

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2025年5月8日(08.05.2025)



(10) 国際公開番号

WO 2025/094917 A1

(51) 国際特許分類:
C12N 15/09 (2006.01) C12N 5/0789 (2010.01)
C12N 5/10 (2006.01) C12N 15/12 (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2024/038444

(22) 国際出願日: 2024年10月29日(29.10.2024)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願 2023-185785 2023年10月30日(30.10.2023) JP

(71) 出願人: C 4 U 株式会社(C4U CORPORATION)
[JP/JP]; 〒5650871 大阪府吹田市山田丘 2 番 8
号 大阪大学テクノアライアンスC棟 7階 (JP).

(72) 発明者: 小堀 峻吾(KOBORI Shungo); 〒5650871
大阪府吹田市山田丘 2 番 8 号 大阪大学テクノ
アライアンスC棟 7階 C 4 U 株式会社内 (JP).
佐伯 涼太(SAEKI Ryota); 〒5650871 大阪府吹
田市山田丘 2 番 8 号 大阪大学テクノアライ
アンスC棟 7階 C 4 U 株式会社内 (JP).

(74) 代理人: 弁理士法人セントクレスト国際
特許事務所(CENTCREST IP ATTORNEYS);
〒1040031 東京都中央区京橋 2 - 8 - 2
1 仁大ビル9階 (JP).

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保
護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA,

BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN,
CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC,
EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR,
HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG,
KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU,
LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, MW, MX, MY,
MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL,
PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK,
SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA,
UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

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

添付公開書類:

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

(54) Title: METHOD FOR PRODUCING HEMATOPOIETIC STEM CELLS IN WHICH BCL11A GENE ENHANCER IS PARTIALLY OR ENTIRELY DESTROYED, AND KIT FOR USE IN THE METHOD

(54) 発明の名称: B C L 1 1 A 遺伝子のエンハンサーの一部又は全部が破壊された造血幹細胞の製造方法、及びその方法に用いるためのキット

(57) Abstract: This method for producing hematopoietic stem cells in which a BCL11A gene enhancer has been partially or entirely destroyed comprises a step for introducing, into hematopoietic stem cells, a CRISPR-Cas3 system including (A) to (C): (A) Cas3 protein, a polynucleotide that encodes the protein, or an expression vector containing the polynucleotide; (B) a cascade protein, a polynucleotide that encodes the protein, or an expression vector containing the polynucleotide; and (C) a crRNA targeting an BCL11A gene enhancer, a polynucleotide that encodes the crRNA, or an expression vector containing the polynucleotide.

(57) 要約: B C L 1 1 A 遺伝子のエンハンサーの一部又は全部が破壊された造血幹細胞を製造する方法であり、次の (A) ~ (C): (A) Cas3 タンパク質、該タンパク質をコードするポリヌクレオチド、又は該ポリヌクレオチドを含む発現ベクター、(B) カスケードタンパク質、該タンパク質をコードするポリヌクレオチド、又は該ポリヌクレオチドを含む発現ベクター、及び (C) B C L 1 1 A 遺伝子のエンハンサーを標的とする c r R N A、該 c r R N A をコードするポリヌクレオチド、又は該ポリヌクレオチドを含む発現ベクターを含む C R I S P R - C a s 3 システムを造血幹細胞に導入する工程を含む、方法。



WO 2025/094917 A1

明 細 書

発明の名称：

BCL11A 遺伝子のエンハンサーの一部又は全部が破壊された造血幹細胞の製造方法、及びその方法に用いるためのキット

技術分野

[0001] 本発明は、BCL11A 遺伝子のエンハンサーの一部又は全部が破壊された造血幹細胞の製造方法、及びその方法に用いるためのキットに関する。

背景技術

[0002] BCL11A (B-cell lymphoma 11A) は C2H2 型のジンクフィンガータンパク質であり、様々な遺伝子の発現制御に関与することが知られている。特に、BCL11A は成体の赤血球前駆細胞における γ -グロビンの発現を抑制し、胎児から成体への移行時における γ -グロビンから β -グロビンへの発現切り替えの主要な転写制御因子として機能する。ヘモグロビン (Hb) は、4つのグロビンペプチドから構成される4量体であり、胎児におけるヘモグロビンの主な形態は、2つの α -グロビンと2つの γ -グロビンとから構成される胎児ヘモグロビン (HbF) であるが、出生直前になると、BCL11A を主とする制御機構によって γ -グロビンの発現が抑制され、HbF は、2つの α -グロビンと2つの β -グロビンとから構成される成人ヘモグロビン (HbA) へと切り替えられる (Haydar Frangoul ら, N Engl J Med, 2021年, 384, p. 252-260 (非特許文献1))。ただし、出生後においても、全ヘモグロビン中には1%以下程度の割合でHbFが存在しており、HbF は酸素運搬能力が高いため、 γ -グロビンの発現量を増大、つまりHbFを増加させることで、 β -グロビンの変異や発現量の減少に起因する β -ヘモグロビン症 (hemoglobinopathy)、鎌状赤血球症 (SCD)、及び β -サラセミア等の異常ヘモグロビン症の臨床的重症度を軽減できること等が報告されている (非特許文献1; Elenoe C. Smith

ら, Blood., 2016年, Nov 10; 128(19): p. 2338-2342 (非特許文献2)。

[0003] そのため、例えば、前記異常ヘモグロビン症等の治療を目的として、特許文献1 (国際公開第2014/085593号) には、BCL11A遺伝子の発現を抑制した前駆細胞を製造する方法が記載されており、当該BCL11A遺伝子の発現を抑制する方法として、造血幹細胞においてBCL11A遺伝子と同じ第2染色体上の60,716,189~60,728,612内に変異を導入する方法が挙げられている。さらに、例えば、特許文献2 (国際公開第2019/113149号) には、BCL11A遺伝子のエンハンサー領域内にある+58 DHS (DNase I hypersensitive site) に変異を導入した造血幹細胞が記載されている。また、前記変異を導入する方法としては、それぞれ、ジンクフィンガーヌクレアーゼやCRISPR-Cas9システム、TALEN等の部位特異的ヌクレアーゼで前記部位を切断して変異を導入する方法が挙げられている。

先行技術文献

特許文献

[0004] 特許文献1: 国際公開第2014/085593号

特許文献2: 国際公開第2019/113149号

非特許文献

[0005] 非特許文献1: Haydar Frangoulら, N Engl J Med, 2021年, 384, p. 252-260

非特許文献2: Elenoe C. Smithら, Blood., 2016年, Nov 10; 128(19): p. 2338-2342

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0006] しかしながら、本発明者らがBCL11A遺伝子の発現抑制について検討したところ、例えば、上記のCRISPR-Cas9システムを用いて造血

幹細胞の BCL11A 遺伝子のエンハンサー領域内に変異を導入しても、これから分化させた赤血球前駆細胞における BCL11A 遺伝子の発現抑制は十分ではなく、その結果、BCL11A による γ -グロビンの発現抑制の解除が不完全となって γ -グロビンの発現量が十分に増大しないという課題を有することを見出した。また、CRISPR-Cas9 システムでは、ガイド RNA の標的配列が短い（通常、好ましくは 20 塩基程度）ことから、特異性が十分ではないという課題や、オフターゲットが生じてしまうという課題も有していた。

[0007] 本発明は、上記従来技術の有する課題に鑑みてなされたものであり、BCL11A 遺伝子の発現が特異的かつ十分に抑制された血球系前駆細胞に分化可能な造血幹細胞を高効率で製造することができる製造方法、及びその製造方法に好適に用いることができるキット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

[0008] 本発明者らは、上記目的を達成すべく鋭意研究を重ね、造血幹細胞において、BCL11A 遺伝子のエンハンサーを CRISPR-Cas3 システムによって破壊することを試みた。その結果、驚くべきことに、従来の CRISPR-Cas9 システムを用いた場合と比較して、当該エンハンサー内の目的部位（編集対象部位）におけるゲノム編集効率（欠損率）が低かったにもかかわらず、CRISPR-Cas3 システムによって前記エンハンサーを破壊した造血幹細胞から分化させた赤血球前駆細胞においては、 γ -グロビンの発現量が著しく高くなることを見出した。つまり、CRISPR-Cas3 システムを用いた場合には、CRISPR-Cas9 システムを用いた場合と比較して、目的部位のゲノム編集効率に対する BCL11A 遺伝子の発現抑制の成功率が高く、BCL11A 遺伝子のエンハンサーを特異的かつ高効率でより確実に破壊できることを見出した。さらに、CRISPR-Cas3 システムを用いた上記技術によれば、オフターゲットがほとんど確認されず、このように少ないオフターゲット頻度に対するオンターゲット効率も相対的にさらに高いことを見出した。したがって、CRISPR-Ca

s 3 システムを特に BCL 1 1 A 遺伝子のエンハンサーの破壊に用いることで、造血幹細胞において、当該 BCL 1 1 A 遺伝子のエンハンサーを特異的かつ高効率で破壊でき、その結果、当該造血幹細胞から分化された血球系前駆細胞において BCL 1 1 A 遺伝子の発現が十分に抑制されるため、CRISPR-Cas 3 システムは BCL 1 1 A 遺伝子の発現抑制のために特に有効であることを本発明者らは見出し、本発明を完成するに至った。

[0009] かかる知見により提供される本発明の態様は以下のとおりである。

[1]

BCL 1 1 A 遺伝子のエンハンサーの一部又は全部が破壊された造血幹細胞を製造する方法であり、

次の (A) ~ (C) :

(A) Cas 3 タンパク質、該タンパク質をコードするポリヌクレオチド、又は該ポリヌクレオチドを含む発現ベクター、

(B) カスケードタンパク質、該タンパク質をコードするポリヌクレオチド、又は該ポリヌクレオチドを含む発現ベクター、及び

(C) BCL 1 1 A 遺伝子のエンハンサーを標的とする crRNA、該 crRNA をコードするポリヌクレオチド、又は該ポリヌクレオチドを含む発現ベクター

を含む CRISPR-Cas 3 システムを造血幹細胞に導入する工程を含む、方法。

[2]

前記 crRNA のヌクレオチド配列が配列番号 : 27 に記載のヌクレオチド配列を含む、 [1] に記載の方法。

[3]

製造された造血幹細胞は γ -グロビンの発現量が増大した赤血球前駆細胞に分化可能である、 [1] 又は [2] に記載の方法。

[4]

[1] ~ [3] のうちのいずれか一項に記載の方法で得られた造血幹細胞

を対象に投与する工程を含む、前記対象の赤血球前駆細胞における γ -グロビンの発現量を向上させる方法。

[5]

