

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7250031号
(P7250031)

(45)発行日 令和5年3月31日(2023.3.31)

(24)登録日 令和5年3月23日(2023.3.23)

(51)国際特許分類

F I

C 1 2 N 15/861 (2006.01)

C 1 2 N 15/861

Z Z N A

C 1 2 N 15/867 (2006.01)

C 1 2 N 15/867

Z

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 N 15/09

1 1 0

請求項の数 10 (全39頁)

(21)出願番号	特願2020-549209(P2020-549209)	(73)特許権者	000173913
(86)(22)出願日	令和1年9月24日(2019.9.24)		公益財団法人微生物化学研究会
(86)国際出願番号	PCT/JP2019/037255		東京都品川区上大崎3丁目14番23号
(87)国際公開番号	WO2020/067004	(74)代理人	100107766
(87)国際公開日	令和2年4月2日(2020.4.2)		弁理士 伊東 忠重
審査請求日	令和3年3月30日(2021.3.30)	(74)代理人	100107515
(31)優先権主張番号	特願2018-179274(P2018-179274)		弁理士 廣田 浩一
(32)優先日	平成30年9月25日(2018.9.25)	(74)代理人	100070150
(33)優先権主張国・地域又は機関	日本国(JP)		弁理士 伊東 忠彦
(31)優先権主張番号	特願2019-121668(P2019-121668)	(72)発明者	齋藤 泉
(32)優先日	令和1年6月28日(2019.6.28)		日本国 141-0021 東京都品川区
(33)優先権主張国・地域又は機関	日本国(JP)		上大崎3丁目14番23号 公益財団法人微生物化学研究会内
前置審査		(72)発明者	中西 友子
			日本国 141-0021 東京都品川区
			最終頁に続く

(54)【発明の名称】 新規ウイルスベクターおよびその製造方法と使用方法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

8個以上のCasガイドRNAを発現する核酸ベクターであって、
前記核酸ベクターが、組換えアデノウイルスベクターである核酸ベクター。

【請求項2】

8個以上のCasガイドRNAを発現する核酸ベクターであって、
前記核酸ベクターが、組換えレンチウイルスベクターである核酸ベクター。

【請求項3】

少なくとも4つのダブルニッキングを誘導することで少なくとも4ヶ所のゲノム切断を起こすように構成された、請求項1から2のいずれかに記載の核酸ベクター。

【請求項4】

ゲノム上からノックダウンする標的配列の上流における近接した領域に、2つのダブルニッキングを誘導し、更に、該標的配列の下流における近接した領域に、2つのダブルニッキングを誘導することで、該標的配列をノックダウンするように設計された、請求項3に記載の核酸ベクター。

【請求項5】

Casタンパク質をコードする遺伝子および8個以上のCasガイドRNA発現ユニットを含む、一体型Cas核酸ベクターであって、

前記核酸ベクターが、組換えアデノウイルスベクターである核酸ベクター。

【請求項6】

C a s タンパク質をコードする遺伝子および 8 個以上の C a s ガイド R N A 発現ユニットを含む、一体型 C a s 核酸ベクターであって、

前記核酸ベクターが、組換えレンチウイルスベクターである核酸ベクター。

【請求項 7】

前記 C a s ガイド R N A 発現ユニットの少なくとも 1 組が、ダブルニッキングを生じるように構成されている、請求項 5 から 6 のいずれかに記載の核酸ベクター。

【請求項 8】

C a s ガイド R N A 発現ユニット、C a s タンパク質をコードする遺伝子、およびノックインされるドナー D N A 配列を含む核酸ベクターであって、

前記核酸ベクターが、組換えアデノウイルスベクターまたは組換えレンチウイルスベクターである核酸ベクター。

【請求項 9】

前記 C a s ガイド R N A 発現ユニットを 2 個以上含み、これらが、ダブルニッキングを誘導するように構成されている、請求項 8 に記載の核酸ベクター。

【請求項 10】

前記 C a s ガイド R N A 発現ユニットを 8 個含み、これらが、4 つのダブルニッキングを誘導するように構成されている、請求項 8 に記載の核酸ベクター。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、短縮されたバックボーンを有する新規アデノウイルスベクター、5 個以上の C a s ガイド R N A 発現ユニットを含有する核酸ベクター、C a s タンパク質をコードする遺伝子および C a s ガイド R N A 発現ユニットを含有する核酸ベクター、並びにこれらのベクターを含む、ゲノム編集をするための組成物およびこれらを用いた遺伝子治療方法に関する。

【背景技術】

【0002】

原核生物の有する C R I S P R / C a s システムの 1 つである C R I S P R / C a s 9 システムは、遺伝子配列を効率よく書き換えるゲノム編集技術として、がんや遺伝病の治療などへの臨床応用が期待されている（非特許文献 1）。基本的な C R I S P R / C a s 9 システムは、DNA二本鎖を切断する C a s 9 タンパク質と、標的ゲノム上の位置特異性を決定する C R I S P R R N A（c r R N A）およびこれと一部相補性を有し、C a s 9 タンパク質への結合の足場となる活性化 R N A（t r a n s - a c t i v a t i n g c r R N A : t r a c r R N A）からなるガイド R N A（g R N A）とから構成される。c r R N A と t r a c r R N A からなるガイド R N A は、これらを融合した単一ガイド R N A（s i n g l e g u i d e R N A / s g R N A）として供給することも可能である。そして、当該ガイド R N A は、これをコードする DNA を含む適当なベクターを用いて、標的細胞内で発現することができる（非特許文献 1）。

【0003】

C R I S P R / C a s 9 システムは部位特異的なゲノム切断をもたらすものの、その精度は完全ではない。理論上はガイド R N A の指定する 20 塩基の配列を有するゲノム部位を特異的に切断することが期待されるものの、実際には、12 塩基程度の特異性しか示さない。したがって、本来意図したゲノム領域以外の位置でゲノムを切断（オフターゲット切断）することがあり、当該切断によるオフターゲット変異が生じる。ヒトのゲノムは 3000M 塩基程度の巨大なサイズを有するため、C R I S P R / C a s 9 システムをそのままヒトのゲノム編集治療に適用すると、標的以外の部位を数百ヶ所で切断する可能性があるため、治療方法として実用化することができない。標的部位以外での意図しない切断を抑制し、ヒトのゲノム編集治療を実用化するためには、オフターゲット変異の頻度を極めて低く抑制する必要がある（非特許文献 2）。

【0004】

これまで、Cas9タンパク質のオフターゲット変異を抑制するために様々な開発が行われてきた。例えば、ガイドRNAの配列を調整することや、Cas9タンパク質のアミノ酸配列を変異させることで、DNAの一方の鎖のみを切断する（ニックを入れる）Cas9ニッカーゼ（Nickase）とし、近接する位置（例えば2個のガイドRNAの5'端から30塩基対程度以内）で、2本鎖DNAのセンス鎖およびアンチセンス鎖にニック（一本鎖切断）を生じることにより、これら2つの位置でニックが形成された時に初めて当該部位でゲノムが切断されるように構成することで（ダブルニッキングシステム）、オフターゲット変異の頻度を大幅に低下させる試みがなされている（非特許文献2）。

【0005】

上記ダブルニッキングシステムを利用することにより、実質的に24塩基長の配列特異性を確保することが可能となり、ヒトゲノム編集に用いる場合に想定されるオフターゲット変異の頻度はほとんどゼロとなることが期待され、ゲノム編集治療の「安全性」が大幅に向上する。

【0006】

また、通常のCRISPR/Cas9システムでは2本鎖のセンス鎖とアンチセンス鎖を同じ位置で切断することで平滑末端を生じるため、切断部位の一部は細胞の有するDNA修復機能によって再結合されてしまう。これに対して、上記ダブルニッキングシステムを、切断部位に5'オーバーハングを形成するように構成することで、切断部位の両端のセンス鎖およびアンチセンス鎖に数十塩基の5'オーバーハングが形成される（図1）。これにより細胞のDNA修復機能による切断部位の再結合が抑制され、標的を不可逆的に、確実にゲノムから欠失破壊することができる。また、上記5'オーバーハングを利用して、高効率で外来DNA断片を挿入（ノックイン）することも可能となる。したがって、ダブルニッキング法を利用することでゲノム編集治療の「効率」は格段に向上する。

【0007】

すなわち、ダブルニッキングシステムはゲノム編集治療をより「安全」かつ「高効率」にするものである。

【0008】

しかしながら、これらの改善にも関わらず、ゲノム編集治療をより「安全」かつ「高効率」にする技術が求められている。

【0009】

ここで、ダブルニッキングシステムでは、ゲノム上に一ヶ所のDNA2重鎖切断部位を作成するために、2個のガイドRNA（ガイドRNAペア）を用いる必要があり、ゲノムから1つのDNA領域をその両端を切断して欠失させるためには、2つのガイドRNAペア、すなわち4個のガイドRNAが必要となる（図1）。しかしながら、単一の核酸ベクターから複数のガイドRNAを同時に発現させることは困難であることが知られている。

【0010】

また切断あるいはニックを入れる能力を完全に失わせたCas9変異体（デッド（dead）Cas9）を用いて遺伝子発現をノックダウンする方法が開発されている（非特許文献3）。多数のガイドRNAを同時発現するベクターは多数の遺伝子の発現を同時にノックダウンさせることができ、基礎研究ではその技術が求められている。

【0011】

理論に縛られるものではないが、その理由の一つは、ベクター上にある各ガイドRNA発現ユニットは、同じDNA配列を有する発現調節ユニットを含んでいるため、各ガイドRNA発現ユニットの転写方向をすべて同じに揃えないと、異なる方向に転写される隣接する発現ユニット間にパリンドローム配列が生じることとなり、当該パリンドローム配列内のDNA相補鎖形成によって、ベクターの複製が阻害されてしまうためであると考えられる。

【0012】

また、他の理由は、宿主細胞のDNA組換え機能により、上記同じDNA配列を有する発現調節ユニット間で相同組換えが生じ、ガイドRNA発現ユニットの欠落が生じるため

10

20

30

40

50

であると考えられる。特に、アデノウイルスベクターを製造する際に高効率作製法として従来利用されていたCOS-TPC法（非特許文献4、特許文献1）では、製造工程において相同組換えが利用されるため、多数のガイドRNA発現ユニットを有するアデノウイルスベクターを製造することは困難であると考えられていた。

【0013】

また、組換えアデノウイルスは遺伝子導入効率の高さ、非分裂細胞にも遺伝子導入できること、高力価のウイルス液の調製の容易さなどの利点から、動物細胞への優れた遺伝子導入用DNAベクターとして使用されており、遺伝子治療のみならず基礎分野での遺伝子機能解析などにも有用性が認められることから広く利用されている（非特許文献5、6）。

【0014】

アデノウイルスベクターがウイルスとして複製し得るためには、そのサイズに上限がある。したがって、アデノウイルスベクターにペイロードとして運搬させる遺伝子断片のサイズをより大きくするためには、アデノウイルスベクターのペイロード以外の部分、すなわちバックボーン構造をできるだけ短くすることが望ましい。このため、アデノウイルスベクターのバックボーン構造を短縮するための試みが様々になされてきた（非特許文献6）。

【0015】

例えば、従来用いられているアデノウイルス由来のベクターでは、ウイルス複製に必須でないE3領域が削除されており、公知のpBHG10プラスミドベクターでは、E3領域から2685塩基長の領域が欠落している。

【0016】

Ad5ベクターでは、更にウイルス遺伝子の発現に必要なE1遺伝子領域が欠失しており、E1遺伝子を持続的に発現するヒト胎児腎由来細胞株（293細胞）などの宿主細胞中のみで複製することができる。このことにより、ベクターとして用いた場合の標的細胞中でウイルスが複製することが抑制されるとともに、より大きな核酸領域をペイロードとして含むことが可能である（非特許文献6）。

【0017】

しかしながら、アデノウイルスベクターのバックボーンを短縮する方法は自明ではなく、より短いバックボーンを有するアデノウイルスベクターを作成することは困難であった。例えば、アデノウイルスにおいてE3遺伝子自体は複製に必須ではないものの、当該遺伝子はゲノム上で必須構造タンパク質と隣接しており、E3遺伝子から欠失させる部分が多すぎると複製可能なアデノウイルスベクターが得られないことが知られていた（非特許文献7）。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0018】

【文献】特開平7-298877号公報

【非特許文献】

【0019】

【文献】Wang et al., Annual Review of Biochemistry, 2016, Vol. 85: pp. 227-264

Ran et al., Cell, 2013, Vol. 154, pp. 1380-1389

Cong et al., Science, 2013, Vol. 339, pp. 819-823

Miyake et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 1996, Vol. 93, pp. 1320-1324

Gultzman et al., In Eukaryotic viral vectors, 1992, pp. 187-192.

Bett et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 1994, Vol. 91, pp. 8802-8806

10

20

30

40

50

斎藤、ウイルス、1997、Vol. 47, No. 2, pp. 231-238

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0020】

本発明の目的は、遺伝子治療等に用いられる、より優れたアデノウイルスベクターを提供することにある。その一つの態様として、本発明はアデノウイルスベクターのバックボーンを改変し、より長い核酸領域をペイロードして運搬することの可能なアデノウイルスベクターを提供することを目的とする。また、別の態様として、本発明はCRISPR/Casシステムによるゲノム編集等に用いるための、5個以上のCasガイドRNAを発現する核酸ベクターを提供することを目的とする。また、別の態様として、本発明はCRISPR/Casシステムによるゲノム編集等に用いるための、CasガイドRNA発現ユニット（好ましくは少なくとも3個）と、Casタンパク質をコードする遺伝子を共に含む、一体型あるいはオールインワン型核酸ベクター（好ましくはアデノウイルスベクターまたはレンチウイルスベクター）を提供することを目的とする。また、別の態様として、本発明はCRISPR/Casシステムによるゲノム編集等に用いるための、CasガイドRNA発現ユニットと、Casタンパク質をコードする遺伝子と、ノックインされるドナーDNA配列とを含む核酸ベクターを提供することを目的とする。また、別の態様において、本発明はアデノウイルスベクターのバックボーン改変を組み合わせることにより、より多種類のCasガイドRNAを発現し、多数の遺伝子を同時に修飾するためのアデノウイルスベクターを提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0021】

本発明者らは上記目的のために鋭意研究を行った結果、アデノウイルスベクターのバックボーンを従来用いられていたものから短縮することに成功した。具体的には、従来用いられていたAd5ベクターから、E3領域において欠失部位を152塩基長拡大することに成功した。

前記E3領域とは、E3遺伝子および近接するL4遺伝子の一部のことをいう。前記L4遺伝子とは、E3遺伝子群と隣り合いL4遺伝子群に属するpVII前駆体遺伝子においてその開始コドンから125番目～277番目の塩基のことをいう。

【0022】

当該新規バックボーンを有する本発明のアデノウイルスベクターは、より長いコーディング配列を有する外来遺伝子を運搬するためのベクターとして有用である。

【0023】

また、本発明者らは、5個以上の、具体的には8個またはそれ以上のガイドRNA発現ユニットを有し、動物細胞内で当該ガイドRNA発現ユニットを安定的に保持し、該ガイドRNAを発現するアデノウイルスベクターおよびレンチウイルスベクターを作成することに成功した。

【0024】

また、本発明者らは、Casタンパク質をコードするDNA断片と3個以上のガイドRNA発現ユニットを有し、これらを同時に発現することのできるアデノウイルスベクターを作成することに成功した。

【0025】

これら知見に基づき、本発明を完成するに至った。

【0026】

すなわち、本発明は一態様において以下のものを提供する

【0027】

[1]

E3領域から2685塩基対長を超える領域が欠落している組換えアデノウイルスベクター。

[2]

E 3 領域から 2 8 3 7 塩基対の領域が欠落している、上記 [1] に記載の組換えアデノウイルスベクター。

[3]

A d 5 ベクター由来の組換えアデノウイルスベクターであって、E 3 領域において、A d 5 ベクターの位置づけで、第 2 7 9 8 2 番塩基～第 3 0 8 1 8 番塩基が欠失している、上記 [1] に記載の組換えアデノウイルスベクター。

[4]

5 個以上の C a s ガイド R N A を発現する核酸ベクター。

[5]

8 個の C a s ガイド R N A を発現する、上記 [4] に記載の核酸ベクター。

10

[6]

少なくとも 4 つのダブルニッキングを誘導することで少なくとも 4 ヶ所のゲノム切断を起こすように構成された、上記 [5] に記載の核酸ベクター。

[7]

ゲノム上からロックダウンする標的配列の上流における近接した領域に、2 つのダブルニッキングを誘導し、更に、該標的配列の下流における近接した領域に、2 つのダブルニッキングを誘導することで、該標的配列をロックダウンするように設計された、上記 [6] に記載の核酸ベクター。

[8]

核酸ベクターが、上記 [1] ～ [3] のいずれか一項に記載の組換えアデノウイルスベクターである、上記 [4] ～ [7] のいずれか一項に記載の核酸ベクター。

20

[9]

C a s タンパク質をコードする遺伝子および C a s ガイド R N A 発現ユニットを含む、一体型 C a s 核酸ベクターである核酸ベクター。

[1 0]

3 個以上の C a s ガイド R N A 発現ユニットを含む、上記 [9] に記載の核酸ベクター。

[1 1]

4 個の C a s ガイド R N A 発現ユニットを含む、上記 [1 0] に記載の核酸ベクター。

[1 2]

