

WO 2022/009873 A1

TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類：

一 国際調査報告（条約第21条(3)）

明 細 書

発明の名称：RNA安定化剤

技術分野

[0001] 本発明は、RNA安定化剤に関する。

背景技術

[0002] DNA、RNAなどの生体由来の核酸の解析により、生体の生理状態を含む様々な情報を獲得することができる。生体由来の核酸は、細胞、組織、体液、分泌物などの生体由来の試料から抽出することができる。特許文献1には、皮膚表上脂質（skin surface lipids；SSL）にRNAが含まれており、該SSL由来RNAを生体の解析に用いることができることが記載されている。

[0003] 生体由来の核酸の中でも、RNAは、DNAと比較して不安定であり分解されやすい。さらに、RNA分解酵素であるリボヌクレアーゼ（RNase）は、細胞及び組織中だけでなく、汗、唾液などの体液、及び環境中にも広く存在する。RNAの抽出や解析の操作においては、RNase活性からRNAを保護することが重要である。RNaseによるRNAの分解を抑えるためには、一般に、RNase阻害剤が用いられる。RNase阻害剤としては、グアニジン塩などのカオトロピック塩、生体由来のRNase阻害活性を有するタンパク質、又はその組換え体などが知られている。

（特許文献1）国際公開公報第2018／008319号

発明の概要

[0004] 一実施形態において、本発明は、遊離脂肪酸、スクアレン、コレステロールエステル、及びトリアシルグリセロールからなる群より選択される少なくとも1種を有効成分とする、RNA安定化剤を提供する。

別の実施形態において、本発明は、対象RNAに、遊離脂肪酸、スクアレン、コレステロールエステル、及びトリアシルグリセロールからなる群より選択される少なくとも1種を適用することを含む、RNA安定化方法を提供

する。

別の実施形態において、本発明は、RNA安定化のための、遊離脂肪酸、スクアレン、コレステロールエステル、及びトリアシルグリセロールからなる群より選択される少なくとも1種の使用を提供する。

別の実施形態において、本発明は、RNA安定化剤の製造における、遊離脂肪酸、スクアレン、コレステロールエステル、及びトリアシルグリセロールからなる群より選択される少なくとも1種の使用を提供する。

図面の簡単な説明

[0005] [図1] 脂質によるRNA安定化。A : RNase A存在下での脂質抽出物によるRNA安定化。B : RNase 7存在下での脂質抽出物によるRNA安定化、4名の被験者からの脂質抽出物についてのデータ（脂質+）を示す。Ctrl : コントロール（脂質抽出物及びRNaseなし）、+/- : 脂質抽出物あり/なし。

[図2] TLC分離により検出された脂質抽出物画分。SQ : スクアレン、CE : コレステロールエステル、WE : ワックスエステル、TAG : トリアシルグリセロール、FA : 遊離脂肪酸、Chol : コレステロール。

[図3] RNase存在下での脂質抽出物画分によるRNA安定化。Ctrl : コントロール（脂質抽出物画分及びRNaseなし）、A~D : 脂質抽出物画分A~D添加、- : 脂質抽出物画分なし。

[図4] 脂質構成脂質成分によるRNA安定化。Ctrl : コントロール（RNAのみ）、- : 脂質構成脂質成分なし（RNA+RNaseのみ）。

発明の詳細な説明

[0006] 本明細書中で引用された全ての特許文献、非特許文献、及びその他の刊行物は、その全体が本明細書中において参考として援用される。

[0007] 本明細書における「RNA」は、1本鎖RNA及び2本鎖RNA、例えば、mRNA、tRNA、rRNA、small RNA（例えば、microRNA (miRNA)、small interfering RNA (siRNA)、PIWI-interacting RNA (piRNA)

等)、long intergenic non-coding (linc) RNA、などを包含する。

[0008] リボヌクレアーゼ (RNase) は、生体に存在するRNA分解酵素である。RNaseは、細胞及び組織中だけでなく汗、唾液などの体液にも含まれており、結果、水、空気中の埃、実験機材を含む環境中に広く存在する。多様な種類のRNaseが見出されている。中でも、RNase A (EC 3. 1. 27. 5) は、古くから研究によく利用されてきたエンドリボヌクレアーゼであり、非常に安定な酵素である。RNase Aは最初にウシ膵臓から同定され、その後、多様な生物種から配列相同なRNaseが見出されており、それらはRNase A superfamilyとして分類されている。ヒトRNase A superfamilyは、RNase 1~8からなる8つのタイプを含み、各タイプの酵素は生体内での発現組織が異なる。このうち、RNase 7は、皮膚を含む上皮系組織において発現することが知られており (Int J Mol Sci. 2016 Aug; 17 (8) : 1278)、被験者や操作者の皮膚、又はそれと接触した実験機器を介して、生体由来RNAのRNase汚染の原因となり得る。

[0009] 本明細書において、「皮膚」とは、特に限定しない限り、角層、表皮、真皮、毛包、ならびに汗腺、皮脂腺及びその他の腺などの組織を含む領域の総称である。

[0010] 本明細書において、「皮膚表上脂質 (skin surface lipids; SSL)」とは、皮膚の表上に存在する脂溶性画分をいい、皮脂と呼ばれることもある。一般に、SSLは、皮膚にある皮脂腺等の外分泌腺から分泌された分泌物を主に含み、皮膚表面を覆う薄い層の形で皮膚表上に存在している。

[0011] 本発明は、RNase存在下でのRNAの安定化に有効なRNA安定化剤を提供する。本発明のRNA安定化剤は、RNaseを阻害し、RNaseによるRNA分解を抑制し、RNase存在下でRNAを安定化させる。また本発明のRNA安定化剤は、生体由来の試料 (例えばSSL) 中のRNA

を安定化させる。

[0012] SSLには、トリアシルグリセロール（TAG）、スクアレン、コレステロール、コレステロールエステル（CE）、遊離脂肪酸（FA）、脂肪酸エステルなどの様々な脂質成分が含まれる。本発明者は、SSL中に、RNAの安定化に有効な成分が含まれていることを見出した。後述の実施例に示すとおり、SSL中の脂質成分の中でスクアレン、CE、TAG、及びFAは、RNaseによるRNA分解を抑制した。

[0013] したがって、本発明は、FA、スクアレン、CE、及びTAGからなる群より選択される少なくとも1種をRNA安定化のために使用することに関する。本明細書において、RNAの「安定化」とは、RNase等による分解が抑制された状態でRNAを維持することをいう。FA、スクアレン、CE、及びTAGは、RNAに対するRNaseの活性を阻害することで、生体由来の試料（例えばSSL）などのRNaseが存在する環境下でRNAの分解を抑制し、RNAを安定化させる。したがって、本発明によるRNA安定化の一態様は、RNase阻害、又はRNA分解抑制であり得る。

[0014] 本発明でRNA安定化のために用いられるFAは、特に限定されないが、好ましくは直鎖脂肪酸であり、また好ましくは不飽和脂肪酸であり、より好ましくは直鎖不飽和脂肪酸である。該FAの鎖長（炭素数）は、特に限定されないが、好ましくは12～22、より好ましくは14～18である。FAの好ましい例としては、ミリストレイン酸、パルミトレイン酸、オレイン酸等が挙げられる。本発明で用いられるFAは、上記に挙げた異なる鎖長や不飽和度を有する遊離脂肪酸のいずれか1種又はいずれか2種以上の組み合わせであればよい。該FAは、皮脂から抽出されたものであってもよく、又は化学的に合成されたものであってもよい。あるいは、市販の遊離脂肪酸（例えば、パルミトレイン酸（Sigma Aldrich））を使用することもできる。該FAは、塩の形態であってもよい。該塩の例としては、ナトリウム塩などが挙げられる。

