

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号
特表2025-518014
(P2025-518014A)

(43)公表日 令和7年6月12日(2025.6.12)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)
C 1 2 Q	1/68 (2018.01)	C 1 2 Q	1/68	Z N A 4 B 0 2 9
C 1 2 M	1/00 (2006.01)	C 1 2 M	1/00	A 4 B 0 6 3
C 1 2 M	1/34 (2006.01)	C 1 2 M	1/34	Z

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全74頁)			
(21)出願番号	特願2024-569359(P2024-569359)	(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22日(2024.11.22)		ス・アー
(86)国際出願番号	PCT/EP2023/064443		スイス, 1 8 0 0 ヴヴェイ, アヴェ
(87)国際公開番号	WO2023/232811		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	63/347,111		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】 イヌの健康寿命を改善する方法

(57)【要約】

本発明は、イヌの死亡リスク及び／又は健康寿命確率を評価する方法を提供し、該方法は、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ことと、b) DNAメチル化プロファイルを使用して、イヌの死亡リスク及び／又は健康寿命確率を評価することと、を含む、方法である。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

イヌの死亡リスク及び／又は健康寿命確率を評価する方法であって、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、前記イヌの死亡リスク及び／又は健康寿命確率を評価するステップと、を含む、方法。

【請求項 2】

イヌの生物学的年齢を評価する方法であって、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であって、前記 DNA メチル化プロファイルが、前記イヌの死亡リスク及び／又は健康寿命確率に関連付けられる、評価するステップと、を含む、方法。

【請求項 3】

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、前記イヌの死亡リスク及び／又は健康寿命確率を評価するステップと、

c) ステップ b) で評価された前記死亡リスク及び／又は健康寿命確率に基づいて、前記イヌに適した生活習慣、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。

【請求項 4】

イヌの死亡リスク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 3 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死亡リスク及び／又は健康寿命確率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に、前記イヌの死亡リスク及び／又は健康寿命確率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。

【請求項 5】

イヌの死亡リスク及び／又はイヌの健康寿命確率を改善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を評価する方法であって、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死亡リスク及び／又は健康寿命確率を評価するステップと、

b) ステップ a) で評価された前記死亡リスク及び／又は健康寿命確率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死亡リスク及び／又は健康寿命確率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、前記イヌの前記死亡リスク及び／又は健康寿命確率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。

【請求項 6】

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

10

20

30

40

50

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の死亡リスク及び／又は健康寿命確率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の死亡リスク及び／又は健康寿命確率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に、前記イヌの前記第1及び第2の死亡リスク及び／又は健康寿命確率の間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、前記イヌの死亡リスクを減少させ、かつ／又は健康寿命確率を増加させ、かつ／又は死亡リスクの増加率を減少させ、かつ／又は健康寿命確率の減少率を増加させる場合、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。

10

【請求項7】

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死亡リスク及び／又は健康寿命確率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前記死亡リスク及び／又は健康寿命確率が、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) で評価された前記死亡リスク及び／又は健康寿命確率に基づいて、前記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ステップであって、

20

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8】

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死亡リスク及び／又は健康寿命確率を評価するステップと、

b) 暦年齢と比較して前記死亡リスクが増加している及び／又は前記健康寿命確率が低下している場合、前記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。

30

【請求項9】

前記イヌの前記死亡リスク及び／又は健康寿命確率を評価するための前記方法が、前記DNAメチル化プロファイルを前記イヌの暦年齢、品種、及び／又は性別のうちの1つ以上と組み合わせることをさらに含む、請求項1～8のいずれか一項に記載の方法。

【請求項10】

前記イヌがその暦年齢と比較して高い死亡リスク及び／又は低い健康寿命確率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3～9のいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項11】

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3～10のいずれか一項に方法。

【請求項12】

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11に記載の方法。

【請求項13】

前記サンプルが、血液サンプルである、請求項1～12のいずれか一項に記載の方法。

【請求項14】

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の評

50

価することをさらに含む、請求項 1～3 又は請求項 5～8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 15】

前記 DNA メチル化プロファイルが、表 3 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 1～14 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 16】

前記 DNA メチル化プロファイルが、表 3 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 15 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 4 に掲載されるメチル化部位を含む、請求項 15 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 5 に掲載されるメチル化部位を含む、請求項 15 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 6 に掲載されるメチル化部位を含む、請求項 15 に記載の方法。

【請求項 20】

前記 DNA メチル化プロファイルが、表 7 に掲載されるメチル化部位を含む、請求項 15 に記載の方法。

【請求項 21】

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) 捕捉に基づいて富化するステップ、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 1 つ以上を含む方法を用いて評価される、請求項 14～20 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 22】

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、における、罹患又は予測される罹患に関連する、請求項 1～21 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 23】

前記イヌに、請求項 22 に記載の組織、臓器、又は生体システムにおける前記罹患又は予測される罹患を改善するのに適した生活習慣計画、食事計画、又は治療の介入を適用することをさらに含む、請求項 22 に記載の方法。

【請求項 24】

イヌの死亡リスクの低下及び／又は健康寿命確率の増加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 1、請求項 7～10、又は請求項 13～23 のいずれか一項に記載の方法によって死亡リスクを評価されたイヌに対して行われる食事介入又は投与される治療モダリティ。

【請求項 25】

イヌの死亡リスクを低下させる、及び／又はイヌの健康寿命確率を増加させるための食事介入による治療モダリティの使用であって、前記食事介入が、請求項 1、請求項 7～20、又は請求項 13～23 のいずれか一項に記載の方法によって死亡リスク及び／又は健康寿命確率を評価されたイヌに対して行われる、使用。

【請求項 26】

実行されると 1 つ以上のプロセッサに請求項 1、2、3、7～16、又は 23 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 27】

イヌの死亡リスク及び／又は健康寿命確率を評価するコンピュータシステムであって、

10

20

30

40

50

前記コンピュータシステムが、前記イヌのDNAメチル化プロファイルを使用して前記イヌの死亡リスクを評価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。

【請求項 28】

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死亡リスク及び／又は健康寿命確率を評価するステップ、及び

b) ステップ a) で評価された死亡リスク及び／又は健康寿命確率に基づいて、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。

10

【請求項 29】

イヌの死亡リスク及び／又は健康寿命確率を改善するために、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、前記イヌの死亡リスク及び／又は健康寿命確率を評価するステップ、及び

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及び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、前記イヌの前記死亡リスク及び／又は健康寿命確率に変化があったか否かを評価するステップ、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 30】

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死亡リスク及び／又は健康寿命確率を評価するステップ、及び

b) 暦年齢と比較して前記死亡リスクが増加している及び／又は前記健康寿命確率が低下している場合、前記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、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。

30

【請求項 31】

プログラム可能なコンピュータに、イヌのDNAメチル化プロファイルを使用して前記イヌの死亡リスク及び／又は健康寿命確率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。

【請求項 32】

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死亡リスク及び／又は健康寿命確率を評価させ、前記DNAメチル化プロファイルを使用して評価された前記死亡リスク及び／又は健康寿命確率に基づいて、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。

40

【請求項 33】

プログラム可能なコンピュータに、a) 生活習慣計画、食事計画又は治療介入前の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、又は治療の介入後の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死亡リスク及び／又は健康寿命確率を評価させ、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る前及び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、前記イヌの前記死亡リスク及び／又は健康寿命確率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。

【請求項 34】

50

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、前記イヌの死亡リスク及び／又は健康寿命確率を評価させ、及びb) その暦年齢と比較して増加した死亡リスク及び／又は低下した健康寿命確率を有する場合に、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としてイヌを特定させるための、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35】

イヌの死亡リスク及び／又は健康寿命確率を評価するためのエピジェネティック時計を作製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DNAメチル化プロファイルを提供することと、b) (i) 生存を、前記メチル化プロファイル、暦年齢、ならびに任意選択で品種クラス及び／又は性別の関数としてモデル化する、第1のゴンペルツ関数又はワイブル関数と、(ii) 生存を、暦年齢、ならびに任意選択で品種クラス及び／又は性別のみの関数としてモデル化する、第2のゴンペルツ関数又はワイブル関数と、の2つのゴンペルツ関数又はワイブル関数を計算することと、を含み、前記死亡リスク及び／又は健康寿命確率が、前記第2のゴンペルツ関数又はワイブル関数によって与えられる前記イヌの生存確率が前記第1のゴンペルツ関数又はワイブル関数によって与えられる前記イヌの暦年齢での生存確率に等しい時間変数に基づいて評価される、方法。

【請求項36】

請求項27～35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。

【請求項37】

イヌの死亡リスク及び／又は健康寿命確率を評価するためのキットであって、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、前記サンプルを郵送して後続の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。