該 C a s ガイド R N A 発現ユニットの少なくとも 1 組が、ダブルニッキングを生じるように構成されている、上記 [9] ～ [1 1] のいずれか一項に記載の核酸ベクター。

30

[1 3]

核酸ベクターが、上記 [1] ～ [8] のいずれか一項に記載のベクターである、上記 [9] ～ [1 2] のいずれか一項に記載の核酸ベクター。

[1 4]

C a s ガイド R N A 発現ユニット、C a s タンパク質をコードする遺伝子、およびニックインされるドナー D N A 配列を含む核酸ベクター。

[1 5]

前記 C a s ガイド R N A 発現ユニットを 2 個以上含み、これらが、ダブルニッキングを誘導するように構成されている、上記 [1 4] に記載の核酸ベクター。

40

[1 6]

前記 C a s ガイド R N A 発現ユニットを 8 個含み、これらが、4 つのダブルニッキングを誘導するように構成されている、上記 [1 4] に記載の核酸ベクター。

[1 7]

核酸ベクターが、上記 [1] ～ [1 3] のいずれか一項に記載のベクターである、上記 [1 4] ～ [1 6] のいずれかに記載の核酸ベクター。

【発明の効果】

【 0 0 2 8 】

本発明の短縮された新規バックボーンを有するアデノウイルスベクターを用いることで、従来のアデノウイルスベクターよりも長い D N A 断片を形質導入することが可能となり

50

、例えば、遺伝子治療において、より長いタンパク質をコードする遺伝子を用いることや、CRISPR/Casシステムにおいて、より多数のガイド発現ユニットを同時に発現させることが可能となる。

【0029】

また、遺伝病治療などにおいて、異常遺伝子配列を正常遺伝子配列と置き換えるノックインが必要となるが、ノックインに用いるDNA断片は、異常配列の両側（上流および下流）に、相同組換えに利用される正常塩基配列を有している。一般的にこれらの配列は左アーム配列（上流）および右アーム配列（下流）と呼ばれている。本発明の短縮された新規バックボーンを有するアデノウイルスベクターを用いることで、ノックインに用いるDNA断片におけるこれら左アーム配列および右アーム配列の長さをより長くすることができ、これにより相同組換えの効率がより高くなり、ノックイン治療の効率を上げることが期待される。

10

【0030】

また、本発明の8個以上のCasガイドRNA発現ユニットを安定的に保持し、これらを同時に発現する核酸ベクターを利用することにより、単に、同時に発現されるCasガイドRNAコーディングDNAユニットの量的な増加が得られるのみならず、これを用いたダブルニッキングシステムの使用法に、有用性の劇的な増大をもたらす質的改善を得ることができる。

【0031】

すなわち、上述の通りダブルニッキングシステムでゲノムから1つのDNA領域を欠失させるためには、4個のCasガイドRNAコーディングDNAが必要であるから、8個以上のCasガイドRNAコーディングDNAを発現させることで初めて、ゲノム上の異なる2ヶ所以上で遺伝子破壊／挿入を同時に安全かつ高効率に行うことが可能となる。このような8個以上のCasガイドRNA発現ユニットを有する単一ベクターの使用は、例えば4個のCasガイドRNA発現ユニットを有するベクターを複数種類組み合わせる方法に比べて、標的細胞へのベクター感染効率、発現量の調整などの点で大きな利点を有するものであり、ゲノム編集をより安全かつ高効率とするものである。

20

【0032】

そして、ゲノム上の異なる2ヶ所以上の領域でダブルニッキング法による遺伝子破壊／挿入を行うことにより、例えば、2つ以上の異なる遺伝子を同時に破壊することが可能となる。多くの癌において、細胞の癌化には2つ以上の異なる遺伝子変異が関与していることが明らかとなっており、ゲノム編集治療において2つ以上の遺伝子を同時に編集できる能力は、癌治療において極めて有益な結果をもたらすことが理解される。また、単一の遺伝子の複数の領域を欠失させることにより、より確実な遺伝子破壊を行うことも可能となる。

30

【0033】

また、ウイルスは変異しやすいため、患者に感染しているウイルスのゲノムの塩基配列は患者によって異なる。患者に持続感染しているウイルスの場合は、一人の患者が持つウイルス集団のゲノムの塩基配列は同一ではなく、さまざまな変異を持つ集団であることが知られている。その結果、薬剤耐性を持つウイルスが選択的に増殖し、薬剤が効果を失う原因となっている。B型肝炎ウイルス（HBV）がその一例であるが、この現象は、HBVのみならず、他のウイルスあるいは細菌やマラリアなど、様々な病原体において観察され、特定の病原体に限定されない。

40

【0034】

従ってウイルスゲノムを標的とするベクターが多重にガイドRNAを発現する（多数の異なるガイドRNAを発現する）ことは、単に多数のウイルス必須部位を同時に破壊することにより治療効果を高めるだけでなく、（1）1つのベクター薬剤が変異ウイルスを持つ広範囲の患者のウイルスに効果をもつ広域薬剤となりうる、（2）一人の患者に持続感染している多様なウイルスのそれぞれを破壊するため残存ウイルスを減少させる、（3）ウイルスゲノム上の多数の部位を同時破壊することにより、ウイルスに変異により耐性を

50

獲得する継代数を与えないため耐性ウイルスの出現を許さない、という効果を奏すると理解される。なお、上記（１）の効果については、本明細書の実施例４を参照されたい。

【００３５】

また癌についても同様の効果が考えられる。すなわち、単にがん細胞の増殖を有利にする多数の細胞遺伝子を同時に破壊することにより治療効果を高めるだけでなく、（１）１つのベクター薬剤が異なるゲノム変異によりがん細胞化している異なる患者にも効果を持つことにより、広範囲の患者のがんに効果をもつ広域薬剤となりうる、（２）一人の患者のがんにおいても、異なるゲノム部位が変異し転移能を獲得したがん細胞や、逆に増殖が遅くなり薬剤抵抗性が増すがん細胞など、多様ながん細胞のそれぞれを破壊することができ、（３）がん細胞のゲノム上の多数の変異部位を同時切断破壊することにより、がん細胞に変異により耐性を獲得する継代数を与えないため耐性がん細胞の出現を許さない、という効果を奏すると理解される。

【００３６】

また、本発明のCasタンパク質をコードするDNA断片とCasガイドRNA発現ユニット（好ましくは、３個以上）の両方を有する一体型核酸ベクター（好ましくは、アデノウイルスベクターまたはレンチウイルスベクター）は、安全かつ高効率なゲノム編集を行う上で、極めて有益な効果を有する。

【００３７】

すなわち、従来、CRISPR/Casシステムでは、Casタンパク質をコードする遺伝子を有するベクターと、CasガイドRNA発現ユニットを含むベクターとを、標的細胞に共感染することでCRISPR/Casシステムを送達していた。このような共感染システムでは感染効率が低く、標的組織におけるゲノム編集の効率は低かった。これに対して、Casタンパク質をコードする遺伝子とCasガイドRNA発現ユニット（好ましくは、３個以上）を有し、これらを同時に発現することのできる本発明の核酸ベクター（好ましくは、アデノウイルスベクターまたはレンチウイルスベクター）は、感染した細胞において高効率でゲノム編集を達成することができ、Casタンパク質またはガイドコーディングDNAのみが送達された場合に生じ得る副作用を回避することができる。

【００３８】

また、本発明では上記アデノウイルスベクターのバックボーン改変と、８個以上のCasガイドRNA発現ユニットまたはCasタンパク質をコードする遺伝子とCasガイドRNA発現ユニットを組み合わせることで、より多数のCasガイドRNAコーディングDNAを同時発現させ、ゲノム編集治療の利益を増大することができる。

【図面の簡単な説明】

【００３９】

【図１】Cas9ニッカーゼ（nickCas9）によるゲノム編集の概要を示す図である。一組のニックで欠失を生ずる場合もある。

【図２】４個のガイドRNAコーディングDNAユニット（ガイドRNA発現ユニット）の構成および、これらを含むアデノウイルスベクターの構成を示す図である。

【図３】E3領域の欠失をPCRで確認した図である。

【図４】４個のガイドRNA発現ユニットを有するアデノウイルスベクターが製造できたことを示すアガロースゲル電気泳動写真を示す図である。完全長DNA導入法により生成したアデノウイルスベクターが高度に増幅した293細胞DNAをBspEIで切断した。mはマーカー、１～６は各アデノウイルスベクタークローン、矢印は４ガイドユニット（4g）を含む断片のバンドの位置（2.2kb）を示す。クローン２～４は４個のガイドユニットを欠失なく保持していた。クローン１ではベクターの大半が１ユニットを欠失して３ユニットを保持するベクターであった（そのバンドを*で示す）。図の右側に記載したAはアデノウイルスベクターゲノム由来のバンド、cはベクター作製に用いたコスミドプラスミド由来のバンドを示す。なお別のガイドRNAのセットを用いた実験では得られた６クローンはすべて欠失なく４ガイドユニットを保持していた。

【図５】４個のガイドRNA発現ユニットを有するアデノウイルスベクターを用いたゲノ

ム編集結果を示す図である。標的領域をPCRで増幅することにより、増幅されるDNA断片長の変化（短縮）に基づいて、ゲノム編集によって生じた標的領域の変化を観察した。上段は野生型Cas9タンパク質（ヌクレアーゼ）を発現するアデノウイルスベクターと組み合わせた場合の結果を、下段はCas9ニッカーゼを発現するアデノウイルスベクターと組み合わせた場合の結果を示す。図5中、左端はマーカー、他は各アデノウイルスベクタークローンを示す。Cas9においては明らかに大きな欠失が見られたのは左から12番目の1クローンであるが、Cas9ニッカーゼでは左から1番目、2番目、15番目の3クローンで明らかに大きな欠失が見られた。この結果はシーケンス解析でも確認された。

【図6】4個のガイドRNA発現ユニットとノックインドナーDNA（挿入）を有するアデノウイルスベクターを用いたゲノム編集結果を示す図である。4個のガイドRNA発現ユニット（4sgRNA）と同じベクター上に含むノックインドナー配列が、ゲノム上に挿入されたことを示す。図左上に共感染したベクターの構造を示す。図左下において2つの矢印で示したドナーDNA配列上、及びその外側の宿主細胞塩基配列上の2つのプライマーを用いたPCRにより、図右下に示すように、正確なノックインが起きてはじめて検出されるバンドが、Cas9ニッカーゼを用いた6日目（レーン2番目（6days: DD&4G+nick））及び16日目（レーン6番目（16days: DD&4G+nick））で観察された。左端のレーンはマーカーである。

【図7】8個のガイドRNA発現ユニット（8gRNA-unit）を有するアデノウイルスベクターの構成（下段）およびこれを作成するのに用いたコスミドベクターの構成（上段）を示す図である。図中、四角形は、ガイドRNA発現ユニットを示す。A d - LおよびA d - Rはそれぞれベクターのアデノウイルスゲノムの左端および右端の位置を示す。Sはコスミドプラスミドの大腸菌内での増殖において挿入された8個のガイド発現ユニットに欠失がないこと確認するためのSspIの切断位置である。なおSspI部位はここに示す以外にもある。またCOSはラムダイニトロパッケージングに必要な配列を示す。

【図8】8個のガイドRNA発現ユニットを有するアデノウイルスベクターが製造できたことを示すアガロースゲル電気泳動写真を示す図である。図4の説明と同様にベクター増幅細胞DNAをBspEIで切断した。mはマーカー、1～6は各アデノウイルスベクタークローン、cは対照である。矢印は8個のガイドユニット（8g）を含む断片のバンドの位置（3.8kb）を示す。また*印は相同組換えにより欠失あるいは増幅したユニットを含む断片を示す。クローン2、3、5は8個のガイドユニットを欠失なく保持していた。クローン1と4では8個のガイドユニットをほぼ欠失なく保持するベクターが大部分であったが、一部に1ユニットが欠失し7ユニットを保持するベクターの混入によるバンド（*印）が見られた。またクローン6では興味深いことに相同組換えによりユニット数が増加した9個のガイドユニットを保持するベクターが大部分であった（*印）。図の右側に記載したAはアデノウイルスベクターゲノム由来のバンド、cはベクター作製に用いたコスミドプラスミド由来のバンドを示す。なお別のガイドRNAのセットを用いた実験では得られた6クローンはすべて欠失なく8個のガイドユニットを保持していた。

【図9】8個のガイドRNAを同時発現するアデノウイルスベクターによるHBVのX遺伝子の切断位置を示す図である。作製したアデノウイルスベクターが発現する8個のガイドRNAは標準株のゲノム配列を元としているが、ここで標的とするHBVは標準株とは異なる患者由来であり、標的配列領域に3塩基の相違が見られる。その結果4個のガイドRNAはこの塩基相違により標的領域を切断することができないが、他の4個のガイドRNA配列はこの患者由来の配列と相同であるため、このベクターはこの患者由来のウイルスゲノムを4ヶ所（図のcut1～cut4）で同時切断することが可能である。このように多重ガイド発現ベクターは、別の患者に持続感染しているHBVゲノムが異なる位置に変異を持っていても同様に複数の切断を行うことができると考えられる。またこの標的領域はHBVによる肝がん発症に関与するとされるX遺伝子の中にありこの遺伝子を破壊するだけでなく、ウイルスゲノム複製に必須であるDR2配列とその下流を欠失破壊する。

10

20

30

40

50

【図10】この8個のガイドRNAを同時発現するアデノウイルスベクターとCas9発現アデノウイルスベクターとの共感染による、X遺伝子内の標的領域の欠失を示す図である。肝がん由来HepG2細胞の染色体DNAに組み込まれたHBVのX遺伝子内の標的領域(cut1からcut4まで)は、ウイルス量moi10において、ほぼ完全に欠失していた。mはマーカー、0、1、3、及び10はmoi、cは対照を示す。図の下側の数字(0、30、70、90)は欠失破壊効率(%)を示す。

【図11】4ヶ所の同時ダブルニッキング切断を行う8個のガイドRNAを同時発現するアデノウイルスベクターによるHBVゲノムの切断位置を示す図である。図左のDN1～DN4はダブルニッキング切断の位置を示す。HepG2細胞で複製中のHBVゲノムから切断により生じたウイルスDNA断片は細胞内で結合し(中央の図の破線)環状化するので、その環状化DNA(図右)を右端の2つのPCRプライマーにより直鎖上PCR断片として検出した。なお図はDN1～DN4が完全切断した場合の図であるが、ウイルスゲノムは複製中であるため、新たに生成した未切断のウイルスゲノム(図左)も存在する。

【図12】4ヶ所のダブルニッキング切断を行う8個のガイドRNAを同時発現するアデノウイルスベクターによるHBVゲノムの切断を示すゲル電気泳動の写真である。肝がん由来HepG2細胞においてこのベクターを、Cas9ニッカーゼを発現するアデノウイルスベクターと共感染させてダブルニッキング切断を行った。共感染7日目(day7)において複製中のHBVゲノム量(レーンNC9:右から2番目、2.8kbのバンド)はコントロール(レーンcont、右から3番目)に比べて約5分の1に低下し、代わりにDN1とDN4が同時に切断された場合に生ずる1.4kbのブロードなバンドの方が濃く検出された。この結果は大部分のHBVゲノムは切断破壊され、切断産物でもはや複製していないHBV DNAの方が多く存在することを示しており、ダブルニッキング切断が非常に効率よく行われたことを示す。また、Cas9ニッカーゼ発現ベクターの代わりに本来のCas9を発現するベクターを用いた実験も併行して行った。この場合は2つの切断部位が近接した4組8ヶ所の同時切断となる。その結果興味深いことに、ダブルニッキング切断の方が本来のCas9による切断よりもHBVゲノムの複製を阻止する効率が高いことが示された(レーン右から2番目のNC9とレーン最右端のCas9で2.8kbのバンドの濃さを比較)。ダブルニッキング切断の方がCas9切断よりも標的を破壊する効率が高いことは、アデノウイルスベクターを用いた他の実験系でも示された。

【図13】12個のガイドRNA発現ユニットを有するアデノウイルスベクターが製造でき、培養細胞実験が行える量まで増幅しても欠失のないベクターが得られたことを示すアガロースゲル電気泳動写真を示す図である。左側の図に独立した6個のアデノウイルスベクタークロンの結果を示し、右側の図にクローン6のベクターを増幅し安定性を調べた実験結果を示す。図8の説明と同様にベクター増幅細胞DNAをBspEIで切断した。mはマーカーのレーンを示す。左側の図で1～6は初代クロンを増幅して得た2代目のクローンにおける各アデノウイルスベクタークロン、cは対照である。矢印は12個のガイドユニット(12g)を含む断片のバンドの位置(5.5kb)を示す。また*印は相同組換えにより欠失あるいは増幅したユニットを含む断片を示す。クローン6以外のクローンでは*印で示す欠失を持つベクターが明らかに見られたが、クローン6(枠で囲んだレーン)では欠失ベクターによるバンドはほとんど検出されなかった。各図のレーン右側のAはアデノウイルスベクターゲノム由来のバンド、cはベクター作製に用いたコスミドプラスミド由来のバンドを示す。右側の図の3rdおよび4thのレーンはクローン6のベクターを増幅して得た3代目および4代目のベクターの結果を示す。図のレーン右側の複数の細い横線は、少量みられる欠失を持つベクター断片のバンドを示す。

