

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2018-530349

(P2018-530349A)

(43) 公表日 平成30年10月18日(2018.10.18)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/877 (2010.01)	C 1 2 N 15/877 Z N A Z	4 B 0 6 5
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10	
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/09 Z	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 170 頁)

(21) 出願番号	特願2018-538060 (P2018-538060)	(71) 出願人	596115687 チルドレンズ メディカル センター コーポレーション アメリカ合衆国マサチューセッツ州02115, ボストン, シャタック・ストリート 55
(86) (22) 出願日	平成28年10月7日 (2016.10.7)	(71) 出願人	518120359 ソン クワン メディカル ファウンデーション 大韓民国 06135 ソウル カンナムーク ノンヒョンーロ 566
(85) 翻訳文提出日	平成30年5月29日 (2018.5.29)	(74) 代理人	100102978 弁理士 清水 初志
(86) 国際出願番号	PCT/US2016/055890	(74) 代理人	100102118 弁理士 春名 雅夫
(87) 国際公開番号	W02017/062706		
(87) 国際公開日	平成29年4月13日 (2017.4.13)		
(31) 優先権主張番号	62/239, 318		
(32) 優先日	平成27年10月9日 (2015.10.9)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	62/242, 050		
(32) 優先日	平成27年10月15日 (2015.10.15)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ヒストンH3ーリシントリメチル化の排除によりヒト体細胞核移入 (SCNT) の効率を増加する方法および組成物、ならびにヒトNT-E SCの誘導方法

(57) 【要約】

本発明は、ヒト細胞の体細胞核移入 (SCNT) の効率を改善するための方法および組成物、ならびに結果としてのヒト核移入ESC (hNT-ESC) の生成を提供する。より具体的には、本発明は、ヒトドナー体細胞の核遺伝物質におけるリプログラミング耐性領域 (RRR) 中のヒストンH3-リシン9のトリメチル化 (H3K9me3) が、効率的なヒト体細胞核リプログラミングまたはSCNTを阻止するという発見に関する。本発明は、デメチラーゼKDM4ファミリーの外因性発現もしくは過剰発現により、ならびに/またはヒストンメチルトランスフェラーゼSUV39h1および/もしくはSUV39h2を阻害することによってH3K9me3のメチル化を阻害することにより、hSCNTの有効性を改善する方法においてH3K9me3を減少させる方法および組成物を提供する。

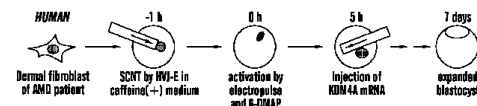
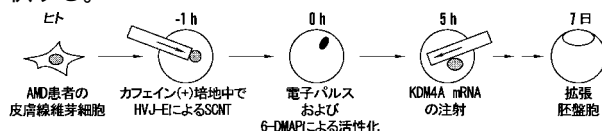


FIG. 2E

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ヒト体細胞核移入（hSCNT）の効率を増加させるための方法であって、
ハイブリッド卵母細胞を、KDM4ファミリーのヒストンデメチラーゼのメンバーの発現を増加させる活性物質と接触させる段階を含み、
該ハイブリッド卵母細胞が、ヒト体細胞の遺伝物質を含む除核したヒト卵母細胞である、
方法。

【請求項 2】

接触させる段階が、ハイブリッド卵母細胞の活性化または融合の後であるがヒト接合体ゲノム活性化（ZGA）が開始する前に起こる、請求項1記載の方法。

【請求項 3】

ヒト体細胞核移入（SCNT）の効率を増加させるための方法であって、以下の少なくとも1つの段階：

（iv）ドナーヒト体細胞もしくはレシピエントヒト卵母細胞を、該ドナーヒト体細胞もしくは該レシピエントヒト卵母細胞におけるH3K9me3メチル化を減少させる少なくとも1つの活性物質と接触させる段階であって、該レシピエントヒト卵母細胞が、有核もしくは除核卵母細胞である、段階；該レシピエントヒト卵母細胞が有核ならば、除核する段階；該ドナーヒト体細胞由来の核を該除核卵母細胞に移植してハイブリッド卵母細胞を形成させる段階；および該ハイブリッド卵母細胞を活性化させてヒトSCNT胚を形成させる段階；または

（v）ハイブリッド卵母細胞を、該ハイブリッド卵母細胞におけるH3K9me3メチル化を減少させる少なくとも1つの活性物質と接触させる段階であって、該ハイブリッド卵母細胞が、ヒト体細胞の遺伝物質を含む除核したヒト卵母細胞である、段階；および該ハイブリッド卵母細胞を活性化させてヒトSCNT胚を形成させる段階；または

（vi）活性化後のヒトSCNT胚を、該ヒトSCNT胚におけるH3K9me3メチル化を減少させる少なくとも1つの活性物質と接触させる段階であって、該SCNT胚が、除核したヒト卵母細胞とヒト体細胞の遺伝物質との融合から作製される、段階を含み、

該ドナーヒト体細胞、該レシピエントヒト卵母細胞、該ハイブリッド卵母細胞または該ヒトSCNT胚のうちのいずれか1つにおけるH3K9me3メチル化の減少が、該SCNTの効率を増加させる、
方法。

【請求項 4】

ヒト核移入胚性幹細胞（hNT-ESC）を産生するための方法であって、

a. 以下の少なくとも1つの段階：

（i）ドナーヒト体細胞もしくはレシピエントヒト卵母細胞を、該ドナーヒト体細胞もしくは該レシピエントヒト卵母細胞におけるH3K9me3メチル化を減少させる少なくとも1つの活性物質と接触させる段階であって、該レシピエントヒト卵母細胞が、有核もしくは除核卵母細胞である、段階；該レシピエントヒト卵母細胞が有核ならば、除核する段階；該ドナーヒト体細胞由来の核を該除核卵母細胞に移植してハイブリッド卵母細胞を形成させる段階；および該ハイブリッド卵母細胞を活性化させてヒトSCNT胚を形成させる段階；または

（ii）ハイブリッド卵母細胞を、該ハイブリッド卵母細胞におけるH3K9me3メチル化を減少させる少なくとも1つの活性物質と接触させる段階であって、該ハイブリッド卵母細胞が、ヒト体細胞の遺伝物質を含む除核したヒト卵母細胞である、段階；および該ハイブリッド卵母細胞を活性化させてヒトSCNT胚を形成させる段階；または

（iii）活性化後のヒトSCNT胚を、該SCNT胚におけるH3K9me3メチル化を減少させる少なくとも1つの活性物質と接触させる段階であって、該SCNT胚が、除核したヒト卵母細胞とヒト体細胞の遺伝物質との融合から作製される、段階、

b. 胚盤胞を形成させるために十分な時間、該SCNT胚をインキュベートする段階；および

10

20

30

40

50

該胚盤胞から少なくとも1つの割球を収集し、該少なくとも1つの割球を培養して少なくとも1つのヒトNT-ESCを形成させる段階を含む、方法。

【請求項 5】

ヒト体細胞核移入（SCNT）胚を産生するための方法であって、

ドナーヒト体細胞、レシピエントヒト卵母細胞またはヒト体細胞核移入（SCNT）胚の少なくとも1つを、該ドナーヒト体細胞、該レシピエントヒト卵母細胞または該ヒトSCNT胚におけるH3K9me3メチル化を減少させる少なくとも1つの活性物質と接触させる段階であって、該レシピエントヒト卵母細胞が、有核または除核卵母細胞である、段階；

該レシピエントヒト卵母細胞が有核ならば、除核する段階；

該ドナーヒト体細胞由来の核を該除核卵母細胞に移植してハイブリッド卵母細胞を形成させる段階；

該ハイブリッド卵母細胞を活性化させる段階；および

該ヒトSCNT胚を形成させるために十分な時間、該ハイブリッド卵母細胞をインキュベートする段階を含む、方法。

【請求項 6】

H3K9me3メチル化を減少させる活性物質が、ヒトKDM4ファミリーのヒストンデメチラーゼのメンバーの発現を増加させる活性物質である、請求項2～5のいずれか一項記載の方法。

【請求項 7】

活性物質が、ヒトKDM4（JMJD2）ファミリーのヒストンデメチラーゼの発現または活性を増加させる、請求項6記載の方法。

【請求項 8】

活性物質が、KDM4A（JMJD2A）、KDM4B（JMJD2B）、KDM4C（JMJD2C）、KDM4D（JMJD4D）またはKDM4E（JMJD2E）の少なくとも1つの発現または活性を増加させる、請求項1～7のいずれか一項記載の方法。

【請求項 9】

活性物質が、KDM4A（JMJD2A）の発現または活性を増加させる、請求項1～8のいずれか一項記載の方法。

【請求項 10】

活性物質が、SEQ ID NO:1～4もしくはSEQ ID NO:45に対応する核酸配列、またはSEQ ID NO:1～4もしくはSEQ ID NO:45の対応する配列と比較してSCNTの効率を同程度もしくはより大きな程度増加させるその生物学的に活性なフラグメントを含む、請求項1～9のいずれか一項記載の方法。

【請求項 11】

活性物質が、SEQ ID NO:1に対応する核酸配列、またはSEQ ID NO:1の核酸配列と比較してSCNTの効率を同程度またはより大きな程度増加させるその生物学的に活性なフラグメントを含む、請求項6記載の方法。

【請求項 12】

活性物質が、H3K9メチルトランスフェラーゼの阻害剤である、請求項1～11のいずれか一項記載の方法。

【請求項 13】

H3K9メチルトランスフェラーゼが、SUV39h1またはSUV39h2である、請求項12記載の方法。

【請求項 14】

H3K9メチルトランスフェラーゼが、SETDB1である、請求項12記載の方法。

【請求項 15】

SUV39h1、SUV39h2およびSETDB1の2つ以上が阻害される、請求項12記載の方法。

【請求項 16】

10

20

30

40

50

H3K9メチルトランスフェラーゼを阻害する活性物質が、RNAi剤、CRISPR/Cas9、CRISPR/Cpf1オリゴヌクレオチド、中和抗体または抗体フラグメント、アプタマー、小分子、ペプチド阻害剤、タンパク質阻害剤、アビジミル (avidimir)、およびその機能的フラグメントまたは誘導体からなる群より選択される、請求項12記載の方法。

【請求項 17】

RNAi剤が、siRNAまたはshRNA分子である、請求項16記載の方法。

【請求項 18】

活性物質が、SEQ ID NO:14~16、47、49、51、52または53のいずれかの発現を阻害する核酸阻害剤を含む、請求項1~17のいずれか一項記載の方法。

【請求項 19】

RNAi剤が、SEQ ID NO:14~16、47、49、51、52または53の少なくとも一部とハイブリダイズする、請求項17記載の方法。

【請求項 20】

RNAi剤が、SEQ ID NO:7、8もしくはSEQ ID NO:18もしくは19の核酸、またはその少なくとも10個の核酸が連続するフラグメント、またはSEQ ID NO:7、8もしくはSEQ ID NO:18もしくは19と少なくとも80%同一の配列を有するホモログの、任意の1つまたは組み合わせを含む、請求項17記載の方法。

【請求項 21】

レシピエントヒト卵母細胞が、除核したヒト卵母細胞である、請求項1~20のいずれか一項記載の方法。

【請求項 22】

ヒトSCNT胚が、1細胞期SCNT胚、活性化の5時間後 (5hpa) のSCNT胚、活性化の10~12時間後 (10~12hpa) のSCNT胚、活性化の20~28時間後 (20~28hpa) のSCNT胚、2細胞期SCNT胚のいずれかより選択される、請求項1~20のいずれか一項記載の方法。

【請求項 23】

核移入前に、活性物質が、レシピエントヒト卵母細胞または除核したヒト卵母細胞と接触する、請求項1~22のいずれか一項記載の方法。

【請求項 24】

活性化の前もしくは活性化の約5時間後に、またはSCNT胚が1細胞期のときに、活性物質が該ヒトSCNT胚と接触する、請求項1~22のいずれか一項記載の方法。

【請求項 25】

活性化の5時間後 (5hpa)、もしくは活性化の12時間後 (hpa)、もしくは活性化の20時間後 (20hpa) に、またはSCNT胚が2細胞期のときに、または5hpa~28hpaの任意の時間に、活性物質が該ヒトSCNT胚と接触する、請求項1~22のいずれか一項記載の方法。

【請求項 26】

レシピエントヒト卵母細胞もしくはハイブリッド卵母細胞、またはヒトSCNT胚を、活性物質と接触させる段階が、該レシピエントヒト卵母細胞もしくは該ハイブリッド卵母細胞、または該ヒトSCNT胚の核または細胞質に該活性物質を注射することを含む、請求項1~22のいずれか一項記載の方法。

【請求項 27】

活性物質がKDM4ファミリーのヒストンデメチラーゼの発現または活性を増加させる、請求項1~26のいずれか一項記載の方法。

【請求項 28】

除核したヒト卵母細胞に注射するために核を取り出す前に、活性物質がドナーヒト体細胞の細胞質または核と接触する、請求項1~22のいずれか一項記載の方法。

【請求項 29】

除核したヒト卵母細胞にドナーヒト体細胞の核を注射する少なくとも24時間前に、または該注射する前の少なくとも1日間、ドナーヒト体細胞が接触される、請求項28記載の方法。

【請求項 30】

10

20

30

40

50

除核したヒト卵母細胞にドナーヒト体細胞の核を注射する前に、活性物質がドナーヒト体細胞と少なくとも24時間、または少なくとも48時間、または少なくとも3日間接触する、請求項28記載の方法。

【請求項 3 1】

活性物質がH3K9メチルトランスフェラーゼを阻害する、請求項28～30のいずれか一項記載の方法。

【請求項 3 2】

H3K9メチルトランスフェラーゼが、SUV39h1もしくはSUV39h2、またはSUV39h1およびSUV39h2（SUV39h1/2）である、請求項28～30のいずれか一項記載の方法。

【請求項 3 3】

ドナーヒト体細胞が、最終分化した体細胞である、請求項1～32のいずれか一項記載の方法。

【請求項 3 4】

ドナーヒト体細胞が、胚性幹細胞、または人工多能性幹（iPS）細胞、または胎児細胞、または胚細胞ではない、請求項1～33のいずれか一項記載の方法。

【請求項 3 5】

ドナーヒト体細胞が、卵丘細胞、上皮細胞、線維芽細胞、神経細胞、角化細胞、造血細胞、メラニン細胞、軟骨細胞、赤血球、マクロファージ、単球、筋細胞、Bリンパ球、Tリンパ球、胚性幹細胞、胚性生殖細胞、胎児細胞、胎盤細胞、および成熟細胞からなる群より選択される、請求項1～34のいずれか一項記載の方法。

【請求項 3 6】

ドナーヒト体細胞が、線維芽細胞または卵丘細胞である、請求項1～35のいずれか一項記載の方法。

【請求項 3 7】

除核したレシピエントヒト卵母細胞に注射するためにドナーヒト体細胞から核を取り出すために、活性物質がドナーヒト体細胞の核と接触する、請求項1～36のいずれか一項記載の方法。

【請求項 3 8】

H3K9me3メチル化を減少させる活性物質の不在下で行われるhSCNTと比較して、胚盤胞期へのhSCNTの効率に少なくとも10%の増加をもたらす、請求項1～37のいずれか一項記載の方法。

【請求項 3 9】

H3K9me3メチル化を減少させる活性物質の不在下で行われるhSCNTと比較して、hSCNTの効率に10～20%の増加をもたらす、請求項1～38のいずれか一項記載の方法。

【請求項 4 0】

H3K9me3メチル化を減少させる活性物質の不在下で行われるhSCNTと比較して、hSCNTの効率に20%よりも大きな増加をもたらす、請求項1～39のいずれか一項記載の方法。

【請求項 4 1】

SCNT効率における増加が、ヒトSCNT胚の胚盤胞期への発生における増加である、請求項38～40のいずれか一項記載の方法。

【請求項 4 2】

SCNT効率における増加が、ヒトSCNT胚由来胚性幹細胞（hNT-ESC）の派生における増加である、請求項38～40のいずれか一項記載の方法。

【請求項 4 3】

ドナーヒト体細胞が、遺伝子組換えされたドナーヒト細胞である、請求項1～42のいずれか一項記載の方法。

【請求項 4 4】

ヒト胚盤胞を形成させるためにヒトSCNT胚をインビトロ培養する段階をさらに含む、請求項5記載の方法。

【請求項 4 5】

10

20

30

40

50

ヒトSCNT胚が、少なくとも4細胞期ヒトSCNT胚である、請求項44記載の方法。

【請求項 4 6】

ヒトSCNT胚が、少なくとも4細胞期SCNT胚である、請求項44記載の方法。

【請求項 4 7】

ヒト胚盤胞由来の内細胞塊から細胞を単離する段階；およびヒト胚性幹（ES）細胞を形成させるために未分化状態の内細胞塊からの細胞を培養する段階をさらに含む、請求項44記載の方法。

【請求項 4 8】

ドナーヒト体細胞、レシピエントヒト卵母細胞またはヒトSCNT胚の任意の1つまたは複数が、凍結および解凍されている、請求項1～48のいずれか一項記載の方法。

10

【請求項 4 9】

請求項1～48のいずれか一項記載の方法から産生された、ヒトSCNT胚由来胚性幹細胞（hNT-ESC）集団。

【請求項 5 0】

hNT-ESCが、遺伝子組換えされたhNT-ESCである、請求項49記載のhNT-ESC集団。

【請求項 5 1】

hNT-ESCが、多能性幹細胞または全能幹細胞である、請求項49記載のhNT-ESC集団。

【請求項 5 2】

hNT-ESCが、培養培地中に存在する、請求項49記載のhNT-ESC集団。

【請求項 5 3】

培養培地が、hNT-ESCを多能性または全能状態に維持する、請求項52記載のhNT-ESC集団。

20

【請求項 5 4】

培養培地が、hNT-ESCの凍結または凍結保存に適切な培地である、請求項52記載のhNT-ESC集団。

【請求項 5 5】

凍結または凍結保存される、請求項54記載のhNT-ESC集団。

【請求項 5 6】

請求項1～55記載の方法によって産生される、ヒトSCNT胚。

【請求項 5 7】

遺伝子組換えされている、請求項56記載のヒトSCNT胚。

30

【請求項 5 8】

レシピエントヒト卵母細胞由来ではないミトコンドリアDNA（mtDNA）を含む、請求項56記載のヒトSCNT胚。

【請求項 5 9】

培養培地中に存在する、請求項56記載のヒトSCNT胚。

【請求項 6 0】

培養培地が、ヒトSCNTの凍結または凍結保存に適切な培地である、請求項59記載のヒトSCNT胚。

【請求項 6 1】

凍結または凍結保存される、請求項60記載のヒトSCNT胚。

40

【請求項 6 2】

ヒトSCNT胚、レシピエントヒト卵母細胞、ヒトハイブリッド卵母細胞または胚盤胞の少なくとも1つと、

a. KDM4ファミリーのヒストンデメチラーゼの発現もしくは活性を増加させる活性物質、または

b. H3K9メチルトランスフェラーゼを阻害する活性物質の少なくとも1つと

を含む、組成物。

【請求項 6 3】

50

KDM4 (JMJD2) ファミリーのヒストンデメチラーゼの発現または活性を増加させる活性物質が、KDM4A (JMJD2A)、KDM4B (JMJD2B)、KDM4C (JMJD2C)、KDM4D (JMJD2D) または KDM4E (JMJD2E) の少なくとも1つの発現または活性を増加させる、請求項62記載の組成物。

【請求項 6 4】

活性物質が、KDM4D (JMJD2D) またはKDM4A (JMJD2A) の発現または活性を増加させる、請求項63記載の組成物。

【請求項 6 5】

活性物質が、SEQ ID NO:1~4もしくはSEQ ID NO:45に対応する核酸、またはSEQ ID NO:1~4もしくはSEQ ID NO:45の対応する配列と比較してヒトSCNTの効率を同程度もしくはより大きな程度増加させるその生物学的に活性なフラグメントを含む、請求項64記載の組成物。

10

【請求項 6 6】

活性物質が、SEQ ID NO:1に対応する核酸、またはSEQ ID NO:1の核酸配列と比較してSCNTの効率を同程度もしくはより大きな程度増加させるその生物学的に活性なフラグメントを含む、請求項64記載の組成物。

【請求項 6 7】

H3K9メチルトランスフェラーゼの阻害剤が、SUV39h1、SUV39h2、またはSETDB1の少なくとも1つまたは任意の組み合わせを阻害する、請求項62記載の組成物。

【請求項 6 8】

ヒトSCNT胚が、1細胞期、2細胞期または4細胞期のヒトSCNT胚である、請求項62記載の組成物。

20

【請求項 6 9】

レシピエントヒト卵母細胞が、除核したレシピエントヒト卵母細胞である、請求項62記載の組成物。

【請求項 7 0】

最終分化したヒト体細胞の核を注射することからヒトSCNT胚が産生されるか；または、除核したヒト卵母細胞に、最終分化したヒト体細胞の核を注射することから産生されるヒトSCNT胚から胚盤胞が発生する、請求項62記載の組成物。

【請求項 7 1】

(i) ヒトKDM4ファミリーのヒストンデメチラーゼの発現もしくは活性を増加させる活性物質および/またはH3K9メチルトランスフェラーゼを阻害する活性物質、ならびに

30

(ii) ヒト卵母細胞

を含む、キット。

【請求項 7 2】

ヒト卵母細胞が、除核した卵母細胞である、請求項92記載のキット。

【請求項 7 3】

ヒト卵母細胞が、非ヒト卵母細胞である、請求項92記載のキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

40

【0 0 0 1】

関連出願の相互参照

本出願は、米国特許法119条(e)項の下で、2015年10月9日に出願された米国仮特許出願第62/239,318号および2015年10月15日に出願された米国仮特許出願第62/242,050号の恩典を主張するものであり、その各内容は全体として参照により本明細書に組み入れられる。

【0 0 0 2】

配列表

本出願は、EFS-Webを介してASCII形式で提出された配列表を含み、これはその全体として参照により本明細書に組み入れられる。前記ASCIIコピーは、2016年10月7日に作成され、701039-085852-PCT_SL.txtという名称であり、サイズが157,721バイトである。

50

【 0 0 0 3 】

発明の分野

本発明は、概して、体細胞核移入（SCNT）の分野に関し、より具体的には、デメチラーゼKDM4ファミリーの過剰発現ならびに / またはSUV39h1および / もしくはSUV39h2ヒストンメチルトランスフェラーゼを阻害することによるH3K9me3のメチル化を阻害することによって、ヒトSCNTの効率を増加させることおよびヒト核移入ESC（hNT-ESC）を産生することに関する。

【 背景技術 】

【 0 0 0 4 】

発明の背景

分化した体細胞のゲノムは、核が体細胞核移入（SCNT）を介して卵母細胞細胞質の分子環境に曝露されると、リプログラムされて胚状態に戻ることができ（Gurdon, 1962）、それにより、最終分化した体細胞からの多能性胚性幹細胞（ESC）の作製が可能になる（Wakayama et al., 2001）。SCNTから派生したESC（NT-ESC）は、核ドナー体細胞に対して遺伝的に自己由来であるので、hSCNTは、疾患モデル化および細胞 / 組織置換療法を含む治療および再生医学に大きな可能性を有する（Hochedlinger and Jaenisch, 2003; Yang et al., 2007）。したがって、hSCNTを用いてミトコンドリア遺伝子関連異常を修正することができ、これは、転写因子に基づくリプログラミングによって行うことができない（Ma et al., 2015）。ヒトNT-ESCの大きな可能性にもかかわらず、技術的困難が、ヒトの治療へのその適用を極度に困難にしている（French et al., 2008; Noggle et al., 2011; Simerly et al., 2003）。

10

20

【 0 0 0 5 】

最初のNT-ESCは、Mitalipovのグループによって、分化した胎児および乳児線維芽細胞を核ドナーとして使用して作製された（Tachibana et al., 2013）。それらの最適化された条件を使用して、本発明者らおよび他者らは、高齢患者成熟体細胞からヒトNT-ESCを派生させることに成功した（Chung et al., 2014; Yamada et al., 2014）。しかし、NT-ESCの派生は、SCNT胚が胚盤胞期へと発生する率が極めて低いせいで、依然として非常に困難な課題のままである。現在、特定の雌からの最も質の高い卵母細胞だけが、SCNT胚の胚盤胞期への発生を支援することができ（Chung et al., 2014; Tachibana et al., 2013）、このことが、有用な卵母細胞ドナープールを制限している。

30

【 0 0 0 6 】

最終分化した体細胞は、体細胞核移入（SCNT）によって除核卵母細胞内に移植されると全能状態にリプログラミングされることができ（Gurdon, 1962）。SCNTは、分化した体細胞の単一の核から動物全体の生成を可能にするので、農業、生物医学工業、および絶滅危惧種の保護に大きな潜在性を有する（Yang et al., 2007）。実際、ヒツジにおける哺乳動物クローニングが1997年に最初に成功して以来（Wilmut et al., 1997）、20種よりも多い哺乳動物種がSCNTを経てクローニングされている（Rodriguez-Osorio et al., 2012）。そのうえ、SCNTによって作製された胚盤胞から多能性胚性幹細胞を樹立することができるので（Wakayama et al., 2001）、SCNTは、ヒトの治療に大いに有望である（Hochedlinger and Jaenisch, 2003）。この有望性は、最初のヒト核移入胚性幹細胞（hNT-ESC）の派生における最近の成功（Tachibana et al., 2013）、および高齢者またはヒト患者細胞からのヒトhNT-ESC作製（Chung et al., 2014; Yamada et al., 2014）の後に、より現実に近づいている。これらのhNT-ESCは、インビトロ疾患モデル化用の細胞の貴重な供給源として、ならびに再生療法および細胞 / 組織置換療法用の細胞の供給源として役立ち得る。

40

【 0 0 0 7 】

その大きな潜在性にもかかわらず、いくつかの技術上の問題が、SCNTの実用的用途を阻止しており、特に、SCNTは、クローン動物の産生に極めて低い効率を有する。例えばマウスSCNT胚の約半数は、着床前に発生停止を示し、代理母に移入された胚のわずか1~2%が最終段階まで発生する（Ogura et al., 2013）。高率の生殖クローニング効率（5~20%

50

）を有するウシ種を除き、全ての他の種における全体的な生殖クローニング効率は、非常に低い（1～5%）（Rodriguez-Orsorio et al., 2012）。さらに、hNT-ESC樹立の成功率も、その不十分な着床前発生のせいで低い（胚盤胞期までが10～25%；Tachibana et al., 2013; Yamada et al., 2014）。

【0008】

SCNTの適用潜在性を実現するために、SCNTのクローニング効率を改善する努力がなされている。第一に、トリコスタチンA（TSA）またはスクリプタイドのようなヒストンデアセチラーゼ（HDAC）阻害剤を用いた1細胞期SCNT胚の一過性処置は、マウス（Kishigami et al., 2006; Van Thuan et al., 2009）、ブタ（Zhao et al., 2009）、ウシ（Akagi et al., 2011）およびヒト（Tachibana et al., 2013; Yamada et al., 2014）を含めた多様な哺乳動物種のリプログラミング効率を改善することが報告されている。第二に、Xistのノックアウトまたはノックダウンは、マウスSCNT胚の着床後発生を改善することが報告されている（Inoue et al., 2010; Matoba et al., 2011）。しかし、これらの方法のいずれも、ヒトSCNTが、治療用クローニングもしくは再生療法用のヒト全能性および多能性幹細胞（例えばヒトNT-ESC）の作製に有用であるのに十分なほど、ヒトSCNTのクローニング効率を改善しない。

【0009】

SCNT胚の発生異常は、マウスで2細胞期に、ブタ、ウシおよびヒトで4～8細胞期に起こる接合体遺伝子活性化（ZGA）のときに出現し始める（Schultz, 2002）。SCNT胚は、ドナー細胞のゲノム中に既存の未確定のエピジェネティックなバリアのせいで、ZGAが困難である。マウス2細胞期SCNT胚（Inoue et al., 2006; Suzuki et al., 2006; Vassena et al., 2007）および卵割後期のヒトSCNT胚（Noggle et al., 2011）において、いくつかの調節不全遺伝子が同定されているものの、「既存のエピジェネティックなバリア」の性質およびそれらとSCNT胚におけるZGA障害との関係は、未知である。

【0010】

したがって、ヒトSCNT胚が発生停止せずに接合体遺伝子活性化（ZGA）を経て効率的に進み、発生異常も生存能の喪失もなしに2、4および8細胞期を経て胚盤胞へと成功裏に発生することができるように、ドナー細胞核のゲノム内のそのようなエピジェネティックなバリアを取り除くことによってヒトSCNTのクローニング効率を改善する必要がある。

【発明の概要】

【0011】

本発明は、部分的には、ヒト体細胞においてH3K9me3がヒトSCNTリプログラミングにおけるバリアとしても働くという発見に基づく。本発明者らは、ドナーから得られたヒト卵母細胞を使用して、KDM4Aの過剰発現（例えば、外因性KDM4A mRNAの注射による）により接合体遺伝子活性化（ZGA）の時点での発生停止がなくなり、ヒトSCNT胚の発生が顕著に改善することで、患者特異的ヒトNT-ESCの効率的な産生を可能にすることを実証した。これらのドナーの卵母細胞は、対照実験においてKDM4A過剰発現の助けなしには胚盤胞へと発生できなかった。したがって、本発明者らは、ヒトSCNT（hSCNT）のためのヒト卵母細胞ドナーの有用性を拡大するための方法を発見しており、例えば、ヒト核移入ESC（NT-ESC）、特に、治療用途のためならびに研究および疾患モデル化に際しての両方での患者由来ヒトNT-ESCの治療用クローニングおよび産生のために、ヒトSCNTを改善するための方法に使用することができるKDM4ファミリーのメンバーを過剰発現させることによって、ヒストンデメチラーゼ介助SCNTを確立する。本発明は、ヒトの生殖的クローニングを意図したものではない。

【0012】

哺乳動物（非ヒト）卵母細胞は、体細胞を全能状態にリプログラミングすることができ、そのことは、体細胞核移入（SCNT）を経た動物の生殖クローニング、またはSCNT胚から発生した胚盤胞からのES細胞株（NT-ESC）の産生を可能にする。しかし、大部分のSCNT胚は、未確定のリプログラミング欠陥のせいで胚盤胞または最終段階まで発生できない。哺乳動物SCNTの非効率性は、再生医学の適用のために患者特異的hESC株を開発することへの

重大な制約である。

【0013】

ヒトドナー体細胞を用いるヒトSCNT由来ヒト胚盤胞の産生が報告されているが、胚盤胞の質および発生効率は、ヒト胚性幹細胞株（ヒトntESC、またはhNT-ESCとも呼ばれる）を産生可能にするには不十分であった（French AJ et al., Stem Cells 26, 485-493 (2008)）。ヒト核移入胚性幹細胞（hNT-ESC）（Tachibana et al., 2013）および高齢者成熟細胞またはヒト患者細胞からのヒトhNT-ESCの作製（Chung et al., 2014; Yamada et al., 2014）が報告されている。しかし、ヒトhNT-ESC樹立についての成功率は、着床前発生が不十分なせいで非常に低い（わずか10～25%だけが胚盤胞期まで発生する；Tachibana et al., 2013; Yamada et al., 2014）。したがって、ヒトSCNT技法の改良は、ヒトSCNT胚の胚盤胞期までの発生を改善するため、SCNTに必要なドナー卵母細胞数を低減するため、ならびに研究および細胞に基づく治療用のヒトおよび患者特異的な同質遺伝子胚性幹細胞株を成功裏に産生するために重大な意味を持つ。

10

【0014】

体細胞核移入（SCNT）を使用するヒト胚性幹細胞（hNT-ESC）の派生が極めて低効率であることは、その潜在的適用を顕著に制限している。ヒトSCNT胚からの胚盤胞形成は、低い率で、かつ一部の卵母細胞ドナーでのみ起こる。SCNT胚の不十分な発生能は、ヒトに限定されず、調査された全ての哺乳動物種にも一般に見られる（Rodriguez-Orsorio et al., 2012）。

20

【0015】

マウス体外受精（IVF）およびSCNT胚の比較トランスクリプトームおよびエピゲノミクス解析により、本発明者らは、以前に、ドナー体細胞ゲノムにおけるヒストンH3リシン9のトリメチル化（H3K9me3）が、SCNTによるマウス細胞の転写リプログラミングを阻止するバリアとして機能し、接合体ゲノム活性化（ZGA）および着床前発生の失敗に繋がることを特定した（Matoba et al., 2014）。本発明者らは、以前に、H3K9me3デメチラーゼであるマウスKDM4dを異所性過剰発現させることによって、マウสดナー体細胞におけるこのエピジェネティックなバリアを取り除くことができるということも実証した。H3K9me3の除去は、ZGAを促進し、その結果、マウスSCNT胚の発生を改善して胚盤胞期に到達させ、マウスNT-ESC（mNT-ESC）産生の率および効率の増加を導いた（Matoba et al., 2014）。

30

【0016】

より具体的には、本発明者らは、以前にマウスにおいて、H3K9me3デメチラーゼKDM4dの異所性発現によるヒストンH3リシン9トリメチル化（H3K9me3）の低減が、SCNTマウス胚の発生を大きく改善することを実証し、これは、その全体として参照により本明細書に組み入れられる国際出願WO2016/044271に開示されている。

【0017】

以前の研究とは異なり、本明細書において、本発明者らは、ヒト細胞におけるH3K9me3デメチラーゼであるKDM4Aの過剰発現が驚くことにヒトSCNTを改善すること、およびH3K9me3が、ヒト体細胞ゲノムにおいて、ヒトSCNT胚が接合体遺伝子活性化（ZGA）を経て効率的に進行することを阻止するSCNTリプログラミングバリアであることを実証している。ヒトES細胞とマウスES細胞とは非常に異なっているので、これは予想外であり、かつマウス細胞でうまくいくものがヒト細胞でうまくいくとは予測できなかった。

40

【0018】

より具体的には、接合体遺伝子活性化（ZGA）はマウス細胞およびヒト細胞において異なる時間に起こるので、マウス細胞におけるZGAバリアを取り除くリプログラミング法が、ヒト細胞において、全く異なる時間枠で、ZGAバリアを取り除くのに機能すると予測することはできない。本明細書の図2Aおよび図2Eに示すように、マウス細胞におけるSCNTの効率を増加させるための手順および/または方法（図2A参照）は、ヒト細胞におけるSCNTの効率を増加させるためのもの（例えば、図2E参照）と異なる。本明細書において本発明者らは、驚くことに、KDM4Aの過剰発現が、転写リプログラミングを促進することによ

50

ってヒトSCNT胚における胚盤胞の形成率を顕著に改善し、異なるヒト患者集団からのヒトNT-ESCの効率的な派生を可能にすることを実証し、例えば、本発明者らは、成人加齢黄斑変性（AMD）患者の体細胞核ドナーからのhNT-ESCの作製を実証した。したがって、本明細書におけるヒトSCNTの効率を増加させるための方法の発見は、再生医学および治療用クローニングを含む多様な状況で多数の潜在的適用を有する。

【0019】

特に、本発明者らは、分化したヒト体細胞のドナー核のゲノムにおけるヒストンH3リシン9のトリメチル化（H3K9me3）が、SCNTによるヒト細胞の効率的なリプログラミングについての主な既存のエピジェネティックなバリアであることを発見し、かつヒトドナー核または活性化SCNT胚におけるH3K9me3のメチル化を減少させることが、ヒトSCNTの効率を増加させ、特に、ヒトSCNT胚から8細胞期または胚盤胞期への着床前発生効率を増加させることができることを発見した。

【0020】

より具体的には、比較分析により、本発明者らは、ヒトSCNT胚における接合体遺伝子活性化（ZGA）に耐性のヒトドナー核のゲノムドメインを発見した。ZGAが2細胞期で起こるマウスならびに4～8細胞期で起こるブタおよびウシ（Schultz, 2002）のような他の哺乳動物とは対照的に、ヒトにおけるZGAは8細胞期で起こる（Schultz, 2002）。本発明者らは本明細書において、ヒトドナー遺伝物質中のリプログラミング耐性領域（RRR）は、抑制的ヒストン修飾H3K9me3が濃縮されており、ヒトドナー体細胞におけるこのエピジェネティックマーカーの除去が、ヒトSCNTの効率を増加させることができることを、発見した。本明細書において、ヒトSCNTの有効性を改善するための2つの方法が、本明細書開示の方法および組成物に包含され、それらは、（i）卵母細胞もしくは活性化SCNT胚（例えば、ハイブリッド卵母細胞が融合もしくは活性化された後）において、ヒトKDM4ファミリーの少なくとも1つのメンバーを過剰発現させること（例えば、外因性ヒトKDM4A、KDM2B、KDM4C、KDM4DまたはKDM4E mRNAを発現させること）のように、H3K9me3特異的デメチラーゼの発現増加もしくは活性化、および/または（ii）ヒト体細胞ドナー核において、ヒトH3K9メチルトランスフェラーゼ、例えば、ヒトSUV39h1もしくはヒトSUV39h2もしくはその両方（すなわち、SUV39h1/2）の発現もしくは機能をノックダウンもしくは阻害することを含む。そのような方法は、ヒトドナー核におけるZGA欠陥を減弱させ、かつRRRを再活性化するだけでなく、ヒトSCNTの効率も大きく改善し、例えば、2細胞期、4細胞期および8細胞期または胚盤胞期に発生しつつあるSCNT胚のパーセンテージを増加させる。

【0021】

したがって、SUV39h1/2介在性H3K9me3は、ヒトSCNTの「エピジェネティックなバリア」であり、かつ、ヒト体細胞ドナー細胞、レシピエントヒト卵母細胞、ハイブリッド卵母細胞またはヒトSCNT胚の核のいずれかにおける、KDM4A/JHDM3A、またはヒトKDM4ファミリーの任意の他のメンバーの過剰発現（例えば、ヒトKDM4A、ヒトKDM4B、ヒトKDM4C、ヒトKDM4D、ヒトKDM4E遺伝子のうちの任意の1つもしくは複数の過剰発現）を介した、および/またはヒトSUV39h1/2タンパク質もしくは遺伝子の阻害剤を使用する、H3K9me3のトリメチル化の阻害および/または除去は、ヒト細胞リプログラミング、特にヒトSCNTを介したヒト体細胞のリプログラミングにおけるZGAで起こるエピジェネティックなバリアを除去するための本明細書開示の方法、組成物およびキットに有用であり、かつヒトSCNTのクローニング効率を改善する方法のために包含される。

【0022】

したがって、本発明は、ヒト細胞において、SCNT胚の産生に採用されるヒト体細胞中のRRRにH3K9me3が濃縮されており、かつヒト体細胞におけるH3K9me3バリアをKDM4Dファミリーのメンバーの過剰発現によって除去することができるという本発明者の発見に基づく。

【0023】

重要なことには、本発明者らは、hSCNT胚（例えば、5～10hpaの間、または2から8細胞期の間）、レシピエント卵母細胞における、ヒトKDM4ファミリーのタンパク質、例えば、ヒトKDM4A、ヒトKDM4B、ヒトKDM4C、ヒトKDM4D、ヒトKDM4Eのうちの少なくとも1つのメン

バーの過剰発現による（例えば、KDM4ファミリーのメンバーをコードする外因性mRNA、例えば、KDM4A mRNAまたはcDNAの導入による）H3K9me3の除去が、ヒトSCNTのクローニング効率に驚くほど顕著な増加をもたらすことを実証した。特に本発明者らは、驚くことに、KDM4Aを注射された後に、胚盤胞に発生しつつあるhSCNT胚が20%超増加し（すなわち、KDM4Aの注射を行った場合に4.2%から26.8%の増加）、KDM4Aを注射された後に、拡張胚盤胞期に発生しつつあるhSCNT胚が14%（対照hSCNT胚のゼロと比較して）であることを実証している。

【0024】

したがって、本発明の局面は、ヒトドナー体細胞におけるヒストンH3-リシン9のトリメチル化（H3K9me3）が、効率的なヒト体細胞核リプログラミング（hSCNT）を阻止するという発見に基づく。本発明者らが以前に、マウスドナー体細胞の核におけるSUV39h1/2の阻害が、驚くことに哺乳動物SCNT効率の効率を増加させたことを実証した（その全体として参照により本明細書に組み入れられる、2015年9月15日に出願され、国際公開公報第2016/044271号として公開された国際出願PCT/US2015/050178に開示されている）ように、本明細書において、ヒトSCNTの有効性を改善する2つの方法が本明細書開示の方法および組成物に包含され、該方法には、（i）デメチラーゼKDM4ファミリーのメンバー、例えば、KDM4A（JMJD2AもしくはJHDM3Aとしても公知）の過剰発現（すなわち、外因性発現、もしくは異所性発現）を使用することによってH3K9me3の脱メチル化を促進すること、および／または（ii）ヒトヒストンメチルトランスフェラーゼSUV39H1および／もしくはSUV39H2を阻害することによってH3K9me3のメチル化を阻害することが含まれる。このように、KDM4A/JHDM3A、もしくはヒトKDM4ファミリーの他のメンバーの過剰発現（例えば、ヒトKDM4A、ヒトKDM4B、ヒトKDM4C、ヒトKDM4D、ヒトKDM4E遺伝子のうちの任意の1つもしくは複数の過剰発現）、および／またはヒトSUV39h1/2タンパク質もしくは遺伝子の阻害は、ヒト細胞のリプログラミング、特にヒトSCNTを介したヒト体細胞のリプログラミングにおけるZGAに存在するエピジェネティックなバリアを除去するための本明細書開示の方法、組成物およびキットに有用である。

【0025】

したがって、本発明の局面は、（i）H3K9me3を脱メチル化する能力のあるヒストンデメチラーゼ、例えば、非限定的にJMJD2A/KDM4Aおよび／もしくはJMJD2D/KDM4Dおよび／もしくはJMJD2B/KDM4Bおよび／もしくはJMJD2C/KDM4Cおよび／もしくはJMJD2E/KDM4Eのような、例えばKDM4ファミリーのヒストンデメチラーゼのメンバーを発現させること、および／または（ii）H3K9me3のメチル化に参与するヒトヒストンメチルトランスフェラーゼを阻害すること、例えばヒトSUV39h1、ヒトSUV39h2もしくはヒトSETDB1の任意の1つもしくは組み合わせを阻害することのいずれかによって、ヒトSCNT胚におけるH3K9me3のメチル化を低減することによりヒトSCNTの効率を増加させることを目指す、方法、組成物およびキットに関する。いくつかの態様では、少なくともKDM4ファミリーのヒストンデメチラーゼのメンバー、例えば、JMJD2A/KDM4Aおよび／またはJMJD2D/KDM4Dおよび／またはJMJD2B/KDM4Bおよび／またはJMJD2C/KDM4Cおよび／またはJMJD2E/KDM4Eの発現または活性を増加させる活性物質が、本明細書開示の方法によりヒトSCNT胚に注射される、またはそれと接触される。

【0026】

H3K9me3の脱メチル化（KDM4c/Jmjd2cによる）は、体細胞リプログラミング効率を増加させるために使用されていることが報告されているものの（例えば、人工多能性幹（iPS）細胞の作製（Sridharan et al., 2013））、最終分化した体細胞からのSCNT効率を増加させるためのH3K9me3の脱メチル化は、まだ報告されていない。Antonyらは、多能性ES細胞由来のドナー核から得られるSCNTにKDM4B/JMJD2Bを使用することを報告している（Antony et al., "Transient JMJD2B-Mediated Reduction of H3K9me3 Levels Improve Reprogramming of Embryonic Stem Cells in Cloned Embryos." Mol. Cell Biol., 2013; 33(5); 974）。多能性ES細胞は、最終分化した体細胞と同じではない、発生的に未熟な細胞である。重要なことには、分化した体細胞と比較して、胚性幹（ES）細胞または人工多能性幹

(iPS)細胞の全般的なエピジェネティック状態には有意な差がある。多能性ES細胞は、より少ないエピジェネティックなバリア(例えば、特にリプログラミング耐性領域(RRR)におけるより少ないメチル化)を有し、したがって、ES細胞核がドナー核として使用されるときに産生されるSCNT胚の効率は、最終分化した体細胞由来の核が使用されるときに産生されるSCNT胚の効率と非常に異なる(Rideout et al., 2000, Nature Genetics, 24(2), 109-10)。

【0027】

Antonyらによる報告とは対照的に、本発明者らは本明細書において、ハイブリッド卵母細胞、例えば、ドナー体細胞遺伝物質を含む除核卵母細胞におけるH3K9me3レベルを、活性化前または活性化後のいずれかに(例えば、ヒトKDM4A mRNAを過剰発現させることによって)減少させることが、8細胞後期のSCNT発生における驚くべき増加をもたらし、例えば、処置されたヒトSCNT胚の32%が桑実胚へと発生し、26.8%が胚盤胞へと発生し、14.3%が拡張胚盤胞期へおよびそれ以降へと発生すること(拡張胚盤胞期に達する無処置ヒトSCNT胚が0%であるのに対して)を実証する。これは、14%の増加である。Antonyらが、上述のように、最終分化した体細胞と同じエピジェネティックマーカーを有さない発生的に未熟な細胞であるES細胞由来のドナー核を使用しても、着床前発生に約9%の改善しか報告していないことを考えれば、この結果は、大いに予想外である。

【0028】

さらに、H3K9me3の脱メチル化が初期の発生期に体細胞をリプログラミングする効率を増加させるという数多くの報告がある(例えば、人工多能性幹(iPS)細胞の作製)(例えば、その全体として参照により本明細書に組み入れられる米国特許出願公開第2011/0136145号および同第2012/0034192号)一方で、iPS細胞の作製のための体細胞リプログラミングメカニズムは、SCNT胚の作製のための体細胞リプログラミングメカニズムと有意に異なる(Pasque et al., 2011, Mechanisms of nuclear reprogramming by eggs and oocytes: a deterministic process? Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 12, 453-459; および Apostolou, E., and Hochedlinger, K., 2013; Chromatin dynamics during cellular reprogramming. Nature 502, 462-471に考察されている)。したがって、iPS細胞の作製でのH3K9me3の脱メチル化から学ぶことは、関連性または適用可能性がなく、SCNTヒト胚の成功裏な作製のための、またはヒトSCNT胚の着床前および着床後両方の効率を増加させるための方法に移すことはできない。

【0029】

特に、ヒトSCNTリプログラミングに存在するバリアとiPSリプログラミングに存在するバリアとの間に著しい差が存在するだけでなく、またヒトSCNTリプログラミングおよびマウスSCNTリプログラミングにも著しい差が存在する。第一に、マウスiPSCリプログラミングにおけるH3K9me3バリアは、主にSETDB1によって樹立される(Chen et al., 2013; Sridharan et al., 2013)。第二に、成功裏なiPSCおよびSCNTリプログラミングに必要な下流の遺伝子ネットワークが、異なる。例えば、iPSCリプログラミングでは、H3K9me3バリアによって抑制されるNanogおよびSox2のような鍵となるコア多能性ネットワーク遺伝子が、リプログラミングの比較的後期に発現される(Chen et al., 2013; Sridharan et al., 2013)。対照的に、SCNTリプログラミングでは、H3K9me3によって抑制される鍵遺伝子が発現され、かつ胚2細胞期で重大な機能を有する(本明細書において以下に考察した)。この区別は、各文脈において成功裏なリプログラミングに必要な転写因子セットの差由来する可能性が最も高い。実際、iPSCリプログラミングに必要なコア転写因子Oct4/Pou5f1は、SCNTのリプログラミングに不必要であることが実証されている(Wu et al., 2013)。したがって、H3K9me3は、iPS細胞の作製および成功裏なSCNTの両方に共通のリプログラミングバリアであるように見えるものの、その沈着およびそれがどのようにリプログラミング過程に影響するかは、iPS細胞を作製するためのリプログラミング方法とSCNT胚を作製するためのリプログラミング方法とで非常に異なる。

【0030】

したがって、たとえヒトiPS細胞にリプログラミングされたヒト体細胞においてH3K9me3

10

20

30

40

50

バリアの除去が実証されているにしても、iPS細胞の作製には異なるリプログラミング遺伝子およびリプログラミングメカニズムが使用されるので、そのような方法がヒトSCNT胚の作製においてヒト体細胞をリプログラミングするのに役立つであろうという示唆はない。実際、米国特許出願公開第2011/0136145号および同第2012/0034192号の両方は、それらの方法がiPSCへの体細胞のリプログラミングにだけあてはまり、全能細胞の作製またはヒトSCNT胚の産生に適さないことを具体的に述べている。したがって、米国特許出願公開第2011/0136145号および同第2012/0034192号の両方は、本発明の内容から遠ざかることを教示している。

【 0 0 3 1 】

さらに、下表1に要約されるように、SCNT胚の作製と比較して、iPSCの作製における体細胞リプログラミングのために非常に異なるメカニズムが使用されるだけでなく、iPSCを産生するために体細胞をリプログラミングすることから産生される幹細胞は、SCNT胚から得られる幹細胞と顕著に異なる (Ma et al., 2014, Abnormalities in human pluripotent cells due to reprogramming mechanisms. Nature, 511(7508), 177-183)。

【 0 0 3 2 】

(表1) SCNT介在性リプログラミングとiPS介在性リプログラミングとの間の主要な差の要約

リプログラミングの特徴	iPS	SCNT	出典
速度	遅い (数日または数週間)	速い (数時間)	(Yamanaka & Blau, 2010)
効率	低い	高い	(Pasque, Miyamoto, & Gurdon, 2010)
因子	Oct4, Sox2, Klf4	未特定 (Oct4ではない)	(Apostolou & Hochedlinger, 2013; Jullien, Pasque, Halley-Stott, Miyamoto, & Gurdon, 2011)
様式	確率論的	決定論的	(Jullien et al., 2011)
発生能	多能性	全能性	(Mitalipov & Don Wolf, 2009)

【 0 0 3 3 】

したがって、上述のように、ヒト体細胞をヒトiPS細胞にリプログラミングするリプログラミング遺伝子およびメカニズムは、ヒト体細胞をヒトSCNTにリプログラミングするリプログラミング遺伝子およびメカニズムと有意に異なり、かつ結果として生じる細胞が有意に異なるので、リプログラミングに作用してiPSCを産生する方法が、ヒトSCNTの作製のためのリプログラミングに役に立つと考える示唆も理由もない。特に、正常なiPSCは、親体細胞に典型的な残留DNAメチル化パターンを保持するのに対して、NT ES細胞のDNAメチル化およびトランスクリプトームプロファイルは、IVF由来ES細胞と密接に対応した (Ma et al., Nature. 2014 Jul 10; 511(7508): 177-183参照)。

【 0 0 3 4 】

したがって、本発明の一局面は、ヒト体細胞核移入 (hSCNT) の効率を増加させるための方法であって、ドナーヒト体細胞、レシピエントヒト卵母細胞、ハイブリッド卵母細胞 (例えば、融合もしくは活性化前のドナー遺伝物質を含むヒト除核卵母細胞) またはヒトSCNT胚 (すなわちドナー核と除核卵母細胞との融合後) のいずれか1つを、ドナーヒト細胞、レシピエントヒト卵母細胞またはヒトSCNT胚におけるH3K9me3メチル化を減少させる活性物質と接触させる段階を含む方法によって、ヒトSCNTの効率を増加させること、例えば、無処置ヒトSCNT胚と比較して、結果として生じたヒトSCNTが胚盤胞へおよびそれ以降

へと発生する効率を増加させることに関する。

【0035】

いくつかの態様では、本発明は、以下の少なくとも1つを含むヒト体細胞核移入（hSCNT）の効率を増加させるための方法を提供する：（i）ドナーヒト体細胞もしくはレシピエントヒト卵母細胞を、ドナーヒト体細胞もしくはレシピエントヒト卵母細胞におけるH3K9me3メチル化を減少させる少なくとも1つの活性物質（例えば、KDM4A mRNA）と接触させる段階であって、レシピエントヒト卵母細胞が、有核もしくは除核卵母細胞である、段階；レシピエントヒト卵母細胞が有核ならば、除核する段階；ドナーヒト体細胞由来の核を除核卵母細胞に移植してハイブリッド卵母細胞を形成させる段階；およびハイブリッド卵母細胞を活性化させてヒトSCNT胚を形成させる段階；または（ii）ハイブリッド卵母細胞を、ハイブリッド卵母細胞におけるH3K9me3メチル化を減少させる少なくとも1つの活性物質と接触させる段階であって、ハイブリッド卵母細胞が、ヒト体細胞の遺伝物質を含む除核ヒト卵母細胞である、段階、およびハイブリッド卵母細胞を活性化させてヒトSCNT胚を形成させる段階；または（iii）活性化後のヒトSCNT胚を、SCNT胚におけるH3K9me3メチル化を減少させる少なくとも1つの活性物質と接触させる段階であって、SCNT胚が、除核ヒト卵母細胞と、ヒト体細胞の遺伝物質との融合から作製される、段階；および胚盤胞を形成させるために十分な時間、SCNT胚をインキュベートする段階。いくつかの態様では、少なくとも1つの割球が胚盤胞から収集および培養されて、少なくとも1つのヒトNT-ESCを形成する。

10

【0036】

いくつかの態様では、H3K9me3メチル化を減少させる活性物質は、以下の少なくとも1つ：（i）KDM4ファミリーのヒストンデメチラーゼのメンバーの発現もしくは活性化もしくは機能を増加させる活性物質および/または（ii）H3K9メチルトランスフェラーゼ阻害剤であり、それにより、RRRにおけるエピジェネティックなバリアを除去し、ヒトSCNTの効率を増加させる。

20

【0037】

いくつかの態様では、ヒト体細胞核移入（SCNT）の効率を増加させることは、SCNT胚（例えば、ヒト除核卵母細胞とドナー細胞のヒト遺伝物質との融合後に）を、少なくとも活性化の5時間後（5hpa）、または10～12hpaの間（すなわち1細胞期）、または約20hpa（すなわち、2細胞期初期）または20～28hpaの間（すなわち、2細胞期）に、以下の少なくとも1つと接触させる段階を含む：（i）KDM4ファミリーのヒストンデメチラーゼ（例えば、KDM4A mRNA）および/または（ii）H3K9メチルトランスフェラーゼ阻害剤（例えば、ヒトSUV39h1/2の阻害剤）。

30

【0038】

いくつかの態様では、H3K9me3メチル化を低減することは、ヒトドナー卵母細胞（除核前または除核後のいずれか）、またはハイブリッド卵母細胞（例えば、ドナー核遺伝物質を含む除核卵母細胞であるが、活性化前）、またはヒトSCNT胚（例えば、少なくとも活性化の5時間後（5hpa）または1細胞期、または2細胞期）、または遺伝物質が除去される前のドナーヒト体細胞の、任意の1つまたは組み合わせにおける、ヒトKDM4遺伝子、例えば、hKDM4A、hKDM4B、hKDM4C、hKDM4DまたはhKDM4Eの過剰発現または外因性発現によって起こる。

40

【0039】

いくつかの態様では、ヒトKDM4遺伝子、例えばKDM4Aの外因性発現は、ヒトドナー卵母細胞中で起こる。いくつかの態様では、ヒトKDM4遺伝子、例えばKDM4Aの外因性発現は、除核ヒトドナー卵母細胞またはハイブリッド卵母細胞（例えば、ドナー核遺伝物質を含む除核卵母細胞であるが、活性化前）において起こる。いくつかの態様では、KDM4遺伝子、例えば、KDM4Aの外因性発現は、SCNT胚において、5hpa、10～12hpaの間（すなわち1細胞期）、約20hpa（すなわち、2細胞期初期）または20～28hpaの間（すなわち、2細胞期）の任意の1つで起こる。ヒトSCNT胚が、例えば、ヒトKDM4遺伝子、例えばKDM4A（例えば、KDM4A mRNAまたはmod-RNA）の外因性発現を増加させる活性物質のような、H3K9me3を阻害す

50

る活性物質と接触されるいくつかの態様では、SCNT胚の各細胞（例えば、2細胞期胚の各細胞または4細胞期胚の各細胞）にKDM4A活性化またはKDM4A過剰発現させる活性物質が注射される（例えば、SCNT胚の各細胞にKDM4A mRNAが注射される）。

【0040】

他の態様では、ドナー遺伝物質におけるH3K9me3メチル化を低減する本明細書開示の方法は、ヒトドナー卵母細胞（除核前または除核後のいずれか）、またはハイブリッド卵母細胞（すなわち、活性化前のドナー遺伝物質を含む除核卵母細胞）、またはSCNT胚（例えば、活性化の少なくとも5時間後（5hpa）もしくは1細胞期、もしくは2細胞期、もしくは4細胞期）、またはドナーヒト体細胞の、任意の1つまたは組み合わせにおける、SUV39h1および/もしくはSUV39h2、またはその両方（SUV39h1/2）の発現を阻害することによって起こる。

10

【0041】

いくつかの態様では、SUV39h1および/もしくはSUV39h2、またはその両方（SUV39h1/2）の阻害は、ドナーヒト体細胞において、例えば、除核したヒトドナー卵母細胞への移入のために核または遺伝物質を取り出す少なくとも約24時間前、または少なくとも約48時間前、または少なくとも約3日前または少なくとも約4日前または4日より前に起こる。いくつかの態様では、SUV39h1および/またはSUV39h2、またはその両方（SUV39h1/2）の発現を阻害する段階は、siRNAによるものであり、かつ核を取り出す前の期間において少なくとも12時間、もしくは少なくとも24時間もしくはそれ以上起こる。

【0042】

20

本発明の別の局面は、ヒト体細胞核移入（SCNT）の効率を増加させるための方法であって、ヒトSCNT胚、ヒト卵母細胞またはハイブリッド卵母細胞、またはドナーヒト体細胞を、H3K9me3メチル化を減少させる活性物質（例えば、KDM4A mRNA）と接触させる段階を含む方法によって、SCNTの効率を増加させることに関する。いくつかの態様では、レシピエントヒト卵母細胞は、IVF手順を使用する成功裏な受精のために質が十分でない、質の不十分なヒト卵母細胞である。いくつかの態様では、ヒト卵母細胞は、ドナーヒト核または遺伝物質の注射前に接触される。いくつかの態様では、レシピエントヒト卵母細胞は、除核ヒト卵母細胞である。いくつかの態様では、SCNT胚は、1細胞期または2細胞期SCNT胚である。いくつかの態様では、H3K9me3メチル化を減少させる活性物質（例えば、KDM4A mRNA）は、最終分化したヒト体細胞からの核または遺伝物質を用いた核移入の前に、レシピエントヒト卵母細胞または除核ヒト卵母細胞と接触する。

30

【0043】

いくつかの態様では、レシピエントヒト卵母細胞、ハイブリッド卵母細胞、ヒト体細胞ドナー細胞、またはヒトSCNT胚と接触する活性物質は、KDM4ファミリーのヒストンデメチラーゼの少なくとも1つのメンバー、例えば、ヒトKDM4A（SEQ ID NO:1）、ヒトKDM4B（SEQ ID NO:2）、ヒトKDM4C（SEQ ID NO:3）またはヒトKDM4D（SEQ ID NO:4）からなるヒトKDM4（JMJD2）ファミリーの少なくとも1つのメンバーの発現または活性を増加させる。いくつかの態様では、KDM4ファミリーのヒストンデメチラーゼの発現または活性を増加させる活性物質は、KDM4D（JMJD2D）またはKDM4A（JMJD2A）またはKDM4BまたはKDM4Cの発現または活性を増加させる。いくつかの態様では、活性物質は、ヒトからのKDM4、例えば、KDM4A（SEQ ID NO:1）、ヒトKDM4B（SEQ ID NO:2）、ヒトKDM4C（SEQ ID NO:3）もしくはヒトKDM4D（SEQ ID NO:4）もしくはヒトKDM4E（SEQ ID NO:45）の核酸配列、または少なくとも80%、もしくは少なくとも約85%、もしくは少なくとも約90%、もしくは少なくとも約95%、もしくは少なくとも約98%、もしくは少なくとも約99%の配列同一性のその生物学的に活性なフラグメントもしくはホモログであって、SEQ ID NO:1~4もしくはSEQ ID NO:45の対応する配列と比較して、ヒトSCNTの効率を同程度もしくはより大きな程度増加させる（例えば、少なくとも約110%、または少なくとも約120%、または少なくとも約130%、または少なくとも約140%、または少なくとも約150%、または150%よりも大きく増加させる）、フラグメントもしくはホモログを含む。

40

【0044】

50

いくつかの態様では、レシピエントヒト卵母細胞またはヒトSCNT胚と接触する活性物質は、SEQ ID NO:9のヒトKDM4Aタンパク質の発現を増加させ、かつ/あるいは対応するSEQ ID NO:1のヒトKDM4A核酸配列、またはSEQ ID NO:1の核酸配列と比較してヒトSCNTの効率を同程度もしくはより大きな程度増加させる（例えば、少なくとも約110%、または少なくとも約120%、または少なくとも約130%、または少なくとも約140%、または少なくとも約150%、または150%よりも大きく増加させる）、その生物学的に活性なフラグメントを含む。

【0045】

いくつかの態様では、レシピエントヒト卵母細胞もしくはヒトSCNT胚と接触する活性物質は、SEQ ID NO:12のヒトKDM4Dタンパク質の発現を増加させる、および/または対応するSEQ ID NO:4のヒトKDM4D核酸配列、あるいはその生物学的に活性なフラグメントを含む。いくつかの態様では、SEQ ID NO:12のKDM4Dの生物学的に活性なフラグメントは、Antonyら、Nature、2013に開示されるように、SEQ ID NO:12のアミノ酸1~424番を含む。いくつかの態様では、SEQ ID NO:12の生物学的に活性なフラグメントは、また、SEQ ID NO:12のアミノ酸1~424番のC末端もしくはN末端の少なくとも1個、もしくは少なくとも2個、もしくは少なくとも2~10個、もしくは少なくとも10~20個、もしくは少なくとも20~50個、もしくは少なくとも50~100個のアミノ酸も欠如している、またはSEQ ID NO:12のアミノ酸1~424番のC末端およびN末端の少なくとも1個、もしくは少なくとも2個、もしくは少なくとも2~10個、もしくは少なくとも10~20個、もしくは少なくとも20~50個、もしくは少なくとも50~100個のアミノ酸を欠如している、SEQ ID NO:12のアミノ酸1~424番を含む。

【0046】

代替的な態様では、ドナーヒト細胞、例えば、最終分化した細胞のドナー核と接触する活性物質は、KDM4ファミリー、例えば非限定的に、上記のようなKDM4A、KDM4B、KDM4C、KDM4DまたはKDM4EからなるKDM4ファミリーのヒストンデメチラーゼの発現または活性を増加させる。

【0047】

本発明の別の局面は、ヒト体細胞核移入（SCNT）の効率を増加させるための方法であって、ドナーヒト細胞、例えば最終分化した体細胞の核を、ドナーヒト体細胞の核におけるH3K9me3メチル化を減少させる活性物質と接触させる段階を含む方法によって、SCNTの効率を増加させることに関する。

【0048】

本発明の全ての局面のいくつかの態様では、ドナーヒト体細胞と接触する活性物質は、H3K9メチルトランスフェラーゼの阻害剤、例えば非限定的にヒトSUV39h1、ヒトSUV39h2またはヒトSETDB1の発現またはタンパク質機能の阻害剤である。いくつかの態様では、ヒトSUV39h1、ヒトSUV39h2またはヒトSETDB1の阻害剤の少なくとも1つまたは任意の組み合わせを、ヒトSCNTの効率を増加させるための方法に使用することができる。いくつかの態様では、H3K9メチルトランスフェラーゼの阻害剤は、ヒトSETDB1の阻害剤ではない。

【0049】

いくつかの態様では、H3K9メチルトランスフェラーゼの阻害剤は、RNAi剤、siRNA剤、shRNA、オリゴヌクレオチド、CRISPR/Cas9、CRISPR/cpf1、中和抗体もしくは抗体フラグメント、アプタマー、小分子、タンパク質、ペプチド、小分子、アビジミル（avidimil）、およびその機能的フラグメントまたは誘導体などからなる群より選択される。いくつかの態様では、H3K9メチルトランスフェラーゼ阻害剤は、RNAi剤、例えば、siRNAまたはshRNA分子である。いくつかの態様では、活性物質は、ヒトSUV39H1タンパク質（SEQ ID NO:5またはSEQ ID NO:48）の発現を阻害するために核酸阻害剤を含む。いくつかの態様では、活性物質は、ヒトSUV39H2タンパク質（SEQ ID NO:6）の発現を阻害するために核酸阻害剤を含む。いくつかの態様では、ヒトSUV39h1のsiRNA阻害剤は、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22もしくはSEQ ID NO:23またはその少なくとも10個のヌクレオチドが連続するフラグメント、またはSEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID

10

20

30

40

50

NO:20、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22もしくはSEQ ID NO:23のいずれかと少なくとも80%の配列同一性（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98%、または少なくとも約99%の配列同一性）を有する核酸配列の少なくとも1つを含む。いくつかの態様では、ヒトSUV39h1のsiRNA阻害剤は、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:21もしくはSEQ ID NO:23またはその少なくとも10個のヌクレオチドが連続するフラグメント、またはSEQ ID NO:8、SEQ ID NO:21もしくはSEQ ID NO:23のいずれかと少なくとも80%の配列同一性（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98%、または少なくとも約99%の配列同一性）を有する核酸配列の少なくとも1つを含む。

【0050】

10

いくつかの態様では、siRNAまたは他の核酸阻害剤は、ヒトSUV39h1のSEQ ID NO:14またはSEQ ID NO:47（それぞれSUV39h1異種2および1に対応する）のいずれかのヌクレオチド領域内に位置する標的配列と完全にまたは部分的にハイブリダイズする。

【0051】

いくつかの態様では、ヒトSUV39h2のsiRNA阻害剤は、SEQ ID NO:18もしくはSEQ ID NO:19、もしくはSEQ ID NO:24、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:27、またはその少なくとも10個のヌクレオチドが連続するフラグメント、またはSEQ ID NO:18もしくはSEQ ID NO:19、もしくはSEQ ID NO:24、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:27と少なくとも80%の配列同一性（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98%、または少なくとも約99%）を有する核酸配列の少なくとも1つを含む。いくつかの態様では、ヒトSUV39h2のsiRNA阻害剤は、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:27、またはその少なくとも10個のヌクレオチドが連続するフラグメント、またはSEQ ID NO:19、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:27と少なくとも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98%、または少なくとも約99%）の配列同一性を有する核酸配列の少なくとも1つを含む。

20

【0052】

いくつかの態様では、siRNAまたは他の核酸阻害剤は、ヒトSUV39h2のSEQ ID NO:15、49、51、52および53（hSUV39h2異種1~5）のいずれかのヌクレオチド領域内に位置する標的配列と完全にまたは部分的にハイブリダイズする。

30

【0053】

いくつかの態様では、活性物質は、活性化前もしくは活性化の約5時間後に、またはヒトSCNT胚が1細胞期、2細胞もしくは4細胞期のときに、SCNT胚と接触することができる。代替的な態様では、活性物質は、活性化の5時間後またはヒトSCNT胚が2細胞期のときに、ヒトSCNT胚と接触することができる。いくつかの態様では、活性物質が、レシピエントヒト卵母細胞、ハイブリッド卵母細胞またはヒトSCNT胚に、例えばレシピエントヒト卵母細胞、ハイブリッド卵母細胞またはヒトSCNT胚の核および/または細胞質へのKDM4A mRNAの注射によって注射される。いくつかの態様では、活性物質は、KDM4ファミリーのヒストンデメチラーゼの少なくとも1つのメンバーの発現または活性を増加させる。

【0054】

40

いくつかの態様では、H3K9me3メチル化を減少させる活性物質（例えば、KDM4A mRNA）は、除核ヒト卵母細胞へのドナーヒト細胞核の注射前に、ドナーヒト細胞、例えば、最終分化した体細胞の核または細胞質と接触するまたはそれに注射される。いくつかの態様では、そのような活性物質は、ドナーヒト体細胞と少なくとも1時間、または少なくとも2時間、またはそれよりも長い時間接触し、その際、接触は、ドナーヒト体細胞から核を取り出して、除核したヒト卵母細胞に入れる少なくとも1日（24時間）前、または少なくとも2日前、または少なくとも3日前、または3日より前に起こる。

【0055】

本発明の全ての局面では、ヒトSCNT胚は、分化した体細胞（多くの場合に最終分化した細胞であるが、ES細胞またはiPSCではない）由来のドナーヒト体細胞核の除核ヒト卵母細胞

50

胞への注射から産生され、その際、ドナー核は、胚性幹（ES）細胞または人工多能性幹（iPS）細胞または胎児細胞由来でない。本発明の全ての局面では、ヒトSCNT胚は、最終分化したヒト体細胞由来のドナー核を除核したヒト卵母細胞に注射することによって作製される。いくつかの態様では、ドナーヒト体細胞遺伝物質は、非ヒトレシピエント卵母細胞に注射される。いくつかの態様では、ハイブリッド卵母細胞の活性化（または融合）後にヒトSCNT胚が発生する。いくつかの態様では、ハイブリッド卵母細胞は、ヒトドナー体細胞由来の核遺伝物質およびまた第3のヒトドナー由来のミトコンドリア遺伝物質（例えば、ミトコンドリアDNAまたはmtDNA）を含む除核ヒト卵母細胞を含む（すなわち、mtDNAは除核卵母細胞にネイティブなものではない）。

【0056】

10

本発明の全ての局面では、ドナー体細胞、レシピエント卵母細胞またはSCNT胚は、ヒト細胞であり、例えば、ヒトドナー細胞、レシピエントヒト卵母細胞またはヒトSCNT胚である。

【0057】

したがって、本発明の全ての局面では、該方法は、H3K9me3メチル化を減少させる活性物質の不在下（すなわち、KDM4ファミリーのメンバーの発現または活性化を増加させる活性物質の不在下）で行われるヒトSCNTと比較して、ヒトSCNTの効率に少なくとも約5%、または少なくとも約10%、または少なくとも約13%、または少なくとも約15%、または少なくとも約30%の増加、または少なくとも50%の増加、または50%～80%の増加、または80%よりも大きい増加をもたらす。別の言い方をすれば、本明細書開示の方法は、SCNT胚の着床前発生の効率を増加させる、またはhSCNT胚の胚盤胞期への発生を増加させる、またはhSCNT胚の拡張胚盤胞期への発生を増加させ、その際、少なくとも約5%、または7%、または10%、または12%または12%超が拡張胚盤胞へと発生する。別の態様では、該方法は、ヒトSCNT胚の発生効率を、例えば、H3K9me3メチル化を減少させる活性物質の不在下で調製されたhSCNT胚と比較して、胚盤胞期への成功裏な発生において少なくとも3倍、または少なくとも4倍、または少なくとも5倍、または少なくとも約6倍、または少なくとも約7倍、または少なくとも約8倍に、または8倍よりも大きく増加させる。いくつかの態様では、本明細書開示の方法および組成物によって提供される、ヒトSCNT効率における増加は、ヒトSCNT胚由来胚性幹細胞（ヒトNT-ESC）の作製または収量における増加を表す。

20

【0058】

30

本発明の別の局面は、ヒトSCNT胚、レシピエントヒト卵母細胞、またはハイブリッド卵母細胞またはヒト胚盤胞の少なくとも1つと、(i) KDM4ファミリー（Jmjd2）のヒストンデメチラーゼの発現もしくは活性を増加させる活性物質、または(ii) H3K9メチルトランスフェラーゼを阻害する活性物質の少なくとも1つとを含む組成物に関する。

【0059】

いくつかの態様では、組成物は、最終分化した体細胞から得られるドナー核の注射前の、除核したヒト卵母細胞またはヒト卵母細胞である、レシピエントヒト卵母細胞を含む。いくつかの態様では、組成物は、ハイブリッド卵母細胞（例えば、活性化前のドナー核遺伝物質を含むヒト除核卵母細胞）を含む。いくつかの態様では、ヒトSCNT胚は、1細胞期、または2細胞、または4細胞期ヒトSCNT胚である。いくつかの態様では、組成物は、KDM4ファミリーのヒストンデメチラーゼのメンバーをコードする少なくとも1つの遺伝子の発現を増加させる、またはKDM4ファミリーのヒストンデメチラーゼ、例えば、KDM4A、KDM4B、KDM4C、KDM4DもしくはKDM4Eの少なくとも1つのメンバーの活性を増加させる、活性物質を含む。いくつかの態様では、活性物質は、KDM4D（JMJD2D）もしくはKDM4A（JMJD2A）の発現もしくは活性を増加させる、またはSEQ ID NO:1～4もしくはSEQ ID NO:45の対応する配列と比較してSCNTの効率を同程度もしくはより大きな程度増加させる生物学的に活性なそのフラグメントもしくはホモログである。いくつかの態様では、組成物は、SEQ ID NO:1の対応するヒトKDM4A核酸配列、またはSEQ ID NO:1の核酸配列と比較してSCNTの効率を同程度もしくはより大きな程度増加させる、生物学的に活性なそのフラグメントを含む。

40

【0060】

50

いくつかの態様では、組成物は、H3K9メチルトランスフェラーゼの阻害剤、例えば非限定的に、ヒトSUV39h1、ヒトSUV39h2またはヒトSETDB1の阻害剤である活性物質を含む。いくつかの態様では、ヒトSUV39h1、ヒトSUV39h2またはヒトSETDB1の阻害剤の少なくとも1つまたは任意の組み合わせを、ヒトSCNTの効率を増加させる方法に使用することができる。

【0061】

いくつかの態様では、組成物は、siRNA、shRNA、中和抗体または抗体フラグメント、アプタマー、小分子、タンパク質、ペプチド、小分子などからなる群より選択されるH3K9メチルトランスフェラーゼ阻害剤を含む。いくつかの態様では、H3K9メチルトランスフェラーゼ阻害剤は、ヒトSUV39h1またはヒトSUV39h2またはヒトSETDB1を阻害するsiRNAまたはshRNA分子である。いくつかの態様では、組成物は、ヒトSUV39h1のSEQ ID NO:14もしくはSEQ ID NO:47（それぞれSUV39h1異種2および1に対応）またはヒトSUV39h2のSEQ ID NO:15、49、51、52および53（hSUV39h2異種1～5）のいずれかのヌクレオチド領域内に位置する標的配列と完全にまたは部分的にハイブリダイズする核酸阻害剤を含む。 10

【0062】

いくつかの態様では、組成物は、SEQ ID NO:7の標的配列またはその少なくとも10個のヌクレオチドが連続するフラグメント、またはSEQ ID NO:7と少なくとも80%の配列同一性（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98%、または少なくとも約99%の配列同一性）を有する核酸配列と完全にまたは部分的に結合するヒトSUV39h1のsiRNA阻害剤を含む。いくつかの態様では、組成物は、SEQ ID NO:8またはその少なくとも10個のヌクレオチドが連続するフラグメント、またはSEQ ID NO:8と少なくとも80%の配列同一性（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98%、または少なくとも約99%の配列同一性）を有する核酸配列を含む、ヒトSUV39h1のsiRNA阻害剤を含む。いくつかの態様では、組成物は、ヒトSUV39h1のSEQ ID NO:14またはSEQ ID NO:47（それぞれSUV39h1異種2および1に対応）のいずれかのヌクレオチド領域内に位置する標的配列と完全にまたは部分的にハイブリダイズする、siRNAまたは他の阻害剤を含む。 20

【0063】

いくつかの態様では、組成物は、ヒトSUV39h2のSEQ ID NO:15、49、51、52および53（hSUV39h2異種1～5）のいずれかのヌクレオチド領域内に位置する標的配列と完全にまたは部分的にハイブリダイズする、siRNAまたは他の核酸阻害剤を含む。 30

【0064】

いくつかの態様では、組成物は、1細胞または2細胞または4細胞期であるヒトSCNT胚を含む。いくつかの態様では、組成物は、除核ヒト卵母細胞またはハイブリッド卵母細胞を含む。いくつかの態様では、組成物は、ヒトSCNT胚、レシピエントヒト卵母細胞、ヒトハイブリッド卵母細胞またはヒト胚盤胞を含む。

【0065】

別の態様は、(i) KDM4ファミリーのヒストンデメチラーゼの発現もしくは活性を増加させる活性物質、例えば、ヒトKDM4ファミリーのメンバーのmRNAを含む活性物質、および/または(ii) H3K9メチルトランスフェラーゼを阻害する活性物質を含む、キットに関する。 40

【0066】

好ましい態様における本明細書記載の開示は、ヒトをクローニングする工程、ヒトの生殖細胞系の遺伝的同一性を改変する工程、または工業もしくは商業的目的でのヒトSCNT胚の使用、または人間に実質的な医学的利益をもたらすことなくそれらに苦しみを与える可能性が高いヒトの遺伝的同一性を改変するための工程、または当該工程から発生するヒトに関係しない。

【図面の簡単な説明】

【0067】

【図1A】図1A～1Fは、体細胞においてヒトリプログラミング耐性領域（RRR）にH3K9me3 50

が濃縮されていることを示す。図1Aは、実験手順の略図である。RNA-seqのために使用される試料を、破線の長方形で囲む。

【図1B】図1A～1Fは、体細胞においてヒトリプログラミング耐性領域（RRR）にH3K9me3が濃縮されていることを示す。図1Bは、IVFヒト着床前胚のトランスクリプトームのヒートマップ図である。各タイルは、スライディングウインドウ解析によって得られる領域内のピークの平均を表す。4細胞から8細胞期IVF胚において活性化する707個の領域を示す。RNA-seqデータセットは、以前の刊行物から得た（Xue et al., 2013）。

【図1C】図1A～1Fは、体細胞においてヒトリプログラミング耐性領域（RRR）にH3K9me3が濃縮されていることを示す。図1Cは、ドナー体細胞、8細胞期IVF胚およびSCNT胚を比較するトランスクリプトームのヒートマップ図である。（図1A）で特定された707個の領域を示す。これらの領域を、8細胞期SCNT胚と8細胞期IVF胚との間の転写レベルにおける変化倍率（FC）に基づき3つの群に分類した。FRR、PRR、およびRRRは、それぞれ完全リプログラミング領域（ $FC \geq 2$ ）、部分的リプログラミング領域（ $2 < FC < 5$ ）およびリプログラミング耐性領域（ $FC > 5$ ）を指す。（略語：RRR=リプログラミング耐性領域、PRR=部分的リプログラミング領域；FRR=完全リプログラミング領域）。

【図1D】図1A～1Fは、体細胞においてヒトリプログラミング耐性領域（RRR）にH3K9me3が濃縮されていることを示す。図1Dに、200kbのランキング領域と比較してFRR、PRR、およびRRRの中で示される、ヒト線維芽細胞（Nhlf）におけるH3K9me3およびH3K4me3の平均ChIP-seq強度を示す。ヒストン修飾のChIP-seqデータセットをENCODEプロジェクトから得た（Bernstein et al., 2012; The Encode Consortium Project, 2011）。（略語：RRR=リプログラミング耐性領域、PRR=部分的リプログラミング領域；FRR=完全リプログラミング領域）。

【図1E】図1A～1Fは、体細胞においてヒトリプログラミング耐性領域（RRR）にH3K9me3が濃縮されていることを示す。図1Eは、異なる体細胞型におけるFRR、PRRおよびRRR内のH3K9me3-ChIP-seqの平均強度を比較する箱ひげ図である。ChIP-seqおよびDNaseI-seqデータセットをENCODEプロジェクトから得た（ENCODE Project Consortium, 2011）。色付き箱の中央の線は中央値を指し、その両端は25/75パーセンタイルを指し、ひげの端は2.5/97.5パーセンタイルを指す。*** $p < 0.001$ 、** $p < 0.01$ 。図5、ならびに表5および6も参照されたい。（略語：RRR=リプログラミング耐性領域、PRR=部分的リプログラミング領域；FRR=完全リプログラミング領域）。

【図1F】図1A～1Fは、体細胞においてヒトリプログラミング耐性領域（RRR）にH3K9me3が濃縮されていることを示す。図1Fは、異なる体細胞型におけるFRR、PRRおよびRRR内のDNaseI-seqの平均強度を比較する箱ひげ図である。ChIP-seqおよびDNaseI-seqデータセットをENCODEプロジェクトから得た（ENCODE Project Consortium, 2011）。色付き箱の中央の線は中央値を指し、その両端は25/75パーセンタイルを指し、ひげの端は2.5/97.5パーセンタイルを指す。*** $p < 0.001$ 、** $p < 0.01$ 。図5、ならびに表5および6も参照されたい。（略語：RRR=リプログラミング耐性領域、PRR=部分的リプログラミング領域；FRR=完全リプログラミング領域）。

【図2A】図2A～2Hに、ヒトKDM4A mRNAの注射がマウスおよびヒトSCNT胚の発生を改善することを示す。図2Aは、マウスSCNT手順の略図である。

【図2B】図2A～2Hに、ヒトKDM4A mRNAの注射がマウスおよびヒトSCNT胚の発生を改善することを示す。図2Bに、mRNA注射の5時間後に抗H3K9me3およびDAPIで染色した1細胞期SCNT胚の代表的な核画像を示す。

【図2C】図2A～2Hに、ヒトKDM4A mRNAの注射がマウスおよびヒトSCNT胚の発生を改善することを示す。図2Cに、KDM4A mRNAの注射がマウスSCNT胚の着床前発生を大きく改善することを示す。表示の時期に達した胚のパーセンテージを示す。エラーバーはs.d.を示す。

【図2D】図2A～2Hに、ヒトKDM4A mRNAの注射がマウスおよびヒトSCNT胚の発生を改善することを示す。図2Dに、120時間インビトロ培養後のSCNT胚の代表的な画像を示す。スケールバー、100 μ m。

【図2E】図2A～2Hに、ヒトKDM4A mRNAの注射がマウスおよびヒトSCNT胚の発生を改善す

ることを示す。図2Eは、ヒトSCNT手順の略図である。

【図 2 F】図2A～2Hに、ヒトKDM4A mRNAの注射がマウスおよびヒトSCNT胚の発生を改善することを示す。図2Fは、4人の異なるドナーからの卵母細胞を使用して7日間インビトロ培養中に得られたヒトSCNT胚の平均発生効率を示す棒グラフである。2細胞期に達した胚の数を使用して効率を計算した。Blast：胚盤胞、ExBlast：拡張胚盤胞。発生率をフィッシャーの正確確率検定により統計解析した。

【図 2 G】図2A～2Hに、ヒトKDM4A mRNAの注射がマウスおよびヒトSCNT胚の発生を改善することを示す。図2Gに、7日インビトロ培養後のSCNT胚の代表的な画像を示す。

【図 2 H】図2A～2Hに、ヒトKDM4A mRNAの注射がマウスおよびヒトSCNT胚の発生を改善することを示す。図2Hに、各卵母細胞ドナー女性から得られたヒトSCNT胚の発生率の棒グラフを示す。表3および4も参照されたい。

10

【図 3 A】図3A～3Jに、AMD患者からのNTK-ESCの樹立および特徴づけを示す。図3Aは、AMD患者の線維芽細胞をKDM4A介助SCNTによる核ドナーとして使用して樹立されたNT-ESC株をまとめた表である。

【図 3 B】図3A～3Jに、AMD患者からのNTK-ESCの樹立および特徴づけを示す。図3Bに、NTK-ESCの代表的な位相差像および免疫染色像を示す。スケールバー、100Jm。

【図 3 C】図3A～3Jに、AMD患者からのNTK-ESCの樹立および特徴づけを示す。図3Cは、RNA-seqデータに基づく多能性特異的遺伝子および線維芽細胞特異的遺伝子の発現レベルを示す棒グラフである。

【図 3 D】図3A～3Jに、AMD患者からのNTK-ESCの樹立および特徴づけを示す。図3Dは、対照ESC株（ESC15）と代表的なNTK-ESCであるNTK6との間で遺伝子発現レベルを比較する散布図である。差次的に発現される遺伝子（FC>3.0）を黒い点で示す。

20

【図 3 E】図3A～3Jに、AMD患者からのNTK-ESCの樹立および特徴づけを示す。図3Eに、RNA-seqデータセットに基づくNTK-ESC、対照ESCおよびドナー皮膚線維芽細胞の階層的クラスタリングを示す。

【図 3 F】図3A～3Jに、AMD患者からのNTK-ESCの樹立および特徴づけを示す。図3Fは、インビトロで2週間自然分化した免疫染色後の胚様体（EB）の代表的な画像である。スケールバー、100Jm。

【図 3 G】図3A～3Jに、AMD患者からのNTK-ESCの樹立および特徴づけを示す。図3Gに、移植の12週間後にNTK6から得られた奇形腫の代表的な組織像を示す。スケールバー、100 μm。

