明　細　書

発明の名称 ：

遺伝子工学、細胞工学、および細胞医薬に適した細胞およびその製造方法

技術分野

[0001] 本発明は、遺伝子工学、細胞工学、および細胞医薬に適した細胞およびその製造方法に関する。

背景技術

[0002] 新規ゲノム編集ツールとしてＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓシステムが報告されてから、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓシステムを利用した様々な研究が行われている（例えば、特許文献１）。ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓシステムを利用したゲノム編集では、ガイドＲＮＡにより標的化された標的領域がＣａｓ９ヌクレアーゼにより二本鎖切断される。二本鎖切断されたＤＮＡは、相同組み換え修復（Ｈｏｍｏｌｏｇｏｕｓ　Ｄｉｒｅｃｔｅｄ　Ｒｅｐａｉｒ：ＨＤＲ）又は非相同末端再結合（Ｎｏｎ－Ｈｏｍｏｌｏｇｏｕｓ　Ｅｎｄ－Ｊｏｉｎｉｎｇ　Ｒｅｐａｉｒ：ＮＨＥＪ）により修復されることが知られている。ＨＤＲでは、標的領域の周辺領域と相同な配列を有するドナーＤＮＡをＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓシステムと共に細胞に導入することにより、任意の配列を標的領域に組み込むことができる。

[0003] ゲノム改変技術を用いて、ＨＤＲにより２以上のアレルを同時に効率よく改変する技術が開発されている（例えば、特許文献２）。特許文献２では、数百ｋｂの大規模欠失を２以上のアレルで同時に効率よく誘発することができたことが開示されている。

[0004] 主要組織適合遺伝子複合体の相違に起因するレシピエントによる移植細胞の拒絶反応の問題に対応するため、ＭＨＣクラスＩの発現および機能が欠失した細胞を製造する技術が開発されている（例えば、特許文献３）。特許文献３では、ＭＨＣクラスＩの発現および機能を欠失させるために、β２ミクログロブリン（Ｂ２Ｍ）をノックアウトすることが提案されている。

先行技術文献

特許文献

[0005] 特許文献1：国際公開第２０１４／０９３６６１号

特許文献2：国際公開第２０２１／２０６０５４号

特許文献3：国際公開第２０１２／１４５３８４号

発明の概要

[0006] ＭＨＣの欠損細胞は、免疫拒絶の問題に対応する有効な手段として開発が進められているが、その手法は、以下の２つに大別される：ＭＨＣ以外の分子の破壊によって、ＭＨＣの細胞表面発現を喪失させる手法、およびＭＨＣのいずれかの分子を破壊する手法。しかしながら、ＭＨＣ遺伝子座は、繰り返し配列が極めて豊富であり、現在の配列解読技術では遺伝子座を解読することが非常に困難である。仮に特定部分の改変ができていたとしても、繰り返し配列の他の部分が維持されているのか、それも改変されてしまっているのかを分析することが困難である。そのため、ＭＨＣ遺伝子座の特定遺伝子を標的化する技術では、ゲノムに予測不能な改変が生じている可能性を除外できず、再生医療等で用いる細胞の作製に利用することが困難である。これに対して、ＭＨＣ以外の分子を破壊することによってＭＨＣの細胞表面発現を喪失させる手法では、当該破壊される分子の働き（例えば、β２ミクログロブリン）が不明であり、破壊による予測不能な問題が生じるリスクも現時点では否定できない。

[0007] そこで、本発明は、ＭＨＣの特定領域の配列解読が困難な繰り返し配列を含む大きな領域を欠失させ、または解読可能な領域に置き換えると同時に、ＭＨＣの特定遺伝子を欠失させた細胞を提供する。本発明ではまた、２個以上のアレルを効率よく改変することができ、且つ比較的大きな領域の改変が可能な、ゲノム改変方法を用いて、当該細胞を製造する方法を提供する。得られた細胞は、移植用途に適しているか、更なる細胞工学への応用に適している。

[0008] 本発明は一例として以下の態様を含む。

［１Ａ］　細胞（特にヒト細胞）であって、欠失を有するゲノムＤＮＡ（特にヒトゲノムＤＮＡ）を含み、前記欠失は、以下（ｉ）～（ｉｖ）に規定される染色体領域：

（ｉ）　ＨＬＡ－Ｆ、ＨＬＡ－Ｇ、およびＨＬＡ－Ａを含む一連の領域（例えば、ｈｇ３８ゲノム配列のｃｈｒ６：２９，７２３，４６４－２９，９４５，４５５、好ましくはｃｈｒ６：２９，７２３，４６４－３０，０１０，６１８例えば、ｃｈｒ６：　２９，７２２，７７５－２９，９４５，８７０、またはｃｈｒ６：　２９，７１１，０００－３０，０２０，０００の染色体領域に対応する染色体領域）、

（ｉｉ）　ＨＬＡ－ＣおよびＨＬＡ－Ｂを含む一連の領域（例えば、ｈｇ３８ゲノム配列のｃｈｒ６：３１，２６９，１６９－３１，３５７，１５８、好ましくはｈｇ３８ゲノム配列のｃｈｒ６：３１，２６９，１６９－３１，４６３，３３８、例えば、ｃｈｒ６：　３１，２６８，７４９－３１，３５７，１７９、またはｃｈｒ６：　３１，１７６，０００－３１，５３４，０００に対応する染色体領域）、

（ｉｉｉ）　ＨＬＡ－ＤＲＡ、ＨＬＡ－ＤＲＢ５、およびＨＬＡ－ＤＲＢ１を含む一連の領域（例えば、ｈｇ３８ゲノム配列のｃｈｒ６：３２，４４５，０００－３２，８１６，９５１、好ましくはｃｈｒ６：３２，４３９，９５１－３２，８１７，００２の染色体領域に対応する染色体領域）、および

（ｉｖ）　ＨＬＡ－ＤＯＡ、ＨＬＡ－ＤＰＡ１、およびＨＬＡ－ＤＰＢ１を含む一連の領域（例えば、ｈｇ３８ゲノム配列のｃｈｒ６：３３，００６，８３８－３３，０８６，２３８、好ましくは、ｃｈｒ６：３３，００６，８３８－３３，１３１，１９９、例えば、ｃｈｒ６：３２，９３４，６３６－３３，０８９，６９６、またはｃｈｒ６：　３３，００２，０００－３３，１４７，０００の染色体領域に対応する染色体領域）

からなる群から選択される１以上（好ましくは全て）の染色体領域中にそれぞれ位置するＨＬＡ類似配列集積領域の一部もしくは全体を含む領域の欠失

（好ましくは、全体を含む領域の欠失）であり、

前記ＨＬＡ類似配列集積領域は、前記染色体領域中にそれぞれ含まれるＨＬＡコードする遺伝子およびＨＬＡ類似配列の全てを含み、

前記一部は少なくとも一つながりの領域を含み、前記一つながりの領域は、上記領域にそれぞれ含まれるＨＬＡコードする遺伝子およびＨＬＡ類似配列からなる群から選択される遺伝子の５０％以上を含む、

細胞。

［２Ａ］上記［１Ａ］に記載の細胞であって、前記ゲノムＤＮＡにおいて請求項１に規定された欠失を有する（ｉ）～（ｉｖ）のいずれかまたは好ましくはすべては、内在性のＨＬＡおよびＨＬＡ類似配列を含まないか、１つしか含まない、細胞。

［３Ａ］上記［１Ａ］または［２Ａ］に記載の細胞であって、前記ゲノムＤＮＡにおいて請求項１に規定された欠失を有する（ｉ）～（ｉｖ）のいずれかまたは好ましくはすべては、内在性のＨＬＡおよびＨＬＡ類似配列を含まない、細胞。

［４Ａ］上記［１Ａ］～［３Ａ］のいずれかに記載の細胞であって、

（ｉ）　ＨＬＡ－Ｆ、ＨＬＡ－Ｇ、およびＨＬＡ－Ａを含む一連の領域（例えば、ｈｇ３８ゲノム配列のｃｈｒ６：２９，７２３，４６４－２９，９４５，４５５、好ましくはｃｈｒ６：２９，７２３，４６４－３０，０１０，６１８例えば、ｃｈｒ６：　２９，７２２，７７５－２９，９４５，８７０、またはｃｈｒ６：　２９，７１１，０００－３０，０２０，０００に対応する染色体領域）中のＨＬＡ類似配列集積領域の全体を欠失したゲノムＤＮＡを有する、細胞。

［５Ａ］上記［１Ａ］～［４Ａ］のいずれかに記載の細胞であって、

（ｉｉ）　ＨＬＡ－ＣおよびＨＬＡ－Ｂを含む一連の領域（例えば、ｈｇ３８ゲノム配列のｃｈｒ６：３１，２６９，１６９－３１，３５７，１５８、好ましくはｈｇ３８ゲノム配列のｃｈｒ６：３１，２６９，１６９－３１，４６３，３３８、例えば、ｃｈｒ６：　３１，２６８，７４９－３１，３

５７，１７９、またはｃｈｒ６：　３１，１７６，０００－３１，５３４，０００に対応する染色体領域）ＨＬＡ－ＣおよびＨＬＡ－Ｂを含む一連の領域（例えば、ｈｇ３８ゲノム配列のｃｈｒ６：３１，２６９，１６９－３１，３５７，１５８、好ましくはｈｇ３８ゲノム配列のｃｈｒ６：３１，２６９，１６９－３１，４６３，３３８、例えば、ｃｈｒ６：　３１，２６８，７４９－３１，３５７，１７９、またはｃｈｒ６：　３１，１７６，０００－３１，５３４，０００に対応する染色体領域）中のＨＬＡ類似配列集積領域の全体を欠失したゲノムＤＮＡを有する、細胞。

［６Ａ］上記［１Ａ］～［５Ａ］のいずれかに記載の細胞であって、

（ｉｉｉ）　ＨＬＡ－ＤＲＡ、ＨＬＡ－ＤＲＢ５、およびＨＬＡ－ＤＲＢ１を含む一連の領域（例えば、ｈｇ３８ゲノム配列のｃｈｒ６：３２，４４５，０００－３２，８１６，９５１、好ましくはｃｈｒ６：３２，４３９，９５１－３２，８１７，００２の染色体領域に対応する染色体領域）、またはｃｈｒ６：　３２，４４５，０００－３２，８２１，０００に対応する染色体領域中のＨＬＡ類似配列集積領域の全体を欠失したゲノムＤＮＡを有する、細胞。

［７Ａ］上記［１Ａ］～［６Ａ］のいずれかに記載の細胞であって、

（ｉｖ）　ＨＬＡ－ＤＯＡ、ＨＬＡ－ＤＰＡ１、およびＨＬＡ－ＤＰＢ１を含む一連の領域（例えば、ｈｇ３８ゲノム配列のｃｈｒ６：３３，００６，８３８－３３，０８６，２３８、好ましくは、ｃｈｒ６：３３，００６，８３８－３３，１３１，１９９、例えば、ｃｈｒ６：３２，９３４，６３６－３３，０８９，６９６、またはｃｈｒ６：　３３，００２，０００－３３，１４７，０００の染色体領域に対応する染色体領域）中のＨＬＡ類似配列集積領域の全体を欠失したゲノムＤＮＡを有する、細胞。

［８Ａ］前記欠失が、ｈｇ３８ゲノム配列のｃｈｒ６：　２９，７０１，０００～２９，７２３，４６４（例えば、Ｃｈｒ６：　２９，７０９，０００－２９，７１１，０００）に対応する染色体領域中の特有の配列（第１の配列）中に一方の端を有し、ｈｇ３８ゲノム配列のｃｈｒ６：　２９，９４５

，４５５－３０，０３０，０００（例えば、Ｃｈｒ６：　３０，０２０，０００－３０，０２０，０００およびｃｈｒ６：　３０，０２１，５００－３０，０２２，８００）に対応する染色体領域中の特有の配列（第２の配列）中に他方の端を有する領域の欠失である、上記［１Ａ］～［７Ａ］のいずれかに記載の細胞。

［９Ａ］前記ゲノムＤＮＡが、制御配列に作動可能に連結された内因性または外来性の所望の遺伝子の挿入を含み、当該挿入は、上記（ｉ）～（ｉｖ）のいずれかの領域内、または上記（ｉ）～（ｉｖ）の領域以外の領域に位置する、上記［１Ａ］～［８Ａ］のいずれかに記載の細胞。

［１０Ａ］前記欠失が、ｈｇ３８ゲノム配列のｃｈｒ６：　３１，１６６，０００～３１，２６９，１６９（例えば、Ｃｈｒ６：　３１，１７４，０００～３１，１７７，０００）に対応する染色体領域中の特有の配列（第３の配列）中に一方の端を有し、ｈｇ３８ゲノム配列のｃｈｒ６：　３１，３５７，１５８～３１，５４４，０００（例えば、Ｃｈｒ６：　３１，５３４，０００～３１，５３８，０００）に対応する染色体領域中の特有の配列（第４の配列）中に他方の端を有する領域の欠失である、上記［１Ａ］～［９Ａ］のいずれかに記載の細胞。

［１１Ａ］前記欠失が、ｈｇ３８ゲノム配列のｃｈｒ６：３２，４１６，０００～３３，４４５，０００（例えば、Ｃｈｒ６：　３２，４４０，０００～３２，４４８，５００）に対応する染色体領域中の特有の配列（第５の配列）中に一方の端を有し、ｈｇ３８ゲノム配列のｃｈｒ６：３２，４３９，９５１－３２，８３１，０００（例えば、Ｃｈｒ６：　３２，８２０，５００～３２，８２２，５００）に対応する染色体領域中の特有の配列（第６の配列）中に他方の端を有する領域の欠失である、上記［１Ａ］～［１０Ａ］のいずれかに記載の細胞。

［１２Ａ］前記欠失が、ｈｇ３８ゲノム配列のｃｈｒ６：３２，９２４，０００～３３，００６，８３８（例えば、Ｃｈｒ６：　３２，９９９，５００～３３，００２，５００）に対応する染色体領域中の特有の配列（第７の配

列）中に一方の端を有し、ｈｇ３８ゲノム配列のｃｈｒ６：　３３，０８６，２３８－３３，１６５，０００（例えば、Ｃｈｒ６：　３３，１４７，５００～３３，１５０，５００）に対応する染色体領域中の特有の配列（第８の配列）中に他方の端を有する領域の欠失である、上記［１Ａ］～［１１Ａ］のいずれかに記載の細胞。

［１３Ａ］上記［１Ａ］～［１２Ａ］のいずれかに記載の細胞であって、欠失を有する上記（ｉ）～（ｉｖ）は、その染色体領域内に繰り返し配列を有しない、細胞。

［１４Ａ］上記［１Ａ］～［１３Ａ］のいずれかに記載の細胞であって、機能的なβ２ミクログロブリンおよび機能的なＣＩＩＴＡのいずれかまたは両方を有する、細胞。

［１５Ａ］上記［１Ａ］～［１４Ａ］のいずれかに記載の細胞であって、ＨＬＡクラスＩおよび／またはＨＬＡクラスＩＩを細胞表面に実質的に発現していない、細胞。

［１６Ａ］上記［１Ａ］～［１５Ａ］のいずれかに記載の細胞であって、欠失が１００ｋｂから４００ｋｂの大きさである、細胞。

［１７Ａ］上記［１Ａ］～［１６Ａ］のいずれかに記載の細胞を含む、組成物。

［１８Ａ］ゲノムの全アレル（２倍体の場合には２アレル）における領域の欠失（例えば、１Ｍｂまで、または５００ｋｂまでの領域の欠失）であって、ＭＨＣ分子をコードする遺伝子座のＭＨＣ類似配列集積領域の一部、または好ましくは全部を含む領域を含む欠失を有するゲノムを有する細胞。

［１９Ａ］各ＭＨＣ類似配列集積領域には、１以下のＭＨＣ分子をコードする遺伝子しか含まれない、上記［１８Ａ］に記載の細胞。

［２０Ａ］各ＭＨＣ類似配列集積領域には、４以下のＭＨＣ分子をコードする遺伝子しか含まれない、上記［１８Ａ］に記載の細胞。

［２１Ａ］各ＭＨＣ類似配列集積領域には、ＭＨＣ分子をコードする遺伝子を含まれない、上記［１８Ａ］に記載の細胞。

［２２Ａ］上記［１８Ａ］に記載の細胞であって、欠失が、ＭＨＣ分子をコードする遺伝子座のＭＨＣ類似配列集積領域の全部を含む領域を含む欠失である、細胞。

［２３Ａ］上記［２２Ａ］に記載の細胞であって、制御配列と当該制御配列に作動可能に連結された所望の遺伝子をさらに含む、細胞。

［２４Ａ］制御配列と当該制御配列に作動可能に連結された所望の遺伝子が、全体として天然に存在しない配列を有する、上記［２３Ａ］に記載の細胞。

［２５Ａ］制御配列と当該制御配列に作動可能に連結された所望の遺伝子が、天然に存在する（または内在性の）配列を有する、上記［２３Ａ］に記載の細胞。

[0009] ［１Ｂ］細胞であって、欠失を有するゲノムＤＮＡを含み、前記欠失は、以下（ｉ）～（ｉｖ）に規定される染色体領域：

（ｉ） ＨＬＡ－Ｆ、ＨＬＡ－Ｇ、およびＨＬＡ－Ａを含む一連の領域（例えば、ｈｇ３８ゲノム配列のｃｈｒ６：２９，７２３，４６４－２９，９４５，４５５、好ましくはｃｈｒ６：２９，７２３，４６４－３０，０１０，６１８例えば、ｃｈｒ６： ２９，７２２，７７５－２９，９４５，８７０、またはｃｈｒ６： ２９，７１１，０００－３０，０２０，０００の染色体領域に対応する染色体領域）、

（ｉｉ） ＨＬＡ－ＣおよびＨＬＡ－Ｂを含む一連の領域（例えば、ｈｇ３８ゲノム配列のｃｈｒ６：３１，２６９，１６９－３１，３５７，１５８、好ましくはｈｇ３８ゲノム配列のｃｈｒ６：３１，２６９，１６９－３１，４６３，３３８、例えば、ｃｈｒ６： ３１，２６８，７４９－３１，３５７，１７９、またはｃｈｒ６： ３１，１７６，０００－３１，５３４，０００に対応する染色体領域）、

（ｉｉｉ） ＨＬＡ－ＤＲＡ、ＨＬＡ－ＤＲＢ５、およびＨＬＡ－ＤＲＢ１を含む一連の領域（例えば、ｈｇ３８ゲノム配列のｃｈｒ６：３２，４４５，０００－３２，８１６，９５１、好ましくはｃｈｒ６：３２，４３９，

９５１－３２，８１７，００２の染色体領域に対応する染色体領域）、および

（ｉｖ） ＨＬＡ－ＤＯＡ、ＨＬＡ－ＤＰＡ１、およびＨＬＡ－ＤＰＢ１を含む一連の領域（例えば、ｈｇ３８ゲノム配列のｃｈｒ６：３３，００６，８３８－３３，０８６，２３８、好ましくは、ｃｈｒ６：３３，００６，８３８－３３，１３１，１９９、例えば、ｃｈｒ６：３２，９３４，６３６－３３，０８９，６９６、またはｃｈｒ６： ３３，００２，０００－３３，１４７，０００の染色体領域に対応する染色体領域）

からなる群から選択される１以上（好ましくは全て）の染色体領域中にそれぞれ位置するＨＬＡ類似配列集積領域の一部もしくは全体を含む領域の欠失（好ましくは全体を含む領域の欠失）であり、

前記ＨＬＡ類似配列集積領域は、前記染色体領域中にそれぞれ含まれるＨＬＡコードする遺伝子およびＨＬＡ類似配列の全てを含み、

前記一部は少なくとも一つながりの領域を含み、前記一つながりの領域は、上記領域にそれぞれ含まれるＨＬＡコードする遺伝子およびＨＬＡ類似配列からなる群から選択される遺伝子の５０％以上を含む、

細胞。

［２Ｂ］上記［１Ｂ］に記載の細胞であって、前記ゲノムＤＮＡにおいて請求項１に規定された欠失を有する（ｉ）～（ｉｖ）のいずれかまたはすべては、内在性のＨＬＡおよびＨＬＡ類似配列を含まないか、１つしか含まない、細胞。

［３Ｂ］上記［１Ｂ］または［２Ｂ］に記載の細胞であって、前記ゲノムＤＮＡにおいて請求項１に規定された欠失を有する（ｉ）～（ｉｖ）のいずれかまたはすべては、内在性のＨＬＡおよびＨＬＡ類似配列を含まない、細胞。

［４Ｂ］上記［１Ｂ］～［３Ｂ］のいずれかに記載の細胞であって、

（ｉ） ＨＬＡ－Ｆ、ＨＬＡ－Ｇ、およびＨＬＡ－Ａを含む一連の領域（例えば、ｈｇ３８ゲノム配列のｃｈｒ６：２９，７２３，４６４－２９，９

４５，４５５、好ましくはｃｈｒ６：２９，７２３，４６４－３０，０１０，６１８例えば、ｃｈｒ６：　２９，７２２，７７５－２９，９４５，８７０、またはｃｈｒ６：　２９，７１１，０００－３０，０２０，０００に対応する染色体領域）中のＨＬＡ類似配列集積領域の全体を欠失したゲノムＤＮＡを有する、細胞。

［５Ｂ］上記［１Ｂ］～［４Ｂ］のいずれかに記載の細胞であって、

（ｉｉ）　ＨＬＡ－ＣおよびＨＬＡ－Ｂを含む一連の領域（例えば、ｈｇ３８ゲノム配列のｃｈｒ６：３１，２６９，１６９－３１，３５７，１５８、好ましくはｈｇ３８ゲノム配列のｃｈｒ６：３１，２６９，１６９－３１，４６３，３３８、例えば、ｃｈｒ６：　３１，２６８，７４９－３１，３５７，１７９、またはｃｈｒ６：　３１，１７６，０００－３１，５３４，０００に対応する染色体領域）ＨＬＡ－ＣおよびＨＬＡ－Ｂを含む一連の領域（例えば、ｈｇ３８ゲノム配列のｃｈｒ６：３１，２６９，１６９－３１，３５７，１５８、好ましくはｈｇ３８ゲノム配列のｃｈｒ６：３１，２６９，１６９－３１，４６３，３３８、例えば、ｃｈｒ６：　３１，２６８，７４９－３１，３５７，１７９、またはｃｈｒ６：　３１，１７６，０００－３１，５３４，０００に対応する染色体領域）中のＨＬＡ類似配列集積領域の全体を欠失したゲノムＤＮＡを有する、細胞。

［６Ｂ］上記［１Ｂ］～［５Ｂ］のいずれかに記載の細胞であって、

（ｉｉｉ）　ＨＬＡ－ＤＲＡ、ＨＬＡ－ＤＲＢ５、およびＨＬＡ－ＤＲＢ１を含む一連の領域（例えば、ｈｇ３８ゲノム配列のｃｈｒ６：３２，４４５，０００－３２，８１６，９５１、好ましくはｃｈｒ６：３２，４３９，９５１－３２，８１７，００２の染色体領域に対応する染色体領域）、またはｃｈｒ６：　３２，４４５，０００－３２，８２１，０００に対応する染色体領域中のＨＬＡ類似配列集積領域の全体を欠失したゲノムＤＮＡを有する、細胞。

［７Ｂ］上記［１Ｂ］～［６Ｂ］のいずれかに記載の細胞であって、

（ｉｖ）　ＨＬＡ－ＤＯＡ、ＨＬＡ－ＤＰＡ１、およびＨＬＡ－ＤＰＢ１

を含む一連の領域（例えば、ｈｇ３８ゲノム配列のｃｈｒ６：３３，００６，８３８－３３，０８６，２３８、好ましくは、ｃｈｒ６：３３，００６，８３８－３３，１３１，１９９、例えば、ｃｈｒ６：３２，９３４，６３６－３３，０８９，６９６、またはｃｈｒ６：　３３，００２，０００－３３，１４７，０００の染色体領域に対応する染色体領域）中のＨＬＡ類似配列集積領域の全体を欠失したゲノムＤＮＡを有する、細胞。

［８Ｂ］前記欠失が、ｈｇ３８ゲノム配列のｃｈｒ６：　２９，７０１，０００～２９，７２３，４６４（例えば、Ｃｈｒ６：　２９，７０９，０００－２９，７１１，０００）に対応する染色体領域中の特有の配列（第１の配列）中に一方の端を有し、ｈｇ３８ゲノム配列のｃｈｒ６：　２９，９４５，４５５－３０，０３０，０００（例えば、Ｃｈｒ６：　３０，０２０，０００－３０，０２０，０００およびｃｈｒ６：　３０，０２１，５００－３０，０２２，８００）に対応する染色体領域中の特有の配列（第２の配列）中に他方の端を有する領域の欠失である、上記［１Ｂ］～［７Ｂ］のいずれかに記載の細胞。

［９Ｂ］前記ゲノムＤＮＡが、制御配列と当該制御配列に作動可能に連結された内因性または外来性の所望の遺伝子の挿入を含み、当該挿入は、上記（ｉ）～（ｉｖ）のいずれかの領域内、または上記（ｉ）～（ｉｖ）の領域以外の領域に位置する、上記［１Ｂ］～［８Ｂ］のいずれかに記載の細胞。

［１０Ｂ］前記欠失が、ｈｇ３８ゲノム配列のｃｈｒ６：　３１，１６６，０００～３１，２６９，１６９（例えば、Ｃｈｒ６：　３１，１７４，０００～３１，１７７，０００）に対応する染色体領域中の特有の配列（第３の配列）中に一方の端を有し、ｈｇ３８ゲノム配列のｃｈｒ６：　３１，３５７，１５８～３１，５４４，０００（例えば、Ｃｈｒ６：　３１，５３４，０００～３１，５３８，０００）に対応する染色体領域中の特有の配列（第４の配列）中に他方の端を有する領域の欠失である、上記［１Ｂ］～［９Ｂ］のいずれかに記載の細胞。

［１１Ｂ］前記欠失が、ｈｇ３８ゲノム配列のｃｈｒ６：３２，４１６，０

００～３３，４４５，０００（例えば、Ｃｈｒ６：　３２，４４０，０００～３２，４４８，５００）に対応する染色体領域中の特有の配列（第５の配列）中に一方の端を有し、ｈｇ３８ゲノム配列のｃｈｒ６：３２，４３９，９５１－３２，８３１，０００（例えば、Ｃｈｒ６：　３２，８２０，５００～３２，８２２，５００）に対応する染色体領域中の特有の配列（第６の配列）中に他方の端を有する領域の欠失である、上記［１Ｂ］～［１０Ｂ］のいずれかに記載の細胞。

［１２Ｂ］前記欠失が、ｈｇ３８ゲノム配列のｃｈｒ６：３２，９２４，０００～３３，００６，８３８（例えば、Ｃｈｒ６：　３２，９９９，５００～３３，００２，５００）に対応する染色体領域中の特有の配列（第７の配列）中に一方の端を有し、ｈｇ３８ゲノム配列のｃｈｒ６：　３３，０８６，２３８－３３，１６５，０００（例えば、Ｃｈｒ６：　３３，１４７，５００～３３，１５０，５００）に対応する染色体領域中の特有の配列（第８の配列）中に他方の端を有する領域の欠失である、上記［１Ｂ］～［１１Ｂ］のいずれかに記載の細胞。

［１３Ｂ］上記［１Ｂ］～［１２Ｂ］のいずれかのいずれか一項に記載の細胞であって、欠失を有する上記（ｉ）～（ｉｖ）は、その染色体領域内に繰り返し配列を有しない、細胞。

［１４Ｂ］上記［１Ｂ］～［１３Ｂ］のいずれかに記載の細胞であって、機能的なβ２ミクログロブリンおよび機能的なＣＩＩＴＡのいずれかまたは両方を有する、細胞。

［１５Ｂ］上記［１Ｂ］～［１４Ｂ］のいずれかに記載の細胞であって、ＨＬＡクラスＩおよび／またはＨＬＡクラスＩＩを細胞表面に実質的に発現していない、細胞。

［１６Ｂ］上記［１Ｂ］～［１５Ｂ］のいずれかに記載の細胞であって、欠失が１００ｋｂから４００ｋｂの大きさである、細胞。

［１７Ｂ］上記［１Ｂ］～［１６Ｂ］のいずれかに記載の細胞を含む、組成物。

[0010] ［１Ｃ］細胞であって、欠失を有するゲノムＤＮＡを含み、前記欠失は、以下（ｉ）～（ｉｖ）に規定される染色体領域：

（ｉ） ＨＬＡ－Ｆ、ＨＬＡ－Ｇ、およびＨＬＡ－Ａを含む一連の領域（例えば、ｈｇ３８ゲノム配列のｃｈｒ６：２９，７２３，４６４－２９，９４５，４５５、好ましくはｃｈｒ６：２９，７２３，４６４－３０，０１０，６１８例えば、ｃｈｒ６： ２９，７２２，７７５－２９，９４５，８７０、またはｃｈｒ６： ２９，７１１，０００－３０，０２０，０００の染色体領域に対応する染色体領域）、

（ｉｉ） ＨＬＡ－ＣおよびＨＬＡ－Ｂを含む一連の領域（例えば、ｈｇ３８ゲノム配列のｃｈｒ６：３１，２６９，１６９－３１，３５７，１５８、好ましくはｈｇ３８ゲノム配列のｃｈｒ６：３１，２６９，１６９－３１，４６３，３３８、例えば、ｃｈｒ６： ３１，２６８，７４９－３１，３５７，１７９、またはｃｈｒ６： ３１，１７６，０００－３１，５３４，０００に対応する染色体領域）、

（ｉｉｉ） ＨＬＡ－ＤＲＡ、ＨＬＡ－ＤＲＢ５、およびＨＬＡ－ＤＲＢ１を含む一連の領域（例えば、ｈｇ３８ゲノム配列のｃｈｒ６：３２，４４５，０００－３２，８１６，９５１、好ましくはｃｈｒ６：３２，４３９，９５１－３２，８１７，００２の染色体領域に対応する染色体領域）、および

（ｉｖ） ＨＬＡ－ＤＯＡ、ＨＬＡ－ＤＰＡ１、およびＨＬＡ－ＤＰＢ１を含む一連の領域（例えば、ｈｇ３８ゲノム配列のｃｈｒ６：３３，００６，８３８－３３，０８６，２３８、好ましくは、ｃｈｒ６：３３，００６，８３８－３３，１３１，１９９、例えば、ｃｈｒ６：３２，９３４，６３６－３３，０８９，６９６、またはｃｈｒ６： ３３，００２，０００－３３，１４７，０００の染色体領域に対応する染色体領域）

からなる群から選択される１以上（好ましくは全て）の染色体領域中にそれぞれ位置するＨＬＡ類似配列集積領域の全体を含む領域の欠失であり、

前記ＨＬＡ類似配列集積領域は、前記染色体領域中にそれぞれ含まれるＨ

ＬＡをコードする遺伝子およびＨＬＡ類似配列の全てを含み、

ゲノムＤＮＡは、ＨＬＡ－Ｅをコードする遺伝子の欠失をさらに含んでいてもよく、

欠失を有する領域のいずれか（例えば、ＨＬＡ－Ｅをコードする遺伝子の欠失を有する領域）は、第１のアレルと第２のアレルを有し、前記第１のアレルと第２のアレルはそれぞれ、ネガティブ選択用選択マーカー遺伝子（および好ましくはポジティブ選択用マーカー遺伝子）を含む１以上の選択マーカー遺伝子の塩基配列を含むカセット（それぞれ第１のカセットおよび第２のカセットという）を当該欠失部位に有し、第１のカセットに含まれるネガティブ選択用選択マーカー遺伝子と第２のカセットに含まれる１以上のネガティブ選択用選択マーカー遺伝子は、相互に区別可能に異なり、これにより、第１のカセットまたは第２のカセットをさらに除去または他の配列と置き換える改変に供した後で前記第１のカセットまたは第２のカセットに含まれるネガティブ選択用選択マーカー遺伝子の非発現を指標として前記第１のカセットまたは第２のカセットにおいて改変を有する細胞を選択できる、

細胞。

［２Ｃ］細胞であって、欠失を有するゲノムＤＮＡを含み、前記欠失は、以下（ｉ）～（ｉｖ）に規定される染色体領域：

（ｉ）　ＨＬＡ－Ｆ、ＨＬＡ－Ｇ、およびＨＬＡ－Ａを含む一連の領域（例えば、ｈｇ３８ゲノム配列のｃｈｒ６：２９，７２３，４６４－２９，９４５，４５５、好ましくはｃｈｒ６：２９，７２３，４６４－３０，０１０，６１８例えば、ｃｈｒ６：　２９，７２２，７７５－２９，９４５，８７０、またはｃｈｒ６：　２９，７１１，０００－３０，０２０，０００の染色体領域に対応する染色体領域）、

（ｉｉ）　ＨＬＡ－ＣおよびＨＬＡ－Ｂを含む一連の領域（例えば、ｈｇ３８ゲノム配列のｃｈｒ６：３１，２６９，１６９－３１，３５７，１５８、好ましくはｈｇ３８ゲノム配列のｃｈｒ６：３１，２６９，１６９－３１，４６３，３３８、例えば、ｃｈｒ６：　３１，２６８，７４９－３１，３

５７，１７９、またはｃｈｒ６：　３１，１７６，０００－３１，５３４，０００に対応する染色体領域）、

（ｉｉｉ）　ＨＬＡ－ＤＲＡ、ＨＬＡ－ＤＲＢ５、およびＨＬＡ－ＤＲＢ１を含む一連の領域（例えば、ｈｇ３８ゲノム配列のｃｈｒ６：３２，４４５，０００－３２，８１６，９５１、好ましくはｃｈｒ６：３２，４３９，９５１－３２，８１７，００２の染色体領域に対応する染色体領域）、および

（ｉｖ）　ＨＬＡ－ＤＯＡ、ＨＬＡ－ＤＰＡ１、およびＨＬＡ－ＤＰＢ１を含む一連の領域（例えば、ｈｇ３８ゲノム配列のｃｈｒ６：３３，００６，８３８－３３，０８６，２３８、好ましくは、ｃｈｒ６：３３，００６，８３８－３３，１３１，１９９、例えば、ｃｈｒ６：３２，９３４，６３６－３３，０８９，６９６、またはｃｈｒ６：　３３，００２，０００－３３，１４７，０００の染色体領域に対応する染色体領域）

からなる群から選択される１以上（好ましくは全て）の染色体領域中にそれぞれ位置するＨＬＡ類似配列集積領域の全体を含む領域の欠失であり、

前記ＨＬＡ類似配列集積領域は、前記染色体領域中にそれぞれ含まれるＨＬＡをコードする遺伝子およびＨＬＡ類似配列の全てを含み、

ゲノムＤＮＡは、ＨＬＡ－Ｅをコードする遺伝子の欠失をさらに含み、

欠失を有する領域のいずれか（例えば、ＨＬＡ－Ｅをコードする遺伝子の欠失を有する領域）は、第１のアレルと第２のアレルを有し、前記第１のアレルは、外来の目的遺伝子を有し、第２のアレルは、ネガティブ選択用選択マーカー遺伝子（および好ましくはポジティブ選択用マーカー遺伝子）を含む１以上の選択マーカー遺伝子の塩基配列を含むカセット（第２のカセットという）を当該欠失部位に有し、これにより、第２のカセットをさらに除去または他の配列と置き換える改変に供した後で前記第２のカセットに含まれるネガティブ選択用選択マーカー遺伝子の非発現を指標として前記第２のカセットにおいて改変を有する細胞を選択できる、

細胞。

［３Ｃ］細胞であって、欠失を有するゲノムＤＮＡを含み、前記欠失は、以下（ｉ）～（ｉｖ）に規定される染色体領域：

（ｉ）　ＨＬＡ－Ｆ、ＨＬＡ－Ｇ、およびＨＬＡ－Ａを含む一連の領域（例えば、ｈｇ３８ゲノム配列のｃｈｒ６：２９，７２３，４６４－２９，９４５，４５５、好ましくはｃｈｒ６：２９，７２３，４６４－３０，０１０，６１８例えば、ｃｈｒ６：　２９，７２２，７７５－２９，９４５，８７０、またはｃｈｒ６：　２９，７１１，０００－３０，０２０，０００の染色体領域に対応する染色体領域）、

（ｉｉ）　ＨＬＡ－ＣおよびＨＬＡ－Ｂを含む一連の領域（例えば、ｈｇ３８ゲノム配列のｃｈｒ６：３１，２６９，１６９－３１，３５７，１５８、好ましくはｈｇ３８ゲノム配列のｃｈｒ６：３１，２６９，１６９－３１，４６３，３３８、例えば、ｃｈｒ６：　３１，２６８，７４９－３１，３５７，１７９、またはｃｈｒ６：　３１，１７６，０００－３１，５３４，０００に対応する染色体領域）、

（ｉｉｉ）　ＨＬＡ－ＤＲＡ、ＨＬＡ－ＤＲＢ５、およびＨＬＡ－ＤＲＢ１を含む一連の領域（例えば、ｈｇ３８ゲノム配列のｃｈｒ６：３２，４４５，０００－３２，８１６，９５１、好ましくはｃｈｒ６：３２，４３９，９５１－３２，８１７，００２の染色体領域に対応する染色体領域）、および

（ｉｖ）　ＨＬＡ－ＤＯＡ、ＨＬＡ－ＤＰＡ１、およびＨＬＡ－ＤＰＢ１を含む一連の領域（例えば、ｈｇ３８ゲノム配列のｃｈｒ６：３３，００６，８３８－３３，０８６，２３８、好ましくは、ｃｈｒ６：３３，００６，８３８－３３，１３１，１９９、例えば、ｃｈｒ６：３２，９３４，６３６－３３，０８９，６９６、またはｃｈｒ６：　３３，００２，０００－３３，１４７，０００の染色体領域に対応する染色体領域）