【請求項38】

イヌのDNAメチル化プロファイルを使用して前記イヌの死亡リスク及び／又は健康寿命確率を評価するための方法であって、前記方法が、(a) 任意選択で請求項37に記載のキットを使用して、前記イヌからの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27に記載のコンピュータシステム又は請求項31に記載のコンピュータプログラム製品を使用して、前記イヌの死亡リスク及び／又は健康寿命確率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39】

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死亡リスク及び／又は健康寿命確率を評価し、並びにDNAメチル化プロファイルを使用して評価された前記死亡リスク及び／又は健康寿命確率に基づいて、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するための方法であって、前記方法が、(a) 任意選択で請求項37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28に記載のコンピュータシステム又は請求項32に記載のコンピュータプログラム製品を使用して、死亡リスク及び／又は健康寿命確率を評価し、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

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 40】

DNAメチル化プロファイルを使用して、イヌの死亡リスク及び／又は健康寿命確率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 37 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 29 に記載のコンピュータシステム又は請求項 33 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及び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、前記イヌの前記死亡リスク及び／又は健康寿命確率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。

10

【請求項 41】

DNAメチル化プロファイルを使用して、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を提供することであって、請求項 37 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 30 に記載のコンピュータシステム又は請求項 34 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より高い死亡リスク及び／又は健康寿命確率の低下を有する場合、老化を防止する生活習慣又は食事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。

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、DNAメチル化プロファイルを使用してイヌの健康状態を評価する方法に関する。特に、本発明は、DNAメチル化プロファイルから評価された健康状態に基づいて、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に関する。

30

【背景技術】

【0002】

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。

【0003】

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係する。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）。

40

【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。

50

【発明の概要】

【0005】

本発明は、DNAメチル化プロファイルに基づいて犬の健康状態を定量する方法に関する。本方法により、イヌのDNAメチル化プロファイルを評価することで、イヌの死亡リスク及び／又は健康寿命確率を評価できる。

【0006】

イヌの健康状態を評価する既存の方法では、DNAメチル化と暦年齢との相関関係に基づいて生物学的年齢を評価する。動物の生物学的年齢を計算することは、DNAメチル化プロファイルを、所与の暦年齢で予測されるDNAメチル化プロファイルと比較して評価することを含み得る。したがって、かかる方法は、健康全般の主要な指標として暦年齢を使用することに基づく。

10

【0007】

対照的に、本発明は、死亡リスク及び／又は健康寿命確率においてDNAメチル化プロファイルの直接的な予測値を考慮に入れる。例として、特定のDNAメチル化マーカーは、暦年齢と直接は相関しない可能性があるが、特定の病理学的状態を示し、ひいては死亡リスクの増加及び／又は健康寿命確率の短縮 (a probability of a reduced healthy lifespan) を示し得る。したがって、本方法は、イヌの死亡リスク及び／又は健康寿命確率を特定するものとして記載され得る。したがって、本発明のDNAメチル化マーカー及びDNAメチル化プロファイルは、必ずしも暦年齢と相関するわけではないが、イヌの表現型年齢と暦年齢との差に関連している。

20

【0008】

第1の態様では、本発明は、イヌの死亡リスクを評価する方法を提供し、該方法は、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の死亡リスクを評価するステップとを含む。

【0009】

死亡リスクを評価することは、イヌが、例えば、暦年齢、性別、及び品種が同じである同等のイヌと比較して、より長期間又はより短期間生存する可能性を評価することを指し得る。したがって、本発明の方法は、イヌの寿命、健康寿命、及び／又は長命の確率を、例えば、同じ年齢、性別、及び品種という点で同等のイヌと比較して評価することができる。さらに、イヌの死亡リスク及び／又は健康寿命確率を改善するための方法は、イヌの推定寿命、健康寿命及び／又は長命を改善し得る。

30

【0010】

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。

【0011】

好適には、死亡リスクは、イヌの健康寿命確率と同等であり得、死亡リスクの減少は、イヌの長期健康寿命確率の増加と同等であり、又は死亡リスクの増加は、イヌの長期健康寿命確率の低下と同等である。死亡リスクは、イヌの評価された年齢 (すなわち、生物学的年齢) と暦年齢との間の差として表され得る。例えば、本方法によって評価された生物学的年齢と暦年齢との間の差の増加は、イヌの死亡リスクの増加を示し得る。本方法によって評価された生物学的年齢と暦年齢との間の差の減少は、イヌの死亡リスクの減少を示し得る。適切には、死亡リスク及び／又は健康寿命確率は、イヌの生物学的年齢として記載され得る。適切には、死亡リスク及び／又は健康寿命確率は、イヌのエピジェネティック年齢として記載され得る。好適には、本生体時計 (biological clock) は、エピジェネティック時計として参照することもできる。

40

【0012】

好適には、イヌの生物学的年齢がその暦年齢を超過していると評価されることは、死亡

50

リスクが高いことを示す。好適には、イヌの生物学的年齢がその暦年齢未満であると評価されることは、死亡リスクが低いことを示す。好適には、イヌの生物学的年齢が暦年齢を超過していると評価されることは、長期健康寿命確率が低いことを示す。好適には、イヌの生物学的年齢が暦年齢未満であると評価されることは、長期健康寿命確率が高いことを示す。

【0013】

適切には、本方法は、死亡リスク及び／又は健康寿命確率に基づいてイヌの生物学的年齢を評価するために使用され得る。

【0014】

したがって、さらなる態様では、本発明は、イヌの生物学的年齢を評価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の生物学的年齢を評価するステップとを含み、DNAメチル化プロファイルが、イヌの死亡リスク及び／又は健康寿命確率に関連付けられる、方法を提供する。

10

【0015】

本方法の全てにおいて、イヌの死亡リスク及び／又は健康寿命確率を評価又は改善することは、イヌの生物学的年齢を評価又は改善することにも適用され、イヌの生物学的年齢は、イヌの死亡リスク及び／又は健康寿命確率に係るDNAメチル化プロファイルを使用して評価される。

【0016】

さらなる態様では、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、イヌの死亡リスク及び／又は健康寿命確率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死亡リスクに基づいて、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、を含む、方法を提供する。

20

【0017】

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ステップ」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ステップ」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ステップ」も包含し得る。

30

【0018】

別の態様では、本発明は、イヌの死亡リスク及び／又は健康寿命確率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) 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であって、生活習慣計画、食事計画、又は治療の介入が、本発明の先の態様に従って選択されている、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死亡リスク及び／又は健康寿命確率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に、イヌの死亡リスク及び／又は健康寿命確率に変化があったか否かを評価するステップと、を含む、方法を提供する。

40

【0019】

さらなる態様では、本発明は、イヌの死亡リスク及び／又は健康寿命確率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、かかる方法は、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死亡リスクを評価するステップと、b) ステップa) で評価された死亡リスク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死亡リスク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、イヌの死亡リスクに変

50

化があったか否かを評価するステップと、を含む方法を提供する。

【0020】

適切には、イヌの死亡リスク及び／又は健康寿命確率を改善することは、イヌの生物学的年齢と暦年齢との間の差の減少を指し得、その場合、イヌの生物学的年齢は、その暦年齢よりも大きい。さらに、イヌの死亡リスク及び／又は健康寿命確率を改善することは、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得、その場合、イヌの生物学的年齢は、その暦年齢未満である。あるいは、イヌの死亡リスク及び／又は健康寿命確率の悪化は、イヌの生物学的年齢と暦年齢との間の差の増加を指し得、その場合、イヌの生物学的年齢は、その暦年齢よりも大きい。イヌの死亡リスク及び／又は健康寿命確率の悪化はまた、イヌの生物学的年齢と暦年齢との間の差の減少を指し得、その場合、イヌの生物学的年齢はその暦年齢未満である。

10

【0021】

適切には、イヌの死亡リスク及び／又は健康寿命確率を改善することは、イヌの生物学的年齢と暦年齢との間の変化率の減少を指し得、その場合、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後の変化率の減少、例えば、介入後のイヌの生物学的年齢が暦年齢の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、イヌの死亡リスク及び／又は健康寿命確率の改善を提供し得る。

【0022】

イヌの生物学的年齢がその暦年齢未満である場合、死亡リスク及び／又は健康寿命確率を改善することは、イヌの生物学的年齢と暦年齢との間の変化率を維持又は増加させることも指し得る。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。

20

【0023】

イヌの死亡リスク及び／又は健康寿命確率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、又は治療介入の有効性の継続的なモニタリングを可能にし得る。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を特定することを可能にし得る。対照的に、イヌの死亡リスク及び／又は健康寿命確率に基づいて、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。

