

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2020-517247

(P2020-517247A)

(43) 公表日 令和2年6月18日(2020.6.18)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/09 1 1 0	4 B 0 6 3
C 1 2 N 15/63 (2006.01)	C 1 2 N 15/63 Z N A Z	4 B 0 6 5
C 4 0 B 40/06 (2006.01)	C 4 0 B 40/06	
C 1 2 Q 1/02 (2006.01)	C 1 2 Q 1/02	
C 1 2 Q 1/6869 (2018.01)	C 1 2 Q 1/6869 Z	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 117 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2019-556689 (P2019-556689)	(71) 出願人 503469393 イェール ユニバーシティ アメリカ合衆国 コネチカット州 ニュー ヘブン トウ ホイットニー アベニュー
(86) (22) 出願日 平成30年4月17日 (2018.4.17)	
(85) 翻訳文提出日 令和1年12月9日 (2019.12.9)	
(86) 国際出願番号 PCT/US2018/027967	
(87) 国際公開番号 W02018/195073	
(87) 国際公開日 平成30年10月25日 (2018.10.25)	(74) 代理人 100102978 弁理士 清水 初志
(31) 優先権主張番号 62/602,290	(74) 代理人 100102118 弁理士 春名 雅夫
(32) 優先日 平成29年4月18日 (2017.4.18)	(74) 代理人 100160923 弁理士 山口 裕孝
(33) 優先権主張国・地域又は機関 米国 (US)	(74) 代理人 100119507 弁理士 刑部 俊
	(74) 代理人 100142929 弁理士 井上 隆一
	最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 Tリンパ球ゲノム操作のためのプラットフォームおよびそのインビボハイスルーブットスクリーニング法

(57) 【要約】

本発明は、インビボでのT細胞ゲノム編集およびスクリーニングのための組成物および方法を含む。ある種の局面において、本発明は、ゲノムスケール突然変異誘発のためのsgRNAライブラリを含む。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

5'長末端反復(LTR)配列、U6プロモーター配列、BsmB1制限部位、EFS配列、sgRNA発現カセット、Thy1.1カセット、3'LTR配列、およびアンピシリン耐性遺伝子配列(AmpR)を含む、ベクター。

【請求項 2】

SEQ ID NO: 129,213、SEQ ID NO: 129,214、およびSEQ ID NO: 129,215からなる群より選択される核酸配列を含む、請求項1に記載のベクター。

【請求項 3】

前記sgRNA発現カセットが、SEQ ID NO: 1~129,209からなる群より選択されるヌクレオチド配列を含むsgRNAを発現する、請求項1または2に記載のベクター。

10

【請求項 4】

前記sgRNA発現カセットが、SEQ ID NO: 129,222~140,680からなる群より選択されるヌクレオチド配列を含むsgRNAを発現する、請求項1または2に記載のベクター。

【請求項 5】

前記sgRNA発現カセットが、SEQ ID NO: 1~129,209からなる群より選択されるヌクレオチド配列からなるsgRNAを発現する、請求項1または2に記載のベクター。

【請求項 6】

前記sgRNA発現カセットが、SEQ ID NO: 129,222~140,680からなる群より選択されるヌクレオチド配列からなるsgRNAを発現する、請求項1または2に記載のベクター。

20

【請求項 7】

複数のベクターを含み、各ベクターが、SEQ ID NO: 1~129,209からなる群より選択されるヌクレオチド配列を含むsgRNAのための発現カセットを含む、sgRNAライブラリ。

【請求項 8】

各ベクターが、SEQ ID NO: 1~129,209からなる群より選択されるヌクレオチド配列からなるsgRNAのための発現カセットを含む、請求項7に記載のsgRNAライブラリ。

【請求項 9】

複数のベクターを含み、各ベクターが、SEQ ID NO: 129,222~140,680からなる群より選択されるヌクレオチド配列を含むsgRNAのための発現カセットを含む、sgRNAライブラリ。

30

【請求項 10】

各ベクターが、SEQ ID NO: 129,222~140,680からなる群より選択されるヌクレオチド配列からなるsgRNAのための発現カセットを含む、請求項9に記載のsgRNAライブラリ。

【請求項 11】

前記複数のベクターが、5'長末端反復(LTR)配列、U6プロモーター配列、BsmB1制限部位、EFS配列、sgRNA発現カセット、Thy1.1カセット、3'LTR配列、およびアンピシリン耐性遺伝子配列(AmpR)を含む、請求項7~10のいずれか一項に記載のsgRNAライブラリ。

【請求項 12】

以下の段階を含む、インビトロでT細胞のゲノム編集およびスクリーニングを行う方法

40

：
該T細胞をCas9およびsgRNAライブラリと接触させ、それにより、該T細胞がゲノム編集を受ける段階であって、該sgRNAライブラリが、複数のベクターを含み、各ベクターが、SEQ ID NO: 1~129,209からなる群より選択されるヌクレオチド配列を含むsgRNAのための発現カセットを含む、該段階；ならびに

該T細胞をインビトロでスクリーニングする段階。

【請求項 13】

以下の段階を含む、インビトロでT細胞のゲノム編集およびスクリーニングを行う方法

：
該T細胞をCas9およびsgRNAライブラリと接触させ、それにより、該T細胞がゲノム編集を受ける段階であって、該sgRNAライブラリが、複数のベクターを含み、各ベクターが、S

50

EQ ID NO: 129,222 ~ 140,680からなる群より選択されるヌクレオチド配列を含むsgRNAのための発現カセットを含む、該段階；ならびに

該T細胞をインビトロでスクリーニングする段階。

【請求項14】

以下の段階を含む、インビボでT細胞のゲノム編集およびスクリーニングを行う方法：

単離されたT細胞をCas9およびsgRNAライブラリと接触させ、それにより、該T細胞がゲノム編集を受けて、改変されたT細胞を生成する段階であって、該sgRNAライブラリが、複数のベクターを含み、各ベクターが、SEQ ID NO: 1 ~ 129,209からなる群より選択されるヌクレオチド配列を含むsgRNAのための発現カセットを含む、該段階、

該改変されたT細胞を動物に投与する段階、ならびに

該T細胞をインビボでスクリーニングする段階。

10

【請求項15】

以下の段階を含む、インビボでT細胞のゲノム編集およびスクリーニングを行う方法：

単離されたT細胞をCas9およびsgRNAライブラリと接触させ、それにより、該T細胞がゲノム編集を受けて、改変されたT細胞を生成する段階であって、該sgRNAライブラリが、複数のベクターを含み、各ベクターが、SEQ ID NO: 129,222 ~ 140,680からなる群より選択されるヌクレオチド配列を含むsgRNAのための発現カセットを含む、該段階、

該改変されたT細胞を動物に投与する段階、ならびに

該T細胞をインビボでスクリーニングする段階。

【請求項16】

20

各ベクターが、SEQ ID NO: 1 ~ 129,209からなる群より選択されるヌクレオチド配列からなるsgRNAのための発現カセットを含む、請求項12または14に記載の方法。

【請求項17】

各ベクターが、SEQ ID NO: 129,222 ~ 140,680からなる群より選択されるヌクレオチド配列からなるsgRNAのための発現カセットを含む、請求項13または15に記載の方法。

【請求項18】

前記T細胞が、CD8+細胞、CD4+細胞、またはT調節(Treg)細胞、Th1細胞、Th2細胞、Th17細胞、濾胞性ヘルパーT細胞(Tfh)、T記憶細胞、Tエフェクタ細胞、Tエフェクタ記憶細胞、操作されたT細胞、およびCAR T細胞からなる群より選択される、請求項12 ~ 17のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項19】

改変されたT細胞を単離および/または濃縮する段階をさらに含む、請求項12 ~ 15のいずれか一項に記載の方法。

【請求項20】

前記動物がヒトである、請求項12 ~ 15のいずれか一項に記載の方法。

【請求項21】

前記スクリーニングによって、前記動物が患っている状態に關与する遺伝子に関する情報が提供される、請求項12 ~ 15のいずれか一項に記載の方法。

【請求項22】

前記状態ががんである、請求項21に記載の方法。

40

【請求項23】

スクリーニングが、ヌクレオチド配列決定、sgRNA PCR、およびフローサイトメトリーからなる群より選択される少なくとも1つの方法を含む、請求項12 ~ 15のいずれか一項に記載の方法。

【請求項24】

複数のベクターを含むsgRNAライブラリと、キットを使用するための取り扱い説明材料とを含み、各ベクターが、SEQ ID NO: 1 ~ 129,209からなる群より選択されるヌクレオチド配列を含むsgRNAのための発現カセットを含む、該キット。

【請求項25】

前記複数のベクターの各々が、5'長末端反復(LTR)配列、U6プロモーター配列、BsmB1制

50

限部位、EFS配列、sgRNA発現カセット、Thy1.1カセット、3' LTR配列、およびアンピシリン耐性遺伝子配列(AmpR)を含む、請求項24に記載のキット。

【請求項 26】

Cas9をさらに含む、請求項24に記載のキット。

【請求項 27】

複数のベクターを含むsgRNAライブラリと、キットを使用するための取り扱い説明材料とを含み、各ベクターが、SEQ ID NO: 129,222~140,680からなる群より選択されるヌクレオチド配列を含むsgRNAのための発現カセットを含む、該キット。

【請求項 28】

前記複数のベクターの各々が、5'長末端反復(LTR)配列、U6プロモーター配列、BsmB1制限部位、EFS配列、sgRNA発現カセット、Thy1.1カセット、3' LTR配列、およびアンピシリン耐性遺伝子配列(AmpR)を含む、請求項27に記載のキット。

10

【請求項 29】

Cas9をさらに含む、請求項27に記載のキット。

【請求項 30】

5'長末端反復(LTR)配列、U6プロモーター配列、BsmB1制限部位、EFS配列、sgRNA発現カセット、mCherry配列、2Aペプチド、cOVA配列、3' LTR配列、およびアンピシリン耐性遺伝子配列(AmpR)を含む、ベクター。

【請求項 31】

SEQ ID NO: 129,216の核酸配列を含む、請求項30に記載のベクター。

20

【請求項 32】

5'逆方向末端反復(ITR)配列、U6プロモーター配列、BbsI制限部位、sgRNA発現カセット、EFS配列、SB100xカセット、3' ITR配列、およびアンピシリン耐性遺伝子配列(AmpR)を含む、ベクター。

【請求項 33】

SEQ ID NO: 129,217の核酸配列を含む、請求項32に記載のベクター。

【請求項 34】

5'逆方向末端反復(ITR)配列、U6プロモーター配列、BbsI制限部位、sgRNA発現カセット、EFS配列、SB100xカセット、Thy1.1カセット、3' ITR配列、およびアンピシリン耐性遺伝子配列(AmpR)を含む、ベクター。

30

【請求項 35】

SEQ ID NO: 129,218の核酸配列を含む、請求項34に記載のベクター。

【請求項 36】

5'逆方向末端反復(ITR)配列、U6プロモーター配列、BbsI制限部位、sgRNA発現カセット、3' ITR配列、およびアンピシリン耐性遺伝子配列(AmpR)を含む、ベクター。

【請求項 37】

SEQ ID NO: 129,219の核酸配列を含む、請求項36に記載のベクター。

40

【請求項 38】

5'逆方向末端反復(ITR)配列、U6プロモーター配列、BbsI制限部位、sgRNA発現カセット、EFS配列、Thy1.1カセット、3' ITR配列、およびアンピシリン耐性遺伝子配列(AmpR)を含む、ベクター。

【請求項 39】

SEQ ID NO: 129,220の核酸配列を含む、請求項38に記載のベクター。

【請求項 40】

5'逆方向末端反復(ITR)配列、U6プロモーター配列、BbsI制限部位、sgRNA発現カセット、EFS配列、SB100xカセット、GFP-NLS融合カセット、3' ITR配列、およびアンピシリン耐性遺伝子配列(AmpR)

50

を含む、ベクター。

【請求項 4 1】

SEQ ID NO: 129,221の核酸配列を含む、請求項40に記載のベクター。

【請求項 4 2】

前記sgRNA発現カセットが、SEQ ID NO: 1~129,209からなる群より選択されるヌクレオチド配列を含むsgRNAを発現する、請求項30~40のいずれか一項に記載のベクター。

【請求項 4 3】

前記sgRNA発現カセットが、SEQ ID NO: 129,222~140,680からなる群より選択されるヌクレオチド配列を含むsgRNAを発現する、請求項30~40のいずれか一項に記載のベクター

。

【請求項 4 4】

前記sgRNA発現カセットが、SEQ ID NO: 1~129,209からなる群より選択されるヌクレオチド配列からなるsgRNAを発現する、請求項30~40のいずれか一項に記載のベクター。

【請求項 4 5】

前記sgRNA発現カセットが、SEQ ID NO: 129,222~140,680からなる群より選択されるヌクレオチド配列からなるsgRNAを発現する、請求項30~40のいずれか一項に記載のベクター。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、米国特許法119条(e)の下で、2017年4月18日付で出願され参照によりその全体が本明細書に組み入れられる米国仮特許出願第62/602,290号の優先権を有する。

【0002】

連邦政府による資金提供を受けた研究または開発に関する声明

本発明は、国立衛生研究所によって授与されたCA209992、CA121974、CA196530、およびGM007205の下で政府の支援を受けてなされた。連邦政府は本発明において一定の権利を有する。

【背景技術】

【0003】

発明の背景

CD8⁺ T細胞は、細胞内病原体および腫瘍に対する細胞性の適応免疫応答を開始することにより、体の細胞完全性を維持する中心的な役割を果たす。病原体特異的CD8⁺ T細胞の選択的活性化は、表面主要組織適合複合体(MHC)クラスI (MHC-I)の同族抗原の認識により媒介され、これがT細胞増殖、サイトカイン分泌、および標的細胞の選択的殺滅をもたらす。この細胞集団の欠損は再発性の感染症またはがんを引き起こしうるが、CD8⁺ T細胞の調節不全活性化は自己免疫および重度の免疫病理を引き起こしうる。

【0004】

CD8⁺ T細胞は、細胞内抗原に対するその特異性および細胞性免疫応答におけるその役割により、多くの新しいがん治療法の焦点となっている。最近開発された最も強力な薬物は、免疫チェックポイント阻害剤である。この新しいクラスの薬物は、CTLA-4またはPD-1の活性を中和することにより、CD8⁺ T細胞の抗腫瘍応答を増強する。CTLA-4の活性を遮断すると、十分な抗原の非存在下でナイーブCD8⁺ T細胞の活性化が可能になる。PD-1活性を阻害すると、消耗したCD8⁺ T細胞が再活性化されて増殖し、悪性細胞を殺滅させる。これらの薬物は、黒色腫および肺がんを含む複数のがん型の処置において効果的であることが示されている。単独療法または併用療法として用いられたこれらの薬物の効力を調べる継続的な研究が行われている。さらなる研究により、潜在的なチェックポイント調節について4-1BB、CD27、CD28、ICOS、LAG3、OX-40、TIM3、およびVISTAが特定された。より新しい治療法では、トランスジェニック発現キメラ抗原受容体(CAR-T)の制御下で活性化するようにCD8⁺ T細胞機構を適合させている。この方法は、造血器悪性腫瘍の処置に効果的であ

10

20

30

40

50

ることが証明されている。チェックポイント遮断およびCAR-T免疫療法は、従来の治療が失敗した場合に効果的であることが示されているが、患者の大部分は応答しないか、または望ましくない副作用があるため、これらの治療モードはまだ開発の初期段階にある。T細胞機能の新しい調節因子を特定し、身体の抗腫瘍応答をより良く増強するために、より体系的なアプローチを用いる必要がある。

【0005】

遺伝子セット特異的なRNAi/shRNAライブラリを用いた研究は、CD8⁺ T細胞機能およびサイトカイン産生を増強する新規T細胞遺伝子を特定するために使用されている。これらの分子ツールは相補的結合を通じて標的mRNAの翻訳を抑制することにより動作するが、RNAiの効果は標的mRNAおよび導入された低分子干渉RNAの発現レベルによって限定される。

10

【0006】

CRISPR技術の開発および適用により、ゲノム編集を実行する能力が劇的に増強された。ハイスループット遺伝子スクリーニングが開発され、複数の適用における新規遺伝子の発見に利用されている。T細胞におけるCRISPRターゲティングの適用は、そのゲノムを操作する最初の段階であり、これは、スクリーニング技術とともに、ハイスループット遺伝子スクリーニングが、超並列方式でのT細胞生物学における重要な因子の偏りのない発見の扉を開くという仮説につながる。しかしながら、T細胞の大規模なゲノム編集は、おそらく複数の技術的障害、リンパ球レパトリーの複雑さ、リンパ系もしくは非リンパ系臓器の組織構造、または腫瘍微小環境のため、報告されていない。

20

【0007】

当技術分野において、T細胞での大規模ゲノム編集に使用できる組成物および方法が必要である。本発明はこの必要性を満たす。

【発明の概要】

【0008】

本明細書において記述されるように、本発明は、インビトロおよびインビボでのT細胞ゲノム編集およびスクリーニングのための組成物および方法に関する。

【0009】

本発明の1つの局面は、5'長末端反復(LTR)配列、U6プロモーター配列、BsmB1制限部位、EFS配列、sgRNA発現カセット、Thy1.1カセット、3'LTR配列、およびアンピシリン耐性遺伝子配列(AmpR)を含む、ベクターを含む。

30

【0010】

本発明の別の局面は、複数のベクターを含むsgRNAライブラリを含み、各ベクターが、SEQ ID NO: 1~129,209からなる群より選択されるヌクレオチド配列を含むsgRNAのための発現カセットを含む。

【0011】

本発明のさらに別の局面は、複数のベクターを含むsgRNAライブラリを含み、各ベクターが、SEQ ID NO: 129,222~140,680からなる群より選択されるヌクレオチド配列を含むsgRNAのための発現カセットを含む。

【0012】

本発明の別の局面は、インビトロでT細胞のゲノム編集およびスクリーニングを行う方法を含む。本方法は、T細胞をCas9およびsgRNAライブラリと接触させる段階を含む。sgRNAライブラリは、複数のベクターを含み、各ベクターが、SEQ ID NO: 1~129,209からなる群より選択されるヌクレオチド配列を含むsgRNAのための発現カセットを含む。T細胞はゲノム編集を受けて、T細胞はインビトロでスクリーニングされる。

40

【0013】

本発明のさらに別の局面は、インビトロでT細胞のゲノム編集およびスクリーニングを行う方法を含む。本方法は、T細胞をCas9およびsgRNAライブラリと接触させる段階を含む。sgRNAライブラリは、複数のベクターを含み、各ベクターが、SEQ ID NO: 129,222~140,680からなる群より選択されるヌクレオチド配列を含むsgRNAのための発現カセットを含む。T細胞はゲノム編集を受けて、T細胞はインビトロでスクリーニングされる。

50

【 0 0 1 4 】

本発明のさらに別の局面は、インビポでT細胞のゲノム編集およびスクリーニングを行う方法を含む。本方法は、単離されたT細胞をCas9およびsgRNAライブラリと接触させる段階を含む。sgRNAライブラリは、複数のベクターを含み、各ベクターが、SEQ ID NO: 1~129,209からなる群より選択されるヌクレオチド配列を含むsgRNAのための発現カセットを含む。T細胞はゲノム編集を受けて、改変されたT細胞を生成する。改変されたT細胞は動物に投与されて、T細胞はインビポでスクリーニングされる。

【 0 0 1 5 】

本発明の別の局面は、インビポでT細胞のゲノム編集およびスクリーニングを行う方法を含む。本方法は、単離されたT細胞をCas9およびsgRNAライブラリと接触させる段階を含む。sgRNAライブラリは、複数のベクターを含み、各ベクターが、SEQ ID NO: 129,222~140,680からなる群より選択されるヌクレオチド配列を含むsgRNAのための発現カセットを含む。T細胞はゲノム編集を受けて、改変されたT細胞を生成する。改変されたT細胞は動物に投与されて、T細胞はインビポでスクリーニングされる。

10

【 0 0 1 6 】

いくつかの態様において、Cas9はベクターにコードされる。いくつかの態様において、Cas9はタンパク質である。

【 0 0 1 7 】

本発明のさらに別の局面は、複数のベクターを含むsgRNAライブラリと、キットを使用するための取り扱い説明材料とを含む、キットを含み、各ベクターが、SEQ ID NO: 1~129,209からなる群より選択されるヌクレオチド配列を含むsgRNAのための発現カセットを含む。

20

【 0 0 1 8 】

本発明のさらに別の局面は、複数のベクターを含むsgRNAライブラリと、キットを使用するための取り扱い説明材料とを含む、キットを含み、各ベクターが、SEQ ID NO: 129,222~140,680からなる群より選択されるヌクレオチド配列を含むsgRNAのための発現カセットを含む。

【 0 0 1 9 】

本発明の別の局面は、5'長末端反復(LTR)配列、U6プロモーター配列、BsmB1制限部位、EFS配列、sgRNA発現カセット、mCherry配列、2Aペプチド、cOVA配列、3'LTR配列、およびアンピシリン耐性遺伝子配列(AmpR)を含む、ベクターを含む。

30

【 0 0 2 0 】

本発明のさらに別の局面は、5'逆方向末端反復(ITR)配列、U6プロモーター配列、BbsI制限部位、sgRNA発現カセット、EFS配列、SB100xカセット、3'ITR配列、およびアンピシリン耐性遺伝子配列(AmpR)を含む、ベクターを含む。

【 0 0 2 1 】

本発明のさらに別の局面は、5'逆方向末端反復(ITR)配列、U6プロモーター配列、BbsI制限部位、sgRNA発現カセット、EFS配列、SB100xカセット、Thy1.1カセット、3'ITR配列、およびアンピシリン耐性遺伝子配列(AmpR)を含む、ベクターを含む。

40

【 0 0 2 2 】

本発明の別の局面は、5'逆方向末端反復(ITR)配列、U6プロモーター配列、BbsI制限部位、sgRNA発現カセット、3'ITR配列、およびアンピシリン耐性遺伝子配列(AmpR)を含む、ベクターを含む。

【 0 0 2 3 】

本発明のさらに別の局面は、5'逆方向末端反復(ITR)配列、U6プロモーター配列、BbsI制限部位、sgRNA発現カセット、EFS配列、Thy1.1カセット、3'ITR配列、およびアンピシリン耐性遺伝子配列(AmpR)を含む、ベクターを含む。

【 0 0 2 4 】

本発明のさらに別の局面は、5'逆方向末端反復(ITR)配列、U6プロモーター配列、BbsI制限部位、sgRNA発現カセット、EFS配列、SB100xカセット、GFP-NLS融合カセット、3'IT

50

R配列、およびアンピシリン耐性遺伝子配列(AmpR)を含む、ベクターを含む。

【0025】

本明細書において記載される本発明の上記の局面または任意の他の局面のさまざまな態様において、ベクターは、SEQ ID NO: 129,213、SEQ ID NO: 129,214、およびSEQ ID NO: 129,215からなる群より選択される核酸配列を含む。

【0026】

1つの態様において、sgRNA発現カセットは、SEQ ID NO: 1~129,209からなる群より選択されるヌクレオチド配列を含むsgRNAを発現する。別の態様において、sgRNA発現カセットは、SEQ ID NO: 129,222~140,680からなる群より選択されるヌクレオチド配列を含むsgRNAを発現する。さらに別の態様において、sgRNA発現カセットは、SEQ ID NO: 1~129,209からなる群より選択されるヌクレオチド配列からなるsgRNAを発現する。さらに別の態様において、sgRNA発現カセットは、SEQ ID NO: 129,222~140,680からなる群より選択されるヌクレオチド配列からなるsgRNAを発現する。

【0027】

1つの態様において、各ベクターは、SEQ ID NO: 1~129,209からなる群より選択されるヌクレオチド配列からなるsgRNAのための発現カセットを含む。別の態様において、各ベクターは、SEQ ID NO: 129,222~140,680からなる群より選択されるヌクレオチド配列からなるsgRNAのための発現カセットを含む。

【0028】

1つの態様において、複数のベクターは、5'長末端反復(LTR)配列、U6プロモーター配列、BsmB1制限部位、EFS配列、sgRNA発現カセット、Thy1.1カセット、3'LTR配列、およびアンピシリン耐性遺伝子配列(AmpR)を含む。

【0029】

1つの態様において、T細胞は、CD8+細胞、CD4+細胞、またはT調節(Treg)細胞、Th1細胞、Th2細胞、Th17細胞、濾胞性ヘルパーT細胞(Tfh)、T記憶細胞、Tエフェクタ細胞、Tエフェクタ記憶細胞、操作されたT細胞、およびCAR T細胞からなる群より選択される。

【0030】

1つの態様において、本方法は、改変されたT細胞を単離および/または濃縮する段階をさらに含む。

【0031】

1つの態様において、動物はヒトである。1つの態様において、状態はがんである。

【0032】

1つの態様において、スクリーニングによって、動物が患っている状態に関する遺伝子に関する情報が提供される。別の態様において、スクリーニングは、ヌクレオチド配列決定、sgRNA PCR、およびフローサイトメトリーからなる群より選択される少なくとも1つの方法を含む。

【0033】

1つの態様において、キットはCas9をさらに含む。いくつかの態様において、Cas9はベクターにコードされる。いくつかの態様において、Cas9はタンパク質である。

【0034】

1つの態様において、ベクターはSEQ ID NO: 129,216の核酸配列を含む。別の態様において、ベクターはSEQ ID NO: 129,217の核酸配列を含む。さらに別の態様において、ベクターはSEQ ID NO: 129,218の核酸配列を含む。さらに別の態様において、ベクターはSEQ ID NO: 129,219の核酸配列を含む。1つの態様において、ベクターはSEQ ID NO: 129,220の核酸配列を含む。別の態様において、ベクターはSEQ ID NO: 129,221の核酸配列を含む。

【図面の簡単な説明】

【0035】

本発明の特定の態様の以下の詳細な説明は、添付の図面と併せて読むとより良好に理解されるであろう。本発明を例証する目的で、図面には例示的な態様が示されている。しか

しながら、本発明は、図面に示されている態様の正確な配置および手段に限定されないことが、理解されるべきである。

【図1】図1A~1Kは、野生型マウスへの養子移入後のゲノムスケールCRISPRライブラリ突然変異誘発CD8⁺ T細胞のインビボ分析を描く一連のプロットおよび画像である。図1Aは、sgRNA発現カセットおよびThy1.1発現カセットを含むT細胞CRISPRノックアウトベクターの設計の概略図である。図1Bは、ライブラリクローニング、ウイルス産生、ナイーブCD8⁺ T細胞の単離および感染、養子移入、ならびにハイスループットsgRNA配列決定による臓器でのCRISPRが標的にするCD8⁺ T_{eff}細胞の生存分析を伴う、本明細書において記述される実験の概略図を示す。収集された臓器は、代表的な非リンパ系臓器として肝臓、膵臓、肺、筋肉および脳、ならびにリンパ系臓器として脾臓およびいくつかのタイプのリンパ節(LN)を含む。収集されたLNは、3つの群: LN1 - 鼠径リンパ節、膝窩リンパ節、および上腕リンパ節から構成される皮膚流入領域リンパ節(sLN); LN2 - 6つの表在性頸部リンパ節を伴う頸部リンパ節(cLN); ならびにLN3 - 腸間膜リンパ節および膵リンパ節を含む腹部リンパ節(aLN)を含む。図1Cは、ゲノムスケールCRISPRライブラリ(MKO)をコードするレンチウイルスによるナイーブCas9 CD8⁺ T細胞感染性を示す一連のFACSプロットである。Thy1.1表面染色は、形質導入されていないT細胞と比較して、Thy1.1発現が有意に上昇した形質導入T細胞の集団を示す。図1Dは、臓器タイプごとに群化された、全ての臓器サンプルについて検出されたsgRNAの数のドットプロットである。各タイプのサンプル数は次の通りである: LN (n = 計20、マウスあたり3、計7マウス。LN3はm4では使用できない)、脾臓、脳、肝臓、肺、筋肉および膵臓 (n = 各7、マウスあたり1、計7マウス)。データを平均 ± 標準誤差 (s.e.m) として示す。図1E~1Fは、代表的な臓器でのsgRNA組成の円グラフである。各サンプルの全読みだしの2%以上を含んだsgRNAが示されており、残りの読み出しは「その他」と分類されている。明確にするため、各sgRNAに関連付けられた遺伝子名のみを示す。モノクローン性(全読み出しの90%以上を有する1種類の主要クローン)、オリゴクローン性(それぞれ全読み出しの2%以上を有する3~10種類の主要クローン)およびポリクローン性(2%またはそれ以上の読み出しを有する10種類超のクローン)組成のT細胞変種がLN、脾臓、肝臓、膵臓、肺、脳および筋肉のようなさまざまな臓器に存在する。図1Gは、プラスミドライブラリ(青色、n = 1)、注射前ライブラリに感染したナイーブCD8⁺ T細胞の細胞ライブラリ(緑色、n = 3)、および注射後7日の複数のマウスからのCD8⁺ T_{eff}細胞を含むさまざまな臓器(オレンジ色、n = 7マウス、計62サンプル)を含め、全てのサンプルにおけるsgRNAライブラリ出現 (representation) 全体のボックスドットプロットである。sgRNA出現は、100万回あたりのlog₂読み出し(rpm)に関して描かれている。分析される組織は、リンパ節(LN)、脾臓、脳、肝臓、肺、筋肉、および膵臓を含む。図1Hは、多様なTCRを有するCD8⁺ T細胞での輸送および生存についてのゲノムスケールスクリーニングからの全サンプルにおけるsgRNAライブラリ出現の相関分析を示す。多様なTCRレパトリーを有するCas9 CD8⁺ T細胞を用いた最初のWTスクリーニングでの全サンプルにわたるsgRNAライブラリ出現のペアワイズピアソン相関性のヒートマップ。サンプルには、プラスミドライブラリ(n = 1)、注射前ライブラリに感染したナイーブCD8⁺ T細胞の細胞ライブラリ(n = 3)、および注射後7日の複数のマウスからのCD8⁺ T_{eff}細胞を含むさまざまな臓器(n = 7マウス、計62サンプル)が含まれていた。相関性は、log₂ rpm値に基づいて計算された。細胞およびプラスミドサンプルは互いに高度に相関していたが、臓器サンプルは他の臓器サンプルとほとんど相関していた。図1Iは、(FDR < 0.5%)で濃縮されている臓器の数でランク付けされた全臓器にわたる上位sgRNAのウォーターフォールプロットである。挿入図は、臓器サンプルの20%以上で有意に濃縮された全sgRNAを示す。図1Jは、少なくとも1つの臓器サンプルで有意に濃縮された0、1、2、または3つの独立したsgRNAを有する遺伝子の数の棒グラフである(FDR < 0.5%)。計115個の遺伝子は、少なくとも2つの独立したsgRNAが濃縮されていることが分かった。Cd247、Bpifb3、およびTsc2は、3つの独立した濃縮sgRNAがあることが分かった。図1Kは、上位の遺伝子ヒットを同定するための3つの濃縮基準のベン図である(1つのサンプルで2%以上の読み出し存在量(n = 227)、20%以上のサンプルで有意(関連する全てのsgRNAを考慮) (n = 118)、および2つ以上の独立した濃縮sgRNA (n =

10

20

30

40

50

115))。計11遺伝子が全3つの基準を満たした(Apc、Cd247、Csnk1a1、Fam103a1、Fam134b、Nf1、Pdc1、Phf21a、Prkar1a、Rab11b、およびTsc2)。

【図2】図2A~2Gは、野生型マウスにおけるMKO感染CD8⁺ T細胞の有意に濃縮されたsgRNAおよび遺伝子を示す一連のプロットおよび画像である。図2Aは、臓器タイプごとに群化された、全ての臓器サンプルについて有意に濃縮されたsgRNAの数のドットプロットである。sgRNA濃縮の統計的有意性は、NTCとの比較により判定され、FDR < 0.2%の閾値であった。有意に濃縮されたsgRNAの数は、サンプル間で異なり、10から392の範囲であった。データを平均 ± 標準誤差(s.e.m)として示す。図2Bは、全てのリンパ節サンプルで最も高度に濃縮されたsgRNAのヒートマップである(平均log₂ rpmが1以上); 横列はsgRNAに対応し、縦列は異なる臓器サンプルに対応する。sgRNA存在量は、log₂ rpmに関して描かれている。図2Cは、全臓器にわたる上位ランクのsgRNAのウォーターフォールプロットである(FDR < 0.2%)。挿入図は、臓器サンプルの50%以上で有意に濃縮された36個のsgRNAを示す。図2Dは、少なくとも1つの臓器サンプルで有意に濃縮された0、1、2または3つの独立したsgRNAを有する遺伝子の数の棒グラフである(FDR < 0.2%)。計80遺伝子は、2つの独立したsgRNAが濃縮されていることが分かった。Pdc1、Slc35c1、およびTsc2は、3つの独立した濃縮sgRNAを有することが分かった。図2Eは、上位の遺伝子ヒットを同定するための3つの濃縮基準のベン図のセットである(1つのサンプルで2%以上の読み出し存在量(n = 253)、25%以上のサンプルで有意(n = 79)、および2つ以上の独立した濃縮sgRNA (n=83))。計9遺伝子が全3つの基準を満たした。これらの遺伝子はAim1、Apc、Csnk1a1、Fam103a1、Nf1、Pdc1、Prkar1a、Spast、およびTsc2を含んだ。図2F: 上パネル: リンパ器官 対 非リンパ器官において有意に濃縮されたsgRNA (FDR < 0.2%)を比較するベン図。計1,566個のsgRNAが少なくとも1つのリンパ系サンプルにおいて濃縮され、1,332個のsgRNAが少なくとも1つの非リンパ系サンプルにおいて濃縮された。これらのうち、761個のsgRNAがリンパ系サンプルと非リンパ系サンプルの両方において濃縮された(重複の有意性, 超幾何学的検定によりpは0にほぼ等しい); 下パネル: リンパ節 対 脾臓において有意に濃縮されたsgRNAを比較するベン図。計1,426個のsgRNAが少なくとも1つのリンパ節において濃縮されていることが分かり、360個のsgRNAが少なくとも1つの脾臓サンプルにおいて濃縮されていた。これらのうち、220個のsgRNAがリンパ節と脾臓の両方のサンプルにおいて濃縮された(重複の有意性, 超幾何学的検定によりpは0にほぼ等しい)。図2Gは、非リンパ系組織(脳、肝臓、肺、筋肉、膵臓)において濃縮されたsgRNAの5方向ベン図である。計83個のsgRNAが、全5つの非リンパ器官において濃縮された。

【図3】図3A~3Fは、cOVA抗原を発現する腫瘍を移植されたRag1^{-/-}マウスにおけるMKO突然変異誘発OT-I; Cas9 CD8⁺ T_{eff}細胞のインビボ生存のフローサイトメトリー分析を示す一連のプロットおよび画像である。図3Aは、OT-IマウスとCas9マウスとの交配、OT-I; Cas9マウスからのナイーブCD8⁺ T細胞単離、CD8⁺ T細胞形質導入、E0771-mCh-cOVA腫瘍担持Rag1^{-/-}マウスへの養子移入、FACSによるE0771-mCh-cOVA腫瘍担持Rag1^{-/-}マウスの流入領域リンパ節、非流入領域リンパ節、脾臓、および腫瘍におけるCD8⁺ T_{eff}細胞生存および浸潤分析を伴う本明細書において記述される実験の概略図である。図3Bは、E0771細胞におけるMHC-I提示のためのSIINFEKL (SEQ ID NO: 129,210)ペプチドの力価測定を示す。E0771細胞に異なる濃度のSIINFEKLペプチドをパルスし、FACSを用いた表面染色の平均蛍光強度(MFI)によりMHC-I - ペプチド複合体(SIINFEKL:H-K2b)を測定した。図3Cは、E0771-mCh-cOVA細胞株における抗原提示の測定を示す。mCherry-2A-cOVA導入遺伝子をコードするレンチウイルスベクターをE0771細胞に形質導入し、単一細胞クローニングにより複数のクローン株を作製した。FACSを用いた表面染色の平均蛍光強度(MFI)によりMHC-I - ペプチド複合体(SIINFEKL:H-K2b)を測定した。図3Dは、異なる処置後のRag1^{-/-}マウスにおける乳腺脂肪体移植されたE0771-mCh-cOVA腫瘍の成長曲線である。PBS対照(n = 3)、ベクターに感染したOT-I; Cas9 CD8⁺ T_{eff}細胞の養子移入(n = 3)、およびMKOに感染したOT-I; Cas9 CD8⁺ T_{eff}細胞の養子移入(n = 8)。矢印は、MKOまたはベクター形質導入OT-I; Cas9 CD8⁺ T_{eff}細胞の養子移入時を示す。データを平均 ± 標準誤差(s.e.m)として示す。図3Eは、E0771-mCh-cOVA腫瘍担持Rag1^{-/-}マウスからの流入領域および非流入領域LN (それぞ

10

20

30

40

50

れdLNおよびndLN)、脾臓、肺、ならびに腫瘍(TIL)における養子移入された T_{eff} 細胞の代表的なFACSプロットを示す。図3Fは、E0771-mCh-cOVA腫瘍担持 $Rag1^{-/-}$ マウスからのdLN、ndLN、脾臓、肺、および腫瘍における養子移入されたOT-I; Cas9 $CD8^{+} T_{eff}$ 細胞のFACSデータの定量分析を示す。データを平均 \pm 標準偏差として示す。

【図4】図4A~4Jは、cOVA抗原を発現する腫瘍を移植された $Rag1^{-/-}$ マウスにおけるMKO突然変異誘発OT-I; Cas9 $CD8^{+} T_{eff}$ 細胞のインビボ生存のsgRNAライブラリ配列決定分析を示す一連のプロットおよび画像である。図4Aは、OT-I; Cas9マウスを作出するためのOT-IマウスとCas9マウスとの交配、OT-I; Cas9マウスの脾臓およびLNからのT細胞単離、MKOライブラリによるT細胞形質導入、E0771-mCh-cOVA腫瘍担持 $Rag1^{-/-}$ マウスへの養子移入、およびsgRNAライブラリ配列決定による臓器におけるT細胞ライブラリ出現分析を伴う本明細書において記述される実験の概略図である。図4Bは、注射前の感染したOT-I; Cas9 $CD8^{+} T_{eff}$ 細胞の細胞ライブラリ($n = 3$)、および複数のマウスからのさまざまな組織($n = 5$ マウス、計25サンプル)を含め、全てのサンプルにおけるsgRNAライブラリ出現全体のボックスドットプロットである。sgRNA出現は、 \log_2 rpmに関して描かれている。分析される組織は、流入領域リンパ節(dLN)、非流入領域リンパ節(ndLN)、脾臓、肺、および腫瘍を含む。図4Cは、サンプルタイプごとに群化された、全てのインビボサンプルについて検出されたsgRNAの数の棒グラフである。各タイプのサンプル数は次の通りである：dLN、ndLN、脾臓、肺、および腫瘍($n =$ 各5、マウスあたり1、計5マウス)。図4Dは、代表的な臓器でのsgRNA組成の円グラフを示す。各サンプルの全読みだしの2%以上を含んだsgRNAが示されており、残りの読み出しは「その他」と分類されている。図4Eは、全ての組織で最も高度に濃縮されたsgRNAのヒートマップである(平均 \log_2 rpmが1以上)、ここで横列はsgRNAに対応し、縦列は異なる臓器または腫瘍サンプルに対応する。各サンプルの組織タイプは、ヒートマップの上部に注釈付けされている。下流の分析を容易にするために各サンプルをリンパ系、非リンパ系、または腫瘍としてさらに分類した。sgRNA存在量は、 \log_2 rpmに関して描かれている。図4Fは、図4Cのようにサンプルタイプごとに群化された、全てのインビボサンプルについて有意に濃縮されたsgRNAの数の棒グラフである。sgRNA濃縮の統計的有意性は、NTCとの比較により判定され、 $FDR < 0.2\%$ の閾値であった。有意に濃縮されたsgRNAの数は、サンプル間で異なり、7から179の範囲であった。図4Gは、注射前の感染したOT-I; Cas9 $CD8^{+} T_{eff}$ 細胞の細胞ライブラリ($n = 3$)、および複数のマウスからの組織($n = 10$ マウス、計腫瘍10個)を含め、全てのサンプルにおけるsgRNAライブラリ出現全体のボックスドットプロットである。sgRNA出現は、 \log_2 rpmに関して描かれている。図4Hは、全腫瘍にわたる上位ランクのsgRNAのウォーターフォールプロットである(腫瘍の50%以上において有意に濃縮された21個のsgRNA, $FDR < 0.5\%$)。挿入図は、腫瘍の20%以上で有意に濃縮された全てのsgRNAのウォーターフォールプロットである。図4Iは、少なくとも1つの臓器サンプルにおいて有意に濃縮された0~4個の独立したsgRNAを有する遺伝子の数の棒グラフである($FDR < 0.5\%$)。計26個の遺伝子は、少なくとも2つの独立したsgRNAが濃縮されていることが分かった。Pdc1およびStradbは、それぞれ4つの独立した濃縮sgRNAを有することが分かった。図4Jは、上位の遺伝子ヒットを同定するための3つの濃縮基準のベン図である(1つのサンプルで2%以上の読み出し存在量($n = 36$)、20%以上のサンプルで有意($n = 220$)、および2つ以上の独立した濃縮sgRNA ($n = 26$)。計6遺伝子が全3つの基準を満たした(Cd247、Fam103a1、Hacvr2、Pdc1、Prkar1a、およびStradb)。

【図5】図5A~5Gは、cOVA抗原を発現する腫瘍を移植された $Rag1^{-/-}$ マウスにおけるMKO突然変異誘発OT-I; Cas9 $CD8^{+} T_{eff}$ 細胞の有意に濃縮されたsgRNAおよび遺伝子を示す一連のプロットおよび画像である。図5Aは、細胞サンプル($n = 3$)と比較した全ての臓器サンプル($n = 20$)にわたるsgRNA存在量平均の散布図である。sgRNA存在量は、 \log_2 rpmに関して描かれている。統計的に有意であることがわかったsgRNA (有意(Sig.)), NTCの分布と比較して、 $FDR < 0.1\%$)には、その標的遺伝子名がラベル付けされている。図5Bは、インビトロ(全細胞サンプルの平均, $n = 5$)と比較した腫瘍内(全腫瘍サンプルの平均, $n = 5$)のsgRNA存在量の散布図である。sgRNA存在量は、 \log_2 rpmに関して描かれている。細胞サンプルと比較して臓器サンプルにおいて統計的に有意に高いことがわかったsgRNA (Benja

10

20

30

40

50

mini-Hochberg調整p値 < 0.05, t検定)はピンク色で着色されており、遺伝子名がラベル付けされている。図5Cは、全臓器にわたる上位ランクのsgRNAのウォーターフォールプロットである(サンプルの50%以上において有意に濃縮された11個のsgRNA, FDR < 0.2%)。図5Dは、臓器サンプルまたは腫瘍サンプルにおいて濃縮されていることが分かった全ての遺伝子のDAVID遺伝子オントロジー分析を示す(濃縮GOターム、各GOタームに対応する濃縮遺伝子の数、および関連する濃縮p値を示している)。図5Eは、リンパ系、非リンパ系、および腫瘍サンプルにおいて有意に濃縮されたsgRNA (FDR < 0.2%)を比較する3方向ベン図である。計392個のsgRNAは少なくとも1つのリンパ系サンプルにおいて濃縮されていることが分かり、320個のsgRNAは少なくとも1つの非リンパ系サンプルにおいて濃縮され、395個のsgRNAは少なくとも1つの腫瘍サンプルにおいて濃縮されていた。3群の各々に関連付けられたsgRNAは、有意に重複することが分かった(リンパ系 対 非リンパ系、 $p = 2.11 \times 10^{-159}$; リンパ系 対 腫瘍、 $p = 3.02 \times 10^{-88}$; 非リンパ系 対 腫瘍、 $p = 1.97 \times 10^{-137}$, 超幾何学的検定)。図5Fは、流入領域リンパ節(dLN)、非流入領域リンパ節(ndLN)、および脾臓サンプルにおいて有意に濃縮されたsgRNAを比較する3方向ベン図である。計90個のsgRNAが少なくとも1つのdLNサンプルにおいて濃縮されていることが分かり、148個のsgRNAが少なくとも1つのndLNサンプルにおいて濃縮され、278個のsgRNAが少なくとも1つの脾臓サンプルにおいて濃縮された。3群の各々に関連付けられたsgRNAは、有意に重複することが分かった(dLN 対 ndLN、 $p = 6.07 \times 10^{-317}$; dLN 対 脾臓、 $p = 2.58 \times 10 \times 10$; ndLN 対 脾臓、 $p = 2.01 \times 10^{-263}$, 超幾何学的検定)。図5Gは、2番目のスクリーニング(cOVA抗原を有する腫瘍担持Rag1^{-/-}宿主におけるOT-1; Cas9 CD8⁺ T_{eff}細胞)からのヒットを1番目のスクリーニング(WT宿主におけるCas9 CD8⁺ T細胞)と比較する2方向ベン図であり、極めて有意な重複を示している(超幾何学的検定、 $p = 1 \times 10^{-23}$)。複数の免疫遺伝子(Tim3/Havcr2、Lexm/BC055111、Zap70、Cd247およびPD-1/Pdcd1のような)、カップルの腫瘍抑制遺伝子(Aim1およびNf1)、ならびにCD8⁺ T細胞において公開されていない機能を有する多くの遺伝子または完全に未知の遺伝子(Shisa6、Siah3、Ccadc105、Ccadc81、および3830406C13Rikのような)を含む共有遺伝子。

10

20

30

40

【図6】図6A~6Dは、WTマウスに静脈内注射されたミニプール突然変異誘発OT-1; Cas9 CD8⁺ T細胞を用いた有意に濃縮された遺伝子の選択セットの検証を示す一連のプロットおよび画像である。図6Aは、ミニプールライブラリクローニング、ウイルス産生、T細胞感染、養子移入、sgRNAライブラリ配列決定による臓器でのCD8⁺ T_{eff}細胞生存分析を伴う本明細書において記述される実験の概略図である。図6Bは、ミニプールライブラリにおいて表された各sgRNAの存在量の全体的なヒートマップである; 横列はsgRNAに対応し、縦列は異なる細胞または臓器サンプルに対応する。各サンプルの組織タイプおよび宿主マウスの遺伝子型は、ヒートマップの上部に注釈付けされている。下流の分析を容易にするために各サンプルを細胞、リンパ系、または非リンパ系としてさらに分類した。sgRNA存在量は、log₂ rpmに関して描かれている。図6Cは、全ての細胞および臓器サンプルにわたる全てのミニプールsgRNAのドットプロットである。細胞はピンク色で、リンパ系サンプルは緑色で、非リンパ系サンプルは青色で示されている。sgRNA存在量は、log₂ rpmに関して描かれている。図6Dは、リンパ系臓器 対 非リンパ系臓器での有意に濃縮されたsgRNA (NTCと比較して、Welch t検定、 $p < 0.05$)を比較したベン図である。計14個のsgRNAが非リンパ系サンプルにおいて濃縮され、全てがリンパ系サンプルにおいて濃縮された17個のsgRNAのなかに含まれていた(重複の有意性、超幾何学的検定により $p = 0.0021$)。

【図7】図7A~7Eは、WTマウスにおけるOT-1; Cas9 CD8⁺ T細胞生存のセットアップ実験についてのFACSデータを示す一連のプロットおよび画像である。図7Aは、ウイルス産生、CD8⁺ T細胞単離およびゲノムスケールCRISPRライブラリ(MKO)による感染、Thy1.1表面染色、ならびにFACS分析を伴う本明細書において記述される実験の概略図を示す。図7Bは、異なる時点で収集されたウイルスの2つのバッチを用いたMKOレンチウイルスの複数希釈によるナイーブOT-1; Cas9 CD8⁺ T細胞感染のFACSプロット(Thy1.1ゲーティング)を示す。図7Cは、T細胞に2つのウイルスバッチからの同等のウイルス力価のものを感染させたCas9 CD8⁺ T細胞のThy1.1発現の重ね合わせヒストグラムを示す。影付きのヒストグラムは、

50

非感染対照を表す。黒色のヒストグラムは、トランスフェクションの48時間後に単離されたMKOライブラリウイルスを表す。赤色のヒストグラムは、トランスフェクションの72時間後に単離されたMKOライブラリウイルスを表す。図7Dは、Thy1.1感染CD8⁺ T細胞の表面染色による2つのウイルスパッチからのMKOレンチウイルスの定量化を示す。データはMFIの幾何平均として示された。図7Eは、Thy1.1感染CD8⁺ T細胞の表面染色による2つのウイルスパッチからのMKOレンチウイルスの定量化を示す。データはThy1.1⁺ CD8⁺ T細胞%として示された。

【図8】図8A~8Gは、WTマウスにおけるCas9 CD8⁺ T細胞生存のゲノムスケールCRISPR損傷の分析のための全体的なsgRNAの定量化を示す一連のプロットおよび画像である。図8Aは、最初のスクリーニングでの全サンプルにわたるsgRNAライブラリ出現のペアワイズピアソン相関性のヒートマップである。相関性は、 \log_2 rpm値に基づいて計算された。細胞およびプラスミドサンプルは互いに高度に相関していたが、臓器サンプルは他の臓器サンプルと最も相関していた。図8Bは、全てのプラスミド(赤色、 $n = 1$)、細胞(橙色、 $n = 3$)、および臓器(青色、 $n = 62$)のサンプルについて検出されたsgRNAの数の棒プロットである。検出されたsgRNAの数は、 \log_{10} スケールで描かれている。プラスミドライブラリおよび細胞プールは検出されたsgRNAの同等数(それぞれ、平均 \log_{10} sgRNAカウント = 5.04および4.93)を有していたが、臓器サンプルでは検出されたsgRNAが数桁少なかった(平均 \log_{10} sgRNAカウント = 2.44)。図8Cは、臓器タイプごとに群化された、全ての臓器サンプルについて有意に濃縮されたsgRNAの数の棒グラフである。sgRNA濃縮の統計的有意性は、NTCとの比較により判定され、 $FDR < 0.2\%$ の閾値であった。有意に濃縮されたsgRNAの数は、サンプル間で異なり、10から392の範囲であった。図8Dは、全ての組織で最も高度に濃縮されたsgRNAのヒートマップである(平均 \log_2 rpmが1以上)、ここで横列はsgRNAに対応し、縦列は異なる臓器サンプルに対応する。各サンプルの組織タイプは、ヒートマップの上部に注釈付けされている。下流の分析を容易にするために各サンプルをリンパ系または非リンパ系としてさらに分類した。sgRNA存在量は、 \log_2 rpmに関して描かれている。図8Eは、インビトロ(全細胞サンプルの平均、 $n = 3$)と比較したインビボ(全臓器サンプルの平均、 $n = 62$)のsgRNA存在量の散布図である。sgRNA存在量は、 \log_2 rpmに関して描かれている。細胞サンプルと比較して臓器サンプルにおいて統計的に有意に高いことが分かったsgRNAは赤色で着色されており(Benjamini-Hochberg調整p値 < 0.05 、t検定)、代表的な遺伝子がラベル付けされている。NTCは濃い灰色で着色されており、他の全ての遺伝子ターゲットsgRNA (GTS)は薄い灰色である。図8Fは、sgRNA存在量のボルケーノプロットであり、リンパ器官 対 非リンパ器官を比較している。平均 \log_2 pm存在量が1以上のsgRNAのみが示されている。x軸はリンパ系サンプル 対 非リンパ系サンプルの平均 \log_2 変化倍率を示し、y軸は比較(t検定)の $-\log_{10}$ p値を示す。非リンパ系サンプルと比べてリンパ系サンプルにおいて有意に濃縮されたSgRNAは、赤色で着色されている($p < 0.05$)。図8Gは、臓器において濃縮されていることが分かった全ての遺伝子の遺伝子オントロジー分析からの結果を示す(濃縮GOターム、各GOタームに対応する濃縮遺伝子の数、および関連する濃縮p値を示している)。代表的なタームセットを示した。

【図9】図9A~9Iは、WTマウスにおけるナイーブCas9 CD8⁺ T_{eff}細胞生存のゲノムスケールCRISPRスクリーニングの分析からの結果を示す一連の円グラフである(3頁中)。臓器サンプル中のsgRNA組成の全ての円グラフ。各サンプルの全読みだしの2%以上を含んだsgRNAが示されており、残りの読み出しは「その他」と分類されている。図9Aは、LN1円グラフを示す。図9Bは、LN2円グラフを示す。図9Cは、LN3円グラフを示す。図9Dは、脾臓円グラフを示す。図9Eは、肝臓円グラフを示す。図9Fは、膵臓円グラフを示す。図9Gは、肺円グラフを示す。図9Hは、脳円グラフを示す。図9Iは、筋肉円グラフを示す。

【図10】図10A~10Fは、cOVA抗原を発現する腫瘍を移植されたRag1^{-/-}マウスにおけるMKO突然変異誘発活性化OT-1; Cas9 CD8⁺ T_{eff}細胞のセットアップ実験のFACSデータを描く一連のプロットおよび画像である。図10Aは、OT-1; Cas9マウスからのCD8⁺ T細胞単離、CD8⁺ T_{eff}細胞形質導入、E0771-mCh-cOVA腫瘍担持Rag1^{-/-}マウスへの養子移入、FACSによるE0771-mCh-cOVA腫瘍担持Rag1^{-/-}マウスの流入領域リンパ節、非流入領域リンパ節、脾

10

20

30

40

50

臓、および腫瘍におけるCD8⁺ T_{eff}細胞生存および浸潤分析を伴う本明細書において記述される実験の概略図である。図10B~10Eは、E0771-mCh-cOVA腫瘍担持Rag1^{-/-}マウスからの流入領域LN (dLN) (図10B)、非流入領域LN (ndLN) (図10C)、脾臓(図10D)、および腫瘍(TIL) (図10E)における養子移入T_{eff}細胞からのデータを示す一連のFACSプロットである。MKOはゲノムスケールT細胞ノックアウトCRISPRライブラリおよび空のベクターである；数字は全体に占める割合を示す。上列はPBS処置マウスからのFACSプロットである。中列は、ベクター感染OT-I; Cas9 CD8⁺ T細胞で処置したマウスからのFACSプロットである。下列は、MKO感染OT-I; Cas9 CD8⁺ T細胞で処置したマウスからのFACSプロットである。図10Fは、異なる処置後のRag1^{-/-}マウスにおける皮下移植E0771-mCh-cOVA腫瘍の成長曲線である。PBS対照(n = 1)、ベクターに感染したOT-I; Cas9 CD8⁺ T_{eff}細胞の養子移入(n = 3)、およびMKOに感染したOT-I; Cas9 CD8⁺ T_{eff}細胞の養子移入(n = 5)。リード矢印は、MKOまたはベクター形質導入OT-I; Cas9 CD8⁺ T_{eff}細胞の養子移入時を示す。データを平均 ± 標準誤差(s.e.m)として示す。

【図11】図11A~11Dは、cOVA抗原を発現する腫瘍を移植されたRag1^{-/-}マウスにおけるMKO突然変異誘発OT-I; Cas9 CD8⁺ T_{eff}細胞の分析のための全体的なsgRNA定量化を示す一連のプロットである。図11Aは、全サンプルにわたるsgRNAライブラリ出現のペアワイズピアソン相関性のヒートマップである。相関性は、log₂ rpm値に基づいて計算された。細胞およびプラスミドサンプルは互いに最も相関していたが、臓器および腫瘍サンプルは他の臓器または腫瘍サンプルと最も相関していた。図11Bは、全ての細胞(橙色、n = 3)および臓器/腫瘍(青色、n = 25)のサンプルについて検出されたsgRNAの数の棒プロットである。検出されたsgRNAの数は、log₁₀スケールで描かれている。細胞サンプルにおいて検出されたsgRNAの数は、臓器/腫瘍よりも数桁大きかった(それぞれ、平均log₁₀ sgRNAカウント = 4.91および2.73)。図11Cは、同じタイプ(腫瘍、dLN、ndLN、脾臓、または肺)ごとに群化された、全ての臓器サンプルについて有意に濃縮されたsgRNAの数の棒グラフである。sgRNA濃縮の統計的有意性は、NTCとの比較により判定され、FDR < 0.2%の閾値であった。図11Dは、少なくとも1つの臓器サンプルにおいて有意に濃縮された0、1、または2つの独立したsgRNAを有する遺伝子の数の棒グラフである(FDR < 0.2%)。13個の遺伝子は2つの独立した濃縮sgRNAを有することが分かった(黄色のボックス)。この実験では、3つの濃縮sgRNAを有する遺伝子は見つからなかった。

【図12】図12A~12Eは、cOVA抗原を発現する腫瘍を移植されたRag1^{-/-}マウスにおけるMKO突然変異誘発OT-I; Cas9 CD8⁺ T_{eff}細胞の分析を描く一連の円グラフである。臓器サンプル中のsgRNA組成の全ての円グラフが描かれている。各サンプルの全読みだしの2%以上を含んだsgRNAが示されており、残りの読み出しは「その他」と分類されている。図12Aは、dLN円グラフを示す。図12Bは、ndLN円グラフを示す。図12Cは、脾臓円グラフを示す。図12Dは、腫瘍円グラフを示す。図12Eは、肺円グラフを示す。

【図13】野生型マウスでのインビボ生存についてのOT-I; Cas9 CD8⁺ T_{eff}細胞ミニプールアッセイ法におけるGTC対NTCのt検定からの結果を示す表である。

【図14】図14A~14Eは、本研究で用いられたベクターの遺伝子識別子を示す。14Aは、ベクター-pSC017_pLKO-U6-sgBsmBI-EFS-Thy11CO-spA(SEQ ID NO:129,213)の遺伝子識別子を示す。図14Bは、ベクター-pSC008_pLKO-U6-BsmBI-chRNA(+85)-EFS-Thy11(SEQ ID NO: 129,214)の遺伝子識別子を示す。図14Cは、ベクター-pSC021_pLKO-U6-sgBsmBI-PGK-Thy11CO-spA.sbd(SEQ ID NO:129,215)の遺伝子識別子を示す。図14D~14Eは、ベクター-pMD02: レンチ-pLKO-U6-sgBsmBI-EFS-mCherry-2A-cOVA (SEQ ID NO:129,216)の遺伝子識別子を示す。

【図15】図15A~15Fは、スクリーニング用のゲノムスケールT細胞CRISPRライブラリ(MKO)の作製、QC、および力価測定を示す一連のプロットおよび画像である。図15Aは、ライブラリQCとしての初期プラスミドライブラリ配列決定のヒストグラムである。ライブラリを配列決定して高いカバレッジを確実にした。ライブラリ全体の少なくとも94.1% (121,608/129,209)で、一意のsgRNAがプラスミドにクローニングし、ライブラリにおいて設計された全ての注釈付き遺伝子(22,786)の98%を網羅していた。出現により密な対数正規分布

が示され、sgRNAの97.6%が2桁(O.M.)以内であり、99.9%が3桁(O.M.)以内であった。図15Bは、MKOプラスミドライブラリにおける遺伝子ごとのクローニングされたsgRNAの分布を示す。ほとんど(17,330個)の遺伝子は依然、6/6 sgRNAにより網羅されていた。20,653個の遺伝子は4つまたはそれ以上のsgRNAを有する。393個の遺伝子はsgRNAを有しない(クローニングの喪失、したがってこのプラスミドライブラリではスクリーニング可能ではない)。図15Cは、ウイルス産生、CD8⁺ T細胞単離およびゲノムスケールCRISPRライブラリ(MKO)による感染、Thy1.1表面染色、ならびにFACS分析を含む実験の概略図である。図15Dは、異なる時点で収集されたウイルスの2つのバッチを用いたMKOレンチウイルスの複数希釈によるナイーブOT-I; Cas9 CD8⁺ T細胞感染のFACSプロット(Thy1.1ゲーティング)を示す。図15Eは、Thy1.1感染CD8⁺ T細胞の表面染色による2つのウイルスバッチからのMKOレンチウイルスの定量化を示す。データはMF1の幾何平均として示された。図15Fは、Thy1.1感染CD8⁺ T細胞の表面染色による2つのウイルスバッチからのMKOレンチウイルスの定量化を示す。データはThy1.1⁺ CD8⁺ T細胞%として示された。

【図16】図16A~16Dは、ゲノムスケールCRISPR CD8⁺ T細胞生存スクリーニングのさらなる分析を示す一連のプロットである。図16Aは、プラスミドライブラリ(n = 1)、注射前ライブラリに感染したナイーブCD8⁺ T細胞の細胞ライブラリ(n = 3)、および注射後7日の複数のマウスからのCD8⁺ T_{eff}細胞を含むさまざまな臓器(n = 7マウス、計62サンプル)を含め、全てのサンプルにおけるsgRNAライブラリ出現全体のボックスドットプロットである。sgRNAの出現は、100万回あたりのlog₂読み出し(rpm)に関して描かれている。分析される組織は、リンパ節(LN)、脾臓、脳、肝臓、肺、筋肉、および膵臓を含む。図16Bは、2匹の複製マウス間の相関分析を示す。各マウスの全ての臓器にわたる平均sgRNA出現を別のマウスに対してプロットした。プロットにはピアソン相関値を示した。完全な相関プロットは図1にあった。図16Cは、レシピエントマウスとしての2種類の宿主間の相関分析を示す。B6レシピエント群の全マウスにわたる平均sgRNAの出現は、Cas9宿主のそれをプロットした。プロットにはピアソン相関値を示した。図16Dは、B6およびCas9レシピエントを用いたCD8⁺ T_{eff}細胞生存と輸送スクリーニングとの間のsgRNAヒットの重複を示すベン図である。超幾何学的検定、p < 1e-5。

【図17】図17A~17Cは、臓器タイプごとのsgRNAライブラリ出現の分析を示す一連のプロットおよび画像である。図17A、左パネル：リンパ器官 対 非リンパ器官において有意に濃縮されたsgRNA (FDR < 0.2%)を比較するベン図である。計1,566個のsgRNAが少なくとも1つのリンパ系サンプルにおいて濃縮され、1,332個のsgRNAが少なくとも1つの非リンパ系サンプルにおいて濃縮された。これらのうち、761個のsgRNAがリンパ系サンプルと非リンパ系サンプルの両方において濃縮された(重複の有意性、超幾何学的検定によりpは0にほぼ等しい)。右パネル：リンパ節 対 脾臓において有意に濃縮されたsgRNAを比較するベン図。計1,426個のsgRNAが少なくとも1つのリンパ節において濃縮されていることが分かり、360個のsgRNAが少なくとも1つの脾臓サンプルにおいて濃縮されていた。これらのうち、220個のsgRNAがリンパ節と脾臓の両方のサンプルにおいて濃縮された(重複の有意性、超幾何学的検定によりpは0にほぼ等しい)。図17Bは、非リンパ系組織(脳、肝臓、肺、筋肉、膵臓)において濃縮されたsgRNAの5方向ベン図である。計83個のsgRNAが、全5つの非リンパ器官において濃縮された。図17Cは、インビボでのT細胞の生存および輸送における高濃縮sgRNAのミニプール検証を示す。全臓器にわたるsgRNA存在量をプロットした。同じミニプールにおいて同時注射された対照sgRNA群に対して統計比較を行った。* = p < 0.05, 両側t検定。

【図18】図18A~18Gは、トランスジェニック、クローンTCRを有するエフェクタCD8⁺ T細胞での輸送および生存についてのゲノムスケールスクリーニングを示す一連のプロットおよび画像である。図18Aは、以下の実験：OT-IマウスとCas9マウスとの交配、OT-I; Cas9マウスからのナイーブCD8⁺ T細胞単離、CD8⁺ T細胞形質導入、マウスへの養子移入、およびハイスルーブットsgRNA配列決定による臓器でのMKO形質導入OT-I; Cas9 CD8⁺ T_{eff}細胞生存分析の概略図である。収集された臓器は、代表的な非リンパ系臓器として肝臓、膵臓、肺、筋肉、および脳、ならびに脾臓およびいくつかのタイプのリンパ節(sLN、cLNお