からなる群から選択される１以上（好ましくは全て）の染色体領域中にそれぞれ位置するＨＬＡ類似配列集積領域の全体を含む領域の欠失であり、

前記ＨＬＡ類似配列集積領域は、前記染色体領域中にそれぞれ含まれるＨ

ＬＡをコードする遺伝子およびＨＬＡ類似配列の全てを含み、

ゲノムＤＮＡは、ＨＬＡ－Ｅをコードする遺伝子の欠失をさらに含み、

欠失を有する領域のいずれか（例えば、ＨＬＡ－Ｅをコードする遺伝子の欠失を有する領域）は、第１のアレルと第２のアレルを有し、かつ、

（１）前記第１のアレルおよび第２のアレルの欠失部位はそれぞれ、外来の目的遺伝子を有する、または、

（２）第１のアレルおよび第２のアレルの欠失部位のいずれか一方が外来の目的遺伝子を有し、他方は欠失部位の両端が直接的または間接的に（例えば、スペーサーなどを介して間接的に）連結した構造を有する、

細胞。

［４Ｃ］第１のアレルは、ＨＬＡ－Ａ、ＨＬＡ－Ｂ、ＨＬＡ－Ｃ、およびＨＬＡ－Ｅからなる群から選択されるいずれか１つ、２つ、３つ、または全てをコードする外来の遺伝子を含む、上記［２Ｃ］に記載の細胞。

［５Ｃ］外来の目的遺伝子は、ＨＬＡ－Ａ、ＨＬＡ－Ｂ、ＨＬＡ－Ｃ、およびＨＬＡ－Ｅからなる群から選択されるいずれか１つ、２つ、３つ、または全てをコードする外来の遺伝子を含み、外来の目的遺伝子はそれぞれ、第１のアレルまたは第２のアレルに含まれる、上記［３Ｃ］に記載の細胞。

［６Ｃ］前記外来の遺伝子はそれぞれ、当該遺伝子のコード領域の転写開始点より上流の配列、イントロン、およびストップコドンの下流の配列をさらに含む、上記［２Ｃ］または［４Ｃ］に記載の細胞。

「７Ｃ」前記外来の遺伝子はそれぞれ、当該遺伝子のコード領域の転写開始点より上流の配列、イントロン、およびストップコドンの下流の配列をさらに含む、上記［３Ｃ］または［５Ｃ］に記載の細胞。

［８Ｃ］前記上流の配列が、１ｋｂｐ以上の長さを有する、上記［６Ｃ］に記載の細胞。

［９Ｃ］前記上流の配列が、１ｋｂｐ以上の長さを有する、上記［７Ｃ］に記載の細胞。

［１０Ｃ］上記［１Ｃ］～［９Ｃ］のいずれかに記載の細胞を含む、組成物

。

［１１Ｃ］上記［２Ｃ］～［９Ｃ］のいずれかに記載の細胞を含む、前記外来の遺伝子の発現および／または機能を解析することに用いるための組成物。

[0011] 本発明は一例として以下の態様を含む。

［１］ＭＨＣ遺伝子座において、染色体ゲノムの２つ以上のアレルを改変するゲノム改変方法（特に染色体ゲノムの２つ以上のアレルを改変して特定遺伝子群を欠失させる方法）であって、

（ａ）下記（ｉ）及び（ｉｉ）を、前記染色体を含む細胞に導入する工程と、

（ｉ）前記染色体ゲノムの標的領域を標的とする配列特異的核酸切断分子、又は前記配列特異的核酸切断分子をコードするポリヌクレオチドを含むゲノム改変システム、

（ｉｉ）前記標的領域の上流側に隣接する塩基配列と相同な塩基配列を有する上流ホモロジーアームと、前記標的領域の下流側に隣接する塩基配列と相同な塩基配列を有する下流ホモロジーアームとの間に、選択マーカー遺伝子の塩基配列を含む、２種以上の選択マーカー用ドナーＤＮＡであって、前記２種以上の選択マーカー用ドナーＤＮＡは、相互に異なる選択マーカー遺伝子を有し、前記選択マーカー用ドナーＤＮＡの種類数は、ゲノム改変の対象とする前記アレルの数と同数以上である、２種以上の選択マーカー用ドナーＤＮＡ、

（ｂ）前記工程（ａ）の後、前記２種以上の選択マーカー用ドナーＤＮＡが有する全ての選択マーカー遺伝子に基づいて、前記細胞を選択する工程と、

を含む、ゲノム改変方法。

［２］前記選択マーカー遺伝子がポジティブ選択マーカー遺伝子であり、前記工程（ｂ）が、前記アレルの数と同数の前記ポジティブ選択マーカー遺伝子を発現する細胞を選択する工程である、［１］に記載のゲノム改変方法。

［３］前記選択マーカー用ドナーＤＮＡが、前記上流ホモロジーアームと前

記下流ホモロジーアームとの間に、ネガティブ選択マーカー遺伝子をさらに有する、［２］に記載のゲノム改変方法。

［４］（ｃ）前記工程（ｂ）の後、前記標的領域の上流側に隣接する塩基配列と相同な塩基配列を有する上流ホモロジーアームと、前記標的領域の下流側に隣接する塩基配列と相同な塩基配列を有する下流ホモロジーアームとの間に、所望の塩基配列を含む組換え用ドナーＤＮＡを、前記細胞に導入する工程と、（ｄ）前記工程（ｃ）の後、前記ネガティブ選択マーカー遺伝子を発現しない細胞を選択する工程と、をさらに含む、［３］に記載のゲノム改変方法。

［５］前記ポジティブ選択マーカー遺伝子が薬剤耐性遺伝子であり、前記ネガティブ選択マーカー遺伝子が蛍光タンパク質遺伝子である、［３］又は［４］に記載のゲノム改変方法。

［６］前記配列特異的核酸切断分子が、配列特異的エンドヌクレアーゼである、［１］～［５］のいずれか一つに記載にゲノム改変方法。

［７］前記ゲノム改変システムが、Ｃａｓタンパク質と、前記標的領域内の塩基配列に相同な塩基配列を有するガイドＲＮＡと、を含む、［６］に記載にゲノム改変方法。

［８］下記（ｉ）及び（ｉｉ）を含む、染色体ゲノムの２つ以上のアレルを改変するゲノム改変キット。

（ｉ）前記染色体ゲノムの標的領域を標的とする配列特異的核酸切断分子、又は前記配列特異的核酸切断分子をコードするポリヌクレオチドを含むゲノム改変システム

（ｉｉ）前記標的領域の上流側に隣接する塩基配列と相同な塩基配列を有する上流ホモロジーアームと、前記標的領域の下流側に隣接する塩基配列と相同な塩基配列を有する下流ホモロジーアームとの間に、選択マーカー遺伝子の塩基配列を含む、２種以上の選択マーカー用ドナーＤＮＡであって、前記２種以上の選択マーカー用ドナーＤＮＡは、相互に異なる選択マーカー遺伝子を有し、前記選択マーカー用ドナーＤＮＡの種類数は、ゲノム改変の対象

とする前記アレルの数と同数以上である、２種以上の選択マーカー用ドナーＤＮＡ。

［９］前記選択マーカー遺伝子がポジティブ選択マーカー遺伝子である、［８］に記載のゲノム改変キット。

［１０］前記選択マーカー用ドナーＤＮＡが、前記上流ホモロジーアームと前記下流ホモロジーアームとの間に、ネガティブ選択マーカー遺伝子をさらに有する、［９］に記載のゲノム改変キット。

［１１］前記配列特異的核酸切断分子が、配列特異的エンドヌクレアーゼである、［８］～［１０］のいずれか一つに記載にゲノム改変キット。

［１２］前記ゲノム改変システムが、Ｃａｓタンパク質と、前記標的領域内の塩基配列に相同な塩基配列を有するガイドＲＮＡと、を含む、［８］～［１１］のいずれか一つに記載にゲノム改変キット。

[0012] 本発明は一例として以下の態様を含む。

〔１〕染色体ゲノムの２つ以上のアレルが改変された細胞を作製する方法であって、

（ａ）下記（ｉ）及び（ｉｉ）を、２つ以上のアレルを含む細胞に導入して、前記２つ以上のアレルそれぞれに選択マーカー遺伝子を導入する工程と、

（ｉ）前記染色体ゲノムの２つ以上のアレル中の標的領域を標的とし、当該標的領域を切断することができる配列特異的核酸切断分子、又は前記配列特異的核酸切断分子をコードするポリヌクレオチドを含むゲノム改変システム、

（ｉｉ）２種以上の選択マーカー用ドナーＤＮＡであって、それぞれが前記標的領域の上流側の塩基配列と相同組換え可能な塩基配列を有する上流ホモロジーアームと、前記標的領域の下流側の塩基配列と相同組換え可能な塩基配列を有する下流ホモロジーアームとを有し、かつ、上流ホモロジーアームと下流ホモロジーアームの間に、選択マーカー遺伝子の塩基配列を含み、前記２種以上の選択マーカー用ドナーＤＮＡは、相互に区別可能に異なる選択マーカー遺伝子をそれぞれ有し、前記選択マーカー遺伝子は、選択マーカー

用ドナーＤＮＡの種類毎に固有であり、前記選択マーカー用ドナーＤＮＡの種類数は、ゲノム改変の対象とする前記アレルの数と同数以上である、２種以上の選択マーカー用ドナーＤＮＡ、

（ｂ）前記工程（ａ）の後、前記２以上のアレルに対して異なる種類の選択マーカー用ドナーＤＮＡがそれぞれ相同組み換えすることによって、当該２以上のアレルにそれぞれ区別可能に異なる固有の選択マーカー遺伝子が導入され、導入された当該区別可能に異なる選択マーカー遺伝子のすべてを発現する細胞を選択する工程（ポジティブ選択のための工程）と、

を含む、方法。

〔２〕染色体ゲノムの２つ以上のアレルを改変する方法であって、

（ａ）下記（ｉ）及び（ｉｉ）を、２つ以上のアレルを含む細胞に導入して、前記２つ以上のアレルそれぞれに選択マーカー遺伝子を導入する工程と、

（ｉ）前記染色体ゲノムの２つ以上のアレル中の標的領域を標的とし、当該標的領域を切断することができる配列特異的核酸切断分子、又は前記配列特異的核酸切断分子をコードするポリヌクレオチドを含むゲノム改変システム、

（ｉｉ）２種以上の選択マーカー用ドナーＤＮＡであって、それぞれが前記標的領域の上流側の塩基配列と相同組換え可能な塩基配列を有する上流ホモロジーアームと、前記標的領域の下流側の塩基配列と相同組換え可能な塩基配列を有する下流ホモロジーアームとを有し、かつ、上流ホモロジーアームと下流ホモロジーアームの間に、選択マーカー遺伝子の塩基配列を含み、前記２種以上の選択マーカー用ドナーＤＮＡは、相互に区別可能に異なる選択マーカー遺伝子をそれぞれ有し、前記選択マーカー遺伝子は、選択マーカー用ドナーＤＮＡの種類毎に固有であり、前記選択マーカー用ドナーＤＮＡの種類数は、ゲノム改変の対象とする前記アレルの数と同数以上である、２種以上の選択マーカー用ドナーＤＮＡ、

（ｂ）前記工程（ａ）の後、前記２以上のアレルに対して異なる種類の選択マーカー用ドナーＤＮＡがそれぞれ相同組み換えすることによって、当該２

以上のアレルにそれぞれ区別可能に異なる固有の選択マーカー遺伝子が導入され、導入された当該区別可能に異なる選択マーカー遺伝子のすべてを発現する細胞を選択する工程（ポジティブ選択のための工程）と、
を含む、方法。
〔３〕標的領域が５ｋｂｐ以上の長さを有する、上記〔１〕または〔２〕に記載の方法。
〔４〕標的領域が８ｋｂｐ以上の長さを有する、上記〔３〕に記載の方法。
〔５〕２種以上の選択マーカー用ドナーＤＮＡがそれぞれ、前記上流ホモロジーアームと前記下流ホモロジーアームの間に、ポジティブ選択用の選択マーカー遺伝子とネガティブ選択用のマーカー遺伝子と標的配列とを有し、ここで、当該選択マーカー遺伝子がポジティブ選択用にもネガティブ選択用にも用いられる場合には、別のネガティブ選択用の選択マーカー遺伝子を有していなくてよく、
（ｃ）前記工程（ｂ）の後、下記（ｉｉｉ）及び（ｉｖ）を選択された細胞に導入して前記２以上のアレルに組換え用ドナーＤＮＡを導入する工程と、
（ｉｉｉ）前記標的配列を標的とし、当該標的配列を切断することができる配列特異的核酸切断分子、又は前記配列特異的核酸切断分子をコードするポリヌクレオチドを含むゲノム改変システム、
（ｉｖ）所望の塩基配列を含む組換え用ドナーＤＮＡであって、前記標的領域の上流側の塩基配列と相同組換え可能な塩基配列を有する上流ホモロジーアームと、前記標的領域の下流側の塩基配列と相同組換え可能な塩基配列を有する下流ホモロジーアームを有する、組換え用ドナーＤＮＡ、
（ｄ）前記工程（ｃ）の後、前記ネガティブ選択用のマーカー遺伝子を発現しない細胞を選択する工程（ネガティブ選択のための工程）と、
をさらに含む、上記〔１〕～〔４〕のいずれかに記載の方法。
〔６〕２種以上の選択マーカー用ドナーＤＮＡがそれぞれ、前記上流ホモロジーアームと前記下流ホモロジーアームの間に、ポジティブ選択用の選択マーカー遺伝子とネガティブ選択用のマーカー遺伝子と標的配列とを有し、こ

こで、当該選択マーカー遺伝子がポジティブ選択用にもネガティブ選択用にも用いられる場合には、別のネガティブ選択用の選択マーカー遺伝子を有していなくてよく、

（ｃ）前記工程（ｂ）の後、下記（ｉｉｉ）及び（ｉｖ）を選択された細胞に導入して前記２以上のアレルに組換え用ドナーＤＮＡを導入する工程と、

（ｉｉｉ）前記標的配列を標的とし、当該標的配列を切断することができる配列特異的核酸切断分子、又は前記配列特異的核酸切断分子をコードするポリヌクレオチドを含むゲノム改変システム、

（ｉｖ）所望の塩基配列を含む組換え用ドナーＤＮＡであって、前記標的領域の上流側の塩基配列と相同組換え可能な塩基配列を有する上流ホモロジーアームと、前記標的領域の下流側の塩基配列と相同組換え可能な塩基配列を有する下流ホモロジーアームを有する、組換え用ドナーＤＮＡ、

（ｄ）前記工程（ｃ）の後、前記ネガティブ選択用のマーカー遺伝子を発現しない細胞を選択する工程（ネガティブ選択のための工程）と、

をさらに含む、上記〔３〕に記載の方法。

〔７〕２種以上の選択マーカー用ドナーＤＮＡがそれぞれ、前記上流ホモロジーアームと前記下流ホモロジーアームの間に、ポジティブ選択用の選択マーカー遺伝子とネガティブ選択用のマーカー遺伝子と標的配列とを有し、ここで、当該選択マーカー遺伝子がポジティブ選択用にもネガティブ選択用にも用いられる場合には、別のネガティブ選択用の選択マーカー遺伝子を有していなくてよく、

（ｃ）前記工程（ｂ）の後、下記（ｉｉｉ）及び（ｉｖ）を選択された細胞に導入して前記２以上のアレルに組換え用ドナーＤＮＡを導入する工程と、

（ｉｉｉ）前記標的配列を標的とし、当該標的配列を切断することができる配列特異的核酸切断分子、又は前記配列特異的核酸切断分子をコードするポリヌクレオチドを含むゲノム改変システム、

（ｉｖ）所望の塩基配列を含む組換え用ドナーＤＮＡであって、前記標的領域の上流側の塩基配列と相同組換え可能な塩基配列を有する上流ホモロジー

アームと、前記標的領域の下流側の塩基配列と相同組換え可能な塩基配列を有する下流ホモロジーアームを有する、組換え用ドナーＤＮＡ、

（ｄ）前記工程（ｃ）の後、前記ネガティブ選択用のマーカー遺伝子を発現しない細胞を選択する工程（ネガティブ選択のための工程）と、

をさらに含む、上記〔４〕に記載の方法。

〔８〕組換え用ドナーＤＮＡの上流ホモロジーアームと下流ホモロジーアームとの間の領域が、５ｋｂｐ以上の長さを有する、上記〔５〕～〔７〕のいずれかに記載の方法。

〔９〕組換え用ドナーＤＮＡの上流ホモロジーアームと下流ホモロジーアームとの間の領域が、５ｋｂｐ以上の長さを有する、上記〔６〕または〔７〕に記載の方法。

〔１０〕組換え用ドナーＤＮＡの上流ホモロジーアームと下流ホモロジーアームとの間の領域が、５ｋｂｐ以上の長さを有する、上記〔７〕に記載の方法。

〔１１〕組換え用ドナーＤＮＡの上流ホモロジーアームと下流ホモロジーアームとの間の領域が、８ｋｂｐ以上の長さを有する、上記〔８〕に記載の方法。

〔１２〕下記（ｉ）及び（ｉｉ）を含む、染色体ゲノムの２つ以上のアレルを改変するゲノム改変キット。

（ｉ）前記染色体ゲノムの標的領域を標的とし、標的領域を切断することができる配列特異的核酸切断分子、又は前記配列特異的核酸切断分子をコードするポリヌクレオチドを含むゲノム改変システム、

（ｉｉ）２種以上の選択マーカー用ドナーＤＮＡであって、前記標的領域の上流側の塩基配列と相同組換え可能な塩基配列を有する上流ホモロジーアームと、前記標的領域の下流側の塩基配列と相同組換え可能な塩基配列を有する下流ホモロジーアームを有し、上流ホモロジーアームと下流ホモロジーアームの間に、選択マーカー遺伝子の塩基配列を含み、前記２種以上の選択マーカー用ドナーＤＮＡは、相互に区別可能に異なる選択マーカー遺伝子を有

し、前記選択マーカー遺伝子は、選択マーカー用ドナーＤＮＡの種類毎に固有であり、前記選択マーカー用ドナーＤＮＡの種類数は、ゲノム改変の対象とする前記アレルの数と同数以上である、２種以上の選択マーカー用ドナーＤＮＡ。

〔１３〕標的領域が５ｋｂｐ以上の長さを有する、上記〔１２〕に記載のキット。

〔１４〕標的領域が８ｋｂｐ以上の長さを有する、上記〔１３〕に記載のキット。

〔１５〕組換え用ドナーＤＮＡをさらに含む、上記〔１２〕～〔１４〕のいずれかに記載のキット。

〔１６〕組換え用ドナーＤＮＡの上流ホモロジーアームと下流ホモロジーアームとの間の領域が、５ｋｂｐ以上の長さを有する、上記〔１２〕～〔１５〕のいずれかに記載のキット。

〔１７〕組換え用ドナーＤＮＡの上流ホモロジーアームと下流ホモロジーアームとの間の領域が、８ｋｂｐ以上の長さを有する、上記〔１２〕～〔１６〕のいずれかに記載のキット。

〔１８〕標的領域が５ｋｂｐ以上の長さを有し、かつ、組換え用ドナーＤＮＡの上流ホモロジーアームと下流ホモロジーアームとの間の領域が、５ｋｂｐ以上の長さを有する、上記〔１２〕に記載のキット。

〔１９〕標的領域が８ｋｂｐ以上の長さを有し、かつ、組換え用ドナーＤＮＡの上流ホモロジーアームと下流ホモロジーアームとの間の領域が、８ｋｂｐ以上の長さを有する、上記〔１８〕に記載のキット。

〔２０〕組換え用ドナーＤＮＡが、組換え用ドナーＤＮＡの上流ホモロジーアームと下流ホモロジーアームとの間の領域に塩基配列を有さず、改変後に得られる染色体ゲノムの前記２つ以上のアレルにおいて、標的領域の上流および下流の配列が、塩基の挿入、置換および欠失なく、シームレスに連結している、上記〔５〕に記載の方法。

〔２１〕組換え用ドナーＤＮＡが、組換え用ドナーＤＮＡの上流ホモロジー

アームと下流ホモロジーアームとの間の領域に塩基配列を有さず、改変後に得られる染色体ゲノムの前記２つ以上のアレルにおいて、標的領域の上流および下流の配列が、塩基の挿入、置換および欠失なく、シームレスに連結している、上記〔６〕または〔７〕に記載の方法。

〔２２〕改変後に得られる染色体ゲノムの前記２つ以上のアレルにおいて、部位特異的組換え酵素の標的配列が存在しない、上記〔３〕に記載の方法。

〔２３〕改変後に得られる染色体ゲノムの前記２つ以上のアレルにおいて、部位特異的組換え酵素の標的配列が存在しない、上記〔４〕に記載の方法。

〔２４〕改変後に得られる染色体ゲノムの前記２つ以上のアレルにおいて、部位特異的組換え酵素の標的配列が存在しない、上記〔５〕に記載の方法。

〔２５〕改変後に得られる染色体ゲノムの前記２つ以上のアレルにおいて、部位特異的組換え酵素の標的配列が存在しない、上記〔６〕または〔７〕に記載の方法。

〔２６〕工程（ｂ）において、２以上のアレルが改変された細胞を選択するまでの過程では単一細胞クローニングは行われない、上記〔１〕～〔１１〕、および〔２０〕～〔２５〕のいずれかに記載の方法。

〔２７〕標的領域に関して染色体ゲノム上に２つ以上のアレルを有する細胞において、前記２つ以上のアレルのそれぞれの標的領域が欠失し、かつ、標的領域の上流および下流の配列が、塩基の挿入、置換および欠失なく、シームレスに連結している、細胞。

〔２８〕標的領域が５ｋｂｐ以上の長さを有する、上記〔２７〕に記載の細胞。

〔２９〕そのゲノム中に部位特異的組換え酵素の標的配列を有しない、上記〔２７〕または〔２８〕に記載の細胞。

〔３０〕組換え用ドナーＤＮＡの上流ホモロジーアームと下流ホモロジーアームとの間の領域が、８ｋｂｐ以上の長さを有する、上記〔６〕または〔７〕に記載の方法。

〔３１〕組換え用ドナーＤＮＡが、組換え用ドナーＤＮＡの上流ホモロジー

アームと下流ホモロジーアームとの間の領域に塩基配列を有さない、上記〔１５〕に記載のキット。

[0013] 本発明は一例として以下の態様を含む。［１Ｄ］細胞（特にヒト細胞）であって、欠失を有するゲノムＤＮＡ（特にヒトゲノムＤＮＡ）を含み、前記欠失は、以下（ｉ）～（ｉｖ）に規定される染色体領域：　（ｉ）　ｈｇ３８ゲノム配列のｃｈｒ６：　２９，７１１，０００－３０，０２０，０００の染色体領域に対応する染色体領域、　（ｉｉ）　ｈｇ３８ゲノム配列のｃｈｒ６：　３１，１７６，０００－３１，５３４，０００染色体領域に対応する染色体領域、　（ｉｉｉ）　ｈｇ３８ゲノム配列のｃｈｒ６：　３２，４４５，０００－３２，８２１，０００染色体領域に対応する染色体領域、および　（ｉｖ）　ｈｇ３８ゲノム配列のｃｈｒ６：　３３，００２，０００－３３，１４７，０００染色体領域に対応する染色体領域からなる群から選択される１以上の染色体領域中にそれぞれ位置するＨＬＡ類似配列集積領域の一部もしくは全体を含む領域の欠失であり、　前記ＨＬＡ類似配列集積領域は、前記染色体領域中にそれぞれ含まれるＨＬＡコードする遺伝子およびＨＬＡ類似配列の全てを含み、　前記一部は少なくとも一つながりの領域を含み、前記一つながりの領域は、上記領域にそれぞれ含まれるＨＬＡコードする遺伝子およびＨＬＡ類似配列からなる群から選択される遺伝子の５０％以上を含む、細胞。［２Ｄ］上記［１Ｄ］に記載の細胞であって、前記ゲノムＤＮＡにおいて請求項１に規定された欠失を有する（ｉ）～（ｉｖ）のいずれかまたは好ましくはすべては、内在性のＨＬＡおよびＨＬＡ類似配列を含まないか、１つしか含まない、細胞。［３Ｄ］上記［１Ｄ］または［２Ｄ］に記載の細胞であって、前記ゲノムＤＮＡにおいて請求項１に規定された欠失を有する（ｉ）～（ｉｖ）のいずれかまたは好ましくはすべては、内在性のＨＬＡおよびＨＬＡ類似配列を含まない、細胞。［４Ｄ］上記［１Ｄ］～［３Ｄ］のいずれかに記載の細胞であって、　（ｉ）　ｃｈｒ６：　２９，７１１，０００－３０，０２０，０００の染色体領域中のＨＬＡ類似配列集積領域の全体を欠失したゲノムＤＮＡを有する、細胞。［５Ｄ］上記［１

Ｄ］～［４Ｄ］のいずれかに記載の細胞であって、　（ｉｉ）　ｃｈｒ６：　３１，１７６，０００－３１，５３４，０００の染色体領域中のＨＬＡ類似配列集積領域の全体を欠失したゲノムＤＮＡを有する、細胞。［６Ｄ］上記［１Ｄ］～［５Ｄ］のいずれかに記載の細胞であって、　（ｉｉｉ）　ｃｈｒ６：　３２，４４５，０００－３２，８２１，０００の染色体領域中のＨＬＡ類似配列集積領域の全体を欠失したゲノムＤＮＡを有する、細胞。［７Ｄ］上記［１Ｄ］～［６Ｄ］のいずれかに記載の細胞であって、　（ｉｖ）　ｃｈｒ６：　３３，００２，０００－３３，１４７，０００の染色体領域中のＨＬＡ類似配列集積領域の全体を欠失したゲノムＤＮＡを有する、細胞。［８Ｄ］前記欠失が、Ｃｈｒ６：　２９，７０９，０００－２９，７１１，０００の染色体領域中の特有の配列（第１の配列）中に一方の端を有し、Ｃｈｒ６：　３０，０２０，０００－３０，０２０，０００の染色体領域およびＣｈｒ６：　３０，０２１，５００－３０，０２２，８００の染色体領域中の特有の配列（第２の配列）中に他方の端を有する領域の欠失である、上記［１Ｄ］～［７Ｄ］のいずれかに記載の細胞。［９Ｄ］前記ゲノムＤＮＡが、制御配列に作動可能に連結された内因性または外来性の所望の所望の遺伝子の挿入を含み、当該挿入は、上記（ｉ）～（ｉｖ）のいずれかの領域内、または上記（ｉ）～（ｉｖ）の領域以外の領域に位置する、上記［１Ｄ］～［８Ｄ］のいずれかに記載の細胞。［１０Ｄ］前記欠失が、Ｃｈｒ６：　３１，１７４，０００～３１，１７７，０００の染色体領域中の特有の配列（第３の配列）中に一方の端を有し、Ｃｈｒ６：　３１，５３４，０００～３１，５３８，０００の染色体領域中の特有の配列（第４の配列）中に他方の端を有する領域の欠失である、上記［１Ｄ］～［９Ｄ］のいずれかに記載の細胞。［１１Ｄ］前記欠失が、Ｃｈｒ６：　３２，４４６，０００～３２，４４８，５００の染色体領域中の特有の配列（第５の配列）中に一方の端を有し、Ｃｈｒ６：　３２，８２０，５００～３２，８２２，５００の染色体領域中の特有の配列（第６の配列）中に他方の端を有する領域の欠失である、上記［１Ｄ］～［１０Ｄ］のいずれかに記載の細胞。［１２Ｄ］前

記欠失が、Ｃｈｒ６：　３２，９９９，５００～３３，００２，５００の染色体領域中の特有の配列（第７の配列）中に一方の端を有し、Ｃｈｒ６：３３，１４７，５００～３３，１５０，５００の染色体領域中の特有の配列（第８の配列）中に他方の端を有する領域の欠失である、上記［１Ｄ］～［１１Ｄ］のいずれかに記載の細胞。［１３Ｄ］上記［１Ｄ］～［１２Ｄ］のいずれかに記載の細胞であって、欠失を有する上記（ｉ）～（ｉｖ）は、その染色体領域内に繰り返し配列を有しない、細胞。［１４Ｄ］上記［１Ｄ］～［１３Ｄ］のいずれかに記載の細胞であって、機能的なβ２ミクログロブリンおよび機能的なＣＩＩＴＡのいずれかまたは両方を有する、細胞。［１５Ｄ］上記［１Ｄ］～［１４Ｄ］のいずれかに記載の細胞であって、ＨＬＡクラスＩおよび／またはＨＬＡクラスＩＩを細胞表面に実質的に発現していない、細胞。［１６Ｄ］上記［１Ｄ］～［１５Ｄ］のいずれかに記載の細胞であって、欠失が１００ｋｂから４００ｋｂの大きさである、細胞。［１７Ｄ］上記［１Ｄ］～［１６Ｄ］のいずれかに記載の細胞を含む、組成物。［１８Ｄ］ゲノムの全アレル（２倍体の場合には２アレル）における領域の欠失（例えば、１Ｍｂまで、または５００ｋｂまでの領域の欠失）であって、ＭＨＣ分子をコードする遺伝子座のＭＨＣ類似配列集積領域の一部、または好ましくは全部を含む領域を含む欠失を有するゲノムを有する細胞。［１９Ｄ］各ＭＨＣ類似配列集積領域には、１以下のＭＨＣ分子をコードする遺伝子しか含まれない、上記［１８Ｄ］に記載の細胞。［２０Ｄ］各ＭＨＣ類似配列集積領域には、４以下のＭＨＣ分子をコードする遺伝子しか含まれない、上記［１８Ｄ］に記載の細胞。［２１Ｄ］各ＭＨＣ類似配列集積領域には、ＭＨＣ分子をコードする遺伝子を含まれない、上記［１８Ｄ］に記載の細胞。［２２Ｄ］上記［１８Ｄ］に記載の細胞であって、欠失が、ＭＨＣ分子をコードする遺伝子座のＭＨＣ類似配列集積領域の全部を含む領域を含む欠失である、細胞。［２３Ｄ］上記［２２Ｄ］に記載の細胞であって、制御配列と当該制御配列に作動可能に連結された所望の遺伝子をさらに含む、細胞。［２４Ｄ］制御配列と当該制御配列に作動可能に連結された所望の遺伝子

が、全体として天然に存在しない配列を有する、上記［２３Ｄ］に記載の細胞。［２５Ｄ］制御配列と当該制御配列に作動可能に連結された所望の遺伝子が、天然に存在する（または内在性の）配列を有する、上記［２３Ｄ］に記載の細胞。

発明の効果

[0014] 本発明によれば、２つ以上のアレルを効率よく改変することができ、且つ比較的大きな領域の改変（特にＨＬＡクラスＩ領域およびＨＬＡクラスＩＩ領域の大規模欠失）が可能な、ゲノム改変方法及び前記ゲノム改変キット、並びに前記改変を有する細胞が提供される。

図面の簡単な説明

[0015] [図1]図１は、ＨＬＡクラスＩ領域およびＨＬＡクラスＩＩ領域が存在する６番染色体領域の遺伝子マップである。ＨＬＡ遺伝子の存在するクラスターが矢印で強調されている。

[図2]図２は、ＨＬＡクラスＩ領域およびＨＬＡクラスＩＩ領域が存在する６番染色体領域におけるＨＬＡ－Ａ遺伝子の類似配列の検索結果を示す。

[図3]図３は、ＨＬＡクラスＩ領域およびＨＬＡクラスＩＩ領域が存在する６番染色体領域におけるＨＬＡ－Ｂ遺伝子の類似配列の検索結果を示す。

[図4]図４は、ＨＬＡクラスＩ領域およびＨＬＡクラスＩＩ領域が存在する６番染色体領域におけるＨＬＡ－Ｃ遺伝子の類似配列の検索結果を示す。

[図5]図５は、ＨＬＡクラスＩ領域およびＨＬＡクラスＩＩ領域が存在する６番染色体領域におけるＨＬＡ－Ｅ遺伝子の類似配列の検索結果を示す。

[図6]図６は、ＨＬＡクラスＩ領域およびＨＬＡクラスＩＩ領域が存在する６番染色体領域におけるＨＬＡ－Ｆ遺伝子の類似配列の検索結果を示す。

[図7]図７は、ＨＬＡクラスＩ領域およびＨＬＡクラスＩＩ領域が存在する６番染色体領域におけるＨＬＡ－Ｇ遺伝子の類似配列の検索結果を示す。

[図8]図８は、ＨＬＡクラスＩ領域およびＨＬＡクラスＩＩ領域が存在する６番染色体領域におけるＨＬＡ－Ｈ遺伝子の類似配列の検索結果を示す。

[図9]図９は、ＨＬＡクラスＩ領域およびＨＬＡクラスＩＩ領域が存在する６

番染色体領域におけるＨＬＡ－Ｊ遺伝子の類似配列の検索結果を示す。

[図10]図１０は、ＨＬＡクラスＩ領域およびＨＬＡクラスＩＩ領域が存在する６番染色体領域におけるＨＬＡ－W遺伝子の類似配列の検索結果を示す。

[図11]図１１は、ＨＬＡクラスＩ領域およびＨＬＡクラスＩＩ領域が存在する６番染色体領域におけるＭＩＣＡ遺伝子の類似配列の検索結果を示す。

[図12]図１２は、ＨＬＡクラスＩ領域およびＨＬＡクラスＩＩ領域が存在する６番染色体領域におけるＭＩＣＢ遺伝子の類似配列の検索結果を示す。

[図13]図１３は、ＨＬＡクラスＩ領域およびＨＬＡクラスＩＩ領域が存在する６番染色体領域におけるＨＬＡ－ＤＲＡ遺伝子の類似配列の検索結果を示す。

[図14]図１４は、ＨＬＡクラスＩ領域およびＨＬＡクラスＩＩ領域が存在する６番染色体領域におけるＨＬＡ－ＤＲＢ１遺伝子の類似配列の検索結果を示す。

[図15]図１５は、ＨＬＡクラスＩ領域およびＨＬＡクラスＩＩ領域が存在する６番染色体領域におけるＨＬＡ－ＤＲＢ５遺伝子の類似配列の検索結果を示す。

[図16]図１６は、ＨＬＡクラスＩ領域およびＨＬＡクラスＩＩ領域が存在する６番染色体領域におけるＨＬＡ－ＤＲＢ６遺伝子の類似配列の検索結果を示す。

[図17]図１７は、ＨＬＡクラスＩ領域およびＨＬＡクラスＩＩ領域が存在する６番染色体領域におけるＨＬＡ－ＤＲＢ９遺伝子の類似配列の検索結果を示す。

[図18]図１８は、ＨＬＡクラスＩ領域およびＨＬＡクラスＩＩ領域が存在する６番染色体領域におけるＨＬＡ－ＤＱＡ１遺伝子の類似配列の検索結果を示す。

[図19]図１９は、ＨＬＡクラスＩ領域およびＨＬＡクラスＩＩ領域が存在する６番染色体領域におけるＨＬＡ－ＤＱＡ２遺伝子の類似配列の検索結果を示す。

[図20]図２０は、ＨＬＡクラスＩ領域およびＨＬＡクラスＩＩ領域が存在する６番染色体領域におけるＨＬＡ－ＤＱＢ１遺伝子の類似配列の検索結果を示す。

[図21]図２１は、ＨＬＡクラスＩ領域およびＨＬＡクラスＩＩ領域が存在する６番染色体領域におけるＨＬＡ－ＤＰＡ１遺伝子の類似配列の検索結果を示す。

[図22]図２２は、ＨＬＡクラスＩ領域およびＨＬＡクラスＩＩ領域が存在する６番染色体領域におけるＨＬＡ－ＤＰＢ１遺伝子の類似配列の検索結果を示す。

[図23]図２３は、ＨＬＡクラスＩ領域およびＨＬＡクラスＩＩ領域が存在する６番染色体領域におけるＨＬＡ－ＤＭＢ遺伝子の類似配列の検索結果を示す。

[図24]図２４は、ＨＬＡクラスＩ領域およびＨＬＡクラスＩＩ領域が存在する６番染色体領域におけるＨＬＡ－ＤＯＡ遺伝子の類似配列の検索結果を示す。

[図25]図２５は、ＨＬＡクラスＩ領域およびＨＬＡクラスＩＩ領域が存在する６番染色体領域におけるＨＬＡ－ＤＯＢ遺伝子の類似配列の検索結果を示す。

[図26]図２６は、ＨＬＡクラスＩ領域およびＨＬＡクラスＩＩ領域における４つのＨＬＡ類似配列（配列）集積領域(ｉ)～(ｉｖ)の位置を示す。

[図27]図２７は、ＨＬＡ類似配列集積領域(ｉ)のテロメア側の末端候補を同定するためのＢＩａｔ検索結果の一例を示す。

[図28]図２８は、ＨＬＡ類似配列集積領域(ｉ)のセントロメア側の末端候補を同定するためのＢＩａｔ検索結果の一例を示す。

[図29]図２９は、ＨＬＡ類似配列集積領域(ｉｉ)のテロメア側の末端候補を同定するためのＢＩａｔ検索結果の一例を示す。

[図30]図３０は、ＨＬＡ類似配列集積領域(ｉｉ)のセントロメア側の末端候補を同定するためのＢＩａｔ検索結果の一例を示す。

[図31]図３１は、ＨＬＡ類似配列集積領域(iii)のテロメア側の末端候補を同定するためのＢｌａｔ検索結果の一例を示す。

[図32]図３２は、ＨＬＡ類似配列集積領域(iii)のセントロメア側の末端候補を同定するためのＢｌａｔ検索結果の一例を示す。

[図33]図３３は、ＨＬＡ類似配列集積領域(iv)のテロメア側の末端候補を同定するためのＢｌａｔ検索結果の一例を示す。

[図34]図３４は、ＨＬＡ類似配列集積領域(iv)のセントロメア側の末端候補を同定するためのＢｌａｔ検索結果の一例を示す。

[図35]図３５は、図２７～図３４の結果のまとめを示す。

[図36]図３６は、ＨＬＡ－Ｆ、ＨＬＡ－Ｇ、およびＨＬＡ－Ａを含む一連の領域の全体を本開示の方法により除去する方法のスキームと、その結果を示す。

[図37]図３７は、ＨＬＡ－ＣとＨＬＡ－Ｂを含む一連の領域の全体を本開示の方法により除去する方法のスキームと、その結果を示す。得られた細胞では、ＨＬＡ－Ｆ、ＨＬＡ－Ｇ、およびＨＬＡ－Ａ、並びに、ＨＬＡ－Ｃ及びＨＬＡ－Ｂが欠失している。

