

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号
特表2025-521131
(P2025-521131A)

(43)公表日 令和7年7月8日(2025.7.8)

(51)国際特許分類	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 Q 1/6869(2018.01)	C 1 2 Q 1/6869	Z Z N A 4 B 0 6 3
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/09	Z 4 C 0 8 4
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	
A 6 1 P 3/04 (2006.01)	A 6 1 P 3/04	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全60頁)

(21)出願番号	特願2024-569178(P2024-569178)	(71)出願人	590002013
(86)(22)出願日	令和5年5月30日(2023.5.30)		ソシエテ・デ・プロデュイ・ネスレ・エ
(85)翻訳文提出日	令和6年11月21日(2024.11.21)		ス・アー
(86)国際出願番号	PCT/EP2023/064444		スイス, 1 8 0 0 ヴヴェイ, アヴェ
(87)国際公開番号	WO2023/232812		ニュー ネスレ 5 5
(87)国際公開日	令和5年12月7日(2023.12.7)	(74)代理人	100088155
(31)優先権主張番号	63/347,106		弁理士 長谷川 芳樹
(32)優先日	令和4年5月31日(2022.5.31)	(74)代理人	100140453
(33)優先権主張国・地域又は機関			弁理士 戸津 洋介
	米国(US)	(74)代理人	100140888
(81)指定国・地域	AP(BW,CV,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ		弁理士 渡辺 欣乃
	,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),	(72)発明者	テクサリ, ロレーン
	EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(		スイス連邦, 1 1 1 0 モルジュ, リ
	AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,		ュー ド ローザンヌ 3 7
	FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV	(72)発明者	ヘルツィヒ, セバスチャン
	最終頁に続く		最終頁に続く

(54)【発明の名称】 生物学的年齢を用いてイヌの健康アウトカムを改善する方法

(57)【要約】

本発明は、イヌのための生活習慣計画、食事計画又は治療の介入を選択するための方法であって、a) イヌから得られたサンプルからDNAメチル化プロファイルを提供するステップと、b) DNAメチル化プロファイルを使用して、イヌについての生物学的年齢を評価するステップと、c) ステップb) において評価された生物学的年齢に基づいて、イヌについての好適な生活習慣計画、食事計画又は治療の介入を選択するステップと、を含む方法を提供する。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

イヌの生活習慣計画、食事計画、又は治療の介入を選択する方法であって、前記方法が、

- a) 前記イヌから得られたサンプルから DNA メチル化プロファイルを提供するステップと、
- b) 前記 DNA メチル化プロファイルを使用して前記イヌの生物学的年齢を評価するステップと、
- c) ステップ b) で評価された前記生物学的年齢に基づいて、生活習慣計画、食事計画若しくは治療の介入を選択するステップと、を含む、方法。

10

【請求項 2】

イヌの生物学的年齢を改善するための生活習慣計画、食事計画、又は治療の介入の有効性を評価するための方法であって、前記方法が、

- a) 請求項 1 に記載の方法に従って選択された生活習慣計画、食事計画、又は治療の介入を前記イヌに適用するステップと、
- b) 前記生活習慣計画、食事計画、又は治療の介入を前記イヌに適用する期間の後に、前記イヌから得られたサンプルからの DNA メチル化プロファイルを使用して、前記イヌの生物学的年齢を評価するステップと、
- c) 前記生活習慣計画、食事計画又は治療の介入に従う期間の後、前記イヌの前記生物学的年齢に変化があったか否かを評価するステップと、を含む、方法。

20

【請求項 3】

イヌの生物学的年齢を改善するための生活習慣計画、食事計画又は治療の介入の有効性を評価するための方法であって、前記方法が、

- a) 前記イヌから得られたサンプルからの DNA メチル化プロファイルを使用して、前記イヌの生物学的年齢を評価するステップと、
- b) ステップ a) で評価された前記生物学的年齢に基づいて選択された生活習慣計画、食事計画又は治療の介入をイヌに適用するステップと、
- c) 前記生活習慣計画、食事計画、又は治療の介入を前記イヌに適用する期間の後に、前記イヌから得られたサンプルからの DNA メチル化プロファイルを使用して、前記イヌの生物学的年齢を評価するステップと、
- d) ステップ a) とステップ c) との間で前記イヌの前記生物学的年齢に変化があったか否かを評価するステップと、を含む、方法。

30

【請求項 4】

イヌの生物学的年齢を改善するための生活習慣計画、食事計画、又は治療の介入の有効性を評価するための方法であって、前記方法が、

- a) 前記イヌから得られたサンプルからの DNA メチル化プロファイルを使用して、前記イヌの第 1 の生物学的年齢を評価するステップと、
- b) 生活習慣計画、食事計画、又は治療の介入を前記イヌに適用するステップと、
- c) 前記生活習慣計画、食事計画、又は治療の介入を前記イヌに適用する期間の後に、前記イヌから得られた第 2 のサンプルからの DNA メチル化プロファイルを使用して、前記イヌの第 2 の生物学的年齢を評価するステップと、
- d) 前記生活習慣計画、食事計画、又は治療の介入に従う期間の後、前記イヌの第 1 及び第 2 の生物学的年齢に変化があったか否かを評価するステップと、を含む、方法。

40

【請求項 5】

老化を防止する生活習慣計画、食事計画、又は治療の介入を開発するための方法であって、前記方法が、

- a) イヌから得られたサンプルからの DNA メチル化プロファイルを使用して、前記イヌの第 1 の生物学的年齢を評価するステップと、
- b) 生活習慣計画、食事計画、又は治療の介入を前記イヌに適用するステップと、
- c) 前記生活習慣計画、食事計画、又は治療の介入を前記イヌに適用する期間の後に、

50

前記イヌから得られた第2のサンプルからのDNAメチル化プロファイルを使用して、前記イヌの第2の生物学的年齢を評価するステップと、

d) 前記生活習慣計画、食事計画、又は治療の介入に従う期間の後、前記イヌの第1及び第2の生物学的年齢に変化があったか否かを評価するステップと、を含み、

前記生活習慣計画、食事計画、又は治療の介入が、前記イヌの生物学的年齢を減少させ、かつ／又は前記イヌの生物学的年齢の増加率を低下させる場合、前記生活習慣計画、食事計画、又は治療の介入が老化を防止するものであると評価される、方法。

【請求項6】

イヌの疾患発症リスクを予防又は低減するための方法であって、前記方法が、

a) 前記イヌから得られたサンプルからのDNAメチル化プロファイルを使用して、前記イヌの生物学的年齢を評価するステップであって、前記イヌについて評価された生物学的年齢が、前記疾患を発症する可能性の増加と関連付けられる、評価するステップと、

b) ステップa) で評価された前記生物学的年齢に基づいて、生活習慣計画、食事計画若しくは治療の介入を選択するステップであって、

前記生活習慣計画、食事計画又は治療の介入が、前記イヌの前記疾患発症リスクを予防又は低減する、選択するステップと、を含み、好ましくは、前記疾患が加齢関連疾患である、方法。

【請求項7】

老化を防止する生活習慣計画、食事計画又は治療の介入を受けるのに適しているとして、イヌを選択する方法であって、前記方法が、

a) 前記イヌから得られたサンプルからのDNAメチル化プロファイルを使用して、前記イヌの生物学的年齢を評価するステップと、

b) 前記イヌが暦年齢と比較して高い前記生物学的年齢を有する場合、老化を防止する生活習慣計画、食事計画、又は治療の介入を受けるのに適しているとして前記イヌを選択するステップと、を含む、方法。

【請求項8】

イヌの生物学的年齢を評価する方法であって、

a) 前記イヌから得られたサンプルからDNAメチル化プロファイルを提供するステップと、

b) 前記DNAメチル化プロファイルを使用して生物学的年齢を評価するステップと、を含む方法。

【請求項9】

前記イヌがその暦年齢と比較して高い生物学的年齢を有するという評価に基づいて、生活習慣計画、食事計画又は治療の介入が選択される、請求項1～3のいずれか一項に記載の方法。

【請求項10】

前記生活習慣計画、食事計画、又は治療の介入が、食事介入である、請求項1～7のいずれか又は請求項9に記載の方法。

【請求項11】

前記食事介入が、カロリー制限食、高齢食、又は低タンパク質食である、請求項10に記載の方法。

【請求項12】

前記サンプルが、血液サンプルである、請求項1～11のいずれか一項に記載の方法。

【請求項13】

ステップa) が、前記イヌから得られたサンプルからDNAメチル化プロファイルを確認することをさらに含む、請求項1又は請求項3～8のいずれか一項に記載の方法。

【請求項14】

前記DNAメチル化プロファイルが、表1に掲載される少なくとも1つのメチル化部位を含む、請求項1～13のいずれか一項に記載の方法。

【請求項15】

10

20

30

40

50

前記DNAメチル化プロファイルが、表1に掲載されるメチル化部位のうちの少なくとも3個、少なくとも5個、少なくとも10個、少なくとも20個、少なくとも50個、少なくとも100個、少なくとも150個、少なくとも200個、又はそれそれを含む、請求項14に記載の方法。

【請求項16】

前記DNAメチル化プロファイルが、表2に掲載されるメチル化部位を含む、請求項14に記載の方法。

【請求項17】

前記DNAメチル化プロファイルが、表3に掲載されるメチル化部位を含む、請求項14に記載の方法。

【請求項18】

前記DNAメチル化プロファイルが、表4に掲載されるメチル化部位を含む、請求項14に記載の方法。

【請求項19】

前記DNAメチル化プロファイルが、表5に掲載されるメチル化部位を含む、請求項14に記載の方法。

【請求項20】

DNAメチル化が、次のステップ：

(a) サンプルDNAをAPOBECで処理してシトシンを脱アミノ化するステップ、
(b) 捕捉に基づき富化するステップ、及び／又は(c) ハイスループット配列決定を行うステップ、のうちの1つ以上を含む方法を用いて評価される、請求項13～19のいずれか一項に記載の方法。

【請求項21】

前記DNAメチル化プロファイルが、(i) 組織、(ii) 臓器、又は(iii) 生体システム、例えば、免疫系、胃腸系、泌尿器系、筋肉系、心血管系、及び／又は神経系などの生物学的年齢が増加していることに関係する、請求項1～20のいずれか一項に記載の方法。

【請求項22】

前記生物学的年齢が増加していると評価された前記組織、臓器、又は生体システムの生物学的年齢を改善するのに適した生活習慣計画、食事計画又は治療の介入をイヌに適用することをさらに含む、請求項21に記載の方法。

【請求項23】

イヌの生物学的年齢の改善における使用のための食事介入又は治療モダリティであって、前記食事介入が、請求項6～8、又は13～21のいずれか一項に記載の方法によって評価された生物学的年齢を有するイヌに対して行われる、食事介入又は治療モダリティ。

【請求項24】

イヌの生物学的年齢を改善するための食事介入又は治療モダリティの使用であって、前記食事介入が、請求項6～8又は請求項13～21のいずれか一項に記載の方法によって評価された生物学的年齢を有するイヌに対して行われる、使用。

【請求項25】

実行されると1つ以上のプロセッサに請求項1又は請求項6～19のいずれか一項に記載の方法を実行させる命令を含む、コンピュータ可読媒体。

【請求項26】

イヌに適した生活習慣計画、食事計画、又は治療の介入を選択するためのコンピュータシステムであって、前記コンピュータシステムが、

a) 前記イヌからのDNAメチル化プロファイルを使用して、前記イヌの生物学的年齢を評価するステップ、及び

b) ステップa) で評価された生物学的年齢に基づいて、適切な生活習慣計画、食事計画若しくは治療の介入を選択するステップ、のうちの1つ以上を実行するようにプログラムされている、コンピュータシステム。

10

20

30

40

50

【請求項 27】

イヌの生物学的年齢を改善するための生活習慣計画、食事計画又は治療の介入の有効性を評価するためのコンピュータシステムであって、前記コンピュータシステムが、

a) 前記生活習慣計画、食事計画又は治療の介入の前に前記イヌから得られたサンプル及び前記生活習慣計画、食事計画又は治療の介入の後に前記イヌから得られたサンプルからの DNA メチル化プロファイルを使用して、前記イヌの生物学的年齢を評価するステップと、

b) 前記生活習慣計画、食事計画又は治療の介入が適用される前と適用された後の前記イヌから得られた前記サンプル間で、前記イヌの生物学的年齢に変化があったか否かを評価するステップと、のうちの 1 つ以上を実行するようにプログラムされている、コンピュータシステム。

10

【請求項 28】

老化を防止する防止生活習慣計画、食事計画、又は治療の介入からイヌが利益を得る可能性を評価するためのコンピュータシステムであって、前記コンピュータシステムが

a) 前記イヌから得られたサンプルからの DNA メチル化プロファイルを使用して、前記イヌの生物学的年齢を評価するステップ、及び

b) 前記イヌが、その暦年齢と比較して高い生物学的年齢を有する場合、老化を防止する生活習慣計画、食事計画、又は治療の介入に応答する可能性が高いとして特定するステップ、のうちの 1 つ以上のステップを実行するようにプログラムされている、コンピュータシステム。

20

【請求項 29】

プログラム可能なコンピュータに、イヌからの DNA メチル化プロファイルを使用して前記イヌの生物学的年齢を評価させ、DNA メチル化プロファイルを使用して評価された生物学的年齢に基づいて前記イヌに適した生活習慣計画、食事計画又は治療の介入を選択させるためのコンピュータ実行可能命令を含む、コンピュータプログラム製品。

【請求項 30】

プログラム可能なコンピュータに、a) 生活習慣計画、食事計画又は治療の介入前のイヌから得られたサンプル及び生活習慣計画、食事計画又は治療の介入後のイヌから得られたサンプルからの DNA メチル化プロファイルを使用して、イヌの生物学的年齢を評価させ、b) 前記生活習慣計画、食事計画又は治療の介入が適用された前後の前記イヌから得られたサンプル間で前記イヌの生物学的年齢に変化があったか否かを評価させるための、コンピュータ実行可能命令を含む、コンピュータプログラム製品。

30

【請求項 31】

プログラム可能なコンピュータに、a) イヌから得られたサンプルからの DNA メチル化プロファイルを使用して前記イヌの生物学的年齢を評価するステップ、及び b) 前記イヌが、その暦年齢と比較して高い生物学的年齢を有する場合、老化を防止する生活習慣計画、食事計画又は治療の介入に応答する可能性が高いとして特定するステップ、の 1 つ以上のステップを実行させるコンピュータ実行可能命令を含む、コンピュータプログラム製品。

【請求項 32】

請求項 26～31 のいずれか一項に記載のコンピュータシステム又はコンピュータプログラム製品であって、前記コンピュータシステム又はコンピュータプログラムが、ステップ (b) の結果を詳述するレポートを作成及び共有する、コンピュータシステム又はコンピュータプログラム製品。

40

【請求項 33】

イヌの生物学的年齢を評価するためのキットであって、前記対象からのサンプルの採取及び任意選択で安定化のための手段及び試薬と、前記サンプルの採取及び任意選択で安定化のための説明書と、を含み、前記サンプルが、郵送して後続の DNA 抽出に供し、前記サンプルから抽出された DNA における DNA メチル化を測定して DNA メチル化プロファイルを得るためのものである、キット。

50

【請求項 3 4】

イヌの適切な生活習慣計画、食事計画、又は治療の介入を選択する方法であって、前記方法が、（a）任意選択で請求項 3 3 に記載のキットを使用して、前記イヌからサンプルを提供するステップと、（b）前記サンプルを提供して後続の DNA 抽出に供し、前記サンプルから抽出された DNA における DNA メチル化を測定して DNA メチル化プロファイルを得るステップと、（c）請求項 2 6 に記載のコンピュータシステム又は請求項 2 9 に記載のコンピュータプログラム製品を使用して、前記イヌに適した生活習慣計画、食事計画又は治療の介入を選択するステップと、を含み、前記コンピュータシステムが、ステップ（c）の結果を詳述するレポートを作成及び共有する、方法。

【請求項 3 5】

イヌの生物学的年齢を改善するための生活習慣計画、食事計画、又は治療の介入の有効性を評価するための方法であって、（a）前記生活習慣計画、食事計画、又は治療の介入の前に前記イヌから得られたサンプル、及び前記生活習慣計画、食事計画、又は治療の介入の後に前記イヌから得られたサンプルを、任意選択で請求項 3 3 に記載のキットを使用して提供するステップと、（b）前記サンプルを提供して後続の DNA 抽出に供し、前記サンプルから抽出された DNA における DNA メチル化を測定して DNA メチル化プロファイルを提供するステップと、（c）請求項 2 7 に記載のコンピュータシステム又は請求項 3 0 に記載のコンピュータプログラム製品を使用して、前記生活習慣計画、食事計画、又は治療の介入が適用される前と適用された後の前記イヌから得られた前記サンプル間で、前記イヌの生物学的年齢に変化があったか否かを評価するステップと、を含み、前記コンピュータシステムが、ステップ（c）の結果を詳述するレポートを作成及び共有する、方法。

【請求項 3 6】

老化を防止する生活習慣計画、食事計画又は治療の介入からイヌが利益を得る可能性を評価するための方法であって、（a）前記イヌから得られたサンプルを提供するステップであって、請求項 3 3 に記載のキットを任意選択で使用する、提供するステップと、（b）前記サンプルを提供して後続の DNA 抽出に供し、前記サンプルから抽出された DNA における DNA メチル化を測定して DNA メチル化プロファイルを得るステップと、（c）請求項 2 8 に記載のコンピュータシステム又は請求項 3 1 に記載のコンピュータプログラム製品を使用して、イヌがその暦年齢と比較して高い生物学的年齢を有する場合、老化を防止する生活習慣計画、食事計画、又は治療の介入に応答する可能性が高いとして前記イヌを特定するステップと、を含み、前記コンピュータシステムが、ステップ（c）の結果を詳述するレポートを作成及び共有する、方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

本発明は、DNA メチル化プロファイルを使用してイヌの生物学的年齢を評価する方法に関し、特に、本発明は、DNA メチル化プロファイルから評価された生物学的年齢に基づいて、イヌのための生活習慣計画、食事計画若しくは治療の介入を選択する方法、又は生活習慣計画、食事計画若しくは治療の介入の有効性を評価する方法、又は老化を防止する生活習慣若しくは食事計画を開発する方法に関する。

【背景技術】

【0 0 0 2】

イヌの健康に関する情報を評価できることは、イヌの健康状態及び幸福度についての情報を得るために望ましい。

【0 0 0 3】

暦年齢は、健康状態の主要な指標であることが知られており、暦年齢の増加は健康の低下に関連する。しかしながら、遺伝、栄養、及び生活習慣により、個体は暦年齢よりも遅く又は速く加齢することがある。したがって、暦年齢は、個体の老化速度又は健康低下のリスクを必ずしも反映していない場合がある。一方、個体の生物学的年齢（例えば、臨床

10

20

30

40

50

生化学及び細胞生物学の尺度に基づく)は、同じ暦年齢の他の個体と比較して異なり得る。生物学的年齢を評価する方法は、それらの暦年齢に基づいて予測されるよりも早期に加齢に伴う障害のリスクがある個体を特定するのに役立ち得る(例えば、国際公開第2019/046725号を参照されたい)。

【0004】

しかしながら、イヌの生物学的年齢を評価し、生物学的年齢の尺度を利用してイヌの健康アウトカムを改善するさらなる方法が必要とされている。

【発明の概要】

【0005】

第1の態様では、本発明は、イヌのため生活習慣計画、食事計画若しくは治療の介入を選択する方法を提供し、本方法は、

a) 前記イヌから得られたサンプルからDNAメチル化プロファイルを提供するステップと、

b) DNAメチル化プロファイルを使用してイヌの生物学的年齢を評価するステップと、

c) ステップb)で評価された生物学的年齢に基づいて、イヌの生活習慣計画、食事計画若しくは治療の介入を選択するステップと、を含む。

【0006】

したがって、本方法は、DNAメチル化プロファイルから評価される生物学的年齢に基づいて、イヌのための適切な生活習慣計画、食事計画又は治療の介入生活習慣計画、食事計画又は治療の介入を選択することを可能にする。例えば、高消化性で高品質のタンパク質食は、一般的にはイヌの暦年齢に基づいて推奨される。例えば、イヌは7歳又は8歳前後で高齢食に切り替えることを推奨される場合もある。しかしながら、本発明の文脈において、イヌの暦年齢と比較して生物学的年齢が高いという評価は、より早い年齢の時点でイヌの食餌を高齢食に切り替える決定を可能にし得る。対照的に、その暦年齢と比較して生物学的年齢が低いイヌは、より長期間、高エネルギー／高タンパク質食を継続することが可能であり得る。

【0007】

本方法は、DNAメチル化プロファイルから評価されたその生物学的年齢に基づき、イヌの寿命、健康寿命及び／又は長命の確率を、同じ暦年齢、性別及び品種の同等のイヌと比較して評価することを含んでもよい。

【0008】

本明細書で使用されるとき、「寿命(lifespan)」は、対象が生存する期間(例えば、年数)の長さを指し得る。「健康寿命(Healthspan)」は、疾患のない人生の期間(例えば、年数)の長さを指し得る。「長命(Longevity)」は、対象がその予測寿命を超えて生存する時間の長さ(例えば、年数)を指し得る。

【0009】

適切には、本方法は、イヌの生物学的年齢が、その暦年齢と比較して高いという評価に従い、イヌに対する生活習慣計画、食事計画又は治療の介入を選択及び／又は適用することを含んでもよい。

【0010】

本明細書で使用されるとき、「イヌに適した生活習慣計画、食事計画、又は治療の介入を選択すること」は、「イヌのための生活習慣計画、食事計画、又は治療の介入を推奨すること」又は「イヌのために推奨された生活習慣計画、食事計画、又は治療の介入を提供すること」も包含し得る。