10

20

30

40

50

よびaLN)を含む。図18Bは、(FDR < 0.5%)で濃縮されている臓器の数でランク付けされた全臓器にわたる上位sgRNAのウォーターフォールプロットである。計27個のsgRNAが20%以上のサンプルにおいて有意であることが分かった。図18Cは、少なくとも1つの臓器サンプルで有意に濃縮された0、1、または2つの独立したsgRNAを有する遺伝子の数の棒グラフである(FDR < 0.5%)。計4個の遺伝子は、2つの独立したsgRNAが濃縮されていることが分かった。Cd247、Bpifb3、およびTsc2は、3つの独立した濃縮sgRNAがあることが分かった。図18Dは、上位の遺伝子ヒットを同定するための3つの濃縮基準のベン図である(1つのサンプルで2%以上の読み出し存在量($n = 99$)、20%以上のサンプルで有意(関連する全てのsgRNAを考慮)($n = 27$)、および2つ以上の独立した濃縮sgRNA($n = 4$))。サンプルの20%以上と2つ以上の独立した濃縮sgRNAのセットが、1つのサンプルにおいて2%以上の読み出し存在量のセットに含まれていたことに留意されたい。計3遺伝子が全3つの基準を満たした。これらの遺伝子はPdc1、Slc35c1、およびStradbであった。図18Eは、多様なTCRスクリーニングからのおよびクローンTCRスクリーニングからのヒットを比較したベン図である。17個の遺伝子が、両方のデータセットからの2つ以上のサンプルにおいて有意であることが分かった。これらは、3830406C13Rik、BC055111、Cd247、Gm6927、Hacvr2、Lrp6、Nf1、Olf1158、Opn3、Pdc1、Serping1、Slc2a7、Slc35c1、Son、Tsc2、Tspan4、およびZfp82を含んでいた。図18Fは、ドナーT細胞およびレシピエント宿主効果分析を示す。多様なまたはクローン性のTCR(Cas9対OT-1;Cas9)を有する、および野生型(B6)または同系宿主(Cas9)を有するCD8⁺T細胞における輸送および生存についてのゲノムスケールスクリーニングからの、全臓器を平均した、全マウスでのsgRNAライブラリ出現のペアワイズピアソン相関性のヒートマップ。図18Gは、ゲノムスケールCRISPR T細胞スクリーニングの臓器パターンを示す。MKOライブラリスクリーニングに基づくクラスタリングパターンを示すt-SNE法による次元削減プロット。各ドットは、凡例(脳、肝臓、LN、肺、筋肉、膵臓および脾臓)ごとに色分けされた臓器でのsgRNAライブラリ出現である。実質的に全ての臓器タイプ(k0)を含む大きなクラスタがあり、8個の小さなクラスタ(k1~k8)があって、いくつかの臓器を異常値として、各々が4~6個の臓器タイプからなる。

10

20

30

40

50

【図19】図19Aおよび19Bは、OT-1;Cas9 CD8⁺T細胞を用いたゲノムスケールCRISPR CD8⁺T細胞生存スクリーニングの分析を示す一連のプロットである。図19Aは、OT-1;Cas9 CD8⁺T細胞を用いた2番目のWTスクリーニングでの全サンプルにわたるsgRNAライブラリ出現のペアワイズピアソン相関性のヒートマップである。サンプルは、注射後7日の複数のマウスからのCD8⁺T_{eff}細胞を含むさまざまな臓器からのものであった($n = 10$ マウス、計70サンプル)。相関性は、 \log_2 rpm値に基づいて計算された。図19Bは、注射後7日の複数のマウスからのCD8⁺T_{eff}細胞を含むさまざまな臓器からの全サンプルでの全体的なsgRNAライブラリ出現のボックスドットプロットである($n = 10$ マウス、計70サンプル)。sgRNA出現は、100万回あたりの \log_2 読み出し(rpm)に関して描かれている。分析される組織は、さまざまなリンパ節(LN)、脾臓、肝臓、膵臓、および肺を含む。

【図20】図20A~20Cは、代表的なヒットの保存分析およびタンパク質ドメインを示す一連の画像である。図20Aは、4つのサブドメイン(DEXDc、P-ループ NTPアーゼ、HELICc、およびHA2)に細分できるHrpAドメインを含む、ヒトDHX37タンパク質のドメイン構造予測を示す。複数の哺乳動物種の間で保存されているDEXDcおよびHELICcドメイン中の領域の代表的なアライメントを以下に示す。図20Bは、予測される5つのドメイン(NHL、重複LDLRb、LY、FXa1、およびLDLa)を含む、ヒトLRP6タンパク質のドメイン構造予測を示す。複数の哺乳動物種の間で保存されているNHLおよびLYドメイン中の領域の代表的なアライメントを以下に示す。図20Cは、予測される2つのドメイン(TPT、およびEamA)を含む、ヒトSLC35C1タンパク質のドメイン構造予測を示す。複数の哺乳動物種の間で保存されているEamA/TPTドメイン中の領域の代表的なアライメントを以下に示す。

【図21】図21A~21Fは、養子移入腫瘍浸潤スクリーニングのさらなる実験を示す一連のプロットおよび画像である。図21Aは、異なる処置後のRag1^{-/-}マウスにおける移植E0771-mCh-cOVA細胞からの皮下腫瘍の成長曲線である。PBS対照($n = 1$)、ベクターに感染したOT-1;Cas9 CD8⁺T_{eff}細胞の養子移入($n = 3$)、およびMKOに感染したOT-1;Cas9 CD8⁺T_{eff}

細胞の養子移入($n = 5$)。矢印は、MKOまたはベクター形質導入OT-I; Cas9 CD8⁺ T_{eff}細胞の養子移入時を示す。誤差が小さいので、特定のデータ点のエラーバーは不可視であった。データを平均 ± 標準誤差(s.e.m)として示す。図21Bは、異なる処置条件後のRag1^{-/-}マウスにおいてcOVA抗原を発現するE0771細胞に由来する腫瘍のヘマトキシリンおよびエオシンにより染色されたフルスライドおよびハイパワー組織学切片を示す。上群: PBSを注射したマウスにおける腫瘍。中群: ベクター処理した活性化OT-I; Cas9 CD8⁺ T_{eff}細胞の養子移入後のマウスにおける腫瘍。下群: MKO突然変異誘発活性化OT-I; Cas9 CD8⁺ T_{eff}細胞の養子移入後のマウスにおける腫瘍。PBS群では、腫瘍はリンパ球を欠いており、急速な増殖と、ほとんど細胞死がないという兆候を示した。養子移入群では、腫瘍にリンパ球が浸潤し、広い範囲で細胞死の兆候を示した。低倍率画像スケールバー: 1mm; 高倍率画像スケールバー: 200 μm。図21Cは、E0771-mCh-cOVA腫瘍担持Rag1^{-/-}マウスからの流入領域および非流入領域LN (それぞれdLNおよびndLN)、脾臓、肺、および腫瘍(TIL)における養子移入されたT_{eff}細胞の代表的なFACSプロットを示す。MKOはゲノムスケールT細胞CRISPRライブラリである。数字は全細胞の割合を示す。上列: PBS処置マウスからのFACSプロット。中列: ベクター感染OT-I; Cas9 CD8⁺ T細胞で処置したマウスからのFACSプロット。下列: MKO感染OT-I; Cas9 CD8⁺ T細胞で処置したマウスからのFACSプロット。図21Dは、E0771-cOVA腫瘍を有するRag1^{-/-}マウスへのOT-I; Cas9 CD8⁺腫瘍浸潤リンパ球のゲノムスケールCRISPR摂動の相関分析を示す。注射前の3つの細胞ライブラリ、および腫瘍浸潤スクリーニングにおける全サンプル($n = 10$ マウス、腫瘍10個)にわたるsgRNAライブラリ出現のペアワイズピアソン相関性のヒートマップ。相関性は、log₂ rpm値に基づいて計算された。E0771-cOVA細胞をマウス1~5の場合は皮下に、およびマウス6~10の場合は乳腺脂肪体に移植した。図21Eは、養子移入スクリーニングのクローン整合性分析を示す。異なるレベルのcOVA (E0771-mChOva cl.3およびcl.5)を発現する2つのクローンの間でミニプールスクリーニングの分析を行う。1つのクローンのsgRNA出現を別のものに対してプロットした。プロットにはピアソン相関値を示した。図21Fは、養子移入スクリーニングのクローン整合性分析を示す。同じcOVA構築体(E0771-mChOvaおよびLCC-mChOva)を発現する異なるがん型(乳房および肺)からの2つの細胞株の間でミニプールスクリーニングの分析を行う。1つのクローンのsgRNA出現を別のものに対してプロットした。プロットにはピアソン相関値を示した。

10

20

【図22】図22A~22Hは、腫瘍抗原に遭遇した際のエフェクタCD8⁺ T細胞の脱顆粒を調節する遺伝子のハイスループット同定を示す一連のプロットおよび画像である。図22Aは、実験の概略図である。ナイーブOT-I; Cas9 CD8⁺ T細胞を単離し、MKOレンチウイルスライブラリで形質導入し、SIINFEKLペプチドパルスE0771細胞(0または1 ng/ml)と共培養し、活性な脱顆粒を起こしているCD8⁺ T_{eff}のCD8およびCD107aについて染色した。染色された細胞を分析し、上位5%のCD107a⁺を選別し、ゲノムDNA抽出、CRISPRライブラリ読み出し、およびスクリーニングデータ分析に供した。図22Bは、E0771細胞におけるMHC-I提示のためのSIINFEKLペプチドの力価測定を示す。E0771細胞に異なる濃度のSIINFEKLペプチドをパルスし、MHC-I-ペプチド複合体(SIINFEKL : H-K2^b)を、FACSを用いた表面染色の平均蛍光強度(MFI)により測定した。図22Cは、OT-I; Cas9 CD8⁺ T細胞およびE0771がん細胞の共培養から分析されたCD107a⁺ T細胞を示すヒストグラムである。上位5%のCD107a⁺細胞を選別した。計3つの生物学的複製を実施した。図22Dは、選別された全ての細胞サンプルにわたる上位ランクのsgRNAのウォーターフォールプロットである(サンプルの66%以上において有意に濃縮された17個のsgRNA、FDR < 0.5%)。図22Eは、インビトロ殺滅アッセイスクリーニングからのヒットおよびインビボでの腫瘍浸潤研究からのヒットを比較するベン図である。両方のデータセットからの2つ以上のサンプルにおいて3つの遺伝子は有意であることが分かった。これらはDhx37、Lyn、およびOdc1を含んでいた。図22Fは、異なる処置後のRag1^{-/-}マウスにおける乳腺脂肪体E0771-mCh-cOVA腫瘍の成長曲線を示す。PBS対照($n = 4$)、ベクターに感染したOT-I; Cas9 CD8⁺ T_{eff}細胞の養子移入($n = 4$)、およびsgDhx37に感染したOT-I; Cas9 CD8⁺ T_{eff}細胞の養子移入($n = 5$)。データを平均 ± 標準誤差(s.e.m)として示す。PBSおよびsgDhx37群をベクター群に対して試験した。PBS群はベクター

30

40

50

と比較して有意に大きな腫瘍を有し、OT-1; Cas9 CD8⁺ T_{eff}細胞の養子移入の効果を示していた。sgDhx37群はベクターと比較して腫瘍量を有意に低減し、遺伝子特異的效果を示していた。図22Gは、sgPD-1でのOT-1; Cas9 CD8⁺ T_{eff}細胞の抗腫瘍効果の試験を示す。個々のマウスからの腫瘍成長曲線を示した。上記と同様に、PBS、ベクター、およびsgPdc d1マウスを示した。個々の点/曲線としてデータを示す。2/5のsgPdc d1マウスはベクターと比較して有意に小さな腫瘍を有し、1/5はわずかに有意(marginal significant)であるが、残りの2/5は有意ではない。図22Hは、sgOdc1によるOT-1; Cas9 CD8⁺ T_{eff}細胞の抗腫瘍効果の試験を示す。個々のマウスからの腫瘍成長曲線を示した。上記と同様に、PBS、ベクター、およびsgOdc1マウスを示した。個々の点/曲線としてデータを示す。3/5のsgOdc1マウスはベクターと比較して有意に小さな腫瘍を有するが、残りの2/5は有意ではない。矢印は、MKOまたはベクター形質導入OT-1; Cas9 CD8⁺ T_{eff}細胞の養子移入時を示すことに留意されたい。図22F~22Hからのデータを一緒に収集したが、3つのパネルからのPBSおよびベクター群の腫瘍曲線は同一であり、これを比較および可視性のため遺伝子ごとに別々にプロットした。統計的比較をベクター群に対して行った。対応のあるt検定により、* = p < 0.05, ** = p < 0.01, *** = p < 0.001。

【図23】図23A~23Gは、E0771-mCh-cOVA腫瘍におけるsgDhx37 OT-1; Cas9 CD8⁺ TILの単一細胞トランスクリプトミクスを示す一連のプロットおよび画像である。図23Aは、実験の概略図である：E0771-mCh-cOVA腫瘍を担持するRag1^{-/-}マウスへのベクターまたはsgDhx37感染OT-1; Cas9 CD8⁺ T_{eff}細胞の養子移入、50日の成長後の腫瘍収集、CD3⁺CD8⁺ T細胞のFACS、マイクロ流体に基づく逆転写法および単一細胞バーコードDNA液滴を産生するための多段階バーコーディングライブラリ調製、その後のハイスループット配列決定およびコンピュータ分析。図23Bは、マウスTIL scRNAseqからの個々の腫瘍浸潤CD8⁺細胞のt-SNE次元削減および視覚化を示す。左パネル：クラスタによる視覚化(同定された4つの異なるクラスタ); 右パネル 実験群、すなわちsgDhx37 (n = 191個の細胞)またはベクター(n = 361)のいずれかで処理したOT-1; Cas9 CD8⁺ T_{eff}細胞ごとの視覚化。図23Cは、ベクター処理と比較して、sgDhx37処理CD8⁺腫瘍浸潤リンパ球において差次的に発現された遺伝子を示す。sgDhx37またはベクター対照で処理した単一のCD8⁺腫瘍浸潤リンパ球における、差次的に発現された上位遺伝子(絶対的なlog₂変化倍率が1以上)のヒートマップ。示した値は、zスコア(横列/遺伝子でスケールリング)の観点からのものである。図23Dは、ベクター対照と比較したsgDhx37で処理した腫瘍浸潤CD8⁺細胞において差次的に発現された遺伝子のボルケーノプロットである。sgDhx37処理細胞では計137個の遺伝子が有意に上方制御された(Benjamini-Hochberg調整p < 0.05)が、sgDhx37処理細胞では215個の遺伝子が有意に下方制御された(調整p < 0.05)。上方制御された上位遺伝子は、Rgs16、Nr4a2、Tox、Lag3、Rbm3、およびCc14を含んでいた。下方制御された上位遺伝子は、Uba52、Hist1h1c、Gm9844、Emp3、およびRps28を含んでいた。図23Eは、sgDhx37で処理した腫瘍浸潤CD8⁺細胞において有意に上方制御された遺伝子の遺伝子オンロジー分析を示す。いくつかの遺伝子オンロジーのカテゴリが有意に濃縮された(ボンフェローニ(Bonferroni)調整p < 0.05)。これらは、リンパ球活性化、サイトカイン産生の正の調節、細胞間接着の調節、免疫エフェクタ過程の調節、およびインターフェロン産生の正の調節を含んでいた。図23Fは、sgDhx37で処理した腫瘍浸潤CD8⁺細胞において有意に下方制御された遺伝子の遺伝子オンロジー分析を示す。いくつかの遺伝子オンロジーのカテゴリが有意に濃縮された(ボンフェローニ調整p < 0.05)。これらは、リボソーム小サブユニットアセンブリ、リボソーム大サブユニット生合成、活性酸素種代謝過程の調節、細胞遊走の調節、白血球遊走の正の調節、およびアポトーシスシグナル伝達経路を含んでいた。図23Gは、クラスタ(T細胞の亜集団)による差次的発現分析を示す。個々の細胞におけるmRNAレベルを、4つの主要クラスタの各々におけるNTCおよびsgDhx37群についてプロットした(bの上パネルを参照のこと)。個々のデータポイントを含むバイオリンプロットを示した。上位の上方制御(Rgs16)および下方制御(Uba52)遺伝子を例として示した。sgDhx37と対照群との間の全ての比較の場合、全てのクラスタで、FDR調整p値 < 0.05。

【図24】図24A~24Eは、ヒト細胞におけるDHX37の分析を示す一連のプロットおよび画

10

20

30

40

50

像である。図24Aは、ヒト細胞におけるDHX37タンパク質のウエスタンブロット分析を示す。左から右に、陽性対照としてのDhx37過剰発現を有するHEK293FT細胞；健常ドナーからの末梢血CD4⁺ T細胞；健常ドナーからの末梢血CD8⁺ T細胞；NSCLC患者から新鮮単離された腫瘍生検からのTIL。図24Bは、末梢血CD8⁺ T細胞およびNSCLC患者TILにおけるDHX37の細胞内タンパク質レベルのFACS分析を示す。図24Cは、複数の患者サンプルにわたるDHX37発現の組織マイクロアレイ分析を示す。DHX37⁺細胞染色の概要レベルのドットプロット。各ドットは、患者サンプルのコア生検の1つのスライス中のDHX37⁺細胞の総数を表す(直径が0.7mm, 表面積が0.385 mm²)。数字の上限を1000までとした。正常脳および神経膠腫のサンプルは同じアレイ上とした。乳がんおよび黒色腫の腫瘍サンプルは、別々のアレイ上とした。正常脳組織は、神経膠腫組織と比較して有意に少ないDHX37⁺細胞を有する(* * * = p < 0.001, 対応のない両側t検定による)。一致した正常組織は、これらのTMAについて乳がんおよび黒色腫には使用することができない。図24Dは、組織マイクロアレイ分析からの2つの患者生検サンプルの代表的な画像を示す。DHX37染色は核において主に見られた(核膜での濃い染色)。矢印は、神経膠腫、乳がんおよび黒色腫の生検における代表的なDHX37⁺ TILを指し示す。随伴サンプルについてH&E染色が示された。図24Eは、患者予後でのDHX37を示す。左上: DHX37が高いほど、低悪性度神経膠腫(LGG)の予後が悪いと予測される。高DHX37-高(n = 221) 対 DHX37-低(n = 223)患者(p = 0.0011, ハザード比 = 1.899)における全生存のカプランマイヤー(Kaplan-Meier)曲線。左下: DHX37が高いほど、肝細胞がん(LIHC)の予後が悪いと予測される。高DHX37-高(n = 161) 対 DHX37-低(n = 162)患者(p = 0.031, ハザード比 = 1.522)における全生存のカプランマイヤー曲線。右上: DHX37が高いほど、肺腺がん(LUAD)の予後が悪いと予測される。高DHX37-高(n = 222) 対 DHX37-低(n = 222)患者(p = 0.0077, ハザード比 = 1.526)における全生存のカプランマイヤー曲線。右下: DHX37が高いと、腎臓腎細胞がん(KIRC)の予後が悪いと予測される。高DHX37-高(n = 228) 対 DHX37-低(n = 228)患者(p = 0.047, ハザード比 = 1.373)における全生存のカプランマイヤー曲線。

10

20

30

40

【図25】図25A~25Eは、単一のヒトT細胞の集団におけるDHX37の遺伝子発現特性を示す一連のプロットである。図25Aは、ヒト末梢血T細胞、組織常在T細胞、腫瘍-正常接合部T細胞、および腫瘍浸潤T細胞におけるCD3⁺/CD4⁺/CD25⁻ヘルパーT細胞、CD3⁺/CD8⁺細胞傷害性T細胞、およびCD3⁺/CD4⁺/CD25⁺調節T細胞でのDHX37発現の分布を示す。各プロットにはDHX37⁺細胞の数および合計割合が示されている。図25Bは、DHX37⁺およびDHX37⁻ CD3⁺/CD8⁺ T細胞におけるIL12A、ITM2A、RGS16、およびSTAT1発現の一連の散布箱ひげ図である。IL12A (p = 7.10 * 10⁻⁹)、ITM2A (p = 0.0033)、RGS16 (p = 1.23 * 10⁻⁷)、およびSTAT1 (p = 0.0033)の発現は、DHX37⁺細胞において有意に低かった。図25Cは、DHX37⁺およびDHX37⁻ CD3⁺/CD8⁺ T細胞におけるPPA1、CISH、TRAP1、およびSLC7A6発現の一連の散布箱ひげ図である。PPA1 (p = 0.0002)、CISH (p = 0.0074)、TRAP1 (p = 9.34 * 10⁻⁵)、およびSLC7A6 (p = 9.64 * 10⁻⁵)の発現は、DHX37⁺細胞において有意に高かった。図25Dは、DHX37⁺およびDHX37⁻ CD3⁺/CD4⁺/CD25⁻ T細胞におけるIKBKEおよびCPT2発現の一連の散布箱ひげ図である。IKBKE (p = 0.0062)およびCPT2 (p = 1.30 * 10⁻⁵)の発現は、DHX37⁺細胞において有意に低かった。図25Eは、DHX37⁺およびDHX37⁻ CD3⁺/CD4⁺/CD25⁻ T細胞におけるSLC35E2BおよびNDFIP1発現の一連の散布箱ひげ図である。SLC35E2B (p = 4.75 * 10⁻⁵)およびNDFIP1 (p = 0.0004)の発現は、DHX37⁺細胞において有意に高かった。統計的有意性を評価するために、両側ウェルチのt検定をB~Eにおいて用いた。Tukeyボックスプロットを示す。

【図26】図26A~26Fは、新しいAAV-CRISPRシステムの開発およびCD8⁺ T_{eff}細胞における急性Dhx37喪失の統合調査を示す一連のプロットおよび画像である。図26Aは、AAVに基づくベクターの2つのITR内にsgRNA発現カセットおよびThy1.1発現カセットを含むAAV-CRISPR T細胞ノックアウトベクターの設計の概略図である。図26Bは、実験の概略図である。ナイーブOT-I; Cas9 CD8⁺ T細胞を単離し、AAV-sgRNA-Thy1.1ベクターで形質導入し、CD3/CD28によって活性化した後、挿入欠失(indel)配列決定、FACS、急性転写調節のための単一細胞RNAseq、および抗腫瘍活性を試験するための養子移入を含めて、感染後の複数の

50

分析を行った。図26Cは、AAV-sgDhx37形質導入7日後の細胞内Dhx37レベルの有意な下方制御を示すプロットである。データ点ごとに幾何平均を示した(*、 $p < 0.05$, 対応のない両側t検定)。図26Dは、AAV-CRISPRシステムによる遺伝子の急性ノックアウトの確認を示す。3つの遺伝子を試験した(MI13、B2m、およびDhx37)。代表的なIlluminaでは、関心対象の遺伝子を標的にするAAV-sgRNAの感染から5日後のsgRNA標的部位のアンプリコン配列決定を標的にした。上位10個の最も高頻繁の変種が示されており、右側のボックスには関連する変種頻度がある。図26Eは、Dhx37ノックアウトのFACS分析を示す。上、CD107a脱顆粒アッセイ法、ここではベクター対照と比較してAAV-sgDhx37形質導入を伴うCD8⁺ T_{eff}細胞が、表面CD107aの有意な上方制御を示した($p = 0.001$)。下、AAV-sgDhx37を有するCD8⁺ T_{eff}細胞は、表面CD62Lレベルの有意な下方制御を示した。データを平均 ± 標準誤差(s.e.m)として示す。個々のデータ点ごとに幾何平均を示した。データをまた、群平均 ± 標準誤差(s.e.m)として示した。図26Fは、CD8⁺ T_{eff}細胞におけるAAV-CRISPR媒介Dhx37ノックアウトの抗腫瘍活性を示す。異なる処置後のRag1^{-/-}マウスにおける乳腺脂肪体E0771-mCh-cOVA腫瘍の成長曲線。PBS対照($n = 2$)、AAVベクターに感染したOT-I; Cas9 CD8⁺ T_{eff}細胞の養子移入($n = 4$)、およびAAV-sgDhx37に感染したOT-I; Cas9 CD8⁺ T_{eff}細胞の養子移入($n = 5$)。データを平均 ± 標準誤差(s.e.m)として示す。紫色の矢印は、ウイルス形質導入されたOT-I; Cas9 CD8⁺ T_{eff}細胞の養子移入時を示す。PBS群マウスは処置されず、早期に大きな腫瘍を有する。AAV-sgDhx37群はAAV-ベクターと比較して腫瘍量を有意に低減させたことから、Dhx37ノックアウト特異的な効果が示された。

【図27】図27A~27Fは、CD8⁺ T_{eff}細胞における急性Dhx37喪失時の遺伝子調節の分子的調査を示す一連のプロットおよび画像である。図27Aは、実験群、すなわちAAV-sgDhx37またはAAV-sgNTCにより着色された、AAVの形質導入から6日後の個々のOT-I; Cas9 CD8⁺ T_{eff}細胞の単一細胞トランスクリプトミクスのt-SNE次元削減および視覚化を示す。図27Bは、クラスタにより着色された、AAVの形質導入から6日後の個々のOT-I; Cas9 CD8⁺ T_{eff}細胞の単一細胞トランスクリプトミクスのt-SNE次元削減および視覚化を示す。計6個の主要なクラスタは、これらのT細胞の部分集団として同定された。図27Cは、AAV-sgDhx37またはAAV-sgNTC間のクラスタ特異的な集団差を示す。AAV-sgDhx37群は、クラスタ2においていっそう多くの細胞を有するが、クラスタ4および6に群化される細胞はいっそう少ない。図27Dは、6つの主要クラスタ全てにわたる全細胞の遺伝子発現特性を示し、これらの個々のOT-I; Cas9 CD8⁺ T_{eff}細胞のクラスタ特異的なマーカーを示している。図27Eは、AAV-sgDhx37またはAAV-sgNTC間のクラスタ特異的な遺伝子調節を示す。AAV-sgDhx37形質導入による急性Dhx37喪失時に上位の上方制御および下方制御された遺伝子を、クラスタ(k1~k6)ごとに示した。Cc15は全てのクラスタにわたって上方制御されることが分かったが、ある種の遺伝子は特定のクラスタでのみ差次的に上方制御されることが分かった(例えばk1、k2、およびk4でのRgs2; k5およびk6でのLag3、K3のみでのIfng)。Rp135はほとんどのクラスタ(k4を除く)にわたって下方制御されることが分かったが、ある種の遺伝子は特定のクラスタでのみ差次的に下方制御されることが分かった(例えばk2、k3、k5、およびk6でのRps29; k5およびk6でのNpm3、k6のみでのLy6c2)。図27Fは、6つの主要なクラスタ(k1~k6)の各々における、AAV-CRISPR形質導入による急性Dhx37喪失時に最も広く差次的に上方制御(Cc15)および下方制御(Rp135)された遺伝子の個々の細胞におけるmRNAレベルについての全データ点を含むパイオリンプロットを示す。Dhx37と対照群との間の全ての比較の場合、Cc15についての全てのクラスタで、およびRp135についてのk4を除く全てのクラスタで、FDR調整p値 < 0.05 。

【図28】図28A~28Cは、マウスおよびヒトCD8⁺細胞におけるDhx37喪失時の遺伝子調節のさらなる分析を示す。図28Aは、AAV-CRISPR形質導入による急性Dhx37喪失時にクラスタ特異的に差次的に発現される遺伝子を示す。6つの主要なクラスタ(k1~k6)の各々における代表的な遺伝子の全データ点を含むパイオリンプロットを示した。Dhx37と対照群との間の全ての比較の場合、全てのクラスタで、FDR調整p値 < 0.05 。図28Bは、CD8⁺ T細胞におけるAAV-sgDhx37媒介ノックアウトによる急性Dhx37喪失時に有意に上方制御された遺伝子の遺伝子オンロジー分析を示す。炎症応答、免疫応答、アポトーシスの負の調節、工

10

20

30

40

50

ンドペプチダーゼ、免疫グロブリン分泌、グルコース刺激への応答およびT細胞共刺激を含めて、上位の生物学的過程は免疫関連であることが分かった。図28Cは、異なる3種類の機構、つまりマウスTILでのレンチCRISPR媒介摂動、培養でのAAV-CRISPR媒介急性喪失、およびヒトT細胞での自然低発現集団による、Dhx37喪失時に差次的に調節される遺伝子の重複を示すベン図である。計24個の遺伝子(表示)は、全3つの機構にわたり有意であることが分かった。

【図29】本発明のベクターを用いたヒトT細胞における遺伝子編集を示す画像である。ヒトDHX37遺伝子(3つの独立したsgRNA)およびPDCD1遺伝子(2つの独立したsgRNA)のサーベイヤー(Surveyor)アッセイ法。矢印は、ヒトT細胞でのオンターゲット遺伝子編集の結果としての切断産物バンドを指し示す。

【発明を実施するための形態】

【0036】

詳細な説明

定義

他に定義されない限り、本明細書において用いられる全ての技術的および科学的用語は、本発明が関係する当業者によって一般に理解されるのと同じ意味を有する。本明細書において記述されるものと類似または同等の任意の方法および材料を本発明の試験の実践において用いることができるが、好ましい材料および方法が本明細書において記述される。本発明を記述および主張するうえで、以下の専門用語が用いられる。

【0037】

また、本明細書において用いられる専門用語は、特定の態様のみを記述する目的のためであり、限定することが意図されるものではないことも理解されるべきである。

【0038】

「1つの(a)」および「1つの(an)」という冠詞は、冠詞の文法的対象の1つまたは2つ以上(すなわち、少なくとも1つ)をいうように本明細書において用いられる。例として、「1つの要素」は、1つの要素または2つ以上の要素を意味する。

【0039】

本明細書において用いられる「約」は、量、一時的期間などのような測定可能な値をいう場合、規定値から $\pm 20\%$ または $\pm 10\%$ 、より好ましくは $\pm 5\%$ 、さらにより好ましくは $\pm 1\%$ 、およびさらにより好ましくは $\pm 0.1\%$ の変動を包含することが意図され、したがってそのような変動は開示された方法を行うのに適切である。

【0040】

本明細書において用いられる「アデノ随伴ウイルス」または「AAV」は、ヒトおよび他の霊長類に感染するが疾患を引き起こさない小さな非エンベロープウイルスをいう。AAVは分裂細胞および静止細胞に感染することができ、宿主ゲノムに組み込まれることなく染色体外の状態で存在する。AAVは、宿主細胞への遺伝子送達のベクターとして用いることができる。

【0041】

本明細書において用いられる場合、「量」という用語は、混合物中の構成要素の存在量または量をいう。

【0042】

本明細書において用いられる場合、「bp」という用語は塩基対をいう。

【0043】

「相補的」という用語は、2つの核酸鎖間の逆平行整列の程度をいう。完全な相補性には、各ヌクレオチドがその反対側にあることが必要である。相補性なしには、各ヌクレオチドがその反対側でないことが必要である。相補性の程度により、一緒になるまたはアニール/ハイブリダイズする配列の安定性が決まる。さらに、さまざまなDNA修復機能および調節機能は、塩基対の相補性に基いている。

【0044】

「CRISPR/Cas」または「クラスタ化され規則的に間隔があいた短い回文構造の繰り返し

10

20

30

40

50

」または「CRISPR」という用語は、ウイルスまたはプラスミドへの以前の曝露によるスペーサーDNAの短いセグメントが続く塩基配列の短い繰り返しを含むDNA遺伝子座をいう。細菌および古細菌は、短鎖RNAを用いて外来核酸の分解を指令するCRISPR/CRISPR関連(Cas)システムと呼ばれる適応免疫防御を進化させた。細菌において、CRISPRシステムは、RNAガイドDNA切断を介して外来DNAの侵入に対しての獲得免疫を提供する。

【0045】

「CRISPR/Cas9」システムまたは「CRISPR/Cas9を介した遺伝子編集」は、ゲノム編集/操作のために改変されたII型CRISPR/Casシステムをいう。それは、典型的には、「ガイド」RNA (gRNA)および非特異的CRISPR関連エンドヌクレアーゼ(Cas9)から構成される。「ガイドRNA (gRNA)」は、「短いガイドRNA (sgRNA)」または「単一ガイドRNA」(sgRNA)と本明細書において互換的に用いられる。sgRNAは、Cas9結合に必要な「足場」配列および改変されるゲノム標的を規定するユーザ定義のおよそ20ヌクレオチドの「スペーサー」または「ターゲティング」配列から構成される短い合成RNAである。Cas9のゲノム標的は、sgRNAに存在するターゲティング配列を変化させることにより変化させることができる。

10

【0046】

「切断」という用語は、核酸分子の骨格におけるような、共有結合の切断またはペプチド結合の加水分解をいう。切断は、ホスホジエステル結合の酵素的または化学的加水分解を含むが、これらに限定されない、種々の方法によって開始することができる。一本鎖切断および二本鎖切断の両方が可能である。二本鎖切断は、2つの異なる一本鎖切断事象の結果として起こりうる。DNA切断により、平滑末端または付着末端のいずれかの生成をもたらすことができる。ある種の態様において、融合ポリペプチドは、切断された二本鎖DNAを標的にするために用いることができる。

20

【0047】

「疾患」は、動物がホメオスタシスを維持できず、かつ疾患が改善されないなら、動物の健康が悪化し続ける動物の健康状態である。対照的に、動物における「障害」は、動物がホメオスタシスを維持できるが、しかし障害がない場合よりも動物の健康状態が好ましくない健康状態である。処置せずに放置されても、障害は動物の健康状態のさらなる低下を必ずしも引き起こさない。

【0048】

「有効量」または「治療的有效量」は、本明細書において互換的に用いられ、特定の生物学的結果を達成するためにまたは治療的もしくは予防的利益を提供するために有効な本明細書において記述される化合物、製剤、材料、または組成物の量をいう。そのような結果は、限定されるものではないが、当技術分野において適切な任意の手段により判定される抗腫瘍活性を含みうる。

30

【0049】

「コードする」は、遺伝子、cDNA、またはmRNAのような、ポリヌクレオチドにおける特異的ヌクレオチド配列が、規定のヌクレオチド配列(すなわち、rRNA、tRNA、およびmRNA)または規定のアミノ酸配列のいずれかを有し、それに由来する生物学的特性を有する、生物学的過程における他の重合体および高分子を合成するための鋳型として役立つ固有の特性をいう。したがって、遺伝子に対応するmRNAの転写および翻訳が、細胞または他の生物学的システムにおいてタンパク質を産生するならば、その遺伝子はタンパク質をコードする。ヌクレオチド配列がmRNA配列と同一でありかつ通常は配列リストに提供される、コード鎖と、遺伝子またはcDNAの転写のための鋳型として用いられる非コード鎖との両方を、その遺伝子またはcDNAのタンパク質または他の産物をコードするということができる。

40

【0050】

本明細書において用いられる場合、「内因性」は、生物、細胞、組織、もしくはシステム由来のまたはそれらの内部で産生される、任意の材料をいう。

【0051】

本明細書において用いられる「発現」という用語は、そのプロモーターによって駆動される特定のヌクレオチド配列の転写および/または翻訳と定義される。

50

【0052】

「発現ベクター」は、発現されるヌクレオチド配列に機能的に連結された発現制御配列を含む組み換えポリヌクレオチドを含むベクターをいう。発現ベクターは、発現に十分なシス作用要素を含む；発現のための他の要素は、宿主細胞によってまたはインビトロ発現系において供給されることができる。発現ベクターは、組み換えポリヌクレオチドを組み込むコスミド、プラスミド(例えば、裸のプラスミドまたはリボソームに含まれるプラスミド)およびウイルス(例えば、センダイウイルス、レンチウイルス、レトロウイルス、アデノウイルス、およびアデノ随伴ウイルス)のような、当技術分野において公知の全てのものを含む。

【0053】

本明細書において用いられる「相同」は、2つの重合体分子間、例えば、2つのDNA分子もしくは2つのRNA分子のような2つの核酸分子間、または2つのポリペプチド分子間のサブユニット配列同一性をいう。2つの分子の両方におけるサブユニットの位置が同じ単量体サブユニットで占められている場合、例えば、2つのDNA分子のそれぞれにおける位置がアデニンで占められているなら、それらはその位置で相同である。2つの配列間の相同性は、一致しているまたは相同の位置の数の一次関数であり；例えば、2つの配列における位置の半分(例えば、長さが10サブユニットの重合体における5つの位置)が相同である場合、2つの配列は50%相同であり；位置の90%(例えば、10個中9個)が一致しているまたは相同である場合、2つの配列は90%相同である。

【0054】

本明細書において用いられる「同一性」は、2つの重合体分子間、特に2つのポリペプチド分子間のような、2つのアミノ酸分子間のサブユニット配列同一性をいう。2つのアミノ酸配列が同じ位置に同じ残基を有する場合、例えば、2つのポリペプチド分子のそれぞれにおける位置がアルギニンで占められているなら、それらはその位置で同一である。2つのアミノ酸配列がアライメントにおける同じ位置に同じ残基を有する同一性または程度は、多くの場合、割合として表される。2つのアミノ酸配列間の同一性は、一致しているまたは同一の位置の数の一次関数であり；例えば、2つの配列における位置の半分(例えば、長さが10アミノ酸の重合体における5つの位置)が同一である場合、2つの配列は50%同一であり；位置の90%(例えば、10個中9個)が一致しているまたは同一である場合、2つのアミノ酸配列は90%同一である。

【0055】

本明細書において用いられる場合、「取り扱い説明材料」は、本発明の組成物および方法の有用性を伝えるために使用できる出版物、記録、図表、または任意の他の表現媒体を含む。本発明のキットの取り扱い説明材料は、例えば、本発明の核酸、ペプチド、および/もしくは組成物を含む容器に添付されてもよい、または核酸、ペプチド、および/もしくは組成物を含む容器と一緒に出荷されてもよい。あるいは、取り扱い説明材料および化合物がレシピエントによって協調的に用いられることを意図して、取り扱い説明材料は容器とは別に出荷されてもよい。

【0056】

「単離された」とは、自然状態から改変または取り出されたことを意味する。例えば、生きている動物において天然に存在する核酸またはペプチドは「単離」されているのではなく、その天然状態の共存材料から部分的にまたは完全に分離された同じ核酸またはペプチドは「単離」されている。単離された核酸もしくはタンパク質は、実質的に精製された形態で存在することができるか、または、例えば宿主細胞のような非天然環境に存在することができる。

【0057】

本明細書において用いられる「ノックダウン」という用語は、1つまたは複数の遺伝子の遺伝子発現の減少をいう。

【0058】

本明細書において用いられる「ノックアウト」という用語は、1つまたは複数の遺伝子

10

20

30

40

50

の遺伝子発現の除去をいう。

【0059】

本明細書において用いられる「レンチウイルス」は、レトロウイルス科(Retroviridae)の属をいう。レンチウイルスは、非分裂細胞に感染できるという点でレトロウイルスの中でも特有であり; それらはかなりの量の遺伝情報を宿主細胞のDNAに送達することができるため、遺伝子送達ベクターの最も効率的な方法の1つである。HIV、SIV、およびFIVは全てレンチウイルスの例である。レンチウイルスに由来するベクターは、インビボでかなりのレベルの遺伝子移入を達成するための手段を供与する。

【0060】

本明細書において用いられる「改変された」という用語とは、本発明の分子または細胞の状態または構造の変化を意味する。分子は、化学的に、構造的に、および機能的になど、多くの方法で改変されうる。細胞は、核酸の導入により改変されうる。

【0061】

本明細書において用いられる「調節する」という用語とは、処置もしくは化合物の非存在下での対象における応答のレベルと比較して、および/または他の点では同一であるが未処置の対象における応答のレベルと比較して、対象における応答のレベルの検出可能な増加または減少に影響を与えることを意味する。この用語は、天然のシグナルまたは応答をかく乱することおよび/またはそれに影響を及ぼすことを包含し、それにより、対象、好ましくは、ヒトにおける有益な治療応答に影響を与える。

【0062】

本明細書において用いられる「変異」は、所与の参照配列(これは、例えば、同じ対象から以前に収集されたDNAサンプルでありうる)からの改変をもたらすDNA配列の変化である。変異は、プリン(アデニンおよび/もしくはチミン)ならびに/またはピリミジン(グアニンおよび/もしくはシトシン)のような少なくとも1つのデオキシリボ核酸塩基の欠失および/または挿入および/または複製および/または置換を含むことができる。変異は、生物(対象)の観察可能な特徴(表現型)の識別可能な変化をもたらす場合もあるか、またはもたらさない場合もある。

【0063】

「核酸」とは、デオキシリボヌクレオシドまたはリボヌクレオシドから構成されているにせよ、ホスホジエステル結合から、またはホスホトリエステル、ホスホルアミデート、シロキサソ、カーボネート、カルボキシメチルエステル、アセトアミデート、カルバメート、チオエーテル、架橋ホスホルアミデート、架橋メチレンホスホネート、ホスホロチオエート、メチルホスホネート、ホスホロジチオエート、架橋ホスホロチオエート、もしくはスルホン結合、およびそのような結合の組み合わせのような改変された結合から構成されているにせよ、任意の核酸を意味する。核酸という用語はまた、具体的には、生物学的に発生する5つの塩基(アデニン、グアニン、チミン、シトシン、およびウラシル)以外の塩基から構成される核酸も含む。

【0064】

本発明の文脈において、一般的に存在する核酸塩基の以下の略語が用いられる。「A」はアデノシンをいい、「C」はシトシンをいい、「G」はグアノシンをいい、「T」はチミジンをいい、「U」はウリジンをいう。

【0065】

特に明記されない限り、「アミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列」は、互いに縮重型であり、かつ同じアミノ酸配列をコードする全てのヌクレオチド配列を含む。タンパク質またはRNAをコードするヌクレオチド配列という語句はまた、タンパク質をコードするヌクレオチド配列が何らかの形でイントロンを含みうる程度までイントロンを含みうる。

【0066】

「オリゴヌクレオチド」という用語は、通常、一般に約60ヌクレオチドより大きくない、短いポリヌクレオチドをいう。ヌクレオチド配列がDNA配列(すなわち、A、T、G、C)に

10

20

30

40

50

よって表される場合、これには「U」が「T」に置き換わるRNA配列(すなわち、A、U、G、C)も含まれることが理解されよう。

【0067】

免疫原性組成物の「非経口」投与は、例えば、皮下(s.c.)、静脈内(i.v.)、筋肉内(i.m.)、もしくは胸骨内注射、または注入技法を含む。

【0068】

本明細書において用いられる「ポリヌクレオチド」という用語は、ヌクレオチドの鎖と定義される。さらに、核酸はヌクレオチドの重合体である。したがって、本明細書において用いられる核酸およびポリヌクレオチドは互換的である。当業者は、核酸が、単量体「ヌクレオチド」に加水分解できるポリヌクレオチドであるという一般的な知識を有する。単量体ヌクレオチドはヌクレオシドに加水分解することができる。本明細書において用いられる場合、ポリヌクレオチドには、非限定的に、組み換え手段、すなわち、通常のクローニング技術およびPCR(商標)などを用いた、組み換えライブラリまたは細胞ゲノムからの核酸配列のクローニングを含む、当技術分野において使用可能な任意の手段により、ならびに合成手段により得られる全ての核酸配列が含まれるが、これらに限定されることはない。本明細書ではポリヌクレオチド配列を記述するために従来を表記法が用いられる：一本鎖ポリヌクレオチド配列の左側末端は5'末端であり；二本鎖ポリヌクレオチド配列の左側方向は5'方向といわれる。

10

【0069】

本明細書において用いられる場合、「ペプチド」、「ポリペプチド」、および「タンパク質」という用語は互換的に用いられ、ペプチド結合により共有結合したアミノ酸残基から構成される化合物をいう。タンパク質またはペプチドは少なくとも2つのアミノ酸を含まなければならない。タンパク質またはペプチドの配列を構成できるアミノ酸の最大数に制限は設けられない。ポリペプチドには、ペプチド結合により互いに連結された2つまたはそれ以上のアミノ酸を含む任意のペプチドまたはタンパク質が含まれる。本明細書において用いられる場合、この用語は、例えば、当技術分野において一般にペプチド、オリゴペプチド、およびオリゴマーともいわれる短い鎖と、当技術分野において一般にタンパク質といわれ、このなかには多くの種類がある、もっと長い鎖の両方をいう。「ポリペプチド」には、例えば、とりわけ、生物学的に活性な断片、実質的に相同なポリペプチド、オリゴペプチド、ホモ二量体、ヘテロ二量体、ポリペプチドの変種、改変ポリペプチド、誘導体、類似体、融合タンパク質が含まれる。ポリペプチドには、天然ペプチド、組み換えペプチド、合成ペプチド、またはそれらの組み合わせが含まれる。

20

30

【0070】

本明細書において用いられる「プロモーター」という用語は、ポリヌクレオチド配列の特異的転写を開始するために必要な、細胞の合成装置または導入された合成装置によって認識されるDNA配列と定義される。

【0071】

本明細書において用いられる「サンプル」または「生体サンプル」は、臓器、組織、エキソソーム、血液、血漿、唾液、尿、および他の体液を含むがこれらに限定されない、対象からの生物学的材料を意味する。サンプルは、対象から得られる任意の材料源であることができる。

40

【0072】

本明細書において用いられる場合、「配列決定」または「ヌクレオチド配列決定」という用語は、核酸サンプル中のヌクレオチド(塩基配列)、例えばDNAまたはRNAの順序を決定することをいう。Sanger配列決定ならびにハイスループット配列決定技術(次世代配列決定技術としても公知)、例えばIlluminaのHiSeqおよびMiSeqプラットフォームまたはRoche Applied Scienceが供与するGS FLXプラットフォームのような、多くの技法が使用可能である。

【0073】

「対象」という用語は、免疫応答を誘発できる生物(例えば、哺乳動物)を含むことが意

50

図される。本明細書において用いられる「対象」または「患者」は、ヒトまたは非ヒト哺乳動物でありうる。非ヒト哺乳動物には、例えば、ヒツジ、ウシ、ブタ、イヌ、ネコ、およびネズミ哺乳動物のような、家畜およびペットが含まれる。好ましくは、対象はヒトである。

【0074】

「標的部位」または「標的配列」は、結合が生じるのに十分な条件の下で結合分子が特異的に結合しうる核酸の一部を規定するゲノム核酸配列をいう。

【0075】

本明細書において用いられる場合、「T細胞受容体」または「TCR」という用語は、抗原の提示に応答してT細胞の活性化に關与する膜タンパク質の複合体をいう。TCRは、主要組織適合遺伝子複合体分子に結合した抗原を認識することに関与している。TCRはアルファ()およびベータ()鎖のヘテロ二量体から構成されるが、一部の細胞では、TCRはガンマおよびデルタ(/)鎖からなる。TCRは / および / の形で存在する場合があります。これは構造的に類似しているが、異なる解剖学的位置および機能を有する。各鎖は、可変ドメインと定常ドメインの2つの細胞外ドメインから構成される。いくつかの態様において、TCRは、例えば、ヘルパーT細胞、細胞傷害性T細胞、記憶T細胞、調節T細胞、ナチュラルキラーT細胞、および/またはガンマデルタT細胞を含めて、TCRを含む任意の細胞で改変することができる。

10

【0076】

本明細書において用いられる「治療の」という用語は、処置および/または予防を意味する。治療効果は、疾患状態の抑制、寛解、または根絶によって得られる。

20

【0077】

本明細書において用いられる「トランスフェクトされた」または「形質転換された」または「形質導入された」という用語は、外因性核酸が宿主細胞に移入または導入されるプロセスをいう。「トランスフェクトされた」または「形質転換された」または「形質導入された」細胞は、外因性核酸をトランスフェクト、外因性核酸で形質転換、または外因性核酸を形質導入された、細胞である。細胞は、初代対象細胞およびその子孫細胞を含む。

【0078】

疾患を「処置する」ことは、この用語が本明細書において用いられる場合、対象が経験する疾患または障害の少なくとも1つの兆候または症状の頻度または重症度を低減させることを意味する。

30

【0079】

「ベクター」は、単離された核酸を含み、単離された核酸を細胞の内部に送達するために使用できる組成物(composition of matter)である。線状ポリヌクレオチド、イオン性または両親媒性化合物に關連するポリヌクレオチド、プラスミド、およびウイルスを含むが、これらに限定されない、多数のベクターが当技術分野において公知である。したがって、「ベクター」という用語は、自律的に複製するプラスミドまたはウイルスを含む。この用語は、例えば、ポリリジン化合物、リボソームなどのような、細胞への核酸の移入を促進する非プラスミドおよび非ウイルス化合物も含むと解釈されるべきである。ウイルスベクターの例としては、センダイウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクターなどが挙げられるが、これらに限定されることはない。

40

【0080】

範囲：本開示の全体を通して、本発明のさまざまな局面を範囲形式で提示することができる。範囲形式での記述は、単に便宜上および簡潔にするためのものであり、本発明の範囲に対する柔軟性のない制限と解釈されるべきではないことが理解されるべきである。したがって、範囲の記述は、全ての可能な部分範囲およびその範囲内の個々の数値を具体的に開示したと見なされるべきである。例えば、1~6のような範囲の記述は、1~3、1~4、1~5、2~4、2~6、3~6などのような部分範囲、ならびにその範囲内の個々の数字、例えば、1、2、2.7、3、4、5、5.3、および6を具体的に開示したと見なされるべきである。こ

50

れは、範囲の幅に関係なく適用される。

【0081】

説明

本発明は、1つの局面において、T細胞のゲノムスケールの編集およびスクリーニングのための組成物および方法を提供する。ある種の態様において、本発明は、インビトロおよび/またはインビボでのT細胞のゲノムスケール突然変異誘発のためのsgRNAライブラリを提供する。他の態様において、本発明は、Tリンパ球(T細胞)における多重ゲノム編集を可能にし、同時に代用/親和性マーカーを用いて編集されたT細胞を単離または濃縮するベクターシステム(多数のベクターを含む)を提供する。さらに他の態様において、本発明は、免疫療法モデルとしてがん細胞におけるモデル抗原の発現を可能にするベクターシステム(多数のベクターを含む)を提供する。さらに他の態様において、本発明は、インビトロおよび/またはインビボでのCD8⁺ T細胞のハイスループット遺伝子調査のための方法を提供する。

10

【0082】

CD8⁺ T細胞は、細胞内病原体および腫瘍に対する適応免疫応答にとって必須である。最近の臨床的進歩は、CD8⁺ T細胞ががん免疫サイクルで中心的な役割を果たすという主題に収束している。差次的遺伝子発現に基づくPD-1遺伝子の発見、マウスモデルにおけるCTLA-4阻害により媒介される抗腫瘍効果、および多くのその後の研究のような、T細胞機能を調節する遺伝子の同定は、チェックポイント遮断の免疫療法パラダイムにつながった。免疫療法はがん処置に革命をもたらし、後期転移性がんを、黒色腫および肺がんでも最も顕著な、ある種のがん型に苦しむ患者の一部に対する死刑宣告ではなくしている。したがって、T細胞において新規遺伝子を発見することは、新しくより効果的ながん治療用物質の開発の鍵となる。古典的な遺伝学的研究により、4-1BB、CD27、CD28、ICOS、LAG3、OX-40、TIM3、およびVISTAのような個々の遺伝子がチェックポイント調節の潜在的な標的としてさらに同定された。しかしながら、部分的にはインビボでT細胞におけるハイスループットスクリーニングを実行するうえでの技術的な課題のため、がん免疫におけるT細胞表現型を調節する遺伝子の偏りのない、全体的見解が欠けている。CD8⁺ T細胞の機能を増強する可能性のある治療標的は、医薬品開発およびクリニックにおいて積極的に追求されており、単剤療法としてまたはさまざまな組み合わせで、新しいチェックポイント遮断抗体および化合物を試験する臨床試験の新たなブームにつながっている。注目すべきは、ヒトで初のゲノム編集臨床試験が、養子移入によりがん患者に注入されたCRISPR編集CD8⁺ T細胞でデビューを果たした。

20

30

【0083】

本研究は、養子移入後のインビボでのT細胞輸送および生存のためのある種の遺伝子を明らかにした。これらの新しい洞察は、キメラ抗原受容体(CAR-T)、チェックポイント遮断、または組み合わせ免疫療法を増強するための新しい標的の概念化に直接影響を与える。

【0084】

本明細書において記述される本研究では、T細胞CRISPRノックアウトベクターを作製し、ゲノムスケールノックアウトライブラリをクローニングした。このシステムを用いて、野生型マウスとTCRトランスジェニックマウスの両方から単離されたCD8⁺細胞傷害性T細胞で2つのハイスループット遺伝子スクリーニングを行った。突然変異誘発細胞を宿主マウスに養子移入することにより、これらのスクリーニングは、マウスのいくつかのリンパ器官内および非リンパ器官内の変異T細胞の相対存在量の全体的な定量的測定をもたらした。sgRNA濃縮解析により、CRISPR摂動時にインビボでCD8⁺ T細胞機能に直接影響を与える、これまでに立証されていないさまざまな標的が同定された。

40

【0085】

組成物

1つの局面において、本発明は、5'長末端反復(LTR)配列、U6プロモーター配列、BsmBI制限部位、EFS配列またはPGK構成的プロモーター、sgRNA発現カセット、Thy1.1カセット

50

、3' LTR配列、およびアンピシリン耐性遺伝子配列(AmpR)を含む、ベクターを含む。1つの態様において、ベクターはSEQ ID NO:129,213 (pSC017_pLKO-U6-sgBsmBI-EFS-Thy11CO-spA)を含む。別の態様において、ベクターはSEQ ID NO:129,214を含む。さらに別の態様において、ベクターはSEQ ID NO:129,215を含む。ある種の態様において、ベクターは、限定されるものではないが、人工選択マーカー、蛍光タンパク質、または第2のU6-sgRNAのような、追加の構成要素を含むことができる。ある種の態様において、本発明のベクターは、T細胞における強力なゲノム編集を可能にする。

【0086】

別の局面において、本発明は、5'長末端反復(LTR)配列、U6プロモーター配列、BsmB1制限部位、EFS配列、sgRNA発現カセット、mCherry配列、2Aペプチド、cOVA配列、3' LTR配列、およびアンピシリン耐性遺伝子配列(AmpR)を含む、ベクターを含む。ある種の態様において、このベクターはトランスジェニックOT-I (CD8+)およびOT-II (CD4+) T細胞によるTCR認識のためのモデル抗原(cOVA)の発現を可能にする。1つの態様において、このベクターは、SEQ ID NO: 129,216 (pMD02: レンチ-pLKO-U6-sgBsmBI-EFS-mCherry-2A-cOVA)を含む。

10

【0087】

別の局面において、本発明はsgRNAライブラリを含む。ライブラリは、複数のベクターを含み、各ベクターが、SEQ ID NO: 1~129,209からなる群より選択されるヌクレオチド配列を含むsgRNAのための発現カセットを含む。ある種の態様において、sgRNAライブラリにおける複数のベクターの各々は、5'長末端反復(LTR)配列、U6プロモーター配列、BsmB1制限部位、EFS配列、sgRNA発現カセット、Thy1.1カセット、3' LTR配列、およびアンピシリン耐性遺伝子配列(AmpR)を含む。

20

【0088】

本発明はまた、sgRNAライブラリを含むキットを提供する。sgRNAライブラリは、複数のベクターを含み、各ベクターが、SEQ ID NO: 1~129,209からなる群より選択されるヌクレオチド配列を含むsgRNAのための発現カセットを含む。ある種の態様において、複数のベクターは、5'長末端反復(LTR)配列、U6プロモーター配列、BsmB1制限部位、EFS配列、sgRNA発現カセット、Thy1.1カセット、3' LTR配列、およびアンピシリン耐性遺伝子配列(AmpR)を含む。キットにはそれを使用するための取り扱い説明材料が含まれる。取り扱い説明材料は、キットの構成要素を用いるための指示書、および結果を解釈するための使用説明書または手引きを含むことができる。

30

【0089】

本発明はまた、5'逆方向末端反復(ITR)配列、U6プロモーター配列、BbsI制限部位、sgRNA発現カセット、EFS配列、SB100xカセット、3' ITR配列、およびアンピシリン耐性遺伝子配列(AmpR)を含む、ベクターを提供する。1つの態様において、ベクターはSEQ ID NO: 129,217を含む。

【0090】

pLY005SB_pAAV-U6sg(BbsI)-EFS-SB100X (SEQ ID NO: 129,217)

1 cctgcaggca gctgcgcgct cgctcgctca ctgaggccgc ccgggcaaag cccgggctc
 61 gggcgacctt tggtcgccc gcctcagtga gcgagcgagc gcgagagag ggagtggcca
 121 actccatcac taggggttcc tgcggccgca cgcgttctag actatacagt tgaagtcgga
 181 agttacata cacttaagt ggagtcatta aaactcgtt tcaactact ccacaaatt
 241 ctgttaaca aacaatagt ttggcaagtc agttaggaca tctactttgt gcatgacaca
 301 agtcatttt ccaacaattg ttacagaca gattattca cttataatc actgtatcac
 361 aattccagtg ggtcagaagt ttacatacac taagttgact gtgcccttaa acagcttggg
 421 aaatccaga aaatgatgc atggccttag agaggatccg agggcctatt tccatgatt
 481 cctcatatt tgcataacg atacaaggct gtagagaga taattagaat taattgact
 541 gtaaacacaa agatattagt acaaaatacg tgacgtagaa agtaataatt tcttgggtag
 601 tttcagttt taaaattatg tttaaaatg gactatcata tgcttaccgt aactgaaag
 661 tattcgatt tcttggctt atatatctt ggaaaggac gaaacaccgg gtcttcgaga
 721 agacctgtt tagagctaga aatagcaagt taaaataagg ctagtccgt atcaactga
 781 aaaagtggca ccgagtcggt gctttttgg ctagtggcc gcgtttaa acgtcactagg
 841 tcttgaagg agtgggaatt ggctccggtg cccgtcagt ggagagcgc acatcgcca
 901 cagtccccga gaagtgggg ggagggtcg gcaattgat cggtcctag agaaggtggc
 961 gcggggtaaa ctgggaaagt gatgtcgtg actggctccg cttttccc gaggggtggg
 1021 gagaaccgta tataagtga gtatgcgccc tgaacgttct tttcgcaac gggtttgcg
 1081 ccagaacaca ggctcgagat gggaaaatca aaagaaatca gccaagacct cagaaaaaga
 1141 attgtagacc tccacaagtc tggttatcc ttgggagcaa ttccaaacg cctggcggta
 1201 ccacgttcat ctgtacaac aatagtagc aagataaac accatgggac cacgcagccg
 1261 tcataccgct caggaaggag acgcttctg tctcctagag atgaacgtac tttggtgca
 1321 aaagtgcaa tcaatccag aacaacagca aaggacctg tgaagatgct ggaggaaaca
 1381 ggtacaaaag tatctatc cacagtaaaa cgagtcctat atcgacataa cctgaaaggc
 1441 cactcagcaa ggaagaagcc actgctcaa aaccgacata agaaagccag actacggtt
 1501 gcaactgcac atggggacaa agatcgtact tttggagaa atgcctctg gtctgatgaa
 1561 acaaaaatag aactgttgg ccataatgac catcgttatg tttggaggaa gaagggggag
 1621 gcttgcaagc cgaagaacac catccaacc gtgaagcacg ggggtggcag catcatgtg
 1681 tgggggtgct ttgctgcagg agggactggt gcactcaca aaatagatgg catcatggac
 1741 gcggtgcagt atgtgatat attgaagcaa catctcaaga catcagtcag gaagttaaag
 1801 ctggctgca aatgggttt ccaacacgac aatgaccca agcatactc caaagtgtg
 1861 gcaaaatgac ttaaggacaa caaagtcaag gtattggagt ggccatcaca aagccctgac
 1921 ctaaatccta tagaaaatt gtgggcagaa ctgaaaaagc gtgtgagagc aaggaggcct
 1981 acaaacctga ctcagttaca ccagctctg caggaggaat gggccaaaat tcaccaaat
 2041 tatttggga agcttggga aggctaccg aaacgttga ccaagttaa acaatttaa

10

20

30

2101 ggcaatgcta ccaatacta ggggcctaa ccgcgggaat aaaagatctt tatttcatt
 2161 agatctgtgt gttggtttt tgtgtgaatt cttagtgta tgtaaacttc tgaccactg
 2221 ggaatgtgat gaaagaaata aaagctgaaa tgaatcattc tcttactat tattctgata
 2281 tttcacattc ttaaaaataa gtggtgatcc taactgacct aagacaggga attttfacta
 2341 ggattaaatg tcaggaattg tgaaaaagtg agtttaaagtg tatttggcta aggtgtatgt
 2401 aaacttccga cttcaactgt ataggcatgc ggtaaccacg tgcggaccga gcggccgcag
 2461 gaacccttag tgatggagtt ggccactccc tctctgcgcg ctgctcgt cactgaggcc
 2521 gggcgaccaa aggtcgcgcc acgcccgggc tttgccggg cggcctcagt gagcgagcga
 2581 gcgcgcagct gcctgcaggg gcgcctgatg cggtatcttc tccttacgca tctgtcgggt
 2641 atttacacc gcatactca aagcaacct agtacgcgc ctgtagcggc gcatlaagcg
 2701 cggcggggtg ggtggttacg cgcagcgtga ccgctacact tgccagcgc ctgagcggc
 2761 ctcttctgc tttcttcc tcttctcgc ccacgttgc cggcttccc cgtcaagtc
 2821 taaatcgggg gctcccitta gggttccgat ttagtcttt acggcacctc gaccccaaaa
 2881 aacttgattt ggggtgatgt tcacgtatg ggccatgcc ctgatagacg gttttcggc
 2941 ctttgacgtt ggagtcacg tctttaata gtggactctt gtccaaact ggaacaacac
 3001 tcaacctat ctgaggctat tctttgatt tataagggat tttgccgatt tggcctatt
 3061 ggttaaaaa tgagctgatt taacaaaaat ttaacgcgaa ttttaacaaa atattaactg
 3121 ttacaattt atgggtcact ctacgtacaa tctgctctga tgccgcatag ttaagccagc
 3181 cccgacacc gccaacacc gctgacgcgc cctgacgggc ttgtctgctc ccggcatccg
 3241 cttacagaca agctgtgacc gtctccggga gctgcatgtg tcagaggttt tcaccgtcat
 3301 caccgaaacg cgcgagacga aagggcctcg tgatagcct attttatag gttaatgca
 3361 tgataaat ggtttcttag acgtcaggtg gcacttttc gggaaatgtg cgcggaacc
 3421 ctattgttt attttctaa atacattcaa atatgtatcc gctcatgaga caataacct
 3481 gataaatgct tcaataat tgaaaaagga agagtatgag tattcaacat ttccgtgtc
 3541 ccttattcc ctttttgcg gcaatttgc tctctgttt tctcaccga gaaacgctgg
 3601 tgaaagtaa agatgctgaa gatcagttgg gtgcacgagt gggttacatc gaactggatc
 3661 tcaacagcgg taagatcctt gagagtttc gcccgaaga acgttttcca atgatgagca
 3721 cttttaaagt tctgctatgt ggcgcggat tatcccgat tgacgcccgg caagagcaac
 3781 tcggctgccg catacactat tctcagaatg acttggttga gtactacca gtcacagaaa
 3841 agcatcttac ggatggcatg acagtaagag aattatgcag tctgccata accatgagtg
 3901 ataactctgc ggccaactta ctctgacaa cgtcggagg accgaaggag ctaaccgctt
 3961 ttttgacaaa catgggggat catgtaact gccttgatc tgggaaccg gagctgaaat
 4021 aagccatacc aaacgacgag cgtgacacca cgtgcctgt agcaatggca acaacgttgc
 4081 gcaactatt aactggcga ctactactc tagcttccc gcaacaatta atagactgga
 4141 tggaggcgga taaagtgc gaccacttc tgcctcggc cctccggct ggctggtta
 4201 ttgctgata atctggagcc ggtgagcgtg ggtctcggg tatcattgca gcactggggc
 4261 cagatggtaa gccctccgt atcgtatgta tctacacgac ggggagtcag gcaactatgg
 4321 atgaacgaaa tagacagatc gctgagatag gtgcctcact gattaagcat tgtaactgt
 4381 cagaccaagt tactcatat atactttaga ttgattaaa acttcattt taatttaaa
 4441 ggatctagg gaagatcctt ttgataatc tcatgaccaa aatccctaa cgtgagttt
 4501 cgttccactg agcgtcagac cccgtagaaa agatcaaagg atctcttga gatcctttt
 4561 tctgcgcgt aatctgctg ttgcaacaa aaaaaccacc gctaccagc gtggtttgt
 4621 tgccgatca agagctacca actcttttc cgaaggtaac tggcttcagc agagcgcaga
 4681 taccaaatac tctcttcta gtgtagccgt agttaggcca ccaactcaag aactctgtg
 4741 caccgcctac atacctcgt ctgctaatcc tgttaccagt ggctgctgcc agtgcgata
 4801 agtctgtct taccgggtg gactcaagac gatagttacc ggataaggcg cagcggctcg
 4861 gctgaacggg gggttcgtg acacagccca gcttgagcgc aacgacctac accgaactga
 4921 gatacctaca gcgtgagcta tgagaaagcg ccacgctcc cgaagggaga aaggcggaca
 4981 ggtatccggt aagcggcagg gtcggaacag gagagcgcac gagggagctt ccaggggaa
 5041 acgctggtta tctttatag cctgtcgggt ttcgccact ctgacttgag cgtcgattt
 5101 tgtgatctc gtcaggggg cggagcctat ggaaaaacgc cagcaacgcg gccttttac
 5161 ggttccctgc ctttctgctg cttttgctc acatgt