[図38]図３８は、得られた細胞が、ＨＬＡ－Ａ、ＨＬＡ－Ｂ、およびＨＬＡ－Ｃのいずれに関しても陰性であることを示すサイトグラムである。

[図39]図３９は、得られた細胞が、未改変のｉＰＳ細胞と同等の多能性幹細胞マーカーの発現を示すことを示す。

[図40]図４０は、ＨＬＡ－Ｅ領域をさらに欠失させる方法のスキームと、その結果を示す。

[図41]図４１は、ＨＬＡ－Ｅ領域をさらに欠失させる方法のスキームと、その結果を示す。

[図42]図４２は、ＨＬＡ－Ｅの代わりにシグナル配列を付加したＨＬＡ－Ｅを導入するスキームとその結果を示す。

[図43]図４３は、ＨＬＡ－ＤＲＡ、ＨＬＡ－ＤＲＢｓ、ＨＬＡ－ＤＱＡｓ、ＨＬＡ－ＤＱＢ１、およびＨＬＡ－ＤＯＢを含む一連の領域の全体を本開示

の方法によりさらに除去する方法のスキームと、その結果を示す。得られた細胞では、ＨＬＡ－Ｆ、ＨＬＡ－Ｇ、およびＨＬＡ－Ａ；ＨＬＡ－Ｃ及びＨＬＡ－Ｂ；並びにＨＬＡ－ＤＲＡ、ＨＬＡ－ＤＲＢｓ、ＨＬＡ－ＤＱＡｓ、ＨＬＡ－ＤＱＢ１、およびＨＬＡ－ＤＯＢが欠失している。

[図44]図４４は、ＨＬＡ－ＤＲＡ、ＨＬＡ－ＤＲＢｓ、ＨＬＡ－ＤＱＡｓ、ＨＬＡ－ＤＱＢ１、およびＨＬＡ－ＤＯＢを含む一連の領域の全体を本開示の方法によりさらに除去する方法のスキームと、その結果を示す。得られた細胞では、ＨＬＡ－Ｆ、ＨＬＡ－Ｇ、およびＨＬＡ－Ａ；ＨＬＡ－Ｃ及びＨＬＡ－Ｂ；並びにＨＬＡ－ＤＲＡ、ＨＬＡ－ＤＲＢｓ、ＨＬＡ－ＤＱＡｓ、ＨＬＡ－ＤＱＢ１、およびＨＬＡ－ＤＯＢが欠失している。

[図45]図４５は、ＨＬＡ－Ｅの欠失を有する領域に任意の目的遺伝子を導入するスキームを示す。

[図46]図４６は、ＨＬＡ－Ｅの欠損部位に対して、外来遺伝子（例えば、ＨＬＡ－Ａ、ＨＬＡ－Ｂ、ＨＬＡ－Ｃ、およびＨＬＡ－Ｅ）を導入するスキームを示す。

[図47]図４７は、ＨＬＡ－Ｆ、ＨＬＡ－Ｇ、およびＨＬＡ－Ａを含む一連の領域とＨＬＡ－ＣとＨＬＡ－Ｂを含む一連の領域を欠失させた細胞のＨＬＡ－ＥをＵＫｉＳマーカーで置き換えて得られた細胞に対して、ＨＬＡ－ＡとＢを組込むスキームと、その結果を示す。

[図48]図４８は、ＨＬＡ－Ｆ、ＨＬＡ－Ｇ、およびＨＬＡ－Ａを含む一連の領域とＨＬＡ－ＣとＨＬＡ－Ｂを含む一連の領域を欠失させた細胞（図３７参照）のＨＬＡ－ＥをＵＫｉＳマーカーで置き換えて得られた細胞に対して、ＨＬＡ－ＣとＥを組込むスキームと、その結果を示す。

[図49]図４９は、ＨＬＡ－ＡおよびＢを再導入した細胞（図４７参照）とＨＬＡ－ＣとＥを再導入した細胞（図４８参照）におけるＨＬＡの細胞表面発現を示す。

[図50]図５０は、ＨＬＡ欠損細胞がＴ細胞による細胞傷害を回避することを示す。

発明を実施するための形態

[0016] ［定義］

「ポリヌクレオチド」及び「核酸」という用語は、相互に互換的に使用され、ヌクレオチドがホスホジエステル結合によって結合したヌクレオチドポリマーを指す。「ポリヌクレオチド」及び「核酸」は、ＤＮＡであってもよく、ＲＮＡであってもよく、ＤＮＡとＲＮＡとの組み合わせから構成されてもよい。また、「ポリヌクレオチド」及び「核酸」は、天然ヌクレオチドのポリマーであってもよく、天然ヌクレオチドと非天然ヌクレオチド（天然ヌクレオチドの類似体、塩基部分、糖部分及びリン酸部分のうち少なくとも一つの部分が修飾されているヌクレオチド（例えば、ホスホロチオエート骨格）等）とのポリマーであってもよく、非天然ヌクレオチドのポリマーであってもよい。

[0017] 「ポリヌクレオチド」又は「核酸」の塩基配列は、特に明示しない限り、一般的に認められている１文字コードで記載される。特に明示しない限り、塩基配列は、５’側から３’側に向かって記載する。「ポリヌクレオチド」又は「核酸」を構成するヌクレオチド残基は、単に、アデニン、チミン、シトシン、グアニン、又はウラシル等、あるいはそれらの１文字コードで記載される場合がある。

[0018] 「遺伝子」という用語は、特定のタンパク質をコードする少なくとも１つのオープンリーディングフレームを含むポリヌクレオチドを指す。遺伝子は、エクソン及びイントロンの両方を含み得る。

[0019] 「ポリペプチド」、「ペプチド」及び「タンパク質」という用語は、相互に互換的に使用され、アミド結合によって結合したアミノ酸のポリマーを指す。「ポリペプチド」、「ペプチド」又は「タンパク質」は、天然アミノ酸のポリマーであってもよく、天然アミノ酸と非天然アミノ酸（天然アミノ酸の化学的類似体、修飾誘導体等）とのポリマーであってもよく、非天然アミノ酸のポリマーであってもよい。特に明示しない限り、アミノ酸配列は、Ｎ末端側からＣ末端側に向かって記載する。

[0020] 「アレル」という用語は、染色体ゲノム上の同一座位に存在する塩基配列のセットを指す。ある態様では、２倍体の細胞では同一座位に２アレル存在し、３倍体の細胞では同一座位に３アレル存在する。また、ある態様では、染色体の異常なコピーまたは当該座位の異常な追加のコピーによって追加のアレルが形成されている場合がある。

[0021] 「ゲノム改変」又は「ゲノム編集」という用語は、相互に互換的に用いられ、ゲノム上の所望の位置（標的領域）に変異を誘導することを指す。ゲノム改変は、標的領域ＤＮＡを切断するように設計された配列特異的核酸切断分子の使用を含み得る。好ましい実施形態において、ゲノム改変は、標的領域のＤＮＡを切断するように操作されたヌクレアーゼの使用、を含み得る。好ましい実施形態において、ゲノム改変は、標的領域中の特定の塩基配列を有する標的配列を切断するように操作されたヌクレアーゼ（例えば、ＴＡＬＥＮやＺＦＮ）の使用を含み得る。好ましい実施形態において、ゲノム改変は、標的領域中の特定の塩基配列を有する標的配列を切断するように、メガヌクレアーゼなどのゲノムに１つしか切断部位を有しない制限酵素（例えば、１６ベースの配列特異性を有する制限酵素（理論上は4^{16}塩基に１つの割合で存在する）、１７ベースの配列特異性を有する制限酵素（理論上は4^{17}塩基に１つの割合で存在する）、および１８ベースの配列特異性を有する制限酵素（理論上は4^{18}塩基に１つの割合で存在する））などの配列特異的エンドヌクレアーゼを用いることができる場合もある。典型的には、部位特異的ヌクレアーゼの使用により、標的領域のＤＮＡに二本鎖切断（ＤＳＢ）が誘導され、その後、相同組み換え修復（Ｈｏｍｏｌｏｇｏｕｓ Ｄｉｒｅｃｔｅｄ Ｒｅｐａｉｒ：ＨＤＲ）及び非相同末端再結合（Ｎｏｎ－Ｈｏｍｏｌｏｇｏｕｓ Ｅｎｄ－Ｊｏｉｎｉｎｇ Ｒｅｐａｉｒ：ＮＨＥＪ）のような、細胞の内因性プロセスによってゲノムが修復される。ＮＨＥＪは、ドナーＤＮＡを用いずに二本鎖切断された末端を連結する修復方法であり、修復の際に挿入及び／又は欠失（ｉｎｄｅｌ）が高頻度で誘導される。ＨＤＲは、ドナーＤＮＡを用いた修復機構であり、標的領域に所望の変異を導入する

ことも可能である。ゲノム改変技術としては、例えば、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓシステムが好ましく例示される。メガヌクレアーゼとしては、例えば、Ｉ－ＳｃｅＩ、Ｉ－ＳｃｅＩＩ、Ｉ－ＳｃｅＩＩＩ、Ｉ－ＳｃｅＩＶ、Ｉ－ＳｃｅＶ、Ｉ－ＳｃｅＶＩ、Ｉ－ＳｃｅＶＩＩ、Ｉ－ＣｅｕＩ、Ｉ－ＣｅｕＡＩＩＰ、Ｉ－ＣｒｅＩ、Ｉ－ＣｒｅｐｓｂＩＰ、Ｉ－ＣｒｅｐｓｂＩＩＰ、Ｉ－ＣｒｅｐｓｂＩＩＩＰ、Ｉ－ＣｒｅｐｓｂＩＶＰ、Ｉ－ＴＩｉＩ、Ｉ－ＰｐｏＩ、ＰＩ－ＰｓｐＩ、Ｆ－ＳｃｅＩ、Ｆ－ＳｃｅＩＩ、Ｆ－ＳｕｖＩ、Ｆ－ＴｅｖＩ、Ｆ－ＴｅｖＩＩ、Ｉ－ＡｍａＩ、Ｉ－ＡｎｉＩ、Ｉ－ＣｈｕＩ、Ｉ－ＣｍｏｅＩ、Ｉ－ＣｐａＩ、Ｉ－ＣｐａＩＩ、Ｉ－ＣｓｍＩ、Ｉ－ＣｖｕＩ、Ｉ－ＣｖｕＡＩＰ、Ｉ－ＤｄｉＩ、Ｉ－ＤｄｉＩＩ、Ｉ－ＤｉｒＩ、Ｉ－ＤｍｏＩ、Ｉ－ＨｍｕＩ、Ｉ－ＨｍｕＩＩ、Ｉ－ＨｓＮＩＰ、Ｉ－ＬｌａＩ、Ｉ－ＭｓｏＩ、Ｉ－ＮａａＩ、Ｉ－ＮａｎＩ、Ｉ－ＮｃＩＩＰ、Ｉ－ＮｇｒＩＰ、Ｉ－ＮｉｔＩ、Ｉ－ＮｊａＩ、Ｉ－Ｎｓｐ２３６ＩＰ、Ｉ－ＰａｋＩ、Ｉ－ＰｂｏＩＰ、Ｉ－ＰｃｕＩＰ、Ｉ－ＰｃｕＡＩ、Ｉ－ＰｃｕＶＩ、Ｉ－ＰｇｒＩＰ、Ｉ－ＰｏｂＩＰ、Ｉ－ＰｏｒＩ、Ｉ－ＰｏｒＩＩＰ、Ｉ－ＰｂｐＩＰ、Ｉ－ＳｐＢｅｔａＩＰ、Ｉ－ＳｃａＩ、Ｉ－ＳｅｘＩＰ、Ｉ－ＳｎｅＩＰ、Ｉ－ＳｐｏｍＩ、Ｉ－ＳｐｏｍＣＰ、Ｉ－ＳｐｏｍＩＰ、Ｉ－ＳｐｏｍＩＩＰ、Ｉ－ＳｑｕＩＰ、Ｉ－Ｓｓｐ６８０３１、Ｉ－ＳｔｈＰｈｉＪＰ、Ｉ－ＳｔｈＰｈｉＳＴ３Ｐ、Ｉ－ＳｔｈＰｈｉＳＴｅ３ｂＰ、Ｉ－ＴｄｅＩＰ、Ｉ－ＴｅｖＩ、Ｉ－ＴｅｖＩＩ、Ｉ－ＴｅｖＩＩＩ、Ｉ－ＵａｒＡＰ、Ｉ－ＵａｒＨＧＰＡＩＰ、Ｉ－ＵａｒＨＧＰＡ１３Ｐ、Ｉ－ＶｉｎＩＰ、Ｉ－ＺｂｉＩＰ、ＰＩ－ＭｔｕＩ、ＰＩ－ＭｔｕＨＩＰ ＰＩ－ＭｔｕＨＩＩＰ、ＰＩ－ＰｆｕＩ、ＰＩ－ＰｆｕＩＩ、ＰＩ－ＰｋｏＩ、ＰＩ－ＰｋｏＩＩ、ＰＩ－Ｒｍａ４３８１２ＩＰ、ＰＩ－ＳｐＢｅｔａＩＰ、ＰＩ－ＳｃｅＩ、ＰＩ－ＴｆｕＩ、ＰＩ－ＴｆｕＩＩ、ＰＩ－ＴｈｙＩ、ＰＩ－ＴＩｉＩ、およびＰＩ－ＴＩｉＩＩ、並びにこれらの機能的な誘導体制限酵素からなる群から選択されるメガヌクレアーゼおよびその切断部位（または認識部位）、好ましくは、１８塩基以上の配列特異性を有する制

限酵素であるメガヌクレアーゼおよびその切断部位（または認識部位）、特に細胞のゲノムを１箇所または複数箇所以上切断しないメガヌクレアーゼおよびその切断部位を用いることができる。

[0022] 「標的領域」という用語は、ゲノム改変の対象となるゲノム領域を指す。「欠失」は、リファレンスゲノムに対する１塩基以上の欠失、および１遺伝子以上の欠失を含む。欠失は、１００ｂｐ以上の欠失、２００ｂｐ以上の欠失、３００ｂｐ以上の欠失、４００ｂｐ以上の欠失、５００ｂｐ以上の欠失、６００ｂｐ以上の欠失、７００ｂｐ以上の欠失、８００ｂｐ以上の欠失、９００ｂｐ以上の欠失、１ｋｂｐ以上の欠失、１０ｋｂｐ以上の欠失、５０ｋｂｐ以上の欠失、１００ｋｂｐ以上の欠失、２００ｋｂｐ以上の欠失、３００ｋｂｐ以上の欠失、４００ｋｂｐ以上の欠失、５００ｋｂｐ以上の欠失、または１Ｍｂｐ以上の欠失またはそれ以下の欠失であり得る。欠失は、１Ｍｂｐ以下の欠失であり得る。欠失は、７００ｋｂｐ以下の欠失であり得る。欠失は、６００ｋｂｐ以下の欠失であり得る。欠失は、５００ｋｂｐ以下の欠失であり得る。欠失は、１０ｋｂｐ以上６００ｋｂｐ以下の欠失であり得る。欠失は、１００ｋｂｐ以上６００ｋｂｐ以下の欠失であり得る。欠失は、１００ｋｂｐ以上５００ｋｂｐ以下の欠失であり得る。

[0023] 「ドナーＤＮＡ」という用語は、ＤＮＡの二本鎖切断の修復に用いられるＤＮＡであって、標的領域周辺のＤＮＡと相同組換え可能なＤＮＡを指す。ドナーＤＮＡは、ホモロジーアームとして標的領域の上流の塩基配列および下流の塩基配列（例えば、標的領域に隣接する塩基配列）を含む。本明細書においては、標的領域の上流側の塩基配列（例えば、上流側に隣接する塩基配列）からなるホモロジーアームを「上流ホモロジーアーム」、標的配列の下流側の塩基配列（例えば、下流側に隣接する塩基配列）からなるホモロジーアームを「下流ホモロジーアーム」と記載する場合がある。ドナーＤＮＡは、上流ホモロジーアームと下流ホモロジーアームとの間に、所望の塩基配列を含むことができる。各ホモロジーアームの長さは、３００ｂｐ以上が好ましく、通常５００～３０００ｂｐ程度である。上流ホモロジーアーム及び

下流ホモロジーアームの長さは、互いに同じであってもよく、異なっていてもよい。標的領域は、配列依存的な切断後にドナーＤＮＡとの間で相同組換えの誘発に成功すると、標的領域の上流の塩基配列および下流の塩基配列の間の配列が、ドナーＤＮＡの配列と置き換わることとなる。

[0024] 標的領域の「上流」とは、標的領域の２本鎖ＤＮＡにおいて、基準となるヌクレオチド鎖の５’側に位置するＤＮＡ領域を意味する。標的領域の「下流」とは、基準となるヌクレオチド鎖の３’側に位置するＤＮＡを意味する。標的領域がタンパク質コード配列を含む場合、基準となるヌクレオチド鎖は、通常、センス鎖である。一般的に、プロモーターは、タンパク質コード配列の上流に位置する。ターミネーターは、タンパク質コード配列の下流に位置する。

[0025] 「配列特異的核酸切断分子」という用語は、特定の核酸配列を認識し、前記特定の核酸配列で核酸を切断することができる分子を指す。配列特異的核酸切断分子は、配列特異的に核酸切断する活性（配列特異的核酸切断活性）を有する分子である。

[0026] 「標的配列」という用語は、配列特異的核酸切断分子による切断の対象となるゲノム中のＤＮＡ配列を指す。配列特異的核酸切断分子がＣａｓタンパク質である場合、標的配列は、Ｃａｓタンパク質による切断の対象となるゲノム中のＤＮＡ配列を指す。ＣａｓタンパクとしてＣａｓ９タンパク質を用いる場合、標的配列は、プロトスペーサー隣接モチーフ（ＰＡＭ）の５’側に隣接する配列である必要がある。標的配列は、通常、ＰＡＭの５’側直前に隣接する１７～３０塩基（好ましくは１８～２５塩基、より好ましくは１９～２２塩基、さらに好ましくは２０塩基）の配列が選択される。標的配列の設計には、ＣＲＩＳＰＲ　ＤＥＳＩＧＮ（ｃｒｉｓｐｒ．ｍｉｔ．ｅｄｕ／）等の公知のデザインツールを利用することができる。

[0027] 「Ｃａｓタンパク質」という用語は、ＣＲＩＳＰＲ関連（ＣＲＩＳＰＲ－ａｓｓｏｃｉａｔｅｄ）タンパク質を指す。好ましい態様において、Ｃａｓタンパク質は、ガイドＲＮＡと複合体を形成し、エンドヌクレアーゼ活性又

はニッカーゼ活性を示す。Ｃａｓタンパク質としては、特に限定されないが、例えば、Ｃａｓ９タンパク質、Ｃｐｆ１タンパク質、Ｃ２ｃ１タンパク質、Ｃ２ｃ２タンパク質、及びＣ２ｃ３タンパク質等が挙げられる。Ｃａｓタンパク質は、ガイドＲＮＡと協働してエンドヌクレアーゼ活性又はニッカーゼ活性を示す限り、野生型Ｃａｓタンパク質及びそのホモログ（パラログ及びオーソログ）、並びにそれらの変異体を包含する。

好ましい態様において、Ｃａｓタンパク質は、クラス２のＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ系に関与するものであり、より好ましくはＩＩ型のＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ系に関与するものである。Ｃａｓタンパク質の好ましい例としては、Ｃａｓ９タンパク質が例示される。Ｃａｓタンパク質の好ましい例としては、Ｃａｓ３タンパク質が例示される。

[0028] 「Ｃａｓ９タンパク質」という用語は、ＩＩ型のＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ系に関与するＣａｓタンパク質を指す。Ｃａｓ９タンパク質は、ガイドＲＮＡと複合体を形成し、ガイドＲＮＡと協働して標的領域のＤＮＡを切断する活性を示す。Ｃａｓ９タンパク質は、前記の活性を有する限り、野生型Ｃａｓ９タンパク質及びそのホモログ（パラログ及びオーソログ）、並びにそれらの変異体を包含する。野生型Ｃａｓ９タンパク質は、ヌクレアーゼドメインとしてＲｕｖＣドメイン及びＨＮＨドメインを有するが、本明細書におけるＣａｓ９タンパク質は、ＲｕｖＣドメイン及びＨＮＨドメインのいずれか一方が不活性化されたものであってもよい。ＲｕｖＣドメイン及びＨＮＨドメインのいずれか一方が不活性化されたＣａｓ９は、二本鎖ＤＮＡに対して一本鎖切断（ニック）を導入する。そのため、ＲｕｖＣドメイン及びＨＮＨドメインのいずれか一方が不活性化されたＣａｓ９を二本鎖ＤＮＡの切断に用いる場合には、センス鎖とアンチセンス鎖それぞれに対してＣａｓ９の標的配列を設定し、センス鎖およびアンチセンス差のニックが十分に近い位置で生じ、それにより二本鎖切断が誘発されるように、改変システムを構成することができる。

Ｃａｓ９タンパク質が由来する生物種は特に限定されないが、ストレプト

コッカス（Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ）属、スタフィロコッカス（Ｓｔａｐｈｙｌｏｃｏｃｃｕｓ）属、ナイセリア（Ｎｅｉｓｓｅｒｉａ）属、又はトレポネーマ（Ｔｒｅｐｏｎｅｍａ）属に属する細菌等が好ましく例示される。より具体的には、Ｓ．ｐｙｏｇｅｎｅｓ、Ｓ．ｔｈｅｒｍｏｐｈｉｌｕｓ、Ｓ．ａｕｒｅｕｓ、Ｎ．ｍｅｎｉｎｇｉｔｉｄｉｓ、又はＴ．ｄｅｎｔｉｃｏｌａ等に由来するＣａｓ９タンパク質が好ましく例示される。好ましい態様において、Ｃａｓ９タンパク質は、Ｓ．ｐｙｏｇｅｎｅｓ由来のＣａｓ９タンパク質である。

[0029] 各種Ｃａｓタンパク質のアミノ酸配列、及びそのコード配列の情報は、ＧｅｎＢａｎｋ、ＵｎｉＰｒｏｔ、Ａｄｄｇｅｎｅ等の各種データベース上で得ることができる。例えば、Ｓ．ｐｙｏｇｅｎｅｓのＣａｓ９タンパク質のアミノ酸配列は、プラスミド番号４２２３０としてＡｄｄｇｅｎｅに登録されたもの等を用いることができる。Ｓ．ｐｙｏｇｅｎｅｓのＣａｓ９タンパク質のアミノ酸配列の一例を配列番号１に示す。

[0030] 「ガイドＲＮＡ」及び「ｇＲＮＡ」という用語は、相互に互換的に使用され、Ｃａｓタンパク質と複合体を形成し、Ｃａｓタンパク質を標的領域に誘導することができるＲＮＡを指す。好ましい態様において、ガイドＲＮＡは、ＣＲＩＳＰＲ　ＲＮＡ（ｃｒＲＮＡ）及びトランス活性化型ＣＲＩＳＰＲ　ＲＮＡ（ｔｒａｃｒＲＮＡ）を含む。ｃｒＲＮＡは、ゲノム上の標的領域への結合に関与し、ｔｒａｃｒＲＮＡは、Ｃａｓタンパク質との結合に関与する。好ましい態様において、ｃｒＲＮＡは、スペーサー配列とリピート配列とを含み、スペーサー配列が標的領域において標的配列の相補鎖と結合する。好ましい態様において、ｔｒａｃｒＲＮＡは、アンチリピート配列と３’テイル配列とを含む。アンチリピート配列はｃｒＲＮＡのリピート配列と相補的な配列を有し、リピート配列と塩基対を形成し、３’テイル配列は通常３つのステムループを形成する。

ガイドＲＮＡは、ｃｒＲＮＡの３’末端にｔｒａｃｒＲＮＡの５’末端を連結した単一ガイドＲＮＡ（ｓｇＲＮＡ）であってもよく、ｃｒＲＮＡ及び

ｔｒａｃｒＲＮＡを別々のＲＮＡ分子とし、リピート配列及びアンチリピート配列で塩基対を形成させたものであってもよい。好ましい態様において、ガイドＲＮＡはｓｇＲＮＡである。

[0031] ｃｒＲＮＡのリピート配列及びｔｒａｃｒＲＮＡの配列は、Ｃａｓタンパク質の種類に応じて適宜選択することができ、Ｃａｓタンパク質と同じ細菌種に由来するものを用いることができる。

例えば、Ｓ．ｐｙｏｇｅｎｅｓ由来のＣａｓ９タンパク質を用いる場合、ｓｇＲＮＡの長さは、５０～２２０ヌクレオチド（ｎｔ）程度とすることができ、６０～１８０ｎｔ程度が好ましく、８０～１２０ｎｔ程度がより好ましい。ｃｒＲＮＡの長さは、スペーサー配列を含めて約２５～７０塩基長とすることができ、２５～５０ｎｔ程度が好ましい。ｔｒａｃｒＲＮＡの長さは１０～１３０ｎｔ程度とすることができ、３０～８０ｎｔ程度が好ましい。

ｃｒＲＮＡのリピート配列は、Ｃａｓタンパク質が由来する細菌種におけるものと同じであってもよく、3’末端の一部を削除したものであってもよい。ｔｒａｃｒＲＮＡは、Ｃａｓタンパク質が由来する細菌種における成熟ｔｒａｃｒＲＮＡと同じで配列を有していてもよく、当該成熟ｔｒａｃｒＲＮＡの5’末端及び／又は3’末端を切断した末端切断型であってもよい。例えば、ｔｒａｃｒＲＮＡは、成熟ｔｒａｃｒＲＮＡの3’末端から１～４０個程度のヌクレオチド残基を除去した末端切断型であり得る。また、ｔｒａｃｒＲＮＡは、成熟ｔｒａｃｒＲＮＡの5’末端から１～８０個程度のヌクレオチド残基を除去した末端切断型であり得る。また、ｔｒａｃｒＲＮＡは、例えば、5’末端から１～２０程度のヌクレオチド残基を除去し、かつ3’末端から１～４０個程度のヌクレオチド残基を除去した末端切断型であり得る。

ｓｇＲＮＡ設計のためのｃｒＲＮＡリピート配列及びｔｒａｃｒＲＮＡの配列は、種々提案されており、当業者は、公知技術に基づいてｓｇＲＮＡを設計することができる（例えば、Ｊｉｎｅｋ　ｅｔ　ａｌ．　（２０１２）

Ｓｃｉｅｎｃｅ，３３７，８１６－２１；Ｍａｌｉ ｅｔ ａｌ．（２０１３）Ｓｃｉｅｎｃｅ，３３９：６１２１，８２３－６；Ｃｏｎｇ ｅｔ ａｌ．（２０１３）Ｓｃｉｅｎｃｅ，３３９：６１２１，８１９－２３；Ｈｗａｎｇ ｅｔ ａｌ．（２０１３）Ｎａｔ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．３１：３，２２７－９；Ｊｉｎｅｋ ｅｔ ａｌ．（２０１３）ｅＬｉｆｅ，２，ｅ００４７１）。

[0032] 「プロトスペーサー隣接モチーフ」及び「ＰＡＭ」という用語は、相互に互換的に使用され、ＣａｓタンパクによるＤＮＡ切断の際に、Ｃａｓタンパク質に認識される配列を指す。ＰＡＭの配列及び位置は、Ｃａｓタンパク質の種類によって異なる。例えば、Ｃａｓ９タンパク質の場合、ＰＡＭは標的配列の３’側直後に隣接する必要がある。Ｃａｓ９タンパク質に対応するＰＡＭの配列は、Ｃａｓ９タンパク質が由来する細菌種によって異なっている。例えば、Ｓ．ｐｙｏｇｅｎｅｓのＣａｓ９タンパク質に対応するＰＡＭは「ＮＧＧ」であり、Ｓ．ｔｈｅｒｍｏｐｈｉｌｕｓのＣａｓ９タンパク質に対応するＰＡＭは「ＮＮＡＧＡＡ」であり、Ｓ．ａｕｒｅｕｓのＣａｓ９タンパク質に対応するＰＡＭは「ＮＮＧＲＲＴ」又は「ＮＮＧＲＲ（Ｎ）」であり、Ｎ．ｍｅｎｉｎｇｉｔｉｄｉｓのＣａｓ９タンパク質に対応するＰＡＭは「ＮＮＮＮＧＡＴＴ」であり、Ｔ．ｄｅｎｔｉｃｏｌａのＣａｓ９タンパク質に対応する「ＮＡＡＡＡＣ」である（「Ｒ」はＡ又はＧ；「Ｎ」は、Ａ、Ｔ、Ｇ又はＣ）。

[0033] 「スペーサー配列」及び「ガイド配列」という用語は、相互に互換的に使用され、ガイドＲＮＡに含まれる配列であって、標的配列の相補鎖と結合し得る配列を指す。通常、スペーサー配列は、標的配列と同一の配列である（但し、標的配列中のＴは、スペーサー配列ではＵとなる）。本発明の実施態様において、スペーサー配列は、標的配列に対して１塩基又は複数塩基のミスマッチを含むことができる。複数塩基のミスマッチを含む場合、隣接した位置にミスマッチを有していてもよく、離れた位置にミスマッチを有してい

てもよい。好ましい態様において、スペーサー配列は、標的配列に対して１～５塩基のミスマッチを含み得る。特に好ましい態様において、スペーサー配列は、標的配列に対して１塩基のミスマッチを含み得る。

ガイドＲＮＡにおいて、スペーサー配列は、ｃｒＲＮＡの５’側に配置される。

[0034] ポリヌクレオチドに関して用いる「機能的に連結」という用語は、第一の塩基配列が第二の塩基配列に十分に近くに配置され、第一の塩基配列が第二の塩基配列又は第二の塩基配列の制御下の領域に影響を及ぼしうることを意味する。例えば、ポリヌクレオチドがプロモーターに機能的に連結するとは、当該ポリヌクレオチドが、当該プロモーターの制御下で発現するように連結されていることを意味する。

[0035] 「発現可能な状態」という用語は、ポリヌクレオチドが導入された細胞内で、該ポリヌクレオチドが転写され得る状態にあることを指す。

「発現ベクター」という用語は、対象ポリヌクレオチドを含むベクターであって、該ベクターを導入した細胞内で、対象ポリヌクレオチドを発現可能な状態にするシステムを備えたベクターを指す。例えば、「Ｃａｓタンパク質の発現ベクター」とは、該ベクターを導入した細胞内で、Ｃａｓタンパク質を発現可能なベクターを意味する。また、例えば、「ガイドＲＮＡの発現ベクター」とは、該ベクターを導入した細胞内で、ガイドＲＮＡを発現可能なベクターを意味する。

[0036] 「ＨＬＡ類似配列」という用語は、ＨＬＡ遺伝子の少なくとも１つとＵＣＳＣ Ｇｅｎｏｍｅ Ｂｒｏｗｓｅｒに搭載されているＢＬＡＴ検索から導かれるＩｄｅｎｔｉｔｙ値で８０％以上を示す一つながりの塩基配列を意味する。ＨＬＡ遺伝子座には、ＨＬＡおよびＨＬＡ類似配列が集積している領域が存在し、これをＨＬＡ類似配列集積領域とよぶ。

[0037] 「ＭＨＣ類似配列」という用語は、ＭＨＣ遺伝子の少なくとも１つとＵＣＳＣ Ｇｅｎｏｍｅ Ｂｒｏｗｓｅｒに搭載されているＢＬＡＴ検索から導かれるＩｄｅｎｔｉｔｙ値で８０％以上を示す一つながりの塩基配列を意味

する。ＭＨＣ遺伝子座には、ＭＨＣおよびＭＨＣ類似配列が集積している領域が存在し、これをＭＨＣ類似配列集積領域とよぶ。

[0038] 「固有の配列」という用語は、他に類似する配列が存在しない特有の配列を意味し、具体的には、その全長に対するＢＬＡＴ検索によるＩｄｅｎｔｉｔｙ値が８０％以上である配列が、当該固有の配列を有するゲノム上に１箇所しか存在しない配列を意味する。固有の配列は、ＢＬＡＴ検索によるＩｄｅｎｔｉｔｙ値が７５％以上である配列が、当該固有の配列を有するゲノム上に１箇所しか存在しない配列であることがより好ましく、ＢＬＡＴ検索によるＩｄｅｎｔｉｔｙ値が７０％以上である配列が、当該固有の配列を有するゲノム上に１箇所しか存在しない配列がさらに好ましく、ＢＬＡＴ検索によるＩｄｅｎｔｉｔｙ値が６５％以上である配列が、当該固有の配列を有するゲノム上に１箇所しか存在しない配列であることがさらにまた好ましく、ＢＬＡＴ検索によるＩｄｅｎｔｉｔｙ値が６０％以上である配列が、当該固有の配列を有するゲノム上に１箇所しか存在しない配列であることが好ましい。「固有の配列」は、「特有の配列」と相互互換的に用いられ得る。

[0039] ＨＬＡクラスＩ（例えば、ＨＬＡ－Ａ～Ｃなど）は、内在の約９個のアミノ酸残基を有するペプチドを溝に埋め込んでキラーＴ細胞に提示する複合体を形成する。感染細胞やがん細胞などにおいて非自己のペプチドが複合体に提示されるとキラーＴ細胞は、これを提示する細胞毎破壊する。ＨＬＡクラスＩＩ（ＨＬＡ－ＤＲ、ＤＱ、ＤＰなど）は、食作用で取り込んだ外来の約１５アミノ酸残基を有するペプチドを溝に埋め込んでヘルパーＴ細胞に提示する。免疫チェックポイント分子は、免疫を抑制する免疫チェックポイントに関与する因子である。免疫チェックポイント分子としては、例えば、ＰＤ－Ｌ１、ＰＤ－Ｌ２、Ｂ７（ＣＤ８０／ＣＤ８６）、ＣＤ２７５、ＣＤ２７６、ＶＩＳＴＡ、ガレクチン９、ＨＶＥＭ、およびＨＬＡクラスＩＩ分子が挙げられる。

[0040] 本開示の細胞は、ｉＰＳ細胞であり得る。本開示の細胞は、ヒト細胞由来のｉＰＳ細胞（ヒトｉＰＳ細胞）であり得る。本開示の細胞は、例えば、免

疫細胞に分化させてから用いることができる。したがって、本開示の細胞は、免疫細胞（特にｉＰＳ細胞由来の免疫細胞）であり得る。免疫細胞は、例えば、Ｔ細胞（例えば、ＣＤ４単独陽性Ｔ細胞、およびＣＤ８単独陽性Ｔ細胞）、ナチュラルキラーＴ細胞（ＮＫＴ細胞）、ナチュラルキラー細胞（ＮＫ細胞）、制御性Ｔ細胞（Ｔｒｅｇ）、αβＴ細胞、γδＴ細胞、およびマクロファージからなる群から選択される１以上の免疫細胞であり得る。免疫細胞は、抗原特異性を有するＴ細胞受容体（ＴＣＲ）を有していてもよい。免疫細胞は、抗原特異性を有するＴ細胞受容体を発現しなくてもよい（例えば、ＴＣＲα鎖欠損を有してもよい）。免疫細胞は、キメラ抗現受容体（ＣＡＲ）を発現していてもよい。例えば、免疫細胞は、ＣＡＲを発現するが、抗原特異性を有するＴＣＲを発現しなくてもよい、Ｔ細胞、ＮＫＴ細胞、ＮＫ細胞、またはγδＴ細胞であり得る。細胞は例えば初代細胞（例えば、初代免疫細胞）であり得る。細胞は例えば細胞株（例えば、免疫細胞株）であり得る。細胞は非がん細胞であり得る。ＣＡＲを発現する細胞は、例えば、内因性または外来のインターロイキン－７（ＩＬ－７）および内因性または外来のＣＣＬ１９のうちのいずれかまたは両方を発現していてもよい。内因性または外来のＩＬ－７および内因性または外来のＣＣＬ１９は、制御配列に作動可能に連結しており、ＣＡＲを発現する細胞は、当該ＩＬ－７およびＣＣＬ１９のいずれかまたは好ましくは両方を有する。ＣＡＲを発現する細胞は、内因性または外来のエンドβ－Ｄ－グルクロニダーゼ（ＨＰＳＥ）を発現してもよい。これらの免疫細胞は、当該細胞が投与される対象と、自己または同種異系の関係を有していることができる。免疫細胞はまた、内因性または外来のＣＤ３を発現してもよい。また、細胞は、ＨＬＡ－Ｅ、ＨＬＡ－Ｇ、ＨＡＣＤ１６、４１ＢＢＬ、ＣＤ３、ＣＤ４、ＣＤ８、ＣＤ４７、ＣＤ１３７、ＣＤ８０、ＰＤＬ１、Ａ２ＡＲ、ＣＡＲ、およびＴＣＲからなる群から選択される１以上の内因性または外来性の因子を発現していてもよく、発現していなくてもよい。ある態様では、細胞は、ＨＬＡ－Ｅ、ＨＬＡ－Ｇ、ＣＤ１６、４１ＢＢＬ、ＣＤ３、ＣＤ４、ＣＤ８、ＣＤ４７、ＣＤ１３

