

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2018-525356

(P2018-525356A)

(43) 公表日 平成30年9月6日(2018.9.6)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 35/48 (2015.01)	A 6 1 K 35/48	4 B 0 5 0
A 6 1 L 27/38 (2006.01)	A 6 1 L 27/38 1 2 0	4 B 0 6 5
A 6 1 P 15/08 (2006.01)	A 6 1 P 15/08	4 C 0 8 1
A 6 1 L 27/36 (2006.01)	A 6 1 L 27/38 3 0 0	4 C 0 8 7
C 1 2 N 5/074 (2010.01)	A 6 1 L 27/36 1 0 0	4 H 0 4 5
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 25 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2018-501922 (P2018-501922)	(71) 出願人	512074386
(86) (22) 出願日	平成28年7月13日 (2016.7.13)		セルマティックス, インコーポレイテッド
(85) 翻訳文提出日	平成30年3月7日 (2018.3.7)		アメリカ合衆国 ニューヨーク 1000
(86) 国際出願番号	PCT/US2016/042070		5, ニューヨーク, ウォール ストリート 14, スイート 16ディー
(87) 国際公開番号	W02017/015023	(74) 代理人	100078282
(87) 国際公開日	平成29年1月26日 (2017.1.26)		弁理士 山本 秀策
(31) 優先権主張番号	62/193, 903	(74) 代理人	100113413
(32) 優先日	平成27年7月17日 (2015.7.17)		弁理士 森下 夏樹
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100181674
			弁理士 飯田 貴敏
		(74) 代理人	100181641
			弁理士 石川 大輔
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 子宮内膜処置のための方法およびシステム

(57) 【要約】

妊娠可能ドナー由来の子宮内膜幹細胞を含む子宮内膜細胞の採取および子宮内膜機能障害を患うホストへの子宮内膜細胞または組織の移植を含む、子宮内膜機能障害を処置する方法が記載される。特定の実施形態では、本方法は、移植前の遺伝子改変、組織培養または子宮内膜細胞の凍結保存を含む。種々の態様では、子宮内膜細胞は、妊娠可能性が最も高い期間に採取され、今後の自家移植のために保管される。本発明は、子宮内膜機能障害および子宮内膜関連不妊症を評価および処置するための方法およびシステムに関する。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

子宮内膜の機能および受精能を増強するための方法であって、
ドナーから子宮内膜幹細胞を得るステップ、および
前記子宮内膜幹細胞を宿主子宮に移植するステップ
を含む方法。

【請求項 2】

前記ドナーが、宿主でもある、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記子宮内膜幹細胞を凍結保存するステップをさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

10

【請求項 4】

前記子宮内膜幹細胞が、前記ドナーの出産後 5 年の期間内に得られる、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

前記子宮内膜幹細胞が、子宮内膜生検により得られる、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

前記子宮内膜幹細胞が、月経液から単離することにより得られる、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 7】

前記子宮内膜幹細胞が、前記宿主の子宮周期の増殖期中に移植される、請求項 1 に記載の方法。

20

【請求項 9】

前記移植ステップが、
前記子宮内膜幹細胞を、前記宿主子宮の子宮内膜内に注射することをさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 10】

移植前に前記子宮内膜幹細胞を遺伝子改変するステップをさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 11】

前記遺伝子改変が、クラスターを形成し規則正しい間隔を持つ短いパンドロームリピート (CRISPR) ヌクレアーゼを使用することを含む、請求項 10 に記載の方法。

30

【請求項 12】

前記遺伝子改変が、子宮内膜受容性に関連するタンパク質の発現を増大させることを含む、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 13】

子宮内膜の機能について前記ドナーをスクリーニングするステップをさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 14】

前記ドナーおよび前記宿主を HLA マッチングするステップをさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

40

【請求項 15】

前記子宮内膜幹細胞を治療化合物に曝露させるステップをさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 16】

前記移植ステップの前に、前記子宮内膜幹細胞から子宮内膜組織を培養するステップをさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 17】

前記移植ステップの前に、前記子宮内膜幹細胞を分化させるステップをさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 18】

50

分化させた細胞を治療化合物に曝露させるステップをさらに含む、請求項 17 に記載の方法。

【請求項 19】

子宮内膜の機能および受精能を増強するための方法であって、
 個体から子宮内膜組織を得るステップ、
 前記子宮内膜組織をするステップ、および
 前記子宮内膜組織を前記個体に移植するステップ

を含む方法。

【請求項 20】

前記遺伝子改変が、クラスターを形成し規則正しい間隔を持つ短いパリンδροームリピート (CRISPR) ヌクレアーゼを使用することを含む、請求項 19 に記載の方法。

10

【請求項 21】

前記遺伝子改変が、子宮内膜受容性に関連するタンパク質の発現を増大させることを含む、請求項 19 に記載の方法。

【請求項 22】

前記子宮内膜組織を治療化合物に曝露させるステップをさらに含む、請求項 19 に記載の方法。

【請求項 23】

子宮内膜の機能および受精能を増強するための方法であって、
 個体から子宮内膜組織を得るステップ、
 前記子宮内膜組織を凍結保存するステップ、および
 前記子宮内膜組織を前記個体に移植するステップ

を含む方法。

20

【請求項 24】

前記子宮内膜組織が、前記個体の出産後 5 年の期間内に得られる、請求項 23 に記載の方法。

【請求項 25】

前記子宮内膜組織を治療化合物に曝露させるステップをさらに含む、請求項 23 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

30

【技術分野】

【0001】

関連出願への相互参照

本願は、2015 年 7 月 17 日に出願され、その全体が参照として援用される米国仮出願第 62 / 193 , 903 号に対する優先権および利益を主張する。

【背景技術】

【0002】

米国疾病予防センターによれば、米国内で、15 ~ 44 歳の間の女性 670 万人 (およそ 10.9%) が、生殖能障害、または妊娠し、出産予定日までベビーをはらむ能力の障害を患っている。Chandra A、Copen CE、Stephen EH、Infertility and impaired fecundity in the United States, 1982 - 2010: Data from the National Survey of Family Growth、National health statistics reports、67 号、Hyattsville、MD: National Center for Health Statistics、2013 年を参照されたい。多くの女性にとって、不妊は、胚の子宮への着床付着に関する問題を伴う。着床は、胚の質、および子宮内膜 (子宮の内層) が胚を受け容れる能力の両方に依存する。子宮内膜は、2 つの層: 子宮腔に最も近い機能層および機能層下の基底層からなる。機能層は、月経中に完全に脱落するまで、各月経周期中に増殖する。

40

【0003】

50

子宮内膜が胚を受容するための準備状態にあることは、子宮内膜受容性と呼ばれる。子宮内膜受容性は、超音波スキャンにより、子宮内膜生検により、または遺伝子発現レベルなどの生化学マーカーの分析により評価することができる。Bonilla-Musolesら、Endometrial receptivity: evaluation with ultrasound、Ultrasound Q.、2013年3月；29巻（1号）：3～20頁；Gomezら、Human Endometrial Transcriptomics: Implications for Embryonic Implantation、Cold Spring Harb Perspect Med.、2015年3月27日；Ruiz-Alonsoら、The genomics of the human endometrium、Biochim Biophys Acta.、2012年12月；1822巻（12号）：1931～42頁；Garrido-Gomezら、Profiling the gene signature of endometrial receptivity: clinical results、Fertil Steril.、2013年3月15日；99巻（4号）：1078～85頁；Elnasharら、Endometrial Receptivity、Middle East Fertility Society Journal、9巻、1号、2004年、10～24頁を参照されたい。これら文献の各々の内容は、それらの全体が本明細書に組み込まれる。

10

【0004】

採胚、保管、および準備に着目し、胚移植手順を継続して改良するための研究がなされているが、有力候補での体外受精（IVF）成功率は、依然として50%程度に留まっている。子宮内膜の機能および受容性は、妊娠成立の主要な制限因子であることが明らかになっている。子宮内膜受容性は、いくつかの因子により負の影響を受け、子宮内膜機能障害および難治性着床不全（RIF）に結びつく場合がある。Strowitzkiら、The human endometrium as a fertility-determining factor、Human Reproduction Update、12巻、5号、617～630頁、2006年；Simonら、Assessment and treatment of repeated implantation failure（RIF）、J Assist Reprod Genet（2012年）29巻：1227～1239頁を参照されたい。これら文献の各々の内容は、それらの全体が本明細書に組み込まれる。公知の処置方法としては、ホルモン制限、遺伝子およびタンパク質治療が挙げられるが、それらは、広く受け入れられていないか、または成功するまでに至っていない。同上。

20

30

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0005】

【非特許文献1】Chandra A、Copen CE、Stephen EH、Infertility and impaired fecundity in the United States, 1982-2010: Data from the National Survey of Family Growth、National health statistics reports、67号、Hyattsville、MD: National Center for Health Statistics、2013年

40

【非特許文献2】Bonilla-Musolesら、Endometrial receptivity: evaluation with ultrasound、Ultrasound Q.、2013年3月；29巻（1号）：3～20頁

【非特許文献3】Gomezら、Human Endometrial Transcriptomics: Implications for Embryonic Implantation、Cold Spring Harb Perspect Med.、2015年3月27日

50

【非特許文献4】Ruiz-Alonsoら、The genomics of the human endometrium、Biochim Biophys Acta、2012年12月；1822巻(12号)：1931～42頁

【非特許文献5】Garrido-Gomezら、Profiling the gene signature of endometrial receptivity：clinical results、Fertil Steril、2013年3月15日；99巻(4号)：1078～85頁

【非特許文献6】Elnasharら、Endometrial Receptivity、Middle East Fertility Society Journal、9巻、1号、2004年、10～24頁

【非特許文献7】Strowitzkiら、The human endometrium as a fertility-determining factor、Human Reproduction Update、12巻、5号、617～630頁、2006年

【非特許文献8】Simonら、Assessment and treatment of repeated implantation failure (RIF)、J Assist Reprod Genet(2012年)29巻：1227～1239頁

