

明 細 書

発明の名称：

探索方法、細胞の作出方法、細胞の選別方法、細胞及び細胞生産物の製造方法

技術分野

[0001] 本開示は、探索方法、細胞の作出方法、細胞の選別方法、細胞及び細胞生産物の製造方法に関する。

背景技術

[0002] 特許文献1には、内在性F e r 1 L 4 遺伝子を含む部位特異的組込み宿主細胞であって、外来性ヌクレオチド配列がF e r 1 L 4 遺伝子に組込まれている宿主細胞が開示されている。

特許文献2には、発現強化座位内の特定の部位で統合される外因性核酸を備えた細胞であって、外因性核酸配列が二特異性抗原結合タンパク質をコードしている細胞が開示されている。

特許文献3には、第一の発現強化座位内に統合された第一の外因性核酸と、第二の発現強化座位内に統合された第二の外因性核酸とを備えた細胞であって、第一及び第二の外因性核酸がともに抗原結合タンパク質をコードする細胞が開示されている。

特許文献4には、第1の高組込み性（H I）座位において染色体組込みされた第1の組換え標的部位（R T S）を含む哺乳動物細胞であって、第1のH I座位が、接近可能なクロマチンの活性のゲノムコンパートメント内且つT A D境界の約30,000塩基対以内にあり、第1のH I座位が、少なくとも1つのエンハンサーエレメントと相互作用する細胞ゲノムの領域とオーバーラップする、細胞が開示されている。

先行技術文献

特許文献

[0003] 特許文献1：欧州特許出願公開第2 7 1 1 4 2 8号明細書

特許文献2：国際公開第2017/184831号

特許文献3：国際公開第2017/184832号

特許文献4：国際公開第2020/072480号

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0004] ヒト化モノクローナル抗体などの医療用タンパク質を安定的に生産する細胞を作出する目的で、目的遺伝子を宿主細胞のゲノムに組み込む技術がある。

遺伝子が高発現する又は安定して発現するゲノム上の領域が予め分かれば、当該領域に目的遺伝子を挿入することで、目的遺伝子を高発現する又は安定して発現する細胞株を高確率で作出できる。

[0005] 本開示は、上記状況のもとになされた。

本開示は、目的遺伝子を挿入するゲノム上の標的領域であり目的遺伝子を高発現する標的領域を見つける探索方法を提供することを課題とする。

本開示は、目的遺伝子を高発現する細胞の作出方法を提供することを課題とする。

本開示は、目的遺伝子を高発現する細胞を選ぶ選別方法を提供することを課題とする。

本開示は、目的遺伝子を高発現する細胞を提供することを課題とする。

本開示は、目的遺伝子がコードする物質の生産性に優れる細胞生産物の製造方法を提供することを課題とする。

課題を解決するための手段

[0006] 課題を解決するための具体的手段には、以下の態様が含まれる。

<1>

目的遺伝子を挿入するゲノム上の標的領域を見つける探索方法であり、

下記（1）を含み、

標的領域としてTADを見つける、

探索方法；

(1) ゲノムが有するTADごとに、転写活性を示すTADスコアを算出し、TADスコアに基づきTADを選ぶこと。

<2>

さらに下記(2)を含む、<1>に記載の探索方法；

(2) ゲノム内の公知のセーフハーバーの少なくとも1つについて、属するTADのTADスコアであるTADスコア-SHを特定し、

少なくとも1つのTADスコア-SHに基づく閾値を決定し、

閾値及びTADスコアに基づきTADを選ぶこと。

<3>

目的遺伝子を挿入するゲノム上の標的領域を見つける探索方法であり、

下記(a)～(d)を含み、

標的領域として、下記の境界対Pによって特定される領域を見つける、

探索方法；

(a) ゲノムに外来遺伝子が組み込まれたゲノムFを有し、外来遺伝子を発現している細胞を用意すること、

(b) 細胞からゲノムFを取得し、ゲノムFを解析して、外来遺伝子を含む領域である領域Fと、領域Fとゲノムとの境界である境界Fとを特定すること、

(c) ゲノムが有するTADごとに、転写活性を示すTADスコアを算出し、境界Fごとに、属するTADのTADスコアであるTADスコア-Fを特定し、TADスコア-Fに基づき境界Fを選ぶこと、

(d) 選択された境界Fのなかから領域Fを挟む境界対Pを見つけること。

<4>

さらに下記(p)を含み、下記(p)によって選択された境界Fについて

(c)を行う、<3>に記載の探索方法；

(p) 領域Fに存在する外来遺伝子のメチル化率を計測し、メチル化率が低値である領域Fの境界Fを選ぶこと。

<5>

さらに下記（q）を含み、（c）及び下記（q）によって選択された境界 F について（d）を行う、＜3＞又は＜4＞に記載の探索方法；

（q）ゲノム内の公知のセーフハーバーの少なくとも1つについて、属する TAD の TAD スコアである TAD スコア－SH を特定し、
少なくとも1つの TAD スコア－SH に基づく閾値を決定し、
閾値及び TAD スコア－F に基づき境界 F を選ぶこと。

＜6＞

さらに下記（r）を含む、＜3＞～＜5＞のいずれか1つに記載の探索方法；

（r）ゲノム F において境界対 P の間にある領域 F が染色体転座によって形成された領域でない境界対 P を選ぶこと。

＜7＞

TAD スコアが、TAD に存在する遺伝子の密度と平均発現量とを乗じた値である、＜1＞～＜6＞のいずれか1つに記載の探索方法。

＜8＞

ゲノムが哺乳動物細胞のゲノムである、＜1＞～＜7＞のいずれか1つに記載の探索方法。

＜9＞

ゲノムが CHO 細胞のゲノムである、＜1＞～＜7＞のいずれか1つに記載の探索方法。

[0007] ＜10＞

＜1＞又は＜2＞に記載の探索方法により TAD を見つけることと、
当該 TAD を有するゲノムの当該 TAD 内部に目的遺伝子を挿入することと、を含む、
細胞の作出方法。

＜11＞

＜3＞～＜9＞のいずれか1つに記載の探索方法により境界対 P によって特定される領域を見つけてることと、

当該領域を有するゲノムの当該領域の前後±10kbpの内部に目的遺伝子を挿入することと、を含む、

細胞の作出方法。

<12>

目的遺伝子が、酵素、抗体、インターロイキン、サイトカイン、ケモカイン、ホルモン、増殖因子、転写因子、受容体、転写制御核酸、ノンコーディングRNA、ウイルス製剤、ワクチン、医療用タンパク質、これらのサブユニット、及びこれらの断片からなる群から選ばれる少なくとも1種をコードする遺伝子である、<10>又は<11>に記載の細胞の作出方法。

[0008] <13>

目的遺伝子を発現する細胞を選ぶ選別方法であり、下記(11)を含む、細胞の選別方法；

(11) 細胞のゲノムが有するTADごとに、転写活性を示すTADスコアを算出し、TADスコアに基づきTADを選び、選択されたTADに目的遺伝子が存在する細胞を選ぶこと。

<14>

さらに下記(12)を含む、<13>に記載の細胞の選別方法；

(12) ゲノム内の公知のセーフハーバーの少なくとも1つについて、属するTADのTADスコアであるTADスコア-SHを特定し、

少なくとも1つのTADスコア-SHに基づく閾値を決定し、

閾値及びTADスコアに基づきTADを選び、選択されたTADに目的遺伝子が存在する細胞を選ぶこと。

<15>

さらに下記(13)を含む、<13>又は<14>に記載の細胞の選別方法；

(13) 選択されたTADに存在する目的遺伝子のメチル化率を計測し、メチル化率が低値である細胞を選ぶこと。

<16>

TADスコアが、TADに存在する遺伝子の密度と平均発現量とを乗じた値である、＜13＞～＜15＞のいずれか1つに記載の細胞の選別方法。

＜17＞

細胞が哺乳動物細胞である、＜13＞～＜16＞のいずれか1つに記載の細胞の選別方法。

＜18＞

細胞がCHO細胞である、＜13＞～＜16＞のいずれか1つに記載の細胞の選別方法。

＜19＞

目的遺伝子が、酵素、抗体、インターロイキン、サイトカイン、ケモカイン、ホルモン、増殖因子、転写因子、受容体、転写制御核酸、ノンコーディングRNA、ウイルス製剤、ワクチン、医療用タンパク質、これらのサブユニット、及びこれらの断片からなる群から選ばれる少なくとも1種をコードする遺伝子である、＜13＞～＜18＞のいずれか1つに記載の細胞の選別方法。

[0009] ＜20＞

チャイニーズハムスターに由来する細胞であり、
表1に示す40領域から選ばれる少なくとも1領域に目的遺伝子が挿入された、
細胞。

＜21＞

チャイニーズハムスターに由来する細胞であり、
表2に示す40領域から選ばれる少なくとも1領域に目的遺伝子が挿入された、
細胞。

＜22＞

チャイニーズハムスターに由来する細胞であり、
表3に示す40領域から選ばれる少なくとも1領域に目的遺伝子が挿入さ

れた、

細胞。

<23>

チャイニーズハムスターに由来する細胞がCHO細胞である、<20>~<22>のいずれか1つに記載の細胞。

<24>

目的遺伝子が、酵素、抗体、インターロイキン、サイトカイン、ケモカイン、ホルモン、増殖因子、転写因子、受容体、転写制御核酸、ノンコーディングRNA、ウイルス製剤、ワクチン、医療用タンパク質、これらのサブユニット、及びこれらの断片からなる群から選ばれる少なくとも1種をコードする遺伝子である、<20>~<23>のいずれか1つに記載の細胞。

[0010] <25>

チャイニーズハムスターに由来する細胞のゲノムの表1に示す40領域から選ばれる少なくとも1領域に目的遺伝子を挿入することを含む、細胞の作出方法。

<26>

チャイニーズハムスターに由来する細胞のゲノムの表2に示す40領域から選ばれる少なくとも1領域に目的遺伝子を挿入することを含む、細胞の作出方法。

<27>

チャイニーズハムスターに由来する細胞のゲノムの表3に示す40領域から選ばれる少なくとも1領域に目的遺伝子を挿入することを含む、細胞の作出方法。

<28>

チャイニーズハムスターに由来する細胞がCHO細胞である、<25>~<27>のいずれか1つに記載の細胞の作出方法。

<29>

目的遺伝子が、酵素、抗体、インターロイキン、サイトカイン、ケモカイ

ン、ホルモン、増殖因子、転写因子、受容体、転写制御核酸、ノンコーディングRNA、ウイルス製剤、ワクチン、医療用タンパク質、これらのサブユニット、及びこれらの断片からなる群から選ばれる少なくとも1種をコードする遺伝子である、＜25＞～＜28＞のいずれか1つに記載の細胞の作出方法。

[0011] ＜30＞

＜10＞～＜12＞及び＜25＞～＜29＞のいずれか1つに記載の細胞の作出方法によって作出した細胞を培養し前記目的遺伝子を発現させること、を含む、細胞生産物の製造方法。

＜31＞

＜13＞～＜19＞のいずれか1つに記載の細胞の選別方法によって選別した細胞を培養し前記目的遺伝子を発現させること、を含む、細胞生産物の製造方法。

＜32＞

＜20＞～＜24＞のいずれか1つに記載の細胞を培養し前記目的遺伝子を発現させること、を含む、細胞生産物の製造方法。

＜33＞

前記目的遺伝子が、酵素、抗体、インターロイキン、サイトカイン、ケモカイン、ホルモン、増殖因子、転写因子、受容体、転写制御核酸、ノンコーディングRNA、ウイルス製剤、ワクチン、医療用タンパク質、これらのサブユニット、及びこれらの断片からなる群から選ばれる少なくとも1種をコードする遺伝子である、＜30＞～＜32＞のいずれか1つに記載の細胞生産物の製造方法。

発明の効果

[0012] 本開示によれば、目的遺伝子を挿入するゲノム上の標的領域であり目的遺伝子を高発現する標的領域を見つける探索方法が提供される。

本開示によれば、目的遺伝子を高発現する細胞の作出方法が提供される。

本開示によれば、目的遺伝子を高発現する細胞を選ぶ選別方法が提供され

る。

本開示によれば、目的遺伝子を高発現する細胞が提供される。

本開示によれば、目的遺伝子がコードする物質の生産性に優れる細胞生産物の製造方法が提供される。

図面の簡単な説明

[0013] [図1]第二の探索方法の概念図である。

[図2]実施例において作出した抗体生産株60株の抗体生産性能を示す散布図である。

[図3]抗体生産株31株のゲノム解析から得た、対になる境界の内部に存在する外来遺伝子のコピー数のヒストグラムである。

[図4]抗体生産株31株のゲノム解析から得た、プロモーター領域及び抗体サブユニット領域の平均メチル化率のヒストグラムである。

[図5]CHO細胞のコンタクトマップの一例である。

[図6]CHO細胞のゲノムに検出された2502個のTADに係るTADスコアの分布図である。

[図7]本実施形態によって見出された高性能領域の性能を示す散布図である。

[図8]本実施形態によって見出された高性能領域の性能を示すグラフである。

[図9]本実施形態によって見出された高性能領域にコード配列を多コピー挿入可能であることを示すグラフである。

[図10]本実施形態によって見出された高性能領域が多コピーのコード配列を安定して発現可能であることを示すグラフである。

発明を実施するための形態

[0014] 以下に、本開示の実施形態を説明する。これらの説明及び実施例は実施形態を例示するものであり、実施形態の範囲を制限するものではない。本開示において述べる作用機序は推定を含んでおり、その正否は実施形態の範囲を制限するものではない。

