(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)特許出願公表番号
特表2018-507701
(P2018-507701A)
(43)公表日　平成30年3月22日(2018.3.22)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
C12N 15/09	(2006.01)	C12N	15/00	ZNAA	4B065
C12N 5/10	(2006.01)	C12N	5/10		

審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 98 頁）

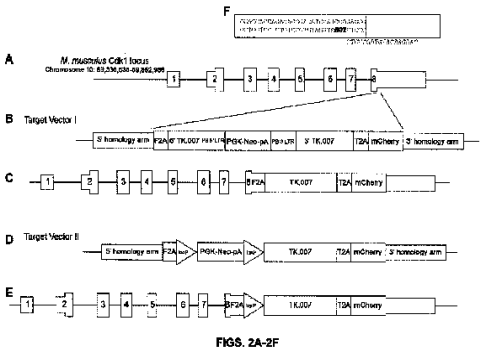
(21)出願番号	特願2017-547568 (P2017-547568)
(86)(22)出願日	平成28年3月9日 (2016.3.9)
(85)翻訳文提出日	平成29年11月7日 (2017.11.7)
(86)国際出願番号	PCT/CA2016/050256
(87)国際公開番号	WO2016/141480
(87)国際公開日	平成28年9月15日 (2016.9.15)
(31)優先権主張番号	62/130,258
(32)優先日	平成27年3月9日 (2015.3.9)
(33)優先権主張国	米国 (US)
(31)優先権主張番号	62/130,270
(32)優先日	平成27年3月9日 (2015.3.9)
(33)優先権主張国	米国 (US)

(71)出願人　517304738
シナイ　ヘルス　システム
カナダ国，オンタリオ州　エム５ジー　１エックス５，トロント，６００　ユニバーシティ　アベニュー
(74)代理人　110002572
特許業務法人平木国際特許事務所
(72)発明者　ナギー，アンドラス
カナダ国　エム６ジー　４シー２　オンタリオ，トロント，セイント　レイモンド　ハイツ　１８
(72)発明者　モネッティ，クラウディオ
カナダ国　エム６ピー　４ビー８　オンタリオ，トロント，ユニット　３１０，ケベック　アベニュー　１００

最終頁に続く

(54)【発明の名称】細胞分裂遺伝子座を用いて細胞の増殖を制御するためのツール及び方法

(57)【要約】
本開示は、細胞分裂遺伝子座（ＣＤＬ）を用いて動物細胞における細胞増殖を制御するための分子ツール、方法及びキットを提供する。本明細書において提供されるＣＤＬは、遺伝子座であって、その転写産物が細胞分裂中に発現される遺伝子座である。ＣＤＬは、本明細書に記載される通り、陰性選択マーカ及び／又は誘導性活性化因子に基づく遺伝子発現系を含むように遺伝子修飾され得、これにより、ユーザは、適切な誘導物質を添加又は除去することにより、遺伝子修飾細胞の増殖を可能にし、アブレートし、及び／又は阻害することができる。
【選択図】図２



FIGS. 2A-2F

【特許請求の範囲】
【請求項１】
動物細胞の増殖を制御する方法であって、
－　動物細胞を用意するステップ；
－　前記動物細胞において、細胞分裂遺伝子座（ＣＤＬ）を遺伝子修飾するステップであって、前記ＣＤＬは、１つ又は複数の遺伝子座であって、その転写産物が分裂細胞によって発現される１つ又は複数の遺伝子座であり、前記ＣＤＬの前記遺伝子修飾は、
ａ）アブレーションリンク（ＡＬＩＮＫ）系であって、前記ＣＤＬをコードするＤＮＡ配列に転写によって連結される陰性選択マーカをコードするＤＮＡ配列を含む、アブレーションリンク（ＡＬＩＮＫ）系と；
ｂ）ＣＤＬの調節の誘導性外性活性化因子（ＥＡＲＣ）系であって、前記ＣＤＬに作動可能に連結される誘導性活性化因子に基づく遺伝子発現系を含む、ＣＤＬの調節の誘導性外性活性化因子（ＥＡＲＣ）系と
の１つ又は複数を含む、ステップ；
－　前記陰性選択マーカの誘導物質を用いて、前記ＡＬＩＮＫ系を含む前記遺伝子修飾動物細胞の増殖を制御するステップ；及び／又は
－　前記誘導性活性化因子に基づく遺伝子発現系の誘導物質を用いて、前記ＥＡＲＣ系を含む前記遺伝子修飾動物細胞の増殖を制御するステップ
を含む方法。
【請求項２】
前記ＡＬＩＮＫ修飾動物細胞の前記制御は、
－　前記陰性選択マーカの誘導物質の非存在下で、前記ＡＬＩＮＫ系を含む前記遺伝子修飾動物細胞を維持することにより、前記ＡＬＩＮＫ系を含む前記遺伝子修飾動物細胞の増殖を可能にするステップ；及び
－　前記ＡＬＩＮＫ系を含む前記動物細胞を前記陰性選択マーカの前記誘導物質に曝露することにより、前記ＡＬＩＮＫ系を含む前記遺伝子修飾動物細胞の増殖をアブレート又は阻害するステップ
の１つ又は複数を含む、請求項１に記載の方法。
【請求項３】
前記ＥＡＲＣ修飾動物細胞の前記制御は、
－　前記ＥＡＲＣ系を含む前記遺伝子修飾動物細胞を前記誘導性活性化因子に基づく遺伝子発現系の誘導物質に曝露することにより、前記ＥＡＲＣ系を含む前記遺伝子修飾動物細胞の増殖を可能にするステップ；及び
－　前記誘導性活性化因子に基づく遺伝子発現系の前記誘導物質の非存在下で、前記ＥＡＲＣ系を含む前記動物細胞を維持することにより、前記ＥＡＲＣ系を含む前記遺伝子修飾動物細胞の増殖を阻止又は阻害するステップ
の１つ又は複数を含む、請求項１又は２に記載の方法。
【請求項４】
前記ＣＤＬの前記遺伝子修飾は、
ａ）前記ＡＬＩＮＫ系を含むＤＮＡベクター；
ｂ）前記ＥＡＲＣ系を含むＤＮＡベクター；及び
ｃ）前記ＡＬＩＮＫ系及び前記ＥＡＲＣ系を含むＤＮＡベクター
の１つ又は複数による前記ＣＤＬの標的置換を実施するステップを含む、請求項１～３のいずれか一項に記載の方法。
【請求項５】
前記ＣＤＬの前記ＡＬＩＮＫ遺伝子修飾は、同型接合性、異型接合性、半接合性若しくは化合物異型接合性であり、及び／又は前記ＥＡＲＣ遺伝子修飾は、機能性ＣＤＬ修飾がＥＡＲＣ修飾対立遺伝子を通してのみ生成され得ることを確実にする、請求項１～４のいずれか一項に記載の方法。
【請求項６】

前記ＣＤＬは、表２に列挙される１つ又は複数の遺伝子座である、請求項１～５のいずれか一項に記載の方法。
【請求項７】
前記ＣＤＬは、遺伝子産物であって、その機能が細胞周期、ＤＮＡ複製、ＲＮＡ転写、タンパク質翻訳、及び代謝の１つ又は複数に関与している遺伝子産物をコードする、請求項６に記載の方法。
【請求項８】
前記ＣＤＬは、Ｃｄｋ１／ＣＤＫ１、Ｔｏｐ２Ａ／ＴＯＰ２Ａ、Ｃｅｎｐａ／ＣＥＮＰＡ、Ｂｉｒｃ５／ＢＩＲＣ５、及びＥｅｆ２／ＥＥＦ２の１つ又は複数であり、好ましくは、前記ＣＤＬはＣｄｋ１又はＣＤＫ１である、請求項７に記載の方法。
【請求項９】
前記ＡＬＩＮＫ系は、単純ヘルペスウイルス－チミジンキナーゼ／ガンシクロビル系、シトシンデアミナーゼ／５－フルオロシトシン系、カルボキシルエステラーゼ／イリノテカン系、又はｉＣａｓｐ９／ＡＰ１９０３系を含み、好ましくは、前記ＡＬＩＮＫ系は単純ヘルペスウイルス－チミジンキナーゼ／ガンシクロビル系である、請求項１～８のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１０】
前記ＥＡＲＣ系は、ｄｏｘ－架橋系、クメートスイッチ誘導系、エクジソン誘導系、電波誘導系、又はリガンド－可逆的二量体化系であり、好ましくは、前記ＥＡＲＣ系はｄｏｘ－架橋系である、請求項１～８のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１１】
前記動物細胞は、哺乳動物細胞又は鳥類細胞である、請求項１～１０のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１２】
前記哺乳動物細胞は、ヒト、マウス、ラット、ハムスター、モルモット、ネコ、イヌ、ウシ、ウマ、シカ、エルク、スイギュウ、雄牛、ラクダ、ラマ、ウサギ、ブタ、ヤギ、ヒツジ、又は非ヒト霊長類細胞であり、好ましくは、前記哺乳動物細胞はヒト細胞である、請求項１１に記載の方法。
【請求項１３】
前記動物細胞は、多能性幹細胞、複能性細胞、単能性前駆細胞、又は最終分化細胞である、請求項１～１２のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１４】
前記動物細胞は、多能性幹細胞、複能性細胞、単能性前駆細胞、又は最終分化細胞に由来する、請求項１～１２のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１５】
請求項１～１４のいずれか一項に記載の方法に従って動物細胞集団の増殖を制御する方法。
【請求項１６】
細胞増殖を制御するための少なくとも１つの機構を含むように遺伝子修飾された動物細胞であって、
－　１つ又は複数の細胞分裂遺伝子座（ＣＤＬ）の遺伝子修飾
を含み、前記ＣＤＬは、１つ又は複数の遺伝子座であって、その転写産物が分裂細胞によって発現される１つ又は複数の遺伝子座であり、前記遺伝子修飾は、
ａ）アブレーションリンク（ＡＬＩＮＫ）系であって、前記ＣＤＬをコードするＤＮＡ配列に転写によって連結される陰性選択マーカをコードするＤＮＡ配列を含む、アブレーションリンク（ＡＬＩＮＫ）系と；
ｂ）ＣＥＤＬの調節の外性活性化因子（ＥＡＲＣ）系であって、前記ＣＤＬに作動可能に連結される誘導性活性化因子に基づく遺伝子発現系を含む、ＣＥＤＬの調節の外性活性化因子（ＥＡＲＣ）系と
の１つ又は複数である、動物細胞。

【請求項１７】
前記ＣＤＬの前記遺伝子修飾は、
ａ）前記ＡＬＩＮＫ系を含むＤＮＡベクター；
ｂ）前記ＥＡＲＣ系を含むＤＮＡベクター；
ｃ）前記ＡＬＩＮＫ系及び前記ＥＡＲＣ系を含むＤＮＡベクター
の１つ又は複数による前記ＣＤＬの標的置換を実施するステップを含む、請求項１６に記載の遺伝子修飾動物細胞。
【請求項１８】
前記ＣＤＬの前記ＡＬＩＮＫ遺伝子修飾は、同型接合性、異型接合性、半接合性若しくは化合物異型接合性であり、及び／又は前記ＥＡＲＣ遺伝子修飾は、機能性ＣＤＬ修飾がＥＡＲＣ修飾対立遺伝子を通してのみ生成され得ることを確実にする、請求項１６又は１７に記載の遺伝子修飾動物細胞。
【請求項１９】
前記ＣＤＬは、表２に列挙される遺伝子座の１つ又は複数である、請求項１６～１８のいずれか一項に記載の遺伝子修飾動物細胞。
【請求項２０】
前記ＣＤＬは、遺伝子産物であって、その機能が細胞周期、ＤＮＡ複製、ＲＮＡ転写、タンパク質翻訳、及び代謝の１つ又は複数に関与している遺伝子産物をコードする、請求項１９に記載の遺伝子修飾動物細胞。
【請求項２１】
前記ＣＤＬは、Ｃｄｋ１／ＣＤＫ１、Ｔｏｐ２Ａ／ＴＯＰ２Ａ、Ｃｅｎｐａ／ＣＥＮＰＡ、Ｂｉｒｃ５／ＢＩＲＣ５、及びＥｅｆ２／ＥＥＦ２の１つ又は複数であり、好ましくは、前記ＣＤＬはＣｄｋ１又はＣＤＫ１である、請求項２０に記載の遺伝子修飾動物細胞。
【請求項２２】
前記ＡＬＩＮＫ系は、単純ヘルペスウイルスーチミジンキナーゼ／ガンシクロビル系、シトシンデアミナーゼ／５－フルオロシトシン系、カルボキシルエステラーゼ／イリノテカン系、又はｉＣａｓｐ９／ＡＰ１９０３系を含み、好ましくは、前記ＡＬＩＮＫ系は単純ヘルペスウイルスーチミジンキナーゼ／ガンシクロビル系である、請求項１６～２１のいずれか一項に記載の遺伝子修飾動物細胞。
【請求項２３】
前記ＥＡＲＣ系は、ｄｏｘ－架橋系、クメートスイッチ誘導系、エクジソン誘導系、電波誘導系、又はリガンド－可逆的二量体化系であり、好ましくは、前記ＥＡＲＣ系はｄｏｘ－架橋系である、請求項１６～２１のいずれか一項に記載の遺伝子修飾動物細胞。
【請求項２４】
前記動物細胞は、哺乳動物細胞又は鳥類細胞である、請求項１６～２３のいずれか一項に記載の遺伝子修飾動物細胞。
【請求項２５】
前記哺乳動物細胞は、ヒト、マウス、ラット、ハムスター、モルモット、ネコ、イヌ、ウシ、ウマ、シカ、エルク、スイギュウ、雄牛、ラクダ、ラマ、ウサギ、ブタ、ヤギ、ヒツジ、又は非ヒト霊長類細胞であり、好ましくは、前記哺乳動物細胞はヒト細胞である、請求項２４に記載の遺伝子修飾動物細胞。
【請求項２６】
前記動物細胞は、多能性幹細胞、複能性細胞、単能性前駆細胞、又は最終分化細胞である、請求項１６～２５のいずれか一項に記載の遺伝子修飾動物細胞。
【請求項２７】
前記動物細胞は、多能性幹細胞、複能性細胞、単能性前駆細胞、又は最終分化細胞に由来する、請求項１６～２５のいずれか一項に記載の遺伝子修飾動物細胞。
【請求項２８】
請求項１６～２７のいずれか一項に記載の細胞による遺伝子修飾動物細胞の集団。

【請求項２９】
細胞分裂遺伝子座（ＣＤＬ）の発現を修飾するためのＤＮＡベクターであって、前記ＣＤＬは、１つ又は複数の遺伝子座であって、その転写産物が分裂細胞によって発現される１つ又は複数の遺伝子座であり、前記ＤＮＡベクターは、
－　アブレーションリンク（ＡＬＩＮＫ）系
を含み、前記ＡＬＩＮＫ系は、前記ＣＤＬに転写によって連結される陰性選択マーカをコードするＤＮＡ配列を含み、
前記ＤＮＡベクターが１つ又は複数の宿主細胞に挿入される場合、前記ＤＮＡベクターを含む増殖宿主細胞は、前記ＤＮＡベクターを含む前記増殖宿主細胞が前記陰性選択マーカの誘導物質に曝露されると殺傷されることになる、ＤＮＡベクター。
【請求項３０】
細胞分裂必須遺伝子座（ＣＤＬ）の発現を修飾するためのＤＮＡベクターであって、前記ＣＤＬは、１つ又は複数の遺伝子座であって、その転写産物が分裂細胞によって発現される１つ又は複数の遺伝子座であり、前記ＤＮＡベクターは、
－　ＣＤＬの調節の外性活性化因子（ＥＡＲＣ）系
を含み、前記ＥＡＲＣ系は、前記ＣＤＬに作動可能に連結される誘導性活性化因子に基づく遺伝子発現系を含み、
前記ＤＮＡベクターが１つ又は複数の宿主細胞に挿入される場合、前記ＤＮＡベクターを含む増殖宿主細胞は、前記ＤＮＡベクターを含む前記増殖宿主細胞が前記誘導性活性化因子に基づく遺伝子発現系の誘導物質に曝露されなければ殺傷されることになる、ＤＮＡベクター。
【請求項３１】
細胞分裂必須遺伝子座（ＣＤＬ）の発現を修飾するためのＤＮＡベクターであって、前記ＣＤＬは、１つ又は複数の遺伝子座であって、その転写産物が分裂細胞によって発現される１つ又は複数の遺伝子座であり、前記ＤＮＡベクターは、
－　アブレーションリンク（ＡＬＩＮＫ）系であって、前記ＣＤＬに転写によって連結される陰性選択マーカをコードするＤＮＡ配列である、アブレーションリンク（ＡＬＩＮＫ）系と；
－　ＣＤＬの調節の外性活性化因子（ＥＡＲＣ）系であって、前記ＣＤＬに作動可能に連結される誘導性活性化因子に基づく遺伝子発現系を含む、ＣＤＬの調節の外性活性化因子（ＥＡＲＣ）系と
を含み、
前記ＤＮＡベクターが１つ又は複数の宿主細胞に挿入される場合、前記ＤＮＡベクターを含む増殖宿主細胞は、前記ＤＮＡベクターを含む前記増殖宿主細胞が前記陰性選択マーカの誘導物質に曝露され、且つ前記ＤＮＡベクターを含む前記増殖宿主細胞が前記誘導性活性化因子に基づく遺伝子発現系の誘導物質に曝露されなければ殺傷されることになる、ＤＮＡベクター。
【請求項３２】
前記ＣＤＬは、表２に列挙される遺伝子座の１つ又は複数である、請求項２９～３１のいずれか一項に記載のＤＮＡベクター。
【請求項３３】
前記ＣＤＬは、遺伝子産物であって、その機能が細胞周期、ＤＮＡ複製、ＲＮＡ転写、タンパク質翻訳、及び代謝の１つ又は複数に関与している遺伝子産物をコードする、請求項３２に記載のＤＮＡベクター。
【請求項３４】
前記ＣＤＬは、Ｃｄｋ１／ＣＤＫ１、Ｔｏｐ２Ａ／ＴＯＰ２Ａ、Ｃｅｎｐａ／ＣＥＮＰＡ、Ｂｉｒｃ５／ＢＩＲＣ５、及びＥｅｆ２／ＥＥＦ２の１つ又は複数であり、好ましくは、前記ＣＤＬはＣｄｋ１又はＣＤＫ１である、請求項３３に記載のＤＮＡベクター。
【請求項３５】
前記ＡＬＩＮＫ系は、単純ヘルペスウイルス－チミジンキナーゼ／ガンシクロビル系、

シトシンデアミナーゼ／５－フルオロシトシン系、カルボキシルエステラーゼ／イリノテカン系、又はｉＣａｓｐ９／ＡＰ１９０３系を含み、好ましくは、前記ＡＬＩＮＫ系は単純ヘルペスウイルスーチミジンキナーゼ／ガンシクロビル系である、請求項２９又は３１に記載のＤＮＡベクター。

【請求項３６】

前記ＥＡＲＣ系は、ｄｏｘ－架橋系、クメートスイッチ誘導系、エクジソン誘導系、電波誘導系、又はリガンド－可逆的二量体化系であり、好ましくは、前記ＥＡＲＣ系はｄｏｘ－架橋系である、請求項３０又は３１に記載のＤＮＡベクター。

【請求項３７】

１つ又は複数の細胞分裂必須遺伝子座（ＣＤＬ）を遺伝子修飾することにより、動物細胞の増殖を制御するためのキットであって、前記ＣＤＬは、１つ又は複数の遺伝子座であって、その転写産物が分裂細胞によって発現される１つ又は複数の遺伝子座であり、前記キットは、

－　アブレーションリンク（ＡＬＩＮＫ）系であって、前記ＣＤＬをコードするＤＮＡ配列に転写によって連結される陰性選択マーカをコードするＤＮＡ配列を含む、アブレーションリンク（ＡＬＩＮＫ）系を含むＤＮＡベクター；及び／又は

－　ＣＤＬの調節の外性活性化因子（ＥＡＲＣ）系であって、前記ＣＤＬに作動可能に連結される誘導性活性化因子に基づく遺伝子発現系を含む、ＣＤＬの調節の外性活性化因子（ＥＡＲＣ）系を含むＤＮＡベクター；及び／又は

－　ＡＬＩＮＫ系とＥＡＲＣ系とを含むＤＮＡベクターであって、前記ＡＬＩＮＫ系及び前記ＥＡＲＣ系は、それぞれ前記ＣＤＬに作動可能に連結されている、ＤＮＡベクター；並びに

－　前記ＤＮＡベクターの１つ又は複数を用いた動物細胞における前記ＣＤＬの標的置換の指示

を含むキット。

【請求項３８】

前記ＣＤＬは、表２に列挙される１つ又は複数の遺伝子座である、請求項３７に記載のキット。

【請求項３９】

前記ＣＤＬは、遺伝子産物であって、その機能が細胞周期、ＤＮＡ複製、ＲＮＡ転写、タンパク質翻訳、及び代謝の１つ又は複数に関与している遺伝子産物をコードする、請求項３８に記載のキット。

【請求項４０】

前記ＣＤＬは、Ｃｄｋ１／ＣＤＫ１、Ｔｏｐ２Ａ／ＴＯＰ２Ａ、Ｃｅｎｐａ／ＣＥＮＰＡ、Ｂｉｒｃ５／ＢＩＲＣ５、及びＥｅｆ２／ＥＥＦ２の１つ又は複数であり、好ましくは、前記ＣＤＬはＣｄｋ１又はＣＤＫ１である、請求項３９に記載のキット。

【請求項４１】

前記ＡＬＩＮＫ系は、単純ヘルペスウイルスーチミジンキナーゼ／ガンシクロビル系、シトシンデアミナーゼ／５－フルオロシトシン系、カルボキシルエステラーゼ／イリノテカン系、又はｉＣａｓｐ９／ＡＰ１９０３系を含み、好ましくは、前記ＡＬＩＮＫ系は単純ヘルペスウイルスーチミジンキナーゼ／ガンシクロビル系である、請求項３７～４０のいずれか一項に記載のキット。

【請求項４２】

前記ＥＡＲＣ系は、ｄｏｘ－架橋系、クメートスイッチ誘導系、エクジソン誘導系、電波誘導系、又はリガンド－可逆的二量体化系であり、好ましくは、前記ＥＡＲＣ系はｄｏｘ－架橋系である、請求項３７～４０のいずれか一項に記載のキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【０００１】

先行出願の相互参照

本願は、パリ条約に基づき、２０１５年３月９日に出願された米国仮特許出願第６２／１３０，２５８号明細書、及び２０１５年３月９日に出願された米国仮特許出願第６２／１３０，２７０号明細書に対する優先権を主張するものであり、これら文献の各々は、記載されているのと同様にその全体が参照により本明細書に組み込まれるものとする。

【０００２】

本記載は、概して、細胞及び分子生物学の分野に関する。より具体的には、本記載は、動物細胞及びそれに関連する遺伝子修飾細胞の分裂を制御するための分子ツール、方法及びキットに関する。

【背景技術】

【０００３】

ヒト多能性幹（ｈＰＳ）細胞は、正常な細胞発生、疾患発生を理解するためのツール、並びに例えば遺伝性疾患、変性疾患及び／又は様々な傷害などの現在治療不能の障害を治療するための細胞療法に用いるためのツールとして使用することができる。これらの細胞の多能性により、細胞は、幹細胞状態の自己再生の期間後にあらゆる細胞型に分裂することができる（Ｒｏｓｓａｎｔ ａｎｄ Ｎａｇｙ，１９９９）。ｈＰＳ細胞の至適基準は、１９９８年に報告されたヒト胚幹細胞（ｈＥＳ）である（Ｔｈｏｍｓｏｎ ｅｔ ａｌ．，１９９８）。２００６年及び２００７年に、皮膚線維芽細胞などの分裂した体細胞をＥＳ細胞様「人工多能性幹」（ｉＰＳ）細胞にリプログラミングする方法が報告され、多能性細胞のタイプを拡大した（Ｔａｋａｈａｓｈｉ ａｎｄ Ｙａｍａｎａｋａ，２００６；Ｔａｋａｈａｓｈｉ ｅｔ ａｌ．，２００７）。それ以来、ｉＰＳ細胞の作製方法並びに疾患及び異常な生理学的状態を治療するための細胞療法をはじめとする多方面でのその適用がさらに開発されている。

【０００４】

多能性細胞療法に関する１つの懸念は安全性である。例えば、細胞移植片を起源とする悪性腫瘍が懸念される。リプログラミング法は、ゲノム損傷及び異常な後成的変化を引き起こし得ることが報告されており（Ｈｕｓｓｅｉｎ ｅｔ ａｌ．，２０１１；Ｌａｕｒｅｎｔ ｅｔ ａｌ．，２０１１；Ｌｉｓｔｅｒ ｅｔ ａｌ．，２０１１）、ｉＰＳ細胞由来の細胞の悪性形質転換の危険性をもたらし得ることから、分化した細胞をｉＰＳ細胞にリプログラミングする方法も安全性に関連する。

【０００５】

ｉｎ ｖｉｔｒｏで増殖させた多能性細胞を伴う細胞療法に関する１つの課題は、細胞自体の多能性である。例えば、多能性細胞が分化した治療細胞中に残っていると、多能性細胞が奇形腫になる場合がある（Ｙｏｓｈｉｄａ ａｎｄ Ｙａｍａｎａｋａ，２０１０）。多能性細胞由来の製剤及び療法の安全性を高める試みとして、ｉｎ ｖｉｔｒｏ分化後に細胞培養物から多能性細胞を排除する取り組みがある。例えば、多能性特異的抗原を有する細胞を排除するために細胞傷害性抗体が使用され（Ｃｈｏｏ ｅｔ ａｌ．，２００８；Ｔａｎ ｅｔ ａｌ．，２００９）；多能性細胞表面マーカに基づいて細胞が選別され（Ｂｅｎ－Ｄａｖｉｄ ｅｔ ａｌ．，２０１３ａ；Ｆｏｎｇ ｅｔ ａｌ．，２００９；Ｔａｎｇ ｅｔ ａｌ．，２０１１）；腫瘍進行遺伝子が細胞内で遺伝子改変され（Ｂｌｕｍ ｅｔ ａｌ．，２００９；Ｍｅｎｅｎｄｅｚ ｅｔ ａｌ．，２０１２）；分化細胞の分離を補助するためのトランスジーンが細胞に導入され（Ｃｈｕｎｇ ｅｔ ａｌ．，２００６；Ｅｉｇｅｓ ｅｔ ａｌ．，２００１；Ｈｕｂｅｒ ｅｔ ａｌ．，２００７）；自殺遺伝子が細胞に導入されて、分化後の残留多能性幹細胞を排除するために使用され（Ｒｏｎｇ ｅｔ ａｌ．，２０１２；Ｓｃｈｕｌｄｉｎｅｒ ｅｔ ａｌ．，２００３）；並びに化学薬品を用いて不要な多能性細胞がアブレートされている（Ｂｅｎ－Ｄａｖｉｄ ｅｔ ａｌ．，２０１３ｂ；Ｄａｂｉｒ ｅｔ ａｌ．，２０１３；Ｔｏｈｙａｍａ ｅｔ ａｌ．，２０１３）。残留する多能性細胞を分化した培養物から排除しても、多能性細胞の分化誘導体は発癌性を有する可能性がある（Ｇｈｏｓｈ ｅｔ ａｌ．，２０１１）。関連する発癌性事象は、ｉ）細胞のｉｎ ｖｉｔｒｏ調製中に、又はｉｉ）宿主に細胞を移植した後に治療用細胞内で起こり得る。

【０００６】
不要な細胞増殖及び／若しくは分化を排除又は予防する最新の戦略は、単純ヘルペスウイルスーチミジンキナーゼ（ＨＳＶ－ＴＫ）／ガンシクロビル（ＧＣＶ）陰性選択可能系に基づくものであり、これは、悪性腫瘍が発生した場合に移植片を完全に排除する（Ｓｃｈｕｌｄｉｎｅｒ ｅｔ ａｌ．，２００３）か、又は意図する分化誘導体に「混入した」多能性細胞のみを排除する（Ｂｅｎ－Ｄａｖｉｄ ａｎｄ Ｂｅｎｖｅｎｉｓｔｙ，２０１４；Ｌｉｍ ｅｔ ａｌ．，２０１３）ために用いることができる。ＧＣＶ誘導細胞殺傷及びアポトーシスの機構は十分に理解されている。これは、ＤＮＡ二本鎖切断の複製依存的形成を生じ（Ｈａｌｌｏｒａｎ ａｎｄ Ｆｅｎｔｏｎ，１９９８）、これによってアポトーシスを招く（Ｔｏｍｉｃｉｃ ｅｔ ａｌ．，２００２）。しかしながら、多くのＨＳＶ－ＴＫ／ＧＣＶ系は、少なくともＨＳＶ－ＴＫのランダム組込み又は一過性発現に依存するため、これらの発現は確実ではない。例えば、カスパーゼ（Ｃａｓｐａｓｅ）９（Ｄｉ Ｓｔａｓｉ ｅｔ ａｌ．，２０１１）などの様々な殺傷機構と共に陰性選択マーカを含む戦略が試験されてきたが、陰性選択マーカの確実な発現は証明されていない。細胞療法は、数百万又は数十億の細胞を必要とし、これは、不要な細胞増殖及び／又は分化によって生じるあらゆる問題を増大し得る。

【発明の概要】
【発明が解決しようとする課題】
【０００７】
本開示の目的は、前述の欠陥の１つ又は複数を軽減し、及び／又は取り除くことである。

【課題を解決するための手段】
【０００８】
一態様では、動物細胞の増殖を制御する方法が提供される。この方法は、動物細胞を用意するステップ；動物細胞において、細胞分裂遺伝子座（ＣＤＬ）を遺伝子修飾するステップであって、ＣＤＬは、１つ又は複数の遺伝子座であって、その転写産物が分裂細胞によって発現される１つ又は複数の遺伝子座であり、ＣＤＬの遺伝子修飾は、ａ）アブレーションリンク（ＡＬＩＮＫ）系であって、ＣＤＬをコードするＤＮＡ配列に転写によって連結される陰性選択マーカをコードするＤＮＡ配列を含む、アブレーションリンク（ＡＬＩＮＫ）系と；ｂ）ＣＤＬの調節の誘導性外性活性化因子（ＥＡＲＣ）系であって、ＣＤＬに作動可能に連結される誘導性活性化因子に基づく遺伝子発現系を含む、ＣＤＬの調節の誘導性外性活性化因子（ＥＡＲＣ）系との１つ又は複数を含む、ステップ；陰性選択マーカの誘導物質を用いて、ＡＬＩＮＫ系を含む遺伝子修飾動物細胞の増殖を制御するステップ；及び／又は誘導性活性化因子に基づく遺伝子発現系の誘導物質を用いて、ＥＡＲＣ系を含む遺伝子修飾動物細胞の増殖を制御するステップを含む。
【０００９】
本明細書に記載する動物細胞の増殖を制御する方法の一実施形態では、ＡＬＩＮＫ修飾動物細胞の制御は、陰性選択マーカの誘導物質の非存在下で、ＡＬＩＮＫ系を含む遺伝子修飾動物細胞を維持することにより、ＡＬＩＮＫ系を含む遺伝子修飾動物細胞の増殖を可能にするステップ；及びＡＬＩＮＫ系を含む動物細胞を陰性選択マーカの誘導物質に曝露することにより、ＡＬＩＮＫ系を含む遺伝子修飾動物細胞の増殖をアブレート又は阻害するステップの１つ又は複数を含む。
【００１０】
本明細書に記載する動物細胞の増殖を制御する方法の一実施形態では、ＥＡＲＣ修飾動物細胞の制御は、ＥＡＲＣ系を含む遺伝子修飾動物細胞を誘導性活性化因子に基づく遺伝子発現系の誘導物質に曝露することにより、ＥＡＲＣ系を含む遺伝子修飾動物細胞の増殖を可能にするステップ；及び誘導性活性化因子に基づく遺伝子発現系の誘導物質の非存在下で、ＥＡＲＣ系を含む動物細胞を維持することにより、ＥＡＲＣ系を含む遺伝子修飾動物細胞の増殖を阻止又は阻害するステップの１つ又は複数を含む。
【００１１】

本明細書に記載する動物細胞の増殖を制御する方法の様々な実施形態では、ＣＤＬの遺伝子修飾は、ａ）ＡＬＩＮＫ系を含むＤＮＡベクター；ｂ）ＥＡＲＣ系を含むＤＮＡベクター；及びｃ）ＡＬＩＮＫ系及びＥＡＲＣ系を含むＤＮＡベクターの１つ又は複数によるＣＤＬの標的置換を実施するステップを含む。

【００１２】

本明細書に記載する動物細胞の増殖を制御する方法の様々な実施形態では、ＣＤＬのＡＬＩＮＫ遺伝子修飾は、同型接合性、異型接合性、半接合性若しくは化合物異型接合性であり、及び／又はＥＡＲＣ遺伝子修飾は、機能性ＣＤＬ修飾がＥＡＲＣ修飾対立遺伝子を通してのみ生成され得ることを確実にする。

【００１３】

本明細書に記載する動物細胞の増殖を制御する方法の様々な実施形態では、ＣＤＬは、表２に列挙される１つ又は複数の遺伝子座である。様々な実施形態では、ＣＤＬは、遺伝子産物であって、その機能が細胞周期、ＤＮＡ複製、ＲＮＡ転写、タンパク質翻訳、及び代謝の１つ又は複数に関与している遺伝子産物をコードする。様々な実施形態では、ＣＤＬは、Ｃｄｋ１／ＣＤＫ１、Ｔｏｐ２Ａ／ＴＯＰ２Ａ、Ｃｅｎｐａ／ＣＥＮＰＡ、Ｂｉｒｃ５／ＢＩＲＣ５、及びＥｅｆ２／ＥＥＦ２の１つ又は複数であり、好ましくは、ＣＤＬはＣｄｋ１又はＣＤＫ１である。

【００１４】

本明細書に記載する動物細胞の増殖を制御する方法の様々な実施形態では、ＡＬＩＮＫ系は、単純ヘルペスウイルス－チミジンキナーゼ／ガンシクロビル系、シトシンデアミナーゼ／５－フルオロシトシン系、カルボキシルエステラーゼ／イリノテカン系、又はｉＣａｓｐ９／ＡＰ１９０３系を含み、好ましくは、ＡＬＩＮＫ系は単純ヘルペスウイルス－チミジンキナーゼ／ガンシクロビル系である。

【００１５】

本明細書に記載する動物細胞の増殖を制御する方法の様々な実施形態では、ＥＡＲＣ系は、ｄｏｘ－架橋（ｄｏｘ－ｂｒｉｄｇｅ）系、クメート（ｃｕｍａｔｅ）スイッチ誘導系、エクジソン誘導系、電波誘導系、又はリガンド－可逆的二量体化系であり、好ましくは、ＥＡＲＣ系はｄｏｘ－架橋系である。

【００１６】

本明細書に記載する動物細胞の増殖を制御する方法の様々な実施形態では、動物細胞は、哺乳動物細胞又は鳥類細胞である。様々な実施形態では、哺乳動物細胞は、ヒト、マウス、ラット、ハムスター、モルモット、ネコ、イヌ、ウシ、ウマ、シカ、エルク、スイギュウ、雄牛、ラクダ、ラマ、ウサギ、ブタ、ヤギ、ヒツジ、又は非ヒト霊長類細胞であり、好ましくは、哺乳動物細胞はヒト細胞である。

【００１７】

本明細書に記載する動物細胞の増殖を制御する方法の様々な実施形態では、動物細胞は、多能性幹細胞、複能性細胞、単能性前駆細胞、又は最終分化細胞である。

【００１８】

本明細書に記載する動物細胞の増殖を制御する方法の様々な実施形態では、動物細胞は、多能性幹細胞、複能性細胞、単能性前駆細胞、又は最終分化細胞に由来する。

【００１９】

一態様では、細胞増殖を制御するための少なくとも１つの機構を含むように遺伝子修飾された動物細胞が提供される。遺伝子修飾された動物細胞は、１つ又は複数の細胞分裂遺伝子座（ＣＤＬ）の遺伝子修飾を含み、ＣＤＬは、１つ又は複数の遺伝子座であって、その転写産物が分裂細胞によって発現される１つ又は複数の遺伝子座である。遺伝子修飾は、ａ）アブレーションリンク（ＡＬＩＮＫ）系であって、ＣＤＬをコードするＤＮＡ配列に転写によって連結される陰性選択マーカをコードするＤＮＡ配列を含む、アブレーションリンク（ＡＬＩＮＫ）系と；ｂ）ＣＥＤＬの調節の外性活性化因子（ＥＡＲＣ）系であって、ＣＤＬに作動可能に連結される誘導性活性化因子に基づく遺伝子発現系を含む、ＣＥＤＬの調節の外性活性化因子（ＥＡＲＣ）系との１つ又は複数である。

【００２０】
本明細書に記載する、細胞増殖を制御するための少なくとも１つの機構を含むように遺伝子修飾された動物細胞の一実施形態では、ＣＤＬの遺伝子修飾は、ａ）ＡＬＩＮＫ系を含むＤＮＡベクター；ｂ）ＥＡＲＣ系を含むＤＮＡベクター；及びｃ）ＡＬＩＮＫ系及びＥＡＲＣ系を含むＤＮＡベクターの１つ又は複数によるＣＤＬの標的置換を実施するステップを含む。
【００２１】
本明細書に記載する、細胞増殖を制御するための少なくとも１つの機構を含むように遺伝子修飾された動物細胞の様々な実施形態では、ＣＤＬのＡＬＩＮＫ遺伝子修飾は、同型接合性、異型接合性、半接合性若しくは化合物異型接合性であり、及び／又はＥＡＲＣ遺伝子修飾は、機能性ＣＤＬ修飾がＥＡＲＣ修飾対立遺伝子を通してのみ生成され得ることを確実にする。
【００２２】
本明細書に記載する、細胞増殖を制御するための少なくとも１つの機構を含むように遺伝子修飾された動物細胞の様々な実施形態では、ＣＤＬは、表２に列挙される１つ又は複数の遺伝子座である。様々な実施形態では、ＣＤＬは、遺伝子産物であって、その機能が細胞周期、ＤＮＡ複製、ＲＮＡ転写、タンパク質翻訳、及び代謝の１つ又は複数に関与している遺伝子産物をコードする。様々な実施形態では、ＣＤＬは、Ｃｄｋ１／ＣＤＫ１、Ｔｏｐ２Ａ／ＴＯＰ２Ａ、Ｃｅｎｐａ／ＣＥＮＰＡ、Ｂｉｒｃ５／ＢＩＲＣ５、及びＥｅｆ２／ＥＥＦ２の１つ又は複数であり、好ましくは、ＣＤＬはＣｄｋ１又はＣＤＫ１である。
【００２３】
本明細書に記載する、細胞増殖を制御するための少なくとも１つの機構を含むように遺伝子修飾された動物細胞の様々な実施形態では、ＡＬＩＮＫ系は、単純ヘルペスウイルス－チミジンキナーゼ／ガンシクロビル系、シトシンデアミナーゼ／５－フルオロシトシン系、カルボキシルエステラーゼ／イリノテカン系、又はｉＣａｓｐ９／ＡＰ１９０３系を含み、好ましくは、ＡＬＩＮＫ系は単純ヘルペスウイルス－チミジンキナーゼ／ガンシクロビル系である。
【００２４】
本明細書に記載する、細胞増殖を制御するための少なくとも１つの機構を含むように遺伝子修飾された動物細胞の様々な実施形態では、ＥＡＲＣ系は、ｄｏｘ－架橋系、クメートスイッチ誘導系、エクジソン誘導系、電波誘導系、又はリガンド－可逆的二量体化系であり、好ましくは、ＥＡＲＣ系はｄｏｘ－架橋系である。
【００２５】
本明細書に記載する、細胞増殖を制御するための少なくとも１つの機構を含むように遺伝子修飾された動物細胞の様々な実施形態では、動物細胞は、哺乳動物細胞又は鳥類細胞である。様々な実施形態では、哺乳動物細胞は、ヒト、マウス、ラット、ハムスター、モルモット、ネコ、イヌ、ウシ、ウマ、シカ、エルク、スイギュウ、雄牛、ラクダ、ラマ、ウサギ、ブタ、ヤギ、ヒツジ、又は非ヒト霊長類細胞であり、好ましくは、哺乳動物細胞はヒト細胞である。
【００２６】
本明細書に記載する、細胞増殖を制御するための少なくとも１つの機構を含むように遺伝子修飾された動物細胞の様々な実施形態では、動物細胞は、多能性幹細胞、複能性細胞、単能性前駆細胞、又は最終分化細胞である。
【００２７】
本明細書に記載する、細胞増殖を制御するための少なくとも１つの機構を含むように遺伝子修飾された動物細胞の様々な実施形態では、動物細胞は、多能性幹細胞、複能性細胞、単能性前駆細胞、又は最終分化細胞に由来する。
【００２８】
一態様では、細胞分裂遺伝子座（ＣＤＬ）の発現を修飾するためのＤＮＡベクターが提

供され、ＣＤＬは、１つ又は複数の遺伝子座であって、その転写産物が分裂細胞によって発現される１つ又は複数の遺伝子座である。ＤＮＡベクターは、アブレーションリンク（ＡＬＩＮＫ）系を含み、ＡＬＩＮＫ系は、ＣＤＬに転写によって連結される陰性選択マーカをコードするＤＮＡ配列を含み、このＤＮＡベクターが１つ又は複数の宿主細胞に挿入される場合、ＤＮＡベクターを含む増殖宿主細胞は、ＤＮＡベクターを含む増殖宿主細胞が陰性選択マーカの誘導物質に曝露されると殺傷されることになる。

【００２９】

一態様では、細胞分裂必須遺伝子座（ＣＤＬ）の発現を修飾するためのＤＮＡベクターが提供され、ＣＤＬは、１つ又は複数の遺伝子座であって、その転写産物が分裂細胞によって発現される１つ又は複数の遺伝子座である。ＤＮＡベクターは、ＣＤＬの調節の外性活性化因子（ＥＡＲＣ）系を含み、ＥＡＲＣ系は、ＣＤＬに作動可能に連結される誘導性活性化因子に基づく遺伝子発現系を含み、このＤＮＡベクターが１つ又は複数の宿主細胞に挿入される場合、ＤＮＡベクターを含む増殖宿主細胞は、ＤＮＡベクターを含む増殖宿主細胞が誘導性活性化因子に基づく遺伝子発現系の誘導物質に曝露されなければ殺傷されることになる。

【００３０】

一態様では、細胞分裂必須遺伝子座（ＣＤＬ）の発現を修飾するためのＤＮＡベクターが提供され、ＣＤＬは、１つ又は複数の遺伝子座であって、その転写産物が分裂細胞によって発現される１つ又は複数の遺伝子座である。ＤＮＡベクターは、アブレーションリンク（ＡＬＩＮＫ）系であって、ＣＤＬに転写によって連結される陰性選択マーカをコードするＤＮＡ配列である、アブレーションリンク（ＡＬＩＮＫ）系と；ＣＤＬの調節の外性活性化因子（ＥＡＲＣ）系であって、ＣＤＬに作動可能に連結される誘導性活性化因子に基づく遺伝子発現系を含む、ＣＤＬの調節の外性活性化因子（ＥＡＲＣ）系とを含み、このＤＮＡベクターが１つ又は複数の宿主細胞に挿入される場合、ＤＮＡベクターを含む増殖宿主細胞は、ＤＮＡベクターを含む増殖宿主細胞が陰性選択マーカの誘導物質に曝露され、且つＤＮＡベクターを含む増殖宿主細胞が誘導性活性化因子に基づく遺伝子発現系の誘導物質に曝露されなければ殺傷されることになる。

【００３１】

本明細書に記載するＤＮＡベクターの様々な実施形態では、ＣＤＬは、表２に列挙される１つ又は複数の遺伝子座である。様々な実施形態では、ＣＤＬは、遺伝子産物であって、その機能が細胞周期、ＤＮＡ複製、ＲＮＡ転写、タンパク質翻訳、及び代謝の１つ又は複数に関与している遺伝子産物をコードする。様々な実施形態では、ＣＤＬは、Ｃｄｋ１／ＣＤＫ１、Ｔｏｐ２Ａ／ＴＯＰ２Ａ、Ｃｅｎｐａ／ＣＥＮＰＡ、Ｂｉｒｃ５／ＢＩＲＣ５、及びＥｆ２／ＥＥＦ２の１つ又は複数であり、好ましくは、ＣＤＬはＣｄｋ１又はＣＤＫ１である。

【００３２】

本明細書に記載するＤＮＡベクターの様々な実施形態では、ＡＬＩＮＫ系は、単純ヘルペスウイルス－チミジンキナーゼ／ガンシクロビル系、シトシンデアミナーゼ／５－フルオロシトシン系、カルボキシルエステラーゼ／イリノテカン系、又はｉＣａｓｐ９／ＡＰ１９０３系を含み、好ましくは、ＡＬＩＮＫ系は単純ヘルペスウイルス－チミジンキナーゼ／ガンシクロビル系である。

【００３３】

本明細書に記載するＤＮＡベクターの様々な実施形態では、ＥＡＲＣ系は、ｄｏｘ－架橋系、クメートスイッチ誘導系、エクジソン誘導系、電波誘導系、又はリガンド－可逆的二量体化系であり、好ましくは、ＥＡＲＣ系はｄｏｘ－架橋系である。

【００３４】

一態様では、１つ又は複数の細胞分裂必須遺伝子座（ＣＤＬ）を遺伝子修飾することにより、動物細胞の増殖を制御するためのキットが提供され、ＣＤＬは、１つ又は複数の遺伝子座であって、その転写産物が分裂細胞によって発現される１つ又は複数の遺伝子座である。キットは、アブレーションリンク（ＡＬＩＮＫ）系であって、ＣＤＬをコードする

ＤＮＡ配列に転写によって連結される陰性選択マーカをコードするＤＮＡ配列を含む、アブレーションリンク（ＡＬＩＮＫ）系を含むＤＮＡベクター；及び／又はＣＤＬの調節の外性活性化因子（ＥＡＲＣ）系であって、ＣＤＬに作動可能に連結される誘導性活性化因子に基づく遺伝子発現系を含む、ＣＤＬの調節の外性活性化因子（ＥＡＲＣ）系を含むＤＮＡベクター；及び／又はＡＬＩＮＫ系とＥＡＲＣ系とを含むＤＮＡベクターであって、ＡＬＩＮＫ系及びＥＡＲＣ系は、それぞれＣＤＬに作動可能に連結されている、ＤＮＡベクター；並びにこれらのＤＮＡベクターの１つ又は複数を用いた動物細胞におけるＣＤＬの標的置換の指示を含む。

【００３５】

本明細書に記載するキットの一実施形態では、ＣＤＬは、表２に列挙される１つ又は複数の遺伝子座である。様々な実施形態では、ＣＤＬは、遺伝子産物であって、その機能が細胞周期、ＤＮＡ複製、ＲＮＡ転写、タンパク質翻訳、及び代謝の１つ又は複数に関与している遺伝子産物をコードする。様々な実施形態では、ＣＤＬは、Ｃｄｋ１／ＣＤＫ１、Ｔｏｐ２Ａ／ＴＯＰ２Ａ、Ｃｅｎｐａ／ＣＥＮＰＡ、Ｂｉｒｃ５／ＢＩＲＣ５、及びＥｅｆ２／ＥＥＦ２の１つ又は複数であり、好ましくは、ＣＤＬはＣｄｋ１又はＣＤＫ１である。

【００３６】

本明細書に記載するキットの様々な実施形態では、ＡＬＩＮＫ系は、単純ヘルペスウイルスーチミジンキナーゼ／ガンシクロビル系、シトシンデアミナーゼ／５－フルオロシトシン系、カルボキシルエステラーゼ／イリノテカン系、又はｉＣａｓｐ９／ＡＰ１９０３系を含み、好ましくは、ＡＬＩＮＫ系は単純ヘルペスウイルスーチミジンキナーゼ／ガンシクロビル系である。

【００３７】

本明細書に記載するキットの様々な実施形態では、ＥＡＲＣ系は、ｄｏｘ－架橋系、クメートスイッチ誘導系、エクジソン誘導系、電波誘導系、又はリガンド－可逆的二量体化系であり、好ましくは、ＥＡＲＣ系はｄｏｘ－架橋系である。

【００３８】

本特許又は出願ファイルは、少なくとも１枚のカラー図面を含む。カラー図面を含む本特許又は特許出願公開のコピーは、要請に応じて且つ必要費用の支払い時に特許庁により提供される。

【００３９】

本開示の上記及びその他の特徴は、添付の図面を参照する以下の詳細な説明においてさらに明らかになるであろう。

【図面の簡単な説明】

【００４０】

【図１－１】本明細書において提供する方法及びツールで使用するために考慮される、誘導された陰性増殖エフェクター（ｉＮＥＰ）の概念及びｉＮＥＰ系の例を説明する概略図を示す。図１Ａは、様々なｉＮＥＰ修飾ＣＤＬの例を表す概略図を示し、ＣＤＬ１での同型接合性修飾、ＣＤＬ１及びＣＤＬ２への同型接合性挿入、共に細胞分裂に不可欠な２つの個別の遺伝子座を含むＣＤＬ（ＣＤＬ３）が含まれる。

【図１－２】図１Ｂは、アベレーションリンク（ＡＬＩＮＫ）とＣＤＬの調節の外性活性化因子（ＥＡＲＣ）とを様々な立体配置で含むｉＮＥＰの例を表す概略図を示す。

【図１－３】図１Ｃは、二量体化物質調節発現誘導と組み合わせた転写活性化因子様エフェクター（ＴＡＬＥ）技術を示す。図１Ｄは、逆クメートトランス活性化因子（ｒｃＴＡ）系を例示する概略図を示す。

【図１－４】図１Ｅは、レチノイドＸ受容体（ＲＸＲ）と、Ｖｐ１６の活性化ドメインに融合したエクジソン受容体（ＥｃＲ）（ＶｐＥｃＲ）のＮ－末端切断とを例示する概略図を示す。