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0006】

本発明は、子宮内膜機能障害および子宮内膜関連不妊症を評価および処置するための方法およびシステムに関する。本発明の態様は、妊娠可能ドナーから子宮内膜細胞(例えば、子宮内膜幹細胞(EnSC)または子宮内膜の基底層もしくは機能層に由来する組織)を得るステップ、およびそれらを宿主に移植するステップを含む。子宮内膜細胞を、受精能が高い時点で女性から回収し(例えば、女性が、生殖寿命の初期付近にある間、または出産後数か月もしくは数年の間)、その後、後の時点でその女性の子宮内膜の増殖性または着床受容性が低下した際に、ドナーの子宮に戻して移植してもよい。子宮内膜細胞は、子宮内膜生検によりドナーから得てもよく、または月経液から単離してもよく、後の使用のために凍結保存してもよい。

【0007】

ある特定の実施形態では、子宮内膜細胞を、採卵と同時に収集し、将来のIVF手順で使用するために、胚と共に凍結または凍結保存してもよい。子宮内膜細胞を収集および保管する理由は様々であってもよく、理由としては、女性が出産を遅らせることを望む場合、または女性に子宮内膜疾患もしくは子宮疾患のリスクがある場合、または女性が子宮内膜に負の影響を及ぼし得る処置を受けようとしている場合が挙げられる。本発明によると、子宮内膜組織または細胞は、例えば、上述のように自己由来であってもよく、または同種異系であってもよく、移植は、ドナーからの採取と時間的に接近していてもよい。

【0008】

採取後、子宮内膜組織または細胞をそのまま移植してもよく、遺伝子改変に供してもよく、または培養して組織として、グラフトしてもよい。ある特定の自己由来の実施形態では、特にドナー/レシピエントが、遺伝的関連性を有する子宮内膜機能障害を患っている場合では、子宮内膜細胞は、様々な子宮内膜細胞機能を回復または増強するために、ウイルス媒介性もしくはリポソーム媒介性トランスフェクションを使用するか、またはCRISPR/Cas系を使用する遺伝子治療に供してもよい。

【0009】

採取および移植のタイミングは、それぞれドナーおよび宿主の子宮周期の期によってもよい。例えば、子宮内膜組織は、胚移植前に宿主の子宮内膜の機能層増殖を促進するために、宿主の増殖期中、月経終了の数日以内に移植してもよい。

【0010】

本発明の態様は、子宮内膜機能障害を処置するための方法を含む。方法のステップは、ドナーから子宮内膜幹細胞を得ること、および子宮内膜幹細胞を宿主子宮に移植することを含む。ある特定の実施形態では、ドナーは、宿主であってもよい。本発明の方法は、子宮内膜幹細胞を凍結保存することを含んでいてもよい。

【0011】

子宮内膜幹細胞は、ドナーの出産後5年の期間内に得てもよい。

【0012】

子宮内膜幹細胞は、子宮内膜生検により得てもよく、または月経液から単離してもよい。ある特定の実施形態では、子宮内膜幹細胞は、宿主の子宮周期の増殖期中に移植してもよい。本発明の方法は、子宮内膜幹細胞を宿主子宮の子宮内膜内に注射することを含んでいてもよい。ある特定の方法は、移植前に子宮内膜幹細胞を遺伝子改変することを含んでいてもよい。遺伝子改変は、クラスターを形成し規則正しい間隔を持つ短いパリンドロームリピート(CRISPR、clustered regularly interspaced short palindromic repeat)ヌクレアーゼを使用することを含んでいてもよく、または子宮内膜受容性に関連するタンパク質の発現を増大させることを含んでいてもよい。方法は、子宮内膜の機能についてドナーをスクリーニングすること、またはドナーおよび宿主をHLAマッチングすることを含んでいてもよい。

【0013】

本発明のある特定の態様は、子宮内膜機能障害を処置するための方法であって、個体から子宮内膜組織を得るステップ、子宮内膜組織を遺伝子改変するステップ、および子宮内膜組織を個体に移植するステップを含む方法に関する。遺伝子改変は、クラスターを形成し規則正しい間隔を持つ短いパリンドロームリピート(CRISPR)ヌクレアーゼを使用することを含んでいてもよい。ある特定の実施形態では、遺伝子改変は、子宮内膜受容性に関連するタンパク質の発現を増大させることを含む。

【0014】

種々の態様では、本発明の方法は、子宮内膜機能障害を処置するための方法を含む。方法のステップは、個体から子宮内膜組織を得ること、子宮内膜組織を凍結保存すること、および子宮内膜組織を個体に移植することを含む。子宮内膜組織は、個体の出産後5年の期間内に得てもよい。

【図面の簡単な説明】

【0015】

【図1】図1は、本発明の方法の概略図を提供する。

【発明を実施するための形態】

【0016】

本発明の方法およびシステムは、概して、子宮内膜機能障害および子宮内膜関連不妊症の評価および処置に関する。子宮内膜組織または幹細胞を、ドナーから得て、子宮内膜の増殖および受容性を促進するためにIVFでの胚移植または自然受精の前に、子宮内膜機能障害を患っている宿主に移植してもよい。子宮内膜細胞は、生検により得てもよく、月経液から単離してもよく、将来の移植のために単独でまたは採取した胚と共に凍結保存で保管してもよい。子宮内膜細胞を、採取後に改変して、移植前に遺伝子欠陥を修正するかまたは選択した子宮内膜の機能を増強してもよい。ある特定の実施形態では、子宮内膜細胞を女性から収集し、保管するか、または同じ女性の子宮に再導入する前に改変して、健康で自己由来の子宮内膜細胞の保存が、以降の人生でまたは子宮内膜の機能に影響を及ぼす事象後に子宮内膜を再構築することを可能にしてもよい。

【0017】

本発明の方法は、宿主から子宮内膜組織または子宮内膜幹細胞(ENSC)を得るステップを含む。細胞は、任意の臨床的に許容される様式で収集することができる。組織は、例えばヒトまたは他の哺乳動物に由来する連結された細胞および/または細胞外マトリックス材料の塊であり、細胞および/または組織に関連する連結材料および液体材料を含む。子宮内膜細胞は、微細針吸引組織または生検組織の形態で得ることができる。細胞は、

細胞培養培地などの培地に懸濁または保管することができる。子宮内膜組織は、子宮周期の様々な時点で得ることができる。

【0018】

図1には、本発明の方法の例示的な実施形態が示されている。子宮内膜細胞をドナー101から得、その後宿主109に移植してもよい。子宮内膜細胞は、任意選択で、移植109の前に、例えばゲノム編集により改変107してもよく、保管してもよく（例えば、凍結保存）、または培養もしくは操作103して組織にしてもよい。任意選択のステップは、任意の組合せおよび順序で実施してもよく、例えば、細胞は、保管の前にまたは後で改変または培養して組織にしてもよい。

【0019】

採取する前に、子宮内膜細胞の健康および宿主との適合性を決定するために、ドナーを、血液分析、免疫学的分析、または核酸分析を含むスクリーニングにかけてもよい。例えば、ドナーおよび宿主を、骨髄または他の幹細胞の移植技法で行われるように、HLAマッチングしてもよい。Petersdorf、HLA matching in allogeneic stem cell transplantation、Curr Opin Hematol.、2004年11月；11巻（6号）：386～91頁を参照されたい。この文献はその全体が本明細書に組み込まれる。ある場合には、HLA型判定を使用して、拒絶またはドナー対宿主疾患を回避するためのある特定のマーカーはマッチしていてもよいが、着床および難治性着床不全に関連する他のマーカーは異なってもよい移植用の細胞を識別することができる。Simonら、Assessment and treatment of repeated implantation failure (RIF)、J Assist Reprod Genet（2012年）29巻：1227～1239頁を参照されたい。この文献はその全体が本明細書に組み込まれる。かなりの割合の宿主子宮内膜組織が、骨髄移植後にドナーのHLA型を保有することが判明しており、子宮内膜細胞移植が、宿主子宮内膜の遺伝構造をも変更することが示されている。Talyor、Endometrial Cells Derived From Donor Stem Cells in Bone Marrow Transplant Recipients、JAMA.、2004年7月7日；292巻（1号）：81～5頁を参照されたい。

採取

【0020】

子宮内膜幹細胞は、例えば、子宮摘出、診断掻爬、経血、および妊娠一期脱落膜でドナーから単離してもよい。Gargettら、Isolation and Culture of Epithelial Progenitors and Mesenchymal Stem Cells from Human Endometrium、BIOLOGY OF REPRODUCTION、80巻、1136～1145頁（2009年）；Xiaolongら、Endometrial regenerative cells: A novel stem cell population、J Transl Med.、2007年、5巻：57頁；Linら、Plasticity of human menstrual blood stem cells derived from the endometrium、J Zhejiang Univ Sci B.、2011年5月；12巻（5号）：372～380頁を参照されたい。これら文献の各々の内容は、それらの全体が本明細書に組み込まれる。

【0021】

ある特定の実施形態では、子宮内膜幹細胞は、例えば、Xiaolongら、2007年に記載の技法を使用して、月経液から単離してもよい。あるいは、子宮内膜幹細胞は、例えば生検により得られる子宮内膜組織（Gargettら、2009年を参照）から単離してもよい。ある特定の実施形態では、基底層または機能層子宮内膜組織などの子宮内膜組織全体をドナーから取り出し、宿主に移植してもよい。Grunberger、V、Successful endometrium transplantations

、Geburtshilfe Frauenheilkd、1969年5月；29巻（5号）：478～81頁を参照されたい。この文献はその全体が本明細書に組み込まれる。

【0022】

ある特定の実施形態では、子宮内膜細胞は、ドナーの子宮周期の特定の期中にドナーから採取してもよい。子宮内膜組織を統御する子宮周期は、いくつかの異なる期を有する。異なる期は、ホルモンの変化により統御される。したがって、期は人によって様々である。子宮周期は、月経期（menstrual phase）または月経期（menstruation phase）と共に始まる。月経期とは、子宮内膜が月経流として脱落する期である。月経液は、頸部および膣から流れ出す。月経流の1日目を、月経周期の1日目と定義する。月経期は、約3～7日間にわたり持続する。月経期の間、脳下垂体は、卵胞刺激ホルモン（FSH）を分泌し始める。FSHの上昇は、増殖期（卵胞期）を誘発する。子宮内膜細胞は、生検により得る場合、例えば、増殖期中に採取してもよい。月経液からの採取が月経期中に行われるのは自明であろう。