[0015] 本開示の実施形態を、図面を参照して説明する場合、本開示の実施形態の構成は図面に示された構成に限定されない。図面における要素の大きさは概

念的なものであり、要素間の大きさの相対的な関係はこれに限定されない。

[0016] 本開示において「工程」との語は、独立した工程だけでなく、他の工程と明確に区別できない場合であってもその工程の目的が達成されれば、本用語に含まれる。

[0017] 本開示において「～」を用いて示された数値範囲は、「～」の前後に記載される数値をそれぞれ最小値及び最大値として含む範囲を示す。

本開示中に段階的に記載されている数値範囲において、一つの数値範囲で記載された上限値又は下限値は、他の段階的な記載の数値範囲の上限値又は下限値に置き換えてもよい。また、本開示中に記載されている数値範囲において、その数値範囲の上限値又は下限値は、実施例に示されている値に置き換えてもよい。

[0018] 本開示において各成分は該当する物質を複数種含んでいてもよい。本開示において組成物中の各成分の量について言及する場合、組成物中に各成分に該当する物質が複数種存在する場合には、特に断らない限り、組成物中に存在する複数種の物質の合計量を意味する。

[0019] 本開示において核酸は、あらゆる核酸（例えば、デオキシリボ核酸（DNA）、リボ核酸（RNA）、これらの類似体、天然物、人工物）と、あらゆる核酸に低分子化合物、基（group。例えばメチル基）、核酸以外の分子、構造物などが連結している核酸とを含む用語である。核酸は、一本鎖でもよく二本鎖でもよい。

[0020] 本開示においてドナーベクターは、細胞及び細胞のゲノムに外来性の核酸を運び入れる作用を有する物質であり、それ自体が核酸である。ドナーベクターの由来、形態及び塩基配列に制限はない。ドナーベクターは、環状の核酸でもよく、線状の核酸でもよい。ドナーベクターは、一本鎖の核酸でもよく、二本鎖の核酸でもよい。ドナーベクターは、二本鎖DNAであることが好ましい。

[0021] 本開示においてタンパク質のアミノ酸残基数に制限はない。タンパク質には、アミノ酸が翻訳後修飾されたタンパク質が含まれる。アミノ酸の翻訳後

修飾としては、リン酸化、メチル化、アセチル化、糖鎖付加、脂質付加などが挙げられる。

本開示においてアミノ酸の表記に、IUPAC-IUBMB-JCBN (IUPAC-IUBMB Joint Commission on Biochemical Nomenclature) が定める3文字表記及び1文字表記を使用する。本開示において言及されるアミノ酸は、特に断らない限り、L-アミノ酸である。

[0022] 本開示において、塩基配列の同一性及びアミノ酸配列の同一性は、BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) を使用して算出する。

[0023] TAD (topologically associating domain, topology associating domain) とは、3次元ゲノム構造解析によって検出されるゲノム内の構造単位であり、空間的な接触確率が相対的に高い領域である。TADのサイズは一般的には、数百kbpから数Mbpsである。

3次元ゲノム構造解析のアルゴリズムは、公開されているアルゴリズムでもよく、公開されているアルゴリズムを改良したアルゴリズムでもよく、新たに開発したアルゴリズムでもよい。

3次元ゲノム構造解析に供するゲノム構造データは、公開されているデータベース、学術論文、技術文献などから取得したデータでもよく、現実に細胞内ゲノムを解析して得たデータでもよい。

3次元ゲノム構造解析の解析法として、Hi-C法；Hi-C法を基本原理とするin situ Hi-C法、low Hi-C法、SAFE Hi-C法、Hi-CO法；Micro-C法；などが挙げられる。

[0024] Hi-C法とは、3次元ゲノム構造解析の解析法の1つであり、ゲノム内の空間的に近接した領域をゲノム全体にわたって網羅的に検出する解析法である。Hi-Cは、high-throughput chromosome conformation captureの略である。

Hi-C解析の計算結果から、空間的な接触確率が相対的に高い領域すなわちTADが検出され、ゲノムが複数個のTADに区画される。Hi-C解

析によって検出されるTADのサイズは一般的には、数百kbpから数Mbpである。Hi-C解析によって、哺乳動物ゲノムは数千個のTADに区画される。

TADの検出に使用するHi-C解析のアルゴリズムは、公開されているアルゴリズムでもよく、公開されているアルゴリズムを改良したアルゴリズムでもよく、新たに開発したアルゴリズムでもよい。

Hi-C解析に供するゲノム構造データは、公開されているデータベース、学術論文、技術文献などから取得したデータでもよく、現実細胞内ゲノムを解析して得たデータでもよい。

[0025] ゲノム内のセーフハーバー (safe harbor) とは、遺伝子を挿入しても宿主細胞が生存する領域であり、且つ、挿入された遺伝子が発現する領域である。ゲノム内のセーフハーバーは、染色体番号又は公的な塩基配列データベースのアクセッション番号と塩基番号とによって特定される。公的な塩基配列データベースとして、INSDB (the International Nucleotide Sequence Databases)、RefSeq (NCBI Reference Sequence Database) 等が挙げられる。

ゲノム内のセーフハーバーは、その領域内又はその領域近傍に存在する公知の遺伝子名で呼称されることがある。

[0026] <探索方法>

本開示は、目的遺伝子を挿入するゲノム上の標的領域を見つける探索方法を提供する。

本開示は、第一の探索方法と第二の探索方法とを提供する。

[0027] <第一の探索方法>

第一の探索方法によって見出される標的領域は、ゲノム内の構造単位であるTADであって、転写活性が比較的高いTADである。

[0028] TADには、転写活性が比較的高いTADと、転写活性が比較的低いTADとがある。第一の探索方法は、転写活性が比較的高いTADを見つける目的で、下記(1)を含む。

[0029] (1) ゲノムが有するTADごとに、転写活性を示すTADスコアを算出し、TADスコアに基づきTADを選ぶこと。

[0030] 本開示においてTADスコアとは、転写活性の高低を示す評価基準である。TADスコアは通常、高いほど好ましい評価基準である。

TADスコアに基づきTADを選ぶことは、例えば、TADスコアが相対的に高いTADを選ぶこと；TADスコアが予め定めた基準を上回るTADを選ぶこと；である。

[0031] TADスコアは、ゲノム上に多数見出されるTAD（例えば哺乳動物ゲノムは数千個のTADに区画される。）のなかから、転写活性が比較的高いTADを見出せる指標であればよい。

TADスコアは、例えば、TADに存在する遺伝子の発現量の総量、平均値又は中央値、TADに存在する遺伝子の密度、TAD内のCpGサイトのメチル化率の逆数又は非メチル化率、これらの2以上の値を乗じた値、これらの2以上の値を基にした指標などである。

[0032] TADに存在する遺伝子は、公開されているデータベース、学術論文、技術文献などから知ることが可能である。TADに存在する遺伝子であってTADスコアの算出にかかわる遺伝子は、少なくとも1遺伝子であり、2遺伝子以上が好ましく、多いほど好ましく、TADに存在する遺伝子を可能な限り網羅することが好ましい。

遺伝子の発現量は、公開されているデータベース、学術論文、技術文献などから取得したデータでもよく、現実には遺伝子の発現量を定量して得たデータでもよい。遺伝子の発現量の定量は、公知のmRNA定量法によって可能である。

[0033] TADスコアの実施形態の一例は、TADに存在する遺伝子の密度と平均発現量とを乗じた値である。この値は、高いほど好ましい評価基準である。

TADに存在する遺伝子の密度とは、TADに存在する内在性遺伝子の個数をTADの塩基対数で除した値（genes/Mb）である。

[0034] 第一の探索方法の実施形態の一例は、さらに下記(2)を含む。

(2) ゲノム内の公知のセーフハーバーの少なくとも1つについて、属するTADのTADスコアであるTADスコア-SHを特定し、
少なくとも1つのTADスコア-SHに基づく閾値を決定し、
閾値及びTADスコアに基づきTADを選ぶこと。

[0035] ゲノム内の公知のセーフハーバーは、公開されているデータベース、学術論文、技術文献などから知ることが可能である。TADスコア-SHを特定するセーフハーバーは、少なくとも1つであり、2つ以上が好ましく、例えば8つ以下である。

[0036] 公知のセーフハーバーが多数ある場合、少なくとも1つを選択してよい。セーフハーバーの選択方法として、例えば、挿入された遺伝子がコードするタンパク質の発現量 (pg/cell/copy) が相対的に多いセーフハーバーを選ぶこと；挿入された遺伝子がコードするタンパク質の発現量 (pg/cell/copy) が予め定めた基準を上回るセーフハーバーを選ぶこと；が挙げられる。セーフハーバーのタンパク質発現量は、公開されているデータベース、学術論文、技術文献などから取得したデータでもよく、現実的にセーフハーバーに遺伝子を挿入してタンパク質発現量を測定して得たデータでもよい。

[0037] セーフハーバーの座標（すなわち、染色体番号又は公的な塩基配列データベースのアクセッション番号と塩基番号）を、TADの区画（3次元ゲノム構造解析（例えばHi-C解析）の出力である。）にあてはめ、そのセーフハーバーが属するTADを特定し、次いでそのTADのTADスコアを特定する。ここでTADスコアは、(1)においてTADごとに算出されたTADスコアである。

本開示において、セーフハーバーが属するTADのTADスコアを「TADスコア-SH」という。TADスコア-SHを少なくとも1つ特定する。

[0038] TADスコア-SHに基づく閾値は、例えば、少なくとも1つのTADスコア-SHの最小値、最大値、平均値又は中央値である。

[0039] TADスコアは通常、高いほど好ましい評価基準である。閾値及びTAD

スコアに基づきTADを選ぶことは、閾値を上回るTADスコアを有するTADを選ぶことである。

[0040] TADスコアSHに基づく閾値を基準にして選ばれたTADは、公知のセーフハーバーと同等である又は公知のセーフハーバーを上回る遺伝子発現量を示すと予想される。

[0041] (1)と(2)とが互いに明確に区別できない場合であっても、(1)及び(2)の目的が達成されれば、第一の探索方法は(1)及び(2)を含む。

[0042] <第二の探索方法>

第二の探索方法によって見出される標的領域は、ゲノム内のセーフハーバーであり且つ転写活性が比較的高い領域である。

[0043] 第二の探索方法は、ゲノム内のセーフハーバーであり且つ転写活性が比較的高い領域を見つける目的で下記(a)～(d)を含み、境界対Pによって特定される領域を見出す。境界対Pによって特定される領域とは、境界対Pを始点及び終点とする領域である。

[0044] (a) ゲノムに外来遺伝子が組み込まれたゲノムFを有し、外来遺伝子を発現している細胞を用意すること。

(b) 細胞からゲノムFを取得し、ゲノムFを解析して、外来遺伝子を含む領域である領域Fと、領域Fとゲノムとの境界である境界Fとを特定すること。

(c) ゲノムが有するTADごとに、転写活性を示すTADスコアを算出し、境界Fごとに、属するTADのTADスコアであるTADスコアFを特定し、TADスコアFに基づき境界Fを選ぶこと。

(d) 選択された境界Fのなかから領域Fを挟む境界対Pを見つけること。

[0045] 図1は、第二の探索方法の概念図である。図1は、第二の探索方法の対象であるゲノム、外来遺伝子、細胞、ゲノムF、領域F、境界F、TAD、境界対Pの関係を示す。

[0046] (a) 及び (b) における外来遺伝子とは、第二の探索方法の対象となる

ゲノムが本来有していない遺伝子であり、セーフハーバーを見つける目的でゲノム解析の際に着目する遺伝子である。外来遺伝子の由来、種類、サイズ及び塩基配列は限定されるものではない。外来遺伝子の実施形態の一例は、構造遺伝子（すなわち、タンパク質をコードする遺伝子）である。

