGGCCAAGAACAGTTGGAACAGCAGAATATGGGCCA AACAGGATATCTGTGTAAGCAGTTCTGCCCGGCTCAGG GCCAAGAACAGATGGTCCCCAGATGCGGTCCCGCCCTCAG CAGTTTCTAGAGAACCATCAGATGTTTCCAGGGTGCCCCAA GGACCTGAAATGACCCTGTGCCTTATTTGAACCTAACCAATCA GTTGCTTCTCGCTTCTGTTGCGCGCTTCTGCTCCCCGAG CTCTATATAAGCAGAGCTCGTTTAGTGAACCGTCAGATCGCC TGGAGACGCCATCCACGCTGTTTGAATTCATAGAAGGAT CTCGCCGCCACCATGCCTCTGGGCTGCTGTGGCTGGGCC TGGCCCTGCTGGGCGCCCTGCACGCCAGGCCGAGATGTG GCACGAGGGCCTGGAGGAGGCCAGCAGGCTGATTTTGGC GAGCGCAACGTGAAGGGCATGTTGAGGTGCTGGAGCCTC TGCACGCCATGATGGAGAGAGGCCACAGACCCTGAAGGA GACATCCTTTAACAGGCCCTATGGACGGGACCTGATGGAGG CACAGGAGTGGTGAGAAAGTACATGAAGTCTGGCAATGTG AAGGACCTGACGACGGCCTGGGATCTGTACTATCACGTGTT TCGGAGAATCTCCAAGGGCAAAGACACGATTCCGTGGCTTG GGCATCTGCTCGTTGGGCTGAGTGGTGCGTTTGGTTTCATC ATCTTGGTCTATCTCTTGATCAATTGCAGAAATACAGGCCCTT GGCTGAAAAAGTGCTCAAGTGAATACCCCGACCCAAGC AAGTTCTTCTCCAGCTTTCTTCAGAGCATGGAGGCGATGT GCAGAAATGGCTCTCTTACCTTTTCCCTCCTCAAGTTTCTC CCCGGGAGGGCTGGCGCCCGAGATTTACCTCTTGAGGTA CTTGAACGAGACAAGGTTACCCAACCTTCTCCTTCAACAGGAT AAGGTACCCGAACCTGCGAGCCTTAGCTCCAACCACTCTCT TACGAGCTGCTTACCAATCAGGGATACTTCTTTTCCACCT TCCCGATGCGCTGGAATCGAAGCATGTCAAGTTACTTTAC	218

10

20

30

40

50

核酸 No.	コードされている 配列名	ヌクレオチド配列	配列 番号
		CTATGATCCATATAGCGAGGAAGATCCCGACGAAGGAGTCG CCGGTGCGCCACGGGTTCTCACCACCAACCTCTCCAGCC TCTCTCAGGAGAAGATGATGCTTATTGCACTTTTCCAGTAG AGACGATCTCCTCCTCTTTTCTCCATCTCTTTGGGGGGACC TTCCCCCCTTCTACGGCACCTGGCGGGTCTGGTGCTGGC GAGGAGCGGATGCCGCCGTCCCTCCAGGAGCGAGTACCAC GAGATTGGGATCCCCAGCCACTTGGACCACCAACTCCAGGC GTACCTGACCTTGTCGATTTTCAACCTCCCCCTGAATTGGTG CTGCGAGAGGCTGGGGAGGAAGTTCCGGACGCTGGGCCG AGGGAGGGCGTGTCCTTCCATGGAGTAGGCCTCCAGGTC AAGGCGAGTTTAGGGCTCTCAACGCGCGGCTGCCGTTGAAT ACAGACGCTTATCTCTCACTGCAGGAAGTCAAGGTACAGGA CCCAACACATCTTGTAGGATCCGGCGCCACCAACTTAGTCT GCTCAAGCAAGCCGGGGACGTCGAGGAAAATCCTGGGCCA GAAATGTGGCACGAAGGACTCGAGGAAGCCAGTCGGCTGT ATTTTGGCGAGCGGAATGTGAAAGGGATGTTTGAAGTGCTC GAGCCTCTCCACGCTATGATGGAACGGGGACCCAGACTCT CAAAGAAACCAGCTTTAATCAGGCTTACGGACGCGACCTCA TGGAAGCTCAAGAATGGTGTAGAAAATATGAAGAGTGGCA ACGTAAAAGATCTGACACAAGCCTGGGATCTCTATTATACG TGTTGAGACGCATCAGCAAAGGCAGCGGCCACAAATTC TCCCTGCTGAAACAGGCCGGCGACGTGGAAGAGAATCCCG GACCTATGCCCAATCCTAGACCTGGCAAGCCAGCGCTCCT TCTCTTGCTCTTGACCTTCTCCTGGTGCAAGTCCATCTTGG CGAGCAGCTCCAAAGGCTAGTGATCTTCTCGGAGCTAGAGG TCCTGGAGGCACATTTGGA	10
	全長ドナー鋳型	ACTTGCCAGGACTGTTACAATAGCCTCCTCACTAGCCCCACT CACAGCAGCCAGATGAATCTTTTGTAGTCCATGCCTAGTCACT GGGGCAAAATAGGACTCCGAGGAGAAAGTCCGAGACCAGC TCCGGCAAGATGAGCAAACACAGCCTGTGCAGGGTGACAGG GAGGGCTAGAGGCCTGAGGCTTGAAACAGCTCTCAAGTGG AGGGGGAAACAACCATTGCCCTCATAGAGGACACATCCACA CCAGGGCTGTGTAGCGTGGGCAGGCAAGCCAGGTGCTG GACCTCTGCACGTGGGGCATGTGTGGGTATGTACATGTACC TGTGTTCTTGGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGT TCTAGAGCTGGGGTGCAACTATGGGGCCCTCGGGACATGT CCCAGCCAATGCCTGCTTTGACCAGAGGAGTGCCACGTG GCTCAGGTGGTCGAGTATCTCATACGCCCTAGCACACGTG TGACTCCTTTCCCCTATTGTCTACGCAGCCTGCCCTTGGACA AGGACCCGATGCCCCAACCCAGGCCTGGCAAGCCCTCGGC CCCTTCCTTGCCCTTGCCCATCCCCAGGAGCCTCGCCC AGCTGGAGGGCTGCACCCAAAGCCTCAGACCTGCTGGGGG CCCGGGGCCCAGGGGGAACCTTCCAGTGAACAGAGAAACA GGAGAAATATGGGCCAAACAGGATATCTGTGGTAAGCAGTTC CTGCCCCGGCTCAGGGCCAAGAACAGTTGGAACAGCAGAA TATGGGCCAAACAGGATATCTGTGGTAAGCAGTTCCTGCCC CGGCTCAGGGCCAAGAACAGATGGTCCCCAGATGCGGTCC CGCCCTCAGCAGTTTCTAGAGAACCATCAGATGTTTCCAGG GTGCCCAAGGACCTGAAATGACCCTGTGCCTTATTTGAAC TAACCAATCAGTTCGCTTCTCGCTTCTGTTCCGCGCCTTCTG CTCCCCGAGCTCTATATAAGCAGAGCTCGTTTAGTGAACCGT CAGATCGCCTGGAGACGCCATCCACGCTGTTTTGACTTCCA TAGAAGGATCTCGCCGCCACCATGCCTCTGGGCCTGCTGTG	219

10

20

30

40

40

核酸 No.	コードされている 配列名	ヌクレオチド配列	配列 番号
		GGCCAAGTAGGTGAGGTGACAGGGCTGAGGCCAGCTCTGC AACTTATTAGCTGTTTGATCTTTAAAAAGTTACTCGATCTCCAT GAGCCTCAGTTTCCATACGTGTAAGGGGGATGATCATAGC ATCTACCATGTGGGCTTGCAGTGCAGAGTATTTGAATTAGAC ACAGAACAGTGAGGATCAGGATGGCCTCTCACCCACCTGCC TTTCTGCCCAGCTGCCACACTGCCCTAGTCATGGTGGCA CCCTCCGGGGCACGGCTGGGCCCCT	

10

【表 1 7】

表 8: FOXP3 座位の標的切断用の gRNA の例

gRNA No.	gRNA のプロトスペーサー配列	配列番号	プロトスペーサー隣接モチーフ (PAM)
1	UCCAGCUGGGCGAGGCUCCU	241	GGG
2	UCGAAGAUCUCGGCCUGGA	242	AGG
3	CGCCUCGAAGAUCUCGGCCC	243	TGG
4	GGGCCGAGAUCUUCGAGGCG	244	GGG

20

30

40

50

【表 18】

表 9: 本明細書に記載の方法、細胞およびシステムにおいて参照したその他の配列の例

配列名	配列	配列番号
MND プロモーター	GAACAGAGAAACAGGAGAATATGGGCCAAACAGGATATCTGTGGTAAG CAGTTCCTGCCCCGGCTCAGGGCCAAGAACAGTTGGAACAGCAGAAT ATGGGCCAAACAGGATATCTGTGGTAAGCAGTTCCTGCCCCGGCTCA GGGCCAAGAACAGATGGTCCCCAGATGCGGTCCCGCCCTCAGCAGTT TCTAGAGAACCATCAGATGTTTCCAGGGTGCCCCAAGGACCTGAAATG ACCCTGTGCCTTATTTGAACCTAACCAATCAGTTCGCTTCTCGCTTCTGT TCGCGCGCTTCTGCTCCCCGAGCTCTATATAAGCAGAGCTCGTTTAGT GAACCGTCAGATC	220
T2A ヌクレオチド配列	GAGGGCAGAGGAAGTCTGCTAACATGCGGTGACGTCGAGGAGAATCC TGGACCT	221
T2A アミノ酸配列	EGRSLLTCGDVEENPGP	222
P2A-1 (TRAC) ヌクレオチド配列	GCTACTAACTTCAGCCTGCTGAAGCAGGCTGGAGACGTGGAGGAGAA CCCTGGACCT	223
P2A-2 (FOXP3-1) ヌクレオチド配列	GCCACCAACTTTAGTCTGCTCAAGCAAGCCGGGGACGTCGAGGAAAA TCCTGGGCCA	224
P2A-3 (FOXP3-2) ヌクレオチド配列	GCCACAAATTTCTCCCTGCTGAAACAGGCCGGCGACGTGGAAGAGAA TCCCGGACCT	225
P2A-1 アミノ酸配列	ATNFSLLKQAGDVEENPGP	226
P2A-2 アミノ酸配列	ATNFSLLKQAGDVEENPGP	227
P2A-3 アミノ酸配列	ATNFSLLKQAGDVEENPGP	228
リンカー	GGGS	229
リンカー	GGGSGGG	230
IGRP 305–324	QLYHFLQIPTHEEHLFYVLS	231
IGRP 241–260	KWCANPDWIHIDTTPFAGLV	232
GAD65 533–572	KVNFFRMVISNPAATHQDID	233
GAD65 265–284	KGMAALPRLIAFTSEHSFSS	234
ブレブロインスリン 76–90	SLQPLALEGSLQKRG	235
野生型 mTOR	MLGTGPAAATTAATTSSNVSVLQQFASGLKSRNEETRAKAAKELQHYVT MELREMSQEESTRFYDQLNHHIFELVSSSDANERKGGILAIASLIGVEGG NATRIGRFANYLRNLLPSNDPVVMEASKAIGRLAMAGDTFTAIEYVEFEV KRALEWLGADRNEGRRHA AVLVLRELAI SVPTFFFQVQPFDFNIFVAVW DPKQAIREGAVAALRA CLILTTQREP KEMQKPQWYRHTFEEAEKGFD ETL AKEKGMNRDDRIHGALLILNELVRISSEMEGERLREEMEEITQQQLVHDKY CKDLMGFGTKPRHITPFTSFQAVQPQQSNALVGLLGYSSHQGLMGFGTS PSPAKSTLVESRCCRDLMEEKFDQVCQWVLKCRNSKNSLIQMTILNLLPR LAAFRPSAFTDTQYLQDTMNHVLS CVKKEKERTAAFQALGLLSVAVRSEF KVYLPRLVDIIRAALPPKDFAHKQKAMQVDATVFTCISMLARAMGPGIQ QDIKELLEPMLAVGLSPALTAVLYDL SRQIPQLKKDIQDGLLKMLS LVL MHK PLRHPGMPKGLAHLASPLTTLPEASDVGSITLALRTLGSFEFEHSLT QFVRHCADHFLNSEHKEIRMEAA RTCSRLLTPSIHLISGHAHVVSQTAVQV VADVLSKLLVVGITDPDPIRYCVLASLDERFDAHLAQAE NLQALFVALND QVFEIRELAICTVGR LSSMNP AFVMPFLRKMLIQILTELEHSGIGRIKEQSA RMLGHLVSNAPRLIRPYMEPILKALILKDPDPDPNPGVINNVLATIGELA QVSGLEMRKWVDELFIIMDMLQDSSLLAKRQVALWTLGQLVASTGYVVE PYRKYPTLLEVLLNFKTEQNQGT RREAIRVLG LLGALDPYKHKVNIGMID QSRDASAVSLSESKSSQDSSDYSTSEMLVMNGNLPLDEFYPAVSMVALM RIFRDQSLSHHHTMVVQAITFIKSLGLKCVQFLPQVMPTFLNVIRVCDGA IREFLFQQLGMLVSFVKSHIRPYMDEIVTLMREFVVMNTSIQSTIILLIEQIV	236

10

20

30

40

50

	VALGGEFKLYLPQLIPHMLRVFMHDNSPGRIVSIKLLAAIQLFGANLDDYLH LLLPPIVKLFDAPAPLPSRKALETVDRLTESLDFTDYASRIIHPVRTLDQ SPELRSTAMDTLSSLVFQLGKKYQIFIPMVNKLVRHRINHQRVDVLCRIV KGYTLADEEEDPLIYQHRMLRSGQG DALASGPVETGPMKKLHVSTINLQ KAWGAARRVSKDDWLEWLRLSLELLKDSSPSLRSCWALAQAYNPMA RDLFNAAFVSCWSELNEDQQDELIRSIELALTSQDIAEVTQTLLNLAEFME HSDKGPLPLRDDNGIVLLGERAAKCRAYAKALHYKELEFQKGPTPAILES L ISINNKLQQPEAAAGVLEYAMKHFGELEIQATWYEKLHEWEDALVAYDKK MDTNKDDPELMLGRMRCLEALGEWGQLHQCCCEKWTLVNDETQAKMA RMAAAAWGLGQWDSMEEYTCMIPRDTHDGAFYRAVLALHQDLFSLAQ QCIDKARDLLDAELTAMAGESYSRAYGAMV SCHMLSELEEVIQYKLVPER REIIRQIWWERLQGCQRIVEDWQKILMVRSVLVSPHEDMRTWLKYASLC GKSGRLALAHKTLVLLLGVDP SRQLDHPLPTVHPQVTYAYMKNMWKSAR KIDAFQHMQHVFQTMQQQAQHA IATEDQQHKQELHKL MARCFLKLGEW QLN LQGINESTIPKVLQYYSAATEHDSWYKAWHAWVMNFEAVLHYKH QNQARDEKKLRHASGANITNATTAATTAATTTASTE GSNSESEAESTE NSPTPSPLQKKVTEDLSKTLLMYTVPVAVQGFFRSISLSRGNNLQDTRLVLT LWF DYGHWPDVNEALVEGVKAIQIDTWLQVIPQLIARIDTPRPLVGRLIHQ LLTDIGRYHPQALIYPLTVASKSTTTARHNAANKILKNMCEHSNTLVQQAM MVSEELIRVAILWHEMWHEGLEEASRLYFGERNVKG MFEVLEPLHAMME RGPQTLKETSFNQAYGRDLMEAEWCRKYMKSGNVKDLTQAWDLYYH VFRRISKQLPQLTSLELQYVSPKLLMCRDLELAVPGTYDPNQPIIRIQSIAP SLQVITSKQRPRKLTLMGSNGHEFVFLKGHEDLRQDERVMQLFGLVNTL LANDPTSLRKNLSIQRYAVIPLSTNSGLIGWVPHCDTLHALIRDYREKKIL LNIEHRIMLRMAPDYDHLTLMQKVEVFEHAVNNTAGDDLAKLLWLKSPSS EVWFDRTNYTRSLAVMSMVGYILGLGDRHPSNLMLDRLSGKILHIDFGD CFEVAMTREKFPEKIPFRLTRMLTNAMEVTGLDGN YRITCHTVMEVLEH KDSVMAVLEAFVYDPLLNWRLMDTNTKGNKRSRTRTDSYSAGQSVEILD GVELGEPAHKKTGTTVPESIHSGIFDGLVKPEALNKKAIQIINRVRDKLTGR DFSHDDTLDVPTQVELLIKATSHENLCQCYIGWCPFW	
gRNA 1	NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNGUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUA AAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCG GUGCUUUU	237
gRNA 2	NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNGUCAUAGUCCAUUAAAAGCCA AAAGUGGCUUUGAUGUUUCUAUGAUAAAGGUUUCGACCCGUGGCG UCGGGGAUCGCCUGCCCAUUGAAUUGGGCUUCUCCCAUUUAUU	238
gRNA 3	NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNGUCAUAGUCCAUUGAAAGCCA AAAGUGGCUUUGAUGUUUCUAUGAUAAAGGUUUCGCGCCGUGGCG UCGGGGAUCGCCUGCCCAUUCGAUGGGCUUCUCCCAUUUAUU	239

10

20

30

40

50

【0685】

その他の実施形態

本明細書に開示したすべての特徴は、どのような組み合わせで組み合わせてもよい。本明細書に開示した各特徴は、同じ目的、同等の目的または類似した目的を果たす別の特徴で置き換えてもよい。したがって、別段の明確な記載がない限り、本開示の各特徴は、同等または類似した汎用的な特徴の一例でしかない。

【0686】

当業者であれば、前述の説明から本開示の本質的な特性を理解することができ、本発明の要旨および範囲から逸脱することなく、本開示に様々な変更および改良を加えて、様々な用途および条件に本開示を適合させることができる。したがって、その他の実施形態も、請求項の範囲内に含まれる。

【0687】

追加の実施形態

1. 遺伝子編集用の化学誘導性シグナル伝達複合体（CISC）システムであって、第1のポリヌクレオチドと第2のポリヌクレオチドを含み、

第1のポリヌクレオチドが、MNDプロモーターである第1のプロモーター；FK結合タンパク質12（FKBP）のラパマイシン結合ドメインまたはその機能性断片と、IL2R γ の細胞内シグナル伝達ドメインまたはその機能性断片とを含む第1のCISC構成要素をコードする第1の核酸；TCR β またはその機能性断片をコードする核酸；ならびにTRAVおよび／もしくはTRAJまたはその機能性断片をコードする核酸を含み、TCR β とTRAVおよび／またはTRAJとが、1型糖尿病（T1D）抗原に特異的なTCRの各部分を形成し、

第2のポリヌクレオチドが、MNDプロモーターである第2のプロモーター；mTORのFKBP12-ラパマイシン結合（FRB）ドメインのラパマイシン結合ドメインまたはその機能性断片を含む第2の細胞外結合ドメインと、IL2R β の細胞内シグナル伝達ドメインまたはその機能性断片を含む第2の細胞内シグナル伝達ドメインとを含む第2のCISC構成要素をコードする第2の核酸；および細胞質ゾル内FRBまたはその機能性断片をコードする第3の核酸を含む、CISCシステム。

10

【0688】

2. 第1のポリヌクレオチドが、TRAC座位である第1の座位のゲノム配列と80%を超える配列同一性をそれぞれ有する第1の5'相同アームと第1の3'相同アームをさらに含み、第2のポリヌクレオチドが、Foxp3座位である第2の座位のゲノム配列と80%を超える配列同一性をそれぞれ有する第2の5'相同アームと第2の3'相同アームをさらに含む、追加の実施形態1に記載のCISCシステム。

【0689】

20

3. 第1のポリヌクレオチドが、第1のCISC構成要素をコードする第1の核酸と、TCR β またはその機能性断片をコードする核酸の間に、2A自己切断ペプチドをコードする核酸をさらに含み、かつTCR β またはその機能性断片をコードする核酸と、TRAVおよび／もしくはTRAJまたはその機能性断片をコードする核酸の間に、2A自己切断ペプチドをコードする核酸をさらに含む、追加の実施形態1または追加の実施形態2に記載のCISCシステム。

【0690】

4. 前記MNDプロモーターが、配列番号1の配列を含む、先行する追加の実施形態のいずれか1つに記載のCISCシステム。

【0691】

30

5. 第1のCISC構成要素をコードする第1の核酸が、配列番号2の配列を含む、先行する追加の実施形態のいずれか1つに記載のCISCシステム。

【0692】

6. 前記TCR β またはその機能性断片をコードする核酸が、配列番号3の配列または配列番号5の配列を含む、先行する追加の実施形態のいずれか1つに記載のCISCシステム。

【0693】

7. 前記TRAVおよび／もしくはTRAJまたはその機能性断片をコードする核酸が、配列番号4または配列番号6の配列を含む、先行する追加の実施形態のいずれか1つに記載のCISCシステム。