10

保管

【0023】

種々の実施形態では、子宮内膜細胞または組織は、下記に記載のように改変もしくは培養されるか、または単にドナーから採取されるかにかかわらず、保管することができる。特に、自己移植の場合、細胞は、将来の子宮内膜機能障害の場合に将来使用するために個体から採取して預託してもよく、または例えば年齢もしくは疾患処置に関する膜機能障害に備えて採取してもよい。子宮内膜細胞は、受精能が増加する期間中に、例えば、妊娠の1、2、3、4、5、もしくは6年以内に、または女性の生殖寿命の最初の数年中に（思春期または定期的排卵が始まってから）、ドナーから収集してもよい。子宮内膜細胞は、卵巣組織、胚、および卵母細胞の保存に使用されるような凍結保存などの公知の方法を使用して保管することができる。Oktaýら、2008年11月、Ovarian cryopreservation and transplantation for fertility preservation for medical indications: report of an ongoing experience、Fertil. Steril.、93巻（3号）：762～8頁；Edgarら、2012年、A critical appraisal of cryopreservation（slow cooling versus vitrification）of human oocytes and embryos、Human Reproduction Update、18巻（5号）：536頁；Kopeikaら、2014年、The effect of cryopreservation on the genome of gametes and embryos: principles of cryobiology and critical appraisal of the evidence、Human Reproduction Update、21巻（2号）：209～227頁を参照されたい。これら文献の各々の内容は、それらの全体が本明細書に組み込まれる。

20

30

改変

【0024】

宿主から子宮内膜幹細胞または組織を採取した後だが、移植する前に、様々な公知の技法により材料を遺伝子改変して、遺伝子欠陥を修正するか、または子宮内膜移植後の増殖もしくは受容性を増強してもよい。例えば、子宮内膜細胞を改変して、PTENなどの子宮内膜がんに関連する遺伝子の突然変異を修復してもよい。子宮内膜がんに関連するさらなる遺伝子は、Okudaら、Genetics of Endometrial Cancers、Obstetrics and Gynecology International、2010巻、論文ID984013、全8頁、2010年を参照されたい。この文献は、その全体が本明細書に組み込まれる。子宮内膜細胞を改変して、Kaoら、Expression profiling of endometrium from women with endometriosis reveals candid

40

50

ate genes for disease - based implantation failure and infertility、Endocrinology、2003年7月；144巻（7号）：2870～81頁に記載されているものなどの子宮内膜症関連遺伝子の発現を変化させてもよい。この文献は、その全体が本明細書に組み込まれる。下記は、その発現レベルが子宮内膜症と有意に相関する遺伝子のリストである：CCL3L1、CCL3、FAM180A、THBS2、PDGFR1、FN1、CLE11A、CCNA2、KIF20A、BUB1B、HSD17B6、HSD11B1、C7、C3、CXCL2、CXCL12、CXCL13、PDGFC、CXCL14、ACTA2、TAGLN、およびSORBS1。増殖期中に脱制御される子宮内膜症関連遺伝子としては、CCNA2、KIF20A、BUB1Bが挙げられる。増殖期中に上方制御される子宮内膜症関連遺伝子としては、HSD17B6、HSD11B1、C7、C3、CXCL2、CXCL12、CXCL14が挙げられる。初期分泌期中に脱制御される子宮内膜症関連遺伝子としては、CXCL13が挙げられる。初期分泌期中に上方制御される子宮内膜症関連遺伝子としては、CCNA2、KIF20A、BUB1Bが挙げられる。中期から後期の分泌期中に上方制御される子宮内膜症関連遺伝子としては、ACTA2、TAGLN、およびSORBS1が挙げられる。期特異的子宮内膜症関連遺伝子は、以下の文献にも記載されている：Hawkins, Shannon M.ら、「Functional microRNA involved in endometriosis」、Molecular endocrinology、25巻、5号（2011年）：821～832頁；Sha, G.ら、「Differentially expressed genes in human endometrial endothelial cells derived from eutopic endometrium of patients with endometriosis compared with those from patients without endometriosis」、Human reproduction、22巻、12号（2007年）：3159～3169頁；Burney, Richard O.ら、「Gene expression analysis of endometrium reveals progesterone resistance and candidate susceptibility genes in women with endometriosis」、Endocrinology、148巻、8号（2007年）：3814～3826頁；Crispi, Stefaniaら、「Transcriptional profiling of endometriosis tissues identifies genes related to organogenesis defects」、Journal of cellular physiology、228巻、9号（2013年）：1927～1934頁；Eyster, Kathleen M.ら、「Whole genome deoxyribonucleic acid microarray analysis of gene expression in ectopic versus eutopic endometrium」、Fertility and sterility、88巻、6号（2007年）：1505～1533頁；Hever, Anikoら、「Human endometriosis is associated with plasma cells and overexpression of B lymphocyte stimulator」、Proceedings of the National Academy of Sciences、104巻、30号（2007年）：12451～12456頁；Hull, M. Louiseら、「Endometrial-peritoneal interactions during endometriotic lesion establishment」、The American journal of pathology、173巻、3号（2008年）：700～715頁；Talbi, S.ら、「Molecular phenotyping of human endometrium distinguishes men

strual cycle phases and underlying biological processes in normo-ovulatory women.」, Endocrinology、147巻、3号(2006年):1097~1121頁。

【0025】

ある特定の実施形態では、子宮内膜細胞を遺伝子改変して、HOXA10、LIF、IL-6、MFAP5、ANGPTL1、EG-VEGF、NLF2などのタンパク質の発現を変更してもよい。Strowitzkiら、2006年; Martinら、Human endometrial receptivity: gene regulation、J Reprod Immunol.、2002年5月~6月; 55巻(1~2号):131~9頁; Riesewijkら、Gene expression profiling of human endometrial receptivity on days LH+2 versus LH+7 by microarray technology、Molecular Human Reproduction、9巻、5号、253~264頁、2003年; Haoziら、Gene expression profile of human endometrial receptivity: comparison between natural and stimulated cycles for the same patients、Hum Reprod.、2009年6月; 24巻(6号):1436~1445頁を参照されたい。これら文献の各々の内容は、それらの全体が本明細書に組み込まれる。

10

20

【0026】

ある特定の実施形態では、上述の手段のいずれかによりドナーから採取された子宮内膜組織または細胞から核酸を抽出して、細胞の健康を決定するために、または子宮内膜機能障害に関連する遺伝子欠陥もしくは突然変異を探索するために、配列決定または他の分析を行ってもよい。種々の実施形態では、少量の子宮内膜組織または細胞を採取し、移植のためにさらなる細胞または組織を採取する前のスクリーニング手順の一部として分析してもよい。

【0027】

核酸は、当技術分野で公知の方法により子宮内膜試料から抽出することができる。例えば、その内容が参照によりその全体において本明細書に組み込まれる、Maniatisら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual、Cold Spring Harbor、N.Y.、280~281頁、1982年を参照されたい。ある特定の実施形態では、ゲノム試料を被験体(宿主、ドナーまたは潜在的ドナー)から回収するのにつき、例えば、目的の子宮内膜に関連する遺伝子または子宮内膜に関連する遺伝子断片を含むヌクレオチドアレイとのハイブリダイゼーションにより、目的の遺伝子領域または遺伝子断片について富化する。試料は、ハイブリッド捕捉など、当技術分野で公知の方法を使用して、目的の遺伝子(例えば、子宮内膜関連遺伝子)について富化することができる。例えば、その内容が参照によりその全体において本明細書に組み込まれる、Lapidus(米国特許第7,666,593号)を参照されたい。

30

【0028】

子宮内膜試料から抽出された核酸は、配列決定または発現分析または転写分析を含むいくつかの手段により分析することができる。

40

【0029】

抽出した核酸を、分析前に増幅してもよい。増幅方法としては、例えば、単一標的核酸の増幅および多重増幅(複数の標的核酸の同時増幅)が挙げられる。増幅は、核酸配列のさらなるコピーの産生を指し、一般的に、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)または当技術分野で周知の他の技術を使用して実施される(例えば、DieffenbachおよびDveksler、PCR Primer, a Laboratory Manual、1995年、Cold Spring Harbor Press、ブレーンビュー、ニューヨーク州)。増幅反応は、ポリメラーゼ連鎖反応、ネステッドポリメラーゼ連鎖反応

50

、ポリメラーゼ連鎖反応一本鎖高次構造多型、リガーゼ連鎖反応 (Barany, F.、Genome research、1巻：5～16頁(1991年)；Barany, F.、PNAS、88巻：189～193頁(1991年)；米国特許第5,869,252号；および米国特許第6,100,099号)、鎖置換増幅および制限断片長多型、転写に基づく増幅系、ローリングサークル増幅、ならびにハイパーブランチドローリングサークル増幅(hyper-branched rolling circle amplification)などの、当技術分野で公知の、核酸分子を増幅するいかなる増幅反応であってもよい。使用することができる増幅技法のさらなる例としては、限定ではないが、以下のものが挙げられる：定量PCR、定量蛍光PCR(QF-PCR)、多重蛍光PCR(MF-PCR)、リアルタイムPCR(RT-PCR)、シングルセルPCR、制限断片長多型(PCR-RFLP)、RT-PCR-RFLP、ホットスタートPCR、in situポロニーPCR、in situローリングサークル増幅(RCA)、ブリッジPCR、ピコタイターPCR(picotiter PCR)、およびエマルジョンPCR。他の好適な増幅方法としては、以下のものが挙げられる：転写増幅、自家持続配列複製法、標的ポリヌクレオチド配列の選択的増幅、コンセンサス配列プライムポリメラーゼ連鎖反応(CP-PCR、consensus sequence primed polymerase chain reaction)、任意プライムポリメラーゼ連鎖反応(AP-PCR、arbitrarily primed polymerase chain reaction)、変性オリゴヌクレオチドプライマーPCR(DOP-PCR、degenerate oligonucleotide-primed PCR)、および核酸に基づく配列増幅(NABSA、nucleic acid based sequence amplification)。本明細書で使用することができる他の増幅方法としては、米国特許第5,242,794号；第5,494,810号；第4,988,617号；および第6,582,938号に記載されているものが挙げられる。

