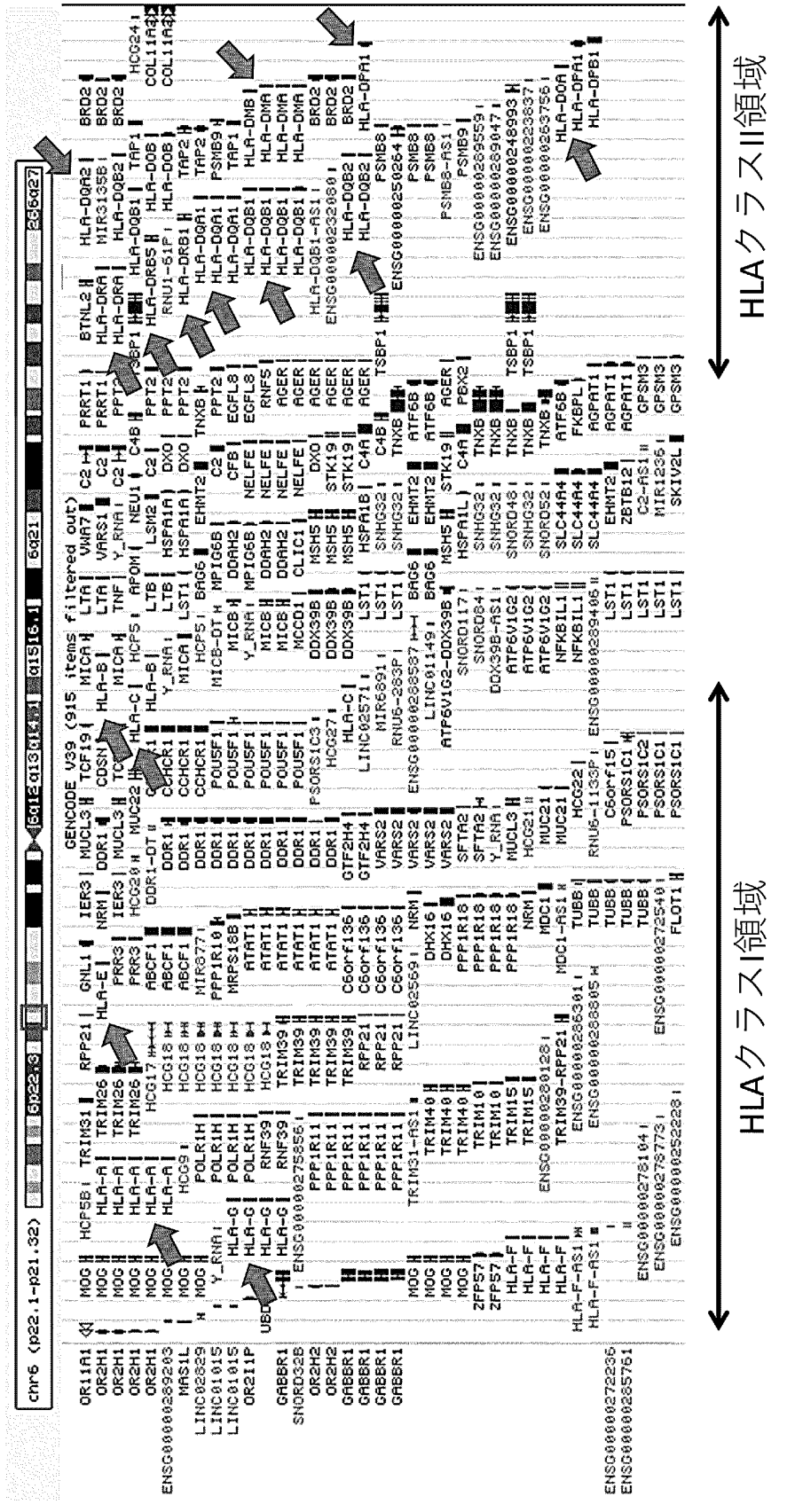
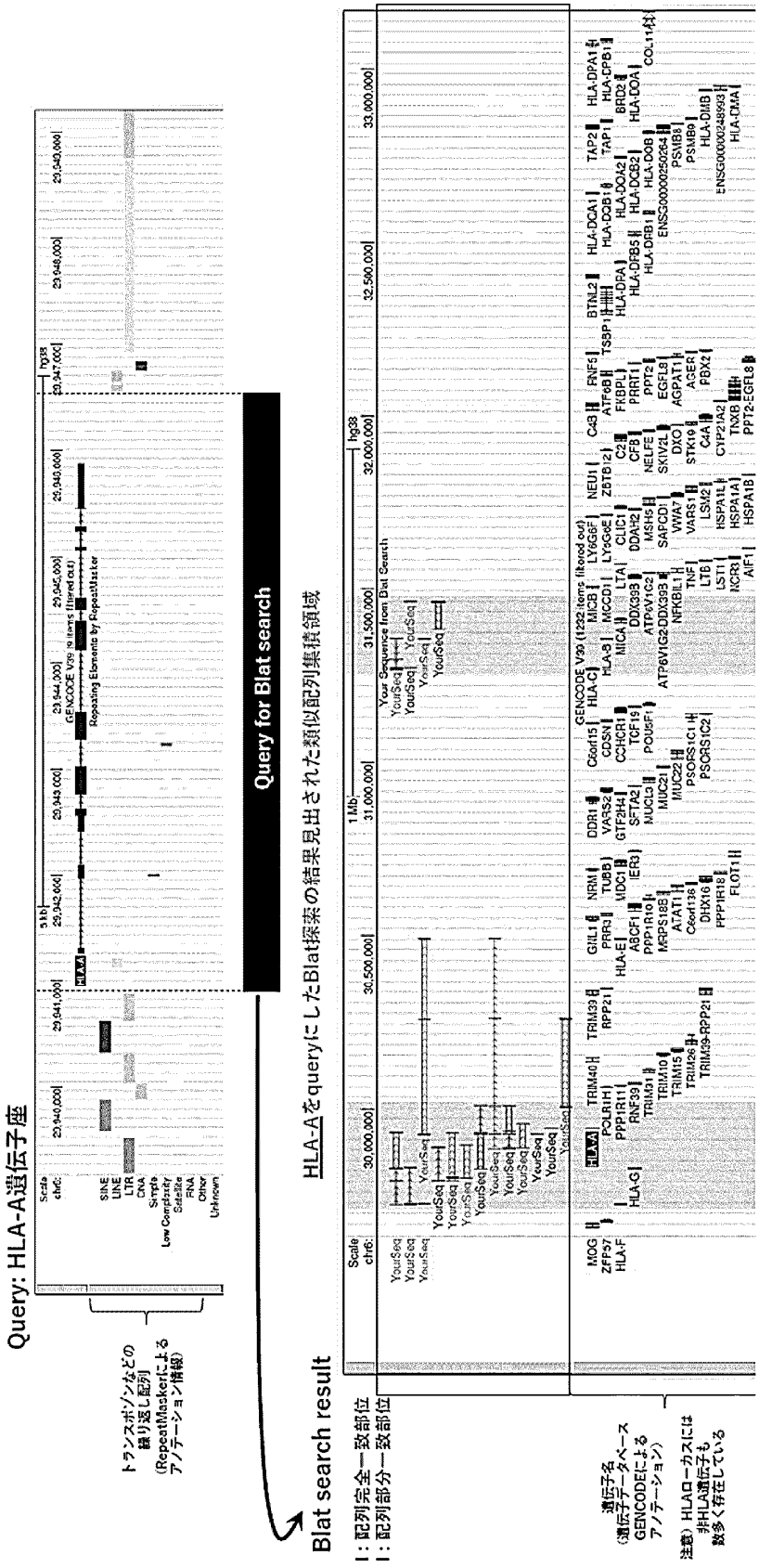
WO 2023/191063 PCT/JP2023/013574

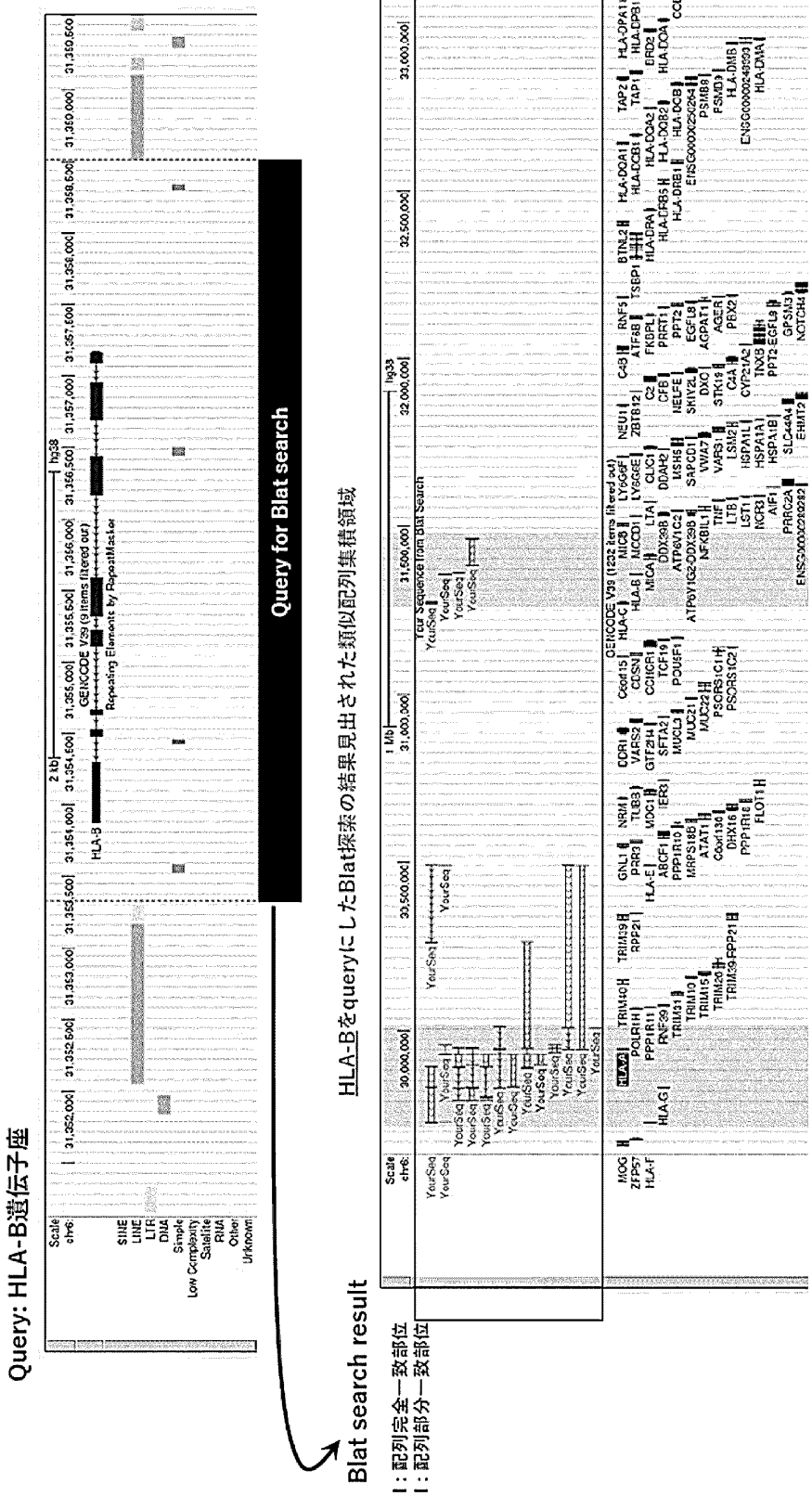
[図1]



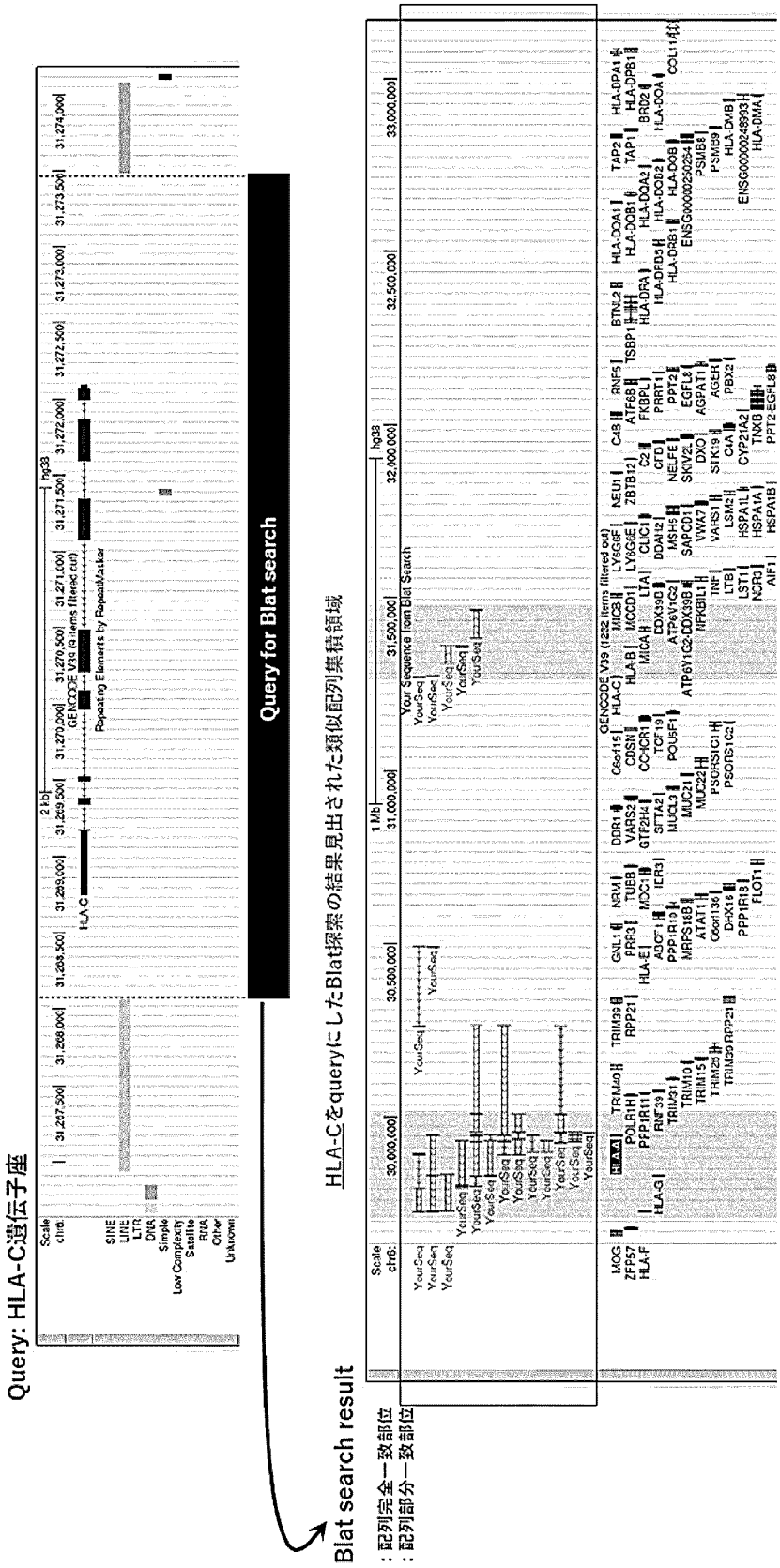
[図2]


Query: HLA-A遺伝子座
トランスポゾンなどの繰り返し配列 (RepeatMaskerによるアノテーション情報)
Query for Blat search
HLA-AをqueryにしたBlat探索の結果見出された類似配列集積領域
Blat search result
1：配列完全一致部位
1：配列部分一致部位
遺伝子名 (遺伝子データベースGENCODEによるアノテーション)
注意）HLAローカスには非HLA遺伝子も数多く存在している

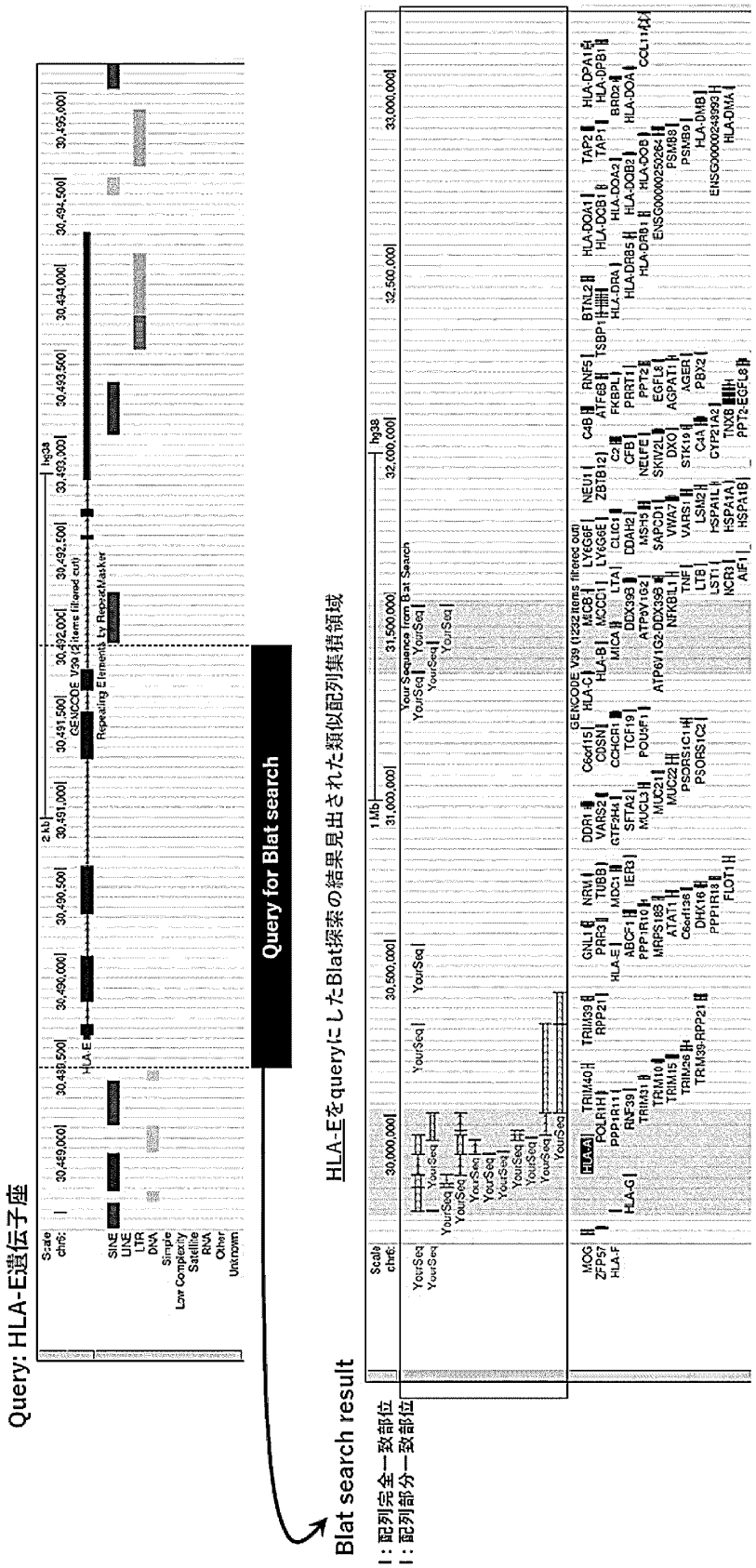
[図3]


Query: HLA-B遺伝子座
Query for Blat search
Blat search result
HLA-BをqueryにしたBlat探索の結果見出された類似配列集積領域
I：配列完全一致部位
I：配列部分一致部位

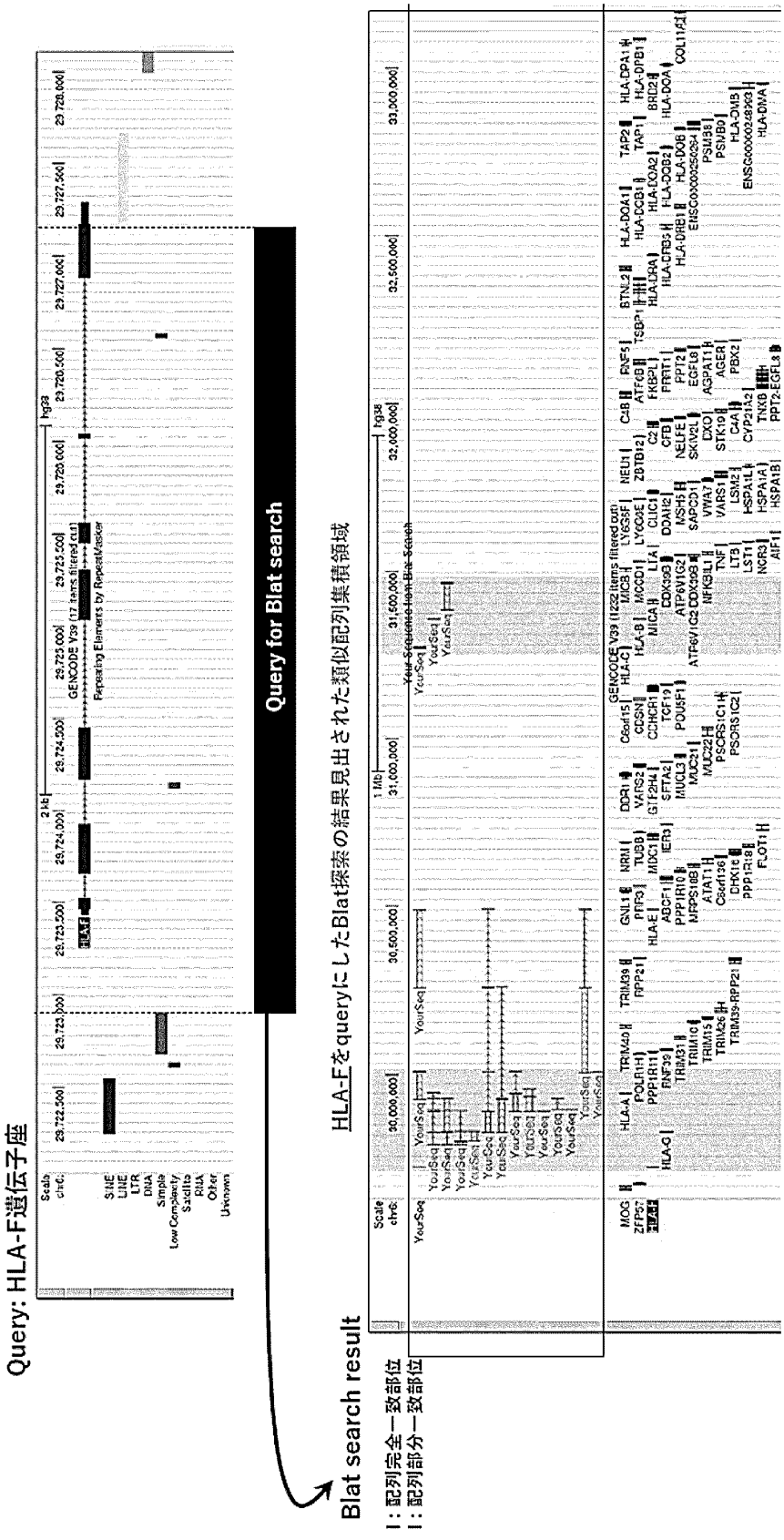
[図4]


Query: HLA-C遺伝子座
Query for Blat search
Blat search result
HLA-Cをqueryにした Blat探索の結果見出された類似配列集積領域
I：配列完全一致部位
I：配列部分一致部位