【0694】

40

8. 第2のCISC構成要素をコードする第2の核酸が、配列番号11の配列を含む、先行する追加の実施形態のいずれか1つに記載のCISCシステム。

【0695】

9. 前記細胞質ゾル内FRBまたはその機能性断片をコードする第3の核酸が、配列番号12の配列を含む、先行する追加の実施形態のいずれか1つに記載のCISCシステム。

【0696】

10. 第1のポリヌクレオチドが、配列番号15の配列または配列番号16の配列を含む、先行する追加の実施形態のいずれか1つに記載のCISCシステム。

【0697】

11. 第2のポリヌクレオチドが、配列番号17の配列を含む、先行する追加の実施形態

50

のいずれか 1 つに記載の CISC システム。

【0698】

12. 第 1 のポリヌクレオチドが、配列番号 15 の配列または配列番号 16 の配列を含み、第 2 のポリヌクレオチドが、配列番号 17 の配列を含む、先行する追加の実施形態のいずれか 1 つに記載の CISC システム。

【0699】

13. Treg 細胞集団を組換える方法であって、

(a) 第 1 の対象から単離した T 細胞集団を、

(i) MND プロモーターである第 1 のプロモーター；FK 結合タンパク質 12 (FKBP) のラパマイシン結合ドメインまたはその機能性断片と、IL2R γ の細胞内シグナル伝達ドメインまたはその機能性断片とを含む第 1 の CISC 構成要素をコードする第 1 の核酸；TCR β またはその機能性断片をコードする核酸；ならびに TRAV および／もしくは TRAJ またはその機能性断片をコードする核酸を含み、TCR β と TRAV および／または TRAJ とが、1 型糖尿病 (T1D) 抗原に特異的な TCR の各部分を形成する、第 1 のポリヌクレオチドと、

10

(ii) MND プロモーターである第 2 のプロモーター；mTOR の FKBP12-ラパマイシン結合 (FRB) ドメインのラパマイシン結合ドメインまたはその機能性断片を含む第 2 の細胞外結合ドメインと、IL2R β の細胞内シグナル伝達ドメインまたはその機能性断片を含む第 1 の細胞内シグナル伝達ドメインとを含む第 2 の CISC 構成要素をコードする第 2 の核酸；および細胞質ゾル内 FRB またはその機能性断片をコードする第 3 の核酸を含む第 2 のポリヌクレオチドと、

20

(iii) TRAC 座位である第 1 の座位を切断することができる第 1 のエンドヌクレアーゼまたはそのコード核酸と、

(iv) Foxp3 座位である第 2 の座位を切断することができる第 2 のエンドヌクレアーゼまたはそのコード核酸に、

接触させることによって、前記第 1 のポリヌクレオチドまたはその断片を第 1 の座位に組み込み、かつ前記第 2 のポリヌクレオチドまたはその断片を第 2 の座位に挿入することによって、前記 T 細胞集団を二重編集する工程；ならびに

(b) 前記 T 細胞集団をラパマイシンと接触させることによって、前記 T 細胞集団中の抑制表現型を有する二重編集細胞の亜集団を選択的に拡大増殖させる工程を含む方法。

30

【0700】

14. 前記 T 細胞集団を、0.01~100 nM のラパマイシンと接触させる、追加の実施形態 13 に記載の方法。

【0701】

15. 前記 T 細胞集団を、10 nM のラパマイシンと接触させる、追加の実施形態 14 に記載の方法。

【0702】

16. 第 1 の対象から T 細胞集団を単離する工程をさらに含み、該 T 細胞集団が、該対象の血液から単離される、追加の実施形態 13~15 のいずれか 1 つに記載の方法。

40

【0703】

17. 第 1 の対象がヒトである、追加の実施形態 13~16 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0704】

18. 抑制表現型を有する二重編集細胞が選択的に拡大増殖した亜集団を含む前記 T 細胞集団の一部を第 2 の対象に投与する工程をさらに含み、該第 2 の対象が、糖尿病に罹患しているか、糖尿病のリスクがある、追加の実施形態 13~17 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0705】

19. 1 型糖尿病を治療、抑制または緩和する方法であって、

抑制表現型を有する二重編集細胞を含む組成物を対象に投与する工程を含み、

50

前記二重編集細胞が、TRAC座位内に挿入された第1のポリヌクレオチドと、Foxp3座位内に挿入された第2のポリヌクレオチドとを含み、

(i) 第1のポリヌクレオチドが、MNDプロモーターである第1のプロモーター；FK結合タンパク質12（FKBP）のラパマイシン結合ドメインまたはその機能性断片と、IL2R γ の細胞内シグナル伝達ドメインまたはその機能性断片とを含む第1のCISC構成要素をコードする第1の核酸；TCR β またはその機能性断片をコードする核酸；ならびにTRAVおよび／もしくはTRAJまたはその機能性断片をコードする核酸を含み、TCR β とTRAVおよび／またはTRAJとが、1型糖尿病（T1D）抗原に特異的なTCRの各部分を形成し、

(ii) 第2のポリヌクレオチドが、MNDプロモーターである第2のプロモーター；mTORのFKBP12-ラパマイシン結合（FRB）ドメインのラパマイシン結合ドメインまたはその機能性断片を含む第2の細胞外結合ドメインと、IL2R β の細胞内シグナル伝達ドメインまたはその機能性断片を含む第1の細胞内シグナル伝達ドメインとを含む第2のCISC構成要素をコードする第2の核酸；および細胞質ゾル内FRBまたはその機能性断片をコードする第3の核酸を含む、

方法。

【0706】

20. 第2の対象にラパマイシンを投与する工程をさらに含む、追加の実施形態18または19に記載の方法。

【0707】

21. 第1の対象と第2の対象が同じ対象である、追加の実施形態18～20のいずれか1つに記載の方法。

【0708】

22. 第2の対象がヒトである、追加の実施形態18～21のいずれか1つに記載の方法。

【0709】

23. 追加の実施形態13～21のいずれか1つに記載の方法によって作製された、抑制表現型を有する二重編集細胞の亜集団を含む細胞集団。

【0710】

24. 抑制表現型を有する二重編集細胞の亜集団を含む細胞集団であって、

前記二重編集細胞の亜集団が、二重編集の2日以内のT細胞集団を少なくとも10%含み、

前記二重編集細胞の亜集団が、TRAC座位内に挿入された第1のポリヌクレオチドと、Foxp3座位内に挿入された第2のポリヌクレオチドとを含む細胞を含み、

(i) 第1のポリヌクレオチドが、MNDプロモーターである第1のプロモーター；FK結合タンパク質12（FKBP）のラパマイシン結合ドメインまたはその機能性断片と、IL2R γ の細胞内シグナル伝達ドメインまたはその機能性断片とを含む第1のCISC構成要素をコードする第1の核酸；TCR β またはその機能性断片をコードする核酸；ならびにTRAVおよび／またはTRAJまたはその機能性断片をコードする核酸を含み、TCR β とTRAVおよび／またはTRAJとが、1型糖尿病（T1D）抗原に特異的なTCRの各部分を形成し、

(ii) 第2のポリヌクレオチドが、MNDプロモーターである第2のプロモーター；mTORのFKBP12-ラパマイシン結合（FRB）ドメインのラパマイシン結合ドメインまたはその機能性断片を含む第2の細胞外結合ドメインと、IL2R β の細胞内シグナル伝達ドメインまたはその機能性断片を含む第1の細胞内シグナル伝達ドメインとを含む第2のCISC構成要素をコードする第2の核酸；および細胞質ゾル内FRBまたはその機能性断片をコードする第3の核酸を含む、

細胞集団。

【0711】

25. 前記二重編集細胞の亜集団が、二重編集の18日以内のT細胞集団を少なくとも60%含む、追加の実施形態24に記載の細胞集団。

【0712】

26. TCRをコードする核酸であって、配列番号3の配列と配列番号4の配列を含むか、または配列番号5の配列と配列番号6の配列を含む、核酸。

【0713】

27. 配列番号19の配列または配列番号20の配列を含む、追加の実施形態24に記載の核酸。

【0714】

等価物および本発明の範囲

本明細書では、本発明のいくつかの実施形態について説明および例示してきたが、当業者であれば、本明細書に記載の機能を実施し、かつ／または本明細書に記載の結果および／または1つ以上の利点を得ることを目的として、様々な他の手段および／または構造を容易に想定することができ、このような変更および／または改良は、本明細書に記載の本発明の実施形態の範囲内であると見なされる。より一般的には、当業者であれば、本明細書に記載のあらゆるパラメーター、寸法、材料および構成は、例示を目的としたものであり、実際のパラメーター、寸法、材料および／または構成は、本発明の教示が利用される具体的な用途に応じて様々に変動することを容易に理解できるであろう。当業者であれば、日常的な実験を行うだけで、本明細書に記載の本発明の特定の実施形態の等価物が多数存在することを容易に理解でき、それらを確認することができるであろう。したがって、前述の実施形態は一例として述べられており、添付の請求項およびその等価物の範囲内において、具体的に記載および請求されている以外の方法で本発明の実施形態を実施してもよい。本開示の本発明の実施形態は、本明細書に記載の個々の特徴、システム、物、材料、キットおよび／または方法に関するものである。さらに、そのような特徴、システム、物、材料、キットおよび／または方法の2つ以上の組み合わせは、そのような特徴、システム、物、材料、キットおよび／または方法が互いに一貫性を保持する限り、本開示の本発明の範囲内に含まれる。

【0715】

本明細書で定義され、使用されているあらゆる定義は、辞書の定義、参照により援用された文献の定義、および／または定義されている用語の一般的な意味よりも優先される。

【0716】

本明細書に開示されたすべての参考文献、特許および特許出願は、それぞれが引用された主題に関して参照により援用され、場合によっては、それらの文献全体を包含してもよい。

【0717】

本明細書および請求項において使用されている不定冠詞「a」および「an」は、矛盾する事項が述べられていない限り、「少なくとも1つ」を意味する。

【0718】

本明細書および請求項において使用されている「および／または」という用語は、この用語で組み合わせられた構成要素の「一方または両方」を意味し、すなわち、複数の構成要素が組み合わせられて存在する場合と、複数の構成要素が別々に分離されて存在する場合とがあることを意味する。「および／または」という用語を用いて列挙された複数の構成要素も、同様に解釈すべきであり、すなわち、複数の構成要素の「1つ以上」が組み合わせられて記載されている。「および／または」という用語を用いて具体的に特定された構成要素以外のその他の構成要素が存在していてもよく、このその他の構成要素は、具体的に特定された構成要素に関連していてもよく、関連していなくてもよい。したがって、例えば、「Aおよび／またはB」は、「含む」といったオープンエンドな用語とともに使用される場合、一実施形態において、Aのみを指してもよく（さらにB以外の構成要素を含んでいてもよく）；別の実施形態では、Bのみを指してもよく（さらにA以外の構成要素を含んでいてもよく）；さらに別の実施形態では、AとBの両方を指してもよく（さらにその他の構成要素を含んでいてもよく）；その他の態様であってもよいが、これらに限定されない。

【0719】

本明細書および請求項において使用されている「または」という用語は、前述で定義された「および／または」と同じ意味を有する。例えば、列挙されている事項が「または」や「および／または」という用語で隔てられている場合、これらの用語は包括的であると解釈され、すなわち、複数の構成要素または列挙された構成要素のうちの少なくとも1つを含むが、そのうちの2つ以上も含み、列挙されていない追加の項目も含んでいてもよい。これとは逆の意味を明確に示す用語としての、例えば、「1つのみ」や「正確に1つのみ」といった用語、あるいは請求項に記載の「からなる」という用語は、複数の構成要素または列挙された構成要素のうち1つの構成要素のみを含むことを意味する。通常、本明細書において使用される「または」という用語は、「どちらか一方」、「そのうちの1つ」、「そのうちの1つのみ」または「そのうちの正確に1つ」などの排他的な用語に続く場合、排他的な選択肢のみ（すなわち、「そのうちの一方または他方だが、両方ではない」）を示すと解釈される。「から実質的になる」という用語が請求項において使用されている場合、特許法の分野において使用される通常の意味を有する。

10

【0720】

本明細書および請求項において、1つ以上の構成要素の列挙に関して使用される「少なくとも1つ」という用語は、この列挙された構成要素に含まれる1つ以上の構成要素から選択される少なくとも1つの構成要素を意味するが、この列挙された構成要素に具体的に記載されたすべての構成要素のうちの少なくとも1つを必ずしも含んでいなくてもよく、この列挙された構成要素のうちのいずれかの組み合わせを除外するものでもない。また、この定義は、「少なくとも1つ」という用語が使用される構成要素の列挙に具体的に記載された構成要素以外の構成要素が存在していてもよいことも意味し、具体的に記載された構成要素以外の構成要素は、具体的に記載された構成要素に関連していてもよく、関連していなくてもよい。したがって、「AとBのうちの少なくとも1つ」（または同様に「AまたはBのうちの少なくとも1つ」もしくは「Aおよび／またはBのうちの少なくとも1つ」）の例として、一実施形態において、少なくとも1つのAを指してもよく、2つ以上のAを含んでいてもよいが、Bは存在しなくてもよいこと（かつB以外の構成要素を含んでいてもよいこと）；別の実施形態では、少なくとも1つのBを指してもよく、2つ以上のBを含んでいてもよいが、Aは存在しなくてもよいこと（かつA以外の構成要素を含んでいてもよいこと）；さらに別の実施形態では、少なくとも1つのAを指してもよく、2つ以上のAを含んでいてもよく、かつ少なくとも1つのBを指してもよく、2つ以上のBを含んでいてもよいこと（かつその他の構成要素を含んでいてもよいこと）などが挙げられるが、これらに限定されない。

20

30

【0721】

2つ以上の工程または行為が含まれる本明細書で請求されている方法において、矛盾する事項が述べられていない限り、この方法の工程または行為の順序は、この方法の工程または行為が記載されている順序に必ずしも限定されない。

【0722】

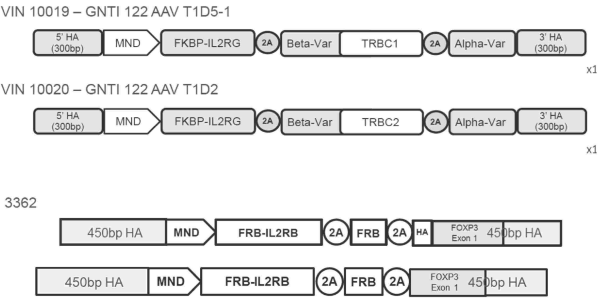
本明細書中の前述の説明および請求項において、「含む」、「包含する」、「保有する」、「有する」、「含んでいる」、「伴う」、「保持する」、「構成される」などのあらゆる移行句は、オープンエンドな表現であり、すなわち、記載の事項を含むが、それらに限定されないことを意味する。米国特許庁によるManual of Patent Examining Proceduresの第2111.03節に記載されているように、「からなる」という移行句のみが、クローズドエンドな移行句であり、「から実質的になる」という移行句のみが、半クローズドエンドな移行句である。オープンエンドな移行句（例えば「含む」）を用いて本明細書で述べられた実施形態は、別の実施形態では、オープンエンドな移行句で述べられたその特徴「からなる」もの、およびその特徴「から実質的になる」ものであることが企図されている。例えば、本開示において、「AとBを含む組成物」という説明がある場合、別の実施形態では、「AとBからなる組成物」および「AとBから実質的になる組成物」も本開示において企図されている。

40

50

【図面】

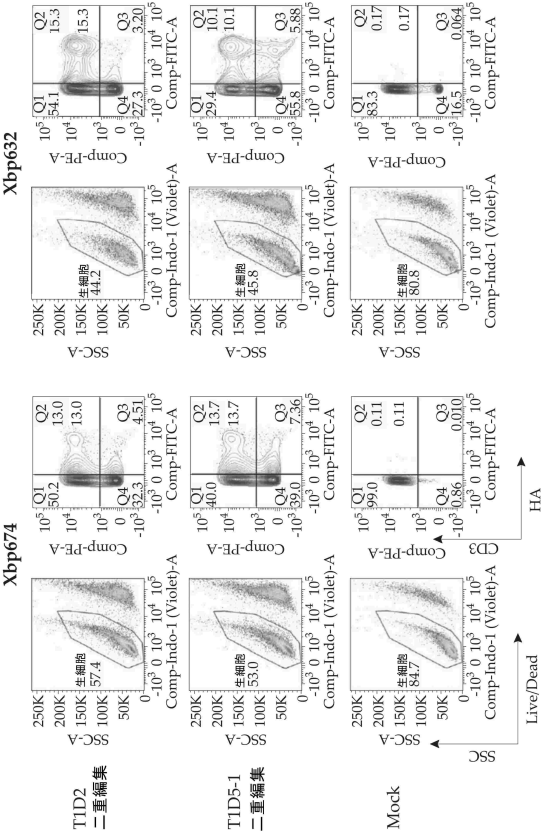
【図 1】



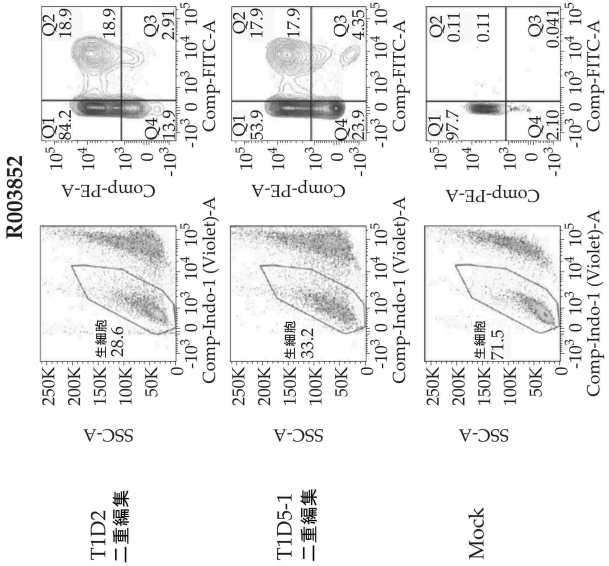
【図 2】

ドナー	FOXP3の編集	TRACの編集	細胞数	編集産物
Xpb674	3362	VIN10020	2x10 ⁶	T1D2 EngTreg
Xpb674	3362	VIN10019	2x10 ⁶	T1D5-1 EngTreg
Xpb674			1x10 ⁶	Mock
Xpb632	3362	VIN10020	2x10 ⁶	T1D2 EngTreg
Xpb632	3362	VIN10019	2x10 ⁶	T1D5-1 EngTreg
Xpb632			1x10 ⁶	Mock
R003852	3362	VIN10020	1x10 ⁶	T1D2 EngTreg
R003852	3362	VIN10019	1x10 ⁶	T1D5-1 EngTreg
R003852			1x10 ⁶	Mock