７、ＣＤ８０、ＰＤＬ１、Ａ２ＡＲ、ＣＡＲ、およびＴＣＲからなる群から選択される１以上の内因性または外来性の因子をコードする核酸を有し、当該核酸は、制御配列に作動可能に連結している。ある態様では、ＣＡＲを発現する細胞は、抗体療法と併用されうる。この併用において、ＣＡＲを発現する細胞では、抗体の標的分子（腫瘍抗原）がノックアウトされていてもよい。ある態様では、そのような腫瘍抗原としては、ＣＤ３８、およびＣＤ５２などが挙げられる。抗ＣＤ３８抗体としては、例えば、ダラツムマブ、およびイサツキシマブが挙げられる（治療対象疾患は、例えば、多発性骨髄腫であり得る）。また、抗ＣＤ５２抗体としては、例えば、アレムツズマブが挙げられる（治療対象疾患は、例えば、白血病、リンパ性白血病、または慢性リンパ性白血病であり得る）。ある態様の細胞（例えば、免疫細胞、または非免疫細胞）では、また、ＮＬＲＣ５がノックアウトされていてもよく、これにより例えば、移植片対宿主病（ＧＶＨＤ）の発症を抑制できてもよい。ある態様の細胞（例えば、免疫細胞、または非免疫細胞）は、ＰＤ１、ＣＤ５２、ＣＴＬＡ４、ｄＣＫ、ＧＧＨ、ＨＰＲＴ、およびβ２ミクログロブリンからなる群から選択される因子とＣＡＲまたはＴＣＲとを発現していてもよい。ある好ましい態様では、本開示の細胞では、機能的なβ２ミクログロブリンおよび／または機能的なＣＩＩＴＡを有する。本開示の細胞は、例えば、ＩＬ－１５：ＩＬ１５Ｒα融合タンパク質を発現してもよい。

[0041] 本明細書では、「キメラ抗原受容体」（ＣＡＲ）は、抗体の抗原結合性断片（特に、ｓｃＦｖ）と免疫細胞の活性化ドメインとを有するキメラ分子である。ＣＡＲは、一般的には、ｓｃＦｖ、細胞外ヒンジドメイン、膜貫通ドメイン（例えば、ＣＤ８αまたはＣＤ２８）、および活性化シグナル伝達ドメイン（例えば、ＣＤ３ζ）が連結してなる分子である。ＣＡＲは、細胞に導入し、細胞表面に発現させることができる。ＣＡＲを発現した細胞は特定の抗原に対して標的化し得る。ＣＡＲは、例えば、Ｔ細胞またはＮＫ細胞などの免疫細胞に導入され、Ｔ細胞またはＮＫ細胞などの免疫細胞をがんに標的化する。第１世代ＣＡＲでは、ｓｃＦｖ、細胞外ヒンジドメイン、膜貫通

ドメイン（例えば、ＣＤ８αまたはＣＤ２８）、および活性化シグナル伝達ドメイン（例えば、ＣＤ３ζ）が連結していたが、第２世代ＣＡＲは、ＣＡＲが導入された免疫細胞活性化のために、共刺激分子シグナル伝達ドメインをさらに含む。共刺激分子シグナル伝達ドメインとしては、ＣＤ２８、４－１ＢＢ、ＯＸ４０、ＣＤ２７、およびＩＣＯＳなどの共刺激因子が用いられている。第３世代ＣＡＲでは、共刺激因子が複数組込まれている。このように、ＣＡＲにおいては、ＣＡＲを導入した免疫細胞を生体内で持続的に増殖させるための改良が加えられてきている。ｓｃＦｖ部分以外のいずれのドメインもヒトタンパク質由来であることが好ましい。

[0042] １実施態様では、内在性または外来性の遺伝子は、内在性または外来性のＨＬＡ遺伝子のいずれか１以上を含む。ＨＬＡ遺伝子は、特に限定されないが例えば、ＨＬＡ－Ａ、ＨＬＡ－Ｂ、ＨＬＡ－Ｃ、ＨＬＡ－Ｅ、ＨＬＡ－Ｆ、ＨＬＡ－Ｇ、ＨＬＡ－Ｈ、ＨＬＡ－Ｊ、ＨＬＡ－Ｗ、ＭＩＣＡ、ＭＩＣＢ、ＨＬＡ－ＤＲＡ、ＨＬＡ－ＤＲＢ１、ＨＬＡ－ＤＲＢ５、ＨＬＡ－ＤＲＢ６、ＨＬＡ－ＤＲＢ９、ＨＬＡ－ＤＱＡ１、ＨＬＡ－ＤＱＡ２、ＨＬＡ－ＤＱＢ１、ＨＬＡ－ＤＰＡ１、ＨＬＡ－ＤＰＢ１、ＨＬＡ－ＤＭＢ、ＨＬＡ－ＤＯＡ、およびＨＬＡ－ＤＯＢが挙げられる。１実施形態では、ＨＬＡ遺伝子は、ＨＬＡ－Ａ、ＨＬＡ－Ｂ、ＨＬＡ－Ｃ、ＨＬＡ－ＤＲ、ＨＬＡ－ＤＱ、およびＨＬＡ－ＤＰからなる群から選択される１以上であり得る。１実施態様では、ＨＬＡ遺伝子は、ＨＬＡ－Ａ、ＨＬＡ－Ｂ、およびＨＬＡ－Ｃからなる群から選択される１以上であり得る。１実施態様では、ＨＬＡ遺伝子は、ＨＬＡ－ＤＲ、ＨＬＡ－ＤＱ、およびＨＬＡ－ＤＰからなる群から選択される１以上であり得る。

[0043] １実施態様では、ＨＬＡ遺伝子は例えば、ＨＬＡ－Ａであり得る。ＨＬＡ－Ａは、いずれのアレルのＨＬＡ－Ａであってもよい。ＨＬＡ－Ａとしては、特に限定されないが例えば、Ａ＊０１：０１、Ａ＊０２：０１、Ａ＊０２：０３、Ａ＊０２：０５、Ａ＊０２：０６、Ａ＊０２：０７、Ａ＊０２：１０、Ａ＊０２：１１、Ａ＊０２：１５Ｎ、Ａ＊０２：１８、Ａ＊０２：２８

、Ａ＊０２：４２、Ａ＊０２：５３Ｎ、Ａ＊０２：５９、Ａ＊０２：７２、Ａ＊０３：０１、Ａ＊０３：０２、Ａ＊１１：０１、Ａ＊１１：０２、Ａ＊１１：１３、Ａ＊２３：０１、Ａ＊２４：０２、Ａ＊２４：０３、Ａ＊２４：０４、Ａ＊２４：０５、Ａ＊２４：０７、Ａ＊２４：０８、Ａ＊２４：１０、Ａ＊２４：２０、Ａ＊２４：２５、Ａ＊２４：２８、Ａ＊２４：４６、Ａ＊２５：０１、Ａ＊２６：０１、Ａ＊２６：０２、Ａ＊２６：０３、Ａ＊２６：０４、Ａ＊２６：０５、Ａ＊２６：０６、Ａ＊２９：０１、Ａ＊２９：０２、Ａ＊３０：０１、Ａ＊３０：０２、Ａ＊３０：０４、Ａ＊３１：０１、Ａ＊３１：１１、Ａ＊３２：０１、Ａ＊３３：０１、Ａ＊３３：０３、Ａ＊３３：０８、Ａ＊３４：０１、およびＡ＊６８：０１が挙げられる。また、ＨＬＡ遺伝子は、例えば、ＨＬＡ－Ｂであり得る。ＨＬＡ－Ｂは、いずれのアレルのＨＬＡ－Ｂであってもよい。ＨＬＡ－Ｂとしては、特に限定されないが例えば、Ｂ＊０７：０２、Ｂ＊０７：０５、Ｂ＊０８：０１、Ｂ＊１３：０１、Ｂ＊１３：０２、Ｂ＊１４：０１、Ｂ＊１４：０２、Ｂ＊１５：０１、Ｂ＊１５：０２、Ｂ＊１５：０３、Ｂ＊１５：０５、Ｂ＊１５：０７、Ｂ＊１５：１１、Ｂ＊１５：１２、Ｂ＊１５：１３、Ｂ＊１５：１７、Ｂ＊１５：１８、Ｂ＊１５：２１、Ｂ＊１５：２５、Ｂ＊１５：２６Ｎ、Ｂ＊１５：２７、Ｂ＊１５：２８、Ｂ＊１５：３５、Ｂ＊１５：３８、Ｂ＊１５：４６、Ｂ＊１８：０１、Ｂ＊１８：０２、Ｂ＊２７：０４、Ｂ＊２７：０５、Ｂ＊２７：０６、Ｂ＊２７：１１、Ｂ＊３５：０１、Ｂ＊３５：０２、Ｂ＊３５：０３、Ｂ＊３５：０５、Ｂ＊３５：０８、Ｂ＊３５：１１、Ｂ＊３５：５１、Ｂ＊３５：６４、Ｂ＊３７：０１、Ｂ＊３８：０１、Ｂ＊３８：０２、Ｂ＊３９：０１、Ｂ＊３９：０２、Ｂ＊３９：０４、Ｂ＊３９：０５、Ｂ＊３９：２３、Ｂ＊４０：０１、Ｂ＊４０：０２、Ｂ＊４０：０３、Ｂ＊４０：０６、Ｂ＊４０：０７、Ｂ＊４０：１１、Ｂ＊４０：５０、Ｂ＊４０：５２、Ｂ＊４１：０１、Ｂ＊４４：０２、Ｂ＊４４：０３、Ｂ＊４５：０１、Ｂ＊４６：０１、Ｂ＊４８：０１、Ｂ＊４８：０３、Ｂ＊４９：０１、Ｂ＊５０：０１、Ｂ＊５１：０１、Ｂ＊５１：０２、Ｂ＊５１：０３

、Ｂ＊５１：０６、Ｂ＊５２：０１、Ｂ＊５３：０１、Ｂ＊５４：０１、Ｂ＊５４：２１、Ｂ＊５５：０１、Ｂ＊５５：０２、Ｂ＊５５：０４、Ｂ＊５５：１０、Ｂ＊５５：１２、Ｂ＊５６：０１、Ｂ＊５６：０３、Ｂ＊５６：０４、Ｂ＊５６：０５、Ｂ＊５７：０１、Ｂ＊５８：０１、Ｂ＊５９：０１、およびＢ＊６７：０１が挙げられる。

[0044] １実施態様では、ＨＬＡ遺伝子は、ＨＬＡ－Ｃであり得る。ＨＬＡ－Ｃは、いずれのアレルのＨＬＡ－Ｃであってもよい。ＨＬＡ－Ｃとしては、特に限定されないが例えば、Ｃ＊０１：０２、Ｃ＊０１：０３、Ｃ＊０１：５５、Ｃ＊０２：０２、Ｃ＊０３：０２、Ｃ＊０３：０３、Ｃ＊０３：０４、Ｃ＊０３：２３Ｎ、Ｃ＊０３：２８、Ｃ＊０３：２９、Ｃ＊０３：４３、Ｃ＊０４：０１、Ｃ＊０４：０３、Ｃ＊０５：０１、Ｃ＊０６：０２、Ｃ＊０７：０１、Ｃ＊０７：０２、Ｃ＊０７：０２Ｎ、Ｃ＊０７：０４、Ｃ＊０８：０１、Ｃ＊０８：０２、Ｃ＊０８：０３、Ｃ＊０８：３９、Ｃ＊１２：０２、Ｃ＊１２：０３、Ｃ＊１２：０４、Ｃ＊１４：０２、Ｃ＊１４：０３、Ｃ＊１５：０２、Ｃ＊１５：０５、Ｃ＊１５：１０、Ｃ＊１６：０１、Ｃ＊１６：０２、およびＣ＊１７：０１が挙げられる。

[0045] １実施態様では、ＨＬＡ遺伝子は、ＨＬＡ－ＤＲであり得る。ＨＬＡ－ＤＲは、いずれのアレルのＨＬＡ－ＤＲであってもよい。ＨＬＡ－ＤＲとしては、特に限定されないが例えば、ＤＲＢ１＊０１：０１、ＤＲＢ１＊０１：０２、ＤＲＢ１＊０１：０３、ＤＲＢ１＊０３：０１、ＤＲＢ１＊０４：０１、ＤＲＢ１＊０４：０２、ＤＲＢ１＊０４：０３、ＤＲＢ１＊０４：０４、ＤＲＢ１＊０４：０５、ＤＲＢ１＊０４：０６、ＤＲＢ１＊０４：０７、ＤＲＢ１＊０４：０８、ＤＲＢ１＊０４：０９、ＤＲＢ１＊０４：１０、ＤＲＢ１＊０４：１１、ＤＲＢ１＊０７：０１、ＤＲＢ１＊０８：０１、ＤＲＢ１＊０８：０２、ＤＲＢ１＊０８：０３、ＤＲＢ１＊０８：０９、ＤＲＢ１＊０８：２３、ＤＲＢ１＊０９：０１、ＤＲＢ１＊１０：０１、ＤＲＢ１＊１１：０１、ＤＲＢ１＊１１：０４、ＤＲＢ１＊１１：０６、ＤＲＢ１＊１１：０８、ＤＲＢ１＊１１：１９、ＤＲＢ１＊１１：２３、ＤＲＢ１＊１

２：０１、ＤＲＢ１＊１２：０２、ＤＲＢ１＊１２：０５、ＤＲＢ１＊１３：０１、ＤＲＢ１＊１３：０２、ＤＲＢ１＊１３：０３、ＤＲＢ１＊１３：０７、ＤＲＢ１＊１３：１２、ＤＲＢ１＊１４：０２、ＤＲＢ１＊１４：０３、ＤＲＢ１＊１４：０４、ＤＲＢ１＊１４：０５、ＤＲＢ１＊１４：０６、ＤＲＢ１＊１４：０７、ＤＲＢ１＊１４：１２、ＤＲＢ１＊１４：２９、ＤＲＢ１＊１４：４５、ＤＲＢ１＊１４：５４、ＤＲＢ１＊１５：０１、ＤＲＢ１＊１５：０２、ＤＲＢ１＊１５：０４、ＤＲＢ１＊１６：０１、ＤＲＢ１＊１６：０２、ＤＲＢ３＊０１：０１、ＤＲＢ３＊０２：０２、ＤＲＢ３＊０３：０１、ＤＲＢ４＊０１：０１、ＤＲＢ４＊０１：０２、ＤＲＢ４＊０１：０３、ＤＲＢ５＊０１：０１、ＤＲＢ５＊０１：０２、およびＤＲＢ５＊０２：０２が挙げられる。

[0046] １実施態様では、ＨＬＡ遺伝子は、ＨＬＡ－ＤＱであり得る。ＨＬＡ－ＤＱは、いずれのアレルのＨＬＡ－ＤＱであってもよい。ＨＬＡ－ＤＱとしては、特に限定されないが例えば、ＤＱＢ１＊０２：０１、ＤＱＢ１＊０２：０２、ＤＱＢ１＊０３：０１、ＤＱＢ１＊０３：０２、ＤＱＢ１＊０３：０３、ＤＱＢ１＊０４：０１、ＤＱＢ１＊０４：０２、ＤＱＢ１＊０５：０１、ＤＱＢ１＊０５：０２、ＤＱＢ１＊０５：０３、ＤＱＢ１＊０６：０１、ＤＱＢ１＊０６：０２、ＤＱＢ１＊０６：０３、ＤＱＢ１＊０６：０４、ＤＱＢ１＊０６：０９、ＤＱＡ１＊０１：０１、ＤＱＡ１＊０１：０２、ＤＱＡ１＊０１：０３、ＤＱＡ１＊０１：０４、ＤＱＡ１＊０１：０５、ＤＱＡ１＊０２：０１、ＤＱＡ１＊０３：０１、ＤＱＡ１＊０３：０２、ＤＱＡ１＊０３：０３、ＤＱＡ１＊０４：０１、ＤＱＡ１＊０５：０１、ＤＱＡ１＊０５：０３、ＤＱＡ１＊０５：０５、ＤＱＡ１＊０５：０６、およびＤＱＡ１＊０５：０８、ＤＱＡ１＊０６：０１が挙げられる。

[0047] １実施態様では、ＨＬＡ遺伝子は、ＨＬＡ－ＤＰであり得る。ＨＬＡ－ＤＰは、いずれのアレルのＨＬＡ－ＤＰであってもよい。ＨＬＡ－ＤＰとしては、特に限定されないが例えば、ＤＰＢ１＊０２：０１、ＤＰＢ１＊０２：０２、ＤＰＢ１＊０３：０１、ＤＰＢ１＊０４：０１、ＤＰＢ１＊０４：０

２、ＤＰＢ１＊０５：０１、ＤＰＢ１＊０６：０１、ＤＰＢ１＊０９：０１、ＤＰＢ１＊１３：０１、ＤＰＢ１＊１４：０１、ＤＰＢ１＊１７：０１、ＤＰＢ１＊１９：０１、ＤＰＢ１＊３６：０１、ＤＰＢ１＊３８：０１、ＤＰＢ１＊４１：０１、ＤＰＡ１＊０１：０３、ＤＰＡ１＊０２：０１、ＤＰＡ１＊０２：０２、およびＤＰＡ１＊０４：０１が挙げられる。

[0048] １実施態様では、挿入は、内在性または外来性の遺伝子と、前記制御配列または推定制御配列を含む当該遺伝子の上流の配列を含む。すなわち、この実施態様では、挿入は、内在性または外来性の遺伝子と、当該遺伝子の本来的な制御配列またはその候補を当該遺伝子の上流に含む。１実施態様では、挿入は、内在性または外来性の遺伝子を含み、当該遺伝子は、１以上のイントロンまたはイントロンの全てを含む。１実施態様では、挿入は、制御配列または推定制御配列を含む当該遺伝子の上流の配列と、１以上のイントロンまたはイントロンの全てを含む前記遺伝子を含む。１実施態様では、挿入は、ゲノム上の一つながりの領域の配列を有し、当該領域は、前記遺伝子と、制御配列または推定制御配列を含む当該遺伝子の上流の配列と、イントロンの全てを含む。このようにすることで、制御配列の遺伝子発現等に対する影響を解析したり、イントロンの遺伝子発現等に対する影響を解析することができる。好ましい態様では、上記遺伝子は、ＨＬＡ遺伝子であり得る。

[0049] 好ましい態様では、挿入に含まれるＨＬＡ遺伝子に対応するゲノム上の遺伝子は欠失している。好ましい態様では、挿入がＨＬＡ遺伝子を含む場合には、ゲノム上の全ての機能的なＨＬＡが欠失している。挿入に含まれるＨＬＡ遺伝子はヌルアリルであってもよい。

[0050] １実施態様では、挿入される遺伝子は、例えば、キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）であり得る。キメラ抗現受容体は、例えば、重鎖および軽鎖を含む一本鎖抗体（例えば、ｓｃＦｖ）と、細胞外ヒンジドメイン（例えば、ＣＤ８）、膜貫通ドメイン（例えば、ＣＤ８αおよびＣＤ２８）、協刺激分子シグナル伝達ドメイン（４－１ＢＢ、ＣＤ２８およびＣＤ１３７）、および活性化シグナル伝達ドメイン（ＣＤ３ζ）を含み得る。キメラ抗現受容体は、これ

により、標的に結合すると、細胞に対して活性化シグナルを発生する。キメラ抗現受容体は、がん細胞に発現する抗原に結合し得る。そのような抗原としては、例えば、ＣＤ１６、ＣＤ１９、ＣＤ２０、ＣＤ２２、ＣＤ１２３、ＣＤ１７１、上皮成長因子受容体（ＥＧＦＲ）、特にＥＧＦＲｖＩＩＩ、３型ＥＧＦＲ、ｄｅ２－７ＥＧＦＲおよびＨＥＲ２、がん胎児性抗原（ＣＥＡ）、前立腺幹細胞抗原（ＰＳＣＡ）、Ｂ細胞成熟抗原（ＢＣＭＡ）、ＣＳ１、ＮＫＧ２Ｄ、ＮＫｐ３０、Ｂ７Ｈ６、ＭＵＣ－１６（ＣＡ１２５）、受容体チロシンキナーゼ用オーファン受容体１（ＲＯＲ－１）、ＧＤ３、ＧＭ２、グリピカン－３（ＧＰＣ３）、メソテリン、ＩＬ１３Ｒ、ｃ－ＫＩＴ、ｃ－ＭＥＴ、ＮＹ－ＥＳＯ－１、ＷＴ１、ＭＡＧＥ－Ａ３、ＭＡＧＥ－Ａ４、ＭＡＧＥ－Ａ１０、ＨＰＶのＥ６、ＨＰＶのＥ７、ＣＭＶ、ＡＦＰ、ＰＲＡＭＥ、ＳＳＸ２、ＫＲＡＳ、ＨＥＲ２、およびＰＤ－Ｌ１からなる群から選択される１以上であり得る。キメラ抗原受容体はまた、例えば、タンパク質性のタグに結合性を有してもよい。ｓｃＦｖの抗原は例えば、フルオレセインイソチオシアネート（ＦＩＴＣ）などの蛍光タンパク質であり得る。がん細胞表面のがん抗原に対して、タンパク質性タグで標識した抗体を結合させ、当該タグを標的とするキメラ抗現受容体を発現する細胞をさらに投与することでも、がん細胞を殺傷し得るためである。

[0051] １実施態様では、挿入される遺伝子は、例えば、Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）であり得る。ＴＣＲは、抗原特異性を有し得る。抗原特異性を有するＴＣＲは、例えば、がん抗原に結合し得る。抗原特異性を有するＴＣＲは、例えば、ＣＤ１６、ＣＤ１９、ＣＤ２０、ＣＤ２２、ＣＤ１２３、ＣＤ１７１、上皮成長因子受容体（ＥＧＦＲ）、特にＥＧＦＲｖＩＩＩ、３型ＥＧＦＲ、ｄｅ２－７ＥＧＦＲおよびＨＥＲ２、がん胎児性抗原（ＣＥＡ）、前立腺幹細胞抗原（ＰＳＣＡ）、Ｂ細胞成熟抗原（ＢＣＭＡ）、ＣＳ１、ＮＫＧ２Ｄ、ＮＫｐ３０、Ｂ７Ｈ６、ＭＵＣ－１６（ＣＡ１２５）、受容体チロシンキナーゼ用オーファン受容体１（ＲＯＲ－１）、ＧＤ３、ＧＭ２、グリピカン－３（ＧＰＣ３）、メソテリン、ＩＬ１３Ｒ、ｃ－ＫＩＴ、ｃ－ＭＥＴ、ＮＹ

－ＥＳＯ－１、ＷＴ１、ＭＡＧＥ－Ａ３、ＭＡＧＥ－Ａ４、ＭＡＧＥ－Ａ１０、ＨＰＶのＥ６、ＨＰＶのＥ７、ＣＭＶ、ＡＦＰ、ＰＲＡＭＥ、ＳＳＸ２、ＫＲＡＳ、ＨＥＲ２、およびＰＤ－Ｌ１からなる群から選択される１以上に結合し得る。ＴＣＲは、ＨＬＡに適合するように選択され得る。

[0052] １実施態様では、挿入される遺伝子は、免疫抑制性因子、例えば、ＣＤ４７、ＣＤ２４、ＣＤ２００、ＰＤ－Ｌ１、ＩＤＯ１、ＣＴＬＡ４－Ｉｇ、Ｃ１－インヒビター、ＩＬ－１０、ＩＬ－３５、ＦＡＳＬ、Ｓｅｒｐｍｂ９、ＣＣ１２１、およびＭｆｇｅ８からなる群から選択される１以上をコードする遺伝子を含む。

[0053] １実施態様では、挿入される遺伝子は、治療遺伝子であり得る。治療遺伝子は、体内で発現させることにより、治療的利益を生じる遺伝子であり得る。治療遺伝子は、炎症誘発性タンパク質、例えば、サイトカインであり得る。治療遺伝子は、抗炎症性タンパク質、例えば、サイトカインであり得る。

[0054] １実施態様では、挿入される遺伝子は、自殺遺伝子であり得る。自殺遺伝子としては、例えば、チミジンキナーゼ遺伝子、特に、ヘルペスウイルス由来チミジンキナーゼ遺伝子（ＨＳＶｔｋ）、細胞傷害性シグナルレセプター（例えば、ジフテリアトキシンレセプター）およびｉＣａｓ９が挙げられる。チミジンキナーゼ遺伝子は、ガンシクロビルをリン酸化して細胞傷害性のガンシクロビル三リン酸を生成する。また、ｉＣａｓ９（inducible caspase-9）は、そのＣＡＲＤがＦＫＢＰ１２により置き換えられたタンパク質であり、タクロリムス誘導体（例えば、ＡＰ１９０３）存在下でｉＣａｓ９発現細胞において細胞死を誘導する。このような自殺遺伝子は、ユニバーサルドナー細胞（ＵＤＣ）などの免疫系を回避する細胞を体内から除去したい場合に有益である。

[0055] 本明細明細書において、塩基配列どうし又はアミノ酸配列どうしの配列同一性（又は相同性）は、２つの塩基配列又はアミノ酸配列を、対応する塩基又はアミノ酸が最も多く一致するように、挿入及び欠失に当たる部分にギャップを入れながら並置し、得られたアラインメント中のギャップを除く、塩

基配列全体又はアミノ酸配列全体に対する一致した塩基又はアミノ酸の割合として求められる。塩基配列又はアミノ酸配列どうしの配列同一性は、当該技術分野で公知の各種相同性検索ソフトウェアを用いて求めることができる。塩基配列の配列同一性の値（Ｉｄｅｎｔｉｔｙ値）は、特に限定されないが例えば、公知の相同性検索ソフトウェアＵＣＳＣ　Ｇｅｎｏｍｅ　Ｂｒｏｗｓｅｒに搭載されているＢＬＡＴ検索により得ることができる。

[0056] ［ゲノム改変方法］

１実施形態において、本発明は、染色体ゲノムの２つ以上のアレルを改変するゲノム改変方法を提供する。前記ゲノム改変方法は、下記（ａ）及び（ｂ）の工程を含む：

（ａ）下記（ｉ）及び（ｉｉ）を、前記染色体を含む細胞に導入する工程；及び

（ｉ）前記染色体ゲノムの標的領域を標的とする配列特異的核酸切断分子、又は前記配列特異的核酸切断分子をコードするポリヌクレオチドを含むゲノム改変システム、

（ｉｉ）前記標的領域の上流側に隣接する塩基配列と相同な塩基配列を有する上流ホモロジーアームと、前記標的領域の下流側に隣接する塩基配列と相同な塩基配列を有する下流ホモロジーアームとの間に、選択マーカー遺伝子の塩基配列を含む、２種以上の選択マーカー用ドナーＤＮＡであって、前記２種以上の選択マーカー用ドナーＤＮＡは、相互に異なる選択マーカー遺伝子を有し、前記選択マーカー用ドナーＤＮＡの種類数は、ゲノム改変の対象とする前記アレルの数と同数以上である、２種以上の選択マーカー用ドナーＤＮＡ、

（ｂ）前記工程（ａ）の後、前記２種以上の選択マーカー用ドナーＤＮＡが有する全ての選択マーカー遺伝子に基づいて、前記細胞を選択する工程。この態様において、前記選択マーカー遺伝子は、選択マーカー用ドナーＤＮＡの種類毎に固有であり得る。この態様においてはまた、工程（ｂ）は、前記工程（ａ）の後、前記２以上のアレルに対して異なる種類の選択マーカー

用ドナーＤＮＡがそれぞれ相同組み換えすることによって、当該２以上のアレルにそれぞれ区別可能に異なる固有の選択マーカー遺伝子が導入され、導入された当該区別可能に異なる選択マーカー遺伝子のすべてを発現する細胞を選択する工程（ポジティブ選択のための工程）であり得る。上記方法は、染色体ゲノムの２つ以上のアレルが改変された細胞を作製する方法であってもよい。

[0057] 本明細書では、便宜的にヒトゲノムの位置を参照するときに、リファレンスゲノムとしてｈｇ３８ゲノム配列における位置を用いる。ｈｇ３８は、カリフォルニア大学サンタクルーズ校（ＵＣＳＣ）により２０１３年１２月にリリースされたリファレンスゲノムである。リファレンスゲノムは、様々なゲノムを組み合わせて作成された参照用のゲノムであり、このゲノムを有するヒトが存在するというわけではない。しかし、ヒト個体のゲノムＤＮＡから解読された断片的な配列情報をリファレンスゲノムに照らすことによって解読された断片的な配列情報を連結してコンピュータ上で一つながりの配列を構築し、これにより当該ヒト個体のゲノムＤＮＡの配列を推定することができる。このようにして、リファレンスゲノムにヒト個体のゲノムＤＮＡの配列を対応付けることによって、ヒト個体等の個体のゲノムＤＮＡを解読することが通常なされている。そして、ｈｇ３８ゲノム配列の特定位置または特定領域に対応する位置または領域とは、具体的な配列の異なる別個体のゲノムにおいて、当該特定位置または特定領域に紐付けられる位置または領域を意味する。具体的には、配列の同一性に基づき、当該位置または領域に特徴的な配列を有する位置または領域が、ｈｇ３８ゲノム配列の特定位置または特定領域に対応する位置または領域である。対応する位置は、２つのゲノムＤＮＡの部分配列のアラインメントにより決定することができる。具体的な配列に相違がある場合であっても、オーソログの関係を有していたり、配列同一性を有していてアラインメントをすることによって、２つのゲノムＤＮＡの対応関係を決定することができる。遺伝子重複により生じたパラログが豊富な領域では、単純な個別の配列に基づく配列の対応関係を決定するだ

けでは、２つのゲノム間の真の対応関係を決定するには十分でない場合がある。このことが類似配列が集積した領域の配列解読の難易度を増加させる。対応する配列の決定に際して、高い配列同一性を求めることで２つのゲノム間の対応関係を明らかにすることができる。また、特定領域が、複数遺伝子を含む大きな領域である場合には、シンテニーを考慮することができる。シンテニーとは、ゲノム上でのオーソログの物理的位置的関係が保存されていることをいう。個人間および生物間でシンテニーを有し得る。したがって、シンテニーを考慮して特定領域を決定することができる。

[0058] １実施態様において、ゲノムの全アレル（２倍体の場合には２アレル）における領域の欠失（例えば、１Ｍｂまで、または５００ｋｂまでの領域の欠失）であって、ＭＨＣ分子をコードする遺伝子座のＭＨＣ類似配列集積領域の一部、または好ましくは全部を含む領域を含む欠失を有するゲノムを有する細胞が提供される。この態様では、類似配列による繰り返し配列が削除されることにより、ゲノムの可読性が向上し、および／または、ゲノムの遺伝子（例えば、ＭＨＣ遺伝子）の標的化効率を高めることができる。当該欠失を有する細胞は、内在性または外来性の遺伝子の挿入を有していてもよい。挿入される遺伝子は、好ましくは制御配列に作動可能に連結されている。１実施態様では、細胞はヒト細胞であり、欠失は、ＨＬＡ分子をコードする遺伝子座のＭＨＣ類似配列集積領域の一部、または好ましくは全部の領域を含む。

[0059] １実施態様において、ＨＬＡ－ＦからＨＬＡ－Ａまでの一連の領域（第１のＨＬＡ類似配列集積領域）、ＨＬＡ－ＣからＨＬＡ－Ｂまでの一連の領域（第２のＨＬＡ類似配列集積領域）、ＨＬＡ－ＤＲＡからＨＬＡ－ＤＯＢまでの一連の領域（第３のＨＬＡ類似配列集積領域）、およびＨＬＡ－ＤＭＢからＨＬＡＤＰＢ２までの一連の領域（第４のＨＬＡ類似配列集積領域）並びにその一部からなる群から選択される１つ、２つ、３つ、または４つの領域を欠失した細胞が提供される。１実施形態において、上記細胞は、ＨＬＡ－Ｅを含む領域を欠失していてもよい。

[0060] 第１から第４のＨＬＡ類似配列集積領域の標的化は、それぞれに固有の配列に対して行うことができる。このようにすることで、オフターゲットによる切断などの予期せぬ改変を防ぐことができる。当業者であれば、標的化をどのように行うとオフターゲットによる切断を防ぐことができるかを理解し、適宜標的化および改変を行うことができる。個々のＨＬＡの改変は、他のＨＬＡとの配列類似性により困難であっても、本開示による大規模欠失では、固有配列の存在する領域を自由に設定することができるので、所望の大規模欠失を作製することができる。１実施形態において、第１から第４のＨＬＡ類似配列集積領域の標的化はそれぞれ、第１から第４のＨＬＡ類似配列集積領域の外の配列に対するものである。

[0061] １実施形態において、第１のＨＬＡ類似配列集積領域は、ｈｇ３８ゲノム配列のｃｈｒ６：　２９，７０６，８３７－２９，９５６，１９９に存在しうる。１実施形態において、第１のＨＬＡ類似配列集積領域は、ｈｇ３８ゲノム配列のｃｈｒ６：　２９，７１１，０００－３０，０２０，０００に存在しうる。１実施形態において、第２のＨＬＡ類似配列集積領域は、ｈｇ３８ゲノム配列のｃｈｒ６：　３１，２２５，７３８－３１，３７６，７８１に存在しうる。１実施形態において、第２のＨＬＡ類似配列集積領域は、ｈｇ３８ゲノム配列のｃｈｒ６：　３１，１７６，０００－３１，５３４，０００に存在しうる。１実施形態において、第３のＨＬＡ類似配列集積領域は、ｈｇ３８ゲノム配列のｃｈｒ６：　３２，４４５，０００－３２，８２１，０００に存在しうる。１実施形態において、第３のＨＬＡ類似配列集積領域は、ｈｇ３８ゲノム配列のｃｈｒ６：　３２，４４５，０００－３２，８２１，０００に存在しうる。１実施形態において、第４のＨＬＡ類似配列集積領域は、ｈｇ３８ゲノム配列のｃｈｒ６：　３２，９３４，２９８－３３，１６１，６２１に存在しうる。１実施形態において、第４のＨＬＡ類似配列集積領域は、ｈｇ３８ゲノム配列のｃｈｒ６：　３３，００２，０００－３３，１４７，０００に存在しうる。

[0062] １実施形態において、第１のＨＬＡ類似配列集積領域は、ｈｇ３８ゲノム

配列のｃｈｒ６：　２９，７２２，７７５－２９，９４５，８７０に存在しうる。１実施形態において、第２のＨＬＡ類似配列集積領域は、ｈｇ３８ゲノム配列のｃｈｒ６：　３１，２６８，７４９－３１，３５７，１７９に存在しうる。１実施形態において、第３のＨＬＡ類似配列集積領域は、ｈｇ３８ゲノム配列のｃｈｒ６：３２，４３９，８８７－３２，８１７，００２に存在しうる。１実施形態において、第４のＨＬＡ類似配列集積領域は、ｈｇ３８ゲノム配列のｃｈｒ６：３２，９３４，６３６－３３，０８９，６９６に存在しうる。

[0063]　第１～第４のＨＬＡ類似配列集積領域のそれぞれにおいて、欠失させるＨＬＡを含む最小の領域を特定し、その上で、当該領域の両外側においてゲノム上で固有の配列を有する領域を決定する。この決定は、ゲノムデータベースなどを参照して適宜行うことができる。このような固有の配列を有する領域は、ゲノム編集および相同組換えのための相同アームの設計に用いることができる。相同アームは、典型的には、当該固有の配列を有する領域と相同組換え可能に設計される（例えば、同一の配列を有するように設計される）。ある好ましい実施形態では、第１～第４のＨＬＡ類似配列集積領域のそれぞれにおいて、全ての機能的なＨＬＡをコードする遺伝子を含む領域を欠失させる。ある好ましい実施形態では、全ての機能的なＨＬＡをコードする遺伝子を含む領域を欠失させ、かつ、当該領域の外側に存在する別の遺伝子をできるだけ含まないように欠失させる。例えば、当該領域の外側に存在する別の遺伝子を５以上、４以上、３以上、２以上、または１以上含まないように欠失させる。欠失領域は、相同組換えアームが相同組換え可能なゲノム上で固有の配列を有する領域の存在に依存する。ヒトの場合には、ヒトの固有の検討を行い、非ヒトの場合には、非ヒトの各生物種に固有の検討を行うことが望まれる。

[0064]　１実施態様において、本発明は、細胞であって、欠失を有するゲノムＤＮＡを含み、前記欠失は、以下（ｉ）～（ｉｖ）に規定される染色体領域：

（ｉ）　ｈｇ３８ゲノム配列のｃｈｒ６：２９，７２３，４６４－２９，

９４５，４５５の染色体領域に対応する染色体領域、

（ｉｉ）　ｈｇ３８ゲノム配列のｃｈｒ６：３１，２６９，１６９－３１，３５７，１５８の染色体領域に対応する染色体領域、

（ｉｉｉ）　ｈｇ３８ゲノム配列のｃｈｒ６：３２，４３９，９５１－３２，８１６，９５１の染色体領域に対応する染色体領域、および

（ｉｖ）　ｈｇ３８ゲノム配列のｃｈｒ６：３３，００６，８３８－３３，０８６，２３８の染色体領域に対応する染色体領域

からなる群から選択される１以上の染色体領域中にそれぞれ位置するＨＬＡ類似配列集積領域の一部もしくは全体を含む領域の欠失であり、

前記ＨＬＡ類似配列集積領域は、前記染色体領域中にそれぞれ含まれるＨＬＡコードする遺伝子およびＨＬＡ類似配列の全てを含み、

前記一部は少なくとも一つながりの領域を含み、前記一つながりの領域は、上記領域にそれぞれ含まれるＨＬＡコードする遺伝子およびＨＬＡ類似配列からなる群から選択される遺伝子の５０％以上、６０％以上、７０％以上、８０％以上、９０％以上、または１００％の遺伝子を含む、

細胞

を提供する。本明細書の全体にわたり、欠失は、両アレルにおける欠失である。ある態様では、本開示の細胞は、上記領域に加えて、その両端から外側に向けて、独立してそれぞれ２０ｋｂｐ以内、１５ｋｂｐ以内、１０ｋｂｐ以内、９ｋｂｐ以内、８ｋｂｐ以内、７ｋｂｐ以内、６ｋｂｐ以内、５ｋｂｐ以内、４ｋｂｐ以内、３ｋｂｐ以内、２ｋｂｐ以内、または１ｋｂｐ以内の領域をさらに欠失していてもよい。また、ある態様では、本開示の細胞は、上記領域内の両端に位置する１以上（好ましくは１つ）のＨＬＡ遺伝子を欠失していなくてもよい。