別の局面において、本発明は、5'逆方向末端反復(ITR)配列、U6プロモーター配列、Bbs I制限部位、sgRNA発現カセット、EFS配列、SB100xカセット、Thy1.1カセット、3' ITR配列、およびアンピシリン耐性遺伝子配列(AmpR)を含む、ベクターを提供する。1つの態様において、ベクターはSEQ ID NO: 129,218を含む。

【 0 0 9 2 】

pLY017SB_pAAV-U6sg(Bbs I)-EFS-Thy1 (SEQ ID NO: 129,218)

```

1 cctgcaggca gctgcgcgct cgctcgctca ctgaggccgc ccgggcaaag cccgggcgctc
61 gggcgacctt tggtcgcccc gcctcagtga gcgagcgagc gcgcagagag ggagtgggcca
121 actccatcac taggggttcc tgcggccgca cgcgttctag actatacagt tgaagtcgga
181 agttacata cacttaagt ggagtcatta aaactcgttt tcaactact ccacaaattt
241 cttgtaaca aacaatagtt ttggcaagtc agttaggaca tctactttgt gcatgacaca
301 agtcattttt ccaacaattg ttacagaca gattatttca cttataattc actgtatcac
361 aattccagtg ggcagaagt ttacatacac taagttgact gtgccttaa acagcttga
421 aaattccaga aatgatgac atggcttag agaggatccg agggcctatt tccatgatt
481 cctcatatt tgcatacag atacaaggct gtagagaga taattagaat taattgact
541 gtaaacacaa agatattagt acaaaatacg tgacgtagaa agtaataatt tcttggttag
601 ttgcagttt taaaattatg tttaaaatg gactatcata tgcttaccgt aacttgaag
661 tatttcgatt tcttgcttt atatatcttg tggaaaggac gaaacaccgg gtcttcgaga
721 agacctgtt tagagctaga aatagcaagt taaaataagg ctagtccgtt atcaactga
781 aaaagtggca ccgagtcggt gctttttgg ctagtggcc gcgtttaaac gtcgactagg
841 tcttgaagg agtgggaatt ggctccggtg ccgctcagtg ggcagagcgc acatcggcca
901 cagtccccga gaagtgggg ggagggggtcg gcaattgac cggtgcctag agaaggtggc
961 gcggggtaaa ctgggaaagt gatgctgtgt actggctccg ctttttccc gaggggtggg
1021 gagaaccgta tataagtga gtagtcgccc tgaacgttct ttttcgcaac gggtttgcg
1081 ccagaacaca ggctcgagat gaaccagcc atcagcgtcg ctctcctgct ctcagtcttg
1141 caggtgtccc gagggcagaa ggtgaccagc ctgacagcct gcctggtgaa ccaaacctt
1201 cgcttgact gccgcatga gaataacacc aaggataact ccatccagca tgagttcagc
1261 ctgaccgag agaagaggaa gcacgtgctc tcaggcacc ttgggatacc cgagcacacg
1321 taccgtccc gcgtcacct ctccaaccag ccctatatca aggtccttac ctagccaac
1381 ttaccacca aggatgagg cgactactt tgtgagctc gcgtgctggg cgcgatccc
1441 atgagctcca ataaaagtat cagtgtgtat agagacaagc tggtaagtg tggcggcata
1501 agcctgctgg ttcagaacac atctggatg ctgctgctgc tgccttccct ctcctcctc
1561 caagccctg acttcattc tctgggcagt ggagagggca gaggaagtct gtaacatgc
1621 ggtgacgtcg aggagaatcc tggccaatg ggaaaatcaa aagaaatcag ccaagacctc
1681 agaaaaagaa ttgtagacct ccacaagtct gggtcatcct tgggagcaat ttccaaacgc

```

10

20

30

1741 ctggcgggtac cacgttcate tgtacaaaca atagtacgca agtataaaca ccatgggacc
 1801 acgcagccgt cataccgctc aggaaggaga cgcgttctgt ctctagaga tgaacgtact
 1861 ttggtgcgaa aagtgc aaat caatcccaga acaacagcaa aggaccttgt gaagatgctg
 1921 gaggaacag gtacaaaagt atctatatacc acagtaaaac gagtcctata tcgacataac
 1981 ctgaaaggcc actcagcaag gaagaagcca ctgctccaaa accgacataa gaaagccaga
 2041 ctacggtttg caactgcaca tggggacaaa gatcgtactt ttggagaaa tgcctctgg
 2101 tctgatgaaa caaaaataga actgtttggc cataatgacc atcgttatgt ttggaggaag
 2161 aagggggagg cttgcaagcc gaagaacacc atccaaccg tgaagcacgg ggggtggcagc
 2221 atcatgttgt ggggggtgctt tgctgcagga gggactggtg cacttcacaa aatagatggc
 2281 atcatggacg cgggtgcagta tgtggatata tgaagcaac atctcaagac atcagtcagg
 2341 aagttaaagc ttggtcgc aa atgggtttc caacacgaca atgaccccaa gcatactcc 10
 2401 aaagtgtgg caaatggct taaggacaac aaagtcaagg tattggagtg gccatcacia
 2461 agccctgacc tcaatctat agaaaattg tgggcagaac tgaaaaagcg tgtgcgagca
 2521 aggaggccta caaacctgac tcagttacac cagctctgc aggaggaatg ggccaaaatt
 2581 caccctaaatt attgtgggaa gctgtgggaa ggctaccga aacgtttgac ccaagttaa
 2641 caattaaag gcaatgctac caaatactag gggccctaac cgcgggaata aaagatctt
 2701 atttcatta gatctgtgtg ttggttttt gtgtgaattc ttgagtgtat gtaaacttct
 2761 gaccactgg gaatgtgatg aaagaataa aagctgaaat gaatcattct ctctactatt
 2821 attctgatat ttacattct taaaataaag tggatgacct aactgacct agacagggaa
 2881 ttttactag gattaaatgt caggaattgt gaaaaagtga gttaaattgt attggctaa
 2941 ggtgtatgta aactccgac ttcaactgta taggcatgcg gtaaccacgt gcggaccgag
 3001 cggccgagg aaccctagt gatggagtg gccactcct ctctgcgcgc tcgctcgc 20
 3061 actgagccg ggcgacaaa ggtgcgccga cgcggggct ttgccccggc ggctcagt
 3121 agcagcagc cgcgcagctg cctgcagggg cgcctgatgc ggtatttct ccttacgcat
 3181 ctgtgcggtt ttacaccg catacgtcaa agcaaccata gtacgcgcc ttagcggcg
 3241 cattaagcgc ggcgggtgtg gtggttacgc gcagcgtgac cgtacactt gccagcgc
 3301 tagcggcgc tctttcct ttcttccct ctttctcgc cagctcgc ggctttccc
 3361 gtcaagctct aatcggggg ctccccttag ggttccgatt tagtgctta cggcacctc
 3421 acccaaaaa actgatttg ggtgatggtt cacgtagtgg gccatcgccc ttagtagcgg
 3481 ttttgcgcc ttgacgttg gactccact tcttaatag tggactctg ttcaaactg
 3541 gaacaact caaccctac tcgggctatt ctttgattt ataagggtt ttgccgatt
 3601 cggcctattg gttaaaaaat gagctgattt acaaaaaat taacgcgaat ttaacaaaa 30
 3661 tattaacgtt tacaattta ttggtgcactc tcagtacaat ctgctctgat gccgcatagt
 3721 taagccagcc ccgacaccg ccaacaccg ctgacgcgc ctgacgggct tctctgctcc
 3781 cggcatccg ttacagaca gctgtgaccg tctccgggag ctgcatgtgt cagaggttt
 3841 caccgtcacc accgaaacgc gcgagacgaa agggcctcgt gatacgccta ttttatagg
 3901 ttaatgcat gataaatatg gtttctaga cgtcaggtgg cacttttcgg ggaaatgtc
 3961 gcggaacccc ttttctta ttttctaaa tacattcaa tatgtatccg tcatgagac
 4021 aataacctg ataatgctt caataatatt gaaaaggaa gagtatgagt attcaacatt
 4081 tccgtcgc cctattccc tttttcgg cattttgct tctgtttt gctcaccag
 4141 aaacgctgt gaaagtaaaa gatgctgaag atcagttggg tgcacgagt ggttacatc
 4201 aactggatct caacagcgg aagatcctt agagtttcg ccccgaagaa cgttttcaa
 4261 ttagtagcac tttaaagt ctgctatgt gcgcggtatt atccgatt gacgccggc 40
 4321 aagagcaact cggtcgcgc atactatt ctcaaatga cttggtgag tactcaccg
 4381 tcacagaaaa gcactctac gatggcatga cagtaagaga attatgcat gctgcataa
 4441 ccatgagtga taactcgc gccaaactac tctgacaac gatcggagga ccgaaggagc

4501 taaccgcttt tttgcacaac atgggggatc atgtaactcg ccttgatcgt tgggaaccgg
 4561 agctgaatga agccatacca aacgacgagc gtagaccac gatgcctgta gcaatggcaa
 4621 caacgttgcg caaactatta actggcgaac tacttactct agcttcccgg caacaattaa
 4681 tagactggat ggagggcgat aaagtgcag gaccacttct gcgctcggcc cttccggctg
 4741 gctggtttat tgctgataaa tctggagccg gtgagcgtgg gtctcgcggt atcattgcag
 4801 cactggggcc agatggtaag cctcccga tegtatgat ctacacgacg gggagtcagg
 4861 caactatgga tgaacgaaat agacagatcg ctgagatagg tgcctcactg attaagcatt
 4921 ggtaactgic agaccaagt tactcatata tactttagat tgatttaaaa cttcattttt
 4981 aatttaaaag gatctaggtg aagatccttt ttgataatct catgacaaa atccctaac
 5041 gtgagtittc gtccactga gcgtcagacc ccgtagaaaa gatcaaagga tcttcttgag
 5101 atccttttt tctgcgcgta atctgctgct tgcaacaaaa aaaaccaccg ctaccagcgg 10
 5161 tggtttgtt gccggatcaa gagctacaa ctcctttcc gaaggttaact ggcttcagca
 5221 gagcgcagat accaaatact gtcttctag ttagccgta gttaggccac cactcaaga
 5281 actctgtagc accgctaca tacctcgtc tgctaatcct gtaccagtg gctgctgcca
 5341 gtggcgataa gtcgtgtctt accgggttgg actcaagacg atagtaccg gataaggcgc
 5401 agcggtcggg ctgaacgggg ggttcgtgca cacagccag cttggagcga acgacctaca
 5461 ccgaactgag atacctacag cgtgagctat gagaaagcgc cacgctccc gaagggagaa
 5521 agggcgacag gtatccgta agcggcaggg tcggaacagg agagcgcacg agggagcttc
 5581 cagggggaaa cgctgtgat cttatagtc ctgtcgggtt tcgccacctc tgacttgagc
 5641 gtcgatttt gtgatgctc tcaggggggc ggagcctat gaaaaacgcc agcaacgcgg
 5701 ccttttacg gttcctggcc ttttctggc cttttgctca catgt 20

【 0 0 9 3 】

別の局面において、本発明は、5'逆方向末端反復(ITR)配列、U6プロモーター配列、Bbs I制限部位、sgRNA発現カセット、3' ITR配列、およびアンピシリン耐性遺伝子配列(AmpR)を含む、ベクターを提供する。1つの態様において、ベクターはSEQ ID NO: 129, 219を含む。

【 0 0 9 4 】

pSC026b_pAAV-U6sgbbSapI-XD011bb (SEQ ID NO: 129, 219)

1 cctgcaggca gctgcgcgct cgctcgtca ctgaggccgc ccgggcaaag cccgggctc
 61 gggcgacctt tggctgcccg gcctcagtga gcgagcagc gcgcagagag ggagtggcca
 121 actccatcac taggggttcc tgcggccgca cgcgttctag aagagggcct atttccatg 30
 181 attccttcat atttgcatac acgatacaag gctgttagag agataattgg aattaattg
 241 actgtaaaca caaagatatt agtacaaaat acgtgacgta gaaagtaata atttctggg
 301 tagtttgcag ttttaaaatt atgttttaa atggactatc atatgcttac cgtaactga
 361 aagtatttcg atttctggc tttatatatc ttGTGGAAAG GACGAAACAC Cggaagagcg
 421 agctcttctg ttttagagct aGAAAtagca agttaaata aggctagtcc gttatcaact
 481 tgaaaaagtg gcaccgagtc ggtgcTTTTT Tggtaccgtg cggaccgagc ggccgcagga
 541 acccctagtg atggagttgg cactccctc tctgcgcgct cgctcgtca ctgaggccgg
 601 gcgaccaaag gtcgcccagc gcccggtt tccccggcg gcctcagtga gcgagcgagc
 661 gcgcagctgc ctgcaggggc gcctgatgcg gtattttctc ctacgcacg tgtcgggtat
 721 ttcacaccgc atacgtcaaa gcaaccatag tacgcgcct gtagcggcgc attaaagcgcg
 781 gcgggtgtgg tggttacgag cagcgtgacc gctacactg ccagcgcct agcggcgcct 40
 841 ctttctgctt tcttccctc ctttctgccc acgttcgccc gctttccccg tcaagctcta
 901 aatcgggggc tcccttagg gttccgatt agtgctttac ggcacctcga ccccaaaaa

961 cttgatttgg gtgatggttc acgtagtggg ccatcgccct gatagacggt tttcgcct
 1021 ttgacgttgg agtccacgtt ctftaatagt ggactcttgt tccaaactgg aacaacactc
 1081 aacctatct cgggctattc tttgattta taagggattt tgccgatttc ggcctattgg
 1141 ttaaaaaatg agctgattta acaaaaaatt aacgcgaatt ttaaaaaat attaacgttt
 1201 acaatttat ggtgactct cagtacaatc tctctgatg ccgcatagt aagccagccc
 1261 cgacaccgc caacaccgc tgacgcgcc tgacgggctt gtctgctccc ggcctcggct
 1321 tacagacaag ctgtgaccgt ctccgggagc tgcattgtgc agaggttttc accgtcatca
 1381 ccgaaacgcg cgagacgaaa gggcctcgtg atacgcctat tttataggt taatgtcatg
 1441 ataataatgg tttcttagac gtcaggtggc acttttcggg gaaatgtgcg cggaaccct
 1501 atttgttat tttctaat acattcaaat atgtatccgc tcatgagaca ataaccctga
 1561 taaatgctc aataatattg aaaaaggaag agtatgagta ttcaacattt ccgtgtcggc
 1621 ctattccct ttttgccgc atttgccct cctgttttg ctcaccaga aacgctggg
 1681 aaagtaaaag atgctgaaga tcagttgggt gcacgagtg gttacatcga actggatctc
 1741 aacagcggta agatcctga gagtttcgc cccgaagaac gtttccaat gatgagcact
 1801 tttaaagtgc tgctatgtgg cgcggtafta tcccgtattg acgccgggca agagcaactc
 1861 ggtcgcgcga tactattc tcagaatgac ttggttgagt actcaccagt cacagaaaag
 1921 catctacgg atggcatgac agtaagagaa ttatgcagtg ctgccataac catgagtgat
 1981 aacactgcgg ccaacttact tctgacaacg atcggaggac cgaggagct aaccgcttt
 2041 ttgcacaaca tgggggatca tgtaactcgc cttgatcgtt ggggaaccgga gctgaatgaa
 2101 gccatacaca acgacgagcg tgacaccacg atgcctgtag caatggcaac aacgttgcgc
 2161 aactattaa ctggcgaact acttactcta gcttcccggc aacaattaat agactggatg
 2221 gagcgggata aagttgcagg accacttctg cgtcggccc tccggctgg ctggtttatt
 2281 gctgataaat ctggagccgg tgagcgtggg tctcgggta tcaattgcagc actggggcca
 2341 gatggtaagc cctcccgtat cgtagtatc tacacgacgg ggagtcaggc aactatggat
 2401 gaacgaaata gacagatcgc tgagataggt gcctcactga ttaagcattg gtaactgtca
 2461 gaccaagttt actcatatat actttagatt gatttaaac ttattttta atttaaaagg
 2521 atctaggtga agatcctttt tgataatctc atgacaaaaa tcccttaacg tgagtttctg
 2581 tccactgag cgtcagacc cgtagaaaag atcaaaggat cttcttgaga tccctttttt
 2641 ctgcgcgtaa tctgctgctt gcaaacaaaa aaaccaccgc taccagcggg ggtttgtttg
 2701 ccggatcaag agctaccaac tcttttccg aaggtaactg gcttcagcag agcgcagata
 2761 ccaataactg tcttctagt gtagccgtag ttagccacc acttcaagaa ctctgtagca
 2821 ccgctacat acctgcctct gctaactctg ttaccagtgg ctgctgccag tggcgataag
 2881 tctgtctta ccgggttga ctaagacga tagttaccgg ataaggcgca gcggtcgggc
 2941 tgaacggggg gttcgtgcac acagcccagc ttggagcga cgacctacac cgaactgaga
 3001 tactacagc gtgagctatg agaaagcgc acgcttcccg aaggagagaa ggcggacagg
 3061 tatccggtaa cggcgagggt cggaacagga gagcgcacga gggagcttc agggggaaac
 3121 gcctggtatc ttatagtcc tgcggggtt cgcacctct gacttgagcg tctgattttg
 3181 tgatgctcgt cagggggcg gagcctatgg aaaaacgcca gcaacgcggc cttttacgg
 3241 ttctggcct tttgctggcc tttgctcac atgt

10

20

30

【 0 0 9 5 】

別の局面において、本発明は、5'逆方向末端反復(ITR)配列、U6プロモーター配列、Bbs
 I制限部位、sgRNA発現カセット、EFS配列、Thy1.1カセット、3' ITR配列、およびアンピ
 シリン耐性遺伝子配列(AmpR)を含む、ベクターを提供する。1つの態様において、ベクタ
 ーはSEQ ID NO: 129,220を含む。

40

【 0 0 9 6 】

pSC025d_pAAV-U6sgbbSapI-EFS-Thy1 (SEQ ID NO: 129,220)

1 cctgcaggca gctgcgcgct cgctcgtca ctgaggccgc ccgggcaaag cccgggcgct
 61 gggcgacctt tggtcgcccg gcctcagtga gcgagcgagc gcgagagag ggagtggcca
 121 actccatcac taggggtfcc tgcggccgca cgcgttctag aagagggcct atttccatg
 181 attcctcat atttgcatat acgatacaag gctgttagag agataattgg aattaattg
 241 actgtaaaca caaagatatt agtacaaaat acgtgacgta gaaagtaata atttcttggg
 301 tagtttcag ttttaaaatt atgtttaaa atggactatc atatgcttac cgtaactga
 361 aagtatttcg atttcttggc ttatataatc ttgtgaaaag gacgaaacac cggaagagcg
 421 agctcttctg ttttagagct agaaatagca agttaaata aggctagtcc gttatcaact
 481 tgaaaaagtg gcaccgagtc ggtgctttt ttgtacctag gtcttgaaag gagtgggaat
 541 tggctccggt gcccgctcgt gggcagagcg cacatcgccc acagtcccc agaagtggg
 601 gggaggggct ggcaattgat ccggtgccta gagaagggtg cgcggggtaa actgggaaag 10
 661 tgatgctg tactggctcc gccttttcc cgagggtggg ggagaaccgt atataagtgc
 721 agtagtcgcc gtgaacgttc ttttcgcaa cgggtttgcc gccagaacac aggcaccggt
 781 tctagacgta cggccaccat gaaccagcc atcagcgtcg ctctcctgct ctcagtctg
 841 caggtgtccc gagggcagaa ggtgaccagc ctgacagcct gcctggtgaa ccaaacctt
 901 cgcctggact gccgcatga gaataacacc aaggataact ccatccagca tgagttcagc
 961 ctgaccgag agaagaggaa gcacgtgctc tcaggcacc ttgggatacc cgagcacacg
 1021 taccgctccc gcgtaccct ctccaaccag ccctatatca aggtccttac ctagccaac
 1081 ttcaccacca aggatgaggc cgactacttt tgtgagcttc gcgtaagtgg cgcgaatccc
 1141 atgagctcca ataaaagtat cagtgtgtat agagacaagc tggtaagtg tggcggcata
 1201 agcctgctgg tcagaacac atcctggatg ctgctgctgc tgcttccct ctccctcctc 20
 1261 caagccctgg acttcatttc tctgtgaagc gcttaagaat tcgatatcaa gcttaataaa
 1321 agatctttat ttcattaga tctgtgtgtt ggtttttgt gtgtaacca cgtgcggacc
 1381 gagcggccgc aggaaccct agtgatggag ttggccactc cctctctgcg cgctcgctcg
 1441 ctactgagg ccggcgacc aaaggtcgcc cgacgcccgg gctttgcccg ggcggcctca
 1501 gtgagcgagc gagcgcgag ctgcctgagc gggcgcctga tgcggtattt tctcctacg
 1561 catctgtgcg gtatttaca ccgcatagc caaagcaacc atagtacgcg cctgtagcg
 1621 gcgcattaag cgcggcgggt gtggtggtta cgcgcagcgt gaccgctaca ctgcccagcg
 1681 ccctagcgc cgctccttc gctttctc ctctcttct cgccacgttc gccggcttc
 1741 cccgtcaagc tctaaatcgg gggctccct tagggttccg atttagtct taccggcacc
 1801 tcgacccaa aaaactgat ttgggtgat gttcacgtag tggccatcg cctgataga
 1861 cggttttcg cctttgacg ttggagtcca cgttcttaa tagtggactc ttgtccaaa 30
 1921 ctggaacaac actcaaccct atctcgggct attctttga ttataaggg atttgcccga
 1981 tttcggccta ttggtaaaa aatgagctga ttaacaaaa attaacgcg aatttaaca
 2041 aaatattaac gtttacaatt ttatggtgca ctctcagtac aatctgctct gatgccgcat
 2101 agttaagcca gccccgacac ccgccaacac ccgctgacgc gccctgacgg gcttctctgc
 2161 tcccggcatc cgcttacaga caagctgtga ccgtctccgg gagctgcatg tctcagaggt
 2221 ttcaccgctc atcaccgaaa cgcgagagc gaaagggcct cgtgatacgc ctattttat
 2281 aggttaatgt catgataata atggttctt agacgtcagg tggcactttt cggggaaatg
 2341 tgcgcggaac ccctatttgt ttattttct aaatacttc aaatatgtat ccgctcatga
 2401 gacaataacc ctgataaatg ctcaataat attgaaaaag gaagagtatg agtattcaac
 2461 atttccgtgt cgccttatt cctttttt cggcattttg ccttctgtt ttgctcacc
 2521 cagaaacgct ggtgaaagta aaagatgctg aagatcagtt ggtgacacga gtgggttaca 40

2581 tcgaactgga tctcaacagc ggtaagatcc ttgagagttt tgcggccgaa gaacgttttc
 2641 caatgatgag cacttttaaa gttctgctat gtggcgcggt attatccgt attgacgccc
 2701 ggcaagagca actcggctgc cgcatacct attctcagaa tgacttggtt gactactcac
 2761 cagtcacaga aaagcatctt acggatggca tgacagtaag agaattatgc agtgctgcca
 2821 taacctgag tgataacct gcggccaact tacttctgac aacgatcggg ggaccgaagg
 2881 agtaaccgc tttttgac aacatggggg atcatgtaac tgccttgat cgttgggaac
 2941 cggagctgaa tgaagccata ccaaacgacg agcgtgacac cacgatgcct gtagcaatgg
 3001 caacaactgt gcgcaacta ttaactggcg aactacttac tctagctcc cggcaacaat
 3061 taatagactg gatggaggcg gataaagttg caggaccact tctgcgctcg gcccttccgg
 3121 ctggctggtt tattgctgat aaatctggag ccggtgagcg tgggtctcgc ggtatcattg
 3181 cagcactggg gccagatggt aagccctccc gtatcgtagt tatctacacg acggggagtc
 3241 aggcaactat ggatgaacga aatagacaga tgcctgagat aggtgcctca ctgattaagc
 3301 attgtaact gtcagacaa gttactcat atatactta gattgattt aaactcatt
 3361 ttaatttaa aaggatctag gtgaagatcc ttttgataa tctcatgacc aaaatccctt
 3421 aacgtgagtt ttcgtccac tgagcgtcag acccgtaga aaagatcaa ggatctctt
 3481 gagatccttt tttctgcgc gtaatctgct gcttgcaaac aaaaaacca ccgctaccag
 3541 cggtggtttg tttgccggat caagagctac caactcttt tccgaaggta actggcttca
 3601 gcagagcga gatacfaat actgtccttc tagttagcc gtagttaggc caccactca
 3661 agaactctgt agcaccgct acatacctcg ctctgctaact cctgttacca gtggctgctg
 3721 ccagtggcga taagctgtgt cttaccgggt tggactcaag acgatagtta ccggataagg
 3781 cgagcggtc gggctgaacg ggggggttctg gcacacagcc cagctggag cgaacgacct
 3841 acaccgaact gagataccta cagcgtgagc tatgagaaa cgccacgctt ccggaaggga
 3901 gaaagggcga caggtatccg gtaagcggca gggctgggaac aggagagcgc acgagggagc
 3961 ttccaggggg aaacgcctgg tatcttata gtctgtcgg gtttccac ctctgactg
 4021 agcgtcgatt tttgtatgc tctcagggg gcgggagcct atggaaaaac gccagcaacg
 4081 cggcctttt acggttctg gccttttgc gccttttgc tcatatg

10

20

30

40

【 0 0 9 7 】

別の局面において、本発明は、5'逆方向末端反復 (ITR) 配列、U6プロモーター配列、Bbs I制限部位、sgRNA発現カセット、EFS配列、SB100xカセット、GFP-NLS融合カセット、3' ITR配列、およびアンピシリン耐性遺伝子配列 (AmpR) を含む、ベクターを提供する。1つの態様において、ベクターはSEQ ID NO: 129,221を含む。

【 0 0 9 8 】

pSC031_pAAV-U6sgbbSapI-EFS-GFP-NLS (SEQ ID NO: 129,221)

1 cctgcaggca gctgcgctc cgctcgtca ctgaggccgc ccgggcaaag cccgggctc
 61 gggcgacctt tggctgcccg gcctcagtga gcgagcagc gcgagagag ggagtggcca
 121 actccatcac taggggttcc tgcggccgca cgcgttctag aagagggcct atttccatg
 181 attcctcat atttgcata acgatacaag gctgttagag agataattgg aattaattg
 241 actgtaaca caaagatatt agtacaat acgtgacgta gaaagtaata atttctggg
 301 tagtttcgag ttttaaaat atgttttaa atggactatc atatgcttac cgtaactga
 361 aagtatttcg atttctggc ttatatac ttgtgaaag gacgaaacac cggaagagcg
 421 agctctctg ttttagagct agaaatagca agttaaata aggctagtcc gttatcaact
 481 tgaaaaagtg gcaccgagtc ggtgctttt tggtagctag gtctgaaag gactgggaat

541 tggctccggt gccctcagt gggcagagcg cacatgcccc acagtcccc agaagtggg
 601 gggagggggt ggcaattgat ccggtgccta gagaagggtg cgcggggtaa actgggaaag
 661 tgatgtctg factggtcc gccttttcc cgagggtggg ggagaaccgt atataagtgc
 721 agtagtcgcc gtgaacgttc ttttcgcaa cgggtttgcc gccagaacac aggaccggt
 781 ctagacgtac ggccaccatg gtgagcaagg gcgaggagct gttaccggg gtggtgccca
 841 tcctggtcga gctggacggc gacgtaaacg gccacaagt cagcgtgtcc ggcgagggcg
 901 agggcgatgc cacctacggc aagctgacct tgaagttcat ctgaccacc ggcaagctgc
 961 ccgtgccctg gccaccctc gtgaccacc tgacctacgg cgtgcagtgc tcagccgct
 1021 accccgacca catgaagcag cagacttct tcaagtcgc catgccgaa ggctacgtcc
 1081 aggagcgcac catcttctc aaggacgacg gcaactaaa gaccgcgcc gaggtgaagt
 1141 tcgagggcga caccctggtg aaccgcatcg agctgaaggg catcgacttc aaggaggacg
 1201 gcaacatcct ggggcacaag ctggagtaca actacaacag ccacaacgtc tatatcatgg
 1261 ccgacaagca gaagaacggc atcaaggtga acttcaagat ccgccacaac atcgaggacg
 1321 gcagcgtgca gctcggcagc cactaccagc agaacacccc catcggcgac ggccccgtgc
 1381 tgctgcccga caacctac ctgagcacc agtccgccct gagcaaagac cccaacgaga
 1441 agcgcgatca catggtcctg ctggagtctg tgaccgccg cgggatcact ctggcatgg
 1501 acgagctgta caagaagcgt cctgctgcta ctaagaaagc tggtaagct aagaaaaaga
 1561 aataagaatt cgatatcaag ctaataaaa gatctttatt ttcattagat ctgtgtgtg
 1621 gtttttgtg tggtaaccac gtgcggaccg agcggccgca ggaacccta gtgatggagt
 1681 tggccactcc ctctctgcgc gctcgtcgc tctctgaggc cgggcgacca aaggtcgcc
 1741 gacgcccggg cttgcccgg gcggcctcag tgagcggagc agcgcgcagc tgcctcagg
 1801 ggcgcctgat gcggtatctt ctcttacgc atctgtcgg tatttcacac cgcatacgtc
 1861 aaagcaacca tagtacgcgc cctgtagcgg cgcattaagc gcggcgggtg tgggtgttac
 1921 gcgcagcgtg accgctacac ttgccagcgc ctagcgcgc gctccttctg cttcttccc
 1981 ttccttctc gccacgtctg ccggcttcc ccgtcaagct ctaaatcggg ggctccctt
 2041 agggttccga ttagtgctt tacggcacct cgacccaaa aaacttgatt tgggtgatgg
 2101 ttcacgtagt gggccatcgc cctgatagac ggttttctgc ctttgacgt tggagtccac
 2161 gttcttfaat agtggactct tgtccaaac tggaaacaaca ctcaacccta tctcgggcta
 2221 tcttttgat ttataaggga tttgccgat tccggcctat tggtaaaaa atgagctgat
 2281 ttaacaaaa ttaacgcga atttaacaa aatattaacg ttacaattt tatggtgcac
 2341 tctcagtaca atctgctctg atccgcata gftaagccag ccccgacacc cgccaacacc
 2401 cgtgacgcg ccctgacggg cttgtctgct cccggcatcc gcttacagac aagctgtgac
 2461 cgtctccggg agctgcatgt gtcagaggtt tcaccgtca tcaccgaaac gcgcgagacg
 2521 aaaggcctc gtgatacgc tattttata ggttaagtgc atgataataa tggtttcta
 2581 gacgtcaggt ggcactttc ggggaaatgt gcgcggaacc cctattgtt tattttcta
 2641 aatacattca aatatgtatc cgtcatgag acaataacce tgataaatgc ttaataata
 2701 ttgaaaaagg aagagtatga gtattcaaca ttcctgtgc gcccttattc ctttttgc
 2761 ggcatttgc ctctctgtt ttgctcacc agaaacgctg gtgaaagtaa aagatgctga
 2821 agatcagttg ggtgcacgag tgggttacat cgaactggat ctcaacagcg gtaagatcct
 2881 tgagagttt cccccgaag aacgtttcc aatgatgagc acttttaaag ttctgctatg
 2941 tggcgcggta ttatccgta ttgacgccg gcaagagcaa ctgggtcgc gcatacacta
 3001 ttctcagaat gacttggtg agtactcacc agtcacagaa aagcatctta cggatggcat
 3061 gacagtaaga gaattatgca gtgctgcat aacctagat gataacactg cggccaactt
 3121 acttctgaca acgatcggag gaccgaagga gctaaccgct ttttgcaca acatggggga
 3181 tcatgtaact cgccttgatc gttgggaacc ggagctgaat gaagccatac caaacgacga
 3241 gcgtgacacc acgatgctg tagcaatggc aacaacgtg cgcaaactat taactggcga

10

20

30

40

3301 actacttact ctagcttccc ggcaacaatt aatagactgg atggaggcgg ataaagtgc
 3361 aggaccactt ctgcgctcgg ccttccggc tggctggttt attgctgata aatctggagc
 3421 cggtagcgt gggctcgcg gtatcattgc agcactgggg ccagatggta agccctccc
 3481 tatcgtagtt atctacacga cggggagtca ggcaactatg gatgaacgaa atagacagat
 3541 cgctgagata ggtgcctcac tgattaagca ttgtaactg tcagaccaag ttactcata
 3601 tatacttag attgatttaa aacttcattt ttaatttaa aggatctagg tgaagatct
 3661 ttttgataat ctcatgacca aaatccccta acgtgagttt tegtccact gagcgtcaga
 3721 ccccgtagaa aagatcaaag gatcttctg agatcctttt ttctgctgcg taactgctg
 3781 cttgcaaaca aaaaaaccac cgctaccagc ggtggtttg ttgccggatc aagagctacc
 3841 aactctttt ccgaaggtaa ctggctcag cagagcgcag ataccaaata ctgctctct
 3901 agtgtagccg tagttaggcc accactcaa gaactctgta gcaccgcta catacctgc
 3961 tctgtaate ctgtaccag tggctgctgc cagtggcgt aagtcgtgct ttaccgggtt
 4021 ggactcaaga cgatagttac cggataaggc gcagcggctg ggctgaacgg ggggttcgtg
 4081 cacacagccc agcttggagc gaacgacct caccgaactg agatactac agcgtgagct
 4141 atgagaaagc gccacgctc ccgaaggag aaggcggac aggtatccgg taagcggcag
 4201 ggtcggaaac ggagagcgc cgagggagct tccaggggga aacgcctggt atctttatg
 4261 tctgtcggg ttctgccacc tctgactga gcgtcgattt ttgtgatgct cgtcaggggg
 4321 gcggagccta tggaaaaacg ccagcaacgc ggcctttta cggctcctgg cctttgctg
 4381 gcctttgct cacatgt

10

【 0 0 9 9 】

ある種の態様において、本発明のベクターのいずれかは、SEQ ID NO: 1~129,209からなる群より選択されるヌクレオチド配列を含むsgRNAを発現するsgRNA発現カセットを含みうる。他の態様において、ベクターのいずれか1つは、SEQ ID NO: 129,222~140,680からなる群より選択されるヌクレオチド配列を含むsgRNAを発現するsgRNA発現カセットを含みうる。ある種の態様において、本発明のベクターのいずれかは、SEQ ID NO: 1~129,209からなる群より選択されるヌクレオチド配列からなるsgRNAを発現するsgRNA発現カセットを含みうる。他の態様において、ベクターのいずれか1つは、SEQ ID NO: 129,222~140,680からなる群より選択されるヌクレオチド配列からなるsgRNAを発現するsgRNA発現カセットを含みうる。

20

【 0 1 0 0 】

方法

1つの局面において、本発明は、インピトロでのT細胞のゲノム編集およびスクリーニングの方法を含む。本方法は、T細胞をCas9およびsgRNAライブラリと接触させる段階を含む。sgRNAライブラリは、複数のベクターを含み、各ベクターが、SEQ ID NO: 1~129,209からなる群より選択されるヌクレオチド配列を含むsgRNAのための発現カセットを含む。接触させる段階は、T細胞にゲノム編集を受けさせる。次に、T細胞をインピトロでスクリーニングする。

30

【 0 1 0 1 】

別の局面において、本発明は、インピトロでのT細胞のゲノム編集およびスクリーニングの方法を含む。本方法は、T細胞をCas9およびsgRNAライブラリと接触させる段階を含む。sgRNAライブラリは、複数のベクターを含み、各ベクターが、SEQ ID NO: 129,222~140,680からなる群より選択されるヌクレオチド配列を含むsgRNAのための発現カセットを含む。接触させる段階は、T細胞にゲノム編集を受けさせる。次に、T細胞をインピトロでスクリーニングする。

40

【 0 1 0 2 】

本発明の別の局面は、インピボでのT細胞のゲノム編集およびスクリーニングの方法を含む。本方法は、単離されたT細胞をCas9およびsgRNAライブラリと接触させる段階を含む。sgRNAライブラリは、複数のベクターを含み、各ベクターが、SEQ ID NO: 1~129,209からなる群より選択されるヌクレオチド配列を含むsgRNAのための発現カセットを含む。接触させる段階は、T細胞にゲノム編集を受けさせ、したがって、改変されたT細胞をもたらす。次いで、改変されたT細胞は動物に投与されて、改変されたT細胞はインピボでスクリー

50

ーニングされる。

【0103】

本発明のさらに別の局面は、インビボでのT細胞のゲノム編集およびスクリーニングの方法を含む。本方法は、単離されたT細胞をCas9およびsgRNAライブラリと接触させる段階を含む。sgRNAライブラリは、複数のベクターを含み、各ベクターが、SEQ ID NO: 1~129,209からなる群より選択されるヌクレオチド配列を含むsgRNAのための発現カセットを含む。接触させる段階は、T細胞にゲノム編集を受けさせ、したがって、改変されたT細胞をもたらす。次いで、改変されたT細胞は動物に投与されて、改変されたT細胞はインビボでスクリーニングされる。

【0104】

T細胞は、CD8+細胞、CD4+細胞、またはT調節(Treg)細胞、Th1細胞、Th2細胞、Th17細胞、濾胞性ヘルパーT細胞(Tfh)、T記憶細胞、Tエフェクタ細胞、Tエフェクタ記憶細胞、操作されたT細胞、およびCAR T細胞を含むがこれらに限定されない任意のタイプのTリンパ球であることができる。本発明の方法は、T細胞を単離およびまたは濃縮する段階をさらに含むことができる。

【0105】

本発明のある種の態様において、動物は、T細胞に関連するまたは影響される任意の状態を含みうる状態を有する。そのような状態の例としては、(1) 重症複合免疫不全症(SCID)、DiGeorge症候群、高免疫グロブリンE症候群(Job症候群としても公知)、分類不能型免疫不全症(CVID) (B細胞レベルは循環血中で正常であるが、しかしIgGの産生は年間を通じて減少するため、10代後半に発症する唯一の原発性免疫疾患である)、慢性肉芽腫性疾患(CGD - NADPHオキシダーゼ酵素の欠損であり、これは酸素ラジカルを生成することの失敗を引き起こす。カタラーゼ陽性細菌および真菌による古典的な反復性感染症)、ウイスコット・アルドリッチ症候群(Wiskott-Aldrich syndrome) (WAS)、自己免疫性リンパ増殖性症候群(ALPS)、高IgM症候群(活性化T細胞でのCD40リガンドの産生の欠損を引き起こすX連鎖障害。これはIgMの産生と循環血中への放出を増大させる。B細胞およびT細胞の数は正常範囲内である。細胞外細菌および日和見感染症に対する感受性の増大)、白血球接着欠損(LAD)、NF- κ B必須修飾因子(NEMO)変異、選択的免疫グロブリンA欠損(IgAの欠損を特徴とする液性免疫の最も一般的な欠陥。反復性の洞肺および胃腸感染症をもたらす)、X連鎖無ガンマグロブリン血症(XLA; ブルトン(Bruton)型無ガンマグロブリン血症としても公知であり、骨髄におけるB細胞成熟を遮断するチロシンキナーゼ酵素の欠損を特徴とする。B細胞は循環血中へ産生されず、したがって、免疫グロブリンクラスは存在しないが、正常な細胞性免疫は存在する傾向がある)、X連鎖リンパ球増殖性疾患(XLP)、毛細血管拡張性運動失調症のような原発性免疫不全; (2) HIV/AIDSのような続発性免疫不全; (3) 免疫媒介炎症性疾患、自己免疫疾患、移植拒絶、移植片対宿主病(GVHD)のような他の内部免疫障害; (4) ウイルス感染症、細菌感染症、および寄生虫感染症のような感染症; (5) 膀胱がん、乳がん、結腸がん、直腸がん、子宮内膜がん、腎臓がん、白血病、肝臓がん、肺がん、黒色腫、非ホジキンリンパ腫、膵臓がん、前立腺がん、および甲状腺がんのようながんを挙げることができるが、これらに限定されることはない。

【0106】

ある種の態様において、sgRNAライブラリが動物に投与された後にT細胞をスクリーニングすることで、動物が有する状態に関する特定の遺伝子に関する情報が提供される。T細胞のスクリーニングは、ヌクレオチド配列決定、sgRNA PCR、および/またはフローサイトメトリーの方法を含むがこれらに限定されない、当業者に一般的に知られている任意の方法を含むことができる。

【0107】

ヌクレオチド配列決定または「配列決定」は、当技術分野において一般的に公知であるように、当業者に一般的に知られている標準的な方法により実施することができる。本発明のある種の態様において、標的にした捕捉配列決定により配列決定が実施される。本明細書において記述されるように、または当業者によって一般的に実施される方法により、

10

20

30

40

50

標的にした捕捉配列決定を実施することができる。本発明のある種の態様において、配列決定は、次世代配列決定を介して実施される。ハイスループット配列決定としても知られる、次世代配列決定(NGS)が、これまでに使われたSanger配列決定よりもはるかに迅速かつ安価にDNAおよびRNAを配列決定することを可能にするいくつかの異なる最新の配列決定技術を記述するために本明細書において用いられる(Metzker, 2010, Nature Reviews Genetics 11.1: 31-46)。サンプルのサイズ、試薬コストを低減するために、および超並列配列決定反応を可能とするために、マイクロ技術およびナノ技術に基づいている。それは高度に多重化することができ、数百万のサンプルの同時配列決定および分析を可能にする。NGSは、第1、第2、第3、および後続の次世代配列決定技術を含む。NGSから生成されたデータは、広範囲の計算ツールを介して分析することができる。当業者は多種多様な分析を認識かつ実施することができる。

10

【0108】

ゲノム編集は、細胞のゲノム全体に変異を導入することを含むことができる。導入される変異は、単一塩基の挿入、単一塩基の削除、フレームシフト、再配列、および2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、40、50、60、70、80、90、100、150、200、250、300塩基、それらの間にある任意のおよび全ての数字の塩基の挿入または欠失を含むがこれらに限定されない、挿入または欠失の任意の組み合わせであることができる。変異は、遺伝子中にまたは非コード領域中に発生することができる。

【0109】

本発明のある種の態様において、動物はマウスである。使用できる他の動物は、ラット、ウサギ、イヌ、ネコ、ウマ、ブタ、ウシ、およびトリを含むが、これらに限定されることはない。ある種の態様において、動物はヒトである。sgRNAライブラリは、当技術分野において標準的な任意の手段により動物に投与することができる。例えば、ベクターを動物に注射することができる。注射は、静脈内、皮下、腹腔内、または組織もしくは臓器への直接注射であることができる。ある種の態様において、sgRNAライブラリは動物に養子移入される。

20

【0110】**CRISPR/Cas9**

CRISPR/Cas9システムは、標的にした遺伝子改変を誘導するための簡単かつ効率的なシステムである。Cas9タンパク質による標的認識には、ガイドRNA(gRNA)内の「シード」配列およびgRNA結合領域の上流にあるプロトスペーサー隣接モチーフ(PAM)配列を含む保存されたジヌクレオチドが必要である。CRISPR/Cas9システムは、細胞株(293T細胞のような)、初代細胞、およびCAR T細胞においてgRNAを再設計することにより、事実上任意のDNA配列を切断するように操作することができる。CRISPR/Cas9システムは、単一のCas9タンパク質を2つまたはそれ以上のgRNAと共発現させることによって複数のゲノム遺伝子座を同時に標的にし、このシステムを、複数の遺伝子編集または標的遺伝子の相乗的活性化に比類なく適したものにすることができる。

30

【0111】

Cas9タンパク質およびガイドRNAは、標的配列を同定かつ切断する複合体を形成する。Cas9は、REC I、REC II、ブリッジヘリックス、PAM相互作用、HNH、およびRuvCの6つのドメインから構成される。RecIドメインはガイドRNAに結合するが、Bridgeヘリックスは標的DNAに結合する。HNHおよびRuvCドメインはヌクレアーゼドメインである。ガイドRNAは、標的DNA配列に相補的な5'末端を有するように操作される。Cas9タンパク質へのガイドRNAの結合により、タンパク質を活性化する立体構造変化が起こる。活性化されると、Cas9は、そのプロトスペーサー隣接モチーフ(PAM)配列に一致する配列に結合することによって標的DNAを検索する。PAMは、ガイドRNAに相補的な領域の1ヌクレオチド下流内にある2または3ヌクレオチドの塩基配列である。1つの非限定的な例では、PAM配列は5'-NGG-3'である。Cas9タンパク質が、適切なPAMを有するその標的配列を見つけると、PAM上流の塩基を融解し、それらをガイドRNA上の相補領域と対合させる。次に、RuvCおよびHNHヌクレアーゼドメインは、PAM上流の3番目のヌクレオチド塩基の後ろで標的DNAを切断する。

40

50

【0112】

遺伝子発現を阻害するために用いられるCRISPR/Casシステムの1つの非限定的な例であるCRISPRiは、米国特許出願公開第US20140068797号に記述されている。CRISPRiは、RNAガイドCas9エンドヌクLEASEを用いてDNAの二本鎖切断を導入し、間違いを起こしやすい修復経路を誘発してフレームシフト変異を引き起こす永続的な遺伝子破壊を誘導する。ガイドRNAと共発現されると、転写伸長、RNAポリメラーゼ結合、または転写因子結合を特異的に妨げるDNA認識複合体が作製される。このCRISPRiシステムは、標的にした遺伝子の発現を効率的に抑制する。

【0113】

CRISPR/Cas遺伝子破壊は、標的遺伝子に特異的なガイド核酸配列およびCasエンドヌクLEASEが細胞に導入され、CasエンドヌクLEASEが標的遺伝子の位置で二本鎖切断を導入することを可能にする複合体を形成する場合に起きる。ある種の態様において、CRISPR/Casシステムは、限定されるものではないが、pAd5F35-CRISPRベクターのような、発現ベクターを含む。他の態様において、Cas発現ベクターはCas9エンドヌクLEASEの発現を誘導する。T7、Cas3、Cas8a、Cas8b、Cas10d、Cse1、Csy1、Csn2、Cas4、Cas10、Csm2、Cmr5、Fok1、当技術分野において公知の他のエンドヌクLEASE、およびそれらの任意の組み合わせを含むがこれらに限定されない、他のエンドヌクLEASEも用いられうる。

【0114】

ある種の態様において、Cas発現ベクターを誘導することは、Cas発現ベクターにおける誘導性プロモーターを活性化する作用物質に細胞を曝露することを含む。そのような態様において、Cas発現ベクターは、抗生物質への曝露により(例えば、テトラサイクリンまたはテトラサイクリンの誘導体、例えばドキシサイクリンにより)誘導可能なものなどの、誘導性プロモーターを含む。しかしながら、他の誘導性プロモーターを使用できることが理解されるべきである。誘導剤は、誘導性プロモーターの誘導をもたらす選択的条件(例えば、作用物質、例えば抗生物質への曝露)であることができる。これにより、Cas発現ベクターの発現がもたらされる。

【0115】

ある種の態様において、ガイドRNAおよびCas9は、リボ核タンパク質(RNP)複合体として細胞に送達されることができ、RNPは、gRNAと複合化された精製Cas9タンパク質から構成され、幹細胞および免疫細胞を含むがこれらに限定されない、複数のタイプの細胞に効率的に送達されることが当技術分野において周知である(Addgene, Cambridge, MA, Mirus Bio LLC, Madison, WI)。

【0116】

ガイドRNAは、関心対象のゲノム領域に特異的であり、CasエンドヌクLEASE誘導性の二本鎖切断のその領域を標的にする。ガイドRNA配列の標的配列は、遺伝子の遺伝子座内またはゲノムの非コード領域内でありうる。ある種の態様において、ガイド核酸配列は、長さが少なくとも10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、またはそれ以上のヌクレオチドである。

【0117】

CRISPR複合体の形成の文脈において、「標的配列」は、標的配列とガイド配列との間のハイブリダイゼーションがCRISPR複合体の形成を促進する、ある程度の相補性を有するようにガイド配列が設計される配列をいう。ハイブリダイゼーションを引き起こし、CRISPR複合体の形成を促進するのに十分な相補性があれば、必ずしも完全な相補性は必要とされない。標的配列は、DNAまたはRNAポリヌクレオチドのような、任意のポリヌクレオチドを含みうる。ある種の態様において、標的配列は細胞の核または細胞質に位置する。他の態様において、標的配列は、真核細胞の細胞小器官、例えば、ミトコンドリアまたは核内でありうる。典型的には、内因性CRISPRシステムの文脈において、CRISPR複合体(標的配列とハイブリダイズされ、1つまたは複数のCasタンパク質と複合化されたガイド配列を含む)の形成により、標的配列の中または近傍(例えば、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、2

10

20

30

40

50

0、50、またはそれ以上の塩基対内)の一方または両方の鎖の切断がもたらされる。標的配列と同様に、これが機能するのに十分であれば、完全な相補性は必要ないと考えられている。

【0118】

ある種の態様において、CRISPRシステムの要素の発現が1つまたは複数の標的部位でのCRISPR複合体の形成を指令するように、CRISPRシステムの1つまたは複数の要素の発現を駆動する1つまたは複数のベクターが宿主細胞に導入される。例えば、Cas酵素、tracr-mate配列に連結されたガイド配列、およびtracr配列はそれぞれ、別々のベクター上の別々の調節要素に機能的に連結されうる。あるいは、同じまたは異なる調節要素から発現される2つまたはそれ以上の要素を単一のベクターにおいて組み合わせ、1つまたは複数のさらなるベクターが、第1のベクターに含まれないCRISPRシステムの任意の構成要素を提供してもよい。単一のベクターにおいて組み合わされるCRISPRシステム要素は、2番目の要素に対して5'側(その「上流」)または2番目の要素に対して3'側(その「下流」)に位置する1つの要素のような、任意の適切な方向に配置されうる。1つの要素のコード配列は、第2の要素のコード配列の同じまたは反対の鎖上に位置し、同じまたは反対の方向に配向されうる。ある種の態様において、単一のプロモーターが、CRISPR酵素をコードする転写産物および1つまたは複数のガイド配列、tracr mate配列(ガイド配列に機能的に連結されてもよい)、ならびに1つまたは複数のイントロン配列内(例えば、それぞれ異なるイントロン中、2つもしくはそれ以上の少なくとも1つのイントロン中、または全てが単一のイントロン中)に埋め込まれたtracr配列の発現を駆動する。

10

20

【0119】

ある種の態様において、CRISPR酵素は、1つまたは複数の異種タンパク質ドメイン(例えばCRISPR酵素に加えて約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個、もしくはそれ以上、または約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10超個、もしくはそれ以上のドメイン)を含む融合タンパク質の一部である。CRISPR酵素融合タンパク質は、任意のさらなるタンパク質配列、および任意により任意の2つのドメイン間のリンカー配列を含みうる。CRISPR酵素に融合されるタンパク質ドメインの例としては、非限定的に、エピトープタグ、レポーター遺伝子配列、ならびに以下の活性:メチラーゼ活性、デメチラーゼ活性、転写活性化活性、転写抑制活性、転写放出因子活性、ヒストン修飾活性、RNA切断活性、および核酸結合活性の1つまたは複数を含むタンパク質ドメインが挙げられる。CRISPR酵素を含む融合タンパク質の一部を形成しうるさらなるドメインは、参照により本明細書に組み入れられる米国特許出願公開第US20110059502号に記述されている。ある種の態様において、標的配列の位置を同定するためにタグ付きCRISPR酵素が用いられる。

30

【0120】

従来のウイルスおよび非ウイルスに基づく遺伝子移入法は、哺乳動物および非哺乳動物細胞または標的組織に核酸を導入するために用いることができる。そのような方法は、培養中の細胞にまたは宿主生物中の細胞にCRISPRシステムの構成要素をコードする核酸を投与するために用いることができる。非ウイルスベクター送達システムは、DNAプラスミド、RNA(例えば、本明細書において記述されるベクターの転写産物)、裸の核酸、およびリポソームのような、送達ビヒクルと複合体化された核酸を含む。ウイルスベクター送達システムには、細胞への送達後にエピソームまたは組み込まれたゲノムのいずれかを有する、DNAおよびRNAウイルスが含まれる(Anderson, 1992, Science 256:808-813; およびYu, et al., 1994, Gene Therapy 1:13-26)。

40

【0121】

ある種の態様において、CRISPR/CasはII型CRISPR/Casシステムに由来する。他の態様において、CRISPR/CasシステムはCas9タンパク質に由来する。Cas9タンパク質は、化膿連鎖球菌(*Streptococcus pyogenes*)、サーモフィルス菌(*Streptococcus thermophilus*)、または他の種に由来することができる。

【0122】

一般に、Casタンパク質は少なくとも1つのRNA認識および/またはRNA結合ドメインを含

50

む。RNA認識および/またはRNA結合ドメインは、ガイドRNAと相互作用する。Casタンパク質は、ヌクレアーゼドメイン(すなわち、DNアーゼまたはRNアーゼドメイン)、DNA結合ドメイン、ヘリカーゼドメイン、RNアーゼドメイン、タンパク質-タンパク質相互作用ドメイン、二量体化ドメイン、および他のドメインも含むことができる。Casタンパク質は、核酸結合親和性および/または特異性を増大させるため、酵素活性を改変させるため、および/またはタンパク質の別の特性を変化させるために修飾することができる。ある種の態様において、融合タンパク質のCas様タンパク質は、野生型Cas9タンパク質またはその断片に由来することができる。他の態様において、Casは修飾Cas9タンパク質に由来することができる。例えば、Cas9タンパク質のアミノ酸配列を修飾して、タンパク質の1つまたは複数の特性(例えば、ヌクレアーゼ活性、親和性、安定性など)を改変することができる。あるいは、修飾Cas9タンパク質が野生型Cas9タンパク質よりも小さくなるように、RNAガイド切断に関与しないCas9タンパク質のドメインをタンパク質から除去することができる。一般に、Cas9タンパク質は少なくとも2つのヌクレアーゼ(すなわち、DNアーゼ)ドメインを含む。例えば、Cas9タンパク質は、RuvC様ヌクレアーゼドメインおよびHNH様ヌクレアーゼドメインを含むことができる。RuvCおよびHNHドメインは共働して一本鎖を切断し、DNA中に二本鎖切断を生じさせる(Jinek, et al., 2012, Science, 337:816-821)。ある種の態様において、Cas9由来タンパク質は、1つの機能的ヌクレアーゼドメイン(RuvC様またはHNH様ヌクレアーゼドメインのいずれか)のみを含むように修飾することができる。例えば、Cas9由来タンパク質は、ヌクレアーゼドメインの1つが欠失または変異されて、もはや機能しなくなるように(すなわち、ヌクレアーゼ活性が存在しないように)修飾することができる。ヌクレアーゼドメインの1つが不活性であるいくつかの態様において、Cas9由来タンパク質は、二本鎖核酸にニックを導入することができる(そのようなタンパク質は「ニックアーゼ」と呼ばれる)が、二本鎖DNAを切断しない。上記の態様のいずれかにおいて、ヌクレアーゼドメインのいずれかまたは全てが、部位特異的突然変異誘発、PCR媒介性の突然変異誘発、および全遺伝子合成、ならびに当技術分野において公知の他の方法のような、周知の方法を用いて1つまたは複数の欠失変異、挿入変異、および/または置換変異によって不活性化されることができる。

10

20

30

40

50

【0123】

1つの非限定的な態様において、ベクターは、CRISPRシステムの発現を駆動する。当技術分野には、本発明において有用である適切なベクターが豊富にある。使用されるベクターは、複製に適しており、任意で、真核細胞への組み込みに適している。典型的なベクターは、転写および翻訳ターミネーター、開始配列、ならびに所望の核酸配列の発現の調節に有用なプロモーターを含む。本発明のベクターはまた、核酸標準的な遺伝子送達プロトコールに用いられてもよい。遺伝子送達の方法は、当技術分野において公知である(参照により本明細書に組み入れられる米国特許第5,399,346号、同第5,580,859号、および同第5,589,466号)。

【0124】

さらに、ベクターは、ウイルスベクターの形で細胞に提供されてもよい。ウイルスベクター技術は、当技術分野において周知であり、例えば、Sambrook et al. (4th Edition, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 2012)に、ならびに他のウイルス学および分子生物学のマニュアルに記述されている。ベクターとして有用なウイルスは、レトロウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、ヘルペスウイルス、シンドビスウイルス、ガンマレトロウイルス、およびレンチウイルスを含むが、これらに限定されることはない。一般に、適切なベクターは、少なくとも1つの生物において機能する複製起点、プロモーター配列、好都合な制限エンドヌクレアーゼ部位、および1つまたは複数の選択マーカーを含む(例えば、WO 01/96584; WO 01/29058; および米国特許第6,326,193号)。

【0125】

核酸の導入

核酸を細胞に導入する方法は、物理的、生物学的、および化学的方法を含む。RNAのよ

うな、ポリヌクレオチドを宿主細胞に導入するための物理的方法は、リン酸カルシウム沈殿、リポフェクション、粒子衝撃、マイクロインジェクション、エレクトロポレーションなどを含む。RNAは、エレクトロポレーション(Amaxa Nucleofector-II (Amaxa Biosystems, Cologne, Germany))、(ECM 830 (BTX) (Harvard Instruments, Boston, Mass.)またはGene Pulser II (BioRad, Denver, Colo.), Multiporator (Eppendorf, Hamburg Germany)を含む市販の方法を用いて標的細胞に導入することができる。リポフェクションを使ったカチオン性リポソーム媒介トランスフェクションを用いて、ポリマーカプセル化を用いて、ペプチド媒介トランスフェクションを用いて、または「遺伝子銃」のような微粒子銃粒子送達システムを用いて、RNAを細胞に導入することもできる(例えば、Nishikawa, et al. Hum Gene Ther., 12(8):861-70 (2001)を参照のこと)。

10

【0126】

関心対象のポリヌクレオチドを宿主細胞に導入するための生物学的方法は、DNAおよびRNAベクターの使用を含む。ウイルスベクター、特にレトロウイルスベクターは、哺乳動物、例えばヒトの細胞に遺伝子を挿入するために最も広く使われる方法になった。他のウイルスベクターは、レンチウイルス、ポックスウイルス、単純ヘルペスウイルス1、アデノウイルス、およびアデノ随伴ウイルスなどに由来することができる。例えば、米国特許第5,350,674号および同第5,585,362号を参照されたい。

【0127】

ポリヌクレオチドを宿主細胞に導入するための化学的手段は、高分子複合体、ナノカプセル、ミクロスフェア、ビーズのようなコロイド分散システム、ならびに水中油型エマルジョン、ミセル、混合ミセル、およびリポソームを含めた脂質に基づくシステムを含む。インビトロおよびインビボで送達ビヒクルとして用いるための例示的なコロイドシステムは、リポソーム(例えば、人工膜小胞)である。

20

【0128】

宿主細胞に外因性核酸を導入するために、または細胞を本発明の阻害剤に曝露するために用いられる方法に関係なく、宿主細胞中の核酸の存在を確認するために、種々のアッセイ法が実施されうる。そのようなアッセイ法は、例えば、サザンおよびノザンプロットティング、RT-PCRおよびPCRのような、当業者に周知の「分子生物学的」アッセイ法；特定のペプチドの有無を検出するような、例えば、免疫学的手段(ELISAおよびウエスタンプロット)によるまたは本発明の範囲内に入る作用物質を同定するための本明細書において記述されるアッセイ法による「生化学的」アッセイ法を含む。

30

【0129】

本発明において有用である方法および組成物は、実施例に記載されている特定の製剤に限定されないことが理解されるべきである。以下の実施例は、当業者に完全な開示および説明を提供するために記載されており、本発明者らがその発明とみなすものの範囲を限定することを意図するものではない。

【0130】

本発明の実践では、特に明記しない限り、分子生物学(組み換え技術を含む)、微生物学、細胞生物学、生化学および免疫学の従来技法を用いるものであり、それらは十分に当業者の範囲内である。そのような技法は、「Molecular Cloning: A Laboratory Manual」、第4版(Sambrook et al. (2012) Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory)；「Oligonucleotide Synthesis」(Gait, M. J. (1984). Oligonucleotide synthesis. IRL press)；「Culture of Animal Cells」(Freshney, R. (2010). Culture of animal cells. Cell Proliferation, 15(2.3), 1)；「Methods in Enzymology」「Weir's Handbook of Experimental Immunology」(Wiley-Blackwell; 5 edition (January 15, 1996)；「Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells」(Miller and Carlos, (1987) Cold Spring Harbor Laboratory, New York)；「Short Protocols in Molecular Biology」(Ausubel et al., Current Protocols; 5 edition (November 5, 2002))；「Polymerase Chain Reaction: Principles, Applications and Troubleshooting」, (Babar, M., VDM Verlag Dr. Muller (August 17, 2011))；「Current Protocols in Immunology」(Coligan, John

40

50

Wiley & Sons, Inc. November 1, 2002)のような、文献のなかで完全に説明されている。

【0131】

当業者は、本明細書において記述される特定の手順、態様、特許請求の範囲、および実施例に対する多数の同等物を認識するか、または、日常的に過ぎない実験法を用いて確認できるであろう。そのような同等物は、本発明の範囲内であるとみなされ、本明細書に添付されている特許請求の範囲により包含されていた。例えば、反応時間、反応サイズ/容積、ならびに、溶媒、触媒、圧力、大気条件、例えば窒素雰囲気、および還元剤/酸化剤のような、実験試薬を含むがこれらに限定されない、当技術分野で認識されている代替物でのおよび日常的に過ぎない実験法を用いた、反応条件における改変が、本出願の範囲内であることが理解されるべきである。

10

【0132】

値および範囲が本明細書において提供されている場合は必ず、これらの値および範囲により包含されている全ての値および範囲は、本発明の範囲内に包含されるように意図されていることが、理解されるべきである。さらに、これらの範囲内に入る全ての値、および値の範囲の上限または下限もまた、本出願により企図される。

【0133】

以下の実施例は、本発明の局面をさらに例証する。しかしながら、それらは、本明細書において記載されているような本発明の教示または開示の限定ではまったくくない。

【実施例】

20

【0134】

実験例

本発明を次に、以下の実施例に関して記述する。これらの実施例は例証のみの目的で提供され、本発明は、これらの実施例に限定されず、むしろ、本明細書において提供される教示の結果として明らかである全ての変形物を包含する。

【0135】

これらの実験において使用された材料および方法をここで記載する。

【0136】

マウス：記述されている本研究には、6~12週齢のマウスのさまざまな系統が用いられた。OT-1 TCRトランスジェニックマウス(OT-1マウス)は、Hogquist et al., Cell 76, 17-27 (1994)によって記述された。構成的Cas9-2A-EGFPマウス(Cas9マウス)は、Platt et al., Cell 159, 440-455 (2014)によって記述された。OT-1; Cas9マウスはOT-1およびCas9マウスを交配させることにより作出され、Jackson Labプロトコールにしたがって遺伝子型が特定された。ナイーブCD8⁺ T細胞は、OT-1マウス、Cas9マウス、およびOT-1;Cas9マウスから単離された。全ての動物は、12時間:12時間または13時間:11時間の光サイクル、室温(21~23)および40~60%の相対湿度で、標準的な個別に換気された無菌条件において飼育された。動物のコホートが複数の処置を受けていた場合、動物は、該当する場合に、性別、同腹仔、年齢のわずかな違い、ケージ、収納位置の影響を最小限に抑えるために、(1) 同腹仔を用いて動物を異なる群に無作為に割り当てること、(2) 処置の前に雌を無作為に混合し、各群での異なるケージからのマウスの均一性または表現を最大化すること、および/または(3) 各群へのマウスの無作為の割り当てにより無作為化された。