【図 3 – 1】



【図 3 – 2】



10

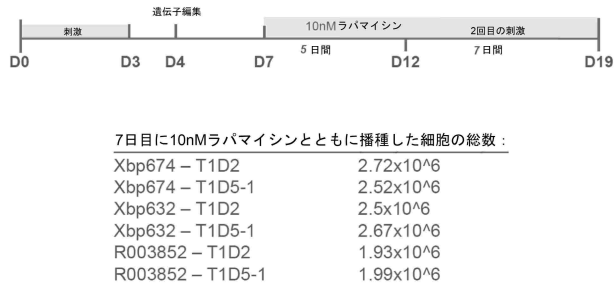
20

30

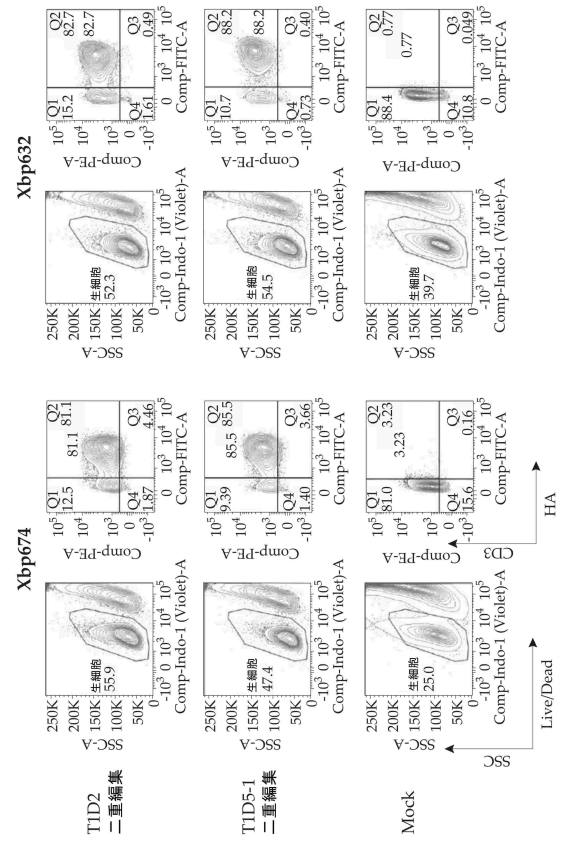
40

50

【図 4】



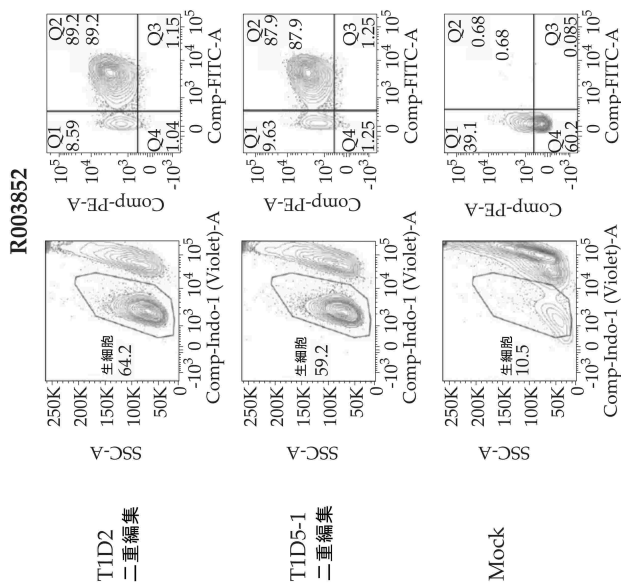
【図 5 - 1】



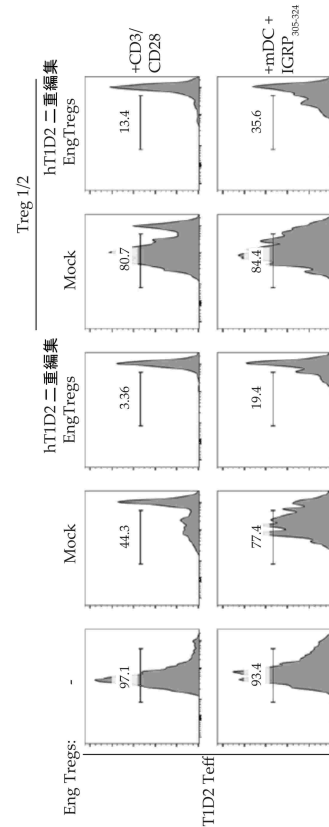
10

20

【図 5 - 2】



【図 6 A - 1】

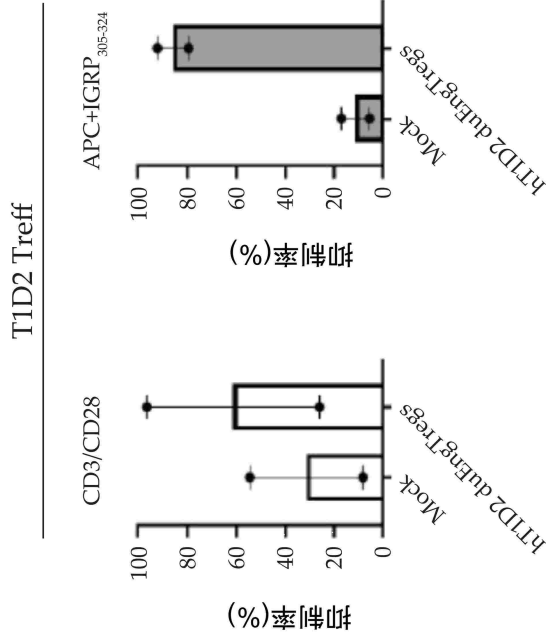


30

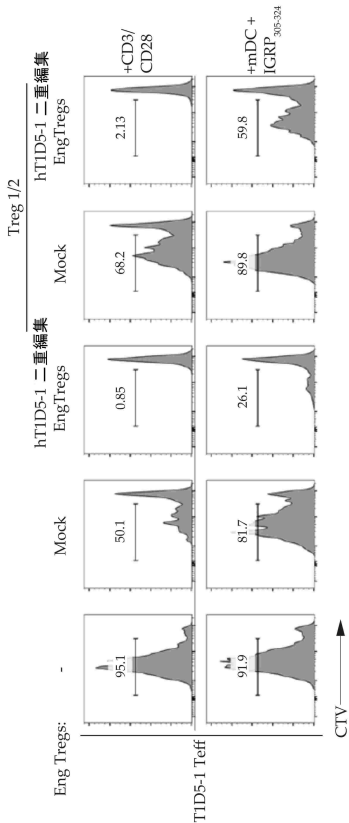
40

50

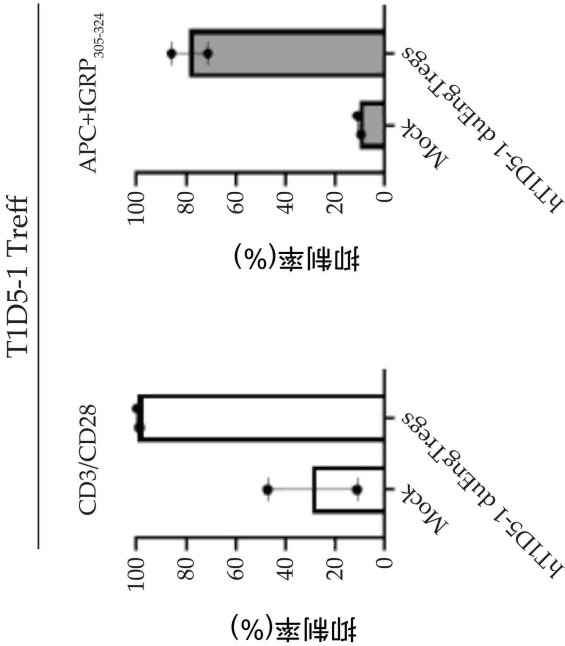
【図 6 A - 2】



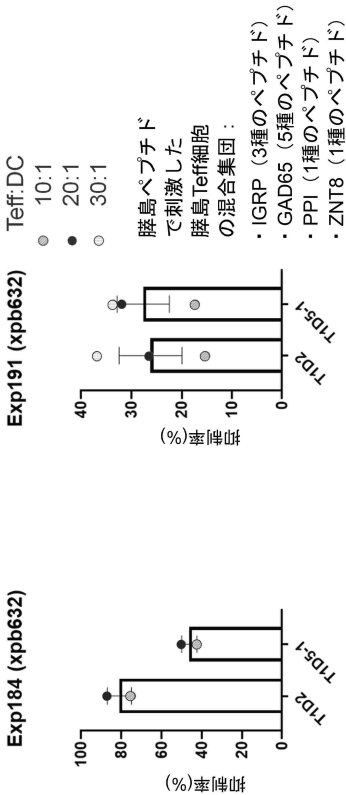
【図 6 B - 1】



【図 6 B - 2】



【図 6 C】



10

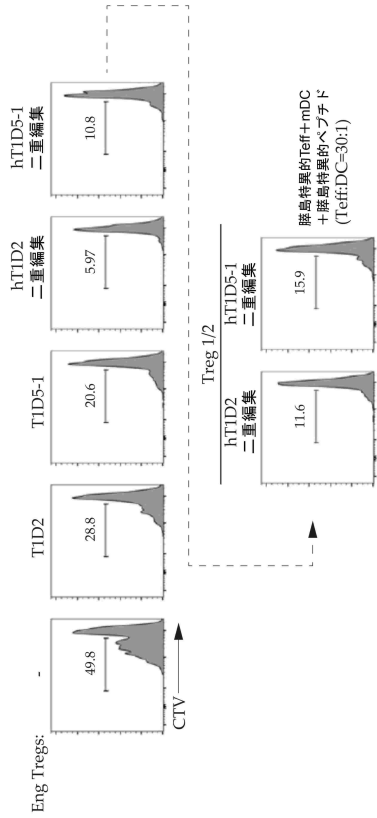
20

30

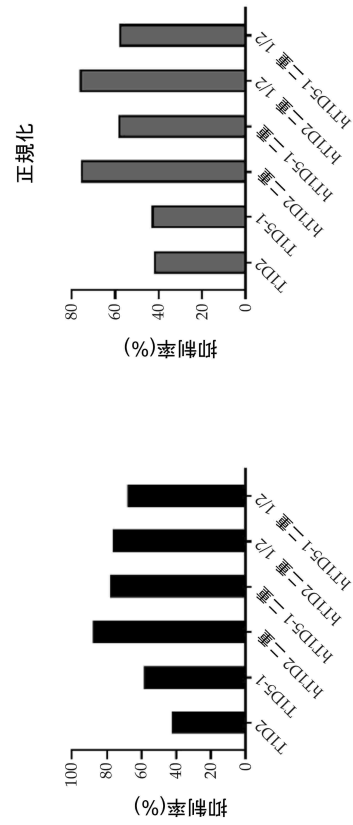
40

50

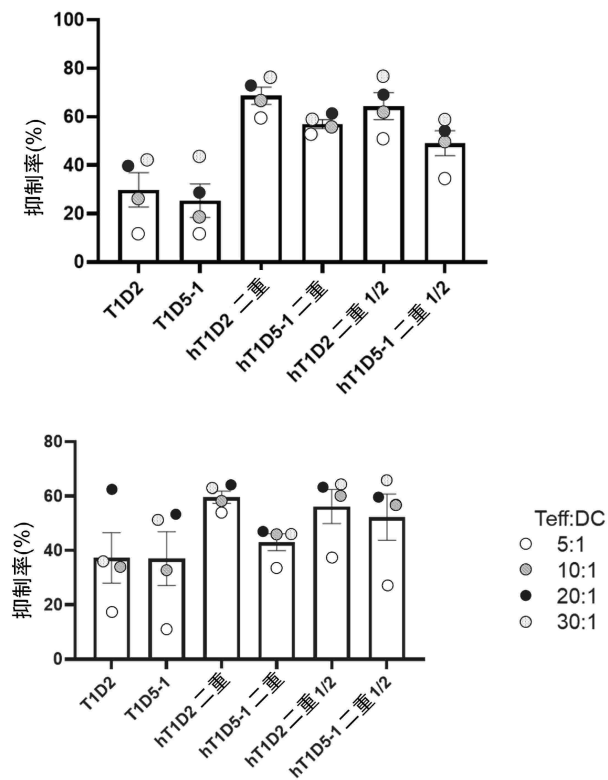
【図 7 A - 1】



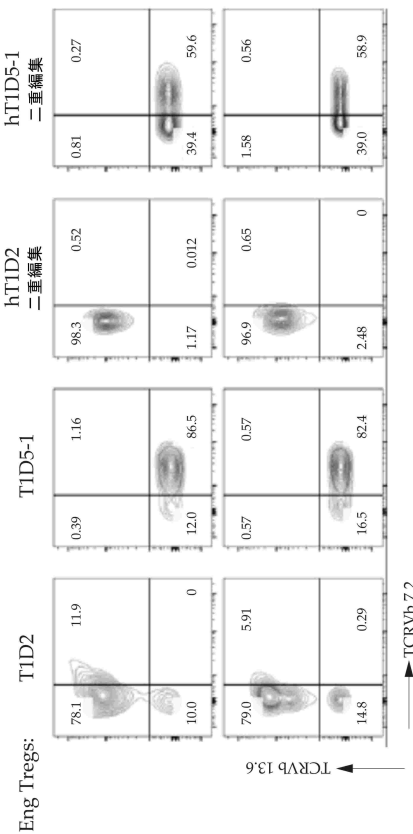
【図 7 A - 2】



【図 7 B】



【図 8 A - 1】



10

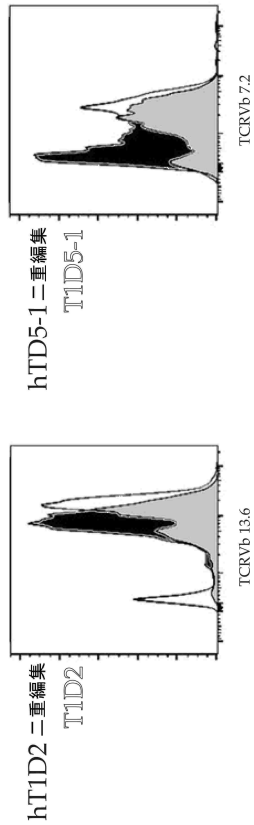
20

30

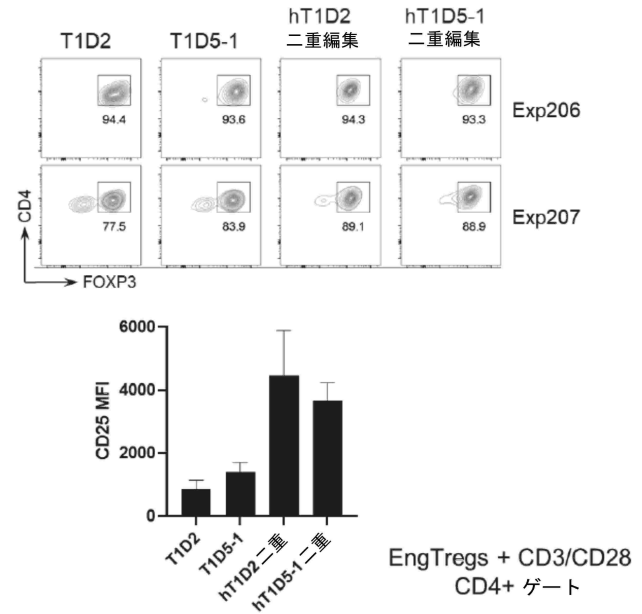
40

50

【図 8 A - 2】



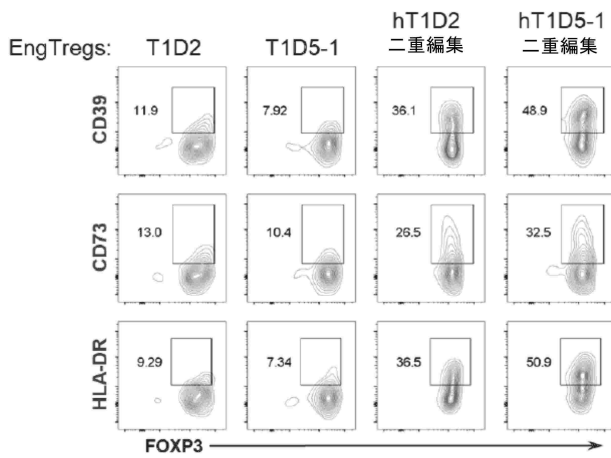
【図 8 B】



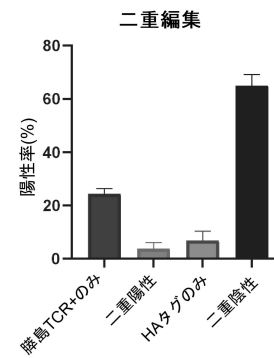
10

20

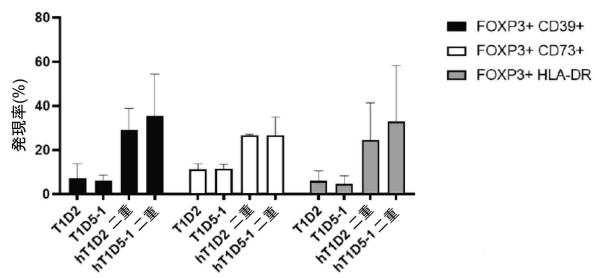
【図 8 C】



【図 9】



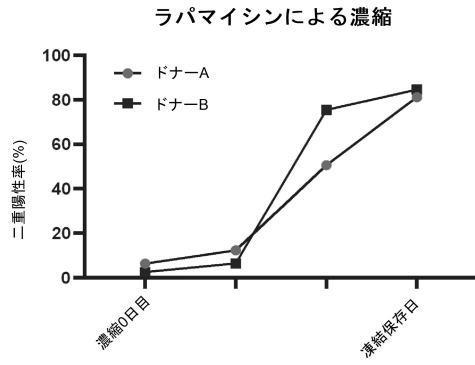
30



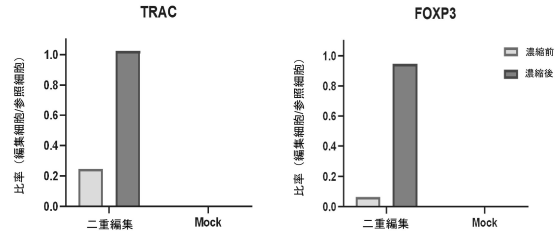
40

50

【図 10】

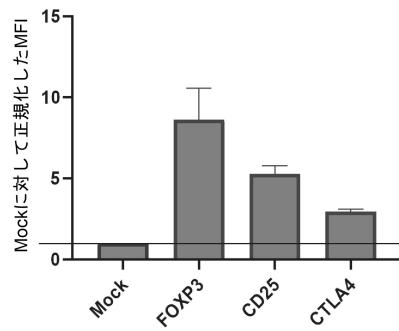


【図 11】

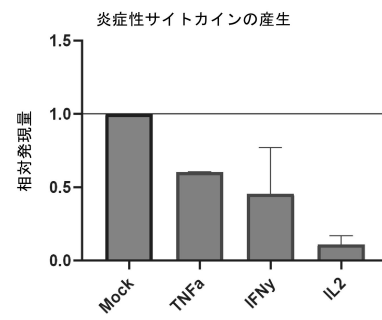


10

【図 12】

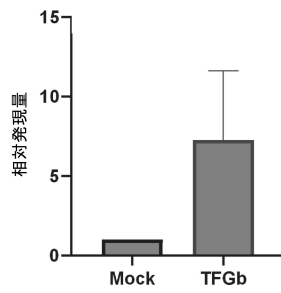


【図 13】

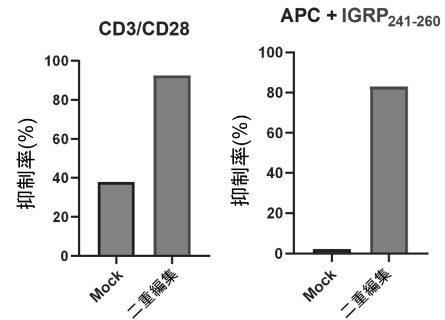


20

【図 14】



【図 15】

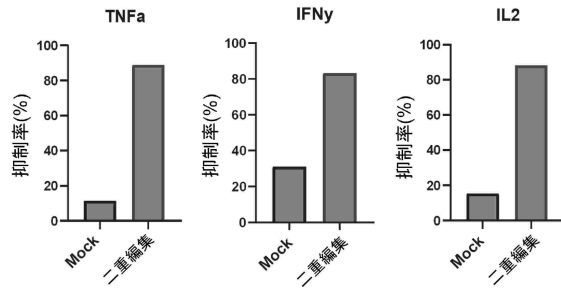


30

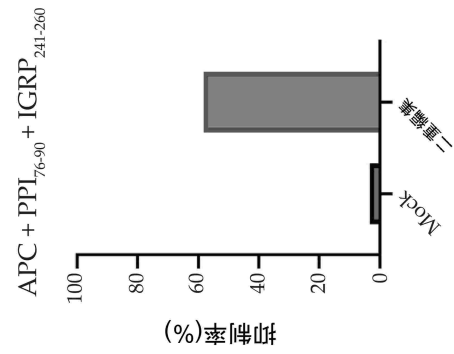
40

50

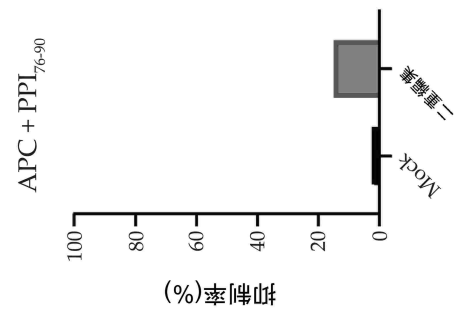
【図 16】



【図 17】

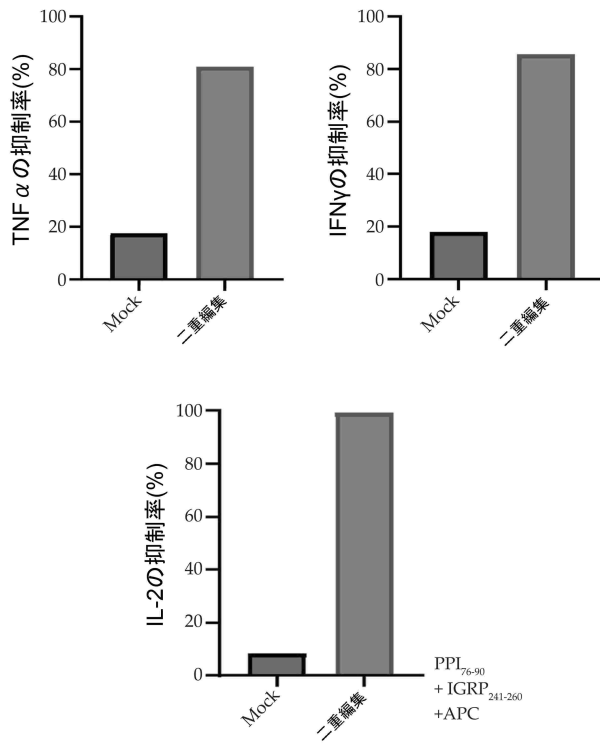


10



20

【図 18】



【図 19】

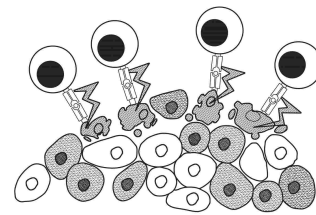


図 19A

30

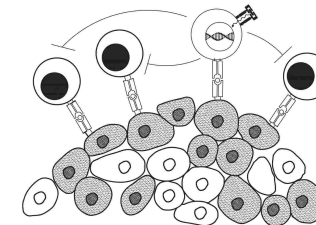


図 19B

40

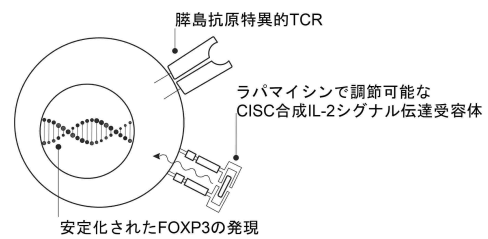
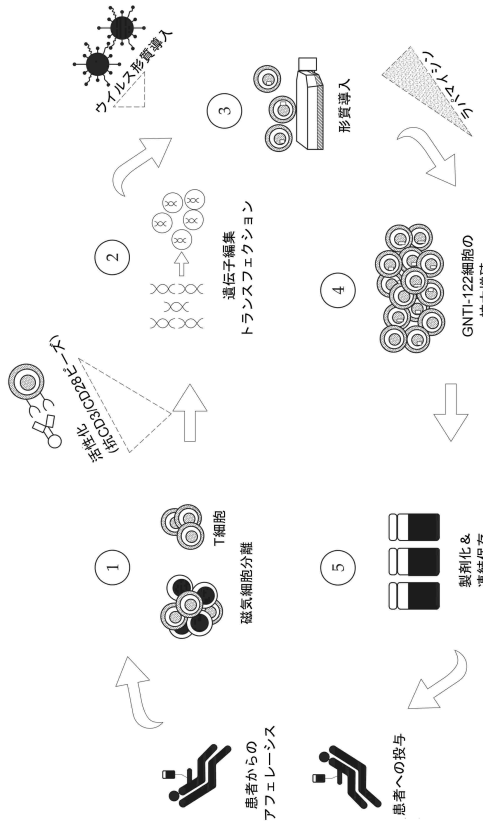