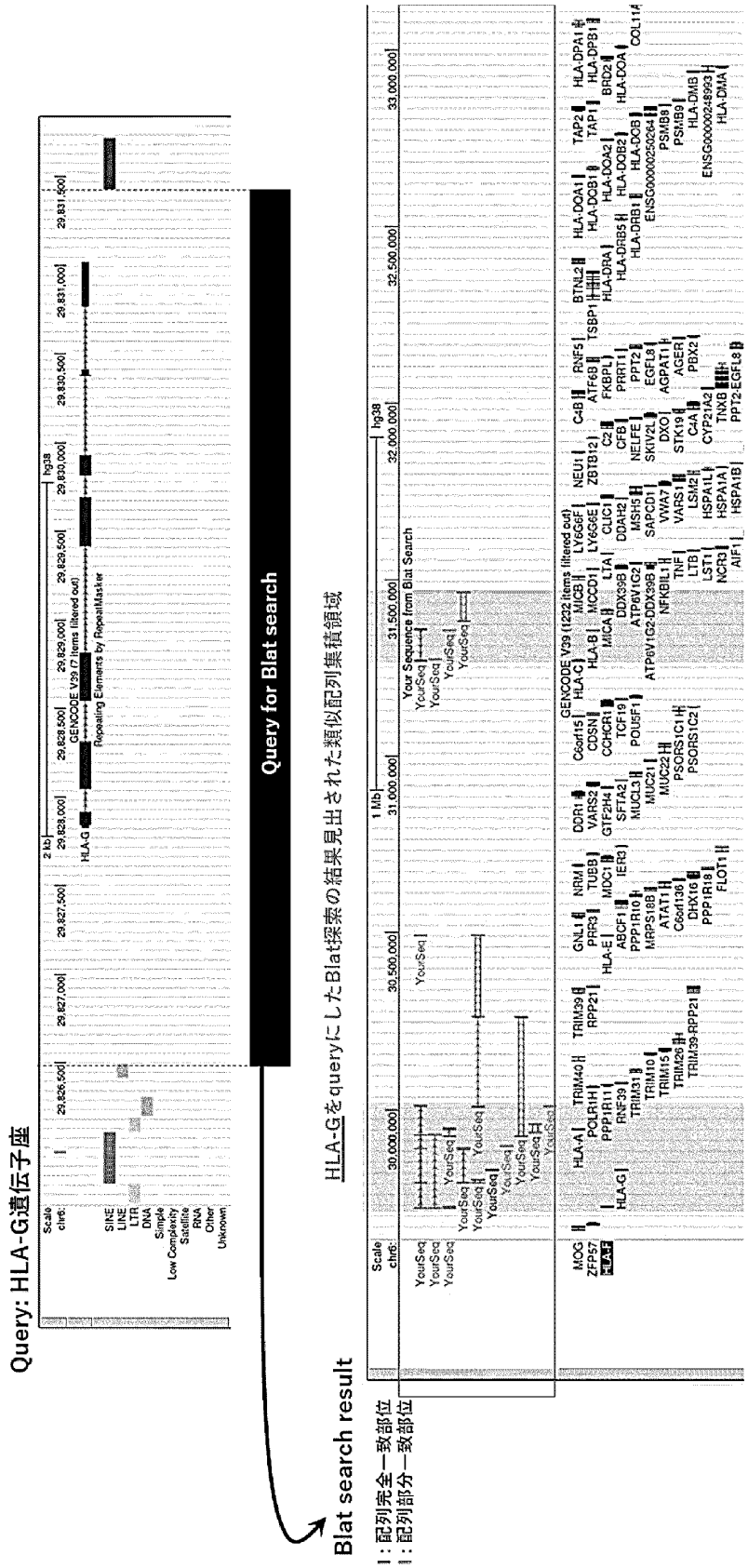
[図5]


Query: HLA-E遺伝子座
Query for Blat search
Blat search result
HLA-EをqueryにしたBlat探索の結果見出された類似配列集積領域
I：配列完全一致部位
I：配列部分一致部位

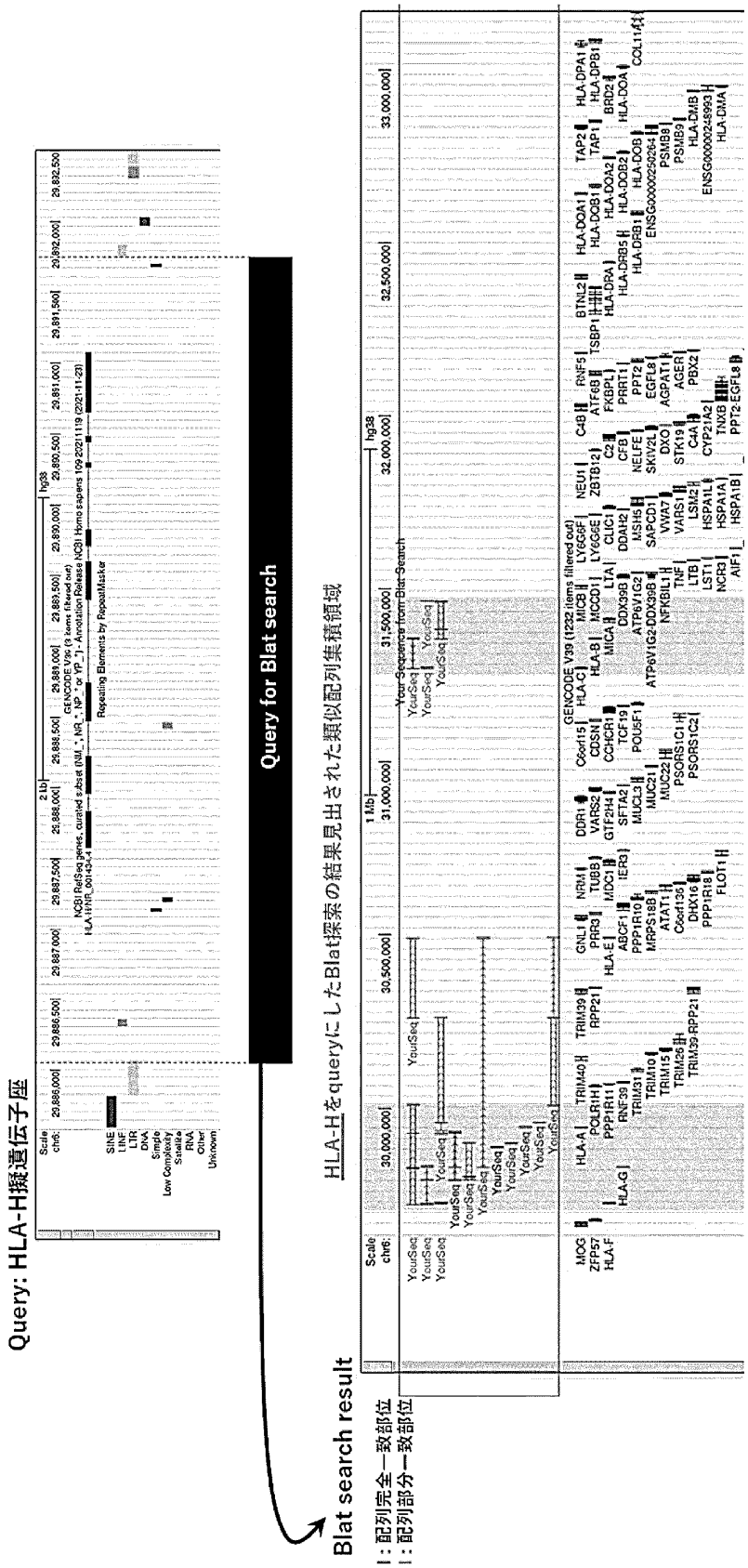
[図6]


Query: HLA-F遺伝子座
Query for Blat search
Blat search result
HLA-FをqueryにしたBlat探索の結果見出された類似配列集積領域
I：配列完全一致部位
I：配列部分一致部位

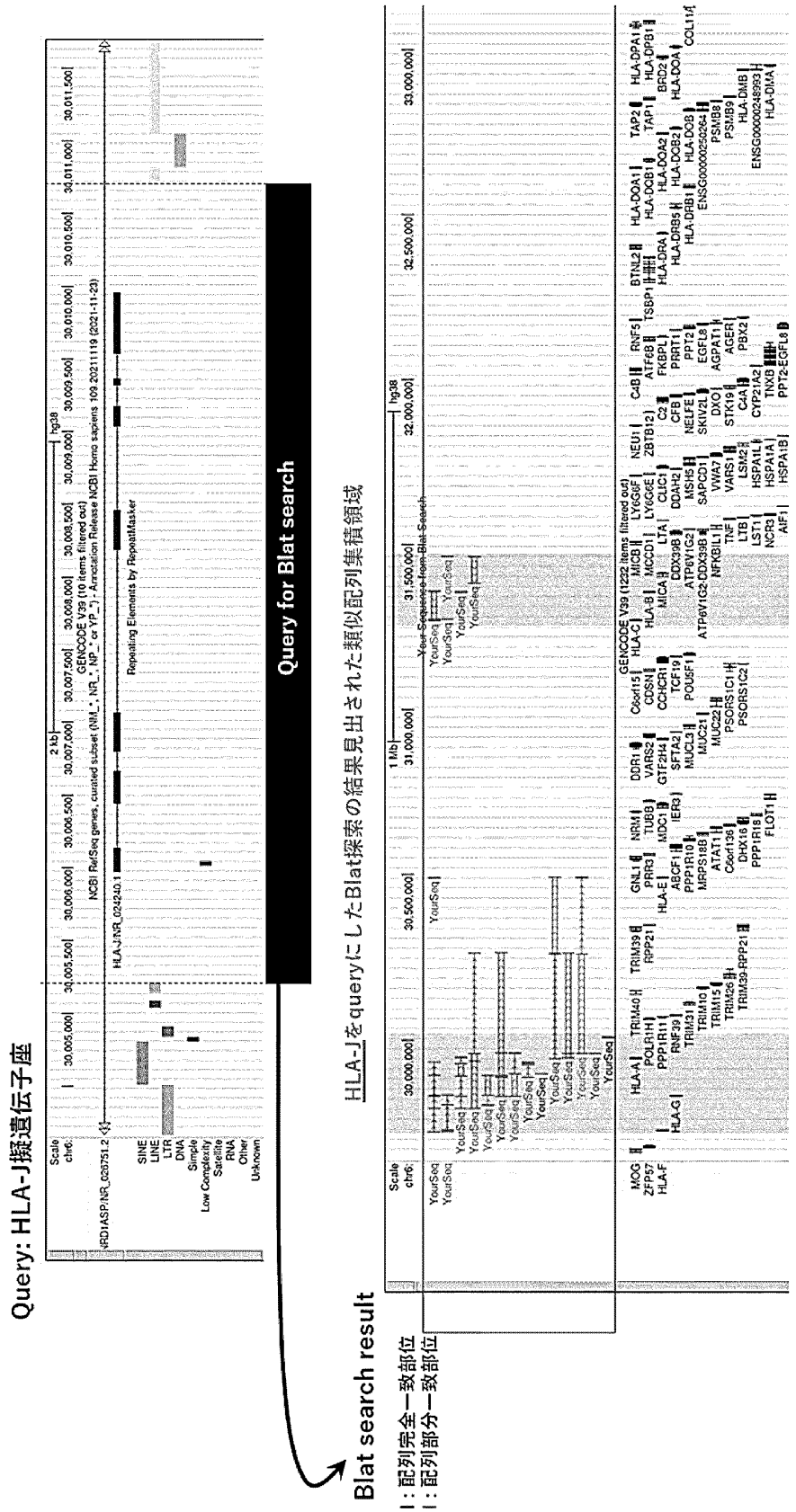
[図7]


Query: HLA-G遺伝子座
Query for Blat search
Blat search result
HLA-GをqueryにしたBlat探索の結果見出された類似配列集積領域
1：配列完全一致部位
1：配列部分一致部位

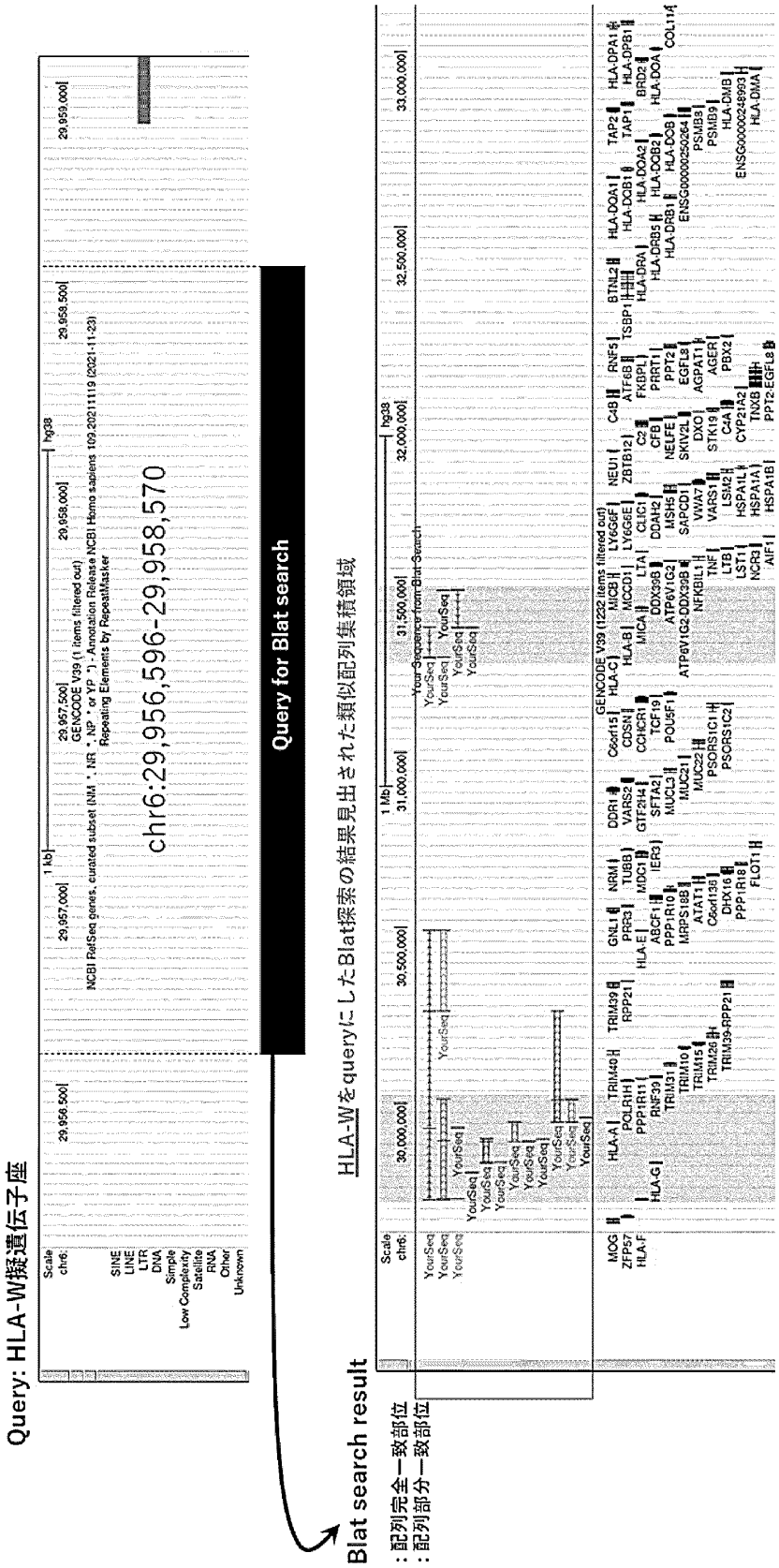
[図8]


Query: HLA-H擬遺伝子座
Query for Blat search
Blat search result
HLA-HをqueryにしたBlat探索の結果見出された類似配列集積領域
Your Sequence from Blat Search
GENCODE V39 (1232 items filtered out)
Repeating Elements by RepeatMasker
NCBI RefSeq genes, curated subset (NM_*, NR_*, NP_* or YP_*) - Annotation Release NCBI Homo sapiens 109.20211119 (2021-11-23)
I：配列完全一致部位
I：配列部分一致部位

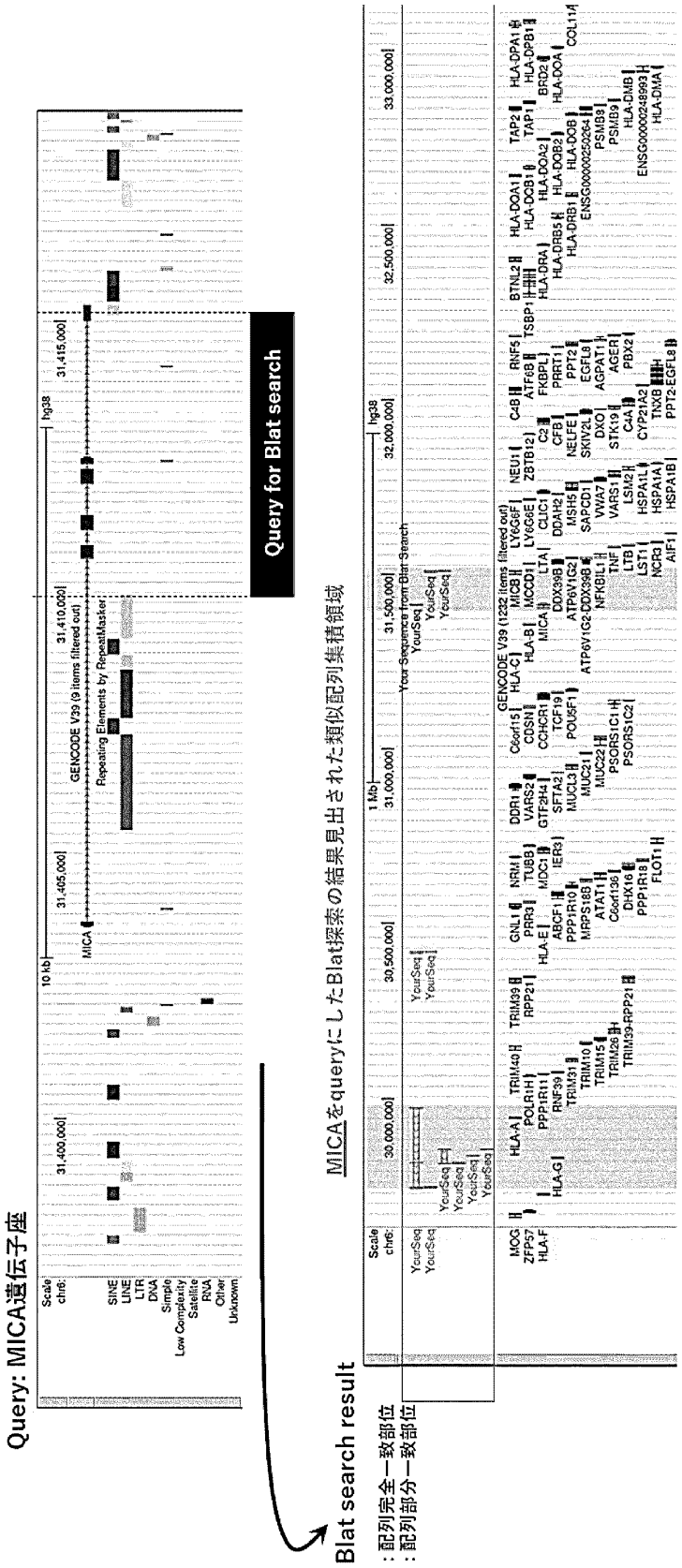
[図9]


Query: HLA-J擬遺伝子座
Query for Blat search
Blat search result
HLA-JをqueryにしたBlat探索の結果見出された類似配列集積領域
I：配列完全一致部位
I：配列部分一致部位

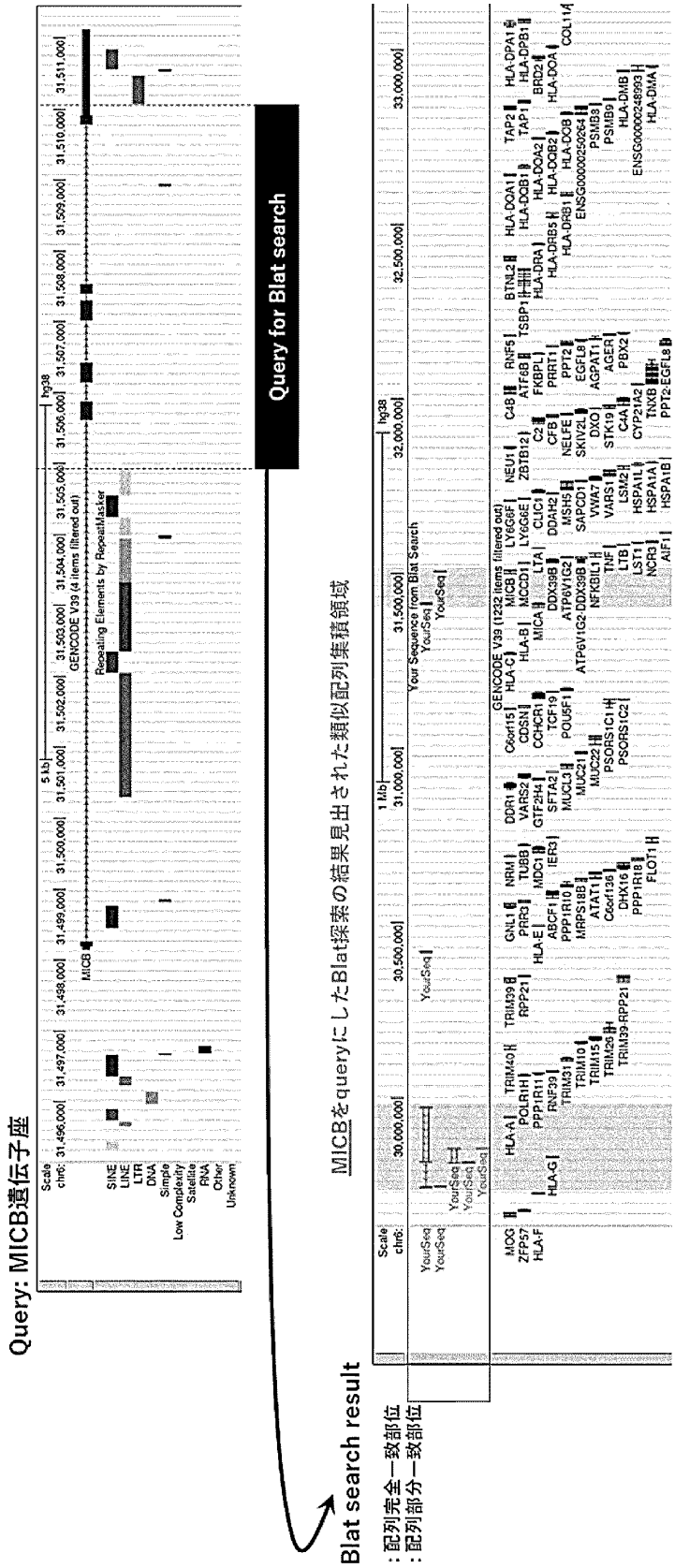
[図10]


Query: HLA-W擬遺伝子座
chr6:29,956,596-29,958,570
Query for Blat search
Blat search result
HLA-Wをqueryにした Blat探索の結果見出された類似配列集積領域
I：配列完全一致部位
I：配列部分一致部位

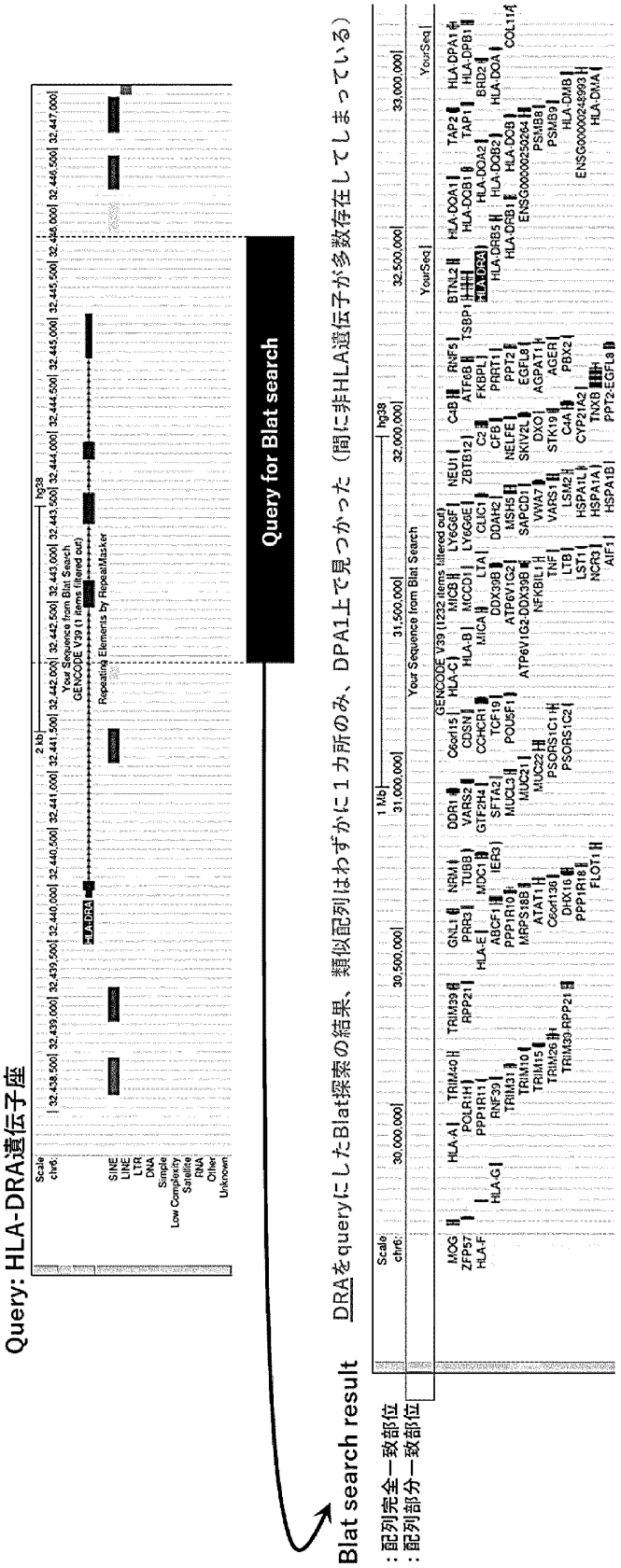
[図11]