[0065]　１実施態様において、本発明は、細胞であって、欠失を有するゲノムＤＮＡを含み、前記欠失は、以下（ｉ）～（ｉｖ）に規定される染色体領域：

（ｉ）　ｈｇ３８ゲノム配列のｃｈｒ６：２９，７２３，４６４－３０，０１０，６１８）の染色体領域に対応する染色体領域、

（ｉｉ）　ｈｇ３８ゲノム配列のｃｈｒ６：３１，２６９，１６９－３１，４６３，３３８の染色体領域に対応する染色体領域、

（ｉｉｉ）　ｈｇ３８ゲノム配列のｃｈｒ６：３２，４３９，８８７－３２，８１７，００２の染色体領域に対応する染色体領域、および

（ｉｖ）　ｈｇ３８ゲノム配列のｃｈｒ６：３３，００６，８３８－３３，１３１，１９９の染色体領域に対応する染色体領域

からなる群から選択される１以上の染色体領域中にそれぞれ位置するＨＬＡ類似配列集積領域の一部もしくは全体を含む領域の欠失であり、

前記ＨＬＡ類似配列集積領域は、前記染色体領域中にそれぞれ含まれるＨＬＡコードする遺伝子およびＨＬＡ類似配列の全てを含み、

前記一部は少なくとも一つながりの領域を含み、前記一つながりの領域は、上記領域にそれぞれ含まれるＨＬＡコードする遺伝子およびＨＬＡ類似配列からなる群から選択される遺伝子の５０％以上、６０％以上、７０％以上、８０％以上、９０％以上、または１００％の遺伝子を含む、

細胞

を提供する。本明細書の全体にわたり、欠失は、両アレルにおける欠失である。ある態様では、本開示の細胞は、上記領域に加えて、その両端から外側に向けて、独立してそれぞれ２０ｋｂｐ以内、１５ｋｂｐ以内、１０ｋｂｐ以内、９ｋｂｐ以内、８ｋｂｐ以内、７ｋｂｐ以内、６ｋｂｐ以内、５ｋｂｐ以内、４ｋｂｐ以内、３ｋｂｐ以内、２ｋｂｐ以内、または１ｋｂｐ以内の領域をさらに欠失していてもよい。また、ある態様では、本開示の細胞は、上記領域内の両端に位置する１以上（好ましくは１つ）のＨＬＡ遺伝子を欠失していなくてもよい。

[0066]　１実施態様において、本発明は、細胞であって、欠失を有するゲノムＤＮＡを含み、前記欠失は、以下（ｉ）～（ｉｖ）に規定される染色体領域：

（ｉ）　ｈｇ３８ゲノム配列のｃｈｒ６：　２９，７１１，０００－３０，０２０，０００の染色体領域に対応する染色体領域、

（ｉｉ）　ｈｇ３８ゲノム配列のｃｈｒ６：　３１，１７６，０００－３

１，５３４，０００染色体領域に対応する染色体領域、

（ｉｉｉ）　ｈｇ３８ゲノム配列のｃｈｒ６：　３２，４４５，０００－３２，８２１，０００染色体領域に対応する染色体領域、および

（ｉｖ）　ｈｇ３８ゲノム配列のｃｈｒ６：　３３，００２，０００－３３，１４７，０００染色体領域に対応する染色体領域

からなる群から選択される１以上の染色体領域中にそれぞれ位置するＨＬＡ類似配列集積領域の一部もしくは全体を含む領域の欠失であり、

前記ＨＬＡ類似配列集積領域は、前記染色体領域中にそれぞれ含まれるＨＬＡコードする遺伝子およびＨＬＡ類似配列の全てを含み、

前記一部は少なくとも一つながりの領域を含み、前記一つながりの領域は、上記領域にそれぞれ含まれるＨＬＡコードする遺伝子およびＨＬＡ類似配列からなる群から選択される遺伝子の５０％以上、６０％以上、７０％以上、８０％以上、９０％以上、または１００％の遺伝子を含む、

細胞

を提供する。本明細書の全体にわたり、欠失は、両アレルにおける欠失である。ある態様では、本開示の細胞は、上記領域に加えて、その両端から外側に向けて、独立してそれぞれ２０ｋｂｐ以内、１５ｋｂｐ以内、１０ｋｂｐ以内、９ｋｂｐ以内、８ｋｂｐ以内、７ｋｂｐ以内、６ｋｂｐ以内、５ｋｂｐ以内、４ｋｂｐ以内、３ｋｂｐ以内、２ｋｂｐ以内、または１ｋｂｐ以内の領域をさらに欠失していてもよい。また、ある態様では、本開示の細胞は、上記領域内の両端に位置する１以上（好ましくは１つ）のＨＬＡ遺伝子を欠失していなくてもよい。

[0067]　１実施態様において、本発明は、細胞であって、欠失を有するゲノムＤＮＡを含み、前記欠失は、以下（ｉ）～（ｉｖ）に規定される染色体領域：

（ｉ）　ｈｇ３８ゲノム配列のｃｈｒ６：　２９，７０６，８３７－２９，９５６，１９９の染色体領域に対応する染色体領域、

（ｉｉ）　ｈｇ３８ゲノム配列のｃｈｒ６：　３１，２６８，７４９－３１，５３４，０００染色体領域に対応する染色体領域、

（ｉｉｉ）　ｈｇ３８ゲノム配列のｃｈｒ６：　３２，４３９，８８７－３２，８１７，００２染色体領域に対応する染色体領域、および

（ｉｖ）　ｈｇ３８ゲノム配列のｃｈｒ６：　３２，９３４，６３６－３３，０８９，６９６染色体領域に対応する染色体領域

からなる群から選択される１以上の染色体領域中にそれぞれ位置するＨＬＡ類似配列集積領域の一部もしくは全体を含む領域の欠失であり、

前記ＨＬＡ類似配列集積領域は、前記染色体領域中にそれぞれ含まれるＨＬＡコードする遺伝子およびＨＬＡ類似配列の全てを含み、

前記一部は少なくとも一つながりの領域を含み、前記一つながりの領域は、上記領域にそれぞれ含まれるＨＬＡコードする遺伝子およびＨＬＡ類似配列からなる群から選択される遺伝子の５０％以上、６０％以上、７０％以上、８０％以上、９０％以上、または１００％の遺伝子を含む、

細胞

を提供する。本明細書の全体にわたり、欠失は、両アレルにおける欠失である。ある態様では、本開示の細胞は、上記領域に加えて、その両端から外側に向けて、独立してそれぞれ２０ｋｂｐ以内、１５ｋｂｐ以内、１０ｋｂｐ以内、９ｋｂｐ以内、８ｋｂｐ以内、７ｋｂｐ以内、６ｋｂｐ以内、５ｋｂｐ以内、４ｋｂｐ以内、３ｋｂｐ以内、２ｋｂｐ以内、または１ｋｂｐ以内の領域をさらに欠失していてもよい。また、ある態様では、本開示の細胞は、上記領域内の両端に位置する１以上（好ましくは１つ）のＨＬＡ遺伝子を欠失していなくてもよい。

[0068] 上記（ｉ）に規定された染色体領域は、ＨＬＡ－Ｆ、ＨＬＡ－Ｇ、およびＨＬＡ－Ａを含むＨＬＡ類似配列集積領域を含む。そして、ある態様では、欠失は、ＨＬＡ類似配列集積領域の一部、または好ましくは全部の欠失である。ここで一部とは、少なくとも１つのＨＬＡおよびＨＬＡ類似配列を含む領域である。例えば、ある態様では、欠失は、ＨＬＡ－Ｆ、ＨＬＡ－Ｇ、およびＨＬＡ－Ａからなる群から選択される１以上、好ましくは、すべてを含む領域の欠失である。ある態様では、欠失は、ＨＬＡ類似配列集積領域の全

部を含む領域の欠失であり、ＨＬＡ－Ｆ、ＨＬＡ－Ｇ、およびＨＬＡ－Ａを含む領域の欠失である。

[0069] ある態様では、ＨＬＡの一部又は全部を欠失した細胞は、例えば、追加的に導入された制御配列に作動可能に連結された内因性または外来性の所望の遺伝子を有していてもよい。追加的に導入された制御配列に作動可能に連結された内因性または外来性の所望の遺伝子は、ある態様では、天然に生じた配列を有するが、ある態様では、天然に生じた配列ではない、または人工的に設計された配列である。追加的に導入された所望の遺伝子は、例えば、細胞に付加的な機能を付与し得る。追加的に導入された所望の遺伝子は、例えば、分化促進因子、分化抑制因子、初期化因子（Ｏｃｔ４を含む多能性細胞への初期化に必要な因子を含む）、細胞の特定機能を活性化する因子、細胞の特定機能を抑制する因子、シグナル伝達因子、シグナル伝達抑制因子、受容体、膜タンパク質、酵素（例えば、代謝酵素、リン酸化酵素、核酸合成酵素、テロメラーゼなど）、増殖因子、増殖抑制因子、免疫活性化分子、または免疫抑制性分子、分解酵素（例えば、タンパク質分解酵素、核酸分解酵素など）、分泌因子（例えば、サイトカイン、ホルモンなど）、核内タンパク質、細胞質タンパク質、ミトコンドリアタンパク質、アンチセンスオリゴヌクレオチド、ｓｉＲＮＡ、ｓｈＲＮＡ、ｃｒＲＮＡ、およびｔｒａｃｒＲＮＡ、一本鎖ｇＲＮＡ、マーカー遺伝子（例えば、薬剤耐性遺伝子、可視化マーカー遺伝子など）、誘導性の自殺遺伝子（例えば、誘導性プロモーターに作動可能に連結されたトキシン、例えば、ジフテリアトキシン）、並びにマイクロＲＮＡからなる群から選択されるいずれか1以上をコードし得る。ある態様では、制御配列は、構成的プロモーターまたは誘導性プロモーターであり得る。

[0070] ある態様では、上記（ｉ）においてＨＬＡの一部を欠失した細胞は、（ｉ）において、例えば、１～数個（例えば、１～４個、好ましくは３個、より好ましくは２個、さらに好ましくは１個）のＨＬＡを有していてもよい（残存させていてもよい）。ある態様では、上記（ｉｉ）においてＨＬＡの一部

を欠失した細胞は、（ｉｉ）において、例えば、１～数個（例えば、１～４個、好ましくは３個、より好ましくは２個、さらに好ましくは１個）のＨＬＡを有していてもよい（残存させていてもよい）。ある態様では、上記（ｉｉ）においてＨＬＡの一部を欠失した細胞は、（ｉｉｉ）において、例えば、１～数個（例えば、１～４個、好ましくは３個、より好ましくは２個、さらに好ましくは１個）のＨＬＡを有していてもよい（残存させていてもよい）。ある態様では、上記（ｉｖ）においてＨＬＡの一部を欠失した細胞は、（ｉｖ）において、例えば、１～数個（例えば、１～４個、好ましくは３個、より好ましくは２個、さらに好ましくは１個）のＨＬＡを有していてもよい（残存させていてもよい）。

[0071] ある態様では、欠失は、ＨＬＡ類似配列集積領域の一部または好ましくは全部を含む領域の欠失である。この態様において、好ましくは、上記（ｉ）に規定された染色体領域に所望の遺伝子が導入されている。これにより、この態様では、（ｉ）に規定された染色体領域は、ＨＬＡ類似配列集積領域の全部を欠失しているが、制御配列に作動可能に連結された所望の遺伝子（内因性または好ましくは外来性の遺伝子）またはその挿入を有する。ある態様では、欠失は、ＨＬＡ類似配列集積領域の一部または好ましくは全部を含む領域の欠失である。この態様において、好ましくは、所望の遺伝子が、（ｉ）に規定された染色体領域以外の領域に再導入されている。これにより、前記ゲノムＤＮＡは、上記（ｉ）に規定された染色体領域においてＨＬＡ類似配列集積領域の一部または好ましくは全体の欠失を有するが、（ｉ）に規定された染色体領域以外の領域に制御配列に作動可能に連結された内因性または好ましくは外来性の所望の遺伝子を有する。内因性とは、欠失を有する細胞が有している、または有していた内在性の遺伝子と同一の塩基配列を有することを意味し、外来性とは、欠失を有する細胞が有している、または有していた内在性の遺伝子とは異なる塩基配列を有することを意味する。所望の遺伝子は、機能的な遺伝子である。機能的な遺伝子とは、当該遺伝子の本来的な機能を有することを意味する。（ｉ）における欠失は、少なくともＨＬ

Ａ－Ａ、およびＨＬＡ－Ｆのいずれかまたは両方を含む。

[0072] 全ての態様において、制御配列に作動可能に連結された所望の遺伝子は、制御配列が外来性または内因性であり、かつ、所望の遺伝子が外来性または内因性である。ある態様において、制御配列は内因性であり、かつ所望の遺伝子は外来性である。ある態様において、制御配列は内因性であり、かつ、所望の遺伝子は内因性である。ある態様において、制御配列は外因性であり、かつ、所望の遺伝子は内因性である。ある態様において、制御配列は外因性であり、かつ所望の遺伝子は外因性である。ある態様において、制御配列は内因性であり、かつ、所望の遺伝子は内因性であるが、制御配列と所望の遺伝子を含む一連の配列は全体として、内因性または外因性である。制御配列としては、エンハンサー、プロモーターなどの様々な公知の制御配列が挙げられる。

[0073] 上記（ｉｉ）に規定された染色体領域は、ＨＬＡ－Ｃ、ＨＬＡ－Ｂ、ＭＩＣＡ、およびＭＩＣＢを含むＨＬＡ類似配列集積領域を含む。そして、ある態様では、欠失は、ＨＬＡ類似配列集積領域の一部、または好ましくは全部である。ここで一部とは、少なくとも１つのＨＬＡおよびＨＬＡ類似配列を含む領域である。例えば、ある態様では、欠失は、ＨＬＡ－Ｃ、ＨＬＡ－Ｂ、ＭＩＣＡ、およびＭＩＣＢからなる群から選択される１以上、好ましくは、すべてを含む領域の欠失である。

[0074] 上記（ｉｉｉ）に規定された染色体領域は、ＨＬＡ－ＤＲＢ５、ＨＬＡ－ＤＲＢ１、ＨＬＡ－ＤＱＡ１、ＨＬＡ－ＤＱＢ１、ＨＬＡ－ＤＱＡ２、ＨＬＡ－ＤＱＢ２、およびＨＬＡ－ＤＯＢを含むＨＬＡ類似配列集積領域を含む。そして、ある態様では、欠失は、ＨＬＡ類似配列集積領域の一部、または好ましくは全部である。ここで一部とは、少なくとも１つのＨＬＡおよびＨＬＡ類似配列を含む領域である。例えば、ある態様では、ＨＬＡ－ＤＲＢ５、ＨＬＡ－ＤＲＢ１、ＨＬＡ－ＤＱＡ１、ＨＬＡ－ＤＱＢ１、ＨＬＡ－ＤＱＡ２、ＨＬＡ－ＤＱＢ２、およびＨＬＡ－ＤＯＢからなる群から選択される１以上、好ましくは、すべてを含む領域の欠失である。

[0075] 上記（ｉｖ）に規定された染色体領域は、ＨＬＡ－ＤＯＡ、ＨＬＡ－ＤＰＡ１、およびＨＬＡ－ＤＰＢ１を含むＨＬＡ類似配列集積領域を含む。そして、ある態様では、欠失は、ＨＬＡ類似配列集積領域の一部、または好ましくは全部である。ここで一部とは、少なくとも１つのＨＬＡおよびＨＬＡ類似配列を含む領域である。例えば、ある態様では、ＨＬＡ－ＤＯＡ、ＨＬＡ－ＤＰＡ１、およびＨＬＡ－ＤＰＢ１からなる群から選択される１以上、好ましくは、すべてを含む領域の欠失である。

[0076] 本発明の趣旨に鑑みれば、上記（ｉ）に規定される領域の欠失は、ＨＬＡ類似配列集積領域のうちのＨＬＡおよびＨＬＡ類似配列のいずれか１つのみを含む領域を除く他の全ての領域の欠失であり得る。

[0077] ある態様では、上記（ｉｉ）に規定される領域の欠失は、ＨＬＡ類似配列集積領域のうちのＨＬＡおよびＨＬＡ類似配列のいずれか１つのみを含む領域を除く他の全ての領域の欠失であり得る。

[0078] ある態様では、上記（ｉｉｉ）に規定される領域の欠失は、ＨＬＡ類似配列集積領域のうちのＨＬＡおよびＨＬＡ類似配列のいずれか１つのみを含む領域を除く他の全ての領域の欠失であり得る。

[0079] ある態様では、上記（ｉｖ）に規定される領域の欠失は、ＨＬＡ類似配列集積領域のうちのＨＬＡおよびＨＬＡ類似配列のいずれか１つのみを含む領域を除く他の全ての領域の欠失であり得る。

[0080] ある態様では、欠失は、（ｉ）に規定される領域の欠失であり、（ｉ）～（ｉｖ）の他の領域ではＨＬＡ類似配列集積領域の一部または全部の欠失を有しない。ある態様では、欠失は、（ｉｉ）に規定される領域の欠失であり、（ｉ）～（ｉｖ）の他の領域ではＨＬＡ類似配列集積領域の一部または全部の欠失を有しない。ある態様では、欠失は、（ｉｉｉ）に規定される領域の欠失であり、（ｉ）～（ｉｖ）の他の領域ではＨＬＡ類似配列集積領域の一部または全部の欠失を有しない。ある態様では、欠失は、（ｉｖ）に規定される領域の欠失であり、（ｉ）～（ｉｖ）の他の領域ではＨＬＡ類似配列集積領域の一部または全部の欠失を有しない。

[0081] ある態様では、欠失は、（ｉ）～（ｉｖ）のそれぞれに規定される領域の欠失である。

[0082] ある態様では、上記の欠失を有する領域には、１以上の遺伝子が挿入（ノックイン）されていてもよい。挿入される遺伝子は、選択マーカー（例えば、薬剤耐性マーカー、および可視化マーカー）および生理機能を有する目的遺伝子であり得る。上記挿入される遺伝子は、制御配列に作動可能に連結していることが好ましい。ある好ましい態様では、遺伝子が挿入される位置は、上記（ｉ）～（ｉｖ）のいずれかである。ある好ましい態様では、遺伝子が挿入される位置は、上記上記（ｉ）～（ｉｖ）のいずれでもない。ある好ましい態様では、遺伝子が挿入される位置は、上記（ｉｉ）の領域内である。ある好ましい領域では、上記（ｉｉ）の領域は、欠失（好ましくは上記に規定される欠失）を有し、かつ、上記１以上の遺伝子の挿入を有する。ある態様では、挿入される遺伝子は、上流および下流のいずれかまたは両方にインシュレーターを有しない。インシュレーターは、例えば、離れた位置にあるエンハンサーがプロモーターに作用するのを防いだり、隣接するヘテロクロマチンの拡大によるユークロマチンのサイレンシングを防ぐ作用を有するシス調節エレメントである。インシュレーターとしては、ＣＴＣＦインシュレーター、ｇｙｐｓｙインシュレーター、およびβグロビンインシュレーターが挙げられる。インシュレーターは、２００～１０００ｂｐほどの長さを有する。インシュレーターは、インシュレーターを跨ぐＰＣＲ増幅などを阻害し得る。ある態様では、上記（ｉｉ）の領域は、欠失（好ましくは上記に規定される欠失）を有し、かつ、上記１以上の遺伝子の挿入をし、かつ、前記１以上の遺伝子は、そのセントロメア側およびテロメア側（または、上流および下流）のいずれかまたは両方にインシュレーターを有しない。ある態様では、上記欠失を有する領域は、新しい配列の挿入を有しない。ある態様では、上記欠失を有する領域は、ｌｏｘＰまたはＦＲＴ（フリッパーゼ認識標的）およびこれらの変種などの部位特異的組換え酵素の認識配列を有しない。

[0083] ある態様では、前記欠失、特に上記（ｉ）に規定される領域の欠失は、ＨＬＡ－Ｆ、ＨＬＡ－Ｇ、およびＨＬＡ－Ａを含む一連の領域（例えば、ｈｇ３８ゲノム配列のｃｈｒ６：２９，７２３，４６４－２９，９４５，４５５、好ましくはｃｈｒ６：２９，７２３，４６４－３０，０１０，６１８に対応する染色体領域の一部または好ましくは全部の欠失であり得る。ある態様では、前記欠失、特に上記（ｉ）に規定される領域の欠失は、ｃｈｒ６：２９，７０１，０００～２９，７２３，４６４（例えば、Ｃｈｒ６：２９，７０９，０００－２９，７１１，０００）の染色体領域中の特有の配列（第１の配列）中に一方の端を有し、ｃｈｒ６：２９，９４５，４５５－３０，０３０，０００（例えば、Ｃｈｒ６：３０，０２０，０００－３０，０２０，０００の染色体領域およびｃｈｒ６：３０，０２１，５００－３０，０２２，８００）の染色体領域中の特有の配列（第２の配列）中に他方の端を有する領域の欠失である。第１の配列および第２の配列は、ゲノムにおける固有の配列（ユニークな配列）を含み、したがって、後述するドナー用ＤＮＡを用いた相同組換えによるゲノム改変における上流ホモロジーアーム（例えば、テロメア側ホモロジーアーム）および下流ホモロジーアーム（例えば、セントロメア側ホモロジーアーム）の標的し、上記固有の配列（ユニークな配列）に対して選択的に結合して狙ったとおりにゲノム改変を達成できるためである。前記欠失は、約３００ｋｂの欠失であるが、このような巨大欠失を効率よく生じさせる手法として、下記方法を好ましく用いることができる。

[0084] ある態様では、前記欠失、特に上記（ｉｉ）に規定される領域の欠失は、ＨＬＡ－ＣおよびＨＬＡ－Ｂを含む一連の領域（例えば、ｈｇ３８ゲノム配列のｃｈｒ６：３１，２６９，１６９－３１，３５７，１５８、好ましくはｃｈｒ６：３１，２６９，１６９－３１，４６３，３３８の染色体領域に対応する染色体領域）の一部または好ましくは全部の欠失である。ある態様では、前記欠失、特に上記（ｉｉ）に規定される領域の欠失は、ｃｈｒ６：３１，１６６，０００～３１，２６９，１６９（例えば、Ｃｈｒ６：３１

，１７４，０００～３１，１７７，０００）の染色体領域中の特有の配列（第３の配列）中に一方の端を有し、ｃｈｒ６：　３１，３５７，１５８～３１，５４４，０００（例えば、Ｃｈｒ６：　３１，５３４，０００～３１，５３８，０００）の染色体領域中の特有の配列（第４の配列）中に他方の端を有する領域の欠失である。第３の配列および第４の配列は、ゲノムにおける固有の配列固有の配列（ユニークな配列、別の言葉では、他に類似する配列が存在しない特有の配列）を含み、したがって、後述するドナー用ＤＮＡを用いた相同組換えによるゲノム改変における上流ホモロジーアーム（例えば、テロメア側ホモロジーアーム）および下流ホモロジーアーム（例えば、セントロメア側ホモロジーアーム）の標的し、上記固有の配列（ユニークな配列）に対して選択的に結合して狙ったとおりにゲノム改変を達成できるためである。前記欠失は、約３６０ｋｂの欠失であるが、このような巨大欠失を効率よく生じさせる手法として、下記方法を好ましく用いることができる。

[0085]　ある態様では、前記欠失、特に上記（ｉｉｉ）に規定される領域の欠失は、ＨＬＡ－ＤＲＡ、ＨＬＡ－ＤＲＢ５、およびＨＬＡ－ＤＲＢ１を含む一連の領域（例えば、ｈｇ３８ゲノム配列のｃｈｒ６：３２，４４５，０００－３２，８１６，９５１、好ましくはｃｈｒ６：３２，４３９，９５１－３２，８１７，００２の染色体領域に対応する染色体領域）の一部または好ましくは全部の欠失である。ある態様では、前記欠失、特に上記（ｉｉｉ）に規定される領域の欠失は、ｃｈｒ６：３２，４１６，０００～３３，４４５，０００、例えば、ｃｈｒ６：３２，４２０，０００～３３，４４５，０００、例えば、ｃｈｒ６：３２，４２９，０００～３３，４４５，０００（例えば、Ｃｈｒ６：　３２，４４６，０００～３２，４４８，５００）の染色体領域中の特有の配列（第５の配列）中に一方の端を有し、ｃｈｒ６：３２，４３９，９５１－３２，８３１，０００（例えば、Ｃｈｒ６：　３２，８２０，５００～３２，８２２，５００）の染色体領域中の特有の配列（第６の配列）中に他方の端を有する領域の欠失である。第５の配列および第６の配

列は、ゲノムにおける固有の配列固有の配列（ユニークな配列、別の言葉では、他に類似する配列が存在しない特有の配列）を含み、したがって、後述するドナー用ＤＮＡを用いた相同組換えによるゲノム改変における上流ホモロジーアーム（例えば、テロメア側ホモロジーアーム）および下流ホモロジーアーム（例えば、セントロメア側ホモロジーアーム）の標的し、上記固有の配列（ユニークな配列）に対して選択的に結合して狙ったとおりにゲノム改変を達成できるためである。前記欠失は、約３８０ｋｂの欠失であるが、このような巨大欠失を効率よく生じさせる手法として、下記方法を好ましく用いることができる。

[0086] ある態様では、前記欠失、特に上記（ｉｖ）に規定される領域の欠失は、ＨＬＡ－ＤＯＡ、ＨＬＡ－ＤＰＡ１、およびＨＬＡ－ＤＰＢ１を含む一連の領域（例えば、ｈｇ３８ゲノム配列のｃｈｒ６：３３，００６，８３８－３３，０８６，２３８、好ましくは、ｃｈｒ６：３３，００６，８３８－３３，１３１，１９９の染色体領域に対応する染色体領域）の一部または全部の欠失であり得る。ある態様では、前記欠失、特に上記（ｉｖ）に規定される領域の欠失は、ｃｈｒ６：３２，９２４，０００～３３，００６，８３８（例えば、Ｃｈｒ６： ３２，９９９，５００～３３，００２，５００）の染色体領域中の特有の配列（第７の配列）中に一方の端を有し、ｃｈｒ６：３３，０８６，２３８－３３，１６５，０００（例えば、Ｃｈｒ６： ３３，１４７，５００～３３，１５０，５００）の染色体領域中の特有の配列（第８の配列）中に他方の端を有する領域の欠失である。第７の配列および第８の配列は、ゲノムにおける固有の配列固有の配列（ユニークな配列、別の言葉では、他に類似する配列が存在しない特有の配列）を含み、したがって、後述するドナー用ＤＮＡを用いた相同組換えによるゲノム改変における上流ホモロジーアーム（例えば、テロメア側ホモロジーアーム）および下流ホモロジーアーム（例えば、セントロメア側ホモロジーアーム）の標的し、上記固有の配列（ユニークな配列）に対して選択的に結合して狙ったとおりにゲノム改変を達成できるためである。前記欠失は、約１５０ｋｂの欠失であ

るが、このような巨大欠失を効率よく生じさせる手法として、下記方法を好ましく用いることができる。

[0087] ある態様では、前記欠失を有する細胞は、欠失を有するゲノムＤＮＡを含み、前記欠失は、以下（ｉ）～（ｉｖ）に規定される染色体領域：

（ｉ） ＨＬＡ－Ｆ、ＨＬＡ－Ｇ、およびＨＬＡ－Ａを含む一連の領域（例えば、ｈｇ３８ゲノム配列のｃｈｒ６：２９，７２３，４６４－２９，９４５，４５５、好ましくはｃｈｒ６：２９，７２３，４６４－３０，０１０，６１８に対応する染色体領域）、

（ｉｉ） ＨＬＡ－ＣおよびＨＬＡ－Ｂを含む一連の領域（例えば、ｈｇ３８ゲノム配列のｃｈｒ６：３１，２６９，１６９－３１，３５７，１５８、好ましくはｃｈｒ６：３１，２６９，１６９－３１，４６３，３３８の染色体領域に対応する染色体領域）、

（ｉｉｉ） ＨＬＡ－ＤＲＡ、ＨＬＡ－ＤＲＢ５、およびＨＬＡ－ＤＲＢ１を含む一連の領域（例えば、ｈｇ３８ゲノム配列のｃｈｒ６：３２，４４５，０００－３２，８１６，９５１、好ましくはｃｈｒ６：３２，４３９，９５１－３２，８１７，００２の染色体領域に対応する染色体領域）、および

（ｉｖ） ＨＬＡ－ＤＯＡ、ＨＬＡ－ＤＰＡ１、およびＨＬＡ－ＤＰＢ１を含む一連の領域（例えば、ｈｇ３８ゲノム配列のｃｈｒ６：３３，００６，８３８－３３，０８６，２３８、好ましくは、ｃｈｒ６：３３，００６，８３８－３３，１３１，１９９の染色体領域に対応する染色体領域）

からなる群から選択される全ての染色体領域中にそれぞれ位置するＨＬＡ類似配列集積領域の一部もしくは全体を含む領域の欠失であり、

前記ＨＬＡ類似配列集積領域は、前記染色体領域中にそれぞれ含まれるＨＬＡコードする遺伝子およびＨＬＡ類似配列の全てを含み、

前記一部は少なくとも一つながりの領域を含み、前記一つながりの領域は、上記領域にそれぞれ含まれるＨＬＡコードする遺伝子およびＨＬＡ類似配列からなる群から選択される遺伝子の５０％以上、６０％以上、７０％以上

、８０％以上、９０％以上、または１００％の遺伝子を含む。

[0088] ある態様では、前記欠失を有する細胞は、欠失を有するゲノムＤＮＡを含み、前記欠失は、以下（ｉ）～（ｉｖ）に規定される染色体領域：

（ｉ） ＨＬＡ－Ｆ、ＨＬＡ－Ｇ、およびＨＬＡ－Ａを含む一連の領域（例えば、ｈｇ３８ゲノム配列のｃｈｒ６：２９，７２３，４６４－２９，９４５，４５５、好ましくはｃｈｒ６：２９，７２３，４６４－３０，０１０，６１８に対応する染色体領域）、

（ｉｉ） ＨＬＡ－ＣおよびＨＬＡ－Ｂを含む一連の領域（例えば、ｈｇ３８ゲノム配列のｃｈｒ６：３１，２６９，１６９－３１，３５７，１５８、好ましくはｃｈｒ６：３１，２６９，１６９－３１，４６３，３３８の染色体領域に対応する染色体領域）、

（ｉｉｉ） ＨＬＡ－ＤＲＡ、ＨＬＡ－ＤＲＢ５、およびＨＬＡ－ＤＲＢ１を含む一連の領域（例えば、ｈｇ３８ゲノム配列のｃｈｒ６：３２，４４５，０００－３２，８１６，９５１、好ましくはｃｈｒ６：３２，４３９，９５１－３２，８１７，００２の染色体領域に対応する染色体領域）、および

（ｉｖ） ＨＬＡ－ＤＯＡ、ＨＬＡ－ＤＰＡ１、およびＨＬＡ－ＤＰＢ１を含む一連の領域（例えば、ｈｇ３８ゲノム配列のｃｈｒ６：３３，００６，８３８－３３，０８６，２３８、好ましくは、ｃｈｒ６：３３，００６，８３８－３３，１３１，１９９の染色体領域に対応する染色体領域）

からなる群から選択される全ての染色体領域の欠失であり、

好ましくは、ＨＬＡ－Ｅを含む一連の領域の更なる欠失、並びにＨＬＡ－ＤＭＢを含む一連の領域、ＭＩＣＡおよびＭＩＣＢを含む一連の領域、およびＨＬＡ－ＤＭＡを含む一連の領域の更なる欠失をさらに有する。

[0089] ある態様では、上記（ｉ）が欠失を有する場合、欠失を有する上記（ｉ）は、その染色体領域内に繰り返し配列を有しない。ある態様では、上記（ｉｉ）が欠失を有する場合、欠失を有する上記（ｉｉ）は、その染色体領域内に繰り返し配列を有しない。ある態様では、上記（ｉｉｉ）が欠失を有する

場合、欠失を有する上記（ｉｉｉ）は、その染色体領域内に繰り返し配列を有しない。ある態様では、上記（ｉｖ）が欠失を有する場合、欠失を有する上記（ｉｖ）は、その染色体領域内に繰り返し配列を有しない。繰り返し配列は、例えば、シークエンシングを困難にする一つながりの配列である。繰り返し配列は、例えば、ドナー用ＤＮＡのホモロジーアームに対してオフターゲットを誘発する一つながりの配列である。繰り返し配列は、例えば、０．５ｋｂ～２ｋｂの配列の繰り返しを含む。

[0090] ある態様では、前記欠失を有するヒト細胞は、機能的なβ２ミクログロブリン（Ｂ２Ｍ）をコードする遺伝子を有する。ある態様では、前記欠失を有するヒト細胞は、機能的なクラスＩＩ腫瘍組織適合遺伝子複合体トランスアクチベーター（ＣＩＩＴＡ）をコードする遺伝子を有する。ある態様では、前記欠失を有するヒト細胞は、機能的なＢ２Ｍをコードする遺伝子および機能的なＣＩＩＴＡをコードする遺伝子を有する。これによりＢ２ＭおよびＣＩＩＴＡが欠失したことにより、細胞に生じ得る不測の機能改変を防ぐことができる。にも関わらず、ある態様では、前記欠失を有するヒト細胞は、ＨＬＡクラスＩおよび／またはＨＬＡクラスＩＩを細胞表面に実質的に発現していない。

[0091] ある態様では、前記欠失は、１００ｋｂ以上、１５０ｋｂ以上、２００ｋｂ以上、２５０ｋｂ以上、３００ｋｂ以上、３５０ｋｂ以上、または４００ｋｂ以上の大きさであり得る。ある態様では、前記欠失は、４００ｋｂ以下、３５０ｋｂ以下、３００ｋｂ以下、２５０ｋｂ以下、２００ｋｂ以下、１５０ｋｂ以下、または１００ｋｂ以下の大きさであり得る。ある態様では、前記欠失は、１００ｋｂ～４００ｋｂの大きさであり得る。

[0092] ある態様では、細胞は、完成体細胞であり得るが、更なる改変導入のための前駆体細胞であってもよい。

[0093] 以下、細胞例１～４として、それ自身が有用な細胞として用いられ得るが、更なる改変導入のための前駆体細胞としても有用な細胞の例を挙げる。細胞例１～４では、ＨＬＡ類似配列集積領域の少なくとも１つが欠失している

ために、ゲノムの配列解読または遺伝子のターゲティングが繰り返し配列の存在により妨げられる問題を解消し得る。これにより、改変が容易になると共に、改変後の配列解読が容易になることで、より確かな遺伝子工学の適用を可能とする。

[0094] 細胞例１

ある態様では、細胞は、上記（ｉ）において欠失を有する。ある好ましい態様では、欠失は、ＨＬＡ類似配列集積領域の全体の欠失であり得る。ある態様では、上記（ｉ）における欠失は、１以上の所望の遺伝子またはその挿入を含むＤＮＡにより置き換えられることによる欠失であり得る。ある態様では、所望の遺伝子は、選択マーカー遺伝子であり得る。選択マーカー遺伝子は、好ましくは、ポジティブ選択マーカー遺伝子を含み、より好ましくは、ポジティブ選択マーカー遺伝子およびネガティブ選択マーカー遺伝子の両方を含むか、またはポジティブ選択用およびネガティブ選択用のいずれにも用い得るマーカー遺伝子を含む。ある態様では、細胞は、上記（ｉ）において欠失を有し、上記（ｉｉ）～（ｉｖ）においては欠失を有しない。細胞例１は、ＨＬＡ－ＡおよびＦを欠失しており、それ自体有用な細胞であるが、例えば、細胞例２～４を作製するために用いられ得る。

[0095] 細胞例２

ある態様では、細胞は、上記（ｉ）において欠失を有し、かつ、制御配列に作動可能に連結された所望の遺伝子またはその挿入を有する。ある好ましい態様では、上記（ｉ）における欠失は、ＨＬＡ類似配列集積領域の全体を含む欠失である。ある態様では、上記（ｉ）における欠失は、１以上の所望の遺伝子またはその挿入を含むＤＮＡにより置き換えられることによる欠失であり得る。ある対象では、所望の遺伝子は、当該欠失を有する細胞に対する免疫を抑制する分子であり得、例えば、免疫抑制性分子をコードする遺伝子であり得る。ある態様では、欠失を有する領域は、選択マーカー遺伝子を含む。選択マーカー遺伝子は、好ましくは、ポジティブ選択マーカー遺伝子を含み、より好ましくは、ポジティブ選択マーカー遺伝子およびネガティブ

選択マーカー遺伝子の両方を含むか、またはポジティブ選択用およびネガティブ選択用のいずれにも用い得るマーカー遺伝子を含む。ある態様では、欠失を有する細胞は、上記（ｉ）以外の領域に所望の遺伝子を有する。細胞例２は、それ自体有用な細胞であるが、例えば、細胞例３～４を作製するために用いられ得る。

[0096] 細胞例３

ある態様では、細胞は、上記（ｉ）、ならびに上記（ｉｉｉ）および／または上記（ｉｖ）において欠失を有し、かつ、制御配列に作動可能に連結された所望の遺伝子またはその挿入を有する。ある好ましい態様では、細胞は、上記（ｉ）、上記（ｉｉｉ）および上記（ｉｖ）において欠失を有し、かつ、制御配列に作動可能に連結された所望の遺伝子またはその挿入を有する。ある好ましい態様では、上記（ｉ）、上記（ｉｉｉ）および上記（ｉｖ）における欠失はそれぞれ、その領域内のＨＬＡ類似配列集積領域の全体を含む欠失である。ある態様では、上記（ｉ）における欠失は、１以上の所望の遺伝子またはその挿入を含むＤＮＡにより置き換えられることによる欠失であり得る。ある対象では、所望の遺伝子は、当該欠失を有する細胞に対する免疫を抑制する分子であり得、例えば、免疫抑制性分子をコードする遺伝子であり得る。ある態様では、細胞は、上記（ｉ）、ならびに上記（ｉｉｉ）および／または上記（ｉｖ）において欠失を有し、欠失した領域のいずれか１以上または全ては、選択マーカー遺伝子を含む。選択マーカー遺伝子は、好ましくは、ポジティブ選択マーカー遺伝子を含み、より好ましくは、ポジティブ選択マーカー遺伝子およびネガティブ選択マーカー遺伝子の両方を含むか、またはポジティブ選択用およびネガティブ選択用のいずれにも用い得るマーカー遺伝子を含む。ある好ましい態様では、上記（ｉ）、上記（ｉｉｉ）および上記（ｉｖ）のいずれも、マーカー遺伝子または新しい遺伝子などの所望の遺伝子の挿入を有しない。ある態様では、細胞は、上記（ｉｉ）においては欠失を有しない。細胞例３は、それ自体有用な細胞であるが、例えば、細胞例４を作製するために用いられ得る。