30

【図 3 H】図3A～3Jに、AMD患者からのNTK-ESCの樹立および特徴づけを示す。図3Hに、NTK6の細胞遺伝Gバンド分析の代表的な画像を示す。

【図 3 I】図3A～3Jに、AMD患者からのNTK-ESCの樹立および特徴づけを示す。図3Iに、16個のSTRマーカーを使用した核DNA遺伝子型判定を示す。

【図 3 J】図3A～3Jに、AMD患者からのNTK-ESCの樹立および特徴づけを示す。図3Jに、表示順にそれぞれSEQ ID NO 58、58および59としてrs2853826（m.10398 A>G）配列、ならびに表示順にそれぞれSEQ ID NO 58、58および59としてrs2853826（m.10400 C>T）配列を開示する。

【図 4 A】図4A～4Cに、8細胞SCNT胚にKDM4A mRNAを注射したときの転写の部分回復を示す。図4Aに、8細胞期後期の318個のRRRの転写レベルを比較するヒートマップ図を示す。318個のRRR中158個の発現レベルは、KDM4A mRNA注射に応答して顕著（FC>2）に増加している。

40

【図 4 B】図4A～4Cに、8細胞SCNT胚にKDM4A mRNAを注射したときの転写の部分回復を示す。図4Bに、206個のKDM4A応答遺伝子（FC>2）の遺伝子オントロジー解析を示す。

【図 4 C】図4A～4Cに、8細胞SCNT胚にKDM4A mRNAを注射したときの転写の部分回復を示す。図4Cに、IVFまたはSCNT（KDM4A mRNA注射を行ったまたは行わない）8細胞期胚における2つの代表的なKDM4A応答遺伝子、UBTF1およびTHOC5の転写レベルの棒グラフおよびゲノムブラウザー表示を示す。表7も参照されたい。

【図 5 A】図5A～5Eは、図1に関連し、ヒト体細胞におけるRRR（リプログラミング耐性領

50

域) がヘテロクロマチン特徴を有することを示す。図5Aに、ヒト線維芽細胞 (Nhlf) におけるFRR、PRR、およびRRRの6つのヒストン修飾の平均ChIP-seqシグナルを比較する箱ひげ図を示す。

【図5B】図5A～5Eは、図1に関連し、ヒト体細胞におけるRRR (リプログラミング耐性領域) がヘテロクロマチン特徴を有することを示す。図5Bに、異なる体細胞型におけるFRR、PRRおよびRRR内のH3K9me3-ChIP-seqの平均強度を比較する箱ひげ図を示す。ChIP-seqおよびDNaseI-seqデータセットをENCODEプロジェクト (ENCODE Project Consortium, 2011) から得た。FRRおよびPRRと比較してRRRではH3K9me3の強度が有意に強化されており、FRRおよびPRRと比較してRRRではDNaseI-seqの強度が有意に低下していることに留意されたい。*** $p < 0.001$ 、** $p < 0.01$ 、* $p < 0.05$ 。

10

【図5C】図5A～5Eは、図1に関連し、ヒト体細胞におけるRRR (リプログラミング耐性領域) がヘテロクロマチン特徴を有することを示す。図5Cに、異なる体細胞型におけるFRR、PRRおよびRRR内のDNaseI-seqの平均強度を比較する箱ひげ図を示す。ChIP-seqおよびDNaseI-seqデータセットをENCODEプロジェクト (ENCODE Project Consortium, 2011) から得た。FRRおよびPRRと比較してRRRではH3K9me3の強度が有意に強化されており、FRRおよびPRRと比較してRRRではDNaseI-seqの強度が有意に低下していることに留意されたい。*** $p < 0.001$ 、** $p < 0.01$ 、* $p < 0.05$ 。

【図5D】図5A～5Eは、図1に関連し、ヒト体細胞におけるRRR (リプログラミング耐性領域) がヘテロクロマチン特徴を有することを示す。図5Dに、ヒトゲノムのFRR、PRRおよびRRRにおけるタンパク質コード遺伝子の密度を表す、エキソン配列の平均パーセンテージを比較する箱ひげ図を示す。*** $p < 0.001$ 、* $p < 0.05$ 。

20

【図5E】図5A～5Eは、図1に関連し、ヒト体細胞におけるRRR (リプログラミング耐性領域) がヘテロクロマチン特徴を有することを示す。図5Eに、FRR、PRRおよびRRR内の反復配列の平均パーセンテージを比較する箱ひげ図を示す。*** $p < 0.001$ 、* $p < 0.05$ 、ns、有意でない。

【図6A】図6A～6Fは図1に関連し、ヒトNTK-ESCが正常な多能性を示すことを示す。図6Aに、NTK-ESCおよびIVF由来対照ESCの代表的な免疫染色像を示す。ESCのコロニーを抗SOX2抗体、抗SSEA4抗体およびDAPIで共染色した。スケールバー、100 μm 。

【図6B】図6A～6Fは図1に関連し、ヒトNTK-ESCが正常な多能性を示すことを示す。図6Bは、対照ESCおよびNTK-ESCの異なる生物学的反復のRNA-seqの再現性の散布図評価である

30

【図6C】図6A～6Fは図1に関連し、ヒトNTK-ESCが正常な多能性を示すことを示す。図6Cに、対照ESCとNTK-ESCとの間で全般的遺伝子発現パターンを比較する散布図を示す。差別的に発現される遺伝子 ($FC > 3.0$) を黒い点で示す。それぞれの対比較の相関が極めて高い ($r = 0.95 \sim 0.99$) ことに留意されたい。

【図6D】図6A～6Fは図1に関連し、ヒトNTK-ESCが正常な多能性を示すことを示す。図6Dに、インビトロで2週間自然分化した胚様体 (EB) を免疫染色したものの代表的な画像を示す。EBを、DAPIと一緒に抗TUJ1、抗ブラキュリ抗体または抗AFP抗体で染色した。スケールバー、100 μm 。

【図6E】図6A～6Fは図1に関連し、ヒトNTK-ESCが正常な多能性を示すことを示す。図6Eに、移植の12週間後にNTK-ESC#6から派生した奇形腫の代表的な組織像を示す。スケールバー、100 μm 。

40

【図6F】図6A～6Fは図1に関連し、ヒトNTK-ESCが正常な多能性を示すことを示す。図6Fに、移植の12週間後のNTK7およびNTK8細胞株から派生した奇形腫の代表的な組織像を示す。

【図7A】図7A～7Cは図3に関連し、ヒトNTK-ESCが核ドナー由来ゲノムおよび卵母細胞ドナー由来ミトコンドリアを含むことを示す。図7Aに、NTK-ESC株NTK7およびNTK8において予期される性染色体組成の正常な核型を示す細胞遺伝Gバンド分析の代表的な画像を示す。

【図7B】図7A～7Cは図3に関連し、ヒトNTK-ESCが核ドナー由来ゲノムおよび卵母細胞ド

50

ナー由来ミトコンドリアを含むことを示す。図7Bに、16個のSTRマーカ―を使用する核DNA遺伝子型判定を示す。NTK-ESC NTK7およびNTK8の全てのSTRマーカ―が、それぞれ本来の核ドナー線維芽細胞DFB-6およびDFB-8のマーカ―と完全にマッチすることに留意されたい。

【図7C-1】図7A~7Cは図3に関連し、ヒトNTK-ESCが核ドナー由来ゲノムおよび卵母細胞ドナー由来ミトコンドリアを含むことを示す。図7Cに、代表的な一塩基多型(SNP)部位のミトコンドリアDNA遺伝子型判定を示す。NTK-ESCのミトコンドリアは、ドナー卵母細胞のみから派生したものである。図7Cに、表示順にそれぞれSEQ ID NO 60~65としてrs1116907 (m.8468 C>T) 配列、ならびに表示順にそれぞれSEQ ID NO 66~69および69~70としてrs1116904 (m.8027 G>A) 配列を開示する。

10

【図7C-2】図7A~7Cは図3に関連し、ヒトNTK-ESCが核ドナー由来ゲノムおよび卵母細胞ドナー由来ミトコンドリアを含むことを示す。図7Cに、代表的な一塩基多型(SNP)部位のミトコンドリアDNA遺伝子型判定を示す。NTK-ESCのミトコンドリアは、ドナー卵母細胞のみから派生したものである。図7Cに、表示順にそれぞれSEQ ID NO 60~65としてrs1116907 (m.8468 C>T) 配列、ならびに表示順にそれぞれSEQ ID NO 66~69および69~70としてrs1116904 (m.8027 G>A) 配列を開示する。

【発明を実施するための形態】

【0068】

発明の詳細な説明

その基礎科学および治療用途の両方における莫大な可能性にもかかわらず、体細胞核移入(SCNT)によるヒト体細胞のクローニングの効率は、非常に低いままであり、胚盤胞への発生不良および拡張胚盤胞でのより少ない細胞数をもたらす。これらの欠陥は、クローニングされたヒトSCNT胚からヒトES細胞株の成功裏な樹立が滅多に起こらないことの原因にもなる。クローニングされたヒト胚の機能不全は、主として、ドナーヒト核における不完全な核プログラミングおよび/またはエピジェネティックなバリアが原因である。

20

【0069】

本発明は、ヒストンH3-リシン9のトリメチル化(H3K9me3)が、ヒトドナー細胞核におけるリプログラミング耐性領域(RRR)で起こり、かつSCNTによる効率的なヒト体細胞核リプログラミングを阻止するエピジェネティックなバリアであるという発見に基づく。本明細書に開示されるように、本発明者らは、ヒトSCNTの有効性を改善する2つの方法を：第一に、KDM4デメチラーゼファミリーのメンバー、例えば、KDM4AもしくはKDM4Dの外因性もしくは増加した発現(例えば、過剰発現)を使用することによるドナー核遺伝物質のH3K9me3の脱メチル化を促進することによって；ならびに/または、ヒストンメチルトランスフェラーゼ、例えば、SUV39h1および/もしくはSUV39h2を阻害することによるH3K9me3のメチル化を阻害することによって、実証した。いくつかの態様では、ハイブリッドヒト卵母細胞(例えば、活性化前のヒトドナー体細胞からの核遺伝物質を含む除核ヒト卵母細胞)および/またはヒトSCNT胚に、KDM4Aおよび/またはKDM4Dの発現を増加させる活性物質(例えば、ヒトKDM4Aタンパク質もしくは該KDM4Aタンパク質の機能的フラグメントをコードするmRNAおよび/またはヒトKDM4Dタンパク質もしくは該KDM4Dタンパク質の機能的フラグメントをコードするmRNA)が注射される。いくつかの態様では、活性物質は、ヒトKDM4AもしくはKDM4Dタンパク質、もしくはそのホモログ、またはヒトKDM4ファミリーのヒストンデメチラーゼの別のメンバーをコードするmRNAである。

30

40

【0070】

いくつかの態様では、ドナーヒト体細胞、レシピエントヒト卵母細胞、ハイブリッド卵母細胞(例えば、融合もしくは活性化前のドナー遺伝物質を含むヒト除核卵母細胞)、またはヒトSCNT胚(すなわち、ドナー核と除核卵母細胞との融合後)に、KDM4ファミリーのメンバーをコードするmRNA、またはmRNAもしくは核酸もしくは核酸類似体(改変mRNA(mod-RNAとしても公知)を含む)が注射される。いくつかの態様では、ドナーヒト体細胞、レシピエントヒト卵母細胞、ハイブリッド卵母細胞、またはヒトSCNTに、ヒトKDM4Aタンパク質もしくは該KDM4Aタンパク質の機能的フラグメントをコードするmRNAおよび/また

50

はヒトKDM4Dタンパク質または該KDM4Dタンパク質の機能的フラグメントをコードするmRNAが注射される。hSCNTに注射が行われるいくつかの態様では、活性化後の任意の時期、例えば、5hpa、または10～12hpa、または20～28hpa、hSCNT胚の1細胞期、2細胞期または4細胞期にそれを行うことができる。

【0071】

したがって、本発明は、ヒト核ゲノム物質中の（例えば、ヒトドナーゲノム中の）エピジェネティックなバリアを除去し、それにより、hSCNT胚の胚盤胞期へおよびそれ以降への発生を含む成功裏なヒトSCNTの効率を増加させるための、H3K9me3ヒストンデメチラーゼ活性化剤、例えばヒトKDM4/JMJD2ファミリー活性化剤および/またはH3K9me3メチルトランスフェラーゼ阻害剤、例えばヒトSUV39h1もしくはヒトSUV39h2またはヒトSETDB1の阻

10

【0072】

したがって、本発明の局面は、(i) H3K9me3を脱メチル化する能力のあるヒストンデメチラーゼ、例えば、KDM4ファミリーのヒストンデメチラーゼのメンバー、例えば非限定的に、JMJD2A/KDM4AもしくはJMJD2B/KDM4BもしくはJMJD2C/KDM4CもしくはJMJD2D/KDM4DもしくはJMJD2E/KDM4Eを発現させること、および/または(ii) H3K9me3のメチル化に關与するヒストンメチルトランスフェラーゼを阻害すること、例えば、ヒトSUV39h1、ヒトSUV39h2もしくはヒトSETDB1の任意の1つもしくは複数を阻害することのいずれかによって、H3K9me3メチル化を低減することによりヒトSCNTの効率を増加させることに向けられた、方法、組成物およびキットに関する。いくつかの態様では、ヒトKDM4ファミリーのヒストンデ

20

【0073】

別の局面は、1つまたは複数の割球に発生させるための、本明細書開示の方法および組成物を使用して産生されるヒトSCNT胚の使用に関し、該ヒトSCNT胚は、取り出すもしくは生検することができ、かつ/またはヒトES細胞（すなわち、ヒトNT-ESC）を作製するために使用することができる。本明細書開示の方法を使用して作製されたNT-hESCを、多様な目的のために、例えば、再生療法および/または細胞ベースの療法のため、アッセイのため、および疾患モデル化の使用のために、使用することができる（例えば、hNT-ESCが患者特異的hNT-ESCの場合、hSCNT胚は、特定の変異もしくはSNPを有し、かつ/または特定の疾患に罹る素因を有するヒトドナー対象からのゲノム核ドナーを使用して作製された）。hNT-ESCは、アッセイ、例えば非限定的に、個別化薬物スクリーニングおよび/または疾患特異的薬物スクリーンを含む薬物スクリーニングアッセイにも使用することができる。本明細書開示の方法および組成物を使用して作製されるhNT-ESCは、凍結保存できるだけでなく、ヒトNT-ESCバンクに預けることもできる。

30

【0074】

定義

便宜上、本出願全体に採用される特定の用語（明細書、実施例、および添付の特許請求の範囲を含む）を、ここに集める。特に定義しない限り、本明細書に使用される全ての技術用語および科学用語は、本発明が属する技術分野の技術者によって通常理解されるのと同じ意味を有する。

40

【0075】

語句「体細胞核移入」または「SCNT」は、通例、治療用または生殖クローニングとも呼ばれ、体細胞が除核卵母細胞と融合される工程である。体細胞核は、遺伝情報を提供し、一方で卵母細胞は、胚発生に必要な栄養分および他のエネルギー産生物質を提供する。融合が起こった後、細胞は全能であり、最終的には胚盤胞まで発生し、その時点で内部細胞塊が単離される。

【0076】

本明細書に使用される用語「核移入」は、除核卵母細胞を細胞核遺伝物質または体細胞

50

核と人工的に組み合わせることによって獲得される、同一の特徴および質を可能にする遺伝子操作技法を表す。いくつかの態様では、核移入手順は、ドナー体細胞由来の核または核遺伝物質が除核卵または除核卵母細胞（核／前核が除去された卵または卵母細胞）に移入される手順である。ドナー核は、体細胞由来であることができる。

【0077】

用語「核遺伝物質」は、個体に関する情報をコードするポリヌクレオチド（例えばDNA）を含む核に見られる構造および／または分子を表す。核遺伝物質は、染色体およびクロマチンを含む。本用語は、親細胞から娘細胞への分裂のような細胞分裂によって産生される核遺伝物質（例えば染色体）も表す。核遺伝物質は、ミトコンドリアDNAを含まない。

【0078】

用語「SCNT胚」は、体細胞の核または核遺伝物質と融合された除核卵母細胞の細胞またはその全能性子孫を表す。SCNT胚は、胚盤胞まで発生することができ、着床後に生きた子孫まで発生することができる。SCNT胚は、1細胞期胚、2細胞期胚、4細胞期胚、または胚盤胞になる前の任意の期の胚であることができる。

【0079】

用語「親胚（parental embryo）」は、単一割球が取り出されるまたは生検されるSCNT胚を表すために使用される。生検後、残りの親胚（生検された割球を除いた親胚）を割球と共に培養して、割球の増殖促進を助けることができる。残りの、生存可能な親SCNT胚は、続いて、長期もしくは永久貯蔵のために、または将来使用するために凍結され得る。あるいは、生存可能な親胚を使用して妊娠が引き起こされ得る。

【0080】

用語「ドナーヒト細胞」または「ドナーヒト体細胞」は、核アクセプターまたはレシピエントとしてのレシピエント卵母細胞に移入される体細胞またはヒト細胞核を表す。

【0081】

用語「体細胞」は、生殖細胞または生殖細胞前駆体ではない植物または動物細胞を表す。いくつかの態様では、分化した細胞は、生殖細胞ではない。体細胞は、多能性細胞または全能性細胞と関係しない。いくつかの態様では、体細胞は、胚に存在しないまたは胚から得られない体細胞であり、そのような細胞のインビトロ増殖に起因しない体細胞が意味される、「非胚性体細胞」である。いくつかの態様では、体細胞は、胚もしくは胎児以外の生物に存在するもしくは得られる、またはそのような細胞のインビトロ増殖に起因する細胞が意味される「成熟体細胞」である。

【0082】

本明細書に使用される用語「分化した細胞」は、体細胞系列に分化する過程の、または最終分化した、任意の細胞を表す。例えば胚細胞は、腸を覆う上皮細胞に分化することができる。分化した細胞は、例えば胎児または生きて生まれた動物から単離することができる。

【0083】

細胞個体発生に関連して、形容詞「分化した（differentiated）」、または「分化している（differentiating）」は、比較されている細胞よりも、「分化した細胞」が発生経路をさらに下流に進行した細胞であることを意味する、相対的な用語である。したがって、幹細胞は、系列制限された前駆細胞（例えば中胚葉幹細胞）に分化することができ、それは、今度はその経路のさらに下流の他の前駆細胞型（例えば心筋細胞前駆細胞）に、それから特定の組織型に特徴的な役割を果たす最終期の分化した細胞に分化することができ、さらに増殖する能力を保持する場合、または保持しない場合がある。

【0084】

本明細書に使用される用語「卵母細胞」は、減数分裂の中期IIに到達した成熟卵母細胞を表す。卵母細胞は、また、生殖に関与する雌性配偶子または生殖細胞を説明するために使用され、かつ通例、卵とも呼ばれる。成熟卵は、単一セットの母系染色体（ヒト霊長類では23X）を有し、中期IIで停止する。

【0085】

「ハイブリッド卵母細胞」は、第1のヒト卵母細胞（「レシピエント」と呼ばれる）由来の細胞質を有するが、レシピエント卵母細胞の核遺伝物質を有さない除核卵母細胞を表し；それは、「ドナー」と呼ばれる別のヒト細胞からの核遺伝物質を有する。いくつかの態様では、ハイブリッド卵母細胞は、レシピエント卵母細胞由来ではなく、ドナー細胞（核遺伝物質と同じドナー細胞または異なるドナー、例えばドナー卵母細胞由来であることができる）由来のミトコンドリアDNA（mtDNA）も含むことができる。

【0086】

本明細書に使用される用語「除核卵母細胞」は、その核が除去されたヒト卵母細胞を表す。

【0087】

本明細書に使用される用語「除核」は、細胞の核物質が除去され、細胞質だけを残す工程を表す。卵に適用される場合、除核は、核膜に囲まれていない母系染色体の除去を表す。用語「除核卵母細胞」は、核物質または核が除去された卵母細胞を表す。

【0088】

本明細書に使用される「レシピエントヒト卵母細胞」は、その本来の核を除去後にヒト核ドナー細胞由来の核を受け入れるヒト卵母細胞を表す。

【0089】

本明細書に使用される用語「融合」は、核ドナー細胞とレシピエント卵母細胞の脂質膜との組み合わせを表す。例えば、脂質膜は、細胞の形質膜または核膜であり得る。融合は、核ドナー細胞およびレシピエント卵母細胞が互いに隣り合って置かれるとき、または核ドナー細胞がレシピエント卵母細胞の囲卵腔内に置かれるときに、それらの間に電気刺激を適用すると起こり得る。

【0090】

本明細書に使用される用語「活性化」は、核移入の前、途中または後に分割するような細胞刺激を表す。好ましくは、本発明において、核移入後に分割するような細胞刺激を意味する。

【0091】

本明細書に使用される用語「生きた子孫」は、子宮外で生存できる動物を意味する。好ましくは、それは、1秒、1分、1日、1週間、1ヶ月、6ヶ月または1年よりも長く生存することができる動物である。動物は、生存のために子宮内環境を要さない場合がある。

【0092】

用語「出生前」は、誕生前に存在または起こることを表す。同様に、用語「出生後」は、誕生後に存在するまたは起こることである。

【0093】

本明細書に使用される用語「胚盤胞」は、胎盤哺乳動物における細胞約30～150個の着床前胚（マウスの受精の約3日後、ヒトの受精の約5日後）を表す。胚盤胞期は桑実胚期に続き、その独特な形態によって識別することができる。胚盤胞は、細胞層（栄養外胚葉）、液体で満たされた腔（卵割腔または胚盤胞腔）、および内部の細胞クラスター（内部細胞塊またはICM）から構成される球体からなる。未分化細胞からなるICMは、胚盤胞が子宮に着床したならば胎児になるものを生み出す。これらの同じICM細胞は、培養状態で増殖するならば、胚性幹細胞株を生じることができる。着床時に、マウス胚盤胞は、約70個の栄養膜細胞および30個のICM細胞から構成されている。

【0094】

本明細書に使用される用語「胞胚」は、割腔と呼ばれる、液体で満たされた腔を囲む細胞の中空球体からなる、胚発生の初期を表す。胞胚という用語は、ときに胚盤胞と互換的に使用される。

【0095】

用語「割球」は、着床前胚から得られる少なくとも1つの割球（例えば1、2、3、4など）を表すために全体にわたり使用される。用語「2つ以上の割球のクラスター」は、「割球由来外植片（outgrowth）」と互換的に使用され、割球のインビトロ培養の間に作製さ

10

20

30

40

50

れる細胞を表す。例えば、割球がSCNT胚から得られて最初に培養された後、それは、一般的に少なくとも1回分裂して2つ以上の割球のクラスター（割球由来外植片としても公知）を産生する。このクラスターを胚細胞または胎児細胞と共にさらに培養することができる。最終的に、割球由来外植片は、分裂し続ける。培養方法の過程で、これらの構造からES細胞、全能性幹（TS）細胞、および部分的に分化した細胞型が発生する。

【0096】

本明細書に使用される用語「カリオプラスト」は、細胞から除核によって得られる、細胞質および形質膜の狭い周縁部によって囲まれる細胞核を表す。

【0097】

本明細書に使用される用語「細胞カプレット」は、融合および/または活性化前の除核卵母細胞および体細胞または胎児カリオプラストを表す。

10

【0098】

本明細書に使用される用語「分割パターン」は、非常に初期の胚で細胞が分裂するパターンを表し、各生物種は、顕微鏡観察できる特徴的な分割パターンを示す。特徴的なパターンからの逸脱は、通常、胚が異常であることを示し、それで、胚の着床前スクリーニングのための基準として分割パターンが使用される。

【0099】

本明細書に使用される用語「クローン」は、DNA分子、細胞、組織、器官、植物もしくは動物全体、または別の生物と同じ核ゲノムを有する生物の正確な遺伝的複製を表す。

【0100】

本明細書に使用される用語「クローニングされた（またはクローニング）」は、別の個別のユニットと同一の遺伝子セットを有する新しい個別のユニットを調製するための遺伝子操作技法を表す。本発明において、本明細書に使用される用語「クローニングされた」は、別の細胞、胚細胞、胎児細胞、分化した細胞、および/または動物細胞の核DNA配列と実質的に類似または同一の核DNA配列を有する、細胞、胚細胞、胎児細胞、および/または動物細胞を表す。用語「実質的に類似」および「同一」は、本明細書に記載される。クローニングされたSCNT胚は、1つの核移入から生じることができ、または代替的に、クローニングされたSCNT胚は、少なくとも1つの再クローニング段階を含むクローニング工程から生じることができる。

20

【0101】

本明細書に使用される用語「トランスジェニック生物」は、ホストが、その染色体組成中に移入された遺伝子の遺伝形質を獲得するように、別の生物由来の遺伝物質が実験的に移入された生物を表す。

30

【0102】

本明細書に使用される用語「胚分割」は、初期胚を、同一の遺伝的構成を有する2つ以上の胚に分離して、本質的に、同一の双生児またはより高度な多生児（三つ子、四つ子など）を創出することを表す。

【0103】

本明細書に使用される用語「桑実胚」は、胚が細胞12~32個から構成される固形の塊（割球）である、受精の3~4日後の着床前胚を表す。8細胞期の後に、着床前胚の細胞は、相互によりしっかりと接着し始め、「緻密」になる。結果として生じた胚は、桑の実に似ており、桑実胚と呼ばれる（ラテン語：morus = 桑の実）。

40

【0104】

用語「胚性幹細胞」（ES細胞）は、細胞株として連続継代されている胚盤胞または桑実胚の内部細胞塊から派生する多能性細胞を表す。ES細胞は、卵細胞と精子またはDNAとの受精、核移入、例えばSCNT、単為生殖などから派生し得る。用語「ヒト胚性幹細胞」（hES細胞）は、ヒトES細胞を表す。用語「ntESC」は、SCNT胚から産出された胚盤胞または桑実胚の内部細胞塊から得られる胚性幹細胞を表す。用語「hNT-ESC」は、ヒトSCNT胚から産出された胚盤胞または桑実胚の内部細胞塊から得られる胚性幹細胞を表す。ESCの作製は、米国特許第5,843,780号；同第6,200,806号に開示されており、体細胞核移入から派生

50

する胚盤胞の内部細胞塊から得られるESCは、米国特許第5,945,577号；同第5,994,619号；同第6,235,970号に記載されており、それらは、その全体として参照により本明細書に組み入れられる。胚性幹細胞の顕著な特徴は、胚性幹細胞の表現型を定義する。したがって、胚性幹細胞が他の細胞と識別することができるように細胞が1つまたは複数の独特な特徴を有する場合、細胞は、胚性幹細胞の表現型を有する。例示的な顕著な胚性幹細胞の特徴には、非限定的に、遺伝子発現プロファイル、増殖能、分化能、核型、特定の培養条件への応答性などが含まれる。

【0105】

本明細書に使用される用語「多能性」は、異なる条件下で1つよりも多い分化した細胞型に分化する能力、好ましくは、3種の胚葉細胞（germ cell layer）全てに特徴的な細胞型に分化する能力を有する細胞を表す。多能性細胞は、主として、例えばヌードマウス奇形腫形成アッセイを使用して、それらが1つよりも多い細胞型、好ましくは3つの胚葉全てに分化できるそれらの能力によって特徴付けられる。そのような細胞には、hES細胞、ヒト胚由来細胞（hEDC）、ヒトSCNT胚由来幹細胞および成体由来幹細胞が含まれる。多能性幹細胞は、遺伝子組換えされている、または遺伝子組換えされていない場合がある。遺伝子組換えされた細胞には、細胞の特定を促進するための蛍光タンパク質のようなマーカーを含み得る。多能性に関する好ましい検査は、3つの胚葉それぞれの細胞への分化能を実証することであるものの、多能性は、胚性幹（ES）細胞マーカーの発現によっても証明される。そのような細胞を単に培養することが、自然にそれらを多能性にするわけではないことに留意されたい。リプログラミングされた多能性細胞（例えばその用語が本明細書において定義されるところのiPS細胞）は、一般的に培養状態で限られた回数だけ分裂する能力を有する初代細胞親と比較して、増殖能を喪失せずに長期間継代できるという特徴も有する。

【0106】

SCNT胚に関連して本明細書に使用される用語「全能」は、生きて生まれた動物まで発生することができるSCNT胚を表す。

【0107】

本明細書に使用される用語「iPS細胞」および「人工多能性幹細胞」は、互換的に使用され、非多能性細胞、典型的には成熟体細胞から、例えば1種または複数種の遺伝子の強制発現を誘導することによって人工的に派生した（例えば、誘導された、または完全な後退による）多能性幹細胞を表す。

【0108】

本明細書に使用される用語「リプログラミング」は、核の発生時計がリセットされるように体細胞の分化状態を変更または後退させる工程；例えば、初期胚細胞核の遺伝プログラムを遂行することができるように、成熟分化細胞核の発生状態をリセットして、胚発生に必要な全てのタンパク質を製造することを表す。いくつかの態様では、ドナーヒト細胞は、SCNTによるリプログラミング前に最終分化する。本明細書開示のリプログラミングは、体細胞の分化状態の多能性または全能性細胞への完全後退を包含する。リプログラミングは、一般的に、接合体が成体まで発生する細胞分化の間に起こる、核酸修飾（例えばメチル化）、クロマチン凝縮、エピジェネティックな変化、ゲノム刷り込みなどの遺伝パターンの少なくとも一部の、変更、例えば後退を含む。体細胞核移入（SCNT）において、レシピエント卵母細胞細胞質の成分は、体細胞核のリプログラミングに重要な役割を演じて、胚性核の機能を遂行すると考えられる。

【0109】

SCNT胚に関連して本明細書に使用される用語「培養すること」は、胚を培地中に入れることを含む実験手順を表す。SCNT胚を適切な時間、培養培地中に入れて、培地中にSCNT胚を静止状態であるが機能的なままにさせる、またはSCNT胚を培地中で成長させることができる。胚を培養するために適した培地は、当業者に周知である。例えば、全ての図面、表および描画を含めてその全体として参照により本明細書に組み入れられる、1993年5月25日に発行された「In vitro Culture of Bovine Embryos」（Firstら）という名称の米国

特許第5,213,979号、および1992年3月17日に発行された「Bovine Embryo Medium」(Rose nkrans, Jr.ら)という名称の米国特許第5,096,822号を参照されたい。

【0110】

用語「培養培地」は、「適切な培地」と互換的に使用され、細胞増殖を可能にする任意の培地を表す。適切な培地は、最大増殖を促進する必要はなく、測定可能な細胞増殖のみを促進する必要がある。いくつかの態様では、培養培地は、細胞を多能性または全能状態に維持する。

【0111】

SCNT胚に関連して本明細書に使用される用語「着床させること」は、代理母雌性動物に本明細書記載のSCNT胚を受胎させることを表す。本技法は、当業者に周知である。例えば、Seidel and Elsdén, 1997, Embryo Transfer in Dairy Cattle, W. D. Hoard & Sons, Co., Hoards Dairymanを参照されたい。胚は、子宮内で発生可能であり得、または代替的に、胎児は、分娩前に子宮環境から取り出され得る。

10

【0112】

本明細書に使用される用語「作用物質」は、非限定的に、小分子、核酸、ポリペプチド、ペプチド、薬物、イオンなどのような任意の化合物または物質を意味する。「作用物質」は、非限定的に、合成および天然のタンパク質性および非タンパク質性実体を含めた、任意の化学物質、実体または部分であることができる。いくつかの態様では、作用物質は、非限定的に、タンパク質、オリゴヌクレオチド、リボザイム、DNAザイム、糖タンパク質、siRNA、リボタンパク質、アプタマー、ならびにそれらの修飾物および組み合わせなどを含めた、核酸、核酸類似体、タンパク質、抗体、ペプチド、アプタマー、核酸のオリゴマー、アミノ酸、または糖質である。特定の態様では、作用物質は、化学部分を有する小分子である。例えば、化学部分には、マクロライド、レプトマイシンおよび関連天然産物またはその類似体を含む、非置換または置換されたアルキル、芳香族、またはヘテロシクリル部分が含まれた。化合物は、所望の活性および/もしくは性質を有することが公知であることができ、または多様な化合物のライブラリーより選択することができる。

20

【0113】

本明細書に使用される、用語「接触させること」(すなわち、ヒトドナー細胞、ヒトレシピエント卵母細胞、ハイブリッド卵母細胞、またはヒトSCNT胚を活性物質と接触させること)は、活性物質と、ヒト細胞、ヒト卵母細胞、ハイブリッド卵母細胞またはhSCNT胚とを一緒にインビトロでインキュベートすること(例えば、培養物中または容器中のドナーヒト細胞、ヒト卵母細胞、ハイブリッド卵母細胞またはhSCNT胚に活性物質を添加すること)を含むことが意図される。いくつかの態様では、用語「接触させること」は、対象において自然に起こり得る、本明細書開示の活性物質への細胞のインビボ曝露(すなわち、自然生理過程の結果として起こり得る曝露)を含むことは意図されない。ヒト体細胞、ヒト卵母細胞、ハイブリッド卵母細胞またはhSCNT胚を、本明細書開示の活性物質と接触させる段階は、任意の適切な方法で行うことができる。例えば、ヒト体細胞、ヒト卵母細胞、ハイブリッド卵母細胞またはhSCNT胚は、接着培養または懸濁培養で処置され得る。ヒト体細胞、ヒト卵母細胞、ハイブリッド卵母細胞またはhSCNT胚を、本明細書開示の活性物質と接触させることができ、同時にまたは続いて、成長因子もしくは他の分化活性物質のような別の活性物質または環境と接触させて、細胞を安定化するまたは細胞をさらに分化させることもできることが理解されている。同様に、ヒト体細胞、ヒト卵母細胞、ハイブリッド卵母細胞またはhSCNT胚を、本明細書開示の活性物質(例えば、KDM4ヒストンデメチラーゼ活性化剤またはmRNA)と、および次に本明細書開示の第2の活性物質(例えばH3K9メチルトランスフェラーゼ阻害剤)と接触させることができ、逆もまた同様である。いくつかの態様では、ヒト体細胞、ヒト卵母細胞、ハイブリッド卵母細胞またはhSCNT胚は、本明細書開示の活性物質および本明細書開示の第2の活性物質と接触され、接触は、時間的に分離されている。いくつかの態様では、ヒトドナー細胞、ヒト体細胞、ヒト卵母細胞、ハイブリッド卵母細胞またはhSCNT胚は、本明細書開示の1種または複数種の活性物質と実質的に同時に接触される(例えば、KDM4ヒストンデメチラーゼ活性化剤(例えば

30

40

50

、KDM4D mRNA) およびH3K9メチルトランスフェラーゼ阻害剤と実質的に同時に接触される)。

【0114】

用語「外因性」は、そのネイティブな起源またはレベル以外の細胞または生物中に存在する物質を表す。例えば、用語「外因性核酸」または「外因性タンパク質」は、人間の手が関与する工程によって細胞または生物などの生体システム中に導入された核酸またはタンパク質であって、該生体システムにおいて、通常見出されない、または導入される核酸もしくはタンパク質が通常は少量しか見出されない、核酸またはタンパク質を表す。ある物質が細胞または該物質を継承する細胞の先祖に導入されるならば、その物質は外因性と思なされる。対照的に、用語「内因性」は、その時点で生体システムまたは細胞にネイティブな物質を表す。例えば、「外因性KDM4A」は、通常見出されない、またはその時点で、細胞または生物に導入されるレベルでは発現されない、KDM4AのmRNAまたはcDNAの導入を表す。

10

【0115】

用語「発現」は、RNAおよびタンパク質の産生に関与する適用可能な細胞過程、例えば転写、翻訳、フォールディング、修飾およびプロセッシングを表す。「発現産物」には、遺伝子から転写されるmRNAの翻訳によって得られる遺伝子およびポリペプチドから転写されるRNAが含まれる。

【0116】

「mtDNA」と互換的に使用される用語「ミトコンドリアDNA」は、核内(その他の全ての染色体が位置する)よりも細胞の細胞質内に存在する構造であるミトコンドリアのDNAを表す。インビボで、全てのmtDNAは母親から遺伝する。各ミトコンドリアにはmtDNAゲノムの2~10個のコピーがある。mtDNAは、二本鎖環状分子である。これは、核内の染色体に比べて非常に小さく、かつミトコンドリア呼吸鎖複合体のいくつかのサブユニットをコードする遺伝子ならびに一部のリボソームRNAおよびトランスファーRNAに関する遺伝子のような限られた数の遺伝子だけを含む。細胞は、細胞質での連続複製に基づくミトコンドリア由来のmtDNAを含み、該ミトコンドリアは、紡錘体置換(spindle transfer)の場合、レシピエントの細胞質を拠点とする。

20

【0117】

用語「ミトコンドリア病」は、ミトコンドリアの機能に影響し、かつ/またはミトコンドリアDNAが原因の疾患および障害を表す。mtDNAは、母系遺伝のみである。一般的にこれらの疾患は、酸化リン酸化の障害が原因である。ミトコンドリア病は、多くの場合、ミトコンドリア遺伝子の病原性変異によって引き起こされる。変異は、通常、ヘテロプラスミックであるので、正常DNAと変異型DNAとの混合物があり、そのレベルは組織の間で異なる可能性がある。しかし、変異のいくつかはホモプラスミックであるので、変異はmtDNAの100%に存在する。子孫における点変異のヘテロプラスミーのパーセンテージは、母親における変異のパーセンテージと関係する。遺伝的ボトルネックがあり、それは、卵母細胞の発生の際に生じる。

30

【0118】

「遺伝子組換えされた」または「操作された」細胞は、外因性核酸がヒトの手を必要とする工程によって導入されている細胞(または核酸の少なくとも一部を受け継いだ、そのような細胞の子孫)を表す。核酸は、例えば、細胞に外因性である配列を含み得、核酸は、ネイティブな配列(すなわち、細胞中に自然に見出される配列)を自然に存在しない配置(例えば、異なる遺伝子由来のプロモーターと連結されるコード領域)で、またはネイティブな配列を変更されたバージョンなどで含み得る。核を細胞内に移入する工程は、任意の適切な技法によって達成することができる。適切な技法には、リン酸カルシウムまたは脂質介在性トランスフェクション、エレクトロポレーション、およびウイルスベクターを使用するトランスダクションまたは感染が含まれる。いくつかの態様では、ポリヌクレオチドまたはその部分は、細胞のゲノム内に組み入れられる。核酸はその後、ゲノムから除去または切り出されていてもよいが、ただしそのような除去または切り出しは、未修飾

40

50

である以外は同等の細胞と比較して細胞における検出可能な変更をもたらす。

【0119】

用語「同一性」は、2種以上の核酸またはポリペプチドの配列が同じである度合いを表す。評価ウィンドウにわたる、例えば関心対象の配列長にわたる、関心対象の配列と第2の配列との間の同一性パーセントは、配列をアライメントすること、ギャップの導入を見込みながら同一性が最大になるように相手側の評価ウィンドウ内で同一残基である残基（ヌクレオチドまたはアミノ酸）の数を判定すること、ウィンドウ内に入る関心対象の配列または第2の配列（どちらでも大きい方）の総残基数で割ること、および100を掛けることによって計算され得る。特定の同一性パーセントを達成するために必要な同一残基数を計算するとき、分数を丸めて最も近い整数にするべきである。同一性パーセントは、当技術分野において公知の多様なコンピュータプログラムを使用して計算することができる。例えば、BLAST2、BLASTN、BLASTP、ギャップ付きBLASTなどのコンピュータプログラムは、アライメントを作製し、関心対象の配列間の同一性パーセントを提供する。Karlin and Altschul, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5877, 1993のように改変された、KarlinおよびAltschul (Karlin and Altschul, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:22264-2268, 1990) のアルゴリズムは、Altschulら (Altschul, et al., J. Mol. Biol. 215:403-410, 1990) のNBLASTおよびXBLASTプログラムに組み入れられている。比較目的でギャップ付きアライメントを得るために、ギャップ付きBLASTが、Altschulら (Altschul, et al. Nucleic Acids Res. 25: 3389-3402, 1997) に記載されているように利用される。BLASTおよびギャップ付きBLASTプログラムを利用するとき、それぞれのプログラムのデフォルトのパラメーターが使用され得る。PAM250またはBLOSUM62マトリックスが使用され得る。BLAST解析を行うためのソフトウェアは、米国国立バイオテクノロジー情報センター (National Center for Biotechnology Information: NCBI) を経由して公的に入手可能である。これらのプログラムについては、www.ncbi.nlm.nih.govのURLを有するウェブサイトを参照されたい。具体的な一態様では、同一性パーセントは、NCBIによって提供されるデフォルトのパラメーターを用いてBLAST2を使用して計算される。いくつかの態様では、核酸またはアミノ酸配列は、該核酸またはアミノ酸配列と少なくとも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98%または少なくとも約99%の配列同一性を有する。

【0120】

本明細書に使用される用語「単離された」または「部分精製された」は、核酸またはポリペプチドの場合、その天然起源から見出される核酸もしくはポリペプチドと共に存在する少なくとも1種の他の成分（例えば、核酸またはポリペプチド）から、かつ/あるいは細胞によって発現される場合は核酸もしくはポリペプチドと共に存在する、または分泌型ポリペプチドの場合は分泌される成分から分離された、核酸またはポリペプチドを表す。化学合成された核酸もしくはポリペプチド、またはインビトロ転写/翻訳を使用して合成された核酸もしくはポリペプチドは、「単離された」と見なされる。「単離された細胞」は、本来それが見い出された生物から取り出された細胞、またはそのような細胞の子孫である。任意で、細胞は、例えば他の細胞の存在下で、インビトロ培養されたものである。任意で、細胞は、その後第2の生物に導入される、またはそれが単離された生物（もしくはその細胞が由来する細胞）に再導入される。

【0121】

本明細書に使用される単離された細胞集団に関連する用語「単離された集団」は、細胞の混合集団または不均一集団から取り出され、分離された細胞集団を表す。いくつかの態様では、単離された集団は、細胞が単離された、または濃縮された元の不均一集団と比較して、実質的に純粋な細胞集団である。

【0122】

特定の細胞集団に関連する用語「実質的に純粋な」は、総細胞集団を構成する細胞に関して、少なくとも約75%、好ましくは少なくとも約85%、より好ましくは少なくとも約90%、最も好ましくは少なくとも約95%純粋な細胞集団を表す。整理し直すと、胚体内胚葉

細胞集団に関する用語「実質的に純粋な」または「本質的に精製された」は、本明細書における用語によって定義される胚体内胚葉細胞またはそれらの子孫ではない細胞を、約20%よりも少ない、より好ましくは約15%、10%、8%、7%よりも少ない、最も好ましくは約5%、4%、3%、2%、1%よりも少ない、または1%未満含有する細胞集団を表す。いくつかの態様では、本発明は、増大した胚体内胚葉細胞集団が胚体内胚葉細胞の実質的に純粋な集団である、胚体内胚葉細胞集団を増大させる方法を包含する。同様に、SCNT由来幹細胞集団または多能性幹細胞集団に関して、「実質的に純粋な」または「本質的に精製された」集団は、本明細書における用語によって定義されるような幹細胞またはそれらの子孫ではない細胞を、約20%よりも少ない、より好ましくは約15%、10%、8%、7%よりも少ない、最も好ましくは約5%、4%、3%、2%、1%よりも少ない、または1%未満含有する細胞集団を表す。

10

【0123】

用語「濃縮すること」または「濃縮される」は、本明細書において互換的に使用され、1種の細胞の収率（割合）が、出発培養物または調製物中のその種の細胞の割合よりも少なくとも10%増加していることを意味する。

【0124】

用語「再生」または「自己再生」または「増殖」は、本明細書において互換的に使用され、幹細胞が長期間および/または何ヶ月～何年にもわたり同じ特殊化していない細胞型に分裂することによって自己再生する能力を表すために使用される。場合によっては、増殖は、単一細胞から2つの同一の娘細胞への反復分裂による細胞の増大を表す。

20

【0125】

本明細書に使用される用語「系列」は、共通の祖先を有する細胞または共通の発生的運命を有する細胞を説明する。内胚葉起源または「内胚葉系列」である細胞に関連して、これは、細胞が内胚葉細胞から派生したが、胚体内胚葉細胞を生じる1種または複数種の発生系列経路のような内胚葉系列に限られた経路に沿って分化することができ、それが今度は肝細胞、胸腺、膵臓、肺および腸に分化することができることを意味する。

【0126】

本明細書に使用される用語「異種の」は、異なる種由来の細胞を表す。

【0127】

本明細書に使用される用語「マーカー」は、細胞の特徴および/または表現型を説明するために使用される。マーカーは、関心対象の特徴を含む細胞の選択のために使用することができる。マーカーは、固有の細胞により様々である。マーカーは、特定の細胞型の細胞、または該細胞型によって発現される分子の形態的、機能的または生化学的（酵素的）特徴のいずれかの特徴である。好ましくは、そのようなマーカーは、タンパク質であり、より好ましくは、当技術分野において利用可能な抗体または他の結合分子についてのエピトープを有する。しかし、マーカーは、非限定的にタンパク質（ペプチドおよびポリペプチド）、脂質、多糖、核酸およびステロイドを含めた細胞から見出される任意の分子からなり得る。形態学的特徴または形質の例には、非限定的に、形状、サイズ、および核細胞質比が含まれる。機能的特徴または形質の例には、非限定的に、特定の基材に接着する能力、特定の色素を取り込むまたは排除する能力、特定条件下で遊走する能力、および特定の系列に沿って分化する能力が含まれる。マーカーは、当業者に利用可能な任意の方法によって検出され得る。マーカーは、また、形態的特徴の非存在またはタンパク質、脂質などの非存在であることができる。マーカーは、ポリペプチドおよび他の形態的特徴の存在および非存在の独特な特徴のパネルの組み合わせであることができる。

30

40

【0128】

用語「モジュレートする」は、当技術分野におけるその使用と一致して使用され、すなわち、関心対象の工程、経路、または現象における質的または量的な変化、変更、または改変を引き起こすまたは助長することを意味する。非限定的に、そのような変化は、工程、経路、または現象の異なる成分または部門の相対強度または活性における増加、減少、または変化であり得る。「モジュレーター」は、関心対象の工程、経路、または現象にお

50

ける質的または量的な変化、変更、または改変を引き起こすまたは助長する作用物質である。

【0129】

用語「RNA干渉」または「RNAi」は、当技術分野におけるその意味と一致して本明細書において使用されて、二本鎖RNA (dsRNA) が、dsRNAの1つの鎖と相補性を有する対応するmRNAの配列特異的分解または翻訳抑制をトリガーする現象を表す。dsRNAの該鎖とmRNAとの間の相補性は、100%である必要はなく、遺伝子発現の阻害(「サイレンシング」または「ノックダウン」とも呼ばれる)を媒介するために十分でさえあればよいことが理解されよう。例えば、相補性の度合いは、鎖が、(i) RNA誘導サイレンシング複合体(RISC)中のmRNAの切断をガイドすること；または(ii) mRNAの翻訳抑制を引き起こすことのいずれかを行うことができる程度である。特定の態様では、RNAの二本鎖部分は、約30ヌクレオチド長未満、例えば17から29ヌクレオチド長の間である。哺乳動物細胞において、RNAiは、細胞に適切な二本鎖核酸を導入すること、または細胞中で核酸を発現させ、次にその核酸を細胞内でプロセッシングしてその中でdsRNAをもたらすことによって達成され得る。RNAiを媒介する能力のある核酸は、本明細書において「RNAi剤」と呼ばれる。RNAiを媒介する能力のある例示的な核酸は、低分子ヘアピン型RNA(shRNA)、低分子干渉RNA(siRNA)、およびマイクロRNA前駆体である。これらの用語は周知であり、当技術分野におけるそれらの意味と一致して本明細書に使用される。siRNAは、典型的には、相互にハイブリダイズされて二重鎖を形成する2つの別々の核酸鎖を含む。例えば、標準的な核酸合成技法を使用して、それらをインビトロ合成することができる。それらは、多種多様な修飾ヌクレオシド、ヌクレオシド類似体を含むことができ、化学的または生物学的に修飾された塩基、修飾された骨格などを含むことができる。当技術分野においてRNAiに有用であると認識されている任意の修飾を使用することができる。いくつかの修飾は、増加した安定性、細胞取り込み、効力などをもたらす。特定の態様では、siRNAは、約19ヌクレオチド長の二重鎖および1~5ヌクレオチド長の1または2つの3'オーバーハングを含み、オーバーハングは、デオキシリボヌクレオチドから構成され得る。shRNAは、主に非自己相補性領域によって分離された2つの相補的部分を含む一本の核酸鎖を含む。相補性部分はハイブリダイズして二重鎖構造を形成し、非自己相補性領域は、二重鎖の片方の鎖の3'末端ともう一方の鎖の5'末端とを繋ぐループを形成する。shRNAは、細胞内プロセッシングを受けてsiRNAを産出する。

10

20

30

【0130】

用語「選択マーカー」は、発現されたときに、細胞傷害剤もしくは細胞増殖抑制剤に対する耐性(例えば抗生物質耐性)、原栄養性、またはタンパク質を発現する細胞をタンパク質を発現しない細胞と識別するための基礎として使用することができる特定のタンパク質の発現のような選択可能な表現型を細胞に付与する、遺伝子、RNA、またはタンパク質を表す。蛍光もしくは発光タンパク質のような、発現を容易に検出できるタンパク質、または着色、蛍光、もしくは発光物質(「検出可能なマーカー」)を産生する基質に作用する酵素が、選択マーカーのサブセットを構成する。通常、多能性細胞に選択的または独占的に発現される遺伝子にネイティブな発現制御エレメントに連結した選択マーカーの存在は、多能性状態にリプログラミングされている体細胞を特定および選択することを可能にする。ネオマイシン耐性遺伝子(neo)、ピューロマイシン耐性遺伝子(puro)、グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ(gpt)、ジヒドロ葉酸レダクターゼ(DHFR)、アデノシンデアミナーゼ(ada)、ピューロマイシン-N-アセチルトランスフェラーゼ(PAC)、ヒグロマイシン耐性遺伝子(hyg)、多剤耐性遺伝子(mdr)、チミジンキナーゼ(TK)、ヒポキサンチン-グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ(HPRT)、およびhisD遺伝子のような多様な選択マーカー遺伝子を使用することができる。検出可能なマーカーには、緑色蛍光タンパク質(GFP)、青色、サファイア、黄色、赤色、橙色、およびシアン蛍光タンパク質ならびにこれらのいずれかのバリエーションが含まれる。ルシフェラーゼ(例えば、ホタルまたはウミシイタケ(Renilla)ルシフェラーゼ)のような発光タンパク質も有用である。当業者に明白なように、本明細書に使用される用語「選択マーカー」は

40

50

、遺伝子または遺伝子発現産物、例えばコードされるタンパク質を表すことができる。

【0131】

用語「小分子」は、複数の炭素炭素結合および1500ダルトン未満の分子量を有する有機化合物を表す。典型的には、そのような化合物は、タンパク質との構造的相互作用、例えば水素結合形成を媒介する1つまたは複数の官能基を含み、典型的には、少なくとも1つのアミン、カルボニル、ヒドロキシルまたはカルボキシル基を含み、いくつかの態様では、少なくとも2つの官能化学基を含む。小分子作用物質は、1つまたは複数の化学官能基および/またはヘテロ原子で置換された、環状炭素もしくは複素環構造および/または芳香族もしくは多環芳香族構造を含み得る。

【0132】

本明細書に使用される用語「ポリペプチド」は、アミノ酸のポリマーを表す。用語「タンパク質」および「ポリペプチド」は、本明細書において互換的に使用される。ペプチドは、典型的には約2から60アミノ酸長の間の、相対的に短いポリペプチドである。本明細書に使用されるポリペプチドは、典型的には、タンパク質中から最も一般的に見出される20種のL-アミノ酸のようなアミノ酸を含む。しかし、当技術分野において公知の他のアミノ酸および/またはアミノ酸類似体を使用することができる。ポリペプチド中の1つまたは複数のアミノ酸は、例えば糖質基、リン酸基、脂肪酸基、コンジュゲーション、官能化などのためのリンカーのような化学実体の付加によって修飾され得る。共有結合または非共有結合した非ポリペプチド部分を有するポリペプチドは、依然、「ポリペプチド」と見なされる。例示的な修飾には、グリコシル化およびパルミトイル化が含まれる。ポリペプチドは、天然起源から精製され、組換えDNA技法を使用して産生され、従来の固相ペプチド合成などのような化学的手段により合成され得る。本明細書に使用される用語「ポリペプチド配列」または「アミノ酸配列」は、ポリペプチドを生化学的に特徴付けるポリペプチド物質自体および/または配列情報（すなわち、アミノ酸名の略語として使用される文字または三文字コードの連続）を表すことができる。本明細書に示されるポリペプチド配列は、特に記載しない限り、N末端からC末端方向に表示される。

【0133】

ポリペプチドまたは核酸配列を指すときの用語「異種」は、例えば、完全長ポリペプチドまたは核酸配列と少なくとも80%、85%、90%、95%、98%、または99%の配列同一性を有するポリペプチドまたは核酸配列であることもできる。いくつかの態様では、異種は、完全長ポリペプチドまたは核酸配列のフラグメントであることができる。いくつかの態様では、異種は、天然に存在するスプライス異種であることもできる。例えば、Suv39h1（遺伝子ID:6839）は、2つの選択的スプライシングされた異種を有し、異種1は、Suv39h1アイソフォーム1タンパク質（長鎖転写物であり、より長いアイソフォームをコードする）を産生し、かつmRNA NM_001282166.1、およびタンパク質NP_001269095.1に対応し、一方で、異種2は、5'UTRが異なるSuv39h1アイソフォーム2を産生し、5'コード領域の一部を欠如しており、かつ異種1と比較して代替的な開始コドンで翻訳を開始する。コードされるSuv39h1アイソフォーム（2）タンパク質は、アイソフォーム1と比較して短く、かつ別個のN末端を有する。Suv39h1アイソフォーム2についてのmRNAは、NM_003173.3であり、これは、NP_003164.1に対応するアイソフォーム2タンパク質をコードする。異種は、完全長ポリペプチドまたは完全長核酸配列の少なくとも50%の長さのフラグメントと、少なくとも80%、85%、90%、95%、98%、または99%の配列同一性を有するポリペプチドまたは核酸配列であることもでき、その際、フラグメントは、関心対象の活性を有する完全長野生型ポリペプチドまたは核酸配列の少なくとも50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%、98%、または99%の長さである。例えば、KDM4dポリペプチドまたはKDM4d核酸配列と比較して、SCNTの効率を増加させる能力を同じまたは同等の程度有するKDM4dの異種である。

【0134】

用語「機能的フラグメント」または「生物学的に活性なフラグメント」は、本明細書において互換的に使用され、フラグメントの元となるポリペプチドよりもサイズが小さなア

10

20

30

40

50

ミノ酸配列を有するポリペプチドを表し、その際、機能的フラグメントのポリペプチドは、フラグメントの元となるポリペプチドの少なくとも約50%、または60%または70%または80%または90%または100%の、または100%よりも大きい、例えば1.5倍、2倍、3倍、4倍の、または4倍よりも大きい、生物学的作用を有する。機能的フラグメントポリペプチドは、減少した抗原性、増加したDNA結合性（転写因子の場合のように）、または変更されたRNA結合性（RNAの安定性もしくは分解を調節する場合のように）を含むことができる追加的な機能を有し得る。いくつかの態様では、生物学的に活性なフラグメントは、フラグメントの元となるポリペプチドと実質的に相同である。理論に限定されることなく、KDM4ヒストンデメチラーゼKDM4Aの活性化剤の機能的フラグメントの例示的な例は、同じ方法を使用し同じ条件下で、SEQ ID NO:9のアミノ酸を含むKDM4Aポリペプチドと比較して、少なくとも約50%、または60%または70%または80%または90%または100%の、または100%よりも大きい、例えば1.5倍、2倍、3倍、4倍の、または4倍よりも大きい、SCNTの効率を増加させる能力を有する、SEQ ID NO:9のフラグメントを含む（例えばその際、フラグメントは、SEQ ID NO:9の少なくとも50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%、98%、または99%の長さである）。いくつかの態様では、SEQ ID NO:9の生物学的に活性なフラグメントは、SEQ ID NO:9のC末端またはN末端に、少なくとも1つ、または少なくとも2つ、または少なくとも2~10個、または少なくとも10~20個、または少なくとも20~50個、または少なくとも50~100個のアミノ酸を欠如している。いくつかの態様では、SEQ ID NO:9の生物学的に活性なフラグメントは、SEQ ID NO:9のC末端およびN末端の両方に、少なくとも1つ、または少なくとも2つ、または少なくとも2~10個、または少なくとも10~20個、または少なくとも20~50個、または少なくとも50~100個のアミノ酸を欠如している。いくつかの態様では、例えば、Antony et al., Nature, 2013に開示されるような、SEQ ID NO:12のアミノ酸1~424番を含むSEQ ID NO:12の生物学的フラグメントのような、SEQ ID NO:12のKDM4Dの生物学的に活性なフラグメントを使用することができる。いくつかの態様では、SEQ ID NO:12の生物学的に活性なフラグメントは、SEQ ID NO:12のアミノ酸1~424番（例えば、SEQ ID NO:13に対応するフラグメント）を含む。いくつかの態様では、SEQ ID NO:12の生物学的に活性なフラグメントは、SEQ ID NO:12のアミノ酸1~424番のC末端またはN末端に、少なくとも1つ、または少なくとも2つ、または少なくとも2~10個、または少なくとも10~20個、または少なくとも20~50個、または少なくとも50~100個のアミノ酸も欠如している。いくつかの態様では、SEQ ID NO:12の生物学的に活性なフラグメントは、SEQ ID NO:12のアミノ酸1~424番のC末端およびN末端の両方に、少なくとも1つ、または少なくとも2つ、または少なくとも2~10個、または少なくとも10~20個、または少なくとも20~50個、または少なくとも50~100個のアミノ酸も欠如している、SEQ ID NO:12のアミノ酸1~424番を含む。

10

20

30

40

50

【0135】

核酸配列に関して本明細書に使用される用語「機能的フラグメント」または「生物学的に活性なフラグメント」は、フラグメントの元となる核酸配列よりもサイズが小さな核酸配列を表し、その際、該核酸配列は、フラグメントの元となる生物学的に活性なフラグメントの少なくとも約50%、または60%または70%または80%または90%または100%の、または100%よりも大きい、例えば1.5倍、2倍、3倍、4倍の、または4倍よりも大きい、同じ生物学的作用を有する。理論に限定されることなく、KDM4ヒストンデメチラーゼ活性化剤KDM4Aの核酸配列の機能的フラグメントの例示的な例は、同じ方法を使用し同じ条件下で、SEQ ID NO:1のKDM4A核酸配列と比較して、少なくとも約50%、または60%または70%または80%または90%または100%の、または100%よりも大きい、例えば1.5倍、2倍、3倍、4倍の、または4倍よりも大きい、ヒトSCNTの効率を増加させる能力を有する、SEQ ID NO:1のフラグメントを含む（例えばその際、フラグメントは、SEQ ID NO:1の少なくとも50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%、98%、または99%の長さである）。

【0136】

単離された細胞に適用されるような用語「処置する」、「処置すること」、「処置」などは、細胞を任意の種類の工程もしくは条件に供すること、または細胞に任意の種類の操

作もしくは手順を行うことを含む。対象に適用されるような該用語は、個体に医学的または外科的な注意、ケア、または管理を提供することを表す。個体は、たいてい病気である（医学／外科的注意を必要とする疾患または他の状態を患う）もしくは負傷している、または集団の平均的メンバーと比較して病気になるリスクが増加しており、かつそのような注意、ケア、もしくは管理の必要がある。本明細書において「個体」は、「対象」と互換的に使用される。本発明の任意の態様では、「個体」は、ヒト、例えば、細胞療法が有用な（「指示される」）疾患を患う、またはそのリスクがあるヒトであり得る。

【0137】

発情周期に関して本明細書に使用される用語「同期化された」または「同期的な」は、当業者に周知の生殖補助技術を表す。これらの技術は、以前の節に引用された参考文献に十分に説明されている。典型的には、エストロゲンおよびプロゲステロンホルモンは、雌性動物の発情周期を胚の発生周期と同期化するために利用される。本明細書に使用される用語「発生周期」は、本発明の胚、および胚内で各細胞分裂の間に存在する時間を表す。この時間は、胚にとって予測可能であり、レシピエント動物の発情周期と同期化することができる。

10

【0138】

核DNA配列に関連して本明細書に使用される用語「実質的に類似する」は、ほぼ同一の2つの核DNA配列を表す。2つの配列は、核DNAの複製の間に通常起こるコピー誤差だけ異なり得る。実質的に類似のDNA配列は、好ましくは97%よりも大きく同一であり、より好ましくは98%よりも大きく同一であり、最も好ましくは99%よりも大きく同一である。同一性は、2つの配列の中で同一な残基数を残基の総数で割り、結果に100を掛けることによって測定される。したがって、正確に同じ配列の2つのコピーは、100%の同一性を有し、一方であまり高度に保存されていない欠失、付加、または置換を有する配列は、より低い程度の同一性を有する。当業者は、配列比較を行って、配列同一性を決定するためにいくつかのコンピュータプログラムが利用可能であることを認識している。

20

【0139】

用語「より低い」、「低下した」、「低下」または「減少する」または「阻害する」は、全て、本明細書において統計的に有意な量だけの減少を意味するために一般的に使用される。しかし、誤解を避けるために、「より低い」、「低下した」、「低下」または「減少する」または「阻害する」は、参照レベルと比較して少なくとも10%の減少、例えば少なくとも約20%、または少なくとも約30%、または少なくとも約40%、または少なくとも約50%、または少なくとも約60%、または少なくとも約70%、または少なくとも約80%、または少なくとも約90%の減少または最大100%以下の減少（すなわち参照試料と比較して非存在のレベル）、または参照レベルと比較して10~100%の間の任意の減少を意味する。

30

【0140】

用語「増加した」、「増加する」または「高まる」または「活性化する」は、全て、本明細書において統計的に有意な量だけの増加を一般的に意味するために使用され、任意の誤解を避けるために、用語「増加した」、「増加する」または「高まる」または「活性化する」は、参照レベルと比較して少なくとも10%の増加、例えば少なくとも約20%、または少なくとも約30%、または少なくとも約40%、または少なくとも約50%、または少なくとも約60%、または少なくとも約70%、または少なくとも約80%、または少なくとも約90%または最大で100%以下の増加または参照レベルと比較して10~100%の間の任意の増加、または参照レベルと比較して少なくとも約2倍、または少なくとも約3倍、または少なくとも約4倍、または少なくとも約5倍または少なくとも約10倍の増加、または2倍~10倍以上の間の任意の増加を意味する。

40

【0141】

用語「統計的に有意な」または「有意に」は、統計的有意性を表し、マーカーの正常濃度から2標準偏差（2SD）よりも下を一般的に意味する。本用語は、差があるという統計的証拠を表す。それは、帰無仮説が実際に真である場合に帰無仮説を棄却する決定をなす確

50

率として定義される。決定は、多くの場合にp値を使用してなされる。

【0142】

本明細書に使用される用語「含んでいる」または「含む」は、本発明に不可欠な組成物、方法、およびそれらの各々の成分に関して使用されるが、不可欠であろうとなかろうと、それでも不特定の要素を包含する。

【0143】

本明細書に使用される用語「から本質的になる」は、所与の態様に必要とされる要素を表す。本用語は、本発明のその態様の基本的な特徴および新規または機能的な特徴に実質的に影響しない追加的な要素の存在を許す。

【0144】

用語「からなる」は、態様のその記載に列挙されない任意の要素を排除する、本明細書記載の組成物、方法、およびそれらの各々の成分を表す。

【0145】

本明細書および添付の特許請求の範囲に使用される、単数形「1つの(a)」、「1つの(an)」、および「該(the)」は、文脈がはっきりと他のことを示さない限り、複数の言及を含む。したがって、例えば「該方法」の言及は、本明細書記載の、および/または本開示などを読むと当業者に明らかになる種類の、1つまたは複数の方法、および/または段階を含む。

【0146】

前述の詳細な説明および以下の実施例は、単なる例証であり、本発明の範囲に対する限定としてとらえるべきではないことが理解されている。開示された態様に対する当業者に明らかな様々な変形および改変が、本発明の精神および範囲から逸脱せずに加えられる。さらに、特定される全ての特許、特許出願、および刊行物は、本発明に関連して使用され得る、例えばそのような刊行物の中で記載される方法論を説明および開示する目的で、参照により本明細書に明白に組み入れられる。これらの刊行物は、本出願の出願日前のそれらの開示内容のためだけに提供される。これに関して何も、本発明者らが、先行発明のために、または任意の他の理由でそのような開示に先行する権利がないと認めるものとして解釈されるべきではない。日付に関する全ての記述またはこれらの文書の内容についての表現は、本出願人が入手可能な情報に基づくものであり、これらの文書の日付または内容の正確性に関するいかなる容認も構成するものではない。

【0147】

KDM4ヒストンデメチラーゼ活性化剤

一局面では、本発明は、ヒトSCNTの効率を増加させる方法であって、ドナーヒト体細胞、レシピエントヒト卵母細胞、ハイブリッド卵母細胞（例えば、融合もしくは活性化前のドナー遺伝物質を含むヒト除核卵母細胞）またはヒトSCNT胚（すなわち、ドナー核と除核卵母細胞との融合後）の核または細胞質を、ヒストンメチル化を阻害する、特にH3K9メチル化を阻害する、特にH3H9me3トリメチル化を阻害する活性物質と接触させる段階を含む方法を提供する。いくつかの態様では、活性物質は、KDM4ヒストンデメチラーゼ活性化剤である。

【0148】

いくつかの態様では、本明細書開示の方法、組成物およびキットに有用なKDM4ヒストンデメチラーゼ活性化剤は、KDM4ファミリーのヒストンデメチラーゼをコードする遺伝子の発現を増加させる、またはヒトKDM4ファミリーのヒストンデメチラーゼ、例えば、ヒトKDM4A、ヒトKDM4B、ヒトKDM4CまたはヒトKDM4Dの活性を増加させる活性物質である。いくつかの態様では、活性物質は、KDM4D(JMJD2D)またはKDM4A(JMJD2A)の発現または活性を増加させる。

【0149】

いくつかの態様では、本明細書開示の方法、組成物およびキットに有用なKDM4ヒストンデメチラーゼ活性化剤は、KDM4Aポリペプチドをコードする核酸剤もしくはKDM4Aポリペプチド、またはその異種もしくは生物学的に活性なフラグメントである。本明細書に使用さ

10

20

30

40

50

れるヒトKDM4Aヌクレオチド配列は、Genbankアクセッション番号：NM_014663.2に対応し、SEQ ID NO:1を表す。KDM4Aは、リシン（K）特異的デメチラーゼ4A、JMJD2、JMJD2A、「jumonjiドメイン含有2」、または「jumonjiドメイン含有2A」としても公知である。ヒトKDM4Aタンパク質は、Genbankアクセッション番号：NP_055478.2（SEQ ID NO:9）に対応する。したがって、KDM4Aのタンパク質配列は、以下の通りである。

MASESETLNPSARIMTFYPTMEEFRNFSRYIAYIESQGAHRAGL

AKVVPPKEWKPRASYDDIDDLVIPAPIQQLVLTGQSGLFTQYNIQKKAMTVREFRKIAN
SDKYCTPRYSEFEELERKYWKNLTFNPPIYGADVNGTLYEKHVDEWNIGRLRLTILDLV
EKESGITIEGVNTPYLYFGMWKTSFAWHTEDMDLYSINYLHFGEPKSWYSVPPEHGKR
LERLAKGFFPGSAQSCEAFLRHKMTLISPLMLKKYGIPFDKVTQEAGEFMITFPYGYH
AGFNHGFNCAESTNFATRRWIEYGKQAVLCSCRKDMVKISMDVFVRKFQPERYKLWKA
GKDNTVIDHTLPTPEAAEFLKESELPPRAGNEEECEPEEDMEGVEDGEEGDLKTSIAKH
RIGTKRHRVLCLEIPQEVQSSELPKEDLSSEQYEMTECPAALAPVRPTHSSVRQVEDG
LTFPDYSDSTEVKFEELKNVKLEEEDEEEQAAAAALDLVNPASVGGRLVFGSGSKKS
SSSLGSGSSRDSISSDSETPLESCRAQGQTGVLTVHSYAKGDGRVTVGEPCTRKKGS
AARSFSERELAEVADEYMFSLLEENKSKSKRRQPLSKLPRHHPLVLQECVSDDETSEQL
TPEEEAEETEAWAKPLSQLWQNRPPNFEEAEKEFNETMAQQAPHCAVCMIFQTYHQVEF
GGFNQNCGNASDLAPQKQRTKPLIPEMCFTSTGCSTDINLSTPYLEEDGTSLVSCCK
CSVRVHASCYGVPPAKASEDWMCSRCSANALEEDCCCLSLRGGALQRANDDRVHVSC
AVAILEARFVNIAERSPVDVSKIPLPRFKLKCIFCKKRRKRTAGCCVQCSHGRCPTAF
HVSCAQAGVMMQPDWPFVVFITCFRHKIPNLERAKGALQSITAGQKVISKHKNGRF
YQCEVRLTTETFYEVNFDDGSFSDNLYPEDIVSQDCLQFGPPAEGEVQVRWTDGQV
YGAKFVASHPIQMYQVEFEDGSQVLVVRDDVYTLDEELPKRVKSRLSVASDMRFNEIF
TEKEVKQEKKRQVRVINSRYREDYIEPALYRAIME（SEQ ID NO:9）

10

20

【0150】

いくつかの態様では、活性物質は、ヒトKDM4Aの核酸配列（SEQ ID NO:1）を含む、またはSEQ ID NO:1の対応する配列と比較してヒトSCNTの効率を同程度もしくはより大きな程度増加させる、それと少なくとも80%の配列同一性（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98%、または少なくとも約99%の配列同一性）の、その生物学的に活性なフラグメントもしくはホモログもしくは異種である。いくつかの態様では、組成物は、SEQ ID NO:1の対応するヒトKDM4A核酸配列、またはSEQ ID NO:1の核酸配列と比較して、ヒトSCNTの効率を同程度もしくはより大きな程度増加させる、その生物学的に活性なフラグメントを含む。

30

【0151】

いくつかの態様では、本明細書開示の方法に使用するためのヒストンデメチラーゼ活性化剤は、任意のヒトKDM4Aポリペプチドをコードする、またはヒトKDM4Aポリペプチドの異種もしくは生物学的に活性なフラグメントをコードする、核酸剤より選択される。いくつかの態様では、本明細書開示の方法に使用するためのヒストンデメチラーゼ活性化剤は、ヒトKDM4Aポリペプチド、またはそのようなヒトKDM4Aポリペプチドの異種もしくは生物学的に活性なフラグメントより選択される。当業者が、本明細書開示の方法および組成物に使用するために、ヒトKDM4Aポリペプチドの適切なヒトホモログ、およびそのようなヒトホモログをコードする核酸を特定できることが、本発明に包含されている。

40

【0152】

いくつかの態様では、本明細書開示の方法、組成物およびキットに有用なKDM4ヒストンデメチラーゼ活性化剤は、KDM4Bポリペプチドをコードする核酸剤もしくはKDM4Bポリペプチド、またはその異種もしくは生物学的に活性なフラグメントである。本明細書に使用されるヒトKDM4B核酸は、Genbankアクセッション番号：NM_015015.2に対応し、本明細書開示のSEQ ID NO:2を表す。KDM4Bは、リシン（K）特異的デメチラーゼ4B、JMJD2Bまたは「jumonjiドメイン含有2B」、KIAA0876、TDRD14B、または「チューダードメイン含有14B」としても公知である。ヒトKDM4Bタンパク質は、Genbankアクセッション番号：NP_055830.1（SEQ ID NO:10）に対応する。したがって、KDM4Bのタンパク質配列は、以下の通りである。

MGSEDHGAQNPSCKIMTFRPTMEEFKDFNKYVAYIESQGAHRAG
LAKIIPPKEWKPRQTYDDIDDVVIPAPIQQVVTGQSGLFTQYNIQKKAMTVGEYRRLA
NSEKYCTPRHQDFDDLKRYWKNLTFVSPYIGADISGSLYDDDVAQWNIGSLRTILDM
VERECGTIIIEGVNTPYLYFGMWKTTFAWHTEDMDLYSINYLHFGEPKSWYAIIPPEHGK
RLERLAIGFFPGSSQGCDAFLRHKMTLISPIILKKYGIPFSRITQEAGEFMITFPYGY
HAGFNHGFNCAESTNFATLRWIDYGKVATQCTCRKDMVKISMDVFVRILQPERYELWK
QGKDLTVLDHTRPTALTSPELSSWSASRASLKAKLLRRSHRKRSPKPKPKPEDPKFPG
EGTAGAALLEEAGGSVKEEAGPEVDPEEEEEEPQPLPHGREAEAGEEDGRGKLRPTKA
KSERKKKSFGLLPPQLPPPPAHFPSEALWLPSPLEPPVLGPGPAAMEESPLPAPLNV
VPPEVPSEELEAKPRPIIPMLYVVRPGKAAFNQEHVSCQQAFAHFQAQKGPTWKEPVS
PMELTGPEDEGAASSGAGRMETKARAGEGQAPSTFSKLKMEIKKSRRHPLGRPPTRSPL
SVVKQEASSDEEASPFSGEEDVSDPDALRPLLSLQWKNRAASFQAERKFNAAAARTEP
YCAICTLFYPYCQALQTEKEAPIASLGEGCPATLPSKSRQKTRPLIPEMCFSTSGGENT
EPLPANSYIGDDGTSPLIACGKCCQLQVHASCYGIRPELVNEGWTCSRCAAHAWTAECCL
CNLRGGALQMTTDRRWIHWICAIAPPEARFLNVIERHPVDISAIPEQRWKLKCVYCR
KRMKKVSGACIQCSYEHCTSFHVTCAHAAGVLMPEPDDWPYVVSITCLKHKSGGHAVQ
LLRAVSLGQVVITKNRNGLYRCRVIGAASQTCYEVNFDDGSYSDNLYPESITSRDCV
QLGPPSEGELVELRWTDGNLYKAKFISSVTSYIYQVEFEDGSQTLTVKRGDIFTLEEEL
PKRVRSLSLSTGAPQEPAFSGEEAKAAKRPRVGTPLATEDSGRSQDYVAFVESLLQV
QGRPGAPF (SEQ ID NO: 10)

10

【0153】

いくつかの態様では、活性物質は、ヒトKDM4Bの核酸配列 (SEQ ID NO:2) を含む、またはSEQ ID NO:2の対応する配列と比較してヒトSCNTの効率を同程度もしくはより大きな程度増加させる、それと少なくとも80%の配列同一性 (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98%、または少なくとも約99%の配列同一性) の、その生物学的に活性なフラグメントもしくはホモログもしくは異種である。いくつかの態様では、組成物は、SEQ ID NO:2の対応するヒトKDM4B核酸配列、またはSEQ ID NO:2の核酸配列と比較して、ヒトSCNTの効率を同程度もしくはより大きな程度増加させる、その生物学的に活性なフラグメントを含む。

20

【0154】

いくつかの態様では、本明細書開示の方法に使用するためのヒストンデメチラーゼ活性化剤は、任意のヒトKDM4Bポリペプチドをコードする、またはヒトKDM4Bポリペプチドの異種もしくは生物学的に活性なフラグメントをコードする、核酸剤より選択される。いくつかの態様では、本明細書開示の方法に使用するためのヒストンデメチラーゼ活性化剤は、任意のヒトKDM4Bポリペプチド、またはそのようなヒトKDM4Bポリペプチドの異種もしくは生物学的に活性なフラグメントより選択される。当業者が、本明細書開示の方法および組成物に使用するために、ヒトKDM4Bポリペプチドの適切なヒトホモログ、およびそのようなヒトホモログをコードする核酸を特定できることが、本発明に包含されている。

30

【0155】

いくつかの態様では、本明細書開示の方法、組成物およびキットに有用なKDM4ヒストンデメチラーゼ活性化剤は、KDM4Cポリペプチドをコードする核酸剤もしくはKDM4Cポリペプチド、またはその異種もしくは生物学的に活性なフラグメントである。本明細書に使用されるヒトKDM4C核酸配列は、本明細書開示のGenbank アクセッション番号: NM_015061.3 (SEQ ID NO:3) に対応する。KDM4Cは、リシン (K) 特異的デメチラーゼC、JMJD2Cもしくは「jumonjiドメイン含有2C」、GASC1、KIAA0780、TDRD14Cまたは「チューダードメイン含有14C」としても公知である。ヒトKDM4Cタンパク質は、Genbankアクセッション番号: NP_055876.2 (SEQ ID NO:11) に対応する。したがって、KDM4Cのタンパク質配列は、以下の通りである。

40

MEVAEVESPLNPSCKIMTFRPSMEEFREFNKYLAYMESKGAHRA
GLAKVIIPKEWKPRQCYDDIDNLLIPAPIQQMVTGQSGLFTQYNIQKKAMTVKEFRQL
ANSGKYCTPRYLDYEDLERKYWKNLT FVAPIYGADINGSIYDEGVDEWNIARLNTVLD
VVEEECGISIEGVNTPYLYFGMWKTTFAWHTEDMDLYSINYLHFGEPKSWYAIIPPEHG
KRRLERLAQGFFPSSSQGCD AFLRHKMTLISPSVLKKYGIPFDKITQEAGEFMITFPYG
YHAGFNHGFNCAESTNFATVRWIDYGKVAKLCTCRKDMVKISMDIFVRKFQPDYQLW
KQGKDIYITIDHTKPTPASTPEVKAWLQRRRKVRKASRSFQCARSTSKRPKADDEEEVS
DEV DGA EVPNPD SVTDDLKVSEKSEAAVKLRNTEASSEESESSASRMQVEQNLS DHIKL
SGNSCLSTSVTEDIKTEDDKAYAYRSVPSISSEADDSIPLSSGYEKPEKSDPSELSWP
KSPESCSSVAESNGVLTEGEESDVESHGNGLEPGEIPAVPSGERNSFKVPSIAEGENK
TSKSWRHPLSRPPARSPMTLVKQQAPSDEELPEVLSIEEEVEETESWAKPLIHLWQTK
SPNFAAEQ EYNATVARMKPHCAICTLLMPYHKPDSSNEENDARWETKLDEVVTSEGKT
KPLIPEMCFIYSEENIEYSPPNAFLEEDGTSLILISCAKCCVRVHASCYGIPSHEICDG
WLCARCKRNAWTAECCLCNLRGGALKQT KNNKWAHVMC AVAVPEVRFTNVPERTQIDV
GRIPLQLRLKLCIFCRHRVKRVSGACIQCSYGRCPASFHVTC AHAAGVLMEPDDWPYV
VNITCFRHKVNPNVSKACEKVISVGQTVITKHNTRYYSRVMAVTSQTFYEV MFDD
GSFSRDTFPEDIVSRDCLKLGPPEGEVQVKWPDGKLYGAKYFGSNIAHMYQVEFED
GSQIAMKREDIYTLDEELPKRVKARFSTASDMRFEDTFYGADIIQGERKRQ RVLSSRF
KNEYVADPVYRTFLKSSSQKKCQKRQ (SEQ ID NO: 11)

10

【0156】

いくつかの態様では、活性物質は、ヒトKDM4Cの核酸配列 (SEQ ID NO:3) を含む、またはSEQ ID NO:3の対応する配列と比較してヒトSCNTの効率を同程度もしくはより大きな程度増加させる、それと少なくとも80%の配列同一性 (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98%、または少なくとも約99%の配列同一性) の、その生物学的に活性なフラグメントもしくはホモログもしくは異種である。いくつかの態様では、組成物は、SEQ ID NO:3の対応するヒトKDM4C核酸配列、またはSEQ ID NO:3の核酸配列と比較して、ヒトSCNTの効率を同程度もしくはより大きな程度増加させる、その生物学的に活性なフラグメントを含む。

20

【0157】

いくつかの態様では、本明細書開示の方法に使用するためのヒストンデメチラーゼ活性化剤は、任意のヒトKDM4Cポリペプチドをコードする、またはヒトKDM4Cポリペプチドの異種もしくは生物学的に活性なフラグメントをコードする、核酸剤より選択される。いくつかの態様では、本明細書開示の方法に使用するためのヒストンデメチラーゼ活性化剤は、任意のヒトKDM4Cポリペプチド、またはそのようなヒトKDM4Cポリペプチドの異種もしくは生物学的に活性なフラグメントより選択される。当業者が、本明細書開示の方法および組成物に使用するために、ヒトKDM4Cポリペプチドの適切なヒトホモログ、およびそのようなヒトホモログをコードする核酸を特定できることが、本発明に包含されている。

30

【0158】

いくつかの態様では、本明細書開示の方法、組成物およびキットに有用なKDM4ヒストンデメチラーゼ活性化剤は、KDM4Dポリペプチドをコードする核酸剤もしくはKDM4Dポリペプチド、またはその異種もしくは生物学的に活性なフラグメントである。本明細書に使用されるヒトKDM4D核酸配列は、Genbank アクセッション番号: NM_018039.2に対応し、本明細書開示のSEQ ID NO:4を表す。KDM4Dは、リシン (K) 特異的デメチラーゼ4D、FLJ10251、J MJD2Dまたは「jumonjiドメイン含有2D」としても公知である。ヒトKDM4Dタンパク質は、Genbankアクセッション番号: NP_060509.2 (SEQ ID NO:12) に対応する。したがって、KDM4Dのタンパク質配列は、以下の通りである。

40

METMKSKANCAQNPNCNIMI FHPTKEEFNDFDKY IAYMESQGAH
 RAGLAKIIPPKEWKARETYDNI SEIL IATPLQQVASGRAGVFTQYHKKKKAMTVGEYR
 HLANSKKYQTPPHQNFEDLERKYWKNRIYNSPIYGADISGSLFDENTKQWNLGHLGTI
 QDLLEKECGVVIEGVNTPYLYFGMWKTTFAWHTEDMDLYSINYHLHGEPKTWYVVPPE
 HGQRLERLARELFPGSSRGCGAFLRHKVALISPTVLKENGIPFNRTQEAGEFMVTFP
 YGYHAGFNHGFNCAEAINFATPRWIDYGKMASQCSCGEARVTFSMDAFVRILQPERYD
 LWKRQDRAVVDHMEPRVPASQELSTQKEVQLPRAALGLRQLPSHWARHSPWPMAAR
 SGTRCHTLVCSSLPRRSVSGTATQPRAAAVHSSKKPSSTPSSTPGPSAQIIHPSNGR
 RGRGRPPQKLRAQELTLQTPAKRPELLAGTTCTASGPEPEPLPEDGALMDKPVPLSPGL
 QHPVKASGCSWAPVP (SEQ ID NO: 12)

【 0 1 5 9 】

10

いくつかの態様では、活性物質は、ヒトKDM4Dの核酸配列 (SEQ ID NO:4) を含む、またはSEQ ID NO:4の対応する配列と比較してSCNTの効率を同程度もしくはより大きな程度増加させる、それと少なくとも80%の配列同一性 (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98%、または少なくとも約99%の配列同一性) の、その生物学的に活性なフラグメントもしくはホモログもしくは異種である。いくつかの態様では、組成物は、SEQ ID NO:4の対応するヒトKDM4D核酸配列、またはSEQ ID NO:4の核酸配列と比較して、ヒトSCNTの効率を同程度もしくはより大きな程度増加させる、その生物学的に活性なフラグメントを含む。

【 0 1 6 0 】

20

いくつかの態様では、ドナーヒト体細胞、レシピエントヒト卵母細胞、ハイブリッド卵母細胞 (例えば、融合もしくは活性化前のドナー遺伝物質を含むヒト除核卵母細胞) またはヒトSCNT胚 (すなわち、ドナー核と除核卵母細胞との融合後) と接触する活性物質は、SEQ ID NO:9のヒトKDM4Aタンパク質、もしくはSEQ ID NO:10のヒトKDM4Bタンパク質、もしくはSEQ ID NO:11のヒトKDM2Cタンパク質、もしくはSEQ ID NO:12のヒトKDM4Dタンパク質の発現を増加させ、かつ/あるいはSEQ ID NO:1の対応するヒトKDM4A核酸配列、SEQ ID NO:2の対応するヒトKDM4B核酸配列、SEQ ID NO:3の対応するヒトKDM4C核酸配列、SEQ ID NO:4の対応するヒトKDM4D核酸配列、SEQ ID NO:45に対応するヒトKDM4E核酸配列、SEQ ID NO:1~4またはSEQ ID NO:45の核酸配列と比較して、ヒトSCNTの効率を同程度もしくはより大きな程度増加させる (例えば、少なくとも約110%、または少なくとも約120%、または少なくとも約130%、または少なくとも約140%、または少なくとも約150%、または150%よりも大きく増加させる)、SEQ ID NO:1~4またはSEQ ID NO:45の生物学的に活性なフラグメントの任意の1つまたは組み合わせを含む。