[0047] 本開示において外来遺伝子とは、細胞内で発現可能な外来遺伝子を意味する。外来遺伝子は、外来遺伝子の発現に必要なすべての配列を有する。外来遺伝子が構造遺伝子の場合、外来遺伝子は、外来遺伝子がコードするタンパク質の発現に必要なすべての配列を有し、タンパク質のコード配列と当該コード配列の細胞内での転写及び翻訳に必要なすべての核酸（例えば、プロモーター、転写ターミネータ、ポリアデニル化配列）とを含む。外来遺伝子は、タンパク質のコード配列を1コピー含んでいてもよく、2コピー以上含んでいてもよい。例えば、外来遺伝子は、ヘテロ多量体タンパク質の全サブユニットを発現するために、各サブユニットのコード配列を少なくとも1コピーずつ含んでいてよい。例えば、外来遺伝子は、抗体のH鎖をコードする配列と、抗体のL鎖をコードする配列とを、少なくとも1コピーずつ含んでいてよい。

[0048] (a)における細胞は、既に樹立されている株化細胞でもよく、新たに作出した細胞でもよい。細胞は、ポリクローナルな細胞集団でもよく、モノクローナルな細胞でもよい。

(a)における細胞は、外来遺伝子がゲノムに組み込まれても死滅することなく且つ外来遺伝子が発現している細胞であるから、当該細胞から取得したゲノムFを解析することによって、セーフハーバーを見出すことができる。

[0049] (a)における細胞の好ましい一例は、外来遺伝子を安定して高発現しているモノクローナル細胞である。当該細胞のゲノムFの外来遺伝子が挿入されている領域は、高性能のセーフハーバー（すなわち、遺伝子を挿入しても宿主細胞が生存し且つ挿入された遺伝子が安定的に高発現する領域）と推定される。当該細胞から取得したゲノムFを解析することによって、効率よく

高性能のセーフハーバーを見出すことができる。

- [0050] (b) は、具体的には例えば、細胞からのゲノム抽出、シーケンス用ライブラリの作製、ライブラリシーケンシング、リードのゲノム上へのマッピング、リード上への外来遺伝子のマッピング、ゲノムと外来遺伝子との境界の特定、外来遺伝子を含むリードの抽出、リードに含まれる外来遺伝子のコピー数の計測、及び、外来遺伝子を挟む境界対の特定を含む。

ライブラリシーケンシングは、ロングリードを取得する観点及びDNAのメチル化データを得る観点から、1分子リアルタイムシーケンシング又はナノポアシーケンシングが好ましい。

- [0051] 領域Fは、ゲノムF内の領域であって、ゲノムと区別される領域であり、外来遺伝子を少なくとも1コピー含む領域である。

境界Fは、ゲノムFにおける領域Fとゲノムとの境界である。境界Fの座標は、探索対象であるゲノムの染色体番号又は公的な塩基配列データベースのアクセッション番号と塩基番号とによって特定される。公的な塩基配列データベースとして、I N S D (the International Nucleotide Sequence Databases)、R e f S e q (NCBI Reference Sequence Database) 等が挙げられる。

- [0052] (b) の実施形態の一例は、領域Fを、外来遺伝子を多コピー（すなわち2コピー以上）含む領域に絞りこむことを含む。この場合、外来遺伝子を多コピー含む領域Fの境界Fが(c)の対象になる。領域Fが含む外来遺伝子のコピー数は、例えば、2コピー～6コピーであってよく、2コピー～5コピーであってよく、2コピー～4コピーであってよい。

外来遺伝子を多コピー含む領域Fは、多コピー耐性があるので、比較的塩基長が長い多コピーの目的遺伝子を挿入しても安定的に目的物を生産できる。すなわち、長期培養後でも目的物の高い生産量が維持される。従来、1か所に多コピーの外来遺伝子を挿入した場合、当該外来遺伝子がコードする物質の生産量が不安定になりがちであったが、本開示の実施形態によればこの問題が改善される。

比較的塩基長が長い多コピーの目的遺伝子の例として、コード配列を2コピー以上連結した核酸、及び、ヘテロ多量体タンパク質の全サブユニットのコード配列を少なくとも1コピーずつ連結した核酸が挙げられる。コード配列を2コピー以上連結した核酸を挿入できる領域は、目的遺伝子がコードする物質を高生産させる領域である。ヘテロ多量体タンパク質の全サブユニットのコード配列を少なくとも1コピーずつ連結した核酸を挿入できる領域は、ヘテロ多量体タンパク質を安定して生産させる領域である。

[0053] (c)におけるTAD及びTADスコアとは、第一の探索方法の(1)におけるTAD及びTADスコアと同義であり、具体的な形態及び算出の仕方も同じである。

TADスコアの実施形態の一例は、TADに存在する遺伝子の密度と平均発現量とを乗じた値である。この値は、高いほど好ましい評価基準である。

[0054] 境界Fの座標（すなわち、染色体番号又は公的な塩基配列データベースのアクセッション番号と塩基番号）を、TADの区画（3次元ゲノム構造解析（例えばHi-C解析）の出力である。）にあてはめ、境界Fが属するTADを特定し、次いでそのTADのTADスコアを特定する。ここでTADスコアは、TADごとに算出されたTADスコアである。

本開示において、境界Fが属するTADのTADスコアを「TADスコアーF」という。

[0055] TADスコアは通常、高いほど好ましい評価基準である。TADスコアーFに基づき境界Fを選ぶことは、例えば、TADスコアーFが相対的に高い境界Fを選ぶこと；TADスコアーFが予め定めた基準を上回る境界Fを選ぶこと；である。

[0056] (d)は、(c)によって選択された境界Fのなかから、領域Fを挟む境界対Pを見つけることである。境界対Pは、ゲノムFにおいて同じ一つの領域Fの一端ともう一端である。

[0057] 境界対Pは、(c)によって選択された境界Fの対であるゆえ、転写活性が比較的高いTADに存在する座標対である。したがって、境界対Pによっ

て特定される領域（すなわち、境界対 P を始点及び終点とする領域）は、転写活性が比較的高い領域であると予想される。

境界対 P の座標対は、探索対象であるゲノムの染色体番号又は公的な塩基配列データベースのアクセッション番号と塩基番号とによって特定される。公的な塩基配列データベースとして、I N S D (the International Nucleotide Sequence Databases)、R e f S e q (NCBI Reference Sequence Database) 等が挙げられる。

[0058] (b) において、領域 F を外来遺伝子を多コピー含む領域に絞りこんだ場合、境界対 P によって特定される領域は、比較的塩基長が長い目的遺伝子（例えば、コード配列を 2 コピー以上連結した核酸、ヘテロ多量体タンパク質の全サブユニットのコード配列を少なくとも 1 コピーずつ連結した核酸）を挿入しても安定的に目的物を生産できる。すなわち、長期培養後でも目的物の高い生産量が維持される。

[0059] 第二の探索方法の実施形態の一例は、さらに下記 (p) を含み、(p) によって選択された境界 F について (c) を行う。

(p) 領域 F に存在する外来遺伝子のメチル化率を計測し、メチル化率が低値である領域 F の境界 F を選ぶこと。

[0060] DNA のメチル化は一般的に、遺伝子発現を抑制する。したがって (p) は、遺伝子発現が抑制されていない領域 F 及びその境界 F を選ぶことである。(p) によって選択された境界 F について (c) を行い、次いで (d) を行うことによって、遺伝子の高発現を期待できる領域に係る境界対 P を見出す。

[0061] 外来遺伝子のメチル化率は、(b) におけるライブラリシーケンシングとして 1 分子リアルタイムシーケンシング又はナノポアシーケンシングを行って得たデータから取得可能である。

メチル化率の値は、例えば、C p G サイトのメチル化シトシン / C p G サイトの全シトシン $\times 100$ である。

メチル化率の値は、外来遺伝子全体の値でもよく、外来遺伝子の一部の値

(例えば、タンパク質をコードする配列の値)でもよく、外来遺伝子を機能によって区分した範囲ごとの値(例えば、プロモーター領域及びタンパク質をコードする配列それぞれの値)でもよい。対象範囲から得た少なくとも1つのメチル化率の最小値、最大値、平均値又は中央値を、領域F及びその境界Fの選択に使用する代表値とする。

[0062] メチル化率が低値である領域Fを選ぶことは、例えば、メチル化率が相対的に低い領域Fを選ぶこと;メチル化率が予め定めた基準(例えば、30%、20%、10%)を下回る領域Fを選ぶこと;である。

[0063] 第二の探索方法の実施形態の一例は、さらに下記(q)を含み、(c)及び(q)によって選択された境界Fについて(d)を行う。

(q) ゲノム内の公知のセーフハーバーの少なくとも1つについて、属するTADのTADスコアであるTADスコア-SHを特定し、
少なくとも1つのTADスコア-SHに基づく閾値を決定し、
閾値及びTADスコア-Fに基づき境界Fを選ぶこと。

[0064] (q)におけるゲノム内の公知のセーフハーバー、TADスコア-SH及び閾値とは、第一の探索方法の(2)におけるゲノム内の公知のセーフハーバー、TADスコア-SH及び閾値と同義であり、具体的な形態及び特定の仕方も同じである。

[0065] TADスコアは通常、高いほど好ましい評価基準である。閾値及びTADスコア-Fに基づき境界Fを選ぶことは、閾値を上回るTADスコア-Fを有する境界Fを選ぶことである。

[0066] (c)及び(q)を行うことによって境界Fを選抜し、次いで(d)を行うことによって、公知のセーフハーバーと同等である又は公知のセーフハーバーを上回る遺伝子発現量を示すと予想される領域に係る境界対Pを見出す。

[0067] (c)と(q)とが互いに明確に区別できない場合であっても、(c)及び(q)の目的が達成されれば、第二の探索方法は(c)及び(q)を含む。

- [0068] 第二の探索方法の実施形態の一例は、さらに下記（r）を含む。
- （r）ゲノムFにおいて境界対Pの間にある領域Fが染色体転座によって形成された領域でない境界対Pを選ぶこと。
- [0069] 領域Fが染色体転座によって形成された領域でないことの確認は、例えば、領域Fを挟む境界対Pの一方の座標と他方の座標とが同一染色体に帰属し、且つ、領域Fの塩基長（言い換えると、ゲノムF上の境界対P間の距離）が長すぎないことによって確認する。例えば、領域Fの塩基長が100kbp以下であるとき、領域Fが染色体転座によって形成された領域でないと判断し、この領域Fを挟む境界対Pを選ぶ。
- [0070] （d）と（r）とが互いに明確に区別できない場合であっても、（d）及び（r）の目的が達成されれば、第二の探索方法は（d）及び（r）を含む。
- [0071] 第一の探索方法の対象となるゲノムは、ゲノム内の構造単位であるTADを有する限り、あらゆる細胞のゲノムである。細胞の例として、菌類、酵母、昆虫細胞、哺乳動物細胞、植物細胞が挙げられる。
- [0072] 第二の探索方法の対象となるゲノムは、ゲノム内の構造単位であるTADを有することと、ゲノムに遺伝子を組み込んで当該遺伝子を発現する細胞を作出できることを満足する限り、あらゆる細胞のゲノムである。細胞の例として、菌類、酵母、昆虫細胞、哺乳動物細胞、植物細胞が挙げられる。
- [0073] 菌類の例として、麹菌（*Aspergillus oryzae*）が挙げられる。
- [0074] 酵母の例として、出芽酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）、ピキアパストリス（*Pichia pastoris*）及びハンセンラボリモルファ（*Hansenula polymorpha*）が挙げられる。
- [0075] 昆虫細胞の例として、カイコ（*Bombyx mori*）由来のBmN細胞、ヨトウガ（*Spodoptera frugiperda*）由来のSf9細胞及びSf21細胞、ショウジョウバエ（*Drosophila melanogaster*）由来のS2細胞、並びにネムリユスリカ（*Polypedilum vanderplanki*）由来のPv11細胞が挙げられる。
- [0076] 哺乳動物細胞の例として、チャイニーズハムスター卵巣細胞（CHO細胞

）、ベビーハムスター腎臓細胞（BHK細胞）、ヒト胚性腎細胞株（例えばHEK293細胞）、ヒト網膜芽由来細胞株（例えばPERC6細胞）、マウスミエローマ細胞株（例えばNSO細胞及びSP2/O細胞）、及びこれらの細胞に由来する株化細胞が挙げられる。

[0077] CHO細胞の例として、CHO-DG44細胞、CHO-K1細胞、CHO-DXB11細胞、CHOpro3-細胞、及びこれらの細胞に由来する株化細胞が挙げられる。

[0078] 哺乳動物細胞の例として、他の細胞への分化能を有する細胞が挙げられる。例えば、ES細胞 (embryonic stem cells)、iPS細胞 (induced pluripotent stem cells) 等の多能性幹細胞 (pluripotent stem cells)；間葉系幹細胞 (mesenchymal stem cells)、組織幹細胞 (tissue stem cells)、体性幹細胞 (somatic stem cells) 等の多分化能幹細胞 (multipotent stem cells)；などである。