[1] ~ [3] のうちのいずれか一項に記載の方法で得られた造血幹細胞を対象に投与する工程を含む、異常ヘモグロビン症の予防又は治療方法。

[6]

[1] ~ [5] のうちのいずれか一項に記載の方法に用いるためのキットであり、

次の(A) ~ (C) :

(A) Cas3タンパク質、該タンパク質をコードするポリヌクレオチド、又は該ポリヌクレオチドを含む発現ベクター、

(B) カスケードタンパク質、該タンパク質をコードするポリヌクレオチド、又は該ポリヌクレオチドを含む発現ベクター、及び

(C) BCL11A遺伝子のエンハンサーを標的とするcrRNA、該crRNAをコードするポリヌクレオチド、又は該ポリヌクレオチドを含む発現ベクター

を含む、キット。

発明の効果

[0010] 本発明によれば、BCL11A遺伝子の発現が特異的かつ十分に抑制された血球系前駆細胞に分化可能な造血幹細胞を高効率で製造することができる製造方法、及びその製造方法に用いることができるキットを提供することが可能となる。

[0011] BCL11A遺伝子のエンハンサーが破壊された造血幹細胞を赤血球前駆細胞に分化させると、かかる赤血球前駆細胞においては、BCL11A遺伝子の発現が抑制され、BCL11Aによる発現抑制が解除されて γ -グロビンの発現が誘導されるため、 γ -グロビンの発現量が増大する。したがって本発明は、 γ -グロビンの発現量が関与する疾患群の予防又は治療に有用である。さらに、CRISPR-Cas3システムを用いたこのような方法に

よれば、オフターゲットを回避することができるため安全性の観点からも有用である。

図面の簡単な説明

[0012] [図1]試験例1のデジタルPCRの結果として、Cas3タンパク質/Cascadeタンパク質 (Cas3タンパク質/(カスケードタンパク質複合体+crRNA))の導入量又はCas9タンパク質の導入量と、目的部位の欠損率(%Deletion)との関係を示すグラフである。

[図2]試験例1の定量PCRの結果として、Cas3タンパク質/Cascadeタンパク質 (Cas3タンパク質/(カスケードタンパク質複合体+crRNA))の導入量又はCas9タンパク質の導入量と、 γ -グロビンの相対発現量(Ratio to β -globin)との関係を示すグラフである。

発明を実施するための形態

[0013] 以下、本発明の好ましい実施形態を例に挙げてより具体的に説明するが、本発明はこれに限定されるものではない。

[0014] <BCL11A遺伝子のエンハンサーが破壊された造血幹細胞の製造方法>

本発明は、BCL11A遺伝子のエンハンサーの一部又は全部が破壊された造血幹細胞を製造する方法であり、

次の(A)～(C)：

(A) Cas3タンパク質、該タンパク質をコードするポリヌクレオチド、又は該ポリヌクレオチドを含む発現ベクター、

(B) カスケードタンパク質、該タンパク質をコードするポリヌクレオチド、又は該ポリヌクレオチドを含む発現ベクター、及び

(C) BCL11A遺伝子のエンハンサーを標的とするcrRNA、該crRNAをコードするポリヌクレオチド、又は該ポリヌクレオチドを含む発現ベクター

を含むCRISPR-Cas3システムを造血幹細胞に導入する工程を含む

、方法（本明細書中、場合により単に「本発明の製造方法」という）を提供する。

[0015] （BCL11A遺伝子、BCL11A遺伝子のエンハンサー、BCL11A遺伝子のエンハンサーが破壊された造血幹細胞）

「BCL11A遺伝子」は、C2H2型のジンクフィンガータンパク質であって、BAFクロマチンリモデリング複合体のサブユニットであるBCL11A（B-cell lymphoma 11A）をコードする遺伝子（ヒトBCL11A遺伝子のリファレンス番号（Gene ID）：53335）である。BCL11Aは、また、EVI9、CTIP1、DILOS、ZNF856、HBFQTL5、BCL11A-L、BCL11A-S、BCL11a-M、又はBCL11A-XLとも称される。BCL11Aは、造血系細胞において高度に発現し、胎児ヘモグロビン（HbF）から成人ヘモグロビン（HbA）へ移行する際の γ -グロビンから β -グロビンへの発現切り替えに寄与することが知られている。「 γ -グロビン」は、ヒトにおいてはHBG1遺伝子及びHBG2遺伝子によってコードされるタンパク質である。2本の γ -グロビン鎖は、2本の α -グロビン鎖と共に胎児ヘモグロビン（HbF）を構成し、これは通常出生後には成人ヘモグロビン（HbA）に置換される（非特許文献1）。

[0016] 「BCL11A遺伝子のエンハンサー」は、BCL11A遺伝子の転写を促進可能な転写因子が結合する領域であり、ヒトゲノムDNAでは、BCL11A遺伝子のイントロン内やBCL11A遺伝子上流又は下流に複数存在することが知られているが、本発明に係るBCL11A遺伝子のエンハンサーとしては、BCL11A遺伝子のイントロン内にあるエンハンサーであることが好ましい。本発明に係るBCL11A遺伝子のエンハンサー領域として、より好ましくは、ヒト第2染色体では60,489,054～60,501,476の領域（12,423bp）が挙げられる。また、前記転写因子として、BCL11A遺伝子のエンハンサーに結合するものとしては、GATA、STAT1、ELF1、KLF1、RREB1、TAL1等が挙

げられる。例えば、「GATA」は、GATA転写因子ファミリーに属するタンパク質であり、GF1、GF-1、NFE1、XLTT、ERYF1、NF-E1、XLANP、XLTD A、及びGATA-1とも称される。BCL11A遺伝子のエンハンサー領域のうち、GATAが結合する領域（GATA結合領域）としては、DNase I hypersensitive site (DHS) である、後述のDHS+55、DHS+58、DHS+62が挙げられる。

[0017] 「造血幹細胞 (hematopoietic stem cell: HSC)」は、自己複製し、血球系細胞の前駆細胞（本明細書中、場合により「血球系前駆細胞」という）へと分化する能力を有する細胞である。前記血球系細胞としては、白血球、赤血球、血小板、肥満細胞、樹上細胞、好酸球、好中球、単球、マクロファージ、顆粒球、T細胞、B細胞、NK細胞が挙げられ、前記血球系前駆細胞としては、白血球前駆細胞、赤血球前駆細胞、巨核球前駆細胞、顆粒球前駆細胞、プロB細胞、プロT細胞、プロNK細胞が挙げられる。本発明の製造方法に用いる造血幹細胞としては、例えば下記の本発明の治療方法により結果として γ -グロビンの発現量を向上させられるという観点から、 γ -グロビンを産生する細胞である赤血球前駆細胞に分化されることが好ましい。なお、本発明において、「造血幹細胞の血球系前駆細胞（好ましくは赤血球前駆細胞）への分化」とは、当該造血幹細胞自体が前記前駆細胞に分化することに加えて、当該造血幹細胞の自己複製に由来して産生された1つ又は複数の造血幹細胞がそれぞれ前記前駆細胞に分化して、1つ又は複数の前駆細胞を産生することも包含する意味である。

[0018] 造血幹細胞は、公知の多くの表現型、例えば、CD34+、CD38-を示す。本発明の製造方法に用いる造血幹細胞は、例えば、前記表現型を指標として、従来公知の方法又はそれに準じた方法により、末梢血、骨髓、臍帯、胎盤等から単離することができる。

[0019] 本発明に係る造血幹細胞の由来としては、動物、好ましくは、ヒト又はヒト以外の哺乳動物が挙げられ、前記ヒト以外の哺乳動物としては、例えば、

ウシ、イノシシ、ブタ、ヒツジ、ヤギ等の偶蹄類；ウマ等の奇蹄類；マウス、ラット、モルモット、ハムスター、リス等の齧歯類；ウサギ、イヌ、ネコ、フェレットが挙げられる。これらの中でも、本発明の製造方法で製造した造血幹細胞を対象に投与する場合、本発明の製造方法に用いる造血幹細胞としては、当該対象と同じ動物であることが好ましい。また、本発明の製造方法に用いる造血幹細胞としては、これら動物の末梢血、骨髓、臍帯、胎盤等から採取された細胞の他、動物を構成している細胞や動物から摘出された器官・組織を構成する細胞等に由来する培養細胞（例えば、誘導多能性幹（iPS）細胞等の幹細胞）であってもよい。

[0020] 本発明の製造方法は、BCL11A遺伝子のエンハンサーが破壊された造血幹細胞を製造する。なお、本発明において、単に「エンハンサーの破壊」といった場合には、エンハンサーの全部の破壊のみならず、一部の破壊も包含する。本発明の製造方法で得られる「BCL11A遺伝子のエンハンサーの一部又は全部が破壊された造血幹細胞」は、すなわち、BCL11A遺伝子のエンハンサーの一部又は全部が欠損又は置換（好ましくは欠損）されてそのエンハンサー機能が抑制される細胞であることを意味する。「BCL11A遺伝子のエンハンサー機能の抑制」とは、より具体的には、例えば、前記転写因子のうちの少なくとも1つ、好ましくは少なくとも1つ以上のGATAが結合しないことを示す。

[0021] BCL11A遺伝子のエンハンサーにおいて欠損又は置換される部位としては、少なくとも上記のヒト第2染色体では60,489,054～60,501,476の領域のうちの一部又は全部であることが好ましい。BCL11A遺伝子のエンハンサーにおいて欠損又は置換（好ましくは欠損）される部位としては、特に、前記GATA結合領域の一部又は全部であることが好ましく、より具体的には、次の3領域：DHS+55（ヒト第2染色体では60,498,289～60,498,552（264bp））、DHS+58（ヒト第2染色体では60,495,103～60,495,330（228bp））、及びDHS+62（ヒト第2染色体では60,490,

907-60, 491, 050 (144 bp)) のうちの少なくともいずれかであることが好ましく、これらのうちの2領域、さらには3領域全てにおいて、それぞれ、一部（例えば、75%以上）又は全部であることがより好ましく、3領域全てにおいてそれぞれ全部であることがさらに好ましい。

[0022] BCL11A遺伝子のエンハンサーの一部又は全部が破壊されていることの確認は、従来公知の方法に基づいて行うことができ、例えば、PCR法（デジタルPCR法、リアルタイムPCR法、エンドポイントPCR法等）、配列決定法、サザンブロットリング法、次世代シーケンシング法等により確認することができる。

[0023] (CRISPR-Cas3システム)