30

【0024】

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死亡リスク及び／又は健康寿命確率に基づいて、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、本発明の文脈では、犬の暦年齢と比較して死亡リスクが増加していること及び／又は健康寿命確率が低下していること（すなわち、生物学的年齢が上昇していること）が評価されると、より早い年齢で犬を高齢食に切り替えることを決定することが可能となる。対照的に、その暦年齢と比較して、死亡リスクが低い及び／又は健康寿命確率が高い（すなわち、生物学的年齢が減少している）イヌは、より長期間、成体食を継続することが可能であり得る。

40

【0025】

適切には、本方法は、イヌがその暦年齢と比較して高い死亡リスク及び／又は低い健康寿命確率を有するという評価の後に、そのイヌに対して生活習慣計画、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み得る。

【0026】

50

別の態様では、本発明は、イヌの疾患発症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死亡リスク及び／又は健康寿命確率を評価するステップであって、イヌについて評価された死亡リスク及び／又は健康寿命確率が、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) で評価された死亡リスク及び／又は健康寿命確率に基づいて、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ステップであって、

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予防又は低減する、選択するステップと、を含む。

10

【0027】

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／又は肝疾患である。

【0028】

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。

【0029】

別の態様では、本発明は、老化を防止する(anti-aging)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死亡リスク及び／又は健康寿命確率を評価するステップと、b) 暦年齢と比較して死亡リスクが増加している及び／又は健康寿命確率が低下している場合、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イヌを選択するステップと、を含む。

20

【0030】

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、その暦年齢と比較して死亡リスクが増加している及び／又は健康寿命確率が減少している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を選択することを可能にすることもできる。

30

【0031】

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死亡リスク及び／又は低い健康寿命確率(すなわち、生物学的年齢の増加)を有するという評価に基づいて選択されてもよい。

【0032】

生活習慣計画、食事計画、又は治療の介入は、食事介入であってもよい。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。

40

【0033】

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、生物学的年齢の増加に関係し得る。

【0034】

本発明は、更に、イヌの死亡リスクの低下及び／又は健康寿命確率の増加における使用のための食事介入を提供し、ここで、食事介入は、本発明の方法によって死亡リスク及び／又は健康寿命確率を評価されたイヌに対して行われる。

【0035】

50

本発明は更に、イヌの死亡リスクを低下させる、及び／又はイヌの健康寿命確率を増加させるための食事介入の使用を提供し、食事介入は、本発明の方法によって死亡リスク及び／又は健康寿命確率を評価されたイヌに対して行われる。

【0036】

別の態様では、本発明は、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。

【0037】

別の態様では、本発明は、イヌの死亡リスクを評価するためのコンピュータシステムを提供し、かかるコンピュータシステムは、イヌのDNAメチル化プロファイルを使用してイヌの死亡リスクを評価するようにプログラムされている。

10

【0038】

別の態様では、本発明は、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死亡リスクを評価するステップと、b) ステップa) で評価された死亡リスク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つ以上のステップ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。

【0039】

別の態様では、本発明は、イヌの死亡リスク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、イヌの死亡リスク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る前及び適用された後のイヌから得られたサンプル間でイヌの死亡リスク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つ以上のステップ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。

20

【0040】

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、かかる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死亡リスクを評価するステップと、b) イヌが、その暦年齢と比較して高い死亡リスクを有する場合、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そのイヌを特定するステップと、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。

30

【0041】

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、イヌのDNAメチル化プロファイルを使用してイヌの死亡リスク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。

【0042】

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、イヌからのDNAメチル化プロファイルを使用してイヌの死亡リスクを評価させ、DNAメチル化プロファイルを使用して評価された死亡リスク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。

40

【0043】

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、イヌの死亡リスクを評価させ、b) 生活習慣計画、食事計画、又は治療の介入が適用される前及び適用された後のイヌから得られたサンプル間でイヌの死亡リスクに変化があ

50

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。

【0044】

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) 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死亡リスクを評価させ、b) イヌがその暦年齢と比較して高い死亡リスクを有する場合、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そのイヌを特定させるための、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。

【0045】

有利なことに、本発明は、複数の臓器系及び機能のマーカーに基づいて死亡リスク及び／又は健康寿命確率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。

【0046】

イヌの死亡リスク及び／又は健康寿命確率を評価することにより、動物の幸福度の幾つか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】

【0047】

【図1】死亡リスクを予測する血液バイオマーカーの特定。性別及び品種クラス（小型又は中型）を含む、算定された28個のバイオマーカーのそれぞれに、cox比例ハザードモデルを当てはめた。多重比較（偽発見率（fdr）による）を考慮して、各パラメータのp値について値を補正する。補正fdrが0.05未満のパラメータを示す。

【図2】pheno ageを評価するためのマルチパラメータモデルの予測能力に寄与するバイオマーカーの実証。

【図3】カロリー制限試験における本発明の例示的な時計の検証。デルタは、暦年齢と、予測されるpheno DNAm age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、対照食を与えられた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4】6歳でのカロリー制限試験における本発明の例示的な時計の検証。デルタは、暦年齢と、予測されるpheno DNAm age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、対照食を与えられたイヌと比較して低い生物学的年齢（より低いデルタ）を有する。

【図5】線形混合効果モデルの調整（ランダム効果としてDog ID）。カロリー制限を受けたイヌは、対照食を与えられたイヌと比較して有意に低い生物学的年齢を有する。

【図6】本発明の例示的な時計によって評価されたときの、生物学的に若いイヌと生物学的に高齢のイヌとの間の生存率。

【図7】トレーニングセットに対し、品種クラス（小型又は中型）で層別化し、性別と、 Δ pheno DNAm age（暦年齢と予測pheno DNAm ageとを比較することによる残差）とを使用して当てはめた、Cox比例ハザードモデル。デルタの増加は、より高い死亡リスクに関連する。

【図8】技術的反復間の再現性の評価。

【図9】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10】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11】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12】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、

10

20

30

40

50

暦年齢と相関する。

【図 13】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】

【0048】

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。

【0049】

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。

【0050】

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。

【0051】

数値範囲は、その範囲を画定する数を含む。

【0052】

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。

【0053】

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。

【0054】

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。

【0055】

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。

【0056】

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。

【0057】

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 10 kg 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 10 kg を超過する品種は中型品種として分類される。

【0058】

10

20

30

40

50

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。

【0059】

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。

【0060】

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。

【0061】

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。

【0062】

好適には、イヌは少なくとも約7歳齢であってもよい。

【0063】

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評価することを含む。

【0064】

好適には、サンプルは、血液、毛包、口腔スワブ（buccal swab）、唾液又は組織サンプルである。

【0065】

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。

【0066】

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（PBMC）又はリンパ球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。

【0067】

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の変更などの、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。

【0068】

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

10

20

30

40

50

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、又は検定される対象に応じて異なってもよい。

【0069】

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(Dnmt)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。

10

【0070】

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、遺伝子発現を可能にするために作用可能な状態(permissive state)に維持されていると考えられる。

20

【0071】

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の低メチル化を示し、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減少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係により、「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。一般に、これらの時計は、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リスクを示し得る。

30

【0072】

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(differentially methylated 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。

40

【0073】

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。

50

【0074】

EM-seq (Enzymatic Methyl-seq)

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 (Enzymatic Methyl-seq)を使用することができる。

【0075】

典型的には、EM-seqでは、第1の酵素ステップにおいて、TET2 (Tet methylcytosine dioxygenase 2)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、もともと存在していた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、APOBEC3A (enzyme apolipoprotein B mRNA editing enzyme catalytic polypeptide-like 3 A)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、機械的せん断によりDNA断片を作製し、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の酵素的ステップ後、脱アミノ化された一本鎖DNAは、ウラシル含有鋳型を増幅することができるNEBNext (登録商標) Q5 U (商標)などのポリメラーゼを使用する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。

【0076】

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わた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。

【0077】

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。

【0078】

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 (methylat ion-sens itive representat ional difference analysis) (Ushijima et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 1997 Mar 18; 94 (6): 2284-9)、及びDMH法 (different ial methylat ion hybridizat ion) (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。

10

【0079】

例として、DMH法 (different ial methylat ion hybridizat ion) (Huang et al., 上記) では、ゲノムを200bp未満の長さに断片化する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1種以上の酵素の特異性に応じて、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解析に適する。

20

【0080】

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製されるDNAメチル化プロファイルを利用する。

【0081】

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製することができ、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)。

30

【0082】

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をランダムに剪断又はランダムに断片化することと、メチル化依存性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を選択的に同定及び／又は解析することとを含む。選択的特定は、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、制限酵素消化後に未消化の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

40

50

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。

【0083】

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。

10

【0084】

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。

20

【0085】

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。

30

【0086】

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。

【0087】

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。

40

【0088】

単一分子配列決定に基づくアプローチ

現行の配列決定法では、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

50

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。

【0089】

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。

【0090】

好適には、DNA部位メチル化部位は、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。

【0091】

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 (Bsa el) ; 2021 ; 12 (6) ; 847) に基づき得られる。