30

40

【0137】

T細胞CRISPRベクター(sgRNA-Thy1.1発現ベクター)の作製：コドン最適化および Thy1.1 およびsgRNA発現カセットをGibson Assemblyを介してレンチウイルスベクターにサブクローニングすることにより、レンチウイルスT細胞CRISPRベクター、レンチ-pLKO-U6-sgRNA(BsmBI)-EFS-Thy1.1CO-spAを作製した。T細胞での強力なゲノム編集を可能とするために、3つの型のベクターを作製した。

【0138】

pSC017_pLKO-U6-sgBsmBI-EFS-Thy11CO-spA (SEQ ID NO:129,213):

ttaatgtagtcttatgcaatactcttgtagtcttgcaacatggtaacgatgagttagcaacatgccttac
aaggagagaaaaagcaccgtgcatgccgattgggtggaagtaaggtggtacgatcgtgccttattaggaag
gcaacagacgggtctgacatggattggacgaaccactgaattgccgcattgcagagatattgtatttaag
tgcttagctcgatacataaacgggtctctctgggttagaccagatctgagcctgggagctctctggctaac
tagggaacccactgcttaagcctcaataaagcttgcccttgagtgttcaagtagtgtgtgcccgtctgtt
gtgtgactctggtaactagagatccctcagacccttttagtcagtggtgaaaaatctctagcagtgggcgc
cgaacagggacttgaaagcgaagggaaaccagaggagctctctcgacgcaggactcggcttgctgaagc
gcgcacggcaagagggcgagggggcggcactgggtgagtacgcaaaaatcttgactagcggaggctagaag
gagagagatgggtgagagagcgtcagtattaagcgggggagaattagatcgcgatgggaaaaaattcgg
taaggccagggggaaagaaaaatataaattaaaacatatagtatgggcaagcagggagctagaacgatt
cgcagttaatcctggcctgttagaaacatcagaaggctgtagacaaatactgggacagctacaaccatcc
cttcagacaggatcagaagaacttagatcattatataatacagtagcaaccctctattgtgtgcatcaaa
ggatagagataaaagacaccaaggaagctttagacaagatagaggaagagcaaaaacaaaagtaagaccac
cgcacagcaagcggccgctgatcttcagacctggaggaggagatatgagggacaattggagaagtgaatt
atataaatataaagtagtaaaaattgaaccattaggagtagcaccacccaaggcaagagaagagtgggtg

cagagagaaaaagagcagtgggaaataggagctttgttccttgggttcttgggagcagcaggaagcacta
 tgggcgagcgtcaatgacgctgacggtagcggccagacaattattgtctggtatagtgacagcagcagaa
 caatttgctgagggctattgagggcgcaacagcatctgttgcaactcacagctctggggcatcaagcagctc
 caggcaagaatcctggctgtggaaagatacctaaaggatcaacagctcctggggatttgggggttgctctg
 gaaaactcatttgcaccactgctgtgccttggaaatgctagttggagtaataaatctctggaacagatttg
 gaatcacacgacctggatggagtgaggacagagaaaattaacaattacacaagcttaatacactccttaatt
 gaagaatcgcaaaaccagcaagaaaagaatgaacaagaattattggaattagataaatgggcaagtttgt
 ggaattgggttaacataacaaattggctgtggtatataaaattattcataatgatagtaggaggcttggg
 aggtttaagaatagtttttgcgtactttctatagtgaaatagagttaggcagggatattcaccattatcg
 tttcagacccacctcccaacccccgaggggacccagagagggcctatttcccattgattccttcatatttgc
 atatacgatacaaggctgtagagagataattagaattaatttgcactgtaaacacaaagataattagtaca
 aaatagctgacgtagaaagtaataatttcttgggtagtttgcagttttaaaattatgttttaaaatggac
 tatcatatgcttaccgtaacttgaaagtatttctgatttcttggctttatataatcttGTGGAAAGGACGAA
 ACACCgGAGACGgaCGTCTCgttttagagctaGAAAtagcaagttaaaataaggctagtcctgttatcaa
 cttgaaaaagtggcaccgagtcggtgctTTTTTaaagcttggcgtaactagatcttgagacaaatggcagt
 attcatccacaatttttaaaagaaaaggggggattggggggtacagtgacaggggaaagaatagtagacata
 atagcaacagacatacaaaactaaagaattacaaaaacaaattacaaaaattcaaaattttcgggtttatt
 acagggacagcagagatccactttggcgccggctcgagggggcccggggaattcgcctagctaggtccttga
 aaggagtgggaattggctccgggtgcccgtagtgaggcagagcgcacatcgccacagtcctccgagaagtt
 ggggggaggggtcggcaattgatccgggtgcctagagaagtgggcggggtaaactgggaaagtgatgtc
 gtgtactggctccgctttttcccgaggggtgggggagaaccgtatataagtgcagtagtcgccgtgaacg
 ttctttttcgcaacgggtttgcccgcagaacacaggaccggttctagacgtacggccaccATGAACCCAG
 CCATCAGCGTCGCTCTCCTGCTCTCAGTCTTGCAAGGTGCCGAGGGCAGAAGGTGACCAGCCTGACAGC
 CTGCCTGGTGAACCAAAACCTTCGCTGGACTGCCGCCATGAGAATAACACCAAGGATAACTCCATCCAG
 CATGAGTTCAGCCTGACCCGAGAGAAGAGGAAGCACGTGCTCTCAGGCACCCTTGGGATAACCCGAGCACA
 CGTACCCTCCCGCTCACCCTCTCCAACCAGCCCTATATCAAGGTCTTACCCTAGCCAACCTCACCAC
 CAAGGATGAGGGCGACTACTTTTTGTGAGCTTCGCGTAAGTGGCGCAATCCCATGAGCTCCAATAAAAGT
 ATCAGTGTGTATAGAGACAAGCTGGTCAAGTGTGGCGGCATAAGCCTGCTGGTTCAGAACACATCCTGGA
 TGCTGCTGCTGCTGCTTTCCCTCTCCCTCCTCCAAGCCCTGGACTTCATTTCTCTGTGAagcgtAATAA
 AAGATCTTTATTTTATTAGATCTGTGTGTTGGTTTTTTGTGTGacgtgcggtcgactttaagaccaatg
 acttacaaggcagctgtagatcttagccacttttttaaaagaaaagggggactggaagggctaattcact
 cccaacgaagacaagatctgctttttgcttgtactgggtctctctggttagaccagatctgagcctggga
 gctctctggctaactagggaaaccactgcttaagcctcaataaagcttgcttgagtgcttcaagtagtg
 tgtgcccgtctgttgtgtgactctggttaactagagatccctcagacccttttagtcagtggtgaaaatct
 ctagcagtagtatagtagttcatgtcatcttattattcagtatattataacttgcaagaaaatgaatac
 agagagtgagaggaacttgtttattgacgcttataatggttacaaaataaagcaatagcatcacaatttc
 acaataaagcatttttttactgcattctagttgtggtttgtccaaactcatcaatgtatcttatcatg
 tctggctctagctatcccgcccttaactccgccatcccgcccttaactccgccagttccgccattct
 ccgccccatggctgactaattttttttatattatgacagaggccgagggccctcgccctctgagctattcc
 agaagtagtgaggagcttttttggaggcctagggacgtacccaattcgccctatagtgagtcgtattac
 gcgcgctcactggcgtcgtttttacaacgctgtgactgggaaaaccctggcgttacccaacttaatcgcc
 ttgacgacatcccccttccgagctggcgtaatagcgaagaggcccgaccgatcgcccttccaaca
 gttgcgagcctgaatggcgaatgggacgcccctgtagcggcgattaagcggcggggtgtggtggtt
 acgcgagcgtgaccgctacacttgccagcgccttagcggccgctcctttcgctttcttcccttcccttc
 tcgccacgttcgcccgttttccccgtcaagctctaaatcgggggctccctttagggttccgatttagtgc
 ttacggcacctcgacccccaaaaaacttgattaggggtgatggttcacgtagtgggccatcgccctgatag
 acggtttttcgcccttgacggttgagtcacggttctttaaattagtgactcttgttccaaactggaacaa
 cactcaaccctatctcggctctattcttttgatttataagggattttgccgatttcggcctattggttaaa
 aatgagctgatttaacaaaaatttaacgcaatttttaacaaaataattaacgcttacaatttaggtggca
 cttttcggggaaatgtgcgcggaaccctatttggttatttttctaaatacattcaaatatgtatccgct
 catgagacaataaccctgataaatgcttcaataatattgaaaaaggaagatgagtagtattcaacatttc
 cgtgtcgccttattcccttttttgcggcattttgccttctgtttttgctcaccagaaacgctggtga

10

20

30

40

aagtaaaagatgctgaagatcagttgggtgcacgagtgggttacatcgaactggatctcaacagcggtaa
gatccttgagagttttcgccccgaagaacgttttccaatgatgagcacttttaagttctgctatgtggc
gcggtattatcccgtattgacgccgggcaagagcaactcggtcgccgcatacactattctcagaatgact
tggttgagtactcaccagtcacagaaaagcatcttacggatggcatgacagtaagagaattatgcagtgc
tgcataaccatgagtgataaacactgcgccaacttacttctgacaacgatcggaggaccgaaggagcta
accgcttttttgcacaacatgggggatcatgtaactcgccttgatcgttgggaaccggagctgaatgaag
ccataccaaacgacgagcgtgacaccacgatgcctgtagcaatggcaacaacgttgcgcaactattaac
tggcgaactacttactctagcttcccggaacaattaatagactggatggaggcggataaagttgcagga
ccacttctgcgctcggcccttccggctggctggtttattgctgataaatctggagccgggtgagcgtgggt
ctcgcggtatcattgcagcactggggccagatggtaagccctcccgatcgtagttatctacacgacggg
gagtcaggcaactatggatgaacgaaatagacagatcgtgagataggtgcctcactgattaagcattgg
taactgtcagaccaagtttactcatataacttttagattgattttaaactttcatttttaatttaaagga
tctaggtgaagatcctttttgataatctcatgaccaaaatcccttaacgtgagttttcgttccactgagc
gtcagacccccgtagaaaagatcaaaggatcttcttgagatccttttttctgcgcgtaatctgctgcttg
caaacaaaaaaaaaccaccgctaccagcgggtggtttggtttgcggatcaagagctaccaactcttttccga
aggtaactggcttcagcagagcgcagataccaaatactgttcttctagtgtagccgtagttaggccacca
cttcaagaactctgtagcaccgcctacatacctcgcctctgctaactcctgttaccagtggtgctgccagt
ggcgataagtcgtgtcttaccgggttgactcaagacgatagttaccggataaggcgcagcgggtcgggct
gaacgggggggttcgtgcacacagcccagcttgagcgaacgacctacaccgaactgagatacctacagcg
tgagctatgagaaagcgcacgccttccgaaggagaaaggcggacaggtatccggtaagcggcagggtc
ggaacaggagagcgcacgagggagcttccagggggaaacgcctggatctttatagtcctgtcgggttct
gccacctctgacttgagcgtcgatttttgtgatgctcgtcagggggcggagcctatggaaaaacgccag
caacgcgccctttttacggttccctggccttttctgctcaccatgttctttcctgcttatcc
cctgattctgtggataaccgtattaccgcttttgagtgagctgataccgctcgcgcagccgaacgaccg
agcgcagcagtgagtgagcaggaagcgggaagagcggcccaatacgaacccgctctccccgcgcttg
gccgattcattaatgcagctggcagcagaggttcccgactggaaagcgggcagtgagcgaacgcaatt
aatgtgagttagctcactcattaggcaccaccaggtttacactttatgcttccggctcgtatggtgtgtg
gaattgtgagcggataacaatttcacacaggaacagctatgacctgattacgccaagcgcgcaattaa
ccctcactaaaggaacaaaagctggagctgcaagc

10

20

【 0 1 3 9 】

pSC008_pLKO-U6-BsmBI - chRNA(+85) -EFS-Thy11 (SEQ ID NO: 129,214):

1 ttaatgtagt cttatgcaat actctttagt tcttgcaaca tggtaacgat gagtttagcaa
61 catgccttac aaggagagaa aaagcacctg gcatgccgat tggtggaagt aagggtggtac
121 gatcgtgcct tatttaggaag gcaacagacg ggtctgacat ggattggacg aaccactgaa
181 ttgccgcatt gcagagatat tgtatttaag tgcctagctc gatacataaa cgggtctctc
241 tggtttagacc agatctgagc ctgggagctc tctggctaac tagggaacc actgcttaag
301 cctcaataaa gcttgccctg agtgcttcaa gtagtgtgtg cccgtctgtt gtgtgactct
361 ggtaactaga gatccctcag acccttttag tcagtgtgga aaatctctag cagtggcgcc
421 cgaacagggga cttgaaagcg aaagggaac cagaggagct ctctcgacgc aggactcggc
481 ttgctgaagc gcgcacggca agaggcgagg ggcggcgact ggtgagtacg ccaaaaattt
541 tgactagcgg aggctagaag gagagagatg ggtgcgagag cgtcagtatt aagcggggga
601 gaattagatc gcgatgggaa aaaattcggg taaggccagg gggaaagaaa aaatataaat
661 taaaacatat agtatgggca agcagggagc tagaacgatt cgcagttaat cctggcctgt
721 tagaaacatc agaaggctgt agacaaatac tgggacagct acaaccatcc cttcagacag
781 gatcagaaga acttagatca ttatataata cagttagcaac cctctattgt gtgcatcaaa
841 ggatagagat aaaagacacc aaggaagctt tagacaagat agaggaagag caaaaacaaa
901 gtaagaccac cgcacagcaa gcggccgctg atcttcagac ctggaggagg agatatgagg
961 gacaattgga gaagtgaatt atataaatat aaagtagtaa aaattgaacc attaggagta
1021 gcaccaccca aggcaaagag aagagtgggtg cagagagaaa aaagagcagt gggaatagga
1081 gctttgttcc ttgggttctt gggagcagca ggaagcacta tgggcgcagc gtcaatgacg
1141 ctgacgggtac aggccagaca attattgtct ggtatagtgc agcagcagaa caatttgctg
1201 agggctattg aggcgcaaca gcatctgttg caactcacag tctggggcat caagcagctc

30

40

1261 caggcaagaa tcctggctgt ggaaagatac ctaaaggatc aacagctcct ggggatttgg
1321 ggttgctctg gaaaactcat ttgcaccact gctgtgcctt ggaatgctag ttggagtaat
1381 aaatctctgg aacagatttg gaatcacacg acctggatgg agtgggacag agaaaattaac
1441 aattacacaa gcttaataca ctccttaatt gaagaatcgc aaaaccagca agaaaagaat
1501 gaacaagaat tattggaatt agataaatgg gcaagtttgt ggaattgggt taacataaca
1561 aattggctgt ggtatataaa attattcata atgatagtag gaggcttggg aggtttaaga
1621 atagtttttg ctgtactttc tatagtgaat agagttaggc agggatattc accattatcg
1681 tttcagaccc acctcccaac cccgagggga cccagagagg gcctatttcc catgatctct
1741 tcatattttg atatacgata caaggctggt agagagataa ttagaattaa ttgactgta
1801 aacacaaaga tattagtaca aaatacgtga cgtagaaagt aataatttct tgggtagttt
1861 gcagttttaa aattatgttt taaaatggac tatcatatgc ttaccgtaac ttgaaagtat
1921 ttcgattttc tggctttata tatcttGTGG AAAGGACGAA ACACCgGAGA CGGaCGTCTC
1981 tgttttagag ctaGAAAtag caagttaaaa taaggctagt ccgttatcaa cttgaaaaag
2041 tggcaccgag tcggtgctTTT TTTaagcttg gcgtaactag atcttgagac aaatggcagt
2101 attcatccac aattttaaaa gaaaaggggg gattgggggg tacagtgcag gggaaagaat
2161 agtagacata atagcaacag acatacaaac taagaatta caaaaacaaa ttacaaaaat
2221 tcaaaatttt cgggttttatt acagggacag cagagatcca ctttggcgcc ggctcgaggg
2281 ggcccgggga attcgctagc taggtcttga aaggagtggg aattggctcc ggtgcccgtc
2341 agtgggcaga gcgcacatcg cccacagtcc ccgagaagtt ggggggaggg gtgcgaatt
2401 gatccggtgc ctagagaagg tggcgcgggg taaactggga aagtgatgtc gtgtactggc
2461 tcccgctttt tcccaggggt gggggagaac cgtatataag tgcagtagtc gccgtgaacg
2521 ttctttttcg caacgggttt gccgcccagaa cacaggaccg gttctagacg tacggccacc
2581 ATGAACCCAG CCATCAGCGT CGCTCTCCTG CTCTCAGTCT TGCAGGTGTC CCGAGGGCAG
2641 AAGGTGACCA GCCTGACAGC CTGCCTGGTG AACCAAACC TTCGCCTGGA CTGCCGCCAT
2701 GAGAATAACA CCAAGGATAA CTCCATCCAG CATGAGTTCA GCCTGACCCG AGAGAAGAGG
2761 AAGCACGTGC TCTCAGGCAC CCTTGGGATA CCCGAGCACA CGTACCGCTC CCGCGTCACC
2821 CTCTCCAACC AGCCCTATAT CAAGGTCCTT ACCCTAGCCA ACTTCACCAC CAAGGATGAG
2881 GGCGACTACT TTTGTGAGCT TCGCGTCTCG GGCGCGAATC CCATGAGCTC CAATAAAAGT
2941 ATCAGTGTGT ATAGAGACAA GCTGGTCAAG TGTGGCGGCA TAAGCCTGCT GGTTCAGAAC
3001 ACATCCTGGA TGCTGTGCT GCTGCTTCC CTCTCCCTCC TCCAAGCCCT GGACTIONT
3061 TCTCTGTGAa gcgctAATAA AAGATCTTTA TTTTCATTAG ATCTGTGTGT TGGTTTTTTG
3121 TGTggtaaCT CGAGacgtgc ggtcgacttt aagaccaatg acttacaagg cagctgtaga
3181 tcttagccac tttttaaaag aaaagggggg actggaagg ctaattcact cccaacgaag
3241 acaagatctg ctttttgctt gtactgggtc tctctggtta gaccagatct gagcctggga
3301 gctctctggc taactagggg acccactgct taagcctcaa taaagcttgc cttgagtgtc
3361 tcaagtagtg tgtgcccgtc tgttgtgtga ctctggtaac tagagatccc tcagaccctt
3421 ttagtcagtg tggaaaatct cttagcagtac gtatagtagt tcatgtcatc ttattattca
3481 gtatttataa cttgcaaaga aatgaatatc agagagttag aggaacttgt ttattgcagc
3541 ttataatggt tacaataaaa gcaatagcat cacaaatttc acaataaag ctttttttc
3601 actgcattct agtttgggtt tgtccaaact catcaatgta tcttatcatg tctggcteta
3661 gctatcccgc ccctaactcc gcccatcccg ccctaactc cgcccagttc cgccattct
3721 ccgccccatg gctgactaat tttttttatt tatgcagagg ccgaggccgc ctggcctct
3781 gagctattcc agaagtagtg aggaggcttt tttggaggcc tagggacgta cccaattcgc
3841 cctatagtga gtcgtattac gcgcgctcac tggcgcgtgt ttacaacgt cgtgactggg
3901 aaaaccctgg cgttacccaa cttaatcgcc ttgcagcaca tcccccttc gccagctggc
3961 gtaatagcga agaggccgc accgatcgcc cttcccaaca gttgcgcagc ctgaatggcg
4021 aatgggacgc gccctgtage ggcgcattaa gcgcggcggg tgtggtggtt acgcgcagcg
4081 tgaccgctac acttgccagc gccctagegc ccgctcctt cgctttcttc ccttccttc
4141 tcgccacggt cgccggcttt ccccgctcaag ctctaaatcg ggggctccct ttagggttcc
4201 gatttagtgc tttacggcac ctgcaccca aaaaacttga ttagggtgat ggttcacgta
4261 gtgggcccac gccctgatag acggtttttc gcccttgac gttggagtcc acgctcttta
4321 atagtggact cttgtttcaa actggaacaa cactcaacc tatctcggtc tattcttttg
4381 atttataagg gatthtgccg atttcggcct attggttaaa aaatgagctg atttaacaaa
4441 aatthaacgc gaatthtaac aaaatattaa cgcttacaat ttagggtggc cttttcgggg
4501 aaatgtgcgc ggaaccctta tttgtttatt tttctaata cattcaaata tgtatccgat
4561 catgagacaa taaccctgat aaatgcttca ataatttga aaaaggaaga gtatgagtat
4621 tcaacatthc cgtgtcgcgc ttattccctt ttttgcggca ttttgccttc ctgthtttgc

10

20

30

40

4681 tcaccagaa acgctggtga aagtaaaaga tgctgaagat cagttgggtg cacgagtggg
4741 ttacatcgaa ctggatctca acagcggtaa gatccttgag agttttcgcc ccgaagaacg
4801 ttttccaatg atgagcactt ttaaagttct gctatgtggc gcggtattat cccgtattga
4861 cgccgggcaa gagcaactcg gtcgccgat acactattct cagaatgact tggttgagta
4921 ctcaccagtc acagaaaagc atcttacgga tggcatgaca gtaagagaat tatgagtg
4981 tgccataacc atgagtgata aactgctggc caacttactt ctgacaacga tcggaggacc
5041 gaaggagcta accgcttttt tgcacaacat gggggatcat gtaactcggc ttgatcgttg
5101 ggaaccggag ctgaatgaag ccataccaaa cgacgagcgt gacaccacga tgctgtgagc
5161 aatggcaaca acgttgcgca aactattaac tggcgaacta cttactctag cttcccggca
5221 acaattaata gactggatgg agggcgataa agttgcagga ccacttctgc gctcggccct
5281 tccggctggc tggtttattg ctgataaatc tggagccggt gagcgtgggt ctgcgggat
5341 cattgcagca ctggggccag atggtaagcc ctcccgtatc gtagtattct acacgacggg
5401 gagtcaggca actatggatg aacgaaatag acagatcgtc gagatagggt cctcactgat
5461 taagcattgg taactgtcag accaagttta ctcatatata ctttagattg atttaaaact
5521 tcatttttaa tttaaaagga tctaggtgaa gatccttttt gataatctca tgacaaaat
5581 cccttaacgt gagttttcgt tccactgagc gtcagacccc gtagaaaaga tcaaaggatc
5641 ttcttgagat cttttttttc tgcgcgtaat ctgctgcttg caaacaacaaa aaccaccgct
5701 accagcggtg gtttgtttgc cggatcaaga gctaccaact ctttttccga aggtaactgg
5761 cttcagcaga gcgcagatac caaatactgt tcttctagt tagccgtagt taggccacca
5821 cttcaagaac tctgtagcac cgcctacata cctcgtcttg ctaatcctgt taccagtggc
5881 tctcgcagc ggcgataagt cgtgtcttac cgggttgac tcaagacgat agttaccgga
5941 taaggcgcag cggtcgggct gaacggggg ttcgtgcaca cagcccagct tggagcgaac
6001 gacctacacc gaactgagat acctacagcg tgagctatga gaaagcgcca cgctcccga
6061 agggagaaaag ggcgacaggt atccggtaag cggcagggtc ggaacaggag agcgcacgag
6121 ggagcttcca gggggaaacg cctggtatct ttatagtcct gtcgggtttc gccacctctg
6181 acttgagcgt cgatttttgt gatgctcgtc aggggggagg agcctatgga aaaacgccag
6241 caacgcggcc tttttacggt tcttgccctt ttgctggcct tttgctcaca tgttctttcc
6301 tgcgttatcc cctgattctg tggataaccg tattaccgcc tttgagttag ctgataccgc
6361 tgcgccgagc cgaacgaccg agcgcagcga gtcagttagc gaggaagcgg aagagcggcc
6421 aatacgcaaa ccgctctccc ccgcgcttg gccgattcat taatgcagct ggcaacgacg
6481 gtttcccagc tggaaagcgg gcagttagcg caacgcaatt aatgtgagtt agctcactca
6541 ttaggcaccc caggctttac actttatgct tccggctcgt atgttgtgtg gaattgtgag
6601 cggataacaa tttcacacag gaaacagcta tgaccatgat tacgccaagc gcgcaattaa
6661 ccctcactaa agggaaacaaa agctggagct gcaagc

10

20

【 0 1 4 0 】

pSC021_pLKO-U6-sgBsmBI-PGK-Thy11CO-spA.sbd (SEQ ID NO: 129,215) :

1 ttaatgtagt cttatgcaat actctttagt tcttgcaaca tggtaacgat gagtttagcaa
61 catgccttac aaggagagaa aaagcaccgt gcatgccgat tggtaggaagt aaggtagtac
121 gatcgtgect tattaggaag gcaacagacg ggtctgacat ggattggacg aaccactgaa
181 ttgccgcatt gcagagata tgtatttaag tgccctagctc gatacataaa cgggtctctc
241 tggtttagacc agatctgagc ctgggagctc tctggctaac tagggaaccc actgcttaag
301 cctcaataaa gcttgccctg agtgcttcaa gtagtgtgtg cccgtctgtt gtgtgactct
361 ggtaactaga gatccctcag acccttttag tcagtgtgga aaatctctag cagtggcgcc
421 cgaacagggg cttgaaagcg aaagggaaac cagaggagct ctctcgacgc aggactcggc
481 ttgctgaagc gcgcacggca agaggcgagg ggcggcact ggtgagtacg ccaaaaattt
541 tgactagcgg aggctagaag gagagagatg ggtgcgagag cgtcagtatt aagcggggga
601 gaattagatc gcgatgggaa aaaattcggg taaggccagg gggaaagaaa aaatataaat
661 taaaacatat agtatgggca agcagggagc tagaacgatt cgcagttaat cctggcctgt
721 tagaaacatc agaaggctgt agacaaatac tgggacagct acaaccatcc cttcagacag
781 gatcagaaga acttagatca ttatataata cagttagcaac cctctattgt gtgcatcaaa
841 ggatagagat aaaagacacc aaggaagctt tagacaagat agaggaagag caaaaacaaa
901 gtaagaccac cgcacagcaa gggccgctg atcttcagac ctggaggagg agatatgagg
961 gacaattgga gaagtgaatt atataaatat aaagtagtaa aaattgaacc attaggagta
1021 gcacccacca aggcaaagag aagagtgggt cagagagaaa aaagagcagt gggaaatagga
1081 gctttgttcc ttgggttctt ggggacgaca ggaagcacta tgggcgacg gtcaatgacg
1141 ctgacgggtac aggcacagaca attattgtct ggtatagtgc agcagcagaa caatttgcgt

30

40

1201 agggctattg aggcgcaaca gcatctgttg caactcacag tctggggcat caagcagctc
1261 caggcaagaa tcctggctgt ggaaagatac ctaaaggatc aacagctcct ggggatttgg
1321 ggttgctctg gaaaactcat ttgcaccact gctgtgcctt ggaatgctag ttggagtaat
1381 aaatctctgg aacagatttg gaatcacacg acctggatgg agtgggacag agaaaattaac
1441 aattacacaa gcttaataca ctcccttaatt gaagaatcgc aaaaccagca agaaaagaat
1501 gaacaagaat tattggaatt agataaatgg gcaagtttgt ggaattgggt taacataaca
1561 aattggctgt ggtatataaa attattcata atgatagtag gaggcttggg aggtttaaga
1621 atagtttttg ctgtactttc tatagtgaat agagttagc agggatattc accattatcg
1681 tttcagaccc acctcccaac cccgagggga cccagagagg gcctatttcc catgattcct
1741 tcatattttg atatacgata caaggctgtt agagagataa ttagaattaa tttgactgta
1801 aacacaaaga tattagtaca aaatacgtga cgtagaaagt aataatttct tgggtagttt
1861 gcagttttta aattatgttt taaaatggac tatcatatgc ttaccgtaac ttgaaagtat
1921 ttcgatttct tggctttata tatcttGTGG AAAGGACGAA ACACCgGAGA CGGaCGTCTC
1981 tgttttagag ctaGAAAtag caagttaaaa taaggctagt ccgttatcaa cttgaaaaag
2041 tggcaccgag tcggtgctTTT TTTaagcttg gcgtaactag atcttgagac aaatggcagt
2101 attcatccac aattttaaaa gaaaaggggg gattgggggg tacagtgcag gggaaagaat
2161 agtagacata atagcaacag acatacaaac taaagaatta caaaaaacaa ttacaaaaat
2221 tcaaaatttt cggggtttatt acagggacag cagagatcca ctttggcgcc ggctcgaggg
2281 ggcccgggga attcgttagc gtctgaagc gagtttacgt ccagccaagc ttaggatctc
2341 gacctcgaaa ttctaccggg taggggaggc gcttttccca aggcagtctg gagcatgcgc
2401 tttagcagcc ccgctggcac ttggcgctac acaagtggcc tctggcctcg cacacattcc
2461 acatccaccg gtagegcaaa cgggctccgt tctttggtgg ccccttcgcg ccacctteta
2521 ctccctccct agtcaggaag tcccccccg ccccgcaget cgcgtcgtgc aggacgtgac
2581 aatggaagt agcatgtcac actagtctcg tgcagatgga cagcaccgct gagcaatgga
2641 agcgggtagg cttttggggc agcggccaat agcagctttg ctccctcgct ttctgggctc
2701 agcagctggg aaggggtgggt cggggggcgg gctcaggggc gggctcaggg gggggcggg
2761 cgcccgaagg tcctccggag gccggcatt ctgcacgctt caaaagcgca cgtctgccgc
2821 gctgttctcc tcttccctcat ctccgggect ttcgacctgc atccatctag atctcgagca
2881 gctgaagctt aaccggttct agacgtacgg ccaccATGAA CCCAGCCATC AGCGTCGCTC
2941 TCCTGTCTCT AGTCTTGCAG GTGTCCCAGG GGCAGAAGGT GACCAGCCTG ACAGCCTGCC
3001 TGGTGAACCA AACCTTCGC CTGGACTGCC GCCATGAGAA TAACACCAAG GATACTCCA
3061 TCCAGCATGA GTTCAGCCTG ACCCGAGAGA AGAGGAAGCA CGTGCTCTCA GGCACCCTTG
3121 GGATACCCGA GCACACGTAC CGCTCCCGCG TCACCCTCTC CAACCAGCCC TATATCAAGG
3181 TCCTTACCCT AGCCAACTTC ACCACCAAGG ATGAGGGCGA CTACTTTTGT GAGCTTCGCG
3241 TAAGTGGCGC GAATCCCATG AGCTCCAATA AAAGTATCAG TGTGTATAGA GACAAGCTGG
3301 TCAAGTGTGG CGGCATAAGC CTGCTGGTTC AGAACACATC CTGGATGCTG CTGCTGCTGC
3361 TTTCCCTCTC CCTCCTCCAA GCCCTGGACT TCATTTCTCT GTGAagcgt AATAAAAGAT
3421 CTTTATTTTC ATTAGATCTG TGTGTTGGTT TTTTGTGTGa cgtgcggtcg actttaagac
3481 caatgactta caaggcagct gtagatctta gccacttttt aaaagaaaag gggggactgg
3541 aagggetaat tcactcccaa cgaagacaag atctgctttt tgcttgact gggctctct
3601 ggtagacca gatctgagcc tgggagctct ctggctaact agggaaacca ctgcttaage
3661 ctcaataaag cttgccttga gtgcttcaag tagtgtgtgc ccgtctgttg tgtgactctg
3721 gtaactagag atccctcaga cccttttagt cagtgtgaa aatctctagc agtacgtata
3781 gtagtccatg tcatcttatt attcagtatt tataacttgc aaagaaatga atatcagaga
3841 gtgagaggaa cttgtttatt gcagcttata atggttacaa ataaagcaat agcatcacia
3901 atttcacaaa taaagcattt ttttactgct attctagtty tggtttgtcc aaactcatca
3961 atgtatctta tcatgtctgg ctctagctat cccgcccta actccgcca tcccgcctt
4021 aactccgccc agttccgccc atttctccgc ccatggctga ctaatttttt ttatttatgc
4081 agaggccgag gccgcctcgg cctctgagct attccagaag tagtgaggag gcttttttgg
4141 aggcctaggg acgtacccaa ttcgccctat agtgagctgt attacgcgcy ctcaactggc
4201 gtcgttttac aacgtcgtga ctgggaaaac cctggcgta cccaacttaa tgccttgca
4261 gcacatcccc ctttcgccag ctggcgtaat agcgaagagg cccgcaccga tgccttcc
4321 caacagttgc gcagcctgaa tggcgaatgg gacgcgccct gtagcggcgc attaagcgcg
4381 gcggtgtggt tggttacgcy cagcgtgacc gctacacttg ccagcgcctt agcgcctct
4441 cctttcgttt tcttcccttc ctttctcgc acgttcgccc gctttccccg tcaagctcta
4501 aatcgggggc tcccttttag gttccgattt agtgctttac ggcacctcga ccccaaaaaa
4561 cttgatttag gtgatggttc acgtagtggg ccatcgcctt gatagacggt ttttcgcctt

10

20

30

40

```

4621 ttgacgttgg agtccacggt ctttaaatagt ggactcttgt tccaaactgg aacaacactc
4681 aaccctatct cgggtctattc ttttgattta taagggatth tgccgatttc ggcctattgg
4741 ttaaaaaatg agctgattta acaaaaaattt aacgcgaatt ttaacaaaat attaacgctt
4801 acaatthtagg tggcactttt cggggaaatg tgcgcggaac ccctatthtg ttatthttct
4861 aaatacattc aaatatgtat ccgctcatga gacaataacc ctgataaatg cttcaataat
4921 attgaaaaag gaagagtatg agtattcaac atthccgtgt cgccttatt ccctthtttg
4981 cggcattthtg cthtctgtt tttgctcacc cagaaacgct ggtgaaagta aaagatgctg
5041 aagatcagtt ggggtgcacga gtgggttaca tcgaactgga tctcaacagc ggtaagatcc
5101 ttgagagtht tcgccccgaa gaacgthttc caatgatgag cactthttaa gttctgctat
5161 gtggcgcggt attatcccggt attgacgcgg gcaagagca actcggtcgc cgcatacact
5221 attctcagaa tgactthggtt gagtactcac cagtacaga aaagcatctt acggatggca
5281 tgacagtaag agaattatgc agtgctgcca taaccatgag tgataacact gcggccaact
5341 tactthctgac aacgatcggg ggaccgaagg agctaaccgc thttthgac aacatggggg
5401 atcatgtaac tcgccttgat cgtthgggaa cggagctgaa tgaagcata ccaaacgacg
5461 agcgtgacac cacgatgcct gtagcaatgg caacaacggt gcgcaacta ttaactggcg
5521 aactacttac tctagcttcc cggcaacaat taatagactg gatggaggcg gataaagthg
5581 caggaccact tctgcgctcg gcccttccgg ctggctggtt tattgctgat aaatctggag
5641 ccggtgagcg tgggtctcgc ggtatcattg cagcactggg gccagatggt aagccctccc
5701 gtatcgtagt tatctacacg acggggagtc aggcaactat ggatgacga aatagacaga
5761 tcgctgagat aggtgcctca ctgattaagc atthgtaact gtcagaccaa gthtctcat
5821 atatacttha gattgattta aaacttcat thtaatttaa aaggatctag gtgaagatcc
5881 thttthgataa tctcatgacc aaaatccctt aacgtgagtt thcgttccac tgagcgtcag
5941 acccgtaga aaagatcaaa ggatcttctt gagatcttth thttctgccc gtaatctgct
6001 gcttgcaaac aaaaaaacca ccgctaccag cggthgthtg thtgccgat caagagctac
6061 caactcttht tccgaaggta actggcttca gcagagcgca gataccaaat actgthcttc
6121 tagtgtagcc gtagthtaggc caccacttca agaactctgt agcaccgctt acatacctcg
6181 ctctgctaath cctgthtacc gtggctgctg ccagthggca taagthctgt ctthaccgggt
6241 tggactcaag acgatagtht ccggataagg cgcagcgtc gggctgaaac ggggthctgt
6301 gcacacagcc cagctthggag cgaacgacct acaccgaact gagataccta cagcgtgagc
6361 tatgagaaaag cgcacgctt cccgaaggga gaaaggcgga cagthtccg gtaagcggca
6421 gggthggaaac aggagagcgc acgagggagc thccaggggg aaacgcctgg thtctthata
6481 gthctgthcgg gthtgcacc ctctgacttg agcgtcgtat thtgthgagc thcgtcagggg
6541 ggcggagcct atggaaaaac gccagcaacg cggctthttt acgthtctg gctthttgct
6601 ggcctthttg thcatgtht thtctgctg thtccctga thctgthgat aaccgtatta
6661 ccgctthttg gtgagctgat accgctcgc gcagccgaa gaccgagcgc agcagthcag
6721 tgagcgagga agcggaaagag cgcaccaata gcaaaccgct thtccccgcg cgtthggcga
6781 thcatthaatg cagctggcac gacagthttc ccgactggaa agcgggcagt gagcgaacg
6841 caatthaatgt gagthtagct actcattagg caccacaggc thtacttht atgctthccgg
6901 thcgtatgth gtgtggaath gtgagcggat acaatthtca cacaggaaac agctatgacc
6961 atgattaacg caagcgcgca atthaacctc actaaaggga acaaaagctg gagctgcaag
7021 c

```

10

20

30

【 0 1 4 1 】

ゲノムスケールマウスT細胞CRISPRライブラリクローニング: 2つのサブライブラリ (mGeCKOaおよびmGeCKOb)における、オリジナルのマウスCRISPRノックアウトライブラリは、Sanjana et al., Nat Methods 11, 783-784 (2014)からのものであった。mGeCKOaおよびmGeCKObを、Gibsonアセンブリおよびエレクトロポレーションにより等モルでT細胞CRISPRベクターにサブクローニングして、1,000個の非ターゲット対照 (NTC) を含む計129,209個のsgRNAを有する、ゲノムスケールマウスT細胞CRISPRライブラリ (MKO) を作製した。エレクトロポレーションでは50倍超 (およそ 7×10^6 個の総コロニー) のライブラリ推定カバレッジが達成された。その後、ライブラリをIllumina配列決定により配列検証した。ライブラリ全体をクローニングした固有のsgRNAの少なくとも94.1% (121,608/129,209) がマウスゲノム内の全てのタンパク質コード遺伝子およびマイクロRNAの98.3% (22,375/22,768) を標的にし、厳密な対数正規分布が設計された全てのsgRNAの大部分に当たっていた (2桁以内で90%、3桁以内で99%)。

40

【 0 1 4 2 】

ウイルスライブラリ作製: MKOライブラリプラスミドを、15 cm組織培養プレート中80%の集密度で低継代HEK293FT細胞にトランスフェクトした。ウイルス上清をトランスフェクション後48時間および72時間の時点で収集し、0.45 μmのろ過ユニット (Fisher/VWR) を介してろ過し、AmiconUltra 100 kD超遠心ユニット (Millipore) を用いて濃縮し、分注し、使用するまで-80 °C中で貯蔵した。空のベクターに対するウイルスも同様の方法で産生

50

された。

【0143】

T細胞の単離および培養：脾臓および腸間膜リンパ節(mLN)を表示されたさまざまなマウス系統から単離し、氷冷2% FBS [FBS (Sigma) + RPMI-1640 (Lonza)]中に入れた。臓器は、100 μmのフィルタを通して臓器をつぶすことにより調製された。リンパ球を2% FBSに懸濁した。脾臓あたり1 mlのACK溶解緩衝液(Lonza)でRBCを溶解し、室温で2分間インキュベートし、2% FBSで洗浄した。リンパ球を、40 μmフィルタを通してろ過し、MACS緩衝液(PBS + 0.5% BSA + 2 μM EDTA)で再懸濁した。Miltenyiにより確立されたプロトコールおよびキットを用いて、ナイーブCD8⁺ T細胞を単離した。ナイーブCD8⁺ T細胞をcRPMI (RPMI-1640 + 10% FBS + 2 mM L-グルタミン + 100U Pen/Strep (Fisher) + 49 nM β-メルカプトエタノール(Sigma))で1 × 10⁶個の細胞/mlの終濃度に再懸濁した。インビボ実験用の培地には、2 ng/ml IL-2 + 2.5 ng/ml IL-7 + 50 ng/ml IL-15 + 1 μg/ml 抗CD28を補充した。インビトロ実験用の培地には、2 ng/ml IL-2 + 2 ng/ml IL-12p70 + 1 μg/ml 抗CD28を補充した。5 μg/ml 抗CD3で前処理したプレートにて細胞を培養し、37 °Cでインキュベートした。さまざまなサイトカインおよび抗体は、BD, BiolegendおよびeBiosciencesから購入した。

10

【0144】

T細胞形質導入、ウイルス力価測定：濃縮ウイルスを培地に直接添加することにより、単離直後に培養液中でT細胞を感染させた。感染3日後に、T細胞をThy1.1発現について染色し、FACSにて分析した。ウイルス力価は、使用したウイルスの体積で割った総T細胞に対して正規化されたThy1.1⁺ T細胞の数により各バッチについて判定された。ウイルス力価を判定するために、実験的重複のある少なくとも3用量のウイルスを用いた。

20

【0145】

抗体およびフローサイトメトリー：CD8⁺ T細胞の感染性は、抗CD3 APC、抗CD8 FITC、および抗Thy1.1 PEでの表面染色により評価された。実験において用いられたBiolegend抗体は、抗CD3 PE/Cy7、抗CD8 APC、抗CD16/32、CD62L PE、CD107a PE、抗グランザイムA PE、抗SIINFEKL:H-2K^b PE、および抗Thy1.1 PEを含む。抗ヒト/マウスDhX37/Dhx37はNovus Biologicalsから購入された。抗ウサギIgG AF594は、cell signalingから購入された。表面染色の場合、細胞を氷上で30分間染色した。サンプルを、3台のレーザーを備えたBD FACSAria細胞選別機にて収集し、MAC(登録商標)ワークステーションにてFlowJoソフトウェア9.9.4 (Treestar, Ashland, OR)を用い分析した。

30

【0146】

T細胞のライブラリスケールウイルス形質導入：T細胞は、本明細書において記述されるように単離および培養された。ウイルス力価情報を用いると、感染反復実験ごとに、計1 × 10⁸超のCas9またはナイーブOT-I; Cas9 CD8⁺ T細胞に、上記のMKOライブラリを含む濃縮レンチウイルスにより1のMOIで形質導入して、700 × 超の初期ライブラリカバレッジを達成した。空のベクターを含むウイルスによる形質導入は、計1 × 10⁷超のナイーブCD8⁺ T細胞により並行して実施された。がん細胞スクリーニングとは異なり、初代細胞でのプールスクリーニングでは、多くの場合、これらの細胞において十分なオンターゲット効率に到達するのに十分な感染力が必要であるため、比較的高いMOIを用いる(Chen et al., (2014) Immunity 41, 325-338; Zhou et al., (2014) Nature 506, 52-57)。複数の計算戦略を用いて、遺伝子の定量的なランク付けリストを作製し、独立した感染反復実験、異なるマウス、独立したスクリーニング、異なるTCR、および独立したsgRNAの使用を含む、強力な選択により、誤関連付けまたは偽陽性と潜在的な真のヒットを区別した。各実験では、特に明記しない限り、T細胞ライブラリの作製のために3回の感染反復実験が適用された。

40

【0147】

ウイルスライブラリ感染T細胞の養子移入および組織処理：培養0日目に、ナイーブCD8⁺ T細胞にレンチウイルスMKOライブラリを感染させ、これを37 °Cで3日間インキュベートした。培養3日目に、T細胞を収集し、氷冷PBSで洗浄し、終濃度5 × 10⁷個の細胞/mlに再懸濁した。1 × 10⁷個の細胞を各マウスに静脈内注射した。C57BL/6 (B6)、B6.129、B6.129.Fvb、

50

Cas9、またはRag1^{-/-}マウスを各実験においてレシピエントマウスとして用いた。本研究における養子細胞移入実験は全て、特に明記しない限り、リンパ球除去なしで行われた。移入後7日目に、マウスを殺処理し、関連臓器を単離した。皮膚流入領域リンパ節は、鼠径リンパ節、膝窩リンパ節、腋窩リンパ節、および上腕リンパ節から構成されていた。単離された頸部リンパ節は、6つの表在性頸部リンパ節を伴っていた。腹部リンパ節は腸間膜リンパ節および脾リンパ節を含んでいた。単離された他の関連臓器は、脾臓、肝臓、膵臓、肺、筋肉および脳であった。

【 0 1 4 8 】

新抗原発現ベクター (mCherry-cOVA発現ベクター) の作製: Gibson Assemblyを介してmCherryレンチウイルスベクターにcOVAをサブクローニングすることにより、レンチウイルス mCherry-cOVA (mCh-cOVA) ベクターであるレンチ-pLKO-U6-sg(BsmBI)-EFS-mCherry-2A-cOVAを作製した。

10

【 0 1 4 9 】

pMD02: レンチ-pLKO-U6-sgBsmBI-EFS-mCherry-2A-cOVA (SEQ ID NO: 129,216):

1 ttaatgtagt cttatgcaat actctttagt tcttgcaaca tggtaacgat gagttagcaa
 61 catgccttac aaggagagaa aaagcaccgt gcatgccgat tggtggaagt aaggtggtac
 121 gatcgtgcct tattaggaag gcaacagacg ggtctgacat ggattggacg aaccactgaa
 181 ttgccgcatt gcagagatat tgtatttaag tgectagctc gatacataaa cgggtctctc
 241 tggttagacc agatctgagc ctgggagctc tctggctaac tagggaaccc actgcttaag
 301 cctcaataaa gcttgcccttg agtgcttcaa gtagtgtgtg cccgtctgtt gtgtgactct
 361 ggtaactaga gatccctcag acccttttag tcagtgtgga aaatctctag cagtggcgcc
 421 cgaacagga cttgaaagcg aaagggaaac cagaggagct ctctcgacgc aggactcggc
 481 ttgctgaagc gcgcacggca agaggcgagg ggcggcact ggtgagtacg ccaaaaatth
 541 tgactagcgg aggctagaag gagagagatg ggtgcgagag cgtcagtatt aagcggggga
 601 gaattagatc gcgatgggaa aaaattcggg taaggccagg gggaaagaaa aaatataaat
 661 taaaacatat agtatgggca agcagggagc tagaacgatt cgcagttaat cctggcctgt
 721 tagaaacatc agaaggctgt agacaaatac tgggacagct acaaccatcc cttcagacag
 781 gatcagaaga acttagatca ttatataata cagtagcaac cctctattgt gtgcatcaaa
 841 ggatagagat aaaagacacc aaggaagctt tagacaagat agaggaagag caaaaacaaa
 901 gtaagaccac cgcacagcaa gcggccgctg atcttcagac ctggaggagg agatatgagg
 961 gacaattgga gaagtgaatt atataaatat aaagtagtaa aaattgaacc attaggagta
 1021 gcacccacca aggcaaagag aagagtgggtg cagagagaaa aaagagcagt gggaaatagga
 1081 gctttgttcc ttgggttctt gggagcagca ggaagcacta tgggcgcagc gtcaatgacg
 1141 ctgacggtac aggccagaca attattgtct ggtatagtgc agcagcagaa caatttgctg
 1201 agggctattg aggcgcaaca gcatctgttg caactcacag tctggggcat caagcagctc
 1261 caggcaagaa tcttgctgtg gaaagatac ctaaaggatc aacagctcct ggggatttgg
 1321 ggttgcctctg gaaaactcat ttgcaccact gctgtgcctt ggaatgctag ttggagtaat
 1381 aaatctctgg aacagatttg gaatcacacg acctggatgg agtgggacag agaaattaac
 1441 aattacacaa gcttaataca ctcttaatt gaagaatcg aaaaccagca agaaaagaat
 1501 gaacaagaat tattggaatt agataaatgg gcaagtttgt ggaattgggt taacataaca
 1561 aattggctgt ggtatataaa attattcata atgatagtag gaggcttggg aggtttaaga
 1621 atagtttttg ctgtactttc tatagtgaat agagttaggc agggataatc accattatcg
 1681 tttcagaccc acctcccaac cccgagggga cccagagagg gcctatttcc catgatctct
 1741 tcatatttgc atatacgata caaggctgtt agagagataa ttagaattaa tttgactgta
 1801 aacacaaaga tattagtaca aaatacgtga cgtagaaagt aataatttct tgggtagttt
 1861 gcagttttaa aattatgttt taaaatggac tatcatatgc ttaccgtaac ttgaaagtat
 1921 ttcgatttct tggctttata tatcttGTGG AAAGGACGAA ACACCgGAGA CGGaCGTCTC
 1981 tgttttagag ctaGAAAtag caagttaaaa taaggctagt ccgttatcaa cttgaaaaag
 2041 tggcaccgag tcgggtgcTTT TTTaagcttg gcgtaactag atcttgagac aaatggcagt
 2101 attcatccac aatttttaaaa gaaaaggggg gattgggggg tacagtgcag gggaaagaat
 2161 agtagacata atagcaacag acatacaaac taaagaatta caaaaacaaa ttacaaaaat
 2221 tcaaaattht cgggttttatt acagggacag cagagatcca ctttggcgcc ggctcgaggg
 2281 ggcccgggtg caaagatgga taaagtttta aacagagagg aatctttgca gctaattggc
 2341 cttctaggtc ttgaaaggag tgggaattgg ctccgggtgc cgtcagtggg cagagcgcac
 2401 atcgcccaca gtccccgaga agttgggggg aggggtcggc aattgatccg gtgcctagag
 2461 aaggtggcgc ggggtaaaact gggaaagtga tgcgtgtac tggctccgcc tttttccga
 2521 ggggtggggga gaaccgtata taagtgcagt agtcgccgtg aacgttcttt ttcgcaacgg
 2581 gtttgccgcc agaacacagc taagtgcctg gtgtggttcc cgcgggcctg gctctttac
 2641 gggttatggc ccttgcgtgc cttgaattac ttccactggc tgcagtaagt gattcttgat
 2701 cccgagcttc gggttggaag tgggtgggag agttcgaggc cttgcgctta aggagccct
 2761 tcgcctcgtg cttgagttga ggctggcct gggcgtggg gccgccgct gcgaatctgg
 2821 tggcaccttc gcgcctgtct cgctgctttc gataagctct tagccattta aaatttttga

10

20

30

2881 tgacctgctg cgacgctttt tttctggcaa gatagtcttg taaatgcggg ccaagatctg
2941 cacactggta tttcggtttt tggggccgcg ggcggcgacg gggcccgtgc gtcccagcgc
3001 acatgttcgg cgaggcgggg cctgcgagcg eggccaccga gaatcggacg ggggtagtct
3061 caagctggcc ggectgctct ggtgcctggc ctegcgcgcg cgtgtatcgc cccgcccctgg
3121 gcggcaagcg tggcccggtc ggcaccagtt gcgtgagcgg aaagatggcc gcttcccggc
3181 cctgctgcag ggagctcaaa atggaggacg cggcgctcgg gagagcgggc gggtgagtca
3241 cccacacaaa ggaaaagggc ctttccgtcc tcagccgtcg cttcatgtga ctccacggag
3301 taccgggcgc cgtccaggca cctcgattag ttctcgagct ttggagtag gtcgtcttta
3361 ggttgggggg aggggtttta tgcgatggag tttcccaca ctgagtgggt ggagactgaa
3421 gttaggccag cttggcaact gatgtaattc tccttggaa ttgccctttt tgagtttggg
3481 tcttggttca ttctcaagcc tcagacagtg gttcaaagt tttttcttcc atttcaggtg
3541 tcgtgacgta cggccaccat gGTGAGCAAG GCGAGGAGG ATAACATGGC CATCATCAAG
3601 GAGTTCATGC GCTTCAAGGT GCACATGGAG GGCTCCGTGA ACGGCCACGA GTTCGAGATC
3661 GAGGGCGAGG GCGAGGGCCG CCCCTACGAG GGCACCCAGA CCGCCAAGCT GAAGGTGACC
3721 AAGGGTGGCC CCCTGCCCTT CGCCTGGGAC ATCCTGTCCC CTCAGTTCAT GTACGGCTCC
3781 AAGGCCTACG TGAAGCACCC CGCCGACATC CCCGACTACT TGAAGCTGTC CTTCCCCGAG
3841 GGCTTCAAGT GGGAGCGCGT GATGAACTT GAGGACGGCG GCGTGGTGAC CGTGACCCAG
3901 GACTCTCCC TGCAGGACGG CGAGTTCATC TACAAGGTGA AGCTGCGCGG CACCAACTTC
3961 CCTCCGCTCC GCCCCGTAAT GCAGAAGAAG ACCATGGGCT GGGAGGCCTC CTCGAGCCGG
4021 ATGTACCCCG AGGACGGCGC CCTGAAGGGC GAGATCAAGC AGAGGCTGAA GCTGAAGGAC
4081 GCGGCCACT ACGACGCTGA GGTCAAGACC ACCTACAAG CCAAGAAGCC CGTGCAGCTG
4141 CCCGGCGCCT ACAACGTCAA CATCAAGTTG GACATCACCT CCCACAACGA GGACTACACC
4201 ATCGTGGAAC AGTACGAACG CGCCGAGGGC CGCCACTCCA CCGGCGGCAT GGACGAGCTG
4261 TACAAGGGCA GTGGAGAGGG CAGAGGAAGT CTGCTAACAT GCGGTGACGT CGAGGAGAAT
4321 CCTGGCCCAA TGGGCTCCAT CGGCGCAGCA AGCATGGAAT TTTGTTTTGA TGTATTCAAG
4381 GAGCTCATCA ATTCTGGGT AGAAAGTCAG ACAAATGGAA TTATCAGAAA TGTCTTCAG
4441 CCAAGCTCCG TGGATTCTCA AACTGCAATG GTTCTGGTTA ATGCCATTGT CTTCAAAGGA
4501 CTGTGGGAGA AAACATTTAA GGATGAAGAC ACACAAGCAA TGCCTTTCAG AGTGACTGAG
4561 CAAGAAAGCA AACCTGTGCA GATGATGTAC CAGATTGGTT TATTTAGAGT GGCATCAATG
4621 GCTTCTGAGA AAATGAAGAT CCTGGAGCTT CCATTTGCCA GTGGGACAAT GAGCATTTTG
4681 TTGCTGTTGC CTGATGAAGT CTCAGGCCTT GAGCAGCTTG AGAGTATAAT CAACTTTGAA
4741 AACTGACTG AATGGACCAG TTCTAATGTT ATGGAAGAGA GGAAGATCAA AGTGTACTTA
4801 CCTCGCATGA AGATGGAGGA AAAATACAAC CTCACATCTG TCTTAATGGC TATGGGCATT
4861 ACTGACGTGT TTAGCTCTTC AGCCAATCTG TCTGGCATCT CCTCAGCAGA GAGCCTGAAG
4921 ATATCTCAAG CTGTCCATGC AGCACATGCA GAAATCAATG AAGCAGGCAG AGAGGTGGTA
4981 GGGTCAGCAG AGGCTGGAGT GGATGCTGCA AGCGTCTCTG AAGAATTTAG GGCTGACCAT
5041 CCATTCTCT TCTGTATCAA GCACATCGCA ACCAACGCCG TTCTCTTCTT TGGCAGATGT
5101 GTTTCCCTT AAacgcgtta agtcgacaat caacctctgg attacaaaat ttgtgaaaga
5161 ttgactggta ttcttaacta tgttgctcct tttacgctat gtggatacgc tgctttaatg
5221 cctttgtate atgctattgc tteccgtatg gctttcattt tctcctcctt gtataaatcc
5281 tggttgetgt ctctttatga ggagttgtgg ccegttgtea ggcaacgtgg cgtggtgtgc
5341 actgtgtttg ctgacgcaac ccccactggt tggggcattg ccaccacctg tcagctcctt
5401 tccgggactt tegetttccc cctccttatt gccacggcgg aactcatcgc cgctgcctt
5461 gcccgtgct ggacaggggc teggctgttg ggcactgaca attccgtggt gttgtcgggg
5521 aatcatcgt cctttccttg gctgctcgcc tgtgttgcca cctggattct gcgcgggacg
5581 tccttctgct acgtcccctc ggccctcaat ccagcggacc ttcttcccg cggcctgctg
5641 ccggetctgc ggectcttcc gegtcttgc cttegcctc agacgagtcg gatctcctt
5701 tgggcccgcct ccccgctcgc actttaagac caatgactta caaggcagct gtagatctta
5761 gccacttttt aaaagaaaag gggggactgg aagggtctaat tcactccca cgaagacaag
5821 atctgctttt tgcttgctact gggctctctct ggtagacca gatctgagcc tgggagctct
5881 ctggctaact agggaaacca ctgcttaagc ctcaataaag cttgccttga gtgcttcaag
5941 tagtgtgtgc ccgtctgttg tgtgactctg gtaactagag atccctcaga cccttttagt
6001 cagtgtggaa aatctctagc agtacgtata gtagttcatg tcactcttatt attcagtatt
6061 tataacttgc aaagaaatga atatcagaga gtgagaggaa cttgtttatt gcagcttata
6121 atggttacia ataaagcaat agcatcacia atttcacia taaagcattt ttttcaactgc
6181 attctagttg tggtttgtcc aaactcatca atgtatctta tcatgtctgg ctctagctat
6241 cccgccccta actccgccc aactccccc aactccccc agtccgccc attctccgce

10

20

30

40


```

6301 ccatggctga ctaatTTTTT ttatttatgc agaggccgag gccgcctcgg cctctgagct
6361 attccagaag tagtgaggag gctTTTTTgg aggcctaggg acgtacccaa ttcgccctat
6421 agtgagtcgt attacgcgcg ctcaactggc gtcgTTTTac aacgtcgtga ctgggaaaac
6481 cctggcgTTa cccaactTaa tcgccttgca gcacatcccc ctttcgccag ctggcgTaat
6541 agcgaagagg cccgcaccga tcgcccttcc caacagttgc gcagcctgaa tggcgaatgg
6601 gacgcgcctt gtagecggcgc attaagcgcg gccgggtgtg tggttacgcg cagcgtgacc
6661 gctacacttg ccagcgcctt agcgcgccgt cctttcgctt tcttcccttc ctttctcgcc
6721 acgttcgcgc gctttccccc tcaagctcta aatcgggggc tcccttagg gttccgattt
6781 agtgctttac ggcacctcga cccccaaaaa cttgattagg gtgatggTtc acgtagtggg
6841 ccatcgccct gatagacggT ttttcgccct ttgaecgttg agtccacgtt ctttaaatagt
6901 ggactcttgt tccaaactgg aacaacactc aaccctatct cggTctattc ttttgattta
6961 taagggattt tgccgatttc ggcctattgg ttaaaaaatg agctgattta acaaaaattt
7021 aacgcgaatt ttaacaaaat attaacgctt acaatttagg tggcactttt cggggaaatg
7081 tgcgcggaac ccctatTTTgt ttatttttct aaatacattc aaatagtat ccgctcatga
7141 gacaataacc ctgataaatg cttcaataat attgaaaaag gaagagtatg agtattcaac
7201 atttccgTgt cgcccttatt ccctTTTTTg cggcattttg ccttccTgtt tttgctcacc
7261 cagaaacgct ggtgaaagta aaagatgctg aagatcagtt gggTgcacga gtgggtTaca
7321 tcgaactgga tctcaacagc ggtaagatcc ttgagagttt tcgccccgaa gaacgttttc
7381 caatgatgag cactttTtaa gttctgctat gtggcgggtt attatcccgt attgacgcgcg
7441 ggcaagagca actcggTcgc cgcatacact attctcagaa tgacttggtt gactactcac
7501 cagtcacaga aaagcatctt acggatggca tgacagtaag agaattatgc agtgcTgcca
7561 taaccatgag tgataacact gggcccaact tacttctgac aacgatcggg ggaccgaagg
7621 agctaaccgc ttttttgca ccaatggggg atcatgtaac tcgcttgat cgttgggaaac
7681 cggagctgaa tgaagccata ccaaacgacg agcgtgacac cacgatgcct gtagcaatgg
7741 caacaacgTt gcgcaacta ttaactggcg aactacttac tctagcttcc cggcaacaat
7801 taatagactg gatggaggcg gataaagttg caggaccact tctgcgctcg gcccttccgg
7861 ctggctggtt tattgctgat aaatctggag ccggtgagcg tgggtctcgc ggtatcattg
7921 cagcactggg gccagatggt aagccctccc gtatcgtagt tatctacacg acggggagtc
7981 aggcaactat ggatgaacga aatagacaga tcgctgagat aggtgcctca ctgattaagc
8041 attggtaact gtcagaccaa gtttactcat atatacttta gattgattta aaacttcatt
8101 tttaatTTaa aaggatctag gtgaagatcc tttttgataa tctcatgacc aaaatccctt
8161 aacgtgagtt ttcgTtccac tgagcgtcag accccgtaga aaagatcaa ggaacttctt
8221 gagatccttt tttctgCgc gtaatctgct ccttgcaaac aaaaaacca ccgctaccag
8281 cggTggtttg tttgcgggat caagagctac caactctttt tccgaaggta actggcttca
8341 gcagagcgca gataccaaat actgttcttc tagttagacc gtagttaggc caccacttca
8401 agaactctgt agcaccgcct acatacctcg ctctgctaat cctgttacca gtggctgctg
8461 ccagtggcga taagtcgtgt cttaccgggt tggactcaag acgatagtta ccggataagg
8521 cgcagcggTc gggctgaacg gggggTtctg gcacacagcc cagcttgag cgaacgacct
8581 acaccgaact gagataccta cagcgtgagc tatgagaaag cgccacgctt cccgaaggga
8641 gaaaggcgga caggtatccg gtaagcggca gggTcggaac aggagagcgc acgaggggagc
8701 ttccaggggg aaacgcctgg tatctttata gtectgtcgg gtttcgccac ctctgacttg
8761 agcgtcgatt tttgtgatgc tcgtcagggg ggccggagcct atggaaaaac gccagcaacg
8821 cggcctTTTT acggttccTg gccttttTgt ggccctttgc tcaatgttc tttcctgctg
8881 tatccccTga ttctgtggat aaccgtatta ccgcctttga gtgagctgat accgctcgcc
8941 gcagccgaac gaccgagcgc agcagTcag tgagcgagga agcggaaag cgccaatac
9001 ccaaacgcgc tctccccgcg cgttgccga ttcattaatg cagctggcac gacaggttct
9061 ccgactggaa agcgggcagt gagecgaacg caattaatgt gagttagctc actcattagg
9121 caccccagge tttacacttt atgcttccgg ctggtatgTt gtgtggaatt gtgagcggat
9181 aacaatttca cacaggaaac agctatgacc atgattacgc caagcgcgca attaaccttc
9241 actaaaggga acaaaagctg gagctgcaag c

```

【 0 1 5 0 】

安定にトランスフェクトされたmCherry-cOVA発現細胞株の作製：E0771ネズミ乳がん細胞にmCh-cOVA発現レンチウイルスを形質導入した。形質導入後3日後に、細胞を10個の細胞/mlに再懸濁し、各ウェル中で細胞懸濁液100 μlを培養することにより、形質導入されたE0771細胞を96ウェルプレート中で個別に培養した。2週間後、クローン性mCh⁺ E0771クローンを蛍光顕微鏡により同定した。mCh⁺ E0771クローンを樹立された抗マウス[SIINFEKLに結合したH-2K^b]抗体(Porgador et al., Immunity 6, 715-726 (1997))で染色して、cOVA発現を判定した。cOVA発現に基づいて、異なるmCh⁺cOVA⁺クローンを選択した。E0771細胞に、さまざまな濃度のSIINFEKLペプチドを37 °Cで4時間パルスし、その後、本明細書の他の箇所に記述されている樹立された抗体で染色した。mCh⁺cOVA⁺ E0771クローンをSIINFEKLパルス細胞と比較した。クローン3は、cOVAの発現が低く均一であるため、より強い表現型を有する遺伝子を選択するため、インビボ実験に選択された。さらに、マウス肺がん

細胞株を形質導入することによりLCC-mChcOVA細胞株が作製された。

【0151】

Rag1^{-/-}マウスへのがん細胞の移植および組織処理：5 × 10⁶個のmCh⁺cOVA⁺ E0771細胞を、Rag1^{-/-}マウスの乳房内脂肪体にまたは皮下に注射した。移植10日後に、ウイルスライブラリに感染したT細胞を、腫瘍担持Rag1^{-/-}マウスに静脈内注射した。7日後、流入領域リンパ節、非流入領域リンパ節、脾臓、肺、および腫瘍を単離した。DNA抽出またはFACS分析用にサンプルを調製した。