【図１－５】図１Ｆは、フェリチンと一緒に、本明細書に記載するｉＮＥＰ系の一例である一過性受容体ポテンシャルバニロイド１（ＴＲＰＶ１）を例示する概略図を示す。

【図１－６】図１Ｇは、ＩＲＥＳ及び二量体化剤をｉＮＥＰとしてどのように用いることができるかを説明する概略図を示す。
【図２】分裂修飾ＣＤＫ１発現細胞の排除を可能にする、ＡＬＩＮＫを生成するためのＣｄｋ１遺伝子座の３’ＵＴＲへのＨＳＶ－ＴＫのターゲティングを説明する概略図を示す。図２Ａは、マウスＣｄｋ１遺伝子座の概略図を示す。図２Ｂは、マウス標的ベクターＩの概略図を示す。図２Ｃは、Ｃｄｋ１^{ＴＣ}対立遺伝子の概略図を示す。図２Ｄは、マウス標的ベクターＩＩの概略図を示す。図２Ｅは、Ｃｄｋ１^{ＴＣｌｏｘ}対立遺伝子の概略図を示す。図２Ｆは、ＣＲＩＳＰＲガイドＲＮＡの位置を示し；黄色のボックス内の配列は、Ｃｄｋ１の第８エキソンである。
【図３－１】ＡＬＩＮＫ例の生成、すなわちマウスＥＳ細胞株にＡＬＩＮＫを生成するためのＣＤＫ１遺伝子座の３’ＵＴＲへのＨＳＶ－ＴＫ－ｍＣｈｅｒｒｙを示す。図３Ａは、マウスＣ２　ＥＳ細胞にＡＬＩＮＫを生成するステップ全体を示す。図３Ｂは、Ｃｄｋ１（ＴＫ／＋）、Ｃｄｋ１（ＴＫ、ｌｏｘＰ－ＴＫ）、及びＣｄｋ１（ＴＫ／ＴＫ）の正しい遺伝子型決定のサザンブロッティング結果を示す。図３Ｃは、マウス細胞でのＡＬＩＮＫ遺伝子型決定に用いられるプライマーの位置を示す。
【図３－２】図３Ｄは、ＣＤＫ１遺伝子座の３’ＵＴＲへのターゲティングベクターＩのターゲティングを説明するＰＣＲ結果を含む。図３Ｅは、ＨＳＶ－ＴＫ－ｍＣｈｅｒｒｙの発現を活性化するための、ターゲティングベクターＩで既に正しくターゲティングされたマウスＥＳ細胞での選択マーカの切り出しイベントを説明するＰＣＲ結果を示す。図３Ｆは、Ｃｄｋ１（ＴＫ／＋）細胞へのターゲティングベクターＩＩのターゲティングを説明するＰＣＲ結果を示す。図３Ｇは、ＨＳＶ－ＴＫ－ｍＣｈｅｒｒｙの第２対立遺伝子発現を活性化し、これによりＣｄｋ１（ＴＫ／ＴＫ）を生成するための、Ｃｄｋ１（ＴＫ、ｌｏｘＰ－ＴＫ）での選択マーカの切り出しイベントを説明するＰＣＲ結果を示す。
【図４－１】ヒトＥＳ細胞株におけるＡＬＩＮＫ修飾の生成、すなわちＣＤＫ１遺伝子座の３’ＵＴＲへのＨＳＶ－ＴＫ－ｍＣｈｅｒｒｙを示す。図４Ａは、ヒトＣＡ１　ＥＳ細胞にＡＬＩＮＫを生成するステップ全体を示す。図４Ｂは、ヒトＣＡ１細胞でのＡＬＩＮＫ遺伝子型決定に用いられるプライマーの位置を示す。図４Ｃは、ＣＤＫ１遺伝子座の３’ＵＴＲへのターゲティングベクターＩのターゲティングを説明するＰＣＲ結果を示す。
【図４－２】図４Ｄは、ＨＳＶ－ＴＫ－ｍＣｈｅｒｒｙの発現を活性化するために、ヒトＣｄｋ１（ＰＢ－ＴＫ／＋）ＥＳ細胞株での選択マーカの切り出しイベントを示すフローサイトメトリーを示し；Ｙ軸は、ｍＣｈｅｒｒｙ発現レベルを示し、Ｘ軸は、自家蛍光チャネルである。図４Ｅは、Ｃｄｋ１（ＴＫ／＋）細胞へのターゲティングベクターＩＩ（ｐｕｒｏバージョン）のターゲティングを説明するＰＣＲ結果を示し；上のパネルは、５’相同性アームにフランキングするプライマーを使用するＰＣＲであり；下のパネルは、５’及び３’相同性アーム内のプライマーを用いるＰＣＲであり、従って、０．７ｋｂバンドの非存在及び２．８ｋｂバンドの存在は、クローンがＡＬＩＮＫにおいて同型接合性であることを意味し、０．７ｋｂバンドの存在は、クローンがＡＬＩＮＫにおいて異型接合性であるか、又は集団がクローンではないことを意味する。図４Ｆは、ＨＳＶ－ＴＫ－ｍＣｈｅｒｒｙの第２対立遺伝子発現を活性化するための、Ｃｄｋ１（ＴＫ、ｌｏｘＰ－ＴＫ）での選択マーカの切り出しイベントを説明するフローサイトメトリー分析を示し；Ｙ軸は、ｍＣｈｅｒｒｙ発現レベルを示し、Ｘ軸は、自家蛍光チャネルである。
【図４－３】図４Ｇは、ヒトＨ１　ＥＳ細胞にＡＬＩＮＫを生成するステップ全体を示す。図４Ｈは、ヒトＨ１細胞でのＡＬＩＮＫ遺伝子型決定に用いられるプライマーの位置を示す。図４Ｉは、ＣＤＫ１遺伝子座の３’ＵＴＲへのターゲティングベクターＩＩのターゲティングを説明するＰＣＲ結果を示す。
【図４－４】図４Ｊは、ＨＳＶ－ＴＫ－ｍＣｈｅｒｒｙの発現を活性化するための、ヒトＨ１　Ｃｄｋ１（ｌｏｘＰ－ＴＫ／＋）での選択マーカの切り出しイベントを説明するＰＣＲ結果を示し；Ｙ軸は、ｍＣｈｅｒｒｙ発現レベルを示し、Ｘ軸は、自家蛍光チャネルである。図４Ｋは、Ｃｄｋ１（ＴＫ／＋）細胞へのターゲティングベクターＩＩＩ（ＧＦＰバージョン）のターゲティングの蛍光活性化細胞選別（ＦＡＣＳ）を示す。ＦＡＣＳ選

別後、希薄な平板培養から採取したクローンをｍＣｈｅｒｒｙ対立遺伝子特異的プライマー、ｅＧＦＰ対立遺伝子特異的プライマー並びに５’及び３’相同性アーム中のプライマーで遺伝子型決定し；オレンジ色の星印で示すクローンは、ｍＣｈｅｒｒｙの１対立遺伝子及びｅＧＦＰの１対立遺伝子を有する同型接合性ＡＬＩＮＫであり；緑色の星印で示す１つのクローンは、ｅＧＦＰの２つの対立遺伝子を有する同型接合性ＡＬＩＮＫである。

【図５】奇形腫組織学（奇形腫の内胚葉、中胚葉及び外胚葉部分をそれぞれ左から右に示す）を示す。図５Ａは、マウスＥＳ　Ｃｄｋ１$^{+/+,\ alink/alink}$細胞由来の奇形腫の顕微鏡写真を示す。図５Ｂは、マウスＥＳ　Ｃｄｋ１$^{earc/earc,\ alink/alink}$細胞由来の奇形腫の顕微鏡写真を示す。図５Ｃは、ヒトＥＳ　Ｃｄｋ１$^{+/+,\ alink/alink}$細胞由来の奇形腫の顕微鏡写真を示す。

【図６】ＣＤＫ１遺伝子座の３’ＵＴＲへのＨＳＶ－ＴＫ－ｍＣｈｅｒｒｙノックインを含むマウスＥＳ細胞のｉｎ　ｖｉｔｒｏ機能性分析を示す。図６Ａは、細胞を様々な濃度のＧＣＶに３日間曝露した後のＴＫ．００７により達成される傷害効率を示す。コロニーサイズ及び数は、ＧＣＶ濃度に直接比例する。２番目に低い濃度の０．０１μＭは、コロニー数に影響しなかったが、コロニーのサイズ縮小により証明されるように、細胞増殖を減速した（ｎ＝５）。図６Ｂは、ＰＢ媒介によるｎｅｏ－カセットの除去前（Ｃｄｋ１・ＨＳＶ－ＴＫ・ＮｅｏＩＮ）及び除去後（Ｃｄｋ１・ＨＳＶ－ＴＫ）のｍＣｈｅｒｒｙの発現を示す。

【図７－１】ＡＬＩＮＫ修飾細胞を用いた細胞実験の結果を示す。図７Ａは、ＡＬＩＮＫ修飾マウスＣ２細胞を含む皮下奇形腫のＧＣＶ処理の結果をグラフで示す。図７Ｂは、ＡＬＩＮＫ修飾Ｈ１　ＥＳ細胞を含む皮下奇形腫のＧＣＶ処理の結果をグラフで示す。図７Ｃは、ＡＬＩＮＫ修飾細胞を含む乳腺腫瘍のＧＣＶ処理の結果をグラフで示す。

【図７－２】図７Ｄは、神経アッセイの実験設計を概略的に示す。図７Ｅは、Ｃｄｋ１$^{+/+,\ +/alink}$ヒトＣＡ１　ＥＳ細胞由来の神経上皮前駆（ＮＥＰ）細胞の顕微鏡画像である。図７Ｆは、分裂ＡＬＩＮＫ修飾ＮＥＰのＧＣＶ誘導による傷害と、非分裂ニューロンの非傷害とを示す顕微鏡画像を示す。

【図８】異型接合性（青色の線）及び同型接合性（赤色の線）ＡＬＩＮＫ細胞から集団を拡大する場合に、ＨＳＶ－ＴＫ遺伝子に自発的突然変異を含む細胞の予想数を示すグラフを示す。

【図９Ａ－９Ｂ】ＥＡＲＣを生成するための、マウスＣｄｋ１遺伝子座の５’ＵＴＲへのｄｏｘ－架橋のターゲティング、及びＣｄｋ１への挿入後の架橋の挙動を示す。図９Ａは、マウスＣｄｋ１遺伝子座の構造、標的ベクター、及び相同組換えイベントの遺伝子型決定に使用するプライマーの位置を示す概略図である。図９Ｂは、Ｃｄｋ１　５’ＵＴＲにｄｏｘ－架橋を組み込んだものを同定するためのプロマイシン耐性コロニーの遺伝子型決定を示すＰＣＲ結果を示す。

【図１０】同型接合性ｄｏｘ－架橋ノックインを有するＥＳ細胞がドキシサイクリン（又はドキシサイクリンオーバーラップ機能を有する薬剤）の存在下でのみ生存及び分裂することを説明するフローチャートを示す。

【図１１】同型接合性ｄｏｘ－架橋ノックインＥＳ細胞がドキシサイクリン濃度依存性生存及び増殖を示すことを説明する典型的顕微鏡写真を示す。

【図１２】Ｃｒｅレコンビナーゼ媒介の切り出しによるｄｏｘ－架橋除去を示し、これは、ＥＳ細胞のドキシサイクリン依存性生存をレスキューする。

【図１３】ｄｏｘ－架橋ＥＳ細胞の増殖に対するドキシサイクリンの使用中止の作用を示す。図１３Ａは、ドキシサイクリンの存在下で、細胞が指数関数的に増殖する（丸の付いた赤色の線）ことを示すグラフであり、これはその正常な増殖を示している。第１日にドキシサイクリンの使用を中止すると、細胞は２日間にわたってのみ増殖し、その後、プレートから消失し始め、第９日には細胞は全く残らなかった（四角の付いた濃い青色の線）。最初の３日間の増殖後の２０倍低いドキシサイクリン濃度（５０ｎｇ／ｍｌ）では、少なくとも５日間プレート上に一定の細胞数を維持した（図１３、三角を有する水色の線）。第１０日にドキシサイクリンの正常濃度をプレートに再度添加したところ、細胞は、再

び正常ＥＳ細胞と同様に増殖を開始した。図１３Ｂは、Ｄｏｘ除去から０、１及び２日後のＣｄｋ１　ｍＲＮＡのレベル（定量ＰＣＲにより測定）を示す棒グラフを示す。発現レベルをβアクチンに正規化する。

【図１４】ｄｏｘ－架橋ＥＳ細胞を増殖するプロセスを示し、培地でのドキシサイクリンを使用中止したとき、１００，０００，０００個のｄｏｘ－架橋ＥＳ細胞中に逃避（ｅｓｃａｐｅｒ）細胞は見出されなかったが、センチネル（野生型、ＧＦＰ陽性）細胞は高い効率で生存したことを示す。

【図１５】ｄｏｘ－架橋ＥＳ細胞に対する高ドキシサイクリン濃度（１０μｇ／ｍｌ）の作用を示すグラフを示し：高いドキシサイクリンの存在下で、細胞は、低ドキシサイクリンの場合と同様にその増殖速度が低下した（高ｄｏｘは１０μｇ／ｍｌ、正常ｄｏｘは１μｇ／ｍｌ、低ｄｏｘは０．０５μｇ／ｍｌ）が、これは、細胞増殖のためのＣＤＫ１発現の最適レベルを定めるＤｏｘ濃度のウィンドウがあることを示している。

【図１６】ＡＬＩＮＫ修飾（すなわち、Ｃｄｋ１（ＴＫ／ＴＫ）細胞；細胞産物は図３Ａ～３Ｇに記載される）を含むマウス細胞のＣｄｋ１遺伝子座の５’ＵＴＲへのｄｏｘ－架橋のターゲティングを示す。図１６Ａは、Ｃｄｋ１（ＴＫ／ＴＫ）細胞におけるＣｄｋ１遺伝子座の構造、架橋標的ベクター、及び遺伝子型決定プライマーの位置を示す概略図である。図１６Ｂは、マウスＣｄｋ１（ＴＫ／ＴＫ）細胞のＣｄｋ１　５’ＵＴＲにｄｏｘ－架橋を組み込み、これによりマウス細胞産物Ｃｄｋ１$^{ｅａｒｃ／ｅａｒｃ，ａｌｉｎｋ／ａｌｉｎｋ}$を産生するものを同定するための、プロマイシン耐性コロニーの遺伝子型決定を示すＰＣＲ結果を示す。

【図１７】ＡＬＩＮＫ修飾（すなわち、Ｃｄｋ１（ＴＫ／ＴＫ）細胞；細胞産物は図４Ａ～４Ｆに記載される）を含むヒト細胞のＣｄｋ１遺伝子座の５’ＵＴＲへのｄｏｘ－架橋のターゲティングを示す。図１７Ａは、Ｃｄｋ１（ＴＫ／ＴＫ）細胞におけるＣｄｋ１遺伝子座の構造、架橋標的ベクター、及び遺伝子型決定プライマーの位置を示す概略図である。図１７Ｂは、ヒトＣｄｋ１（ＴＫ／ＴＫ）細胞のＣｄｋ１　５’ＵＴＲにｄｏｘ－架橋を組み込み、従って、ヒト細胞産物Ｃｄｋ１$^{ｅａｒｃ／ｅａｒｃ，ａｌｉｎｋ／ａｌｉｎｋ}$を産生するものを同定するための、プロマイシン耐性コロニーの遺伝子型決定を示すＰＣＲ結果を示す。

【図１８】Ｔｏｐ２ａへのＥＡＲＣ挿入を生成するためのＴｏｐ２遺伝子座の５’ＵＴＲへのｄｏｘ－架橋のターゲティングを示す。図１８Ａは、Ｔｏｐ２ａ遺伝子座の構造及び標的ベクターを示す概略図である。ＴＯＰ２ａ＿５ｓｃｒＦ、ｒｔｔａＲｅｖ、ＣＭＶｆｏｒｗ及びＴＯＰ２ａ＿３ｓｃｒＲは、相同組換えイベントの遺伝子型決定に用いられるプライマーの位置を示す。図１８Ｂは、Ｔｏｐ２ａ　５’ＵＴＲにｄｏｘ－架橋を組み込んだものを同定するためのｐｕｒｏ耐性コロニーの遺伝子型決定を示すＰＣＲ結果を示す。これらの細胞株のうちの９つが同型接合性ターゲティングされ、Ｔｏｐ２ａの両対立遺伝子の５’ＵＴＲへの相同組換えにより挿入されたｄｏｘ－架橋を含むことが判明した。

【図１９】Ｔｏｐ２ａ－ＥＡＲＣ　ＥＳ細胞の増殖に対するドキシサイクリンの使用中止の作用を示す。図１９Ａは、ドキシサイクリンの使用中止により、４日以内に有糸分裂活性ＥＳ細胞の完全な排除が起こることを示している。図１９Ｂは、細胞増殖を４日間測定することにより、様々な濃度のドキシサイクリンがｄｏｘ－架橋ＥＳ細胞の増殖にどの程度影響したかを示す。ドキシサイクリンの存在下で、ＥＳ細胞は指数関数的に増殖したが、これはその正常な増殖を示している。対照的に、ドキシサイクリンの除去から２日後、細胞増殖は完全に停止した。

【図２０】ＣｅｎｐａへのＥＡＲＣ挿入を生成するためのＣｅｎｐａ遺伝子座の５’ＵＴＲへのｄｏｘ－架橋のターゲティングを示す。図２０Ａは、Ｃｅｎｐａ遺伝子座の構造及び標的ベクターを示す概略図である。Ｃｅｎｐａ＿５ｓｃｒＦ、ｒｔｔａＲｅｖ、ＣＭＶｆｏｒｗ及びＣｅｎｐａ＿３ｓｃｒＲは、相同組換えイベントの遺伝子型決定に用いられるプライマーの位置を示す。図２０Ｂは、Ｃｅｎｐａ　５’ＵＴＲにｄｏｘ－架橋を組み込んだものを同定するためのｐｕｒｏ耐性コロニーの遺伝子型決定を示すＰＣＲ結果を示す。これらの細胞株のうちの６つが５’及び３’に正しい挿入を有することが判明し、少

なくとも１つのクローン（Ｃｅｎｐａ＃４）が同型接合性ターゲティングを有し、Ｃｅｎｐａの両対立遺伝子の５’ＵＴＲへの相同組換えにより挿入されたｄｏｘ－架橋を含むことが判明した。

【図２１】Ｃｅｎｐａ－ＥＡＲＣ　ＥＳ細胞の増殖に対するドキシサイクリンの使用中止の作用を示す。図２１Ａは、ドキシサイクリンの使用中止により、４日以内に有糸分裂活性ＥＳ細胞の完全な排除が起こることを示している。図２１Ｂは、Ｄｏｘを用いた場合及びＤｏｘ除去から２日後のＣｅｎｐａ－ＥＡＲＣ細胞におけるＣｅｎｐａ遺伝子発現レベル（ｑ－ＰＣＲにより決定）であり、これを野生型マウスＥＳ細胞（Ｃ２）での発現レベルと比較した。予想通り、Ｃｅｎｐａ発現レベルは、２日間ＤｏｘなしのＣｅｎｐａ－ＥＡＲＣ細胞において大幅に低下した。

【図２２】細胞増殖を４日間測定することにより、様々な濃度のドキシサイクリンがＣｅｎｐａ－ＥＡＲＣ　ＥＳ細胞の増殖にどの程度影響したかを示す。ドキシサイクリンの存在下で、ＥＳ細胞は指数関数的に増殖したが、これはその正常な増殖を示している。対照的に、ドキシサイクリンの除去から８０時間後、細胞増殖は完全に停止した。

【図２３】Ｂｉｒｃ５遺伝子座へのＥＡＲＣ挿入を生成するためのＢｉｒｃ５遺伝子座の５’ＵＴＲへのｄｏｘ－架橋のターゲティングを示す。図２３Ａは、Ｂｉｒｃ５遺伝子座の構造及び標的ベクターを示す概略図である。Ｂｉｒｃ５＿５ｓｃｒＦ及びｒｔｔａＲｅｖは、相同組換えイベントの遺伝子型決定に用いられるプライマーの位置を示す。図２３Ｂは、Ｂｉｒｃ５　５’ＵＴＲにｄｏｘ－架橋を組み込んだものを同定するためのｐｕｒｏ耐性コロニーの遺伝子型決定を示すＰＣＲ結果を示す。５つのクローンが正しくターゲティングされ、Ｂｉｒｃ５の両対立遺伝子の５’ＵＴＲへの相同組換えにより挿入されたｄｏｘ－架橋を含むことが判明した。これらのクローンの１つはＢｉｒｃ＃３であり、Ｄｏｘの非存在下で増殖を停止するか、又は死滅することが判明した。

【図２４】Ｂｉｒｃ５－ＥＡＲＣ　ＥＳ細胞の増殖に対するドキシサイクリンの使用中止の作用を示す。図２４Ａは、ドキシサイクリンの使用中止により、４日以内に有糸分裂活性ＥＳ細胞の完全な排除が起こることを示している。図２４Ｂは、Ｄｏｘを用いた場合及びＤｏｘ除去から２日後のＢｉｒｃ５－ＥＡＲＣ細胞におけるＢｉｒｃ５遺伝子発現レベル（ｑ－ＰＣＲにより決定）であり、これを野生型マウスＥＳ細胞（Ｃ２）での発現レベルと比較した。予想通り、Ｂｉｒｃ５発現レベルは、２日間ＤｏｘなしのＢｉｒｃ５－ＥＡＲＣ細胞において大幅に低下した。

【図２５】細胞増殖を４日間測定することにより、様々な濃度のドキシサイクリンがＢｉｒｃ５－ＥＡＲＣ　ＥＳ細胞の増殖にどの程度影響したかを示す。ドキシサイクリンの存在下で、ＥＳ細胞は指数関数的に増殖したが、これはその正常な増殖を示している。対照的に、ドキシサイクリンの除去から５０時間後、細胞増殖は完全に停止した。興味深いことに、低Ｄｏｘ濃度（０．５及び０．０５μｇ／ｍｌ）の方が高濃度（１μｇ／ｍｌ）より良好に細胞増殖を促進した。

【図２６】Ｅｅｆ２へのＥＡＲＣ挿入を生成するためのＥｅｆ２遺伝子座の５’ＵＴＲへのｄｏｘ－架橋のターゲティングを示す。図２６Ａは、Ｅｅｆ２遺伝子座の構造及び標的ベクターを示す概略図である。Ｅｅｆ２＿５ｓｃｒＦ及びｒｔｔａＲｅｖは、相同組換えイベントの遺伝子型決定に用いられるプライマーの位置を示す。図２６Ｂは、Ｅｅｆ２　５’ＵＴＲにｄｏｘ－架橋を組み込んだものを同定するためのｐｕｒｏ耐性コロニーの遺伝子型決定を示すＰＣＲを示す。これらの細胞株のうちの９つが、Ｄｏｘ培地中でのみ増殖する少なくとも１つのクローンで正しくターゲティングされていることが判明した。

【図２７】Ｅｅｆ２－ＥＡＲＣ　ＥＳ細胞の増殖に対するドキシサイクリンの使用中止の作用を示す。ドキシサイクリンの使用中止により、４日以内に有糸分裂活性ＥＳ細胞の完全な排除が起こる。

【図２８】細胞増殖を４日間測定することにより、様々な濃度のドキシサイクリンがＥｅｆ２－ＥＡＲＣ　ＥＳ細胞の増殖にどの程度影響したかを示す。ドキシサイクリンの存在下で、ＥＳ細胞は指数関数的に増殖したが、これはその正常な増殖を示している。対照的に、ドキシサイクリンがなければ、細胞は全く増殖することができない。

【発明を実施するための形態】
【００４１】
別に定義しない限り、本明細書で使用する技術及び科学用語は全て、本開示が属する技術分野の当業者により一般に理解されるものと同じ意味を有する。
【００４２】
定義
本明細書で使用する用語「１つの細胞分裂遺伝子座」、「複数の細胞分裂遺伝子座」及び「ＣＤＬ」は、ゲノム遺伝子座であって、その転写産物が分裂細胞によって発現されるゲノム遺伝子座を指す。ＣＤＬが単一遺伝子座を含むとき、細胞（又はその誘導体）におけるＣＤＬ発現の非存在は、細胞がＣＤＬ発現の非存在下でアブレートされるか、又は細胞の増殖がＣＤＬ発現の非存在下で阻止若しくは障害されるかのいずれかであるため、腫瘍開始及び／又は形成が妨げられることを意味する。ＣＤＬが複数の遺伝子座を含む場合、細胞（又はその誘導体）における遺伝子座の全部又はサブセットによる発現の非存在は、細胞がＣＤＬ発現の非存在下でアブレートされるか、又は細胞の増殖がＣＤＬ発現の非存在下で阻止若しくは障害されるかのいずれかであるため、腫瘍開始及び／又は形成が妨げられることを意味する。ＣＤＬは、非分裂及び／又は非増殖細胞において発現されても、発現されなくてもよい。ＣＤＬは、宿主細胞に対して内在性であってもよく、又はトランスジーンであってもよい。ＣＤＬがトランスジーンである場合、これは、宿主細胞と同じ若しくは異なる種に由来するものでもよく、又は合成起源のものでもよい。一実施形態では、ＣＤＬは、細胞分裂中に転写される単一遺伝子座である。例えば、一実施形態では、単一遺伝子座ＣＤＬは、ＣＤＫ１である。一実施形態では、ＣＤＬは、細胞分裂中に転写される２つ以上の遺伝子座を含む。例えば、一実施形態では、多遺伝子座ＣＤＬは、２つのＭＹＣ遺伝子（ｃ－Ｍｙｃ及びＮ－ｍｙｃ）を含む（Ｓｃｏｇｎａｍｉｇｌｉｏ ｅｔ ａｌ．，２０１６）。一実施形態では、多遺伝子座ＣＤＬは、ＡＵＲＯＲＡ Ｂ及びＣキナーゼを含み、これらは重複する機能を有し得る（Ｆｅｒｎａｎｄｅｚ－Ｍｉｒａｎｄａ ｅｔ ａｌ．，２０１１）。細胞分裂及び細胞増殖は、本明細書では置き換え可能に使用され得る用語である。
【００４３】
本明細書で使用する用語「細胞分裂の正常速度」、「正常な細胞分裂速度」、「細胞増殖の正常速度」、及び「正常な細胞増殖速度」は、非癌性の健全な細胞に典型的な細胞分裂及び／又は増殖の速度を指す。細胞分裂及び／又は増殖の正常速度は、細胞型に特有であり得る。例えば、表皮、腸、肺、血液、骨髄、胸腺、精巣、子宮及び乳腺の細胞数は、高速度の細胞分裂及び高速度の細胞死によって維持されることが広く認められている。対照的に、膵臓、腎臓、角膜、前立腺、骨、心臓及び脳の細胞数は、低速度の細胞分裂及び低速度の細胞死によって維持される（Ｐｅｌｌｅｔｔｉｅｒｉ ａｎｄ Ｓａｎｃｈｅｚ Ａｌｖａｒａｄｏ，２００７）。
【００４４】
本明細書で使用する用語「誘導性陰性増殖エフェクター」及び「ｉＮＥＰ」は、ｉ）ＣＤＬ発現を誘導により停止又は阻止し、これによって細胞分裂及び増殖を妨げ；ｉｉ）ＣＤＬ発現細胞を誘導によりアブレートする（すなわち、増殖細胞の少なくとも一部を殺傷する）；又はｉｉｉ）細胞分裂の速度が腫瘍形成に寄与する上で十分速くならないように、細胞の正常細胞分裂速度に対して細胞分裂の速度を遅くすることにより、細胞分裂及び／又は増殖を制御する目的で、ＣＤＬ発現の使用を促進する遺伝子修飾を指す。
【００４５】
本明細書で使用する用語「アブレーションリンク」及び「ＡＬＩＮＫ」は、ＣＤＬと、陰性選択マーカをコードする配列との間に転写リンクを含む、ｉＮＥＰの一例を指す。ＡＬＩＮＫ修飾により、ユーザは、ＡＬＩＮＫ修飾細胞を陰性選択マーカの誘導物質に曝露することにより、ＡＬＩＮＫを含む増殖宿主細胞を誘導的に殺傷するか、又は増殖細胞の少なくとも一部を殺傷することにより、宿主細胞の増殖を阻害することが可能になる。例えば、増殖細胞の少なくとも一部を殺傷することによって増殖細胞をアブレートするか又

は細胞増殖を阻害するために、ＣＤＬにＡＬＩＮＫを含むように修飾された細胞を陰性選択マーカの誘導物質（例えば、プロドラッグ）で処理してもよい（図１Ｂ）。

【００４６】

本明細書で使用する用語「ＣＤＬの調節の外性活性化因子」及び「ＥＡＲＣ」は、活性化因子を介した非コード若しくはコードＤＮＡ転写又は対応する翻訳の外因性改変を促進する機構又は体系を含む、ｉＮＥＰの一例を指す。ＥＡＲＣ修飾により、ユーザは、ＥＡＲＣ修飾細胞から、ＥＡＲＣ修飾ＣＤＬの転写及び／又は翻訳を可能にする誘導物質を除去することにより、ＥＡＲＣを含む細胞の分裂を停止又は阻害することが可能になる。例えば、誘導性活性化因子に基づく遺伝子発現系をＣＤＬに作動可能に連結させて、ＣＤＬの発現又はＣＤＬ翻訳を外因的に制御するために使用することができ、これにより、ＣＤＬ転写及び／又は翻訳に薬物誘導性活性化因子及び対応する誘導薬の存在が必要となる。誘導薬の非存在下では、細胞分裂及び／又は増殖は停止又は阻害される（例えば、正常細胞分裂速度まで減速される）であろう。例えば、ＣＤＬ　Ｃｄｋ１／ＣＤＫ１の発現並びに細胞分裂及び増殖が誘導物質（例えば、ドキシサイクリン）の存在下でのみ可能となるように、ＣＤＬ　Ｃｄｋ１／ＣＤＫ１を修飾してｄｏｘ－架橋を含有させもよい（図１Ｂ）。

【００４７】

本明細書で使用する用語「増殖アンタゴニスト系」は、その存在が細胞の増殖を（完全若しくは部分的に）阻害する天然又は操作された化合物を指す。

【００４８】

ツール及び方法の概要

本明細書に記載するように、本発明者らは、動物細胞における１つ又は複数の細胞分裂遺伝子座（ＣＤＬ）を用いて遺伝子修飾細胞を作製するための分子ツール、方法及びキットを提供しており、こうした細胞において、細胞分裂及び／又は増殖は、ユーザにより１つ又は複数のｉＮＥＰを介して制御することができる（図１Ａ）。例えば、本明細書に記載する１つ又は複数のツール及び／又は方法を用いて作製された細胞の分裂は、細胞の分裂速度が腫瘍形成に寄与するほど十分早くならないように、ユーザによって停止、阻止若しくは阻害することができる。例えば、本明細書に記載する１つ又は複数のツール及び／若しくは方法を用いて作製された細胞の増殖は、増殖細胞の少なくとも一部を殺傷又は停止することにより、ユーザによって停止、阻止若しくは阻害することができ、これにより、細胞増殖速度又は量は、それぞれユーザが所望する速度又はサイズで維持され得る。

【００４９】

例えば、より高速の細胞分裂速度（正常細胞分裂速度に対して）が望ましくない場合、細胞分裂及び／又は増殖を制御するツール及び／又は方法が望ましい。例えば、正常速度より速く分裂する細胞は、ｉｎ　ｓｉｔｕで腫瘍を形成する可能性があり、これは、宿主にとって有害となり得る。一実施形態では、本明細書に記載する遺伝子修飾動物細胞は、望ましくない細胞分裂及び／又は増殖がユーザにより制御され得るように、正常な細胞分裂及び／又は増殖を可能すると共に、細胞分裂及び／又は増殖を停止し、アブレートし、阻止し、及び／又は遅らせるための１つ又は複数の機構を含む（図１Ｂ）。図１Ｂを参照すると、例（Ｉ）では、ＥＡＲＣがＣＤＬの５’ＵＴＲに挿入され、またＡＬＩＮＫが３’ＵＴＲに挿入され、転写の産物は、２つのタンパク質でプロセシングされる２シストロン性ｍＲＮＡである。例（ＩＩ）では、ＥＡＲＣ及びＡＬＩＮＫの両方がＣＤＬの５’ＵＴＲに挿入され、転写の産物は、２つのタンパク質でプロセシングされる２シストロン性ｍＲＮＡである。例（ＩＩＩ）では、ＥＡＲＣがＣＤＬの５’ＵＴＲに挿入され、またＡＬＩＮＫがＣＤＬコード配列内に挿入され、転写の産物は、前駆タンパク質でプロセシングされて、特殊設計された切断配列の切断時に２つの個別のタンパク質を産生するｍＲＮＡである。例（ＩＶ）では、ＥＡＲＣ及びＡＬＩＮＫの両方がＣＤＬの５’ＵＴＲに挿入され、転写の産物は、ＣＤＬ及びＡＬＩＮＫ機能の両方を維持する融合タンパク質にプロセシングされるｍＲＮＡである。例（Ｖ）では、ＥＡＲＣがＣＤＬの５’ＵＴＲに挿入され、ＡＬＩＮＫが３’ＵＴＲに挿入され、転写の産物は、ＣＤＬ及びＡＬＩＮＫ機能の両

方を維持する融合タンパク質にプロセシングされるｍＲＮＡである。

【００５０】

例えば、本明細書に記載する遺伝子修飾動物細胞は、対象に適用される細胞療法処置に使用され得る。対象に提供された遺伝子修飾動物細胞の１つ又は複数が望ましくない速度で（例えば、正常より早く）分裂を開始することになる場合、ユーザは、ｉ）望ましくない速度で分裂する細胞に、細胞中の遺伝子修飾に対応する誘導物質を適用するか；又はｉｉ）細胞中の遺伝子修飾に対応する誘導物質に対する、望ましくない速度で分裂する細胞のアクセスを制限することにより、望ましくない速度で分裂する細胞の分裂を停止するか若しくは遅らせ、望ましくない速度で増殖する細胞を遅らせるか若しくは停止することができ、ｉ）又はｉｉ）は、遺伝子修飾動物細胞に提供されたｉＮＥＰのタイプに基づいて決定される。

【００５１】

一実施形態では、本明細書に記載する遺伝子修飾動物細胞は、「フェイルセーフ細胞」と呼ばれることもある。フェイルセーフ細胞は、１つ又は複数のＣＤＬに１つ又は複数の同型接合性、異型接合性、半接合性又は化合物異型接合性ＡＬＩＮＫを含む。一実施形態では、フェイルセーフ細胞は、１つ又は複数のＣＤＬに１つ又は複数のＥＡＲＣをさらに含む。一実施形態では、フェイルセーフ細胞は、ＡＬＩＮＫ及びＥＡＲＣ修飾の両方を含むＣＤＬを含む。

【００５２】

本明細書で使用する場合、用語「フェイルセーフ」は、細胞数を定める確率（ｐＦＳと呼ばれる）を指す。例えば、単一のフェイルセーフ細胞から増殖させることができる細胞の数（クローン量）であり、ここで、全てのＡＬＩＮＫを喪失した細胞を含むクローンを取得する確率は、任意の値（ｐＦＳ）より低い。例えば、ｐＦＳ＝０．０１は、クローンが、ＡＬＩＮＫ修飾ＣＤＬを含む単一細胞から１００倍増殖された場合、１つのみのクローンがＡＬＩＮＫ機能（陰性選択マーカの発現）を喪失しているものの、細胞分裂が依然として可能な細胞を有すると予想される、シナリオを指す。フェイルセーフ量は、ＡＬＩＮＫの数及びＡＬＩＮＫ標的ＣＤＬの数に左右される。フェイルセーフ特性は、表１にさらに詳しく記載する。

【００５３】

表１．フェイルセーフ細胞量、並びにヒト身体とのそれらの関係を、数学的モデル化を用いて計算した。このモデルは、ＣＤＬ発現が陰性選択マーカ活性の消失と一緒に同時消失し、細胞増殖を障害した際のイベントは計算に入れなかった。従って、これらの値は過小評価値であり、陰性選択マーカについて１０～６前進突然変異速度を想定して算出した。ヒト身体の推定細胞数：３．７２×１０^{13}を（Ｂｉａｎｃｏｎｉ　ｅｔ　ａｌ．，２０１３）から採用した。

【００５４】

【表１】

CDL #	ALINK #	CDL における遺伝子型	フェイルセーフ量 (#細胞)	ヒト身体=3.72x10^{13} 細胞に対する (x)	クローンの推定重量
1	1	het	512	0.0000000000137	1μg
1	2	hom	16777216	0.000000451	31 mg
2	3	het, hom	1.374E+11	0.004	0.26 kg
2	4	hom, hom	1.13E+15	30	2100 kg

【００５５】

本明細書では、フェイルセーフ細胞は、こうした細胞が宿主への細胞の移植前又は移植後に産生されたか否かとは関係なく、望ましくない増殖速度を呈示する細胞を排除することが要望され得る細胞療法で有用となると考えられる。

【００５６】

細胞分裂遺伝子座（ＣＤＬ）
本明細書に記載するシステム、方法及び組成物は、例えば、表２に示すＣＤＬなどの１つ又は複数のＣＤＬの同定に基づく。本明細書では、本明細書に記載する方法を用いて様々なＣＤＬをターゲティングすることができると考えられる。
【００５７】
様々な実施形態では、ＣＤＬは、Ｗａｎｇ　ｅｔ　ａｌ．，２０１５（明示されているのと同様に、参照によりその全体を本明細書に組み込む）に記載されている「必須遺伝子」として同定される遺伝子座である。Ｗａｎｇ　ｅｔ　ａｌ．，２０１５に記載の必須遺伝子は、各々の遺伝子についてスコア（すなわち、ＣＲＩＳＰＲスコア）を計算することによって同定され、このスコアは、遺伝子の不活性化により課される適応コストを表す。一実施形態では、ＣＤＬは、約－１．０未満のＣＲＩＳＰＲスコアを有する（表２、第５列）。
【００５８】
様々な実施形態では、ＣＤＬは、細胞分裂及び／又は複製に関連する遺伝子産物をコードする１つ又は複数の遺伝子座である（表２、第６列）。例えば、様々な実施形態では、ＣＤＬは、ｉ）細胞周期；ｉｉ）ＤＮＡ複製；ｉｉｉ）ＲＮＡ転写及び／又はタンパク質翻訳；並びにｉｖ）代謝の１つ又は複数に関連する遺伝子産物をコードする遺伝子座である（表２、第７列）。
【００５９】
一実施形態では、ＣＤＬは、細胞周期の進行の調節（例えば、Ｇ１／Ｓ　Ｇ２／Ｍ及び中期から後期への移行の制御）に関与する１つ又は複数のサイクリン依存性キナーゼ、例えば、ＣＤＫ１、ＣＤＫ２、ＣＤＫ３、ＣＤＫ４、ＣＤＫ５、ＣＤＫ６、ＣＤＫ７、ＣＤＫ８、ＣＤＫ９及び／又はＣＤＫ１１などである（Ｍｏｒｇａｎ，２００７）。一実施形態では、ＣＤＬは、１つ又は複数のＣＤＫを活性化することによって細胞周期の進行の制御に関与する１つ又は複数のサイクリン、例えば、サイクリンＢ、サイクリンＥ、サイクリンＡ、サイクリンＣ、サイクリンＤ、サイクリンＨ、サイクリンＣ、サイクリンＴ、サイクリンＬ及び／又はサイクリンＦなどである（ＦＵＮＧ　ａｎｄ　ＰＯＯＮ，２００５）。一実施形態では、ＣＤＬは、細胞周期のＭ期における中期から後期への移行の進行を制御する後期促進複合体に関与する１つ又は複数の遺伝子座である（Ｐｅｔｅｒｓ，２００２）。一実施形態では、ＣＤＬは、細胞周期のＭ期における中期から後期への移行の進行を制御する動原体成分に関与する１つ又は複数の遺伝子座である。一実施形態では、ＣＤＬは、細胞周期に必要な微小管運動を制御する微小管成分に関与する１つ又は複数の遺伝子座である（Ｃａｓｓｉｍｅｒｉｓ，１９９９）。
【００６０】
様々な実施形態では、ＣＤＬは、ハウスキーピングに関与する１つ又は複数の遺伝子座である。本明細書で使用する場合、用語「ハウスキーピング遺伝子」又は「ハウスキーピング遺伝子座」は、基本的な細胞機能の維持に必要な１つ又は複数の遺伝子を指す。ハウスキーピング遺伝子は、正常な状態及び病態生理学的状態にある生物の全ての細胞で発現される。
【００６１】
様々な実施形態では、ＣＤＬは、細胞分裂及び／又は増殖に関連する遺伝子産物をコードする１つ又は複数の遺伝子座であり、約－１．０未満のＣＲＩＳＰＲスコアを有する。例えば、一実施形態では、ＣＤＬは、ｉ）細胞周期；ｉｉ）ＤＮＡ複製；ｉｉｉ）ＲＮＡ転写及び／又はタンパク質翻訳；並びにｉｖ）代謝の１つ又は複数に関連する遺伝子産物をコードする１つ又は複数の遺伝子座であり、約－１．０未満のＣＲＩＳＰＲスコアを有する。一実施形態では、ＣＤＬは、ハウスキーピング遺伝子でもある。
【００６２】
一実施形態では、潜在的なＣＤＬを同定するために、本発明者らは、遺伝子ノックアウトの早期マウス胚性致死表現型を調べた（ＫＯｓ；表２、第８列）。例えば、本発明者らは、Ｃｄｋ１（サイクリン依存性キナーゼ１、細胞分裂周期タンパク質２相同体（ＣＤＣ

２）とも呼ばれる）ヌル突然変異について同型接合性ヌルのマウス胚が２細胞期で死滅することを見出した（Ｅ１．５）（Ｓａｎｔａｍａｒｉａ　ｅｔ　ａｌ．，２００７）。Ｃｄｋ１（ヒトではＣＤＫ１と呼ばれる）は、その機能が細胞周期の調節に極めて重要である高度に保存されたセリン／トレオニンキナーゼである。Ｃｄｋ１のタンパク質複合体は、多数の標的基質をリン酸化することによって細胞周期進行をもたらす。Ｃｄｋ１発現が存在しなければ、細胞は、細胞周期のＧ２からＭ期に移行することができない。

【００６３】

Ｃｄｋ１／ＣＤＫ１は、単一遺伝子座ＣＤＬの一例である。遺伝子座の転写がＡＬＩＮＫ修飾の挿入によりアブレートされるか、及び／又はＥＡＲＣ修飾の挿入により外因的に制御されるＣｄｋ１／ＣＤＫ１の遺伝子修飾を本明細書において実施例１、２及び３に記載するように調べた。Ｔｏｐ２Ａ／ＴＯＰ２Ａは、ＣＤＬの一例である。Ｃｅｎｐａ／ＣＥＮＰＡは、ＣＤＬの一例である。Ｂｉｒｃ５／ＢＩＲＣ５は、ＣＤＬの一例である。Ｅｆ２／ＥＥＦ２は、ＣＤＬの一例である。遺伝子座の転写をＥＡＲＣ修飾の挿入により外因的に制御することができる、Ｔｏｐ２ａ、Ｃｅｎｐａ、Ｂｉｒｃ５、及びＥｅｆ２の遺伝子修飾を本明細書で実施例４～７にそれぞれ記載するように調べた。

【００６４】

一実施形態では、本明細書において、代替及び／又は追加の遺伝子座は、本明細書に記載する方法を用いてターゲティングすることができるＣＤＬであることが考えられる。

【００６５】

例えば、ヒト細胞株のＲＮＡｉスクリーニングにより、細胞増殖に不可欠な複数の遺伝子が同定された（Ｈａｒｂｏｒｔｈ　ｅｔ　ａｌ．，２００１；Ｋｉｔｔｌｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，２００４）。本発明者らは、オーソログが欠損するマウスの遺伝子座の早期胚性致死表現型を確認し、及び／又は遺伝子座のＧＯターム（ｔｅｒｍ）及び／又はジーンカード（ｇｅｎｅｃａｒｄ）を分析した後、これらの遺伝子座のサブセットがＣＤＬであると予測した（表２、第８列）。

【００６６】

アブレーションリンク（ＡＬＩＮＫ）遺伝子修飾を有するＣＤＬのターゲティング

一態様では、本開示は、ＣＤＬの発現を、陰性選択マーカをコードするＤＮＡ配列の発現と連結することにより、結果的にＣＤＬと陰性選択マーカを発現する有糸分裂活性細胞の薬物誘導性アブレーションを可能にするための分子ツール、方法及びキットを提供する。増殖細胞のアブレーションは、例えば、細胞増殖が制御不良であり、及び／又は細胞の正常分裂速度に対して加速している（例えば、癌細胞により呈示される制御不良の細胞分裂）場合に望ましいであろう。増幅細胞のアブレーションは、陰性選択マーカをコードするＤＮＡ配列の発現をＣＤＬの発現と連結することにより、結果としてＣＤＬ遺伝子座を発現するＡＬＩＮＫ修飾増幅細胞の排除又は十分な阻害（腫瘍形成に寄与するには低すぎる速度までの細胞増殖速度の阻害である十分な阻害）を可能にする、本明細書で「アブレーションリンク」（ＡＬＩＮＫ）と呼ばれる細胞に対する遺伝子修飾により達成することができる。陰性選択系のプロドラッグ又は他の誘導物質の存在下で陰性選択マーカを発現する細胞は、選択マーカの作用機構に応じて増殖を停止するか、又は死滅するであろう。細胞は、同型接合性、異型接合性、半接合性又は化合物異型接合性ＡＬＩＮＫを含むように修飾してよい。一実施形態では、アブレーションの忠実性を向上させるために、ＣＤＬの全ての機能性対立遺伝子に陰性選択マーカを導入してもよい。１つの好ましい実施形態では、ＣＤＬの全ての機能性対立遺伝子に陰性選択マーカを導入してもよい。

【００６７】

ＡＬＩＮＫは、ＣＤＬの任意の位置に導入してよく、これにより、ＣＤＬ及び陰性選択マーカの同時発現が可能になる。

【００６８】

以下の実施例１にさらに論じるように、陰性選択マーカの発現により、陰性選択マーカ並びに必然的にＣＤＬを発現する宿主細胞が陰性選択マーカの誘導物質（例えば、プロドラッグ）（例えば、ガンシクロビル（ＧＣＶ））の存在下で死滅するように、陰性選択マ

ーカ（例えば、ＨＳＶ－ＴＫ）をコードするＤＮＡを宿主細胞のＣＤＬ（例えば、ＣＤＫ１）に挿入することができる。この例では、ＡＬＩＮＫで修飾された宿主細胞は、チミジンキナーゼ（ＴＫ）を産生し、及びＴＫタンパク質は、ＧＣＶをＧＣＶ一リン酸に変換し、次にこれが細胞キナーゼによりＧＣＶ三リン酸に変換される。ＧＣＶ三リン酸はＳ期中に複製ＤＮＡに組み込まれ、これは、ＤＮＡ伸長及び細胞アポトーシスの終結を招く（Ｈａｌｌｏｒａｎ ａｎｄ Ｆｅｎｔｏｎ、１９９８）。

【００６９】

修飾ＨＳＶ－ＴＫ遺伝子（Ｐｒｅｕｓｓ ｅｔ ａｌ．，２０１０）は、本明細書において、望ましくない細胞分裂速度を含む細胞を選択的にアブレートするためのＡＬＩＮＫ遺伝子修飾に使用され得る陰性選択マーカをコードするＤＮＡの一例として開示される。

【００７０】

本明細書では、代替及び／又は追加の陰性選択系を本明細書に記載するツール及び／又は方法で使用することができると考えられる。様々な陰性選択マーカ系が当技術分野で知られている（例えば、ｄＣＫ．ＤＭ（Ｎｅｓｃｈａｄｉｍ ｅｔ ａｌ．，２０１２））。

【００７１】

例えば、臨床との関連を有する様々な陰性選択系は、副作用が全くないか、又は最小限の副作用で従来の癌療法の治療効果を改善することを目標とする「遺伝子指向性酵素／プロドラッグ療法」（ＧＥＰＴ）の分野で開発進行中である（Ｈｅｄｌｅｙ ｅｔ ａｌ．，２００７；Ｎａｗａ ｅｔ ａｌ．，２００８）。多くの場合、ＧＥＰＴは、ウイルスベクターを使用して、癌細胞又は癌細胞の領域内で癌細胞の近傍に、哺乳動物細胞には存在せず、酵素を産生する遺伝子を送達することを含み、この酵素は、比較的非毒性のプロドラッグを毒性物質に変換することができる。

【００７２】

ＨＳＶ－ＴＫ／ＧＣＶ、シトシンデアミナーゼ／５－フルオロシトシン（ＣＤ／５－ＦＣ）、及びカルボキシルエステラーゼ／イリノテカン（ＣＥ／ＣＰＴ－１１）は、ＧＥＰＴ前臨床試験及び臨床試験で評価されている陰性選択マーカ系の例である（Ｄａｎｋｓ ｅｔ ａｌ．，２００７；Ｓｈａｈ，２０１２）。

【００７３】

１型単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ／ガンシクロビル（ＴＫ／ＧＣＶ）系の潜在的な免疫原性の問題を解決するために、ヒトデオキシシチジンキナーゼ酵素がチミジン活性となり、非毒性プロドラッグ：ブロモビニル－デオキシウリジン（ＢＶｄＵ）、Ｌ－デオキシチミジン（ＬｄＴ）又はＬ－デオキシウリジン（ＬｄＵ）と共に陰性選択（自殺）系として作用するように、この酵素を操作することによって「ヒト化」自殺系が開発されている（Ｎｅｓｃｈａｄｉｍ ｅｔ ａｌ．，２０１２）。

【００７４】

ＣＤ／５－ＦＣ陰性選択マーカ系は、広く使用されている「自殺遺伝子」系である。シトシンデアミナーゼ（ＣＤ）は、細菌又は酵母（例えば、それぞれ大腸菌（Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ ｃｏｌｉ）又はサッカロミセス・セレビシエ（Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）由来）から得ることができる非哺乳動物酵素である（Ｒａｍｎａｒａｉｎｅ ｅｔ ａｌ．，２００３）。ＣＤは、シトシンのウラシルへの変換を触媒し、原生動物及び真菌におけるピリミジンサルベージ経路の重要なメンバーであるが、哺乳動物細胞には存在しない。５－フルオロシトシン（５－ＦＣ）は、ヒトにおける低レベルの細胞傷害性を引き起こす抗真菌プロドラッグである（Ｄｅｎｎｙ，２００３）。ＣＤは、５－ＦＣの遺伝毒性物質５－ＦＵへの変換を触媒し、ヒトにおいて高レベルの毒性を有する（Ｉｒｅｔｏｎ ｅｔ ａｌ．，２００２）。

【００７５】

ＣＥ／ＣＰＴ－１１系は、哺乳動物種の様々な組織に見出されるセリンエステラーゼであるカルボキシルエステラーゼ酵素を基材とする（Ｈｕｍｅｒｉｃｋｈｏｕｓｅ ｅｔ ａｌ．，２０００）。抗がん剤ＣＰＴ－１１は、ＣＥにより活性化されて、強力な哺乳動

物トポイソメラーゼＩ阻害物質である、７－エチル－１０－ヒドロキシカンプトテシン（ＳＮ－３８）と呼ばれる活性を産生する（Ｗｉｅｒｄｌ　ｅｔ　ａｌ．，２００１）。ＳＮ－３８は、分裂細胞に二本鎖ＤＮＡ切断の蓄積を誘導する（Ｋｏｊｉｍａ　ｅｔ　ａｌ．，１９９８）。