【0030】

種々の態様では、本発明の方法は、個体の体細胞から単離された核酸サンプルの配列決定、または循環無細胞核酸の配列決定に関する。配列決定は、当技術分野で公知の任意の方法によるものであってもよい。DNA配列決定技法としては、以下のものが挙げられる：標識ターミネーターまたはプライマーおよびスラブまたはキャピラリーでのゲル分離が使用される、古典的ジデオキシ配列決定反応(サンガー法)；可逆的に終端標識されたヌクレオチドが使用される、合成による配列決定(sequencing by synthesis)；ピロシーケンス；454シーケンシング(454 sequencing)；Illumina/Solexa配列決定法；標識オリゴヌクレオチドプローブのライブラリーとの対立遺伝子特異的ハイブリダイゼーション；標識クローンのライブラリーとの対立遺伝子特異的ハイブリダイゼーションおよびその後ライゲーションを使用した、合成による配列決定；重合ステップ中の標識ヌクレオチドの組み込みのリアルタイムモニタリング；ポロニー配列決定；ナノポアまたはナノチャネルによるトランスロケーション；ナノポアまたはナノチャネルでのヌクレオチドの検出と組み合わせたDNAの消化または重合；ナノポアまたはナノチャネルに局在化されている鎖のヌクレオチドの光学的検出；ならびにSOLiD配列決定法。分離された分子は、ポリメラーゼまたはリガーゼを使用した連続したまたは単一の伸長反応により、ならびにプローブのライブラリーとの単一のまたは連続した差別的ハイブリダイゼーションにより配列決定することができる。

【0031】

一部の実施形態では、配列決定技法(例えば、次世代配列決定技法)を使用して、1つまたは複数の捕捉標的(例えば、またはそれらの増幅産物)の部分で配列決定し、その配列を使用して、存在する異なるバーコードの数を計数する。したがって、一部の実施形態では、本発明の態様は、高度に多重化されたqPCR反応に関する。

【0032】

使用することができる配列決定技法としては、例えば、Illumina配列決定法が

挙げられる。Illumina 配列決定法は、ホールバックPCR (fold-back PCR) およびアンカープライマーを使用した、固体表面でのDNA増幅に基づく。DNAを断片化し、断片の5'および3'末端にアダプターを付加する。フローセルチャネルの表面に付着されているDNA断片が伸長され、ブリッジが増幅される。断片は二本鎖になり、二本鎖分子を変性させる。固相増幅およびその後の変性の複数サイクルは、フローセルの各チャネルで同じ鑄型の一本鎖DNA分子のおよそ1,000コピーの数百万個のクラスターを生成することができる。プライマー、DNAポリメラーゼ、および4つのフルオロフォア標識可逆的終端ヌクレオチドを使用して、連続的配列決定が実施される。ヌクレオチド組込み後、レーザーを使用してフルオロフォアを励起させ、画像を取り込み、最初の塩基の同一性を記録する。組み込まれた塩基の各々から3'ターミネーターおよびフルオロフォアを除去し、組込みステップ、検出ステップ、および識別ステップを繰り返す。この技術による配列決定は、以下の文献に記載されている：米国特許第7,960,120号；米国特許第7,835,871号；米国特許第7,232,656号；米国特許第7,598,035号；米国特許第6,911,345号；米国特許第6,833,246号；米国特許第6,828,100号；米国特許第6,306,597号；米国特許第6,210,891号；米国特許出願公開第2011/0009278号；米国特許出願公開第2007/0114362号；米国特許出願公開第2006/0292611号；および米国特許出願公開第2006/0024681号。これらの文献の各々は、それらの全体が参照により組み込まれる。

10

20

【0033】

配列決定は、複数の読取りを生成する。読取りは、一般的に、長さが約150塩基未満または長さが約90塩基未満のヌクレオチドデータの配列を含む。ある特定の実施形態では、読取りは、長さが約80~約90塩基の間、例えば約85塩基である。一部の実施形態では、これらは、非常に短い読取りであり、つまり長さが約50未満または約30塩基未満である。

【0034】

提供される発明の方法で 사용할 ことができる配列決定技法としては、例えば、454シーケンシングが挙げられる(454 Life Sciences、Roche company、ブランフォード、コネチカット州)(Margulies, Mら、Nature、437巻：376~380頁(2005年)；米国特許第5,583,024号；米国特許第5,674,713号；および米国特許第5,700,673号)。454シーケンシングは、2つのステップを含む。第1のステップでは、DNAを、およそ300~800塩基対の断片に剪断し、断片を平滑末端化する。その後、オリゴヌクレオチドアダプターを、断片の末端にライゲーションする。アダプターは、断片を増幅および配列決定するためのプライマーの役目を果たす。断片は、DNA捕捉ビーズ、例えば、5'-ビオチンタグを含有するアダプターBが使用されている、例えばストレプトアビジンコーティングビーズに付着させることができる。ビーズに付着させた断片を、油水エマルジョンの液滴内でPCR増幅する。その結果、各ビーズでクローン的に増幅されたDNA断片の複数コピーがもたらされる。第2のステップでは、ビーズをウェル(ピコリットルサイズ)に捕捉する。各DNA断片でピロシーケンスを同時に実施する。1つまたは複数のヌクレオチドの付加は、光シグナルを生成し、光シグナルは、配列決定装置のCCDカメラにより記録される。シグナルの強度は、組み込まれたヌクレオチドの数に比例する。ピロシーケンスでは、ヌクレオチド付加時に放出されるピロリン酸塩(PPi)が使用される。PPiは、アデノシン5'ホスホスルフェートの存在下でATPスルフィラーゼによりATPに変換される。ルシフェラーゼは、ATPを使用して、ルシフェリンをオキシルシフェリンに変換し、この反応により発生する光が、検出および分析される。

30

40

【0035】

提供される発明の方法で 사용할 ことができるDNA配列決定技法の別の例は、Life Technologies Corporation(カルズバッド、カリフォルニア州)のApplied BiosystemsによるSOLiD技術である。SOL

50

i D 配列決定法では、DNAを断片に剪断して、断片の5'および3'末端にアダプターを付着させ、断片ライブラリーを生成する。あるいは、アダプターを断片の5'および3'末端にライゲーションし、断片を環状化し、環状化された断片を消化して、内部アダプターを生成し、得られた断片の5'および3'末端にアダプターを付着させて、メイト対ライブラリー(mate-paired library)を生成することより、内部アダプターを導入することができる。次に、クローンビーズ集団を、ビーズ、プライマー、鋳型、およびPCR成分を含有するマイクロリアクタ内で調製する。PCRした後、鋳型を変性させ、ビーズを濃縮して、伸長された鋳型を有するビーズを分離する。選択されたビーズの鋳型を、スライドガラスへの結合を可能にする3'修飾にかける。配列は、特定のフルオロフォアにより識別される中央の決定されている塩基(または塩基の対)を有する部分的に無作為化されたオリゴヌクレオチドの連続ハイブリダイゼーションおよびライゲーションにより決定することができる。発色を記録した後、ライゲーションされたオリゴヌクレオチドを切断および除去してから、このプロセスを繰り返す。

10

【0036】

提供される発明の方法で 사용할 ことができるDNA配列決定技法の別の例は、例えば、米国特許出願公開第2009/0026082号、第2009/0127589号、第2010/0035252号、第2010/0137143号、第2010/0188073号、第2010/0197507号、第2010/0282617号、第2010/0300559号、第2010/0300895号、第2010/0301398号、および第2010/0304982号に記載されているIon Torrent配列決定法である。これら文献の各々の内容は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。Ion Torrent配列決定法では、DNAを、およそ300~800塩基対の断片に剪断し、断片を平滑末端化する。その後、オリゴヌクレオチドアダプターを断片の末端にライゲーションする。アダプターは、断片を増幅および配列決定するためのプライマーの役目を果たす。断片を表面に付着させることができ、断片が個々に解像可能なような解像度で付着させる。1つまたは複数のヌクレオチドの付加は、陽子(H^+)を放出させ、そのシグナルが、配列決定装置で検出および記録される。シグナルの強度は、組み込まれたヌクレオチドの数に比例する。

20

【0037】

提供される発明の方法で 사용할 ことができる配列決定技術の別の例は、Illumina配列決定法である。Illumina配列決定法は、ホールバックPCRおよびアンカープライマーを使用した、固体表面でのDNA増幅に基づく。DNAを断片化し、断片の5'および3'末端にアダプターを付加する。フローセルチャネルの表面に付着されているDNA断片が伸長され、ブリッジが増幅される。断片は二本鎖になり、二本鎖分子を変性させる。固相増幅およびその後の変性の複数サイクルは、フローセルの各チャネルで同じ鋳型の一本鎖DNA分子のおよそ1,000コピーの数百万個のクラスターを生成することができる。プライマー、DNAポリメラーゼ、および4つのフルオロフォア標識可逆的終端ヌクレオチドを使用して、連続的配列決定が実施される。ヌクレオチド組み込み後、レーザーを使用してフルオロフォアを励起させ、画像を取り込み、最初の塩基の同一性が記録される。組み込まれた塩基の各々から3'ターミネーターおよびフルオロフォアを除去し、組み込みステップ、検出ステップ、および識別ステップを繰り返す。この技術による配列決定は、以下の文献に記載されている：米国特許出願公開第2011/0009278号、米国特許出願公開第2007/0114362号、米国特許出願公開第2006/0024681号、米国特許出願公開第2006/0292611号、米国特許第7,960,120号、米国特許第7,835,871号、米国特許第7,232,656号、米国特許第7,598,035号、米国特許第6,306,597号、米国特許第6,210,891号、米国特許第6,828,100号、米国特許第6,833,246号、および米国特許第6,911,345号。これらの文献の各々は、それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる。