CRISPR-Casシステムは、目的領域（切断対象領域）を複数のタンパク質の複合体により切断するクラス1と、1つのタンパク質により切断するクラス2とに分かれる。これまでゲノム編集ツールとして開発されてきたCRISPR-Cas9システムやCRISPR-Cas12 (Cpf1) システム、CRISPR-Cas13システム等は、全てクラス2に分類されるが、本発明に係るCRISPR-Cas3システムはクラス1のタイプIに属する。タイプIシステムについては、複数のサブタイプに分類されており、現在では、タイプI-A、I-B、I-C、I-D、I-E、及びI-F、及びタイプI-BのサブタイプであるタイプI-Gに分類されている（例えば、[van der Oost J et al., Nature Reviews Microbiologym, 2014年, Vol. 12 (No. 7), p. 479-492]、[Jackson RN et al., Current Opinion in Structural Biology, 2014年, Vol. 24, p. 106-114]、[Makarova et al., Nat Rev Microbiol., 2020年, 18, p. 67-83]を参照）。

[0024] 本発明に係る「CRISPR-Cas3システム」は、具体的には、次の(A)～(C)：

(A) Cas3タンパク質、該タンパク質をコードするポリヌクレオチド、又は該ポリヌクレオチドを含む発現ベクター、

(B) カスケードタンパク質、該タンパク質をコードするポリヌクレオチド、又は該ポリヌクレオチドを含む発現ベクター、及び

(C) BCL11A遺伝子のエンハンサーを標的とするcrRNA、該crRNAをコードするポリヌクレオチド、又は該ポリヌクレオチドを含む発現ベクター

を含む。

[0025] [Casタンパク質群]

CRISPR-Cas3システムを構成するCas3タンパク質は、DNA切断活性及びヘリカーゼ活性を有する。Cas3タンパク質は、CRISPR-Cas3システムを構成するカスケードタンパク質及びcrRNAと共同することにより、標的DNAを複数箇所切断することができる。なお、本明細書において、単に「Cas3」と記載した場合は、「Cas3タンパク質」を意味するものとする。また、本明細書においては、Cas3タンパク質及びカスケードタンパク質を総称して場合により「Casタンパク質群」と称する。

[0026] 本発明に係るCRISPR-Cas3システムは、タイプIの7種類のサブタイプの全てを包含する。タイプIのCRISPR-Cas3システムの中でも一般的であるタイプI-Eのシステムは、前記Casタンパク質群として、Cas3、Cas8 (Cse1)、Cas11 (Cse2)、Cas5、Cas6、及びCas7を含み、かかるCasタンパク質群がcrRNAと協働することにより、標的DNAを切断する。この場合、前記Casタンパク質群は、典型的には、Cas3が1分子、Cas8が1分子、Cas11が2分子、Cas7が6分子、Cas5が1分子、及びCas6が1分子の複合体（カスケード複合体）を形成する。

[0027] タイプI-Aのシステムでは、前記Casタンパク質群として、Cas3-HD、Cas3-HEL、Cas5、Cas6、Cas7、Cas8、及

びCas11を含み；タイプーBのシステムでは、前記Casタンパク質群として、Cas3、Cas5、Cas6、Cas7、Cas8、及びCas11を含み；タイプーCのシステムでは、前記Casタンパク質群として、Cas3、Cas5、Cas7、Cas8、及びCas11を含み；タイプーDのシステムでは、前記Casタンパク質群として、Cas3、Cas5、Cas6、Cas7、Cas10、及びCas11を含み；タイプーFのシステムでは、前記Casタンパク質群として、Cas2-3、Cas5、Cas6、Cas7、及びCas8を含み；タイプーGのシステムでは、前記Casタンパク質群として、Csb2（Cas6様）、Cas7、Cas8g、Cas3、及びCas11を含む。ただし、Cas11については、タイプーシステムの構成要素から除外された場合でも、各システムはDNA切断活性を示す（例えば、タイプーBやタイプーCのシステムでは、Cas11を含まない場合でも、Cas11を含む場合と比較して低レベルではあるが、DNA切断活性を示すことが知られており、また、タイプーDのシステムでも同様である）。したがって、本発明に係るCRISPR-Cas3システムには、Cas11を含まないシステムも含まれる。

[0028] 本発明に係るCasタンパク質群の由来は特に限定されないが、動物細胞でのゲノム編集に適しているという観点から、大腸菌由来であることが好ましい。本発明に係るCasタンパク質群を構成する各タンパク質のアミノ酸配列は、例えば、公共のデータベース（Genbank等）から取得することができるが、前記Casタンパク質群の構成の好ましい態様の1つとしては、典型的な大腸菌由来タイプーEのシステムの配列として、次の構成：

Cas3：配列番号1で示されるアミノ酸配列を含むタンパク質

Cas8（Cse1）：配列番号3で示されるアミノ酸配列を含むタンパク質

Cas11（Cse2）：配列番号5で示されるアミノ酸配列を含むタンパク質

C a s 5 : 配列番号 7 で示されるアミノ酸配列を含むタンパク質

C a s 6 : 配列番号 9 で示されるアミノ酸配列を含むタンパク質

C a s 7 : 配列番号 1 1 で示されるアミノ酸配列を含むタンパク質

が挙げられる。

[0029] また、本発明に係る C a s タンパク質群には、自然界において生じた、又は、人為的に改変された変異体も含まれる。したがって、本発明に係る C a s タンパク質群の構成の他の好ましい態様としては、各タンパク質が、上記典型的な C a s タンパク質群の各アミノ酸配列とそれぞれ高い同一性を有するアミノ酸配列を含むタンパク質であり、かつ、C a s 3 が DNA 切断活性を有する（好ましくはさらに C a s タンパク質群がカスケード複合体形成能を有する）構成が挙げられる。高い同一性とは、例えば、80%以上、好ましくは85%以上、より好ましくは90%以上（例えば、91%以上、92%以上、93%以上、94%以上）、さらに好ましくは95%以上（例えば、96%以上、97%以上、98%以上、99%以上）のアミノ酸配列の同一性である。アミノ酸配列の同一性は、例えばBLAST（Basic Local Alignment Search Tool at the National Center for Biological Information（米国国立生物学情報センターの基本ローカルアラインメント検索ツール））等を利用して（例えば、デフォルト、すなわち初期設定のパラメータを用いて）決定することができる。

[0030] 本発明に係る C a s タンパク質群の構成の他の好ましい態様としては、また、各タンパク質が、上記典型的な C a s タンパク質群の各アミノ酸配列において1又は複数のアミノ酸が置換、欠失、付加、及び／又は挿入されたアミノ酸配列を含むタンパク質であり、かつ、C a s 3 が DNA 切断活性を有する（好ましくはさらに C a s タンパク質群がカスケード複合体形成能を有する）構成も挙げられる。ここで「複数」とは、通常、50アミノ酸以内、好ましくは30アミノ酸以内、より好ましくは20アミノ酸以内、特に好ましくは10アミノ酸以内（例えば、5アミノ酸以内、3アミノ酸以内、2ア

ミノ酸以内、1アミノ酸)である。

[0031] なお、「DNA切断活性を有する」とは、DNA鎖を少なくとも1箇所において切断できることを示す。前記Cas3がDNA切断活性及びカスケード複合体形成能を有することは、例えば、上記典型的なCasタンパク質群を用いた場合と同等以上（例えば50%以上、80%以上）のDNA切断活性を示すことで確認することができる。

[0032] 前記Casタンパク質群を構成する各タンパク質には、必要に応じて、それぞれ、さらに機能的分子を付加してもよい。前記機能的分子としては、例えば、真核細胞の核内への移行を促進するための核移行シグナル（例えば、Wu Jら、2009年、Biophysical Journal, Vol. 96 (Issue 9), p. 3840-3849等に記載のもの）、精製を容易にするためのタグ（例えば、HNタグ、Hisタグ、FLAGタグ、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ（GST）タグ）、検出を容易にするためのレポータータンパク質（例えば、緑色蛍光蛋白質（GFP）等の蛍光タンパク質、ルシフェラーゼ等の化学発光タンパク質）が挙げられ、これらのうちの1種であっても2種以上の組み合わせであってもよいが、これらに制限されるものではない。前記機能的分子を付加する場合には、例えば、各タンパク質のN末端側及び／又はC末端側に付加することができる。

[0033] 以下、タイプI-EのCRISPR-Cas3システムを代表例として説明するが、その他のタイプのCRISPR-Cas3システムについては、システムを構成するカスケードタンパク質を、適宜読み替えばよい。

[0034] 本発明に係るCRISPR-Cas3システムにおいて、前記Casタンパク質群を構成する各タンパク質は、それぞれ独立に、タンパク質の形態で、当該タンパク質をコードするポリヌクレオチドの形態で、又は、当該ポリヌクレオチドを含む発現ベクターの形態で、前記造血幹細胞に導入することができる。

[0035] 前記Casタンパク質群をタンパク質の形態で細胞に導入する場合には、各タンパク質の量等を適宜調製することが可能であり、ハンドリングの観点

、及びゲノムにDNAが導入されない観点で好ましい。

[0036] このようなCasタンパク質群を構成する各タンパク質は、それぞれ、公知の方法又はそれに準じた方法で調製することができる。例えば、Cas3タンパク質の調製方法としては、国際公開第2022/186063号に記載の方法が挙げられる。また、カスケードタンパク質は、例えば、それぞれ、Kazuto Yoshimura, Nature Communications, 2022年, 13:4917, <https://doi.org/10.1038/s41467-022-32618-0> (以下、「文献1」という)に記載の方法で調製することができる。

[0037] 前記Casタンパク質群をタンパク質の形態で細胞に導入する場合、当該Casタンパク質群としては、細胞内での切断効率等の観点から、Casタンパク質群を構成するタンパク質のうちの2種以上からなる複合体を予め形成させて、これを細胞へ導入することが好ましい。細胞へ導入する複合体におけるタンパク質の組み合わせとしては、例えば、2分子のCas11からなる複合体；6分子のCas7からなる複合体；1分子のCas8、1分子のCas5、及び1分子のCas6からなる複合体；1分子のCas3、1分子のCas8、2分子のCas11、6分子のCas7、1分子のCas5、及び1分子のCas6からなる複合体；及びこれらの1又は2以上の組み合わせが挙げられる。さらに、前記Casタンパク質群としては、前記複合体と下記のcrRNAとの複合体を予め形成させて、これを細胞へ導入することがより好ましい。このような複合体は、公知の方法又はそれに準じた方法で調製することができ、例えば、上記文献1に記載の方法で調製することができる。

[0038] 前記Casタンパク質群をポリヌクレオチドの形態で細胞に導入する場合、当該ポリヌクレオチドとしては、DNAのみからなるものの他、RNA、GNA、LNA、BNA、PNA、TNA等からなるものや、これらの混合からなるものであってよい。また、糖鎖等の核酸以外の成分によって修飾されていてもよい。このようなポリヌクレオチドは、公知の方法又はそれに準