【００７６】

陰性選択マーカ系の別の例は、ｉＣａｓｐ９／ＡＰ１９０３自殺系であり、これは、ヒトＦＫ５０６結合タンパク質（ＦＫＢＰ）に融合した修飾ヒトカスパーゼ９を基材とし、小分子ＡＰ１９０３を用いて化学的二量体化を可能にするものであり、これはヒトで安全に試験されている。二量体化薬を投与すると、操作カスパーゼ９成分を発現する細胞のアポトーシスが誘導される。この系は、例えば、低い潜在的免疫原性をはじめとするいくつかの利点を有し、これはヒト遺伝子産物から構成されるため、二量体化薬は、操作カスパーゼ９成分を発現する細胞のみに作用する（Ｓｔｒａａｔｈｏｆ　ｅｔ　ａｌ．，２００５）。ｉＣａｓｐ／ＡＰ１９０３自殺系は、臨床現場で試験中である（Ｄｉ　Ｓｔａｓｉ　ｅｔ　ａｌ．，２０１１）。

【００７７】

本明細書において、ＡＬＩＮＫ系の陰性選択マーカ系は、増殖アンタゴニスト系で置換することができると考えられる。本明細書で使用する用語「増殖アンタゴニスト」は、その存在が細胞の分裂を（完全若しくは部分的に）阻害する天然又は操作化合物を指す。例えば、Ｏｍｏｍｙｃ^{ＥＲ}は、突然変異マウスエストロゲン受容体（ＥＲ）ドメインとＭＹＣドミネントネガティブＯｍｏｍｙｃとの融合タンパク質である。タモキシフェン（ＴＡＭ）で誘導されると、融合タンパク質Ｏｍｏｍｙｃ^{ＥＲ}は核に局在化し、ここで、ドミネントネガティブＯｍｏｍｙｃは、Ｃ－Ｍｙｃ、Ｌ－Ｍｙｃ及びＮ－Ｍｙｃと二量体化して、これらを、Ｍｙｃ　ＤＮＡ結合共通配列と結合することができない複合体中に隔離する（Ｓｏｕｃｅｋ　ｅｔ　ａｌ．，２００２）。Ｍｙｃ活性が欠失しているために細胞は分裂することができない（Ｏｒｉｃｃｈｉｏ　ｅｔ　ａｌ．，２０１４）。増殖アンタゴニストの別の例は、Ａ－Ｆｏｓ、すなわち、等モル競合でのＤＮＡ結合を阻害する、活性化タンパク質１（ＡＰ１）に対するドミネントネガティブ（癌遺伝子Ｆｏｓ及びＪｕｎのヘテロ二量体）である（Ｏｌｉｖｅ　ｅｔ　ａｌ．，１９９７）。Ａ－Ｆｏｓはまた、ＥＲドメインと融合して、ＴＡＭにより誘導されるその核局在化をもたらす。Ｏｍｏｍｙｃ^{ＥＲ}／タモキシフェン又はＡ－Ｆｏｓ^{ＥＲ}／タモキシフェンは、ＴＫ／ＧＣＶの代わりに用いてＡＬＩＮＫにすることができる。

【００７８】

ＥＡＲＣ遺伝子修飾を有するＣＤＬのターゲティング

一態様では、本開示は、誘導性活性化因子に基づく遺伝子発現系などのＥＡＲＣとＣＤＬとを作動可能に連結することにより、ＣＤＬを外因的に制御するための分子ツール、方法及びキットを提供する。これらの条件下では、ＣＤＬは、誘導性活性化因子に基づく遺伝子発現系の誘導物質の存在下でのみ発現され、その存在下でのみ細胞は分裂することができる。これらの条件下で、ＥＡＲＣ修飾細胞は、誘導物質が存在しなければ、誘導性活性化因子に基づく遺伝子発現系の作用機構及びＣＤＬ機能に応じて分裂を停止するか、大幅に減速するか、又は死滅する。細胞は、同型接合性若しくは化合物異型接合性ＥＡＲＣを含むように修飾してもよく、又はＥＡＲＣ修飾対立遺伝子のみが機能性ＣＤＬを産生することができるように改変してもよい。一実施形態では、例えば、細胞分裂制御のための機構を提供するために、ＥＡＲＣ修飾をＣＤＬの全ての対立遺伝子に導入してもよい。

【００７９】

ＥＡＲＣは、誘導物質の存在下で、ＣＤＬ及び誘導系の活性化因子成分の同時発現を可能にするＣＤＬの任意の位置に挿入してよい。

【００８０】

一実施形態では、「活性化因子」に基づく遺伝子発現系は、「抑制因子」に基づく遺伝子発現系より好ましい。例えば、抑制因子を用いてＣＤＬを抑制する場合、抑制因子の機能突然変異の喪失によってＣＤＬ発現が解除され、これにより細胞増殖が可能になる。細

胞分裂の活性化に基づく抑制の場合、活性化因子機能の喪失（突然変異）によってＣＤＬ発現が停止され、これにより細胞増殖が不可能となる。

【００８１】

以下の実施例２～６にさらに論じるように、誘導物質（例えば、ドキシサイクリン又は「ＤＯＸ」）の存在下で、ｄｏｘ－架橋がＣＤＬ発現を可能にし、これにより細胞分裂及び増殖が可能になるように、ｄｏｘ－架橋を宿主細胞のＣＤＬ（例えば、ＣＤＫ１）に挿入してもよい。ｄｏｘ－架橋ＥＡＲＣで修飾された宿主細胞は、分裂細胞中（例えば、ＣＤＬ中）で活性のプロモータの転写制御下において逆テトラサイクリントランス－アクチベータ（ｒｔＴＡ）遺伝子を含み得る（Ｕｒｌｉｎｇｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，２０００）。この標的挿入により、ＣＤＬプロモータは、ＣＤＬ転写のためにもはや利用可能ではなくなる。ＣＤＬ転写を回復するために、テトラサイクリン応答エレメント促進剤（例えば、ＴＲＥ（Ａｇｈａ－Ｍｏｈａｍｍａｄｉ　ｅｔ　ａｌ．，２００４））をＣＤＬ転写物の前に挿入すれば、これは、ｒｔＴＡが発現され、ドキシサイクリンが存在する状況でのみＣＤＬ遺伝子を発現するであろう。ＣＤＬ発現の唯一の供給源がｄｏｘ－架橋対立遺伝子であるとき、ドキシサイクリンの非存在下でＣＤＬ遺伝子発現は起こらない。ＣＤＬ発現がなければ、ＥＡＲＣ修飾細胞は、細胞死、細胞分裂の停止によるか、又はＥＡＲＣ修飾細胞が腫瘍形成に寄与できないほど細胞有糸分裂速度を遅くすることによるかのいずれかでその増幅が障害される。

【００８２】

本明細書で使用する用語「ｄｏｘ－架橋」は、内在性若しくは外性プロモータによりｒｔＴＡを発現させ（Ｇｏｓｓｅｎ　ｅｔ　ａｌ．，１９９５）、標的領域の転写をＴＲＥの制御下に置くことにより、標的転写領域からプロモータの活性を分離する機構を指す。本明細書で使用する場合、「ｒｔＴＡ」は、テトラサイクリン誘導系の逆テトラサイクリントランスアクチベータエレメントを指し（Ｇｏｓｓｅｎ　ｅｔ　ａｌ．，１９９５）、「ＴＲＥ」は、最小プロモータ上流のＴｅｔＯオペレータ配列から構成されるプロモータを指す。ドキシサイクリンの存在下でＴＲＥプロモータにｒｔＴＡを結合した後、ＴＲＥプロモータ下流の遺伝子座の転写が増大する。標的領域の転写発現の許可又は不許可ステータスがドキシサイクリンにより制御される限り、ｒｔＴＡ配列は、ＣＤＬと同じ転写ユニット又はゲノムの異なる位置に挿入してよい。ｄｏｘ－架橋は、ＥＡＲＣの一例である。

【００８３】

本明細書では、ＣＤＬの５’調節領域へのＥＡＲＣ系の導入も考慮される。

【００８４】

本明細書では、ＥＡＲＣ修飾を生成するために、本明細書に記載するツール又は方法に、別の及び／又は追加の誘導性活性化因子に基づく遺伝子発現系を使用できることが考慮される。

【００８５】

例えば、細胞分裂及び／又は増殖が望ましいとき、コードＣＤＬの作用タンパク質産物と融合した不安定化タンパク質ドメイン（Ｂａｎａｓｚｙｎｓｋｉ　ｅｔ　ａｌ．，２００６）を小分子合成リガンドと一緒に使用して、ＣＤＬ融合タンパク質を安定化することができる。安定化物質が存在しない場合、不安定化ＣＤＬタンパク質は、細胞により分解され、次に、この細胞が増殖を停止することになる。安定化化合物が添加されると、これは、不安定化ＣＤＬタンパク質と結合し、不安定化ＣＤＬタンパク質は分解されないため、細胞は増殖することが可能になる。

【００８６】

例えば、転写活性化因子様エフェクター（ＴＡＬＥ）技術（Ｍａｅｄｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，２０１３）を二量体化物質調節発現誘導（Ｐｏｌｌｏｃｋ　ａｎｄ　Ｃｌａｃｋｓｏｎ，２００２）と組み合わせることができる。ＴＡＬＥ技術を用いて、ＣＤＬのプロモータに代わる最小プロモータと一緒に配置される配列に特異的であるように設計されたＤＮＡ結合ドメインを作製することができる。ＴＡＬＥ　ＤＮＡ結合ドメインも薬剤二量体化

ドメインによって伸長した。後者は、対応する二量体化ドメイン及び転写活性化ドメインを有する別の操作タンパク質に結合することができる（図１Ｃ）。

【００８７】

例えば、図１Ｄを参照すると、逆クメートトランス活性化因子（ｒｃＴＡ）をＣＤＬの５’非翻訳領域に挿入し、これが内在性ＣＤＬプロモータにより発現されるようにしてもよい。クメートオペレータ（Ｃｕｍａｔｅ　Ｏｐｅｒａｔｏｒ）の６回反復（６×ＣｕＯ）をＣＤＬの転写開始（ＡＴＧ）の直前に挿入してもよい。その系にクメートがない場合、ｒｃＴＡは、６×ＣｕＯに結合することができず、６×ＣｕＯが活性でないため、ＣＤＬは転写されない。クメートが添加されると、これはｒｃＴＡと複合体を形成し、６×ＣｕＯとの結合が可能になるため、ＣＤＬの転写が可能になる（Ｍｕｌｌｉｃｋ　ｅｔ　ａｌ．，２００６）。

【００８８】

例えば、図１Ｅを参照すると、レチノイドＸ受容体（ＲＸＲ）と、Ｖｐ１６の活性化ドメインに融合したエクジソン受容体（ＥｃＲ）（ＶｐＥｃＲ）のＮ－末端切断型とをＣＤＬの５’非翻訳領域に挿入して、これらが内在性ＣＤＬプロモータにより同時発現されるようにしてもよい。エクジソン応答性エレメント（ＥｃＲＥ）は、下流の最小プロモータと一緒に、出発コドンの直接上流でＣＤＬに挿入してもよい。同時発現されたＲＸＲとＶｐＥｃＲとは、互いにヘテロ二量体化することができる。エクジソン又は合成薬類似体ムリステロンＡがない場合、二量体化ＲＸＲ／ＶｐＥｃＲはＥｃＲＥと結合することができないため、ＣＤＬは転写されない。エクジソン又はムリステロンＡの存在下では、二量体化ＲＸＲ／ＶｐＥｃＲはＥｃＲＥと結合し、これによりＣＤＬは転写される（Ｎｏ　ｅｔ　ａｌ．，１９９６）。

【００８９】

例えば、図１Ｆを参照すると、一過性受容体ポテンシャルバニロイド１（ｔｒａｎｓｉｅｎｔ　ｒｅｃｅｐｔｏｒ　ｐｏｔｅｎｔｉａｌ　ｖａｎｉｌｌｏｉｄ－１）（ＴＲＰＶ１）をフェリチンと一緒に、ＣＤＬの５’非翻訳領域に挿入して、内在性ＣＤＬプロモータにより同時発現させてもよい。また、ＮＦＡＴ（ＮＦＡＴｒｅ）により誘導可能なプロモータを出発コドンの直接上流でＣＤＬに挿入してもよい。通常の環境では、ＮＦＡＴプロモータは活性ではない。しかし、低周波電波に曝露すると、ＴＲＰＶ１及びフェリチンは、細胞に進入するＣａ$^{++}$の波を形成し、次に、これが細胞質－ＮＦＡＴ（ＮＦＡＴｃ）を核－ＮＦＡＴ（ＮＦＡＴｎ）に変換し、これは、最終的にＮＦＡＴｒｅを活性化してＣＤＬを転写することになる（Ｓｔａｎｌｅｙ　ｅｔ　ａｌ．，２０１５）。

【００９０】

例えば、図１Ｇを参照すると、ＣＤＬは、部分／ドメイン：５’－ＣＤＬ及び３’ＣＤＬに機能的に区分してＦＫＢＰペプチド配列を各ドメインに挿入することができる。ＩＲＥＳ（内部リボソーム進入部位）配列は、２つのドメイン間に配置してよく、これらはＣＤＬプロモータによって同時に転写されるが、２つの個別のタンパク質を産生する。誘導物質がなければ、２つの個別のＣＤＬドメインは機能的に不活性となる。ラパマイシン又はＡＰ２０１８７などの二量体化物質を導入すると、ＦＫＢＰペプチドは二量体化し、５’及び３’ＣＤＬ部分をもたらし、活性タンパク質を再構成する（Ｒｏｌｌｉｎｓ　ｅｔ　ａｌ．，２０００）。

【００９１】

動物細胞の分裂を制御する方法

一態様では、動物細胞の分裂を制御する方法が本明細書において提供される。

【００９２】

本方法は、動物細胞を用意するステップを含む。例えば、動物細胞は、鳥類又は哺乳動物細胞であってよい。例えば、哺乳動物細胞は、多能性（例えば、胚性幹細胞若しくはｉＰＳ細胞）、複能性、単能性前駆、又は最終分化細胞である、単離されたヒト又は非ヒト細胞であってもよい。哺乳動物細胞は、多能性、複能性、単能性前駆、又は最終分化細胞に由来するものであってもよい。哺乳動物細胞は、体幹細胞、複能性、単能性前駆細胞、

複能性体細胞、又は体幹細胞、複能性前駆細胞若しくは体細胞に由来する細胞であってもよい。好ましくは、動物細胞は、遺伝子修飾を受けやすい。好ましくは、動物細胞は、治療価値を有するとユーザによりみなされ、これは、細胞を用いて、治療を必要とする対象の疾患、障害、欠損又は傷害を治療し得ることを意味する。様々な実施形態では、非ヒト哺乳動物細胞は、マウス、ラット、ハムスター、モルモット、ネコ、イヌ、ウシ、ウマ、シカ、エルク、スイギュウ、雄牛、ラクダ、ラマ、ウサギ、ブタ、ヤギ、ヒツジ、又は非ヒト霊長類細胞である。好ましい実施形態では、動物細胞はヒト細胞である。

【００９３】

本方法は、動物細胞において、ＣＤＬを遺伝子修飾するステップをさらに含む。ＣＤＬを遺伝子修飾するステップは、１つ又は複数のＡＬＩＮＫ系又は１つ又は複数のＡＬＩＮＫ系及びＥＡＲＣ系などのｉＮＥＰを宿主動物細胞に導入するステップを含む。陰性選択マーカ系及び誘導性活性化因子に基づく遺伝子発現系などの様々な遺伝子修飾を動物細胞に導入する技術は、当技術分野で公知であり、その修飾の標的（すなわち、非ランダム）化合物異型接合性及び同型接合性導入の技術などがある。ＥＡＲＣ修飾の使用を含む場合、修飾により、機能性ＣＤＬ発現がＥＡＲＣ修飾対立遺伝子を通してのみ生成され得ることを確実にすべきである。例えば、１つ又は複数のＡＬＩＮＫのみを含むか、これらを若しくは１つ又は複数のＥＡＲＣ系と一緒に含むＤＮＡベクターによるＣＤＬ又はＣＤＬの標的置換を実施して、宿主動物細胞を遺伝子修飾してもよい。

【００９４】

本方法は、ｉＮＥＰ系を含む遺伝子修飾動物細胞の分裂を可能にするステップもさらに含む。

【００９５】

例えば、ＡＬＩＮＫ系を含む遺伝子修飾動物細胞を、対応するＡＬＩＮＫ陰性選択マーカの誘導物質の非存在下で維持することにより、ＡＬＩＮＫ修飾細胞の分裂を可能にすることである。細胞分裂及び増殖は、ｉｎ　ｖｉｔｒｏ及び／又はｉｎ　ｖｉｖｏで実施することができる。例えば、遺伝子修飾細胞は、治療用途のために十分大きい細胞集団が形成されるまでｉｎ　ｖｉｔｒｏで増殖及び拡大させることができる。例えば、増殖及び拡大させた遺伝子修飾動物細胞の１つ又は複数を宿主に導入し（例えば、移植により）、ｉｎ　ｖｉｖｏでさらに増殖させることもできる。様々な実施形態では、ＡＬＩＮＫ系を含む遺伝子修飾動物細胞のアブレート及び／又は阻害は、ＡＬＩＮＫ系を含む遺伝子修飾動物細胞を、対応する陰性選択マーカの誘導物質に曝露することにより、ｉｎ　ｖｉｔｒｏ及び／又はｉｎ　ｖｉｖｏで実施することができる。このような曝露は、増殖細胞の少なくとも一部を殺傷することにより、増殖細胞をアブレートし、及び／又は遺伝子修飾動物細胞の増殖速度を阻害することになる。遺伝子修飾細胞のアブレーション及び／又は遺伝子修飾動物細胞の細胞増殖の阻害は、例えば、細胞がｉｎ　ｖｉｔｒｏ又はｉｎ　ｖｉｖｏで正常より速い速度で分裂を開始し、それが腫瘍形成及び／又は不要な細胞増殖を招き得る場合に望ましいであろう。

【００９６】

例えば、ＥＡＲＣ系を含む遺伝子修飾動物細胞を、誘導性活性化因子に基づく遺伝子発現系の誘導物質の存在下で維持することにより、ＥＡＲＣ修飾細胞の分裂を可能にすることである。細胞分裂及び増殖は、ｉｎ　ｖｉｔｒｏ及び／又はｉｎ　ｖｉｖｏで実施することができる。例えば、遺伝子修飾細胞は、治療用途のために十分大きい細胞集団が形成されるまでｉｎ　ｖｉｔｒｏで増殖及び拡大させることができる。例えば、増殖及び拡大させた遺伝子修飾動物細胞の１つ又は複数を宿主に導入し（例えば、移植により）、ｉｎ　ｖｉｖｏでさらに増殖させることもできる。様々な実施形態では、ＥＡＲＣ系を含む遺伝子修飾動物細胞のアブレート及び／又は阻害は、ＥＡＲＣ系を含む遺伝子修飾動物細胞を、誘導性活性化因子に基づく遺伝子発現系の誘導物質への曝露を阻止若しくは阻害することにより、ｉｎ　ｖｉｔｒｏ及び／又はｉｎ　ｖｉｖｏで実施することができる。誘導物質が存在しなければ、腫瘍形成に寄与するには速度が遅すぎる増殖により、増殖細胞をアブレートし、及び／又は遺伝子修飾動物細胞の拡大を阻害し得る。遺伝子修飾動物細胞

のアブレーション及び／又は細胞増殖の阻害は、例えば、細胞がｉｎ　ｖｉｔｒｏ又はｉｎ　ｖｉｖｏで正常より速い速度で分裂を開始し、それが腫瘍形成及び／又は不要な細胞増殖を招き得る場合に望ましいであろう。

【００９７】

例えば、以下の様々な実施例に記載する、本明細書で提供する方法の様々な実施形態では、誘導物質はドキシサイクリン及びガンシクロビルである。

【００９８】

一実施形態では、ドキシサイクリンは、例えば、増殖培地中約１μｇ／ｍｌの最終濃度まで、H_2Oに溶解させた約１ｍｇ／ｍｌのＤｏｘなどの誘導物質の濃縮溶液を細胞増殖培地に添加することにより、細胞にｉｎ　ｖｉｔｒｏで送達することができる。ｉｎ　ｖｉｖｏでドキシサイクリンを対象に経口投与してもよく、例えば、飲料水（例えば、約５～１０ｍｇ／ｋｇの用量で）若しくは食品（例えば、約１００ｍｇ／ｋｇの用量で）、注射（例えば、約５０ｍｇ／ｋｇの用量でのＩ．Ｖ．若しくはＩ．Ｐ．）により、又は錠剤（例えば、約１～４ｍｇ／ｋｇの用量で）により投与することができる。

【００９９】

一実施形態では、ガンシクロビルは、例えば、増殖培地中約０．２５～２５μｇ／ｍｌの最終濃度まで、H_2Oに溶解させた約１０ｍｇ／ｍｌのＧＣＶなどの誘導物質の濃縮溶液を細胞増殖培地に添加することにより、細胞にｉｎ　ｖｉｔｒｏで送達することができる。ｉｎ　ｖｉｖｏでＧＣＶを対象に経口投与してもよく、例えば、飲料水（例えば、約４～２０ｍｇ／ｋｇの用量で）若しくは食品（例えば、約４～２０ｍｇ／ｋｇの用量で）、注射（例えば、約Ｉ．Ｖ．若しくはＩ．Ｐ．５０ｍｇ／ｋｇの用量で）により、又は錠剤（例えば、約４～２０ｍｇ／ｋｇの用量で）により投与することができる。

【０１００】

一実施形態では、誘導物質がｉｎ　ｖｉｔｒｏで作用しているかどうかを評価するために、例えば、治療開始後２４時間毎に細胞増殖及び細胞死を測定してもよい（例えば、細胞計数及び生存能アッセイにより）。誘導物質がｉｎ　ｖｉｖｏで作用しているかどうかを評価するために、遺伝子修飾多能性細胞から産生された奇形腫のサイズを例えば治療開始後１～２日毎に測定することができる。

【０１０１】

本明細書において提供される方法の特に好ましい実施形態では、動物細胞は、ＡＬＩＮＫ及びＥＡＲＣ系の両方を含むように遺伝子修飾してもよい。ＡＬＩＮＫ及びＥＡＲＣ系は、同じ又は異なるＣＤＬをターゲティングし得る。こうした細胞は、例えば、増殖細胞の少なくとも一部を殺傷することにより、細胞分裂をアブレート及び／若しくは阻害し、且つ／又は増殖をアブレート及び／若しくは阻害する少なくとも２つの機構をユーザに提供することから、特定の用途について望ましいであろう。

【０１０２】

本明細書では、本明細書において提供される方法を用いて、鳥類細胞、例えば、ニワトリ細胞の分裂及び／又は増殖を制御し得ることが考慮される。

【０１０３】

細胞分裂を制御するための少なくとも１つの機構を含むように操作された細胞

一態様では、細胞分裂及び／又は増殖並びにその集団を制御するための少なくとも１つの機構を含むように遺伝子修飾された動物細胞が本明細書において提供される。例えば、哺乳動物細胞は、多能性（例えば、胚性肝細胞若しくはｉＰＳ細胞）、複能性、単能性前駆、又は最終分化細胞である、単離されたヒト又は非ヒト細胞であってもよい。哺乳動物細胞は、多能性、複能性、単能性前駆、又は最終分化細胞に由来するものであってもよい。哺乳動物細胞は、体幹細胞、複能性、単能性前駆、前駆細胞若しくは体細胞、又は体幹細胞、複能性若しくは単能性前駆細胞又は体細胞に由来する細胞であってもよい。好ましくは、動物細胞は、遺伝子修飾を受けやすい。好ましくは、動物細胞は、治療価値を有するとユーザによりみなされ、これは、細胞を用いて、治療を必要とする対象の疾患、障害、欠損又は傷害を治療し得ることを意味する。一部の実施形態では、非ヒト哺乳動物細胞

は、マウス、ラット、ハムスター、モルモット、ネコ、イヌ、ウシ、ウマ、シカ、エルク、スイギュウ、雄牛、ラクダ、ラマ、ウサギ、ブタ、ヤギ、ヒツジ、又は非ヒト霊長類細胞である。

【０１０４】

本明細書において提供される遺伝子修飾細胞は、１つ又は複数のＣＤＬの１つ又は複数の遺伝子修飾を含む。ＣＤＬの遺伝子修飾はＡＬＩＮＫ系であり、複数のＣＤＬの場合、ＡＬＩＮＫ系及びＥＡＲＣ系の１つ又は複数、例えば、本明細書に記載のＡＬＩＮＫ系及び／又はＥＡＲＣ系の１つ又は複数である。例えば、本明細書において提供される遺伝子修飾動物細胞は、１つ又は複数のＣＤＬに１つのＡＬＩＮＫ系；１つ又は複数のＣＤＬに１つのＥＡＲＣ系；又は１つ又は複数のＣＤＬにＡＬＩＮＫ及びＥＡＲＣ系を含んでよく、ここで、ＡＬＩＮＫ及びＥＡＲＣ系は、同じ若しくは異なるＣＤＬに対応する。遺伝子修飾細胞は、同型接合性、異型接合性、半接合性又は化合物異型接合性ＡＬＩＮＫ遺伝子修飾を含み得る。ＥＡＲＣ修飾の場合、修飾により、機能性ＣＤＬ発現がＥＡＲＣ修飾対立遺伝子を通してのみ生成され得ることを確実にすべきである。

【０１０５】

本明細書で提供される遺伝子修飾細胞は、疾患、障害若しくは傷害の治療を目的とする細胞療法並びに／又は化合物及び／若しくは組成物（例えば、天然若しくは設計生物製剤）の制御細胞送達を含む細胞療法に有用となり得る。前述したように、患者の安全は、特に、治療細胞移植片から生じる悪性増殖の可能性に関して、細胞療法における懸念事項である。治療細胞移植片の強度の増殖を必要としない細胞療法の場合、本明細書に記載するように、１つ又は複数のｉＮＥＰ修飾を含む遺伝子修飾細胞が治療及び安全ニーズに取り組む上で好適であると考えられる。治療細胞移植片の強度の増殖を必要とする細胞療法の場合、本明細書に記載するように、２つ以上のｉＮＥＰ修飾を含む遺伝子修飾細胞が治療及び安全ニーズに取り組む上で好適であると考えられる。

【０１０６】

本明細書では、ニワトリ細胞などの鳥類細胞を用意してもよく、ここで、鳥類細胞は前述の遺伝子修飾を含むことが考えられる。

【０１０７】

ＣＤＬをターゲティングする分子ツール

一態様では、ＣＤＬの発現を修飾するための様々なＤＮＡベクターが本明細書において提供される。

【０１０８】

一実施形態では、ＤＮＡベクターはＡＬＩＮＫ系を含み、このＡＬＩＮＫ系は、陰性選択マーカをコードするＤＮＡ配列を含む。陰性選択マーカの発現はＣＤＬの発現と関連している。

【０１０９】

一実施形態では、ＤＮＡベクターはＥＡＲＣ系を含み、ＥＡＲＣ系は、ＣＤＬに作動可能に連結した誘導性活性化因子に基づく遺伝子発現系を含み、ここで、ＣＤＬの発現は、誘導性活性化因子に基づく遺伝子発現系によって誘導可能である。

【０１１０】

一実施形態では、ＤＮＡベクターは、本明細書に記載する通りのＡＬＩＮＫ系と、本明細書に記載する通りのＥＡＲＣ系とを含む。このようなカセットを宿主細胞に挿入すると、ＣＤＬ転写産物の発現がＡＬＩＮＫ系の陰性選択マーカの誘導物質により阻止及び／又は阻害され、また、ＣＤＬの発現は、ＥＡＲＣ系の誘導性活性化因子に基づく遺伝子発現系により誘導可能である。

【０１１１】

様々な実施形態では、ＤＮＡベクター中のＣＤＬは、表２に列挙されるＣＤＬである。

【０１１２】

様々な実施形態では、ＤＮＡベクター中のＡＬＩＮＫ系は、単純ヘルペスウイルス－チミジンキナーゼ／ガンシクロビル系、シトシンデアミナーゼ／５－フルオロシトシン系、

カルボキシルエステラーゼ／イリノテカン系又はｉＣａｓｐ９／ＡＰ１９０３系である。
【０１１３】
様々な実施形態では、ＤＮＡベクター中のＥＡＲＣ系は、ｄｏｘ－架橋系、クメートスイッチ誘導系、エクジソン誘導系、電波誘導系、又はリガンド－可逆的二量体化系である。
【０１１４】
キット
本開示は、本明細書に開示する方法を実施するためのキットを考慮する。このようなキットは、典型的に、ＣＤＬ及び／又はＣＤＬを用いて、細胞増殖を制御するのに必要な２つ以上の構成要素を含む。キットの構成要素は、限定はしないが、１つ又は複数の化合物、試薬、容器、装置、並びにキットの使用指示書を含む。従って、本明細書に記載する方法は、本明細書において提供されるプレパッケージキットを使用することにより実施することができる。一実施形態では、キットは、１つ又は複数のＤＮＡベクター及び指示書を含む。一部の実施形態では、指示書は、１つ又は複数のＤＮＡベクターを宿主細胞に導入するための１つ又は複数のプロトコルを含む。一部の実施形態では、キットは、１つ又は複数の対照を含む。
【０１１５】
一実施形態では、キットは、本明細書に記載するように、ＣＤＬの発現を修飾する１つ又は複数のＤＮＡベクターを含む。例として、キットは、ＡＬＩＮＫ系を含むＤＮＡベクター；ＥＡＲＣ系を含むＤＮＡベクター；及び／又はＡＬＩＮＫ系及びＥＡＲＣ系を含むＤＮＡベクター；並びに１つ又は複数のＤＮＡベクターを用いた動物細胞中のＣＤＬ及び／又はＣＤＬの標的置換のための指示書を含み得る。好ましい実施形態では、キットは、キットのＤＮＡベクターに提供されるＡＬＩＮＫ及び／又はＥＡＲＣ系に対応する１つ又は複数の誘導物質（例えば、誘導薬）をさらに含んでもよい。
【実施例】
【０１１６】
本開示を例証する非限定的実施例を以下に記載する。
【０１１７】
実施例１：ＡＬＩＮＫ修飾細胞（マウス及びヒト）の作製
実施例１では、Ｃｄｋ１／ＣＤＫ１をターゲティングするＡＬＩＮＫ（ＨＳＶ－ＴＫ）ベクターの構築、並びに増殖細胞の少なくとも一部を殺傷することにより、マウス及びヒトＥＳ細胞における細胞増殖を制御するためのそのベクターの使用を記載する。この実施例では、Ｃｄｋ１／ＣＤＫ１はＣＤＬであり、ＨＳＶ－ＴＫは陰性選択マーカである。
【０１１８】
Ｃｄｋ１／ＣＤＫ１は、全ての有糸分裂活性（すなわち、分裂細胞）に発現させる。ＣＤＫ１遺伝子座とＨＳＶ－ＴＫとの間に同型接合性ＡＬＩＮＫを含むように修飾された細胞では、全ての有糸分裂活性細胞がＣＤＫ１及びＨＳＶ－ＴＫを発現する。従って、ＡＬＩＮＫ修飾された有糸分裂活性細胞は、ＧＣＶ（ＨＳＶ－ＴＫのプロドラッグ）での処置により排除することができる。対立遺伝子を発現する全ての機能性ＣＤＫ１がＡＬＩＮＫ修飾されて、細胞がＨＳＶ－ＴＫ発現をサイレンシングする場合、同様に、ＣＤＫ１発現もサイレンシングされて、細胞はもはや分裂することはできなくなるであろう。静止（すなわち、非分裂）細胞は、Ｃｄｋ１／ＣＤＫ１を発現しない。従って、ＡＬＩＮＫ修飾された静止細胞は、Ｃｄｋ１／ＣＤＫ１－ＨＳＶ－ＴＫリンクを発現しないであろう。
【０１１９】
実施例１では、相同組換えに基づくノックインによってＣｄｋ１／ＣＤＫ１及びＨＳＶ－ＴＫ間の転写リンクを達成した。
【０１２０】
方法
標的ベクターの作製
マウス標的ベクター１：

マウスＣｄｋ１ゲノム遺伝子座を図２Ａに示す。図２Ｂを参照すると、ｐＵＣ５７ベクター（ＧｅｎＳｃｒｉｐｔ）での遺伝子合成により、２つのＤＮＡ断片：５ＴＫ（配列番号１）及び３ＴＫ（配列番号２）（ＳａｌＩ－Ｆ２Ａ－５’ＴＫ．００７－ＰＢ　５’ＬＴＲ－ＮｏｔＩ－ＳａｃＩＩ及びＳａｌＩ－ＳａｃＩＩ－３’ＴＫ．００７－ＰＢ　３’ＬＴＲ－３’ＴＫ．００７－Ｔ２Ａ－ＸｈｏＩ－ｍＣｈｅｒｒｙ－ＮｈｅＩ）を取得した。断片５ＴＫをＳａＩＩ＋ＳａｃＩＩで消化し、同じ消化で３ＴＫにクローニングしてｐＵＣ５７－５ＴＫ－３ＴＫを作製した。プラスミドｐＢｌｕｅｓｃｒｉｐｔ－Ｍ２１４（配列番号３）をＮｏｔＩ＋ＨｉｎｄＩＩＩで切断することにより、ＰＧＫ－ネオマイシンカセットを取得し、これをｐＵＣ５７－５ＴＫ－３ＴＫのＮｏｔＩ＋ＳａｃＩＩ部位に連結して、Ｃｄｋ１（すなわち、ＣＤＬ）の３’末端に挿入するためのＡＬＩＮＫカセットを作製した。

【０１２１】

ＣＤＬの３’への挿入ＡＬＩＮＫに対する相同性アーム：

Ｔｈｅ　Ｃｅｎｔｅｒ　ｆｏｒ　Ａｐｐｌｉｅｄ　Ｇｅｎｏｍｉｃｓ（ＴＣＡＧ）から購入したＣｄｋ１のゲノム配列（配列番号４）で、細菌人工染色体（ＢＡＣ）を含有するＤＨ１０Ｂ大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）細胞株を組み換えることにより、Ｃｄｋ１ＤＮＡコード配列をクローニングした。組換えプロセスは、プラスミドｐＳＣ１０１－ＢＡＤ－γβα　Ｒｅｄ／ＥＴ（ｐＲＥＴ）（ＧｅｎｅＢｒｉｄｇｅｓ，Ｈｅｉｄｅｌｂｅｒｇ　Ｇｅｒｍａｎｙ）により媒介した。初めに、ｐＲＥＴをＢＡＣ含有ＤＨ１０Ｂ大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）に１．８ｋＶ、２５μＦ、４００オームでエレクトロポレーションした（ＢｉｏＲａｄ　ＧｅｎｅＰｕｌｓｅｒＩ／ＩＩ　ｓｙｓｔｅｍ，ＢｉｏＲａｄ，ＯＮ，ＣＡ）後、クロラムフェニコール及びテトラサイクリン耐性について選択した。ＡＬＩＮＫ挿入点（Ｃｄｋ１終止コドンの５’及び３’）にわたる短い相同性アーム（５０ｂｐ）（それぞれ配列番号５及び６）をＰＣＲにより、カセット、Ｆ２Ａ－５’ＴＫ－ＰＢ－ＰＧＫｎｅｏ－ＰＢ－３’ＴＫ－Ｔ２Ａ－ｃｈｅｒｒｙに付加した。このＰＣＲ産物を前述の条件下でＢａｃ＋ｐＲＥＴＤＨ１０Ｂ大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）にエレクトロポレーションした後、カナマイシン耐性について選択した。７５５ｂｐ及び８４２塩基対（ｂｐ）相同性アーム（それぞれ配列番号７及び８）から構成される最終ターゲティングカセットを、プライマー（それぞれ配列番号９及び１０）を含むＰＣＲにより回収してｐＧｅｍＴ－Ｅａｓｙベクターにクローニングすることにより、マウス標的ベクターＩを作製した。ベクターの重要な結合領域をＴＣＡＧで配列決定し、確認した。

【０１２２】

マウス標的ベクターＩＩ：

図２Ｄを参照すると、Ｆ２Ａ－ｌｏｘＰ－ＰＧＫ－ｎｅｏ－ｐＡ－ｌｏｘＰ－ＡｓｃＩ（配列番号１１）をｐＬｏｘＰＮｅｏ１ベクターからＰＣＲ増幅した後、ＴＡをｐＤｒｉｖｅベクター（Ｑｉａｇｅｎ）にクローニングした。ＡｓｃＩ－ＴＫ－Ｔ２Ａ－ｍＣｈｅｒｒｙ－ＥｃｏＲＩ（配列番号１２）を、切除したＴＣ対立遺伝子ＩからＰＣＲ増幅した後、ＴＡをｐＤｒｉｖｅベクターにクローニングした。次に、後者の断片をＢａｍＨＩ＋ＡｓｃＩ制限部位により前者のベクターにクローニングした。このＦ２Ａ－ｌｏｘＰ－ＰＧＫ－ｎｅｏ－ｐＡ－ｌｏｘＰ－ＴＫ－Ｔ２Ａ－ｍＣｈｅｒｒｙカセットを、ＧｅｎｅＡｒｔ（登録商標）Ｓｅａｍｌｅｓｓ　Ｃｌｏｎｉｎｇ　ａｎｄ　Ａｓｓｅｍｂｌｙ　Ｋｉｔ（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）によってマウスＣｄｋ１相同性アーム間に挿入した。プルマイシン（ｐｕｒｏ）バージョンベクターを作製するために、ＰＧＫ－ｐｕｒｏ－ｐＡ断片（配列番号１３）をＢａｍＨＩ＋ＮｏｔＩでｐＮｅｗＤｏｃｋＺから切断し、Ｔ４平滑化した。ネオバージョンベクターをＡｓｃＩ＋ＣｌａＩで切断し、Ｔ４平滑化した後、ＰＧＫ－ｐｕｒｏ－ｐＡと連結した。

【０１２３】

ヒト標的ベクターＩ：

マウス標的ベクターＩと同様に、ヒトＣＤＫ１終止コドン（配列番号１４）の上流８４７ｂｐ＋Ｆ２Ａ－５’ＴＫ－ＰＢ－ＰＧＫｎｅｏ－ＰＢ－３’ＴＫ－Ｔ２Ａ－ｃｈｅｒｒ

ｙ（配列番号１５）＋ヒトＣＤＫ１終止コドン（配列番号１６）の下流８３１ｂｐを組換え技術により作製した。選択のためのプロマイシン耐性カセットを含むベクターの別のバージョンを作製して、同型接合性ターゲティングの一度での生成を促進した。ＡｇｅＩ－ＰＧＫ－ｐｕｒｏ－ｐＡ－ＦｓｅＩ（配列番号１７）をｐＮｅｗＤｏｃｋＺベクターから増幅し、消化して、ＡｇｅＩ＋ＦｓｅＩにより切断されたネオバージョンベクターにクローニングした。

【０１２４】

ヒト標的ベクターＩＩ：

ＢａｍＨＩ－Ｆ２Ａ－ｌｏｘＰ－ＰＧＫ－ｎｅｏ－ｐＡ－ｌｏｘＰ－ＴＫ－Ｔ２Ａ－ｍＣｈｅｒｒｙ（配列番号１８）及びＢａｍＨＩ－Ｆ２Ａ－ｌｏｘＰ－ＰＧＫ－ｐｕｒｏ－ｐＡ－ｌｏｘＰ－ＴＫ－Ｔ２Ａ－ｍＣｈｅｒｒｙ（配列番号１９）を対応するマウス標的ベクターＩＩから増幅した後、ＢａｍＨＩ＋ＳｇｒＡＩで消化した。ｍＣｈｅｒｒｙ（３’３０ｂｐ）－ｈＣＤＫ１３’ＨＡ－ｐＧｅｍＥａｓｙ－ｈＣＤＫ１５’ＨＡ－ＢａｍＨＩ（配列番号２０）をＰＣＲ増幅し、これもＢａｍＨＩ＋ＳｇｒＡＩで消化した。ヒト標的ベクターＩＩのネオ及びプロマイシンバージョンを、相同性アームバックボーンとネオ又はプロマイシンバージョンＡＬＩＮＫカセットとの連結によって作製した。

【０１２５】

ヒト標的ベクターＩＩＩ：

ＦＡＣＳにより、また選択カセットの切除ステップは回避して、蛍光マーカ（ｍＣｈｅｒｒｙ又はｅＧＦＰ）でターゲティングするために、選択カセットを含まない標的ベクターを作製した。ＢａｍＨＩ－Ｆ２Ａ－ＴＫ－Ｔ２Ａ－ｍＣｈｅｒｒｙ－ＳｇｒＡＩ（配列番号５８）を、切除したＴＣ対立遺伝子ＩからＰＣＲ増幅し、ＢａｍＨＩ＋ＳｇｒＡＩで消化し、消化されたｍＣｈｅｒｒｙ（３’３０ｂｐ）－ｈＣＤＫ１３’ＨＡ－ｐＧｅｍＥａｓｙ－ｈＣＤＫ１５’ＨＡ－ＢａｍＨＩ（配列番号２０）で連結した。部位指定ＰＣＲ突然変異誘発プロトコルを用いて、標的ベクター内のＣＲＩＳＰＲ　ＰＡＭ部位をプライマーＰＡＭ＿ｆｗｄ（配列番号５９）及びＰＡＭ＿ｒｅｖ（配列番号６０）で突然変異させた。ＮＥＢｕｉｌｅｒ　ＨｉＦｉ　ＤＮＡ　Ａｓｓｅｍｂｌｙ　Ｃｌｏｎｉｎｇ　Ｋｉｔ（Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　Ｂｉｏｌａｂｓ　Ｉｎｃ．）を用いて、ＰＣＲ増幅ＸｈｏＩ－ＧＦＰ（配列番号６１）及びｐＧｅｍＴ－ｈＣｄｋ１－ＴＫ－ＰＡＭｍｕｔ（配列番号６２）の融合により、ＧＦＰバージョンベクターを作製した。

【０１２６】

ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９プラスミドの作製

高度のターゲティング効率を達成するためにＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９支援遺伝子ターゲティングを使用した（Ｃｏｎｇ　ｅｔ　ａｌ．，２０１３）。オンラインＣＲＩＳＰＲ設計ツール（ｈｔｔｐ：／／ｃｒｉｓｐｒ．ｍｉｔ．ｅｄｕ）（Ｈｓｕ　ｅｔ　ａｌ．，２０１３）を用いて、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９のガイド配列を分析した。

【０１２７】

配列番号２３においてマウスＣｄｋ１をターゲティングするためにＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９プラスミドｐＸ３３５－ｍＣｄｋＴＫ－Ａ（配列番号２１）及びｐＸ３３５－ｍＣｄｋＴＫ－Ｂ（配列番号２２）を設計した。

【０１２８】

配列番号２６においてヒトＣｄｋ１をターゲティングするためにＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９プラスミドｐＸ３３０－ｈＣｄｋＴＫ－Ａ（配列番号２４）及びｐＸ４５９－ｈＣｄｋＴＫ－Ａ（配列番号２５）を設計した。

【０１２９】

Ａｄｄｇｅｎｅから購入したバックボーンプラスミドを用い、提案されたプロトコルに従ってＣＲＩＳＰＲを作製した（Ｒａｎ　ｅｔ　ａｌ．，２０１３）。

【０１３０】

ＡＬＩＮＫ修飾マウスＥＳ細胞の作製

マウスＥＳ細胞培養：

１５％ウシ胎児血清（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）、１ｍＭピルビン酸ナトリウム（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）、０．１ｍＭ ＭＥＭ非必須アミノ酸（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）、２ｍＭ ＧｌｕｒａＭＡＸ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）、０．１ｍＭ ２－ｍＥＡＲＣａｐｒｏｅｔａｎｏ－ｌ（Ｓｉｇｍａ）、各々５０Ｕ／ｍｌのペニシリン／ストレプトマイシン（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）及び１０００Ｕ／ｍｌの白血病阻害因子（ＬＩＦ）（Ｃｈｅｍｉｃｏｎ）を添加したダルベッコ改変イーグルス培地（ＤＭＥＭ）（高グロース、４５００ｍｇ／リットル）（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）中でマウスＥＳ細胞を培養する。マウスＥＳ細胞を０．２５％トリプシン及び０．１％ＥＤＴＡで継代させた。

【０１３１】

ターゲティング：

５×１０^{5}個のマウスＣ５７ＢＬ／６ Ｃ２ＥＳ細胞（Ｇｅｒｔｓｅｎｓｔｅｉｎ ｅｔ ａｌ．，２０１０）をＪｅｔＰｒｉｍｅトランスフェクション（Ｐｏｌｙｐｌｕｓ）により、２ｕｇのＤＮＡ（標的ベクター：０．５μｇ、ＣＲＩＳＰＲベクター：１．５μｇ）でトランスフェクトした。トランスフェクションから４８時間後、細胞をＧ４１８及び／又はプロマイシン耐性について選択した。独立に耐性クローンを採取し、９６ウェルプレートに移した。凍結及び遺伝子型決定（配列番号２７、２８、２９及び３０）のために９６ウェルプレートを複製した。ＰＣＲ陽性クローンを拡大し、複数のバイアルに凍結し、サザンブロッティングにより遺伝子型決定した。

【０１３２】

選択カセットの切除：

正しくターゲティングしたＥＳクローンをＥｐｉｓｏｍａｌ－ｈｙＰＢａｓｅ（標的ベクターＩ用）（配列番号３４）又はｐＣＡＧＧｓ－ＮＬＳ－Ｃｒｅ－Ｉｒｅｓ－Ｐｕｒｏｍｙｃｉｎ（標的ベクターＩＩ用）（配列番号３５）でトランスフェクトした。トランスフェクションから２～３日後、細胞をトリプシン処理した後、クローン性に平板培養した（１０ｃｍプレート当たり１０００～２０００細胞）。ｍＣｈｅｒｒｙ陽性クローンを採取し、独立して９６ウェルプレートに移した後、ＰＣＲにより遺伝子型決定し（配列番号３１及び３６）、サザンブロットにより切除イベントを確認した。除去領域の結合をＰＣＲ増幅し、配列決定して、インタクトで、しかもフレームシフトのないシームレスであることを確認した。

【０１３３】

同型接合性ターゲティング：

ネオバージョン標的ベクターで既に正しくターゲティングされ、選択カセットから切除されたＥＳクローンを標的ベクターのプロマイシン耐性バージョンで再度トランスフェクトした。トランスフェクションから４８時間後、プロマイシンの選択を追加し、次に、前述した通りにコロニーを採取し、分析した（配列番号３１及び３２）。独立のプロ（ｐｕｒｏ）－耐性クローンをゼラチン上に増殖させ、ＰＣＲのためにＤＮＡを抽出して、野生型対立遺伝子バンド（配列番号３１、３３）が存在しないことを確認した。

【０１３４】

ＡＬＩＮＫ修飾ヒトＥＳ細胞の作製

ヒトＥＳ細胞培養：

ヒトＣＡ１又はＨ１（Ａｄｅｗｕｍｉ ｅｔ ａｌ．，２００７）ＥＳ細胞を、Ｇｅｌｔｒｅｘ（Ｌｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）フィーダフリー条件でペニシリン－ストレプトマイシン（Ｌｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ製Ｇｉｂｃｏ）を含むｍＴｅＳＲ１培地（ＳＴＥＭＣＥＬＬ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）で培養した。ＴｒｙｐｌＥ Ｅｘｐｒｅｓｓ（Ｌｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）又は Ａｃｃｕｔａｓｅ（ＳＴＥＭＣＥＬＬ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）により細胞を継代させ、最初の２４時間にわたり、ＲＯＣＫ阻害物質（ＳＴＥＭＣＥＬＬ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）を含むｍＴｅＳＲ培地上で平板培養した後、ｍＴｅＳＲ培地に変えた。完全に密集状態の６ウェルプレートからの細胞の半分を１ｍｌの９０％ＦＢＳ（Ｌｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）＋１０％ＤＭＳＯ（Ｓｉｇｍａ）中で凍結させた。

【０１３５】
ターゲティング：
６×１０^{6}個のＣＡ１ｈＥＳ細胞を２４ｕｇのＤＮＡ（標的ベクター：ｐＸ３３０－ｈＣｄｋＴＫ－Ａ＝１８ｕｇ：６ｕｇ）でＮｅｏｎプロトコル１４によりトランスフェクトした。トランスフェクション後、細胞を４つの１０ｃｍプレート上で平板培養した。トランスフェクションから４８時間後、Ｇ４１８及び／又はプロマイシン選択を開始し、独立したコロニーを採取して９６ウェルプレートに移した。さらなる増殖及び遺伝子型決定（配列番号３７、３８、３９及び４０）のために各プレートを２つずつ作製した。ＰＣＲ陽性クローンを拡大し、複数のバイアルに凍結してサザンブロッティングにより遺伝子型決定した。
【０１３６】
選択カセットの除去：
ＡＬＩＮＫ標的ＥＳクローンをｈｙＰＢａｓｅ又はｐＣＡＧＧｓ－ＮＬＳ－Ｃｒｅ－ＩＲＥＳ－プロマイシンでトランスフェクトした後、６ウェルプレートで平板培養した。細胞が６ウェルプレート中で密集に達したら、細胞をハンクス平衡塩溶液（ＨＢＳＳ）（Ｃａ２＋／Ｍｇ２＋Ｆｒｅｅ）（２５ ｍＭ ＨＥＰＥＳ ｐＨ７．０、１％ウシ胎児血清）中に懸濁させ、ＡＳＴＲＩＯＳ ＥＱセルソータ（Ｂｅｃｋｍａｎ Ｃｏｕｌｔｅｒ）を用いて、ｍＣｈｅｒｒｙ陽性細胞を選別して９６ウェルプレートに移した。
【０１３７】
同型接合性ターゲティング：
同型接合性ターゲティングは、マウス系と同じ方法、又はｍＣｈｅｒｒｙ及びｅＧＦＰヒト標的ベクターＩＩＩ及びｐＸ３３０－ｈＣｄｋＴＫ－Ａ若しくはｐＸ４５９－ｈＣｄｋＴＫ－Ａをトランスフェクトした後、ｍＣｈｅｒｒｙ及びｅＧＦＰ二重陽性細胞のＦＡＣＳソーティングを実施することによって達成することができる。
【０１３８】
奇形腫アッセイ
Ｍａｔｒｉｇｅｌ Ｍａｔｒｉｘ Ｈｉｇｈ Ｃｏｎｃｅｎｔｒａｔｉｏｎ（Ｃｏｒｎｉｎｇ）を氷上の低温ＤＭＥＭ培地で１：３希釈した。５～１０×１０^{6}個の細胞を１００ｕｌの６６％ＤＭＥＭ＋３３％Ｍａｔｒｉｇｅｌ培地に懸濁させた後、Ｂ６Ｎマウス（マウスＣ２ＥＳ細胞の場合）及びＮＯＤ－ＳＣＩＤマウス（ヒトＥＳ細胞の場合）の片方若しくは両方の脇腹に皮下注射した。注射の２～４週間後、奇形腫が形成した。奇形腫のサイズをカリパスで測定し、奇形腫体積は、式Ｖ＝（Ｌ×Ｗ×Ｈ）π／６を用いて算出した。様々な処置時間で、腹腔内への５０ｍｇ／ｋｇの毎日の注射により、ＧＣＶ／ＰＢＳ処置を実施した。処置の終了時にマウスを犠牲にして、腫瘍を切除し、組織学分析のために４％パラホルムアルデヒド中で固定化した。
【０１３９】
乳腺腫瘍アッセイ
Ｃｄｋ１$^{+/+,+/loxp-alink}$マウスＣ２ ＥＳ及びＣＤ－１バックグラウンドのキメラを二倍体凝集によって作製した後、Ｂ６Ｎ ＷＴマウスと交配させ、生殖細胞系伝達によりＣｄｋ１$^{+/+,+/loxp-alink}$マウスを作製した。Ｃｄｋ１$^{+/+,+/loxp-alink}$マウスをＥｌｌａ－Ｃｒｅマウスと交配させてＣｄｋ１$^{+/+,+/alink}$マウスを作製した。次に、Ｃｄｋ１$^{+/+,+/alink}$マウスをＭＭＴＶ－ＰｙＭＴマウス（Ｇｕｙ ｅｔ ａｌ．，１９９２）と交配させて、乳腺腫瘍とＡＬＩＮＫ修飾とを有する二重陽性子ネズミを取得した。フェイルセーフ修飾を有する乳腺腫瘍を単離し、１ｍｍ^{3}の切片に切断し、野生型Ｂ６Ｎ雌の第４乳腺に移植した。ＧＣＶ／ＰＢＳ処置剤を腹腔内に１日おきに５０ｍｇ／ｋｇの用量で様々な処置時間を用いて注射した。乳腺腫瘍サイズをカリパスで測定して、式Ｖ＝長さ×幅×高さ×π／６を用いて計算した。
【０１４０】
神経前駆細胞対ニューロン傷害アッセイ