30

【 0 1 6 1 】

40

いくつかの態様では、SEQ ID NO:12の生物学的に活性なフラグメントは、Antony et al., Nature, 2013に開示されるような、SEQ ID NO:12のアミノ酸1~424番を含む。いくつかの態様では、SEQ ID NO:12の生物学的に活性なフラグメントは、SEQ ID NO:12のアミノ酸1~424番のC末端またはN末端に、少なくとも1つ、または少なくとも2つ、または少なくとも2~10個、または少なくとも10~20個、または少なくとも20~50個、または少なくとも50~100個のアミノ酸も欠如している、SEQ ID NO:12のアミノ酸1~424番を含む。いくつかの態様では、SEQ ID NO:12の生物学的に活性なフラグメントは、SEQ ID NO:12のアミノ酸1~424番のC末端およびN末端の両方に、少なくとも1つ、または少なくとも2つ、または少なくとも2~10個、または少なくとも10~20個、または少なくとも20~50個、または少なくとも50~100個のアミノ酸も欠如している、SEQ ID NO:12のアミノ酸1~424番を含む。いくつかの態様では、SEQ ID NO:12の生物学的に活性なフラグメントは、SEQ ID NO:64を含み、その際、SEQ ID NO:13のタンパク質配列は：

METMKSKANCAQNPNCNIMIFHPTKEEFNDFDKYIAYMESQGAH
RAGLAKIIPPKEWKARETYDNISEILIATPLQQVASGRAGVFTQYHKKKKAMTVGEYR
HLANSKKYQTPPHQNFEDLERKYWKNRIYNSPIYGADISGSLFDENTKQWNLGHLGTI
QDLLEKECGVVIEGVNTPYLYFGMWKTTFAWHTEDMDLYSINYHLHGEPKWTWYVVPPE
HGQRLERLARELFPGSSRGCGAFLRHKVALISPTVLKENGIPFNRTQEAGEFMVTFP
YGYHAGFNHGFNCAEAINFATPRWIDYGKMASQCSCGEARVTFSMDFVRILQPERYD
LWKRQDRAVVDHMEPRVPASQELSTQKEVQLPRRAALGLRQLPSHWARHSPWPMAAR
SGTRCHTLVCSSLPRRSVAVSGTATQPRAAAV (SEQ ID NO: 13)

を含む。

【0162】

いくつかの態様では、SEQ ID NO:12の生物学的に活性なフラグメントは、SEQ ID NO:13
のC末端に少なくとも1つ、または少なくとも2つ、または少なくとも2～10個、または少な
くとも10～20個、または少なくとも20～50個のアミノ酸も欠如しているSEQ ID NO:13のア
ミノ酸を含む。いくつかの態様では、SEQ ID NO:12の生物学的に活性なフラグメントは、
SEQ ID NO:13のN末端に少なくとも1つ、または少なくとも2つ、または少なくとも2～10個
、または少なくとも10～20個、または少なくとも20～50個のアミノ酸も欠如しているSEQ
ID NO:13のアミノ酸を含む。

【0163】

いくつかの態様では、本明細書開示の方法、組成物およびキットに使用するためのヒス
トンデメチラーゼ活性化剤は、任意のヒトKDM4Dポリペプチドをコードする、またはヒトK
DM4Dポリペプチドの異種もしくは生物学的に活性なフラグメントをコードする、核酸剤より
選択される。いくつかの態様では、本明細書開示の方法に使用するためのヒストンデメ
チラーゼ活性化剤は、任意のヒトKDM4Dポリペプチド、またはそのようなヒトKDM4Dポリペ
プチドの異種もしくは生物学的に活性なフラグメントより選択される。当業者が、本明細
書開示の方法および組成物に使用するために、ヒトKDM4Dポリペプチドの適切なヒトホモ
ログ、およびそのようなヒトホモログをコードする核酸を特定できることが、本発明に包
含されている。

【0164】

いくつかの態様では、本明細書開示の方法、組成物およびキットに有用なKDM4ヒストン
デメチラーゼ活性化剤は、KDM4Eポリペプチドをコードする核酸剤、またはKDM4Eポリペ
プチド、またはその異種もしくは生物学的に活性なフラグメントである。本明細書に使用さ
れるヒトKDM4E核酸は、Genbankアクセッション番号：NM_001161630.1に対応し、本明細書
開示のSEQ ID NO:45を表す。KDM4Eは、リシン（K）特異的デメチラーゼ4E、JMJD2Eまたは
「jumonjiドメイン含有2E」、KDM4DL、または「リシン（K）特異的デメチラーゼ4D様」と
しても公知である。ヒトKDM4Bタンパク質は、Genbankアクセッション番号：NP_001155102
.1（SEQ ID NO:46）に対応する。したがって、ヒトKDM4Eのタンパク質配列は、以下の通
りである。

MKSVHSSPQNTSHTIMTFYPTMEEFADFNTYVAYMESQGAHQAG
LAKVIPPKEWKARQMYDDIEDILIATPLQQVTSQGQGVFTQYHKKKKAMRVGQYRRLA
NSKKYQTPPHQNFADLEQRYWKSHPGNPPIYGADISGSLFEESTKQWNLGHLGTILD
LEQECGVVIEGVNTPYLYFGMWKTTFAWHTEDMDLYSINYLHFGEPKWTWYVVPPEHGQ
HLERLARELFPDISRGCEAFLRHKVALISPTVLKENGIPFNCMTQEAGEFMVTFPYGY
HAGFNHGFNCAEAINFATPRWIDYGKMASQCSCGESTVTFSMDFVRIVQPESYELWK
HRQDLAIVEHTEPRVAESQELSNWRDDIVLRRALGLRLLPNLTAQCPTQPVSSGH
CYNPKGCGTDAVPGSAFQSSAYHTQTQSLTLGMSARVLLPSTGWSGSGRGRGRGQGG
CSRGRGHGCTRELGTTEPTVQPASKRRLMLMGTRSRAQGHRPQLPLANDLMTNLSL (SEQ ID NO:
46)

【0165】

いくつかの態様では、活性物質は、ヒトKDM4Eの核酸配列（SEQ ID NO:45）を含む、ま
たはSEQ ID NO:45の対応する配列と比較してヒトSCNTの効率を同程度またはより大きな程
度増加させる、それと少なくとも80%の配列同一性（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98%、または少なくとも

約99%の配列同一性)の、その生物学的に活性なフラグメントもしくはホモログもしくは異種である。いくつかの態様では、組成物は、SEQ ID NO:45の対応するヒトKDM4E核酸配列、またはSEQ ID NO:45の核酸配列と比較して、ヒトSCNTの効率を同程度もしくはより大きな程度増加させる、その生物学的に活性なフラグメントを含む。

【0166】

いくつかの態様では、本明細書開示の方法に使用するためのヒストンデメチラーゼ活性化剤は、任意のヒトKDM4Eポリペプチドをコードする、またはヒトKDM4Eポリペプチドの異種もしくは生物学的に活性なフラグメントをコードする、核酸剤より選択される。いくつかの態様では、本明細書開示の方法に使用するためのヒストンデメチラーゼ活性化剤は、任意のヒトKDM4Eポリペプチド、またはそのようなヒトKDM4Eポリペプチドの異種もしくは生物学的に活性なフラグメントより選択される。当業者が、本明細書開示の方法および組成物に使用するために、ヒトKDM4Eポリペプチドの適切なヒトホモログ、およびそのようなヒトホモログをコードする核酸を特定できることが、本発明に包含されている。

【0167】

いくつかの態様に使用されるように、本明細書開示の方法に使用するためのヒストンデメチラーゼ活性化剤は；

AOF (LSD1), AOF1 (LSD2), FBXL11

(JHDM1A), Fbxl10 (JHDM1B), FBXL19 (JHDM1C), KIAA1718 (JHDM1D), PHF2 (JHDM1E),

PHF8 (JHDM1F), JMJD1A (JHDM2A), JMJD1B (JHDM2B), JMJD1C (JHDM2C), **KDM4A**

(JMJD2A; JHDM3A), **KDM4B** (JMJD2B; JHDM3B), **KDM4C** (JMJD2C; JHDM3C), **KDM4D**

(JMJD2D; JHDM3D), **KDM4E** (JMJD2E), RBP2 (JARID1A), PLU1 (JARID1B), SMCX (JARID1C),

SMCY (JARID1D), Jumonji (JARID2), UTX (UTX), UTY (UTY), JMJD3 (JMJD3), JMJD4 (JMJD4),

JMJD5 (JMJD5), JMJD6 (JMJD6), JMJD7 (JMJD7), JMJD8 (JMJD8)

からなる群のうちのいずれかより選択される。そのようなヒストンデメチラーゼ活性化剤は、その全体として参照により本明細書に組み入れられる米国特許出願公開第2011/0139145号に開示されている。

【0168】

いくつかの態様では、KDM4ヒストンデメチラーゼ活性化剤は、SEQ ID NO:9~12もしくはSEQ ID NO:46の任意のヒトKDM4ポリペプチド(ヒトKDM4A~KDM4E)の完全長ポリペプチドもしくはそのポリペプチドのフラグメントと、またはSEQ ID NO:1~4もしくはSEQ ID NO:45に対応する核酸配列の任意の1つによってコードされる完全長ポリペプチドもしくはそのポリペプチドのフラグメントと、少なくとも80%、85%、90%、95%、98%もしくは99%同一のポリペプチド異種またはポリペプチド異種をコードする核酸配列である。

【0169】

いくつかの態様では、KDM4ヒストンデメチラーゼ活性化剤は、SEQ ID NO:9~12もしくはSEQ ID NO:46のKDM4ポリペプチド(ヒトKDM4A~KDM4E)の完全長ポリペプチドもしくはそのポリペプチドのフラグメントと少なくとも80%、85%、90%、95%、98%もしくは99%同一のポリペプチド異種またはポリペプチド異種をコードする核酸配列である。いくつかの態様では、KDM4ヒストンデメチラーゼは、SEQ ID NO:9~12もしくはSEQ ID NO:46(ヒトKDM4A~KDM4E)の少なくとも20個の連続するアミノ酸のフラグメント、またはそれぞれSEQ ID NO:9~12もしくはSEQ ID NO:46(ヒトKDM4A~KDM4E)のタンパク質の効率と比較して、SCNTの効率を増加させる能力が少なくとも80%以上のような、関心対象の活性を有する、完全長野生型ポリペプチドもしくはそのドメインの少なくとも50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%、98%、もしくは99%の長さのヒトKDM4A、KDM4B、KDM4C、KDM4DもしくはKDM4Eのフラグメントである。

【0170】

いくつかの態様では、ヒトKDM4Aの生物学的に活性なフラグメントは、同じ方法を使用して同じ条件下で、SEQ ID NO:9のアミノ酸を含むKDM4Aポリペプチドと比較して、少なく

とも約50%、または60%または70%または80%または90%または100%または100%よりも大きな、例えば1.5倍、2倍、3倍、4倍または4倍よりも大きな、SCNTの効率を増加させる能力を有する、SEQ ID NO:9のフラグメント（例えば、その際、フラグメントは、SEQ ID NO:9の少なくとも50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%、98%、または99%の長さである）を含む。

【0171】

いくつかの態様では、ヒトKDM4Bの生物学的に活性なフラグメントは、同じ方法を使用して同じ条件下で、SEQ ID NO:10のアミノ酸を含むKDM4Bポリペプチドと比較して、少なくとも約50%、または60%または70%または80%または90%または100%または100%よりも大きな、例えば1.5倍、2倍、3倍、4倍または4倍よりも大きな、SCNTの効率を増加させる能力を有する、SEQ ID NO:10のフラグメント（例えば、その際、フラグメントは、SEQ ID NO:10の少なくとも50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%、98%、または99%の長さである）を含む。

10

【0172】

いくつかの態様では、ヒトKDM4Cの生物学的に活性なフラグメントは、同じ方法を使用して同じ条件下で、SEQ ID NO:11のアミノ酸を含むKDM4Cポリペプチドと比較して、少なくとも約50%、または60%または70%または80%または90%または100%または100%よりも大きな、例えば1.5倍、2倍、3倍、4倍または4倍よりも大きな、SCNTの効率を増加させる能力を有する、SEQ ID NO:11のフラグメント（例えば、その際、フラグメントは、SEQ ID NO:11の少なくとも50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%、98%、または99%の長さである）を含む。

20

【0173】

いくつかの態様では、ヒトKDM4Dの生物学的に活性なフラグメントは、同じ方法を使用して同じ条件下で、SEQ ID NO:12のアミノ酸を含むKDM4Dポリペプチドと比較して、少なくとも約50%、または60%または70%または80%または90%または100%または100%よりも大きな、例えば1.5倍、2倍、3倍、4倍または4倍よりも大きなSCNTの効率を増加させる能力を有する、SEQ ID NO:12のフラグメント（例えば、その際、フラグメントは、SEQ ID NO:12の少なくとも50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%、98%、または99%の長さである）を含む。いくつかの態様では、SEQ ID NO:12の生物学的に活性なフラグメントは、Antony et al., Nature, 2013に開示されるような、SEQ ID NO:12のアミノ酸1~424番を含む。いくつかの態様では、SEQ ID NO:12の生物学的に活性なフラグメントは、SEQ ID NO:12のアミノ酸1~424番のC末端またはN末端に少なくとも1つ、または少なくとも2つ、または少なくとも2~10個、または少なくとも10~20個、または少なくとも20~50個、または少なくとも50~100個のアミノ酸も欠如している、SEQ ID NO:12のアミノ酸1~424番を含む。いくつかの態様では、SEQ ID NO:12の生物学的に活性なフラグメントは、SEQ ID NO:12のアミノ酸1~424番のC末端およびN末端の両方に少なくとも1つ、または少なくとも2つ、または少なくとも2~10個、または少なくとも10~20個、または少なくとも20~50個、または少なくとも50~100個のアミノ酸も欠如している、SEQ ID NO:12のアミノ酸1~424番を含む。いくつかの態様では、SEQ ID NO:12の生物学的に活性なフラグメントは、SEQ ID NO:13を含み、その際、SEQ ID NO:13のタンパク質配列は、以下を含む：

30

40

METMKSKANCAQNPN CNIMIFHPTKEEFNDFDKYIAYMESQGAH
RAGLAKIIPPKEWKARETYDNISEIL IATPLQQVASGRAGVFTQYHKKKKAMTVGEYR
HLANSKKYQTPPHQNFEDLERKYWKNRIYNSPIYGADISGSLFDENTKQWNLGHLGTI
QDLLEKECGVVIEGVNTPYLYFGMWKTTFAWHTEDMDLYSINYLHLGEPKTYVVPPE
HGQRLERLARELFP GSSRGC GAFLRHKVALISPTVLKENGIPFN RITQEAGEFMVTFP
YGYHAGFNHGFNCAEAINFATPRWIDYGKMASQCSCGEARVTF SMDAFVRILQPERYD
LWKRQGDRAVVDHMEPRVPASQELSTQKEVQLPRRAALGLRQLPSHWA RHSPWPMAAR
SGTRCHTLVCSSLP RRSASVSGTATQPRAAAV (SEQ ID NO: 13)

【0174】

いくつかの態様では、SEQ ID NO:12の生物学的に活性なフラグメントは、SEQ ID NO:13のC末端に、少なくとも1つ、または少なくとも2つ、または少なくとも2~10個、または少

50

なくとも10~20個、または少なくとも20~50個のアミノ酸も欠如している、SEQ ID NO:13のアミノ酸を含む。いくつかの態様では、SEQ ID NO:12の生物学的に活性なフラグメントは、SEQ ID NO:13のN末端に、少なくとも1つ、または少なくとも2つ、または少なくとも2~10個、または少なくとも10~20個、または少なくとも20~50個のアミノ酸も欠如している、SEQ ID NO:13のアミノ酸を含む。

【0175】

いくつかの態様では、ヒトKDM4Eの生物学的に活性なフラグメントは、同じ方法を使用して同じ条件下で、SEQ ID NO:46のアミノ酸を含むKDM4Eポリペプチドと比較して、少なくとも約50%、または60%または70%または80%または90%または100%または100%よりも大きな、例えば1.5倍、2倍、3倍、4倍または4倍よりも大きな、SCNTの効率を増加させる能力を有する、SEQ ID NO:46のフラグメント（例えば、その際、フラグメントは、SEQ ID NO:46の少なくとも50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%、98%、または99%の長さである）を含む。

10

【0176】

いくつかの態様では、ヒトKDM4Aの生物学的に活性な異種は、同じ方法を使用して同じ条件下で、SEQ ID NO:9のアミノ酸を含むKDM4Aポリペプチドと比較して、少なくとも約50%、または60%または70%または80%または90%または100%または100%よりも大きな、例えば1.5倍、2倍、3倍、4倍または4倍よりも大きな、ヒトSCNTの効率を増加させる能力を有する、SEQ ID NO:9と少なくとも80%の配列同一性（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98%、または少なくとも約99%の配列同一性）を有する、SEQ ID NO:9の異種（例えば、その際、該異種は、SEQ ID NO:9と少なくとも85%、90%、95%、98%、または99%同一である）を含む。

20

【0177】

いくつかの態様では、ヒトKDM4Bの生物学的に活性な異種は、同じ方法を使用して同じ条件下で、SEQ ID NO:10のアミノ酸を含むKDM4Bポリペプチドと比較して、少なくとも約50%、または60%または70%または80%または90%または100%または100%よりも大きな、例えば1.5倍、2倍、3倍、4倍または4倍よりも大きな、ヒトSCNTの効率を増加させる能力を有する、SEQ ID NO:10と少なくとも80%の配列同一性（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98%、または少なくとも約99%の配列同一性）を有するSEQ ID NO:10の異種（例えば、その際、該異種は、SEQ ID NO:10と少なくとも85%、90%、95%、98%、または99%同一である）を含む。

30

【0178】

いくつかの態様では、ヒトKDM4Cの生物学的に活性な異種は、同じ方法を使用して同じ条件下で、SEQ ID NO:11のアミノ酸を含むKDM4Cポリペプチドと比較して、少なくとも約50%、または60%または70%または80%または90%または100%または100%よりも大きな、例えば1.5倍、2倍、3倍、4倍または4倍よりも大きな、ヒトSCNTの効率を増加させる能力を有する、SEQ ID NO:11と少なくとも80%の配列同一性（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98%、または少なくとも約99%の配列同一性）を有するSEQ ID NO:11の異種（例えば、その際、該異種は、SEQ ID NO:11と少なくとも85%、90%、95%、98%、または99%同一である）を含む。

40

【0179】

いくつかの態様では、ヒトKDM4Dの生物学的に活性な異種は、同じ方法を使用して同じ条件下で、SEQ ID NO:12のアミノ酸を含むKDM4Dポリペプチドと比較して、少なくとも約50%、または60%または70%または80%または90%または100%または100%よりも大きな、例えば1.5倍、2倍、3倍、4倍または4倍よりも大きな、ヒトSCNTの効率を増加させる能力を有する、SEQ ID NO:12と少なくとも80%の配列同一性（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98%、または少なくとも約99%の配列同一性）を有するSEQ ID NO:12の異種（例えば、その際、該異種は、SEQ ID NO:12と少なくとも85%、90%、95%、98%、または99%同一である）を含む。

【0180】

50

いくつかの態様では、ヒトKDM4Eの生物学的に活性な異種は、同じ方法を使用して同じ条件下で、SEQ ID NO:46のアミノ酸を含むKDM4Eポリペプチドと比較して、少なくとも約50%、または60%または70%または80%または90%または100%または100%よりも大きな、例えば1.5倍、2倍、3倍、4倍または4倍よりも大きな、ヒトSCNTの効率を増加させる能力を有する、SEQ ID NO:46と少なくとも80%の配列同一性（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98%、または少なくとも約99%の配列同一性）を有するSEQ ID NO:46の異種（例えば、その際、該異種は、SEQ ID NO:46と少なくとも85%、90%、95%、98%、または99%同一である）を含む。

【0181】

いくつかの態様では、本明細書開示の方法および組成物およびキットに有用なKDM4ヒストンデメチラーゼ活性化剤は、配列SEQ ID NO:1~4もしくはSEQ ID NO:45に対応する、またはSEQ ID NO:9~12もしくはSEQ ID NO:46に対応するタンパク質もしくは機能的フラグメントをコードする、米国特許出願公開第2012/03228640号に開示されているようなRNAもしくは修飾RNA (modRNA) またはその生物学的に活性な異種もしくはフラグメントなどの核酸剤である。いくつかの態様では、KDM4ヒストンデメチラーゼ活性化剤は、SEQ ID NO:1~4もしくはSEQ ID NO:45のいずれかより選択される核酸剤、またはSEQ ID NO:1~4もしくはSEQ ID NO:45と少なくとも80%の配列同一性（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98%、または少なくとも約99%の配列同一性）を有する異種核酸を含む。いくつかの態様では、KDM4ヒストンデメチラーゼ活性化剤は、SEQ ID NO:1~4またはSEQ ID NO:45の任意の1つの少なくとも20個の連続するアミノ酸のフラグメント、例えば、SEQ ID NO:1~4またはSEQ ID NO:45の少なくとも20個、または少なくとも30個または少なくとも40個または少なくとも50個の核酸のフラグメントである核酸を含む。いくつかの態様では、方法および組成物およびキットに有用な核酸剤であるKDM4ヒストンデメチラーゼ活性化剤は、ベクター、例えば、ウイルスベクターから発現される。

【0182】

代替的な態様では、本明細書に使用するために包含されるKDM4ヒストンデメチラーゼ活性化剤は、配列SEQ ID NO:1~4もしくはSEQ ID NO:45に対応する、またはSEQ ID NO:9~12もしくはSEQ ID NO:46に対応するタンパク質もしくはその機能的フラグメントをコードする合成修飾RNA (modRNA) である。合成修飾RNA (modRNA) は、米国特許出願公開第2012/03228640号；同第2009/0286852号および同第2013/0111615号ならびに米国特許第8,278,036号；同第8,691,966号；同第8,748,089号；同第8,835,108号に記載されており、これらは、その全体として参照により本明細書に組み入れられる。いくつかの態様では、合成修飾RNA分子は、ベクターにおいて発現されず、合成修飾RNA分子は、裸の合成修飾RNA分子であることができる。いくつかの態様では、組成物は、脂質複合体中に存在する少なくとも1つの合成修飾RNA分子を含むことができる。

【0183】

いくつかの態様では、合成修飾RNA分子は、少なくとも2つの修飾ヌクレオシドを含み、例えば少なくとも2つの修飾ヌクレオシドは、5-メチルシチジン (5mC)、N6-メチルアデノシン (m6A)、3,2'-O-ジメチルウリジン (m4U)、2-チオウリジン (s2U)、2'フルオロウリジン、プソイドウリジン、2'-O-メチルウリジン (Um)、2'デオキシウリジン (2'dU)、4-チオウリジン (s4U)、5-メチルウリジン (m5U)、2'-O-メチルアデノシン (m6A)、N6,2'-O-ジメチルアデノシン (m6Am)、N6,N6,2'-O-トリメチルアデノシン (m62Am)、2'-O-メチルシチジン (Cm)、7-メチルグアノシン (m7G)、2'-O-メチルグアノシン (Gm)、N2,7-ジメチルグアノシン (m2,7G)、N2,N2,7-トリメチルグアノシン (m2,2,7G)、およびイノシン (I) からなる群より選択される。いくつかの態様では、合成修飾RNA分子は、さらに、5'キャップ類似体、例えば、5'ジグアノシンキャップのような5'キャップを含む。いくつかの態様では、本明細書開示の方法および組成物に使用するための合成修飾RNA分子は、5'-三リン酸エステルを含まない。いくつかの態様では、本明細書開示の方法および組成物に使用するための合成修飾RNA分子は、さらに、ポリ (A) 尾部、コザック配

列、3'非翻訳領域、5'非翻訳領域、またはその任意の組み合わせを含み、いくつかの態様では、合成修飾RNA分子を、任意で、アルカリホスファターゼで処理することができる。

【0184】

H3K9メチルトランスフェラーゼ阻害剤

一局面では、本発明は、ヒトSCNTの効率を増加させる方法であって、ドナーヒト体細胞、レシピエントヒト卵母細胞、ハイブリッド卵母細胞（例えば、融合もしくは活性化前のドナー遺伝物質を含むヒト除核卵母細胞）またはヒトSCNT胚（すなわち、ドナー核と除核卵母細胞との融合後）の核または細胞質を、ヒト核遺伝物質におけるヒストンメチル化を阻害する、特にH3K9メチル化を阻害する、特にH3H9me3トリメチル化を阻害する活性物質と接触させる段階を含む、方法を提供する。本発明の特定の態様では、活性物質は、ヒストンメチルトランスフェラーゼ活性を阻害する。本発明の特定の態様では、活性物質は、ヒストンメチルトランスフェラーゼの発現を阻害する。本発明の特定の態様では、阻害剤は、ヒトH3K9メチルトランスフェラーゼの阻害剤である。本明細書に述べられるように、本発明者らは、H3K9メチルトランスフェラーゼタンパク質の阻害を用いてヒトSCNTの効率を増加させることができることを発見した。いくつかの態様では、H3K9メチルトランスフェラーゼ阻害剤は、タンパク質阻害剤であり、いくつかの態様では、阻害剤は、H3K9メチルトランスフェラーゼタンパク質の機能またはその遺伝子からのH3K9メチルトランスフェラーゼの発現を阻害する任意の活性物質である。

10

【0185】

本発明の特定の態様では、活性物質は、ヒトヒストンメチルトランスフェラーゼSUV39h1タンパク質の発現または機能を阻害する。SUV39h1は、2つの選択的スプライシングされた異種（異種1および2）を有し、それらは、SUV39h1アイソフォーム1およびSUV39h1アイソフォーム2タンパク質を産生する。いくつかの態様では、本明細書開示の方法、キットおよび組成物に使用するための活性物質は、SUV39h1の異種1（SEQ ID NO:47）または異種2（SEQ ID NO:14）のmRNAの翻訳を阻害する。いくつかの態様では、本明細書開示の方法、キットおよび組成物に使用するための活性物質は、SUV39h1タンパク質のアイソフォーム1（SEQ ID NO:48）またはアイソフォーム2（SEQ ID NO:5）の機能を阻害する。

20

【0186】

本発明の特定の態様では、活性物質は、ヒトヒストンメチルトランスフェラーゼSUV39h2タンパク質を阻害する。本発明の特定の態様では、活性物質は、ヒトヒストンメチルトランスフェラーゼSUV39h2タンパク質の発現または機能を阻害する。SUV39h2は、5つの選択的スプライシングされた異種（異種1～5）を有し、それらは、SUV39h2の4つのアイソフォームを産生する（異種2および3は、どちらもアイソフォーム2をコードする）。いくつかの態様では、本明細書開示の方法、キットおよび組成物に使用するための活性物質は、SEQ ID NO:15、49、51、52および53（hSUV39h2異種1～5）の任意の1つまたは複数のmRNAの翻訳を阻害する。いくつかの態様では、本明細書開示の方法、キットおよび組成物に使用するための活性物質は、SEQ ID NO:6およびSEQ ID NO:54～57に対応するhSuv39h2アイソフォーム1～4の機能を阻害する。

30

【0187】

本発明の特定の態様では、活性物質は、ヒトヒストンメチルトランスフェラーゼEHMT1の阻害剤である。本発明の特定の態様では、活性物質は、ヒトヒストンメチルトランスフェラーゼSETDB1を阻害する。特定の態様では、少なくとも2つのH3K9メチルトランスフェラーゼ（例えば、2、3、4つなど）が阻害される。本発明の特定の態様では、SUV39h1およびSUV39h2の両方が、同じ活性物質（例えば、SUV39h1/2阻害剤）または2つ以上の別々の活性物質によって阻害される。本発明の特定の態様では、活性物質は、H3K9メチルトランスフェラーゼ；ヒトSUV39h1、ヒトSUV39h2、またはヒトSETDB1の任意の1つまたは複数の発現を阻害するRNAi剤、例えばsiRNAまたはshRNAである。

40

【0188】

本明細書に使用される用語「SUV39h1」または「H3K9ヒストンメチルトランスフェラーゼSUV39h1」は、当技術分野におけるその一般的な意味を有し、ヒストンH3のLys-9をメチ

50

ル化するヒストンメチルトランスフェラーゼ「斑入りサプレッサー3-9ホモログ1(ショウジョウバエ(*Drosophila*))」を表す(Aagaard L, Laible G, Selenko P, Schmid M, Dorn R, Schotta G, Kuhfittig S, Wolf A, Lebersorger A, Singh P B, Reuter G, Jenuwein T (June 1999). "Functional mammalian homologues of the *Drosophila* PEV-modifier Su(var)3-9 encode centromere-associated proteins which complex with the heterochromatin component M31". *EMBO J* 18 (7): 1923-38.)。該ヒストンメチルトランスフェラーゼは、MG44、KMT1A、SUV39H、ヒストン-リシンN-メチルトランスフェラーゼSUV39H1、H3-K9-HMTase 1、OTTHUMP00000024298、Su(var)3-9ホモログ1、リシンN-メチルトランスフェラーゼ1A、ヒストンH3-K9メチルトランスフェラーゼ1、斑入り位置効果3-9ホモログ、ヒストン-リシン N-メチルトランスフェラーゼ、またはH3リシン-9特異的1としても公知である。本用語は、SU(VAR)3-9のような全てのSUV39h1オーソログを包含し、SUV39h1アイソフォーム1およびSUV39h1アイソフォーム2をコードする異種1および異種2を含む。表8に要約するように、理論に縛られることを望むわけではなく、Suv39h1(遺伝子ID:6839)は、2つの選択的スプライシングされた異種を有し、異種1は、Suv39h1アイソフォーム1タンパク質(長鎖転写物であり、より長いアイソフォームをコードする)を産生し、mRNA NM_001282166.1(SEQ ID NO:47)およびタンパク質NP_001269095.1(SEQ ID NO:48)に対応する。Suv39h1の異種2は、アイソフォーム2をコードし、5'UTRが異なり、5'コード領域の一部を欠如しており、異種1と比較して代替的な開始コドンで翻訳を開始する。コードされるSuv39h1アイソフォーム2タンパク質は、アイソフォーム1タンパク質と比較して短く、別個のN末端を有する。Suv39h1アイソフォーム2についてのmRNAは、NM_003173.3(SEQ ID NO:14)であり、これは、NP_003164.1に対応するアイソフォーム2タンパク質(SEQ ID NO:5)をコードする。

10

20

30

40

【0189】

本明細書に使用される用語「SUV39h2」または「H3K9ヒストンメチルトランスフェラーゼSUV39h2」は、当技術分野におけるその一般的な意味を有し、ヒストンH3のLys-9をメチル化するヒストンメチルトランスフェラーゼ「斑入りサプレッサー3-9ホモログ2(ショウジョウバエ)」を表す。該ヒストンメチルトランスフェラーゼは、KMT1B、FLJ23414、H3-K9-HMTase 2、ヒストンH3-K9メチルトランスフェラーゼ2、リシンN-メチルトランスフェラーゼ1B、su(var)3-9ホモログ2としても公知である。本用語は、全てのホモログ(Suv39h2遺伝子は、チンパンジー、アカゲザル、イヌ、ウシ、マウス、ラット、ニワトリおよびカエルにおいて保存されている)ならびに表8に開示されるSUV39h2の選択的スプライシングされた異種を包含する。理論に縛られることを望むわけではないが、表8に、以下のような、5つの選択的スプライシングされたヒトSuv39h2(遺伝子ID:79723)異種を挙げる: 異種1は、Suv39h2アイソフォーム1タンパク質をコードし(長鎖転写物であり、より長いアイソフォームをコードする); 異種2および異種3は、どちらもSuv39h2アイソフォーム2をコードし; 異種4は、Suv39h2アイソフォーム3をコードし、異種5は、Suv39h2アイソフォーム4をコードする。Suv39h2異種についてのmRNAおよびそれらの対応するタンパク質の配列識別名を表8に示す。

【0190】

(表8) hSUVh1およびhSUVh2異種についての配列の要約

hSUV39h1/2 遺伝子	mRNA (アクセッション番号) (一般名)	アミノ酸配列 (アクセッション番号) (一般名)	説明
hSUV39h1 異種 1/アイソフォーム1	SEQ ID NO: 47 (NM_001282166.1) (hSUV39h1 異種 1)	SEQ ID NO: 48 (NP_001269095.1) (hSUV39h1 アイソフォーム1)	異種1はSuv39h1アイソフォーム1タンパク質を産生し(長鎖転写物であり、より長いアイソフォームをコードする)、かつ mRNA NM_001282166.1に対応する
hSUV39h1 異種 2/アイソフォーム2	SEQ ID NO: 14 (NM_003173.3) (hSUV39h1 異種 2)	SEQ ID NO: 5 (NP_003164.1) (hSUV39h1 アイソフォーム2)	異種2は、5' UTRが異なり、5' コード領域の一部を欠如し、かつ異種1と比較して代替的な開始コドンで翻訳を開始するSuv39h1アイソフォーム2を産生する。コードされるSuv39h1アイソフォーム (2) タンパク質は、より短く、かつアイソフォーム1と比較して別個のN末端を有する。
hSUV39h2 異種 1/アイソフォーム1	SEQ ID NO: 49 (NM_001193424.1) (hSUV39h2 異種 1)	SEQ ID NO: 54 (NP_001180353.1) (hSUV39h2 アイソフォーム1)	異種1は、最も長いhSuv39h2アイソフォームであるアイソフォーム1をコードする。
hSUV39h2 異種 2/アイソフォーム2	SEQ ID NO: 51 (NM_001193425.1) (hSUV39h2 異種 2)	SEQ ID NO: 55 (NP_001180354.1) (hSUV39h2 アイソフォーム2)	異種2は、異種1と比較して代替的な5' 末端エキソンを含む。この結果、フレーム内の下流のAUGから翻訳が開始し、アイソフォーム1と比較して短いアイソフォーム2をコードする。(異種2および3は、同じアイソフォーム2をコードする)
hSUV39h2 異種 3/アイソフォーム2	SEQ ID NO: 15 (NM_024670.3) (hSUV39h2 異種 3)	SEQ ID NO: 6 (NP_078946.1) (hSUV39h2 アイソフォーム2)	異種3は、代替的な5' 末端エキソンを含み、かつ異種1と比較して後続のエキソンを欠いている。この結果、フレーム内の下流のAUGから翻訳が開始し、アイソフォーム1と比較して短いアイソフォーム2が生じる。(異種2および3は、同じアイソフォーム2をコードする)
hSUV39h2 異種 4/アイソフォーム3	SEQ ID NO: 52 (NM_001193426.1) (hSUV39h2 異種 4)	SEQ ID NO: 56 (NP_001180355.1) (hSUV39h2 アイソフォーム3)	異種4は、異種1と比較して内部にコードされるエキソンのドナー選択的スプライス部位を利用し、リーディングフレームを維持し、アイソフォーム1と比較して内部タンパク質セグメントを欠いたより短いアイソフォーム3が生じる。
hSUV39h2 異種 5/アイソフォーム4	SEQ ID NO: 53 (NM_001193427.1) (hSUV39h2 異種 5)	SEQ ID NO: 57 (NP_001180356.1) (hSUV39h2 アイソフォーム4)	異種5は、代替的な5' 末端エキソンを含み、異種1と比較して内部にコードされるエキソンのドナー選択的スプライス部位を利用する。この結果、フレーム内の下流のAUGから翻訳が開始し、アイソフォーム1と比較して内部タンパク質セグメントを欠いた、より短いアイソフォーム4が生じる。

10

20

30

【0191】

本発明によると、ヒトSUV39h1の阻害剤は、H3K9ヒストンメチルトランスフェラーゼSUV39h1タンパク質機能の阻害剤またはH3K9ヒストンメチルトランスフェラーゼSUV39h1の遺伝子発現阻害剤からなる群より選択される。

40

【0192】

用語「H3K9ヒストンメチルトランスフェラーゼSUV39h1の阻害剤」は、H3K9ヒストンメチルトランスフェラーゼSUV39h1によるヒストンH3のLys-9のメチル化を阻害する能力を有する、任意の(天然または非天然)化合物を表す。用語「H3K9ヒストンメチルトランスフェラーゼSUV39h2の阻害剤」は、H3K9ヒストンメチルトランスフェラーゼSUV39h2によるヒストンH3のLys-9のtheメチル化を阻害する能力を有する、任意の(天然またはその他の)化合物を表す。

【0193】

50

化合物の阻害活性は、その全体として参照により本明細書に組み入れられるGreiner D. Et al. Nat Chem Biol. 2005 August; 1(3):143-5またはEskeland, R. et al. Biochemistry 43, 3740-3749 (2004)に記載されるように、様々な方法を使用して決定され得る。

【0194】

いくつかの態様では、H3K9メチルトランスフェラーゼの阻害は、活性物質による。任意の活性物質、例えば非限定的に、核酸、核酸類似体、ペプチド、ファージ、ファージミド、ポリペプチド、ペプチド模倣体、リボソーム、アプタマー、抗体、小型もしくは大型の有機もしくは無機分子、またはその任意の組み合わせを使用することができる。

【0195】

いくつかの態様では、H3K9メチルトランスフェラーゼの阻害剤は、RNAi剤、siRNA剤、shRNA、オリゴヌクレオチド、CRISPR/Cas9、CRISPR/Cpf1、中和抗体または抗体フラグメント、アプタマー、小分子、タンパク質、ペプチド、小分子、アビジミル、アビミル (avimir)、およびその機能的フラグメントまたは誘導体などからなる群より選択される。CRISPR/Cas9またはCRISPR/Cpf1システムを介してSUV39h1および/またはSUV39h2をノックアウトするために市販されている配列は、Origene (製品番号KN202428およびKN317005)ならびにSanta Cruz Biotechnology (製品番号:sc-401717)から入手可能であり、本明細書開示の方法および組成物での使用のために包含されている。

【0196】

本明細書開示の方法に有用な活性物質は、遺伝子発現も阻害する (すなわち遺伝子の発現を抑制および/または抑圧する) ことができる。そのような活性物質は、当技術分野において「遺伝子サイレンサー」と呼ばれ、当業者に一般的に公知である。例には、非限定的に、RNA、DNAまたは核酸類似体のための核酸配列が含まれ、かつ一本鎖または二本鎖であることができ、かつ関心対象のタンパク質をコードする核酸、オリゴヌクレオチド、核酸、核酸類似体、例えば非限定的に、ペプチド核酸 (PNA)、疑似相補性PNA (pc-PNA)、ロックド核酸 (LNA) およびその誘導体などを含む群より選択することができる。核酸剤には、また、例えば非限定的に、転写リプレッサーとして作用するタンパク質をコードする核酸配列、アンチセンス分子、リボザイム、低分子阻害性核酸配列、例えば非限定的に、RNAi、shRNAi、siRNA、マイクロRNAi (miRNA)、アンチセンスオリゴヌクレオチドなどが含まれる。

【0197】

本発明の全ての局面のいくつかの態様では、ドナーヒト体細胞、レシピエントヒト卵母細胞、ハイブリッド卵母細胞 (例えば、融合または活性化前のドナー遺伝物質を含むヒト除核卵母細胞) またはヒトSCNT胚 (すなわち、ドナー核と除核卵母細胞との融合後) と接触する活性物質は、H3K9メチルトランスフェラーゼの阻害剤、例えば非限定的に、ヒトSUV39h1、ヒトSUV39h2またはヒトSETDB1の任意の1つの阻害剤である。いくつかの態様では、ヒトSUV39h1、ヒトSUV39h2またはヒトSETDB1の阻害剤の少なくとも1つまたは任意の組み合わせを、ヒトSCNTの効率を増加させるための方法に使用することができる。いくつかの態様では、SUV39h1、SUV39h2またはSETDB1の阻害剤は、ヒトSUV39h1、ヒトSUV39h2もしくはヒトSETDB1核酸配列 (例えば、SEQ ID NO:14~16、またはSEQ ID NO:47またはSEQ ID NO:49、51~53) の発現、またはヒトSUV39h1タンパク質 (SEQ ID NO:5またはSEQ ID NO:48)、ヒトSUV39h2 (SEQ ID NO:6またはSEQ ID NO:54~57) もしくはヒトSETDB1タンパク質 (SEQ ID NO:17) の活性を阻害する。

【0198】

本発明に関連して、H3K9ヒストンメチルトランスフェラーゼSUV39h1/2の阻害剤は、好ましくは、他の分子と比較して、H3K9ヒストンメチルトランスフェラーゼSUV39h1/2に対し選択的である。「選択的」とは、阻害剤の親和性が、他のヒストンメチルトランスフェラーゼに対する親和性よりも、少なくとも10倍、好ましくは25倍、より好ましくは100倍、なお好ましくは500倍高いことを意味する。

【0199】

典型的には、H3K9ヒストンメチルトランスフェラーゼSUV39h1および/またはSUV39h2の

阻害剤は、小型有機分子である。用語「小型有機分子」は、一般的に医薬品に使用される有機分子に匹敵するサイズの分子を表す。本用語は、生物学的高分子（例えばタンパク質、核酸など）を除外するものである。好ましい小型有機分子は、最大で約5000Da、より好ましくは最大で2000Da、最も好ましくは最大で約1000Daサイズの範囲である。

【0200】

特定の一態様では、H3K9ヒストンメチルトランスフェラーゼSUV39h1の阻害剤は、Greiner D, Bonaldi T, Eskeland R, Roemer E, Imhof A. Identification of a specific inhibitor of the histone methyltransferase SU(VAR)3-9. *Nat Chem Biol.* 2005 August; 1(3):143-5. Epub 2005 Jul. 17.; Weber, H. P., et al., The molecular structure and absolute configuration of chaetocin. *Acta Cryst.*, B28, 2945-2951 (1972); Udagawa, S., et al., The production of chaetoglobosins, sterigmatocystin, O-methylsterigmatocystin, and chaetocin by *Chaetomium* spp. and related fungi. *Can. J. microbiol.*, 25, 170-177 (1979).; Gardiner, D. M., et al., The epipolythiodioxopiperazine (ETP) class of fungal toxins: distribution, mode of action, functions and biosynthesis. *Microbiol.*, 151, 1021-1032 (2005)によって記載されるカエトシン (chaetocin) (CAS 28097-03-2) である。例えばカエトシンは、Sigma Aldrichから市販されている。

10

【0201】

別の態様では、H3K9ヒストンメチルトランスフェラーゼSUV39h1の阻害剤は、アプタマーである。アプタマーは、分子認識に関して抗体の代替となる分子のクラスである。アプタマーは、高い親和性および特異性で事実上任意のクラスの標的分子を認識する能力を有するオリゴヌクレオチド配列またはオリゴペプチド配列である。そのようなリガンドは、Tuerk C. and Gold L., 1990に記載されるように、ランダムな配列ライブラリーの試験管内進化法 (SELEX: Systematic Evolution of Ligands by Exponential enrichment) を経て単離され得る。ランダムな配列ライブラリーは、DNAのコンビナトリアル化学合成によって入手可能である。このライブラリーにおいて、各メンバーは、ユニーク配列の、最終的に化学修飾された直鎖オリゴマーである。このクラスの分子の可能な修飾、使用および利点は、Jayasena S. D., 1999に総説されている。ペプチドアプタマーは、ツーハイブリッド法によってコンビナトリアルライブラリーより選択される、大腸菌 (*E. coli*) チオレドキシンAのようなプラットフォームタンパク質によってディスプレイされる立体配座的に制限された抗体可変領域からなる (Colas et al., 1996)。

20

30

【0202】

本発明に使用するための発現阻害剤は、アンチセンスオリゴヌクレオチド構築物に基づき得る。アンチセンスRNA分子およびアンチセンスDNA分子を含むアンチセンスオリゴヌクレオチドは、H3K9ヒストンメチルトランスフェラーゼSUV39h1またはHP1 のmRNAに結合することによってその翻訳を直接遮断することで、タンパク質の翻訳を阻止するように、またはmRNAの分解を増加させることによってH3K9ヒストンメチルトランスフェラーゼSUV39h1もしくはHP1 のレベルを減少させ、このようにして細胞内の活性に作用する。例えば、少なくとも約15塩基であり、H3K9ヒストンメチルトランスフェラーゼSUV39h1をコードするmRNA転写物配列のユニーク領域に相補的なアンチセンスオリゴヌクレオチドを、例えば、従来のホスホジエステル技法によって合成し、例えば静脈内注射または注入によって投与することができる。その配列が周知の遺伝子の遺伝子発現を特異的に阻害するためにアンチセンス技法を使用するための方法は、当技術分野において周知である (例えば、米国特許第6,566,135号; 同第6,566,131号; 同第6,365,354号; 同第6,410,323号; 同第6,107,091号; 同第6,046,321号; および同第5,981,732号を参照されたい)。SUV39h1の阻害剤は、その全体として参照により本明細書に組み入れられる米国特許出願公開第2015/0038496号に開示されている。小分子、ベチシリン (Veticillin) は、その全体として参照により本明細書に組み入れられ、かつ本明細書開示の方法、組成物およびキットにおける使用のために包含される、米国特許出願公開第2014/0161785号に開示されるような、ヒトSUV39h1およびヒトSUV39h2の両方に対する (すなわち、SUV39h1/2を阻害する) 選択的阻害剤と

40

50

して特定される。

【0203】

SUV39h2の阻害剤およびその特定方法は、その全体として参照により本明細書に組み入れられる米国特許出願公開第2014/0094387号に開示されている。

【0204】

H3K9メチルトランスフェラーゼのRNAi阻害剤。いくつかの態様では、H3K9メチルトランスフェラーゼ阻害剤は、RNAi剤、例えば、siRNAまたはshRNA分子である。ヒトSUV39h1、ヒトSUV39h2、ヒトSETDB1、ヒトEHMT1、およびヒトPRDM2のRNAi剤は、当技術分野において周知である。いくつかの態様では、H3K9メチルトランスフェラーゼの阻害剤は、RNAi剤である。いくつかの態様では、RNAi剤は、本明細書開示のヒトSUV39h1核酸配列（SEQ ID NO:14もしくはSEQ ID NO:47）、ヒトSUV39h2タンパク質（SEQ ID NO:15、49、51、52、53）またはヒトSETDB1タンパク質（SEQ ID NO:16）の任意の1つのヌクレオチド領域内に位置する標的配列と完全にまたは部分的にハイブリダイズする。

10

【0205】

いくつかの態様では、RNAi剤は、本明細書開示のヒトSUV39h1タンパク質（SEQ ID NO:5またはSEQ ID NO:48）、ヒトSUV39h2タンパク質（SEQ ID NO:6またはSEQ ID NO:54～57）またはヒトSETDB1タンパク質（SEQ ID NO:17）の任意の1つの発現を阻害する。

【0206】

H3K9メチルトランスフェラーゼ遺伝子の阻害は、当業者に一般的に公知の方法による遺伝子サイレンシングRNAi分子によることができる。いくつかの態様では、H3K9メチルトランスフェラーゼ阻害剤は、表2より選択されるsiRNA剤の任意の1つまたは組み合わせであるRNAi剤である。

20

【0207】

例えば、異種2に対応するNM_003173.3（SEQ ID NO:14）または異種1に対応するNM_001282166.1（SEQ ID NO:47）に対応するヒトSUV39h1内に位置する領域を標的とする遺伝子サイレンシングsiRNAオリゴヌクレオチド二重鎖を、ヒトSUV39h1の発現をノックダウンするために容易に使用することができる。siRNAを使用して、SUV39h1 mRNAを成功裏に標的とすることができ；他のsiRNA分子は、標的mRNAの公知配列に基づき当業者によって容易に調製され得る。誤解を避けるために、ヒトSUV39h1の配列は、例えばGenBankアクセッション番号：NM_003173.3（SEQ ID NO:14）（アイソフォーム1をコードする異種2）またはNM_001282166.1（SEQ ID NO:47）（アイソフォーム1をコードする異種1）に提供される。当業者は、ヒトSUV39h1タンパク質（SEQ ID NO:5もしくはSEQ ID NO:48）をコードするmRNAの発現を阻害する、または任意の他の哺乳動物SUV39h1タンパク質の発現を阻害する、使用されるべきRNAi剤を選択することができる。

30

【0208】

誤解を避けるために、ヒトSUV39h1 cDNAの配列は、例えば、異種2に対応するGenBankアクセッション番号：NM_003173.3（SEQ ID NO:14）または異種1に対応するNM_001282166.1（SEQ ID NO:47）に提供され、かつ、本明細書開示の方法および組成物にH3K9メチル転移阻害剤として使用するための、ヒトSUV39h1 mRNAの発現を阻害する遺伝子サイレンシングRNAiモジュレーターを設計するために使用することができる。いくつかの態様では、ヒトSUV39h1の阻害剤は、siRNA剤、例えば、GAAACGAGUCCGUAUUGAAtt（SEQ ID NO:7）またはUUCAAUACGGACUCGUUUCtt（SEQ ID NO:8）の少なくとも1つまたは両方およびそのフラグメントまたは少なくとも80%の配列同一性の誘導体を含むsiRNA剤である。

40

【0209】

本明細書に使用される用語「SUV39h1タンパク質」は、本明細書開示のSEQ ID NO:5（アイソフォーム2）またはSEQ ID NO:48（アイソフォーム1）のアミノ酸配列、および機能の構造に不利に影響しない保存的置換、付加、欠失をその中に含むそのホモログを表す。いくつかの態様では、SUV39h1タンパク質は、以下のようなヒトSUV39h1転写物（SEQ ID NO:14）異種2（Suv39h1アイソフォーム2タンパク質をコードする）についての核酸配列によってコードされる。

50

1 cgctcttctc gcgaggccgg ctaggcccga atgtcgttag ccgtggggaa agatggcgga
 61 aaatttaaaa ggctgcagcg tgtgttgcaa gtcttcttgg aatcagctgc aggacctgtg
 121 ccgcctggcc aagctctcct gccctgccct cggatatctct aagaggaacc tctatgactt
 181 tgaagtogag tacctgtgcg attacaagaa gatccgcgaa caggaatatt acctgggtgaa
 241 atggcgtgga tatccagact cagagagcac ctgggagcca cggcagaatc tcaagtgtgt
 301 gcgtatcctc aagcagttcc acaaggactt agaaaggag ctgctccggc ggcaccaccg
 361 gtcaaagacc ccccggcacc tggacccaag cttggccaac tacctgggtgc agaaggccaa
 421 gcagaggcgg gcgctccgtc gctgggagca ggagctcaat gccaagcgca gccatctggg
 481 acgcatcact gtagagaatg aggtggacct ggacggccct ccgcgggcct tctgttacat
 541 caatgagtac cgtgttggtg agggcatcac cctcaaccag gtggtgtgtg gctgcgagtg
 601 ccaggactgt ctgtgggcac ccactggagg ctgctgcccg gggcgctcac tgcacaagtt
 661 tgectacaat gaccagggcc aggtgcggct tcgagccggg ctgcccctct acgagtgc aa
 721 ctcccgtgc cgctgcggct atgactgccc aaatcgtgtg gtacagaagg gtatccgata
 781 tgacctctgc atcttccgca cggatgatgg gcgtggctgg ggcgtccgca ccctggagaa
 841 gattcgcaag aacagcttcg tcatggagta cgtgggagag atcattacct cagaggaggc
 901 agagcggcgg ggcagatct acgaccgtca gggcgccacc tacctctttg acctggacta

10

961 cgtggaggac gtgtacaccg tggatgcgcg ctactatggc aacatctccc actttgtcaa
 1021 ccacagttgt gaccccaacc tgcagggtga caacgtcttc atagacaacc ttgacgagcg
 1081 gctgccccgc atcgctttct ttgccacaag aaccatccgg gcaggcgagg agctcacctt
 1141 tgattacaac atgcaagtgg acccgtgga catggagagc acccgcatgg actccaactt
 1201 tggcctggct gggtccctg gctcccctaa gaagcgggtc cgtattgaat gcaagtgtgg
 1261 gactgagtcc tgccgcaaat acctcttcta gcccttagaa gtctgaggcc agactgactg
 1321 agggggcctg aagctacatg cacctcccc actgctgccc tctgtctgag aatgactgcc
 1381 agggcctgcg ctgcctccac ctgccccac ctgctcctac ctgctctacg ttcagggtctg
 1441 tggccgtggt gaggaccgac tccaggagtc ccttttccct gtcccagccc catctgtggg
 1501 ttgcaacttac aaacccccac ccaccttcag aaatagtttt tcaacatcaa gactctctgt
 1561 cgttgggatt catggcctat taaggaggtc caaggggtga gtcccaaccc agccccagaa
 1621 tataattgtt tttgcacctg cttctgcctg gagattgagg ggtctgctgc aggcctctc
 1681 cctgctgccc caaaggatg ggggaagcaac cccagagcag gcagacatca gaggccagag
 1741 tgcctagccc gacatgaagc tggttcccca accacagaaa ctttgtacta gtgaaagaaa
 1801 gggggctcct gggctacggg ctgaggctgg tttctgctcg tgcttacagt gctgggtagt
 1861 gttggcccta agagctgtag ggtctcttct tcagggtctg atatctgaga agtggatgcc
 1921 cacatgccac tgggaaggaa gtgggtgtcc atggggcact gagcagttag aggaaggcag
 1981 tgcagagctg gccagccctg gaggtaggct gggaccaagc tctgccttca cagtgcagtg
 2041 aaggtaacct gggctcttgg gagctctgcg gttgctaggg gccctgacct ggggtgtcat
 2101 gaccgctgac accactcaga gctggaacca agatctagat agtccgtaga tagcacttag
 2161 gacaagaatg tgcattgatg ggggtggtgat gaggtgccag gcaactgggtg gagcacctgg
 2221 tccacgtgga ttgtctcagg gaagccttga aaaccacgga ggtggatgcc aggaaagggc
 2281 ccatgtggca gaaggcaaag tacaggccaa gaattggggg tgggggagat ggcttcccca
 2341 ctatgggatg acgaggcgag agggaagccc ttgctgcctg ccattcccag accccagccc
 2401 tttgtgctca ccctgggtcc actggtctca aaagtcacct gcctacaaat gtacaaaagg
 2461 cgaaggttct gatggctgcc ttgctccttg cccccacc ccctgtgagg acttctctag
 2521 gaagtccttc ctgactacct gtgcccagag tgcccctaca tgagactgta tgccctgcta
 2641 tcagatgcca gatctatgtg tctgtctgtg tgtccatccc gccggcccc cagactaacc
 2641 tccaggcatg gactgaatct ggttctcctc ttgtacaccc ctcaacccta tgcagcctgg
 2701 agtgggcatc aataaaatga actgtcgact gaacaaaaaa aaaaaaaaaa aa

20

30

(SEQ ID NO: 14)

【 0 2 1 0 】

いくつかの態様では、SUV39h1タンパク質は、以下のようなヒトSUV39h1転写物 (SEQ ID NO:47) 異種1 (Suv39h1アイソフォーム1タンパク質をコードする) についての核酸配列

40

によってコードされる。

```

1 gatcaactat ccacgctgct cgaatcacag catgctggag ggcctggctg ggtgctctga
61 ctgactgate acctgacaga cgggtgcggtc agtcgcatgc tgagaatgac tgacgatgtg
121 atgaggggcg gattgaacga gtcacaggcc agctggccag gagcaaaatc ggcatagctg
181 tctgactcga tggctgtacg tggttacgga ctgtctgccc tgatagaatc tcagcttcaa
241 cgcacacagag gagactgact tgaccaatgg tggggatgag tcgcctgaga aatgacagac
301 tggctgaccc actgacaggc tgcagcgtgt gttgcaagtc ttcttggaat cagctgcagg
361 acctgtgccc cctggccaag ctctcctgcc ctgcctcgg tatctctaag aggaacctct
421 atgactttga agtcgagtac ctgtgcgatt acaagaagat ccgcgaacag gaattattacc
481 tggtgaaatg gcgtggatat ccagactcag agagcacctg ggagccacgg cagaatctca
541 agtgtgtgcg tctctcaag cagttccaca aggacttaga aaggagctg ctccggcggc
601 accacgggtc aaagaccccc cggcacctgg acccaagctt ggccaactac ctggtgcaga
661 aggccaagca gaggcgggcg ctccgtcgct gggagcagga gctcaatgcc aagcgcagcc
721 atctgggacg catcactgta gagaatgagg tggacctgga cggccctccg cgggccttcg
781 tgtacatcaa tgagtaccgt gttggtgagg gcatcacctc caaccagggt gctgtgggct
841 gcgagtcca ggactgtctg tgggcaccca ctggaggctg ctgcccgggg gcgtcactgc
901 acaagtttgc ctacaatgac cagggccagg tgcggcttcg agccgggctg cccatctacg
961 agtgcaactc ccgctgccgc tgcggctatg actgccaaa tcgtgtggta cagaagggtg
1021 tccgatatga cctctgcac ttccgcacgg atgatgggcg tggctggggc gtccgcaccc
1081 tggagaagat tcgcaagaac agcttcgtca tggagtacgt gggagagatc attacctcag
1141 aggaggcaga gcggcggggc cagatctacg accgtcaggg cgccacctac ctctttgacc
1201 tggactacgt ggaggacgtg tacaccctgc atgccccta ctatggcaac atctcccact
1261 ttgtcaacca cagttgtgac cccaacctgc agtgtacaa cgtcttcata gacaaccttg
1321 acgagcggct gccccgcac gctttctttg ccacaagaac catccgggca ggcgaggagc

1381 tcacctttga ttacaacatg caagtggacc ccgtggacat ggagagcacc cgcattgact
1441 ccaactttgg cctggctggg ctccctggct ccctaagaa gcgggtccgt attgaatgca
1501 agtgtgggac tgagtccctg cgcaaatacc tcttctagcc cttagaagtc tgaggccaga
1561 ctgactgagg gggcctgaag ctacatgcac ctccccact gctgcctcc tgcagagaat
1621 gactgccagg gcctgcctg cctccacctg cccccacctg ctctacctg ctctacgttc
1681 agggctgtgg ccgtggtgag gaccgactcc aggagtcccc tttccctgtc ccagcccat
1741 ctgtgggttg cacttacaaa cccccacca cttcagaaa tagtttttca acatcaagac
1801 tctctgtcgt tgggattcat ggcctattaa ggaggtccaa ggggtgagtc ccaaccagc
1861 cccagaatat atttgttttt gcacctgctt ctgcctggag attgaggggt ctgctgcagg
1921 cctcctccct gctgccccaa aggtatgggg aagcaacccc agagcaggca gacatcagag
1981 gccagagtgc ctagcccgac atgaagctgg ttcccccaacc acagaaactt tgtactagt
2041 aaagaaaggg ggtccctggg ctacgggctg aggtctggtt ctgctcgtgc ttacagtgt
2101 gggtagtggt ggccctaaga gctgtagggt ctcttcttca gggctgcata tctgagaagt
2161 ggatgcccac atgccactgg aagggaagtg ggtgtccatg ggccactgag cagtgaagg
2221 aaggcagtgc agagctggcc agccctggag gtaggctggg accaagctct gccttcacag
2281 tgcagtgaag gtacctaggg ctcttgggag ctctgcggtt gctaggggcc ctgacctggg
2341 gtgtcatgac cgtgcacacc actcagagct ggaaccaaga tctagatagt ccgtagatag
2401 cacttaggac aagaatgtgc attgatggg tggatgatgag gtgccaggca ctgggtagag
2461 cacctgggtc acgtggattg tctcagggaa gccttgaaaa ccacggaggt ggatgccagg
2521 aaagggccca tgtggcagaa ggcaaagtac aggccaaaga ttgggggtgg gggagatggc
2581 ttccccacta tgggatgacg aggcgagagg gaagcccttg ctgctgcca ttcccagacc
2641 ccagcccttt gtgctcacc tggttccact ggtctcaaaa gtcacctgcc tacaatgta
2701 caaaaggcga aggttctgat ggctgccttg ctcttgctc cccaccccc tgtgaggact
2761 tctctaggaa gtccctcctg actacctgtg ccagagtgc ccctacatga gactgtatgc
2821 cctgctatca gatgccagat ctatgtgtct gtctgtgtgt ccacccgcc gggccccccag
2881 actaacctcc aggcattggac tgaatctggt tctcctcttg tacaccctc aacctatgc
2941 agcctggagt gggcatcaat aaaatgaact gtcgactgaa caaaaaaaaa aaaaaaaaaa
(SEQ ID NO: 47)

```

10

20

30

40

【 0 2 1 1 】

いくつかの態様では、活性物質は、ヒトSUV39h1 mRNA (SEQ ID NO:14またはSEQ ID NO:47) の発現を少なくとも50% (SUV39h1阻害剤の不在下と比較して) 阻害または低下させる核酸阻害剤を含む。

【 0 2 1 2 】

いくつかの態様では、活性物質は、ヒトSUV39h1タンパク質 (SEQ ID NO:5 (アイソフォーム2) またはSEQ ID NO:48 (アイソフォーム1) のレベルまたは機能を阻害または減少させる核酸阻害剤を含む。いくつかの態様では、活性物質は、ヒトSUV39h2タンパク質 (すなわち、SEQ ID NO:6、54~57のいずれか) のレベルまたは機能を阻害または減少させる核酸阻害剤を含む。

50

【0213】

いくつかの態様では、ヒトSUV39h1のsiRNA阻害剤は、SEQ ID NO:8もしくはその少なくとも10個のヌクレオチドが連続するフラグメント、またはSEQ ID NO:8と少なくとも80%の配列同一性（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98%、または少なくとも約99%の配列同一性）を有する核酸配列である。いくつかの態様では、siRNAまたは他の核酸阻害剤は、SEQ ID NO:7の標的配列と完全にまたは部分的にハイブリダイズする。

【0214】

いくつかの態様では、マウスSUV39h2のsiRNA阻害剤は、SEQ ID NO:19もしくはその少なくとも10個のヌクレオチドが連続するフラグメント、またはSEQ ID NO:19と少なくとも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98%、または少なくとも約99%）の配列同一性を有する核酸配列である。いくつかの態様では、siRNAまたは他の核酸阻害剤は、SEQ ID NO:18の標的配列と完全にまたは部分的にハイブリダイズする。

【0215】

いくつかの態様では、ヒトSUV39h1のsiRNA阻害剤は、SEQ ID NO:21もしくはその少なくとも10個のヌクレオチドが連続するフラグメント、またはSEQ ID NO:21と少なくとも80%の配列同一性（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98%、または少なくとも約99%の配列同一性）を有する核酸配列である。いくつかの態様では、siRNAまたは他の核酸阻害剤は、SEQ ID NO:20の標的配列と完全にまたは部分的にハイブリダイズする。

【0216】

いくつかの態様では、siRNAまたは他の核酸阻害剤は、ヒトSUV39h2のSEQ ID NO:15、49、51、52および53（hSUV39h2異種1～5）のいずれかのヌクレオチド領域内に位置する標的配列と完全にまたは部分的にハイブリダイズする。

【0217】

H3K9メチルトランスフェラーゼ遺伝子の阻害は、当業者によって一般的に公知の方法に従い遺伝子サイレンシングRNAi分子によることができる。ヒトSUV39h1、ヒトSUV39h2、ヒトSETDB1、ヒトEHMT1、およびヒトPRDM2の阻害は、当技術分野において周知である。いくつかの態様では、H3K9メチルトランスフェラーゼ阻害剤は、表2より選択されるsiRNA剤の任意の1つまたは組み合わせであるRNAi剤である。

【0218】

いくつかの態様では、SUV39H1は、hsa-mir-98-5p（MIRT027407）、hsa-mir-615-3p（MIRT040438）、hsa-mir-331-3p（MIRT043442）またはそれと少なくとも85%の配列同一性のmiR異種によって標的とされかつ阻害されることができる。ヒト細胞においてSUV39h1および/またはSUV39h2を阻害する、市販のsiRNA、RNAiおよびshRNA製品は、Origene、QiagenおよびSanta Cruz Biotechnologyから入手可能であり、かつ当業者によって使用されることができる。

【0219】

例えば、ヒトSUV39H2異種1～5（SEQ ID NO:15、49、51、52および53）のいずれかに位置する核酸配列に部分的にまたは完全に結合し、かつハイブリダイズする遺伝子サイレンシングsiRNAオリゴヌクレオチドを、SUV39h2の発現をノックダウンするために容易に使用することができる。siRNAを使用して、SUV39h2 mRNAを成功裏に標的とすることができ；他のsiRNA分子は、標的mRNAの公知の配列に基づき当業者によって容易に調製され得る。誤解を避けるために、ヒトSUV39h2異種の配列は、表8に示される。誤解を避けるために、ヒトSUV39h2異種のcDNA配列は、例えばGenBankアクセッション番号：NM_024670.3（SEQ ID NO:15）、NM_001193425.1（SEQ ID NO:51）、NM_001193426.1（SEQ ID NO:52）、NM_001193427.1（SEQ ID NO:53）に提供され、本明細書開示の方法および組成物においてH3K9メチル転移阻害剤として使用するために、ヒトSUV39h2 mRNAの発現を阻害する遺伝子サイレンシングRNAiモジュレーターを設計するために使用することができる。いくつかの態様

では、SUV39h2の阻害剤は、siRNA剤であり、例えば、siRNAは、以下の配列：

GCUCACAUGUAAAUCGAUUtt (SEQ ID NO: 18)または

AAUCGAUUUACAUGUGAGCtt (SEQ ID NO: 19)

の少なくとも1つまたは両方およびそのフラグメントまたは少なくとも80%の配列同一性の誘導体を含むことができる。いくつかの態様では、SUV39h2の阻害剤は、少なくとも標的配列

GCUCACAUGUAAAUCGAUUtt (SEQ ID NO: 18)

に結合するsiRNA剤である。いくつかの態様では、SUV39h2の阻害剤は、

AAUCGAUUUACAUGUGAGCtt (SEQ ID NO: 19)

の部分の少なくとも5つの連続するヌクレオチドまたはそのフラグメントもしくは少なくとも80%の配列同一性の誘導体を含むsiRNA剤である。

10

【 0 2 2 0 】

本明細書に使用される、用語「SUV39H2タンパク質」は、本明細書開示のSEQ ID NO:54 (アイソフォーム1)、SEQ ID NO:6またはSEQ ID NO:53 (アイソフォーム2)、SEQ ID NO:56 (アイソフォーム3)もしくはSEQ ID NO:57 (アイソフォーム4)のいずれかのアミノ酸、および機能の構造に不利に影響しない保存的置換、付加、欠失をその中に含むそのホモログを表す。hSUV39h2異種核酸配列およびそれらの対応するタンパク質についてのアクセッション番号は、表8に示される。例えば、SUV39h2アイソフォーム2タンパク質は、以下のようなヒトSUV39H2異種3転写物についての核酸配列 (SEQ ID NO:15) によってコードされる。

20

```

1  cggggccgag  gcgcgaggag  gtgaggctgg  agcgcggccc  cctcgccttc  cctgttccca
61  ggcaagctcc  caaggcccgg  gcggcggggc  cgtecccgcg  gccagccaga  tggcgacgtg
121  gcggttcccc  gcccgccgcg  accccaactc  cgggacgcac  gctgcggacg  cctatcctcc
181  cccaggccgc  tgaccgcct  ccctgcccgg  ccggtcccg  ccgcgaggga  tatggaatat
241  tatcttgtaa  aatggaaagg  atggccagat  tctacaaata  cttgggaacc  tttgaaaat
301  ctgaagtgcc  cgttactgct  tcagcaattc  tctaatagaca  agcataatta  tttatctcag
361  gtaaagaaag  gcaaagcaat  aactccaaaa  gacaataaca  aaactttgaa  acctgcccatt
421  gctgagtaca  ttgtgaagaa  ggctaaacaa  aggatagctc  tgcagagatg  gcaagatgaa
481  ctcaacagaa  gaaagaatca  taaaggaatg  atatttggtg  aaaatactgt  tgatttagag
541  ggcccacctt  cagacttcta  ttacattaac  gaatacaaac  cagctccttg  aatcagctta
601  gtcaatgaag  ctaccttttg  ttgttcatgc  acagattgct  tctttcaaaa  atgttgtcct
661  gctgaagctg  gagttctttt  ggcttataat  aaaaaccaac  aaattaaaat  cccacctggt
721  actcccatct  atgaatgcaa  ctcaagggtg  cagtgtggtc  ctgattgtcc  caataggatt
781  gtacaaaaag  gcacacagta  ttcgctttgc  atctttcgaa  ctagcaatgg  acgtggctgg
841  ggtgtaaaga  cccttgtaga  gattaaaaga  atgagttttg  tcatggaata  tggtggagag
901  gtaatcacia  gtgaagaagc  tgaaagacga  ggacagttct  atgacaacia  gggaatcacg
961  tatctctttg  atctggacta  tgagtctgat  gaattcacag  tggatgcggc  tcgatacggc
1021  aatgtgtctc  attttgtaga  tcacagctgt  gacccaaatc  ttcaggtgtt  caatgttttc
1081  attgataacc  tcgatactcg  tcttccccga  atagcattgt  tttccacaag  aaccataaat
1141  gctggagaag  agctgacttt  tgattatcaa  atgaaagggt  ctggagatat  atcttcagat
1201  tctattgacc  acagcccagc  caaaaagagg  gtcagaacag  tatgtaaatg  tggagctgtg
1261  acttgacag  gttacctcaa  ctgaactttt  tcaggaaata  gagctgatga  ttataatatt
1321  tttttcctaa  tgtaaacatt  tttaaaaata  cataattggg  actcttatta  tcaaggttct
1381  acctatgtta  atttacaatt  catgtttcaa  gacatttgcc  aaatgtatta  ccgatgcctc
1441  tgaaaagggg  gtcactgggt  ctcatagact  gatatgaagt  cgacatattt  atagtgttta
1501  gagaccaaac  taatggaagg  cagactattt  acagcttagt  atatgtgtac  ttaagtctat
1561  gtgaacagag  aatgcctcc  cgtagtggtt  gaaagcgtaa  agctgataat  gtaattaaca
1621  actgctgaga  gatcaaagat  tcaacttgcc  atacacctca  aattcggaga  aacagttaat
1681  ttgggcaaat  ctacagtctt  gtttttgcta  ctctattgtc  attcctgttt  aatactcact
1741  gtacttgtat  ttgagacaaa  taggtgatac  tgaattttat  actgttttct  acttttccat
1801  taaaacattg  gcacctcaat  gataaagaaa  tttaaaggtat  aaaattaaat  gtaaaaatta
1861  atttcagctt  catttcgtat  ttcgaaagcaa  tctagactgt  tgtgatgagt  tatgtctga
1921  acctgtaatt  cttaaaagac  ttcttaatat  tctagaagaa  aaatctccga  agagctctct
1981  ctagaagtcc  aaaatggcta  gccattatgc  ttctttgaaa  ggacatgata  atgggaccag
2041  gatgggtttt  tggagtacca  agcaagggga  atggagcact  ttaaggggcg  ctgttagtaa
2101  catgaattgg  aaatctgtgt  cgagtacctc  tgatctaaac  ggtaaaacaa  gctgcctgga
2161  gagcagctgt  acctacaat  actgtaatgt  acattaacat  tacagcctct  caatttcagg
2221  caggtgtaac  agttcctttc  caccagattt  aatattttta  tacttcctgc  aggttcttct
2281  taaaaagtaa  tctatatttt  tgaactgata  cttgttttat  acataaattt  ttttagatg
2341  tgataaagct  aaacttggcc  aaagtgtgtg  cctgaattat  tagacctttt  tattagtcaa
2401  cctacgaaga  ctaaaataga  atatattagt  tttcaaggga  gtgggaggct  tccaacatag
2461  tattgaatct  caggaaaaac  tattctttct  tgtctgattc  tgagatttct  aattgtgttg
2521  tgaaaatgat  aaatgcagca  aatctagctt  tcagtattcc  taatttttac  ctaagctcat
2581  tgcctcaggc  tttgattacc  taaaataaag  ttggataaaa  ttgaaccaac  ttaagaatg
2641  cagcacttct  taatctttag  ctctttcttg  ggagaagcta  gactttattc  attatattgc
2701  tatgacaact  tcactctttc  ataatatata  ggataaattg  tttacatgat  tggacctca
2761  gattctgtta  accaaaattg  cagaatgggg  ggccaggcct  gtgtggtggc  tcacacctgt
2821  gatcccagca  ctttgggagg  ctgaggtagg  aggatcacgt  gaggtcgga  gttcaagacc
2881  agcctggcca  tcatggtgaa  accctgtctc  tactgaaaat  acaaaaatta  gccgggcgtg
2941  gtggcacacg  cctgtagtcc  cagctactca  ggaggtgag  gcaggagaat  cactgaatt
3001  caggaggcgg  aggttgagct  gagccaagat  cataccactg  cactgcagcc  tgagtgcac
3061  agtaagactg  tctccaaaaa  aaaaaaaaaa  aaa (SEQ ID NO: 15)

```

10

20

30

40

【 0 2 2 1 】

いくつかの態様では、活性物質は、本明細書開示のヒトSUV39h2のSEQ ID NO:15、49、51、52および53 (hSUV39h2異種1~5) のいずれかのmRNA発現を阻害する。いくつかの態様では、当業者は、SEQ ID NO:6、54~57の任意の1つまたは複数のヒトSUV39h2タンパク質をコードするmRNAの発現を阻害する、使用されるべきRNAi剤を選択することができる。

【 0 2 2 2 】

ヒトSUV39H1およびSUV39H2を阻害するための他の例示的なsiRNA配列は、その全体として参照により本明細書に組み入れられる米国特許出願公開第2012/0034192号に開示されている。

【 0 2 2 3 】

50

(表2) H3K9メチルトランスフェラーゼを阻害するための例示的なsiRNA配列

遺伝子	SEQ ID NO:	名称	siRNA 配列
ヒト SUV39h1	7	hSUV39h1 siRNA(センス)	GAAACGAGUCCGUAUUGAAtt (センス)
ヒト SUV39h1	8	hSUV39h1 siRNA(アンチセンス)	UUCAAUACGGACUCGUUUUc (アンチセンス)
ヒト SUV39h2	18	hSUV39h2 siRNA(センス)	GCUCACAUGUAAAUCGAUUtt (センス)
ヒト SUV39h2	19	hSUV39h2 siRNA(アンチセンス)	AAUCGAUUUACAUGUGAGCtt (アンチセンス)
ヒト SUV39h1	20	hSUV39h1 siRNA(センス)	GGUGUACAACGUAUUCUAAtt (センス)
ヒト SUV39h1	21	hSUV39h1 siRNA(アンチセンス)	UAUGAAUACGUUGUACACc (アンチセンス)
ヒト SUV39h1	22	hSUV39h1 siRNA(センス)	GGUCCUUUGUCUAUAUCAAtt (センス)
ヒト SUV39h1	23	hSUV39h1 siRNA(アンチセンス)	UUGAUUAAGACAAAGGACc (アンチセンス)
ヒト SUV39h2	24	hSUV39h2 siRNA(センス)	GCUCACAUGUAAAUCGAUUtt (センス)
ヒト SUV39h2	25	hSUV39h2 siRNA(アンチセンス)	AAUCGAUUUACAUGUGAGCtt (アンチセンス)
ヒト SUV39h2	26	hSUV39h2 siRNA(センス)	GUGUCGAUGUGGACCUGAAtt (センス)
ヒト SUV39h2	27	hSUV39h2 siRNA(アンチセンス)	UUCAGGUCCACAUCGACACc (アンチセンス)
ヒト SETDB1 (ESET)	28	hSETDB1 siRNA (センス)	GGACUACAGUAUCAUGACAAtt (センス)
ヒト SETDB1 (ESET)	29	hSETDB1 siRNA (アンチセンス)	UGUCAUGAUACUGUAGUCCca (アンチセンス)
ヒト SETDB1 (ESET)	30	hSETDB1 siRNA (センス)	GGACGAUGCAGGAGAUAGAtt (センス)
ヒト SETDB1 (ESET)	31	hSETDB1 siRNA(アンチセンス)	UCUAUCUCCUGCAUCGUCCga (アンチセンス)
ヒト SETDB1 (ESET)	32	hSETDB1 siRNA (センス)	GGAUGGGUGUCGGGAUAAAAtt (センス)
ヒト SETDB1 (ESET)	33	hSETDB1 siRNA(アンチセンス)	UUUAUCCCGACACCCAUCct (アンチセンス)
ヒト EHMT1(GLP)	34	hEHMT1 siRNA (センス)	GCACCUUUGUCUGCGAAUAAtt (センス)
ヒト EHMT1(GLP)	35	hEHMT1 siRNA(アンチセンス)	UAUUCGCAGACAAAGGUGCcc (アンチセンス)
ヒト EHMT1(GLP)	36	hEHMT1 siRNA (センス)	GAUCAAACCUGCUCGGAAAtt (センス)
ヒト EHMT1(GLP)	37	hEHMT1 siRNA(アンチセンス)	UUUCCGAGCAGGUUUGAUCCa (アンチセンス)
ヒト PRDM2/Riz1	38	hPRDM2 siRNA (センス)	GAAUUUGCCUUCUUAUGCAAtt (センス)
ヒト PRDM2/Riz1	39	hPRDM2 siRNA(アンチセンス)	UGCAUAAAGAAGGCAAAUUCtt (アンチセンス)
ヒト PRDM2/Riz1	40	hPRDM2 siRNA (センス)	GAGGAAUUCUAGUCCCGUAAtt (センス)
ヒト PRDM2/Riz1	41	hPRDM2 siRNA(アンチセンス)	UACGGGACUAGAAUUCUCaa (アンチセンス)

【0224】

誤解を避けるために、ヒトSETDB1 cDNAの配列は、例えばGenBankアクセッション番号：NM_001145415.1 (SEQ ID NO:16) に提供され、かつ本明細書開示の方法および組成物においてH3K9メチル転移阻害剤として使用するための、ヒトSETDB1 mRNAの発現を阻害する遺伝子サイレンシングRNAiモジュレーターを設計するために、当業者によって使用されることができる。

【0225】

誤解を避けるために、ヒトEHMT1 cDNAの配列は、例えばGenBankアクセッション番号：NM_024757.4 (SEQ ID NO:42) に提供され、かつ本明細書開示の方法および組成物においてH3K9メチル転移阻害剤として使用するための、ヒトEHMT1 mRNAの発現を阻害する遺伝子サイレンシングRNAiモジュレーターを設計するために、当業者によって使用されることができる。

【0226】

誤解を避けるために、ヒトPRDM2 cDNAの配列は、例えばGenBankアクセッション番号：N

10

20

30

40

50

M_012231.4 (SEQ ID NO:43) に提供され、かつ本明細書開示の方法および組成物において H3K9メチル転移阻害剤として使用するための、ヒトPRDM2 mRNAの発現を阻害する遺伝子サイレンシングRNAiモジュレーターを設計するために、当業者によって使用されることができる。

【0227】

いくつかの態様では、H3K9メチルトランスフェラーゼの阻害剤は、RNAi剤、siRNA剤、shRNA、オリゴヌクレオチド、CRISPR/Cas9、CRISPR/Cpf1、中和抗体または抗体フラグメント、アプタマー、小分子、タンパク質、ペプチド、小分子、アビジミル、およびその機能的フラグメントまたは誘導体などからなる群より選択される。いくつかの態様では、H3K9メチルトランスフェラーゼ阻害剤は、RNAi剤、例えばsiRNAまたはshRNA分子である。いくつかの態様では、活性物質は、ヒトSUV39H1タンパク質 (SEQ ID NO:5もしくはSEQ ID NO:48) またはSUV29h1 mRNA (SEQ ID NO:14もしくはSEQ ID NO:47) またはヒトSUV39H2タンパク質 (SEQ ID NO:6もしくはSEQ ID NO:54~57) またはSUV39h2 mRNA (SEQ ID NO:15もしくはSEQ ID NO:49、51、52、53) のタンパク質発現を低下させる核酸阻害剤を含む。いくつかの態様では、ヒトSUV39h1のsiRNA阻害剤は、SEQ ID NO:8もしくはその少なくとも10個のヌクレオチドが連続するフラグメント、またはSEQ ID NO:8と少なくとも80%の配列同一性 (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98%、または少なくとも約99%の配列同一性) を有する核酸配列である。いくつかの態様では、siRNAまたは他の核酸阻害剤は、SUV39H1のSEQ ID NO:7の標的配列と、完全にまたは部分的にハイブリダイズする。いくつかの態様では、ヒトSUV39H2のsiRNA阻害剤は、SEQ ID NO:19もしくはその少なくとも10個のヌクレオチドが連続するフラグメント、またはSEQ ID NO:19と少なくとも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98%、または少なくとも約99%) の配列同一性を有する核酸配列を含む。いくつかの態様では、siRNAまたは他の核酸阻害剤は、SUV39h2のSEQ ID NO:18またはSEQ ID NO:15の標的配列に完全にまたは部分的にハイブリダイズする。

【0228】

上記局面の他の態様では、H3K9メチルトランスフェラーゼ阻害剤は、SUV39H1、SUV39H2、G9A (EHMT2)、EHMT1、ESET (SETDB1)、SETDB2、MLL、MLL2、MLL3、SETD2、NSD1、SMYD2、DOT1L、SETD8、SUV420H1、SUV420H2、EZH2、SETD7、PRDM2、PRMT1、PRMT2、PRMT3、PRMT4、PRMT5、PRMT6、PRMT7、PRMT8、PRMT9、PRMT10、PRMT11、CARM1からなる群より選択される上記のヒストンメチルトランスフェラーゼの任意の1つを阻害する。

【0229】

いくつかの態様では、H3K9メチルトランスフェラーゼを阻害する、例えば、ヒトSUV39H1、ヒトSUV39H2またはヒトSETDB1を阻害する活性物質は、核酸である。H3K9メチルトランスフェラーゼ、例えば、SUV39H1、SUV39H2またはSETDB1の核酸阻害剤には、例えば非限定的に、RNA干渉 (RNAi) 誘導分子、例えば非限定的に、siRNA、dsRNA、stRNA、shRNAおよびその修飾バージョンが含まれ、その際、RNA干渉 (RNAi) 分子は、ヒトSUV39H1、ヒトSUV39H2および/またはヒトSETDB1遺伝子の任意の1つからの遺伝子発現をサイレンシングする。

【0230】

したがって、いくつかの態様では、H3K9メチルトランスフェラーゼの阻害剤、例えば、ヒトSUV39H1、ヒトSUV39H2またはヒトSETDB1の阻害剤は、当業者によって一般的に公知の任意の「遺伝子サイレンシング」方法によって阻害することができる。いくつかの態様では、H3K9メチルトランスフェラーゼの核酸阻害剤、例えば、例えばヒトSUV39H1、ヒトSUV39H2またはヒトSETDB1の阻害剤は、アンチセンスオリゴ核酸、または核酸類似体、例えば非限定的に、DNA、RNA、ペプチド-核酸 (PNA)、疑似相補性PNA (pc-PNA)、またはロッキング核酸 (LNA) などである。代替的な態様では、核酸は、DNAまたはRNA、および核酸類似体、例えばPNA、pcPNAおよびLNAである。核酸は、一本鎖または二本鎖であることができ、関心対象のタンパク質をコードする核酸、オリゴヌクレオチド、PNAなどを含む群よ

り選択することができる。そのような核酸配列には、例えば非限定的に、転写リプレッサーとして作用するタンパク質をコードする核酸配列、アンチセンス分子、リボザイム、低分子阻害性核酸配列、例えば非限定的に、RNAi、shRNAi、siRNA、マイクロRNAi (mRNAi)、アンチセンスオリゴヌクレオチドなどが含まれる。

【0231】

いくつかの態様では、真核細胞に内因的に見出されるRNAの一形態である一本鎖RNA (ssRNA) を使用して、RNAi分子を形成させることができる。細胞性ssRNA分子には、メッセンジャーRNA (および前駆体のプレ-メッセンジャーRNA)、核内低分子RNA、核小体低分子RNA、転移RNAおよびリボソームRNAが含まれる。二本鎖RNA (dsRNA) は、サイズ依存性免疫応答を誘導し、それにより30bpよりも大きなdsRNAがインターフェロン応答を活性化し、一方でより短いdsRNAがDicer酵素下流の細胞の内因性RNA干渉機構に供給される。

10

【0232】

RNA干渉 (RNAi) は、選択された標的ポリペプチドの発現を阻害するための強力なアプローチを提供する。RNAiは、選択的分解のために、標的ポリペプチドをコードするメッセンジャーRNAを標的とする低分子干渉RNA (siRNA) 二重鎖を使用する。遺伝子発現のsiRNA依存性転写後サイレンシングは、siRNAによってガイドされる部位で標的メッセンジャーRNA分子を切断することを伴う。