じた方法で調製することができ、例えば、人工的に合成することができる。

[0039] 前記C a sタンパク質群を発現ベクターの形態で細胞に導入する場合、当該発現ベクターとしては、宿主ゲノムに組み込まれることなく、コードするタンパク質を安定して発現することができるものであることが好ましい。このような発現ベクターの基材ベクターとしては、一般に使用される種々のベクターを用いることができ、導入する細胞や導入方法等に応じて適宜選択することができる。かかる基材ベクターとしては、例えば、ファージベクター、プラスミドベクター、ウイルスベクター、レトロウイルスベクター、染色体ベクター、エピソームベクター及びウイルス由来ベクター（細菌プラスミド、バクテリオファージ、酵母エピソーム等）、酵母染色体エレメント及びウイルス（バキュロウイルス、パポバウイルス、ワクシニアウイルス、アデノウイルス、トリポックスウイルス、仮性狂犬病ウイルス、ヘルペスウイルス、レンチウイルス、レトロウイルス等）、並びに、これらのうちの2種以上の組み合わせに由来するベクター（コスミド、ファージミド等）が挙げられる。

[0040] 前記発現ベクターとしては、さらに、転写開始及び転写終結のための部位を含んでおり、かつ、転写領域中にリボソーム結合部位を含んでいることが好ましい。また、前記発現ベクターとしては、導入する細胞の種類に応じたプロモーター配列、DNAからの転写を亢進させるための配列（例えば、エンハンサー配列）、転写されたRNAを安定化させるための配列（例えば、ポリA付加配列）のうちの1種又は2種以上を含んでいることも好ましい。さらに、前記発現ベクターにおいては、前記C a sタンパク質群を構成する各タンパク質をコードするポリヌクレオチドが、それぞれ独立して、適宜コドン最適化されたものであってもよい。

[0041] 前記C a sタンパク質群を構成する複数のタンパク質を発現ベクターの形態で細胞に導入する場合、同一の発現ベクター内には、当該複数のタンパク質をそれぞれコードする複数のポリヌクレオチドを含めてよく、その数は当該発現ベクターを導入した宿主細胞内でCRISPR-C a s 3システムの

機能を発揮しうる限りにおいて、特に限定されない。例えば、Casタンパク質群を構成する各タンパク質をコードする全てのポリヌクレオチドを1種類の（同一の）発現ベクターに搭載するという設計が可能であり、また、さらに、Casタンパク質群を構成する各タンパク質をコードするポリヌクレオチドの一部又は1種を別々の発現ベクターに搭載するという設計も可能である。例えば、カスケードタンパク質をコードするポリヌクレオチドを1種類の（同一の）発現ベクターに搭載し、Cas3をコードするポリヌクレオチドを別の発現ベクターに搭載するという設計が可能である。発現効率等の観点からは、Casタンパク質群を構成する各タンパク質をコードするポリヌクレオチドをそれぞれ別の6種類の発現ベクターに搭載する方法が好ましい。その他、発現量を調節する等の目的のために、同一の発現ベクター内に、同じタンパク質をコードするポリヌクレオチドを複数搭載してもよい。例えば、Cas3をコードするポリヌクレオチドを1種類の（同一の）発現ベクター内の2箇所に配置するという設計が可能である。また、発現ベクターがCasタンパク質群を構成する複数のタンパク質をそれぞれコードする複数のポリヌクレオチドを含む場合には、当該複数のポリヌクレオチドの間には、細胞内のプロテアーゼにより切断されるアミノ酸配列（2Aペプチド等）をコードするヌクレオチド配列が挿入されていてもよい。

[0042] このような発現ベクターは、公知の方法又はそれに準じた方法によって調製することができる。例えば、ベクター作製用のキットに付属する実施マニュアルに記載の方法に加え、種々の手引書に記載の方法、例えば、「Joseph Sambrook & David W. Russell, Molecular cloning: a laboratory manual 3rd Ed., New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001」に記載の方法を採用することができる。

[0043] [crRNA]

CRISPR-Cas3システムを構成するcrRNA (CRISPR

RNA)は、標的DNA上の標的配列と相補的なヌクレオチド配列を有する。本発明に係るcrRNAは前記BCL11A遺伝子のエンハンサー領域を切断の目的領域(切断対象領域)とするものであり、ヒトにおいて、前記標的DNAはBCL11A遺伝子のエンハンサーが存在する第2染色体であり、前記切断対象領域はBCL11A遺伝子のエンハンサー領域内(好ましくは、DHS+55、DHS+58、及びDHS+62のうちの少なくともいずれかの領域内)である。前記標的配列としては、前記切断対象領域に応じて選択することができ、より具体的には、ヒト第2染色体では60,485,907~60,503,552の範囲内にあることが好ましく、切断対象領域(BCL11A遺伝子のエンハンサー領域、好ましくはDHS+55、DHS+58、及びDHS+62のうちの少なくともいずれか)の前後5,000bpの範囲内にあることが好ましく、例えば、ヒト第2染色体では60,495,486~60,495,517を含むことがより好ましい。また、一般に、前記標的配列の長さとしては、32~37塩基であることが好ましい(Ming Liら, Nucleic Acids Res., 2017年, May 5; 45(8): p. 4642-4654)。

[0044] 本発明に係るCRISPR-Cas3システムにおいて、crRNAは、RNAの形態で、当該RNAをコードするポリヌクレオチドの形態で、又は、当該ポリヌクレオチドを含む発現ベクターの形態で、前記造血幹細胞に導入することができる。

[0045] CRISPR-Cas3システムとして、crRNAを前記Casタンパク質群とは別に単独でRNAの形態で、又は、crRNAをコードするポリヌクレオチド若しくはそれを含む発現ベクターの形態で、真核細胞である前記造血幹細胞に導入する場合、crRNAとしては、国際公開第2018/225858号に記載のプレcrRNAであることが好ましい。本発明において、「プレcrRNA」とは、細胞内でCRISPR-Cas3システムの構成として機能するcrRNA(場合により「成熟crRNA」という)にリピート配列等が付加された構造を有し、典型的には、「リーダー配列-

リピート配列ー Spacer配列ーリピート配列（L R S R構造）」又は「リピート配列ー Spacer配列ーリピート配列（R S R構造）」の構造を有する。リーダー配列及びリピート配列の典型的態様は国際公開第2018/225858号に記載のとおりである。Pre-crRNAは、カスケードタンパク質（例えば、タイプI-A、B、D～EではCas6、タイプI-CではCas5）により切断されると成熟crRNAとなる。

[0046] crRNA（成熟crRNA）は、典型的には、前記標的配列と相補的なヌクレオチド配列と3'末端の繰り返し配列（1単位がそれぞれ約10～70塩基、好ましくは30～50塩基、少なくとも1つのヘアピン構造を含む）とを有し、かかるヘアピン構造と、前記Casタンパク質群を構成する1又は複数のタンパク質（典型的にはCas6）とが相互作用して複合体を形成する。このため、crRNAは、前記標的配列を認識して前記標的DNAに結合し、当該crRNAと複合体を形成するCasタンパク質群を前記切断対象領域付近に誘導して、誘導されたCasタンパク質群が、Cas3のヘリカーゼ活性によって一本鎖DNAを露出すると共に、DNA切断活性によって前記切断対象領域を切断する。

[0047] BCL11A遺伝子のエンハンサー（切断対象領域）において、CRISPR-Cas3システムによる切断は、crRNAのヌクレオチド配列と前記標的配列との間の塩基対形成の相補性と、前記標的配列の相補鎖の5'側に存在するPAM配列と、の両方によって決定される位置で起きる。

[0048] 本発明に係るCRISPR-Cas3システムに対するPAM配列は、前記標的配列の5'側に隣接する「AAG」又はそれに類似した塩基配列（例えば、「AGG」、「GAG」、「TAC」、「ATG」、「TAG」等）である。

[0049] 前記crRNA（成熟crRNA及びpreRNAを包含する）の配列は、前記標的配列に応じて適宜設計すればよい。本発明に係るcrRNAの好ましい態様の1つとしては、例えば、前記標的配列（ヒト第2染色体の60,495,486～60,495,517）と相補的なヌクレオチド配列を含

む配列が挙げられ、より具体的には、配列番号27に記載のヌクレオチド配列を含む配列が挙げられる。

[0050] 前記c rRNAをRNAの形態又は当該RNAをコードするポリヌクレオチドの形態で細胞に導入する場合、これらのポリヌクレオチドとしては、公知の方法又はそれに準じた方法で調製することができ、例えば、人工的に合成することができる。

[0051] また、前記c rRNAを発現ベクターの形態で細胞に導入する場合、当該発現ベクターとしては、公知の方法又はそれに準じた方法で調製することができ、例えば、その好ましい態様も含めて、上記Casタンパク質群においてその発現ベクターとして述べたものを適宜採用することができる。

[0052] (導入工程)

本発明の製造方法においては、前記CRISPR-Cas3システムを前記造血幹細胞に導入して、前記標的領域とc rRNAとの結合を介してBCL11A遺伝子のエンハンサー上の切断対象領域付近に誘導されたCas3のDNA切断活性により、BCL11A遺伝子のエンハンサー内を切断（好ましくは複数箇所切断）することで、BCL11A遺伝子のエンハンサーの一部又は全部を破壊する。

[0053] 前記CRISPR-Cas3システムの前記造血幹細胞への導入方法は、上述のように、前記CRISPR-Cas3システムをタンパク質又はRNAの形態で導入する方法であっても、これらをコードするポリヌクレオチド、又は当該ポリヌクレオチドを含む発現ベクターを導入して細胞内で発現させる方法であってもよい。したがって、前記CRISPR-Cas3システムとしては、前記Casタンパク質群を構成する各タンパク質を、それぞれ独立に、タンパク質の形態で細胞に導入しても、当該タンパク質をコードするRNAやDNA（ポリヌクレオチド）の形態で細胞に導入して細胞内で発現させても、当該タンパク質を発現するベクター（発現ベクター）の形態で細胞に導入して細胞内で発現させてもよい。また、これと独立して、前記c rRNAを、RNA（ポリヌクレオチド）の形態で細胞に導入しても、当該

RNAをコードするDNA（ポリヌクレオチド）の形態で細胞に導入して細胞内で発現させても、当該RNAを発現するベクター（発現ベクター）の形態で細胞に導入して細胞内で発現させてもよい。

[0054] 前記CRISPR-Cas3システムを発現ベクターの形態で細胞に導入して細胞内で発現させる場合には、例えば、前記Casタンパク質群を構成する各タンパク質を発現するベクターと前記crRNAを発現するベクターとをそれぞれ別々に細胞内に導入してもよく、また、これらのうちの2種以上を組み合わせて発現するベクターを細胞内に導入してもよい。

