

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2022-548044

(P2022-548044A)

(43)公表日 令和4年11月16日(2022.11.16)

(51)国際特許分類	F I	テーマコード(参考)
C 1 2 N 15/54 (2006.01)	C 1 2 N 15/54	4 B 0 5 0
A 6 1 K 31/7105(2006.01)	A 6 1 K 31/7105	4 B 0 6 5
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	4 C 0 8 4
A 6 1 K 35/76 (2015.01)	A 6 1 K 35/76	4 C 0 8 6
A 6 1 K 35/761 (2015.01)	A 6 1 K 35/761	4 C 0 8 7
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全79頁) 最終頁に続く		

(21)出願番号	特願2022-516113(P2022-516113)	(71)出願人	308032460
(86)(22)出願日	令和2年9月14日(2020.9.14)		ザ リージェンツ オブ ザ ユニバーシテ
(85)翻訳文提出日	令和4年4月12日(2022.4.12)		ィ オブ コロラド, ア ボディー コーポ
(86)国際出願番号	PCT/US2020/050665		レイト
(87)国際公開番号	WO2021/051054		THE REGENTS OF THE U
(87)国際公開日	令和3年3月18日(2021.3.18)		NIVERSITY OF COLORA
(31)優先権主張番号	62/899,861		DO, a body corporate
(32)優先日	令和1年9月13日(2019.9.13)		アメリカ合衆国 コロラド 8 0 2 0 3 ,
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		デンバー, グラント ストリート 1 8
			0 0 , 8 ティーエイチ フロアー
(81)指定国・地域	AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA, RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,A T,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR ,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,	(74)代理人	100099759
	最終頁に続く		弁理士 青木 篤
		(74)代理人	100123582
			弁理士 三橋 真二
		(74)代理人	100117019
			最終頁に続く

(54)【発明の名称】 細胞および組織の若返りのための方法および組成物

(57)【要約】

本開示は、標的細胞の若返りのための組成物、方法、およびキットを提供する。側面によっては、これらの組成物、方法、およびキットは、TERTおよび/またはTERCの発現を促進するmRNAを含む。

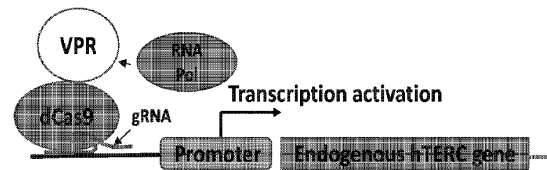


FIG. 1

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

a) テロメラーゼ逆転写酵素 (TERT) の少なくとも一部分をコードする核酸配列を含む少なくとも1つの第1のポリヌクレオチド分子; および

b) 少なくとも1つのDNA標的ポリペプチドの少なくとも一部分をコードする核酸配列を含む少なくとも1つの第2のポリヌクレオチド分子を含む、

前記DNA標的ポリペプチドはテロメラーゼRNA成分 (TERC) の転写を増大させる、組成物。

【請求項 2】

a) テロメラーゼ逆転写酵素 (TERT) の少なくとも一部分をコードする核酸配列を含む少なくとも1つの第1のポリヌクレオチド分子; および

b) 少なくとも1つのDNA標的ポリペプチドを含む、

前記DNA標的ポリペプチドはテロメラーゼRNA成分 (TERC) の転写を増大させる、組成物。

【請求項 3】

前記少なくとも1つの第1のポリヌクレオチド分子は、TERTの少なくとも一部分をコードするmRNA分子を含む、請求項 1 または請求項 2 に記載の組成物。

【請求項 4】

前記少なくとも1つの第1のポリヌクレオチド分子は、TERTの少なくとも一部分の発現を駆動するのに十分な少なくとも1つのプロモーターに作動可能に連結されるTERTの少なくとも一部分をコードする核酸配列を含むプラスミドを含む、請求項 1 または請求項 2 に記載の組成物。

【請求項 5】

前記少なくとも1つの第2のポリヌクレオチド分子は、少なくとも1つのDNA標的ポリペプチドの少なくとも一部分をコードするmRNA分子を含む、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 6】

前記少なくとも1つの第2のポリヌクレオチド分子は、少なくとも1つのDNA標的ポリペプチドの少なくとも一部分の発現を駆動するのに十分な少なくとも1つのプロモーターに作動可能に連結される前記少なくとも1つのDNA標的ポリペプチドの少なくとも一部分をコードする核酸配列を含むプラスミドを含む、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 7】

前記DNA標的ポリペプチドは、少なくとも1つのCas9分子、少なくとも1つのCas9変異分子、少なくとも1つのCas9相同分子、またはそれらの任意の組合せを含む、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 8】

前記Cas9分子、Cas9変異分子、またはCas9相同分子は、ヌクレアーゼ欠乏性またはヌクレアーゼ不活性である、請求項 7 に記載の組成物。

【請求項 9】

前記Cas9変異分子は、eSpCas9 (K855A)、eSpCas9 (1.0)、eSpCas9 (1.1)、SpCas9-HF1 (VP12)、HypaCas9、xCas9、SpyFi Cas9、iSpy Cas9、iSpyMac、Cas9 (VQR)、Cas9 (EQR)、Cas9 (VRER)、Cas9 (D1135E)、Cas9 (QQR1)、SaCas9 (KKH)、Nme1Cas9、Nme2Cas9、Nme3Cas9、またはそれらの任意の組合せを含む、請求項 8 に記載の組成物。

【請求項 10】

前記Cas9相同分子は、化膿連鎖球菌Cas9 (spCas9)、フランシセラ・ノビシダCas9 (FnCas9)、黄色ブドウ球菌Cas9 (SaCas9)、骨髄炎菌Cas9 (NmCas9; NmeCas9)、高温性連鎖球菌CRISPR1-Cas9 (St1Cas9)、高温性連鎖球菌CRISPR3-Cas9 (St3Cas9)、カンピロバクター・ジェジュニCas9 (CjCas9)、アシダミノコッカス属BV3L6 Cpf1 (AsCpf1)、ラクノスピラ科細菌ND2006 Cpf1 (LbCpf1)、ストレプトコッカス・カニスCas9 (SCCas9)、トレポネーマ・デンティコラCas9 (TdCas9)、ストレブ

10

20

30

40

50

トコッカス・マカカエCas9 (SmacCas9)、Cas (Cas12j)、野兔病菌亜種ノビシダCas9、パストレラ・ムルトシダCas9、カンピロバクター・ラリCF89-12 Cas9、マイコプラズマ・ガリセプチカム株F Cas9、ニトラチフラクター・サルスジニス株DSM 16511 Cas9、パルピバクulum・ラバメンチボランスCas9、ロゼブリア・インテスティナリスCas9、ナイセリア・シネレアCas9、グルコンアセットバクター・ジアゾトロフィカスCas9、アゾソピリルムB510 Cas9、スファエロカエタ・グロブス株バディCas9、フラボバクテリウム・カラムナーレCas9、フルビイコーラ・タフェンシスCas9、バクテロイデス・コプロフィルスCas9、マイコプラズマ・モービレCas9、ラクトバチルス・ファルシミニスCas9、ストレプトコッカス・パステウリアヌスCas9、ラクトバチルス・ジョンソニイCas9、ブドウ球菌シューディンテルメディウスCas9、フィリファクター・アロシスCas9、レジオネラ・ニューモフィラ株パリスCas9、サテレラ・ワズワルセンシスCas9、コリネバクター・ジフテリアエCas9、またはそれらの任意の組合せを含む、請求項8に記載の組成物。

10

【請求項11】

前記Cas9相同分子は、化膿連鎖球菌Cas9 (spCas9)、フランシセラ・ノビシダCas9 (FnCas9)、黄色ブドウ球菌Cas9 (SaCas9)、骨髄炎菌Cas9 (NmCas9)、高温性連鎖球菌CRISPR1-Cas9 (St1Cas9)、高温性連鎖球菌CRISPR3-Cas9 (St3Cas9)、カンピロバクター・ジェジュニCas9 (CjCas9)、アシダミノコッカス属BV3L6 Cpf1 (AsCpf1)、ラクノスピラ科細菌ND2006 Cpf1 (LbCpf1)、ストレプトコッカス・カニスCas9 (SCCas9)、トレポネーマ・デンティコラCas9 (TdCas9)、ストレプトコッカス・マカカエCas9 (SmacCas9)、Cas (Cas12j)、野兔病菌亜種ノビシダCas9、パストレラ・ムルトシダCas9、カンピロバクター・ラリCF89-12 Cas9、マイコプラズマ・ガリセプチカム株F Cas9、ニトラチフラクター・サルスジニス株DSM 16511 Cas9、パルピバクulum・ラバメンチボランスCas9、ロゼブリア・インテスティナリスCas9、ナイセリア・シネレアCas9、グルコンアセットバクター・ジアゾトロフィカスCas9、アゾソピリルムB510 Cas9、スファエロカエタ・グロブス株バディCas9、フラボバクテリウム・カラムナーレCas9、フルビイコーラ・タフェンシスCas9、バクテロイデス・コプロフィルスCas9、マイコプラズマ・モービレCas9、ラクトバチルス・ファルシミニスCas9、ストレプトコッカス・パステウリアヌスCas9、ラクトバチルス・ジョンソニイCas9、ブドウ球菌シューディンテルメディウスCas9、フィリファクター・アロシスCas9、レジオネラ・ニューモフィラ株パリスCas9、サテレラ・ワズワルセンシスCas9、コリネバクター・ジフテリアエCas9、またはそれらの任意の組合せのキメラ変異体を含む、請求項8に記載の組成物。

20

30

【請求項12】

前記DNA標的ポリペプチドは、少なくとも1つのTALE分子、少なくとも1つの亜鉛フィンガー分子、少なくとも1つのメガヌクレアーゼ分子、またはそれらの任意の組合せを含む、請求項1～11のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項13】

前記DNA標的ポリペプチドは、少なくとも1つのトランス活性化分子を含む、請求項1～12のいずれか一項に記載の組成物。

40

【請求項14】

前記少なくとも1つのトランス活性化分子は、少なくとも1つのP65分子、少なくとも1つのRta分子、少なくとも1つのVP16分子、少なくとも1つのVP64分子、少なくとも1つのVP160分子、少なくとも1つのVP64-P65-Rta (VPR) 分子、少なくとも1つのSunTagペプチド、少なくとも1つのシングルガイドRNA-MS2 (sgRNA-MS2) 分子、またはそれらの任意の組合せを含む、請求項13に記載の組成物。

【請求項15】

前記DNA標的ポリペプチドは、DNA標的リボ核タンパク質 (RNP) 複合体を含む、請求項1～14のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項16】

50

前記DNA標的ポリペプチドは、少なくとも1つのガイドRNAを含む、請求項1～15のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項17】

前記トランス活性化分子は、少なくとも1つのシングルガイドRNA-MS2 (sgRNA-MS2) 分子を含む、請求項13に記載の組成物。

【請求項18】

前記少なくとも1つのsgRNA-MS2分子は、内因性TERC遺伝子の上流、その内部、またはその下流に位置する核酸配列に対し相補的な核酸配列、および少なくとも約1個、または少なくとも約2個、または少なくとも約3個、または少なくとも約4個、または少なくとも約5個、または少なくとも約6個、または少なくとも約7個、または少なくとも約8個、または少なくとも約9個、または少なくとも約10個のMS2 RNAアプタマーを含む、請求項17に記載の組成物。

10

【請求項19】

前記DNA標的ポリペプチドは、dCas9分子およびVPR分子を含む、請求項1～18のいずれかに一項に記載の組成物。

【請求項20】

前記DNA標的ポリペプチドは、内因性TERC遺伝子の上流、その5'、その内部、その下流、またはその3'に結合する、請求項1～19のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項21】

前記mRNA分子は、修飾mRNA分子である、請求項1～20のいずれか一項に記載の組成物。

20

【請求項22】

前記修飾mRNA分子は、少なくとも1つの修飾リボヌクレオシド塩基を含む、請求項21に記載の組成物。

【請求項23】

前記修飾リボヌクレオシド塩基は、シュードウリジン()残基、5-メチルシチジン(m^5C)残基、またはそれらの任意の組合せを含む、請求項22に記載の組成物。

【請求項24】

前記修飾mRNA分子は、少なくとも1つの修飾ヌクレオシドを含む、請求項22に記載の組成物。

30

【請求項25】

前記修飾ヌクレオシドは、5-メチルシチジン(m^5C)、5-メチルウリジン(m^5U)、N6-メチルアデノシン(m^6A)、イノシン2'-O-メチル化ヌクレオシド、またはそれらの任意の組合せを含む、請求項24に記載の組成物。

【請求項26】

複数のガイドRNA(gRNA)分子をさらに含み、前記複数のgRNAのうちの少なくとも1つのgRNAは、内因性TERC遺伝子の上流、その内部、またはその下流に位置する核酸配列に対し相補的である、請求項1～25のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項27】

前記複数のgRNA分子は、少なくとも約1個、または少なくとも約2個、または少なくとも約3個、または少なくとも約4個、または少なくとも約5個、または少なくとも約6個、または少なくとも約7個、または少なくとも約8個、または少なくとも約9個、または少なくとも約10個の個別種のgRNA分子を含み、それらの種はそれぞれ異なる核酸配列を有する、請求項26に記載の組成物。

40

【請求項28】

少なくとも1種のgRNAの発現を駆動するのに十分な少なくとも1つのプロモーターに作動可能に連結される前記少なくとも1種のgRNAをコードする少なくとも1つの核酸配列を含む少なくとも1つのプラスミドをさらに含む、請求項1～27のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項29】

50

前記複数のgRNA分子は、複数のシングルガイドRNA (sgRNA) 分子、crRNA : tracrRNA分子、切詰め型sgRNA分子、高忠実度足場gRNA分子、またはそれらの任意の組合せを含む、請求項 26 ~ 28 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 30】

前記少なくとも1つのガイドRNA分子は、修飾ガイドRNA (mod gRNA) 分子である、請求項 26 ~ 29 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 31】

前記少なくとも1つのガイドRNA分子は、表 1 または表 2 に記載の任意の配列を含む、請求項 26 ~ 30 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 32】

a) ヒトテロメラーゼ逆転写酵素 (hTERT) の少なくとも一部分をコードする核酸配列を含む少なくとも1つの修飾mRNA分子；
 b) 少なくとも1つのDNA標的ポリペプチドの少なくとも一部分をコードする核酸配列を含む少なくとも1つの修飾mRNA分子；および
 c) 複数のガイドRNA (gRNA) 分子を含む、
 前記少なくとも1つのDNA標的ポリペプチドは、dCas9およびVP64-P65-Rta (VPR) 分子を含み、前記複数のgRNAのうちの少なくとも1つのgRNAは、内因性hTERC遺伝子上流に位置する核酸配列に対し相補的である、組成物。

【請求項 33】

少なくとも1つの若返り因子をコードする少なくとも1つのmRNAおよび/またはポリヌクレオチドをさらに含む、請求項 1 ~ 32 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 34】

前記若返り因子は、テロメラーゼRNA成分 (TERC)、テロメラーゼ関連逆転写酵素 (TERT)、テロメアの保護因子1 (POT1)、インシュリン様成長因子1 (IGF1)、TP53 に対するWD反復含有アンチセンス (WRAP53)、核タンパク質ファミリーA、メンバー3 (NOP3)、異種核リボ核タンパク質A1 (hnRNPA1)、シェルタリン複合体小単位およびテロメラーゼ動員因子 (ACD/TPP1)、TRF-1相互作用アンキリン関連ADPリボースポリメラーゼ (TNKS)、テロメア反復結合因子1 (TRF-1)、テロメア反復結合因子2 (TRF-2)、TERF1相互作用核因子2 (TIN2)、テロメア反復結合因子2 (Rap1)、ディスクレインシュードウリジン合成酵素1 (DKC1)、リボ核タンパク質NHP2、またはこれらの任意の組合せを含む、請求項 33 に記載の組成物。

【請求項 35】

TERTはヒトTERT (hTERT) である、請求項 1 ~ 34 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 36】

TERCはヒトTERC (hTERC) である、請求項 1 ~ 35 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 37】

請求項 1 ~ 36 のいずれか一項に記載の組成物を含む、少なくとも1つのウイルス粒子を含む組成物。

【請求項 38】

前記少なくとも1つのウイルス粒子は、アデノ随伴ウイルス (AAV) 粒子、アデノウイルス粒子、レンチウイルス粒子、泡沫状ウイルス粒子、単純ヘルペスウイルス (HSV) 粒子、レトロウイルス粒子、ウイルス粒子、フラビウイルス粒子、ラブドウイルス粒子、麻疹ウイルス粒子、ニューカッスル病ウイルス粒子、ポックスウイルス粒子、ピコルナウイルス粒子、またはそれらの任意の組合せである、請求項 37 に記載の組成物。

【請求項 39】

前記少なくとも1つのAAV粒子は、AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、AAV2/1、AAV2/2、AAV2/3、AAV2/4、AAV2/5、AAV2/6、AAV2/7、AAV2/8、AAV2/9、AAV-DJ、また

10

20

30

40

50

はAAV-DJ8の各粒子である、請求項38に記載の組成物。

【請求項40】

前記少なくとも1つのレトロウイルス粒子は、MMSV粒子またはMSCV粒子である、請求項38に記載の組成物。

【請求項41】

前記少なくとも1つのレンチウイルス粒子は、HIV-1粒子またはHIV-2粒子である、請求項38に記載の組成物。

【請求項42】

前記少なくとも1つのウイルス粒子は、SFV粒子、SIN粒子、VEE粒子、またはM1粒子である、請求項38に記載の組成物。

10

【請求項43】

前記少なくとも1つのフラビウイルス粒子は、クンジンウイルス粒子、ウエストナイルウイルス粒子、またはデングウイルス粒子である、請求項38に記載の組成物。

【請求項44】

少なくとも1つのエキソソーム、微小胞体、またはリポソームを含む組成物であって、前記少なくとも1つのエキソソーム、微小胞体、またはリポソームは、請求項1～34のいずれか一項に記載の組成物を含む、組成物。

【請求項45】

少なくとも1つのナノ粒子を含む組成物であって、前記少なくとも1つのナノ粒子は、請求項1～36のいずれか一項に記載の組成物を含む、組成物。

20

【請求項46】

前記ナノ粒子は、リポソーム、ミセル、高分子系ナノ粒子、脂質高分子系ナノ粒子、金属系ナノ粒子、ナノ結晶、カーボンナノチューブ系ナノ粒子、または高分子ミセルを含む、請求項45に記載の組成物。

【請求項47】

請求項1～45のいずれか一項に記載の組成物を含むキット。

【請求項48】

少なくとも1つの細胞を若返らせる方法であって、前記少なくとも1つの細胞を請求項1～47のいずれか一項に記載の組成物またはキットに接触させる工程を含む、方法。

【請求項49】

請求項1～47のいずれか一項に記載の組成物またはキットに接触させた前記少なくとも1つの細胞を増殖して複数の若返り細胞を生成する工程をさらに含む、請求項48に記載の方法。

30

【請求項50】

対象の疾患を治療かつ/あるいは予防する方法であって、

a) 少なくとも1つの細胞を請求項1～47のいずれか一項に記載の組成物またはキットに接触させる工程、

b) 請求項1～47のいずれか一項に記載の組成物またはキットに接触させた前記少なくとも1つの細胞を増殖して複数の若返り細胞を生成する工程、および

c) 前記複数の若返り細胞を前記対象に投与する工程を含む、方法

40

【請求項51】

対象の疾患を治療かつ/あるいは予防する方法であって、

a) 少なくとも1つの細胞を請求項1～47のいずれか一項に記載の組成物またはキットに接触させる工程、

b) 請求項1～47のいずれか一項に記載の組成物またはキットに接触させた前記少なくとも1つの細胞を増殖して複数の若返り細胞を生成する工程、

c) 前記複数の若返り細胞を少なくとも1つの組織または器官に転換させるのに十分な条件で前記複数の若返り細胞を培養する工程；および

d) 前記少なくとも1つの組織または器官を前記対象に投与する工程を含む、方法。

【請求項52】

50

生体外で組織または器官を生成する方法であって、

- a) 少なくとも1つの細胞を請求項1～47のいずれか一項に記載の組成物またはキットに接触させる工程；
- b) 請求項1～47のいずれか一項に記載の組成物またはキットに接触させた前記少なくとも1つの細胞を増殖して複数の若返り細胞を生成する工程；および
- c) 前記複数の若返り細胞を少なくとも1つの組織または器官に転換させるのに十分な条件で前記複数の若返り細胞を培養する工程を含む、方法。

【請求項53】

複数の若返り編集細胞を生成する方法であって、

- a) 複数の細胞のうち少なくとも1つの細胞のゲノム中の少なくとも1つの遺伝子を編集するように前記複数の細胞を遺伝子編集システムに接触させて、それによって少なくとも1つの編集細胞を生成する工程；
- b) 前記少なくとも1つの編集細胞を単離する工程、
- c) 単離された前記少なくとも1つの編集細胞を請求項1～47のいずれか一項に記載の組成物またはキットに接触させる工程、および
- d) 請求項1～47のいずれか一項に記載の組成物またはキットと接触させた前記少なくとも1つの細胞を増殖して複数の若返り編集細胞を生成する工程を含む、方法。

【請求項54】

対象の疾患を治療かつ/あるいは予防する方法であって、

- a) 複数の細胞のうち少なくとも1つの細胞のゲノム中の少なくとも1つの遺伝子を編集するように前記複数の細胞を遺伝子編集システムに接触させて、それによって少なくとも1つの編集細胞を生成する工程；
- b) 前記少なくとも1つの編集細胞を単離する工程；
- c) 単離された前記少なくとも1つの編集細胞を請求項1～47のいずれか一項に記載の組成物またはキットに接触させる工程；
- d) 請求項1～47のいずれか一項に記載の組成物またはキットに接触させた前記少なくとも1つの細胞を増殖して複数の若返り編集細胞を生成する工程；および
- e) 前記複数の若返り編集細胞を前記対象に投与する工程を含む、方法。

【請求項55】

対象の表皮水疱症（EB）を治療する方法であって、

- a) 複数の細胞のうち少なくとも1つの細胞のゲノム中の少なくとも1つの遺伝子を編集するように、角化細胞、皮膚線維芽細胞、間葉系幹細胞/間質細胞、またはそれらの任意の組合せを含む前記複数の細胞を遺伝子編集システムに接触させて、それによって少なくとも1つの編集細胞を生成する工程；
- b) 前記少なくとも1つの編集細胞を単離する工程、
- c) 単離された前記少なくとも1つの編集細胞を請求項1～47のいずれか一項に記載の組成物またはキットに接触させる工程；
- d) 請求項1～47のいずれか一項に記載の組成物またはキットに接触させた前記少なくとも1つの細胞を増殖して複数の若返り編集細胞を生成する工程；および
- e) 前記複数の若返り編集細胞を前記対象に投与する工程を含む、方法。

【請求項56】

前記少なくとも1つの細胞を増殖する工程は、調整Opti-MEM、非調整Opti-MEM、ヒト血清、ウシ胎児血清（FBS）、またはそれらの任意の組合せを用いて、前記少なくとも1つの細胞を培養することを含む、請求項48～55のいずれか一項に記載の方法。

【請求項57】

少なくとも1つの細胞を若返らせる工程は、前記少なくとも1つの細胞内のTERCの発現を増加させること、前記少なくとも1つの細胞内のTERTの発現を増加させること、前記少なくとも1つの細胞によって示される集団倍加総数を増加させること、前記少なくとも1つの細胞内のテロメアの長さを増加させること、前記少なくとも1つの細胞内のミトコンドリアDNAコピー数を増加させること、前記少なくとも1つの細胞内のミトコンドリ

アDNAの量を増加させること、前記少なくとも1つの細胞内のミトコンドリアの数を増加させること、前記少なくとも1つの細胞の移動活性を増加させること、前記少なくとも1つの細胞内のタンパク質中のチオール基の酸化水準を若々しい状態に回復させること、前記少なくとも1つの細胞内の老化に関連するDNAメチル化を低減すること、またはそれらの任意の組合せを含む、請求項48～56のいずれか一項に記載の方法。

【請求項58】

前記少なくとも1つの細胞は、線維芽細胞、角化細胞、間葉系幹細胞/間質細胞、末梢血単核細胞、キメラ抗原受容体T細胞(CAR-T細胞)、内皮細胞、軟骨細胞、筋肉幹細胞、神経幹細胞、肝細胞、辺縁幹細胞、網膜色素上皮細胞、造血幹細胞、マクロファージ、心筋細胞、膵細胞、細胞、またはこれらの組合せである、請求項48～57のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項59】

前記疾患は、移植片対宿主病(GvHD)、自己免疫疾患、表皮水疱症(EB)、劣性ジストロフィー型EB(RDEB)、接合型EB(JEB)、単純型EB(EBS)、先天性魚鱗症、先天性角化不全、黄斑変性、パーキンソン病、アルツハイマー病、老化、I型およびII型糖尿病、火傷、慢性皮膚創傷、糖尿病関連潰瘍/創傷、心臓病、骨粗鬆症、癌、エーラーズ・ダンロス症候群(EDS)またはマルファン症候群などの結合組織疾患、肝疾患、肺疾患、およびそれらの任意の組合せを含む、請求項48～58のいずれか一項に記載の方法。

【請求項60】

少なくとも1つの細胞に接触させる工程は、遺伝子移入、形質導入、電気穿孔、核酸注入、少なくとも1つの細胞透過性ペプチド、またはそれらの任意の組合せを含む、請求項48～59のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項61】

請求項1～46のいずれか一項に記載の組成物の少なくとも1つの治療有効量を対象に投与することを含む、対象の少なくとも1つの細胞を若返らせる方法。

【請求項62】

請求項1～46のいずれか一項に記載の組成物の少なくとも1つの治療有効量を対象に投与することを含む、少なくとも1つの対象を若返らせる方法。

【請求項63】

前記対象は哺乳類である、請求項48～62のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項64】

前記哺乳類は、ヒト、霊長類、マウス、ラット、イヌ、ネコ、ウシ、ウマ、ヤギ、ラクダ、ヒツジ、ブタ、または任意の他の哺乳類である、請求項63に記載の方法。

【請求項65】

前記哺乳類はヒトである、請求項64に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【背景技術】

【0001】

関連特許

本出願は、2019年9月13日に提出された米国仮出願第62/899,861号の優先権およびその利益を主張し、その内容は参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

40

配列一覧

本出願は、EFS-Webを介してASCII形式で提出された配列一覧を含み、その全体が参照により本出願に組み込まれる。2020年8月31日に作成された前記ASCIIのコピーは、「UNCO-028_001WO_SeqList.txt」と名付けられ、サイズは約241 KBである。

【0002】

鎖状染色体の末端に位置する反復DNA配列であるテロメアの短縮は、細胞の老化、アポトーシス、または悪性腫瘍をもたらす可能性がある。特に生体外で培養された細胞内のテロメアの短縮は、治療用細胞集団のさらなる増殖を制限するだけでなく細胞の生体活性

50

を低下させる可能性があり、それにより臨床的な効力の低下をもたらすので、治療用細胞集団の生成に対する障害となっている。細胞内のテロメアの長さを増加させることは、細胞の若返りに繋がるが、発癌性細胞の不死化などの有害な副作用を引き起こす可能性もある。従って、制御可能な手法で細胞内のテロメアの長さを効率的かつ安全に増加させ、それによって細胞を若返らせることを目的とする組成物、キット、および方法に対する要求が当該技術分野では存在する。

【発明の概要】

【0003】

本開示は、a) テロメラーゼ逆転写酵素 (TERT) の少なくとも一部分をコードする核酸配列を含む少なくとも1つの第1のポリヌクレオチド分子；および b) 少なくとも1つのDNA標的ポリペプチドの少なくとも一部分をコードする核酸配列を含む少なくとも1つの第2のポリヌクレオチド分子を含む組成物を提供し、このDNA標的ポリペプチドはテロメラーゼRNA成分 (TERC) の転写を増大させる。

10

【0004】

本開示は、a) テロメラーゼ逆転写酵素 (TERT) の少なくとも一部分をコードする核酸配列を含む少なくとも1つの第1のポリヌクレオチド分子；および b) 少なくとも1つのDNA標的ポリペプチドを含む組成物を提供し、このDNA標的ポリペプチドはテロメラーゼRNA成分 (TERC) の転写を増大させる。

【0005】

第1のポリヌクレオチド分子は、TERTの少なくとも一部分をコードするmRNA分子を含んでもよい。第1のポリヌクレオチド分子は、TERTの少なくとも一部分の発現を駆動するのに十分な少なくとも1つのプロモーターに作動可能に連結されるTERTの少なくとも一部分をコードする核酸配列を含むプラスミドを含んでもよい。

20

【0006】

第2のポリヌクレオチド分子は、少なくとも1つのDNA標的ポリペプチドの少なくとも一部分をコードするmRNA分子を含んでもよい。第2のポリヌクレオチド分子は、少なくとも1つのDNA標的ポリペプチドの少なくとも一部分の発現を駆動するのに十分な少なくとも1つのプロモーターに作動可能に連結される少なくとも1つのDNA標的ポリペプチドの少なくとも一部分をコードする核酸配列を含むプラスミドを含んでもよい。

【0007】

DNA標的ポリペプチドは、少なくとも1つのCas9分子、少なくとも1つのCas9変異分子、少なくとも1つのCas9相同分子、またはそれらの任意の組合せを含んでもよい。Cas9分子、Cas9変異分子、またはCas9相同分子は、ヌクレアーゼ欠乏性またはヌクレアーゼ不活性であってもよい。Cas9変異分子は、eSpCas9 (K855A)、eSpCas9 (1.0)、eSpCas9 (1.1)、SpCas9-HF1 (VP12)、HypaCas9、xCas9、SpyFi Cas9、iSpy Cas9、iSpyMac、Cas9 (VQR)、Cas9 (EQR)、Cas9 (VRER)、Cas9 (D1135E)、Cas9 (QQR1)、SaCas9 (KKH)、Nme1Cas9、Nme2Cas9、Nme3Cas9、またはそれらの任意の組合せを含んでもよい。Cas9相同分子は、化膿連鎖球菌 (*Streptococcus pyogenes*) Cas9 (spCas9)、フランシセラ・ノビシダ (*Francisella novicida*) Cas9 (FnCas9)、黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*) Cas9 (SaCas9)、骨髄炎菌 (*Neisseria meningitidis*) Cas9 (NmCas9)、高温性連鎖球菌 (*Streptococcus thermophilus*) CRISPR1-Cas9 (St1Cas9)、高温性連鎖球菌 (*Streptococcus thermophilus*) CRISPR3-Cas9 (St3Cas9)、カンピロバクター・ジェジュニ (*Campylobacter jejuni*) Cas9 (CjCas9)、アシダミノコッカス属 (*Acidaminococcus* sp.) BV3L6 Cpf1 (AsCpf1)、ラクノスピラ科細菌 (*Lachnospiraceae* bacterium) ND2006 Cpf1 (LbCpf1)、ストレプトコッカス・カニス (*Streptococcus canis*) Cas9 (SCCas9)、トレポネーマ・デンティコラ (*Treponema denticola*) Cas9 (TdCas9)、ストレプトコッカス・マカカエ (*Streptococcus macacae*) Cas9 (SmacCas9)、Cas (Cas12j)、野兔病菌亜種ノビシダ (*Francisella tularensis* subsp. *novicida*) Cas9、パストレラ・ムルトシダ (*Pasteurella multocida*)

30

40

50

Cas9、カンピロバクター・ラリ (Campylobacter lari) CF89-12 Cas9、マイコプラズマ・ガリセプチカム株 (Mycoplasma gallisepticum str.) F Cas9、ニトラチフラクター・サルスジニス株 (Nitratifactor salsuginis str.) DSM 16511 Cas9、パルビバクulum・ラバメンチボランス (Parvibaculum lavamentivorans) Cas9、ロゼブリア・インテスティナリス (Roseburia intestinalis) Cas9、ナイセリア・シネレア (Neisseria cinerea) Cas9、グルコンアセトバクター・ジアゾトロフィカス (Gluconacetobacter diazotrophicus) Cas9、アゾスピリルム (Azospirillum) B510 Cas9、スファエロカエタ・グロブス株バディ (Sphaerochaeta globus str. Buddy) Cas9、フラボバクテリウム・カラムナーレ (Flavobacterium columnare) Cas9、フルビイコーラ・タフェンシス (Fluviicola taffensis) Cas9、バクテロイデス・コプロフィルス (Bacteroides coprophilus) Cas9、マイコプラズマ・モービレ (Mycoplasma mobile) Cas9、ラクトバチルス・ファルシミニス (Lactobacillus farciminis) Cas9、ストレプトコッカス・パステウリアヌス (Streptococcus pasteurianus) Cas9、ラクトバチルス・ジョンソニー (Lactobacillus johnsonii) Cas9、ブドウ球菌シューディンテルメディウス (Staphylococcus pseudintermedius) Cas9、フィリファクター・アロシス (Filifactor alocis) Cas9、レジオネラ・ニューモフィラ株パリス (Legionella pneumophila str. Paris) Cas9、サテレラ・ワズワルセンシス (Sutterella wadsworthensis) Cas9、コリネバクター・ジフテリアエ (Corynebacter diphtheriae) Cas9、またはそれらの任意の組合せを含んでもよい。

【0008】

DNA標的ポリペプチドは、少なくとも1つのTALE分子、少なくとも1つの亜鉛フィンガー分子、少なくとも1つのメガヌクレアーゼ分子、またはそれらの任意の組合せを含んでもよい。

【0009】

DNA標的ポリペプチドは、少なくとも1つのトランス活性化分子を含んでもよい。トランス活性化分子は、少なくとも1つのP65分子、少なくとも1つのRta分子、少なくとも1つのVP16分子、少なくとも1つのVP64分子、少なくとも1つのVP160分子、少なくとも1つのVP64-P65-Rta (VPR) 分子、少なくとも1つのSunTagペプチド、少なくとも1つのシングルガイドRNA-MS2 (sgRNA-MS2) 分子、またはそれらの任意の組合せを含んでもよい。側面によっては、DNA標的ポリペプチドは、DNA標的リボ核タンパク質 (RNP) 複合体であってもよい。DNA標的リボ核タンパク質複合体は、少なくとも1つのタンパク質成分と少なくとも1つの核酸成分の両方を含んでもよい。DNA標的ポリペプチドは、少なくとも1つのガイドRNAを含んでもよい。トランス活性化分子は、少なくとも1つのシングルガイドRNA-MS2 (sgRNA-MS2) 分子を含んでもよい。sgRNA-MS2分子は、内因性TERC遺伝子上流、その内部、またはその下流に位置する核酸配列に対し相補的な核酸配列、および少なくとも約1個、または少なくとも約2個、または少なくとも約3個、または少なくとも約4個、または少なくとも約5個、または少なくとも約6個、または少なくとも約7個、または少なくとも約8個、または少なくとも約9個、または少なくとも約10個のMS2 RNAアプタマーを含んでもよい。

【0010】

DNA標的ポリペプチドは、dCas9分子およびVPR分子を含んでもよい。

【0011】

DNA標的ポリペプチドは、内因性TERC遺伝子上流、その5'、その内部、その下流、あるいはその3'に結合してもよい。

【0012】

mRNA分子は、修飾mRNA分子であってもよい。修飾mRNA分子は、少なくとも1つの修飾リボヌクレオシド塩基を含んでもよい。修飾リボヌクレオシド塩基は、シュードウリジン () 残基、5-メチルシチジン (m⁵C) 残基、またはそれらの任意の組合せを含んでもよい。修飾mRNA分子は、少なくとも1つの修飾ヌクレオシドを含んでもよい。修飾

ヌクレオシドは、5-メチルシチジン (m^5C)、5-メチルウリジン (m^5U)、N6-メチルアデノシン (m^6A)、イノシン2'-O-メチル化ヌクレオシド、またはその任意の組合せを含んでもよい。

【0013】

本開示の任意の組成物は、複数のガイドRNA (gRNA) 分子をさらに含んでもよく、これら複数ガイドRNAのうちの少なくとも1つのgRNAは、内因性TERC遺伝子の上流、その内部、またはその下流に位置する核酸配列に対し相補的である。複数のgRNA分子は、少なくとも約1個、または少なくとも約2個、または少なくとも約3個、または少なくとも約4個、または少なくとも約5個、または少なくとも約6個、または少なくとも約7個、または少なくとも約8個、または少なくとも約9個、または少なくとも約10個の異なる種のgRNA分子を含んでもよく、それぞれの種は、異なる核酸を有する。本開示の任意の組成物は、少なくとも1種のgRNAの発現を駆動するのに十分な少なくとも1つのプロモーターに作動可能に連結される少なくとも1種のgRNAをコードする少なくとも1つの核酸配列を含む少なくとも1つのプラスミドをさらに含んでもよい。複数のgRNA分子は、複数のシングルガイドRNA (sgRNA) 分子、crRNA : tracrRNA分子、切詰め型sgRNA分子、高忠実度足場gRNA分子、またはそれらの任意の組合せを含んでもよい。ガイドRNA分子は、修飾ガイドRNA (mod gRNA) 分子であってもよい。ガイドRNA分子は、表1または表2に記載の任意の配列を含んでもよい。

10

【0014】

本開示は、a) ヒトテロメラーゼ逆転写酵素 (hTERT) の少なくとも一部分をコードする核酸配列を含む少なくとも1つの修飾mRNA分子; b) 少なくとも1つのDNA標的ポリペプチドの少なくとも一部分をコードする核酸配列を含む少なくとも1つの修飾mRNA分子; および c) 複数のガイドRNA (gRNA) 分子を含む組成物を提供し、この少なくとも1つのDNA標的ポリペプチドは、dCas9およびVP64-P65-Rta (VPR) 分子を含み、これら複数のgRNAのうちの少なくとも1つのgRNAは、内因性hTERC遺伝子の上流に位置する核酸配列に対し相補的である。

20

【0015】

本開示の任意の組成物は、少なくとも1つの若返り因子をコードする少なくとも1つのmRNAおよび/またはポリヌクレオチドを含んでもよい。若返り因子は、テロメラーゼRNA成分 (TERC)、テロメラーゼ関連逆転写酵素 (TERT)、テロメアの保護因子1 (POT1)、インシュリン様成長因子1 (IGF1)、TP53に対するWD反復含有アンチセンス (WRAP53)、核タンパク質ファミリーA、メンバー3 (NOP3)、異種核リボ核タンパク質A1 (hnRNPA1)、シエルタリン複合体小単位およびテロメラーゼ動員因子 (ACD/TPP1)、TRF-1相互作用アンキリン関連ADPリボースポリメラーゼ (TNKS)、テロメア反復結合因子1 (TRF-1)、テロメア反復結合因子2 (TRF-2)、TERF1相互作用核因子2 (TIN2)、テロメア反復結合因子2 (Rap1)、ディスクリンシュードウリジン合成酵素1 (DKC1)、リボ核タンパク質NHP2、またはこれらの任意の組合せを含んでもよい。

30

【0016】

TERTは、ヒトTERT (hTERT) であってもよい。TERCは、ヒトTERC (hTERC) であってもよい。

40

【0017】

本開示は、本開示の任意の組成物を含む少なくとも1つのウイルス粒子を含む組成物を提供する。ウイルス粒子は、アデノ随伴ウイルス (AAV) 粒子、アデノウイルス粒子、レンチウイルス粒子、泡沫状ウイルス粒子、単純ヘルペスウイルス (HSV) 粒子、レトロウイルス粒子、ウイルス粒子、フラビウイルス粒子、ラウドウイルス粒子、麻疹ウイルス粒子、ニューカッスル病ウイルス粒子、ポックスウイルス粒子、ピコルナウイルス粒子、またはそれらの任意の組合せであってもよい。AAV粒子は、AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、AAV2/1、AAV2/2、AAV2/3、AAV2/4、AAV2/5、AAV2/6、AAV2/7、AAV2/8、

50

AAV2/9、AAV-DJ、またはAAV-DJ8の各粒子であってもよい。レトロウイルス粒子は、MMSVまたはMSCVの各粒子であってもよい。レンチウイルス粒子は、HIV-1またはHIV-2の各粒子であってもよい。ウイルス粒子は、SFV、SIN、VEE、またはM1の各粒子であってもよい。フラビウイルス粒子は、クンジンウイルス、ウエストナイルウイルス、またはデングウイルスの各粒子であってもよい。