【図14】12個のガイドRNAを同時発現するアデノウイルスベクターによるHBVのX遺伝子の切断位置を示す図である。このベクターは図8に示す8個のガイドRNA発現ユニットに加えて、さらに4個のガイドRNA発現ユニットを持つ。その4個のうち2個は図の最下段に示すようにX遺伝子の終止コドンの近傍にX遺伝子の配列と重複した標的配列を持つ。一つの標的配列はこの遺伝子配列と一致しており、その切断部位をcut5で示す。他方の標的配列はその5'端の1塩基(図の最後の塩基)がX遺伝子の配列と相違

10

20

30

40

50

しているため切断することができない。5' 端の1塩基が相違していなかった場合の切断位置を最下段中の縦の点線の矢印で示す。

【図15】この12個のガイドRNAを同時発現するアデノウイルスベクターとCas9発現アデノウイルスベクターとの共感染による、X遺伝子内の標的領域の欠失を示す図である。mはマーカー、0、1、3、及び10はmoiを示す。レーン右側の複数の細い横線は、切断効率がやや低いcut2またはcut3と、cut1またはcut4またはcut5との組合せにより生じた欠失によるバンドを示す。図の下の数字(0、22、45、74)は欠失破壊効率(%)を示す。

【図16】Cas9ニッカーゼをコードする遺伝子および4個のガイドRNA発現ユニットを有するアデノウイルスベクターが製造できたことを示すアガロースゲル電気泳動写真を示す図である。mはマーカー、1～6は各アデノウイルスベクタークローン、cは対照である。inward、outwardはそれぞれCas9ニッカーゼをコードする遺伝子の転写方向が内向きあるいは外向きであることを示す。どちらの向きでも得られた6クローンすべてが欠失なく4ユニットを保持していた(矢印で示した2.2kbのバンド)。ただし図ではほとんど見えないがinwardのクローン1では欠失による3ユニットのバンドわずかに見られた。

【図17】マウスH2Aa遺伝子エクソン1を2ヶ所切断する4個のダブルニッキングガイドRNAの位置を示す図である。エクソン1は5'キャップ部位および開始コドンを含み、その下流に設定した2組のダブルニッキング切断(DN切断)を行う4個のガイドRNA標的配列(1～4)の位置を示している。

【図18】4個のガイドRNAによるダブルニッキング2ヶ所切断を行う一体型アデノウイルスベクターを用いたマウスH2Aa遺伝子の破壊(in vivo)を示す図である。一体型アデノウイルスベクターの模式図、および、ベクター投与後7日目(day7)(Control、4g out-m1、4g out-m2、4g in-m3、4g in-m4)および15日目(day15)(Control、4g out-m5、4g out-m6、4g in-m7、4g in-m8)における、T7E1(T7エンドヌクレアーゼI)アッセイによる標的部位のゲノム断片の長さを示すアガロースゲル電気泳動写真を示す。+はT7E1酵素反応後、-は酵素無添加である。無修飾のゲノム断片を示す0.56kbのバンドに加えて、コントロール(ベクター無投与、マーカーのレーンを除く左から2番目の(Controlの+のレーン))では観察されない、ダブルニッキングされた領域(DN領域)が酵素により除去されて生じた約0.33kbおよび0.16kbのバンドが、7日目(4g out-m1、4g out-m2、4g in-m3、4g in-m4)および15日目(4g out-m5、4g out-m6、4g in-m7、4g in-m8)において観察された。+のレーンの下の数値(パーセント)は0.56kb DNAの切断除去効率を示す。

【図19】ガイドRNA発現ユニットの構造を示す図である。U6プロモーター中の欠失させた部分(135bp: -219~-85)を白抜きの矢印で示した囲みで示す。

【図20】マウスNTCP遺伝子エクソン2を4ヶ所切断する8個のダブルニッキングガイドRNAの位置を示す図である。エクソン2は開始コドンを含み、その下流に設定した4組のダブルニッキング切断(DN切断)を行う8個のガイドRNA標的配列(1～8)の位置を示している。

【図21】8個のガイドRNA発現ユニットとCas9ニッカーゼ発現ユニットを持つ一体型アデノウイルスベクターが作製できたことを示す図である。一体型アデノウイルスベクターの模式図、および、アガロースゲル電気泳動写真を示す。図21の下段の左の図における最も右側のレーン「c」はアデノウイルスベクター作製に用いたコスミドを示し、図21の下段の各図におけるゲル右側に示す「A」はアデノウイルスベクターおよびコスミド由来のバンド、「c」はコスミド由来のバンドであることを示す。3.0kbのバンドは、ベクターが8ガイド発現ユニットを含むことを示している。図21の下段の左側ゲルの「2nd」、右側ゲルの「3rd」、「4th」、「5th」は、それぞれクローンを2、3、4、5回継代して純化したことを意味している。「purify」は、動物実

10

20

30

40

50

験が可能な量の精製ウイルスを意味している。精製ウイルスの大部分は3.0 kbのバンドを示し、8個のユニットを保持していることが判明した。

【図22】8個のガイドRNAによるダブルニッキング4ヶ所切断を行う一体型アデノウイルスベクターを用いたマウスNTCP遺伝子の破壊(in vitro)の結果を示す図である。左側に短時間露光のアガロースゲル電気泳動写真、右側に長時間露光のアガロースゲル電気泳動写真を示す。0.65 kbpの断片は、無修飾のゲノム断片を示す。0.65 kbpの断片に対して、約150塩基の欠失を示す0.5 kbpの断片は、ガイドRNA1、2とガイドRNA3、4の同時切断による欠失、あるいはガイドRNA3、4とガイドRNA7、8の同時切断による欠失を示している。0.65 kbpの断片に対して、約350塩基の欠失を示す0.3 kbpの断片は、ガイド1と2およびガイド7と8の間の欠失を示している。

10

【図23】8個のガイドRNAによるダブルニッキング4ヶ所切断を行う一体型アデノウイルスベクターを用いたマウスNTCP遺伝子の破壊(in vivo)の結果を示す図である。15日目における2番、3番、4番のマウスにおいて1.05 kbおよび0.85 kbのバンドが認められた。

【図24】X遺伝子を標的とする4ヶ所のダブルニッキング切断を行う8個のガイドRNAの標的位置を示した図である。8個のガイドRNAを数字1～8で示す。ダブルニッキング部位を太い横線で示す。図24中、実線の矢印は、Cas9ニッカーゼによるニックの位置を示し、破線の矢印は、Cas9の場合にはその位置で2本鎖切断が起こることを示す。

20

【図25】8個のガイドRNAを発現するレンチウイルスベクターと、Cas9若しくはCas9ニッカーゼを発現するアデノウイルスベクターまたはコントロールアデノウイルスベクターとによる、染色体上に組込まれたX遺伝子の破壊を示した図である。4ヶ所8個のガイドRNA標的領域はこれを挟むフォワードおよびリバースプライマーにより0.66 kbのDNA断片として増幅される。mはマーカー、Cas9はCas9を発現するアデノウイルスベクター、NC9はCas9ニッカーゼを発現するアデノウイルスベクター、1w1は発現ユニットを持たないコントロールアデノウイルスベクターを用いた場合の結果を示す。

【発明を実施するための形態】

【0040】

30

以下、本発明の実施形態について説明する。以下の説明は単なる例示であり、本発明の範囲はこれらの説明に拘束されることはなく、本発明の趣旨を損なわない範囲で適宜変更し実施することができる。

【0041】

(定義)

本明細書において、複数の数値の範囲が示された場合、それら複数の範囲の任意の下限値および上限値の組み合わせからなる範囲も同様に意味する。

【0042】

本発明において、「組換えアデノウイルスベクター」または「アデノウイルスベクター」とは、アデノウイルス固有の塩基配列以外の塩基配列をそのゲノム中に含有するアデノウイルスのことをいう。アデノウイルス固有の塩基配列以外の塩基配列には特に制限はなく、タンパク質をコードする遺伝子やプロモーターやポリA配列などの調節遺伝子であってもよいし、また何ら機能を有さない塩基配列であってもよい。

40

【0043】

本発明の組換えアデノウイルスベクターに含まれる外来遺伝子としては、ヒトの治療用遺伝子や、GFP遺伝子等のいわゆるレポーター遺伝子、リコンビナーゼ等が挙げられる。外来遺伝子の挿入位置としては、E1領域欠失部位、E3領域欠失部位、E4遺伝子上流挿入部位等を選択できるがこれらに限定されない。

【0044】

本発明に用いる組換えアデノウイルスベクターの由来は特に限定されないが、ヒト由来

50

のアデノウイルスであることが好ましい。ヒト由来のアデノウイルスにおいては、C型に分類される2型または5型がより好ましい。

【0045】

組換えアデノウイルスベクターの作製法は特に限定されないが、アデノウイルスゲノムの全長を含むコスミドベクターに目的遺伝子を挿入後、293細胞へトランスフェクションすることによって組換えアデノウイルスベクターを得る方法（完全長DNA導入法：Fukuda et al., Microbiol. Immunol. 2006, Vol. 50, pp. 463-454）を用いることが好ましい。

【0046】

本発明において、「ゲノム編集」は、1つまたは複数のヌクレアーゼおよび／またはニッカーゼを用いて、DNAが、標的DNA、例えば、細胞のゲノムから挿入、置換、または除去される一連の遺伝子操作を意味する。ヌクレアーゼは、ゲノムにおいて所望の位置に、特異的な二本鎖切断を生じさせ、細胞の内因性機構を利用して、相同組換え修復（HDR）または非同源末端結合（NHEJ）により、引き起こされた切断を修復する。ニッカーゼは、ゲノムにおいて所望の位置に特異的な一本鎖切断を生じさせる。ある態様において、2つのニッカーゼは、標的DNAの向かい合わせのストランドに2個の一本鎖切断を生じさせるために用いることができ、それにより、平滑または突出末端を生み出す。標的DNA配列のゲノム編集を誘導するために任意の適切なヌクレアーゼを導入することができ、それらには、CRISPR関連タンパク質（Cas）ヌクレアーゼ、Cpf1、ジungkフィンガーヌクレアーゼ（ZFN）、転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ（TALEN）、メガヌクレアーゼ、他のエンドーまたはエキソヌクレアーゼ、それらのバリエーション、それらの断片、およびそれらの組合せが挙げられるが、それらに限定されない。

【0047】

本発明において、「ゲノム切断」または「ゲノムの切断」とは、上述のゲノム編集に伴って、ゲノムを構成する2本鎖核酸の両方の鎖が切断されることを意味する。当該2本鎖核酸の切断は、センス鎖とアンチセンス鎖の互いに対応する塩基対での切断により、平滑末端を生じるものでもよいし、センス鎖とアンチセンス鎖が近接する異なる位置で切断されることにより、突出末端を生じるものであってもよい。

【0048】

本発明において、「CRISPR/Casシステム」は、原核生物が有する免疫機構であるCRISPR（clustered regularly interspaced short palindromic repeat）核酸とCasタンパク質（CRISPR-associated protein）を利用したシステムを意味する。「CRISPR/Casシステム」はクラス1とクラス2に分類され、クラス2の「CRISPR/Casシステム」はさらにII型、V型、VI型に分類される（Yamano et al., Molecular Cell, 2017, Vol. 67, pp. 633-645）。

【0049】

II型「CRISPR/Casシステム」に分類される、Casタンパク質としてCas9を利用するシステムは、ストレプトコッカス・ピオゲネス（Streptococcus pyogenes）由来のCas9タンパク質と、CRISPR RNA（crRNA）およびこれと部分的に相補的であり、Cas9タンパク質への結合の足場となるトランス作動性RNA（trans-activating crRNA：tracrRNA）からなるガイドRNA（gRNA）を利用する。上記crRNAとtracrRNAは、融合した単一のRNA分子（単一ガイドRNA）として供給されてもよいし、別々のRNA分子（「非単一ガイドRNA」と称することがある）として供給されてもよい。一つの態様において、「CRISPR/Cas9システム」は標的細胞に対して、Cas9タンパク質をコードするDNA断片、crRNAをコードするDNA断片およびtracrRNAを発現するDNA断片として供給される。また、一つの態様において、「CRIS

10

20

30

40

50

PR/Cas9システム」は、Cas9タンパク質をコードするDNA断片および単一ガイドRNAをコードするDNA断片として供給される。一つの態様において、これらのDNA断片は、ウイルスベクターを用いて標的細胞に供給される。これらのDNA断片は、単一のウイルスベクターあるいは、別々のウイルスベクターにより標的細胞に供給され得る。なお、tracrRNAをコードするDNAとしては、特に制限はなく、公知のものを適宜選択することができ、例えば、Addgene社製のプラズミド(pX260)などを適宜選択することができる。前記プラズミド中のtracrRNAをコードする部分のDNAの具体的な配列は、配列番号52で表される。

【0050】

本発明において、「Casタンパク質」は、「CRISPR/Casシステム」を構成する、エフェクター分子として機能するタンパク質をおよびその誘導体を意味する。例えば、「Casタンパク質」は、Cas9タンパク質、Cpf1タンパク質およびDNA切断活性を有するその変異体を意味する。一つの態様において、「Casタンパク質」はDNA2重鎖切断活性を有するCasヌクレアーゼである。一つの態様において、「Casタンパク質」はDNA2重鎖の片方の鎖のみを切断する活性を有するCasニッカーゼである。一つの態様において、CasニッカーゼはRuvCドメインに変異を有するCas9(D10A)ニッカーゼ(Jinek et al., 2012, Science, 2012, Vol. 337, no6096, pp. 816-821)であってもよい。

【0051】

本発明において、「ガイドRNA発現ユニット」または「CasガイドRNA発現ユニット」は、CRISPR/Casシステムにおいて使用されるガイドRNA(「CasガイドRNA」と称することもある。)を発現するためのDNA構成単位を意味する。CRISPR/Cas9システムに利用する場合、当該ガイドRNAとして、crRNAとtracrRNAを融合した単一ガイドRNAを用いることができ、crRNAとtracrRNAとを別々とした非単一ガイドRNAを用いることもできる。前記「ガイドRNA発現ユニット」の態様としては、crRNAとtracrRNAを融合した単一ガイドRNAを発現するための「単一ガイドRNA発現ユニット」、crRNAを発現するための「crRNA発現ユニット」、tracrRNAを発現するための「tracrRNA発現ユニット」とすることができる。前記「ガイドRNA発現ユニット」は、「単一ガイドRNA発現ユニット」のみからなるものであってもよいし、「crRNA発現ユニット」と「tracrRNA発現ユニット」とからなるものであってもよいし、「単一ガイドRNA発現ユニット」と、「crRNA発現ユニット」と、「tracrRNA発現ユニット」とを含むものであってもよい。ガイドRNA発現ユニットは、当該ガイドRNAをコードするDNAの他、プロモーターなどその発現を調節する発現調節領域等を含む。当該プロモーターは特に限定されないが、U6プロモーター、H1プロモーター、tRNAプロモーターおよびアデノウイルスVAプロモーター等を使用することができる。通常、ベクターに複数のガイドRNA発現ユニットを含ませる場合、これらは同じ転写方向になるように隣接してタンデムに配置される。

【0052】

本発明において、CasガイドRNA発現ユニットが「ダブルニッキングを生じるように構成される」とは、少なくとも2個のガイドRNA発現ユニットが、ゲノム上の近接する位置のセンス鎖およびアンチセンス鎖にそれぞれ一本鎖切断、すなわち「ニック」を誘導するように選択されており、それによりゲノムDNAの2本鎖が当該2つのニックの付近で切断されることを意味する。

【0053】

本発明において、DNA上の2つの位置が「近接する位置」にあるとは、当該2つの位置の間に、例えば1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50塩基対が存在することを意

10

20

30

40

50

味するが、これらに限定されない。

【0054】

本発明において、「核酸」は、「ヌクレオチド」、または「ポリヌクレオチド」と同等のものとして用いられ、一本鎖、二本鎖、または多重鎖のいずれかの形での、デオキシリボ核酸（DNA）、リボ核酸（RNA）、およびそれらのポリマーを意味する。「核酸」には、一本鎖、二本鎖、もしくは多重鎖DNAもしくはRNA、ゲノムDNA、cDNA、DNA-RNAハイブリッドが含まれるが、これらに限定されない。例えば、プリン塩基および／もしくはピリミジン塩基、もしくは他の天然、化学修飾型、生化学的修飾型、非天然、合成、もしくは誘導体化のヌクレオチド塩基を含むポリマーも含む。特に言及することがない限り、特定の配列を有する核酸は、その保存的に改変されたバリエーション（例えば、縮重コドン置換）、対立遺伝子、オルソログ、一塩基多型（SNP）、および相補的配列を包含する。

10

【0055】

本発明において、特定のRNAを「コードする」DNA配列は、RNAに転写されるDNA核酸配列である。DNAポリヌクレオチドは、タンパク質に翻訳されるRNA（mRNA）をコードする場合もあるし、あるいは、DNAポリヌクレオチドは、タンパク質に翻訳されないRNA（例えばtRNA、rRNA、またはDNA標的化RNA；「非コード」RNAまたは「ncRNA」とも称される）をコードする場合もある。

【0056】

本発明において、「遺伝子」は「ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列」と同等に用いられ、ポリペプチド鎖を産生するのに関与するDNAのセグメントを意味する。当該DNAセグメントは、直接ポリペプチドをコードする領域に加えて、その転写、翻訳の調節に関与する機能を有する、コード領域の前および後の領域（リーダーおよびトレイラー）を含む。当該DNAセグメントは、また、上記コード領域（エクソン）の間の介在配列（イントロン）を含んでもよい。