[0055] 本発明に係るCRISPR-Cas3システムを細胞に導入する方法としては、特に制限されず、タンパク質、DNA断片、RNA断片、及びベクターを細胞に導入する方法として公知の方法を細胞の種類等に応じて適宜採用することができる。このような方法としては、例えば、電気穿孔法（エレクトロポレーション法）、マイクロインジェクション法、パーティクルガン法、リン酸カルシウム法、ポリエチレンイミン（PEI）法、リポソーム法（リポフェクション法）、DEAE-デキストラン法、カチオン性脂質媒介トランスフェクション、ウイルス（アデノウイルス、レンチウイルス、アデノ随伴ウイルス、バキュロウイルス等）、アグロバクテリウム法、酢酸リチウム法、スフェロプラスト法、熱ショック法（塩化カルシウム法、塩化ルビジウム法）等が挙げられる。このような方法は、「Davis et al., Basic methods in molecular biology, New York: Elsevier, 1986」等、多くの標準的研究室マニュアルに記載されている。

[0056] 前記CRISPR-Cas3システムが細胞に導入（細胞内での発現を含む）されると、前記標的領域とcrRNAとの結合を介して前記CRISPR-Cas3システムとBCL11A遺伝子のエンハンサー（切断対象領域）とが接触し、上記のCRISPR-Cas3システムのDNA切断活性による切断対象領域の切断により、BCL11A遺伝子のエンハンサーの一部又は全部が破壊（好ましくは欠損）される。

[0057] (BCL11A遺伝子のエンハンサーが破壊された造血幹細胞の用途)

本発明の製造方法は、BCL11A遺伝子の発現が抑制された赤血球前駆細胞に分化可能な造血幹細胞の製造方法、又は、 γ -グロビンの発現が促進された赤血球前駆細胞に分化可能な造血幹細胞の製造方法と表現することもできる。すなわち、本発明の製造方法で得られた造血幹細胞は、赤血球前駆細胞に分化した際に、エンハンサーの破壊によってそのBCL11A遺伝子の発現が抑制されているため、成体では通常BCL11Aによって抑制されている γ -グロビンの発現が促進される。なお、本発明において、「発現」には、転写レベルの発現(DNAがmRNAへと転写されるプロセス)及び翻訳レベルの発現(mRNAがペプチド、ポリペプチド、又はタンパク質へと翻訳されるプロセス)のいずれも包含し、mRNAをスプライシングする工程も含むが、「BCL11A遺伝子の発現」といった場合、主には、転写レベルの発現を意味する。

[0058] したがって、例えば、本発明の製造方法で得られた造血幹細胞を対象に投与することにより、対象の生体内において当該造血幹細胞が赤血球前駆細胞に分化すると、当該対象の赤血球前駆細胞における γ -グロビンの発現量を増大させることができる。 γ -グロビンの発現量の増大や、それによる胎児ヘモグロビン(HbF)の増加は、 β -ヘモグロビン症(hemoglobinopathy)、鎌状赤血球症(SCD)、及び β -サラセミア等の異常ヘモグロビン症の予防や治療に寄与する(非特許文献1、非特許文献2)。

[0059] したがって、本発明は、上記本発明の製造方法で得られた造血幹細胞を対象に投与する工程を含む、前記対象の赤血球前駆細胞における γ -グロビンの発現量を向上させる方法や、上記本発明の製造方法で得られた造血幹細胞を対象に投与する工程を含む、異常ヘモグロビン症の予防又は治療方法(本明細書中、場合によりこれらを「本発明の治療方法」と総称する)も提供する。

[0060] 前記対象としては、上記の動物が挙げられ、ヒトが好ましい。前記投与方

法としては、例えば、注射、移植が挙げられる。

[0061] <キット>

本発明は、上記本発明の製造方法及び本発明の治療方法に用いるためのキットとして、

次の(A)～(C)：

(A) Cas3タンパク質、該タンパク質をコードするポリヌクレオチド、又は該ポリヌクレオチドを含む発現ベクター、

(B) カスケードタンパク質、該タンパク質をコードするポリヌクレオチド、又は該ポリヌクレオチドを含む発現ベクター、及び

(C) BCL11A遺伝子のエンハンサーを標的とするcrRNA、該crRNAをコードするポリヌクレオチド、又は該ポリヌクレオチドを含む発現ベクター

を含むキットを提供する。

[0062] 上記の(A)～(C)は、それらの好ましい態様も含めて、それぞれ、上記の本発明の製造方法のCRISPR-Cas3システムにおいて述べたとおりである。これらはそれぞれ独立して、タンパク質又はRNAの形態であっても、当該タンパク質又はRNAをコードするポリヌクレオチドの形態であっても、当該ポリヌクレオチドを含む、タンパク質又はRNAを発現する発現ベクターの形態であってもよい。これらの形態も、それらの好ましい態様も含めて、それぞれ上述のとおりである。

[0063] また、(C)が発現ベクターの形態である場合、当該発現ベクターは、前記標的配列に応じて、ユーザーがcrRNAを設計することができるように、

(C') BCL11A遺伝子のエンハンサーを標的とするcrRNAをコードするポリヌクレオチドの挿入部位を含む発現ベクター
であってもよい。この場合、挿入部位は、crRNAをコードするポリヌクレオチドのうち、前記標的配列と相補的なヌクレオチド配列のみを挿入する構成として、それ以外のcrRNAをコードするポリヌクレオチドは前記発

現ベクターに予め含まれていてもよい。なお (C) が c r R N A をコードするポリヌクレオチド又は発現ベクターの形態である場合、c r R N A としては、上記のプレc r R N A であることが好ましい。

[0064] 本発明のキットにおいて、(A) ~ (C) の形態の組み合わせとしては特に限定されず、(A) ~ (C) をそれぞれ個々に含む組み合わせ物であっても、(A) ~ (C) のうちの2つ以上が予め混合されたものであってもよく、また、これらに他の成分(溶媒等)を含む組成物であってもよい。例えば、(B) としては、上記のうち、カスケードタンパク質毎に異なる形態であっても、2つ以上のカスケードタンパク質を含む複合体又は組成物の形態や、2つ以上のカスケードタンパク質をそれぞれコードするポリヌクレオチド、又は該ポリヌクレオチドを含む発現ベクターの形態であってもよい。また、(A) 及び (B) としては、合わせて、前記C a s タンパク質群を構成する複数のタンパク質を含む複合体又は組成物の形態や、2つ以上のタンパク質をそれぞれコードするポリヌクレオチド、又は該ポリヌクレオチドを含む発現ベクターの形態であってもよい。さらに、例えば、(A)、(B) をタンパク質、(C) をR N A の形態で細胞に導入する場合には、予めこれらのうちの2つ以上の複合体の形態であってもよいし、(A) ~ (C) を発現ベクターの形態で細胞に導入する場合には、2つ以上のポリヌクレオチドを含む発現ベクターの形態であってもよい。

[0065] 本発明のキットとしては、1つ又は複数の追加の試薬をさらに含んでもよい。このような追加の試薬としては、例えば、造血幹細胞を分離するための試薬、造血幹細胞を培養するための培地、希釈緩衝液、再構成溶液、洗浄緩衝液、核酸導入試薬、タンパク質導入試薬、対照試薬が挙げられるが、これらに制限されるものではない。また、当該キットは、本発明の製造方法及び本発明の治療方法を実施するための使用説明書をさらに含んでもよい。

[0066] また、本発明のキットとしては、本発明の治療方法に用いる場合、例えば、製造された造血幹細胞を医薬組成物として対象に投与するための医薬品添

加物や器材をさらに備えていてもよい。前記医薬組成物は、常法により調製することができる。より具体的には、上記本発明の製造方法で製造された造血幹細胞を、例えば、投与方法に応じて、医薬品添加物と調合することによって調製することができる。前記医薬品添加物としては、賦形剤、結合剤、崩壊剤、滑沢剤、流動化剤（固形防止剤）、着色剤、可塑剤、溶剤、溶解補助剤、乳化剤、懸濁化剤（粘着剤）、粘稠剤、pH調整剤（酸性化剤、アルカリ化剤、緩衝剤）、湿潤剤（可溶化剤）、抗菌性保存剤、キレート剤、医療用水、安定剤、保存剤等が挙げられ、これらのうちの1種であっても2種以上であってもよい。

[0067] 前記キットに含まれる各要素は、それぞれ別個の容器に收容されていてもよいし、同一の容器に收容されていてもよい。各要素は、一回の使用量ごとに容器に收容されていてもよいし、複数回分の量が一つの容器に收容されていてもよい。各要素は乾燥形態で容器に收容されていてもよいし、適当な溶媒（緩衝液、安定剤、保存剤、防腐剤等を含む溶媒）中に溶解した形態で容器に收容されていてもよい。

実施例

[0068] 以下、実施例に基づいて本発明をより具体的に説明するが、本発明は以下の実施例に限定されるものではない。

[0069] <試験例1> CRISPR-Cas3システムによるヒト造血幹細胞のBCL11A遺伝子のエンハンサーの破壊

(1) BCL11A遺伝子のエンハンサー

本試験例で破壊対象となるBCL11A遺伝子のエンハンサー内の切断対象領域は、ヒトゲノムDNAの第2染色体（chr2）の60,495,269周辺とした。

[0070] (2) CRISPR-Cas3システム

(CRISPR-Cas3システム（実施例）)

本試験例で用いたCRISPR-Cas3システムを構築した。Cas3タンパク質のアミノ酸配列及びそれをコードするヌクレオチド配列を配列番

号：1及び配列番号：2にそれぞれ示す。Cas3タンパク質は、国際公開第2022/186063号に記載の方法で調製、精製した。

[0071] カスケードタンパク質は、Cas8 (Cse1) - Cas11 (Cse2) - Cas7 - Cas5 - Cas6からなり、Cas8が1分子、Cas11が2分子、Cas7が6分子、Cas5が1分子、Cas6が1分子からなるカスケードタンパク質複合体とした。Cas8タンパク質、Cas11タンパク質、Cas5タンパク質、Cas6タンパク質、Cas7タンパク質のアミノ酸配列及びそれをコードするヌクレオチド配列を順に、配列番号：3～12にそれぞれ示す。各カスケードタンパク質及びカスケードタンパク質複合体は、文献1に記載の方法で調製、精製した。

[0072] BCL11A遺伝子のエンハンサーを標的とするcrRNAは、ヒトゲノムDNAの第2染色体 (chr2) の60,495,486～60,495,517を標的配列として合成した。下記の表1にcrRNAの標的配列 (下線) 及びPAM配列 (太字) を示す。crRNAは、文献1に記載の方法で成熟crRNAとして調製、精製した。また、Cas3タンパク質、カスケードタンパク質複合体、及びcrRNAは、文献1に記載の方法によりタンパク質-RNA複合体とし、これをCRISPR-Cas3システムとして用いた。