【0011】

別の態様では、本発明は、イヌの生物学的年齢を改善するための生活習慣計画、食事計画又は治療の介入の有効性を評価するための方法を提供し、本方法は、

a) 本発明の第1の態様に従って選択された生活習慣計画、食事計画又は治療の介入をイヌに適用するステップと、

b) 生活習慣計画、食事計画、又は治療の介入をイヌに適用する期間の後に、イヌから得られたサンプルからのDNAメチル化プロファイルを使用して、イヌの生物学的年齢を評価するステップと、

c) 生活習慣計画、食事計画又は治療の介入に従う期間の後、イヌの生物学的年齢に変化があったか否かを評価するステップと、を含む。

【0012】

別の態様では、本発明は、イヌの生物学的年齢を改善するための生活習慣計画、食事計画又は治療の介入の有効性を評価するための方法を提供し、本方法は、

a) イヌから得られたサンプルからのDNAメチル化プロファイルを使用して、イヌの生物学的年齢を評価するステップと、

b) ステップa) で評価された生物学的年齢に基づいて選択された生活習慣計画、食事計画又は治療の介入をイヌに適用するステップと、

c) 生活習慣計画、食事計画、又は治療の介入をイヌに適用する期間の後に、イヌから得られたサンプルからのDNAメチル化プロファイルを使用して、イヌの生物学的年齢を評価するステップと、

d) ステップa) とステップc) との間でイヌの生物学的年齢に変化があったか否かを評価するステップと、を含む。

【0013】

さらなる態様では、本発明は、イヌの生物学的年齢を改善するための生活習慣計画、食事計画又は治療の介入の有効性を評価するための方法に関し、本方法は、

a) イヌから得られたサンプルからのDNAメチル化プロファイルを使用して、イヌの生物学的年齢を評価するステップと、

b) 生活習慣計画、食事計画、又は治療の介入を前記イヌに適用するステップと、

c) 生活習慣計画、食事計画、又は治療の介入をイヌに適用する期間の後に、イヌから得られた第2のサンプルからのDNAメチル化プロファイルを使用して、イヌの第2の生物学的年齢を評価するステップと、

d) 生活習慣計画、食事計画又は治療の介入に従う期間の後、イヌの第1及び第2の生物学的年齢に変化があったか否かを評価するステップと、を含む。

【0014】

適切には、イヌの生物学的年齢を改善することは、イヌの生物学的年齢と暦年齢との間の差の低減を指してもよく、その際、イヌの生物学的年齢は、その暦年齢よりも大きい。さらに、イヌの生物学的年齢を改善することは、イヌの生物学的年齢と暦年齢との間の差を維持すること、又はさらに増加させることを指してもよく、その際、イヌの生物学的年齢は、その暦年齢未満である。あるいは、イヌの生物学的年齢の悪化は、イヌの生物学的年齢と暦年齢との間の差の増加を指してもよく、その際、イヌの生物学的年齢は、その暦年齢よりも大きい。イヌの生物学的年齢の悪化はまた、イヌの生物学的年齢と暦年齢との間の差の減少を指してもよく、その際、イヌの生物学的年齢はその暦年齢未満である。

【0015】

適切には、イヌの生物学的年齢を改善することは、イヌの生物学的年齢と暦年齢との間の変化率の低減を指してもよく、その際、イヌの生物学的年齢は、その暦年齢よりも大きい。例えば、イヌの生物学的年齢は、暦年齢が1年増加するごとに1.5年増加している可能性がある。生活習慣及び食事計画の介入に続いて、イヌの生物学的年齢がその後、暦年齢の1年の増加あたり1.25年増加するような変化率の減少は、イヌの生物学的年齢の改善を提供し得る。

【0016】

生物学的年齢を改善することは、イヌの生物学的年齢がその暦年齢未満である場合、イヌの生物学的年齢と暦年齢との間の変化率を維持又は増加させることも指してもよい。例えば、イヌの生物学的年齢は、暦年齢の1年の増加あたり1年未満（例えば、0.9年）増加し得る。生活習慣、食事計画又は治療の介入後の変化率は、例えば、介入後のイヌの生物学的年齢を、例えば、暦年齢の1年の増加あたり0.8年以下だけ増加させるように

10

20

30

40

50

変化し得、この変化はイヌの生物学的年齢の改善を提供し得る。

【0017】

イヌの生物学的年齢を改善するための、生活習慣計画、食事計画又は治療の介入の有効性を評価するための本方法は、有利には、イヌの健康を改善又は維持するための生活習慣計画、食事計画又は治療の介入の有効性の継続的な経過観察を可能にし得る。かかる方法の使用は、有利なことに、特に有効な生活習慣計画、食事計画又は治療の介入が特定されることを可能にし得る。対照的に、イヌの生物学的年齢に基づいて、生活習慣計画、食事計画又は治療の介入が無効であると評価される場合、次いで、代替的な生活習慣計画、食事計画、又は治療の介入が実施され得る。

【0018】

別の態様では、本発明は、イヌが疾患を発症するリスクを防止又は低減する方法を提供し、方法は、

a) イヌから得られたサンプルからのDNAメチル化プロファイルを使用して、イヌの生物学的年齢を評価することであって、イヌについて評価された生物学的年齢が、疾患を発症する可能性の増加と関連付けられる、評価するステップと、

b) ステップa) で評価された生物学的年齢に基づいて、生活習慣計画、食事計画若しくは治療の介入を選択することであって、

生活習慣計画、食事計画、又は治療の介入が、イヌの疾患発症リスクを防止又は低減する、選択するステップと、を含む。

【0019】

適切には、疾患は、加齢関連疾患である。例えば、加齢関連疾患は、変形性関節症、認知症、認知機能障害、前糖尿病状態、糖尿病、がん、心疾患、肥満、胃腸障害、失禁、腎疾患、サルコペニア、視力低下、聴力低下、骨粗鬆症、白内障、脳血管疾患、及び／又は肝疾患であり得る。

【0020】

本方法は、任意選択で、イヌに対して生活習慣計画、食事計画、又は治療の介入を行うことをさらに含み得る。適切には、生活習慣計画は、食事介入又は治療モダリティであり得る。

【0021】

別の態様では、本発明は、老化を防止する生活習慣計画、食事計画又は治療の介入を受けるのに適しているイヌを選択する方法に関し、本方法は、a) イヌから得られたサンプルからのDNAメチル化プロファイルを使用して、イヌの生物学的年齢を評価するステップと、b) 生物学的年齢が暦年齢と比較して高い場合、老化を防止する生活習慣計画、食事計画又は治療の介入を受けるのに適しているとしてイヌを選択するステップと、を含む。

【0022】

適切には、老化を防止する生活習慣計画、食事計画又は治療の介入は、暦年齢に基づいてイヌに有効であり得るが、生物学的年齢がその暦年齢と比較して高いイヌに適用された場合に特に有効であり得る。したがって、本方法は、有利なことに、老化を防止する生活習慣計画、食事計画又は治療の介入に応答する可能性が高い、又は応答の程度が改善されたイヌの選択を可能にすることもできる。

【0023】

生活習慣計画、食事計画又は治療の介入は、イヌが、その暦年齢と比較して、高い生物学的年齢を有するという評価に基づいて選択されてもよい。

【0024】

生活習慣計画、食事計画、又は治療の介入は、食事介入であり得る。食事介入としては、カロリー制限食、高齢食、低タンパク質食などがあり得る。

【0025】

DNAメチル化プロファイルは、(i) 組織、(ii) 臓器、又は(iii) 生体システム、例えば、免疫系、胃腸系、泌尿器系、筋系、心血管系、及び／又は神経系などの、

10

20

30

40

50

生物学的年齢の増加に関連し得る。

【0026】

本発明は、更に、イヌの生物学的年齢の改善における使用のための食事介入を提供し、本食事介入は、本発明の方法によって生物学的年齢が評価されたイヌに対して行われる。

【0027】

本発明はさらに、イヌの生物学的年齢を改善するための食事介入の使用に関し、本食事介入は、本発明の方法によって生物学的年齢が評価されたイヌに対して行われる。

【0028】

本発明は、更に、実行されると1以上のプロセッサに本発明の方法を実行させる命令を含む、コンピュータ可読媒体を提供する。

【0029】

本発明はまた、イヌに適した生活習慣計画、食事計画又は治療の介入を選択するためのコンピュータシステムであって、a) イヌからのDNAメチル化プロファイルを使用してイヌの生物学的年齢を評価するステップと、b) ステップa) で評価された生物学的年齢に基づいてイヌに適した生活習慣計画、食事計画又は治療の介入を選択するステップとのうちの1つ又は複数を実行するようにプログラムされた、コンピュータシステムを提供する。

【0030】

別の態様では、本発明は、イヌの生物学的年齢を改善するための生活習慣計画、食事計画又は治療の介入の有効性を評価するためのコンピュータシステムであって、a) 生活習慣計画、食事計画又は治療の介入前のイヌから得られたサンプル及び生活習慣計画、食事計画又は治療の介入後のイヌから得られたサンプルからのDNAメチル化プロファイルを使用してイヌの生物学的年齢を評価するステップと、b) 生活習慣計画、食事計画又は治療の介入が適用された前後のイヌから得られたサンプル間でイヌの生物学的年齢に変化があったか否かを評価するステップと、の1つ又は複数を実行するようにプログラムされた、コンピュータシステムを提供する。

【0031】

さらなる態様では、本発明は、老化を防止する生活習慣計画、食事計画又は治療の介入からイヌが利益を得る可能性を評価するためのコンピュータシステムを提供し、本コンピュータシステムは、a) イヌから得られたサンプルからのDNAメチル化プロファイルを使用してイヌの生物学的年齢を評価するステップと、b) その暦年齢と比較して高い生物学的年齢を有する場合、老化を防止する生活習慣計画、食事計画又は治療の介入に応答する可能性が高いとしてイヌを特定するステップと、の1つ又は複数のステップを実行するようにプログラムされている。

【0032】

さらなる態様では、本発明は、プログラム可能なコンピュータに、イヌからのDNAメチル化プロファイルを使用してイヌの生物学的年齢を評価させ、DNAメチル化プロファイルを使用して評価された生物学的年齢に基づいてイヌに適した生活習慣計画、食事計画又は治療の介入を選択させるためのコンピュータ実行可能命令を含むコンピュータプログラム製品を提供する。

【0033】

別の態様では、本発明は、プログラム可能なコンピュータに、a) 生活習慣計画、食事計画又は治療の介入前のイヌから得られたサンプル及び生活習慣計画、食事計画又は治療の介入後のイヌから得られたサンプルからのDNAメチル化プロファイルを使用してイヌの生物学的年齢を評価させ、b) 生活習慣計画、食事計画又は治療の介入が適用された前後のイヌから得られたサンプル間でイヌの生物学的年齢に変化があったか否かを評価させるための、コンピュータ実行可能命令を含むコンピュータプログラム製品を提供する。

【0034】

さらなる態様では、本発明は、プログラム可能なコンピュータに、a) イヌから得られたサンプルからのDNAメチル化プロファイルを使用してイヌの生物学的年齢を評価させ

10

20

30

40

50

、b) その暦年齢と比較して高い生物学的年齢を有する場合、老化を防止する生活習慣計画、食事計画又は治療の介入に応答する可能性が高いとしてイヌを特定させる、コンピュータ実行可能命令を含むコンピュータプログラム製品を提供する。

【0035】

有利なことに、本発明は、複数の臓器系及び機能に関するマーカーに基づいて生物学的年齢を評価することを可能にし得る。したがって、本発明の方法は、可能性のある様々な臓器機能不全を有利に包含し得る。

【0036】

イヌの生物学的年齢を評価することにより、動物の幸福度の1つ以上の態様を検定することが可能になる。第1に、測定／評価は、この動物が食事又は栄養補助食品に基づく介入を必要とする可能性がより高いか否かを予測することができる。測定／評価はまた、食事又は栄養補助食品に基づく介入の、加齢に対する有効性を検定するために利用することができる。

【図面の簡単な説明】

【0037】

【図1】本発明の例示的な生体時計を使用して予測される生物学的年齢は、暦年齢と高度に相関する。

【図2】カロリー制限試験における本発明の例示的な生体時計の検証。デルタは、暦年齢と、第1の生物学的時計により予測された生物学的年齢とを比較する回帰モデルの残差に対応する。カロリー制限を受けたイヌは、対照食のイヌと比較して有意に低い生物学的年齢（より低いデルタ）を有する。

【図3】完全な生体時計からの上位3個のメチル化部位を含む例示的な生体時計は、暦年齢と相関する。

【図4】完全な生体時計からの上位5個のメチル化部位を含む例示的な生体時計は、暦年齢と相関する。

【図5】完全な生体時計からの上位10個のメチル化部位を含む例示的な生体時計は、暦年齢と相関する。

【図6】完全な生体時計からの上位20個のメチル化部位を含む例示的な生体時計は、暦年齢と相関する。

【図7】完全な生体時計からの上位50個のメチル化部位を含む例示的な生体時計は、暦年齢と相関する。

【発明を実施するための形態】

【0038】

次に、本発明の様々な好ましい特徴及び実施形態を、非限定的な実施例により記載する。当業者は、開示される本発明の範囲から逸脱することなく、本明細書に開示される本発明の全ての特徴を組み合わせることができることを理解されたい。

【0039】

本明細書及び添付の特許請求の範囲において使用する場合、単数形「a」、「an」、及び「the」は、別段の指示がない限り、複数の指示対象を含むことについて留意する必要がある。

【0040】

本明細書で用いる用語「含んでいる (comprising)」、「含む (comprises)」及び「で構成される (comprised of)」は、「含んでいる (including)」、「含む (includes)」と同義である、又は「含有している (containing)」、「含有する (contains)」と同義である、他を包含し得る又はオープンエンドのものであり、追加の、明記されていないメンバー、要素又は方法工程を除外するものではない。用語「含む (comprising)」、「含む (comprises)」、及び「を含む (comprised of)」はまた、用語「からなる (consisting of)」を含む。

【0041】

数値範囲は、その範囲を画定する数を含む。

【0042】

本明細書で論じられる刊行物は、単に本出願の出願日より前にそれらが開示されていたがために提供されている。本明細書において引用されるいかなる文献も、これらの刊行物が本明細書に添付の特許請求の範囲に対する先行技術を構成するものであると認めるものとして解釈されるべきではない。

【0043】

本明細書に開示される方法及びシステムは、獣医、医療専門家、検査技師、及びペットケア提供者等によって使用することができる。

【0044】

対象

本方法は、イヌ被検体を対象とする。したがって、本発明の対象はイヌである。

【0045】

別の態様では、対象はネコ科動物の被検体であってもよい。したがって、本発明の別の態様では、対象はネコである。本明細書における全ての開示は、別段の記載がない限り、ネコに等しく適用可能である。

【0046】

品種

本発明の方法は、イヌの品種に関する情報を利用することもできる。イヌは、例えば、超小型 (toy) 犬種、小型犬種、中型犬種、大型犬種、又は超大型犬種として分類されてもよい。好適には、イヌの品種は、イヌの体重に基づいて分類されてもよい。好適には、イヌの品種は、所定の品種についてのイヌの平均体重に基づいて分類されてもよい。

【0047】

好適には、イヌは、小型品種又は中型品種として分類されてもよい。好適には、分類は、この品種の成犬の平均体重によって評価される。好適には、平均体重が10kg未満である品種は小型品種として分類され、及び／又は平均体重が10kgを超過する品種は中型品種として分類される。

【0048】

対象がネコである別の態様では、ネコは飼いネコであってもよい。好適には、ネコは、飼育されている (domestic) 短毛ネコであってもよい。

【0049】

性別

好適には、イヌの性別は、オス又はメスとして分類されてもよい。

【0050】

暦年齢

暦年齢は、対象の出生から所与の日付までに経過した時間量として定義されてもよい。暦年齢は、年、月、日等で表されてもよい。

【0051】

好適には、本発明の方法は、任意の暦年齢のイヌに対して適用され得る。特定の実施形態では、イヌは少なくとも約2歳齢であってもよい。好適には、イヌは、少なくとも約2歳齢、少なくとも約3歳齢、少なくとも約4歳齢、少なくとも約5歳齢、少なくとも約6歳齢、少なくとも約7歳齢、少なくとも約8歳齢、少なくとも約9歳齢、又は少なくとも約10歳齢であってもよい。

【0052】

好適には、イヌは少なくとも約7歳齢であってもよい。

【0053】

サンプル

本発明は、対象から得られた1つ以上のサンプルからDNAメチル化プロファイルを提供又は確定することを含む。

【0054】

好適には、サンプルは、血液、毛包、口腔スワブ（b u c c a l s w a b）、唾液又は組織サンプルである。

【0055】

好適には、サンプルは、毛包、口腔スワブ又は唾液サンプルである。かかるサンプルタイプは、サンプルが例えば獣医環境の外で、例えば本発明によるキットを使用して提供される場合に特に適用可能である。

【0056】

好適には、サンプルは、血液由来である。試料は、血液画分を含有していてもよい、又は、全血であってもよい。サンプルは、好ましくは全血を含む。サンプルは、末梢血単核細胞（P B M C）又はリンパ球のサンプルを含み得る。対象からサンプルを採取し、サンプルからDNA（例えば、ゲノムDNA）を抽出するための技術は、当該技術分野において周知である。

【0057】

本発明の方法は、対象から得られた1つ以上のサンプルに対して実施され得る。例えば、本発明の方法は、所与の時点で得られた第1の試料と、第1の試料が得られた後の時間間隔の後に得られた第2の試料とを使用して実施されてもよい。本発明の方法は、ある期間にわたって同じイヌから得られた試料に対して2回以上実施することができる。例えば、試料は、1ヶ月に1回、1年に1回、又は2年に1回、繰り返し得られてもよい。好適には、試料は、1年に約1回（例えば、毎年の獣医学的健康診断の間に）得られてもよい。このことは、例えば、食事介入や運動療法変更などの、特定の治療の効果を又は生活習慣の変更の効果を評価する際に有用であり得る。

【0058】

一実施形態では、本発明の方法は、生活習慣の変更（例えば、食事製品による介入又は運動療法の変更）の前に対象から得られたサンプルに適用することができる。別の実施形態では、本発明の方法は、例えば、食事製品による介入又は運動療法の変更の前及び後に対象から得られたサンプルに適用することができる。本発明の方法は、例えば食事製品による介入期間中又は運動療法の変更の期間中に、予め定められた複数の時点で採取されたサンプルにも適用することができる。これらの予め定められた複数の時点は、例えば、食事製品による介入期間中、又は運動療法の変更の期間中の周期的なものであってもよく、例えば、毎日又は3日毎であってもよく、又は検査される対象に応じて異なってもよい。

【0059】

DNAメチル化

DNAメチル化は、DNA分子の一部であるシトシン塩基に対して共有結合によりメチル基（CH₃）が付加されるプロセスである。インビボでは、このプロセスは、S-アデニルメチオニン（SAM）からのメチル基の転移によって修飾シトシンを生成するDNAメチルトランスフェラーゼ（Dnm_t）のファミリーによって触媒される。シトシンは、5番目の炭素原子上で修飾され、修飾された残基は5-メチルシトシン（5mC）として知られている。DNAメチル化はまた、5-ヒドロキシメチルシトシン（5hmC）を含み得る。

【0060】

DNAメチル化はエピジェネティック機構の一例であり、すなわち、基礎となるDNA配列を改変することなく遺伝子発現を変更させることができる。DNAメチル化は、例えば、抑制因子の動員シグナルとして作用することによって、又は転写因子の動員を直接遮断することによって、遺伝子の発現を阻害することができる。DNAメチル化は、哺乳動物の体細胞ゲノムでは、シトシン及びグアニンが隣接してジヌクレオチドを形成している部位（CpG）で主に生じる。胚発生では非CpGメチル化が観察される一方で、成体では、これらの修飾はほとんどの細胞型において著しく減少する。CpGアイランドはCpG密度が高いが一般的にはメチル化されていないDNA領域である。これらの領域は、プロモーター領域、特にハウスキーピング遺伝子のプロモーター領域と関連しており、遺伝

10

20

30

40

50

子発現を可能にするために作用可能な状態 (p e r m i s s i v e s t a t e) に維持されていると考えられる。

【 0 0 6 1 】

DNAメチル化は、ヒト及び他の動物において年齢とともに変化することが見出されている。老化した哺乳動物組織は全般的にDNA低メチル化を示し、この低メチル化は、DMNT1メチルトランスフェラーゼ活性の漸進的な低下又はミスターゲティングに起因すると考えられるが、CpGアイランドでは局所的な過剰メチル化が示される。局所的な過剰メチル化は特定の遺伝子の抑制をもたらし得るものであり、この抑制が加齢関連疾患に寄与する場合がある。DNAメチル化におけるエピジェネティックな変化と年齢との間の関連により、「DNAメチル化時計」を使用した「生物学的年齢」の推定が可能になる。これらの時計は通常、教師あり機械学習手法を使用して暦年齢に対して訓練されており、個体の実際の暦年齢からの「時計年齢」の偏差は、「生物学的」年齢の指標と見なされる。生物学的年齢は個体の暦年齢と相関するが、相関からの偏差は、個体における加齢関連疾患又は疾病の潜在的风险を示し得る。

10

【 0 0 6 2 】

特定のメチル化DNAの検出は、複数の方法によって達成することができる（例えば、Zuo et al., 2009; Epigenomics. 1 (2): 331-345）及びRauluseviciute et al.; Clinical Epigenetics; 2019; 11 (193)を参照）。血液、尿、糞便又は唾液のようなサンプル中の、特定の遺伝子座においてメチル化が異なるDNA (d i f f e r e n t i a l l y m e t h y l a t e d DNA) の検出には、多くの方法が利用可能である。これらの方法では、非メチル化DNAと5-メチルシトシン又はメチル化DNAとを区別した後に、特定のゲノム領域のメチル化DNA及び非メチル化DNAの割合を定量することができる。

20

【 0 0 6 3 】

本方法は、任意の適切な方法を使用してイヌのDNAメチル化プロファイルを評価することを含み得る。適切な方法としては、以下に記載されるものが挙げられるが、これらに限定されない。

【 0 0 6 4 】

EM-seq (E n z y m a t i c M e t h y l - s e q)

30

好適には、5mC及び5hmCを検出するために酵素的アプローチが用いられる。例として、EM-seq (E n z y m a t i c M e t h y l - s e q) を使用することができる。

【 0 0 6 5 】

典型的には、EM-seqでは、第1の酵素ステップにおいて、Tetメチルシトシンジオキシゲナーゼ2 (TET2) の活性によって、5mCが5hmCに、次いで5fCに、最後に5caCに酸化される。さらに、T4-BGT酵素を使用して、元々存在していた5hmCと、TET2活性によって産生された5hmCとの両方をグルコシル化する。二本鎖DNAの変性に続く第2の酵素ステップでは、酵素アポリポタンパク質B mRNA編集酵素触媒ポリペプチド様3A (APOBEC3A) を使用してシトシンを脱アミノ化するが、酸化又はグリコシル化された5mC及び5hmCを脱アミノ化することはできない。非メチル化シトシンのみが脱アミノ化されてウラシル塩基を形成する。第1の酵素的ステップの前に、機械的剪断によりDNA断片を作成し、末端修復し、Aテールを付加し、配列決定アダプターにライゲーションしてもよく、これらは、例えば、NEBNext (登録商標) DNA Ultra II 試薬 (NEB) を使用して実施することができる。第2の酵素的ステップに続いて、脱アミノ化された一本鎖DNAは、ウラシル含有鋳型を増幅させることができるNEBNext (登録商標) Q5U (商標) などのポリメラーゼを使用して、PCR反応によって増幅することができ、得られたライブラリーは、亜硫酸水素塩配列決定によって作製されたDNAサンプルと同一の様式で配列決定又は解析することができる。EM-seqのアウトプットは、一般に、全ゲノム亜硫酸水素塩配列