[0079] <細胞の作出方法>

本開示は、目的遺伝子を高発現する細胞の作出方法を提供する。

本開示は、第一の探索方法を含む細胞作出方法と、第二の探索方法を含む細胞作出方法とを提供する。

[0080] 第一の探索方法を含む細胞作出方法は、第一の探索方法によりTADを見つけることと、当該TADを有するゲノムの当該TAD内部に目的遺伝子を挿入することと、を含む。

[0081] 第一の探索方法を含む細胞作出方法において目的遺伝子の挿入領域は、転写活性を示すTADスコアに基づき選ばれたTADの内部であり、つまり転写活性が比較的高いTADの内部である。したがって、作出された細胞は、目的遺伝子を高発現する可能性が高い。

[0082] 第二の探索方法を含む細胞作出方法は、第二の探索方法により境界対Pによって特定される領域を見つけることと、当該領域を有するゲノムの当該領域の前後±10kbpの内部に目的遺伝子を挿入することと、を含む。

[0083] 第二の探索方法を含む細胞作出方法において目的遺伝子の挿入領域は、境

界対Pによって特定される領域（すなわち、境界対Pを始点及び終点とする領域）の前後±10kbpの内部であれば、境界対Pを始点及び終点とする領域の内部でもよく、境界対Pを始点及び終点とする領域の外部でもよく、境界対Pを始点及び終点とする領域の内外にまたがっていてもよい。目的遺伝子の挿入領域は、第二の探索方法によって見出されたセーフハーバーの内部であるか又はその近傍であるので、作出された細胞は、死滅することなく目的遺伝子を高発現する可能性が高い。

[0084] 第二の探索方法を含む細胞作出方法は、目的遺伝子の挿入領域をより狭い範囲に限定してもよい。目的遺伝子の挿入領域の一例として、境界対Pによって特定される領域の前後±8kbpの内部；境界対Pによって特定される領域の前後±5kbpの内部；境界対Pによって特定される領域の前後±3kbpの内部；境界対Pによって特定される領域の前後±1kbpの内部；境界対Pによって特定される領域の内部；が挙げられる。

[0085] 目的遺伝子を挿入する対象となるゲノムは、ゲノム内の構造単位であるTADを有する限り、あらゆる細胞のゲノムである。細胞の例として、菌類、酵母、昆虫細胞、哺乳動物細胞、植物細胞が挙げられる。細胞の具体例は、本開示の探索方法の説明において挙げた具体例と同様である。

[0086] 本開示の細胞作出方法の実施形態の一例は、哺乳動物細胞のゲノムに目的遺伝子を挿入する。哺乳動物細胞の例として、チャイニーズハムスター卵巢細胞（CHO細胞）、ベビーハムスター腎臓細胞（BHK細胞）、ヒト胚性腎細胞株（例えばHEK293細胞）、ヒト網膜芽由来細胞株（例えばPER.C6細胞）、マウスミエローマ細胞株（例えばNS0細胞及びSP2/O細胞）、及びこれらの細胞に由来する株化細胞が挙げられる。

[0087] 本開示の細胞作出方法の実施形態の一例は、CHO細胞のゲノムに目的遺伝子を挿入する。CHO細胞の例として、CHO-DG44細胞、CHO-K1細胞、CHO-DXB11細胞、CHOpro3-細胞、及びこれらの細胞に由来する株化細胞が挙げられる。

[0088] 本開示の細胞作出方法の実施形態の一例は、他の細胞への分化能を有する

細胞のゲノムに目的遺伝子を挿入する。当該細胞の例として、E S細胞、i P S細胞等の多能性幹細胞；間葉系幹細胞、組織幹細胞、体性幹細胞等の分化能幹細胞；が挙げられる。

[0089] ゲノムの標的領域に目的遺伝子を挿入することは、公知のゲノム編集技術によって可能である。

[0090] 目的遺伝子の由来、サイズ及び塩基配列は限定されるものではない。目的遺伝子には、タンパク質をコードする核酸と、タンパク質をコードしない核酸とが含まれる。

目的遺伝子の例として、酵素、抗体、インターロイキン、サイトカイン、ケモカイン、ホルモン、増殖因子、転写因子、受容体、転写制御核酸、ノンコーディングRNA、ウイルス製剤、ワクチン、医療用タンパク質、これらのサブユニット、及びこれらの断片からなる群から選ばれる少なくとも1種をコードする遺伝子が挙げられる。

[0091] 目的遺伝子がタンパク質をコードする核酸である場合、目的遺伝子がコードするタンパク質（本開示において「目的タンパク質」という。）の例として、酵素、抗体、インターロイキン、サイトカイン、ケモカイン、ホルモン、増殖因子、転写因子、受容体、ウイルス製剤を構成するタンパク質、ワクチン、医療用タンパク質、これらのサブユニット、及びこれらの断片からなる群から選ばれる少なくとも1種が挙げられる。

[0092] 本開示において抗体は、免疫グロブリンに限定されず、抗原に結合する分子であればよい。本開示において抗体は、抗体断片及び抗原結合分子を含む用語である。本開示において、抗体の重鎖をH鎖ともいい、抗体の軽鎖をL鎖ともいう。

[0093] タンパク質をコードしない核酸として、転写制御核酸、ノンコーディングRNA、ウイルス製剤を構成する核酸が挙げられる。

ノンコーディングRNA (ncRNA) として、miRNA (microRNA)、shRNA (short hairpin RNA)、siRNA (small interfering RNA)、snRNA (small nuclear RNA)、rRNA (ribosomal RNA)、tR

N A (transfer RNA) 等が挙げられる。

[0094] 本開示において目的遺伝子とは、細胞内で発現可能な目的遺伝子を意味する。目的遺伝子は、目的遺伝子の発現に必要なすべての配列を有する。目的遺伝子が構造遺伝子の場合、目的遺伝子は、目的遺伝子がコードするタンパク質の発現に必要なすべての配列を有し、タンパク質のコード配列と当該コード配列の細胞内での転写及び翻訳に必要なすべての核酸（例えば、プロモーター、転写ターミネータ、ポリアデニル化配列）を含む。目的遺伝子は、タンパク質のコード配列を1コピー含んでいてもよく、2コピー以上含んでいてもよい。例えば、目的遺伝子は、ヘテロ多量体タンパク質の全サブユニットを発現するために、各サブユニットのコード配列を少なくとも1コピーずつ含んでいてよい。例えば、目的遺伝子は、抗体のH鎖をコードする配列と、抗体のL鎖をコードする配列とを、少なくとも1コピーずつ含んでいてよい。

[0095] 本開示の細胞作出方法の実施形態の一例は、コード配列を2コピー以上連結した核酸を目的遺伝子としてゲノムの標的領域に挿入する。本実施形態によって、目的遺伝子がコードする物質を高生産しうる細胞が作出される。

目的遺伝子に含まれるコード配列のコピー数は、細胞の長期継代安定性の観点からは多過ぎないことが好ましく、2コピー～6コピーが好ましく、2コピー～5コピーがより好ましく、2コピー～4コピーが更に好ましい。

[0096] 本開示の細胞作出方法の実施形態の一例は、ヘテロ多量体タンパク質の全サブユニットのコード配列を少なくとも1コピーずつ連結した核酸を目的遺伝子としてゲノムの標的領域に挿入する。本実施形態によって、ヘテロ多量体タンパク質を安定して生産しうる細胞が作出される。

本実施形態における目的遺伝子は、ヘテロ多量体タンパク質の発現量を上げる観点から、全サブユニットのコード配列セットを2コピー以上連結した核酸であることが好ましい。目的遺伝子に含まれる当該セットのコピー数は、細胞の長期継代安定性の観点からは多過ぎないことが好ましく、2コピー～6コピーが好ましく、2コピー～5コピーがより好ましく、2コピー～4

コピーが更に好ましい。

[0097] <細胞の選別方法>

本開示は、目的遺伝子を高発現する細胞を選ぶ選別方法を提供する。

[0098] 目的遺伝子の由来、サイズ及び塩基配列は限定されるものではない。目的遺伝子には、タンパク質をコードする核酸と、タンパク質をコードしない核酸とが含まれる。

目的遺伝子の例として、酵素、抗体、インターロイキン、サイトカイン、ケモカイン、ホルモン、増殖因子、転写因子、受容体、転写制御核酸、ノンコーディングRNA、ウイルス製剤、ワクチン、医療用タンパク質、これらのサブユニット、及びこれらの断片からなる群から選ばれる少なくとも1種をコードする遺伝子が挙げられる。

目的遺伝子の意味及び具体的な形態は、本開示の細胞作出方法の説明に記載した、目的遺伝子の意味及び具体的な形態と同じである。

[0099] 本開示の細胞選別方法は、下記(11)を含む。

(11) 細胞のゲノムが有するTADごとに、転写活性を示すTADスコアを算出し、TADスコアに基づきTADを選び、選択されたTADに目的遺伝子が存在する細胞を選ぶこと。

[0100] (11)におけるTAD及びTADスコアとは、第一の探索方法の(1)におけるTAD及びTADスコアと同義であり、具体的な形態及び算出の仕方も同じである。

TADスコアの実施形態の一例は、TADに存在する遺伝子の密度と平均発現量とを乗じた値である。この値は、高いほど好ましい評価基準である。

[0101] TADに目的遺伝子が存在することの確認は、具体的には例えば、細胞からのゲノム抽出、シーケンス用ライブラリの作製、ライブラリシーケンシング、リードのゲノム上へのマッピング、リード上への目的遺伝子のマッピング、目的遺伝子を含むリードの抽出、及びリードに含まれる目的遺伝子のコピー数の計測によって行う。

ライブラリシーケンシングは、ロングリードを取得する観点及びDNAの

メチル化データを得る観点から、1分子リアルタイムシーケンシング又はナノポアシーケンシングが好ましい。

[0102] (11)によって選択された細胞は、転写活性が比較的高いTADに目的遺伝子が存在するゆえ、目的遺伝子を高発現する細胞であると予想される。

[0103] (11)の実施形態の一例は、選択されたTADに目的遺伝子が多コピー（すなわちコード配列が2コピー以上）存在する細胞を選ぶことを含む。この細胞は、目的遺伝子をより高発現する可能性が高い。選択されたTADに存在する目的遺伝子のコピー数は、細胞の長期継代安定性の観点からは多過ぎないことが好ましく、2コピー～6コピーが好ましく、2コピー～5コピーがより好ましく、2コピー～4コピーが更に好ましい。

[0104] 本開示の細胞選別方法の実施形態の一例は、さらに下記(12)を含む。
(12) ゲノム内の公知のセーフハーバーの少なくとも1つについて、属するTADのTADスコアであるTADスコア-SHを特定し、
少なくとも1つのTADスコア-SHに基づく閾値を決定し、
閾値及びTADスコアに基づきTADを選び、選択されたTADに目的遺伝子が存在する細胞を選ぶこと。

[0105] (12)におけるゲノム内の公知のセーフハーバー、TADスコア-SH及び閾値とは、第一の探索方法の(2)におけるゲノム内の公知のセーフハーバー、TADスコア-SH及び閾値と同義であり、具体的な形態及び特定の仕方も同じである。

[0106] (12)によって選択された細胞は、公知のセーフハーバーに目的遺伝子が挿入された細胞と同等である又は上回る遺伝子発現量を示すと予想される。

[0107] (11)と(12)とが互いに明確に区別できない場合であっても、(11)及び(12)の目的が達成されれば、本開示の細胞選別方法は(11)及び(12)を含む。

[0108] 本開示の細胞選別方法の実施形態の一例は、さらに下記(13)を含む。
(13) 選択されたTADに存在する目的遺伝子のメチル化率を計測し、メ

チル化率が低値である細胞を選ぶこと。

[0109] DNAのメチル化は一般的に、遺伝子発現を抑制する。したがって、(13)を行うことによって、目的遺伝子をより高発現する細胞を選抜する。

[0110] 目的遺伝子のメチル化率は、(11)におけるライブラリシーケンシングとして1分子リアルタイムシーケンシング又はナノポアシーケンシングを行って得たデータから取得可能である。

メチル化率の値は、例えば、CpGサイトのメチル化シトシン/CpGサイトの全シトシン×100である。

メチル化率の値は、目的遺伝子全体の値でもよく、目的遺伝子の一部の値(例えば、タンパク質をコードする配列の値)でもよく、目的遺伝子を機能によって区分した範囲ごとの値(例えば、プロモーター領域及びタンパク質をコードする配列それぞれの値)でもよい。対象範囲から得た少なくとも1つのメチル化率の最小値、最大値、平均値又は中央値を、細胞の選択に使用する代表値とする。

[0111] 目的遺伝子のメチル化率が低値である細胞を選ぶことは、例えば、メチル化率が相対的に低い細胞を選ぶこと；メチル化率が予め定めた基準(例えば、30%、20%、10%)を下回る細胞を選ぶこと；である。