【0092】

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。

【0093】

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部位を含んでもよく、又はそれらからなってもよい。

【0094】

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部位を含んでもよく、又はそれらからなってもよい。

【0095】

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アイランドからなってもよい。

【0096】

「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の予測されるCpGに対する比が60%超であるDNA領域を指し得る。

【0097】

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。

【0098】

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。

【0099】

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

10

20

30

40

50

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ものの、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。

【0100】

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。

【0101】

「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すことができ、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）を示すことができ、又は配列中のどこでメチル化が生じるかの正確な情報は提供せずに、配列内の領域のメチル化密度に関する情報を示すことができる。メチル化状態は、任意選択で、「メチル化値」によって表すか、又は示すことができる。

【0102】

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。

【0103】

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。

【0104】

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

10

20

30

40

50

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。

【0105】

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。

【0106】

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。

【0107】

富化 (Enrichment) 及び検出方法

DNAメチル化プロファイルを評価することは、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。

【0108】

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ォーマットを使用することができる。

【0109】

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。

【0110】

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、プローブと相補的な配列を含むDNAを捕捉することができ、したがって、目的のDNA領域を含むDNAと、目的のDNA領域を含まないDNAとを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。

【0111】

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。

【0112】

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。

【0113】

10

20

30

40

50

本明細書で使用されるとき、「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。

【0114】

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。

【0115】

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。

【0116】

配列決定の特定ステップは、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。

【0117】

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。

【0118】

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。

【0119】

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、イヌの死亡リスク及び／又は健康寿命確率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メチル化マーカーからの値を組み合わせることによって改善され得る。

【0120】

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。

【0121】

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、イヌの死亡リスク及び／又は健康寿命確率（すなわち生物学的年齢）を評価することができる。

【0122】

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

10

20

30

40

50

位からの 5 m C の存在又は非存在を指してもよい。

【0123】

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 5 m C の存在又は非存在を指してもよい。

【0124】

死亡リスク及び／又は健康寿命確率を評価するための生体時計を作製するために、初期メチル化プロファイル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。

【0125】

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。

【0126】

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。

【0127】

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係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。

【0128】

好適には、生体システムは、炎症系、筋系、心血管系、及び／又は神経系であり得る。

【0129】

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。

【0130】

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。

【0131】

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 %

10

20

30

40

50

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。組み合わせら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が、死亡リスク及び／又は健康寿命確率の評価に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である。

【0132】

好適には、DNAメチル化プロファイルは、表3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。

【0133】

好適には、1つ以上のメチル化部位は、配列番号1～261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1～261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;Jagannathan et al.; Genes \(Bsael\); 2021; 12\(6\); 847](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/assembly/GCF_000002285.5;Jagannathan%20et%20al.;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）。

【0134】

適切には、メチル化部位は、表3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chr1:3844418-3844420に関して、メチル化マーカーはchr1:3844419である。適切には、DNAメチル化プロファイルは、表3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、又は好ましくはそれぞれを含み得る。

【0135】

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、chr22.46374563.46374565、及びchr6.45773846.45773848を含み得る。これらの部位を表4に示す。

【0136】

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、chr22.46374563.46374565；chr6.45773846.45773848；chr5.61645225.61645227、及びchr3.70831746.70831748を含み得る。これらの部位を表5に示す。

【0137】

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、chr22.46374563.46374565；chr6.45773846.45773848；chr5.61645225.61645227；chr3.70831746.70831748；chr15.10856498.10856500；chr16.8886545.8886547；chr3.46843750.46843752；chr20.44942213.44942215、及びchr20.57347921.57347923を含み得る。これらの部位を表6に示す。

【0138】

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、chr22.46374563.46374565；chr6.45773846.45773848；chr5.61645225.61645227；

10

20

30

40

50

chr3. 70831746. 70831748; chr15. 10856498. 10856500; chr16. 8886545. 8886547; chr3. 46843750. 46843752; chr20. 44942213. 44942215; chr20. 57347921. 57347923; chr24. 21051024. 21051026; chr33. 26512711. 26512713; chr23. 37987526. 37987528; chr5. 32347978. 32347980; chr6. 60675998. 60676000; chr19. 44679975. 44679977; chr10. 7411293. 7411295; chr33. 26512692. 26512694; chr1. 121182146. 121182148、及びchr17. 62156690. 62156692を含み得る。これらの部位を表7に示す。

10

【0139】

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、chr22. 46374563. 46374565; chr6. 45773846. 45773848; chr5. 61645225. 61645227; chr3. 70831746. 70831748; chr15. 10856498. 10856500; chr16. 8886545. 8886547; chr3. 46843750. 46843752; chr20. 44942213. 44942215; chr20. 57347921. 57347923; chr24. 21051024. 21051026; chr33. 26512711. 26512713; chr23. 37987526. 37987528; chr5. 32347978. 32347980; chr6. 60675998. 60676000; chr19. 44679975. 44679977; chr10. 7411293. 7411295; chr33. 26512692. 26512694; chr1. 121182146. 121182148; chr17. 62156690. 62156692; chr35. 23853863. 23853865; chr17. 49222883. 49222885; chr14. 5949013. 5949015; chr5. 67427228. 67427230; chr20. 43366718. 43366720; chr24. 12518910. 12518912; chr29. 19479611. 19479613; chr4. 36180013. 36180015; chr35. 23852932. 23852934; chr1. 58324050. 58324052; chr9. 12522577. 12522579; chr5. 32711703. 32711705; chr33. 23473772. 23473774; chr2. 51831832. 51831834; chr20. 46098568. 46098570; chr11. 24476652. 24476654; chr1. 100289525. 100289527; chr17. 33851462. 33851464; chr6. 12827818. 12827820; chr20. 54301453. 54301455; chr1. 19541665. 19541667; chr5. 55848493. 55848495; chr10. 44524681. 44524683; chr9. 50976682. 50976684; chr33. 26512695. 26512697; chr24. 24968751. 24968753; chr10. 18237423. 18237425; chr35. 23853763. 23853765; chr9. 1046331. 1046333、及びchr20. 49940551. 49940553を含み得る。

20

30

40

【0140】

死亡リスク及び／又は健康寿命確率を示すDNAメチル化部位／DNAメチル化プロファイルの評価

本発明は、DNAメチル化プロファイルを利用して、イヌの死亡リスク及び／又は健康寿命確率を評価することを含む。したがって、本発明は、死亡リスク及び／又は健康寿命確率に関係する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」とも呼ばれ得る。

【0141】

50

死亡リスク及び／又は健康寿命確率を示す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。

【0142】

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、既知の死亡アウトカム（生存又は死亡）及び暦年齢のイヌを含むデータセットに対して訓練されてもよい。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死亡アウトカム及び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。

【0143】

例えば、死亡リスク及び／又は健康寿命確率を示す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、死亡アウトカム（生存又は死亡）及び暦年齢が既知であ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治療保留（with-held）コホートに対して検定することによって提供されてもよい。

【0144】

機械学習フレームワークは、罰則付きモデルを、死亡アウトカム（生存又は死亡）及び暦年齢（ならびに任意選択で品種及び／又は性別）が既知であるイヌの訓練データセットに対して当てはめることを含んでもよく、例えばglmnet Rパッケージを使用する。

【0145】

好適には、罰則付きモデルは、例えば、罰則付きCox回帰、LARS（Least Angle Regression path of solution）Cox回帰又は罰則付き生存モデルであり得る。

【0146】

機械学習フレームワークは、罰則付きCox回帰を、死亡アウトカム（生存又は死亡）及び暦年齢（ならびに任意選択で品種及び／又は性別）が既知であるイヌの訓練データセットに対して当てはめることを含んでもよく、例えばglmnet Rパッケージを使用する。

【0147】

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及び暦年齢（ならびに任意選択で品種及び／又は性別）によって説明される既知の死亡アウトカム（生存又は死亡）／生存の罰則付きモデル、好ましくは罰則付きCox回帰を当てはめることを含んでもよい。

【0148】

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、暦年齢、品種及び性別によって説明される既知の死亡アウトカム（生存又は死亡）／生存の罰則付きモデル、好ましくは罰則付きCox回帰を当てはめることを含んでもよい。

【0149】

本明細書で使用されるとき、「既知の死亡アウトカム（生存又は死亡）」は、「生存」とも称され得る。

【0150】

適切には、機械学習フレームワークを使用して、死亡リスク及び／又は健康寿命確率を示す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。