Ｃｄｋ１＋／＋，＋／ａｌｉｎｋヒトＣＡ１　ＥＳ細胞を神経上皮前駆細胞（ＮＥＰ）に分化させた。続いて、ニューロンへの分化のための条件下でＮＥＰを培養することにより、非分化ニューロン及び分化ＮＥＰの混合培養物を作製し、これらをＤＡＰＩ、Ｋｉ６７及びＳｏｘ２の免疫染色により特性決定した。ＧＣＶ（１０ｕＭ）を混合培養物に１日おきに２０日間添加した。次に、培養物からＧＣＶを４日かけて回収した後、４％ＰＦＡにより細胞を固定化した。残る全ての細胞が細胞周期から脱したかどうかを確認するための増殖マーカＫｉ６７、並びに成熟ニューロンマーカβ－ＴｕｂｌｉｎＩＩＩについて固定化細胞を免疫染色した。

【０１４１】

結果

マウスＣｄｋ１ゲノム遺伝子座を図２ａに示す。マウスＣｄｋ１をターゲティングする２つのベクターを作製したが（図２Ｂ及びＤ）、各々は、最後のエキソンの終止コドンをＦ２Ａ（Ｓｚｙｍｃｚａｋ　ｅｔ　ａｌ．，２００４）配列で置換し、次に、ｍＣｈｅｒｒｙリポータに結合した増強ＨＳＶ－ＴＫ（ＴＫ．００７（Ｐｒｅｕｓｓ　ｅｔ　ａｌ．，２０１０））遺伝子をＴ２Ａ（Ｓｚｙｍｃｚａｋ　ｅｔ　ａｌ．，２００４）配列で置換することにより、Ｃｄｋ１遺伝子（図２Ａ）の３’ＵＴＲを修飾するように立体配置されている。

【０１４２】

図２Ｂ及びマウス標的ベクターＩを参照すると、ＰＧＫ－ｎｅｏ－ｐＡ選択性マーカ（ターゲティングに必要）が、ＴＫ発現を中断するｐｉｇｇｙＢａｃトランスポゾンと共にＴＫ．００７オープンリーディングフレームに挿入された。ｐｉｇｇｙＢａｃトランスポゾン挿入は、トランスポゾン除去によってＴＫ．００７の正常なＯＲＦが回復され、その結果、機能性チミジンキナーゼの発現が起こるように設計された（図２Ｃ）。

【０１４３】

図２Ｄ及びマウス標的ベクターＩＩを参照すると、ｎｅｏカセットがｌｏｘＰとフランキングしてＦ２ＡとＴＫ．００７との間に挿入された。

【０１４４】

標的ベクターＩ及びＩＩは短い（約８００ｂｐ）相同性アームを有し、これらは、ＣＲＩＳＰＲ支援相同組換えターゲティングに十分であり、ターゲティングイベントを同定するためのＰＣＲ遺伝子型決定を容易且つ確実にした。ＣＲＩＳＰＲは、４０％ＰＣＲ陽性の薬物耐性クローンで高いターゲティング頻度を促進した（図３Ｄ）。

【０１４５】

ｐｉｇｇｙＢａｃ挿入及びｌｏｘＰフランキングｎｅｏカセットの両方をｐｉｇｇｙＢａｃトランスポザーゼ及びＣｒｅレコンビナーゼの一過性発現によってそれぞれ除去したところ、図２Ｃ及び２Ｅにそれぞれ示す対立遺伝子を含む細胞株が得られた。図２Ｅを参照すると、残るｌｏｘＰ部位はＴＫとフレーム内にあり、１３アミノ酸がＴＫのＮ末端に付加された。ＴＫ機能性試験（ＧＣＶ傷害）により、このＮ末端挿入はＴＫ機能を妨害しないことが証明された。

【０１４６】

図４を参照すると、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ９技術により支援されて、２つの異なるヒトＥＳ細胞株、ＣＡ１及びＨ１に同型接合性ＡＬＩＮＫを効率的に作製することもできる（Ａｄｅｗｕｍｉ　ｅｔ　ａｌ．，２００７）。

【０１４７】

図５Ａ及び５Ｃを参照すると、データは、ｉ）Ｃｄｋ１の３’ＵＴＲへのＴＫ．００７挿入がＣｄｋ１発現を妨害しないこと；ｉｉ）ＡＬＩＮＫ修飾同型接合性マウスＣ２　ＥＳ細胞がＥＳ細胞条件下で適正に自己再生し、ｉｎ　ｖｉｖｏで分化して複雑な奇形腫を形成すること；ｉｉｉ）ＡＬＩＮＫ修飾同型接合性ヒトＣＡ１　ＥＳ細胞がＥＳ細胞条件下で適正に自己再生し、ｉｎ　ｖｉｖｏで分化して複雑な奇形腫を形成することを示す。

【０１４８】

図６を参照すると、データは、ｉ）ＴＫ．００７が適正に発現され；未分化ＥＳ細胞の

ＧＣＶ処置により、異型接合性及び同型接合性修飾細胞の両方がアブレートされる（図６Ａ）こと；及びｉｉ）Ｔ２Ａ連結ｍＣｈｅｒｒｙがＥＳ細胞において構成的に発現される（図６Ｂ）ことを示す。

【０１４９】

図７Ａを参照すると、データは、ＡＬＩＮＫ修飾細胞移植片を含む宿主において、ＡＬＩＮＫ修飾ＥＳ細胞を含む皮下奇形腫のＧＣＶ処置が、分裂細胞をアブレートすることにより奇形腫増殖を停止することを示す。ＧＣＶ処置は奇形腫の静止細胞に影響しなかった。レシピエントの短い（３週間）ＧＣＶ処置は、奇形腫を休眠状態にするのに十分であった。図７Ｂを参照すると、ＡＬＩＮＫ修飾ヒト細胞移植片を含むＮＯＤｓｃｉｄγマウス宿主では、２ラウンドのＧＣＶ処置（第１ラウンド１５日＋第２ラウンド４０日）により、奇形腫は休眠状態になった。

【０１５０】

図７Ｃを参照すると、ＡＬＩＮＫ修飾ＭＭＴＶ－ＰｙＭＴ形質転換乳房表皮腫瘍形成細胞移植片を含むＢ６Ｎ宿主において、ＧＣＶ処置は乳腺腫瘍を休眠状態にすることができた。

【０１５１】

図７Ｄ～Ｆを参照すると、非分裂ニューロンと分裂ＮＥＰとの混合培養物（全ての細胞は、Ｃｄｋ１$^{+/+,+/}$ａｌｉｎｋヒトＣＡ１　ＥＳ細胞から得られた）において、ＧＣＶは分裂ＮＥＰを傷害したが、非分裂ニューロンは傷害しなかった。

【０１５２】

一実施形態では、不活性化突然変異がＣＤＬ－ＨＳＶ－ＴＫ転写リンクのＨＳＶ－ＴＫ成分で起こるはずであった場合、１つ又は複数の分裂細胞は、ＧＣＶ媒介アブレーションから逃避し得ることが考慮される。細胞逃避の可能性に取り組むために、本発明者らは、１細胞分裂当たりの一般的突然変異速度（すなわち、10^{-6}）を考慮し、１つの突然変異型細胞を作出するのに必要な細胞分裂の予測される回数が異型接合性Ｃｄｋ１－ＨＳＶ－ＴＫ転写リンクを含む細胞では１６であり、同型接合性Ｃｄｋ１－ＨＳＶ－ＴＫ転写リンクを含む細胞では３０回の細胞分裂であると決定した。これは、単一の異型接合性ＡＬＩＮＫ修飾細胞が2^{16}（すなわち、６５，０００細胞）に拡大され、また単一の同型接合性ＡＬＩＮＫ修飾細胞が2^{30}（すなわち、１０億細胞）に拡大されると、異型接合性及び同型接合性細胞集団毎に、消失ＨＳＶ－ＴＫ活性を含む平均１突然変異型細胞が生成されることになる（図８）。従って、本発明者らは、同型接合性ＡＬＩＮＫ修飾細胞が細胞療法での使用のために非常に安全であると判定した。細胞療法のレベルを計算する別の方法を上に示した。

【０１５３】

実施例２：Ｃｄｋ１遺伝子座におけるＥＡＲＣ修飾マウスＥＳ細胞の作製

実施例２では、Ｃｄｋ１をターゲティングするＥＡＲＣ（ｄｏｘ－架橋）ベクターの構築及びマウスＥＳ細胞の細胞分裂を制御するためのその使用について記載する。この実施例では、Ｃｄｋ１／ＣＤＫ１はＣＤＬであり、これは誘導性遺伝子発現系によってターゲティングされ、ここで、ｄｏｘ－架橋が挿入されて、ドキシサイクリンがＣＤＬの発現を誘導する。

【０１５４】

前述したように、Ｃｄｋ１／ＣＤＫ１は、全て有糸分裂活性（すなわち、分裂）細胞において発現される。Ｃｄｋ１遺伝子座にＥＡＲＣ（ｄｏｘ－架橋）を含むように修飾された細胞では、細胞分裂は、Ｃｄｋ１の発現を可能にする誘導物質（ドキシサイクリン）の存在下でのみ可能である。従って、ＥＡＲＣ修飾された有糸分裂活性細胞の細胞分裂は、ドキシサイクリンの非存在下で排除することができる。

【０１５５】

実施例２では、Ｃｄｋ１遺伝子の５’ＵＴＲへのｄｏｘ－架橋挿入は、相同組換えノックイン技術により達成された。

【０１５６】

方法
ｄｏｘ－架橋を含むＥＡＲＣターゲティングベクターの構築
ｒＴＴＡコード配列（配列番号４１）を含有する断片、それに続く３×ＳＶ４０ｐＡシグナルを、ｒＴＴＡの５’に付加されたｌｏｘ７１部位を含有するプライマー（ｒｔｔａ３ｘｐａＦｒｗ１（配列番号６３）、ｒｔｔａ３ｘｐａＲｅｖ１（配列番号６４））を用いて、ＰＢ－ＣＡＧＧ－ｒｔｔａプラスミドからＰＣＲにより増幅した。この断片をｐＧｅｍＴプラスミドにサブクローニングしてｐＧｅｍ－ｂｒｉｄｇｅ－ｓｔｅｐ１を作製した。続いて、ＴｅｔＯプロモータ（配列番号４２）（ｐＰＢ－ＴｅｔＯ－ＩＲＥＳ－ｍＣｈｅｒｒｙ由来）を含有するＳａｃＩＩ断片をｐＧｅｍ－ｂｒｉｄｇｅ－ｓｔｅｐ１のＳａｃＩＩ部位にクローニングしてｐＧｅｍ－ｂｒｉｄｇｅ－ｓｔｅｐ２を作製した。ＢａｍＨＩ　ＩＲＥＳ－プロマイシン断片（配列番号４３）をｐＧｅｍ－ｂｒｉｄｇｅ－ｓｔｅｐ２のＢａｍＨＩ部位に挿入することにより、架橋の最終エレメントをクローニングしてｐＧｅｍ－ｂｒｉｄｇｅ－ｓｔｅｐ３を作製した。Ｃ５７／Ｂ６ゲノムＤＮＡから９００ｂｐ断片（配列番号４４）をＰＣＲ増幅し（プライマーｃｄｋ５ＦｒｗＰｓｔ（配列番号４５）及びｃｄｋ５ＲｅｖＳｐｅ（配列番号４６）、これをｐＧｅｍ－ｂｒｉｄｇｅ－ｓｔｅｐ３のＳｂｆＩ及びＳｐｅＩにクローニングすることにより、５’相同性アームをクローニングした。同様に、プライマーｄｋｅ３＿５’ＦＳｐｅ（配列番号４８）、ｃｄｋｅｘ３＿３ｌｏｘ（配列番号４９）を用いたＰＣＲにより、３’相同性アーム（９００ｂｐ）（配列番号４７）を増幅し、ＳｐｈＩ及びＮｃｏＩにクローニングして最終ターゲティングベクターを作製し、これをｐＢｒｉｄｇｅ（配列番号１４８）と呼ぶ。

【０１５７】
ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９プラスミドの構築
オフターゲット突然変異の可能性を最小限にするために、二重ニッカーゼ戦略を選択した。ガイドＲＮＡ配列（配列番号５０、５１、５２及び５３）をｐＸ３３５（Ａｄｄｇｅｎｅから取得し、提案されたプロトコルに従う）（Ｒａｎ　ｅｔ　ａｌ．，２０１３）にクローニングした。

【０１５８】
ＥＡＲＣ修飾マウスＥＳ細胞の作製
マウスＥＳ細胞培養物：
事前に特性決定したＣ５７ＢＬ／６ＮマウスＥＳ細胞株（Ｃ２）について全ての遺伝子操作を実施した（Ｇｅｒｔｓｅｎｓｔｅｉｎ　ｅｔ　ａｌ．，２０１０）。１５％ＥＳ細胞－グレードＦＢＳ（Ｇｉｂｃｏ）、０．１ｍＭ　２－ｍＥＡＲＣａｐｔｏｐｈｅｎｏｌ、２ｍＭ　Ｌ－グルタミン、１ｍＭピルビン酸ナトリウム、０．１ｍＭ非必須アミノ酸、及び２，０００単位／ｍｌ白血病阻止因子（ＬＩＦ）を補充した、高グルコースＤＭＥＭ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）を基材とする培地中でマウスＥＳ細胞を増殖させた。マイトマイシンＣ処理マウス胚性線維芽細胞（ＭＥＦ）上で５％CO_2中３７℃において細胞を維持した。

【０１５９】
ターゲティング：
ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９成分（ｐＸ３３５－ｃｄｋ－ｅｘ３Ａ（配列番号１５１）及びｐＸ３３５－ｃｄｋ－ｅｘ３Ｂ（配列番号１５２））を含有するプラスミドと、ターゲティングプラスミド（ｐＢｒｉｄｇｅ；配列番号１４８）とを、８：２のＦｕＧＥＮＥ：ＤＮＡ比（２μｇの総ＤＮＡ：各ｐＸ３３０については２５０ｎｇ、またｐＢｒｉｄｇｅについては１５００ｎｇ）を使用し、製造者の指示に従い、ＦｕＧＥＮＥ　ＨＤ（Ｃｌｏｎｔｅｃｈ）を用いてマウスＥＳ細胞に同時トランスフェクトした。典型的トランスフェクションを3×10^5細胞に実施し、３５ｍｍプレート上で平板培養した。トランスフェクション時、ドキシサイクリンを１μｇ／ｍｌの最終濃度まで培地に添加した。トランスフェクションから２日後、細胞を１００ｍｍプレート上に平板培養し、１μｇ／ｍｌのプロマイシンを用いて選択を適用した。選択の開始から８～１０日後、プロマイシン耐性コロニーを採取し、ＰＣＲスクリーニングまで９６ウェルプレート内で維持した。

【０１６０】
遺伝子型決定：
（Ｎａｇｙ　ｅｔ　ａｌ．，２００３）に従って９６ウェルプレート内のＥＳ細胞から直接ＤＮＡを抽出した。Ｃｄｋ１遺伝子の５’におけるｐＢｒｉｄｇｅの相同組換えによる正しい挿入について陽性のクローンを、５’及び３’相同性アームにわたるプライマー（５’アームについてはプライマーｒｔｔａＲｅｖ（配列番号５４）、ｅｘ３＿５ｓｃｒ（配列番号５５）、３’アームについてはプライマーＣＭＶｆｏｒｗ（配列番号５６）、ｅｘ３＿３ｓｃｒ（配列番号５７））を用いたＰＣＲによりスクリーニングした。
【０１６１】
標的細胞増殖：
Ｆ３－ブリッジ標的細胞をトリプシン処理した後、１ウェル当たり５×１０^{4}細胞の密度においてゼラチン化２４ウェルプレート上で平板培養した。平板培養後１日目から、それぞれの条件について３ウェルをトリプシン処理した後、Ｃｏｕｎｔｅｓｓ自動化細胞計数器（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）を用いて生存細胞を計数することにより、細胞計数を実施した。平板培養から２日後にドキシサイクリンを除去するか又は０．０５ｎｇ／ｍｌまで低減し、様々な条件で１８日後まで毎日生存細胞を計数した。
【０１６２】
Ｃｒｅ－切り出し：
Ｆ３－ブリッジ細胞（Ｄｏｘ＋培地中で増殖）をトリプシン処理した後、２μｇのプラスミド発現Ｃｒｅ（ｐＣＡＧＧ－ＮＬＳ－Ｃｒｅ）でトランスフェクトした。トランスフェクションは、ＪｅｔＰｒｉｍｅ（Ｐｏｌｙｐｌｕｓ）を用いて、製造者のプロトコルに従って実施した。トランスフェクション後、ドキシサイクリンを除去し、コロニーをトリプシン処理した後、プールとして拡大した。
【０１６３】
定量ＰＣＲ：
製造者の指示に従い、ＧｅｎｅＥｌｕｔｅ全ＲＮＡミニプレップキット（Ｓｉｇｍａ）を用いて、１μｇ／ｍｌ及び０μｇ／ｍｌのＤｏｘで２日間処理した細胞から全ＲＮＡを抽出した。製造者の指示に従い、ＱｕａｎｔｉＴｅｃｔ逆転写キット（Ｑｉａｇｅｎ）を用いて、１μｇのＲＮＡの逆転写によりｃＤＮＡを作製した。ＳｅｎｓｉＦａｓｔ－ＳＹＢＲ　ｑＰＣＲミックス（Ｂｉｏｌｉｎｅ）を用いて、ＢｉｏＲａｄＣＦＸサーモサイクラ内でリアルタイムｑＰＣＲを設定した。使用したプライマーは、以下のものであった：ｑｐｃｒｃｄｋ１＿Ｆ（配列番号６５）、ｑｐｃｒｃｄｋ１＿Ｒ（配列番号６６）及びａｃｔＢｆ（配列番号６７）、ａｃｔＢｒ（配列番号６８）。結果はΔΔＣＴ法で分析し、βアクチンについて正規化した。
【０１６４】
結果
図９を参照すると、図９Ａに示すｄｏｘ－架橋標的ベクターを用いて３つの標的Ｃ２ＥＳマウスＥＳ細胞株を作製した（図９Ｂ）。これらの細胞株の１つは、Ｃｄｋ１の両対立遺伝子の５’ＵＴＲへの相同組換えにより挿入されたｄｏｘ－架橋を含む同型接合性標的株（図９Ｂの３Ｆ）であることが判明した。
【０１６５】
予想通り、このＥＳ細胞株は、ドキシサイクリンの存在下でのみ増殖する。ドキシサイクリンの存在下で、Ｃｄｋ１プロモータ活性生成ｒｔＴＡはＴＲＥに結合し、Ｃｄｋ１の転写を開始する。３’修飾と同様に、ＣＤＬ発現がＥＡＲＣによってのみ起こり得ることを確実にするために、Ｃｄｋ１の両対立遺伝子の５’ＵＴＲにｄｏｘ－架橋を挿入してもよい。別の方法は、ＣＤＬの残る非ＥＡＲＣ修飾対立遺伝子の全てにヌル突然変異を生成することである。
【０１６６】
ドキシサイクリンの使用を中止すると、５日以内に有糸分裂活性ＥＳ細胞の完全な排除が起こった（図１０）。ｄｏｃ－架橋（dox-架橋）細胞株の誘導及び維持のために使用し

た濃度と比較してドキシサイクリン濃度を２０倍低下させる（５０ｎｇ／ｍｌ）と、一部の細胞／コロニーを５日間生存させることができた（図１１）。

【０１６７】

図１２を参照すると、ｄｏｘ－架橋は、対立遺伝子の本来の内在性発現調節を回復し、ドキシサイクリンの欠如から細胞致死性をレスキューする、２つのｌｏｘ７１部位間のセグメントのＣｒｅリコンビナーゼ媒介による切り出しを用いて除去することができた。これらのデータは、予測した通り、ｄｏｘ－架橋が細胞内で機能していたことを示す。

【０１６８】

図１３を参照すると、本発明者らは、ドキシサイクリンの存在及び非存在下で細胞増殖を測定することにより、ドキシサイクリンの使用中止がｄｏｘ－架橋ＥＳ細胞の排除にどの程度影響したかを決定した。ドキシサイクリンの存在下で、ＥＳ細胞は指数関数的に増殖したが、これはその正常な増殖を示している。対照的に、ドキシサイクリンの使用を中止すると（第１日）、細胞は２日間にわたってのみ増殖し、その後、細胞死が始まり、これは第９日に生存細胞が存在しなくなるまで続いた。最初の３日の細胞増殖後に供給された２０倍低いドキシサイクリン濃度（５０ｎｇ／ｍｌ）は、少なくとも５日にわたってプレート上で一定数の細胞を維持するのに十分であった（図１３、水色の線）。通常濃度のドキシサイクリンを第１０日のプレートに再度添加すると、細胞は、正常なＥＳ細胞と同様に再び増殖し始めた。

【０１６９】

ドキシサイクリンが不足する培地中で増殖させた場合、分裂細胞は、Ｃｄｋ１のＥＡＲＣ（ｄｏｘ－架橋）修飾を逃避することができると考えられた。細胞逃避の可能性に対処するために、ＥＡＲＣ（ｄｏｘ－架橋）修飾マウスＥＳ細胞を、ドキシサイクリンを含有する培地中の１０プレート上で１００，０００，０００細胞／プレートまで増殖させた。次に、３００ＧＦＰ陽性野生型ＥＳ細胞（センチネル）を修飾ＥＳ細胞の１０プレートの各々に混合した後、培地でのドキシサイクリンの使用を中止する。ＧＦＰ陽性コロニーのみが回収された（図１４）が、これは、培地中の１００，０００，０００細胞中に逃避したｄｏｘ－架橋ＥＳ細胞がなかったことを示している。従って、本発明者らは、ＥＡＲＣ（ｄｏｘ－架橋）修飾ＥＳ細胞が、特定の細胞療法用途のためにＡＬＩＮＫ修飾にさらなるレベルの安定性を追加すると判定した。なぜなら、ｄｏｘ－架橋の喪失が突然変異によって起こるとは考えにくく、細胞分裂は、ＣＤＬ発現の阻止による誘導物質（ドキシサイクリン）の非存在下では不可能であるからである。

【０１７０】

図１５を参照すると、ｄｏｘ－架橋ＥＳ細胞の増殖に対する高ドキシサイクリン濃度（１０μｇ／ｍｌ）の作用を調べた。高濃度ドキシサイクリンの存在下で、ｄｏｘ－架橋ＥＳ細胞の増殖速度は、低濃度ドキシサイクリンで増殖させた細胞と同様の速度まで低下した。これらのデータは、野生型細胞様増殖のための最適なＣｄｋ１発現を可能にし得るドキシサイクリン濃度の範囲があることを示している。

【０１７１】

実施例３：ＣＤＫ１遺伝子座におけるＥＡＲＣ－ＡＬＩＮＫ修飾細胞（マウス及びヒト）の作製

実施例３では、ＣＤＫ１をターゲティングするＥＡＲＣ（ｄｏｘ－架橋）ベクターの構築、並びにマウス及びヒトＡＬＩＮＫ修飾ＥＳ細胞の両方の細胞分裂を制御するためのそのベクターの使用について説明する。この実施例では、Ｃｄｋ１／ＣＤＫ１はＣＤＬであり、ｄｏｘ－架橋はＥＡＲＣであり、ＨＳＶ－ＴＫはＡＬＩＮＫである。ＣＤＬ　Ｃｄｋ１は、同型接合形態のＥＡＲＣ及びＡＬＩＮＫ系の両方で修飾されており、ここで、ドキシサイクリンは、ＣＤＬの発現を誘導するために必要であり、ドキシサイクリンとＧＣＶとは一緒に、修飾増幅細胞を傷害する方法を提供する。

【０１７２】

実施例３では、ＣＤＫ１遺伝子の５’ＵＴＲへのｄｏｘ－架橋挿入は、相同組換えノックイン技術により達成された。

【０１７３】
方法
マウスＥＡＲＣターゲティングベクター、マウスターゲティングのためのＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９プラスミドの構築は、実施例２と同じである。ターゲティング及び遺伝子型決定方法も、Ｃ２ＷＴ細胞の代わりに、実施例１（図３Ａ～３Ｇ）で作製したＣｄｋ１（ＴＫ／ＴＫ）細胞をトランスフェクションに使用した以外には実施例２に記載したものと同じである。
【０１７４】
ヒトＣＤＫ１のためのｄｏｘ－架橋を含むＥＡＲＣターゲティングベクターの構築
ＣＡ１ゲノムＤＮＡ（プライマーｈｃｄｋ５’Ｆ（配列番号７０）及びｈｃｄｋ５’Ｒ（配列番号７１）から９８１ｂｐ断片をＰＣＲ増幅した後、これをｐＧｅｍ－ｂｒｉｄｇｅ－ｓｔｅｐ３のＳｂｆＩにクローニングすることにより、５’相同性アーム（配列番号６９）をクローニングした。同様に、プライマーｈｃｄｋ３’Ｆ（配列番号７３）及びｈｃｄｋ３’Ｒ（配列番号７４）を用いたＰＣＲにより３’相同性アーム（９４３ｂｐ；配列番号７２）を増幅し、これをＳｐｈＩ及びＮｃｏＩにクローニングして最終ターゲティングベクターを作製し、これをｐＢｒｉｄｇｅ－ｈＣｄｋ１（配列番号７５）と呼ぶ。
【０１７５】
ヒトターゲティングのためのＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９プラスミドの構築
ガイドＲＮＡ（ｈＣｄｋ１Ａ＿ｕｐ（配列番号７６）、ｈＣｄｋ１Ａ＿ｌｏｗ（配列番号７７）、ｈＣｄｋ１Ｂ＿ｕｐ（配列番号７８）、ｈＣｄｋ１Ｂ＿ｌｏｗ（配列番号７９）をｐＸ３３５（配列番号１４９）及びｐＸ３３０（配列番号１５０）にクローニングすることにより、ｐＸ３３５－１Ａ（配列番号８０）、ｐＸ３３５－１Ｂ（配列番号８１）及びｐＸ３３０－１Ｂ（配列番号８２）を作製した。
【０１７６】
ＥＡＲＣ修飾ヒトＥＳ細胞の作製
ターゲティング：
2×10^{6}ＣＡ１（ＴＫ／ＴＫ）（すなわち、図４Ａ～４Ｆで説明した細胞生成物）ｈＥＳ細胞を８ｕｇのＤＮＡ（標的ベクター：ｐＸ３３０－ｈＣｄＴＫ－Ａ＝５ｕｇ：２ｕｇ）でＮｅｏｎプロトコル１４によりトランスフェクトした。トランスフェクション後、細胞を４つの１０ｃｍプレート上で平板培養した。トランスフェクション後、ドキシサイクリンを最終濃度１μｇ／ｍｌまで培地に添加した。トランスフェクションから２日後、０．７５μｇ／ｍｌのプロマイシンを用いて選択を適用した。プロマイシン耐性コロニーを採取して９６ウェルプレートに移し、さらなる増殖並びにプライマー（ｈＣｄｋ１Ｂｒ－５ＨＡｇｅｎ＿Ｆ１（配列番号８３）、ｒｔＴＡ＿ｒｅｖ＿１（配列番号８４）、ｍＣＭＶ＿Ｆ（配列番号８５）、ｈＣｄｋ１Ｂｒ－３ＨＡｇｅｎ＿Ｒ１（配列番号８６））を用いた遺伝子型決定のためにこれを２回繰り返した。
【０１７７】
結果
図１６Ａを参照すると、マウスｄｏｘ－架橋標的ベクター、ｐＢｒｉｄｇｅを用いて実施例１で作製したマウス細胞産物、マウス$\mathrm{Cdk1}^{earc/earc,alink/alink}$細胞を産生するＣｄｋ１（ＴＫ／ＴＫ）をターゲティングした。１回のトランスフェクションにより、９つの$\mathrm{Cdk1}^{earc/earc,alink/alink}$クローンが産生された（図１６Ｂ）。
【０１７８】
図５Ｂを参照すると、データは、ＥＡＲＣ及びＡＬＩＮＫ修飾同型接合性マウスＣ２ＥＳ　$\mathrm{Cdk1}^{earc/earc,alink/alink}$細胞がＥＳ細胞条件下で適正に自己再生し、ｉｎ　ｖｉｖｏで分化して複雑な奇形腫を形成したことを示している。
【０１７９】
図１７Ａを参照すると、ヒトｄｏｘ－架橋標的ベクター、ｐＢｒｉｄｇｅ－ｈＣｄｋ１を用いて実施例１で作製したヒト細胞産物、ヒト$\mathrm{Cdk1}^{earc/earc,alin}$

ｋ／ａｌｉｎｋ細胞を産生するＣｄｋ１（ＴＫ／ＴＫ）をターゲティングした。１回のトランスフェクションにより、少なくともＣｄｋ１ｅａｒｃ／ｅａｒｃ，ａｌｉｎｋ／ａｌｉｎｋＣＡ１クローンが産生された（図１７Ｂ）。

【０１８０】

実施例４：Ｔｏｐ２ａ遺伝子座でのＥＡＲＣ修飾マウスＥＳ細胞の作製

実施例４では、Ｔｏｐ２ａをターゲティングするＥＡＲＣ（ｄｏｘ－架橋）ベクターの構築、並びにマウスＥＳ細胞の細胞分裂を制御するためのそのベクターの使用について説明する。この実施例では、Ｔｏｐ２ａ／Ｔｏｐ２ＡはＣＤＬであり、これは、ｄｏｘ－架橋が挿入されて、ドキシサイクリンがＣＤＬの発現を誘導する誘導性遺伝子発現系によってターゲティングされる。

【０１８１】

前述したように、Ｔｏｐ２ａ／ＴＯＰ２Ａは、全ての有糸分裂活性（すなわち、分裂）細胞で発現される。Ｔｏｐ２ａ遺伝子座にＥＡＲＣ（ｄｏｘ－架橋）挿入を含むように修飾された細胞において、細胞分裂は、Ｔｏｐ２ａの発現を可能にする誘導物質（ドキシサイクリン）の存在下でのみ可能である。従って、ＥＡＲＣ修飾有糸分裂活性細胞の細胞分裂は、ドキシサイクリンの非存在下で排除することができる。

【０１８２】

実施例４において、Ｔｏｐ２ａ遺伝子の５’ＵＴＲへのｄｏｘ－架橋挿入は、相同組換えノックイン技術により達成された。

【０１８３】

方法

Ｔｏｐ２ａのためのｄｏｘ－架橋を含むＥＡＲＣターゲティングベクターの構築

Ｃ５７／Ｂ６ゲノムＤＮＡ（プライマーＴｏｐ５Ｆ（配列番号８８）及びＴｏｐ５Ｒ（配列番号８９）から８７０ｂｐ断片をＰＣＲ増幅した後、これをｐＧｅｍ－ｂｒｉｄｇｅ－ｓｔｅｐ３のＳｂｆＩ及びＳｐｅＩにクローニングすることにより、５’相同性アーム（配列番号８７）をクローニングした。同様に、プライマーＴｏｐ３Ｆ（配列番号９１）、Ｔｏｐ３Ｒ（配列番号９２）を用いたＰＣＲにより３’相同性アーム（８１８ｂｐ；配列番号９０）を増幅し、これをＳｐｈＩ及びＮｃｏＩにクローニングして最終ターゲティングベクターを作製し、これをｐＢｒｉｄｇｅ－Ｔｏｐ２ａ（配列番号９３）と称する。

【０１８４】

ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９プラスミドの構築

オフターゲット突然変異の可能性を最小限にするために、二重ニッカーゼ戦略を選択した。オリゴ：ＴＯＰ２Ａ１ＢＦ（配列番号９４）、ＴＯＰ２Ａ１ＢＲ（配列番号９５）、ＴＯＰ２Ａ１ＡＦ（配列番号９６）、ＴＯＰ２Ａ１ＡＲ（配列番号９７）を用いて、提案されたプロトコル（Ｒａｎ ｅｔ ａｌ．，２０１３）に従い、ガイドＲＮＡ配列をｐＸ３３５（Ａｄｄｇｅｎｅ）にクローニングしてＣＲＩＳＰＲベクターｐＸ３３５－Ｔｏｐ２ａＡ（配列番号９８）及びｐｘ３３５－Ｔｏｐ２ａＢ（配列番号９９）を作製した。

【０１８５】

ＥＡＲＣ修飾マウスＥＳ細胞の作製

マウスＥＳ細胞培養物：

事前に特性決定したＣ５７ＢＬ／Ｂ６マウスＥＳ細胞株（Ｃ２）について全ての遺伝子操作を実施した（Ｇｅｒｔｓｅｎｓｔｅｉｎ ｅｔ ａｌ．，２０１０）。１５％ＥＳ細胞－グレードＦＢＳ（Ｇｉｂｃｏ）、０．１ｍＭ ２－ｍＥＡＲＣａｐｔｏｐｈｅｎｏｌ、２ｍＭ Ｌ－グルタミン、１ｍＭピルビン酸ナトリウム、０．１ｍＭ非必須アミノ酸、及び２，０００単位／ｍｌ白血病阻止因子（ＬＩＦ）を補充した、高グルコースＤＭＥＭ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）を基材とする培地中でマウスＥＳ細胞を増殖させた。マイトマイシンＣ処理マウス胚性線維芽細胞（ＭＥＦ）上で５％CO_2中３７℃において細胞を維持した。

【０１８６】

ターゲティング：

ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９成分（ｐＸ３３５－Ｔｏｐ２ａＡ（配列番号９８）及びｐＸ３３５－Ｔｏｐ２ａＢ（配列番号９９））を含有するプラスミドと、ターゲティングプラスミド（ｐＢｒｉｄｇｅ－Ｔｏｐ２ａ（配列番号９３））とを、８：２のＦｕＧＥＮＥ：ＤＮＡ比（２μｇの総ＤＮＡ：各ｐＸ３３５については２５０ｎｇ及びｐＢｒｉｄｇｅ－Ｔｏｐ２ａについては１５００ｎｇ）で、製造者の指示に従い、ＦｕＧＥＮＥ　ＨＤ（Ｃｌｏｎｔｅｃｈ）を用いてマウスＥＳ細胞に同時トランスフェクトした。典型的トランスフェクションを３×１０^{5}細胞で実施し、３５ｍｍプレート上で平板培養した。トランスフェクション時、ドキシサイクリンを１μｇ／ｍｌの最終濃度まで培地に添加した。トランスフェクションから２日後、細胞を１００ｍｍプレート上に平板培養し、１μｇ／ｍｌのプロマイシンを用いて選択を適用した。選択の開始から８～１０日後、プロマイシン耐性コロニーを採取し、ＰＣＲスクリーニングまで９６ウェルプレート内で維持した。

【０１８７】

遺伝子型決定：

（Ｎａｇｙ　ｅｔ　ａｌ．，２００３）に従って９６ウェルプレート内のＥＳ細胞から直接ＤＮＡを抽出した。Ｔｏｐ２ａ遺伝子の５’におけるｐＢｒｉｄｇｅ－Ｔｏｐ２ａの相同組換えによる正しい挿入について陽性のクローンを、５’及び３’相同性アームにわたるプライマー（５’アームについてはプライマーｒｔｔａＲｅｖ（配列番号５４）、ｔｏｐ２ａ＿５ｓｃｒ（配列番号５５）、３’アームについてはプライマーＣＭＶｆｏｒｗ（配列番号５６）、ｔｏｐ２ａ＿３ｓｃｒ（配列番号５７））を用いたＰＣＲによりスクリーニングした。

【０１８８】

標的細胞増殖：

Ｔｏｐ２ａ同型接合性標的細胞をトリプシン処理した後、１ウェル当たり５×１０^{4}細胞の密度においてゼラチン化２４ウェルプレート上で平板培養した。平板培養後の１日目から、様々なＤｏｘ濃度（１μｇ／ｍｌ、０．５μｇ／ｍｌ、０．０５μｇ／ｍｌ及び０μｇ／ｍｌ）に細胞を曝露し、３～４日にわたって２時間毎に写真を撮り、密集度を測定することにより、ＩｎｃｕｃｙｔｅＺｏｏｍ　ｓｙｓｔｅｍ（Ｅｓｓｅｎ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅ）でプレートを分析した。

【０１８９】

結果

図１８を参照すると、図１８Ａに示すｄｏｘ－架橋ベクターを用いていくつかの標的Ｃ２マウスＥＳ細胞株を作製した（図１８Ｂ）。これらの細胞株のうちの９つは、同型接合性ターゲティングされており（図１８Ｂ）、Ｔｏｐ２ａの両対立遺伝子の５’ＵＴＲへの相同組換えによって挿入されたｄｏｘ－架橋を含むことが判明した。

【０１９０】

予想通り、このＥＳ細胞株は、ドキシサイクリンの存在下でのみ増殖する。ドキシサイクリンの存在下で、Ｔｏｐ２ａプロモータにより生成されたｒｔＴＡはＴＲＥに結合し、Ｔｏｐ２ａコード配列の転写を開始する。ＣＤＬ発現がＥＡＲＣによってのみ起こり得ることを確実にするために、Ｔｏｐ２ａの両対立遺伝子の５’ＵＴＲにｄｏｘ－架橋を挿入してもよい。別の方法は、ＣＤＬの残る非ＥＡＲＣ修飾対立遺伝子の全てにヌル突然変異を生成することである。

【０１９１】

ドキシサイクリンの使用を中止すると、４日以内に有糸分裂活性ＥＳ細胞が完全に排除された（図１９Ａ）。

【０１９２】

図１９Ｂを参照すると、本発明者らは、４日にわたって細胞増殖を測定することにより、様々な濃度のドキシサイクリンがｄｏｘ－架橋ＥＳ細胞の増殖にどの程度影響するかを決定した。ドキシサイクリンの存在下で、ＥＳ細胞は指数関数的に増殖し、その正常な増殖を示した。対照的に、ドキシサイクリンの除去から２日後、ＥＡＲＣ修飾細胞の細胞増殖は完全に停止した。

【０１９３】
実施例５：Ｃｅｎｐａ遺伝子座でのＥＡＲＣ修飾マウスＥＳ細胞の作製
実施例５では、ＣｅｎｐａをターゲティングするｅＡＲＣ（ｄｏｘ－架橋）ベクターの構築、並びにマウスＥＳ細胞の細胞分裂を制御するためのそのベクターの使用について説明する。この実施例では、Ｃｅｎｐａ／ＣＥＮＰＡはＣＤＬであり、これは、ｄｏｘ－架橋が挿入されて、ドキシサイクリンがＣＤＬの発現を誘導する誘導性遺伝子発現系によってターゲティングされる。
【０１９４】
前述したように、Ｃｅｎｐａ／ＣＥＮＰＡは、全ての有糸分裂活性（すなわち、分裂）細胞で発現される。Ｃｅｎｐａ遺伝子座にＥＡＲＣ（ｄｏｘ－架橋）挿入を含むように修飾された細胞において、細胞分裂は、Ｃｅｎｐａの発現を可能にする誘導物質（ドキシサイクリン）の存在下でのみ可能である。従って、ＥＡＲＣ修飾有糸分裂活性細胞の細胞分裂は、ドキシサイクリンの非存在下で排除することができる。
【０１９５】
実施例５において、Ｃｅｎｐａ遺伝子の５’ＵＴＲへのｄｏｘ－架橋挿入は、相同組換えノックイン技術により達成された。
【０１９６】
方法
ｄｏｘ－架橋を含むＥＡＲＣターゲティングベクターの構築
Ｃ５７／Ｂ６ゲノムＤＮＡ（プライマーＣｅｎｐａ５Ｆ（配列番号１０１）及びＣｅｎｐａ５Ｒ（配列番号１０２）から８７４ｂｐ断片をＰＣＲ増幅した後、これをｐＧｅｍ－ｂｒｉｄｇｅ－ｓｔｅｐ３のＳｂｆＩ及びＳｐｅＩにクローニングすることにより、５’相同性アーム（配列番号１００）をクローニングした。同様に、プライマーＣｅｎｐａ３Ｆ（配列番号１０４）、Ｃｅｎｐａ３Ｒ（配列番号１０５）を用いたＰＣＲにより３’相同性アーム（８２５ｂｐ；配列番号１０３）を増幅し、これをＳｐｈＩ及びＮｃｏＩにクローニングして最終ターゲティングベクターを作製し、これをｐＢｒｉｄｇｅ－Ｃｅｎｐａ（配列番号１０６）と呼んだ。
【０１９７】
ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９プラスミドの構築
オフターゲット突然変異の可能性を最小限にするために、二重ニッカーゼ戦略を選択した。オリゴＣｅｎｐａＡＦ（配列番号１０７）、ＣｅｎｐａＡＲ（配列番号１０８）、ＣｅｎｐａＢＦ（配列番号１０９）、ＣｅｎｐａＢＲ（配列番号１１０）を用いて、提案されたプロトコル（Ｒａｎ ｅｔ ａｌ．，２０１３）に従い、ガイドＲＮＡ配列をｐＸ３３５（Ａｄｄｇｅｎｅ）にクローニングしてＣＲＩＳＰＲベクターｐＸ３３５－ＣｅｎｐａＡ（配列番号１１１）及びｐＸ３３５－ＣｅｎｐａＢ（配列番号１１２）を作製した。
【０１９８】
ＥＡＲＣ修飾マウスＥＳ細胞の作製
マウスＥＳ細胞培養物：
実施例４に記載の通り。
ターゲティング：
ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９成分（ｐＸ３３５－ＣｅｎｐａＡ；配列番号１１１、及びｐＸ３３５－ＣｅｎｐａＢ；配列番号１１２）を含有するプラスミドと、ターゲティングプラスミド（ｐＢｒｉｄｇｅ－Ｃｅｎｐａ；配列番号１０６）とを、実施例４に記載のように、ＦｕＧＥＮＥ ＨＤ（Ｃｌｏｎｔｅｃｈ）を用いてマウスＥＳ細胞に同時トランスフェクトした。
【０１９９】
遺伝子型決定：
実施例４に記載のようにＤＮＡを抽出した。Ｃｅｎｐａ遺伝子の５’におけるｐＢｒｉｄｇｅ－Ｃｅｎｐａの相同組換えによる正しい挿入について陽性のクローンを、５’及び３’相同性アームにわたるプライマー（５’アームについてはプライマーｒｔｔａＲｅｖ

（配列番号５４）、Ｃｅｎｐａ＿５ｓｃｒ（配列番号１１３）、３’アームについてはプライマーＣＭＶｆｏｒｗ（配列番号１１４）、Ｃｅｎｐａ＿３ｓｃｒ（配列番号１１５））を用いたＰＣＲによりスクリーニングした。

【０２００】

標的細胞増殖：

Ｃｅｎｐａ同型接合性標的細胞をトリプシン処理した後、１ウェル当たり5×10^4細胞の密度においてゼラチン化２４ウェルプレート上で平板培養した。平板培養後の１日目から、様々なＤｏｘ濃度（１μｇ／ｍｌ、０．５μｇ／ｍｌ、０．０５μｇ／ｍｌ及び０μｇ／ｍｌ）に細胞を曝露し、３～４日にわたって２時間毎に写真を撮り、密集度を測定することにより、ＩｎｃｕｃｙｔｅＺｏｏｍ ｓｙｓｔｅｍ（Ｅｓｓｅｎ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅ）でプレートを分析した。

【０２０１】

定量ＰＣＲ：

製造者のプロトコルに従い、ＧｅｎｅＥｌｕｔｅ全ＲＮＡミニプレップキット（Ｓｉｇｍａ）を用いて、１μｇ／ｍｌ及び０μｇ／ｍｌのＤｏｘで２日間処理した細胞から全ＲＮＡを抽出した。製造者のプロトコルに従い、ＱｕａｎｔｉＴｅｃｔ逆転写キット（Ｑｉａｇｅｎ）を用いて、１μｇのＲＮＡの逆転写によりｃＤＮＡを作製した。ＳｅｎｓｉＦａｓｔ－ＳＹＢＲ ｑＰＣＲミックス（Ｂｉｏｌｉｎｅ）を用いて、ＢｉｏＲａｄＣＦＸサーモサイクラ内でリアルタイムｑＰＣＲを設定した。使用したプライマーは、以下のものであった：ｑｐｃｒｃｅｎｐａ＿Ｆ（配列番号１１６）、ｑｐｃｒｃｅｎｐａ＿Ｒ（配列番号１１７）及びａｃｔＢｆ（配列番号６７）、ａｃｔＢｒ（配列番号６８）。結果はΔΔＣＴ法で分析し、βアクチンについて正規化した。

【０２０２】

結果

図２０を参照すると、図２０Ａに示すｄｏｘ－架橋標的ベクターを用いていくつかの標的Ｃ２マウスＥＳ細胞株を作製した（図２０Ｂ）。これらの細胞株の６つは、５’及び３’に正しい挿入を有することが判明し、少なくとも１つのクローン（Ｃｅｎｐａ＃４）は、Ｃｅｎｐａの両対立遺伝子の５’ＵＴＲへの相同組換えにより挿入されたｄｏｘ－架橋を含む同型接合標的株（図２０Ｂ）であることが判明した。

【０２０３】

予想通り、このＥＳ細胞株は、ドキシサイクリンの存在下でのみ増殖する。ドキシサイクリンの存在下で、Ｃｅｎｐａプロモータにより生成されたｒｔＴＡはＴＲＥに結合し、Ｃｅｎｐａコード配列の転写を開始する。ＣＤＬ発現がＥＡＲＣによってのみ起こり得ることを確実にするために、Ｃｅｎｐａの両対立遺伝子の５’ＵＴＲにｄｏｘ－架橋を挿入してもよい。別の方法は、ＣＤＬの残る非ＥＡＲＣ修飾対立遺伝子の全てにヌル突然変異を生成することである。

【０２０４】

ドキシサイクリンの使用を中止すると、４日以内に有糸分裂活性ＥＳ細胞が完全に排除された（図２１Ａ）。

【０２０５】

図２１Ｂを参照すると、本発明者らは、Ｄｏｘを用いた場合及びＤｏｘの除去の２日後のＣｅｎｐａ－ＥＡＲＣ細胞中のＣｅｎｐａ遺伝子発現レベルをｑＰＣＲにより決定し、それを野生型マウスＥＳ細胞（Ｃ２）中の発現レベルと比較した。予想した通り、Ｃｅｎｐａ発現レベルは、２日間Ｄｏｘを用いないＣｅｎｐａ－ＥＡＲＣ細胞で大幅に低下した。

【０２０６】

図２２を参照すると、本発明者らは、４日にわたって細胞増殖を測定することにより、様々な濃度のドキシサイクリンがｏｘ－架橋ＥＳ細胞の増殖にどの程度影響するかを決定した。ドキシサイクリンの存在下で、ＥＳ細胞は指数関数的に増殖し、その正常な増殖を示した。対照的に、ドキシサイクリンの除去から８０時間後、細胞増殖は完全に停止した

。
【０２０７】
実施例６：Ｂｉｒｃ５遺伝子座でのＥＡＲＣ修飾マウスＥＳ細胞の作製
実施例６では、Ｂｉｒｃ５をターゲティングするＥＡＲＣ（ｄｏｘ－架橋）ベクターの構築、並びにマウスＥＳ細胞の細胞分裂を制御するためのそのベクターの使用について説明する。この実施例では、Ｂｉｒｃ５／ＢＩＲＣ５は、ＣＤＬであり、これは、ｄｏｘ－架橋が挿入されて、ドキシサイクリンがＣＤＬの発現を誘導する誘導性遺伝子発現系によってターゲティングされる。
【０２０８】
前述したように、Ｂｉｒｃ５／ＢＩＲＣ５は、全ての有糸分裂活性（すなわち、分裂）細胞で発現される。Ｂｉｒｃ５遺伝子座にＥＡＲＣ（ｄｏｘ－架橋）挿入を含むように修飾された細胞において、細胞分裂は、Ｂｉｒｃ５の発現を可能にする誘導物質（ドキシサイクリン）の存在下でのみ可能である。従って、ＥＡＲＣ修飾有糸分裂活性細胞の細胞分裂は、ドキシサイクリンの非存在下で排除することができる。
【０２０９】
実施例６において、Ｂｉｒｃ５遺伝子の５’ＵＴＲへのｄｏｘ－架橋挿入は、相同組換えノックイン技術により達成された。
【０２１０】
方法
ｄｏｘ－架橋を含むＥＡＲＣターゲティングベクターの構築
Ｃ５７／Ｂ６ゲノムＤＮＡ（プライマーＢｉｒｃ３Ｆ（配列番号１１９）及びＢｉｒｃ３Ｒ（配列番号１２０）から７７５ｂｐ断片をＰＣＲ増幅した後、これをｐＧｅｍ－ｂｒｉｄｇｅ－ｓｔｅｐ３のＳｂｆＩ及びＮｃｏＩにクローニングすることにより、３’相同性アーム（配列番号１１８）をクローニングした。同様に、プライマーＢｉｒｃ５Ｆ（配列番号１２２）及びＢｉｒｃ５Ｒ　ＰｓｔＩ（配列番号１２３）及びＳｐｅＩを用いたＰＣＲにより５’相同性アーム（６１７ｂｐ；配列番号１２１）を増幅し、これをＳｐｅＩにクローニングして最終ターゲティングベクターを作製し、これをｐＢｒｉｄｇｅ－Ｂｉｒｃ５（配列番号１２４）と称する。
【０２１１】
ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９プラスミドの構築
オフターゲット突然変異の可能性を最小限にするために、二重ニッカーゼ戦略を選択した。オリゴＢｉｒｃ５ＡＦ（配列番号１２５）、Ｂｉｒｃ５ＡＲ（配列番号１２６）、Ｂｉｒｃ５ＢＦ（配列番号１２７）、Ｂｉｒｃ５ＢＲ（配列番号１２８）を用いて、提案されたプロトコル（Ｒａｎ　ｅｔ　ａｌ．，２０１３）に従い、ガイドＲＮＡ配列をｐＸ３３５（Ａｄｄｇｅｎｅ）にクローニングしてＣＲＩＳＰＲベクターｐＸ３３５－Ｂｉｒｃ５Ａ（配列番号１２９）及びｐＸ３３５－Ｂｉｒｃ５Ｂ（配列番号１３０）を作製した。
【０２１２】
ＥＡＲＣ修飾マウスＥＳ細胞の作製
マウスＥＳ細胞培養物：
実施例４に記載の通り。
ターゲティング：
ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９成分（ｐＸ３３５－Ｂｉｒｃ５Ａ及びｐＸ３３５－Ｂｉｒｃ５Ｂ）を含有するプラスミドと、ターゲティングプラスミド（ｐＢｒｉｄｇｅ－Ｂｉｒｃ５）とを、実施例４に記載のように、ＦｕＧＥＮＥ　ＨＤ（Ｃｌｏｎｔｅｃｈ）を用いて、マウスＥＳ細胞に同時トランスフェクトした。
【０２１３】
遺伝子型決定：
実施例４に記載のように、ＤＮＡを抽出した。Ｂｉｒｃ５遺伝子の５’におけるｐＢｒｉｄｇｅ－Ｂｉｒｃ５の相同組換えによる正しい挿入について陽性のクローンを、５’相同性アームにわたるプライマー（プライマーｒｔｔａＲｅｖ（配列番号５４）、Ｂｉｒｃ