Query: MICA遺伝子座
Query for Blat search
Blat search result
MICAをqueryにしたBlat探索の結果見出された類似配列集積領域
I：配列完全一致部位
I：配列部分一致部位

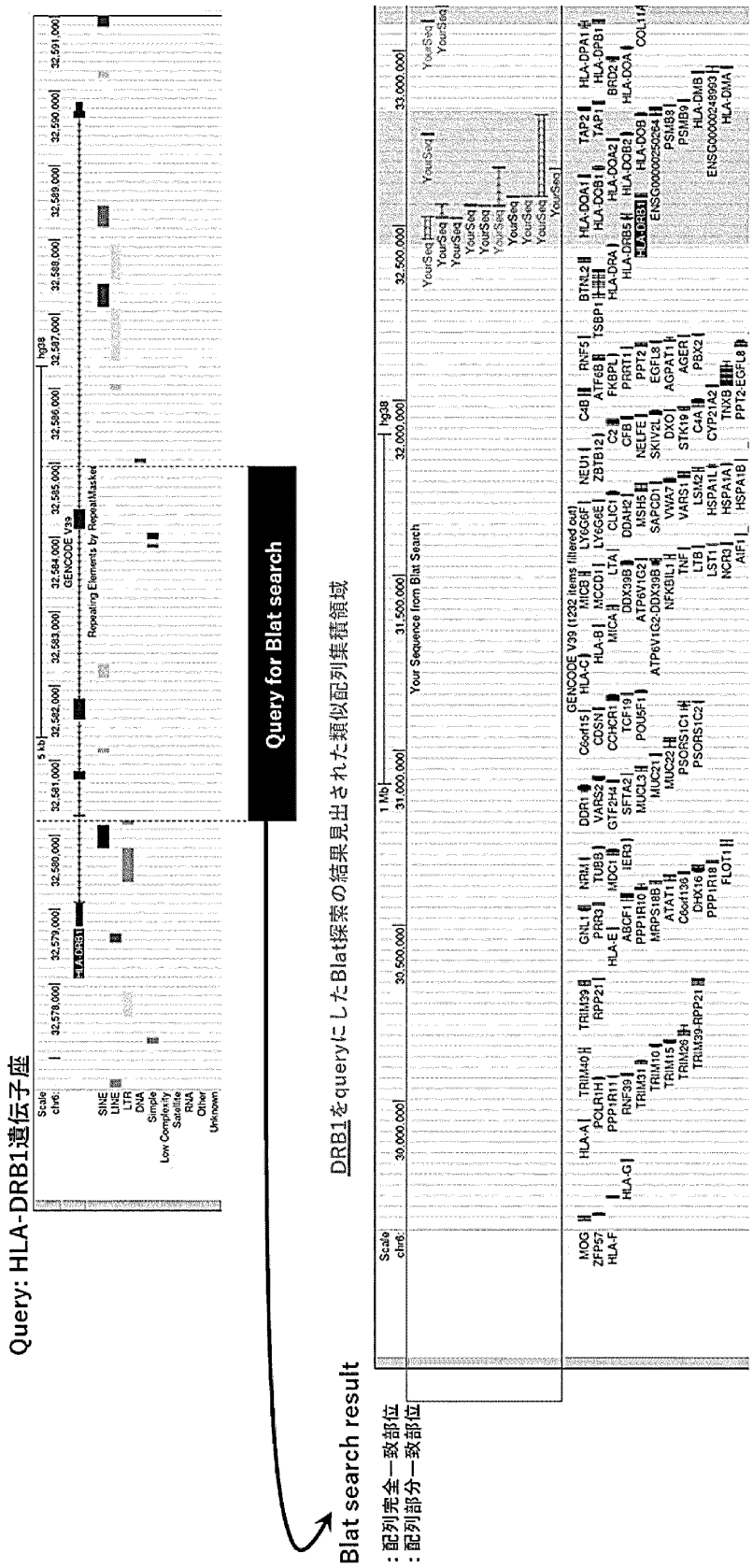
[図12]


Query: MICB遺伝子座
Query for Blat search
Blat search result
MICBをqueryにしたBlat探索の結果見出された類似配列集積領域
1：配列完全一致部位
1：配列部分一致部位

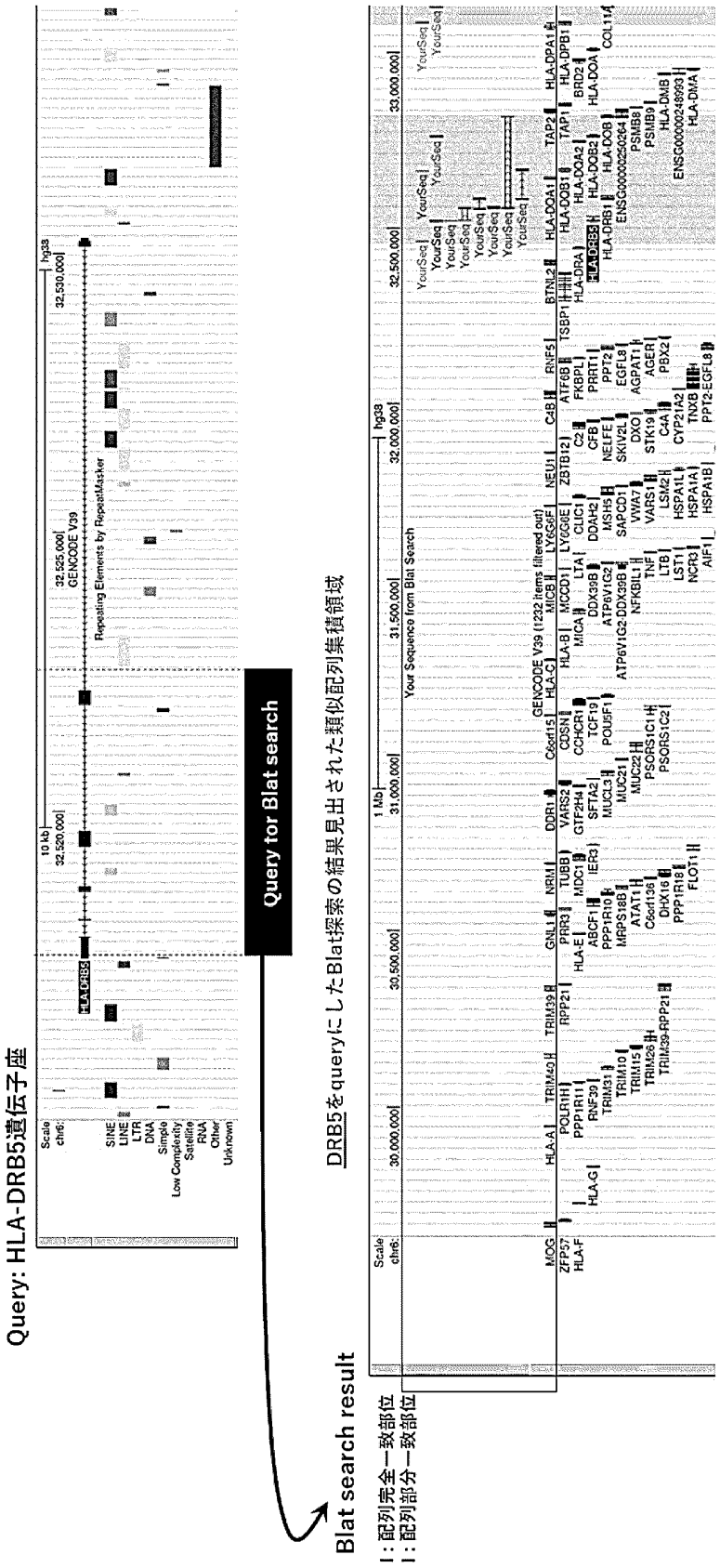
[図13]


Query: HLA-DRA遺伝子座
Query for Blat search
Blat search result
DRAをqueryにしたBlat探索の結果、類似配列はわずかに1カ所のみ、DPA1上で見つかった（間に非HLA遺伝子が多数存在してしまっている）
I：配列完全一致部位
I：配列部分一致部位

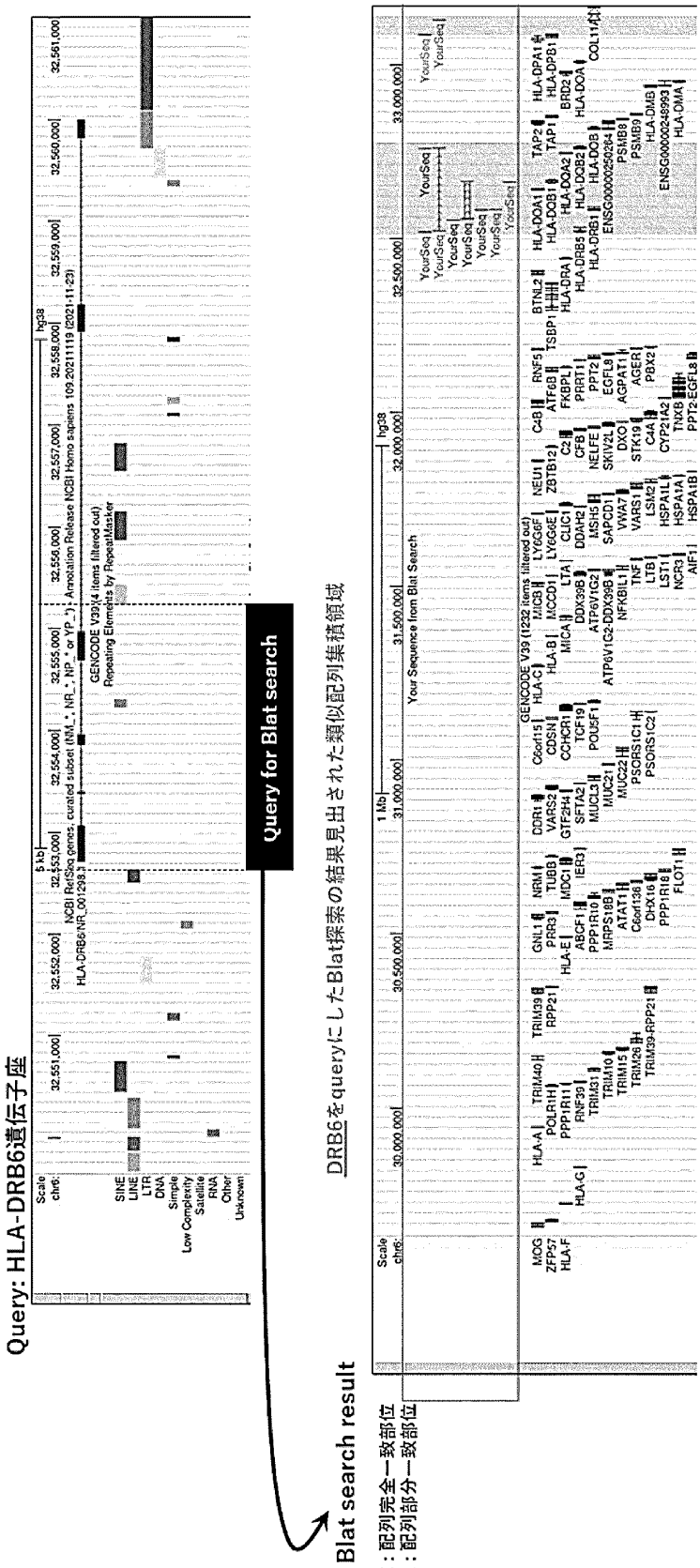
[図14]


Query: HLA-DRB1遺伝子座
Query for Blat search
Blat search result
DRB1をqueryにしたBlat探索の結果見出された類似配列集積領域
I：配列完全一致部位
i：配列部分一致部位

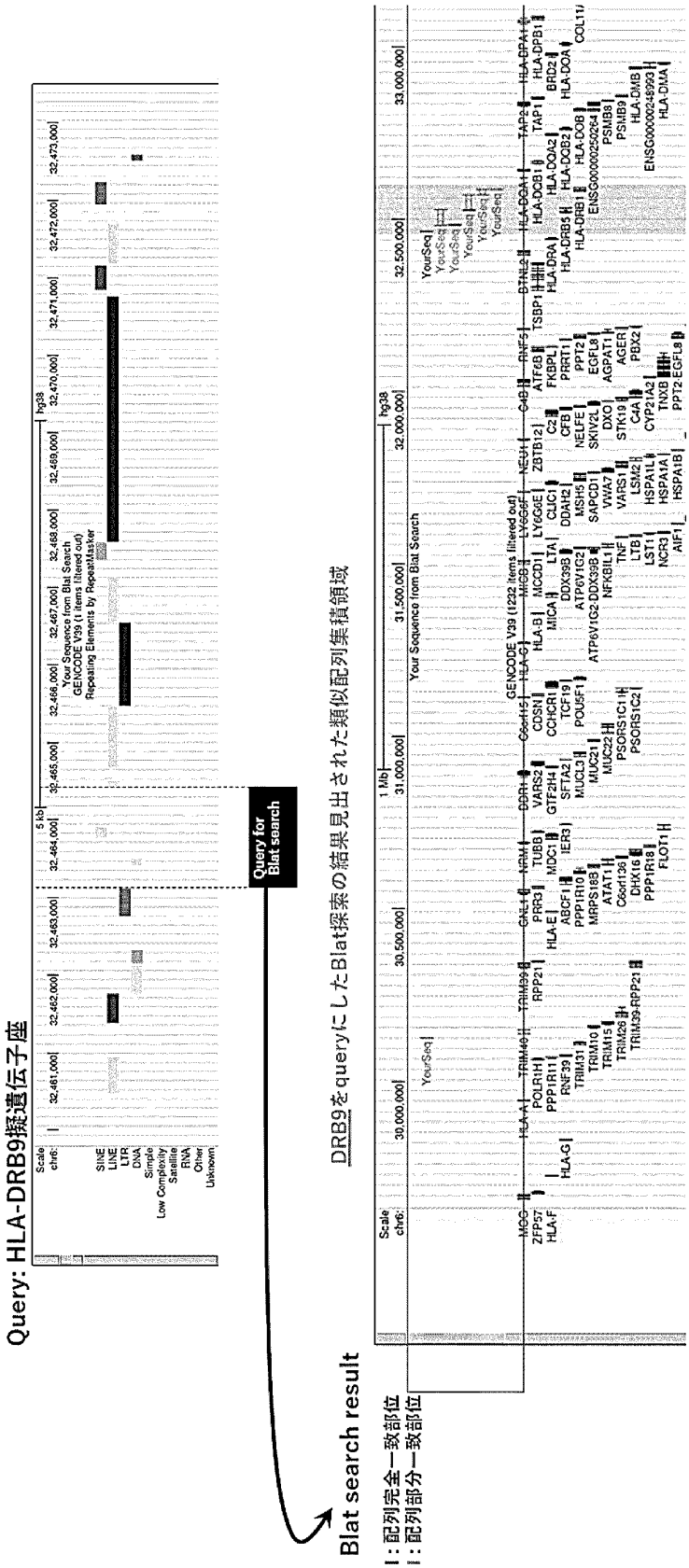
[図15]


Query: HLA-DRB5遺伝子座
Query for Blat search
DRB5をqueryにしたBlat探索の結果見出された類似配列集積領域
Blat search result
I：配列完全一致部位
I：配列部分一致部位

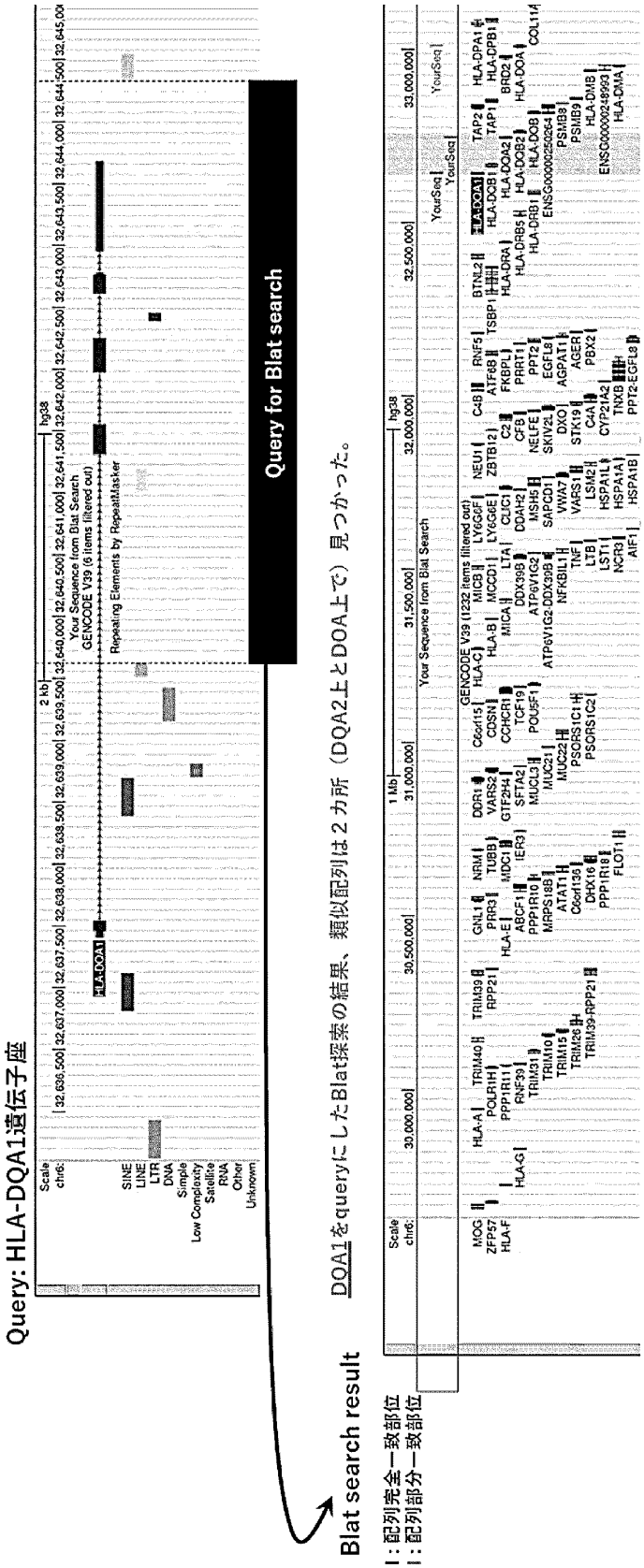
[図16]


Query: HLA-DRB6遺伝子座
Query for Blat search
Blat search result
DRB6をqueryにしたBlat探索の結果見出された類似配列集積領域
I：配列完全一致部位
I：配列部分一致部位

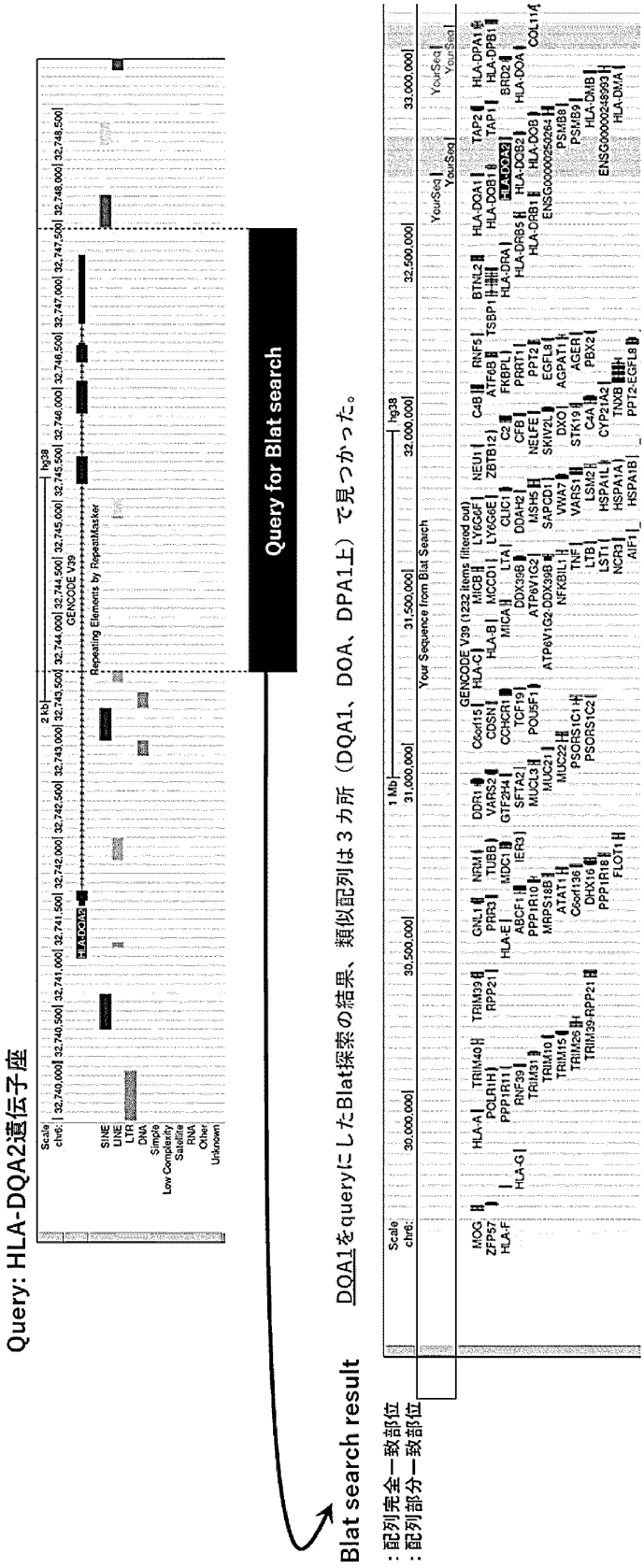
[図17]


Query: HLA-DRB9擬遺伝子座
Query for Blat search
DRB9をqueryにしたBlat探索の結果見出された類似配列集積領域
Blat search result
I：配列完全一致部位
i：配列部分一致部位