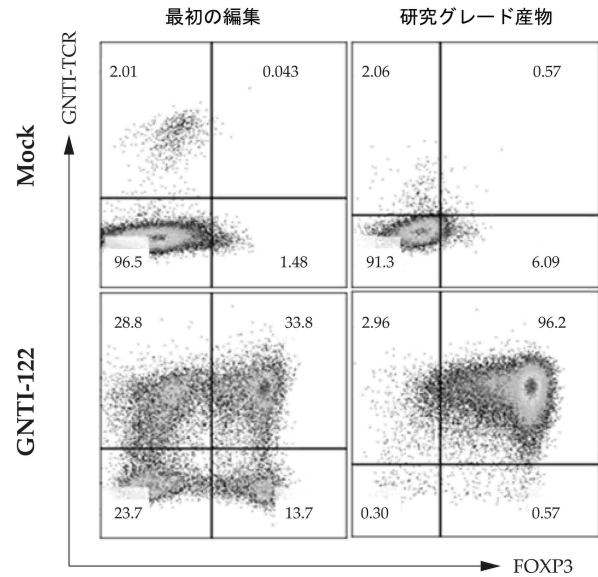
図 19C

50

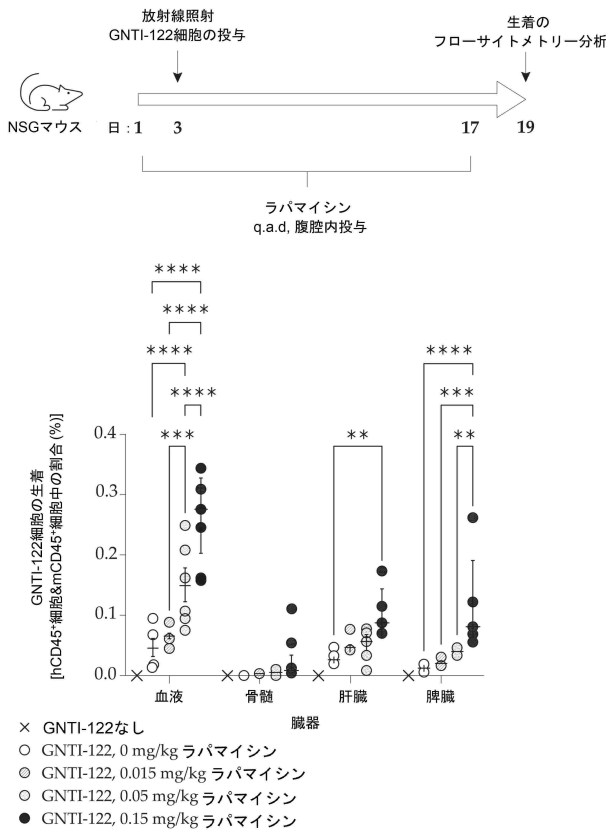
【図 20】



【図 21】



【図 22 A】



【図 22 B - C】

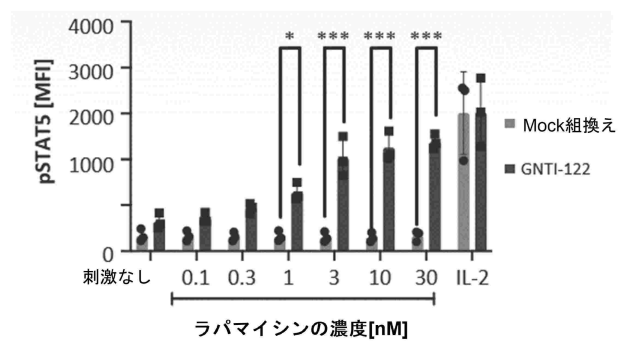


図 22B

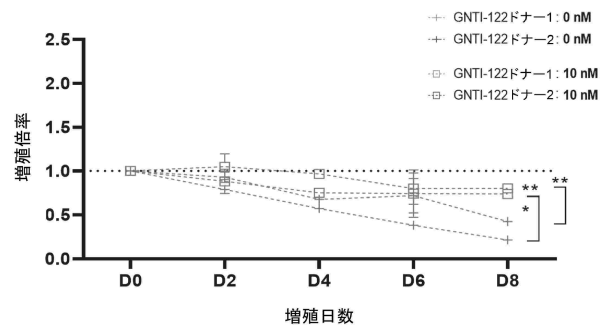


図 22C

10

20

30

40

50

【図 2 2 D - E】

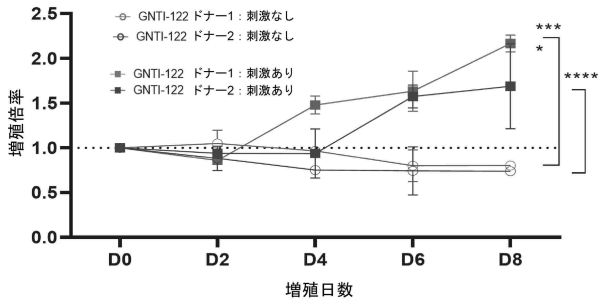


図 22D

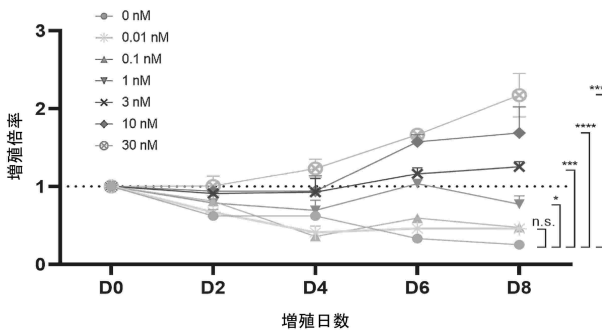
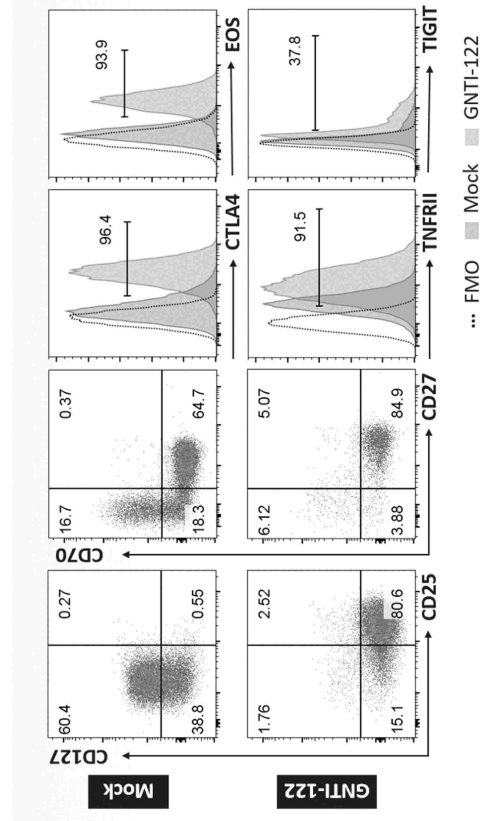


図 22E

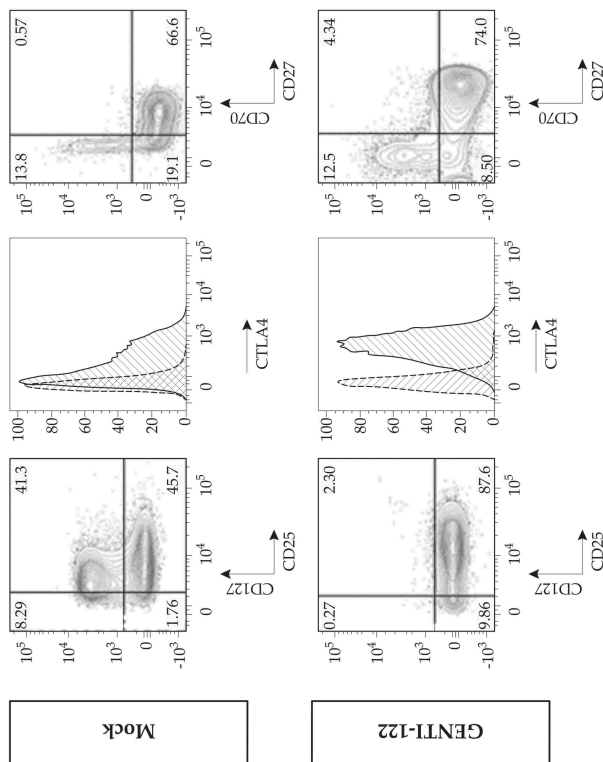
【図 2 3 A】



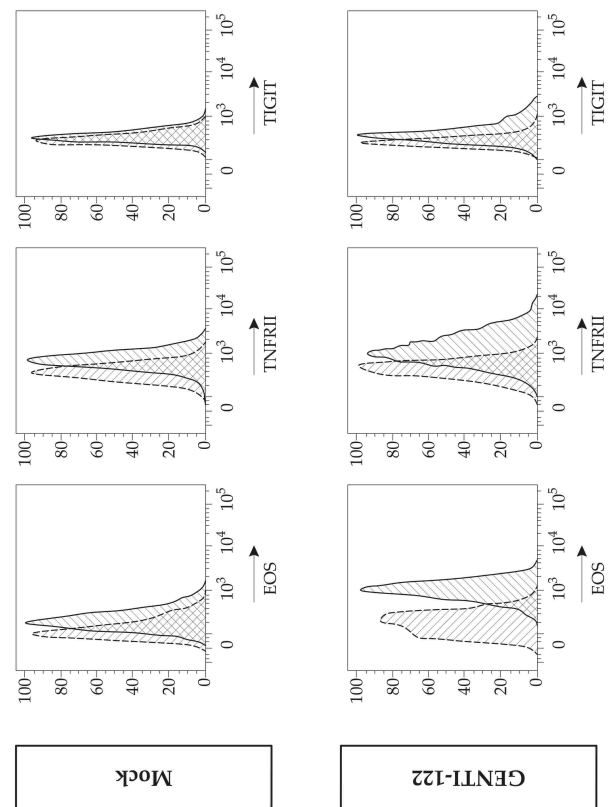
10

20

【図 2 3 B - 1】



【図 2 3 B - 2】

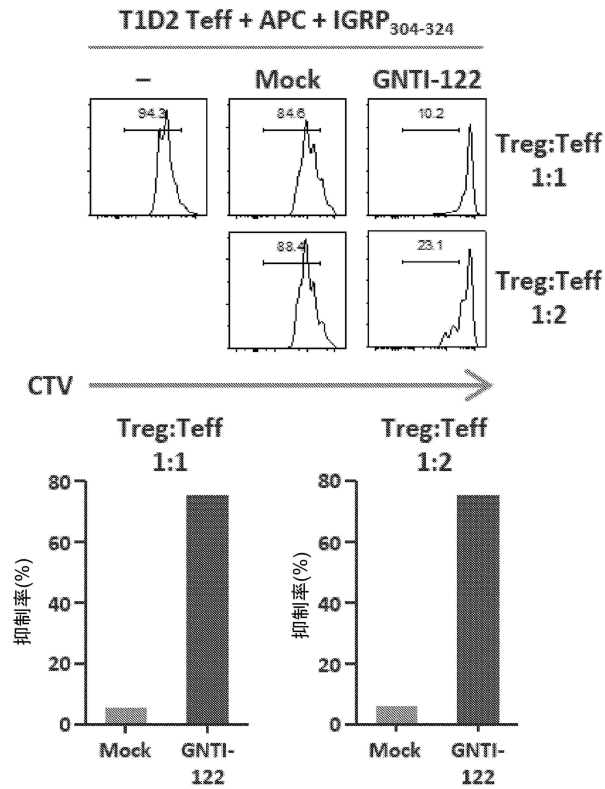


30

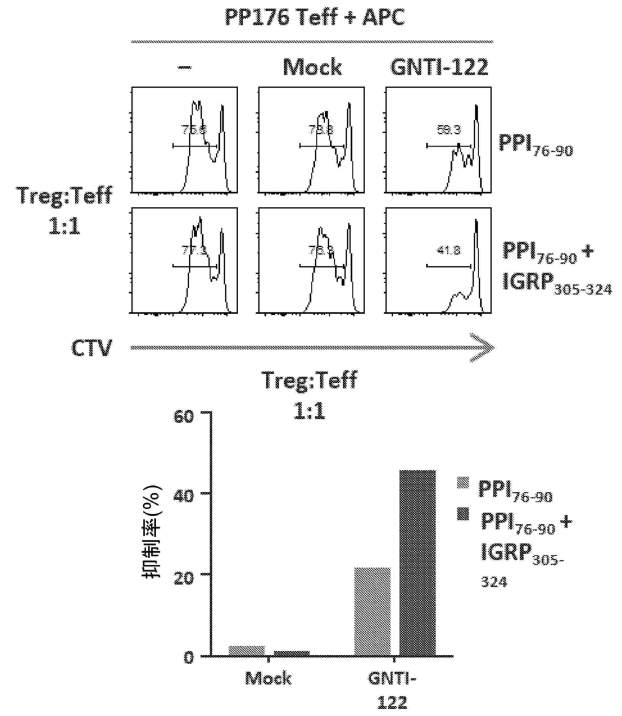
40

50

【図 2 3 C】



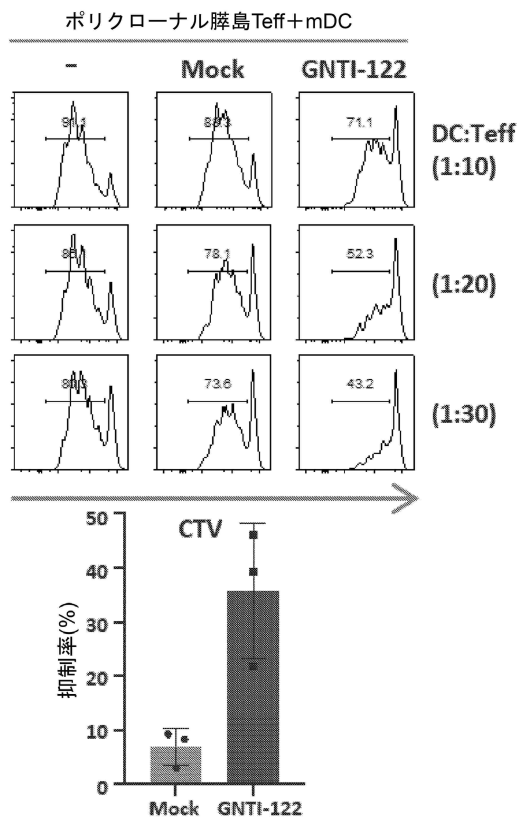
【図 2 3 D】



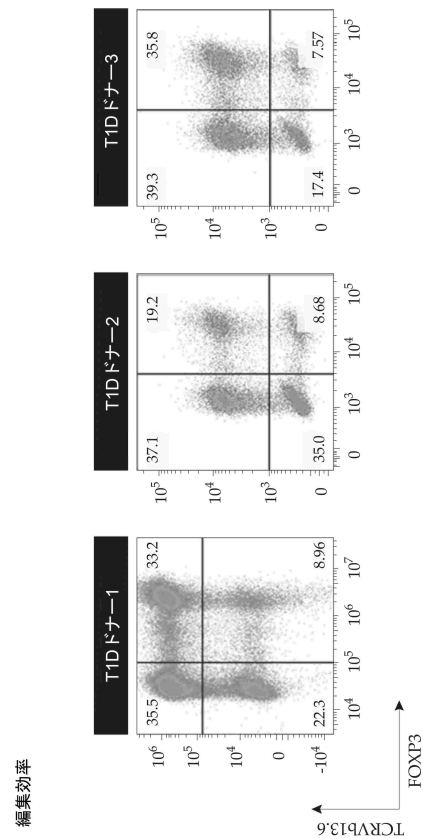
10

20

【図 2 3 E】



【図 2 3 F】

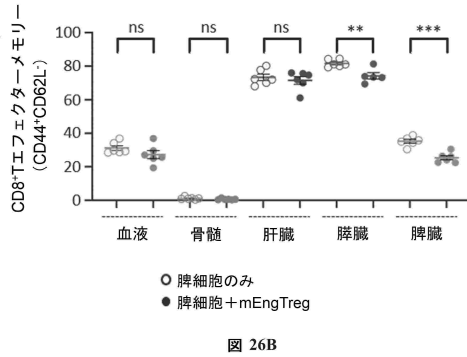
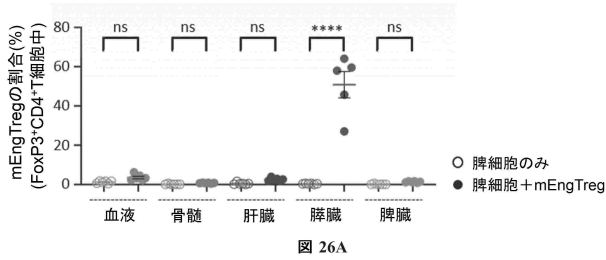


30

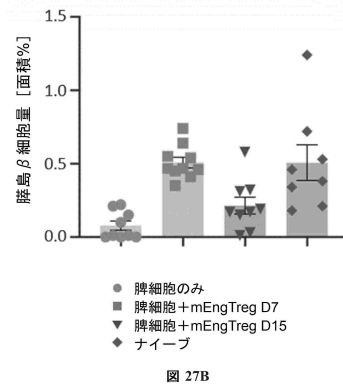
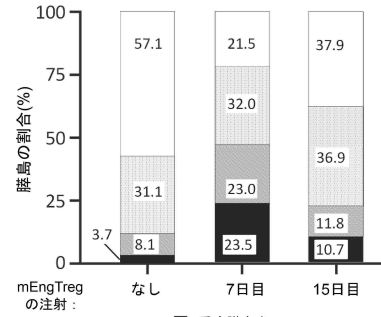
40