【0018】

本開示は、少なくとも1つのエキソソーム、微小胞体、またはリポソームを含む組成物を提供し、この少なくとも1つのエキソソーム、微小胞体、またはリポソームは、本開示の任意の組成物を含む。本開示は、少なくとも1つのナノ粒子を含む組成物を提供し、この少なくとも1つのナノ粒子は、本開示の任意の組成物を含む。ナノ粒子は、リポソーム、ミセル、高分子系ナノ粒子、脂質高分子系ナノ粒子、金属系ナノ粒子、ナノ結晶、カーボンナノチューブ系ナノ粒子、または高分子ミセルを含んでもよい。

10

【0019】

本開示は、本開示の任意の組成物を含むキットを提供する。

【0020】

本開示は、少なくとも1つの細胞を若返らせる方法を提供し、この方法は、少なくとも1つの細胞を本開示の任意の組成物またはキットに接触させることを含む。先述の方法は、本開示の任意の組成物またはキットを接触させた少なくとも1つの細胞を増殖して、複数の若返り細胞を生成することをさらに含んでもよい。

【0021】

本開示は、対象の疾患を治療かつ/あるいは予防する方法を提供し、この方法は、a) 少なくとも1つの細胞を本開示の任意の組成物またはキットに接触させる工程；b) 本開示の任意の組成物またはキットに接触させた少なくとも1つの細胞を増殖して複数の若返り細胞を生成する工程；およびc) 複数の若返り細胞を対象に投与する工程を含む。

20

【0022】

本開示は、対象の疾患を治療かつ/あるいは予防する方法を提供し、この方法は、a) 少なくとも1つの細胞を本開示の任意の組成物またはキットに接触させる工程；b) 本開示の任意の組成物またはキットに接触させた少なくとも1つの細胞を増殖して複数の若返り細胞を生成する工程；c) 複数の若返り細胞を少なくとも1つの組織または器官に転換させるのに十分な条件で培養する工程；およびd) 少なくとも1つの組織または器官を対象に投与する工程を含む。

30

【0023】

本開示は、生体外で組織または器官を生成する方法を提供し、この方法は、a) 少なくとも1つの細胞を本開示の任意の組成物またはキットに接触させる工程；b) 本開示の任意の組成物またはキットに接触させた少なくとも1つの細胞を増殖して複数の若返り細胞を生成する工程；c) 複数の若返り細胞を少なくとも1つの組織または器官に転換させるのに十分な条件で複数の若返り細胞を培養する工程を含む。

【0024】

本開示は、複数の若返り編集細胞を生成する方法を提供し、この方法は、a) 複数の細胞のうちの少なくとも1つの細胞のゲノム中の少なくとも1つの遺伝子を編集するように複数の細胞を遺伝子編集システムに接触させて、それによって少なくとも1つの編集細胞を生成する工程；b) 少なくとも1つの編集細胞を単離する工程；c) 単離された少なくとも1つの編集細胞を本開示の任意の組成物またはキットに接触させる工程；およびd) 本開示の任意の組成物またはキットに接触させた少なくとも1つの細胞を増殖して複数の若返り編集細胞を生成する工程を含む。

40

【0025】

本開示は、対象の疾患を治療かつ/あるいは予防する方法を提供し、この方法は、a) 複数の細胞のうちの少なくとも1つの細胞のゲノム中の少なくとも1つの遺伝子を編集するように複数の細胞を遺伝子編集システムに接触させて、それによって少なくとも1つの編集細胞を生成する工程；b) 少なくとも1つの編集細胞を単離する工程；c) 単離され

50

た少なくとも1つの編集細胞を本開示の任意の組成物またはキットに接触させる工程； d) 本開示の任意の組成物またはキットに接触させた少なくとも1つの細胞を増殖して複数の若返り編集細胞を生成する工程； および e) 複数の若返り編集細胞を対象に投与する工程を含む。

【0026】

本開示は、対象の表皮水疱症（EB）を治療する方法を提供し、この方法は、 a) 複数の細胞のうち少なくとも1つの細胞のゲノム中の少なくとも1つの遺伝子を編集するように、角化細胞、皮膚線維芽細胞、間葉系幹細胞/間質細胞、またはそれらの任意の組合せを含む複数の細胞を遺伝子編集システムに接触させて、それによって少なくとも1つの編集細胞を生成する工程； b) 少なくとも1つの編集細胞を単離する工程、 c) 単離された少なくとも1つの編集細胞を本開示の任意の組成物またはキットに接触させる工程； d) 本開示の任意の組成物またはキットに接触させた少なくとも1つの細胞を増殖して複数の若返り編集細胞を生成する工程； および e) 複数の若返り編集細胞を対象に投与する工程を含む。

10

【0027】

少なくとも1つの細胞の増殖は、調整Opti-MEM、非調整Opti-MEM、ヒト血清、ウシ胎児血清（FBS）、またはそれらの任意の組合せを用いて、少なくとも1つの細胞を培養することを含んでもよい。

【0028】

少なくとも1つの細胞を若返らせる工程は、少なくとも1つの細胞内のTERCの発現を増加させること、少なくとも1つの細胞内のTERTの発現を増加させること、少なくとも1つの細胞によって示される集団倍加総数を増加させること、少なくとも1つの細胞内のテロメアの長さを増加させること、少なくとも1つの細胞内のミトコンドリアDNAコピー数を増加させること、少なくとも1つの細胞内のミトコンドリアDNAの量を増加させること、少なくとも1つの細胞内のミトコンドリアの数を増加させること、少なくとも1つの細胞の移動活性を増加させること、少なくとも1つの細胞内のタンパク質中のチオール基酸化水準を若々しい状態に回復させること、少なくとも1つの細胞内の老化に関連するDNAメチル化を低減すること、またはこれらの任意の組合せを含んでもよい。

20

【0029】

少なくとも1つの細胞は、線維芽細胞、角化細胞、間葉系幹細胞/間質細胞、末梢血単核細胞、キメラ抗原受容体T細胞（CAR-T細胞）、内皮細胞、軟骨細胞、筋肉幹細胞、神経幹細胞、肝細胞、辺縁幹細胞、網膜色素上皮細胞、造血幹細胞、マクロファージ、心筋細胞、膵細胞、細胞、またはこれらの組合せであってもよい。

30

【0030】

疾患は、移植片対宿主病（GvHD）、自己免疫疾患、表皮水疱症（EB）、劣性ジストロフィー型EB（RDEB）、接合型EB（JEB）、単純型EB（EBS）、先天性魚鱗症、先天性角化不全、黄斑変性、パーキンソン病、アルツハイマー病、老化、I型およびII型糖尿病、火傷、慢性皮膚創傷、糖尿病関連潰瘍/創傷、心臓病、骨粗鬆症、癌、エーラース・ダンロス症候群（EDS）またはマルファン症候群などの結合組織疾患、肝疾患、肺疾患、およびそれらの任意の組合せを含んでもよい。

40

【0031】

少なくとも1つの細胞に接触させる工程は、遺伝子移入、形質導入、電気穿孔、核酸注入、少なくとも1つの細胞透過性ペプチド、またはそれらの任意の組合せを含んでもよい。

【0032】

本開示は、対象内の少なくとも1つの細胞を若返らせる方法を提供し、この方法は、本開示の任意の組成物またはキットの少なくとも1つの治療有効量を対象に投与する工程を含む。

【0033】

本開示は、少なくとも1つの対象を若返らせる方法を提供し、この方法は、本開示の任

50

意の組成物またはキットの少なくとも1つの治療有効量を対象に投与することを含む。

【0034】

対象は哺乳類であってもよい。対象は、ヒト、霊長類、マウス、ラット、イヌ、ネコ、ウシ、ウマ、ヤギ、ラクダ、ヒツジ、ブタ、または任意の他の哺乳類であってもよい。対象は鳥類であってもよい。

【0035】

上記の側面のいずれかを、他の側面と組み合わせてもよい。

【0036】

特に定義のない限り、本明細書で用いる全ての技術用語および科学用語は、本開示が属する技術分野での通常の当業者が一般的に理解するのと同じ意味を有する。本明細書では、単数形は、特に文脈で明確に指示しない限り複数形も含み、例として、用語「a」、「an」、および「the」は単数または複数であると理解され、用語「または」は包括的であると理解される。例として、用語「要素(an element)」は、1つ以上の要素を意味する。本明細書に全体を通して、用語「含む(comprise)」、あるいはその変形「含む(comprises)」また「含むこと(comprising)」は、記載の要素、整数、または工程、あるいは要素群、整数群、または工程群を含むことを意味するが、その他の要素、整数、または工程、あるいは要素群、整数群、または工程群を排除しないことを意味することになる。用語「約」は、記載値の10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%、0.5%、0.1%、0.05%、または0.01%以内としてもよい。文脈に明示しない限り、本明細書に提供の全ての数値は、用語「約」によって修飾されている。

【0037】

本明細書に記載の方法および材料に類似するまたは同等の方法および材料を本開示の実施または試験に用いてもよいが、好適な方法および材料は以下に記載する。本明細書に記載の全ての刊行物、特許出願、特許、およびその他の参考文献は、その全体が参照により組み込まれる。本明細書に引用の参考文献は、請求される本発明の先行技術であるとは認められない。矛盾が生じる場合には、定義を含めて本明細書が優先する。さらに材料、方法、および実施例は、例示に過ぎず限定を意図するものではない。本開示の他の特徴および利点は、以下の詳細な説明および請求項から明らかになる。

【0038】

上述の特徴とさらなる特徴は、添付の図面とともに解釈した場合に、以下の詳細な説明からより明確に理解される。

【図面の簡単な説明】

【0039】

【図1】図1は、内因性hTERC遺伝子座の上流に結合する本開示のDNA標的分子の概略図である。この非限定的な例では、このDNA標的分子はdCas9およびトランス活性化分子を含み、このトランス活性化分子はVP64-P65-Rta(VPR)分子である。

【図2】図2は、本開示の治療方法および/または生体外で組織を生成する方法の概略図である。

【図3】図3は、本開示の複数の若返り編集細胞を生成する方法の概略図である。

【図4】図4は、様々な細胞種でのhTERC転写水準を示す図表である。

【図5】図5は、本開示の組成物で遺伝子移入されたF50細胞でのヒトTERC RNAの水準を示す図表である。

【図6】図6は、非遺伝子移入HEKn細胞、非遺伝子移入hMSC細胞、およびF50由来の人工多能性幹細胞と比較して、本開示の組成物(+dCas9-VPR+gmix)で遺伝子移入されたHEKn細胞(左側)内およびヒト間葉系幹細胞/間質細胞(hMSC)(右側)内でのヒトTERC RNAの水準を示す一連の図表である。

【図7】図7は、ガイドRNAを含まない本開示の組成物(+dCas9-VPR(ガイド無し))で遺伝子移入されたF50細胞(左側)およびhMSC(右側)でのヒトTERC RNAの水準を示す一連の図表である。

【図8】図8は、本開示の遺伝子移入の1種の処理計画の概略図である。

【図 9】図 9 は、本開示の組成物で遺伝子移入された老化 F50S 細胞の総集団の倍加を示す図表である。

【図 10】図 10 は、本開示の別の遺伝子移入による処理計画の概略図である。

【図 11】図 11 は、本開示の別の遺伝子移入による処理計画の概略図である。

【図 12】図 12 は、非遺伝子移入 F50S 細胞および F50 由来の人工多能性幹細胞と比較して、本開示の組成物 (+ TERT + dCas9-VPR/gmix) で遺伝子移入した老化 F50S 細胞での相対テロメア長を示す図表である。

【図 13】図 13 は、非遺伝子移入 F50 細胞および F50 由来の人工多能性幹細胞と比較して、本開示の組成物 (+ hTERT + dCas9-VPR/gmix) で遺伝子移入した F50 細胞での相対テロメア長を示す図表である。

【図 14】図 14 は、非遺伝子移入 HEK293T 細胞、非遺伝子移入 hMSC、および F50 由来の人工多能性幹細胞と比較して、本開示の組成物 (+ TERT + dCas9-VPR/gmix) で遺伝子移入した HEK293T 細胞 (左側) および hMSC (右側) での相対テロメア長を示す一連の図表である。

【図 15】図 15 は、非遺伝子移入 F50 細胞、非遺伝子移入 HEK293T 細胞、および非遺伝子移入 hMSC と比較して、本開示の組成物 (+ TERT + dCas9-VPR/gmix) で遺伝子移入した F50 細胞 (左側)、HEK293T 細胞 (中央)、および hMSC (右側) でのミトコンドリア DNA の相対量を示す一連の図表である。

【図 16】図 16 は、本開示の種々の組成物を遺伝子移入した F50 細胞 (F50 + TERT および F50 + TERT + dCas9-VPR/gmix) ならびに非遺伝子移入 F50 細胞および F50 由来の人工多能性幹細胞でのテロメラーゼ活性測定の結果を示すゲル画像である。

【図 17】図 17 は、遺伝子移入されていない単細胞 (上部の 2 列) または本開示の組成物 (+ hTERT/dCas9-VPR + gRNA) で遺伝子移入された単細胞 (下部の 2 列) から増殖された成人ヒト初代線維芽細胞の一連の代表的な顕微鏡画像である。

【図 18】図 18 は、経内皮移動 (TEM) 測定法の概略図である。

【図 19】図 19 は、TEM 測定法を用いて測定された、本開示の組成物で遺伝子移入された hMSC の移動活性を示す図表である。

【図 20】図 20 は、非遺伝子移入の若い低継代の hMSC および老いた高継代の hMSC と比較して、本開示の組成物で遺伝子移入された老いた hMSC での選択されたタンパク質内に検出されるチオール基の酸化水準を示す一連の図表である。

【図 21】図 21 は、非遺伝子移入の若い低継代の細胞および老いた高継代の細胞と比較して、本開示の組成物で遺伝子移入された種々の型の老いた細胞内の 9 個の老化に関連する DNA メチル化部位でのメチル化の水準を示す一連の図表である。

【発明を実施するための形態】

【0040】

テロメアは、鎖状染色体の末端に位置する反復 DNA 配列を含み、この鎖状染色体では、十分に長い場合に、各染色体の末端が二本鎖または一本鎖 DNA 切断として作用することから保護するループを形成できる。テロメアは、部分的に酸化損傷や不完全な DNA 複製により経時的に短縮され、最終的には、保護ループを形成できない程の極端に短いテロメア、染色体末端の露出、染色体 - 染色体間の融合、DNA 損傷応答、および細胞の老化、アポトーシス、または悪性化に至る。

【0041】

酵素複合テロメラーゼは、テロメアを伸長し、かつ 2 つの必須成分：テロメラーゼ逆転写酵素 (TERT) とテロメラーゼ RNA 成分 (TERC) として知られる RNA 成分を含む。テロメラーゼ複合体の他の成分には、タンパク質 TCAB1、ディスクリン、Gar1、Nhp2、Nop10、および RHAU が含まれる。

【0042】

テロメア長を維持することは、細胞の老化やアポトーシスかつその結果生じる細胞機能障害を防止するのに重要であるので、TERT および TERC の遺伝子変異は、特発性肺線維症、先天性角化不全症、再生不良性貧血などのテロメアの維持不全による致命的な遺伝性

10

20

30

40

50

疾患に関連している。これらの疾患では、テロメアの短縮による早期の細胞老化やアポトーシスの影響は、それ自体が破壊的でありかつ癌のリスクの増大により悪化する可能性がある。さらに生体外で培養される細胞でのテロメアの短縮により、治療用細胞集団の生成、研究や薬剤試験のための生体外での合成組織や腫瘍の形成および非癌性の体細胞株の生体外での形成に大きな問題を引き起こす。生体外で継代を繰り返すと、老化が進み、かつさらなる増殖能が得られず、治療用の細胞集団の場合には、臨床関連の生体活性の低下に繋がる可能性がある。

【0043】

従って、細胞を若返らせるためにテロメアを伸長させることを目的とする組成物、キット、および方法について当該技術分野では明確な必要性が存在する。標的細胞でのTERTおよび/またはTERCの発現の増大を目的とする既存の手法では、TERTおよび/またはTERCの発現に所望の増大を得るために組み込みウイルスの使用に頼っていた。しかしながらこれらの手法は、組み込みウイルスが潜在的に危険かつ永続的なゲノム修飾をもたらす可能性があるため、安全性の懸念に悩まされている。さらにTERTおよび/またはTERCの持続的な過剰発現およびそれに付随するテロメア長の増大は、癌細胞の不死化と関連して、組み込みウイルスは臨床的な環境では危険な手法となっている。

10

【0044】

理論に束縛されることを望まないが、本開示の組成物、キット、および方法では、標的細胞を若返らせるのに十分に長い時間ではあるが、有害かつ危険な標的外への影響を避けるのに十分に短い時間に亘って、TERTおよび/またはTERCの発現を一過的に増加させることが可能となる。本開示での非組み込みRNA分子の使用により、臨床的に安全な方法で若返り因子の発現水準および化学量論組成を微調整することが可能となる。

20

【0045】

本開示の組成物、キット、および方法は、限定はされないが、治療用細胞集団（例えば、CAR-T細胞集団、間葉系幹細胞/間質細胞集団）の生成、その後の移植、研究、または薬剤試験のための生体外での組織および器官の生成、治療および研究用途のためのゲノム編集細胞集団の生成、ならびに老化、高齢、および疾患に関連する細胞株の若返りなどの種々の研究および臨床応用に用いられてもよい。

【0046】

本開示の様々な組成物、キット、および方法を、本明細書ではその全てを詳述する。

30

【0047】

若返りのための組成物

【0048】

側面によっては、本開示は、a) テロメラーゼ逆転写酵素 (TERT) の少なくとも一部分をコードする核酸配列を含む少なくとも1つの第1のポリヌクレオチド分子；およびb) 少なくとも1つのDNA標的ポリペプチドの少なくとも一部分をコードする核酸配列を含む少なくとも1つの第2のポリヌクレオチド分子を含む組成物を提供し、このDNA標的ポリペプチドはテロメラーゼRNA成分 (TERC) の転写を増大させる。

【0049】

側面によっては、本開示は、a) テロメラーゼ逆転写酵素 (TERT) の少なくとも一部分をコードする核酸配列を含む少なくとも1つの第1のポリヌクレオチド分子；およびb) 少なくとも1つのDNA標的ポリペプチドを含む組成物を提供し、このDNA標的ポリペプチドはテロメラーゼRNA成分 (TERC) の転写を増大させる。

40

【0050】

側面によっては、テロメラーゼ逆転写酵素 (TERT) の少なくとも一部分をコードする核酸配列を含む少なくとも1つの第1のポリヌクレオチド分子は、TERTの少なくとも一部分をコードするmRNA分子であってもよい。側面によっては、少なくとも1つの第1のポリヌクレオチド分子は、TERTの少なくとも一部分の発現を駆動するのに十分な少なくとも1つのプロモーターに作動可能に連結されたTERTの少なくとも一部分をコードする核酸配列を含むプラスミドであってもよい。

50

【 0 0 5 1 】

側面によっては、少なくとも1つのDNA標的ポリペプチドの少なくとも一部分をコードする核酸配列を含む少なくとも1つの第2のポリヌクレオチド分子は、少なくとも1つのDNA標的ポリペプチドの少なくとも一部分をコードするmRNA分子であってもよい。側面によっては、少なくとも1つの第2のポリヌクレオチド分子は、少なくとも1つのDNA標的ポリペプチドの少なくとも一部分の発現を駆動するのに十分な少なくとも1つのプロモーターに作動可能に連結された少なくとも1つのDNA標的ポリペプチドの少なくとも一部分をコードする核酸配列を含むプラスミドであってもよい。

【 0 0 5 2 】

従って本開示は、a) テロメラーゼ逆転写酵素 (TERT) の少なくとも一部分をコードする少なくとも1つの第1のmRNA分子；およびb) 少なくとも1つのDNA標的ポリペプチドの少なくとも一部分をコードする少なくとも1つの第2のmRNA分子を含む組成物を提供し、このDNA標的ポリペプチドはテロメラーゼRNA成分 (TERC) の転写を増大させる。

10

【 0 0 5 3 】

本開示はまた、a) TERTの少なくとも一部分の発現を駆動するのに十分な少なくとも1つのプロモーターに作動可能に連結されたTERTの少なくとも一部分をコードする核酸配列を含む少なくとも1つのプラスミド；およびb) 少なくとも1つのDNA標的ポリペプチドの少なくとも一部分をコードする少なくとも1つの第2のmRNA分子を含む組成物を提供し、このDNA標的ポリペプチドはテロメラーゼRNA成分 (TERC) の転写を増大させる。

20

【 0 0 5 4 】

本開示はまた、a) テロメラーゼ逆転写酵素 (TERT) の少なくとも一部分をコードする少なくとも1つの第1のmRNA分子；およびb) 少なくとも1つのDNA標的ポリペプチドの少なくとも一部分の発現を駆動するのに十分な少なくとも1つのプロモーターに作動可能に連結された少なくとも1つのDNA標的ポリペプチドの少なくとも一部分をコードする核酸配列を含む少なくとも1つのプラスミドを含む組成物を提供し、このDNA標的ポリペプチドはテロメラーゼRNA成分 (TERC) の転写を増大させる。

【 0 0 5 5 】

本開示はまた、a) TERTの少なくとも一部分の発現を駆動するのに十分な少なくとも1つのプロモーターに作動可能に連結されたTERTの少なくとも一部分をコードする核酸配列を含む少なくとも1つのプラスミド、およびb) 少なくとも1つのDNA標的ポリペプチドの少なくとも一部分の発現を駆動するのに十分な少なくとも1つのプロモーターに作動可能に連結された少なくとも1つのDNA標的ポリペプチドの少なくとも一部分をコードする核酸配列を含む少なくとも1つのプラスミドを含む組成物を提供し、このDNA標的ポリペプチドはテロメラーゼRNA成分 (TERC) の転写を増大させる。

30

【 0 0 5 6 】

側面によっては、DNA標的ポリペプチドは、少なくとも1つのCas9分子、少なくとも1つのCas9変異分子、少なくとも1つのCas9相同分子、またはそれらの任意の組合せを含んでもよい。

40

【 0 0 5 7 】

側面によっては、Cas9分子、Cas9変異分子、またはCas9相同分子は、ヌクレアーゼ欠乏性またはヌクレアーゼ不活性であってもよい。本明細書で使用される用語「dCas9」は、ヌクレアーゼ欠乏性またはヌクレアーゼ不活性であるCas9分子、相同体、および/または変異体を指すように最も広義に用いられる。非限定的な例では、Cas9分子、Cas9変異分子、またはCas9相同分子は、Cas9分子、Cas9変異分子、またはCas9相同分子を核酸欠乏性または核酸不活性にする少なくとも1つの変異、欠損、または挿入を含んでいてもよい。

【 0 0 5 8 】

側面によっては、Cas9変異分子は、eSpCas9 (K855A)、eSpCas9 (1.0)、eSpCa

50

s9 (1.1)、SpCas9-HF1 (VP12)、HypaCas9、xCas9、SpyFi Cas9、iSpy Cas9、iSpyMac、Cas9 (VQR)、Cas9 (EQR)、Cas9 (VRER)、Cas9 (D1135E)、Cas9 (QQR1)、SaCas9 (KKH)、Nme1Cas9、Nme2Cas9、Nme3Cas9、またはそれらの任意の組合せを含んでもよい。

【0059】

側面によっては、Cas9相同分子は、化膿連鎖球菌Cas9 (spCas9)、フランシセラ・ノビシダCas9 (FnCas9)、黄色ブドウ球菌Cas9 (SaCas9)、骨髄炎菌Cas9 (NmCas9)、高温性連鎖球菌CRISPR1-Cas9 (St1Cas9)、高温性連鎖球菌CRISPR3-Cas9 (St3Cas9)、カンピロバクター・ジェジュニCas9 (CjCas9)、アシダミノコッカス属BV3 L6 Cpf1 (AsCpf1)、ラクノスピラ科細菌ND2006 Cpf1 (LbCpf1)、ストレプトコッカス・カニスCas9 (SCCas9)、トレポネーマ・デンティコラCas9 (TdCas9)、ストレプトコッカス・マカカエCas9 (SmacCas9)、Cas (Cas12j)、野兎病菌亜種ノビシダCas9、パストレルラ・ムルトシダCas9、カンピロバクター・ラリCF89-12 Cas9、マイコプラズマ・ガリセプチカム株F Cas9、ニトラチフラクター・サルスジニス株DSM 16511 Cas9、パルピバクテリウム・ラバメンチボランスCas9、ロゼブリア・インテステイナリスCas9、ナイセリア・シネレアCas9、グルコンアセトバクター・ジアゾトロフィカスCas9、アゾソピリルムB510 Cas9、スファエロカエタ・グロブス株バディCas9、フラボバクテリウム・カラムナーレCas9、フルビイコーラ・タフェンシスCas9、バクテロイデス・コプロフィルスCas9、マイコプラズマ・モービレCas9、ラクトバチルス・ファルシミニスCas9、ストレプトコッカス・パステウリアヌスCas9、ラクトバチルス・ジョンソニイCas9、ブドウ球菌シューディンテルメディウスCas9、フィリファクター・アロシスCas9、レジオネラ・ニューモフィラ株パリスCas9、サテレラ・ワズワルセンシスCas9、コリネバクター・ジフテリアエCas9、またはそれらの任意の組合せを含んでもよい。

10

20

【0060】

側面によっては、Cas9相同分子は、化膿連鎖球菌Cas9 (spCas9)、フランシセラ・ノビシダCas9 (FnCas9)、黄色ブドウ球菌Cas9 (SaCas9)、骨髄炎菌Cas9 (NmCas9)、高温性連鎖球菌CRISPR1-Cas9 (St1Cas9)、高温性連鎖球菌CRISPR3-Cas9 (St3Cas9)、カンピロバクター・ジェジュニCas9 (CjCas9)、アシダミノコッカス属BV3 L6 Cpf1 (AsCpf1)、ラクノスピラ科細菌ND2006 Cpf1 (LbCpf1)、ストレプトコッカス・カニスCas9 (SCCas9)、トレポネーマ・デンティコラCas9 (TdCas9)、ストレプトコッカス・マカカエCas9 (SmacCas9)、Cas (Cas12j)、野兎病菌亜種ノビシダCas9、パストレルラ・ムルトシダCas9、カンピロバクター・ラリCF89-12 Cas9、マイコプラズマ・ガリセプチカム株F Cas9、ニトラチフラクター・サルスジニス株DSM 16511 Cas9、パルピバクテリウム・ラバメンチボランスCas9、ロゼブリア・インテステイナリスCas9、ナイセリア・シネレアCas9、グルコンアセトバクター・ジアゾトロフィカスCas9、アゾソピリルムB510 Cas9、スファエロカエタ・グロブス株バディCas9、フラボバクテリウム・カラムナーレCas9、フルビイコーラ・タフェンシスCas9、バクテロイデス・コプロフィルスCas9、マイコプラズマ・モービレCas9、ラクトバチルス・ファルシミニスCas9、ストレプトコッカス・パステウリアヌスCas9、ラクトバチルス・ジョンソニイCas9、ブドウ球菌シューディンテルメディウスCas9、フィリファクター・アロシスCas9、レジオネラ・ニューモフィラ株パリスCas9、サテレラ・ワズワルセンシスCas9、コリネバクター・ジフテリアエCas9、またはそれらの任意の組合せのキメラ変異体を含んでもよい。

30

40

【0061】

側面によっては、DNA標的ポリペプチドは、少なくとも1つのTALE分子、少なくとも1つの亜鉛フィンガー分子、少なくとも1つのメガヌクレアーゼ分子、またはそれらの任意の組合せを含んでもよい。

【0062】

側面によっては、DNA標的ポリペプチドは、少なくとも1つのトランス活性化分子を含

50

んでもよい。側面によっては、トランス活性化分子は、標的遺伝子の転写を駆動可能な転写因子および/または転写共調節因子に結合する分子である。

【0063】

側面によっては、トランス活性化分子は、少なくとも1つのP65分子、少なくとも1つのRta分子、少なくとも1つのVP16分子、少なくとも1つのVP64分子、少なくとも1つのVP160分子、少なくとも1つのVP64-P65-Rta (VPR) 分子、少なくとも1つのSun Tagペプチド、少なくとも1つのシングルガイドRNA-MS2 (sgRNA-MS2) 分子、またはそれらの任意の組合せを含んでもよい。

【0064】

側面によっては、DNA標的ポリペプチドは、DNA標的リボ核タンパク質 (RNP) 複合体であってもよい。DNA標的リボ核タンパク質複合体は、少なくとも1つのタンパク質成分と少なくとも1つの核酸成分の両方を含んでもよい。少なくとも1つのタンパク質成分は、限定はされないが、トランス活性化分子、Cas9分子、Cas9変異分子またはCas9相同分子、TALE分子、亜鉛フィンガー分子、メガヌクレアーゼ分子、またはそれらの任意の組合せなどの本明細書に記載のタンパク質成分のうちのいずれかを含んでもよい。少なくとも1つの核酸成分は、リボ核酸成分であってもよい。少なくとも1つの核酸成分は、限定はされないが、ガイドRNA分子、シングルガイドRNA分子、シングルガイドRNA-MS2 (sgRNA-MS2) 分子、またはそれらの任意の組合せなどの本明細書に記載の核酸成分のうちのいずれかを含んでもよい。

【0065】

側面によっては、DNA標的ポリペプチドは、少なくとも1つの細胞透過性ペプチドをさらに含んでもよい。細胞透過性ペプチドは、HIV由来のTATタンパク質、ポリアルギニン、当該技術分野で既知のその他の任意の細胞透過性ペプチド、またはそれらの任意の組合せのうちの少なくとも一部分を含んでもよい。

【0066】

側面によっては、DNA標的ポリペプチドは、少なくとも1つのガイドRNAを含んでもよい。側面によっては、トランス活性化分子は、少なくとも1つのシングルガイドRNA-MS2 (sgRNA-MS2) 分子を含んでもよい。側面によっては、sgRNA-MS2分子は、内因性TERC遺伝子上流、その内部、またはその下流に位置する核酸配列に対し相補的な核酸配列、および少なくとも約1個、または少なくとも約2個、または少なくとも約3個、または少なくとも約4個、または少なくとも約5個、または少なくとも約6個、または少なくとも約7個、または少なくとも約8個、または少なくとも約9個、または少なくとも約10個のMS2 RNAアプタマーを含んでもよい。

【0067】

側面によっては、DNA標的ポリペプチドは、dCas9分子およびVPR分子を含んでもよい。

【0068】

側面によっては、DNA標的ポリペプチドは、内因性TERC遺伝子、例えば内因性ヒトTERC遺伝子上流、その5'、その内部、その下流、またはその3'に結合していてもよい。

【0069】

側面によっては、少なくとも1つのDNA標的ポリペプチドは、少なくとも約0.1キロ塩基 (kb)、または少なくとも約0.5 kb、または少なくとも約1.0 kb、または少なくとも約1.5 kb、または少なくとも約2.0 kb、または少なくとも約2.5 kb、または少なくとも約3.0 kb、または少なくとも約3.5 kb、または少なくとも約4.0 kb、または少なくとも約4.5 kb、または少なくとも約5.0 kb、または少なくとも約5.5 kb、または少なくとも約6.0 kb、または少なくとも約6.5 kb、または少なくとも約7.0 kb、または少なくとも約7.5 kb、または少なくとも約8.5 kb、または少なくとも約9.0 kb、または少なくとも約9.5 kb、または少なくとも約10.0 kb、または少なくとも約15 kb、または少なくとも約20 kb、または少なくとも約30 kb、または少なくとも約40 kb、または少なくとも約50 kb、または少なくとも約60 kb、または少なくとも約15 kb、ま

10

20

30

40

50

、または少なくとも約750 kb、または少なくとも約1,000 kb、または少なくとも5,000 kb、または少なくとも約10,000 kbで、内因性TERC遺伝子、例えば内因性ヒトTERC遺伝子の5'に結合してもよい。

【0073】

側面によっては、本開示の任意の組成物のmRNA分子は、修飾mRNA分子であってもよい。

【0074】

側面によっては、修飾mRNA分子は、少なくとも1つの修飾リボヌクレオシド塩基を含んでもよい。修飾リボヌクレオシド塩基は、シュードウリジン()残基、5-メチルシチジン(m^5C)残基、またはそれらの任意の組合せを含んでもよい。

10

【0075】

側面によっては、修飾mRNA分子は、少なくとも1つの修飾ヌクレオシドを含んでもよい。修飾ヌクレオシドとして、N7-メチルグアノシン(m^7G)、2-チオウリジン(s^2U)、シュードウリジン()、2'-O-メチル-U、 m^1A (1-メチルアデノシン)に加えて、5-メチルシチジン(m^5C)、5-メチルウリジン(m^5U)、N6-メチルアデノシン(m^6A)、イノシン、および2'-O-メチル化ヌクレオシド； m^2A (2-メチルアデノシン)； A_m (2'-O-メチルアデノシン)； m^3m^6A (2-メチルチオ-N⁶-メチルアデノシン)； i^6A (N⁶-イソペンテニルアデノシン)； ms^2i^6A (2-メチルチオ-N⁶イソペンテニルアデノシン)； io^6A (N⁶-(シス-ヒドロキシイソペンテニル)アデノシン)； ms^2i^6A (2-メチルチオ-N⁶-(シス-ヒドロキシイソペンテニル)アデノシン)； g^6A (N⁶-グリニルカルバモイルアデノシン)； t^6A (N⁶-トレオニルカルバモイルアデノシン)； ms^2t^6A (2-メチルチオ-N⁶-トレオニルカルバモイルアデノシン)； m^6t^6A (N⁶-メチル-N⁶-トレオニルカルバモイルアデノシン)； hn^6A (N⁶-ヒドロキシノルバリルカルバモイルアデノシン)； ms^2hn^6A (2-メチルチオ-N⁶-ヒドロキシノルバリルカルバモイルアデノシン)； $Ar(p)$ (2'-O-リボシルアデノシン(リン酸))； I (イノシン)； m^1I (1-メチルイノシン)； m^1Im (1,2'-O-ジメチルイノシン)； m^3C (3-メチルシチジン)； C_m (2'-O-メチルシチジン)； β^3C (2-チオシチジン)； ac^4C (N⁴-アセチルシチジン)； f^5C (5-ホルミルシチジン)； m^5C_m (5,2'-O-ジメチルシチジン)； a^6C_m (N⁴-アセチル-2'-O-メチルシチジン)； R^3C (リシジン)； m^1G (1-メチルグアノシン)； m^2G (N²-メチルグアノシン)； m^7G (7-メチルグアノシン)； G_m (2'-O-メチルグアノシン)； m^2_2G (N²,N²-ジメチルグアノシン)； m^2G_m (N²,2'-O-ジメチルグアノシン)； $m^2_2G_m$ (N²,N²,2'-O-トリメチルグアノシン)； $Gr(p)$ (2'-O-リボシルグアノシン(リン酸))； yW (ワイプトシン)； o_2yW (ペルオキシワイプトシン)； $OHyW$ (ヒドロキシワイプトシン)； $OHyW^*$ (不全修飾ヒドロキシワイプトシン)； imG (ワイオシン)； $mimG$ (メチルワイオシン)； Q (キューオシン)； oQ (エポキシキューオシン)； $galQ$ (ガラクトシルキューオシン)； $manQ$ (マンノシルキューオシン)； $preQ_0$ (7-シアノ-7-デアザグアノシン)； $preQ_1$ (7-アミノメチル-7-デアザグアノシン)； G^+ (アルケオシン)； D (ジヒドロウリジン)； m^5Um (5,2'-O-ジメチルウリジン)； s^4U (4-チオウリジン)； m^5s^2U (5-メチル-2-チオウリジン)； s^2Um (2-チオ-2'-O-メチルウリジン)； $ac\beta^3U$ (3-(3-アミノ-3-カルボキシプロピル)ウリジン)； ho^5U (5-ヒドロキシウリジン)； mo^5U (5-メトキシウリジン)； cmo^5U (ウリジン5-オキシ酢酸)； $mcmo^5U$ (ウリジン5-オキシ酢酸メチルエステル)； chm^5U (5-(カルボキシヒドロキシメチル)ウリジン)； $mchm^5U$ (5-(カルボキシヒドロキシメチル)ウリジンメチルエステル)； mcm^5U (5-メトキシカルボニルメチルウリジン)； mcm^5Um (5-メトキシカルボニルメチル-2'-O-メチルウリジン)； $mc\beta^3s^2U$ (5-メトキシカルボニルメチル-2-チオウリジン)； nm^5s^2U (5-アミノメチル-2-チオウリジン)； mnm^5U (5-メチルアミノメチルウリジン)； mnm^5s^2U (5-メチルアミノメチル-2-チオウリジン)； mnm^5se^2U (5-メチルアミノメチル-2-セレノウリジン)； ncm^5U (5-カルバモイルメチルウリジン)； ncm^5Um (5-カルバモイルメチル-2'-O-メチルウリジン)； $cmnm^5U$ (5-カルボキシメチルアミノメチルウリジン)； $cmnm^5Um$ (

20

30

40

50

5-カルボキシメチルアミノメチル-2'-O-メチルウリジン) ; $cmn\overset{m}{m}s^2U$ (5-カルボキシメチルアミノメチル-2-チオウリジン) ; m^6_2A (N^6, N^6 -ジメチルアデノシン) ; Im (2'-O-メチルイノシン) ; mC (N^4 -メチルシチジン) ; $m^4 Cm$ ($N^4, 2'$ -O-ジメチルシチジン) ; hm^5C (5-ヒドロキシメチルシチジン) ; m^3U (3-メチルウリジン) ; cm^5U (5-カルボキシメチルウリジン) ; m^6Am ($N^6, 2'$ -O-ジメチルアデノシン) ; m^2_2Am ($N^6, N^6, 0-2'$ -27222722トリメチルアデノシン) ; m^2_7G ($N^2, 7$ -ジメチルグアノシン) ; $m^{2,2,7}G$ ($N^2, N^2, 7$ -トリメチルグアノシン) ; m^3Um (3,2'-O-ジメチルウリジン) ; m^5D (5-メチルジヒドロウリジン) ; f^5Cm (5-ホルミル-2'-O-メチルシチジン) ; m^1Gm (1,2'-O-ジメチルグアノシン) ; m^1Am (1,2'-O-ジメチルアデノシン) ; m^5U (5-タウリノメチルウリジン) ; m^5s^2U (5-タウリノメチル-2-チオウリジン) ; $imG-14$ (4-デメチルワイオシン) ; $imG2$ (イソワイオシン) ; ac^6A (N^6 -アセチルアデノシン)、またはそれらの任意の組合せを挙げてもよい。

10

【0076】

側面によっては、mRNA分子は、当該技術分野で標準的な方法を用いて化学的に合成されてもよい。側面によっては、mRNA分子は、mRNA分子が少なくとも1つの化学修飾を含むように化学的に合成されてもよい。側面によっては、mRNA分子は、限定はされないが、プラスミド鋳型を用いる生体外転写、PCR系鋳型を用いる生体外転写を含む当該技術分野で標準的な生体外での転写法によって生成されてもよい。側面によっては、生体外での転写法は、生成されたmRNA分子が少なくとも1つの化学修飾を含むように実施してもよい。

20

【0077】

側面によっては、精製されたDNA標的ポリペプチドは、限定はされないが、細菌、真菌、昆虫、および/または哺乳類の各系内での組換えタンパク質発現および精製、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、免疫アフィニティークロマトグラフィー、サイズ排除クロマトグラフィーなどの当該技術分野で標準的な方法、および/または当該技術分野で既知のその他の標準的なタンパク質生成/精製方法を用いて生成されてもよい。

【0078】

側面によっては、精製DNA標的リボ核タンパク質(RNP)複合体は、限定はされないが、細菌、真菌、昆虫、および/または哺乳類の各系内での組換えタンパク質の発現および精製、生体外RNA転写、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、免疫アフィニティークロマトグラフィー、サイズ排除クロマトグラフィーなどの当該技術分野で標準的な方法、当該技術分野で既知のその他の標準的なタンパク質生成/精製方法、および/または当該技術分野で既知のその他の標準的な核酸生成/精製方法を用いて生成されてもよい。側面によっては、少なくとも1つのタンパク質成分と少なくとも1つの核酸の両方を含む予め組み立てられたRNP複合体は、生体内(すなわち、細菌、真菌、昆虫、および/または哺乳類の組換え発現系内)で組み立てられ、かつ共精製されてもよい。側面によっては、RNP複合体は、少なくとも1つのタンパク質成分および少なくとも1つの核酸成分を個別に精製した後に生体外で組み立てられてもよい。