[0015] 本発明で用いられるFAの量は、RNA安定化の観点からは、対象RNA

の $1\mu\text{g}$ あたり、好ましくは 0.005mg 以上、より好ましくは 0.5mg 以上であり、かつ、好ましくは 100mg 以下、より好ましくは 50mg 以下である。例えば、対象RNAの $1\mu\text{g}$ あたり、好ましくは $0.005\sim 100\text{mg}$ 、より好ましくは $0.05\text{mg}\sim 50\text{mg}$ 又は $5\text{mg}\sim 100\text{mg}$ 、さらに好ましくは $0.5\sim 50\text{mg}$ である。

[0016] 本発明でRNA安定化のために用いられるスクアレンは、皮脂から抽出されたものであってもよく、又は化学的に合成されたものであってもよい。あるいは、市販のスクアレン（例えば、スクアレン（Sigma Aldrich））を使用することもできる。

[0017] 本発明で用いられるスクアレンの量は、RNA安定化の観点からは、対象RNAの $1\mu\text{g}$ あたり、好ましくは 0.05mg 以上、より好ましくは 5mg 以上であり、かつ、好ましくは 100mg 以下、より好ましくは 50mg 以下である。例えば、対象RNAの $1\mu\text{g}$ あたり、好ましくは $0.005\sim 100\text{mg}$ 、より好ましくは $0.05\text{mg}\sim 50\text{mg}$ 又は $5\text{mg}\sim 100\text{mg}$ 、さらに好ましくは $0.5\sim 50\text{mg}$ である。

[0018] 本発明でRNA安定化のために用いられるCEは、コレステロールと脂肪酸のエステルである。CEを構成する脂肪酸部分は、特に限定されないが、好ましくは直鎖脂肪酸であり、また好ましくは不飽和脂肪酸であり、より好ましくは直鎖不飽和脂肪酸である。脂肪酸の鎖長（炭素数）は、特に限定されないが、好ましくは $12\sim 22$ 、より好ましくは $14\sim 18$ である。脂肪酸の好ましい例としては、ミリストレイン酸、パルミトレイン酸、オレイン酸等が挙げられる。該CEは、皮脂から抽出されたものであってもよく、又は化学的に合成されたものであってもよい。あるいは、市販のCE（例えば、Cholesteryl palmitoleate; D-161 (Olbacht Serdary Research Laboratories)）を使用することもできる。

[0019] 本発明で用いられるCEの量は、RNA安定化の観点からは、対象RNAの $1\mu\text{g}$ あたり、好ましくは 0.05mg 以上、より好ましくは 5mg 以上

であり、かつ、好ましくは100mg以下、より好ましくは50mg以下である。例えば、対象RNAの1μgあたり、好ましくは0.005~100mg、より好ましくは0.05mg~50mg又は5mg~100mg、さらに好ましくは0.5~50mgである。

[0020] 本発明でRNA安定化のために用いられるTAGは、皮脂から抽出されたものであってもよく、又は化学的に合成されたものであってもよい。あるいは、市販のTAG（例えば、トリオレイン（富士フィルム和光純薬））を使用することもできる。該TAGは、塩の形態であってもよい。該塩の例としては、ナトリウム塩などが挙げられる。該TAGに含まれるアシル基は、特に限定されないが、好ましくは直鎖脂肪酸基であり、また好ましくは不飽和脂肪酸基であり、より好ましくは直鎖不飽和脂肪酸基である。該アシル基の鎖長（炭素数）は、特に限定されないが、好ましくは12~22、より好ましくは14~18である。アシル基の好ましい例としては、9-テトラデセノイル基、9-ヘキサデセノイル基、オレオイル基等が挙げられる。該TAGに含まれる個々のアシル基は、互いに同じであっても異なってもよい。また本発明で用いられるTAGは、異なるアシル基組成を有するTAGの組み合わせであってもよい。

[0021] 本発明で用いられるTAGの量は、RNA安定化の観点からは、対象RNAの1μgあたり、好ましくは0.05mg以上、より好ましくは5mg以上であり、かつ、好ましくは100mg以下、より好ましくは50mg以下である。例えば、対象RNAの1μgあたり、好ましくは0.005~100mg、より好ましくは0.05mg~50mg又は5mg~100mg、さらに好ましくは0.5~50mgである。

[0022] 本発明では、FA、スクアレン、CE、及びTAGからなる群より選択される少なくとも1種を、好ましくはFA、スクアレン、及びCEからなる群より選択される少なくとも1種を、より好ましくはFA及び／又はスクアレンを、さらに好ましくはFAを使用する。また、本発明において、FA、スクアレン、CE、及びTAGのうちの2種以上を組み合わせる場合、好まし

くはF A及び／又はスクアレンを、より好ましくはF Aを少なくとも使用するの
のがよい。上記において使用する各成分の量は、上述した各成分の使用量の
範囲内で適宜調整すればよい。

[0023] 一態様において、本発明は、F A、スクアレン、C E、及びT A Gからなる
群より選択される少なくとも1種を有効成分とする、R N A安定化剤を提供する。
別の態様において、本発明は、R N A安定化剤の製造における、F A、スクアレン、
C E、及びT A Gからなる群より選択される少なくとも1種の使用を提供する。別の
態様において、本発明は、対象R N Aに本発明のR N A安定化剤を適用すること
を含む、R N A安定化方法を提供する。

[0024] 一実施形態において、本発明のR N A安定化剤は、F A、スクアレン、C
E、及びT A Gからなる群より選択される少なくとも1種からなるものであり得る。
別の実施形態において、本発明のR N A安定化剤は、F A、スクアレン、C E、
及びT A Gからなる群より選択される少なくとも1種を含む組成物であり得る。
該組成物の具体的な例としては、F A、スクアレン、C E、又はT A Gのいずれかを
少なくとも含有する油脂組成物、例えば植物、動物、微生物等に由来する油脂
組成物が挙げられ、好ましくは植物由来の食用油脂が挙げられる。該組成物
中のF A、スクアレン、C E、及びT A Gの含有量は、上述した対象R N Aに
対する使用量が達成できる量であればよい。対象R N Aに本発明のR N A
安定化剤を適用する手段は特に限定されず、例えば対象R N Aを含む試料に
R N A安定化剤を添加又は混合できる手段であればよい。

[0025] 好ましい実施形態において、安定化すべき対象R N Aは、生体由来試料
中のR N Aであり、本発明のR N A安定化剤は、生体由来試料中のR N Aの
安定化剤である。該生体由来試料は、生体から分離、分泌又は放出されたR N
Aを含む試料であればよく、例えば、生体から採取した細胞、組織、体液（
血液等）、糞尿、分泌物（唾液等）、角層、皮膚及び生体の皮膚上の分泌物
（汗、S S L等）、などが挙げられる。該生体由来試料に本発明のR N A
安定化剤を適用すればよい。例えば、該生体由来試料が液体（例えば体液又は

分泌物)の場合、該試料と本発明のRNA安定化剤を混合することが好ましい。また例えば、該生体由来試料が固体(例えば細胞又は組織)の場合、破碎した該試料と本発明のRNA安定化剤を混合すること、又は該試料を本発明の安定化剤と共に破碎することが好ましい。

[0026] 好ましい実施形態において、該生体由来試料はSSLである。SSLは、皮膚上にSSLを有する被験体、例えばヒト又は非ヒト哺乳動物から採取され得る。SSLが採取される皮膚の部位としては、頭、顔、首、体幹、手足等の身体の任意の部位の皮膚が挙げられる。被験体の皮膚からのSSLの採取には、皮膚からのSSLの回収又は除去に用いられているあらゆる手段を採用することができる。好ましくは、SSL吸収性素材、SSL接着性素材、又は皮膚からSSLをこすり落とす器具を使用することができる。SSL吸収性素材又はSSL接着性素材としては、SSLに親和性を有する素材であれば特に限定されず、例えばポリプロピレン、パルプ等が挙げられる。皮膚からのSSLの採取手順のより詳細な例としては、あぶら取り紙、あぶら取りフィルム等のシート状素材へSSLを吸収させる方法、ガラス板、テープ等へSSLを接着させる方法、スパーテル、スクレイパー等によりSSLをこすり落として回収する方法、などが挙げられる。SSLの吸着性を向上させるため、脂溶性の高い溶媒を予め含ませたSSL吸収性素材を用いてもよい。一方、SSL吸収性素材が水溶性の高い溶媒や水分を含んでいると、SSLの吸着が阻害されるため好ましくない。SSL吸収性素材は、乾燥した状態で用いることが好ましい。