[0073] (CRISPR-Cas9システム (比較例))

比較対象として、CRISPR-Cas9システムを構築した。Cas9タンパク質は、Integrated DNA Technologies社より入手した。また、gRNAは、ヒトゲノムDNAの第2染色体 (chr2) の60,495,264～60,495,283を標的配列として合成した。下記の表1にgRNAの標的配列 (下線) 及びPAM配列 (太字) を示す。

[0074]

[表1]

ヌクレオチド配列 (5'-3')	配列番号
crRNAの標的配列 (下線) 及びPAM配列 (太字)	13
<u>aagtcctgtctagctgcccttcctttatcacaggaat</u>	
gRNAの標的配列 (下線) 及びPAM配列 (太字)	14
<u>ctaacagttgctttatcacagg</u>	

[0075] (3) 細胞培養

ヒト造血幹細胞 (hHSC) として、健常人の臍帯血由来のヒトCD34+細胞をStemExpress, Folsom CAより入手したものを用了。hHSCは、先ず、培地 (StemSpanTM CD34+ Expansion Supplement (10X) を添加したStemSpan SFEM、ベリタス社) で培養した。次いで、培養開始から4日目に上記 (2) で構築したCRISPR-Casシステムをそれぞれエレクトロポレーションにより導入し、培養開始から7日 (CRISPR-Casシステムを導入してから3日) まで同条件で培養した。

[0076] 次いで、培養開始から7日目に、hHSCを赤血球前駆細胞へ分化誘導するために、先ず、培地を次の組成: StemSpan SFEM (ベリタス社)、50 ng/mL SCF、20 ng/mL EPO、10 ng/mL IL-3、10 ng/mL IGF-1、1 μM デキサメタゾンの培地に替えて5日間 (培養開始から12日目まで) 培養した。次いで、培養開始から12日目に、培地を次の組成: StemSpan SFEM (ベリタス社)、20 ng/mL EPO、10 ng/mL IGF-1、0.5 mg/mL ヒトトランスフェリン、2% BSAの培地に替えて分化誘導し、さらに6日間 (培養開始から18日目まで) 培養して、赤血球前駆細胞を得た。

[0077] (4) エレクトロポレーション

上記（３）におけるエレクトロポレーションは、培養開始から４日目のhHSCを含む100万個の細胞群へエレクトロポレーション法（Maxcyte-Atx（MaxCyte社）、プログラム：HSC-5）によって行なった。上記（２）で構築した各CRISPR-Casシステムは、それぞれ、次の構成：

（CRISPR-Cas3システム）

タンパク質-RNA複合体：Cas3タンパク質/Cascadeタンパク質：Cas3タンパク質/（カスケードタンパク質複合体+crRNA）

（Cas3タンパク質：（カスケードタンパク質複合体+crRNA）=1：1（モル比））：2.5 μM、5 μM、又は10 μM

（CRISPR-Cas9システム）

Cas9タンパク質：1.5 μM、3 μM、又は6 μM

gRNA：6 μM

となるように前記細胞群へ導入した。

[0078] （５）デジタルPCR

上記（３）においては、各CRISPR-Casシステムを導入してから３日目（培養開始から７日目）に細胞からゲノムDNAを回収して、デジタルPCRによって上記のBCL11A遺伝子のエンハンサー内の目的部位が欠損した割合を求めた。本試験では、GATA結合領域であるDHS+58の一部を含む領域A（ヒト第2染色体の60,495,229~60,495,399:171bp）を、ゲノム編集の有無を判別するためのポイント（目的部位）として、この領域AがPCRによって増幅されなかった場合に「BCL11A遺伝子のエンハンサー内の目的部位が欠損した」と判断した。ゲノム抽出にはDNeasy Blood&Tissue Kit（キアゲン社）を用い、デジタルPCRにはQIAcuity（キアゲン社）を用いた。なお、比較対象として、上記（２）で構築したCRISPR-Casシステムをいずれも導入せずに同条件で培養した未編集細胞（NoEP）を用いた。また、各欠損率は、BCL11A遺伝子近傍のCRISPR-Ca

sシステムによってゲノムDNAが切断されない領域を内在コントロールとして、次式： $(1 - (\text{CRISPR-Casシステム導入細胞の領域Aの増幅産物量} / \text{CRISPR-Casシステム導入細胞の内在コントロールの増幅産物量}) / (\text{NoEPの領域Aの増幅産物量} / \text{NoEPの内在コントロールの増幅産物量})) \times 100$ により、欠損率(%Deletion)をそれぞれ算出した。下記の表2にデジタルPCRに用いた各プライマー及びプローブのヌクレオチド配列を示す。表2中、HEX/BHQ1及びFAM/BHQ1は、それぞれレポーター色素とクエンチャー色素との組み合わせを示し、各増幅産物量は、レポーター色素に由来する蛍光強度とした。

[0079] [表2]

プローブ、プライマー		ヌクレオチド配列 (5'-3')	配列番号
目的部位用	Target_probe (蛍光)	ttatccacaggctccaggaaggg (HEX/BHQ1)	15
	Target_Fwd	tgattccagtgcasagtcca	16
	Target_Rev	caacciaatcagaggcaca	17
内在コントロール用	Reference_probe (蛍光)	tagatgtggcaagtcagaccacag (FAM/BHQ1)	18
	Reference_Fwd	tgaagttttccagggggttg	19
	Reference_Rev	cttctctgagggcattggag	20

[0080] (6) 定量PCR (qPCR)

上記(3)の後、培養開始から18日目に細胞からmRNAを回収して、逆転写反応後、定量PCRによって γ -グロビン及び β -グロビンの発現量(mRNA量)を算出した。なお、比較対象として、上記(2)で構築したCRISPR-Casシステムをいずれも導入せずに同条件で培養した未編集細胞(NoEP)を用いた。また、各発現量は、ACTB遺伝子を内在コントロール(ノーマライズ)として用いて算出し、それぞれ、 γ -グロビン発現量の β -グロビン発現量に対する相対発現量(Ratio to β -globin)を求めた。下記の表3に定量PCRに用いた各プライマーのヌクレオチド配列を示す。

[0081]

[表3]

プライマー		ヌクレオチド配列 (5'-3')	配列番号
γ-グロビン用	γ-globin_Fwd	cttccttgggagatgccat	21
	γ-globin_Rev	gaattctttgccgaaatggat	22
β-グロビン用	β-globin_Fwd	ctttagtgaatggcctggct	23
	β-globin_Rev	cactgatggggatgaattct	24
内在コントロール用	ACTB_Fwd	caccattggcaatgagcggctc	25
	ACTB_Rev	aggtctttggggaatgccacgt	26

[0082] 上記(5)のデジタルPCRの結果として、Cas3タンパク質/Cascadeタンパク質 (Cas3タンパク質/(カスケードタンパク質複合体+crRNA))の導入量又はCas9タンパク質の導入量と目的部位の欠損率(%Deletion)との関係を図1に示す。また、上記(6)の定量PCRの結果として、Cas3タンパク質/Cascadeタンパク質 (Cas3タンパク質/(カスケードタンパク質複合体+crRNA))の導入量又はCas9タンパク質の導入量とγ-グロビンの相対発現量(Ratio to β-globin)との関係を図2に示す。さらに、Cas3タンパク質/Cascadeタンパク質 (Cas3タンパク質/(カスケードタンパク質複合体+crRNA))の導入量が10μM、Cas9タンパク質の導入量が6μMのときの、前記欠損率と前記γ-グロビンの相対発現量との関係を下記の表4に示す。

[0083] [表4]

CRISPR-Casシステム		(a)欠損率(%)	(b)γ-グロビン 相対発現量	(b)/(a)
CRISPR-Cas3	Cas3タンパク質:5μM/ Cascadeタンパク質:5μM	16	3.6	0.225
CRISPR-Cas9	Cas9タンパク質:6μM/ gRNA:6μM	35	2.9	0.083

[0084] 図1に示したように、CRISPR-Cas3システムによってBCL11A遺伝子のエンハンサー内の目的部位が欠損した割合は16%(10μM

)であったのに対し、CRISPR-Cas9システムによってBCL11A遺伝子のエンハンサー内の目的部位が欠損した割合は35% (6 μM)と、CRISPR-Cas9システムを用いた場合の方が目的部位の欠損率、すなわちゲノム編集効率は高かった。他方、図2及び表4に示したように、CRISPR-Cas3システムによってγ-グロビン発現量は未編集細胞の3.6倍 (10 μM)まで増加したのに対し、CRISPR-Cas9システムによる増加量は2.9倍 (6 μM)と、CRISPR-Cas3システムを用いた場合の方がγ-グロビンの発現量は著しく増加した。また、表4に示したように、BCL11A遺伝子のエンハンサー内の目的部位の欠損率に対するγ-グロビンの相対発現量 ((b) / (a))は、CRISPR-Cas3システムを用いた場合の方が約3倍多くなった。

[0085] このように、ゲノム編集効率 (目的部位が欠損した割合) はCRISPR-Cas9システムを用いた場合の方が高かったにも関わらず、γ-グロビンの発現の増加量はCRISPR-Cas3システムを用いた場合の方がはるかに高く、γ-グロビンの発現を高い効率で誘導できたことが確認された。よって、本発明のCRISPR-Cas3システムを用いる方法により、造血幹細胞において、特異的かつ高効率でBCL11A遺伝子のエンハンサーを破壊でき、その結果、分化された血球系前駆細胞においてBCL11A遺伝子の発現を十分に抑制できることが確認された。

[0086] <試験例2> CRISPR-Casシステムによるゲノム欠損パターンの解析

(1) CRISPR-Cas9システムによるゲノム欠損パターンの解析
上記<試験例1>でCRISPR-Cas9システムを細胞に導入してから3日目 (培養開始から7日目) に回収したゲノムDNAのうち、上記<試験例1> (5) のデジタルPCRによって「BCL11A遺伝子のエンハンサー内の目的部位が欠損した」と判定されたサンプルを鋳型として、GATA結合領域であるDHS+58を含む領域B (ヒト第2染色体の60,494,994~60,495,500:507bp) をPCRによって増幅し

た。次いで、増幅した断片について、シーケンスプライマー（ヒト第2染色体の60,495,481~60,495,500:20bp）を用いてサンガーシーケンスを実施した。得られたサンガーシーケンスの波形データ（.ab1）をSYNTEGO ICE Analysis（Synthego社製）にて解析し、ゲノム欠損パターンを得た。なお、比較対象として、CRISPR-Casシステムをいずれも導入せずに同条件で培養した未編集細胞（NoEP）から同様に回収したゲノムDNAを用いて同様に解析した。