20

【0057】

本発明において、「ポリペプチド」、「ペプチド」、および「タンパク質」は同等のものとして使用され、アミノ酸残基のポリマーを意味する。「ポリペプチド」は天然に存在するアミノ酸ポリマー、天然に存在しないアミノ酸ポリマー、一部のアミノ酸が対応する人工の化学的模倣体に置換されているポリマーを含む。

30

【0058】

本発明において、「核酸ベクター」とは、外来遺伝子を標的細胞内に送達するために用いられる、核酸からなる分子を意味する。核酸ベクターは特に限定されないが、プラスミドまたはDNAウイルスベクター、RNAウイルスベクター等のウイルスベクターであってもよい。当該ウイルスベクターとして、例えばアデノウイルス、レンチウイルス、バキュロウイルス、センダイウイルス、ワクシニアウイルス、ヘルペスウイルスまたはこれらの変異体を用いることができる。

【0059】

本発明において、「ダブルニッキング」とは、近接する位置で、2本鎖DNAのセンス鎖およびアンチセンス鎖にニック（一本鎖切断）を生じることにより、これら2つの位置でニックが形成された時に初めて当該部位でゲノムが切断されるように構成する手法をいい、当該手法を用いるために構成される複数のガイドRNA発現ユニットを含むゲノム編集システムを「ダブルニッキングシステム」と呼ぶことがある。当該ニックの間の距離は、例えば40塩基対以内であり、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40塩基対であってもよいが、これらに限定されない。

40

【0060】

2つの「ダブルニッキング」を近接する位置で行うことにより、当該位置におけるゲノム切断を更に安全、確実とすることが可能であり、また、ゲノム上からノックダウンする標的配列の上流における近接した領域に、2つのダブルニッキングを誘導し、更に、該標的配列の下流における近接した領域に、2つのダブルニッキングを誘導することで、該標

50

的配列をロックダウンすることで、当該標的配列を極めて安全かつ確実にロックダウンすることが可能となる。

【0061】

本発明において、「一体型Cas核酸ベクター」または「オールインワン型Cas核酸ベクター」とは、当該核酸ベクターが、CasガイドRNA発現ユニットと、Casタンパク質をコードする遺伝子を共に含むことを意味する。「一体型Cas核酸ベクター」は、単に「一体型核酸ベクター」または「オールインワン型核酸ベクター」と呼ばれることがあり、また、Casタンパク質の種類に応じて、「一体型Cas9核酸ベクター」または「オールインワン型Cas9核酸ベクター」と呼ばれることがある。また、例えば核酸ベクターがアデノウイルスベクターである場合、「一体型Casアデノウイルスベクター」などと呼ばれることもある。

10

【0062】

「一体型Cas核酸ベクター」が含有する、CasガイドRNA発現ユニットと、Casタンパク質をコードする遺伝子の数は特に限定されないが、典型的には1コピーのCasタンパク質をコードする遺伝子と共に、2個以上、例えば、2、3、4、5、6個のCasガイドRNA発現ユニットを含むことができる。一態様として、4個の単一ガイドRNA発現ユニットと、1個のCasタンパク質をコードする遺伝子を含む態様、2個のtracrRNA発現ユニットと、6個のcrRNA発現ユニットと、1個のCasタンパク質をコードする遺伝子を含む態様、4個のtracrRNA発現ユニットと、4個のcrRNA発現ユニットと、1個のCasタンパク質をコードする遺伝子を含む態様、又は6個のtracrRNA発現ユニットと、2個のcrRNA発現ユニットと、1個のCasタンパク質をコードする遺伝子を含む態様が好ましい。

20

【0063】

また、本件発明の「一体型Cas核酸ベクター」は、更にロックインされるドナーDNA配列を含むことができる。当該ドナーDNA配列は、遺伝子をコードする配列であってもよいし、遺伝子をコードしない配列であってもよい。当該「一体型Casロックイン核酸ベクター」は、極めて高い効率で、当該ドナーDNA配列をゲノム上の特定の位置へ導入することができる。典型的には、当該一体型Casロックイン核酸ベクターはダブルニックングを生じるための1組(2個)のCasガイドRNA発現ユニット、1つのドナーDNA配列および1つのCasタンパク質をコードする遺伝子から構成されるが、当該構成に限定されない。

30

【0064】

本発明において、「宿主細胞」とは、一般に外来性DNA配列を形質移入された細胞を意味し、特に、本発明の核酸ベクターの産生に適した細胞を意味する。たとえば、微生物、酵母細胞、昆虫細胞、及び哺乳類細胞などを使用することができる。特に哺乳類細胞を使用することが好ましい。適切な哺乳類細胞として、必ずしも限定するものではないが、HeLa細胞、CHO細胞、293細胞、Vero細胞、NIH3T3細胞、Huh-7細胞、BHK細胞、PC12細胞、COS細胞、COS-7細胞、RAT1細胞、マウスL細胞、Sf9細胞、ヒト胎児由来腎臓(HEK)細胞、HepG2細胞などを使用することができる。

40

【0065】

本発明において、「相補性」は、核酸が、別の核酸配列と水素結合を形成する能力を指す。相補性のパーセントは、核酸分子において別の核酸配列と水素結合を形成することができる塩基のパーセンテージを示す。「完全に相補的な」とは、核酸配列の全ての連続した残基が、第2の核酸配列における連続した残基の同じ数と水素結合することを意味する。本明細書で用いられる場合、2つの核酸が「実質的に相補的」とあるとは、当該2つの核酸がストリンジェントな条件下でハイブリダイズすることを意味する。

【0066】

本発明において、「ストリンジェントな条件」とは、標的配列と相補性を有する核酸が、主にその標的配列とハイブリダイズし、かつ非標的配列とは実質的にハイブリダイズし

50

ない、条件を指す。一般的に、配列が長ければ長いほど、その配列がその標的配列と特異的にハイブリダイズする温度は高くなる。

【0067】

本発明において、「変異体」または「バリエント」は、天然に存在するものから逸脱する、生物体、菌株、遺伝子、ポリヌクレオチド、ポリペプチド、または特性の一形態を指す。

【0068】

(短縮された新規バックボーンを有するアデノウイルスベクター)

本発明の短縮された新規バックボーンを有するアデノウイルスベクターは、アデノウイルス由来のベクターであって、E3領域において、2685塩基対長を超える領域が欠落している組換えアデノウイルスベクターである。

【0069】

このようなアデノウイルスベクターはAd5ベクターをベースとして、Ad5のE3領域においてApaI制限酵素切断部位に隣接する第27982番目塩基～第30818番塩基を欠失させることで作成することができる。

【0070】

当該塩基配列の欠失には、当業者が通常用いる標準的な遺伝子組み換え技術を用いることができる。

【0071】

当該短縮された新規バックボーンを有するアデノウイルスベクターは、例えばAd5アデノウイルスベクターと通常組み合わせて使用される細胞(例えば293細胞)を用いて増幅させることができる。

【0072】

(5個以上のガイドRNA発現ユニットを含有する核酸ベクター)

本発明の5個以上のガイドRNA発現ユニットを含有する(5個以上のCasガイドRNAを発現する)核酸ベクターとして、好ましくは組換えアデノウイルスベクターまたはレンチウイルスベクターを用いることができる。

【0073】

5個以上のガイドRNA発現ユニットを含有する核酸ベクターの製造方法としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができる。

例えば、5個以上のガイドRNA発現ユニットを含有するアデノウイルスベクターの製造方法は特に限定されないが、好ましくはアデノウイルスゲノムDNAの一部を含むコスミドベクターに、それぞれ遺伝子発現調節部位を伴った5個以上のガイドRNA発現ユニットを挿入した後、293細胞へトランスフェクションすることによって組換えアデノウイルスベクターを得る方法(完全長DNA導入法: Fukuda et al., Microbiol. Immunol. 2006, Vol. 50, pp. 463-454)により作成することができる。

【0074】

上記アデノウイルスベクターとして使用し得るベクターは特に限定されず、様々なアデノウイルス由来のベクターを使用することができる。

【0075】

一つの態様において、上記アデノウイルスベクターとして、Ad5ベクターおよびその改変体を用いることが望ましい。一つの態様において、上記本発明の短縮されたバックボーンを有するアデノウイルスベクターを用いることで、更に多数のガイドRNA発現ユニットを含有するアデノウイルスベクターを作成することができる。

【0076】

また、核酸ベクターとして、レンチウイルスベクター等他のベクターを用いることもできる。これらのベクターは、当業者が通常行う方法によって製造することができ、例えば、レンチウイルスベクターの場合、後述する実施例13に記載の方法で製造することができる。

10

20

30

40

50

【0077】

本発明の5個以上のガイドRNA発現ユニットを含有する核酸ベクターの含有するガイドRNA発現ユニットの数は、5個以上であれば核酸ベクターに包含させられ得る限り特に限定されず、例えば、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16個以上であり得る。前記「ガイドRNA発現ユニット」の態様の具体例としては、「単一ガイドRNA発現ユニット」からなる態様、「crRNA発現ユニット」及び「tracrRNA発現ユニット」からなる態様が挙げられる。また、前記「crRNA発現ユニット」及び「tracrRNA発現ユニット」からなる態様では、例えば、前記「tracrRNA発現ユニット」を2個、前記「crRNA発現ユニット」を6個とする態様、前記「tracrRNA発現ユニット」を4個、前記「crRNA発現ユニット」を4個とする態様、前記「tracrRNA発現ユニット」を6個、前記「crRNA発現ユニット」を2個とする態様、前記「tracrRNA発現ユニット」を4個、前記「crRNA発現ユニット」を8個とする態様とする態様などが挙げられる。

10

前記5個以上のガイドRNA発現ユニットを含有する核酸ベクターでは、更にノックインされるドナーDNA配列を含むことができる。前記ドナーDNA配列は、上記した「一体型Cas核酸ベクター」におけるものと同様のものを用いることができる。

【0078】

(Casタンパク質をコードする遺伝子とガイドRNA発現ユニットを含有する核酸ベクター)

本発明のCasタンパク質をコードするDNA断片とガイドRNA発現ユニットを含有する核酸ベクターは、様々な核酸ベクターに基づいて作成することができる。一態様において、核酸ベクターはアデノウイルスベクターまたはレンチベクターであることが好ましい。アデノウイルスベクターに基づいて作成する場合は、上記完全長DNA導入法を用いて作成することが好ましいが、これに限定されない。293細胞を用いた完全長DNA導入法を用いる場合、293細胞による培養期間は、好ましくは11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24日間以上継続される。また、レンチウイルスベクターに基づいて作成する場合、後述する実施例13に記載の方法と同様にして作成することができる。

20

【0079】

Casタンパク質をコードする遺伝子とガイドRNA発現ユニットの位置関係については適宜選択することができ、例えば、Casタンパク質をコードする遺伝子に対して上流にガイドRNA発現ユニットを位置させることもできるし、Casタンパク質をコードする遺伝子に対して下流にガイドRNA発現ユニットを位置させることもできる。

30

【0080】

Casタンパク質としては特に限定されず、様々なものを使用することができ、好ましくはCas9ヌクレアーゼまたはCas9ニッカーゼを使用することができる。

【0081】

本発明のCasタンパク質をコードするDNA断片とガイドRNA発現ユニットを含有する核酸ベクターに含まれるガイドRNA発現ユニットの個数は、核酸ベクターに含有させ得る範囲であれば特に限定されない。好ましくは、3個、4個、5個、6個、7個、8個以上のガイドRNA発現ユニットを含ませることができる。前記「ガイドRNA発現ユニット」の態様の具体例としては、「単一ガイドRNA発現ユニット」からなる態様、「crRNA発現ユニット」及び「tracrRNA発現ユニット」からなる態様が挙げられる。また、前記「crRNA発現ユニット」及び「tracrRNA発現ユニット」からなる態様では、例えば、前記「tracrRNA発現ユニット」を2個、前記「crRNA発現ユニット」を6個とする態様、前記「tracrRNA発現ユニット」を4個、前記「crRNA発現ユニット」を4個とする態様、前記「tracrRNA発現ユニット」を6個、前記「crRNA発現ユニット」を2個とする態様、前記「tracrRNA発現ユニット」を4個、前記「crRNA発現ユニット」を8個とする態様、前記「tracrRNA発現ユニット」を2個、前記「crRNA発現ユニット」を2個とする態

40

50

様などが挙げられる。本発明の Cas タンパク質をコードする DNA 断片とガイド RNA 発現ユニットを含有する核酸ベクターとして、好ましくは組換えアデノウイルスベクターまたはレンチウイルスベクターを用いることができる。

【0082】

本発明の Cas タンパク質をコードする DNA 断片とガイド RNA 発現ユニットを含有するアデノウイルスベクターは、様々なアデノウイルスベクターに基づいて製造することができる。例えば、本発明の短縮されたバックボーン構造を有するアデノウイルスベクターを用いることで、更に含有するガイド RNA 発現ユニットを増加することができる。

【0083】

本発明の Cas タンパク質をコードする DNA 断片とガイド RNA 発現ユニットを含有する核酸ベクターは、様々な宿主細胞において製造、増幅することができる。本発明の Cas タンパク質をコードする DNA 断片とガイド RNA 発現ユニットを含有する核酸ベクターは、宿主細胞においても Cas タンパク質のゲノム編集活性を生じ得るため、当該活性の生じにくい培養条件にて培養することが好ましい。また、当該 Cas タンパク質の発現を抑制し得るような条件で培養することも望ましい。一態様において、当該培養細胞に Cas タンパク質の発現を抑制する siRNA を発現するベクターを導入することで、本発明の核酸ベクターの製造工程における、Cas タンパク質の発現を抑制することができる。好ましくは、当該 siRNA は Cas タンパク質をコードする遺伝子の複数の異なる領域、例えば、2、3、4、5、6 ヶ所以上に対して用いられる。

【0084】

本発明の核酸ベクターまたはアデノウイルスベクターは、有効量を培養細胞に適用することでゲノム編集実験に用いることができる他、有効量をヒト以外の動物に投与することによるゲノム編集実験または疾患治療、有効量をヒトに投与することによるゲノム編集疾患治療に適用することなどができる。

【0085】

(治療方法)

本発明において、「投与すること」には、対象への経口投与、局所的接触、坐剤としての投与、静脈内、腹腔内、筋肉内、病巣内、髄腔内、鼻腔内、または皮下の投与が挙げられる。投与は、非経口および経粘膜（例えば、頬側、舌下、口蓋、歯肉、鼻、膣、直腸、または経皮）を含む任意の経路による。非経口投与には、例えば、静脈内、筋肉内、細動脈内、皮内、皮下、腹腔内、脳室内、および頭蓋内が挙げられる。送達他の様式には、リポソーム製剤の使用、静脈内注入、経皮パッチなどが挙げられるが、それらに限定されない。

【0086】

本発明において、「有効量」または「十分な量」は、有益な、または所望の結果をもたらすのに十分である作用物質（例えば、Cas ヌクレアーゼ、ガイド RNA など）の量を指す。治療的有效量は、処置されている対象および疾患状態、対象の体重および年齢、疾患状態の重症度、投与の様式などの1つまたは複数の依存して変わり得、それは、当業者により容易に決定することができる。特定の量は、選択された特定の作用物質、標的細胞型、対象における標的細胞の位置、従われるべき投与計画、それが他の作用物質と併用して投与されるかどうか、投与のタイミング、およびそれが運ばれる物理的送達系の1つまたは複数の依存して変わり得る。

【0087】

本発明において、「薬学的に許容される担体」は、作用物質（例えば、Cas ヌクレアーゼ、ガイド RNA など）の細胞、生物体、または対象への投与を助ける物質を意味する。薬学的に許容される担体としては、水、NaCl、生理食塩水、乳酸リンゲル液、規定のスクロース、規定のグルコース、結合剤、増量剤、崩壊剤、潤滑剤、コーティング剤、甘味剤、香料および着色剤などが挙げられるが、これらに限定されない。

【実施例】

【0088】

以下、実施例により本発明をさらに詳細に説明するが、本発明はこれらによって限定されるものではない。

【0089】

[実施例1]

短縮された新規バックボーンを有するアデノウイルスベクターの製造

【0090】

市販のE1/E3欠落型Ad5ベクターを元に、E3領域において、Ad5ベクターの位置づけで、第27982番塩基～第30818番塩基が欠落した組換えアデノウイルスベクターを製造した。

【0091】

作製方法は以下の通りである。市販のpAxcwit2のアデノウイルスゲノムからSpeI(27082)–NdeI(31089)断片をプラスミドにクローン化した。このプラスミドをApaI(27984)とBglII(30819)で二重切断した後にクレノー(Klenow)ポリメラーゼで両端を平滑化し結合することにより、E3領域から2837塩基対が欠落したプラスミドを得た。pAxcwit2をSpeIとNdeIで切断しこの部分が欠落した断片と、pAxcwit2からプラスミド部分を含むNdeI–PmeI(13258)断片、およびPmeI–SpeI断片の3者を同時結合することにより、上記のE3領域欠落を含みそれ以外のアデノウイルスDNAを保持したプラスミドpAxcw3da1t2を得た。このプラスミドをNdeIで切断しE3欠落領域を含む断片を調製した後、E4領域にSwalクローン化部位を持つpAxc4wit2(Suzuki et al., Gene Ther., 2015, Vol. 22, pp. 421–429)を同様にNdeIで切断しE3領域を置換することにより、E3領域に当該の欠落を持ちE4にSwalクローン化部位を持つアデノウイルスベクター作製用プラスミドpAxc3da4wを得た。