[0097] 細胞例４

ある態様では、細胞は、上記（ｉ）～上記（ｉｖ）のすべてにおいて欠失を有し、かつ、制御配列に作動可能に連結された所望の遺伝子またはその挿入を有する。ある好ましい態様では、上記（ｉ）における欠失は、１以上の所望の遺伝子またはその挿入を含むＤＮＡにより置き換えられることによる欠失であり得る。ある対象では、所望の遺伝子は、当該欠失を有する細胞に対する免疫を抑制する分子であり得、例えば、免疫抑制性分子をコードする遺伝子であり得る。ある好ましい態様では、上記（ｉｉ）における欠失は、１以上の所望の遺伝子を含むＤＮＡにより置き換えられることによる欠失であり得る。ある好ましい態様では、所望の遺伝子は、選択マーカー遺伝子であり得る。選択マーカー遺伝子は、好ましくは、ポジティブ選択マーカー遺伝子を含み、より好ましくは、ポジティブ選択マーカー遺伝子およびネガティブ選択マーカー遺伝子の両方を含むか、またはポジティブ選択用およびネガティブ選択用のいずれにも用い得るマーカー遺伝子を含む。ある好ましい態様では、上記（ｉｉｉ）および上記（ｉｖ）のいずれも、マーカー遺伝子または新しい遺伝子などの所望の遺伝子の挿入を有しない。細胞例４は、それ自体有用な細胞であるが、例えば、上記（ｉｉ）における１以上の所望の遺伝子またはその挿入を含むＤＮＡ部分を更に他のＤＮＡに置き換えることに用いられ得る。例えば、これにより、マーカー遺伝子を除去したり、マーカー遺伝子を除去した上で別の所望の遺伝子を導入することができる。ゲノム解析からは、上記（ｉｉ）の領域は、転写活性化された領域であり、所望の遺伝子を導入することによって、当該所望の遺伝子を良好に発現させることができると期待できる。ある好ましい態様では、所望の遺伝子は、上記（ｉｉ）の領域に挿入され、当該遺伝子のセントロメア側およびテロメア側のいずれかまたは両方にインシュレーターが存在しない。

[0098] ある態様では、前記欠失を有する細胞は、少なくともＨＬＡ－Ａを有しない。ある態様では、前記欠失を有する細胞は、少なくともＨＬＡ－ＡおよびＦを有しない。一方で、前記欠失を有する細胞は、ＨＬＡ－Ｂ、Ｃ、Ｅ、Ｇ

、Ｈ、Ｊ、およびＷ；ＭＩＣＡおよびＭＩＣＢ；並びにＨＬＡ－ＤＲＡ、ＤＲＢ１、ＤＲＢ５、ＤＲＢ６、ＤＲＢ９、ＤＱＡ１、ＤＱＡ２、ＤＱＢ１、ＤＰＡ１、ＤＰＢ１、ＤＭＢ、ＤＯＡ、およびＤＯＢからなる群から選択される１以上または全てを有していてもよい。

[0099] 以上が細胞例１～４の説明である。このように、ＨＬＡ欠失を有する細胞において、ＨＬＡ領域は、マーカー遺伝子に置き換わっていてもよいし、所望の遺伝子（目的遺伝子）に置き換わっていてもよい。マーカー遺伝子および目的遺伝子は、制御配列に作動可能に連結している。

[0100] 全ての態様において、前記欠失を有する細胞では、欠失は２つのアレルにおいて生じており、これにより、欠失させた遺伝子の発現が欠失している。

[0101] ある態様では、前記欠失を有する細胞は、単離された細胞または細胞株であり得る。

[0102] ある態様では、前記欠失を有する細胞は、Ｔ細胞ナチュラルキラー細胞（ＮＫ細胞）による細胞傷害作用を回避し得る。ある態様では、前記欠失を有する細胞は、同種異系の個体に投与されても、当該細胞に対する免疫拒絶を誘発しないことができる。これにより、例えば、造血幹細胞移植、臓器移植、細胞移植、または組織移植に好ましく用い得る細胞が提供されるのである。

[0103] ある態様では、前記欠失を有する細胞は、細胞凍結保護液中で凍結されうる。ある態様では、前記欠失を有する細胞を含む細胞凍結保護液は、非凍結状態または好ましくは凍結状態で提供され得る。凍結状態の前記欠失を有する細胞を含む細胞凍結保護液（「フリーズストック」ともいう）は、リサーチセルバンク（ＲＣＢ）、マスターセルバンク（ＭＣＢ）、またはワーキングセルバンク（ＷＣＢ）として用いることができる。したがって、本発明では、上記フリーズストックを含む、リサーチセルバンク（ＲＣＢ）、マスターセルバンク（ＭＣＢ）、またはワーキングセルバンク（ＷＣＢ）が提供される。前記欠失を有するゲノムＤＮＡは、全ゲノムシークエンスがなされ得る。また、ある態様では、前記全ゲノムシークエンスからリファレンスゲノ

ムデータが作成される。上記において（ｉ）～（ｉｖ）における繰り返し配列が除去されている場合には、このリファレンスゲノムデータの作成は、より容易になる。前記欠失を有するゲノムＤＮＡを有する細胞をさらにゲノム改変した後には、当該リファレンスゲノムに基づいて改変部位の改変状況を確認することができる。これにより、前記欠失を有する細胞は、さらなるゲノム改変を容易にし、または確実にし、かつ、得られた改変ゲノムの配列を容易に確定し得ることとなる。

[0104] 前記細胞としては、例えば、多能性細胞（例えば、胚性幹細胞（ＥＳ細胞）および誘導多能性幹細胞（ｉＰＳ細胞）などの多能性幹細胞）、造血幹細胞、造血前駆細胞、骨髄細胞、脾臓細胞、骨髄系共通前駆細胞、免疫細胞（例えば、Ｔ細胞、Ｂ細胞、ＮＫ細胞、ＮＫＴ細胞、マクロファージ、単球、好中球、好酸球、好塩基球）、赤血球、巨核球、心臓細胞、心筋細胞、心臓線維芽細胞、膵β細胞、角膜細胞（例えば、角膜上皮細胞、および角膜内皮細胞）、表皮細胞、真皮細胞、脂肪細胞、軟骨細胞、骨細胞、破骨細胞、骨芽細胞、間葉系幹細胞（例えば、脂肪由来、骨髄由来、胎盤由来および臍帯由来）、歯髄細胞、腱細胞、靭帯細胞、神経細胞（例えば、錐体細胞、星状細胞、および顆粒細胞）、グリア細胞、プルキンエ細胞、網膜神経節細胞、網膜細胞、視神経細胞、および神経幹細胞が挙げられる。ある好ましい態様では、細胞は初代細胞であり得る。ある好ましい態様では、細胞は不死化された細胞、または細胞株であり得る。

[0105] 前記欠失を有する細胞は、オルガノイドなどの細胞集塊を形成していてもよい。前記欠失を有する細胞は、細胞シートを形成していてもよい。前記欠失を有する細胞は、臓器もしくは組織の全体または部分構造を形成していてもよい。

[0106] ある態様では、前記欠失を有する細胞を含む組成物（例えば、医薬組成物、または細胞製剤）が提供される。前記組成物は、医療用途に用いられ得る。前記組成物は、細胞に加えて、薬学的に許容可能な担体および／または添加剤をさらに含んでいてもよい。薬学的に許容可能な担体としては、例えば

、水、および生理食塩水が挙げられる。薬学的に許容可能な添加剤としては、例えば、塩、ｐＨ緩衝剤、および等張剤が挙げられる。前記組成物は、好ましい態様では、血清フリーであり得る。

[0107] 以下に記載する方法（例えば、ＵＫｉＳ；国際公開第２０２１／２０６０５４号参照）は、染色体ゲノムの２つ以上のアレルに同時に同じ改変を効率よく導入する方法として有益であり、例えば、標的となる染色体領域に配列特異的様式で１００ｋｂ～５００ｋｂ程度の大きさの欠失を作製することに適しており、上記細胞の作製に好ましく用いることができる。この方法は、１倍体の細胞の改変に対しても適用することができる。この方法はまた、ゲノムＤＮＡ上で、ＨＬＡ遺伝子領域のアレルが１つのみである細胞に対しても適用することができる。

[0108] １実施態様において、本発明は、染色体ゲノムの２つ以上のアレルが改変された細胞を作製する方法であって、

（ａ）下記（ｉ）及び（ｉｉ）を、２つ以上のアレルを含む細胞に導入して、前記２つ以上のアレルそれぞれに選択マーカー遺伝子を導入する工程と、

（ｉ）前記染色体ゲノムの２つ以上のアレル中の標的領域を標的とし、当該標的領域を切断することができる配列特異的核酸切断分子、又は前記配列特異的核酸切断分子をコードするポリヌクレオチドを含むゲノム改変システム、

（ｉｉ）２種以上の選択マーカー用ドナーＤＮＡであって、それぞれが前記標的領域の上流側の塩基配列と相同組換え可能な塩基配列を有する上流ホモロジーアームと、前記標的領域の下流側の塩基配列と相同組換え可能な塩基配列を有する下流ホモロジーアームとを有し、かつ、上流ホモロジーアームと下流ホモロジーアームの間に、選択マーカー遺伝子の塩基配列を含み、前記２種以上の選択マーカー用ドナーＤＮＡは、相互に区別可能に異なる選択マーカー遺伝子をそれぞれ有し、前記選択マーカー遺伝子は、選択マーカー用ドナーＤＮＡの種類毎に固有であり、前記選択マーカー用ドナーＤＮＡの種類数は、ゲノム改変の対象とする前記アレルの数と同数以上である、２種

以上の選択マーカー用ドナーＤＮＡ、

（ｂ）前記工程（ａ）の後、前記２以上のアレルに対して異なる種類の選択マーカー用ドナーＤＮＡがそれぞれ相同組み換えすることによって、当該２以上のアレルにそれぞれ区別可能に異なる固有の選択マーカー遺伝子が導入され、導入された当該区別可能に異なる選択マーカー遺伝子のすべてを発現する細胞を選択する工程（ポジティブ選択のための工程）と、

を含む、方法であり得る。

[0109]（工程（ａ））

工程（ａ）では、前記（ｉ）及び（ｉｉ）を、染色体を含む細胞に導入する。

[0110] 本実施形態のゲノム改変方法に用いる細胞は、特に限定されず、１倍体または２倍体以上の染色体ゲノムを有する細胞であればよい。細胞は、２倍体であってもよく、３倍体であってもよく、４倍体以上であってもよい。細胞としては、特に限定されないが、真核生物の細胞が挙げられる。細胞は、植物細胞であってもよく、動物細胞であってもよく、真菌細胞であってもよい。動物細胞は、特に限定されないが、ヒト、ヒト以外の哺乳動物（例えば、サルなどの非ヒト霊長類、イヌ、ネコ、ウシ、ウマ、ヒツジ、ヤギ、ラマ、齧歯類などの非ヒト哺乳類）、鳥類、爬虫類、両生類、魚類、その他の脊椎動物のいずれの細胞であってもよい。

[0111] ゲノム改変の対象となる標的領域は、１以上のアレルを有するゲノム上の任意の領域とすることができる。標的領域のサイズは、特に限定されない。本実施形態のゲノム改変方法では、従来よりも大きなサイズの領域を改変することができる。標的領域は、例えば、１０ｋｂｐ以上であってもよい。標的領域は、例えば、１００ｂｐ以上、２００ｂｐ以上、４００ｂｐ以上、８００ｂｐ以上、１ｋｂｐ以上、２ｋｂｐ以上、３ｋｂｐ以上、４ｋｂｐ以上、５ｋｂｐ以上、８ｋｂｐ以上、１０ｋｂｐ以上、２０ｋｂｐ以上、４０ｋｂｐ以上、８０ｋｂｐ以上、１００ｋｂｐ以上、２００ｋｂｐ以上、３００ｋｂｐ、４００ｋｂｐ以上、５００ｋｂｐ以上、６００ｋｂｐ以上、７００

ｋｂｐ以上、８００ｋｂｐ以上、９００ｋｂｐ以上、もしくは１Ｍｂｐ以上、または上記のいずれかの数値以下であってもよい。ある態様では、改変された細胞において、上記標的領域が欠失している。

[0112] ＜（ｉ）ゲノム改変システム＞

「ゲノム改変システム」とは、所望の標的領域を改変することが可能な分子機構を意味する。ゲノム改変システムは、染色体ゲノムの標的領域を標的とする配列特異的核酸切断分子、又は前記配列特異的核酸切断分子をコードするポリヌクレオチドを含む。

[0113] 配列特異的核酸切断分子は、配列特異的核酸切断活性を有する分子であれば、特に限定されず、合成有機化合物であってもよく、タンパク質等の生体高分子化合物であってもよい。配列特異的核酸切断活性を有する合成有機化合物としては、例えば、ピロール・イミダゾールポリアミド等が挙げられる。配列特異的部位切断活性を有するタンパク質としては、例えば、配列特異的エンドヌクレアーゼが挙げられる。

[0114] 配列特異的エンドヌクレアーゼは、所定の配列で核酸を切断することができる酵素である。配列特異的エンドヌクレアーゼは、所定の配列で、２本鎖ＤＮＡを切断することができる。配列特異的エンドヌクレアーゼとしては、特に限定されないが、例えば、ジンクフィンガーヌクレアーゼ（Ｚｉｎｃ ｆｉｎｇｅｒ ｎｕｃｌｅａｓｅ（ＺＦＮ））、ＴＡＬＥＮ（Ｔｒａｎｓｃｒｉｐｔｉｏｎ ａｃｔｉｖａｔｏｒ－ｌｉｋｅ ｅｆｆｅｃｔｏｒ ｎｕｃｌｅａｓｅ）、Ｃａｓタンパク質等が挙げられるが、これらに限定されない。

[0115] ＺＦＮは、ジンクフィンガーアレイを含む結合ドメインにコンジュゲートした核酸切断ドメインを含む人工ヌクレアーゼである。切断ドメインとしては、ＩＩ型制限酵素ＦｏｋＩの切断ドメインが挙げられる。標的配列を切断可能なジンクフィンガーヌクレアーゼの設計は、公知の方法で行うことができる。

[0116] ＴＡＬＥＮは、ＤＮＡ切断ドメイン（例えば、ＦｏｋＩドメイン）に加え

て転写活性化因子様（ＴＡＬ）エフェクターのＤＮＡ結合ドメインを含む人工ヌクレアーゼである。標的配列を切断可能なＴＡＬＥ構築物の設計は、公知の方法で行うことができる（例えば、Ｚｈａｎｇ，　Ｆｅｎｇ　ｅｔ．ａｌ．　（２０１１）　Ｎａｔｕｒｅ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ　２９（２））。

[0117] 配列特異的核酸切断分子として、Ｃａｓタンパク質を用いる場合、ゲノム改変システムは、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓシステムを含む。すなわち、ゲノム改変システムは、Ｃａｓタンパク質と、標的領域内の塩基配列に相同な塩基配列を有するガイドＲＮＡを含むことが好ましい。ガイドＲＮＡは、スペーサー配列として、標的領域内の配列（標的配列）と相同な配列を含んでいればよい。ガイドＲＮＡは、標的領域内のＤＮＡに結合できるものでればよく、標的配列と完全に同一の配列を有している必要はない。この結合は、細胞核内の生理的条件下で形成されればよい。ガイドＲＮＡは、例えば、標的配列に対して、例えば、０～３塩基のミスマッチを含むことができる。前記ミスマッチの数は、０～２塩基が好ましく、０～１がより好ましく、ミスマッチを有しないことがさらに好ましい。ガイドＲＮＡの設計は、公知の方法に基づいて行うことができる。ゲノム改変システムは、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓシステムであることが好ましく、Ｃａｓタンパク質とガイドＲＮＡを含むことが好ましい。Ｃａｓタンパク質は、Ｃａｓ９タンパク質であることが好ましい。

[0118] 配列特異的エンドヌクレアーゼは、タンパク質として細胞に導入してもよく、配列特異的エンドヌクレアーゼをコードするポリヌクレオチドとして細胞に導入してもよい。例えば、配列特異的エンドヌクレアーゼのｍＲＮＡを導入してもよく、配列特異的エンドヌクレアーゼの発現ベクターを導入してもよい。発現ベクターにおいて、配列特異的エンドヌクレアーゼのコード配列（配列特異的エンドヌクレアーゼ遺伝子）は、プロモーターに機能的に連結されている。プロモーターは、特に限定されず、例えば、ｐｏｌ　ＩＩ系プロモーターを各種使用することができる。ｐｏｌ　ＩＩ系プロモーターと

しては、特に制限されないが、例えばＣＭＶプロモーター、ＥＦ１プロモーター（ＥＦ１αプロモーター）、ＳＶ４０プロモーター、ＭＳＣＶプロモーター、ｈＴＥＲＴプロモーター、βアクチンプロモーター、ＣＡＧプロモーター、ＣＢｈプロモーター等が挙げられる。

[0119] プロモーターは、誘導性プロモーターであってもよい。誘導性プロモーターは、プロモーターを駆動する誘導因子の存在下でのみ、当該プロモーターに機能的に連結されたポリヌクレオチドの発現を誘導することができるプロモーターである。誘導性プロモーターとしては、ヒートショックプロモーターなどの加熱により遺伝子発現を誘導するプロモーターが挙げられる。また、誘導性プロモーターには、プロモーターを駆動する誘導因子が薬剤であるプロモーターが挙げられる。このような薬剤誘導性プロモーターとしては、例えば、Ｃｕｍａｔｅオペレーター配列、λオペレーター配列（例えば、１２×λＯｐ）、テトラサイクリン系誘導性プロモーター等が挙げられる。テトラサイクリン系誘導性プロモーターとしては、例えば、テトラサイクリンもしくはその誘導体（例えば、ドキシサイクリン）、またはリバーステトラサイクリン制御性トランス活性化因子（ｒｔＴＡ）の存在下で遺伝子発現を駆動するプロモーターが挙げられる。テトラサイクリン系誘導性プロモーターとしては、例えば、ＴＲＥ３Ｇプロモーターが挙げられる。

[0120] 発現ベクターは、公知のものを特に制限なく用いることができる。発現ベクターとしては、例えば、プラスミドベクター、ウイルスベクターが挙げられる。配列特異的エンドヌクレアーゼがＣａｓタンパク質である場合、発現ベクターは、Ｃａｓタンパク質のコード配列（Ｃａｓタンパク質遺伝子）に加えて、ガイドＲＮＡコード配列（ガイドＲＮＡ遺伝子）及びを含んでいてもよい。この場合、ガイドＲＮＡコード配列（ガイドＲＮＡ遺伝子）は、ｐｏｌ　ＩＩＩ系プロモーターに機能的にされていることが好ましい。ｐｏｌ　ＩＩＩ系プロモーターとしては、例えば、マウス及びヒトのＵ６－ｓｎＲＮＡプロモーター、ヒトＨ１－ＲＮａｓｅ　Ｐ　ＲＮＡプロモーター、ヒトバリン－ｔＲＮＡプロモーター等が挙げられる。

[0121] ＜（ｉｉ）選択マーカー用ドナーＤＮＡ＞

選択マーカー用ドナーＤＮＡは、選択マーカーを標的領域にノックインするためのドナーＤＮＡである。選択マーカー用ドナーＤＮＡは、標的領域の上流側に隣接する塩基配列と相同な塩基配列を有する上流ホモロジーアームと、標的領域の下流側に隣接する塩基配列と相同な塩基配列を有する下流ホモロジーアームとの間に、１以上の選択マーカー遺伝子の塩基配列を含む。

[0122] 選択マーカー用ドナーＤＮＡは、特に限定されないが、例えば、１ｋｂ以上、２ｋｂ以上、３ｋｂ以上、４ｋｂ以上、５ｋｂ以上、６ｋｂ以上、７ｋｂ以上、８ｋｂ以上、９ｋｂ以上、９．５ｋｂ以上、または１０ｋｂ以上の長さを有し得る。選択マーカー用ドナーＤＮＡは、特に限定されないが、例えば、５０ｋｂ以下、４５ｋｂ以下、４０ｋｂ以下、３５ｋｂ以下、３０ｋｂ以下、２５ｋｂ以下、２０ｋｂ以下、１５ｋｂ以下、１４ｋｂ以下、１３ｋｂ以下、１２ｋｂ以下、１１ｋｂ以下、１０ｋｂ以下、９ｋｂ以下、８ｋｂ以下、７ｋｂ以下、６ｋｂ以下、５ｋｂ以下、または４ｋｂ以下の長さを有し得る。

[0123] 「選択マーカー」とは、その発現の有無に基づいて、細胞を選択することができるタンパク質を意味する。選択マーカー遺伝子は、選択マーカーをコードする遺伝子である。選択マーカー発現細胞及び非発現細胞が混在する細胞集団において、選択マーカー発現細胞を選択する場合、当該選択マーカーを「ポジティブ選択マーカー」または「ポジティブ選択用の選択マーカー」という。選択マーカー発現細胞及び非発現細胞が混在する細胞集団において、選択マーカー非発現細胞を選択する場合、当該選択マーカーを「ネガティブ選択マーカー」または「ネガティブ選択用の選択マーカー」という。選択マーカーが相互に異なるとは、相互に区別できること（例えば、区別可能に異なること）を意味し、例えば、選択マーカーが導入された細胞に付与する薬剤耐性の性質などの生理学的性質またはその他の物理化学的性質において少なくとも相互に区別できることを意味する。すなわち、選択マーカーが相互に異なるとは、異なる複数の選択マーカーが他の選択マーカーと区別可能

に検出できること、または他の選択マーカーとは区別可能に薬剤選択できることを意味する。また、前記選択マーカー遺伝子が選択マーカー用ドナーＤＮＡの種類毎に固有であるとは、選択マーカー用ドナーＤＮＡの１種が有する選択マーカー遺伝子が、上記以外の種類の選択マーカー用ドナーＤＮＡには含まれないこと、または、複数種類のドナーＤＮＡに含まれている場合には、同時に２種類以上のドナーＤＮＡから発現しないように構成されていることを意味する。このとき、２種類以上のドナーＤＮＡは、選択マーカー以外は同一であってもよく、選択マーカー以外の配列および／または構成において相違があってもよい。

[0124] ポジティブ選択マーカーは、それを発現する細胞を選択可能なものであれば、特に限定されない。ポジティブ選択マーカー遺伝子としては、例えば、薬剤耐性遺伝子、蛍光タンパク質遺伝子、発光酵素遺伝子、発色酵素遺伝子等が挙げられる。

[0125] ネガティブ選択マーカーは、それを発現しない細胞を選択可能なものであれば、特に限定されない。ネガティブ選択マーカー遺伝子としては、例えば、自殺遺伝子（チミジンカイネース等）、蛍光タンパク質遺伝子、発光酵素遺伝子、発色酵素遺伝子等が挙げられる。ネガティブ選択マーカー遺伝子が、細胞の生存に負の影響を与える遺伝子（例えば、自殺遺伝子）である場合、当該ネガティブ選択マーカー遺伝子は、誘導性プロモーターに機能的に連結され得る。誘導性プロモーターに機能的に連結することで、ネガティブ選択マーカー遺伝子を有する細胞を除去したいときにのみ、ネガティブ選択マーカー遺伝子を発現させることができる。ネガティブ選択マーカー遺伝子が、蛍光、発光、および発色等の光学的に検出可能なマーカー遺伝子（可視化マーカー遺伝子；ｖｉｓｉｂｌｅ　ｍａｒｋｅｒ　ｇｅｎｅ）である場合など、細胞の生存に負の影響が少ない場合には、恒常的に発現させてもよい。

[0126] 薬剤耐性遺伝子としては、例えば、ピューロマイシン耐性遺伝子、ブラスティサイディン耐性遺伝子、ジェネティシン耐性遺伝子、ネオマイシン耐性遺伝子、テトラサイクリン耐性遺伝子、カナマイシン耐性遺伝子、ゼオシン

耐性遺伝子、ハイグロマイシン耐性遺伝子、クロラムフェニコール耐性遺伝子等が挙げられるが、これらに限定されない。

蛍光タンパク質遺伝子としては、例えば、緑色蛍光タンパク質（ＧＦＰ）遺伝子、黄色蛍光タンパク質（ＹＦＰ）遺伝子、赤色蛍光タンパク質（ＲＦＰ）遺伝子等が挙げられるが、これらに限定されない。

発光酵素遺伝子としては、例えば、ルシフェラーゼ遺伝子などが挙げられるが、これらに限定されない。

発色酵素遺伝子としては、例えば、βガラクトシターゼ遺伝子、βグルクロニダーゼ遺伝子、アルカリフォスファターゼ遺伝子等が挙げられるが、これらに限定されない。

自殺遺伝子としては、例えば、単純ヘルペスウイルスのチミジンキナーゼ（ＨＳＶ－ＴＫ）、誘導性カスパーゼ９（ｉｎｄｕｃｉｂｌｅ　ｃａｓｐａｓｅ　９）等が挙げられるが、これらに限定されない。

[0127] 選択マーカー用ドナーＤＮＡが有する選択マーカー遺伝子は、ポジティブ選択マーカー遺伝子であることが好ましい。すなわち、選択マーカーを発現する細胞を、選択マーカー遺伝子がノックインされた細胞として、選択することができる。

[0128] 上流ホモロジーアームは、改変対象のゲノムにおいて、標的領域の上流側の塩基配列と相同組換え可能な塩基配列を有し、例えば、標的配列の上流側に隣接する塩基配列と相同な塩基配列を有する。下流ホモロジーアームは、改変対象のゲノムにおいて、標的領域の上流側の塩基配列と相同組換え可能な塩基配列を有し、例えば、標的配列の下流側に隣接する塩基配列と相同な塩基配列を有する。上流ホモロジーアーム及び下流ホモロジーアームは、標的領域の周辺領域と相同組換可能であれば、その長さ及び配列は特に限定されない。上流ホモロジーアーム及び下流ホモロジーアームは、相同組換え可能な限り、標的領域の上流側配列若しくは下流側配列と必ずしも完全一致する必要はない。例えば、上流ホモロジーアームは、標的領域の上流側に隣接する塩基配列と９０％以上の配列同一性（相同性）を有する配列であること

ができ、９２％以上、９３％以上、９４％以上、９５％以上、９６％以上、９７％以上、９８％以上、又は９９％以上の配列同一性を有することが好ましい。例えば、下流ホモロジーアームは、標的領域の下流側に隣接する塩基配列と９０％以上の配列同一性（相同性）を有する配列であることができ、９２％以上、９３％以上、９４％以上、９５％以上、９６％以上、９７％以上、９８％以上、又は９９％以上の配列同一性を有することが好ましい。また、上流ホモロジーアームと下流ホモロジーアームとは、少なくともそのいずれかが標的領域中の切断箇所により近いとアレルの改変効率をより高め得る。ここで、「近い」とは、２つの配列の距離が１００ｂｐ以下、５０ｂｐ以下、４０ｂｐ以下、３０ｂｐ以下、２０ｂｐ以下、または１０ｂｐ以下であることを意味し得る。

[0129] 選択マーカー用ドナーＤＮＡにおいて、選択マーカー遺伝子は、上流ホモロジーアームと下流ホモロジーアームとの間に位置する。これにより、上記（ｉ）のゲノム改変システムと共に選択マーカー用ドナーＤＮＡを細胞に導入した場合に、ＨＤＲにより、選択マーカー遺伝子が標的領域に導入される（これにより遺伝子が破壊される場合、遺伝子ノックアウトといい、これにより所望の遺伝子が導入される場合、遺伝子ノックインという、遺伝子をノックアウトしつつ、別の遺伝子をノックインすることもできる）。

[0130] 選択マーカー遺伝子は、適切なプロモーターの制御下で発現されるように、プロモーターに機能的に連結されていることが好ましい。プロモーターは、ドナーＤＮＡを導入する細胞の種類に応じて適宜選択することができる。プロモーターとしては、例えば、ＳＲαプロモーター、ＳＶ４０初期プロモーター、レトロウイルスのＬＴＲ、ＣＭＶ（サイトメガロウイルス）プロモーター、ＲＳＶ（ラウス肉腫ウイルス）プロモーター、ＨＳＶ－ＴＫ（単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ）プロモーター、ＥＦ１αプロモーター、メタロチオネインプロモーター、ヒートショックプロモーター等が挙げられる。選択マーカー用ドナーＤＮＡは、エンハンサー、ポリＡ付加シグナル、ターミネーター等の任意の制御配列等を有していてもよい。

[0131] 選択マーカー用ドナーＤＮＡは、インスレーター配列を有していてもよい。「インスレーター」とは、隣接する染色体環境の影響を遮断または緩和し、その領域に挟まれたＤＮＡの転写調節の独立性を保証するまたは高める配列をいう。インスレーターは、エンハンサー遮断効果（エンハンサーとプロモーターの間に挿入することにより、エンハンサーによるプロモーター活性への影響を遮断する効果）、及び位置効果の抑制作用（導入遺伝子の両側をインスレーターで挟むことにより、導入遺伝子の発現を挿入されたゲノム上の位置に影響されないようにする作用）により定義される。選択マーカー用ドナーＤＮＡは、上流アームと選択マーカー遺伝子との間（又は上流アームと選択マーカー遺伝子を制御するプロモーターとの間）に、インスレーター配列を有していてもよい。選択マーカー用ドナーＤＮＡは、下流アームと選択マーカー遺伝子との間に、インスレーター配列を有していてもよい。

[0132] 選択マーカー用ドナーＤＮＡは、直鎖状であってもよく、環状であってもよいが、環状であることが好ましい。好ましくは、選択マーカー用ドナーＤＮＡは、プラスミドである。選択マーカー用ドナーＤＮＡは、上記の配列に加えて、任意の配列を含み得る。例えば、上流ホモロジーアーム、インスレーター、選択マーカー遺伝子、及び下流ホモロジーアームの各配列間の全て又は一部に、スペーサー配列を含んでいてもよい。

[0133] 工程（ａ）では、ゲノム改変の対象とするアレルの数と同数以上の種類の選択マーカー用ドナーＤＮＡを細胞に導入する。異なる種類の選択マーカー用ドナーＤＮＡは、相互に異なる（区別可能な）種類の選択マーカー遺伝子を有する。ある態様では、異なる種類の選択マーカー用ドナーＤＮＡは、完全に同一の選択マーカー遺伝子またはそのセットを有しない。つまり、第１の種類の選択マーカー用ドナーＤＮＡは、第１の種類の選択マーカー遺伝子を有し、第２の種類の選択マーカー用ドナーＤＮＡは、第２の種類の選択マーカー遺伝子を有する。第３の種類の選択マーカー用ドナーＤＮＡは、第３の種類の選択マーカー遺伝子を有し、それ以降の種類の選択マーカー用ドナーＤＮＡについても同様である。ゲノム改変の対象とするアレルが２個であ

る場合、選択マーカー用ドナーＤＮＡの種類は２種類以上である。ゲノム改変の対象とするアレルが３個である場合、選択マーカー用ドナーＤＮＡの種類は３種類以上である。ある態様では、１つの選択マーカー用ドナーＤＮＡが、２種類以上の相互に異なる（区別可能な）選択マーカーを有していてもよい（この場合であっても、異なる種類の選択マーカー用ドナーＤＮＡは、相互に異なる（区別可能な）種類（例えば、固有）の選択マーカー遺伝子を有していなければならない）。ある態様では、選択マーカー用ドナーＤＮＡは、部位特異的組換え酵素の組換え配列（例えば、Ｃｒｅリコンビナーゼにより組換えられるｌｏｘＰ配列およびその変種）を有しない。また、ある態様では、本発明の方法は、部位特異的組換え酵素及びその組換え配列（例えば、Ｃｒｅリコンビナーゼにより組換えられるｌｏｘＰ配列およびその変種）を用いない。部位特異的組換え酵素を用いると、通常は、編集後のゲノムに部位特異的組換え酵素の組換え配列が１つ残存する。これに対して、ある態様では、本発明の方法で得られる細胞の改変ゲノムは、部位特異的組換え酵素の組換え配列（外来である）を有しない。

[0134] 選択マーカー用ドナーＤＮＡの種類数は、ゲノム改変の対象とするアレルの数と同数以上であればよく、上限は特に限定されない。ゲノム改変の対象とするアレルの数と同数以上の種類の選択マーカー用ドナーＤＮＡを用いることで、２つ以上のアレルを安定的に改変することができる。選択マーカー用ドナーＤＮＡの種類数は、後述の工程（ｂ）での選択操作の観点から、ゲノム改変の対象とするアレルの数と同数又は１～２多い程度が好ましく、ゲノム改変の対象とするアレルの数と同数であることがより好ましい。

[0135] 上記（ｉ）と（ｉｉ）を細胞に導入する方法は特に限定されず、公知の方法を特に制限なく用いることができる。（ｉ）及び（ｉｉ）を細胞に導入する方法としては、例えば、ウイルス感染法、リポフェクション法、マイクロインジェクション法、カルシウムリン酸法、ＤＥＡＥ－デキストラン法、エレクトロポーレーション法、パーティクルガン法等が挙げられるが、これらに限定されない。上記（ｉ）と（ｉｉ）とを細胞に導入することにより、上

記（ｉ）の配列特異的核酸切断分子により、標的領域のＤＮＡが切断された後、ＨＤＲにより（ｉｉ）の選択マーカー用ドナーＤＮＡ中の選択マーカーが標的領域にノックインされる。この際、２種以上の選択マーカー用ドナーＤＮＡは、それぞれの上流ホモロジーアームおよび下流ホモロジーアームが同一である場合には、ランダムに標的領域の２つ以上のアレルにノックインされ得る。但し、２種以上の選択マーカー用ドナーＤＮＡは、２以上のアレルそれぞれの標的領域の上流配列および下流配列と相同組換え可能な塩基配列をホモロジーアームの塩基配列をそれぞれ有している限り２以上のアレルそれぞれを改変できるので、完全に同一のホモロジーアームの塩基配列を有する必要はない。ある態様では、２種以上の選択マーカー用ドナーＤＮＡにおいては、その上流および下流ホモロジーアームの塩基配列が、それぞれのアレルの標的領域の上流配列および下流配列とより同一性の高い塩基配列を有していてもよい（例えば、そのように最適化されていてもよい）。

[0136] 選択マーカー用ドナーＤＮＡは、ある態様では、上流ホモロジーアームおよび下流ホモロジーアームを有し、上流ホモロジーアームおよび下流ホモロジーアームの間に、選択マーカー遺伝子を有し、好ましくは、メガヌクレアーゼの切断部位などのエンドヌクレアーゼ（塩基配列特異的核酸切断分子）の標的配列をさらに有し得る。この態様において、ある好ましい態様では、選択マーカーは、ポジティブ選択用の選択マーカー遺伝子およびネガティブ選択用のマーカー遺伝子を含む。別の好ましい態様では、選択マーカーは、ポジティブ選択用の選択マーカーを含むが、これとは別にネガティブ選択マーカー遺伝子を含まなくてもよい。ある好ましい態様では、ポジティブ選択用の選択マーカー遺伝子は、ネガティブ選択用にも用いられ得、そのようなマーカー遺伝子としては、可視化マーカー遺伝子が挙げられる。

２以上の選択マーカー用ドナーＤＮＡのセットは、上記の選択マーカー用ドナーＤＮＡの組合せであり、かつ、それぞれが互いに区別可能なポジティブ選択用の選択マーカー遺伝子を有している。上記セットにおいては、メガヌクレアーゼの切断部位などのエンドヌクレアーゼ（塩基配列特異的核酸切

断分子）の標的配列をさらに有し得、当該標的配列は互いに異なっていてもよいが、同一である（または同一の塩基配列特異的核酸切断分子で切断できる）ことが好ましい。選択マーカー用ドナーＤＮＡの長さは上記の通りであるが、例えば、５ｋｂｐ以上、８ｋｂｐ以上、または１０ｋｂｐ以上であり得る。

[0137]（工程（ｂ））

前記工程（ａ）の後、工程（ｂ）を行う。工程（ｂ）では、２以上のアレルにそれぞれ区別可能に異なる選択マーカー遺伝子またはその組合せが導入された細胞を、当該区別可能に異なる選択マーカー遺伝子の発現に基づいて、選択する。より具体的には、工程（ｂ）では、前記２以上のアレルに対して異なる種類の選択マーカー用ドナーＤＮＡがそれぞれ相同組み換えすることによって、当該２以上のアレルにそれぞれ区別可能に異なる固有の選択マーカー遺伝子が導入され、導入された当該区別可能に異なる選択マーカー遺伝子のすべてを発現する細胞を選択する。ある態様では、工程（ｂ）では、前記２種以上の選択マーカー用ドナーＤＮＡが有する選択マーカー遺伝子であって染色体ゲノムに組込まれたすべての選択マーカー遺伝子の発現に基づいて、異なる選択マーカー用ドナーＤＮＡが導入されたことによりそれぞれのアレルが改変された細胞を選択する。ある態様では、工程（ｂ）では、前記２種以上の選択マーカー用ドナーＤＮＡが有する全ての選択マーカー遺伝子に基づいて、細胞を選択する。ある態様では、工程（ｂ）では、前記２種以上の選択マーカー用ドナーＤＮＡが有する選択マーカー遺伝子であって染色体ゲノムに組込まれたすべての選択マーカー遺伝子（ポジティブ選択用のマーカー遺伝子）の発現に基づいて、区別可能な選択マーカー用ドナーＤＮＡが導入されたことによりそれぞれのアレルが改変された細胞を選択する。ある態様では、工程（ｂ）で得られる細胞は、各アレルが異なるポジティブ選択用のマーカー遺伝子を有する。ある態様では、工程（ｂ）で得られる細胞は、各アレルが、共通したポジティブ選択用のマーカー遺伝子をここで、ある態様では、工程（ｂ）では、単一細胞クローニングを行わない｛但し、