[0027] 一実施形態においては、被験体から分離したSSLに本発明のRNA安定化剤を添加する。一例では、SSLを回収したSSL吸収性素材又はSSL接着性素材に本発明のRNA安定化剤を添加する。別の一実施形態においては、本発明のRNA安定化剤は、被験体の皮膚上の前記皮膚表上脂質に添加される。一例では、被験体の皮膚上に本発明のRNA安定化剤を外用(例えば塗布又はスプレー)してSSLと混合し、その後、RNA安定化剤とともにSSLを回収する。別の一例では、本発明のRNA安定化剤を含むSSL

吸収性素材又はSSL接着性素材を被験体の皮膚上に接触させ、SSLを回収するとともに該SSLにRNA安定化剤を添加する。

[0028] 本発明のRNA安定化剤を適用した生体由来試料からのRNAの回収は、通常の生体由来試料からのRNAの回収手順に従って実施すればよい。例えば、生体由来試料に適した市販のRNA精製試薬を用いることができる。

[0029] 本発明の例示的实施形態として、以下の物質、製造方法、用途、方法等をさらに本明細書に開示する。但し、本発明はこれらの実施形態に限定されない。

[0030] [1] 遊離脂肪酸、スクアレン、コレステロールエステル、及びトリアシルグリセロールからなる群より選択される少なくとも1種を有効成分とする、RNA安定化剤。

[2] 前記コレステロールエステルを構成する脂肪酸部分が、好ましくは直鎖脂肪酸又は不飽和脂肪酸、より好ましくは直鎖不飽和脂肪酸である、[1]記載のRNA安定化剤。

[3] 前記コレステロールエステルを構成する脂肪酸部分の鎖長が、好ましくは12～22、より好ましくは14～18である、[1]又は[2]記載のRNA安定化剤。

[4] 前記トリアシルグリセロールに含まれるアシル基が、好ましくは直鎖脂肪酸基又は不飽和脂肪酸基、より好ましくは直鎖不飽和脂肪酸基である、[1]～[3]のいずれか1項記載のRNA安定化剤。

[5] 前記トリアシルグリセロールに含まれるアシル基の鎖長が、好ましくは12～22、より好ましくは14～18である、[1]～[4]のいずれか1項記載のRNA安定化剤。

[6] 前記遊離脂肪酸が、好ましくは直鎖脂肪酸又は不飽和脂肪酸、より好ましくは直鎖不飽和脂肪酸である、[1]～[5]のいずれか1項記載のRNA安定化剤。

[7] 前記遊離脂肪酸の鎖長が、好ましくは12～22、より好ましくは14～18である、[1]～[6]のいずれか1項記載のRNA安定化剤。

〔 8 〕 好ましくは、RNaseが存在する環境下でのRNA分解抑制のために使用される、〔 1 〕 ～ 〔 7 〕 のいずれか 1 項記載のRNA安定化剤。

〔 9 〕 好ましくは、RNaseの活性を阻害するために使用される、〔 1 〕 ～ 〔 7 〕 のいずれか 1 項記載のRNA安定化剤。

〔 1 0 〕 好ましくは、RNase阻害剤又はRNA分解抑制剤である、〔 1 〕 ～ 〔 7 〕 のいずれか 1 項記載のRNA安定化剤。

〔 1 1 〕 前記RNaseが、

好ましくはRNase A superfamilyに属するRNaseであり、

より好ましくはRNase A又はRNase 7である、

〔 8 〕 ～ 〔 1 0 〕 のいずれか 1 項記載のRNA安定化剤。

〔 1 2 〕 前記RNAが、

好ましくは生体由来試料中のRNAであり、

より好ましくは皮膚表上脂質中のRNAである、

〔 1 〕 ～ 〔 1 1 〕 のいずれか 1 項記載のRNA安定化剤。

〔 1 3 〕 好ましくは、被験体から分離した前記皮膚表上脂質に添加されるか、又は被験体の皮膚上の前記皮膚表上脂質に添加される、〔 1 2 〕 記載のRNA安定化剤。

〔 1 4 〕 前記スクアレンが対象RNAに対して以下の量で適用される、〔 1 〕 ～ 〔 1 3 〕 のいずれか 1 項記載のRNA安定化剤：

対象RNAの1 μ gあたり、好ましくは0.05mg以上、より好ましくは5mg以上、かつ好ましくは100mg以下、より好ましくは50mg以下、又は、

対象RNAの1 μ gあたり、好ましくは0.05～100mg、より好ましくは0.05mg～50mg又は5mg～100mg、さらに好ましくは5～50mg。

〔 1 5 〕 前記コレステロールエステルが対象RNAに対して以下の量で適用される、〔 1 〕 ～ 〔 1 4 〕 のいずれか 1 項記載のRNA安定化剤：

対象RNAの1 μ gあたり、好ましくは0.05mg以上、より好ましくは5mg以上、かつ好ましくは100mg以下、より好ましくは50mg以下、又は、

対象RNAの1 μ gあたり、好ましくは0.05～100mg、より好ましくは0.05mg～50mg又は5mg～100mg、さらに好ましくは5～50mg。

〔16〕前記トリアシルグリセロールが対象RNAに対して以下の量で適用される、〔1〕～〔15〕のいずれか1項記載のRNA安定化剤：

対象RNAの1 μ gあたり、好ましくは0.05mg以上、より好ましくは5mg以上、かつ好ましくは100mg以下、より好ましくは50mg以下、又は、

対象RNAの1 μ gあたり、好ましくは0.05～100mg、より好ましくは0.05mg～50mg又は5mg～100mg、さらに好ましくは5～50mg。

〔17〕前記遊離脂肪酸が対象RNAに対して以下の量で適用される、〔1〕～〔16〕のいずれか1項記載のRNA安定化剤：

対象RNAの1 μ gあたり、好ましくは0.005mg以上、より好ましくは0.5mg以上、かつ好ましくは100mg以下、より好ましくは50mg以下、又は、

対象RNAの1 μ gあたり、好ましくは0.005～100mg、より好ましくは0.05mg～50mg又は5mg～100mg、さらに好ましくは0.5～50mg。

〔18〕好ましくは、前記遊離脂肪酸、スクアレン、コレステロールエステル、トリアシルグリセロールからなる群より選択される少なくとも1種を含む油脂組成物を含有する、〔1〕～〔17〕のいずれか1項記載のRNA安定化剤。

[0031] 〔19〕対象RNAに、〔1〕～〔18〕のいずれか1項記載のRNA安定化剤を適用することを含む、RNA安定化方法。

〔20〕好ましくは、前記RNA安定化が、RNAse阻害、又はRNAseが存在する環境下でのRNA分解抑制を含む、〔19〕記載の方法。

[0032] 〔21〕RNA安定化剤の製造における、遊離脂肪酸、スクアレン、コレステロールエステル、及びトリアシルグリセロールからなる群より選択される少なくとも1種の使用。

〔22〕RNA安定化のための、遊離脂肪酸、スクアレン、コレステロールエステル、及びトリアシルグリセロールからなる群より選択される少なくとも1種の使用。

〔23〕前記コレステロールエステルを構成する脂肪酸部分が、好ましくは直鎖脂肪酸又は不飽和脂肪酸、より好ましくは直鎖不飽和脂肪酸である、〔21〕又は〔22〕記載の使用。

〔24〕前記コレステロールエステルを構成する脂肪酸部分の鎖長が、好ましくは12～22、より好ましくは14～18である、〔21〕～〔23〕のいずれか1項記載の使用。