50

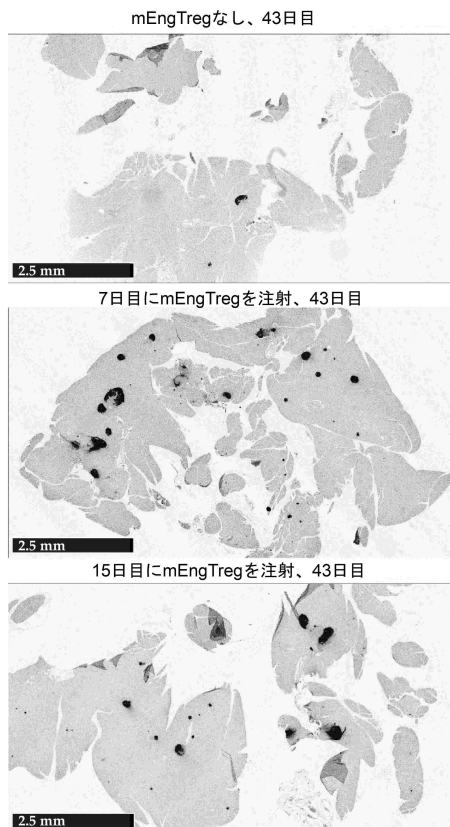
【図 26 A - B】



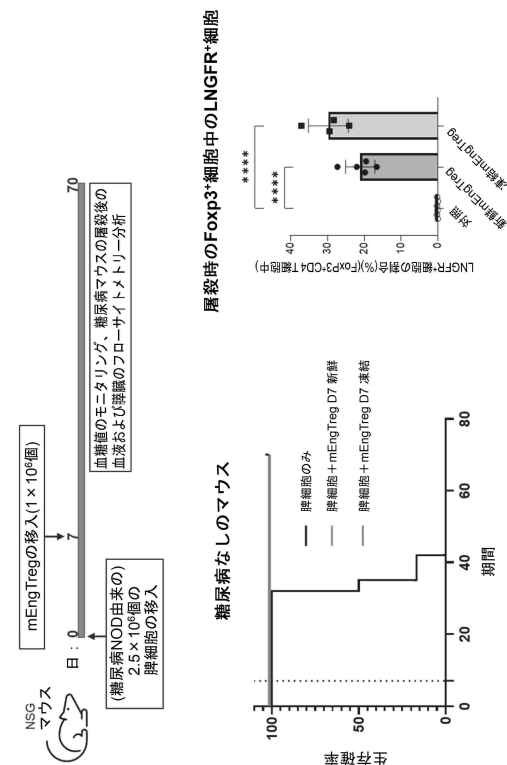
【図 27 A - B】



【図 27 C】



【図 28】



10

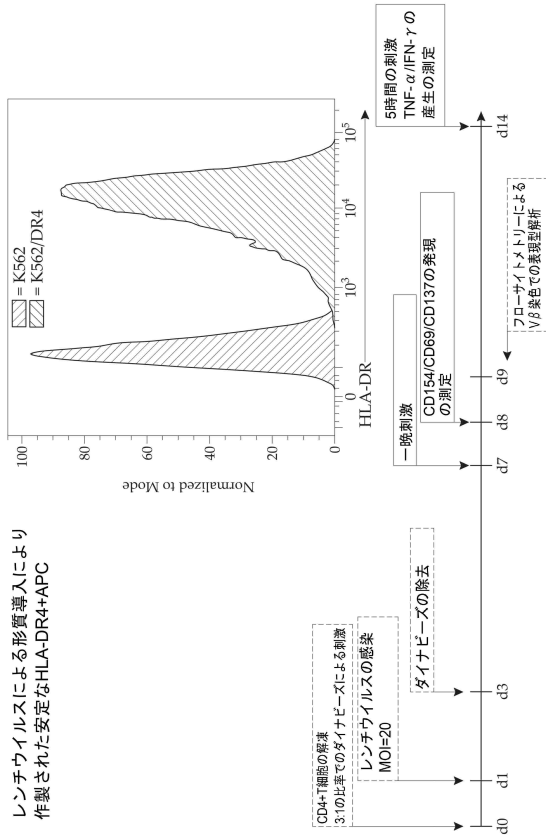
20

30

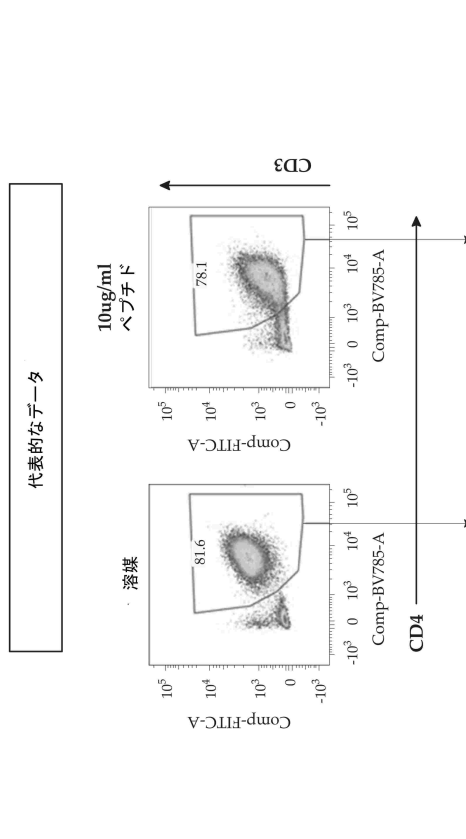
40

50

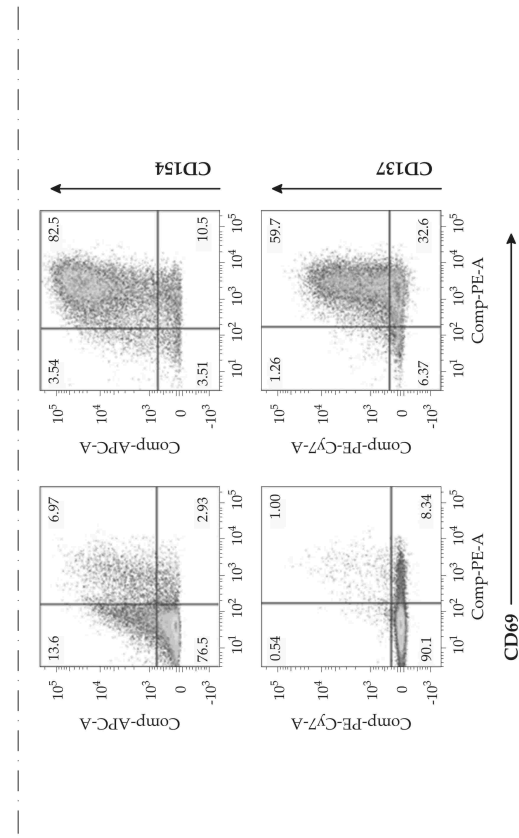
【図 2 9 A】



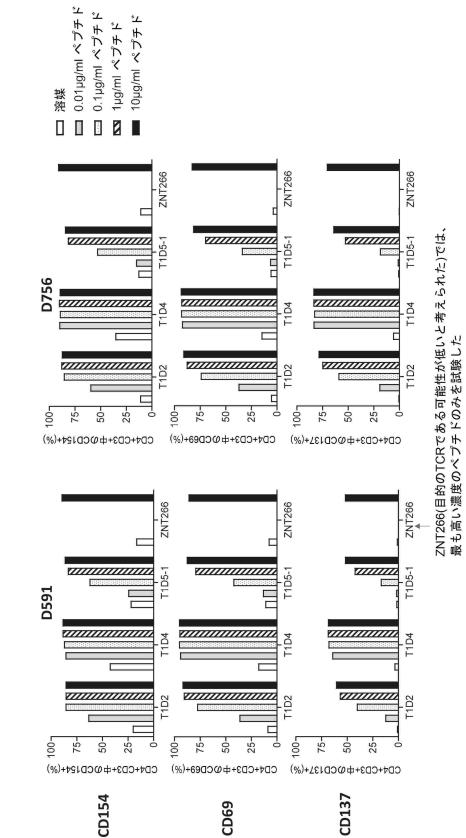
【図 2 9 B - 1】



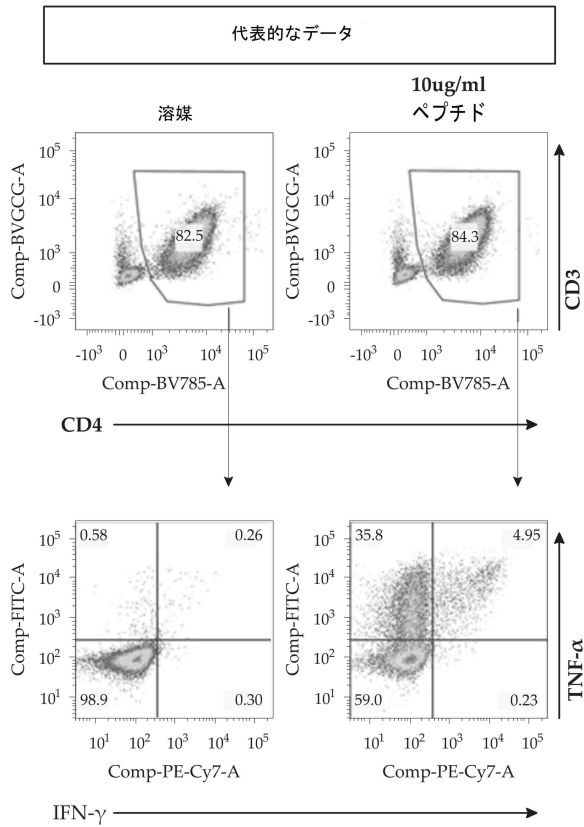
【図 2 9 B - 2】



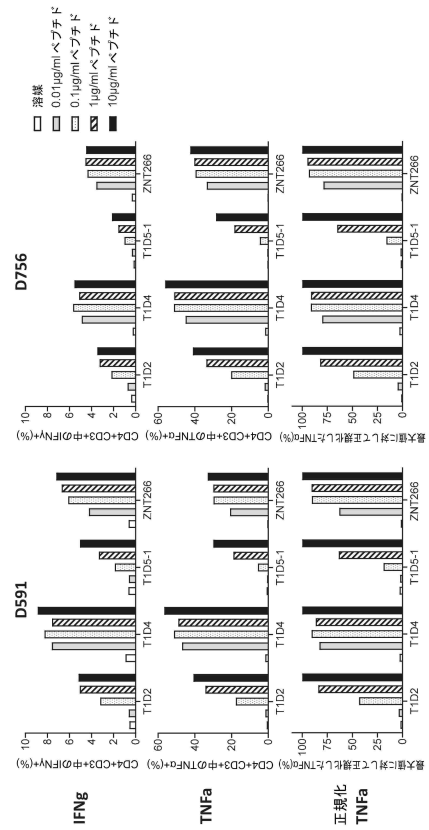
【図 2 9 C】



【図 29 D】



【図 29 E】



10

20

【図 30 A - B】

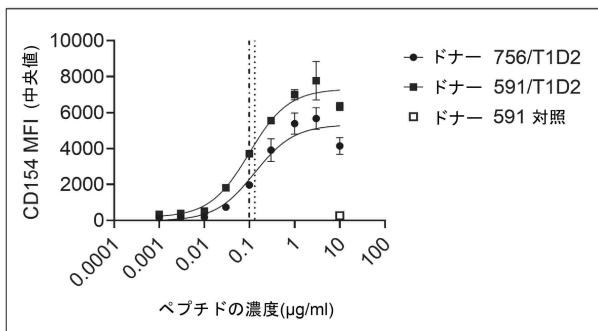


図 30A

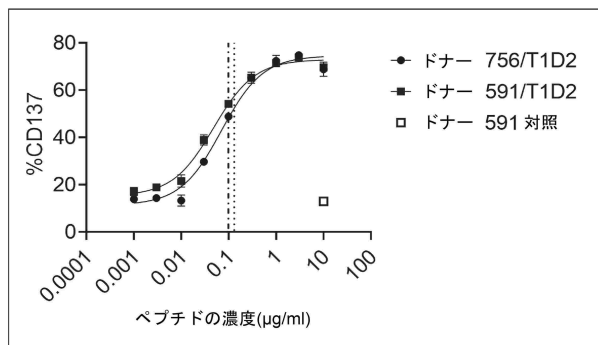


図 30B

【図 31 A - B】

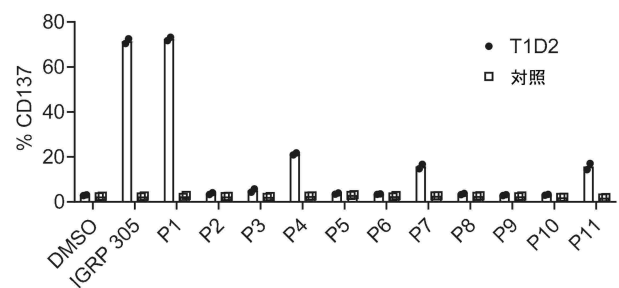


図 31A

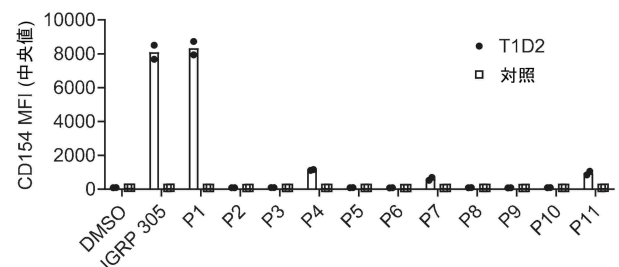


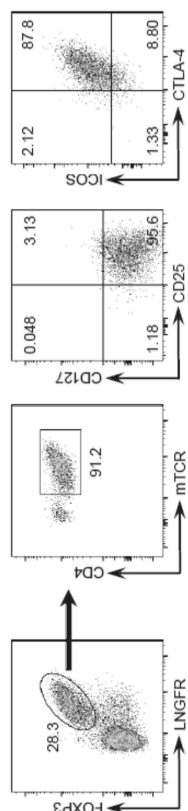
図 31B

30

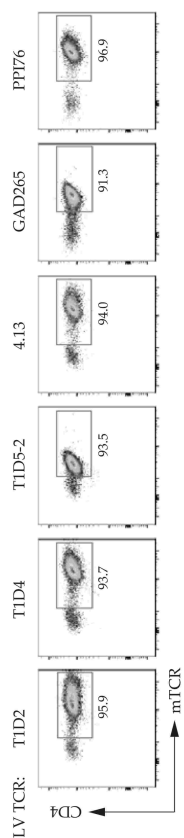
40

50

【図 3 3 C】



【図 3 3 F】



【図 3 3 D - E】

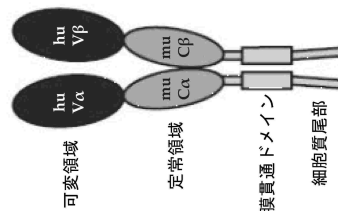


図 33E

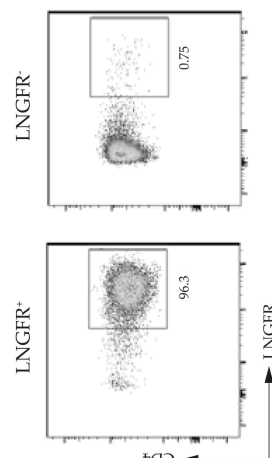
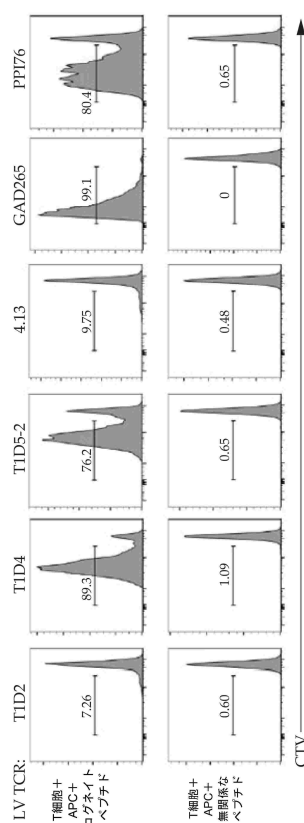


図 33D

【図 3 3 G】



10

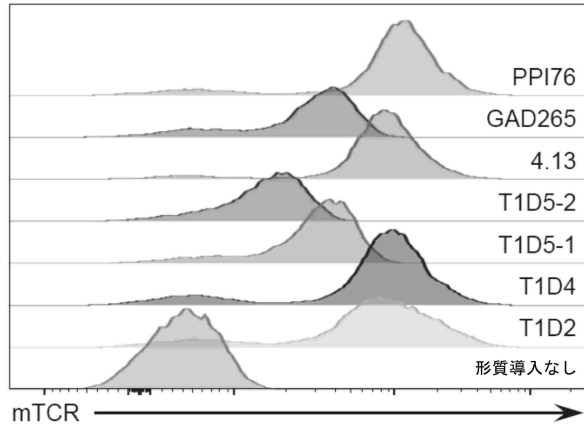
20

30

40

50

【図 3 3 H】



【図 3 4 A - B】

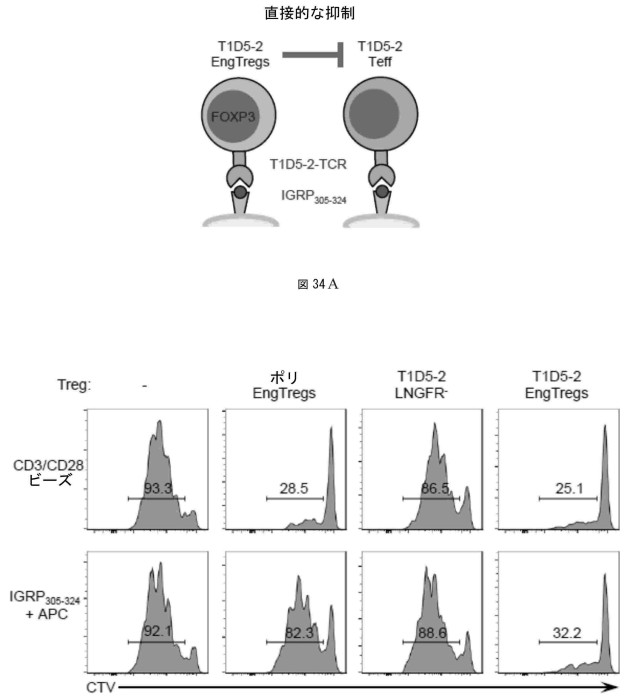


図 34 A

図 34 B

【図 3 4 C - D】

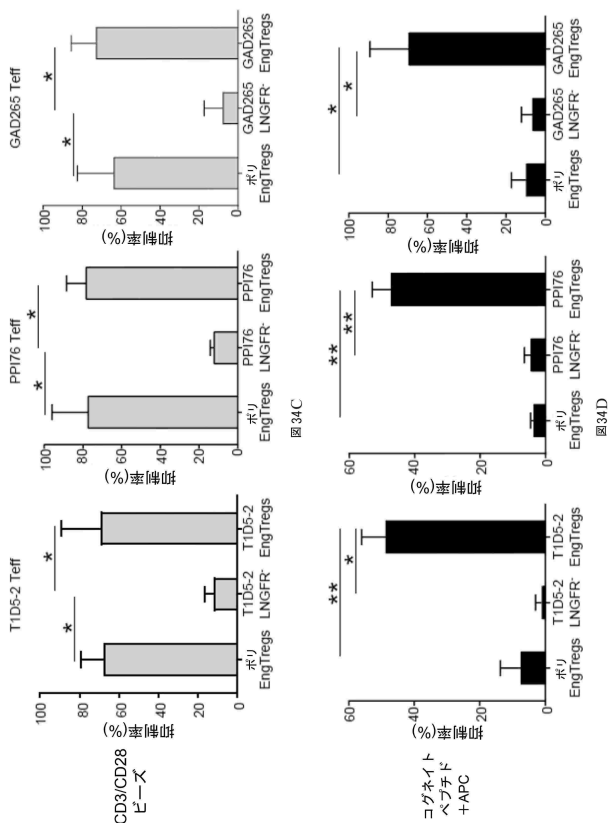
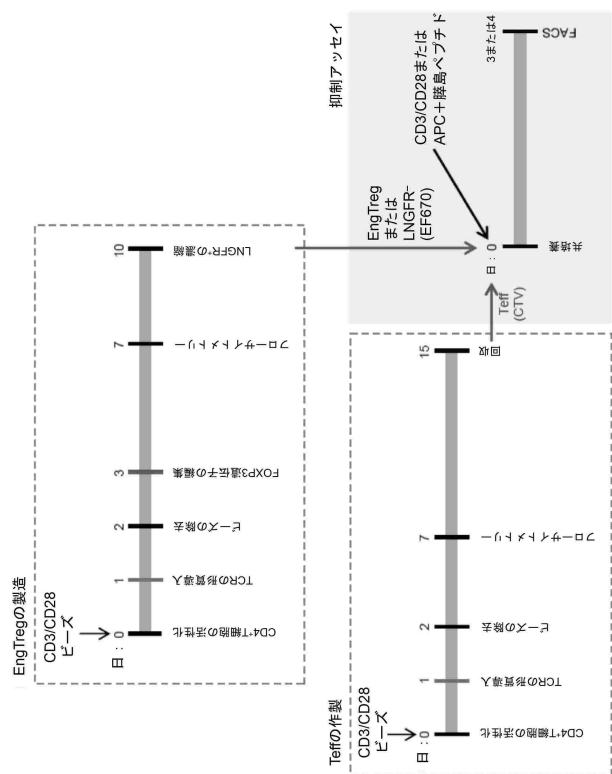