40

50

決定と同じであるが、DNAを損傷させる試薬の使用がより少なく、結果として、サンプルの減少を低減し、シトシンメチル化コールのカバレッジ、感度、及び精度において、亜硫酸水素塩変換による調製サンプルよりも性能が優れている。例示的なEM-seq法は、Vaisvila et al. (Genome Research; 2021; 31: 1-10)に記載されている。

【0066】

亜硫酸水素塩による変換に基づく方法

亜硫酸水素塩による変換は、非メチル化シトシンを亜硫酸水素ナトリウムで処理したときのウラシルへの選択的変換を利用する。変性DNAを亜硫酸水素ナトリウムで処理すると、全ての未修飾シトシンがウラシルに変換され、その後のPCR増幅によってこれらの残基がチミンに変換される。産生されたDNA配列の解析は、様々な方法を介して行うことができ、その例としては、変性ゲル電気泳動、一本鎖高次構造多型、融解曲線、蛍光リアルタイムPCR (Methylight)、MALDI質量分析、アレイハイブリダイゼーション、及び配列決定（例えば、全ゲノム亜硫酸水素塩配列決定WGBS）が挙げられるが、これらに限定されない。最近開発された技術（例えば、SeqCap Epi）は、配列決定の前に目的の配列を富化することで、より範囲を絞った領域に対するより深いカバレッジを可能にする）。亜硫酸水素塩により変換されたサンプル中の配列の存在量を未処理対照の存在量と比較することにより、標的部位のメチル化の解析が可能となり、変換された配列の割合は、標的部位のメチル化レベルを示す。

【0067】

標準的な亜硫酸水素塩による変換下で5mCと同様に挙動する酸化型5-ヒドロキシメチルシトシン (5hmC) と5mCを区別することができ、さらなる修飾5-ホルミルシトシン (5fC) を検出することができる、亜硫酸水素塩による変換法のさらなる変形が利用可能である。oxBS-Seq及びredBS-Seqなどのこれらの方法は、これらのマーカーの酸化及び還元を利用して、亜硫酸水素塩による変換に対するそれぞれの分子 (each species) の感受性を修飾し、比較解析により標的遺伝子座におけるそれぞれの修飾の量を定量する。

【0068】

選択的制限エンドヌクレアーゼによる消化方法

存在するDNAメチル化パターンを解析する方法には、制限酵素の使用が含まれてもよい。これらには、例えば、RLGS法 (restriction landmark genomic scanning) (Costello et al., 2000; Nat Genet.; 24 (2): 132-8)、MS-RDA法 (methylational-sensitive representational difference analysis) (Ushijima et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 1997 Mar 18; 94 (6): 2284-9)、及びDMH法 (differential methylation hybridization) (Huang et al. 1997 Mar 15; 57 (6): 1030-4) が挙げられる。制限エンドヌクレアーゼの消化活性はメチル化依存的であり得る。この特異性を利用して、メチル化配列と非メチル化配列とを区別することができる。ある種の制限酵素、例えばBstUI、HpaII及びNotIは、メチル化認識配列に感受性である。他には、McrBCなどは、メチル化配列に特異的である。

【0069】

例として、DMH法 (differential methylation hybridization) (Huangら、上記) では、ゲノムを200bp未満の長さの断片化するMseIなどのバルクゲノム (bulk genome) 制限酵素により、最初にゲノムを断片化する必要がある。断片化ステップの後、ゲノム断片を、メチル化感受性制限エンドヌクレアーゼ (MRE) を使用して消化するか、又はこの手法のいくつかのバージョンでは、カバレッジを改善するためにMREのカクテルを使用して消化する。使用される酵素 (1種又は複数種) の特異性に応じて、メチル化配列又は非メチル化配列のい

ずれかが分解される。消化された配列は、その後のPCRステップにおいて増幅されない。得られたPCR産物は、配列決定による又は蛍光色素と組み合わせたマイクロアレイハイブリダイゼーションによるさらなる処理及び分析に適する。

【0070】

適切には、本方法は、1種以上のMREの使用を含む方法によって作成されるDNAメチル化プロファイルを利用する。

【0071】

適切な比較要素 (comparator) を使用して、条件間でメチル化状態を調査することができる。メチル化状態の変化を検出するために、健常対象由来のDNAを、高齢対象又は罹患対象と比較することができる (Huang et al., Hum Mol Genet. 1999 Mar; 8 (3): 459-70)。あるいは、メチル化非感受性のHpaIIアイソシゾマーMspIなどの二次消化酵素を使用して対照サンプルを作成することができ、その結果、ゲノム内又はゲノム間でのメチル化の比較を行うことができる (Khulan et al., Genome Res. 2006 Aug; 16 (8): 1046-55)。

【0072】

いくつかの実施形態では、メチル化を検出するための方法は、ゲノムDNAをランダムに切断又はランダムに断片化することと、メチル化依存性制限酵素又はメチル化感受性制限酵素でDNAを切断することと、その後、切断又は未切断DNAを選択的に特定及び／又は解析することを含む。選択的同定は、例えば、切断されたDNAと切断されていないDNAとを分離すること (例えば、サイズによって)、及び切断されたか、あるいは切断されなかった目的配列を定量することを含み得る。あるいは、この方法は、制限酵素消化後に消化されていないDNAを増幅し、それによって、制限酵素によって切断されなかった増幅された領域中のDNAのみを増幅するステップを含み得る。いくつかの実施形態では、増幅は、遺伝子特異的であるプライマーを使用して行われ得る。あるいは、ランダムに断片化されたDNAの末端にアダプターを付加することができ、DNAをメチル化依存性又はメチル化感受性制限酵素で消化することができ、アダプター配列にハイブリダイズするプライマーを用いて未消化のDNAを増幅することができる。この場合、第2のステップは、増幅されたDNAプール中の特定の遺伝子の存在、非存在又は量を評価するために行うことができる。いくつかの実施形態では、DNAは、リアルタイム定量PCRを用いて増幅される。

【0073】

適切には、未消化の核酸に対するプローブ又はプライマーの選択的ハイブリダイゼーションによって、核酸の消化の有無が検出される。あるいは、このプローブは、消化された核酸及び未消化の核酸の両方に選択的にハイブリダイズするが、例えば、電気泳動による、両方の形態の間の区別を容易にする。ハイブリダイゼーションプローブに対する選択的ハイブリダイゼーションを達成するための適切な検出方法としては、例えば、サザンハイブリダイゼーション又は他の核酸ハイブリダイゼーションが挙げられる。

【0074】

適切なハイブリダイゼーション条件は、プローブを含む核酸二本鎖の融解温度 (T_m) に基づいて決定され得る。当業者は、最適なハイブリダイゼーション反応条件が各プローブについて経験的に決定されるべきであることを承知しているが、いくつかの一般則が適用され得る。好ましくは、短いオリゴヌクレオチドプローブを用いるハイブリダイゼーションは、低～中程度のストリンジェンシーで行われる。GCリッチなプローブ若しくはプライマー又はより長いプローブ若しくはプライマーの場合、高ストリンジェンシーのハイブリダイゼーション及び／又は洗浄が好ましい。高ストリンジェンシーは、本明細書において、約0.1×SSC緩衝液及び／若しくは約0.1% (w/v) SDS、又はより低い塩濃度、及び／又は少なくとも65℃の温度、又は同等の条件で行われるハイブリダイゼーション及び／又は洗浄であると定義される。本明細書における特定のレベルのストリンジェンシーへの言及は、当業者に公知のSSC以外の洗浄／ハイブリダイゼーション溶

液を使用する等価な条件を包含する。

【0075】

親和性富化に基づく方法

メチル化DNAと非メチル化DNAとの区別は、抗5mCなどの抗体、及び／又はメチル化CpG結合ドメイン(MBD)を含有するメチル化CpG結合タンパク質の使用によって達成することができる。MBDドメインタンパク質の抗体は、非メチル化DNAよりもメチル化DNAを特異的に単離することができる。抗体を利用する方法は一般的にMeDIPと呼ばれ、メチル化CpG結合タンパク質を利用する方法はしばしばMBD又はMIRAアプローチとして知られている。

【0076】

これらの方法ではゲノムを最初に断片化する必要があり、断片化は、頻繁に切断するMseIなどの酵素によるバルクゲノム消化を用いて行うことができ、その後、メチル化断片のアフィニティー精製が続く。インプットDNAと、精製されたメチル化DNAとを、マイクロアレイハイブリダイゼーション又は配列決定によって比較することで、特定の部位におけるメチル化レベルの比較解析を得ることができる。

【0077】

MethylCap-Seq又はMBD-Seqなどの親和性富化に基づく方法のさらなる変形が利用可能である。これらの方法では、塩勾配を使用して、メチル化CpG存在量に依存する様式でメチル化DNA断片を溶出し、CpGアイランド及び他の高度にメチル化された遺伝子座を、CpG密度がより低い遺伝子座から分離することによって、サンプルの複雑性を減少させる。次いで、画分を別々に配列決定して、配列カバレッジを改善することができる。

【0078】

単一分子配列決定に基づくアプローチ

現行の配列決定法は、単一分子を直接配列決定することができる。1分子リアルタイム(SMRT)DNA配列決定、例えば、Pacific BiosciencesからのSequelシステムが利用可能であり、ポリメラーゼ動態に基づいてメチル化シトシンなどの修飾塩基を同定できることが示されている。DNAの長い鎖を個々に配列決定することができるOxford Nanopore Technologies製のMinIONナノポア配列決定装置などのナノポア配列決定装置は、メチル化を含む塩基修飾を検出することもできる。

【0079】

DNAメチル化部位

好適には、DNAメチル化部位は、単一のシトシン、好適には単一のCpGジヌクレオチドにおける5mCの存在又は非存在を指し得る。

【0080】

好適には、DNAメチル化部位は、DNA領域内の複数のCpG部位にわたるメチル化の存在又は非存在(すなわち、5mCの数又は5mCの割合)を指し得る。好適には、DNAメチル化部位は、DNA領域内の複数のCpG部位にわたるメチル化レベル(すなわち、5mCの数又は5mCの割合)を指し得る。「DNA領域」は、ゲノムDNAの特定の部分を指し得る。これらのDNA領域は、遺伝子名又は染色体座標のセットのいずれかを参照することによって特定され得る。遺伝子名及び染色体座標の両方が当業者に周知であり、理解されるであろう。

【0081】

適切には、遺伝子名及び／又は座標は、「Tasha」イヌ参照ゲノム([https://www.ncbi.nlm.nih.gov/assembly/GCF_000002285.5_Jagannathan_et_al.;Genes\(Bsael\);2021;12\(6\);847](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/assembly/GCF_000002285.5_Jagannathan_et_al.;Genes(Bsael);2021;12(6);847))に基づき得られる。

【0082】

DNA領域は、例えば、遺伝子のプロモーターに近接するDNAの部分を定め得る。プ

10

20

30

40

50

ロモーター領域はCpGに富んでいることが知られている。例として、DNA領域は、プロモーターの約3kb上流から約3kb下流、約2kb上流～約2kb下流、約2kb上流～約1kb下流、約2kb上流～約0.5kb下流、約1kb上流～約0.5kb下流、約0.5kb上流～約0.5kb下流、を指し得る。適切には、DNA領域は、プロモーターの約1kb上流～約0.5kb下流を指し得る。

【0083】

適切には、DNA領域は、約5000塩基未満、約4000塩基未満、約3000塩基未満、約2000塩基未満、約1000塩基未満、約500塩基未満、又は約200塩基未満離れているCpG部位を含み得るか、又はそれからなり得る。

【0084】

適切には、DNA領域は、約200～約5000塩基、約200～約4000塩基、約200～約3000塩基、約200～約2000塩基、又は約200～約1000塩基離れているCpG部位を含み得るか、又はそれからなり得る。

【0085】

適切には、DNA領域は、1つ以上のCpGアイランドを含み得る。適切には、DNA領域は、CpGアイランドからなり得る。

【0086】

「CpGアイランド」とは、少なくとも200bpを含み、50%を超えるGCパーセンテージを含み、観察されたCpGの予測されたCpGに対する比が60%超であるDNA領域を指し得る。

【0087】

好適には、DNAメチル化部位は、X染色体及び／又はY染色体のCpGを含まない。

【0088】

好適には、DNAメチル化部位は、CpGにSNPを含むことが知られているCpGを含まない。

【0089】

上記で詳述した遺伝子／DNA領域の各々への言及は、これらの分子の全ての形態及びその断片又は多様体への言及として理解されるべきである。当業者によって理解されるように、いくつかの遺伝子は、個体間の対立遺伝子変異又は一塩基多型を示すことが知られている。多様体は、少なくとも90%、95%、98%、99%の配列同一性を共有する同じ領域からの核酸配列を含み、すなわち、かかる領域は、本明細書に記載されるDNA領域と比較して1つ以上の欠失、付加、置換、反転配列などを有する。したがって、本発明は、個体間には実際の核酸配列間に小さな遺伝変異が存在し得るという事実があるのにもかかわらず、本出願に関しては同じ結果を達成する多様体に及ぶことが理解されるべきである。したがって、本発明は、任意の他の変異、多型又は対立遺伝子変異から生じるDNAの全ての形態に及ぶことが理解されるべきである。

【0090】

これらの遺伝子領域のメチル化についてのスクリーニングに関して、アッセイが、特定のDNAをスクリーニングするように設計され得ることは理解されるべきである。解析する鎖の選択と、かかる鎖の染色体座標に基づく標的化とは、十分に当業者の技術の範囲内である。いくつかの状況において、アッセイは、両方の鎖をスクリーニングするために確立され得る。

【0091】

「メチル化状態」は、DNA領域内の特定の1個以上のヌクレオチドにおけるメチル化の存在、非存在及び／又は量への言及として理解され得る。特定のDNA配列（例えば、本明細書に記載されるDNA領域）のメチル化状態は、配列中の全ての塩基のメチル化状態を示し得るか、又は配列内の塩基対のサブセットのメチル化状態（例えば、シトシン又は1つ以上の特定の制限酵素認識配列のメチル化状態）を示し得るか、又は配列中のどこでメチル化が生じるかの正確な情報を提供せずに配列内の領域メチル化密度に関する情報を示し得る。メチル化状態は、任意選択で、「メチル化値」によって表すか、又は示すこ

10

20

30

40

50

とができる。

【0092】

適切には、DNAメチル化は、EM-Seq戦略を使用して評価され得る。かかる方法において、メチル化レベルは、酵素処理後及びAPOBEC3Aによる変換処理後の標的CpG部位「i」における「C」塩基+「U」塩基の合計のうちの「C」塩基の割合として評価することができる。他の実施形態では、メチル化レベルは、酵素処理及びAPOBEC3Aによる変換処理並びにその後の拡散増幅後の部位「i」における「C」塩基+「T」塩基の合計のうちの「C」塩基の割合として評価することができる。次いで、各部位における平均メチル化レベルを評価して、1つ以上の閾値が満たされているか否かを評価することもできる。

10

【0093】

いくつかの実施形態では、特に亜硫酸水素塩による変換及び配列決定方法が使用される場合、メチル化レベルは、亜硫酸水素塩処理後の標的CpG部位「i」における「C」塩基+「U」塩基の合計のうちの「C」塩基の割合として評価することができる。他の実施形態では、メチル化レベルは、亜硫酸水素塩処理及びその後の増幅後の部位「i」における「C」塩基+「T」塩基の合計のうちの「C」塩基の割合として評価することができる。次いで、各部位における平均メチル化レベルを評価して、1つ以上の閾値が満たされているか否かを評価することもできる。

【0094】

あるいは、メチル化値は、例えば、メチル化依存性制限酵素による制限消化後に存在する未消化のDNAの量を定量することによって生成することができる。この例において、DNA中の特定の配列が定量的PCRを使用して定量される場合、テンプレートのDNA量が、制限酵素非添加で処理された(mock treated)コントロールとほぼ等しいと、その配列が高度のメチル化を受けていないことを示すのに対し、テンプレートDNAの量が、制限酵素非添加で処理されたサンプル中に存在する量よりも実質的に少ないと、その配列にメチル化DNAが存在することを示す。したがって、例えば上記の例からの値、すなわちメチル化値は、メチル化状態を表し、したがってメチル化状態の定量的指標として使用することができる。メチル化値は、サンプル中の配列のメチル化状態を閾値と比較することが望ましい場合に特に有用である。

20

【0095】

サンプル間でいくらかのばらつきが生じるため、本発明は、生物学的年齢を示すと考えられるメチル化残基の正確な数によって限定されない。本発明はまた、必ずしもメチル化残基の配置(例えば、特定のメチル化部位)によって限定されない。

30

【0096】

一実施形態では、1つ以上の特定のシトシン残基又は反対のDNA鎖上のn+1位の対応するシトシンのメチル化状態を評価することを特に対象とするスクリーニング方法を使用することができる。

【0097】

富化(Enrichment)及び検出方法

DNAメチル化プロファイルを確定することは、選択されたDNA領域についてDNAサンプルを富化することを含んでもよい。例えば、本方法は、DNAメチル化プロファイルを構成するDNAメチル化部位を含むDNA領域について、DNAサンプルを富化することを含んでもよい。

40

【0098】

適切な富化方法は当該技術分野で公知であり、例えば、増幅又はハイブリダイゼーションに基づく方法が挙げられる。増幅富化は、典型的には、例えば、富化されるDNA領域に対するプライマーを使用するPCRベースの富化を指す。例えば、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)、ローリングサークル増幅(RCA)、逆ポリメラーゼ連鎖反応(iPCR)、in situ PCR、鎖置換増幅(strand displacement amplification)、又はサイクリングプローブ法などの任意の適切な増幅フ

50

フォーマットを使用することができる。

【0099】

ハイブリダイゼーションによる富化又は捕捉に基づく富化は、典型的には、富化されるDNA領域にハイブリダイズするハイブリダイゼーションプローブ（又は捕捉プローブ）の使用を指す。

【0100】

ハイブリダイゼーションプローブは、固体支持体に直接結合されてもよく、又はビオチン部分を捕捉するのに適した固体支持体（例えば、ストレプトアビジンでコーティングされたビーズ）への結合を可能にする部分（例えば、ビオチン）を含んでもよい。いずれの場合も、プローブに対して相補的な配列を含むDNAが捕捉され得るものであり、したがって、目的のDNA領域を含むDNAを、目的のDNA領域を含まないDNAから分離することが可能になる。したがって、このような捕捉ステップは、目的のDNA領域について富化することを可能にする。例えば、DNA領域は遺伝子プロモーターに近接するDNA領域であり得る。

10

【0101】

本明細書中で使用されるアレイは、プローブ組成物及びアレイに所望される用途に応じて異なり得る。例えば、アレイ中で検出される核酸（又はCpG部位）は、少なくとも10、100、1,000、10,000、10万、100万、1000万、1億、又はそれ以上であり得る。あるいは、又はさらに、検出される核酸（又はCpG部位）は、1億、1千万、1百万、10万、10,000、1,000、100以下であるように選択され得る。同様の範囲は、当該技術分野で公知のものなどの核酸配列決定アプローチ、例えば、次世代又は大規模並列（massively parallel）配列決定を使用して達成することができる。

20

【0102】

適切には、富化ステップは、メチル化DNA及び非メチル化DNAを分離するステップ又は区別して処理するステップの前又は後に実施されてもよい。

【0103】

本明細書で使用される場合、「DNA」又は「DNA領域」についての用語「富化する」又は「富化」は、所望の配列を含むDNAの（絶対）量及び／又は割合が、出発材料中の所望の配列を含むDNAの量及び／又は割合と比較して増加されるプロセスを意味する。これに関して、増幅による富化は、所望の配列の量及び割合を増加させる。捕捉に基づく富化による富化は、所望の配列を含むDNAの割合を増加させる。

30

【0104】

メチル化された部位とメチル化されていない部位とを区別するためのDNAのプロセッシングに続いて、本発明の方法は、メチル化された部位又はメチル化されていない部位（すなわち、元のサンプルにおいて）を特定するステップをさらに包含してもよい。

【0105】

特定するステップは、当該技術分野で公知の任意の適切な方法、例えば、アレイ検出又は配列決定（例えば、次世代配列決定）を含んでもよい。

【0106】

配列決定の特定するステップは、好ましくは、次世代配列決定（大規模並列又はハイスループット配列決定）を含む。次世代配列決定法は当該技術分野において周知であり、原則として、任意の方法が本発明において使用されることが企図され得る。次世代配列決定の手法は、製造業者による説明書（例えば、Roche、Illumina又はApplied Biosystemsによって提供される）に従って実施され得る。

40

【0107】

好ましい実施形態では、サンプルは、酵素反応を使用してDNAメチル化を変換し、全ゲノムライブラリー調製を実施し、配列決定（EM-Seq）によってメチル化プロファイルを測定することによって処理される。

【0108】

50

特に好ましい実施形態では、酵素反応を用いてDNAメチル化を変換し、全ゲノムライブラリー調製を行い、全ゲノム変換されたライブラリー調製物を捕捉プローブ（好ましくは、遺伝子プロモーターに近接するDNA領域を捕捉することができる捕捉プローブ）に対してハイブリダイズさせ、配列決定（EM-Seq）によってメチル化プロファイルを測定することによって、サンプルを処理する。

【0109】

DNAメチル化プロファイル

「DNAメチル化プロファイル」又は「メチル化プロファイル」は、1つ以上のDNAメチル化部位における5mCの存在、非存在、量又はレベルを指し得る。好ましくは、「メチル化プロファイル」は、複数のDNAメチル化部位における5mCの存在、非存在、量又はレベルを指す。したがって、複数の部位内の各個別のDNAメチル化部位における5mCの存在、非存在、量又はレベルが評価されてもよく、イヌの生物学的年齢の評価に寄与し得る。したがって、本方法の品質及び／又は能力は、複数のDNAメチル化マーカからの値を組み合わせることによって改善され得る。