〔25〕前記トリアシルグリセロールに含まれるアシル基が、好ましくは直鎖脂肪酸基又は不飽和脂肪酸基、より好ましくは直鎖不飽和脂肪酸基である、〔21〕～〔24〕のいずれか1項記載の使用。

〔26〕前記トリアシルグリセロールに含まれるアシル基の鎖長が、好ましくは12～22、より好ましくは14～18である、〔21〕～〔25〕のいずれか1項記載の使用。

〔27〕前記遊離脂肪酸が、好ましくは直鎖脂肪酸又は不飽和脂肪酸、より好ましくは直鎖不飽和脂肪酸である、〔21〕～〔26〕のいずれか1項記載の使用。

〔28〕前記遊離脂肪酸の鎖長が、好ましくは12～22、より好ましくは14～18である、〔21〕～〔27〕のいずれか1項記載の使用。

〔29〕好ましくは、前記RNA安定化が、RNAseが存在する環境下でのRNA分解抑制によるRNA安定化である、〔21〕～〔28〕のいずれか1項記載の使用。

〔30〕好ましくは、前記RNA安定化が、RNase阻害によるRNA安定化である、〔21〕～〔28〕のいずれか1項記載の使用。

〔31〕好ましくは、前記RNA安定化が、RNase阻害、又はRNaseが存在する環境下でのRNA分解抑制を含む、〔21〕～〔28〕のいずれか1項記載の使用。

〔32〕前記RNaseが、

好ましくはRNase A superfamilyに属するRNaseであり、

より好ましくはRNase A又はRNase 7である、

〔29〕～〔31〕のいずれか1項記載の使用。

〔33〕前記RNAが、

好ましくは生体由来試料中のRNAであり、

より好ましくは皮膚表上脂質中のRNAである、

〔21〕～〔32〕のいずれか1項記載の使用。

〔34〕好ましくは、前記遊離脂肪酸、スクアレン、コレステロールエステル、及びトリアシルグリセロールからなる群より選択される少なくとも1種が、被験体から分離した前記皮膚表上脂質に添加されるか、又は被験体の皮膚上の前記皮膚表上脂質に添加される、〔33〕記載の使用。

〔35〕前記スクアレンが対象RNAに対して以下の量で適用される、〔21〕～〔34〕のいずれか1項記載の使用：

対象RNAの1 μ gあたり、好ましくは0.05mg以上、より好ましくは5mg以上、かつ好ましくは100mg以下、より好ましくは50mg以下、又は、

対象RNAの1 μ gあたり、好ましくは0.05～100mg、より好ましくは0.05mg～50mg又は5mg～100mg、さらに好ましくは5～50mg。

〔36〕前記コレステロールエステルが対象RNAに対して以下の量で適用される、〔21〕～〔35〕のいずれか1項記載の使用：

対象RNAの1 μ gあたり、好ましくは0.05mg以上、より好ましくは5mg以上、かつ好ましくは100mg以下、より好ましくは50mg以下、又は、

対象RNAの1 μ gあたり、好ましくは0.05～100mg、より好ましくは0.05mg～50mg又は5mg～100mg、さらに好ましくは5～50mg。

〔37〕前記トリアシルグリセロールが対象RNAに対して以下の量で適用される、〔21〕～〔36〕のいずれか1項記載の使用：

対象RNAの1 μ gあたり、好ましくは0.05mg以上、より好ましくは5mg以上、かつ好ましくは100mg以下、より好ましくは50mg以下、又は、

対象RNAの1 μ gあたり、好ましくは0.05～100mg、より好ましくは0.05mg～50mg又は5mg～100mg、さらに好ましくは5～50mg。

〔38〕前記遊離脂肪酸が対象RNAに対して以下の量で適用される、〔21〕～〔37〕のいずれか1項記載の使用：

対象RNAの1 μ gあたり、好ましくは0.005mg以上、より好ましくは0.5mg以上、かつ好ましくは100mg以下、より好ましくは50mg以下、又は、

対象RNAの1 μ gあたり、好ましくは0.005～100mg、より好ましくは0.05mg～50mg又は5mg～100mg、さらに好ましくは0.5～50mg。

〔39〕好ましくは、前記遊離脂肪酸、スクアレン、コレステロールエステル、及びトリアシルグリセロールからなる群より選択される少なくとも1種を含む油脂組成物が使用される、〔21〕～〔38〕のいずれか1項記載の使用。

実施例

[0033] 以下、実施例に基づき本発明をさらに詳細に説明するが、本発明はこれに

限定されるものではない。

[0034] 実施例 1 皮脂のRNA安定化活性

1) 皮脂抽出物の調製

ヒト被験者4名の顔面からあぶら取りフィルム(5.0cm×8.0cm、オイルクリアフィルム、白元アース)で皮脂を採取した。皮脂を採取したあぶら取りフィルムをハサミで細断し、DDW/t-Butyl Methyl Ether(1:4 v/v)溶液(Wako)内で試験管ミキサーにより混合し、3,000rpmで10分間遠心した。上層(t-Butyl Methyl Ether層)を回収して50℃、窒素ガス気流下で溶媒を除去し、皮脂抽出物を得た。

[0035] 2) 皮脂抽出物のRNA安定化活性評価

Human Epidermal Keratinocytes, neonatal (HEKn) (Cascade Biologics) からRN easy mini kit (QIAGEN) を用いて付属のプロトコルに従って抽出したRNAを被験RNAとして用いた。RNaseには、ウシRNase A(富士フイルム和光純薬)又はヒトRNase 7(Recombinant human RNASE 7 protein; NOVUS)を用いた。10mM Tris-HCl(pH8.0)を溶媒として調製した被験RNA溶液(最終濃度20μg/mL)と、1)で調製した皮脂抽出物1μLとを混合し(皮脂抽出物最終濃度2%v/v)、室温で1分間ソニケーションした。一方、皮脂抽出物非添加の被験RNA溶液には、皮脂抽出物と同量の10mM Tris-HCl(pH8.0)を混合した。得られた皮脂抽出物添加又は非添加の被験RNA溶液に、RNase A又はRNase 7を最終濃度1μg/mLで添加し(反応液50μL)、室温で15分又は30分間(RNase 7を添加した場合は全て30分間)静置した。反応液にTrizol LS(Invitrogen)/Chloroformを加えてキットのプロトコルに従いRNAを分離し、イソプロパノール沈殿によりRNAを回収した。コントロールとして、皮脂抽出物及びRNA

se非添加のサンプルを用意し、他のサンプルと同様の方法でRNAを回収した。回収したRNAを、Agilent 4200 TapeStation system (Agilent technologies) にて、High Sensitivity RNA Screen Tape (Agilent technologies) 及びHigh Sensitivity RNA ScreenTape Sample buffer (Agilent technologies) を用いて電気泳動した。

[0036] RNAの電気泳動像を図1に示す。皮脂抽出物の添加によりRNase A又はRNase 7によるRNA分解が抑制されたことから、皮脂がRNase活性を阻害し、RNAを安定化する作用を有することが示された。

[0037] 実施例2 皮脂成分のRNA安定化活性評価

1) 薄層クロマトグラフィー (TLC) による皮脂抽出物の分画

実施例1の1)で調製した皮脂抽出物5mgを、Chloroform/methanol (2:1 v/v) 50 μ Lに溶解した。得られた溶液をHPTLCプレート (Glass HPTLC Silica gel 60 plates; 10 $\times$ 20cm, Merck) にアプライした。リファレンス用として、適量の皮脂抽出物及び脂質標品を同じHPTLCプレートにアプライした。水平展開槽にて展開溶媒Hexane/diethyl ether/acetic acid (70:30:1 v/v/v) を用いて分離した。プレートを、ガラスカッターを用いてリファレンス用と抽出用とに切り分けた。リファレンス用のプレートに10%硫酸銅/8%リン酸溶液をスプレー後、180 $^{\circ}$ Cで3分間加熱してスポットを検出した。脂質標品としては、コレステロールエステル [CE] としてCholesteryl palmitate (sigma, C6072)、ワックスエステル [WE] としてLauryl palmitoleate (santa cruz biotechnology, sc-280908)、トリアシルグリセロール [TAG] としてTriolein (sigma, T7140)、遊離脂肪酸 [FA] としてPalmitoleic acid (sigma