30

40

【0038】

50

本発明の方法で 사용할 ことができる配列決定技術の別の例としては、P a c i f i c B i o s c i e n c e s (メンローパーク、カリフォルニア州)の単一分子リアルタイム (S M R T) 技術が挙げられる。S M R Tでは、4つのDNA塩基の各々が、4つの異なる蛍光色素のうちの1つに付着される。これらの色素は、ホスホ連結される。単一のDNAポリメラーゼを、ゼロモード導波路 (Z M W) の底部に、鋳型一本鎖DNAの単一分子と共に固定する。Z M Wは、Z M WへとおよびZ M Wから迅速に (マイクロ秒で) 拡散する蛍光ヌクレオチドのバックグラウンドに対してDNAポリメラーゼによる単一ヌクレオチドの組み込みの観察を可能にする閉じ込め構造である。ヌクレオチドを成長中の鎖に組み込むには数ミリ秒かかる。この間に、蛍光標識が励起され、蛍光シグナルが生成し、蛍光タグが切断される。色素の対応する蛍光を検出することにより、どの塩基が組み込まれたかが示される。このプロセスを繰り返す。

10

【0039】

提供される発明の方法で 사용할 ことができる配列決定技法の別の例は、ナノポア配列決定法である (S o n i , G . V . および M e l l e r , A . , C l i n C h e m、53巻: 1996~2001頁 (2007年))。ナノポアは、直径が約1ナノメートル程度の小さな穴である。ナノポアを導電性流体に浸漬し、ナノポアに電圧を印加すると、イオンがナノポアを伝導することによりわずかな電流が生じる。流れる電流の量は、ナノポアのサイズに感応性である。DNA分子がナノポアを通過する際に、DNA分子の各ヌクレオチドがナノポアを閉塞する度合いは異なる。したがって、DNA分子がナノポアを通過する際にナノポアを流れる電流の変化は、DNA配列の読取りを表す。

20

【0040】

提供される発明の方法で 사용할 ことができる配列決定技法の別の例は、化学感応性電界効果トランジスタ (c h e m F E T、c h e m i c a l - s e n s i t i v e f i e l d e f f e c t t r a n s i s t o r) アレイを使用してDNAの配列決定を行うことを含む (例えば、米国特許出願公開第2009/0026082号に記載されている)。この技法の1つの例では、DNA分子を反応チャンバに入れてもよく、鋳型分子を、ポリメラーゼに結合している配列決定用プライマーとハイブリダイズさせてもよい。配列決定用プライマーの3'末端での1つまたは複数の三リン酸の新たな核酸鎖への組み込みは、電流が変化することによりc h e m F E Tで検出することができる。アレイは、複数のc h e m F E Tセンサーを有することができる。別の例では、単一核酸をビーズに付着させ、核酸をビーズ上で増幅してもよく、個々のビーズを、c h e m F E Tアレイ上にある、各々がc h e m F E Tセンサーを有する個々の反応チャンバに移動させ、核酸を配列決定してもよい。

30

【0041】

提供される発明の方法で 사용할 ことができる配列決定技法の別の例は、電子顕微鏡を使用することを含む (M o u d r i a n a k i s E . N . および B e e r M . , P N A S、53巻: 564~71頁 (1965年))。この技法の1つの例では、個々のDNA分子を、電子顕微鏡を使用して識別可能な金属標識を使用して標識する。その後、これら分子を平坦表面に伸展させ、電子顕微鏡を使用して画像化し、配列を測定する。

40

【0042】

提供される発明の方法で 사용할 ことができる配列決定技法の別の例は、P C T出願P C T / U S 2 0 1 3 / 0 3 3 4 5 1号に記載されている迅速異数性スクリーニング検査配列決定システム (F A S T - S e q S、F a s t A n e u p l o i d y S c r e e n i n g T e s t - S e q u e n c i n g S y s t e m) を含む。この文献は参照により組み込まれる。また、K i n d e r、 「F A S T - S e q S: A S i m p l e a n d E f f i c i e n t M e t h o d f o r t h e D e t e c t i o n o f A n e u p l o i d y b y M a s s i v e l y P a r a l l e l S e q u e n c i n g」、DOI: 10.1371/journal.pone.0041162を参照されたい。この文献は参照により組み込まれる。F A S T - S e q Sでは、特定のプライマー、具体的には、ゲノム全体にわたって散在する配列のサブセットにアニーリングす

50

る単一对のプライマーが使用される。単一对のプライマーで増幅することができるが、増幅された遺伝子座のほとんどを識別可能にする程度には十分に固有であるように、領域を類似性により選択する。FAST-SeqSがもたらす配列は、各タグが独立してアラインされなければならない従来の全ゲノム増幅ライブラリーとは対照的に、少数の位置にアラインする。

【0043】

配列アセンブリは、リファレンス配列に基づくアセンブリ、デノボアセンブリ、アラインメントによるアセンブリ、または組合せ方法を含む、当技術分野で公知の方法により達成することができる。一部の実施形態では、配列アセンブリには、Kleinら、LOCAS - A low coverage sequence assembly tool for re-sequencing projects、PLoS One、6巻(8号)論文23455(2011年)に記載されているローカバレッジ配列アセンブリソフトウェア(LOCAS、low coverage sequence assembly software)ツールが使用される。この文献の内容は、それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる。配列アセンブリは、米国特許第8,165,821号;米国特許第7,809,509号;米国特許第6,223,128号;米国特許出願公開第2011/0257889号;および米国特許出願公開第2009/0318310号に記載されている。これら文献の各々の内容は、それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる。

10

20

【0044】

RNAは、細胞の溶解およびその中に含有されるタンパク質の変性を伴う手技により、真核細胞から単離することができる。目的の組織は、配偶子細胞、性腺組織、子宮内膜組織、受精胚、および胎盤を含む。RNAは、その中に含有されるタンパク質の変性を伴う手技により、目的の体液から単離することができる。目的の体液は、血液、月経液、乳腺液、卵巣の卵胞液、腹腔液、または培養培地を含む。さらなるステップを援用して、DNAを除去することができる。細胞溶解は非イオン系界面活性剤により遂行し、続くマイクロ遠心分離により核を除去して、細胞内DNAのバルクを除去することができる。一実施形態では、RNAは、目的とする多様な種類の細胞から、チオシアン酸グアニジウム溶解、これに続く、RNAをDNAから分離するためのCsCl遠心分離によって抽出する(Chirgwinら、Biochemistry、18巻:5294~5299頁(1979年))。ポリ(A)+RNAは、オリゴ-dTセルロースを用いる選択により選択する(Sambrookら、MOLECULAR CLONING - A LABORATORY MANUAL(2版)、1~3巻、Cold Spring Harbor Laboratory、Cold Spring Harbor、N.Y.(1989年)を参照されたい)。代替的に、RNAの、DNAからの分離は、例えば、熱フェノールまたはフェノール/クロロホルム/イソアミルアルコールを用いる有機抽出により遂行することもできる。所望の場合、RNAアーゼ阻害剤を、溶解緩衝液へと添加することができる。同様に、ある特定の細胞型のためには、タンパク質の変性/消化ステップを、プロトコルへと追加することも所望でありうる。

30

40

【0045】

多くの適用では、転移RNA(tRNA)およびリボソームRNA(rRNA)など、他の細胞内RNAに対して、mRNAを優先的に富化することが望ましい。大半のmRNAは、それらの3'末端において、ポリ(A)テールを含有する。このため、例えば、セルロースまたはSEPHADEXなどの固体支持体へとカップリングさせた、オリゴ(dT)またはポリ(U)を使用して、それらをアフィニティークロマトグラフィーにより富化することが可能である(Ausubelら、CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY、2巻、Current Protocols Publishing、New York(1994年)を参照されたい)。結合させたら、2mMのEDTA/0.1%SDSを使用して、ポリ(A)+mRNAを、アフィニティークラムから溶出させる。

50

【0046】

ある特定の実施形態によると、宿主または潜在的ドナーの発現レベルを、子宮周期の期に特異的な基準データと比較する。基準データは、妊娠可能な女性の正常組織の期特異的シグネチャーであってもよい。シグネチャーの差異、特に自家移植における宿主/ドナーでの差異を分析して、それらの子宮内膜機能障害に関連する制御パターンを特徴付け、移植前に特定の遺伝子を改変の標的とすることができる。

【0047】

ある特定の態様では、本発明は、生体試料中、例えば、宿主または潜在的ドナーからの子宮内膜細胞に存在する転写物を評価することを伴う。このような方法は、総RNAから増幅されたcDNAを調製することを伴いうる。cDNAは、単離されたRNA試料を希釈したり、単離されたRNA中の遺伝子材料の混合物を、個別の反応試料へと分配したりせずに、調製し、無差別的に増幅する。増幅は、mRNAおよび非ポリアデニル化転写物の両方の増幅を可能とするように、試料中の全トランスクリプトームにわたって、3'末端からおよびランダムに開始することが好ましい。こうして、二本鎖cDNA増幅産物を、次世代シーケンシングプラットフォームのためのシーケンシングライブラリーの生成のために最適化する。本発明の方法に従い、cDNAを増幅するのに適するキットは、例えば、Ovation（登録商標）RNA-Seq Systemを含む。

10

【0048】

本発明の方法はまた、増幅されたcDNAのシーケンシングも伴いうる。増幅されたcDNA混合物を配列決定するのに、単一分子シーケンシング方法を含む、任意の公知のシーケンシング方法を使用する。増幅されたcDNAは、全トランスクリプトームショットガンシーケンシング（本明細書ではまた、「RNA-Seq」とも称する）により配列決定される。全トランスクリプトームショットガンシーケンシング（RNA-Seq）は、Illumina Genome Analyzerプラットフォーム、ABI Solid Sequencingプラットフォーム、またはLife Scienceの454 Sequencingプラットフォームなど、様々な次世代シーケンシングプラットフォームを使用して遂行することができる。