＿５ｓｃｒＦ（配列番号１３１））を用いたＰＣＲによりスクリーニングした。
【０２１４】
標的細胞増殖：
Ｂｉｒｃ５同型接合性標的細胞をトリプシン処理した後、１ウェル当たり５×１０^{4}細胞の密度で、ゼラチン化２４ウェルプレート上で平板培養した。平板培養後の１日目から、様々なＤｏｘ濃度（１μｇ／ｍｌ、０．５μｇ／ｍｌ、０．０５μｇ／ｍｌ及び０μｇ／ｍｌ）に細胞を曝露し、３～４日にわたって２時間毎に写真を撮り、密集度を測定することにより、ＩｎｃｕｃｙｔｅＺｏｏｍ ｓｙｓｔｅｍ（Ｅｓｓｅｎ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅ）でプレートを分析した。
【０２１５】
定量ＰＣＲ：
製造者のプロトコルに従い、ＧｅｎｅＥｌｕｔｅ全ＲＮＡミニプレップキット（Ｓｉｇｍａ）を用いて、１μｇ／ｍｌ及び０μｇ／ｍｌのＤｏｘで２日間処理した細胞から全ＲＮＡを抽出した。製造者のプロトコルに従い、ＱｕａｎｔｉＴｅｃｔ逆転写キット（Ｑｉａｇｅｎ）を用いて、１μｇのＲＮＡの逆転写により、ｃＤＮＡを作製した。ＳｅｎｓｉＦａｓｔ－ＳＹＢＲ ｑＰＣＲミックス（Ｂｉｏｌｉｎｅ）を用いて、ＢｉｏＲａｄＣＦＸサーモサイクラ内でリアルタイムｑＰＣＲを設定した。使用したプライマーは、以下のものであった：ｑｐｃｒｂｉｒｃ＿Ｆ（配列番号１３２）、ｑｐｃｒｂｉｒｃ＿Ｒ（配列番号１３３）及びａｃｔＢｆ（配列番号６７）、ａｃｔＢｒ（配列番号６８）。結果は、ΔΔＣＴ法で分析し、βアクチンについて正規化した。
【０２１６】
結果
図２３を参照すると、図２３Ａに示すｄｏｘ－架橋標的ベクターを用いて、標的Ｃ２マウスＥＳ細胞株を作製した（図２３Ｂ）。５つのクローンは、正しくターゲティングされ（図２３Ｂ）、Ｂｉｒｃ５の両対立遺伝子の５’ＵＴＲへの組換えにより挿入されたｄｏｘ－架橋を含むことが判明した。これらのクローンの１つは、Ｂｉｒｃ＃３であり、これは、Ｄｏｘの非存在下で増殖を停止するか、又は死滅することが判明した。
【０２１７】
予想通り、このＥＳ細胞株は、ドキシサイクリンの存在下でのみ増殖する。ドキシサイクリンの存在下で、Ｂｉｒｃ５プロモータにより生成されたｒｔＴＡは、ＴＲＥに結合し、Ｂｉｒｃ５コード配列の転写を開始する。ＣＤＬ発現がＥＡＲＣによってのみ起こり得ることを確実にするために、Ｂｉｒｃ５の両対立遺伝子の５’ＵＴＲにｄｏｘ－架橋を挿入してもよい。別の方法は、ＣＤＬの残る非ＥＡＲＣ修飾対立遺伝子の全てにヌル突然変異を生成することである。
【０２１８】
ドキシサイクリンの使用を中止すると、４日以内に有糸分裂活性ＥＳ細胞が完全に排除された（図２４Ａ）。
【０２１９】
図２４Ｂを参照すると、本発明者らは、Ｄｏｘを用いた場合と、Ｄｏｘの除去の２日後のＢｉｒｃ５－ＥＡＲＣ細胞中のＢｉｒｃ５遺伝子発現レベルをｑＰＣＲにより決定し、それを野生型マウスＥＳ細胞（Ｃ２）中の発現レベルと比較した。予想した通り、Ｂｉｒｃ５発現レベルは、２日間Ｄｏｘを用いないＢｉｒｃ５－ＥＡＲＣ細胞において大幅に低下した。
【０２２０】
図２５を参照すると、本発明者らは、４日にわたって細胞増殖を測定することにより、様々な濃度のドキシサイクリンがｄｏｘ－架橋ＥＳ細胞の増殖にどの程度影響するかを決定した。ドキシサイクリンの存在下で、ＥＳ細胞は指数関数的に増殖し、その正常な増殖を示した。対照的に、ドキシサイクリンの除去から５０時間後、細胞増殖は完全に停止した。興味深いことに、より低いＤｏｘ濃度（０．５及び０．０５μｇ／ｍｌ）は、より高い濃度（１μｇ／ｍｌ）に比べ、細胞増殖を良好に促進しているように見える。

【０２２１】
実施例７：Ｅｅｆ２遺伝子座でのＥＡＲＣ修飾マウスＥＳ細胞の作製
実施例７では、Ｅｅｆ２をターゲティングするＥＡＲＣ（ｄｏｘ－架橋）ベクターの構築、並びにマウスＥＳ細胞の細胞分裂を制御するためのそのベクターの使用について説明する。この実施例では、Ｅｅｆ２／ＥＥＦ２は、ＣＤＬであり、これは、ｄｏｘ－架橋が挿入されて、ドキシサイクリンがＣＤＬの発現を誘導する誘導性遺伝子発現系によってターゲティングされる。
【０２２２】
前述したように、Ｅｅｆ２／ＥＥＦ２は、全ての有糸分裂活性（すなわち、分裂）細胞で発現される。Ｅｅｆ２遺伝子座にＥＡＲＣ（ｄｏｘ－架橋）挿入を含むように修飾された細胞において、細胞分裂は、Ｅｅｆ２の発現を可能にする誘導物質（ドキシサイクリン）の存在下でのみ可能である。従って、ＥＡＲＣ修飾有糸分裂活性細胞の細胞分裂は、ドキシサイクリンの非存在下で排除することができる。
【０２２３】
実施例７において、Ｅｅｆ２遺伝子の５’ＵＴＲへのｄｏｘ－架橋挿入は、相同組換えノックイン技術により達成された。
【０２２４】
方法
ｄｏｘ－架橋を含むＥＡＲＣターゲティングベクターの構築
Ｃ５７／Ｂ６ゲノムＤＮＡ（プライマーＥｅｆ２＿５Ｆ（配列番号１３５）及びＥｅｆ２＿５Ｒ（配列番号１３６）から８１７ｂｐ断片（配列番号１３４）をＰＣＲ増幅した後、これをｐＧｅｍ－ｂｒｉｄｇｅ－ｓｔｅｐ３のＳｂｆＩ及びＳｐｅＩにクローニングすることにより、５’相同性アームをクローニングした。同様に、プライマーＥｅｆ２＿３Ｆ（配列番号１３８）、Ｅｅｆ２＿３Ｒ（配列番号１３９）を用いたＰＣＲにより３’相同性アーム（８２６ｂｐ；配列番号１３７）を増幅し、これをＳｐｈＩにクローニングして、ｐＢｒｉｄｇｅ－Ｅｅｆ２（配列番号１４０）と称する最終ターゲティングベクターを作製した。
【０２２５】
ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９プラスミドの構築
オフターゲット突然変異の可能性を最小限にするために、二重ニッカーゼ戦略を選択した。オリゴＥｅｒｆ２ａＦＷＤ（配列番号１４１）、Ｅｅｒｆ２ａＲＥＶ（配列番号１４２）、Ｅｅｒｆ２ｂＦＷＤ（配列番号１４３）、Ｅｅｒｆ２ｂＲＥＶ（配列番号１４４）を用いて、提案されたプロトコル（Ｒａｎ　ｅｔ　ａｌ．，２０１３）に従い、ガイドＲＮＡ配列をｐＸ３３５（Ａｄｄｇｅｎｅ）にクローニングしてＣＲＩＳＰＲベクターｐＸ３３５－Ｅｅｆ２Ａ（配列番号１４５）及びｐＸ３３５－Ｅｅｆ２Ｂ（配列番号１４６）を作製した。
【０２２６】
ＥＡＲＣ修飾マウスＥＳ細胞の作製
マウスＥＳ細胞培養物：
実施例４に記載の通り。
ターゲティング：
ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９成分（ｐＸ３３５－Ｅｅｆ２Ａ及びｐＸ３３５－Ｅｅｆ２Ｂ）を含有するプラスミドと、ターゲティングプラスミド（ｐＢｒｉｄｇｅ－Ｅｅｆ２）とを、実施例４に記載のように、ＦｕＧＥＮＥ　ＨＤ（Ｃｌｏｎｔｅｃｈ）を用いてマウスＥＳ細胞に同時トランスフェクトした。
【０２２７】
遺伝子型決定：
実施例４に記載のようにＤＮＡを抽出した。Ｅｅｆ２遺伝子の５’におけるｐＢｒｉｄｇｅ－Ｅｅｆ２の相同組換えによる正しい挿入について陽性のクローンを、５’相同性アームにわたるプライマー（プライマーｒｔｔａＲｅｖ（配列番号５４）、Ｅｅｆ２＿５ｓ

ｃｒＦ（配列番号１４７））を用いたＰＣＲによりスクリーニングした。
【０２２８】
標的細胞増殖：
Ｅｅｆ２同型接合性標的細胞をトリプシン処理した後、１ウェル当たり５×１０^{4}細胞の密度においてゼラチン化２４ウェルプレート上で平板培養した。平板培養後の１日目から、様々なＤｏｘ濃度（１μｇ／ｍｌ、０．５μｇ／ｍｌ、０．０５μｇ／ｍｌ及び０μｇ／ｍｌ）に細胞を曝露し、３～４日にわたって２時間毎に写真を撮り、密集度を測定することにより、ＩｎｃｕｃｙｔｅＺｏｏｍ ｓｙｓｔｅｍ（Ｅｓｓｅｎ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅ）でプレートを分析した。
【０２２９】
結果
図２６を参照すると、図２６Ａに示すｄｏｘ－架橋標的ベクターを用いていくつかの標的Ｃ２マウスＥＳ細胞株を作製した（図２６Ｂ）。これらの細胞株のうちの９つは、正しくターゲティングされ（図２６Ｂ）、少なくとも１つのクローンがＤｏｘ培地中でのみ増殖することが判明した。
【０２３０】
予想通り、このＥＳ細胞株は、ドキシサイクリンの存在下でのみ増殖する。ドキシサイクリンの存在下で、Ｅｅｆ２プロモータにより生成されたｒｔＴＡはＴＲＥに結合し、Ｅｅｆ２コード配列の転写を開始する。ＣＤＬ発現がＥＡＲＣによってのみ起こり得ることを確実にするために、Ｅｅｆ２の両対立遺伝子の５’ＵＴＲにｄｏｘ－架橋を挿入してもよい。別の方法は、ＣＤＬの残る非ＥＡＲＣ修飾対立遺伝子の全てにヌル突然変異を生成することである。
【０２３１】
ドキシサイクリンの使用を中止すると、４日以内に有糸分裂活性ＥＳ細胞が完全に排除された（図２７）。
【０２３２】
図２８を参照すると、本発明者らは、４日にわたって細胞増殖を測定することにより、様々な濃度のドキシサイクリンがｄｏｘ－架橋ＥＳ細胞の増殖にどの程度影響するかを決定した。ドキシサイクリンの存在下で、ＥＳ細胞は指数関数的に増殖し、その正常な増殖を示した。対照的に、ドキシサイクリンがなければ、細胞は全く増殖することができなくなった。
【０２３３】
いくつかの具体的な実施形態を参照して本開示を説明してきたが、その様々な改変形態は当業者に明らかであろう。本明細書において提供するいずれの実施例も、本開示を例示するために含まれているにすぎず、本開示を何ら限定する意図はない。本明細書において提供するいずれの図面も、本開示の様々な態様を例示することを目的とするにすぎず、本開示を一定の比率で描くこと又は限定することを決して意図しない。添付の特許請求の範囲は、上の説明に記載した好ましい実施形態によって限定すべきではなく、全体として本明細書と一致する最も広い解釈が与えられるべきである。本明細書で挙げた全ての従来の技術の開示は、全体として参照により本明細書に組み込まれるものとする。
【０２３４】
表２：
予測ＣＤＬ（ＩＤは、ＥｎｔｒｅｚＧｅｎｅ識別番号を指す。ＣＳスコアは、Ｗａｎｇ ｅｔ ａｌ．，２０１５に記載されているＣＲＩＳＰＲスコア平均を指し；機能は、遺伝子座の既知若しくは予測機能を指し、予測は、Ｇｅｎｅ Ｏｎｔｏｌｏｇｙ Ｃｏｎｓｏｒｔｉｕｍウェブサイトｈｔｔｐ：／／ｇｅｎｅｏｎｔｏｌｏｇｙ．ｏｒｇ／に記載の通り、ＧＯ ｔｅｒｍに基づくものであり；機能カテゴリーは、ＧＯｔｅｒｍ予測機能に基づく細胞機能の４カテゴリーを指し；ＣＤＬ（基本）は、遺伝子がＣＤＬであることを予測するために本発明者らが用いた情報を指し、予測は、ＣＳスコア、入手可能な遺伝子ノックアウト（ＫＯ）データ、遺伝子機能、及び本明細書に記載する実験データに基づく

）。

【０２３５】

【表２】

名称 (マウス)	ID (マウス)	名称 (ヒト)	ID (ヒト)	CS スコア	機能 (GOターム)	機能 カテゴリー	CDL (基本)	出典
Actr8	56249	ACTR8	93973	-1.88	クロマチン リモデリング	細胞周期	CS スコア、機能	
Alg11	207958	ALG11	440138	-1.27	ドリコール結合型 オリゴ糖生 合成プロセス	細胞周期	CS スコア、機能	
Anapc11	66156	ANAPC11	51529	-2.68	ユビキチン依存性 タンパク質の異化プロセスに 関与するタンパク質 ユビキチン化	細胞周期	CS スコア、機能	
Anapc2	99152	ANAPC2	29882	-2.88	有糸分裂細胞周期	細胞周期	CS スコア、マウス K.O.、機能	Wirth KG, et al. Genes Dev. 2004 Jan 1;18(1):88-98
Anapc4	52206	ANAPC4	29945	-1.79	有糸分裂 中期/後期 移行の調節	細胞周期	CS スコア、機能	
Anapc5	59008	ANAPC5	51433	-1.66	有糸分裂細胞周期	細胞周期	CS スコア、機能	
Aurka	20878	AURKA	6790	-2.26	減数分裂紡錘体 構成	細胞周期	CS スコア、マウス K.O.、機能	Sasai K, et al. Oncogene. 2008 Jul 3;27(29):4122-7
Banf1	23825	BANF1	8815	-2.14	有糸分裂細胞周期	細胞周期	CS スコア、機能	
Birc5	11799	BIRC5	332	-2.24	シグナル伝達の 調節	細胞周期	CS スコア、マウス K.O.、機能	Uren AG, et al. Curr Biol. 2000 Nov 2;10(21):1319-28
Bub3	12237	BUB3	9184	-3.15	有糸分裂姉妹 染色分体 分離	細胞周期	CS スコア、マウス K.O.、機能	Kalitsis P, et al. Genes Dev. 2000 Sep 15;14(18):2277-82
Casc5	76464	CASC5	57082	-1.16	有糸分裂細胞周期	細胞周期	CS スコア、マウス K.O.、機能	Overbeek PA, et al. MGI Direct Data Submission. 2011
Ccna2	12428	CCNA2	890	-1.59	サイクリン 依存性タンパク質 セリン/トレオニンキナーゼ 活性の調節	細胞周期	CS スコア、マウス K.O.、機能	Kalaszczynska I, et al. Cell. 2009 Jul 23;138(2):352-65
Ccnh	66671	CCNH	902	-2.01	サイクリン 依存性タンパク質 セリン/トレオニンキナーゼ 活性の調節	細胞周期	CS スコア、機能	
Cdc123	98828	CDC123	8872	-2.45	細胞周期	細胞周期	CS スコア、機能	
Cdc16	69957	CDC16	8881	-3.58	細胞分裂	細胞周期	CS スコア、機能	
Cdc20	107995	CDC20	991	-2.97	有糸分裂細胞周期	細胞周期	CS スコア、マウス K.O.、機能	Li M, et al. Mol Cell Biol. 2007 May;27(9):3481-8
Cdc23	52563	CDC23	8697	-2.28	有糸分裂細胞周期	細胞周期	CS スコア、機能	

【０２３６】

【表３】

Cdk1	12534	CDK1	983	-2.44	細胞周期	細胞周期	CS スコア、マウス K.O.、機能	Diril MK, et al. Proc Natl Acad Sci U S A. 2012 Mar 6;109(10):3826-31
Cenpa	12615	CENPA	1058	-1.87	細胞周期	細胞周期	CS スコア、マウス K.O.、機能	Howman EV, et al. Proc Natl Acad Sci U S A. 2000 Feb 1;97(3):1148-53
Cenpm	66570	CENPM	79019	-2.53	有糸分裂細胞周期	細胞周期	CS スコア、機能	
Chek1	12649	CHEK1	1111	-1.67	タンパク質リン酸化	細胞周期	CS スコア、マウス K.O.、機能	Takai H, et al. Genes Dev. 2000 Jun 15;14(12):1439-47
Chmp2a	68953	CHMP2A	27243	-2.40	液胞輸送	細胞周期	CS スコア、機能	
Ckap5	75786	CKAP5	9793	-2.94	有糸分裂細胞周期のG2/M 移行	細胞周期	CS スコア、マウス K.O.、機能	Barbarese E, et al. PLoS One. 2013;8(8):e69989
Cltc	67300	CLTC	1213	-1.75	細胞内タンパク質輸送	細胞周期	CS スコア、機能	
Cops5	26754	COPS5	10987	-1.75	タンパク質の脱NEDD 化	細胞周期	CS スコア、マウス K.O.、機能	Tian L, et al. Oncogene. 2010 Nov 18;29(46):6125-37
Dctn2	69654	DCTN2	10540	-1.48	有糸分裂細胞周期のG2/M 移行	細胞周期	CS スコア、機能	
Dctn3	53598	DCTN3	11258	-1.77	有糸分裂細胞周期のG2/M 移行	細胞周期	CS スコア、機能	
Dhfr	13361	DHFR	1719	-2.84	有糸分裂細胞周期のG1/S 移行	細胞周期	CS スコア、機能	
Dtl	76843	DTL	51514	-2.69	タンパク質のポリユビキチン化	細胞周期	CS スコア、マウス K.O.、機能	Liu CL, et al. J Biol Chem. 2007 Jan 12;282(2):1109-18
Dync1h1	13424	DYNC1H1	1778	-3.44	有糸分裂細胞周期のG2/M 移行	細胞周期	CS スコア、マウス K.O.、機能	Harada A, et al. J Cell Biol. 1998 Apr 6;141(1):51-9
Ecd	70601	ECD	11319	-3.18	解糖プロセスの調節	細胞周期	CS スコア、機能	
Ect2	13605	ECT2	1894	-1.80	細胞形態形成	細胞周期	CS スコア、マウス K.O.、機能	Hansen J, et al. Proc Natl Acad Sci U S A. 2003 Aug 19;100(17):9918-22
Ep300	328572	EP300	2033	-2.04	有糸分裂細胞周期のG2/M 移行	細胞周期	CS スコア、マウス K.O.、機能	Yao TP, et al. Cell. 1998 May 1;93(3):361-72
Ercc3	13872	ERCC3	2071	-2.10	ヌクレオチド除去修復	細胞周期	CS スコア、マウス K.O.、機能	Andressoo JO, et al. Mol Cell Biol. 2009 Mar;29(5):1276-90
Espl1	105988	ESPL1	9700	-3.24	タンパク質分解	細胞周期	CS スコア、マウス K.O.、機能	Wirth KG, et al. J Cell Biol. 2006 Mar 13;172(6):847-60
Fntb	110606	FNTB	2342	-2.42	光シグナル伝達,可視光線	細胞周期	CS スコア、マウス K.O.、機能	Mijimolle N, et al. Cancer Cell. 2005 Apr;7(4):313-24
Gadd45gip1	102060	GADD45GIP1	90480	-1.81	オルガネラ構成	細胞周期	CS スコア、マウス K.O.、機能	Kwon MC, et al. EMBO J. 2008 Feb 20;27(4):642-53
Gins1	69270	GINS1	9837	-1.84	有糸分裂細胞周期	細胞周期	CS スコア、マウス K.O.、機能	Ueno M, et al. Mol Cell Biol. 2005 Dec;25(23):10528-32
Gnb2l1	14694	GNB2L1	10399	-2.84	骨芽細胞分化	細胞周期	CS スコア、機能	
Gspt1	14852	GSPT1	2935	-1.77	有糸分裂細胞周期のG1/S 移行	細胞周期	CS スコア、機能	
Haus1	225745	HAUS1	115106	-1.92	紡錘体集合	細胞周期	CS スコア、機能	
Haus3	231123	HAUS3	79441	-1.38	細胞核分裂	細胞周期	CS スコア、機能	
Haus5	71909	HAUS5	23354	-2.55	紡錘体集合	細胞周期	CS スコア、機能	

【０２３７】

【表４】

Haus8	76478	HAUS8	93323	-1.73	細胞核 分裂	細胞周期	CS スコア、 機能	
Hdac3	15183	HDAC3	8841	-2.12	ヒストン脱アセチル化	細胞周期	CS スコア、 マウス K.O.、 機能	Bhaskara S, et al. Mol Cell. 2008 Apr 11;30(1):61-72
Kif11	16551	KIF11	3832	-3.23	微小管に基づく 運動	細胞周期	CS スコア、 マウス K.O.、 機能	Castillo A, et al. Biochem Biophys Res Commun. 2007 Jun 8;357(3):694-9
Kif23	71819	KIF23	9493	-1.59	微小管に基づく 運動	細胞周期	CS スコア、 機能	
Kpnb1	16211	KPNB1	3837	-3.19	核細胞質間 輸送	細胞周期	CS スコア、 マウス K.O.、 機能	Miura K, et al. Biochem Biophys Res Commun. 2006 Mar 3;341(1):132-8
Mastl	67121	MASTL	84930	-2.36	タンパク質 リン酸化	細胞周期	CS スコア、 マウス K.O.、 機能	Alvarez-Fernandez M, et al. Proc Natl Acad Sci U S A. 2013 Oct 22;110(43):17374-9
Mau2	74549	MAU2	23383	-2.71	有糸分裂細胞周期	細胞周期	CS スコア、 マウス K.O.、 機能	Smith TG, et al. Genesis. 2014 Jul;52(7):687-94
Mcm3	17215	MCM3	4172	-2.52	有糸分裂細胞周期の G1/S 移行	細胞周期	CS スコア、 機能	
Mcm4	17217	MCM4	4173	-1.87	有糸分裂細胞周期の G1/S 移行	細胞周期	CS スコア、 マウス K.O.、 機能	Shima N, et al. Nat Genet. 2007 Jan;39(1):93-8
Mcm7	17220	MCM7	4176	-2.39	有糸分裂細胞周期の G1/S 移行	細胞周期	CS スコア、 機能	
Mnat1	17420	MNAT1	4331	-1.22	サイクリン依存性 タンパク質 セリン/トレオニンキナーゼ 活性の調節	細胞周期	CS スコア、 マウス K.O.、 機能	Rossi DJ, et al. EMBO J. 2001 Jun 1;20(11):2844-56
Mybbp1a	18432	MYBBP1A	10514	-2.17	骨芽細胞 分化	細胞周期	CS スコア、 マウス K.O.、 機能	Mori S, et al. PLoS One. 2012;7(10):e39723
Ncapd2	68298	NCAPD2	9918	-2.03	分裂期染色体 凝縮	細胞周期	CS スコア、 機能	
Ncaph	215387	NCAPH	23397	-2.33	分裂期染色体 凝縮	細胞周期	CS スコア、 マウス K.O.、 機能	Nishide K, et al. PLoS Genet. 2014 Dec;10(12):e1004847
Ndc80	67052	NDC80	10403	-2.98	分裂期紡錘体微 小管のキネトコアへの 付着	細胞周期	CS スコア、 機能	
Nle1	217011	NLE1	54475	-1.88	体節形成	細胞周期	CS スコア、 マウス K.O.、 機能	Hentges KE, et al. Gene Expr Patterns. 2006 Aug;6(6):653-65
Nsl1	381318	NSL1	25936	-1.90	有糸分裂細胞周期	細胞周期	CS スコア、 機能	
Nudc	18221	NUDC	10726	-1.93	有糸分裂細胞周期	細胞周期	CS スコア、 機能	
Nuf2	66977	NUF2	83540	-1.78	細胞核 分裂	細胞周期	CS スコア、 機能	
Nup133	234865	NUP133	55746	-2.26	有糸分裂細胞周期	細胞周期	CS スコア、 マウス K.O.、 機能	Garcia-Garcia MJ, et al. Proc Natl Acad Sci U S A. 2005 Apr 26;102(17):5913-9
Nup160	59015	NUP160	23279	-2.64	有糸分裂細胞周期	細胞周期	CS スコア、 機能	
Nup188	227699	NUP188	23511	-1.16	有糸分裂細胞周期	細胞周期	CS スコア、 機能	
Nup214	227720	NUP214	8021	-2.70	有糸分裂細胞周期	細胞周期	CS スコア、 マウス K.O.、 機能	van Deursen J, et al. EMBO J. 1996 Oct 15;15(20):5574-83
n/a	n/a	NUP62	23636	-2.35	有糸分裂細胞周期	細胞周期	CS スコア、 機能	
Nup85	445007	NUP85	79902	-2.47	有糸分裂細胞周期	細胞周期	CS スコア、 機能	
Orc3	50793	ORC3	23595	-1.67	有糸分裂細胞周期の G1/S 移行	細胞周期	CS スコア、 機能	
Pafah1b1	18472	PAFAH1B1	5048	-2.34	有糸分裂細胞周期の G2/M 移行	細胞周期	CS スコア、 マウス K.O.、 機能	Cahana A, et al. Proc Natl Acad Sci U S A. 2001 May 22;98(11):6429-34

【０２３８】

【表５】

Pcid2	234069	PCID2	55795	-1.98	アポトーシスプロセスの負の調節	細胞周期	CS スコア、機能	
Pfas	237823	PFAS	5198	-2.58	プリンヌクレオチドの生合成プロセス	細胞周期	CS スコア、機能	
Phb2	12034	PHB2	11331	-2.98	核へのタンパク質移入、転位	細胞周期	CS スコア、マウス K.O.、機能	Park SE, et al. Mol Cell Biol. 2005 Mar;25(5):1989-99
Pkmyt1	268930	PKMYT1	9088	-1.93	サイクリン依存性タンパク質セリン/トレオニンキナーゼ活性の調節	細胞周期	CS スコア、機能	
Plk1	18817	PLK1	5347	-2.83	タンパク質リン酸化	細胞周期	CS スコア、マウス K.O.、機能	Lu LY, et al. Mol Cell Biol. 2008 Nov;28(22):6870-6
Pmf1	67037	PMF1	11243	-2.15	有糸分裂細胞周期	細胞周期	CS スコア、機能	
Pole2	18974	POLE2	5427	-3.08	有糸分裂細胞周期の G1/S 移行	細胞周期	CS スコア、機能	
Ppat	231327	PPAT	5471	-2.15	有糸分裂細胞周期の G1/S 移行	細胞周期	CS スコア、機能	
Psma6	26443	PSMA6	5687	-3.51	有糸分裂細胞周期の G1/S 移行	細胞周期	CS スコア、機能	
Psma7	26444	PSMA7	5688	-2.91	有糸分裂細胞周期の G1/S 移行	細胞周期	CS スコア、機能	
Psmb1	19170	PSMB1	5689	-1.63	有糸分裂細胞周期の G1/S 移行	細胞周期	CS スコア、機能	
Psmb4	19172	PSMB4	5692	-2.91	有糸分裂細胞周期の G1/S 移行	細胞周期	CS スコア、機能	
Psmd12	66997	PSMD12	5718	-1.69	有糸分裂細胞周期の G1/S 移行	細胞周期	CS スコア、機能	
Psmd13	23997	PSMD13	5719	-1.57	有糸分裂細胞周期の G1/S 移行	細胞周期	CS スコア、機能	
Psmd14	59029	PSMD14	10213	-3.01	有糸分裂細胞周期の G1/S 移行	細胞周期	CS スコア、機能	
Psmd7	17463	PSMD7	5713	-2.18	有糸分裂細胞周期の G1/S 移行	細胞周期	CS スコア、マウス K.O.、機能	Soriano P, et al. Genes Dev. 1987 Jun;1(4):366-75
Racgap1	26934	RACGAP 1	29127	-1.94	分裂期紡錘体集合	細胞周期	CS スコア、マウス K.O.、機能	Van de Putte T, et al. Mech Dev. 2001 Apr;102(1-2):33-44
Rad21	19357	RAD21	5885	-2.12	有糸分裂細胞周期	細胞周期	CS スコア、機能	
Rae1	66679	RAE1	8480	-2.15	有糸分裂細胞周期	細胞周期	CS スコア、マウス K.O.、機能	Babu JR, et al. J Cell Biol. 2003 Feb 3;160(3):341-53
Rcc1	100088	RCC1	1104	-2.91	有糸分裂細胞周期の G1/S 移行	細胞周期	CS スコア、機能	
Rfc3	69263	RFC3	5983	-2.74	有糸分裂細胞周期	細胞周期	CS スコア、機能	
Rps27a	78294	RPS27A	6233	-2.74	有糸分裂細胞周期の G1/S 移行	細胞周期	CS スコア、機能	
Rrm2	20135	RRM2	6241	-3.09	有糸分裂細胞周期の G1/S 移行	細胞周期	CS スコア、機能	
Sae1	56459	SAE1	10055	-2.08	細胞タンパク質修飾プロセス	細胞周期	CS スコア、機能	
Sec13	110379	SEC13	6396	-2.96	有糸分裂細胞周期	細胞周期	CS スコア、機能	
Smarcb1	20587	SMARCB 1	6598	-1.98	クロマチンリモデリング	細胞周期	CS スコア、マウス K.O.、機能	Guidi CJ, et al. Mol Cell Biol. 2001 May 15;21(10):3598-603
Smc2	14211	SMC2	10592	-2.13	分裂期染色体凝縮	細胞周期	CS スコア、マウス K.O.、機能	Nishide K, et al. PLoS Genet. 2014 Dec;10(12):e1004847
Smc4	70099	SMC4	10051	-1.47	染色体構成	細胞周期	CS スコア、機能	
Son	20658	SON	6651	-1.99	微小管細胞骨格構成	細胞周期	CS スコア、機能	
Spc24	67629	SPC24	147841	-2.83	有糸分裂細胞周期	細胞周期	CS スコア、機能	
Spc25	66442	SPC25	57405	-1.63	有糸分裂細胞周期	細胞周期	CS スコア、機能	

【０２３９】

【表６】

Terf2	21750	TERF2	7014	-2.17	テロメア維持	細胞周期	CS スコア、マウス K.O.、機能	Celli GB, et al. Nat Cell Biol. 2005 Jul;7(7):712-8
Tpx2	72119	TPX2	22974	-2.08	アポトーシスプロセス	細胞周期	CS スコア、マウス K.O.、機能	Aguirre-Portoles C, et al. Cancer Res. 2012 Mar 15;72(6):1518-28
Tubg1	103733	TUBG1	7283	-2.08	微小管核形成	細胞周期	CS スコア、マウス K.O.、機能	Yuba-Kubo A, et al. Dev Biol. 2005 Jun 15;282(2):361-73
Tubgcp2	74237	TUBGCP2	10844	-2.78	微小管細胞骨格構成	細胞周期	CS スコア、機能	
Tubgcp5	233276	TUBGCP5	114791	-1.76	微小管細胞骨格構成	細胞周期	CS スコア、機能	
Tubgcp6	328580	TUBGCP6	85378	-1.52	微小管細胞骨格構成	細胞周期	CS スコア、機能	
Txnl4a	27366	TXNL4A	10907	-3.89	細胞核分裂	細胞周期	CS スコア、機能	
Usp39	28035	USP39	10713	-2.85	スプライソソーム複合体集合	細胞周期	CS スコア、機能	
Wdr43	72515	WDR43	23160	-3.02	生殖	細胞周期	CS スコア、機能	
Zfp830	66983	ZNF830	91603	-1.52	胚盤胞成長	細胞周期	CS スコア、マウス K.O.、機能	Houlard M, et al. Cell Cycle. 2011 Jan 1;10(1):108-17
Aatf	56321	AATF	26574	-1.46	DNA 損傷刺激に対する細胞の応答	DNA 複製、DNA 修復	CS スコア、マウス K.O.、機能	Thomas T, et al. Dev Biol. 2000 Nov 15;227(2):324-42
Alyref	21681	ALYREF	10189	-1.92	DNA 組換えの調節	DNA 複製、DNA 修復	CS スコア、機能	
Brf2	66653	BRF2	55290	-2.30	DNA 鋳型による転写、開始	DNA 複製、DNA 修復	CS スコア、機能	
Cdc45	12544	CDC45	8318	-3.69	DNA 複製チェックポイント	DNA 複製、DNA 修復	CS スコア、マウス K.O.、機能	Yoshida K, et al. Mol Cell Biol. 2001 Jul;21(14):4598-603
Cdc6	23834	CDC6	990	-1.87	DNA 複製開始	DNA 複製、DNA 修復	CS スコア、機能	
Cdt1	67177	CDT1	81620	-2.74	DNA 複製チェックポイント	DNA 複製、DNA 修復	CS スコア、機能	
Cinp	67236	CINP	51550	-1.64	DNA 複製	DNA 複製、DNA 修復	CS スコア、機能	
Cirh1a	21771	CIRH1A	84916	-2.62	転写、DNA 鋳型による	DNA 複製、DNA 修復	CS スコア、機能	
Ddb1	13194	DDB1	1642	-2.14	ヌクレオチド除去修復、DNA 損傷除去	DNA 複製、DNA 修復	CS スコア、マウス K.O.、機能	Cang Y, et al. Cell. 2006 Dec 1;127(5):929-40
Ercc2	13871	ERCC2	2068	-2.80	DNA 二本鎖巻き戻し	DNA 複製、DNA 修復	CS スコア、マウス K.O.、機能	de Boer J, et al. Cancer Res. 1998 Jan 1;58(1):89-94
Gabpb1	14391	GABPB1	2553	-1.74	転写、DNA 鋳型による	DNA 複製、DNA 修復	CS スコア、マウス K.O.、機能	Xue HH, et al. Mol Cell Biol. 2008 Jul;28(13):4300-9
Gtf2b	229906	GTF2B	2959	-2.76	転写の調節、DNA 鋳型による	DNA 複製、DNA 修復	CS スコア、機能	
Gtf2h4	14885	GTF2H4	2968	-1.93	ヌクレオチド除去修復、DNA 損傷除去	DNA 複製、DNA 修復	CS スコア、機能	
Gtf3a	66596	GTF3A	2971	-2.25	転写の調節、DNA 鋳型による	DNA 複製、DNA 修復	CS スコア、機能	
Gtf3c1	233863	GTF3C1	2975	-2.45	転写、DNA 鋳型による	DNA 複製、DNA 修復	CS スコア、機能	

【０２４０】

【表７】

Gtf3c2	71752	GTF3C2	2976	-2.09	転写、DNA 鋳型による	DNA 複製、DNA 修復	CS スコア、機能	
Hinfp	102423	HINFP	25988	-2.35	DNA 損傷チェックポイント	DNA 複製、DNA 修復	CS スコア、マウス K.O.、機能	Xie R, et al. Proc Natl Acad Sci U S A. 2009 Jul 9
n/a	n/a	HIST2H2AA3	8337	-1.71	DNA 修復	DNA 複製、DNA 修復	CS スコア、機能	
Ints3	229543	INTS3	65123	-3.14	DNA 修復	DNA 複製、DNA 修復	CS スコア、機能	
Kin	16588	KIN	22944	-1.99	DNA 複製	DNA 複製、DNA 修復	CS スコア、機能	
Mcm2	17216	MCM2	4171	-2.86	DNA 複製開始	DNA 複製、DNA 修復	CS スコア、機能	
Mcm6	17219	MCM6	4175	-1.55	DNA 複製	DNA 複製、DNA 修復	CS スコア、機能	
Mcrs1	51812	MCRS1	10445	-1.23	DNA 修復	DNA 複製、DNA 修復	CS スコア、機能	
Med11	66172	MED11	400569	-2.39	転写、DNA 鋳型による	DNA 複製、DNA 修復	CS スコア、機能	
Mtpap	67440	MTPAP	55149	-1.86	転写、DNA 鋳型による	DNA 複製、DNA 修復	CS スコア、機能	
Myc	17869	MYC	4609	-2.49	転写の調節、DNA 鋳型による	DNA 複製、DNA 修復	CS スコア、マウス K.O.、機能	Trumpp A, et al. Nature. 2001 Dec 13;414(6865):768-73
Ndnl2	66647	NDNL2	56160	-2.03	DNA 修復	DNA 複製、DNA 修復	CS スコア、機能	
Nol11	68979	NOL11	25926	-1.59	転写、DNA 鋳型による	DNA 複製、DNA 修復	CS スコア、機能	
Nol8	70930	NOL8	55035	-1.35	DNA 複製	DNA 複製、DNA 修復	CS スコア、機能	
Pcna	18538	PCNA	5111	-3.60	DNA 複製	DNA 複製、DNA 修復	CS スコア、マウス K.O.、機能	Roa S, et al. Proc Natl Acad Sci U S A. 2008 Oct 21;105(42):16248-53
Pola1	18968	POLA1	5422	-2.28	DNA 依存性 DNA 複製	DNA 複製、DNA 修復	CS スコア、機能	
Pold2	18972	POLD2	5425	-2.51	DNA 複製	DNA 複製、DNA 修復	CS スコア、機能	
Pole	18973	POLE	5426	-2.90	DNA 複製	DNA 複製、DNA 修復	CS スコア、機能	
Polr1a	20019	POLR1A	25885	-2.62	転写、DNA 鋳型による	DNA 複製、DNA 修復	CS スコア、機能	
n/a	n/a	POLR2J2	246721	-3.08	転写、DNA 鋳型による	DNA 複製、DNA 修復	CS スコア、機能	
Polr3a	218832	POLR3A	11128	-2.43	転写、DNA 鋳型による	DNA 複製、DNA 修復	CS スコア、機能	
Polr3c	74414	POLR3C	10623	-2.02	転写、DNA 鋳型による	DNA 複製、DNA 修復	CS スコア、機能	
Polr3h	78929	POLR3H	171568	-2.66	転写、DNA 鋳型による	DNA 複製、DNA 修復	CS スコア、機能	
Prmt1	15469	PRMT1	3276	-2.40	転写の調節、DNA 鋳型による	DNA 複製、DNA 修復	CS スコア、マウス K.O.、機能	Pawlak MR, et al. Mol Cell Biol. 2000 Jul;20(13):4859-69
Prmt5	27374	PRMT5	10419	-2.69	転写の調節、DNA 鋳型による	DNA 複製、DNA 修復	CS スコア、マウス K.O.、機能	Tee WW, et al. Genes Dev. 2010 Dec 15;24(24):2772-7

【０２４１】

【表８】

Puf60	67959	PUF60	22827	-2.69	転写、DNA 鋳型による	DNA 複製、DNA 修復	CS スコア、機能	
Rad51	19361	RAD51	5888	-2.29	DNA 修復	DNA 複製、DNA 修復	CS スコア、マウス K.O.、機能	Tsuzuki T, et al. Proc Natl Acad Sci U S A. 1996 Jun 25;93(13):6236-40
Rad51c	114714	RAD51C	5889	-1.62	DNA 修復	DNA 複製、DNA 修復	CS スコア、マウス K.O.、機能	Smeenk G, et al. Mutat Res. 2010 Jul 7;689(1-2):50-58
Rbx1	56438	RBX1	9978	-2.19	DNA 修復	DNA 複製、DNA 修復	CS スコア、マウス K.O.、機能	Tan M, et al. Proc Natl Acad Sci U S A. 2009 Apr 14;106(15):6203-8
Rfc2	19718	RFC2	5982	-2.88	DNA 依存性 DNA 複製	DNA 複製、DNA 修復	CS スコア、機能	
Rfc4	106344	RFC4	5984	-1.92	DNA 依存性 DNA 複製	DNA 複製、DNA 修復	CS スコア、機能	
Rfc5	72151	RFC5	5985	-2.78	DNA 依存性 DNA 複製	DNA 複製、DNA 修復	CS スコア、機能	
Rpa1	68275	RPA1	6117	-2.61	DNA 複製	DNA 複製、DNA 修復	CS スコア、マウス K.O.、機能	Wang Y, et al. Nat Genet. 2005 Jul;37(7):750-5
Rps3	27050	RPS3	6188	-2.75	DNA 修復	DNA 複製、DNA 修復	CS スコア、機能	
Rrm1	20133	RRM1	6240	-4.16	DNA 複製	DNA 複製、DNA 修復	CS スコア、機能	
Ruvbl1	56505	RUVBL1	8607	-3.26	DNA 二本鎖巻き戻し	DNA 複製、DNA 修復	CS スコア、機能	
Ruvbl2	20174	RUVBL2	10856	-3.91	DNA 修復	DNA 複製、DNA 修復	CS スコア、機能	
Sap30bp	57230	SAP30BP	29115	-2.18	転写の調節、DNA 鋳型による	DNA 複製、DNA 修復	CS スコア、機能	
Smc1a	24061	SMC1A	8243	-2.76	DNA 修復	DNA 複製、DNA 修復	CS スコア、機能	
Smc3	13006	SMC3	9126	-3.22	DNA 修復	DNA 複製、DNA 修復	CS スコア、マウス K.O.、機能	White JK, et al. Cell. 2013 Jul 18;154(2):452-64
Snapc4	227644	SNAPC4	6621	-2.78	転写の調節、DNA 鋳型による	DNA 複製、DNA 修復	CS スコア、機能	
Snapc5	330959	SNAPC5	10302	-2.24	転写の調節、DNA 鋳型による	DNA 複製、DNA 修復	CS スコア、機能	
Snip1	76793	SNIP1	79753	-1.78	転写の調節、DNA 鋳型による	DNA 複製、DNA 修復	CS スコア、機能	
Srrt	83701	SRRT	51593	-2.18	転写、DNA 鋳型による	DNA 複製、DNA 修復	CS スコア、マウス K.O.、機能	Wilson MD, et al. Mol Cell Biol. 2008 Mar;28(5):1503-14
Ssrp1	20833	SSRP1	6749	-1.45	DNA 複製	DNA 複製、DNA 修復	CS スコア、マウス K.O.、機能	Cao S, et al.5 mouse embryos. Mol Cell Biol. 2003 Aug;23(15):5301-7
Taf10	24075	TAF10	6881	-1.38	DNA 鋳型による転写、開始	DNA 複製、DNA 修復	CS スコア、マウス K.O.、機能	Mohan WS Jr, et al. Mol Cell Biol. 2003 Jun;23(12):4307-18
Taf1c	21341	TAF1C	9013	-1.80	rDNA でのクロマチンサイレンシング	DNA 複製、DNA 修復	CS スコア、機能	
Taf6	21343	TAF6	6878	-1.84	DNA 鋳型による転写、開始	DNA 複製、DNA 修復	CS スコア、機能	
Taf6l	67706	TAF6L	10629	-1.53	DNA 鋳型による転写、開始	DNA 複製、DNA 修復	CS スコア、機能	

【０２４２】

【表９】

Ticrr	77011	TICRR	90381	-2.03	DNA 複製	DNA 複製、DNA 修復	CS スコア、機能	
Top1	21969	TOP1	7150	-2.02	DNA トポロジーの変化	DNA 複製、DNA 修復	CS スコア、マウス K.O.、機能	Morham SG, et al. Mol Cell Biol. 1996 Dec;16(12):6804-9
Top2a	21973	TOP2A	7153	-1.50	DNA 複製	DNA 複製、DNA 修復	CS スコア、機能	
Trrap	100683	TRRAP	8295	-2.36	DNA 修復	DNA 複製、DNA 修復	CS スコア、マウス K.O.、機能	Herceg Z, et al. Nat Genet. 2001 Oct;29(2):206-11
Zbtb11	271377	ZBTB11	27107	-2.34	転写、DNA 鋳型による	DNA 複製、DNA 修復	CS スコア、機能	
Actl6a	56456	ACTL6A	86	-2.33	神経網膜発生	DNA 複製、DNA 修復	CS スコア、マウス K.O.、機能	Krasteva V, et al. Blood. 2012 Dec 6;120(24):4720-32
Atr	245000	ATR	545	-2.01	相同組換えによる二本鎖切断修復	DNA 複製、DNA 修復	CS スコア、マウス K.O.、機能	de Klein A, et al. Curr Biol. 2000 Apr 20;10(8):479-82
Chd4	107932	CHD4	1108	-1.71	クロマチン構成	DNA 複製、DNA 修復	CS スコア、機能	
Ciao1	26371	CIAO1	9391	-1.94	染色体分離	DNA 複製、DNA 修復	CS スコア、機能	
Ddx21	56200	DDX21	9188	-2.84	骨芽細胞分化	DNA 複製、DNA 修復	CS スコア、機能	
Dnaja3	83945	DNAJA3	9093	-2.19	ミトコンドリア構成	DNA 複製、DNA 修復	CS スコア、マウス K.O.、機能	Lo JF, et al. Mol Cell Biol. 2004 Mar;24(6):2226-36
Dnmt1	13433	DNMT1	1786	-1.97	メチル化	DNA 複製、DNA 修復	CS スコア、マウス K.O.、機能	Lei H, et al. Development. 1996 Oct;122(10):3195-205
Gins2	272551	GINS2	51659	-3.32	切断誘導性の複製による二本鎖切断修復	DNA 複製、DNA 修復	CS スコア、機能	
Gtf2h3	209357	GTF2H3	2967	-1.84	ヌクレオチド除去修復	DNA 複製、DNA 修復	CS スコア、機能	
n/a	n/a	HIST2H2BF	440689	-1.70	クロマチン構成	DNA 複製、DNA 修復	CS スコア、機能	
Mms22l	212377	MMS22L	253714	-1.38	相同組換えによる二本鎖切断修復	DNA 複製、DNA 修復	CS スコア、機能	
Mtor	56717	MTOR	2475	-1.98	相同組換えによる二本鎖切断修復	DNA 複製、DNA 修復	CS スコア、マウス K.O.、機能	Murakami M, et al. Mol Cell Biol. 2004 Aug;24(15):6710-8
Narfl	67563	NARFL	64428	-2.13	低酸素に対する応答	DNA 複製、DNA 修復	CS スコア、マウス K.O.、機能	Song D, et al. J Biol Chem. 2011 Mar 2
Ndufa13	67184	NDUFA13	51079	-1.31	ペプチダーゼ活性の正の調節	DNA 複製、DNA 修復	CS スコア、マウス K.O.、機能	Huang G, et al. Mol Cell Biol. 2004 Oct;24(19):8447-56
Nol12	97961	NOL12	79159	-1.61	ポリ(A)RNA 結合	DNA 複製、DNA 修復	CS スコア、機能	
Nup107	103468	NUP107	57122	-1.30	輸送	DNA 複製、DNA 修復	CS スコア、機能	
Oraov1	72284	ORAOV1	220064	-2.26	生物学的プロセス	DNA 複製、DNA 修復	CS スコア、機能	
Pam16	66449	PAM16	51025	-2.13	ミトコンドリア基質へのタンパク質移入	DNA 複製、DNA 修復	CS スコア、機能	