【0233】

RNA干渉 (RNAi) は、標的遺伝子と同一または高度に類似の配列のRNAの発現または導入が、その標的指向性遺伝子から転写されるメッセンジャーRNA (mRNA) の配列特異的分解または特異的転写後遺伝子サイレンシング (PTGS) をもたらす (Coburn, G. and Cullen, B. (2002) J. of Virology 76(18):9225参照) ことによって標的遺伝子の発現を阻害する、進化的に保存された過程である。一態様では、RNAは、二本鎖RNA (dsRNA) である。この過程は、植物、無脊椎動物、および哺乳動物細胞において記載されている。自然界で、RNAiは、長鎖dsRNAからsiRNAと呼ばれる二本鎖フラグメントの連続的切断を促進するdsRNA特異的エンドヌクレアーゼDicerによって開始される。siRNAは、標的mRNAを認識および切断するタンパク質複合体 (「RNA誘導サイレンシング複合体」または「RISC」と呼ばれる) に組み入れられる。また、核酸分子、例えば合成siRNAまたはRNA干渉剤を導入して、標的遺伝子の発現を阻害またはサイレンシングすることによって、RNAiを開始することができる。本明細書に使用される、「標的遺伝子発現の阻害」は、RNA干渉が誘導されていない状況と比較して、標的遺伝子または標的遺伝子によってコードされるタンパク質の発現またはタンパク質活性またはレベルにおける任意の減少を含む。減少は、標的遺伝子の発現またはRNA干渉剤によって標的とされていない標的遺伝子によってコードされるタンパク質の活性もしくはレベルと比較して、少なくとも30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%または99%またはそれよりも大きいことができる。

20

30

【0234】

本明細書において「低分子干渉RNA」とも呼ばれる「短鎖干渉RNA」(siRNA) は、標的遺伝子、例えばRNAiによる、標的遺伝子の発現を阻害するように機能する作用物質として定義される。siRNAは、化学合成することができ、インビトロ転写によって産生することができ、または宿主細胞内で産生することができる。一態様では、siRNAは、約15~約40ヌクレオチド長、好ましくは約15~約28ヌクレオチド、より好ましくは約19~約25ヌクレオチド長、より好ましくは約19、20、21、22、または23ヌクレオチド長の二本鎖RNA (dsRNA) 分子であり、各鎖上に約0、1、2、3、4、または5ヌクレオチド長を有する3'および/または5'オーバーハングを含むことができる。オーバーハングの長さは、2つの鎖の間で無関係であり、すなわち、一方の鎖上のオーバーハングの長さは、2番目の鎖上のオーバーハングの長さに依存しない。好ましくは、siRNAは、標的メッセンジャーRNA (mRNA) の分解または特異的転写後遺伝子サイレンシング (PTGS) によりRNA干渉を促進する能力がある。

40

【0235】

siRNAには、また、低分子ヘアピン型 (ステムループとも呼ばれる) RNA (shRNA) が含

50

まれる。一態様では、これらのshRNAは、短鎖（例えば、ヌクレオチド約19～約25個の）アンチセンス鎖に続くヌクレオチド約5～約9個のヌクレオチドループ、および類似のセンス鎖から構成される。あるいは、センス鎖は、ヌクレオチドループ構造に先行することができ、アンチセンス鎖は、後続することができる。これらのshRNAは、プラスミド、レトロウイルス、およびレンチウイルス中に含有され、例えばpol III U6プロモーター、または別のプロモーターから発現されることができる（例えば、その全体として参照により本明細書に組み入れられる、Stewart, et al. (2003) RNA Apr;9(4):493-501を参照されたい）。

【0236】

RNA干渉剤の標的遺伝子または配列は、細胞の遺伝子またはゲノム配列、例えばSUV39h1、SUV39h2またはSETDB1遺伝子配列のH3K9メチルトランスフェラーゼ遺伝子配列であることができる。siRNAは、標的遺伝子もしくはゲノム配列、またはそのフラグメントと実質的に相同であることができる。これに関連して使用されるように、用語「相同である」は、標的のRNA干渉を引き起こすために、標的mRNAまたはそのフラグメントと実質的に同一、十分に相補的、または類似であるとして定義される。ネイティブなRNA分子に加えて、標的配列の発現を阻害または干渉するために適切なRNAには、RNA誘導体および類似体が含まれる。好ましくは、siRNAは、その標的配列と同一である。

【0237】

siRNAは、好ましくは、1つの配列だけを標的とする。siRNAのような各RNA干渉剤は、例えば発現プロファイリングにより潜在的オフターゲット効果についてスクリーニングすることができる。そのような方法は、当業者に公知であり、例えば、Jackson et al, Nature Biotechnology 6:635-637, 2003に記載されている。発現プロファイリングに加えて、配列データベース中の類似配列について潜在的標的配列をスクリーニングして、オフターゲット効果を有する可能性がある潜在的配列を特定することができる。例えばJacksonら（同上）によると、配列が同一な15個、またはことによるとわずか11個の連続するヌクレオチドは、標的とされていない転写物のサイレンシングを指令するのに十分である。したがって、提案されたsiRNAを最初にスクリーニングして、BLASTのような任意の公知の配列比較方法による配列同一性分析を使用して潜在的なオフターゲットサイレンシングを回避することができる。

【0238】

siRNA分子は、RNAだけを含む分子に限定される必要はなく、例えばさらに化学修飾ヌクレオチドおよび非ヌクレオチドを包含し、また、リボース糖分子が、別の糖分子または類似の機能を果たす分子の代わりに置換された分子を含む。そのうえ、ヌクレオチド残基間にホスホロチオエート結合のような非天然結合を使用することができる。例えば、RNA中に見出される天然D-リボヌクレオシドの代わりにD-アラビノフラノシル構造を含むsiRNAを、本発明によるRNAi分子に使用することができる（米国特許第5,177,196号）。他の例には、ヌクレオシドの糖と複素環塩基との間にヌクレアーゼ耐性を付与する α -結合を含むRNA分子および2'-O-メチルリボース、アラビノース、特にD-アラビノースを含むオリゴヌクレオチドに類似のオリゴヌクレオチド分子に結合する、緊密な相補鎖が含まれる（米国特許第5,177,196号）。

【0239】

RNA鎖は、フルオロフォアのようなレポーター基の反応性官能基で誘導体化することができる。特に有用な誘導体は、RNA鎖の1つまたは複数の末端で、典型的にはセンス鎖の3'末端で、修飾される。例えば、3'末端の2'-ヒドロキシルを、多様な基で容易におよび選択的に誘導体化することができる。

【0240】

他の有用なRNA誘導体は、2'-O-アルキル化残基または2'-O-メチルリボシル誘導体および2'-O-フルオロリボシル誘導体のような修飾糖質部分を有するヌクレオチドを組み入れている。RNA塩基も修飾することができる。標的配列の発現を阻害または干渉するために有用な任意の修飾塩基を、使用することができる。例えば、5-プロモウラシルおよび5-ヨウ

10

20

30

40

50

ドウラシルのようなハロゲン化塩基を組み入れることができる。また塩基をアルキル化することができる、例えば、グアノシン残基の代わりに7-メチルグアノシンを組み入れることができる。成功裏な阻害をもたらす非天然塩基も、組み入れることができる。

【0241】

最も好ましいsiRNA修飾には、2'-デオキシ-2'-フルオロウリジンまたはロックド核酸(LNA)ヌクレオチドおよびホスホジエステルまたは様々な数のホスホロチオエート結合のいずれかを含むRNA二重鎖が含まれる。そのような修飾は、当業者に公知であり、例えば、Braasch et al., Biochemistry, 42: 7967-7975, 2003に記載されている。アンチセンスオリゴヌクレオチド技法のために樹立された化学反応を使用して、siRNA分子への有用な修飾の大部分を導入することができる。好ましくは、修飾は、最小限の2'-O-メチル修飾を伴い、好ましくはそのような修飾を排除する。修飾は、また、好ましくはsiRNAの遊離5'-ヒドロキシル基の修飾を排除する。

10

【0242】

それらの3'-またはそれらの5'-末端のいずれかまたは両方に共有結合した様々な「尾部」を有するsiRNAおよびmiRNA分子も、当技術分野において公知であり、本発明の方法を使用して送達されるsiRNAおよびmiRNA分子を安定化するために使用することができる。一般的に述べると、挿入基(intercalating group)、RNA分子の3'または5'末端に結合される様々な種類のレポーター基および親油性基は、当業者に周知であり、本発明の方法により有用である。本発明により有用な修飾RNA分子の調製に適用可能な3'-コレステロールまたは3'-アクリジン修飾オリゴヌクレオチドの合成の説明は、例えば文献: Gamper, H. B., Reed, M. W., Cox, T., Viroso, J. S., Adams, A. D., Gall, A., Scholler, J. K. and Meyer, R. B. (1993) Facile Preparation and Exonuclease Stability of 3'-Modified Oligodeoxynucleotides. Nucleic Acids Res. 21 145-150; および Reed, M. W., Adams, A. D., Nelson, J. S., and Meyer, R. B., Jr. (1991) Acridine and Cholesterol-Derivatized Solid Supports for Improved Synthesis of 3'-Modified Oligonucleotides. Bioconjugate Chem. 2 217-225 (1993)から見出すことができる。

20

【0243】

H3K9メチルトランスフェラーゼ、例えばSUV39h1、SUV39h2またはSETDB1遺伝子を標的とするのに有用な他のsiRNAを、容易に設計および検査することができる。したがって、本明細書記載の方法に有用なsiRNAには、特異的H3K9メチルトランスフェラーゼ遺伝子、例えばSUV39h1、SUV39h2またはSETDB1遺伝子に相同な、約15~約40または約15~約28ヌクレオチド長のsiRNA分子が含まれる。いくつかの態様では、H3K9メチルトランスフェラーゼを標的とする作用物質、例えばSUV39h1、SUV39h2またはSETDB1を標的とするsiRNA分子は、約25~約29ヌクレオチド長を有する。いくつかの態様では、H3K9メチルトランスフェラーゼを標的とするsiRNA、例えばSUV39h1、SUV39h2またはSETDB1を標的とするsiRNA分子は、約27、28、29、または30ヌクレオチド長を有する。いくつかの態様では、H3K9メチルトランスフェラーゼを標的とするRNAi、例えばSUV39h1、SUV39h2またはSETDB1を標的とするsiRNA分子は、また、3'ヒドロキシル基を含むことができる。いくつかの態様では、H3K9メチルトランスフェラーゼを標的とするsiRNA、例えばSUV39h1、SUV39h2またはSETDB1を標的とするsiRNA分子は、一本鎖または二本鎖であることができ、そのような分子は、平滑末端である、またはオーバーハング末端(例えば、5'、3')を含むことができる。特定の態様では、RNA分子は、二本鎖であり、かつ平滑末端であるか、またはオーバーハング末端を含むかのいずれかであることができる。

30

40

【0244】

一態様では、H3K9メチルトランスフェラーゼ、例えばSUV39h1、SUV39h2またはSETDB1を標的とするRNA分子の少なくとも1つの鎖は、約0~約6ヌクレオチド(例えばピリミジンヌクレオチド、プリンヌクレオチド)長の3'オーバーハングを有する。他の態様では、3'オーバーハングは、約1~約5ヌクレオチド、約1~約3ヌクレオチド、および約2~約4ヌクレオチド長である。一態様では、ヒトSUV39h1/2、SETDB1、EHMT1またはPRDM2を標的とするRNA分子は、二本鎖であり、一方の鎖が3'オーバーハングを有し、もう一方の鎖が平滑末端

50

である、またはオーバーハングを有することができる。H3K9メチルトランスフェラーゼ、例えばSUV39h1、SUV39h2 SETDB1、EHMT1またはPRDM2のRNAi剤が二本鎖であり、両方の鎖が、オーバーハングを含む態様では、オーバーハングの長さは、各鎖で同じまたは異なることができる。特定の一態様では、本発明のRNAは、約19、20、21、または22個のヌクレオチドを含み、それらは対形成しており、かつそれらはRNAの両方の3'末端に約1～約3つ、特に約2つのヌクレオチドのオーバーハングを有する。一態様では、3'オーバーハングを、分解に対抗して安定化することができる。好ましい一態様では、RNAは、アデノシンまたはグアノシンヌクレオチドのようなプリンヌクレオチドを含めることによって安定化される。あるいは修飾類似体によるピリミジンヌクレオチドの置換、例えば、2'-デオキシチミジンによるウリジン2ヌクレオチド3'オーバーハングの置換は、耐容され、RNAiの効率に影響しない。2'ヒドロキシルの非存在は、組織培養培地中のオーバーハングのヌクレアーゼ耐性を顕著に高める。

10

20

30

40

50

【0245】

本明細書に開示するように、H3K9メチルトランスフェラーゼSUV39h1、SUV39h2およびSETDB1に対するsiRNAは、マウスSCNTの効率を増加させるために成功裏に使用されてきた。H3K9メチルトランスフェラーゼの遺伝子サイレンシングRNAi、例えばヒトSUV39h1、ヒトSUV39h2、ヒトSETDB1、ヒトEHMT1またはヒトPRDM2の発現を阻害する/遺伝子サイレンシングするためのRNAi剤が市販されていないいくつかの態様では、ヒトSUV39h1、ヒトSUV39h2、ヒトSETDB1、ヒトEHMT1またはヒトPRDM2またはPRDM2の阻害を標的とする遺伝子サイレンシングRNAi剤を、当業者が本明細書開示の方法により産生することができる。いくつかの態様では、ヒトSUV39h1、ヒトSUV39h2、ヒトSETDB1、ヒトEHMT1またはヒトPRDM2のmRNAおよび/またはタンパク質の発現および/またはノックダウンの評価は、当業者に公知の市販のキットを使用して決定することができる。当業者は、標的mRNAの公知の配列に基づいて、他のものを容易に調製することができる。

【0246】

いくつかの態様では、H3K9メチルトランスフェラーゼの阻害剤は、ヒトSUV39h1、ヒトSUV39h2、ヒトSETDB1、ヒトEHMT1またはヒトPRDM2のmRNAレベルの任意の1つまたは複数を下方調節または減少させる遺伝子サイレンシングRNAi剤であり、かつ25ntヘアピン型配列であることができる。いくつかの態様では、H3K9メチルトランスフェラーゼ阻害剤は、例えば、ヒトSUV39h1、ヒトSUV39h2、ヒトSETDB1、ヒトEHMT1またはヒトPRDM2の任意の1つまたは複数のshRNA配列などの遺伝子サイレンシングRNAiである。

【0247】

一態様では、本明細書記載の方法に使用されるRNA干渉剤は、RNA干渉剤、例えば本発明の方法に使用されるsiRNAの効率的なインピボ送達を例証しているベクターを使用せずに静脈内注射、例えばハイドロダイナミック注射の後に細胞によって能動的にインピボ取り込みされる。

【0248】

例えばベクター、例えばプラスミドまたはウイルスベクター、例えばレンチウイルスベクターによる送達のような、RNA干渉剤、例えば本発明の方法に使用されるsiRNAまたはshRNAの送達のための他の戦略も用いることができる。そのようなベクターを、例えばXiao-Feng Qin et al. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 100: 183-188に記載されているように使用することができる。他の送達方法には、RNA干渉剤を塩基性ペプチド、例えばTATペプチドのフラグメントとコンジュゲートもしくは混合すること、陽イオン性脂質と混合すること、または粒子に製剤化することにより塩基性ペプチドを用いる、RNA干渉剤、例えば本発明のsiRNAまたはshRNAの送達が含まれる。

【0249】

述べたように、siRNAまたはshRNAのようなdsRNAを、テトラサイクリン誘導ベクターなどの誘導ベクターを使用して送達することができる。例えば、pTet-Onベクター (BD Biosciences Clontech, Palo Alto, CA) を用いる、Wang et al. Proc. Natl. Acad. Sci. 100: 5103-5106に記載の方法を使用することができる。いくつかの態様では、ベクターは、

プラスミドベクター、ウイルスベクター、または挿入のために適合された任意の他の適切なビヒクルおよび真核細胞に導入するための外来配列であることができる。ベクターは、アゴニストまたはアンタゴニスト核酸分子のDNA配列のRNAへの転写を指令する能力のある発現ベクターであることができる。ウイルス発現ベクターは、例えば レトロウイルス、レンチウイルス、エプスタイン-バーウイルス、ウシバビローマウイルス、アデノウイルスおよびアデノ随伴ウイルスに基づくベクターまたは上記のいずれかのハイブリッドウイルスを含む群より選択することができる。一態様では、ベクターはエピソーム性である。適切なエピソームベクターの使用は、対象におけるアンタゴニスト核酸分子を高コピー数染色体外DNA中に維持することによって、染色体組み込みの潜在的効果を除去する手段を提供する。

10

【0250】

本明細書開示の方法に有用なRNA干渉分子および核酸阻害剤は、直接化学合成のような公知の技法を使用して、組換えDicerタンパク質またはショウジョウバエ胚溶解物への曝露によるより長い二本鎖RNAのプロセッシングを介して、S2細胞由来インビトロシステムを介して、ファージRNAポリメラーゼ、RNA依存性RNAポリメラーゼ、およびDNAベースのベクターを使用して、産生することができる。細胞溶解物の使用またはインビトロプロセッシングはさらに、短鎖の、例えば約21~23個のヌクレオチドのsiRNAを溶解物などからその後、単離することを伴うことができる。化学合成は、通常、2つの一本鎖RNAオリゴマーを製造することによって進み、続いて2つの一本鎖オリゴマーが二本鎖RNAにアニーリングされる。他の例には、siRNAの化学的および酵素的合成を教示する国際公開公報第99/32619号および同第01/68836号に開示される方法が含まれる。そのうえ、特定のsiRNAを設計および製造するために多数の商業サービスが利用可能である（例えば、QIAGEN Inc., Valencia, CAおよびAMBIION Inc., Austin, TXを参照されたい）。

20

【0251】

用語「アンチミル (antimir)」、「マイクロRNA阻害剤」または「miR阻害剤」は、同義であり、特異的miRNAの活性を干渉するオリゴヌクレオチドを表す。阻害剤は、一本鎖、二本鎖 (RNA/RNAまたはRNA/DNA二重鎖)、およびヘアピン設計を含めた多様な立体配置を採ることができる。一般に、マイクロRNA阻害剤は、標的とされるべきmiRNAの1つ (または複数の) 成熟鎖と相補的または部分的に相補的な、1つまたは複数の配列または配列の部分を含み、加えて、miRNA阻害剤は、成熟miRNAの逆相補鎖である配列の5'および3'に位置する追加的な配列も含むことができる。追加的な配列は、成熟miRNAが得られる一次miRNA (pri-miRNA) 中の成熟miRNAに隣接する配列の逆相補鎖であることができ、または付加的な配列は、任意の配列であることができる (A、G、C、U、またはdTの混合を有する)。いくつかの態様では、付加的な配列の一方または両方は、ヘアピンを形成する能力のある任意の配列である。したがって、いくつかの態様では、miRNAの逆相補鎖である配列は、ヘアピン構造により5'側および3'側に隣接する。マイクロRNA阻害剤は、二本鎖の場合、向かい合う鎖のヌクレオチド間にミスマッチを含むことができる。

30

【0252】

いくつかの態様では、作用物質は、ヒトSUV39h1、ヒトSUV39h2 ヒトSETDB1、ヒトEHMT1および/またはヒトPRDM2のようなH3K9メチルトランスフェラーゼの任意の1つまたは組み合わせの発現を阻害する、タンパク質またはポリペプチドまたはRNAi剤である。そのような態様では、細胞は、改変されて (例えば相同組換えにより)、そのような作用物質の増加した発現を提供することができ、改変は、例えば天然プロモーターを全体でまたは部分的に異種プロモーターの全てまたは部分と置換することにより、その結果、細胞は、ヒトSUV39h1、ヒトSUV39h2、ヒトSETDB1、ヒトEHMT1および/またはヒトPRDM2のようなH3K9メチルトランスフェラーゼの阻害剤、例えばタンパク質またはRNAi剤 (例えば遺伝子サイレンシングRNAi剤) を発現する。典型的には、異種プロモーターは、作用物質をコードする所望の核酸に機能的に連結されるように挿入される。例えば、Transkaryotic Therapies, Inc.によるPCT国際公開公報W094/12650、Cell Genesys, Inc.によるPCT国際公開公報W092/20808、およびApplied Research SystemsによるPCT国際公開公報W091/09955を参照され

40

50

たい。阻害性作用物質を含む内因性遺伝子を誘導調節エレメントの制御下で発現するように、細胞を操作することもでき、その場合、内因性遺伝子の調節配列を、相同組換えによって置換することができる。遺伝子活性化技法は、Chappelへの米国特許第5,272,071号；Sherwinらへの米国特許第5,578,461号；SeldenらによるPCT/US92/09627（国際公開公報第93/09222号）；およびSkoultchiらによるPCT/US90/06436（国際公開公報第91/06667号）に記載されている。作用物質は、miRNAを発現するために適した培養条件下で形質転換宿主細胞を培養することによって調製することができる。次に、結果として生じた発現済み作用物質を、そのような培養物から（すなわち培地または細胞抽出物から）、ゲル濾過およびイオン交換クロマトグラフィーのような公知の精製工程を使用して精製することができる。ヒトSUV39h1、ヒトSUV39h2、ヒトSETDB1、ヒトEHMT1および/またはヒトPRDM2のようなH3K9メチルトランスフェラーゼのペプチドまたは核酸作用物質阻害剤の精製は、また、タンパク質と結合する作用物質を含有するアフィニティークラム；コンカナバリンA-アガロース、HEPARIN-TOYOPEARL（商標）またはシバクロンブルー（Cibacrom blue）3GAセファロースのようなアフィニティー樹脂による1つまたは複数のカラム段階；フェニルエーテル、ブチルエーテル、もしくはプロピルエーテルのような樹脂を使用する疎水性相互作用クロマトグラフィーを伴う1つまたは複数の段階；イムノアフィニティークロマトグラフィー、または相補的cDNAアフィニティークロマトグラフィーを含むことができる。

10

【0253】

一態様では、ヒトSUV39h1、ヒトSUV39h2、ヒトSETDB1、ヒトEHMT1および/またはヒトPRDM2のようなH3K9メチルトランスフェラーゼの核酸阻害剤、例えば（遺伝子サイレンシングRNAi剤）は、合成的に、例えば、当業者に公知の任意の合成方法により核酸を化学合成することによって得ることができる。次に、ヒトSUV39h1、ヒトSUV39h2、ヒトSETDB1、ヒトEHMT1および/またはヒトPRDM2のようなH3K9メチルトランスフェラーゼの合成核酸阻害剤を、当技術分野において公知の任意の方法によって精製することができる。核酸の化学合成のための方法には、非限定的に、ホスホトリエステル、リン酸エステルもしくはホスホロアミダイト化学反応および固相技法を使用する、またはデオキシヌクレオシドH-ホスホン酸中間体を介する、インビトロ化学合成（Bhongleへの米国特許第5,705,629号参照）が含まれる。

20

【0254】

一部の状況では、例えば、核酸阻害剤の増加したヌクレアーゼ安定性が望ましい場合、核酸類似体および/または修飾ヌクレオシド間結合を有する核酸を使用することができる。修飾ヌクレオシド間結合を含む核酸を、また、当技術分野において周知の試薬および方法を使用して合成することができる。例えば、ホスホネート、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ホスホルアミデート、メトキシエチルホスホルアミデート、ホルムアセタール、チオホルムアセタール、ジイソプロピルシリル、アセトアミデート、カルバメート、ジメチレン-スルフィド（ $-\text{CH}_2-\text{S}-\text{CH}_2-$ ）、ジメチレン（diethylene）-スルホキシド（ $-\text{CH}_2-\text{SO}-\text{CH}_2-$ ）、ジメチレン-スルホン（ $-\text{CH}_2-\text{SO}_2-\text{CH}_2-$ ）、2'-O-アルキル、および2'-デオキシ-2'-フルオロ'ホスホロチオエートヌクレオシド間結合を含有する核酸を合成する方法は、当技術分野において周知である（Uhlmann et al., 1990, Chem. Rev. 90:543-584; Schneider et al., 1990, Tetrahedron Lett. 31:335およびその中に引用される参考文献を参照されたい）。Cookらへの米国特許第5,614,617号および同第5,223,618号、Acavedoらへの同第5,714,606号、Cookらへの同第5,378,825号、Buhrらへの同第5,672,697号および同第5,466,786号、Cookらへの同第5,777,092号、De Mesmackerらへの同第5,602,240号、Cookらへの同第5,610,289号、およびWangへの同第5,858,988号も、増強されたヌクレアーゼ安定性および細胞取り込みのための核酸類似体を記載している。

30

40

【0255】

shRNA分子を含む合成siRNA分子も、当業者に公知のいくつかの技法を使用して容易に得ることができる。例えば、当技術分野において公知の方法を使用して、例えば適切に保護されたりボヌクレオシドホスホロアミダイトおよび従来のDNA/RNA合成装置を使用して、siRNA分子を化学合成または組換え産生することができる（例えば、Elbashir, S.M. et al

50

. (2001) Nature 411:494-498; Elbashir, S.M., W. Lendeckel and T. Tuschl (2001) Genes & Development 15:188-200; Harborth, J. et al. (2001) J. Cell Science 114:4557-4565; Masters, J.R. et al. (2001) Proc. Natl. Acad. Sci., USA 98:8012-8017; およびTuschl, T. et al. (1999) Genes & Development 13:3191-3197を参照されたい)。あるいは、非限定的に、Proligo (Hamburg, Germany)、Dharmacon Research (Lafayette, CO, USA)、Pierce Chemical (Perbio Scienceの一部門、Rockford, IL, USA)、Glen Research (Sterling, VA, USA)、ChemGenes (Ashland, MA, USA)、およびCruachem (Glasgow, UK)を含めた、いくつかの商業的RNA合成供給業者が、利用可能である。このように、siRNA分子は、合成が過度に困難なわけではなく、RNAiに適切な質で容易に供給される。加えて、プラスミドベクター、レトロウイルスおよびレンチウイルスによってコードされるステムループ構造としてdsRNAを発現させることができる (Paddison, P.J. et al. (2002) Genes Dev. 16:948-958; McManus, M.T. et al. (2002) RNA 8:842-850; Paul, C.P. et al. (2002) Nat. Biotechnol. 20:505-508; Miyagishi, M. et al. (2002) Nat. Biotechnol. 20:497-500; Sui, G. et al. (2002) Proc. Natl. Acad. Sci., USA 99:5515-5520; Brummelkamp, T. et al. (2002) Cancer Cell 2:243; Lee, N.S., et al. (2002) Nat. Biotechnol. 20:500-505; Yu, J.Y., et al. (2002) Proc. Natl. Acad. Sci., USA 99:6047-6052; Zeng, Y., et al. (2002) Mol. Cell 9:1327-1333; Robinson, D.A., et al. (2003) Nat. Genet. 33:401-406; Stewart, S.A., et al. (2003) RNA 9:493-501)。これらのベクターは、一般的に、dsRNAの上流にpol IIIプロモーターを有し、センスおよびアンチセンスRNA鎖を別々に、および/またはヘアピン構造として発現することができる。細胞内で、Dicerは、低分子ヘアピン型RNA (shRNA)を有効なsiRNAにプロセシングする。

10

20

30

40

50

【0256】

いくつかの態様では、H3K9メチルトランスフェラーゼの阻害剤は、ヒトSUV39h1、ヒトSUV39h2、ヒトSETDB1、ヒトEHMT1および/またはヒトPRDM2遺伝子の任意の1つを標的とする遺伝子サイレンシングsiRNA分子であり、特定の態様では、開始コドンの約25~50ヌクレオチド、約50~75ヌクレオチド、または約75~100ヌクレオチド下流から開始する、ヒトSUV39h1、ヒトSUV39h2、ヒトSETDB1、ヒトEHMT1および/またはヒトPRDM2のようなH3K9メチルトランスフェラーゼのコードmRNA配列を標的とする。本発明のsiRNA分子を設計する方法は、ヌクレオチド29個の配列モチーフAA(N29)TT (式中、Nは、任意のヌクレオチドであることができる) (SEQ ID NO:50)を特定する段階、および少なくとも25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%または75%のG/C含量を有するヒットを選択する段階を伴う。配列の「TT」部分は、任意である。あるいは、そのような配列が見つからないならば、モチーフNA(N21) (式中、Nは、任意のヌクレオチドであることができる)を使用して検索を拡張することができる。この状況下で、センスsiRNAの3'末端をTTに変換して、センスおよびアンチセンスの3'オーバーハングの配列組成に関して対称的な二重鎖の作製を可能にすることができる。次に、アンチセンスsiRNA分子を、ヌクレオチド23個の配列モチーフのヌクレオチド位置1~21番の相補体として合成することができる。対称的3'TTオーバーハングの使用は、低分子干渉リボ核タンパク質粒子 (siRNP) がおよそ等しい比のセンス標的RNA切断siRNPおよびアンチセンス標的RNA切断siRNPで形成されることを確実にするために有利であることができる (Elbashir et al. (2001)前記およびElbashir et al. 2001前記)。非限定的に、NCBI、BLAST、DerwentおよびGenSeqを含めた配列データベースの解析ならびにOLIGOENGINE (登録商標)のような市販のオリゴ合成ソフトウェアも使用して、ESTライブラリーに対してsiRNA配列を選択して、唯一の遺伝子が標的とされることを確実にすることができる。

【0257】

本明細書記載の方法に有用なsiRNAには、ヒトSUV39h1、ヒトSUV39h2、ヒトSETDB1、ヒトEHMT1および/またはヒトPRDM2のようなH3K9メチルトランスフェラーゼの任意の1つに相同な、約15~約40または約15~約28ヌクレオチド長のsiRNA分子が含まれる。好ましくは、ヒトSUV39h1、ヒトSUV39h2、ヒトSETDB1、ヒトEHMT1および/またはヒトPRDM2のよう

なH3K9メチルトランスフェラーゼ遺伝子に対する標的指向性siRNA分子は、約19～約25ヌクレオチド長を有する。より好ましくは、標的指向性siRNA分子は、約19、20、21、または22ヌクレオチド長を有する。標的指向性siRNA分子は、また、3'ヒドロキシル基を含むことができる。標的指向性siRNA分子は、一本鎖または二本鎖であることができ、そのような分子は平滑末端である、またはオーバーハング末端（例えば、5'、3'）を含むことができる。特定の態様では、RNA分子は、二本鎖であり、かつ平滑末端であるか、またはオーバーハング末端を含むかのいずれかである。

【0258】

一態様では、RNA分子を標的とするH3K9メチルトランスフェラーゼRNAiの少なくとも1つの鎖は、約0～約6ヌクレオチド（例えば、ピリミジンヌクレオチド、プリンヌクレオチド）長の3'オーバーハングを有する。他の態様では、3'オーバーハングは、約1～約5ヌクレオチド、約1～約3ヌクレオチドおよび約2～約4ヌクレオチド長である。一態様では、標的指向性RNA分子は、二本鎖であり、一方の鎖が3'オーバーハングを有し、もう一方の鎖が平滑末端である、またはオーバーハングを有することができる。標的指向性RNA分子が二本鎖である態様において、両方の鎖は、オーバーハングを含み、オーバーハングの長さは、各鎖で同じまたは異なることができる。特定の一態様では、本発明のRNAは、約19、20、21、または22個のヌクレオチドを含み、それらは対形成しており、かつそれらはRNAの両方の3'末端に約1～約3つ、特に約2つのヌクレオチドのオーバーハングを有する。一態様では、3'オーバーハングは、分解に対して安定化することができる。好ましい一態様では、RNAは、アデノシンまたはグアノシンヌクレオチドのようなプリンヌクレオチドを含めることによって安定化される。あるいは、修飾類似体によるピリミジンヌクレオチドの置換、例えば、2'-デオキシチミジンによるウリジン2つのヌクレオチドの3'オーバーハングの置換は耐容性であり、RNAiの効率に影響しない。2'ヒドロキシルの非存在は、組織培養培地中でのオーバーハングのヌクレアーゼ耐性を顕著に高める。

【0259】

オリゴヌクレオチドの修飾

未修飾オリゴヌクレオチドは、一部の適用において最適未満である可能性があり、例えば未修飾オリゴヌクレオチドは、例えば細胞ヌクレアーゼによる分解を受けやすい可能性がある。ヌクレアーゼは、核酸ホスホジエステル結合を加水分解することができる。しかし、オリゴヌクレオチドの1つまたは複数のサブユニットに対する化学修飾は、改善された性質を付与することができ、例えば、オリゴヌクレオチドをヌクレアーゼに対してより安定にすることができる。

【0260】

修飾核酸およびヌクレオチド代用物は、(i)変更、例えば、ホスホジエステル骨格結合における一方もしくは両方の非結合型リン酸エステル性酸素および/または1つもしくは複数の結合型リン酸エステル性酸素の置換、(ii)変更、例えば、リボース糖の構成要素の、例えばリボース糖の2'ヒドロキシルの置換；(iii)「デホスホ」リンカーによるリン酸エステル部分の大規模置換；(iv)非天然塩基による天然塩基の修飾または置換；(v)リボースリン酸エステル骨格の置換または修飾；(vi)オリゴヌクレオチドの3'末端または5'末端の修飾、例えば、末端リン酸基の除去、修飾もしくは置換、またはオリゴヌクレオチドの3'もしくは5'末端のいずれかへの部分、例えば蛍光標識部分のコンジュゲーション；および(vii)糖（例えば六員環）の修飾の、1つまたは複数を含むことができる。

【0261】

この文脈で使用される置換、修飾、変更のような用語は、任意の工程の限定を意味せず、例えば修飾は、参照または天然のリボ核酸から出発してそれを修飾して修飾リボ核酸を産生しなければならないことを意味するわけではなく、むしろ修飾は、単に天然分子と異なることを示す。

【0262】

オリゴヌクレオチドは、サブユニットまたはモノマーのポリマーであるので、本明細書

10

20

30

40

50

記載の修飾、例えば核酸塩基、糖、リン酸エステル部分、またはリン酸エステル部分の非架橋型酸素の修飾の多くは、オリゴヌクレオチド内で繰り返される位置に生じることができる。所与のオリゴヌクレオチドにおける全ての位置が一様に修飾されている必要はなく、実際、上述の修飾の1つよりも多くを、単一のオリゴヌクレオチドに、またはオリゴヌクレオチド内の単一のヌクレオチドにさえ、組み入れることができる。

【0263】

一部の例では、修飾は、オリゴヌクレオチドにおける対象位置の全てに生じるが、多くの、実際に大部分の場合で、そうならない。例として、修飾は、3'または5'末端位にだけ生じることができ、内部領域にだけ生じることができ、末端領域に、例えばオリゴヌクレオチドの末端ヌクレオチドの位置に、または最後の2、3、4、5、もしくは10個のヌクレオチドにだけ生じることができる。修飾は、二本鎖領域、一本鎖領域、またはその両方に生じることができる。修飾は、オリゴヌクレオチドの二本鎖領域にだけ生じることができ、またはオリゴヌクレオチドの一本鎖領域にだけ生じることができる。例えば、非架橋型酸素位置でのホスホロチオエート修飾は、一方または両方の末端にだけ生じることができ、末端領域、例えば末端ヌクレオチドの位置に、または鎖の最後の2、3、4、5、もしくは10個のヌクレオチドにだけ生じることができ、または二本鎖および一本鎖領域の特に末端に生じることができる。1つまたは複数の5'末端をリン酸化することができる。

10

【0264】

本明細書記載の修飾は、唯一の修飾、もしくは複数のヌクレオチド上に含まれる唯一の種類修飾であることができ、または修飾は、本明細書記載の1つまたは複数の他の修飾と組み合わせることができる。本明細書記載の修飾は、また、オリゴヌクレオチド上に組み合わせることができる、例えばオリゴヌクレオチドの異なるヌクレオチドは、本明細書記載の異なる修飾を有する。

20

【0265】

いくつかの態様では、例えば安定性を高めるために、オーバーハング中に特定の核酸塩基を含むこと、または一本鎖オーバーハング中に、例えば5'もしくは3'オーバーハング、もしくはその両方に修飾ヌクレオチドもしくはヌクレオチド代用物を含むことが特に好ましい。例えば、オーバーハング中にプリンヌクレオチドを含めることが理想的であることができる。いくつかの態様では、3'または5'オーバーハング中の塩基の全てまたは一部は、例えば本明細書記載の修飾で修飾される。修飾は、例えばリボース糖の2'OH基に修飾を使用すること、例えばリボヌクレオチドの代わりにデオキシリボヌクレオチド、例えばデオキシチミジンを使用すること、およびリン酸基を修飾すること、例えばホスホチオエート(phosphothioate)修飾をすることを含むことができる。オーバーハングは、標的配列と相同である必要はない。

30

【0266】

オリゴヌクレオチドへの特異的修飾

リン酸基

リン酸基は、負荷電化学種である。電荷は、2つの非架橋型酸素原子に等しく分布される。しかし、リン酸基を、酸素の一方を異なる置換基により置換することによって修飾することができる。RNAリン酸エステル骨格に対するこの修飾の1つの結果は、核酸分解性破壊に対するオリゴリボヌクレオチドの増加した耐性であることができる。したがって、理論に縛られることを望むわけではないが、非荷電リンカーまたは非対称な電荷分布を有する荷電リンカーのいずれかを生じる変更を導入することが、いくつかの態様で理想的であることができる。

40

【0267】

修飾リン酸基の例には、ホスホロチオエート、ホスホロセレネート、ボラノリン酸、ボラノリン酸エステル、ホスホン酸水素、ホスホロアミデート、アルキルホスホネートまたはアリールホスホネートおよびホスホトリエステルが含まれる。特定の態様では、リン酸エステル骨格部分における非架橋型リン酸エステル性酸素原子の1つを、以下：S、Se、BR₃(Rは、水素、アルキル、アリールである)、C(すなわち、アルキル基、アリール基な

50

ど)、H、NR₂(Rは、水素、アルキル、アリールである)、またはOR(Rは、アルキルまたはアリールである)のいずれかによって置換することができる。未修飾リン酸基中のリン原子は、アキラルである。しかし、上記原子または原子群の1つによる非架橋型酸素の1つの置換は、リン原子をキラルにし;言い換えると、この方法で修飾されたリン酸基におけるリン原子は不斉中心である。不斉リン原子は、「R」立体配置(本明細書においてRp)または「S」立体配置(本明細書においてSp)のいずれかを有することができる。

【0268】

ホスホロジチオエートは、両方の非架橋型酸素を硫黄により置換されている。ホスホロジチオエートにおけるリン中心は、アキラルであり、このことが、オリゴリボヌクレオチドジアステレオマーの形成を妨げている。したがって、理論に縛られることを望むわけではないが、キラル中心を除去する両方の非架橋型酸素への修飾、例えばホスホロジチオエート形成は、それらがジアステレオマー混合物を産生できない点で理想的であることができる。したがって、非架橋型酸素は、独立して、S、Se、B、C、H、N、またはOR(Rは、アルキルまたはアリールである)の任意の1つであることができる。

10

【0269】

リン酸エステルリンカーは、また、架橋型酸素(すなわち、リン酸エステルをヌクレオシドに結合する酸素)の、窒素(架橋型ホスホロアミデート)、硫黄(架橋型ホスホロチオエート)および炭素(架橋型メチレンホスホネート)による置換によって修飾することができる。置換は、一方の結合型酸素または両方の結合型酸素で生じることができる。架橋型酸素がヌクレオシドの3'-酸素である場合、炭素による置換が好ましい。架橋型酸素がヌクレオシドの5'-酸素である場合、窒素による置換が好ましい。

20

【0270】

リン酸基の置換

リン酸基を、リン不含コネクターによって置換することができる。理論に縛られることを望むわけではないが、荷電ホスホジエステル基は、核酸分解における反応中心であるので、中性構造模倣物によるその置換は、増強したヌクレアーゼ安定性を付与するはずであると考えられる。さらに、理論に縛られることを望むわけではないが、いくつかの態様において、荷電リン酸基が中性部分によって置換される変更を導入することが理想的であることができる。

30

【0271】

リン酸基を置換することができる部分の例には、メチルホスホネート、ヒドロキシルアミノ、シロキサン、カルボネート、カルボキシメチル、カルバメート、アミド、チオエーテル、エチレンオキシドリナー、スルホネート、スルホンアミド、チオホルムアセタール、ホルムアセタール、オキシム、メチレンイミノ、メチレンメチルイミノ、メチレンヒドラゾ、メチレンジメチルヒドラゾ、およびメチレンオキシメチルイミノが含まれる。好ましい置換には、メチレンカルボニルアミノおよびメチレンメチルイミノ基が含まれる。

【0272】

リン酸エステルに結合している酸素の少なくとも1つが置換されている、またはリン酸基が非リン基によって置換されている修飾リン酸エステル結合も、「非ホスホジエステル骨格結合」と呼ばれる。

40

【0273】

リボリン酸エステル骨格の置換

リン酸リンカーおよびリボース糖が、ヌクレアーゼ耐性のヌクレオシド代用物またはヌクレオチド代用物によって置換されている、オリゴヌクレオチド模倣足場も構築することができる。理論に縛られることを望むわけではないが、反復荷電した骨格の非存在は、ポリアニオンを認識するタンパク質(例えばヌクレアーゼ)への結合を減少させると考えられる。さらに、理論に縛られることを望むわけではないが、ある態様において、塩基が中性代用物骨格によって繋がれている変更を導入することが理想的であることができる。例には、モルホリノ、シクロブチル、ピロリジンおよびペプチド核酸(PNA)ヌクレオシド代用物が含まれる。好ましい代用物は、PNA代用物である。

50

【0274】

糖修飾

オリゴヌクレオチドは、核酸の糖基の全てまたは一部の修飾を含むことができる。例えば、2'ヒドロキシル基(OH)を、いくつかの異なる「オキシ」または「デオキシ」置換基により修飾または置換することができる。理論に縛られるわけではなく、ヒドロキシルが脱プロトン化されてもはや2'-アルコキシドイオンを形成することができないので、増強した安定性が予期される。2'-アルコキシドは、リンカーのリン原子への分子内求核攻撃による分解を触媒することができる。さらに、理論に縛られることを望むわけではないが、2'位でのアルコキシド形成が不可能である変更を導入することが、いくつかの態様に理想的であることができる。

10

【0275】

「オキシ」-2'ヒドロキシル基の修飾の例には、アルコキシまたはアリアルオキシ(OR、例えば、R=H、アルキル、シクロアルキル、アリアル、アラルキル、ヘテロアリアルまたは糖)；ポリエチレングリコール(PEG)、 $O(CH_2CH_2O)_nCH_2CH_2OR$ ；2'ヒドロキシルが、例えばメチレン架橋によって同じリボース糖の4'炭素に結合される「ロックド」核酸(LNA)；O-アミン(アミン=NH₂；アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、ヘテロシクリル、アリアルアミノ、ジアリアルアミノ、ヘテロアリアルアミノ、またはジヘテロアリアルアミノ、エチレンジアミン、ポリアミノ)およびアミノアコキシ、 $O(CH_2)_n$ アミン、(例えば、アミン=NH₂；アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、ヘテロシクリル、アリアルアミノ、ジアリアルアミノ、ヘテロアリアルアミノ、またはジヘテロアリアルアミノ、エチレンジアミン、ポリアミノ)が含まれる。メトキシエチル基(MOE)($OCH_2CH_2OCH_3$ 、PEG誘導体)だけを含むオリゴヌクレオチドが、頑健なホスホロチオエート修飾を有する修飾に匹敵するヌクレアーゼ安定性を示すことは、注目すべきである。

20

【0276】

「デオキシ」修飾には、水素(すなわち、部分的dsRNAのオーバーハング部分に特に関連するデオキシリボース糖)；ハロ(例えばフルオロ)；アミノ(例えばNH₂；アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、ヘテロシクリル、アリアルアミノ、ジアリアルアミノ、ヘテロアリアルアミノ、ジヘテロアリアルアミノ、またはアミノ酸)； $NH(CH_2CH_2NH)_nCH_2CH_2$ -アミン(アミン=NH₂；アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、ヘテロシクリル、アリアルアミノ、ジアリアルアミノ、ヘテロアリアルアミノ、またはジヘテロアリアルアミノ)、
-NHC(O)R(R=アルキル、シクロアルキル、アリアル、アラルキル、ヘテロアリアルまたは糖)、シアノ；メルカプト；アルキル-チオ-アルキル；チオアルコキシ；チオアルキル；ならびに例えばアミノ官能基により置換されてもよいことができるアルキル、シクロアルキル、アリアル、アルケニルおよびアルキニルが含まれる。

30

【0277】

糖基は、また、リボース中の対応する炭素と比較して逆の立体化学的立体配置を有する、1つまたは複数の炭素を含むことができる。したがって、オリゴヌクレオチドは、例えば、糖としてアラビノースを含むヌクレオチドを含むことができる。モノマーは、糖の1'位に結合例えば、-ヌクレオシドを有することができる。オリゴヌクレオチドは、また、C-1'に核酸塩基を欠如している「脱塩基」糖を含むことができる。これらの脱塩基糖は、また、構成糖原子の1つまたは複数の糖、例えばL-ヌクレオシドを含むことができる。

40

【0278】

好ましい置換基は、2'-O-Me(2'-O-メチル)、2'-O-MOE(2'-O-メトキシエチル)、2'-F、2'-O-[2-(メチルアミノ)-2'-オキシエチル](2'-O-NMA)、2'-S-メチル、2'-O-CH₂-(4'-C)(LNA)、2'-O-CH₂CH₂-(4'-C)(ENA)、2'-O-アミノプロピル(2'-O-AP)、2'-O-ジメチルアミノエチル(2'-O-DMAOE)、2'-O-ジメチルアミノプロピル(2'-O-DMAP)および2'-O-ジメチルアミノエチルオキシエチル(2'-O-DMAEOE)である。

50

【0279】

末端修飾

オリゴヌクレオチドの3'ダッシュ(3')および5'ダッシュ(5')末端を修飾することができる。そのような修飾は、分子の3'末端、5'末端または両末端にあることができる。それらは、末端リン酸全体またはリン酸基の原子の1つまたは複数の修飾または置換を含むことができる。例えば、オリゴヌクレオチドの3'および5'末端を、標識部分、例えばフルオロフォア(例えば、ピレン、TAMRA、フルオレセイン、Cy3もしくはCy5色素)または保護基(例えば、硫黄、ケイ素、ホウ素またはエステルに基づく)のような他の機能的分子実体にコンジュゲートすることができる。機能的分子実体を、リン酸基および/またはリンカーを経由して糖に結合させることができる。リンカーの末端原子は、リン酸基の結合原子または糖のC-3'もしくはC-5'のO、N、SもしくはC基と結合またはそれを置換することができる。あるいは、リンカーは、ヌクレオチド代用物(例えばPNA)の末端原子と結合またはそれを置換することができる。

【0280】

リンカー/リン酸-機能的分子実体-リンカー/リン酸アレイがdsRNAの2つの鎖の間に挿置された場合、このアレイは、ヘアピン型RNA作用物質においてヘアピン型RNAループの代わりとなることができる。

【0281】

活性をモジュレートするために有用な末端修飾には、リン酸エステルまたはリン酸エステル類似体による5'末端の修飾が含まれる。例えば、好ましい態様では、dsRNAのアンチセンス鎖は、5'リン酸化されている、または5'ダッシュ末端にホスホリル類似体を含む。5'-リン酸修飾には、RISC介在性遺伝子サイレンシングに適合するものが含まれる。5'末端での修飾は、また、対象の免疫系を刺激または阻害することに有用であることができる。適切な修飾には: 5'-一リン酸($(\text{HO})_2(\text{O})\text{P}-\text{O}-5'$); 5'-二リン酸($(\text{HO})_2(\text{O})\text{P}-\text{O}-\text{P}(\text{HO})(\text{O})-\text{O}-5'$); 5'-三リン酸($(\text{HO})_2(\text{O})\text{P}-\text{O}-(\text{HO})(\text{O})\text{P}-\text{O}-\text{P}(\text{HO})(\text{O})-\text{O}-5'$); 5'-グアノシンキャップ(7-メチル化または非メチル化)($7\text{m-G}-\text{O}-5'-(\text{HO})(\text{O})\text{P}-\text{O}-(\text{HO})(\text{O})\text{P}-\text{O}-\text{P}(\text{HO})(\text{O})-\text{O}-5'$); 5'-アデノシンキャップ(Appp)、および任意の修飾または未修飾ヌクレオチドキャップ構造($\text{N}-\text{O}-5'-(\text{HO})(\text{O})\text{P}-\text{O}-(\text{HO})(\text{O})\text{P}-\text{O}-\text{P}(\text{HO})(\text{O})-\text{O}-5'$); 5'-モノチオホスフェート(ホスホロチオエート; $(\text{HO})_2(\text{S})\text{P}-\text{O}-5'$); 5'-モノジチオホスフェート(ホスホロジチオエート; $(\text{HO})(\text{HS})(\text{S})\text{P}-\text{O}-5'$)、5'-ホスホロチオレート(phosphorothiolate)($(\text{HO})_2(\text{O})\text{P}-\text{S}-5'$); 酸素/硫黄置換された一リン酸エステル、二リン酸エステルおよび三リン酸エステルの任意の追加的な組み合わせ(例えば5'- γ -チオ三リン酸、5'- β -チオ三リン酸、5'- α -チオ三リン酸など)、5'-ホスホルアミデート($(\text{HO})_2(\text{O})\text{P}-\text{NH}-5'$ 、 $(\text{HO})(\text{NH}_2)(\text{O})\text{P}-\text{O}-5'$)、5'-アルキルホスホネート($\text{R}=\text{アルキル}=\text{メチル}$ 、エチル、イソプロピル、ブロピルなど、例えば $\text{RP}(\text{OH})(\text{O})-\text{O}-5'$ 、 $(\text{OH})_2(\text{O})\text{P}-5'-\text{CH}_2-$)、5'-アルキルエーテルホスホネート($\text{R}=\text{アルキルエーテル}=\text{メトキシメチル}(\text{MeOCH}_2-)$ 、エトキシメチルなど、例えば $\text{RP}(\text{OH})(\text{O})-\text{O}-5'$)が含まれる。他の態様には、 BH_3 、 BH_3 -および/またはSeによる酸素/硫黄の置換が含まれる。

【0282】

末端修飾は、また、分布をモニタリングするために有用であることができ、そのような場合、付加されるべき好ましい基には、フルオロフォア、例えばフルオレセインまたはALEXA(登録商標)色素、例えばALEXA(登録商標)488が含まれる。末端修飾は、また、取り込みを高めるために有用であることができ、このために有用な修飾には、コレステロールが含まれる。末端修飾は、また、RNA作用物質を別の部分に架橋結合させるために有用であることができ、このために有用な修飾には、マイトマイシンCが含まれる。

【0283】

核酸塩基

アデニン、グアニン、シトシンおよびウラシルは、RNAに見出される最も一般的な塩基である。これらの塩基を、修飾または置換して、改善された性質を有するRNAを提供することができる。例えばヌクレアーゼ耐性オリゴリボヌクレオチドを、これらの塩基を用いて、または合成および天然の核酸塩基(例えば、イノシン、チミン、キサンチン、ヒボキ

10

20

30

40

50

サンチン、ヌブラリン (nubularine)、イソグアニシン (isoguanisine)、もしくはツベルシジン) および上記修飾の任意の1つを用いて調製することができる。あるいは、上記塩基および「ユニバーサル塩基」のいずれかの置換または修飾類似体を用いることができる。例には、2-(ハロ)アデニン、2-(アルキル)アデニン、2-(プロピル)アデニン、2(アミノ)アデニン、2-(アミノアルキル)アデニン、2(アミノプロピル)アデニン、2(メチルチオ)N6(イソペンテニル)アデニン、6(アルキル)アデニン、6(メチル)アデニン、7(デアザ)アデニン、8(アルケニル)アデニン、8-(アルキル)アデニン、8(アルキニル)アデニン、8(アミノ)アデニン、8-(ハロ)アデニン、8-(ヒドロキシル)アデニン、8(チオアルキル)アデニン、8-(チオール)アデニン、N6-(イソペンチル)アデニン、N6(メチル)アデニン、N6,N6(ジメチル)アデニン、2-(アルキル)グアニン、2(プロピル)グアニン、6-(アルキル)グアニン、6(メチル)グアニン、7(アルキル)グアニン、7(メチル)グアニン、7(デアザ)グアニン、8(アルキル)グアニン、8-(アルケニル)グアニン、8(アルキニル)グアニン、8-(アミノ)グアニン、8(ハロ)グアニン、8-(ヒドロキシル)グアニン、8(チオアルキル)グアニン、8-(チオール)グアニン、N(メチル)グアニン、2-(チオ)シトシン、3(デアザ)5(アザ)シトシン、3-(アルキル)シトシン、3(メチル)シトシン、5-(アルキル)シトシン、5-(アルキニル)シトシン、5(ハロ)シトシン、5(メチル)シトシン、5(プロピニル)シトシン、5(プロピニル)シトシン、5(トリフルオロメチル)シトシン、6-(アゾ)シトシン、N4(アセチル)シトシン、3(3アミノ-3カルボキシプロピル)ウラシル、2-(チオ)ウラシル、5(メチル)2(チオ)ウラシル、5(メチルアミノメチル)-2(チオ)ウラシル、4-(チオ)ウラシル、5(メチル)4(チオ)ウラシル、5(メチルアミノメチル)-4(チオ)ウラシル、5(メチル)2,4(ジチオ)ウラシル、5(メチルアミノメチル)-2,4(ジチオ)ウラシル、5(2-アミノプロピル)ウラシル、5-(アルキル)ウラシル、5-(アルキニル)ウラシル、5-(アリルアミノ)ウラシル、5(アミノアリル)ウラシル、5(アミノアルキル)ウラシル、5(グアニジニウムアルキル)ウラシル、5(1,3-ジアゾール-1-アルキル)ウラシル、5-(シアノアルキル)ウラシル、5-(ジアルキルアミノアルキル)ウラシル、5(ジメチルアミノアルキル)ウラシル、5-(ハロ)ウラシル、5-(メトキシ)ウラシル、ウラシル-5オキシ酢酸、5(メトキシカルボニルメチル)-2-(チオ)ウラシル、5(メトキシカルボニル-メチル)ウラシル、5(プロピニル)ウラシル、5(プロピニル)ウラシル、5(トリフルオロメチル)ウラシル、6(アゾ)ウラシル、ジヒドロウラシル、N3(メチル)ウラシル、5-ウラシル(すなわち、プソイドウラシル)、2(チオ)プソイドウラシル、4(チオ)プソイドウラシル、2,4-(ジチオ)プソイドウラシル、5-(アルキル)プソイドウラシル、5-(メチル)プソイドウラシル、5-(アルキル)-2-(チオ)プソイドウラシル、5-(メチル)-2-(チオ)プソイドウラシル、5-(アルキル)-4(チオ)プソイドウラシル、5-(メチル)-4(チオ)プソイドウラシル、5-(アルキル)-2,4(ジチオ)プソイドウラシル、5-(メチル)-2,4(ジチオ)プソイドウラシル、1置換プソイドウラシル、1置換2(チオ)-プソイドウラシル、1置換4(チオ)プソイドウラシル、1置換2,4-(ジチオ)プソイドウラシル、1(アミノカルボニルエチレニル)-プソイドウラシル、1(アミノカルボニルエチレニル)-2(チオ)-プソイドウラシル、1(アミノカルボニルエチレニル)-4(チオ)プソイドウラシル、1(アミノカルボニルエチレニル)-2,4-(ジチオ)プソイドウラシル、1(アミノアルキルアミノカルボニルエチレニル)-プソイドウラシル、1(アミノアルキルアミノカルボニルエチレニル)-2(チオ)-プソイドウラシル、1(アミノアルキルアミノカルボニルエチレニル)-4(チオ)プソイドウラシル、1(アミノアルキルアミノカルボニルエチレニル)-2,4-(ジチオ)プソイドウラシル、1,3-(ジアザ)-2-(オキソ)-フェノキサジン-1-イル、1-(アザ)-2-(チオ)-3-(アザ)-フェノキサジン-1-イル、1,3-(ジアザ)-2-(オキソ)-フェンチアジン(phenthiazin)-1-イル、1-(アザ)-2-(チオ)-3-(アザ)-フェンチアジン-1-イル、7-置換1,3-(ジアザ)-2-(オキソ)-フェノキサジン-1-イル、7-置換1-(アザ)-2-(チオ)-3-(アザ)-フェノキサジン-1-イル、7-置換1,3-(ジアザ)-2-(オキソ)-フェンチアジン-1-イル、7-置換1-(アザ)-2-(チオ)-3-(アザ)-フェンチアジン-1-イル

、7-(アミノアルキルヒドロキシ)-1,3-(ジアザ)-2-(オキソ)-フェノキサジン-1-イル、7-(アミノアルキルヒドロキシ)-1-(アザ)-2-(チオ)-3-(アザ)-フェノキサジン-1-イル、7-(アミノアルキルヒドロキシ)-1,3-(ジアザ)-2-(オキソ)-フェンチアジン-1-イル、7-(アミノアルキルヒドロキシ)-1-(アザ)-2-(チオ)-3-(アザ)-フェンチアジン-1-イル、7-(グアニジニウムアルキルヒドロキシ)-1,3-(ジアザ)-2-(オキソ)-フェノキサジン-1-イル、7-(グアニジニウムアルキルヒドロキシ)-1-(アザ)-2-(チオ)-3-(アザ)-フェノキサジン-1-イル、7-(グアニジニウムアルキルヒドロキシ)-1,3-(ジアザ)-2-(オキソ)-フェンチアジン-1-イル、7-(グアニジニウムアルキルヒドロキシ)-1-(アザ)-2-(チオ)-3-(アザ)-フェンチアジン-1-イル、1,3,5-(トリアザ)-2,6-(ジオキサ)-ナフタレン、イノシン、キサンチン、ヒポキサンチン、ヌブラリン、ツベルシジン、イソグアニシン (isoguanisine)、イノシニル、2-アザ-イノシニル、7-デアザ-イノシニル、ニトロイミダゾリル、ニトロピラゾリル、ニトロベンゾイミダゾリル、ニトロインダゾリル、アミノインドリル、ピロールピリミジニル、3-(メチル)イソカルボスチリリル (isocarbostyryl)、5-(メチル)イソカルボスチリリル、3-(メチル)-7-(プロピニル)イソカルボスチリリル、7-(アザ)インドリル、6-(メチル)-7-(アザ)インドリル、イミジゾピリジニル (imidizopyridinyl)、9-(メチル)-イミジゾピリジニル、ピロールピリジニル、イソカルボスチリリル、7-(プロピニル)イソカルボスチリリル、プロピニル-7-(アザ)インドリル、2,4,5-(トリメチル)フェニル、4-(メチル)インドリル、4,6-(ジメチル)インドリル、フェニル、ナフタレニル、アントラセニル、フェナントラセニル、ピレニル、スチルベニル、テトラセニル、ペンタセニル、ジフルオロトリル、4-(フルオロ)-6-(メチル)ベンゾイミダゾール、4-(メチル)ベンゾイミダゾール、6-(アゾ)チミン、2-ピリジノン、5ニトロインドール、3ニトロピロール、6-(アザ)ピリミジン、2(アミノ)プリン、2,6-(ジアミノ)プリン、5置換ピリミジン、N2-置換プリン、N6-置換プリン、O6-置換プリン、置換1,2,4-トリアゾール、またはその任意のO-アルキル化もしくはN-アルキル化誘導体が含まれる。

10

20

30

40

50

【0284】

さらなるプリンおよびピリミジンには、参照により本明細書に組み入れられる米国特許第3,687,808号に開示されるもの、Concise Encyclopedia Of Polymer Science And Engineering, pages 858-859, Kroschwitz, J. I., ed. John Wiley & Sons, 1990に開示されるもの、およびEnglisch et al., Angewandte Chemie, International Edition, 1991, 30, 613に開示されるものが含まれる。

【0285】

陽イオン性基

オリゴヌクレオチドへの修飾は、また、リン酸エステルまたは修飾リン酸エステル骨格部分の糖、塩基、および/またはリン原子に対する1つまたは複数の陽イオン性基の結合を含むことができる。陽イオン性基は、天然、異常またはユニバーサル塩基上での置換が可能な任意の原子に結合することができる。好ましい位置は、ハイブリダイゼーションを妨害しない、すなわち、塩基対形成のために必要な水素結合形成相互作用を妨害しない位置である。陽イオン性基は、例えば糖のC2'位または環式もしくは非環式糖代用物における類似の位置を経由して結合することができる。例えば、陽イオン性基は、例えば、O-アミン(アミン=NH₂; アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、ヘテロシクリル、アリールアミノ、ジアリールアミノ、ヘテロアリールアミノ、もしくはジヘテロアリールアミノ、エチレンジアミン、ポリアミノ); アミノアルコキシ、例えば、O(CH₂)_nアミン、(例えば、アミン=NH₂; アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、ヘテロシクリル、アリールアミノ、ジアリールアミノ、ヘテロアリールアミノ、もしくはジヘテロアリールアミノ、エチレンジアミン、ポリアミノ); アミノ(例えばNH₂; アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、ヘテロシクリル、アリールアミノ、ジアリールアミノ、ヘテロアリールアミノ、ジヘテロアリールアミノ、もしくはアミノ酸); またはNH(CH₂CH₂NH)_nCH₂CH₂-アミン(アミン=NH₂; アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、ヘテロシクリル、アリールアミノ、ジアリールアミノ、ヘテロアリールアミノ、もしくはジヘテロアリールアミノ)から得られるプロト

ン化アミノ基を含むことができる。

【0286】

オリゴヌクレオチド内の配置

いくつかの修飾は、好ましくは、オリゴヌクレオチド上の特定の部位で、例えば鎖の内部位置で、またはオリゴヌクレオチドの5'もしくは3'末端上に含まれることができる。オリゴヌクレオチド上の修飾の好ましい部位は、作用物質に好ましい性質を付与することができる。例えば、特定の修飾の好ましい部位は、最適な遺伝子サイレンシング性質、またはエンドヌクレアーゼもしくはエキソヌクレアーゼ活性に対する増加した耐性を付与することができる。

【0287】

オリゴヌクレオチドの1つまたは複数のヌクレオチドは、2'-5'結合を有することができる。オリゴヌクレオチドの1つまたは複数のヌクレオチドは、逆結合 (inverted linkage)、例えば3'-3'、5'-5'、2'-2'または2'-3'結合を有することができる。

【0288】

オリゴヌクレオチドは、少なくとも1つの5'-ピリミジン-プリン-3' (5'-PyPu-3') ジヌクレオチドを含むことができ、その際、ピリミジンは、2'-O-Me (2'-O-メチル)、2'-O-MOE (2'-O-メトキシエチル)、2'-F、2'-O-[2-(メチルアミノ)-2-オキソエチル] (2'-O-NMA)、2'-S-メチル、2'-O-CH₂-(4'-C) (LNA) および2'-O-CH₂CH₂-(4'-C) (ENA) からなる群より独立して選択される修飾で修飾されている。

【0289】

一態様では、オリゴヌクレオチド中の配列モチーフ5'-ピリミジン-プリン-3' (5'-PyPu-3') ジヌクレオチドの全ての出現における、最も5'側のピリミジンは、2'-O-Me (2'-O-メチル)、2'-O-MOE (2'-O-メトキシエチル)、2'-F、2'-O-[2-(メチルアミノ)-2-オキソエチル] (2'-O-NMA)、2'-S-メチル、2'-O-CH₂-(4'-C) (LNA) および2'-O-CH₂CH₂-(4'-C) (ENA) からなる群より選択される修飾により修飾されている。

【0290】

二本鎖オリゴヌクレオチドは、少なくとも1つの5'-ウリジン-アデニン-3' (5'-UA-3') ジヌクレオチド (ここで、該ウリジンは、2'-修飾ヌクレオチドである)、または5'-ウリジン-グアニン-3' (5'-UG-3') ジヌクレオチド (ここで、該5'-ウリジンは、2'-修飾ヌクレオチドである)、または末端5'-シチジン-アデニン-3' (5'-CA-3') ジヌクレオチド (ここで、該5'-シチジンは2'-修飾ヌクレオチドである)、または末端5'-ウリジン-ウリジン-3' (5'-UU-3') ジヌクレオチド (ここで、該5'-ウリジンは、2'-修飾ヌクレオチドである)、または末端5'-シチジン-シチジン-3' (5'-CC-3') ジヌクレオチド (ここで、該5'-シチジンは、2'-修飾ヌクレオチドである)、または末端5'-シチジン-ウリジン-3' (5'-CU-3') ジヌクレオチド (ここで、該5'-シチジンは、2'-修飾ヌクレオチドである)、または末端5'-ウリジン-シチジン-3' (5'-UC-3') ジヌクレオチド (ここで、該5'-ウリジンは、2'-修飾ヌクレオチドである) を含むことができる。これらの修飾を含めた二本鎖オリゴヌクレオチドは、エンドヌクレアーゼ活性に対して特に安定化されている。

【0291】

一般的な参考文献

本発明により使用されるオリゴリボヌクレオチドおよびオリゴリボヌクレオシドは、固相合成で合成することができる。例えば、"Oligonucleotide synthesis, a practical approach", Ed. M. J. Gait, IRL Press, 1984; "Oligonucleotides and Analogues, A Practical Approach", Ed. F. Eckstein, IRL Press, 1991 (特にChapter 1, Modern machine-aided methods of oligodeoxyribonucleotide synthesis, Chapter 2, Oligoribonucleotide synthesis, Chapter 3, 2'-O-Methyloligoribonucleotides: synthesis and applications, Chapter 4, Phosphorothioate oligonucleotides, Chapter 5, Synthesis of oligonucleotide phosphorodithioates, Chapter 6, Synthesis of oligo-2'-deoxyribonucleoside methylphosphonates, およびChapter 7, Oligodeoxynucleotides containing modified basesを参照されたい。他の特に有用な合成手順、試薬、ブロッキング基およ

10

20

30

40

50

び反応条件は、Martin, P., *Helv. Chim. Acta*, 1995, 78, 486-504; Beaucage, S. L. and Iyer, R. P., *Tetrahedron*, 1992, 48, 2223-2311およびBeaucage, S. L. and Iyer, R. P., *Tetrahedron*, 1993, 49, 6123-6194、またはその中で参照される参考文献に記載されている。国際公開公報第00/44895号、同第01/75164号、または同第02/44321号に記載されている修飾を、本明細書において使用することができる。本明細書に挙げられる全ての刊行物、特許、および公開された特許出願の開示は、参照により本明細書に組み入れられる。

【0292】

リン酸基の参考文献

ホスフィン酸オリゴリボヌクレオチドの調製は、米国特許第5,508,270号に記載されている。アルキルホスホネートオリゴリボヌクレオチドの調製は、米国特許第4,469,863号に記載されている。ホスホロアミダイトオリゴリボヌクレオチドの調製は、米国特許第5,256,775号または同第5,366,878号に記載されている。ホスホトリエステルオリゴリボヌクレオチドの調製は、米国特許第5,023,243号に記載されている。ボラノリン酸オリゴリボヌクレオチドの調製は、米国特許第5,130,302号および第5,177,198号に記載されている。3'-デオキシ-3'-アミノホスホルアミデートオリゴリボヌクレオチドの調製は、米国特許第5,476,925号に記載されている。3'-デオキシ-3'-メチレンホスホネートオリゴリボヌクレオチドは、An, H, et al. *J. Org. Chem.* 2001, 66, 2789-2801に記載されている。硫黄架橋ヌクレオチドの調製は、Sproat et al. *Nucleosides Nucleotides* 1988, 7, 651およびCrosstick et al. *Tetrahedron Lett.* 1989, 30, 4693に記載されている。

10

20

【0293】

糖基の参考文献

2'修飾への修飾は、Verma, S. et al. *Annu. Rev. Biochem.* 1998, 67, 99-134およびその中の全ての参考文献に見出すことができる。リボースへの特異的修飾は、以下の参考文献中に見出すことができる：2'-フルオロ (Kawasaki et. al., *J. Med. Chem.*, 1993, 36, 831-841)、2'-MOE (Martin, P. *Helv. Chim. Acta* 1996, 79, 1930-1938)、「LNA」(Wengel, J. *Acc. Chem. Res.* 1999, 32, 301-310)。

【0294】

リン酸基の置換の参考文献

本明細書においてMMI結合型オリゴリボヌクレオシドとしても特定されるメチレンメチルイミノ結合型オリゴリボヌクレオシド、本明細書においてMDH結合型オリゴリボヌクレオシドとしても特定されるメチレンジメチルヒドラゾ結合型オリゴリボヌクレオシド、および本明細書においてアミド-3結合型オリゴリボヌクレオシドとしても特定されるメチレンカルボニルアミノ結合型オリゴリボヌクレオシド、および本明細書においてアミド-4結合型オリゴリボヌクレオシドとしても特定されるメチレンアミノカルボニル結合型オリゴリボヌクレオシド、ならびに例えば交互のMMI結合およびPOまたはPS結合として有する混合骨格化合物は、米国特許第5,378,825号、同第5,386,023号、同第5,489,677号および公開されたPCT出願PCT/US92/04294およびPCT/US92/04305(それぞれ国際公開公報第92/20822号および同第92/20823号として公開されている)に記載されているように調製することができる。ホルムアセタール結合型オリゴリボヌクレオシドおよびチオホルムアセタール結合型オリゴリボヌクレオシドは、米国特許第5,264,562号および同第5,264,564号に記載されているように調製することができる。エチレンオキシド結合型オリゴリボヌクレオシドは、米国特許第5,223,618号に記載されているように調製することができる。シロキサン置換は、Cormier, J.F. et al. *Nucleic Acids Res.* 1988, 16, 4583に記載されている。カルボネート置換は、Tittensor, J.R. *J. Chem. Soc. C* 1971, 1933に記載されている。カルボキシメチル置換は、Edge, M.D. et al. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* 1972, 1991に記載されている。カルバメート置換は、Stirchak, E.P. *Nucleic Acids Res.* 1989, 17, 6129に記載されている。

30

40

【0295】

リン酸-リボース骨格の置換の参考文献

50

シクロブチル糖代用化合物は、米国特許第5,359,044号に記載されているように調製することができる。ピロリジン糖代用物は、米国特許第5,519,134号に記載されているように調製することができる。モルホリノ糖代用物は、米国特許第5,142,047号および同第5,235,033号および他の関連特許開示に記載されているように調製することができる。ペプチド核酸（PNA）は、それ自体が公知であり、Peptide Nucleic Acids (PNA): Synthesis, Properties and Potential Applications, Bioorganic & Medicinal Chemistry, 1996, 4, 5-23の中で参照される様々な手順のいずれかに従って調製することができる。それらは、その全体として参照により本明細書に組み入れられる米国特許第5,539,083号に従って調製することもできる。

【0296】

10

末端修飾の参考文献

末端修飾は、Manoharan, M. et al. Antisense and Nucleic Acid Drug Development 12, 103-128 (2002) およびその中の参考文献に記載されている。

【0297】

核酸塩基の参考文献

N-2置換プリンヌクレオシドアミダイトは、米国特許第5,459,255号に記載されているように調製することができる。3-デアザプリンヌクレオシドアミダイトは、米国特許第5,457,191号に記載されているように調製することができる。5,6-置換ピリミジンヌクレオシドアミダイトは、米国特許第5,614,617号に記載されているように調製することができる。5-プロピニルピリミジンヌクレオシドアミダイトは、米国特許第5,484,908号に記載されているように調製することができる。追加的な参考文献は、塩基修飾に関する上記の節に開示されている。

20

【0298】

オリゴヌクレオチドの産生

本発明のオリゴヌクレオチド化合物は、溶液相または固相有機合成を使用して調製することができる。有機合成は、非天然ヌクレオチドまたは修飾ヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチド鎖を容易に調製できるという利点を提供する。当技術分野において公知のそのような合成のための任意の他の手段を、追加的または代替的に用いることができる。ホスホロチオエート、ホスホロジチオエートおよびアルキル化誘導体のような他のオリゴヌクレオチドを調製するために類似の技法を使用することも公知である。本発明の二本鎖オリゴヌクレオチド化合物は、二段階手順を使用して調製することができる。最初に、二本鎖分子の個別の鎖は、別々に調製される。次に、構成要素の鎖がアニーリングされる。

30

【0299】

合成方法にかかわらず、オリゴヌクレオチドは、製剤化に適切な溶液（例えば、水溶液および/または有機溶液）として調製することができる。例えば、オリゴヌクレオチド調製物を沈殿させ、純粋な再蒸留水中に再溶解させ、凍結乾燥することができる。次に、乾燥したオリゴヌクレオチドを、意図される製剤化工程に適した溶液中に再懸濁することができる。

【0300】

特定の修飾オリゴヌクレオチドの合成に関する教示は、以下の米国特許または係属中の特許出願：ポリアミンコンジュゲート型オリゴヌクレオチドに関する米国特許第5,138,045号および同第5,218,105号；キラルなリン結合を有するオリゴヌクレオチドの調製のためのモノマーに関する米国特許第5,212,295号；修飾された骨格を有するオリゴヌクレオチドに関する米国特許第5,378,825号および第5,541,307号；骨格修飾型オリゴヌクレオチドおよび還元カップリングによるその調製に関する米国特許第5,386,023号；3-デアザプリン環系に基づく修飾核酸塩基およびその合成方法に関する米国特許第5,457,191号；N-2置換プリンに基づく修飾核酸塩基に関する米国特許第5,459,255号；キラルなリン結合を有するオリゴヌクレオチドを調製するための方法に関する米国特許第5,521,302号；ペプチド核酸に関する米国特許第5,539,082号； β -ラクタム骨格を有するオリゴヌクレオチドに関する米国特許第5,554,746号；オリゴヌクレオチドの合成のための方法および材料に関

40

50

する米国特許第5,571,902号；ヌクレオシドの多様な位置のいずれかに結合される他の部分へのリンカーとして使用できるアルキルチオ基を有するヌクレオシドに関する米国特許第5,578,718号；高いキラル純度のホスホロチオエート結合を有するオリゴヌクレオチドに関する米国特許第5,587,361号および同第5,599,797号；2,6-ジアミノプリン化合物を含めた2'-O-アルキルグアノシンおよび関連化合物の調製のための方法に関する米国特許第5,506,351号；N-2置換プリンを有するオリゴヌクレオチドに関する米国特許第5,587,469号；3-デアザプリンを有するオリゴヌクレオチドに関する米国特許第5,587,470号；共にコンジュゲート型4'-デスメチルヌクレオシド類似体に関する米国特許第5,223,168号および米国特許第5,608,046号；骨格修飾オリゴヌクレオチド類似体に関する米国特許第5,602,240号および同第5,610,289号；ならびにとりわけ2'-フルオロ-オリゴヌクレオチドを合成する方法に関する米国特許第6,262,241号および同第5,459,255号から見い出すことができる。

10

【0301】

RNA干渉剤の送達

標的細胞（例えば、基底細胞または肺および／もしくは呼吸器系の細胞または他の所望の標的細胞）にRNAi剤、例えばsiRNA、またはRNAi剤を含有するベクターを送達する方法は、当業者に周知である。いくつかの態様では、ヒトSUV39h1、ヒトSUV39h2、ヒトSETDB1、ヒトEHMT1および／またはヒトPRDM2の任意の1つを阻害するRNAi剤のようなH3K9メチルトランスフェラーゼの阻害剤である、RNAi剤（例えば遺伝子サイレンシングRNAi剤）を、エアロゾル手段を介して、例えばネブライザーなどを使用して、対象に投与することができる。代替的な態様では、H3K9メチルトランスフェラーゼ阻害剤、例えば、SUV39h1、SUV39h2、SETDB1、EHMT1および／またはPRDM2の任意の1つの阻害剤である、RNAi剤（例えば遺伝子サイレンシングRNAi剤）の投与は、例えば（i）RNA干渉剤、例えばsiRNAを含有する組成物の注射、または（ii）細胞（例えば、ドナーヒト細胞、レシピエント卵母細胞、またはSCNT胚）を、RNAi剤、例えばsiRNAを含む組成物と直接接触させることを含むことができる。

20

【0302】

いくつかの態様では、細胞、卵母細胞または胚の投与は、単回注射または2回以上の注射によることができる。いくつかの態様では、RNAi剤は、薬学的に許容される担体中に入れて送達される。1種または複数種のRNAi剤を同時に使用することができ、例えば、SUV39h1、SUV39h2、SETDB1、EHMT1および／またはPRDM2のようなH3K9メチルトランスフェラーゼの1種または複数種の遺伝子サイレンシングRNAi剤阻害剤と一緒に投与することができる。RNA干渉剤、例えば、ヒトSUV39h1、ヒトSUV39h2、ヒトSETDB1、ヒトEHMT1および／またはヒトPRDM2の任意の1つを阻害するためのsiRNAを、単回で、または他のRNA干渉剤、例えばsiRNA、例えば他の細胞遺伝子に対するsiRNAと組み合わせて送達することができる。

30

【0303】

いくつかの態様では、RNA干渉を非特異的に標的とすることによって起こるRNA干渉の潜在的副作用を限定しながら、RNA干渉を用いて特定の細胞を標的とする。該方法は、例えば細胞標的指向部分と、RNAiを細胞内に効果的に送達するために使用されるRNA干渉結合性部分とを含む複合体または融合分子を使用することができる。例えば抗体-プロタミン融合タンパク質は、siRNAと混合すると、siRNAと結合し、かつ抗体によって認識される抗原を発現している細胞内にsiRNAを選択的に送達し、結果として抗体によって特定される抗原を発現する細胞だけに遺伝子発現のサイレンシングをもたらす。

40

【0304】

いくつかの態様では、siRNAまたはRNAi結合性部分は、タンパク質またはタンパク質の核酸結合性ドメインもしくはフラグメントであり、結合性部分は、標的指向部分の一部に融合される。標的指向部分の部位は、構築物のカルボキシル末端もしくはアミノ末端または融合タンパク質の中央のいずれかであることができる。

【0305】

いくつかの態様では、Xia, H. et al. (2002) Nat Biotechnol 20(10):1006)に記載さ

50

れているように、siRNA、例えばヒトSUV39h1、ヒトSUV39h2、ヒトSETDB1、ヒトEHMT1および/またはヒトPRDM2のsiRNA（例えば遺伝子サイレンシングRNAi剤）阻害剤を細胞にインビトロ送達するために、ウイルス介在性送達メカニズムも用いることができる。Robinson, D.A.ら（(2003) Nat. Genet. 33:401-406）およびStewart, S.A.ら（(2003) RNA 9:493-501）に記載されるように、shRNAを細胞にインビトロおよびインビボ送達するために、shRNAのプラスミドまたはウイルス介在性送達メカニズムも用いることができる。あるいは、他の態様では、RNAi剤、例えば、SUV39h1、SUV39h2、SETDB1、EHMT1および/またはPRDM2のようなH3K9メチルトランスフェラーゼの遺伝子サイレンシングRNAi剤阻害剤は、細胞、卵母細胞またはSCNT胚をRNAi剤阻害剤単独またはRNAi剤を発現しているウイルスベクターと共に培養することによっても、細胞内に導入することができる。

10

【0306】

一般に、核酸分子を送達する任意の方法を、RNAi干渉分子を用いた使用のために適応させることができる（例えば、その全体として参照により本明細書に組み入れられるAkhtar S. and Julian RL. (1992) Trends Cell. Biol. 2(5):139-144；国際公開公報第94/02595号を参照されたい）。

【0307】

細胞取り込みを高めかつ分解を防止するために、コレステロールなどの親油性基への化学コンジュゲーションによって、RNA干渉分子を修飾することができる。代替的な一態様では、例えば、ナノ粒子、デンドリマー、ポリマー、リボソーム、または陽イオン性送達システムなどの薬物送達システムを使用して、RNAi分子を送達することができる。陽性荷電した陽イオン性送達システムは、RNA干渉分子（陰性荷電）の結合を容易にし、かつまた陰性荷電した細胞膜での相互作用を高めて、細胞によるsiRNAの効率的な取り込みを可能にする。陽イオン性脂質、デンドリマー、またはポリマーは、RNA干渉分子に結合しているか、またはRNAi分子を収容する小胞もしくはミセルを形成するように誘導されるかのいずれかであることができる（例えば、Kim SH., et al (2008) Journal of Controlled Release 129(2):107-116を参照されたい）。小胞またはミセルの形成は、さらに、全身投与したときのRNAi分子の分解を防止する。陽イオン-RNAi複合体を製造および投与するための方法は、十分に当業者の能力の範囲内である（例えば、その全体として参照により本明細書に組み入れられるSorensen, DR., et al (2003) J. Mol. Biol. 327:761-766; Verma, UN., et al (2003) Clin. Cancer Res. 9:1291-1300; Arnold, AS et al (2007) J. Hypertens. 25:197-205を参照されたい）。

20

30

【0308】

特定のRNAi剤の用量は、RNA干渉、例えば、ヒトSUV39h1、ヒトSUV39h2、ヒトSETDB1、ヒトEHMT1および/またはヒトPRDM2の遺伝子サイレンシングを引き起こすことによって、ヒトSUV39h1、ヒトSUV39h2、ヒトSETDB1、ヒトEHMT1および/またはヒトPRDM2の遺伝子発現レベルの減少ならびにその後のそれぞれのタンパク質発現レベルにおける減少を導くために必要な量である。

【0309】

RNAi分子が、それらの標的配列と完全に一致する必要がないことも公知である。しかし、好ましくは、siRNAのアンチセンス（ガイド）鎖の5'および中央部分は、ヒトSUV39h1、ヒトSUV39h2、ヒトSETDB1、ヒトEHMT1および/またはヒトPRDM2遺伝子のいずれか1つの標的核酸配列と完全に相補的である。

40

【0310】

したがって、本明細書開示のヒトSUV39h1、ヒトSUV39h2、ヒトSETDB1、ヒトEHMT1および/またはヒトPRDM2の遺伝子サイレンシングRNAi剤阻害剤として機能するRNAi分子は、例えば非限定的に、短鎖一時的（short-temporal）RNA（stRNA）、低分子干渉RNA（siRNA）、低分子ヘアピン型RNA（shRNA）、マイクロRNA（miRNA）、二本鎖RNA（dsRNA）（例えばBaulcombe, Science 297:2002-2003, 2002を参照されたい）を含む、未修飾および修飾二本鎖（ds）RNA分子である。dsRNA分子、例えばsiRNAは、また、3'オーバーハング、好ましくは3'UUまたは3'TTオーバーハングを含むことができる。一態様では、本発明のsiRN

50

A分子には、約30～40塩基、約40～50塩基、約50塩基以上よりも大きなssRNAを含むRNA分子が含まれない。一態様では、本発明のsiRNA分子は、それらの長さの約25%超、約50%超、約60%超、約70%超、約80%超、約90%超が二本鎖である。

【0311】

いくつかの態様では、ヒトSUV39h1、ヒトSUV39h2、ヒトSETDB1、ヒトEHMT1および/またはヒトPRDM2の遺伝子サイレンシングRNAi核酸阻害剤は、ヒトSUV39h1、ヒトSUV39h2、ヒトSETDB1、ヒトEHMT1および/またはヒトPRDM2と結合し、かつその発現を阻害する任意の活性物質であり、その際、それぞれのメチルトランスフェラーゼ遺伝子の発現が阻害される。

【0312】

本発明の別の態様では、ヒトSUV39h1、ヒトSUV39h2、ヒトSETDB1、ヒトEHMT1および/またはヒトPRDM2の阻害剤は、RNA転写物を切断することによって野生型タンパク質の産生を阻止する能力のある、例えばリボザイムのような触媒性核酸構築物であることができる。リボザイムは、リボザイム触媒部位に隣接する標的と相補性の2つの配列領域のおかげで特定の配列に標的とされ、その配列とアニーリングする。結合した後、リボザイムは、標的を部位特異的に切断する。例えば当業者に周知の技法（例えばLieber and Strauss, (1995) Mol Cell Biol 15:540.551、その開示は、参照により本明細書に組み入れられる）による、ヒトSUV39h1、ヒトSUV39h2、ヒトSETDB1、ヒトEHMT1および/またはヒトPRDM2のようなH3K9メチルトランスフェラーゼの切断のための、本明細書記載の遺伝子産物の配列を特異的に認識して切断するリボザイムの設計および検査である。