20

【0049】

宿主または潜在的ドナーの子宮内膜試料中の差次的転写物レベルはまた、マイクロアレイ技法を使用して解析することもできる。増幅されたcDNAを使用して、任意の出産前状態、または任意の種類のがん、炎症性疾患、もしくは自己免疫疾患など、1または複数の状態または疾患と関連する遺伝子転写物を含有するマイクロアレイをプローブすることができる。

30

【0050】

ある特定の態様では、本発明は、個別のアドレス可能（addressable）な位置で基材に付着されている複数のオリゴヌクレオチドを含み、オリゴヌクレオチドの少なくとも1つが、不妊関連突然変異を含む表1の遺伝子の部分にハイブリダイズするマイクロアレイを提供する。ある特定の実施形態中。

【0051】

当技術分野では、マイクロアレイを構築する方法が公知である。例えば、その内容が参照によりその全体において本明細書に組み込まれる、Yeamanら（米国特許出願第2006/0195269号）を参照されたい。

40

【0052】

マイクロアレイは、ポリヌクレオチド配列を含むプローブを選択し、次いで、このようなプローブを、固体支持体または固体表面へと固定することにより調製する。例えば、プローブは、DNA配列、RNA配列、またはDNAとRNAとのコポリマー配列を含みうる。プローブのポリヌクレオチド配列はまた、DNAおよび/もしくはRNA類似体、またはこれらの組合せも含みうる。例えば、プローブのポリヌクレオチド配列は、ゲノムDNAの完全断片の場合もあり、部分断片の場合もある。プローブのポリヌクレオチド配列はまた、合成オリゴヌクレオチド配列など、合成されたヌクレオチド配列であってもよい。

50

プローブ配列は、*in vivo*において酵素的に合成することもでき、*in vitro*において（例えば、PCRにより）酵素的に合成することもでき、*in vitro*において非酵素的に合成することもできる。

【0053】

本発明の方法において使用される1または複数のプローブは、多孔性の場合もあり、非多孔性の場合もある固体支持体へと固定することが好ましい。例えば、本発明のプローブは、ポリヌクレオチドの3'末端または5'末端において、ニトロセルロース膜もしくはニトロセルロースフィルターまたはナイロン膜もしくはナイロンフィルターへと、共有結合的に付着させたポリヌクレオチド配列でありうる。当技術分野では、このようなハイブリダイゼーションプローブが周知である（例えば、Sambrookら、*MOLECULAR CLONING - A LABORATORY MANUAL*（2版）、1～3巻、Cold Spring Harbor Laboratory、Cold Spring Harbor、N.Y.（1989年）を参照されたい）。代替的に、固体支持体または固体表面は、ガラスまたはプラスチック表面であってもよい。ある特定の実施形態では、その表面に、DNAもしくはDNA模倣体の集団、または、代替的に、RNAもしくはRNA模倣体の集団など、ポリヌクレオチドの集団を固定した固相からなる、プローブのマイクロアレイとのハイブリダイゼーションレベルを測定する。固相は、非多孔性材料の場合もあり、任意選択で、ゲルなどの多孔性材料の場合もある。

10

【0054】

マイクロアレイは、各々が、本明細書で記載される遺伝子のうちの1つ、特に、表1に記載の遺伝子を表す、結合性（例えば、ハイブリダイゼーション）部位または「プローブ」の順序付けられたアレイを伴う、支持体または表面を含む。好ましくは、マイクロアレイは、アドレス可能なアレイであり、より好ましくは、位置アドレス可能なアレイである。より具体的には、アレイの各プローブは、各プローブの実体（*identity*）（すなわち、配列）を、アレイ内の（すなわち、支持体上または表面上の）その位置から決定しうるように、固体支持体上の、既知の、所定の位置に配置することが好ましい。ある特定の実施形態では、各プローブを、単一部位において、固体支持体へと、共有結合的に付着させる。

20

【0055】

マイクロアレイは、多数の方式で作製することができ、それらのうちのいくつかについては、下記に記載される。しかし、作製されたマイクロアレイは、ある特定の特徴を共有する。アレイは、複製可能であり、所与のアレイの複数のコピーを生成し、互いと容易に比較することを可能とする。マイクロアレイは、結合（例えば、核酸ハイブリダイゼーション）条件下で安定な材料から作製することが好ましい。マイクロアレイは、小型、例えば、 $1\text{ cm}^2 \sim 25\text{ cm}^2$ の間、 $12\text{ cm}^2 \sim 13\text{ cm}^2$ の間、または 3 cm^2 であることが好ましい。しかし、また、大型のアレイも想定され、例えば、アレイのスクリーニングにおける使用のために好ましい場合がある。マイクロアレイ内の所与の結合性部位または結合性部位の固有のセットは、細胞内の単一の遺伝子の産物（例えば、特異的なmRNA、またはこれに由来する特異的なcDNA）に特異的に結合する（例えば、これとハイブリダイズする）ことが好ましい。しかし、一般に、他の関連の配列または類似の配列も、所与の結合性部位と交差ハイブリダイズする。

30

40

【0056】

本発明のマイクロアレイは、それらの各々が、検出されるRNAまたはDNAの部分配列と相補的なポリヌクレオチド配列を有する、1または複数の被験プローブを含む。固体表面上の各プローブの位置は、既知であることが好ましい。実際、マイクロアレイは、好ましくは、位置アドレス可能なアレイである。具体的には、アレイの各プローブは、各プローブの実体（すなわち、配列）を、アレイ上の（すなわち、支持体上または表面上の）その位置から決定しうるように、固体支持体上の、既知の、所定の位置に配置することが好ましい。

【0057】

50

本発明によると、マイクロアレイとは、各位置が、本明細書で記載されるバイオマーカーのうちの1つを表すアレイ（すなわち、マトリックス）である。例えば、各位置は、ゲノムDNAに基づくDNAまたはDNA類似体であって、その遺伝子マーカーから転写される特定のRNAまたはcDNAが特異的にハイブリダイズしうる、DNAまたはDNA類似体を含む。DNAまたはDNA類似体は、例えば、合成オリゴマーの場合もあり、遺伝子断片の場合もある。一実施形態では、マーカーの各々を表すプローブが、アレイ上に存在する。ある特定の実施形態では、アレイは、子宮内膜症と関連することが公知の遺伝子についてのプローブを含む。加えて、アレイプローブは、子宮周期のある特定の期において、子宮内膜症と関連することが公知の遺伝子に特異的でありうる。

【0058】

上記で言及した通り、本発明による特定のポリヌクレオチド分子が特異的にハイブリダイズするプローブは、相補的なゲノムポリヌクレオチド配列を含む。マイクロアレイのプローブは、1,000ヌクレオチド以下のヌクレオチド配列からなることが好ましい。一部の実施形態では、アレイのプローブは、10～1,000ヌクレオチドのヌクレオチド配列からなる。種々の実施形態では、プローブのヌクレオチド配列は10～200ヌクレオチドの長さの範囲内にあって、生物の種のゲノム配列であり、その結果、このような生物の種のゲノムと相補的であり、そのためそのゲノムにハイブリダイズすることが可能な配列であって、このようなゲノムの全部または一部にわたり、順次タイリングされる配列を有する複数の異なるプローブが存在する。他の具体的な実施形態では、プローブは、10～30ヌクレオチドの長さの範囲内、10～40ヌクレオチドの長さの範囲内、20～50ヌクレオチドの長さの範囲内、40～80ヌクレオチドの長さの範囲内、50～150ヌクレオチドの長さの範囲内、80～120ヌクレオチドの長さの範囲内であり、最も好ましくは、60ヌクレオチドの長さである。

【0059】

プローブは、生物のゲノムの部分に対応する、DNAまたはDNA「模倣体」（例えば、誘導体および類似体）を含む。別の実施形態では、マイクロアレイのプローブは、相補的なRNAまたはRNA模倣体である。DNA模倣体とは、DNAとの、特異的な、ワトソン-クリック様ハイブリダイゼーション、またはRNAとの特異的なハイブリダイゼーションが可能なサブユニットから構成されるポリマーである。核酸は、塩基部分において修飾することもでき、糖部分において修飾することもでき、リン酸骨格において修飾することもできる。例示的なDNA模倣体は、例えば、ホスホロチオエートを含む。

【0060】

DNAは、例えば、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）による、ゲノムDNAまたはクローニングされた配列の増幅によって得ることができる。PCRプライマーは、公知のゲノムの配列であって、ゲノムDNAの特異的な断片の増幅を結果としてもたらす配列に基づき選ぶことが好ましい。当技術分野では、Oligoバージョン5.0（National Biosciences）など、要請される特異性および最適な増幅特性を有するプライマーのデザインにおいて有用なコンピュータプログラムが周知である。マイクロアレイ上の各プローブは、10塩基～50,000塩基の間、通例、300塩基～1,000塩基の間の長さであることが典型的である。当技術分野では、PCR方法が周知であり、例えば、Innisら編、PCR PROTOCOLS: A GUIDE TO METHODS AND APPLICATIONS、Academic Press Inc.、San Diego、Calif.（1990年）において記載されている。当業者には、制御型ロボットシステムが、核酸の単離および増幅に有用であることが明らかである。

【0061】

マイクロアレイのポリヌクレオチドプローブを生成するための、代替的な手段は、例えば、N-ホスホネート化学反応またはホスホルアミダイト化学反応（Froehlerら、Nucleic Acid Res.、14巻：5399～5407頁（1986年）；McBrideら、Tetrahedron Lett.、24巻：246～248頁

10

20

30

40

50

(1983年))を使用する、合成ポリヌクレオチドまたは合成オリゴヌクレオチドの合成による手段である。合成配列は、典型的には、約10～約500塩基の間の長さであり、より典型的には、約20～約100塩基の間であり、最も好ましくは、約40～約70塩基の間の長さである。一部の実施形態では、合成核酸は、イノシンなどであるが、これらには決して限定されない非天然塩基を含む。上記で言及した通り、核酸類似体は、ハイブリダイゼーションのための結合性部位として使用することができる。適切な核酸類似体の例は、ペプチド核酸(例えば、Egholmら、Nature、363巻:566～568頁(1993年);米国特許第5,539,083号を参照されたい)である。