【0151】

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。

【0152】

10

20

30

40

50

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。

【0153】

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。

【0154】

イヌの生物学的年齢は、年、月、日などで表されてもよい。

【0155】

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。かかる方法は、例えば、訓練セット（例えば、イヌの状態（生存又は死亡）が既知である場合）に対する2つのゴンペルツ関数又はワイブル関数の計算を含み、その1つの関数は、メチル化プロファイル、暦年齢、品種クラス（小型犬又は中型犬）、及び性別の関数として生存をモデル化するものであり（モデル1）、またもう1つの関数は、暦年齢、品種クラス、及び性別のみを考慮する（モデル2）。これらのモデルは、Rソフトウェア環境において、`flexsurv package (v 2.1)` を使用して当てはめることができる。

【0156】

生物学的年齢は、モデル2によって与えられる動物の生存確率が、モデル1によって与えられるそれらの暦年齢での生存確率に等しい時間変数（「暦年齢」）として定義することができる。

【0157】

死亡リスク及び／又は健康寿命確率を示すDNAメチル化部位又はメチル化プロファイルのモデルは、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、DNAサンプル採取時の年齢で予測されるPhenoAgeに対して訓練し、モデルの正確さを検証するために治療保留コホートに対して検定することによって提供されてもよい。

【0158】

イヌ又はネコのPhenoAgeを評価する方法は、PCT/EP2023/061058及びPCT/EP2023/061059に、それぞれ記載されている。PhenoAgeの計算は、死亡リスク及び／又は健康寿命確率において、血液のバイオマーカーの直接的な予測値を考慮する。例として、所与のバイオマーカーが、暦年齢とは直接相関はせずに特定の病態を示すことがあり、ひいては死亡リスクの増加及び／又は健康寿命短縮（`reduced healthy lifespan`）確率の増加を示すことがある。

【0159】

イヌのPhenoAgeの評価は、イヌから得られた1つ以上のサンプルにおける1つ以上のバイオマーカーの値を測定するステップを含んでもよく、前記1つ以上のバイオマーカーは、白血球数、血清アルブミン、血清アルカリホスファターゼ、血清クレアチンキナーゼ、ヘモグロビン、ヘマトクリット、平均赤血球ヘモグロビン量、血清グルコース、平均赤血球容積、血清グロブリン、血清カルシウム、血小板数、及び／又は赤血球数から選択される。

【0160】

好適には、イヌのPhenoAgeは、

a. イヌから得られた1つ以上の試料における次のバイオマーカー、白血球数、血清アルブミン、血清アルカリホスファターゼ、血清クレアチンキナーゼ、ヘモグロビン、ヘマトクリット、平均赤血球ヘモグロビン量、血清グルコース、平均赤血球容積、及び血清グロブリンの値を測定するステップと、

b. 式(1)を使用してイヌの表現型年齢（PhenoAge）を評価するステップと、
によって提供されてもよく、

【数1】

10

20

30

40

50

$$Phenoage = \ln \left(\frac{\gamma_{breed} * e^{xb} * \{e^{\gamma_{age}} - 1\}}{e^{\{breed * \beta_{breed2}\} + \{sex * \beta_{sex2}\} + \beta_{02} * \gamma}} + 1 \right) * \frac{1}{\gamma_{breed}}$$

式中、 $x b$ は、式（２）に従って、各バイオマーカー、性別、及び品種の値にそれぞれの係数を乗じた値の合計であり、

【数２】

$$xb = \sum_{u=1}^p x_u \beta_u + \beta_0$$

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、

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、

表現型齢は、イヌの死亡リスク及び／又は健康寿命確率を評価するために使用される。

【０１６１】

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、上記の式で使用するための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。かかる方法は、例えば、訓練セット（例えば、イヌの状態（生存又は死亡）が既知である場合）に対する２つのゴンペルツ関数又はワイブル関数の計算を含み、１つ目の関数は、選択されたバイオマーカー、暦年齢、品種クラス（小型犬又は中型犬）、及び性別の関数として生存をモデル化するものであり（モデル１）、２つ目の関数は、暦年齢、品種クラス、及び性別のみを考慮する（モデル２）。これらのモデルは、Ｒソフトウェア環境において、`flexsurv`パッケージ（`v 2.1`）を使用して当てはめることができる。

【０１６２】

好適には、所与のバイオマーカーについての負の係数は、該バイオマーカーの値が高くなるほど死亡リスクの低下に対して正の効果を有すること、及び／又は該バイオマーカーの値が低くなるほど死亡リスクの低下に対して負の効果を有することを意味する。好適には、所与のバイオマーカーについての正の係数は、該バイオマーカーの値が高くなるほど死亡リスクの低下に対して負の効果を有すること、及び／又は該バイオマーカーの値が低くなるほど死亡リスクの低下に対して正の効果を有することを意味する。

【０１６３】

例示的な係数及び γ 及び γ_{breed} 値を以下の表に提供する。

10

20

30

40

50

【表 1】

	係数
γ	0.491790219
β_0	-6.036261473
β 白血球数	0.091862564
β ヘモグロビン	-0.009131623
β 平均赤血球容積	-0.007486146
β ヘマトクリット	-0.018418391
β 平均赤血球ヘモグロビン	-0.128195615
β 血清グルコース	0.009169677
β 血清グロブリン	0.132755858
β 血清クレアチンキナーゼ	0.332818902
β 血清アルブミン	-0.744060565
β 血清アルカリホスファターゼ	0.262594338
β 品種	1.138018960
β 性別	0.151826455
γ_{breed}	0.5668399
β_{02}	-9.5204440
$\beta_{\text{breed}2}$	1.2299804
$\beta_{\text{sex}2}$	0.2678798

10

20

【0164】

表現型齢は、モデル2によって与えられる動物の生存確率が、モデル1によって与えられるそれらの暦年齢での生存確率に等しい時間変数（「暦年齢」）として定義することができる。

【0165】

イヌの表現型齢（即ち、PhenoAge）は、年、月、日などで表されてもよい。

【0166】

PhenoAgeの評価のために使用されるバイオマーカーは、当該技術分野における標準的な方法を使用して測定することができ、典型的には、動物の疾患状態を評価するための標準的な血液検査の一部として計測される。例えば、バイオマーカーは一般に、標準的な臨床全血球計算（cbc）及び標準的な臨床血液化学分析の一部として測定される。

30

【0167】

好適には、PhenoAgeに対して訓練された死亡リスク及び／又は健康寿命確率を示すDNAメチル化部位のモデル又はDNAメチル化プロファイルは、2段階プロセスで提供され得る。

【0168】

第1のステップにおいて、機械学習フレームワークは、本明細書に記載される1種以上の血中バイオマーカーによって説明される表現型齢（PhenoAge）及び暦年齢（ならびに任意選択で性別及び／又は品種）の罰則付きモデルを当てはめることを含んでもよく、例えばglmnet Rパッケージを使用する。好ましくは、機械学習フレームワークは、本明細書に記載される1種以上の血中バイオマーカー、暦年齢、性別及び品種によって説明される表現型齢（PhenoAge）の罰則付きモデルを当てはめることを含んでもよい。

40

【0169】

好適には、罰則付きモデルは、例えば、罰則付きCox回帰、LARS（Least Angle Regression path of solution）Cox回帰又は罰則付き生存モデルであり得る。

【0170】

機械学習フレームワークは、本明細書に記載される1種以上の血中バイオマーカー、暦年齢、性別及び品種によって説明される表現型齢（PhenoAge）の罰則付きCox

50

回帰を当てはめることを含んでもよい。

【0171】

第2のステップにおいて、機械学習フレームワークは、DNAメチル化によって説明されるPhenoAgeの罰則付き回帰を当てはめることを含んでもよい。好適には、機械学習フレームワークは、DNAメチル化プロファイルによって説明されるフェノエイジの罰則付き回帰を当てはめることを含み得る。

【0172】

罰則付き回帰は、elastic net回帰であってもよい。

【0173】

用語「1つ以上のバイオマーカー」は、本明細書で使用する時、少なくとも1個、少なくとも2個、少なくとも3個、少なくとも4個、少なくとも5個、少なくとも6個、少なくとも7個、少なくとも8個、少なくとも9個、少なくとも10個、少なくとも11個、少なくとも12個、又は少なくとも13個のバイオマーカーを含み得る。

【0174】

本明細書で使用する「1つ以上のバイオマーカー」という用語は、1個、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個、11個、12個、又は13個のバイオマーカーを含み得る。

【0175】

適切には、死亡リスク及び／又は健康寿命確率を示すモデルを生成するために、DNAメチル化部位又はDNAメチル化プロファイルを、本明細書に記載の1つ以上の血液バイオマーカーの値と組み合わせてもよい。例えば、本明細書に記載されるDNAメチル化プロファイルと1つ以上の血液バイオマーカーの値との組み合わせを含むモデルは、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及び1つ以上の血液バイオマーカーの値を、死亡アウトカム（生存又は死亡）及び暦年齢が既知であるイヌの訓練データセットに対して訓練し、モデルの正確性を検証するために治療保留コホートに対して検定することによって提供されてもよい。