【0313】

H3K9メチルトランスフェラーゼのタンパク質阻害剤およびペプチド阻害剤

いくつかの態様では、H3K9メチルトランスフェラーゼ阻害剤は、ヒトSUV39h1、ヒトSUV39h2、ヒトSETDB1、ヒトEHMT1および/またはヒトPRDM2のようなH3K9メチルトランスフェラーゼの任意の1つのタンパク質阻害剤および/またはペプチド阻害剤、例えば非限定的に、ヒトSUV39h1、ヒトSUV39h2、ヒトSETDB1、ヒトEHMT1および/またはヒトPRDM2の変異型タンパク質；治療用タンパク質および組換えタンパク質ならびにドミナントネガティブ阻害剤（例えば、H3K9メチルトランスフェラーゼの非機能的タンパク質、またはH3K9メチルトランスフェラーゼに競合的に結合するH3K9メチルトランスフェラーゼの非機能的リガンド）である。タンパク質およびペプチド阻害剤は、また、例えば変異型タンパク質、遺伝子組換えされたタンパク質、ペプチド、合成ペプチド、組換えタンパク質、キメラタンパク質、抗体、ヒト化タンパク質、ヒト化抗体、キメラ抗体、修飾タンパク質およびそのフラグメントを含むことができる。

【0314】

本明細書に使用される、H3K9メチルトランスフェラーゼ、例えば、ヒトSUV39h1、ヒトSUV39h2、ヒトSETDB1、ヒトEHMT1および/もしくはヒトPRDM2の遺伝子発現の阻害剤ならびに/またはヒトSUV39h1、ヒトSUV39h2、ヒトSETDB1、ヒトEHMT1および/もしくはヒトPRDM2タンパク質機能の阻害としての方法に有用な活性物質は、任意の種類の実体、例えば非限定的に化学物質、核酸配列、核酸類似体、タンパク質、ペプチドまたはそのフラグメントであることができる。いくつかの態様では、活性物質は、非限定的に、合成および天然の非タンパク質性実体を含む、任意の化学物質、実体または部分である。特定の態様では、活性物質は、化学部分を有する小分子である。

【0315】

代替的な態様では、本明細書開示の方法に有用な活性物質は、H3K9メチルトランスフェラーゼ、例えばヒトSUV39h1、ヒトSUV39h2、ヒトSETDB1、ヒトEHMT1および/またはヒトPRDM2の遺伝子発現または機能を阻害するタンパク質および/もしくはペプチドまたはそのフラグメントである。そのような活性物質には、例えば非限定的に、タンパク質異種、変異型タンパク質、治療用タンパク質、切断型タンパク質およびタンパク質フラグメントが含まれる。タンパク質活性物質は、変異型タンパク質、遺伝子組換えされたタンパク質、ペプチド、合成ペプチド、組換えタンパク質、キメラタンパク質、抗体、ミディボディー

(midibody)、ミニボディー(minibody)、トリアボディー(triabody)、ヒト化タンパク質、ヒト化抗体、キメラ抗体、修飾タンパク質およびそのフラグメントを含む群より選択することもできる。

【0316】

あるいは、ヒトSUV39h1、ヒトSUV39h2、ヒトSETDB1、ヒトEHMT1および/またはヒトPRDM2の阻害剤として本明細書開示の方法に有用な活性物質は、非限定的に、合成および天然の非タンパク質性実体を含む化学物質、小分子、大分子または実体または部分であることができる。特定の態様では、活性物質は、本明細書開示の化学部分を有する小分子である。

【0317】

いくつかの態様では、本明細書開示の方法および組成物に使用するためのH3K9メチルトランスフェラーゼ阻害剤は、H3K9メチルトランスフェラーゼのドミナントネガティブ異種、例えば、SEQ ID NO:5、6、48および54~57の少なくとも約50個、もしくは少なくとも約60個、もしくは少なくとも約70個、もしくは少なくとも約80個もしくは少なくとも約90個もしくは90個よりも多いアミノ酸のフラグメントのような、SEQ ID NO:5、6、48および54~57のアミノ酸のいずれかの連続アミノ酸のフラグメントを含む切断型タンパク質またはドミナントネガティブタンパク質であることができる、例えば、ヒトSUV39h1、ヒトSUV39h2、ヒトSETDB1、ヒトEHMT1および/またはヒトPRDM2の非機能的異種である。いくつかの態様では、ヒトSUV39h1、ヒトSUV39h2、ヒトSETDB1、ヒトEHMT1および/またはヒトPRDM2タンパク質のようなH3K9メチルトランスフェラーゼタンパク質のドミナントネガティブ阻害剤は、H3K9メチルトランスフェラーゼタンパク質の可溶性細胞外ドメインである。

【0318】

DBC1 (Deleted Breast Cancer 1) 遺伝子の遺伝子産物またはタンパク質のようなタンパク質阻害剤は、SUV39H1触媒ドメインに結合し、それがヒストンH3をインビトロおよびインビボでメチル化する能力を阻害し (Lu et al., Inhibition of SUV39H1 Methyltransferase Activity by DBC1, JBC, 2009, 284; 10361-10366)、本明細書開示の方法および組成物における使用のために包含される。

【0319】

抗体

いくつかの態様では、本発明の方法に有用なH3K9メチルトランスフェラーゼ阻害剤には、例えば、モノクローナル、キメラヒト化、および組換え抗体ならびにその抗原結合性フラグメントを含めた抗体が含まれる。いくつかの態様では、中和抗体は、H3K9メチルトランスフェラーゼ阻害剤として使用することができる。抗体は、ウサギまたはマウスのような動物において、抗原を免疫処置することによって容易に産生される。免疫処置されたマウスは、ハイブリドーマを製造するためのB細胞源を提供するために特に有用であり、今度はハイブリドーマが培養されて、大量のモノクローナル抗体を産生する。ヒトSUV39h1および/またはSUV39h2の市販の抗体阻害剤が、本発明における使用のために包含され、例えばSanta Cruz biotechnologyなどから入手可能である。

【0320】

本発明の一態様では、本明細書において特定される遺伝子産物に対する阻害剤は、抗体分子または抗体分子のエピトープ結合性部分などであることができる。抗体は、多種多様な標的抗原およびハプテンに対して高い結合アフィニティおよび独特な特異性を提供する。本発明の実施に有用なモノクローナル抗体は、抗体全体およびそのフラグメントを含み、ハイブリドーマ合成、組換えDNA技法およびタンパク質合成のような従来技法により作製される。

【0321】

有用なモノクローナル抗体およびフラグメントは、任意の種(ヒトを含む)由来であることができ、または1種よりも多い配列を用いるキメラタンパク質として形成させることができる。ヒトモノクローナル抗体または「ヒト化」マウス抗体は、また、本発明により使用される。例えばマウスモノクローナル抗体は、マウスFv領域(すなわち抗原結合部位

を含む) またはその相補性決定領域をコードするヌクレオチド配列を、ヒト定常ドメイン領域およびFc領域をコードするヌクレオチド配列と遺伝的に組換えすることによって「ヒト化」することができる。ヒト化標的指向部分は、ホストレシピエントにおける抗体またはポリペプチドの免疫反応性を減少させ、欧州特許出願第0,411,893A2号に開示されるものに類似して半減期の増加および有害免疫反応の可能性の減少を可能にすることが認識されている。マウスモノクローナル抗体は、好ましくは、ヒト化形態として用いるべきである。抗原結合活性は、抗体の可変部分(Fv)の軽鎖および重鎖に位置する6つの相補性決定領域(CDR)(各3つ)のアミノ酸の配列およびコンフォメーションによって決定される。軽鎖可変領域(VL)および重鎖可変領域(VH)が短鎖ペプチドスパーサー配列を介して結合したもののから構成される25kDaの一本鎖Fv(scFv)分子は、これまでのところ開発された最も小さな抗体フラグメントである。scFvに対する遺伝子を含む線状ファージの表面にscFv分子をディスプレイするための技法が開発されている。広い範囲の抗原特異性を有するscFv分子は、scFvファージライブラリーの単一の大型プール中に存在することができる。本発明の方法に有用な高親和性モノクローナル抗体およびそのキメラ誘導体のいくつかの例は、欧州特許出願EP186,833; PCT特許出願である国際公開公報第92/16553号; および米国特許第6,090,923号に記載されている。

10

【0322】

キメラ抗体は、様々な動物種由来の2つ以上のセグメントまたは部分によって特徴付けられる免疫グロビン(immunoglobulin)分子である。一般的に、キメラ抗体の可変領域は、マウスモノクローナル抗体のような非ヒト哺乳動物抗体由来であり、免疫グロビン定常領域は、ヒト免疫グロビン分子由来である。好ましくは、両方の領域および組み合わせは、日常的に決定されるように低免疫原性を有する。

20

【0323】

scFv分子の1つの限界は、それらが標的抗原と一価的に相互作用することである。scFvからその標的抗原への結合を改善する最も容易な方法の1つは、マルチマーの創出によりその機能的親和性を増加させることである。ダイアボディー、トリアボディーおよびテトラボディーを形成するための同一のscFv分子の結合は、いくつかの同一のFvモジュールを含むことができる。したがって、これらの試薬は、多価であるが一特異性である。異なる親Ig由来のVHおよびVLドメインをそれぞれ含む、2つの異なるscFv分子の結合は、完全に機能的な二重特異性ダイアボディーを形成する。二重特異性scFvの独特な適用は、2つの部位を2つの(隣接する)表面エピトープを介して同じ標的分子上に同時に結合させることである。これらの試薬は、単一のscFvまたはFabフラグメントよりも顕著なアビディティという利点を獲得している。例えばミニ抗体、ダイマー性ミニ抗体、ミニボディー、(scFv)₂、ダイアボディーおよびトリアボディーを含めた、scFvに基づくいくつかの多価構造が操作されている。これらの分子は、一連の価数(2~4つの結合部位)、サイズ(50~120kDa)、柔軟性および産生の容易さに及ぶ。一本鎖Fv抗体フラグメント(scFv)は、主にモノマー性であり、その際、VHおよびVLドメインは、少なくとも12残基のポリペプチドリンカーによって繋がれている。モノマー性scFvは、全ての条件下で12および25アミノ酸長のリンカーを有して熱力学的に安定である。非共有ダイアボディーおよびトリアボディー分子は、操作しやすく、単一のscFv分子の可変重鎖および可変軽鎖を連結するペプチドリンカーを短縮することによって産生される。scFvダイマーは、高度の柔軟性を提供する両親媒性ヘリックスによって繋がれ、ミニ抗体構造を修飾して、二重ヘリックスを介して結合される2つのミニ抗体(4つのscFv分子)を含有するダイマー性二重特異性(DiBi)ミニ抗体を創出することができる。遺伝子融合またはジスルフィド結合scFv二量体は、中等度の柔軟性を提供し、C末端Gly4Cys(SEQ ID NO:44)配列を付加する直接的クローニング技法によって産生される。scFv-CH3ミニボディーは、直接(LDミニボディー)または極めて柔軟なヒンジ領域(Flexミニボディー)を介してのいずれかでIgG CH3ドメインに繋がれた2つのscFv分子から構成される。約80kDaの分子量により、これらの二価構築物は、顕著に抗原に結合する能力がある。Flexミニボディーは、マウスにおいてすばらしい腫瘍局在化を示す。二重特異性および三重特異性マルチマーを、異なるscFv分子の結合によっ

30

40

50

て形成させることができる。Fabまたは単鎖Fv抗体フラグメント（scFv）フラグメントが、ダイマー、トリマー、またはより大きな凝集物に複合体化されると、機能的親和性の増加を達成することができる。一価scFvおよびFabフラグメントを上回る多価scFvの最も重要な利点は、標的抗原に対する機能的結合親和性（アビディティ）の獲得である。高アビディティは、scFvマルチマーが別々の標的抗原に同時に結合する能力があることを必要とする。scFvモノマーと比較してscFvダイアボディーについての機能的親和性の獲得は有意であり、主として、2つ以上の標的抗原との多重結合、および1つのFvが解離した場合の再結合に起因する解離速度定数（off-rate）の低下に見られる。そのようなscFv分子が結合してマルチマーになる場合、それらを、単一標的抗原に対する高アビディティ、または異なる標的抗原に対する多重特異性のいずれかを有するように設計することができる。抗原との多重結合は、Fvモジュールにおける正確なアライメントおよび配向に依存する。多価scFv標的における最大限のアビディティのために、抗原結合部位は同じ方向を向いていなければならない。多重結合が立体的に不可能ならば、機能的親和性の明らかな獲得は、拡散速度および抗原濃度に依存する再結合の増加の効果に起因し得る。これらの性質を改善する部分とコンジュゲートした抗体も本発明のために考えられている。例えば、抗体のインビボ半減期を増加させるPEGとの抗体コンジュゲートを本発明のために使用することができる。免疫ライブラリーは、ナイーブなまたは免疫処置された動物または患者のBリンパ球由来の可変抗体フラグメントをコードする遺伝子をPCR増幅に供することによって調製される。免疫グロブリン遺伝子または免疫グロブリン遺伝子ファミリーに特異的なオリゴヌクレオチドの組み合わせが使用される。免疫グロブリン生殖系列遺伝子を使用して、半合成抗体レパートリーを調製することができ、可変フラグメントの相補性決定領域が、縮重プライマーを使用してPCRによって増幅される。これらの単一ポットライブラリーは、多数の抗原に対する抗体フラグメントを、単一のライブラリーから単離できるという利点を有する。ファージディスプレイ技法を使用して、抗体フラグメントの親和性を増加させることができ、新たなライブラリーが、ランダムな、コドンに基づく、または部位特異的な変異誘発によって、個別のドメインの鎖をナイーブなレパートリー由来のフラグメントの鎖とシャッフルすることによって、または細菌ミューター株の使用によって、既存の抗体フラグメントから調製される。

【0324】

あるいは、SCID-huマウス、例えば、Genpharmによって開発されたモデルを使用して、抗体またはそのフラグメントを産生することができる。一態様では、多価相互作用の効果を利用することによって創出された、ペプタボディーと呼ばれる新しい種類の高アビディティ結合分子が考えられている。短いペプチドリガンドが半剛性ヒンジ領域を介して軟骨オリゴマー性マトリックスタンパク質のコイルドコイル集合ドメインと融合されて、五量体多価結合分子が生じた。本発明の好ましい態様では、リガンドおよび/またはキメラ阻害剤を、例えば、抗リガンド抗体（Ab）および特異的標的物に対するAbの化学的連結により産生される二重特異性抗体を使用することによって、組織特異的標的または腫瘍特異的標的を標的とすることが可能である。化学コンジュゲートの限界を回避するために、抗体の分子コンジュゲートを、リガンドおよび/またはキメラ阻害剤を細胞表面分子に向ける組換え二重特異性単鎖Abの産生のために使用することができる。あるいは、標的指向部分に結合した2種以上の活性作用物質および/または阻害剤を投与することができ、その際、各コンジュゲートは、標的指向部分、例えば異なる抗体を含む。各抗体は、異なる標的部位エピトープと反応する（同じまたは異なる標的部位抗原と結合）。作用物質が結合した異なる抗体は、所望の標的部位で相加的に蓄積する。抗体に基づくまたは抗体に基づかない標的指向部分を用いて、標的部位にリガンドまたは阻害剤を送達することができる。好ましくは、この目的のために、調節されていない抗原または疾患関連抗原に対する天然結合作用物質が使用される。

【0325】

小分子

上の節に述べられる適用の全ては、参照により本明細書に組み入れられる。いくつかの

10

20

30

40

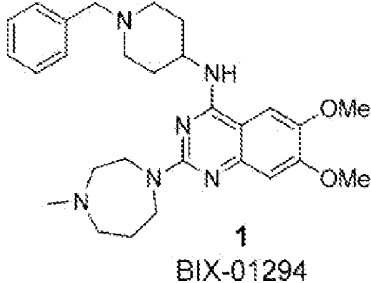
50

態様では、当業者は、H3K9メチルトランスフェラーゼ阻害剤として他の作用物質を使用することができ、例えば、抗体、デコイ抗体、またはRNAiは、本明細書開示のSCNTの効率を増加させるための方法、化合物およびキットに有効である。

【0326】

いくつかの態様では、本明細書に記載の方法、組成物、およびキットにおいて有用なH3K9メチルトランスフェラーゼ阻害剤は、グリオトキシンまたは関連エピボリチオジオキソピペラジン、またはBIX-01294（その全体として参照により本明細書に組み入れられるTakahashi et al., 2012, J. Antibiotics 65, 263-265またはShaabam et al., Chemistry & Biology, Volume 14, Issue 3, March 2007, Pages 242-244に開示されるようなジアゼピン-キナゾリン-アミン誘導体）である。BIX-01294は、以下の化学構造を有する。

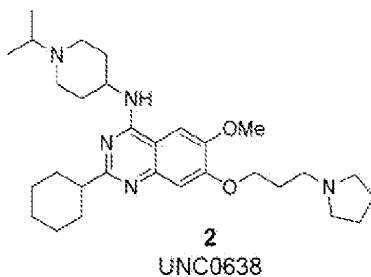
10



【0327】

UNC0638としても公知のキナゾリンも、G9aを阻害し、本明細書開示の方法および組成物に使用するために包含される。UNC0638は、以下の構造を有する。

20



【0328】

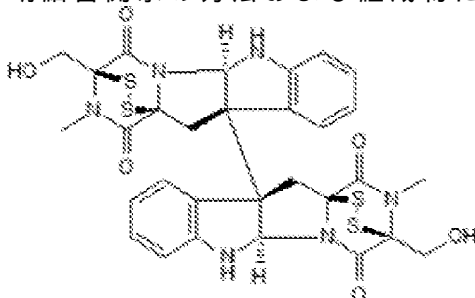
SUV39h1の小分子阻害剤は、その全体として参照により本明細書に組み入れられる米国特許出願公開第2015/0038496号に開示されている。その全体として参照により本明細書に組み入れられる米国特許出願公開第2014/0161785号に開示されるように、小分子ベルチシリンAは、SUV39h1およびSUV39h2の両方についての選択的阻害剤（すなわち、SUV39h1/2を阻害する）として特定され、かつ本明細書開示の方法、組成物、およびキットに使用するために包含される。

30

【0329】

SUV39h1の他の小分子阻害剤には、カエトシン（化学名：（3S,3'S,5aR,5aR,10bR,10'bR,11aS,11'aS）-2,2',3,3',5a,5'a,6,6'-オクタヒドロ-3,3'-ビス（ヒドロキシメチル）-2,2'-ジメチル-[10b,10'b(11H,11'H)-ピ3,11a-エピジチオ-11aH-ピラジノ[1',2':1,5]ピロロ[2,3-b]インドール]-1,1',4,4'-テトラオン）（Bernhard et al., FEBS Letts, 2011, 585 (22); 3549-3554を参照されたい）が含まれ、カエトシンは以下の化学構造を有し、かつ本明細書開示の方法および組成物に使用するために包含される。

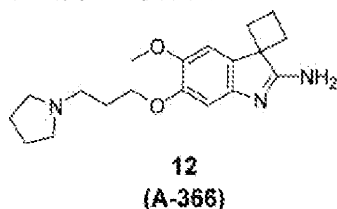
40



50

【0330】

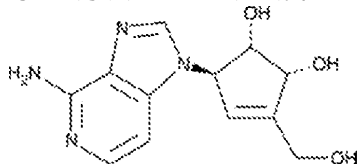
化合物A-366 (CHEMBL3109630とも呼ばれる) (PubChem CID: 76285486) も、3.3nMのIC₅₀を有し、21種の他のメチルトランスフェラーゼと比較して1000倍よりも大きな選択性を有する、G9aとしても公知のEHMT2 (ユークロマチン性ヒストンメチルトランスフェラーゼ2)の強力な阻害剤であることが見出されており (Sweis et al., . Discovery and development of potent and selective inhibitors of histone methyltransferase G9a. ACS medicinal Chem Letts, 2014; 5(2); 205-209を参照されたい)、本明細書開示の方法および組成物に使用するために包含される。小分子A-366は、以下の構造を有する。



IC₅₀: 3.3 nM

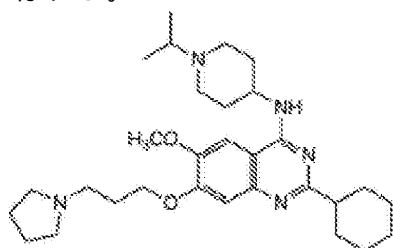
【0331】

3-デアザネブラノシンA (DZNep) (CAS No: 102052-95-9) は、SETDB1 H3K9me3 HMTaseの減少をもたらし、H3K27me3およびH3K9me3の両方の低下したレベルにおける減少をもたらす (Lee et al., Biochem Biophys Res Comm, 2013, 438(4); 647-652)、本明細書開示の方法および組成物に使用するために包含される。DZNpは、次式を有する。



【0332】

HMTase阻害剤IVであるUNC0638 (Calbiochemから入手可能) は、SUV39h2を最低限に阻害し (IC₅₀ > 10 μM) (Vedadi, M., et al. 2011. Nat. Chem. Biol. 7, 566; およびLiu, F., et al. 2011. J. Med. Chem. 54, 6139を参照されたい)、本明細書開示の方法および組成物に使用するために包含される。HMTase阻害剤IVは、また、同義語: 2-シクロヘキシル-N-(1-イソプロピルピペリジン-4-イル)-6-メトキシ-7-(3-(ピロリジン-1-イル)プロポキシ)キナゾリン-4-アミン、DNAメチルトランスフェラーゼ阻害剤III、DNA MTase阻害剤III、EHMT1/GLP阻害剤II、EHMT2/G9a阻害剤IVによって公知であり、以下の化学式を有する。



【0333】

SCNT

本発明の目的の1つは、ヒトSCNTの効率を増加させる手段およびヒトSCNT胚からのヒトNT-ESCの産生を提供することである。本開示の方法は、哺乳動物をクローニングするため、全能細胞もしくは多能性細胞を得るため、またはヒト細胞をリプログラミングするために使用され得る。

【0334】

レシピエントヒト卵母細胞

特定の態様では、本発明の方法、キットおよび組成物に使用するためのレシピエントヒ

10

20

30

40

50

ト卵母細胞は、健康なヒトドナー由来であり得る。いくつかの態様では、凍結保存した卵母細胞が、レシピエント卵母細胞として使用される。特定の態様では、レシピエント卵母細胞はヒト性である。卵母細胞の低温保存および解凍は、当業者に公知である (Tucker et al., Curr Opin Obstet Gynecol. 1995 June; 7(3):188-92を参照されたい)。いくつかの態様では、ヒトレシピエント卵母細胞は、自発的なヒト女性ドナー、例えば卵ドナー、例えばIVFクリニック用の卵ドナーから得られる。いくつかの態様では、卵母細胞は、卵巣刺激または卵巣の過剰刺激 (すなわち排卵誘発または制御卵巣過剰刺激) を受けた女性ヒト対象から得られる。制御卵巣過剰刺激の方法は、例えばその全体として参照により本明細書に組み入れられる米国特許第8,173,592号および国際特許出願である国際公開公報第2000/059542号に開示されるように、当技術分野において周知である。

10

【0335】

いくつかの態様では、レシピエント卵母細胞は除核卵母細胞である。ドナー卵母細胞の除核は、参照により本明細書に組み入れられる米国特許第4,994,384号に記載されるような公知の方法によって達成され得る。例えば、中期II (MII) 卵母細胞は、即時除核について、任意で7.5マイクログラム/ミリリットルのサイトカラシンBを含有するHECM中に入れられるか、または適切な培地、例えば10%発情期雌ウシ血清を加えたCR1aaに入れられ得るかのいずれかであり、次いでその後、除核される。除核は、また、マイクロ手術によって、極体および隣接細胞質を取り出すためにマイクロピペットを使用して達成することができる。次に、細胞をスクリーニングして、成功裏に除核された細胞が特定され得る。このスクリーニングは、HECM 1mL中1マイクログラムの33342 Hoechst色素で細胞を染色し、次に紫外線照射下で細胞を10秒未満観察することによって達成され得る。次に、成功裏に除核された細胞を適切な培養培地中に入れることができる。

20

【0336】

いくつかの態様では、紫外線照射が日常的な手順として使用される、例えば両生類由来卵母細胞の除核のための手順に類似して、卵母細胞の除核のための非侵襲アプローチを使用することができる (Gurdon Q. J. Microsc. Soc. 101 299-311 (1960))。いくつかの態様では、ヒト卵母細胞の卵母細胞除核は、紫外線にマウス卵母細胞を30秒よりも長く曝露することが細胞の発生能を低下させる、DNA特異的蛍光色素を使用して行うことができる (Tsunoda et al., J. Reprod. Fertil. 82 173 (1988))。

30

【0337】

いくつかの態様では、除核したヒト卵母細胞は、減数分裂紡錘体の微小管の不安定化 (例えば脱重合) を介して減数分裂紡錘体を破壊することによる卵母細胞の除核を表す「誘発除核」を受けている (その全体として参照により本明細書に組み入れられる米国特許出願公開第2006/0015950号を参照されたい)。微小管の不安定化は、減数分裂成熟の間に染色分体が分離するのを阻止し (例えば、成功する核分裂を阻止し)、かつ卵母細胞ゲノム (例えば核クロマチン) が不等分離する (例えば歪む) ように誘導し、その際、卵母細胞の本質的に全ての内因性クロマチンが第二極体中に集まる。

【0338】

いくつかの態様では、卵母細胞の供与は、健康な女性、例えば、健康なヒト女性卵母細胞ドナーからのものである。いくつかの態様では、本明細書開示の方法、組成物およびキットに使用するためのヒト卵母細胞は、不妊クリニックから得られた、もはやIVF手順に必要とされない余剰の卵母細胞である。いくつかの態様では、本明細書開示の方法、組成物およびキットに使用するためのヒト卵母細胞は、不十分な質が原因で精子によってインビトロで成功裏に受精する可能性が低いという点で、不十分な、または最適以下の質である (例えば、ヒト卵母細胞は、IVF手順において失敗する可能性が高い、不十分な質の可能性がある)。いくつかの態様では、本明細書開示の方法、組成物およびキットに使用するために選択されるヒト卵母細胞は、その質に基づき選択され、いくつかの態様では、精子によってインビトロで (例えば、IVF手順において) 成功裏に受精する可能性が低いと予測される質の低い卵母細胞が選択される。いくつかの態様では、精子によってインビトロで (例えば、IVF手順において) 成功裏に受精する可能性が高い、高~中等度の質の卵

40

50

母細胞が選択される。いくつかの態様では、インビトロで成功裏に受精する可能性が低いと予測される、閉経後のヒト女性から供与されたヒト卵母細胞が選択され、本明細書開示の方法、組成物およびキットにおける使用のために包含される。

【0339】

いくつかの態様では、ヒト卵母細胞ドナーの必要性を回避するために、異種間SCNTが探究されており、その際、ヒトドナー体細胞の核リプログラミングのために非ヒト卵母細胞が報告されている (Chung et al., Cloning and Stem Cells 11, 1-11 (2009))。したがって、いくつかの態様では、ドナー卵母細胞は、非ヒト霊長類由来、またはウシ卵母細胞または任意の他の非ヒト哺乳動物種であり、それは、ヒトドナー体細胞から得られた核または核遺伝物質のためのレシピエント卵母細胞であることができる。

10

【0340】

いくつかの態様では、ヒトが卵母細胞を産生するよう刺激され (ホルモンなどによる)、これらの卵母細胞が回収される場合、収集される卵母細胞は異なる期である可能性がある。中期I (MI) のヒト卵母細胞もあれば、一方で中期II (MII) の卵母細胞もある。そのような場合、中期I (MI) のヒト卵母細胞を中期IIに達するまで培養し、次に除核のために使用して、レシピエント卵母細胞として役立てることができる。任意で、潜在的宿主細胞のプールのために、培養されて中期IIに達したヒト卵母細胞を、回収時にすでに中期IIであった卵母細胞と組み合わせる。他の場合では、回収物から中期IIのヒト卵母細胞だけを除核のために使用する。これらのヒト卵母細胞のいずれかをさらなる使用のために凍結することができる。したがって、ドナーおよび/またはレシピエント卵母細胞を、使用前に凍結保存することができる。

20

【0341】

したがって、いくつかの態様では、レシピエントヒト卵母細胞は、ドナーヒト体細胞が得られる対象または個体と異なる対象または個体から得られる。いくつかの態様では、レシピエントヒト卵母細胞は、hSCNT胚から得られるhNT-ESCが体内移植されるのと同じ対象から得られる。例えば、患者特異的hNT-ESCは、患者ドナーヒト体細胞からの核遺伝物質がレシピエントヒト卵母細胞に注射されたhSCNT胚から得ることができる。

【0342】

いくつかの態様では、卵母細胞は、ミトコンドリア病を有さない女性対象から得られる。いくつかの態様では、卵母細胞は、ミトコンドリア病を有する女性から得られる。ミトコンドリアDNA (mtDNA) の異常によって遺伝するミトコンドリア病は、当業者に周知である。

30

【0343】

一態様では、レシピエントヒト卵母細胞は、ホモプラスミックまたはヘテロプラスミックなミトコンドリア病のようなミトコンドリアDNA変異を有さない対象からのものである。これを、例えば、ミトコンドリアDNAを評価することによるものなどの遺伝子アッセイにより判定することができ、または臨床評価により判定することができる。ホモプラスミックまたはヘテロプラスミックなミトコンドリア病のようなミトコンドリアDNA病を有するヒト対象などの対象由来のドナー卵母細胞から、染色体などの核遺伝物質を単離することができる。

40

【0344】

いくつかの態様では、ミトコンドリア病は、不妊と関連する可能性がある。不妊と関連するミトコンドリア病の例には、レーバー遺伝性視神経症、ミオクローヌステんかん、またはカーンズ-セイアー症候群が含まれる。したがって、一部の例では、レシピエント霊長類卵母細胞は、レーバー遺伝性視神経症、ミオクローヌステんかん、またはカーンズ-セイアー症候群を有さない対象からのものである。

【0345】

他の例では、染色体を含む核遺伝物質は、レーバー遺伝性視神経症、ミオクローヌステんかん、ニューロパチー、運動失調および色素性網膜症症候群、母系遺伝リー症候群 (MLS)、赤色ぼろ線維-ミオクローヌステんかん症候群 (MERRF)、ミトコンドリア脳筋症 -

50

乳酸アシドーシス-脳卒中様症候群 (MELAS)、難聴を伴った母系遺伝糖尿病、ミトコンドリア脳筋症、慢性進行性外眼筋麻痺、ピアソン骨髄膵臓症候群、尿崩症-糖尿病-視神経萎縮-難聴 (DIDMOAD)、慢性進行性外眼筋麻痺またはカーンズ-セイアー症候群を有する霊長類対象からのドナーヒト卵母細胞からのものである。したがって、レシピエントヒト卵母細胞は、レーバー遺伝性視神経症、ミオクロヌステんかん、ニューロパチー、運動失調および色素性網膜症候群、母系遺伝リー症候群 (MILS)、赤色ぼろ線維-ミオクロヌステんかん症候群 (MERRF)、ミトコンドリア脳筋症-乳酸アシドーシス-脳卒中様症候群 (MELAS)、難聴を伴った母系遺伝糖尿病、ミトコンドリア脳筋症、慢性進行性外眼筋麻痺、ピアソン骨髄膵臓症候群、尿崩症-糖尿病-視神経萎縮-難聴 (DIDMOAD)、慢性進行性外眼筋麻痺およびカーンズ-セイアー症候群のようなミトコンドリア病を有さない対象から単離される。

10

【0346】

レーバー遺伝性視神経症 (LHON) またはレーバー視神経萎縮症は、(母親から全ての子孫に) ミトコンドリア遺伝する網膜神経節細胞 (RGC) およびその軸索の変性であり、中心視力の急性または亜急性の視力低下に至り; これは、主として若年成人の男性に発症する。しかし、LHONは、主に(核ではなく) ミトコンドリアゲノムの変異が原因であり、卵だけがミトコンドリアを胚に与えるので、母親によってのみ伝わる。LHONは、通常、3つの病原性ミトコンドリアDNA (mtDNA) 点変異のうちの1つが原因である。これらの変異は、ミトコンドリアにおける酸化リン酸化鎖の複合体IのND4、ND1およびND6サブユニット遺伝子内のそれぞれヌクレオチド位置11778G A、3460G Aおよび14484T Cである。臨床的には、最初に一つの眼に、次いで数週間から数ヶ月後に反対の眼に急性の視力低下の発症がある。発症は、通常、若年成人期であるが、発症年齢範囲は8~60歳と報告されている。これは、典型的には、非常に重症の視神経萎縮および視力の永続的低下に進展する。

20

【0347】

亜急性壊死性脳脊髄症 (SNEM) としても公知のリー病は、中枢神経系を冒す稀な神経代謝障害である。これは、通常、3ヶ月齢から2歳の間の乳児に発症する遺伝障害であるが、稀にティーンエイジャーおよび成人にも同様に発症する。この疾患の場合、ミトコンドリアDNA (mtDNA) または核DNA (遺伝子SURFおよびいくつかのCOX集合因子) における変異が、運動技能の退化および最終的に死亡を引き起こす。この疾患は、運動を制御する能力の退化から気付くことが最も多い。この疾患は急速に進行するので、一番最初の徴候は、乳を飲む能力が乏しいことならびに首すわりおよび運動スキルの欠如であり得る。他の症状には、食欲不振、嘔吐、かんしゃく (irritability)、泣き止まないこと (乳児において)、および発作が含まれる。その後の徴候は、呼吸機能および腎機能の障害に至る可能性のある乳酸アシドーシスのエピソードである可能性もある。一部の小児は、発育スキルの欠如または発育退行を示す可能性があり、多くの場合に、発育不全について調査されてきた。この疾患が成人において進行するとき、全身の脱力感、腎不全、および心臓の不具合を引き起こす場合もある。平均余命は、通常、症状の開始から約1年以内であるが、数日の急性劇症疾患および長期生存の両方が報告されている。

30

【0348】

ニューロパチー、運動失調、および色素性網膜炎 (NARP) は、主に神経系を冒す多様な徴候および症状を引き起こす状態である。小児期または成人期初期に始まり、NARPを有する大部分の人は、痺れ、刺痛、または腕および脚の疼痛 (感覚性ニューロパチー); 筋力低下; ならびにバランスおよび協調の問題 (運動失調) を経験する。多数の罹患した個体は、眼の後面を覆う光感受性組織 (網膜) の変化によって引き起こされる視力低下も有する。一部の例では、視力低下は、色素性網膜炎と呼ばれる状態に起因する。この眼疾患は、網膜の光感知細胞を徐々に劣化させる。ニューロパチー、運動失調、および色素性網膜炎は、ミトコンドリアDNAの、特にMT-ATP6遺伝子の変異に関係する状態である。

40

【0349】

筋神経原性胃腸管性脳症またはMNGIEは、典型的には20代から50代の間に出現する別のミトコンドリア病である。MNGIEは、下垂、進行性外眼筋麻痺、胃腸管運動不全 (しばし

50

ば偽腸閉塞症)、びまん性白質脳症、細い体型、末梢性ニューロパチー、およびミオパチーを引き起こす多臓器障害である。

【0350】

いくつかの態様では、女性対象がミトコンドリアDNA (mtDNA) 欠陥またはmtDNAにおける変異を有するならば、健康なミトコンドリアおよび野生型mtDNAを有する卵細胞質を卵細胞質移入とも呼ばれる細胞質移入を介してレシピエント卵母細胞に導入して、ヘテロプラスミー卵母細胞を生じることができるよう、ミトコンドリア移入が起こることができる (Sterneckert et al., Nat Reviews Genetics, Genetics 15, 625-639 (2014)およびMa et al., 2015; Metabolic rescue in pluripotent cells from patients with mtDNA disease, Nature 524, 234-238を参照されたい)。細胞質移入のための方法は、周知であり、例えば、その全体として参照により本明細書に組み入れられる米国特許出願公開第2004/0268422号に記載されている。次に、そのようなヘテロプラスミー卵母細胞を除核し、ドナー体細胞からの核遺伝物質の注射のためのレシピエント卵母細胞として使用することができる。したがって、いくつかの態様では、結果として生じるSCNT胚は、3つの別々の個体由来であることができ;すなわち、ドナー体細胞由来の核遺伝物質、レシピエント卵母細胞由来の細胞質、および第3の個体またはドナー対象由来の野生型または変異型mtDNAを含有することができる。

10

【0351】

ドナーヒト細胞

本明細書開示の方法、キットおよび組成物は、ドナーヒト細胞を含み、その細胞から核が収集(回収)され、除核したヒト卵母細胞内に注射されてヒトSCNT胚が作製される。いくつかの態様では、ドナーヒト細胞は、最終分化した体細胞である。いくつかの態様では、ドナーヒト細胞は、胚性幹細胞または成熟幹細胞またはiPS細胞ではない。いくつかの態様では、ドナー体細胞は、男性ヒト対象、例えばXY対象から得られる。代替的な態様では、体細胞のドナーは、女性ヒト対象、例えばXX対象から得られる。いくつかの態様では、ヒト体細胞のドナーは、XXYヒト対象から得られる。

20

【0352】

本発明に有用なヒトドナー体細胞には、例として、上皮、神経細胞、表皮細胞、角化細胞、造血細胞、メラニン細胞、軟骨細胞、リンパ球(BおよびTリンパ球)、他の免疫細胞、赤血球、マクロファージ、メラニン細胞、単球、単核球、線維芽細胞、心筋細胞、卵丘細胞および他の筋細胞などが含まれる。いくつかの態様では、核移入のために使用されるヒト体細胞は、異なる器官、例えば、皮膚、肺、脾臓、肝臓、胃、腸、心臓、生殖器、膀胱、腎臓、尿道および他の泌尿器などから得られ得る。これらは、適切なヒトドナー細胞のいくつかの例に過ぎない。適切なドナー細胞、すなわち、対象発明に有用な細胞は、身体の任意の細胞または器官から得られ得る。これには、全ての体細胞およびいくつかの態様では生殖細胞、例えば、始原生殖細胞、精子細胞が含まれる。いくつかの態様では、ヒトドナー細胞またはヒトドナー細胞由来の核(すなわち核遺伝物質)は、活発に分裂している、すなわち非静止状態の細胞であり、クローニング有効性を高めると報告されている。そのようなドナー体細胞には、G1、G2、SまたはM細胞期の体細胞が含まれる。あるいは、静止状態の細胞が使用され得る。いくつかの態様では、そのようなヒトドナー細胞は、G1細胞期である。特定の態様では、本出願のヒトドナーおよび/またはレシピエント細胞は、2細胞期停止を受けない。

30

40

【0353】

いくつかの態様では、ヒトドナー体細胞の核遺伝物質(すなわち核)は、卵丘細胞、セルトリ細胞または胚性線維芽細胞または成熟線維芽細胞から得られる。

【0354】

いくつかの態様では、核遺伝物質は、例えば遺伝的変異もしくは異常を修正するために、または遺伝的修飾を導入するために、例えば疾患モデルにおける、例えばヒトSCNT胚から得られるNT-ESCにおける遺伝的修飾の効果を検討するために、遺伝子組換えされる。そのような態様では、NT-ESCは、患者特異的NT-ESCであり、それは、治療用クローニングの

50

ために、および／または患者が特定の疾患を有するかもしれないその疾患を発生する素因を有する特定の疾患を研究するために、使用することができる。いくつかの態様では、ヒトドナー細胞の核遺伝物質は、例えば体細胞ドナー細胞に所望の特徴を導入するために、遺伝子組換えされる。体細胞を遺伝子組換えするための方法は、当業者に周知であり、本明細書開示の方法および組成物に使用するために包含される。

【0355】

いくつかの態様では、ヒトドナー体細胞は、その全体として参照により本明細書に組み入れられる米国特許出願公開第2004/0025193号に開示されるような方法に従って選択され、これは、ヒトドナー体細胞に所望の導入遺伝子を導入することおよび導入遺伝子を有するヒト体細胞を選択すること、その後、レシピエント卵母細胞内に注射するために核を得ることを開示している。

10

【0356】

特定の態様では、ヒトドナー核（例えば、ドナー体細胞からの核遺伝物質）は、標識され得る。細胞は、緑色蛍光タンパク質のような容易に視覚化されるタンパク質（Yang, M., et al., 2000, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 97:1206-1211）、もしくはその誘導体の1つをコードする導入遺伝子を用いて遺伝子組換えされ得る、またはホタル（*Photinus pyralis*）ルシフェラーゼ遺伝子（Fluc）から構築された導入遺伝子を用いて（Sweeney, T. J., et al. 1999, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 96: 12044-12049）もしくはウミシイタケ（*Renilla reniformis*）ルシフェラーゼ遺伝子（Rluc）から構築された導入遺伝子を用いて（Bhaumik, S., and Ghambhir, S. S., 2002, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 99:377-382）修飾され得る。

20

【0357】

ドナー体細胞の核遺伝物質中に導入される1つもしくは複数の導入遺伝子が「ハウスキーピング遺伝子」プロモーターを使用して構成的に発現され得ることにより、導入遺伝子（1つまたは複数）は、多数もしくは全ての細胞に高レベルで発現され、または導入遺伝子（1つまたは複数）が組織特異的および／もしくは特定の発生期特異的遺伝子プロモーターを使用して発現され得ることにより、特別なニッチに局在し、かつ特定の組織もしくは細胞型に発生した特定の細胞系列もしくは細胞だけが、導入遺伝子（1つまたは複数）を発現し、視覚化される（導入遺伝子がレポーター遺伝子の場合）。追加的なレポーター導入遺伝子または標識化試薬には、非限定的に、蛍光タンパク質類似体およびバイオセンサーを含む発光標識された高分子、緑色蛍光タンパク質およびその変異体と一緒に形成されるものを含む発光高分子キメラ、生理学的応答に関連する細胞性抗原と反応する発光標識された一次または二次抗体、発光株、色素、および他の小分子が含まれる。モザイク胚盤胞由来の標識細胞を、例えばクローニングされた集団を単離するためのフローサイトメトリーによって選別することができる。

30

【0358】

いくつかの態様では、ヒトドナー体細胞は、健康なヒトドナー、例えば健康なヒト、または既存の医学的状態を有するドナー（例えば、パーキンソン病（PD）、ALS、アルツハイマー病、ハンチントン病、関節リウマチ（RA）、加齢性黄斑変性（AMD）、糖尿病、肥満症、心疾患、嚢胞性線維症、自己免疫疾患（例えば、MS、狼瘡）、神経変性疾患、遺伝的もしくは後天性疾患を有する任意の対象）、または現存するもしくは既存のもしくは発生中の状態もしくは疾患を処置するために再生療法および／もしくは幹細胞移植を必要とする任意の対象由来であることができる。例えば、いくつかの態様では、ドナーヒト体細胞は、将来的にSCNT由来ヒトES細胞（NT-ESC）の幹細胞移植のレシピエントとなる対象から得られ、それによって患者特異的hES細胞の自家移植が可能になる。したがって、いくつかの態様では、該方法および組成物は、患者特異的同質遺伝子胚性幹細胞株（すなわち同質遺伝子hNT-ESC株）の産生を可能にする。

40

【0359】

したがって、本明細書開示の方法、組成物およびキットは、ヒト卵母細胞株を機能的に除核することおよびヒト患者ドナーから収集した体細胞から得られた核遺伝物質と融合さ

50

せることにより、患者特異的ヒト幹細胞株を得て、それにより、hSCNTを作製することを可能にし、患者特異的NT-ESCを作製するためにそのhSCNTを使用することができる。いくつかの態様では、患者特異的hNT-ESCを患者に投与することによる処置方法が、本明細書に包含され、その際、いくつかの態様では、患者は、核遺伝物質がSCNT手順のために回収されたヒト体細胞のドナーであった。

【0360】

いくつかの態様では、ヒトドナー体細胞または核（すなわち、核遺伝物質）は、本明細書開示のH3K9メチルトランスフェラーゼ阻害剤、例えば、ヒトSUV39h1、ヒトSUV39h2またはヒトSETDB1の阻害剤の任意の1つで本明細書開示の方法により処置される。特定の態様では、ドナーヒト細胞または核は、核移入の前に前処置されず、ハイブリッド卵母細胞またはhSCNT胚は、本明細書開示の方法によりH3K9メチルトランスフェラーゼ阻害剤および/またはKDM4ヒストンデメチラーゼ活性化剤で処置される。特定の態様では、ドナー細胞または核は、核移入または除核したレシピエント卵母細胞に注射するための遺伝物質（または核）の収集の前に、スベルミン、プロタミン、またはブトレッシンで前処置されない。

10

【0361】

ドナー体細胞、レシピエントヒト卵母細胞、ハイブリッド卵母細胞またはヒトSCNTを、H3K9me3メチル化を減少させる活性物質と接触させる段階

いくつかの態様では、ヒトドナー体細胞は、H3K9メチルトランスフェラーゼ阻害剤および/またはKDM4ヒストンデメチラーゼ活性化剤で処置される、またはそれと接触される。いくつかの態様では、ドナーヒト細胞の核（または核遺伝物質）は、H3K9メチルトランスフェラーゼ阻害剤および/またはKDM4ヒストンデメチラーゼ活性化剤で処置される、またはそれと接触される。いくつかの態様では、ドナーヒト細胞の細胞質および/または核は、本明細書開示のH3K9メチルトランスフェラーゼ阻害剤、例えば、ヒトSUV39h1、ヒトSUV39h2および/またはヒトSETDB1の任意の1つまたは組み合わせの阻害剤で処置される、またはそれと接触される。いくつかの態様では、接触は、ドナーヒト体細胞の細胞質および/または核へのH3K9メチルトランスフェラーゼ阻害剤および/またはKDM4ヒストンデメチラーゼ活性化剤のマイクロインジェクションである。

20

【0362】

いくつかの態様では、ドナー体細胞は、除核したヒトドナー卵母細胞への移入のために核を取り出す少なくとも約24時間、または少なくとも約48時間、または少なくとも約3日または少なくとも約4日または4日より前に、ヒトSUV39h1および/もしくはヒトSUV39h2、またはその両方（SUV39h1/2）の阻害剤と接触される。いくつかの態様では、SUV39h1および/もしくはSUV39h2、またはその両方（SUV39h1/2）の阻害剤は、siRNAによるものであり、SUV39h1および/もしくはSUV39h2、またはその両方（SUV39h1/2）の発現阻害は、レシピエント卵母細胞に注射するために核を取り出す前に、少なくとも12時間、または少なくとも24時間またはそれよりも長い期間起こる。いくつかの態様では、SUV39h1および/もしくはSUV39h2、またはその両方（SUV39h1/2）の阻害は、例えば、除核したヒトドナー卵母細胞への移入のために核を取り出す、少なくとも約24時間、または少なくとも約48時間、または少なくとも約3日または少なくとも約4日または4日より前に、ドナー体細胞において起こる。いくつかの態様では、SUV39h1および/もしくはSUV39h2、またはその両方（SUV39h1/2）の発現を阻害することは、siRNAによるものであり、核を取り出す前に、少なくとも12時間、または少なくとも24時間またはそれよりも長い期間起こる。

30

40

【0363】

いくつかの態様では、いくつかの態様では、ヒト卵母細胞は、H3K9メチルトランスフェラーゼ阻害剤および/またはKDM4ヒストンデメチラーゼ活性化剤で処置される、またはそれと接触される。いくつかの態様では、ヒト卵母細胞は、例えば除核卵母細胞の細胞質への直接注射によって、H3K9メチルトランスフェラーゼ阻害剤および/またはKDM4ヒストンデメチラーゼ活性化剤で処置される、またはそれと接触される除核卵母細胞である。いくつかの態様では、ヒト卵母細胞または除核したヒト卵母細胞は、KDM4ヒストンデメチラー

50

ゼ活性化剤、例えば非限定的に、KDM4ファミリーのヒストンデメチラーゼのメンバー、例えばヒトKDM4A、ヒトKDM4B、ヒトKDM4C、ヒトKDM4DまたはヒトKDM4Eの任意の1つまたは組み合わせを活性化する活性物質で処置される、またはそれと接触される。いくつかの態様では、除核卵母細胞は、ドナー核の遺伝物質を注射されたこと、または受け入れたことがない。

【0364】

代替的な態様では、レシピエントヒト卵母細胞は、核移入前（すなわち、ドナー核の遺伝物質を注射される前）の約40時間の時間枠内で、H3K9メチルトランスフェラーゼ阻害剤および/またはKDM4ヒストンデメチラーゼ活性化剤で処置される。そのような接触は、核移入の約40時間前に、またはより好ましくは核移入の約12もしくは24時間前の時間枠内で、最も好ましくは核移入の約4～9時間前の時間枠内で起きることができる。いくつかの態様では、レシピエントヒト卵母細胞がハイブリッド卵母細胞である（すなわち、ドナー体細胞由来の核遺伝物質を含むが、まだ活性化されていない）とき、該レシピエント卵母細胞は、H3K9メチルトランスフェラーゼ阻害剤および/またはKDM4ヒストンデメチラーゼ活性化剤と接触される。そのような接触は、核移入の約40時間後、またはより好ましくは核移入の約1～4もしくは4～12時間後の時間枠内で、または24時間後以内の任意の時間に、最も好ましくは、核移入の約1～4または4～9時間後の時間枠内であるが、融合または活性化の前に、起きることができる。

【0365】

レシピエントヒト卵母細胞を、ヒトドナー体細胞から得られた核遺伝物質の核移入の前、同時、または後のいずれかに、H3K9メチルトランスフェラーゼ阻害剤および/またはKDM4ヒストンデメチラーゼ活性化剤で処置することができる。一般に、レシピエントヒト卵母細胞は、核移入の5時間以内または活性化もしくは融合の5時間以内（例えば、5hpa；活性化の5時間後）に処置される。いくつかの態様では、活性化（または融合）は、遺伝物質をドナー体細胞から除核卵母細胞に注射した1～2または2～4時間後以内に起き、その場合、SCNT胚は、H3K9メチルトランスフェラーゼ阻害剤および/またはKDM4ヒストンデメチラーゼ活性化剤と接触される。

【0366】

いくつかの態様では、ヒトSCNT胚は、H3K9メチルトランスフェラーゼ阻害剤および/またはKDM4ヒストンデメチラーゼ活性化剤で処置される。ヒトSCNT胚は、核（例えば核遺伝物質）をドナー体細胞から除核レシピエント卵母細胞に注射して、「ハイブリッド卵母細胞」を形成させることから作製され、ハイブリッド卵母細胞は活性化（または融合）されてSCNT胚が作製される。いくつかの態様では、ハイブリッド卵母細胞（例えば、活性化前のドナー核遺伝物質を含む除核卵母細胞）は、本明細書開示のH3K9メチルトランスフェラーゼ阻害剤および/またはKDM4ヒストンデメチラーゼ活性化剤で処置される。

【0367】

SCNT胚は、レシピエント卵母細胞の細胞質を用いたドナー核遺伝物質の活性化（融合としても公知）後に作製される。いくつかの態様では、ヒトドナー細胞および/または除核卵母細胞由来の細胞質また核のいずれかまたは両方は、本明細書開示のH3K9メチルトランスフェラーゼ阻害剤および/またはKDM4ヒストンデメチラーゼ活性化剤で処置されている、またはそれと接触されている。いくつかの態様では、ハイブリッド卵母細胞が処置され、かつ/またはhSCNT胚が処置されるときに、ドナー細胞および/または除核卵母細胞のいずれも、H3K9メチルトランスフェラーゼ阻害剤および/またはKDM4ヒストンデメチラーゼ活性化剤で処置されていない。

【0368】

いくつかの態様では、ヒト体細胞核移入（hSCNT）の効率を増加させる段階は、例えば少なくとも5hpa、または10～12hpaの間（すなわち1細胞期）、または約20hpa（すなわち2細胞初期）または20～28hpaの間（すなわち2細胞期）のヒトSCNT胚を、（i）KDM4ファミリーのヒストンデメチラーゼ、および/または（ii）H3K9メチルトランスフェラーゼ阻害剤の少なくとも1つと接触させる段階を含む。いくつかの態様では、KDM4遺伝子、例えばK

DM4Aの外因性発現は、5hpa、10～12hpaの間（すなわち1細胞期）、約20hpa（すなわち2細胞期初期）または20～28hpaの間（すなわち2細胞期）の任意の1つに、SCNT胚において起こる。hSCNT胚が、H3K9me3を阻害する活性物質、例えば、KDM4遺伝子、例えばKDM4Aの外因性発現（例えばKDM4A mRNAまたはmod-RNA）を増加させる活性物質などの活性物質と接触されるいくつかの態様では、SCNT胚の各細胞（例えば、2細胞期胚または4細胞期胚の各細胞）に、KDM4Aを活性化または過剰発現させる活性物質が注射される。いくつかの態様では、KDM4遺伝子、例えばKDM4Aの外因性発現は、5hpa、10～12hpaの間（すなわち1細胞期）、約20hpa（すなわち2細胞期初期）または20～28hpaの間（すなわち2細胞期）またはその後（例えば4細胞期）の任意の1つに、ヒトSCNT胚において起こる。ヒトSCNT胚が、H3K9me3を阻害する活性物質、例えば、KDM4遺伝子、例えばKDM4Aの外因性発現（例えばKDM4A mRNAまたはmod-RNA）を増加させる活性物質などの活性物質と接触されるいくつかの態様では、SCNT胚の各細胞（例えば、2細胞期胚または4細胞期胚の各細胞）に、KDM4dを活性化または過剰発現させる活性物質が注射される。

10

【0369】

核移入の方法

本発明の一目的は、ヒト体細胞をより効率的にクローニングする手段を提供することである。本開示の方法および組成物は、ヒトの治療用クローニングのために、例えば多能性幹細胞（PSC）およびヒト全能細胞（TSC）を得るために、ならびにヒト体細胞をリプログラミングするために、使用され得る。

【0370】

核移入技法または核移植技法は、文献から公知である。特に、その全体として参照により本明細書に組み入れられるCampbell et al, Theriogenology, 43:181 (1995); Collas et al, Mol. Reprod Dev., 38:264-267 (1994); Keefer et al, Biol. Reprod., 50:935-939 (1994); Sims et al, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 90:6143-6147 (1993); 国際公開公報第94/26884号；同第94/24274号、および同第90/03432号を参照されたい。また、米国特許第4,944,384号および同第5,057,420号は、ウシ核移植の手順を記載している。Cibelli et al, Science, Vol. 280:1256-1258 (1998)も参照されたい。

20

【0371】

ドナー核をレシピエントの受精胚に移入する段階は、マイクロインジェクション装置を用いて行われ得る。特定の態様では、最小限の細胞質が核と共に移入される。最小限の細胞質の移入は、細胞融合アプローチによる移入とは対照的に、核がマイクロインジェクションを使用して移入される場合に達成可能である。一態様では、マイクロインジェクション装置は、圧電ユニットを含む。典型的には、針に振動を付与するように、圧電ユニットが針に操作可能に取り付けられる。しかし、針に振動を付与することができる任意の構成の圧電ユニットが、本発明の範囲内に含まれる。特定の場合に、圧電ユニットは、針が物体内を通過するのを助けることができる。特定の態様では、圧電ユニットは、核と共に最小限の細胞質を移入するために使用され得る。その目的に適した任意の圧電ユニットが使用され得る。特定の態様では、圧電ユニットは、圧電マイクロマニピュレーター制御装置PMM150（PrimeTech, Japan）である。

30

【0372】

いくつかの態様では、該方法は、ドナー核を除核卵母細胞と融合させる段階を含む。細胞質体と核との融合は、ポリエチレングリコール（Pontecorvo "Polyethylene Glycol (PEG) in the Production of Mammalian Somatic Cell Hybrids" Cytogenet Cell Genet. 16(1-5):399-400 (1976)参照、核の直接注射、センダイウイルス介在性融合（米国特許第4,664,097号およびGraham Wistar Inst. Symp. Monogr. 9 19 (1969)参照）、または電気融合のような当技術分野において公知の他の技法を含む、当技術分野において公知のいくつかの技法を使用して行われる。細胞の電気融合は、細胞を一緒に近接させて、それらを交流電場に曝露することを伴う。適切な条件下で、細胞は一緒に押し付けられ、そこで細胞膜の融合、次に融合（fusate）細胞またはハイブリッド細胞の形成がある。細胞の電気融合およびそれを行うための装置は、例えば米国特許第4,441,972号、同第4,578,168号お

40

50

よび同第5,283,194号、国際特許出願PCT/AU92/00473 [国際公開公報第1993/05166号として公開]、Pohl, "Dielectrophoresis", Cambridge University Press, 1978およびZimmerman et al., Biochimica et Biophysica Acta 641: 160-165, 1981に記載されている。

【 0 3 7 3 】

SCNTの方法、およびレシピエント卵母細胞の細胞質を用いたドナー核遺伝物質の活性化（すなわち融合）は、その全体として参照により本明細書に組み入れられる米国特許出願公開第2004/0148648号に開示されている。

【 0 3 7 4 】

卵母細胞の収集

卵母細胞ドナーは、以前に記載されたように同期化および過排卵させることができ（Gavin W.G., 1996）、精管切除された雄と48時間にわたり交配された。収集後、2mM L-グルタミンおよび1%ペニシリン/ストレプトマイシン（各10,000 I.U./ml）を補充した10%FBSを有する平衡化M199中で卵母細胞を培養した。核移入は、インピボまたはインピトロで成熟できた卵母細胞を利用することもできる。インピボ成熟した卵母細胞を、上に説明したように派生させ、インピトロ成熟した卵母細胞を特定の細胞期までインピトロで発生させ、その後、核移入に使用するためにそれらが回収される。

【 0 3 7 5 】

細胞質体の調製および除核

卵丘細胞が付着した卵母細胞は、典型的には廃棄される。卵丘細胞のない卵母細胞を2群に分類した：停止した分裂中期II（1つの極体）および分裂終期IIのプロトコール（はっきりと視認可能な極体または部分的に突出している第二極体の存在がない）。停止した分裂中期IIのプロトコールでは卵母細胞は最初に除核される。活性化分裂終期IIのプロトコールに割り当てられた卵母細胞は、M199/10%FBS中で2~4時間培養することによって調製された。この期間の後に、全ての活性化卵母細胞（部分的に突出した第二極体が存在）を、培養誘導カルシウム活性化分裂終期II卵母細胞（分裂終期II-Ca）として群分けし、除核した。続いて、培養期間中に活性化されなかった卵母細胞を、7%エタノール含有M199、10%FBS中で5分間インキュベートして活性化を誘導し、次に10%FBSを有するM199中で追加的に3時間培養して、分裂終期IIに到達させた（分裂終期II-EtOHプロトコール）。除核前に、全ての卵母細胞をサイトカラシン-Bで15~30分間処置する。ガラスピペットで第一極体および極体周囲の隣接細胞質（細胞質の約30%）吸引して赤道板を除去することによって、分裂中期IIの卵母細胞を除核した。第一極体および部分的に突出している第二極体を含む周囲の細胞質（細胞質の10~30%）を除去することによって、分裂終期II-Caおよび分裂終期II-EtOH卵母細胞を除核した。除核後、全ての卵母細胞を直ちに再構築した。

【 0 3 7 6 】

核移入および再構築

卵母細胞の除核のために使用された同じ培地中でドナー細胞の注射を行った。ガラスピペットを使用して、透明帯と卵細胞質膜との間にドナー細胞を1つ置いた。電気融合および活性化手順の前に、細胞-卵母細胞のカプレット（couplet）をM199中で30~60分間インキュベートした。再構築された卵母細胞を、融合緩衝液（300mM マンニトール、0.05mM CaCl₂、0.1mM MgSO₄、1mM K₂HPO₄、0.1mMグルタチオン、0.1mg/ml BSA）中で2分間平衡化した。融合培地で満たされた「融合スライド」になるよう形成された2つのステンレス鋼電極（間隙500 μm; BTX-Genetronics, San Diego, Calif.）を有する融合チャンバー中において、電気融合および活性化を室温で行った。

【 0 3 7 7 】

融合スライドを使用して融合（例えば活性化）を行う。融合ディッシュ内に融合スライドを置き、十分量の融合緩衝液にこのディッシュを浸して、融合スライドの電極を覆った。カプレットを培養インキュベーターから取り出し、融合緩衝液に通して洗浄した。実体顕微鏡を使用して、カリオプラスト/細胞質体接合部が電極と平行となるよう、カプレットを両方の電極から等距離に置いた。活性化および融合を促進するためにカプレットに印

加される電圧範囲は、1.0kV/cm～10.0kV/cmであることができることに留意すべきである。しかし、最初の単回同時融合および活性化電気パルスは、好ましくは、電圧範囲2.0～3.0kV/cm、最も好ましくは2.5kV/cmを有し、好ましくは持続時間少なくとも20μ秒である。これは、BTX ECM 2001 Electrocell Manipulatorを使用して細胞カプレットに印加される。マイクロパルスの持続時間は、10～80μsecまで変動することができる。この工程の後、処置されたカプレットは、典型的には1滴の新鮮な融合緩衝液に移動される。融合処置されたカプレットを平衡化SOF/FBSに通して洗浄し、次にサイトカラシンBを有するまたは有さない平衡化SOF/FBSに移動させた。サイトカラシンBが使用される場合、その濃度は、1～15μg/mlまで変動することができ、最も好ましくは5μg/mlである。空気中に約5%のCO₂が入った加湿ガスチャンパー中でカプレットを37～39℃でインキュベートした。本開示に提供される任意のプロトコルの全体にわたり、サイトカラシンBの代わりにマンニトールが使用され得る（Ca²⁺およびBSAを有するHEPES緩衝マンニトール（0.3mm）に基づく培地）ことに留意すべきである。融合後10～90分の間に、最も好ましくは融合の30分後に開始して、その後の体内移植または核移入の追加的なラウンドに使用するためのトランスジェニック胚の発生のために、実際のカリオプラスト/細胞質体融合体の存在が判定される。

10

【0378】

シクロヘキシミド処置後に、少なくとも0.1%、好ましくは少なくとも0.7%、好ましくは0.8%のウシ血清アルブミンに加えて100U/mlペニシリンおよび100μg/mlストレプトマイシン（SOF/BSA）を補充した平衡化SOF培地でカプレットを徹底的に洗浄する。カプレットを平衡化SOF/BSAに移し、約6%O₂、5%CO₂、残りは窒素が入った加湿モジュールインキュベーションチャンパー中に入れ、37～39℃で24～48時間静置培養した。齢に応じた発生を示す核移入胚（24～48時間で1細胞～最大8細胞）を代理母である同期化されたレシピエントに移入した。

20

【0379】

核移入胚培養およびレシピエントへの移入

SCNT胚の培養

hSCNTによって得られた胚は、胚が通常培養される条件（少なくともインビボ）以外のインビボ培養条件から利益を得る、またはそれを必要にさえし得ると示唆されている。ウシ胚の日常的な増倍において、再構築された胚（その多くが一度に）は、ヒツジ輸卵管内で5～6日間培養されたものである（Willadsen, In Mammalian Egg Transfer (Adams, E. E., ed.) 185 CRC Press, Boca Raton, Fla. (1982)によって記載）。特定の態様では、SCNT胚は、移入前に寒天のような保護培地中に包埋され、次に一時的レシピエントから回収後に寒天から切り出され得る。保護寒天または他の培地の機能は、2つある：第一に、それは、透明帯と一緒に保持することによってSCNT胚用の構造補助物として作用し、第二に、それは、レシピエント動物の免疫系細胞に対するバリアとして作用する。このアプローチは、胚盤胞を形成する胚の比率を増加させるものの、いくつかの胚が失われ得るという欠点がある。いくつかの態様では、hSCNT胚を、50μlの液滴中でフィーダー細胞、例えば初代ヤギ輸卵管上皮細胞の単層上で共培養することができる。胚培養物を、5%CO₂を有する加湿39℃インキュベーター中で48時間維持し、その後、移入することができる。hSCNT胚は、卵割球を収集してhNT-ESCを産生することができる。

30

40

【0380】

適用

全能細胞を得る段階

SCNT実験から、分化した成熟体細胞由来の核を全能状態にリプログラミングできることが示された。したがって、本明細書開示の方法を使用して作製されるhSCNT胚を、全能または胚性の幹細胞または幹様細胞および細胞コロニーの作製のために適したインビトロ培養培地中で培養することができる。胚の培養および成熟に適した培養培地は、当技術分野において周知である。ウシ胚の培養および維持のために使用され得る公知の培地の例には、HamのF-10 + 10%ウシ胎児血清（FCS）、組織培養培地-199（TCM-199）+ 10%ウシ胎児

50

血清、タイロート-アルブミン-ラクテート-ビルベート (TALP)、Dulbeccoリン酸緩衝食塩水 (PBS)、EagleおよびWhitten培地が含まれる。卵母細胞の収集および成熟のために使用される最も一般的な培地の1つは、TCM-199、およびウシ胎児血清、新生児血清、発情期雌ウシ血清、子ヒツジ血清または去勢ウシ血清を含む、1~20%血清補充物である。好ましい維持培地には、アール塩、10%ウシ胎児血清、0.2Maビルビン酸塩および50ug/ml硫酸ゲンタマイシンを有するTCM-199が含まれる。上記のいずれかは、顆粒膜細胞、輸卵管細胞、BRL細胞および子宮細胞およびSTO細胞のような多様な細胞型と一緒に共培養も伴い得る。

【0381】

特に、子宮内膜のヒト上皮細胞は、着床前および着床期の間に白血病抑制因子 (LIF) を分泌する。したがって、いくつかの態様では、hSCNT由来胚のインビトロ発生を高めるために、培養培地へのLIFの添加が包含される。胚または幹細胞培養物のためのLIFの使用は、参照により本明細書に組み入れられる米国特許第5,712,156号に記載されている。

10

【0382】

別の維持培地が、参照により本明細書に組み入れられるRosenkrans, Jr.らへの米国特許第5,096,822号に記載されている。CR1と名付けられたこの胚培地は、胚を支援するために必要な栄養物を含有する。CR1は、ヘミカルシウムL-ラクテートを1.0mM~10mM、好ましくは1.0mM~5.0mMの範囲の量で含有する。ヘミカルシウムL-ラクテートは、ヘミカルシウム塩が組み入れられたL-ラクテートである。また、Thomson et al., Science, 282:1145-1147 (1998)およびProc. Natl. Acad. Sci., USA, 92:7844-7848 (1995)に述べられたよ

20

【0383】

いくつかの態様では、フィーダー細胞は、マウス胚性線維芽細胞を含む。適切な線維芽細胞フィーダー層の調製のための手段は、以下の実施例に記載されており、十分に当業者の技能の範囲内である。

【0384】

胚盤胞期ヒトSCNT胚 (またはその同等物) からヒトES細胞 (例えば、ヒトNT-ESCまたはhNT-ESC) を派生させる方法は、当技術分野において周知である。そのような技法は、ヒトSCNT胚からヒトES細胞 (例えば、hNT-ESC) を派生させるために使用することができ、その際、hSCNT胚は、KDM4デメチラーゼファミリーのメンバーおよび/またはヒストンメチルトランスフェラーゼSUV39h1/SUV39h2の阻害剤で処置されなかったhSCNTと比較して低下したレベルのH3K9me3をヒト体細胞ドナー細胞から供与された核遺伝物質中に有するhNT-ESCを作製するために、使用される。追加的または代替的に、hNT-ESCは、発生により初期の間に、クローニングされたヒトSCNT胚から派生させることができる。特定の態様では、本明細書開示の方法、組成物およびキットを使用して作製されるヒトSCNT胚から作製される割球を、ガラスピペットを使用して解離させて全能細胞を得ることができる。いくつかの態様では、解離は、0.25%トリプシンの存在下で起こり得る (Collas and Robl, 43 BIOL. REPROD. 877-84, 1992; Stice and Robl, 39 BIOL. REPROD. 657-664, 1988; Kanka et al., 43 MOL. REPROD. DEV. 135-44, 1996)。

30

【0385】

特定の態様では、結果として生じたhSCNT胚由来の胚盤胞または胚盤胞様クラスターを使用して、胚性幹細胞株、例えば核移入ESC (ntESC) 細胞株を得ることができる。そのような株は、例えば、その全体として参照により本明細書に組み入れられるThomson et al., Science, 282:1145-1147 (1998)およびThomson et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 92:7544-7848 (1995)によって報告される培養方法に従って得ることができる。

40

【0386】

多能性胚性幹細胞を、また、出生までの胚の正常な発生を妨害せずに、hSCNT胚から取り出された単一割球から作製することができる。その開示が、その全体として参照により組み入れられる、2004年11月4日に出版された米国特許出願第60/624,827号; 2005年3月14日に出版された同第60/662,489号; 2005年6月3日に出版された同第60/687,158号; 2005年

50

10月3日に出席された同第60/723,066号；2005年10月14日に出席された同第60/726,775号；2005年11月4日に出席された同第11/267,555号；2005年11月4日に出席されたPCT出願PCT/US05/39776を参照されたく、それぞれの全開示が、その全体として参照により組み入れられる；Chung et al., Nature, Oct. 16, 2005（印刷に先立って電子刊行された）およびChung et al., Nature V. 439, pp. 216-219 (2006)も参照されたい）。そのような場合において、hSCNT胚は、多能性幹細胞の産生のために破壊されることはない。

【0387】

本発明の一局面では、該方法は、hSCNT胚から派生した細胞の研究および治療法における利用を含む。そのようなヒト多能性幹細胞（PSC）または全能幹細胞（TSC）は、非限定的に、皮膚細胞、軟骨細胞、骨細胞、骨格筋細胞、心筋細胞、腎細胞、肝細胞、血液および血液形成細胞、血管前駆および血管内皮細胞、膵細胞、神経細胞、グリア細胞、網膜細胞、内耳包細胞、腸細胞、肺細胞を含めた、体内の任意の細胞に分化し得る。

【0388】

本発明の別の態様では、hSCNT胚、または胚盤胞、またはhSCNT胚（例えばNT-ESC）から得られる多能性もしくは全能細胞を、網膜色素上皮、造血前駆細胞および血管芽前駆細胞ならびに外胚葉、中胚葉、および内胚葉の多数の他の有用な細胞型のような、他の治療的に有用な細胞をもたらすために、1種または複数種の分化誘導因子に曝露することができる。そのような誘導因子には、非限定的に、インターロイキン-A、インターフェロン-A/D、インターフェロン-、インターフェロン-、インターフェロン-誘導タンパク質-10、インターロイキン-1-17、角化細胞成長因子、レプチン、白血病抑制因子、マクロファージコロニー刺激因子、およびマクロファージ炎症性タンパク質-1、1-、2、3、3、および単球走化性タンパク質1-3、6カインなどのサイトカイン、アクチビンA、アンフィレギュリン、アンジオゲニン、B-内皮細胞成長因子、セルリン（cellulin）、脳由来の神経栄養因子、C10、カルジオトロフィン-1、絨毛神経栄養因子、サイトカイン誘導好中球走化性因子-1、エオタキシン、上皮成長因子、上皮好中球活性化ペプチド-78、エリトロポエチン、エストロゲン受容体-、エストロゲン受容体-、線維芽細胞成長因子（酸性および塩基性）、ヘパリン、FLT-3/FLK-2リガンド、神経膠細胞株由来の神経栄養因子、Gly-His-Lys、顆粒球コロニー刺激因子、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子、GRO-/M-CSF、GRO-、GRO-、HCC-1、ヘパリン結合上皮成長因子、肝細胞成長因子、ヘレグリン-、インスリン、インスリン成長因子結合タンパク質-1、インスリン様成長因子結合タンパク質-1、インスリン様成長因子、インスリン様成長因子II、神経発育因子、ニューロトロフィン-3,4、オンコスタチンM、胎盤成長因子、プレイオトロフィン、RANTES、幹細胞因子、ストロマ細胞由来因子1B、スロモポエチン（thromopoietin）、形質転換成長因子--（、1、2、3、4、5）、腫瘍壊死因子（および）、血管内皮成長因子、および骨形成タンパク質、17B-エストラジオール、副腎皮質刺激ホルモン、アドレノメデュリン、-メラニン細胞刺激ホルモン、絨毛性ゴナドトロピン、コルチコステロイド結合グロブリン、コルチコステロン、デキサメタゾン、エストリオール、卵胞刺激ホルモン、ガストリン1、グルカゴン、ゴナドトロピン、L-3,3',5'-トリヨードチロニン、黄体ホルモン、L-チロキシン、メラトニン、MZ-4、オキシトシン、副甲状腺ホルモン、PEC-60、下垂体成長ホルモン、プロゲステロン、プロラクチン、セクレチン、性ホルモン結合グロブリン、甲状腺刺激ホルモン、サイトロピン放出因子、チロキシン結合グロブリン、およびパソプレシンのようなホルモンおよびホルモンアンタゴニストの発現を変更する酵素、フィブロネクチン、フィブロネクチンのタンパク質分解フラグメント、ラミニン、テネイシン、トロンボスポンジンのような細胞外マトリックス成分、ならびにアグリカン、ヘパラン硫酸プロテオグリカン、コントロイチン硫酸プロテオグリカン、およびシンデカンのようなプロテオグリカンが含まれる。他の誘導因子には、本発明のリプログラミングされた細胞から派生する分化途中の細胞に誘導信号を提供するために使用される所定の組織由来の細胞に由来する細胞または成分が含まれる。そのようなインデューサー細胞（inducer cell）は、ヒト、非ヒト哺乳動物、または鳥類の、例えば特定病原体未感染（SPF）胚または成熟細胞から派生し得る。

10

20

30

40

50

【0389】

割球の培養。一態様では、hSCNT胚を使用して割球を作製し、着床前遺伝子診断（PGD）に現在使用される技法に係るインピトロ技法を利用して、本明細書開示の方法によって作製されるhSCNT胚から、hSCNT胚を破壊せずに、またはその他の点でその生存率を顕著に変更することなく、単一割球を単離することができる。本明細書に示されるように、多能性ヒト胚性幹（hES）細胞および細胞株を、出生までの胚の正常な発生に干渉せずに、本明細書開示のhSCNT胚から取り出される単一割球から作製することができる。

【0390】

治療用クローニング

ヒツジ「Dolly」のクローニングにおけるWilmutらの発見（Wilmut, et al, Nature 385, 810 (1997)）は、hESCを派生させることにおけるThomsonらの発見（Thomson et al., Science 282, 1145 (1998)）と一緒に、患者自身の核から作製されるhSCNT胚またはhSCNT操作された細胞塊から派生する患者特異的hESCの樹立に基づく再生細胞移植について大きな熱狂を引き起こした。自家移植により免疫拒絶反応を避けることを目的とするこの戦略は、おそらく、hSCNTについての最も強力な臨床的な理論的根拠である。その証拠に、複合疾患特異的SCNT-hESCの派生は、疾患メカニズムの発見を加速し得る。細胞移植について、個別のマウス自身のSCNT由来mESCを用いた、マウスSCIDおよびPDモデルの革新的な処置が有望である（Rideout et al, Cell 109, 17 (2002); Barberi, Nat. Biotechnol. 21, 1200 (2003)）。最終的に、広範な組織適合性を有するSCNT由来幹細胞のバンクを創出できることが、新しい卵母細胞を継続して供給する必要性を下げるであろう。

【0391】

本発明の特定の態様では、治療的有用性を示すために、hSCNT胚（例えばhNT-ESC）から得られる多能性細胞または全能細胞を任意で分化させ、かつこれらの細胞が普通は属する組織内に導入することができる。例えば、hSCNT胚から得られた多能性細胞または全能細胞を組織内に導入することができる。特定の他の態様では、hSCNT胚から得られる多能性細胞または全能細胞を、全身的に、または治療的有用性が望まれる部位から距離をおいて、導入することができる。そのような態様では、hSCNT胚から得られる多能性細胞または全能細胞は、距離をおいて作用することができ、または所望の部位にホーミングし得る。

【0392】

本発明の特定の態様では、クローニングされた細胞、hSCNT胚から得られる多能性細胞または全能細胞を、他の多能性幹細胞の分化を誘導することに利用することができる。遺伝子発現の胚性パターンを維持しながら、インピトロで増殖する能力のある細胞の単一細胞由来集団を作製することは、他の多能性幹細胞の分化を誘導する上で有用である。細胞-細胞誘導は、初期胚における分化を方向付ける一般的な手段である。脊髄神経細胞、心臓細胞、膵細胞、および最終造血細胞を含む、潜在的に医学に有用な多くの細胞型は、正常な胚発生の際に誘導シグナルによって影響される。遺伝子発現の胚性パターンを維持しながら、インピトロで増殖する能力のある細胞の単一細胞由来集団を、多様なインピトロ、インオボ（in ovo）、またはインビボ培養条件で培養して、所望の細胞または組織型になるための他の多能性幹細胞の分化を誘導することができる。

【0393】

hSCNT胚（例えばntESC）から得られる多能性細胞または全能細胞を使用して、任意の所望の分化した細胞型を得ることができる。そのような分化したヒト細胞の治療的使用は、比類がない。例えば、ヒト造血幹細胞は、骨髄移植を必要とする医学処置に使用され得る。そのような手順は、多数の疾患、例えば、卵巣癌および白血病のような末期癌、ならびにAIDSのような免疫系を損なう疾患を処置するために使用される。造血幹細胞は、例えば、ヒトの癌またはAIDS患者から得られるドナー最終分化成熟体細胞、例えば上皮細胞またはリンパ球を、レシピエント除核ヒト卵母細胞と融合させること、それにより、本明細書開示の方法に従ってhSCNT胚を得ること（hSCNT胚は、次に、上記の患者特異的多能性もしくは全能細胞または幹細胞を得るために使用することができる）、および造血幹細胞が得られるまでそのような細胞を分化に好都合な条件下で培養することによって、得ること

ができる。そのような造血細胞は、癌およびAIDSを含む疾患の処置に使用され得る。本明細書に述べられるように、ヒトドナー成熟細胞、またはレシピエントヒト卵母細胞、ハイブリッド卵母細胞またはhSCNT胚を、本明細書開示の方法に従って、KDM4ヒストンジメチラーゼ活性化剤および/またはH3K9メチルトランスフェラーゼ阻害剤で処置することができる。

【0394】

あるいは、ドナーヒト細胞は、神経学的障害を有するヒト患者由来の成熟体細胞であることができ、作製されたhSCNT胚を使用して、患者特異的または疾患特異的多能性細胞または全能細胞を産生することができ、それらの細胞を分化条件下で培養して、神経細胞株を産生することができる。そのようなNT-ESCを、神経障害を処置するための治療用クローニングまたは神経障害および神経変性障害の疾患モデル化に使用することができる。そのようなhNT-ESCは、当業者に一般的に公知の方法によって神経系列に沿って定方向分化することができる。細胞に基づく治療およびそのようなヒト神経細胞の移植によって処置可能な特定の疾患には、例として、とりわけパーキンソン病、アルツハイマー病、ALS、MSおよび脳性麻痺が含まれる。特定の例のパーキンソン病(PD)では、移植された胎児脳神経細胞が周囲の細胞と適正に結合を作り、ドーパミンを産生することが実証されている。これは、パーキンソン病の症状の長期後退をもたらすことができる。したがって、いくつかの態様では、神経系列に沿って分化した患者特異的NT-ESCを、PD患者を処置する方法に使用することができ、その際、NT-ESCはhSCNT胚から得られ、hSCNT胚は、PDを有する対象から得られる体細胞からの核遺伝物質と、KDM4アゴニストまたはSUV39h1および/もしくはSUV39h2のmRNAおよび/もしくは阻害剤で処置されたヒト除核卵母細胞との融合から創出された。

10

20

【0395】

いくつかの態様では、hSCNT胚(例えばNT-ESC)から得られる多能性細胞または全能細胞は、皮膚の出生前遺伝子発現パターンを有する細胞に分化することができ、その細胞は、高度に弾性線維形成性である、または瘢痕形成を引き起こさずに再生する能力がある。特に、関節周囲の領域内のような、外皮が高レベルの弾性から利益を得る場所に対応する、哺乳動物胎児皮膚の皮膚線維芽細胞は、ターンオーバーなしに長年機能する弾性線維の入り組んだ構造をデノボ合成することを担う。加えて、初期胎児皮膚は、瘢痕形成なしに再生する能力がある。SCNT胚から得られる多能性細胞または全能細胞からの胚発生におけるこのポイントからの細胞は、正常なエラスチン構造を形成することを含む、瘢痕なしの皮膚再生を促進する上で有用である。これは、正常なヒト加齢の過程の症状を処置する上で、または皮膚の弛みおよび皺を含む加齢性外観をもたらす皮膚の深部弾性線維分解があり得る光線性皮膚損傷に、特に有用である。

30

【0396】

NT-ESCが異なる系列に沿って分化した後にそれらの分化した細胞の特異的選択を可能にするために、いくつかの態様では、誘導プロモーターを介して発現される選択マーカーをドナーヒト体細胞にトランスフェクトすることによって、分化が誘導されたときに特定の細胞系列の選択または富化が可能になり得る。例えば、造血細胞の選択のためにCD34-neoが、筋細胞のためにPw1-neoが、交感神経細胞のためにMash-1-neoが、大脳皮質の灰白質のヒトCNS神経細胞のためにMal-neoなどが、使用され得る。

40

【0397】

本発明の大きな利点は、hSCNTの効率を増加させることによって、同質遺伝子のまたはシンジェニックなヒトES細胞、具体的には、人工多能性幹細胞ではない(例えば、iPSCではない)多能性のES細胞の、本質的に無限の供給を提供することである。そのようなNT-ESCは、部分多能性ではなく、かつそれらのリプログラミングを指令するためのウイルス導入遺伝子またはリプログラミング因子の強制発現を有さないもので、iPSCと比べて利点を有し、かつ移植に適している。

【0398】

いくつかの態様では、hSCNTから作製されるhNT-ESCは、hSCNT胚から得られる患者特異

50

的多能性であり、その際、ドナーヒト細胞は、多能性幹細胞またはその分化した子孫で処置されるべき対象から得られたものである。したがって、それは、現在の移植方法に関連する重大な問題、すなわち、宿主対移植片または移植片対宿主拒絶反応のせいで起こり得る、移植された組織の拒絶反応を回避する。慣例的に、拒絶反応は、シクロスポリンなどの抗拒絶反応薬の投与によって阻止または軽減される。しかし、そのような薬物は、重大な有害副作用、例えば免疫抑制、発癌性を有するだけでなく、非常に高価である。本発明は、シクロスポリン、イムラン、FK-506、グルココルチコイド、およびラパマイシン、ならびにその誘導体などの抗拒絶反応薬の必要性を排除する、または少なくとも大きく低減するはずである。

【0399】

同質遺伝子細胞療法によって処置可能な他の疾患および状態には、例として、非限定的に、脊髄損傷、多発性硬化症（MS）、筋ジストロフィー、糖尿病、肝疾患、すなわち高コレステロール血症、心疾患、軟骨置換、糖尿病、熱傷、足潰瘍、消化管疾患、血管病、腎臓病、尿路疾患、ならびに加齢黄斑変性（AMD）および類似の状態を含む加齢関連疾患が含まれる。

【0400】

ヒトNT-ESC、例えばヒト多能性幹細胞（PSC）およびヒト全能幹細胞（TSC）のための使用hSCNTの効率を増加させるための本明細書記載の方法および組成物は、幹細胞研究および発生生物学の分野を進歩させる数多くの重要な用途を有する。例えば、hSCNT胚は、hES細胞、hES細胞株、ヒト全能幹（TS）細胞および細胞株を作製するために使用することができ、それから分化した細胞を、基礎発生生物学に加えて特定の疾患を研究するために使用することができ、数多くの疾患および状態の処置に治療的に使用することができる。追加的に、これらのhNT-ESCの増殖、分化、生存、または移動をモジュレートするために使用することができる要因および条件を特定するために、これらのhNT-ESCをスクリーニングアッセイに使用することができる。特定された活性物質は、インビトロおよびインビボ細胞挙動を調節するために使用することができ、かつ細胞または無細胞療法の基礎を形成し得る。

【0401】

多能性ヒト胚性幹細胞の単離および哺乳動物におけるSCNTでのブレイクスルーは、組織修復および移植医療に潜在的適用を有して、研究に使用するための未分化細胞の潜在的に無限の供給源を作製するために、ヒトSCNTを行う可能性をもたらしている。

【0402】

「治療用クローニング」と呼ばれるときもあるこの概念は、除核ドナー卵母細胞への体細胞核の移入を表す（Lanza, et al., Nature Med. 5, 975 (1999)）。理論上、卵母細胞の細胞質は、体細胞遺伝子の全てをサイレンシングし、胚細胞遺伝子を活性化することによって、移入された核をリプログラミングする。ES細胞（すなわちntESC）は、クローニングされた着床前期胚の内部細胞塊（ICM）から単離される。治療環境において適用されると、これらの細胞は患者の核ゲノムを有し、したがって、定方向細胞分化の後に、免疫拒絶反応なしに細胞を移植して、糖尿病、変形性関節症、およびパーキンソン病（とりわけ）のような変性障害を処置できることが提唱されている。以前の報告は、クローニングされた胚盤胞のICMからのウシES様細胞（Cibelli et al., Nature Biotechnol. 16, 642 (1998)）、およびマウスES細胞の作製（Munsie et al., Curro Biol 10, 989 (2000); Kawase, et al., Genesis 28, 156 (2000); Wakayama et al., Science 292, 740 (2001)）、ならびにクローニングされたヒト胚から8~10細胞期および胚盤胞の発生（Cibelli et al., Regen. Med. 26, 25 (2001); Shu, et al., Fertil. Steril. 78, S286 (2002)）を記載している。ここで、本発明を使用して、本明細書開示の方法によって作製されたSCNT操作細胞塊からヒト患者特異的ES細胞を作製させることができる。SCNTから作製されるそのようなES細胞は、本明細書において「ntESC」と呼ばれ、患者特異的同質遺伝子胚性幹細胞株を含むことができる。