【0092】

E3領域を欠落したアデノウイルスベクターと同じ領域の配列を持つ上述のpAxc3da4wの当該部位を市販のpAxcwit2の対応する領域をPCRにより増幅しE3領域の欠失を比較確認した(図3)。またこの欠落部分の配列はシーケンスを行い確認した。

【0093】

当該アデノウイルスベクターは、293細胞内で複製可能であることが確認された。

【0094】

このプラスミドに外来遺伝子発現ユニットを組み込み、アデノウイルスゲノムの両端をPacIで切断した後に293細胞へトランスフェクションすることにより外来遺伝子を発現するアデノウイルスベクターを得ることができた。図9に示すCas9ニッカーゼ発現ユニットをE1領域に、4個のガイドRNA発現ユニット(単一ガイドRNA)をE4遺伝子上流挿入部位に持つアデノウイルスベクターはその一例である。

【0095】

[実施例2]

複数のガイドRNAを同時発現するアデノウイルスベクターによるゲノム編集

アデノウイルスゲノムは、約36kbpの2本鎖線状DNAであって、DNA鎖両端にはE2B遺伝子産物が切断加工された55kのタンパク質が共有結合しているという特異な構造をしている。複数のガイドRNAを同時に発現するアデノウイルスベクターを作成するために、ラムダファージがcos部位を持つ38kbp～52kbpのDNA断片だけを取り込む性質を用いて、アデノウイルスゲノムの断片および4個のガイドRNA発現ユニットをタンデムにつないだコスミドプラスミドを作製し、ベクターゲノムの全長をプラスミドから切り出して293細胞へトランスフェクションを行い(完全長DNA導入法)、4個のガイドRNA発現ユニット(単一ガイドRNA)を含むアデノウイルスベクターを作成した。

【0096】

当該ガイドRNAは、マウスH2-A α 遺伝子のエクソン1を標的とするものであり、多重ガイドRNA発現ユニットは、5'-GCGGCATCCTGGTCTCTGGG-3'（配列番号1）および5'-GCAGCAGAGCTCTGATTCTG-3'（配列番号2）からなる第1のダブルニッキング用ガイドコーディングDNA、ならびに5'-GAGGCTGAGATGGTGGTCA-3'（配列番号3）および5'-GGAGGTGAA GACGACATTGA-3'（配列番号4）からなる第2のダブルニッキング用ガイドコーディングDNA配列を含んでいた（図2）。

【0097】

各ガイドRNA発現ユニットは、上記ガイドコーディングDNA配列以外に、U6プロモーター（約261塩基対）およびガイドRNAの足場部分（標的20塩基対以外の配列）（約83塩基対）を含んでいた。

10

【0098】

作製した多重ガイドRNA発現ユニットを持つコスミドを用いて、アデノウイルスベクター（AdV）を作製したところ、ガイドRNA発現ユニットを欠失することなくアデノウイルスベクターを調製することができた（図4）。

【0099】

このAdVは動物実験が可能な量までスケールアップすることが可能だった。そこで、AdVをマウスの静脈から投与するとそのほとんどが肝臓に感染することを利用し、4個のガイドRNAを発現するAdVを、Cas9またはCas9ニッカーゼを発現するAdVとともにマウスに接種し、肝臓における標的遺伝子のゲノム編集効率について解析を行った。

20

【0100】

その結果、肝臓において高効率で遺伝子破壊が観察され、Cas9発現ベクターと組み合わせた場合に比べて、Cas9ニッカーゼ発現ベクターと組み合わせた場合により大きな領域での欠失が観察され、Cas9ニッカーゼ発現ベクターを用いることで、より完全な遺伝子破壊が行われたことが示唆された（図5）。また、多重ガイドRNA発現AdVにドナーDNAをさらに含有させることで、当該ドナーDNAを標的部位に遺伝子ノックインすることも可能であることを見出した（図6）。

【0101】

これらの結果は、多数のガイドRNAを発現するアデノウイルスベクターを用いて、in vivoで安全性の高いがん遺伝子破壊実験や遺伝病のゲノム編集治療実験が可能であることを示している。

30

【0102】

【実施例3】

8個のガイドRNAを同時発現するアデノウイルスベクターの作成

完全長DNA導入法を用いて、HBVのX遺伝子内のDR2領域を標的とした8個のガイドRNA発現ユニット（単一ガイドRNA）を含有するアデノウイルスベクターの作成を試みた（図7参照）。使用したガイドコーディングDNA配列は、配列番号5～12に示す通りであった。

40

配列番号5 G A A G C G A A G T G C A C A C G G T C

配列番号6 G A G G T G A A G C G A A G T G C A C A

配列番号7 G G T T T C C A T G C G A C G T G C A G

配列番号8 G G C A G A T G A G A A G G C A C A G A

配列番号9 G A A G C G A A G T G C A C A C G G T C

配列番号10 G A G G T G A A G C G A A G T G C A C A

配列番号11 G G T T T C C A T G C G A C G T G C A G

配列番号12 G A C C T G G T G G G C G T T C A C G G

【0103】

細胞内に導入されたDNAは相同組換えを起こすことが知られており、ノックインはその現象を利用して広く行われている。またアデノウイルスゲノムにおいても従来行われて

50

いたC O S－T P C法では、発現ユニットを含んだコスミドと、切断した親ウイルスDNA－末端蛋白複合体（DNA－T P C）を最終段階で293細胞に共形質導入し、コスミドと親ウイルスDNA－末端蛋白複合体の間の共通配列の間で生じる相同組換えを利用して、目的のDNA断片を含むウイルスDNA－末端蛋白複合体をアデノウイルスベクターとして回収している。

したがって、8つのガイドRNA発現ユニットを含有するアデノウイルスベクターを作成する際には、これらの発現ユニットが共通DNA配列を含んでいるために、相同組換えによって発現ユニットの一部が脱落することが予想された。

【0104】

ところが実験の結果、驚くべきことに8個のガイドRNA発現ユニットを含有するアデノウイルスベクターを、発現ユニットの欠落なく作成し得ることが見いだされた（図8）。 10

すなわち、アデノウイルスベクターの作製で一般的に行われている方法では、外来DNAを込む込んだウイルスゲノムを293細胞にトランスフェクションし、そこで生じたベクターウイルスを個々に分離することなく生じたウイルスをプールとして作製している。しかし図8に見られるように一部のユニットが欠失したウイルスが生じるのは免れないため、ウイルスを個々のクローンとして得ることが必要である。具体的には、トランスフェクションした293細胞を次の日に培養皿から剥がして希釈し、トランスフェクションしていない多量の293細胞と混合して96穴プレートへまき直す。増殖してきたウイルスによって死滅した293細胞が96穴プレートの3分の1以下の個数であるプレートからのみウイルスを分離した。 20

この最初のウイルスストックを分離するステップでは、図8に示すようにユニットが欠失したウイルスストックと8ユニットを保っているストックが生ずるが、8ユニットのみのウイルスストックを更に大きいステップで293細胞に感染する場合に通常量の3倍の量を感染させることで、ユニットの欠失のない高濃度のウイルスストックが得られた。この感染条件でウイルス増幅を繰り返すことにより、動物実験に十分な量の欠失のないウイルスベクターを得ることができた。

【0105】

〔実施例4〕

8個のガイドRNAを同時発現するアデノウイルスベクターによる染色体上のHBV－X遺伝子の効率の破壊 30

【0106】

HBV－X遺伝子はこのウイルスによる肝がん発症に関与しているとされており、しばしば肝がん細胞においてX遺伝子DNAが組み込まれている。そこで肝がん治療のモデルケースとして、X遺伝子が染色体に組み込まれているHep G2細胞株Gx11（Shintani, Saito, Koike et al., J. Gen. Virol. 1999, Vol. 80, pp. 3257－3265）に対して、実施例3で作製された8個のガイドRNAを同時発現するアデノウイルスベクター（8ガイド発現ベクター）およびCas9発現アデノウイルスベクターを共感染し、X遺伝子の破壊を試みた。

【0107】

当該8ガイド発現ベクターで発現する8個のガイドRNAは、標準株ウイルスゲノムの塩基配列（図9の塩基配列）を元にして作られているが、患者間におけるウイルスゲノム配列の相違のため、Gx11細胞染色体に組み込まれているウイルスの配列は、この領域の標的領域の塩基配列において、標準株ウイルスゲノムの塩基配列と3塩基の相違がある（図9の1段目、A→T、2段目、A→GおよびT→C；該当塩基を枠で囲み、その枠の外側にGx11細胞株における塩基を記載した。）。この8個のガイドRNAの各20塩基の標的配列はオーバーラップしており、8個のガイドRNAのうち4個のガイドRNAは、これら塩基の相違のため切断することができない（破線矢印）。しかし標準株ウイルスゲノムの塩基配列とGx11細胞染色体上のウイルスゲノム塩基配列は、残りの4個のガイドRNAの塩基配列においては一致していたため、この領域をそれぞれの標的部位で切断できる（切断位置をcut1～cut4で示す）。もしcut1からcut4までの 40 50

すべての位置で切断がおきれば、cut 1 から cut 4 の間の約 120 塩基が欠失することになる。図 9 の 4 段目に X 遺伝子の終止コドン TAA、およびその上流の X 遺伝子コード領域を太線で示す。この太線の領域で欠失がおきれば X 遺伝子は機能を失う。4 段目右端の MsLI は Gx11 細胞内に組み込まれたウイルス DNA の末端の位置を示す。

【0108】

8 ガイド発現ベクターと Cas9 発現ベクターを異なる量で共感染する実験を行った。この領域を含む PCR プライマーにより PCR を行った結果、ウイルス量 (moi で表す) 3 において、非感染 (moi 0) の場合と比較して明らかに本来のサイズ (0.53 kb) のバンドの減少が見られ、moi 10 ではほぼ完全に消失し、110 塩基の欠失で見られる 0.42 kb のバンドに移行した (図 10 参照)。この結果は、8 ガイド発現ベクターと Cas9 発現ベクターによる染色体上 X 遺伝子の破壊が高い効率で行われたことを示す。PCR に用いたプライマーの配列は、配列番号 13、14 に示す通りであった。

フォワードプライマー：

配列番号 13 AACTGGATCCTGCGCGGGACGTCCTTTGTCTC

リバースプライマー：

配列番号 14 GAAAAAGATCTCAGTGGTATTTGTGAGCCAGG

【0109】

[実施例 5]

4ヶ所のダブルニッキング切断を行う 8 ガイド発現ベクターによる複製中の HBV ゲノムの切断破壊

HBV は複製のプロセス中に環状 2 本鎖 DNA ゲノム (ccc) の形態をとる。複製増幅中の HBV ccc ゲノムを 4ヶ所でダブルニッキング切断を行う 8 ガイド RNA (単一ガイド RNA) 発現ベクターを作製した。およその切断部位を図 11 の左側に示す。DN はダブルニッキングを意味する。使用したガイドコーディング DNA 配列は、配列番号 15～22 であった。

DN1 部位：

配列番号 15 GACCTGGTGCGCGTTTCACGG

配列番号 16 GTCCTTATATAAGAGGACTCT

DN2 部位：

配列番号 17 GACATGAACATGAGATGATT

配列番号 18 GCTGTGCCCTTGGGTGGCTTT

DN3 部位：

配列番号 19 GATTGAGACCTTCGTCTGCG

配列番号 20 GTCGCAGAAAGATCTCAATCT

DN4 部位：

配列番号 21 GATATGGGTGAGGCAAGTAGT

配列番号 22 GTCAATCTTCTCGAGGACTG

【0110】

複製中の HBV ccc ゲノムが 4ヶ所のダブルニッキング切断を受けると、完全切断の場合 4つの DNA 断片となる。それぞれの断片は細胞内の修復機構により両端が結合して環状化する (図 11 中央、点線で最大断片の結合部位を示す)。それぞれの環状 DNA は HBV ゲノムの大半が欠失しており、DNA 複製することができない。その中で最大環状 DNA (図 11、右側) を PCR により検出した。この場合、複製 HBV ゲノム生成アデノウイルスベクターにより生じたばかりでまだ切断を受けていない複製中の全長環状 DNA ゲノム (図 11、左端) も同時に検出される。PCR プライマーの配列は、配列番号 23 および 24 であった。

フォワードプライマー：

配列番号 23 TTAACCTTCATGGGATATGTAATTGG

リバースプライマー：

配列番号 24 ACTCAAGATGTTGTACAGACTTGCC

【0111】

HBV複製ゲノムを得るために、HBVのS遺伝子の一部を欠失する、複製HBVゲノム生成アデノウイルスベクターAx-CM103G-ΔpreS (Suzuki, Saito, et. al., 2017, Vol. 7, pp. 41851)をHepG2細胞へmoi3で感染し、環状HBVゲノムが複製している3日後(day 0)に、4ヶ所でダブルニッキング切断を行う8ガイド発現ベクターとCas9ニッカーゼ(NC9)あるいは本来のCas9を発現するアデノウイルスベクターをそれぞれmoi7で共感染させた。そして共感染後3日目、および7日目で細胞全DNAを抽出し、図11右端で示したプライマーを用いて環状DNAを検出した。

【0112】

図12における「cont」はインサートをDNA持たないいわゆる空ベクターを感染したコントロールであり、複製HBVゲノム生成アデノウイルスベクターにより生成したHBVゲノムが複製した(2.8kb、全レーンに共通(図12))。一方、4ヶ所でダブルニッキング切断を行う8ガイド発現ベクターとCas9ニッカーゼ発現ベクターの共感染を行った場合は、その感染後7日目において、複製HBVゲノム生成ベクターから生ずる未切断のHBVゲノム(2.8kb)の量は、HBVゲノムが自由に複製するコントロールにくらべて約5分の1に減少していた(図12、マーカー(m)のレーンを除いた左から4番目と5番目のレーン、day7のcontとNC9で2.8kbのバンドの濃さを比較)。一方、ダブルニッキング切断によりHBVゲノムの大部分を失った欠失環状DNA(1.4kb、図11の右端)が出現し、その量は複製中の2.8kbHBVゲノムの量よりはるかに多かった。また*印のバンドはコントロールでも見られることから非特異的に生じるバンドである。この実験系ではHBVゲノムは、複製HBVゲノム生成アデノウイルスベクターから常に供給され続けているため2.8kbのバンドがなくなることはないこと、不完全切断で生じるバンドがほとんど検出されないことを考えると、4ヶ所のダブルニッキング切断を行うアデノウイルスベクターでの切断効率は非常に高いと考えられた。

【0113】

Cas9ニッカーゼ発現ベクターの代わりに本来のCas9発現ベクターを共感染させた実験も同時に行った。この場合は、本来のCas9により4組8ヶ所の同時切断が行われるが、その切断効率は4ヶ所ダブルニッキング切断を行った場合より低かった(マーカー(m)のレーンを除いた左から5番目と6番目のレーン、day7のNC9とCas9を比較)。この結果は本来のCas9の切断の末端は平滑端であり容易に再結合し元の構造に戻るのに対し、ダブルニッキング切断の末端は数十塩基の1本鎖DNAが生じる結果、修復されにくいと考えられる。

またその修復時には数十塩基の欠失が起こる結果、本来のCas9では予想される1.5kbの欠失DNAが検出されるのに対し、ダブルニッキングではそれより短い1.4kbのバンドが検出されることが説明できる。以上の結果により、4ヶ所のダブルニッキング切断を起こす8ガイド発現アデノウイルスベクターは、高い切断効率と安全性を兼ね備えている可能性が示唆された。

【0114】

[実施例6]

12個のガイドRNAを同時発現するアデノウイルスベクターの作成

8個のガイドRNA発現ユニットを含有するアデノウイルスベクターの作成(図7参照)と同じ方法で、12個のガイドRNA発現ユニット(単一ガイドRNA)を含有するアデノウイルスベクターの作成を試みた。使用したガイドコーディングDNA配列は、上記した配列番号5~12に示す8個と、X遺伝子終止コドン近傍及びその下流にある以下の配列番号39~42に示す4個であった。

配列番号39 G C A G A G G T G A A A A G T T G C A
配列番号40 G A C A T G A A C A T G A G A T G A T T
配列番号41 G C T G T G C C T T G G G T G G C T T T

配列番号 42 G A A G C T C C A A A T T C T T T A T A

【0115】

図7に示す8個のガイドRNA発現ユニットを含有するアデノウイルスベクターの作成に用いたコスミドは、その8個のガイドRNA発現ユニットの左端に、他に切断配列のないSgrDIクローン化部位を持っていた。そこでこの部位に上記した配列番号39～42に示すガイドコーディングDNA配列を有する4個のガイドRNA発現ユニットを挿入し、得られたコスミドを用いて12個のガイドRNA発現ユニットを含有するアデノウイルスベクターを検討した。

【0116】

分離した6個の独立したアデノウイルスベクタークローンを調べた結果、図13の左側の図に示すように、5個のクローンでは12個のユニットのいくつかが欠失して生じたと見られるウイルスゲノムによる断片（*印で示す）が見られた。しかし1個のクローン（クローン6、レーンを囲みで示す）ではこの欠失を示すバンドがほとんど見られなかったこと、12個のユニットを持つ5.5kbの断片の量は近接した5kb弱のベクターバックボーンに由来するバンド（5kb弱の2個の近接したAで示す）の量よりやや少ない程度であったため、このウイルス調製ストックはユニットを欠失したベクターの混入がほとんどなくその大部分が12個のユニットを欠失なく保持したベクターであると考えられた。すなわち12個のガイドRNA発現ユニットを持つアデノウイルスベクターの作成では8個の場合と異なり、ほとんどのクローン調製では欠失をもつベクターの混入が明らかに認められたが、驚くべきことに12個ものガイドRNA発現ユニットを持つアデノウイルスベクターの作成において欠失をもつベクターの混入が非常に少ないウイルス調製ストックを得ることが可能であった。

【0117】

当該ウイルスストックは初代のウイルスストックを1回継代してベクターを増幅させた2代継代ストックである。さらに継代による増幅を行い、3代継代ストック、4代継代ストックで12個のガイドRNA発現ユニットは安定に保たれているかを検討した。その結果を図13の右側の図に示す。その結果、4代継代ストックに置いても12個のユニットを持つ5.5kbの断片は明らかなバンドとして認められ、その量は近接した5kb弱のベクターバックボーンに由来するバンドの1/2から1/3程度であると考えられた。本実験では6クローンを調べただけであり、さらに多くのクローンを調べれば、より欠失ベクターの混入が少ないストックを得ることが可能であろうと考えられた。

【0118】

【実施例7】

12個のガイドRNAを同時発現するアデノウイルスベクターによる染色体上のHBV-X遺伝子の効率的破壊

【0119】

4代あるいは5代継代ストックは一般的に通常の培養細胞を用いた実験に使われる。このベクターストックを図9および図10で示した8個のガイド発現ユニットをもつベクター用いたものと同じ細胞に同じ実験条件で感染させ、染色体DNAに組みこまれているX遺伝子を対象として、このベクターから発現する12個のガイドRNAの全てが機能しているかを検討した。新たに加えられた4個のガイドRNAは図14の最下段に示すcut5の配列、およびX遺伝子から染色体上に組み込まれたDNA末端のMslI部位までの配列の2つの配列を標的とする（他の2個のガイドRNAの標的配列はX遺伝子の外にあり、この細胞の染色体上には存在しない）。MslI部位までの標的配列はその5'端の1塩基が異なっているため、8ガイドRNA発現ユニットで標的配列が1塩基異なる場合と同様に切断を起こさないと考えられた。

【0120】

12個のガイドRNA発現ユニットを持つアデノウイルスベクターを用いた上記の感染実験の結果を図15に示す。8個のガイドRNA発現ユニットを持つアデノウイルスベクターを用いた実験結果（図10）と同様に、cut1からcut4までの欠失を示す0.