10

【0110】

好適には、本生体時計は、複数のメチル化部位からのメチル化プロファイルを含む。

【0111】

好適には、少なくとも3個、少なくとも5個、少なくとも10個、少なくとも20個、少なくとも50個、少なくとも100個、少なくとも200個、少なくとも500個、少なくとも1000個、少なくとも2000個、少なくとも5000個、少なくとも10000個、少なくとも50000個、少なくとも100000個、少なくとも250000個、又は少なくとも500000個のDNAメチル化部位からの5mCの存在又は非存在を用いて、イヌの生物学的年齢を評価することができる。

20

【0112】

好適には、メチル化プロファイルは、少なくとも100個、少なくとも200個、少なくとも500個、少なくとも1000個、又は少なくとも2000個のDNAメチル化部位からの5mCの存在又は非存在を指してもよい。

【0113】

適切には、メチル化プロファイルは、約100個、約200個、約500個、約1000個又は約2000個のDNAメチル化部位からの5mCの存在又は非存在を指してもよい。

30

【0114】

生体時計を作製するために、初期メチル化プロファイルを処理又は合理化して、制限されたメチル化プロファイルを生成し、次いでこれを用いて生体時計を生成してもよい。

【0115】

例として、初期メチル化プロファイルは、例えば、個々のシトシンではなくDNA領域を使用することによって、特定の生理学的又は生化学的経路に関連するメチル化部位のサブセットを選択して相関分析を実施することによって、クラスタ当たり1つ以上の代表的なDNAメチル化部位を確保（retaining）することによって、又はDNAメチル化部位を予め選択するか若しくは若齢のイヌと老齢のイヌとの間でより変化の大きいDNAメチル化部位を確保するために差分解析（differential analysis）を実施することによって、処理又は合理化されてもよい。

40

【0116】

例えば、1つ以上のDNA領域は、本明細書で定義される任意の1つ以上のDNA領域であり得る。

【0117】

適切には、メチル化プロファイルは、特定の生理学的又は生化学的経路に関連する遺伝子のDNAメチル化部位を指し得る。したがって、メチル化プロファイルは、特定の組織、臓器、又は生体システムの生物学的年齢を評価することを可能にし得る。特定の組織、臓器又は生体システムについて生物学的年齢を評価することは、有利には、その組織、臓

50

器、又は生体システムの病理及び疾患に着目する様式で本方法が利用されることを可能にし得る。例えば、特定の品種のイヌに筋疾患又は心血管疾患が関連することが知られている場合、その生体システムの生物学的年齢を評価することが有利であり得る。

【0118】

好適には、生体システムは、免疫系、胃腸系、泌尿器系、筋系、心血管系、及び／又は神経系であり得る。

【0119】

特定の組織、臓器又は生体システムの生物学的年齢が、その組織、臓器又は生体システムによって優先的又は特異的に発現される遺伝子からのメチル化部位を含むか又はそれからなるDNAメチル化プロファイルを使用して評価されてもよい。特定の組織、臓器、又は生体システムによる遺伝子の分類は、例えば、Gene Ontology (<http://geneontology.org/>)、KEGG pathway database (<https://www.genome.jp/kegg/>)、又はMSIGDB (<https://www.gsea-msigdb.org/gsea/msigdb/index.jsp>) などから公的に利用可能である。

【0120】

いくつかの実施形態では、閾値は、エピジェネティック年齢予測因子について最高ランクの平均メチル化値を有する部位を選択する。例えば、閾値は、予測因子、例えば、生体時計について試験された全ての部位「i」にわたる平均メチル化レベルの上位50%、上位40%、上位30%、上位20%、上位10%、上位5%、上位4%、上位3%、上位2%、又は上位1%である平均メチル化レベルを有する部位であり得る。

【0121】

あるいは、閾値は、50、60、70、80、90、95、96、97、98、又は99以上のパーセンタイルランクで平均メチル化レベルを有する部位であり得る。他の実施形態では、閾値は、平均メチル化レベルの絶対値に基づき得る。例えば、閾値は、99%超、98%超、97%超、96%超、95%超、90%超、80%超、70%超、60%超、50%超、40%超、30%超、20%超、10%超、9%超、8%超、7%超、6%超、5%超、4%超、3%超、又は2%超である平均メチル化レベルを有する部位であり得る。相対閾値及び絶対閾値は、各部位「i」における平均メチル化レベルに個別に又は組み合わせて適用することができる。組み合わされた閾値の適用の例として、平均メチル化レベルによって検定される全ての部位の上位3%にあり、6%を超える絶対平均メチル化レベルも有する部位のサブセットを選択することができる。この選択プロセスの結果として、生物学的年齢の評価について最も有益であると考えられる特定の高メチル化部位（例えば、CpG部位）のDNAメチル化プロファイルが得られる。

【0122】

好適には、DNAメチル化プロファイルは、表1に掲載される少なくとも1つのメチル化部位を含み得る。

【0123】

好適には、1つ以上のメチル化部位は、配列番号1~255のいずれか1つ以上に存在するメチル化マーカーとして定義され得る。配列番号1~255は、「Tasha」イヌ参照ゲノムにおけるメチル化マーカーの両側の配列を示す([https://www.ncbi.nlm.nih.gov/assembly/GCF_000002285.5;Jagannathanetal.;Genes\(Bsael\);2021;12\(6\);847](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/assembly/GCF_000002285.5;Jagannathanetal.;Genes(Bsael);2021;12(6);847))。「CG」メチル化マーカーは、配列中の26番目及び27番目のヌクレオチドである（すなわち、メチル化マーカーに先行する25個のヌクレオチド及びメチル化マーカーに後続する25個のヌクレオチドが存在する）。

【0124】

適切には、メチル化部位は、表1において「部位」と表記した列において遺伝子間位置(intervening position)として定義され得る。例えば、部位chr1:32205238-32205240に関して、メチル化マーカーはchr1:3

2205239である。適切には、DNAメチル化プロファイルは、表1に掲載されるメチル化部位の少なくとも3個、少なくとも5個、少なくとも10個、少なくとも20個、少なくとも50個、少なくとも100個、少なくとも150個、少なくとも200個、又は好ましくはそれぞれを含み得る。

【0125】

好適には、DNAメチル化プロファイルは、メチル化部位chr2.32494387.32494389、chr6.45773846.45773848、及びchr16.8886545.8886547を含み得る。これらの部位を表2に示す。

【0126】

好適には、DNAメチル化プロファイルは、メチル化部位chr2.32494387.32494389、chr6.45773846.45773848；chr16.8886545.8886547 chr5.61645225.61645227；及びchr15.10856498.10856500を含み得る。これらの部位を表3に示す。

10

【0127】

好適には、DNAメチル化プロファイルは、メチル化部位chr2.32494387.32494389、chr6.45773846.45773848；chr16.8886545.8886547 chr5.61645225.61645227；chr15.10856498.10856500；chr33.26512711.26512713；chr20.57347921.57347923；chr12.12684190.12684192；chr24.30860619.30860621、及びchr33.26512692.26512694を含み得る。これらの部位を表4に示す。

20

【0128】

好適には、DNAメチル化プロファイルは、メチル化部位chr2.32494387.32494389、chr6.45773846.45773848；chr16.8886545.8886547 chr5.61645225.61645227；chr15.10856498.10856500；chr33.26512711.26512713；chr20.57347921.57347923；chr12.12684190.12684192；chr24.30860619.30860621；chr33.26512692.26512694；chr10.7411293.7411295；chr1.22213697.22213699；chr5.32711703.32711705；chr24.21051024.21051026；chr5.21480151.21480153；chr17.33851462.33851464；chr3.46843750.46843752；chr13.37474592.37474594；chr33.19810904.19810906、及びchr20.44942213.44942215を含み得る。これらの部位を表5に示す。

30

【0129】

好適には、DNAメチル化プロファイルは、メチル化部位chr2.32494387.32494389、chr6.45773846.45773848；chr16.8886545.8886547 chr5.61645225.61645227；chr15.10856498.10856500；chr33.26512711.26512713；chr20.57347921.57347923；chr12.12684190.12684192；chr24.30860619.30860621；chr33.26512692.26512694；chr10.7411293.7411295；chr1.22213697.22213699；chr5.32711703.32711705；chr24.21051024.21051026；chr5.21480151.21480153；chr17.33851462.33851464；chr3.46843750.46843752；chr13.37474592.37474594；chr33.19810904.19810906；chr20.44

40

50

9 4 2 2 1 3 . 4 4 9 4 2 2 1 5 ; c h r 2 0 . 5 4 3 0 1 4 5 3 . 5 4 3 0 1 4 5 5 ;
c h r 3 5 . 2 3 8 5 2 9 3 2 . 2 3 8 5 2 9 3 4 ; c h r 6 . 6 0 6 7 5 9 9 8 . 6 0
6 7 6 0 0 0 ; c h r 2 2 . 4 6 3 7 4 5 6 3 . 4 6 3 7 4 5 6 5 ; c h r 2 4 . 1 2 5
1 8 9 1 0 . 1 2 5 1 8 9 1 2 ; c h r 1 6 . 8 8 8 6 3 5 6 . 8 8 8 6 3 5 8 ; c h r
2 1 . 4 3 4 9 0 7 9 6 . 4 3 4 9 0 7 9 8 ; c h r 1 1 . 5 3 5 7 6 9 7 0 . 5 3 5 7
6 9 7 2 ; c h r 4 . 3 6 1 8 0 0 1 3 . 3 6 1 8 0 0 1 5 ; c h r 4 . 4 3 2 1 7 4 3
2 . 4 3 2 1 7 4 3 4 ; c h r 9 . 3 5 9 8 5 9 8 3 . 3 5 9 8 5 9 8 5 ; c h r 3 2 .
4 0 4 0 9 7 2 9 . 4 0 4 0 9 7 3 1 ; c h r 2 3 . 3 7 9 8 7 5 2 6 . 3 7 9 8 7 5 2
8 ; c h r 1 8 . 4 4 6 7 9 2 3 6 . 4 4 6 7 9 2 3 8 ; c h r 2 1 . 1 6 2 3 3 6 2 8
. 1 6 2 3 3 6 3 0 ; c h r 1 0 . 1 8 2 3 7 4 2 3 . 1 8 2 3 7 4 2 5 ; c h r 3 0 .
8 0 3 1 0 6 0 . 8 0 3 1 0 6 2 ; c h r 1 . 1 2 1 1 8 2 1 4 6 . 1 2 1 1 8 2 1 4 8
; c h r 9 . 5 0 9 7 6 6 8 2 . 5 0 9 7 6 6 8 4 ; c h r 1 4 . 5 8 4 2 4 6 8 9 . 5
8 4 2 4 6 9 1 ; c h r 2 0 . 4 9 9 4 0 5 5 1 . 4 9 9 4 0 5 5 3 ; c h r 2 . 3 1 6
5 5 1 0 7 . 3 1 6 5 5 1 0 9 ; c h r 1 8 . 4 6 9 9 0 9 6 3 . 4 6 9 9 0 9 6 5 ; c
h r 2 0 . 4 6 0 9 8 5 6 8 . 4 6 0 9 8 5 7 0 ; c h r 1 0 . 6 8 6 4 9 4 3 6 . 6 8
6 4 9 4 3 8 ; c h r 9 . 2 5 4 1 5 8 7 1 . 2 5 4 1 5 8 7 3 ; c h r 1 4 . 3 9 7 3
5 2 7 3 . 3 9 7 3 5 2 7 5 ; c h r 1 1 . 3 3 5 2 3 8 0 0 . 3 3 5 2 3 8 0 2 ; c h
r 5 . 3 2 3 4 7 9 7 8 . 3 2 3 4 7 9 8 0 、及び c h r 1 9 . 4 4 6 7 9 9 7 5 . 4 4
6 7 9 9 7 7 を含み得る。

【0130】

生物学的年齢を示すDNAメチル化部位／DNAメチル化プロファイルの確定

本発明は、イヌの生物学的年齢を評価するためにDNAメチル化プロファイルを利用することを含む。したがって、本発明は、生体時計を作製するためにDNAメチル化プロファイルを利用することを含む。本生体時計は、「エピジェネティック時計」とも呼ばれる。

【0131】

生物学的年齢を示すDNAメチル化部位又はDNAメチル化プロファイルの提供は、例えば、訓練データセット及び機械学習アプローチを通して達成され得る。好適には、機械学習アプローチは、教師付き機械学習アプローチであってもよい。

【0132】

例として、DNAメチル化部位又はDNAメチル化プロファイルは、既知の暦年齢のイヌを含むデータセットに対して訓練され得る。適切には、DNAメチル化部位又はDNAメチル化プロファイルは、既知の品種及び／又は性別と組み合わせた既知の暦年齢のイヌを含むデータセットに対して訓練され得る。

【0133】

例えば、生物学的年齢を示すDNAメチル化部位又はDNAメチル化プロファイルのモデルは、機械学習フレームワークを使用して、既知の暦年齢を有するイヌの訓練データセットに対して複数のDNAメチル化部位におけるメチル化状態のデータセットを訓練し、モデルの正確さを検証するために保有コホートに対して検定することによって提供され得る。

【0134】

機械学習フレームワークは、罰則付き回帰を、既知の暦年齢（ならびに任意選択で品種及び／又は性別）を有するイヌの訓練データセットに当てはめることを含んでもよく、例えば g l m n e t R パッケージを使用して当てはめてもよい。

【0135】

機械学習フレームワークは、エラスティックネット回帰を、既知の暦年齢（ならびに任意選択で品種及び／又は性別）を有するイヌの訓練データセットに当てはめることを含んでもよく、例えば g l m n e t R パッケージを使用して当てはめてもよい。

【0136】

適切には、機械学習フレームワークは、DNAメチル化プロファイル（ならびに任意選

10

20

30

40

50

択で品種、年齢及び／又は性別）によって説明される暦年齢の、`elastic net` 回帰などのペナルティ付き回帰を当てはめることを含んでもよい。

【0137】

適切には、機械学習フレームワークは、DNAメチル化プロファイル、品種、年齢及び性別によって説明される暦年齢の、`elastic net` 回帰などのペナルティ付き回帰を当てはめることを含んでもよい。

【0138】

適切には、機械学習フレームワークを使用して、生物学的年齢を示すDNAメチル化部位のセット又はDNAメチル化プロファイルを含むモデルを評価することができる。

【0139】

モデルは、複数のDNAメチル化部位におけるメチル化状態を含んでもよく、ここで、各部位におけるメチル化状態は、係数値を掛けることによってモデルにおいて考慮される。

【0140】

各パラメータの係数値は、典型的には、モデルにおける全ての変数の計測単位に依存する。したがって、当業者によって理解されるように、各係数値の値は、例えば、モデルにおいて使用される異なるパラメータの数及び性質、並びに提供される訓練データの性質に応じて異なる。したがって、係数値に到達させるために、通例の統計的手法を訓練データセットに適用してもよい。

【0141】

適切には、性別は、メスを0とし、オスを1とする数値としてコード化されてもよい。

【0142】

適切には、品種は、小型品種を0とし、中型品種を1とする数値としてコード化されてもよい。

【0143】

好適には、機械学習プラットフォームは、1つ以上の深層ニューラルネットワークを備えてもよい。ニューラルネットワークは、非巡回グラフでつながれたニューロン（ユニットとも呼ばれる）の集合である。ニューラルネットワークモデルは、ニューロンの別個の層により構成されることが多い。ほとんどのニューラルネットワークに関し最も一般的な層のタイプは全結合層であり、2つの隣接する層間のニューロンが完全にペアワイズ接続されているが、単一層内のニューロンは接続を共有していない。深層ニューラルネットワークの主な特徴の1つは、ニューロンが非線形活性化関数によって制御されることである。ディープアーキテクチャと非線形的に組み合わせることにより、入力する特徴量をより複雑に組合せることを可能にし、最終的にはそれらの間の関係のより広い理解をもたらす。結果として、より信頼できる最終アウトプットをもたらす。深層ニューラルネットワークは、構造データから化学記述子又はトランスクリプトミクスデータに及ぶ多くのタイプのデータに適用されてきた。

【0144】

好適には、機械学習プラットフォームは、1つ以上の敵対的生成ネットワークを含む。適切には、機械学習プラットフォームは、敵対的オートエンコーダアーキテクチャを含む。好適には、機械学習プラットフォームは、DNAメチル化部位を生物学的年齢評価におけるそれらの重要性によってランク付けするための特徴量重要度解析を含む。

【0145】

イヌの生物学的年齢は、年、月、日などで表されてもよい。

【0146】

基準又は対照との比較

本発明の方法は、さらに、検査サンプル中の1つ以上の部位におけるDNAメチル化の差を1つ以上の参照又は対照と比較するステップを含み得る。参照又は対照における1つ以上の部位でのDNAメチル化の有無は、所定の生物学的年齢と関連付けられ得る。いくつかの実施形態では、基準値は、生物学的年齢が既知である対象又は対象の群について、

10

20

30

40

50

予め得られた値である。参照値は、暦年齢、品種、及び／又は性別が既知である対象の群からの、1つ以上の部位における既知のDNAメチル化状態、例えば、平均値又は中央値に基づき得る。

【0147】

更なる計測値及び／又は特徴量とバイオマーカー値との組み合わせ

好適には、本方法は、イヌの品種及び／又は性別のうちの1つ以上と組み合わせ、DNAメチル化プロファイルによって暦年齢を説明することをさらに含む。

【0148】

対象の層別化

本発明の方法によって評価された生物学的年齢はまた、1つ以上の所定の閾値（すなわち、暦年齢に対する差）と比較されてもよい。かかる閾値を使用して、対象を、例えば、低、中、高などの特定リスクを示すカテゴリに分類してもよい。閾値からの逸脱の程度は、どの対象が特定の介入から最も効果を得るのかを特定するのに有用である。このようにして、食事介入と、生活習慣の修正とを最適化することができる。

【0149】

対象の生活習慣計画、食事計画、又は治療の介入を選択／モニタリングする方法

更なる態様では、本発明は、対象のために生活習慣計画、食事計画、又は治療の介入を選択する方法を提供する。生活習慣の修正は、本明細書に記載される任意の変更、例えば、食事介入であっても、及び／又は運動療法の変更であってもよい。生活習慣の修正は、治療モダリティの投与であってもよい。

【0150】

生活習慣計画、食事計画、又は治療の介入は、任意の適切な期間にわたってイヌに適用され得る。かかる期間の後、イヌの生物学的年齢は、イヌの生物学的年齢を改善するための生活習慣計画、食事計画又は治療の介入の有効性を評価するために、本発明の方法を使用して再び評価され得る。例として、生活習慣計画、食事計画、又は治療の介入は、少なくとも2週間、少なくとも4週間、少なくとも8週間、少なくとも16週間、少なくとも32週間、又は少なくとも64週間適用され得る。生活習慣計画、食事計画、又は治療の介入は、少なくとも3ヶ月間、少なくとも6ヶ月間、少なくとも12ヶ月間、少なくとも24ヶ月間、少なくとも36ヶ月間、少なくとも48ヶ月間、又は少なくとも60ヶ月間適用され得る。

【0151】

生活習慣計画、食事計画、又は治療の介入は、老化を防止する生活習慣計画、食事計画、又は治療介入と称され得る。

【0152】

修正は、本明細書に記載の食事介入であることが好ましい。用語「食事介入」は、対象に適用されて対象の食事を変更させる外部要因を意味する。より好ましくは、食事介入は、少なくとも食事製品又は食事の計画又は栄養補助食品を与えることを含む。

【0153】

食事計画は、食事、食事の計画、栄養補助食品若しくは栄養補助食品の計画、又は食事と栄養補助食品との組み合わせ、又は食事と複数の栄養補助食品との組み合わせであり得る。

【0154】

本明細書に記載される食事介入又は食事製品は、任意の適切な食事計画、例えば、カロリー制限食、高齢食、低タンパク質食、リン食、低タンパク質食、カリウム補給食、多価不飽和脂肪酸（PUFA）補給食、抗酸化物質補給食、ビタミンB補給食、流動食、セレン補給食、 $\omega 3-6$ 比率食（ $\omega 3-6$ ratio diet）、あるいはカルニチン、分岐鎖アミノ酸若しくは誘導体、ヌクレオチド、ニコチンアミドモノヌクレオチド（NMN）若しくはニコチンアミドリボシド（NR）などのニコチンアミド前駆体、又は上記の任意の組合せを補給された食事であってもよい。

【0155】

好適には、食事介入又は食事製品は、カロリー制限食、高齢食、又は低タンパク質食であってもよい。好適には、食事介入又は食事製品は、カロリー制限食であってもよい。好適には、食事介入製品又は食事製品は、低タンパク質食であってもよい。

【0156】

食事介入は、イヌのベースライン維持エネルギー必要量（MER）に基づいて決定することができる。好適には、MERは、イヌの体重を安定させる（3週間にわたり変化が5%未満）食品の量であってもよい。

【0157】

例として、若い成長中のイヌは、高エネルギー／高タンパク質食から利益を得ることが一般的に理解されている。しかしながら、高齢のイヌはエネルギー必要量が低いことがあるので、食事は適切に修正され得る。特に、多くの製造業者は、低カロリー、高繊維であるが、タンパク質及び脂肪は高齢のイヌに適した量である、「シニア」の範囲のドッグフードを製造している。

【0158】

好適には、カロリー制限食は、イヌのMERの約50%、約55%、約60%、約65%、約75%、約80%、約85%、又は約90%を含み得る。好適には、カロリー制限食は、イヌのMERの約60%又は約75%を含んでもよい。

【0159】

好適には、低タンパク質食は、20%未満のタンパク質（%乾物）を含んでもよい。例えば、低タンパク質食は、19%未満（%乾物）含まれてもよい。

【0160】

これらの食事は、一般に、イヌの暦年齢に基づいて推奨される。例えば、イヌは7歳又は8歳前後で高齢食に切り替えることが推奨される場合もある。しかしながら、本発明の文脈において、イヌの暦年齢を所与として予測されるものと比較しての死亡リスクの増加という評価は、より早い年齢の時点でイヌの食餌を高齢食に切り替える決定を可能にし得る。対照的に、その暦年齢と比較して、死亡リスクが低下しているイヌは、より長期間、成犬用の食餌（adult diet）を継続することが可能であり得る。