【0403】

ヒトhESC株を産生するための本技法は、過剰なIVFクリニックの胚を利用し、患者特異的ES細胞を生じない。患者特異的な、免疫がマッチしたhESCは、疾患および発生の研究のために、および治療用幹細胞移植方法を進歩させるために、生物医学的に非常に重要であると予期されている。したがって、本発明は、提供された除核卵母細胞中にその核が挿入されている、インフォームド・ドナー由来のヒトドナー皮膚細胞、ヒトドナー卵丘細胞、または他のヒトドナー体細胞から作製されるhSCNTからhESC株を樹立するために使用することができる。hSCNT由来hESCのこれらの株は、動物タンパク質不含培養培地上で増殖される。

【0404】

免疫学的適合性を示すために、各SCNT由来hESC（すなわち、hNT-ESC）の主要組織適合遺伝子複合体の同一性を患者自身の同一性と比較することができるが、これは、来たるべき移植にとって重要である。これらのSCNT由来hESC（すなわち、hNT-ESC）の作製を用いて、遺伝的およびエピジェネティックな安定性の評価がなされる。

10

【0405】

多数のヒト傷害および疾患は、単一細胞型での欠陥に起因する。欠陥細胞を適切な幹細胞、前駆細胞、またはインビトロ分化した細胞により置換できるならば、および移植された細胞の免疫拒絶反応を回避できるならば、クリニックで疾患および傷害を細胞レベルで処置することが可能であり得る（Thomson et al., Science 282, 1145 (1998)）。体細胞核が個別の患者からもたらされたヒトSCNT胚またはSCNT操作細胞塊からhESCを作製するという、核ゲノムがドナーのゲノムと同一（ミトコンドリアDNA（mtDNA）は同一でないにせよ）という状況によって、もしもこれらの細胞がヒトの処置に使用されるならば、免疫拒絶反応の可能性は排除され得るであろう（Jaenisch, N. Engl. Med. 351, 2787 (2004); Drukker, Benvenisty, Trends Biotechnol. 22, 136 (2004)）。近年、重症複合免疫不全症（SCID）およびパーキンソン病（PD）のマウスモデル（Barberi et al., Nat. Biotechnol. 21, 1200 (2003)）は、NT胚盤胞から派生した、分化したマウス自己胚性幹細胞（mESC）の移植という治療用クローニングとも呼ばれる工程によって成功裏に処置されている。

20

【0406】

本明細書開示の方法を使用して作製されたヒトSCNT胚またはSCNT操作細胞塊からhESCを作製することを、アルカリホスファターゼ（AP）、ステージ特異的胚抗原4（SSEA-4）、SSEA-3、腫瘍拒絶抗原1-81（Tra-1-81）、Tra-1-60、およびオクタマー-4（Oct-4）を含めたhESC多能性マーカーの発現について評価することができる。ヒト短反復配列プローブを用いたDNAフィンガープリンティングを使用して、各NT-hESC株が体細胞性ヒト細胞のそれぞれのドナーに端を発して派生したことを、ならびにこれらの株が、除核の失敗およびその後の単為生殖活性化の結果ではなかったことを高い確実性で示すこともできる。幹細胞は、自己再生できること、ならびに全部で3つの胚葉、すなわち外胚葉、中胚葉、および内胚葉から体細胞に分化できることによって定義される。分化は、適切な動物モデルへのIM注射によって実証されるように、奇形腫形成および胚様体（EB）形成に関して分析される。

30

【0407】

要約すれば、hSCNTの効率を増加させるための本方法は、ES細胞を派生させるための現行方法の代替を提供する。しかし、現行のアプローチとは異なり、ドナー組織と組織適合性のES細胞株を作製するために、hSCNTを使用することができる。このように、本明細書開示の方法によって生成されるhSCNT胚は、将来的に、処置を必要とする特定の患者と組織適合性の細胞療法を開発する機会を提供し得る。

40

【0408】

いくつかの態様では、本明細書開示の方法、システム、キットおよび装置をサービス提供会社が行うことができ、例えばその際、研究者は、hSCNT胚、またはhSCNT胚から派生した多能性幹細胞もしくは全能幹細胞を提供するようサービス提供会社に要請することができ、hSCNT胚は、サービス提供会社によって運営される研究室内で本明細書開示の方法を使用して作製されたものである。そのような態様では、ドナーヒト体細胞を得た後、

50

サービス提供会社は、本明細書開示の方法を行って、hSCNT胚もしくはそのようなhSCNT胚から派生する胚盤胞を作製する、またはそのようなhSCNT胚からhNT-ESCを作製することができ、次にサービス提供会社は、hSCNT胚、またはそのようなSCNT胚から派生する胚盤胞もしくはそのようなhSCNT胚からのhNT-ESCを研究者に提供することができる。いくつかの態様では、研究者は、ドナーヒト体細胞試料を任意の手段、例えば郵便、速達便などによりサービス提供会社へ送ることができ、またはその代わりに、サービス提供会社は、ドナーヒト体細胞試料を研究者から収集し、それらをサービス提供会社の研究室に輸送するサービスを提供することができる。いくつかの態様では、研究者は、hSCNT方法において使用されるべきドナーヒト体細胞試料をサービス提供会社の研究室の所在地に寄託することができる。代替的な態様では、サービス提供会社は、ストップバイ (stop-by) サービスを提供し、そのサービスでは、サービス提供会社が研究者の研究室に人員を派遣し、また、研究者の研究室において研究者の所望の / 好ましいドナーヒト体細胞 (例えば、患者特異的体細胞) の、本明細書に開示されるような本発明のhSCNT方法およびシステムを行うためのキット、装置、および試薬も提供する。そのようなサービスは、治療用クローニングのために、例えば、hSCNT胚由来の胚盤胞からhNT-ESCおよび / または多能性幹細胞を得るために、例えば、再生細胞または組織療法の必要のある対象への移植のための患者特異的多能性幹細胞のために、有用である。

10

【0409】

ヒトへの投与に適した製剤中の、NT-ESC由来の (それから産生された) 移植可能な細胞から構成される治療用組成物も、本明細書に提供される。一態様では、移植用のレシピエントは、ドナー体細胞の供給源であるドナーヒトである。いくつかの態様では、治療用組成物には、複能性 (multipotent) 細胞、系列特異的幹細胞だけでなく、本明細書提供のhNT-ESC由来の部分的または完全に分化した細胞が含まれる。

20

【0410】

hSCNT由来のhNT-ESC細胞の調製は、移植可能な細胞の1つまたは複数の調製物の有効量を、それを必要とする個体に投与することによって、それを必要とする個体に細胞を提供するための方法を可能にする。細胞は、主要組織適合遺伝子複合体 (MHC) の1つまたは複数の遺伝子座でマッチする。一態様では、各MHC遺伝子座で完全なマッチがある。一態様では、hSCNT由来のhNT-ESC細胞は、関心対象の個体の体細胞からの核を第2の個体からの除核宿主細胞 (例えば卵母細胞) に移植することによって製造される。次に、hSCNT由来のhNT-ESC細胞を上記のように培養して多能性幹細胞および複能性幹細胞 (MPSC) を産生することができる。次に、関心対象の対象において複能性細胞の治療有効量を利用することができる。一態様では、処置された個体と1つまたは複数のMHC遺伝子座でマッチする細胞が作製され、SCNTによるような本明細書提供の教示を使用して培養される。好ましい態様では、細胞は、無血清培地中で培養される。別の好ましい態様では、細胞は、異種細胞 (例えばマウス胚性線維芽細胞などの非ヒト線維芽細胞) と共に培養されていない。

30

【0411】

損傷または変質した体細胞によって特徴づけられる疾患に苦しむヒトにhSCNT由来のhNT-ESC細胞を移植する段階を含む、疾患を処置するための方法が提供される。そのような細胞は、複能性細胞または任意の他の種類の移植可能な細胞であることができる。

40

【0412】

本明細書記載のhSCNT由来のhNT-ESCは、所望の細胞型の細胞を作製するために有用である。いくつかの態様では、hSCNT由来のhNT-ESCは、間葉系幹細胞、神経幹細胞、および / または造血幹細胞を派生させるために使用される。他の態様では、hSCNT由来のhNT-ESCは、非限定的に、脾臓、肝臓、骨、上皮、内皮、腱、軟骨、および筋細胞、ならびにそれらの前駆細胞を含む細胞を作製するために使用される。したがって、hSCNT由来の移植可能なhNT-ESC細胞を、1つまたは複数の細胞型を必要とする個体に投与して、疾患、障害、または状態を処置することができる。治療または予防され得る疾患、障害、または状態の例には、神経、内分泌、構造、骨格、血管、泌尿器、消化、外皮、血液、免疫、自己免疫、炎症、腎臓、膀胱、心血管、癌、循環、造血、代謝、生殖および筋肉の疾患、障害および

50

状態が含まれる。いくつかの態様では、hSCNTから派生するhNT-ESC由来の造血幹細胞が、癌を処置するために使用される。いくつかの態様では、これらの細胞は、組織または器官を修復または置換するためなどの再建用途のために使用される。

【0413】

本明細書記載のhSCNT由来のhNT-ESCを使用して、複能性幹細胞または移植可能な細胞を作製することができる。一例では、移植可能な細胞は、間葉系幹細胞である。間葉系幹細胞は、非常に多数の別個の組織を生み出す (Caplan, J. Orth. Res 641-650, 1991)。骨、筋肉、腱、脂肪組織、間質細胞および軟骨に分化する能力のある間葉系幹細胞も、髄から単離されている (Caplan, J. Orth. Res. 641-650, 1991)。米国特許第5,226,914号は、骨髄から間葉系幹細胞を単離するための例示的な方法を記載している。他の例では、皮膚および腸の内壁の状態の処置に使用するために上皮前駆細胞または角化細胞を作製することができる (Rheinwald, Meth. Cell Bio. 21A:229, 1980)。これらの細胞を使用して肝前駆細胞 (PCT公報である国際公開公報第94/08598号参照) または腎前駆細胞 (Karp et al., Dev. Biol. 91:5286-5290, 1994参照) を産生することもできる。これらの細胞を使用して、内耳前駆細胞を産生することもできる (Li et al., TRENDS Mol. Med. 10: 309, 2004参照)。

10

【0414】

hSCNT由来のhNT-ESC由来の移植可能な細胞は、神経細胞であることもできる。対象に投与される神経細胞懸濁液のような細胞懸濁液の体積は、植え込みの部位、処置の目標および溶液中の細胞の量に応じて変動する。典型的には、対象に投与される細胞の量は、治療有効量である。例えば、処置がパーキンソン病のためである場合、治療有効量の細胞の移植は、典型的には、その障害に関連する症状、例えば、固縮、無動および歩行障害の量および/または重症度の低減を生じる。一例では、重症パーキンソン患者は、移植から実質的な有益効果を得るために移植部位あたり少なくとも約100,000個の生きたドーパミン細胞を必要とする。一般に脳組織移植では細胞生存率が低い (5~10%) ので、少なくとも100万個の細胞が投与され、例えば約100万~約400万個のドーパミン作動性神経細胞が移植される。一態様では、細胞は、対象の脳に投与される。脳の実質内の、くも膜下腔もしくは脳室のような脳脊髄液を含む腔内に、または神経外に、細胞を植え込むことができる。したがって、一例では、細胞は、中枢神経系または腹腔神経節もしくは坐骨神経などの末梢神経系内ではない対象の領域に、移植される。別の態様では、細胞は、硬膜内に全ての構造を含む中枢神経系に移植される。神経細胞の注射は、一般的に、18~21ゲージ針を有する無菌シリンジを用いて行うことができる。針の正確なサイズは、処置される種に依存するが、いずれの種においても、針は、直径1mmよりも大きくあるべきではない。当業者は、対象の脳に細胞を投与するための技法に精通している。

20

30

【0415】

一般的に、hSCNT由来のhNT-ESCの治療有効量が個体に投与される。細胞を薬学的担体に入れて投与することができる。有用な薬学的に許容される担体は、従来品である。例えば、E. W. Martin, Mack Publishing Co., Easton, Pa., 15th Edition (1975) による Remington's Pharmaceutical Sciences は、本明細書開示の細胞の薬学的送達に適切な組成物および製剤を記載している。一般に、担体の性質は、採用される特定の投与様式に依存する。例えば、非経口製剤は、通常、水、生理食塩液、平衡塩類溶液、水性デキストロース、グリセロールなどのような薬学的および生理学的に許容される液体をビヒクルとして含む注射液を含む。固体組成物 (例えば、散剤、丸剤、錠剤、またはカプセル剤の剤形) 用の従来の無毒の固体担体は、例えば、医薬品グレードのマニトール、ラクトース、デンプンまたはステアリン酸マグネシウムを含むことができる。生物学的に中立性の担体に加えて、投与されるべき薬学的組成物は、湿潤剤または乳化剤、保存剤、およびpH緩衝剤など、例えば酢酸ナトリウムまたはモノラウリン酸ソルビタンのような少量の無毒の補助物質を含有することができる。

40

【0416】

個体は、任意の関心対象の対象であることができる。適切な対象は、幹細胞または前駆

50

細胞由来の細胞の増殖から利益を得る対象を含む。一態様では、個体は、神経前駆細胞および/またはグリア前駆細胞の増殖を必要とする。例えば個体は、神経変性障害を有する、または脳卒中などの虚血イベントを有したことがある可能性がある。神経変性障害の特定の非限定的な例は、アルツハイマー病、パントテン酸キナーゼ関連神経変性症、パーキンソン病、ハンチントン病 (Dexter et al., Brain 114:1953-1975, 1991)、HIV脳症 (Miszkziel et al., Magnetic Res. Imag. 15:1113-1119, 1997)、および筋萎縮性側索硬化症である。適切な個体には、年齢が少なくとも約65歳、少なくとも約70歳、少なくとも約75歳、少なくとも約80歳、または少なくとも約85歳の個体のような高齢の対象も含まれる。追加的な例では、個体は、脊髄損傷、パッテン病または二分脊椎を有する可能性がある。さらなる例では、個体は、難聴の対象のような聴力障害を有する可能性がある、または聴力障害を予防するために内耳から幹細胞を増殖させる必要がある可能性がある。

10

【0417】

いくつかの態様では、本開示の方法を使用して産生されるhSCNT由来のhNT-ESCは、生殖細胞系に寄与する能力がある。したがって、関心対象の対象からの体細胞を使用してES細胞を産生することができ、続いてES細胞を卵母細胞または精子に分化させることができる。次に、これらの卵母細胞または精子を受精のために使用することができ、不妊対象がその対象と遺伝的に関係する子供をもうけることを可能にする。そのような方法は、ミトコンドリア病を有する女性対象に有用であり、その際、そのような疾患を有する女性は、該方法のためのヒトドナー体細胞の供給源であり、それにより、hSCNTからのNT-ESCの産生が可能になり、NT-ESCは、卵母細胞に分化することができ、その卵母細胞を、mtDNAに異常を有さない女性が子供をもうけることに使用することができる。加えて、ES細胞由来の卵は、研究に有用である。例えば、これらの卵を今度はヒトSCNT由来ES細胞の製造のために使用することができる。これらの卵母細胞のこの入手性は、研究用に供与されたヒト卵の使用を減らすことができる。

20

【0418】

hSCNT由来のhNT-ESCを使用して、細胞培養に有用な栄養外胚葉のような胚体外細胞を作製することもできる。一態様では、フィーダー細胞としての自己細胞 (例えば栄養外胚葉) の使用が、幹細胞作製の助けとなることができ、今度は幹細胞が、分化した器官特異的細胞に分化する能力を有する。他の態様では、フィーダー層成分の作製を可能にする方法で全能幹細胞を培養することを用いることによって得られた同種フィーダー細胞の使用は、異種混入を避けるために有用であり、したがって、その上に培養された分化後の細胞が、治療目的でFDA認可を受けることがより容易に可能になる。

30

【0419】

本明細書開示の方法によって産生されるhSCNT由来のhNT-ESCのような細胞は、活性物質が分化または細胞増殖に影響するかどうかを判定するためなどの、関心対象の活性物質の検査にも有用である。例えば、hSCNT由来のhNT-ESCは、活性物質と接触され、細胞が分化または増殖する能力が、活性物質の存在下および不在下で評価される。したがって、本明細書開示の方法によって産生されるhSCNT由来のhNT-ESCは、神経細胞に影響する活性物質などの特定のヒト細胞型に影響する活性物質を選択するために医薬品をスクリーニングすることにも使用することができる。本明細書開示の方法によって産生されるhSCNT由来のhNT-ESCを使用して、分化に影響する活性物質を選択するために活性物質をスクリーニングすることもできる。試験化合物は、化学化合物、小分子、ポリペプチドまたは他の生物学的活性物質 (例えば抗体またはサイトカイン) を含む任意の関心対象の化合物であることができる。いくつかの例では、潜在的な活性物質のパネルがスクリーニングされ、例えばサイトカインまたは成長因子のパネルがスクリーニングされる。

40

【0420】

所望の活性について検査できる分子のコンビナトリアルライブラリーを調製するための方法は、当技術分野において周知であり、これらの方法は、例えば、拘束性ペプチドであることができるペプチドのファージディスプレイライブラリー (例えば、米国特許第5,622,699号; 同第5,206,347号; Scott and Smith, Science 249:386-390, 1992; Markland e

50

t al., Gene 109:13-19, 1991参照)、ペプチドライブラリー(米国特許第5,264,563号); ペプチド模倣体ライブラリー(Blondelle et al., Trends Anal Chem. 14:83-92, 1995); 核酸ライブラリー(O'Connell et al., Proc. Natl Acad. Sci., USA 93:5883-5887, 1996; Tuerk and Gold, Science 249:505-510, 1990; Gold et al., Ann. Rev. Biochem. 64:763-797, 1995); オリゴ糖ライブラリー(York et al., Carb. Res. 285:99-128, 1996; Liang et al., Science 274:1520-1522, 1996; Ding et al., Adv. Expt. Med. Biol. 376:261-269, 1995); リボタンパク質ライブラリー(de Kruif et al., FEBS Lett. 399:23-26, 1996); 糖タンパク質もしくは糖脂質ライブラリー(Karaoglu et al., J. Cell Biol. 130:567-577, 1995); または例えば薬物もしくは他の医薬品を含む化学ライブラリー(Gordon et al., J. Med. Chem. 37:1385-1401, 1994; Ecker and Crooke, BioTechnology 13:351-360, 1995)を製造する方法を含む。細胞ポリペプチドを含む細胞標的に対して結合特異性を有する核酸分子は天然に存在するので、かつそのような特異性を有する合成分子は容易に調製および特定することができるので(例えば、米国特許第5,750,342号参照)、ポリヌクレオチドは、多能性または全能細胞の機能を変更することができる活性物質として特に有用であることができる。

【0421】

一態様では、高スループット形式のために、本明細書開示の方法によって産生されるhSCNTまたはMPSC由来のhNT-ESCをマルチウェルプレートのウェルまたはガラススライドまたはマイクロチップに導入することができ、かつ試験活性物質と接触させることができる。一般的に、細胞はアレイ状、特にアドレス指定可能なアレイ状に編成され、それにより、細胞および溶液を操作するため、ならびに特に調査されている機能に関して細胞をモニタリングするためにロボットを好都合に使用することができる。高スループット形式を使用する利点は、多数の試験活性物質を平行して調査することができ、所望であれば、試験条件と同一の条件で対照反応も行えることである。このように、本明細書開示の方法は、例えば調節分子の高レベル発現を維持することによって、hSCNT由来のhNT-ESCの機能を変更することができる活性物質、例えばhNT-ESCを所望の細胞型に分化するように誘導する活性物質、または自然分化を阻止する活性物質を特定するために、1種、数種、または多種の試験活性物質をスクリーニングするための手段を提供する。

【0422】

hNT-ESCは、この細胞と相互作用するために十分な試験化合物と接触される。化合物が別個の受容体と結合する場合、細胞は、活性物質がその受容体と結合するのに十分な時間接触される。いくつかの態様では、細胞は、基質のリン酸化に影響するのに十分な時間、試験化合物と共にインキュベートされる。いくつかの態様では、hNT-ESCは、5%CO₂加湿雰囲気中37℃で、試験化合物でインビトロ処置される。試験化合物で処置後、細胞は、Ca²⁺およびMg²⁺不含PBSで洗浄され、総タンパク質が既述のように抽出される(Haldar et al., Cell Death Diff. 1:109-115, 1994; Haldar et al., Nature 342:195-198, 1989; Haldar et al., Cancer Res. 54:2095-2097, 1994)。追加的な態様では、試験化合物の段階希釈が使用される。

【0423】

組成物およびキット

本発明の別の局面は、本明細書開示の方法によって産生されるSCNTから得られるhNT-ESC集団に関する。いくつかの態様では、hNT-ESCは、ヒトntESC、例えば患者特異的hNT-ESC、および/または患者特異的同質遺伝子hNT-ESCである。いくつかの態様では、hNT-ESCは、hNT-ESCを全能または多能性状態に維持する培養培地などの培養培地中に存在する。いくつかの態様では、培養培地は、凍結保存に適した培地である。いくつかの態様では、hNT-ESC集団は凍結保存される。低温保存は、例えば将来使用するために、例えば、治療使用のために、または他の使用、例えば研究使用のために、hNT-ESCを貯蔵するために有用である。hNT-ESCは増幅され得、増幅されたhNT-ESCの一部が使用され得、別の部分が低温保存され得る。hNT-ESCを増幅および保存できることは、大きな柔軟性、例えば複数の患者特異的ヒトhNT-ESCの産生およびSCNT手順に使用するためのドナー体細胞の選択を可

能にする。例えば、組織適合性ドナー由来の細胞が、増幅され、複数のレシピエントに使用され得る。組織バンクがhNT-ESCの低温保存を提供することができる。hNT-ESCは、組織適合性データを伴って凍結保存され得る。本明細書開示の方法を使用して産生されるhNT-ESCを、日常的な手順により凍結保存することができる。例えば、適切な増殖培地、10%BSAおよび7.5%ジメチルスルホキシドを含むことができる「凍結」培地中の約100万~1000万個の細胞に関して凍結保存を実施することができる。hNT-ESCは遠心分離される。増殖培地が吸引され、凍結培養培地により置換される。hNT-ESCが球体として再懸濁される。細胞は、例えば-80℃の容器中に入れることによってゆっくりと凍結される。凍結したhNT-ESCは、37℃の浴中でかきまぜることによって解凍され、新鮮幹細胞培地中に再懸濁され、上記のように増殖される。

10

【0424】

いくつかの態様では、hNT-ESCは、レシピエント卵母細胞が第三のドナー対象由来のmtDNAを含む、レシピエント卵母細胞の細胞質中にドナー体細胞由来の核遺伝物質を注射することから作製されたSCNT胚から作製される。

【0425】

本発明は、また、本明細書開示の方法によって産生されるhSCNT胚に関する。いくつかの態様では、hSCNT胚はヒト胚である。いくつかの態様では、ヒトSCNT胚は、遺伝子組換えされており、例えば、少なくとも1つの導入遺伝子がSCNT手順の前に（すなわちドナー核を収集し、レシピエント卵母細胞の細胞質と融合させる前に）ドナー核遺伝物質において修飾された（例えば、導入または欠失または変化された）ものである。いくつかの態様では、hSCNT胚は、ヒトドナー体細胞由来の核DNA、ヒトレシピエント卵母細胞由来の細胞質、および第三のヒトドナー対象由来のmtDNAを含む。

20

【0426】

本発明の別の局面は、ヒトSCNT胚もしくはその胚盤胞、またはレシピエントヒト卵母細胞（有核もしくは除核）の少なくとも1つ、および（i）KDM4ファミリーのヒストンデメチラーゼの発現もしくは活性を増加させる活性物質；または（ii）H3K9メチルトランスフェラーゼを阻害する活性物質、の少なくとも1つを含む組成物に関する。

【0427】

別の態様では、本発明は、本発明の方法を実施するためのキットを提供する。本発明の別の局面は、（i）KDM4ファミリーのヒストンデメチラーゼの発現もしくは活性を増加させる活性物質および/またはH3K9メチルトランスフェラーゼを阻害する活性物質、ならびに（ii）ヒト卵母細胞を含む、1つまたは複数の容器、を含むキットに関する。キットは、任意で、レシピエント卵母細胞および/またはSCNT胚のための培養培地、ならびにレシピエント卵母細胞の細胞質を用いたドナー核遺伝物質の活性化（例えば融合）のための1種または複数種の試薬を含み得る。いくつかの態様では、ヒト卵母細胞は除核卵母細胞である。いくつかの態様では、ヒト卵母細胞は、除核されていない。いくつかの態様では、ヒト卵母細胞は、凍結保存用凍結培地中で凍結されている、かつ/または凍結保存用凍結培地中に存在する。いくつかの態様では、ヒト卵母細胞は、ミトコンドリア病を有する、またはmtDNAに変異もしくは異常を有するドナー女性対象から得られる。いくつかの態様では、卵母細胞は、ミトコンドリア病を有さない、またはmtDNAに変異を有さないドナー女性対象から得られる。いくつかの態様では、卵母細胞は、第三の対象由来のmtDNAを含む。

30

40

【0428】

キットは、任意で、KDM4ファミリーのヒストンデメチラーゼの発現もしくは活性を増加させる活性物質および/またはH3K9メチルトランスフェラーゼを阻害する活性物質の、光もしくは他の有害条件による分解を阻止するために適したシステム（例えば不透明な容器）または安定化剤（例えば抗酸化剤）も含み得る。

【0429】

キットは、任意で、hSCNT手順を行うため（例えば、卵母細胞を除核するため、および/またはレシピエント卵母細胞にドナー体細胞の核遺伝物質を注射するため、および/ま

50

たは融合／活性化のため、および／またはhSCNT胚を培養するため)の指示書(すなわちプロトコール)を含む教材、ならびにドナー体細胞および／またはレシピエント卵母細胞および／またはhSCNT胚の少なくとも1つを、KDM4ファミリーのヒストンデメチラーゼの発現もしくは活性を増加させる活性物質および／またはH3K9メチルトランスフェラーゼを阻害する活性物質の少なくとも1つと接触させる指示を含み得る。

【0430】

本明細書記載の発明が完全に理解され得るように、以下の詳細な説明を述べる。

【0431】

本発明は、以下の番号付き項目のいずれかにさらに定義されることができる。

1. ハイブリッド卵母細胞を、KDM4ファミリーのヒストンデメチラーゼのメンバーの発現を増加させる活性物質と接触させる段階を含む、ヒト体細胞核移入(hSCNT)の効率を増加させるための方法であって、
該ハイブリッド卵母細胞が、ヒト体細胞の遺伝物質を含む除核したヒト卵母細胞である、方法。

2. 接触させる段階が、ハイブリッド卵母細胞の活性化または融合の後であるがヒト接合体ゲノム活性化(ZGA)が開始する前に起こる、項目1の方法。

3. ヒト体細胞核移入(SCNT)の効率を増加させるための方法であって、以下の少なくとも1つの段階：

(i) ドナーヒト体細胞もしくはレシピエントヒト卵母細胞を、該ドナーヒト体細胞もしくは該レシピエントヒト卵母細胞におけるH3K9me3メチル化を減少させる少なくとも1つの活性物質と接触させる段階であって、該レシピエントヒト卵母細胞が、有核もしくは除核卵母細胞である、段階；該レシピエントヒト卵母細胞が有核ならば、除核する段階；該ドナーヒト体細胞由来の核を該除核卵母細胞に移植してハイブリッド卵母細胞を形成させる段階；および該ハイブリッド卵母細胞を活性化させてヒトSCNT胚を形成させる段階；または

(ii) ハイブリッド卵母細胞を、該ハイブリッド卵母細胞におけるH3K9me3メチル化を減少させる少なくとも1つの活性物質と接触させる段階であって、該ハイブリッド卵母細胞が、ヒト体細胞の遺伝物質を含む除核したヒト卵母細胞である、段階；および該ハイブリッド卵母細胞を活性化させてヒトSCNT胚を形成させる段階；または

(iii) 活性化後のヒトSCNT胚を、該ヒトSCNT胚におけるH3K9me3メチル化を減少させる少なくとも1つの活性物質と接触させる段階であって、該SCNT胚が、除核したヒト卵母細胞とヒト体細胞の遺伝物質との融合から作製される、段階

を含み、
該ドナーヒト体細胞、該レシピエントヒト卵母細胞、該ハイブリッド卵母細胞または該ヒトSCNT胚のうちのいずれか1つにおけるH3K9me3メチル化の減少が、該SCNTの効率を増加させる、
方法。

4. ヒト核移入胚性幹細胞(hNT-ESC)を産生するための方法であって、

a. 以下の少なくとも1つの段階：

(i) ドナーヒト体細胞もしくはレシピエントヒト卵母細胞を、該ドナーヒト体細胞もしくは該レシピエントヒト卵母細胞におけるH3K9me3メチル化を減少させる少なくとも1つの活性物質と接触させる段階であって、該レシピエントヒト卵母細胞が、有核もしくは除核卵母細胞である、段階；該レシピエントヒト卵母細胞が有核ならば、除核する段階；該ドナーヒト体細胞由来の核を該除核卵母細胞に移植してハイブリッド卵母細胞を形成させる段階；および該ハイブリッド卵母細胞を活性化させてヒトSCNT胚を形成させる段階；または

(ii) ハイブリッド卵母細胞を、該ハイブリッド卵母細胞におけるH3K9me3メチル化を減少させる少なくとも1つの活性物質と接触させる段階であって、該ハイブリッド卵母細胞が、ヒト体細胞の遺伝物質を含む除核したヒト卵母細胞である、段階；および該ハイブリッド卵母細胞を活性化させてヒトSCNT胚を形成させる段階；または

(iii) 活性化後のヒトSCNT胚を、該SCNT胚におけるH3K9me3メチル化を減少させる少なくとも1つの活性物質と接触させる段階であって、該SCNT胚が、除核したヒト卵母細胞とヒト体細胞の遺伝物質との融合から作製される、段階、

b. 胚盤胞を形成させるために十分な時間、該SCNT胚をインキュベートする段階；および該胚盤胞から少なくとも1つの割球を収集し、該少なくとも1つの割球を培養して少なくとも1つのヒトNT-ESCを形成させる段階

を含む、方法。

5. ヒト体細胞核移入（SCNT）胚を産生するための方法であって、

ドナーヒト体細胞、レシピエントヒト卵母細胞またはヒト体細胞核移入（SCNT）胚の少なくとも1つを、該ドナーヒト体細胞、該レシピエントヒト卵母細胞または該ヒトSCNT胚におけるH3K9me3メチル化を減少させる少なくとも1つの活性物質と接触させる段階であって、該レシピエントヒト卵母細胞が、有核または除核卵母細胞である、段階；

該レシピエントヒト卵母細胞が有核ならば、除核する段階；

該ドナーヒト体細胞由来の核を該除核卵母細胞に移植してハイブリッド卵母細胞を形成させる段階；

該ハイブリッド卵母細胞を活性化させる段階；および

該ヒトSCNT胚を形成させるために十分な時間、該ハイブリッド卵母細胞をインキュベートする段階を含む、方法。

6. H3K9me3メチル化を減少させる活性物質が、ヒトKDM4ファミリーのヒストンデメチラーゼのメンバーの発現を増加させる活性物質である、項目2～5のいずれかの方法。

7. 活性物質が、ヒトKDM4（JMJD2）ファミリーのヒストンデメチラーゼの発現または活性を増加させる、項目6の方法。

8. 活性物質が、KDM4A（JMJD2A）、KDM4B（JMJD2B）、KDM4C（JMJD2C）、KDM4D（JMJD4D）またはKDM4E（JMJD2E）の少なくとも1つの発現または活性を増加させる、項目1～7のいずれかの方法。

9. 活性物質が、KDM4A（JMJD2A）の発現または活性を増加させる、項目1～8のいずれかの方法。

10. 活性物質が、SEQ ID NO:1～4もしくはSEQ ID NO:45に対応する核酸配列、またはSEQ ID NO:1～4もしくはSEQ ID NO:45の対応する配列と比較してSCNTの効率を同程度もしくはより大きな程度増加させるその生物学的に活性なフラグメントを含む、項目1～9のいずれかの方法。

11. 活性物質が、SEQ ID NO:1に対応する核酸配列、またはSEQ ID NO:1の核酸配列と比較してSCNTの効率を同程度またはより大きな程度増加させるその生物学的に活性なフラグメントを含む、項目6の方法。

12. 活性物質が、H3K9メチルトランスフェラーゼの阻害剤である、項目1～11のいずれかの方法。

13. H3K9メチルトランスフェラーゼが、SUV39h1またはSUV39h2である、項目12の方法。

14. H3K9メチルトランスフェラーゼが、SETDB1である、項目12の方法。

15. SUV39h1、SUV39h2およびSETDB1の2つ以上が阻害される、項目12の方法。

16. H3K9メチルトランスフェラーゼを阻害する活性物質が、RNAi剤、CRISPR/Cas9、CRISPR/Cpf1オリゴヌクレオチド、中和抗体または抗体フラグメント、アプタマー、小分子、ペプチド阻害剤、タンパク質阻害剤、アビジミル（avidimir）、およびその機能的フラグメントまたは誘導体からなる群より選択される、項目12の方法。

17. RNAi剤が、siRNAまたはshRNA分子である、項目16の方法。

18. 活性物質が、SEQ ID NO:14～16、47、49、51、52または53のいずれかの発現を阻害する核酸阻害剤を含む、項目1～17のいずれかの方法。

19. RNAi剤が、SEQ ID NO:14～16、47、49、51、52または53の少なくとも一部とハイブリダイズする、項目17の方法。

20. RNAi剤が、

10

20

30

40

50

SEQ ID NO:7、8もしくはSEQ ID NO:18もしくは19の核酸、またはその少なくとも10個の核酸が連続するフラグメント、または

SEQ ID NO:7、8もしくはSEQ ID NO:18もしくは19と少なくとも80%同一の配列を有するホモログ

の任意の1つまたは組み合わせを含む、項目17の方法。

21. レシピエントヒト卵母細胞が、除核したヒト卵母細胞である、項目1~20のいずれかの方法。

22. ヒトSCNT胚が、1細胞期SCNT胚、活性化の5時間後(5hpa)のSCNT胚、活性化の10~12時間後(10~12hpa)のSCNT胚、活性化の20~28時間後(20~28hpa)のSCNT胚、2細胞期SCNT胚のいずれかより選択される、項目1~20のいずれかの方法。

10

23. 核移入前に、活性物質が、レシピエントヒト卵母細胞または除核したヒト卵母細胞と接触する、項目1~22のいずれかの方法。

24. 活性化の前もしくは活性化の約5時間後に、またはSCNT胚が1細胞期のときに、活性物質が該ヒトSCNT胚と接触する、項目1~22のいずれかの方法。

25. 活性化の5時間後(5hpa)、もしくは活性化の12時間後(hpa)、もしくは活性化の20時間後(20hpa)に、またはSCNT胚が2細胞期のときに、または5hpa~28hpaの任意の時間に、活性物質が該ヒトSCNT胚と接触する、項目1~22のいずれかの方法。

26. レシピエントヒト卵母細胞もしくはハイブリッド卵母細胞、またはヒトSCNT胚を、活性物質と接触させる段階が、該レシピエントヒト卵母細胞もしくは該ハイブリッド卵母細胞、または該ヒトSCNT胚の核または細胞質に該活性物質を注射することを含む、項目1~22のいずれかの方法。

20

27. 活性物質がKDM4ファミリーのヒストンデメチラーゼの発現または活性を増加させる、項目1~26のいずれかの方法。

28. 除核したヒト卵母細胞に注射するために核を取り出す前に、活性物質がドナーヒト体細胞の細胞質または核と接触する、項目1~22のいずれかの方法。

29. 除核したヒト卵母細胞にドナーヒト体細胞の核を注射する少なくとも24時間前に、または該注射する前の少なくとも1日間、ドナーヒト体細胞が接触される、項目28の方法。

30. 除核したヒト卵母細胞にドナーヒト体細胞の核を注射する前に、活性物質がドナーヒト体細胞と少なくとも24時間、または少なくとも48時間、または少なくとも3日間接触する、項目28の方法。

30

31. 活性物質がH3K9メチルトランスフェラーゼを阻害する、項目28~30のいずれかの方法。

32. H3K9メチルトランスフェラーゼが、SUV39h1もしくはSUV39h2、またはSUV39h1およびSUV39h2(SUV39h1/2)である、項目28~30のいずれかの方法。

33. ドナーヒト体細胞が、最終分化した体細胞である、項目1~32のいずれかの方法。

34. ドナーヒト体細胞が、胚性幹細胞、または人工多能性幹(iPS)細胞、または胎児細胞、または胚細胞ではない、項目1~33のいずれかの方法。

35. ドナーヒト体細胞が、卵丘細胞、上皮細胞、線維芽細胞、神経細胞、角化細胞、造血細胞、メラニン細胞、軟骨細胞、赤血球、マクロファージ、単球、筋細胞、Bリンパ球、Tリンパ球、胚性幹細胞、胚性生殖細胞、胎児細胞、胎盤細胞、および成熟細胞からなる群より選択される、項目1~34のいずれかの方法。

40

36. ドナーヒト体細胞が、線維芽細胞または卵丘細胞である、項目1~35のいずれかの方法。

37. 除核したレシピエントヒト卵母細胞に注射するためにドナーヒト体細胞から核を取り出すために、活性物質がドナーヒト体細胞の核と接触する、項目1~36のいずれかの方法。

38. H3K9me3メチル化を減少させる活性物質の不在下で行われるhSCNTと比較して、胚盤胞期へのhSCNTの効率に少なくとも10%の増加をもたらす、項目1~37のいずれかの方法。

39. H3K9me3メチル化を減少させる活性物質の不在下で行われるhSCNTと比較して、hSCNTの効率に10~20%の増加をもたらす、項目1~38のいずれかの方法。

50

40. H3K9me3メチル化を減少させる活性物質の不在下で行われるhSCNTと比較して、hSCNTの効率に20%よりも大きな増加をもたらす、項目1~39のいずれかの方法。
41. SCNT効率における増加が、ヒトSCNT胚の胚盤胞期への発生における増加である、項目38~40のいずれかの方法。
42. SCNT効率における増加が、ヒトSCNT胚由来胚性幹細胞(hNT-ESC)の派生における増加である、項目38~40のいずれかの方法。
43. ドナーヒト体細胞が、遺伝子組換えされたドナーヒト細胞である、項目1~42のいずれかの方法。
44. ヒト胚盤胞を形成させるためにヒトSCNT胚をインビトロ培養する段階をさらに含む、項目5の方法。 10
45. ヒトSCNT胚が、少なくとも4細胞期ヒトSCNT胚である、項目44の方法。
46. ヒトSCNT胚が、少なくとも4細胞期SCNT胚である、項目44の方法。
47. ヒト胚盤胞由来の内細胞塊から細胞を単離する段階；およびヒト胚性幹(ES)細胞を形成させるために未分化状態の内細胞塊からの細胞を培養する段階をさらに含む、項目44の方法。
48. ドナーヒト体細胞、レシピエントヒト卵母細胞またはヒトSCNT胚の任意の1つまたは複数が、凍結および解凍されている、項目1~48のいずれかの方法。
49. 項目1~48のいずれかの方法から産生された、ヒトSCNT胚由来胚性幹細胞(hNT-ESC)集団。
50. hNT-ESCが、遺伝子組換えされたhNT-ESCである、項目49のhNT-ESC集団。 20
51. hNT-ESCが、多能性幹細胞または全能幹細胞である、項目49のhNT-ESC集団。
52. hNT-ESCが、培養培地中に存在する、項目49のhNT-ESC集団。
53. 培養培地が、hNT-ESCを多能性または全能状態に維持する、項目52のhNT-ESC集団。
54. 培養培地が、hNT-ESCの凍結または凍結保存に適切な培地である、項目52のhNT-ESC集団。
55. 凍結または凍結保存される、項目54のhNT-ESC集団。
56. 項目1~55の方法によって産生される、ヒトSCNT胚。
57. 遺伝子組換えされている、項目56のヒトSCNT胚。
58. レシピエントヒト卵母細胞由来ではないミトコンドリアDNA(mtDNA)を含む、項目56のヒトSCNT胚。 30
59. 培養培地中に存在する、項目56のヒトSCNT胚。
60. 培養培地が、ヒトSCNTの凍結または凍結保存に適切な培地である、項目59のヒトSCNT胚。
61. 凍結または凍結保存される、項目60のヒトSCNT胚。
62. ヒトSCNT胚、レシピエントヒト卵母細胞、ヒトハイブリッド卵母細胞または胚盤胞の少なくとも1つと、
- a. KDM4ファミリーのヒストンデメチラーゼの発現もしくは活性を増加させる活性物質、または
- b. H3K9メチルトランスフェラーゼを阻害する活性物質 40
- の少なくとも1つとを含む、組成物。
63. KDM4(JMJD2)ファミリーのヒストンデメチラーゼの発現または活性を増加させる活性物質が、KDM4A(JMJD2A)、KDM4B(JMJD2B)、KDM4C(JMJD2C)、KDM4D(JMJD2D)またはKDM4E(JMJD2E)の少なくとも1つの発現または活性を増加させる、項目62の組成物。
64. 活性物質が、KDM4D(JMJD2D)またはKDM4A(JMJD2A)の発現または活性を増加させる、項目63の組成物。
65. 活性物質が、SEQ ID NO:1~4もしくはSEQ ID NO:45に対応する核酸、またはSEQ ID NO:1~4もしくはSEQ ID NO:45の対応する配列と比較してヒトSCNTの効率を同程度もしくはより大きな程度増加させるその生物学的に活性なフラグメントを含む、項目64の組成物。
66. 活性物質が、SEQ ID NO:1に対応する核酸、またはSEQ ID NO:1の核酸配列と比較して 50

SCNTの効率を同程度もしくはより大きな程度増加させるその生物学的に活性なフラグメントを含む、項目64の組成物。

67. H3K9メチルトランスフェラーゼの阻害剤が、SUV39h1、SUV39h2、またはSETDB1の少なくとも1つまたは任意の組み合わせを阻害する、項目62の組成物。

68. ヒトSCNT胚が、1細胞期、2細胞期または4細胞期のヒトSCNT胚である、項目62の組成物。

69. レシピエントヒト卵母細胞が、除核したレシピエントヒト卵母細胞である、項目62の組成物。

70. 最終分化したヒト体細胞の核を注射することからヒトSCNT胚が産生されるか；または、除核したヒト卵母細胞に、最終分化したヒト体細胞の核を注射することから産生されるヒトSCNT胚から胚盤胞が発生する、項目62の組成物。

71. (i) ヒトKDM4ファミリーのヒストンデメチラーゼの発現もしくは活性を増加させる活性物質および/またはH3K9メチルトランスフェラーゼを阻害する活性物質、ならびに
(ii) ヒト卵母細胞

を含む、キット。

72. ヒト卵母細胞が、除核した卵母細胞である、項目92のキット。

73. ヒト卵母細胞が、非ヒト卵母細胞である、項目92のキット。

【0432】

特に定義しない限り、本明細書に使用される全ての技術用語および科学用語は、本明細書が属する技術分野の技術者によって通常理解されるものと同じ意味を有する。本明細書記載の方法および材料と類似または等価の方法および材料を本発明または本発明の試験に使用することができるものの、適切な方法および材料が下に記載されている。これらの材料、方法および実施例は、例証に過ぎず、限定することを意図しない。

【0433】

本明細書において言及される全ての刊行物、特許、特許公報、特許出願および他の文書は、その全体として参照により組み入れられる。

【0434】

上に要約するように、本発明は、初期胚の単一割球から、胚を必ずしも破壊せずに、ES細胞、ES細胞株、および分化した細胞型を派生させるための方法を提供する。該方法の様々な特徴が、下に詳細に記載されている。上および下に詳述される本発明の様々な局面および態様の組み合わせの全てが、考察されている。

【実施例】

【0435】

本明細書に紹介される実施例は、ヒトSCNT胚および/またはヒト体細胞のヒトドナー核における、(i) ヒトKDM4ファミリーのヒストンデメチラーゼのメンバー、例えばKDM4Aの発現もしくは活性を増加させること、および/または(ii) ヒトメチルトランスフェラーゼhSUV39h1もしくはhSUV39h2の任意の1つを阻害することのいずれかによって、H3K9me3を減少または除去することによって、ヒトSCNTの効率を増加させるための方法および組成物に関する。本出願にわたり、様々な刊行物が参照される。刊行物および該刊行物の中でその全体として引用される参考文献の全ての開示は、本発明が属する現況技術をより十分に説明するために、本明細書によって参照により本出願に組み入れられる。以下の実施例は、本発明への特許請求の範囲を限定することを意図するのではなく、むしろ、特定の態様の例示を意図する。当業者に思い浮かぶ、例示された方法における任意の変形は、本発明の範囲内に入ることが意図される。

【0436】

実験手順

ヒトSCNTの手順およびKDM4A mRNAの注射

特有の第1極体を有する全てMII期ヒト卵母細胞を、ボルスコープ(Oosight(登録商標), Cambridge Research & Instrumentation)を備える倒立顕微鏡下で除核した。除核および核ドナー細胞の融合は、カフェイン(1.25mM)の存在下で実施した。除核のために、

10

20

30

40

50

0.5 $\mu\text{g/ml}$ サイトカラシンBおよびカフェイン (1.25mM) を含有するヘペス (Life Global) を有するGlobal HTF培地中で卵母細胞を5分間予備インキュベートした。次に、ピエゾアクチュエーター (Primetech, Japan) を使用して紡錘体複合体を除去した。HVJ-E抽出物 (Cosmo Bio, USA) を含有する液滴中に再懸濁した皮膚線維芽細胞細胞を除核卵母細胞の卵胞腔内に挿入した。細胞融合が確認されるまで、再構築した卵母細胞をカフェイン (1.25mM) 含有操作培地中で維持し、次に再構築した卵母細胞をGlobal培地10%SPSに移し、活性化の前に1~1.5時間インキュベートした。以前に記載されたように (Tachibana et al., 2013)、0.25M d-ソルビトール緩衝液および6-DMAP (2mM、4hr) 中で電子パルス ($2 \times 50 \mu\text{s}$ DCパルス、2.7kV/cm) を適用することによって活性化を実施した。活性化した胚を、トリコスタチンA (TSA、10nM、Sigma) を補充したGlobal 10%SPS培地に12時間移し、次に胚をTSA不含のGlobal 10%FBSに移し、6%CO₂/5%O₂/89%N₂雰囲気をもつインキュベーター中にて37℃で最大7日間培養した。培養培地を3日目に交換した。

10

【0437】

mRNA注射のために、活性化したSCNT胚を洗浄し、Global 10%SPS中で1時間培養し、その後、KDM4A mRNAを注射した。ヘペス-HTF 10%SPS培地中で活性化後5時間で、以前に記載されたようにピエゾアクチュエーターを使用してSCNT胚にKDM4A mRNA約10 μl を注射した (Matoba et al., 2014)。ドナー細胞の調製、mRNAの調製、RNA-seqおよび他の手順のさらなる詳細は、補足実験手順に見出すことができる。

【0438】

ヒトリプログラミング耐性領域の特定

20

スライディングウインドウ (サイズ20kb、ステップサイズ10kb) を使用して、4細胞期および8細胞期ヒト胚のゲノムワイドな発現レベルを評価した。各ウインドウについて、規準化RPM (独特にマッピングされた100万リードあたりのリード数) を用いて発現レベルを定量した。4細胞期IVF胚と比べて8細胞期において有意に活性化された領域を厳密な基準 (8細胞期IVF胚においてFC > 5、RPM > 5) で特定し、重複する領域を合体した。ヒトSCNTおよびIVFの8細胞期胚における発現差に基づき、これらの活性化された領域を3つの群に分類した。

【0439】

マウス

C57BL/6J雌をDBA/2J雄と交配することによってB6D2F1/J (BDF1) マウスを産生し、SCNT用の卵母細胞および核ドナーの両方を収集するために使用した。全ての動物実験は、Harvard Medical Schoolの所内動物実験委員会 (Institutional Animal Care and Use Committee) によって承認された。

30

【0440】

ヒトKDM4A mRNAのインビトロ転写

以前に記載されたようにインビトロ転写を行った (Matoba et al., 2014)。簡潔には、完全長ヒトKDM4A/JHDM3A cDNAを、クローニング部位の3'末端にポリ(A)83を含有するpcDNA3.1プラスミドにクローニングした。PrimeSTAR変異誘発キット (TAKARA # R045A) を使用して触媒欠陥変異型のKDM4A (H188A) を作製した。mMESSAGE mMACHINE T7 Ultra Kit (Life technologies # AM1345) を使用してmRNAを合成した。合成されたmRNAをヌクレアーゼ不含水中に溶解させた。mRNAの濃度をNanoDrop ND-1000分光光度計 (NanoDrop Technologies) によって測定した。mRNAの一定分量を、使用まで-80℃で貯蔵した。

40

【0441】

マウスSCNTおよびKDM4A mRNAの注射

以前に記載されたようにマウス体細胞核移入を実施した (Matoba et al., 2014)。簡潔には、妊馬血清ゴナドトロピン (PMSG; Millipore # 367222) 7.5IUおよびヒト絨毛性ゴナドトロピン (hCG; Millipore # 230734) 7.5IUを注射することによる過排卵を経て成体BDF1雌性マウスからレシピエントMII卵母細胞およびドナー卵丘細胞の両方を収集した。hCG注射の15から17時間後に、卵丘-卵母細胞複合体 (COC) を輸卵管から収集し、300U/ml ウシ精巢ヒアルロニダーゼ (Calbiochem #385931) を含有するヘペス緩衝カリウムシン

50

ブックス最適化培地 (KSOM) で短時間処置して、解離したMII卵母細胞および卵丘細胞を得た。ピエゾ駆動式マイクロマニピュレーター (Primetech # PMM-150FU) を使用することによって、単離したMII卵母細胞を、7.5jig/ml サイトカラシンB (Calbiochem # 250233) を含有するヘパス緩衝KSOM培地中で除核した。ドナー卵丘細胞の核を除核卵母細胞中に注射した。KSOM中で1時間インキュベーションした後、再構築したSCNT卵母細胞を、2.5mM SrCl₂および5jig/ml サイトカラシンBを含有するCa不含KSOM中で1時間インキュベートすることによって活性化し、サイトカラシンBを有するKSOM中でさらに4時間培養した。活性化したSCNT胚を、SrCl₂処理の開始から5時間後 (活性化後時間、hpa) に洗浄し、5% CO₂を有する加湿雰囲気中で37.8 °CのKSOM中で培養した。ピエゾ駆動式マイクロマニピュレーターを使用することによってSCNT胚に水 (対照)、1500ng/μl 野生型または変異型 (H188A) ヒトKDM4A mRNA 約10pIを5~6hpaに注射した。着床前発生率をスチューデントのT検定によって解析した。

10

【0442】

ヒト卵母細胞の調製

ヒト卵母細胞の実験プロトコル (CHA001) は、CHA Regenerative Medicine Institute (CHARMI) Stem Cell Research Oversight (SCRO) CommitteeおよびPearl Institutional Review Board (PIRB) の両方によって承認された。以前に記載されたように、最初の卵母細胞ドナーの募集はウェブ広告によって行った (Chung et al., 2014)。全てのドナーは、米国生殖医学会 (ASRM: American Society for Reproductive Medicine) のガイドラインに従って生殖的、医学的、および心理的健康に基づきスクリーニングされた自発的な参加者であった。卵母細胞ドナーは、その時間、労力、賃金損失、旅行関連費用、不快感、および供与プロセスに関連する他の関係費用について、ASRMにより制定されたガイドラインの規定に基づき金銭的に償還された。

20

【0443】

以前に記載されたように、卵巣刺激を実施した (Chung et al., 2014)。簡潔には、ヒト組換え卵胞刺激ホルモン (rFSH, 225-300IU, Merck) およびヒト閉経後ゴナドトロピン (Menopur 75IU, Ferring) の組み合わせを使用して、GnRHアンタゴニスト (Ganirelix acetate, Merck) 抑制と共に卵巣を9~11日間刺激した。1または2つの卵胞が直径18mmに達したとき、リュープロン 4mgを使用してLHサージを模倣した。全ての医薬品は皮下注射により投与した。リュープロン注射の約36時間後に経腔的卵母細胞回収を行った。回収の1~2時間後以内に、収集したCOCを5080IU/ml ヒアルロニダーゼ (Sigma-Aldrich) で裸化した。次に、使用まで、10%血清タンパク質補充物 (SPS; Cooper Surgical) (IVF Online) を補充したGlobal培地中でそれらの細胞を維持した。

30

【0444】

供与されたヒトIVF胚

標準的なIVF手順後に所望の数の子供をもうけ、残りの胚が数年間 (2~6年間) 凍結して貯蔵されていた患者から、本研究のために使用されるIVF胚を得た。全てのドナーは、インフォームドコンセントの書式に署名することによって、研究用に自分の胚 (複数細胞分割期) を自発的に供与した。研究用の胚供与プログラムは、江南CHA病院 (CHA Gangnam Medical Center) のIRBによって承認された。

40

【0445】

ヒトドナー体細胞の調製および特徴付け

ヒト核ドナー体細胞を調製するために、局所麻酔下で腹部皮膚片 (0.5cm x 0.3cm) を生検用に採取し、それを、抗生物質/抗真菌剤溶液 (anti-anti 1x, Invitrogen) を補充したPBS中で3回洗浄して、存在し得る混入物を除去した。本研究に使用される全ての体細胞ドナーは、AMD患者であった (AMD亜型: 中心性輪紋状脈絡膜萎縮症)。DFB-6は、52歳女性由来であった。DFB-7は42歳女性由来であった。DFB-8は59歳男性由来であった。

【0446】

体細胞核ドナー細胞の調製手順は、以前に記載されたものと本質的に同じである (Chung et al., 2014)。簡潔には、皮膚外植片を機械的に刻み、10μg/ml ペニシリン-ストレ

50

プトマイシン溶液を補充したDMEM中のコラゲナーゼ（I型、200ユニット/ml, Worthington-biochem）で処理して、皮膚組織を解離させた。一晚インキュベーションした後、解離した細胞を収集し、2回洗浄し、37 °Cおよび5%CO₂でDMEM（Invitrogen、10%FBS、1%可欠アミノ酸および10 µg/mL ペニシリン-ストレプトマイシンを加える）溶液が入った60mm培養皿に播種した。細胞が80%の集密度に達した後、最初の増殖物の1/2を凍結保存し、残りの細胞を数回継代して維持し、各継代からの細胞を凍結保存した。続いて、凍結細胞をSCNTの前に解凍し、4ウェル皿（Nunc）中で集密に達するまで培養した。次に、これらの細胞を血清枯渇DMEM（0.5%FBS）中で2～3日間培養して、使用前に細胞周期を同期化した。

【0447】

KDM4A介助SCNT胚盤胞からのヒトNTK-ESCの派生

全ての拡張胚盤胞を酸性タイロイド液で処理して透明帯を除去し、次に、胚盤胞全体を（栄養外胚葉を除去せずに）、Knockout Serum Replacement（10%SR, Invitrogen）、FBS（10%Hyclone）、bFGF（30ng/ml）、ヒトLIF（2000ユニット/ml, Sigma-Aldrich）、およびROCK阻害剤（1µM, Sigma-Aldrich）を補充したknockout-DMEM中の有糸分裂不活性化マウス線維芽細胞（MEF, Global Stem Inc.）上に乗せた。翌3日間は派生培地を交換せず、それから以前に記載されたように、培地の1/2をROCK阻害剤なしの新鮮培地と毎日置換した（Chung et al., 2008）。3回継代後、FBSの量を2%に減らし、それをSRと置き換えた。5回継代後、ES細胞を、FGF（8ng/ml, Invitrogen）、SR（18%, Invitrogen）、およびFBS（2%Hyclone）を補充したDMEM/F12中で培養した。10回継代後、ES細胞を、FGF（8ng/ml）および20%SRを補充したDMEM/F12中で維持した。

【0448】

ZGA分析用の8細胞期ヒト胚の調製

健康な女性（#64）1人が供与した卵母細胞およびAMD患者からの皮膚線維芽細胞（DFB-8）を使用して、ZGA分析のために使用するSCNT胚を作製した。最長で、割球の緊密化が開始する8細胞期後期までSCNTおよびIVF胚を培養し、次にこれらを酸性タイロイド液で短時間処理して透明帯を除去した。8細胞期SCNT胚を調製するために、卵母細胞ドナー1人からの卵母細胞および体細胞核ドナー1人からの皮膚線維芽細胞を使用した。全ての手順は、「ヒトSCNT手順およびKDM4A mRNAの注射」の節に記載されたものと同じである。活性化の74時間後に同期的に8細胞期後期に達した胚だけを収集し、実験に使用した。

【0449】

対照IVF胚の調製のために、いくつかの供与された8細胞期初期のIVF胚を解凍し、5～7時間培養して、これらを8細胞期後期に到達させ、その後、処理した。透明帯の除去後、裸化胚をPBS中で3回洗浄し、RNaseおよびDNase不含PCRチューブに入れ、遠心分離して沈降させ、液体窒素中で急速凍結した。次に、これらを使用まで-80 °Cで保存した。対照として、体細胞核ドナーの皮膚線維芽細胞も調製した。これらの線維芽細胞を25cm²フラスコの中のDMEM 10%FBS中で培養し、細胞約10,000個/ドナーを収集し、急速凍結し、使用まで-80 °Cで保存した。

【0450】

免疫染色

マウス1細胞期SCNT胚、未分化のヒトESCコロニーまたは分化した胚様体（EB）を4%パラホルムアルデヒド（PFA）により室温で20分間固定した。10mg/ml BSAを含有するPBS（PBS/BSA）で3回洗浄後、固定された試料を0.5%トリトン-X100と共に15分間インキュベートすることによって透過処理した。PBS/BSA中に入れて室温で1時間ブロッキング後、これらを一次抗体の混合物中で4 °Cで一晩インキュベートした。使用される一次抗体は、以下の通りである：抗H3K9me3（Abcam, ab71604, 1:500）、抗NANOG（Abcam, ab109250, 1:200）、抗OCT-4（Santa Cruz, sc-8628, 1:100）、抗TRA160（Millipore, MAB4360, 1:100）、抗SOX2（R&D, AF2018, 1:200）、抗SSEA4（Millipore, MAB4304, 1:100）、抗AFP（アルファ-1-フェトプロテイン；Dako A0008, 1:100）、抗ブラキュリ（Abcam ab20680, 1:100）、およびTUJ1（B-チューブリン；Covance PRB-435P、ウサギ、1:100）。3回洗浄後

10

20

30

40

50

、試料を、ロバ抗ヤギTRITC (Jackson ImmunoResearch, 705-026-147)、ロバ抗マウス488 (Jackson ImmunoResearch, 715-486-151)、ロバ抗ヤギ649 (Jackson ImmunoResearch, 705-496-147)、ロバ抗ウサギTRITC (Jackson ImmunoResearch, 711026-152) を含む二次抗体と共に室温で1時間インキュベートした。核をDAPI (Vector Laboratories) で共染色した。

【 0 4 5 1 】

ESCのインビトロ分化および奇形腫のアッセイ

インビトロ分化アッセイのために、低付着皿中のbFGF不含ESC培地中で胚様体 (EB) を形成するまでESCを1週間培養した。その後、マトリゲル (BD Biosciences) をコーティングした4ウェル皿 (Nunc) にEBを移し、さらに1週間培養した。洗浄、ブロッキングならびに1%BSAおよび0.1%トリトン-Xを含有するPBS中での透過処理の後、EBを一次抗体と共に一晩インキュベートした。1%BSAを含有するPBSで3回洗浄後、EBを二次抗体およびDAPIで1時間染色し、蛍光顕微鏡下で観察した。奇形腫アッセイのために、未分化のNTK-ESC約 1×10^5 個をNOD/SCIDマウスの精巣に注射した。各NTK-ESC系列について少なくとも動物3匹を使用した。12週間後、奇形腫を切除し、PFA中で固定し、パラフィン中に包埋し、切片とし、次に以前に記載されたように染色後に組織学的に分析した (Chung et al., 2014)。

【 0 4 5 2 】

染色体の分析

以前に記載 (Chung et al., 2014) されたような標準的なプロトコールによって両方のNTK-ESC系列についての染色体分析を行った。中期スプレッドをGTG (ギムザを用いたトリプシンによるGバンド) バンド形成技法によって染色し、2人の細胞遺伝学の専門家が20個の中期を分析し、核型を決定した。Ikaros核型決定システム (MetaSystems, Germany) によってイデオグラムを作った。

【 0 4 5 3 】

RNA配列分析

各群について5つの8細胞期胚を直接溶解し、SMART-Seq v4 Ultra Low Input RNAキット (Clontech) を使用するcDNA合成のために使用した。MEFドナーについて、SMART-Seq v4 Ultra Low Input RNA Kitを使用するcDNA合成のために総RNA 10ngを使用した。増幅後、Covaris超音波処理器M220 (Covaris) を使用してcDNA試料を平均サイズ150bpに断片化した。断片化したDNAを用いてIllumina用NEBNext Ultra DNA Library Prep Kitを使用して、製造業者 (New England Biolabs) の説明書に従って異なるバーコードの付いたシーケンシングライブラリーを作った。hESCの各RNA-seq分析のために総RNA 1 μ gをmRNA精製のために使用した。Illumina用NEBNext Ultra Directional RNA Library Prep Kit (New England Biolabs) を使用してバーコード化されたRNA-seqライブラリーを作製した。HiSeq 2500シーケンサー (Illumina) により一端の50bpシーケンシングを行った。Tophat2を用いてシーケンシングのリードをヒトゲノム (hg19) に対してマッピングした。全てのプログラムをデフォルト設定で実行した (特に記載しない限り)。各シーケンシングライブラリーについて少なくとも2200万個の独特にマッピングされたリードが得られ、続いてそれらを、Cufflinks v2.0.2を用いて参照アノテーション (Refseq遺伝子モデル) によって案内される転写物にアセンブリーした。規準化FPKM (マッピングされたフラグメント100万個あたりのエキソンのキロ塩基あたりのフラグメント) を用いて各遺伝子の発現レベルを定量した。Rを用いて統計解析を行った (「www.r-project.org/」 から入手可能)。独立した2群Wilcoxon順位和検定を使用して、Rでのwilcox.test関数を使用して分布を比較した。デフォルトのパラメーターを用いたcor関数を使用して、Pearsonのr係数を計算した。Rでのheatmap.2関数 (gplotsパッケージ) を使用して、異なる試料での全般的遺伝子発現パターンの階層的クラスタリング分析を実施した。

【 0 4 5 4 】

公表されたChIP-seqおよびDNAメチル化データセットの解析

図1および5においてヒストン修飾濃縮の解析を行うために、本発明者らは、以下の公表

10

20

30

40

50

されたChIP-seqおよびDNaseI-seqデータセットを使用した：Nhlf線維芽細胞におけるH3K9me3、H3K4me1、H3K4me2、H3K4me3、H3K27me3、H3K36me3、H3K27acおよびH4K20me1 ChIP-seq (ENCODE/Broad Histoneプロジェクト)、HsmmおよびK562細胞におけるH3K9me3 ChIP-seq (ENCODE/Broad Histoneプロジェクト)、Mcf7細胞におけるH3K9me3 ChIP-seq (ENCODE/Sydh Histoneプロジェクト)、IMR90、Hsmm、K562およびMcf7細胞におけるDnaseI-seq (ENCODE/OpenChromDnaseプロジェクト)。本発明者らは、DNAメチル化解析のためのRoadmap Epigenomicsプロジェクト (Roadmap Epigenomics et al., 2015) からのIMR90細胞の全ゲノム重亜硫酸塩配列データセットも使用した。IMR90における処理後DNAメチル化データをワールドワイドウェブの「egg2.wustl.edu/roadmap/web_portal/」からダウンロードした。規準化FPKMを用いてChIP-seq強度を定量した。シーケンシングリードによりゲノムの位置に関するカバー率を決定し、UCSCゲノムブラウザーでのカスタムトラックとして視覚化した。独立した2群Wilcoxon順位和検定を使用して、Rでのwilcox.test関数を使用して各群の間のChIP-seqの分布を比較した。

10

【0455】

実施例1

8細胞期ヒトSCNT胚におけるリプログラミング耐性領域の特定

2細胞期に行われるマウスの接合体ゲノム活性化 (ZGA) とは異なり、ヒトの接合体ゲノム活性化 (ZGA) は、4細胞期後期から8細胞期後期の間に行われる (Niakan et al., 2012) (図1A)。正常なヒトIVF胚のZGAの間に活性化されるゲノム領域を特定するために、本発明者らは、公表されたヒト着床前胚RNA-シーケンシング (RNA-seq) データセットを解析し (Xue et al., 2013)、サイズが20~160kbの範囲の707個のゲノム領域を特定し (表5)、これらの領域は、4細胞期と比較して8細胞期で少なくとも5倍活性化されていた (図1B)。

20

【0456】

ヒトSCNTにおいてZGAが適正に行われているかどうかを判定するために、本発明者らは、SCNTまたはIVFのいずれか由来の8細胞期後期の胚を収集し (5つ/群)、RNA-seq (図1A) を行った。平行して、本発明者らは、ドナー皮膚線維芽細胞 (DFB-8、方法参照) のRNA-seqも行った。上に定義された707個のゲノム領域 (図1Bおよび表5) の解析により、大部分のZGA領域がドナー線維芽細胞と比較してSCNT胚において活性化されることが示されている (図1C)。しかし、活性化のレベルは、IVF胚のレベルに匹敵しない (図1C)。707個のゲノム領域のうち、169個がIVF胚と匹敵するレベルで活性化されたので (FC 2、IVF対SCNT)、本発明者らの以前の定義に従って、これらの領域を完全リプログラミング領域 (FRR) と名付けた (Matoba et al., 2014)。同様に、IVF胚と比較してSCNTにおいて220個の領域が部分的に活性化され ($2 < FC \leq 5$)、「部分リプログラミング領域」 (PRR) と名付けられた。しかし、「リプログラミング耐性領域」 (RRR) と名付けられた残りの318個の領域 (表6) は、SCNT胚において活性化できなかった ($FC > 5$)。したがって、比較トランスクリプトーム解析は、本発明者らに、ヒト8細胞期SCNT胚において転写リプログラミングに耐性であった318個のRRRを特定させた。

30

【0457】

(表5) ヒトZGA活性化領域からの転写物の発現レベル (図1と関係)。#=RNA-seqのデータセットを、Xue et al., 2013から得た。

40

染色体	開始	終止	長さ	名称	発現レベル (FPKM) [#]		変化 倍率 (log2) [8- 細胞期/4- 細胞期]	分類	
					4-細胞期	8-細胞期			
chr19	48290001	48320000	30000	chr19_48290001_48320000	0.15	564.65	11.14	RRR	
chr19	48350001	48390000	40000	chr19_48350001_48390000	0.2	585.17	10.93	RRR	
chr3	1.21E+08	1.21E+08	50000	chr3_121270001_121320000	0.18	269.03	9.91	RRR	
chr1	1.61E+08	1.61E+08	50000	chr1_160940001_160990000	0.14	223.72	9.87	RRR	
chr16	49300001	49330000	30000	chr16_49300001_49330000	0.06	146.95	9.84	PRR	10
chr19	54120001	54160000	40000	chr19_54120001_54160000	0.1	154.74	9.6	RRR	
chr3	1.09E+08	1.09E+08	60000	chr3_109000001_109060000	0.05	115.21	9.59	RRR	
chr3	42280001	42320000	40000	chr3_42280001_42320000	0.02	85.86	9.48	FRR	
chr17	48340001	48370000	30000	chr17_48340001_48370000	0.04	92.97	9.38	RRR	
chr19	51490001	51540000	50000	chr19_51490001_51540000	0.11	135.93	9.34	RRR	
chr3	1.41E+08	1.41E+08	30000	chr3_141230001_141260000	0	62.02	9.28	RRR	
chrX	30220001	30280000	60000	chrX_30220001_30280000	0	57.8	9.18	RRR	
chr17	66260001	66280000	20000	chr17_66260001_66280000	0.03	72.54	9.13	RRR	
chr7	63820001	63860000	40000	chr7_63820001_63860000	0.01	50.06	8.83	RRR	20
chr18	19750001	19800000	50000	chr18_19750001_19800000	0.25	150.02	8.74	RRR	
chr19	23430001	23470000	40000	chr19_23430001_23470000	0.02	50.42	8.72	RRR	
chr7	57500001	57560000	60000	chr7_57500001_57560000	0.08	74.89	8.7	RRR	
chrX	1.51E+08	1.51E+08	30000	chrX_151080001_151110000	0.02	46.74	8.61	RRR	
chr3	1.27E+08	1.27E+08	50000	chr3_126970001_127020000	3.12	1250.92	8.6	RRR	
chr13	52140001	52180000	40000	chr13_52140001_52180000	0.01	40.9	8.54	RRR	
chr4	63290001	63320000	30000	chr4_63290001_63320000	0.03	47.69	8.52	RRR	
chr2	96270001	96310000	40000	chr2_96270001_96310000	0.25	120.7	8.43	RRR	
chr9	6780001	6830000	50000	chr9_6780001_6830000	0.04	48.12	8.43	RRR	30
chrX	1.47E+08	1.47E+08	70000	chrX_147050001_147120000	0.03	44.45	8.42	RRR	
chr19	6520001	6550000	30000	chr19_6520001_6550000	0.01	37.55	8.42	RRR	
chr7	63650001	63740000	90000	chr7_63650001_63740000	0.79	302.56	8.41	RRR	
chr19	23840001	23880000	40000	chr19_23840001_23880000	0.04	45.44	8.35	RRR	
chr6	1.07E+08	1.07E+08	30000	chr6_107320001_107350000	0.03	39.91	8.27	RRR	
chr4	180001	240000	60000	chr4_180001_240000	0	30.67	8.27	RRR	
chr14	47110001	47140000	30000	chr14_47110001_47140000	0.06	48.22	8.24	RRR	
chr1	1.52E+08	1.52E+08	40000	chr1_152060001_152100000	0	28.8	8.17	PRR	

染色体	開始	終止	長さ	名称	発現レベル (FPKM) [#]		変化 倍率 (log2) [8- 細胞期/4- 細胞期]	分類	
					4-細胞期	8-細胞期			
chr2	16070001	16100000	30000	chr2_16070001_16100000	0.01	31.3	8.16	PRR	
chr10	61480001	61530000	50000	chr10_61480001_61530000	0	26.96	8.08	RRR	
chr12	65550001	65580000	30000	chr12_65550001_65580000	0.01	29.21	8.06	PRR	
chr2	96100001	96140000	40000	chr2_96100001_96140000	0.37	118.53	7.98	RRR	
chr2	1.79E+08	1.79E+08	30000	chr2_178690001_178720000	0.04	35.14	7.98	RRR	10
chr13	52620001	52650000	30000	chr13_52620001_52650000	0.42	130.18	7.97	RRR	
chr17	8080001	8100000	20000	chr17_8080001_8100000	0	24.89	7.97	PRR	
chr4	99870001	99910000	40000	chr4_99870001_99910000	0.03	31.66	7.93	RRR	
chr19	30230001	30270000	40000	chr19_30230001_30270000	0	23.77	7.9	PRR	
chr6	74270001	74300000	30000	chr6_74270001_74300000	0.12	50.88	7.86	RRR	
chr3	1.36E+08	1.36E+08	30000	chr3_136440001_136470000	0.02	27.38	7.84	RRR	
chr4	1.4E+08	1.4E+08	30000	chr4_140040001_140070000	0	22.12	7.8	RRR	
chr4	48280001	48310000	30000	chr4_48280001_48310000	0	21.42	7.75	RRR	
chr8	67840001	67880000	40000	chr8_67840001_67880000	0.06	34.03	7.74	PRR	20
chrX	1.18E+08	1.18E+08	40000	chrX_118190001_118230000	0.02	25.62	7.74	FRR	
chr12	15040001	15070000	30000	chr12_15040001_15070000	0	21.11	7.73	PRR	
chr19	18110001	18140000	30000	chr19_18110001_18140000	0.92	211.76	7.7	RRR	
chrX	37880001	37920000	40000	chrX_37880001_37920000	0.06	32.35	7.66	RRR	
chr6	86360001	86380000	20000	chr6_86360001_86380000	0.02	23.95	7.65	RRR	
chrX	47260001	47290000	30000	chrX_47260001_47290000	0.06	31.29	7.62	RRR	
chr15	85910001	85970000	60000	chr15_85910001_85970000	0.01	20.81	7.57	PRR	
chrX	40680001	40710000	30000	chrX_40680001_40710000	0.01	20.21	7.53	RRR	
chr16	29470001	29490000	20000	chr16_29470001_29490000	0	18.15	7.51	RRR	30
chr12	49140001	49160000	20000	chr12_49140001_49160000	0	17.88	7.49	RRR	
chr8	1.26E+08	1.26E+08	40000	chr8_126430001_126470000	0.03	23.06	7.48	RRR	
chr10	61400001	61430000	30000	chr10_61400001_61430000	0.01	19.38	7.47	RRR	
chr17	1120001	1150000	30000	chr17_1120001_1150000	0.01	19.22	7.46	RRR	
chr2	98240001	98260000	20000	chr2_98240001_98260000	0.25	60.61	7.44	RRR	
chr1	13460001	13540000	80000	chr1_13460001_13540000	2.23	390.55	7.39	RRR	
chr12	14420001	14450000	30000	chr12_14420001_14450000	0.09	31.46	7.38	RRR	
chr7	1.52E+08	1.52E+08	30000	chr7_151710001_151740000	0	16.27	7.35	PRR	
chr9	78920001	78980000	60000	chr9_78920001_78980000	0.12	35.71	7.35	RRR	40
chr1	13680001	13760000	80000	chr1_13680001_13760000	2.23	379.86	7.35	RRR	
chr15	86020001	86050000	30000	chr15_86020001_86050000	0.02	19.36	7.34	PRR	
chr16	88650001	88670000	20000	chr16_88650001_88670000	0.11	34.03	7.34	FRR	
chr7	64710001	64740000	30000	chr7_64710001_64740000	0.01	17.38	7.31	PRR	
chr5	1.23E+08	1.23E+08	30000	chr5_123080001_123110000	0	15.73	7.31	FRR	

染色体	開始	終止	長さ	名称	発現レベル (FPKM) [#]		変化 倍率 (log2) [8- 細胞期/4- 細胞期]	分類	
					4-細胞期	8-細胞期			
chr3	1.12E+08	1.12E+08	40000	chr3_112170001_112210000	0.01	17.17	7.29	RRR	
chr14	1.04E+08	1.04E+08	20000	chr14_103810001_103830000	0.04	21.76	7.29	RRR	
chrX	52770001	52810000	40000	chrX_52770001_52810000	0.02	18.53	7.28	RRR	
chr17	20850001	20900000	50000	chr17_20850001_20900000	0.01	16.41	7.23	RRR	
chr16	30210001	30230000	20000	chr16_30210001_30230000	0.02	17.8	7.22	RRR	10
chr16	3050001	3070000	20000	chr16_3050001_3070000	0.01	16.1	7.2	RRR	
chr7	64820001	64860000	40000	chr7_64820001_64860000	0.01	16.07	7.2	RRR	
chr1	6590001	6640000	50000	chr1_6590001_6640000	0.73	121.11	7.19	RRR	
chrX	8740001	8780000	40000	chrX_8740001_8780000	0.02	17.25	7.18	RRR	
chr1	1.83E+08	1.83E+08	40000	chr1_182690001_182730000	0.01	15.79	7.17	RRR	
chr1	1.93E+08	1.93E+08	40000	chr1_192810001_192850000	0.38	68.39	7.16	RRR	
chr12	38550001	38580000	30000	chr12_38550001_38580000	0	14.11	7.15	RRR	
chr17	47270001	47340000	70000	chr17_47270001_47340000	0.93	146.32	7.15	PRR	
chr5	1.16E+08	1.16E+08	30000	chr5_115890001_115920000	0.01	15.53	7.15	PRR	20
chr11	1.08E+08	1.08E+08	20000	chr11_107780001_107800000	0.4	71.07	7.15	PRR	
chrX	52710001	52740000	30000	chrX_52710001_52740000	0.03	18.19	7.14	RRR	
chr3	1.28E+08	1.28E+08	30000	chr3_128460001_128490000	0.01	15.41	7.14	PRR	
chr5	62880001	62930000	50000	chr5_62880001_62930000	0.01	15.34	7.13	RRR	
chr17	37540001	37560000	20000	chr17_37540001_37560000	0.03	18.05	7.13	PRR	
chr13	34490001	34520000	30000	chr13_34490001_34520000	0.01	14.95	7.1	RRR	
chr7	1.01E+08	1.01E+08	20000	chr7_100890001_100910000	0.12	30.17	7.1	RRR	
chr6	26240001	26270000	30000	chr6_26240001_26270000	0.01	15	7.1	FRR	
chr6	76130001	76160000	30000	chr6_76130001_76160000	0.01	14.82	7.08	RRR	30
chr19	58600001	58630000	30000	chr19_58600001_58630000	0.04	18.89	7.08	RRR	
chr19	22140001	22210000	70000	chr19_22140001_22210000	0.13	30.7	7.07	RRR	
chr16	30490001	30530000	40000	chr16_30490001_30530000	0.01	14.68	7.07	FRR	
chrX	48120001	48140000	20000	chrX_48120001_48140000	0.02	15.86	7.06	RRR	
chr17	37480001	37530000	50000	chr17_37480001_37530000	0.01	14.28	7.03	RRR	
chr14	21780001	21810000	30000	chr14_21780001_21810000	0	12.97	7.03	PRR	
chr7	63910001	63960000	50000	chr7_63910001_63960000	0	12.88	7.02	RRR	
chr10	70320001	70350000	30000	chr10_70320001_70350000	0	12.68	7	PRR	
chr1	1.12E+08	1.12E+08	30000	chr1_112010001_112040000	0.01	13.98	7	PRR	40
chr1	65600001	65630000	30000	chr1_65600001_65630000	0.32	53.29	6.99	RRR	
chr9	15290001	15320000	30000	chr9_15290001_15320000	0.03	16.44	6.99	PRR	
chr7	57170001	57210000	40000	chr7_57170001_57210000	0.09	23.78	6.97	RRR	
chr9	3950001	3980000	30000	chr9_3950001_3980000	0	12.39	6.96	RRR	
chr19	12300001	12350000	50000	chr19_12300001_12350000	0.11	25.94	6.95	PRR	

染色体	開始	終止	長さ	名称	発現レベル (FPKM) [#]		変化 倍率 (log2) [8- 細胞期/4- 細胞期]	分類	
					4-細胞期	8-細胞期			
chr17	78690001	78720000	30000	chr17_78690001_78720000	0.04	17.23	6.95	PRR	10
chr5	16800001	16830000	30000	chr5_16800001_16830000	0.09	23.19	6.94	FRR	
chr14	83600001	83630000	30000	chr14_83600001_83630000	0.03	15.82	6.94	RRR	
chr1	26910001	26940000	30000	chr1_26910001_26940000	0.01	13.31	6.93	PRR	
chr2	65640001	65670000	30000	chr2_65640001_65670000	0.01	13.25	6.92	PRR	
chr13	34530001	34560000	30000	chr13_34530001_34560000	0.06	19.06	6.9	RRR	
chr3	1.56E+08	1.56E+08	20000	chr3_155770001_155790000	0	11.84	6.9	RRR	
chr11	57120001	57160000	40000	chr11_57120001_57160000	0.06	19.04	6.9	FRR	
chr13	21260001	21290000	30000	chr13_21260001_21290000	0.55	76.84	6.89	PRR	
chr2	1.76E+08	1.76E+08	30000	chr2_176130001_176160000	0	11.75	6.89	FRR	
chr12	53280001	53310000	30000	chr12_53280001_53310000	0.04	16.43	6.88	FRR	20
chrX	48240001	48280000	40000	chrX_48240001_48280000	0.01	12.82	6.88	RRR	
chr9	19440001	19470000	30000	chr9_19440001_19470000	0.01	12.8	6.87	PRR	
chr14	83550001	83580000	30000	chr14_83550001_83580000	0.01	12.65	6.86	RRR	
chr18	70900001	70930000	30000	chr18_70900001_70930000	0.04	16.09	6.85	FRR	
chr10	81680001	81710000	30000	chr10_81680001_81710000	0	11.33	6.84	RRR	
chr13	56030001	56060000	30000	chr13_56030001_56060000	0	11.25	6.83	RRR	
chr12	42610001	42640000	30000	chr12_42610001_42640000	0.01	12.22	6.81	PRR	
chr16	9060001	9090000	30000	chr16_9060001_9090000	0.01	12.14	6.8	RRR	
chr11	64650001	64680000	30000	chr11_64650001_64680000	0.3	44.37	6.8	RRR	30
chrX	70920001	70940000	20000	chrX_70920001_70940000	0.19	32.28	6.8	RRR	
chr10	15230001	15250000	20000	chr10_15230001_15250000	0.03	14.25	6.79	RRR	
chr1	1510001	1530000	20000	chr1_1510001_1530000	0.01	12.03	6.78	FRR	
chr1	26500001	26530000	30000	chr1_26500001_26530000	0.08	19.51	6.77	PRR	
chr18	8750001	8780000	30000	chr18_8750001_8780000	0.13	24.96	6.77	RRR	
chr16	2840001	2870000	30000	chr16_2840001_2870000	0	10.81	6.77	PRR	
chr16	61220001	61250000	30000	chr16_61220001_61250000	0.01	11.79	6.76	RRR	
chr6	1.17E+08	1.17E+08	30000	chr6_117060001_117090000	0	10.69	6.75	RRR	
chr15	60950001	60970000	20000	chr15_60950001_60970000	0	10.52	6.73	PRR	40
chr8	37710001	37730000	20000	chr8_37710001_37730000	0.01	11.58	6.73	PRR	
chr12	40470001	40500000	30000	chr12_40470001_40500000	0	10.45	6.72	RRR	
chr12	53500001	53530000	30000	chr12_53500001_53530000	0.12	23.03	6.72	RRR	
chr3	1.39E+08	1.39E+08	70000	chr3_138710001_138780000	0.72	83.86	6.68	RRR	
chr8	83390001	83450000	60000	chr8_83390001_83450000	0.13	23.48	6.68	RRR	
chr7	26300001	26330000	30000	chr7_26300001_26330000	0.11	21.32	6.67	RRR	
chr7	1.4E+08	1.4E+08	30000	chr7_140200001_140230000	0.01	10.99	6.66	FRR	
chr14	19970001	20000000	30000	chr14_19970001_20000000	0.01	10.91	6.65	RRR	