【0176】

機械学習フレームワークは、罰則付き回帰を、死亡アウトカム（生存又は死亡）及び暦年齢（ならびに任意選択で品種及び／又は性別）が既知であ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glmnet Rパッケージを使用して当てはめる。

【0177】

機械学習フレームワークは、罰則付きCox回帰を、死亡アウトカム（生存又は死亡）及び暦年齢（ならびに任意選択で品種及び／又は性別）が既知であ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glmnet Rパッケージを使用して当てはめる。

【0178】

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られたニューロン（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。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。

【0179】

10

20

30

40

50

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の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。

【0180】

イヌの生物学的年齢は、年、月、日などで表されてもよい。

【0181】

好ましくは、死亡リスク及び／又は健康寿命確率は、イヌの生物学的年齢と暦年齢との差として表される。

【0182】

基準又は対照との比較

本発明の方法は、さらに、検定サンプル中の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、所定の死亡リスク及び／又は健康寿命確率（すなわち、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、死亡リスク及び／又は健康寿命確率（すなわち、生物学的年齢）が既知である対象又は対象群について以前に得られた値である。参照値は、死亡率の状態（生存又は死亡）、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、平均値又は中央値のレベルに基づいてもよい。

【0183】

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、本発明の方法は、DNAメチル化プロファイルを、イヌの暦年齢、品種、及び／又は性別のうちの1つ以上と組み合わせることを更に含む。この情報を組み合わせることによって、死亡リスク及び／又は健康寿命確率に係る生物学的年齢を評価してもよい。

【0184】

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。閾値からの偏差の程度は、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。

【0185】

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。

【0186】

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、イヌの死亡リスク及び／又は健康寿命確率は、イヌの死亡リスクを低下させる及び／又は健康寿命確率を増加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。

【0187】

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

10

20

30

40

50

、又は治療の介入と称され得る。

【0188】

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。

【0189】

食事介入は、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ってもよい。

【0190】

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、 ω 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。

【0191】

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。

【0192】

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。

【0193】

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。

【0194】

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。

【0195】

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%未満のタンパク質（%乾物）を含んでもよい。

【0196】

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。

【0197】

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、

10

20

30

40

50

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。

【0198】

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。

【0199】

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選択又は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。好適には、死亡リスクの増加に起因して、及び／又は病気関連経路に関係することが知られている特定のバイオマーカーに基づいて、かかる障害のリスクがあると特定されたイヌに予防療法を行うこともできる。他の実施形態では、（死亡リスクの増加に起因する、及び／又は病気関連経路に関係することが知られている特定のバイオマーカーに基づいて）特定の状態のリスクがあると評価されたイヌは、できるだけ早く診断及び治療を開始できるように、より定期的に経過観察されてもよい。

【0200】

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。

【0201】

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。

【0202】

一態様では、本発明は、イヌの死亡リスクを低下させるため及び／又は健康寿命確率を増加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を評価するための方法であって、a) 本発明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死亡リスク及び／又は健康寿命確率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に、イヌの死亡リスクに変化があったか否かを評価するステップと、を含む、方法を提供する。

【0203】

さらなる態様では、本発明は、イヌの死亡リスクを低下させ、かつ／又は健康寿命確率を増加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を評価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のDNAメチル化プロファイルを使用

10

20

30

40

50

してイヌの死亡リスク及び／又は健康寿命確率を評価するステップと、b) ステップa) で評価された死亡リスク及び／又は健康寿命確率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死亡リスク及び／又は健康寿命確率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、イヌの死亡リスク及び／又は健康寿命確率に変化があったか否かを評価するステップと、を含む、方法を提供する。

【0204】

好適には、生活習慣計画、食事計画、又は治療の介入は、第1の死亡リスク及び／又は健康寿命確率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、イヌの死亡リスク及び／又は健康寿命確率を改善する（すなわち、死亡リスクを低下させ、及び／又は健康寿命確率を増加させる）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回以上死亡リスク及び／又は健康寿命確率を評価することによって経過観察されてもよい。

10

【0205】

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。

20

【0206】

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。

【0207】

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。

【0208】

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。

30

【0209】

食事介入の使用

一態様では、本発明は、イヌの死亡リスクの低下及び／又は健康寿命確率の増加において使用するための食事介入を提供し、食事介入は、本発明の方法によって死亡リスク及び／又は健康寿命確率を評価されたイヌに対して行われる。

【0210】

別の態様では、本発明は、イヌの死亡リスクを低下させるための、及び／又は健康寿命確率を増加させるための食事介入の使用を提供し、食事介入は、本発明の方法によって死亡リスク及び／又は健康寿命確率を評価されたイヌに対して行われる。

40

【0211】

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。

【0212】

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。

【0213】

50

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。

【0214】

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。

【0215】

一態様では、本発明は、本明細書に記載されるように、イヌの死亡リスク及び／又は健康寿命確率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。

10

【0216】

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種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。

【0217】

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

【0218】

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

【0219】

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。

【0220】

実施例1 エピジェネティックな生体時計を作製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

【0221】

捕捉プローブには、約40000個の標的（プロモーター領域－プロモーターの約1 kb上流及び0.5 kb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。

【0222】

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う：

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

50

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

`trimGalore`を使用してアダプターをトリミングする—`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/`

`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` 10

`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製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。 20

【0223】

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5カウント以上を有さない部位を除去するステップ

3) X染色体部位及び／又はY染色体部位を除去するステップ

【0224】

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： 30

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)） 40

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。

【0225】

生体時計の作製

イヌのコホートの死亡状態（生存又は死亡）、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、訓練セット及び検定セットに分割される（例えば、メタデータに関し良好なスプリットを確保する、訓練用の2／3のデータ及び検定用の1／3のデータ；例 50

えば、訓練セット及び検定セットにおける各品種／各性別の同様の割合）。

【0226】

メチル化部位、品種／品種クラス、性別及び暦年齢を予測因子として使用して、罰則付きCoxモデルを生存に当てはめる。モデルのパラメータならびに罰則パラメータは、R内のglmnetパッケージを使用して推定される。

【0227】

2つのゴンペルツ関数またはワイブル関数の計算を実行する。1つ目の関数はメチル化プロファイル、暦年齢、品種クラス（小型犬または中型犬）、および性別の関数として生存をモデル化する関数（モデル1）であり、2つ目の関数は暦年齢、品種クラス、および性別のみを考慮する関数（モデル2）である。かかるモデルを、Rソフトウェア環境において、flexsurv package (v2.1)を使用して当てはめる。

10

【0228】

死亡リスク及び／又は健康寿命確率は、モデル2によって与えられる動物の生存確率が、モデル1によって与えられるそれらの暦年齢での生存確率に等しい時間変数（「暦年齢」）として定義することができる。

【0229】

罰則パラメータは、死亡リスク及び／又は健康寿命確率に当てはま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。

【0230】

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。

20

【0231】

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.; Zoollinger et al.; Biostatistics, 19 (2), 153-168; (2018)); 標的ごとの部位 (TSSの周囲1500bp) 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. に記載されている定義)。

30

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) ;

40

6) phenoAge_pred (DNA採取時の年齢におけるPhenoAgeの予測値) を応答変数として使用して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261部位を選択する (表3参照)。

【0232】

時計は、評価の範囲を使用して検証した。図3は、カロリー制限における時計の検証を示し、カロリー制限を受けているイヌは、対照食のイヌと比較して、より低い生物学的年齢 (より低いデルタ) を有する。図3のデルタは、暦年齢と、予測されるphenoDNAmAgeとを比較する回帰モデルの残差に対応する。

50

【0233】

図4にはさらなる検証が示されており、2つの食餌の間にはデルタ（phenodNA mAge）の差があり、制限食を与えられたイヌは生物学的に6歳若い。

【0234】

図5は、線形混合効果モデル（ランダム効果としてDogID）を調整したときに、2つの食餌間に有意差があることを示す。

【0235】

図6は、生物学的に若いイヌと生物学的に高齢のイヌとの間の、生存における有意差を示す。

【0236】

図7は、性別及び Δ phenodNA mAge（chronologicalAgeと、予測されるphenodNA mAgeとを比較した残差）を使用してCox比例ハザードモデルを当てはめ、訓練セット上の品種クラス（小型又は中型）に層別化したときに、 Δ phenodNA mAgeの増加が死亡リスクの増加と有意に関係することを示す。

【0237】

図8は、生体時計が技術的反復間で高度に再現可能であることを示す。

【0238】

単変量解析を実施して、261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3参照）。

【0239】

表3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、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9～図13参照）。これらの生体時計は、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4～表7に示す。