[0112] 本開示の細胞選別方法の対象となる細胞は、構造単位TADを備えたゲノムを有する限り、あらゆる細胞である。細胞の例として、菌類、酵母、昆虫細胞、哺乳動物細胞、植物細胞が挙げられる。細胞の具体例は、本開示の探索方法の説明において挙げた細胞と同様である。

[0113] 本開示の細胞選別方法の実施形態の一例は、哺乳動物細胞を対象にする。哺乳動物細胞の例として、チャイニーズハムスター卵巢細胞(CHO細胞)、ベビーハムスター腎臓細胞(BHK細胞)、ヒト胚性腎細胞株(例えばHEK293細胞)、ヒト網膜芽由来細胞株(例えばPER.C6細胞)、マウスミエローマ細胞株(例えばNSO細胞及びSP2/O細胞)、及びこれらの細胞に由来する株化細胞が挙げられる。

[0114] 本開示の細胞選別方法の実施形態の一例は、CHO細胞を対象にする。C

HO細胞の例として、CHO-DG44細胞、CHO-K1細胞、CHO-DXB11細胞、CHOpro3-細胞、及びこれらの細胞に由来する株化細胞が挙げられる。

- [0115] 本開示の細胞選別方法の実施形態の一例は、分化能を有する哺乳動物細胞から分化した細胞を対象にする。例えば、多能性幹細胞（ES細胞、iPS細胞等）又は多分化能幹細胞（間葉系幹細胞、組織幹細胞、体性幹細胞等）に目的遺伝子を導入して分化させた細胞を対象にする。

[0116] <細胞>

本開示は、ゲノムに外来性の目的遺伝子が組み込まれた細胞であり、目的遺伝子を高発現する細胞を提供する。

- [0117] 本開示の細胞は、チャイニーズハムスターに由来する細胞である。チャイニーズハムスターに由来する細胞の例として、線維芽細胞、脂肪細胞、脂肪由来幹細胞、骨髓由来幹細胞、卵巣細胞、及びこれらの細胞に由来する株化細胞が挙げられる。

- [0118] チャイニーズハムスターに由来する細胞の実施形態の一例は、チャイニーズハムスター卵巣細胞（CHO細胞）である。CHO細胞の例として、CHO-DG44細胞、CHO-K1細胞、CHO-DXB11細胞、CHOpro3-細胞、及びこれらの細胞に由来する株化細胞が挙げられる。

- [0119] 本開示の細胞は、チャイニーズハムスターに由来する細胞のゲノムの下記の表1に示す40領域から選ばれる少なくとも1領域に目的遺伝子が挿入された細胞である。

表1に示す40領域は、チャイニーズハムスターのRefSeqアクセス番号と塩基番号、すなわち表1中の「RefSeq ID」、「start」及び「end」によって特定される領域である。

[0120]

[表1]

ID	RefSeq ID	start	end	TAD start	TAD end
ID001	NC_048599.1	14,718,000	14,719,000	14,500,000	15,500,000
ID002	NC_048596.1	51,129,000	51,130,000	50,900,000	51,400,000
ID003	NW_023276806.1	59,884,000	59,885,000	59,800,000	60,700,000
ID004	NC_048595.1	36,214,000	36,215,000	35,700,000	36,300,000
ID005	NC_048600.1	114,071,000	114,072,000	113,400,000	114,500,000
ID006	NC_048600.1	91,446,000	91,447,000	90,900,000	91,700,000
ID007	NW_023276806.1	130,298,000	130,299,000	129,000,000	130,800,000
ID008	NC_048595.1	399,476,000	399,478,000	398,500,000	399,800,000
ID009	NC_048600.1	44,678,000	44,679,000	44,300,000	45,900,000
ID010	NC_048597.1	133,640,000	133,641,000	133,300,000	134,100,000
ID011	NC_048596.1	49,747,000	49,748,000	49,400,000	49,900,000
ID012	NW_023276806.1	64,039,000	64,040,000	63,800,000	64,400,000
ID013	NC_048599.1	24,283,000	24,284,000	23,300,000	24,700,000
ID014	NC_048597.1	103,921,000	103,922,000	103,500,000	104,300,000
ID015	NW_023276807.1	98,900,000	98,901,000	98,200,000	99,100,000
ID016	NC_048596.1	52,669,000	52,670,000	52,400,000	53,000,000
ID017	NC_048595.1	4,234,000	4,235,000	3,800,000	4,400,000
ID018	NC_048600.1	128,311,000	128,312,000	128,000,000	128,600,000
ID019	NC_048598.1	101,190,000	101,191,000	100,500,000	102,300,000
ID020	NC_048596.1	74,294,000	74,296,000	72,800,000	74,600,000
ID021	NC_048597.1	135,053,000	135,054,000	134,100,000	135,100,000
ID022	NW_023276806.1	231,799,000	231,800,000	231,200,000	232,000,000
ID023	NC_048598.1	124,775,000	124,776,000	124,000,000	126,000,000
ID024	NW_023276806.1	99,361,000	99,364,000	99,200,000	100,000,000
ID025	NW_023276806.1	65,423,000	65,424,000	65,300,000	66,200,000
ID026	NW_023276806.1	65,250,000	65,251,000	64,400,000	65,300,000
ID027	NC_048600.1	128,983,000	128,984,000	128,600,000	129,300,000
ID028	NC_048595.1	376,666,000	376,667,000	376,000,000	376,900,000
ID029	NC_048595.1	17,007,000	17,010,000	15,000,000	18,400,000
ID030	NC_048596.1	53,710,000	53,712,000	53,000,000	54,900,000
ID031	NC_048597.1	102,218,000	102,219,000	102,100,000	102,700,000
ID032	NC_048595.1	402,863,000	402,867,000	402,000,000	404,000,000
ID033	NC_048596.1	160,455,000	160,457,000	159,300,000	160,900,000
ID034	NW_023276806.1	113,498,000	113,499,000	113,000,000	114,000,000
ID035	NC_048600.1	83,874,000	83,875,000	83,500,000	85,200,000
ID036	NC_048598.1	97,009,000	97,010,000	96,900,000	97,600,000
ID037	NC_048600.1	43,400,000	43,401,000	43,300,000	44,300,000
ID038	NC_048599.1	11,603,000	11,606,000	11,300,000	11,900,000
ID039	NC_048596.1	182,191,000	182,192,000	181,900,000	182,500,000
ID040	NC_048597.1	6,894,000	6,898,000	5,300,000	7,500,000

[0121] 表1には、各領域が属するTADも示した。ここでのTADとは、後述す

る実施例において検出したTADである。表1中の「TAD start」及び「TAD end」とは、後述する実施例において取得したTADの境界座標である。表2及び表3においても「TAD start」及び「TAD end」の意味は同じである。

[0122] 表1に示す40領域は、本開示の第二の探索方法によって見出された領域及びその近傍とからなる領域であり、遺伝子が高発現しうる領域である。

したがって、表1に示す40領域から選ばれる少なくとも1領域に目的遺伝子が挿入されたゲノムを有する細胞は、目的遺伝子を高発現しうる細胞である。

[0123] 本開示の細胞の好ましい一例は、チャイニーズハムスターに由来する細胞のゲノムの下記の表2に示す40領域及び当該40領域のいずれかと90%以上の配列同一性を有する領域からなる群から選ばれる少なくとも1領域に目的遺伝子が挿入された細胞である。

表2に示す40領域は、チャイニーズハムスターのRefSeqアクセッション番号と塩基番号、すなわち表2中の「RefSeq ID」、「start」及び「end」によって特定される領域である。

[0124]

[表2]

ID	RefSeq ID	start	end	TAD start	TAD end
ID001	NC_048599.1	14,718,500	14,719,000	14,500,000	15,500,000
ID002	NC_048596.1	51,129,100	51,129,300	50,900,000	51,400,000
ID003	NW_023276806.1	59,884,700	59,885,000	59,800,000	60,700,000
ID004	NC_048595.1	36,214,700	36,215,000	35,700,000	36,300,000
ID005	NC_048600.1	114,071,400	114,071,600	113,400,000	114,500,000
ID006	NC_048600.1	91,446,400	91,446,600	90,900,000	91,700,000
ID007	NW_023276806.1	130,298,700	130,298,900	129,000,000	130,800,000
ID008	NC_048595.1	399,476,900	399,477,100	398,500,000	399,800,000
ID009	NC_048600.1	44,678,000	44,678,200	44,300,000	45,900,000
ID010	NC_048597.1	133,640,300	133,640,400	133,300,000	134,100,000
ID011	NC_048596.1	49,747,500	49,747,600	49,400,000	49,900,000
ID012	NW_023276806.1	64,039,600	64,039,800	63,800,000	64,400,000
ID013	NC_048599.1	24,283,600	24,283,900	23,300,000	24,700,000
ID014	NC_048597.1	103,921,700	103,922,000	103,500,000	104,300,000
ID015	NW_023276807.1	98,900,400	98,900,800	98,200,000	99,100,000
ID016	NC_048596.1	52,669,000	52,669,400	52,400,000	53,000,000
ID017	NC_048595.1	4,234,000	4,234,300	3,800,000	4,400,000
ID018	NC_048600.1	128,311,600	128,311,800	128,000,000	128,600,000
ID019	NC_048598.1	101,190,200	101,190,300	100,500,000	102,300,000
ID020	NC_048596.1	74,294,900	74,295,200	72,800,000	74,600,000
ID021	NC_048597.1	135,053,600	135,053,800	134,100,000	135,100,000
ID022	NW_023276806.1	231,799,700	231,799,900	231,200,000	232,000,000
ID023	NC_048598.1	124,775,600	124,775,700	124,000,000	126,000,000
ID024	NW_023276806.1	99,361,200	99,363,200	99,200,000	100,000,000
ID025	NW_023276806.1	65,423,200	65,423,400	65,300,000	66,200,000
ID026	NW_023276806.1	65,250,100	65,250,200	64,400,000	65,300,000
ID027	NC_048600.1	128,983,800	128,983,900	128,600,000	129,300,000
ID028	NC_048595.1	376,666,100	376,666,300	376,000,000	376,900,000
ID029	NC_048595.1	17,007,000	17,009,100	15,000,000	18,400,000
ID030	NC_048596.1	53,710,800	53,711,100	53,000,000	54,900,000
ID031	NC_048597.1	102,218,700	102,219,000	102,100,000	102,700,000
ID032	NC_048595.1	402,863,400	402,866,800	402,000,000	404,000,000
ID033	NC_048596.1	160,455,800	160,456,100	159,300,000	160,900,000
ID034	NW_023276806.1	113,498,200	113,498,300	113,000,000	114,000,000
ID035	NC_048600.1	83,874,600	83,874,800	83,500,000	85,200,000
ID036	NC_048598.1	97,009,800	97,010,000	96,900,000	97,600,000
ID037	NC_048600.1	43,400,600	43,400,900	43,300,000	44,300,000
ID038	NC_048599.1	11,603,900	11,606,000	11,300,000	11,900,000
ID039	NC_048596.1	182,191,200	182,191,300	181,900,000	182,500,000
ID040	NC_048597.1	6,894,900	6,898,000	5,300,000	7,500,000

[0125] 表2に示す40領域は、表1に示す40領域の内部の領域である。

表2に示す40領域は、本開示の第二の探索方法によって見出された領域及びその近傍とからなる領域であり、遺伝子が高発現しうる領域である。

したがって、表2に示す40領域から選ばれる少なくとも1領域に目的遺伝子が挿入されたゲノムを有する細胞は、目的遺伝子を高発現しうる細胞である。

[0126] 本開示の細胞のより好ましい一例は、チャイニーズハムスターに由来する細胞のゲノムの下記の表3に示す40領域及び当該40領域のいずれかと90%以上の配列同一性を有する領域からなる群から選ばれる少なくとも1領域に目的遺伝子が挿入された細胞である。

表3に示す40領域は、チャイニーズハムスターのRefSeqアクセッション番号と塩基番号、すなわち表3中の「RefSeq ID」、「start」及び「end」によって特定される領域である。

[0127]

[表3]