42 kbのバンドは予想通り確認された。さらに新たに加えた4個のガイド発現ユニットで予想されるcut5の切断からcut1の切断までの欠失を示す0.30 kbのバンドが明らかに見られた。また未切断から生ずる0.54 kbのバンド、上記の0.42 kbおよび0.30 kbのバンドの間にある複数のバンドの位置は、これらのcut1、cut4およびcut5以外のcut2、cut3がこれらと同時に切断された時に生ずるバンドの位置とほぼ一致していた。以上のことから、12個ものガイドRNA発現ユニットを持つアデノウイルスベクターで切断を起こすことが予想されるガイドRNAはすべて機能していたことが示された。

【0121】

〔実施例8〕

Casタンパク質をコードするDNA断片とガイドRNA発現ユニットを含有する一体型アデノウイルスベクターの作成

完全長DNA導入法を用いて、Cas9タンパク質をコードするDNA断片と4個のガイドRNA発現ユニット（単一ガイドRNA）を含有するアデノウイルスベクターの作成を試みた。使用したガイドコーディングDNA配列は、配列番号1～4と同一であった。Cas9タンパク質をコードするDNA断片が、4個のガイドRNA発現ユニットの上流に位置するように構成されたアデノウイルスベクター（inward）と、Cas9タンパク質をコードするDNA断片が、4個のガイドRNA発現ユニットの下流に位置する（outward）ように構成されたアデノウイルスベクターの二種類を取得した。図16の上段にはアデノウイルスベクターのゲノム構造を示し、右側の四角形は4個のガイドRNA発現ユニットを、また中央下の三角形はE3領域の欠失を示す。

【0122】

通常、完全長DNA導入法を用いたアデノウイルスベクターの作製では、最終段階のコスミド及び親アデノウイルスベクターを共形質導入した293細胞の組換え培養において、形質導入後10日間培養した後に目的の組換えアデノウイルスベクターを取得する。

【0123】

今回、当該培養期間を20～24日継続することで、初めて目的の組換えアデノウイルスベクターを取得することが可能となった。一般に293細胞を20～24日間継続培養することは困難であり、また、Cas9タンパク質をコードするDNA断片のみを含有するアデノウイルスベクターを製造することも単純なプロセスではないことに鑑みれば、上記Cas9タンパク質をコードするDNA断片と4個のガイドRNA発現ユニットを含有するアデノウイルスベクターを取得できたことは驚くべき結果である。

【0124】

また、上述のとおり、ガイドRNA発現ユニットは共通DNA配列を有しており、20～24日間もの長期間培養後に、4個のガイドRNA発現ユニットを維持されていたことも予想外の結果であり、その理由は不明である。

【0125】

〔実施例9〕

4個のガイドRNAによるダブルニッキング2ヶ所切断を行う一体型アデノウイルスベクターを用いたマウスH2Aa遺伝子のin vivo破壊

ノックアウトする標的遺伝子であるマウスH2Aa遺伝子のエクソン1の配列を図17に示す。エクソン1は5'キャップ部位および開始コドンを含み、その下流に設定した2組のダブルニッキング切断（DN切断）を行う4個のガイドRNA標的配列（1～4）の位置を示している。ガイドコーディング標的配列は既に記した配列番号1～4である。またPCR増幅に用いたプライマー配列を以下に示す。

フォワードプライマー（F-primer）

配列番号25 TTGGATCCAAAGTCTGCAGCTGGCAACTTTGACG

リバースプライマー（R-primer）

配列番号26 AAAGAATTCTACACTACAGGTACAAAGGGCTTCAG

10

20

30

40

50

【0126】

上記で作製された、マウスH2Aa遺伝子を標的とする4個のガイドRNA発現ユニット（単一ガイドRNA）とCas9ニッカーゼ発現ユニットを併せ持つ一体型アデノウイルスベクターを精製し、新生仔マウスに静注することにより、*in vivo*における遺伝子破壊効率および4個のガイドが機能しているかについてT7E1アッセイ法により検討した（図18）。

【0127】

その結果、ベクター投与後7日目において、無修飾のゲノム断片を示す0.56 kbのバンドに加えて、コントロール（ベクター無投与、マーカーのレーンを除く左から2番目のレーン（Controlの+））では観察されない、DN領域が酵素により除去されて生じた約0.33 kbおよび0.16 kbのバンドが、4匹のマウス（4g out-m1、4g out-m2、4g in-m3、4g in-m4）全てにおいて観察された。また、ベクター投与後15日目でも、同様のシグナルが観察された（下段）。一般的に行われているCas9酵素と1個のガイドRNAによるゲノムDNA切断では、切断されたゲノムDNAは末端結合（end joining）修復とCas9切断を繰り返すうちに微小挿入欠失を生じ、標的20塩基配列と異なる配列となるため反応が停止する。T7E1アッセイは2本鎖DNAであるPCR断片を熱変性し対合させることにより生じた1本鎖DNAと2本鎖DNAの分岐部を切断し2本のバンドを生じるため、この2本のバンドのサイズは未切断の断片のサイズと微小しか変わらない。しかしCas9ニッカーゼによるダブルニッキングは1ヶ所の切断で標的DNA部位に数十塩基のランダムな長さの欠失を引き起こすことが発明者の実験から明らかにされている。その結果として生ずるDNA断片は、上流端から約160塩基下流のガイド1とガイド2によるランダムなDN切断の周辺まで、およびガイド3とガイド4によるランダムなDN切断周辺から約330塩基下流の下流端までの幅広いバンドになると考えられる。すなわち二つのDN切断の間のDNAが欠失除去される結果、この2つのバンドサイズの差は除去される領域のサイズを示していると考えられる。本実験では予想された0.33 kbおよび0.16 kbのバンドが認められたことから、二つのDN切断間の約70塩基が欠失していること、従って4個のすべてのガイドRNAが同時に機能していることが示された。8匹全てのマウスのレーンについて、欠失効率は17%および19%であった。これらの結果から4ガイド発現一体型ベクターによりダブルニッキング切断が起こったと考えられた。

【0128】

[実施例10]

8個のガイドRNA発現ユニットとCas9ニッカーゼ発現ユニットを持つ一体型アデノウイルスベクターの作製

アデノウイルスゲノムがウイルス粒子にパッケージされる上限のサイズは38.0 kbであり、E3領域を短縮したベクターゲノムのサイズは30.2 kbであった。従って組み込める外来DNAは最長で約7.8 kbである。またCas9ニッカーゼの発現ユニットは5.3 kbあるため、多重ガイド発現ユニットに使える長さは2.5 kbまでである。一方、1個の通常のガイド発現ユニットのサイズは約0.4 kbであるから、8個のユニットの長さは3.2 kbであり、2.5 kbをはるかに超えるため、通常の発現ユニットでは作製することは不可能である。

【0129】

そこで発現ユニットの中にあるU6プロモーターの短縮を試みた。図19はガイドRNA発現ユニットの構造を示す。U6プロモーターは2つの必須エレメント（DSEおよびPSE）を持ち、その中間の領域は欠失しても活性を保持することが基礎研究において知られている（例：Stunlel et al., *Molec. Cell. Biol.*, 1997, vol. 17, No. 8, pp. 4397-4405）。しかしU6プロモーターの大きさは通常の目的には十分に小さいため、中間領域の欠失したU6プロモーターは応用研究ではほとんど使われていない。通常のU6プロモーターをもつプラスミドに、下記および図19に示すPCRプライマーを用いて、このDSEおよびPSEエレメン

トの中間部分の135塩基を含まず、これ以外のプラズミド部分全体を持つ断片を調製した。次いでこの断片をBsrGIで切断し、さらにKlenow酵素により平滑化した後セルフライゲーションすることにより、結合端がSnaBI配列(TGTACGTACA)となる短縮U6プロモーターを持つプラズミドを得た。図19では欠失させた部分を白抜きの矢印で示した囲みで示す。またU6プロモーターの3'端6塩基(-6から-1の位置)をBamHI認識配列とした。用いたプライマーの塩基配列を下記に示す。

DSE配列を含むリバースプライマー

配列番号27 GCGTGTACAGTATATGCAAATATGAAGGAATCATGGG

PSE配列を一部含むフォワードプライマー

配列番号28 GCGTGTACAAAATGGACTATCATATGCTTACCGTAAC

この結果各ガイドRNA発現ユニットのサイズは0.4kbから約0.28kbに短縮され、8ガイド発現ユニットの長さは約2.3kbとなり、ベクターに組み込める上限サイズの2.5kbをわずかに下回ったため、8個のガイドRNA発現ユニットを持つ一体型ベクターが作製できる可能性が得られた。

【0130】

ノックアウトする標的遺伝子であるマウスNTCP遺伝子のエクソン2の配列を図20に示す。エクソン2は開始コドンを含み、その下流に4組のダブルニッキング切断(DN切断)を行う8個のガイドRNA標的配列(1~8)を設定した。本実験では4ヶ所のダブルニッキング切断を1つのエクソン内に近接して設定しているが、2つの遺伝子の2ヶ所切断による破壊、あるいは4つの異なる遺伝子の同時破壊を行うように設定することも可能である。この標的配列をもつ8ガイドRNA発現ユニット作製に用いた標的20塩基の配列を以下に示す。

配列番号29 GCGGCAGGGAGAAATTGAAG

配列番号30 GCCGCCTGGCTTTGGCCACC

配列番号31 GATGAAAGACCTTGCACAGA

配列番号32 GCTCTGGCCATCCTCATCTG

配列番号33 GATACCGTACTGGGCCACTA

配列番号34 GCCCCTCAGTGCTTTTCCTTC

配列番号35 GAGGTTTCATGTCCCCCTTCA

配列番号36 GGACCGAGGGTTAAGAGGAA

【0131】

上記短縮U6プロモーターを持つ8個のガイドRNA発現ユニットおよびCas9ニッカーゼ発現ユニットを持つ一体型アデノウイルスベクター(図21上段)の作製を行った。293細胞へベクターゲノム全長DNAをトランスフェクションしウイルスベクターを得たが、ウイルスが増殖してクローンが得られるまでの期間は通常2週間であるのに対し、4ガイド発現一体型ベクターと同様にやはり3週間に要した。しかし4ガイド一体型ではすべてのクローンが欠失なく4ガイドユニットを保持していたのに対し、8ガイド一体型では6クローンのほとんどのクローンでユニットの欠失が見られたが(図21下段の左)、欠失なく増幅していたクローンを得ることができた(No.6;3.0kbのバンドが8ガイド発現ユニットを含む。このクローン以外では*で示す欠失ユニットを含むバンドが見られる)。このウイルスクローンを継代することにより動物実験が可能な量の精製ウイルスを調製したところ、大部分のウイルスDNAは8個のユニットを保持しており(図21下段の右;3.0kbのバンド)、8ガイドRNA同時発現実験が可能であることが示唆された。現在までに3種類の8ガイドRNA発現一体型ベクターの作製に成功したが、ほぼ同様な結果であった。

【0132】

[実施例11]

ダブルニッキング法による4ヶ所同時切断を行う一体型アデノウイルスベクターを用いた

マウスNTCP遺伝子の *in vitro*における破壊

4ヶ所のダブルニッキング切断を行うよう設計された一体型アデノウイルスベクターによる標的遺伝子の破壊を検討した。アデノウイルスはヒトに感染するウイルスであり、図9に示すようにヒト由来の培養細胞株（HepG2）の染色体上にあるHBV遺伝子の破壊効率は約90%であった。しかし今回の標的はマウス遺伝子であるためマウス培養細胞での実験が必要であるが、マウス細胞へのアデノウイルスベクターの導入効率はヒト細胞にくらべて約100分の1以下であり、実験が難しい。しかしながらこのベクターをマウス初代繊維芽細胞（MEF細胞）に図9の実験の30倍量のベクターを感染させることにより、56%の遺伝子の欠失破壊効率が得られた（図22左）。また約150塩基の欠失が見られたことから、ガイドRNA1、2とガイドRNA3、4の同時切断による欠失、あるいはガイドRNA3、4とガイドRNA7、8の同時切断による欠失が効率よく行われていることが示唆された（図20参照）。1つの欠失は4個のガイドRNAが同時に機能してニックをいれたことを示すものであるから、複数のダブルニッキング切断による1つの欠失が示されたことは、効率のよい安全な遺伝子の破壊が可能であることを示唆していると考えられる。またウイルス感染量（moi）100および300のレーンに置いてPCR断片全長の6.5kbのバンドの直下に数十塩基短いDNA領域を認めたが（*印で示す）、ダブルニッキングによる1ヶ所の切断は数十塩基の欠失を引き起こすことが発明者の実験から明らかにされており、この領域は複数ヶ所の同時切断による大きな欠失のみならず、4ヶ所あるいはいくつかの個々の切断部位において短い欠失による遺伝子破壊が行われたことを示唆するものである。

さらにウイルス感染量100および300において、0.5kbの位置にスミアの領域が観察されたが、このスミアの領域は長時間露光の同じ電気泳動ゲルの写真において、感染ウイルス量の増加に伴い濃くなることが示された（図22右の0.5）。また感染量100および300において0.3kbの領域を認めた。本PCRでは欠失がない場合は0.65kbのバンドを生ずるが、0.5kbおよび0.3kbの領域はそれぞれ約150塩基および350塩基の欠失により生じたと考えられる。この長さは予想された（図20の3つの点線で示す）ガイド1と2およびガイド3と4の間の欠失、あるいはガイド3と4およびガイド7と8の間の欠失、そしてガイド1と2およびガイド7と8の間の欠失の長さとも一致した。すなわち8個のガイドのほとんどが同時に機能して欠失を引き起こしたと考えられた。以上の結果から、4ヶ所のダブルニッキング切断を行う8ガイドユニット搭載一体型アデノウイルスベクターにより、感染効率が低いマウス細胞においても複数の部位の同時切断が可能であることが示された。

【0133】

〔実施例12〕

8個のガイドRNAによるダブルニッキング4ヶ所切断を行う一体型アデノウイルスベクターを用いたマウスNTCP遺伝子の *in vivo*における破壊

上記8個のガイドRNAによるダブルニッキング4ヶ所切断を行う一体型アデノウイルスベクターを新生仔マウスへ静注し、マウスNTCP遺伝子の *in vivo*における破壊実験を行なった。その結果を図23に示す。15日目（day15）において2番（8g m2）、3番（8g m3）、4番（8g m4）のマウスとも1.05kbおよび0.85kbのバンドが認められた。この結果から8個のガイドRNAは多くのガイドRNAが機能して欠失を引き起こしたと考えられた。用いたプライマーの塩基配列を以下に示す。

プライマー-mNTCPint1-BbsI

配列番号37

GTCATGGACACAGCCTCTCCTGAAGACAGC

プライマー-mNTCPint2-AlwI

配列番号38

CCTTTACAGTGATCCTGTAGAGACTTCTGG

【0134】

[実施例 13]