図 34 C

図 34 D

【図 3 4 E】



10

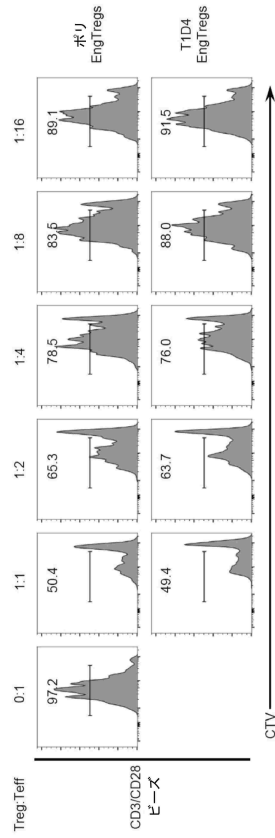
20

30

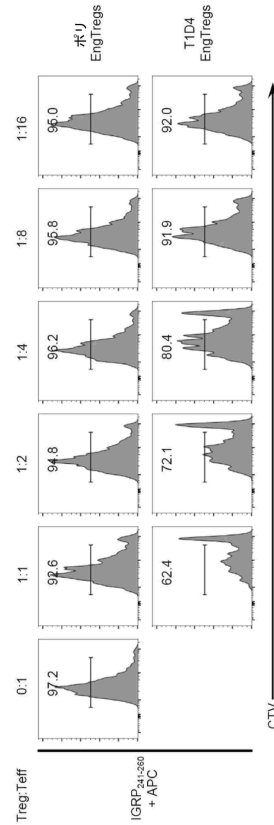
40

50

【図 3 4 F】



【図 3 4 G】



【図 3 4 H - I】

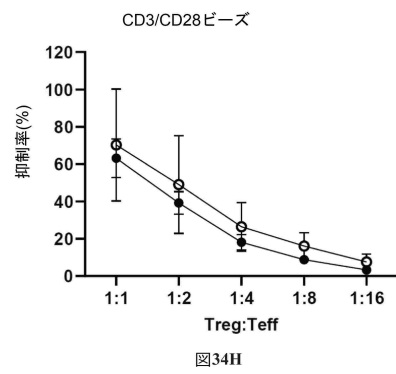


図34H

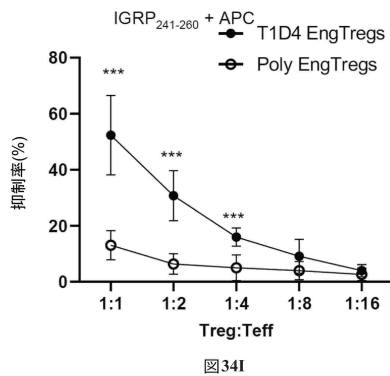
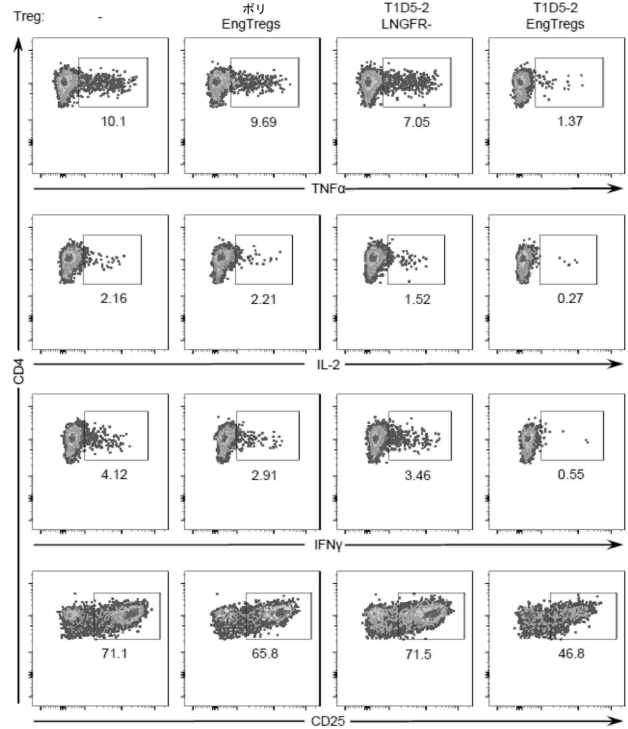


図34I

【図 3 5 A】



10

20

30

40

50

【図 3 5 B - C】

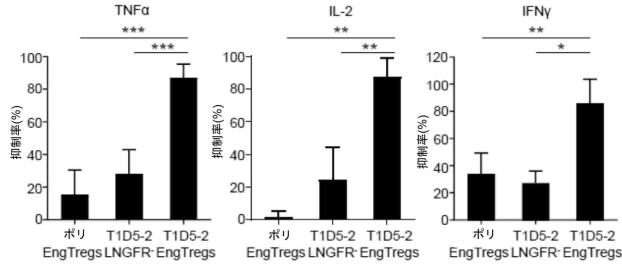


図 35 B

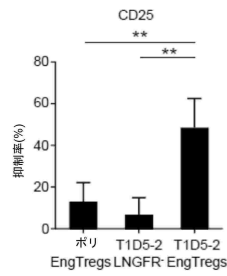
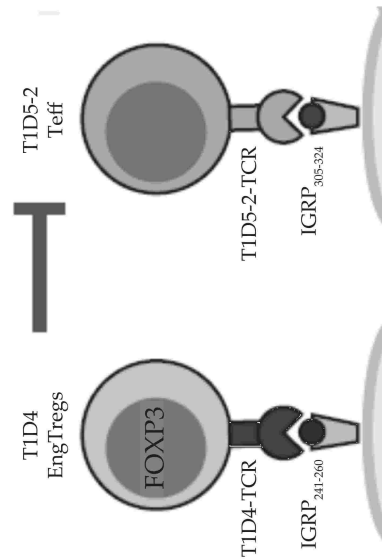


図 35 C

【図 3 6 A】

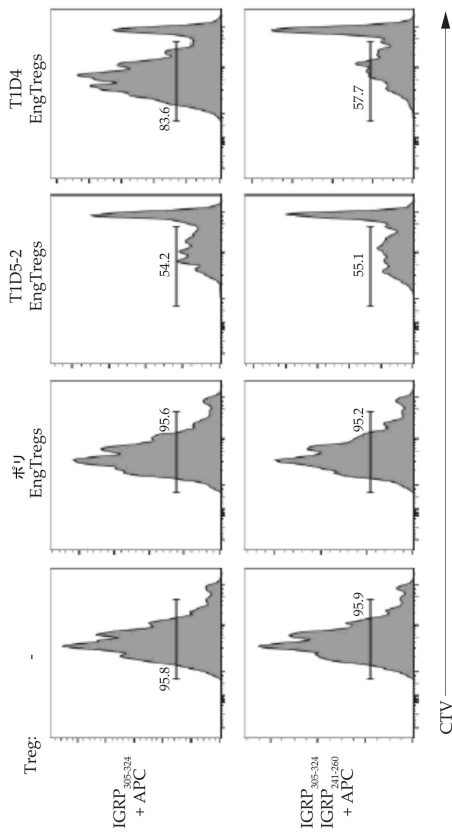
バイスタンダー抑制



10

20

【図 3 6 B】



【図 3 6 C - E】

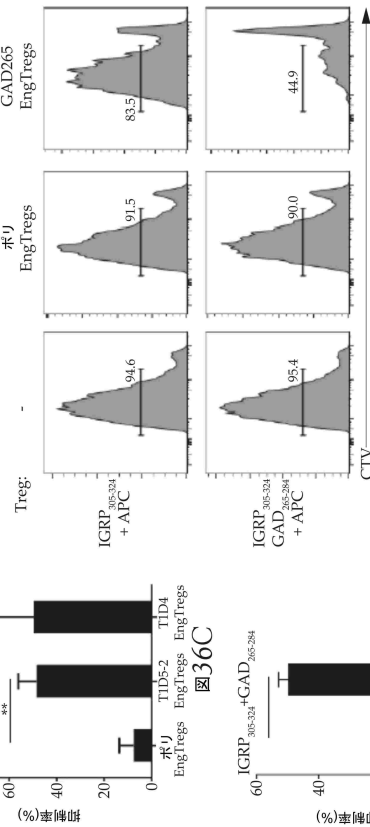


図 36D

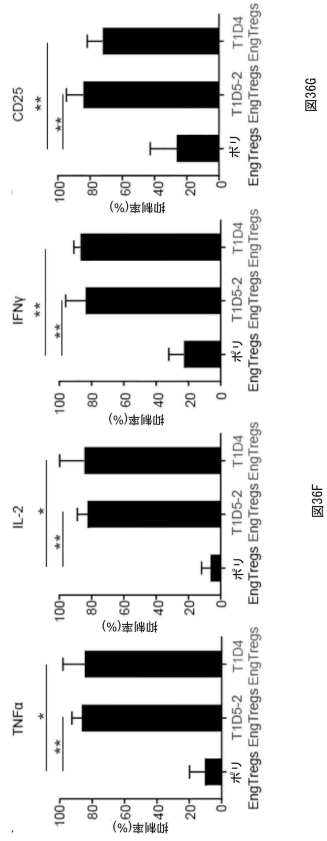
図 36E

30

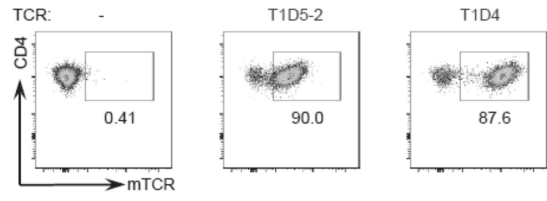
40

50

【図 3 6 F - G】



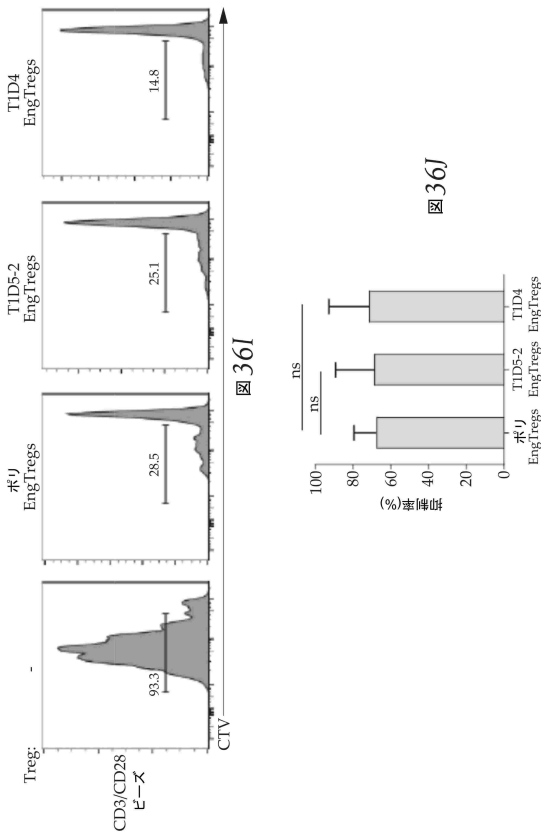
【図 3 6 H】



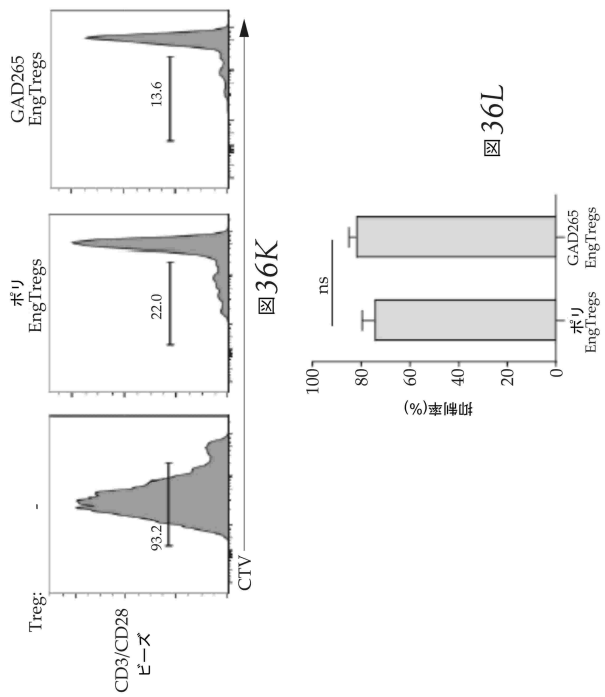
10

20

【図 3 6 I - J】



【図 3 6 K - L】

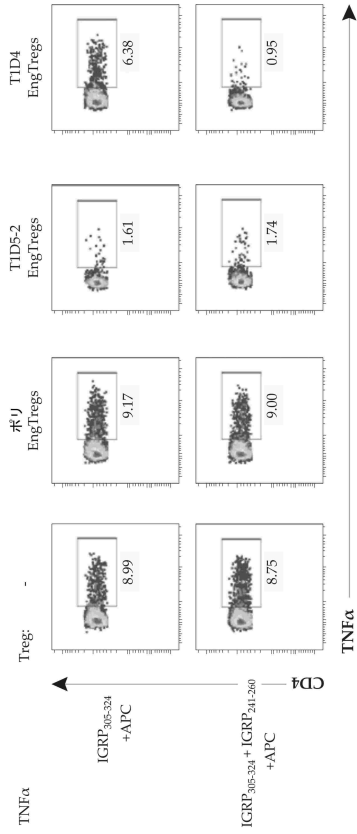


30

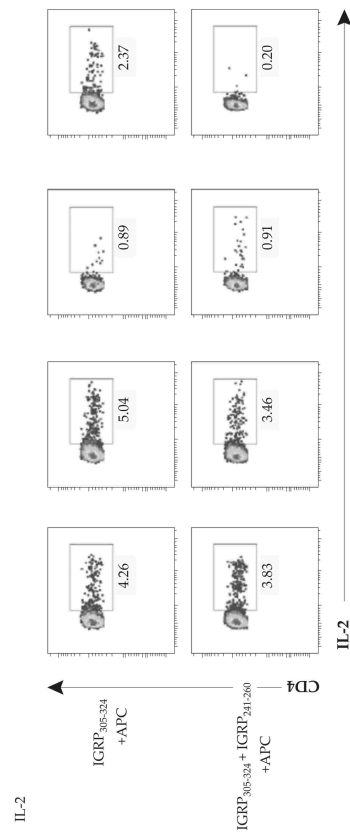
40

50

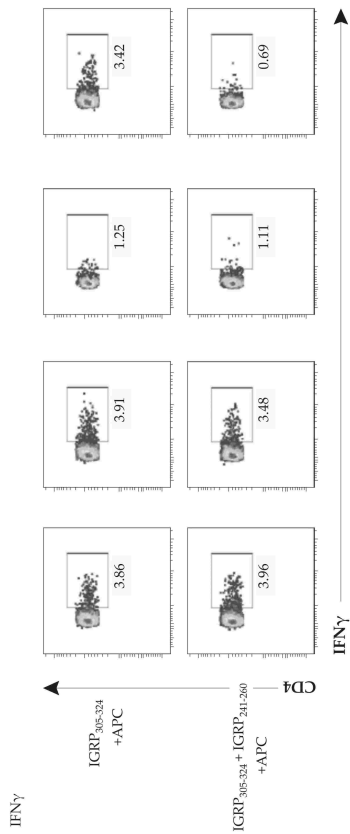
【図 3 6 M】



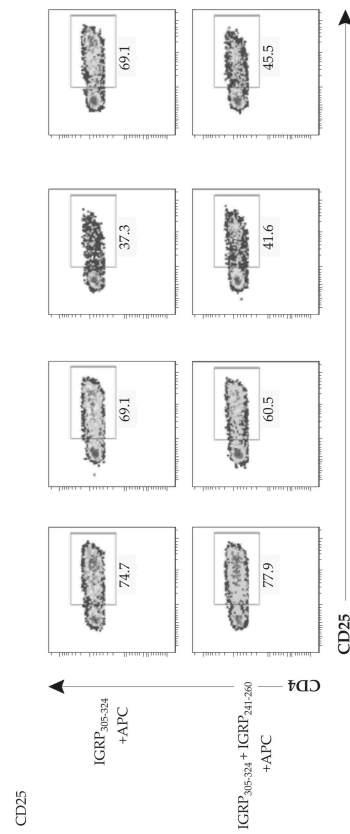
【図 3 6 N】



【図 3 6 O】



【図 3 6 P】



10

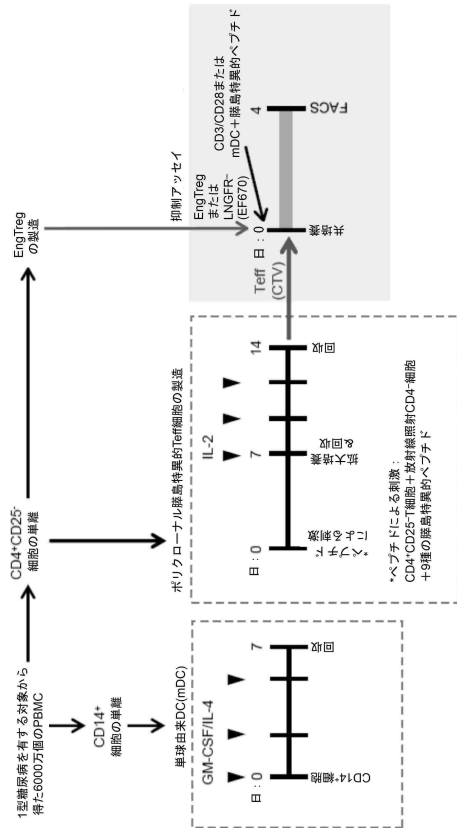
20

30

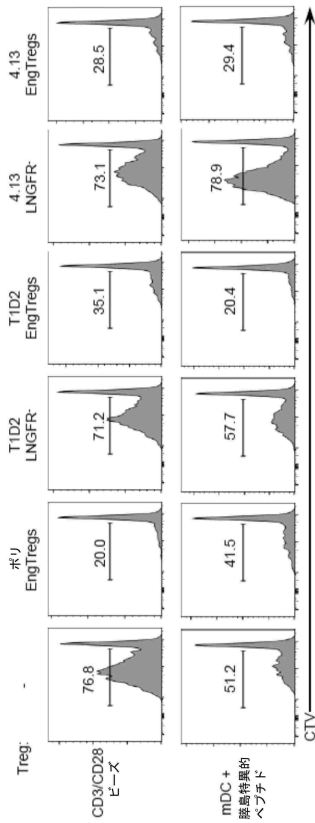
40

50

【図 3 7 A】



【図 3 7 B】



【図 3 7 C - D】

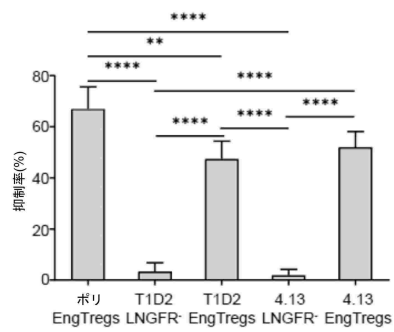


図37C

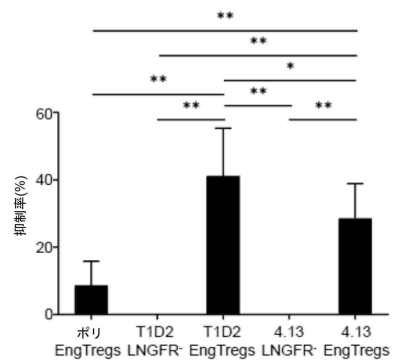
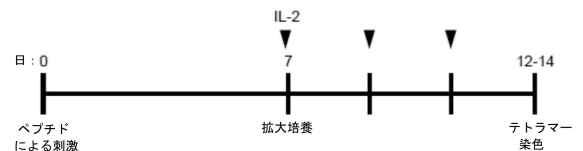


図37D

【図 3 7 E】



10

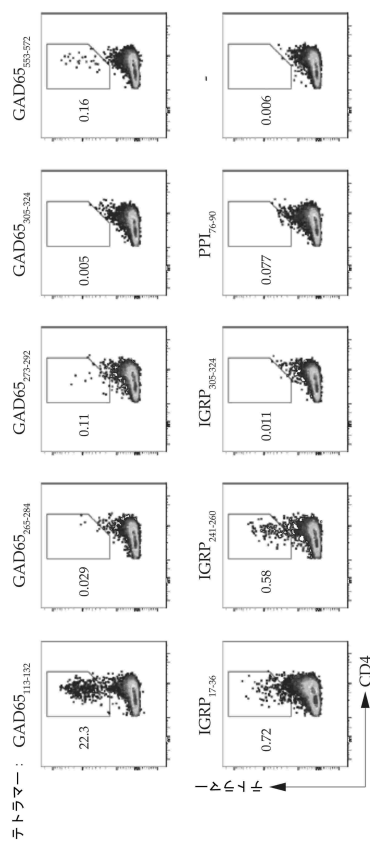
20

30

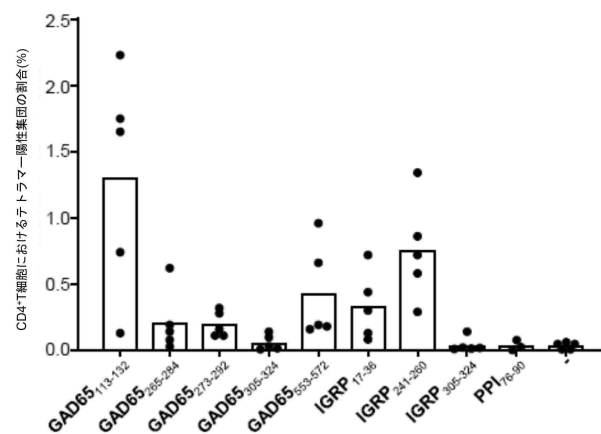
40

50

【図 37 F】



【図 37 G】



10

20

【図 37H-J】

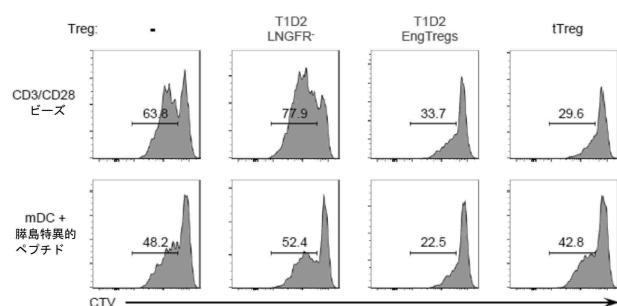


图 37 H

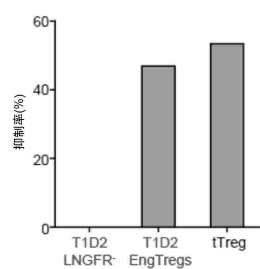


图 37 I

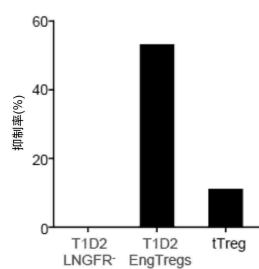
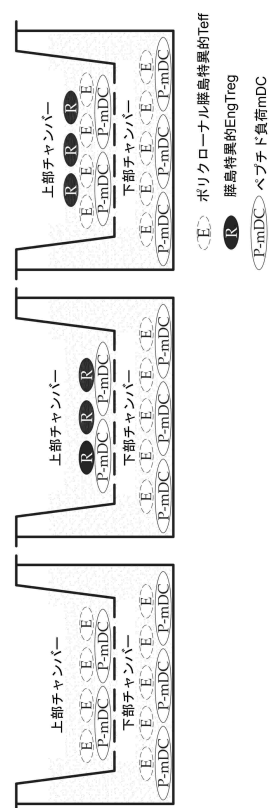