[0087] (2) CRISPR-Cas3システムによるゲノム欠損パターンの解析
(2-1) NGSライブラリの調製

GATA結合領域であるDHS+58を含む領域を濃縮するためのOligoパネル（Twist Bioscience社製）を、領域C（ヒト第2染色体の60,493,189~60,543,189bp）に対して設計した。上記<試験例1>でCRISPR-Cas3システムを細胞に導入してから3日目（培養開始から7日目）に回収したゲノムDNAのうち、上記<試験例1>（5）のデジタルPCRによって「BCL11A遺伝子のエンハンサー内の目的部位が欠損した」と判定されたサンプルから、Twist Library Prep EF Kit 2.0、Twist UM1 Adapter System TruSeq Compatible、Twist Std Hyb and Wash Kit、Twist Dry Down Beads、Twist Universal Blockers、及び上記Oligoパネル（以上、TwistBioScience社製）を用いて領域Cを濃縮し、BCL11A遺伝子のエンハンサーの欠損パターン解析用のライブラリを構築した。構築したNGSライブラリをNova-seq（イルミナ社製）にて解析した。なお、比較対象として、CRISPR-Casシステムをいずれも導入せずに同条件で培養した未編集細胞（NoEP）から同様に回収したゲノムDNAを用いて同様にライブラリを調整した。

[0088] (2-2) CRISPR-Cas3システムによるゲノム欠損パターンの解析

上記(2-1)で取得されたNGSのrawデータに対し、Quality Check及びゲノムマッピングを経て、Splitリード(Structure variantを意味する)を抽出した。抽出したSplitリードからCRISPR-Cas3システムによってGATA結合領域であるDHS+58を含む領域のゲノム欠損長を解析した。

[0089] 上記(1)及び(2)の解析の結果、CRISPR-Cas9システムによるゲノム欠損パターンでは数塩基(1~20塩基)の欠損しか確認されなかったのに対して、CRISPR-Cas3システムによるゲノム欠損パターンでは数k塩基に及ぶ広範囲(49~20,699塩基)の欠損が確認された。すなわち、BCL11A遺伝子のエンハンサー領域のうち、GATAが結合する領域(GATA結合領域)は複数存在する(DHS+55、DHS+58、DHS+62)が、CRISPR-Cas9システムでは単一のシステムで欠損可能な範囲は単一のGATA結合領域の一部にとどまっていたのに対して、本発明のCRISPR-Cas3システムを用いた方法によれば、単一のシステムによって複数のGATA結合領域を欠損可能であり、より確実にBCL11A遺伝子のエンハンサーを破壊できることが確認された。

[0090] <試験例3> CRISPR-Cas3システムによるオフターゲットの解析

(1) crRNAのオフターゲット候補の抽出

上記<試験例1>(2)で調製した、ヒトゲノムDNAの第2染色体(chr2)の60,495,486~60,495,517を標的配列としたcrRNAの塩基配列に対して相同性の高い遺伝子配列及びがん原遺伝子配列を、in silico解析にて、ヒトゲノム及びヒトがん原遺伝子から抽出し、それぞれ上位50遺伝子座から重複を除いた92遺伝子座をオフターゲット候補遺伝子座とした。

[0091] (2) NGSライブラリの調製

上記(1)で抽出した92オフターゲット候補遺伝子座に対してそれぞれOligoパネルを設計し、上記<試験例2>(2-1)と同様にして濃縮し、上記<試験例1>でCRISPR-Cas3システムを細胞に導入してから3日目(培養開始から7日目)に回収したゲノムDNAのうち、上記<試験例1>(5)のデジタルPCRによって「BCL11A遺伝子のエンハンサー内の目的部位が欠損した」と判定されたサンプルから、オフターゲット解析用のNGSライブラリを構築した。なお、本ライブラリ構築時には、各サンプルのゲノムDNA量に対して1%の比率で、ゲノム切断検出のコントロールとして、ヒト内在ゲノム領域の欠損(1kb欠損)フラグメントを加えた。構築したNGSライブラリをNova-seq 6000(イリミナ社製)にて解析した。

[0092] (3) CRISPR-Cas3システムによるオフターゲットのin silico解析

上記(2)で取得されたNGSのrawデータに対し、Quality Check及びゲノムマッピングを経て、オフターゲット候補遺伝子座のSplitリードを抽出した。比較対象として、CRISPR-Cas3システムをいずれも導入せずに同条件で培養した未編集細胞(NoEP)から回収したゲノムDNAについても同様に解析してSplitリードを抽出し、シグナル数を比較した。各サンプルに加えたヒト内在ゲノム領域の欠損フラグメントの検出リード数を1%のゲノム編集効率が検出されたときの指標として、各オフターゲット候補遺伝子座の切断を評価した。

[0093] 上記解析の結果、いずれのオフターゲット候補遺伝子座においても切断は検出されず、本発明のCRISPR-Cas3システムを用いたBCL11A遺伝子のエンハンサーの破壊によれば、オフターゲットの切断の誘導が十分に抑制されることが確認された。

産業上の利用可能性

[0094] 以上説明したように、本発明によれば、BCL11A遺伝子の発現が特異

的かつ十分に抑制された血球系前駆細胞に分化可能な造血幹細胞を高効率で製造することができる製造方法、及びその製造方法に好適に用いることができるキットを提供することが可能となる。

[0095] BCL11A遺伝子のエンハンサーが破壊された造血幹細胞を赤血球前駆細胞に分化させると、かかる赤血球前駆細胞においては、BCL11A遺伝子の発現が抑制され、BCL11Aによる発現抑制が解除されて γ -グロビンの発現が誘導されるため、 γ -グロビンの発現量が増大する。したがって本発明は、 γ -グロビンの発現量が関与する疾患群の予防又は治療に有用である。さらに、CRISPR-Cas3システムを用いたこのような方法によれば、オフターゲットを回避することができるため安全性の観点からも有用である。

請求の範囲

[請求項1] BCL11A遺伝子のエンハンサーの一部又は全部が破壊された造血幹細胞を製造する方法であり、

次の(A)～(C)：

(A) Cas3タンパク質、該タンパク質をコードするポリヌクレオチド、又は該ポリヌクレオチドを含む発現ベクター、

(B) カスケードタンパク質、該タンパク質をコードするポリヌクレオチド、又は該ポリヌクレオチドを含む発現ベクター、及び

(C) BCL11A遺伝子のエンハンサーを標的とするcrRNA、該crRNAをコードするポリヌクレオチド、又は該ポリヌクレオチドを含む発現ベクター

を含むCRISPR-Cas3システムを造血幹細胞に導入する工程を含む、方法。

[請求項2] 前記crRNAのヌクレオチド配列が配列番号：27に記載のヌクレオチド配列を含む、請求項1に記載の方法。

[請求項3] 製造された造血幹細胞は γ -グロビンの発現量が向上した赤血球前駆細胞に分化可能である、請求項1に記載の方法。

[請求項4] 請求項1に記載の方法で得られた造血幹細胞を対象に投与する工程を含む、前記対象の赤血球前駆細胞における γ -グロビンの発現量を向上させる方法。

[請求項5] 請求項1に記載の方法で得られた造血幹細胞を対象に投与する工程を含む、異常ヘモグロビン症の予防又は治療方法。

[請求項6] 請求項1～5のうちのいずれか一項に記載の方法に用いるためのキットであり、

次の(A)～(C)：

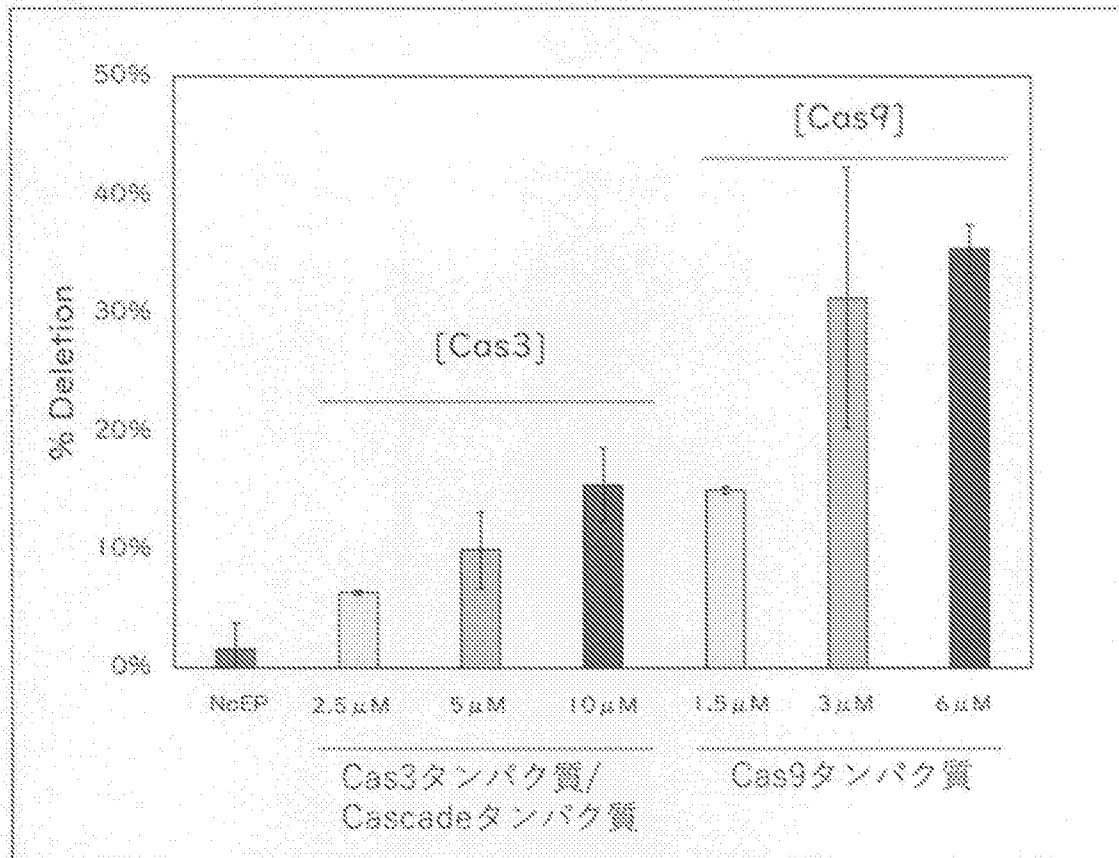
(A) Cas3タンパク質、該タンパク質をコードするポリヌクレオチド、又は該ポリヌクレオチドを含む発現ベクター、