【0161】

食事介入は、1日のカロリー摂取量を制限することなく、カロリー制限（CR）の利益を模倣する栄養素及び／又は生物活性物質を含む食品、栄養補助食品、及び／又は飲料を含んでもよい。例えば、食品、栄養補助食品、及び／又は飲料は、CRのような利益を有する機能性原材料を含んでもよい。好適には、食品、栄養補助食品、及び／又は飲料は、オートファジー誘導因子を含んでもよい。好適には、食品、栄養補助食品、及び／又は飲料は、果実及び／又はナッツ（又はその抽出物）を含んでもよい。好適な例としては、ザクロ、イチゴ、ブラックベリー、カムカム、クルミ、栗、ピスタチオ、ペカンが挙げられるが、これらに限定されない。好適には、食品、栄養補助食品、及び／又は飲料は、果実抽出物又はナッツ抽出物を含む又は含まないプロバイオティクスを含んでもよい。

【0162】

また対象の生活習慣の修正には、対象に生活習慣を変える必要性を示すこと、例えば、より多く運動するよう指示することが含まれる。食事介入と同様に、暦年齢を所与として予測されるものと比較しての、イヌの死亡リスクの増加の評価は、イヌをより適切な運動計画に切り替える決定を可能にし得る。

【0163】

対象の生活習慣に修正を加えることは、治療モダリティ又は治療計画を推奨することを含む。治療モダリティ又は治療計画は、例えば、関節炎、歯科疾患、内分泌障害、心疾患、糖尿病、肝疾患、腎疾患、前立腺障害、がん、及び行動障害又は認知障害を治療及び／又は予防するのに有用なモダリティであってもよい。適切には、予防的治療は、生物学的年齢が上昇していることに起因してかかる障害のリスクがあると特定されたイヌに対して行われ得る。他の実施形態において、生物学的年齢が上昇していることに起因して特定の状態のリスクがあると評価されたイヌは、診断及び処置が可能な限り早く開始され得るよ

10

20

30

40

50

うに、より定期的に経過観察されてもよい。

【0164】

本発明はまた、老化を防止する療法の有効性を経過観察及び／若しくは評価すること、又は老化を防止する療法を開発することに関する。老化を防止する療法は、例えば、「若返り」介入を含み得る。若返り介入は、対象のエピジェネティック年齢又は生物学的年齢の低下をもたらすことを目的とする。適切には、若返り介入は、エピジェネティック年齢を非常に若いイヌの年齢へと再プログラムし得る。このような若返り介入の例としては、エピジェネティック年齢を、好適には非常に若いイヌの年齢に再プログラムする遺伝子治療が挙げられるが、これに限定されない。生活習慣計画、食事計画、若しくは治療の介入の有効性を経過観察及び／若しくは評価するための、又は生物学的年齢を低下させるための生活習慣計画、食事計画、若しくは治療の介入を開発するための本方法は、この態様に特に適用可能である。

10

【0165】

したがって、本発明は、有利なことに、所与の介入（例えば、生活習慣計画、食事計画又は治療の介入）に特に良好に応答すると予測されるイヌの特定を可能にし得る。したがって、介入は、応答すると予測されるイヌに対してよりの絞った方法で適用することができる。

【0166】

一態様では、本発明は、イヌの生物学的年齢を改善するための生活習慣計画、食事計画又は治療の介入の有効性を評価するための方法を提供し、本方法は、

20

- a) 本発明の第1の態様に従って選択された生活習慣計画、食事計画又は治療の介入をイヌに適用するステップと、
- b) 生活習慣計画、食事計画、又は治療の介入をイヌに適用する期間の後に、イヌから得られたサンプルからのDNAメチル化プロファイルを使用して、イヌの生物学的年齢を評価するステップと、
- c) 生活習慣計画、食事計画又は治療の介入に従う期間の後、イヌの生物学的年齢に変化があったか否かを評価するステップと、を含む。

【0167】

別の態様では、本発明は、イヌの生物学的年齢を改善するための生活習慣計画、食事計画又は治療の介入の有効性を評価するための方法に関し、本方法は、

30

- a) イヌから得られたサンプルからのDNAメチル化プロファイルを使用して、イヌの生物学的年齢を評価するステップと、
- b) ステップa) で評価された生物学的年齢に基づいて選択された生活習慣計画、食事計画又は治療の介入をイヌに適用するステップと、
- c) 生活習慣計画、食事計画、又は治療の介入をイヌに適用する期間の後に、イヌから得られたサンプルからのDNAメチル化プロファイルを使用して、イヌの生物学的年齢を評価するステップと、
- d) ステップa) とステップc) との間でイヌの生物学的年齢に変化があったか否かを評価するステップと、を含む。

【0168】

40

さらなる態様では、本発明は、イヌの生物学的年齢を改善するための生活習慣計画、食事計画又は治療の介入の有効性を評価するための方法に関し、本方法は、

- a) イヌから得られたサンプルからのDNAメチル化プロファイルを使用して、イヌの第1の生物学的年齢を評価することであって、
- b) 生活習慣計画、食事計画、又は治療の介入をイヌに適用するステップと、
- c) 前記生活習慣計画、食事計画、又は治療の介入をイヌに適用する期間の後に、イヌから得られた第2のサンプルからのDNAメチル化プロファイルを使用して、イヌの第2の生物学的年齢を評価するステップと、
- d) 生活習慣計画、食事計画又は治療の介入に従う期間の後、イヌの第1及び第2の生物学的年齢に変化があったか否かを評価するステップと、を含む。

50

【0169】

好適には、生活習慣計画、食事計画又は治療の介入は、第1の生物学的年齢が評価される前の期間にイヌに適用されてもよいが、しかしながら、イヌの生物学的年齢を改善する（例えば、生物学的年齢を減少させる、生物学的年齢の増加又は増加率を減少させる）ための生活習慣計画、食事計画又は治療の介入の有効性は、生活習慣計画、食事計画又は治療の介入の適用中に2回以上生物学的年齢を評価することによって引き続き経過観察されてもよい。

【0170】

好適には、本方法は、「エコシステム」、特にデジタルエコシステムを含んでもよい。適切には、本方法は、イヌから得られたサンプルを、任意選択で本発明によるキットを使用して、提供するステップと、(b) サンプルを（例えば郵送によって）提供して後続のDNA抽出に供し、サンプルから抽出されたDNAにおけるDNAメチル化を測定してDNAメチル化プロファイルを得るステップと、を含み得る。

10

【0171】

次いで、DNAメチル化プロファイルは、本発明の方法のいずれに従って使用されてもよく、好ましくは、本発明によるコンピュータシステム又はコンピュータプログラム製品を使用する。

【0172】

次いで、コンピュータシステム又はコンピュータプログラムは、例えば、イヌに適した生活習慣計画、食事計画、若しくは治療の介入、又は本発明の方法の任意の他の結果を選択又は推奨する形式で、分析／方法の結果を詳述するレポートを作成及び共有してもよい。

20

【0173】

好適には、サンプルは、イヌの飼い主が自宅で得ることができる（獣医や医療専門家を必要としない）サンプルであり得る。好適には、サンプルは、毛包、口腔スワブ又は唾液サンプルであり得る。

【0174】

食事介入の使用

一態様では、本発明は、イヌの生物学的年齢の改善に使用するための食事介入を提供し、食事介入は、本方法によって評価された生物学的年齢を有するイヌに適用される。

30

【0175】

別の態様において、本発明は、イヌの生物学的年齢を改善するための食事介入の使用であって、食事介入が、本方法によって評価された生物学的年齢を有するイヌに適用される、使用を提供する。

【0176】

本明細書に記載されるように、食事介入は、食事製品又は食事計画又は栄養補助食品であってもよい。

【0177】

コンピュータプログラム製品

本発明の方法は、コンピュータを使用して実行してもよい。したがって、本方法はインシリコで実行してもよい。

40

【0178】

適切には、コンピュータは、本方法の結果を詳述するレポートを作成及び共有してもよい。

【0179】

本明細書に記載の方法は、1つ以上のコンピュータプロセッサなどの汎用ハードウェア上で動作するコンピュータプログラムとして実装してもよい。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の機能は、スマートフォン、タブレット端末、又はパーソナルコンピュータなどのデバイスによって実行されてもよい。

【0180】

50

一態様では、本発明は、本明細書に記載されるように、イヌの生物学的年齢をプログラム可能コンピュータに評価させるためのコンピュータ実行可能命令を含む、コンピュータプログラム製品を提供する。

【0181】

別の態様では、本発明は、装置に、イヌからのDNAメチル化プロファイルを使用してイヌの生物学的年齢を評価させ、任意選択的に、DNAメチル化プロファイルを使用して評価された生物学的年齢に基づいてイヌに適した生活習慣計画、食事計画又は治療の介入を選択させるためのコンピュータ実行可能命令を含むコンピュータプログラム製品を提供する。コンピュータプログラム製品はまた、イヌのための追加のパラメータ又は特徴量を与えられてもよい。本明細書に記載されるように、追加のパラメータ又は特徴は、暦年齢、品種、及び性別を含んでもよい。

10

【0182】

一実施形態では、ユーザは、任意で暦年齢、品種、及び性別と共に、本明細書で定義されるDNAメチル化マーカーのうちの1つ以上の値をデバイスに入力する。次いで、デバイスは、この情報を処理し、イヌの生物学的年齢の評価を提供する。あるいは、デバイスは、次いで、この情報を処理し、生物学的年齢に基づいて、イヌに適した生活習慣計画、食事計画、又は治療の介入の評価を提供する。

【0183】

デバイスは、概してネットワーク上のサーバであってもよい。しかしながら、バイオマーカーデータ及び／又は追加のパラメータ若しくは特徴量データを、プロセッサ、又は中央処理装置（CPU）等を用いて処理できるものであれば、任意のデバイスを用いてもよい。デバイスは、例えば、スマートフォン、タブレット端末、又はパーソナルコンピュータであってもよく、イヌについて評価された生物学的年齢を示す、又は生物学的年齢に基づくイヌに適した生活習慣計画、食事計画、若しくは治療の介入の評価を示す情報をアウトプットしてもよい。

20

【0184】

当業者は、開示された本発明の範囲から逸脱することなく、本明細書に記載の本発明の全ての特徴を自由に組み合わせることができることを、当業者であれば理解するであろう。

【実施例】

30

【0185】

次に、実施例により本発明を更に説明するが、これらの実施例は、当業者が本発明を実施するのに役立てるために提供することを意味するものであり、決して本発明の範囲を限定することを意図するものではない。

【0186】

実施例1 エピジェネティック生体時計を作成するための例示的な方法

DNAメチル化部位の特定

イヌコホートからの全血サンプルを、DNA抽出を実施し、酵素反応を使用することによってDNAメチル化を変換し、全ゲノムライブラリーの調製を実施し、遺伝子プロモーターに対する捕捉プローブに全ゲノム変換ライブラリー調製物をハイブリダイズさせ、配列決定（EM-Seq）によってメチル化プロファイルを確定することによって解析した。

40

【0187】

捕捉プローブは、約40000個の標的（プロモーター領域－プロモーターの約1kb上流及び0.5kb下流）を対象とさせた。これらの標的領域は、対象とする潜在的なメチル化部位（メチル化され得る個々のシトシン残基）を含む。

【0188】

配列決定の後及びさらなる解析の前に、以下のバイオインフォマティクスステップを行った：

fastQCを使用してfastqを品質チェックする <https://www.>

50

`bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/`

`trimGalore`を使用してアダプタをトリミングする `-https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/trim_galore/`

`bwa-meth`を使用してイヌゲノムに対してアラインする (`https://github.com/brentp/bwa-meth`) (又はBismark) `-https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/bismark/`。

【0189】

`Picard`を使用して重複をマークする `-https://gatk.broadinstitute.org/hc/en-us/articles/360037052812-MarkDuplicates-Picard-`

`Methyldackel`を使用してメチル化を呼び出す `-https://github.com/dpryan79/Methyldackel`

生体時計を訓練するための制限されたDNAメチル化プロファイルを作成するために部位をフィルタリングするためのアプローチ

各サンプルにおけるメチル化部位のメチル化状態の評価に続いて、より少ない別個のメチル化部位を含む制限されたメチル化プロファイルを生成するために、初期メチル化プロファイルをフィルタリング／処理してもよい。このフィルタリングは、生体時計を訓練するために使用することができる、例えば50000～500000個のメチル化部位を含む制限されたメチル化プロファイルを提供することを目標とする。

【0190】

初期メチル化プロファイルをフィルタリングする方法は、次のステップを含む：

1) 全てのサンプルにおいてメチル化されている（メチル化されていない）部位を除去するステップ

2) サンプルの少なくとも90%において少なくとも5カウントを有さない部位を除去するステップ

3 X) 染色体及び／又はY) 染色体部位を除去するステップ

【0191】

別個のメチル化部位の数を減少させるためのさらなる有望なフィルタリングステップとしては、次のステップが挙げられる：

1) メチル化部位をDNA領域として定義するステップ（CpGアイランド、例えば1000bp未満で離れている部位は同じものとみなされる）

2) 標的を例えば炎症部位、例えばGO／KEGG経路による炎症に関係する遺伝子に制限し、これらの遺伝子上の部位を選択するステップ

3) クラスタごとの1つ以上の代表値を相関解析及び保持（`retention`）するステップ（例えば、重み付き相関ネットワーク解析（WGCNA）（`Langfelder & Horvath; BMC Bioinformatics; 9 (559); 2008`又はEBModules（`Zollinger et al.; Biostatistics, 19 (2), 153-168; (2018)`））。

【0192】

4) DNAメチル化部位を予め選択する（例えば、ロジスティック回帰を使用する）か、又は若齢イヌと老齢イヌとの間でより変化が大きい部位を特定する（例えば、分散分析を使用する）ためにメチル化についての差分解析をするステップ。メチル化についての差分解析が行われる場合（Rにおける関数`preprocessQuantile`を使用）、フィルタリングステップの前に標準化（分位）を行う。

【0193】

生体時計の作製

イヌのコホートの暦年齢、品種及び性別に関する情報を含むデータセットは、訓練セッ

10

20

30

40

50

ト及び検定セットに分割される（例えば、訓練用の2／3のデータ及び検定用の1／3データ、それにより、メタデータに関し良好な分割が得られ、例えば、訓練セット及び検定セットにおいては各品種／各性別の同様の割合）。

【0194】

生物学的年齢に関連するDNAメチル化部位を特定するために（すなわち、DNAメチル化生体時計を作製するために）、暦年齢と、制限されたDNAメチル化プロファイル、性別及び品種との間で罰則付き回帰を当てはめる。

【0195】

罰則パラメータは、生物学的年齢に適合する良好なモデルを有する妥当な数のDNAメチル化部位（例えば、最大1000）を提供するように選択される。

【0196】

次いで、DNAメチル化部位に基づく生物学的年齢のモデルを、検定セットで評価する。

【0197】

本実施例では、以下のステップを行った：

1）15カウント未満のカバレッジを有する全てのメチル化部位を「欠損」として設定するステップ

2）「Boostme」アルゴリズム（Zou et al. ; BMC Genomics 19, 390 (2018)）を使用してインピュテーションを実施し、訓練、検定及び検証のセットサイズを、200,000の無作為に選択された部位に設定するステップ

3）ChrX部位を除去するステップ

4）EBmoduleを使用してサイトフィルタリングを実施するステップ（Zollinger et al. ; Biostatistics, 19 (2), 153-168 ; (2018)）；標的ごと（TSSの周囲1500bp）の部位及び染色体ごとの部位をグループ化することによって、データセットを約5000部位のブロックに分離した。次に、Zollinger et al.によって記載されているように、EBモジュールを適用した相関行列を計算した。次に、各モジュールをメドイド（medoid）部位によって表した。いくつかの部位は、いずれのモジュールにも属さず、散在部位と呼ばれる（Zollinger et al.により記載されているとおりの定義）。

【0198】

5）哺乳動物のCpGアレイ上に存在する部位を除去するステップ（Arneson et al. ; Nature Communications ; 13 ; 783 ; 2022）；

6）応答変数として暦年齢（DNA採取時年齢）を使用してElastic net回帰を500K部位で調整するステップ；生体時計を形成するものとして255部位を選択する（表1参照）。

【0199】

生体時計を使用して予測される生物学的年齢は、暦年齢と高度に相関する（図1参照）。

【0200】

生体時計はまた、カロリー制限試験を使用して検証した（図2参照）。デルタは、暦年齢と、生体時計を使用して予測された生物学的年齢とを比較する回帰モデルの残差に対応する。カロリー制限を受けたイヌは、対照食のイヌと比較して有意に低い生物学的年齢（より低いデルタ）を有するとして評価された（図2）。

【0201】

単変量解析を実施して、255の部位のそれぞれの単独が、生物学的年齢との関係に関して統計的に有意であるか否かを評価した（表1参照）。

【0202】

表1に示す部位の完全なリストから、上位3個、上位5個、上位10個、上位20個、

10

20

30

40

50

及び上位 50 個の部位のみを使用して、さらなる生体時計も作製した。それぞれが、生物学的年齢と相関することが示された（図 3～図 7 参照）。これらの時計は、完全な生体時計の係数の絶対値に基づいて上位 n 個の部位を選択することによって作製した（降順で、大きい係数を最初に取り）。予測因子として上位 n 個の部位を使用して、それぞれ暦年齢を説明する線形モデルを当てはめた。上位 3 個、上位 5 個、上位 10 個及び上位 20 個の時計の詳細を表 2～表 5 に示す。

【0203】

上記明細書で言及した全ての刊行物は、参照により本明細書に援用される。本発明の開示される方法、組成物及び使用の様々な修正及び変更は、本発明の範囲及び主旨から逸脱することなく、当業者には明らかであろう。本発明は、特定の好ましい実施形態に関連して開示されているが、特許請求される本発明は、このような特定の実施形態に過度に限定されるべきではないことを理解されたい。実際、本発明を実施するために開示された様式の種々の改変は、当業者には自明であり、以下の特許請求の範囲の範囲内であることを意図している。

【0204】

10

20

30

40

50

【表 1】

表 1

部位	係数	単変量解析(p値)	配列(5mC部位の25塩基上流及び下流)	配列番号
切片項(Intercept)	11.62197421	NA	NA	
chr1:32205238-32205240	$-1 < x < 0$	$1.47E-36$	GTTTTCACTTCTTGTTCCAGACAG CCGCCTGTTTTCCGGATCATATT GTTC	1
chr1:22213697-22213699	> 1	$1.44E-81$	TGACCCCGAGGGAGCCGCACCCC GGCGCCGCGACGTTACCTCCGG GGGCGC	2
chr1:109309639-109309641	$-1 < x < 0$	$3.25E-08$	GCGTCCACCAGGAGCTGGGTGCC TCCGACCTGGCCCAGGACAAGTA TGTGGC	3
chr1:108982935-108982937	$-1 < x < 0$	$2.70E-66$	CTGAAGTCACTCCAGGCTAGAGG GGCGGGGCAATCCCCCTCCCCTG CAATCC	4
chr1:116329650-116329652	$-1 < x < 0$	$1.39E-16$	GATTGGTCGGGAGGCCCTCGAGA GTCGGCCAGGCTTCGGGGTGCCT GTGGGC	5
chr1:121182146-121182148	$0 < x < 1$	$2.96E-18$	CTGGCCCGGAAGGCGCAGGGCAT CTCGATGTCGTCTCCCTCCCGGAC TGTCA	6
chr1:118453583-118453585	$0 < x < 1$	$2.72E-17$	AAGCCACAGGATTGGCACAAGGC TGCGGTGAGGTGGGGTGGGGATG CTCAGG	7
chr1:58324050-58324052	$0 < x < 1$	$5.00E-49$	CTGCCGAGGGCCGGGGAAGGCCT CCCGGACTCCTCGAAAGCATCTC GCACCG	8
chr1:65058896-65058898	$-1 < x < 0$	$4.23E-35$	CCCTCCGGCGCGGCACCGTCCCT GGCGGGTCTCGCACAGCTGGACC CTCGGA	9
chr1:94142224-94142226	$0 < x < 1$	0.004658423	GGCCAAGGACCGCACGTCCCAGG ACCGGGTGGAGGTGACGGGGCGC AGCAGG	10
chr1:98084469-98084471	$-1 < x < 0$	$6.90E-49$	ACTTGTGTTTTTTGTCAACATCCTT CGATGATATGCACTTCCTTAGAAT CAC	11
chr1:100289525-100289527	$0 < x < 1$	$2.93E-62$	TTCACAGACCGCACACTGAGGCT CGCGGGGCTGCGACCTACTCAGG CCTTCC	12
chr1:107216628-107216630	$-1 < x < 0$	$4.37E-30$	AACCTGATGAATGAGGCCAGACG GCCGGAAGAACGGCAGAAATAAA TGCAGG	13
chr10:801511-801513	$-1 < x < 0$	$3.10E-56$	GGCCGCGCCAGGACGATGGAGTT GCCGGAGAGAGAGGGGAGCGGC GCCTCTC	14
chr10:7411293-7411295	> 1	$1.15E-77$	CAGCACCGGGCATCTGGACAGCA ACCGGAGAGCGAGGCGTGTTTCT CCTGGT	15
chr10:16799192-16799194	$-1 < x < 0$	$3.16E-11$	CTGGACACGGTGGGAGCGTCACA GACGCCACCAGACACTGCGGAGA GGACGG	16

10

20

30

40

(表1の続き)