【０２４３】

【表１０】

Pola2	18969	POLA2	23649	-2.84	核へのタンパク質移入、転位	DNA複製、DNA修復	CSスコア、機能	
Ppie	56031	PPIE	10450	-1.63	タンパク質ペプチジル-プロリル異性化	DNA複製、DNA修復	CSスコア、機能	
Prpf19	28000	PRPF19	27339	-3.96	最初のエステル交換ステップのための触媒スプライソソームの生成	DNA複製、DNA修復	CSスコア、マウスK.O.、機能	Fortschegger K, et al. Mol Cell Biol. 2007 Apr;27(8):3123-30
Psmc5	19184	PSMC5	5705	-2.57	小胞体関連ユビキチン依存性タンパク質異化プロセス	DNA複製、DNA修復	CSスコア、機能	
Rbbp5	213464	RBBP5	5929	-1.70	クロマチン構成	DNA複製、DNA修復	CSスコア、機能	
Rbbp6	19647	RBBP6	5930	-1.78	子宮内胚発生	DNA複製、DNA修復	CSスコア、マウスK.O.、機能	Li L, et al. Proc Natl Acad Sci U S A. 2007 May 8;104(19):7951-6
Rptor	74370	RPTOR	57521	-2.43	TORシグナル伝達	DNA複製、DNA修復	CSスコア、マウスK.O.、機能	Guertin DA, et al. Dev Cell. 2006 Dec;11(6):859-71
Rrn3	106298	RRN3	54700	-1.85	子宮内胚発生	DNA複製、DNA修復	CSスコア、マウスK.O.、機能	Yuan X, et al. Mol Cell. 2005 Jul 1;19(1):77-87
Smg1	233789	SMG1	23049	-1.94	相同組換えによる二本鎖切断修復	DNA複製、DNA修復	CSスコア、マウスK.O.、機能	Roberts TL, et al. Proc Natl Acad Sci U S A. 2013 Jan 22;110(4):E285-94
Supt6	20926	SUPT6H	6830	-1.78	クロマチンリモデリング	DNA複製、DNA修復	CSスコア、マウスK.O.、機能	Dietrich JE, et al. EMBO Rep. 2015 Aug;16(8):1005-21
Tada2b	231151	TADA2B	93624	-1.23	クロマチン構成	DNA複製、DNA修復	CSスコア、機能	
Tfip11	54723	TFIP11	24144	-2.19	スプライソソーム複合体分解	DNA複製、DNA修復	CSスコア、機能	
Tonsl	66914	TONSL	4796	-3.03	相同組換えによる二本鎖切断修復	DNA複製、DNA修復	CSスコア、機能	
Tpt1	22070	TPT1	7178	-2.05	カルシウムイオン輸送	DNA複製、DNA修復	CSスコア、マウスK.O.、機能	Susini L, et al. Cell Death Differ. 2008 Aug;15(8):1211-20
Uba1	22201	UBA1	7317	-2.90	タンパク質ユビキチン化	DNA複製、DNA修復	CSスコア、機能	
Vps25	28084	VPS25	84313	-2.31	多胞体選別経路によるユビキチン依存性タンパク質異化プロセスに関与する液胞に対するタンパク質ターゲティング	DNA複製、DNA修復	CSスコア、機能	
Wbscr22	66138	WBSCR22	114049	-2.70	メチル化	DNA複製、DNA修復	CSスコア、機能	
Wdr5	140858	WDR5	11091	-1.99	骨格系発生	DNA複製、DNA修復	CSスコア、機能	
Xab2	67439	XAB2	56949	-2.86	最初のエステル交換ステップのための触媒スプライソソームの生成	DNA複製、DNA修復	CSスコア、マウスK.O.、機能	Yonemasu R, et al. DNA Repair (Amst). 2005 Apr 4;4(4):479-91
Zmat2	66492	ZMAT2	153527	-2.17	ヒスチジン-tRNAリガーゼ活性	DNA複製、DNA修復	CSスコア、機能	
Zfp335	329559	ZNF335	63925	-1.58	子宮内胚発生	DNA複製、DNA修復	CSスコア、マウスK.O.、機能	Yang YJ, et al. Cell. 2012 Nov 21;151(5):1097-112
Acly	104112	ACLY	47	-1.54	アセチル-CoA代謝プロセス	代謝	CSスコア、マウスK.O.、機能	Beigneux AP, et al. J Biol Chem. 2004 Mar 5;279(10):9557-64

【０２４４】

【表１１】

Adsl	11564	ADSL	158	-2.39	代謝プロセス	代謝	CS スコア、機能	
Ahcy	269378	AHCY	191	-2.07	含硫アミノ酸代謝プロセス	代謝	CS スコア、機能	
Arl2	56327	ARL2	402	-2.29	エネルギー保存代謝プロセス	代謝	CS スコア、機能	
Chka	12660	CHKA	1119	-1.64	脂質代謝プロセス	代謝	CS スコア、マウス K.O.、機能	Wu G, et al. J Biol Chem. 2008 Jan 18;283(3):1456-62
Coasy	71743	COASY	80347	-1.82	ビタミン 代謝プロセス	代謝	CS スコア、機能	
Cox4i1	12857	COX4I1	1327	-2.00	前駆代謝物及びエネルギーの生成	代謝	CS スコア、機能	
n/a	n/a	COX7C	1350	-1.59	前駆代謝物及びエネルギーの生成	代謝	CS スコア、機能	
n/a	n/a	CTPS1	1503	-2.52	核酸塩基含有化合物代謝プロセス	代謝	CS スコア、機能	
Ddx10	77591	DDX10	1662	-2.02	代謝プロセス	代謝	CS スコア、機能	
Ddx20	53975	DDX20	11218	-2.49	代謝プロセス	代謝	CS スコア、マウス K.O.、機能	Mouillet JF, et al. Endocrinology. 2008 May;149(5):2168-75
Dhdds	67422	DHDDS	79947	-2.86	代謝プロセス	代謝	CS スコア、機能	
Dhx30	72831	DHX30	22907	-1.93	代謝プロセス	代謝	CS スコア、機能	
Dhx8	217207	DHX8	1659	-2.61	代謝プロセス	代謝	CS スコア、機能	
Dhx9	13211	DHX9	1660	-1.73	代謝プロセス	代謝	CS スコア、マウス K.O.、機能	Lee CG, et al. Proc Natl Acad Sci U S A. 1998 Nov 10;95(23):13709-13
Dlst	78920	DLST	1743	-1.93	代謝プロセス	代謝	CS スコア、機能	
Dpagt1	13478	DPAGT1	1798	-2.80	UDP-N-アセチルグルコサミン代謝プロセス	代謝	CS スコア、マウス K.O.、機能	Marek KW, et al. Glycobiology. 1999 Nov;9(11):1263-71
Gfpt1	14583	GFPT1	2673	-1.81	フルクトース 6-リン酸代謝プロセス	代謝	CS スコア、機能	
Gmps	229363	GMPS	8833	-1.80	プリン核酸塩基代謝プロセス	代謝	CS スコア、機能	
Gpn1	74254	GPN1	11321	-1.79	代謝プロセス	代謝	CS スコア、機能	
Gpn3	68080	GPN3	51184	-3.12	代謝プロセス	代謝	CS スコア、機能	
Guk1	14923	GUK1	2987	-2.67	プリンヌクレオチド代謝プロセス	代謝	CS スコア、機能	
Hsd17b10	15108	HSD17B10	3028	-1.84	脂質代謝プロセス	代謝	CS スコア、機能	
Lrr1	69706	LRR1	122769	-3.44	代謝プロセス	代謝	CS スコア、機能	
Mtg2	52856	MTG2	26164	-2.04	代謝プロセス	代謝	CS スコア、機能	
Myh9	17886	MYH9	4627	-1.70	代謝プロセス	代謝	CS スコア、マウス K.O.、機能	Matsushita T, et al. Biochem Biophys Res Commun. 2004 Dec 24;325(4):1163-71
Nampt	59027	NAMPT	10135	-2.40	ビタミン代謝プロセス	代謝	CS スコア、マウス K.O.、機能	Revollo JR, et al. Cell Metab. 2007 Nov;6(5):363-75
Ncbp1	433702	NCBP1	4686	-1.62	RNA 代謝プロセス	代謝	CS スコア、機能	
Nfs1	18041	NFS1	9054	-2.40	代謝プロセス	代謝	CS スコア、機能	
Ppcdc	66812	PPCDC	60490	-1.98	代謝プロセス	代謝	CS スコア、機能	
Qrsl1	76563	QRSL1	55278	-1.67	代謝プロセス	代謝	CS スコア、機能	

【０２４５】

【表１２】

Rpp14	67053	RPP14	11102	-1.72	脂肪酸代謝プロセス	代謝	CS スコア、機能	
Smarca4	20586	SMARCA4	6597	-1.89	代謝プロセス	代謝	CS スコア、マウス K.O.、機能	Bultman S, et al. Mol Cell. 2000 Dec;6(6):1287-95
Snrnp200	320632	SNRNP200	23020	-2.50	代謝プロセス	代謝	CS スコア、機能	
Srbd1	78586	SRBD1	55133	-2.35	核酸塩基含有化合物代謝プロセス	代謝	CS スコア、機能	
Srcap	100043597	SRCAP	10847	-1.43	代謝プロセス	代謝	CS スコア、機能	
Ube2i	22196	UBE2I	7329	-2.55	代謝プロセス	代謝	CS スコア、マウス K.O.、機能	Nacerddine K, et al. Dev Cell. 2005 Dec;9(6):769-79
Ube2m	22192	UBE2M	9040	-2.39	代謝プロセス	代謝	CS スコア、機能	
Vcp	269523	VCP	7415	-2.85	代謝プロセス	代謝	CS スコア、マウス K.O.、機能	Muller JM, et al. Biochem Biophys Res Commun. 2007 Mar 9;354(2):459-465
Aamp	227290	AAMP	14	-2.37	血管新生	代謝	CS スコア、機能	
Acin1	56215	ACIN1	22985	-1.53	宿主によるウイルスに対する防御応答の正の調節	代謝	CS スコア、機能	
Aco2	11429	ACO2	50	-2.08	トリカルボン酸回路	代謝	CS スコア、機能	
Adss	11566	ADSS	159	-2.46	プリンヌクレオチドの生合成プロセス	代謝	CS スコア、機能	
Alg2	56737	ALG2	85365	-2.29	生合成プロセス	代謝	CS スコア、機能	
Ap2s1	232910	AP2S1	1175	-2.00	細胞内タンパク質輸送	代謝	CS スコア、機能	
Arcn1	213827	ARCN1	372	-1.91	細胞内タンパク質輸送	代謝	CS スコア、機能	
Armc7	276905	ARMC7	79637	-2.02	分子機能	代謝	CS スコア、機能	
Atp2a2	11938	ATP2A2	488	-3.01	カルシウムイオン膜透過輸送	代謝	CS スコア、マウス K.O.、機能	Andersson KB, et al. Cell Calcium. 2009 Sep;46(3):219-25
Atp5a1	11946	ATP5A1	498	-1.99	内皮細胞増殖の負の調節	代謝	CS スコア、機能	
Atp5d	66043	ATP5D	513	-2.21	酸化的リン酸化	代謝	CS スコア、機能	
Atp5o	28080	ATP5O	539	-1.17	ATP 生合成プロセス	代謝	CS スコア、機能	
Atp6v0b	114143	ATP6V0B	533	-3.01	細胞鉄イオンホメオスタシス	代謝	CS スコア、機能	
Atp6v0c	11984	ATP6V0C	527	-3.84	細胞鉄イオンホメオスタシス	代謝	CS スコア、マウス K.O.、機能	Sun-Wada GH, et al. Dev Biol. 2000 Dec 15;228(2):315-25
Atp6v1a	11964	ATP6V1A	523	-3.58	プロトン輸送	代謝	CS スコア、機能	
Atp6v1b2	11966	ATP6V1B2	526	-2.94	細胞鉄イオンホメオスタシス	代謝	CS スコア、機能	
Atp6v1d	73834	ATP6V1D	51382	-2.58	膜透過輸送	代謝	CS スコア、機能	
Aurkaip1	66077	AURKAIP1	54998	-1.56	オルガネラ構成	代謝	CS スコア、機能	
n/a	n/a	C1orf109	54955	-2.43	分子機能	代謝	CS スコア、機能	
n/a	n/a	C21orf59	56683	-2.77	細胞突起形態形成	代謝	CS スコア、機能	
Ccdc84	382073	CCDC84	338657	-1.86	分子機能	代謝	CS スコア、機能	
Cct2	12461	CCT2	10576	-3.23	タンパク質折り畳み	代謝	CS スコア、機能	
Cct3	12462	CCT3	7203	-3.31	タンパク質折り畳み	代謝	CS スコア、機能	
Cct4	12464	CCT4	10575	-2.62	タンパク質折り畳み	代謝	CS スコア、機能	
Cct5	12465	CCT5	22948	-2.84	タンパク質折り畳み	代謝	CS スコア、機能	

【０２４６】

【表１３】

Cct7	12468	CCT7	10574	-2.47	タンパク質折り畳み	代謝	CS スコア、機能	
Cct8	12469	CCT8	10694	-2.03	タンパク質折り畳み	代謝	CS スコア、機能	
Cdipt	52858	CDIPT	10423	-2.53	リン脂質生合成プロセス	代謝	CS スコア、機能	
Cenpi	102920	CENPI	2491	-1.81	セントロメア複合体集合	代謝	CS スコア、機能	
Chordc1	66917	CHORDC1	26973	-1.52	中心体重複の調節	代謝	CS スコア、マウス K.O.、機能	Ferretti R, et al. Dev Cell. 2010 Mar 16;18(3):486-95
Coa5	76178	COA5	493753	-2.33	ミトコンドリア	代謝	CS スコア、機能	
Cog4	102339	COG4	25839	-1.39	ゴルジ小胞輸送	代謝	CS スコア、機能	
Copa	12847	COPA	1314	-1.63	細胞内タンパク質輸送	代謝	CS スコア、機能	
Copb1	70349	COPB1	1315	-2.30	細胞内タンパク質輸送	代謝	CS スコア、機能	
Copb2	50797	COPB2	9276	-2.65	細胞内タンパク質輸送	代謝	CS スコア、機能	
Cope	59042	COPE	11316	-2.93	ER からのゴルジ小胞媒介の輸送	代謝	CS スコア、機能	
Copz1	56447	COPZ1	22818	-1.87	輸送	代謝	CS スコア、機能	
Coq4	227683	COQ4	51117	-1.29	ユビキノン生合成プロセス	代謝	CS スコア、機能	
Cox15	226139	COX15	1355	-2.14	酸素へのミトコンドリア電子伝達、シトクロム c	代謝	CS スコア、マウス K.O.、機能	Viscomi C, et al. Cell Metab. 2011 Jul 6;14(1):80-90
Cox17	12856	COX17	10063	-1.97	銅イオン輸送	代謝	CS スコア、マウス K.O.、機能	Takahashi Y, et al. Mol Cell Biol. 2002 Nov;22(21):7614-21
Cse1l	110750	CSE1L	1434	-2.31	核からのタンパク質排出	代謝	CS スコア、マウス K.O.、機能	Bera TK, et al. Mol Cell Biol. 2001 Oct;21(20):7020-4
Csnk2b	13001	CSNK2B	1460	-1.94	タンパク質キナーゼ活性の調節	代謝	CS スコア、マウス K.O.、機能	Buchou T, et al. Mol Cell Biol. 2003 Feb;23(3):908-15
Cycs	13063	CYCS	54205	-2.36	活性酸素種に対する応答	代謝	CS スコア、マウス K.O.、機能	Li K, et al. Cell. 2000 May 12;101(4):389-99
Dad1	13135	DAD1	1603	-2.21	タンパク質グリコシル化	代謝	CS スコア、マウス K.O.、機能	Brewster JL, et al. Genesis. 2000 Apr;26(4):271-8
Dap3	65111	DAP3	7818	-1.70	アポトーシスプロセス	代謝	CS スコア、マウス K.O.、機能	Kim HR, et al. FASEB J. 2007 Jan;21(1):188-96
Dctn5	59288	DCTN5	84516	-2.39	抗原プロセシング及び MHC クラス II を介した外性ペプチド抗原の提示	代謝	CS スコア、機能	
Ddost	13200	DDOST	1650	-2.38	アスパラギンを介したタンパク質 N 連結グリコシル化	代謝	CS スコア、機能	
Dgcr8	94223	DGCR8	54487	-2.10	遺伝子発現	代謝	CS スコア、マウス K.O.、機能	Ouchi Y, et al. J Neurosci. 2013 May 29;33(22):9408-19
Dhodh	56749	DHODH	1723	-2.57	de novo ピリミジン核酸塩基生合成プロセス	代謝	CS スコア、機能	
Dnlz	52838	DNLZ	728489	-1.92	タンパク質折り畳み	代謝	CS スコア、機能	
Dnm1l	74006	DNM1L	10059	-3.25	ミトコンドリア分裂	代謝	CS スコア、マウス K.O.、機能	Wakabayashi J, et al. J Cell Biol. 2009 Sep 21;186(6):805-16
Dnm2	13430	DNM2	1785	-3.98	エンドサイトーシス	代謝	CS スコア、マウス K.O.、機能	Ferguson SM, et al. Dev Cell. 2009 Dec;17(6):811-22

【０２４７】

【表１４】

Dohh	102115	DOHH	83475	-1.76	ペプチジル-ヒプシンへのペプチジル-リシン修飾	代謝	CS スコア、機能	
Dolk	227697	DOLK	22845	-2.38	ドリコール結合型オリゴ糖生合成プロセス	代謝	CS スコア、機能	
Donson	60364	DONSON	29980	-2.30	多細胞生物の発生	代謝	CS スコア、機能	
Dph3	105638	DPH3	285381	-1.62	ペプチジル-ヒスチジンからのペプチジル-ジフタミド生合成プロセス	代謝	CS スコア、マウス K.O.、機能	Liu S, et al. Mol Cell Biol. 2006 May;26(10):3835-41
Dtymk	21915	DTYMK	1841	-3.54	リン酸化	代謝	CS スコア、機能	
Eif2b2	217715	EIF2B2	8892	-2.24	卵胞発生	代謝	CS スコア、機能	
Eif2s2	67204	EIF2S2	8894	-2.33	子宮内胚発生	代謝	CS スコア、マウス K.O.、機能	Heaney JD, et al. Hum Mol Genet. 2009 Apr 15;18(8):1395-404
Emc1	230866	EMC1	23065	-1.34	小胞体におけるタンパク質折り畳み	代謝	CS スコア、機能	
Emc7	73024	EMC7	56851	-2.27	生物学的プロセス	代謝	CS スコア、機能	
Eno1	13806	ENO1	2023	-2.03	解糖プロセス	代謝	CS スコア、マウス K.O.、機能	Couldrey C, et al. Dev Dyn. 1998 Jun;212(2):284-92
Fam50a	108160	FAM50A	9130	-3.16	精子形成	代謝	CS スコア、機能	
Fam96b	68523	FAM96B	51647	-1.90	鉄-硫黄クラスター集合	代謝	CS スコア、機能	
Fdps	110196	FDPS	2224	-2.41	イソプレノイド生合成プロセス	代謝	CS スコア、機能	
Gapdh	14433	GAPDH	2597	-2.40	酸化-還元プロセス	代謝	CS スコア、機能	
Gart	14450	GART	2618	-1.87	プリン核酸塩基生合成プロセス	代謝	CS スコア、機能	
Gemin4	276919	GEMIN4	50628	-1.56	スプライソソーム snRNP 集合	代謝	CS スコア、機能	
Gemin5	216766	GEMIN5	25929	-2.51	スプライソソーム snRNP 集合	代謝	CS スコア、機能	
Ggps1	14593	GGPS1	9453	-1.62	コレステロール生合成プロセス	代謝	CS スコア、機能	
Gmppb	331026	GMPPB	29925	-3.22	生合成プロセス	代謝	CS スコア、機能	
Gnb1l	13972	GNB1L	54584	-1.93	G-タンパク質結合受容体シグナル伝達経路	代謝	CS スコア、機能	
n/a	n/a	GOLGA6L1	283767	-3.15		代謝	CS スコア、機能	
Gosr2	56494	GOSR2	9570	-1.13	液胞へのタンパク質ターゲティング	代謝	CS スコア、機能	
Gpkow	209416	GPKOW	27238	-1.36	生物学的プロセス	代謝	CS スコア、機能	
Gpn2	100210	GPN2	54707	-3.71	生物学的プロセス	代謝	CS スコア、機能	
Gps1	209318	GPS1	2873	-2.11	MAPK 活性の不活性化	代謝	CS スコア、機能	
Grpel1	17713	GRPEL1	80273	-2.61	タンパク質折り畳み	代謝	CS スコア、機能	
Grwd1	101612	GRWD1	83743	-1.90	ポリ(A)RNA 結合	代謝	CS スコア、機能	
Hmgcr	15357	HMGCR	3156	-2.94	コレステロール生合成プロセス	代謝	CS スコア、マウス K.O.、機能	Ohashi K, et al. J Biol Chem. 2003 Oct 31;278(44):42936-41
Hmgcs1	208715	HMGCS1	3157	-2.41	肝臓発生	代謝	CS スコア、機能	
Hspa5	14828	HSPA5	3309	-3.86	血小板脱顆粒	代謝	CS スコア、マウス K.O.、機能	Luo S, et al. Mol Cell Biol. 2006 Aug;26(15):5688-97
Hspa9	15526	HSPA9	3313	-3.55	タンパク質折り畳み	代謝	CS スコア、機能	
Hspd1	15510	HSPD1	3329	-1.95	低酸素に対する応答	代謝	CS スコア、マウス K.O.、機能	Christensen JH, et al. Cell Stress Chaperones. 2010 Nov;15(6):851-63

【０２４８】

【表１５】

Hspe1	15528	HSPE1	3336	-3.75	骨芽細胞分化	代謝	CS スコア、機能	
Hyou1	12282	HYOU1	10525	-2.06	虚血に対する応答	代謝	CS スコア、機能	
Ipo13	230673	IPO13	9670	-2.84	細胞内タンパク質輸送	代謝	CS スコア、機能	
Iscu	66383	ISCU	23479	-2.40	細胞鉄イオンホメオスタシス	代謝	CS スコア、機能	
Itpk1	217837	ITPK1	3705	-1.55	リン酸化	代謝	CS スコア、機能	
Kansl2	69612	KANSL2	54934	-1.19	クロマチン構成	代謝	CS スコア、機能	
Kansl3	226976	KANSL3	55683	-1.53	クロマチン構成	代謝	CS スコア、機能	
Kri1	215194	KRI1	65095	-2.49	ポリ(A)RNA 結合	代謝	CS スコア、機能	
Lamtor2	83409	LAMTOR2	28956	-1.62	MAPKK 活性の活性化	代謝	CS スコア、マウス K.O.、機能	Teis D, et al. J Cell Biol. 2006 Dec 18;175(6):861-8
Leng8	232798	LENG8	114823	-1.75	生物学的プロセス	代謝	CS スコア、機能	
Ltv1	353258	LTV1	84946	-1.81	核質	代謝	CS スコア、機能	
Mak16	67920	MAK16	84549	-2.30	ポリ(A)RNA 結合	代謝	CS スコア、機能	
Mat2a	232087	MAT2A	4144	-2.34	S-アデノシルメチオニン生合成プロセス	代謝	CS スコア、機能	
Mcm3ap	54387	MCM3AP	8888	-1.58	免疫系プロセス	代謝	CS スコア、マウス K.O.、機能	Yoshida M, et al. Genes Cells. 2007 Oct;12(10):1205-13
Mdn1	100019	MDN1	23195	-1.68	タンパク質複合体集合	代謝	CS スコア、機能	
n/a	n/a	MFAP1	4236	-1.94	生物学的プロセス	代謝	CS スコア、機能	
Mmgt1	236792	MMGT1	93380	-1.55	マグネシウムイオン輸送	代謝	CS スコア、機能	
Mrpl16	94063	MRPL16	54948	-1.80	オルガネラ構成	代謝	CS スコア、機能	
Mrpl17	27397	MRPL17	63875	-1.80	ミトコンドリアゲノム維持	代謝	CS スコア、機能	
Mrpl33	66845	MRPL33	9553	-1.62	オルガネラ構成	代謝	CS スコア、機能	
Mrpl38	60441	MRPL38	64978	-1.95	オルガネラ構成	代謝	CS スコア、機能	
Mrpl39	27393	MRPL39	54148	-1.71	オルガネラ構成	代謝	CS スコア、機能	
Mrpl45	67036	MRPL45	84311	-1.75	オルガネラ構成	代謝	CS スコア、機能	
Mrpl46	67308	MRPL46	26589	-1.83	オルガネラ構成	代謝	CS スコア、機能	
Mrpl53	68499	MRPL53	116540	-1.84	オルガネラ構成	代謝	CS スコア、機能	
Mrps22	64655	MRPS22	56945	-1.32	オルガネラ構成	代謝	CS スコア、機能	
Mrps25	64658	MRPS25	64432	-1.63	オルガネラ構成	代謝	CS スコア、機能	
Mrps35	232536	MRPS35	60488	-1.60	オルガネラ構成	代謝	CS スコア、機能	
Mrps5	77721	MRPS5	64969	-1.65	オルガネラ構成	代謝	CS スコア、機能	
Mvd	192156	MVD	4597	-3.24	イソプレノイド生合成プロセス	代謝	CS スコア、機能	
Mvk	17855	MVK	4598	-1.73	イソプレノイド生合成プロセス	代謝	CS スコア、機能	
Naa25	231713	NAA25	80018	-2.40	ペプチド α-N-アセチルトランスフェラーゼ活性	代謝	CS スコア、機能	
Napa	108124	NAPA	8775	-2.31	細胞内タンパク質輸送	代謝	CS スコア、機能	
Nat10	98956	NAT10	55226	-2.16	生物学的プロセス	代謝	CS スコア、機能	
Ndor1	78797	NDOR1	27158	-2.10	細胞死	代謝	CS スコア、機能	

【０２４９】

【表１６】

Ndufab1	70316	NDUFAB1	4706	-1.83	脂肪酸 生合成プロセス	代謝	CS スコア、機能	
Nol10	217431	NOL10	79954	-1.79	ポリ(A)RNA 結合	代謝	CS スコア、機能	
Nop9	67842	NOP9	161424	-1.44	生物学的プロセス	代謝	CS スコア、機能	
Nrde2	217827	NRDE2	55051	-2.69	生物学的プロセス	代謝	CS スコア、機能	
Nsf	18195	NSF	4905	-2.76	ゴルジ小胞内媒介の輸送	代謝	CS スコア、機能	
Nubp1	26425	NUBP1	4682	-2.05	細胞鉄イオンホメオスタシス	代謝	CS スコア、機能	
Nudcd3	209586	NUDCD3	23386	-1.71	分子機能	代謝	CS スコア、機能	
Nup155	170762	NUP155	9631	-1.59	核細胞質間輸送	代謝	CS スコア、マウス K.O.、機能	Zhang X, et al. Cell. 2008 Dec 12;135(6):1017-27
Nup93	71805	NUP93	9688	-2.11	核へのタンパク質移入	代謝	CS スコア、機能	
Nus1	52014	NUS1	116150	-1.94	血管新生	代謝	CS スコア、マウス K.O.、機能	Park EJ, et al. Cell Metab. 2014 Sep 2;20(3):448-57
Nvl	67459	NVL	4931	-2.61	テロメラーゼ活性の正の調節	代謝	CS スコア、機能	
Ogdh	18293	OGDH	4967	-2.98	トリカルボン酸回路	代謝	CS スコア、機能	
Osbp	76303	OSBP	5007	-2.06	脂質 輸送	代謝	CS スコア、機能	
Pak1ip1	68083	PAK1IP1	55003	-2.28	細胞増殖	代謝	CS スコア、機能	
Pfdn2	18637	PFDN2	5202	-1.32	タンパク質折り畳み	代謝	CS スコア、機能	
Pgam1	18648	PGAM1	5223	-2.37	解糖プロセス	代謝	CS スコア、機能	
Pkm	18746	PKM	5315	-1.68	解糖プロセス	代謝	CS スコア、マウス K.O.、機能	Lewis SE, et al. 1983:267-78. Plenum Publ. Corp.
Pmpcb	73078	PMPCB	9512	-1.77	タンパク質分解	代謝	CS スコア、機能	
Ppil2	66053	PPIL2	23759	-3.01	タンパク質のポリユビキチン化	代謝	CS スコア、機能	
Ppp4c	56420	PPP4C	5531	-2.89	タンパク質脱リン酸化	代謝	CS スコア、マウス K.O.、機能	Toyo-oka K, et al. J Cell Biol. 2008 Mar 24;180(6):1133-47
Prelid1	66494	PRELID1	27166	-2.27	アポトーシスプロセス	代謝	CS スコア、機能	
Prpf31	68988	PRPF31	26121	-3.20	スプライソソームトリ-snRNP 複合体集合	代謝	CS スコア、マウス K.O.、機能	Bujakowska K, et al. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2009 Dec;50(12):5927-33
Prpf6	68879	PRPF6	24148	-2.96	スプライソソームトリ-snRNP 複合体集合	代謝	CS スコア、機能	
Psma1	26440	PSMA1	5682	-2.39	プロテアソームユビキチン非依存性タンパク質異化プロセス	代謝	CS スコア、機能	
Psma2	19166	PSMA2	5683	-2.23	プロテアソームユビキチン非依存性タンパク質異化プロセス	代謝	CS スコア、機能	
Psma3	19167	PSMA3	5684	-2.30	プロテアソームユビキチン非依存性タンパク質異化プロセス	代謝	CS スコア、機能	
Psmb2	26445	PSMB2	5690	-2.12	プロテアソームユビキチン非依存性タンパク質異化プロセス	代謝	CS スコア、機能	
Psmb3	26446	PSMB3	5691	-2.78	細胞タンパク質異化プロセスに関与するタンパク質分解	代謝	CS スコア、機能	
Psmb5	19173	PSMB5	5693	-1.67	プロテアソームユビキチン非依存性タンパク質異化プロセス	代謝	CS スコア、機能	

【０２５０】

【表１７】

Psmb6	19175	PSMB6	5694	-2.42	プロテアソーム ユビキチン非依存性 タンパク質異化 プロセス	代謝	CS スコア、機能	
Psmb7	19177	PSMB7	5695	-2.69	プロテアソーム ユビキチン非依存性 タンパク質異化 プロセス	代謝	CS スコア、機能	
Psmc2	19181	PSMC2	5701	-2.35	タンパク質異化 プロセス	代謝	CS スコア、機能	
Psmc3	19182	PSMC3	5702	-2.76	小胞体関連 ユビキチン依存性 タンパク質異化 プロセス	代謝	CS スコア、マウス K.O.、機能	Sakao Y, et al. Genomics. 2000 Jul 1;67(1):1-7
Psmc4	23996	PSMC4	5704	-2.36	胚盤胞 発生	代謝	CS スコア、マウス K.O.、機能	Sakao Y, et al. Genomics. 2000 Jul 1;67(1):1-7
Psmd1	70247	PSMD1	5707	-1.88	タンパク質異化 プロセスの調節	代謝	CS スコア、機能	
Psmd2	21762	PSMD2	5708	-2.16	タンパク質異化 プロセスの調節	代謝	CS スコア、機能	
Psmd3	22123	PSMD3	5709	-2.10	タンパク質異化 プロセスの調節	代謝	CS スコア、機能	
Psmd4	19185	PSMD4	5710	-1.77	ユビキチン依存性 タンパク質異化 プロセス	代謝	CS スコア、マウス K.O.、機能	Soriano P, et al. Genes Dev. 1987 Jun;1(4):366-75
Psmd6	66413	PSMD6	9861	-2.27	プロテアソーム 媒介の ユビキチン 依存性タンパク質異化 プロセス	代謝	CS スコア、機能	
Psmg3	66506	PSMG3	84262	-2.57	分子機能	代謝	CS スコア、機能	
Ptpmt1	66461	PTPMT1	114971	-2.89	タンパク質 脱リン酸化	代謝	CS スコア、マウス K.O.、機能	Shen J, et al. Mol Cell Biol. 2011 Dec;31(24):4902-16
Ptpn23	104831	PTPN23	25930	-1.59	上皮細胞遊走の 負の 調節	代謝	CS スコア、マウス K.O.、機能	Gingras MC, et al. Int J Dev Biol. 2009;53(7):1069-74
Rabggta	56187	RABGGTA	5875	-3.18	タンパク質プレニル化	代謝	CS スコア、機能	
Rabggtb	19352	RABGGTB	5876	-2.44	タンパク質 ゲラニルゲラニル化	代謝	CS スコア、機能	
Rbm19	74111	RBM19	9904	-2.03	多細胞 生物の 発生	代謝	CS スコア、マウス K.O.、機能	Zhang J, et al. BMC Dev Biol. 2008;8:115
Rfk	54391	RFK	55312	-1.56	リボフラビン生合成 プロセス	代謝	CS スコア、マウス K.O.、機能	Yazdanpanah B, et al. Nature. 2009 Aug 27;460(7259):1159-63
Rheb	19744	RHEB	6009	-1.38	シグナル伝達	代謝	CS スコア、マウス K.O.、機能	Zou J, et al. Dev Cell. 2011 Jan 18;20(1):97-108
Riok1	71340	RIOK1	83732	-1.27	タンパク質 リン酸化	代謝	CS スコア、機能	
Rpn1	103963	RPN1	6184	-2.13	タンパク質グリコシル化	代謝	CS スコア、機能	
Rtfdc1	66404	RTFDC1	51507	-2.09	生物学的プロセス	代謝	CS スコア、機能	
Sacm1l	83493	SACM1L	22908	-1.80	タンパク質 脱リン酸化	代謝	CS スコア、機能	
Samm50	68653	SAMM50	25813	-1.62	ミトコンドリアへの タンパク質ターゲティング	代謝	CS スコア、機能	
Sco2	100126824	SCO2	9997	-1.60	眼の発生	代謝	CS スコア、マウス K.O.、機能	Yang H, et al. Hum Mol Genet. 2010 Jan 1;19(1):170-80
Sdha	66945	SDHA	6389	-2.20	トリカルボン酸 回路	代謝	CS スコア、機能	
Sdhb	67680	SDHB	6390	-2.33	トリカルボン酸 回路	代謝	CS スコア、機能	
Sec61a1	53421	SEC61A1	29927	-2.42	タンパク質輸送	代謝	CS スコア、機能	

【０２５１】

【表１８】

Slc20a1	20515	SLC20A1	6574	-2.38	ナトリウムイオン輸送	代謝	CS スコア、マウス K.O.、機能	Festing MH, et al. Genesis. 2009 Dec;47(12):858-63
Slc7a6os	66432	SLC7A6OS	84138	-2.30	造血前駆細胞分化	代謝	CS スコア、機能	
Smn1	20595	SMN1	6606	-1.58	スプライソソーム複合体集合	代謝	CS スコア、マウス K.O.、機能	Hsieh-Li HM, et al. Nat Genet. 2000 Jan;24(1):66-70
Smu1	74255	SMU1	55234	-3.65	分子機能	代謝	CS スコア、機能	
Snrpd1	20641	SNRPD1	6632	-2.79	スプライソソーム複合体集合	代謝	CS スコア、機能	
Snrpd3	67332	SNRPD3	6634	-3.62	スプライソソーム複合体集合	代謝	CS スコア、機能	
Snrpe	20643	SNRPE	6635	-2.74	スプライソソーム複合体集合	代謝	CS スコア、機能	
Spata5	57815	SPATA5	166378	-1.50	多細胞生物の発生	代謝	CS スコア、機能	
Spata5l1	214616	SPATA5L1	79029	-2.70	分子機能	代謝	CS スコア、機能	
Tango6	272538	TANGO6	79613	-2.29	膜の不可欠な構成要素	代謝	CS スコア、機能	
n/a	n/a	TBC1D3B	414059	-1.67	GTPase 活性の正の調節	代謝	CS スコア、機能	
n/a	n/a	TBC1D3C	414060	-2.01	GTPase 活性の正の調節	代謝	CS スコア、機能	
Tbcb	66411	TBCB	1155	-1.97	神経系発生	代謝	CS スコア、機能	
Tbcc	72726	TBCC	6903	-3.02	細胞形態形成	代謝	CS スコア、機能	
Tbcd	108903	TBCD	6904	-1.82	微小管細胞骨格構成	代謝	CS スコア、機能	
Tcp1	21454	TCP1	6950	-2.34	タンパク質折り畳み	代謝	CS スコア、機能	
Telo2	71718	TELO2	9894	-2.34	TOR シグナル伝達の調節	代謝	CS スコア、マウス K.O.、機能	Takai H, et al. Cell. 2007 Dec 28;131(7):1248-59
Tex10	269536	TEX10	54881	-1.26	膜の不可欠な構成要素	代謝	CS スコア、機能	
Tfrc	22042	TFRC	7037	-3.40	細胞鉄イオンホメオスタシス	代謝	CS スコア、マウス K.O.、機能	Levy JE, et al. Nat Genet. 1999 Apr;21(4):396-9
Timm10	30059	TIMM10	26519	-1.99	ミトコンドリアへのタンパク質ターゲティング	代謝	CS スコア、機能	
Timm13	30055	TIMM13	26517	-1.62	ミトコンドリアへのタンパク質ターゲティング	代謝	CS スコア、機能	
Timm23	53600	TIMM23	100287932	-2.00	ミトコンドリアへのタンパク質ターゲティング	代謝	CS スコア、マウス K.O.、機能	Ahting U, et al. Biochim Biophys Acta. 2009 May;1787(5):371-6
Timm44	21856	TIMM44	10469	-1.73	ミトコンドリア基質へのタンパク質移入	代謝	CS スコア、機能	
Tmx2	66958	TMX2	51075	-2.29	生物学的プロセス	代謝	CS スコア、機能	
Tnpo3	320938	TNPO3	23534	-1.82	核へのスプライシング因子タンパク質移入	代謝	CS スコア、機能	
Trmt112	67674	TRMT112	51504	-3.70	ペプチジル-グルタミンメチル化	代謝	CS スコア、機能	
Trnau1ap	71787	TRNAU1AP	54952	-1.40	セレノシステインの組み込み	代謝	CS スコア、機能	
Ttc1	66827	TTC1	7265	-1.74	タンパク質折り畳み	代謝	CS スコア、機能	
Ttc27	74196	TTC27	55622	-2.54	生物学的プロセス	代謝	CS スコア、機能	
Tti1	75425	TTI1	9675	-2.91	TOR シグナル伝達の調節	代謝	CS スコア、機能	
Tti2	234138	TTI2	80185	-1.94	分子機能	代謝	CS スコア、機能	
n/a	n/a	TUBB	203068	-3.40	微小管に基づくプロセス	代謝	CS スコア、機能	
Txn2	56551	TXN2	25828	-1.41	硫酸同化	代謝	CS スコア、マウス K.O.、機能	Nonn L, et al. Mol Cell Biol. 2003 Feb;23(3):916-22

【０２５２】

【表１９】

Uqcrc1	22273	UQCRC1	7384	-1.29	酸化的 リン酸化	代謝	CS スコア、 機能	
Uqcrh	66576	UQCRH	7388	-1.28	酸化的 リン酸化	代謝	CS スコア、 機能	
Urb2	382038	URB2	9816	-2.25	分子機能	代謝	CS スコア、 機能	
Vmp1	75909	VMP1	81671	-1.75	エキソサイトーシス	代謝	CS スコア、 機能	
n/a	n/a	VPS28	51160	-3.06	多胞体選別 経路による ユビキチン依存性 タンパク質異化プロセスに 関与する液胞に 対するタンパク質 ターゲティング	代謝	CS スコア、 機能	
Vps29	56433	VPS29	51699	-2.05	細胞内タンパク質 輸送	代謝	CS スコア、 機能	
Vps52	224705	VPS52	6293	-1.85	外胚葉細胞 分化	代謝	CS スコア、 マウス K.O.、 機能	Sugimoto M, et al. Cell Rep. 2012 Nov 29;2(5):1363-74
Wars2	70560	WARS2	10352	-1.16	脈管形成	代謝	CS スコア、 機能	
Wdr7	104082	WDR7	23335	-1.47	造血 前駆細胞 分化	代謝	CS スコア、 機能	
Wdr70	545085	WDR70	55100	-1.69	酵素結合	代謝	CS スコア、 機能	
Wdr74	107071	WDR74	54663	-2.84	胚盤胞形成	代謝	CS スコア、 機能	
Wdr77	70465	WDR77	79084	-2.19	スプライソソーム snRNP 集合	代謝	CS スコア、 マウス K.O.、 機能	Zhou L, et al. J Mol Endocrinol. 2006 Oct;37(2):283-300
Yae1d1	67008	YAE1D1	57002	-1.71	分子機能	代謝	CS スコア、 機能	
Yrdc	230734	YRDC	79693	-2.33	輸送の負の 調節	代謝	CS スコア、 機能	
Znhit2	29805	ZNHIT2	741	-2.70	金属イオン結合	代謝	CS スコア、 機能	
Aars	234734	AARS	16	-2.48	アラニル-tRNA アミノアシル化	RNA 転写 、タンパク質 翻訳	CS スコア、 機能	
Bms1	213895	BMS1	9790	-1.36	リボソーム集合	RNA 転写 、タンパク質 翻訳	CS スコア、 機能	
Bud31	231889	BUD31	8896	-2.46	mRNA スプライシング、 スプライソソームによる	RNA 転写 、タンパク質 翻訳	CS スコア、 機能	
Bysl	53414	BYSL	705	-2.24	トリシストロン性 rRNA 転写物からの SSU-rRNA の成熟 (SSU-rRNA、5.8S rRNA、 LSU-rRNA)	RNA 転写 、タンパク質 翻訳	CS スコア、 マウス K.O.、 機能	Aoki R, et al. FEBS Lett. 2006 Nov 13;580(26):6062-8
Cars	27267	CARS	833	-2.45	タンパク質翻訳のための tRNA アミノアシル化	RNA 転写 、タンパク質 翻訳	CS スコア、 機能	
Cdc5l	71702	CDC5L	988	-2.09	mRNA スプライシング、 スプライソソームによる	RNA 転写 、タンパク質 翻訳	CS スコア、 機能	
Cdc73	214498	CDC73	79577	-2.58	RNA ポリメラーゼ II プロモータからの 転写の負の調節	RNA 転写 、タンパク質 翻訳	CS スコア、 マウス K.O.、 機能	Wang P, et al. Mol Cell Biol. 2008 May;28(9):2930-40
Cebpz	12607	CEBPZ	10153	-2.11	RNA ポリメラーゼ II プロモータからの転写	RNA 転写 、タンパク質 翻訳	CS スコア、 機能	
Clasrp	53609	CLASRP	11129	-1.30	mRNA プロセシング	RNA 転写 、タンパク質 翻訳	CS スコア、 機能	
Clp1	98985	CLP1	10978	-3.47	mRNA スプライシング、 スプライソソームによる	RNA 転写 、タンパク質 翻訳	CS スコア、 マウス K.O.、 機能	Hanada T, et al. Nature. 2013 Mar 28;495(7442):474-80

【０２５３】

【表２０】

Cox5b	12859	COX5B	1329	-1.50	RNA ポリメラーゼ II プロモータからの 転写開始	RNA 転写 、タンパク質 翻訳	CS スコア、 機能	
Cpsf1	94230	CPSF1	29894	-2.58	mRNA スプライシング、 スプライソソームによる	RNA 転写 、タンパク質 翻訳	CS スコア、 機能	
Cpsf2	51786	CPSF2	53981	-2.55	mRNA ポリアデニル化	RNA 転写 、タンパク質 翻訳	CS スコア、 機能	
Cpsf3l	71957	CPSF3L	54973	-2.09	snRNA プロセシング	RNA 転写 、タンパク質 翻訳	CS スコア、 機能	
Dars	226414	DARS	1615	-2.90	翻訳	RNA 転写 、タンパク質 翻訳	CS スコア、 機能	
Dbr1	83703	DBR1	51163	-3.75	RNA スプライシング、 エステル 交換反応による	RNA 転写 、タンパク質 翻訳	CS スコア、 機能	
Ddx18	66942	DDX18	8886	-2.33	RNA 二次 構造巻き戻し	RNA 転写 、タンパク質 翻訳	CS スコア、 機能	
Ddx23	74351	DDX23	9416	-3.01	RNA 二次 構造巻き戻し	RNA 転写 、タンパク質 翻訳	CS スコア、 機能	
Ddx24	27225	DDX24	57062	-1.40	RNA 二次 構造巻き戻し	RNA 転写 、タンパク質 翻訳	CS スコア、 機能	
Ddx41	72935	DDX41	51428	-1.74	RNA 二次 構造巻き戻し	RNA 転写 、タンパク質 翻訳	CS スコア、 機能	
Ddx46	212880	DDX46	9879	-2.79	mRNA スプライシング、 スプライソソームによる	RNA 転写 、タンパク質 翻訳	CS スコア、 機能	
Ddx47	67755	DDX47	51202	-2.20	RNA 二次 構造巻き戻し	RNA 転写 、タンパク質 翻訳	CS スコア、 機能	
Ddx49	234374	DDX49	54555	-3.20	RNA 二次 構造巻き戻し	RNA 転写 、タンパク質 翻訳	CS スコア、 機能	
Ddx54	71990	DDX54	79039	-2.94	RNA 二次 構造巻き戻し	RNA 転写 、タンパク質 翻訳	CS スコア、 機能	
Ddx56	52513	DDX56	54606	-2.85	rRNA プロセシング	RNA 転写 、タンパク質 翻訳	CS スコア、 機能	
Dgcr14	27886	DGCR14	8220	-1.76	mRNA スプライシング、 スプライソソームによる	RNA 転写 、タンパク質 翻訳	CS スコア、 機能	
Dhx15	13204	DHX15	1665	-2.58	mRNA プロセシング	RNA 転写 、タンパク質 翻訳	CS スコア、 機能	
Dhx16	69192	DHX16	8449	-1.35	mRNA プロセシング	RNA 転写 、タンパク質 翻訳	CS スコア、 機能	
Dhx38	64340	DHX38	9785	-1.76	mRNA スプライシング、 スプライソソームによる	RNA 転写 、タンパク質 翻訳	CS スコア、 機能	
Diexf	215193	DIEXF	27042	-2.03	トリシストロン性 rRNA 転写物からの SSU-rRNA の 成熟 (SSU-rRNA、5.8S rRNA、LSU-rRNA)	RNA 転写 、タンパク質 翻訳	CS スコア、 機能	

【０２５４】

【表２１】

Dimt1	66254	DIMT1	27292	-1.87	rRNA メチル化	RNA 転写、タンパク質翻訳	CS スコア、機能	
Dis3	72662	DIS3	22894	-1.77	mRNA 異化プロセス	RNA 転写、タンパク質翻訳	CS スコア、機能	
Dkc1	245474	DKC1	1736	-2.37	box H/ACA snoRNA 3'-末端プロセシング	RNA 転写、タンパク質翻訳	CS スコア、マウス K.O.、機能	He J, et al. Oncogene. 2002 Oct 31;21(50):7740-4
Dnajc17	69408	DNAJC17	55192	-2.25	RNA ポリメラーゼ II プロモータからの転写の負の調節	RNA 転写、タンパク質翻訳	CS スコア、マウス K.O.、機能	Amendola E, et al. Endocrinology. 2010 Apr;151(4):1948-58
Ears2	67417	EARS2	124454	-1.91	タンパク質翻訳のための tRNA アミノアシル化	RNA 転写、タンパク質翻訳	CS スコア、機能	
Ebna1bp2	69072	EBNA1BP2	10969	-1.52	リボソーム生合成	RNA 転写、タンパク質翻訳	CS スコア、機能	
Eef1a1	13627	EEF1A1	1915	-3.11	翻訳延長	RNA 転写、タンパク質翻訳	CS スコア、機能	
Eef1g	67160	EEF1G	1937	-1.42	翻訳	RNA 転写、タンパク質翻訳	CS スコア、機能	
Eef2	13629	EEF2	1938	-3.53	翻訳	RNA 転写、タンパク質翻訳	CS スコア、機能	
Eftud2	20624	EFTUD2	9343	-3.79	mRNA スプライシング、スプライソソームによる	RNA 転写、タンパク質翻訳	CS スコア、機能	
Eif1ad	69860	EIF1AD	84285	-2.26	翻訳開始	RNA 転写、タンパク質翻訳	CS スコア、機能	
Eif2b1	209354	EIF2B1	1967	-2.23	翻訳開始の調節	RNA 転写、タンパク質翻訳	CS スコア、機能	
Eif2b3	108067	EIF2B3	8891	-3.00	翻訳開始	RNA 転写、タンパク質翻訳	CS スコア、機能	
Eif2s1	13665	EIF2S1	1965	-3.93	翻訳	RNA 転写、タンパク質翻訳	CS スコア、機能	
Eif3c	56347	EIF3C	8663	-2.59	翻訳開始前複合体の形成	RNA 転写、タンパク質翻訳	CS スコア、機能	
n/a	n/a	EIF3CL	728689	-2.71	翻訳開始前複合体の形成	RNA 転写、タンパク質翻訳	CS スコア、機能	
Eif3d	55944	EIF3D	8664	-3.23	翻訳開始前複合体の形成	RNA 転写、タンパク質翻訳	CS スコア、機能	
Eif3f	66085	EIF3F	8665	-1.44	翻訳開始前複合体の形成	RNA 転写、タンパク質翻訳	CS スコア、機能	
Eif3g	53356	EIF3G	8666	-3.10	翻訳開始	RNA 転写、タンパク質翻訳	CS スコア、機能	
Eif3i	54709	EIF3I	8668	-2.24	翻訳開始前複合体の形成	RNA 転写、タンパク質翻訳	CS スコア、機能	
Eif3l	223691	EIF3L	51386	-1.28	翻訳開始	RNA 転写、タンパク質翻訳	CS スコア、機能	

【０２５５】

【表２２】

Eif4a1	13681	EIF4A1	1973	-1.97	翻訳開始	RNA 転写、タンパク質翻訳	CS スコア、機能	
Eif4a3	192170	EIF4A3	9775	-4.32	RNA スプライシング	RNA 転写、タンパク質翻訳	CS スコア、機能	
Eif4g1	208643	EIF4G1	1981	-1.79	核転写 mRNA 異化プロセス、ナンセンス変異依存分解	RNA 転写、タンパク質翻訳	CS スコア、機能	
Eif5b	226982	EIF5B	9669	-2.93	翻訳開始	RNA 転写、タンパク質翻訳	CS スコア、機能	
Eif6	16418	EIF6	3692	-2.75	成熟リボソーム集合	RNA 転写、タンパク質翻訳	CS スコア、マウス K.O.、機能	Gandin V, et al. Nature. 2008 Oct 2;455(7213):684-8
Elac2	68626	ELAC2	60528	-2.06	tRNA 3'-トレーラ切断、エンドヌクレアーゼによる	RNA 転写、タンパク質翻訳	CS スコア、機能	
Ell	13716	ELL	8178	-2.23	RNA ポリメラーゼ II プロモータからの転写延長	RNA 転写、タンパク質翻訳	CS スコア、マウス K.O.、機能	Mitani K, et al. Biochem Biophys Res Commun. 2000 Dec 20;279(2):563-7
Etf1	225363	ETF1	2107	-2.44	翻訳終結	RNA 転写、タンパク質翻訳	CS スコア、機能	
Exosc2	227715	EXOSC2	23404	-1.66	トリシストロン性 rRNA 転写物から 5.8S rRNA の成熟 3'-末端を生成するためのエキソヌクレアーゼによるトリミング (SSU-rRNA、5.8S rRNA、LSU-rRNA)	RNA 転写、タンパク質翻訳	CS スコア、機能	
Exosc4	109075	EXOSC4	54512	-3.21	核転写 mRNA 異化プロセス、脱アデニル化依存性分解	RNA 転写、タンパク質翻訳	CS スコア、機能	
Exosc5	27998	EXOSC5	56915	-2.09	rRNA 異化プロセス	RNA 転写、タンパク質翻訳	CS スコア、機能	
n/a	n/a	EXOSC6	118460	-3.20	核転写 mRNA 異化プロセス、脱アデニル化依存性分解	RNA 転写、タンパク質翻訳	CS スコア、機能	
Exosc7	66446	EXOSC7	23016	-2.17	核転写 mRNA 異化プロセス、脱アデニル化依存性分解	RNA 転写、タンパク質翻訳	CS スコア、機能	
Exosc8	69639	EXOSC8	11340	-2.08	核転写 mRNA 異化プロセス、脱アデニル化依存性分解	RNA 転写、タンパク質翻訳	CS スコア、機能	
Fars2	69955	FARS2	10667	-1.90	タンパク質翻訳のための tRNA アミノアシル化	RNA 転写、タンパク質翻訳	CS スコア、機能	
Farsa	66590	FARSA	2193	-3.30	フェニルアラニル tRNA アミノアシル化	RNA 転写、タンパク質翻訳	CS スコア、機能	
Farsb	23874	FARSB	10056	-2.49	フェニルアラニル tRNA アミノアシル化	RNA 転写、タンパク質翻訳	CS スコア、機能	
Fau	14109	FAU	2197	-2.64	翻訳	RNA 転写、タンパク質翻訳	CS スコア、機能	