ID	RefSeq ID	start	end	TAD start	TAD end
ID001	NC_048599.1	14,718,537	14,718,914	14,500,000	15,500,000
ID002	NC_048596.1	51,129,124	51,129,247	50,900,000	51,400,000
ID003	NW_023276806.1	59,884,736	59,884,955	59,800,000	60,700,000
ID004	NC_048595.1	36,214,754	36,214,975	35,700,000	36,300,000
ID005	NC_048600.1	114,071,453	114,071,525	113,400,000	114,500,000
ID006	NC_048600.1	91,446,475	91,446,543	90,900,000	91,700,000
ID007	NW_023276806.1	130,298,782	130,298,868	129,000,000	130,800,000
ID008	NC_048595.1	399,476,949	399,477,087	398,500,000	399,800,000
ID009	NC_048600.1	44,678,001	44,678,194	44,300,000	45,900,000
ID010	NC_048597.1	133,640,371	133,640,374	133,300,000	134,100,000
ID011	NC_048596.1	49,747,511	49,747,523	49,400,000	49,900,000
ID012	NW_023276806.1	64,039,641	64,039,762	63,800,000	64,400,000
ID013	NC_048599.1	24,283,669	24,283,893	23,300,000	24,700,000
ID014	NC_048597.1	103,921,782	103,921,984	103,500,000	104,300,000
ID015	NW_023276807.1	98,900,416	98,900,795	98,200,000	99,100,000
ID016	NC_048596.1	52,669,001	52,669,381	52,400,000	53,000,000
ID017	NC_048595.1	4,234,084	4,234,208	3,800,000	4,400,000
ID018	NC_048600.1	128,311,615	128,311,783	128,000,000	128,600,000
ID019	NC_048598.1	101,190,261	101,190,263	100,500,000	102,300,000
ID020	NC_048596.1	74,294,973	74,295,112	72,800,000	74,600,000
ID021	NC_048597.1	135,053,691	135,053,742	134,100,000	135,100,000
ID022	NW_023276806.1	231,799,769	231,799,836	231,200,000	232,000,000
ID023	NC_048598.1	124,775,601	124,775,631	124,000,000	126,000,000
ID024	NW_023276806.1	99,361,271	99,363,118	99,200,000	100,000,000
ID025	NW_023276806.1	65,423,238	65,423,335	65,300,000	66,200,000
ID026	NW_023276806.1	65,250,143	65,250,198	64,400,000	65,300,000
ID027	NC_048600.1	128,983,816	128,983,850	128,600,000	129,300,000
ID028	NC_048595.1	376,666,157	376,666,240	376,000,000	376,900,000
ID029	NC_048595.1	17,007,040	17,009,047	15,000,000	18,400,000
ID030	NC_048596.1	53,710,835	53,711,073	53,000,000	54,900,000
ID031	NC_048597.1	102,218,787	102,218,939	102,100,000	102,700,000
ID032	NC_048595.1	402,863,440	402,866,729	402,000,000	404,000,000
ID033	NC_048596.1	160,455,825	160,456,061	159,300,000	160,900,000
ID034	NW_023276806.1	113,498,266	113,498,270	113,000,000	114,000,000
ID035	NC_048600.1	83,874,602	83,874,708	83,500,000	85,200,000
ID036	NC_048598.1	97,009,803	97,009,945	96,900,000	97,600,000
ID037	NC_048600.1	43,400,692	43,400,878	43,300,000	44,300,000
ID038	NC_048599.1	11,603,997	11,605,946	11,300,000	11,900,000
ID039	NC_048596.1	182,191,235	182,191,245	181,900,000	182,500,000
ID040	NC_048597.1	6,894,998	6,897,936	5,300,000	7,500,000

[0128] 表3に示す40領域は、表2に示す40領域の内部の領域である。

表3に示す40領域は、本開示の第二の探索方法によって見出された領域であり、セーフハーバー且つ遺伝子が高発現する領域である。

したがって、表3に示す40領域から選ばれる少なくとも1領域に目的遺伝子が挿入されたゲノムを有する細胞は、目的遺伝子を安定して高発現する細胞である。

[0129] 目的遺伝子の由来、サイズ及び塩基配列は限定されるものではない。目的遺伝子には、タンパク質をコードする核酸と、タンパク質をコードしない核酸とが含まれる。

目的遺伝子の例として、酵素、抗体、インターロイキン、サイトカイン、ケモカイン、ホルモン、増殖因子、転写因子、受容体、転写制御核酸、ノンコーディングRNA、ウイルス製剤、ワクチン、医療用タンパク質、これらのサブユニット、及びこれらの断片からなる群から選ばれる少なくとも1種をコードする遺伝子が挙げられる。

[0130] 目的遺伝子がタンパク質をコードする核酸である場合、目的タンパク質の例として、酵素、抗体、インターロイキン、サイトカイン、ケモカイン、ホルモン、増殖因子、転写因子、受容体、ウイルス製剤を構成するタンパク質、ワクチン、医療用タンパク質、これらのサブユニット、及びこれらの断片からなる群から選ばれる少なくとも1種が挙げられる。

[0131] タンパク質をコードしない核酸として、転写制御核酸、ノンコーディングRNA、ウイルス製剤を構成する核酸が挙げられる。

ノンコーディングRNA (ncRNA) として、miRNA (microRNA)、shRNA (short hairpin RNA)、siRNA (small interfering RNA)、snRNA (small nuclear RNA)、rRNA (ribosomal RNA)、tRNA (transfer RNA) 等が挙げられる。

[0132] 本開示において目的遺伝子とは、細胞内で発現可能な目的遺伝子を意味する。目的遺伝子は、目的遺伝子の発現に必要なすべての配列を有する。目的遺伝子が構造遺伝子の場合、目的遺伝子は、目的遺伝子がコードするタンパク質の発現に必要なすべての配列を有し、タンパク質のコード配列と当該コ

ード配列の細胞内での転写及び翻訳に必要なすべての核酸（例えば、プロモーター、転写ターミネータ、ポリアデニル化配列）とを含む。目的遺伝子は、タンパク質のコード配列を1コピー含んでいてもよく、2コピー以上含んでいてもよい。例えば、目的遺伝子は、ヘテロ多量体タンパク質の全サブユニットを発現するために、各サブユニットのコード配列を少なくとも1コピーずつ含んでいてよい。例えば、目的遺伝子は、抗体のH鎖をコードする配列と、抗体のL鎖をコードする配列とを、少なくとも1コピーずつ含んでいてよい。

[0133] 本開示の細胞の実施形態の一例は、コード配列を2コピー以上連結した核酸が目的遺伝子として挿入されたゲノムを有する。本実地形態の細胞は、目的遺伝子がコードする物質を高生産しうる。

目的遺伝子に含まれるコード配列のコピー数は、細胞の長期継代安定性の観点からは多過ぎないことが好ましく、2コピー～6コピーが好ましく、2コピー～5コピーがより好ましく、2コピー～4コピーが更に好ましい。

[0134] 本開示の細胞の実施形態の一例は、ヘテロ多量体タンパク質の全サブユニットのコード配列を少なくとも1コピーずつ連結した核酸が目的遺伝子として挿入されたゲノムを有する。本実地形態の細胞は、ヘテロ多量体タンパク質を安定して生産しうる。

本実施形態における目的遺伝子は、ヘテロ多量体タンパク質の発現量を上げる観点から、全サブユニットのコード配列セットを2コピー以上連結した核酸であることが好ましい。目的遺伝子に含まれる当該セットのコピー数は、細胞の長期継代安定性の観点からは多過ぎないことが好ましく、2コピー～6コピーが好ましく、2コピー～5コピーがより好ましく、2コピー～4コピーが更に好ましい。

[0135] 本開示は、チャイニーズハムスターに由来する細胞であって、目的遺伝子を高発現する細胞の作出方法を提供する。

当該細胞作出方法は、チャイニーズハムスターに由来する細胞のゲノムの表1に示す40領域から選ばれる少なくとも1領域に目的遺伝子を挿入する

ことを含む。

当該細胞作出方法の好ましい一例は、チャイニーズハムスターに由来する細胞のゲノムの表2に示す40領域から選ばれる少なくとも1領域に目的遺伝子を挿入することを含む。

当該細胞作出方法のより好ましい一例は、チャイニーズハムスターに由来する細胞のゲノムの表3に示す40領域から選ばれる少なくとも1領域に目的遺伝子を挿入することを含む。

ゲノムの標的領域に目的遺伝子を挿入することは、公知のゲノム編集技術によって可能である。

[0136] <細胞生産物の製造方法>

本開示は、生産性に優れる細胞生産物の製造方法を提供する。本開示の細胞生産物の製造方法は、目的遺伝子を高発現する細胞を用いることによって、目的遺伝子がコードする物質（本開示において「目的物質」という。）の生産性に優れる。目的遺伝子を高発現する細胞とは、本開示の細胞作出方法によって作出した細胞、本開示の細胞選別方法によって選別した細胞及び本開示の細胞からなる群から選ばれる少なくとも1種である。

[0137] 本開示の細胞生産物の製造方法は、細胞を培養し、目的遺伝子を発現させ、目的物質を生産する。細胞を培養することによって、目的物質が細胞内で生産され、培養液及び／又は細胞に目的物質が蓄積する。

[0138] 細胞の培養方法及び培地組成は、細胞の種類に応じて選択すればよい。培養条件（例えば、培養スケール、細胞密度、温度及びCO₂濃度）も、細胞の種類に応じて選択すればよい。

[0139] 本開示の細胞生産物の製造方法の実施形態の一例は、培養液から目的物質を回収することを含む。培養液から目的物質を回収する方法として、例えば、遠心分離、濾過、透析濾過、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、疎水的相互作用クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィー及び高速液体クロマトグラフィー（HPLC）が挙げられる。回収された目的物質は、例えば、医薬組成物の製造に使用される。

[0140] 本開示の細胞生産物の製造方法の実施形態の一例は、目的物質が蓄積した細胞を培地から回収することを含む。培地から細胞を回収する方法として、例えば、遠心分離及び濾過が挙げられる。目的物質は、その性質にしたがって細胞の内部又は表面に蓄積する。回収された細胞は、例えば、哺乳動物に投与、輸注又は移植される。

実施例

[0141] 以下に具体例を挙げて、本開示の探索方法などをより具体的に説明する。以下の具体例に示す材料、処理手順などは、本開示の趣旨を逸脱しない限り適宜変更することができる。本開示の探索方法などの範囲は、以下に示す具体例によって限定的に解釈されるべきではない。

[0142] <抗体生産株の作出>

[方法]

ジヒドロ葉酸レダクターゼ（DHFR）遺伝子を有する人工プラスミドを基盤にして、公知のIgGをコードする遺伝子（H鎖遺伝子1個とL鎖遺伝子1個の合計2個の抗体サブユニット遺伝子）を搭載したプラスミドを構築した。H鎖遺伝子及びL鎖遺伝子はそれぞれ、hEF-1 α プロモーター、フィブロネクチン分泌リーダーのコード配列、抗体サブユニットのコード配列及びポリA配列を含む。フィブロネクチン分泌リーダーは、ポリペプチドの細胞外への分泌を誘導するシグナルペプチドである。

プラスミド上の2個の抗体サブユニット遺伝子の並び順は、L鎖-H鎖である。以下、この遺伝子群（L鎖-H鎖）を「GoI」という。

[0143] プラスミドを線状化し、CHO-DG44細胞にエレクトロポレーションによって導入した。メトトレキサート（MTX）を含む培地で14日～21日間静置培養し、MTX耐性の細胞プールを樹立した。

96ウェルプレートに1ウェルあたり1細胞播種し、温度37℃且つCO₂濃度10%（v/v）雰囲気下で静置培養した。

培養14日目に培養上清を回収し、分子間相互作用解析装置Octet Qke（ザルトリウス）を用いて抗体濃度を測定した。抗体濃度が上位のク

ローンを選抜し、24ウェルプレートで培養し、次いでバイオリクターチューブで培養し、スケールアップを行った。抗体濃度が上位の細胞を60株選抜した。

細胞の長期継代安定性を確認する目的で、継代培地に細胞を懸濁し、3日おきに継代を行った。細胞の分裂回数が合計60回を超えたところで継代を終了した。

[0144] <フェドバッチ培養試験>

[方法]

長期継代を行う前と後の抗体生産株60株をそれぞれ、基礎培地40mLに懸濁し、振盪培養用125mLフラスコに移し、温度37℃且つCO₂濃度5% (v/v) 雰囲気下、速度140rpmで振盪培養及びフィードを行った。

培養開始3日目から13日目まで毎日、フィード培地を一定量加えた。1日～3日おきにサンプリングし、細胞密度、培養液成分及び抗体濃度を測定した。測定には、セルカウンターVicerCELLEXR (ベックマン・コールター)、細胞培養環境分析装置FLEX2 (ノバ・バイオメディカル) 及び生成物測定装置CedexBio (ロシュ・ダイアグノスティックス) を用いた。

培養開始14日目に培養液を回収し、デプスフィルター (ポアサイズ0.22μm) を用いて細胞と細胞デブリを除き、培養上清を得た。培養上清中の抗体濃度を、プロテインAカラムを用いた液体クロマトグラフィーによって測定した。

[0145] [結果]

図2に、抗体生産株60株の抗体生産性能を示す。図2の散布図は、横軸が比生産速度の長期継代前後の変化度、縦軸が相対的な比生産速度である。

抗体生産株60株から、横軸が-20%以上である31株を選抜した。

[0146] <GoIの挿入位置の計測>

[方法]