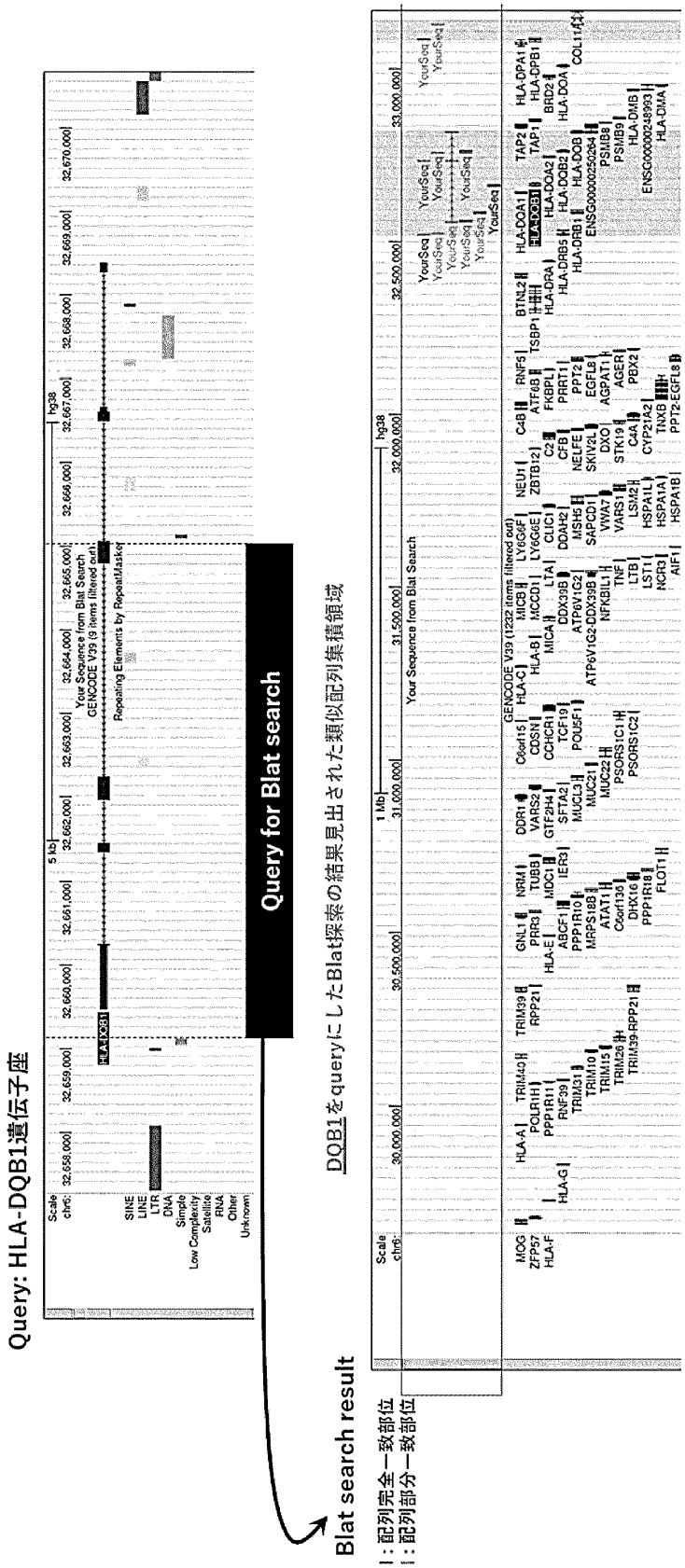
[図18]


Query: HLA-DQA1遺伝子座
Query for Blat search
Blat search result
DQA1をqueryにしたBlat探索の結果、類似配列は２カ所（DQA2上とDOA上で）見つかった。
I：配列完全一致部位
I：配列部分一致部位

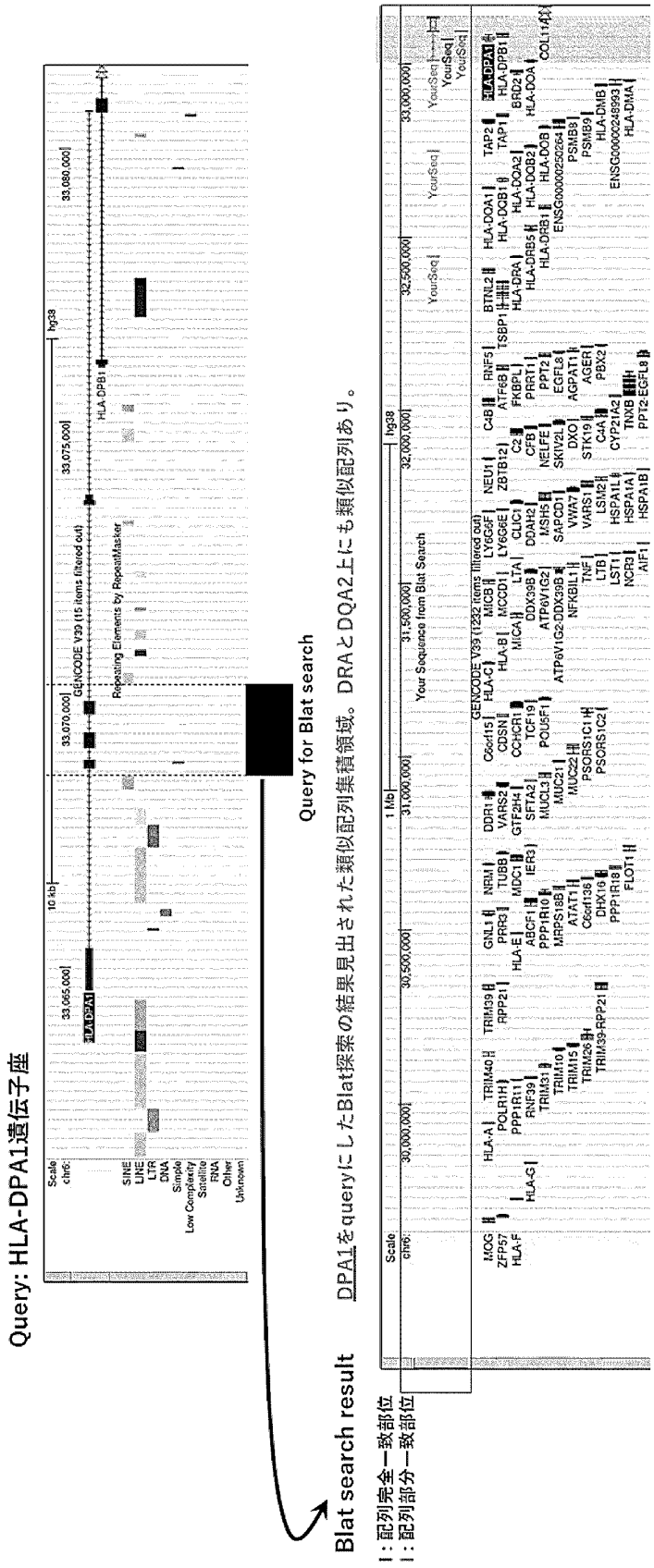
[図19]


Query: HLA-DQA2遺伝子座
Query for Blat search
Blat search result
DQA1をqueryにしたBlat探索の結果、類似配列は３カ所（DQA1、DOA、DPA1上）で見つかった。
I：配列完全一致部位
I：配列部分一致部位

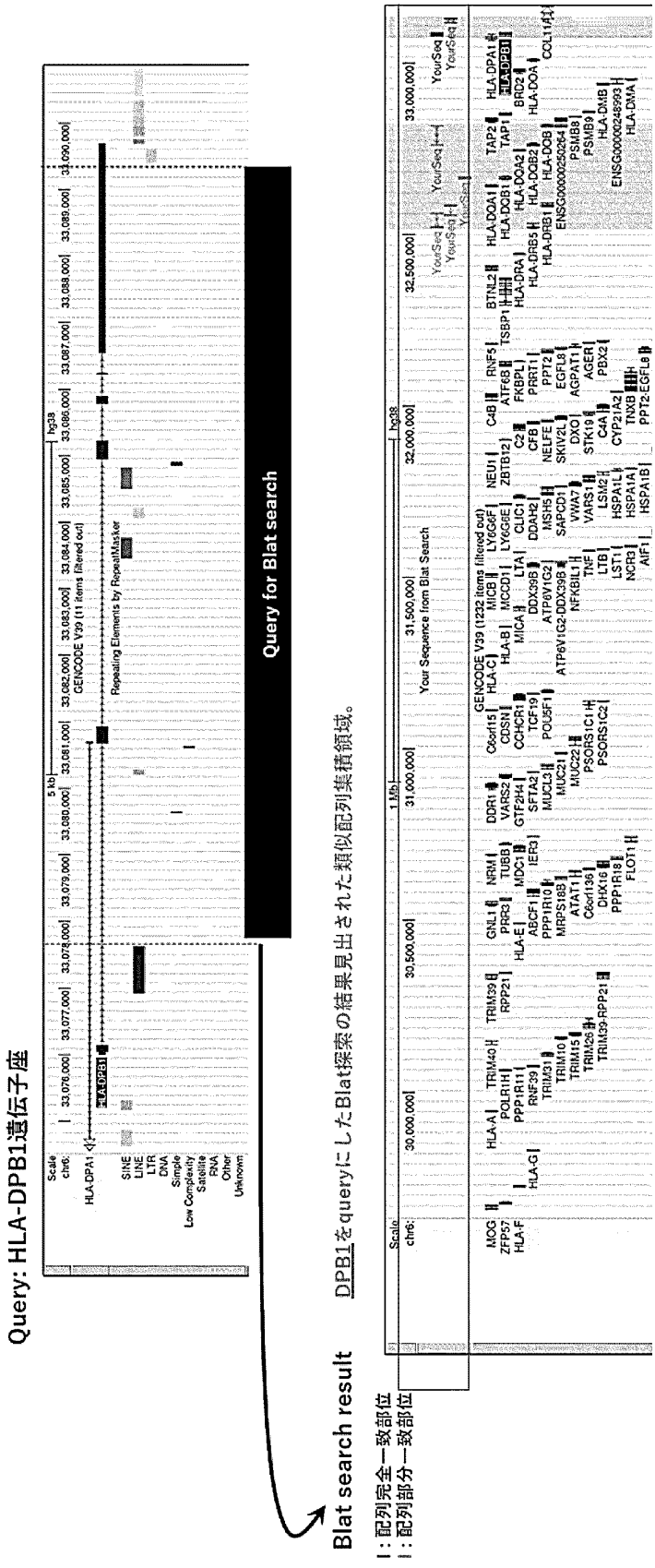
[図20]


Query: HLA-DQB1遺伝子座
Query for Blat search
Blat search result
DQB1をqueryにしたBlat探索の結果見出された類似配列集積領域
I：配列完全一致部位
i：配列部分一致部位

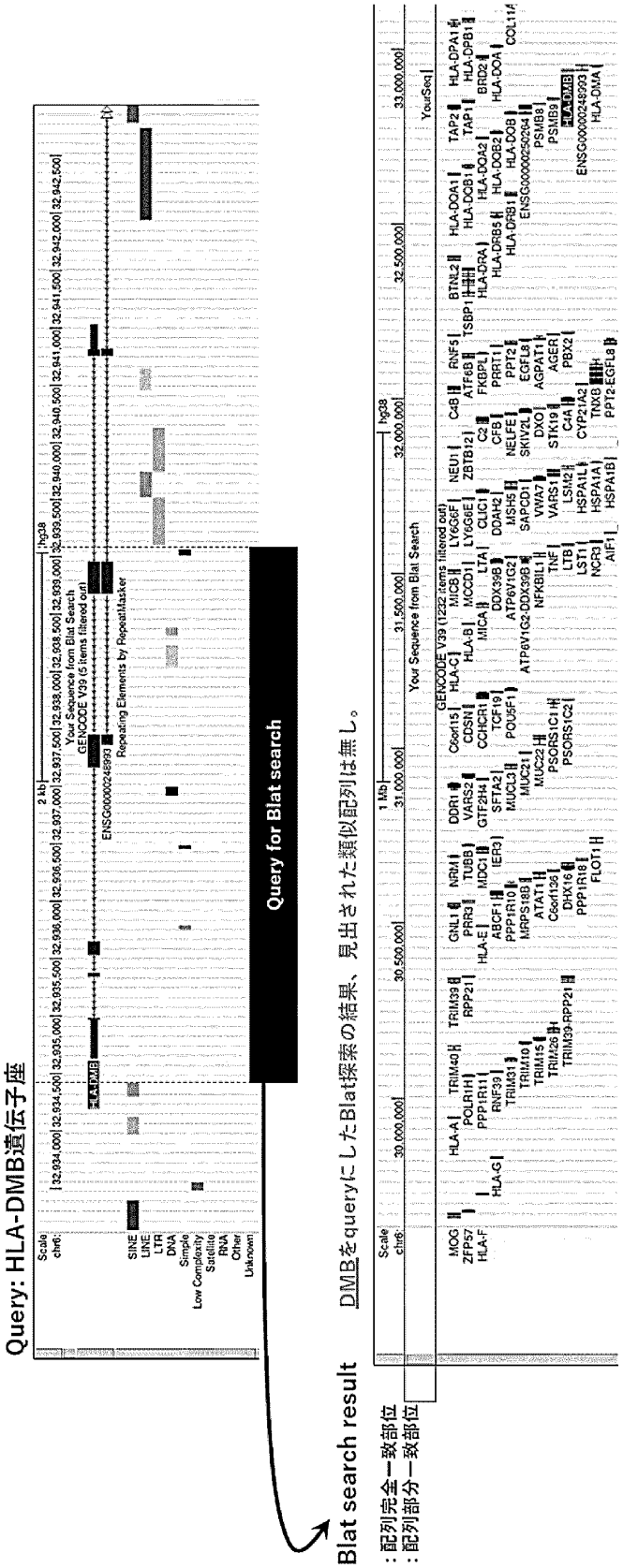
[図21]


Query: HLA-DPA1遺伝子座
Query for Blat search
Blat search result
DPA1をqueryにしたBlat探索の結果見出された類似配列集積領域。DRAとDQA2上にも類似配列あり。
I：配列完全一致部位
I：配列部分一致部位

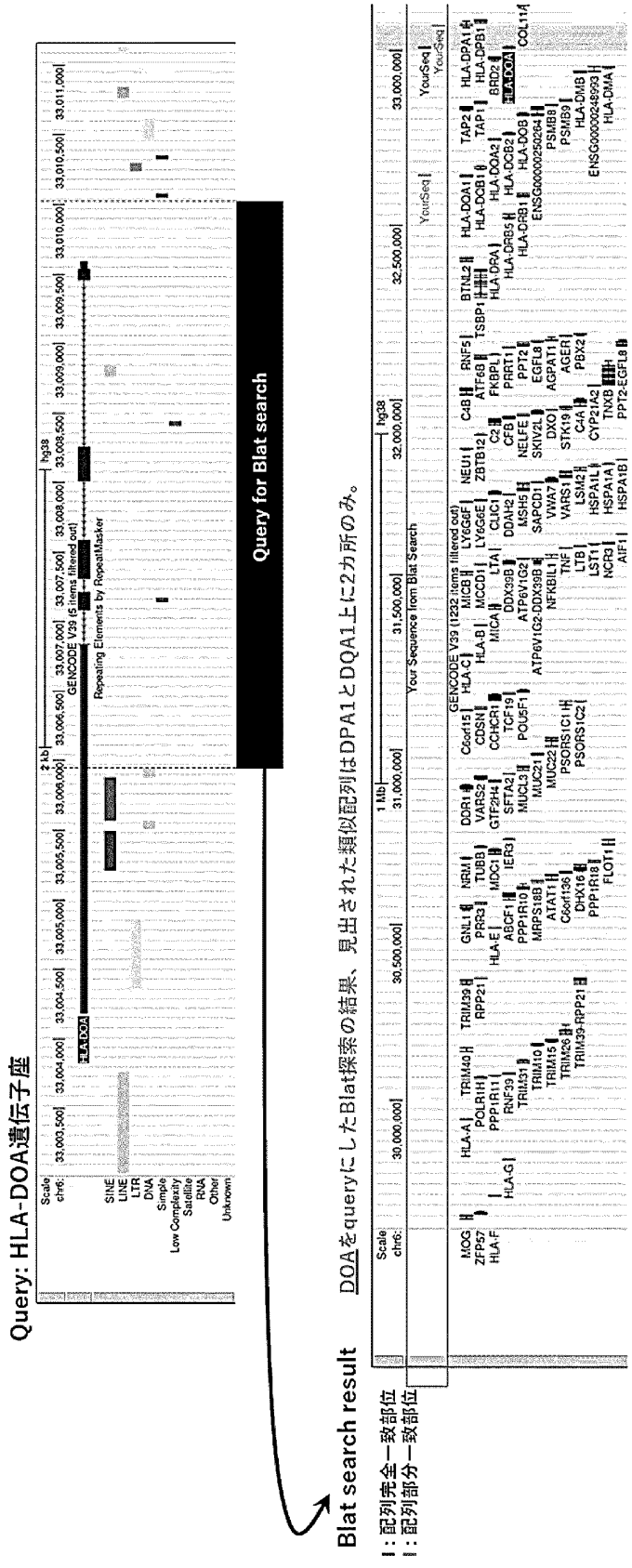
[図22]


Query: HLA-DPB1遺伝子座
Query for Blat search
Blat search result
DPB1をqueryにしたBlat探索の結果見出された類似配列集積領域。
I：配列完全一致部位
I：配列部分一致部位

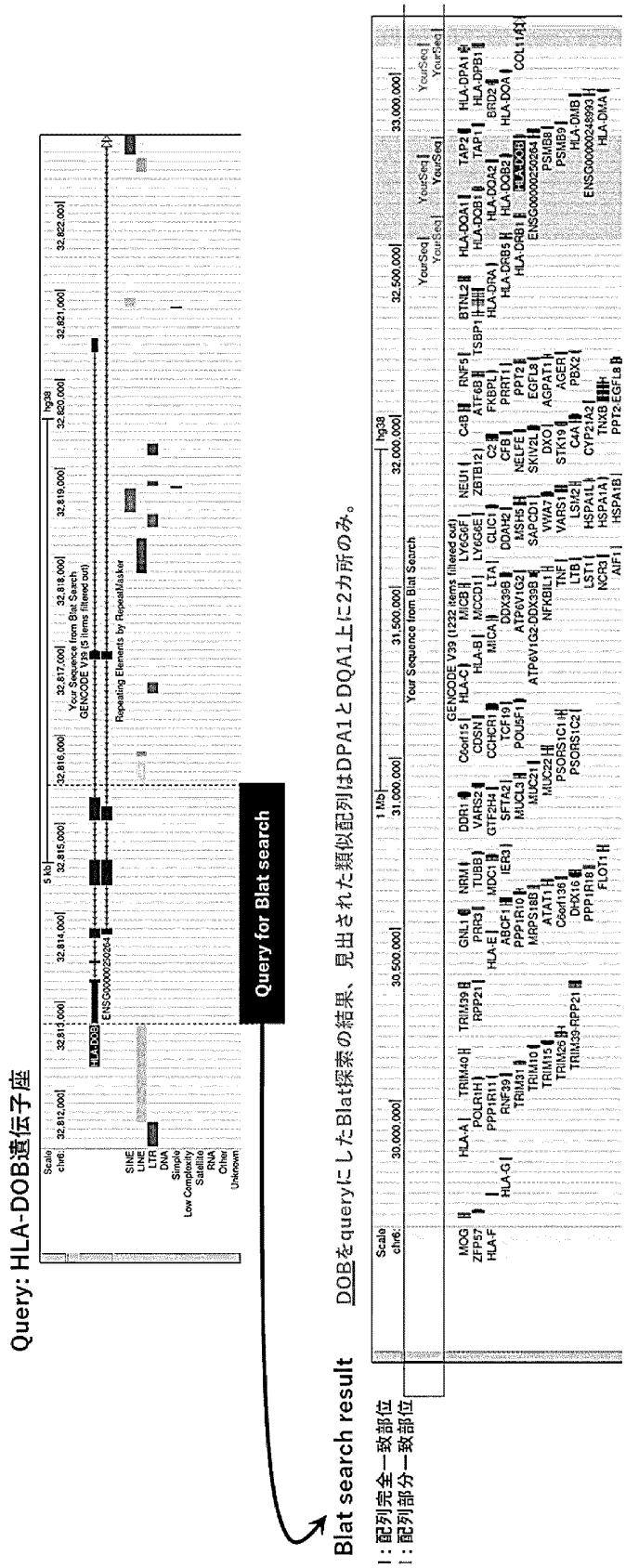
[図23]


Query: HLA-DMB遺伝子座
Query for Blat search
Blat search result
DMBをqueryにしたBlat探索の結果、見出された類似配列は無し。
I：：配列完全一致部位
i：：配列部分一致部位

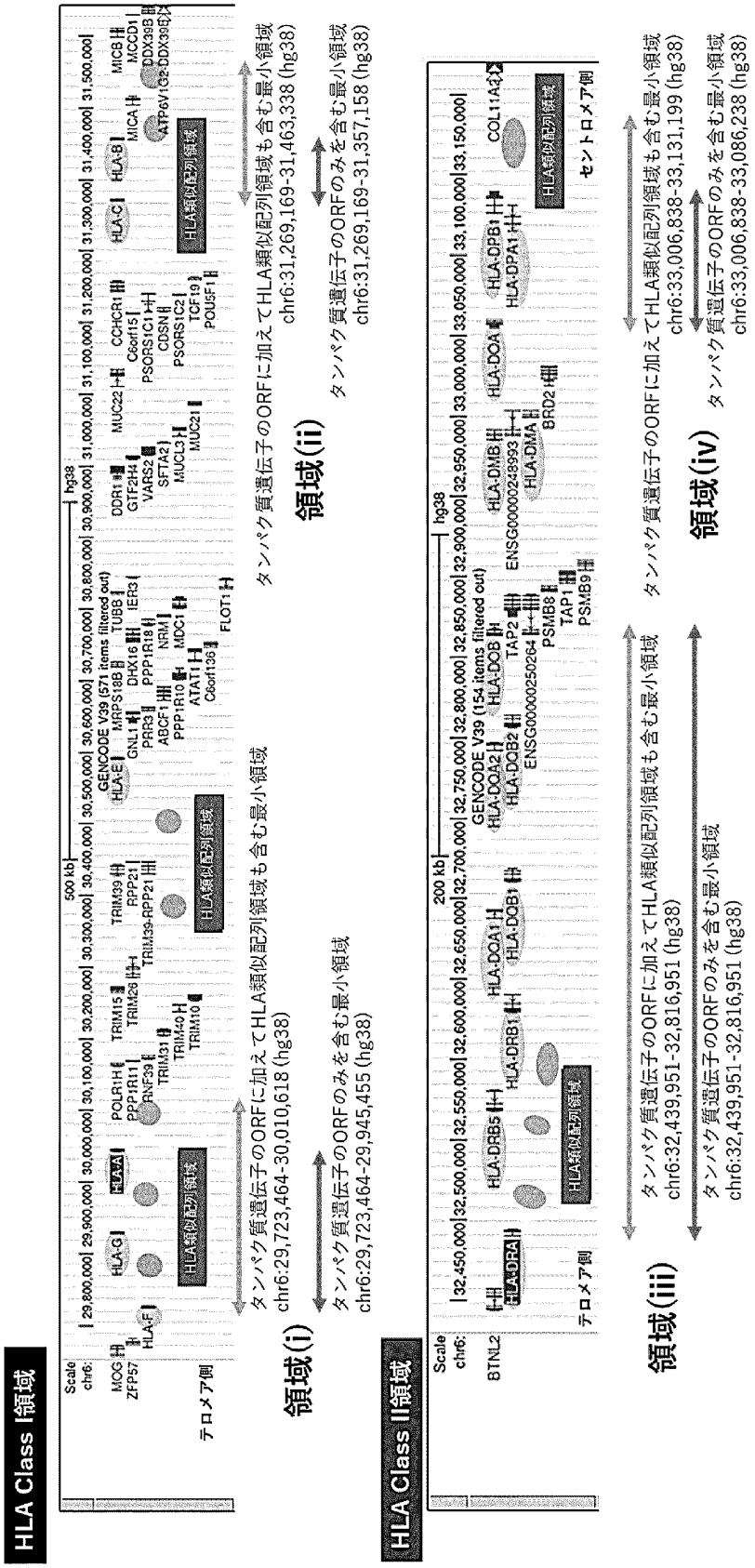
[図24]


Query: HLA-DOA遺伝子座
Query for Blat search
Blat search result
DOAをqueryにしたBlat探索の結果、見出された類似配列はDPA1とDQA1上に2カ所のみ。
Your Sequence from Blat Search
GENCODE V39 (1232 items filtered out)
Repeating Elements by RepeatMasker
GENCODE V39 (5 items filtered out)
SINE
LINE
LTR
DNA
Simple
Low Complexity
Satellite
RNA
Other
Unknown
I：配列完全一致部位
I：配列部分一致部位