【０２５６】

【表２３】

Fip1l1	66899	FIP1L1	81608	-1.93	mRNA プロセシング	RNA 転写、タンパク質翻訳	CS スコア、機能	
Ftsj3	56095	FTSJ3	117246	-1.50	rRNA メチル化	RNA 転写、タンパク質翻訳	CS スコア、機能	
Gle1	74412	GLE1	2733	-1.89	核からの mRNA 排出	RNA 転写、タンパク質翻訳	CS スコア、機能	
Gnl3l	237107	GNL3L	54552	-1.35	リボソーム生合成	RNA 転写、タンパク質翻訳	CS スコア、機能	
Gtf2e1	74197	GTF2E1	2960	-1.22	RNA ポリメラーゼ II プロモータでの転写開放型複合体形成	RNA 転写、タンパク質翻訳	CS スコア、機能	
Gtpbp4	69237	GTPBP4	23560	-2.25	リボソーム生合成	RNA 転写、タンパク質翻訳	CS スコア、機能	
Hars	15115	HARS	3035	-3.49	ヒスチジル-tRNA アミノアシル化	RNA 転写、タンパク質翻訳	CS スコア、機能	
Hars2	70791	HARS2	23438	-1.92	ヒスチジル-tRNA アミノアシル化	RNA 転写、タンパク質翻訳	CS スコア、機能	
Heatr1	217995	HEATR1	55127	-2.58	トリシストロン性 rRNA 転写物からの SSU-rRNA の成熟 (SSU-rRNA、5.8S rRNA、LSU-rRNA)	RNA 転写、タンパク質翻訳	CS スコア、機能	
Hnrnpc	15381	HNRNPC	3183	-1.95	mRNA スプライシング、スプライソソームによる	RNA 転写、タンパク質翻訳	CS スコア、マウス K.O.、機能	Williamson DJ, et al. Mol Cell Biol. 2000 Jun;20(11):4094-105
Hnrnpk	15387	HNRNPK	3190	-2.39	mRNA スプライシング、スプライソソームによる	RNA 転写、タンパク質翻訳	CS スコア、機能	
Hnrnpl	15388	HNRNPL	3191	-1.88	mRNA プロセシング	RNA 転写、タンパク質翻訳	CS スコア、マウス K.O.、機能	Gaudreau MC, et al. J Immunol. 2012 Jun 1;188(11):5377-88
Hnrnpu	51810	HNRNPU	3192	-2.44	mRNA スプライシング、スプライソソームによる	RNA 転写、タンパク質翻訳	CS スコア、マウス K.O.、機能	Roshon MJ, et al. Transgenic Res. 2005 Apr;14(2):179-92
Iars	105148	IARS	3376	-3.87	イソロイシル-tRNA アミノアシル化	RNA 転写、タンパク質翻訳	CS スコア、機能	
Iars2	381314	IARS2	55699	-2.83	タンパク質翻訳のための tRNA アミノアシル化	RNA 転写、タンパク質翻訳	CS スコア、機能	
Imp3	102462	IMP3	55272	-3.46	rRNA プロセシング	RNA 転写、タンパク質翻訳	CS スコア、機能	
Imp4	27993	IMP4	92856	-2.01	rRNA プロセシング	RNA 転写、タンパク質翻訳	CS スコア、機能	
Ints1	68510	INTS1	26173	-1.93	snRNA プロセシング	RNA 転写、タンパク質翻訳	CS スコア、マウス K.O.、機能	Nakayama M, et al. FASEB J. 2006 Aug;20(10):1718-20
Ints4	101861	INTS4	92105	-1.75	snRNA プロセシング	RNA 転写、タンパク質翻訳	CS スコア、機能	
Ints5	109077	INTS5	80789	-2.10	snRNA プロセシング	RNA 転写、タンパク質翻訳	CS スコア、機能	

【０２５７】

【表２４】

Ints8	72656	INTS8	55656	-1.35	snRNA プロセシング	RNA 転写、タンパク質翻訳	CS スコア、機能	
Ints9	210925	INTS9	55756	-2.26	snRNA プロセシング	RNA 転写、タンパク質翻訳	CS スコア、機能	
Isg20l2	229504	ISG20L2	81875	-2.27	リボソーム生合成	RNA 転写、タンパク質翻訳	CS スコア、機能	
Kars	85305	KARS	3735	-2.76	タンパク質翻訳のための tRNA アミノアシル化	RNA 転写、タンパク質翻訳	CS スコア、機能	
n/a	n/a	KIAA0391	9692	-1.56	tRNA プロセシング	RNA 転写、タンパク質翻訳	CS スコア、機能	
Lars	107045	LARS	51520	-1.83	タンパク質翻訳のための tRNA アミノアシル化	RNA 転写、タンパク質翻訳	CS スコア、機能	
Lars2	102436	LARS2	23395	-1.60	タンパク質翻訳のための tRNA アミノアシル化	RNA 転写、タンパク質翻訳	CS スコア、機能	
Las1l	76130	LAS1L	81887	-2.12	rRNA プロセシング	RNA 転写、タンパク質翻訳	CS スコア、機能	
Lrpprc	72416	LRPPRC	10128	-1.39	ミトコンドリア RNA 異化プロセスの負の調節	RNA 転写、タンパク質翻訳	CS スコア、マウス K.O.、機能	Ruzzenente B, et al. EMBO J. 2012 Jan 18;31(2):443-56
Lsm2	27756	LSM2	57819	-2.96	核転写 mRNA 異化プロセス、脱アデニル化依存性分解	RNA 転写、タンパク質翻訳	CS スコア、機能	
Lsm3	67678	LSM3	27258	-1.66	核転写 mRNA 異化プロセス、脱アデニル化依存性分解	RNA 転写、タンパク質翻訳	CS スコア、機能	
Lsm7	66094	LSM7	51690	-1.96	核転写 mRNA 異化プロセス、脱アデニル化依存性分解	RNA 転写、タンパク質翻訳	CS スコア、機能	
Magoh	17149	MAGOH	4116	-1.78	核転写 mRNA 異化プロセス、ナンセンス変異依存分解	RNA 転写、タンパク質翻訳	CS スコア、マウス K.O.、機能	Silver DL, et al. Nat Neurosci. 2010 May;13(5):551-8
Mars	216443	MARS	4141	-3.24	メチオニル-tRNA アミノアシル化	RNA 転写、タンパク質翻訳	CS スコア、機能	
Mars2	212679	MARS2	92935	-2.31	タンパク質翻訳のための tRNA アミノアシル化	RNA 転写、タンパク質翻訳	CS スコア、機能	
Med17	234959	MED17	9440	-1.78	RNA ポリメラーゼ II プロモータからの転写の調節	RNA 転写、タンパク質翻訳	CS スコア、機能	
Med20	56771	MED20	9477	-2.00	RNA ポリメラーゼ II プロモータからの転写の調節	RNA 転写、タンパク質翻訳	CS スコア、機能	
Med22	20933	MED22	6837	-1.86	RNA ポリメラーゼ II プロモータからの転写の調節	RNA 転写、タンパク質翻訳	CS スコア、機能	
Med27	68975	MED27	9442	-1.48	RNA ポリメラーゼ II プロモータからの転写の調節	RNA 転写、タンパク質翻訳	CS スコア、機能	
Med30	69790	MED30	90390	-2.21	RNA ポリメラーゼ II プロモータからの転写の調節	RNA 転写、タンパク質翻訳	CS スコア、機能	

【０２５８】

【表２５】

Med8	80509	MED8	112950	-1.64	RNA ポリメラーゼ II プロモータからの 転写の調節	RNA 転写 、タンパク質 翻訳	CS スコア、 機能	
Mepce	231803	MEPCE	56257	-2.08	RNA ポリメラーゼ II プロモータからの 転写の負の調節	RNA 転写 、タンパク質 翻訳	CS スコア、 機能	
Mettl16	67493	METTL16	79066	-2.10	rRNA 塩基 メチル化	RNA 転写 、タンパク質 翻訳	CS スコア、 機能	
Mphosph10	67973	MPHOSP H10	10199	-1.85	RNA スプライシング、 エステル交換反応による	RNA 転写 、タンパク質 翻訳	CS スコア、 機能	
Mrpl10	107732	MRPL10	124995	-1.38	翻訳	RNA 転写 、タンパク質 翻訳	CS スコア、 機能	
Mrpl12	56282	MRPL12	6182	-1.56	翻訳	RNA 転写 、タンパク質 翻訳	CS スコア、 機能	
Mrpl21	353242	MRPL21	219927	-1.91	翻訳	RNA 転写 、タンパク質 翻訳	CS スコア、 機能	
Mrpl28	68611	MRPL28	10573	-1.50	翻訳	RNA 転写 、タンパク質 翻訳	CS スコア、 機能	
Mrpl3	94062	MRPL3	11222	-1.58	翻訳	RNA 転写 、タンパク質 翻訳	CS スコア、 機能	
Mrpl34	94065	MRPL34	64981	-1.66	翻訳	RNA 転写 、タンパク質 翻訳	CS スコア、 機能	
Mrpl4	66163	MRPL4	51073	-2.41	翻訳	RNA 転写 、タンパク質 翻訳	CS スコア、 機能	
Mrpl41	107733	MRPL41	64975	-2.15	翻訳	RNA 転写 、タンパク質 翻訳	CS スコア、 機能	
Mrpl51	66493	MRPL51	51258	-1.40	翻訳	RNA 転写 、タンパク質 翻訳	CS スコア、 機能	
Mrps14	64659	MRPS14	63931	-1.82	翻訳	RNA 転写 、タンパク質 翻訳	CS スコア、 機能	
Mrps15	66407	MRPS15	64960	-1.28	翻訳	RNA 転写 、タンパク質 翻訳	CS スコア、 機能	
Mrps16	66242	MRPS16	51021	-2.29	翻訳	RNA 転写 、タンパク質 翻訳	CS スコア、 機能	
Mrps18a	68565	MRPS18 A	55168	-1.55	翻訳	RNA 転写 、タンパク質 翻訳	CS スコア、 機能	
Mrps2	118451	MRPS2	51116	-1.59	翻訳	RNA 転写 、タンパク質 翻訳	CS スコア、 機能	
Mrps21	66292	MRPS21	54460	-1.51	翻訳	RNA 転写 、タンパク質 翻訳	CS スコア、 機能	
Mrps24	64660	MRPS24	64951	-1.71	翻訳	RNA 転写 、タンパク質 翻訳	CS スコア、 機能	

【０２５９】

【表２６】

Mrps6	121022	MRPS6	64968	-1.65	翻訳	RNA転写、タンパク質翻訳	CSスコア、機能	
Nars	70223	NARS	4677	-3.31	タンパク質翻訳のためのtRNAアミノアシル化	RNA転写、タンパク質翻訳	CSスコア、機能	
Nars2	244141	NARS2	79731	-1.32	タンパク質翻訳のためのtRNAアミノアシル化	RNA転写、タンパク質翻訳	CSスコア、機能	
Ncbp2	68092	NCBP2	22916	-3.00	mRNAシススプライシング、スプライソソームによる	RNA転写、タンパク質翻訳	CSスコア、機能	
Nedd8	18002	NEDD8	4738	-2.45	RNAポリメラーゼIIプロモータからの転写の調節	RNA転写、タンパク質翻訳	CSスコア、機能	
Ngdn	68966	NGDN	25983	-2.35	トリシストロン性rRNA転写物からのSSU-rRNAの成熟(SSU-rRNA、5.8S rRNA、LSU-rRNA)	RNA転写、タンパク質翻訳	CSスコア、機能	
Nhp2	52530	NHP2	55651	-1.74	rRNAプソイドウリジン合成	RNA転写、タンパク質翻訳	CSスコア、機能	
Nip7	66164	NIP7	51388	-2.03	リボソーム集合	RNA転写、タンパク質翻訳	CSスコア、機能	
Noc2l	57741	NOC2L	26155	-2.34	RNAポリメラーゼIIプロモータからの転写の負の調節	RNA転写、タンパク質翻訳	CSスコア、機能	
Noc4l	100608	NOC4L	79050	-2.11	リボソーム生合成	RNA転写、タンパク質翻訳	CSスコア、機能	
Nol6	230082	NOL6	65083	-2.28	rRNAプロセシング	RNA転写、タンパク質翻訳	CSスコア、機能	
Nol9	74035	NOL9	79707	-2.20	トリシストロン性rRNA転写物の5.8S rRNA及びLSU-rRNA間のITS2における切断(SSU-rRNA、5.8S rRNA、LSU-rRNA)	RNA転写、タンパク質翻訳	CSスコア、機能	
Nop16	28126	NOP16	51491	-2.10	リボソーム大サブユニット生合成	RNA転写、タンパク質翻訳	CSスコア、機能	
Nop2	110109	NOP2	4839	-2.14	rRNAプロセシング	RNA転写、タンパク質翻訳	CSスコア、機能	
Nop58	55989	NOP58	51602	-2.54	rRNA修飾	RNA転写、タンパク質翻訳	CSスコア、機能	
Nsa2	59050	NSA2	10412	-1.78	rRNAプロセシング	RNA転写、タンパク質翻訳	CSスコア、機能	
Nudt21	68219	NUDT21	11051	-2.36	mRNAポリアデニル化	RNA転写、タンパク質翻訳	CSスコア、機能	
Osgep	66246	OSGEP	55644	-1.98	tRNAプロセシング	RNA転写、タンパク質翻訳	CSスコア、機能	
Pabpn1	54196	PABPN1	8106	-1.92	mRNAスプライシング、スプライソソームによる	RNA転写、タンパク質翻訳	CSスコア、機能	
Pdcd11	18572	PDCD11	22984	-1.47	rRNAプロセシング	RNA転写、タンパク質翻訳	CSスコア、機能	

【０２６０】

【表２７】

Pes1	64934	PES1	23481	-2.92	トリシストロン性 rRNA 転写物からの LSU-rRNA の成熟 (SSU-rRNA、5.8S rRNA、 LSU-rRNA)	RNA 転写 、タンパク質 翻訳	CS スコア、 マウス K.O.、 機能	Lerch-Gaggl A, et al. J Biol Chem. 2002 Nov 22;277(47):45347-55
Phb	18673	PHB	5245	-2.26	RNA ポリメラーゼ II プロモータからの転写の調節	RNA 転写 、タンパク質 翻訳	CS スコア、 マウス K.O.、 機能	He B, et al. Endocrinology. 2011 Mar;152(3):1047-56
Phf5a	68479	PHF5A	84844	-3.52	mRNA スプライシング、 スプライソソームによる	RNA 転写 、タンパク質 翻訳	CS スコア、 機能	
Pnn	18949	PNN	5411	-1.34	mRNA スプライシング、 スプライソソームによる	RNA 転写 、タンパク質 翻訳	CS スコア、 マウス K.O.、 機能	Joo JH, et al. Dev Dyn. 2007 Aug;236(8):2147-58
Polr1b	20017	POLR1B	84172	-3.23	RNA ポリメラーゼ I プロモータからの転写	RNA 転写 、タンパク質 翻訳	CS スコア、 マウス K.O.、 機能	Chen H, et al. Biochem Biophys Res Commun. 2008 Jan 25;365(4):636-42
Polr1c	20016	POLR1C	9533	-2.79	RNA ポリメラーゼ I プロモータからの転写	RNA 転写 、タンパク質 翻訳	CS スコア、 機能	
Polr2a	20020	POLR2A	5430	-3.15	RNA ポリメラーゼ II プロモータからの転写	RNA 転写 、タンパク質 翻訳	CS スコア、 機能	
Polr2b	231329	POLR2B	5431	-3.09	RNA ポリメラーゼ II プロモータからの転写	RNA 転写 、タンパク質 翻訳	CS スコア、 機能	
Polr2c	20021	POLR2C	5432	-3.15	mRNA スプライシング、 スプライソソームによる	RNA 転写 、タンパク質 翻訳	CS スコア、 機能	
Polr2d	69241	POLR2D	5433	-2.23	核転写 mRNA 異化プロセス、 脱アデニル化 依存性分解	RNA 転写 、タンパク質 翻訳	CS スコア、 機能	
Polr2f	69833	POLR2F	5435	-2.31	RNA ポリメラーゼ I プロモータからの転写	RNA 転写 、タンパク質 翻訳	CS スコア、 機能	
Polr2g	67710	POLR2G	5436	-2.78	核転写 mRNA 異化プロセス、 エキソヌクレアーゼによる	RNA 転写 、タンパク質 翻訳	CS スコア、 機能	
Polr2h	245841	POLR2H	5437	-1.83	RNA ポリメラーゼ I プロモータからの転写	RNA 転写 、タンパク質 翻訳	CS スコア、 機能	
Polr2i	69920	POLR2I	5438	-2.92	DNA-鋳型 RNA ポリメラーゼ II プロモータからの 転写延長中の 転写忠実性の 維持	RNA 転写 、タンパク質 翻訳	CS スコア、 機能	
Polr2j	20022	POLR2J	5439	-3.31	mRNA スプライシング、 スプライソソームによる	RNA 転写 、タンパク質 翻訳	CS スコア、 機能	
Polr2l	66491	POLR2L	5441	-3.55	mRNA スプライシング、 スプライソソームによる	RNA 転写 、タンパク質 翻訳	CS スコア、 機能	
Polr3e	26939	POLR3E	55718	-2.33	RNA ポリメラーゼ III プロモータからの転写	RNA 転写 、タンパク質 翻訳	CS スコア、 機能	
Pop1	67724	POP1	10940	-1.79	tRNA 5'-リーダ 除去	RNA 転写 、タンパク質 翻訳	CS スコア、 機能	

【０２６１】

【表２８】

Pop4	66161	POP4	10775	-1.87	RNA リン酸ジエステル結合加水分解	RNA 転写、タンパク質翻訳	CS スコア、機能	
Ppa1	67895	PPA1	5464	-1.63	タンパク質翻訳のための tRNA アミノアシル化	RNA 転写、タンパク質翻訳	CS スコア、機能	
Ppan	235036	PPAN	56342	-1.62	リボソーム大サブユニット集合	RNA 転写、タンパク質翻訳	CS スコア、機能	
Ppp2ca	19052	PPP2CA	5515	-3.01	核転写 mRNA 異化プロセス、ナンセンス変異依存分解	RNA 転写、タンパク質翻訳	CS スコア、マウス K.O.、機能	Gu P, et al. Genesis. 2012 May;50(5):429-36
Prim1	19075	PRIM1	5557	-2.07	DNA 複製、RNA プライマーの合成	RNA 転写、タンパク質翻訳	CS スコア、機能	
Prpf38b	66921	PRPF38B	55119	-2.68	mRNA プロセシング	RNA 転写、タンパク質翻訳	CS スコア、機能	
Prpf4	70052	PRPF4	9128	-2.24	RNA スプライシング	RNA 転写、タンパク質翻訳	CS スコア、機能	
Prpf8	192159	PRPF8	10594	-3.43	mRNA スプライシング、スプライソソームによる	RNA 転写、タンパク質翻訳	CS スコア、機能	
Ptcd1	71799	PTCD1	26024	-1.77	tRNA 3'-末端プロセシング	RNA 転写、タンパク質翻訳	CS スコア、機能	
Pwp2	110816	PWP2	5822	-2.52	リボソーム小サブユニット集合	RNA 転写、タンパク質翻訳	CS スコア、機能	
Qars	97541	QARS	5859	-3.35	タンパク質翻訳のための tRNA アミノアシル化	RNA 転写、タンパク質翻訳	CS スコア、機能	
Ran	19384	RAN	5901	-3.09	核からのリボソーム大サブユニット排出	RNA 転写、タンパク質翻訳	CS スコア、機能	
Rars	104458	RARS	5917	-2.30	タンパク質翻訳のための tRNA アミノアシル化	RNA 転写、タンパク質翻訳	CS スコア、機能	
Rars2	109093	RARS2	57038	-1.93	アルギニル-tRNA アミノアシル化	RNA 転写、タンパク質翻訳	CS スコア、機能	
Rbm25	67039	RBM25	58517	-2.15	選択的 mRNA スプライシングの調節、スプライソソームによる	RNA 転写、タンパク質翻訳	CS スコア、機能	
Rbm8a	60365	RBM8A	9939	-2.97	核転写 mRNA 異化プロセス、ナンセンス変異依存分解	RNA 転写、タンパク質翻訳	CS スコア、機能	
Rbmx	19655	RBMX	27316	-1.95	選択的 mRNA スプライシングの調節、スプライソソームによる	RNA 転写、タンパク質翻訳	CS スコア、機能	
Rcl1	59028	RCL1	10171	-2.08	トリシストロン性 rRNA 転写物のエンドヌクレアーゼによる切断 (SSU-rRNA、5.8S rRNA、LSU-rRNA)	RNA 転写、タンパク質翻訳	CS スコア、機能	
Rngtt	24018	RNGTT	8732	-2.90	RNA ポリメラーゼ II プロモータからの転写	RNA 転写、タンパク質翻訳	CS スコア、機能	
Rnmt	67897	RNMT	8731	-1.45	7-メチルグアノシン mRNA キャッピング	RNA 転写、タンパク質翻訳	CS スコア、機能	

【０２６２】

【表２９】

Rnpc3	67225	RNPC3	55599	-1.95	mRNA スプライシング、スプライソソームによる	RNA 転写、タンパク質翻訳	CS スコア、機能	
Rpap1	68925	RPAP1	26015	-2.58	RNA ポリメラーゼ II プロモータからの転写	RNA 転写、タンパク質翻訳	CS スコア、機能	
Rpl10	110954	RPL10	6134	-3.76	翻訳	RNA 転写、タンパク質翻訳	CS スコア、機能	
Rpl10a	19896	RPL10A	4736	-2.15	核転写 mRNA 異化プロセス、ナンセンス変異依存分解	RNA 転写、タンパク質翻訳	CS スコア、機能	
Rpl11	67025	RPL11	6135	-2.99	翻訳	RNA 転写、タンパク質翻訳	CS スコア、機能	
Rpl12	269261	RPL12	6136	-2.64	リボソーム大サブユニット集合	RNA 転写、タンパク質翻訳	CS スコア、機能	
Rpl13	270106	RPL13	6137	-3.28	翻訳	RNA 転写、タンパク質翻訳	CS スコア、機能	
Rpl14	67115	RPL14	9045	-2.92	核転写 mRNA 異化プロセス、ナンセンス変異依存分解	RNA 転写、タンパク質翻訳	CS スコア、機能	
Rpl15	66480	RPL15	6138	-3.50	翻訳	RNA 転写、タンパク質翻訳	CS スコア、機能	
Rpl18	19899	RPL18	6141	-3.72	翻訳	RNA 転写、タンパク質翻訳	CS スコア、機能	
Rpl18a	76808	RPL18A	6142	-3.37	翻訳	RNA 転写、タンパク質翻訳	CS スコア、機能	
Rpl23	65019	RPL23	9349	-3.02	翻訳	RNA 転写、タンパク質翻訳	CS スコア、機能	
n/a	n/a	RPL23A	6147	-4.25	翻訳	RNA 転写、タンパク質翻訳	CS スコア、機能	
Rpl24	68193	RPL24	6152	-2.55	リボソーム大サブユニット集合	RNA 転写、タンパク質翻訳	CS スコア、マウス K.O.、機能	Oliver ER, et al. Development. 2004 Aug;131(16):3907-20
Rpl26	19941	RPL26	6154	-2.88	翻訳	RNA 転写、タンパク質翻訳	CS スコア、機能	
Rpl27	19942	RPL27	6155	-2.25	翻訳	RNA 転写、タンパク質翻訳	CS スコア、機能	
Rpl27a	26451	RPL27A	6157	-2.87	翻訳	RNA 転写、タンパク質翻訳	CS スコア、マウス K.O.、機能	Terzian T, et al. J Pathol. 2011 Aug;224(4):540-52
Rpl3	27367	RPL3	6122	-3.27	リボソーム大サブユニット集合	RNA 転写、タンパク質翻訳	CS スコア、機能	
Rpl30	19946	RPL30	6156	-2.53	核転写 mRNA 異化プロセス、ナンセンス変異依存分解	RNA 転写、タンパク質翻訳	CS スコア、機能	
Rpl31	114641	RPL31	6160	-1.92	翻訳	RNA 転写、タンパク質翻訳	CS スコア、機能	
Rpl32	19951	RPL32	6161	-3.70	核転写 mRNA 異化プロセス、ナンセンス変異依存分解	RNA 転写、タンパク質翻訳	CS スコア、機能	

【０２６３】

【表３０】

n/a	n/a	RPL34	6164	-2.37	核転写 mRNA 異化プロセス、ナンセンス変異依存分解	RNA 転写、タンパク質翻訳	CS スコア、機能	
Rpl35	66489	RPL35	11224	-2.25	核転写 mRNA 異化プロセス、ナンセンス変異依存分解	RNA 転写、タンパク質翻訳	CS スコア、機能	
Rpl35a	57808	RPL35A	6165	-3.20	翻訳	RNA 転写、タンパク質翻訳	CS スコア、機能	
Rpl36	54217	RPL36	25873	-3.44	核転写 mRNA 異化プロセス、ナンセンス変異依存分解	RNA 転写、タンパク質翻訳	CS スコア、機能	
Rpl37	67281	RPL37	6167	-3.02	翻訳	RNA 転写、タンパク質翻訳	CS スコア、機能	
Rpl37a	19981	RPL37A	6168	-2.62	核転写 mRNA 異化プロセス、ナンセンス変異依存分解	RNA 転写、タンパク質翻訳	CS スコア、機能	
Rpl38	67671	RPL38	6169	-2.57	翻訳	RNA 転写、タンパク質翻訳	CS スコア、マウス K.O.、機能	MORGAN WC, et al. J Hered. 1950 Aug;41(8):208-15
Rpl4	67891	RPL4	6124	-2.67	核転写 mRNA 異化プロセス、ナンセンス変異依存分解	RNA 転写、タンパク質翻訳	CS スコア、機能	
Rpl5	100503670	RPL5	6125	-3.20	翻訳	RNA 転写、タンパク質翻訳	CS スコア、機能	
Rpl6	19988	RPL6	6128	-3.07	翻訳	RNA 転写、タンパク質翻訳	CS スコア、機能	
Rpl7	19989	RPL7	6129	-2.15	核転写 mRNA 異化プロセス、ナンセンス変異依存分解	RNA 転写、タンパク質翻訳	CS スコア、機能	
Rpl7a	27176	RPL7A	6130	-3.45	リボソーム生合成	RNA 転写、タンパク質翻訳	CS スコア、機能	
Rpl7l1	66229	RPL7L1	285855	-1.86	トリシストロン性 rRNA 転写物からの LSU-rRNA の成熟 (SSU-rRNA、5.8S rRNA、LSU-rRNA)	RNA 転写、タンパク質翻訳	CS スコア、機能	
Rpl8	26961	RPL8	6132	-4.00	翻訳	RNA 転写、タンパク質翻訳	CS スコア、機能	
Rpl9	20005	RPL9	6133	-3.57	翻訳	RNA 転写、タンパク質翻訳	CS スコア、機能	
Rplp0	11837	RPLP0	6175	-2.61	核転写 mRNA 異化プロセス、ナンセンス変異依存分解	RNA 転写、タンパク質翻訳	CS スコア、機能	
Rpp21	67676	RPP21	79897	-2.96	tRNA プロセシング	RNA 転写、タンパク質翻訳	CS スコア、機能	
Rpp30	54364	RPP30	10556	-1.79	tRNA プロセシング	RNA 転写、タンパク質翻訳	CS スコア、機能	
Rps10	67097	RPS10	6204	-2.88	リボソーム小サブユニット集合	RNA 転写、タンパク質翻訳	CS スコア、機能	
Rps11	27207	RPS11	6205	-2.93	翻訳	RNA 転写、タンパク質翻訳	CS スコア、機能	

【０２６４】

【表３１】

Rps12	20042	RPS12	6206	-3.33	核転写 mRNA 異化プロセス、ナンセンス変異依存分解	RNA 転写、タンパク質翻訳	CS スコア、機能	
Rps13	68052	RPS13	6207	-3.13	翻訳	RNA 転写、タンパク質翻訳	CS スコア、機能	
n/a	n/a	RPS14	6208	-3.18	翻訳	RNA 転写、タンパク質翻訳	CS スコア、機能	
Rps15	20054	RPS15	6209	-3.20	リボソーム小サブユニット集合	RNA 転写、タンパク質翻訳	CS スコア、機能	
Rps15a	267019	RPS15A	6210	-3.18	翻訳	RNA 転写、タンパク質翻訳	CS スコア、機能	
Rps16	20055	RPS16	6217	-2.35	翻訳	RNA 転写、タンパク質翻訳	CS スコア、機能	
Rps17	20068	RPS17	6218	-2.69	リボソーム小サブユニット集合	RNA 転写、タンパク質翻訳	CS スコア、機能	
Rps19	20085	RPS19	6223	-3.49	翻訳	RNA 転写、タンパク質翻訳	CS スコア、マウス K.O.、機能	Matsson H, et al. Mol Cell Biol. 2004 May;24(9):4032-7
Rps2	16898	RPS2	6187	-2.50	翻訳	RNA 転写、タンパク質翻訳	CS スコア、機能	
Rps21	66481	RPS21	6227	-1.84	核転写 mRNA 異化プロセス、ナンセンス変異依存分解	RNA 転写、タンパク質翻訳	CS スコア、機能	
Rps23	66475	RPS23	6228	-2.86	翻訳	RNA 転写、タンパク質翻訳	CS スコア、機能	
Rps25	75617	RPS25	6230	-2.38	核転写 mRNA 異化プロセス、ナンセンス変異依存分解	RNA 転写、タンパク質翻訳	CS スコア、機能	
n/a	n/a	RPS3A	6189	-3.72	翻訳	RNA 転写、タンパク質翻訳	CS スコア、機能	
Rps4x	20102	RPS4X	6191	-3.04	翻訳	RNA 転写、タンパク質翻訳	CS スコア、機能	
Rps5	20103	RPS5	6193	-2.61	翻訳	RNA 転写、タンパク質翻訳	CS スコア、機能	
Rps6	20104	RPS6	6194	-3.31	翻訳	RNA 転写、タンパク質翻訳	CS スコア、機能	
Rps7	20115	RPS7	6201	-2.97	核転写 mRNA 異化プロセス、ナンセンス変異依存分解	RNA 転写、タンパク質翻訳	CS スコア、機能	
Rps8	20116	RPS8	6202	-3.44	核転写 mRNA 異化プロセス、ナンセンス変異依存分解	RNA 転写、タンパク質翻訳	CS スコア、機能	
Rps9	76846	RPS9	6203	-3.16	翻訳	RNA 転写、タンパク質翻訳	CS スコア、機能	
Rpsa	16785	RPSA	3921	-3.06	リボソーム小サブユニット集合	RNA 転写、タンパク質翻訳	CS スコア、マウス K.O.、機能	Han J, et al. MGI Direct Data Submission. 2008

【０２６５】

【表３２】

Rsl24d1	225215	RSL24D1	51187	-2.76	翻訳	RNA転写、タンパク質翻訳	CS スコア、機能	
Sars	20226	SARS	6301	-2.67	タンパク質翻訳のためのtRNA アミノアシル化	RNA転写、タンパク質翻訳	CS スコア、機能	
Sars2	71984	SARS2	54938	-2.25	セリル-tRNA アミノアシル化	RNA転写、タンパク質翻訳	CS スコア、機能	
Sart1	20227	SART1	9092	-2.13	5S rRNA の成熟	RNA転写、タンパク質翻訳	CS スコア、機能	
Sart3	53890	SART3	9733	-1.88	RNA プロセシング	RNA転写、タンパク質翻訳	CS スコア、機能	
Sdad1	231452	SDAD1	55153	-1.96	核からのリボソーム大サブユニット排出	RNA転写、タンパク質翻訳	CS スコア、機能	
Sf1	22668	SF1	7536	-3.04	mRNA スプライシング、スプライソソームによる	RNA転写、タンパク質翻訳	CS スコア、マウス K.O.、機能	Shitashige M, et al. Cancer Sci. 2007 Dec;98(12):1862-7
Sf3a1	67465	SF3A1	10291	-3.18	mRNA 3'-スプライス部位認識	RNA転写、タンパク質翻訳	CS スコア、機能	
Sf3a2	20222	SF3A2	8175	-2.66	mRNA 3'-スプライス部位認識	RNA転写、タンパク質翻訳	CS スコア、機能	
Sf3a3	75062	SF3A3	10946	-2.26	RNA スプライシング、エステル交換反応による	RNA転写、タンパク質翻訳	CS スコア、機能	
Sf3b2	319322	SF3B2	10992	-2.51	mRNA スプライシング、スプライソソームによる	RNA転写、タンパク質翻訳	CS スコア、機能	
Sf3b3	101943	SF3B3	23450	-4.13	RNA スプライシング、エステル交換反応による	RNA転写、タンパク質翻訳	CS スコア、機能	
Sf3b4	107701	SF3B4	10262	-2.60	RNA スプライシング、エステル交換反応による	RNA転写、タンパク質翻訳	CS スコア、機能	
Sfpq	71514	SFPQ	6421	-2.27	RNA ポリメラーゼ II プロモータからの転写の負の調節	RNA転写、タンパク質翻訳	CS スコア、機能	
Sin3a	20466	SIN3A	25942	-1.74	RNA ポリメラーゼ II プロモータからの転写の負の調節	RNA転写、タンパク質翻訳	CS スコア、マウス K.O.、機能	Dannenberg JH, et al. Genes Dev. 2005 Jul 1;19(13):1581-95
Smg5	229512	SMG5	23381	-2.35	核転写 mRNA 異化プロセス、ナンセンス変異依存分解	RNA転写、タンパク質翻訳	CS スコア、機能	
Smg6	103677	SMG6	23293	-1.18	核転写 mRNA 異化プロセス、ナンセンス変異依存分解	RNA転写、タンパク質翻訳	CS スコア、機能	
Snrnp25	78372	SNRNP25	79622	-2.43	mRNA プロセシング	RNA転写、タンパク質翻訳	CS スコア、機能	
Snrnp27	66618	SNRNP27	11017	-1.36	mRNA プロセシング	RNA転写、タンパク質翻訳	CS スコア、機能	
Snrpd2	107686	SNRPD2	6633	-2.47	RNA スプライシング	RNA転写、タンパク質翻訳	CS スコア、機能	
Snrpf	69878	SNRPF	6636	-3.58	mRNA スプライシング、スプライソソームによる	RNA転写、タンパク質翻訳	CS スコア、機能	

【０２６６】

【表３３】

Srrm1	51796	SRRM1	10250	-1.81	mRNA プロセシング	RNA 転写、タンパク質翻訳	CS スコア、機能	
Srsf1	110809	SRSF1	6426	-2.75	mRNA 5'-スプライス部位認識	RNA 転写、タンパク質翻訳	CS スコア、マウス K.O.、機能	Xu X, et al. Cell. 2005 Jan 14;120(1):59-72
Srsf2	20382	SRSF2	6427	-3.66	選択的 mRNA スプライシングの調節、スプライソソームによる	RNA 転写、タンパク質翻訳	CS スコア、マウス K.O.、機能	Ding JH, et al. EMBO J. 2004 Feb 25;23(4):885-96
Srsf3	20383	SRSF3	6428	-2.28	mRNA スプライシング、スプライソソームによる	RNA 転写、タンパク質翻訳	CS スコア、マウス K.O.、機能	Jumaa H, et al. Curr Biol. 1999 Aug 26;9(16):899-902
Srsf7	225027	SRSF7	6432	-2.06	mRNA スプライシング、スプライソソームによる	RNA 転写、タンパク質翻訳	CS スコア、機能	
Ssu72	68991	SSU72	29101	-2.57	mRNA ポリアデニル化	RNA 転写、タンパク質翻訳	CS スコア、機能	
Sugp1	70616	SUGP1	57794	-1.36	RNA プロセシング	RNA 転写、タンパク質翻訳	CS スコア、機能	
Tars	110960	TARS	6897	-2.53	タンパク質翻訳のための tRNA アミノアシル化	RNA 転写、タンパク質翻訳	CS スコア、機能	
Tars2	71807	TARS2	80222	-1.91	トレオニル-tRNA アミノアシル化	RNA 転写、タンパク質翻訳	CS スコア、機能	
Tbl3	213773	TBL3	10607	-2.41	トリシストロン性 rRNA 転写物からの SSU-rRNA の成熟 (SSU-rRNA、5.8S rRNA、LSU-rRNA)	RNA 転写、タンパク質翻訳	CS スコア、機能	
Thoc2	331401	THOC2	57187	-2.52	mRNA プロセシング	RNA 転写、タンパク質翻訳	CS スコア、機能	
Thoc5	107829	THOC5	8563	-1.57	mRNA プロセシング	RNA 転写、タンパク質翻訳	CS スコア、マウス K.O.、機能	Mancini A, et al. BMC Biol. 2010;8:1
Thoc7	66231	THOC7	80145	-2.23	mRNA プロセシング	RNA 転写、タンパク質翻訳	CS スコア、機能	
Timeless	21853	TIMELESS	8914	-2.27	RNA ポリメラーゼ II プロモータからの転写の負の調節	RNA 転写、タンパク質翻訳	CS スコア、マウス K.O.、機能	Gotter AL, et al. Nat Neurosci. 2000 Aug;3(8):755-6
Tsen2	381802	TSEN2	80746	-1.41	tRNA 型イントロンスプライス部位認識及び切断	RNA 転写、タンパク質翻訳	CS スコア、機能	
Tsr1	104662	TSR1	55720	-1.76	リボソーム生合成	RNA 転写、タンパク質翻訳	CS スコア、機能	
Tsr2	69499	TSR2	90121	-2.82	トリシストロン性 rRNA 転写物からの SSU-rRNA の成熟 (SSU-rRNA、5.8S rRNA、LSU-rRNA)	RNA 転写、タンパク質翻訳	CS スコア、機能	
Tufm	233870	TUFM	7284	-1.92	翻訳延長	RNA 転写、タンパク質翻訳	CS スコア、機能	
Tut1	70044	TUT1	64852	-2.65	mRNA ポリアデニル化	RNA 転写、タンパク質翻訳	CS スコア、機能	

【０２６７】

【表３４】

Twistnb	28071	TWISTNB	221830	-2.17	RNA ポリメラーゼ I プロモータからの転写	RNA 転写、タンパク質翻訳	CS スコア、機能	
U2af1	108121	U2AF1	7307	-2.41	mRNA スプライシング、スプライソソームによる	RNA 転写、タンパク質翻訳	CS スコア、機能	
U2af2	22185	U2AF2	11338	-2.80	mRNA プロセシング	RNA 転写、タンパク質翻訳	CS スコア、機能	
Uba52	22186	UBA52	7311	-2.54	翻訳	RNA 転写、タンパク質翻訳	CS スコア、機能	
Ubl5	66177	UBL5	59286	-2.56	mRNA スプライシング、スプライソソームによる	RNA 転写、タンパク質翻訳	CS スコア、機能	
Upf1	19704	UPF1	5976	-2.63	核転写 mRNA 異化プロセス、ナンセンス変異依存分解	RNA 転写、タンパク質翻訳	CS スコア、マウス K.O.、機能	Medghalchi SM, et al. Hum Mol Genet. 2001 Jan 15;10(2):99-105
Upf2	326622	UPF2	26019	-2.16	核転写 mRNA 異化プロセス、ナンセンス変異依存分解	RNA 転写、タンパク質翻訳	CS スコア、マウス K.O.、機能	Weischenfeldt J, et al. Genes Dev. 2008 May 15;22(10):1381-96
Utp15	105372	UTP15	84135	-1.65	トリシストロン性 rRNA 転写物からの SSU-rRNA の成熟 (SSU-rRNA、5.8S rRNA、LSU-rRNA)	RNA 転写、タンパク質翻訳	CS スコア、機能	
Utp20	70683	UTP20	27340	-2.28	トリシストロン性 rRNA 転写物からの 5.8S rRNA 及び LSU-rRNA から SSU-rRNA を分離するための ITS1 における エンドヌクレアーゼによる 切断(SSU-rRNA、5.8S rRNA、LSU-rRNA)	RNA 転写、タンパク質翻訳	CS スコア、機能	
Utp23	78581	UTP23	84294	-2.54	rRNA プロセシング	RNA 転写、タンパク質翻訳	CS スコア、機能	
Utp3	65961	UTP3	57050	-1.58	トリシストロン性 rRNA 転写物からの SSU-rRNA の成熟 (SSU-rRNA、5.8S rRNA、LSU-rRNA)	RNA 転写、タンパク質翻訳	CS スコア、機能	
Utp6	216987	UTP6	55813	-1.99	トリシストロン性 rRNA 転写物からの SSU-rRNA の成熟 (SSU-rRNA、5.8S rRNA、LSU-rRNA)	RNA 転写、タンパク質翻訳	CS スコア、機能	
Vars	22321	VARS	7407	-3.35	タンパク質翻訳のための tRNA アミノアシル化	RNA 転写、タンパク質翻訳	CS スコア、機能	
Wars	22375	WARS	7453	-2.22	トリプトファニル-tRNA アミノアシル化	RNA 転写、タンパク質翻訳	CS スコア、機能	
Wdr12	57750	WDR12	55759	-2.16	トリシストロン性 rRNA 転写物からの LSU-rRNA の成熟 (SSU-rRNA、5.8S rRNA、LSU-rRNA)	RNA 転写、タンパク質翻訳	CS スコア、機能	
Wdr3	269470	WDR3	10885	-2.65	トリシストロン性 rRNA 転写物からの SSU-rRNA の成熟 (SSU-rRNA、5.8S rRNA、LSU-rRNA)	RNA 転写、タンパク質翻訳	CS スコア、機能	
Wdr33	74320	WDR33	55339	-2.63	mRNA ポリアデニル化	RNA 転写、タンパク質翻訳	CS スコア、機能	
Wdr36	225348	WDR36	134430	-2.04	rRNA プロセシング	RNA 転写、タンパク質翻訳	CS スコア、マウス K.O.、機能	Gallenberger M, et al. Hum Mol Genet. 2011 Feb 1;20(3):422-35

【０２６８】

【表３５】

Wdr46	57315	WDR46	9277	-2.41	トリシストロン性 rRNA 転写物からの SSU-rRNA の成熟 (SSU-rRNA、5.8S rRNA、 LSU-rRNA)	RNA 転写 、タンパク質 翻訳	CS スコア、 機能	
Wdr61	66317	WDR61	80349	-2.63	核転写 mRNA 異化プロセス、 エキソヌクレアーゼ的、3'-5'	RNA 転写 、タンパク質 翻訳	CS スコア、 機能	
Wdr75	73674	WDR75	84128	-2.12	RNA ポリメラーゼ II プロモータからの転写の 調節	RNA 転写 、タンパク質 翻訳	CS スコア、 機能	
Xpo1	103573	XPO1	7514	-3.50	核からの リボソーム 大サブユニット排出	RNA 転写 、タンパク質 翻訳	CS スコア、 機能	
Yars	107271	YARS	8565	-2.78	タンパク質翻訳のための tRNA アミノアシル化	RNA 転写 、タンパク質 翻訳	CS スコア、 機能	
Yars2	70120	YARS2	51067	-2.40	翻訳	RNA 転写 、タンパク質 翻訳	CS スコア、 機能	
Ythdc1	231386	YTHDC1	91746	-2.35	mRNA スプライス部位 選択	RNA 転写 、タンパク質 翻訳	CS スコア、 機能	
Zbtb8os	67106	ZBTB8OS	339487	-2.54	tRNA スプライシング、 エンドヌクレアーゼ的 切断及び連結による	RNA 転写 、タンパク質 翻訳	CS スコア、 機能	
Zc3h3	223642	ZC3H3	23144	-1.22	mRNA ポリアデニル化	RNA 転写 、タンパク質 翻訳	CS スコア、 機能	

【０２６９】

引用文献

Rossant J,Nagy A.Nature Biotechnology,Jan.,pp.23.(1999)
Thomson JA et al.Science.282(5391):1145.(1998)
Takahashi K,Yamanaka S.Cell.126(4):663.(2006)
Takahashi K et al.Cell.131(5):861.(2007)
Hussein SM et al.Nature.471(7336):58.(2011)
Laurent LC et al.Stem Cell.8(1):106.(2011)
Lister R et al.Nature.471(7336):68.(2011)
Yoshida Y,Yamanaka S.Circulation.122(1):80.(2010)
Choo AB et al.STEM CELLS.26(6):1454.(2008)
Tan HL et al.STEM CELLS.27(8):1792.(2009)
Ben-David U,Nudel N,Benvenisty N.Nature Communications.4:.(2013a)
Fong CY,Peh GSL,Gauthaman K,Bongso A.Stem Cell Rev and Rep.5(1):72.(2009)
Tang C et al.Nature Biotechnology.29(9):829.(2011)
Blum B,Bar-Nur O,Golan-Lev T,Benvenisty N.Nature Biotechnology.27(3):281.(2009)
Menendez S et al.Aging Cell.11(1):41.(2012)
Chung S et al.J Neurochem.97(5):1467.(2006)
Eiges R et al.Current Biology.11(7):514.(2001)
Huber I et al.The FASEB Journal.21(10):2551.(2007)
Rong Z,Fu X,Wang M,Xu Y.Journal of Biological Chemistry.287(39):32338.(2012)
Schuldiner M,Itskovitz-Eldor J,Benvenisty N.STEM CELLS.21(3):257.(2003)
Ben-David U et al.Cell Stem Cell.12(2):167.(2013b)
Dabir DV et al.Developmental Cell.25(1):81.(2013)
Tohyama S et al.Stem Cell.12(1):127.(2013)
Ghosh Z et al.Cancer Research.71(14):5030.(2011)

Ben-David U,Benvenisty N.Nat Protoc.9(3):729.(2014)
Lim T-T et al.PLoS ONE.8(7):e70543.(2013)
Halloran PJ,Fenton RG.Cancer Research.58(17):3855.(1998)
Tomicic MT,Thust R,Kaina B.Oncogene.21(14):2141.(2002)
Di Stasi A et al.N Engl J Med.365(18):1673.(2011)
Santamaria D et al.Nature.448(7155):811.(2007)
Diril MK et al.Proceedings of the National Academy of Sciences.109(10):3826.(2012)
Scognamiglio R et al.Cell.164(4):668.(2016)
Fernandez-Miranda G et al.Development.138(13):2661.(2011)
Pellettieri J,Sanchez Alvarado A.Annu.Rev.Genet.41:83.(2007)
Bianconi E et al.Ann.Hum.Biol.40(6):463.(2013)
Wang T et al.Science.350(6264):1096.(2015)
Morgan DO.(2007)
FUNG T,POON R.Seminars in Cell and Developmental Biology.16(3):335.(2005)
Peters J-M.Mol Cell.9(5):931.(2002)
Fukagawa T.Front Biosci.13(13):2705.(2007)
Cassimeris L.Current Opinion in Cell Biology.11(1):134.(1999)
Satyanarayana A et al.Development.135(20):3389.(2008)
Kittler R et al.Nature.432(7020):1036.(2004)
Harborth J et al.J.Cell.Sci.114(Pt 24):4557.(2001)
Silk AD,Holland AJ,Cleveland DW.The Journal of Cell Biology.184(5):677.(2009)
Oda H et al.Molecular and Cellular Biology.29(8):2278.(2009)
Liu Q et al.Genes&Development.14(12):1448.(2000)
Martin-McCaffrey L et al.Developmental Cell.7(5):763.(2004)
Uren AG et al.Curr.Biol.10(21):1319.(2000)
Leung CG et al.J Exp Med.204(7):1603.(2007)
Cutts SM et al.Human Molecular Genetics.8(7):1145.(1999)
Howman EV et al.Proceedings of the National Academy of Sciences.97(3):1148.(2000)
Chauviere M,Kress C,Kress M.Biochem Biophys Res Commun.372(4):513.(2008)
Miura K et al.Biochem Biophys Res Commun.341(1):132.(2006)
Magnaghi P et al.Nat Chem Biol.9(9):548.(2013)
Smith ED et al.Molecular and Cellular Biology.24(3):1168.(2004)
Morham SG,Kluckman KD,Voulomanos N,Smithies O.Molecular and Cellular Biology.16(12):6804.(1996)
Akimitsu N et al.Genes Cells.8(4):393.(2003)
Jeganathan K et al.The Journal of Cell Biology.179(2):255.(2007)
Ono T et al.Cell.115(1):109.(2003)
Bharadwaj R,Qi W,Yu H.J.Biol.Chem.279(13):13076.(2004)
Parisi G,Fornasari MS,Echave J.FEBS Lett.562(1-3):1.(2004)
Harborth J,Weber K,Osborn M.J.Biol.Chem.275(41):31979.(2000)
Krull S et al.Mol.Biol.Cell.15(9):4261.(2004)
Topper LM et al.Cell Cycle.1(4):282.(2002)
Zhang Y-W et al.J.Biol.Chem.284(27):18085.(2009)
Simmons AD et al.Human Molecular Genetics.8(12):2155.(1999)
Plate M et al.Mol Cells.29(4):355.(2010)
Franco M et al.Proceedings of the National Academy of Sciences.95(17):9926.(1998)
Ohno M,Shimura Y.Genes&Development.10(8):997.(1996)

Achsel T et al.EMBO J.18(20):5789.(1999)
Shichijo S et al.J Exp Med.187(3):277.(1998)
Jurica MS et al.RNA.8(4):426.(2002)
Chari A et al.Cell.135(3):497.(2008)
Xu C et al.J.Biol.Chem.281(23):15900.(2006)
Yeh H et al.Genomics.23(2):443.(1994)
Kokkola T et al.FEBS Lett.585(17):2665.(2011)
Chan CC et al.RNA.10(2):200.(2004)
Zhou M et al.Proceedings of the National Academy of Sciences.105(47):18139.(2008)
Takatsu H et al.J.Biol.Chem.273(38):24693.(1998)
Chen Y et al.Cell Research.22(2):333.(2012)
Mansfeld J et al.Nat.Cell Biol.13(10):1234.(2011)
He F,Wang C-T,Gou L-T.Genet.Mol.Res.8(4):1466.(2009)
Lieu A-S et al.Int J Oncol.37(2):429.(2010)
Preuss E et al.Human Gene Therapy.21(8):929.(2010)
Neschadim A et al.Molecular Therapy.20(5):1002.(2012)
Hedley D,Ogilvie L,Springer C.Nat Rev Cancer.7(11):870.(2007)
Nawa A et al.Anticancer Agents Med Chem.8(2):232.(2008)
Danks MK et al.Cancer Research.67(1):22.(2007)
Shah K.Adv.Drug Deliv.Rev.64(8):739.(2012)
Ramnaraine M et al.Cancer Research.63(20):6847.(2003)
Denny WA.J.Biomed.Biotechnol.2003(1):48.(2003)
Ireton GC,McDermott G,Black ME,Stoddard BL.J.Mol.Biol.315(4):687.(2002)
Humerickhouse R et al.Cancer Research.60(5):1189.(2000)
Wierdl M et al.Cancer Research.61(13):5078.(2001)
Kojima A,Hackett NR,Ohwada A,Crystal RG.J.Clin.Invest.101(8):1789.(1998)
Straathof KC et al.Blood.105(11):4247.(2005)
Soucek L et al.Cancer Research.62(12):3507.(2002)
Oricchio E et al.CellReports,pp.1.(2014)
Olive M et al.J.Biol.Chem.272(30):18586.(1997)
Urlinger S et al.Proceedings of the National Academy of Sciences.97(14):7963.(2000)
Agha-Mohammadi S et al.J Gene Med.6(7):817.(2004)
Gossen M et al.Science.268(5218):1766.(1995)
Banaszynski LA et al.Cell.126(5):995.(2006)
Maeder ML et al.Nature Methods.10(3):243.(2013)
Pollock R,Clackson T.Current Opinion in Biotechnology.13(5):459.(2002)
Mullick A et al.BMC Biotechnology.6(1):43.(2006)
No D,Yao TP,Evans RM.Proceedings of the National Academy of Sciences.93(8):3346.(1996)
Stanley SA et al.Nature Medicine.21(1):92.(2015)
Rollins CT et al.Proceedings of the National Academy of Sciences.97(13):7096.(2000)
Cong L et al.Science.339(6121):819.(2013)
Hsu PD et al.Nature Biotechnology.31(9):827.(2013)
Ran FA et al.Nat Protoc.8(11):2281.(2013)
Gertsenstein M et al.PLoS ONE.5(6):e11260.(2010)
Adewumi O et al.Nature Biotechnology.25(7):803.(2007)
Guy CT,Cardiff RD,Muller WJ.Molecular and Cellular Biology.12(3):954.(1992)