【0240】

実施例2イヌにおける死亡リスクに関連する血液バイオマーカーの測定

予測的な血液バイオマーカーは、標準臨床全血球計算（cbc）及び標準臨床血液化学分析からなるバイオマーカーパネルから決定した。血清試料を、一晩絶食後に採取し、標準的な獣医学的臨床プラクティスにより計測した。

10

20

30

40

50

【表 2】
表 1 臨床全血球計算(cbc)及び臨床血液化学分析

パラメータ名	計測単位
ヘマトクリット	%
ヘモグロビン	g/dL
平均赤血球ヘモグロビン量	pg
平均赤血球ヘモグロビン濃度	g/dL
平均赤血球容積	fL
血小板	$10^3/\mu\text{L}$
赤血球	$10^3/\mu\text{L}$
白血球	$10^3/\mu\text{L}$
血清アルブミン+	g/dL
血清アルカリホスファターゼ*	U/L
血清ALT*	U/L
血清AST*	U/L
血清カルシウム	mg/dL
血清クロール	mmol/L
血清コレステロール	mg/dL
血清クレアチンキナーゼ*	IU/L
血清クレアチン、ヤッフエ法*	mg/dL
血清GGT*	g/dL
血清グロブリン	g/dL
血清グルコース	mg/dL
血清マグネシウム	mg/dL
血清リン	mg/dL
血清カリウム	mmol/L
血清ナトリウム	mmol/L
血清総ビリルビン*	mg/dL
血清総タンパク質	g/dL
血清トリグリセリド*	mg/dL
血清尿素窒素*	mg/dL

* 値は、自然対数を用いて対数変換した。

【0241】

本発明者らは、イヌの縦断研究を行い、これらのパラメータ、並びにイヌの状態（生存又は死亡）、性別及び品種についての情報を繰り返し計測した。本発明者らはまず、この品種の成犬の平均体重に基づいて、品種を小型又は中型（それぞれ、10kg未満又は10kg超）に分類した。次に、Rプログラミング言語を用いてデータを整理した。各イヌについて、本発明者らは、バイオマーカーを、左が開いており、右が閉じている時間間隔（即ち、 $(tstart, tstop]$ ）を使用して時間依存共変量として記録した。バイオマーカー情報は、この時間間隔の開始に相当し、事象（生存又は死亡）は、最後の $tstop$ 値として記録される。この目的のために、本発明者らは、R（v. 3.2-13）における生存パッケージの $tmerge$ 関数を使用した。次に、性別及び品種クラス（小型又は中型）を含む28個のバイオマーカーのそれぞれのデータに cox 比例ハザードモデルを当てはめた。次いで、多重比較（偽発見率（ fdr ）による）を考慮して、各パラメータの p 値を補正し、補正 fdr が0.05未満である特徴を選択した（図1）。

【0242】

この方法により、本発明者らは、イヌにおける生存確率を個々に予測する13個のバイオマーカーを特定した。

【0243】

白血球数（ $10^3/\mu\text{L}$ ）

血清アルブミン (g / d L)
 血清アルカリホスファターゼ (U / L、自然対数変換)
 血清クレアチンキナーゼ (IU / L、自然対数変換)
 ヘモグロビン (g / d L)
 ヘマトクリット (%)
 平均赤血球ヘモグロビン量 (pg)
 血清ナトリウム (mmol / L)
 平均赤血球容積 (fL)
 血清グロブリン (g / d L)
 血清カルシウム (mg / d L)
 血清血小板数 ($10^3 / \mu\text{L}$)
 赤血球数 ($10^3 / \mu\text{L}$)

10

【0244】

実施例3 死亡リスクを予測するためのマルチパラメータモデル

次に、本発明者らは、年齢とともに生じる多様な臓器機能不全をカバーする可能性がより高いものとして、複数のパラメータを同時に考慮する最良のモデルを構築した。しかしながら、互いに相関し得るいくつかの特徴を選択することは、バイアスを受ける。この問題を回避するために、`glmnet` package (v4.1-3) を使用する罰則付き回帰法を使用した。罰則付き `cox` 比例ハザードモデルの `LASSO` にデータを当てはめ、20分割交差検証を用い、罰則パラメータ λ の異なる値を比較した。このアプローチにより、以下に示す重要度順による、生存についての上位10個の最も予測的な血液バイオマーカーの選択が得られる。

20

【0245】

- ・白血球数 ($10^3 / \mu\text{L}$)
- ・血清アルブミン (g / d L)
- ・血清アルカリホスファターゼ (U / L、 $\ln$ 変換)
- ・血清クレアチンキナーゼ (IU / L、 $\ln$ 変換)
- ・ヘモグロビン (g / d L)
- ・ヘマトクリット (%)
- ・平均赤血球ヘモグロビン量 (pg)
- ・血清グルコース (mg / d L)
- ・平均赤血球容積 (fL)
- ・血清グロブリン (g / d L)

30

【0246】

本発明者らはまた、このリストの最初の3つのバイオマーカーが最も予測的であること、並びにその次の7つのバイオマーカーのそれぞれを組み込むことによって性能を向上させることができることを見出した。

【0247】

動物の表現型年齢を抽出するために、本発明者らは、本発明者らの訓練セットに対して2つの異なるゴンペルツ関数、即ち、選択されたバイオマーカー、年齢、品種クラス（小型犬又は中型犬）、及び性別の関数として生存をモデル化する1つめの関数（モデル1）と、年齢、品種クラス、及び性別のみを考慮する2つめの関数（モデル2）とを計算した。これらのモデルは、`flexsurv` package (v2.1) を用いて当てはめた。表現型年齢は、モデル2によって与えられる動物の生存確率が、モデル1によって与えられるそれらの暦年齢での生存確率に等しい時間変数（「年齢 (age)」）として定義した。これにより、血中バイオマーカーを `phenoage` に関連付ける数学的関数が得られ、以下の式によって与えられる。

40

【数3】

$$\text{Phenoage} = \ln \left(\frac{\gamma_{\text{breed}} * e^{x^b * \{e^{\gamma * \text{age}} - 1\}}}{e^{\{\text{breed} * \beta_{\text{breed}2}\} + \{\text{sex} * \beta_{\text{sex}2}\} + \beta_{02} * \gamma}} + 1 \right) * \frac{1}{\gamma_{\text{breed}}}$$

50

式中、 x は、各バイオマーカー、性別、及び品種の値にそれぞれの係数を乗じた合計である。性別及び品種は、メスを 0 とし、オスを 1 とし、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る。係数は、本発明者らの訓練セットで訓練された 2 つのゴンペルツ関数によって与えられる。

【0248】

一例として、係数、並びに γ 及び γ_{breed} 値は、バイオマーカーの完全なリストについての本発明者らの訓練セットから計測されたものであり、表 2 に示す。

【数 4】

$$xb = \sum_{u=1}^p x_u \beta_u + \beta_0$$

10

【表 3】

表 2 訓練セットから計測された係数及び γ 及び γ_{breed} 値

	係数
γ	0.491790219
β_0	-6.036261473
β 白血球数	0.091862564
β ヘモグロビン	-0.009131623
β 平均赤血球容積	-0.007486146
β ヘマトクリット	-0.018418391
β 平均赤血球ヘモグロビン	-0.128195615
β 血清グルコース	0.009169677
β 血清グロブリン	0.132755858
β 血清クレアチンキナーゼ	0.332818902
β 血清アルブミン	-0.744060565
β 血清アルカリホスファターゼ	0.262594338
β 品種	1.138018960
β 性別	0.151826455
γ_{breed}	0.5668399
β_{02}	-9.5204440
$\beta_{\text{breed}2}$	1.2299804
$\beta_{\text{sex}2}$	0.2678798

20

30

【0249】

更に、リストの一番上から開始して、系統的に 1 つのバイオマーカーを除去して 10 個のバイオマーカーのセットを減じることによって、本発明者らは、生存予測（p 値）の強度の減少を観察した。低下は第 1 のパラメータで最も顕著であり、寄与が最大であることを確認したが、本発明者らは、セットのそれぞれを減じることによる予測精度（quality of prediction）の変化を観察し、それぞれのパラメータが全体予測に寄与することを示した（図 2）。