工程（ｂ）で２つ以上のアレルが改変された細胞を選択した後に単一細胞クローニングを行うことを含んでいても、含まなくてもよい}。ある態様では、工程（ｂ）では、細胞の選択は、各アレルに導入された区別可能なポジティブ選択用のマーカー遺伝子の複数の発現に基づいて行われる。ある態様では、工程（ｂ）は、単一の選択マーカー遺伝子の発現強度（例えば、蛍光タンパク質の発現強度または蛍光強度）に基づいて改変アレル数の多さを推定する方式では行われない。単一の選択マーカー遺伝子の発現強度の強弱に基づいて改変アレル数の多さを推定する方式で細胞を選択する場合、細胞毎の遺伝子発現量に変動が生じ、２以上のアレルが改変された細胞を１つのアレルが改変された細胞から完全に分離することが困難となり、したがって、工程（ｂ）において単一細胞クローニングが必要となるためである。

[0138] 工程（ｂ）は、工程（ａ）で用いた選択マーカー遺伝子の種類に応じて、適宜、細胞の選択を行えばよい。この際、工程（ａ）で用いた選択マーカー遺伝子の全ての発現に基づいて細胞を選択する。

[0139] 例えば、選択マーカー遺伝子がポジティブ選択マーカー遺伝子である場合、改変対象の染色体ゲノムに組込まれる（または組込まれた）すべての選択マーカー遺伝子を発現する細胞を選択することができ、例えば、改変対象のアレルの数と同数のポジティブ選択マーカーを発現する細胞を選択することができる。ポジティブ選択マーカー遺伝子が薬剤耐性遺伝子である場合、当該薬剤を含む培地で細胞を培養することにより、前記ポジティブ選択マーカーを発現する細胞を選択することができる。ポジティブ選択マーカー遺伝子が蛍光タンパク質遺伝子、発光酵素遺伝子、又は発色酵素遺伝子である場合、蛍光タンパク質、発光酵素、又は発色酵素による蛍光、発光、又は発色を呈する細胞を選択することにより、前記ポジティブ選択マーカーを発現する細胞を選択することができる。本工程では、改変されるべきアレルの数と同数の選択マーカー用ドナーＤＮＡがゲノムに取り込まれた場合、当該数のアレルが改変されている。ｎ倍体の細胞においては、改変されるべきアレルの数はｎまたはそれ以下であり、当該数以上ｎ以下の種類の選択マーカー用ド

ナーＤＮＡがゲノムに取り込まれた場合には、少なくとも改変されるべきアレル（２以上のアレルである）が改変されている。ある態様では、改変されるべきアレルの数がｎであり、当該数の種類の選択マーカー用ドナーＤＮＡが染色体ゲノムに取り込まれ、すべてのアレルが改変されている。ある態様では、本工程では、改変対象とするアレルの数と同数以上の種類の選択マーカー用ドナーＤＮＡを用いているため、細胞が発現するポジティブ選択マーカーの数は、当該数のアレルが確実に改変されていることを意味する。工程（ｂ）における細胞の選択効率を高める観点では、改変対象とするアレルの数は、選択マーカー用ドナーＤＮＡの種類数と同一であることが好ましい。

[0140] 上記の通り、本実施形態のゲノム改変方法では、ｎ倍体の細胞においてｎ個のアレルを改変するためにｎ種類の選択マーカー用ドナーＤＮＡを用いてＨＤＲを誘発させることによって、細胞が有する全てのアレルが改変された細胞を効率よく取得することができる。また、全てのアレルが改変された細胞を確実に取得することができるため、標的領域が大きいサイズ（例えば、１０ｋｂｐ以上）であっても、標的領域が改変された細胞を効率よく取得することができる。そのため、大規模なゲノム改変も可能となる。

[0141] ある態様では、工程（ｂ）では、工程（ａ）によって得られた細胞を含むプールから、細胞をクローニングすることなく、改変された細胞を選択することができる。クローニングの工程を省くことによって工程に必要な時間が短縮され得る。上記プールはある態様では、10^5以上、10^6以上、10^7以上、または10^8以上の細胞を含んでいてもよい。

[0142]（任意工程）

本実施形態のゲノム改変方法は、上記工程（ａ）及び工程（ｂ）に加えて、任意の工程を有していてもよい。任意の工程としては、例えば、下記（ｃ）及び（ｄ）の工程が挙げられる：

（ｃ）前記工程（ｂ）の後、前記標的領域の上流側に隣接する塩基配列と相同な塩基配列を有する上流ホモロジーアームと、前記標的領域の下流側に隣接する塩基配列と相同な塩基配列を有する下流ホモロジーアームとの間に

、所望の塩基配列を含む組換え用ドナーＤＮＡを、前記細胞に導入する工程；及び

（ｄ）前記工程（ｃ）の後、前記ネガティブ選択マーカーを発現しない細胞を選択する工程。

[0143] ある態様では、本実施形態のゲノム改変方法は、上記工程（ａ）及び工程（ｂ）に加えて、任意の工程を有していてもよい。ある態様では、本実施形態のゲノム改変方法または、ゲノムが改変された細胞を得る方法では、２種以上の選択マーカー用ドナーＤＮＡがそれぞれ、前記上流ホモロジーアームと前記下流ホモロジーアームの間に、ポジティブ選択用の選択マーカー遺伝子とそれとは別のネガティブ選択用のマーカー遺伝子と標的配列とを有し、ここで、当該選択マーカー遺伝子がポジティブ選択用にもネガティブ選択用にも用いられる場合には、当該別のネガティブ選択用の選択マーカー遺伝子を有していなくてよく、例えば、下記（ｃ）及び（ｄ）の工程を有し得る：

（ｃ）前記工程（ｂ）の後、下記（ｉｉｉ）及び（ｉｖ）を選択された細胞に導入して前記２以上のアレルに組換え用ドナーＤＮＡを導入する工程と、

（ｉｉｉ）前記さらなる標的配列を標的とし、当該さらなる標的配列を切断することができる配列特異的核酸切断分子、又は前記配列特異的核酸切断分子をコードするポリヌクレオチドを含むゲノム改変システム、

（ｉｖ）所望の塩基配列を含む組換え用ドナーＤＮＡであって、前記標的領域の上流側の塩基配列と相同組換え可能な塩基配列を有する上流ホモロジーアームと、前記標的領域の下流側の塩基配列と相同組換え可能な塩基配列を有する下流ホモロジーアームを有する組換え用ドナーＤＮＡ｛当該組換え用ドナーＤＮＡは、上流ホモロジーアームと下流ホモロジーアームの間に、所望の塩基配列を含んでいても、何らの塩基配列を含まなくてもよい｝、

（ｄ）前記工程（ｃ）の後、前記ネガティブ選択用のマーカー遺伝子を発現しない細胞を選択する工程（ネガティブ選択のための工程）。

[0144] ＜工程（ｃ）＞

工程（ｂ）の後、工程（ｃ）を行ってもよい。ある態様において、工程（ｃ）では、上流ホモロジーアームと下流ホモロジーアームの間に、所望の塩基配列を含む、または含まない組換え用ドナーＤＮＡを、工程（ｂ）で選択した細胞に導入する。ある態様において、工程（ｃ）では、標的領域の上流側に隣接する塩基配列と相同な塩基配列を有する上流ホモロジーアームと、標的領域の下流側に隣接する塩基配列と相同な塩基配列を有する下流ホモロジーアームとの間に、所望の塩基配列を含む組換え用ドナーＤＮＡを、工程（ｂ）で選択した細胞に導入する。

[0145] ≪組換え用ドナーＤＮＡ≫

組換え用ドナーＤＮＡは、ノックインする所望の塩基配列を含んでいてもよい。前記所望の塩基配列は、特に限定されない。例えば、ゲノム改変の目的が、標的領域に含まれる遺伝子の機能をノックアウトすることにある場合には、標的領域の一部または全部の塩基配列を欠失させた塩基配列を所望の塩基配列として用いることができる。また、標的領域に、外来遺伝子を組み込む場合には、当該遺伝子を含む塩基配列を所望の塩基配列として用いることができる。所望の塩基配列のサイズは、特に限定されず、任意のサイズとすることができる。所望の塩基配列は、例えば、１０ｂｐ以上、２０ｂｐ以上、４０ｂｐ以上、８０ｂｐ以上、２００ｂｐ以上、４００ｂｐ以上、８００ｂｐ以上、１ｋｂｐ以上、２ｋｂｐ以上、３ｋｂｐ以上、４ｋｂｐ以上、５ｋｂｐ以上、６ｋｂｐ以上、７ｋｂｐ以上、８ｋｂｐ以上、９ｋｂｐ以上、１０ｋｂｐ以上、１５ｋｂｐ以上、２０ｋｂｐ以上、４０ｋｂｐ以上、８０ｋｂｐ以上、１００ｋｂｐ以上、又は２００ｋｂｐ以上等とすることができる。本実施形態の方法では、所望の塩基配列が２以上のアレルにノックインされた細胞を効率よく選択することができる。そのため、例えば、５ｋｂｐ以上、８ｋｂｐ以上、又は１０ｋｂｐ以上の大きなサイズのＤＮＡであってもノックインすることが可能である。組換え用ドナーＤＮＡは、例えば、選択マーカー用ドナーＤＮＡよりも長さにおいて短くてもよい。

[0146] 組換え用ドナーＤＮＡが有する上流ホモロジーアーム及び下流ホモロジー

アームは、前記選択マーカー用ドナーＤＮＡが有するものと、同じであってもよく、異なっていてもよい。便宜上、選択マーカー用ドナーＤＮＡが含む上流ホモロジーアーム及び下流ホモロジーアームを「第１の上流ホモロジーアーム」及び「第１の下流ホモロジーアーム」、組換え用ドナーＤＮＡが含む上流ホモロジーアーム及び下流ホモロジーアームを「第２の上流ホモロジーアーム」及び「第２の下流ホモロジーアーム」という場合がある。第２の上流ホモロジーアーム及び第２の下流ホモロジーアームは、例えば、第１の上流ホモロジーアームまたはそれよりも上流の領域と相同組換え可能であり、かつ、第１の下流ホモロジーアームまたはそれよりも下流の領域と相同組換え可能であれば、その長さ及び配列は特に限定されない（ある態様では、標的領域の周辺領域と相同組換可能であれば、その長さ及び配列は特に限定されない）。組換え用ドナーＤＮＡによる組換え後に、選択マーカー用ドナーＤＮＡの塩基配列の一部がゲノム上に残存することは許容されるが、好ましくは、選択マーカー用ドナーＤＮＡの塩基配列は、組換え用ドナーＤＮＡとの組換えにより、ゲノム上から完全に除去される。選択マーカー用ドナーＤＮＡに搭載されている様々な遺伝子は、組換え用ドナーＤＮＡによる組換えにより除去される。これによって、ある態様では、細胞の２つ以上のアレルは、それぞれ組換え用ドナーＤＮＡによって置き換わり得る。ある態様では、組換え用ドナーＤＮＡは、所望の塩基配列を有していてよく、これにより、２つ以上のアレルが改変された細胞は、当該改変されたアレルに当該所望の塩基配列を有することとなる。

[0147] 組換え用ドナーＤＮＡにおいて、所望の塩基配列は、第２の上流ホモロジーアームと第２の下流ホモロジーアームとの間に位置する。組換え用ドナーＤＮＡが外来遺伝子を含む場合、当該外来遺伝子は、プロモーターに機能的に連結されていることが好ましい。組換え用ドナーＤＮＡは、エンハンサー、ポリＡ付加シグナル、ターミネーター等の任意の制御配列等を有していてもよい。また、組換え用ドナーＤＮＡが外来遺伝子を含む場合、組換え用ドナーＤＮＡは当該外来遺伝子の上流及び下流にインスレーター配列を有して

いてもよい。ある態様では、組換え用ドナーＤＮＡは、第２の上流ホモロジーアームと第２の下流ホモロジーアームとの間にスペーサー配列を含む。ある態様では、組換え用ドナーＤＮＡは、選択マーカー用ドナーＤＮＡが有するネガティブ選択マーカー遺伝子を有する細胞を除去するときに、当該当該遺伝子と同じ（または区別できない）遺伝子をその毒性が発揮される条件下で発現させると、組換え用ドナーＤＮＡで相同組換えが生じた細胞を選択することができない。したがって、組換え用ドナーＤＮＡは、選択マーカー用ドナーＤＮＡが有するネガティブ選択マーカー遺伝子を有する細胞を除去するときに、当該当該遺伝子と同じ（または区別できない）遺伝子をその毒性が発揮される条件下で発現しないように構成されている。例えば、ある態様では、組換え用ドナーＤＮＡは、第２の上流ホモロジーアームと第２の下流ホモロジーアームとの間にネガティブ選択マーカー遺伝子および第２の標的配列を有しない。

[0148] 組換え用ドナーＤＮＡは、上記（ｉ）と共に細胞に導入されることが好ましい。組換え用ドナーＤＮＡを上記（ｉ）と共に細胞に導入することにより、上記（ｉ）の配列特異的核酸切断分子により、標的領域のＤＮＡが切断された後、ＨＤＲにより組換え用ドナーＤＮＡ中の所望の塩基配列が標的領域にノックインされる。本工程で組換え用ドナーＤＮＡを導入する細胞は、工程（ｂ）で選択された細胞であるため、標的領域に選択マーカー用ドナーＤＮＡの塩基配列がノックインされている。そのため、（ｉ）のゲノム改変システムの標的配列は、選択マーカー用ドナーＤＮＡノックイン後の標的領域に含まれる塩基配列である。便宜上、工程（ａ）におけるゲノム改変システムの標的配列を「第１の標的配列」、工程（ｃ）におけるゲノム改変システムの標的配列を「第２の標的配列」という場合がある。第２の標的配列は、工程（ｂ）後の細胞の標的領域に含まれる任意の配列を用いることができる。ある態様では、選択マーカー用ドナーＤＮＡ中の第２の標的配列は、当該細胞のゲノム上に存在しない配列であり得る。ある態様では、選択マーカー用ドナーＤＮＡ中の第２の標的配列は、当該細胞のゲノム上に存在しない配

列であり、オフターゲットによるゲノム上の他の配列を切断しない程度に他の配列と異なる配列である。ある態様では、選択マーカー用ドナーＤＮＡ中の第２の標的配列は、ゲノム上に存在しないメガヌクレアーゼの切断部位であり得る。ある態様では、第２の標的配列は、工程（ｄ）におけるネガティブ選択マーカー遺伝子以外の領域である。当然ながら、組換え用ドナーＤＮＡは、組換え用ドナーＤＮＡによる相同組換えが著しく阻害されないように構成されている。第１の標的配列が、工程（ｂ）後の細胞の標的領域に残っている場合または第１の標的配列が選択マーカー用ドナーＤＮＡにより再導入された場合、第２の標的配列は第１の標的配列と同じであってもよく、異なっていてもよい。

[0149] 組換え用ドナーＤＮＡは、上流ホモロジーアームと下流ホモロジーアームとの間に塩基配列を含まなくてもよいが、上流ホモロジーアームと下流ホモロジーアームとの間に１０ｂｐ以下、２０ｂｐ以下、３０ｂｐ以下、４０ｂｐ以下、５０ｂｐ以下、６０ｂｐ以下、７０ｂｐ以下、８０ｂｐ以下、９０ｂｐ以下、１００ｂｐ以下、２００ｂｐ以下、３００ｂｐ以下、４００ｂｐ以下、５００ｂｐ以下、６００ｂｐ以下、７００ｂｐ以下、８００ｂｐ以下、９００ｂｐ以下、または１ｋｂｐ以下の塩基配列を含んでいてもよい。組換え用ドナーＤＮＡは、上流ホモロジーアームと下流ホモロジーアームとの間に、１ｋｂｐ以上、２ｋｂｐ以上、３ｋｂｐ以上、４ｋｂｐ以上、５ｋｂｐ以上、６ｋｂｐ以上、７ｋｂｐ以上、８ｋｂｐ以上、９ｋｂｐ以上、または１０ｋｂｐ以上の塩基配列を含んでいてもよい。

[0150] 組換え用ドナーＤＮＡは、上流ホモロジーアームと下流ホモロジーアームとの間に、選択マーカー遺伝子、部位特異的組換え酵素の標的配列、生理活性を有する因子をコードする遺伝子、細胞毒性を有する因子をコードする遺伝子、およびプロモーター配列からなる群から選択される１以上またはすべてを含む、もしくは前記群から選択される１以上またはすべてを含まない。

[0151] 工程（ｃ）では、工程（ｂ）で選択細胞に対して、組換え用ドナーＤＮＡを導入する。工程（ｂ）で選択した細胞は、標的領域に選択マーカー遺伝子

がノックインされている。工程（ｃ）は、前記標的領域にノックインされた選択マーカー遺伝子を、除去するまたは所望の塩基配列に置き換える工程であるともいえる。

[0152]（工程（ｄ））

工程（ｃ）の後、工程（ｄ）を行ってもよい。工程（ｄ）では、ネガティブ選択マーカーを発現しない細胞を選択する。

[0153] 工程（ｄ）を行う場合、工程（ａ）において、選択マーカー用ドナーＤＮＡはそれぞれ、ポジティブ選択マーカー遺伝子とネガティブ選択マーカー遺伝子と、を含むものを用い得る。すなわち、工程（ａ）で用いる選択マーカー用ドナーＤＮＡは、上流ホモロジーアームと、下流ホモロジーアームとの間に、ポジティブ選択マーカー遺伝子及びネガティブ選択マーカー遺伝子を含み得る。ポジティブ選択マーカー遺伝子とネガティブ選択マーカー遺伝子との位置関係は、特に限定されず、ポジティブ選択マーカー遺伝子がネガティブ選択マーカー遺伝子の上流にあってもよいし、その逆であってもよい。選択マーカー用ドナーＤＮＡが、ポジティブ選択マーカー遺伝子とネガティブ選択マーカー遺伝子とを有する場合、ポジティブ選択マーカー遺伝子とネガティブ選択マーカー遺伝子との間には、自己切断型ペプチドをコードする塩基配列、又はＩＲＥＳ（ｉｎｔｅｒｎａｌ ｒｉｂｏｚｙｍｅ ｅｎｔｒｙ ｓｉｔｅ）配列等が介在していてもよい。これらの配列を介在させることで、１つのプロモーターから、ポジティブ選択マーカー遺伝子とネガティブ選択マーカー遺伝子とを独立して発現させることができる。２Ａペプチドとしては、例えば、口蹄疫ウイルス（ＦＭＤＶ）由来の２Ａペプチド（Ｆ２Ａ）、ウマ鼻炎Ａウイルス（ＥＲＡＶ）由来の２Ａペプチド（Ｅ２Ａ）、Ｐｏｒｃｉｎｅ ｔｅｓｃｈｏｖｉｒｕｓ（ＰＴＶ－１）由来の２Ａペプチド（Ｐ２Ａ）及びＴｈｏｓｅａ ａｓｉｇｎａ ｖｉｒｕｓ（ＴａＶ）由来の２Ａペプチド（Ｔ２Ａ）等が挙げられる。

[0154] あるいは、同じ選択マーカー遺伝子を、工程（ａ）ではポジティブ選択マーカーとして用い、工程（ｄ）ではネガティブ選択マーカーとして用いても

よい。例えば、選択マーカー遺伝子が蛍光タンパク質遺伝子、発光酵素遺伝子、もしくは発色酵素遺伝子などの蛍光又は色素等の発色に関わるマーカー遺伝子（可視化マーカー遺伝子）である場合、工程（ａ）では、蛍光タンパク質、発光酵素、又は発色酵素の発現による蛍光、発光又は発色を呈する細胞を選択し、工程（ｃ）では、これらの蛍光、発光又は発色が消失した細胞を選択してもよい。同じ選択マーカー遺伝子がポジティブ選択マーカーとネガティブ選択マーカーを兼ねる場合も、選択マーカー用ドナーＤＮＡが、ポジティブ選択マーカーに加えて、ネガティブ選択マーカーをさらに有する場合に包含される。

[0155] ネガティブ選択マーカー遺伝子は、選択マーカー用ドナーＤＮＡの種類毎に、異なっていてもよいし、同じであってもよい。ネガティブ選択マーカー遺伝子に共通のものを用いることにより、工程（ｄ）における細胞の選択作業が簡易となる。

[0156] 工程（ｄ）は、工程（ａ）で用いたネガティブ選択マーカー遺伝子の種類に応じて、適宜細胞の選択を行えばよい。この際、工程（ａ）で用いたネガティブ選択マーカー遺伝子を全ての発現しない細胞を選択する。

[0157] 例えば、ネガティブ選択マーカー遺伝子が蛍光タンパク質遺伝子、発光酵素遺伝子、又は発色酵素遺伝子などの可視化マーカー遺伝子である場合、蛍光、発光又は発色等の可視化マーカーが消失した細胞を選択すればよい。また、ネガティブ選択マーカー遺伝子が自殺遺伝子である場合、当該自殺遺伝子の発現により毒性を発現する薬剤を含む培地で細胞を培養することにより、前記ネガティブ選択マーカーを発現しない細胞を選択することができる。例えば、自殺遺伝子としてチミジンカイネース遺伝子を用いた場合、ガンシクロビルを含む培地で細胞を培養すればよい。ネガティブ選択マーカー遺伝子の発現の消失は、工程（ａ）で標的領域に組み込まれたネガティブ選択マーカー遺伝子が、組換え用ドナーＤＮＡの所望の塩基配列を含むポリヌクレオチドに置き換えられたことを意味する。このとき、ポリヌクレオチドの置き換えは、工程（ａ）でノックインされた塩基配列全体で起きていると考え

られる。そのため、ネガティブ選択マーカー遺伝子の発現が消失した細胞を選択することにより、工程（ａ）でノックインされた塩基配列が、組換え用ドナーＤＮＡの所望の塩基配列で置き換えられた細胞を、効率よく選択することができる。自殺遺伝子等のネガティブ選択マーカー遺伝子は、誘導性プロモーターに機能的に連結されていてもよく、その毒性が発揮される条件下で当該ネガティブ選択マーカー遺伝子が発現されるように誘導性プロモーターを駆動させる薬剤の存在下で、細胞を培養することによって前記ネガティブ選択マーカーを発現しない細胞を選択することができる。この場合、ネガティブ選択マーカー遺伝子は、発現するだけで細胞に毒性を生じる細胞毒素（例えば、リシンおよびジフテリアトキシン）をコードする遺伝子であってもよい。

[0158] ある態様では、工程（ｄ）では、工程（ｃ）によって得られた細胞を含むプールから、細胞をクローニングすることなく、２以上のアレルが改変された細胞（ネガティブ選択マーカー遺伝子が非存在の細胞）を選択することができる。上記プールはある態様では、10^5以上、10^6以上、10^7以上、または10^8以上の細胞を含んでいてもよい。

[0159] 上記の通り、工程（ｃ）及び工程（ｄ）を行うことにより、細胞が有する全てのアレルが所望の配列に改変された細胞を効率よく取得することができる。また、全てのアレルが改変された細胞を確実に取得することができるため、所望の塩基配列が大きいサイズ（例えば、１０ｋｂｐ以上）であっても、当該塩基配列が標的領域にノックインされた細胞を効率よく取得することができる。ある態様では、工程（ｃ）及び工程（ｄ）を行うことにより、細胞が有する全てのアレルにおいて標的領域が欠失し、その前後（すなわち、上流ホモロジーアームおよび下流ホモロジーアームがそれぞれ相同組換えを起こす配列）が、塩基の挿入、置換、および欠失からなる群から選択される１以上なしに（例えば、塩基の挿入、置換および欠失なく）、シームレスに連結している。ある態様では、得られる細胞では、欠損させた領域を挟む上流側と下流側の塩基配列がシームレスに連結している。

[0160] なお、工程（ｂ）によって、生存する細胞の数が少ない場合、または生存する細胞が得られない場合には、上流ホモロジーアームおよび下流ホモロジーアームと相同組換えによりゲノムから除去された標的領域中に、細胞の増殖または生存に影響する遺伝子が含まれていることが示される。したがって、標的領域に細胞の増殖または生存に影響する遺伝子が含まれているか否かを調べることができる。また、この場合には、上流ホモロジーアームおよび下流ホモロジーアームの設計位置を変化させて、ゲノム上から相同組換えにより消失させる遺伝子を変化させて、細胞の増殖または生存に影響する遺伝子を特定することができる。したがって、本発明は、工程（ｂ）の後に、工程（ｅ）を行うことができる。すなわち、工程（ｅ）は、工程（ｂ）において、生存する細胞の数が少ない場合、または生存する細胞が得られない場合には、標的領域を狭め、ゲノム上から消失させる遺伝子を減らすことによって、細胞の増殖または生存に影響する遺伝子を特定することを含む。標的領域には、１つの遺伝子しか含まれていない場合には、当該遺伝子が、細胞の増殖または生存に影響する遺伝子であることが示される。そして、細胞の増殖または生存に影響する遺伝子が特定された場合、工程（ｆ）を行うことができる。工程（ｆ）は、特定された細胞の増殖または生存に影響する遺伝子を改変するゲノムの他の領域（例えば、セーフハーバー領域等）にノックインすることを含む｛ノックインには組換え用ドナーＤＮＡを用いてもよい｝。これによって、本発明の方法によって削る領域を拡大する（標的領域を上流および／または下流に広げる）ことができる。生存する細胞の数が少ないことは、細胞の生存や増殖に影響しない領域に対して工程（ａ）および（ｂ）を実施したときに得られる細胞の数との比較によって確認することができる。ある態様では、工程（ａ）は、細胞の増殖や生存を消失させる領域を標的領域としないことができる。本発明は、例えば、（ｉ）の染色体領域において欠失を有する細胞のゲノムＤＮＡに対して、所望の遺伝子を（ｉ）の染色体領域または（ｉ）以外の領域（例えば、セーフハーバー領域等）にノックインすることを含む。そのような細胞は、（ｉ）の染色体領域において欠

失を有し、（ｉ）の染色体領域または（ｉ）以外の領域（例えば、欠失を有する上記（ｉｉ）の領域およびセーフハーバー領域等）所望の遺伝子をコードする遺伝子を有するゲノムを有する。

[0161] ［ゲノム改変キット］

１実施形態において、本発明は、染色体ゲノムの２つ以上のアレルを改変するゲノム改変キットを提供する。前記ゲノム改変キットは、下記（ｉ）及び（ｉｉ）を含む：

（ｉ）前記染色体ゲノムの標的領域を標的とする配列特異的核酸切断分子、又は前記配列特異的核酸切断分子をコードするポリヌクレオチドを含むゲノム改変システム；及び

（ｉｉ）前記標的領域の上流側に隣接する塩基配列と相同な塩基配列を有する下流ホモロジーアームと、前記標的領域の下流側に隣接する塩基配列と相同な塩基配列を有する下流ホモロジーアームとの間に、選択マーカー遺伝子の塩基配列を含む、２種以上の選択マーカー用ドナーＤＮＡであって、前記２種以上の選択マーカー用ドナーＤＮＡは、相互に異なる選択マーカー遺伝子を有し、前記選択マーカー用ドナーＤＮＡの種類数は、ゲノム改変の対象とする前記アレルの数と同数以上である、２種以上の選択マーカー用ドナーＤＮＡ。

[0162] １実施形態において、本発明は、下記（ｉ）及び（ｉｉ）を含む、染色体ゲノムの２つ以上のアレルを改変するゲノム改変キット。

（ｉ）前記染色体ゲノムの標的領域を標的とし、標的領域を切断することができる配列特異的核酸切断分子、又は前記配列特異的核酸切断分子をコードするポリヌクレオチドを含むゲノム改変システム、

（ｉｉ）２種以上の選択マーカー用ドナーＤＮＡであって、前記標的領域の上流側の塩基配列と相同組換え可能な塩基配列を有する上流ホモロジーアームと、前記標的領域の下流側の塩基配列と相同組換え可能な塩基配列を有する下流ホモロジーアームを有し、上流ホモロジーアームと下流ホモロジーアームの間に、選択マーカー遺伝子の塩基配列を含み、前記２種以上の選択マ

ーカー用ドナーＤＮＡは、相互に区別可能な選択マーカー遺伝子を有し、前記選択マーカー用ドナーＤＮＡの種類数は、ゲノム改変の対象とする前記アレルの数と同数以上である、２種以上の選択マーカー用ドナーＤＮＡ。この態様において、前記選択マーカー遺伝子は、選択マーカー用ドナーＤＮＡの種類毎に固有であり得る。上記キットは、上記キットは本発明の方法に用いられるものであり得る。上記キットは、染色体ゲノムの２つ以上のアレルが改変された細胞を作製する方法に用いられてもよい。

[0163] 本実施形態のキットが含む（ｉ）及び（ｉｉ）は、上記［ゲノム改変方法］の項で説明した（ｉ）及び（ｉｉ）と同様である。本実施形態のキットを用いることにより、上記のゲノム改変方法を容易に行うことができる。

[0164] １実施形態において、本発明は、染色体ゲノムの２つ以上のアレルが改変された細胞であって、当該２つ以上のアレルそれぞれにおいて相互に異なる（区別可能な）選択マーカー遺伝子を有する、細胞を提供する。ある態様では、細胞は、単細胞生物の細胞であり得る。ある態様では、細胞は、単離された細胞であり得る。ある態様では、細胞は、多能性細胞、および多能性幹細胞（胚性幹細胞および誘導多能性幹細胞など）からなる群から選択される細胞であり得る。ある態様では、細胞は、組織幹細胞であり得る。ある態様では、細胞は、体細胞であり得る。ある態様では、細胞は、生殖系列細胞（例えば、生殖細胞）であり得る。ある態様では、細胞は、細胞株であり得る。ある態様では、細胞は不死化細胞であり得る。ある態様では、細胞はがん細胞であり得る。ある態様では、細胞は、非がん細胞であり得る。ある態様では、細胞は、疾患患者の細胞であり得る。ある態様では、細胞は健常者の細胞であり得る。ある態様では、細胞は、動物細胞（例えば、ヒト細胞）、例えば、昆虫細胞（例えば、カイコ細胞）、ＨＥＫ２９３細胞、ＨＥＫ２９３Ｔ細胞、Ｅｘｐｉ２９３Ｆ（商標）細胞、ＦｒｅｅＳｔｙｌｅ（商標）２９３Ｆ細胞、チャイニーズハムスター卵巣細胞（ＣＨＯ細胞）、ＣＨＯ－Ｓ細胞、ＣＨＯ－Ｋ１細胞、およびＥｘｐｉＣＨＯ細胞、ならびにこれらの細胞からの派生細胞からなる群から選択される細胞であり得る。ある好ましい

態様では、上記細胞においては、染色体ゲノムの標的領域のすべてのアレルが改変され、改変後の領域は、それぞれ相互に異なる（区別可能な）選択マーカー遺伝子を有する。

[0165] １実施形態において、染色体ゲノムの２つ以上のアレルが改変された細胞であって、当該２つ以上のアレルそれぞれにおいて相互に異なる（区別可能な）選択マーカー遺伝子を有する、細胞の培養方法が提供される。選択マーカー遺伝子が、薬剤耐性マーカー遺伝子である場合には、培養はそれぞれの薬剤耐性マーカー遺伝子に対する薬剤の存在下で培養され得る。培養は、細胞の維持または増殖に適した条件下で行われ得る。

[0166] １実施形態において、本発明は、２つ以上のアレルが改変された染色体ゲノムを有する非ヒト生物であって、当該２つ以上のアレルそれぞれにおいて相互に異なる（区別可能な）選択マーカー遺伝子を有する、非ヒト生物が提供される。ある態様では、細胞は、単細胞生物の細胞であり得る。ある態様では、非ヒト生物は、酵母（例えば、分裂酵母または出芽酵母、例えば、サッカロミセス・セレビシエ（Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ　ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）、サッカロミセス・カールスベルゲンシス（Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ　ｃａｒｌｓｂｅｒｇｅｎｓｉｓ）、サッカロミセス・フラギリス（Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ　ｆｒａｇｉｌｉｓ）、サッカロミセス・ルーキシー（Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ　ｒｏｕｘｉｉ）などのサッカロミセス属、キャンディダ・ユーティリス（Ｃａｎｄｉｄａ　ｕｔｉｌｉｓ）、キャンディダ・トロピカリス（Ｃａｎｄｉｄａ　ｔｒｏｐｉｃａｌｉｓ）などのキャンディダ属、ピキア（Ｐｉｃｈｉａ）属、クリベロマイセス（Ｋｌｕｙｖｅｒｏｍｙｃｅｓ）属、ヤロイワ（Ｙａｒｒｏｗｉａ）属、ハンゼニュラ（Ｈａｎｓｅｎｕｌａ）属、エンドマイセス（Ｅｎｄｏｍｙｃｅｓ）属などの酵母からなる群から選択される生物であり得る。ある態様では、非ヒト生物は、糸状菌（例えば、Ａｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ，Ｔｒｉｃｈｏｄｅｒｍａ，Ｈｕｍｉｃｏｌａ，Ａｃｒｅｍｏｎｉｕｍ，Ｆｕｓａｒｉｕｍ，及びＰｅｎｉｃｉｌｌｉｕｍ種）であり得る。ある態様では、非ヒト生物は、は、

多細胞生物であり得る。ある態様では、非ヒト生物は、非ヒト動物であり得る。ある態様では、非ヒト生物は、植物であり得る。ある好ましい態様では、上記非ヒト生物では、染色体ゲノムの標的領域のすべてのアレルが改変され、改変後の領域は、それぞれ相互に異なる（区別可能な）選択マーカー遺伝子を有する。

[0167] 上記細胞では、細胞の生存や増殖に必要な遺伝子などの所望の遺伝子の１以上が、染色体ゲノムの他の領域に含まれ、または集められていてもよい。他の領域は、例えば、セーフハーバー領域（例えば、ＡＡＶＳ１領域など）であり得る。他の領域は、例えば、欠失を有する上記（ｉｉ）の領域であり得る。

実施例

[0168] 実施例１：相同配列の検索結果

各ＨＬＡをクエリーとしてヒトゲノム配列（ｈｇ３８ゲノム配列）をＢＩａｔ検索した。ＨＬＡとしては、ＨＬＡ－Ａ、Ｂ、Ｃ、Ｅ、Ｆ、Ｇ、Ｈ、Ｊ、およびＷ；ＭＩＣＡおよびＭＩＣＢ；並びにＨＬＡ－ＤＲＡ、ＤＲＢ１、ＤＲＢ５、ＤＲＢ６、ＤＲＢ９、ＤＱＡ１、ＤＱＡ２、ＤＱＢ１、ＤＰＡ１、ＤＰＢ１、ＤＭＢ、ＤＯＡ、およびＤＯＢをクエリーとして検索した。結果は、それぞれ図１～２５に示される通りであった。

[0169] 図１～２５に示されるように、複数の類似配列が、(i)ｃｈｒ６：２９，７１１，０００～３０，０２０，０００の領域、(ii)ｃｈｒ６：３１，１７６，０００～３１，５３４，０００ｂの領域、(iii)ｃｈｒ６：３２，４４５，０００～３２，８２１，０００の領域、および(iv)ｃｈｒ６：３３，０２０，０００～３３，１４７，０００の領域に集積していた。図２６に結果の概要をまとめた。図２６中の（i)～(iv)は、上記領域にそれぞれ対応する。より具体的には、複数の類似配列は、（ｉ）ｈｇ３８ゲノム配列のｃｈｒ６：２９，７２３，４６４－２９，９４５，４５５の染色体領域に対応する染色体領域、（ｉｉ）ｈｇ３８ゲノム配列のｃｈｒ６：３１，２６９，１６９－３１，３５７，１５８の染色体領域に対応する染色体領域、（ｉｉｉ）ｈｇ

３８ゲノム配列のｃｈｒ６：３２，４３９，９５１－３２，８１６，９５１の染色体領域に対応する染色体領域、および（ｉｖ）ｈｇ３８ゲノム配列のｃｈｒ６：３３，００６，８３８－３３，０８６，２３８の染色体領域に対応する染色体領域に存在していた。

[0170] ＨＬＡ遺伝子座の配列解読が難しい理由の一つは、複数の類似配列が集積しているためである。このため、(i)～(iv)のいずれかの領域で１つの遺伝子を選択的に破壊しようとしても、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９を含むゲノム編集方法では、標的化した遺伝子に加えて、その他の類似配列に対しても改変が加わるおそれがある。また、重複する類似配列の存在によって破壊した領域の配列解読が困難であるために、周辺の類似配列への影響を調べることもまた困難である。したがって、本発明では、(i)～(iv)の少なくとも１つ、好ましくは２つ、より好ましくは３つ、さらに好ましくは４つを欠損した細胞を提供する。このような細胞はＨＬＡの少なくとも１つを欠失していると共に、欠失した領域の周辺に関して配列解読が容易である。したがって、さらなる編集の成否を配列解読により明らかにすることに適している。

[0171] 国際公開第２０２１／２０６０５４号によれば、２倍体細胞において２つのアレル上で効率よく同時に特定の数百ｋｂの領域を欠失させる技術（ＵＫｉＳ）が開示されている。通常のゲノム編集では、２倍体細胞において片側アレルを効率よく編集することができるが、両アレルを同時に編集する効率は極めて低い。両アレルを同時に編集する効率を劇的に改善したのがＵＫｉＳ技術であり、今回のようなノックアウト用途に適する。国際公開第２０２１／２０６０５４号では、欠失させる領域に隣接する上流ホモロジーアームと下流ホモロジーアームを有し、上流ホモロジーアームと下流ホモロジーアームの間に相互に区別可能な選択マーカーを有するドナーＤＮＡを、上流ホモロジーアームがハイブリダイスする第１のゲノムＤＮＡ部分と下流ホモロジーアームがハイブリダイスする第２のゲノムＤＮＡ部分のいずれか、または好ましくは両方に切断を有するゲノムＤＮＡと接触させることによって、第１のゲノムＤＮＡ部分と第２のゲノムＤＮＡ部分の間に存在していたゲノ