【0062】

プローブは、結合エネルギー、塩基組成、配列の複雑性、交差ハイブリダイゼーション結合エネルギー、および二次構造を考慮に入れるアルゴリズムを使用して選択することが好ましい。2001年1月25日に公開された、Friendら、国際特許公開第WO01/05935号;Hughesら、Nat. Biotech., 19巻:342～7頁(2001年)を参照されたい。

【0063】

当業者はまた、陽性対照プローブ、例えば、標的ポリヌクレオチド分子内の配列と相補的であり、ハイブリダイズ可能であることが公知のプローブ、および陰性対照プローブ、例えば、標的ポリヌクレオチド分子内の配列と相補的でなく、ハイブリダイズ可能でないことが公知のプローブを、アレイ上を含めるべきことも十分に理解する。一実施形態では、陽性対照を、アレイの外周に沿って合成する。別の実施形態では、陽性対照を、アレイを横切って対角線状に合成する。さらに別の実施形態では、各プローブの逆相補体を、プローブに隣接した位置に合成して、陰性対照として用いる。さらに別の実施形態では、他の生物の種に由来する配列を、陰性対照または「スパイクイン」対照として使用する。

【0064】

プローブは、例えば、ガラス、プラスチック(例えば、ポリプロピレン、ナイロン)、ポリアクリルアミド、ニトロセルロース、ゲル、または他の多孔性材料もしくは非多孔性材料から作製されうる、固体支持体または固体表面へと付着させる。核酸を表面へと付着させるための1つの方法は、Schenaら、Science、270巻:467～470頁(1995年)により一般に記載されている通り、ガラスプレート上にプリントすることによる方法である。この方法は、cDNAのマイクロアレイを調製するために、とりわけ有用である(DeRisiら、Nature Genetics、14巻:457～460頁(1996年);Shaltonら、Genome Res., 6巻:639～645頁(1996年);およびSchenaら、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 93巻:10539～11286頁(1995年)もまた参照されたい)。

【0065】

マイクロアレイを作製するための第2の方法は、高密度オリゴヌクレオチドアレイの作製による方法である。in situにおける合成のためのフォトリソグラフィ技法(Fodorら、1991年、Science、251巻:767～773頁;Peaseら、1994年、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 91巻:5022～5026頁;Lockhartら、1996年、Nature Biotechnology、14巻:1675頁;米国特許第5,578,832号;同第5,556,752号、および同第5,510,270号を参照されたい)、または定義されたオリゴヌクレオチドの迅速な合成および沈着のための他の方法(Blanchardら、Biosensors & Bioelectronics、11巻:687～690頁)を使用して、定義された配列と相補的な、数千に及ぶオリゴヌクレオチドを含有するアレイを、表面上の定義された場所において作製するための技法が公知である。これらの方法を使用する場合、公知の配列のオリゴヌクレオチド(例えば、60マー)を、誘導体化されたスライドガラスなどの表面上で直接合成する。通例、作製されるアレイは、冗長であり、RNA 1つ当たりいくつかのオリゴヌクレオチド分子を有する。

10

20

30

40

50

【0066】

また、マイクロアレイを作製するための他の方法、例えば、マスキングによる方法（Mas Kos および Southern、1992年、Nuc. Acids. Res.、20巻：1679～1684頁）も使用することができる。原理的には、かつ、上掲で言及されている通り、任意の種類のアレイ、例えば、ナイロンハイブリダイゼーション膜上のドットプロット（Sambrookら、MOLECULAR CLONING - A LABORATORY MANUAL（2版）、1～3巻、Cold Spring Harbor Laboratory、Cold Spring Harbor、N.Y.（1989年）を参照されたい）も使用しうる。しかし、当業者により認識される通り、ハイブリダイゼーション容量がより少なくなるため、極小アレイがしばしば好ましい。

10

【0067】

一実施形態では、本発明のアレイは、ポリヌクレオチドプローブを、支持体上で合成することにより調製する。このような実施形態では、ポリヌクレオチドプローブを、ポリヌクレオチドの3'末端または5'末端において、支持体へと、共有結合的に付着させる。

【0068】

ある特定の実施形態では、本発明のマイクロアレイを、例えば、Blanchard、米国特許第6,028,189号；Blanchardら、1996年、Biosensors and Bioelectronics、11巻：687～690頁；Blanchard、1998年、Synthetic DNA Arrays in Genetic Engineering、20巻、J.K. Setlow 編、Plenum Press、New York、111～123頁により記載されている方法およびシステムを使用する、オリゴヌクレオチド合成のためのインクジェット式プリンティングデバイスにより製造する。具体的には、このようなマイクロアレイ内のオリゴヌクレオチドプローブは、プロピレンカーボネートなど、高表面張力の溶媒による「マイクロ液滴」中に、個々のヌクレオチド塩基を順次沈着させることにより、例えば、スライドガラス上のアレイ内で合成することが好ましい。マイクロ液滴は、容量が小さく（例えば、100 pL またはこれ未満、より好ましくは、50 pL またはこれ未満）、マイクロアレイ上で互いから分離され（例えば、疎水性ドメインにより）て、アレイエレメント（すなわち、異なるプローブ）の場所を定義する、円形の表面張力ウェルを形成する。このインクジェット方法により製造されるマイクロアレイは、好ましくは、1 cm² 当たり少なくとも約2,500の密度の異なるプローブを有する高密度であることが典型的である。ポリヌクレオチドプローブは、ポリヌクレオチドの3'末端または5'末端において、支持体へと、共有結合的に付着させる。

20

30

【0069】

本発明により解析しうるポリヌクレオチド分子は、DNA、RNA、またはタンパク質である。標的ポリヌクレオチドは、1または複数のヌクレオチドにおいて、検出可能な形で標識する。当技術分野で公知の任意の方法を使用して、標的ポリヌクレオチドを、検出可能な形で標識することができる。この標識付けは、標識を、DNAまたはRNAの全長に沿って、均一に組み込むことが好ましく、標識付けは、高効率で実行することがより好ましい。

40

【0070】

ある特定の実施形態では、検出可能な標識は、発光標識である。本発明では、例えば、蛍光標識、生物発光標識、化学発光標識、および比色標識を使用することができる。一部の実施形態では、標識は、フルオレセイン色素誘導体、リン光体（phosphor）色素誘導体、ローダミン色素誘導体、またはポリメチン色素誘導体などの蛍光標識である。市販の蛍光標識の例は、例えば、FluorePrime（Amersham Pharmacia、Piscataway、N.J.）、FluoreDite（Millipore、Bedford、Mass.）、FAM（ABI、Foster City、Calif.）、およびCy3またはCy5（Amersham Pharmacia、Piscataway、N.J.）などの蛍光ホスホルアミダイトを含む。別の実施形態で

50

は、検出可能な標識は、放射性標識されたヌクレオチドである。

【0071】

さらなる実施形態では、患者試料に由来する標的ポリヌクレオチド分子を、基準試料の標的ポリヌクレオチド分子と別々に標識する。基準試料は、正常組織試料に由来する標的ポリヌクレオチド分子を含みうる。

【0072】

核酸ハイブリダイゼーション条件および洗浄条件は、標的ポリヌクレオチド分子が、アレイの相補的なポリヌクレオチド配列、好ましくは、その相補的なDNAを配置した特異的なアレイ部位に特異的に結合するか、またはこれと特異的にハイブリダイズするように選ぶ。

10

【0073】

その上に置かれた二本鎖のプロブDNAを含有するアレイは、標的ポリヌクレオチド分子と接触させる前に、変性条件に供して、DNAを一本鎖とすることが好ましい。一本鎖のプロブDNA（例えば、合成オリゴデオキシリボ核酸）を含有するアレイは、標的ポリヌクレオチド分子と接触させる前に変性させて、例えば、自己相補的配列に起因して形成される、ヘアピンまたは二量体を除去することが必要な場合がある。

【0074】

最適のハイブリダイゼーション条件は、プロブおよび標的核酸の長さ（例えば、200塩基を超えるポリヌクレオチドと対比されるオリゴマー）および種類（例えば、RNA、またはDNA）に依存する。当業者は、オリゴヌクレオチドが短くなるにつれて、満足のゆくハイブリダイゼーション結果のために、比較的均一な溶融温度を達成するそれらの長さを調整することが必要となりうることを十分に理解する。核酸の特異的な（すなわち、厳密な）ハイブリダイゼーション条件のための一般的なパラメータについては、Sambrookら、MOLECULAR CLONING - A LABORATORY MANUAL（2版）、1～3巻、Cold Spring Harbor Laboratory、Cold Spring Harbor、N.Y.（1989年）、およびAusubelら、CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY、2巻、Current Protocols Publishing、New York（1994年）において記載されている。SchenarらによるcDNAマイクロアレイのための、典型的なハイブリダイゼーション条件は、5倍濃度のSSC + 0.2%のSDS中、65℃で4時間にわたるハイブリダイゼーションに続く、低厳密性の洗浄緩衝液（1倍濃度のSSC + 0.2%のSDS）中、25℃における洗浄に続く、高厳密性の洗浄緩衝液（0.1倍濃度のSSC + 0.2%のSDS）中、25℃で10分間にわたる洗浄（Schenarら、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.、93巻：10614頁（1993年））である。有用なハイブリダイゼーション条件についてはまた、例えば、Tijssen、1993年、HYBRIDIZATION WITH NUCLEIC ACID PROBES、Elsevier Science Publishers B.V.；およびKricka、1992年、NONISOTOPIC DNA PROBE TECHNIQUES、Academic Press、San Diego、Calif.においても提示されている。

20

30

40

【0075】

ハイブリダイゼーション条件は、1MのNaCl、50mMのMES緩衝液（pH 6.5）、0.5%のサルコシナトリウム、および30%のホルムアミド中、プロブの平均溶融温度、またはこの近傍の温度（例えば、51℃以内、より好ましくは、21℃以内）におけるハイブリダイゼーションを含む。

【0076】

蛍光標識された遺伝子または遺伝子産物を使用する場合、マイクロアレイの各部位における蛍光放射は、走査共焦点レーザー顕微鏡法により検出することが好ましい場合がある。一実施形態では、適切な励起線を使用して、使用される2つのフルオロフォアの各々について、別個の走査を実行する。代替的に、2つのフルオロフォアに特異的な波長におけ