, P 9 4 1 7)、スクアレン [S Q] (s i g m a, S 3 6 2 6)、及びコレステロール [C h o l] (s i g m a, C 8 6 6 7)を用いた。

[0038] T L Cの結果を図2に示す。スクアレン (S Q)、コレステロールエステル (C E)、トリアシルグリセロール (T A G)、遊離脂肪酸 (F A)、コレステロール (C h o l) などのスポットが検出された。また明確なスポットは検出されなかったが、ワックスエステル (W E) が分離されたことも確認された。

[0039] 2) 皮脂抽出物画分の分離

リファレンス用プレートのスポットを参照して、抽出用のプレートから、S Q、C E 及びW Eを含む画分 (A)、T A Gを含む画分 (B)、F Aを含む画分 (C)、及びC h o lを含む画分 (D) の領域 (図2 参照) をかきとり、C h l o r o f o r m / m e t h a n o l (2 : 1 v / v) 8 m L に溶解し、ソニケーションした。得られた溶液を3, 0 0 0 r p m で5 分間遠心し、上清を回収し、5 0 °C で窒素乾固し、皮脂抽出物画分を得た。

[0040] 3) 皮脂抽出物画分のR N A 安定化活性評価

2) で得た皮脂抽出物画分の全量をD M S O (1 5 μ L) に再溶解した。実施例1の2) と同様の手順で、該皮脂抽出物画分のR N A 安定化活性を評価した。被験R N A 溶液 (最終濃度2 0 μ g / m L) と混合する皮脂抽出物画分としては、前記再溶解液及びそれを2 段階で3 倍ずつ希釈した希釈溶液を使用し、各々の溶液を最終濃度4 % (v / v) で添加した。R N a s e には、ヒトR N a s e 7 (R e c o m b i n a n t h u m a n R N A S E 7 p r o t e i n ; N O V U S) を用いた。R N a s e の最終濃度は1 μ g / m L、処理時間は3 0 分間とした。

[0041] 皮脂抽出物画分存在下でR N a s e 処理したR N A の電気泳動像を図3に示す。S Q、C E 及びW Eを含む画分 (A)、T A Gを含む画分 (B)、及びF Aを含む画分 (C) でR N A 分解が抑制された。

[0042] 実施例3 脂質のR N A 安定化活性評価

実施例1 と同様の手順で、皮脂構成脂質成分のR N A 安定化活性を調べた

。 lipid 構成脂質成分としては、スクアレン [SQ] (Squalene; sigma, S3626)、コレステロールエステル [CE] (Cholesteryl palmitoleate; Olbracht Serdary Research Laboratories, D-161)、ワックスエステル [WE] (Behenyl palmitoleate; NuChek Prep, WE-1368)、トリアシルグリセロール [TAG] (Glyceryl tripalmitolate; sigma, T5888)、遊離脂肪酸 [FA] (Palmitoleic acid; sigma, P9417)、及びコレステロール [Chol] (Cholesterol; sigma, C8667) を用いた。各脂質の最終濃度は 1 又は 100 mg/mL (CE、WE 及び Chol は 1 mg/mL のみ) とした。被験 RNA は、実施例 1 で抽出した RNA (最終濃度 20 µg/mL) を用いた。RNase には、ヒト RNase 7 (Recombinant human RNASE 7 protein; NOVUS) を用いた。RNase の最終濃度は 1 µg/mL、処理時間は 30 分間とした。また、RNA 分解度の指標として知られる、RNA 全体に占める 200 塩基以上の RNA の割合を、Agilent 4200 TapeStation system を用いて電気泳動像から算出した。

[0043] 次いで、脂肪酸鎖長の異なる TAG 及び FA の RNA 安定化活性を調べた。TAG 及び FA には、トリアシルグリセロール [TAG 16:1] (Glyceryl tripalmitolate; sigma, T5888)、トリアシルグリセロール [TAG 18:1] (Glyceryl trioleate; sigma, T7140)、C14 遊離脂肪酸 [FA 14:1] (Myristoleic acid; sigma, M3525)、C16 遊離脂肪酸 [FA 16:1] (Palmitoleic acid; sigma, P9417)、及び C18 遊離脂肪酸 [FA 18:1] (Oleic acid; sigma, O1008) を用いた。各脂質の最終濃度は 100 mg/mL とした。RNase には、ヒト RNase 7 (

Recombinant human RNASE 7 protein;
NOVUS) を用いた。RNase の最終濃度は $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ 、処理時間は
30 分間とした。

[0044] 図 4 A に示すとおり、SQ、CE、TAG、及び FA により RNA 分解が
抑制された。また図 4 B に示すとおり、皮脂中に多く存在する一価不飽和遊
離脂肪酸である C14 (ミリストレイン酸)、C16 (パルミトレイン酸)
、及び C18 (オレイン酸) のいずれも RNA 分解抑制活性を有していた。
また、C16 (パルミトレイル基) 又は C18 (オレイル基) の一価不飽和
のアシル基を有する TAG のいずれも RNA 分解抑制活性を有していた。

請求の範囲

- [請求項1] 対象RNAに、遊離脂肪酸、スクアレン、コレステロールエステル、及びトリアシルグリセロールからなる群より選択される少なくとも1種を適用することを含む、RNA安定化方法。
- [請求項2] 前記遊離脂肪酸の鎖長が12～22である、請求項1記載の方法。
- [請求項3] 前記コレステロールエステルを構成する脂肪酸の鎖長が12～22である、請求項1又は2記載の方法。
- [請求項4] 前記トリアシルグリセロールに含まれるアシル基の鎖長が12～22である、請求項1～3のいずれか1項記載の方法。
- [請求項5] RNaseが存在する環境下での前記対象RNAの分解を抑制する、請求項1～4のいずれか1項記載の方法。
- [請求項6] 前記RNaseがRNase A superfamilyに属するRNaseである、請求項5記載の方法。
- [請求項7] 前記対象RNAが生体由来試料中のRNAである、請求項1～6のいずれか1項記載の方法。
- [請求項8] 前記遊離脂肪酸、スクアレン、コレステロールエステル、及びトリアシルグリセロールからなる群より選択される少なくとも1種が、被験体から分離した前記皮膚表上脂質に添加されるか、又は被験体の皮膚上の前記皮膚表上脂質に添加される、請求項1～7のいずれか1項記載の方法。
- [請求項9] 前記スクアレンが前記対象RNAに対して、該対象RNAの1 μ gあたり0.05～100mg以下の量で適用されるか、
前記コレステロールエステルが前記対象RNAに対して、該対象RNAの1 μ gあたり0.05～100mg以下の量で適用されるか、
前記トリアシルグリセロールが前記対象RNAに対して、該対象RNAの1 μ gあたり0.05～100mg以下の量で適用されるか、
又は、
前記遊離脂肪酸が前記対象RNAに対して、該対象RNAの1 μ g