4ヶ所のダブルニッキング切断を行う8個のガイドRNA発現ユニット(単一ガイドRNA)を有するレンチウイルスベクターの作成

目的遺伝子を発現させるためのEF1 α プロモーターを持ち、かつピューロマイシン(Pur)を発現するレンチウイルスベクター pLV SIN-EF1 α Pur(タカラバイオ社)をEcoRIとSbfIで切断し、Klenow酵素により平滑化して結合することにより、EF1 α プロモーター領域を欠失させたプラスミド pLV SINwPurを得た。これをSgrDIで切断しKlenow酵素で平滑化した末端とNheI末端を持つレンチウイルスベクター断片を、charomid9-36(Saito et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 1996, vol. 83, pp. 8664-8668)のSmaIとXbaIの間にクローン化して、コスミド chLVpur-wを得た。このコスミドをBstXIで切断しKlenow酵素処理後環状化して、BstXI部位を持たない40.1kbのコスミドカセットchLVpur-kx-wを得た。このコスミドは多重ガイドRNA発現ユニット断片をレンチウイルスベクターのSwaIクローン化部位に組み込むことにより、8ガイドRNA発現ユニットを持つアデノウイルスベクター作製用コスミドと同様に、ラムダファージのin vitroパッケージングを用いて、多重ガイドRNA発現ユニット断片を欠失させることなく大腸菌内で増幅させることができる。

【0135】

下記に記載した、X遺伝子を標的として4ヶ所のダブルニッキング切断を行う、8個のガイドRNAにおけるガイドコーディングDNA配列を含む8個のガイドRNA発現ユニットを含む断片を調製し、chLVpur-kx-wのSwaI部位に組込んだ43.2kbのコスミドchLVpur-g8DNHBxKKを得た。このコスミドは約30kbの不要なスペーサー配列を持つためトランスフェクションでレンチウイルスベクターを得るには不向きである。そこでスペーサー配列を切断するPhsAIでスペーサーを除去し、得られた8重ガイドRNA発現ユニットを持ちレンチウイルスベクターを含む14.4kbの断片が3個連結した43.2kbの三角形コスミドをNakanishiらの方法で作製した(Nakanishi et al., J. Gene Med., 2019, e3115)。このコスミドは多重ガイドRNA発現ユニットを欠失させることなく大腸菌で増幅させることができる。このDNAをApaIで切断し直鎖状にしてから293T細胞にトランスフェクションして、レンチウイルスベクター LVpur-g8DNHBxKKを得た。

【0136】

図24にX遺伝子上のガイドRNA標的配列の位置を示す。またダブルニッキングに用いた8個のガイドRNAにおけるガイドコーディングDNA配列を以下に示す。

配列番号43	A G A C A A A G G A C G T C C C G C G C
配列番号44	G A C C C G T C T C G G G G C C G T T T
配列番号45	G C C G G A A C G G C A G A T G A A G A
配列番号46	G G G G C G C A C C T C T C T T T A C G
配列番号47	G G T C T C C A T G C G A C G T G C A G
配列番号48	G A C C A C C G T G A A C G C C C A C C
配列番号49	G T C C T C T T A T G T A A G A C C T T
配列番号50	G A T G T C A A C G A C C G A C C T T G

【0137】

また欠失を検討するPCRのフォワードプライマーは、X遺伝子上流でこのX遺伝子発現ユニットの染色体導入に用いたネオ遺伝子内にある以下の配列番号51に示すものを用いた。

フォワードプライマー:

配列番号51	A T C T T A T C A T G T C T G G A T C A A A T C C G A A C G C
--------	---

なお、リバープライマーは実施例4においてX遺伝子を増幅したときに用いた配列番

号14のプライマーを用いた。

この2つのプライマーにより4通りのダブルニッキング切断を行うためのX遺伝子を含む0.66kbの断片が生成される。しかし配列番号43でU6プロモーターにより生成するガイドRNA(図24における「1」のガイドRNA)の5'端はAであり、U6プロモーターから生成するRNAの5'端はGが至適であるため、このガイドRNAの産生量は少ないと予想された。その結果このガイドRNAを片方にもつダブルニッキングの切断効率は低いことが予想された。

【0138】

細胞染色体DNAに組込まれたレンチウイルスベクターは8個のガイドRNAを発現し、そこにアデノウイルスベクターによりCas9、またはCas9ニッカーゼが供給されると、染色体上のX遺伝子DNA上の標的配列を認識し、8ヶ所の切断(Cas9)、または4ヶ所のダブルニッキング切断(Cas9ニッカーゼ)を起こすと考えられた(図24)。当該レンチウイルスベクターを含む293T細胞の培養上清を、X遺伝子を染色体上に持つGX11細胞に感染させ、6日後にCas9、若しくはCas9ニッカーゼを発現するアデノウイルスベクター(Cas9またはNC9と表記)または発現ユニットを持たないコントロールベクター(1w1と表記)をmoi5で感染させた。実験結果を図25に示す。

【0139】

図25は、Cas9、若しくはCas9ニッカーゼを発現するアデノウイルスベクター(Cas9またはNC9と表記)または発現ユニットを持たないコントロールベクター(1w1と表記)を感染させた6日後の結果を示す図である。HBVのX遺伝子および8ガイドRNA発現ユニットを持つレンチウイルスベクターを染色体上に持つ当該細胞にCas9発現アデノウイルスベクターを感染させた場合(レーンにCas9と記載)ではPCRで得られた0.66kbの全長断片が複数ヶ所切断されて生じたバンドが検出された。そのサイズから、0.58kbのバンドは「1」のガイドRNAと「3」のガイドRNA、または「5」のガイドRNAと「8」のガイドRNAとの同時切断により生成したと考えられた。同様に0.48kbのバンドは「1」のガイドRNAと「5」のガイドRNA、または「3」のガイドRNAと「8」のガイドRNAとの同時切断、0.38kbのバンドは「1」のガイドRNAと「8」のガイドRNAとの同時切断により生じたと考えられた。従って8個のガイドRNAのうち少なくとも「1」のガイドRNAと「8」のガイドRNAを含む複数のガイドRNAが機能していることが示された。一方Cas9ニッカーゼ発現アデノベクターの場合(レーンNC9)は、0.66kbの全長断片の下に特に0.60kbから0.55kbにかけてスメアの領域が見られ、複数のダブルニッキングによる多様なサイズの欠失が生じて、複数のダブルニッキング切断が起こっていることが示唆された。

本実験での結果は標的遺伝子の切断効率が一見高くないように見えるが必ずしもそうではない。通常レンチウイルスベクターを用いた実験ではベクターにピューロマイシン耐性遺伝子を組み込んで発現させることにより、レンチウイルスベクターが染色体内に組み込まれた細胞だけを選択した上で実験を行う。本実験に用いたレンチウイルスベクターもピューロマイシン耐性酵素を発現させているが、この実験ではピューロマイシン選択を行っていない。そのため大多数の細胞はこのレンチウイルスベクターを持っていないため非常の効率が低いように見えると考えられる。従ってピューロマイシン選択を行う一般的な実験においては、遺伝子切断破壊効率は本実験の結果より格段に高い可能性があると考えられる。