30

【0079】

側面によっては、本開示の組成物のいずれかは、複数のガイドRNA(gRNA)分子をさらに含んでもよく、複数のgRNAのうちの少なくとも1つのgRNAは、内因性TERC遺伝子上流、その内部、またはその下流に位置する核酸配列に対し相補的である。側面によっては、複数のgRNA分子は、少なくとも約1個、または少なくとも約2個、または少なくとも約3個、または少なくとも約4個、または少なくとも約5個、または少なくとも約6個、または少なくとも約7個、または少なくとも約8個、または少なくとも約9個、または少なくとも約10個、または少なくとも約11個、または少なくとも約12個、または少なくとも約13個、または少なくとも約14個、または少なくとも約15個、少なくとも約16個、または少なくとも約17個、または少なくとも約18個、または少なくとも約19個、または少なくとも約20個、または少なくとも約30個、または少なくとも約40個、

40

50

または少なくとも約50個、または少なくとも約60個、または少なくとも約70個、または少なくとも約80個、または少なくとも約90個、または少なくとも約100個、または少なくとも約500個、または少なくとも約1,000個の個別種のgRNA分子を含んでもよく、それらの種はそれぞれ異なる核酸配列を有する。

【0080】

側面によっては、本開示の組成物のいずれかは、少なくとも1種のgRNAの発現を駆動するのに十分な少なくとも1つのプロモーターに作動可能に連結される少なくとも1種のgRNAをコードする少なくとも1つの核酸配列を含む少なくとも1つのプラスミドをさらに含んでもよい。側面によっては、本開示の組成物のいずれかは、gRNA種の発現を駆動するのに十分な少なくとも1つのプロモーターに作動可能に連結される、少なくとも約2個、または少なくとも約3個、または少なくとも約4個、または少なくとも約5個、または少なくとも約6個、または少なくとも約7個、または少なくとも約8個、または少なくとも約9個、または少なくとも約10個、または少なくとも約11個、または少なくとも約12個、または少なくとも約13個、または少なくとも約14個、または少なくとも約15個、少なくとも約16個、または少なくとも約17個、または少なくとも約18個、または少なくとも約19個、または少なくとも約20個、または少なくとも約30個、または少なくとも約40個、または少なくとも約50個、または少なくとも約60個、または少なくとも約70個、または少なくとも約80個、または少なくとも約90個、または少なくとも約100個、または少なくとも約500個、または少なくとも約1,000個の個別種のgRNA分子をコードする少なくとも1つの核酸配列を含む少なくとも1つのプラスミドをさらに含んでもよく、それらの種はそれぞれ異なる核酸配列を有する。

【0081】

側面によっては、複数のgRNA分子は、複数のシングルガイドRNA (sgRNA) 分子、crRNA: tracrRNA分子、切詰め型sgRNA分子、高忠実度足場gRNA分子、またはそれらの任意の組合せを含んでもよい。

【0082】

側面によっては、複数のgRNA分子は、複数のシングルガイドRNA (sgRNA) 分子を含んでもよい。側面によっては、sgRNA分子は、内因性TERC遺伝子上流、その内部、またはその下流に位置する核酸配列に対し相補的な核酸配列、および少なくとも1つのMS2 RNAアプタマーを含んでもよい。側面によっては、sgRNA分子は、少なくとも約2個、または少なくとも約3個、または少なくとも約4個、または少なくとも約5個、または少なくとも約6個、または少なくとも約7個、または少なくとも約8個、または少なくとも約9個、または少なくとも約10個のMS2 RNAアプタマーを含んでもよい。

【0083】

側面によっては、本開示の任意の組成物のガイドRNA分子は、修飾ガイドRNA (mod gRNA) 分子であってもよい。

【0084】

側面によっては、修飾ガイドRNAは、少なくとも1つの修飾リボヌクレオシド塩基を含んでもよい。修飾リボヌクレオシド塩基は、シュードウリジン() 残基、5-メチルシチジン (m^5C) 残基、またはそれらの任意の組合せを含んでもよい。

【0085】

側面によっては、修飾ガイドRNAは、少なくとも1つの修飾ヌクレオシドを含んでもよい。修飾ヌクレオシドとして、N7-メチルグアノシン (m^7G)、2-チオウリジン (s^2U)、シュードウリジン()、2'-O-メチル-U、 m^1A (1-メチルアデノシン) に加えて、5-メチルシチジン (m^5C)、5-メチルウリジン (m^5U)、N6-メチルアデノシン (m^6A)、イノシン、および2'-O-メチル化ヌクレオシド; m^2A (2-メチルアデノシン); A_m (2'-O-メチルアデノシン); $m^3 m^6A$ (2-メチルチオ-N⁶-メチルアデノシン); i^6A (N⁶-イソペンテニルアデノシン); $ms^2 i^6A$ (2-メチルチオ-N⁶イソペンテニルアデノシン); io^6A (N⁶-(シス-ヒドロキシイソペンテニル)アデノシン); $ms^2 i^6A$ (2-メチルチオ-N⁶-(シス-ヒドロキシイソペンテニル)アデノシン); g^6A (N⁶-グリシニ

ルカルバモイルアデノシン) ; t^6A (N^6 -トレオニルカルバモイルアデノシン) ; ms^2t^6A (2-メチルチオ- N^6 -トレオニルカルバモイルアデノシン) ; m^6t^6A (N^6 -メチル- N^6 -トレオニルカルバモイルアデノシン) ; hn^6A (N^6 -ヒドロキシノルバリルカルバモイルアデノシン) ; ms^2hn^6A (2-メチルチオ- N^6 -ヒドロキシノルバリルカルバモイルアデノシン) ; $Ar(p)$ (2'-O-リボシルアデノシン (リン酸)) ; I (イノシン) ; mI (1-メチルイノシン) ; m^1Im (1,2'-O-ジメチルイノシン) ; mC (3-メチルシチジン) ; Cm (2'-O-メチルシチジン) ; βC (2-チオシチジン) ; ac^4C (N^4 -アセチルシチジン) ; f^5C (5-ホルミルシチジン) ; m^5Cm (5,2'-O-ジメチルシチジン) ; ac^4Cm (N^4 -アセチル-2'-O-メチルシチジン) ; R^4C (リシジン) ; m^1G (1-メチルグアノシン) ; m^2G (N^2 -メチルグアノシン) ; m^7G (7-メチルグアノシン) ; Gm (2'-O-メチルグアノシン) ; m^2_2G (N^2, N^2 -ジメチルグアノシン) ; m^2Gm ($N^2, 2'$ -O-ジメチルグアノシン) ; m^2_2Gm ($N^2, N^2, 2'$ -O-トリメチルグアノシン) ; $Gr(p)$ (2'-O-リボシルグアノシン (リン酸)) ; yW (ワイプトシン) ; o_2yW (ペルオキシワイプトシン) ; $OHyW$ (ヒドロキシワイプトシン) ; $OHyW^*$ (不全修飾ヒドロキシワイプトシン) ; imG (ワイオシン) ; $mimG$ (メチルワイオシン) ; Q (キューオシン) ; oQ (エポキシキューオシン) ; $galQ$ (ガラクトシルキューオシン) ; $manQ$ (マンノシルキューオシン) ; $preQ_0$ (7-シアノ-7-デアザグアノシン) ; $preQ_1$ (7-アミノメチル-7-デアザグアノシン) ; G^+ (アルケオシン) ; D (ジヒドロウリジン) ; m^5Um (5,2'-O-ジメチルウリジン) ; s^4U (4-チオウリジン) ; m^5s^2U (5-メチル-2-チオウリジン) ; s^2Um (2-チオ-2'-O-メチルウリジン) ; $ac\beta U$ (3-(3-アミノ-3-カルボキシプロピル)ウリジン) ; ho^5U (5-ヒドロキシウリジン) ; mo^5U (5-メトキシウリジン) ; cmo^5U (ウリジン5-オキシ酢酸) ; $mcmo^5U$ (ウリジン5-オキシ酢酸メチルエステル) ; chm^5U (5-(カルボキシヒドロキシメチル)ウリジン) ; $mchm^5U$ (5-(カルボキシヒドロキシメチル)ウリジンメチルエステル) ; mcm^5U (5-メトキシカルボニルメチルウリジン) ; mcm^5Um (5-メトキシカルボニルメチル-2'-O-メチルウリジン) ; $mc\bar{m}s^2U$ (5-メトキシカルボニルメチル-2-チオウリジン) ; nm^5s^2U (5-アミノメチル-2-チオウリジン) ; mnm^5U (5-メチルアミノメチルウリジン) ; mnm^5s^2U (5-メチルアミノメチル-2-チオウリジン) ; mnm^5se^2U (5-メチルアミノメチル-2-セレノウリジン) ; ncm^5U (5-カルバモイルメチルウリジン) ; ncm^5Um (5-カルバモイルメチル-2'-O-メチルウリジン) ; $cmnm^5U$ (5-カルボキシメチルアミノメチルウリジン) ; $cmnm^5Um$ (5-カルボキシメチルアミノメチル-2'-O-メチルウリジン) ; $cmn\bar{m}s^2U$ (5-カルボキシメチルアミノメチル-2-チオウリジン) ; m^6_2A (N^6, N^6 -ジメチルアデノシン) ; Im (2'-O-メチルイノシン) ; mC (N^4 -メチルシチジン) ; m^4Cm ($N^4, 2'$ -O-ジメチルシチジン) ; hm^5C (5-ヒドロキシメチルシチジン) ; m^3U (3-メチルウリジン) ; cm^5U (5-カルボキシメチルウリジン) ; m^6Am ($N^6, 2'$ -O-ジメチルアデノシン) ; m^6_2Am ($N^6, N^6, 0-2'-2'7'2'2'7'2'2'$ トリメチルアデノシン) ; m^6_7G ($N^2, 7$ -ジメチルグアノシン) ; $m^{2,2,7}G$ ($N^2, N^2, 7$ -トリメチルグアノシン) ; m^3Um (3,2'-O-ジメチルウリジン) ; m^5D (5-メチルジヒドロウリジン) ; f^5Cm (5-ホルミル-2'-O-メチルシチジン) ; m^1Gm (1,2'-O-ジメチルグアノシン) ; m^1Am (1,2'-O-ジメチルアデノシン) ; m^5U (5-タウリノメチルウリジン) ; m^5s^2U (5-タウリノメチル-2-チオウリジン) ; $imG-14$ (4-デメチルワイオシン) ; $imG2$ (イソワイオシン) ; ac^6A (N^6 -アセチルアデノシン)、またはそれらの任意の組合せを挙げてもよい。

【0086】

側面によっては、ガイドRNA分子は、表1または表2に記載される任意の配列を含んでもよい。

【0087】

【表 1 - 1】

ガイドRNA 配列

配列名称	配列	配列番号	配列名称	配列	配列番号
1015 逆	UGUUCAUAAAUUUACUGACA	1	1934 逆	GAGAAGCCCCGGCCGACCG	265
1025 正	AAAAAAUCGUUACA AUUUA	2	1937 正	CGAACCCCGCCUGGAGCCG	266
1028 正	AAAUCGUUACA AUUUAUGG	3	1941 正	CCCGCCUGGAGCCCGGGU	267
1037 逆	UCUUGAUGAGGUAAAAAGAG	4	1944 逆	GGUGCCUCCGGAGAAGCCCC	268
1038 逆	GUCUUGAUGAGGUAAAAAGA	5	1945 逆	GGUGCCUCCGGAGAAGCCCC	269
1039 逆	UGUCUUGAUGAGGUAAAAAG	6	1946 正	CCUGGAGCCCGGGUCGGCC	270
103 逆	AAUUUCUCUCCUUUGCAUUAU	7	1947 正	CUGGAGCCCGGGUCGGCCC	271
1049 逆	AGUAGUGCUGUGUCUUGAUG	8	1948 正	UGGAGCCCGGGUCGGCCCG	272
1059 逆	AGGGGACCUACUUAUGGUAAU	9	1956 逆	GCGGUGGCAGUGGGUGCCUC	273
1066 逆	CAAUUCCAGGGACCUACUUAU	10	1957 正	CGGUCGGCCCGGGCUUCUC	274
106 正	ACGGAGCCGAGUCCCCGCGG	11	1960 正	UCGGCCCGGGCUUCUCCGG	275
1073 正	UUUUAACCUAUUAACCUAAGU	12	1965 逆	CAACUCUUCGGGUGGCAGU	276
1077 逆	UAUCUGCUAGACAAUCCAG	13	1966 逆	CCAACUCUUCGGGUGGCAG	277
1078 逆	GUUUCUGCUAGACAAUCCA	14	1986 正	CCACUGCCACCCGGAAGAGU	278
1079 逆	UGUUAUCUGCUAGACAAUCC	15	1987 正	CAGUGCCACCCGGAAGAGUU	279
1081 正	UAUUACCUAAGUAGGUCCCC	16	199 正	UUUGGAGAAUAAAUGAAUG	280
1098 逆	UCCUUUUUAUUAAGAAAGAA	17	1 逆	CAGAGCCCAACUCUCCGGG	281
1107 逆	GACUGAAUCUCCUUUUUAUUAU	18	203 正	GAGAAUAAAUGAAUGAGGA	282
1116 正	CGCCUUUCUUUCUAAUAAA	19	203 逆	CCAUUGCCGGGAGGGGUGA	283
1117 正	GCCUUUCUUUCUAAUAAA	20	206 逆	AACUGAUCACCAAUCUCCA	284
1129 逆	CUACUACAUUAUUAUCUUA	21	207 逆	UAACUGAUCACCAAUCUCC	285
1139 逆	CCAGCAACAGUGGACUCUAG	22	209 正	AAAUUGAAUGAGGAAGGCC	286
1149 逆	GAGAACAUAUACCAGCAACAG	23	209 逆	AAGCCCCAUUGCCGGCGAG	287
114 正	GCUAAAUAUCCAUAUGCAA	24	210 逆	CAAGCCCCAUUGCCGGCGA	288
1159 正	CCUCUAGAGUCCACUGUUGC	25	211 逆	ACAAGCCCCAUUGCCGGCG	289
1168 逆	GCCUCUCCUUGAGCAGAGGA	26	216 逆	GGUUCACAAGCCCCAUUGC	290
116 逆	GGUGCACGUCCACAGCUCA	27	217 正	UGAGGAAGGCCUUGGAGAUU	291
1172 逆	UCCAGCCUCUCCUUGAGCAG	28	217 正	GCGCAUCCGUCACCCUCGC	292
1178 正	CUGGUAAUGUUCUCUAAUA	29	223 正	CCGUCACCCUCCGGCGCAA	293
117 逆	GGUGCAGUCCACAGCUC	30	224 正	CGUCACCCUCCGGCGAAU	294
1182 正	UAAAAGCCAUCUCUGCUCA	31	225 正	GUCACCCUCCGGCGAAUG	295
1187 正	GCCAUCUCUGCUCAAGGAG	32	226 正	UCACCCUCCGGCGAAUGG	296
1191 正	UCCUCUGCUCAAGGAGAGGC	33	237 逆	GCCCAGUCAGUCAGGUUUG	297
1193 逆	UCCACAAAACCAUGCUGAU	34	238 逆	GGCCAGUCAGUCAGGUUUG	298
1197 正	GCUCAAGGAGAGGCUUGAGA	35	239 逆	UGGCCAGUCAGUCAGGUUU	299
1203 正	AAAUUUUUUCCUAUCAGCA	36	240 逆	CUGGCCAGUCAGUCAGGUU	300
1207 正	AGGCUUGGAGAAGGCAUUCUA	37	243 逆	AAGACUUGGCACUUAUUAUG	301
1211 正	UCCUAUCAGCAUGGUUUUG	38	245 逆	GCACACUGGCCAGUCAGUC	302

10

20

30

40

50

【表 1 - 2】

1213 正	GAGAAGGCAUUCUAAGGAGA	39	255 正	AACCCCAAAACCGACUGAC	303
1214 正	AGAAGGCAUUCUAAGGAGAA	40	256 正	ACCCCAAAACCGACUGACU	304
1215 正	GAAGGCAUUCUAAGGAGAAG	41	257 逆	AUAAUCUUGAGUACAAGACU	305
1216 正	AAGGCAUUCUAAGGAGAAGG	42	259 逆	CCUGCCAAUUUGCAGCACAC	306
1220 正	CAUUCUAAGGAGAAGGGGGC	43	275 正	UGGGCCAGUGGCGCAAUU	307
1221 正	AUUCUAAGGAGAAGGGGGCA	44	279 正	CCAGUGGCGCAAUUUGGC	308
1221 正	CAUGGUUUUGGAAAAGUA	45	287 正	UACUCAAGAUUUAAGCAAU	309
1225 正	UAAGGAGAAGGGGGCAGGGU	46	28 逆	CCUGCCCGGAGAGACCGG	310
1232 正	AAGGGGGCAGGGUAGGAACU	47	290 正	CAAAUUGGCAGGAGACGUGA	311
1234 逆	CAAGACUCUAGACAAGUUCU	48	295 逆	UUCAUUUUGCCGACUUUGG	312
1241 逆	GAAUCUUGUCUGGCGCAGU	49	298 逆	CCAUUCAUUUUGGCCGACUU	313
1242 逆	AGAAUCUUGUCUGGCGCAG	50	305 正	CGUGAAGGCACCUCCAAAGU	314
1250 逆	ACUACAGCAGAAUCUUGUCU	51	308 逆	GGCUCACUGCCCAUUCUUU	315
1257 正	AGAAUCUUGUCUAGAGUCUUG	52	318 正	CCAAAGUCGGCCAAAUGAA	316
126 正	CGGCGCAUUCUCCUGAGCUG	53	319 正	CAAAGUCGGCCAAAUGAAU	317
127 正	GGCGCAUUCUCCUGAGCUGU	54	31 正	GAGUUGGGCUCUGCAGCCG	318
1281 逆	CUUUGUGAAAAUAGAUUCCC	55	329 逆	GGAACGGCUCAGGCAACCC	319
1281 逆	AGAUACCUUGAGUAAACUG	56	32 正	AGUUGGGCUCUGCAGCCGC	320
1283 正	CUGCUGUAGUCAGUGCUGCC	57	330 正	AAAUGAAUGGGCAGUGAGC	321
1284 正	UGCUGUAGUCAGUGCUGCCU	58	331 正	AAAUGAAUGGGCAGUGAGCC	322
1295 正	AGUAAGCCUCAGUUAUCUCA	59	331 逆	UUUCCCUUCAUUAUCUAAGU	323
1308 逆	GUUUUGAUCAUCACAUUUUU	60	332 正	AAUGAAUGGCAGUGAGCCG	324
1332 正	AAAUGUGAUGAUCAAAACU	61	338 逆	ACCCACGCAGGAACGGCUC	325
1335 正	UUCUUCUUCUUCUUGAGA	62	340 正	GGCAGUGAGCCGGGUUGCC	326
1341 逆	CCAGCUCUGGGUGACAGAGU	63	345 逆	CGGGAGAACCACGCAGGAA	327
1342 逆	UCCAGCUCUGGGUGACAGAG	64	346 正	UAGUGCCUACUUAAGAUUGA	328
1353 逆	GGACACUCGACUCCAGCUCU	65	347 正	AGUGCCUACUUAAGAUUGAA	329
1354 正	GAAUAGUGUUCUGUGUCUU	66	348 正	GUGCCUACUUAAGAUUGAAG	330
1354 逆	GGGACACUCCAGCUC	67	350 逆	GAAGACGGGAGAACCACGC	331
1357 逆	GAAUUCACAGGAAGAUUUUA	68	356 正	UUAGAUUGAAGGGAAAGA	332
1358 逆	GGAAUUCACAGGAAGAUUUU	69	356 正	UGCCUGGAGCCGUUCUGCG	333
1361 正	CCCACUCUGACCCAGAGC	70	357 正	UAGAUUGAAGGGAAAGAA	334
1369 逆	ACCUUAAAAUGGAAUUCAC	71	357 正	GCCUGGAGCCGUUCUGCGU	335
1374 逆	GGUUGCAGUGAGCCAAGAUG	72	364 逆	GGCAACAAAAAGCGGAAGAC	336
1375 逆	AGGUUGCAGUGAGCCAAGAU	73	365 逆	AGGCAACAAAAAGCGGAAGA	337
1376 逆	GAGGUUGCAGUGAGCCAAGA	74	372 正	AAGAAGGUUUGAGAUAAUG	338
1379 逆	CACCUAGACUACCUAAAAA	75	372 逆	CCAUAAAAGGCAACAAAAG	339
137 逆	GCAUGUGUGAGCCGAGUCCU	76	373 正	AGAAGGGUUUGAGAUAAUGU	340
1382 正	GGAGUGCAGUGCCCAUCU	77	385 逆	AGUUGUAUAACAACCAUAAA	341
1388 正	UCCUGUGAAUUCAUUUUA	78	388 正	AAUGUGGGAUGCUAAGAGAA	342
138 逆	UGCAUGUGUGAGCCGAGUCC	79	391 正	GUGGGAUGCUAAGAGAAUGG	343
1395 逆	GCUAGAAACCGAGGAGCAG	80	392 正	CCGCUUUUUGUUGCCUUUA	344
1397 正	UUCCAUUUUUAAAGGUAGUCG	81	40 正	UCUGUCAGCCGGGUCUCU	345

10

20

30

40

50

【表 1 - 3】

1401 逆	AAAUCGCUAGAAACCGAGG	82	413 逆	CUCAACAAAUCUGCAGAGC	346
1404 逆	UAUCCUCUGCAGACCAGACG	83	41 正	CUGUCAGCCGCGGGUCUCUC	347
1404 逆	GAGAAAAUCGCUAGAAACCG	84	42 正	UGUCAGCCGCGGGUCUCUCG	348
1407 正	CACUGCAACCCUCGCCUCU	85	434 正	CUGCUCUGCAGAUUUUGUUG	349
140 正	GAAAUJAAAGAUUUAAAAGC	86	439 正	UUUAGCAUCUACUCUUAUGUA	350
140 正	GAGCUGUGGGACGUGCACCC	87	43 正	GUCAGCCGCGGGUCUCUCGG	351
1411 正	UAGUCGAGGUGAACCCGCGUC	88	448 逆	GACUGGUCGAGAUUACCUU	352
1421 正	GAACCGGUCUGGGUCUCGAG	89	449 逆	GGACUGGUCGAGAUUACCU	353
1431 逆	UGUAAACCCAGCUACUUGGG	90	452 正	UGAGGUUUUUGCUUCUCCA	354
1433 正	GUCUGCAGAGGAUAGAAAA	91	465 逆	CCACACCCCGUUGAGGGGAC	355
1434 逆	GCCUGUAAACCCAGCUACU	92	470 逆	UUCUCCACACCCCGUUGAG	356
1435 逆	UGCCUGUAAACCCAGCUACU	93	471 逆	GUUCUCCACACCCCGUUGA	357
1436 逆	AACUAACUUGAGGUUAUCAGA	94	472 正	AGUGCAAUAGUGCUAAAAAC	358
1437 逆	AAACUAACUUGAGGUUAUCAG	95	472 逆	UGUUCUCCACACCCCGUUG	359
1444 正	CUCUCAGCCUCCCAAGUAGC	96	478 正	AUCUCGACCAGUCCCUCAA	360
1445 正	UCUCAGCCUCCCAAGUAGCU	97	479 正	UCUCGACCAGUCCCUCAAC	361
1446 逆	UUAAGGUGAAACUAACUUG	98	480 正	CUCGACCAGUCCCUCAACG	362
1453 正	UCCCAAGUAGCUGGGUUUAC	99	485 正	CCAGUCCCUCAACGGGGUG	363
145 逆	AUCAUAACAUAGUUCCUUA	100	486 正	CAGUCCCUCAACGGGGUGU	364
1462 逆	UUACUJCCGACCUUCUUUA	101	488 逆	CCAGGUUGUAAAGUUUUUA	365
1462 逆	AAAAAUACAGCCGGGUUAGG	102	48 正	CCGCGGGUCUCUGGGGGCG	366
1465 逆	ACAAAAAUACAGCCGGGUUA	103	49 正	CGCGGGUCUCUGGGGGCGA	367
146 正	UGGGACGUGCACCCAGGACU	104	4 逆	UGACAGAGCCCAACUCUUCG	368
1470 逆	AAAAUACAAAAAUACAGCC	105	506 逆	UUUCUUCUAGCAUCUGCC	369
1471 逆	GAAAAUACAAAAAUACAGC	106	508 正	CCGUAAAAACUUJACAACC	370
1472 正	GUUAGUUUACCUUUAAAGA	107	530 正	GCAGUUCUUAUGAAAGAAAA	371
1472 正	CAGGCACACACCACUACC	108	531 正	CAGAUUCUUAUGAAAGAAAA	372
1476 正	GUUUCACCUUUAAGAAGGU	109	532 正	AGAUGCUUAUGAAAGAAAAG	373
1495 逆	CCUUCGCCAGCUCGGGAA	110	536 正	GCUAUGAAAGAAAAGGGGA	374
1500 逆	CGUUGCCUUCGCCAGUCC	111	537 正	CUAUGAAAGAAAAGGGGAU	375
1501 逆	ACGUUGCCUUCGCCAGGUC	112	549 正	AAGGGGAUGGGAGAGAGAGA	376
1502 正	UAAAGACGCAAGCCUJUC	113	54 正	GUCUCUCGGGGCGAGGGCG	377
1502 正	UUUUGUJUUUCAGUAAAGU	114	552 正	GGGAUGGGAGAGAGAGAAGG	378
1503 正	UUUGUJUUUCAGUAAAGUJ	115	553 正	GGGAUGGGAGAGAGAGAAGGA	379
1507 正	UAUUUUCAGUAAAGUJGGC	116	561 正	UAGAAGAUUCUAAAUGAACAU	380
150 正	AUUJAAAAGCAGGAGCCAUJ	117	563 正	GAGAGAAGGAGGGAGAGAGA	381
1510 正	CAAAGCCUJUCGGGACGUG	118	568 正	AAGGAGGGAGAGAUJGGAG	382
1511 正	UUCAGUAAAGUJGGGACGGC	119	569 正	AGGAGGGAGAGAUJGGAGA	383
1514 正	GCCUJUCGGGACGUGCGGA	120	574 逆	CAUAAACCGAUGACCAUUA	384
1514 逆	CACCUGAGGUCAGGAGUUCG	121	57 正	AACAAGCGCUAUGACUAGCA	385
1515 正	CCUJUCGGGACGUGCGGAA	122	581 正	UGGAAAUJUGUJUCUJUA	386
1523 逆	CGGGCGGAUCACCGAGGUC	123	588 正	UGUGUJCCUJUAUJGGUJUA	387
1524 逆	UCCAUJUCGGGCAUGAGGA	124	597 逆	AAAAAGAAACUUCUJACUC	388

10

20

30

40

50

【表 1 - 4】

1528 逆	AAGUUCCAUUCCGGCCAUG	125	598 正	UUUACUUUUCUUCAGAUUG	389
1528 逆	AGAAGCGGGGGGAUACCCUG	126	601 正	UGGUCUUCGGUUUUGCCAG	390
1532 正	GGCCUCGAACUCCUGACCUC	127	602 逆	CUCGUGGAGUUGUCGUGU	391
1533 正	AAGGGCAACGUCCUUCUCA	128	60 正	CGGGGGCAGGGCGAGGUUC	392
1536 逆	GGAAAUJAAAGUCCAUUUC	129	617 逆	AUUCAGUJAGAUAAACUCCG	393
1537 正	GCAACGUCCUCCUCAUGGC	130	620 正	GACCGACAGCGACAACUCCA	394
1539 逆	CUUUGGGAGGAGAAAGCGGG	131	632 逆	ACUGCUCUAGGUCUUGCCA	395
1542 逆	GCACUUUGGAGGAGAGAAGC	132	635 正	UUUUUJAAAAAUJAGACCU	396
1543 正	UCCUCCUCUAGGCCGAAAA	133	63 逆	UCCUCUCCUGGGCCUGAA	397
1543 逆	AGCACUUUGGAGGCGAGAAG	134	644 逆	GGGUUAUUCUACUGCUCU	398
1552 逆	UGUAUJCCAGCACUUUGGG	135	655 正	UGGGGAUGACCUJAGCAGU	399
1555 逆	GCCUGUAUCCAGCACUUU	136	663 逆	CAGUUUACAUJAAAUGAC	400
1556 逆	CGCCUGUAUCCAGCACUU	137	664 逆	UUGGAACGCUAAGCUUGUGG	401
1557 逆	GGGGGUGGUUGGGGGAAAC	138	665 逆	AUUGGAACGCUAAGCUUGUG	402
1558 逆	GGGGGUGGUUGGGGGAA	139	666 逆	UAUUGGAACGCUAAGCUUGU	403
1563 逆	UCUCGGGGGGGUGGUUGGG	140	667 逆	UUUJUGGAACGCUAAGCUUG	404
1564 逆	CUCUCGGGGGGGUGGUUGG	141	683 逆	UAUGCCUJAGUJCCGUUJAU	405
1565 正	GCUCUCGCCUCCAAAGUGC	142	68 正	UGACUJAGCAAGGUJAGUGA	406
1565 逆	UCUCUCGGGGGGGUGGUUG	143	690 正	CAAGCUJAGCGUJCCAAUAA	407
1566 正	CUUCUGCCUCCAAAGUGCU	144	694 正	UAUGUAAAACUGCACUJAUAC	408
1566 逆	CUCUCUGGGGGGGGUGGUU	145	697 逆	CCGGCCGGAAUUUUUJAA	409
1567 逆	ACUCUCUGGGGGGGGUGGU	146	699 正	CGUJCCAAUJAGGAAACU	410
1571 逆	AGUCACUCUCUGGGGGGGC	147	69 正	GGGGGAGGUJAGGCUUUC	411
1574 正	UCCCAAAGUGGUGGGAUJAC	148	713 正	CUGGCCAUJAUAAAAUJUG	412
1575 逆	UGAGAGUCACUCUCUGGGC	149	714 正	ACACUJAGGCAUJAGAAAGA	413
1576 逆	GUGAGAGUCACUCUCUGGG	150	716 逆	CAGGUJAGGCGCACCGCAC	414
1579 逆	CUCGUGAGAGUCACUCUCUC	151	717 正	CCAUJAUAAAAUJCGCGGC	415
1580 逆	UCUCGUGAGAGUCACUCUCU	152	718 正	CAUJAUAAAAUJCGGGCC	416
1583 逆	GGAUUCUJAGUCCCGCACGG	153	71 逆	ACUUJAGCCUJAGUCC	417
1586 逆	AAGGGAUCUJAGUCCCGCA	154	723 正	UAAAAUJCGCGGGCGGUG	418
1591 正	UACAGGCGUGAGCCACCGUG	155	726 正	AAAUJCGGGGGGGGUGCGG	419
1592 正	ACAGGCGUGAGCCACCGUGC	156	72 逆	UCGCUCCGUJCCUJCCUG	420
1593 正	CAGGCGUGAGCCACCGUGCG	157	731 逆	AGGGUJGGGGGUGGGGGUG	421
1604 逆	AUUGGCAAGCUGACUCUCG	158	735 逆	UCCCAAAGUGCUGGGAUJAC	422
1604 逆	GAGUCCCGCCUJGCAAAA	159	736 逆	CUGGGAGGUGGGGGUGGG	423
1605 逆	GGAGUCCCGCCUJGCAAAA	160	737 逆	GCUGGGAGGUGGGGGUGG	424
1614 正	GGACUAAGAUCUUUUGCA	161	738 逆	GGCUGGGAGGUGGGGGUG	425
1615 正	GACUAAGAUCUUUUGCAA	162	739 逆	CGGCUGGGAGGUGGGGGU	426
1618 正	UAAGAUCUUUUGCAAGGG	163	73 正	AGCAAGGUJAGUGAAGGCC	427
1619 正	GAGAGCGGAGAGUCAGCU	164	740 逆	CCGCGUGGAGGUGGGGG	428
1619 正	AAGAUCCUUUUGCAAGGGC	165	743 逆	CUUCGGCCUCCAAAGUGCU	429
1620 正	AGAUCUUUUGCAAGGGCG	166	743 逆	CUGCCGGCUGGAGGUGG	430
1622 逆	CGGCGCGGACCGCACGGAU	167	744 逆	GCUUCGGCCUCCAAAGUGC	431

10

20

30

40

50

【表 1 - 5】

1626 逆	AUGCACUUGUCUGUAGUUA	168	744 逆	ACUGCCGGCUGGGAGGGUUG	432
1627 逆	GGGAGCGCCGCCGACCGCA	169	745 逆	GACUGCCGGCUGGGAGGGUU	433
1632 正	GUCAGCUUGGCCAAUCCGUG	170	746 逆	AGACUGCCGGCUGGGAGGGU	434
1636 正	GCUUGGCCAAUCCGUGCGGU	171	74 正	GCAAGGUUAAGUGAAGGCCA	435
1639 正	UGGCCAAUCCGUGCGGUCGG	172	750 逆	UGGGAGACUGCCGGCUGGGA	436
1642 逆	GAGUCGGCUUAUAAAGGGAG	173	751 逆	GUGGGAGACUGCCGGCUGGG	437
1647 逆	CGGGCGAGUCGGCUUAUAAA	174	753 正	UACCGUUAUCCAGCACUU	438
1648 逆	CCGGCGAGUCGGCUUAUAA	175	754 正	ACCGUUAUCCAGCACUUU	439
1658 逆	CGGUGCGUCGCCGGCGAGU	176	754 逆	CUUGGGAGACUGCCGGCU	440
1665 逆	GAAGCAAAGUACCACUAGA	177	755 逆	UCUUGGGAGACUGCCGGC	441
1666 逆	CCGCAACCCGUGCGCUGCC	178	757 正	UGUAAUCCAGCACUUUGGG	442
1667 逆	UCCGCAACCCGUGCGCUGC	179	759 逆	CAAUCUUGUGGGAGACUGC	443
1668 正	CCUUUAUAGCCGACUCGCC	180	760 正	CCACCCCAACCCUCCAGC	444
1673 正	UUUGUUCUUAUCCAUUCUAG	181	760 逆	CUCAAGUUAUCCAGCCGUU	445
1678 逆	CAGGCCACCCUCCGCAACC	182	766 正	AGCACUUUGGGAGGCCAAG	446
1679 正	CGACUCGCCCGCAGCGCAC	183	767 正	GCACUUUGGGAGGCCAAGC	447
1680 正	GACUCGCCCGCAGCGCAC	184	769 逆	AAUUCAGAGCCAAUUCUUGU	448
1686 正	CCCGGCAGCGACCCGGUUG	185	76 正	GUUCAGGCCUUUCAGGCCG	449
1689 正	GGCAGCGCACCCGGUUGCGG	186	770 正	CUUGGGAGGCCAAGCGGG	450
1689 逆	CACCACAAUUGUUAUAAUG	187	770 逆	GAAUUCAGAGCCAAUUCUUG	451
1690 正	GCAGCGACCCGGUUGCGGA	188	780 正	CGGCAGUCUCCACAAGAAU	452
1693 正	GCGCACCCGGUUGCGGAGGG	189	783 逆	CAGGCUGGUCUGAACGCCA	453
1694 正	GCGCACCCGGUUGCGGAGGGU	190	784 逆	CCAGGCUGGUCUGAACGCC	454
1697 逆	AAUUGGCCACCCCCUCCC	191	786 正	CGGGUGGUAUCUUGAGCCC	455
1699 正	CGGGUUGCGGAGGGUGGGCC	192	792 逆	CCAUAUCUUAUUUCUUA	456
1700 正	GGGUUGCGGAGGGUGGGCCU	193	798 逆	UUUACCAUGUUGCCAGGC	457
1703 正	UUGCGGAGGGUGGGCCUGGG	194	802 逆	GGGGUUCACCAUGUUGCCC	458
1704 正	UGCGGAGGGUGGGCCUGGGA	195	804 正	CCUGCGUUGGAGACCAGCC	459
1705 正	GCGGAGGGUUGGGCCUGGGAG	196	805 正	CUGGCGUUGGAGACCAGCCU	460
1707 正	CUCCACAUUUAACAACUUG	197	812 正	CCUUUAAGAAAUAAGCUAA	461
1708 正	GAGGGUGGGCCUGGGAGGGG	198	813 正	CGAGACCAGCCUGGGCAACA	462
170 逆	UCGGCGUUCGCCCCACCAAC	199	815 逆	UUUGUUCUUAACCCUAGU	463
1710 正	CACAUUUAACAACUUGUGG	200	816 逆	GUUUGUUCUUAACCCUAG	464
1711 正	GGUGGGCCUGGGAGGGUGG	201	821 正	AAUUAAGCUAUGGCCACU	465
1714 逆	AGUJAGGGUAGACAAAAA	202	821 逆	UGUGUUUUAGUAGAGCGG	466
1716 正	UACAACAUUUGUGGUGGUGC	203	822 逆	UUGUGUUUUAGUAGAGAGC	467
1717 正	ACAACAUUUGUGGUGGUGCA	204	823 逆	UUUGUGUUUUAGUAGAGAC	468
1720 逆	CUGUGGCCAUUCUUGCUUA	205	824 逆	UUUGUGUUUUAGUAGAGA	469
1729 逆	GCCUACGCCUUCUCAGUUA	206	82 正	GCCUUCAGGCCCGAGGAAG	470
1730 逆	CGCCUACGCCUUCUCAGUUA	207	839 正	CUAGGUUGAAGAAACAAC	471
1734 正	GCAGGGCCGUAAGCAAGAA	208	83 正	AGUGAAGGCCAGGGACUGAA	472
1737 逆	AGAAAAACAUUCCAGUCUG	209	842 逆	GUCGUGAUUAGUGGGCAGAA	473
1741 正	UUGUCUAACCCUACUCAGAA	210	850 逆	AUUACCUUGUCGUGUAAGU	474