あたり0.005～100mg以下の量で適用される、
請求項1～8のいずれか1項記載の方法。

- [請求項10] 前記対象RNAに対して、遊離脂肪酸、スクアレン、コレステロールエステル、及びトリアシルグリセロールからなる群より選択される少なくとも1種を含む油脂組成物を適用することを含む、請求項1～9のいずれか1項記載の方法。
- [請求項11] RNA安定化剤の製造における、遊離脂肪酸、スクアレン、コレステロールエステル、及びトリアシルグリセロールからなる群より選択される少なくとも1種の使用。
- [請求項12] RNA安定化のための、遊離脂肪酸、スクアレン、コレステロールエステル、及びトリアシルグリセロールからなる群より選択される少なくとも1種の使用。
- [請求項13] 前記遊離脂肪酸の鎖長が12～22である、請求項11又12記載の使用。
- [請求項14] 前記コレステロールエステルを構成する脂肪酸の鎖長が12～22である、請求項11～13のいずれか1項記載の使用。
- [請求項15] 前記トリアシルグリセロールに含まれるアシル基の鎖長が12～22である、請求項11～14のいずれか1項記載の使用。
- [請求項16] 前記RNA安定化が、RNaseが存在する環境下でのRNAの分解抑制によるRNA安定化である、請求項11～15のいずれか1項記載の使用。
- [請求項17] 前記RNaseがRNase A superfamilyに属するRNaseである、請求項16記載の使用。
- [請求項18] 前記RNAが生体由来試料中のRNAである、請求項11～17のいずれか1項記載の使用。
- [請求項19] 前記遊離脂肪酸、スクアレン、コレステロールエステル、及びトリアシルグリセロールからなる群より選択される少なくとも1種が、被験体から分離した前記皮膚表上脂質に添加されるか、又は被験体の皮

膚上の前記皮膚表上脂質に添加される、請求項 11～18 のいずれか 1 項記載の使用。

[請求項20] 前記スクアレンが前記対象RNAに対して、該対象RNAの1 μ g あたり0.05～100mg以下の量で適用されるか、

前記コレステロールエステルが前記対象RNAに対して、該対象RNAの1 μ g あたり0.05～100mg以下の量で適用されるか、

前記トリアシルグリセロールが前記対象RNAに対して、該対象RNAの1 μ g あたり0.05～100mg以下の量で適用されるか、又は、

前記遊離脂肪酸が前記対象RNAに対して、該対象RNAの1 μ g あたり0.005～100mg以下の量で適用される、請求項 11～19 のいずれか 1 項記載の使用。

[請求項21] 好ましくは、前記遊離脂肪酸、スクアレン、コレステロールエステル、及びトリアシルグリセロールからなる群より選択される少なくとも 1 種を含む油脂組成物が使用される、請求項 11～20 のいずれか 1 項記載の使用。

[請求項22] 遊離脂肪酸、スクアレン、コレステロールエステル、及びトリアシルグリセロールからなる群より選択される少なくとも 1 種を有効成分とする、RNA安定化剤。

[請求項23] 前記遊離脂肪酸の鎖長が12～22である、請求項22記載のRNA安定化剤。

[請求項24] 前記コレステロールエステルを構成する脂肪酸の鎖長が12～22である、請求項22又は23記載のRNA安定化剤。

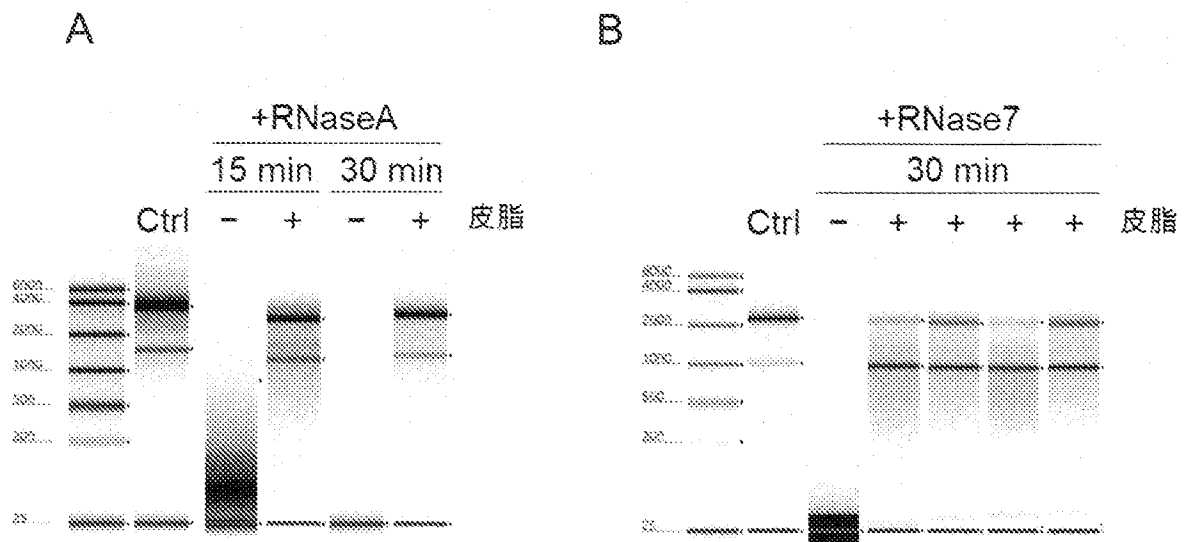
[請求項25] 前記トリアシルグリセロールに含まれるアシル基の鎖長が12～22である、請求項22～24のいずれか1項記載のRNA安定化剤。

[請求項26] 前記RNAが生体由来試料中のRNAである、請求項22～25のいずれか1項記載のRNA安定化剤。

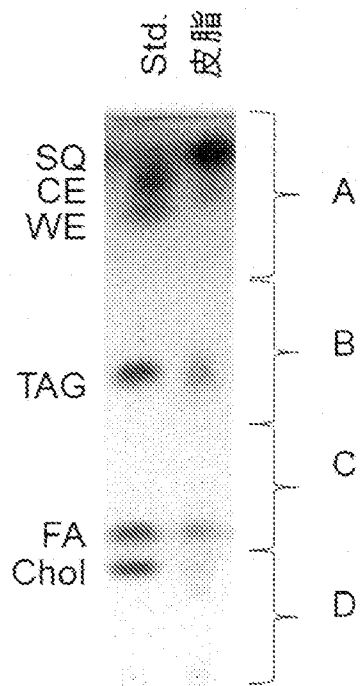
[請求項27] RNAaseが存在する環境下でのRNA分解抑制のために使用され

る、請求項 22 ～ 26 のいずれか 1 項記載の RNA 安定化剤。

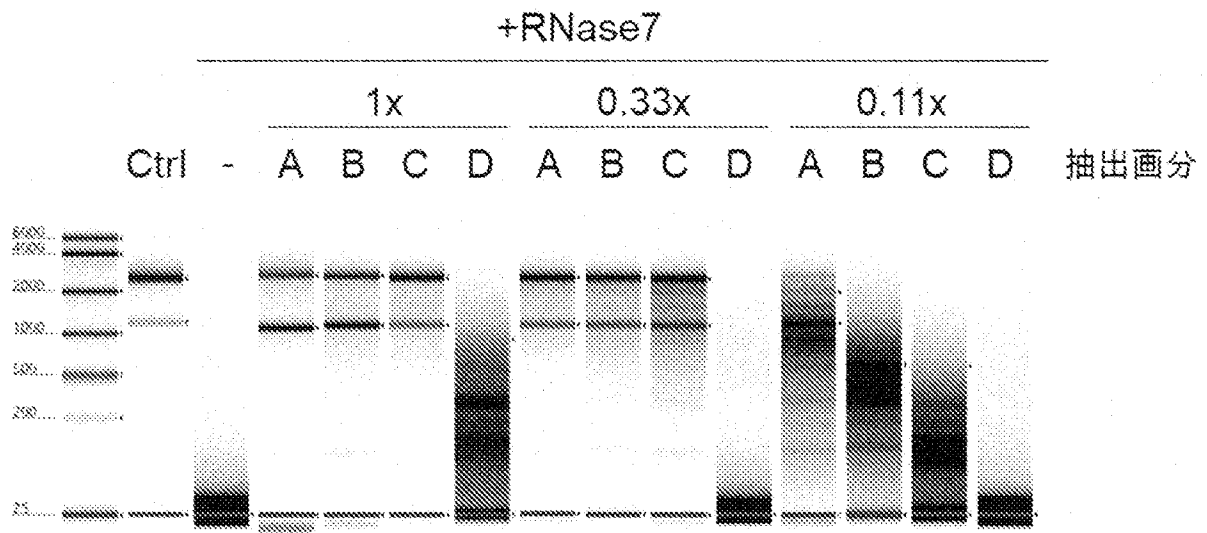
[図1]