图 37 J

【図 3 8 A】

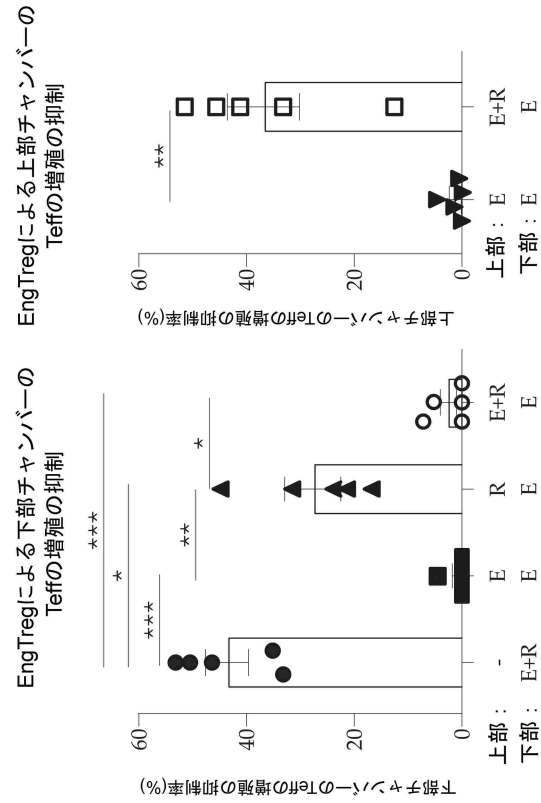


30

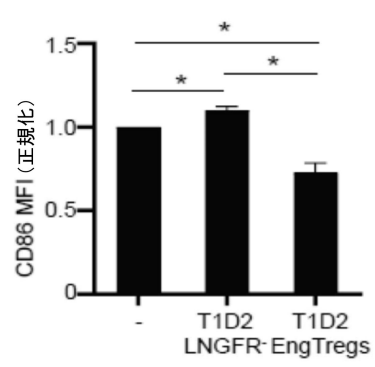
40

50

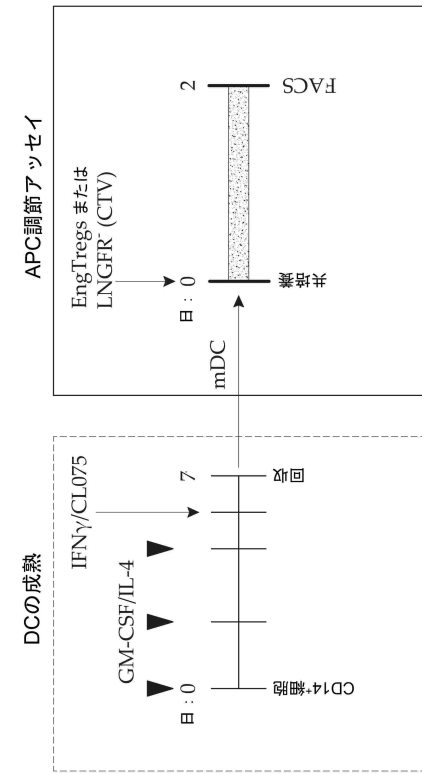
【図 3 8 B】



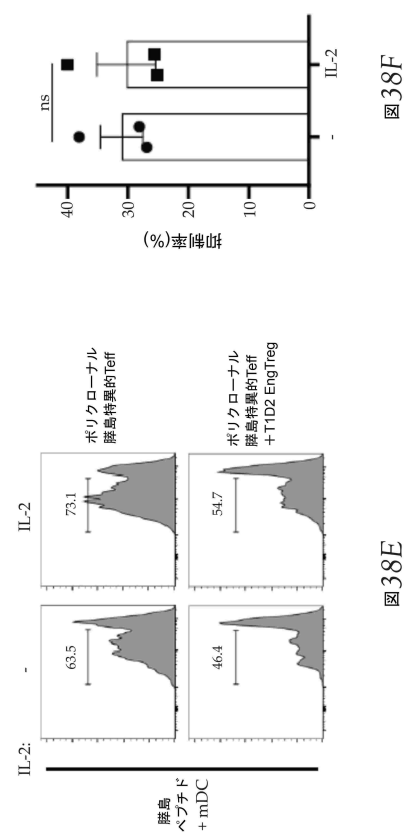
【図 3 8 D】



【図 3 8 C】



【図 3 8 E - F】



10

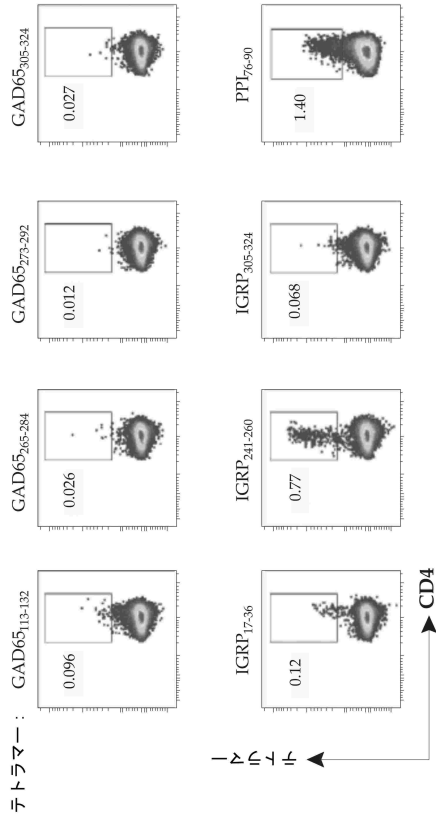
20

30

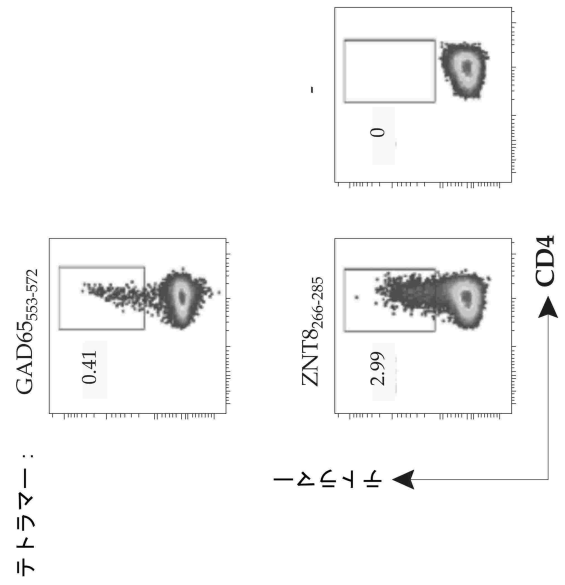
40

50

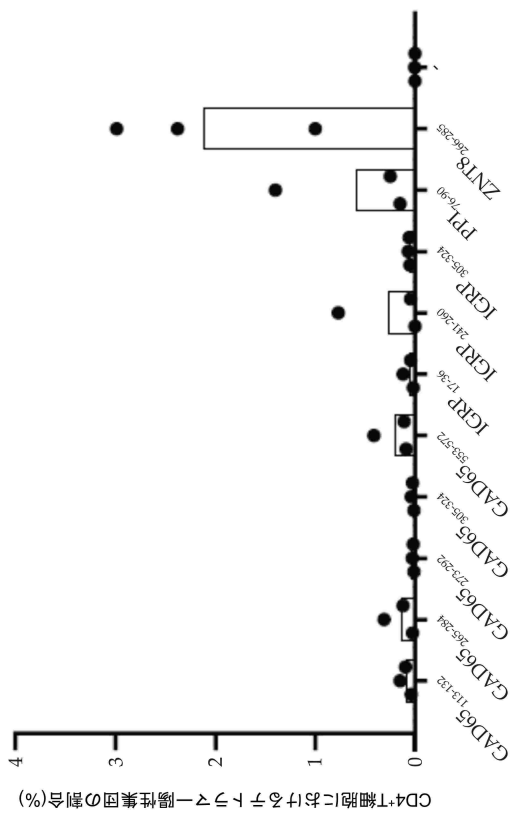
【図 3 8 G - 1】



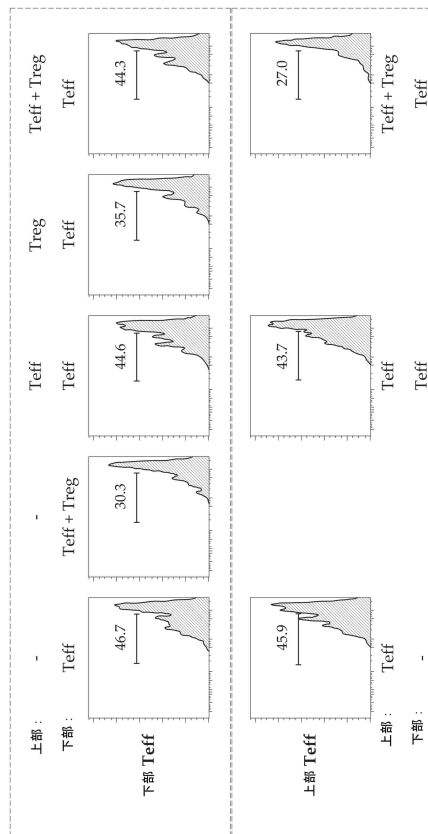
【図 3 8 G - 2】



【図 3 8 H】



【図 3 8 I】



10

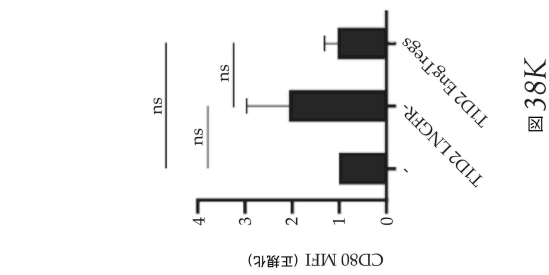
20

30

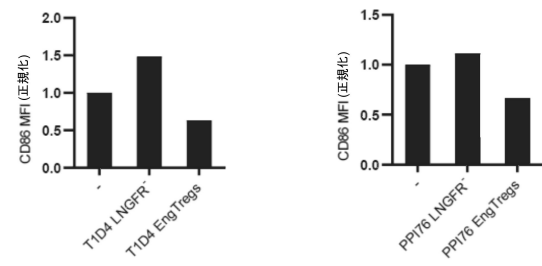
40

50

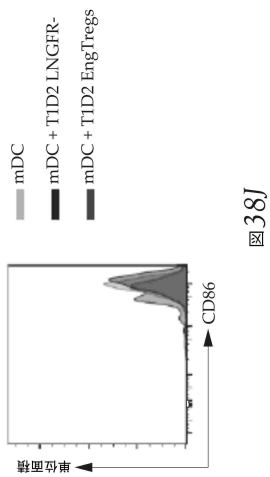
【図 3 8 J - K】



【図 3 8 L】

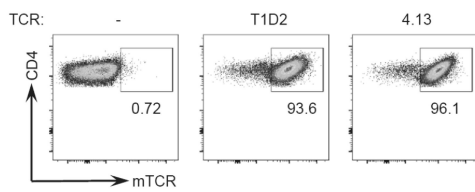


10

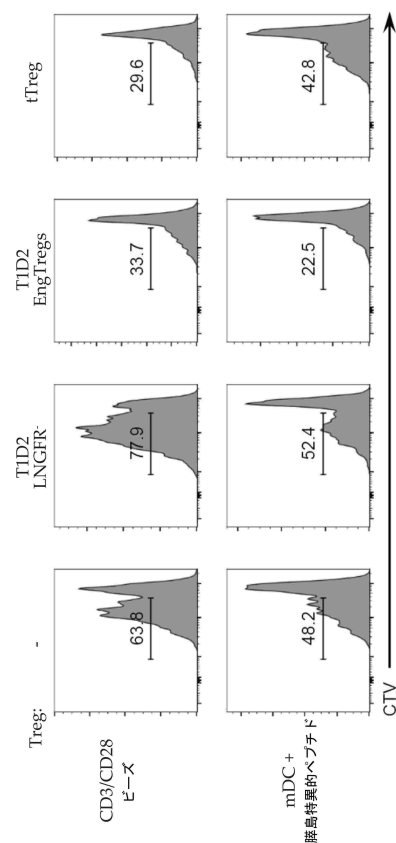


20

【図 3 8 M】



【図 3 8 N】



30

40

50

【図 38 O - P】

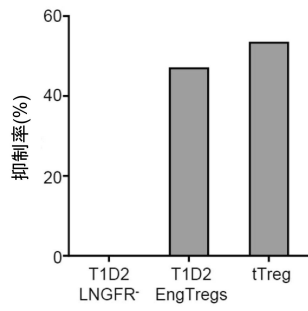


図38O

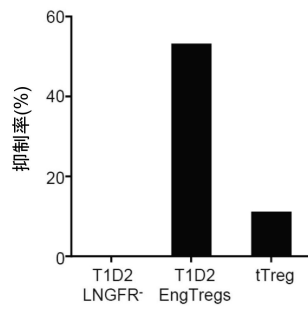


図38P

【図 39 A - B】

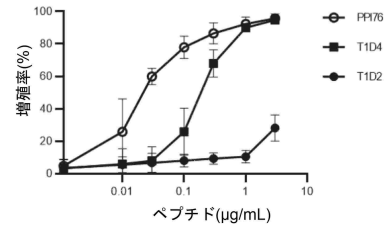


図39A

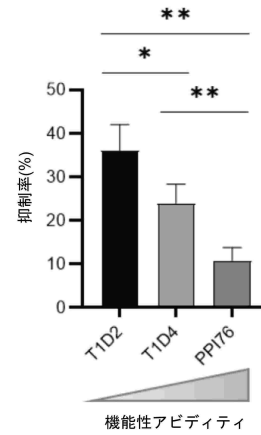


図39B

【図 39 C - D】

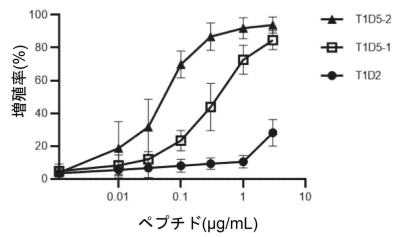


図39C

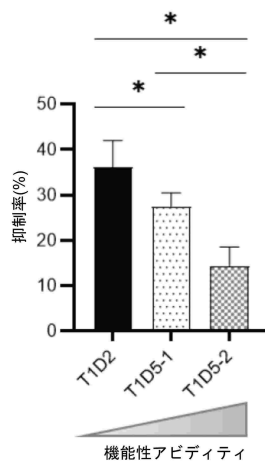


図39D

【図 39 E - G】

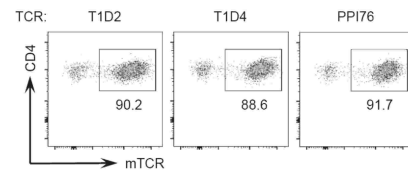


図39E

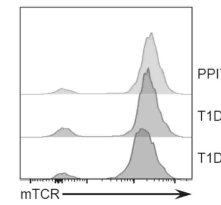


図39F

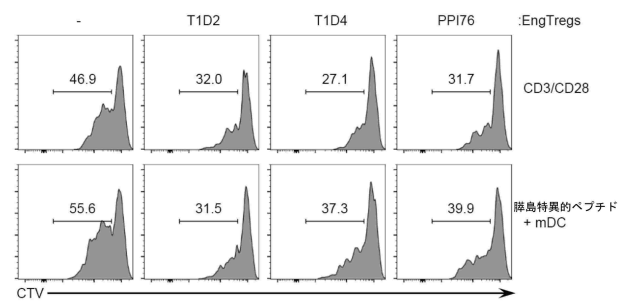


図39G

10

20

30

40

50

【図 39H-J】

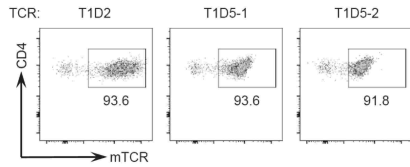


図 39H

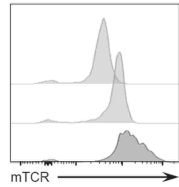


図 39I

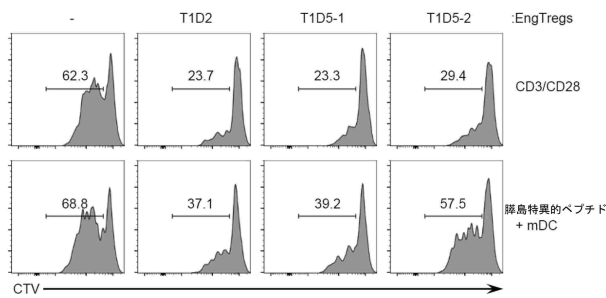


図 39J

【図 40A-C】



図 40A

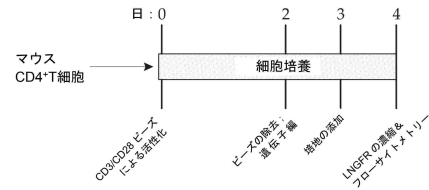


図 40B

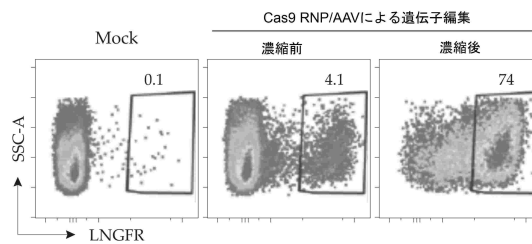


図 40C

【図 40D-E】

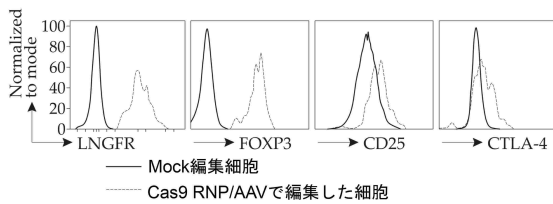


図 40D

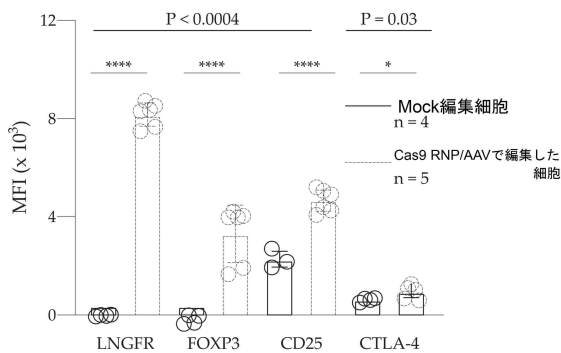


図 40E

【図 40F-H】

インビトロでの抗原特異的抑制

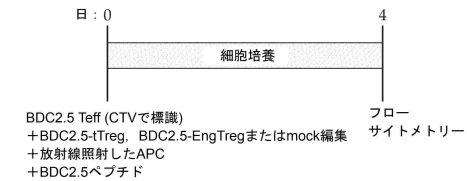


図 40F

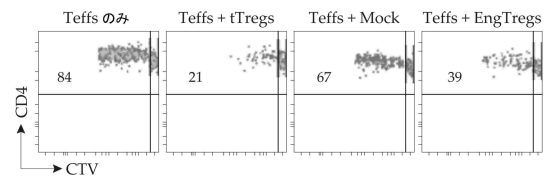


図 40G

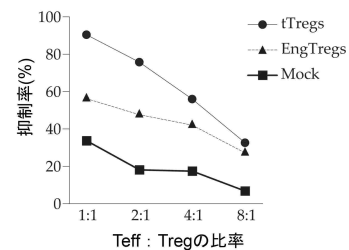


図 40H

10

20

30

40

50

【図 4 1 A - B】

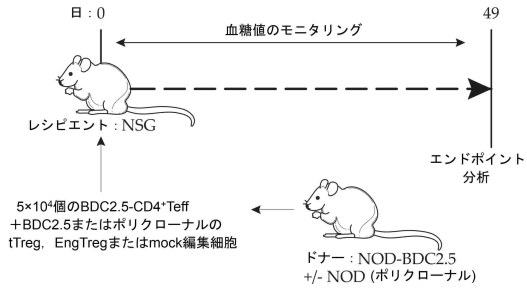


図 41A

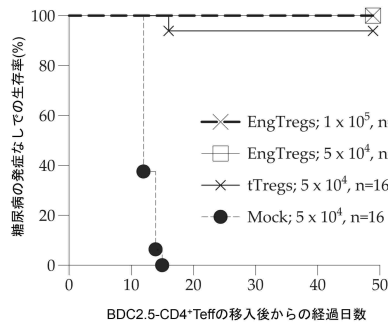
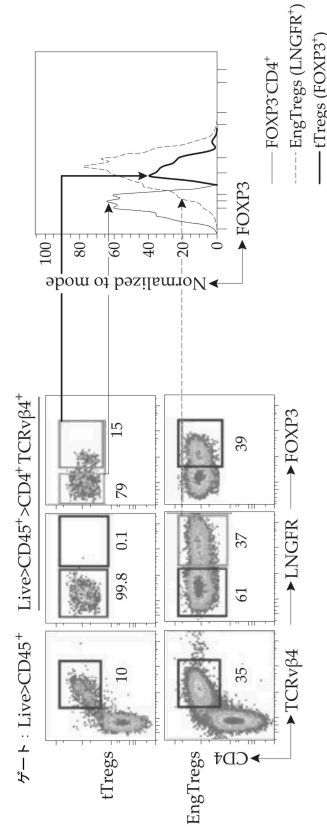