抗体生産株31株を2週間振盪培養した。培地は、無血清基礎培地（CD OptiCHO Medium、型番12681-011、サーモフィッシュサイエンティフィック）にL-グルタミン酸及びメトトレキサートを添加した液体培地を使用した。

各細胞の培地からそれぞれ 4×10^6 細胞を回収し、長鎖ゲノム抽出キットを用いてゲノムを抽出した。ゲノムの鎖長を調整し濃縮した。

ロングリードシーケンスキット（Ligation Sequencing Kit、型番SQK-LSK109、オックスフォード・ナノポアテクノロジーズ）を用いて、濃縮したゲノムからライブラリを作製した。ライブラリ中のDNAの配列を、ナノポアシーケンサー（型番M1CCapEx、オックスフォード・ナノポアテクノロジーズ）を用いて読み取った。

シーケンサーから出力されたfast5ファイルをベースコールしてfastqファイル及び相当するfastaファイルを取得した。すべてのリードから、H鎖遺伝子及びL鎖遺伝子を含むリードをBLAST（Basic Local Alignment Search Tool）によって抽出し、それらをCHOゲノム（GCF_003668045.3）にマッピングし、マッピングデータ（bamファイル）を取得した。マッピングツールには、minimap2を使用した。

bamファイルをIntegrative Genomics Viewer（IGV）（Broad Institute）で可視化し、GoIとゲノムとの境界を網羅的に特定した。

以下、GoIとゲノムとの境界を「ジャンクション」といい、その座標を「ジャンクション座標」という。

[0147] [結果]

抗体生産株31株から合計226個のジャンクションが見つかった。

[0148] <GoIの挿入様式の計測>

[方法]

シーケンサーから出力されたfast5ファイルをベースコールしてfastq

s t q ファイルを取得した。リードをCHOゲノム (C r i G r i - P l C R H) にマッピングした。マッピングツールには、m i n i m a p 2 を使用した。ジャンクション座標から 6 5 0 0 b p 以内にマッピングされたリードのみを抽出した。

自作ソフト「T a u l V i s」を用いて、抽出したリード中の、ゲノムとの相同領域及び G o l との相同領域を可視化した。2つのジャンクション及び G o l が一つながりに読み取れるリード（すなわち「ジャンクションー G o l ージャンクション」）を抽出した。

[0149] [結果]

上記の一つながりのリードに含まれるジャンクションは、合計 1 7 6 個であった。

[0150] <G o l を挟むジャンクションの特定>

[方法]

上記の一つながりのリード上に、H鎖遺伝子及びL鎖遺伝子をマッピングした。マッピングツールには、m i n i m a p 2 を使用した。H鎖遺伝子の完全長がマッピングできたとき、H鎖コピー数としてカウントした。同じく、L鎖遺伝子の完全長がマッピングできたとき、L鎖コピー数としてカウントした。

H鎖遺伝子及びL鎖遺伝子が1コピー以上カウントされたリードを抽出し、抽出したリードに含まれるジャンクションを特定した。

[0151] [結果]

図3に、H鎖遺伝子及びL鎖遺伝子のコピー数のヒストグラムを示す。図3のヒストグラムは、横軸がコピー数、縦軸がジャンクション数である。

H鎖遺伝子及びL鎖遺伝子が1コピー以上カウントされたリードに含まれるジャンクションは、合計 1 6 5 個であった。

[0152] <低メチル化領域の検出>

[方法]

H鎖遺伝子及びL鎖遺伝子が1コピー以上カウントされたリードにおいて

、前述の `fast5` ファイルから、塩基修飾解析ツール (`Megalodon`、オックスフォード・ナノポアテクノロジーズ) を用いて、`CpG` サイトのメチル化シトシンを検出した。プロモーター領域、`H` 鎖コード配列及び `L` 鎖コード配列ごとに、メチル化率 ($\text{CpG サイトのメチル化シトシン} / \text{CpG サイトの全シトシン} \times 100$) を計測し、メチル化率の算術平均値を算出した。

[0153] [結果]

図 4 に、プロモーター領域、`H` 鎖コード配列及び `L` 鎖コード配列それぞれの平均メチル化率を示す。図 4 のヒストグラムは、横軸が平均メチル化率、縦軸がジャンクション数である。

プロモーター領域及び抗体サブユニット領域のすべての平均メチル化率が 10% 以下であったリードに含まれるジャンクションは、合計 140 個であった。

[0154] <TAD の境界座標の取得>

[方法]

`CHO` 細胞のゲノム構造を解析した論文 (William Hilliard, Kelvin H. Lee, Systematic identification of safe harbor regions in the CHO genome through a comprehensive epigenome analysis, Biotechnology and Bioengineering, 2020, <https://doi.org/10.1002/bit.27599>) から、`Hi-C` 解析に供するゲノム構造データ (`fastq` ファイル, `SRRID: SRR12194154`) を取得した。

マッピングプログラム `bwa` を用いて、`fastq` ファイルを `CHO` ゲノム (`CriGr-PICRH`, https://www.ncbi.nlm.nih.gov/datasets/genome/GCF_003668045.3/) にマッピングし (アラインメントパラメーター: `-A1`, `-B4`, `-E50`, `-L0`)、マッピングデータ (`bam` ファイル) を取得した。

次いで、`Hi-C` データ解析・可視化ツールである `HiCExplorer` の `hicBuildMatrix` コマンド (`binSize: 100000`

）を用いて、マッピングデータ（bamファイル）からコンタクトマップを取得した。

次いで、hicFindTADsコマンド（minDepth:300000, maxDepth:600000, Step:100000, minBoundaryDistance 400000）を用いて、コンタクトマップからTADの境界座標（始点と終点の対の集合）を取得した。

[0155] [結果]

上記の論文から取得したゲノム構造データはペアエンドの281,721,369リードを含むデータであった。全リードをCHOゲノムへマッピングした結果、pairとなったリードは1億5000リードあり、これらを用いて染色体ごとのコンタクトマップを取得した。

図5に、RefSeqアクセッション番号NW_023276806.1のコンタクトマップ（ヒートマップとして表現した。）を示す。

CHOゲノム全体で2502個のTADを検出した。

[0156] <TADスコアの算出>

[方法]

CHO細胞の内在性遺伝子の座標情報（GCF_003668045.3_CriGri-PICRH-1.0_genomic.gtf）をもとに、2502個のTADそれぞれに含まれる内在性遺伝子を検出した。

CHO-DG44細胞を試料にしてRNA-Seq（タカラバイオ）を実施し、内在性遺伝子のmRNA量を定量し、mRNA量をTPM（transcripts per million）に補正した値を内在性遺伝子の発現量として取得した。

2502個のTADごとに、内在性遺伝子の密度と内在性遺伝子の平均発現量（常用対数変換後のTPM値の平均）とを乗じた値を算出し、この値をTADスコアとした。

[0157] [結果]

図6にTADスコアの分布を示す。図6中の「×」が、降順に示した2502個のTADスコアである。

[0158] <公知のセーフハーバーのTADスコアの特定>

[方法]

CHO細胞のセーフハーバーとしてF e r 1 l 4 遺伝子座、H p r t 遺伝子座及びC 1 2 o r f 3 5 遺伝子座が知られている。これら3つの遺伝子座が属するTADを特定し、そのTADスコアを特定した。3つのTADスコアのうちの最小値を閾値に決定した。

[0159] [結果]

3つの遺伝子座が属するTADのTADスコアは下記の値であった。図6の分布図に、3本の横線として示した。

F e r 1 l 4 遺伝子座= 3 4 . 3

H p r t 遺伝子座= 1 2 . 3

C 1 2 o r f 3 5 遺伝子座= 9 . 0

閾値を9 . 0に決定した。

[0160] <TADスコアが高いジャンクションの選択>

[方法]

140個のジャンクションが属するTAD及びそのTADスコアを特定した。

140個のジャンクションのなかから、閾値9 . 0（すなわち、C 1 2 o r f 3 5 遺伝子座のTADスコア）を上回るTADスコアを有するジャンクションを選んだ。

[0161] [結果]

図6中の「○」が、メチル化率によって選抜した140個のジャンクションである。

140個のジャンクションのうち28個のジャンクションのTADスコアが9 . 0を上回っていた。

[0162] <染色体転座がないジャンクション対の検出>

[方法]

H鎖遺伝子及びL鎖遺伝子を1コピー以上含む領域を挟むジャンクション

対のうち、ジャンクション座標に基づきジャンクション対が同一染色体上にあると判断でき、且つ、リード上のジャンクション対の間の距離が100 kb以下であるとき、ジャンクション対の間に染色体転座がないと判断した。この判断基準に基づき、ジャンクション間に染色体転座がないジャンクション対を検出した。

[0163] [結果]

TADスコアが9.0を上回っていた28個のジャンクションのうち14個のジャンクションが、ジャンクション間に染色体転座がないジャンクション対であった。

7つのジャンクション対に挟まれた7領域は、ここまでの一連の処理によって、挿入遺伝子のセーフハーバーであり、且つ、挿入遺伝子が安定して高発現する領域と推定された。

表4に、7領域及び14個のジャンクション座標（7領域の「start」及び「end」）を示す。

[0164] [表4]

ID	RefSeq ID	start	end	TAD start	TAD end
ID023	NC_048598.1	124,775,601	124,775,631	124,000,000	126,000,000
ID024	NW_023276806.1	99,361,271	99,363,118	99,200,000	100,000,000
ID029	NC_048595.1	17,007,040	17,009,047	15,000,000	18,400,000
ID032	NC_048595.1	402,863,440	402,866,729	402,000,000	404,000,000
ID034	NW_023276806.1	113,498,266	113,498,270	113,000,000	114,000,000
ID038	NC_048599.1	11,603,997	11,605,946	11,300,000	11,900,000
ID040	NC_048597.1	6,894,998	6,897,936	5,300,000	7,500,000

[0165] <7領域の遺伝子発現量の検証>

[方法]

表4に示す7領域それぞれについて、挿入遺伝子の両端に7領域に対するホモロジーアームを付加したプラスミドを作製した。挿入遺伝子は、前述の2個の抗体サブユニット遺伝子（L鎖－H鎖）である。

[0166] 作製したプラスミドをCHO細胞にエレクトロポレーション（4D-Nucleofector X unit system、ロンザ）で導入した

。

ゲノムと挿入遺伝子の境界を増幅するPCR及びデジタルPCRシステム（QX-200、バイオ・ラッドラボラトリーズ）によって、挿入遺伝子が予定した領域に1コピーのみ導入された株を選抜した。

比較対象として、CHO細胞の公知のセーフハーバーであるFer114遺伝子座に、挿入遺伝子が1コピーのみ導入された株を、上記と同様にして作出した。

比較対象として、線状化した挿入遺伝子をCHO細胞にエレクトロポレーションで導入し、ゲノムへランダムインテグレーションさせた。デジタルPCRシステムによって、挿入遺伝子が全ゲノムあたり1コピーのみ導入された株を選抜した。

細胞株を培養し、H鎖及びL鎖それぞれのmRNA量をリアルタイムPCR（CFX96、バイオ・ラッドラボラトリーズ）により定量した。

[0167] [結果]

図7にH鎖のmRNA量を示す。縦軸は、ランダムインテグレーションによって作出した、1コピーのみ挿入遺伝子が導入された47株のmRNA量の平均値に対するmRNA量比である。

「R1」が、ランダムインテグレーションによって作出した47株である。

「T1」が上から順に、Fer114遺伝子座に挿入した株、ID029に挿入した株、ID040に挿入した株である。

図7に示した結果から、本実施形態によって見出された領域への遺伝子挿入は、ランダムインテグレーションに比べて、目的遺伝子を高発現する株を作出する確率が高いことが分かる。

[0168] 図8に、ID040に挿入した株、ID029に挿入した株、ID038に挿入した株、ID032に挿入した株、及びID024に挿入した株の、H鎖の比生産速度を示す。ここでの比生産速度とは、Fer114遺伝子座に挿入した株の生産速度に対する比である。

上記の5株は、比生産速度0.8超であり、Fer114遺伝子座に挿入した株と比べて遜色なかった。

[0169] <多コピー挿入株の作出>

[方法]

表4に示す7領域にコード配列の多コピー挿入を試みた。7領域それぞれについて、挿入遺伝子の両端に7領域に対するホモロジーアームを付加したプラスミドを作製した。挿入遺伝子は、前述の2個の抗体サブユニット遺伝子（L鎖－H鎖）を2つ又は4つ連結した核酸である。

[0170] 作製したプラスミドをCHO細胞にエレクトロポレーション（4D-Nucleofector X unit system、ロンザ）で導入した。

ゲノムと挿入遺伝子の境界を増幅するPCR及びデジタルPCRシステム（QX-200、バイオ・ラッドラボラトリーズ）によって、挿入遺伝子が予定した領域に2コピー又は4コピーのみ導入された株を選抜した。