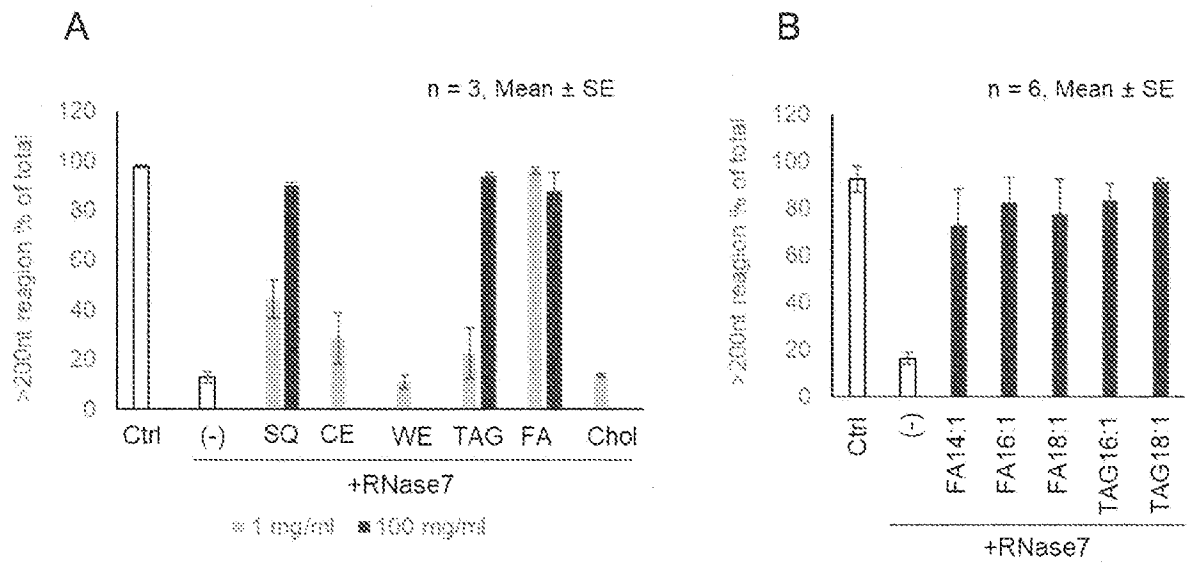
[図2]



[図3]



[図4]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2021/025441

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER <i>C12N 15/10</i> (2006.01)i; <i>C12N 9/22</i> (2006.01)i; <i>C12N 9/99</i> (2006.01)i FI: C12N15/10 100Z; C12N9/99; C12N9/22 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) C12N15/10; C12N9/22; C12N9/99 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Published examined utility model applications of Japan 1922-1996 Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2021 Registered utility model specifications of Japan 1996-2021 Published registered utility model applications of Japan 1994-2021 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	SAHA, Ranajay et al., "Lipid vesicles chaperone an encapsulated RNA aptamer", nature communications, 2018, vol. 9, no. 2313, pp. 1-11 Abstract, Methods	1-2, 5-13, 16-23, 26-27
A	WO 2019/093423 A1 (THE UNIVERSITY OF TOKYO) 16 May 2019 (2019-05-16) entire text	1-2, 5-13, 16-23, 26-27
A	JP 2010-100581 A (HIROSHIMA UNIVERSITY) 06 May 2010 (2010-05-06) entire text	1-2, 5-13, 16-23, 26-27
A	TEBBEY, P. W. et al., "Arachidonic Acid Down-regulates the Insulin-dependent Glucose Transporter Gene (GLUT4) in 3T3-L1 Adipocytes by Inhibiting Transcription and Enhancing mRNA Turnover", The Journal of Biological Chemistry, 1994, vol. 269, no. 1, pp. 639-644 entire text	1-2, 5-13, 16-23, 26-27
☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 17 September 2021		Date of mailing of the international search report 28 September 2021
Name and mailing address of the ISA/JP Japan Patent Office (ISA/JP) 3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915 Japan		Authorized officer Telephone No.

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

Document 1: SAHA, Ranajay et al., "Lipid vesicles chaperone an encapsulated RNA aptamer", nature communications, 2018, vol. 9, no. 2313, pp. 1-11, Abstract, Methods

Claims are classified into the following four inventions.

(Invention 1)

Document 1 discloses the review of the effect on the folding of RNA by the encapsulation of RNA, and indicates that RNA is encapsulated in a vesicle containing myristoleic acid, thereby stabilizing RNA (Abstract, Methods).

Therefore, parts relating to a free fatty acid of the invention in claim 1 of the present application and claim 2 lack novelty in light of document 1, and thus do not have a special technical feature.

In addition, parts relating to a free fatty acid of the invention in claims 5-6 lack novelty in light of document 1 because the encapsulation in the vesicle naturally leads to the inhibition of the digestion by RNase, and thus do not have a special technical feature.

Next, a special technical feature was found in parts relating to a free fatty acid of the invention in claim 7.

Therefore, the parts relating to a free fatty acid of the inventions in claims 1-2 and 5-7 are classified as invention 1.

In addition, the parts relating to a free fatty acid of the inventions in claims 8-13, 16-23 and 26-27 are also classified as invention 1.

(Invention 2)

Parts relating to squalene of the inventions in claims 1, 5-12, 16-22, and 26-27 cannot be said to have a special technical feature identical or corresponding to the parts relating to a free fatty acid of the invention in claim 7 classified as invention 1.

In addition, the parts relating to squalene of the inventions in claims 1, 5-12, 16-22, and 26-27 are not dependent on the parts relating to a free fatty acid of the invention in claim 7.

Further, the parts relating to squalene of the inventions in claims 1, 5-12, 16-22, and 26-27 are not substantially identical or equivalent to any of the inventions classified as invention 1.

Therefore, the parts relating to squalene of the inventions in claims 1, 5-12, 16-22, and 26-27 cannot be classified as invention 1, and are thus classified as invention 2.

(Invention 3)

Parts relating to cholesterol ester of the inventions in claims 1, 3, 5-12, 14, 16-22, 24, and 26-27 cannot be said to have a special technical feature identical or corresponding to the parts relating to a free fatty acid of the invention in claim 7 classified as invention 1 and the parts relating to squalene of the invention in claim 1 classified as invention 2.

Parts relating to cholesterol ester of the inventions in claims 1, 3, 5-12, 14, 16-22, 24, and 26-27 are not dependent on either the parts relating to a free fatty acid of the invention in claim 7 classified as invention 1 or the parts relating to squalene of the invention in claim 1 classified as invention 2.

Further, the parts relating to cholesterol ester of the inventions in claims 1, 3, 5-12, 14, 16-22, 24, and 26-27 are not substantially identical or equivalent to any of the inventions classified as either invention 1 or 2.

Therefore, the parts relating to cholesterol ester of the inventions in claims 1, 3, 5-12, 14, 16-22, 24, and 26-27 cannot be classified as either invention 1 or 2, and are thus classified as invention 3.

(Invention 4)

Parts relating to triacylglycerol of the inventions in claims 1, 4-12, 15-22, and 25-27 cannot be said to have a special technical feature identical or corresponding to the parts relating to a free fatty acid of the invention in claim 7 classified as invention 1, the parts relating to squalene of the invention in claim 1 classified as invention 2, and the parts relating to cholesterol ester of the invention in claim 1 classified as invention 3.

In addition, the parts relating to triacylglycerol of the inventions in claims 1, 4-12, 15-22, and 25-27 are not dependent on any one of the parts relating to a free fatty acid of the invention in claim 7 classified as invention 1, the parts relating to squalene of the invention in claim 1 classified as invention 2, or the parts relating to cholesterol ester of the invention in claim 1 classified as invention 3.