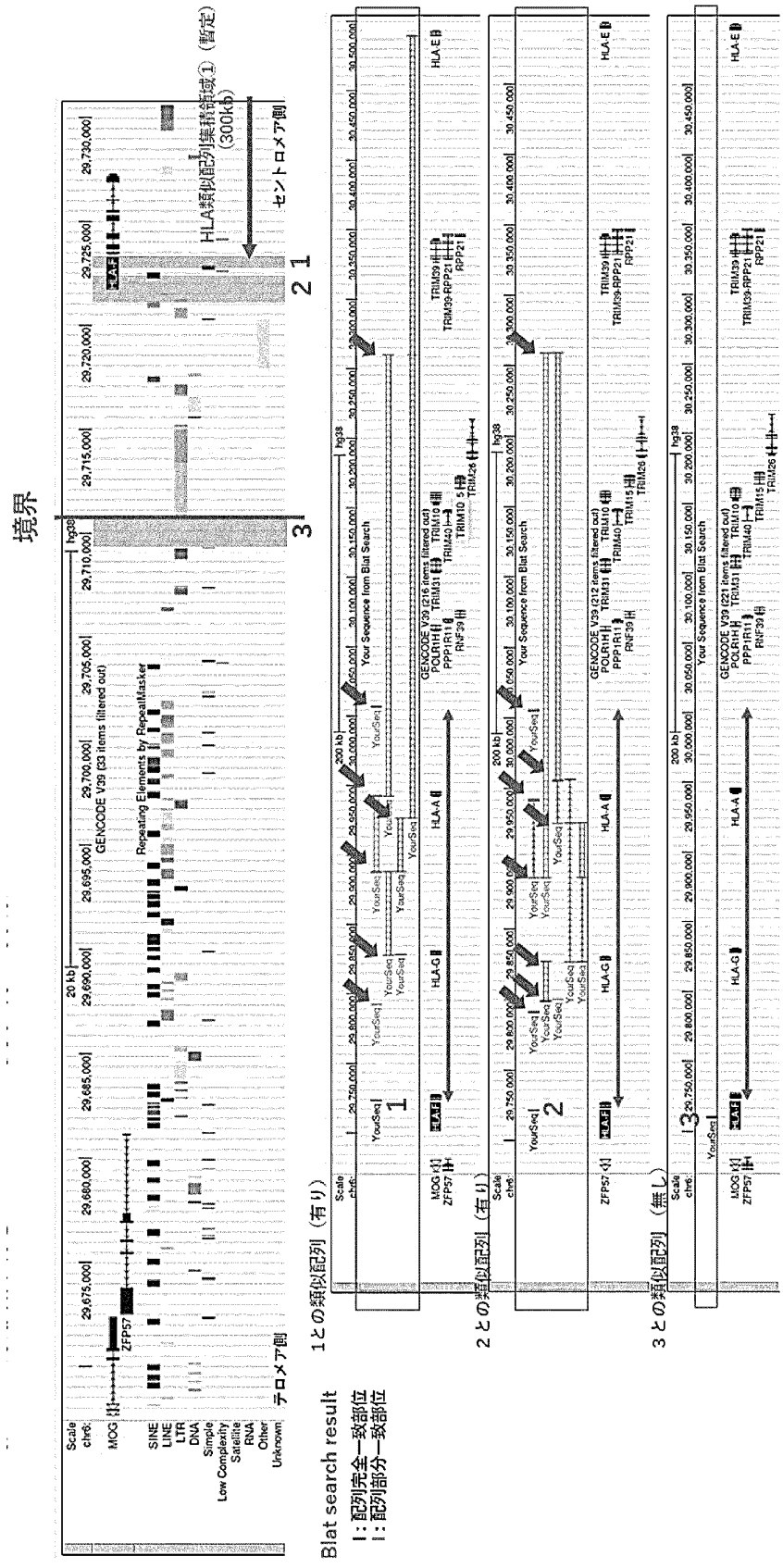
[図25]


Query: HLA-DOB遺伝子座
Query for Blat search
Blat search result
DOBをqueryにしたBlat探索の結果、見出された類似配列はDPA1とDQA1上に2カ所のみ。
I：配列完全一致部位
I：配列部分一致部位

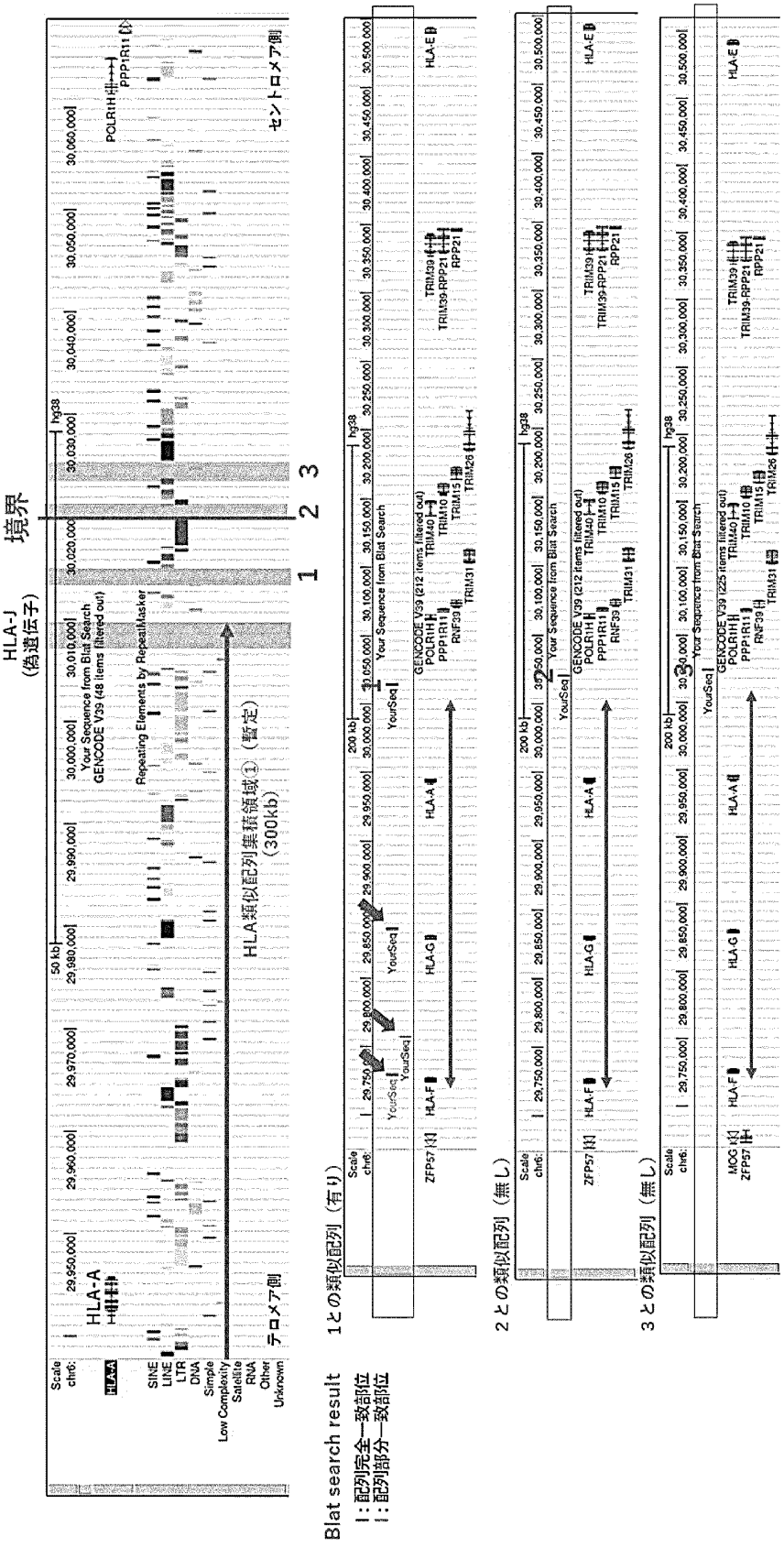
[図26]


HLA Class I領域
HLA Class II領域
領域(i)
領域(ii)
領域(iii)
領域(iv)
タンパク質遺伝子のORFに加えてHLA類似配列領域も含む最小領域
chr6:29,723,464-30,010,618 (hg38)
タンパク質遺伝子のORFのみを含む最小領域
chr6:29,723,464-29,945,455 (hg38)
タンパク質遺伝子のORFに加えてHLA類似配列領域も含む最小領域
chr6:31,269,169-31,463,338 (hg38)
タンパク質遺伝子のORFのみを含む最小領域
chr6:31,269,169-31,357,158 (hg38)
タンパク質遺伝子のORFに加えてHLA類似配列領域も含む最小領域
chr6:32,439,951-32,816,951 (hg38)
タンパク質遺伝子のORFのみを含む最小領域
chr6:32,439,951-32,816,951 (hg38)
タンパク質遺伝子のORFに加えてHLA類似配列領域も含む最小領域
chr6:33,006,838-33,131,199 (hg38)
タンパク質遺伝子のORFのみを含む最小領域
chr6:33,006,838-33,086,238 (hg38)
テロメア側
セントロメア側
HLA類似配列領域
hg38

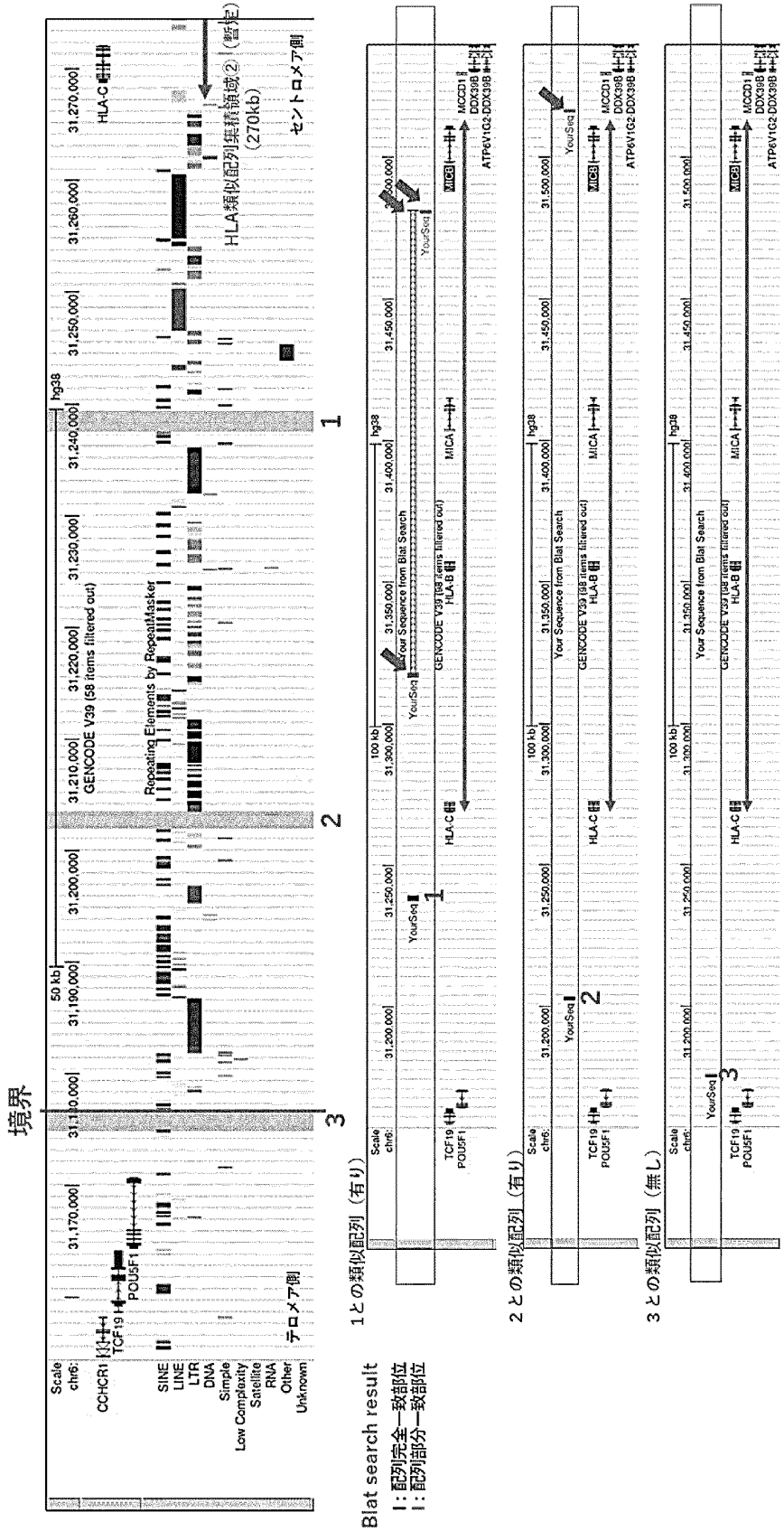
[図27]


境界
テロメア側
セントロメア側
HLA類似配列集積領域①（暫定）
（300kb）
1
2
3
1との類似配列（有り）
2との類似配列（有り）
3との類似配列（無し）
Blat search result
I：配列完全一致部位
I：配列部分一致部位

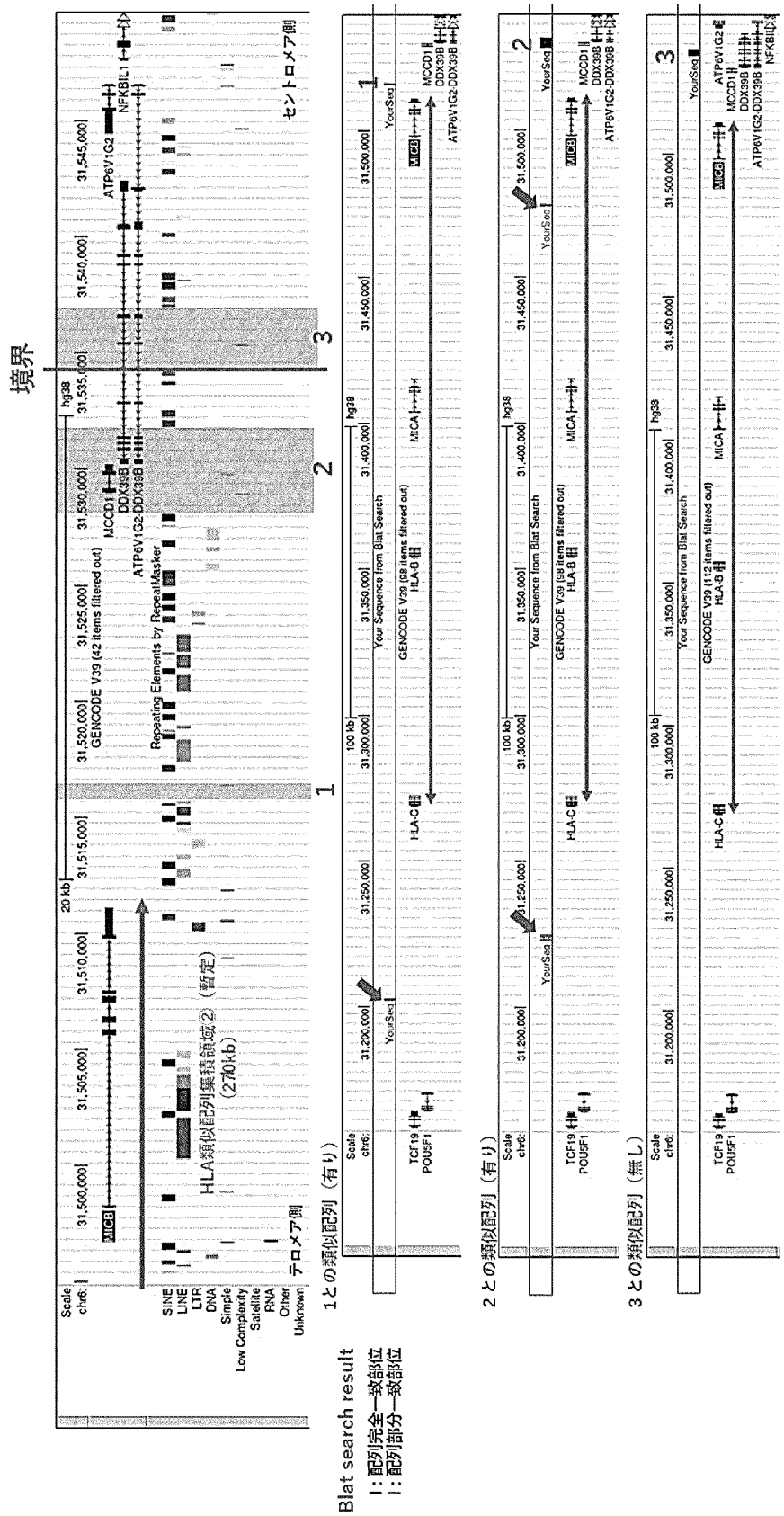
[図28]


HLA-J
(偽遺伝子)
境界
1 2 3
HLA-A
テロメア側
セントロメア側
HLA類似配列集積領域①（暫定）
（300kb）
Repeating Elements by RepeatMasker
SINE
LINE
LTR
DNA
Simple
Low Complexity
Satellite
RNA
Other
Unknown
Your Sequence from Blat Search
GENCODE V39 (48 items filtered out)
Your Sequence from Blat Search
GENCODE V39 (212 items filtered out)
Your Sequence from Blat Search
GENCODE V39 (225 items filtered out)
Blat search result
1：配列完全一致部位
|：配列部分一致部位
1との類似配列（有り）
2との類似配列（無し）
3との類似配列（無し）

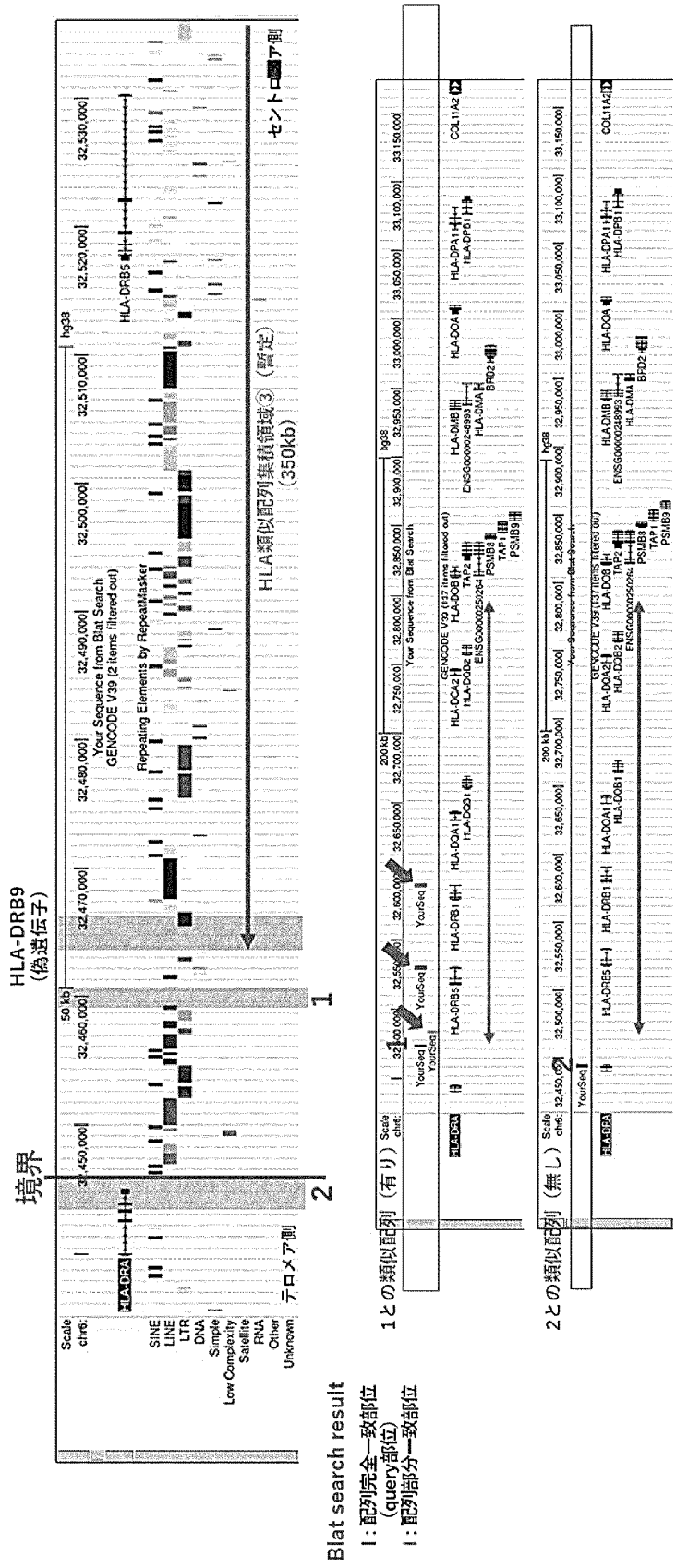
[図29]


境界
HLA類似配列集積領域②（暫定）
（270kb）
セントロメア側
テロメア側
Repeating Elements by RepeatMasker
GENCODE V39 (58 items filtered out)
Your Sequence from Blat Search
1との類似配列（有り）
2との類似配列（有り）
3との類似配列（無し）
Blat search result
1：配列完全一致部位
1：配列部分一致部位

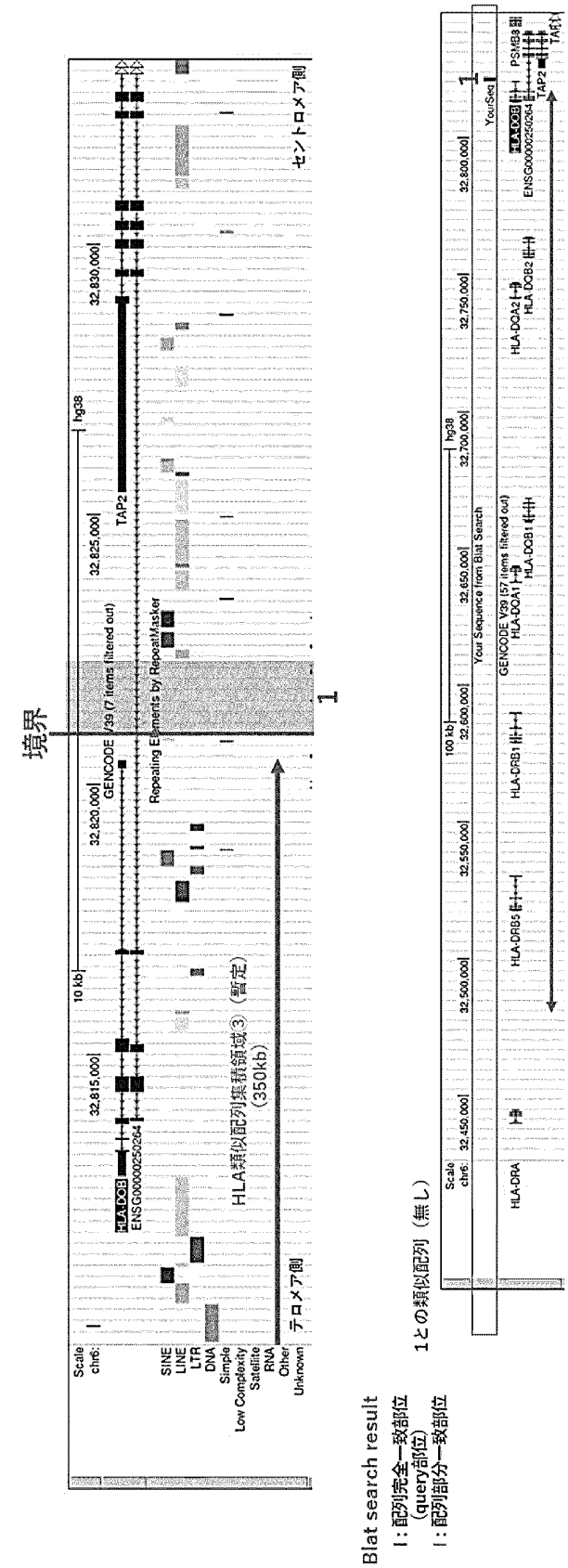
[図30]


境界
テロメア側
セントロメア側
HLA類似配列集積領域②（暫定）
（270kb）
1との類似配列（有り）
2との類似配列（有り）
3との類似配列（無し）
Blat search result
I：配列完全一致部位
i：配列部分一致部位

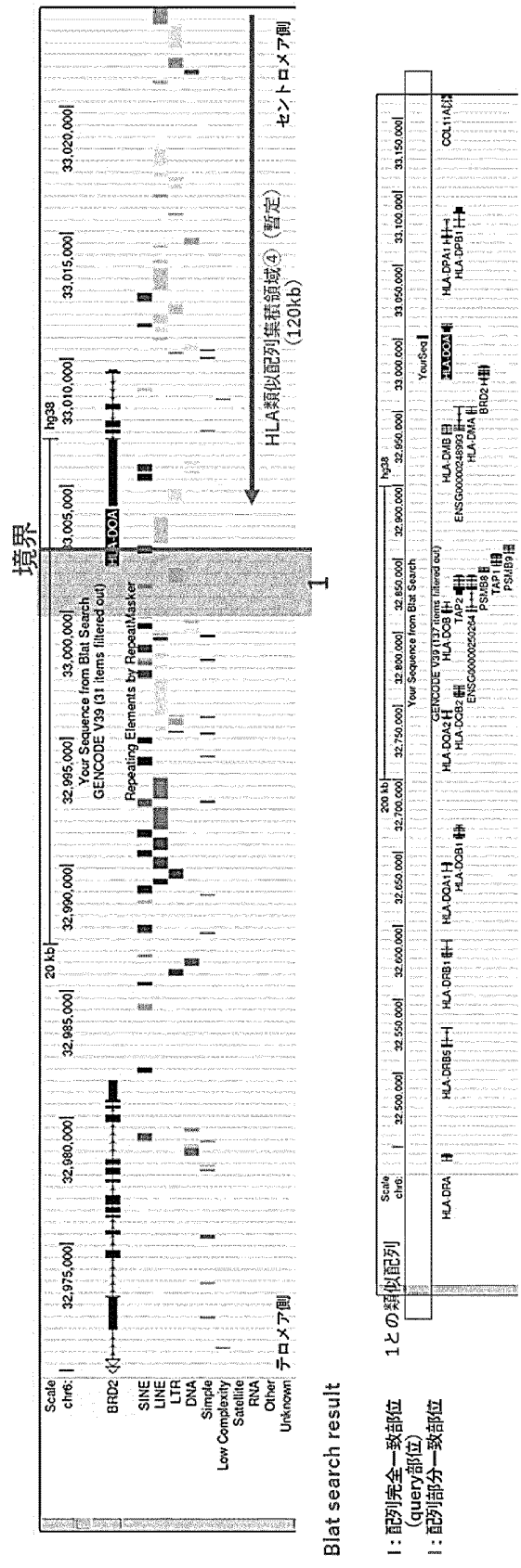
[図31]