【0152】

脾臓およびリンパ節は、本明細書の他の箇所に記述されているように調製された。腫瘍はレンズ豆のサイズほどの、小さな断片に分解された。次に、MiltenyiのGentleMacs Octo解離器を用いて腫瘍を1 μg/mlのコラゲナーゼIVで30分間解離させ、細胞懸濁液を染色前に100 μmフィルタに2回通した。

【0153】

ゲノムスケールCRISPRスクリーニングおよび検証での脱顆粒(殺滅)アッセイ法：E0771細胞にさまざまな濃度のSIINFEKLペプチドを37 °Cで4時間パルスすることによって実験をまず最適化し、その後、抗マウス[SIINFEKL : H-2K^b]抗体で染色し、フローサイトメトリーによって分析した。1 ng/mlの用量は、抗(SIINFEKL : H-2K^b)によって検出されず試験された最大濃度に相当するために選択された。ナイーブOT-I; Cas9 CD8⁺ T細胞を単離し、本明細書において記述されるMKOレンチウイルスライブラリで形質導入した。感染したOT-I; Cas9 CD8⁺ T細胞を、2 ng/ml IL-2 + 2 ng/ml IL-12p70 + 1 μg/ml 抗CD28を補充したcRPMI中5 μg/mlの抗CD3 で前処理したプレートにて6日間インキュベートした。アッセイの12時間前に、感染したOT-I; Cas9 CD8⁺ T細胞を2 ng/ml IL-2 + 2 ng/ml IL-12p70の存在下で未処理プレートにてインキュベートし、細胞を休止させた。6日目、アッセイの12時間前に、1 × 10⁷個のE0771細胞をまた、D10培地(DMEM + 10% FBS + 100U Pen/Strep)中で10 cmプレートにプレATINGした。翌日、E0771細胞を、0または1 ng/ml SIINFEKLペプチドを補充した加温D10培地とともに4時間インキュベートした。一方、感染したOT-I; Cas9 CD8⁺ T細胞をcRPMI + 2 nMモネンシン + 抗CD107a PE抗体とともに終濃度1 × 10⁶個の細胞/mlに再懸濁し、T細胞:播種がん細胞比 = 1:1でE0771細胞に添加した。細胞を37 °Cで2時間共インキュベートした。細胞を次に、氷上で30分間抗CD8 APCにより染色し、細胞をBD FACSAriaにより選別した。計1 × 10⁷個のT細胞を分析し、上位5%のCD107a⁺細胞を選別し、ゲノムDNA抽出、CRISPRライブラリの読み出し、およびスクリーニングデータ分析に供した。計3回の生物学的反復実験を実施した。

【0154】

検証実験では、T細胞と播種がん細胞の比率 = 1:1を維持しながら、T細胞とE0771細胞の両方をそれに応じて縮小した。手短に言えば、細胞を感染させ、37 °Cで7日間培養した。6日目に、T細胞を終夜休止させ、E0771細胞を12ウェルプレート中に5 × 10⁵個の細胞/ml/ウェルでプレATINGした。次に、E0771細胞をD10培地中10 ng/mlのSIINFEKLとともに4時間インキュベートした。5 × 10⁵個のOT-I; Cas9 CD8⁺ T細胞をパルスE0771細胞に添加した。共培養中に、IL-2、IL-12、抗CD107a-PE (1 : 400)、およびモネンシンを添加した。2時間のインキュベーション後、細胞を単離し、染色し、フローサイトメトリーにか

【0155】

細胞およびマウス組織からのゲノムDNA抽出：gDNA抽出の場合、3つの方法を用いた。方法1：総数1 × 10⁵個以下の細胞を有するサンプルの場合、QuickExtract溶液(Epicentre) 100 μlを細胞に直接添加し、細胞ペレットが完全に溶解するまで65 °Cで30~60分間インキュベートした。方法2：総数1 × 10⁵~2 × 10⁶個の細胞を有する細胞サンプル、またはマウスリンパ節由来の組織サンプルの場合、製造元のプロトコールにしたがってサンプルをQIAamp Fast DNA Tissue Kit (Qiagen)に供した。方法3：総数2 × 10⁶個超の細胞を有する細胞サンプル、または脾臓、肺、肝臓、脳、膵臓、結腸、もしくは腫瘍サンプルのようなマウス臓器由来の組織サンプルの場合、カスタムPuregeneプロトコールを用いた。

10

20

30

40

50

【 0 1 5 6 】

手短に言えば、凍結粉碎した組織50~200 mgを15 mlコニカルチューブ中の溶解緩衝液(50 mM Tris、50 mM EDTA、1% SDS、pH 8) 6 mlに再懸濁し、20 mg/mlのプロテイナーゼK (Qiagen) 30 μ lを組織/細胞サンプルに添加し、55 で終夜インキュベートした。翌日、10 mg/ml RNアーゼ A (Qiagen) 30 μ lを、溶解したサンプルに添加し、これを次に、25回反転させ、37 で30分間インキュベートした。サンプルを氷上で冷却した後、予冷した7.5 M酢酸アンモニウム(Sigma) 2 mlを添加してタンパク質を沈殿させた。サンプルを高速で20秒間ボルテックスし、その後、4,000 \times g以上で10分間遠心分離した。次に、各チューブに固いペレットが見えたら、上清を慎重に新たな15 mlコニカルチューブの中に静かに移した。次に、100%イソプロパノール6 mlをチューブに添加し、50回反転させ、4,000 \times g以上で10分間遠心分離した。ゲノムDNAは、各チューブ中に小さな白色のペレットとして見えた。上清を捨て、新たに調製された70%エタノール6 mlを添加し、チューブを10回反転させ、その後、4,000 \times g以上で1分間遠心分離した。上清を注いで捨てた。チューブを短時間回転させ、P200ピペットを用いて残存するエタノールを除去した。10~30分間風乾した後、DNAの外観は乳白色のペレットからわずかに半透明に変化した。次に、ddH₂O 500 μ lを添加し、チューブを65 で1時間および室温で終夜インキュベートして、DNAを完全に再懸濁させた。翌日、gDNAサンプルを短時間ボルテックスした。Nanodrop (Thermo Scientific)を用いてgDNA濃度を測定した。

10

【 0 1 5 7 】

ディープシーケンシングによるsgRNAライブラリの読み出し：sgRNAライブラリの読み出しは、2段階PCR戦略を用いて実施し、ここでは、第1のPCRではライブラリの複雑さを完全に保持するのに十分なゲノムDNAを含み、第2のPCRでは最初のPCRからの産物に適切な配列決定アダプタを加える。

20

【 0 1 5 8 】

PCR#1の場合、sgRNAカセットを含む領域は、T細胞CRISPRベクターに特異的なプライマーを用いて増幅された。

フォワード CCGAGGGGACCCAGAGAG (SEQ ID NO: 129,211)

リバース CAATCCCCTCTTTCAAGAC (SEQ ID NO:129,212)

【 0 1 5 9 】

PCRは、Phusion Flash High Fidelity Master Mix (PF)またはDreamTaq Green PCR Master Mix (DT) (ThermoFisher)を用いて実施された。PCR#1における、PFを用いた反応の場合、サーモサイクリングパラメータは、98 で2分間、18~24サイクル(98 で1秒間、62 で5秒間、72 で30秒間)、および72 で2分間であった。DTを用いた反応の場合、製造元のプロトコールにしたがってサーモサイクリングパラメータを調整した。各PCR#1反応では、総gDNA 3 μ gを用いた。サンプルごとに、適切な数のPCR#1反応を用いて、スクリーンの完全増幅(full representation)の捕捉を行った。例えば、129,209 MKO sgRNAライブラリのおよそ200倍のカバレッジで、 2.5×10^7 個の細胞からのgDNAを用いた。細胞あたり6.6 pgのgDNAを想定すると、サンプルあたりおよそ160 μ gのgDNAが、およそ50回のPCR#1反応において(反応あたりおよそ3 μ gのgDNAで)用いられた。

30

40

【 0 1 6 0 】

各生体サンプルのPCR#1産物をプールし、バーコードを付けた第2のPCRプライマーによる増幅に用いた。サンプルごとに、PCR#2反応あたり2 μ lのプールされたPCR#1産物を用いて、少なくとも4回のPCR#2反応を実施した。第2のPCR産物をプールし、その後、各生体サンプルに対して正規化してから、一意にバーコード化された個別の生体サンプルを組み合わせた。次に、QiaQuickキット(Qiagen)を用いて2% E-gel EX (Life Technologies)からプールされた産物をゲル精製した。精製されたプールライブラリを次に、Low-Range Quantitative Ladder Life Technologies、dsDNA High-Sensitivity Qubit (Life Technologies)、BioAnalyzer (Agilent)および/またはqPCRを用いたゲルに基づく方法で定量化した。5~20% PhiXで希釈したライブラリをMiSeq、HiSeq 2500またはHiSeq 4000システム(1

50

Illumina)で配列決定した。

【0161】

逆多重化および読み出し前処理: Cutadaptを用いて、未加工のシングルエンドfastq読み出しファイルをフィルタリングおよび逆多重化した(Martin et al., *EMBnet.journal* 17, 10-12 (2011))。sgRNAスペーサー配列下流(すなわち3'末端)の余分な配列を除去するために、以下の設定:

```
cutadapt --廃棄-非トリム -a GTTTTAGAGCTAGAAATGGC
```

を用いた。sgRNA出現の読み出しに使用されるフォワードPCRプライマーは、多重化された配列決定を容易にするために種々のバーコードを有するように設計されていたため、これらのフィルタリングされた読み出しを次に、以下の設定: cutadapt -g file:fbc.fasta -no-trimで逆多重化し、ここでfbc.fastaには、フォワードプライマー内に12個の可能なバーコード配列が含まれていた。最後に、sgRNAスペーサー上流(すなわち5'末端)の余分な配列を除去するために、以下の設定:

```
cutadapt --廃棄-非トリム -g GTGGAAAGGACGAAACACCG
```

を用いた。この手順により、未加工のfastq読み出しファイルを20 bp sgRNAスペーサー配列にまで減らすことができる。

【0162】

sgRNAスペーサーのマッピングおよびsgRNAの定量化: 各逆多重化サンプルから20 bp sgRNAスペーサー配列を抽出した後、sgRNAスペーサーを次に、由来するMKOライブラリ(mGeCKO)にマッピングした。どちらのsgRNAライブラリのボウタイ指数も、Bowtie 1.1.2のボウタイ・ビルド(bowtie-build)コマンドを用いて生成された(Langmead et al., *Genome Bio* 10, R25 (2009))。これらのボウタイ指数を用いて、フィルタリングされたfastq読み出しファイルを、以下の設定によりマッピングした: bowtie -v 1 --suppress 4,5,6,7 --c hunkmbs 2000 -best。結果として得られたマッピング出力を用いて、ライブラリ内の各sgRNAにマッピングされた読み出しの数を定量化した。sgRNA出現棒グラフを作製するために、1読み出しの検出閾値を設定し、各サンプルに存在する一意のsgRNA数をカウントした。

【0163】

sgRNA存在量の正規化および概要レベルの分析: 未加工のsgRNAカウントを100万回あたりの読み出し(rpm)に変換することによって各サンプルにおける読み出し数を正規化した。特定の分析の場合にはrpm値を \log_2 変換に供した。相関ヒートマップを作製するために、NMF Rパッケージを用い(Gaujoux et al., *BMC Bioinformatics* 11, 367 (2010))、 \log_2 rpmカウントを用いて個々のサンプル間のピアソン相関性を計算した。各サンプル群の累積分布関数を計算するために、正規化されたsgRNAカウントを所与の群内の全てのサンプルで最初に平均化した。次に、latticeExtra Rパッケージにおけるecdfplot関数を用いて、経験的累積分布プロットを作製した。

【0164】

sgRNAの濃縮分析: 3つの基準を用いて上位の候補遺伝子を同定した: (1) sgRNAが少なくとも1つの臓器サンプルにおける総読み出しの2%以上を含んだかどうか; (2) 全ての非ターゲティング対照の存在量に基づいて2%の偽発見率(FDR)閾値を用いてsgRNAが全ての臓器サンプルの25%以上において統計的に有意に濃縮されていると見なされたかどうか; または(3) 同じ遺伝子を標的にする2つ以上の独立したsgRNAがそれぞれ、少なくとも1つのサンプルにおいて2%未満のFDRで統計的に有意であることが判明したかどうか。第1および第2の基準の場合、個々のsgRNAヒットを遺伝子に崩して、第3の基準からのヒットとの比較を容易にした。

【0165】

sgRNAライブラリ出現のヒートマップ: デフォルトの設定(NMF Rパッケージ)でaheatmap関数を用い、濃縮された上位sgRNAのヒートマップを作製した。1以上の \log_2 rpmを有するsgRNAのみが、ヒートマップでの視覚化に含まれていた。

【0166】

濃縮sgRNAの重複および有意性分析: 濃縮sgRNAのベン図を作成するために、異なる統計

10

20

30

40

50

呼び出しアルゴリズム、異なるT細胞、または異なる実験にわたって有意に濃縮されることが判明した全てのsgRNAを考慮した。

【0167】

臓器ごとの追加のCRISPRスクリーニングT細胞生存分析：特定のFDRカットオフを通過する重要なsgRNAを呼び出すためのサンプルとして、各臓器に対して濃縮分析を最初の実施した。有意なsgRNAのセットを互いに比較した。さらに、ライブラリ出現全体を、単一細胞RNA-seq分析のようにt-SNEを用いた次元削減分析の入力として使用して臓器のクラスタを見出した。

【0168】

ミニプールスクリーニング検証：sgRNAミニプールを、一次スクリーニングからの選択の遺伝子をプールすることにより生成し、同じT細胞CRISPRベクターにクローニングした。ウイルス産生、形質導入、および養子移入を、移入ごとに 1×10^6 T細胞を用いたスクリーニングと同様に行った。

10

【0169】

濃縮sgRNAの経路濃縮分析：各組織タイプにおいて有意に濃縮されたsgRNAを判定した。これらのsgRNAをそれらの標的遺伝子に変換するため、DAVID機能注釈分析用に得られた遺伝子セットを用いた(Huang da et al., *Nucleic Acids Res* 37, 1-13 (2009))。濃縮p値が0.01未満であり、Benjamini-Hochberg調整p値が0.1未満である場合、GOカテゴリは統計的に有意であると見なされた。

【0170】

遺伝子オントロジーおよび経路濃縮分析：DAVID機能注釈分析を用いた遺伝子オントロジーおよび経路濃縮分析にさまざまな遺伝子セットを用いた。sgRNAセットの場合、sgRNAをその標的遺伝子に変換し、その後、結果として得られた遺伝子を分析に用いた。

20

【0171】

養子移入による個々の遺伝子を標的にするsgRNAを用いたT細胞の抗腫瘍機能の試験：個々の遺伝子を標的にするsgRNAをT細胞CRISPRベクターにクローニングした。各遺伝子(例えばDhx37)を標的にする2つの独立したsgRNAを用いた。本明細書において記述されるように、ウイルス調製およびT細胞感染を実施した。 5×10^6 個の mCh^+cOVA^+ E0771細胞を $Rag1^{-/-}$ マウスの乳房内脂肪体にまたは皮下に注射した。移植7日後に、新鮮単離したナイーブOT-1; Cas9 $CD8^+$ T細胞を、2 ng/ml IL-2 + 2.5 ng/mL IL-7 + 50 ng/mL IL-15 + 1 μ g/ml抗CD28を補充したcRPMI中の5 μ g/mlの抗-CD3 で前処理したプレートにプレATINGし、本明細書において記述されるこれらのsgRNA含有レンチウイルス(およそ1のMOIで)に感染させ、3日間培養した。移植10日後に、 5×10^6 個のウイルス感染T細胞を、腫瘍担持 $Rag1^{-/-}$ マウスに静脈内注射した(T細胞:初期がん細胞比 = 1:1)。PBSおよび空ベクターに感染したT細胞を養子移入対照として用いた。腫瘍サイズを、キャリパにより週1~2回測定した。養子移入6週間後に、腫瘍を解剖し、サンプルを分子分析、細胞分析、組織分析、または単一細胞RNA-seqに供した。腫瘍成長曲線の統計的比較のために、各時点で複数のt検定を実施した(Benjamini, KriegerおよびYekutieli FDR法)。

30

【0172】

単一細胞RNA-seqのための腫瘍浸潤リンパ球(TIL)単離：腫瘍担持マウスを指定の時点で安楽死させ、その腫瘍を収集し、氷冷2% FBS中に保持した。外科用メスを用いて腫瘍を1~3 mmサイズの小片に切り刻み、その後、Miltenyi GentleMACS Octo Dissociatorを用いて30~60分間1 μ g/mlのコラゲナーゼIV中で消化した。腫瘍懸濁液を100 μ mの細胞ストレイナに通して2回ろ過し、再び40 μ mの細胞ストレイナに通してろ過し、大きなバルクを除去した。その後、腫瘍懸濁液を慎重にFicoll-Paque培地(GE Healthcare)に重ね、400 gで30分間遠心分離して、二重層界面でリンパ球を濃縮した。界面の細胞を慎重に収集し、2% FBSで2回洗浄し、カウントし、氷上で30分間、表示された抗体で染色した。次に、 $CD3^+CD8^+$ TILをBD FACSAriaにて選別した。腫瘍ごとに計 $3 \times 10^3 \sim 2 \times 10^4$ 個のTILを収集した。

40

【0173】

50

マウスTIL単一細胞RNA-seq (scRNAseq): 製造元のプロトコール(10x Genomics)にしたがって、新鮮単離された腫瘍から選別されたTILを単一細胞RNAseqライブラリ調製に供した。手短に言えば、RT試薬ミックス、RTプライマー、添加剤A、およびRT酵素ミックスを含有するシングルセルマスターミックス(Single Cell Master Mix)を新たに調製した。Single Cell 3' Chipを10x(商標) Chip Holderに入れた。それに応じて未使用の各ウェルに50%グリセロール溶液を添加し、マスターミックスとともにおよそ100個の細胞/uIのTIL溶液を添加した。Single Cell 3' Gel Bead Stripを10x(商標) Vortex Adapterに入れ、30秒間ボルテックスした。次に、指定された列のウェルの底にSingle Cell 3' Gel Bead懸濁液およびPartitioning Oilを分注した。次に、完全にロードされたチップをChromium(商標) Controllerに挿入してエマルジョンを作製した。次に、GEM-RT反応、RTクリーンアップ、cDNA増幅、cDNAクリーンアップ、定量化、およびQCのためにエマルジョンを96ウェルPCRプレートに移入し、Illuminaライブラリ構築に供した。ライブラリの構築では、クリーンなインプットcDNAを断片化、末端修復、Aテーリングに供した。その後、SPRI Selectを用いて両面サイズの選択を実施し、その後アダプタのライゲーション、クリーンアップ、およびサンプルインデックスPCR、プーリング、ならびにPCRクリーンアップを行い、単一細胞RNA-seqライブラリをもたらした。酵素の断片化およびサイズ選択を用いて、製造元のプロトコールにしたがってライブラリ構築の前に、cDNAアンプリコンのサイズを最適化した。GEMインキュベーション中にR1 (リード1プライマー配列)を分子に加える。末端修復、Aテーリング、アダプターライゲーション、およびPCRを介してライブラリ構築中にP5、P7、サンプルインデックス、およびR2 (リード2プライマー配列)を加える。Single Cell 3' Protocolでは、Illuminaブリッジ増幅において用いられるP5およびP7プライマーを含むIllumina対応配列決定ライブラリが作製される。次に、この最終ライブラリを、BioAnalyzerを用いてQC化かつ定量化し、標準のIlluminaペアエンド配列決定のためにHiSeq 2500 RapidRunにロードした。ここでバーコードおよび10 bpランダム(UMI)はリード1においてコード化され、リード2はcDNA断片を配列決定するために用いられた。サンプルインデックス配列は、i7インデックスリードとして組み入れられた。

10

20

30

40

50

【0174】

scRNA-seqデータ処理: TIL scRNA-seq fastqデータは、確立されたカスタムパイプラインを用いて前処理された。手短に言えば、未加工のIlluminaデータファイルをCell Rangerに供し、cellranger mkfastqを用いてIlluminaのbcl2fastqをラップし、Chromiumで調製された配列決定サンプルを正しく逆多重化し、バーコードおよび読み出しデータをFASTQファイルに変換した。次に、cellranger カウントを用いてFASTQファイルを取得し、マウスゲノム(mm10)へのアライメント、フィルタリング、およびUMIカウンティングを実施した。未加工の配列決定出力は、Cell Ranger 1.3 (10x Genomics) (Zheng et al., 2017b)によりcellranger mkfastq、count、およびaggr (正規化モードなし)を用いて最初に前処理された。Cell Rangerパイプラインによって課せられた初期品質管理の評価基準をパスした細胞を、種々の基準を用いてさらにフィルタリングした(Lun et al., (2016) F1000Res 5, 2122): (1) 平均を下回る標準偏差が4以上であった全ライブラリカウント(すなわちUMI数)を有する全ての細胞を除外した; (2) 平均を下回る標準偏差が4以上であったライブラリ多様性(すなわち検出された遺伝子/特徴の数)を有する全ての細胞を除外した; および(3) ミトコンドリア遺伝子がライブラリの全%を不均衡に構成していた(平均を上回る標準偏差が4以上であった)全ての細胞を除外した。これらの3つのフィルタを適用した後、さらに分析するために最終セットの細胞を保持した。27,998個の遺伝子/特徴を、フラットカットオフ評価基準を用いてさらにフィルタリングした。分散の低い遺伝子を除外した。最後に、scran Rパッケージを用いたライブラリサイズによってデータを正規化した(Lun et al., (2016) F1000Res 5, 2122)。

【0175】

scRNA-seq t-SNE次元削減および視覚化: 最終的な正規化され処理されたデータセット(上記)を用い、デフォルト設定のRtsne Rパッケージを使ってt-SNE次元削減を実施した(Maaten, (2014) J Mach Learn Res 15, 3221-3245; Maaten and Hinton, (2008) J Mach Le

arn Res 9, 2579-2605)。各細胞の処理条件に基づいて、個々のデータ点を色付けした。

【0176】

scRNA-seq差次的発現分析：最終的な正規化され処理されたデータセット(上記)を用い、edgeR Rパッケージを使って差次的発現分析を実施した(Robinson et al., (2010) Bioinformatics 26, 139-14)。手短に言えば、edgeRでは最初に負の二項分散パラメーターを推定して、同じ処理群の細胞間の分散をモデル化する。次に、一般化線形モデルを適合させて、処理条件間で差次的に発現する遺伝子を判定する。多重仮説補正をBenjamini-Hochberg法によって実施した。有意に差次的に発現される遺伝子は、正の対数変化倍率を有する上方制御された遺伝子および負の対数変化倍率を有する下方制御された遺伝子とともに、Benjamini-Hochberg調整 $p < 0.05$ を有すると定義された。edgeR出力統計を用いて、ボルケーノ(Volcano)プロットを作製した。PANTHER分類システムを用いて、差次的に発現される遺伝子に対する遺伝子オントロジー濃縮分析を実施した(Mi et al., (2013) Nat Protoc 8, 1551-1566)。統計的な過剰出現試験を用いて、差次的に発現される遺伝子の中で濃縮されたGO (生物学的過程)カテゴリを同定した。ボンフェローニ(Bonferroni)多重仮説補正を実施した。

10

【0177】

差次的に発現された遺伝子のscRNA-seqヒートマップ：差次的に発現された上位遺伝子の全体像を作製するために、データセットの各行(すなわち遺伝子ごと)をスケールリングしてzスコアを取得した。NMF Rパッケージを用いてヒートマップを作製した(Gaujoux and Seoighe, (2010) BMC Bioinformatics 11, 367)。

20

【0178】

ヒトT細胞scRNA-seqデータの分析：肝がん患者由来のヒトT細胞scRNA-seqデータ(Zheng et al., (2017) Cell 169, 1342-1356 e1316)は、GEO (GSE98638)から取得された。細胞をオリジナルの定義にしたがって分類した：末梢血、組織常在、腫瘍-正常接合部、および腫瘍浸潤T細胞；CD3⁺/CD4⁺/CD25⁻ T細胞、CD3⁺/CD8⁺ T細胞、およびCD3⁺/CD4⁺/CD25⁺ T細胞。比較的高いレベルのDHX37を発現する細胞(DHX37⁺ T細胞)および低いまたは検出不能なレベルを発現する細胞(DHX37⁻ T細胞)と比較した細胞の亜集団の層別化は、 $1 \log_2(\text{cpm})$ 正規化発現のカットオフによって行われた。差次的に発現する遺伝子の分析は、不均等な分散を仮定した両側対ウエルチt検定を用いてDHX37⁺およびDHX37⁻群を比較することによって行われた。

30

【0179】

DHX37過剰発現：Dhx37 cDNAは、標準的な分子生物学技法を用いてレンチウイルスベクターにクローニングし、それを用いて、細胞にトランスフェクトまたは形質導入シタンパク質を過剰発現させた。

【0180】

ウエスタンブロットによるヒトDHX37発現の分析：ヒトPB CD4⁺、CD8⁺ T細胞、および患者TILを、ウサギポリクローナル抗体(Novus、NBP2-13922)でのウエスタンブロットによりDHX37タンパク質発現について分析した。

【0181】

FACSによるヒトDHX37発現の分析：細胞内DHX37発現を、ヒトPB CD8⁺ T細胞、および患者TILについてウサギポリクローナル抗体(Novus、NBP2-13922)により分析した。

40

【0182】

組織マイクロアレイ(TMA)を用いたヒトDHX37の分析：ヒトのサンプルを伴う全ての作業は、機関IRBによって承認された。適所に既存のIRBプロトコルを用いて、ヒト組織サンプルを収集した。いくつかのがん型からのTMAは、以下のがん型：神経膠腫、乳がん、および黒色腫について生物検体バンクから、脳由来の正常および腫瘍生検で採取された。DHX37のIHCは、ウサギポリクローナル抗体(Novus、NBP2-13922)で行われた。H&EおよびIHCスライドを、Leicaスライドスキャナを用いてスキャンし、リンパ球およびDHX37+細胞について手動でスコアリングした。

【0183】

50

AAV T細胞ノックアウトベクターの作製: Gibson Assembly (NEB)を介してThy1.1およびsgRNA発現カセットをAAVベクターにサブクローニングすることにより、アデノ随伴ウイルス(AAV)ノックアウトベクター、pAAV-U6-sgBbsI-EFS-Thy1.1-PolyAを作製した。個々の遺伝子ターゲティングのために、AAVノックアウトベクターをBbsIで消化した。M113、B2m、およびmDhx37のsgRNAをコードするオリゴヌクレオチドを、T4リガーゼ(NEB)を用いて、消化されたAAVノックアウトベクターにライゲーションした。

【0184】

AAVウイルス産生: AAVノックアウトプラスミドベクター(AAV-ベクター)、AAV-M113、AAV-B2m、およびAAV-mDhx37をAAV9産生および化学精製に供した。手短に言えば、ポリエチレンイミン(PEI)を用いてHEK293FT細胞(ThermoFisher)に移入プラスミド(AAVプラスミド)、血清型(AAV9)プラスミドおよびパッケージング(pDF6)プラスミドを一過性にトランスフェクトした。トランスフェクションからおよそ72時間後に、細胞を取り除き、滅菌PBS中でコニカルチューブへ移し入れた。1/10容量の純粋なクロロホルムを混合物に添加し、37°Cで1時間インキュベートした。NaClを終濃度1 Mまで添加した。引き続き混合物を溶解するまで振盪し、次いで4°Cで20,000g×にて15分間ペレット化した。クロロホルム層を捨て、水層を別のチューブに移し入れた。PEG8000を10% (w/v)まで添加し、溶解するまで振盪した。混合物を4°Cで1時間インキュベートし、4°Cで20,000g×にて15分間回転させた。上清を捨てた後、ペレットをDPBS + MgCl₂に再懸濁し、ベンゾナーゼ(Sigma)で処理し、次に37°Cで30分間インキュベートした。次いでクロロホルム(体積1:1)を添加し、振盪し、4°Cで12,000gにて15分間遠心沈殿させた。水層を分離し、100-kDa MWCO (Millipore)に通した。濃縮溶液をPBSで洗浄し、ろ過プロセスを繰り返した。カスタムTaqmanアッセイ(ThermoFisher)を用いたqPCRによりウイルスの力価を測定した。

【0185】

AAVウイルス形質導入: T細胞ペレットに、示されたAAVウイルスを直接形質導入した。感染3日後、T細胞をThy1.1発現について染色し、FACSにて分析した。

【0186】

切断効率の判定: 細胞をEpicentre QuickExtract とともに65°Cで30分間インキュベートし、引き続き98°Cで5分間インキュベートすることにより、細胞からのDNAを抽出した。サンプルからのgDNAをPCRによって増幅させた。精製されたPCR産物を、T7エンドヌクレアーゼサーベイヤー(NEB)およびNextera配列決定の両方にIlluminaプロトコールにしたがって供した。

【0187】

マウスCD8⁺ T細胞の急性欠失および遺伝子発現分析: OT-1; Cas9 CD8⁺ T細胞にAAV-sgDhx37またはAAV-sgNTCを形質導入し、インビトロで6日間活性化および培養した後、10×Genomics単一細胞RNAseqライブラリ調製に供した。最初のscRNAseqデータ処理は上記のように行った。

【0188】

Seuratを用いた単一細胞RNAseq分析: Seurat (Butler and Satija, (2017) bioRxiv)を推奨設定で用いて未加工のUMIに基づく10×カウントマトリックスを分析した。カウントを細胞ごとのUMIによって正規化し、ダウンストリーム分析のためにログ変換した。グラフに基づくクラスタリングを実施して、データセット全体の部分集団を同定した。その後、sgDhx37とNTCのサンプルを比較する差次的発現分析をノンパラメトリックウィルコクソン検定により実施した。

【0189】

核染色: eBioscienceのFoxP3染色キットおよびプロトコールを用いて核染色を実施した。核染色の前に、一次抗体を氷上で少なくとも30分間事前に吸着させた。事前吸着に使用される血清は、染色されるサンプルの種に依って異なっていた。5%ヒト血清を用いて、ヒトT細胞染色用の抗体を事前に吸着させた。5%正常マウスおよび5%正常ラット血清を用いて、ネズミT細胞染色用の抗体を事前に吸着させた。細胞を一次染色により4°Cで終夜染色し、引き続き二次抗体により室温で1時間染色した。

10

20

30

40

50

【0190】

エンドソーム染色: BD Cytotfix/Cytoperm染色キットおよびプロトコルを用いてエンドソーム染色を実施した。エンドソーム染色の前に、細胞を抗CD16/32とともにインキュベートしてFc RII/IIIを中和し、引き続き氷上で30分間エンドソーム染色により染色した。

【0191】

盲検化の記載: 治験責任医師は、配列決定データ分析については盲検化されたが、腫瘍の生着、養子移入、臓器解剖、およびフローサイトメトリーについては盲検化されなかった。

【0192】

実験の結果をここで記載する。

【0193】

実施例1: T細胞CRISPRベクターおよびゲノムスケールライブラリの設計、構築、および作製

CD8⁺ T細胞の効率的なゲノム編集および単離を可能にするために、T細胞CRISPRベクターを設計および作製した。このベクターは、Cas9と組み合わせたゲノム編集を可能にするsgRNA発現カセット、およびThy1タンパク質の共通遺伝子変種(Thy1.1)を発現するカセットを含み、形質導入されたCD8⁺ T細胞の特異的な同定および単細胞単離を可能にした(図1A)。大規模な遺伝子操作、したがってハイスループットスクリーニングを可能にするために、1,000個の非ターゲティング対照(NTC)を含む計129,209個のsgRNA (SEQ ID NO: 1 ~ 129,209)を含むゲノムスケールsgRNAライブラリを、50倍超の推定ライブラリカバレッジ(およそ 7×10^6 個の合計コロニー)でこのベクターにクローニングした。ライブラリのクローニングの成功は、Illumina配列決定: (1) 2桁(0.M.)以内で97.6%のsgRNA、および3 0 .M.以内で99.9%での設計されたsgRNAの密な対数正規分布、(2) 98.3%の標的にされた遺伝子のカバレッジにより検証された(図15A ~ 15B)。

【0194】

高力価レンチウイルスをマウスゲノムスケールsgRNAライブラリ(以後MKOと呼ぶ)から生成し、細胞傷害性T細胞の効率的なウイルス形質導入について試験した。ナイーブCD8⁺ T細胞を、Cas9を構成的に発現するマウスから単離し、sgRNAの送達時に遺伝的損傷を可能にし、さまざまな濃度のMKOウイルスで形質導入し、感染3日後にフローサイトメトリーによりThy1.1表面マーカーの発現について分析した(図1B、図7A、図15C)。CD8⁺ T細胞の効率的な形質導入は、元のウイルス濃縮物の100分の1希釈から始めて、さまざまな濃度のMKOウイルスで達成した(図1C、図7B ~ 7E、図15D ~ 15F)。

【0195】

実施例2: CD8⁺ T細胞のゲノムスケール突然変異誘発および養子移入

インビボでの多様なT細胞集団の輸送および生存を調節する遺伝的要因をマッピングするために、MKOライブラリを用いて、関連臓器への輸送後に養子移入された変異T細胞の生存を調べた(図1B)。最初に、MKOレンチウイルスsgRNAライブラリで形質導入することにより新鮮単離されたナイーブCas9 CD8⁺ T細胞を突然変異誘発させて、感染の反復(n = 3)ごとに700倍超の初期カバレッジを達成した。形質導入の3日後に、CD8⁺ T細胞のMKO感染変異体プール(MKO T細胞ライブラリ)を、リンパ球減少またはいずれの他の免疫調節なしに、野生型C57BL/6 (B6)レシピエントマウス(n = 7)に養子移入した(図1B)。養子移入後、循環血中のT細胞は、リンパ器官および非リンパ器官に移動し、そこでそれらは生存するか、またはアポトーシスを受ける。T細胞がこれらの器官に移動し、インビボ組織微小環境内で持続するかどうかを体系的に調べるために、養子移入の7日後に生存変異体の相対的存在量を評価した。マウスを殺処理し、さまざまなリンパ器官および非リンパ器官を単離して、sgRNA出現を配列決定することにより、各器官において生存しているMKO T細胞を調査した。肝臓、脾臓、肺、筋肉、および脳を収集し、代表的な非リンパ器官として調べ、脾臓およびいくつかのタイプのリンパ節(LN)をリンパ器官として調べた(図1C)。収集されたLNは、3つの群: LN1 - 鼠径リンパ節、膝窩リンパ節、および上腕リンパ節から構

10

20

30

40

50

成される皮膚流入領域リンパ節(sLN); LN2 - 6つの表在性頸部リンパ節を伴う頸部リンパ節(cLN); ならびにLN3 - 腸間膜リンパ節および脾リンパ節を含む腹部リンパ節(aLN)を含んだ(図1B)。

【0196】

実施例3: CD8⁺ T_{eff} 細胞輸送後のマウス臓器での出現を目的としたゲノムスケールT細胞突然変異のインビボ分析

Illumina配列決定を実施したところ、あらゆる臓器におけるCD8⁺ T細胞のsgRNAライブラリ出現および事前に注射したMKO導入T細胞の3種類の代表的なプールの読み出しに成功した。図1E~1Fに示すとおり、種々の臓器でみられるsgRNAの構成はきわめて動的である。ある種の臓器の大部分は、1種類または数種類のT細胞変異体(例えばマウス3のLNサンプルの大部分を占めるプログラム細胞死タンパク質1 (PD-1/Pdcd1)を標的とするsgRNAを保有するCD8⁺ T細胞クローン)が占めているが(図1E)、所与の臓器はきわめて多いものの優勢ではない複数のクローンで構成されることもある(図1E~1F、図9A~9I)。T細胞変種モノクローン性(1種類の主要クローン)、オリゴクローン性(読み出される総比率がそれぞれ2%以上の2~10種類の主要クローン)およびポリクローン性(2%以上読み出される10種類超のクローン)の構造は、リンパ器官と非リンパ器官のいずれにおいても存在する(図1E~1G、図9A~9I)。複製した未注射の全3種類のT細胞におけるライブラリ出現では、相互およびMKOプラスミドライブラリによって密接なクラスタが形成されたが、あらゆる臓器のライブラリ出現はクラスタを形成した(図1H、図8A)。平均総数が86,277 ± 536 (プラスミド: 78.34% ± 0.49%)のsgRNAが、初期のT細胞集団で検出されたが(平均 ± 標準誤差(s.e.m)、n = 3) (図8B)、ほんのわずかであるが臓器からsgRNAが検出されたため(プラスミド: 435 ± 62または0.39% ± 0.06%)、これらの臓器におけるT細胞変異体の多様性は低いことが示唆された(図8B)。あらゆる種類の臓器のうち、sgRNAの検出率が最も高かったのはLN群であり(578 ± 106 (平均 ± 標準誤差(s.e.m)、n = 20)、最も低かったのは肝臓(142 ± 25、n = 7)であった(図1D、図8B)。これらのデータによって、インビボでの7日間にわたる輸送後に、目的の臓器で生存が認められた、養子移入したCD8⁺ T細胞変種はわずかであることが示唆された。

【0197】

事前に注射した感染T細胞のライブラリ出現は、遺伝子を標的とするsgRNA (GTS)およびNTCの対数正規分布に基づくものであるが、臓器におけるsgRNA出現は、わずかなsgRNA (標的T細胞のクローン増殖の特性)が優位であることを特徴とする(図1E~1G、図9A~9I、図16A)。ある種の臓器の大部分は、1種類または数種類のT細胞変異体(例えばマウス3のLN3サンプルの大部分を占めるプログラム細胞死タンパク質1 (PD-1/Pdcd1)を標的とするsgRNAを保有するCD8⁺ T細胞クローン)が占めているが(図1E)、所与の臓器はきわめて多いが優勢ではない複数のクローンで構成されることもある(図1E、図9A~9I)。T細胞変種モノクローン性(読み出される総比率が90%以上の1種類の主要クローン)、オリゴクローン性(読み出される総比率がそれぞれ2%以上の3~10種類の主要クローン)およびポリクローン性(2%またはそれ以上読み出される10種類超のクローン)の構造は、リンパ器官と非リンパ器官のいずれにおいても存在する(図1E、図9A~9I)。個々のマウスレベルでは、種々のマウスにおけるsgRNA出現に相関が認められた(図16B)。62種類の全臓器サンプルで濃縮されたこれらの全sgRNAでは、濃縮パターンがきわめて不均一な状態であり、複数の臓器が多くのsgRNAを共有していた(図8D)。これらのデータによって、CD8⁺ T細胞の変異体に関する臓器の生存の全般的なランドスケープが示され、TCRのレパートリーも多様であったため、MKO CD8⁺ T細胞プールから入手した変種の小さなサブセットでは、新たな宿主で7日間にわたって輸送および生存した後に、インビボで濃縮が起きたことが示された。

【0198】

各サンプルのライブラリ出現を分析し、濃縮されたsgRNAを確認し、1,000個のNTC sgRNAと比較した。インビボでの摂動によって、種々の臓器でCD8⁺ T_{eff} 細胞の生存能力を向上させると考えられる遺伝子を同定するため、複数の統計学的メトリクスを用いて、sgRNAおよびMKOライブラリにおいて出現した遺伝子の順位付けを行った。偽陽性率(FDR)が0.5%

以下であった場合は、各臓器で有意に濃縮された一連のsgRNAが同定された(図2A、図8C)。調査したマウス7匹の臓器全62箇所では、sgRNAが平均で 112 ± 9 (平均 \pm 標準誤差(s.e.m))と有意な濃縮が認められた(図8D)。有意なsgRNAの数は、臓器間でほぼ同等であったが、他のあらゆる臓器よりも平均値が高かったのはLN(96 ± 9)であった(対応のない両側t検定、 $p = 0.03$) (図2A、図8D)。62の全臓器サンプルで濃縮が確認された、これらのあらゆるsgRNAでは、濃縮パターンがきわめて不均一な状態であった(図2B、図8D)。これらのデータによって、養子移入後の内臓におけるCD8⁺ T細胞の変異体のクローン選択の高度に動的なマップが示された。

【0199】

実施例4: 免疫遺伝子および多様な機能を有する遺伝子を標的とした有意に濃縮されたsgRNA

インビボにおける種々の臓器でCD8⁺ T_{eff}細胞が生存する能力を向上させると考えられる遺伝子を同定するため、複数の統計学的メトリクスを用いて、sgRNAおよびMKOライブラリにおいて出現した遺伝子の順位付けを行った。濃縮された一連のsgRNAを臓器間で比較したところ、リンパ器官と非リンパ器官で有意に重複することが確認されたが(超幾何学的検定、 p は0にほぼ等しい)(図17A)、臓器の種類に特異的な一連のsgRNAはかなり多く存在し(図17A)、非リンパ器官と比較して、リンパ器官では一連のsgRNAに有意に特異的な濃縮がみられることが示された。リンパ器官では、LNと脾臓でも有意な重複が認められた(p は0にほぼ等しい)(図17A)。非リンパ器官では、5種類の各臓器(脳、肝臓、肺、筋肉、および膵臓)における一連の重要なsgRNAに有意な重複がみられた(全ての対比較について、 $p < 1 \times 10^{-5}$)(図17B)。発現率(prevalence)(1つの臓器で濃縮される頻度)(図11)または細胞と比した臓器における全平均存在量(図8E)によって、sgRNAの順位付けを行ったところ、以下の3種類の遺伝子の最も有力なシグネチャが明らかとなった: (1) T細胞の役割と合致する免疫遺伝子(Lexm/BC055111、Socs5、Zap70など)、(2) 全般的な細胞の成長および増殖を調節する遺伝子(例えばTsc2、Nf1、Aim1、PtenおよびTrp53などのがん抑制遺伝子)、ならびに(3) CD8⁺ T細胞で記録されていない機能を有する遺伝子または特性がほぼ評価されていない遺伝子(Sgk3、Fam103a、Phf21a、および1110057K04Rikなど)(図2C、図8E、図11)。非依存的な濃縮が認められたsgRNAの数によるsgRNAの順位付けでも、これらの3種類の遺伝子が確認され、上位3種類の遺伝子は、異なる3つの区分であった(Cd247 - 免疫、Tsc2 - 成長、およびBpifb3 - 不明)(図1J)。所与のsgRNAは、単一サンプルで読み出された比率が2%以上でなければならぬとする3番目の基準も用いた場合、3つ全ての基準で有意に濃縮された遺伝子は計11種類であり、ここでも免疫(Pdcd1、Cd247)、成長(Apc、Nf1、Tsc2)および不明(Csnk1a1、Fam103a1、Fam134b、Phf21a、Prkar1a、およびRab11b)の遺伝子が示された(図1K)。PD-1としても知られているPdcd1は、十分に確立されたT細胞に発現する免疫チェックポイント調節因子であり、チェックポイント阻害の主要な標的である。Pdcd1が3つ全ての基準を満たしており、頑健なヒットとして出てきたことから、このアプローチの妥当性に関する強力なエビデンスが得られた。有意に濃縮された遺伝子の多くは、免疫系に関連する膜タンパク質である。ミニプール検証実験を実施し、インビボでのミニプール生存実験において、7種類中7種類すべての遺伝子(100%)を網羅するsgRNAの14種類中10種類(71.4%)の妥当性が確認された。臓器では、特定の遺伝子を標的とするsgRNAのほうがNTCより多く存在し、これらには3830406C13Rik、Cd247、Havcr2、PD-1、Shisa6、Siah3、およびTsc2を標的とするsgRNAが含まれた(図17C)。要約すると、これらのデータは、CRISPRによってこれらの遺伝子を変えることで、インビボでのリンパ器官および非リンパ器官におけるCD8⁺ T_{eff}細胞の生存率を上昇させることができる。

【0200】

実施例5: トランスジェニッククローンTCRを有するエフェクタCD8⁺ T細胞による輸送および生存に関するゲノムスケールスクリーニング

Cas9マウスではTCRのレパートリーが多様であるため、TCRプールの不均一性によって、特定の遺伝的影響がマスクされる可能性がある。この問題に対応してアイソジェニックな状況で同時に起きる実態を示すため、MHC-IのハプロタイプであるH-2K^bに発現するトリ卵

10

20

30

40

50

白アルブミン(cOVA)のSIINFEKLペプチドを特異的に認識するトランスジェニックOT-I TCRを発現したCD8⁺ T_{eff}細胞の同種プールを用いて、ゲノムスケールCRISPRスクリーニングを反復して実施した。遺伝的交雑によって、Cas9およびOT-IトランスジェニックTCRの両方を発現するマウス系統(OT-I、Cas9マウス)を作出した(図18A)。これらのマウスを用いた目的は、クローンTCRで開始した輸送後の摂動によって、インビボでの種々の臓器におけるT_{eff}細胞の生存能力を向上させることが考えられる遺伝子を同定することであった。同様に、ナイーブOT-I; Cas9 CD8⁺ T細胞を単離し、3種類の感染複製によってMKOレンチウイルスライブラリを導入し、野生型B6(n = 5)またはCas9(n = 5)レシピエントマウス(n = 計10)への養子移入を行った(図18A)。養子移入後7日目に、マウスを安楽死させ、関連するリンパ器官および非リンパ器官を採取した。Illumina配列決定を実施し、sgRNAライブラリ出現を読み出した。sgRNAライブラリ出現によって、インビボでのクローンTCRを有するT_{eff}細胞の変異体に関する臓器生存の全般的なランドスケープが示された(図19A~19B)。

10

【0201】

OT-I; Cas9 CD8⁺ T_{eff}細胞の輸送および生存を調節する遺伝子を同定するため、複数の統計学的メトリクスを用いて、MKOライブラリに示されたsgRNAおよび遺伝子の順位付けを行った。発現率(1つの臓器で濃縮される頻度)によって、sgRNAの順位付けを再度行ったところ(図2b)、以下の3種類の遺伝子の最も有力な特性が明らかとなった: (1) 免疫遺伝子(BC055111、Hacvr2、Lyn、およびPdcd1など)、(2) 成長調節因子(例えばNf1)(ただし、過去のスクリーニングより少なかった)、ならびに(3) CD8⁺ T細胞で記録されていない機能を有する遺伝子または特性がほぼ評価されていない遺伝子(Slc35c1、Siah3、Gjb3、Tmem135、およびShisa6など)(図18B)。Tim-3としても知られているHavcr2は、十分に確立されたT細胞に発現する免疫チェックポイント調節因子であり、免疫調節を目的とした最新のアクティブ標的である。非依存的な濃縮が認められるsgRNAの数でsgRNAの順位付けを行ったところ、濃縮された複数のsgRNA(mir-463、Pdcd1、Slc35c1、およびStradb)を有する4種類の遺伝子が確認された(図18C)。sgRNA存在量に関する基準(1つのサンプルで読み出された総比率が2%以上)も用いた場合、3つ全ての基準で有意に濃縮された遺伝子は計3種類(Pdcd1、Slc35c1、およびStradb)であった(図18D)。当該データを要約したところ、これらの遺伝子を標的とするCRISPRによって、インビボでのリンパ器官および非リンパ器官におけるTCRクローンOT-I CD8⁺ T_{eff}細胞の生存率が上昇することが示唆された。

20

30

【0202】

全体として多様TCRおよびクローンTCRを用いた両スクリーニングによって、総合分析を行った。多様(Cas9 CD8⁺ T細胞)およびクローン(OT-I; Cas9 CD8⁺ T細胞)の両TCRを対象に、T細胞の機能を調節すると考えられる遺伝子の候補を特定するため、これらの2種類のスクリーニングによって得た遺伝子セットを直接比較した。両スクリーニングで共通してヒットした計17種類の遺伝子が同定され(図18E)、これらにもT細胞の免疫遺伝子(BC055111、Cd247、Hacvr2、およびPdcd1)、がん抑制因子(Nf1およびTsc2)、ならびに不明または特性未評価の遺伝子(例えばGm6927、Slc35c1、Slc2a7、Lrp6、およびZfp82)が含まれた。これらの共有ヒットの一部は、保存表面タンパク質(十分に確立された免疫調節因子/免疫療法の標的(Cd247、Hacvr2、Pdcd1)であるか、もしくはモノクローナル抗体で直接標的にすることができる可能性がある(Slc35c1、Slc2a7、Lrp6)タンパク質)を高度にコードしている。複数の哺乳動物にみられるこれらのタンパク質は、高度に保存された機能ドメインを有している(図20A~20C)。C57BL/6またはCas9同系である2種類のレシピエントの宿主では、全てのsgRNA出現に有意な相関が認められるため(図16C)、いずれのスクリーニングも大規模なヒット集団を共有している(p < 1e5)(図16D)。したがって、この場合での宿主の選択が、インビボでの生存スクリーニングの結果に及ぼした影響はみられなかった。t-SNEなどの次元削減法を用いたところ、組織浸潤T細胞集団におけるsgRNA出現のみに基づいたサンプルのクラスタリングパターンが認められた(図18G)。実質的にあらゆる種類の臓器(脳、肝臓、LN、肺、筋肉、膵臓および脾臓など)を含む大規模クラスタ(k0)が確認されたが、4~6種類の臓器でそれぞれ構成され、外れ値としていくつかの臓器が含まれる8

40

50

種類の比較的小規模なクラスター(k1~k8)が認められた(図18G)。多様TCRおよびクローンTCRで共有される最上位のヒットとして複数の免疫遺伝子が出てきたことによって、このアプローチの厳密さの妥当性をさらに確認したところ、明らかになっていない遺伝子またはT細胞の機能とはこれまで関連付けられていなかった遺伝子の表現型に関する信頼度が高まった。

【0203】

実施例6: モデル抗原を発現する腫瘍を有するマウスにおけるTCR操作エフェクタ T_{eff} 細胞のインビボゲノムスケール分析

抗原認識の点からみたインビボでの $CD8^+ T_{eff}$ 細胞の輸送および生存を分析するため、特性が十分に評価されたモデル抗原であるトリ卵白アルブミン(cOVA)を特異的に認識する操作されたTCRを使用した。遺伝的交雑によって、cOVAの8アミノ酸ペプチドエピトープ(SIINFEKL)の(SEQ ID NO: 129,210)に特異的なCas9およびOT-IトランスジェニックTCRの両方を発現するマウス系統(OT-I; Cas9マウス)を作出した(図3Aおよび図10A~10F)。乳がん細胞株E0771を、さまざまな濃度のSIINFEKLペプチドでパルスし、ペプチド-タンパク質複合体に対して免疫染色を行ったところ、MHC-Iによる細胞表面での用量依存的な抗原提示が観察された(図3B)。cOVAを発現するクローン細胞株を作製したところ、表面のH-2K^b(OT-I TCRによって認識されたMHC-Iのハプロタイプ)に抗原性SIINFEKLペプチドが提示された(図3C)。E0771-mCherry-cOVA(略語: E0771-mCh-cOVA)細胞株のクローン3は、 1×10^{-5} g/mlのペプチドでパルスした細胞と同等のレベルでH-2K^bにSIINFEKLを提示したため、インビボ試験に採用された。このクローン細胞株の細胞を、Rag1^{-/-}マウスに対して1匹あたり 5×10^6 個移植したところ、10日以内に腫瘍としての増殖が認められた(図3A、3D、10A、および10F)。

【0204】

マウスのがんモデルを対象に、T細胞浸潤スクリーニングを行った。E0771は、C57BL/6マウス由来の一般的に使用される三重陰性乳がん細胞株である。注目すべき点は、同系C57BL/6宿主で親細胞のE0771が移植腫瘍として頑強に増殖したが(マウスで移植細胞の100%が腫瘍として増殖した)、検討したあらゆるE0771-mCherry-cOVAクローンが同一宿主によって拒絶された(腫瘍として増殖した細胞は0%)。これは抗原性cOVAに対する $CD4^+/CD8^+$ T細胞を介した免疫拒絶によって起きた可能性がある。その結果として、免疫不全Rag1^{-/-}マウスに対してクローン3の細胞を 5×10^6 個移植したところ、10日以内に急速な腫瘍形成が観察された(図3D、図21A~21B)。OT-I; Cas9マウスからナイーブ $CD8^+$ T細胞を単離し、MKO sgRNAライブラリを用いて突然変異を誘発後、cOVA抗原を発現した腫瘍を有するRag1^{-/-}マウスに 1×10^7 個の細胞を養子移入し、フローサイトメトリーおよびsgRNAライブラリ配列決定によって、インビボでの種々の臓器の輸送および生存を分析した(図3A、図10A)。当該実験で腫瘍サイズを計測したところ、T細胞の注射(ベクターまたはMKO導入)によって腫瘍の増殖が減少し、PBSとの大きな差が認められた(評価項目である腫瘍サイズをPBSとベクターで比較したときの対応のない両側t検定について、 $p = 0.02$ 。MKOとPBSの比較では、 $p < 0.0001$) (図3D)。MKO導入集団では、対照のベクターより強力な治療効果が認められた(評価項目である腫瘍サイズをMKOとベクターで比較したときの対応のない両側t検定について、 $p = 0.03$) (図3D)。この抗腫瘍効果は、皮下移植モデルでも確認されたが、その程度は低かった(図21A)。養子移入後7日目(がん細胞移植後17日目)にマウスを殺処理し、腫瘍、腫瘍近傍の流入領域リンパ節(dLN)、非流入領域リンパ節(ndLN)および脾臓を摘出し、インビボでの T_{eff} 細胞の輸送および生存を分析した。腫瘍浸潤リンパ球(TIL)についても、腫瘍の分析を行った。組織学的および病理学的分析を行ったところ、ベクターおよびMKO $CD8^+ T_{eff}$ 細胞が注射されたマウスの腫瘍からリンパ球が確認されたが、PBSが投与されたマウスの腫瘍では認められなかった(図21B)。臓器および腫瘍の単細胞懸濁液のフローサイトメトリー分析(マウス: $n = 3$)では、T細胞が注射されたRag1^{-/-}マウスから多数の $CD8^+ T_{eff}$ 細胞が検出されたが、PBS投与群では認められなかったため(図3B~3C、図10B~10E)、これらのサンプルで確認された $CD8^+ T_{eff}$ 細胞は、養子移入されたことが示唆された。マウスの並行比較コホートから入手した代表的リンパ器官(dLN、ndLNおよ

び脾臓)、非リンパ器官(肺)および腫瘍を対象に、ハイスループットsgRNAライブラリ配列決定を実施したところ(図4A)、注射前にOT-1; Cas9 CD8⁺ T_{eff}細胞の突然変異を誘発したMKOおよびインビボでのあらゆるサンプルにおけるsgRNA表現型が示された(図4B、図4G、図11A、図21D)。

【0205】

初回スクリーニングと同様に、事前に注射したCD8⁺ T細胞集団におけるsgRNAライブラリ出現は、高度な多様性が特徴であることが確認された(図4Bおよび図11B)。臓器サンプルのうち、検出されたsgRNAの数が最も多かったのはdLN群であった(図4C)。一方、検出されたsgRNAの数が最も少なかったのはndLN群であり、2番目にsgRNAの検出数が少なかったのは腫瘍であった(図4C)。リンパ器官、非リンパ器官、および腫瘍では、突然変異したCD8⁺ T_{eff}細胞のモノクローナル性、オリゴクローン性およびポリクローン性組成物が観測された(図4Dおよび図12A~12E)。同一の基準(FDR < 0.2%)を用いたところ、各臓器または腫瘍で有意に濃縮されたsgRNAが同定された(図11C)。これらのsgRNAでみられた存在量のパターンは、臓器および腫瘍で不均一であった(図4E)。腫瘍群では、検出されたsgRNAの数が比較的少なかったが、有意に濃縮されたsgRNAの数が最も多かった(図4Fおよび図11C)。これとは対照的に、dLN群では検出されたsgRNAの数が比較的多かったが、有意に濃縮されたsgRNAの数が最も少なかった(図4Fおよび図11C)(重要なsgRNAについて、腫瘍群では 10.1 ± 30 ($n = 5$)であったのに対して、dLN群では 24 ± 10 、 $n = 5$ であった)(Mann-Whitney両側検定について、 $p = 0.048$)(図4F)。これは、腫瘍が発現したcOVA抗原を、近接するdLNから腫瘍に流入したOT-1; Cas9 CD8⁺ T_{eff}細胞が認識したことによって説明できると考えられる。

【0206】

実施例7: リンパ器官、非リンパ器官、およびcOVA発現腫瘍において有意に濃縮されたsgRNAおよび遺伝子

臓器(図5A)または腫瘍(図5B)における全存在量の平均値でsgRNAの順位付けを再度行ったところ、免疫遺伝子(Tim3/Havcr2、Lexm/BC055111、Lyn、Cd247、およびPD-1/Pdcd1など)、がん抑制遺伝子(Aim1およびNf1)ならびにCD8⁺ T細胞で記録されていない機能を有する遺伝子または全般的に特性が評価されていない遺伝子(Shisa6、Siah3、Odc1、Dhx37、および3830406C13Rikなど)の最も有力な特性が明らかになった(図5A~5B)。複数のサンプルにおける発現率または非依存的な濃縮が認められたsgRNAの数によってsgRNAの順位付けを行ったところ、同等の特性が明らかとなった(図5Cおよび図11D)。免疫機能による機能的区分では、全ての重要な遺伝子が集合的に濃縮された(図5D)。要約すると、これらのデータは、これらの遺伝子の機能が喪失することによって、一貫してインビボでの臓器および腫瘍におけるCD8⁺ T_{eff}細胞の生存率が上昇することを示唆している。

【0207】

濃縮された一連のsgRNAをさまざまな種類のサンプルで比較することによって、3つの各群(リンパ器官、非リンパ器官、および腫瘍)で有意に濃縮されたsgRNAは他の群と有意に重複することが確認された(対での超幾何学的検定において、リンパ器官と非リンパ器官の比較では $p = 2.11 \times 10^{-159}$ 、リンパ器官と腫瘍の比較では $p = 3.02 \times 10^{-88}$ 、非リンパ器官と腫瘍の比較では $p = 1.97 \times 10^{-137}$ であった)(図5E)。濃縮されたsgRNAは、各種サンプルに特異的であった(図5E)。リンパ器官の3群(dLN、ndLNおよび脾臓)でも、有意な重複がみられた(対での超幾何学的検定において、dLNとndLNの比較では $p = 6.07 \times 10^{-317}$ 、dLNと脾臓の比較では $p = 2.58 \times 10^{-203}$ 、ndLNと脾臓の比較では $p = 2.01 \times 10^{-263}$)(図5F)。このスクリーニングで認められたヒット(cOVA抗原を伴う腫瘍を有するRag1^{-/-}宿主のOT-1; Cas9 CD8⁺ T_{eff}細胞)を初回スクリーニング(WT宿主のCas9 CD8⁺ T_{eff}細胞)と比較したところ、きわめて有意な遺伝子の重複が認められた(超幾何学的検定における $p = 1 \times 10^{-23}$)(図5G)。共有遺伝子には、複数の免疫遺伝子(Tim3/Havcr2、Lexm/BC055111、Zap70、Cd247、およびPD-1/Pdcd1など)、数種類のがん抑制遺伝子(Aim1およびNf1)ならびにCD8⁺ T細胞で機能が記録されていない多くの遺伝子または情報に乏しい遺伝子(Shisa6、Siah3、Ccadc105、Ccadc81、および3830406C13Rikなど)が含まれた(図5G)。これらのデータは、

抗原の有無を問わず、臓器および腫瘍におけるCD8⁺ T_{eff}細胞の輸送および生存を調節する一連の共通遺伝子が存在することを示唆している。

【0208】

0.5%未満のFDRを基準としたところ、各腫瘍で有意に濃縮されたsgRNAが同定された(図4H)。腫瘍における発現率でsgRNAの順位付けを行ったところ、ここでも免疫遺伝子(Tim3/Havcr2、BC055111、およびLynなど)、成長遺伝子(例えばNf1)ならびにCD8⁺ T細胞で記録されていない機能を有する遺伝子または全般的に特性が評価されていない遺伝子(Shisa6、Siah3、Odc1、Dhx37、および3830406C13Rikなど)の最も有力な特性が明らかになった(図4H)。非依存的な濃縮が認められたsgRNAの数によってsgRNAの順位付けを行ったところ、濃縮された複数のsgRNAを有する26種類の遺伝子が明らかとなった(図4I)。注目すべき点は、2種類の遺伝子(Pdcd1およびStradb)が、濃縮された4種類のsgRNAを有していたことから、これらの表現型に関する独立したエビデンスが示された(図4I)。実質的なTILクローンを示す、第3の基準であるsgRNAの存在量(単一の腫瘍で読み出された総比率が2%以上)に基づいて検討したところ、3つの全基準において、有意に濃縮された遺伝子は計6種類であることが確認された(Cd247、Fam103a1、Hacvr 2、Pdcd1、Prkar1a、およびStradb)(図4J)。クローンがcOVA抗原の発現レベルに及ぼす影響について検討するため、当該スクリーニングで得た上位のヒットを採用し、cOVA抗原の発現レベルが異なる2種類のクローン(クローン3およびクローン5)を用いたミニプールスクリーニングを行ったところ、これらの2種類のクローンではsgRNA出現の一貫性が高いことが確認された(ピアソン相関 = 0.981)(図21E)。これらの結果が種々のがん細胞で同様にみられるか検討するため、2種類の細胞株のE0771-mCh-cOVA(乳がん)およびLCC-mCh-cOVA(肺がん)を用いたミニプールスクリーニングを実施したところ、sgRNA出現が強く相関していた(ピアソン相関 = 0.932)(図21F)。要約すると、これらのデータは、CRISPRによってこれらの遺伝子に摂動が生じると、CD8⁺ T_{eff}細胞の腫瘍浸潤および腫瘍の微小環境における生存が一貫して向上することを示唆している。

【0209】

実施例8: 選択した有意に濃縮された一連の遺伝子に対するさらなる試験

本明細書において記述する2つのゲノムスケールスクリーニングにおいて濃縮された遺伝子を対象に、T細胞の輸送および生存特性についてさらに検討するため、当該スクリーニングのいずれかまたは両方で高度に濃縮されたため選択された一連の遺伝子に焦点を合わせ、これらの遺伝子を標的とするsgRNAの小規模プールを作製した(ミニプール)(図6A)。これらのミニプールからレンチウイルスを生成し、OT-1; Cas9 CD8⁺ T_{eff}細胞の突然変異を誘発した後、さまざまなWTマウス系統に静脈内投与した(図6A)。養子移入後7日目に、代表的なリンパ器官(sLN、cLN、およびaLN)ならびに非リンパ器官(肝臓、肺および膵臓)を摘出し、各サンプルを対象にsgRNA出現の配列決定を行った(図6A)。全てのサンプルを対象に、sgRNAの出現の相対的存在を計測した(図6B)。あらゆるsgRNAの存在量は、遺伝子導入した注射前の細胞集団とほぼ同等であることが確認されたが(図6B)、内臓におけるsgRNAの存在像はより動的であり、特定のsgRNAは不存在であるか、その存在量が少なかった、中等度であった、または多かった(図6B~6C)。対照のsgRNAと比較したところ、臓器では遺伝子を標的とする22種類のsgRNAのうち、有意に濃縮されたのは17種類(77%)であり、これらはLexm、Shisa6、Siah3、Tim3/Havcr2、PD-1/Pdcd1、Cd247、Tsc2、およびRcc1などの遺伝子を標的とするものであった(図6B~6Cおよび図13)。リンパ器官において濃縮されたsgRNAは計17種類であった。非リンパ器官で濃縮されたのは14種類であり、リンパ器官ではこれら全種の濃縮が確認された(超幾何学的検定におけるp = 0.0021)(図6D)。これらのデータは、両スクリーニングで得られたヒットでは、複数の臓器におけるsgRNAの強力な濃縮が認められるが、培養における影響はほとんどないことを示唆している。