Further, the parts relating to triacylglycerol of the inventions in claims 1, 4-12, 15-22, and 25-27 are not substantially identical or equivalent to any of the inventions classified as any one of inventions 1-3.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2021/025441

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

Therefore, the parts relating to triacylglycerol of the inventions in claims 1, 4-12, 15-22, and 25-27 cannot be classified as any one of inventions 1-3, and are thus classified as invention 4.

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.: **(1) Claims 1-2, 4-7 and 9-23,26**

Remark on Protest

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/JP2021/025441

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
WO	2019/093423	A1	16 May 2019	(Family: none)	
JP	2010-100581	A	06 May 2010	(Family: none)	

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC）） C12N 15/10(2006.01)i; C12N 9/22(2006.01)i; C12N 9/99(2006.01)i FI: C12N15/10 100Z; C12N9/99; C12N9/22										
B. 調査を行った分野										
調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC）） C12N15/10; C12N9/22; C12N9/99										
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922 - 1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971 - 2021年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996 - 2021年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994 - 2021年</td> </tr> </table>			日本国実用新案公報	1922 - 1996年	日本国公開実用新案公報	1971 - 2021年	日本国実用新案登録公報	1996 - 2021年	日本国登録実用新案公報	1994 - 2021年
日本国実用新案公報	1922 - 1996年									
日本国公開実用新案公報	1971 - 2021年									
日本国実用新案登録公報	1996 - 2021年									
日本国登録実用新案公報	1994 - 2021年									
国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語） CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)										
C. 関連すると認められる文献										
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号								
X	SAHA, Ranajay et al., Lipid vesicles chaperone an encapsulated RNA aptamer, nature communications, 2018, Vol.9, No.2313, P.1-11 Abstract, Methods	1-2, 5-13, 16-23, 26-27								
A	WO 2019/093423 A1 (国立大学法人東京大学) 16.05.2019 (2019 - 05 - 16) 全文	1-2, 5-13, 16-23, 26-27								
A	JP 2010-100581 A (国立大学法人広島大学) 06.05.2010 (2010 - 05 - 06) 全文	1-2, 5-13, 16-23, 26-27								
A	TEBBEY, P. W. et al., Arachidonic Acid Down-regulates the Insulin-dependent Glucose Transporter Gene (GLUT4) in 3T3-L1 Adipocytes by Inhibiting Transcription and Enhancing mRNA Turnover, The Journal of Biological Chemistry, 1994, Vol.269, No.1, P.639-644 全文	1-2, 5-13, 16-23, 26-27								
☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。 ☒ パテントファミリーに関する別紙を参照。										
* 引用文献のカテゴリー “A” 特に関連のある文献ではなく、一般的な技術水準を示すもの “E” 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの “L” 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す） “O” 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 “P” 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献 “T” 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの “X” 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの “Y” 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの “&” 同一パテントファミリー文献										
国際調査を完了した日 17.09.2021		国際調査報告の発送日 28.09.2021								
名称及びあて先 日本国特許庁(ISA/JP) 〒100-8915 日本国 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		権限のある職員（特許庁審査官） 馬場 亮人 4B 4043 電話番号 03-3581-1101 内線 3488								

第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

文献1 : SAHA, Ranajay et al., Lipid vesicles chaperone an encapsulated RNA aptamer, nature communications, 2018, Vol.9, No.2313, P.1-11, Abstract, Methods

請求の範囲は、以下の4つの発明に区分される。

（発明1）

文献1には、RNAのカプセル化によるRNAのフォールディングへの影響等について検討したことが記載されており、RNAをミリストレイン酸を含む小胞にカプセル化させることにより、RNAが安定化することが記載されている（Abstract、Methods）。

したがって、本願の請求項1に係る発明のうち遊離脂肪酸に関する部分、及び請求項2は文献1により新規性が欠如しているため、特別な技術的特徴を有しない。

また、請求項5-6に係る発明のうち、遊離脂肪酸に関する部分についても、上記小胞にカプセル化されれば当然RNAaseによる分解も抑制されることから、文献1により新規性が欠如しており、特別な技術的特徴を有しない。

次に、請求項7に係る発明のうち遊離脂肪酸に関する部分に特別な技術的特徴が発見された。

そのため、請求項1-2、5-7に係る発明のうち遊離脂肪酸に関する部分を発明1に区分する。

また、請求項8-13、16-23、26-27に係る発明のうち遊離脂肪酸に関する部分も発明1に区分する。

（発明2）

請求項1、5-12、16-22、26-27に係る発明のうちスクアレンに関する部分は、発明1に区分された請求項7に係る発明のうち遊離脂肪酸に関する部分と、同一の又は対応する特別な技術的特徴を有しているとはいえない。

また、請求項1、5-12、16-22、26-27に係る発明のうちスクアレンに関する部分は、請求項7に係る発明のうち遊離脂肪酸に関する部分に従属するものではない。

さらに、請求項1、5-12、16-22、26-27に係る発明のうちスクアレンに関する部分は、発明1に区分されたいずれの発明に対しても実質同一又はそれに準ずる関係にはない。

したがって、請求項1、5-12、16-22、26-27に係る発明のうちスクアレンに関する部分は、発明1に区分できず、これらは発明2に区分する。

（発明3）

請求項1、3、5-12、14、16-22、24、26-27に係る発明のうちコレステロールエステルに関する部分は、発明1に区分された請求項7に係る発明のうち遊離脂肪酸に関する部分及び発明2に区分された請求項1に係る発明のうちスクアレンに関する部分と、同一の又は対応する特別な技術的特徴を有しているとはいえない。

また、請求項1、3、5-12、14、16-22、24、26-27に係る発明のうちコレステロールエステルに関する部分は、発明1に区分された請求項7に係る発明のうち遊離脂肪酸に関する部分及び発明2に区分された請求項1に係る発明のうちスクアレンに関する部分のいずれにも従属するものではない。

さらに、請求項1、3、5-12、14、16-22、24、26-27に係る発明のうちコレステロールエステルに関する部分は、発明1、2に区分されたいずれの発明に対しても実質同一又はそれに準ずる関係にはない。

従って、請求項1、3、5-12、14、16-22、24、26-27に係る発明のうちコレステロールエステルに関する部分は発明1、2に区分できず、これらは発明3に区分する。

（発明4）

請求項1、4-12、15-22、25-27に係る発明のうちトリアシルグリセロールに関する部分は、発明1に区分された請求項7に係る発明のうち遊離脂肪酸に関する部分、発明2に区分された請求項1に係る発明のうちスクアレンに関する部分、及び、発明3に区分された請求項1に係る発明のうちコレステロールエステルに関する部分と、同一の又は対応する特別な技術的特徴を有しているとはいえない。

また、請求項1、4-12、15-22、25-27に係る発明のうちトリアシルグリセロールに関する部分は、発明1に区分された請求項7に係る発明のうち遊離脂肪酸に関する部分、発明2に区分された請求項1に係る発明のうちスクアレンに関する部分、及び、発明3に区分された請求項1に係る発明のうちコレステロールエステルに関する部分のいずれにも従属するものではない。

第Ⅲ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第１ページの３の続き）

さらに、請求項１，４-１２，１５-２２，２５-２７に係る発明のうちトリアシルグリセロールに関する部分は、発明１-３に区分されたいずれの発明に対しても実質同一又はそれに準ずる関係にはない。

したがって、請求項１，４-１２，１５-２２，２５-２７に係る発明のうちトリアシルグリセロールに関する部分は、発明１-３に区分できず、これらは発明４に区分する。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求項について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求項について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求項のみについて作成した。
4. ☒ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求項について作成した。
請求項１-２，５-１３，１６-２３，２６-２７

追加調査手数料の異議の
申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。
- ☐ 追加調査手数料の納付はあったが、異議申立てはなかった。

国際調査報告
パテントファミリーに関する情報

国際出願番号

PCT/JP2021/025441

引用文献			公表日	パテントファミリー文献	公表日
WO	2019/093423	A1	16.05.2019	(ファミリーなし)	
JP	2010-100581	A	06.05.2010	(ファミリーなし)	