HLA-DRB9
(偽遺伝子)
境界
テロメア側
HLA類似配列集積領域③（暫定）
(350kb)
セントロメア側
Blat search result
I：配列完全一致部位
(query部位)
I：配列部分一致部位
1との類似配列（有り）
2との類似配列（無し）

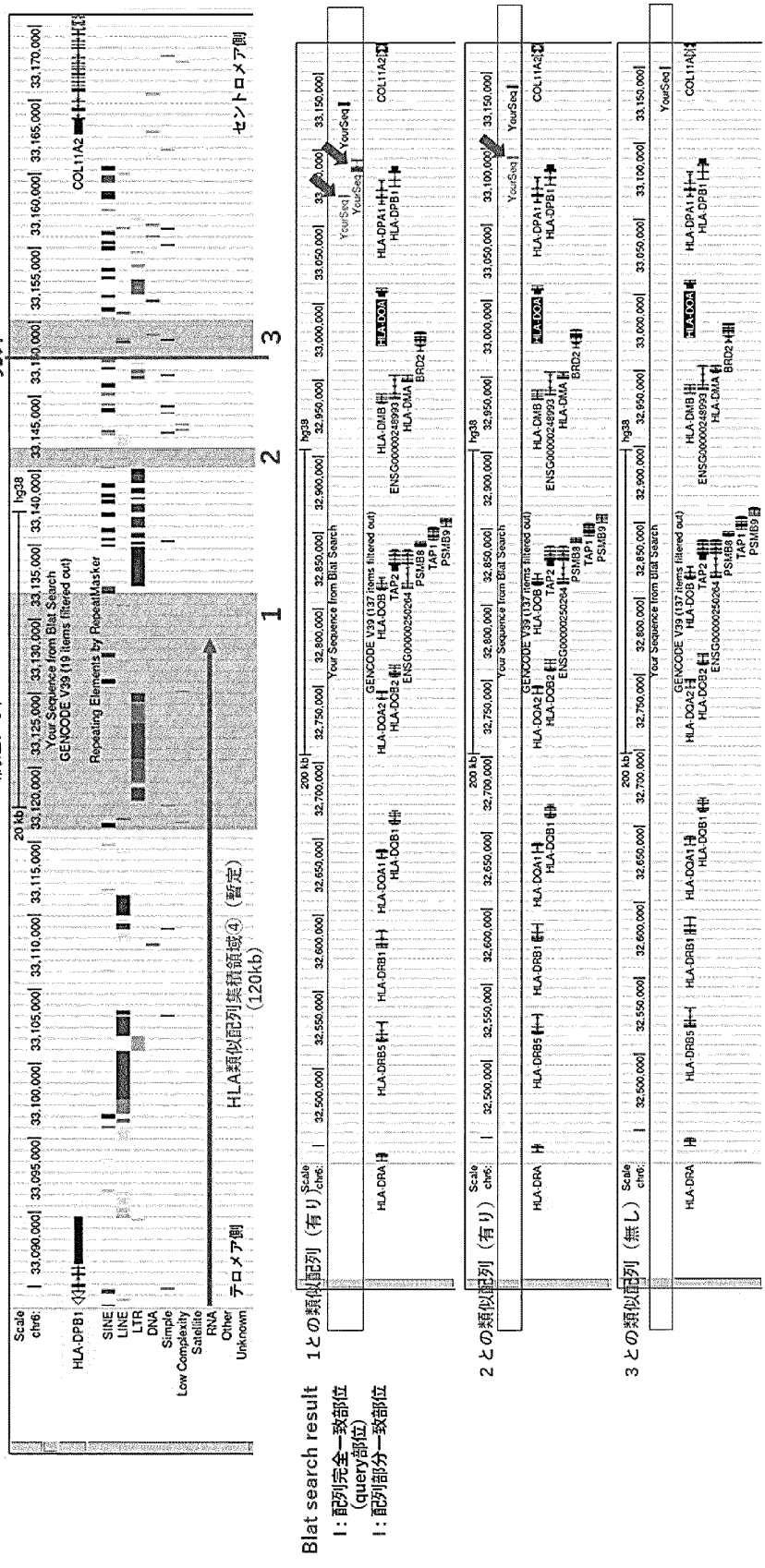
[図32]


境界
セントロメア側
テロメア側
HLA類似配列集積領域③（暫定）
(350kb)
HLA-DOB
ENSG00000250264
TAP2
GENCODE
Repeating Elements by RepeatMasker
SINE
LINE
LTR
DNA
Simple
Low Complexity
Satellite
RNA
Other
Unknown
1との類似配列（無し）
Blat search result
I：配列完全一致部位
（query部位）
I：配列部分一致部位
Your Sequence from Blat Search
GENCODE V39 (57 items filtered out)
YourSeq
HLA-DRB1
HLA-DRB5
HLA-DRA
HLA-DQA1
HLA-DQB1
HLA-DQA2
HLA-DQB2
PSMB8
TAP1
hg38

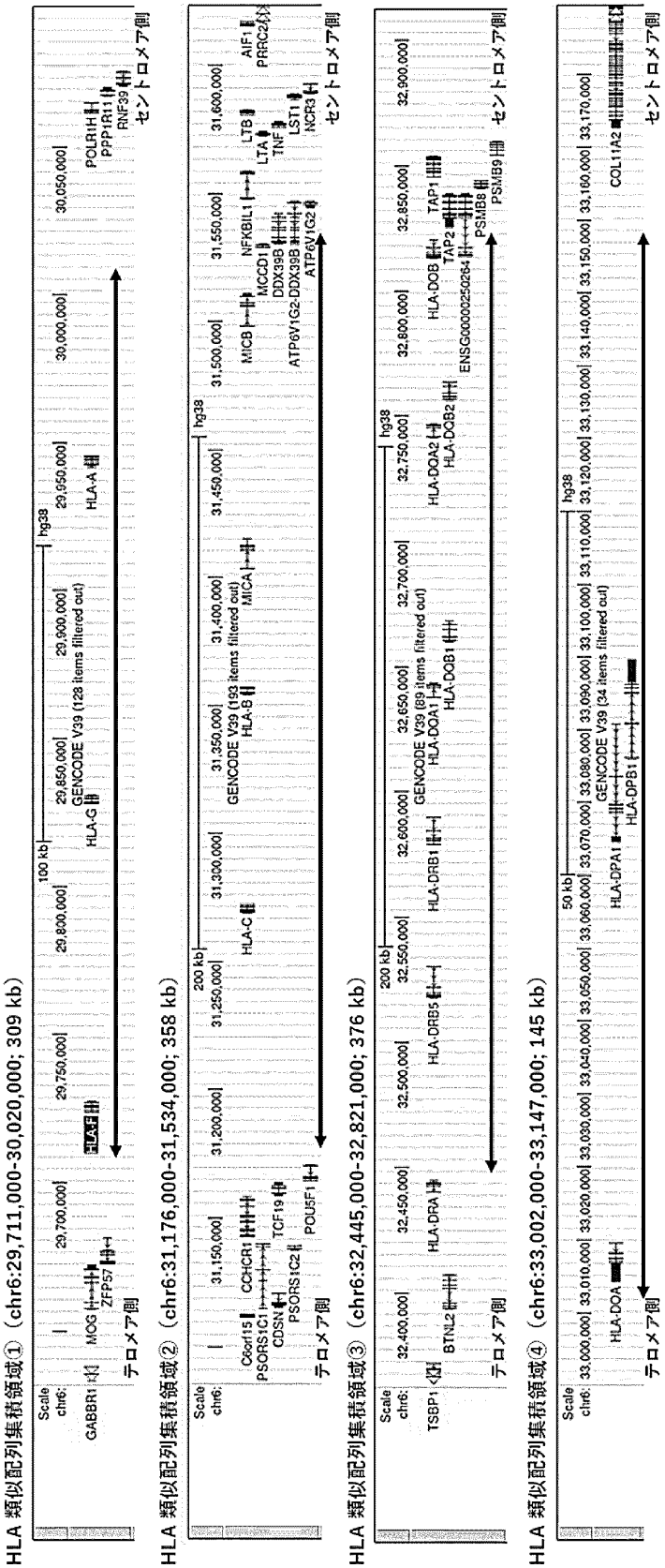
[図33]


境界
HLA類似配列集積領域④（暫定）
(120kb)
セントロメア側
テロメア側
1
Blat search result
1：配列完全一致部位
(query部位)
1：配列部分一致部位
1との類似配列

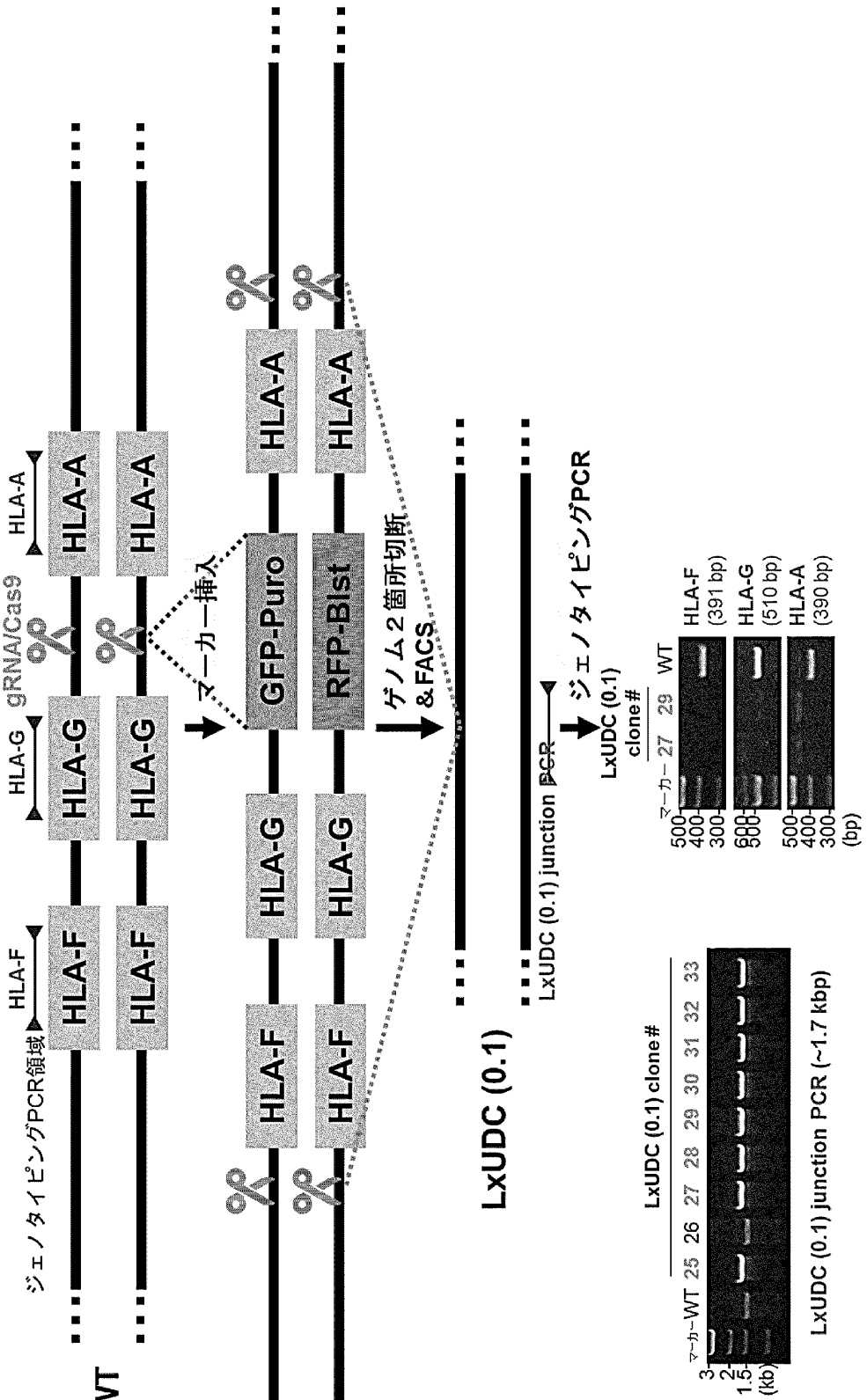
[図34]


境界
(偽遺伝子)
テロメア側
HLA類似配列集積領域④（暫定）
(120kb)
セントロメア側
1
2
3
HLA-DPB1
COL11A2
Blat search result
I：配列完全一致部位
(query部位)
I：配列部分一致部位
1との類似配列（有り）
2との類似配列（有り）
3との類似配列（無し）
Your Sequence from Blat Search
GENCODE V39 (137 items filtered out)
Repeating Elements by RepeatMasker
SINE
LINE
LTR
DNA
Simple
Low Complexity
Satellite
RNA
Other
Unknown

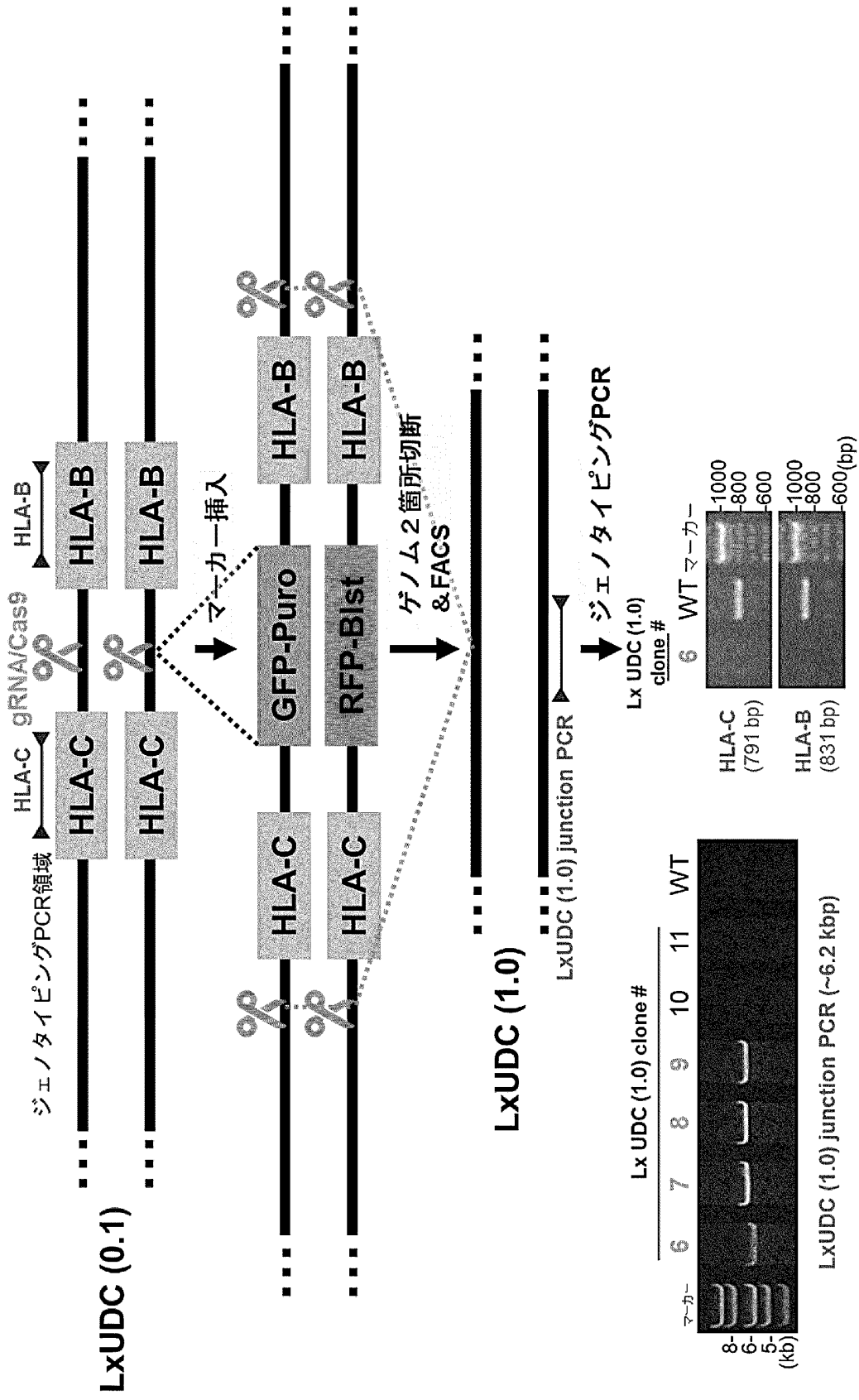
[図35]


HLA 類似配列集積領域①（chr6:29,711,000-30,020,000; 309 kb）
HLA 類似配列集積領域②（chr6:31,176,000-31,534,000; 358 kb）
HLA 類似配列集積領域③（chr6:32,445,000-32,821,000; 376 kb）
HLA 類似配列集積領域④（chr6:33,002,000-33,147,000; 145 kb）
テロメア側
セントロメア側

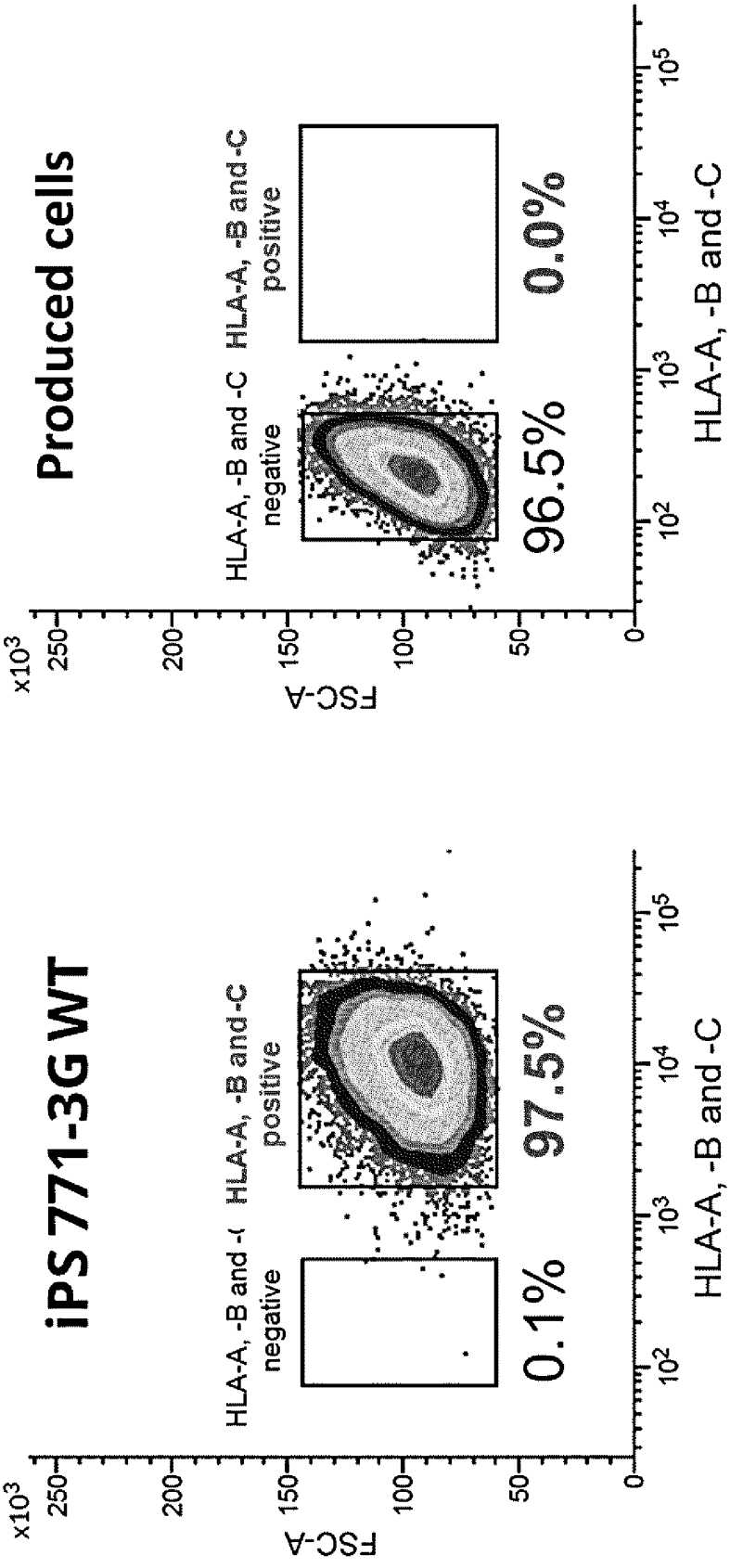
[図36]


iPS WT
ジェノタイピングPCR領域
HLA-F
HLA-G
gRNA/Cas9
HLA-A
マーカー挿入
GFP-Puro
RFP-Blst
ゲノム2箇所切断
&FACS
LxUDC (0.1)
LxUDC (0.1) junction PCR
ジェノタイピングPCR
LxUDC (0.1) clone#
マーカー 27 29 WT
HLA-F (391 bp)
HLA-G (510 bp)
HLA-A (390 bp)
500
400
300
600
500
500
400
300
(bp)
LxUDC (0.1) clone#
マーカー WT 25 26 27 28 29 30 31 32 33
3
2
1.5
(kb)
LxUDC (0.1) junction PCR (~1.7 kbp)

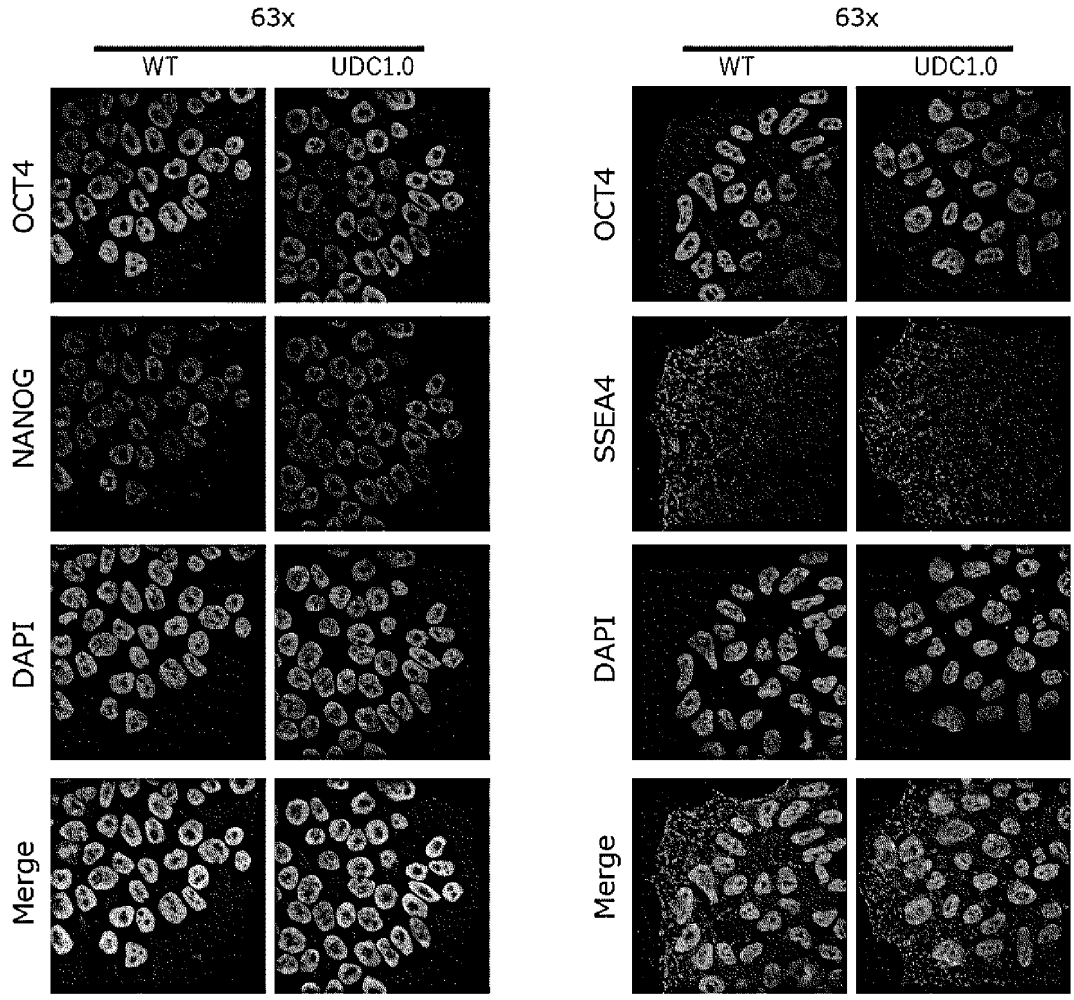
[図37]