部位	係数	単変量解析(p値)	配列(5mC部位の25塩基上流及び下流)	配列番号
chr10:18237423-18237425	$0 < x < 1$	$4.87E-15$	CCGGGGCGCGTGCGGAACCCAGCCTCCGCAGAGCCCTCCAGGCCCTACACGCG	17
chr10:19851621-19851623	$-1 < x < 0$	$2.05E-13$	AGTGGGAGGCCTGGAGACTGCGCAGCGCTTGTTCTCAGGGGGCCA TGCCCT	18
chr10:20655689-20655691	$0 < x < 1$	$5.86E-10$	TCCTCTCCCTCTCCCCAGCCCCCCGCCGAGGACTAAGGGGCAAGC TAGAA	19
chr10:44524663-44524665	$-1 < x < 0$	$3.78E-24$	AGCAAAGCAGGCACAATTCCAAGAGCGAGACGATCCCATTGAGCGC TTCTGG	20
chr10:44524681-44524683	$-1 < x < 0$	$1.33E-19$	CCAAGAGCGAGACGATCCCATTGAGCGCTTCTGGGTACTGTGTCTTG AGGAT	21
chr10:44846025-44846027	$0 < x < 1$	$2.79E-19$	CACTCATAATAAAAACATTATACGTCGTGTTTGCCGGAGGATGTCTAA AATA	22
chr10:40787376-40787378	$-1 < x < 0$	$1.55E-61$	CATCTTGTTGACCAGACTGACCCC TCGGAGCCTAAACCCCCGAGCGG GGCC	23
chr10:62719946-62719948	$0 < x < 1$	$3.34E-78$	CTACGAGGGTCTTTTACCCATTCCACGCCTGAGAAGAGGCCATGACG ATCCA	24
chr10:68649436-68649438	$-1 < x < 0$	0.156992847	GCGGCGGGGGTGCTGCGCGGCGTCCCGTGCGGTTGCAGGCTGGGCG GGAGGC	25
chr11:1992634-1992636	$-1 < x < 0$	$1.20E-14$	ATTCACCACAAAAAGGAATGAAGTACGGACATACACAAGGACGCAGG TAAAC	26
chr11:33523800-33523802	$0 < x < 1$	$1.28E-50$	TGTAAGAGGGCTTCGGAGTGGTCCTCGGCCAAGCGCTACCAGCACC GCAAAA	27
chr11:24476652-24476654	$-1 < x < 0$	$3.10E-09$	ACTGTTCCAGGGTGACAAATCCCACGCCAACATCCAAAATAATGGC AAATA	28
chr11:49947821-49947823	$-1 < x < 0$	$7.57E-06$	GTGGATTGAGGATTATACCCCTACCCGACCCAGACTGTGAGCTGCG GGAGA	29
chr11:50260436-50260438	$-1 < x < 0$	$2.89E-06$	GCCCCACCTTCTTGTGTTGCCAA GCGCACCCCATCCTTGTCCTCT TCCA	30
chr11:51974516-51974518	$0 < x < 1$	$1.68E-19$	CACGTTGATTGACAAACGCGCGG GGCGAAGGCCTAGTGGAGCGCGG GTGGGG	31
chr11:53576970-53576972	$0 < x < 1$	$5.55E-76$	GTCCGGCAGCAGCGCGCACCGGG CCCGGCCCCGCGCTCCGGGACGC GAGCGG	32

10

20

30

40

50

(表1の続き)

部位	係数	単変量解析(p値)	配列(5mC部位の25塩基上流及び下流) ↓	配列 番号
chr11:6283983 6-62839838	$0 < x < 1$	$3.61E-11$	CACACGGGGCGGGGGGCGCGGTC CCCGGGGCTGCCAGCGCCGCGGT CACTCA	33
chr12:1207870 -1207872	$-1 < x < 0$	$6.31E-45$	CCCCGCCCCGCTCACGCTCACCG CGCGGCGCACCACTCACCGGCTC TCTCCC	34
chr12:3769194 -3769196	$0 < x < 1$	$1.44E-26$	GTCCCCCCTGCAGGCTCCAGGCT CCCGGACACACTCGGGGTTCAAG TCAAGA	35
chr12:1041864 4-10418646	$-1 < x < 0$	$1.59E-42$	CCCCAAAATATCTCCTCTCTGGGT CCGGAATCCCTCCCAACCCTCT CCGAG	36
chr12:1268419 0-12684192	> 1	$2.80E-21$	CTCAGCCGCTTGGGCGGGTATCC ACCGGCCCGGGGGTAGTCGGCC CCTGCG	37
chr12:1429441 9-14294421	$-1 < x < 0$	$1.31E-119$	GTGAGCCAGCCTGGTCAGGGGCG GCCGGAGCCAAGGACCCGTGGCT CCCTCA	38
chr12:4649140 7-46491409	$-1 < x < 0$	$1.86E-60$	CCTCCTAAACGTGGGCCCTGTGTT CCGGAGCCCCTGGAATCGTTTCA GCATG	39
chr13:3737760 -3737762	$-1 < x < 0$	$5.17E-41$	CGCACCTGACCCCGTTGCCAC TGCGAAATTTCTCCAAAGCTTCCA TCCA	40
chr13:1011384 5-10113847	$-1 < x < 0$	$2.88E-55$	CGGGGCACTCCCTGGACAACAGG GACGCGCTGGCCCCAACGTTAGG CGCAAT	41
chr13:3719518 2-37195184	$0 < x < 1$	$2.76E-05$	CCGACACCTGCAACAACGGCACC TGCGGGGGCGGAGGGGTGTGGC TGGGCG	42
chr13:3733203 2-37332034	$-1 < x < 0$	$3.16E-13$	AGTCCAGGGAACAGGGCCAAGGT CACGCAGAAAGGTCACTGTTATCA AAACG	43
chr13:3747459 2-37474594	$-1 < x < 0$	$2.27E-44$	TTCCCGGCTCCCGAACCAGGGTG GCCGAGCCAGGCCTCTGCCTCCG GGGGTC	44
chr13:3766566 7-37665669	$-1 < x < 0$	$1.49E-32$	CCCTGGTGGGGGCCTTAGGCAAA AACGGGTAGCCGCAAGCAGGGAC GCAGCG	45
chr13:3787775 9-37877761	$0 < x < 1$	$6.31E-36$	TGCAGCCGGGCCTCCTGGGGCAG GGCGAGCTCGCACCTGCTGGCCT CCCCGC	46
chr13:3790609 8-37906100	$0 < x < 1$	$3.77E-59$	TGACGCTCCCGCGGCGCGGCTCC CCCGCCGAGCCACGGCGCTCCG GCCCA	47
chr13:3833980 7-38339809	$0 < x < 1$	$7.26E-80$	CTCGCCTGCGCTCCTCACCTGGG CGCGCTGCGCGGTACGGCAGAT GCTCGG	48

10

20

30

40

50

(表1の続き)

部位	係数	単変量解析(p値)	配列(5mC部位の25塩基上流及び下流)	配列番号
chr14:345761-345763	$-1 < x < 0$	$1.22E-06$	GGGGCGACCCCTGGACTGTGGCT GGCGTCTGCTGTGAGGTGGCCTG TGGGGT	49
chr14:6144664-6144666	$0 < x < 1$	$6.62E-07$	TATCTCAGCCATTCATAGCGCCTA ACGGCTCACAATACCCTAAAGGCT CCCT	50
chr14:5949450-5949452	$0 < x < 1$	$9.32E-81$	CCGGCGGTGCCAGCATGTCCGCC GCCGTGGCGTGCTGGACTACTT CGCCGC	51
chr14:7586529-7586531	$-1 < x < 0$	$6.72E-09$	GAGCTTTACCTCCCACCACTCCCT CCGCATGTCCTGGGCTCTGGCCAT TACC	52
chr14:39735273-39735275	$-1 < x < 0$	$3.33E-07$	TGGTAGCTGGGGCCCCCGCCTGG GCCGCCGTCTCCGCCGCCGGGC CGCTGT	53
chr14:58424689-58424691	$-1 < x < 0$	$1.56E-75$	TTTCTAGGACTACGTCTGTGCACC TCGTGTGGCAAATAAACTATGCT AACA	54
chr15:2611795-2611797	$0 < x < 1$	$6.88E-35$	CCTCTAGACCCCAACCCTTCGAG GTCGGTCTCAGGTCCGGTCTCAG GTCTCG	55
chr15:7297280-7297282	$0 < x < 1$	$6.12E-77$	AATAACTCGTCAAGTCCCTGGGCT CCGAGGCAGCCTGCCTCCCCACC AGCCC	56
chr15:10856498-10856500		$7.42E-18$	CCCCAGCCGGGCGCGGCTCGGGTT TCCGACGGAGGGCCGGGCTGCGC GGCGTC	57
chr15:10856612-10856614	$0 < x < 1$	$1.44E-59$	GGCAGCCGGGGCAGCGGGAGGC GTGCGCAGCGCCGGCGAGGAGGA CCCGCGC	58
chr15:18190829-18190831	$0 < x < 1$	0.032879523	CACCGCTGAGCTTCCCGCCGCC TGCGCAGCGCAGCCCTCTCGCCG CTTATA	59
chr15:20380665-20380667	$-1 < x < 0$	$1.86E-07$	AGTTTCTTTTGGGAAGATGAACC CCGACGGAGGCAGCTGCGCGGGG TGTGT	60
chr15:51319029-51319031	$-1 < x < 0$	$1.03E-36$	GAGTTTCTGTGCACGAGGTCATCC TCGGTCAAGTATTATTCCCACCCG TCTC	61
chr16:8886356-8886358	> 1	$2.94E-15$	CCGGCCGGCCGGCCACGGAAACC TCCGGAGGCCCGGGCCCCGCCGG GGTGTC	62
chr16:8886545-8886547	> 1	$2.03E-101$	GGCGGGCTCCCCGTGCGCGCACG GCCGCGGCCGACCTCTCCGCGCG GGCTCC	63
chr16:15250294-15250296	$-1 < x < 0$	$5.04E-14$	CATAACTGATGCCACAGGGTCTG ACGTTCTGAGTTAACCTGCATTAT AACT	64

10

20

30

40

50

(表1の続き)

部位	係数	単変量解析(p値)	配列(5mC部位の25塩基上流及び下流) ↓	配列 番号
chr17:1501452 7-15014529	$0 < x < 1$	$2.86E-29$	ACGCGGCATAGCGGGCTCCGCGC TCCGGCAGGGGTCCGTCTCGAA GGTCGG	65
chr17:1940568 2-19405684	$0 < x < 1$	$1.09E-17$	TGGATAGAGAGGGGTCCCTTAAAA GCGTGCCTTGAGTTCAGGCTTTGA AAAA	66
chr17:3354411 3-33544115	$0 < x < 1$	$3.12E-75$	CTGGGGGCTACGAGCGAGAATCC CTCGACGCTCCTGAGAACTCAG ACCAGA	67
chr17:3385146 2-33851464	> 1	$2.82E-131$	ACAGCAGGATGAAGCCGAAAGCC TCCGAGTGCCGGTCGAAGAAGTA CTCGTT	68
chr17:3411542 8-34115430	$-1 < x < 0$	$3.35E-49$	TCCTGGGCCCGCGGCGCTGGCCC CTCGGGCCTCGCTGAAAGCCCCT TGTTCC	69
chr17:4827451 3-48274515	$0 < x < 1$	$1.03E-43$	ATGCTACTGCAGGCACTGGCTGCT TCGGCGTGGCTCTGTGCGGTAGT GTCTC	70
chr17:4922288 3-49222885	$0 < x < 1$	$7.66E-32$	GAAGCGAGGAGCCGCCTCCCGAG GCCGGTCCCGGCGAGCAAGGGCG CCTCGG	71
chr17:5583601 4-55836016	$0 < x < 1$	$1.59E-15$	CGGGTGTCTGTGTGTATCTGTGT GCGTGTTTGTTTAATCCTCCCCCA AGCT	72
chr17:6002228 9-60022291	$-1 < x < 0$	$5.73E-66$	ACAATCCTTTTAAGGCAACGTGTC CCGCCTCTCCTAACCATATAAGTG CAAC	73
chr18:5425112 -5425114	$0 < x < 1$	$7.01E-67$	CAGACGCGAGCGAGGCCGGTGGA GGCGGGGTGGCTGCGTTGGACGG GACGGG	74
chr18:3199973 9-31999741	$0 < x < 1$	$1.47E-20$	GGTGCCGTCGGCGAAGCGGGCCA GCCGTTGGAGCTGCGCCCGCAG CCGCCG	75
chr18:4667053 5-46670537	$0 < x < 1$	$3.67E-30$	GTGGCCTGGGCAGGTCAGCGGAG CCCGCGGCGCTCAGCGCCCCACC TGTATG	76
chr18:4699096 3-46990965	$0 < x < 1$	$7.61E-44$	GGCGCGATGCGGGCGGCCGCGGC GGCGTCTACGAGCACCTCGGCGG GGCGCC	77
chr18:4467923 6-44679238	$-1 < x < 0$	$1.20E-31$	TCCCGGAAGTCCTGCTCAACTAGC CCGGCTGGCGGCCCGGTGTCACC CGCTG	78
chr18:4468639 4-44686396	$-1 < x < 0$	$2.56E-78$	GTGCCACCATCCCCGGGTGAAG GACGGGTTCCGAGTGAGCCAGGA ACCACC	79
chr18:4868170 2-48681704	$-1 < x < 0$	$1.01E-08$	GGATCCGTCATTGACCCTTGAGAG ACGGAAGATTCTGGGGGCTCAAA GGAGT	80

10

20

30

40

50

(表1の続き)

部位	係数	単変量解析(p値)	配列(5mC部位の25塩基上流及び下流) ↓	配列 番号
chr18:50259206-50259208	$-1 < x < 0$	5.46E-54	CCAACATGACGCTCATCGGAGAG AACGGCCACAGCACCGACACGCT CACGGG	81
chr18:51915009-51915011	$-1 < x < 0$	0.06485116	TTAAGCCCACGCTAATTTCCATAG GCGAGTTAGAATGTGGCCTAAATT GCTT	82
chr18:51374197-51374199	$0 < x < 1$	7.00E-102	CCCACAGCCCCTCGCGTCCCCGG AGCGCGCACGCCCCGACGCGGTGC AAACTG	83
chr18:53063592-53063594	$-1 < x < 0$	6.71E-33	AGAAGGATCTGGAACGTGTAGGA GACGTGCAGCTTCTCAGGGTCCG TCTCCA	84
chr19:44679975-44679977	$0 < x < 1$	1.44E-18	GCCCATCGCCTGCGGCCTCGGTC TCCGGGGAGAGGGAAAGTAACTC CGGAGC	85
chr2:32494387-32494389	> 1	0.178817525	TTGGAAGCTCGGGGGGCGGAGAT CCCGCGCCGCCCGGCCGGCCTCG GGGCGG	86
chr2:31655107-31655109	$-1 < x < 0$	1.12E-44	CTGCACAGCCCTGCTCCGCCCTG CGCGGCCCTGCACGGTGCTGCTC GGTGCT	87
chr2:32780982-32780984	$0 < x < 1$	2.44E-08	TTGAGTGACGGCTAGCGGCCCGC CCCGGGCGTGACGTCATCCCGGT GTTGCT	88
chr2:64665545-64665547	$-1 < x < 0$	2.99E-09	CTTCACAGTAAGCCTAAAGAGTAG GCGTTATCTCCGTTTATGGTGTA CTGG	89
chr2:65566948-65566950	$-1 < x < 0$	3.68E-14	CGCCAGCCTGCAGCAGGTCCATG AGCGGACGTGGGCCCGGCAGTTG CTGCAG	90
chr20:3395529-3395531	$-1 < x < 0$	1.27E-18	AAAAGCCAGGGGAGAGGGGAGGC GCCGGCTCCCACAGGCCACTGTA AGTCCC	91
chr20:3833805-3833807	$-1 < x < 0$	4.84E-49	AGTAAGGAGCTGCTCTCATGACTG TCGTTGCTGTTGCTAAGTGGCCCT TTTC	92
chr20:3832009-3832011	$-1 < x < 0$	8.18E-17	CCGCGGCCCACTCGGTCACGCC CACGGGCACCCTCACGGAGCCTC CAGGGA	93
chr20:18594283-18594285	$0 < x < 1$	2.07E-50	CCCGCGCGCTGCCGCGGCCGCT GTCGGCCAAGGAGCTCAACCACG TCCTGC	94
chr20:36046282-36046284	$0 < x < 1$	8.06E-63	CTTCATTGCATCGCCTTCCCGACG CCGGGTGCCAACAAGCAACCAAA AAATT	95
chr20:40374930-40374932	$0 < x < 1$	4.41E-91	CCAGGATTCCACATGGTCAGGAG AACGCTCTCTGCACATCATGGACA CCAAA	96

10

20

30

40

50

(表1の続き)

部位	係数	単変量解析(p値)	配列(5mC部位の25塩基上流及び下流) ↓	配列 番号
chr20:4468921 3-44689215	$0 < x < 1$	$3.92E-125$	TTCTCCCGCCTCAGCACCTCCAGC GCGGACAGCTCCTCGCTGTCGCC TCCAC	97
chr20:4494221 3-44942215	> 1	$1.98E-31$	GGCAGGGCCGCCAGGCGCCGGC CCCCGGTGAAGAAGTCCTCGGCG CTGCGCT	98
chr20:4509161 4-45091616	$0 < x < 1$	$5.38E-50$	TTGCGTAGGAGGTAGGAGGCGAG GCCGTGGGGCTGGGAACCCGAAC TGGGCT	99
chr20:4536092 0-45360922	$-1 < x < 0$	$1.11E-19$	CAAGTCACCCAGCTCATCTGTTGA GCGTTCACTGTCCTAAGCCCTTTA TGAC	100
chr20:4609856 8-46098570	$0 < x < 1$	$4.57E-68$	TCGGTGCCGCCCGCCTCGGGCTC TGCGCGCGGCCAGCGCTGCGGGT GACAGA	101
chr20:4984456 1-49844563	$-1 < x < 0$	$2.37E-33$	TGAAATTTTCGAGTCTCGGAGACG GCGTGATGCTGGGGGTCCTGAA AGCCT	102
chr20:4994055 1-49940553	$-1 < x < 0$	$4.34E-59$	ACCTGCCCATGGGGGATAATAATA ACGTTAATGAAACCCTTGACAGAGT ACTC	103
chr20:5430145 3-54301455	> 1	$3.30E-119$	ACCACGCCCCGGGGGCGGAGCGT CGCGGGGGTCGGACGCCGAGCAG CTGCCG	104
chr20:5392100 3-53921005	$-1 < x < 0$	$9.56E-10$	CCCTCAGGAACCTCCTCCAGGTCC AGCGTCCCGCTGCCATCACGGTC CCAGCG	105
chr20:5734792 1-57347923	$-1 < x < 0$	$1.16E-62$	ACCAGCCGCCAGCCGTGACCTT TCCGGGCCTGTTCTGCGGCTCTG GGCGC	106
chr20:5731801 2-57318014	$0 < x < 1$	$1.45E-14$	GCGGCAGCTCGGGAAGTCAACCC CCCGCGACATCTGACAGGGCAG GCCGGC	107
chr20:5762111 9-57621121	$-1 < x < 0$	$2.51E-16$	AGCGCAGGACACCCCTGCACGTC GGCGCCGCGGGCGGTGCCAAGGT CCTGGG	108
chr21:1623362 8-16233630	$0 < x < 1$	$1.28E-11$	CGGCGGGCGCGCTGCTGGCGGGC GCCGAGGGCGGGGACGTGCGCGA GGCCAC	109
chr21:4186418 8-41864190	$-1 < x < 0$	$1.42E-10$	AGAATAAGTCCGTCTTCATCCTGG GCGCCAGCGGGGAAACCGGCAGA GTGCT	110
chr21:4349079 6-43490798	> 1	$3.27E-88$	ACGCGCTGGCCCGCGCTGCCCGC CGCGCTCGGGAGAGCATCCCTGC CGCTGC	111
chr22:4637456 3-46374565	> 1	$1.65E-07$	TTGGACGCGGAGGCCGTCCGGGC GCCGAGCAACGAGCAGCACAGCA CGGTGG	112

10

20

30

40

50

(表1の続き)

部位	係数	単変量解析(p値)	配列(5mC部位の25塩基上流及び下流) ↓	配列 番号
chr23:11942623-11942625	$-1 < x < 0$	1.81E-08	ATCCAGAGGGGGCTCCTGGGGCC TGCGTTGCCGGAGCACCCCAAGC AAATAC	113
chr23:29966538-29966540	$-1 < x < 0$	2.56E-38	AGGGGGAGGTGACATGGGAATTA AACGCCCTTTCCCTCAGCCAGTGC CAAAAT	114
chr23:37987526-37987528	$-1 < x < 0$	0.15833084	CGGGGCGGGAATCCGCCCGCCCG CTCGCCCCCGGCGCCTAGACCCG GGGCGC	115
chr23:50123623-50123625	$0 < x < 1$	8.61E-122	CCCAGAACTACGGCAAACCTCGC GCCGGGTGCGCGCTGGAAGGGGG AGTCCG	116
chr24:12518910-12518912	> 1	3.37E-125	CTCTTCCTCGGAGATCCATGCTCG CCGTGCAGCGAAGGAGGCCAGAT GTGCT	117
chr24:17354043-17354045	$-1 < x < 0$	9.00E-50	TGGGTAGGTGAGAGCAGGGCAGG GGCGCCAAGTTCGGGCTGCCAG ACTGCT	118
chr24:21051024-21051026	> 1	1.02E-124	ACGTTGCTCTTCGTGCTCCTGCCC TCGCTGGTCGTGCAGCTGCTCAG CTTCC	119
chr24:30860619-30860621	> 1	0.176671196	CAGAACC GCGCTTCCCCGAAACT CGCGGGCGGTGGGATCGCAAGTC ACCCCC	120
chr24:24968751-24968753	$-1 < x < 0$	3.88E-104	GTCCTCTGGCGAGGGAAGTTACA GACGCCAAGCCAGAGTCTGGGG TGCCCA	121
chr24:43790837-43790839	$0 < x < 1$	9.16E-44	CGCCGGGCCCCAGGAGCCGCCGT CACGACCGCCGCTCGCGTAGCG CCTCCG	122
chr25:15332071-15332073	$-1 < x < 0$	2.20E-31	ACCACCGACAAAAGATAATGTTGC CCGAATAAGTTACGTGCATCTTAA CATG	123
chr25:15332101-15332103	$-1 < x < 0$	1.11E-28	AAGTTACGTGCATCTTAACATGTC ACGGGATCTGTTCTGTGTGTTCT TGTG	124
chr25:16764068-16764070	$-1 < x < 0$	1.40E-42	CGCTCGAGCATCTACTCTACTGCG GCGAATTTAATCCACATTTCTCT GCAT	125
chr25:18016409-18016411	$0 < x < 1$	3.89E-62	AGAGCCAGGCGCGGCCCGCGAG GCCGGGTGCACGTGCACACGAGG GGCGCC	126
chr25:35778245-35778247	$-1 < x < 0$	1.05E-28	CTTGAGGCCTTGAGGATGGCCCC TGCGTCCACGACCAGGGCTGGGG CTCCTG	127
chr25:47511184-47511186	$0 < x < 1$	1.37E-79	CCGGGACCCGGAACGCAGGCGCC GCCGACCCTCAGTCCCGGGCCGC GTGCAT	128

10

20

30

40

50

(表1の続き)