10

20

30

40

50

【表 1 - 6】

1742 正	UGUCUAACCCUAACUGAGAA	211	851 逆	AAUUACCUUGUCGUGAUAG	475
1745 正	AAGCAAGAAUGGCCACAGAC	212	853 正	CUAAAAACACAAAAACUAGC	476
1746 正	AGCAAGAAUGGCCACAGACU	213	854 正	UAAAAACACAAAAACUAGCU	477
1748 正	ACCCUAACUGAGAAGGGCGU	214	859 正	ACACAAAAACUAGCUGGGCG	478
1753 逆	GCGCGCGGGGAGCAAAAGCA	215	862 正	CAAAAAACUAGCUGGGCGUGG	479
175 正	CAUGCAGUUCGCUUCCUGU	216	866 正	AACUAGCUGGGCGUGGUGGC	480
1766 逆	AGCGAGAAAAACAGCGCGCG	217	866 正	UCUGCCACUUAUCACGACA	481
1767 逆	CAGCGAGAAAAACAGCGCGC	218	871 逆	UCCUGAGUAGCUGGGAUUAC	482
1768 逆	UCAGCGAGAAAAACAGCGCG	219	874 逆	UUGAAGGUUAGGUAUUGGGA	483
178 正	GCAGUUCGCUUCCUGUUGG	220	878 逆	GGAAUUGAAGGUUUGGAUU	484
1798 正	UUUUUCUCGCGUAGCUUUCAG	221	879 逆	UCUCAGCCUCCUGAGUAGCU	485
1799 正	UUUUUCGCGUAGCUUUCAGC	222	879 逆	AGGAAUUGAAGGUUUGGAUU	486
179 正	CAGUUCGCUUCCUGUUGGU	223	87 正	UCAGGCCGCGAGGAGAGGAA	487
1802 正	UCUCGCGUAGCUUUCAGCGGG	224	880 逆	GUCUCAGCCUCCUGAGUAGC	488
180 正	AGUUCGCUUCCUGUUGGUG	225	885 逆	AUCCUAAGGAAUUGAAGGUA	489
1810 逆	CGGUGGAAAGCGGGCAGGCCG	226	890 正	GCCUGUAAUCCAGCUACUC	490
1813 正	UUCAGCGGGCGAAAAGCCU	227	890 逆	AGAUGAUCCUAGGAAUUGA	491
1816 逆	AAUGAACGGUGGAAAGCGGC	228	893 正	UGUAAUCCAGCUACUCAGG	492
181 正	UUAUGAUAAUGUGAUAGUU	229	899 逆	ACUACCCCGAGAUGAUCCUA	493
181 正	GUUCGCUUCCUGUUGGUGG	230	903 正	AUCCAUACCUUCAAUCCUU	494
1820 逆	CUAGAAUGAACGGUGGAAAG	231	912 正	UUGAAUCCUJAGGAUCAUC	495
1823 逆	GCUCUAGAAUGAACGGUGGA	232	913 正	UCAAUCCUJAGGAUCAUCU	496
1827 逆	GUUJGCUJAGAAUGAACGG	233	914 正	CAAUCCUJAGGAUCAUCUG	497
182 正	UUCGCUUCCUGUUGGUGGG	234	915 正	AAUCCUJAGGAUCAUCUGG	498
1830 逆	UUUGUJGCUJAGAAUGAA	235	919 逆	CACUGCAACCUJGCCUCCC	499
1866 正	AAACAAAAAUGUCAGCUGC	236	920 逆	UCACUGCAACCUJGCCUCC	500
1869 逆	GGUCCCCGGGAGGGGCGAAC	237	921 正	ACACGAGAAUCGCUUGAACCC	501
1870 逆	AGGUCCCCGGGAGGGGCGAA	238	922 正	CACGAGAAUCGCUUGAACCC	502
1877 逆	CCGCCGAGGUCCCCGGGAG	239	924 逆	CCCCGGCUGCUCUCUCUCU	503
1878 逆	CCGCCGAGGUCCCCGGGA	240	925 正	GAGAAUCGCUUGAACCCGGG	504
1879 逆	ACCCGCCGAGGUCCCCGGG	241	931 正	CGCUUGAACCCGGGAGGCAG	505
1882 逆	GCGACCCGCGGAGGUCCCC	242	940 逆	GGCCUUUAUJACACACCCC	506
1883 逆	GGCGACCCGCGGAGGUCCC	243	942 正	UGCCAAGAGAGAGAGCAGCC	507
1884 正	GCUGGCCGJUUCGCCCUCC	244	943 正	GCCAAGAGAGAGAGCAGCCA	508
1885 正	CUGGCCGJUUCGCCCUCCC	245	944 正	CCAAGAGAGAGAGCAGCCAG	509
1886 正	UGGCCGJUUCGCCCUCCCG	246	944 逆	GGAGUCUJAGUGGCGUGAUCU	510
1890 逆	CUGGGCAGGGACCCGCCGC	247	955 逆	CCAGGCUGGAGGAGUCUAG	511
1894 正	UCGCCCUCCCGGGACCCUG	248	958 正	AGCCAGGGGUGUGUAUUA	512
1897 正	CCCUCCCGGGACCCUGCGG	249	961 逆	CAGGCUAUCACCCUAAAGGU	513
1898 正	CCCUCCCGGGACCCUGCGG	250	962 逆	UCAGGCUAUCACCCUAAAGG	514
189 逆	GGGUGACGGUAGCGCACGAU	251	965 逆	GCUCUJGCGCCAGGCUGGA	515
1904 逆	GCGGGUJGCGGGGCGGGC	252	965 逆	GAUUCAGGCUAUCACCCUAA	516
1908 逆	CCAGGCGGGUJGCGGGGCU	253	969 逆	UCUJGCUJGCGCCAGGC	517

10

20

30

40

50

【表 1 - 7】

1909 逆	UCCAGGCGGGGUUCGGGGGC	254	970 正	GUUAUAAAAGGCCACCUUU	518
1913 逆	GGCCUCCAGGCGGGGUUCGG	255	971 正	UAUAUAAAAGGCCACCUUUA	519
1914 逆	CGGCCUCCAGGCGGGGUUCG	256	973 逆	GGAGUCUJGCUUUUCGCC	520
1915 逆	GCGGCCUCCAGGCGGGGUUC	257	975 正	CCACUAGACUCCAUCAGCC	521
1916 逆	CGCGGCCUCCAGGCGGGGUU	258	976 正	CACUAGACUCCAUCAGCCU	522
1921 逆	CCGACCGCGGCCUCCAGGCG	259	97 逆	AGGGAUCGCGCGCGCGCG	523
1922 逆	GCCGACCGCGGCCUCCAGGC	260	980 逆	ACUUCAAUCAUCAGGAUUC	524
1923 逆	GGCCGACCGCGGCCUCCAGG	261	987 逆	ACUUCUGACUUCAAUCAUC	525
1926 逆	CCGGGCCGACCGCGGCCUCC	262	98 逆	CAGGGAUCGCGCGCGCGCG	526
1928 正	CCCAGCCCCGAACCCCGCC	263	994 逆	AACGAUUUUUUUUUUGAGA	527
1931 正	AGCCCCGAACCCCGCCUGG	264	99 逆	UCAGGGAUCGCGCGCGCGCG	528

10

20

30

40

50

【 0 0 8 8 】

【表 2 - 1】

ガイドRNA 配列

配列名称	配列	配列番号	配列名称	配列	配列番号
1420 正	GUGAACGGGUCUGGUCUGCA	529	967 逆	AGUCUUGCUCUUUGGCCAGG	584
1591 逆	GCUGACUCUCGGGUCUCGU	530	991 逆	UAACGAUUUUUUUUUGAGA	585
634 正	AACUCCACGGAGUUUAUCUAA	531	94 逆	GCCCAACUCUUCGGGUGGCA	586
640 正	ACGGAGUUUAUCUAACUGAAU	532	302 逆	CCGCAUUGCGGGGAGGGGUG	587
1688 正	CCGGCAGCGACCGGGUUGCG	533	997 逆	AACUACCCCAGAUGAUCCUA	588
716 正	GGCCAUUAUAAAAUUCGGCG	534	237 逆	ACUGCAUGUGAGCCGAGUC	589
1608 正	AGUGACUCUCACGAGAGCGCG	535	309 逆	CACAAGCCCCAUUGCCGGCG	590
1678 正	GCCGACUCGCCCGGACGCGCA	536	579 正	GAUCUCGACCAGUCCCCUAA	591
1728 逆	GGCGCUACGCCUUCUCAGU	537	110 正	GAGGCACCACUGCCACCGCG	592
620 正	GGACGACAGCGACAACUCCA	538	1082 正	GCCACCUUJAGGGUGAUAGC	593
1239 逆	CAGAAUCUUGUCUGGUCAG	539	456 正	GUUGCCUGGAGCCGUCCUGC	594
1229 逆	UCUCGGUCAGUGGGAUUGCU	540	1391 逆	AAAAAGCGAUCUJAGAUACC	595
1584 正	CCCCCAACAGCCGCCCGGA	541	414 正	GCACCUCCAAAGUCGGCCAAA	596
481 逆	GGUUGUAAAGUUUUUACGGA	542	1182 正	CUAUUACCUAAGUAGGUCCC	597
1625 逆	AAGGGAGCGGCCGCGACCGC	543	192 正	GGCGCAGGAAGGGAACGGA	598
1896 正	CGCCUCUGCGGGGACUCGCG	544	875 正	UCCAGCGGGCAGUCGCCAC	599
1661 逆	CGCAACCCGUGCGUCGCCGG	545	1830 正	GGUGGUCAGGGCCGUGAAGC	600
383 正	UGAGAUAAUGGGGAUGCUAA	546	214 逆	GGGUGCACGUCCACAGCUCA	601
472 正	AAGUGCAUAGUGCUAAAAAC	547	1724 逆	CAUGCACUUGUCUGUAGUUA	602
614 逆	UAUUCAGUJAGAUAAACUCG	548	1070 正	GUGUAUJAAAGGCCACCUU	603
1376 逆	UCACCUAGACUACCUAAAAA	549	337 逆	CUGGCCAGUCAGUCAGUUU	604
166 正	CCAUAAAGAAACUAGUUUUG	550	850 逆	UUGUGGGAGACUGCCGGCUGG	605
409 逆	AUAGAGUAGAUCAAUUGCU	551	984 逆	UGAUCCUAAAGAAUUGAAGGU	606
1170 逆	UCUCCAGCCUCUCCUJAGCA	552	1086 逆	UGACUUCUGACUJUCAUUAU	607
1122 逆	CUACAUUUAUUCUUAAGGA	553	843 逆	AGACUGCCGGCUGGGAGGGU	608
1372 正	CUUAGGCCCUAAAAUCUCCU	554	1014 正	UUCAAUCCUJAGGAUCAUCU	609
268 逆	AAAUUCCUJUGCUJAAUUAUC	555	1348 正	UGAUUUUGCCAAGAACUJUGC	610
1836 逆	GCUGACAUUUUUGUJUGCUC	556	1703 逆	AGGAGUCCCGCCUJGCAA	611
183 正	UAUGAUGAAUGUGAUJUUUG	557	244 逆	AAAGCGAACUGCAUGUGUGAG	612
1260 逆	CCCAGGCAGCACUGACUACAG	558	945 逆	UACCUUGUGGUAJAGUGGG	613
1034 逆	GUCUUGAUGAGGUAAAAAGAG	559	1847 正	AAGCAAGAUGGCCACAGACU	614
1027 正	AAAAAUUCGUJACAAUJUAUG	560	1043 正	UUGCCAAGAGAGAGCAGCC	615
287 正	GUACUJAGAUJAAAGCAAU	561	50 逆	GGGCGACCGGGCCUCCAGG	616
101 逆	UUAUUUCUCUCCUJUGCAUA	562	131 正	AAGAGUUGGGCUCUGCAGCC	617
1201 逆	CCUACCCUGCCCCUUCUCCU	563	1217 正	AGAUACAUUCUJAGCACUAU	618
1284 正	CUGCUGAUGCAGUGCUGCCU	564	1763 逆	AGAAGCAAAGUACCACUAGA	619
429 逆	CACUJAGCACAGUACCUJACA	565	431 正	CAAAAUGAUGGGCAGUGAGC	620
355 正	ACUJAGAUJAGAGGGAAAG	566	1322 正	GCAUGGUUUUGGAAAAGUA	621

10

20

30

40

50

【表 2 - 2】

661 逆	UGCAGUUUUACAUAUAAAUGA	567	972 逆	AUUGAAGGUUUGGUAUUUGGA	622
1703 正	GUUGCGGAGGGUGGGCCUGGG	568	629 正	UGAGAGAUCAUUUAACAUIUA	623
1332 正	AAAAAUGUGAUGAUCAAAACU	569	1003 正	AAAUCCAUACCUUCAAUUCCU	624
1219 正	GGCAUUCUAAGGAGAAGGGGG	570	1244 正	UAAGAAAUGUAAAAAACCUUC	625
372 正	AAAGAAGGGUUUGAGAUAAUG	571	836 逆	CGGCUGGGAGGGUUGGGGGUG	626
192 正	UGUGAUAGUUUGGAGAAUAAA	572	1462 正	UCCCACUCUGUCACCCAGAGC	627
531 正	GCAGAUUCUAUGAAAGAAAAA	573	764 逆	UUUUUGGAACGCUAAGCUUGU	628
708 逆	UAUGAGCCACCGCACCCGGCC	574	829 逆	GAGGGUUGGGGGUGGGGGGUG	629
741 逆	CGCUUCGGCCUCCCAAAGUGC	575	1445 逆	CUGCACUCCAGCUCUGGGUGA	630
765 正	CCAGCACUUUGGGAGGCCGAA	576	755 正	CUUGGCGAUGACCUUGAGCAG	631
769 正	CACUUUGGGAGGCCGAAGCGG	577	1436 正	UUUCUUCUCUUUCUUUUGAGA	632
820 逆	UUUUGUGUUUUUAGUAGAGAC	578	1453 逆	UGGGGACACUGCACUCCAGCU	633
877 逆	UGUCUCAGCCUCCUGAGUAGC	579	1544 正	UUCUCUCAGCCUCCCAAGUAG	634
886 逆	CGAUUCUGUGUCUCAGCCUC	580	1570 逆	CUGAAAUAACAAAAAUCAG	635
905 正	CUACUCAGGAGGCUGAGACAC	581	1621 逆	GCGGGCGGAUCACCUAGAGGUC	636
918 逆	GCUCACUGCAACCUUCUGCCUC	582	1638 逆	CACUUUGGGAGGCAGAAGCGG	637
962 逆	UGCUCUUUCGCCAGGCUGGA	583	1666 正	CGCUUCUGCCUCCCAAAGUGC	638

10

20

【0089】

側面によっては、ガイドRNA分子は、表3または表4に記載される任意の配列の一部を含んでもよい。側面によっては、ガイドRNA分子は、表3に記載される任意の配列の最初の約20ヌクレオチドを含んでもよい。側面によっては、ガイドRNA分子は、表4に記載される任意の配列の最初の約21ヌクレオチドを含んでもよい。

【0090】

30

40

50

【表 3 - 1】

ガイドRNA 配列

配列名称	配列	配列番号	配列名称	配列	配列番号
1015 逆	UGUUCUAUAAUUUACUGACAUGG	639	1934 逆	GAGAAGCCCGGGCCGACCGCGG	903
1025 正	AAAAAAUCGUUACAAUUUUGG	640	1937 正	CGAACCCCGCCUGGAGGCCGCGG	904
1028 正	AAAUCGUUACAAUUUUGGUGG	641	1941 正	CCCCGCCUGGAGGCCGCGGUCGG	905
1037 逆	UCUUGAUGAGGUAAAAAGAGGG	642	1944 逆	GGUGCCUCCGGAGAAGCCCGGG	906
1038 逆	GUCUUGAUGAGGUAAAAAGAGGG	643	1945 逆	GGGUGCCUCCGGAGAAGCCCGGG	907
1039 逆	UGUCUUGAUGAGGUAAAAAGAGG	644	1946 正	CCUGGAGGCCGCGGUCGGCCCGG	908
103 逆	AAUUUCUCUCCUUUGCAUUAUUGG	645	1947 正	CUGGAGGCCGCGGUCGGCCCGGG	909
1049 逆	AGUAGUGCUGUCUUGAUGAGG	646	1948 正	UGGAGGCCGCGGUCGGCCCGGG	910
1059 逆	AGGGGACCUACUUAAGGUAAUAGG	647	1956 逆	GCGGUGGCAGUGGGUCCUCGG	911
1066 逆	CAAUUCAGGGGACCUACUUAAGG	648	1957 正	CGGUCGGCCGGGGCUUCUCGG	912
106 正	ACGGAGCGAGUCCCGCGCGCGG	649	1960 正	UCGGCCCGGGGUUCUCCGGAGG	913
1073 正	UUUUAAACCUAUUACCUAAGUAGG	650	1965 逆	CAACUCUUCGCGGUGGCAGUGGG	914
1077 逆	UAUCUGCUAGACAAUCCAGGGG	651	1966 逆	CCAACUCUUCGCGGUGGCAGUGG	915
1078 逆	GUUUCUGCUAGACAAUCCAGGG	652	1986 正	CCACUGCCACCGGAAGAGUUUGG	916
1079 逆	UGUUCUGCUAGACAAUCCAGG	653	1987 正	CACUGCCACCGGAAGAGUUUGG	917
1081 正	UAUUACCUAAGUAGGUCCCUUGG	654	199 正	UUUGGAGAAUAAUUGAAUAGG	918
1098 逆	UCCCUUUUUAUJAGGAAAGAAAGG	655	1 逆	CAGAGCCCAACUCUUCGCGGUGG	919
1107 逆	GACUGAAUCUCCUUUUUAUJAGG	656	203 正	GAGAAUAAUUGAAUAGGAAAGG	920
1116 正	CGCCUUUCUUCUUAUAAAGG	657	203 逆	CCAUUGCCCGGAGGGGUGACGG	921
1117 正	GCCUUUCUUCUUAUAAAGG	658	206 逆	AACUGAUCACAAAUCUCAGGG	922
1129 逆	CUACUACAUUAUUAUCUUAAGG	659	207 逆	UAACUGAUCACAAAUCUCAGG	923
1139 逆	CCAGCAACAGUGGACUCUAGAGG	660	209 正	AAAUUGAUGAGGAAGGCCUUGG	924
1149 逆	GAGAACAUUACCAGCAACAGUGG	661	209 逆	AAGCCCCAUUGCCGGGAGGGG	925
114 正	GCUAAAUUACCAUUAUGCAAAGG	662	210 逆	CAAGCCCCAUUGCCGGGAGGG	926
1159 正	CCUCUAGAGUCCACUGUUGCUGG	663	211 逆	ACAAGCCCCAUUGCCGGGAGG	927
1168 逆	GCCUCUCCUUGAGCAGAGGAUGG	664	216 逆	GGUUCACAAGCCCCAUUGCCGG	928
116 逆	GGUGCAGUCCACAGCUCAGGG	665	217 正	UGAGGAAGGCCUUGGAGAUUUGG	929
1172 逆	UCCAGCCUCUCCUUGAGCAGAGG	666	217 正	GCGCAUCCGUCACCCUCGCGGG	930
1178 正	CUGGUAAUUGUUCUUAUUAAGG	667	223 正	CCGUCACCCUCGCGGCAUUGG	931
117 逆	GGGUGCACGUCCACAGCUCAGG	668	224 正	CGUCACCCUCGCGGCAUUGGG	932
1182 正	UUAAAGCCAUCCUCUGCUAAGG	669	225 正	GUCACCCUCGCGGCAUUGGGG	933
1187 正	GCCAUCUCUGCUCUAGGAGAGG	670	226 正	UCACCCUCGCGGCAUUGGGG	934
1191 正	UCCUCUGCUCUAGGAGAGGUCUGG	671	237 逆	GCCCAGUCAGUCAGGUUUGGGG	935
1193 逆	UCCACAAAACCAUUCUGAUAGG	672	238 逆	GGCCAGUCAGUCAGGUUUGGG	936
1197 正	GCUCAAGGAGAGGCUUGGAGAAGG	673	239 逆	UGGCCAGUCAGUCAGGUUUGGG	937
1203 正	AAAUUUUUUCCUUAUCAGCAUGG	674	240 逆	CUGGCCAGUCAGUCAGGUUUGG	938
1207 正	AGGCGGAGAAGGCAUUCUJAGG	675	243 逆	AAGACUUGGCACUUUAUUGUGG	939
1211 正	UCCUUAUCAGCAUGGUUUUGUGG	676	245 逆	GCACACUGGCCAGUCAGUCAGG	940
1213 正	GAGAAGGCAUUCUJAGGAGAAGG	677	255 正	AACCCCAAACCUJAGUCAGUCUGG	941
1214 正	AGAAGGCAUUCUJAGGAGAAGG	678	256 正	ACCCCAAACCUJAGUCAGUCUGG	942

10

20

30

40

50

【表 3 - 2】

1215 正	GAAGGCAUUCUAAGGAGAAGGGG	679	257 逆	AUAAUCUUGAGUACAAGACUJGG	943
1216 正	AAGGCAUUCUAAGGAGAAGGGG	680	259 逆	CCUGCCAAUJUGCAGCACACUJGG	944
1220 正	CAUUCUAAGGAGAAGGGGGCAGG	681	275 正	UGGGCCAGUJUGCUGCAAUJGG	945
1221 正	AUUCUAAGGAGAAGGGGGCAGG	682	279 正	CCAGUGUGCUGCAAUJGGCAGG	946
1221 正	CAUGGUUUUGUGGAAAAGUAAGG	683	287 正	UACUCAAGAUUUAAGCAAUJGG	947
1225 正	UAAGGAGAAGGGGGCAGGGUJGG	684	28 逆	CCUCGGCCCGAGAGACCCGGGG	948
1232 正	AAGGGGGCAGGGUAGGAACUCGG	685	290 正	CAAUJUGGCAAGAGACGUGAAGG	949
1234 逆	CAAGACUCUAGACAAGUUCUJGG	686	295 逆	UUCAUUUUGCCGACUJUGGAGG	950
1241 逆	GAAUCUJUGUCUGGUCAGUJGG	687	298 逆	CCAUCAUUUUGCCGACUJUGG	951
1242 逆	AGAAUCUJUGUCUGGUCAGUJGG	688	305 正	CGUGAAGGCACCUCAAAGUCGG	952
1250 逆	ACUACAGCAGAUCUJUGUCUGG	689	308 逆	GGCUCACUGCCAAUUCAUUUJGG	953
1257 正	AGAACUJUGUCUAGAGUCUJGG	690	318 正	CCAAAGUCGGCCAAAUAUJGG	954
126 正	CGGCGCAUJCCUGAGCUGUJGG	691	319 正	CAAAGUCGGCCAAAUAUJGG	955
127 正	GGCGCAUJCCUGAGCUGUJGG	692	31 正	GAGUJGGCUCUGUCAGCCGGGG	956
1281 逆	CUUUGUGAAAUAAGAUJCCAGG	693	329 逆	GGAACGGCUCAGGCAACCCGGG	957
1281 逆	AGAUCACCUJUGAUAACUJGG	694	32 正	AGUJGGCUCUGUCAGCCGGGG	958
1283 正	CUGCUGUAGUCAGUGCUGCUGG	695	330 正	AAAUGAAUJGGCAGUGAGCCGG	959
1284 正	UGCUGUAGUCAGUGCUGCUGGG	696	331 正	AAAUGAAUJGGCAGUGAGCCGG	960
1295 正	AGUAAGCCUCAGUUACUCAAGG	697	331 逆	UUUCCCUUCAUAUCUAAGUJGG	961
1308 逆	GUUUUGAUCAUCACAUUUUJGG	698	332 正	AAUGAAUJGGCAGUGAGCCGGGG	962
1332 正	AAAUGUGAUGAUCAAAACUJGG	699	338 逆	ACCCAGCAGGAACGGCUCAGG	963
1335 正	UUCUUCUCUUCUJUGAGACGG	700	340 正	GGCAGUGAGCCGGGUJGGCUGG	964
1341 逆	CCAGCUCUGGGUGACAGAGUJGG	701	345 逆	CGGGAGAACCACGCAGGAACGG	965
1342 逆	UCCAGCUCUGGGUGACAGAGUJGG	702	346 正	UAGUGCCUACUJAGAUJGGAGG	966
1353 逆	GGACACUGCACUCCAGCUCUGGG	703	347 正	AGUGCCUACUJAGAUJGGAGGG	967
1354 正	GAAUJAGUUCUJUGUCUJGG	704	348 正	GUGCCUACUJAGAUJGGAGGGG	968
1354 逆	GGGACACUGCACUCCAGCUCUGG	705	350 逆	GAAGACGGGAGAACCACGCAGG	969
1357 逆	GAAUUCACAGGAAGAUUUJGG	706	356 正	UUAGAUJGGAGGGGAAAGAGG	970
1358 逆	GGAAUUCACAGGAAGAUUUJGG	707	356 正	UGCCUGGAGCCGUJCCUGCUGG	971
1361 正	CCCACUCUGCACCCAGAGCUGG	708	357 正	UAGAUJGGAGGGGAAAGAGGG	972
1369 逆	ACCUUAAAAUJGGAAUJUCAGG	709	357 正	GCCUGGAGCCGUJCCUGCUGGG	973
1374 逆	GGUJGCAGUGAGCCAAGAUJGGG	710	364 逆	GGCAACAAAAGCGGAAGACGGG	974
1375 逆	AGGUJGCAGUGAGCCAAGAUJGG	711	365 逆	AGGCAACAAAAGCGGAAGACGG	975
1376 逆	GAGGUJGCAGUGAGCCAAGAUJGG	712	372 正	AAGAAGGUUJGGAGAUJGG	976
1379 逆	CACCUJGCAGUACCUUAAAAUJGG	713	372 逆	CCAUAAAAGGCAACAAAAGCGG	977
137 逆	GCAUGUGAGCCGAGUCCUGGG	714	373 正	AGAAGGUUJGGAGAUJGG	978
1382 正	GGAGUGCAGUGCCCAUCUJGG	715	385 逆	AGUJGUAAUACAACCAUJGG	979
1388 正	UCCUGUGAAUJCCAUUUUAAGG	716	388 正	AAUGUGGGAUGCUAAGAAUJGG	980
138 逆	UGCAUGUGAGCCGAGUCCUGG	717	391 正	GUGGGAUGCUAAGAAUJGG	981
1395 逆	GCUAGAAACCGAGGAGCAGAGG	718	392 正	CCGCUUUUJGGUJCCUJGG	982
1397 正	UUCCAUUUUUAAGGUJAGUCAGG	719	40 正	UCUGUCAGCCGGGUCUCJGG	983
1401 逆	AAAUCGCUJAGAAACCGAGGAGG	720	413 逆	CUCAACAAAUCUGCAGAGCAGG	984
1404 逆	UAUCCUCJGCAGACCAACCGGG	721	41 正	CUGUCAGCCGGGUCUCJGG	985
1404 逆	GAGAAAUCGCUJAGAAACCGAGG	722	42 正	UGUCAGCCGGGUCUCJGG	986

10

20

30

40

50

【表 3 - 3】

1407 正	CACUGCAACCUUGCCUCUCGG	723	434 正	CUGCUCUGCAGAUUUUGUUGAGG	987
140 正	GAAAUUAAAAGAUUUAAAAGCAGG	724	439 正	UUUAGCAUCUACUCUAUGUAAGG	988
140 正	GAGCUGUGGGACGUGCACCAGG	725	43 正	GUCAGCCGCGGGUCUCUCGGGG	989
1411 正	UAGUCGAGGUGAACCGCUCUGG	726	448 逆	GACUGGUCGAGAUUACCUUGGG	990
1421 正	GAACCGCUCUGGUCUGCAGAGG	727	449 逆	GGACUGGUCGAGAUUACCUUGGG	991
1431 逆	UGUAAACCCAGCUACUUGGGAGG	728	452 正	UGAGGUUUUUGCUCUCCCAAGG	992
1433 正	GUCUCGAGAGGAUAGAAAAAGG	729	465 逆	CCACACCCCGUUGAGGGGACUGG	993
1434 逆	GCCUGUAAACCCAGCUACUUGGG	730	470 逆	UUCUCCACACCCCGUUGAGGGG	994
1435 逆	UGCCUGUAAACCCAGCUACUUGGG	731	471 逆	GUUCUCCACACCCCGUUGAGGGG	995
1436 逆	AACUAACUUGAGGUUAUCAGAGGG	732	472 正	AGUGCAAUAGUGCUAAAAACAGG	996
1437 逆	AAACUAACUUGAGGUUAUCAGAGGG	733	472 逆	UGUUCUCCACACCCCGUUGAGGG	997
1444 正	CUCUCAGCCUCGCAAGUAGCUGG	734	478 正	AUCUCGACCAGUCCCUCAACGG	998
1445 正	UCUCAGCCUCCCAAGUAGCUGGG	735	479 正	UCUCGACCAGUCCCUCAACGGG	999
1446 逆	UUAAAGGUGAAACUAAACUUGAGG	736	480 正	CUCGACCAGUCCCUCAACGGGG	1000
1453 正	UCCCAAGUAGCUGGGUUUACAGG	737	485 正	CCAGUCCCUCAACGGGGUUGGG	1001
145 逆	AUCAUAACAUAUUUCCUUAUGG	738	486 正	CAGUCCCUCAACGGGGUUGGG	1002
1462 逆	UUACUUCGACCUUUUAAAGG	739	488 逆	CCAGGUUGUAAAGUUUUUACGG	1003
1462 逆	AAAAAUACGCCGGGUUGGUGG	740	48 正	CCGCGGGUCUCUCGGGGGCGAGG	1004
1465 逆	ACAAAAAUACGCCGGGUUGGUGG	741	49 正	CGCGGGUCUCUCGGGGGCGAGGG	1005
146 正	UGGGACGUGCACCAGGACUCGG	742	4 逆	UGACAGAGCCCAACUCUUCGCGG	1006
1470 逆	AAAAUACAAAAAUACAGCGGG	743	506 逆	UUUCUUCAUAGCAUCUGCCAGG	1007
1471 逆	GAAAAUACAAAAAUACAGCGGG	744	508 正	CCGUAAAAACUUUACAACCUUGG	1008
1472 正	GUUAGUUUACCUUUUAAAGAAGG	745	530 正	GCAGAUUCUUAUGAAAGAAAAAGG	1009
1472 正	CAGGCACACACCACUACCCGG	746	531 正	CAGAUUCUUAUGAAAGAAAAAGGG	1010
1476 正	GUUACCUUUUAAAGAAGGUCGG	747	532 正	AGAUGCUAUGAAAGAAAAAGGGG	1011
1495 逆	CCCUCCGACGUCGGGAAGG	748	536 正	GCUAUGAAAGAAAAAGGGGAUGG	1012
1500 逆	CGUUGCCCUUCGCGACGUCGGGG	749	537 正	CUAUGAAAGAAAAAGGGGAUGGG	1013
1501 逆	ACGUUGCCCUUCGCGACGUCGGGG	750	549 正	AAGGGGAUGGGAGAGAGAAGG	1014
1502 正	UAAAGACGCAAGCCUUUCCCGG	751	54 正	GUCUCUCGGGGGCGAGGGCGAGG	1015
1502 正	UUUUGUAUUUCAGUAAAGUUGG	752	552 正	GGGAUGGGAGAGAGAAGGAGG	1016
1503 正	UUUGUAUUUCAGUAAAGUUGGG	753	553 正	GGAUUGGGAGAGAGAAGGAGGG	1017
1507 正	UAUUUCAGUAAAGUUGGGCAGG	754	561 正	UAGAAGAUCAAUAUGAACAUUGG	1018
150 正	AUUUAAAAGCAGGAGCCUAAGG	755	563 正	GAGAGAAGGAGGAGAGAGAUGG	1019
1510 正	CAAAGCCUUUCGGGACGUCGGG	756	568 正	AAGGAGGAGAGAGAUUGGAGAGG	1020
1511 正	UUCAGUAAAGUUGGGCAGGUCGG	757	569 正	AGGAGGAGAGAGAUUGGAGAGGG	1021
1514 正	GCCUUUCCCGGACGUCGGAAGG	758	574 逆	CAUAAACCGAUACCAUUAAAGG	1022
1514 逆	CACCUAGAGGUCAGGAGUUCGAGG	759	57 正	AACAAGCGCUAUGACUAGCAAGG	1023
1515 正	CCUUUCCCGGACGUCGGGAAGGG	760	581 正	UGGAAAUUGUGUCCUUUAAUGG	1024
1523 逆	CGGGCGGAUCACCUAGGUCAGG	761	588 正	UGUGUCCUUUAAUGGUCUUCGG	1025
1524 逆	UCCAUUUCGGCCAUGAGGAAGG	762	597 逆	AAAAAGAAACUUAACCUUCUGG	1026
1528 逆	AAGUCCAUUUCGGCCAUGAGG	763	598 正	UUUACUUUUCUUCAGAUUCGAGG	1027
1528 逆	AGAAGCGGGCGGAUCACCUAGAGG	764	601 正	UGGUCAUCGGUUUUAUGCCAGAGG	1028
1532 正	GGCCUCGAACUCCUAGCCUCAGG	765	602 逆	CUCCGUGGAGUUGUCGUCUCGG	1029
1533 正	AAGGGCAACGUCCUUCUCAUGG	766	60 正	CGGGGGCGAGGGCGAGGUUCAGG	1030

10

20

30

40

【表 3 - 4】

1536 逆	GGAAAUJAAAGUJCCAUIUCCGG	767	617 逆	AUUCAGUJAGAUAAACUCCGUGG	1031
1537 正	GCAACGUCUJCCUUAUGGCCGG	768	620 正	GACCGACAGCGACAACUCCACGG	1032
1539 逆	CUUJGGGAGGCAGAAGCGGGCGG	769	632 逆	ACUGCUAAGGUCAUCGCCAAGG	1033
1542 逆	GCACUJUGGGAGGCAGAAGCGGG	770	635 正	UUUUUJGAAAAUJAGACCUJGG	1034
1543 正	UCCUJCCUUAUGGCCGGAUAUGG	771	63 逆	UCCCUJCCUUGCGGCCUGAAAGG	1035
1543 逆	AGCACUJUGGGAGGCAGAAGCGG	772	644 逆	GGGUUAUJCCUACUGCUCAAGG	1036
1552 逆	UGUAUJCCAGCACUJUGGGAGG	773	655 正	UGGCGAUGACCUUGAGCAGUAGG	1037
1555 逆	GCCUGUAUJCCAGCACUJUGGG	774	663 逆	CAGUUUJACAUUAAUUGACAGG	1038
1556 逆	CGCCUGUAUJCCAGCACUJUGG	775	664 逆	UJGGAACGCUAAGCUUGUGGGG	1039
1557 逆	GCGGGCUGGUJGGGGGAACGGG	776	665 逆	AUJGGAACGCUAAGCUUGUGGGG	1040
1558 逆	GCGGGCUGGUJGGGGGAACGGG	777	666 逆	UAUJGGAACGCUAAGCUUGUGGG	1041
1563 逆	UCUCGGGCGGGCUGGUJGGGGG	778	667 逆	UJAUJGGAACGCUAAGCUUGUGG	1042
1564 逆	CUCUCGGGCGGGCUGGUJGGGGG	779	683 逆	UAUGCCUJAGUJCCGUUAUJGG	1043
1565 正	GCUUCJGCCUCCAAAGUGCUGG	780	68 正	UGACUJAGCAAGGUJAAAGUGAAGG	1044
1565 逆	UCUCJCGGGCGGGCUGGUJGGGG	781	690 正	CAAGCUJAGCGUCCAAUACCGG	1045
1566 正	CUUCJGCCUCCAAAGUGCUGGG	782	694 正	UAUGJAAAACUGCACUUAUCUGG	1046
1566 逆	CUCUCJCGGGCGGGCUGGUJGGG	783	697 逆	CGGGCGGGAUUUUUAUUAUGG	1047
1567 逆	ACUCUCJCGGGCGGGCUGGUJGG	784	699 正	CGUCCAAUACGGAACACUJAGG	1048
1571 逆	AGUCACUCUCJCGGGCGGGCUGG	785	69 正	GGGCGAGGUJACGGCCUUCAGG	1049
1574 正	UCCCAAAGUGCUGGGAUJACAGG	786	713 正	CUJGGCAUJUAUAAAAUUCGCGG	1050
1575 逆	UGAGAGUCACUCUCJCGGGCGGG	787	714 正	ACACUJAGGCAUUAUGAAAGACGG	1051
1576 逆	GUGAGAGUCACUCUCJCGGGCGG	788	716 逆	CAGGUJAGGCCACCGCACCCGG	1052
1579 逆	CUCGUGAGAGUCACUCUCJCGGG	789	717 正	CCAUUAUAAAAUJCGCGGCGGG	1053
1580 逆	UCUCGUGAGAGUCACUCUCJCGG	790	718 正	CAUUAUAAAAUJCGCGGCGGG	1054
1583 逆	GGAUJUJAGUCCCGCACGGUGG	791	71 逆	ACUUJAAAGCCUJUCAGUCCUGG	1055
1586 逆	AAGGAUCUJAGUCCCGCACGG	792	723 正	UAAAAUJCGCGCCGGGUGCGG	1056
1591 正	UACAGGCGUGAGCCACCGUGCGG	793	726 正	AAAUJCGCGCCGGGUGCGGUGG	1057
1592 正	ACAGGCGUGAGCCACCGUGCGGG	794	72 逆	UCGCUCCGUJCCUJCCUJCGGG	1058
1593 正	CAGGCGUGAGCCACCGUGCGGGG	795	731 逆	AGGGUJGGGGGUGGGGGUGUGG	1059
1604 逆	AUJGGCCAAGUCAGUCUCJCGCGG	796	735 逆	UCCCAAAGUCUGGGAUJACAGG	1060
1604 逆	GAGUCCCGCCCUJGCAAAAGGG	797	736 逆	CUJGGAGGGUJGGGGUGGGGG	1061
1605 逆	GGAGUCCCGCCCUJGCAAAAGGG	798	737 逆	GCUJGGAGGGUJGGGGUGGGGG	1062
1614 正	GGACUJAGAUCCUJUUJGCAAGG	799	738 逆	GGCUJGGAGGGUJGGGGUGGGG	1063
1615 正	GACUJAGAUCCUJUUJGCAAGGG	800	739 逆	CGGCUJGGAGGGUJGGGGUGGG	1064
1618 正	UAAGAUCCUJUUJGCAAGGGCGG	801	73 正	AGCAAGGUJAAAGUGAAGGCCAGG	1065
1619 正	GAGAGCCGAGAGUCAGCUJGG	802	740 逆	CCGGCUJGGAGGGUJGGGGUGG	1066
1619 正	AAGAUCCUJUUJGCAAGGGCGGG	803	743 逆	CUJCGGCCUCCCAAAGUGCUGGG	1067
1620 正	AGAUCCUJUUJGCAAGGGCGGGG	804	743 逆	CUJCGGCCUJGGAGGGUJGGGG	1068
1622 逆	CGGCGCCGACCGCACGGAUJGG	805	744 逆	GCUJCGGCCUCCAAAGUGCUGG	1069
1626 逆	AUGCACUJUGUCUJAGUJCAAGG	806	744 逆	ACUGCGGGCUGGAGGGUJGGGG	1070
1627 逆	GGGAGCGGCGCGACCGCACGG	807	745 逆	GACUGCGGGCUGGAGGGUJGGG	1071
1632 正	GUCAGCUJGGCCAAUCCGUGCGG	808	746 逆	AGACUGCGGGCUGGAGGGUJGG	1072
1636 正	GCUJGGCCAAUCCGUGCGGUCGG	809	74 正	GCAAGGUJAAAGUGAAGGCCAGGG	1073
1639 正	UJGGCAAUCCGUGCGGUCGGCGG	810	750 逆	UGGGAGACUGCCGGCUGGGAGGG	1074