10

20

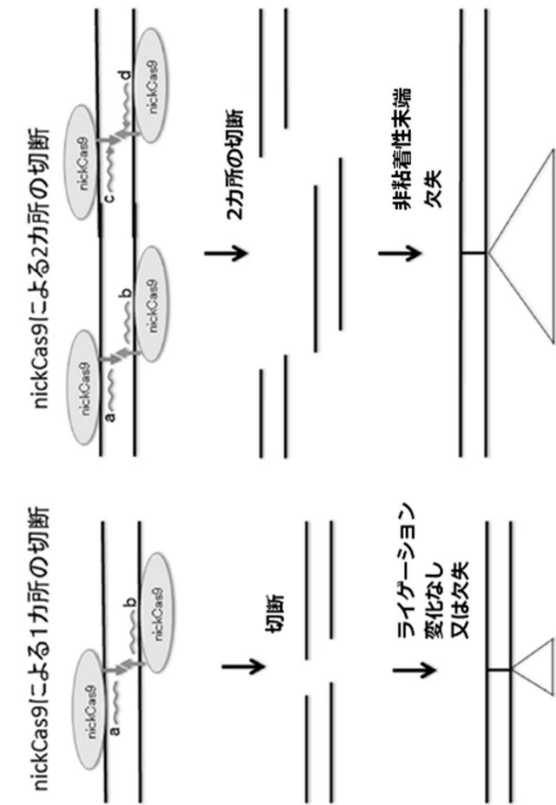
30

40

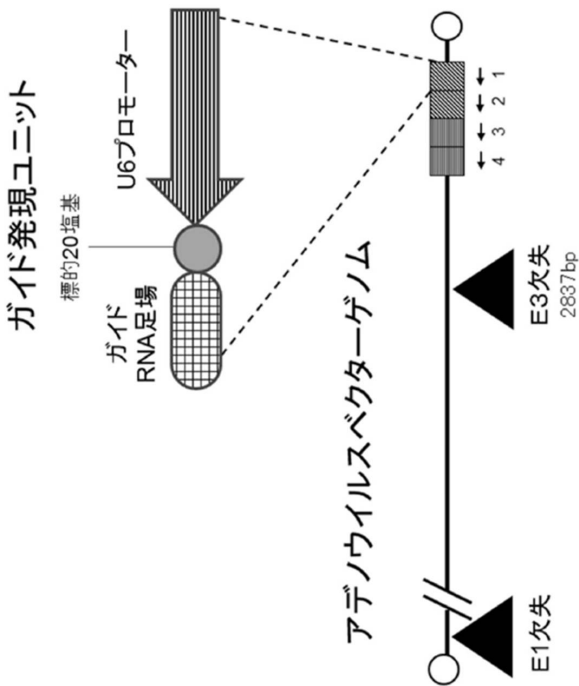
50

【図面】

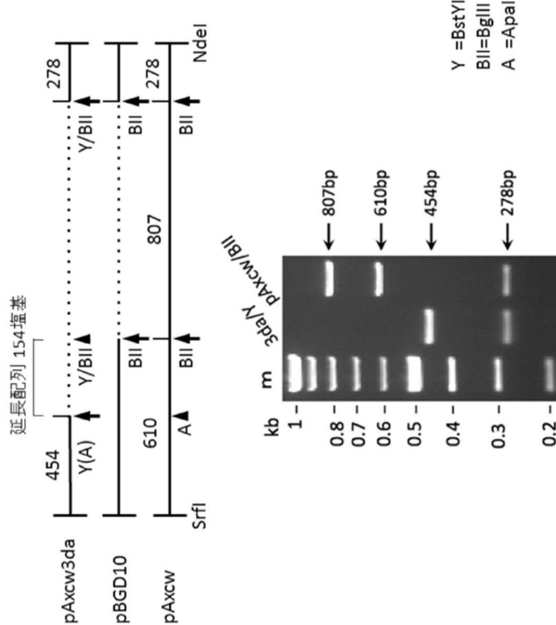
【図 1】



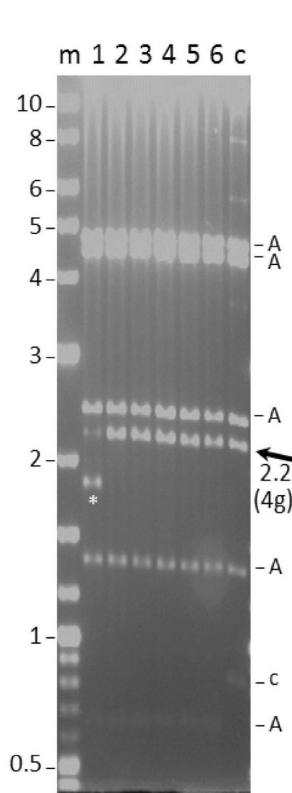
【図 2】



【図 3】



【図 4】



10

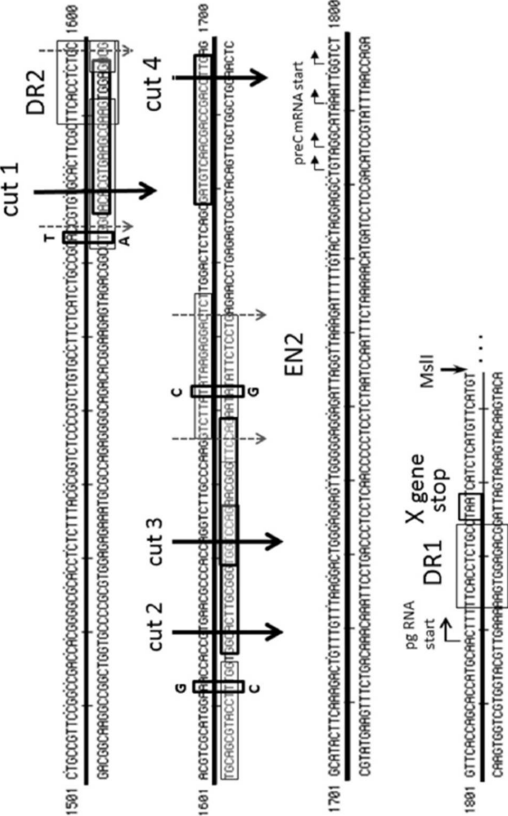
20

30

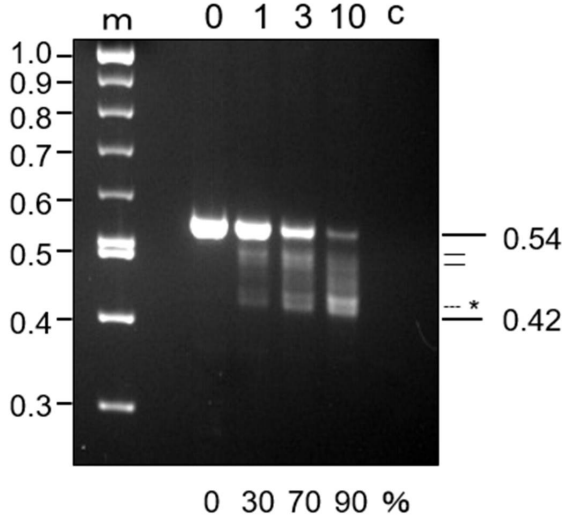
40

50

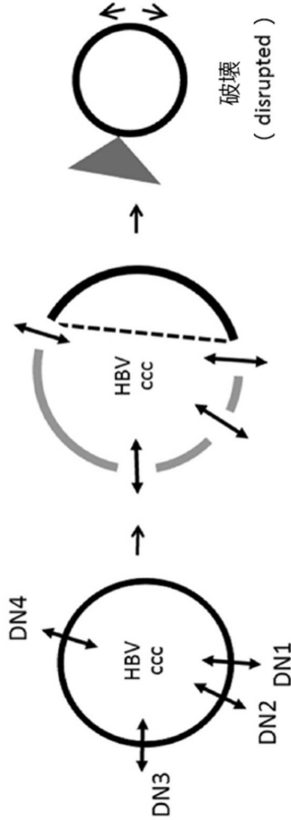
【図 9】



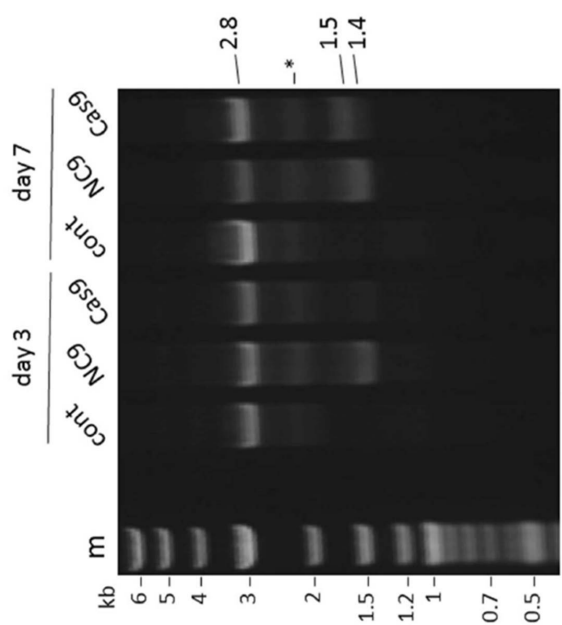
【図 10】



【図 11】



【図 12】



10

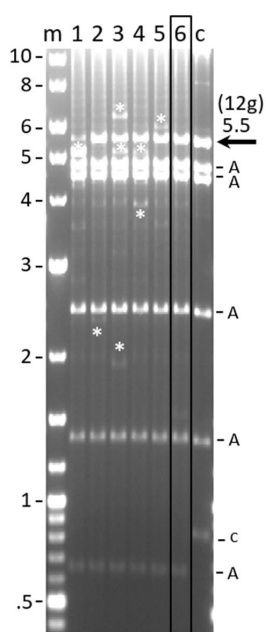
20

30

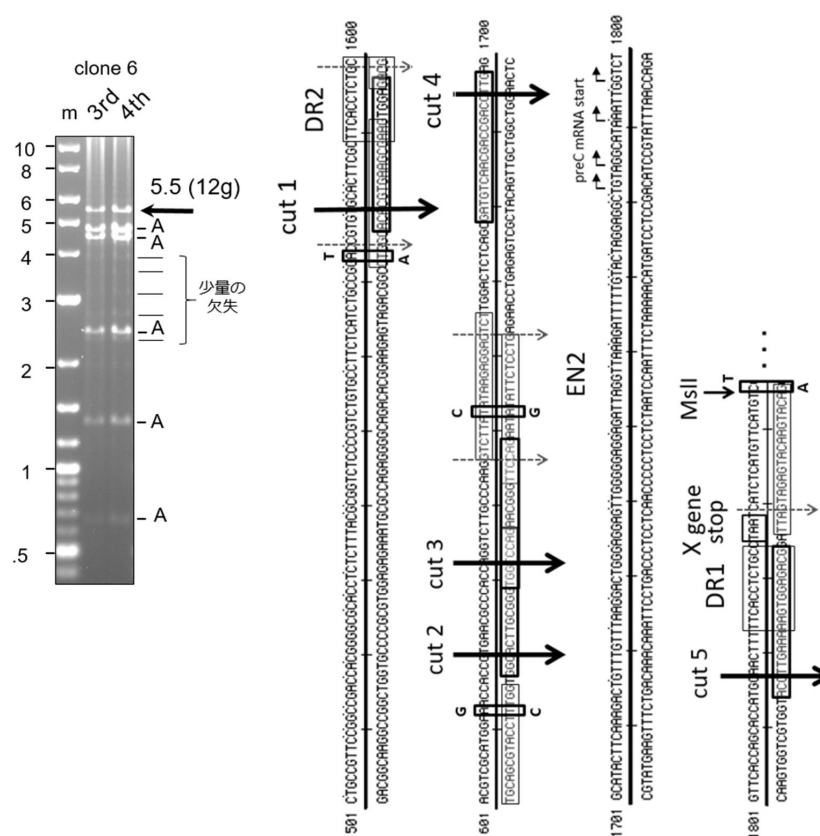
40

50

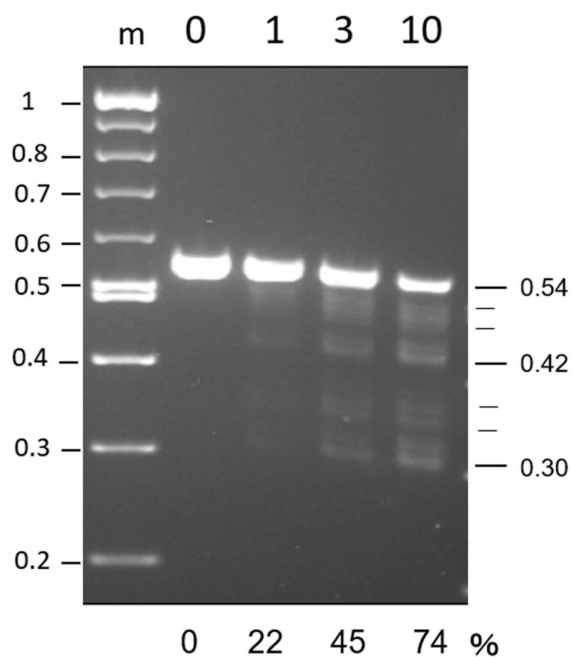
【図 13】



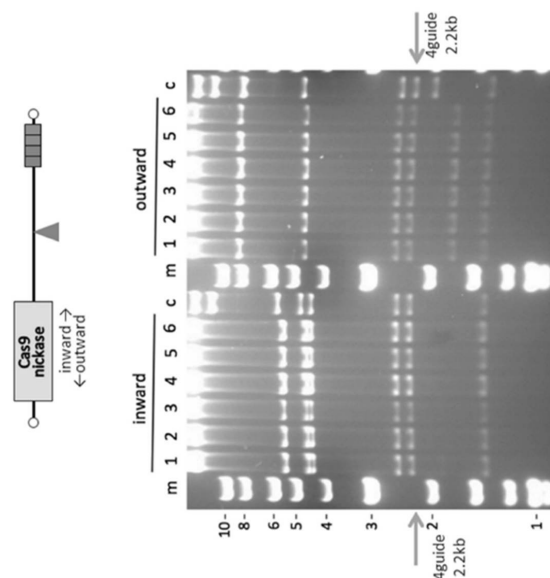
【図 14】



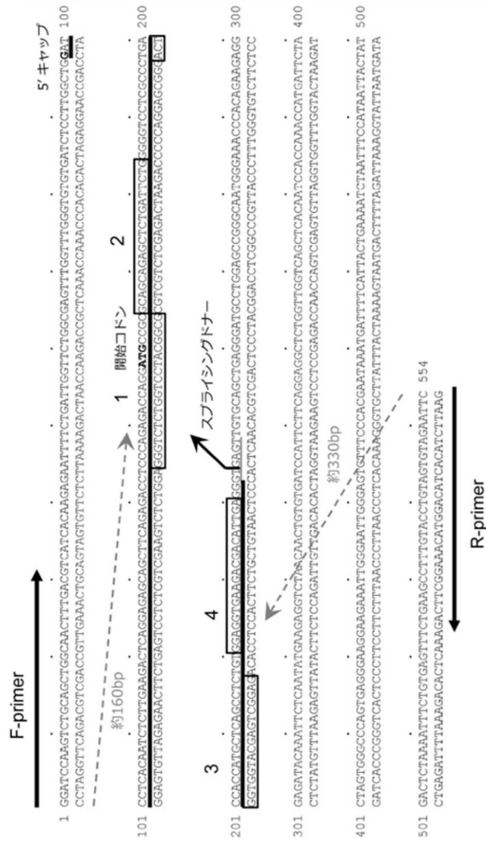
【図 15】



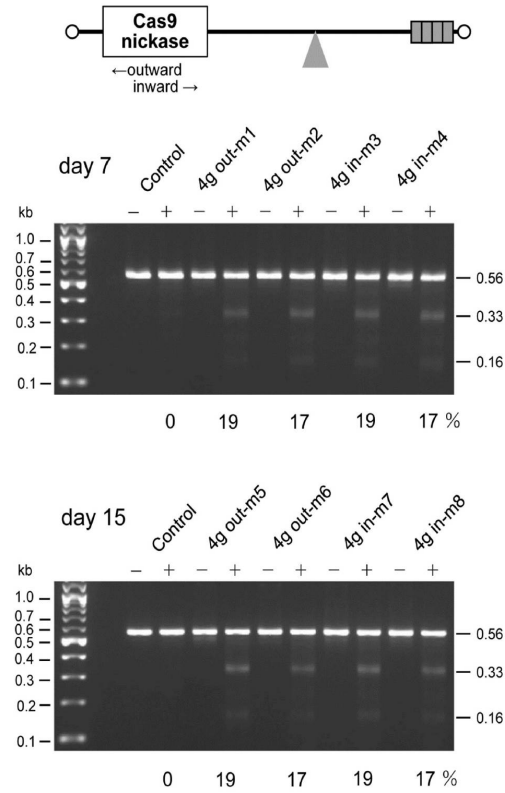
【図 16】



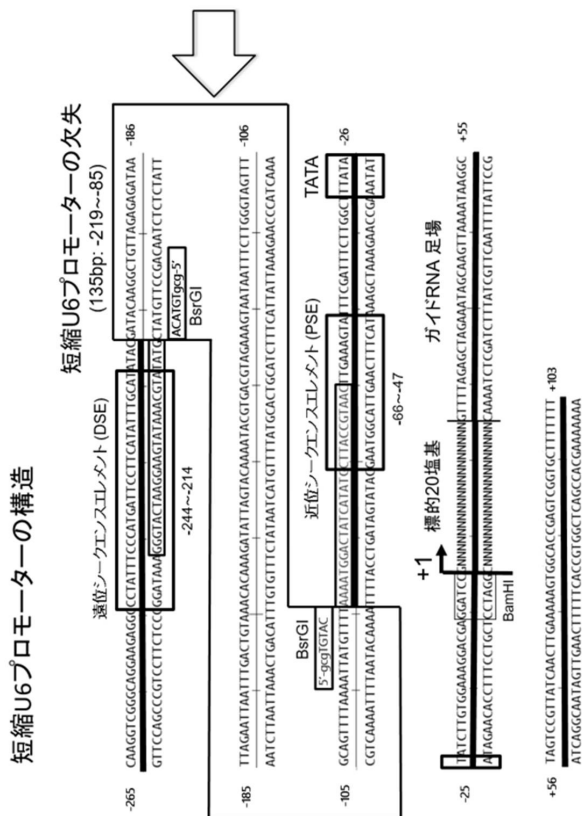
【図 17】



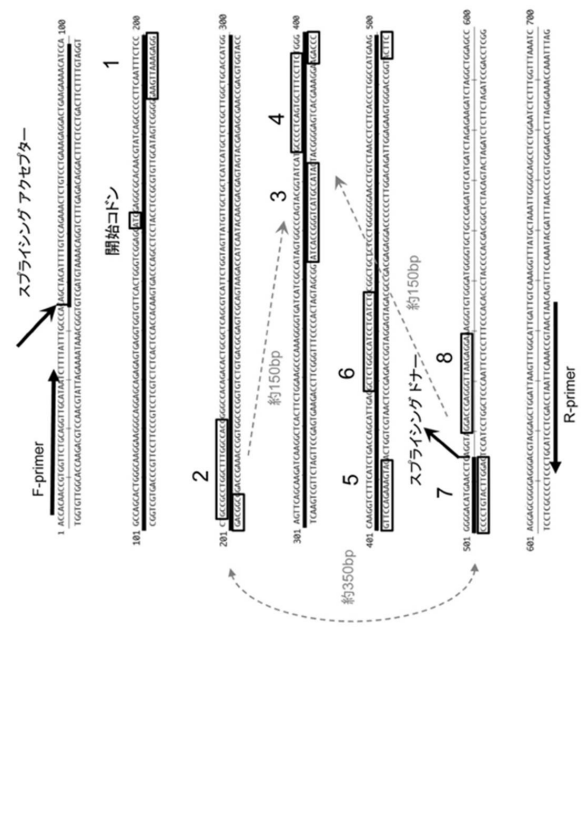
【図 18】



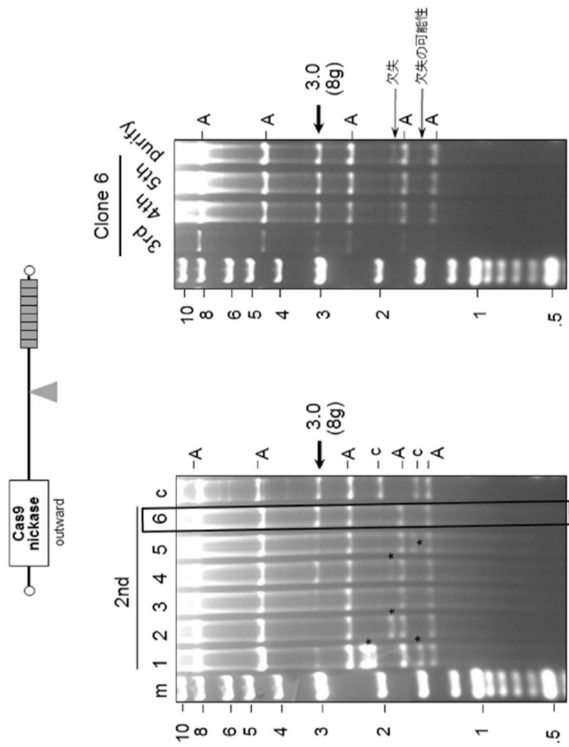
【図 19】



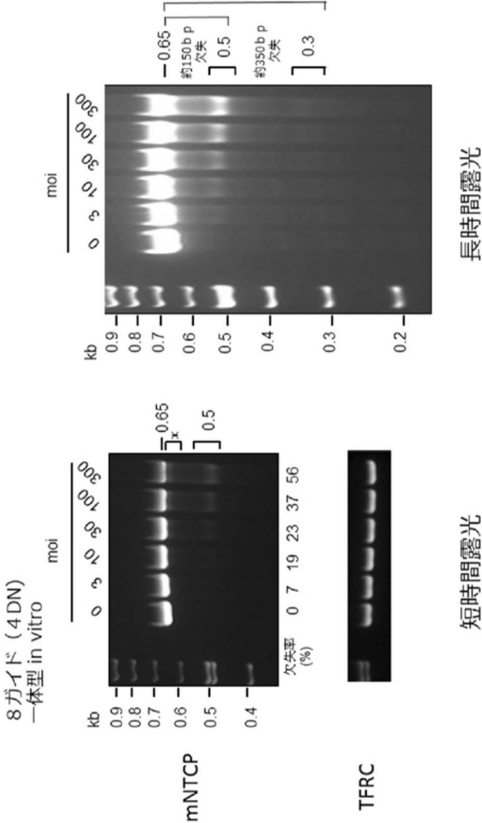
【図 20】



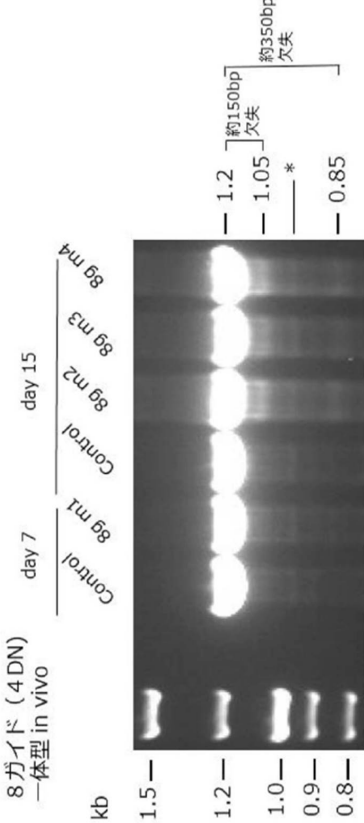
【図 2 1】



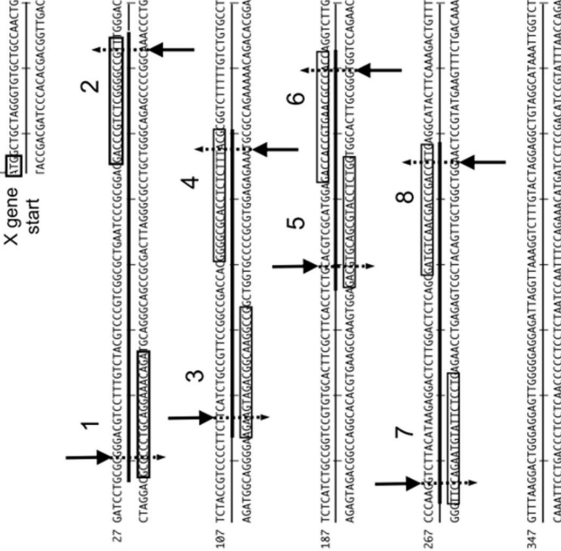
【図 2 2】



【図 2 3】



【図 2 4】



10

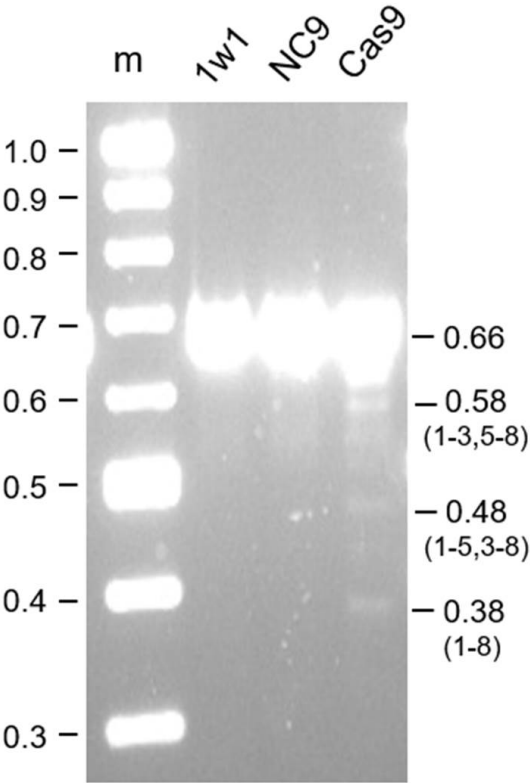
20

30

40

50

【図 2 5】



【配列表】

0007250031000001.app

10

20

30

40

50

フロントページの続き

上大崎3丁目14番23号 公益財団法人微生物化学研究会内

審査官 中村 俊之

(56)参考文献

特開2016-103986(JP, A)

特表2016-515822(JP, A)

BETT, A. J. et al., Packaging Capacity and Stability of Human Adenovirus Type 5 Vectors, Journal of Virology, 1993年, Vol.67, No.10, pp.5911-5921, Abstract, p.5919 右欄 l.19-40, Fig.2B

AMALFITANO, A. et al., Production and Characterization of Improved Adenovirus Vectors with the E1, E2b, and E3 Genes Deleted, Journal of Virology, 1998年, Vol.72, No.2, pp.926-933, Abstract, Fig.1B, p.928左欄 l.27-29

斎藤泉 他, 同時多数・高効率切断とoff-targetの解決をめざしたguide RNA発現ユニット多重連結をもつプラスミドおよびアデノウイルスベクター作成法の開発と応用, 日本分子生物学会年会プログラム・要旨集, 2016年, Vol.39th, #1P-0779, 全文

Multiplex genome engineering in human cells using all-in-one CRISPR/Cas9 vector system, Scientific Reports, 2014年, Vol.4, #5400

PRIELHOFER, R. et al., GoldenPiCS: a Golden Gate-derived modular cloning system for applied synthetic biology in the yeast Pichia pastoris, BMC Systems Biology, 2017年, Vol.11, #123, 全文、全図

SHAO, Y. et al., Cas9-nickase-mediated genome editing corrects hereditary tyrosinemia in rats, Journal of Biological Chemistry, 2018年03月, Vol.293, No.18, pp.6883-6892, 全文、全図

(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)

C12N 15/00-15/90

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

Caplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)