Szymczak AL et al.Nature Biotechnology.22(5):589.(2004)

【０２７０】

Nagy A.et al.Manipulating the Mouse Embryo.(2003)

【図１－１】

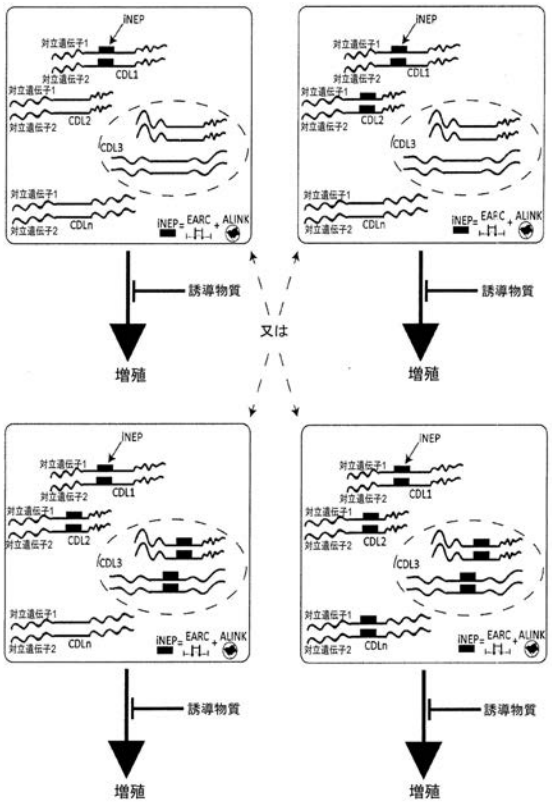


図1A

【図１－２】

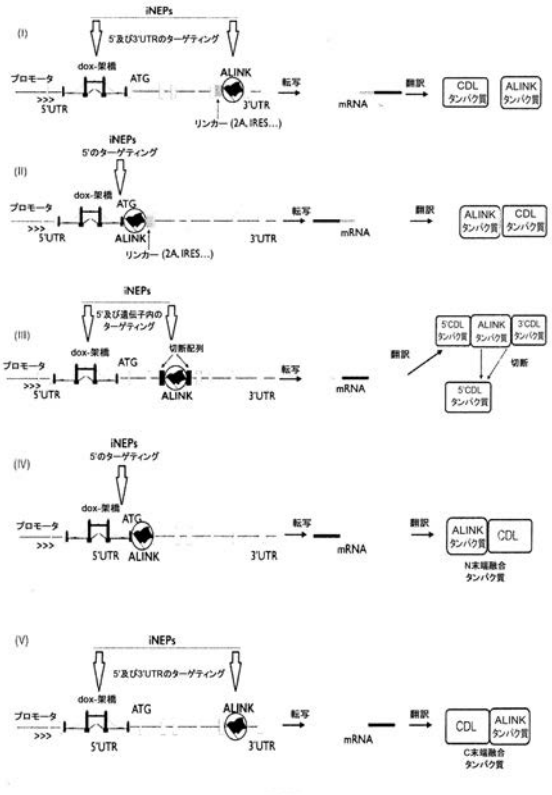


図1B

【図１－３】

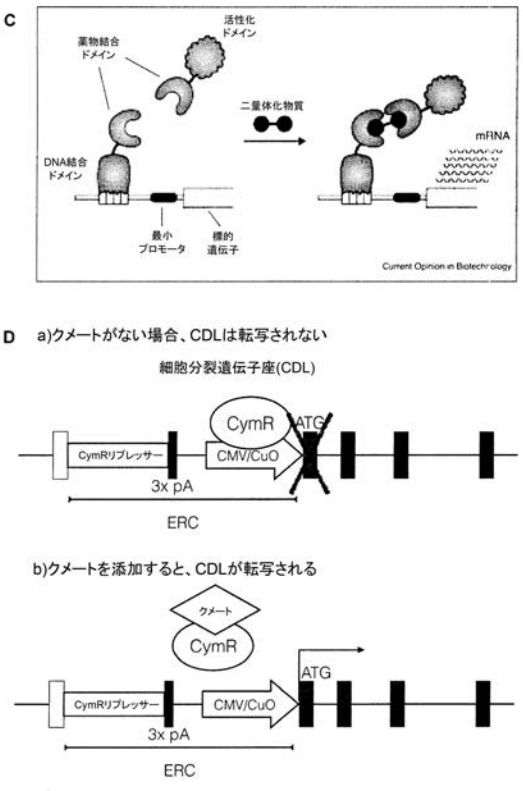


図1C-1D

【図１－４】

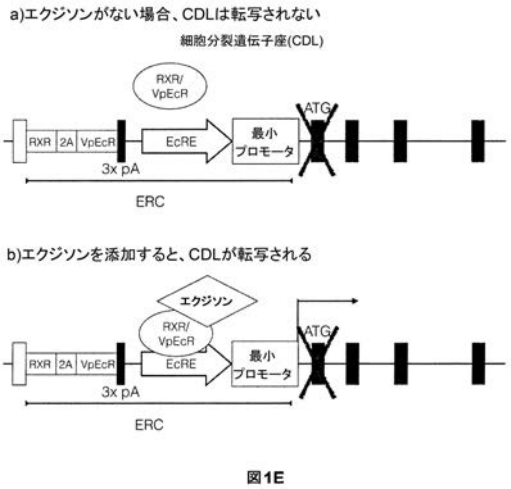


図1E

【図１－５】

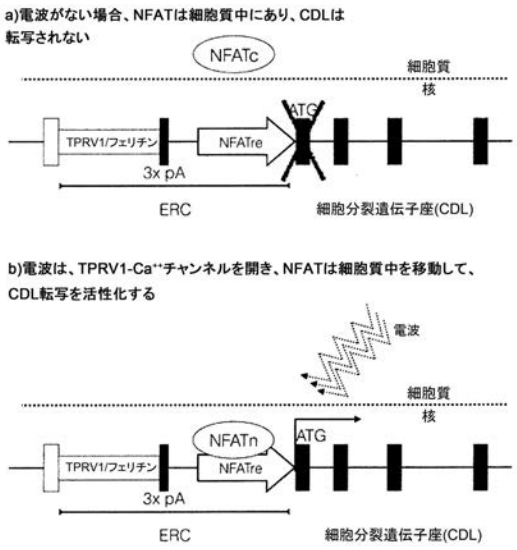


図1F

【図１－６】

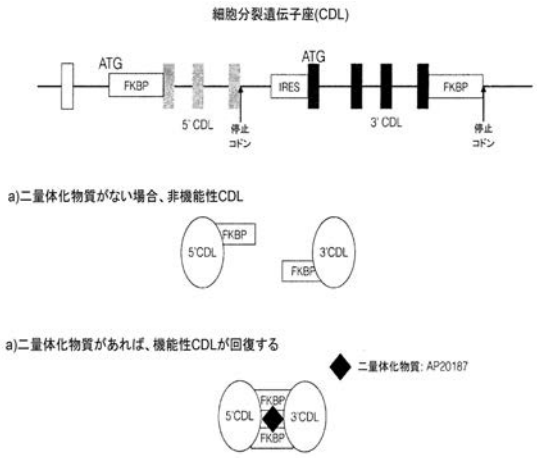


図1G

【図２】

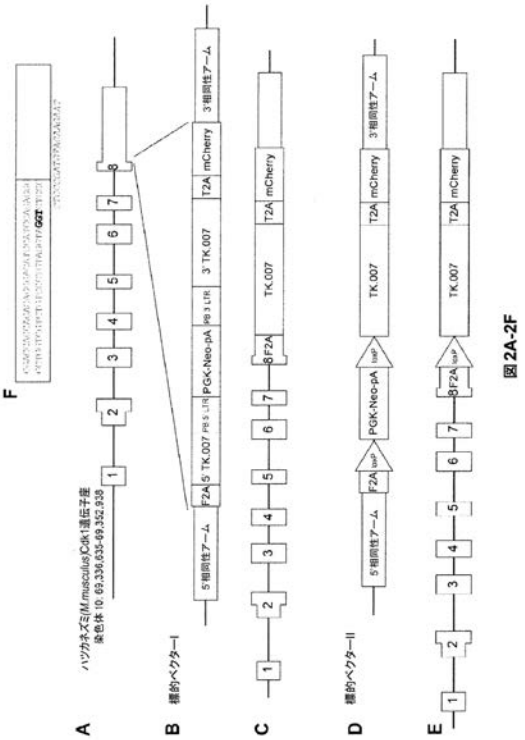


図2A-2F

【図３－１】

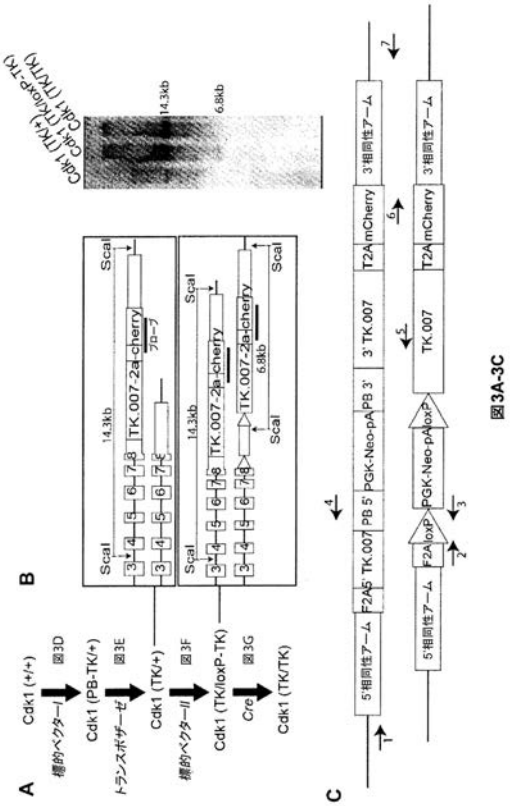


図3A-3C

【図３－２】

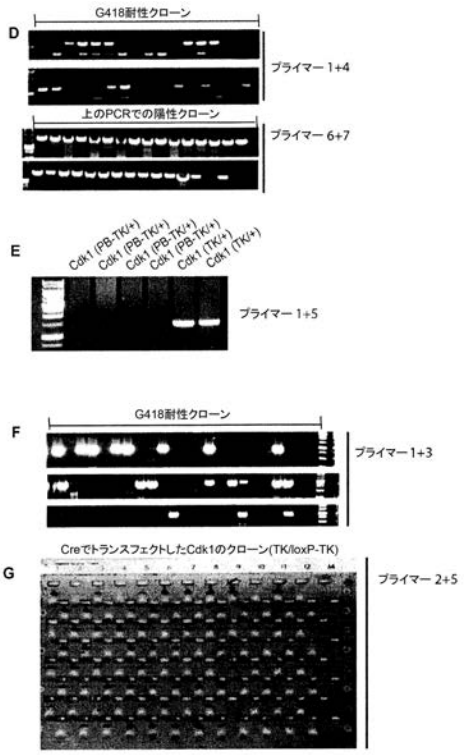


図3D-3G

【図４－１】

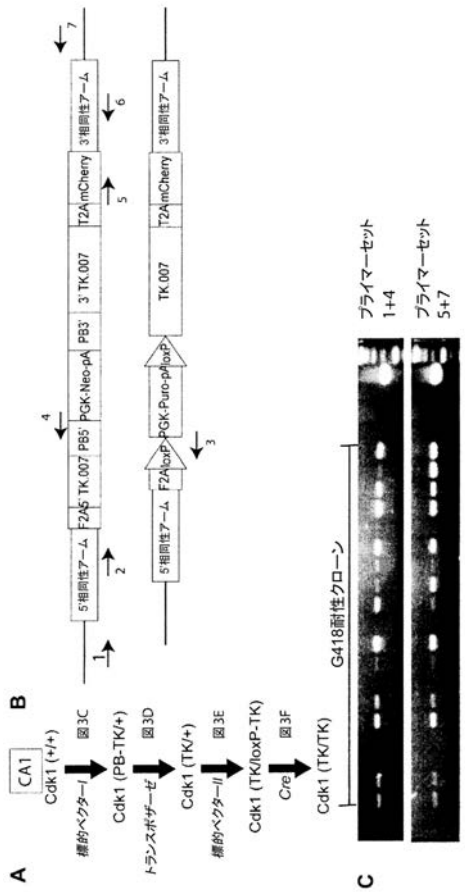


図4A-4C

【図４－２】

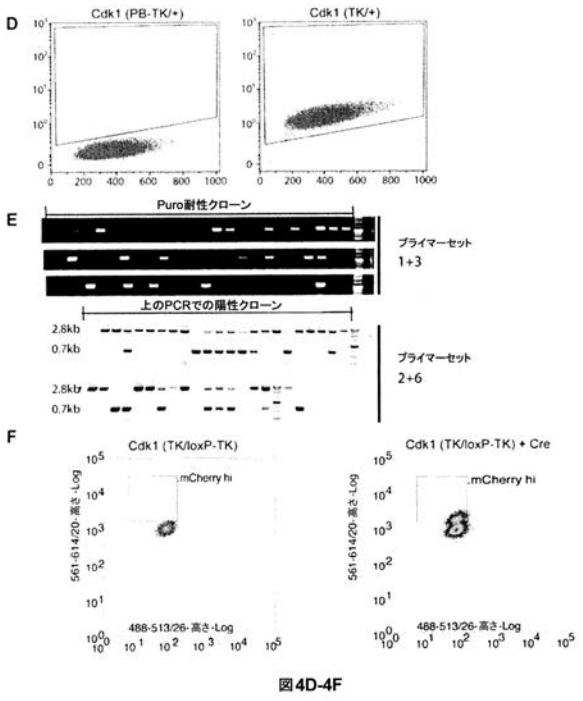


図4D-4F

【図４－３】

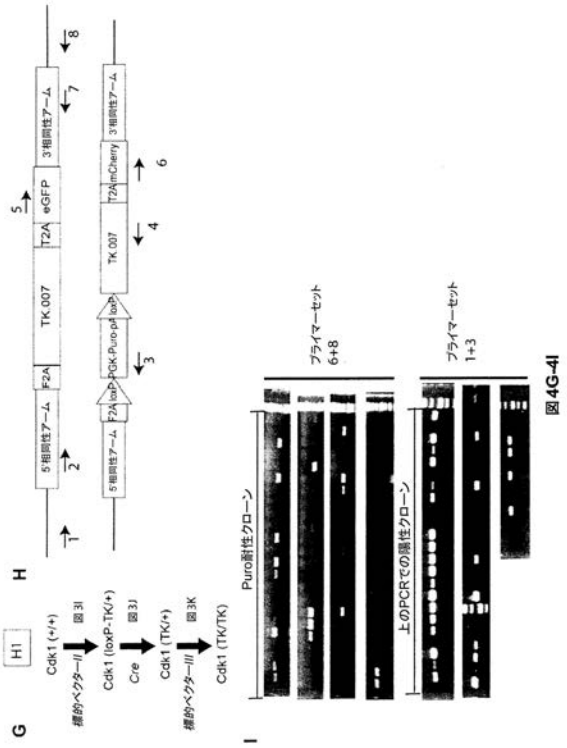


図4G-4I

【図４－４】

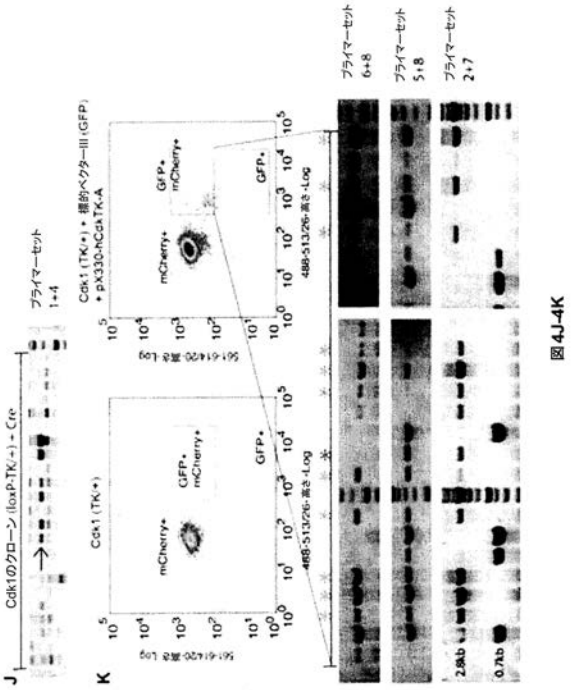


図4J-4K

【図５】

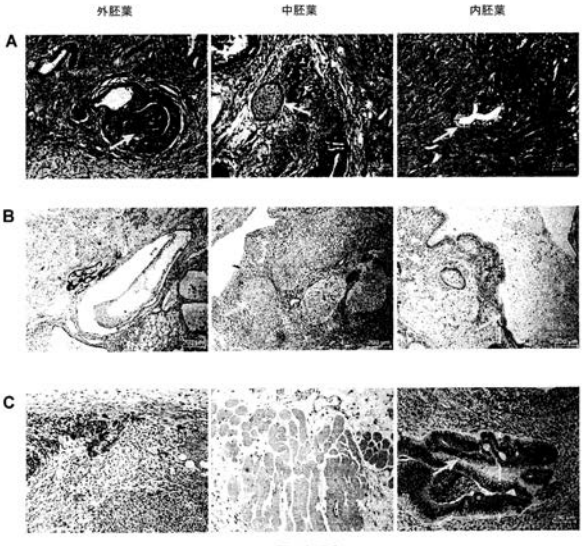


図5A-5C

【図６】

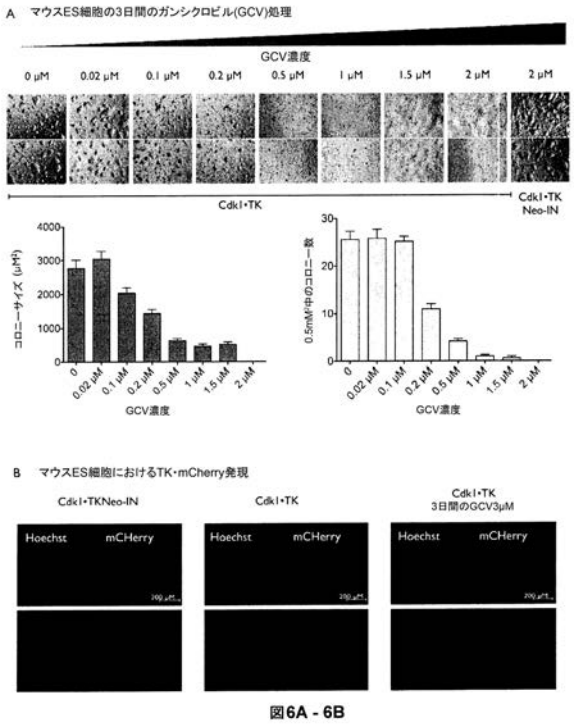


図6A - 6B

【図７－１】

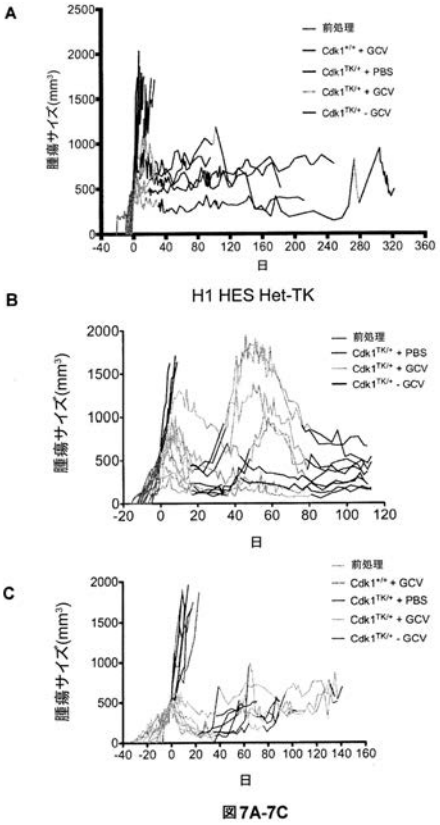


図7A-7C

【図７－２】

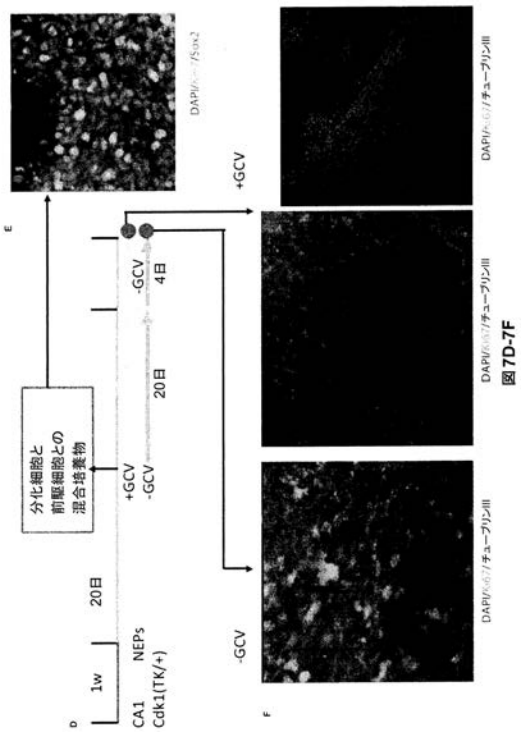


図7D-7F

【図８】

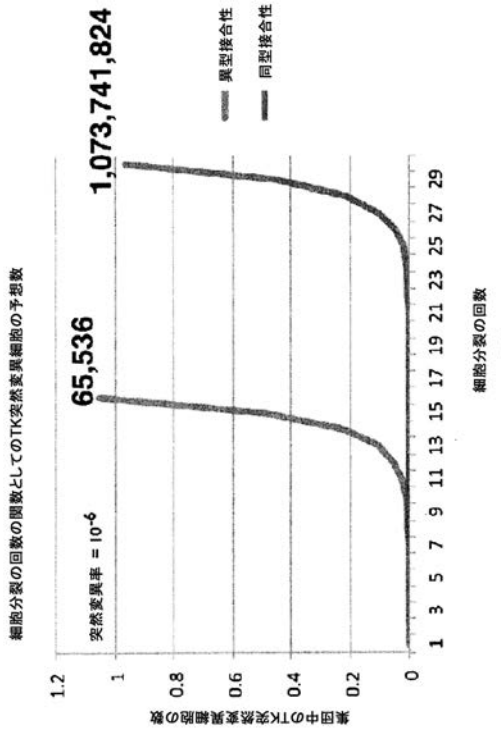


図8

【図９Ａ－９Ｂ】

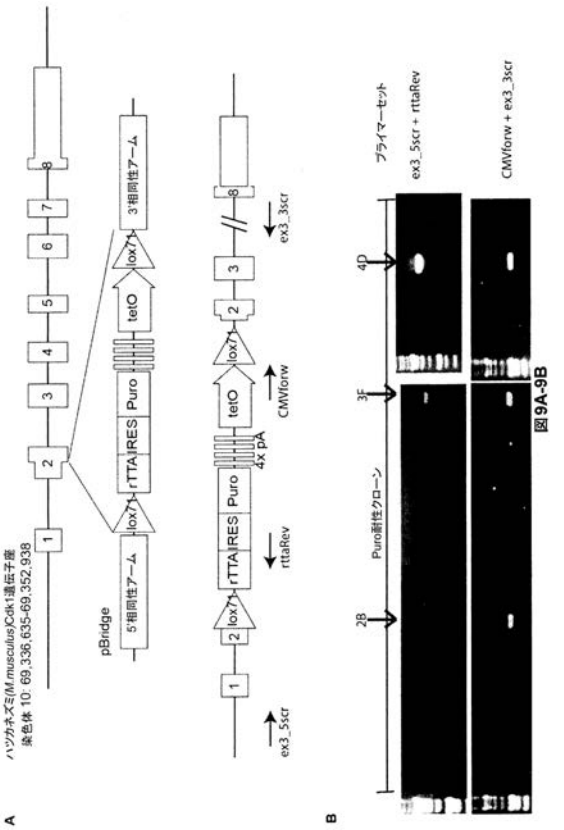


図9A-9B

【図１０】

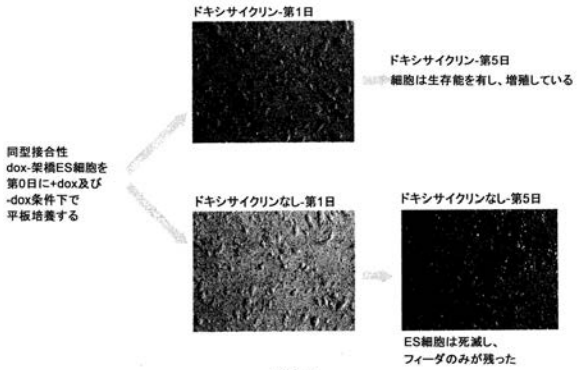


図10

【図１１】

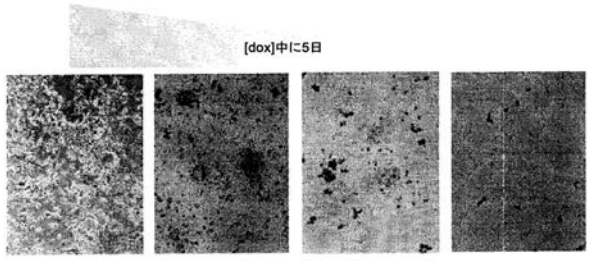


図11

【図１２】

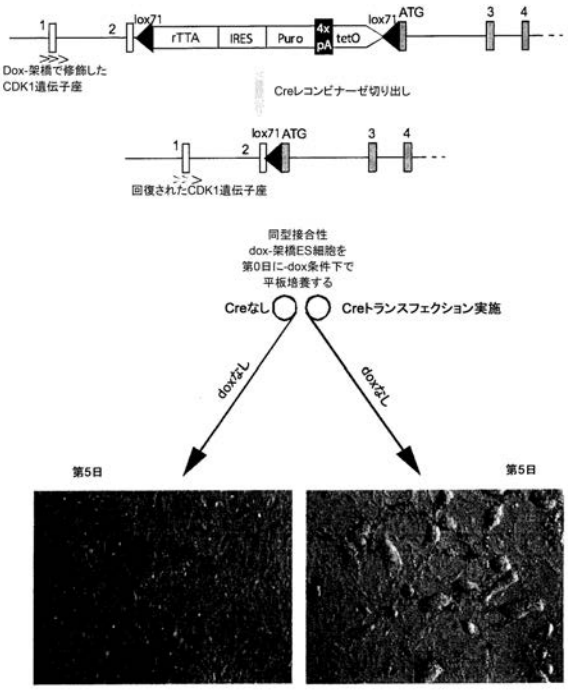


図12

【図１３】

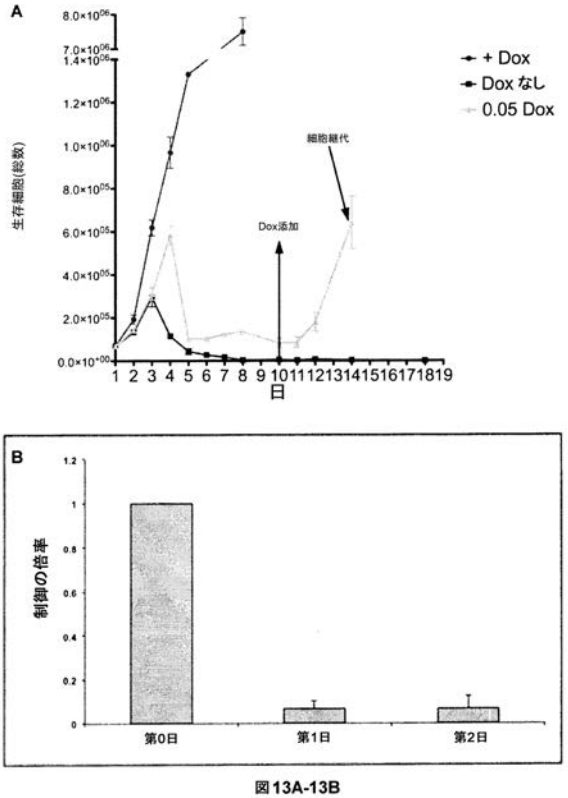


図13A-13B

【図１４】

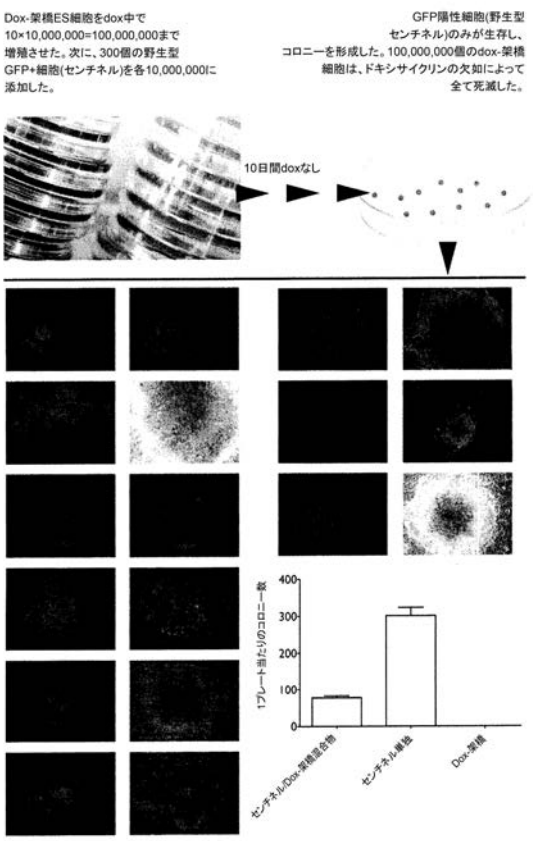


図14

【図１５】

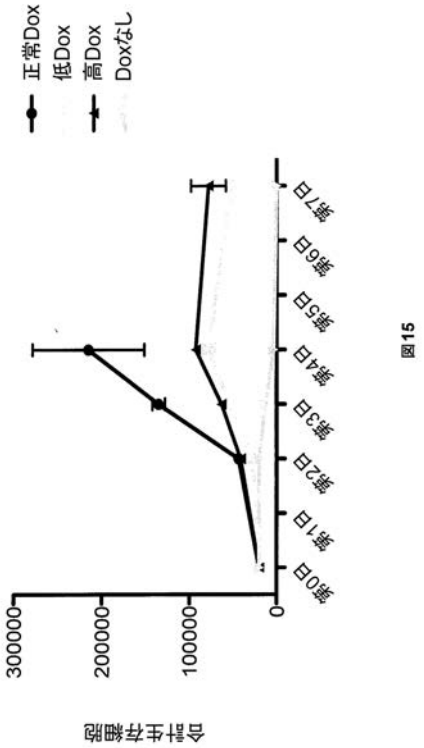


図15

【図１６】

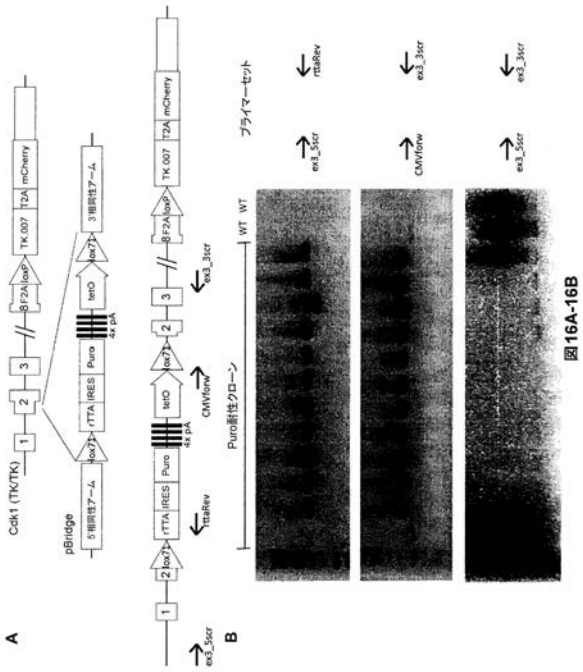


図16A-16B

【図１７】

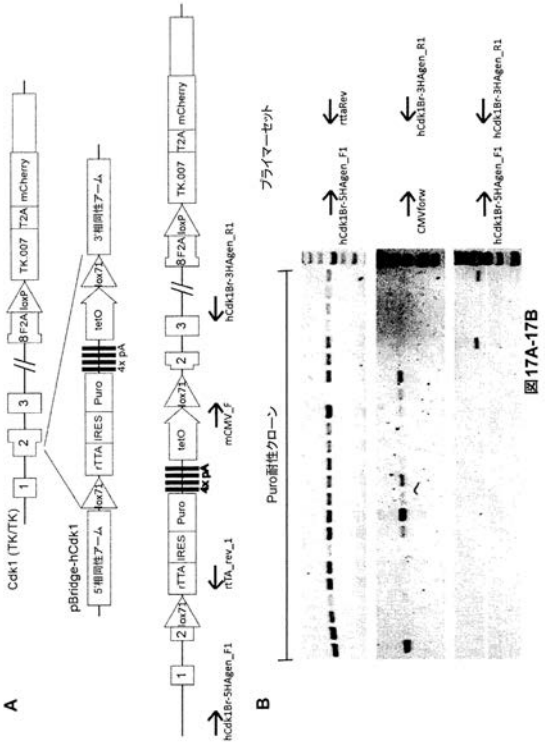


図17A-17B

【図１８】

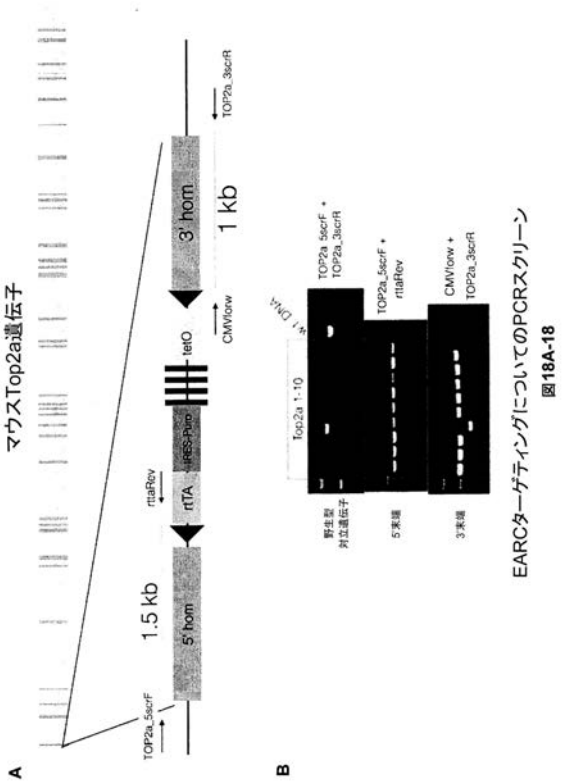


図18A-18

【図１９】

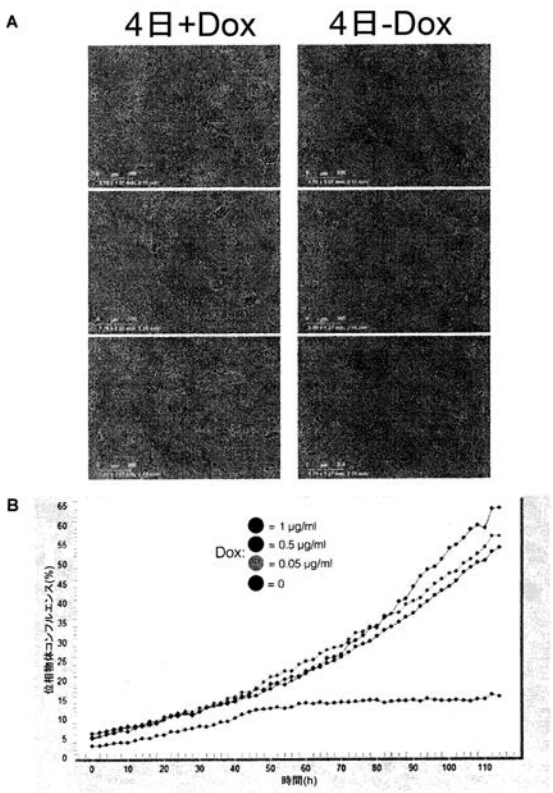


図19A-19B

【図２０】

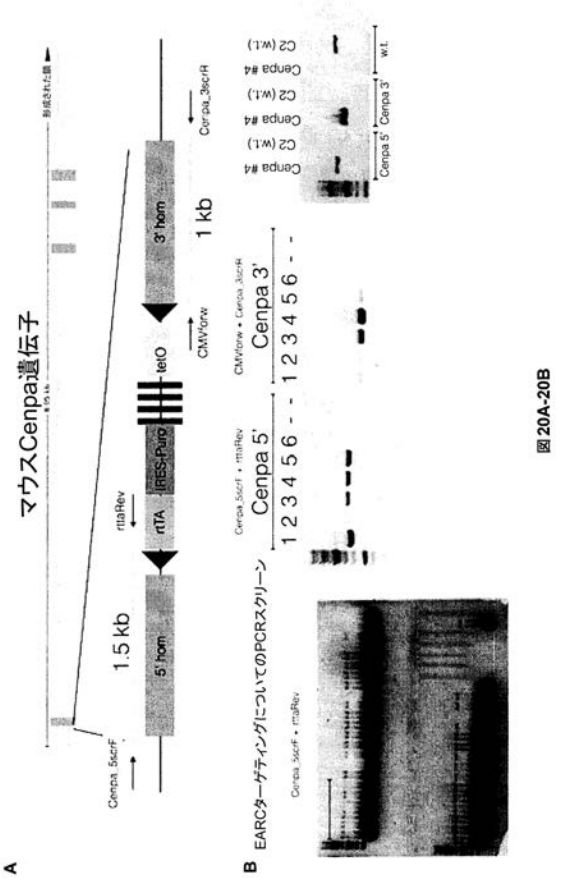


図20A-20B

【図２１】

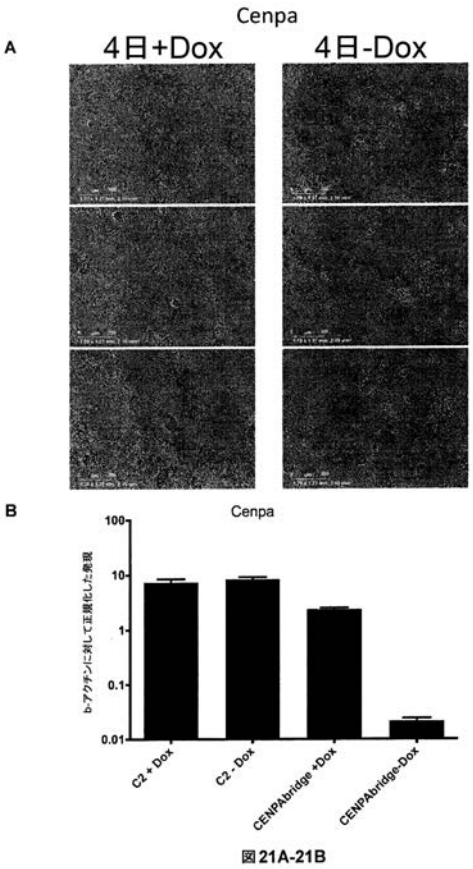


図21A-21B

【図２２】

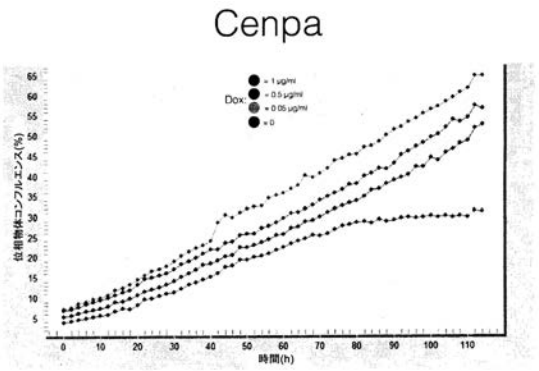
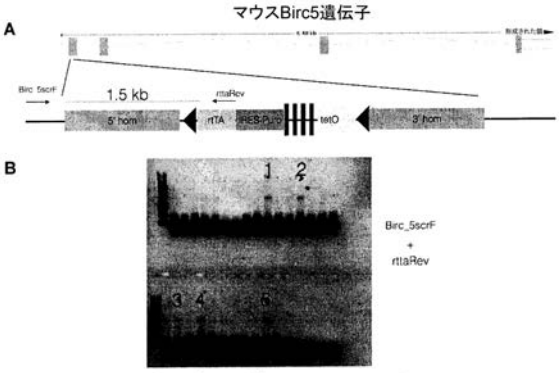


図22

【図２３】



EARCターゲティングについてのPCRスクリーン

図23A-23B

【図２４】

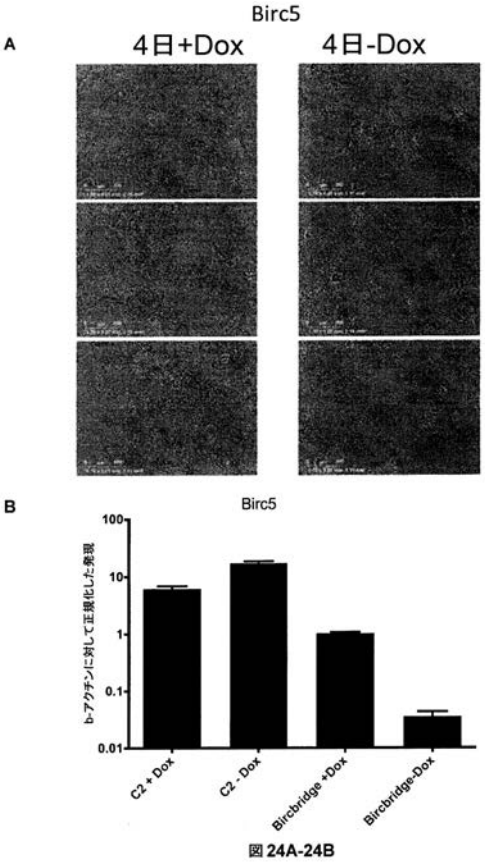


図24A-24B

【図２５】

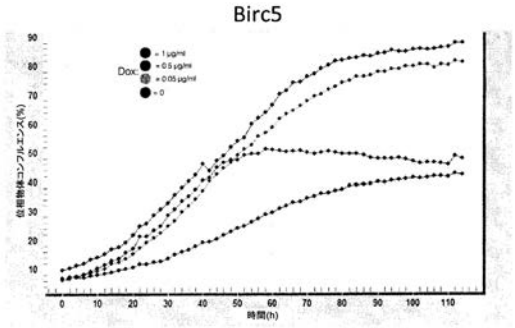


図25

【図２６】

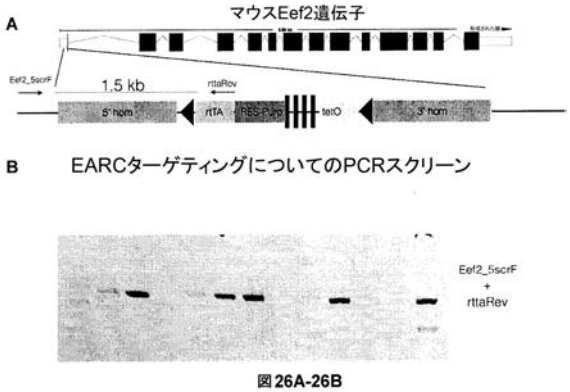


図26A-26B

【図２７】

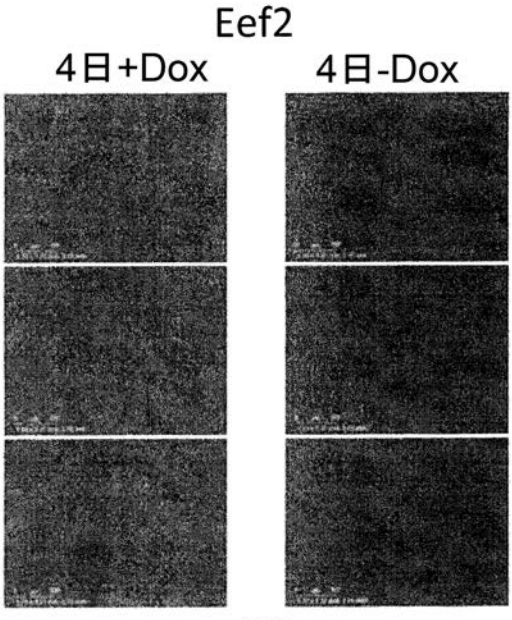


図27

【図２８】

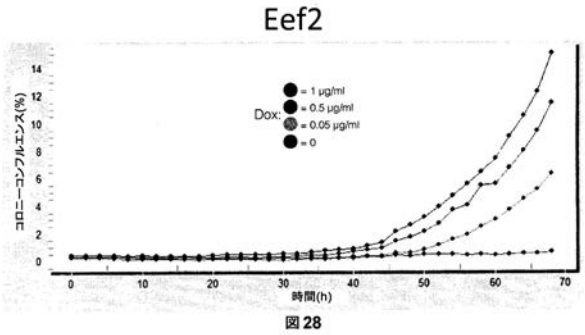


図28

【配列表】

2018507701000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CA2016/050256

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC: ***C12N 15/85*** (2006.01), ***C12N 15/09*** (2006.01), ***C12N 5/10*** (2006.01)

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)
IPC: ***C12N 15/85*** (2006.01), ***C12N 15/09*** (2006.01), ***C12N 5/10*** (2006.01)

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

Electronic database(s) consulted during the international search (name of database(s) and, where practicable, search terms used)
Databases: STN (Biosis, CaPlus, Medline, Agricola), Questel Orbit, Canadian Patent Database
Keywords: embryonic stem cell, pluripotent, proliferation, dividing, cell cycle control, conditional, suicide gene, stem cell therapy, teratoma, cancer, malignant, graft, inducer, inducible, CRISPR, HSV-TK, doxycycline, cdk1, top2a, cenpa, birc5, eef2

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	RONG Z et al., "*A scalable approach to prevent teratoma formation of human embryonic stem cells*". The Journal of Biological Chemistry, 4 August 2012 (04-08-2012), Vol. 287, pp. 32338-32345, ISSN 0021-9258 *the whole document*	1-5, 9-18, 22-29, 35 6-8, 19-21, 30-34, 36-42
X Y	HARA A et al., "*Neuron-like differentiation and selective ablation of undifferentiated embryonic stem cells containing suicide gene with Oct-4 promoter*". Stem Cells and Development, 2008, Vol. 17, pp. 619-628, ISSN 1547-3287 *the whole document*	1-5, 9-18, 22-29, 35 6-8, 19-21, 30-34, 36-42
X Y	SARIN KY et al., "*Conditional telomerase induction causes proliferation of hair follicle stem cells*". Nature, 18 August 2005 (18-08-2005), Vol. 436, pp. 1048-1052, ISSN 0028-0836 *the whole document*	1-5, 9-18, 22-28, 30, 36 6-8, 19-21, 29, 31-35, 37-42

☑ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

*	Special categories of cited documents:	"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
"A"	document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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
"E"	earlier application or patent but published on or after the international filing date	"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
"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)	"&"	document member of the same patent family
"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		

Date of the actual completion of the international search 07 July 2016 (07-07-2016)	Date of mailing of the international search report 13 July 2016 (13-07-2016)
Name and mailing address of the ISA/CA Canadian Intellectual Property Office Place du Portage I, C114 - 1st Floor, Box PCT 50 Victoria Street Gatineau, Quebec K1A 0C9 Facsimile No.: 819-953-2476	Authorized officer Julie Treadwell (819) 639-7663

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CA2016/050256

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

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:

a. ☑ forming part of the international application as filed:

☑ in the form of an Annex C/ST.25 text file.

☐ on paper or in the form of an image file.

b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13*ter*.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.

c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:

☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13*ter*.1(a)).

☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).

2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CA2016/050256

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of the 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. ☑ Claim Nos.: 1-15, insofar as they relate to ***in vivo*** applications
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claims 1-15, insofar as they relate to ***in vivo*** applications, are directed to methods of medical treatment of the human or animal body by surgery or therapy which this Authority is not required to search under Rule 39.1 (iv) of the PCT. Regardless, this Authority has carried out a search based on the alleged effect of the inducer/CDL-modified animal cells as defined in claims 1-15.

2. ☐ Claim 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. ☐ Claim Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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:

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 claim 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 claim Nos.:

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CA2016/050256

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	KYBA M, "*Enhanced hematopoietic differentiation of embryonic stem cells conditionally expressing Stat5*". PNAS, 30 September 2003 (30-09-2003), Vol. 100, pp. 11904-11910, ISSN 0027-8424 *the whole document*	1-5, 9-18, 22-28, 30, 36 6-8, 19-21, 29, 31-35, 37-42
P, A	WANG T et al., "*Identification and characterization of essential genes in the human genome*". Science, 27 November 2015 (27-11-2015), Vol. 350, pp. 1096-1101, ISSN 0036-8075 *the whole document*	
A	MALECKI M, "'*Above all, do no harm': safeguarding pluripotent stem cell therapy against iatrogenic tumorigenesis*". Stem Cell Research and Therapy, 3 June 2014 (03-06-2014), Vol. 5, doi: 10.1186/scrt462, ISSN 1757-6512 (online) *the whole document*	

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW,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,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,CZ,DE,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,JP,KE,KG,KN,KP,KR,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US

(72)発明者 ライアン，チン
カナダ国 エム４ケー １ブイ９ オンタリオ，トロント，ブラウニング アベニュー ９６

Ｆターム(参考) 4B065 AA90X AB01 AC20 BA02 BD50 CA44