10

20

30

40

50

【表 3 - 5】

1642 逆	GAGUCGGCUUUAUAAGGGAGCGG	811	751 逆	GUGGGAGACUGCCGGCUGGGAGG	1075
1647 逆	CGGGCGAGUCGGCUUUAAGGG	812	753 正	UACCUGUAUCCAGCACUUJGG	1076
1648 逆	CGGGCGAGUCGGCUUUAAGGG	813	754 正	ACCUGUAUCCAGCACUUJGG	1077
1658 逆	CGGUGGGCUGCCGGGGAGUCGG	814	754 逆	CUUGUGGGAGACUGCCGGCUGGG	1078
1665 逆	GAAGCAAAAGUACCACUAGAUJGG	815	755 逆	UCUUGUGGGAGACUGCCGGCUGG	1079
1666 逆	CCGCAACCCGGUGCGCUGCCGGG	816	757 正	UGUAUCCAGCACUUJGGGAGG	1080
1667 逆	UCCGCAACCCGGUGCGCUGCCGG	817	759 逆	CAAUUCUUGGGAGACUGCCGG	1081
1668 正	CCUUUAUAAGCCGACUCGCCCGG	818	760 正	CCACCCCAACCCUCCAGCCGG	1082
1673 正	UUUGUUCUJACUCCAUCUJAGUGG	819	760 逆	CUCAAGUGAUCCACCGCUUCGG	1083
1678 逆	CAGGCCACCCUCCGCAACCCGG	820	766 正	AGCACUUJGGGAGGCCGAAGCGG	1084
1679 正	CGACUCGCCCGGAGCGCACCCGG	821	767 正	GCACUUJGGGAGGCCGAAGCGGG	1085
1680 正	GACUCGCCCGGAGCGCACCCGG	822	769 逆	AAAUAGAGCCAAUUCUJUGUGG	1086
1686 正	CCCGGAGCGCACCGGGUJGCGG	823	76 正	GUUCAGGCCUUUCAGGCCGAGG	1087
1689 正	GGCAGCGCACCGGGUJGCGGAGG	824	770 正	CUUUGGGAGGCCGAAGCGGGUGG	1088
1689 逆	CACCACAAUUGUJAAAUJUGUGG	825	770 逆	GAAUUCAGAGCCAAUUCUJUGUGG	1089
1690 正	GCAGCGCACCGGGUJGCGGAGGG	826	780 正	CGGCAGUCUCCACAAGAAUJGG	1090
1693 正	GCGCACCGGGUJGCGGAGGGUGG	827	783 逆	CAGGCUGGUCUGGAACGCCAGGG	1091
1694 正	CGCACCGGGUJGCGGAGGGUGGG	828	784 逆	CCAGGCUGGUCUGGAACGCCAGG	1092
1697 逆	AAUJGGCCACCACCCUCCAGG	829	786 正	GGGUGGUAUCUJGAGCCUJGG	1093
1699 正	CGGGUJGCGGAGGGUGGGCCUGG	830	792 逆	CCAUJAGCUUUAUUUCUJAAAGG	1094
1700 正	GGGUJGCGGAGGGUGGGCCUJGG	831	798 逆	UUUCACCAUGUJGCCAGGCUGG	1095
1703 正	UJGCGGAGGGUGGGCCUJGGGAGG	832	802 逆	GGGGUUUCACCAUGUJGCCAGG	1096
1704 正	UGCGGAGGGUGGGCCUJGGGAGGG	833	804 正	CCUJGCGUJCGAGACCAGCCUGG	1097
1705 正	GCGGAGGGUGGGCCUJGGGAGGG	834	805 正	CUJGGCUJCGAGACCAGCCUGGG	1098
1707 正	CUCCACAUUJACAACAUUJUGUGG	835	812 正	CCUUJAGAAAAUJAGCUJAAUGG	1099
1708 正	GAGGGUGGGCCUJGGGAGGGUGG	836	813 正	CGAGACCAGCCUGGGCAACUJGG	1100
170 逆	UCGGCGUJCCCCCACCAACAGG	837	815 逆	UUUGUJUCUJUCAACCUJAGUGGG	1101
1710 正	CACAUUJACAACAUUJUGUGUGG	838	816 逆	GUUUGUJUCUJUCAACCUJAGUGG	1102
1711 正	GGUGGGCCUJGGGAGGGUGGUGG	839	821 正	AAAUJAGCUJAAUGGCCACUJAGG	1103
1714 逆	AGUJAGGGUJAGACAAAAAUJGG	840	821 逆	UGUGUJUUJAGUJAGAGACGGGG	1104
1716 正	UACAACAUUJUGGGUGGUGCAGG	841	822 逆	UUUGUJUUUJAGUJAGAGACGGGG	1105
1717 正	ACAACAUUJUGGGUGGUGCAGGG	842	823 逆	UUUGUJUUUJAGUJAGAGACGGG	1106
1720 逆	CUJGUGCCAUUCUJGCUJACCGG	843	824 逆	UUUUGUJUUUJAGUJAGAGACGG	1107
1729 逆	GCCUJAGCCCUJUCUAGUJAGGG	844	82 正	GCCUJAGCCCGCAGGAAGAGG	1108
1730 逆	CGCCUJAGCCCUJUCUAGUJAGG	845	839 正	CUJAGGUJAGAAACAAACAGG	1109
1734 正	GCAGGGCCGUGAAGCAAGAAUJGG	846	83 正	AGUGAAGGCCAGGGACUGAAAGG	1110
1737 逆	AGAAAAACAUJCCGAGUCUGUGG	847	842 逆	GUJGUGAUJAGUGGGCAGAAUGG	1111
1741 正	UUUGCUJACCCUJACUJGAGAAGG	848	850 逆	AUJACCUJUGCGUGAUJAGUGGG	1112
1742 正	UGUCUJACCCUJACUJGAGAAGGG	849	851 逆	AAUJACCUJUGCGUGAUJAGUGG	1113
1745 正	AAGCAAGAUJGGCCACAGACUGG	850	853 正	CUAAAAACAAAAACUJAGCUGG	1114
1746 正	AGCAAGAUJGGCCACAGACUGGG	851	854 正	UAAAAACAAAAACUJAGCUGGG	1115
1748 正	ACCCUJACUJGAGAAGGGCGUJAGG	852	859 正	ACAAAAACUJAGCUGGGCGUGG	1116
1753 逆	GCGCGGGGAGCAAAAGCACGG	853	862 正	CAAAAAACUJAGCUGGGCGUGG	1117
175 正	CAUGCAGUJCGCUJCCUGUJGG	854	866 正	AACUJAGCUGGGCGUGGCGAGG	1118

10

20

30

40

【表 3 - 6】

1766 逆	AGCGAGAAAAACAGCGCGCGGG	855	866 正	UCUGCCACUUAUCACGACAAGG	1119
1767 逆	CAGCGAGAAAAACAGCGCGCGGG	856	871 逆	UCCUGAGUAGCUGGGAUUACAGG	1120
1768 逆	UCAGCGAGAAAAACAGCGCGCGGG	857	874 逆	UUGAAGGUUAGGUAUUGGGACGG	1121
178 正	GCAGUUCGCUUUCUGUUGGUGG	858	878 逆	GGAAUUGAAGGUUAGGUAUUGGG	1122
1798 正	UUUUUCGCGUACUUUCAGCGGG	859	879 逆	UCUCAGCCUCCUGAGUAGCUGGG	1123
1799 正	UUUUCGCGUACUUUCAGCGGG	860	879 逆	AGGAAUUGAAGGUUAGGUAUUGG	1124
179 正	CAGUUCGCUUUCUGUUGGUGGG	861	87 正	UCAGGCCGCGAGGAAGGAACGG	1125
1802 正	UCUCGCGUACUUUCAGCGGGCGG	862	880 逆	GUCUCAGCCUCCUGAGUAGCUGG	1126
180 正	AGUUCGCUUUCUGUUGGUGGG	863	885 逆	AUCCUAAGGAAUUGAAGGUUAGG	1127
1810 逆	CGGUGGAAAGCGCGAGGCCGAGG	864	890 正	GCCUGUAUCCAGCUACUCAGG	1128
1813 正	UUCAGCGGGCGGAAAGCCUCGG	865	890 逆	AGAUGAUCCUAGGAAUUGAAGG	1129
1816 逆	AAUGAACGGUGGAAAGCGCGAGG	866	893 正	UGUAUCCAGCUACUCAGGAGG	1130
181 正	UUUUGAUGAAUUGUAGUUGG	867	899 逆	ACUACCCAGAUUCCUAAGG	1131
181 正	GUUCGCUUUCUGUUGGUGGG	868	903 正	AUCCAUACCUAAUCCUJAGG	1132
1820 逆	CUAGAUGAACGGUGGAAAGCGGG	869	912 正	UUCAAUCCUJAGGAUCAUCUGG	1133
1823 逆	GCUCUAGAUAACGGUGGAAAGG	870	913 正	UCAAUUCCUJAGGAUCAUCUGG	1134
1827 逆	GUUUGCUCUAGAUAACGGUGG	871	914 正	CAAUUCUJAGGAUCAUCUGGG	1135
182 正	UUCGCUUUCUGUUGGUGGGGG	872	915 正	AAUUCUJAGGAUCAUCUGGGGG	1136
1830 逆	UUUGUUGCUCUAGAUAACGG	873	919 逆	CACUGCAACCUUGCCUCCGG	1137
1866 正	AAACAAAAAUUGCAGCUGCUGG	874	920 逆	UCACUGCAACCUUGCCUCCGG	1138
1869 逆	GGUCCCGGGAGGGCGAACCGGG	875	921 正	ACACGAGAAUCGCUUGAACCGGG	1139
1870 逆	AGUCCCGGGAGGGCGAACCGGG	876	922 正	CACGAGAAUCGCUUGAACCGGG	1140
1877 逆	CCGCCGAGGUCCCGGGAGGG	877	924 逆	CCCUGGCUUCUCUCUCUUGG	1141
1878 逆	CCGCCGAGGUCCCGGGAGGG	878	925 正	GAGAAUCGCUUGAACCGGGAGG	1142
1879 逆	ACCGCGCAGGUCCCGGGAGGG	879	931 正	CGCUUGAACCGGGAGGCAGAGG	1143
1882 逆	GCGACCGCGCAGGUCCCGGG	880	940 逆	GGCUUUUAUACACACCCUUG	1144
1883 逆	GGCGACCGCGCAGGUCCCGGG	881	942 正	UGCCAAGAGAGAGCAGCCAGG	1145
1884 正	GCUGGCCGCUUGCCCUCCCGGG	882	943 正	GCCAAGAGAGAGCAGCCAGGG	1146
1885 正	CUGCCCGUUCGCCCUCCCGGG	883	944 正	CCAAGAGAGAGCAGCCAGGG	1147
1886 正	UGGCCGCUUGCCCUCCCGGG	884	944 逆	GGAGUCUAGUGGGGUGAUCUCGG	1148
1890 逆	CUGGGAGGGACCGCGCAGG	885	955 逆	CCAGGCUUGAUGGAGUCUAGUGG	1149
1894 正	UCGCCCUCCCGGGACCUUGCGGG	886	958 正	AGCCAGGGUGUGUAUUAAGG	1150
1897 正	CCCUCCCGGGACCUUGCGGG	887	961 逆	CAGGCUAUCACCUAAAGGUGG	1151
1898 正	CCUCCCGGGACCUUGCGGG	888	962 逆	UCAGGCUAUCACCUAAAGGUGG	1152
189 逆	GGGUGACGGAUUGCACGAUCGG	889	965 逆	GCUCUUUGCCAGGCUUGGAUGG	1153
1904 逆	GCGGGUUCGGGGGCUUGGCGAGG	890	965 逆	GAUUCAGGCUAUCACCUAAAGG	1154
1908 逆	CCAGGCGGGUUCGGGGCUGGG	891	969 逆	UCUUGCUCUUCGCCAGGCUUG	1155
1909 逆	UCCAGGCGGGUUCGGGGCUGG	892	970 正	GUUAUUAAGGCCACCUUAGG	1156
1913 逆	GGCCUCAGGCGGGUUCGGGG	893	971 正	UAUAUUAAGGCCACCUUAGG	1157
1914 逆	CGGCCUCCAGGCGGGUUCGGGG	894	973 逆	GGAGUCUUGCUCUUCGCCAGG	1158
1915 逆	GCGGCCUCCAGGCGGGUUCGGGG	895	975 正	CCACUAGACUCCAUCCAGCCUGG	1159
1916 逆	CGCGCCUCCAGGCGGGUUCGGGG	896	976 正	CACUAGACUCCAUCCAGCCUGG	1160
1921 逆	CCGACCGCGCCUCCAGGCGGG	897	97 逆	AGGAAUCGCGCCGCGCGGG	1161
1922 逆	GCCGACCGCGCCUCCAGGCGGG	898	980 逆	ACUUCAAUCAUCAGGAUUCAGG	1162

10

20

30

40

【表 3 - 7】

1923 逆	GGCCGACCGGGCCUCCAGGCGG	899	987 逆	ACUUCUGACUUAUCAUCAGG	1163
1926 逆	CCGGGCGGACCGGGCCUCCAGG	900	98 逆	CAGGAAUCGGCCGCGCGGG	1164
1928 正	CCCAGCCCCGAACCCCGCCUGG	901	994 逆	AACGAUUUUUUUUGAGACGG	1165
1931 正	AGCCCCGAACCCCGCCUGGAGG	902	99 逆	UCAGGAAUCGCGCCGCGCGGG	1166

【表 4 - 1】

ガイド RNA 配列

配列 名称	配列	配列 番号	配列 名称	配列	配列 番号
1420 正	GUUAACCGGUCUGGUCUCAGAGGAU	1167	967 逆	AGUCUUGCUCUUCGCCAGGCUGGAU	1222
1591 逆	GCUGACUCUCGCGGCUCUGGAGAGU	1168	991 逆	UAACGAUUUUUUUUUUGAGACGGAGU	1223
634 正	AACUCCACGGAGUUUAUCUAACUGAAU	1169	94 逆	GCCCAACUCUUCGCGGUGGCAGUGGGU	1224
640 正	ACGGAGUUUAUCUAACUGAAUACGAGU	1170	302 逆	CCCAUUGCCGGCGAGGGUGACGGAU	1225
1688 正	CCGGCAGCGCACCGGGUUGCGGAGGGU	1171	997 逆	AACUACCCCAAGAUUCCUAAGGAU	1226
716 正	GGCAUUAUAAAAUUCGCGGCGGGU	1172	237 逆	ACUGCAUGUGAGCCGAGUCCUGGGU	1227
1608 正	AGUGACUCUCACGAGAGCGCGAGAGU	1173	309 逆	CACAAGCCCCAUUGCCGGCGAGGGU	1228
1678 正	GCCGACUCGCGCGCAGCGCACCGGGU	1174	579 正	GAUCUCGACCAGUCCCCUCAACGGGU	1229
1728 逆	GGGCGCUACGCCUUCUCAGUUAAGGGU	1175	110 正	GAGGCACCACUGCCACCGGAAGAGU	1230
620 正	GGACCGACAGCGACAACUCCACGGAGU	1176	1082 正	GCCACCUUUAGGGUGAUAGCCUGAAU	1231
1239 逆	CAGAAUCUUGUCUCGGCUCAGUGGGU	1177	456 正	GUUGCCUGGAGCCGUUCUCUGCGUGGGU	1232
1229 逆	UCUCGGCUCAGUGGGUAGCGUCGAGU	1178	1391 逆	AAAAAGCGAUCUUAAGAUACCCUUGAGU	1233
1584 正	CCCCCAACCGCCCGCCGAGAGAGU	1179	414 正	GCACCUCAAAGUCGGCCAAAUGAAU	1234
481 逆	GGUUGUAAAGUUUUUACGGACAGAAU	1180	1182 正	CUAUUACCUAAGUAGGUCCCCUGGAU	1235
1625 逆	AAGGGAGCGCGCGGACCGCACGGAU	1181	192 正	GGCGCAGGAAGAGGAACGGAGCGAGU	1236
1896 正	CGCCCUCCCGGGACUUGCGGGGGU	1182	875 正	UCCAGCCGGCAGUCUCCACAAGAAU	1237
1661 逆	CGCAACCCGGUGCGCUGCGGGCGAGU	1183	1830 正	GGUGGUGCAGGGCCGUGAAGCAAGAAU	1238
383 正	UGAGAUAAUGUGGGAUGCUAAGAGAAU	1184	214 逆	GGGUGCACGUCCACAGCUCAGGGAU	1239
472 正	AAGUGCAAUAGUGCUAAAAACAGGAGU	1185	1724 逆	CAUGCACUUGUCUGUAGUUAAGGAGU	1240
614 逆	UAUUCAGUUAAGUAAACUCCGUGGAGU	1186	1070 正	GUGUAUUAAGGCCACCUUUAAGGGU	1241
1376 逆	UCACCUCGACUACCUUAAAAUUGGAU	1187	337 逆	CUGGCCAGUCAGUCAGGUUUGGGGGU	1242
166 正	CCAUAAGGAAACUAGUUAUGAUAAU	1188	850 逆	UUGUGGGAGACUGCCGGCUGGGAGGGU	1243
409 逆	AUAGAGUAGAUUAAUAGCUUUGAGU	1189	984 逆	UGAUCCUAAGGAUUAAGGAUUGGAU	1244
1170 逆	UCUCAGCCUCUCUUGAGCAGAGGAU	1190	1086 逆	UGACUUCGACUUAUUAUUAUAGGAU	1245
1122 逆	CUACAUUAUUAUCUUAAGGACUGAAU	1191	843 逆	AGACUGCCGGCUGGGAGGGUUGGGGGU	1246
1372 正	CUUAGGCCUAAAAUCUCCUGUGAAU	1192	1014 正	UUCAAUCCUUAAGGAUUAUUGGGGGU	1247
268 逆	AAAUCCUUAUUGCUUAUUAUUCUGAGU	1193	1348 正	UGAUUUUGCCAAGAACUUGUCUAGAGU	1248
1836 逆	GCUGACAUUUUUGUUGUCUCUAGAAU	1194	1703 逆	AGGAGUCCCGCCUUGCAAAAGGGAU	1249
183 正	UAUGAUGAUGUGAUUUGGAGAAU	1195	244 逆	AAAGCGAACUGCAUUGUGAGCCGAGU	1250
1260 逆	CCCAGGCAGCAGACUACAGCAGAAU	1196	945 逆	UACCUUGUCGUGUAAGUGGGCAGAAU	1251
1034 逆	GUCUJAGUAGAGUAAAAAGAGGGGAGU	1197	1847 正	AAGCAAGAUUGCCACAGACUGGGAAU	1252
1027 正	AAAAAUUGUUAACAAUUAUUGGUGGAU	1198	1043 正	UUGCCAAGAGAGAGAGCAGCCAGGGGU	1253
287 正	GUACUCAAGAUUAAGCAAUAGGAU	1199	50 逆	GGGCGACCGCGCCUCCAGGCGGGGU	1254
101 逆	UUAUUUCUCUCUUAUUGCAUUAUGGAU	1200	131 正	AAGAUUGGGCUCUGUCAGCCGCGGGU	1255
1201 逆	CCUACCCUGCCCCUUCUCCUUAAGAAU	1201	1217 正	AGAUACAUUUCUUAAGCAUUAUAGAAU	1256
1284 正	CUGCUGUAGUCAGUCUGCCUGGGAAU	1202	1763 逆	AGAAGCAAAGUACCACUAGAUUGGAGU	1257
429 逆	CACUJAGCACAGUACCUUACAUAGAGU	1203	431 正	CAAAUAGAUUGGCAGUAGCCGGGGU	1258

10

20

30

40

50

【表 4 - 2】

355 正	ACUJAGAUUGAAGGGGAAAGAAGGGU	1204	1322 正	GCAUGGUUUUGUGGAAAAGUAAGGAU	1259
661 逆	UGCAGUUUUACAUAUAAAUGACAGGAU	1205	972 逆	AUUGAAGGUUUGGAUUUGGGACGGAAU	1260
1703 正	GUJUGCGGAGGGUGGGCCUGGGAGGGGU	1206	629 正	UGAGAGAUCAUUUUACAUAUUUAUGAAU	1261
1332 正	AAAAAUGUGAUGAUCAAAACUAGGAU	1207	1003 正	AAAUCCAUAACCUUCAAUUCCUJAGGAU	1262
1219 正	GGCAUUCUAAGGAGAAGGGGGCAGGGU	1208	1244 正	UAAGAAAUGUAAAAAACCCUCUAGAGU	1263
372 正	AAAGAAGGGUUUGAGAUAAUUGGGGAU	1209	836 逆	CGGCUGGGAGGGUUGGGGGUGGGGGU	1264
192 正	UGUGAUAGUUUGGAGAAUAAUUGAAU	1210	1462 正	UCCACUCUGUCACCCAGAGCUGGAGU	1265
531 正	GCAGAUUCUAUGAAAGAAAAGGGGAU	1211	764 逆	UUUJUGGAACGCUAAGCUUGUGGGGU	1266
708 逆	UAUGAGCCACCGCACCCGGCCGCGAAU	1212	829 逆	GAGGGUUGGGGGUGGGGGUGUGGAU	1267
741 逆	CGCUUCGCCUCCCAAAGUGCUGGGAU	1213	1445 逆	CUGCACUCCAGCUCUGGGUGACAGAGU	1268
765 正	CCAGCACUUUGGGAGGCCGAAGCGGGU	1214	755 正	CUJGGCGAUGACCUJAGAGAGUAGGAU	1269
769 正	CACUUUGGGAGGCCGAAGCGGGUGGAU	1215	1436 正	UUUCUUCUCUJUCUUUUGAGACGGAGU	1270
820 逆	UUUUGUGUUUUUAGUAGAGACGGGGU	1216	1453 逆	UGGGGACACUGCACUCCAGCUCUGGGU	1271
877 逆	UGUCUCAGCCUCCUGAGUAGCUGGGAU	1217	1544 正	UUCUCUCAGCCUCCCAAGUAGCUGGGU	1272
886 逆	CGAUUCUGGUGUCUCAGCCUCCUGAGU	1218	1570 逆	CUGAAAAUACAAAAAAUACGCCGGGU	1273
905 正	CUACUCAGGAGGUCUGAGACAGGAAU	1219	1621 逆	GCGGGCGGAUCACCUGAGGUCAGGAGU	1274
918 逆	GCUCACUGCAACCUJUGCCUCCCGGGU	1220	1638 逆	CACUUUGGGAGGCAGAAGCGGGCGGAU	1275
962 逆	UGCUCUUUCGCCAGGCUGGAUGGAGU	1221	1666 正	CGCUUCUGCCUCCCAAAGUCUGGGAU	1276

10

20

【0091】

側面によっては、ガイドRNA分子は、当該技術分野で標準的な方法を用いて化学的に合成されてもよい。側面によっては、ガイドRNA分子は、ガイドRNA分子が少なくとも1つの化学修飾を含むように化学的に合成されてもよい。側面によっては、ガイドRNA分子は、限定はされないが、プラスミド鋳型を用いる生体外転写、PCR系鋳型を用いる生体外転写などの当該技術分野で標準的な生体外での転写法によって生成されてもよい。側面によっては、生体外での転写法は、生成されたガイドRNA分子が少なくとも1つの化学修飾を含むように実施してもよい。

30

【0092】

側面によっては、本開示の組成物のいずれかは、MS2外被タンパク質(MCP)の少なくとも一部分と少なくとも1つのトランス活性化分子を含む融合タンパク質をコードする少なくとも1つのmRNAおよび/またはポリヌクレオチドをさらに含んでもよい。側面によっては、少なくとも1つのポリヌクレオチドは、MS2外被タンパク質(MCP)の少なくとも一部分と、融合タンパク質の発現を駆動するのに十分な少なくとも1つのプロモーターに作動可能に連結される少なくとも1つのトランス活性化分子とを含む融合タンパク質をコードする核酸を含むプラスミドであってもよい。

【0093】

側面によっては、本開示の組成物のいずれかは、MS2外被タンパク質(MCP)の少なくとも一部分と少なくとも1つのVP64トランス活性化分子を含む融合タンパク質をコードする少なくとも1つのmRNAおよび/またはポリヌクレオチドをさらに含んでもよい。側面によっては、少なくとも1つのポリヌクレオチドは、MS2外被タンパク質(MCP)の少なくとも一部分と、融合タンパク質の発現を駆動するのに十分な少なくとも1つのプロモーターに作動可能に連結される少なくとも1つのVP64トランス活性化分子とを含む融合タンパク質をコードする核酸を含むプラスミドであってもよい。

40

【0094】

側面によっては、本開示の組成物のいずれかは、MS2外被タンパク質(MCP)の少なくとも一部分と少なくとも1つのP65-HSFトランス活性化分子を含む融合タンパク質をコードする少なくとも1つのmRNAおよび/またはポリヌクレオチドをさらに含んでもよ

50

い。側面によっては、少なくとも1つのポリヌクレオチドは、MS2外被タンパク質(MCP)の少なくとも一部分と、融合タンパク質の発現を駆動するのに十分な少なくとも1つのプロモーターに作動可能に連結される少なくとも1つのP65-HSFトランス活性化分子とを含む融合タンパク質をコードする核酸を含むプラスミドであってもよい。

【0095】

側面によっては、本開示の組成物のいずれかは、SunTagペプチドに結合する少なくとも1つの抗体と少なくとも1つのトランス活性化分子を含む融合タンパク質をコードする少なくとも1つのmRNAおよび/またはポリヌクレオチドをさらに含んでもよい。側面によっては、少なくとも1つのポリヌクレオチドは、SunTagペプチドに結合する少なくとも1つの抗体と、融合タンパク質の発現を駆動するのに十分な少なくとも1つのプロモーターに作動可能に連結される少なくとも1つのトランス活性化分子とを含む融合タンパク質をコードする核酸を含むプラスミドであってもよい。

10

【0096】

側面によっては、本開示の組成物のいずれかは、SunTagペプチドに結合する少なくとも1つの抗体と少なくとも1つのP65-HSFトランス活性化分子を含む融合タンパク質をコードする少なくとも1つのmRNAおよび/またはポリヌクレオチドをさらに含んでもよい。側面によっては、少なくとも1つのポリヌクレオチドは、SunTagペプチドに結合する少なくとも1つの抗体と、融合タンパク質の発現を駆動するのに十分な少なくとも1つのプロモーターに作動可能に連結される少なくとも1つのP65-HSFトランス活性化分子とを含む融合タンパク質をコードする核酸を含むプラスミドであってもよい。

20

【0097】

側面によっては、本開示の組成物のいずれかは、SunTagペプチドに結合する少なくとも1つの抗体と少なくとも1つのVP64トランス活性化分子を含む融合タンパク質をコードする少なくとも1つのmRNAおよび/またはポリヌクレオチドをさらに含んでもよい。側面によっては、少なくとも1つのポリヌクレオチドは、SunTagペプチドに結合する少なくとも1つの抗体と、融合タンパク質の発現を駆動するのに十分な少なくとも1つのプロモーターに作動可能に連結される少なくとも1つのVP64トランス活性化分子とを含む融合タンパク質をコードする核酸を含むプラスミドであってもよい。

【0098】

側面によっては、本開示の任意の組成物は、少なくとも1つの若返り因子をコードする少なくとも1つのmRNAおよび/またはポリヌクレオチドをさらに含んでもよい。側面によっては、少なくとも1つのポリヌクレオチドは、少なくとも1つの若返り因子の発現を駆動するのに十分な少なくとも1つのプロモーターに作動可能に連結される少なくとも1つの若返り因子をコードする核酸を含むプラスミドであってもよい。若返り因子は、テロメラーゼRNA成分(TERC)、テロメラーゼ関連逆転写酵素(TERT)、テロメアの保護因子1(POT1)、インシュリン様成長因子1(IGF1)、TP53に対するWD反復含有アンチセンス(WRAP53)、核タンパク質ファミリーA、メンバー3(NOP3)、異種核リボ核タンパク質A1(hnRNPA1)、シエルタリン複合体小単位およびテロメラーゼ動員因子(ACD/TPP1)、TRF-1相互作用アンキリン関連ADPリボースポリメラーゼ(TNK5)、テロメア反復結合因子1(TRF-1)、テロメア反復結合因子2(TRF-2)、TERF1相互作用核因子2(TIN2)、テロメア反復結合因子2(Rap1)、ディスクリンシュードウリジン合成酵素1(DKC1)、リボ核タンパク質NHP2、またはこれらの任意の組合せを含んでもよい。

30

40

【0099】

本開示の組成物は、少なくとも1つの細胞培養液中に希釈させてもよい。側面によっては、少なくとも1つの細胞培養培地は、調整Opti-MEM(pHを8.2に調整したOpti-MEM)、またはpHを7.4~8.6の範囲の任意の数値に調整したOpti-MEM)、非調整Opti-MEM、ヒト血清、牛胎児血清(FBS)、pHを7.0~8.6の範囲とした1倍のリン酸緩衝塩(PBS)、またはその任意の組合せを含んでもよい。

【0100】

50

側面によっては、本開示の任意の組成物は、当該技術分野で既知の任意の細胞送達システムに詰め込んでもよい。細胞送達システムには、限定はされないが、アデノ随伴ウイルス（AAV；全ての血清型、偽型、および混成型）、アデノウイルス、レンチウイルス、泡沫状ウイルス、単純ヘルペスウイルス（HSV）粒子、レトロウイルス粒子、ウイルス粒子、フラビウイルス粒子、ラブドウイルス粒子、麻疹ウイルス粒子、ニューカッスル病ウイルス粒子、ボックスウイルス粒子、ピコルナウイルス粒子、ナノ粒子、エキソソーム、およびそれらの任意の組合せが含まれる。

【0101】

側面によっては、アデノ随伴ウイルスは、限定はされないが、AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、AAV2/1、AAV2/2、AAV2/3、AAV2/4、AAV2/5、AAV2/6、AAV2/7、AAV2/8、AAV2/9、AAV-DJ、AAV-DJ8、またはそれらの任意の組合せを含んでもよい。

10

【0102】

本開示は、少なくとも1つのウイルス粒子を提供し、少なくとも1つのウイルス粒子は、本開示の任意の組成物を含む。側面によっては、少なくとも1つのウイルス粒子は、アデノ随伴ウイルス（AAV）粒子であってもよい。側面によっては、少なくとも1つのウイルス粒子は、AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、AAV2/1、AAV2/2、AAV2/3、AAV2/4、AAV2/5、AAV2/6、AAV2/7、AAV2/8、AAV2/9、AAV-DJ、またはAAV-DJ8の各粒子であってもよい。側面によっては、少なくとも1つのウイルス粒子は、アデノウイルス粒子であってもよい。側面によっては、少なくとも1つのウイルス粒子は、泡沫状ウイルス粒子であってもよい。側面によっては、少なくとも1つのウイルス粒子は、レンチウイルス粒子であってもよい。レトロウイルス粒子は、MMSV粒子またはMSCV粒子であってもよい。レンチウイルス粒子は、HIV-1粒子またはHIV-2粒子であってもよい。ウイルス粒子は、SFV粒子、SIN粒子、VEE粒子、またはM1粒子であってもよい。フラビウイルス粒子は、クンジンウイルス粒子、ウエストナイルウイルス粒子、またはデングウイルス粒子であってもよい。

20

【0103】

本開示は、少なくとも1つのエキソソーム、微小胞体、またはリポソームを提供し、少なくとも1つのエキソソーム、微小胞体、またはリポソームは、本開示の任意の組成物を含む。

30

【0104】

本開示は、少なくとも1つのナノ粒子を提供し、少なくとも1つのナノ粒子は、本開示の任意の組成物を含む。側面によっては、ナノ粒子は、リポソーム、ミセル、高分子系ナノ粒子、脂質高分子系ナノ粒子、金属系ナノ粒子、ナノ結晶、カーボンナノチューブ系ナノ粒子、または高分子ミセルを含んでもよい。側面によっては、高分子系ナノ粒子は、マルチブロック共重合体、二元ブロック共重合体、高分子ミセル、または超分岐高分子を含んでもよい。側面によっては、高分子系ナノ粒子は、マルチブロック共重合体、または二元ブロック共重合体を含んでもよい。側面によっては、高分子系ナノ粒子は、ポリ（乳酸-グリコール酸）であるPLGA高分子を含む。

40

【0105】

側面によっては、本開示は、a) ヒトテロメラーゼ逆転写酵素（hTERT）の少なくとも一部分をコードする核酸配列を含む少なくとも1つの修飾mRNA分子；b) 少なくとも1つのDNA標的ポリペプチドの少なくとも一部分をコードする核酸配列を含む少なくとも1つの修飾mRNA分子；およびc) 複数のガイドRNA（gRNA）分子を含む組成物を提供し、この少なくとも1つのDNA標的ポリペプチドは、dCas9およびVP64-P65-Rta（VPR）分子を含み、これら複数のgRNAのうちの少なくとも1つのgRNAは、内因性hTERT遺伝子の上流に位置する核酸配列に対し相補的である。

【0106】

キット

50

【0107】

側面によっては、本開示は、本開示の任意の組成物を含むキットを提供する。側面によっては、本開示は、本開示の任意の組成物の任意の部分を含むキットを提供する。側面によっては、本開示の任意のキットは、本開示の任意の方法に用いてもよい。

【0108】

非限定的な例では、本開示は、a) テロメラーゼ逆転写酵素 (TERT) の少なくとも一部分をコードする核酸配列を含む少なくとも1つの第1のポリヌクレオチド分子；および b) 少なくとも1つのDNA標的ポリペプチドの少なくとも一部分をコードする核酸配列を含む少なくとも1つの第2のポリヌクレオチド分子を含むキットを提供し、このDNA標的ポリペプチドはテロメラーゼRNA成分 (TERC) の転写を増加させる。

10

【0109】

本開示の若返り方法

【0110】

本開示は、少なくとも1つの細胞を若返らせる方法を提供し、この方法は、少なくとも1つの細胞を本開示の少なくとも1つの組成物に接触させる工程を含む。この方法は、本開示の少なくとも1つの組成物に接触させた少なくとも1つの細胞を増殖して複数の若返り細胞を生成する工程をさらに含む。

【0111】

従って、本開示は、少なくとも1つの細胞を若返らせる方法を提供し、この方法は、少なくとも1つの細胞を、a) テロメラーゼ逆転写酵素 (TERT) の少なくとも一部分をコードする核酸配列を含む少なくとも1つの第1のポリヌクレオチド分子；および b) 少なくとも1つのDNA標的ポリペプチドの少なくとも一部分をコードする核酸配列を含む少なくとも1つの第2のポリヌクレオチド分子を含む組成物に接触させる工程を含み、このDNA標的ポリペプチドはテロメラーゼRNA成分 (TERC) の転写を増加させる。

20

【0112】

本開示は、対象の疾患を治療および/または予防する方法を提供し、この方法は、a) 少なくとも1つの細胞を本開示の少なくとも1つの組成物に接触させる工程；b) 本開示の少なくとも1つの組成物に接触させた少なくとも1つの細胞を増殖して複数の若返り細胞を生成する工程；および c) 複数の若返り細胞を対象に投与する工程を含む。

【0113】

本開示は、対象の疾患を治療および/または予防する方法を提供し、この方法は、a) 少なくとも1つの細胞を本開示の少なくとも1つの組成物に接触させる工程；b) 本開示の少なくとも1つの組成物に接触させた少なくとも1つの細胞を増殖して複数の若返り細胞を生成する工程；c) 複数の若返り細胞を少なくとも1つの組織または器官に転換させるのに十分な条件で培養する工程；および d) 少なくとも1つの組織または器官を対象に投与する工程を含む。

30

【0114】

本開示は、生体外で組織または器官を生成する方法を提供し、この方法は、a) 少なくとも1つの細胞を本開示の組成物に接触させる工程；b) 本開示の少なくとも1つの組成物に接触させた少なくとも1つの細胞を増殖して複数の若返り細胞を生成する工程；および c) 複数の若返り細胞を少なくとも1つの組織または器官に転換させるのに十分な条件で複数の若返り細胞を培養する工程を含む。少なくとも1つの組織または器官は、限定はされないが、薬物および/または治療用化合物の試験を含むさらなる生体外試験に用いてもよい。

40

【0115】

本開示は、複数の若返り細胞を生成する方法を提供し、この方法は、a) 少なくとも1つの細胞を本開示の少なくとも1つの組成物に接触させる工程；および b) 本開示の少なくとも1つの組成物に接触させた少なくとも1つの細胞を増殖して複数の若返り細胞を生成する工程を含む。

【0116】

50

本開示は、複数の若返り編集細胞を生成する方法を提供し、この方法は、a) 複数の細胞を、複数の細胞のうち少なくとも1つの細胞のゲノム中の少なくとも1つの遺伝子を編集するように遺伝子編集システムに接触させ、それによって少なくとも1つの編集細胞を生成する工程；b) 少なくとも1つの編集細胞を単離する工程；c) 単離された少なくとも1つの編集細胞を本開示の少なくとも1つの組成物に接触させる工程；およびd) 本開示の少なくとも1つの組成物に接触させた少なくとも1つの細胞を増殖して複数の若返り編集細胞を生成する工程を含む。

【0117】

本開示は、対象の疾患を治療および/または予防する方法を提供し、この方法は、a) 複数の細胞を、複数の細胞のうち少なくとも1つの細胞のゲノム中の少なくとも1つの遺伝子を編集するように遺伝子編集システムに接触させ、それによって少なくとも1つの編集細胞を生成する工程；b) 少なくとも1つの編集細胞を単離する工程；c) 単離された少なくとも1つの編集細胞を本開示の少なくとも1つの組成物と接触させる工程；d) 本開示の少なくとも1つの組成物に接触させた少なくとも1つの細胞を増殖して複数の若返り編集細胞を生成する工程；およびe) 複数の若返り編集細胞を対象に投与する工程を含む。

10

【0118】

側面によっては、本開示は、対象の表皮水疱症(EB)を治療する方法を提供し、この方法は、a) 角化細胞、皮膚線維芽細胞、間葉系幹細胞/間質細胞、またはそれらの任意の組合せを含む複数の細胞を、複数の細胞のうち少なくとも1つの細胞のゲノム中の少なくとも1つの遺伝子を編集するように遺伝子編集システムに接触させ、それによって少なくとも1つの編集細胞を生成する工程；b) 少なくとも1つの編集細胞を単離する工程；c) 単離された少なくとも1つの編集細胞を本開示の少なくとも1つの組成物に接触させる工程；d) 本開示の少なくとも1つの組成物に接触させた少なくとも1つの細胞を増殖して複数の若返り編集細胞を生成する工程；およびe) 複数の若返り編集細胞を対象に投与する工程を含む。

20

【0119】

側面によっては、本開示は、対象の少なくとも1つの細胞を若返らせる方法を提供し、この方法は、本開示の少なくとも1つの組成物の少なくとも1つの治療有効量を対象に投与する工程を含む。側面によっては、本開示は、対象の少なくとも1つの細胞を若返らせる方法を提供し、この方法は、本開示の少なくとも1つの組成物の少なくとも一部分の少なくとも1つの治療有効量を対象に投与する工程を含む。

30

【0120】

側面によっては、本開示は、少なくとも1つの対象を若返らせる方法を提供し、この方法は、本開示の少なくとも1つの組成物の少なくとも1つの治療有効量を投与する工程を含む。側面によっては、本開示は、少なくとも1つの対象を若返らせる方法を提供し、この方法は、本開示の少なくとも1つの組成物の少なくとも一部分の少なくとも1つの治療有効量を投与することを含む。

【0121】

本開示の方法の側面によっては、少なくとも1つの細胞を本開示の少なくとも1つの組成物に接触させる工程は、少なくとも1つの細胞を本開示の少なくとも1つの組成物の第1の部分に接触させ、次いで少なくとも1つの細胞を本開示の少なくとも1つの組成物の第1の部分に接触させた少なくとも1時間後に、または少なくとも約2時間後に、または少なくとも約3時間後に、または少なくとも約4時間後に、または少なくとも約5時間後に、または少なくとも約6時間後に、または少なくとも約7時間後に、または少なくとも約8時間後に、または少なくとも約9時間後に、または少なくとも約10時間後に、または少なくとも約11時間後に、または少なくとも約12時間後に、または少なくとも約16時間後に、または少なくとも約20時間後に、または少なくとも約24時間後に、または少なくとも約28時間後に、または少なくとも約32時間後に、または少なくとも約36時間後に、または少なくとも約40時間後に、または少なくとも約44時間後に、または少なくとも

40

50

も約48時間後に、または少なくとも約52時間後に、または少なくとも約56時間後に、または少なくとも約60時間後に、または少なくとも約64時間後に、または少なくとも約68時間後に、または少なくとも約72時間後に、または少なくとも約76時間後に、または少なくとも約80時間後に、または少なくとも約84時間後に、または少なくとも約88時間後に、または少なくとも約92時間後に、または少なくとも約96時間後に、少なくとも1つの細胞を本開示の少なくとも1つの組成物の第2の部分に接触させる工程を含んでもよい。

【0122】

従って、少なくとも1つの細胞を本開示の少なくとも1つの組成物に接触させる工程は、a) 少なくとも1つの細胞を、テロメラーゼ逆転写酵素 (TERT) の少なくとも一部分をコードする核酸配列を含む少なくとも1つの第1のポリヌクレオチド分子に接触させる工程; および b) 少なくとも1つの細胞を、少なくとも1つのDNA標的ポリペプチドの少なくとも一部分をコードする核酸配列を含む少なくとも1つの第2のポリヌクレオチド分子に接触させる工程を含んでもよく、このDNA標的ポリペプチドは、テロメラーゼRNA成分 (TERC) の転写を工程 (a) の少なくとも約24時間後に増加させる。場合によっては、工程 (a) および工程 (b) を、約1日毎に、または約2日毎に、または約3日毎に、または約4日毎に、または約5日毎に、または約6日毎に、または約7日毎に、または約8日毎に、または約9日毎に、または約10日毎に繰り返してもよい。

10

【0123】

本開示の方法の側面によっては、少なくとも1つの細胞を本開示の少なくとも1つの組成物に接触させる工程は、少なくとも1つの細胞を前処理する工程をさらにも含む。側面によっては、細胞を前処理する工程は、少なくとも1つの細胞をテロメラーゼ逆転写酵素 (TERT) の少なくとも一部分をコードする核酸配列を含む少なくとも1つの第1のポリヌクレオチド分子に、約4時間毎に1回、または約8時間毎に1回、または約12時間毎に1回、または約16時間毎に1回、または約20時間毎に1回、または約24時間毎に1回、または約28時間毎に1回、または約32時間毎に1回、または約36時間毎に1回、または約40時間毎に1回、または約44時間毎に1回、または約48時間毎に1回接触させる工程を含んでもよい。側面によっては、少なくとも1つの細胞を、少なくとも約2日間、または少なくとも約4日間、または少なくとも約6日間、または少なくとも約8日間、または少なくとも約10日間前処理してもよい。