部位	係数	単変量解析(p値)	配列(5mC部位の25塩基上流及び下流) ↓	配列 番号
chr26:5490242 -5490244	$-1 < x < 0$	$3.09E-113$	TCCCAGCGTTTCAGCTCCTGAGTG TCGGCTGGAAGCCCGCCAGGGTT ACCAT	129
chr26:9207175 -9207177	$-1 < x < 0$	$1.73E-06$	CCCGGCAGTACTGGCTCTTCGCC CGCGAGCACCCGACACCACGCGCC GCTGCG	130
chr26:1069157 6-10691578	$-1 < x < 0$	$5.16E-17$	TGTATTAAGTCCATAAATGTATATA CGGGATAGAAGGACCTGCCCTGT CTCC	131
chr26:2291862 3-22918625	$-1 < x < 0$	$3.10E-26$	TAATTCCATTCTGGTTTGTAGAATT CGTCTGCAGGCTATTGTGGATAGG ATA	132
chr27:9490065 -9490067	$-1 < x < 0$	$7.50E-09$	CCCTGAGCAGTGCCACCCTTCTTC CCGAAAAGGAGGGAAGCCATCC TTTTTC	133
chr27:2930709 7-29307099	$-1 < x < 0$	$2.59E-25$	CAACATGCAACTCGGGGTTGTTCT GCGGATGTGTTTAAGGCCAATGTA ATTCT	134
chr27:4503786 4-45037866	$0 < x < 1$	$4.82E-106$	CCAGCGGCCGCCAGCCCTGCGCC GCCGCGACACAAAGAGTGCGGGC GATTCC	135
chr28:8994532 -8994534	$0 < x < 1$	$4.42E-57$	GAGCCCGCCAAGTTAGAAGACTG GTCGGTCGGGGCCACACGGCTGG TCCGGG	136
chr28:2174423 8-21744240	$-1 < x < 0$	$1.81E-57$	TAGTAGTCGATAGAGGACTGGAAC ACGGCACTTCAGATAAAGAATGCT CCAG	137
chr29:9541477 -9541479	$-1 < x < 0$	$4.37E-13$	ACTAGATTTTGAATTCTATGATGA CCGGGACTACTACTACTTCTACCT TTGC	138
chr29:1947961 1-19479613	$0 < x < 1$	$6.53E-89$	TGGGGAGGTGGGGAATCGCGTAC CACGGTGGCAGCTTGCTGTACCA GGGCAG	139
chr29:3218991 0-32189912	$-1 < x < 0$	$2.95E-66$	GCAGGTGGTGGGACAGCCATTGG GCCGTGTAGAACCGAGGTTCCCA CGTTTG	140
chr29:3562929 2-35629294	$-1 < x < 0$	$3.46E-55$	TCCCGATGATGGTGATTGATCATT ACGAGGACGGTAATAAGATTGTTA CCCG	141
chr3:17063027 -17063029	$0 < x < 1$	$7.60E-31$	CCCGCCCGCACTCCCGGCCCGCG CCCGAGGCAGTGTGGGGTGCGG GCCTCC	142
chr3:30303462 -30303464	$0 < x < 1$	$1.61E-47$	TGGAGCGGTGCGCGATGCTGTCT CACGCCGACCTCCTGGACGCCAG GCTAGG	143
chr3:30303526 -30303528	$0 < x < 1$	$2.78E-23$	TCTCGCCCGGGCAACCAGGAGAA GCCGGGGCAGGAAATTGTCAATTT GTTCC	144

10

20

30

40

50

(表1の続き)

部位	係数	単変量解析(p値)	配列(5mC部位の25塩基上流及び下流) ↓	配列 番号
chr3:31677748 -31677750	$0 < x < 1$	$2.45E-111$	GCTGAGCCCGCAGCTGCGGCGCG GACGCCGGTCGCACGCCCGGCGG GGCTGG	145
chr3:46852141 -46852143	$0 < x < 1$	$3.72E-16$	CTATGGGCGATATTGCAAAGCAAG ACGACCCGAGGCACAGCCAAATT CCACT	146
chr3:46843750 -46843752	> 1	$1.98E-135$	CCAGGGCCACAGACCTGGAAGTC GCCGGGAGCCCGGCAGCACTCCT CTCAAG	147
chr3:70831746 -70831748	$0 < x < 1$	$3.57E-19$	CTACCTGTCGGCGGGAGGCGAGC ACCGGGCGCCCGCACGTGCGGCC GGCGGG	148
chr3:72353348 -72353350	$-1 < x < 0$	$9.65E-58$	GGGACACCTACTCTGGGCCCCGG CACGGCCGAGACAGACAGGTGCC TGCAA	149
chr30:8031058 -8031060	$0 < x < 1$	$1.27E-55$	GGCCGTGCGGGCGGGGGCCGGCTC ACCGCGGCGCGCGTGGGAGGGCC GGGCCG	150
chr30:8031060 -8031062	$0 < x < 1$	$1.06E-40$	CCGTCGGGCGGGGGCCGGCTCAC CGCGGCGCGCGTGGGAGGGCCG GGCCGGC	151
chr30:3792088 3-37920885	$0 < x < 1$	$3.52E-27$	TTCCAAGGGCGCCGGGCCGCCTC CGCGCGTGGAGCGTCCACTGTTG GGGTAA	152
chr31:3512368 8-35123690	$0 < x < 1$	$2.86E-15$	CACCCTCCGGACACCCAGGGAG CACGGACAGGTCTTCCCAGCACG GCAGGC	153
chr32:1004487 0-10044872	$-1 < x < 0$	$1.29E-11$	GTGAGACGGAATGTGTGAGTATGT ACGTAACAGGTTTTAAGAAATTGT GTAC	154
chr32:4040972 9-40409731	$0 < x < 1$	$2.89E-62$	GAGCTCTTCAAGGGCTTCGTCAAC GCGGTGCGCCGGTGCGCCAGGA CCCCG	155
chr32:4040973 6-40409738	$0 < x < 1$	$1.49E-50$	TCAAGGGCTTCGTCAACGCGGTC GCCGCGGTGCGCCAGGACCCCGA CGGCAC	156
chr32:4057101 8-40571020	$-1 < x < 0$	$3.33E-83$	TTTGGGTCTTAGCCAAGGTACACA TCGGCGTTTGTTCATTGTGAT CTA	157
chr33:2324794 7-23247949	$-1 < x < 0$	$1.70E-32$	GACAAGGGTATGGAATACCTACAA ACGGTGATTCTGATTCTTTTCAAG GGTG	158
chr33:2347377 2-23473774	$0 < x < 1$	$1.07E-05$	ACAGGCAACATCGTGGGCCTTCTA CCGGGCACTTCCTTCTTCTCTGCC CGCA	159
chr33:2347385 6-23473858	$0 < x < 1$	$7.19E-11$	GCCCAGAGGTATCCACAGCCAG CTCGCTGTGGTCTCACACACAGC GTCTCA	160

10

20

30

40

50

(表1の続き)

部位	係数	単変量解析(p値)	配列(5mC部位の25塩基上流及び下流) ↓	配列 番号
chr33:2651269 2-26512694	>1	3.39E-65	CGGCTGCCGCGCCCGCAGTCGTC GCCGCCGCGCTCCTGCCAGGCCG ACCTGG	161
chr33:2651271 1-26512713	>1	3.97E-30	CGTCGCCGCGCGCTCCTGCCAG GCCGACCTGGAGCGGAAGCTGAA GCCGAA	162
chr33:1981090 4-19810906	>1	1.38E-70	GCGCTCCTCGCCGCTCTCGGTGG CCCGGAGAACAAAAGCCCCGGGC CTGGCC	163
chr33:2824160 9-28241611	$-1 < x < 0$	4.28E-75	GGAGGGCAGCTGGGAGTACTTCC CACGCCACATGAGCCTTTGTGTG AAAAT	164
chr33:2824183 3-28241835	$-1 < x < 0$	1.22E-83	AATTACTTTCACTTTGTTGTGAGGT CGCTGCTGTCTTCTGTGTCACCCC AGG	165
chr33:2920159 2-29201594	$-1 < x < 0$	2.23E-80	CTGGTGCCCGACGGAAATAGGAG GCCGGCAGCCTGCCAGAGTGGGA CAGTCC	166
chr33:2920157 8-29201580	$-1 < x < 0$	4.79E-64	GTGGCCCTGTTACCCTGGTGCCC GACGAAATAGGAGGCCGGCAGC CTGCCA	167
chr34:2123742 7-21237429	$0 < x < 1$	1.02E-35	GGGGGTGCGTTGGCTTGTTGCC CGCGAAGAAGGAGTTGGTGTCTT GCAGGC	168
chr35:7689584 -7689586	$0 < x < 1$	5.64E-14	GGGCGGGGCCTCCCGGGCTGGAG TGCGGTACCTGAGCGAGACGCGC ACCAGA	169
chr35:2385293 2-23852934	>1	1.76E-44	ACACGCCGCTGCGCTCCTTGAC GACGACACGGCCTGGACGATCAG CTCCGA	170
chr35:2385376 3-23853765	$0 < x < 1$	2.09E-70	GCTGACGCCGTCCTTCACGCGCG GGCGGCACGTGTGGAACACGCAG CGCGCA	171
chr36:1866258 9-18662591	$-1 < x < 0$	2.78E-36	CCCGGTGGTCTCCAACACAGCCA GGCGTCGGGTTTTGTGCGGGATG GTGCAG	172
chr37:2007181 -2007183	$-1 < x < 0$	7.34E-48	TTCATCATTGGATGATAGTTTTTCA CGACCTTGAGAGTCTCCTTGTA AAACT	173
chr37:2673540 3-26735405	$-1 < x < 0$	3.70E-30	CCCTTTTTTACACATGAACAAAAC GCGCTACAGAGAGGAATAACCTC CCAG	174
chr38:1476292 8-14762930	$0 < x < 1$	1.11E-57	GCCACGCGGCCCGCGCCCAGCCC CACGCACAGCGACAGCAGGTCCG ACAGCA	175
chr38:2131797 0-21317972	$-1 < x < 0$	1.16E-21	GGAGTCTAGGATGGCAGTGTGAC TCCGAGAAGGTAGGACAGCGCGG GAGAGG	176

10

20

30

40

50

(表1の続き)

部位	係数	単変量解析(p値)	配列(5mC部位の25塩基上流及び下流) ↓	配列 番号
chr4:19870655 -19870657	$-1 < x < 0$	2.31E-06	CCTAAATAAACTCTTAGGAATTCC CCGGTTCCTTCTCCCTGTCCCCAC TGCA	177
chr4:23880514 -23880516	$-1 < x < 0$	0.018537335	CGCCCGACCCCGGAACCCCGGT GGCGTCACTGCTGCGCGTCCGCC GGAGCA	178
chr4:25509815 -25509817	$-1 < x < 0$	1.33E-39	ATGGCCTCCTGTCTATCCTGGGAC CCGTCTCCACCCCATCAGAGCC AATGA	179
chr4:34981731 -34981733	$0 < x < 1$	4.21E-25	TGCGCCCCGGGGTCTGGCTCGTC CGCGCGGGGCAGCGGCCCATGGT CGGCGG	180
chr4:36661557 -36661559	$-1 < x < 0$	5.86E-25	TATTACAGTGTGTCGAGTCAAAC GCGCTTTTCACTCAATGGAAATTC CTCT	181
chr4:36180013 -36180015	$0 < x < 1$	1.08E-119	GCGGGCTGGGGGCCCGGAGGGG CCGCGCCTCGCACCGCGGACGCT GCAGTTC	182
chr4:40697330 -40697332	$0 < x < 1$	3.06E-42	GGGAGGGCGGCTGCTCGGGTCAC TCCGGGGGCAGCATGCGCGGCGG CGCTGG	183
chr4:43217432 -43217434	$0 < x < 1$	3.97E-81	GTGTCGTGCACGTTAGCGTGCC GACGGCGTGGTGGGCCCTGGGCC GCAAGC	184
chr5:19192793 -19192795	$0 < x < 1$	6.11E-87	TAGCAGGGCTCTGGGAGTCCCTA GCCGGTGCAAAGTGTTAGAAAGA CATCAC	185
chr5:21480151 -21480153	> 1	4.09E-32	TTGAGCTGCCTGGAGCAGCAGCC GTCGGCCACCTAGCAGGAGTGTC CTCGCA	186
chr5:32347978 -32347980	$-1 < x < 0$	0.890183588	ACACGATAGCCCCTGGCCCGGTC CCCGGCCACCCCGCCAGCAGCC CGATGC	187
chr5:32612576 -32612578	$-1 < x < 0$	1.82E-15	ACTTCCTTGGTGAGAACCACGGCT TCGCCTGAGAACTAATTGTTACCC TCGA	188
chr5:32711703 -32711705	> 1	0.068664987	GGTATCCCGTCCCCTCGGCTCGG CTCGGCTCGGCTCGGCTCGGCGG GCCCCG	189
chr5:32884319 -32884321	$-1 < x < 0$	2.18E-34	CCAGCTTTGTTTGGGTCTCCCACA CCGCCTGTGTATGAATGGGACTAA ATTT	190
chr5:40054086 -40054088	$0 < x < 1$	7.25E-31	CGTACAGCGCGTCCTGCGCCTCC AGCGGCATGGCCGGGCGGACCGG CCCCGG	191
chr5:33220460 -33220462	$0 < x < 1$	2.71E-47	ACGTAAGGTGAGAAGGCGCGAGC GCCGCGGACCCGTCCGGTGGGAT GAGGGG	192

10

20

30

40

50

(表1の続き)

部位	係数	単変量解析(p値)	配列(5mC部位の25塩基上流及び下流) ↓	配列 番号
chr5:46881938 -46881940	$0 < x < 1$	6.21×10^{-74}	TCCTCGGCCGTCAGCACCGTCTG GCCGGACATGTCGCTGGCGCTGC CGCCGC	193
chr5:55848493 -55848495	$-1 < x < 0$	1.84×10^{-13}	GACCCTGTGCCCTCAGCTGGCCT CACGTGCATGGAATGGTGCTGTG CCCTGT	194
chr5:56981423 -56981425	$-1 < x < 0$	9.11×10^{-71}	CTGCCGGGCCTGGCCGGGGCCGC TTCGTGGTCTGCACTTACCCACG TGCCA	195
chr5:61645225 -61645227	> 1	1.61×10^{-64}	TAAAGGGGCGATGCCGCGACCCA GGCGCTGGCGTGGGGTCCACCGG CGTCGC	196
chr5:64909470 -64909472	$-1 < x < 0$	2.94×10^{-20}	AGAGTGTAGAGCTGCTGGGGGCT GCCGTCTGCCCTGCTGGCCTGCT GTGGTA	197
chr5:76278186 -76278188	$-1 < x < 0$	3.25×10^{-40}	TTCATCTCTGGTTCTTGTCATCC CCGCAGGAAGTGTGTCTTCAGAC CACAG	198
chr5:76278307 -76278309	$-1 < x < 0$	2.57×10^{-05}	GTGAAATTCCTGCAAGTCGTGTTG CCGACATAGTCTGCAGGACAAAC TTTTA	199
chr6:8231142 -8231144	$-1 < x < 0$	6.01×10^{-28}	GAGAGGCGGGCCCCTGGCTTTTG GGCGCAGACCTCCAGGGCCCGCA TCAAGT	200
chr6:8915114 -8915116	$-1 < x < 0$	3.25×10^{-61}	TCCAGACCCTAGCAGTTGGAGGA TCCGAGTTCGAATTCTGTCTTTGC CATTC	201
chr6:29756505 -29756507	$0 < x < 1$	1.70×10^{-24}	TGCACGACCACCGCAGCGTCCCA ACCGTGGTCTCGGCCCTGGCTC CCTCCT	202
chr6:31453418 -31453420	$0 < x < 1$	4.35×10^{-06}	GCGGCAGAAGTCCGGCGTGGGCG CCCGGGTCGGGGGCGCGTCCGAG ACCCCC	203
chr6:40418271 -40418273	$0 < x < 1$	3.39×10^{-53}	GGCCCGATTGTGCCGCTGTTGTG TCGGTTGACTCTTGCCCGATTGCC GCGC	204
chr6:40624669 -40624671	$-1 < x < 0$	7.26×10^{-43}	CCTGGTGCCGGAGAGCGGGATGT CACGGCTTGATCGATCACGCGTT GAACC	205
chr6:41485415 -41485417	$-1 < x < 0$	3.69×10^{-05}	GGCCGTCCATGGCAGTGCCGGCC CACGAGGCAGGGGGCAGATAAGG GGGCCG	206
chr6:41661247 -41661249	$-1 < x < 0$	3.49×10^{-53}	TCTCTGGCGCAATAAAAGAGACC CCCGTGAGGAAGCCCCCCCAGCA CTCATA	207
chr6:45773846 -45773848	> 1	5.94×10^{-243}	GAGAAGGACGTCCCTGTCGCGAA GCCGTTGCGAGCGCGCGGCCCTG GGGGCG	208

10

20

30

40

50

(表1の続き)

部位	係数	単変量解析(p値)	配列(5mC部位の25塩基上流及び下流) ↓	配列 番号
chr6:60675998 -60676000	>1	$1.02E-37$	GATAGCTTCCTCGGCTCGGTCGG GGCGGCTGCTGAGCGGCGGAGCG GCGCGG	209
chr7:388496- 388498	$0 < x < 1$	$3.63E-26$	GAGGGGACCTGCCCCGTGGGGTG GCCGTGCAGGTTGCGGGGCGCAT CCTGCG	210
chr7:38420583 -38420585	$0 < x < 1$	$6.52E-09$	CAGGGACCTCGGCCCTCCCTCCC AGCGGCCGGGACCAGACTCCGGG GTGCCT	211
chr7:38136719 -38136721	$-1 < x < 0$	$1.74E-12$	GCGTCCCCGGAGGTGTTTACCGA CCCGCGCACACACACCCCGCTAC GTGCCA	212
chr7:41785316 -41785318	$-1 < x < 0$	$3.46E-24$	AGGGCTGGGAAGATTGGCAGCCC TTCGGAGTTTATGCGTGAAGGGAG TCCAT	213
chr7:41785327 -41785329	$-1 < x < 0$	$1.25E-17$	GATTGGCAGCCCTTCGGAGTTTAT GCGTGAAGGGAGTCCATCTTACC CTCCC	214
chr7:41980137 -41980139	$-1 < x < 0$	$1.31E-49$	CCACAGCATCAGCCCAGGAGAGG CACGGTTTATTGACAGGTTACACC CCAGG	215
chr7:42504060 -42504062	$0 < x < 1$	$2.99E-18$	CCACAGCGGAAACCATCACTGGC ACCGGCTACTCCTTACGGACAATG CTGGG	216
chr7:78016807 -78016809	$0 < x < 1$	$3.99E-20$	AAATGTACAGCCAGCGATTTGGCA TCGTACAGCGGGAGGTTAAGGGC CCCAC	217
chr8:14013084 -14013086	$0 < x < 1$	$1.77E-07$	ACGGAGAAACCACTTTATCTGAGG ACGGTCGAAAATTAGATCCTACTT TCCC	218
chr8:14259939 -14259941	$-1 < x < 0$	$1.79E-36$	ATTTTAGATGCCAATTCTTTGAAG GCGTTGGATGTAACACCCCTTCAT TTCC	219
chr8:4291048 -4291050	$-1 < x < 0$	$2.83E-89$	GGCGGGCAGGTAGAGGGCCGATC CCCGGCCTTTTCACATCCCACTTC TTTCC	220
chr8:15508656 -15508658	$-1 < x < 0$	$3.75E-08$	ACCCTTGCCCTCCTTGGCAGGCC AGCGCTCCGGGAGGCCCTAAAGA ACGGAC	221
chr8:26390136 -26390138	$-1 < x < 0$	$2.00E-20$	GTGTTTACCTGGAGACTAATTCAT ACGGTAGTTATTGGGCTTTAAATC CAGG	222
chr8:26943273 -26943275	$0 < x < 1$	$1.51E-17$	GTGGCCAGCCTATTTAGTTCCACA TCGTTTCAGCCTAGATGCCCCCAC CACT	223
chr8:37559917 -37559919	$0 < x < 1$	$2.38E-18$	TCTGTAAGAGTGTTTCCCTTCGAC ACGGTGTATTTCTGGAAGGTTTTCT TTCT	224

10

20

30

40

50

(表1の続き)

部位	係数	単変量解析(p値)	配列(5mC部位の25塩基上流及び下流) ↓	配列 番号
chr8:33509086 -33509088	$0 < x < 1$	$2.95E-94$	GGGCCAGTGAGTGCGGCTGCGCG GCCGGGAGGGCGGCGGGCGGCC CGCGGGC	225
chr8:42969805 -42969807	$0 < x < 1$	$2.55E-45$	TCGCCGTCGCTGGAGCAGGCGGA GTCGGACGCGCTGGACATCAGCA CCAAAG	226
chr8:52253090 -52253092	$-1 < x < 0$	$1.16E-47$	GAGGTCAGCATGCGCCTCCACTC CCCGCGAGTGGACTTGGAGCGGC TCAGCA	227
chr8:67527837 -67527839	$0 < x < 1$	$9.12E-123$	GCGTGGCGCCCGAAGCGCTGCCA CTCGCGCGCCAGCTTGCGCCCCT TCTGCC	228
chr8:67627712 -67627714	$-1 < x < 0$	$1.67E-99$	ATTCCTGAGTGCCCACTCTGTGC CCGACATGGGTACACAGCTCCC CCAGG	229
chr8:70455928 -70455930	$-1 < x < 0$	$6.25E-120$	GAGCCCAGGCCGCGTGCAGGCC CACGTCACCGCAGACATACACAG ACACGC	230
chr9:933885- 933887	$-1 < x < 0$	$2.32E-24$	CACCTGTGCTAGTCCAGCCTGATG GCGCAGGTGCAGCCCAACACTCA GGGGG	231
chr9:1046331 -1046333	$-1 < x < 0$	$4.39E-23$	AGGAAGGGGGGCGAGGGCATGC TTCGAGTTTGGATCCGAGGTCTTC AGGGG	232
chr9:2360284 -2360286	$0 < x < 1$	$3.93E-08$	CGGGAGCCCAGCGACCCGGGGAA ACCGATGTTAAGATGAAGGTATTT TCATT	233
chr9:5481047 -5481049	$-1 < x < 0$	0.413612259	GCCTTCCCCACTCAGCGGCCGGG CCCGGCTTTCCCGCCCCACGGCC CGGCCA	234
chr9:5697426 -5697428	$-1 < x < 0$	$1.47E-13$	GGCGCTGGACGGGCATTCCGGGG GGCGGGGGAGCCAGCCCGACCCC AAGCAC	235
chr9:12758035 -12758037	$-1 < x < 0$	$2.63E-12$	TTGCTGATCTCTGCCCCGTGGAGC CCGCCCCCGAGGTTCCAGTTA CACTC	236
chr9:17910388 -17910390	$0 < x < 1$	$1.44E-17$	CCGGGCTACCGGGTGCGGGGGGC AGCGGCGCCATCAGCACGGCCAC CTACAC	237
chr9:12642800 -12642802	$0 < x < 1$	$1.49E-36$	GCGAGGCTGCGAGGCTGCGAGGC TGCGAGGCGCGGCGCCCCGTGGT GGTCAC	238
chr9:18277673 -18277675	$0 < x < 1$	$1.06E-41$	GCCTCGCAGCCCTGGCGCGCGCG CTCGCAGATGGAGCGGCACGGCG GGATGG	239
chr9:18277684 -18277686	$0 < x < 1$	$6.23E-49$	CTGGCGCGCGCGCTCGCAGATGG AGCGGCACGGCGGGATGGCCTGC TCCAGC	240