【0210】

実施例9: 腫瘍抗原遭遇時にエフェクタCD8⁺ T細胞の脱顆粒を調節する遺伝子のハイスループット同定

インビボでの抗腫瘍効果が認められたため、次の目的は、腫瘍特異的な抗原を有するが

10

20

30

40

50

ん細胞を標的としかつ殺滅させるCD8⁺ T_{eff}細胞の能力を調節すると考えられる遺伝子を同定することとした。この目的を果たすため、SIINFEKLペプチドを提示するE0771がん細胞に反応すると、OT-1; Cas9 CD8⁺ T_{eff}細胞が脱顆粒する共培養系を用いた脱顆粒スクリーニングを開発した(図22A)。さまざまな濃度のSIINFEKLペプチドでE0771細胞をパルスしたところ、SIINFEKLペプチドが表面のMHC-Iに用量依存的に提示されることが確認された(図22B)。ハイスループットCRISPR脱顆粒スクリーニングを実施するため、ナイーブOT-1; Cas9 CD8⁺ T細胞を単離し、MKOライブラリを用いて遺伝子導入した。これらの細胞を、刺激するためにIL-2、IL-12、抗CD28、および抗CD3を添加したcRPMIで6日間インキュベートし、実験前に未処置のプレートに12時間静置した後、1:1の割合(T細胞対がん細胞)でMKO導入CD8⁺ T_{eff}細胞を、SIINFEKLでパルスしたE0771細胞と共培養した(方法)。T細胞については、MHC上の同族抗原とT細胞が遭遇したときに、細胞表面に一時的に提示されるT細胞顆粒のマーカである表面のCD107aの一時的沈着を標識する抗CD107抗体を含有する培地を用いてインキュベートした。生物学的反復実験を3回実施し、1回あたり計1×10⁷個のT細胞を分析し、上位5%のCD107a⁺細胞を分類した後(図22C)、ゲノムDNA抽出、CRISPRライブラリの読み出し、およびスクリーニングデータ分析を実施した(図22A)。FDRの水準カットオフを0.5%未満とし、共培養においてSIINFEKLでパルスしたE0771腫瘍細胞に曝露した分類済みCD8⁺CD107a⁺ T細胞から、有意に濃縮されたsgRNAを同定した(図22D)。意外なことに、3種類全てのサンプルでこれらの3種類の遺伝子が有意に濃縮され(Dhx37、Lyn、およびOdc1)、この所見は腫瘍浸潤スクリーニングでも顕著であった(図22E)。要約すると、これらのデータは、Dhx37、Lyn、およびOdc1が、インビボでCD8⁺ T細胞によって抗腫瘍活性が増強しうる有望な標的であることが確認された。

【0211】

実施例10: Dhx37摂動を有するOT-1; Cas9 CD8⁺ T_{eff}細胞の抗腫瘍機能の向上および単一細胞のトランスクリプトームの特性

免疫療法モデルにおけるDhx37の表現型について検討した。本明細書において記述されるように、Dhx37を標的とする2種類のsgRNAのクローンをT細胞CRISPRベクターに移入し、ウイルスを生成し、T細胞を感染させた。クローン3のmCh⁺cOVA⁺ E0771細胞5×10⁶個を哺乳動物脂肪体に移植した10日後に、5×10⁶個のsg-Dhx37またはベクターのレンチウイルスで遺伝子導入したOT-1; Cas9 CD8⁺ T細胞を、乳がんの腫瘍を有するマウスに養子移入した。それぞれの注射の際に、1:1 (T細胞対がん細胞)の割合で養子移入を再度行った(10日前の腫瘍のがん細胞の数は、T細胞5×10⁶個を大幅に上回っていたことに留意)。養子移入後の最初の3日間は増殖がみられたが、その後の2.5週間で腫瘍は退縮した(図22F)。ベクターおよびsgDhx37に感染したOT-1; Cas9 CD8⁺ T_{eff}細胞は、いずれも養子移入後7日目から強力な抗腫瘍効果を示した(ベクターまたはsgDhx37対PBS。両側t検定における17日以降の補正後のp < 0.001 (Benjamini, Krieger and Yekutieli method)) (図22F)。その結果、sgDhx37に感染したOT-1; Cas9 CD8⁺ T_{eff}細胞(マウス: n = 5)では、ベクターに感染したOT-1; Cas9 CD8⁺ T_{eff} T細胞が投与されたマウス(マウス: n = 4)と比較して、再発が有意に抑制された(両側t検定における37日以降の補正後のp < 0.01) (図22F)。これらのデータは、CRISPR/Cas9およびsgRNAによってDhx37を標的とすることで、同族抗原のcOVAを発現するE0771腫瘍に対するOT-1; Cas9 CD8⁺ T_{eff}細胞の抗腫瘍効果が促進されることを示唆している。

【0212】

スクリーニングで確認された他のヒットが、免疫療法の標的として機能する可能性があるかをさらに検討するため、さらなる試験を実施し、考えうる抗腫瘍効果を調査した。さらに2種類の遺伝子Pdcd1およびOdc1について検討した。Pdcd1は、十分に確立されている免疫療法の標的であるPD-1をコードするが、患者やがんの種類によって奏効率にばらつきがある。Odc1は、オルニチンからプロレシリンに触媒するポリアミン生合成経路の律速酵素であるオルニチン脱炭酸酵素をコードする。同一のアッセイを行ったところ、sgPdcd1 OT-1; Cas9 CD8⁺ T_{eff}細胞を養子移入したマウス5匹のうち2匹(40%)では、ベクター対照群と比較して腫瘍が有意に退縮したが、5匹中3匹には退縮がみられず(図22G)、患者のPD-1

を阻害した場合のように奏効率にばらつきが認められた。同様に、sgOdc1 OT-1; Cas9 CD8⁺ T_{eff} 細胞を養子移入したマウス5匹のうち3匹(60%)では、ベクター対照群と比較して腫瘍が有意に退縮した(図22H)。これらの2種類の遺伝子に対するsgRNAの損傷は一部で有効であったが、その程度はDhx37(5匹中5匹、100%)より低かった。

【0213】

Dhx37はDEAHボックスRNAヘリカーゼであり、ゼブラフィッシュにおいてグリシン受容体の発現を経た逃避行動を調節することが報告されているが、これまで哺乳動物ではT細胞機能との関連は認められていない。推定上のATP依存性RNAヘリカーゼのドメインおよび保存は、遺伝子の発現および細胞機能に影響を及ぼす可能性があることを示している。Dhx37損傷時の遺伝子発現の変化が及ぼす影響を検討するため、TILでのsgDhx37 OT-1; Cas9 CD8⁺ T細胞のトランスクリプトーム分析を実施した。TILは、TILの状態に影響を及ぼさる不均一な腫瘍微小環境下であり、それによって遺伝子の発現に大きなばらつきが生じるため、単一細胞RNA配列決定(scRNAseq)を実施し、sgDhx37 TILのトランスクリプトームを調査した。腫瘍担持マウスを安楽死させ、物理的解離および酵素分解によって腫瘍から単細胞懸濁液を生成した後、染色およびFACSによって生CD3⁺CD8⁺ 細胞を分別してTILを収集した。これらの腫瘍において、TILはごくわずかな細胞で構成されるため、全腫瘍から大半の単細胞懸濁液を分別し、腫瘍ごとに $3 \times 10^3 \sim 2 \times 10^4$ 個の生CD3⁺CD8⁺ TILを収集した(図23A)。収集したこれらの新鮮なTILを、エマルジョンに基づく微小流体装置にかけ、sgDhx37群およびベクター群のCD8⁺ TILのバーコード標識を行い、scRNAseqライブラリを作製した。ライブラリには、Illumina HiSeqプラットフォームを用いたunique molecular identifier (UMI)配列決定を実施し、細胞バーコードおよび各細胞のトランスクリプトームを定量化した。

【0214】

scRNA配列決定の生データの処理、厳密なフィルタリング、および正規化を行った最終的なデータセットは、552個の細胞(sgDhx37: n = 191個、ベクター: n = 361個)で構成され、計測したTILの発現遺伝子は計8,244種類であった。最初にt-SNEによる次元削減を実施し、これらの細胞の全体的なトランスクリプトームのランドスケープを可視化した(図23B)。この分析では、それらのトランスクリプトームによって、4種類の主要クラスター(k0~k3)が、これらのT細胞の主要な部分集団であることが明らかになった(図23B)。その後、差次的発現を分析し、sgDhx37で処置したTILをベクターで処理したTILと比較したところ、有意に上方制御および下方制御された一連の遺伝子が同定された。sgDhx37 TILで有意に下方制御された遺伝子は215種類であったが、有意に上方制御された遺伝子は137種類であり(Benjamini-Hochbergによって補正した $p < 0.05$) (図23C~23D)、ほぼ高度に上方制御された遺伝子はRgs16、Tox、およびNr4a2であった(図23D)。Rgs16は、ヒトTリンパ球のIL-2依存性活性遺伝子として発見され、活性/エフェクタT細胞での濃縮が確認されている。Nr4a2は、胸腺における調節性T細胞(T_{reg})の発現および恒常性維持に必要な核内受容体であり、T細胞の活性化と関連しているが、CD8⁺ T細胞またはTILにおけるその特異的な機能の特性はまだ十分に評価されていない。Toxは、CD8⁺ T細胞およびCD4⁺ T細胞の発現に關与するHMGボックスタンパク質をある程度コードするが、MHCとTCRの相互作用を必要としない。その他の有意に上方制御された遺伝子には、CD8⁺ T細胞またはTILで明らかになっているEomes、Nr4a3、Lag3、Ccl4、Ifnar1、およびIkzf2などの免疫関連遺伝子、ならびに情報に乏しい遺伝子が含まれた(図23D)。1つの遺伝子セットにまとめると、遺伝子オントロジー分析では、sgDhx37 TILで有意な上方制御がみられた複数の免疫関連経路が明らかとなり(補正後の $p < 0.05$)、それらにはリンパ球の活性、サイトカイン産生の正の調節、細胞と細胞の接着の調節、免疫エフェクタ過程の調節、ならびにインターフェロン-ガンマ産生の正の調節が含まれた(図23E)。いくらか興味深い点は、sgDhx37が上方制御された遺伝子にも、Ctla4およびPdcd1などの白血球の活性の負の調節に關与する遺伝子が含まれており、その程度は低いものの、ヒト黒色腫患者から入手したTILにおけるT細胞の細胞毒性スコアとこれらのマーカーの正の相関性を反映している。Lag3、Ctla4、およびPdcd1は、T細胞の活性化の誘発を示すマーカーであり、これらを阻害することで抗

腫瘍活性が向上するが、これらが存在することで養子細胞移入療法の効果が阻害されるわけではない。Lag3は、Rgs16、Nr4a2、およびToxとともに高度に発現する一方で、Ctla4およびPdcd1は、比較的度は低い、その他の免疫を活性化する転写物とともに発現する。一方、リボソームの小さなサブユニット集合およびリボソームの大きなサブユニットの生合成において、sgDhx37 TILで下方制御された遺伝子の濃縮がみられ(図23F)、これは核とサイトゾルにおけるrRNAの修飾およびプロセッシングで仮定されたヒトDHX37タンパク質の役割と一致する(UniProtKB - Q81Y37)。最上位の上方制御された遺伝子(Rgs16)および下方制御された遺伝子(Uba52)は、4種類の各クラスで一貫して上方制御または下方制御される(図23G)。要約すると、scRNA配列決定データによって、単細胞レベルでの不均一な腫瘍微小環境において、sgDhx37 TILのトランスクリプトームが有意に変化することが示された。

10

【0215】

実施例11: ヒトでのDHX37の調査

ヒトDHX37はほとんどの臓器において発現されており、骨髄、リンパ節、脾臓、および虫垂のようなリンパ系組織において最も発現が高い。ヒトT細胞におけるDHX37の関連する役割を調べるために、タンパク質レベルでのその内因性発現をアッセイした。レンチウイルス過剰発現ベクターを陽性対照として作製した。DHX37タンパク質の存在は、ヒト末梢血(PB) CD8⁺およびCD4⁺ T細胞、ならびに肺がん患者由来のTILにおいて検出された(図24A)。この所見は、細胞内染色およびFACS分析を用いてさらに裏付けられた(図24B)。空間レベルでDHX37発現を分析するために、神経膠腫、乳がんおよび黒色腫を含むいくつかのがん型で使用可能な組織マイクロアレイ(TMA)を取得した。DHX37についてH&E染色および免疫組織化学(IHC)染色を実施した。神経膠腫におけるDHX37⁺細胞の有意にいっそう高いレベルが、正常な脳組織と比較して観察された(対応のないt検定、両側、 $p < 0.001$) (図24C)。乳がんおよび黒色腫の腫瘍サンプルも、神経膠腫に匹敵するレベルで多数のDHX37⁺細胞を有していたが、これらのTMAについて乳がんおよび黒色腫で一致した正常組織は使用できなかった(図24C)。TILのさまざまな集団が全3つのがん型において観察された(図24D)。DHX37は主に核に局在しており、核膜に強い染色を有する(図24D)。重要なことに、TCGAから入手可能な患者生存データにより、その高いDHX37レベルは、神経膠腫、肝臓肝細胞がん、肺腺がんおよび腎臓腎細胞がんを含む複数のがん型全体の生存不良と関連することが分かった(図24E)。これらのデータはともに、ヒトT細胞におけるDHX37の発現、患者のTILおよび予後の関連性を指し示している。

20

30

【0216】

ヒトT細胞におけるDHX37の特性をさらに探索するために、ヒトTILの最近の単細胞トランスクリプトームデータセットを分析した。DHX37発現は、末梢血T細胞、組織常在T細胞、および腫瘍浸潤T細胞の一部において検出された(図25A)。DHX37は、CD3⁺/CD8⁺ (細胞傷害性T細胞)、CD3⁺/CD4⁺/CD25⁻ (Tヘルパー細胞)、およびCD3⁺/CD4⁺/CD25⁺ (Treg)集団において発現された(図25A)。比較的高いレベルのDHX37を発現する細胞(DHX37⁺ T細胞)の部分集団では、低いまたは検出不能なレベルを発現するもの(DHX37⁻ T細胞)と比較して種々の遺伝子が差次的に発現された。興味深いことに、DHX37⁺細胞傷害性T細胞は、さらにまた本発明者らのマウスTIL scRNA-seqと一致して、IL12A、ITM2A、RGS16、およびSTAT1を含む、細胞傷害性、T細胞活性化、サイトカイン媒介細胞シグナル伝達、調節機能および抗がん免疫での役割が立証されている複数の免疫遺伝子を下方制御する(図S9b)。DHX37⁺細胞においていっそう高発現された遺伝子は、PPA1、CISH、TRAP1、およびSLC7A6を含んだ(図25C)。CD3⁺/CD4⁺/CD25⁻ヘルパーT細胞において、IKBKEおよびCPT2のような遺伝子の発現はDHX37⁺細胞で有意に低かったが、SLC35E2BおよびNDFIP1は有意に低かった(図25D~25E)。まとめて、ヒトT細胞scRNAseqデータの分析により、DHX37⁺対DHX37⁻T細胞の遺伝子発現変化の特性が明らかにされた。これらの差次的に発現される遺伝子の多くは、T細胞において既知の役割を果たしており、DHX37発現の自然な細胞集団全体の変動がヒトT細胞の機能に影響を与えうることを示唆している。

40

【0217】

50

実施例12: AAV-CRISPR媒介T細胞遺伝子編集によるCD8⁺ T_{eff}細胞における急性Dhx37喪失の調査

Dhx37の機能を、直接、培養CD8⁺ T細胞においてさらに調べた。マウス初代CD8⁺ T細胞は、培養7日目の後に大部分の細胞がアポトーシスを起こし、長期培養に困難があるため、アデノ随伴ウイルス(AAV)が初代CD8⁺ T細胞における遺伝子編集のためのビヒクルとして採用した。初代T細胞を標的にすることができる新しいAAV CRISPRベクターを作製した(図26A)。OT-1; Cas9 CD8⁺ T_{eff}細胞を単離し、AAV-sgRNA-Thy1.1ベクターに感染させた後、遺伝子調節および抗腫瘍活性に加えて、急性Dhx37喪失時に分子および機能分析を実施した(図26B)。AAV-sgDhx37ならびにAAV-sgM113およびAAV-sgB2mは、インビトロ培養の5日後に標的遺伝子座を強力に突然変異誘発したことが実証された(図26D)。この知見は、細胞内Dhx37タンパク質レベルの低減と裏付けられている(図26C)。部分的なノックダウンは、この時点でのDhx37タンパク質の安定性や、全ての挿入欠失が効果的なタンパク質喪失につながるわけではないことに起因する可能性が高い。ベクター対照と比較して、AAV-sgDhx37処理OT-1; Cas9 CD8⁺ T_{eff}細胞は、同種S11NFEKLパルスE0771がん細胞と共培養されると表面CD107aのレベルが有意に増加し(t検定、両側、p = 0.001、図26E)、これにより殺滅アッセイスクリーニングがさらに検証された。AAV-sgDhx37処理OT-1; Cas9 CD8⁺ T_{eff}細胞はまた、減少したレベルのCD62Lを示した(図26E)。AAV-sgDhx37処理OT-1; Cas9 CD8⁺ T_{eff}細胞の養子移入はAAVベクターと比較して、インビボで抗腫瘍活性を有意に増強した(図26F)。これらの実験は、強力かつ迅速なT細胞遺伝子編集のための独立したシステムとしてAAV-CRISPRを確立し、Dhx37の急性喪失の細胞表現型をさらに解明し、T細胞におけるDhx37遮断の抗腫瘍効果を検証した。

【0218】

AAV-sgDhx37は、Dhx37遺伝子座における変異体の混合物を生成し、マウス初代T細胞は単一細胞クローンとして増殖しない。したがって、より洗練された解像度で異種T細胞集団における急性Dhx37喪失時の転写変化をよりよく理解するために、単一細胞トランスクリプトームプロファイリングを、はるかに大きな細胞セットで再び実施した(インビトロの培養でノックアウトを確立すると、TILとしてのCD8⁺ T細胞の低可用性の障壁がなくなる)。計1,883個のAAV-sgDhx37処理OT-1; Cas9 CD8⁺ T_{eff}細胞を、1,735個のAAV-sgNTC処理細胞と並行して、感染6日後にプロファイルした(図27A)。次元削減分析は、これらの細胞について6つの主要なクラスタを示した(図27B)。各クラスタは、異なる遺伝子特性により表され(図27D)、クローンTCRのT細胞でもかなりのレベルのトランスクリプトーム不均一性を明らかにした(AAV-sgNTCおよびAAV-sgDhx37の両方において)。興味深いことに、AAV-sgDhx37 CD8⁺ T細胞はクラスタ2で濃縮されているが、クラスタ4および6では枯渇されている(超幾何学的検定、p < 0.001)(図27C)。差次的発現分析は、各クラスタで統計的検出力を提供するのに十分な細胞数を備えた6つのクラスタ全てで実施され、急性Dhx37喪失時に調節解除された遺伝子のパネルが明らかにされた(図27E)。全てのクラスタにわたり一貫して調節解除された少数の遺伝子があり、より多くのクラスタ特異的な差次的に調節された遺伝子がある(図27E)。例えば、Cc15は、全6つのクラスタでの急性Dhx37喪失時に有意に上方制御され、Rpl35は5/6クラスタで有意に下方制御される(図27F)。複数の遺伝子は、特定のクラスタでのみ差次的に調節されることが分かり(例えばRgs2、Lag3、Ifng、Ramp3、Rps29、Nkg7、Smox、Lta、Serpnb6b、Rpl41、Tmsb10、Hmgn2、Npm3、およびLy6c2)(図27E、図28A)、不均一な細胞集団全体での部分集団特異的な動的遺伝子調節を反映している。急性Dhx37喪失時に上方制御された遺伝子は、免疫機能を伴う遺伝子セットのカテゴリでも高度に濃縮されているが(図28B)、下方制御された遺伝子セットはリボソーム成分である。異なる実験的設定下ではあるが、異なる3種類の機構、つまりマウスTILでのレンチCRISPR媒介摂動、培養でのAAV-CRISPR媒介急性喪失、およびヒトT細胞での自然低発現集団による、Dhx37喪失時に差次的に調節される遺伝子は、計24個の遺伝子に収束した(図28C)。

【0219】

実施例13: ヒトT細胞における遺伝子編集の実証

10

20

30

40

50

遺伝子編集は、本発明の組成物および方法を用いヒトT細胞において実施された(図29)。ヒトDHX37遺伝子(3つの独立したsgRNA)およびPDCD1遺伝子(2つの独立したsgRNA)のサーベイアッセイの結果を図29に示す。矢印は、ヒトT細胞でのオンターゲット遺伝子編集の結果としての切断産物バンドを指し示した。

【0220】

実施例14:

本明細書では、ゲノム編集をハイスループットスクリーニング法と組み合わせて、生理学的および病理学的(がん)設定の両方で、インビボでのCD8⁺ T細胞の輸送および生存を体系的に研究するために直接適用した。本明細書において提示されたデータではCD8⁺ T細胞に焦点を合わせたが、この手法はCD4⁺ Tヘルパー細胞および調節T細胞(T_{reg})を研究するために容易に適用することができる。本がん免疫療法モデルは、乳がん細胞の同所移植とそれに続くCRISPRが標的にするCD8⁺ T_{eff}細胞の養子移入に基づき開発されたが、遺伝子組み換えマウスモデルおよびゲノム編集に基づくがんモデルのような、種々のがんモデルは全て可能な選択肢である。養子移入なしのインビボでのT細胞の直接的なハイスループット遺伝子操作により、T細胞集団の直接的な突然変異誘発が実現可能とされるはずである。

10

【0221】

CD8⁺ T細胞は、細胞内病原体および腫瘍に対して開始された適応免疫応答において基本的な役割を果たし、がん免疫応答において中心的な役割を果たしている。本明細書では、野生型動物のCD8⁺ T_{eff}細胞でおよび免疫療法の設定でハイスループットインビボCRISPRスクリーニングを実施し、これによって既知の抗原の存在下および非存在下でCD8⁺細胞傷害性T細胞の輸送および生存を調節する遺伝的要因のゲノムスケールのマップを作製し、文献において立証されていない複数のもを含むさまざまな機能的カテゴリに属する濃縮遺伝子を同定した。本研究はインビボでのT細胞のハイスループット遺伝子調査のための新たな手法を実証し、これを免疫学および免疫療法での多様な研究のために広く適用することができる。

20

【0222】

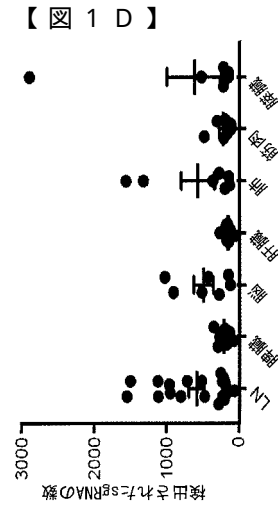
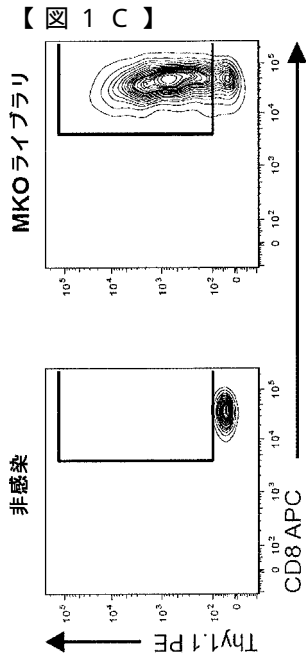
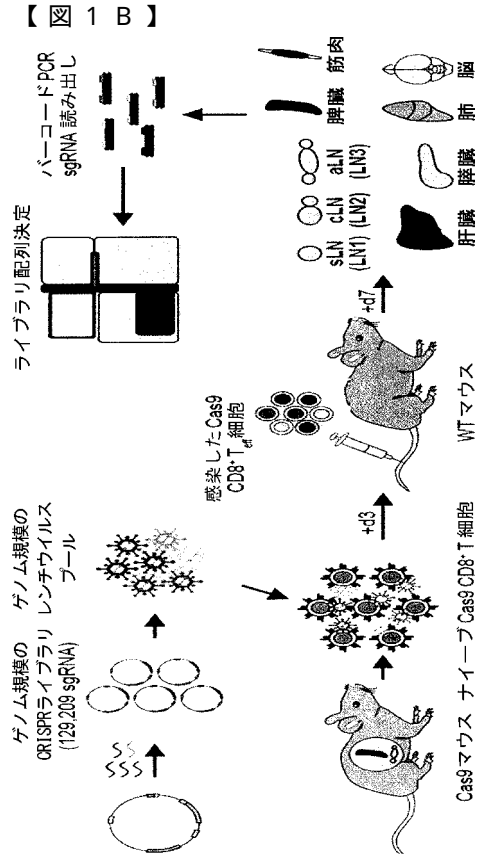
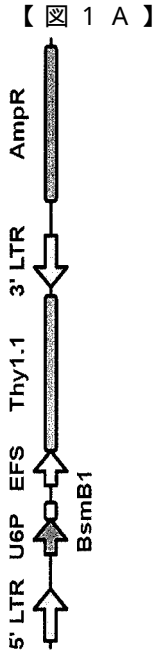
他の態様

本明細書での変数の任意の定義における要素のリストの列挙は、リストされた要素の単一の要素または組み合わせ(または部分的組み合わせ)としての変数の定義を含む。本明細書における態様の列挙は、任意の単一の態様として、または任意の他の態様もしくはその部分と組み合わせるその態様を含む。

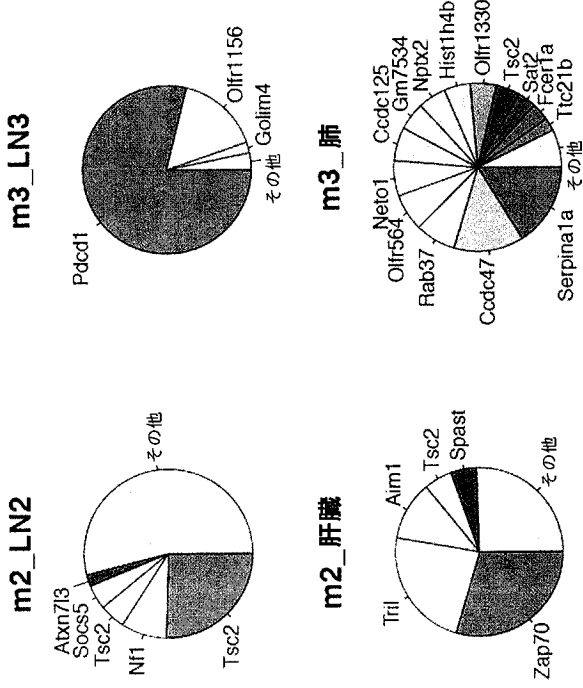
30

【0223】

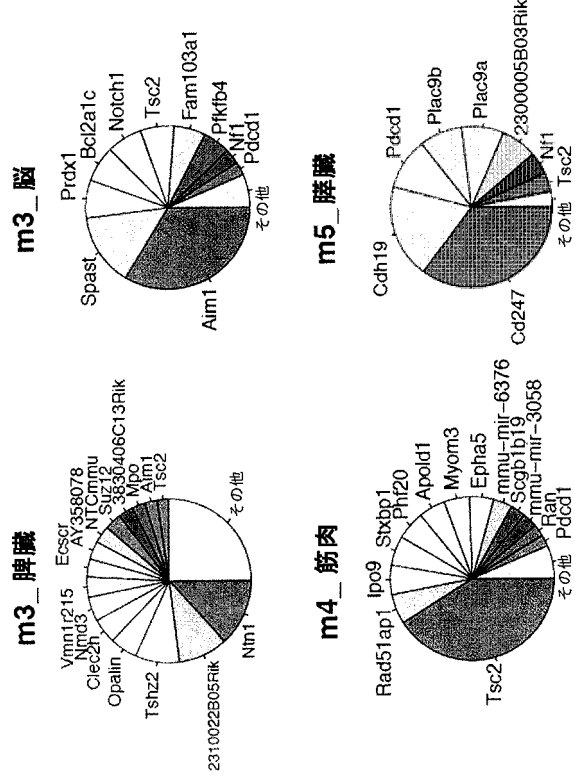
本明細書において引用されている各々のおよびあらゆる特許、特許出願、および刊行物の開示は、参照によりその全体が本明細書に組み入れられる。本発明は具体的な態様に関して開示されているが、本発明の真の趣旨および範囲から逸脱することなく、本発明の他の態様および変形物が当業者により考案されることが明白である。添付の特許請求の範囲は、全てのそのような態様および同等の変形物を含むと解釈されるように意図される。



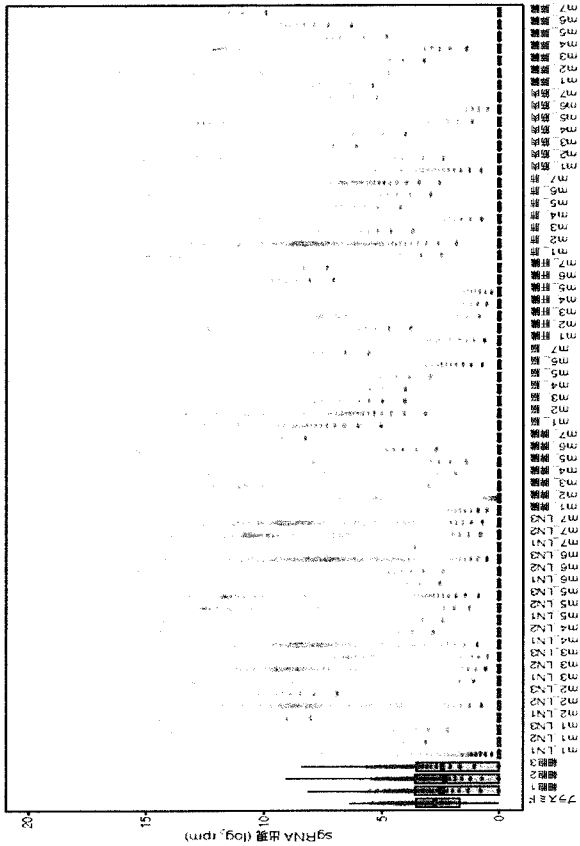
【 図 1 E 】



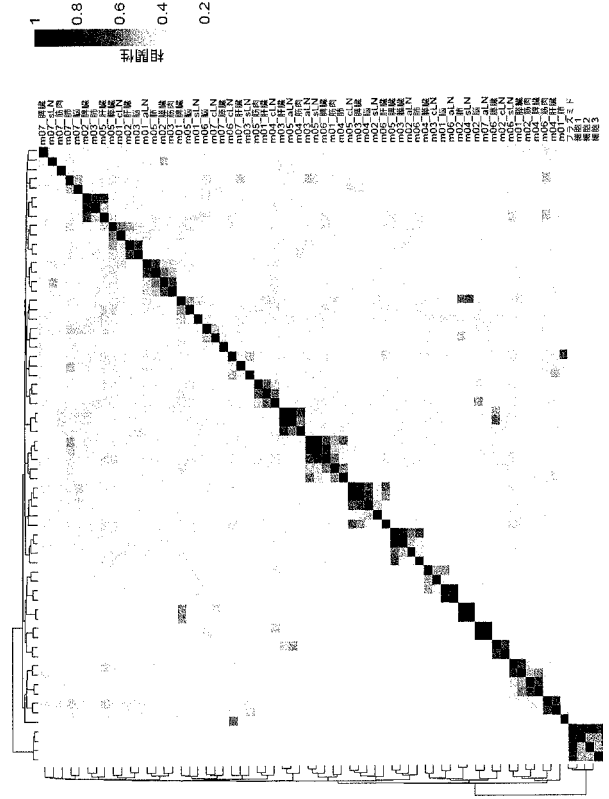
【 図 1 F 】



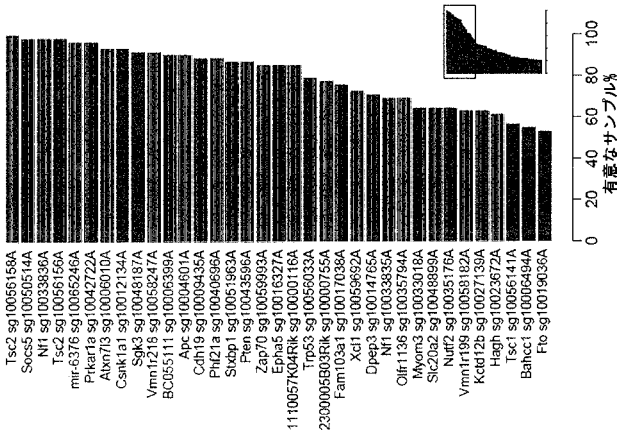
【 図 1 G 】



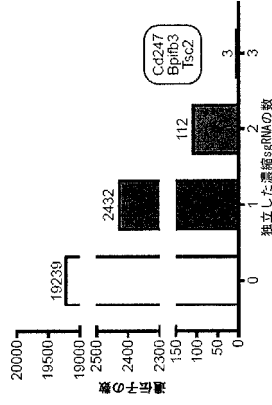
【 図 1 H 】



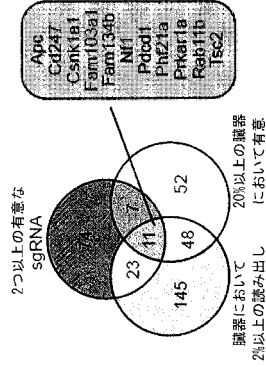
【 図 1 I 】



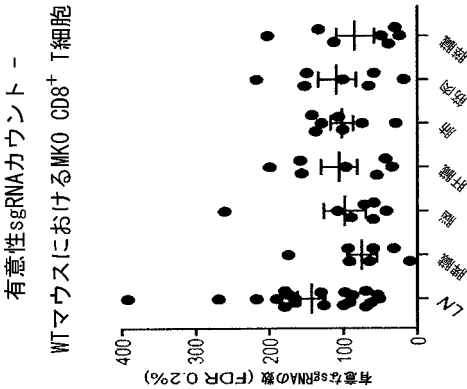
【 図 1 J 】



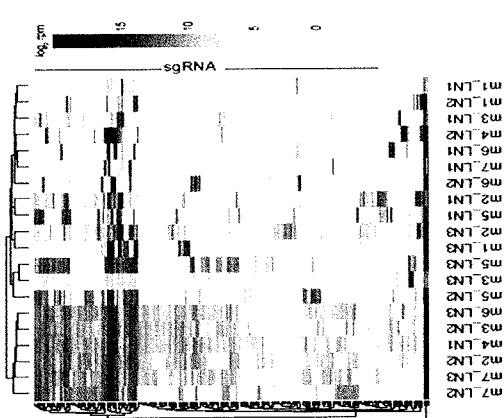
【 図 1 K 】



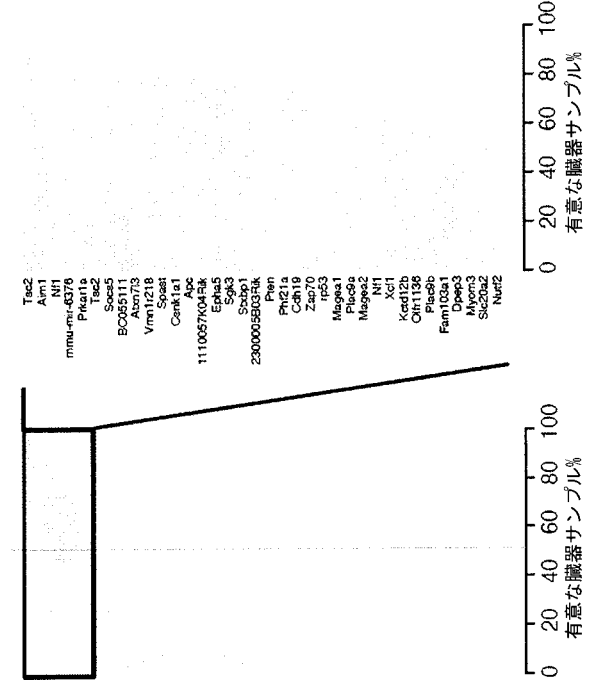
【 図 2 A 】

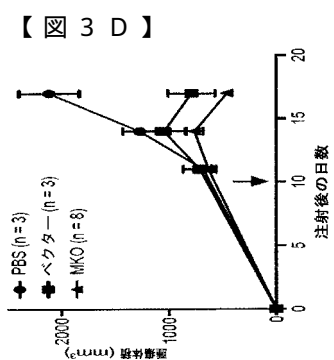
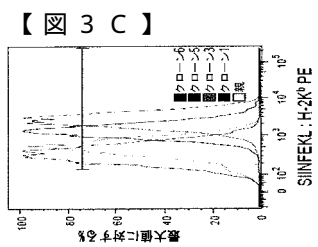
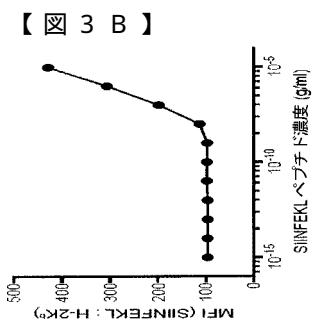
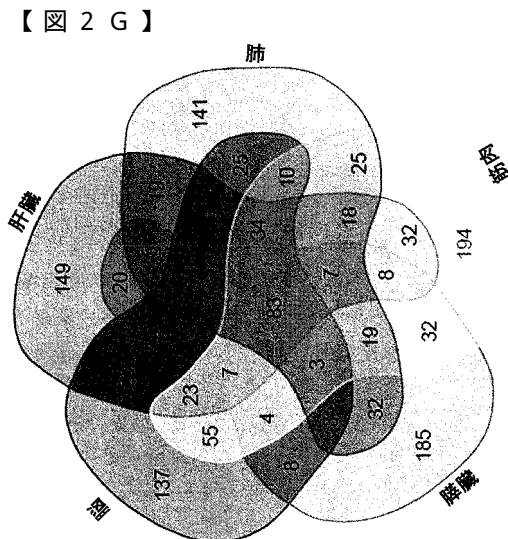
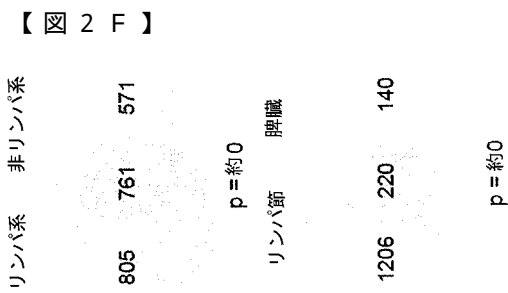
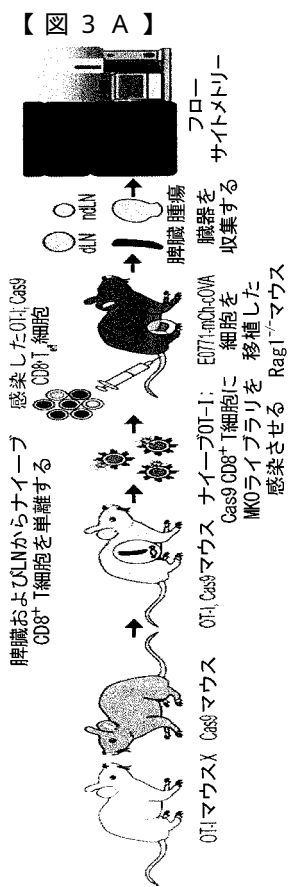
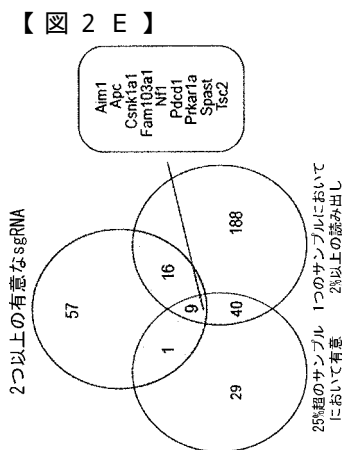
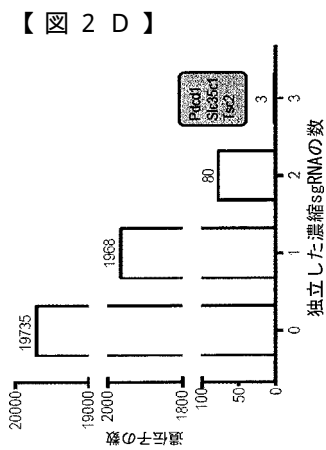


【 図 2 B 】

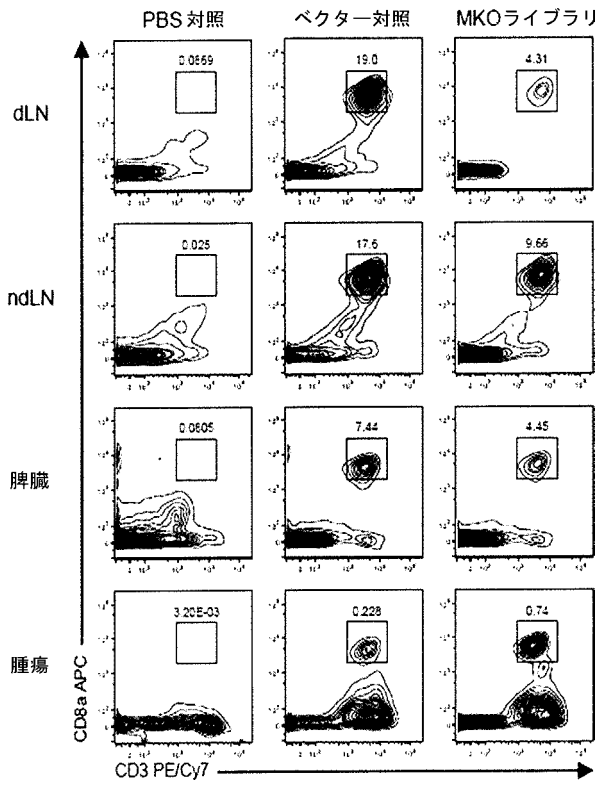


【 図 2 C 】

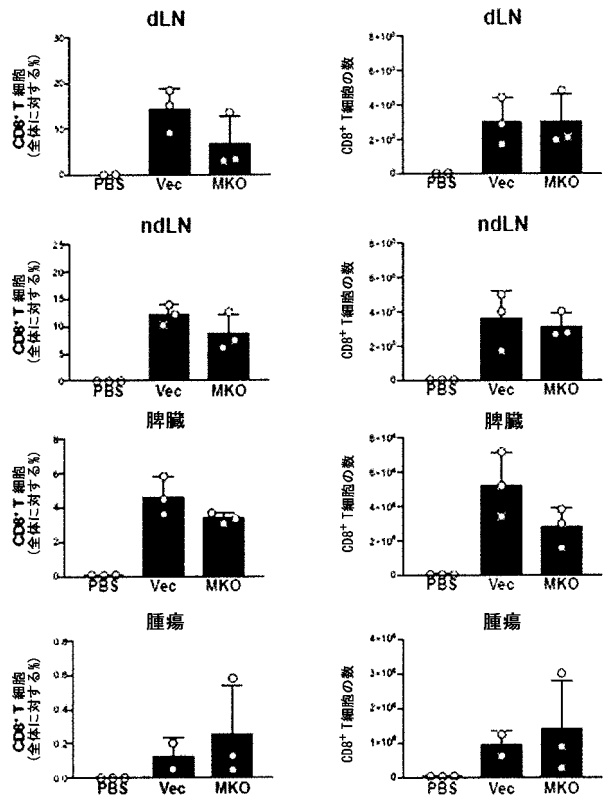




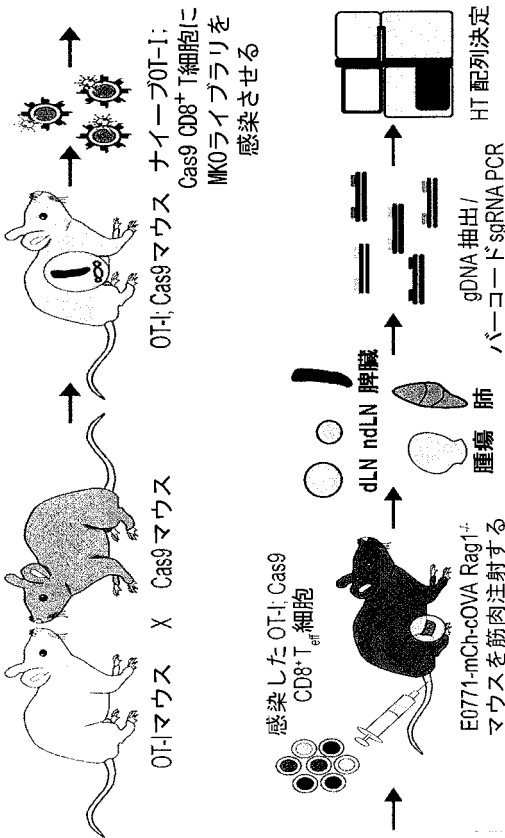
【図 3 E】



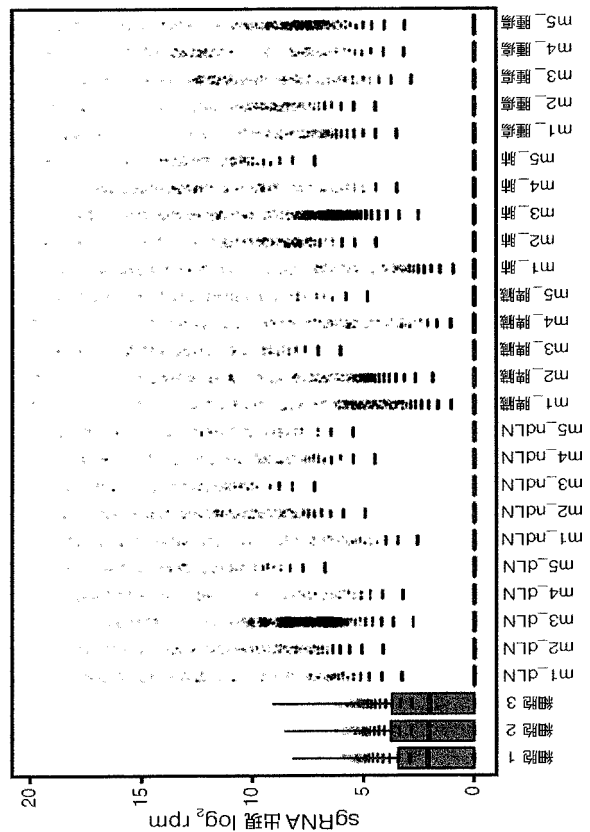
【図 3 F】



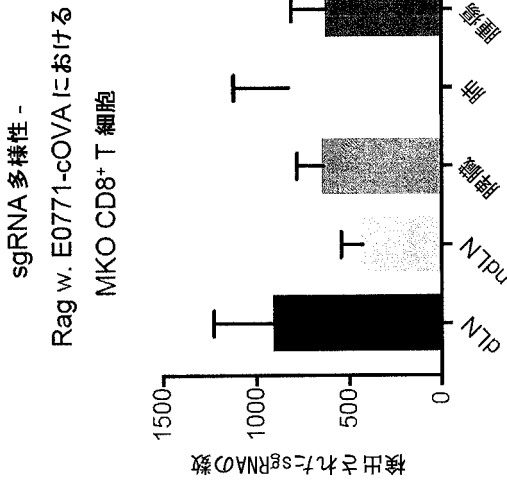
【図 4 A】



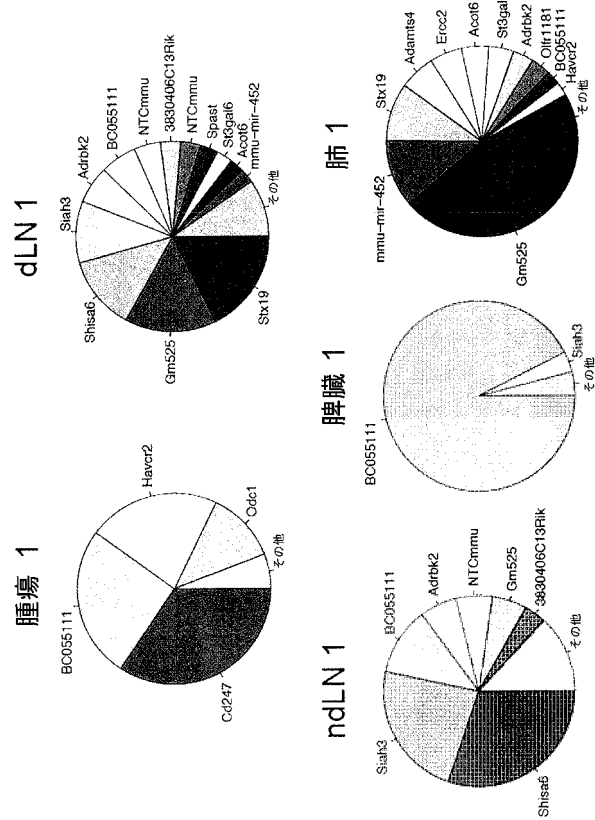
【図 4 B】



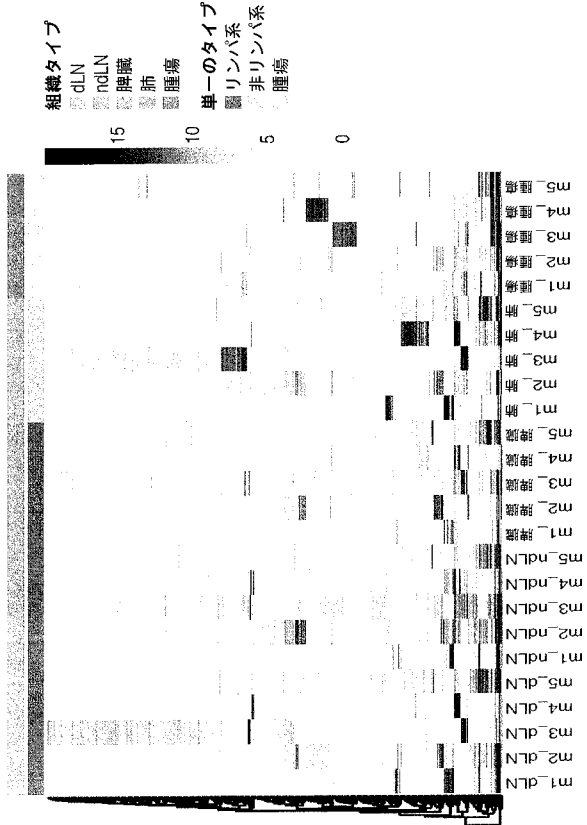
【図 4 C】



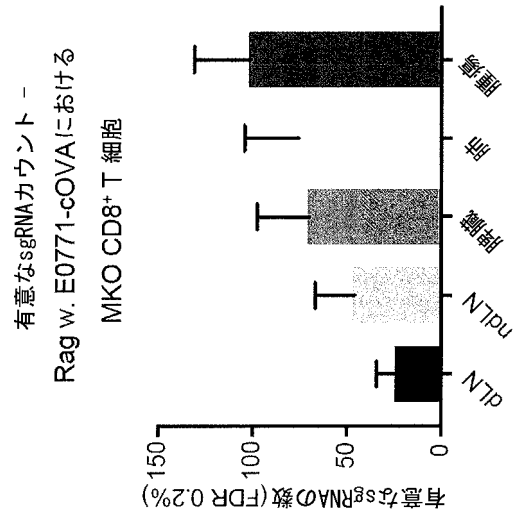
【図 4 D】



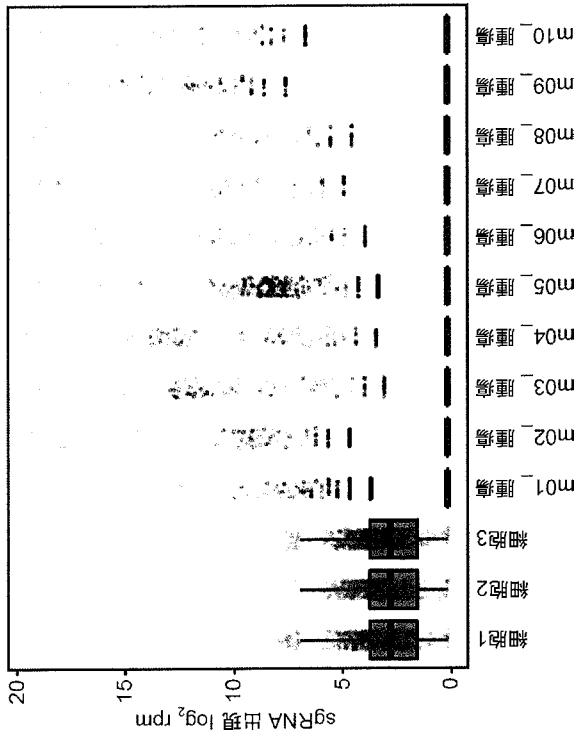
【図 4 E】



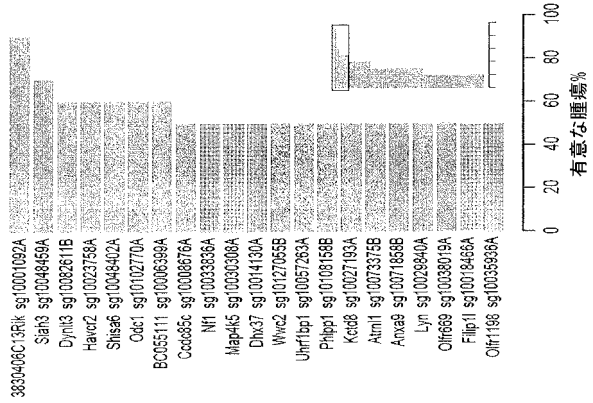
【図 4 F】



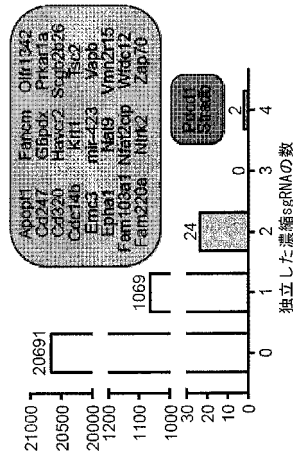
【図4G】



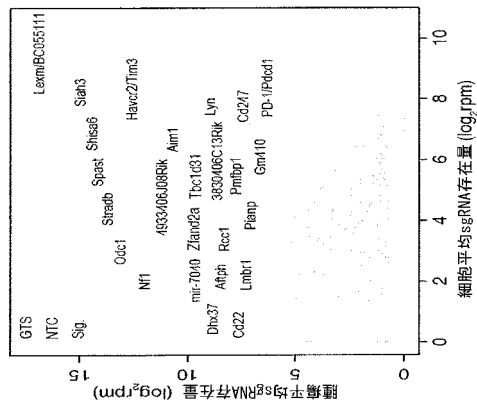
【図4H】



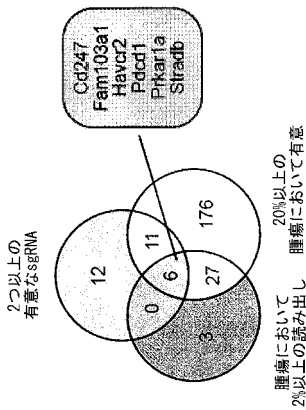
【図4I】



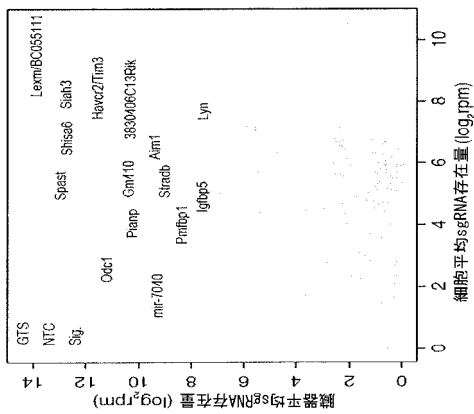
【図5B】



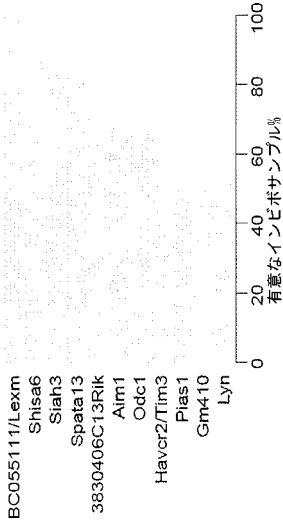
【図4J】



【図5A】



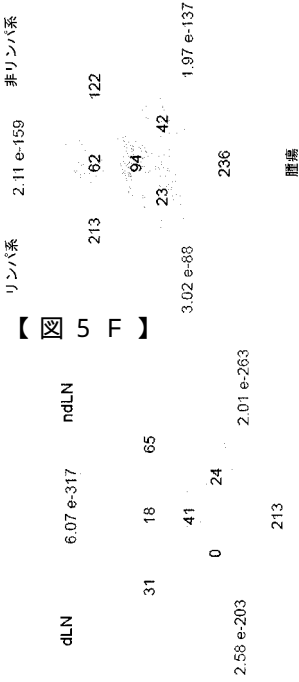
【 5 C 】



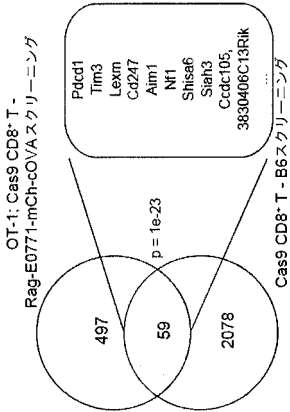
【 5 D 】

キーワード	n	p 値
獲得されたCD4+ T	8	7.83E-05
抗原性抗原反応	12	2.23E-04
プログラム細胞死に対する防御的応答	17	4.66E-04
ERK1およびERK2カスケードの正の調節	6	4.83E-04
細胞における自然免疫応答	5	6.38E-04
シナプス伝達の調節、GABA作動性	12	1.00E-03
NF-κBシグナル伝達経路	6	1.97E-03
CD4+モカイリン受容体結合	5	2.44E-03
ケモカイン受容体結合	7	2.84E-03
Rasグアンニヌクレオチド交換因子、ドメイン	10	3.25E-04
原形腫瘍の細胞質側の外因性成分	7	2.75E-03
オレオソーム	13	3.49E-03
核周部	184	1.05E-02
原形質膜	5	2.32E-02
免疫学的シナプス		