20

30

【0124】

側面によっては、少なくとも1つの細胞を本開示の少なくとも1つの組成物に接触させる工程は、a) テロメラーゼ逆転写酵素 (TERT) の少なくとも一部分をコードする核酸配列を含む少なくとも1つの第1のポリヌクレオチド分子、およびテロメラーゼRNA成分 (TERC) の転写を増加させる少なくとも1つのDNA標的ポリペプチドの少なくとも一部分をコードする核酸配列を含む少なくとも1つの第2のポリヌクレオチド分子に少なくとも1つの細胞を接触させる工程、および b) 約1日毎に、または約2日毎に、または約3日毎に、または約4日毎に、または約5日毎に、または約6日毎に、または約7日毎に、または約8日毎に、または約9日毎に、または約10日毎に工程 (a) を繰り返す工程を含んでもよい。

40

【0125】

遺伝子移入による処理計画の例を、図8、10、および11に示す。

【0126】

本開示の方法の側面によっては、少なくとも1つの細胞を本開示の組成物に接触させる工程は、遺伝子移入を含んでもよい。側面によっては、遺伝子移入は、リポフェクタミンの使用を含んでもよい。側面によっては、遺伝子移入は、当該技術分野で既知の任意の標準的な遺伝子移入法を含んでもよい。本開示の方法の側面によっては、少なくとも1つの細胞を本開示の組成物に接触させる工程は、電気穿孔を含んでもよい。

【0127】

本開示の方法の側面によっては、少なくとも1つの細胞を接触させる工程は、遺伝子移

50

入、形質導入、電気穿孔、核酸注入、少なくとも1つの細胞透過性ペプチド、またはそれらの任意の組合せを含んでもよい。

【0128】

本開示の方法の側面によっては、少なくとも1つの細胞を本開示の組成物に接触させる工程は、核酸注入を含んでもよい。側面によっては、核酸注入は、当該技術分野で既知の任意の標準的な核酸注入法を含んでもよい。

【0129】

本開示の方法の側面によっては、少なくとも1つの細胞を本開示の組成物に接触させる工程は、少なくとも1つの細胞透過性ペプチドに細胞を接触させる工程を含んでもよい。側面によっては、細胞透過性ペプチドは、HIV由来のTATタンパク質であってもよい。側面によっては、細胞透過性ペプチドは、ポリアルギニンを含んでもよい。理論に束縛されることを望まないが、少なくとも1つの細胞透過性ペプチドは、標的細胞の細胞質への本開示のタンパク質またはRNP複合体の送達を支援できる。

【0130】

側面によっては、本開示の少なくとも1つの組成物または少なくとも1つの組成物の少なくとも一部分を、経口、鼻腔内、経皮、肺内、吸入、口内、舌下、腹腔内、皮下、筋肉内、静脈内、直腸内、胸腔内、髄腔内、および/または非経口で対象に投与してもよい。

【0131】

本開示の方法の側面によっては、少なくとも1つの細胞を増殖する工程は、調整Opti-MEM、非調整Opti-MEM、ヒト血清、ウシ胎児血清(FBS)、またはそれらの任意の組合せを用いて少なくとも1つの細胞を培養することを含んでもよい。

【0132】

本開示の方法の側面によっては、少なくとも1つの細胞を若返らせる工程は、少なくとも1つの細胞内でTERCの発現を増加させることを含んでもよい。側面によっては、少なくとも1つの細胞を若返らせる工程は、TERCの発現を少なくとも約1%、または少なくとも約5%、または少なくとも約10%、または少なくとも約15%、または少なくとも約20%、または少なくとも約25%、または少なくとも約30%、または少なくとも約35%、または少なくとも約40%、または少なくとも約45%、または少なくとも約50%、または少なくとも約55%、または少なくとも約60%、または少なくとも約65%、または少なくとも約70%、または少なくとも約75%、または少なくとも約80%、または少なくとも約85%、または少なくとも約90%、または少なくとも約95%、または少なくとも約100%、または少なくとも約150%、または少なくとも約200%、または少なくとも約250%、または少なくとも約300%、または少なくとも約350%、または少なくとも約400%、または少なくとも約450%、または少なくとも約500%、または少なくとも約550%、または少なくとも約600%、または少なくとも約650%、または少なくとも約700%、または少なくとも約750%、または少なくとも約800%、または少なくとも約850%、または少なくとも約900%、または少なくとも約950%、または少なくとも約1,000%、または少なくとも約10,000%、または少なくとも約100,000%、または少なくとも約1,000,000%、または少なくとも約10,000,000%、または少なくとも約100,000,000%まで増加させることを含んでもよい。側面によっては、少なくとも1つの細胞を若返らせる工程は、少なくとも1つの細胞を本開示の少なくとも1つの組成物に接触させた後のTERCの発現水準が、少なくとも1つの細胞を本開示の少なくとも1つの組成物に接触させる前のTERCの発現水準と比較して、少なくとも約0.5倍、または少なくとも約1.0倍、または少なくとも約1.5倍、または少なくとも約2.0倍、または少なくとも約2.5倍、または少なくとも約3.0倍、または少なくとも約3.5倍、または少なくとも約4.0倍、または少なくとも約4.5倍、または少なくとも約5.0倍、または少なくとも約5.5倍、または少なくとも約6.0倍、または少なくとも約6.5倍、または少なくとも約7.0倍、または少なくとも約7.5倍、または少なくとも約8.0倍、または少なくとも約8.5倍、または少なくとも約9.0倍、または少なくとも約9.5倍、または少なくとも約10.0倍、または少なくとも約25倍、または少なくとも約50倍、または少なくとも約75倍、または少なくとも約100倍、ま

10

20

30

40

50

たは少なくとも約1,000倍、または少なくとも約10,000倍、または少なくとも約20,000倍、または少なくとも約30,000倍、または少なくとも約40,000倍、または少なくとも約50,000倍、または少なくとも約60,000倍、または少なくとも約70,000倍、または少なくとも約80,000倍、または少なくとも約90,000倍、または少なくとも約100,000倍高くなるように、少なくとも1つの細胞内でTERCの発現を増加させることを含んでもよい。

【0133】

本開示の方法の側面によっては、少なくとも1つの細胞を若返らせる工程は、TERCの発現水準が、対照細胞でのTERCの発現に対して少なくともほぼ同じ、または少なくとも約1.5倍、または少なくとも約2.0倍、または少なくとも約2.5倍、または少なくとも約3.0倍、または少なくとも約3.5倍、または少なくとも約4.0倍、または少なくとも約4.5倍、または少なくとも約5.0倍、または少なくとも約5.5倍、または少なくとも約6.0倍、または少なくとも約6.5倍、または少なくとも約7.0倍、または少なくとも約7.5倍、または少なくとも約8.0倍、または少なくとも約8.5倍、または少なくとも約9.0倍、または少なくとも約9.5倍、または少なくとも約10.0倍、または少なくとも約25倍、または少なくとも約50倍、または少なくとも約75倍、または少なくとも約100倍、または少なくとも約1,000倍、または少なくとも約10,000倍、または少なくとも約20,000倍、または少なくとも約30,000倍、または少なくとも約40,000倍、または少なくとも約50,000倍、または少なくとも約60,000倍、または少なくとも約70,000倍、または少なくとも約80,000倍、または少なくとも約90,000倍、または少なくとも約100,000倍となるように、少なくとも1つの細胞内でTERCの発現を増加させることを含んでもよい。

【0134】

本開示の方法の側面によっては、少なくとも1つの細胞を若返らせる工程は、少なくとも1つの細胞内でTERTの発現を増加させることを含んでもよい。側面によっては、少なくとも1つの細胞を若返らせる工程は、TERTの発現を少なくとも約1%、または少なくとも約5%、または少なくとも約10%、または少なくとも約15%、または少なくとも約20%、または少なくとも約25%、または少なくとも約30%、または少なくとも約35%、または少なくとも約40%、または少なくとも約45%、または少なくとも約50%、または少なくとも約55%、または少なくとも約60%、または少なくとも約65%、または少なくとも約70%、または少なくとも約75%、または少なくとも約80%、または少なくとも約85%、または少なくとも約90%、または少なくとも約95%、または少なくとも約100%、または少なくとも約150%、または少なくとも約200%、または少なくとも約250%、または少なくとも約300%、または少なくとも約350%、または少なくとも約400%、または少なくとも約450%、または少なくとも約500%、または少なくとも約550%、または少なくとも約600%、または少なくとも約650%、または少なくとも約700%、または少なくとも約750%、または少なくとも約800%、または少なくとも約850%、または少なくとも約900%、または少なくとも約950%、または少なくとも約1,000%、または少なくとも約10,000%、または少なくとも約100,000%、または少なくとも約1,000,000%、または少なくとも約10,000,000%、または少なくとも約100,000,000%まで増加させることを含んでもよい。側面によっては、少なくとも1つの細胞を若返らせる工程は、少なくとも1つの細胞を本開示の少なくとも1つの組成物に接触させた後のTERTの発現水準が、少なくとも1つの細胞を本開示の少なくとも1つの組成物に接触させる前のTERTの発現水準と比較して、少なくとも約0.5倍、または少なくとも約1.0倍、または少なくとも約1.5倍、または少なくとも約2.0倍、または少なくとも約2.5倍、または少なくとも約3.0倍、または少なくとも約3.5倍、または少なくとも約4.0倍、または少なくとも約4.5倍、または少なくとも約5.0倍、または少なくとも約5.5倍、または少なくとも約6.0倍、または少なくとも約6.5倍、または少なくとも約7.0倍、または少なくとも約7.5倍、または少なくとも約8.0倍、または少なくとも約8.5倍、または少なくとも約9.0倍、または少なくとも約9.5倍、または少なくとも約10.0倍、または少なくとも約25倍

、または少なくとも約50倍、または少なくとも約75倍、または少なくとも約100倍、または少なくとも約1,000倍、または少なくとも約10,000倍、または少なくとも約20,000倍、または少なくとも約30,000倍、または少なくとも約40,000倍、または少なくとも約50,000倍、または少なくとも約60,000倍、または少なくとも約70,000倍、または少なくとも約80,000倍、または少なくとも約90,000倍、または少なくとも約100,000倍高くなるように、少なくとも1つの細胞内でTERTの発現を増加させることを含んでもよい。

【0135】

本開示の方法の側面によっては、少なくとも1つの細胞を若返らせる工程は、TERTの発現水準が、対照細胞でのTERTの発現に対して少なくともほぼ同じ、または少なくとも約1.5倍、または少なくとも約2.0倍、または少なくとも約2.5倍、または少なくとも約3.0倍、または少なくとも約3.5倍、または少なくとも約4.0倍、または少なくとも約4.5倍、または少なくとも約5.0倍、または少なくとも約5.5倍、または少なくとも約6.0倍、または少なくとも約6.5倍、または少なくとも約7.0倍、または少なくとも約7.5倍、または少なくとも約8.0倍、または少なくとも約8.5倍、または少なくとも約9.0倍、または少なくとも約9.5倍、または少なくとも約10.0倍、または少なくとも約25倍、または少なくとも約50倍、または少なくとも約75倍、または少なくとも約100倍、または少なくとも約1,000倍、または少なくとも約10,000倍、または少なくとも約20,000倍、または少なくとも約30,000倍、または少なくとも約40,000倍、または少なくとも約50,000倍、または少なくとも約60,000倍、または少なくとも約70,000倍、または少なくとも約80,000倍、または少なくとも約90,000倍、または少なくとも約100,000倍となるように、少なくとも1つの細胞内でTERTの発現を増加させることを含んでもよい。

【0136】

本開示の方法の側面によっては、少なくとも1つの細胞を若返らせる工程は、少なくとも1つの細胞によって示される集団倍加総数を増加させることを含んでもよい。側面によっては、少なくとも1つの細胞を若返らせる工程は、少なくとも1つの細胞によって示される集団倍加総数を少なくとも1%、または少なくとも約5%、または少なくとも約10%、または少なくとも約15%、または少なくとも約20%、または少なくとも約25%、または少なくとも約30%、または少なくとも約35%、または少なくとも約40%、または少なくとも約45%、少なくとも約50%、または少なくとも約55%、または少なくとも約60%、または少なくとも約65%、または少なくとも約70%、または少なくとも約75%、または少なくとも約80%、または少なくとも約85%、または少なくとも約90%、または少なくとも約95%、または少なくとも約100%、または少なくとも約150%、または少なくとも約200%、または少なくとも約250%、または少なくとも約300%、または少なくとも約350%、または少なくとも約400%、または少なくとも約450%、または少なくとも約500%、または少なくとも約550%、または少なくとも約600%、または少なくとも約650%、または少なくとも約700%、または少なくとも約750%、または少なくとも約800%、または少なくとも約850%、または少なくとも約900%、または少なくとも約950%、または少なくとも約1,000%、または少なくとも約2,000%、または少なくとも約3,000%、または少なくとも約4,000%、または少なくとも約5,000%、または少なくとも約6,000%、または少なくとも約7,000%、または少なくとも約8,000%、または少なくとも約9,000%、または少なくとも約10,000%、または少なくとも約20,000%、または少なくとも約30,000%、または少なくとも約40,000%、または少なくとも約50,000%、または少なくとも約60,000%、または少なくとも約70,000%、または少なくとも約80,000%、または少なくとも約90,000%、または少なくとも約100,000%まで増加させることを含んでもよい。

【0137】

側面によっては、少なくとも1つの細胞を若返らせる工程は、少なくとも1つの細胞によって示される集団倍加数が、少なくとも1つの対照細胞によって示される集団倍加総数の少なくとも約1.5倍、または少なくとも約2.0倍、または少なくとも約2.5倍、または

10

20

30

40

50

少なくとも約3.0倍、または少なくとも約3.5倍、または少なくとも約4.0倍、または少なくとも約4.5倍、または少なくとも約5.0倍、または少なくとも約5.5倍、または少なくとも約6.0倍、または少なくとも約6.5倍、または少なくとも約7.0倍、または少なくとも約7.5倍、または少なくとも約8.0倍、または少なくとも約8.5倍、または少なくとも約9.0倍、または少なくとも約9.5倍、または少なくとも約10.0倍、または少なくとも約25倍、または少なくとも約50倍、または少なくとも約75倍、または少なくとも約100倍、または少なくとも約200倍、または少なくとも約300倍、または少なくとも約400倍、または少なくとも約500倍、または少なくとも約600倍、または少なくとも約700倍、または少なくとも約800倍、または少なくとも約900倍、または少なくとも約1,000倍となるように、集団倍加総数を増加させることを含んでもよい。

10

【0138】

本開示の方法の側面によっては、少なくとも1つの細胞を若返らせる工程は、少なくとも1つの細胞内のテロメアの長さを増加させることを含んでもよい。側面によっては、少なくとも1つの細胞を若返らせる工程は、少なくとも1つの細胞内のテロメアの長さを少なくとも約1%、または少なくとも約5%、または少なくとも約10%、または少なくとも約15%、または少なくとも約20%、または少なくとも約25%、または少なくとも約30%、または少なくとも約35%、または少なくとも約40%、または少なくとも約45%、または少なくとも約50%、または少なくとも約55%、または少なくとも約60%、または少なくとも約65%、または少なくとも約70%、または少なくとも約75%、または少なくとも約80%、または少なくとも約85%、または少なくとも約90%、または少なくとも約95%、または少なくとも約100%、または少なくとも約150%、または少なくとも約200%、または少なくとも約250%、または少なくとも約300%、または少なくとも約350%、または少なくとも約400%、または少なくとも約450%、または少なくとも約500%、または少なくとも約550%、または少なくとも約600%、または少なくとも約650%、または少なくとも約700%、または少なくとも約750%、または少なくとも約800%、または少なくとも約850%、または少なくとも約900%、または少なくとも約950%、または少なくとも約1,000%、または少なくとも約2,000%、または少なくとも約3,000%、または少なくとも約4,000%、または少なくとも約5,000%、または少なくとも約6,000%、または少なくとも約7,000%、または少なくとも約8,000%、または少なくとも約9,000%、または少なくとも約10,000%、または少なくとも約20,000%、または少なくとも約30,000%、または少なくとも約40,000%、または少なくとも約50,000%、または少なくとも約60,000%、または少なくとも約70,000%、または少なくとも約80,000%、または少なくとも約90,000%、または少なくとも約100,000%まで増加させることを含んでもよい。

20

30

【0139】

側面によっては、少なくとも1つの細胞を若返らせる工程は、少なくとも1つの細胞内のテロメアの長さが、少なくとも1つの対照細胞内のテロメアの長さに対して同じ、または少なくとも1.5倍、または少なくとも約2.0倍、または少なくとも約2.5倍、または少なくとも約3.0倍、または少なくとも約3.5倍、または少なくとも約4.0倍、または少なくとも約4.5倍、または少なくとも約5.0倍、または少なくとも約5.5倍、または少なくとも約6.0倍、または少なくとも約6.5倍、または少なくとも約7.0倍、または少なくとも約7.5倍、または少なくとも約8.0倍、または少なくとも約8.5倍、または少なくとも約9.0倍、または少なくとも約9.5倍、または少なくとも約10.0倍、または少なくとも約25倍、または少なくとも約50倍、または少なくとも約75倍、または少なくとも約100倍、または少なくとも約200倍、または少なくとも約300倍、または少なくとも約400倍、または少なくとも約500倍、または少なくとも約600倍、または少なくとも約700倍、または少なくとも約800倍、または少なくとも約900倍、または少なくとも約1,000倍となるように、少なくとも1つの細胞内のテロメアの長さを増加させることを含んでもよい。

40

【0140】

50

本開示の方法の側面によっては、少なくとも1つの細胞を若返らせる工程は、少なくとも1つの細胞内のミトコンドリアDNAコピー数を増加させることを含んでもよい。側面によっては、少なくとも1つの細胞を若返らせる工程は、少なくとも1つの細胞内のミトコンドリアDNAコピー数を少なくとも約1%、または少なくとも約5%、または少なくとも約10%、または少なくとも約15%、または少なくとも約20%、または少なくとも約25%、または少なくとも約30%、または少なくとも約35%、または少なくとも約40%、または少なくとも約45%、または少なくとも約50%、または少なくとも約55%、または少なくとも約60%、または少なくとも約65%、または少なくとも約70%、または少なくとも約75%、または少なくとも約80%、または少なくとも約85%、または少なくとも約90%、または少なくとも約95%、または少なくとも約100%、または少なくとも約150%、または少なくとも約200%、または少なくとも約250%、または少なくとも約300%、または少なくとも約350%、または少なくとも約400%、または少なくとも約450%、または少なくとも約500%、または少なくとも約550%、または少なくとも約600%、または少なくとも約650%、または少なくとも約700%、または少なくとも約750%、または少なくとも約800%、または少なくとも約850%、または少なくとも約900%、または少なくとも約950%、または少なくとも約1,000%、または少なくとも約2,000%、または少なくとも約3,000%、または少なくとも約4,000%、または少なくとも約5,000%、または少なくとも約6,000%、または少なくとも約7,000%、または少なくとも約8,000%、または少なくとも約9,000%、または少なくとも約10,000%、または少なくとも約20,000%、または少なくとも約30,000%、または少なくとも約40,000%、または少なくとも約50,000%、または少なくとも約60,000%、または少なくとも約70,000%、または少なくとも約80,000%、または少なくとも約90,000%、または少なくとも約100,000%まで増加させることを含んでもよい。

【0141】

側面によっては、少なくとも1つの細胞を若返らせる工程は、少なくとも1つの細胞内のミトコンドリアDNAコピー数が、少なくとも1つの対照細胞内のミトコンドリアDNAコピー数に対して同じ、または少なくとも1.5倍、または少なくとも約2.0倍、または少なくとも約2.5倍、または少なくとも約3.0倍、または少なくとも約3.5倍、または少なくとも約4.0倍、または少なくとも約4.5倍、または少なくとも約5.0倍、または少なくとも約5.5倍、または少なくとも約6.0倍、または少なくとも約6.5倍、または少なくとも約7.0倍、または少なくとも約7.5倍、または少なくとも約8.0倍、または少なくとも約8.5倍、または少なくとも約9.0倍、または少なくとも約9.5倍、または少なくとも約10.0倍、または少なくとも約25倍、または少なくとも約50倍、または少なくとも約75倍、または少なくとも約100倍、または少なくとも約200倍、または少なくとも約300倍、または少なくとも約400倍、または少なくとも約500倍、または少なくとも約600倍、または少なくとも約700倍、または少なくとも約800倍、または少なくとも約900倍、または少なくとも約1,000倍となるように、少なくとも1つの細胞内のミトコンドリアDNAコピー数を増加させることを含んでもよい。

【0142】

本開示の方法の側面によっては、少なくとも1つの細胞を若返らせる工程は、少なくとも1つの細胞内のミトコンドリアDNAの量を増加させることを含んでもよい。側面によっては、少なくとも1つの細胞を若返らせる工程は、少なくとも1つの細胞内のミトコンドリアDNAの量を少なくとも約1%、または少なくとも約5%、または少なくとも約10%、または少なくとも約15%、または少なくとも約20%、または少なくとも約25%、または少なくとも約30%、または少なくとも約35%、または少なくとも約40%、または少なくとも約45%、または少なくとも約50%、または少なくとも約55%、または少なくとも約60%、または少なくとも約65%、または少なくとも約70%、または少なくとも約75%、または少なくとも約80%、または少なくとも約85%、または少なくとも約90%、または少なくとも約95%、または少なくとも約100%、または少なくとも約150%、または少なくとも約200%、または少なくとも約250%、または少なくとも約300%、または少なくとも

とも約350%、または少なくとも約400%、または少なくとも約450%、または少なくとも約500%、または少なくとも約550%、または少なくとも約600%、または少なくとも約650%、または少なくとも約700%、または少なくとも約750%、または少なくとも約800%、または少なくとも約850%、または少なくとも約900%、または少なくとも約950%、または少なくとも約1,000%、または少なくとも約2,000%、または少なくとも約3,000%、または少なくとも約4,000%、または少なくとも約5,000%、または少なくとも約6,000%、または少なくとも約7,000%、または少なくとも約8,000%、または少なくとも約9,000%、または少なくとも約10,000%、または少なくとも約20,000%、または少なくとも約30,000%、または少なくとも約40,000%、または少なくとも約50,000%、または少なくとも約60,000%、または少なくとも約70,000%、または少なくとも約80,000%、または少なくとも約90,000%、または少なくとも約100,000%まで増加させることを含んでもよい。

10

【0143】

側面によっては、少なくとも1つの細胞を若返らせる工程は、少なくとも1つの細胞内のミトコンドリアDNAの量が、少なくとも1つの対照細胞内のミトコンドリアDNAの量に対して同じ、または少なくとも1.5倍、または少なくとも約2.0倍、または少なくとも約2.5倍、または少なくとも約3.0倍、または少なくとも約3.5倍、または少なくとも約4.0倍、または少なくとも約4.5倍、または少なくとも約5.0倍、または少なくとも約5.5倍、または少なくとも約6.0倍、または少なくとも約6.5倍、または少なくとも約7.0倍、または少なくとも約7.5倍、または少なくとも約8.0倍、または少なくとも約8.5倍、または少なくとも約9.0倍、または少なくとも約9.5倍、または少なくとも約10.0倍、または少なくとも約25倍、または少なくとも約50倍、または少なくとも約75倍、または少なくとも約100倍、または少なくとも約200倍、または少なくとも約300倍、または少なくとも約400倍、または少なくとも約500倍、または少なくとも約600倍、または少なくとも約700倍、または少なくとも約800倍、または少なくとも約900倍、または少なくとも約1,000倍となるように、少なくとも1つの細胞内のミトコンドリアDNAの量を増加させることを含んでもよい。

20

【0144】

本開示の方法の側面によっては、少なくとも1つの細胞を若返らせる工程は、少なくとも1つの細胞内のミトコンドリアの数を増加させることを含んでもよい。側面によっては、少なくとも1つの細胞を若返らせる工程は、少なくとも1つの細胞内のミトコンドリアの数を少なくとも約1%、または少なくとも約5%、または少なくとも約10%、または少なくとも約15%、または少なくとも約20%、または少なくとも約25%、または少なくとも約30%、または少なくとも約35%、または少なくとも約40%、または少なくとも約45%、または少なくとも約50%、または少なくとも約55%、または少なくとも約60%、または少なくとも約65%、または少なくとも約70%、または少なくとも約75%、または少なくとも約80%、または少なくとも約85%、または少なくとも約90%、または少なくとも約95%、または少なくとも約100%、または少なくとも約150%、または少なくとも約200%、または少なくとも約250%、または少なくとも約300%、または少なくとも約350%、または少なくとも約400%、または少なくとも約450%、または少なくとも約500%、または少なくとも約550%、または少なくとも約600%、または少なくとも約650%、または少なくとも約700%、または少なくとも約750%、または少なくとも約800%、または少なくとも約850%、または少なくとも約900%、または少なくとも約950%、または少なくとも約1,000%、または少なくとも約2,000%、または少なくとも約3,000%、または少なくとも約4,000%、または少なくとも約5,000%、または少なくとも約6,000%、または少なくとも約7,000%、または少なくとも約8,000%、または少なくとも約9,000%、または少なくとも約10,000%、または少なくとも約20,000%、または少なくとも約30,000%、または少なくとも約40,000%、または少なくとも約50,000%、または少なくとも約60,000%、または少なくとも約70,000%、または少なくとも約80,000%、または少なくとも約90,000%、または少なくとも約100,000%まで増加させる

30

40

50

ことを含んでもよい。

【0145】

側面によっては、少なくとも1つの細胞を若返らせる工程は、少なくとも1つの細胞内のミトコンドリアの数が、少なくとも1つの対照細胞内のミトコンドリアの数に対して同じ、または少なくとも1.5倍、または少なくとも約2.0倍、または少なくとも約2.5倍、または少なくとも約3.5倍、または少なくとも約4.0倍、または少なくとも約4.5倍、または少なくとも約5.0倍、または少なくとも約5.5倍、または少なくとも約6.0倍、または少なくとも約6.5倍、または少なくとも約7.0倍、または少なくとも約7.5倍、または少なくとも約8.0倍、または少なくとも約8.5倍、または少なくとも約9.0倍、または少なくとも約9.5倍、または少なくとも約10.0倍、または少なくとも約25倍、または少なくとも約50倍、または少なくとも約75倍、または少なくとも約100倍、または少なくとも約200倍、または少なくとも約300倍、または少なくとも約400倍、または少なくとも約500倍、または少なくとも約600倍、または少なくとも約700倍、または少なくとも約800倍、または少なくとも約900倍、または少なくとも約1,000倍となるように、少なくとも1つの細胞内のミトコンドリアの数を増加させることを含んでもよい。

10

【0146】

本開示の方法の側面によっては、少なくとも1つの細胞を若返らせる工程は、少なくとも1つの細胞の移動活性を増加させることを含んでもよい。側面によっては、少なくとも1つの細胞を若返らせる工程は、少なくとも1つの細胞の移動活性を少なくとも約1%、または少なくとも約5%、または少なくとも約10%、または少なくとも約15%、または少なくとも約20%、または少なくとも約25%、または少なくとも約30%、または少なくとも約35%、または少なくとも約40%、または少なくとも約45%、または少なくとも約50%、または少なくとも約55%、または少なくとも約60%、または少なくとも約65%、または少なくとも約70%、または少なくとも約75%、または少なくとも約80%、または少なくとも約85%、または少なくとも約90%、または少なくとも約95%、または少なくとも約100%、または少なくとも約150%、または少なくとも約200%、または少なくとも約250%、または少なくとも約300%、または少なくとも約350%、または少なくとも約400%、または少なくとも約450%、または少なくとも約500%、または少なくとも約550%、または少なくとも約600%、または少なくとも約650%、または少なくとも約700%、または少なくとも約750%、または少なくとも約800%、または少なくとも約850%、または少なくとも約900%、または少なくとも約950%、または少なくとも約1,000%、または少なくとも約2,000%、または少なくとも約3,000%、または少なくとも約4,000%、または少なくとも約5,000%、または少なくとも約6,000%、または少なくとも約7,000%、または少なくとも約8,000%、または少なくとも約9,000%、または少なくとも約10,000%、または少なくとも約20,000%、または少なくとも約30,000%、または少なくとも約40,000%、または少なくとも約50,000%、または少なくとも約60,000%、または少なくとも約70,000%、または少なくとも約80,000%、または少なくとも約90,000%、または少なくとも約100,000%まで増加させることを含んでもよい。

20

30

【0147】

側面によっては、少なくとも1つの細胞を若返らせる工程は、少なくとも1つの細胞の移動活性が、少なくとも1つの対照細胞の移動活性に対して同じ、または少なくとも1.5倍、または少なくとも約2.0倍、または少なくとも約2.5倍、または少なくとも約3.5倍、または少なくとも約4.0倍、または少なくとも約4.5倍、または少なくとも約5.0倍、または少なくとも約5.5倍、または少なくとも約6.0倍、または少なくとも約6.5倍、または少なくとも約7.0倍、または少なくとも約7.5倍、または少なくとも約8.0倍、または少なくとも約8.5倍、または少なくとも約9.0倍、または少なくとも約9.5倍、または少なくとも約10.0倍、または少なくとも約25倍、または少なくとも約50倍、または少なくとも約75倍、または少なくとも約100倍、または少なくとも約200倍、または少なくとも約300倍、または少なくとも約400倍、または少なくとも約500倍、または少なくとも約600倍、または少なくとも約700倍、または少なくとも約800倍、または少な

40

50

くとも約900倍、または少なくとも約1,000倍となるように、少なくとも1つの細胞の移動活性を増加させることを含んでもよい。

【0148】

側面によっては、少なくとも1つの細胞を若返らせる工程は、少なくとも1つの細胞内の少なくとも1つのタンパク質表面のチオール基の酸化を若々しい状態に回復させることを含んでもよい。非限定的な例では、この若返らせる工程は、少なくとも1つの細胞内の少なくとも1つのタンパク質のチオール基の酸化が、若い細胞内の同じタンパク質のチオール基の酸化と同等になるように、少なくとも1つの細胞内の少なくとも1つのタンパク質のチオール基の酸化を増加させることを含んでもよい。非限定的な例では、この若返らせる工程は、少なくとも1つの細胞内の少なくとも1つのタンパク質のチオール基の酸化が、若い細胞内の同じタンパク質のチオール基の酸化と同等になるように、少なくとも1つの細胞内の少なくとも1つのタンパク質のチオール基の酸化を減少させることを含んでもよい。

10

【0149】

側面によっては、少なくとも1つの細胞を若返らせる工程は、少なくとも1つの細胞内の少なくとも1つのタンパク質のチオール基の酸化を少なくとも約1%、または少なくとも約5%、または少なくとも約10%、または少なくとも約15%、または少なくとも約20%、または少なくとも約25%、または少なくとも約30%。または少なくとも約35%、または少なくとも約40%、または少なくとも約45%、または少なくとも約50%、または少なくとも約55%、または少なくとも約60%、または少なくとも約65%、または少なくとも約70%、または少なくとも約75%、または少なくとも約80%、または少なくとも約85%、または少なくとも約90%、または少なくとも約95%、または少なくとも約100%まで減少させることを含んでもよい。側面によっては、この少なくとも1つのタンパク質は、EIF2S1、TM9F3、またはUSP14であってもよい。

20

【0150】

側面によっては、少なくとも1つの細胞を若返らせる工程は、少なくとも1つの細胞内の少なくとも1つのタンパク質のチオール基の酸化を少なくとも約1%、または少なくとも約5%、または少なくとも約10%、または少なくとも約15%、または少なくとも約20%、または少なくとも約25%、または少なくとも約30%、または少なくとも約35%、または少なくとも約40%、または少なくとも約45%、または少なくとも約50%、または少なくとも約55%、または少なくとも約60%、または少なくとも約65%、または少なくとも約70%、または少なくとも約75%、または少なくとも約80%、または少なくとも約85%、または少なくとも約90%、または少なくとも約95%、または少なくとも約100%、または少なくとも約150%、または少なくとも約200%、または少なくとも約250%、または少なくとも約300%、または少なくとも約350%、または少なくとも約400%、または少なくとも約450%、または少なくとも約500%、または少なくとも約550%、または少なくとも約600%、または少なくとも約650%、または少なくとも約700%、または少なくとも約750%、または少なくとも約800%、または少なくとも約850%、または少なくとも約900%、または少なくとも約950%、または少なくとも約1,000%、または少なくとも約2,000%、または少なくとも約3,000%、または少なくとも約4,000%、または少なくとも約5,000%、または少なくとも約6,000%、または少なくとも約7,000%、または少なくとも約8,000%、または少なくとも約9,000%、または少なくとも約10,000%、または少なくとも約20,000%、または少なくとも約30,000%、または少なくとも約40,000%、または少なくとも約50,000%、または少なくとも約60,000%、または少なくとも約70,000%、または少なくとも約80,000%、または少なくとも約90,000%、または少なくとも約100,000%まで増加させることを含んでもよい。側面によっては、この少なくとも1つのタンパク質は、IGFB5であってもよい。

30

40

【0151】

本開示の方法の側面によっては、少なくとも1つの細胞を若返らせる工程は、少なくとも1つの細胞内の老化に関連するDNAメチル化を減少させることを含んでもよい。側面に

50

よっては、少なくとも1つの細胞内の老化に関連するDNAメチル化を低減することは、老化に関連するメチル化に相関する少なくとも1つのゲノム位置でのDNAメチル化を低減することを含んでもよい。側面によっては、少なくとも1つのゲノム位置は、cg09780241、cg05099537、cg24541426、cg04316624、cg13180312、cg13316854、cg15726154、cg21507095、cg01697719、またはそれらの任意の組合せであってもよい。

【0152】

側面によっては、少なくとも1つの細胞を若返らせる工程は、少なくとも1つのゲノム位置でのDNAメチル化を、少なくとも約1%、または少なくとも約5%、または少なくとも約10%、または少なくとも約15%、または少なくとも約20%、または少なくとも約25%、または少なくとも約30%、または少なくとも約35%、または少なくとも約40%、または少なくとも約45%、または少なくとも約50%、または少なくとも約55%、または少なくとも約60%、または少なくとも約65%、または少なくとも約70%、または少なくとも約75%、または少なくとも約80%、または少なくとも約85%、または少なくとも約90%、または少なくとも約95%、または少なくとも約100%まで減少させることを含んでもよい。

【0153】

側面によっては、少なくとも1つの対照細胞は、本開示の組成物に接触していない細胞を含んでもよい。側面によっては、少なくとも1つの対照細胞は、本開示の組成物と接触していないが、それ以外は本開示の組成物と接触した少なくとも1つの細胞と同一の条件で増殖した細胞を含んでもよい。側面によっては、少なくとも1つの対照細胞は、50歳のヒト対象から単離された皮膚線維芽細胞であってもよい。側面によっては、少なくとも1つの対照細胞は、新生児ヒト表皮角化細胞（HEKn）であってもよい。側面によっては、少なくとも1つの対照細胞は、人工多能性幹細胞（iPSC）であってもよい。

【0154】

側面によっては、少なくとも1つの細胞を編集することは、少なくとも1つの細胞内の少なくとも1つの遺伝子の補正、少なくとも1つの細胞内の少なくとも1つの遺伝子のノックアウト、少なくとも1つの細胞のゲノムへの少なくとも1つのDNA配列の挿入、少なくとも1つの細胞のゲノム内の少なくとも1つのDNA配列の欠失、またはそれらの任意の組合せを含んでもよい。側面によっては、遺伝子編集システムとして、限定はされないが、CRISPR法、ウイルス法などを含む、標的細胞のゲノムを修飾するための当該技術分野で既知の任意のシステムを挙げてもよい。

【0155】

少なくとも1つの細胞は、対象から取得および/または単離してもよい。側面によっては、少なくとも1つの細胞は、任意の体細胞であってもよい。側面によっては、少なくとも1つの細胞は、線維芽細胞、角化細胞、間葉系幹細胞/間質細胞、末梢血単核細胞、キメラ抗原受容体T細胞（CAR-T細胞）、内皮細胞、軟骨細胞、筋肉幹細胞、神経幹細胞、肝細胞、辺縁幹細胞、網膜色素上皮細胞、造血幹細胞、マクロファージ、心筋細胞、膵細胞、細胞、またはこれらの任意の組合せであってもよい。

【0156】

側面によっては、少なくとも1つの細胞は、外分泌上皮細胞、ブルンナー腺細胞、呼吸器および消化管の隔離性杯状細胞、胃小窩細胞、主細胞、壁細胞、膵臓腺房細胞、小腸パネート細胞、II型肺細胞、肺クラブ細胞、バリア細胞、I型肺細胞、胆嚢上皮細胞、房心細胞、介在導管細胞、腸管刷子縁細胞、ホルモン分泌細胞、腸内分泌細胞、K細胞、L細胞、I細胞、G細胞、腸クロム親和性細胞、腸クロム親和性様細胞、N細胞、S細胞、D細胞、Mo細胞（またはM細胞）、甲状腺細胞。甲状腺上皮細胞、傍濾胞細胞、副甲状腺細胞、副甲状腺主細胞、好酸素性細胞、膵島（ランゲルハンス島）、細胞、細胞、細胞、細胞、PP細胞（細胞）、外分泌上皮細胞、唾液腺粘液細胞、唾液腺漿液細胞、フォン・エブネル腺細胞、乳腺細胞、涙腺細胞、耳道腺細胞、エクリン汗腺暗細胞。エクリン汗腺透明細胞、アポクリン汗腺細胞、モル腺細胞、皮脂腺細胞、ボーマン腺細胞、下