染色体	開始	終止	長さ	名称	発現レベル (FPKM) [#]		変化 倍率 (log2) [8- 細胞期/4- 細胞期]	分類	
					4-細胞期	8-細胞期			
chrY	6790001	6820000	30000	chrY_6790001_6820000	0.01	10.98	6.65	PRR	
chr1	1.14E+08	1.14E+08	30000	chr1_113930001_113960000	0	9.84	6.64	FRR	
chr1	46470001	46490000	20000	chr1_46470001_46490000	0	9.79	6.63	RRR	
chr17	66000001	66030000	30000	chr17_66000001_66030000	0.01	10.73	6.62	RRR	
chr12	22780001	22810000	30000	chr12_22780001_22810000	0.06	15.59	6.62	PRR	10
chr6	30470001	30500000	30000	chr6_30470001_30500000	0.01	10.64	6.61	RRR	
chr11	77560001	77580000	20000	chr11_77560001_77580000	0	9.64	6.61	RRR	
chr7	63460001	63490000	30000	chr7_63460001_63490000	0.2	28.85	6.59	RRR	
chr12	32100001	32130000	30000	chr12_32100001_32130000	0.34	42.2	6.59	PRR	
chr5	79600001	79620000	20000	chr5_79600001_79620000	0	9.56	6.59	PRR	
chr2	36830001	36850000	20000	chr2_36830001_36850000	0.05	14.29	6.58	RRR	
chr18	6770001	6800000	30000	chr18_6770001_6800000	0.04	13.22	6.57	RRR	
chr17	37150001	37180000	30000	chr17_37150001_37180000	0	9.31	6.56	RRR	
chr10	32410001	32440000	30000	chr10_32410001_32440000	0.04	12.97	6.54	RRR	20
chr10	12050001	12070000	20000	chr10_12050001_12070000	0	9.08	6.52	RRR	
chr17	29270001	29300000	30000	chr17_29270001_29300000	0	9.09	6.52	FRR	
chr9	75470001	75500000	30000	chr9_75470001_75500000	0.01	9.93	6.51	RRR	
chr3	1.37E+08	1.37E+08	20000	chr3_136580001_136600000	0	9.01	6.51	RRR	
chr5	1.4E+08	1.4E+08	20000	chr5_140000001_140020000	0.04	12.7	6.51	PRR	
chr11	31730001	31760000	30000	chr11_31730001_31760000	0	8.83	6.48	RRR	
chr2	27510001	27530000	20000	chr2_27510001_27530000	0.03	11.52	6.48	PRR	
chr4	25660001	25700000	40000	chr4_25660001_25700000	8.86	797.06	6.48	PRR	
chr10	43160001	43190000	30000	chr10_43160001_43190000	0.01	9.73	6.48	PRR	30
chr9	79620001	79650000	30000	chr9_79620001_79650000	0.08	15.82	6.47	FRR	
chr3	48760001	48780000	20000	chr3_48760001_48780000	0	8.6	6.44	PRR	
chr16	54310001	54330000	20000	chr16_54310001_54330000	0.01	9.42	6.44	PRR	
chr7	65780001	65820000	40000	chr7_65780001_65820000	0.03	11.09	6.43	FRR	
chr16	46740001	46760000	20000	chr16_46740001_46760000	0.01	9.34	6.42	RRR	
chr7	1.4E+08	1.4E+08	30000	chr7_139860001_139890000	0.06	13.6	6.42	FRR	
chr2	23610001	23640000	30000	chr2_23610001_23640000	0	8.38	6.41	RRR	
chr8	80860001	80890000	30000	chr8_80860001_80890000	0.01	9.23	6.41	PRR	
chr6	1.33E+08	1.33E+08	30000	chr6_133140001_133170000	0.01	9.24	6.41	FRR	40
chr17	44310001	44350000	40000	chr17_44310001_44350000	0.14	20.22	6.4	RRR	
chr6	15180001	15210000	30000	chr6_15180001_15210000	0.04	11.74	6.4	RRR	
chr12	86090001	86120000	30000	chr12_86090001_86120000	0.01	9.06	6.38	RRR	
chr19	34380001	34410000	30000	chr19_34380001_34410000	0.44	44.99	6.38	PRR	
chr6	1.27E+08	1.28E+08	20000	chr6_127490001_127510000	0	8.22	6.38	RRR	

染色体	開始	終止	長さ	名称	発現レベル (FPKM) [#]		変化 倍率 (log2) [8- 細胞期/4- 細胞期]	分類	
					4-細胞期	8-細胞期			
chr14	39880001	39900000	20000	chr14_39880001_39900000	0	8.17	6.37	FRR	
chr12	1870001	1890000	20000	chr12_1870001_1890000	0.07	13.89	6.36	RRR	
chr12	7830001	7860000	30000	chr12_7830001_7860000	0.01	8.92	6.36	PRR	
chr17	42020001	42050000	30000	chr17_42020001_42050000	0.04	11.22	6.34	PRR	
chr10	12180001	12200000	20000	chr10_12180001_12200000	0	7.93	6.33	RRR	10
chr6	28940001	28970000	30000	chr6_28940001_28970000	0.04	11.17	6.33	PRR	
chr1	1.11E+08	1.11E+08	30000	chr1_111430001_111460000	0.04	11.07	6.32	FRR	
chr7	75000001	75030000	30000	chr7_75000001_75030000	0.02	9.41	6.31	RRR	
chr19	22560001	22580000	20000	chr19_22560001_22580000	0.01	8.6	6.31	RRR	
chr8	59570001	59590000	20000	chr8_59570001_59590000	0.03	10.23	6.31	RRR	
chr3	48050001	48070000	20000	chr3_48050001_48070000	0.02	9.44	6.31	PRR	
chr1	1.15E+08	1.15E+08	20000	chr1_115330001_115350000	0.03	10.12	6.3	RRR	
chr11	1.08E+08	1.08E+08	20000	chr11_107680001_107700000	0	7.7	6.29	RRR	
chr9	1.2E+08	1.2E+08	30000	chr9_119590001_119620000	0.03	10.05	6.29	PRR	20
chr16	29590001	29620000	30000	chr16_29590001_29620000	0.01	8.49	6.29	FRR	
chr12	69620001	69640000	20000	chr12_69620001_69640000	0	7.65	6.28	RRR	
chr16	51780001	51800000	20000	chr16_51780001_51800000	0.01	8.41	6.27	RRR	
chrX	99530001	99560000	30000	chrX_99530001_99560000	0.06	12.18	6.26	FRR	
chr6	7260001	7280000	20000	chr6_7260001_7280000	0	7.59	6.26	FRR	
chr14	1.03E+08	1.03E+08	30000	chr14_103210001_103240000	0.02	9.06	6.25	RRR	
chrX	70970001	71000000	30000	chrX_70970001_71000000	0.32	31.84	6.25	RRR	
chr17	4670001	4690000	20000	chr17_4670001_4690000	0.01	8.26	6.25	RRR	
chr16	67410001	67440000	30000	chr16_67410001_67440000	0.02	9.04	6.25	FRR	30
chr4	46720001	46750000	30000	chr4_46720001_46750000	0.17	20.26	6.24	RRR	
chr19	42810001	42830000	20000	chr19_42810001_42830000	0.17	20.07	6.22	PRR	
chr12	31790001	31820000	30000	chr12_31790001_31820000	0	7.35	6.22	PRR	
chr2	69820001	69850000	30000	chr2_69820001_69850000	0.22	23.82	6.22	FRR	
chr17	75760001	75790000	30000	chr17_75760001_75790000	0.14	17.85	6.22	RRR	
chr2	25940001	25960000	20000	chr2_25940001_25960000	0	7.31	6.21	PRR	
chr5	60620001	60650000	30000	chr5_60620001_60650000	0	7.28	6.21	PRR	
chr19	20400001	20430000	30000	chr19_20400001_20430000	0.52	45.58	6.2	RRR	
chr1	28610001	28650000	40000	chr1_28610001_28650000	0.14	17.57	6.2	RRR	40
chr6	34680001	34710000	30000	chr6_34680001_34710000	0	7.21	6.19	PRR	
chr13	43600001	43630000	30000	chr13_43600001_43630000	0.04	10.07	6.18	RRR	
chr9	35010001	35040000	30000	chr9_35010001_35040000	0.01	7.85	6.18	FRR	
chr1	1.56E+08	1.56E+08	30000	chr1_155520001_155550000	0.24	24.33	6.17	PRR	
chr16	8150001	8180000	30000	chr16_8150001_8180000	0	7.08	6.17	RRR	

染色体	開始	終止	長さ	名称	発現レベル (FPKM) [#]		変化 倍率 (log2) [8- 細胞期/4- 細胞期]	分類	
					4-細胞期	8-細胞期			
chr3	1.22E+08	1.23E+08	30000	chr3_122480001_122510000	0.01	7.82	6.17	FRR	
chr12	46360001	46380000	20000	chr12_46360001_46380000	0.3	28.59	6.16	RRR	
chr1	1.96E+08	1.96E+08	30000	chr1_195680001_195710000	0.01	7.74	6.16	RRR	
chr2	1.14E+08	1.14E+08	30000	chr2_113840001_113870000	0	7.02	6.15	PRR	
chr1	1.47E+08	1.47E+08	30000	chr1_146870001_146900000	0.02	8.36	6.14	RRR	10
chr1	11530001	11560000	30000	chr1_11530001_11560000	0.01	7.62	6.13	PRR	
chr14	1.06E+08	1.06E+08	30000	chr14_106310001_106340000	0.01	7.62	6.13	RRR	
chr2	60950001	60980000	30000	chr2_60950001_60980000	0.35	31.15	6.12	PRR	
chr19	54250001	54270000	20000	chr19_54250001_54270000	0	6.75	6.1	RRR	
chr19	40210001	40240000	30000	chr19_40210001_40240000	0.82	62.56	6.09	RRR	
chr2	1.57E+08	1.57E+08	30000	chr2_156810001_156840000	0.01	7.37	6.09	RRR	
chr15	23500001	23530000	30000	chr15_23500001_23530000	0	6.7	6.09	RRR	
chr14	64200001	64230000	30000	chr14_64200001_64230000	0.01	7.39	6.09	PRR	
chr9	38050001	38070000	20000	chr9_38050001_38070000	0.03	8.59	6.06	PRR	20
chr12	49770001	49800000	30000	chr12_49770001_49800000	0	6.56	6.06	PRR	
chr2	8110001	8130000	20000	chr2_8110001_8130000	0.01	7.17	6.05	RRR	
chr19	11840001	11860000	20000	chr19_11840001_11860000	0	6.51	6.05	RRR	
chr17	29380001	29420000	40000	chr17_29380001_29420000	0.12	14.46	6.05	RRR	
chr5	1.51E+08	1.51E+08	90000	chr5_150670001_150760000	1.28	91.08	6.05	RRR	
chr19	1890001	1910000	20000	chr19_1890001_1910000	0.11	13.61	6.03	RRR	
chr5	1.51E+08	1.51E+08	30000	chr5_150780001_150810000	0.02	7.73	6.03	PRR	
chrX	70880001	70900000	20000	chrX_70880001_70900000	0	6.41	6.02	PRR	
chr6	28470001	28500000	30000	chr6_28470001_28500000	0.03	8.27	6.01	PRR	30
chr15	65580001	65600000	20000	chr15_65580001_65600000	0.01	6.95	6	PRR	
chr10	43850001	43880000	30000	chr10_43850001_43880000	0.17	17.1	5.99	PRR	
chr5	82370001	82390000	20000	chr5_82370001_82390000	0.03	8.08	5.98	RRR	
chr2	1.31E+08	1.31E+08	20000	chr2_130880001_130900000	0.01	6.84	5.98	FRR	
chrX	1.52E+08	1.52E+08	160000	chrX_151790001_151950000	4.27	273.22	5.97	RRR	
chr7	72680001	72710000	30000	chr7_72680001_72710000	0.04	8.69	5.97	RRR	
chr15	75440001	75470000	30000	chr15_75440001_75470000	0.09	11.7	5.96	RRR	
chr1	31970001	32000000	30000	chr1_31970001_32000000	0.03	8.02	5.96	PRR	
chr1	1.1E+08	1.1E+08	20000	chr1_109990001_110010000	0	6.07	5.95	PRR	40
chr12	88940001	88970000	30000	chr12_88940001_88970000	0	6.09	5.95	FRR	
chrX	8990001	9010000	20000	chrX_8990001_9010000	0	6.02	5.94	RRR	
chr6	32490001	32520000	30000	chr6_32490001_32520000	0	6.06	5.94	RRR	
chr17	47070001	47090000	20000	chr17_47070001_47090000	0	6.03	5.94	RRR	
chr8	53610001	53640000	30000	chr8_53610001_53640000	0	5.97	5.92	RRR	

染色体	開始	終止	長さ	名称	発現レベル (FPKM) [#]		変化 倍率 (log2) [8- 細胞期/4- 細胞期]	分類	
					4-細胞期	8-細胞期			
chr19	58060001	58080000	20000	chr19_58060001_58080000	0	5.96	5.92	RRR	
chr7	64020001	64090000	70000	chr7_64020001_64090000	0.61	42.89	5.92	RRR	
chrX	99650001	99670000	20000	chrX_99650001_99670000	0.01	6.5	5.91	RRR	
chr19	36970001	37000000	30000	chr19_36970001_37000000	0.17	16.14	5.91	RRR	
chr3	1.3E+08	1.3E+08	20000	chr3_130170001_130190000	0.03	7.66	5.9	FRR	10
chr4	1.36E+08	1.36E+08	30000	chr4_135920001_135950000	0.01	6.49	5.9	RRR	
chr1	1.62E+08	1.62E+08	30000	chr1_162390001_162420000	0.04	8.26	5.9	RRR	
chr5	74710001	74730000	20000	chr5_74710001_74730000	0.01	6.48	5.9	PRR	
chr5	19020001	19050000	30000	chr5_19020001_19050000	0	5.86	5.9	RRR	
chr14	19600001	19620000	20000	chr14_19600001_19620000	0	5.84	5.89	RRR	
chr13	41610001	41630000	20000	chr13_41610001_41630000	0.07	9.82	5.87	RRR	
chr7	72920001	72950000	30000	chr7_72920001_72950000	0.02	6.93	5.87	FRR	
chr19	9580001	9600000	20000	chr19_9580001_9600000	0.26	20.88	5.86	PRR	
chr1	46130001	46150000	20000	chr1_46130001_46150000	0	5.71	5.86	PRR	20
chr2	9750001	9770000	20000	chr2_9750001_9770000	0.01	6.29	5.86	FRR	
chr4	54880001	54910000	30000	chr4_54880001_54910000	0.09	10.83	5.85	PRR	
chr9	34030001	34060000	30000	chr9_34030001_34060000	0	5.68	5.85	PRR	
chr9	37150001	37180000	30000	chr9_37150001_37180000	0	5.67	5.85	PRR	
chr6	99710001	99740000	30000	chr6_99710001_99740000	0	5.67	5.85	FRR	
chr6	26500001	26520000	20000	chr6_26500001_26520000	0.02	6.67	5.82	RRR	
chr7	1.29E+08	1.29E+08	30000	chr7_129410001_129440000	0.09	10.67	5.82	FRR	
chr19	55840001	55870000	30000	chr19_55840001_55870000	0.1	11.11	5.81	FRR	
chr6	56750001	56770000	20000	chr6_56750001_56770000	0	5.5	5.81	RRR	30
chr5	81430001	81450000	20000	chr5_81430001_81450000	0	5.51	5.81	RRR	
chr10	1.17E+08	1.17E+08	20000	chr10_116540001_116560000	0	5.47	5.8	RRR	
chr16	87380001	87430000	50000	chr16_87380001_87430000	0.46	31.16	5.8	RRR	
chr7	16750001	16770000	20000	chr7_16750001_16770000	0	5.44	5.79	RRR	
chr13	19750001	19770000	20000	chr13_19750001_19770000	0	5.45	5.79	RRR	
chr19	37250001	37300000	50000	chr19_37250001_37300000	0.99	60.04	5.79	FRR	
chr7	26190001	26220000	30000	chr7_26190001_26220000	0.25	19.24	5.79	PRR	
chr5	95170001	95200000	30000	chr5_95170001_95200000	0.07	9.27	5.78	FRR	
chr16	18920001	18950000	30000	chr16_18920001_18950000	0.39	26.71	5.77	RRR	40
chr16	70250001	70270000	20000	chr16_70250001_70270000	0.38	25.89	5.76	RRR	
chrX	47970001	47990000	20000	chrX_47970001_47990000	0.28	20.53	5.76	RRR	
chr5	32190001	32220000	30000	chr5_32190001_32220000	0.01	5.82	5.75	RRR	
chr7	1.43E+08	1.43E+08	30000	chr7_142750001_142780000	0.19	15.44	5.74	RRR	
chr4	37010001	37040000	30000	chr4_37010001_37040000	0	5.21	5.73	RRR	

染色体	開始	終止	長さ	名称	発現レベル (FPKM) [#]		変化 倍率 (log2) [8- 細胞期/4- 細胞期]	分類	
					4-細胞期	8-細胞期			
chr1	1.61E+08	1.61E+08	50000	chr1_161360001_161410000	0.43	27.94	5.73	PRR	
chr1	1.1E+08	1.1E+08	20000	chr1_109610001_109630000	0.08	9.23	5.7	PRR	
chr7	1.4E+08	1.4E+08	30000	chr7_140160001_140190000	0.01	5.6	5.7	PRR	
chr17	34310001	34340000	30000	chr17_34310001_34340000	0.01	5.58	5.69	RRR	
chr15	80520001	80550000	30000	chr15_80520001_80550000	0.03	6.62	5.69	PRR	10
chr19	20650001	20670000	20000	chr19_20650001_20670000	0	5.08	5.69	RRR	
chr17	61520001	61550000	30000	chr17_61520001_61550000	0.11	10.72	5.69	FRR	
chr3	42130001	42160000	30000	chr3_42130001_42160000	0.01	5.59	5.69	PRR	
chr14	77090001	77150000	60000	chr14_77090001_77150000	0.35	23.04	5.68	PRR	
chr9	1.23E+08	1.23E+08	20000	chr9_123240001_123260000	0.02	6.05	5.68	RRR	
chr18	29570001	29670000	#####	chr18_29570001_29670000	2.63	138.73	5.67	PRR	
chr12	1.08E+08	1.08E+08	30000	chr12_108260001_108290000	16.33	807.48	5.62	PRR	
chr16	19000001	19020000	20000	chr16_19000001_19020000	0.01	5.32	5.62	PRR	
chr11	82830001	82860000	30000	chr11_82830001_82860000	0.06	7.78	5.62	PRR	20
chr18	57850001	57880000	30000	chr18_57850001_57880000	0.09	9.16	5.61	RRR	
chr14	21650001	21670000	20000	chr14_21650001_21670000	0.01	5.18	5.58	PRR	
chr12	3260001	3280000	20000	chr12_3260001_3280000	0.01	5.12	5.57	RRR	
chr1	22790001	22820000	30000	chr1_22790001_22820000	0.08	8.48	5.57	FRR	
chr4	71750001	71780000	30000	chr4_71750001_71780000	0.13	10.81	5.57	PRR	
chr7	26050001	26080000	30000	chr7_26050001_26080000	0.41	23.94	5.56	PRR	
chr11	94750001	94770000	20000	chr11_94750001_94770000	1.34	67.17	5.55	FRR	
chr13	1.07E+08	1.07E+08	20000	chr13_107170001_107190000	0.05	6.91	5.55	PRR	
chr11	43710001	43740000	30000	chr11_43710001_43740000	0.09	8.65	5.53	FRR	30
chr19	50230001	50260000	30000	chr19_50230001_50260000	0.17	12.4	5.53	PRR	
chr14	20070001	20100000	30000	chr14_20070001_20100000	0.07	7.72	5.52	RRR	
chr6	95560001	95590000	30000	chr6_95560001_95590000	0.04	6.29	5.51	PRR	
chr15	89470001	89500000	30000	chr15_89470001_89500000	0.03	5.79	5.5	RRR	
chr6	1.08E+08	1.08E+08	30000	chr6_108020001_108050000	0.12	9.87	5.5	FRR	
chr7	57570001	57610000	40000	chr7_57570001_57610000	0.18	12.46	5.49	RRR	
chr13	51910001	51930000	20000	chr13_51910001_51930000	0.03	5.76	5.49	PRR	
chr1	35390001	35410000	20000	chr1_35390001_35410000	0.03	5.7	5.48	RRR	
chr12	14660001	14700000	40000	chr12_14660001_14700000	0.38	21.07	5.46	RRR	40
chr2	1.12E+08	1.12E+08	70000	chr2_111870001_111940000	1.26	59.02	5.44	FRR	
chr16	87510001	87540000	30000	chr16_87510001_87540000	0.12	9.28	5.41	RRR	
chrX	70570001	70590000	20000	chrX_70570001_70590000	0.03	5.4	5.4	PRR	
chr1	1.13E+08	1.13E+08	30000	chr1_113420001_113450000	0.45	22.88	5.38	RRR	
chr5	1400001	1460000	60000	chr5_1400001_1460000	0.64	30.62	5.38	FRR	

染色体	開始	終止	長さ	名称	発現レベル (FPKM) [#]		変化 倍率 (log2) [8- 細胞期/4- 細胞期]	分類	
					4-細胞期	8-細胞期			
chr6	1.13E+08	1.13E+08	20000	chr6_112820001_112840000	0.04	5.67	5.37	RRR	
chr2	48540001	48560000	20000	chr2_48540001_48560000	0.08	7.33	5.37	PRR	
chr17	7540001	7570000	30000	chr17_7540001_7570000	0.35	18.52	5.37	FRR	
chr18	8920001	8950000	30000	chr18_8920001_8950000	0.03	5.23	5.36	FRR	
chr6	390001	420000	30000	chr6_390001_420000	0.3	16.17	5.35	FRR	10
chr1	40990001	41010000	20000	chr1_40990001_41010000	0.09	7.58	5.34	RRR	
chr19	57040001	57060000	20000	chr19_57040001_57060000	0.05	5.9	5.32	RRR	
chr18	11900001	11920000	20000	chr18_11900001_11920000	0.06	6.31	5.32	PRR	
chr12	68810001	68840000	30000	chr12_68810001_68840000	0.36	18.06	5.3	RRR	
chr6	27080001	27100000	20000	chr6_27080001_27100000	0.71	31.87	5.3	FRR	
chr10	43690001	43710000	20000	chr10_43690001_43710000	0.21	12	5.29	PRR	
chr17	65220001	65240000	20000	chr17_65220001_65240000	0.04	5.3	5.27	PRR	
chr12	56450001	56490000	40000	chr12_56450001_56490000	0.71	30.63	5.25	PRR	
chr19	15050001	15080000	30000	chr19_15050001_15080000	0.4	18.82	5.24	FRR	20
chr1	1.44E+08	1.44E+08	30000	chr1_144000001_144030000	1.41	56.94	5.24	PRR	
chr7	64360001	64380000	20000	chr7_64360001_64380000	0.06	5.89	5.23	RRR	
chr17	20790001	20840000	50000	chr17_20790001_20840000	0.42	19.17	5.21	PRR	
chr17	19520001	19550000	30000	chr17_19520001_19550000	0.04	5.07	5.21	RRR	
chr19	47350001	47380000	30000	chr19_47350001_47380000	0.37	17.13	5.2	PRR	
chr1	1.5E+08	1.5E+08	30000	chr1_150150001_150180000	1.93	74.77	5.2	RRR	
chr19	6920001	6960000	40000	chr19_6920001_6960000	0.43	19.23	5.19	PRR	
chr1	1.47E+08	1.47E+08	60000	chr1_146940001_147000000	0.97	38.34	5.17	RRR	
chr6	34750001	34770000	20000	chr6_34750001_34770000	0.12	7.83	5.17	RRR	30
chr7	1.05E+08	1.05E+08	50000	chr7_104520001_104570000	0.55	23.28	5.17	PRR	
chr1	21700001	21730000	30000	chr1_21700001_21730000	0.29	13.85	5.16	RRR	
chr7	64390001	64410000	20000	chr7_64390001_64410000	0.08	6.32	5.16	RRR	
chr4	8420001	8450000	30000	chr4_8420001_8450000	0.3	14.04	5.14	PRR	
chr4	87890001	87930000	40000	chr4_87890001_87930000	0.48	20.25	5.13	FRR	
chr5	53680001	53730000	50000	chr5_53680001_53730000	0.63	25.1	5.11	RRR	
chr9	90700001	90740000	40000	chr9_90700001_90740000	0.53	21.7	5.11	RRR	
chr15	20830001	20890000	60000	chr15_20830001_20890000	2.43	87.45	5.11	RRR	
chr19	57630001	57690000	60000	chr19_57630001_57690000	72.44	2490.01	5.1	RRR	40
chr17	28910001	28940000	30000	chr17_28910001_28940000	0.22	10.7	5.08	PRR	
chr10	66860001	66920000	60000	chr10_66860001_66920000	1.11	39.95	5.05	RRR	
chr19	23270001	23300000	30000	chr19_23270001_23300000	0.17	8.8	5.04	PRR	
chr6	1.15E+08	1.15E+08	40000	chr6_115300001_115340000	4.07	136.3	5.03	RRR	
chr19	22830001	22900000	70000	chr19_22830001_22900000	0.58	22.18	5.03	PRR	

染色体	開始	終止	長さ	名称	発現レベル (FPKM) [#]		変化 倍率 (log2) [8- 細胞期/4- 細胞期]	分類	
					4-細胞期	8-細胞期			
chr15	41330001	41350000	20000	chr15_41330001_41350000	0.09	6.06	5.02	RRR	
chr14	45350001	45370000	20000	chr14_45350001_45370000	0.21	9.75	4.99	RRR	
chr4	85490001	85510000	20000	chr4_85490001_85510000	0.09	5.92	4.99	PRR	
chrX	55100001	55120000	20000	chrX_55100001_55120000	0.08	5.61	4.99	RRR	
chrX	54340001	54380000	40000	chrX_54340001_54380000	0.63	22.95	4.98	RRR	10
chr2	39800001	39820000	20000	chr2_39800001_39820000	0.3	12.55	4.98	FRR	
chr2	53200001	53230000	30000	chr2_53200001_53230000	0.2	9.15	4.95	RRR	
chr11	89800001	89840000	40000	chr11_89800001_89840000	1.07	35.7	4.94	RRR	
chr9	97230001	97250000	20000	chr9_97230001_97250000	0.07	5.05	4.92	PRR	
chr13	32570001	32590000	20000	chr13_32570001_32590000	0.17	8.04	4.91	RRR	
chr19	340001	400000	60000	chr19_340001_400000	1.42	45.67	4.91	PRR	
chr10	98630001	98660000	30000	chr10_98630001_98660000	0.22	9.5	4.91	FRR	
chr10	63610001	63640000	30000	chr10_63610001_63640000	0.41	15.11	4.9	RRR	
chr14	1.02E+08	1.02E+08	30000	chr14_102130001_102160000	0.19	8.53	4.9	RRR	20
chr11	82650001	82680000	30000	chr11_82650001_82680000	0.25	10.33	4.9	RRR	
chr13	84640001	84670000	30000	chr13_84640001_84670000	0.38	14.18	4.89	RRR	
chr11	60920001	60940000	20000	chr11_60920001_60940000	0.08	5.22	4.89	PRR	
chr5	17800001	17820000	20000	chr5_17800001_17820000	0.17	7.84	4.88	PRR	
chr10	51550001	51570000	20000	chr10_51550001_51570000	0.11	5.86	4.83	PRR	
chr1	13310001	13380000	70000	chr1_13310001_13380000	19.07	540.6	4.82	RRR	
chr7	1.29E+08	1.29E+08	30000	chr7_129260001_129290000	0.43	14.84	4.82	RRR	
chr12	1.13E+08	1.13E+08	30000	chr12_112690001_112720000	0.13	6.34	4.81	FRR	
chr19	23550001	23600000	50000	chr19_23550001_23600000	2.05	60.05	4.81	RRR	30
chr17	66080001	66110000	30000	chr17_66080001_66110000	0.46	15.66	4.81	PRR	
chr6	1.06E+08	1.06E+08	20000	chr6_105520001_105540000	0.38	13.26	4.8	RRR	
chr14	71370001	71390000	20000	chr14_71370001_71390000	0.13	6.19	4.77	RRR	
chr18	19160001	19190000	30000	chr18_19160001_19190000	0.14	6.46	4.77	FRR	
chr5	76090001	76150000	60000	chr5_76090001_76150000	1.31	37.73	4.75	PRR	
chrX	1.36E+08	1.36E+08	30000	chrX_136390001_136420000	0.93	27.56	4.75	FRR	
chr10	99080001	99110000	30000	chr10_99080001_99110000	12.99	348.7	4.74	RRR	
chr13	36990001	37030000	40000	chr13_36990001_37030000	20.32	543.57	4.73	PRR	
chr15	99020001	99050000	30000	chr15_99020001_99050000	0.66	19.79	4.71	FRR	40
chr1	13790001	13820000	30000	chr1_13790001_13820000	0.96	27.23	4.69	FRR	
chr11	82130001	82160000	30000	chr11_82130001_82160000	1.23	33.91	4.68	RRR	
chr12	85780001	85840000	60000	chr12_85780001_85840000	0.9	25.46	4.68	RRR	
chr3	5140001	5180000	40000	chr3_5140001_5180000	1.61	43.16	4.66	RRR	
chr19	23130001	23180000	50000	chr19_23130001_23180000	2.37	61.7	4.65	RRR	

染色体	開始	終止	長さ	名称	発現レベル (FPKM) [#]		変化 倍率 (log2) [8- 細胞期/4- 細胞期]	分類	
					4-細胞期	8-細胞期			
chr7	62740001	62770000	30000	chr7_62740001_62770000	0.42	13	4.65	RRR	
chr2	34900001	34920000	20000	chr2_34900001_34920000	0.11	5.12	4.64	FRR	
chr19	12100001	12120000	20000	chr19_12100001_12120000	0.17	6.65	4.64	RRR	
chr19	2180001	2210000	30000	chr19_2180001_2210000	1.05	28.37	4.63	FRR	
chr19	41660001	41710000	50000	chr19_41660001_41710000	1	27.2	4.63	PRR	10
chr1	1.57E+08	1.57E+08	20000	chr1_157100001_157120000	1.28	33.69	4.61	PRR	
chr1	45870001	45890000	20000	chr1_45870001_45890000	0.12	5.27	4.61	PRR	
chr2	1.73E+08	1.73E+08	20000	chr2_172760001_172780000	0.12	5.21	4.59	RRR	
chr15	21890001	21920000	30000	chr15_21890001_21920000	0.65	17.75	4.57	PRR	
chr18	11860001	11880000	20000	chr18_11860001_11880000	0.14	5.53	4.55	RRR	
chr12	1.2E+08	1.2E+08	50000	chr12_120420001_120470000	0.74	19.61	4.55	FRR	
chr14	54400001	54450000	50000	chr14_54400001_54450000	1.51	37.48	4.54	FRR	
chr4	1.29E+08	1.29E+08	30000	chr4_128870001_128900000	0.13	5.16	4.52	RRR	
chr14	29290001	29320000	30000	chr14_29290001_29320000	0.49	13.42	4.52	RRR	20
chr3	1.38E+08	1.38E+08	20000	chr3_137860001_137880000	0.29	8.77	4.51	PRR	
chr10	88840001	88860000	20000	chr10_88840001_88860000	0.16	5.75	4.49	RRR	
chr2	1.5E+08	1.5E+08	30000	chr2_149620001_149650000	4.44	99.92	4.46	FRR	
chr2	1.4E+08	1.4E+08	50000	chr2_140190001_140240000	0.92	22.28	4.46	RRR	
chr2	10590001	10610000	20000	chr2_10590001_10610000	0.55	14.14	4.45	RRR	
chr6	78290001	78310000	20000	chr6_78290001_78310000	0.14	5.11	4.44	RRR	
chr9	99690001	99730000	40000	chr9_99690001_99730000	1.06	24.85	4.43	PRR	
chr1	44570001	44620000	50000	chr1_44570001_44620000	33.17	719.27	4.43	RRR	
chr6	40330001	40360000	30000	chr6_40330001_40360000	0.26	7.66	4.43	FRR	30
chr5	42880001	42940000	60000	chr5_42880001_42940000	90.18	1940.68	4.43	PRR	
chr19	37940001	37970000	30000	chr19_37940001_37970000	0.43	11.31	4.43	FRR	
chr10	8080001	8110000	30000	chr10_8080001_8110000	0.75	18.11	4.42	FRR	
chrX	1.53E+08	1.53E+08	20000	chrX_152940001_152960000	0.9	21.3	4.42	RRR	
chr3	75540001	75560000	20000	chr3_75540001_75560000	0.25	7.37	4.42	RRR	
chr1	90440001	90470000	30000	chr1_90440001_90470000	0.49	12.44	4.41	RRR	
chr1	1.55E+08	1.55E+08	20000	chr1_155040001_155060000	0.86	20.31	4.41	PRR	
chr12	10090001	10120000	30000	chr12_10090001_10120000	0.22	6.59	4.39	RRR	
chr1	63770001	63800000	30000	chr1_63770001_63800000	0.3	8.25	4.38	FRR	40
chr4	1.4E+08	1.4E+08	30000	chr4_140360001_140390000	0.38	9.85	4.37	FRR	
chr6	27440001	27470000	30000	chr6_27440001_27470000	0.56	13.47	4.36	PRR	
chr1	27430001	27500000	70000	chr1_27430001_27500000	4.57	95.03	4.35	FRR	
chr1	28960001	28980000	20000	chr1_28960001_28980000	0.19	5.77	4.34	PRR	
chr6	5120001	5150000	30000	chr6_5120001_5150000	0.32	8.34	4.33	RRR	

染色体	開始	終止	長さ	名称	発現レベル (FPKM) [#]		変化 倍率 (log2) [8- 細胞期/4- 細胞期]	分類	
					4-細胞期	8-細胞期			
chr7	76250001	76270000	20000	chr7_76250001_76270000	0.35	8.81	4.31	PRR	
chr19	55650001	55680000	30000	chr19_55650001_55680000	4.15	83.24	4.29	PRR	
chr19	750001	800000	50000	chr19_750001_800000	1.19	25.1	4.29	PRR	
chr6	27840001	27860000	20000	chr6_27840001_27860000	0.22	6.07	4.27	FRR	
chr11	64990001	65020000	30000	chr11_64990001_65020000	0.35	8.56	4.27	FRR	10
chr3	46530001	46550000	20000	chr3_46530001_46550000	0.34	8.22	4.24	PRR	
chr3	1.29E+08	1.29E+08	30000	chr3_128540001_128570000	1	20.64	4.24	PRR	
chr1	13620001	13660000	40000	chr1_13620001_13660000	18.81	355.08	4.23	RRR	
chr1	1.13E+08	1.13E+08	30000	chr1_113330001_113360000	0.25	6.48	4.23	FRR	
chr18	77420001	77480000	60000	chr18_77420001_77480000	0.93	19.2	4.23	FRR	
chr19	41130001	41160000	30000	chr19_41130001_41160000	0.41	9.35	4.21	RRR	
chr2	26550001	26580000	30000	chr2_26550001_26580000	0.53	11.53	4.21	PRR	
chr5	53600001	53630000	30000	chr5_53600001_53630000	0.3	7.19	4.19	PRR	
chr11	3650001	3690000	40000	chr11_3650001_3690000	0.86	17.19	4.17	FRR	20
chr1	95540001	95570000	30000	chr1_95540001_95570000	0.19	5.13	4.17	FRR	
chrX	37290001	37310000	20000	chrX_37290001_37310000	0.56	11.75	4.17	RRR	
chr1	13400001	13440000	40000	chr1_13400001_13440000	19.85	356.6	4.16	RRR	
chr14	27390001	27420000	30000	chr14_27390001_27420000	0.29	6.83	4.15	PRR	
chr19	58730001	58750000	20000	chr19_58730001_58750000	0.22	5.58	4.15	RRR	
chr8	6340001	6410000	70000	chr8_6340001_6410000	1	19.46	4.15	PRR	
chr1	97210001	97240000	30000	chr1_97210001_97240000	0.54	11.23	4.15	FRR	
chr16	22300001	22320000	20000	chr16_22300001_22320000	0.62	12.7	4.15	RRR	
chr14	1.03E+08	1.03E+08	30000	chr14_103050001_103080000	1.3	24.6	4.14	PRR	30
chr11	62110001	62140000	30000	chr11_62110001_62140000	0.22	5.55	4.14	RRR	
chr12	19580001	19630000	50000	chr12_19580001_19630000	0.84	16.28	4.12	PRR	
chr3	48290001	48310000	20000	chr3_48290001_48310000	0.57	11.51	4.12	FRR	
chr14	68060001	68080000	20000	chr14_68060001_68080000	0.59	11.82	4.11	PRR	
chr16	5230001	5260000	30000	chr16_5230001_5260000	0.25	5.93	4.11	PRR	
chr19	22460001	22520000	60000	chr19_22460001_22520000	1.37	25.1	4.1	RRR	
chr19	48770001	48810000	40000	chr19_48770001_48810000	0.96	18.12	4.1	RRR	
chr6	64250001	64280000	30000	chr6_64250001_64280000	0.61	11.87	4.08	PRR	
chr10	1.04E+08	1.04E+08	30000	chr10_104260001_104290000	1.93	34.14	4.08	FRR	40
chr16	72550001	72580000	30000	chr16_72550001_72580000	0.5	9.97	4.07	PRR	
chr5	1.09E+08	1.09E+08	30000	chr5_109250001_109280000	0.4	8.24	4.06	RRR	
chr1	13090001	13160000	70000	chr1_13090001_13160000	19.72	327.64	4.05	RRR	
chrX	50020001	50050000	30000	chrX_50020001_50050000	1	18.16	4.05	FRR	
chr19	22350001	22390000	40000	chr19_22350001_22390000	2.29	39.3	4.04	RRR	

染色体	開始	終止	長さ	名称	発現レベル (FPKM) [#]		変化 倍率 (log2) [8- 細胞期/4- 細胞期]	分類	
					4-細胞期	8-細胞期			
chr7	1.01E+08	1.01E+08	30000	chr7_100980001_101010000	0.97	17.53	4.04	FRR	
chr7	1.42E+08	1.43E+08	50000	chr7_142450001_142500000	0.84	15.32	4.04	FRR	
chr12	49680001	49710000	30000	chr12_49680001_49710000	1.19	21.09	4.04	RRR	
chr1	1.13E+08	1.13E+08	30000	chr1_113380001_113410000	0.66	12.22	4.02	FRR	
chr19	30290001	30330000	40000	chr19_30290001_30330000	39.47	630.9	4	PRR	10
chr2	1.32E+08	1.32E+08	20000	chr2_131810001_131830000	1.18	20.09	3.98	PRR	
chr3	23370001	23400000	30000	chr3_23370001_23400000	0.27	5.72	3.98	PRR	
chr5	64780001	64800000	20000	chr5_64780001_64800000	0.37	7.22	3.96	RRR	
chr18	12730001	12780000	50000	chr18_12730001_12780000	4.14	65.05	3.94	PRR	
chr7	1.4E+08	1.4E+08	30000	chr7_139930001_139960000	1.41	22.93	3.93	PRR	
chr1	1.49E+08	1.49E+08	30000	chr1_148840001_148870000	0.44	8.12	3.93	PRR	
chr2	1.29E+08	1.29E+08	20000	chr2_128630001_128650000	0.74	12.66	3.93	PRR	
chr3	10170001	10190000	20000	chr3_10170001_10190000	0.33	6.44	3.93	FRR	
chr10	28960001	28990000	30000	chr10_28960001_28990000	6.35	97.98	3.93	RRR	20
chr2	1.33E+08	1.33E+08	30000	chr2_132710001_132740000	0.48	8.58	3.9	RRR	
chr7	7700001	7730000	30000	chr7_7700001_7730000	0.58	10.07	3.9	RRR	
chr5	12480001	12510000	30000	chr5_12480001_12510000	0.32	6.19	3.9	PRR	
chr1	45810001	45830000	20000	chr1_45810001_45830000	2.37	36.72	3.9	PRR	
chr7	98230001	98270000	40000	chr7_98230001_98270000	1.67	25.73	3.87	PRR	
chr19	23980001	24010000	30000	chr19_23980001_24010000	0.87	14	3.86	PRR	
chr19	46070001	46100000	30000	chr19_46070001_46100000	0.75	12.23	3.86	FRR	
chr6	71180001	71210000	30000	chr6_71180001_71210000	0.63	10.49	3.86	FRR	
chr6	31860001	31880000	20000	chr6_31860001_31880000	0.84	13.51	3.86	PRR	30
chr19	5940001	5960000	20000	chr19_5940001_5960000	0.61	10.12	3.85	PRR	
chr12	31590001	31650000	60000	chr12_31590001_31650000	1.59	24.2	3.85	FRR	
chr11	59540001	59560000	20000	chr11_59540001_59560000	1.35	20.72	3.84	PRR	
chr19	40260001	40290000	30000	chr19_40260001_40290000	70.6	1003.72	3.83	FRR	
chr13	1.13E+08	1.13E+08	30000	chr13_113330001_113360000	0.57	9.43	3.83	FRR	
chr1	1.61E+08	1.61E+08	70000	chr1_160860001_160930000	6.27	89.3	3.81	FRR	
chr17	37430001	37460000	30000	chr17_37430001_37460000	0.67	10.59	3.8	RRR	
chrX	80050001	80080000	30000	chrX_80050001_80080000	0.3	5.49	3.8	RRR	
chr3	1.33E+08	1.33E+08	20000	chr3_133280001_133300000	0.97	14.84	3.8	PRR	40
chr8	1.05E+08	1.05E+08	20000	chr8_105290001_105310000	0.27	5.07	3.8	FRR	
chr16	9170001	9190000	20000	chr16_9170001_9190000	1.46	21.63	3.8	FRR	
chr6	1.35E+08	1.35E+08	40000	chr6_134600001_134640000	1.1	16.14	3.76	PRR	
chr10	89190001	89220000	30000	chr10_89190001_89220000	0.87	12.89	3.74	RRR	
chr6	32320001	32360000	40000	chr6_32320001_32360000	1.88	26.13	3.73	RRR	

染色体	開始	終止	長さ	名称	発現レベル (FPKM) [#]		変化 倍率 (log2) [8- 細胞期/4- 細胞期]	分類	
					4-細胞期	8-細胞期			
chr10	21830001	21860000	30000	chr10_21830001_21860000	0.7	10.45	3.72	FRR	10
chr5	5420001	5450000	30000	chr5_5420001_5450000	0.55	8.42	3.71	FRR	
chr3	25880001	25910000	30000	chr3_25880001_25910000	0.45	7.05	3.7	RRR	
chr19	3840001	3870000	30000	chr19_3840001_3870000	1.52	20.97	3.7	FRR	
chrX	1.35E+08	1.35E+08	20000	chrX_134510001_134530000	1.05	14.62	3.68	RRR	
chr10	1.26E+08	1.26E+08	30000	chr10_125780001_125810000	0.51	7.74	3.68	FRR	
chr2	54470001	54500000	30000	chr2_54470001_54500000	0.8	11.33	3.67	RRR	
chr12	22890001	22920000	30000	chr12_22890001_22920000	0.91	12.76	3.67	FRR	
chr1	53880001	53900000	20000	chr1_53880001_53900000	0.38	5.99	3.67	PRR	
chr15	63390001	63410000	20000	chr15_63390001_63410000	0.69	9.86	3.66	RRR	
chr19	21370001	21390000	20000	chr19_21370001_21390000	0.45	6.72	3.63	RRR	20
chr18	76940001	76970000	30000	chr18_76940001_76970000	0.45	6.71	3.63	FRR	
chr8	42550001	42580000	30000	chr8_42550001_42580000	2.73	34.63	3.62	PRR	
chr7	1.52E+08	1.52E+08	60000	chr7_152410001_152470000	1.31	17.25	3.62	FRR	
chr14	96810001	96830000	20000	chr14_96810001_96830000	0.73	10.08	3.62	FRR	
chr7	12520001	12550000	30000	chr7_12520001_12550000	0.34	5.3	3.62	FRR	
chr14	20790001	20810000	20000	chr14_20790001_20810000	1.91	24.22	3.6	RRR	
chr5	17640001	17670000	30000	chr5_17640001_17670000	41.04	497.68	3.6	PRR	
chr14	77160001	77190000	30000	chr14_77160001_77190000	1.02	13.36	3.59	PRR	
chr2	1.32E+08	1.32E+08	20000	chr2_132220001_132240000	0.8	10.71	3.59	RRR	30
chr6	1.44E+08	1.44E+08	30000	chr6_143920001_143950000	0.77	10.27	3.58	PRR	
chr17	41390001	41420000	30000	chr17_41390001_41420000	2.2	27.38	3.58	PRR	
chr7	1.03E+08	1.03E+08	30000	chr7_102900001_102930000	0.81	10.79	3.58	FRR	
chr1	12980001	13070000	90000	chr1_12980001_13070000	42.37	504.52	3.57	RRR	
chr1	9600001	9640000	40000	chr1_9600001_9640000	2.09	25.94	3.57	FRR	
chrX	24010001	24040000	30000	chrX_24010001_24040000	1.05	13.54	3.57	PRR	
chr17	19910001	19940000	30000	chr17_19910001_19940000	0.82	10.81	3.57	FRR	
chr7	91770001	91790000	20000	chr7_91770001_91790000	0.35	5.19	3.56	RRR	
chr12	31450001	31470000	20000	chr12_31450001_31470000	0.44	6.23	3.55	PRR	40
chr14	76350001	76370000	20000	chr14_76350001_76370000	0.39	5.61	3.54	PRR	
chr3	1.14E+08	1.14E+08	30000	chr3_113940001_113970000	0.63	8.4	3.54	FRR	
chr12	1.17E+08	1.17E+08	70000	chr12_117080001_117150000	2.06	25	3.54	PRR	
chr14	76030001	76060000	30000	chr14_76030001_76060000	0.75	9.73	3.53	PRR	
chr15	41130001	41170000	40000	chr15_41130001_41170000	10.02	115.15	3.51	FRR	
chr19	20740001	20770000	30000	chr19_20740001_20770000	0.53	7	3.49	PRR	
chrX	4450001	4470000	20000	chrX_4450001_4470000	0.39	5.42	3.49	RRR	
chr3	53380001	53400000	20000	chr3_53380001_53400000	0.41	5.56	3.47	PRR	

染色体	開始	終止	長さ	名称	発現レベル (FPKM) [#]		変化 倍率 (log2) [8- 細胞期/4- 細胞期]	分類	
					4-細胞期	8-細胞期			
chr4	15200001	15230000	30000	chr4_15200001_15230000	0.46	6.05	3.46	RRR	
chr19	21610001	21660000	50000	chr19_21610001_21660000	9.33	103.39	3.46	RRR	
chr14	31700001	31730000	30000	chr14_31700001_31730000	0.66	8.18	3.45	PRR	
chr2	85790001	85810000	20000	chr2_85790001_85810000	0.37	5.01	3.44	FRR	
chr19	49820001	49840000	20000	chr19_49820001_49840000	0.45	5.81	3.43	FRR	10
chr17	29190001	29210000	20000	chr17_29190001_29210000	0.45	5.79	3.42	PRR	
chr19	56690001	56720000	30000	chr19_56690001_56720000	75.87	810.62	3.42	RRR	
chr7	1.43E+08	1.43E+08	20000	chr7_143090001_143110000	1.97	21.87	3.41	PRR	
chrX	1.54E+08	1.54E+08	30000	chrX_153540001_153570000	4.27	45.69	3.39	PRR	
chr2	1.79E+08	1.79E+08	30000	chr2_179070001_179100000	1.52	16.83	3.39	PRR	
chr17	78510001	78530000	20000	chr17_78510001_78530000	0.5	6.21	3.39	PRR	
chr8	81440001	81460000	20000	chr8_81440001_81460000	0.79	9.17	3.38	RRR	
chr8	9030001	9070000	40000	chr8_9030001_9070000	5.56	58.76	3.38	FRR	
chr11	10420001	10450000	30000	chr11_10420001_10450000	1.41	15.51	3.37	RRR	20
chr14	1.01E+08	1.01E+08	30000	chr14_100710001_100740000	1.03	11.61	3.37	RRR	
chr1	16150001	16170000	20000	chr1_16150001_16170000	0.65	7.58	3.36	PRR	
chrX	69890001	69920000	30000	chrX_69890001_69920000	0.64	7.44	3.35	RRR	
chr1	92440001	92540000	#####	chr1_92440001_92540000	47.67	486.02	3.35	RRR	
chr9	97300001	97320000	20000	chr9_97300001_97320000	0.44	5.39	3.35	PRR	
chr11	50250001	50270000	20000	chr11_50250001_50270000	0.58	6.81	3.35	PRR	
chrX	1.09E+08	1.09E+08	30000	chrX_109090001_109120000	0.97	10.76	3.34	RRR	
chr4	1.53E+08	1.53E+08	30000	chr4_153320001_153350000	6.4	65.81	3.34	PRR	
chr7	77150001	77170000	20000	chr7_77150001_77170000	0.61	7.11	3.34	RRR	30
chr11	82320001	82360000	40000	chr11_82320001_82360000	5.96	60.99	3.33	RRR	
chr6	10820001	10850000	30000	chr6_10820001_10850000	0.68	7.72	3.33	FRR	
chr18	76860001	76890000	30000	chr18_76860001_76890000	0.96	10.48	3.32	RRR	
chr17	2150001	2200000	50000	chr17_2150001_2200000	2.86	29.53	3.32	PRR	
chr2	1.79E+08	1.79E+08	30000	chr2_178520001_178550000	0.89	9.71	3.31	RRR	
chr12	8100001	8130000	30000	chr12_8100001_8130000	0.69	7.68	3.3	PRR	
chr4	1.47E+08	1.47E+08	20000	chr4_146610001_146630000	0.66	7.34	3.29	FRR	
chr6	10400001	10420000	20000	chr6_10400001_10420000	0.61	6.73	3.27	FRR	
chr8	83340001	83370000	30000	chr8_83340001_83370000	0.64	7	3.26	RRR	40
chr15	64470001	64490000	20000	chr15_64470001_64490000	1.66	16.76	3.26	PRR	
chr11	89460001	89500000	40000	chr11_89460001_89500000	2.83	27.79	3.25	FRR	
chr1	1.72E+08	1.72E+08	40000	chr1_171800001_171840000	2	19.89	3.25	PRR	
chr7	7750001	7780000	30000	chr7_7750001_7780000	1.24	12.65	3.25	RRR	
chrX	35630001	35660000	30000	chrX_35630001_35660000	1.04	10.72	3.25	FRR	

染色体	開始	終止	長さ	名称	発現レベル (FPKM) [#]		変化 倍率 (log2) [8- 細胞期/4- 細胞期]	分類	
					4-細胞期	8-細胞期			
chr11	2890001	2920000	30000	chr11_2890001_2920000	0.89	9.32	3.25	FRR	
chr16	48420001	48440000	20000	chr16_48420001_48440000	1.54	15.43	3.24	RRR	
chr5	76240001	76280000	40000	chr5_76240001_76280000	1.21	11.96	3.2	FRR	
chr5	1.31E+08	1.31E+08	40000	chr5_131260001_131300000	3.3	30.95	3.19	PRR	
chr11	1.19E+08	1.2E+08	30000	chr11_119470001_119500000	17.82	161.97	3.18	FRR	10
chr12	1.04E+08	1.04E+08	30000	chr12_104220001_104250000	1.25	12.01	3.17	FRR	
chr19	47510001	47560000	50000	chr19_47510001_47560000	3.04	28.1	3.17	PRR	
chr5	65800001	65830000	30000	chr5_65800001_65830000	1.69	15.78	3.15	PRR	
chr8	92930001	92960000	30000	chr8_92930001_92960000	1.23	11.73	3.15	PRR	
chr10	93520001	93560000	40000	chr10_93520001_93560000	2.12	19.44	3.14	RRR	
chr19	22000001	22040000	40000	chr19_22000001_22040000	1.82	16.83	3.14	RRR	
chr13	22600001	22630000	30000	chr13_22600001_22630000	0.73	7.18	3.13	PRR	
chr10	1.05E+08	1.05E+08	20000	chr10_105120001_105140000	2.72	24.57	3.13	FRR	
chr15	75780001	75800000	20000	chr15_75780001_75800000	0.72	6.96	3.11	RRR	20
chr6	10760001	10780000	20000	chr6_10760001_10780000	1.39	12.59	3.09	FRR	
chr16	1430001	1460000	30000	chr16_1430001_1460000	1.61	14.47	3.09	PRR	
chrX	73010001	73040000	30000	chrX_73010001_73040000	2.27	19.9	3.08	FRR	
chr14	1.07E+08	1.07E+08	40000	chr14_106830001_106870000	1.64	14.54	3.07	PRR	
chr16	28560001	28580000	20000	chr16_28560001_28580000	0.67	6.31	3.06	PRR	
chr16	75700001	75760000	60000	chr16_75700001_75760000	91.1	751.4	3.04	PRR	
chr10	93050001	93080000	30000	chr10_93050001_93080000	2.24	19.13	3.04	FRR	
chr11	49060001	49120000	60000	chr11_49060001_49120000	4.89	40.75	3.03	FRR	
chr16	29750001	29780000	30000	chr16_29750001_29780000	2.2	18.74	3.03	PRR	30
chr11	20580001	20610000	30000	chr11_20580001_20610000	5.36	44.25	3.02	RRR	
chr1	28050001	28080000	30000	chr1_28050001_28080000	2.83	23.51	3.01	FRR	
chr19	39280001	39300000	20000	chr19_39280001_39300000	3.09	25.68	3.01	PRR	
chr4	1.53E+08	1.53E+08	30000	chr4_153440001_153470000	1.36	11.39	2.98	FRR	
chr6	1.19E+08	1.19E+08	50000	chr6_118810001_118860000	4.36	34.83	2.97	RRR	
chr5	40790001	40810000	20000	chr5_40790001_40810000	0.56	5.06	2.97	RRR	
chr1	13200001	13230000	30000	chr1_13200001_13230000	10.41	82.42	2.97	FRR	
chrX	12950001	12980000	30000	chrX_12950001_12980000	1.43	11.83	2.96	FRR	
chr6	1.08E+08	1.09E+08	20000	chr6_108480001_108500000	0.85	7.2	2.94	FRR	40
chr17	57560001	57590000	30000	chr17_57560001_57590000	0.92	7.72	2.94	RRR	
chr12	25100001	25130000	30000	chr12_25100001_25130000	0.79	6.69	2.93	PRR	
chr12	19640001	19660000	20000	chr12_19640001_19660000	0.63	5.48	2.93	PRR	
chr4	89380001	89440000	60000	chr4_89380001_89440000	5.02	38.99	2.93	PRR	
chr6	27540001	27560000	20000	chr6_27540001_27560000	0.68	5.79	2.92	FRR	

染色体	開始	終止	長さ	名称	発現レベル (FPKM) [#]		変化 倍率 (log2) [8- 細胞期/4- 細胞期]	分類	
					4-細胞期	8-細胞期			
chr7	1.4E+08	1.4E+08	20000	chr7_139650001_139670000	0.91	7.43	2.9	RRR	
chr10	96250001	96280000	30000	chr10_96250001_96280000	1	8.03	2.89	RRR	
chr16	50650001	50680000	30000	chr16_50650001_50680000	2.02	15.66	2.89	FRR	
chr12	94650001	94680000	30000	chr12_94650001_94680000	1.94	14.87	2.88	FRR	
chr19	42980001	43010000	30000	chr19_42980001_43010000	0.79	6.4	2.87	FRR	10
chr17	42640001	42660000	20000	chr17_42640001_42660000	0.78	6.34	2.87	FRR	
chr17	19710001	19740000	30000	chr17_19710001_19740000	0.81	6.52	2.86	RRR	
chr6	11090001	11110000	20000	chr6_11090001_11110000	0.86	6.85	2.86	FRR	
chr7	25170001	25190000	20000	chr7_25170001_25190000	1.01	7.87	2.84	PRR	
chr10	94060001	94090000	30000	chr10_94060001_94090000	1.05	8.13	2.84	RRR	
chr2	38910001	38930000	20000	chr2_38910001_38930000	0.8	6.34	2.84	PRR	
chr10	70260001	70280000	20000	chr10_70260001_70280000	1.14	8.7	2.83	PRR	
chr6	26280001	26300000	20000	chr6_26280001_26300000	8.03	57.38	2.82	FRR	
chr2	88060001	88080000	20000	chr2_88060001_88080000	0.72	5.66	2.81	PRR	20
chr14	1.07E+08	1.07E+08	40000	chr14_106920001_106960000	9.64	66.58	2.78	FRR	
chr9	99800001	99820000	20000	chr9_99800001_99820000	1.95	13.85	2.77	RRR	
chr16	18880001	18910000	30000	chr16_18880001_18910000	1.98	14.12	2.77	FRR	
chr5	1630001	1650000	20000	chr5_1630001_1650000	0.73	5.57	2.77	FRR	
chr16	24530001	24560000	30000	chr16_24530001_24560000	5.2	35.89	2.76	FRR	
chr11	18130001	18160000	30000	chr11_18130001_18160000	2.66	18.54	2.76	RRR	
chr1	1.13E+08	1.13E+08	30000	chr1_113250001_113280000	1.96	13.9	2.76	PRR	
chr17	19680001	19700000	20000	chr17_19680001_19700000	4.79	32.95	2.76	RRR	
chr1	45940001	45970000	30000	chr1_45940001_45970000	3.14	21.88	2.76	FRR	30
chr18	56480001	56510000	30000	chr18_56480001_56510000	1.36	9.76	2.76	FRR	
chrX	1.49E+08	1.49E+08	20000	chrX_148690001_148710000	1.94	13.56	2.74	RRR	
chr7	1.01E+08	1.01E+08	20000	chr7_100930001_100950000	2.95	20.34	2.74	FRR	
chr2	75120001	75140000	20000	chr2_75120001_75140000	2.43	16.53	2.72	FRR	
chr7	43690001	43710000	20000	chr7_43690001_43710000	0.89	6.37	2.71	FRR	
chr10	43810001	43840000	30000	chr10_43810001_43840000	3.36	22.44	2.7	PRR	
chr6	36390001	36420000	30000	chr6_36390001_36420000	0.83	5.93	2.7	FRR	
chr2	87210001	87240000	30000	chr2_87210001_87240000	1.09	7.58	2.69	PRR	
chr16	75100001	75130000	30000	chr16_75100001_75130000	1.52	10.35	2.69	PRR	40
chr18	3820001	3850000	30000	chr18_3820001_3850000	1.19	8.19	2.68	PRR	
chr6	88400001	88420000	20000	chr6_88400001_88420000	6.15	40.01	2.68	FRR	
chr14	35010001	35030000	20000	chr14_35010001_35030000	1.23	8.36	2.67	PRR	
chr3	32920001	32950000	30000	chr3_32920001_32950000	6.22	39.86	2.66	FRR	
chr10	81510001	81540000	30000	chr10_81510001_81540000	1.08	7.33	2.65	RRR	

染色体	開始	終止	長さ	名称	発現レベル (FPKM) [#]		変化 倍率 (log2) [8- 細胞期/4- 細胞期]	分類	
					4-細胞期	8-細胞期			
chr6	1.19E+08	1.19E+08	30000	chr6_118870001_118900000	4.51	28.68	2.64	RRR	
chr19	11750001	11800000	50000	chr19_11750001_11800000	7.57	47.87	2.64	FRR	
chr7	72730001	72750000	20000	chr7_72730001_72750000	1.49	9.61	2.61	FRR	
chr6	90490001	90520000	30000	chr6_90490001_90520000	1.09	7.1	2.6	FRR	
chr13	96200001	96230000	30000	chr13_96200001_96230000	2.13	13.42	2.6	FRR	10
chr10	27530001	27560000	30000	chr10_27530001_27560000	2.37	14.82	2.59	PRR	
chr19	23010001	23070000	60000	chr19_23010001_23070000	17.39	105.36	2.59	RRR	
chr10	57720001	57750000	30000	chr10_57720001_57750000	2.5	15.33	2.57	PRR	
chr8	7200001	7230000	30000	chr8_7200001_7230000	1.28	8.12	2.57	FRR	
chr9	89640001	89670000	30000	chr9_89640001_89670000	1.54	9.63	2.57	FRR	
chr15	98270001	98300000	30000	chr15_98270001_98300000	2.79	17.03	2.57	FRR	
chr16	2380001	2420000	40000	chr16_2380001_2420000	1.78	11.05	2.57	PRR	
chr10	1.27E+08	1.27E+08	20000	chr10_126650001_126670000	2.37	14.43	2.56	FRR	
chr1	37980001	38000000	20000	chr1_37980001_38000000	1.15	7.14	2.53	FRR	20
chr18	43820001	43840000	20000	chr18_43820001_43840000	2.25	13.35	2.52	PRR	
chr13	51270001	51300000	30000	chr13_51270001_51300000	4.82	27.94	2.51	RRR	
chr3	1270001	1290000	20000	chr3_1270001_1290000	1.1	6.74	2.51	FRR	
chr7	5970001	5990000	20000	chr7_5970001_5990000	1.78	10.6	2.51	RRR	
chr12	1.11E+08	1.11E+08	30000	chr12_111380001_111410000	3.86	22.33	2.5	PRR	
chr6	33080001	33110000	30000	chr6_33080001_33110000	1.52	8.99	2.49	FRR	
chr19	56820001	56840000	20000	chr19_56820001_56840000	0.87	5.33	2.48	FRR	
chrX	1.19E+08	1.19E+08	30000	chrX_119200001_119230000	10.17	57.39	2.48	RRR	
chr12	91200001	91230000	30000	chr12_91200001_91230000	0.89	5.37	2.47	RRR	30
chr8	170001	190000	20000	chr8_170001_190000	1.17	6.95	2.47	FRR	
chr14	1.04E+08	1.04E+08	20000	chr14_104230001_104250000	1.05	6.24	2.46	PRR	
chr11	1.15E+08	1.15E+08	40000	chr11_115080001_115120000	4.82	26.9	2.46	FRR	
chr2	30350001	30370000	20000	chr2_30350001_30370000	2.52	14.35	2.46	FRR	
chr10	1.22E+08	1.22E+08	40000	chr10_121530001_121570000	6.62	36.66	2.45	FRR	
chr19	45050001	45080000	30000	chr19_45050001_45080000	1.73	9.87	2.45	FRR	
chr14	1.07E+08	1.07E+08	30000	chr14_106730001_106760000	1.68	9.58	2.44	RRR	
chr5	79460001	79490000	30000	chr5_79460001_79490000	3.94	21.82	2.44	FRR	
chr14	74020001	74040000	20000	chr14_74020001_74040000	1.31	7.49	2.43	PRR	40
chr4	270001	300000	30000	chr4_270001_300000	1.76	9.93	2.43	FRR	
chr12	50360001	50380000	20000	chr12_50360001_50380000	1.58	8.88	2.42	RRR	
chr1	22300001	22330000	30000	chr1_22300001_22330000	1.73	9.65	2.41	RRR	
chr5	51560001	51580000	20000	chr5_51560001_51580000	5.85	31.4	2.4	RRR	
chr5	1.16E+08	1.16E+08	20000	chr5_116080001_116100000	2.86	15.57	2.4	FRR	

染色体	開始	終止	長さ	名称	発現レベル (FPKM) [#]		変化倍率 (log2) [8-細胞期/4-細胞期]	分類
					4-細胞期	8-細胞期		
chr19	5830001	5860000	30000	chr19_5830001_5860000	3.34	18	2.4	PRR
chr14	19640001	19660000	20000	chr14_19640001_19660000	0.89	5.11	2.4	PRR
chr7	64120001	64140000	20000	chr7_64120001_64140000	1.2	6.75	2.4	FRR
chr17	80320001	80340000	20000	chr17_80320001_80340000	7.21	38.56	2.4	PRR
chr2	64170001	64190000	20000	chr2_64170001_64190000	1.02	5.76	2.39	RRR
chr10	15190001	15210000	20000	chr10_15190001_15210000	1.67	9.15	2.39	PRR
chr3	78620001	78640000	20000	chr3_78620001_78640000	1.56	8.45	2.36	PRR
chr13	49790001	49810000	20000	chr13_49790001_49810000	1.82	9.79	2.36	FRR
chr18	44410001	44430000	20000	chr18_44410001_44430000	3.19	16.5	2.34	FRR
chr10	35680001	35700000	20000	chr10_35680001_35700000	0.94	5.12	2.33	RRR

[#] : RNA-seqのデータセットを、Xue et al., 2013から得た。

【 0 4 5 8 】

(表 6) ヒトリプログラミング耐性領域 (RRR) からの転写物の発現レベル (図1に關係)

染色体	開始	終止	長さ	名称	発現レベル (FPKM)			変化倍率 (log2) [IVF 8-細胞期 / SCNT 8-細胞期]
					ドナー	IVF 8-細胞期	SCNT 8-細胞期	
chr5	62880001	62930000	50000	chr5_62880001_62930000	0	64.75	0	9.34
chr14	83550001	83580000	30000	chr14_83550001_83580000	0	115.27	0.08	9.32
chr4	99870001	99910000	40000	chr4_99870001_99910000	0	47.35	0	8.89
chr4	135920001	135950000	30000	chr4_135920001_135950000	0	41.27	0	8.69
chr14	83600001	83630000	30000	chr14_83600001_83630000	0	54.44	0.04	8.61
chr14	47110001	47140000	30000	chr14_47110001_47140000	0.04	89.8	0.15	8.49
chrX	147050001	147120000	70000	chrX_147050001_147120000	0	73.22	0.12	8.38
chr13	51270001	51300000	30000	chr13_51270001_51300000	0.92	77.18	0.15	8.27
chr4	46720001	46750000	30000	chr4_46720001_46750000	0.21	50.64	0.08	8.14
chr10	61480001	61530000	50000	chr10_61480001_61530000	0.13	123.03	0.35	8.1
chr1	192810001	192850000	40000	chr1_192810001_192850000	0.04	54.36	0.15	7.77
chr5	51560001	51580000	20000	chr5_51560001_51580000	0	26.06	0.04	7.55
chr6	127490001	127510000	20000	chr6_127490001_127510000	0	17.32	0	7.44
chr16	3050001	3070000	20000	chr16_3050001_3070000	0.21	331.71	2.08	7.25
chrX	30220001	30280000	60000	chrX_30220001_30280000	0	102.22	0.62	7.15

染色体	開始	終止	長さ	名称	発現レベル (FPKM)			変化 倍率 (log2)
					ドナー	IVF 8- 細胞期	SCNT 8- 細胞期	[IVF 8-細胞 期 / SCNT 8-細胞期]
chr6	112820001	112840000	20000	chr6_112820001_112840000	0	13.95	0	7.13
chr16	51780001	51800000	20000	chr16_51780001_51800000	0	24.69	0.08	7.11
chr13	32570001	32590000	20000	chr13_32570001_32590000	0	11.56	0	6.87
chr6	117060001	117090000	30000	chr6_117060001_117090000	0.17	43.23	0.27	6.87
chrX	151790001	151950000	160000	chrX_151790001_151950000	0.33	393.05	3.35	6.83
chr12	91200001	91230000	30000	chr12_91200001_91230000	0	11.09	0	6.81
chr3	121270001	121320000	50000	chr3_121270001_121320000	0.67	534.82	5.36	6.61
chr12	86090001	86120000	30000	chr12_86090001_86120000	0	9.56	0	6.59
chrX	37880001	37920000	40000	chrX_37880001_37920000	0.08	16.85	0.08	6.56
chr6	76130001	76160000	30000	chr6_76130001_76160000	0.04	13.13	0.04	6.56
chr6	115300001	115340000	40000	chr6_115300001_115340000	0.04	198.41	2.12	6.48
chr8	83340001	83370000	30000	chr8_83340001_83370000	0	12.23	0.04	6.46
chr9	75470001	75500000	30000	chr9_75470001_75500000	0.04	11.88	0.04	6.42
chr11	10420001	10450000	30000	chr11_10420001_10450000	0.04	168.7	1.93	6.38
chr18	6770001	6800000	30000	chr18_6770001_6800000	0	14.85	0.08	6.38
chrX	55100001	55120000	20000	chrX_55100001_55120000	0	49.97	0.5	6.38
chr17	48340001	48370000	30000	chr17_48340001_48370000	1.25	128.29	1.46	6.36
chr6	78290001	78310000	20000	chr6_78290001_78310000	0	8.07	0	6.35
chrX	151080001	151110000	30000	chrX_151080001_151110000	0	93.21	1.04	6.35
chr10	61400001	61430000	30000	chr10_61400001_61430000	0.04	7.6	0	6.27
chr6	26500001	26520000	20000	chr6_26500001_26520000	0	7.45	0	6.24
chr11	82130001	82160000	30000	chr11_82130001_82160000	0	12.46	0.08	6.12
chrX	8740001	8780000	40000	chrX_8740001_8780000	0	40.37	0.5	6.08
chr5	53680001	53730000	50000	chr5_53680001_53730000	0.04	21.91	0.23	6.06
chr13	34490001	34520000	30000	chr13_34490001_34520000	0.08	6.43	0	6.03
chr1	195680001	195710000	30000	chr1_195680001_195710000	0	14.58	0.15	5.88
chr19	54120001	54160000	40000	chr19_54120001_54160000	0.08	190.45	3.24	5.83
chr13	34530001	34560000	30000	chr13_34530001_34560000	1.29	22.89	0.31	5.81
chr13	43600001	43630000	30000	chr13_43600001_43630000	0.04	34.41	0.54	5.75
chr4	37010001	37040000	30000	chr4_37010001_37040000	0	5.02	0	5.68
chr17	34310001	34340000	30000	chr17_34310001_34340000	0.21	28.65	0.5	5.58
chr12	49140001	49160000	20000	chr12_49140001_49160000	0	23.48	0.5	5.3
chr2	53200001	53230000	30000	chr2_53200001_53230000	0	13.95	0.27	5.25
chr13	56030001	56060000	30000	chr13_56030001_56060000	0.04	16.93	0.35	5.24
chr5	150670001	150760000	90000	chr5_150670001_150760000	0.5	197.7	5.17	5.23
chr13	84640001	84670000	30000	chr13_84640001_84670000	0	19.09	0.42	5.21

10

20

30

40

染色体	開始	終止	長さ	名称	発現レベル (FPKM)			変化 倍率 (log2)
					ドナー	IVF 8- 細胞期	SCNT 8- 細胞期	[IVF 8-細胞 期 / SCNT 8-細胞期]
chr7	63460001	63490000	30000	chr7_63460001_63490000	0.13	61.26	1.62	5.16
chr17	4670001	4690000	20000	chr17_4670001_4690000	0.08	41.39	1.08	5.14
chr3	25880001	25910000	30000	chr3_25880001_25910000	0	41.94	1.12	5.11
chr10	89190001	89220000	30000	chr10_89190001_89220000	0.92	16.66	0.39	5.1
chr12	14660001	14700000	40000	chr12_14660001_14700000	0.33	8.27	0.15	5.07
chr16	8150001	8180000	30000	chr16_8150001_8180000	0	12.31	0.27	5.07
chrX	47970001	47990000	20000	chrX_47970001_47990000	0	16.62	0.42	5.01
chr2	132710001	132740000	30000	chr2_132710001_132740000	0	14.19	0.35	4.99
chr19	23840001	23880000	40000	chr19_23840001_23880000	1.38	57.58	1.73	4.98
chr12	53500001	53530000	30000	chr12_53500001_53530000	1.13	71.33	2.31	4.89
chr7	100890001	100910000	20000	chr7_100890001_100910000	1.75	25.32	0.77	4.87
chr17	37150001	37180000	30000	chr17_37150001_37180000	0	37.39	1.19	4.86
chr1	160940001	160990000	50000	chr1_160940001_160990000	0.71	469.63	16.19	4.85
chr7	16750001	16770000	20000	chr7_16750001_16770000	0.04	7.02	0.15	4.83
chr14	45350001	45370000	20000	chr14_45350001_45370000	0.42	6.94	0.15	4.82
chr14	102130001	102160000	30000	chr14_102130001_102160000	1.96	14.03	0.42	4.76
chr17	66260001	66280000	20000	chr17_66260001_66280000	0.33	113.39	4.16	4.74
chr5	19020001	19050000	30000	chr5_19020001_19050000	0	19.99	0.69	4.67
chr17	37430001	37460000	30000	chr17_37430001_37460000	0.67	38.18	1.43	4.64
chr19	22460001	22520000	60000	chr19_22460001_22520000	0.04	111.59	4.39	4.64
chrX	119200001	119230000	30000	chrX_119200001_119230000	0.08	204.64	8.1	4.64
chr6	5120001	5150000	30000	chr6_5120001_5150000	0.04	11.76	0.39	4.6
chrX	69890001	69920000	30000	chrX_69890001_69920000	0.04	14.07	0.5	4.56
chr9	3950001	3980000	30000	chr9_3950001_3980000	1.04	15.64	0.58	4.53
chr11	77560001	77580000	20000	chr11_77560001_77580000	0.42	5.49	0.15	4.48
chr6	30470001	30500000	30000	chr6_30470001_30500000	0.46	24.18	1	4.46
chr9	90700001	90740000	40000	chr9_90700001_90740000	0	47.78	2.08	4.46
chr16	30210001	30230000	20000	chr16_30210001_30230000	1.25	31.43	1.35	4.44
chr17	44310001	44350000	40000	chr17_44310001_44350000	0	24.22	1.04	4.42
chr7	7750001	7780000	30000	chr7_7750001_7780000	0.88	15.91	0.69	4.34
chr19	20400001	20430000	30000	chr19_20400001_20430000	0.04	30.81	1.43	4.34
chr16	29470001	29490000	20000	chr16_29470001_29490000	1.29	30.61	1.46	4.3
chr16	61220001	61250000	30000	chr16_61220001_61250000	0	5.6	0.19	4.3
chr19	51490001	51540000	50000	chr19_51490001_51540000	0.67	160.7	8.1	4.29
chr5	109250001	109280000	30000	chr5_109250001_109280000	0	7.88	0.31	4.28
chr16	70250001	70270000	20000	chr16_70250001_70270000	1	107.08	5.44	4.27

10

20

30

40

染色体	開始	終止	長さ	名称	発現レベル (FPKM)			変化 倍率 (log2)
					ドナー	IVF 8- 細胞期	SCNT 8- 細胞期	[IVF 8-細胞 期 / SCNT 8-細胞期]
chr2	64170001	64190000	20000	chr2_64170001_64190000	1.46	51.78	2.62	4.25
chr13	19750001	19770000	20000	chr13_19750001_19770000	0	10.31	0.46	4.22
chr10	81680001	81710000	30000	chr10_81680001_81710000	0.17	9.41	0.42	4.19
chr6	56750001	56770000	20000	chr6_56750001_56770000	0.38	8.82	0.39	4.19
chr10	32410001	32440000	30000	chr10_32410001_32440000	0.08	42.76	2.27	4.18
chr10	63610001	63640000	30000	chr10_63610001_63640000	0	9.29	0.42	4.17
chr4	48280001	48310000	30000	chr4_48280001_48310000	0	14.78	0.73	4.16
chrX	70970001	71000000	30000	chrX_70970001_71000000	0	35.35	1.89	4.15
chr11	18130001	18160000	30000	chr11_18130001_18160000	0.33	55.03	3.01	4.15
chr3	136580001	136600000	20000	chr3_136580001_136600000	1.17	25.4	1.35	4.14
chr1	150150001	150180000	30000	chr1_150150001_150180000	0.33	163.64	9.21	4.14
chr10	12180001	12200000	20000	chr10_12180001_12200000	1.92	21.48	1.16	4.1
chr10	66860001	66920000	60000	chr10_66860001_66920000	0.04	86.46	4.97	4.09
chr3	112170001	112210000	40000	chr3_112170001_112210000	0	32.1	1.81	4.08
chr7	57500001	57560000	60000	chr7_57500001_57560000	0.25	243.95	14.3	4.08
chr18	57850001	57880000	30000	chr18_57850001_57880000	0	5.45	0.23	4.07
chr3	126970001	127020000	50000	chr3_126970001_127020000	0.08	1099.22	65.99	4.06
chr11	31730001	31760000	30000	chr11_31730001_31760000	1	8.03	0.39	4.05
chr6	107320001	107350000	30000	chr6_107320001_107350000	0.33	44.96	2.62	4.05
chr17	29380001	29420000	40000	chr17_29380001_29420000	0.33	15.64	0.85	4.05
chr8	83390001	83450000	60000	chr8_83390001_83450000	0.75	19.36	1.08	4.04
chr1	35390001	35410000	20000	chr1_35390001_35410000	0	19.68	1.12	4.02
chr19	22350001	22390000	40000	chr19_22350001_22390000	0.17	150.74	9.29	4.01
chr18	19750001	19800000	50000	chr18_19750001_19800000	0.42	78.08	4.74	4.01
chr2	23610001	23640000	30000	chr2_23610001_23640000	0.08	9.45	0.5	3.99
chr2	10590001	10610000	20000	chr2_10590001_10610000	0.13	77.68	4.78	3.99
chr1	22300001	22330000	30000	chr1_22300001_22330000	0	32.14	1.93	3.99
chr19	1890001	1910000	20000	chr19_1890001_1910000	0.33	39.94	2.43	3.98
chr19	23430001	23470000	40000	chr19_23430001_23470000	1.84	72.28	4.55	3.96
chr7	63650001	63740000	90000	chr7_63650001_63740000	0.04	1059.4	68.19	3.96
chr19	36970001	37000000	30000	chr19_36970001_37000000	0.96	60.63	3.85	3.94
chr15	89470001	89500000	30000	chr15_89470001_89500000	0	10.9	0.62	3.93
chr15	63390001	63410000	20000	chr15_63390001_63410000	0.04	7.37	0.39	3.93
chr11	64650001	64680000	30000	chr11_64650001_64680000	1.54	10.74	0.62	3.91
chrX	47260001	47290000	30000	chrX_47260001_47290000	0	19.87	1.27	3.87
chr8	81440001	81460000	20000	chr8_81440001_81460000	0.21	10.7	0.66	3.83

10

20

30

40

染色体	開始	終止	長さ	名称	発現レベル (FPKM)			変化 倍率 (log2)
					ドナー	IVF 8- 細胞期	SCNT 8- 細胞期	[IVF 8-細胞 期 /SCNT 8-細胞期]
chr19	23130001	23180000	50000	chr19_23130001_23180000	0.04	246.42	17.23	3.83
chr19	11840001	11860000	20000	chr19_11840001_11860000	0.17	19.48	1.31	3.8
chr19	54250001	54270000	20000	chr19_54250001_54270000	0	6.15	0.35	3.8
chrX	37290001	37310000	20000	chrX_37290001_37310000	0.67	6.55	0.39	3.76
chr7	75000001	75030000	30000	chr7_75000001_75030000	1.54	13.8	0.93	3.75
chr9	78920001	78980000	60000	chr9_78920001_78980000	0.13	28.65	2.04	3.75
chr10	116540001	116560000	20000	chr10_116540001_116560000	0.04	7.41	0.46	3.75
chr15	75440001	75470000	30000	chr15_75440001_75470000	0.04	13.09	0.89	3.74
chr14	19600001	19620000	20000	chr14_19600001_19620000	0	58.64	4.36	3.72
chr12	49680001	49710000	30000	chr12_49680001_49710000	0.08	64.28	4.82	3.71
chr19	21610001	21660000	50000	chr19_21610001_21660000	0.04	137.34	10.45	3.7
chr1	162390001	162420000	30000	chr1_162390001_162420000	0	22.77	1.66	3.7
chr1	146940001	147000000	60000	chr1_146940001_147000000	0	140.24	10.95	3.67
chr12	68810001	68840000	30000	chr12_68810001_68840000	0.08	9.6	0.66	3.67
chr15	23500001	23530000	30000	chr15_23500001_23530000	0.04	8.58	0.58	3.67
chr12	69620001	69640000	20000	chr12_69620001_69640000	1.13	24.18	1.81	3.67
chr2	8110001	8130000	20000	chr2_8110001_8130000	0	8	0.54	3.66
chr14	19970001	20000000	30000	chr14_19970001_20000000	1.84	100.54	7.86	3.66
chr19	22560001	22580000	20000	chr19_22560001_22580000	0.33	21.95	1.66	3.65
chr16	9060001	9090000	30000	chr16_9060001_9090000	0.08	43.35	3.35	3.65
chr19	58730001	58750000	20000	chr19_58730001_58750000	1.79	20.46	1.58	3.61
chr19	18110001	18140000	30000	chr19_18110001_18140000	0.92	24.65	1.93	3.61
chr8	59570001	59590000	20000	chr8_59570001_59590000	0.17	10.27	0.77	3.58
chr1	40990001	41010000	20000	chr1_40990001_41010000	1.96	32.57	2.66	3.57
chr7	63820001	63860000	40000	chr7_63820001_63860000	0.46	28.34	2.31	3.56
chr19	23010001	23070000	60000	chr19_23010001_23070000	0	208.24	17.54	3.56
chr10	28960001	28990000	30000	chr10_28960001_28990000	0.38	30.38	2.51	3.55
chr1	13310001	13380000	70000	chr1_13310001_13380000	0	262.76	22.59	3.53
chr2	178520001	178550000	30000	chr2_178520001_178550000	0	9.52	0.73	3.53
chr2	36830001	36850000	20000	chr2_36830001_36850000	0	13.91	1.12	3.52
chr13	52620001	52650000	30000	chr13_52620001_52650000	0.46	52.48	4.47	3.52
chr3	136440001	136470000	30000	chr3_136440001_136470000	0.29	24.89	2.08	3.52
chr17	66000001	66030000	30000	chr17_66000001_66030000	0	17.29	1.43	3.51
chrX	40680001	40710000	30000	chrX_40680001_40710000	0.08	8.58	0.66	3.51
chr2	172760001	172780000	20000	chr2_172760001_172780000	0.71	44.92	3.85	3.51
chr19	57040001	57060000	20000	chr19_57040001_57060000	1.54	12.31	1	3.5

10

20

30

40

染色体	開始	終止	長さ	名称	発現レベル (FPKM)			変化 倍率 (log2)
					ドナー	IVF 8- 細胞期	SCNT 8- 細胞期	[IVF 8-細胞 期 / SCNT 8-細胞期]
chr1	113420001	113450000	30000	chr1_113420001_113450000	0.04	55.5	4.82	3.5
chr7	5970001	5990000	20000	chr7_5970001_5990000	0.04	32.1	2.74	3.5
chr10	12050001	12070000	20000	chr10_12050001_12070000	1.17	7.02	0.54	3.48
chr1	13460001	13540000	80000	chr1_13460001_13540000	0	286.71	25.67	3.48
chr17	1120001	1150000	30000	chr17_1120001_1150000	0	36.22	3.16	3.48
chr19	22140001	22210000	70000	chr19_22140001_22210000	0.46	129.27	11.56	3.47
chr19	58600001	58630000	30000	chr19_58600001_58630000	0.46	23.63	2.04	3.47
chrX	152940001	152960000	20000	chrX_152940001_152960000	1.25	6.98	0.54	3.47
chr14	29290001	29320000	30000	chr14_29290001_29320000	0	17.64	1.5	3.47
chr6	118870001	118900000	30000	chr6_118870001_118900000	1.96	40.88	3.62	3.46
chr12	40470001	40500000	30000	chr12_40470001_40500000	0.13	5.25	0.39	3.45
chr13	41610001	41630000	20000	chr13_41610001_41630000	0.42	7.33	0.58	3.45
chr19	21370001	21390000	20000	chr19_21370001_21390000	0.71	6.39	0.5	3.44
chr3	141230001	141260000	30000	chr3_141230001_141260000	0.21	81.8	7.44	3.44
chr12	38550001	38580000	30000	chr12_38550001_38580000	0	6.78	0.54	3.43
chr18	8750001	8780000	30000	chr18_8750001_8780000	0.71	12.15	1.04	3.43
chr1	146870001	146900000	30000	chr1_146870001_146900000	0	8.31	0.69	3.41
chr17	19710001	19740000	30000	chr17_19710001_19740000	0.17	31.94	2.93	3.4
chrX	109090001	109120000	30000	chrX_109090001_109120000	0	35.59	3.28	3.4
chrX	148690001	148710000	20000	chrX_148690001_148710000	0.46	10.78	0.96	3.36
chr2	54470001	54500000	30000	chr2_54470001_54500000	0	7.21	0.62	3.34
chr12	14420001	14450000	30000	chr12_14420001_14450000	0	30.3	2.93	3.33
chr19	48350001	48390000	40000	chr19_48350001_48390000	0.13	224.47	22.2	3.33
chrX	70920001	70940000	20000	chrX_70920001_70940000	0.08	28.85	2.78	3.33
chr1	13680001	13760000	80000	chr1_13680001_13760000	0.08	278.28	27.99	3.31
chr2	178690001	178720000	30000	chr2_178690001_178720000	0	29.71	2.93	3.3
chr12	85780001	85840000	60000	chr12_85780001_85840000	0.17	50.99	5.13	3.29
chr7	129260001	129290000	30000	chr7_129260001_129290000	0.75	42.02	4.2	3.29
chr19	23550001	23600000	50000	chr19_23550001_23600000	0.96	70.32	7.21	3.27
chr5	81430001	81450000	20000	chr5_81430001_81450000	0.13	6.04	0.54	3.26
chr1	65600001	65630000	30000	chr1_65600001_65630000	0.96	32.73	3.35	3.25
chrX	8990001	9010000	20000	chrX_8990001_9010000	0	6	0.54	3.25
chr18	76860001	76890000	30000	chr18_76860001_76890000	0.88	19.36	1.97	3.23
chr11	20580001	20610000	30000	chr11_20580001_20610000	0.04	142.12	15.07	3.23
chr3	155770001	155790000	20000	chr3_155770001_155790000	0	22.42	2.31	3.22
chr6	15180001	15210000	30000	chr6_15180001_15210000	0	5.88	0.54	3.22