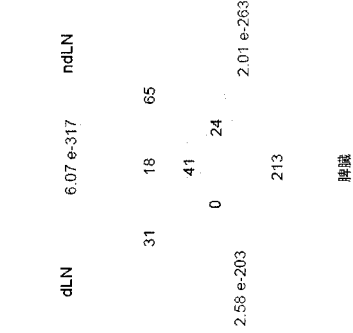
【 5 E 】



【 5 G 】

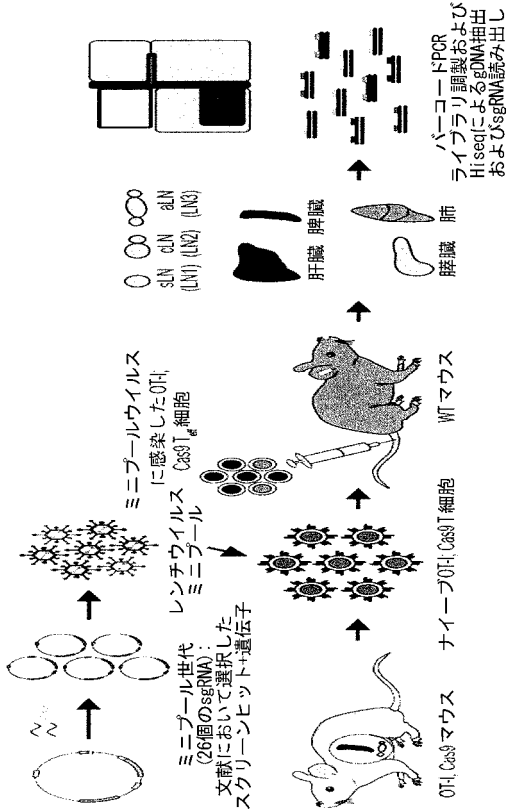


【 5 F 】

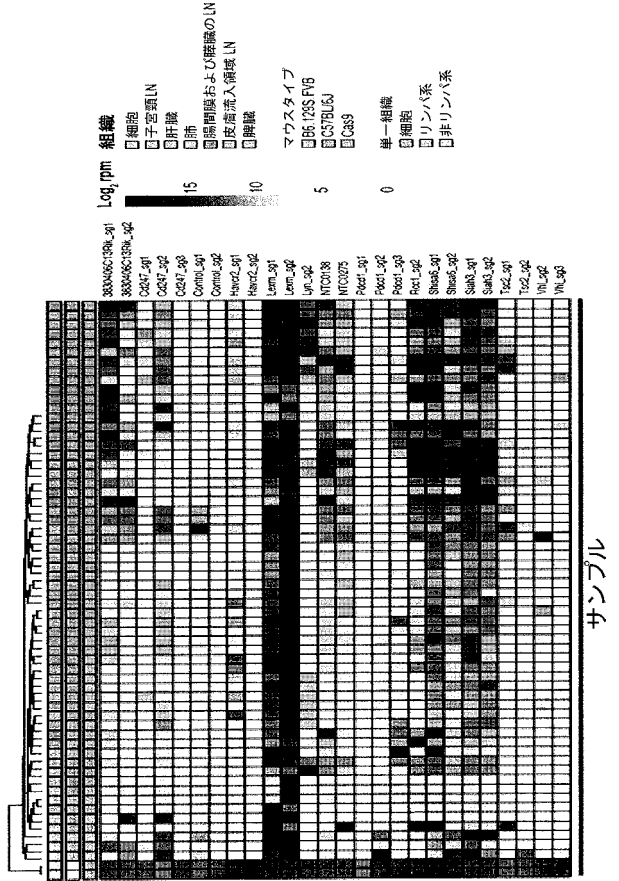


脾臓

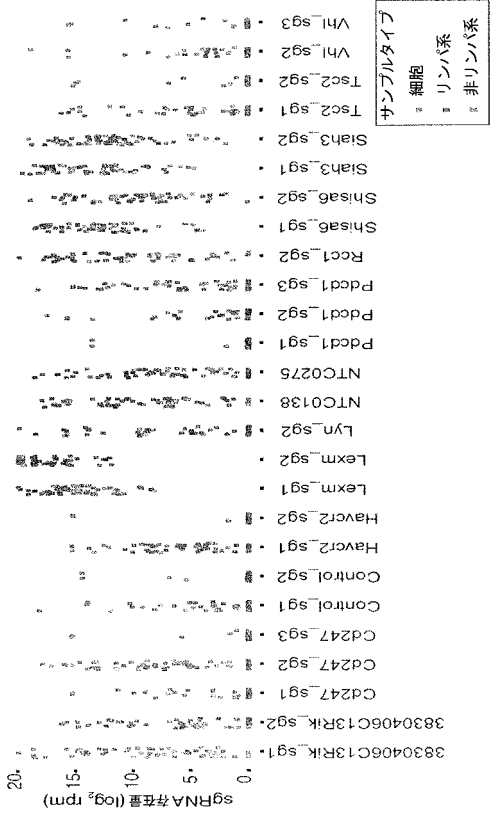
【図 6 A】



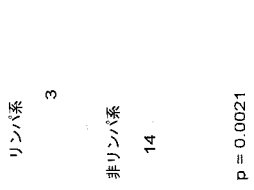
【図 6 B】



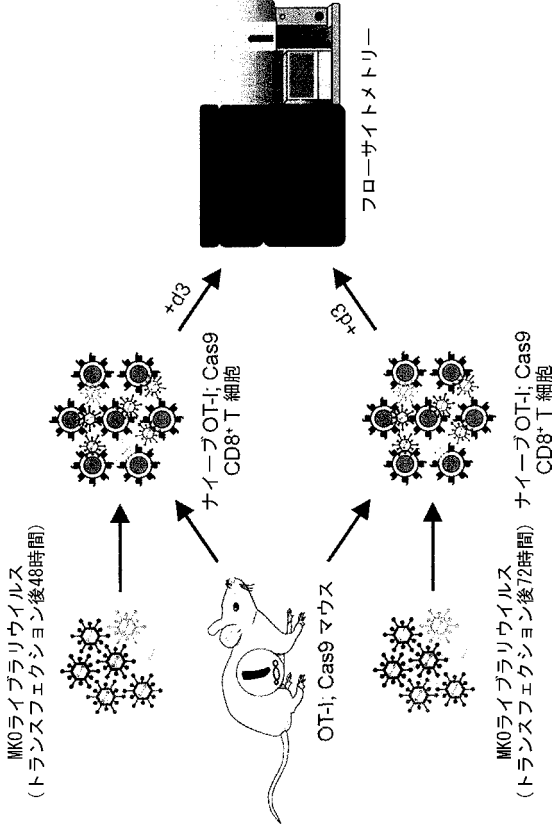
【図 6 C】



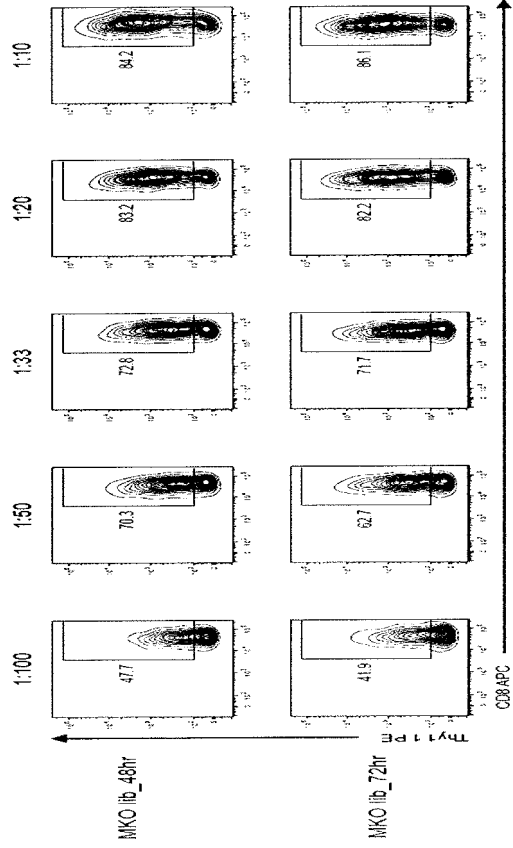
【図 6 D】



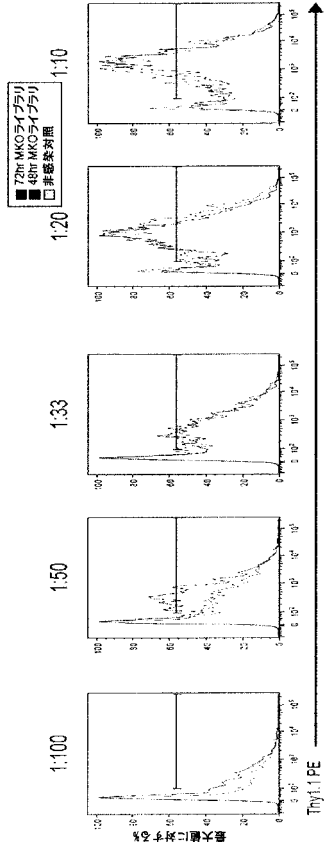
【図 7 A】



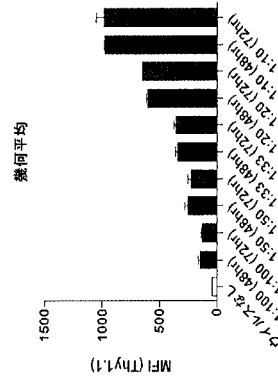
【図 7 B】



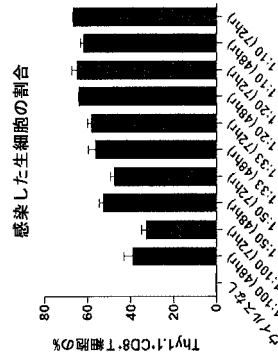
【図 7 C】



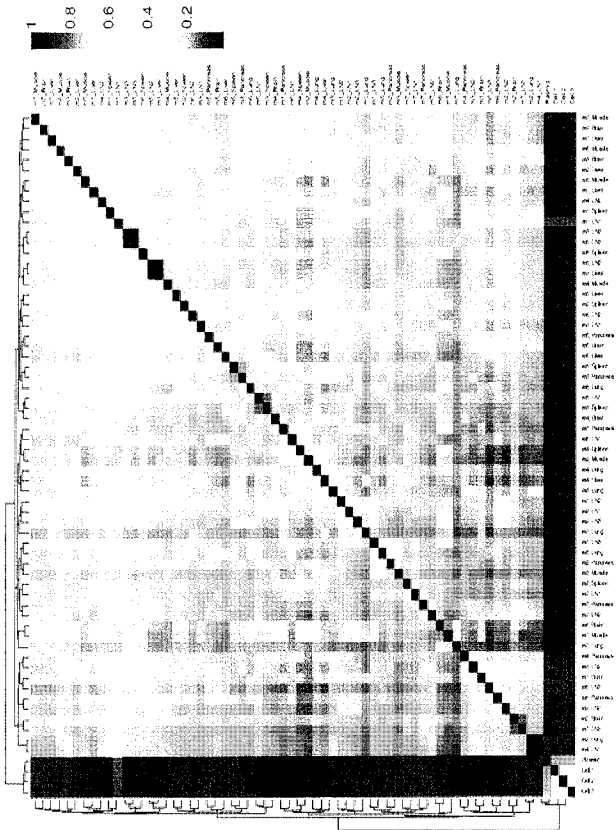
【図 7 D】



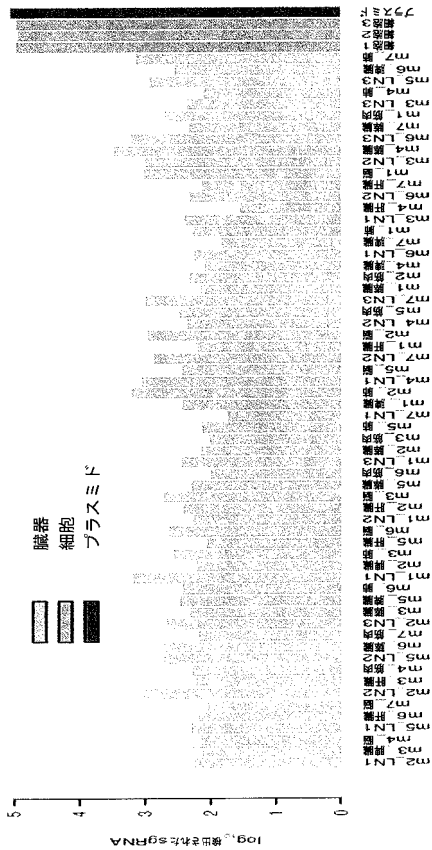
【図 7 E】



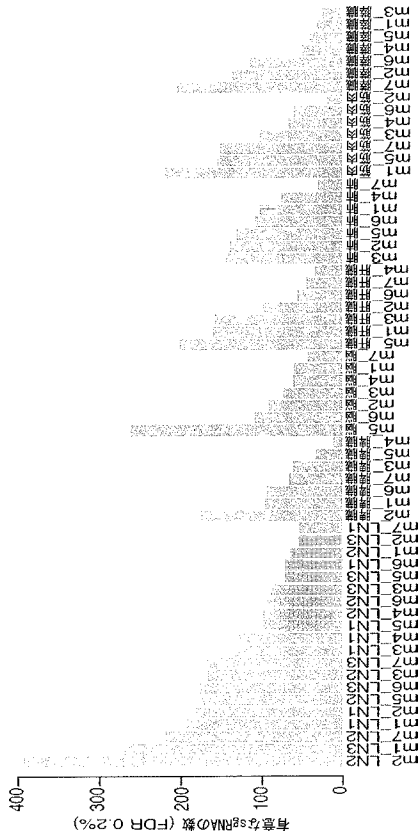
【 8 A 】



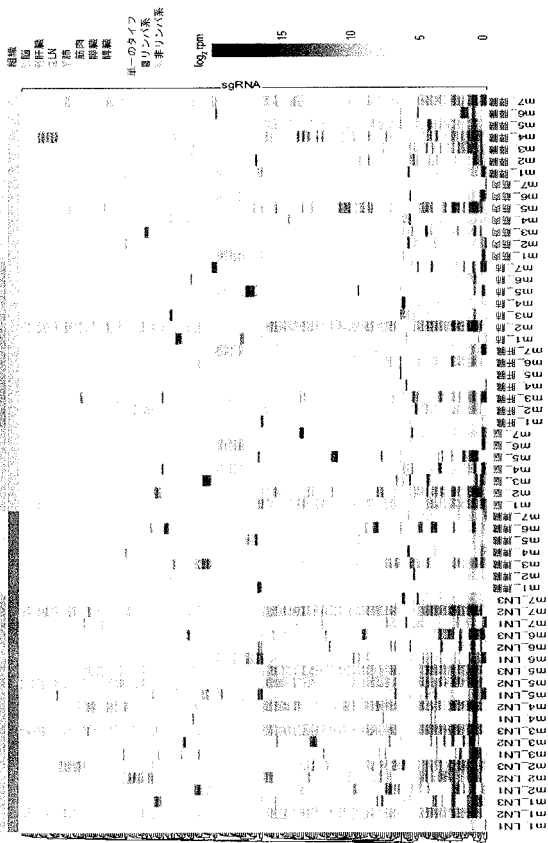
【 8 B 】



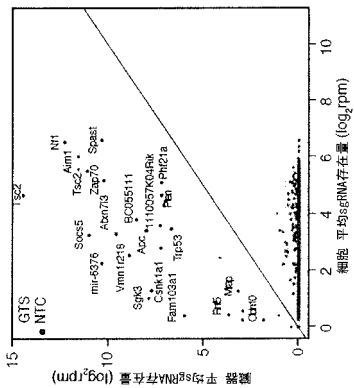
【 8 C 】



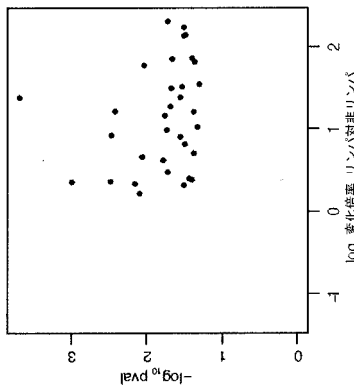
【 8 D 】



【 図 8 E 】



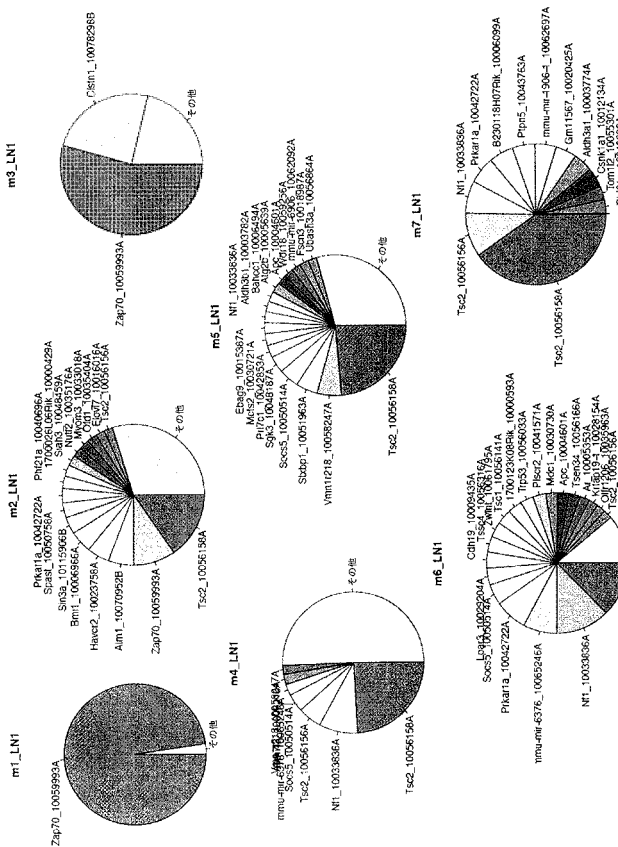
【 図 8 F 】



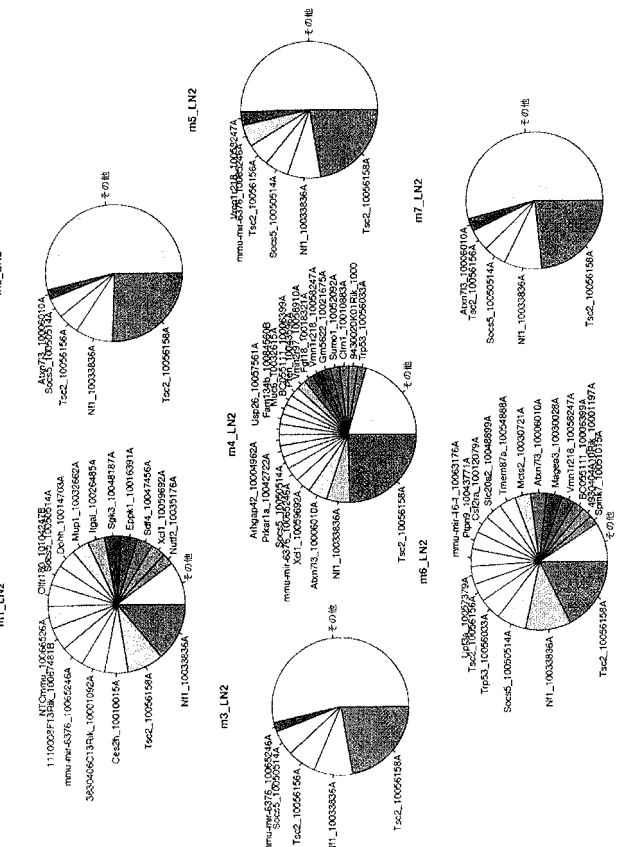
【 図 8 G 】

GO ターム	n	濃縮値
分化	82	7.73E-05
選択的スプライシング	469	4.46E-06
細胞膜	359	6.99E-04
細胞接着	63	1.18E-03
受容体	256	1.26E-03

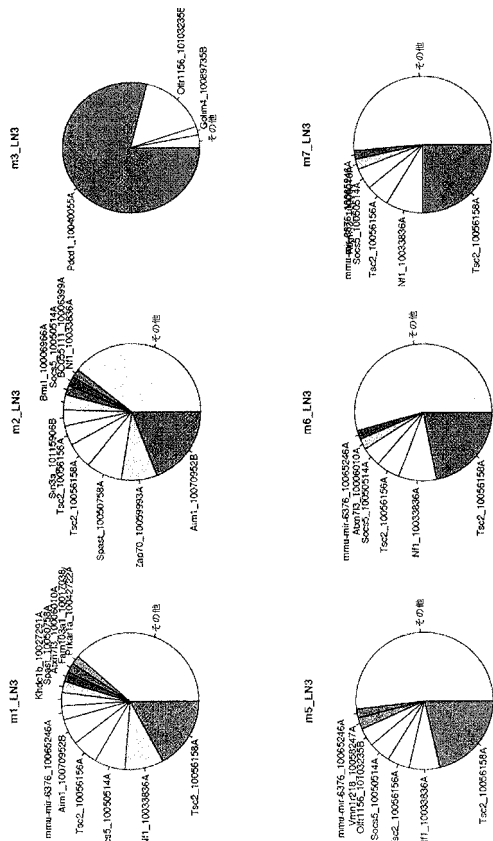
【 図 9 A 】



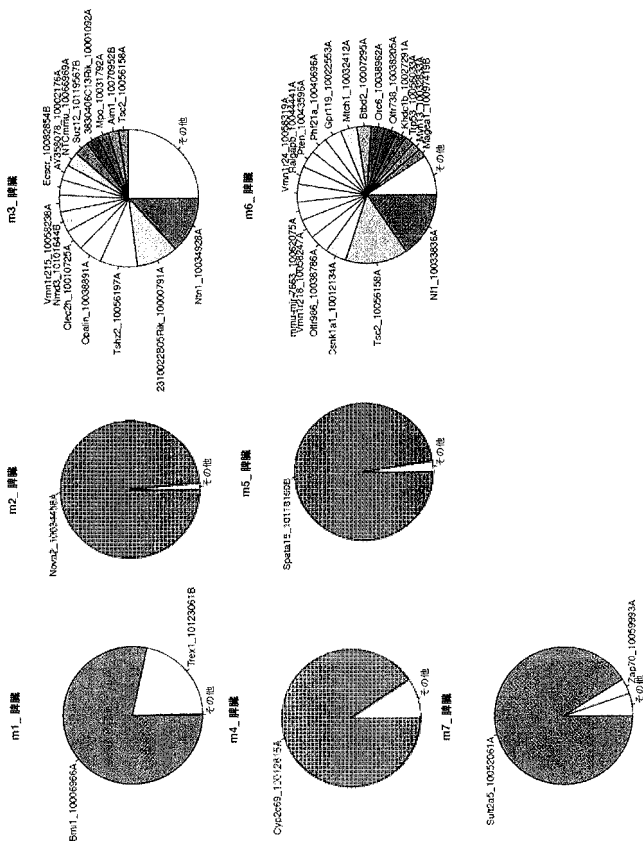
【 図 9 B 】



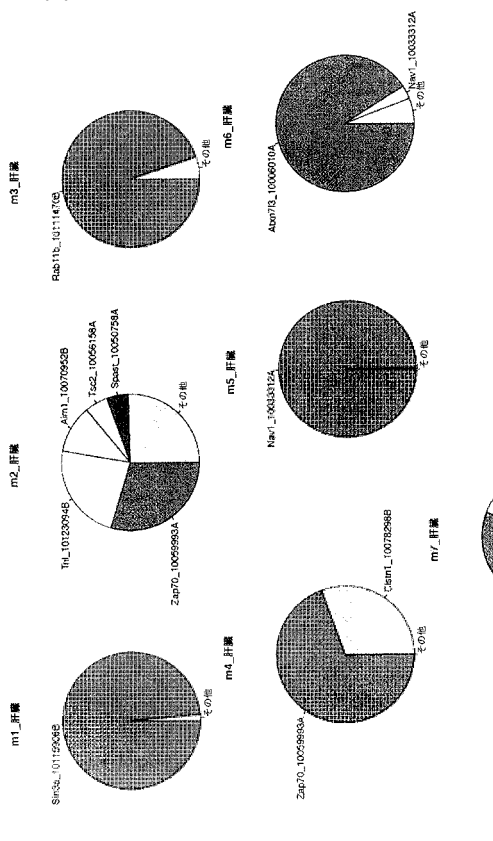
【 9 C 】



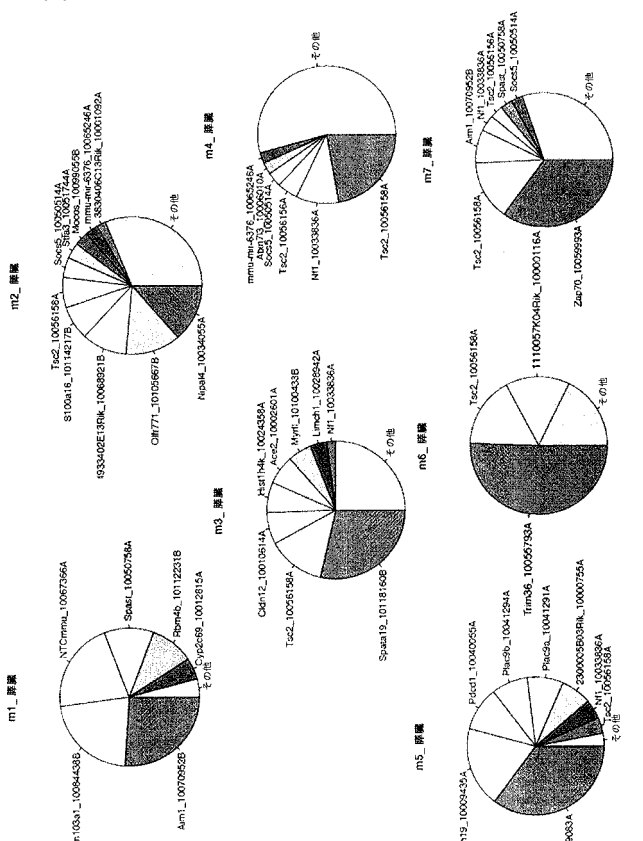
【 9 D 】



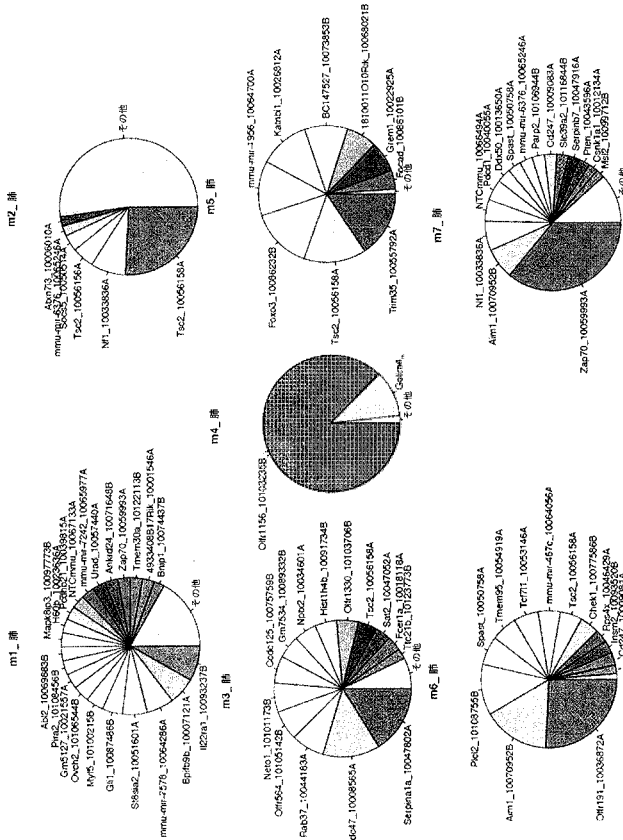
【 9 E 】



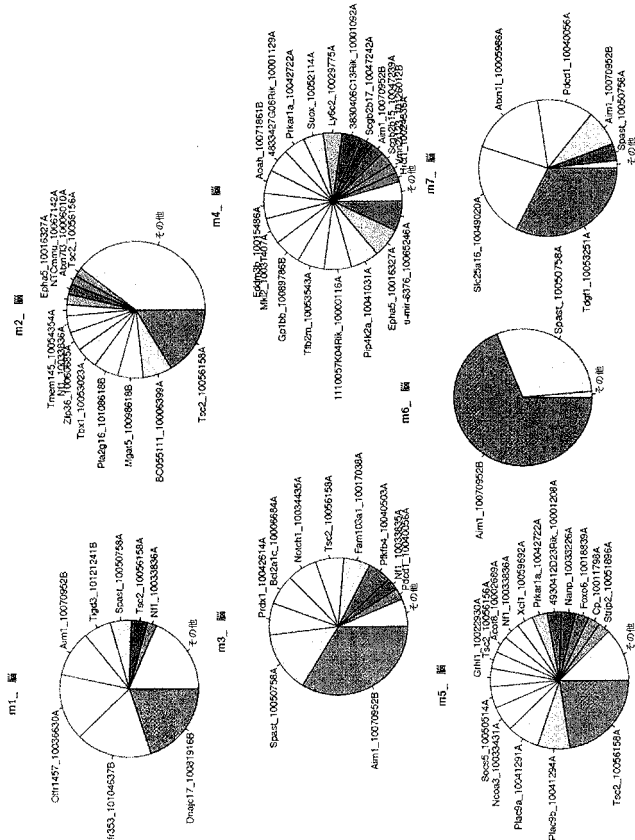
【 9 F 】



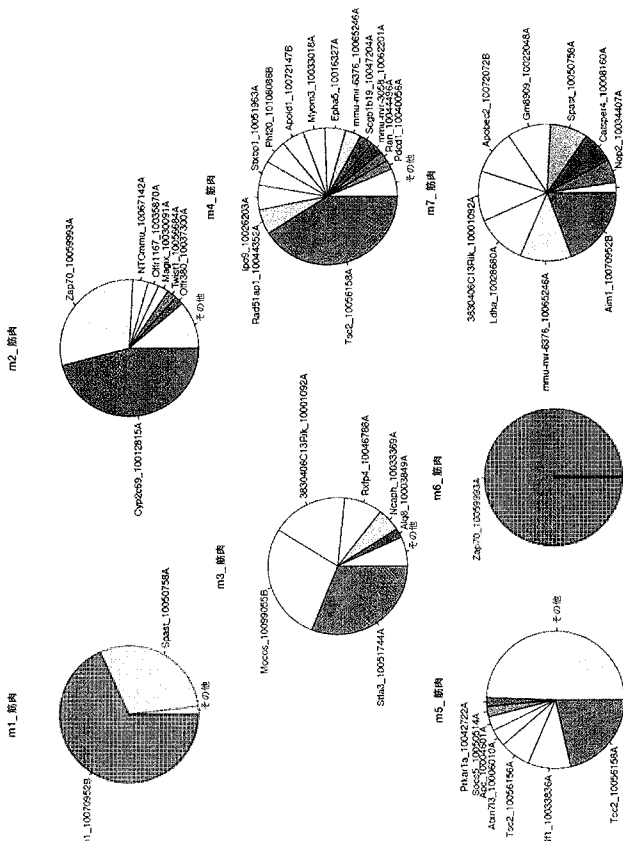
【 9 G 】



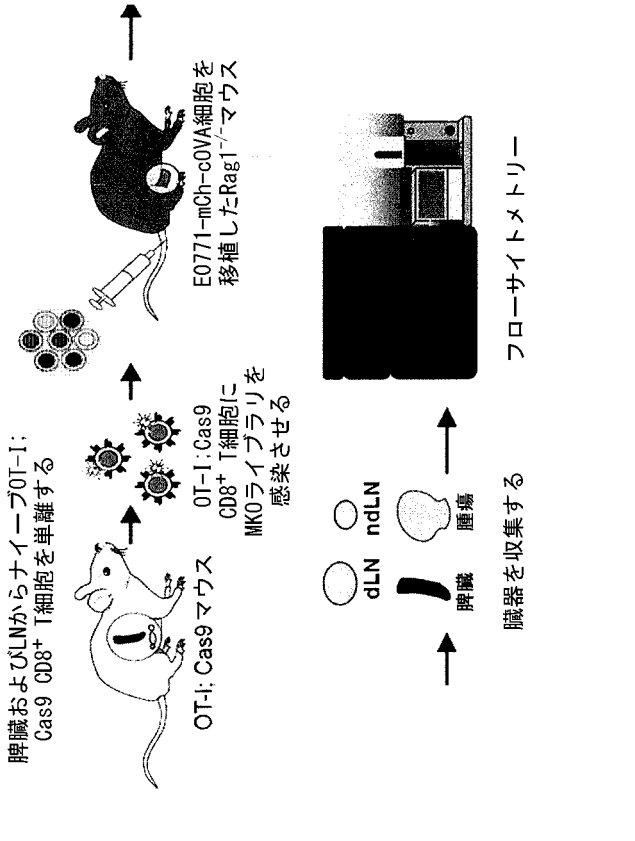
【 9 H 】

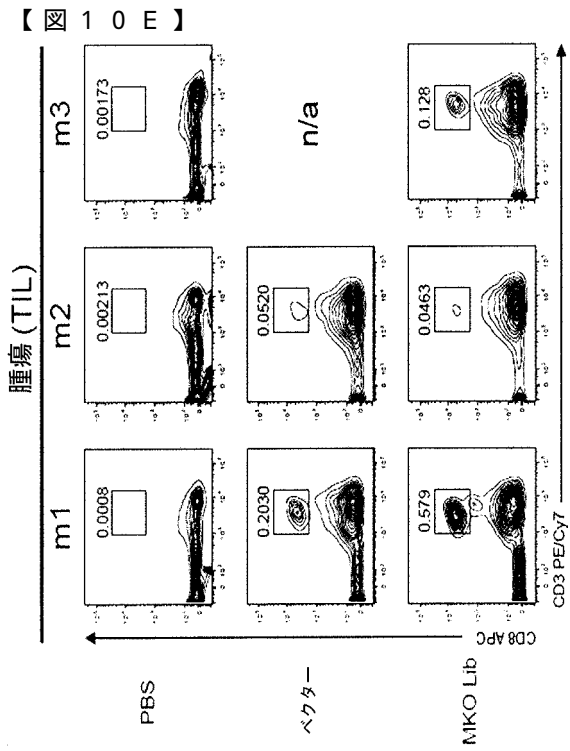
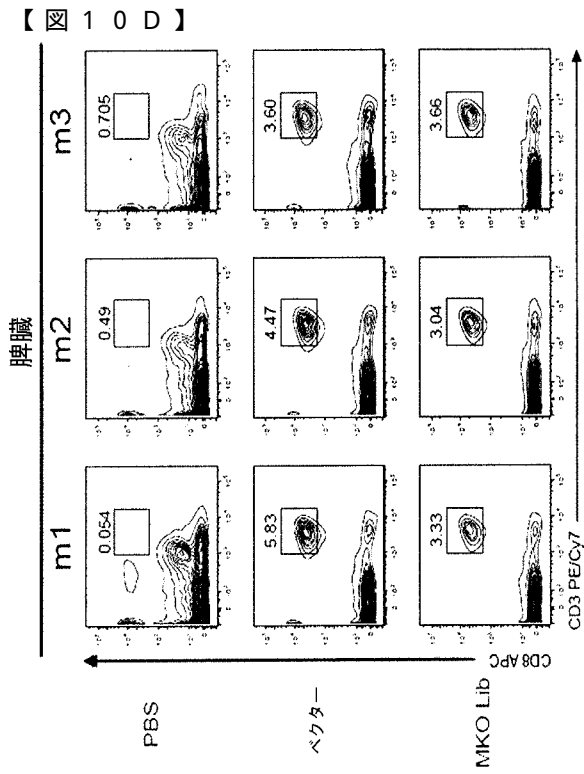
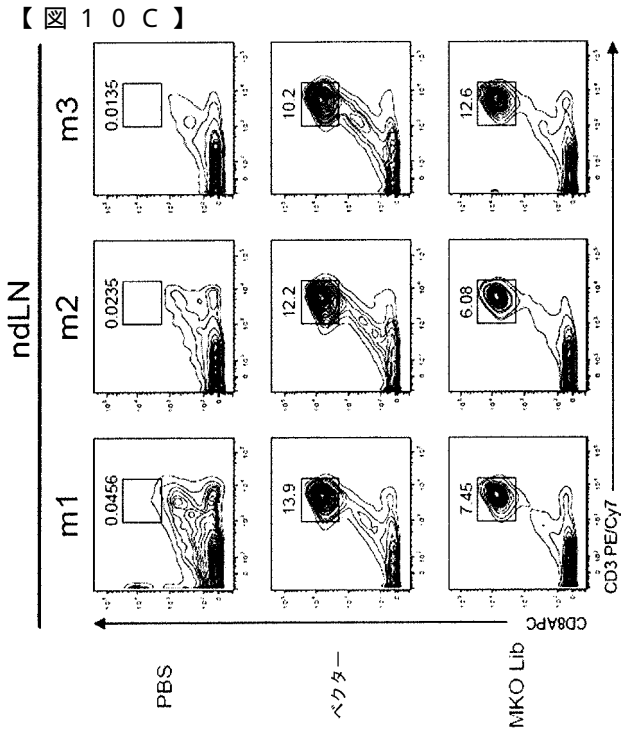
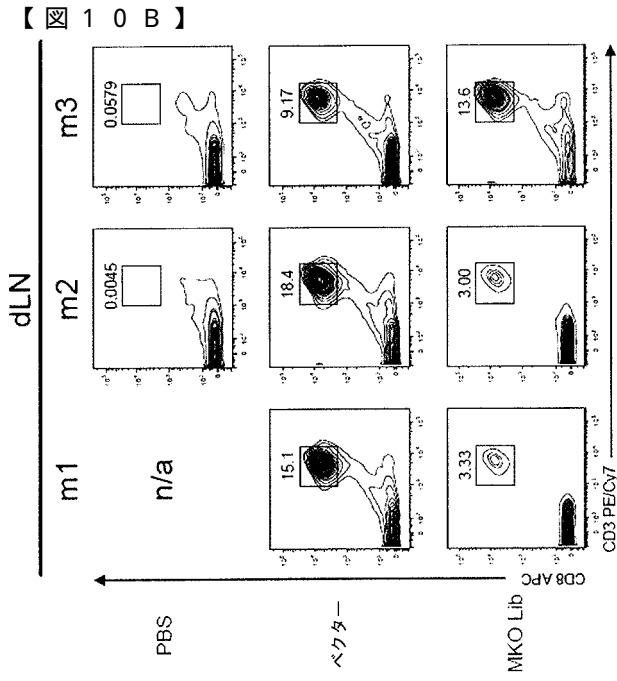


【 9 I 】

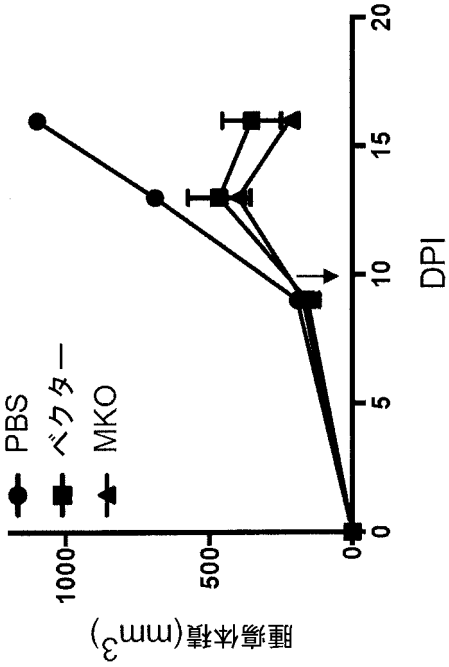


【 10 A 】

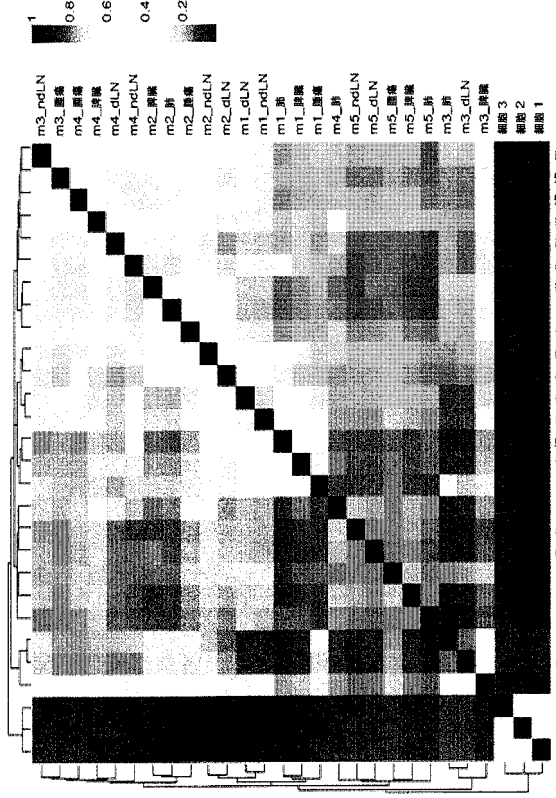




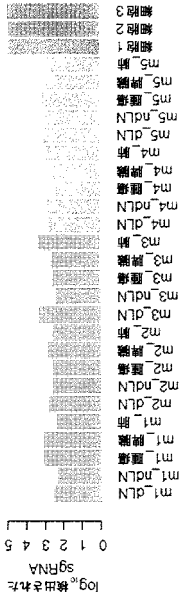
【図 10 F】



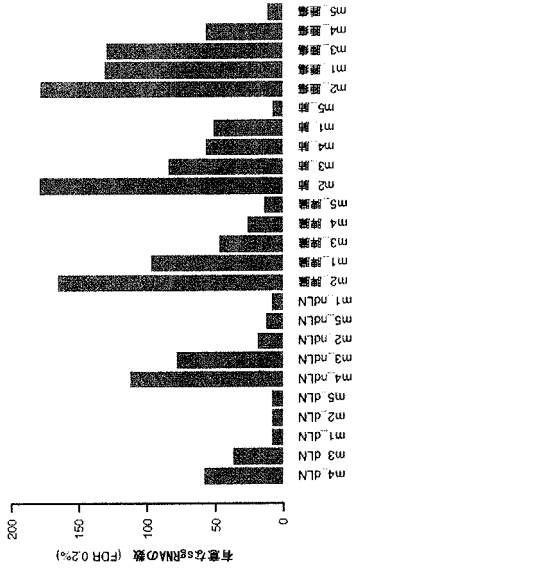
【図 11 A】



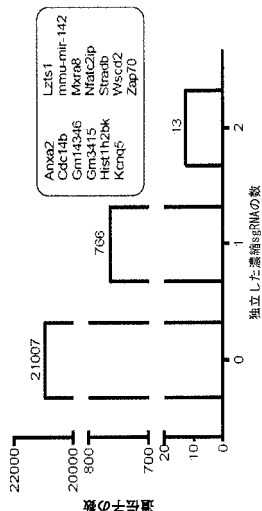
【図 11 B】



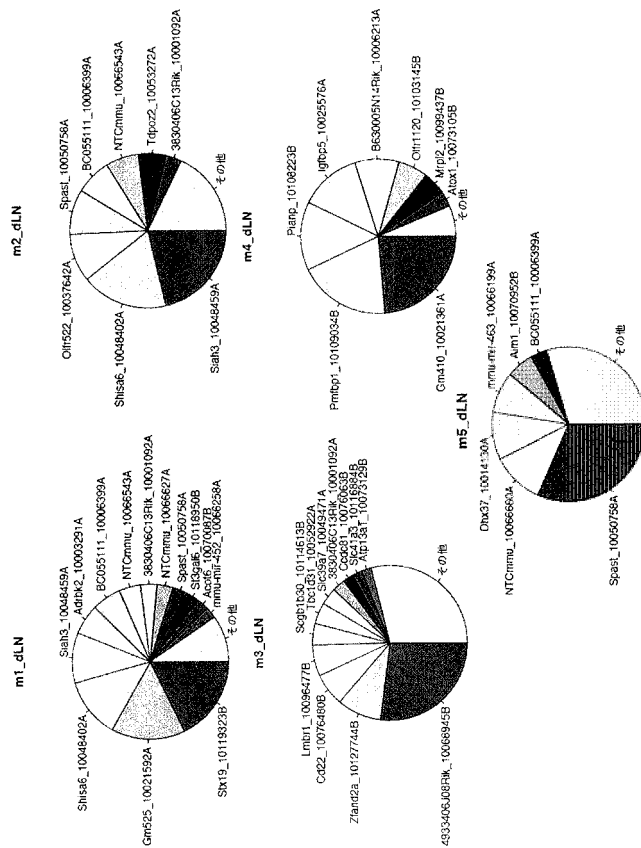
【図 11 C】



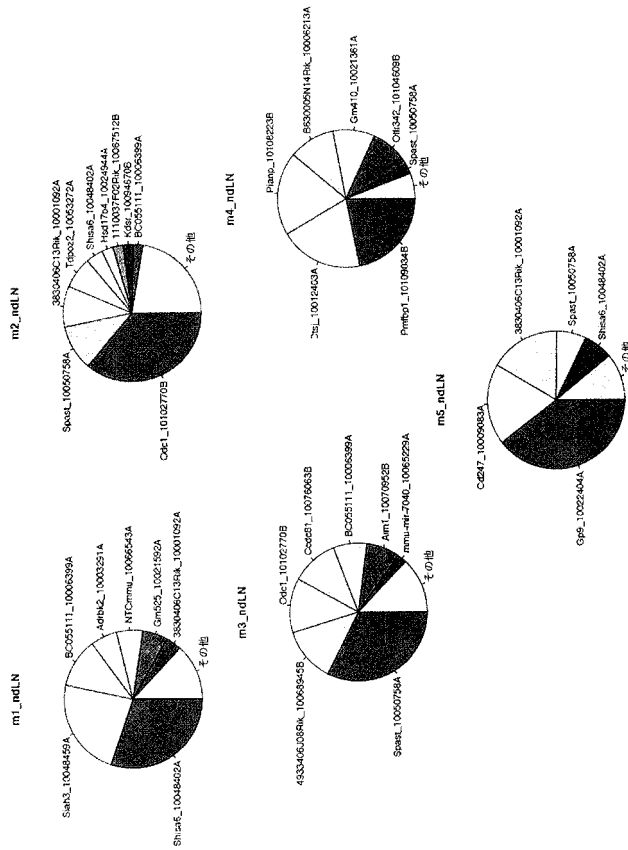
【 1 1 D 】



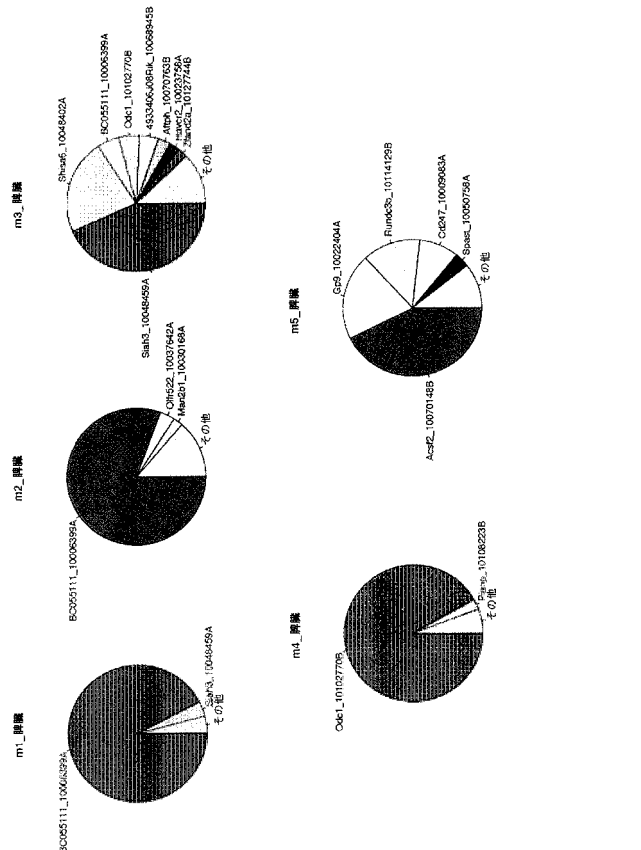
【 1 2 A 】



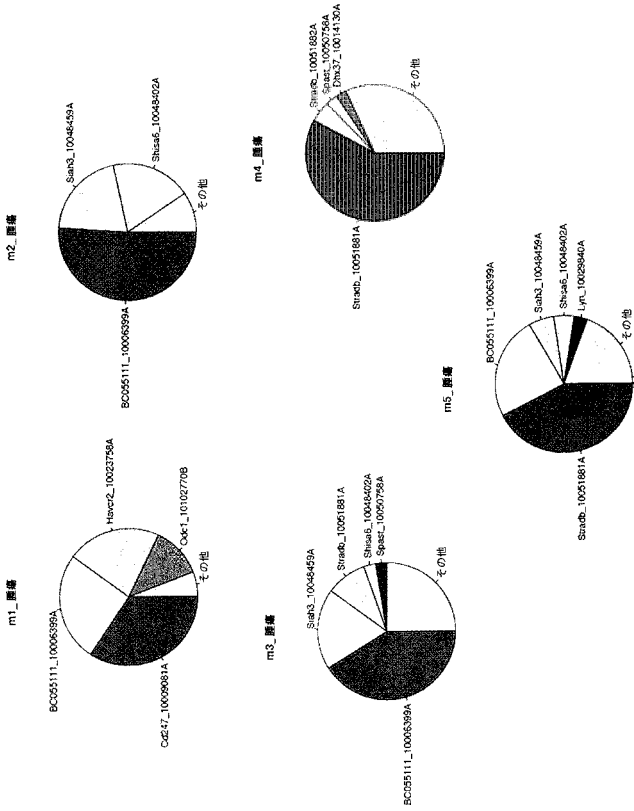
【 1 2 B 】



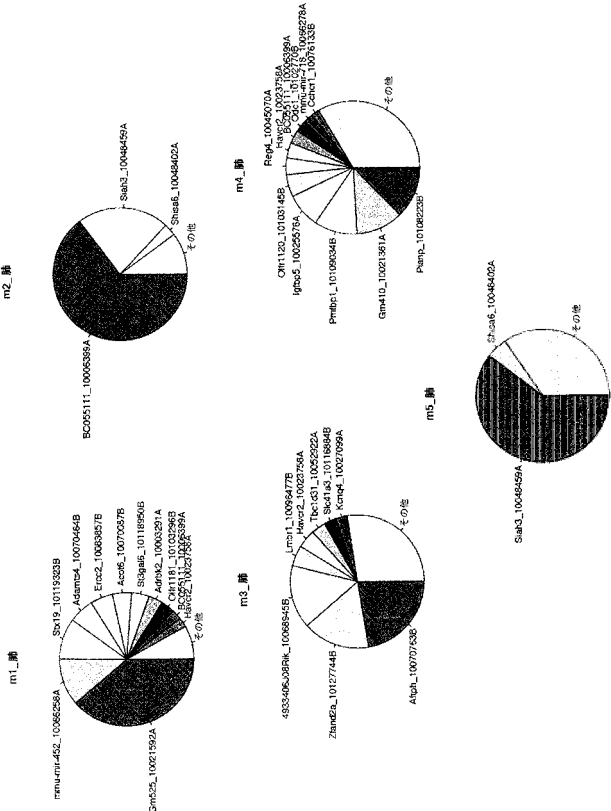
【 1 2 C 】



【 1 2 D 】



【 1 2 E 】

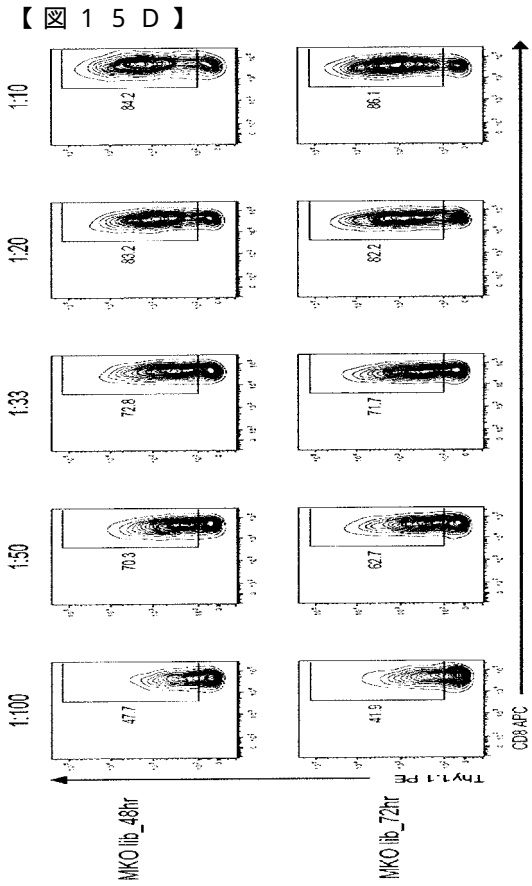
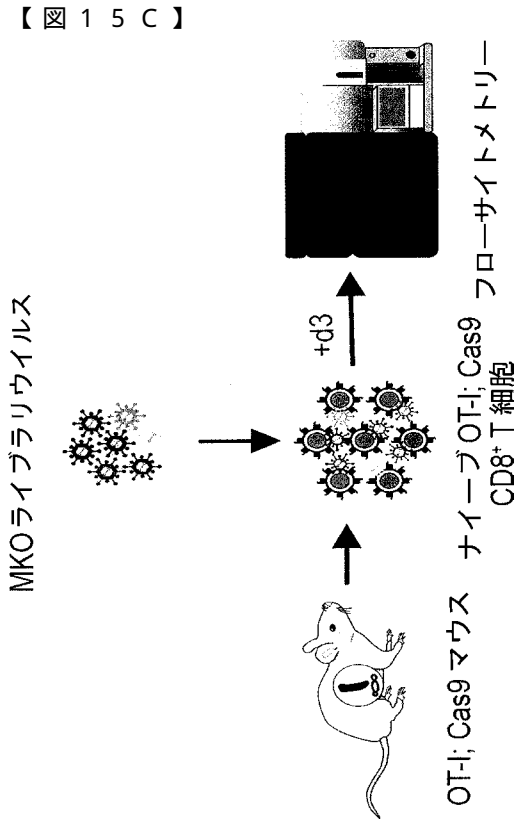
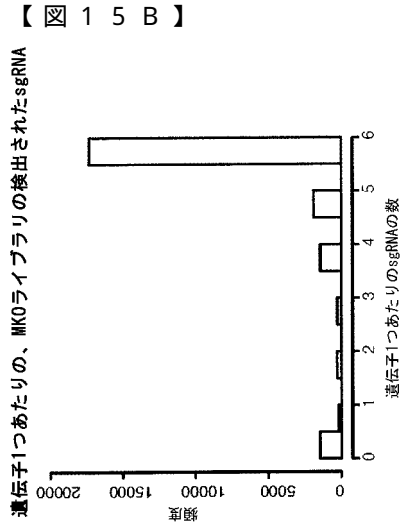
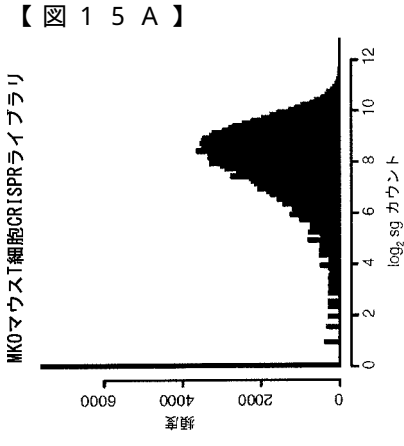


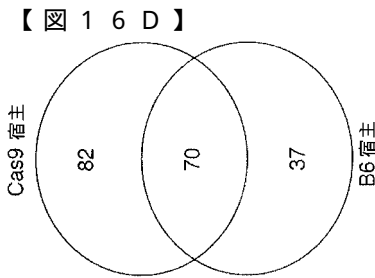
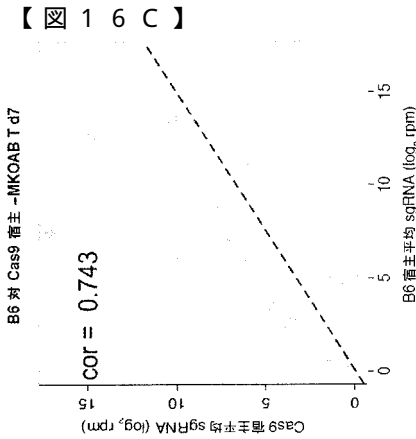
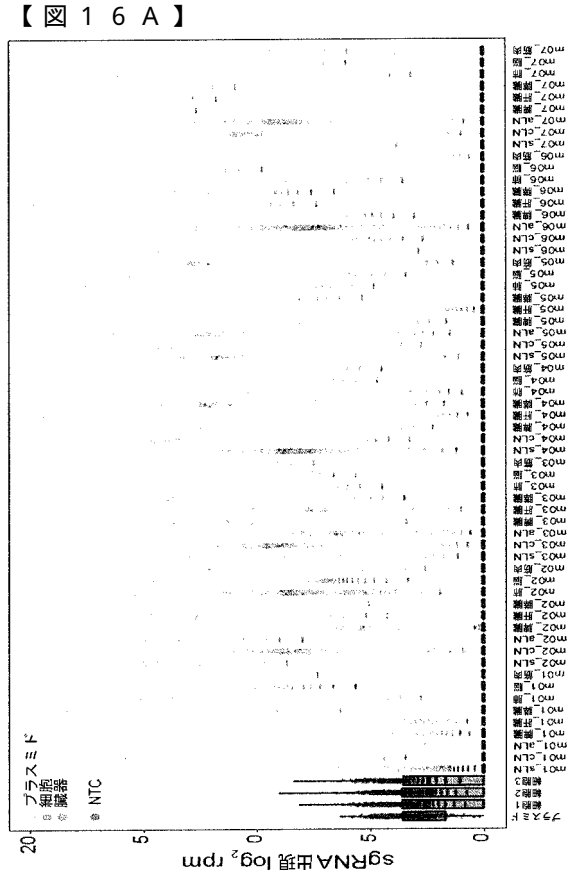
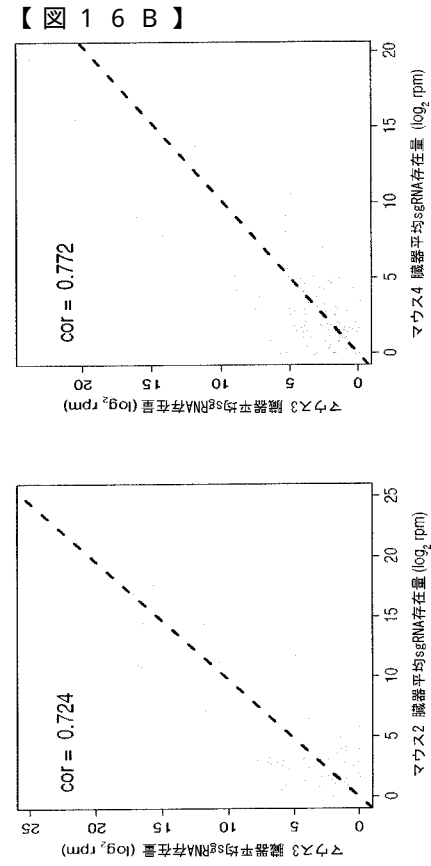
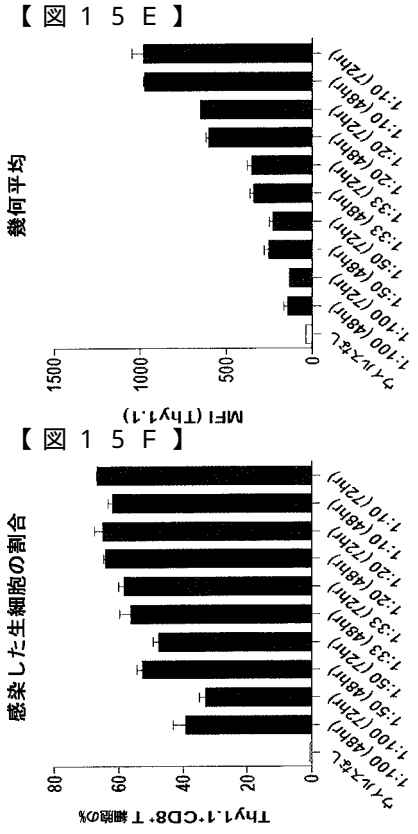
【 1 3 】

sgRNA	変化倍率対 NT 平均	t 検定対 NTC 平均
Lexm_sg2	4.039740667	1.68E-57
Lexm_sg1	3.297240882	1.68E-40
Shisa6_sg1	2.906492389	6.41E-29
Shah3_sg1	2.942100616	9.73E-28
Shah3_sg2	2.613933621	1.37E-21
Havrc2_sg2	0.006495433	6.32E-20
Pdcd1_sg1	0.007311084	6.34E-20
Cd247_sg3	0.0318748	7.89E-20
Tsc2_sg2	0.118302181	3.04E-15
Vhl_sg3_二重鎖	0.14566173	4.02E-15
Shisa6_sg2	2.181069602	3.07E-13
Rcc1_sg2	2.211589617	1.92E-10
Cd247_sg1	0.324099608	1.31E-08
Vhl_sg2_二重鎖	0.357798703	4.81E-07
Pdcd1_sg2	0.366709515	1.07E-06
3830406C13Rik_sg1	1.876787973	2.74E-06
Cd247_sg2	1.693861488	3.32E-05
Tsc2_sg1	0.770257006	0.132053653
3830406C13Rik_sg2	1.139354263	0.387359469
Havrc2_sg1	1.104986069	0.440164842
Pdcd1_sg3	1.069296326	0.658715105
Lyn_sg2	1.033384757	0.854463638

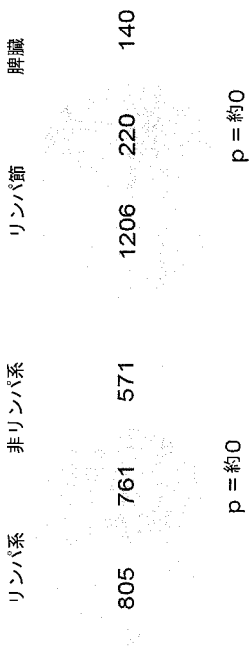
【 1 4 A 】

LOCUS	p50C17	9355 bp	DNA	circular	primer_bind	misc_feature
COMMENT	SIDE_CHEM1	MATTHEW_DONG1			1717..1736	pp13
COMMENT	WIREREPLYTYPE_P1	psmid			2131..2230	pp13
FEATURES	key=1	qualifiers			/dnas:title="pp13"	/vnt:key="21"
misc_feature	5733..5765				1985..2065	
rep_origin	/dnas:title="Amp^r"				/note="chimeric rna backbone 1 (smb2)"	
rep_origin	/vnt:key="21"				2039..2400	36 (rv)
rep_origin	complement(5724..6339)				1971..1991	
rep_origin	/vnt:key="3"				/note="HK0037"	
rep_origin	/vnt:key="3"				3581..3069	
rep_origin	/vnt:key="3"				/dnas:title="plko_TSC005"	
rep_origin	/vnt:key="3"				3581..3069	
LTR	/vnt:key="3"				/note="Thy1.1 mouse"	
LTR	3202..3437				/note="Short polyA"	
polyA_signal	/vnt:key="3"				2463..3201	
polyA_signal	/vnt:key="3"				3107..285	p50C17
polyA_signal	3314..3644				/note="EF5-F1"	
polyA_signal	/vnt:key="3"				3124..3143	
polyA_signal	/vnt:key="3"				1894..1924	008_R1
polyA_signal	/vnt:key="3"				2132..2195	
polyA_signal	/vnt:key="3"				/note="ArFay-F1"	
polyA_signal	3301..3356				1884..1912	01_R1
polyA_signal	/vnt:key="3"				/note="HK0157"	
polyA_signal	/vnt:key="3"				1884..1912	01_R1
polyA_signal	/vnt:key="3"				/note="HK0138"	
polyA_signal	2289..2310				/note="HK0138"	
polyA_signal	/vnt:key="3"				1701..1719	
polyA_signal	/vnt:key="3"				/note="p6K03-F3"	
polyA_signal	/vnt:key="3"				/note="p6K2 BC priming site F"	
polyA_signal	568..692				2142..2166	BC priming site R"
polyA_signal	/vnt:key="3"				/note="p5C008pCRL_F1"	
polyA_signal	/vnt:key="3"				1707..1728	BC priming site R"
polyA_signal	/vnt:key="3"				2497..2516	
polyA_signal	/vnt:key="3"				1390..1411	
polyA_signal	/vnt:key="3"				/note="p5C008pCRL_R2"	
polyA_signal	/vnt:key="3"				2364..2322	008pCRL_F2"
polyA_signal	/vnt:key="3"				2823..2814	
polyA_signal	/vnt:key="3"				/note="p5C008pCRL_R3"	
polyA_signal	/vnt:key="3"				/note="p5C008pCRL_F3"	
polyA_signal	/vnt:key="3"				1932..1966	
polyA_signal	/vnt:key="3"				/note="p5C011pCRLprimingsite"	
polyA_signal	/vnt:key="3"				2904..2910	
polyA_signal	/vnt:key="3"				/note="Codon optimized remove 6smb1"	