(B) カスケードタンパク質、該タンパク質をコードするポリヌク

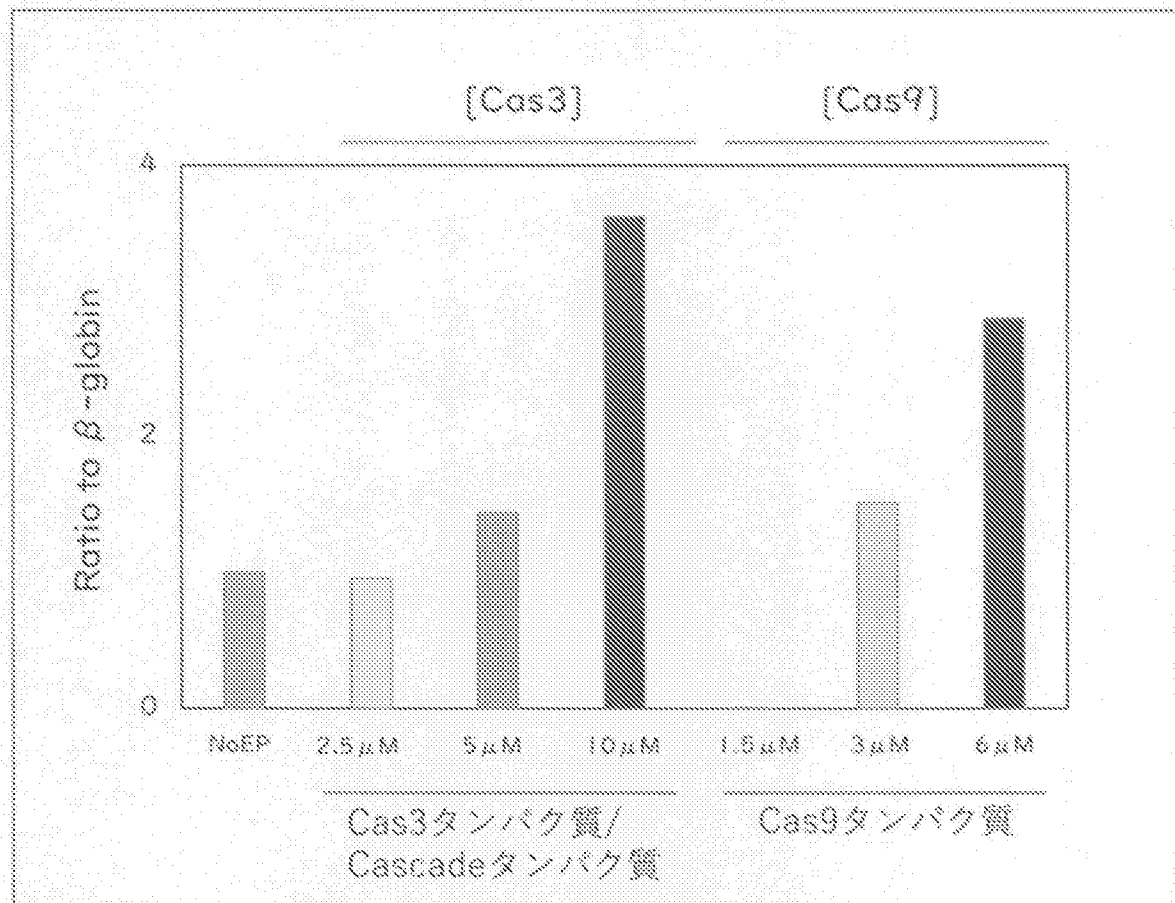
レオチド、又は該ポリヌクレオチドを含む発現ベクター、及び

(C) BCL 1 1 A 遺伝子のエンハンサーを標的とする c r R N A
、該 c r R N A をコードするポリヌクレオチド、又は該ポリヌクレオ
チドを含む発現ベクター
を含む、キット。

[図1]



[図2]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2024/038444

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
<i>C12N 15/09</i> (2006.01)i; <i>C12N 5/10</i> (2006.01)i; <i>C12N 5/0789</i> (2010.01)i; <i>C12N 15/12</i> (2006.01)n FI: C12N15/09 110; C12N5/10 ZNA; C12N5/0789; C12N15/12		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12N15/09; C12N5/10; C12N5/0789; C12N15/12		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Published examined utility model applications of Japan 1922-1996 Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2024 Registered utility model specifications of Japan 1996-2024 Published registered utility model applications of Japan 1994-2024		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); Cplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 2019-513407 A (CRISPR THERAPEUTICS AG.) 30 May 2019 (2019-05-30) claims, paragraphs [0049], [0072], example 14, fig. 3	4-5
Y		1-6
Y	WO 2018/225858 A1 (OSAKA UNIVERSITY) 13 December 2018 (2018-12-13) examples A-2	1-6
Y	WO 2020/184723 A1 (TOKUSHIMA UNIVERSITY) 17 September 2020 (2020-09-17) paragraph [0004]	1-6
Y	WO 2022/186063 A1 (C4U CORPORATION) 09 September 2022 (2022-09-09) paragraph [0003]	1-6
Y	JP 2022-547105 A (BOYA EIHE (BEIJING) BIOTECHNOLOGY CO., LTD.) 10 November 2022 (2022-11-10) paragraphs [0050]-[0051]	1-6
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "D" document cited by the applicant in the international application "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 08 January 2025		Date of mailing of the international search report 21 January 2025
Name and mailing address of the ISA/JP Japan Patent Office (ISA/JP) 3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915 Japan		Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2024/038444

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2021-505587 A (VERTEX PHARMACEUTICALS INCORPORATED) 18 February 2021 (2021-02-18) paragraph [0063]	1-6

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2024/038444

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

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/JP2024/038444

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
JP	2019-513407	A	30 May 2019	US 2019/0201553 A1 claims, paragraphs [0056], [0173], example 14, fig. 3	
				WO 2017/182881 A2	
				EP 3445388 A2	
				KR 10-2019-0008533 A	
				CN 109715198 A	

WO	2018/225858	A1	13 December 2018	US 2020/0102580 A1 examples A-2	
				EP 3636753 A1	
				CN 110770342 A	
				KR 10-2020-0015700 A	

WO	2020/184723	A1	17 September 2020	(Family: none)	

WO	2022/186063	A1	09 September 2022	US 2024/0141310 A1 paragraph [0003]	
				EP 4303310 A1	
				CN 116940689 A	
				KR 10-2023-0150998 A	

JP	2022-547105	A	10 November 2022	US 2022/0340969 A1 paragraphs [0071]-[0072]	
				WO 2021/043278 A1	
				EP 4026910 A1	
				CN 114269941 A	
				KR 10-2022-0053671 A	

JP	2021-505587	A	18 February 2021	US 2020/0384033 A1 paragraph [0071]	
				WO 2019/113149 A1	
				EP 3720473 A1	
				KR 10-2020-0106159 A	
				CN 111629747 A	

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC）） C12N 15/09(2006.01)i; C12N 5/10(2006.01)i; C12N 5/0789(2010.01)i; C12N 15/12(2006.01)n FI: C12N15/09 110; C12N5/10 ZNA; C12N5/0789; C12N15/12		
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC）） C12N15/09; C12N5/10; C12N5/0789; C12N15/12 最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの 日本国実用新案公報 1922 - 1996年 日本国公開実用新案公報 1971 - 2024年 日本国実用新案登録公報 1996 - 2024年 日本国登録実用新案公報 1994 - 2024年		
国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語） JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); Cplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X	JP 2019-513407 A (クリスパー セラピューティクス アクチュエータゼルシャフト) 30.05.2019 (2019 - 05 - 30) 特許請求の範囲、[0049]、[0072]、実施例14、図3	4-5
Y		1-6
Y	WO 2018/225858 A1 (国立大学法人大阪大学) 13.12.2018 (2018 - 12 - 13) 実施例A-2	1-6
Y	WO 2020/184723 A1 (国立大学法人徳島大学) 17.09.2020 (2020 - 09 - 17) [0004]	1-6
Y	WO 2022/186063 A1 (C4U株式会社) 09.09.2022 (2022 - 09 - 09) [0003]	1-6
Y	JP 2022-547105 A (博雅▲輯▼因(北京)生物科技有限公司) 10.11.2022 (2022 - 11 - 10) [0050] - [0051]	1-6
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input checked="" type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー “A” 特に関連のある文献ではなく、一般的技术水準を示すもの “D” 国際出願で出願人が先行技術文献として記載した文献 “E” 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの “L” 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す） “O” 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 “P” 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献 “T” 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの “X” 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの “Y” 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの “&” 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日	08.01.2025	国際調査報告の発送日 21.01.2025
名称及びあて先 日本国特許庁(ISA/JP) 〒100-8915 日本国 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	権限のある職員（特許庁審査官） 三谷 直也 4B 2564 電話番号 03-3581-1101 内線 3448	

C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	JP 2021-505587 A (パーテックス ファーマシューティカルズ インコーポレイテッド) 18.02.2021 (2021 - 02 - 18) [0063]	1-6

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

1. この国際出願で開示されたヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、以下の配列表に基づき国際調査を行った。
- a. 出願時における国際出願の一部を構成する配列表
- b. 国際出願日後に、国際調査のために提出された配列表（PCT規則13の3.1(a)）
 配列表が出願時の国際出願の開示の範囲を超えるものではない旨の陳述書が添付されていた。
2. この国際出願で開示されたヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、この国際調査報告は、WIPO標準ST.26に準拠する配列表なしで有意義な国際調査をすることができる限度において作成された。
3. 補足意見：

国際調査報告
 パテントファミリーに関する情報

国際出願番号

PCT/JP2024/038444

引用文献	公表日	パテントファミリー文献	公表日
JP 2019-513407 A	30.05.2019	US 2019/0201553 A1 特許請求の範囲、[0056]、[0173]、実施例14、図3 WO 2017/182881 A2 EP 3445388 A2 KR 10-2019-0008533 A CN 109715198 A	
WO 2018/225858 A1	13.12.2018	US 2020/0102580 A1 実施例A-2 EP 3636753 A1 CN 110770342 A KR 10-2020-0015700 A	
WO 2020/184723 A1	17.09.2020	(ファミリーなし)	
WO 2022/186063 A1	09.09.2022	US 2024/0141310 A1 [0003] EP 4303310 A1 CN 116940689 A KR 10-2023-0150998 A	
JP 2022-547105 A	10.11.2022	US 2022/0340969 A1 [0071] - [0072] WO 2021/043278 A1 EP 4026910 A1 CN 114269941 A KR 10-2022-0053671 A	
JP 2021-505587 A	18.02.2021	US 2020/0384033 A1 [0071] WO 2019/113149 A1 EP 3720473 A1 KR 10-2020-0106159 A CN 111629747 A	