10

20

30

40

染色体	開始	終止	長さ	名称	発現レベル (FPKM)			変化 倍率 (log2)
					ドナー	IVF 8- 細胞期	SCNT 8- 細胞期	[IVF 8-細胞 期 /SCNT 8-細胞期]
chr1	90440001	90470000	30000	chr1_90440001_90470000	1.21	32.1	3.39	3.21
chr6	74270001	74300000	30000	chr6_74270001_74300000	0.21	36.02	3.85	3.19
chr6	32320001	32360000	40000	chr6_32320001_32360000	0.17	20.42	2.16	3.18
chr1	182690001	182730000	40000	chr1_182690001_182730000	0.04	13.88	1.5	3.13
chr7	62740001	62770000	30000	chr7_62740001_62770000	0	58.91	6.63	3.13
chr7	64390001	64410000	20000	chr7_64390001_64410000	1.17	21.32	2.35	3.13
chr17	20850001	20900000	50000	chr17_20850001_20900000	0	7.49	0.77	3.13
chr11	107680001	107700000	20000	chr11_107680001_107700000	1.88	14.5	1.58	3.12
chr1	92440001	92540000	1.00E+05	chr1_92440001_92540000	0.08	527.68	60.87	3.11
chr2	96100001	96140000	40000	chr2_96100001_96140000	1.34	194.25	22.74	3.09
chr12	10090001	10120000	30000	chr12_10090001_10120000	1.38	7.29	0.77	3.09
chr1	46470001	46490000	20000	chr1_46470001_46490000	1.84	7.33	0.77	3.09
chr1	28610001	28650000	40000	chr1_28610001_28650000	0	57.46	6.71	3.08
chr19	40210001	40240000	30000	chr19_40210001_40240000	0	17.72	2.04	3.06
chr2	96270001	96310000	40000	chr2_96270001_96310000	1.67	205.89	24.59	3.06
chr16	48420001	48440000	20000	chr16_48420001_48440000	0	45.11	5.32	3.06
chr9	99800001	99820000	20000	chr9_99800001_99820000	0.04	72.39	8.6	3.06
chr19	6520001	6550000	30000	chr19_6520001_6550000	0.21	11.68	1.31	3.06
chr6	118810001	118860000	50000	chr6_118810001_118860000	1.25	37.43	4.43	3.05
chr2	140190001	140240000	50000	chr2_140190001_140240000	0	5.88	0.62	3.05
chr7	139650001	139670000	20000	chr7_139650001_139670000	0	7.96	0.89	3.03
chr14	20070001	20100000	30000	chr14_20070001_20100000	0	8.47	0.96	3.02
chr19	12100001	12120000	20000	chr19_12100001_12120000	1.92	18.07	2.16	3.01
chrX	52770001	52810000	40000	chrX_52770001_52810000	0	25.71	3.12	3
chr1	21700001	21730000	30000	chr1_21700001_21730000	0	9.92	1.16	2.99
chr10	15230001	15250000	20000	chr10_15230001_15250000	0	7.45	0.85	2.99
chrX	48240001	48280000	40000	chrX_48240001_48280000	0	37.74	4.7	2.98
chr19	22000001	22040000	40000	chr19_22000001_22040000	1.84	36.06	4.51	2.97
chr16	18920001	18950000	30000	chr16_18920001_18950000	0.21	12.93	1.58	2.96
chr7	64360001	64380000	20000	chr7_64360001_64380000	0.96	20.22	2.54	2.94
chr10	35680001	35700000	20000	chr10_35680001_35700000	0.17	8.66	1.04	2.94
chr12	50360001	50380000	20000	chr12_50360001_50380000	0.33	8.9	1.08	2.93
chrX	52710001	52740000	30000	chrX_52710001_52740000	0	23.75	3.08	2.91
chr14	103810001	103830000	20000	chr14_103810001_103830000	0.96	9.09	1.12	2.91
chr1	12980001	13070000	90000	chr1_12980001_13070000	0.17	191.19	25.52	2.9
chr14	100710001	100740000	30000	chr14_100710001_100740000	1.5	8.98	1.12	2.9

10

20

30

40

染色体	開始	終止	長さ	名称	発現レベル (FPKM)			変化 倍率 (log2)
					ドナー	IVF 8- 細胞期	SCNT 8- 細胞期	[IVF 8-細胞 期 / SCNT 8-細胞期]
chr7	142750001	142780000	30000	chr7_142750001_142780000	0	9.29	1.16	2.9
chr10	81510001	81540000	30000	chr10_81510001_81540000	0.71	9.56	1.19	2.9
chrX	134510001	134530000	20000	chrX_134510001_134530000	0.04	13.44	1.73	2.89
chr9	6780001	6830000	50000	chr9_6780001_6830000	1.88	51.66	6.86	2.89
chr10	94060001	94090000	30000	chr10_94060001_94090000	1.21	7.45	0.93	2.87
chr7	64820001	64860000	40000	chr7_64820001_64860000	1.29	54.48	7.36	2.87
chr14	106730001	106760000	30000	chr14_106730001_106760000	0	5.64	0.69	2.86
chr14	103210001	103240000	30000	chr14_103210001_103240000	0.13	5.64	0.69	2.86
chr17	37480001	37530000	50000	chr17_37480001_37530000	0.17	33.08	4.47	2.86
chr17	75760001	75790000	30000	chr17_75760001_75790000	0	8.47	1.08	2.86
chr5	82370001	82390000	20000	chr5_82370001_82390000	0.38	12.31	1.62	2.85
chr16	87510001	87540000	30000	chr16_87510001_87540000	0.67	9.09	1.19	2.83
chrX	99650001	99670000	20000	chrX_99650001_99670000	0.13	5.25	0.66	2.82
chr7	63910001	63960000	50000	chr7_63910001_63960000	0.17	21.6	2.97	2.82
chr4	180001	240000	60000	chr4_180001_240000	1.17	39.16	5.47	2.82
chr1	13620001	13660000	40000	chr1_13620001_13660000	0.04	154.62	21.74	2.82
chr13	52140001	52180000	40000	chr13_52140001_52180000	1.71	32.45	4.55	2.81
chr18	11860001	11880000	20000	chr18_11860001_11880000	0.29	6.86	0.89	2.81
chr3	109000001	109060000	60000	chr3_109000001_109060000	0.58	142.87	20.51	2.79
chr19	48770001	48810000	40000	chr19_48770001_48810000	0.58	14.46	2	2.79
chr16	87380001	87430000	50000	chr16_87380001_87430000	1.54	35.08	5.09	2.76
chr19	48290001	48320000	30000	chr19_48290001_48320000	0.08	231.68	34.27	2.75
chr6	32490001	32520000	30000	chr6_32490001_32520000	0	22.22	3.24	2.74
chr11	62110001	62140000	30000	chr11_62110001_62140000	0.21	12.62	1.81	2.74
chr11	82320001	82360000	40000	chr11_82320001_82360000	0	14.27	2.08	2.72
chr12	1870001	1890000	20000	chr12_1870001_1890000	1.84	16.31	2.39	2.72
chr1	13090001	13160000	70000	chr1_13090001_13160000	0	167.01	25.48	2.71
chr1	44570001	44620000	50000	chr1_44570001_44620000	1.59	279.07	42.94	2.7
chr7	91770001	91790000	20000	chr7_91770001_91790000	0.04	28.97	4.36	2.7
chr8	53610001	53640000	30000	chr8_53610001_53640000	0.5	28.1	4.28	2.69
chr10	99080001	99110000	30000	chr10_99080001_99110000	0.79	63.57	9.75	2.69
chr5	32190001	32220000	30000	chr5_32190001_32220000	0	6.66	0.96	2.67
chr7	64020001	64090000	70000	chr7_64020001_64090000	0.71	43.23	6.71	2.67
chr15	75780001	75800000	20000	chr15_75780001_75800000	1.42	6.9	1	2.67
chr1	13400001	13440000	40000	chr1_13400001_13440000	0	150.63	23.67	2.66
chr7	72680001	72710000	30000	chr7_72680001_72710000	1.34	14.19	2.16	2.66

10

20

30

40

染色体	開始	終止	長さ	名称	発現レベル (FPKM)			変化 倍率 (log2)
					ドナー	IVF 8- 細胞期	SCNT 8- 細胞期	[IVF 8-細胞 期 / SCNT 8-細胞期]
chr7	77150001	77170000	20000	chr7_77150001_77170000	0.54	11.44	1.73	2.66
chr19	41130001	41160000	30000	chr19_41130001_41160000	0.92	8.27	1.23	2.65
chrX	54340001	54380000	40000	chrX_54340001_54380000	0.25	50.72	8.02	2.65
chr15	20830001	20890000	60000	chr15_20830001_20890000	0.08	280.09	44.6	2.65
chr12	3260001	3280000	20000	chr12_3260001_3280000	0	5.72	0.85	2.62
chr4	15200001	15230000	30000	chr4_15200001_15230000	0	17.25	2.74	2.61
chr10	88840001	88860000	20000	chr10_88840001_88860000	1.34	6.35	0.96	2.61
chr19	57630001	57690000	60000	chr19_57630001_57690000	0.54	2323.72	382.66	2.6
chr10	93520001	93560000	40000	chr10_93520001_93560000	0.42	41	6.75	2.58
chr14	71370001	71390000	20000	chr14_71370001_71390000	0.42	15.87	2.58	2.58
chrX	4450001	4470000	20000	chrX_4450001_4470000	0.04	9.01	1.43	2.57
chr14	20790001	20810000	20000	chr14_20790001_20810000	1.38	23.4	3.85	2.57
chr1	6590001	6640000	50000	chr1_6590001_6640000	1.92	49.19	8.25	2.56
chr17	19680001	19700000	20000	chr17_19680001_19700000	1.34	29.47	4.9	2.56
chr9	123240001	123260000	20000	chr9_123240001_123260000	1.5	6.35	1	2.55
chr14	106310001	106340000	30000	chr14_106310001_106340000	0	7.45	1.19	2.55
chr7	7700001	7730000	30000	chr7_7700001_7730000	1.42	13.05	2.16	2.54
chr3	75540001	75560000	20000	chr3_75540001_75560000	0	15.4	2.58	2.53
chr17	57560001	57590000	30000	chr17_57560001_57590000	0.04	7.37	1.19	2.53
chr4	63290001	63320000	30000	chr4_63290001_63320000	0	5.96	0.96	2.52
chr19	56690001	56720000	30000	chr19_56690001_56720000	0.38	868.21	150.99	2.52
chr17	47070001	47090000	20000	chr17_47070001_47090000	0.79	8.86	1.46	2.52
chr16	22300001	22320000	20000	chr16_22300001_22320000	0.42	7.72	1.27	2.51
chr15	41330001	41350000	20000	chr15_41330001_41350000	1.54	5.29	0.85	2.5
chr6	105520001	105540000	20000	chr6_105520001_105540000	0.04	18.58	3.2	2.5
chr2	156810001	156840000	30000	chr2_156810001_156840000	0	5.02	0.81	2.49
chr2	98240001	98260000	20000	chr2_98240001_98260000	0	92.07	16.27	2.49
chrX	80050001	80080000	30000	chrX_80050001_80080000	0.46	11.01	1.89	2.48
chr5	40790001	40810000	20000	chr5_40790001_40810000	0.5	10.35	1.77	2.48
chr11	89800001	89840000	40000	chr11_89800001_89840000	0.04	303.37	55.16	2.46
chr8	126430001	126470000	40000	chr8_126430001_126470000	0.96	9.17	1.58	2.46
chrX	48120001	48140000	20000	chrX_48120001_48140000	0	12.93	2.27	2.46
chr11	82650001	82680000	30000	chr11_82650001_82680000	0.21	8.66	1.5	2.45
chr7	57170001	57210000	40000	chr7_57170001_57210000	0	47.27	8.6	2.44
chr6	86360001	86380000	20000	chr6_86360001_86380000	0.71	22.18	4.01	2.44
chr6	34750001	34770000	20000	chr6_34750001_34770000	0.08	5.84	1	2.43

10

20

30

40

染色体	開始	終止	長さ	名称	発現レベル (FPKM)			変化倍率 (log2)
					ドナー	IVF 8-細胞期	SCNT 8-細胞期	[IVF 8-細胞期 / SCNT 8-細胞期]
chr4	140040001	140070000	30000	chr4_140040001_140070000	0.96	28.46	5.24	2.42
chr16	46740001	46760000	20000	chr16_46740001_46760000	0.29	21.52	4.01	2.4
chr7	57570001	57610000	40000	chr7_57570001_57610000	0.04	20.62	3.85	2.39
chr12	46360001	46380000	20000	chr12_46360001_46380000	1.29	26.06	4.93	2.38
chr5	64780001	64800000	20000	chr5_64780001_64800000	0.71	13.68	2.54	2.38
chr17	19520001	19550000	30000	chr17_19520001_19550000	0	6.27	1.12	2.38
chr4	128870001	128900000	30000	chr4_128870001_128900000	1.59	9.21	1.7	2.37
chr1	115330001	115350000	20000	chr1_115330001_115350000	0	11.99	2.24	2.37
chr7	26300001	26330000	30000	chr7_26300001_26330000	0	35.31	6.75	2.37
chr2	132220001	132240000	20000	chr2_132220001_132240000	0.96	13.56	2.54	2.37
chr3	5140001	5180000	40000	chr3_5140001_5180000	1.96	50.17	9.68	2.36
chr19	58060001	58080000	20000	chr19_58060001_58080000	0.67	12.62	2.39	2.35
chr19	20650001	20670000	20000	chr19_20650001_20670000	0	10.31	1.97	2.33
chr10	96250001	96280000	30000	chr10_96250001_96280000	0.42	9.09	1.73	2.33
chr3	138710001	138780000	70000	chr3_138710001_138780000	0.17	9.92	1.89	2.33

10

20

30

40

50

【0459】

RRRのヘテロクロマチンの特徴はヒト体細胞において保存されている

本発明者らは、次に、ヒトRRRがマウスRRRに似たヘテロクロマチンの特徴を有するかどうかを評価した。ヒト線維芽細胞からの8つの主要なヒストン修飾の公的に入手可能なChIP-seqデータセットの解析 (Bernstein et al., 2012; The Encode Consortium Project, 2011) により、ヒトRRRにおけるH3K9me3の特異的な濃縮が明らかになった (図1Dおよび5A)。同様の濃縮はFRRまたはPRRからは観察されなかったため、H3K9me3の濃縮はRRRに独特であった (図1Dおよび5A)。同様の解析により、K562赤白血球細胞、Hsmm骨格筋芽細胞、およびMcf7乳癌細胞においてもRRRにH3K9me3が濃縮されていることが明らかになり (図1Eおよび5B)、これは、RRRにおけるH3K9me3の濃縮が体細胞の一般的な特徴であることを示している。

【0460】

次に、本発明者らは、ENCODEプロジェクトによって生成したデータセットを使用して4つの異なる体細胞型のDNaseI過感受性を分析した。この分析により、分析された全てのヒト体細胞型において、FRRおよびPRRと比較してRRRがDNaseIに対して有意に低い感受性であることが明らかになった (図1Fおよび5C)。それらのヘテロクロマチンの特徴と一致して、ヒトRRRは、FRRまたはPRRと比較して相対的に遺伝子に乏しく (図5D)、SINEではなくLINEおよびLTRのような特異的リピート配列が濃縮されている (図5E)。まとめると、これらの結果から、RRRのヘテロクロマチン特徴、すなわちH3K9me3の濃縮およびDNaseIの低い利用可能性が、マウスおよびヒト体細胞の両方において保存されていることが示される。

【0461】

実施例2

ヒトKDM4A mRNAの注射はマウスSCNT胚の発生を改善する

ヒトRRRにH3K9me3が濃縮されていることが証明されたため、本発明者らは、次に、H3K9me3の除去がヒトSCNT胚におけるリプログラミングバリアを乗り越えることを助けることができるかどうかを評価した。本発明者らは、以前に、マウスSCNTモデルを使用して、マウスH3K9me3デメチラーゼKDM4dをコードするmRNAを注射することによってH3K9me3バリア

を除去することができたことを実証した (Matoba et al., 2014)。ヒトSCNTモデルに移る前に、H3K9me3デメチラーゼ活性を有するKDM4ファミリーの複数のメンバーがマウスおよびヒトにおいて存在することを考慮して (Klose et al., 2006; Krishnan and Trievel, 2013; Whetstine et al., 2006)、本発明者らは、SCNTリプログラミングの促進にKDM4Dを使用する代わりに、KDM4AなどのKDM4ファミリーの他のメンバーを使用することができるかどうかを評価した。加えて、本発明者らは、KDM4ファミリーのメンバーが種を越えて機能することもできるかどうかを評価した。

【0462】

この目的のために、本発明者らは、成体雌性マウスの卵丘細胞を核ドナーとして使用するSCNTを行い、本発明者らの以前の研究で使したものと同じ手順に従って活性化の5時間後 (hpa) にヒトKDM4A mRNAを注射した (図2A) (Matoba et al., 2014)。免疫染色により、触媒変異体ではなく野生型のヒトKDM4A mRNAの注射が、マウスSCNT胚の核におけるH3K9me3レベルを大きく低下させたことが明らかになった (図1B)。重要なことには、KDM4A mRNAの注射は、SCNT胚の発生能を大きく増加させ、その90.3%が胚盤胞期に発生し、これは、対照における胚盤胞形成率26%と対照的である (図2Cおよび2D、表3)。胚盤胞形成の極めて高い効率、KDM4dを注射されたマウスSCNT胚において観察された88.6%と類似している (Matoba et al., 2014)。これらの結果により、驚くことに、KDM4ファミリーデメチラーゼの任意のメンバーがH3K9me3デメチラーゼ活性を含む限り、それによって体細胞ゲノムにおけるリプログラミングバリアであるH3K9me3を除去することができることが実証されている。

【0463】

(表3) KDM4A介助マウスSCNT胚の着床前発生、図2に關係

ドナー 細胞型	注射された mRNA	mRNA の濃度 (ng/μl)	反復 回数	再構築され た1細胞期 胚の数	1細胞期胚	2細胞期胚	2細胞期胚	2細胞期胚
					あたりの 分割の % ± SD	あたりの 4細胞期胚の % ± SD	あたりの 桑実胚の % ± SD	あたりの 胚盤胞の % ± SD
卵丘	水		5	91	94.8 ± 2.9	45.6 ± 18.9	35.8 ± 5.6	26.0 ± 11.3
	KDM4A WT	1680	3	75	97.0 ± 5.2	96.8 ± 2.7*	92.5 ± 3.6*	90.3 ± 0.3*
	KDM4A	1930	3	74	93.7 ± 2.7	43.3 ± 7.6	35.5 ± 13.5	23.7 ± 11.6

* 水を注射した対照と比べて $P < 0.01$

【0464】

KDM4A mRNAの注射はヒトSCNT胚の胚盤胞形成率を有意に増加させる

本発明者らは、次に、KDM4A mRNAの注射が、ヒストンデアセチラーゼ阻害剤であるトリコスタチンA (TSA) の使用を含む最適化されたSCNT条件を使用するヒトSCNTにおいてリプログラミングバリアを乗り越えることを助けることができるかどうかを評価した (Tachibana et al., 2013)。KDM4A介助SCNTの将来的な臨床適用を念頭において、本発明者らは、加齢黄斑変性 (AMD) 患者の皮膚線維芽細胞を核ドナーとして使用した (Bressler et al., 1988)。

【0465】

ヒトSCNTに及ぼすKDM4Aの有益な効果を再確認するために、本発明者らは、通常のIVF手順を用いた事前の過去の試みで卵母細胞が拡張胚盤胞に発生できなかった卵母細胞ドナーを選択する (Chung et al., 2014)。除核後、4人の卵母細胞ドナーから収集された合計114個のMII卵母細胞をHVJ-Eによりドナー線維芽細胞と融合させた。活性化後、再構成されたSCNT卵母細胞のうち63個にヒトKDM4A mRNAを注射し、残り (51個) を非注射対照として役立てた (図2E、表4)。本発明者らは、これらのSCNT胚の発生過程をモニタリングし、これら2つの群が2細胞期胚を形成する類似の分割効率を特徴として備えていたことを見出した (対照: $48/51=94.1\%$ 、KDM4A: $56/63=88.9\%$) (表4)。予想通り、KDM4A mRNAの注射は、8細胞期の終わりにZGAが終了する前のSCNT胚の発生率にいかなる有益効果も示さなかった (68.8% 対 71.4%) (図2Fおよび表4)。しかし、桑実胚期に有益効果が明白にな

った（16.7%対32.1%）（図2Fおよび表4）。驚くことに、6日目に、KDM4Aを注射された胚の26.8%（15/56）は、対照胚のわずか4.2%（2/48）と比較して、成功裏に胚盤胞期に達した。7日目に、KDM4Aを注射された胚の14.3%は拡張胚盤胞期に発生し、一方で対照胚はどれもこの期まで発生しなかった（図2Fおよび2G）。重要なことには、KDM4Aの有益効果は、調査された4人のドナー全てで観察された（図2H）。したがって、本発明者らは、KDM4A mRNAの注射が、特にZGAを過ぎたヒトSCNT胚の発生能を改善することができることを明確に実証している。

【0466】

（表4）KDM4A介助ヒトSCNT胚の着床前発生、図2に關係。

* 注射されたヒトKDM4A mRNAの濃度は1500ng/μlである。対照胚は注射なし。

卵母細胞 ドナー	体細胞ドナー			注射 された mRNA*	供与 された 細胞の 数	再構築 された 1細胞 期の胚 の数	分割 の数（ 1細胞期 胚あた りの %）	4細胞 期胚の 数（2 細胞期 胚あた りの%）	細胞数 （2細胞 期胚 あたり の%）	桑実胚 の数（ 2細胞期 胚あたり の%）	胚盤胞 の数（ 2細胞 期胚 あたり の%）	拡張 胚盤胞 の数（ 2細胞期 胚あた りの%）
	年齢 （歳）	ID	性別									
30	DFB-8	XY	59	-	15	15	15 (100)	12 (80)	11 (73)	4 (27)	0 (0)	0 (0)
				KDM4A	17	17	16 (94)	14 (88)	12 (75)	7 (44)	6 (38)	4 (25)
23	DFB-7	XX	42	-	13	13	13 (100)	11 (85)	10 (77)	2 (15)	2 (15)	0 (0)
				KDM4A	11	10	10 (100)	9 (90)	5 (50)	4 (40)	4 (40)	1 (10)
27	DFB-6	XX	52	-	12	12	12 (100)	12 (100)	8 (67)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
				KDM4A	14	14	13 (93)	12 (92)	10 (77)	6 (46)	4 (31)	2 (15)
23	DFB-6	XX	52	-	12	11	8 (73)	7 (88)	4 (50)	2 (25)	0 (0)	0 (0)
				KDM4A	22	22	17 (77)	15 (88)	13 (76)	1 (6)	1 (6)	1 (6)

【0467】

実施例3

KDM4Aを注射されたSCNT胚盤胞から派生したヒトESCの樹立および特徴づけ

本発明者らは、次に、KDM4Aを注射されたSCNT胚盤胞から核移入ESC（NT-ESC）を派生させた。本発明者らは、KDM4Aを注射されたSCNT胚から合計8つの拡張胚盤胞を得た（図3Aおよび表4）。透明帯の除去後、従来のESC派生培地中の照射後マウス胚性線維芽細胞（MEF）上で拡張胚盤胞を培養した。8つの胚盤胞のうち7つがMEFフィーダー細胞に付着し、成長を開始した。5回継代後、本発明者らは、4つの安定なNT-ESC株を成功裏に派生させ、それらの株をそれぞれNTK（KDM4Aによって介助されたNT）-ESC #6～9と名付けた（図3A、CH A-NT #6～9とも命名）。

【0468】

免疫染色により、OCT4、NANOG、SOX2、SSEA-4およびTRA1-60が全て、IVFによって派生した対照ヒトESC株と類似のパターンで発現していたことが明らかになった（図3B、図6Aおよび6B）。RNA-seq（図6C）により、NTK-ESCが、対照ESCと類似のレベルで多能マーカー遺伝子を発現することが明らかになった（図3C）。包括的トランスクリプトームの対比較により、NTK-ESCと対照ESCとの間の高い相関が明らかになった（図3Dおよび6D）。トランスクリプトームの階層的クラスタリング分析により、NTK-ESCが対照ESCと一緒にクラスターを形成することが明らかになった（図3E）。これらの結果は、NTK-ESCが対照ESCと分子レベルで識別不能であることを示唆している。

【0469】

本発明者らは、インビトロ分化およびインビボ奇形腫アッセイによってNTK-ESCの分化能を調査した。2週間インビトロ培養後の胚様体（EB）の免疫染色により、NTK-ESCが3つ

の胚葉細胞の全てを効率的に生み出すことができたことが明らかになった（図3Fおよび6E）。そのうえ、NTK-ESCは、移植の12週間以内に3つの胚様細胞の全てを含む奇形腫を形成した（図3Gおよび6F）。これらの結果は、NTK-ESCが多能性であることを示している。

【0470】

核型分析により、これらのNTK-ESCが正常な数の染色体を維持し、核ドナー体細胞と同じ、予想される対の性染色体を有することが実証された（NTK6/7について46、XX；NTK8について46、XY；図3HおよびS3A）。短鎖縦列反復配列（STR）分析により、ゲノム全体にわたって位置する、全部で16個の反復マーカーが、ドナー体細胞とそれらの派生細胞NTK-ESCとの間で完全なマッチを示したことが実証された（図3Iおよび7B）。ミトコンドリアDNA配列分析により、NTK-ESCの両方のSNPが卵母細胞ドナーと正確にマッチしたが、核ドナーとはマッチしなかったことが明らかになった（図3Jおよび7C）。まとめると、これらの結果は、本発明者らのSCNT方法の信頼性を立証し、KDM4A mRNAの注射が、樹立したNTK-ESCの多能性またはゲノム安定性を損なわずにSCNT介在性ESC派生を改善することを実証している。

10

【0471】

KDM4Aは、8細胞期SCNT胚におけるRRRのZGAを促進する

KDM4A mRNAの注射がZGA後のhSCNT胚の発生を有意に改善するという事実は、ドナー体細胞ゲノムにおけるH3K9me3が実際にヒトSCNT胚におけるZGAについてのバリアとして機能することを実証している。KDM4A mRNAの注射がSCNT胚におけるZGAの異常をどの程度克服することができたかを決定するために、本発明者らは、KDM4Aの注射を行ってまたは行わずに、8細胞期SCNT胚のRNA-seqを行った。比較トランスクリプトーム解析により、318個のRRRの50%（158個）が、KDM4A mRNAの注射によって顕著にアップレギュレーションされたことが示され（図4A、FC>2）、これは、H3K9me3の抹消がSCNT胚におけるZGAを少なくとも部分的に促進することができることを示している。

20

【0472】

KDM4Aを注射されたSCNT胚の発生改善の説明を助け得る候補遺伝子を特定するために、本発明者らは、特定された遺伝子の解析に焦点を当てた。KDM4Aの注射によって発現が有意にアップレギュレーション（FPKM>5、FC>2）された206個の遺伝子である（表7）。遺伝子オントロジー解析により、これらの遺伝子は、転写調節、リボソームのバイオジェネシスおよびRNAプロセッシングが豊富であったことが明らかになったが（図4B）、このことは、これらの発生学的に重要な機構の調節不全が、SCNT胚の発生停止の原因であり得ると示唆している。206個の遺伝子の大部分の着床前発生における機能は今のところ未知であるが、そのうちの2つ、UBTFL1およびTHOC5（図4C）は、マウスにおいて正常な着床前発生に必要とされることが公知である（Wang et al., 2013; Yamada et al., 2009）。したがって、これらの遺伝子の異常活性化は、ヒトSCNT胚の不十分な発生の少なくとも部分的な原因である。

30

【0473】

（表7）KDM4A応答性ZGA遺伝子の発現レベル（図4に關係）

遺伝子	発現レベル (FPKM)				変化倍率 (log2)	変化倍率 (log2)
	ドナー	IVF	対照 SCNT	KDM4A SCNT	[IVF/ 対照 SCNT]	[KDM4A SCNT/ 対照 SCNT]
ATP5J2-PTCD1	0.55	18.93	0	4.51	7.57	5.53
SPINK7	0	14.61	0.2	12.41	5.62	5.38
RNU11	0	10.02	0	3.75	6.66	5.27
DLEU7	0.15	33.73	0	2.91	8.4	4.91
M1	0	411.03	0	2.52	12.01	4.71
KPTN	3.47	71.09	0.24	6.84	7.71	4.35
FAM9A	0	25.61	0	1.32	8.01	3.83
CLC	0	31.23	0.98	13.82	4.86	3.69
CSAG1	0.11	144.65	0.14	2.22	9.24	3.27
MAGEB2	0	62.18	0	0.79	9.28	3.15
COX7B2	0.3	149.63	0	0.79	10.55	3.15
CCL2	80.96	5.94	0.65	6.1	3.01	3.05
CCL15	0	26.92	0.04	0.89	7.59	2.82
SGCG	4.03	5.12	0.07	1.03	4.94	2.73
ZNF826P	2.09	16.57	0.24	2.07	5.62	2.67
FAM19A3	0.41	16.11	0.2	1.7	5.76	2.58
PTPN22	1.63	9.07	0.11	1.15	5.45	2.57
ZNF100	2.32	50.76	0.57	3.76	6.25	2.53
SFTPD	0	5.18	0.03	0.61	5.34	2.45
PRAMEF3	0	18.13	0.2	1.48	5.93	2.4
MTERF	11.7	36.41	0.52	3.15	5.88	2.39
KITLG	28.76	35.88	0.1	0.93	7.49	2.36
LOC100289211	0	20.14	1.54	8.18	3.63	2.34
ZNF625-ZNF20	1.16	6.2	0.31	1.95	3.94	2.32
VPS54	3.9	26.91	0.7	3.79	5.08	2.28
LOC284408	1.46	46.82	0.21	1.36	7.24	2.24
VAMP1	5.82	23.55	2.7	13.05	3.08	2.23
CXorf61	0	12.63	0.11	0.85	5.92	2.18
PPP2CB	24.75	14.8	0.16	1.07	5.84	2.17
C20orf7	10.11	11.37	0.44	2.28	4.41	2.14
ZNF679	0	311.32	19.78	86.94	3.97	2.13
LOC653513	0.45	11.37	0.16	1.03	5.46	2.12
12-Sep	0	11.35	0	0.3	6.84	2
LIM2	0	14.74	0.43	2.01	4.81	1.99
FAM151A	1.19	150.04	0.18	1.01	9.07	1.99

10

20

30

40

遺伝子	発現レベル (FPKM)				変化倍率 (log2)	変化倍率 (log2)
	ドナー	IVF	対照 SCNT	KDM4A SCNT	[IVF/ 対照 SCNT]	[KDM4A SCNT/ 対照 SCNT]
BTAF1	2.79	11.71	0.31	1.46	4.85	1.93
KHDC1	3.65	244.62	22.95	85.25	3.41	1.89
ALG5	75.12	92.57	2.55	9.71	5.13	1.89
ZNF675	6.14	137.41	4.05	15.04	5.05	1.87
ZNF625	1.87	15.14	0.2	1	5.67	1.87
SNAR-C3	0	2211.75	27.24	98.14	6.34	1.85
IL13RA2	58.59	26.81	0	0.26	8.07	1.85
H3F3A	16.86	137.56	3.98	14.47	5.08	1.84
RP2	17.73	6.63	0.3	1.31	4.07	1.82
NUDT9	21.53	9.06	0.31	1.35	4.48	1.82
RPS6KB2	37.1	13.09	0.02	0.32	6.78	1.81
MAGEA12	0	36.15	0	0.25	8.5	1.81
UBTFL1	0.05	291.04	34.32	120.09	3.08	1.8
PDE4DIP	9.38	18.06	1.1	4.04	3.92	1.79
NANOGNB	0.14	224.47	8.87	30.92	4.65	1.79
C12orf60	3.01	94.51	13.42	46.22	2.81	1.78
VCX2	0	9.84	0	0.24	6.64	1.77
CNPY4	28.16	9.11	1.45	5.19	2.57	1.77
KLK11	0	146.34	2.02	7.07	6.11	1.76
ZNF729	0.01	15.68	0.21	0.94	5.67	1.75
LOC401397	200.17	80.87	3.25	11.19	4.6	1.75
ZNF486	1.78	14.55	0.76	2.77	4.09	1.74
TTC28-AS1	4.77	47.69	2.27	7.79	4.33	1.74
FBXL12	8.39	8.63	0.47	1.8	3.94	1.74
SHFM1	642.03	338.42	6.31	21.11	5.72	1.73
FAM162A	74.24	75.16	5.77	19.35	3.68	1.73
VCX	0	7.47	0	0.23	6.24	1.72
TTC27	18.22	22.84	0.1	0.56	6.84	1.72
SNAR-E	132.48	27727.6	747.8	2468.68	5.21	1.72
SNAPC1	23.13	53.15	5.33	17.7	3.29	1.71
SIAH1	4.57	569.25	27.31	88.93	4.38	1.7
PLBD1	0.06	5.02	0.16	0.74	4.3	1.69
SUZ12P	0.58	6.08	0.34	1.31	3.81	1.68
PPM1N	0.03	9.05	0.21	0.89	4.88	1.68
KLK4	0	5.38	0.37	1.41	3.54	1.68
C1D	106.39	610.21	30.49	97	4.32	1.67

10

20

30

40

遺伝子	発現レベル (FPKM)				変化倍率 (log2)	変化倍率 (log2)
	ドナー	IVF	対照 SCNT	KDM4A SCNT	[IVF/ 対照 SCNT]	[KDM4A SCNT/ 対照 SCNT]
TEN1	28.72	10.56	1.02	3.43	3.25	1.66
CLDN6	0.13	276.58	1.06	3.54	7.9	1.65
PLVAP	0	12	0.46	1.63	4.43	1.63
LOC100506668	8.5	27.33	2.77	8.79	3.26	1.63
CELA3B	0	12.68	0.09	0.49	6.07	1.63
DRAM1	12.86	11.34	0.14	0.63	5.57	1.6
MRPL28	137.28	22.89	0.45	1.56	5.39	1.59
GIP	0.69	192	4.23	12.94	5.47	1.59
ZNHIT6	7.27	10.63	1.23	3.88	3.01	1.58
PIK3R4	9.7	16.52	0.37	1.31	5.14	1.58
LOC100505854	3.44	26.67	1.53	4.77	4.04	1.58
GOLGB1	13.56	7.74	0.39	1.36	4	1.58
ZNF208	0.06	11.9	0.52	1.74	4.27	1.57
POTEM	0	9.89	0.6	1.96	3.84	1.56
BLVRB	34.36	20.53	0.65	2.11	4.78	1.56
TRIML2	0	41.08	0.55	1.8	5.99	1.55
GALM	12.76	23.12	1.19	3.67	4.17	1.55
MPV17L2	4.85	9.17	1.47	4.48	2.56	1.54
KHDC1L	1.75	16683.7	230.38	668.53	6.18	1.54
ZNF684	4.91	54.59	2.44	7.21	4.43	1.53
ZNF700	2.96	7.21	0.6	1.86	3.38	1.49
ZFYVE19	18.4	15.45	1.38	4.05	3.39	1.49
FMR1NB	0	80.4	0	0.18	9.65	1.49
CNKS3	0.73	6.07	0.04	0.29	5.46	1.48
ZNF345	1.3	11.48	0.45	1.41	4.4	1.46
THOC5	29.48	35.42	1.76	5.02	4.26	1.46
RPF2	120.62	546.39	37.07	102.42	3.88	1.46
PHOSPHO1	0	7.05	0.02	0.23	5.9	1.46
PRAMEF17	0	6.91	0.18	0.66	4.65	1.44
MED31	28.81	268.28	9.99	27.22	4.73	1.44
LOC643955	0	20.31	1.11	3.18	4.08	1.44
COX17	282.86	364.43	9.72	26.62	5.21	1.44
C18orf56	3.07	8.65	0.06	0.33	5.77	1.43
TMEM92	0.43	48.78	0.3	0.97	6.93	1.42
SNHG12	3.48	34.45	2.56	7.02	3.7	1.42
TIMM10	146.61	606.02	9.42	25.23	5.99	1.41

10

20

30

40

遺伝子	発現レベル (FPKM)				変化倍率 (log2)	変化倍率 (log2)
	ドナー	IVF	対照 SCNT	KDM4A SCNT	[IVF/ 対照 SCNT]	[KDM4A SCNT/ 対照 SCNT]
SGPP1	5.74	7.64	0.46	1.39	3.79	1.41
TCN2	2.19	5.92	0.2	0.69	4.33	1.4
PRPF39	9.9	31.33	1.26	3.48	4.53	1.4
NOP58	95.17	464.08	20.99	55.54	4.46	1.4
MFSD11	11.68	24.72	2.94	7.94	3.03	1.4
RAB9A	31.41	186.19	0.46	1.37	8.38	1.39
LINC00263	0.64	12.46	1.39	3.81	3.08	1.39
ZNF791	16.38	25.28	1.39	3.79	4.09	1.38
TAC1	0.17	13.69	2.14	5.72	2.62	1.38
ZNF326	9.16	23.42	1.02	2.8	4.39	1.37
ZNF254	4.02	107.91	0.45	1.32	7.62	1.37
SEPX1	33.35	5.15	0.85	2.34	2.47	1.36
RASA2	1.46	7.97	0.33	1	4.23	1.36
LOC347411	0	8.55	0.57	1.62	3.69	1.36
GJA1	66.62	23.99	0.58	1.64	5.15	1.36
UTP23	8.59	27.75	1.23	3.29	4.39	1.35
STAG3L2	2.31	34.62	1.01	2.72	4.97	1.35
LARP6	17.8	9.07	0.1	0.41	5.52	1.35
ZNF280A	0.18	875.26	33.4	84.94	4.71	1.34
POLR3K	57.96	569.5	43.15	109.26	3.72	1.34
C11orf67	98.51	68.59	11.09	28.21	2.62	1.34
FAM83D	7.53	16.01	0.95	2.53	3.94	1.32
ACBD5	17.46	20.05	0.59	1.62	4.87	1.32
PRAMEF11	0	55.08	7.28	18.18	2.9	1.31
SNHG9	246.15	1263.55	25.71	63.59	5.61	1.3
ZNF676	0.04	40.96	1.82	4.61	4.42	1.29
RFK	4.26	75.03	1.11	2.86	5.96	1.29
FOXN2	9.46	38.72	2.2	5.53	4.08	1.29
CUL2	34.51	546.12	5.8	14.32	6.53	1.29
CSTF3	71.39	228.17	11.82	28.96	4.26	1.29
ZNF789	3.86	12.25	2.08	5.2	2.5	1.28
UTS2	0	6.73	0.41	1.14	3.74	1.28
TSEN34	6.76	5.45	0.66	1.75	2.87	1.28
NMNAT1	6.92	20.03	1.47	3.71	3.68	1.28
LUC7L	21.44	47.3	1.14	2.91	5.26	1.28
C2orf74	35.69	6.14	0.11	0.41	4.89	1.28

10

20

30

40

遺伝子	発現レベル (FPKM)				変化倍率 (log2)	変化倍率 (log2)
	ドナー	IVF	対照 SCNT	KDM4A SCNT	[IVF/ 対照 SCNT]	[KDM4A SCNT/ 対照 SCNT]
STAP2	1.66	5.6	0.29	0.83	3.87	1.25
ALPPL2	0	29.71	1.48	3.65	4.24	1.25
ZNF735	0.05	352.37	13.97	33.19	4.65	1.24
ZNF174	1.53	16.97	0.42	1.13	5.04	1.24
PAGE5	0	26.69	0.73	1.86	5.01	1.24
C16orf91	22.55	89.35	4.15	9.96	4.4	1.24
SRA1	127.15	42.34	2.29	5.51	4.15	1.23
CAB39L	5.35	33.49	1.67	4.06	4.25	1.23
ZCCHC10	19.07	93.41	6.67	15.69	3.79	1.22
CLK4	5.85	95.8	8.56	19.9	3.47	1.21
ZNF487P	1.53	9.18	1.26	3.02	2.77	1.2
PLD2	6.69	6	0.38	1	3.67	1.2
LOC100506305	0.37	6.63	0.34	0.91	3.94	1.2
KLF17	0.21	78.88	3.62	8.4	4.41	1.19
BUD31	158.08	520.53	33.31	76.07	3.96	1.19
AASDH	4.18	6.74	1.19	2.84	2.41	1.19
ZNF680	5.56	41.6	2.41	5.58	4.05	1.18
WDR77	54	11.44	1.47	3.45	2.88	1.18
EIF1AD	9.39	115.55	4.12	9.43	4.78	1.18
TMEM159	12.8	35.26	3.75	8.54	3.2	1.17
STAG3L4	9.22	20.16	0.99	2.35	4.22	1.17
FAM200A	5.95	9.4	0.49	1.23	4.01	1.17
NDUFAF2	135.33	38.57	2.8	6.37	3.74	1.16
SCO1	13.51	18.35	0.84	1.99	4.29	1.15
NOC4L	8.34	8.7	0.22	0.61	4.78	1.15
LOC723809	0.06	17.08	1.67	3.84	3.28	1.15
CCAR1	42.64	48.69	2.03	4.62	4.52	1.15
TMEM41B	28.8	128.12	8.64	19.19	3.87	1.14
SAMD8	7.22	43.46	1.91	4.34	4.44	1.14
DDX26B	1.11	5.7	0.75	1.77	2.77	1.14
TCEANC2	4.59	7.91	1.27	2.9	2.55	1.13
SERTAD1	44.92	271.45	3.17	7.03	6.38	1.12
GUSBP4	0.8	6.82	1.06	2.42	2.58	1.12
ZNF273	1.16	22.99	2	4.43	3.46	1.11
PDCD11	13.33	13.1	0.82	1.88	3.84	1.11
MATR3	89.04	188.2	4.31	9.43	5.42	1.11

10

20

30

40

遺伝子	発現レベル (FPKM)				変化倍率 (log2)	変化倍率 (log2)
	ドナー	IVF	対照 SCNT	KDM4A SCNT	[IVF/ 対照 SCNT]	[KDM4A SCNT/ 対照 SCNT]
LEMD3	3.09	5.62	0.22	0.59	4.16	1.11
GUSBP1	9.68	107.53	3.64	7.96	4.85	1.11
DNASE2	30.05	18.63	0.23	0.61	5.83	1.11
SSX3	0	20.42	2.61	5.71	2.92	1.1
FAM133B	4.76	21.24	2.78	6.06	2.89	1.1
CENPC1	9.51	38.75	3.4	7.41	3.47	1.1
CCDC86	46.08	8.05	1.29	2.88	2.55	1.1
TRIM39-RPP21	1	5.9	0.54	1.26	3.23	1.09
ECE2	15.32	33.28	0.5	1.18	5.8	1.09
C17orf89	14.37	5.47	0.3	0.75	3.8	1.09
BTK	0.02	43.99	0.73	1.67	5.73	1.09
ZNF669	3.46	131.98	3.79	8.14	5.09	1.08
UTP3	12.64	39.85	1.36	2.98	4.77	1.08
PRAMEF6	0.03	37.49	6.7	14.29	2.47	1.08
XAGE5	0	14.36	0	0.11	7.18	1.07
DEFB122	0	13.98	0.24	0.61	5.37	1.06
PRAMEF10	0	140.56	23.74	49.42	2.56	1.05
IFI30	22.64	151.39	12.34	25.62	3.61	1.05
FASTKD5	9.26	78.82	2.08	4.41	5.18	1.05
BEX2	0.16	10.46	1.24	2.68	2.98	1.05
ZNF724P	2.07	78.22	6.36	13.16	3.6	1.04
ZNF92	6.55	165.41	10.67	21.84	3.94	1.03
LOC100129515	0	25.79	4.52	9.35	2.49	1.03
APOC1P1	0.12	5.44	0.16	0.43	4.41	1.03
PRAMEF4	0	110.38	8.98	18.29	3.6	1.02
GUCA1B	0.37	11.28	0.36	0.83	4.63	1.02
ELL2	30.17	7.07	0.64	1.39	3.28	1.01

【 0 4 7 4 】

実施例5

数十年の努力の後、最近になってついにヒトNT-ESCが導き出された (Chung et al., 2014; Tachibana et al., 2013; Yamada et al., 2014)。これらの進歩は、主に、SCNTの派生条件の最適化のせいであった。しかし、ヒトSCNT胚の発生停止を引き起こすエピジェネティックなリプログラミングにおける内因性の異常は、特定されていない。本明細書において、本発明者らは、体細胞ゲノムにおいてH3K9me3がヒトSCNTのリプログラミングについてのバリアを提示することを実証している。H3K9me3デメチラーゼKDM4Aを過剰発現させることによるこのバリアの除去は、ZGAでの転写リプログラミングを促進し、それにより、ヒトSCNT胚がより効率的に胚盤胞へと発生することが可能になり、本発明者らは、この胚盤胞からゲノム安定性または多能性を損なわずに複数のAMD患者特異的NT-ESC株を成功裏に樹立した。したがって、本発明者らは、H3K9me3を、SCNTによるヒト体細胞のリプログラミングにおける一般的なリプログラミングバリアとして実証しているが、クローニング効率を改善するための実際的なアプローチも証明している。

【 0 4 7 5 】

10

20

30

40

50

ヒト卵母細胞がSCNT胚の発生を支援する能力は、卵母細胞ドナーに依存して大きく異なることが周知である。実際に、女性の小グループにより供与された質の高い卵母細胞がレシピエントとして使用された場合にのみ、ヒトNT-ESCが派生することができる (Chung et al., 2014; Tachibana et al., 2013; Yamada et al., 2014)。もっとも、卵母細胞の質に依存する理由は理解しづらいためである。KDM4A mRNAを注射しない場合、一貫して、胚盤胞の形成を高めることが報告されているTSAの存在下であっても、4人のドナーのうち1人 (ID #58) からの卵母細胞だけがSCNT胚盤胞の形成を支援した (Tachibana et al., 2013) (図2Hおよび表4)。対照的に、KDM4A mRNAが注射された場合、検査された4人のドナー全員の卵母細胞が胚盤胞の形成を支援したが、これは、KDM4Aがドナーのばらつきの問題を克服することができることを示している。KDM4AがIVF胚の発生を改善することができるかどうかは、まだ判定されていない。

10

【0476】

胚盤胞期に達しつつあるヒトSCNT胚の発生能は、KDM4A mRNA注射によって有意にかつ一貫して改善されたものの、改善の大きさはマウスほど劇的ではなかった (マウス90%対ヒト27%)。種の相違および/またはヒト卵母細胞の質が、1回の排卵由来の同じバッチの卵母細胞内であっても大きく変動し、IVFによってもその一部分だけが胚盤胞期への発生を支援する能力を有している可能性があり、成功率は15~60%である (Shapiro et al., 2002; Stone et al., 2014)。これは、胚の90%超が胚盤胞期に発生することができるマウスIVFと明らかに対照的である。したがって、マウス卵母細胞と比較してヒト卵母細胞の質が低いことを考えると、hSCNT効率がKDM4Aの注射で改善したことは驚くべきことである。実験に使用されたヒト卵母細胞のいくつかは、IVFによっても胚盤胞の形成を支援できなかった可能性もある。

20

【0477】

ヒトSCNT効率およびNT-ESCの派生の改善におけるKDM4Aの有効性を実証することに加えて、別の重要な発見は、KDM4AがヒトSCNTリプログラミングを促進できることである。ヒトKDM4AがマウスSCNT胚において機能してKDM4dと類似の効果を発揮することを考慮し、本発明者らは、H3K9me3デメチラーゼ活性を有する限り、hSCNTを促進するためにKDM4ファミリーの全てのメンバーを使用できることを実証した。

【0478】

要約すれば、本発明者らは、本明細書において改良型のKDM4介助ヒトSCNT方法を実証した。この方法を使用して、本発明者らは、AMD患者成熟細胞からヒト胚盤胞を派生させ、続いてドナー患者と同一のゲノムを有する複数のNT-ESC (NTK-ESC) を樹立した。これは、AMDを理解するためだけでなく、AMDの処置のための治療薬をスクリーニングするための、独特で重要な細胞源を提供する。他のヒト疾患の研究に同じ戦略を適応できることを考えて、本発明者らは、ヒト治療に一般的な影響を有するであろう患者特異的NT-ESCを作製するための新しい方法を実証した。追加的に、本明細書において実証されるように (図3H~Jおよび7)、hSCNTは、レシピエント卵母細胞のミトコンドリアによる体細胞ミトコンドリアの置換を可能にするので、本明細書開示の方法、組成物およびキットは、ミトコンドリアDNA関連疾患を処置する機会を提供する。実際に、最近の研究により、mtDNA変異が引き起こすメタボリックシンドロームの表現型を、SCNTによりmtDNAを置換することによって修正することができることが実証された (Ma et al., 2015)。したがって、本明細書開示のKDM4介助SCNT方法は、mtDNA置換療法にも有用である。

30

40

【0479】

参考文献

本明細書に開示の参考文献は、その全体が参照により組み入れられる。

Chung, Y., Klimanskaya, I., Becker, S., Li, T., Maserati, M., Lu, S.J., Zdravkovic, T., Ilic, D., Genbacev, O., Fisher, S., et al. (2008). Human Embryonic Stem Cell Lines Generated without Embryo Destruction. *Cell Stem Cell* 2, 113–117.

Matoba, S., Liu, Y., Lu, F., Iwabuchi, K.A., Shen, L., Inoue, A., and Zhang, Y. (2014). Embryonic Development following Somatic Cell Nuclear Transfer Impeded by Persisting Histone Methylation. *Cell* 159, 884–895.

Bernstein, B.E., Birney, E., Dunham, I., Green, E.D., Gunter, C., and Snyder, M. (2012). An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome. *Nature* 489, 57-74. 10

Chung, Y.G., Eum, J.H., Lee, J.E., Shim, S.H., Sepilian, V., Hong, S.W., Lee, Y., Treff, N.R., Choi, Y.H., Kimbrel, E. a, et al. (2014). Human Somatic Cell Nuclear Transfer Using Adult Cells. *Cell Stem Cell* 14, 777-780.

French, A.J., Adams, C. a, Anderson, L.S., Kitchen, J.R., Hughes, M.R., and Wood, S.H. (2008). Development of human cloned blastocysts following somatic cell nuclear transfer with adult fibroblasts. *Stem Cells* 26, 485-493.

Gurdon, J.B. (1962). The developmental capacity of nuclei taken from intestinal epithelium cells of feeding tadpoles. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 10, 622-640. 20

Hochedlinger, K., and Jaenisch, R. (2003). Nuclear transplantation, embryonic stem cells, and the potential for cell therapy. *N. Engl. J. Med.* *349*, 275-286.

Klose, R.J., Yamane, K., Bae, Y., Zhang, D., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Wong, J., and Zhang, Y. (2006). The transcriptional repressor JHDM3A demethylates trimethyl histone H3 lysine 9 and lysine 36. *Nature* *442*, 312-316.

Krishnan, S., and Trievel, R.C. (2013). Structural and functional analysis of JMJD2D reveals molecular basis for site-specific demethylation among JMJD2 demethylases. *Structure* *21*, 98-108.

10

Ma, H., Folmes, C.D.L., Wu, J., Morey, R., Mora-Castilla, S., Ocampo, A., Ma, L., Poulton, J., Wang, X., Ahmed, R., et al. (2015). Metabolic rescue in pluripotent cells from patients with mtDNA disease. *Nature*.

Matoba, S., Liu, Y., Lu, F., Iwabuchi, K.A., Shen, L., Inoue, A., and Zhang, Y. (2014). Embryonic Development following Somatic Cell Nuclear Transfer Impeded by Persisting Histone Methylation. *Cell* *159*, 884-895.

Niakan, K.K., Han, J., Pedersen, R.A., Simon, C., and Pera, R.A.R. (2012). Human pre-implantation embryo development. *Development* *841*, 829-841.

20

Noggle, S., Fung, H.-L., Gore, A., Martinez, H., Satriani, K.C., Prosser, R., Oum, K., Paull, D., Druckenmiller, S., Freeby, M., et al. (2011). Human oocytes reprogram somatic cells to a pluripotent state. *Nature* *478*, 70-75.

Rodriguez-Osorio, N., Urrego, R., Cibelli, J.B., Eilertsen, K., and Memili, E. (2012). Reprogramming mammalian somatic cells. *Theriogenology* *78*, 1869-1886.

Shapiro, B.S., Richter, K.S., Harris, D.C., and Daneshmand, S.T. (2002). Implantation and pregnancy rates are higher for oocyte donor cycles after blastocyst-stage embryo transfer. *Fertil. Steril.* *77*, 1296-1297.

30

Simerly, C., Dominko, T., Navara, C., Payne, C., Capuano, S., Gosman, G., Chong, K., Takahashi, D., Chace, C., Compton, D., et al. (2003). Molecular correlates of primate nuclear transfer failures. *Science* (80-.). *300*, 297.

Stone, B. a., March, C.M., Ringler, G.E., Baek, K.J., and Marrs, R.P. (2014). Casting for determinants of blastocyst yield and of rates of implantation and of pregnancy after blastocyst transfers. *Fertil. Steril.* *102*, 1055-1064.

Tachibana, M., Amato, P., Sparman, M., Gutierrez, N.M., Tippner-Hedges, R., Ma, H., Kang, E., Fulati, A., Lee, H.-S., Sritanandomchai, H., et al. (2013). Human embryonic stem cells derived by somatic cell nuclear transfer. *Cell* *153*, 1228-1238.

40

The Encode Consortium Project (2011). A user's guide to the encyclopedia of DNA elements (ENCODE). *PLoS Biol.* *9*, e1001046.

Wakayama, T., Tabar, V., Rodriguez, I., Perry, a C., Studer, L., and Mombaerts, P. (2001). Differentiation of embryonic stem cell lines generated from adult somatic cells by nuclear transfer. *Science* 292, 740–743.

Wang, L., Miao, Y.L., Zheng, X., Lackford, B., Zhou, B., Han, L., Yao, C., Ward, J.M., Burkholder, A., Lipchina, I., et al. (2013). The THO complex regulates pluripotency gene mRNA export and controls embryonic stem cell self-renewal and somatic cell reprogramming. *Cell Stem Cell* 13, 676–690.

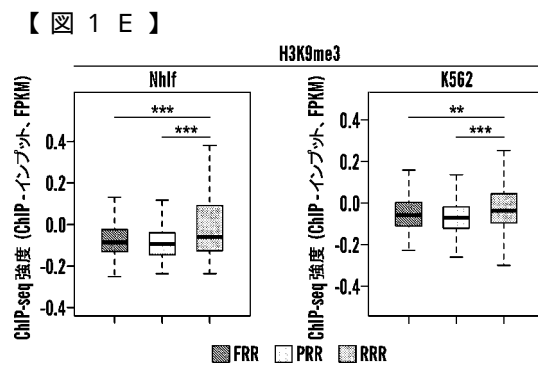
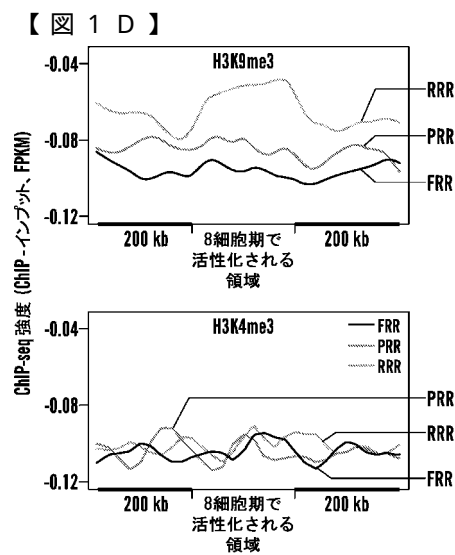
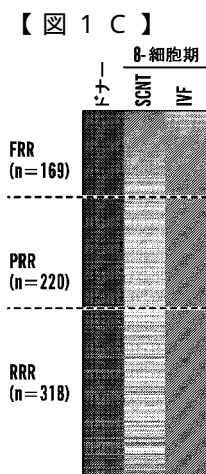
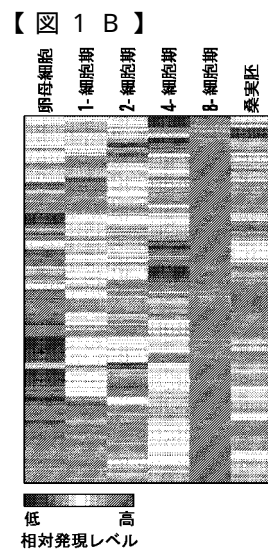
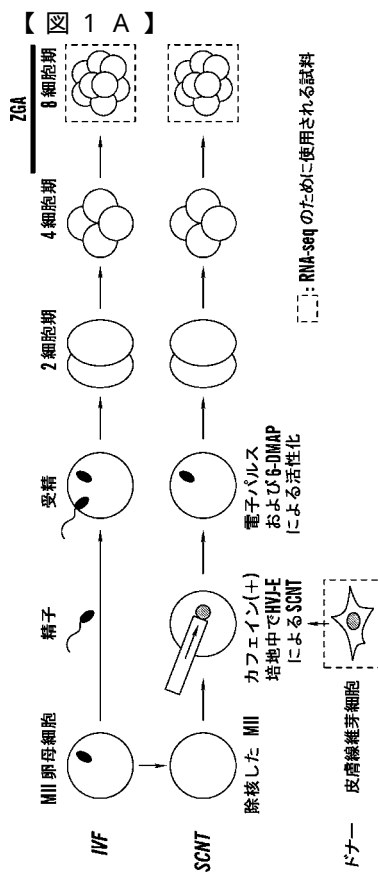
Whetstine, J.R., Nottke, A., Lan, F., Huarte, M., Smolikov, S., Chen, Z., Spooner, E., Li, E., Zhang, G., Colaiacovo, M., et al. (2006). Reversal of histone lysine trimethylation by the JMJD2 family of histone demethylases. *Cell* 125, 467–481. 10

Xue, Z., Huang, K., Cai, C., Cai, L., Jiang, C., Feng, Y., Liu, Z., Zeng, Q., Cheng, L., Sun, Y.E., et al. (2013). Genetic programs in human and mouse early embryos revealed by single-cell RNA sequencing. *Nature* 500, 593–597.

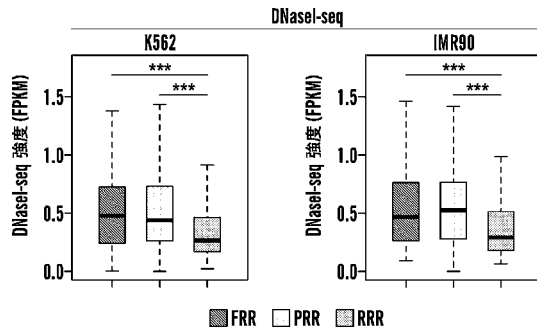
Yamada, M., Hamatani, T., Akutsu, H., Chikazawa, N., Kuji, N., Yoshimura, Y., and Umezawa, A. (2009). Involvement of a novel preimplantation-specific gene encoding the high mobility group box protein Hmgpi in early embryonic development. *Hum. Mol. Genet.* 19, 480–493. 20

Yamada, M., Johannesson, B., Sagi, I., Burnett, L.C., Kort, D.H., Prosser, R.W., Paull, D., Nestor, M.W., Freeby, M., Greenberg, E., et al. (2014). Human oocytes reprogram adult somatic nuclei of a type 1 diabetic to diploid pluripotent stem cells. *Nature* 510, 533–536.

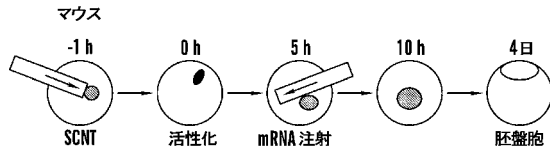
Yang, X., Smith, S.L., Tian, X.C., Lewin, H.A., Renard, J., and Wakayama, T. (2007). Nuclear reprogramming of cloned embryos and its implications for therapeutic cloning. *Nat. Genet.* 39, 295–302.



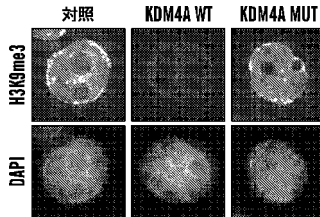
【図 1 F】



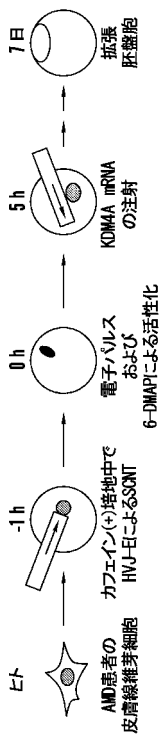
【図 2 A】



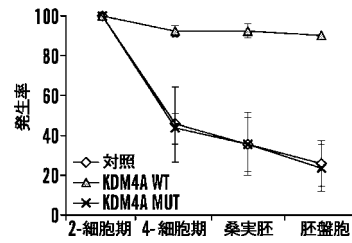
【図 2 B】



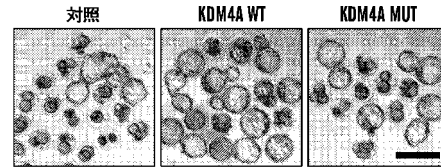
【図 2 E】



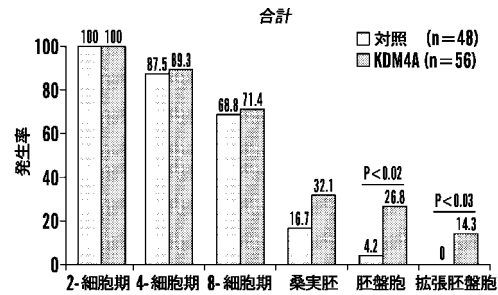
【図 2 C】



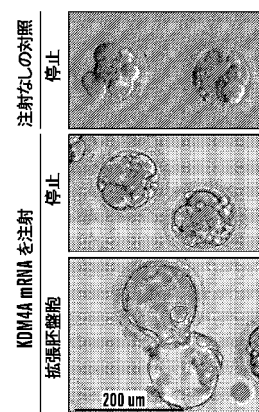
【図 2 D】



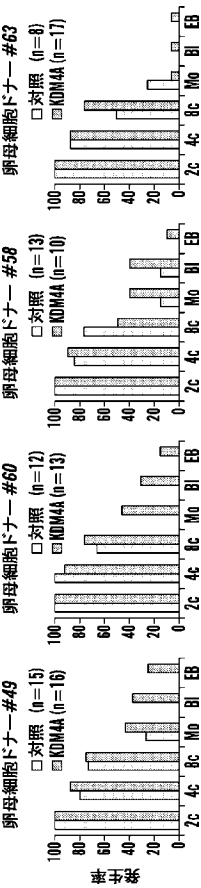
【図 2 F】



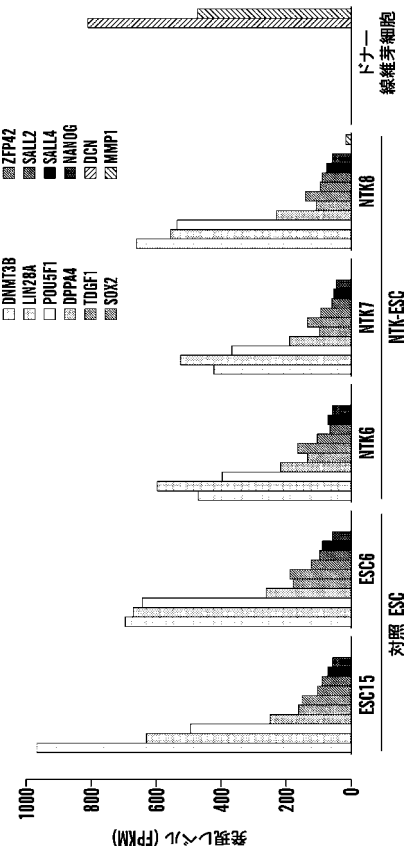
【図 2 G】



【 図 2 H 】



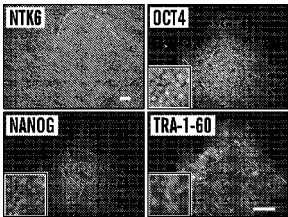
【 図 3 C 】



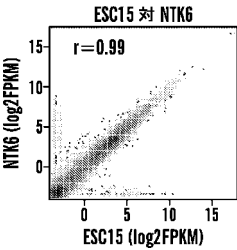
【 図 3 A 】

卵母細胞ドナー		体細胞ドナー			拡張胚盤胞 の数	NTK-ESC の数	NTK-ESC の名称
ID	年齢	ID	性別	年齢			
#49	30	DFB-8	XY	59	4	2	NTK8/3
#58	23	DFB-7	XX	42	1	0	-
#60	27	DFB-6	XX	52	2	1	NTK6
#63	23	DFB-6	XX	52	1	1	NTK7

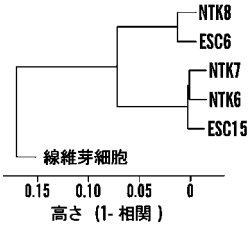
【 図 3 B 】



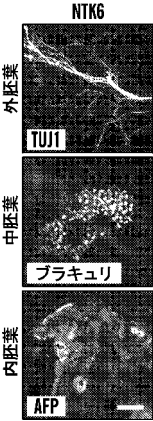
【 図 3 D 】



【 図 3 E 】



【 図 3 F 】



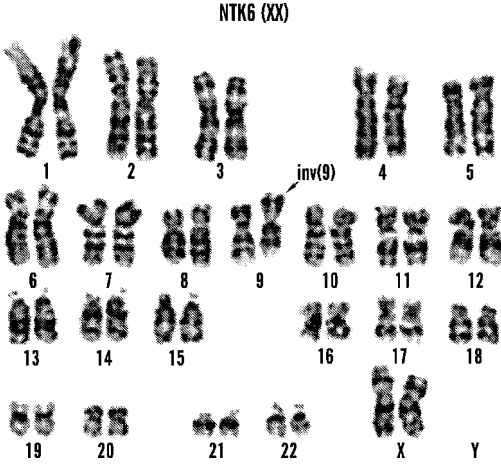
【 図 3 G 】



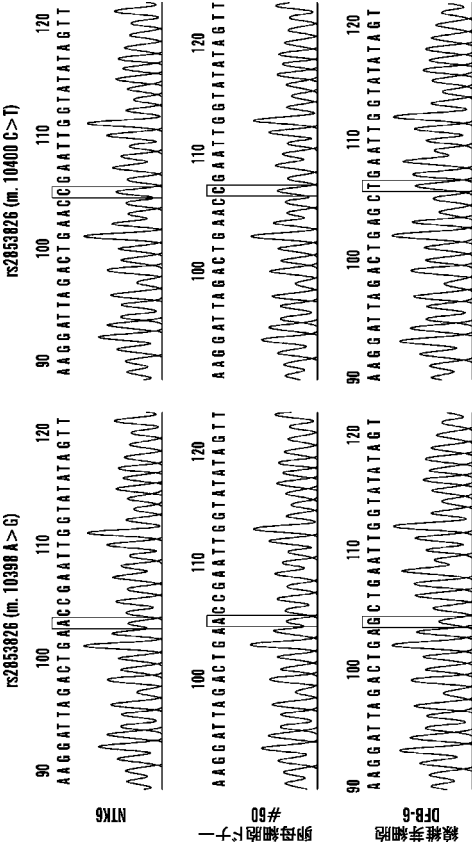
【 図 3 I 】

	線維芽細胞 DFB-6		NTK6		卵母細胞ドナー #60	
AMEL	X	X	X	X	X	X
D8S1179	12	13	12	13	11	12
D21S11	29	29	29	29	31	33.2
D7S820	11	12	11	12	12	12
CSF1PO	10	13	10	13	10	11
D3S1358	15	16	15	16	14	14
TH01	9	9	9	9	7	9
D13S317	8	11	8	11	11	13
D16S539	11	13	11	13	9	11
D2S1338	17	24	17	24	16	21
D19S433	13	14.2	13	14.2	12	16
vWA	14	17	14	17	14	16
TPOX	8	8	8	8	8	8
D18S51	14	15	14	15	13	16
D5S818	10	11	10	11	12	13
FGA	23	23	23	23	19	25

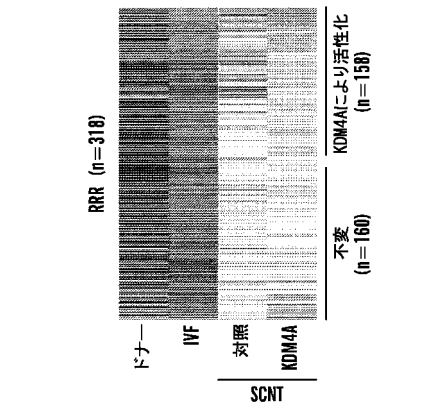
【 図 3 H 】



【 図 3 J 】



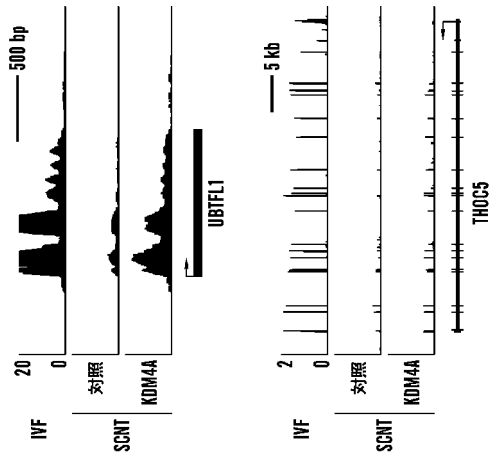
【 図 4 A 】



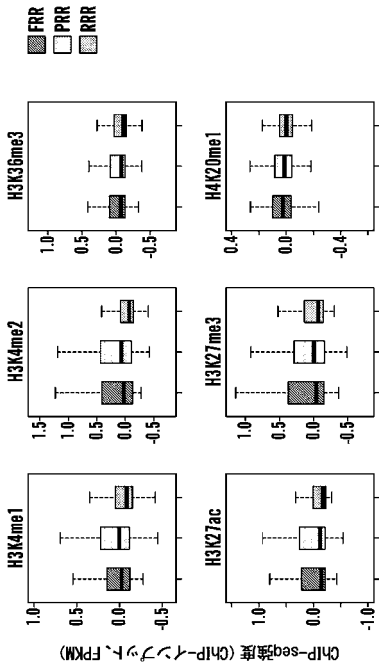
【 図 4 B 】

GO 期間	P 値
転写調節	4.30E-04
リボ核タンパク質複合体のバイオジェネシス	7.80E-04
リボソームのバイオジェネシス	3.60E-03
RNAプロセッシング	1.60E-02

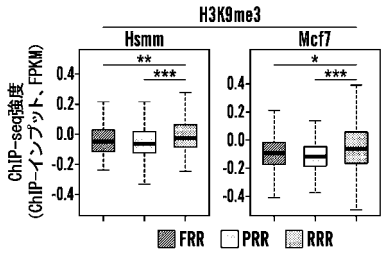
【 図 4 C 】



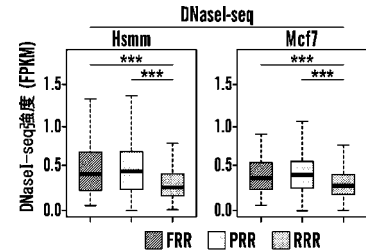
【 図 5 A 】



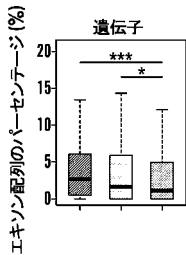
【 図 5 B 】



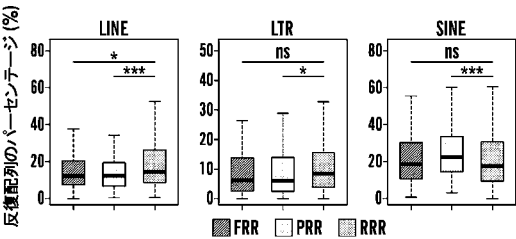
【 図 5 C 】



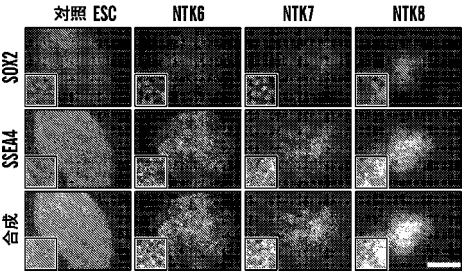
【 図 5 D 】



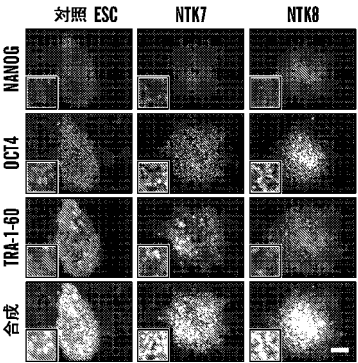
【図 5 E】



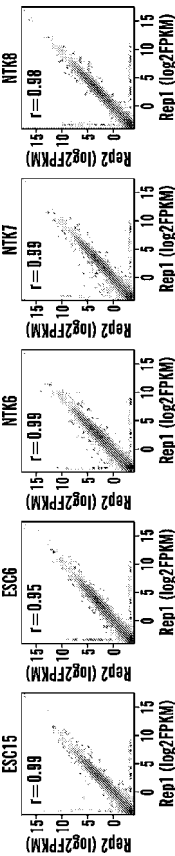
【図 6 A】



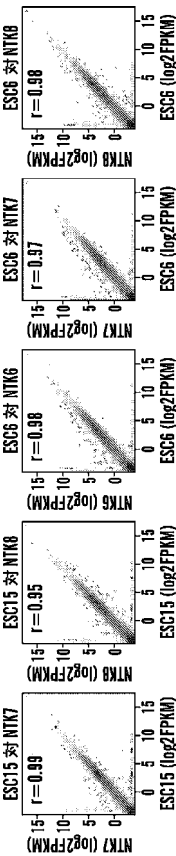
【図 6 B】

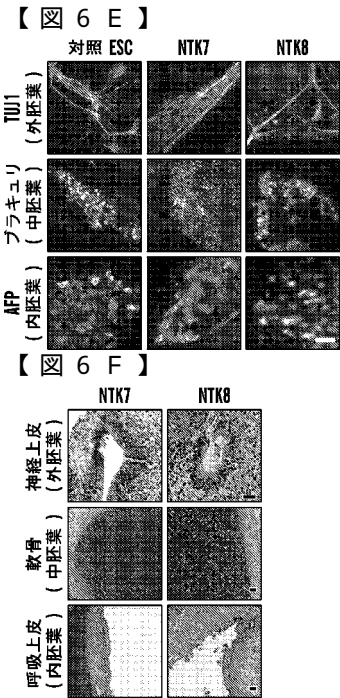


【図 6 C】



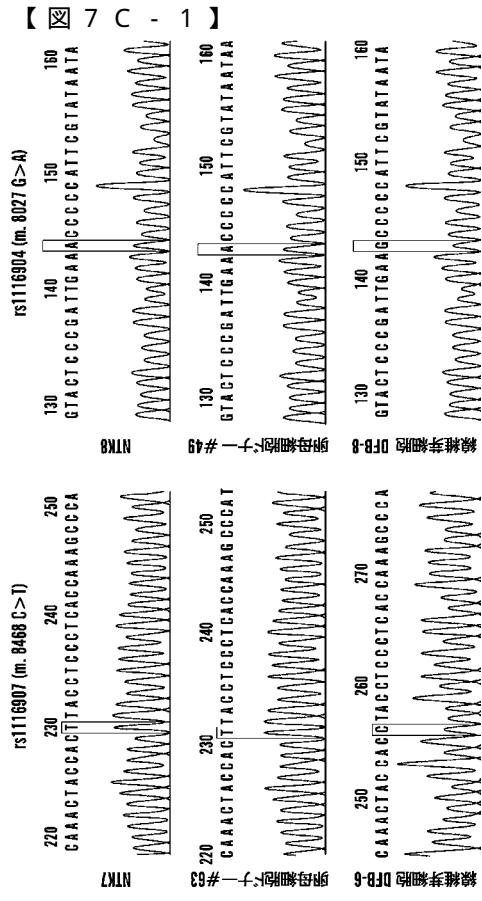
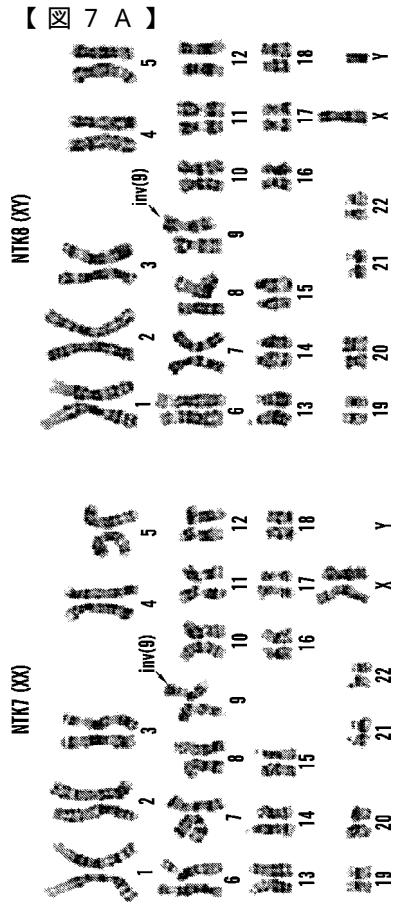
【図 6 D】

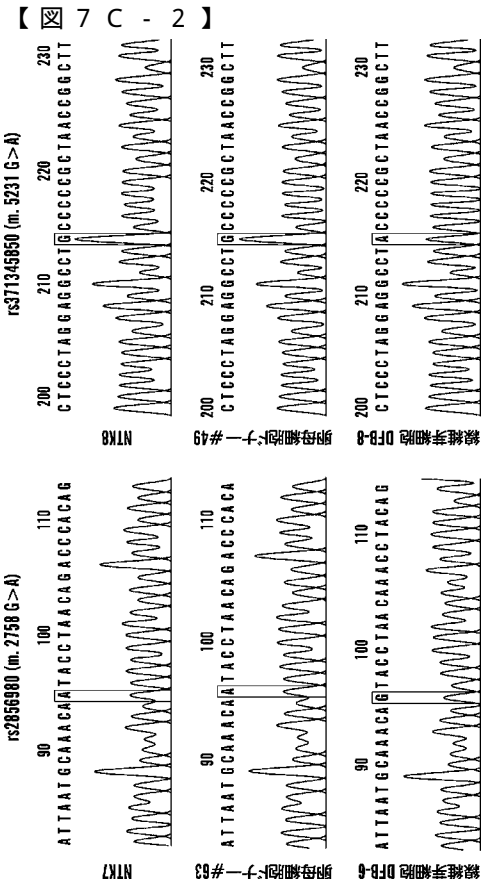




【図 7 B】

	線維芽細胞 DFB-6			線維芽細胞 DFB-8			NTK8			卵母細胞 #49		
	X	X	X	X	X	X	X	X	X	Y	X	X
AMEL												
D8S1179	12	13	12	13	12	14	12	14	9	14		
D21S11	29	29	29	29	30.2	31	30	31	30	30		
D7S820	11	12	11	12	9	11	11	12	8	10		
CSF1PO	10	13	10	13	10	12	12	11	12	7		
D3S1358	15	16	15	16	16	17	15	17	14	18		
TH01	9	9	9	9	9	9.3	6	6	6	6		
D13S317	8	11	8	11	12	13	11	12	8	12		
D16S539	11	13	11	13	8	9	9	13	11	12		
D2S1338	17	24	17	24	19	23	18	24	17	23		
D19S433	13	14.2	13	14.2	13	13	14.2	14.2	13	15		
vWA	14	17	14	17	16	16	14	18	14	16		
TPOX	8	8	8	8	8	11	8	9	8	11		
D18S51	14	15	14	15	15	22	11	13	13	17		
D5S818	10	11	10	11	12	12	9	11	11	12		
FGA	23	23	23	23	21	22	19	23	19	26		





【配列表】
2018530349000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2016/055890

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(B) - A61K 35/12; C12N 5/0735; C12N 5/074; C12N 5/075; C12N 5/10; C12N 15/873 (2016.01) CPC - A01K 67/0273; C12N 5/0606; C12N 5/0896; C12N 2501/00; C12N 2510/00; C12N 2517/04 (2016.11) 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) IPC - A61K 35/12; C12N 5/0735; C12N 5/074; C12N 5/075; C12N 5/10; C12N 15/873; C12N 15/877 CPC - A01K 67/0273; C12N 5/0606; C12N 5/0896; C12N 2501/00; C12N 2510/00; C12N 2517/04; C12N 2517/10 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched USPC - 435/325; 435/366; 435/375; 435/377; 800/24 (keyword delimited) Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) PatBase, Google Patents, Google Scholar, Pub Med Search terms used: human somatic cell nuclear transfer KDM4 H3K9 methyltransferase		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	MATOKA et al. "Embryonic development following somatic cell nuclear transfer impeded by persisting histone methylation," Cell. 30 October 2014 (30.10.2014), Vol. 159, Pgs. 884-95/S1-S7 entire document	1-3, 5-7, 44-46
Y	US 2014/0234968 A1 (SUNG KWANG MEDICAL FOUNDATION) 21 August 2014 (21.08.2014) entire document	4, 47, 62-70
Y	WO 2014/197835 A2 (THE GENERAL HOSPITAL CORPORATION) 11 December 2014 (11.12.2014) entire document	4, 47, 62-73
Y	US 2011/0172107 A1 (KATZ et al) 14 July 2011 (14.07.2011) entire document	65, 66
Y	US 2011/0172107 A1 (KATZ et al) 14 July 2011 (14.07.2011) entire document	71-73
A	ANTONY et al. "Transient JMJD2B-mediated reduction of H3K9me3 levels improves reprogramming of embryonic stem cells into cloned embryos," Mol Cell Biol. 21 December 2012 (21.12.2012), Vol. 33, Pgs. 974-83 entire document	1-7, 11, 44-47, 62-73
A	CHUNG et al. "Human somatic cell nuclear transfer using adult cells," Cell Stem Cell. 17 April 2014 (17.04.2014), Vol. 14, Pgs. 777-80 entire document	1-7, 11, 44-47, 62-73
PX	CHUNG et al. "Histone Demethylase Expression Enhances Human Somatic Cell Nuclear Transfer Efficiency and Promotes Derivation of Pluripotent Stem Cells," Cell Stem Cell. 29 October 2015 (29.10.2015), Vol. 17, Pgs. 758-66 entire document	1-7, 11, 44-47, 62-73
A	US 2013/0189780 A1 (SHOEMAKER et al) 25 July 2013 (25.07.2013) entire document	1-7, 11, 44-47, 62-73
A	US 2011/0136145 A1 (SONG et al) 09 June 2011 (09.06.2011) entire document	1-7, 11, 44-47, 62-73
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input 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 "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 05 December 2016		Date of mailing of the international search report 27 DEC 2016
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300		Authorized officer Blaine R. Copenheaver PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2016/055890

Box No. 1 Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:

- a. ☒ forming part of the international application as filed:
☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
☐ on paper or in the form of an image file.
- b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13ter. I(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter. I(a)).
☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13ter. I(b) and Administrative Instructions, Section 713).

2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

SEQ ID NOs: 1-4 and 45 were searched.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2016/055890

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☒ Claims Nos.: 8-10, 12-43, 48-61
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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:

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.:

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.

フロントページの続き

(81)指定国 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, 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), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, 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, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA

(74)代理人 100160923
弁理士 山口 裕孝

(74)代理人 100119507
弁理士 刑部 俊

(74)代理人 100142929
弁理士 井上 隆一

(74)代理人 100148699
弁理士 佐藤 利光

(74)代理人 100128048
弁理士 新見 浩一

(74)代理人 100129506
弁理士 小林 智彦

(74)代理人 100205707
弁理士 小寺 秀紀

(74)代理人 100114340
弁理士 大関 雅人

(74)代理人 100114889
弁理士 五十嵐 義弘

(74)代理人 100121072
弁理士 川本 和弥

(72)発明者 チャン イ
アメリカ合衆国 0 2 4 5 9 マサチューセッツ州 ニュートン ボールドベート ロード 1 4 4

(72)発明者 リー ドン リュル
大韓民国 0 1 7 8 0 ソウル ノウォン - ク ソムバト - ロ 2 3 2 ウースン アパートメント 1 0 8 - 7 0 5

(72)発明者 的場 章悟
アメリカ合衆国 0 2 4 4 5 マサチューセッツ州 ブルックライン ワシントン ストリート 4 4 アpartment 2 1 7

(72)発明者 チャン ユン ジエ
アメリカ合衆国 0 1 5 4 5 マサチューセッツ州 シュールズベリー アーバー ドライブ 2 9

F ターム(参考) 4B065 AA91X AA93X AB01 AC20 BA01 BA08 BA30 BB25 BC03 BD45