10

20

30

40

50

(表1の続き)

部位	係数	単変量解析(p値)	配列(5mC部位の25塩基上流及び下流)	配列番号
chr9:19703027-19703029	$-1 < x < 0$	$3.63E-24$	AAGCCCCTCCCCCAAGCCAAGGA CCCGGTCACCCATCCCCTCCACC TCCCTA	241
chr9:20527917-20527919	$0 < x < 1$	$4.14E-12$	CGAGTCCCCCTCGCACCCCGCCC CGCGGCCAGTCCCGCTCCGGAGC CCTCTG	242
chr9:25415871-25415873	$0 < x < 1$	$5.08E-66$	GTGAGGATGCTGCTGAGCTTGCG ATCGAAGGAGCCACTCATCCTGG CGAGCG	243
chr9:24331651-24331653	$-1 < x < 0$	$5.37E-15$	GATCGCCCCGGCCACATGACCGGC GCCGGCCAATCGCTGGATTCAAC CACTCA	244
chr9:35985983-35985985	$0 < x < 1$	$1.12E-10$	GAGGGACCGCGAGCCGCTGATTG GTCGCGAGGCCGCGGTGACGTCGG CGGGCG	245
chr9:36717168-36717170	$0 < x < 1$	$2.42E-35$	GGCTCCGGGGCTTTTCCACCCGC CGCGAGTCCACTTTTAGTCTGTAG AGAAG	246
chr9:47196375-47196377	$0 < x < 1$	$3.67E-33$	CCATAGCGGCTGCCAGCTCGTC CCCGAAGCGGACCATGGTTCCCG GGCGCC	247
chr9:47612619-47612621	$-1 < x < 0$	$1.62E-34$	GGACCGGGGACCTGCAGGTCGGT CACGATGGGTGGACGTCGCTCCA GCCCTG	248
chr9:47612682-47612684	$-1 < x < 0$	$1.95E-33$	GCTCTGGGCCTGGGGACTCAGCA GACGCCTCCCCACCCGCTAGCAG GACCCT	249
chr9:47957838-47957840	$-1 < x < 0$	0.000380125	GGAACAGCTGGCCTGGCCTCTGC AGCGCCCAGGAGCTGGCCCGGCT GACGCC	250
chr9:48225579-48225581	$0 < x < 1$	$4.32E-06$	CCGCCATCCCTGGGGGTCAAGTG CCCGGCCTGTCTCCTGGAGGCTC GCCACG	251
chr9:50976682-50976684	$0 < x < 1$	$2.19E-57$	CCGGAGTGATGACGCTGATTGGC TCCGGCCGATTTTGGGGGTGATGT CACGG	252
chr9:49248845-49248847	$-1 < x < 0$	$4.75E-26$	GGTCACTGAGCTCTGGTTTCATCA GCGAGGGAACTTACTCAGCTCGA GGGAA	253
chr9:54993941-54993943	$-1 < x < 0$	$4.44E-32$	CTGCCCTGTCCCACAAGCTACCTC CCGAGTGAAATACCCATGCGCTG AGCCC	254
chr9:57421027-57421029	$0 < x < 1$	$1.10E-47$	CGTGTTACCTTTTGCTGGGCTCCT TCGCAGTCACTTTGCAGGTCCTTC TACC	255

10

20

30

40

50

【0205】

【表 2】

表2 上位3個の生体時計

部位	時計係数	p値($\Pr(> t)$)	配列	配列番号
(切片項)	-1.488083921	7.40E-19		
chr2.32494387 .32494389	25.49884175	0.000801242	TTGGAAGCTCGGGGGGCGGAGA TCCCGCGCCGCCGGCCGGCCT CGGGGCGG	86
chr6.45773846 .45773848	18.31906431	2.49E-165	GAGAAGGACGTCCCTGTCGCGA AGCCGTTTCGACGCGCGGCC TGGGGGCG	208
chr16.8886545 .8886547	15.43246339	1.49E-22	GGCGGGCTCCCCGTGCGCGCAC GGCCGCGGCCGACCTCTCCGCG CGGGCTCC	63

10

【0206】

【表 3】

表3 上位5個の生体時計

部位	時計係数	p値($\Pr(> t)$)	配列	配列番号
(切片項)	-1.626008306	2.92E-23		
chr2.3249438 7.32494389	25.40472484	0.000515096	TTGGAAGCTCGGGGGGCGGAGAT CCCGCGCCGCCGGCCGGCCTCG GGGCGG	86
chr6.4577384 6.45773848	16.83100695	3.51E-140	GAGAAGGACGTCCCTGTCGCGAA GCCGTTTCGACGCGCGGCCCTG GGGGCG	208
chr16.888654 5.8886547	14.1755269	2.09E-20	GGCGGGCTCCCCGTGCGCGCACG GCCGCGGCCGACCTCTCCGCGCG GGCTCC	63
chr5.6164522 5.61645227	9.685390237	1.46E-06	TAAAGGGGCGATGCCGCGACCCA GGCGCTGGCGTGGGGTCCACCGG CGTCGC	196
chr15.108564 98.10856500	20.454796	4.36E-10	CCCCAGCCGGGCGGCTCGGGTT TCCGACGGAGGGCCGGGCTGCGC GGCGTC	57

20

30

【0207】

40

50

【表 4】

表4 上位10個の生体時計

部位	時計係数	p値($\Pr(> t)$)	配列	配列番号
(切片項)	2. 636785028	1. 68E-11		
chr2. 324943 87. 3249438 9	31. 48707725	3. 15E-06	TTGGAAGCTCGGGGGGCGGAGATC CCGCGCCGCCCGGCCGGCCTCGG GGCGG	86
chr6. 457738 46. 4577384 8	14. 11743561	1. 46E-118	GAGAAGGACGTCCCTGTCGCGAAG CCGTTGCGCAGCGCGCGGCCCTGGG GGCG	208
chr16. 88865 45. 8886547	11. 15446753	3. 81E-16	GGCGGGCTCCCCGTGCGCGCACG GCCGCGGCCGACCTCTCCGCGCG GGCTCC	63
chr5. 616452 25. 6164522 7	7. 635417929	1. 71E-05	TAAAGGGGCGATGCCGCGACCCAG GCGCTGGCGTGGGGTCCACCGGCG TCGC	196
chr15. 10856 498. 108565 00	15. 04348128	2. 25E-07	CCCCAGCCGGGCGGCTCGGGTTT CCGACGGAGGGCCGGGCTGCGCG GCGTC	57
chr33. 26512 711. 265127 13	9. 624991584	2. 86E-05	CGTCGCCGCCGCGCTCCTGCCAGG CCGACCTGGAGCGGAAGCTGAAGC CGAA	162
chr20. 57347 921. 573479 23	-8. 924503605	7. 22E-31	ACCAGCCGCCAGCCGTGACCTTT CCGGGCCTGTTCTGCGGCTCTGG GCGC	106
chr12. 12684 190. 126841 92	10. 01399267	0. 004659424	CTCAGCCGCTTGGGCGGGTATCCA CCGGCCCCGGGGTAGTCGGCCC CTGCG	37
chr24. 30860 619. 308606 21	-6. 97439064	0. 178939513	CAGAACCGCGCTTCCCCGAAACTC GCGGGCGGTGGGATCGCAAGTCAC CCCC	120
chr33. 26512 692. 265126 94	5. 841178421	3. 34E-06	CGGCTGCCGCGCCCGCAGTCGTG CCGCCGCGCTCCTGCCAGGCCGAC CTGG	161

【0208】

10

20

30

40

50

【表 5】

表5 上位20個の生体時計

部位	時計係数	p値(Pr(> t))	配列	配列番号
(切片項)	1. 426173487	0. 000738149		
chr2. 3249438 7. 32494389	29. 97454506	1. 89E-07	TTGGAAGCTCGGGGGGCGGAGAT CCCGCGCCGCCCGGCCGCGCTC GGGGCGG	86
chr6. 4577384 6. 45773848	8. 47941593	1. 94E-47	GAGAAGGACGTCCCTGTGCGGAA GCCGTTGCGAGCGCGCGGCCCTG GGGGCG	208
chr16. 888654 5. 8886547	5. 880759211	1. 03E-06	GGCGGGCTCCCCGTGCGCGCAC GGCCGCGGCCGACCTCTCCGCG CGGGCTCC	63
chr5. 6164522 5. 61645227	4. 434791641	0. 003872156	TAAAGGGGCGATGCCGCGACCCA GGCGCTGGCGTGGGGTCCACCG GCGTCGC	196
chr15. 108564 98. 10856500	10. 82275414	1. 28E-05	CCCCAGCCGGGCCGGCTCGGGTT TCCGACGGAGGGCCGGGCTGCG CGGCGTC	57
chr33. 265127 11. 26512713	6. 576079765	0. 000762612	CGTCGCCGCGCGCTCCTGCCAG GCCGACCTGGAGCGGAAGCTGAA GCCGAA	162
chr20. 573479 21. 57347923	-7. 357261642	9. 37E-28	ACCAGCCGCCAGCCGTGACCTT TCCGGGCCTGTTCTGCGGCTCT GGGCGC	106
chr12. 126841 90. 12684192	6. 041563837	0. 045272957	CTCAGCCGCTTGGGCGGGTATCC ACCGGCCCGGGGGTAGTCGGC CCCTGCG	37
chr24. 308606 19. 30860621	-4. 447714718	0. 314850718	CAGAACCGCGCTTCCCCGAAACT CGCGGGCGGTGGGATCGCAAGTC ACCCC	120
chr33. 265126 92. 26512694	2. 226277287	0. 041402225	CGGCTGCCGCGCCCGCAGTCGTC GCCGCCGCGCTCCTGCCAGGCC GACCTGG	161
chr10. 741129 3. 7411295	3. 014021236	2. 67E-08	CAGCACCGGGCATCTGGACAGCA ACCGGAGAGCGAGGCGTGTCTCT CCTGGT	15
chr1. 2221369 7. 22213699	4. 119609069	0. 001713821	TGACCCCGAGGGAGCCGCACCC CGGCGCCGCGACGTTACCTCCG GGGGCGC	2
chr5. 3271170 3. 32711705	10. 34618246	0. 000750409	GGTATCCCGTCCCCTCGGCTCGG CTCGGCTCGGCTCGGCTCGGCGG GCCCCG	189
chr24. 210510 24. 21051026	1. 754900433	0. 014548112	ACGTTGCTCTTCGTGCTCCTGCC CTCGCTGGTCGTGCAGCTGCTCA GCTTCC	119
chr5. 2148015 1. 21480153	5. 475715773	0. 001332943	TTGAGCTGCCTGGAGCAGCAGCC GTCGGCCACCTAGCAGGAGTGTC CTCGCA	186

10

20

30

40

50

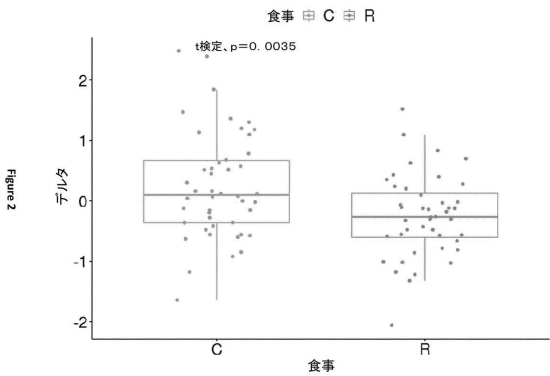
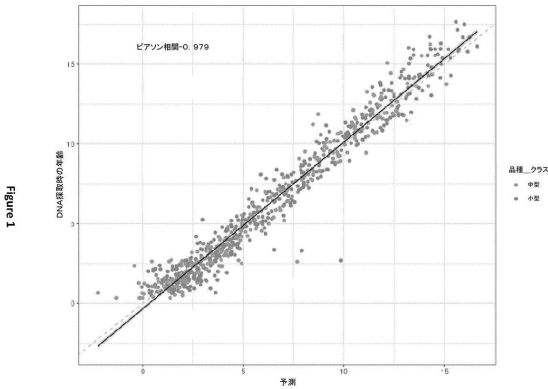
(表5の続き)

部位	時計係数	p値(Pr(> t)	配列	配列 番号
chr17. 338514 62. 33851464	5. 28692709	3. 41E-07	ACAGCAGGATGAAGCCGAAAGCC TCCGAGTGCCGGTCGAAGAAGTA CTCGTT	68
chr3. 4684375 0. 46843752	4. 070393226	1. 33E-10	CCAGGGCCACAGACCTGGAAGTC GCCGGGAGCCCGGCAGCACTCCT CTCAAG	147
chr13. 374745 92. 37474594	-4. 646099678	2. 64E-11	TTCCCGGCTCCCGAACCAGGGTG GCCGAGCCAGGCCTCTGCCTCCG GGGGTC	44
chr33. 198109 04. 19810906	2. 651938013	0. 001641489	GCGCTCCTCGCCGCTCTCGGTGG CCCGGAGAACAAAAGCCCCGGG CCTGGCC	163
chr20. 449422 13. 44942215	4. 772633102	7. 94E-06	GGCAGGGCCGCCAGGCGCCGGC CCCCGGTGAAGAAGTCCTCGGCG CTGCGCT	98

【図面】

【図 1】

【図 2】



10

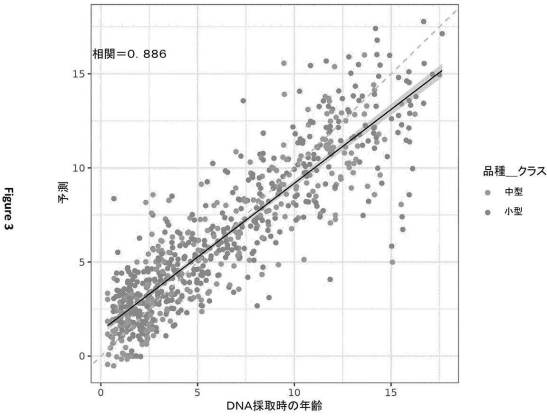
20

30

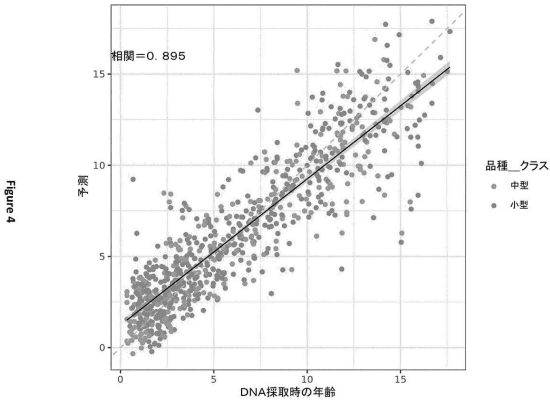
40

50

【図 3】



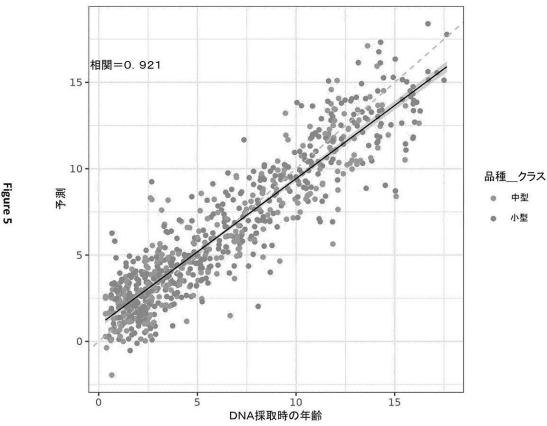
【図 4】



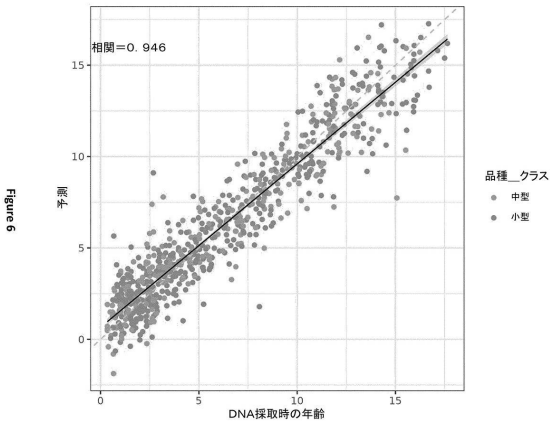
10

20

【図 5】



【図 6】

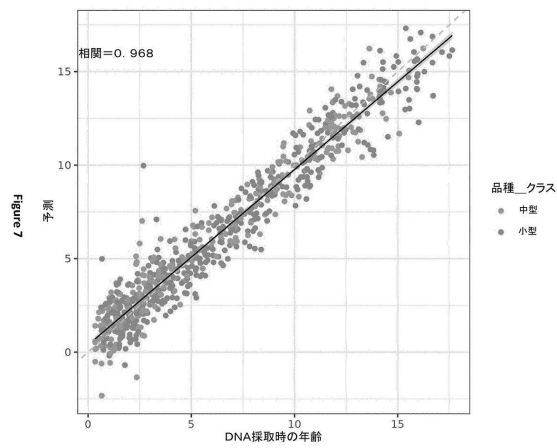


30

40

50

【図 7】



10

20

【配列表】

2025521131000001.xml

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2023/064444

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C12Q1/6876 C12Q1/6883
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, FSTA, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Horvath Steve ET AL: "Epigenetic clock and methylation studies in dogs", bioRxiv, 30 March 2021 (2021-03-30), XP093075639, DOI: 10.1101/2021.03.30.437604 Retrieved from the Internet: URL:https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2021.03.30.437604v1.full.pdf [retrieved on 2023-08-22] abstract; p. 4, 2nd para.; p. 5, 2nd-3rd para.; p. 10, 4th para.; p. 12, 2nd-3rd para. ----- -/--	8, 12, 13, 21, 25

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

25 August 2023

Date of mailing of the international search report

04/09/2023

Name and mailing address of the ISA/
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Ripaud, Leslie

1

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

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2023/064444

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	THOMPSON MICHAEL J. ET AL: "An epigenetic aging clock for dogs and wolves", AGING, vol. 9, no. 3, 28 March 2017 (2017-03-28), pages 1055-1068, XP093076090, DOI: 10.18632/aging.101211 Retrieved from the Internet: URL:https://www.aging-us.com/article/101211/pdf> abstract; p. 1059, left-hand col., 1st para.; p. 1059, para. bridging left- to right-hand col.; p. 1064, left-hand col., 1st para.; p. 1064, right-hand col., last para. -----	8, 12, 13, 20, 21, 25
X	EP 3 162 899 A1 (RHEINISCH-WESTFÄLISCHE TECHNISCHE HOCHSCHULE AACHEN [DE]) 3 May 2017 (2017-05-03) ara. 34, 83, 94, 95, 99 -----	33
X	WO 2019/046725 A1 (THE REGENT OF THE UNIV OF CALIFORNIA [US]) 7 March 2019 (2019-03-07)	1-15, 20-32, 34-36
A	para. 7-10, 46, 50, 52, 70-78; claims 9, 10 -----	16-19
A	Morgane Levine ET AL: "An epigenetic biomarker of aging for lifespan and healthspan", AGING2018, 17 April 2018 (2018-04-17), XP055766769, Retrieved from the Internet: URL:https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5940111/pdf/aging-10-101414.pdf [retrieved on 2021-01-19] the whole document -----	1-36
A	LIU ZUYUN ET AL: "A new aging measure captures morbidity and mortality risk across diverse subpopulations from NHANES IV: A cohort study", PLOS MEDICINE, vol. 15, no. 12, 1 January 2018 (2018-01-01), page e1002718, XP093057615, DOI: 10.1371/journal.pmed.1002718 Retrieved from the Internet: URL:https://journals.plos.org/plosmedicine/article/file?id=10.1371/journal.pmed.1002718&type=printable> the whole document -----	1-36
1	A WO 2018/150042 A1 (DEUTSCHES KREBSFORSCH [DE]) 23 August 2018 (2018-08-23) the whole document -----	1-36
1		

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP2023/064444

Box No. I 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.
- b. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)).
- ☐ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.
2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.
3. Additional comments:

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No
PCT/EP2023/064444

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 3162899	A1	03-05-2017	EP 3162899 A1	03-05-2017
			EP 3368684 A1	05-09-2018
			US 2019017124 A1	17-01-2019
			WO 2017072292 A1	04-05-2017
WO 2019046725	A1	07-03-2019	US 2020362402 A1	19-11-2020
			WO 2019046725 A1	07-03-2019
WO 2018150042	A1	23-08-2018	EP 3583229 A1	25-12-2019
			US 2020056234 A1	20-02-2020
			WO 2018150042 A1	23-08-2018

10

20

30

40

50

フロントページの続き

,MC,ME,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,C
O,CR,CU,CV,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IQ,I
R,IS,IT,JM,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,MG,MK,MN,MU,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
,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW
スイス連邦, 1110 モルジュ, リュードローザンヌ 37

(72)発明者 ゾリンジャー, アリックス

スイス連邦, 1026 ダンジュ, シュルレムーラン 20

(72)発明者 パン, ユアンロン

アメリカ合衆国, ミズーリ州, チェスターフィールド, ウェイヴァリー プレイス コート 334

(72)発明者 ガット, フィリップ

スイス連邦, 1201 ジュネーヴ, ルージャン-エー. ゴーティエ 5

(72)発明者 スタイナー, パスカル

アメリカ合衆国, ミズーリ州, セントルイス, ウェストパインブルバード 4954

(72)発明者 ルキヤネンコ, ローラ

スイス連邦, 1007 ローザンヌ, アヴェニューボールガール 5

Fターム(参考) 4B063 QA01 QA13 QA19 QQ42 QR08 QR50 QS24 QS28 QS36 QX02
4C084 AA17 NA14 ZA701 ZC521