垂体前細胞 / 中間細胞、副腎皮質刺激ホルモン分泌細胞、性腺刺激ホルモン分泌細胞、乳
 腺刺激ホルモン分泌細胞、メラニン細胞刺激ホルモン分泌細胞、成長ホルモン分泌細胞、
 甲状腺刺激ホルモン分泌細胞、大細胞性神経分泌細胞、傍細胞性神経分泌細胞、クロム親
 和性細胞、上皮細胞、角化細胞、表皮基底細胞、メラニン形成細胞、糸胞細胞、毛軸細胞
 、皮質毛軸細胞、角質毛軸細胞。ハックスリ層毛根鞘細胞、ヘンレ層毛根鞘細胞、外根鞘
 毛細胞、表面上皮細胞、基底細胞（幹細胞）、介在導管細胞、線条導管細胞、乳腺管細胞
 、エナメル芽細胞、口腔細胞、象牙芽細胞、白垂質芽細胞、神経細胞、聴覚内耳毛細胞、
 聴覚外耳毛細胞、嗅覚上皮基底細胞、冷感性一次感覚神経細胞、熱感性一次感覚神経細胞
 、メルケル細胞、嗅覚受容体神経細胞、痛覚受容体神経細胞、光受容体細胞、光受容体杆
 体細胞、光受容体青感性錐体細胞、光受容体緑感性錐体細胞、光受容体赤感性錐体細胞、
 固有受容性一次感覚神経細胞、触覚一次感覚神経細胞、化学受容体頸動脈小体細胞、外毛
 細胞、内毛細胞、味覚受容体細胞、自律神経細胞、コリン作動性神経細胞、アドレナリン
 作動性神経細胞、ペプチド作動性神経細胞、内柱細胞、外柱細胞、内部支持細胞、外部支
 持細胞、境界細胞、ヘンゼン細胞、前庭器官支持細胞、味覚芽支持細胞、嗅覚上皮支持細
 胞、シュワン細胞、付随体膠細胞、腸管膠細胞、膠細胞、介在神経細胞、籠細胞、車輪細
 胞。星状細胞、ゴルジ細胞、顆粒細胞、ルガ口細胞、単極刷子細胞、マルチノッティ細胞
 、シャンデリア細胞、カハール・レチウス細胞、ダブルブーケ細胞、神経膠形態細胞、網
 膜水平細胞、無軸索細胞、脊髄介在神経細胞、レンショウ細胞、主要細胞、紡錘神経細胞
 、音叉状神経細胞、ピラミッド状細胞、場所細胞、グリッド細胞、スピード細胞、頭部方
 向細胞、ベッツ細胞、星状細胞、境界細胞、房状細胞、プルキンエ細胞、中棘細胞、（種
 々の）星状細胞、乏突起膠細胞、上衣細胞、伸長上衣細胞、下垂体細胞、水晶体細胞、前
 水晶体上皮細胞、結晶含有水晶体纖維細胞、白色脂肪細胞、褐色脂肪細胞などの脂肪細胞
 、肝脂肪細胞、内卵胞膜細胞、黄体細胞、顆粒膜黄体細胞、卵胞膜黄体細胞、テストステ
 ロンを分泌する精巢のライディッヒ細胞、精囊細胞、前立腺細胞、球状尿道腺細胞、バル
 トリン腺細胞、リットレ腺細胞、子宮内膜細胞、傍糸球体細胞、腎臓黄斑細胞、腎臓周極
 細胞、腎臓メサングウム細胞、パリア細胞、頭頂上皮細胞、有足細胞、近位尿細管刷子境
 界細胞、ヘンレループ細隙細胞、腎臓遠位尿細管細胞。腎臓集合管主細胞、介在細胞、移
 行上皮細胞、導管細胞、精巢輸出管細胞、精巢上体主細胞、精巢上体基底細胞、内皮細胞
 、半月板上皮細胞、歯間上皮細胞、角膜線維芽細胞、腱線維芽細胞、骨髓網状組織線維芽
 細胞、その他の非上皮性線維芽細胞、肝星細胞（伊藤細胞）、椎間板髓核細胞、ヒアルロ
 ン酸軟骨細胞、線維軟骨細胞、弾性軟骨細胞、骨芽細胞 / 骨細胞、骨芽前駆細胞、眼球硝
 子体細胞、耳介リンパ節周囲星状細胞、脾臓星状細胞、骨格筋細胞、赤色骨格筋細胞、白
 色骨格筋細胞、中間骨格筋細胞、筋紡錘体核袋状細胞、筋紡錘体核鎖状細胞、筋付随体細
 胞、心筋細胞、SA結節細胞、プルキンエ線維細胞、平滑筋細胞、筋上皮細胞、赤血球、
 巨核球、血小板、単球細胞、結合組織マクロファージ、表皮ランゲルハンス細胞、破骨細
 胞、樹状細胞、小神経膠細胞、好中球顆粒細胞、骨髓芽球、前骨髓球、骨髓球、後骨髓球
 、好酸球、好塩基球、肥満細胞、ヘルパーT細胞、サブレッサーT細胞、細胞障害性T細
 胞、ナチュラルキラーT細胞、B細胞、血漿細胞、ナチュラルキラー細胞、造血幹細胞、
 生殖細胞、卵原細胞 / 卵母細胞、精子細胞、精子原細胞、精原細胞、精子、栄養細胞、顆
 粒膜細胞、セルトリ細胞、上皮網状細胞、間質細胞、間質腎細胞、またはそれらの組合せ
 であってもよい。

【0157】

側面によっては、疾患は、炎症性疾患、自己免疫疾患、変性疾患、心血管疾患、虚血性
 疾患、癌、遺伝性疾患、代謝性疾患、特発性疾患、またはそれらの任意の組合せを含ん
 てもよい。側面によっては、疾患として、限定はされないが、直接的な組織傷害（火傷、外
 傷、褥瘡など）；虚血 / 血管性事象（心筋梗塞、脳卒中、ショック症、出血、凝固障害な
 ど）、感染（小肺炎、肺炎、髄膜炎、SIRSなど）；腫瘍（例えば、乳がん、肺がん、リ
 ンパ腫など）；免疫 / 自己免疫疾患（移植片対宿主病、多発性硬化症、糖尿病、炎症性腸
 疾患、紅斑性狼瘡、関節リウマチ、乾癬など）；変性疾患（骨粗鬆症、変形性関節症、ア
 ルツハイマー病など）；先天性疾患 / 遺伝性疾患（表皮水疱症、骨形成不全症、筋ジスト

ロフィー、リソソーム蓄積疾患、ハンチントン病など)；薬物副作用(薬物誘導性肝炎、薬物誘導性心筋障害など)；毒性損傷(放射線被曝、化学物質被曝、アルコール性肝炎、アルコール性膵炎、アルコール性心筋症、コカイン心筋症など)；代謝異常(尿毒症性心膜炎、代謝性アシドーシスなど)；医原性症状(放射線誘発性組織損傷、手術関連合併症など)；および/または原因不明の進行症状(筋萎縮性側索硬化症、パーソネイジ・ターナー症候群など)、またはそれらの任意の組合せを含む任意の疾患が挙げられる。側面によっては、疾患は、移植片対宿主病(GvHD)、表皮水疱症(EB)、接合型EB(JEB)、単純型EB(EBS)、先天性魚鱗癬、先天性角化不全症、劣性ジストロフィー型EB(RDEB)、黄斑変性症、アルツハイマー病、老化症、II型糖尿病、心臓病、骨粗鬆症、慢性皮膚創傷、糖尿病関連潰瘍/創傷、エーラス・ダンロス症候群(EDS)やマルファン症候群などの結合組織病、癌、またはそれらの任意の組合せを含んでもよい。側面によっては、疾患はまた傷害を含んでもよい。傷害は、火傷、骨折、脳震盪、挫傷、骨破碎、腱断裂、靭帯断裂、皮膚の穿刺、瘢痕化および/または切断、あるいは当該技術分野で既知の任意の他の損傷を含んでもよい。側面によっては、疾患は、エーラス・ダンロス症候群であってもよい。

10

20

30

40

50

【0158】

本明細書で使用される用語「治療すること(treating)」あるいは「治療する(treat)」は、疾患、病状、または障害と闘うことを目的とする患者の管理および看護を指していて、かつ疾患の症状または合併症を改善するために、あるいは疾患、病状、または障害を排除するために、本開示の化合物あるいはその薬学的に許容可能な塩、多形、または溶媒和物を投与することを含む。用語「処理する(treat)」はまた、生体外での細胞または動物モデルの処理を含んでもよい。

【0159】

本明細書で使用される用語「予防すること(preventing)」、「予防する(prevent)」、または「に対して防御する(protecting against)」は、このような疾患、病状、または障害の症状または合併症の発症を低減すること、あるいは排除することを指している。

【0160】

本明細書で使用される用語「改善する(ameliorate)」、「改善すること(ameliorating)」およびその文法的変形は、対象の疾患症状の重篤度を低減させることを意味する。

【0161】

薬剤または化合物の「有効量(effective amount)」および「治療有効量(therapeutically effective amount)」という用語は、最も広い意味では、所望の効果または利益を提供する無毒で十分な量の活性薬剤または化合物を指すように用いられる。

【0162】

用語「利益(benefit)」は、最も広い意味では、任意の望ましい効果を指すように用いられ、かつ特に本明細書で定義の臨床的な利益を含む。臨床的利益は、種々の目標点、例えば、遅延および完全停止を含む疾患進行のある程度の阻害；疾患の発症数および/または症候数の低下；病変サイズの低下；隣接する末梢器官および/または組織への疾患細胞の浸潤の阻害(すなわち低減、遅延、または完全停止)；疾患の拡大の阻害(すなわち低減、遅延、または完全停止)；自己免疫反応の低減(これは疾患病変の退縮または切除をもたらす可能性はあるものの、それは必須ではない)；疾患に伴う1つ以上の症状のある程度の緩和；治療後の無病状期間の長さ、例えば無増悪生存期間の延伸；全生存期間の延伸；より高い応答率；および/または治療後の所定の時点での死亡率の低下を評価して決定してもよい。

【0163】

本開示の任意の方法、組成物、またはキットでは、TERTはヒトTERT(hTERT)であってもよい。

【0164】

本開示の任意の方法、組成物、またはキットでは、TERCは、ヒトTERC (hTERC) であってもよい。

【0165】

本明細書で使用される「対象」は哺乳類を含む。哺乳類は、任意の哺乳類、例えば、ヒト、霊長類、マウス、ラット、イヌ、ネコ、ウシ、ウマ、ヤギ、ラクダ、ヒツジ、ブタ、または任意の他の哺乳類であってもよい。側面によっては、哺乳類はヒトであってもよい。対象は、オスマたはメスであってもよい。

【実施例】

【0166】

実施例1：hTERC転写の水準は、線維芽細胞と比較して人工多能性幹細胞では高い

線維芽細胞 (FB)、人工多能性幹細胞 (iPSC) 内のヒトテロメラーゼRNA成分 (hTERC) の転写の水準を、NanoString社のnCounter Gene Expression測定法を用いて測定した。図4に示すように、親細胞であるF50 (50歳の個体由来のヒト皮膚線維芽細胞) 株およびFN2 (新生児の線維芽細胞) 株と比較して、iPSCでは約2.4~4.6倍のhTERCの発現上昇が確認された。

【0167】

実施例2：体細胞を本開示の組成物に接触させると、体細胞内のhTERCの水準が増加する

この実施例では、種々の細胞株に本開示の種々の組成物を遺伝子移入した。

【0168】

50歳の個体由来のヒト皮膚線維芽細胞 (F50)、新生児ヒト表皮角化細胞 (HEKn)、およびGFP発現ヒト間葉系幹細胞/間質細胞 (hMSC-GFP) に、Lipofectamine (登録商標) RNAiMAX (商標) (RNAiMAX) (Thermo Fisher Scientific社製) を用いて、dCas9-VPRと500 ngのhTERCガイドRNA (gRNA) (それぞれ個別に、あるいは1:1:1:1比率の4種のガイドの混合物として) をコードする500 ngの修飾mRNA (mod-mRNA) で1回の遺伝子移入を実施した。細胞を遺伝子移入の24時間後に回収した。次いでBio-Rad社のCFX Connect Systemを用いて、ヒトTERC RNA発現についてリアルタイム定量PCR反応を実施した。データを Ct法を用いて解析した。

【0169】

内因性hTERC転写物の活性化を試験するために、F50細胞に、1種の個別のgRNA (g1、g2、g3、およびg4) とdCas9-VPRをコードするmod-mRNA、あるいは1:1:1:1比率の4種のガイド全ての混合物 (gmix) とdCas9-VPRをコードするmod-mRNAを遺伝子移入した。hTERC転写の水準は、定量的逆転写PCRを用いて定量した。図5に示すように、その結果は、僅か1種のみシングルガイド (g2、g4) でも、4種のgRNAの混合物によって達成される水準に匹敵する水準まで内因性hTERCを活性化するのに十分であることを示している。4種のgRNAの混合物とdCas9-VPRをコードするmod-mRNAでの遺伝子移入は、図5に示すように、hTERCの発現に最大の増加を示していた。

【0170】

他の細胞株全体に対してdCas9-VPRによる内因性hTERCの活性化を観察するために、HEKn細胞株およびhMSC-GFP細胞株に、全ての4種のgRNAの混合物とdCas9-VPRをコードするmod-mRNAを遺伝子移入した。次いでhTERCの発現を、定量的逆転写PCRを用いて測定した。その結果を図6に示す。図6に示すように、試験した全ての細胞株で観察されたhTERC活性化の水準は、iPSCで観察された水準に匹敵していた。

【0171】

実施例2での方法

細胞株：50歳のヒト皮膚線維芽細胞 (F50、5番目の継代) 株、および新生児ヒト表皮角化細胞 (HEKn、7番目の継代) 株をATCCから入手した。GFP蛍光を含むヒト間葉系幹細胞/間質細胞 (hMSC-GFP、15番目の継代) をCyagen社から入手した。F50株は、5%のヒト血清、1倍のMEM非必須アミノ酸溶液、55 μMの2-メルカプトエタノール (-ME)、1倍のGlutaMAX (商標) 補充物、および抗生物質 (全てThermo Fisher Scientific社製) を補充したDMEM/F12からなる線維芽細胞増殖培地 (FEM) 内で

10

20

30

40

50

、50 ug/mLのアスコルビン酸、1 ng/mLのヒドロコルチゾン（ともにSigma社製）、12 ng/mLの基礎FGF（Gibco社製）、および5 ng/mLのヒトEGF（Invitrogen社製）とともに培養した。HEKn細胞は、EDGSおよび抗生物質（全てThermo Fisher社製）を補充したEpiLife培地内で培養した。hMSCは、間葉系幹細胞増殖培地（MSCGM）（Cyagen社からキットとして入手）内で培養した。

【0172】

遺伝子移入：線維芽細胞および角化細胞での全ての遺伝子移入を、複合化緩衝液としてOpti-MEM（登録商標）I還元血清培地（Opti-MEM）（Thermo Fisher Scientific社）を用いて実施し、ヒト間葉系幹細胞/間質細胞（hMSC）の遺伝子移入を、Kogutらの文献（Nature Communications, 2018）の説明のように、pHを8.2に調整したOpti-MEM（Opti-MEM - pH 8.2）を用いて実施した。dCas9-VPRをコードする500 ngのmod-mRNAおよび500 ngのhTERCガイドRNA（gRNA）（それぞれ個別（g1、g2、g3、g4）または1:1:1:1比率での4種のガイドの混合物（gmix））またはdCas9-VPRのみをコードする500 ngのmod mRNAによる1回の遺伝子移入を、Lipofectamine（登録商標）RNAiMAX（商標）（RNAiMAX）（Thermo Fisher Scientific社）を用いて実施した。RNAおよびRNAiMAXをまず、角化細胞と線維芽細胞の遺伝子移入のためのOpti-MEM、またはhMSCの遺伝子移入のためのOpti-MEM-pH 8.2のいずれかに希釈した。mod-mRNAおよび/またはgRNAの遺伝子移入では、100 ng/μLのRNAを5倍に希釈し、mod-mRNAおよび/または1 mgのgRNA当たり5 μLのRNAiMAXを（角化細胞と線維芽細胞のための）Opti-MEMまたは（hMSCのための）Opti-MEM-pH 8.2を用いて10倍に希釈した。希釈後に、これらの成分を共に組み合わせて室温で15分間培養した。室温での培養後に、200 ng/mLのB18R（eBioscience社製）を補充したそれぞれの培地中に、mod-RNA mixおよび/またはgRNAとRNAiMAXの遺伝子移入混合物を細胞培養物に供与した。

10

20

30

【0173】

PCR：遺伝子移入24時間後にF50細胞、HEKn細胞、およびhMSC-GFP細胞を回収した。RNAをRNeasy Plus Minikit（Qiagen社）を用いて抽出した。cDNAをiScript（商標）cDNA Synthesis Kit（BioRad社）を用いて合成した。ヒトTERC RNAの定量PCR（QPCR）反応を、SsoAdvanced（商標）Universal SYBR（登録商標）Green Supermixを用いて実施した。データを、Ct法を用いて解析した。

【0174】

実施例2の要約：本開示の組成物、より具体的にはdCas9-VPRをコードするmod-mRNAを1つ以上の種々のgRNA種を含む複数のgRNAと組合わせて体細胞に遺伝子移入すると、人口多能性幹細胞と同等の水準まで遺伝子移入細胞内でのhTERCの発現を増加させることができる。

【0175】

実施例3：dCas9-VPRをコードするmod-RNAを単独で遺伝子移入しても、標的細胞内でのhTERC発現を誘導しない

本実施例では、種々の細胞株に、本開示の種々の組成物、具体的にはdCas9-VPRをコードするmod-RNAのみを含む組成物で遺伝子移入した。

40

【0176】

50歳のヒト皮膚線維芽細胞（F50）、およびGFP発現ヒト間葉系幹細胞/間質細胞（hMSC-GFP）に、Lipofectamine（登録商標）RNAiMAX（商標）（RNAiMAX）（Thermo Fisher Scientific社製）を用いて、dCas9-VPRをコードする500 ngのmod-mRNAで1回の遺伝子移入を実施した。細胞（F50、hMSC-GFP）を遺伝子移入24時間後に回収した。Bio-Rad社のCFX Connect Systemを用いて、ヒトTERC RNA発現の定量的逆転写PCR反応を実施し、データをCt法を用いて解析した。その結果を図7に示す。図7に示すように、任意のガイドRNAが不在の状態、dCas9-VPRをコードするmod-RNAのみを標的細胞内に遺伝子移入しても、hTERCの発現水準は増加しない。

【0177】

50

実施例 3 での方法：

細胞株：50歳のヒト皮膚線維芽細胞（F50、5番目の継代）をATCCから入手した。GFP蛍光を有するヒト間葉系幹細胞/間質細胞（hMSC-GFP、11番目の継代）をCyagen社から入手した。F50株を、5%のヒト血清、1倍のMEM非必須アミノ酸溶液、55 μMの2-メルカプトエタノール（-ME）、1倍のGlutaMAX（商標）補充物、および抗生物質（全てThermo Fisher Scientific社製）を補充したDMEM/F12からなる線維芽細胞増殖培地（FEM）中で、50 ug/mLのアスコルビン酸、1 ng/mLのヒドロコルチゾン（ともにSigma社製）、12 ng/mLの基礎FGF（Gibco社製）、および5 ng/mLのヒトEGF（Invitrogen社製）とともに培養した。hMSCは、間葉系幹細胞増殖培地（MSCGM）（Cyagen社からキットとして入手）中で培養した。

10

【0178】

遺伝子移入：線維芽細胞の遺伝子移入は全て、Opti-MEMを複合緩衝液として用いて実施し、ヒト間葉系幹細胞/間質細胞（hMSC）の遺伝子移入は、Opti-MEM-pH 8.2を用いて実施した。dCas9-VPRのみをコードする500 ngのmod-mRNAで1回の遺伝子移入を、Lipofectamine（登録商標）RNAiMAX（商標）（RNAiMAX）（Thermo Fisher Scientific社製）を用いて実施した。RNAとRNAiMAXを、まず適切なOpti-MEM中に希釈した。mod-mRNAの遺伝子移入では、100 ng/μLのRNAを5倍に希釈し、1 μgのmod-mRNA当たり5 μLのRNAiMAXを適切なOpti-MEMを用いて10倍に希釈した。希釈後に、これらの成分を共に組み合わせて室温で15分間培養した。室温での培養後に、mod-RNAとRNAiMAXの遺伝子移入混合物を、200 ng/mLのB18R（eBioscience社製）を補充したそれぞれの培地内でこれら細胞培養物に供与した。

20

【0179】

PCR：F50細胞とhMSC-GFP細胞を遺伝子移入の24時間後に回収した。RNAをRNeasy Plus Minikit（Qiagen社製）を用いて抽出した。cDNAをiScript（商標）cDNA Synthesis Kit（BioRad社製）を用いて合成した。ヒトTERC RNAのQPCR反応は、SoAdvanced（商標）Universal SYBR（登録商標）Green Supermixを用いて実施した。データはCt法を用いて解析した。P値を一对の学生t検定を用いて算出した。*P 0.05、**P 0.01、***P 0.001。

【0180】

実施例 3 の要約：本開示の方法および組成物を用いるhTERC発現の増加は、例えば少なくとも1種のガイドRNAの共投与によるトランス活性化ドメインを含むDNA標的化分子の特異的な標的化に依存している。

30

【0181】

実施例 4：本開示の方法および組成物は、老いた線維芽細胞の集団倍加（PD）の増加を引き起こす

本実施例では、本開示の方法を用いて、老いた線維芽細胞を本開示の組成物に接触させた。

【0182】

50歳のヒト皮膚線維芽細胞（F50）株をATCCから入手し、その後にKogutらの文献（Nature Communications, 2018）での過去の説明のように、90%の細胞が老化表現型を呈するまで培養した。簡潔に言えば、この老化表現型は、細胞形態の拡張と老化関連のβ-ガラクトシダーゼの陽性の約90%以上への上昇を含んでもよい。F50株を解凍し（F50S、15番目の継代：p15、32.5 PD）、5%のヒト血清、1倍のMEM非必須アミノ酸溶液、55 μMの2-メルカプトエタノール（-ME）、1倍のGlutaMAX（商標）補充物、および抗生物質（全てThermo Fisher Scientific社製）を補充したFEM:DMEM/F12中で、50 ug/mLのアスコルビン酸、1 ng/mLのヒドロコルチゾン（ともにSigma社製）、12 ng/mLの基礎FGF（Gibco社製）および5 ng/mLのヒトEGF（Invitrogen社製）とともに培養した。最初に1ウェル当たり10 kの線維芽細胞（F50S、p15、32.5 PD）を播種した。

40

【0183】

50

図8は、本開示の若返り組成物を用いる線維芽細胞の遺伝子移入計画を示す概略図である。最初に1ウェル当たり10 kの老いた線維芽細胞 (F50S、p15、32.5 PD) を播種した。この細胞をまず、hTERTをコードする500 ngのmod-mRNAで3回の連続的な遺伝子移入によって前処理した。前処理後に、Lipofectamine (登録商標) RNAiMAX (商標) (RNAiMAX) (Thermo Fisher Scientific社製) を用いて、hTERTをコードする500 ngのmod-mRNA、続いて翌日にdCas9-VPRと500 ngのヒトTERCガイドRNA (gRNA) (4種のガイドを1:1:1:1比率で) をコードする500 ng mod-mRNAで4回の連続的な遺伝子移入を実施した。RNAとRNAiMAXを、まずOpti-MEM (登録商標) I還元型血清培地 (Opti-MEM) 内に希釈した。mod-mRNAおよび/またはgRNAの遺伝子移入では、100 ng/ μ LのRNAを5倍に希釈し、mod-mRNAおよび/または1 mgのgRNA当たり5 μ LのRNAiMAXを、Opti-MEMを用いて10倍に希釈した。希釈後にこれらの成分を共に組み合わせて、室温で15分間培養した。室温での培養後に、200 ng/mLのB18R (eBioscience社製) を補充したFEM中でmod-RNA mixおよび/またはgRNAとRNAiMAXの遺伝子移入混合物を細胞培養物に供与した。この培地は、各遺伝子移入の後の一晩の培養後に交換した。

10

【0184】

(図8に示す計画を用いて) 未処理の老いた線維芽細胞 (F50S、p15、32.5 PD) および若返り組成物で処理した同一の細胞の累積集団倍加を測定した。細胞が70~80%の集密度に到達した際に、これら細胞をトリプシン処理して、血球計数器を用いて計数し継代した。PDを、最終計数值 (N) の開始 (標準) 計数值 (X_0) に対する比の対数を2の対数で割った数値; すなわち $PD = [\log (N \div X_0)] \div \log 2$ として計算した。P値を、一对の学生t検定を用いて計算した。*P 0.05, **P 0.01, ***P 0.001。その結果を図9に示す。図9に示すように、本開示の若返り組成物による処理により集団倍加が増加がもたらされる。

20

【0185】

実施例4の要約: 本開示の組成物および方法を用いて、老いた線維芽細胞を含む老いた細胞を若返らせることができ、処理した細胞が呈する集団倍加の総数の増加がもたらされる。

【0186】

実施例5: 本開示の方法および組成物は、遺伝子移入された標的細胞内のテロメア長およびミトコンドリアDNA量を増加させる

30

本実施例では、種々の細胞株 (低継代および老いた50歳のヒト皮膚線維芽細胞 (それぞれF50とF50S)、ヒト間葉系幹細胞/間質細胞 (hMSC)、およびヒト角化細胞) に、本開示の種々の方法を用いて本開示の種々の組成物を遺伝子移入した。次いで各細胞株でのテロメア長の変化を測定した。

【0187】

低継代および老いた50歳のヒト皮膚線維芽細胞: 50歳のヒト皮膚線維芽細胞 (F50) 株をATCCから入手し、その後にKogutらの文献 (Nature Communications, 2018) での過去の説明のように90%の細胞が老化表現型を呈するまで培養した。簡潔に言えば、老化表現型は、細胞形態の拡張および老化関連 α -ガラクトシダーゼの陽性の約90%以上への上昇を含んでもよい。F50株を解凍して (F50S、15番目の継代、32.5 PD)、5%のヒト血清、1倍のMEM非必須アミノ酸溶液、55 μ Mの2-メルカプトエタノール (-ME)、1倍のGlutaMAX (商標) 補充物、および抗生物質 (全てThermo Fisher Scientific社製) を補充したFEM:DMEM/F12内で、50 μ g/mLのアスコルビン酸、1 ng/mLのヒドロコルチゾン (ともにSigma社製)、12 ng/mLの基礎FGF (Gibco社製)、および5 ng/mLのヒトEGF (Invitrogen社製) とともに培養した。最初に1ウェル当たり10 kの線維芽細胞 (F50、p3~4、またはF50S、p15、32.5 PD) を播種した。

40

【0188】

図8は、本開示の若返り組成物を用いる線維芽細胞の遺伝子移入計画を示す概略図であ

50

る。最初に1ウェル当たり10 kの老いた線維芽細胞 (F50S、p15、32.5 PD) を播種した。この細胞をまず、hTERTをコードする500 ngのmod-mRNAで3回の連続的な遺伝子移入によって前処理した。前処理後に、Lipofectamine (登録商標) RNAiMAX (商標) (RNAiMAX) (Thermo Fisher Scientific社製) を用いて、hTERTをコードする500 ngのmod-mRNA、続いて翌日にdCas9-VPRと500 ngのヒトTERCガイドRNA (gRNA) (4種のガイドを1:1:1:1比率で) をコードする500 ng mod-mRNAで4回の連続的な遺伝子移入を実施した。RNAとRNAiMAXを、まずOpti-MEM (登録商標) I還元型血清培地 (Opti-MEM) 内に希釈した。mod-mRNAおよび/またはgRNAの遺伝子移入では、100 ng/ μ LのRNAを5倍に希釈し、mod-mRNAおよび/または1 mgのgRNA当たり5 μ LのRNAiMAXを、Opti-MEMを用いて10倍に希釈した。希釈後にこれらの成分を共に組み合わせて、室温で15分間培養した。室温での培養後に、200 ng/mLのB18R (eBioscience社製) を補充したFEM中でmod-RNA mixおよび/またはgRNAとRNAiMAXの遺伝子移入混合物を細胞培養物に供与した。この培地は、各遺伝子移入の後の一晩の培養後に交換した。

【0189】

図10は、本開示の若返り組成物を用いる線維芽細胞の別の遺伝子移入計画を示す概略図である。F50線維芽細胞を、6ウェル形式ディッシュの1ウェル当たり15 K細胞でFEM内に播種した。Lipofectamine (登録商標) RNAiMAX (商標) (RNAiMAX) (Thermo Fisher Scientific社製) を用いて、hTERTをコードする500 ngのmod-mRNAを、dCas9-VPRと500 ngのhTERCガイドRNA (gRNA) (1種の選択ガイド) をコードする200 ngのmod-mRNAとともに、4日間毎に4回の遺伝子移入を実施した。RNAとRNAiMAXを、まずOpti-MEM (登録商標) I還元型血清培地 (Opti-MEM) 内に希釈した。mod-mRNAおよび/またはgRNAの遺伝子移入では、100 ng/ μ LのRNAを5倍に希釈し、mod-mRNAおよび/または1 mgのgRNA当たり5 μ LのRNAiMAXを、Opti-MEMを用いて10倍に希釈した。希釈後にこれらの成分を共に組み合わせて、室温で15分間培養した。室温での培養後に、200 ng/mLのB18R (eBioscience社製) を補充したFEM中でmod-RNA mixおよび/またはgRNAとRNAiMAXの遺伝子移入混合物を細胞培養物に供与した。この培地は、各遺伝子移入の後の一晩の培養後に交換した。

【0190】

ヒト間葉系幹細胞/間質細胞: ヒト間葉系幹細胞/間質細胞 (hMSC) を、間葉系幹細胞増殖培地 (MSCGM) (Cyagen社からキットとして入手) を用いて低酸素 (5%) で培養した。hMSCの全ての遺伝子移入は、Kogutらの文献 (Nature Communications, 2018) の説明のように、pHを8.2に調整したOpti-MEM (Opti-MEM-pH 8.2) を用いて実施した。

【0191】

図11は、本開示の若返り組成物を用いるhMSCの遺伝子移入計画を示す概略図である。Lipofectamine (RNAiMAX) (Thermo Fisher Scientific社製) を用いて、ヒトTERTをコードする500 ngのmod-mRNAでの3回の遺伝子移入の前処理を実施した。hTERT mod-mRNA遺伝子移入による前処理後に、Lipofectamine (登録商標) RNAiMAX (商標) (RNAiMAX) (Thermo Fisher Scientific社製) を用いて、hTERTをコードする500 ngのmod-mRNA、続いて翌日のdCas9-VPRと500 ngのヒトTERCガイドRNA (gRNA) (4種のガイドを1:1:1:1の比率で) をコードする500 ngのmod-mRNAによる4回の連続的な遺伝子移入を実施した。RNAとRNAiMAXを、まずOpti-MEM-pH 8.2内に希釈した。mod-mRNAの遺伝子移入では、100 ng/ μ LのRNAを5倍に希釈し、1 mgのmod-mRNA当たり5 μ LのRNAiMAXを、Opti-MEM-pH 8.2を用いて10倍に希釈した。希釈後にこれらの成分を共に組み合わせて、室温で15分間培養した。室温での培養後に、200 ng/mLのB18Rを補充したそれぞれの培地中でmod-RNA mixとRNAiMAXの遺伝子移入混合物を細胞培養物に供与した。この培地は、各遺伝子移入の後の一晩の培養後に交換した。

【0192】

ヒト角化細胞：ヒト新生児表皮角化細胞（HEKn）を、EDGSおよび抗生物質を補充したEpiLife培地（全てThermoFisher製）中で培養した。HEKの遺伝子移入は全て、pH無調整のOpti-MEMを用いて実施した。

【0193】

図11は、本開示の若返り組成物を用いるHEKnの遺伝子移入計画を示す概略図である。Lipofectamine（登録商標）RNAiMAX（商標）（RNAiMAX）（Thermo Fisher Scientific社製）を用いて、ヒトTERTをコードする100 ngのmod-mRNAでの3回の遺伝子移入の前処理を実施した。RNAとRNAiMAXを、まずOpti-MEM（登録商標）I還元型血清培地（Opti-MEM）（Thermo Fisher Scientific社製）内に希釈した。mod-mRNAの遺伝子移入では、100 ng/ μ LのRNAを5倍に希釈し、1 μ gのmod-mRNA 10
当たり5 μ LのRNAiMAXをOpti-MEMで10倍に希釈した。希釈後に、これらの成分を共に組合わせて室温で15分間培養した。室温での培養後に200 ng/mLのB18R（eBioscience社製）を補充したEpiLife培地中でmod-RNA mixとRNAiMAXの遺伝子移入混合物を細胞培養物に供与した。HEKn細胞株の前処理後に、Lipofectamine（登録商標）RNAiMAX（商標）（RNAiMAX）（Thermo Fisher Scientific社製）を用いて、hTERTをコードする100 ngのmod-mRNA、続いて翌日のdCas9-VPRと100 ngのgRNA mixをコードする100 ngのmod-mRNAによる4回の連続的な遺伝子移入を実施した。RNAとRNAiMAXを、まずOpti-MEM（Thermo Fisher Scientific社製）内に希釈した。mod-mRNAおよび/またはgRNAの遺伝子移入では、100 ng/ μ LのRNA 20
を5倍に希釈し、mod-mRNAおよび/または1 μ gのgRNA当たり5 μ LのRNAiMAXをOpti-MEMを用いて10倍に希釈した。希釈後にこれらの成分を共に組み合わせ、室温で15分間培養した。室温での培養後に、200 ng/mLのB18R（eBioscience社）を補充したEpiLife中でmod-RNA mixおよび/またはgRNAとRNAiMAXの遺伝子移入混合物を細胞培養物に供与した。この培地は、各遺伝子移入の後の一晩の培養後に交換した。

【0194】

F50S細胞を、最後の遺伝子移入の3日後に回収した。DNeasy（登録商標）Blood and Tissue Kit（Qiagen社製）を用いてゲノムDNA（gDNA）を抽出した。SsoAdvanced（商標）Universal SYBR（登録商標）Green Supermixを用いて、処理細胞と未処理細胞の相対テロメア長に関する定量的PCR反応を実施した。その結果を図12に示す。

【0195】

F50細胞を、最後の遺伝子移入の3日後に回収した。Quick-DNA（商標）Miniprep Kit（Zymo Research社製）を用いて、ゲノムDNA（gDNA）を抽出した。ScienCell社のAbsolute Human Telomere Length Quantification and Mitochondrial DNA Copy Number qPCR Assay Kit「絶対的ヒトテロメア長定量およびミトコンドリアDNAコピー数qPCR測定キット」（#8958）に基づく定量的PCRを用いて、処理細胞と未処理細胞での平均テロメア長の変化を測定した。テロメアとプライマーの組は、ヒトの17番染色体上に位置する100塩基対（bp）のテロメア配列を含有する対照ゲノムDNA（キットに付属）と試料を比較して、テロメア長を認識かつ増幅する。プライマー・プローブリアルタイムPCRを、BioRad社のCFX96リアルタイムシステム（BioRad社製、Hercules, CA）を用いて実施した。その結果を図13に示す。

【0196】

最後の遺伝子移入の3日後に、hMSC細胞とHEKn細胞を回収した。DNeasy（登録商標）Blood and Tissue Kit（Qiagen社）を用いてゲノムDNA（gDNA）を抽出した。ScienCell社のAbsolute Human Telomere Length Quantification and Mitochondrial DNA Copy Number qPCR Assay Kit（#8958）に基づく定量的PCRを用いて、処理細胞と未処理細胞での平均テロメア長の変化を測定した。テロメアとプライマーの組は、ヒトの17番染色体上に位置する100塩基対（bp）のテロメア配列を含有する対照ゲノムDNA（キットに付属）と試料を比較して、テロメア長を認識かつ増幅する。プライマー・プローブリアルタイムPCRを、BioRad社のCFX96リアルタイムシス 50

テム (BioRad社、Hercules, CA) を用いて実施した。その結果を図 1 4 に示す。

【 0 1 9 7 】

図 1 2、図 1 3、および図 1 4 に示すように、本開示の若返り組成物で処理した F50S、F50、hMSC、および HEK293T の各細胞は、未処理の対照細胞と比較して、テロメア長が増加していた。さらに処理した F50S 細胞および HEK293T 細胞の場合に、テロメア長は、F50 由来の人工多能性幹細胞 (F50-iPSC) で測定されたテロメア長を超えていた。

【 0 1 9 8 】

ScienCell社のAbsolute Human Telomere Length Quantification and Mitochondrial DNA Copy Number Dual Quantification qPCR Assay Kit (#8958) を用いる定量PCRによりミトコンドリアDNA (mtDNA) コピー数の変化を測定した。mtDNAとプライマーの組は、ヒトmtDNA上の最大の保存領域のうちの1つを認識かつ増幅し、核ゲノムDNA上の非標的配列を増幅することはない。シングルコピー対照 (SCR) とプライマーの組は、ヒトの17番染色体上の100 bp長の領域を認識かつ増幅し、データの正規化のための対照として機能する。プライマー・プローブリアルタイムPCRを、BioRad社のCFX96リアルタイムシステム (BioRad社製、Hercules, CA) を用いて実施した。その結果を図 1 5 に示す。図 1 5 に示すように、本開示の若返り組成物で処理した F50S、hMSC、および HEK293T の各細胞は、未処理の細胞と比較して、ミトコンドリアDNAコピー数が増加していた。

【 0 1 9 9 】

実施例 5 の要約：本開示の組成物および方法を用いて、低継代および老いた線維芽細胞、ヒト間葉系幹細胞 / 間質細胞、およびヒト表皮角化細胞を含む種々の細胞型を若返らせることができ、処理した細胞でのテロメア長およびミトコンドリアDNA量の増加がもたらされる。

【 0 2 0 0 】

実施例 6：本開示の方法および組成物は、線維芽細胞内でテロメラーゼ活性を再活性化する

本実施例では、50歳のヒト線維芽細胞 (F50) に本開示の種々の組成物を遺伝子移入した。遺伝子移入された標的細胞ならびに対照細胞でのテロメラーゼ活性を分析した。

【 0 2 0 1 】

50歳のヒト皮膚線維芽細胞 (F50、6番目の継代) を、5%のヒト血清、1倍のMEM非必須アミノ酸溶液、55 μ Mの2-メルカプトエタノール (-ME)、1倍のGlutaMAX (商標) 補充物、および抗生物質 (全てThermo Fisher Scientific社製) を補充したDMEM/F12からなる線維芽細胞増殖培地 (FEM) 中で、50 μ g/mLのアスコルビン酸、1 ng/mLのヒドロコルチゾン (ともにSigma社製)、12 ng/mLの基礎FGF (Gibco社製)、および5 ng/mLのヒトEGF (Invitrogen製) とともに培養した。未処理対照株として、F50-iPSC株を、Matrigel基底基質 (Corning社製) で被覆されたプレート上にある1倍のmTeSR (商標) 補充物 (StemCell Technologies社製) ならびに抗生物質 (Thermo Fisher Scientific社製) を添加したmTeSR™1培地内で培養した。

【 0 2 0 2 】

Lipofectamine (登録商標) RNAiMAX (商標) (RNAiMAX) (Thermo Fisher Scientific社製) を用いて、hTERTをコードする3 μ gのmod-mRNAまたはdCas9-VP Rと500 ngのgRNA mixをコードする3 μ gのmod-mRNAを有するhTERTをコードする3 μ gのmod-mRNAのいずれかで2回の連続的な遺伝子移入を実行した。RNAとRNAiMAXを、まずOpti-MEM (登録商標) I還元型血清培地 (Opti-MEM) (Thermo Fisher Scientific社製) 内に希釈した。mod-mRNAの遺伝子移入では、100 ng/ μ LのRNAを5倍に希釈し、1 μ gのmod-mRNA当たり5 μ LのRNAiMAXをOpti-MEMを用いて10倍に希釈した。希釈後に、これらの成分を共に組合わせて、室温で15分間培養した。室温での培養後に、200 ng/mLのB18R (eBioscience社製) を補充したFEM内で、mod-RNAおよび / またはgRNAとRNAiMAXの遺伝子移入混合物を細胞培養物に供与した。この培地は、各遺伝子移入の後の一晩の培養後に交換した。

【0203】

テロメラーゼ活性は、TRAPeze (登録商標) Telomerase Detection Kit (Millipore社製) を用いて、製造元の説明書に従って測定した。CHAPS (1倍) 溶解緩衝液を用いて、陽性対照細胞 (キットに付属)、F50由来のiPSC株 (F50-iPSC)、線維芽細胞 (F50)、および3 ugのhTERTのみまたは3 ugのdCas9-VPRと3ugのgRNA mixを有する3 ugのhTERTの2回の連続的な遺伝子移入で処理された線維芽細胞 (F50) の抽出物を取得した。約10,000個の細胞をそれぞれのテロメア反復増幅手順の測定法で測定し、1,500個の細胞当量を15%の非変性TBE (トリスホウ酸、EDTA) - 尿素ポリアクリルアミドゲルの各ウェル内に負荷した。各試料を、85℃かつ10分間で熱不活性化して測定法でのバックグラウンドを評価した。

10

【0204】

テロメラーゼ活性測定の結果は、図16に示す通りである。より明るく表示される生成物はより高い活性を示している。図16に示すように、hTERTをコードするmod-mRNA、およびdCas9-VPRとhTERTに特異的なgRNAをコードするmod-mRNAによる組合せ処理は、未処理のiPSCまたはhTERTのみをコードするmod-mRNAを遺伝子移入したF50細胞と比較して、より高い水準のテロメラーゼ活性をもたらすことが判明した。

【0205】

実施例6の要約：本開示の組成物および方法は、標的細胞内のテロメラーゼ活性を再活性化かつ増加させて、それによって標的細胞を若返らせることができる。

【0206】

実施例7：本開示の組成物は単一細胞の増殖を促進する

本実施例では、初代ヒト成人線維芽細胞に本開示の組成物を遺伝子移入して、本開示の方法および組成物が単一細胞からの増殖を支援し得るか否かを決定した。

20

【0207】

初代ヒト成人線維芽細胞は皮膚生検から採取した。成人線維芽細胞を、5%のヒト血清、1倍のMEM非必須アミノ酸溶液、55 μMの2-メルカプトエタノール (-ME)、1倍のGlutaMAX (商標) 補充物、および抗生物質 (全てThermo Fisher Scientific社製) を補充したDMEM/F12からなる線維芽細胞増殖培地 (FEM) 中で、50 ug/mLのアスコルビン酸、1 ng/mLのヒドロコルチゾン (ともにSigma社製)、12 ng/mLの基礎FGF (Gibco社製)、および5 ng/mLのヒトEGF (Invitrogen社製) とともに培養した。個々の患者由来の線維芽細胞を播種して、単一細胞を (10 × 10 mmの) PYREX (登録商標) クローニングシリンダーを用いて選択した。