細胞の長期継代安定性を確認する目的で、継代培地に細胞を懸濁し、3日おきに継代を行った。細胞の分裂回数が合計60回を超えたところで継代を終了した。

[0171] [結果]

図9にddPCRによって決定したL鎖及びH鎖のコピー数を示す。横軸は作出した株名を表し、領域IDの後ろに株の識別番号を付してある。

ID040-1株及びID040-2株には、L鎖－H鎖を2つ連結した核酸が挿入されていた。ID040は、L鎖－H鎖を少なくとも2コピー挿入可能な領域であった。

ID029-1株及びID029-2株には、L鎖－H鎖を4つ連結した核酸が挿入されていた。ID029は、L鎖－H鎖を少なくとも4コピー挿入可能な領域であった。

ID032-1株及びID032-2株には、L鎖－H鎖を4つ連結した核酸が挿入されていた。ID032は、L鎖－H鎖を少なくとも4コピー挿

入可能な領域であった。

[0172] <フェドバッチ培養試験>

[方法]

ID040-1株、ID040-2株、ID029-1株、ID029-2株、ID032-1株及びID032-2株を培養試験に供した。

[0173] 長期継代を行う前と後の抗体生産株6株をそれぞれ、基礎培地40mLに懸濁し、振盪培養用125mLフラスコに移し、温度37℃且つCO₂濃度5% (v/v) 雰囲気下、速度140rpmで振盪培養及びフィードを行った。

培養開始3日目から13日目まで毎日、フィード培地を一定量加えた。1日～3日おきにサンプリングし、細胞密度、培養液成分及び抗体濃度を測定した。測定には、セルカOUNTER V i e r C E L L X R (ベックマン・コールター)、細胞培養環境分析装置 F L E X 2 (ノバ・バイオメディカル) 及び生成物測定装置 C e d e x B i o (ロシュ・ダイアグノスティックス) を用いた。

培養開始14日目に培養液を回収し、デブスフィルター (ポアサイズ0.22µm) を用いて細胞と細胞デブリを除き、培養上清を得た。培養上清中の抗体濃度を、プロテインAカラムを用いた液体クロマトグラフィーによって測定した。

[0174] [結果]

図10に、長期培養前後の抗体生産株6株の抗体生産性能を示す。preは長期培養前、postは長期培養後の抗体生産株である。縦軸が相対的な比生産速度である。

図10に示した結果から、ID040、ID029又はID032にL鎖-H鎖が2コピー又は4コピー挿入された抗体生産株は、長期培養後でも抗体生産量が低下せず、安定的に抗体を生産できることが分かる。ID040にL鎖-H鎖が2コピー挿入された株に比べて、ID029又はID032にL鎖-H鎖が4コピー挿入された株の方が抗体生産性が高く、コード配列

のコピー数の増加に伴い抗体生産量が増加することが分かる。

- [0175] 本明細書に記載された全ての文献、特許出願、及び技術規格は、個々の文献、特許出願、及び技術規格が参照により取り込まれることが具体的かつ個々に記された場合と同程度に、本明細書中に参照により取り込まれる。
- [0176] 2023年11月29日に出願された日本国出願番号第2023-202228号の開示は、その全体が参照により本明細書に取り込まれる。

請求の範囲

- [請求項1] 目的遺伝子を挿入するゲノム上の標的領域を見つける探索方法であり、
- 下記（１）を含み、
- 前記標的領域としてTADを見つける、
- 探索方法；
- （１）ゲノムが有するTADごとに、転写活性を示すTADスコアを算出し、前記TADスコアに基づきTADを選ぶこと。
- [請求項2] さらに下記（２）を含む、請求項１に記載の探索方法；
- （２）前記ゲノム内の公知のセーフハーバーの少なくとも１つについて、属するTADの前記TADスコアであるTADスコア－SHを特定し、
- 少なくとも１つの前記TADスコア－SHに基づく閾値を決定し、
- 前記閾値及び前記TADスコアに基づきTADを選ぶこと。
- [請求項3] 目的遺伝子を挿入するゲノム上の標的領域を見つける探索方法であり、
- 下記（a）～（d）を含み、
- 前記標的領域として、下記の境界対Pによって特定される領域を見つける、
- 探索方法；
- （a）ゲノムに外来遺伝子が組み込まれたゲノムFを有し、前記外来遺伝子を発現している細胞を用意すること、
- （b）前記細胞から前記ゲノムFを取得し、前記ゲノムFを解析して、前記外来遺伝子を含む領域である領域Fと、前記領域Fと前記ゲノムとの境界である境界Fとを特定すること、
- （c）前記ゲノムが有するTADごとに、転写活性を示すTADスコアを算出し、前記境界Fごとに、属するTADの前記TADスコアであるTADスコア－Fを特定し、前記TADスコア－Fに基づき前記

境界 F を選ぶこと、

(d) 選択された前記境界 F のなかから前記領域 F を挟む境界対 P を見つけること。

[請求項4] さらに下記 (p) を含み、下記 (p) によって選択された前記境界 F について前記 (c) を行う、請求項 3 に記載の探索方法；

(p) 前記領域 F に存在する前記外来遺伝子のメチル化率を計測し、前記メチル化率が低値である前記領域 F の境界 F を選ぶこと。

[請求項5] さらに下記 (q) を含み、前記 (c) 及び下記 (q) によって選択された前記境界 F について前記 (d) を行う、請求項 3 又は請求項 4 に記載の探索方法；

(q) 前記ゲノム内の公知のセーフハーバーの少なくとも 1 つについて、属する TAD の前記 TAD スコアである TAD スコア - SH を特定し、

少なくとも 1 つの前記 TAD スコア - SH に基づく閾値を決定し、前記閾値及び前記 TAD スコア - F に基づき前記境界 F を選ぶこと。

[請求項6] さらに下記 (r) を含む、請求項 3 又は請求項 4 に記載の探索方法；

(r) 前記ゲノム F において前記境界対 P の間にある前記領域 F が染色体転座によって形成された領域でない境界対 P を選ぶこと。

[請求項7] 前記 TAD スコアが、前記 TAD に存在する遺伝子の密度と平均発現量とを乗じた値である、請求項 1 ～請求項 4 のいずれか 1 項に記載の探索方法。

[請求項8] 前記ゲノムが哺乳動物細胞のゲノムである、請求項 1 又は請求項 3 に記載の探索方法。

[請求項9] 前記ゲノムが CHO 細胞のゲノムである、請求項 1 又は請求項 3 に記載の探索方法。

[請求項10] 請求項 1 に記載の探索方法により前記 TAD を見つけることと、

前記TADを有するゲノムの前記TAD内部に目的遺伝子を挿入することと、を含む、
細胞の作出方法。

[請求項11] 請求項3に記載の探索方法により前記境界対Pによって特定される領域を見つけることと、

前記領域を有するゲノムの前記領域の前後±10kbpの内部に目的遺伝子を挿入することと、を含む、
細胞の作出方法。

[請求項12] 前記目的遺伝子が、酵素、抗体、インターロイキン、サイトカイン、ケモカイン、ホルモン、増殖因子、転写因子、受容体、転写制御核酸、ノンコーディングRNA、ウイルス製剤、ワクチン、医療用タンパク質、これらのサブユニット、及びこれらの断片からなる群から選ばれる少なくとも1種をコードする遺伝子である、請求項10又は請求項11に記載の細胞の作出方法。

[請求項13] 目的遺伝子を発現する細胞を選ぶ選別方法であり、下記(11)を含む、細胞の選別方法；

(11) 細胞のゲノムが有するTADごとに、転写活性を示すTADスコアを算出し、前記TADスコアに基づきTADを選び、選択されたTADに前記目的遺伝子が存在する細胞を選ぶこと。

[請求項14] さらに下記(12)を含む、請求項13に記載の細胞の選別方法；

(12) 前記ゲノム内の公知のセーフハーバーの少なくとも1つについて、属するTADの前記TADスコアであるTADスコア-SHを特定し、

少なくとも1つの前記TADスコア-SHに基づく閾値を決定し、
前記閾値及び前記TADスコアに基づきTADを選び、選択されたTADに前記目的遺伝子が存在する細胞を選ぶこと。

[請求項15] さらに下記(13)を含む、請求項13又は請求項14に記載の細胞の選別方法；

(13) 選択されたTADに存在する前記目的遺伝子のメチル化率を計測し、前記メチル化率が低値である細胞を選ぶこと。

[請求項16] 前記TADスコアが、前記TADに存在する遺伝子の密度と平均発現量とを乗じた値である、請求項13又は請求項14に記載の細胞の選別方法。

[請求項17] 前記細胞が哺乳動物細胞である、請求項13に記載の細胞の選別方法。

[請求項18] 前記細胞がCHO細胞である、請求項13に記載の細胞の選別方法。

[請求項19] 前記目的遺伝子が、酵素、抗体、インターロイキン、サイトカイン、ケモカイン、ホルモン、増殖因子、転写因子、受容体、転写制御核酸、ノンコーディングRNA、ウイルス製剤、ワクチン、医療用タンパク質、これらのサブユニット、及びこれらの断片からなる群から選ばれる少なくとも1種をコードする遺伝子である、請求項13に記載の細胞の選別方法。

[請求項20] チャイニーズハムスターに由来する細胞であり、
下記の表1に示す40領域から選ばれる少なくとも1領域に目的遺伝子が挿入された、
細胞。

[表1]

ID	RefSeq ID	start	end
ID001	NC_048599.1	14,718,000	14,719,000
ID002	NC_048596.1	51,129,000	51,130,000
ID003	NW_023276806.1	59,884,000	59,885,000
ID004	NC_048595.1	36,214,000	36,215,000
ID005	NC_048600.1	114,071,000	114,072,000
ID006	NC_048600.1	91,446,000	91,447,000
ID007	NW_023276806.1	130,298,000	130,299,000
ID008	NC_048595.1	399,476,000	399,478,000
ID009	NC_048600.1	44,678,000	44,679,000
ID010	NC_048597.1	133,640,000	133,641,000
ID011	NC_048596.1	49,747,000	49,748,000
ID012	NW_023276806.1	64,039,000	64,040,000
ID013	NC_048599.1	24,283,000	24,284,000
ID014	NC_048597.1	103,921,000	103,922,000
ID015	NW_023276807.1	98,900,000	98,901,000
ID016	NC_048596.1	52,669,000	52,670,000
ID017	NC_048595.1	4,234,000	4,235,000
ID018	NC_048600.1	128,311,000	128,312,000
ID019	NC_048598.1	101,190,000	101,191,000
ID020	NC_048596.1	74,294,000	74,296,000
ID021	NC_048597.1	135,053,000	135,054,000
ID022	NW_023276806.1	231,799,000	231,800,000
ID023	NC_048598.1	124,775,000	124,776,000
ID024	NW_023276806.1	99,361,000	99,364,000
ID025	NW_023276806.1	65,423,000	65,424,000
ID026	NW_023276806.1	65,250,000	65,251,000
ID027	NC_048600.1	128,983,000	128,984,000
ID028	NC_048595.1	376,666,000	376,667,000
ID029	NC_048595.1	17,007,000	17,010,000
ID030	NC_048596.1	53,710,000	53,712,000
ID031	NC_048597.1	102,218,000	102,219,000
ID032	NC_048595.1	402,863,000	402,867,000
ID033	NC_048596.1	160,455,000	160,457,000
ID034	NW_023276806.1	113,498,000	113,499,000
ID035	NC_048600.1	83,874,000	83,875,000
ID036	NC_048598.1	97,009,000	97,010,000
ID037	NC_048600.1	43,400,000	43,401,000
ID038	NC_048599.1	11,603,000	11,606,000
ID039	NC_048596.1	182,191,000	182,192,000
ID040	NC_048597.1	6,894,000	6,898,000

[請求項21] 前記チャイニーズハムスターに由来する細胞がCHO細胞である、
請求項20に記載の細胞。

- [請求項22] 前記目的遺伝子が、酵素、抗体、インターロイキン、サイトカイン、ケモカイン、ホルモン、増殖因子、転写因子、受容体、転写制御核酸、ノンコーディングRNA、ウイルス製剤、ワクチン、医療用タンパク質、これらのサブユニット、及びこれらの断片からなる群から選ばれる少なくとも1種をコードする遺伝子である、請求項20又は請求項21に記載の細胞。
- [請求項23] 請求項10又は請求項11に記載の細胞の作出方法によって作出した細胞を培養し前記目的遺伝子を発現させること、を含む、
細胞生産物の製造方法。
- [請求項24] 請求項13又は請求項14に記載の細胞の選別方法によって選別した細胞を培養し前記目的遺伝子を発現させること、を含む、
細胞生産物の製造方法。
- [請求項25] 請求項20又は請求項21に記載の細胞を培養し前記目的遺伝子を発現させること、を含む、
細胞生産物の製造方法。