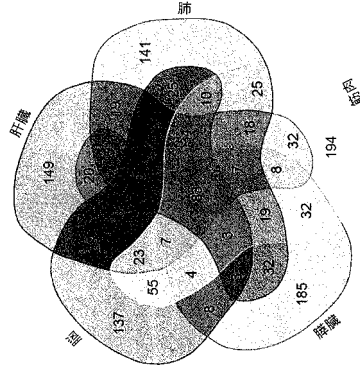




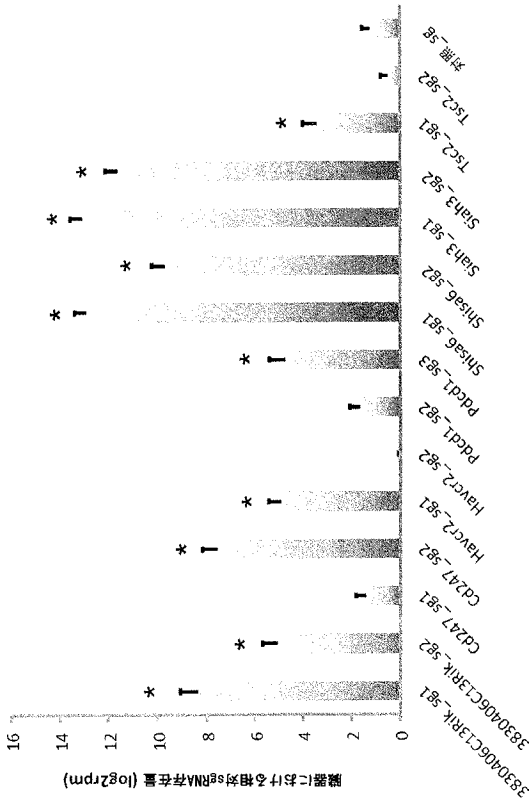
【図 17 A】



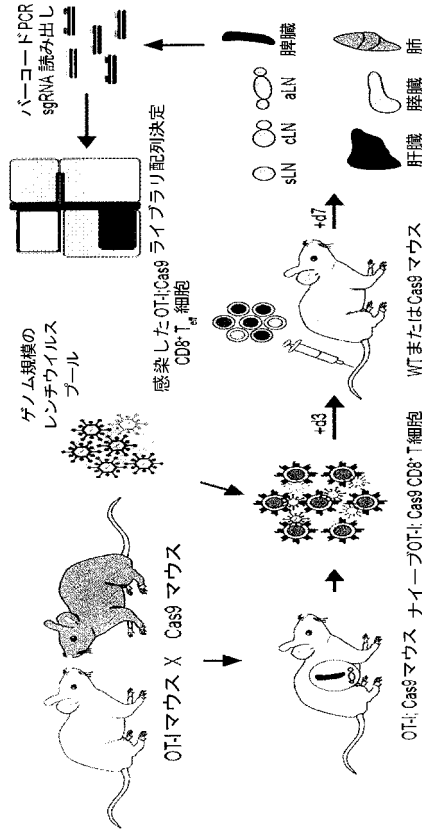
【図 17 B】



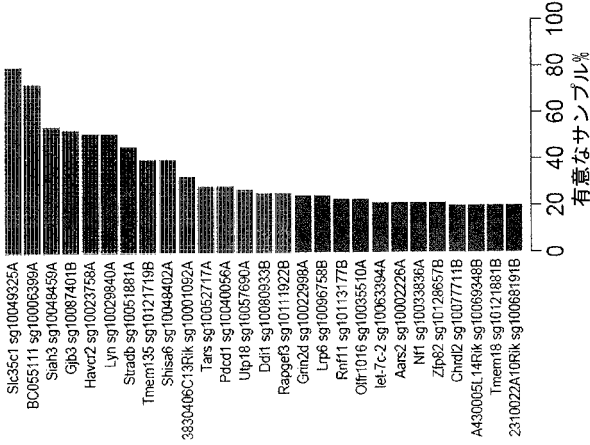
【図 17 C】



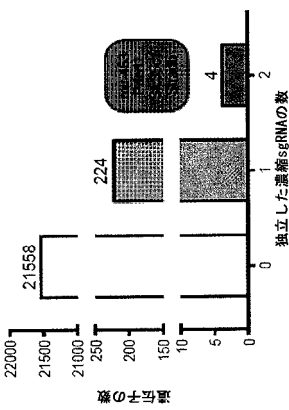
【図 18 A】



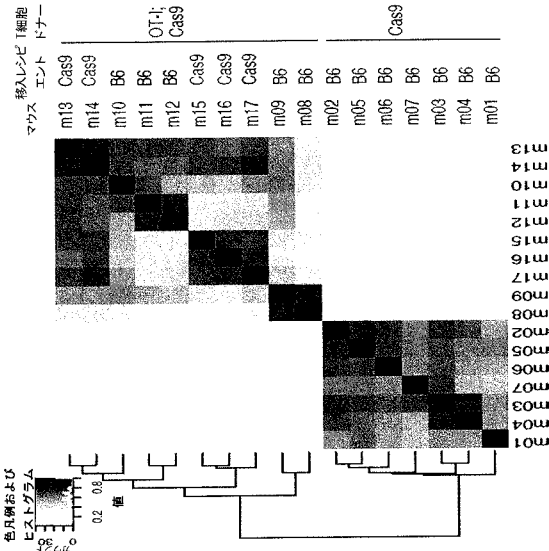
【図 18B】



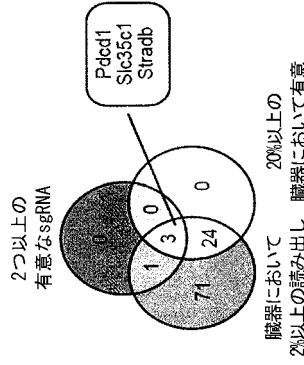
【図 18C】



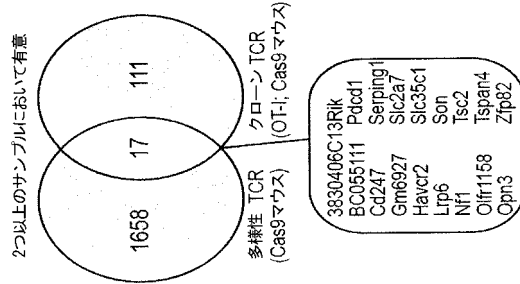
【図 18F】



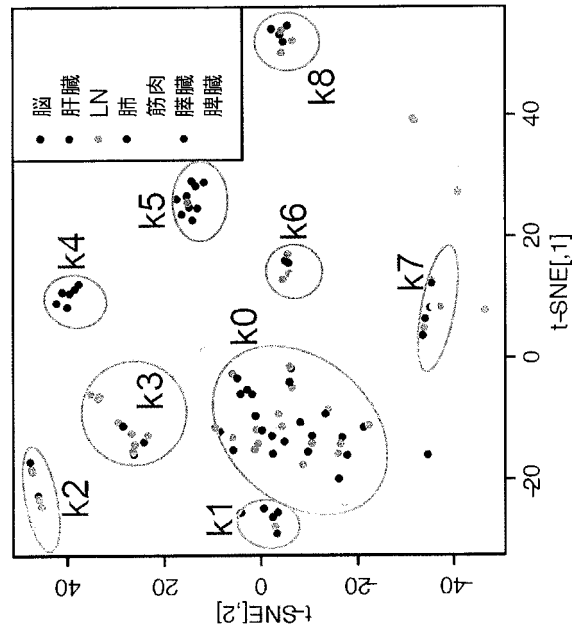
【図 18D】



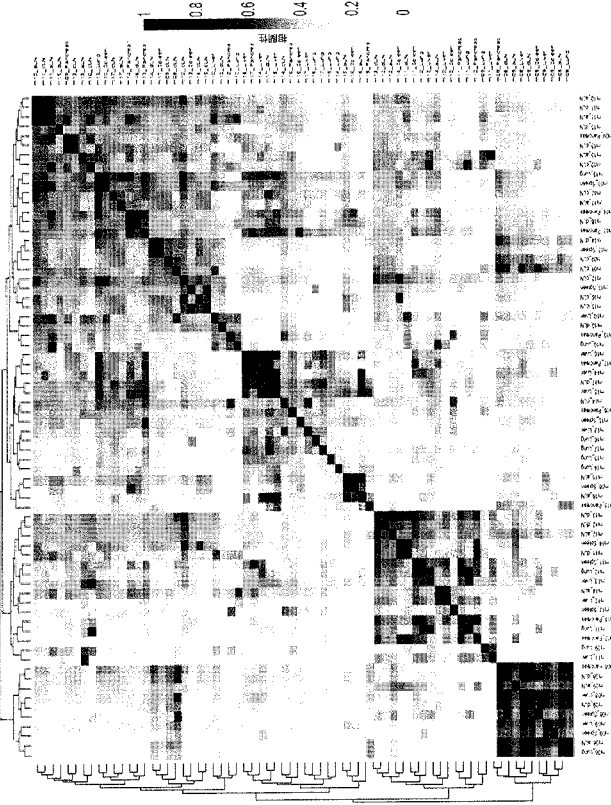
【図 18E】



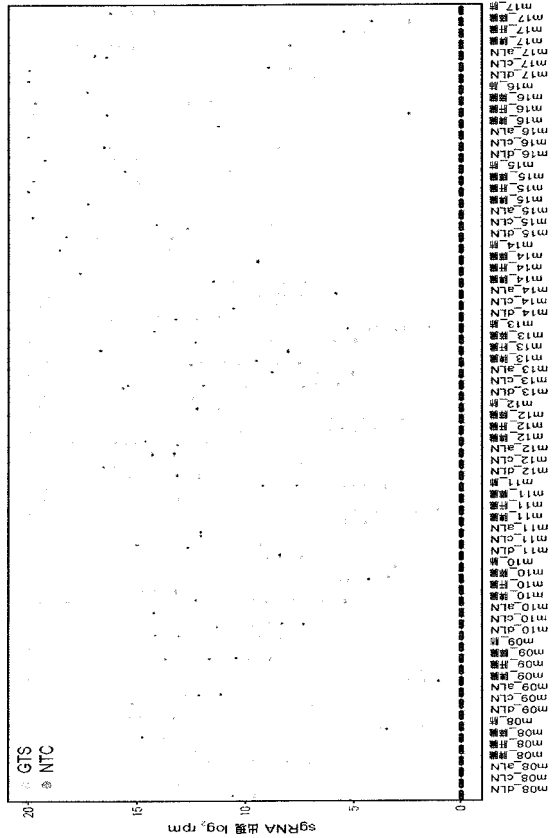
【図 18G】



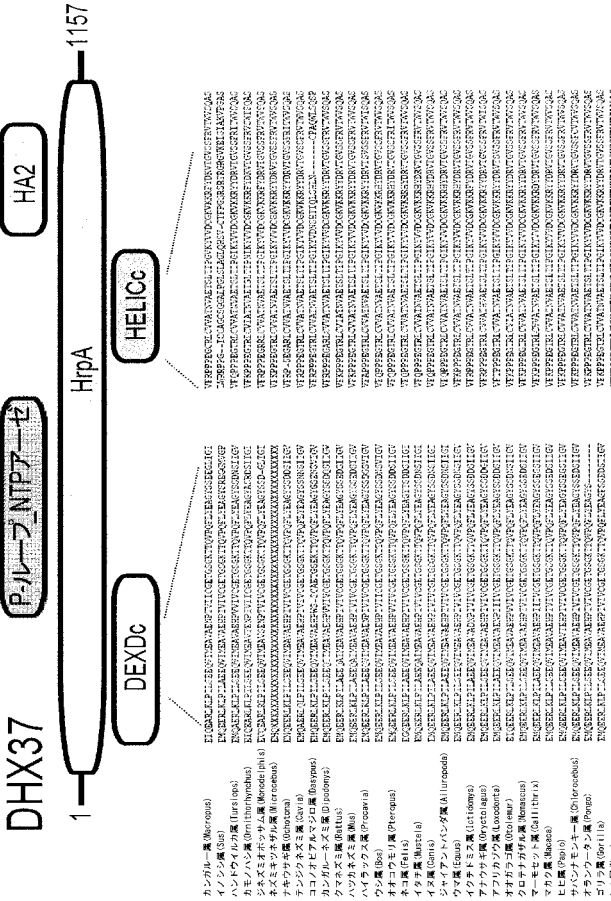
【図19A】



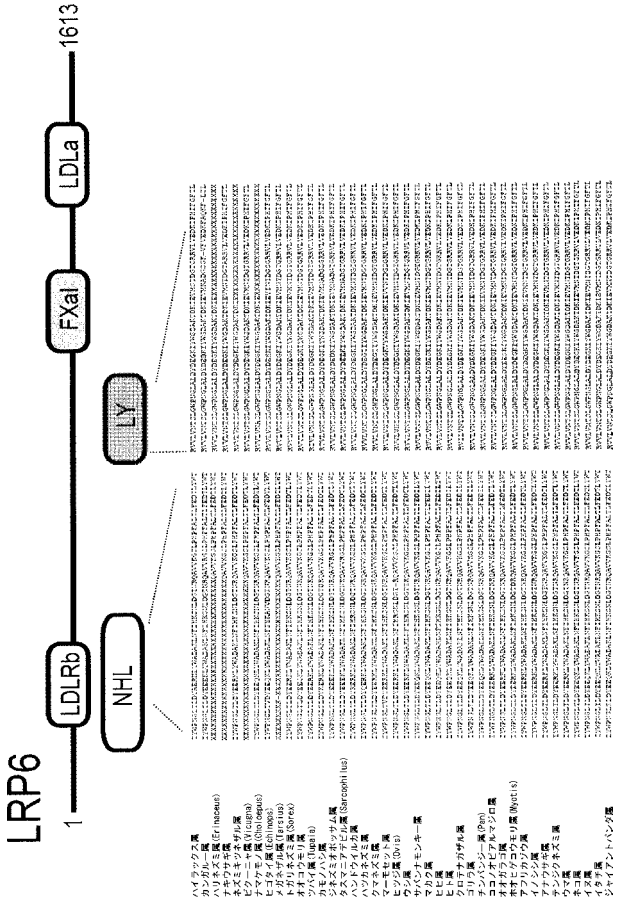
【図19B】



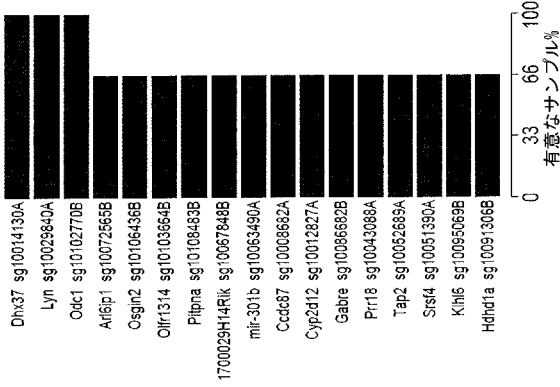
【図20A】



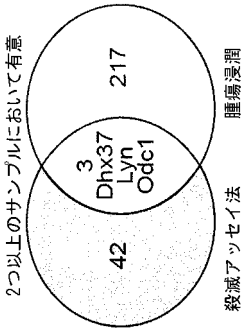
【図20B】



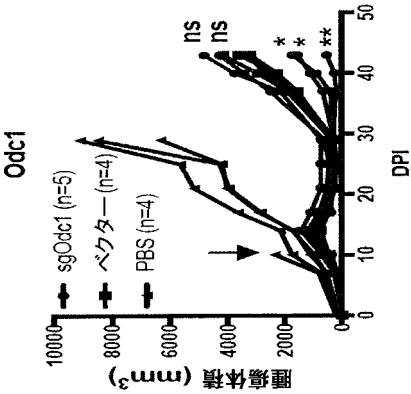
【図 2 2 D】



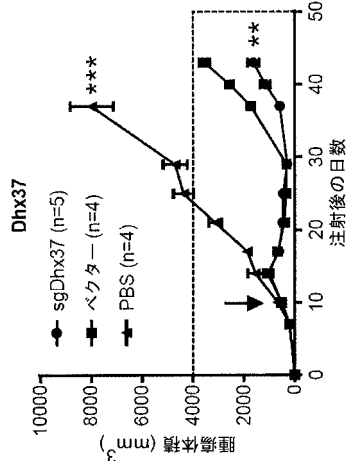
【図 2 2 E】



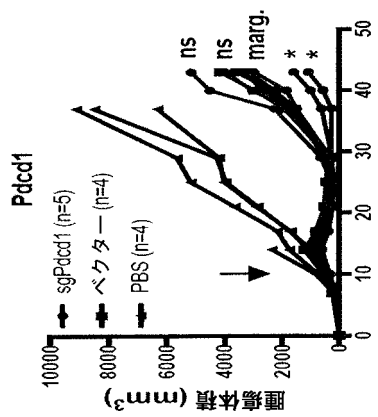
【図 2 2 H】



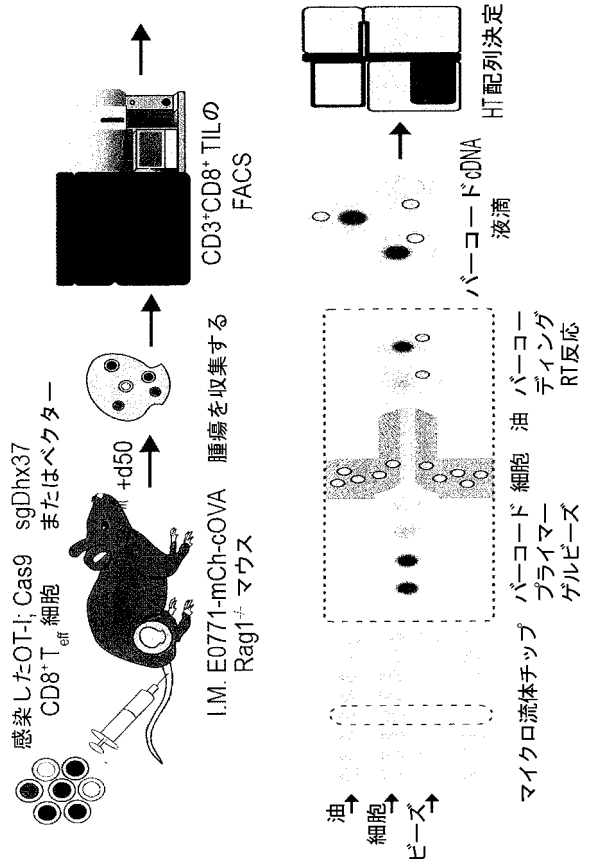
【図 2 2 F】



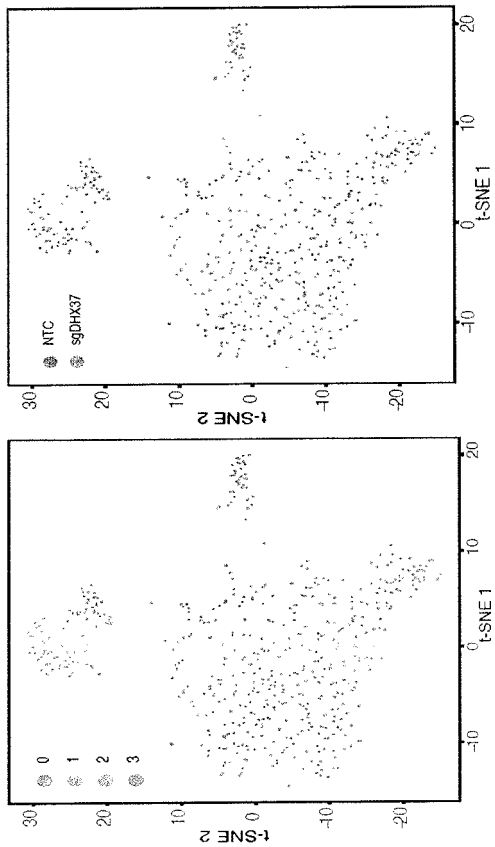
【図 2 2 G】



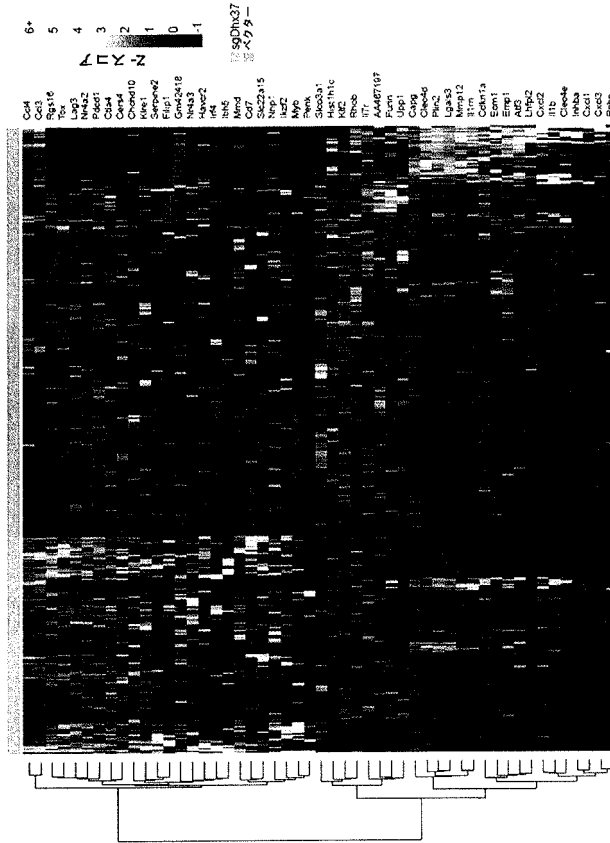
【図 2 3 A】



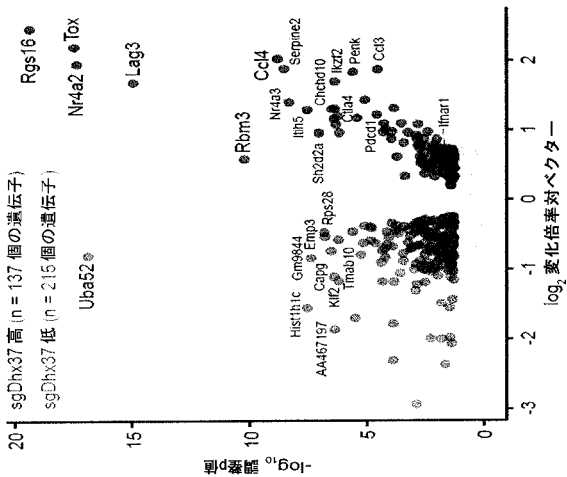
【図 2 3 B】



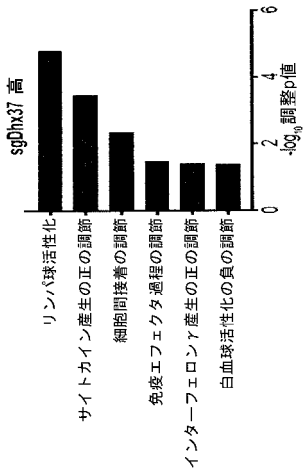
【図 2 3 C】

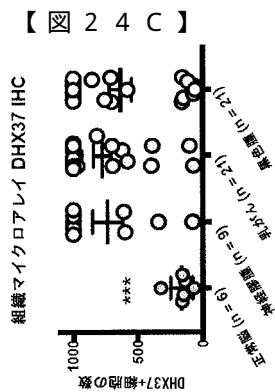
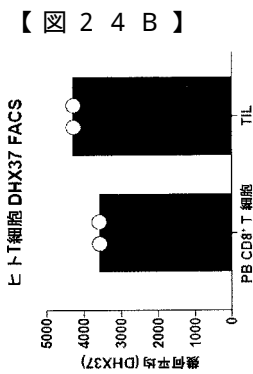
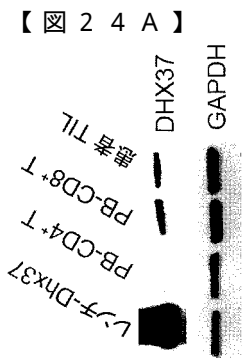
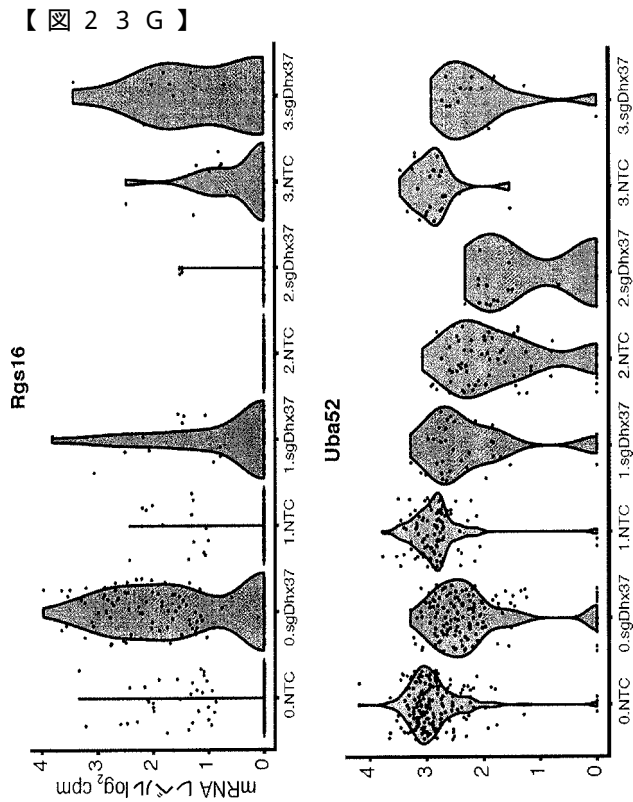
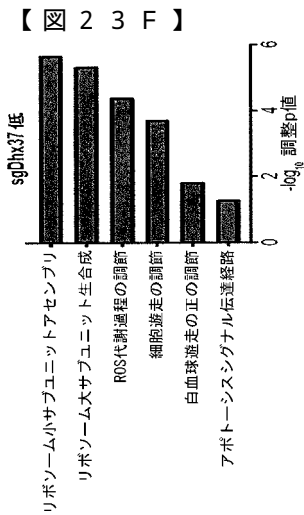


【図 2 3 D】



【図 2 3 E】

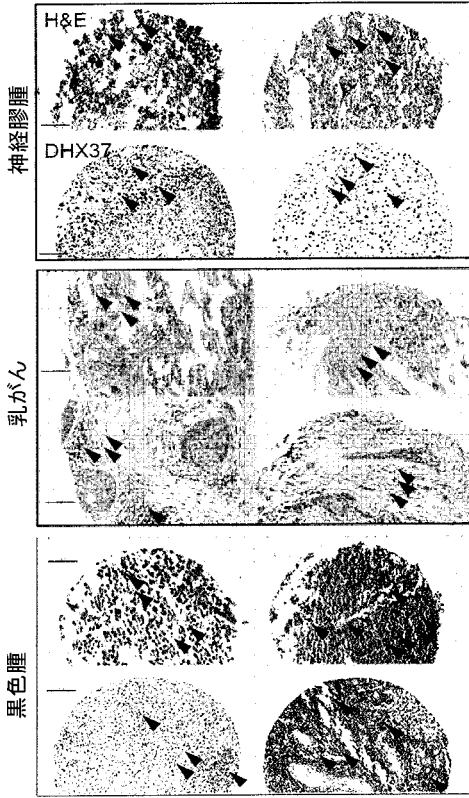




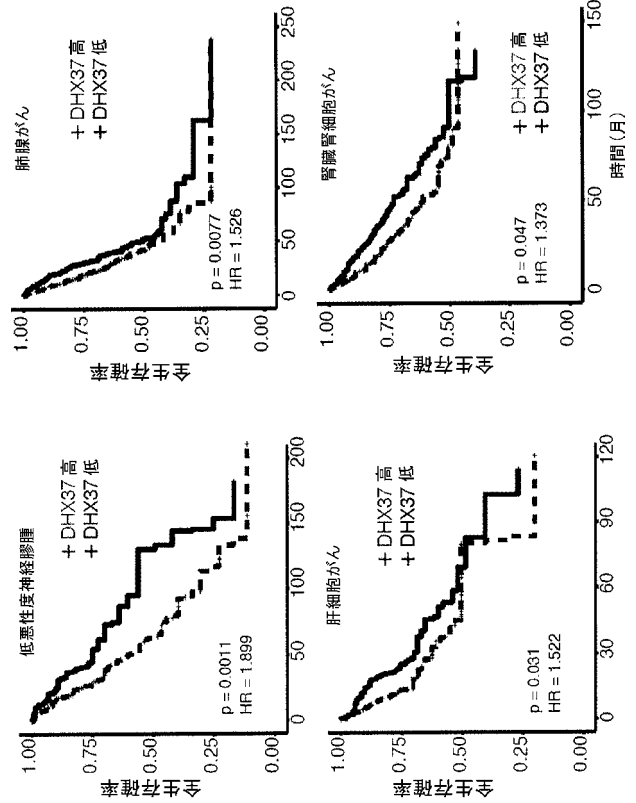
【図 2 4 D】

代表的な患者 1

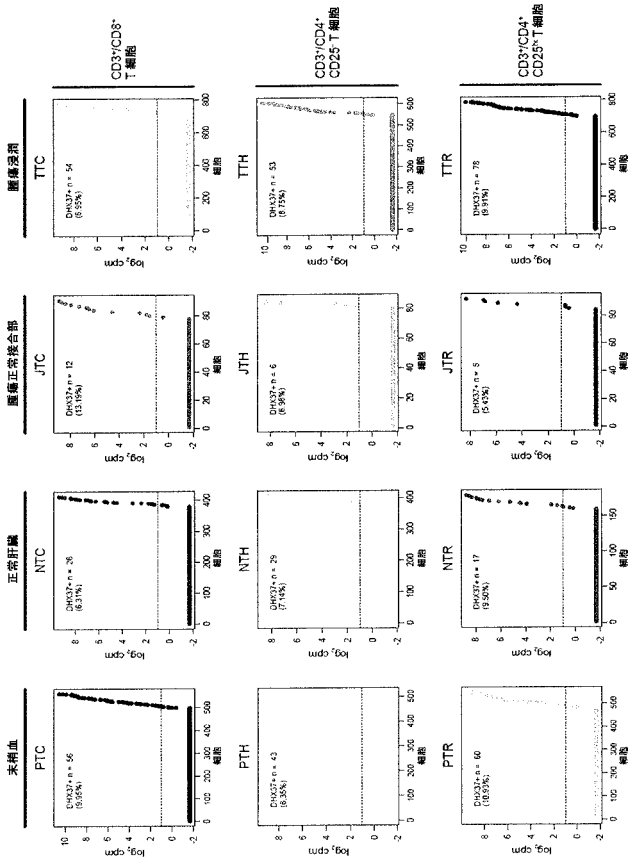
代表的な患者 2



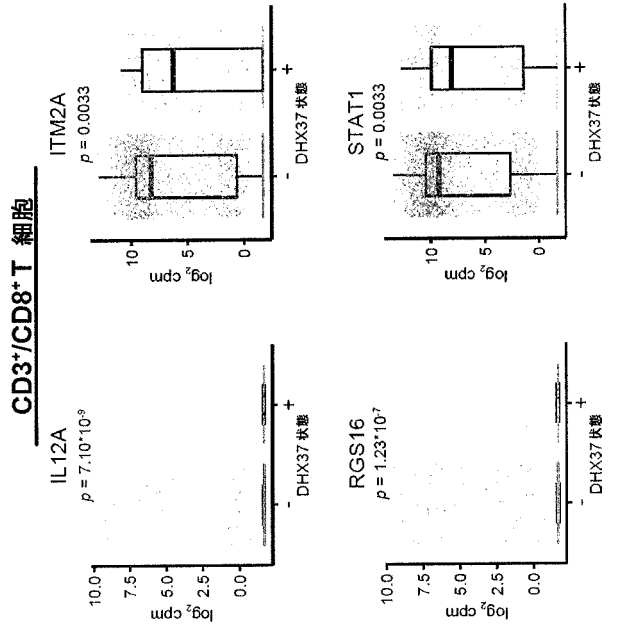
【図 2 4 E】



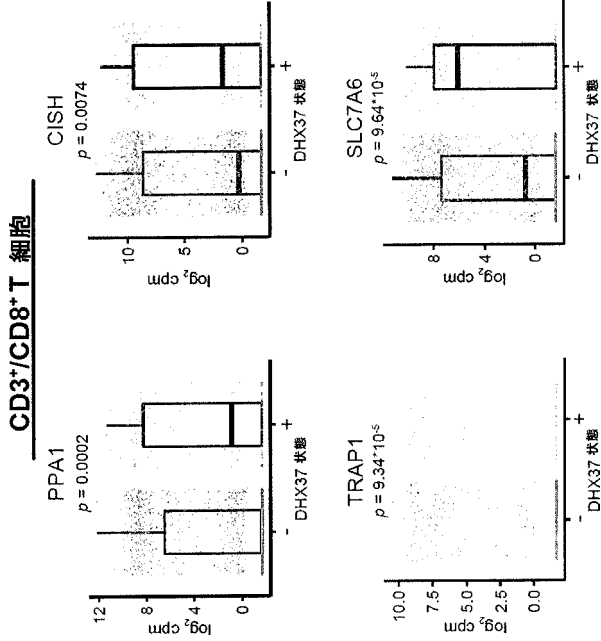
【図 2 5 A】



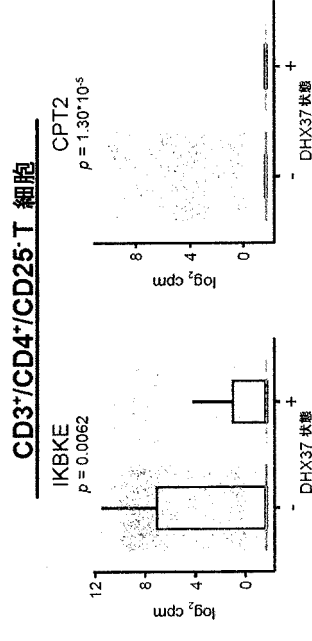
【図 2 5 B】



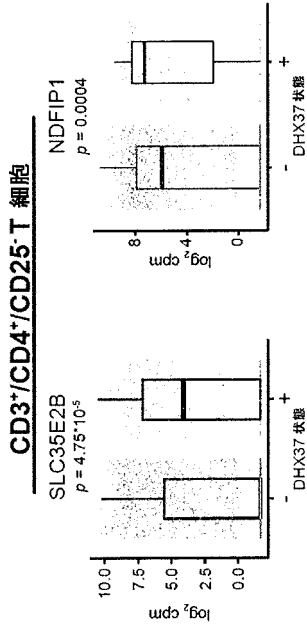
【 2 5 C 】



【 2 5 D 】



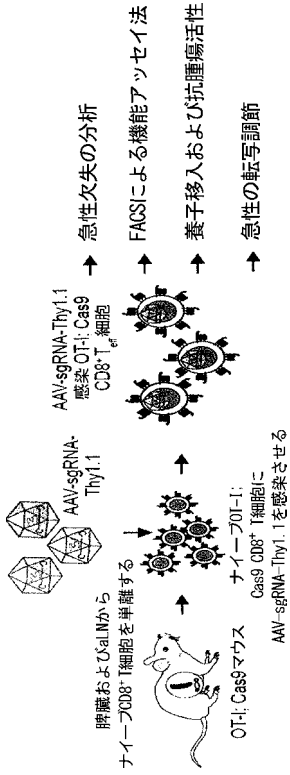
【 2 5 E 】



【 2 6 A 】



【図 26B】

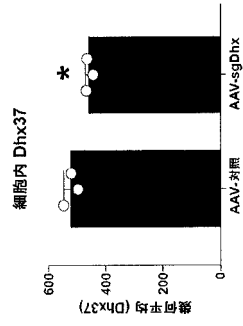


【図 26D】

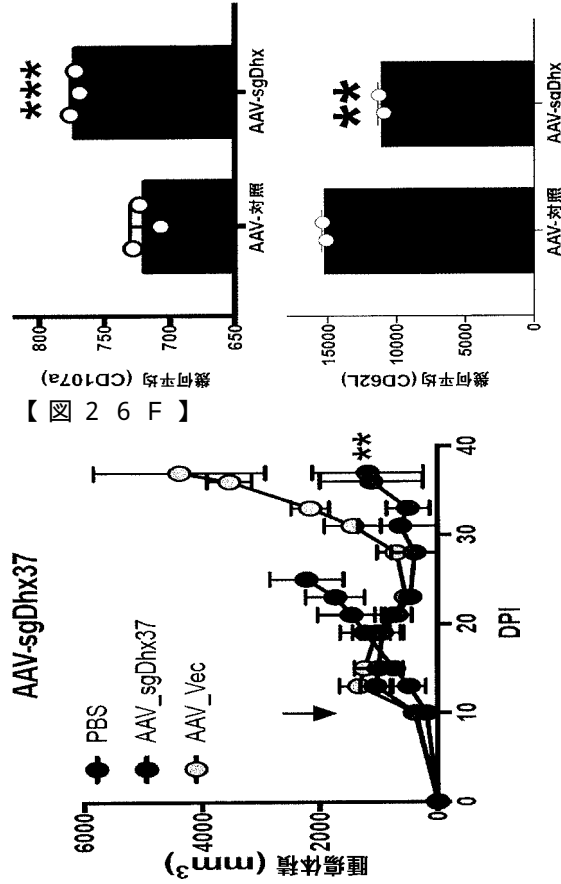
sgRNA	5'	B2m sg5	PAM	3'	配列 (%)
+	CAAGTGGGGTGGCTTTCAGTGTCCAGCATGGCTGCTCGGT	CGTGGGGTGGCTTTCAGTGTCCAGCATGGCTGCTCGGT	GGTGGGGTGGCTTTCAGTGTCCAGCATGGCTGCTCGGT	GGTGGGGTGGCTTTCAGTGTCCAGCATGGCTGCTCGGT	100
-	CAAGTGGGGTGGCTTTCAGTGTCCAGCATGGCTGCTCGGT	CGTGGGGTGGCTTTCAGTGTCCAGCATGGCTGCTCGGT	GGTGGGGTGGCTTTCAGTGTCCAGCATGGCTGCTCGGT	GGTGGGGTGGCTTTCAGTGTCCAGCATGGCTGCTCGGT	70.93
-	CAAGTGGGGTGGCTTTCAGTGTCCAGCATGGCTGCTCGGT	CGTGGGGTGGCTTTCAGTGTCCAGCATGGCTGCTCGGT	GGTGGGGTGGCTTTCAGTGTCCAGCATGGCTGCTCGGT	GGTGGGGTGGCTTTCAGTGTCCAGCATGGCTGCTCGGT	9.78
-	CAAGTGGGGTGGCTTTCAGTGTCCAGCATGGCTGCTCGGT	CGTGGGGTGGCTTTCAGTGTCCAGCATGGCTGCTCGGT	GGTGGGGTGGCTTTCAGTGTCCAGCATGGCTGCTCGGT	GGTGGGGTGGCTTTCAGTGTCCAGCATGGCTGCTCGGT	1.39
-	CAAGTGGGGTGGCTTTCAGTGTCCAGCATGGCTGCTCGGT	CGTGGGGTGGCTTTCAGTGTCCAGCATGGCTGCTCGGT	GGTGGGGTGGCTTTCAGTGTCCAGCATGGCTGCTCGGT	GGTGGGGTGGCTTTCAGTGTCCAGCATGGCTGCTCGGT	0.89
-	CAAGTGGGGTGGCTTTCAGTGTCCAGCATGGCTGCTCGGT	CGTGGGGTGGCTTTCAGTGTCCAGCATGGCTGCTCGGT	GGTGGGGTGGCTTTCAGTGTCCAGCATGGCTGCTCGGT	GGTGGGGTGGCTTTCAGTGTCCAGCATGGCTGCTCGGT	0.82
-	CAAGTGGGGTGGCTTTCAGTGTCCAGCATGGCTGCTCGGT	CGTGGGGTGGCTTTCAGTGTCCAGCATGGCTGCTCGGT	GGTGGGGTGGCTTTCAGTGTCCAGCATGGCTGCTCGGT	GGTGGGGTGGCTTTCAGTGTCCAGCATGGCTGCTCGGT	0.77
-	CAAGTGGGGTGGCTTTCAGTGTCCAGCATGGCTGCTCGGT	CGTGGGGTGGCTTTCAGTGTCCAGCATGGCTGCTCGGT	GGTGGGGTGGCTTTCAGTGTCCAGCATGGCTGCTCGGT	GGTGGGGTGGCTTTCAGTGTCCAGCATGGCTGCTCGGT	0.75
-	CAAGTGGGGTGGCTTTCAGTGTCCAGCATGGCTGCTCGGT	CGTGGGGTGGCTTTCAGTGTCCAGCATGGCTGCTCGGT	GGTGGGGTGGCTTTCAGTGTCCAGCATGGCTGCTCGGT	GGTGGGGTGGCTTTCAGTGTCCAGCATGGCTGCTCGGT	0.74
-	CAAGTGGGGTGGCTTTCAGTGTCCAGCATGGCTGCTCGGT	CGTGGGGTGGCTTTCAGTGTCCAGCATGGCTGCTCGGT	GGTGGGGTGGCTTTCAGTGTCCAGCATGGCTGCTCGGT	GGTGGGGTGGCTTTCAGTGTCCAGCATGGCTGCTCGGT	0.72
-	CAAGTGGGGTGGCTTTCAGTGTCCAGCATGGCTGCTCGGT	CGTGGGGTGGCTTTCAGTGTCCAGCATGGCTGCTCGGT	GGTGGGGTGGCTTTCAGTGTCCAGCATGGCTGCTCGGT	GGTGGGGTGGCTTTCAGTGTCCAGCATGGCTGCTCGGT	0.64
-	CAAGTGGGGTGGCTTTCAGTGTCCAGCATGGCTGCTCGGT	CGTGGGGTGGCTTTCAGTGTCCAGCATGGCTGCTCGGT	GGTGGGGTGGCTTTCAGTGTCCAGCATGGCTGCTCGGT	GGTGGGGTGGCTTTCAGTGTCCAGCATGGCTGCTCGGT	0.58
-	CAAGTGGGGTGGCTTTCAGTGTCCAGCATGGCTGCTCGGT	CGTGGGGTGGCTTTCAGTGTCCAGCATGGCTGCTCGGT	GGTGGGGTGGCTTTCAGTGTCCAGCATGGCTGCTCGGT	GGTGGGGTGGCTTTCAGTGTCCAGCATGGCTGCTCGGT	0.56

sgRNA	5'	mDhx37 sg2	PAM	3'	配列 (%)
+	CAGGGACAAGTTGGCTACCTATAGCAGTGGCTGCTG	CGTGGGGTGGCTTTCAGTGTCCAGCATGGCTGCTCGGT	GGTGGGGTGGCTTTCAGTGTCCAGCATGGCTGCTCGGT	GGTGGGGTGGCTTTCAGTGTCCAGCATGGCTGCTCGGT	100
-	CAGGGACAAGTTGGCTACCTATAGCAGTGGCTGCTG	CGTGGGGTGGCTTTCAGTGTCCAGCATGGCTGCTCGGT	GGTGGGGTGGCTTTCAGTGTCCAGCATGGCTGCTCGGT	GGTGGGGTGGCTTTCAGTGTCCAGCATGGCTGCTCGGT	48.70
-	CAGGGACAAGTTGGCTACCTATAGCAGTGGCTGCTG	CGTGGGGTGGCTTTCAGTGTCCAGCATGGCTGCTCGGT	GGTGGGGTGGCTTTCAGTGTCCAGCATGGCTGCTCGGT	GGTGGGGTGGCTTTCAGTGTCCAGCATGGCTGCTCGGT	7.48
-	CAGGGACAAGTTGGCTACCTATAGCAGTGGCTGCTG	CGTGGGGTGGCTTTCAGTGTCCAGCATGGCTGCTCGGT	GGTGGGGTGGCTTTCAGTGTCCAGCATGGCTGCTCGGT	GGTGGGGTGGCTTTCAGTGTCCAGCATGGCTGCTCGGT	6.64
-	CAGGGACAAGTTGGCTACCTATAGCAGTGGCTGCTG	CGTGGGGTGGCTTTCAGTGTCCAGCATGGCTGCTCGGT	GGTGGGGTGGCTTTCAGTGTCCAGCATGGCTGCTCGGT	GGTGGGGTGGCTTTCAGTGTCCAGCATGGCTGCTCGGT	5.07
-	CAGGGACAAGTTGGCTACCTATAGCAGTGGCTGCTG	CGTGGGGTGGCTTTCAGTGTCCAGCATGGCTGCTCGGT	GGTGGGGTGGCTTTCAGTGTCCAGCATGGCTGCTCGGT	GGTGGGGTGGCTTTCAGTGTCCAGCATGGCTGCTCGGT	4.30
-	CAGGGACAAGTTGGCTACCTATAGCAGTGGCTGCTG	CGTGGGGTGGCTTTCAGTGTCCAGCATGGCTGCTCGGT	GGTGGGGTGGCTTTCAGTGTCCAGCATGGCTGCTCGGT	GGTGGGGTGGCTTTCAGTGTCCAGCATGGCTGCTCGGT	2.72
-	CAGGGACAAGTTGGCTACCTATAGCAGTGGCTGCTG	CGTGGGGTGGCTTTCAGTGTCCAGCATGGCTGCTCGGT	GGTGGGGTGGCTTTCAGTGTCCAGCATGGCTGCTCGGT	GGTGGGGTGGCTTTCAGTGTCCAGCATGGCTGCTCGGT	1.62
-	CAGGGACAAGTTGGCTACCTATAGCAGTGGCTGCTG	CGTGGGGTGGCTTTCAGTGTCCAGCATGGCTGCTCGGT	GGTGGGGTGGCTTTCAGTGTCCAGCATGGCTGCTCGGT	GGTGGGGTGGCTTTCAGTGTCCAGCATGGCTGCTCGGT	1.52
-	CAGGGACAAGTTGGCTACCTATAGCAGTGGCTGCTG	CGTGGGGTGGCTTTCAGTGTCCAGCATGGCTGCTCGGT	GGTGGGGTGGCTTTCAGTGTCCAGCATGGCTGCTCGGT	GGTGGGGTGGCTTTCAGTGTCCAGCATGGCTGCTCGGT	1.44
-	CAGGGACAAGTTGGCTACCTATAGCAGTGGCTGCTG	CGTGGGGTGGCTTTCAGTGTCCAGCATGGCTGCTCGGT	GGTGGGGTGGCTTTCAGTGTCCAGCATGGCTGCTCGGT	GGTGGGGTGGCTTTCAGTGTCCAGCATGGCTGCTCGGT	1.41
-	CAGGGACAAGTTGGCTACCTATAGCAGTGGCTGCTG	CGTGGGGTGGCTTTCAGTGTCCAGCATGGCTGCTCGGT	GGTGGGGTGGCTTTCAGTGTCCAGCATGGCTGCTCGGT	GGTGGGGTGGCTTTCAGTGTCCAGCATGGCTGCTCGGT	1.39

【図 26C】

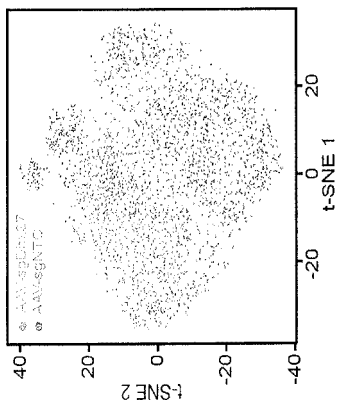


【図 26E】

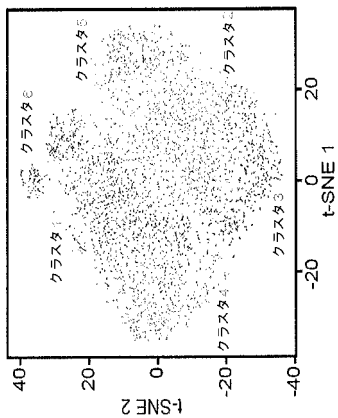


【図 26F】

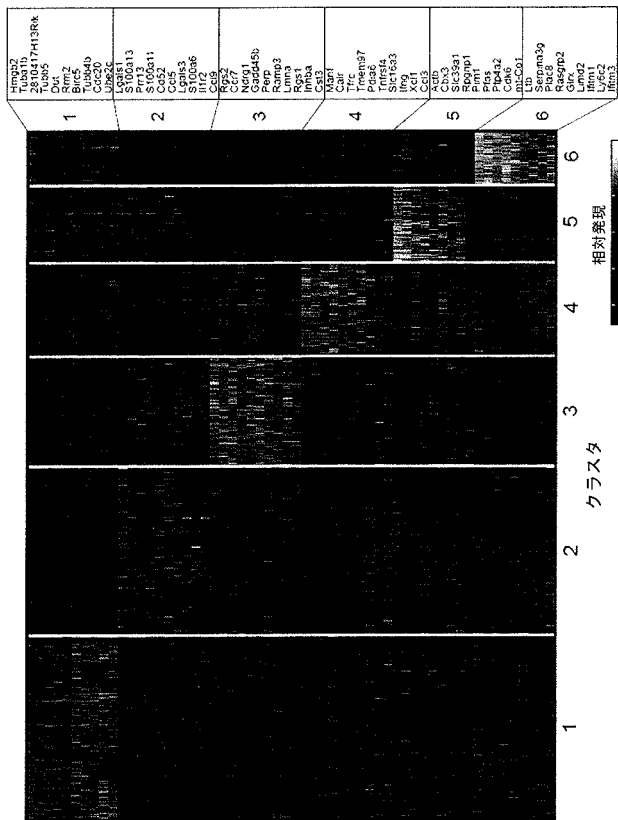
【図 27 A】



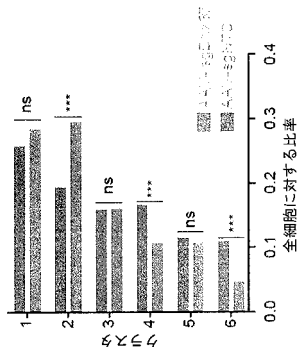
【図 27 B】



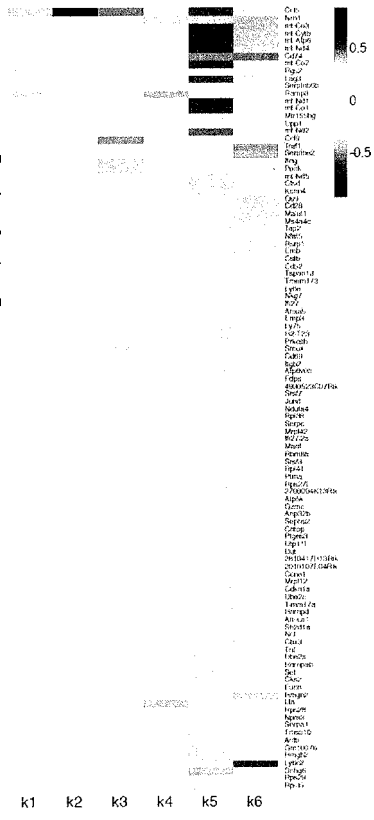
【図 27 D】



【図 27 C】

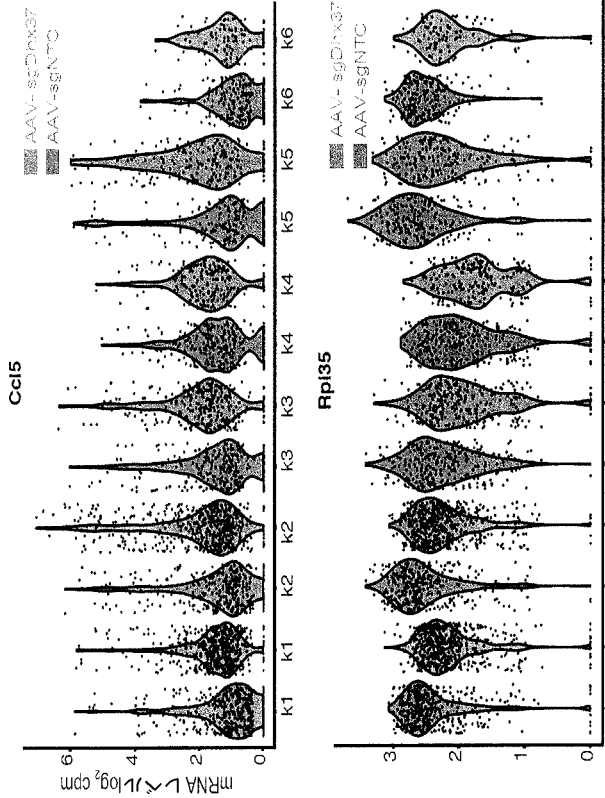


【図 27 E】

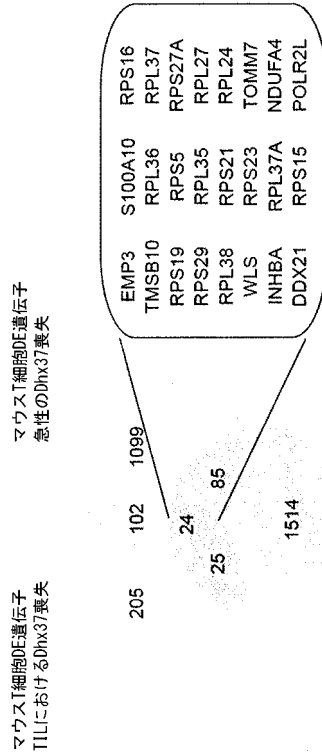


ターム	P 値
GO:0006954~炎症反応	3.53E-04
GO:0006955~免疫応答	4.52E-04
GO:0043086~アポトーシス過程の負の調節	1.02E-03
GO:0010951~エンドペプチダーゼ活性の負の調節	2.20E-03
GO:0048305~免疫グロブリン分泌	2.80E-03
GO:0071333~グルコース刺激に対する細胞応答	3.11E-03
GO:0031295~T 細胞共刺激	4.90E-03

【 図 2 7 F 】



【 図 2 8 B 】

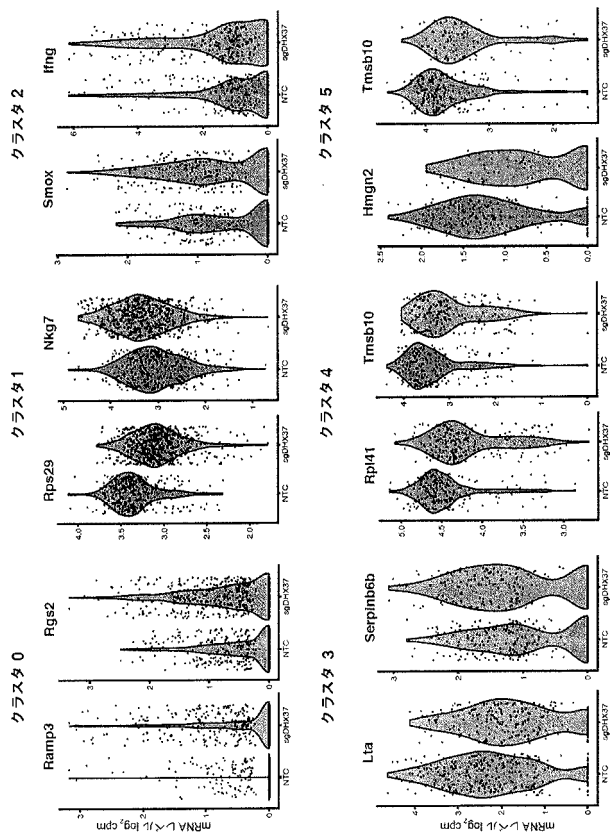


マウスT細胞DE遺伝子
TILにおけるDhx37喪失

マウスT細胞DE遺伝子
急性のDhx37喪失

ヒトT細胞DE遺伝子
天然Dhx37 高対低

【 図 2 8 A 】



クラスタ0

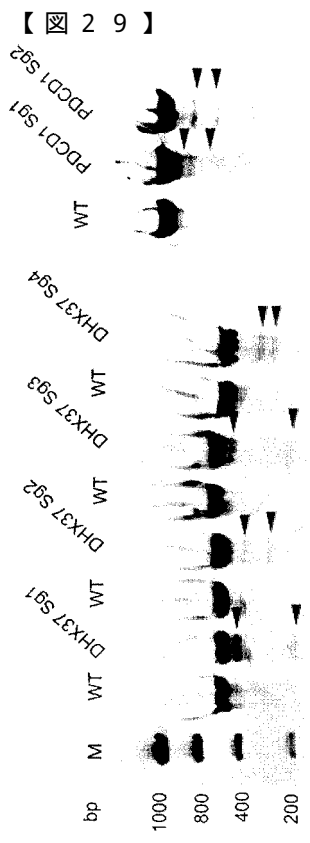
クラスタ1

クラスタ2

クラスタ3

クラスタ4

クラスタ5



【 配列表 】
2020517247000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 18/27967

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(B) - C12N 15/11, 15/63 (2018.01) CPC - C12N 15/111, 15/1093, 2310/20, 2330/31, 15/63		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) See Search History Document		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched See Search History Document		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) See Search History Document		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y — A	US 2016/0168594 A1 (BROAD INSTITUTE, INC.) 16 June 2016 (16.06.2016). Especially para [0165], [0384], sheet 93 fig 58A.	1, 3/1 ----- 2, 3/2, 5/(1,2)
Y — A	WO 2017/081097 A1 (IFOM FONDAZIONE ISTITUTO FIRG DI ONCOLOGIA MOLECOLARE) 18 May 2017 (18.05.2017). Especially pg 4 ln 5, pg 7 ln 10.	1, 3/1 ----- 2, 3/2, 5/(1,2)
Y — A	US 2009/0187997 A1 (STERN et al.) 23 July 2009 (23.07.2009). Especially para [0161], [0262], [0264]	1, 3/1 ----- 2, 3/2, 5/(1,2)
Y — A	US 2005/0214823 A1 (BLUME et al.) 29 September 2005 (29.09.2005). Especially SEQ ID NO: 474247	3/1 ----- 5/1
A	US 2016/0311908 A1 (MERRIMACK PHARMACEUTICALS, INC.) 27 October 2016 (27.10.2016). Especially SEQ ID NO: 32	5/(1,2)
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input 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 "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 2 August 2018	Date of mailing of the international search report 24 OCT 2018	
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300	Authorized officer: Lee W. Young PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774	

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (January 2015)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 18/27967

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.: 18
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
----Go to Extra Sheet for continuation----

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims: it is covered by claims Nos.: 1-6, 30, 31, (42-45)(in part) limited to Thy1.1 cassette, SEQ ID NO 1 and SEQ ID NO: 129,213 (claims 1, 2, 3, 5)

- Remark on Protest**
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 18/27967

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

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
- a. forming part of the international application as filed:
 in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 on paper or in the form of an image file.
- b. furnished together with the international application under PCT Rule 13^{ter}.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- c. furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
 in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13^{ter}.1(a)).
 on paper or in the form of an image file (Rule 13^{ter}.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

GenCore ver 6.4.1 SEQ ID NOs: 1-3, 129213, 129214, 129215

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 18/27967

continuation of Box III: Observations where Unity of invention is lacking

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.

Group I+: Claims 1-6, 30, 31, (42-45)(in part) drawn to a vector comprising a 5' LTR (long terminal repeat) and a 3' LTR.

The vector construct will be searched to the extent that the vector comprises the first named cassette, Thy1.1, nucleic acid sequence, SEQ ID NO: 129,213 (claim 2) and the first named sgRNA expression cassette, SEQ ID NO: 1 (claims 3, 5). It is believed that claims 1, 2, 3, 5, read on this first named invention and thus these claims will be searched without fee to the extent that they Thy1.1 cassette, nucleic acid SEQ ID NO: 129,213 and sgRNA expression cassette SEQ ID NO: 1. Additional cassettes, nucleic acid sequences, and sgRNA expression cassettes will be searched upon payment of additional fees. Applicant must specify the claims that encompass any additional elected cassettes, nucleotide sequences, and/or sgRNA expression cassettes. Applicants must further indicate, if applicable, the claims which read on the first named invention if different than what was indicated above for this group. Failure to clearly identify how any paid additional invention fees are to be applied to the "+" group(s) will result in only the first claimed invention to be searched/examined. An exemplary election would be: the vector comprises cassette mCherry, nucleotide sequence SEQ ID NO: 129,126 and sgRNA expression cassette SEQ ID NO: 129,222 (claims 30, 31, (43,45)(in part)).

Group II+: Claims 7-11, 24-29, drawn to a sgRNA library composition or kit comprising a plurality of vectors, wherein each vector comprises an expression cassette for an sgRNA.

Group II+ will be searched upon payment of additional fee(s). The library or kit composition may be searched, for example, to the extent that the plurality of expression cassettes comprises SEQ ID NOs: 1,2 for an additional fee and election as such. It is believed that claims 7, 8, 11(in part), 24-26 read on this exemplary invention. Additional sgRNA libraries or kits will be searched upon the payment of additional fees. Applicants must indicate, if applicable, which claims read on this named invention if different than what was indicated above for this group. Failure to clearly identify how any paid additional invention fees are to be applied to the "+" group(s) will result in only the first named invention to be library or kit searched/examined. An exemplary election would be library or kit comprises sgRNA expression cassettes SEQ ID NOs: 129,222 and 129,223 (claims 9, 10, 11(in part), 27-29).

Group III: Claims 12-17, 19-23, drawn to performing genome editing and performing screening of a T cell.

Group IV: Claims 32-41, (42-45)(in part), drawn to a vector comprising a 5' ITR (inverted terminal repeat) and a 3' ITR.

The inventions listed as Groups I+, II+, III, IV do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

Technical Features:

Group I+ inventions have the special technical feature of a vector composition comprising a vector comprising a 5' LTR and a 3' UTR, not required by Groups II+, III, IV

Group II+ inventions have the special technical feature of a composition of expression cassettes with specific nucleotide sequences, not required by Groups I+, III, IV

Group III has the special technical feature of performing genome editing and performing screening of a T cell in vitro or in vivo, not required by Groups I+, II+, IV.

Group IV has the special technical feature of a vector comprising a 5' ITR and a 3' ITR, not required by Groups I+, II+, III:

Group IV has special technical feature of a SB100x cassette [a Sleeping Beauty transposase cassette], not required by Groups I+, II+, III.

No technical features are shared between the vector nucleic acid sequences and sgRNA cassette sequences of Group I+ and Group II+ and, accordingly, these groups lack unity a priori.

Additionally, even if Groups I+, II+, III, IV were considered to share the technical features of:

1. Groups I+, II+, III, IV share the common technical feature of an expression vector with a sgRNA insert comprising a sgRNA library or kit.
2. Group I+ inventions share the technical feature of claims 1 and 30.
3. Group II+ inventions share the technical feature of claims 7, 9, 24 and 27.

these shared technical features are previously disclosed by US 2014/0357530 A1 to Broad Institute, Inc. (hereinafter "Broad '530"), in view of US 2016/0168594 A1 to Broad Institute, Inc. (hereinafter "Broad '594").

----continued on next sheet----

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 18/27967

---continued from previous sheet---

As to common technical feature #1, Broad '530 teaches a vector with a sgRNA insert comprising a sgRNA library or kit (claim 1; "1. A genome wide library comprising a plurality of CRISPR-Cas system guide RNAs comprising guide sequences that are capable of targeting a plurality of target sequences in a plurality of genomic loci in a population of eukaryotic cells"; Para [0139]; "FIG. 52 shows a list of U6 reverse primer sequences used to generate U6-guide RNA expression cassettes. Each primer needs to be paired with the U6 forward primer "gcactgaggcctattcccatgattc" to generate amplicons containing U6 and the desired guide RNA").

As to shared technical feature #3, claims 7 and 9, Broad '530 teaches an sgRNA library comprising a plurality of vectors, wherein each vector comprises an expression cassette for an sgRNA comprising a nucleotide sequence (claim 1; "1. A genome wide library comprising a plurality of CRISPR-Cas system guide RNAs comprising guide sequences that are capable of targeting a plurality of target sequences in a plurality of genomic loci in a population of eukaryotic cells"; Para [0139]; "FIG. 52 shows a list of U6 reverse primer sequences used to generate U6-guide RNA expression cassettes. Each primer needs to be paired with the U6 forward primer "gcactgaggcctattcccatgattc" to generate amplicons containing U6 and the desired guide RNA"); para [0261]; "Aspects of the invention relate to bicistronic vectors for chimeric RNA and Cas9. Bicistronic expression vectors for chimeric RNA and Cas9 are preferred. In general, and particularly in this embodiment Cas9 is preferably driven by the CBh promoter. The chimeric RNA may preferably be driven by a U6 promoter").

As to shared technical feature #3, claims 24 and 27, Broad '530 teaches an sgRNA library comprising a plurality of vectors, wherein each vector comprises an expression cassette for an sgRNA comprising a nucleotide sequence (claim 1; para [0139], [0261]). Broad '530 further teaches kits with instructional material for their use (para [0325]; In one aspect, the invention provides kits containing any one or more of the elements disclosed in the above methods and compositions? In some embodiments, the kit includes instructions").

As to shared technical feature #2, claim 1, concerning a vector comprising a 5' long terminal repeat (LTR) sequence, a U6 promoter sequence, a BsmB1 restriction site, an EFS sequence, an sgRNA expression cassette, a Thy1.1 cassette, a 3' LTR sequence and an ampicillin resistance gene sequence (AmpR), Broad '594 teaches a vector comprising a 5' long terminal repeat (LTR) sequence, a U6 promoter sequence, an EFS sequence, an sgRNA expression cassette, a 3' LTR sequence (para [0165]; FIG. 56A-56E shows stable modification of hematopoietic stem cells by a lentiviral CRISPR-Cas delivery system A) Depiction of a lentiviral vector for bi-cistronic expression of the sgRNA from a U6 promoter (U6) and Cas9 from a short EF1a promoter (EFS) with a fluorescent protein marker (eGFP) from a picorna virus derived 2A auto-cleavage site (P2A)"; see sheet 93 fig 56A; Para [0384]; "Lentiviral vectors are retroviral vectors that are able to transduce or infect non-dividing cells and typically produce high viral titers. Selection of a retroviral gene transfer system would therefore depend on the target tissue. Retroviral vectors are comprised of cis-acting long terminal repeats with packaging capacity for up to 6-10 kb of foreign sequence. The minimum cis-acting LTRs are sufficient for replication and packaging of the vectors"). Broad does not specifically teach a BsmB1 restriction site, a Thy1.1 cassette, or an ampicillin resistance marker (AmpR). However, inclusion of a cloning site comprising a restriction site, for example BsmB1, were well known in the art to enable modular specific sgRNAs to be inserted into a vector were well-known in the art, for instance, in constructing a sgRNA library. Further, inclusion of a Thy1.1 cassette could have substituted for the fluorescent protein in the construct taught by Broad '594, because it would have enabled expression of a specific cell surface marker for easy isolation of cells, for instance by FACS analysis, as was common practice in the art. Finally, use of an antibiotic resistance marker, such as AmpR, as a cell selection marker was routine in the art for selecting cells that had been successfully transformed or transfected.

As to shared technical feature #2, claim 30, concerning a vector comprising a 5' long terminal repeat (LTR) sequence, a U6 promoter sequence, a BsmB1 restriction site, an EFS sequence, an sgRNA expression cassette, an mCherry sequence, a 2A peptide, a cOVA sequence, a 3' LTR sequence and an ampicillin resistance gene sequence (AmpR), Broad teaches a vector comprising a 5' long terminal repeat (LTR) sequence, a U6 promoter sequence, an EFS sequence, an sgRNA expression cassette, a 2A peptide, and a 3' LTR sequence (para [0165]; see sheet 93 fig 56A; para [0384]. Broad does not specifically teach a BsmB1 restriction site, a mCherry sequence, a cOVA sequence, or an ampicillin resistance marker (AmpR). However, inclusion of a cloning site comprising a restriction site, for example BsmB1, were well known in the art to enable modular specific sgRNAs to be inserted into a vector were well-known in the art, for instance, in constructing a sgRNA library. Further, inclusion of a mCherry could have substituted for the eGFR fluorescent protein reporter in the construct taught by Broad '594, because it would have served as an alternative reporter group and was common practice in the art. In addition, use of an antibiotic resistance marker, such as AmpR, as a cell selection marker was routine in the art for selecting cells that had been successfully transformed or transfected. Concerning inclusion of a cOVA sequence in the vector, use of an ovalbumin antigenic marker in antigen presenting cells (APCs) was well known in the art as a positive control in T cell systems, for stimulation of T cells specific for the OVA peptide and enabling a means of T cell activation.

As the shared technical features were known in the art at the time of the invention, they cannot be considered common shared technical features that would otherwise unify the groups. The inventions lack unity with one another.

Therefore, Groups I+, II+, III, IV lack unity of invention under PCT Rule 13 because they do not share a same or corresponding special technical feature.

Note concerning item 4: Claim 18 is a multiple dependent claim and is not drafted according to the second and third sentences of PCT Rule 6.4(a).

フロントページの続き

(51) Int.Cl.			F I			テーマコード(参考)
C 1 2 Q	1/686	(2018.01)	C 1 2 Q	1/686	Z	
C 1 2 N	5/10	(2006.01)	C 1 2 N	5/10		

(81) 指定国・地域 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT

(74) 代理人 100148699

弁理士 佐藤 利光

(74) 代理人 100128048

弁理士 新見 浩一

(74) 代理人 100129506

弁理士 小林 智彦

(74) 代理人 100205707

弁理士 小寺 秀紀

(74) 代理人 100114340

弁理士 大関 雅人

(74) 代理人 100114889

弁理士 五十嵐 義弘

(74) 代理人 100121072

弁理士 川本 和弥

(72) 発明者 チェン シディ

アメリカ合衆国 0 6 4 6 1 コネチカット州 ミルフォード スワンソン クレセント 4 3 3

(72) 発明者 ドン マシュー

アメリカ合衆国 9 4 1 3 3 カリフォルニア州 サンフランシスコ グリニッジ ストリート
9 4 0

F ターム(参考) 4B063 QA01 QA13 QA18 QA20 QQ08 QQ52 QR08 QR32 QR42 QR56

QR62 QS24 QS25 QS34 QX02 QX10

4B065 AA94X AB01 AC20 BA02 CA44