30

【0208】

図11は、限定の組織培養表面積に対して実施される調整とともに、本開示の若返り組成物を用いる選択された単一の線維芽細胞の遺伝子移入計画の概略図である。これらの細胞を、まずhTERTをコードする50 ngのmod-mRNAでの3回の連続的な遺伝子移入で前処理した。前処理後に、Lipofectamine (登録商標) RNAiMAX (商標) (RNAiMAX) (Thermo Fisher Scientific社製) を用いて、hTERTをコードする50 ngのmod-mRNA、続いて翌日のdCas9-VPRおよび50 ngのhTERTガイドRNA (gRNA) (4種のガイドを1:1:1:1の比率で) をコードする50 ngのmod-mRNAによる4回の連続的な遺伝子移入を実施した。RNAとRNAiMAXを、まずOpti-MEM (登録商標) I還元型血清培地 (Opti-MEM) 内に希釈した。mod-mRNAおよび/またはgRNAの遺伝子移入では、100 ng/μLのRNAを5倍に希釈し、mod-mRNAおよび/または1 μgのgRNA当たり5 μLのRNAiMAXをOpti-MEMを用いて10倍に希釈した。希釈後に、これらの成分を共に組合わせて、室温で15分間培養した。室温での培養後に、200 ng/mLのB18R (eBioscience社製) を補充したFEM中で、mod-RNA mixおよび/またはgRNAとRNAiMAXの遺伝子移入混合物を細胞培養物に供与した。この培地は、各遺伝子移入の後の一晩の培養後に交換した。

40

【0209】

遺伝子移入処置に続いて、各ウェルをトリプシン処理し、6ウェルの組織培養プレート

50

の1ウェル中に細胞を移して、FEM中でさらに増殖させた。図17に示すように、最後の遺伝子移入の1週間後に、未処理細胞では10個中2個のウェルのみが、正常に増殖されてgDNA抽出のために回収できたが、一方で処理済みの線維芽細胞では10個中9個のウェルが増殖されて回収できた。

【0210】

実施例7の要約：本開示の組成物および方法により、単一細胞であっても増殖を促進できる。

【0211】

実施例8：本開示の組成物および方法は、高継代のヒト間葉系幹細胞/間質細胞(hMSC)の移動活性を増加させる

10

本実施例では、ヒト間葉系幹細胞/間質細胞(hMSC)に本開示の組成物を遺伝子移入させて、本開示の組成物および方法が高継代のhMSCの移動活性を増加させることができるか否かを決定した。

【0212】

処理および未処理のhMSCの移動活性を測定するために、経内皮移動(TEM)測定法を用いた。TEM測定法の模式図を図18に示す。簡潔に言えば、Corning社のFluoroBlok細胞培養挿入体を、ヒト内皮細胞(HUVEC)とともに予め播種した。GFP発現hMSCを被覆して、HUVEC層およびFluoroBlok膜の孔を貫通するそれらの移動を、CellInsight CX7 High-Content Screening (HCS) Platformなどの底面読取式蛍光顕微鏡によって経時的に定量した。

20

【0213】

24ウェルのCorning FluoroBlok(商標)挿入体をコーゲンで被覆した。被覆後に、ヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)をECM-2MV BulletKit(商標)培地(Lonza社製)中に80 K/cm²で播種して、5%のCO₂中で一晚培養して付着させた。一晚の培養により付着を成功させた後に、基底室内の培地を、ヒト組換えEGF[10 ng/mL](Stemcell Technologies社製)で補充したヒト間葉系幹細胞増殖培地(Cyagen社製)に変更した。Cyagen社から購入した緑色蛍光タンパク質(GFP)で標識されたヒト間葉系幹細胞/間質細胞は、12番目の継代(P12)まで培養して図11および実施例5の説明のように本開示の若返り組成物で処理し、一方で対照hMSCはmRNAの処理をせずに培養した。若返りの手順を2回の継代を継続して、継代数をP14とした。若返ったhMSCの一部をCoolCell LX(商標)内に-80°Cで一晚凍結させ、残りの細胞は培養したままとした。2回の継代後に、凍結した細胞を解凍してさらに2回の継代により培養した。

30

【0214】

4種の条件を以下の通りとした：全く若返らせず、かつ凍結させなかった老いた高継代のhMSC(P20)；GFP標識したhMSCの新鮮なバイアル(Cyagen社製)であり、かつこれを解凍させて一晚付着させた後に持ち上げて経内皮移動測定を実行した、若い低継代のhMSC(P5)；P15で凍結させた後に解凍して2回の継代により培養させた、凍結かつ若返らせたhMSC(P17)；および全く凍結はさせなかったが若返り手順に従って5回の継代を実施した若返らせたhMSC。次いでこれらの4種の条件試料を、付着させたHUVEC層の上部にあるFluoroBlokの頂上室に加えた。ThermoScientific社のCellInsight CX7 LED High-Content Screening (HCS) Platformで3回反復して4個の視野を取得した。CX7 HCSは、蛍光スペクトル全体に対して明視野、広視野、共焦点の各顕微鏡を用いて、経内皮移動試験(TEM)で実施される動態解析などのハイコンテツなデータを迅速に取得かつ定量するように設計されている。図19に示すように、若返らせた高継代のhMSCは、未処理の若いhMSCよりも顕著に速く飽和点に達した(40~50時間順序対130時間順序)。一方で老いた高継代のhMSC(P20)は移動能力が低いことが示された。一元配置分散分析では、高継代のhMSCに比較して、若いhMSCと若返らせた両群のhMSCとの間にp=0.0001の有意性が示された。

40

【0215】

実施例8の要約：本開示の組成物および方法を用いて処理した高継代のhMSCの移動活

50

性の上昇が証明しているように、本開示の組成物および方法は、hMSCを若返らせることができる。

【0216】

実施例9：本開示の組成物および方法は、高継代の老いたヒト間葉系幹細胞/間質細胞（hMSC）でのタンパク質のチオール基の酸化水準を、若い低継代のhMSCで観察される水準まで回復させる

本実施例では、老いた高継代のヒト間葉系幹細胞/間質細胞（hMSC）に本開示の組成物を遺伝子移入させて、本開示の組成物および方法が、高継代の老いたヒト間葉系幹細胞/間質細胞（hMSC）でのタンパク質のチオール基の酸化水準を、若い低継代のhMSCで観察される水準まで回復させることができるか否かを決定した。アミノ酸の中でも、硫黄含有システイン（Cys）は、特に酸化され易い。このことは、Cysの側鎖内にチオール部位（-SH）が存在して、酸化に反応して別のチオール部位と容易にジスルフィド結合を形成することによる。Cysチオールの可逆的な酸化は、酵素の活性やリガンド結合を制御するとともに酸化還元シグナル伝達にも関与し、その制御の緩和は多くのヒト疾患の発症や老化に本質的な役割を担っている。

10

【0217】

ヒト間葉系幹細胞/間質細胞（hMSC）を間葉系幹細胞増殖培地（MSCGM）（Cyagen社からキットとして入手）を用いて低酸素（5%）で培養した。3種の条件を以下の通りとした：全く若返らせなかった老いた高継代のhMSC（P14）；hMSCの新鮮なバイアルであり、かつそれを解凍して一晩付着させた後に持ち上げてペプチド分析用に処理された若い低継代のhMSC（P5）；および本開示の若返り組成物で12回目の継代で処理された老いた高継代のhMSC。若返り手順を2回の継代で継続し、処理された老いたhMSCの継代数は、ペプチド分析が実施される前にP14となり、未処理の老いたhMSCに一致した。

20

【0218】

hMSCでは、Lipofectamine（登録商標）RNAiMAX（商標）（RNAiMAX）（Thermo Fisher Scientific社製）を用いて、ヒトTERTをコードする500 ngのmod-mRNAにより3回の遺伝子移入の前処理を実施した。hTERT mod-mRNA遺伝子移入による前処理の後に、hTERTをコードする500 ngのmod-mRNA、続いて翌日のdCas9-VPRと500 ngのhTERCガイドRNA（gRNA）（1種の選択ガイド）をコードする500 ngのmod-mRNAによる3回の連続的な遺伝子移入を、Lipofectamine登録商標）RNAiMAX（商標）（RNAiMAX）（Thermo Fisher Scientific社）を用いて実施した。RNAとRNAiMAXを、まずOpti-MEM-pH 8.2内に希釈した。mod-mRNAの遺伝子移入では、100 ng/ μ LのRNAを5倍に希釈し、1 μ gのmod-mRNA当たり5 μ LのRNAiMAXをOpti-MEM-pH 8.2を用いて10倍に希釈した。希釈後に、これらの成分を共に組み合わせ室温で15分間培養した。室温での培養後に、mod-RNA mixとRNAiMAXの遺伝子移入混合物を、200 ng/mLのB18Rを補充したそれぞれの培地内で細胞培養物に供与した。この培地は、各遺伝子移入の後の一晩の培養後に交換した。

30

【0219】

遺伝子移入した老いたhMSC、遺伝子移入していない老いたhMSC、および低継代の若いhMSCを、ヨウ化TMTsixplex Isobaric Mass Tag Labeling Kit（Thermo Scientific社製）を用いて処理した。得られたヨウ化TMT標識ペプチド混合物を、Easy nLC 1000 UPLC systemを備えるQExactive HF Orbitrap質量分析計（Thermo Fisher Scientific社製）によって分析した。ペプチドの同定をMaxQuantプログラムを用いて実施した。各MS/MSスペクトルを、ヒトに特異的なデータベース（Uniprot）に対して分析した。この分析の後に、データファイルを排出させて、さらにPerseusソフトウェアで目的のデータについて解析した。各実験を2回繰り返した。MaxQuantおよびPerseusソフトウェアは、マックスプランク生化学研究所のウェブサイトからダウンロードした。

40

【0220】

老いた高継代のhMSCでのチオール基の酸化水準は、若いhMSCに比較して、88個の

50

タンパク質で増加して、31個のタンパク質で減少していた。本開示の若返り組成物を老いたhMSCに遺伝子移入すると、約90%の標的タンパク質でのチオール基の酸化水準の若い細胞で観察される水準への回復をもたらされた。図20は、老いた高継代のhMSCでのチオール基の酸化水準が増加したタンパク質(EIF2S1、TM9F3、およびUSP14) および減少したタンパク質(IGF5) でのチオール基の分析の代表的な結果、および若返り組成物による処理にตอบสนองしてこれらのチオール基の酸化水準が若々しい状態に回復することを示す図である。

【0221】

実施例9の要約：本開示の組成物および方法は、本開示の組成物および方法を用いて処理された高継代のhMSCでのタンパク質のチオール基の酸化の若々しい水準への復活が証明するように、hMSCを若返らせることができる。

10

【0222】

実施例10：本開示の組成物および方法は、高継代の老いたヒト間葉系幹細胞/間質細胞(hMSC)およびヒト新生児表皮角化細胞(HEKn)での老化に関連するDNAのメチル化を低減する

本実施例では、老いた高継代のヒト間葉系幹細胞/間質細胞(hMSC)および老いた高継代のヒト新生児表皮角化細胞(HEKn)に本開示の組成物を遺伝子移入して、本開示の組成物および方法がこれらの細胞で老化に関連するDNAのメチル化水準を低減できるかを決定した。DNAメチル化の変化は、老化および細胞老化での最も一般的な分子変化の1種として認識されている。

20

【0223】

種々の由来のヒト線維芽細胞をFEM内で培養し、種々の由来のヒト角化細胞をEDGSを補充したEpiLife培地内で培養し、かつhMSCを間葉系幹細胞増殖培地(MSCGM)内で培養した。DNAメチル化の分析に用いた以下の細胞種は、若返り組成物で処理されておらず、それぞれ若い低継代の新生児線維芽細胞(P3)、若い低継代の成人F50線維芽細胞(P3)、若い低継代の新生児角化細胞HEKn(P3)、若い低継代の胎児角化細胞(P2)、若い低継代の成体角化細胞(P3)、若い臍帯由来hMSC(P2)、老いた高継代のF50S線維芽細胞(P15)、老いた高継代のhMSC(P13)、および老いた高継代のHEKn(P10)であった。この処理群には、図11および実施例5に説明の若返り組成物で処理された老いた高継代のHEKnおよび老いた高継代のhMSCを含んでいた。組成物による処理の終了後に、処理した細胞をさらに6日間増殖させた。ゲノムDNA(gDNA)を、Quick-DNA(商標)Miniprep Kit(Zymo Research社製)を用いて各細胞培養物から抽出して、Illumina社製のInfinium MethylationEPIC BeadChip Kitを用いてDNAのメチル化分析に供した。

30

【0224】

種々の種類の細胞について得られたDNAのメチル化データを、Rパッケージ「IlluminaHumanMethylationEPICanno.ilm10b2.hg19」を用いて解析し、以下の3群に纏めた：若い細胞；老いた(高継代の)細胞；および本開示の若返り組成物で処理された老いた細胞。若い細胞の群には、若い低継代の新生児線維芽細胞(P3)、若い低継代の成人線維芽細胞(P3)、若い低継代の新生児角化細胞(P3)、若い低継代の胎児角化細胞(P2)、若い低継代の成人角化細胞(P3)、および若い臍帯由来hMSC(P2)が含まれていた。老いた細胞の群には、老いた高継代のF50S線維芽細胞(P15)、老いた高継代のhMSC(P13)、および老いた高継代のHEKn(P10)が含まれていた。処理された細胞群には、若返り組成物で処理された老いた高継代のHEKnおよび老いた高継代のhMSCが含まれていた。細胞種に特異的なメチル化の各群の間の差異を排除するために、種々の種類および由来の細胞を老化した状態に基づいて混合した。これらの群を不等分散による2群間のt両側検定を用いて比較し、メチル化度を目的部位のメチル化ヌクレオチドの比率として0~1の範囲で算出した。差のあるメチル化部位を、各群でのメチル化度の最も大きい差に基づいて選択して、9個のDNAメチル化部位を、細胞種の由来に関係なく老いた高継代の細胞のうちで最高のメチル化部位として同定した。

40

50

【 0 2 2 5 】

図 2 1 は、同定された9個の老化に関連するDNAマーカの位置およびそれらの関連ゲノム座を示す図である。9個の部位全てに、老いた高継代群でのDNAメチル化水準の上昇が見られた。老いた群からの細胞を本開示の若返り組成物で処理すると、9個の部位全てでDNAメチル化水準が若い細胞群に類似の水準にまで低下した。

【 0 2 2 6 】

実施例 1 0 の要約：本開示の組成物および方法を用いて、老いたヒト間葉系幹細胞 / 間質細胞およびヒト表皮角化細胞を含む種々の細胞型を若返らせて、処理された細胞では老化に関連するDNAメチル化の低減をもたらすことができる。

【 図 面 】

【 図 1 】

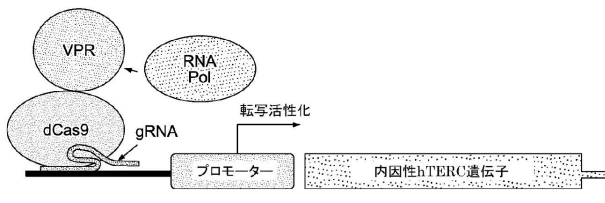


FIG. 1

【 図 2 】

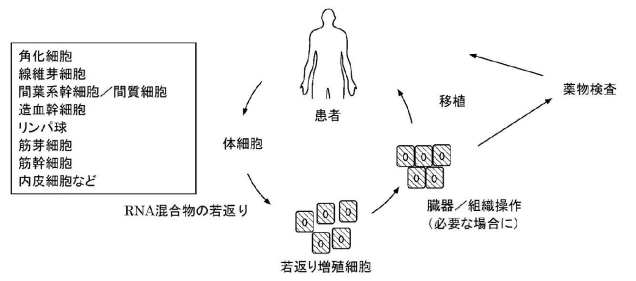


FIG. 2

10

20

【 図 3 】

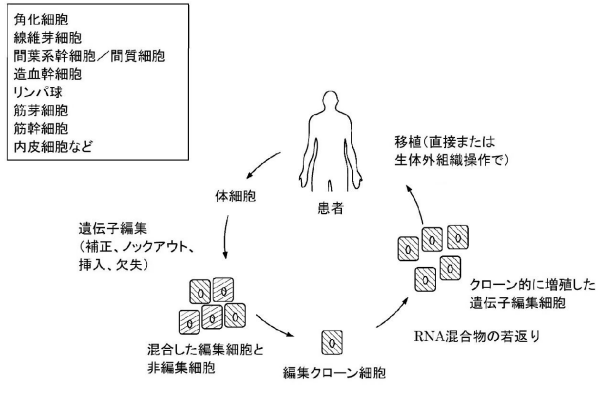


FIG. 3

【 図 4 】

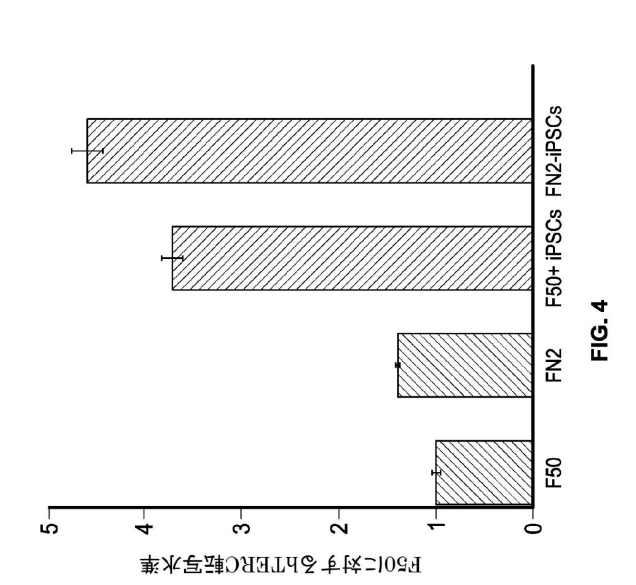


FIG. 4

30

40

50

【 図 5 】

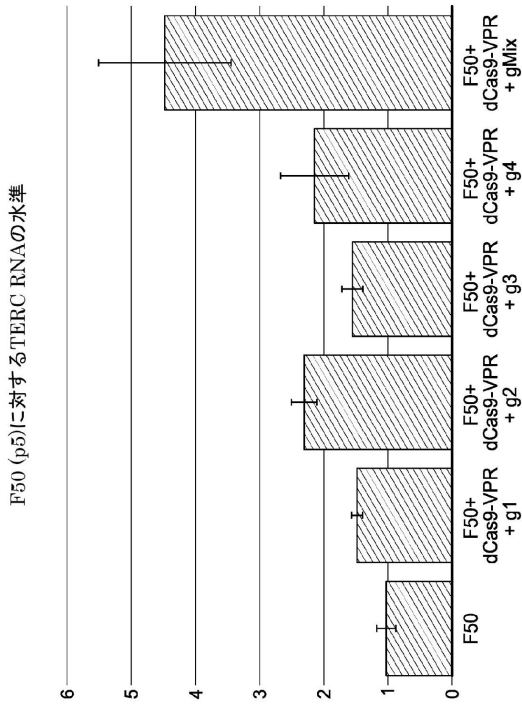


FIG. 5

【 図 6 】

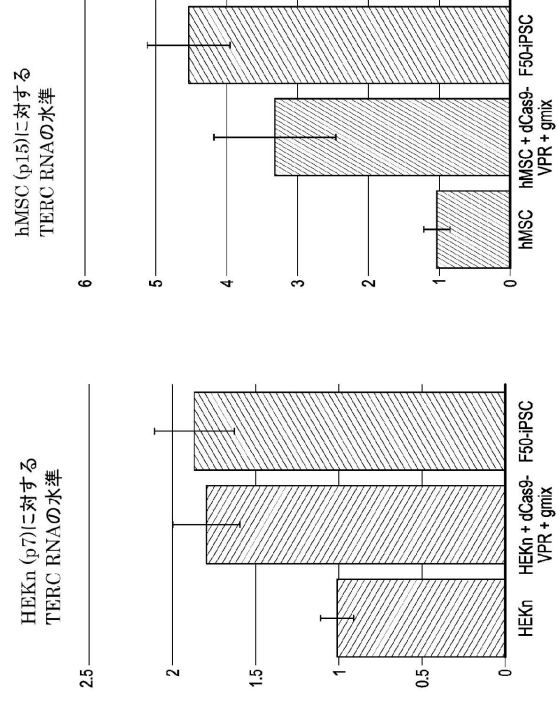


FIG. 6

【 図 7 】

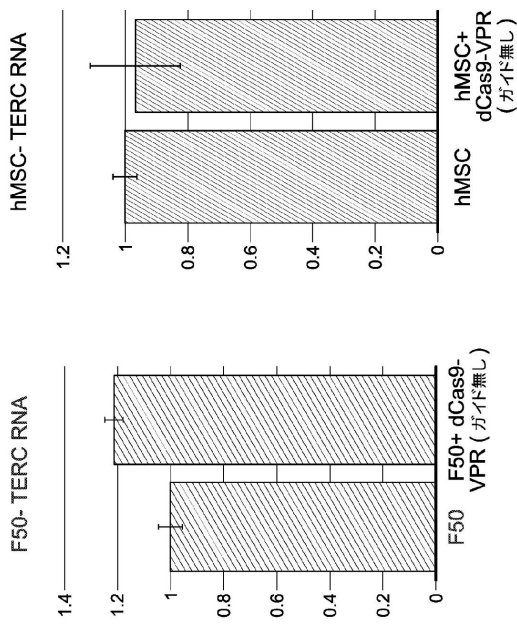


FIG. 7

【 図 8 】

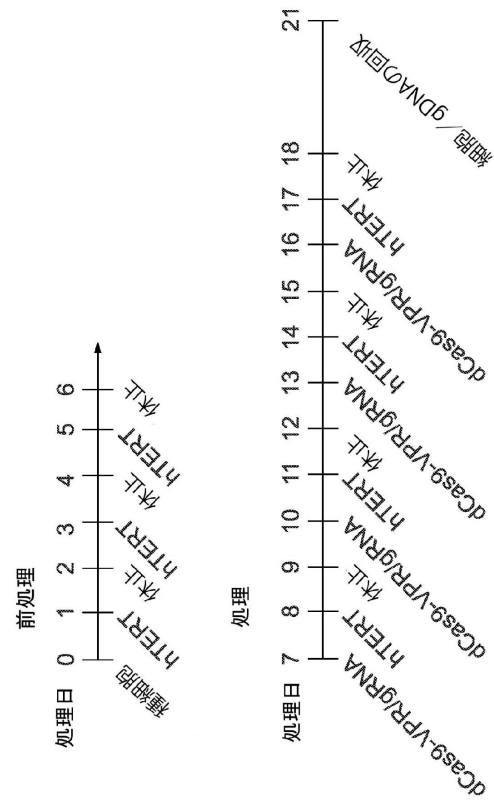


FIG. 8

【 図 1 3 】

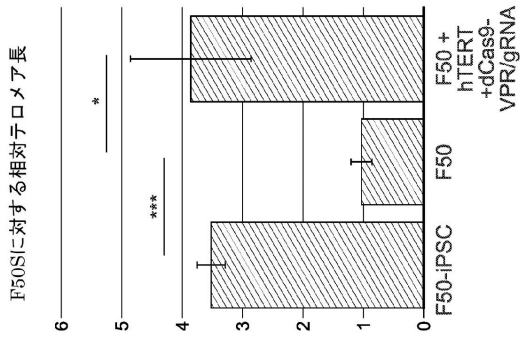


FIG. 13

【 図 1 4 】

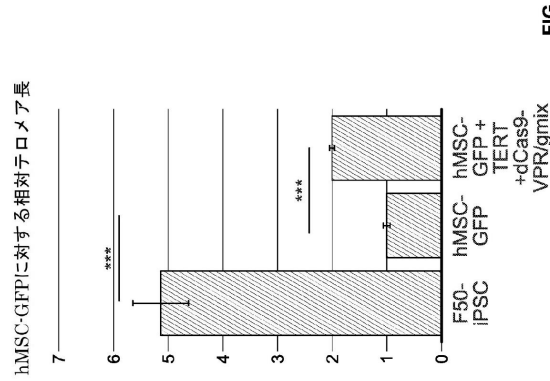


FIG. 14

【 図 1 5 】

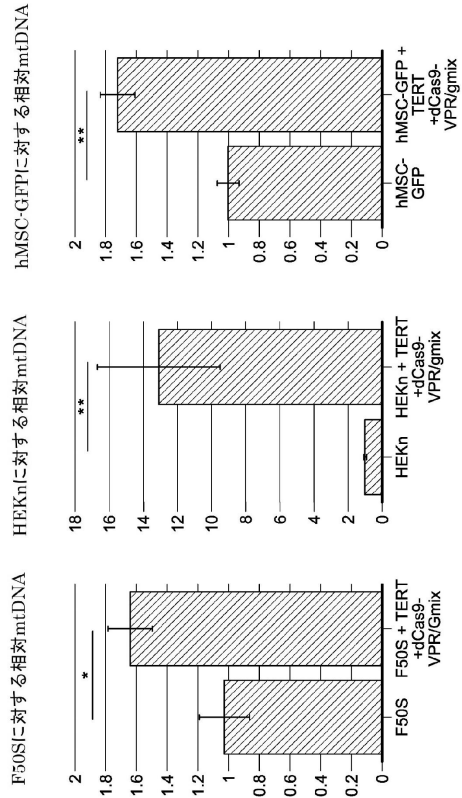


FIG. 15

【 図 1 6 】

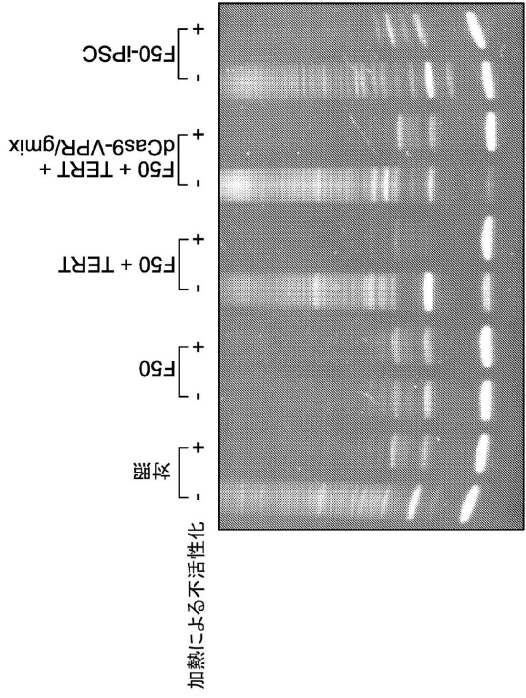


FIG. 16

【 図 1 7 】

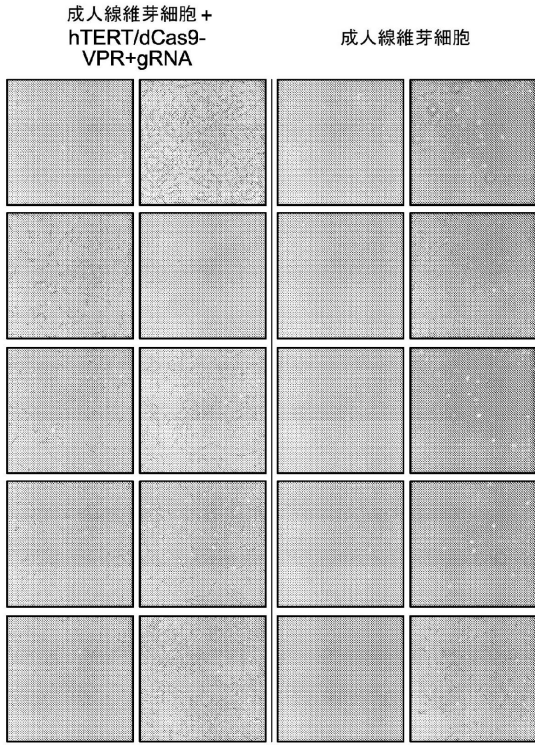


FIG. 17

【 図 1 8 】

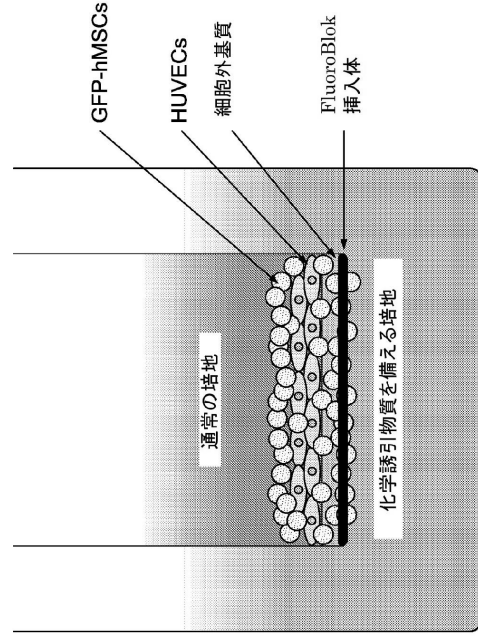


FIG. 18

10

20

【 図 1 9 】

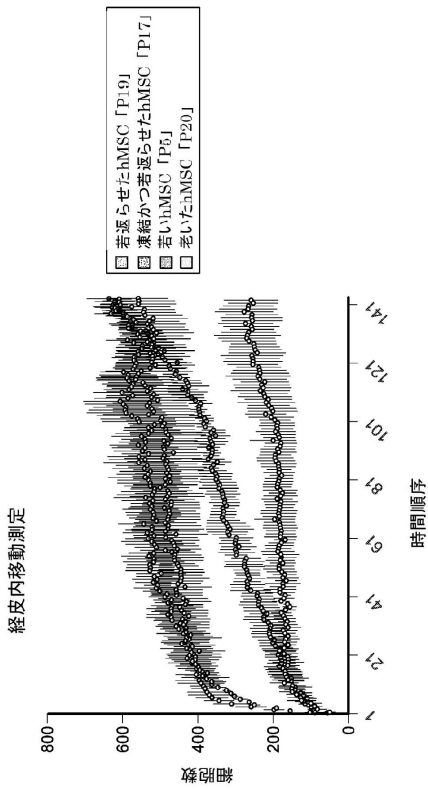


FIG. 19

【 図 2 0 】

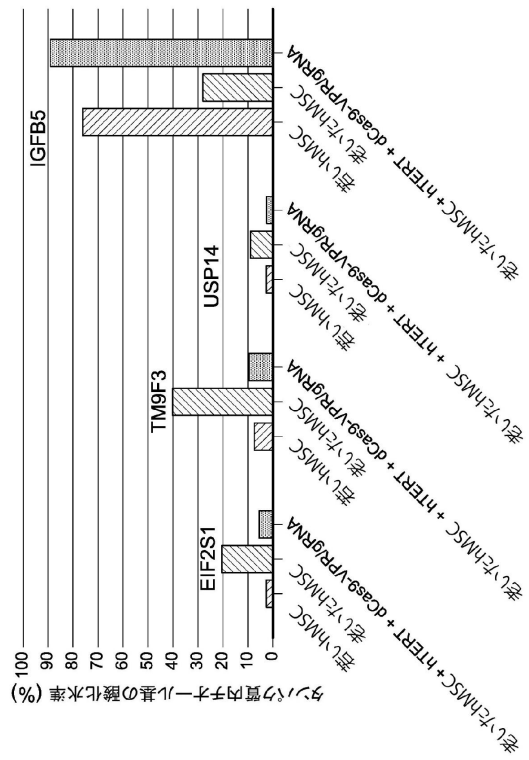


FIG. 20

30

40

50

【 図 2 1 】

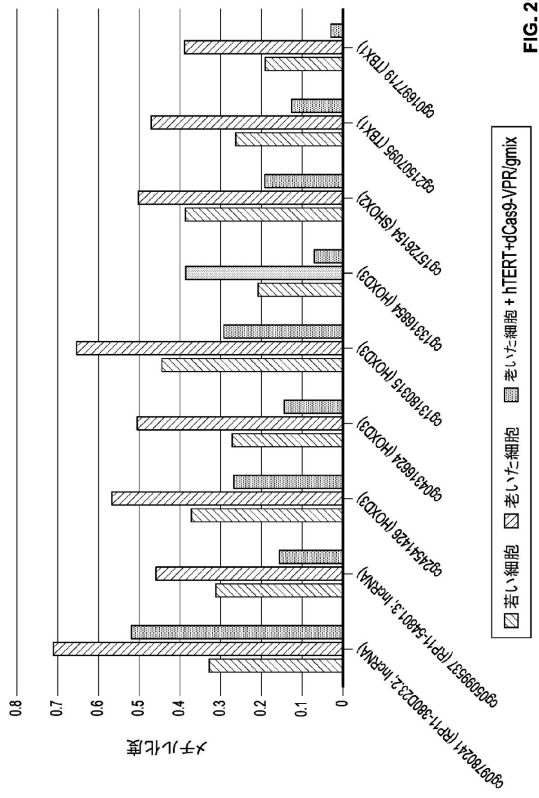


FIG. 21

【 配列表 】

2022548044000001.app

10

20

30

40

50

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2020/050665

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
INV. C12N9/22	C12N9/12 A61K48/00	
ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12N C07K A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, Sequence Search, EMBASE, FSTA		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2014/197748 A2 (UNIV DUKE [US]) 11 December 2014 (2014-12-11) claims 1-130; example 2; Fig. 2f -----	1-65
X	WO 2018/110471 A1 (ASTELLAS PHARMA INC) 21 June 2018 (2018-06-21) claims 1-15; Table 1; examples 1-8 -----	1,2,6, 12-14, 20, 47-49, 56-58,60
A	WO 2015/100269 A2 (DOUBLE HELIX CORP [CA]; COYLE DOUGLAS [CA]; FOSSEL MICHAEL [US]) 2 July 2015 (2015-07-02) claims 1-44 ----- ----- -/--	1-65
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		<input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.
* Special categories of cited documents :		
A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance		*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
E earlier application or patent but published on or after the international filing date		*X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
L document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)		*Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
O document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means		
P document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		*Z* document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search 2 December 2020		Date of mailing of the international search report 10/12/2020
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Behrens, Joyce

1

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

page 1 of 2

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2020/050665

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2014/065112 A1 (MADONNA ROSALINDA [US] ET AL) 6 March 2014 (2014-03-06) claims 1-20	1-65
A	----- ANDREW BRANE ET AL: "Targeting Telomeres and Telomerase: Studies in Aging and Disease Utilizing CRISPR/Cas9 Technology", CELLS, vol. 8, no. 2, 21 February 2019 (2019-02-21), page 186, XP055755534, DOI: 10.3390/cells8020186 refer to abstract; pg 7; Fig. 3	1-65
A	----- LINGHE XI ET AL: "A novel two-step genome editing strategy with CRISPR-Cas9 provides new insights into telomerase action and TERT gene expression", GENOME BIOLOGY, vol. 16, no. 1, 10 November 2015 (2015-11-10), pages 1-17, XP055631223, DOI: 10.1186/s13059-015-0791-1 abstract	1-65

10

20

30

40

1

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2020/050665

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2014197748 A2	11-12-2014	AU 2014274840 A1	21-01-2016
		AU 2020203924 A1	02-07-2020
		CA 2914519 A1	11-12-2014
		CN 105658805 A	08-06-2016
		EP 3004370 A2	13-04-2016
		EP 3417880 A1	26-12-2018
		EP 3539573 A1	18-09-2019
		JP 2016521555 A	25-07-2016
		JP 2020058349 A	16-04-2020
		KR 20160023765 A	03-03-2016
		US 2016201089 A1	14-07-2016
		US 2018320197 A1	08-11-2018
		WO 2014197748 A2	11-12-2014
WO 2018110471 A1	21-06-2018	EP 3553090 A1	16-10-2019
		JP WO2018110471 A1	24-10-2019
		US 2019330280 A1	31-10-2019
		WO 2018110471 A1	21-06-2018
WO 2015100269 A2	02-07-2015	AU 2014369969 A1	28-07-2016
		CA 2934948 A1	02-07-2015
		CN 106103731 A	09-11-2016
		EP 3087193 A2	02-11-2016
		JP 2017503022 A	26-01-2017
		KR 20160102069 A	26-08-2016
		RU 2016130595 A	01-02-2018
		US 2016324986 A1	10-11-2016
		WO 2015100269 A2	02-07-2015
US 2014065112 A1	06-03-2014	US 2014065112 A1	06-03-2014
		US 2016243167 A1	25-08-2016

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

テーマコード (参考)

A 6 1 K	35/763 (2015.01)	A 6 1 K	35/763	
A 6 1 K	35/766 (2015.01)	A 6 1 K	35/766	
A 6 1 K	35/12 (2015.01)	A 6 1 K	35/12	
A 6 1 P	37/06 (2006.01)	A 6 1 P	37/06	
A 6 1 P	37/02 (2006.01)	A 6 1 P	37/02	
A 6 1 P	21/00 (2006.01)	A 6 1 P	21/00	
A 6 1 P	17/00 (2006.01)	A 6 1 P	17/00	
A 6 1 P	27/02 (2006.01)	A 6 1 P	27/02	
A 6 1 P	25/16 (2006.01)	A 6 1 P	25/16	
A 6 1 P	25/28 (2006.01)	A 6 1 P	25/28	
A 6 1 P	3/10 (2006.01)	A 6 1 P	3/10	
A 6 1 P	9/00 (2006.01)	A 6 1 P	9/00	
A 6 1 P	19/10 (2006.01)	A 6 1 P	19/10	
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 P	35/00	
C 1 2 N	9/12 (2006.01)	C 1 2 N	9/12	Z N A
C 1 2 N	15/864 (2006.01)	C 1 2 N	15/864	1 0 0 Z
C 1 2 N	15/867 (2006.01)	C 1 2 N	15/867	Z
C 1 2 N	15/86 (2006.01)	C 1 2 N	15/86	Z
C 1 2 N	15/88 (2006.01)	C 1 2 N	15/88	Z
C 1 2 N	15/09 (2006.01)	C 1 2 N	15/09	1 1 0
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	15/09	1 0 0
		C 1 2 N	5/10	

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

弁理士 渡辺 陽一

(74)代理人 100141977

弁理士 中島 勝

(74)代理人 100138210

弁理士 池田 達則

(74)代理人 100134784

弁理士 中村 和美

(72)発明者 イガー コグート

アメリカ合衆国, コロラド 8 0 1 1 1 , グリーンウッド ビレッジ, イースト メープルウッド
アベニュー 1 1 8 7 0

(72)発明者 ガンナ ビロウソバ

アメリカ合衆国, コロラド 8 0 1 1 1 , グリーンウッド ビレッジ, イースト メープルウッド
アベニュー 1 1 8 7 0

(72)発明者 ニコール フランシス ディエット

アメリカ合衆国, コロラド 8 0 2 2 7 , レイクウッド, ウェスト フロイド ドライブ 8 7 0 8

(72)発明者 パトリック シーン マクグラス

アメリカ合衆国, コロラド 8 0 6 0 2 , ソートン, イースト ワンハンドレッドアンドシックス
ティセブンス ウェイ 2 0 5 3

F ターム (参考) 4B050 CC03 CC07 DD11 LL01 LL10

4B065 AA90X AA90Y AB01 AC14 AC20 BA01 CA27 CA43 CA44

4C084 AA13 NA13 NA14 ZA15 ZA16 ZA33 ZA36 ZA94 ZA97 ZB07

ZB08 ZB26

4C086 AA01 AA02 EA16 MA01 MA04 NA13 NA14 ZA15 ZA16 ZA33

F ターム (参考)

ZA36 ZA94 ZA97 ZB07 ZB08 ZB26

4C087 AA01 AA02 BB63 CA12 CA20 NA13 NA14 ZA15 ZA16 ZA33

ZA36 ZA94 ZA97 ZB07 ZB08 ZB26