LxUDC (0.1)
HLA-C
HLA-B
gRNA/Cas9
ジェノタイピングPCR領域
マーカー挿入
GFP-Puro
RFP-Blst
ゲノム2箇所切断
&FACS
LxUDC (1.0)
LxUDC (1.0) junction PCR
ジェノタイピングPCR
Lx UDC (1.0) clone #
6 7 8 9 10 11 WT
マーカー
8-
6-
5-
(kb)
LxUDC (1.0) junction PCR (~6.2 kbp)
Lx UDC (1.0)
clone #
6 WT マーカー
1000
800
600
HLA-C
(791 bp)
HLA-B
(831 bp)
1000
800
600(bp)

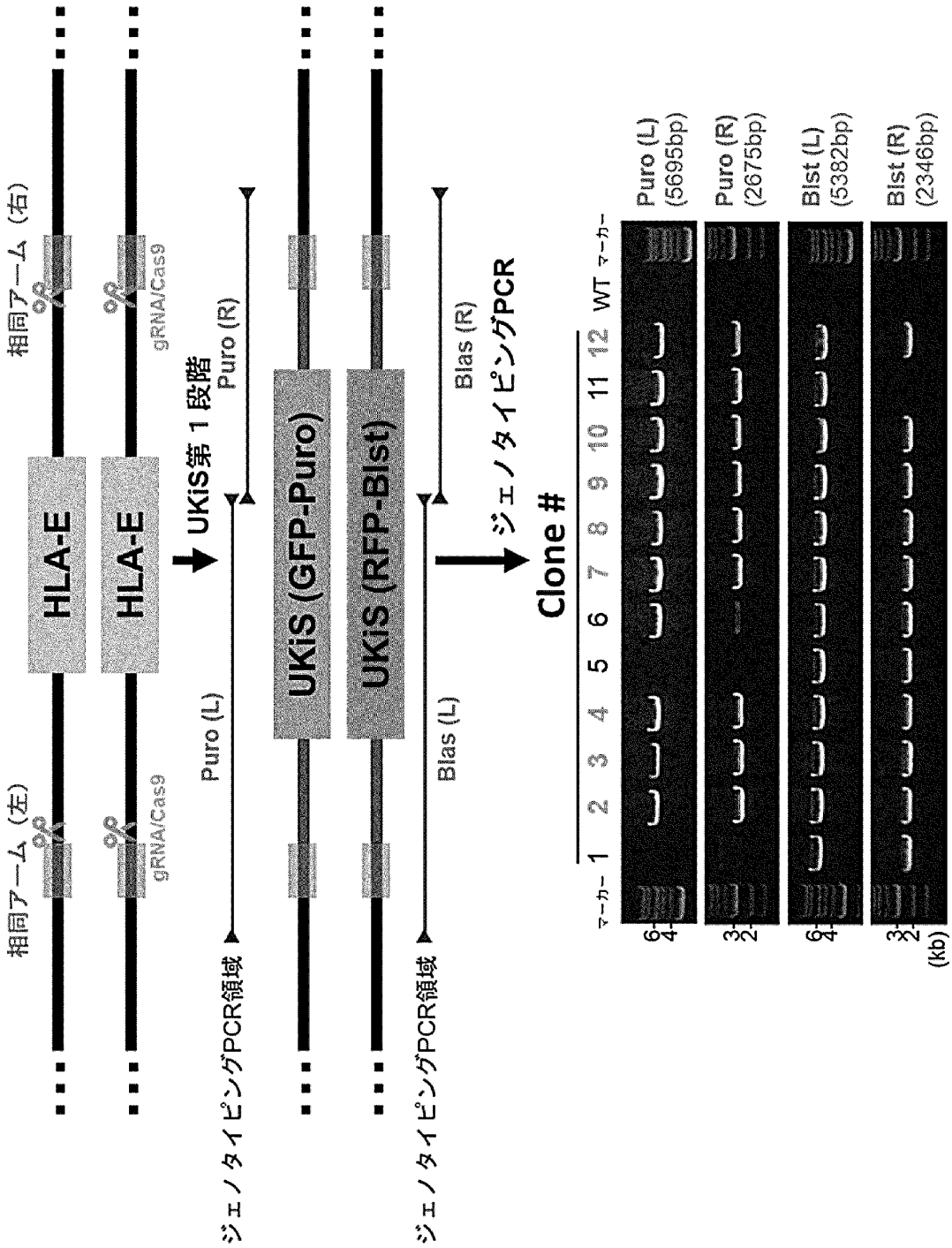
[図38]


Produced cells
HLA-A, -B and -C negative
HLA-A, -B and -C positive
96.5%
0.0%
iPS 771-3G WT
HLA-A, -B and -C negative
HLA-A, -B and -C positive
0.1%
97.5%
FSC-A
x10^3
HLA-A, -B and -C

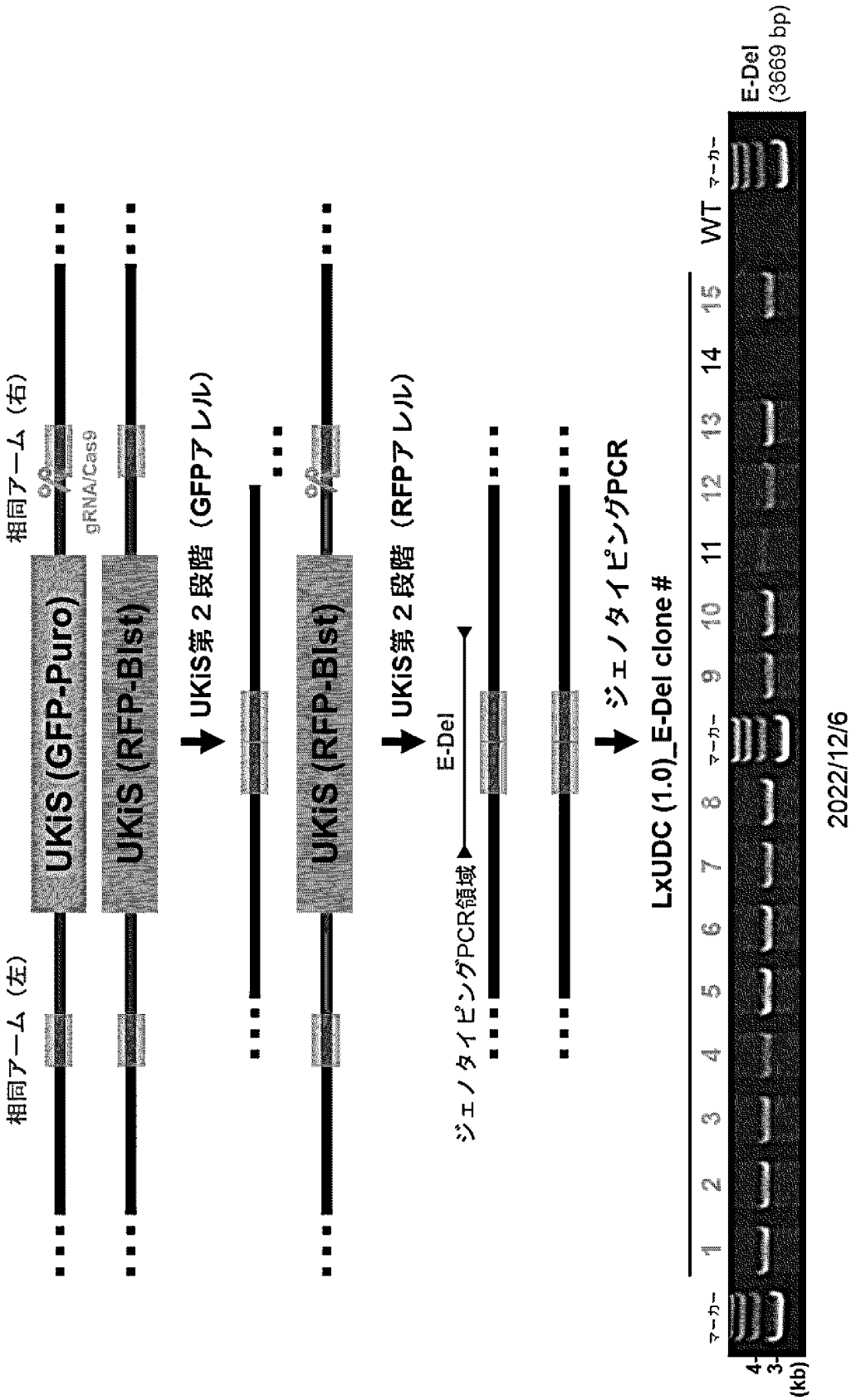
[図39]


63x
WT
UDC1.0
OCT4
NANOG
DAPI
Merge
63x
WT
UDC1.0
OCT4
SSEA4
DAPI
Merge

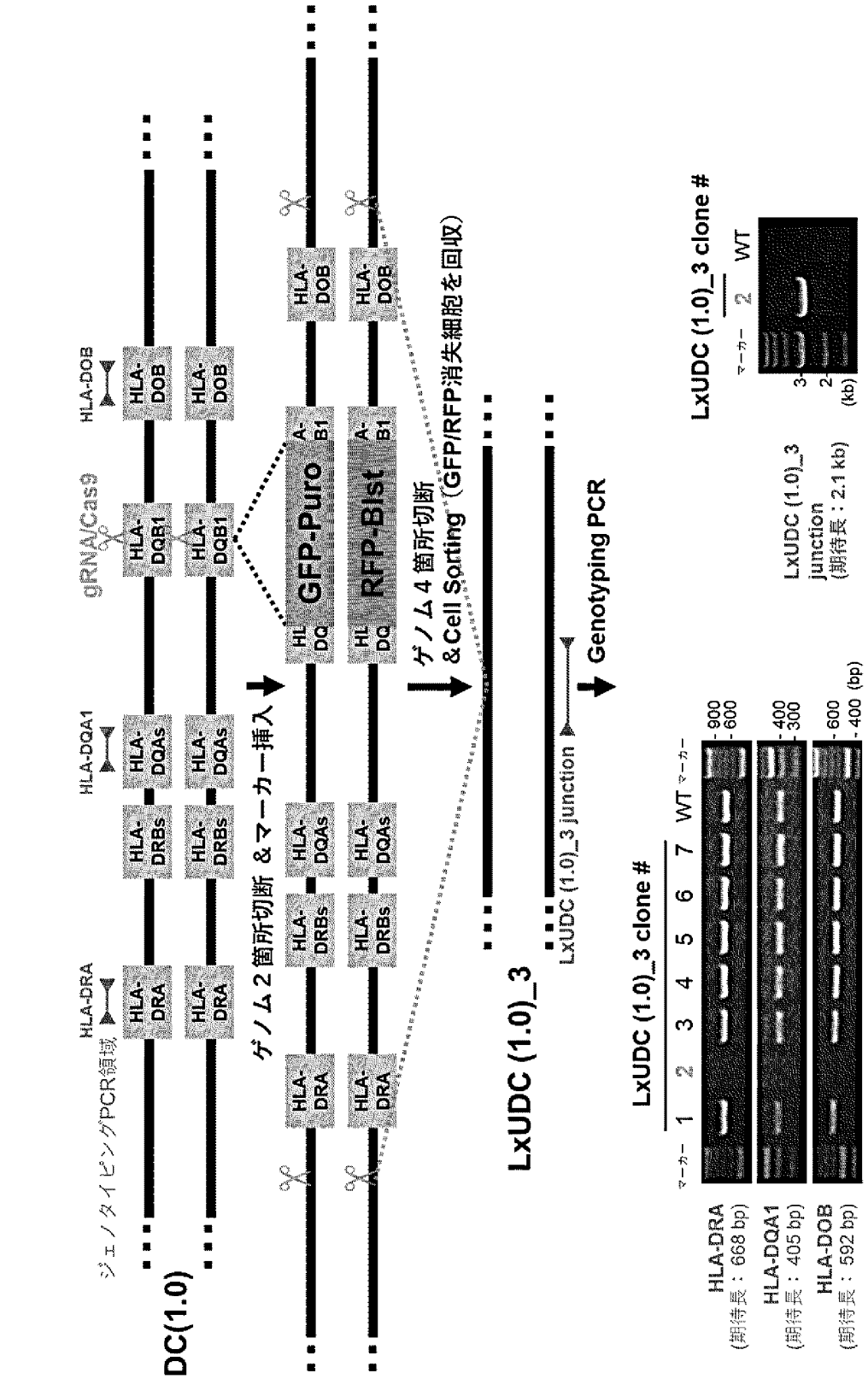
[図40]


相同アーム（左）
相同アーム（右）
HLA-E
HLA-E
gRNA/Cas9
gRNA/Cas9
UKiS第１段階
Puro (R)
Puro (L)
ジェノタイピングPCR領域
UKiS (GFP-Puro)
UKiS (RFP-Blst)
Blas (R)
Blas (L)
ジェノタイピングPCR領域
ジェノタイピングPCR
Clone #
マーカー 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 WT マーカー
Puro (L) (5695bp)
Puro (R) (2675bp)
Blst (L) (5382bp)
Blst (R) (2346bp)
6
4
3
2
6
4
3
2
(kb)

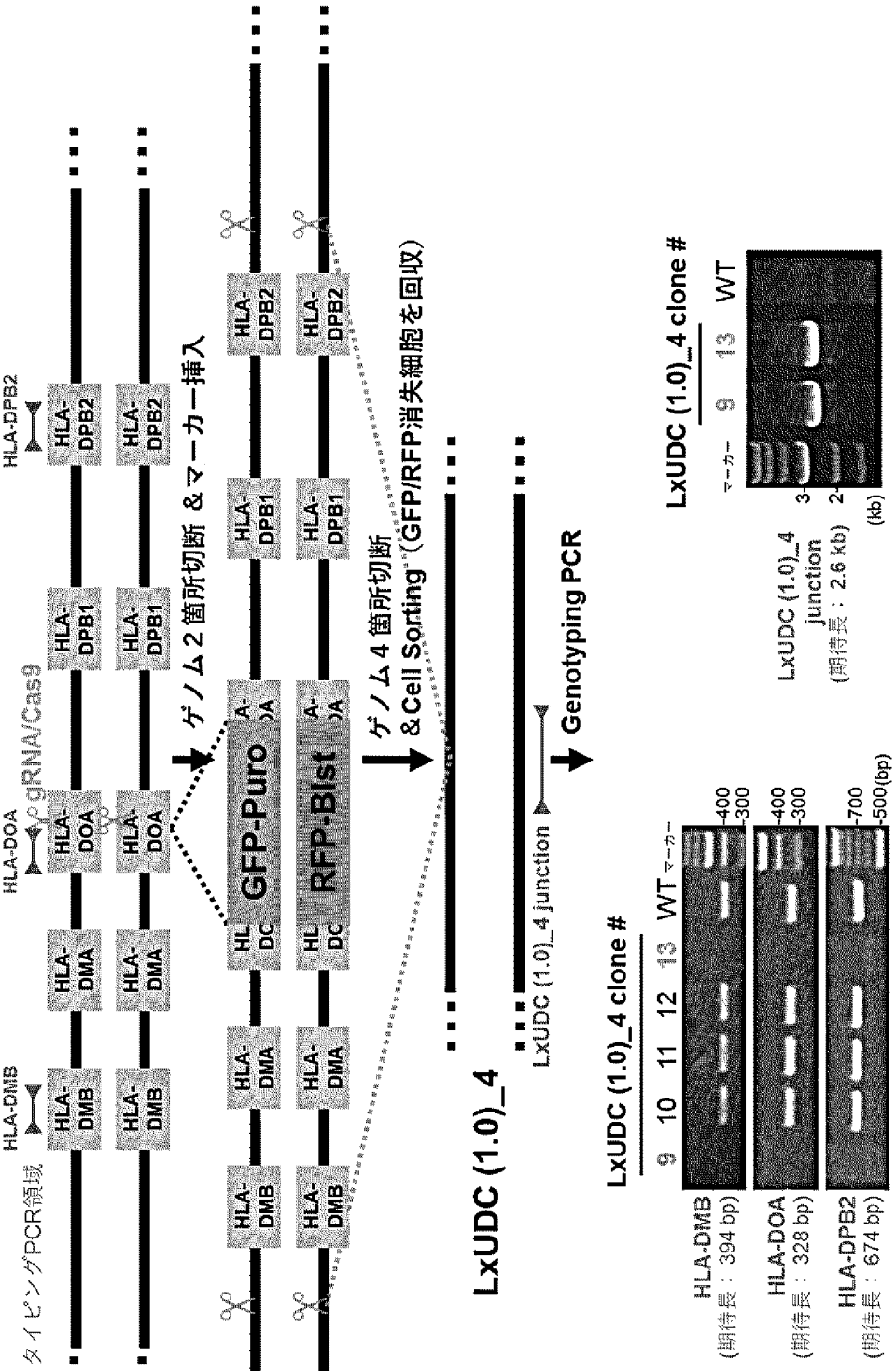
[図41]


相同アーム（右）
相同アーム（左）
UKiS (GFP-Puro)
UKiS (RFP-Blst)
gRNA/Cas9
UKiS第２段階（GFPアレル）
UKiS (RFP-Blst)
UKiS第２段階（RFPアレル）
E-Del
ジェノタイピングPCR領域
ジェノタイピングPCR
LxUDC (1.0)_E-Del clone #
マーカー
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15
WT
マーカー
E-Del
(3669 bp)
4
3
(kb)
2022/12/6

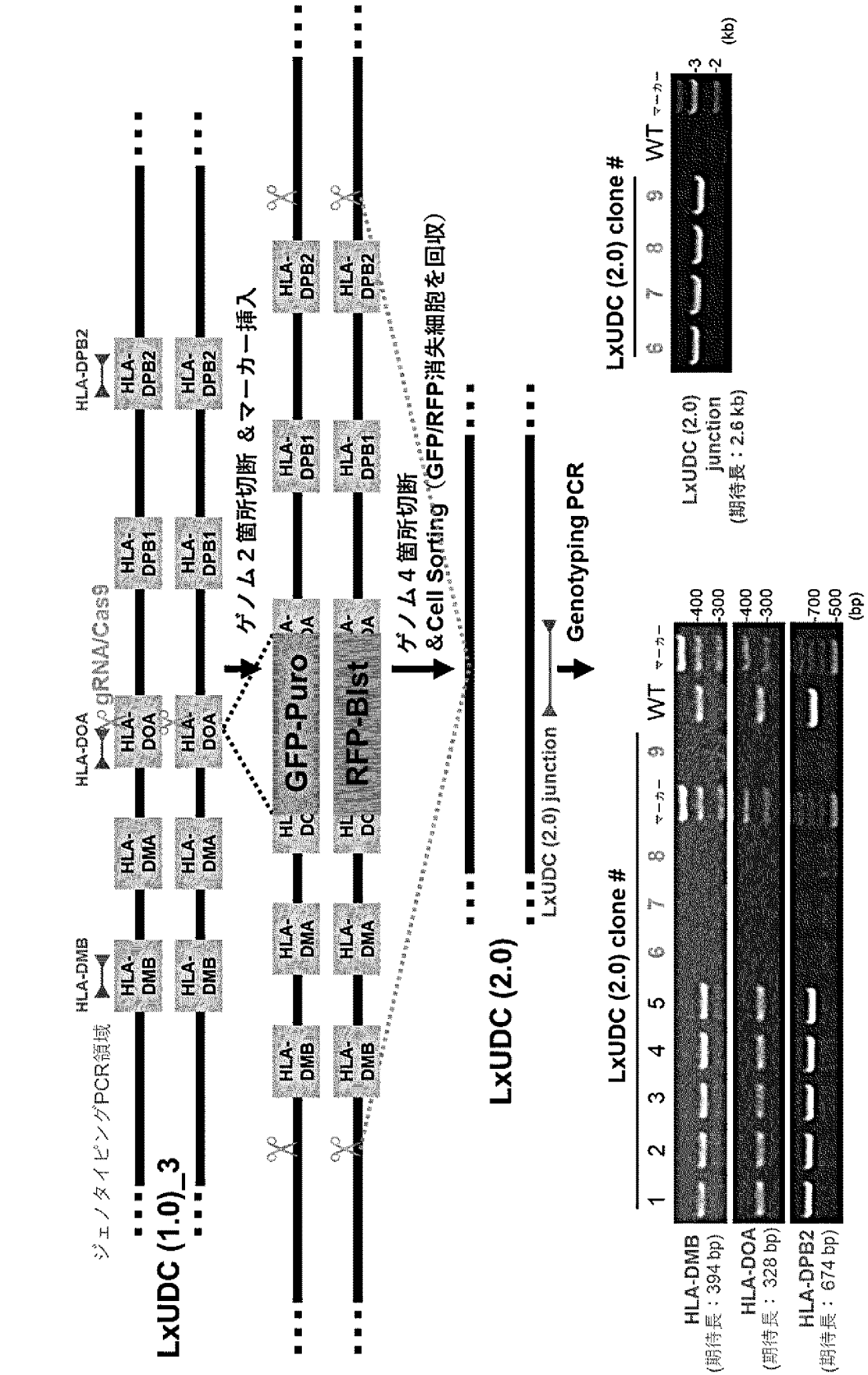
[図42]


LxUDC(1.0)
ジェノタイピングPCR領域
HLA-DRA
HLA-DQA1
gRNA/Cas9
HLA-DOB
HLA-DRA
HLA-DRBs
HLA-DQAs
HLA-DQB1
HLA-DOB
ゲノム2箇所切断 &マーカー挿入
GFP-Puro
RFP-Bist
ゲノム4箇所切断
&Cell Sorting（GFP/RFP消失細胞を回収）
LxUDC (1.0)_3
LxUDC (1.0)_3 junction
Genotyping PCR
LxUDC (1.0)_3 clone #
マーカー 1 2 3 4 5 6 7 WT マーカー
HLA-DRA
(期待長：668 bp)
HLA-DQA1
(期待長：405 bp)
HLA-DOB
(期待長：592 bp)
900
600
400
300
600
400 (bp)
LxUDC (1.0)_3
junction
(期待長：2.1 kb)
LxUDC (1.0)_3 clone #
マーカー 2 WT
3
2
(kb)