図 41B

【図 4 1 C】



10

20

【図 4 1 D - E】

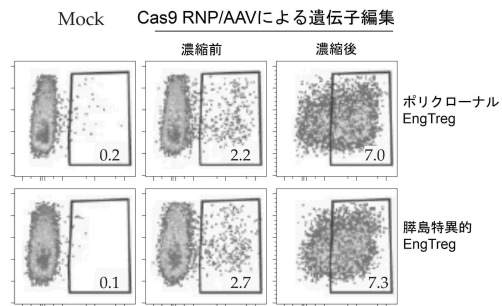


図 41D

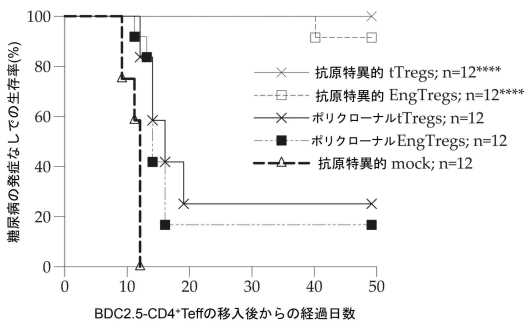


図 41E

【図 4 1 F - G】

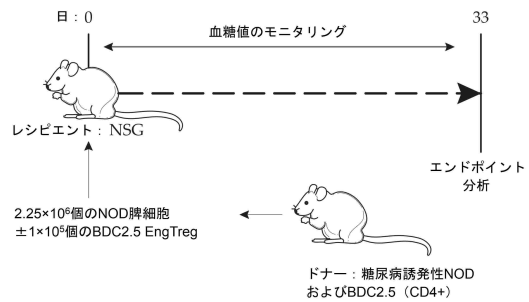


図 41F

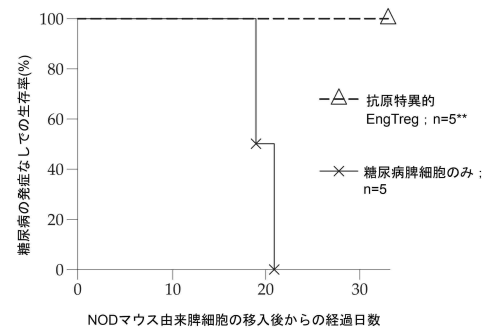


図 41G

30

40

50

【図 4 1 H - I】

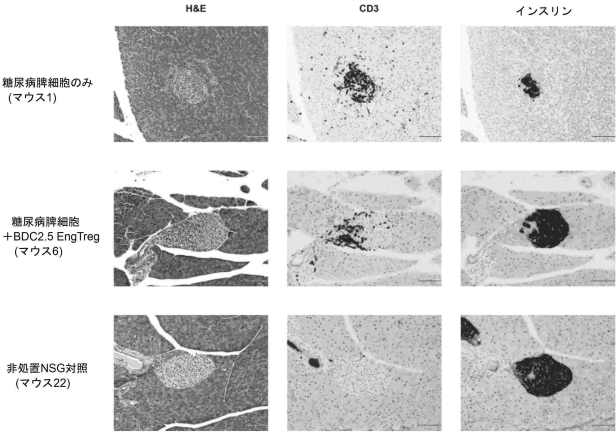


図 41H

実験群	症例 (マウスNo., 切片)	正常な 膵島	軽度の 膵島炎 (<30%の 膵島病変)	中程度の 膵島炎 (30~70%の 膵島病変)	重度の 膵島炎 (>70%の 膵島病変)	インスリン ⁺ 膵島 (IHC)	間質性炎症 (IHCによる CD3+細胞の評価 スコア: 0~3+)
糖尿病 脾細胞のみ	1 L1	0	0	0	0.16	0.03	3+
	1 L2	0	0	0	0.18	0.04	3+
	2 L1	0	0	0	0.16	0.04	3+
	2 L2	0	0	0	0.18	0.05	3+
糖尿病 脾細胞 + BDC2.5 EngTreg	6 L1	0.13	0.06	0.13	0.07	0.40	1+
	6 L2	0.11	0.13	0.11	0.13	0.46	1+
	7 L1	0.03	0.13	0.06	0.19	0.38	1+
	7 L2	0	0.13	0.12	0.22	0.35	1+
非処置 NSG対照	22 L1	0.67	0	0	0	0.75	0
	22 L2	0.73	0	0	0	0.77	0
	25 L1	0.51	0	0	0	0.59	0
	25 L2	0.61	0	0	0	0.55	0

図 41I

【配列表】

2025501611000001.xml

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 22/81929

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC - INV. A61K 35/17, C07K 14/725, C12N 5/0783 (2023.01)

ADD. C12N 15/85, C12N 15/90 (2023.01)

CPC - INV. C12N 5/0637, C12N 15/907

ADD. C07K 14/7051, C07K 14/4702, C12N 2310/20

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)

See Search History document

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

See Search History document

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

See Search History document

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2020/264039 A1 (SEATTLE CHILDREN'S HOSPITAL et al.) 30 December 2020 (30.12.2020) Abstract; Claim 3; Claim 11; Claim 34; Claim 55; para [0021]; para [0046]; para [0068]; para [0101]; para [0234-0235]	1-3 4
Y	US 2011/0151447 A1 (PARK et al.) 23 June 2011 (23.06.2011) para [0139-0140]; SEQ ID NO 24; SEQ ID NO 25	4

☐ 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

24 March 2023

Date of mailing of the international search report

JUN 02 2023

Name and mailing address of the ISA/US

Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents

P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450

Facsimile No. 571-273-8300

Authorized officer

Kari Rodriguez

Telephone No. PCT Helpdesk: 571-272-4300

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2022)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 22/81829

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:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 22/81929

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☒ Claims Nos.: 5-57, 62-118, 123-174
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

10

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:

---Please see continuation in first extra 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. 1-4

20

30

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.

40

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 22/81929

Continuation of Box No. III. Observations where unity of invention is lacking.

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be searched, the appropriate additional search fees must be paid.

Group I, claims 1-4, directed to a method of producing a genetically modified cell.

Group II, claims 58-61, 119-122, directed to a genetically modified cell and system.

The inventions listed as Groups I-II do not relate to a single special technical feature under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

Special technical features:

Group I has the special technical feature of method of producing a genetically modified cell, that is not required by Group II.

Group II has the special technical feature of a genetically modified cell and system, that is not required by Group I.

Common technical features:

Groups I-II share the common technical feature of:

- (i) a first nucleic acid comprising:
 - (a) a first 5' homology arm having homology to a first nucleic acid sequence in a TRAC locus in the cell genome;
 - (b) a first promoter, wherein the first promoter is an MND promoter;
 - (c) a nucleotide sequence encoding a first chemically induced signaling complex (CISC) component comprising:
 - (1) an extracellular binding domain comprising a rapamycin-binding domain of FK506-binding protein (FKBP),
 - (2) an IL-2Rgamma transmembrane domain, and
 - (3) an intracellular domain comprising an IL-2Rgamma cytoplasmic domain or a functional fragment thereof;
 - (d) a nucleotide sequence encoding a TCRbeta polypeptide or a functional fragment thereof;
 - (e) a nucleotide sequence encoding at least a portion of a TCRa polypeptide, wherein the portion comprises a TCRa variable region and TCRa joining region, wherein a T cell receptor (TCR) comprising the TCRa and TCRb polypeptides binds to a type 1 diabetes (T1D)-associated antigen; and
 - (f) a first 3' homology arm having homology to a second nucleic acid sequence in the TRAC locus that is downstream from the first nucleic acid sequence in the TRAC locus;
- (ii) a second nucleic acid comprising:
 - (a) a second 5' homology arm having homology to a first nucleic acid sequence in a FOXP3 locus in the cell genome;
 - (b) a second promoter, wherein the second promoter is an MND promoter;
 - (c) a nucleotide sequence encoding a second CISC component comprising:
 - (1) an extracellular binding domain comprising an FKBPrapamycin-binding (FRB) domain of mTOR,
 - (2) an IL-2Rb transmembrane domain, and
 - (3) an IL-2Rb cytoplasmic domain or a functional fragment thereof;
 - (d) a nucleotide sequence encoding a cytosolic FRB domain that binds rapamycin and does not comprise a transmembrane domain; and
 - (e) a second 3' homology arm having homology to a second nucleic acid sequence in the FOXP3 locus that is downstream from the first nucleic acid sequence in the FOXP3 locus, and downstream from a Treg-specific demethylated region (TSDR) in the FOXP3 locus.

However, this shared technical feature does not represent a contribution over prior art, because this shared technical feature is made obvious by WO 2020/264039 A1 to Seattle Children's Hospital et al., (hereinafter 'SCH').

---please see continuation on next sheet-----

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 22/81929

Continuation of Box No. III. Observations where unity of invention is lacking.

-----continued from previous sheet-----

SCH teaches (i) a first nucleic acid comprising:

- (a) a first 5' homology arm having homology to a first nucleic acid sequence in a TRAC locus in the cell genome (para [0101] - 'Each repair template is flanked by 300 bp homology arms matched to a gRNA targeting either the TRAC locus (gRNA_4) or FOXP3 locus (gRNA_T9) (#3207, 3208, 3240, 3243, 3251, 3252, 3273).');
- (b) a first promoter, wherein the first promoter is an MND promoter (para [0101] - 'FIG.54 depicts a schematic of AAV HDR donor constructs used in human T cell dual-editing. The first 7 constructs are IL-2 split-CISC repair templates with either GFP, mCherry, HA-tagged FOXP3 or T1D4 driven by the MND promoter');
- (c) a nucleotide sequence encoding a first chemically induced signaling complex (CISC) component comprising:
- (1) an extracellular binding domain comprising a rapamycin-binding domain of FK506-binding protein (FKBP),
 - (2) an IL-2Rgamma transmembrane domain, and
 - (3) an intracellular domain comprising an IL-2Rgamma cytoplasmic domain a functional fragment thereof (para [0101] - 'FIG.54 depicts a schematic of AAV HDR donor constructs used in human T cell dual-editing. The first 7 constructs are IL-2 split-CISC repair templates with either GFP, mCherry, HA-tagged FOXP3 or T1D4 driven by the MND promoter. Each component of the split CISC includes a heterodimeric rapamycin binding complex (either FKBP and FRB domains), along with the chimeric endoplasmic reticulum targeting domain fused to one half of the IL2R signaling complex (either IL2RB or IL2RG) trans-membrane and intracellular domains.');
- (d) a nucleotide sequence encoding a TCRbeta polypeptide or a functional fragment thereof (Claim 34 - 'The airT cell of any one of claims 1-33, comprising at least a first and a second transduced polynucleotide each encoding an antigen-specific TCR polypeptide, wherein said first transduced polynucleotide encodes a TCR V-alpha polypeptide and said second transduced polynucleotide encodes a TCR V-beta polypeptide, wherein said V-alpha polypeptide and said V-beta polypeptide comprise a functional TCR capable of specific antigen recognition.');
- (e) a nucleotide sequence encoding at least a portion of a TCRa polypeptide, wherein the portion comprises a TCRa variable region, wherein a T cell receptor (TCR) comprising the TCRa and TCRb polypeptides binds to a type 1 diabetes (T1D)-associated antigen; and
- (f) a first 3' homology arm having homology to a second nucleic acid sequence in the TRAC locus that is downstream from the first nucleic acid sequence in the TRAC locus (Claim 34; para [0021] - 'In some embodiments the airT cell comprises at least a first and a second transduced polynucleotide sequence encoding, respectively, a TCR V-alpha polypeptide and a TCR V-beta polypeptide of a TCR that specifically binds in a human HLA-restricted manner to an antigenic polypeptide, wherein the TCR V-alpha and V-beta polypeptides comprise paired sequences selected from any one paired TCR V-alpha and V-beta polypeptide sequences set forth in FIG.143.; para [0046] - 'FIG.5 depicts exemplary lentiviral islet-specific TCR constructs expressing rare islet-specific TCRs derived from Type 1 diabetes (T1D) subjects');
- (ii) a second nucleic acid comprising:
- (a) a second 5' homology arm having homology to a first nucleic acid sequence in a FOXP3 locus in the cell genome;
- (b) a second promoter, wherein the second promoter is an MND promoter (para [0101] - 'FIG.54 depicts a schematic of AAV HDR donor constructs used in human T cell dual-editing. The first 7 constructs are IL-2 split-CISC repair templates with either GFP, mCherry, HA-tagged FOXP3 or T1D4 driven by the MND promoter. Each component of the split CISC includes a heterodimeric rapamycin binding complex (either FKBP and FRB domains), along with the chimeric endoplasmic reticulum targeting domain fused to one half of the IL2R signaling complex (either IL2RB or IL2RG) trans-membrane and intracellular domains.');
- (c) a nucleotide sequence encoding a second CISC component comprising:
- (1) an extracellular binding domain comprising an FKBP/rapamycin-binding (FRB) domain of mTOR,
 - (2) an IL-2RB transmembrane domain, and
 - (3) an IL-2RB cytoplasmic domain or a functional fragment thereof;
- (d) a nucleotide sequence encoding a cytosolic FRB domain that binds rapamycin and does not comprise a transmembrane domain; and
- (e) a second 3' homology arm having homology to a second nucleic acid sequence in the FOXP3 locus that is downstream from the first nucleic acid sequence in the FOXP3 locus, and downstream from a Treg-specific demethylated region (TSDR) in the FOXP3 locus (para [0234] - 'By these approaches, engineered FOXP3 and TCR genes may be delivered to a single specific gene locus or to two different specific loci. As also described herein, in some embodiments this strategy may further include incorporating split chemical-induced signaling complex (split CISC) components that permit selective expansion of only those T cells that express both the inserted TCR and the Foxp3 genes in the same cell, thereby enriching for airT cells. Chemical-induced signaling complex (CISC); para [0235] - 'As described herein, some embodiments exploit a split chemical-induced signaling complex (split CISC) strategy by which gene-edited airT cells may be generated and selectively expanded on the basis of successful expression in the same cells of both (i) a constitutively expressed Foxp3 gene-edited gene product, the expression of which is associated with cell surface expression of a first CISC component that specifically binds to a CISC inducer molecule, the first CISC component being present as a transmembrane fusion protein having a first extracellular CISC inducer molecule binding domain, a transmembrane domain, and a first intracellular activation signal transduction domain; and (ii) a transduced heterologous TCR gene-edited gene product, the expression of which is associated with cell surface expression of a second CISC component that is different than the first CISC component and specifically binds to the CISC inducer molecule, the second CISC component being present as a transmembrane fusion protein having a second extracellular CISC inducer molecule binding domain, a transmembrane domain, and a second intracellular activation signal transduction domain that is different than the first intracellular activation signal transduction domain.'). SCH does not expressly teach a TCRa joining region. However, it would have been obvious to one of ordinary skill in the art to consider a longer TCRa construct for any improvement in efficiency.

As the technical features were known in the art at the time of the invention, they cannot be considered special technical features that would otherwise unify the groups.

Therefore, Group I-II inventions lack unity under PCT Rule 13 because they do not share the same or corresponding special technical feature.

Continuation of Item 4 above: claims 5-57, 62-118, 123-174 are held unsearchable because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

フロントページの続き

- (51)国際特許分類
- | | F I | テーマコード (参考) |
|--------------------------|----------------|-------------|
| C 1 2 N 15/55 (2006.01) | C 1 2 N 15/55 | |
| C 1 2 N 15/864 (2006.01) | C 1 2 N 15/09 | 1 1 0 |
| C 1 2 N 5/10 (2006.01) | C 1 2 N 15/864 | 1 0 0 Z |
| A 6 1 K 35/12 (2015.01) | C 1 2 N 5/10 | |
| A 6 1 K 35/17 (2025.01) | A 6 1 K 35/12 | |
| A 6 1 P 3/10 (2006.01) | A 6 1 K 35/17 | |
| | A 6 1 P 3/10 | |
- (32)優先日 令和4年5月6日(2022.5.6)
- (33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
- (31)優先権主張番号 63/378,928
- (32)優先日 令和4年10月10日(2022.10.10)
- (33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
- (31)優先権主張番号 63/384,830
- (32)優先日 令和4年11月23日(2022.11.23)
- (33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
- (81)指定国・地域 AP(BW,CV,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(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),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),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,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW
- 2 0 1
- (71)出願人 524235854
ゲンティバイオ, インコーポレイテッド
G E N T I B I O , I N C .
アメリカ合衆国 0 2 1 4 0 マサチューセッツ州, ケンブリッジ, ケンブリッジパーク ドライブ
1 5 0 スイート 9 0 0
1 5 0 Cambridgepark Drive, Suite 9 0 0, Cambridge,
Massachusetts 0 2 1 4 0 U. S. A.
- (74)代理人 100077012
弁理士 岩谷 龍
- (72)発明者 バクナー, ジェーン
アメリカ合衆国 9 8 1 0 1 ワシントン州, シアトル, ナインス アベニュー 1 2 0 1 ベナロヤ
リサーチ インスティテュート アット バージニア メイソン内
- (72)発明者 ローリングス, デヴィッド ジェイ.
アメリカ合衆国 9 8 1 0 1 ワシントン州, シアトル, ナインス アベニュー 1 9 0 0 シアトル
チルドレンズ ホスピタル (ディービーエイ シアトル チルドレンズ リサーチ インスティテュ
ート) 内
- (72)発明者 クック, ピーター ジェイ.
アメリカ合衆国 9 8 1 0 1 ワシントン州, シアトル, ナインス アベニュー 1 9 0 0 シアトル
チルドレンズ ホスピタル (ディービーエイ シアトル チルドレンズ リサーチ インスティテュ
ート) 内
- (72)発明者 ヤン, スジョン
アメリカ合衆国 9 8 1 0 1 ワシントン州, シアトル, ナインス アベニュー 1 2 0 1 ベナロヤ

リサーチ インスティテュート アット バージニア メイソン内
(72)発明者 ウィッカム, トム
アメリカ合衆国 02140 マサチューセッツ州, ケンブリッジ, ケンブリッジパーク ドライブ
150 スイート 900 ゲンティバイオ, インコーポレイテッド内
(72)発明者 パテル, チャンドラ
アメリカ合衆国 02140 マサチューセッツ州, ケンブリッジ, ケンブリッジパーク ドライブ
150 スイート 900 ゲンティバイオ, インコーポレイテッド内
(72)発明者 ウエニシ, ジーン
アメリカ合衆国 02140 マサチューセッツ州, ケンブリッジ, ケンブリッジパーク ドライブ
150 スイート 900 ゲンティバイオ, インコーポレイテッド内
(72)発明者 キーファーークォン, フィリップ
アメリカ合衆国 02140 マサチューセッツ州, ケンブリッジ, ケンブリッジパーク ドライブ
150 スイート 900 ゲンティバイオ, インコーポレイテッド内
F ターム (参考) 4B065 AA90X AB01 BA02 CA44
4C087 AA01 AA02 BB37 BB65 CA12 NA14 ZC35