50

る同時的な検体の照射を可能とするレーザーを使用することができ、2つのフルオロフォアに由来する放射を、同時に解析することができる(参照によりその全体において全ての目的で組み込まれる、Shallonら、1996年、「A DNA microarray system for analyzing complex DNA samples using two-color fluorescent probe hybridization」、Genome Research、6巻:639~645頁を参照されたい)。ある特定の実施形態では、アレイを、コンピュータ制御X-Yステージおよび顕微鏡対物レンズを伴う、レーザー蛍光スキャナーで走査する。2つのフルオロフォアの順次励起は、多重線混合ガスレーザー(multi-line, mixed gas laser)により達成し、放射される光は、波長で分け、2つの光電子増倍管により検出する。蛍光レーザー走査デバイスについては、Schenarら、Genome Res.、6巻:639~645頁(1996年)、および本明細書で引用される他の参考文献において記載されている。代替的に、Fergusonら、Nature Biotech.、14巻:1681~1684頁(1996年)(その全体の内容が本明細書に援用される)により記載されている光ファイバーバンドルを使用して、mRNAの存在レベルを、多数の部位において同時にモニタリングすることができる。

10

20

30

40

50

【0077】

所望の遺伝子改変を決定したら、様々な遺伝子編集技法またはゲノム編集技法を使用して、所望の遺伝子改変を達成することができる。遺伝子編集技法またはゲノム編集技法としては、ジンクフィンガードメイン方法、ウイルス性転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ(TALEN)、リボソーム媒介性遺伝子移入、またはクラスターを形成し規則正しい間隔を持つ短いパンドロームリピート(CRISPR)ヌクレアーゼが挙げられる。

【0078】

TALENでは、本質的にあらゆる配列を標的とすることができるDNA結合ドメインに融合されている非特異的DNA切断ヌクレアーゼが使用される。TALEN技術では、標的部位を特定し、発現ベクターを製作する。Liuら、2012年、Efficient and specific modifications of the Drosophila genome by means of an easy TALEN strategy、J. Genet. Genomics、39巻:209~215頁を参照されたい。この文献の内容は、それらの全体が本明細書に組み込まれる。Life Technologies(カルズバッド、カリフォルニア州)のmMESSAGE mACHINE SP6転写キットなどの市販のキットを使用することができる。YoungおよびSander、2013年、TALENs: a widely applicable technology for targeted genome editing、Nat Rev Mol Cell Bio、14巻:49~55頁を参照されたい。この文献の内容は、それらの全体が本明細書に組み込まれる。

【0079】

CRISPR方法論では、ヌクレアーゼ、CRISPR関連(Cas9)が、プロトスペーサー隣接モチーフ(PAM)の上流で配列特異的にDNAを切断するためのガイド(gRNA)として作用する小型RNAと共に使用される。Cas9およびガイドRNA(gRNA)は、公知の方法により合成することができる。CRISPRは、crRNAおよびtracrRNAとして公知の異なるガイドRNAを使用することができる。これら異なる2つのRNAは、短鎖ガイドRNAを設計することにより部位特異的な哺乳動物ゲノム切断を可能にするように組み合わせて単一RNAにされている。Cas9/ガイドRNA(gRNA)は、非特異的DNA切断タンパク質Cas9、およびハイブリダイズしてCas9/gRNA複合体を標的および動員するRNAオリゴを使用する。Changら、2013年、Genome editing with RNA-guided Cas9 nuclease in zebrafish embryos、Cell Res、23巻:465~472頁;Hwangら、2013年、Efficient g

genome editing in zebrafish using a CRISPR-Cas system、Nat. Biotechnol、31巻：227～229頁；Xiaoら、2013年、Chromosomal deletions and inversions mediated by TALENS and CRISPR/Cas in zebrafish、Nucl Acids Res、1-11を参照されたい。これら文献の各々の内容は、それらの全体が本明細書に組み込まれる。

【0080】

ある特定の実施形態では、ゲノム編集は、ジンクフィンガーヌクレアーゼ媒介性プロセスまたはリポソーム媒介性遺伝子移入を使用して実施される。Weinsteinの米国特許出願公開第2011/0023144号；Manninoら、Liposome mediated gene transfer、BioTechniques、1988年、6巻（7号）：682～690頁を参照されたい。これら文献の各々の内容は、それらの全体が本明細書に組み込まれる。

10

【0081】

種々の実施形態では、子宮内膜組織は、Gargettら、2009年またはZhongら、Feasibility investigation of allogeneic endometrial regenerative cells、Journal of Translational Medicine、2009年、7巻：15頁に記載されているものなどの組織培養技法により子宮内膜細胞から調製することができる。この文献はその全体が本明細書に組み込まれる。ある特定の実施形態では、組織操作技法を使用して、ドナー子宮内膜細胞から移植用の子宮内膜移植片を生成することができる。Chenら、Stem Cells for Skin Tissue Engineering and Wound Healing、Crit Rev Biomed Eng.、2009年；37巻（4～5号）：399～421頁を参照されたい。この文献はその全体が本明細書に組み込まれる。

20

【0082】

ある特定の実施形態では、ドナーから得られた子宮内膜細胞または組織を、宿主子宮への移植前に治療化合物に曝露させてもよい。治療化合物の例としては、以下のものが挙げられる：例えば、精漿；抗生物質；FSH、エストロゲン、黄体形成ホルモン（LH）、プロゲステロン、または絨毛性性腺刺激ホルモンなどのホルモン；酵素；ならびに上皮増殖因子、線維芽細胞増殖因子、形質転換増殖因子アルファ（TGF）- α 、血小板由来増殖因子（PDGF）、形質転換増殖因子 β 1（TGF- β 1）、インターロイキン8（IL-8）、IL-1、IL-11、IL-15、遊走阻害因子（MIF）、および血管内皮増殖因子（VEGF）などのサイトカインまたは増殖因子。

30

移植

【0083】

本発明のシステムおよび方法によると、子宮内膜幹細胞は、子宮内膜下帯への経子宮筋層注射、または掻爬を伴うもしくは伴わない基底部付近の子宮腔へのカテーテル導入などによる様々な技法により、宿主またはレシピエントの子宮内に導入することができる。Singhら、Autologous stem cell transplantation in refractory Asherman's syndrome: A novel cell based therapy、J Hum Reprod Sci、2014年4月～6月；7巻（2号）：93～98頁；Nagoriら、Endometrial regeneration using autologous adult stem cells followed by conception by in vitro fertilization in a patient of severe Asherman's syndrome、J Hum Reprod Sci.、2011年1月；4巻（1号）：43～8頁を参照されたい。これら文献の各々の内容は、それらの全体が本明細書に組み込まれる。ある特定の実施形態では、子宮内膜組織を、宿主の子宮に移植またはグラフトしてもよい。

40

50

【 0 0 8 4 】

移植に伴って、エストロゲンを補完し、子宮内膜組織を肥厚させるシグナルを伝達してもよい。ある特定の実施形態では、子宮内膜細胞を移植する契機は、月経の終了であってもよく、または血中もしくは尿中のホルモンレベル（ＦＳＨ、エストロゲン、またはＬＨなど）の測定値変化であってもよい。移植は、宿主の同じ子宮周期内でのＩＶＦ胚移植または他の支援生殖技法の後であってもよい。

参照による組込み

【 0 0 8 5 】

本開示を通して、特許、特許出願、特許公開、雑誌、書籍、論文、ウェブコンテンツなど、他の文書に対する言及およびこれらの引用を行ってきた。全てのこのような文書は、参照によりそれらの全体において全ての目的で本明細書に組み込まれる。

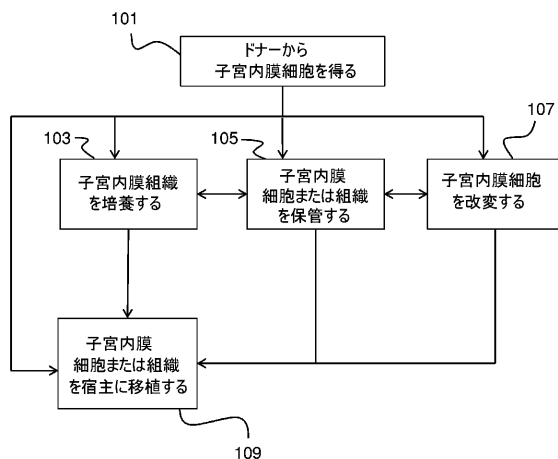
10

【 0 0 8 6 】

同等物

本発明は、その精神または不可欠の特徴から逸脱しない限りにおいて、他の特殊な形態でも具体化することができる。したがって、上掲の実施形態は、全ての点で、本明細書で記載される本発明に対して、限定的なものではなく、例示的なものであると考えるべきである。こうして、本発明の範囲は、上掲の記載ではなく、付属の特許請求の範囲により指し示され、したがって、特許請求の範囲と同等な意味および範囲の中に納まる全ての変化は、

【 図 1 】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N	9/16	(2006.01)	A 6 1 L 27/36 3 2 0
A 6 1 K	35/545	(2015.01)	A 6 1 L 27/36 4 1 0
C 1 2 N	5/10	(2006.01)	C 1 2 N 5/074
C 0 7 K	14/47	(2006.01)	C 1 2 N 9/16 A
			A 6 1 K 35/545
			C 1 2 N 5/10
			C 0 7 K 14/47

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

(74)代理人 230113332

弁護士 山本 健策

(72)発明者 ベイム , ピライエ ユルタス

アメリカ合衆国 ニューヨーク 1 0 0 0 4 , ニューヨーク , リトル ウェスト ストリート
7 0 , ピーエイチ 1 ビー

F ターム(参考) 4B050 CC07 LL01 LL10

4B065 AA93X AB01 BB40 BD09 BD12 CA44

4C081 AB12 BA12 CD34 EA02 EA16

4C087 AA01 AA03 BB61 BB64 BB65 CA04 MA66 MA67 NA14 ZA81

4H045 AA10 AA30 CA40 DA50 EA20