ムＤＮＡ領域が欠失し、上流ホモロジーアームと下流ホモロジーアームの間の配列（第３の配列）に置き換わる。国際公開第２０２１／２０６０５４号では、第３の配列も、ゲノムＤＮＡから除去することができ、第１のゲノムＤＮＡ部分と第２のゲノムＤＮＡ部分とがシームレスに連結したゲノムＤＮＡが得られる。しかも、国際公開第２０２１／２０６０５４号では、両アレル上で同様の改変を同時に達成できる。このようにして、国際公開第２０２１／２０６０５４号に開示された技術などのゲノム改変技術を用いることによって、反復配列の多いＨＬＡ領域をまるごとゲノムＤＮＡから欠失させることは可能である。

[0172] 本実施例によれば、(i)～(iv)の領域は、配列解読が困難な領域であると考えられた。したがって、この配列解読が困難と考えられる領域を少なくとも１つ欠失させることによって、欠失を有する領域に関しては、配列解読が容易となる。また、反復配列を欠失させることによって、ゲノム編集の標的が予期せぬ他の繰り返し配列中に現れてオフターゲットの改変を生じさせるリスクも低減できる。その上で、改変後のゲノムＤＮＡは配列解読が容易であるために、狙った通りに改変されているかを確認することができる。

[0173] したがって、本発明によれば、ＵＫｉＳを用いて、(i)～(iv)の少なくとも１つ、好ましくは２つ、より好ましくは３つ、さらに好ましくは４つを欠損した細胞を作成することが原理的に可能であることが理解できる。ＵＫｉＳ技術を適用するためには、ゲノム上のユニークな配列が必要である。当該ユニークな配列を標的化することによって、配列特異的に欠失を導入することができる。小さな領域の欠失の場合は、繰り返し配列のために相同組換えの標的となる配列が繰り返し配列を構成していることにより、正確な相同組換えは困難である。上記大きな領域の欠失の際には、ゲノム上のユニークな配列を相同組換えの標的配列として選択して適宜行うことができる。

[0174] 図２７～３４には、上記(i)～(iv)についてテロメア側の境界およびセントロメア側の境界を特定するために行われた検索の結果を示す。図２７によれば、領域１および領域２は、類似配列を有するために、ここを標的化するこ

とができないが、これに対して領域３は類似配列を有しないユニーク配列であるために、標的化できる配列の候補となり得る。

[0175] 実施例２：ＨＬＡ欠損を有する細胞の作製

本実施例では、細胞に対して本開示の技術を適用して、ＨＬＡの欠損を誘発させた。細胞としては、様々な細胞への分化能を有するｉＰＳ細胞を用いた。

[0176] （１）ＵＫｉＳマーカーの導入

細胞の調製：ＤＰＢＳで１５０倍希釈したｉＭａｔｒｉｘ－５１１で事前にコーティングした２４ウェルプレートに、ｉＰＳ細胞を１．２５×10^5細胞ずつ播種した。培地はＳｔｅｍＦｉｔ　ＡＫ０２Ｎ（１０μＭ　Ｙ－２７６３２）を用いた。

マーカーの挿入：ＯｐｔｉＭＥＭ　５０μＬ、マーカー挿入配列切断用ｇＲＮＡ／Ｃａｓ９発現プラスミド　３００　ｎｇ、ドナープラスミド（ＧＦＰ－Ｐｕｒｏ）　１００　ｎｇ、ドナープラスミド（ＲＦＰ－Ｂｌｓｔ）　１００　ｎｇ，　Ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ　Ｓｔｅｍ　ｔｒａｎｓｆｅｃｔｉｏｎ　ｒｅａｇｅｎｔ　２μＬを混合し、室温で５分間インキュベートしたトランスフェクション溶液を、細胞をまいた２４ウェルプレートに加えた。ドナープラスミド（ＧＦＰ－Ｐｕｒｏ）は、ＥＦ１プロモーターに作動可能に連結した緑色蛍光タンパク質（ＧＦＰ）と薬剤耐性遺伝子であるピューロマイシン耐性遺伝子（Ｐｕｒｏ）をコードする遺伝子を有した。ＧＦＰとＰｕｒｏは、Ｔ２Ａ配列を介して連結させた。ドナープラスミド（ＲＦＰ－Ｂｌｓｔ）は、ＥＦ１プロモーターに作動可能に連結した赤色蛍光タンパク質（ＲＦＰ）と薬剤耐性遺伝子であるブラスチサイジン耐性遺伝子（Ｂｌｓｔ）をコードする遺伝子を有した。ＲＦＰとＢｌｓｔは、Ｔ２Ａ配列を介して連結させた。詳細は、ＷＯ２０２１／２０６０５４の実施例１および図１に示される通りであった。本明細書では、上記ドナープラスミドに搭載されたマーカーをＵＫｉＳマーカーといい、ＵＫｉＳマーカーが導入された細胞をＵＫｉＳマーカー導入細胞という。また、ＵＫｉＳマーカー導入細胞

をＵＫｉＳ第１段階の細胞ともいう。

薬剤選択と拡大培養：得られた細胞を６ウェルプレートに播種し、ピューロマイシンとブラスチサイジンの存在下で細胞の薬剤選択を行った。薬剤選択用培地としては、ＳｔｅｍＦｉｔＲ　ＡＫ０２Ｎ（１μＭ　ピューロマイシン、１０μＭ　ブラスチサイジンを含む）を用いた。これにより薬剤選択後の生存細胞は、２つの薬剤に耐性であり、すなわち、ピューロマイシン耐性遺伝子とブラスチサイジン耐性遺伝子の両方を有する細胞である。このような細胞は、理論的には、ｇＲＮＡで標的化した領域の片アレルにピューロマイシン耐性遺伝子が導入され、他方のアレルにブラスチサイジン耐性遺伝子が導入された場合に生じる。生き残ってきた細胞の拡大培養を行い、ＵＫｉＳマーカーを有する細胞を得た。ＵＫｉＳマーカーを有する細胞は、必要に応じてクローニングされた。細胞は、薬剤選択後の生存細胞を１コロニーずつ回収し、細胞を増殖させることによりクローニングした。

[0177] （２）ゲノム上の２箇所の切断とフローサイトメトリ

細胞の調製：ＤＰＢＳで１５０倍希釈したｉＭａｔｒｉｘ－５１１で事前にコーティングした２４ウェルプレートに、ｉＰＳ細胞を１．２５×10^5細胞ずつ播種した。培地はＳｔｅｍＦｉｔ　ＡＫ０２Ｎ（１０μＭ　Ｙ－２７６３２）を用いた。

ｇＲＮＡ／Ｃａｓ９の導入：ｇＲＮＡは、欠失させる領域の両端をそれぞれ標的化するように２つ作製した。溶液１（ＯｐｔｉＭＥＭ　２５μＬ、ＣＲＩＳＰＲＭＡＸ　１．５μＬ）と溶液２（ＯｐｔｉＭＥＭ　２５μＬ、ｇＲＮＡ（左側）　６２．５　ｎｇ、ｇＲＮＡ（右側）　６２．５　ｎｇ、Ｃａｓ９タンパク質　７５０μｇ、Ｃａｓ９　ｐｌｕｓ　１．２μＬ）を混合し、室温で５分間インキュベートしたトランスフェクション溶液を、細胞をまいた２４ウェルプレートに加えた。２４時間後、培地を交換した。

フローサイトメトリ：培養の後に、フローサイトメーターを用いてＧＦＰネガティブかつＲＦＰネガティブの細胞を選択し、１細胞ずつ、９６ウェルプレートに播種し、細胞を増殖させた。このようにすると、ＵＫｉＳマーカ

一導入領域を含む領域を両アレルにおいて欠失した細胞を得ることができる。

[0178] （３）ジェノタイピングＰＣＲ

ゲノム精製：２×１０^{5}程度の変異導入細胞を回収し、ゲノムを精製した。

ジェノタイピング用のプライマーとしては以下表１に示されるものを用いた。ＰＣＲは常法により実施した。

[0179] [表1]

表１：ジェノタイピング用のプライマー

対応図	増幅対象	フォワードプライマー	リバースプライマー
36	HLA-A	CCTCACCTTCCCCTCTTTTC	ACCTTCCCCTGTGACTTGTG
36	HLA-F	CTCACCTTCCCTTCCTTTCC	ACCTTCCCCTGTGATTTGTG
36	HLA-G	CCACCACCCTGTCTTTGACT	TGTCACCCCTTCCTTACCTG
36	LxUDC (0.1) junction	GAGGCAGAAAGGCACACATA	AGCCTCTCCTTCCCATTCTT
37	HLA-B	TCCATCAACCTCTCATAGCAAA	ACTTCTGGAAATTCCTTTTGG
37	HLA-C	GATGGCCCATGTGTGGAT	TTATCCCAGGTGCCTGTGTC
37	LxUDC (1.0) junction	TTCCCACTTACAGCCAGACC	TACGGGAGGTAGCCAGTGTT
40	Puro (L)	TGGGAAGTGGTCAGGAGATAA	GGCCTTCCATCTGTTGCT
40	Puro (R)	GACATCGGCAAGGTGTGG	GTGGTGGAGTGAACGGAGA
40	Blst (L)	TGGGAAGTGGTCAGGAGATAA	TGTAATCTTCTCTGTCGCTACTTC
40	Blst (R)	TGCACCAGATTGTTTTGTGT	GTGGTGGAGTGAACGGAGA
41	E-Del	CCACCTTAGCCTCCTCCTCT	AAAGCATATTTGGGCACTCTG
42	HLA-DRA	AGACAAGTTCACCCCACCAG	TCACCTCCATGTGCCTTACA
42	HLA-DQA1	ACAGAGAGAAGGGCACAGGA	CATCAGCAGAAGGGAGGAAG
42	HLA-DOB	AACATGCAAAGGGGATTCTG	TGGAAGTGGCTTTTGGTTTC
42	LxUDC (1.0)_3 junction	TGGATTTCATGCCTCACAAA	TTCCTCTTGTCTCCCCAGAA
43	LxUDC (1.0)_4 junction	CACCATCACCCTTCTTCCAC	TGCTTCCTCTTCCCAGCTAA
44	LxUDC (2.0) junction	CACCATCACCCTTCTTCCAC	TGCTTCCTCTTCCCAGCTAA
43&44	HLA-DMB	GCAGAGAGTGGGACCAAGAG	TGCTAATTCTGGGGAGATGG
43&44	HLA-DOA	TCCATCAGGGTCTTCTGGTC	TTTTTAACCGGCTCTGGATG
43&44	HLA-DPB2	GAGAGCCCTTAGCTGGTGTG	GTGCAGTTTGTCCACCCTTT
45	Sig-E (L)	TGGGAAGTGGTCAGGAGATAA	GTCTGGGTAAGGGCCAGGGCC CCCGAGAGTAGCAGGAGGA
45	Sig-E (R)	ACGTAGGGTCCTTCATCCTG	GTGGTGGAGTGAACGGAGA
47	A&B (L)	TGGGAAGTGGTCAGGAGATAA	AGACAACTGCCAAGGACACC
47	A&B (R)	GTGGTGGAGTGAACGGAGA	CCCTGTGTGAGTCCAGAACA
48	C&E (L)	TGGGAAGTGGTCAGGAGATAA	CCCTGTGTGAGTCCAGAACA
48	C&E (R)	GTGGTGGAGTGAACGGAGA	CCCTGTGTGAGTCCAGAACA

[0180]

[表2]

表２：ゲノム切断に用いたｇＲＮＡ

対応図	マーカー導入用	ゲノム切断用（左側）	ゲノム切断用（右側）
36	CTTCATCTCCGTCGGCTACG	ATGATGGAAAACTCGATGGG	TGGAATCCGGTATAGGCGCC
37	TGAGTGACCCGATAAAACTC	TCTTAAAAACTTCTATATCG	GTGCAACTCCCGAATAGGCT
42	TGGGCCTTATCATCCGTCAA	TGGGTCTGTCGAGCACAAGG	GGTCAAATGCCTTGTACTCG
43，44	GGGAGGGCCGGTACCGTTGA	ATAGCTAACGTCACTATTGC	CGTTCTCAGCGCGGGCACTA
対応図	UKiS第１段階用	UKiS第２段階（GFPアレル）用	UKiS第２段階（RFPアレル）用
40	GCCGCTGCCGCTCTACGCTT	－	－
	CAGAAAGGGTAAGCGCACAG	－	－
41，46	－	GGCGCAACGCGATCGCGTAA	－
	－	－	GACGCCAGTGCATTCGACGA
45，46，47，48	－	GGCGCAACGCGATCGCGTAA	－

[0181] （４）クローニングされたＵＫｉＳマーカー導入細胞の更なる改変

ＵＫｉＳマーカー導入細胞は、様々な更なる改変のプラットフォームとなる。ＵＫｉＳマーカー導入細胞は、更なる改変に供され、ＵＫｉＳマーカーが挿入された領域（ＵＫｉＳマーカー挿入領域）を切断し、更なるドナーＤＮＡを接触させることにより、ＵＫｉＳマーカー導入領域を当該更なるドナーＤＮＡの配列に置き換えることができる。例えば、２つのアレルそれぞれに区別可能に異なるＵＫｉＳマーカーが導入されている細胞（すなわち、ＵＫｉＳマーカー導入細胞）を用意する。ＵＫｉＳマーカー挿入領域中の一方のアレルを選択的に切断することで、当該一方のアレルを改変することができる。他方のアレルも同様に改変することができる。

[0182] 具体的には、ＯｐｔｉＭＥＭ　５０μＬ、ＵＫｉＳマーカー挿入領域切断用ｇＲＮＡ／Ｃａｓ９発現プラスミド（ＧＦＰアレル用またはＲＦＰアレル用）　４００　ｎｇ、変異導入用ドナープラスミド１００　ｎｇ、　Ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ　Ｓｔｅｍ　ｔｒａｎｓｆｅｃｔｉｏｎ　ｒｅａｇｅｎｔ　２μＬを混合し、室温で５分間インキュベートしたトランスフェクション溶液を、細胞をまいた２４ウェルプレートに加えた。フローサイトメトリにより、ＧＦＰ陰性細胞またはＲＦＰ陰性細胞を回収し、細胞を増殖させた。

[0183] このようにして得られた細胞は、確かに、ｃｈｒ６：２９，７０６，８３

７－２９，９５６，１９９、ｃｈｒ６：３１，２２５，７３８－３１，３７６，７８１、ｃｈｒ６：３２，４２１，２５７－３２，８２０，１６７、およびｃｈｒ６：３２，９３４，２９８－３３，１６１，６２１の４つの領域を欠失していた。

[0184] （５）ＨＬＡの発現の評価

細胞をＴｒｙｐＬＥで１細胞に解離させた。０．５％ＢＳＡを含むＰＢＳで細胞を洗浄し、抗ＨＬＡ－Ａ抗体、抗ＨＬＡ－Ｂ抗体、抗ＨＬＡ－Ｃ抗体（ＢｉｏＬｅｇｅｎｄ　３１１４１３；２００倍希釈）を細胞に接触させた。洗浄後、フローサイトメーターにより細胞を解析した。

[0185] （６）多能性幹細胞マーカーの発現の評価

細胞を４％パラホルムアルデヒドを含むＰＢＳで固定した。細胞をＰＢＳで洗浄した後、ＰＢＳＴを加え、室温で３０分間静置した。１％ウシ血清アルブミン（ＢＳＡ）を含むＰＢＳＴ中で室温で１時間静置した。一次抗体（抗ＯＣＴ４抗体、抗ＮＡＮＯＧ抗体、抗ＳＳＥＡ４抗体）を細胞に反応させた。洗浄し、二次抗体と細胞を反応させた。その後、ＤＡＰＩにより核を染色した。染色された細胞を共焦点顕微鏡下で観察した。

[0186] 結果

細胞のＨＬＡ－ＧとＨＬＡ－Ａの間の領域をｇＲＮＡにより標的化してＣａｓ９により切断し、ＵＫｉＳマーカーを当該領域に組込んだ（図３６参照）。ＰｕｒｏおよびＢｌｓｔ存在下で薬剤選択を行って得られた細胞の、ＨＬＡ－ＦからＨＬＡ－Ａまでの一連の領域の外側をｇＲＮＡにより標的化してＣａｓ９により切断し、ＨＬＡ－ＦからＨＬＡ－Ａまでの一連の領域の全体を欠失させた細胞（クローン２７および２９）を得た（図３６参照）。

[0187] 次に、上記クローン２７のＨＬＡ－ＣからＨＬＡ－Ｂの間の領域をｇＲＮＡにより標的化してＣａｓ９により切断し、ＵＫｉＳマーカーを当該領域に組込んだ（図３７参照）。ＰｕｒｏおよびＢｌｓｔ存在下で薬剤選択を行って得られたクローンの、ＨＬＡ－ＦからＨＬＡ－Ａまでの一連の領域の外側をｇＲＮＡにより標的化してＣａｓ９により切断し、ＨＬＡ－ＦからＨＬＡ

－Ａまでの一連の領域の全体を欠失させた細胞（クローン６）を得た（図３７参照）。

[0188] クローン６について、ＨＬＡ－Ａ、ＨＬＡ－Ｂ、およびＨＬＡ－Ｃの発現をフローサイトメトリにより確認した。結果は、図２８に示されるように、改変前の細胞（ｉＰＳ　７７１－３Ｇ　ＷＴ）では、ほぼ全ての細胞がＨＬＡ－Ａ、ＨＬＡ－Ｂ、およびＨＬＡ－Ｃの少なくとも１以上が陽性であったのに対して、改変により得られたクローン６では、その発現は完全に消失した。

[0189] 次に、改変後の細胞（クローン６）における多能性幹細胞マーカーの発現を確認した。図３９に示されるように、改変後の細胞（クローン６）は改変前のｉＰＳ細胞と同等の多能性幹細胞マーカーの発現を示した。したがって、上記ＨＬＡ領域の大型欠損は、細胞の増殖や多能性に対して有意な影響を示さないことが明らかになった。

[0190] さらに、クローン６からＨＬＡ－Ｅを含む領域をｇＲＮＡにより標的化してＣａｓ９により切断し、ＵＫｉＳマーカーを当該領域に組込んだ（図４０参照）。その結果、ＨＬＡ－Ｅを含む領域の代わりにＵＫｉＳマーカーを有する８つのクローンが得られた（図４０参照）。

[0191] 得られた８つのクローンのうちの１つからＵＫｉＳマーカーを１つずつ除去した（図４１参照）。その結果、ＨＬＡ－Ｅを含む領域が完全に欠失した１３クローンが得られた（図４１参照）。

[0192] クローン６からさらにＨＬＡクラスＩＩ領域を欠失させた。具体的には、クローン６のＨＬＡ－ＤＱＢ１をｇＲＮＡにより標的化してＣａｓ９により切断し、ＵＫｉＳマーカーを当該領域に組込んだ（図４２参照）。その後、ＨＬＡ－ＤＲＡからＨＬＡ－ＤＯＢまでの一連の領域の外側をｇＲＮＡにより標的化してＣａｓ９により切断し、上記一連の領域を欠失した細胞（クローン２）を得た（図４２参照）。

[0193] クローン６からさらにＨＬＡクラスＩＩの別の領域を欠失させた。具体的には、クローン６のＨＬＡ－ＤＯＡをｇＲＮＡにより標的化してＣａｓ９に

より切断し、ＵＫｉＳマーカーを当該領域に組込んだ（図４３参照）。その後、ＨＬＡ－ＤＭＢからＨＬＡ－ＤＰＢ２までを含む一連の領域の外側をｇＲＮＡにより標的化してＣａｓ９により切断し、上記一連の領域を欠失した細胞（クローン９および１３）を得た（図４３）。さらに図４２で得られたクローンにおいて、図４４のスキームにしたがってＨＬＡ領域を欠失させた。結果、さらなるＨＬＡ領域を欠失するクローン６～９が得られた（図４４）。

[0194] このように、本開示の発明によれば、ＨＬＡ集積領域を編集し、または欠失させることができ、複数のＨＬＡ集積領域を欠失させることもできることが明らかであった。

[0195] さらに任意の領域（例えば、ＨＬＡ－Ｅの遺伝子座）に様々な外来遺伝子を導入することができる。例えば、図４５では、細胞（ＨＬＡ－Ａ～Ｃ、Ｆ、およびＧを欠失している）からＨＬＡ－Ｅを欠失させ、代わりにその領域にＵＫｉＳマーカーが導入された細胞に対して、外来遺伝子を導入するスキームが示されている。図４５では、外来遺伝子として、上記遺伝子座に、シグナル配列を人工的に連結したＨＬＡ－Ｅ（MAVMAPRTLLLLLSGALALTQTWAGSHSLKYFHTSVSRPGRGEPRFISVGYVDDTQFVRFDNDAASPRMVPRAPWMEQEGSEYWDRETRSARDTAQIFRVNLRTLRGYYNQSEAGSHTLQWMHGCELGPDRRFLRGYEQFAYDGKDYLTLNEDLRSWTAVDTAAQISEQKSNDASEAEHQRAYLEDTCVEWLHKYLEKGKETLLHLEPPKTHVTHHPISDHEATLRCWALGFYPAEITLTWQQDGEGHTQDTELVETRPAGDGTFQKWAAVVVPSGEEQRYTCHVQHEGLPEPVTLRWKPASQPTIPIVGIIAGLVLLGSVVSGAVVAAVIWRKKSSGGKGGSYSKAEWSDSAQGSESHSL）を組込んだ。シグナル配列は、ＨＬＡ－Ａの２番目から１５番目のアミノ酸に相当する配列（AVMAPRTLLLLLSG）を用いた。結果は、図４５に示される通りであり、６／７クローンで外来遺伝子の導入に成功した。

[0196] さらに外来遺伝子として、ＨＬＡ－Ａ～ＣおよびＥを任意の領域（例えば、ＨＬＡ－Ｅの遺伝子座）に導入した。例えば、図４６では、細胞（ＨＬＡ－Ａ～Ｃ、Ｆ、およびＧを欠失している）からＨＬＡ－Ｅを欠失させ、代わりにその領域にＵＫｉＳマーカーが導入された細胞に対して、外来遺伝子を

導入するスキームが示されている。図４６では、外来電子として、上記遺伝子座に、ＨＬＡ－Ａ、ＨＬＡ－Ｂ、ＨＬＡ－Ｃ、およびＨＬＡ－Ｅを組込んだ。これらの遺伝子はそれぞれ、タンパク質のコード領域の上流から終止コドンの下流までを含むものであり、各遺伝子に天然に含まれる全イントロンも含んだ。具体的には以下の通りであった。HLA-Aはコード領域の上流2.3kbpから下流1.1kbpを含み、HLA-Bはコード領域の上流2.1kbpから下流1.1kbpを含み、HLA-Cはコード領域の上流2.2kbpから下流1.1kbpを含み、HLA-Eはコード領域の上流2.6kbpから下流2.2kbpを含んだ。結果は、図４７および４８にそれぞれ示される通りであり、所望のアレルに対して所望の外来遺伝子を組込むことに成功した。得られた細胞における導入外来遺伝子の発現をフローサイトメトリにより確認した。細胞検出用の抗体としてＨＬＡ－Ａ、ＢおよびＣに結合する抗体（Biolegend社、製造番号：311413）を用いた。元のｉＰＳ細胞では、ＨＬＡの発現が認められたが、改変細胞（ＬｘＵＤＣ（１．０））では、これらのＨＬＡをコードする遺伝子が欠損しており、実際にＨＬＡの細胞表面発現が消失した（図４９参照）。これに対して、ＨＬＡ－ＡおよびＢを組込んだ細胞では、ＨＬＡの細胞表面発現が確認された（図４９参照）。ＨＬＡ－ＣおよびＥを組込んだ細胞でも、ＨＬＡの細胞表面発現が確認された（図４９参照）。このように、本開示の方法によれば、片アレル毎に所望の遺伝子を組込むことができる。例えば、本実施例のように、ＨＬＡを欠失した細胞に対して、天然のＨＬＡを制御配列およびイントロン含め導入することで、導入したＨＬＡの発現量の評価および機能性評価が可能となる。したがって、ＨＬＡ類似配列、および多型のそれぞれの発現解析や機能性評価に有用であると考えられる。

[0197] Ｔ細胞による細胞傷害を上記ＵＤＣが回避することを確認した。ｉＰＳ細胞（野生型）、ＬｘＵＤＣ（１．０）＿Ｅ－Ｄｅｌ、またはβ２－ミクログロブリン（Ｂ２Ｍ）ノックアウト細胞とＴ細胞とを１：１、１：３、１：５、または１：１０の比率で混合し、Ｔ細胞による細胞傷害性を確認した。その結果、図５０に示されるように、ＬｘＵＤＣ（１．０）＿Ｅ－Ｄｅｌは、

Ｂ２Ｍノックアウトよりも強く細胞傷害を回避した。

[0198] 配列表の内容

Sequence Number (ID): 1 cttcatctcc gtcggctacg 20

Sequence Number (ID): 2 atgatggaaa actcgatggg 20

Sequence Number (ID): 3 tggaatccgg tataggcgcc 20

Sequence Number (ID): 4 tgagtgaccc gataaaactc 20

Sequence Number (ID): 5 tcttaaaaac ttctatatcg 20

Sequence Number (ID): 6 gtgcaactcc cgaataggct 20

Sequence Number (ID): 7 tgggccttat catccgtcaa 20

Sequence Number (ID): 8 tgggtctgtc gagcacaagg 20

Sequence Number (ID): 9 ggtcaaatgc cttgtactcg 20

Sequence Number (ID): 10 gggagggccg gtaccgttga 20

Sequence Number (ID): 11 atagctaacg tcactattgc 20

Sequence Number (ID): 12 cgttctcagc gcgggcacta 20

Sequence Number (ID): 13 gccgctgccg ctctacgctt 20

Sequence Number (ID): 14 cagaaagggt aagcgcacag 20

Sequence Number (ID): 15 ggcgcaacgc gatcgcgtaa 20

Sequence Number (ID): 16 gacgccagtg cattcgacga 20

Sequence Number (ID): 17 ggcgcaacgc gatcgcgtaa 20

Sequence Number (ID): 18 cctcaccttc ccctcttttc 20

Sequence Number (ID): 19 accttcccct gtgacttgtg 20

Sequence Number (ID): 20 ctcaccttcc cttcctttcc 20

Sequence Number (ID): 21 accttcccct gtgatttgtg 20

Sequence Number (ID): 22 ccaccaccct gtctttgact 20

Sequence Number (ID): 23 tgtcacccct tccttacctg 20

Sequence Number (ID): 24 gaggcagaaa ggcacacata 20

Sequence Number (ID): 25 agcctctcct tcccattctt 20

Sequence Number (ID): 26 tccatcaacc tctcatagca aa 22

Sequence Number (ID): 27	acttctggaa	attccttttg	g	21
Sequence Number (ID): 28	gatggcccat	gtgtggat		18
Sequence Number (ID): 29	ttatcccagg	tgcctgtgtc		20
Sequence Number (ID): 30	ttcccactta	cagccagacc		20
Sequence Number (ID): 31	tacgggaggt	agccagtgtt		20
Sequence Number (ID): 32	tgggaagtgg	tcaggagata	a	21
Sequence Number (ID): 33	ggccttccat	ctgttgct		18
Sequence Number (ID): 34	gacatcggca	aggtgtgg		18
Sequence Number (ID): 35	gtggtggagt	gaacggaga		19
Sequence Number (ID): 36	tgggaagtgg	tcaggagata	a	21
Sequence Number (ID): 37	tgtaatcttc	tctgtcgcta	cttc	24
Sequence Number (ID): 38	tgcaccagat	tgttttgtgt		20
Sequence Number (ID): 39	gtggtggagt	gaacggaga		19
Sequence Number (ID): 40	ccaccttagc	ctcctcctct		20
Sequence Number (ID): 41	aaagcatatt	tgggcactct	g	21
Sequence Number (ID): 42	agacaagttc	accccaccag		20
Sequence Number (ID): 43	tcacctccat	gtgccttaca		20
Sequence Number (ID): 44	acagagagaa	gggcacagga		20
Sequence Number (ID): 45	catcagcaga	agggaggaag		20
Sequence Number (ID): 46	aacatgcaaa	ggggattctg		20
Sequence Number (ID): 47	tggaagtggc	ttttggtttc		20
Sequence Number (ID): 48	tggatttcat	gcctcacaaa		20
Sequence Number (ID): 49	ttcctcttgt	ctccccagaa		20
Sequence Number (ID): 50	caccatcacc	cttcttccac		20
Sequence Number (ID): 51	tgcttcctct	tcccagctaa		20
Sequence Number (ID): 52	caccatcacc	cttcttccac		20
Sequence Number (ID): 53	tgcttcctct	tcccagctaa		20
Sequence Number (ID): 54	gcagagagtg	ggaccaagag		20

Sequence Number (ID): 55 tgctaattct ggggagatgg 20

Sequence Number (ID): 56 tccatcaggg tcttctggtc 20

Sequence Number (ID): 57 tttttaaccg gctctggatg 20

Sequence Number (ID): 58 gagagccctt agctggtgtg 20

Sequence Number (ID): 59 gtgcagtttg tccacccttt 20

Sequence Number (ID): 60 tgggaagtgg tcaggagata a 21

Sequence Number (ID): 61 gtctgggtaa gggccagggc ccccgagagt agcagg agga 40

Sequence Number (ID): 62 acgtagggtc cttcatcctg 20

Sequence Number (ID): 63 gtggtggagt gaacggaga 19

Sequence Number (ID): 64 tgggaagtgg tcaggagata a 21

Sequence Number (ID): 65 agacaactgc caaggacacc 20

Sequence Number (ID): 66 gtggtggagt gaacggaga 19

Sequence Number (ID): 67 ccctgtgtga gtccagaaca 20

Sequence Number (ID): 68 tgggaagtgg tcaggagata a 21

Sequence Number (ID): 69 ccctgtgtga gtccagaaca 20

Sequence Number (ID): 70 gtggtggagt gaacggaga 19

Sequence Number (ID): 71 ccctgtgtga gtccagaaca 20

Sequence Number (ID): 72

MAVMAPRTLL LLLSGALALT QTWAGSHSLK YFHTSVSRPG RGEPRFISVG YVDDTQFVR F 60

WMHGCELGPD RRFLRGYEQF AYDGKDYLTL NEDLRSWTAV DTAAQISEQK SNDASEAEH Q 180

WQQDGEGHTQ DTELVETRPA GDGTFQKWAA VVVPSGEEQR YTCHVQHEGL PEPVTLRWK P 300

L 361

Sequence Number (ID): 73 AVMAPRTLLL LLSG 14

請求の範囲

[請求項1] 細胞であって、欠失を有するゲノムＤＮＡを含み、前記欠失は、以下（ｉ）～（ｉｖ）に規定される染色体領域：

（ｉ） ＨＬＡ－Ｆ、ＨＬＡ－Ｇ、およびＨＬＡ－Ａを含む一連の領域、

（ｉｉ） ＨＬＡ－ＣおよびＨＬＡ－Ｂを含む一連の領域、

（ｉｉｉ） ＨＬＡ－ＤＲＡ、ＨＬＡ－ＤＲＢ５、およびＨＬＡ－ＤＲＢ１を含む一連の領域、および

（ｉｖ） ＨＬＡ－ＤＯＡ、ＨＬＡ－ＤＰＡ１、およびＨＬＡ－ＤＰＢ１を含む一連の領域

からなる群から選択される１以上の染色体領域中にそれぞれ位置するＨＬＡ類似配列集積領域の一部もしくは全体を含む領域の欠失であり、

前記ＨＬＡ類似配列集積領域は、前記染色体領域中にそれぞれ含まれるＨＬＡコードする遺伝子およびＨＬＡ類似配列の全てを含み、

前記一部は少なくとも一つながりの領域を含み、前記一つながりの領域は、上記領域にそれぞれ含まれるＨＬＡコードする遺伝子およびＨＬＡ類似配列からなる群から選択される遺伝子の５０％以上を含む、

細胞。

[請求項2] 請求項１に記載の細胞であって、前記ゲノムＤＮＡにおいて請求項１に規定された欠失を有する（ｉ）～（ｉｖ）のいずれかまたは好ましくはすべては、内在性のＨＬＡおよびＨＬＡ類似配列を含まないか、１つしか含まない、細胞。

[請求項3] 請求項１または２に記載の細胞であって、前記ゲノムＤＮＡにおいて請求項１に規定された欠失を有する（ｉ）～（ｉｖ）のいずれかまたは好ましくはすべては、内在性のＨＬＡおよびＨＬＡ類似配列を含まない、細胞。

[請求項4] 請求項１～３のいずれかに記載の細胞であって、

（ｉ） ＨＬＡ－Ｆ、ＨＬＡ－Ｇ、およびＨＬＡ－Ａを含む一連の領域中のＨＬＡ類似配列集積領域の全体を欠失したゲノムＤＮＡを有する、細胞。

[請求項5] 請求項１～４のいずれかに記載の細胞であって、

（ｉｉ） ＨＬＡ－ＣおよびＨＬＡ－Ｂを含む一連の領域中のＨＬＡ類似配列集積領域の全体を欠失したゲノムＤＮＡを有する、細胞。

[請求項6] 請求項１～５のいずれかに記載の細胞であって、

（ｉｉｉ） ＨＬＡ－ＤＲＡ、ＨＬＡ－ＤＲＢ５、およびＨＬＡ－ＤＲＢ１を含む一連の領域、またはｃｈｒ６： ３２，４４５，０００－３２，８２１，０００に対応する染色体領域中のＨＬＡ類似配列集積領域の全体を欠失したゲノムＤＮＡを有する、細胞。

[請求項7] 請求項１～６のいずれかに記載の細胞であって、

（ｉｖ） ＨＬＡ－ＤＯＡ、ＨＬＡ－ＤＰＡ１、およびＨＬＡ－ＤＰＢ１を含む一連の領域中のＨＬＡ類似配列集積領域の全体を欠失したゲノムＤＮＡを有する、細胞。

[請求項8] 前記欠失が、ｈｇ３８ゲノム配列のｃｈｒ６： ２９，７０１，０００～２９，７２３，４６４に対応する染色体領域中の特有の配列（第２の配列）中に他方の端を有する領域の欠失である、請求項１～７のいずれかに記載の細胞。

[請求項9] 前記ゲノムＤＮＡが、制御配列に作動可能に連結された内因性または外来性の所望の遺伝子の挿入を含み、当該挿入は、上記（ｉ）～（ｉｖ）のいずれかの領域内、または上記（ｉ）～（ｉｖ）の領域以外の領域に位置する、請求項１～８のいずれかに記載の細胞。

[請求項10] 前記欠失が、ｈｇ３８ゲノム配列のｃｈｒ６： ３１，１６６，０００～３１，２６９，１６９に対応する染色体領域中の特有の配列（第３の配列）中に一方の端を有し、ｈｇ３８ゲノム配列のｃｈｒ６： ３１，３５７，１５８～３１，５４４，０００に対応する染色体領

域中の特有の配列（第４の配列）中に他方の端を有する領域の欠失である、請求項１～９のいずれかに記載の細胞。

[請求項11] 前記欠失が、ｈｇ３８ゲノム配列のｃｈｒ６：３２，４１６，０００～３３，４４５，０００に対応する染色体領域中の特有の配列（第５の配列）中に一方の端を有し、ｈｇ３８ゲノム配列のｃｈｒ６：３２，４３９，９５１－３２，８３１，０００に対応する染色体領域中の特有の配列（第６の配列）中に他方の端を有する領域の欠失である、請求項１～１０のいずれかに記載の細胞。

[請求項12] 前記欠失が、ｈｇ３８ゲノム配列のｃｈｒ６：３２，９２４，０００～３３，００６，８３８に対応する染色体領域中の特有の配列（第７の配列）中に一方の端を有し、ｈｇ３８ゲノム配列のｃｈｒ６：３３，０８６，２３８－３３，１６５，０００に対応する染色体領域中の特有の配列（第８の配列）中に他方の端を有する領域の欠失である、請求項１～１１のいずれかに記載の細胞。

[請求項13] 請求項１～１２のいずれかに記載の細胞であって、欠失を有する上記（ｉ）～（ｉｖ）は、その染色体領域内に繰り返し配列を有しない、細胞。

[請求項14] 請求項１～１３のいずれかに記載の細胞であって、機能的なβ２ミクログロブリンおよび機能的なＣＩＩＴＡのいずれかまたは両方を有する、細胞。

[請求項15] 請求項１～１４のいずれかに記載の細胞であって、ＨＬＡクラスＩおよび／またはＨＬＡクラスＩＩを細胞表面に実質的に発現していない、細胞。

[請求項16] 請求項１～１５のいずれかに記載の細胞であって、欠失が１００ｋｂから４００ｋｂの大きさである、細胞。

[請求項17] 請求項１～１６のいずれかに記載の細胞を含む、組成物。

[請求項18] ゲノムの全アレルにおける領域の欠失であって、ＭＨＣ分子をコードする遺伝子座のＭＨＣ類似配列集積領域の一部、または好ましくは

全部を含む領域を含む欠失を有するゲノムを有する細胞。

[請求項19] 各ＭＨＣ類似配列集積領域には、１以下のＭＨＣ分子をコードする遺伝子しか含まれない、請求項１８に記載の細胞。

[請求項20] 各ＭＨＣ類似配列集積領域には、４以下のＭＨＣ分子をコードする遺伝子しか含まれない、請求項１８に記載の細胞。

[請求項21] 各ＭＨＣ類似配列集積領域には、ＭＨＣ分子をコードする遺伝子を含まれない、請求項１８に記載の細胞。

[請求項22] 請求項１８に記載の細胞であって、欠失が、ＭＨＣ分子をコードする遺伝子座のＭＨＣ類似配列集積領域の全部を含む領域を含む欠失である、細胞。

[請求項23] 請求項２２に記載の細胞であって、制御配列と当該制御配列に作動可能に連結された所望の遺伝子をさらに含む、細胞。

[請求項24] 制御配列と当該制御配列に作動可能に連結された所望の遺伝子が、全体として天然に存在しない配列を有する、請求項２３に記載の細胞。

[請求項25] 制御配列と当該制御配列に作動可能に連結された所望の遺伝子が、天然に存在する配列を有する、請求項２３に記載の細胞。