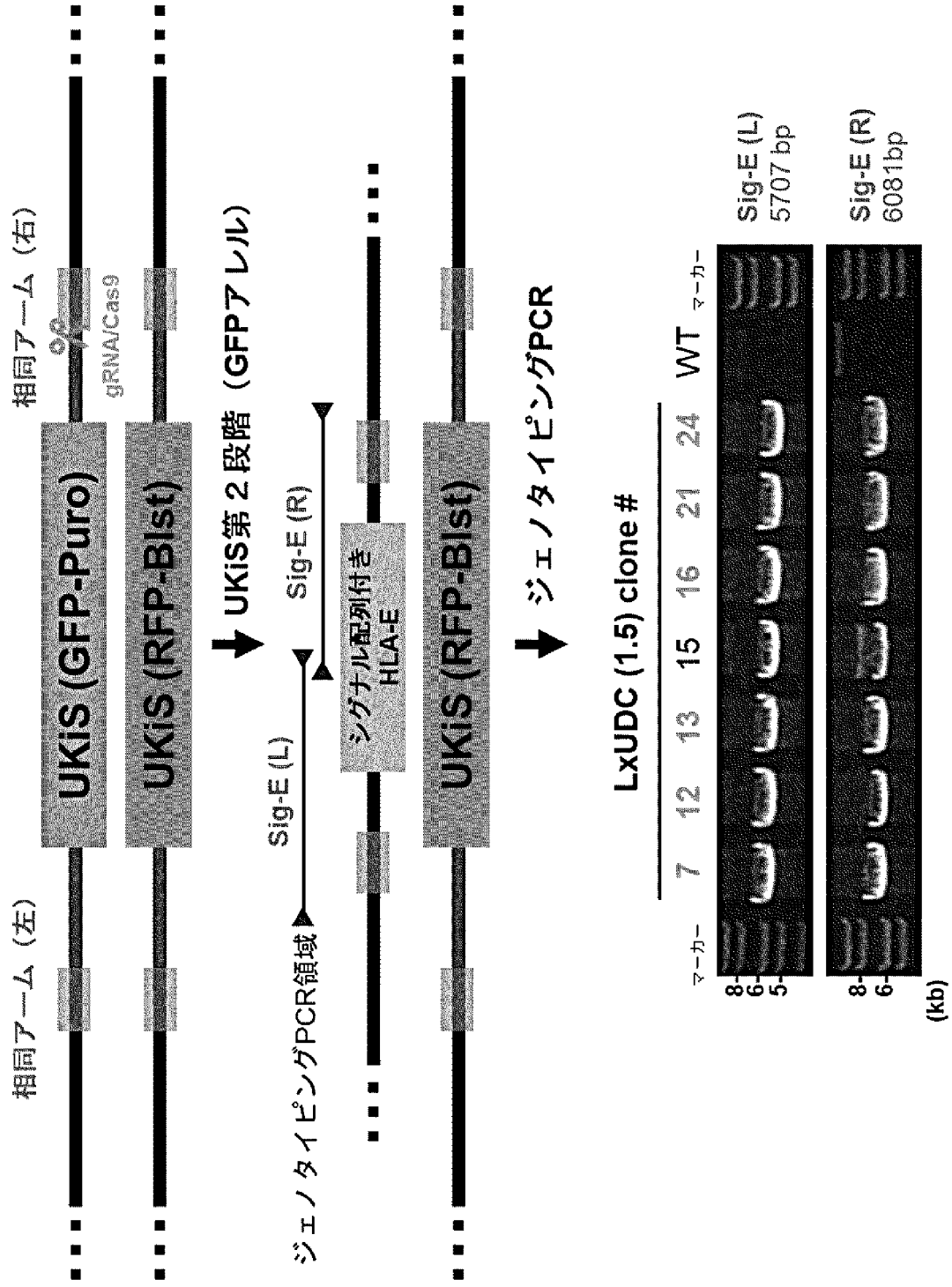
[図43]


LxUDC (1.0)
ジェノタイピングPCR領域
HLA-DMB
HLA-DOA
gRNA/Cas9
HLA-DPB2
HLA-DMB
HLA-DMA
HLA-DOA
HLA-DPB1
HLA-DPB2
ゲノム2箇所切断 &マーカー挿入
GFP-Puro
RFP-Blst
ゲノム4箇所切断
&Cell Sorting（GFP/RFP消失細胞を回収）
LxUDC (1.0)_4
LxUDC (1.0)_4 junction
Genotyping PCR
LxUDC (1.0)_4 clone #
9 10 11 12 13 WT マーカー
HLA-DMB
(期待長：394 bp)
HLA-DOA
(期待長：328 bp)
HLA-DPB2
(期待長：674 bp)
400
300
700
500(bp)
LxUDC (1.0)_4 clone #
マーカー 9 13 WT
LxUDC (1.0)_4
junction
(期待長：2.6 kb)
3
2
(kb)

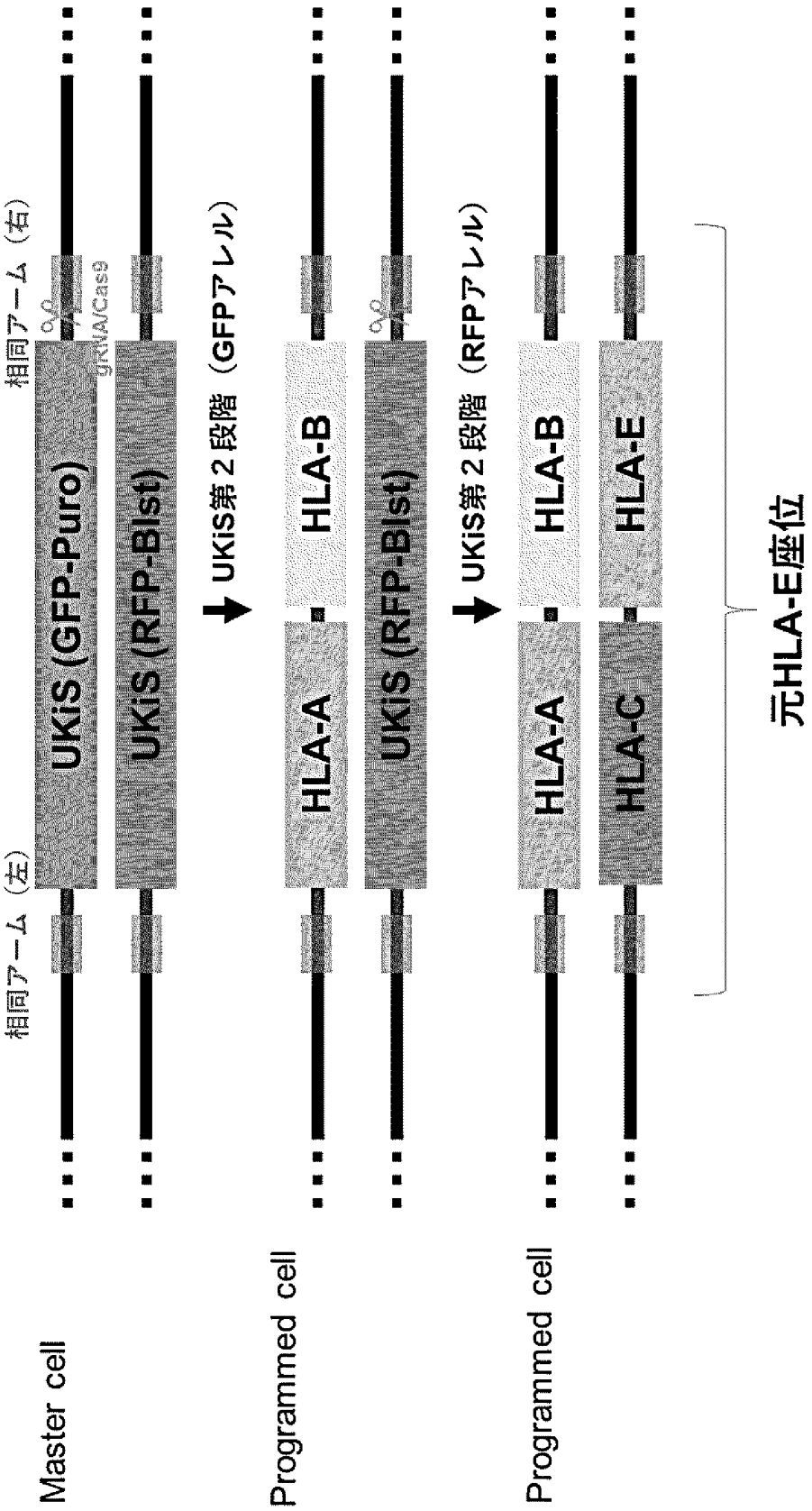
[図44]


ジェノタイピングPCR領域
HLA-DMB
HLA-DOA
gRNA/Cas9
HLA-DPB2
LxUDC (1.0)_3
HLA-DMB
HLA-DMA
HLA-DOA
HLA-DPB1
HLA-DPB2
ゲノム2箇所切断 &マーカー挿入
GFP-Puro
RFP-Blst
ゲノム4箇所切断
&Cell Sorting *(GFP/RFP消失細胞を回収)
LxUDC (2.0)
LxUDC (2.0) junction
Genotyping PCR
LxUDC (2.0) clone #
1 2 3 4 5 6 7 8 マーカー 9 WT マーカー
HLA-DMB
(期待長：394 bp)
HLA-DOA
(期待長： 328 bp)
HLA-DPB2
(期待長： 674 bp)
400
300
700
500
(bp)
LxUDC (2.0) clone #
6 7 8 9 WT マーカー
LxUDC (2.0) junction
(期待長：2.6 kb)
3
2
(kb)

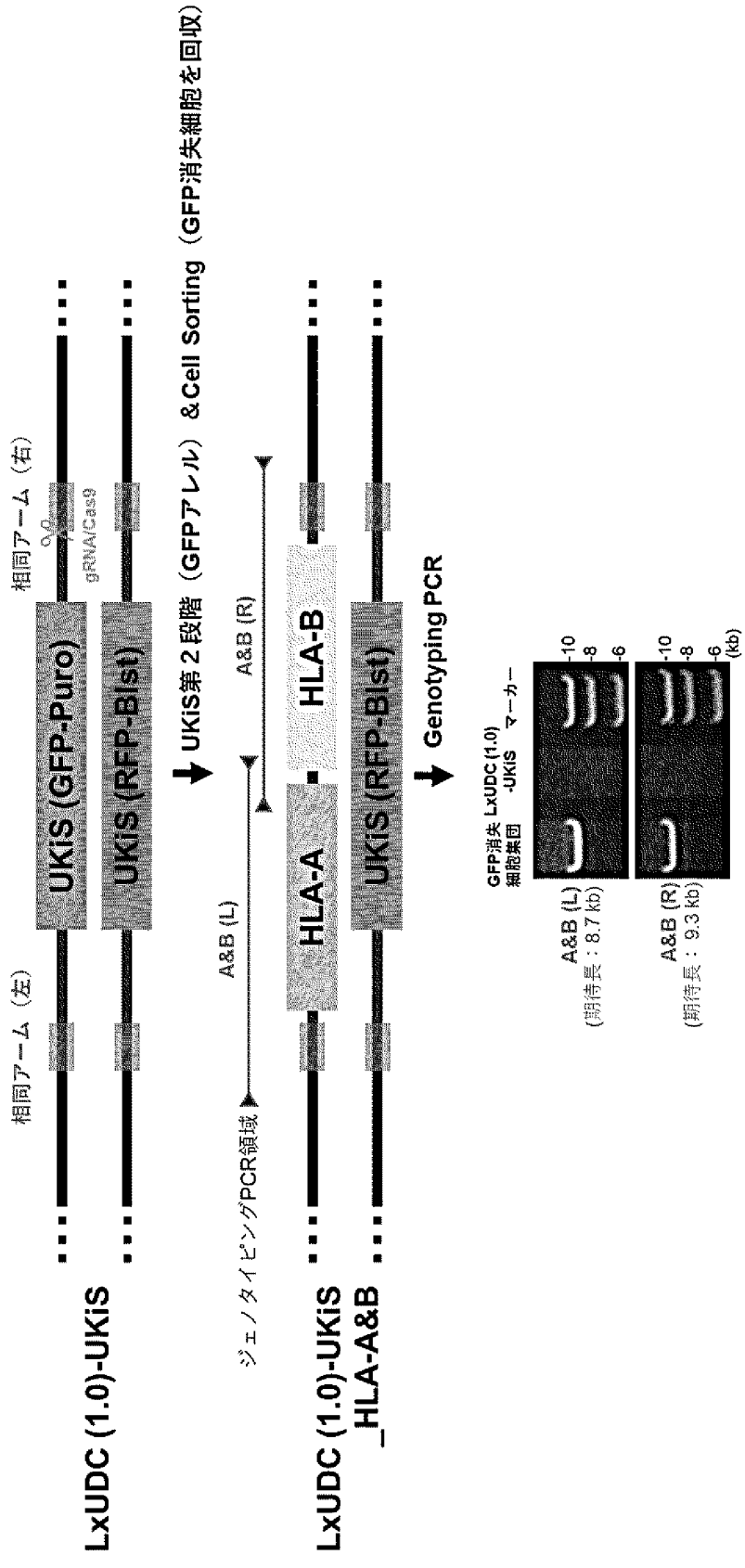
[図45]


相同アーム（右）
gRNA/Cas9
UKiS (GFP-Puro)
UKiS (RFP-Blst)
相同アーム（左）
UKiS第２段階（GFPアレル）
Sig-E (R)
Sig-E (L)
シグナル配列付き HLA-E
ジェノタイピングPCR領域
UKiS (RFP-Blst)
ジェノタイピングPCR
LxUDC (1.5) clone #
マーカー 7 12 13 15 16 21 24 WT マーカー
Sig-E (L) 5707 bp
Sig-E (R) 6081bp
8
6
5
8
6
(kb)

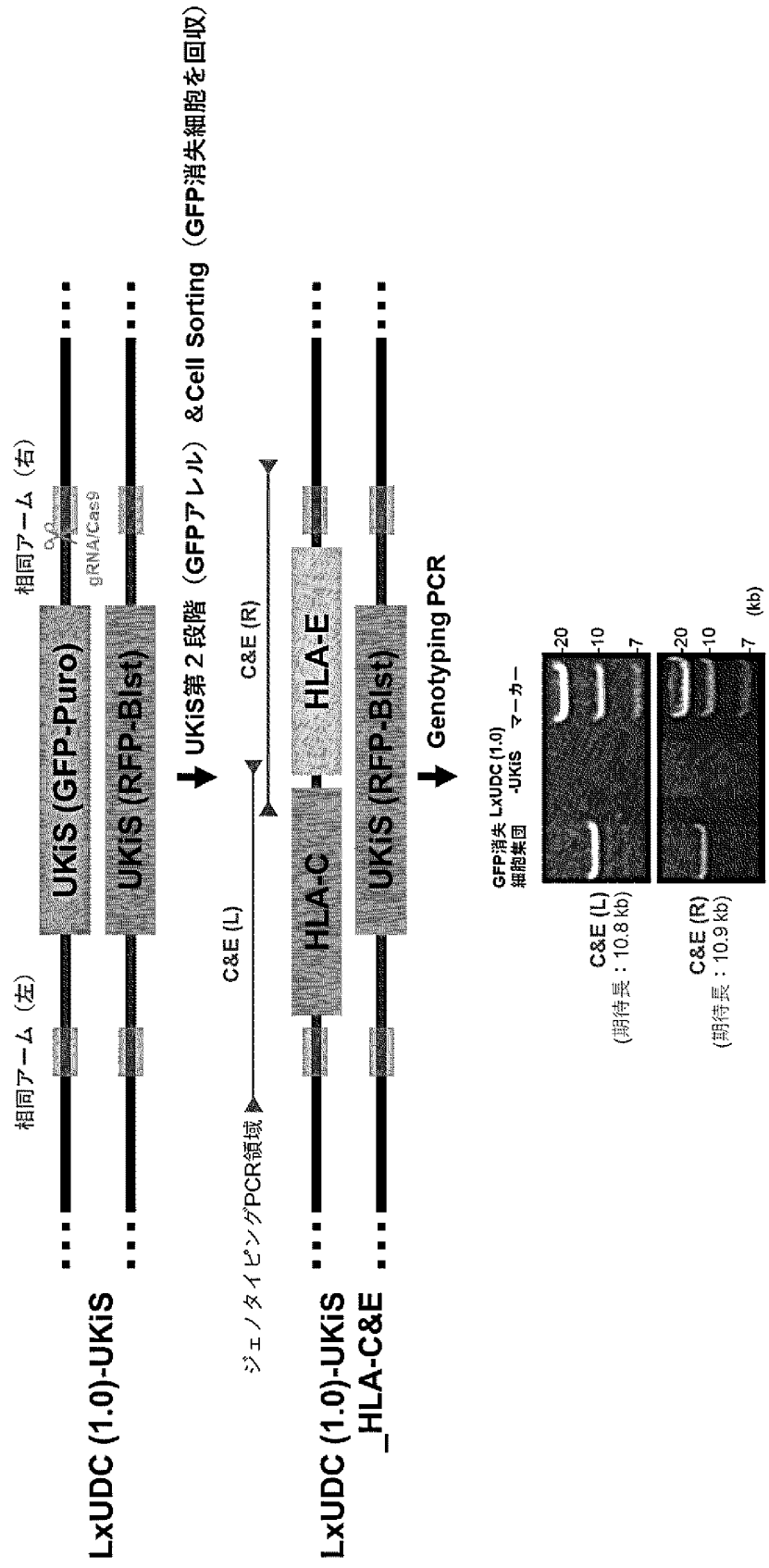
[図46]


Master cell
相同アーム（左）
UKiS (GFP-Puro)
gRNA/Cas9
UKiS (RFP-Blst)
相同アーム（右）
UKiS第２段階（GFPアレル）
Programmed cell
HLA-A
HLA-B
UKiS (RFP-Blst)
UKiS第２段階（RFPアレル）
Programmed cell
HLA-A
HLA-B
HLA-C
HLA-E
元HLA-E座位

[図47]

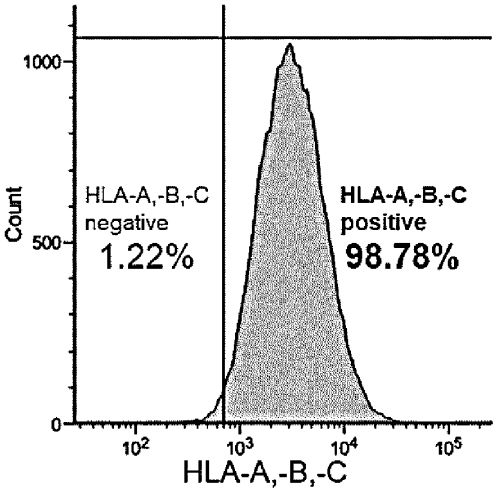

LxUDC (1.0)-UKiS
相同アーム（左）
UKiS (GFP-Puro)
UKiS (RFP-Blst)
相同アーム（右）
gRNA/Cas9
UKiS第２段階（GFPアレル）&Cell Sorting（GFP消失細胞を回収）
ジェノタイピングPCR領域
A&B (L)
A&B (R)
LxUDC (1.0)-UKiS
_HLA-A&B
HLA-A
HLA-B
UKiS (RFP-Blst)
Genotyping PCR
GFP消失 LxUDC (1.0)
細胞集団
-UKiS
マーカー
A&B (L)
(期待長：8.7 kb)
A&B (R)
(期待長：9.3 kb)
-10
-8
-6
(kb)

[図48]

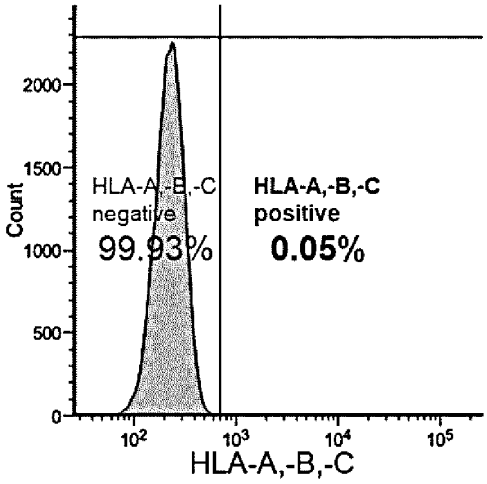

LxUDC (1.0)-UKiS
相同アーム（左）
UKiS (GFP-Puro)
UKiS (RFP-Blst)
相同アーム（右）
gRNA/Cas9
UKiS第２段階（GFPアレル）&Cell Sorting（GFP消失細胞を回収）
ジェノタイピングPCR領域
C&E (L)
C&E (R)
HLA-C
HLA-E
LxUDC (1.0)-UKiS
_HLA-C&E
UKiS (RFP-Blst)
Genotyping PCR
GFP消失 LxUDC (1.0)
細胞集団 -UKiS マーカー
20
10
7
(kb)
C&E (L)
(期待長：10.8 kb)
C&E (R)
(期待長：10.9 kb)

[図49]

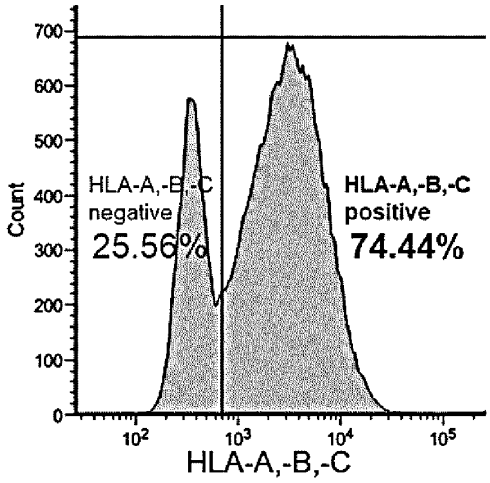
元の野生型iPS細胞



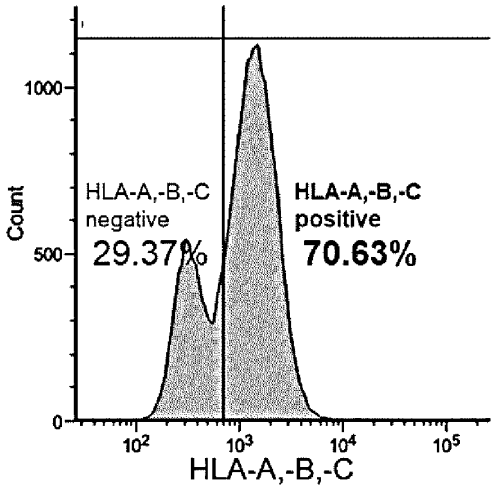

LxUDC (1.0)



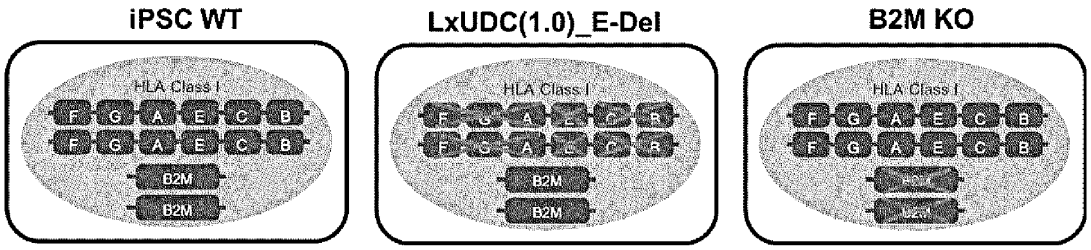

GFP消失細胞集団
(LxUDC (1.0)-UKiS
_HLA-A&Bを含む)

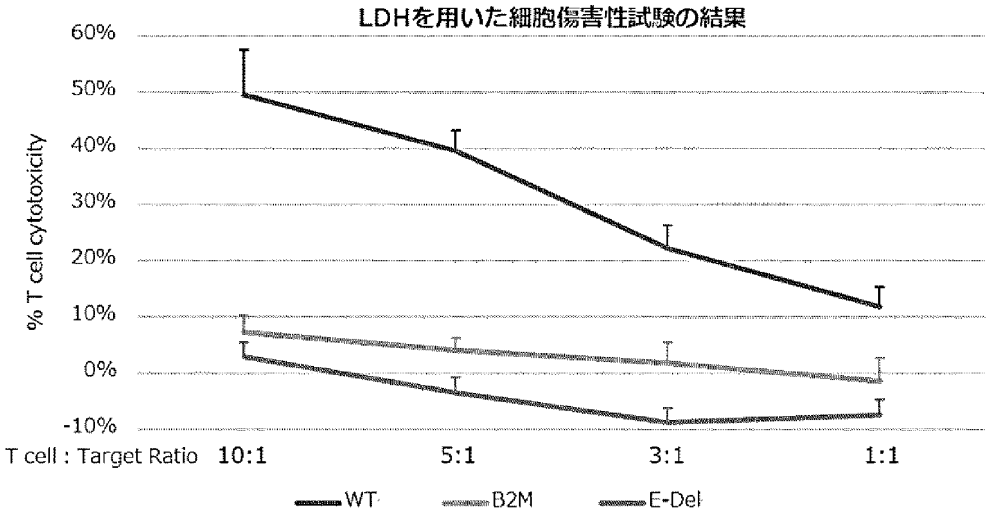



GFP消失細胞集団
(LxUDC (1.0)-UKiS
_HLA-C&Eを含む)



[図50]


iPSC WT
HLA Class I
F G A E C B
F G A E C B
B2M
B2M
LxUDC(1.0)_E-Del
HLA Class I
B2M
B2M
B2M KO
HLA Class I
F G A E C B
F G A E C B


LDHを用いた細胞傷害性試験の結果
% T cell cytotoxicity
60%
50%
40%
30%
20%
10%
0%
-10%
T cell : Target Ratio
10:1
5:1
3:1
1:1
WT
B2M
E-Del