【0250】

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。

40

50

【表 4】

表 3

部位	係数	単変量解析 (p 値)	配列	配列番号:
切片項 (Intercept)	12. 32478528	NA	NA	
chr1: 3844418 - 3844420	$-1 < x < 0$	2. 98E - 26	GCCTGGGGCAGCAGGACCGGGGCTCGGGCCCTCCCAGT	1
chr1: 19541665 - 19541667	$0 < x < 1$	3. 01E - 24	TGGGCATTTCTG GGTGCCGTGGCCACACCGGGATCCCCGACTTGCTGCAAAA	2
chr1: 22213697 - 22213699	$0 < x < 1$	1. 15E - 65	GACCCCTCGTTA TGACCCGAGGGAGCCGCGCACCCCGGGCGCGGACGTTCA	3
chr1: 108982935 - 108982937	$-1 < x < 0$	5. 96E - 55	CCTCCGGGGCGC CTGAAGTCACTCAGGGCTAGAGGGGCGGGGCAATCCCCCT	4
chr1: 112673186 - 112673188	$-1 < x < 0$	0. 000323576	CCCTTCCTTCAACCTCATCTAACTCGAAGCAGCCGAGGG	5
chr1: 121182146 - 121182148	> 1	2. 29E - 14	GGGATCTTCTGG CTGGCCCGGAAGGCGCAGGGCATCTCGATGTCGTCTCCCT	6
chr1: 58324050 - 58324052	$0 < x < 1$	1. 82E - 36	CCGGACTGTCA CTGCCGAGGGCCGGGGAAGGCCCTCCGGACTCCTCGAAA	7
chr1: 97456109 - 97456111	$0 < x < 1$	3. 39E - 13	GCATCTCGACCG AAGTACAACCGCTTCAGGAATGACTCGGTGACATCGGTGC	8
chr1: 98084469 - 98084471	$-1 < x < 0$	1. 04E - 37	ACGACCTTCTGC ACTTGTGTTTTTTGTCAACATCCTTCGATGATATGCACCTCC	9
chr1: 98433022 - 98433024	$0 < x < 1$	7. 27E - 19	TTAGAATCAC GCGCAGAAAGCAGGCCCTGGTGTGCGGGCGCGGGCGGC	10
chr1: 100289525 - 100289527	$0 < x < 1$	2. 33E - 47	CGGGCGGGCGTCC TTCACAGACCCGCACACTGAGGCTCGCGGGGCTGCGACCTA	11
chr1: 107216628 - 107216630	$-1 < x < 0$	1. 54E - 24	CTCAGGCCCTTC AACCTGATGAATGAGGCCAGACGCGCGGAAGAACGGCAGA	12
chr10: 801511 - 801513	$0 < x < 1$	1. 39E - 49	AATAATGCAGG GGCCGCGCCAGGACGATGGAGTTGCCGGAGAGAGAGGGG	13
chr10: 7411293 - 7411295	> 1	1. 96E - 58	AGCGCGCCTCTC CAGCACCGGGCATCTTGACAGCAACCGGAGAGCGGAGGCG	14
chr10: 18237423 - 18237425	$0 < x < 1$	1. 50E - 12	TGTTTCTCCTGGT CCGGGCGCGGTGCGGGAACCGCCTCCGCGAGAGCCCTCCA	15
			GGCCCTACACGGC	

10

20

30

40

50

(表3の続き)

染色体	係数	単変量解析(p値)	配列	配列番号:
chr10:19851621-19851623	$-1 < x < 0$	4. 61E-13	AGTGGAGGGCTGGAGACTGGCAGCGCTTGGTTCTCAGG GGCCATGCCCT	16
chr10:44524681-44524683	$-1 < x < 0$	1. 40E-16	CAAAGACGAGACGATCCCATTCAGCGCTTCTGGGTACTG TGCTTTGAGGAT	17
chr10:40787376-40787378	$-1 < x < 0$	4. 45E-53	CATCTTGTGACCAAGACTGACCCCTGGAGCCCTAAACCCC CGAGCGGGGCC	18
chr10:49526790-49526792	$0 < x < 1$	1. 95E-16	GCCTCATCTCCTCTCCAGACAGCGCGGGCTCGGGGCG GGCGGGGCTCGG	19
chr10:62719946-62719948	$0 < x < 1$	2. 78E-62	CTACGAGGGTCTTTAOCATTCCACGCCTGAGAAGAGGC CATGACGATCCA	20
chr11:19910066-19910068	$0 < x < 1$	1. 00E-44	CCGCTCGGCCCGCCCGGAGCCCGCGGAGCCCCCGGCG GGTCCGCGCCAGC	21
chr11:33523800-33523802	$0 < x < 1$	7. 25E-40	TGTAAGAGGGCTTGGAGTGCTCTCGGCCAAGCGCTACC AGCACCGCAAAA	22
chr11:24476652-24476654	$-1 < x < 0$	2. 19E-11	ACTGTTCCAGGGGTACAAATCCACGCCAACATCCAAAAT AATGGCAAATA	23
chr11:49947821-49947823	$-1 < x < 0$	2. 35E-06	GTGGATTCAGGATTATACCCCTACCCGACCCAGACTGTG AGTGCGGGAGA	24
chr11:49987374-49987376	$-1 < x < 0$	1. 06E-11	CAGCAACCGACAGTGAAGTGAGCCCGGGTGAATCTCTGG GCAAGCCGGAGT	25
chr11:50642620-50642622	$-1 < x < 0$	4. 31E-36	TAGGAGAAAGCCCTGGGTGCGTCCCGGCCCTTCCCGCTCAC CCTGCGCGCTGG	26
chr11:51974516-51974518	$0 < x < 1$	4. 46E-20	CACGTTCAATTGACAAAACGCGCGGGGCGAAGGCCTAGTGGA GCGCGGTGGGG	27
chr11:53577274-53577276	$0 < x < 1$	9. 73E-30	GGCAGCCCGCGAGCGGGGTCCCGCGGAGGCCGCGGGG CGCGCGCGGGCG	28
chr11:53577353-53577355	$0 < x < 1$	5. 21E-23	GCGGAAAGCCGCCCTACAGCTACATCGCGCTCATCGCCAT GGCCATCGGCA	29
chr11:53576970-53576972	$0 < x < 1$	3. 53E-60	GTCCGGCAGCAGCGCGCACCGGGCCCGGCCCGCGCTCC GGGACGCGAGCGG	30
chr11:66137549-66137551	$-1 < x < 0$	2. 47E-29	AAGACATTTTGCTGAGTAGAGTTCTCGGCAGTAACCTAGCT GGGTTTTTTGT	31

10

20

30

40

50

(表3の続き)

部位	係数	単変量解析 (p値)	配列	配列番号:
chr11:66814981-66814983	$0 < x < 1$	1. 79E-16	CGGGTTCCCCCCCCACCGGGCTGGGGCGCCCTCCTGGCGG CCTTGGGTGCTCT	32
chr12:10418644-10418646	$-1 < x < 0$	5. 33E-36	CCCCAAAATATCTCCTCTCTCTGGTCCGGAATCCCTCCAA CCCTCCGAG	33
chr12:11605135-11605137	$-1 < x < 0$	9. 20E-10	TTATCTATTACTTATGCTTGGCTTACGATTGGTGCTATCAGT TACTATTGAA	34
chr12:14294419-14294421	$-1 < x < 0$	1. 16E-98	GTAGCCAGCCTGGTGAGGGGCGGCGGAGCCAAAGGACC CGTGGCTCCCTCA	35
chr12:48113683-48113685	$-1 < x < 0$	2. 04E-20	ACATTCTCAGTGGAGACTTTCAGGTGCCACCACTGCTGG GTGCTTTAAGC	36
chr13:10113845-10113847	$-1 < x < 0$	3. 57E-41	CGGGGCACTCCCTGGACAACAGGACGCGCTGGCCCCAA CGTTAGCGCAAT	37
chr13:27910113-27910115	$0 < x < 1$	4. 23E-18	GGGAAGACTTTGGTGCCCCCGGTGCCGTGCGCCCTCTCCG CGGGCCCCAGCG	38
chr13:36969021-36969023	$0 < x < 1$	2. 13E-11	CAACAGCCAATGAGAAGCAGGCCCTCGGCGGCGCGGCC CCAGGAGATGGT	39
chr13:37474592-37474594	$-1 < x < 0$	3. 38E-35	TTCCCGGCTCCCGAACCAAGGTGGCCGAGCCAGGCCTCTG CCTCCGGGGTC	40
chr13:37665667-37665669	$-1 < x < 0$	1. 92E-25	CCCTGGTGGGGGCCCTTAGGCAAAAACGGGTAGCCGCAAGC AGGACGACGG	41
chr13:37877786-37877788	$0 < x < 1$	2. 89E-40	AGCTCGACCTGCTGGCCTCCCCCGGAGCCACCCGTGA TGCTTCCTCT	42
chr13:37877759-37877761	$0 < x < 1$	2. 10E-28	TGCAGCGGCCCTCCTGGGGCAGGGCGAGCTCGCACCTG CTGGCTCCCCGC	43
chr13:37906098-37906100	$0 < x < 1$	4. 78E-48	TGACGCTCCCGCGGCGGGCTCCCCCGCGAGCCCCACGG CGCTCCGGCCCCA	44
chr14:345761-345763	$-1 < x < 0$	2. 19E-05	GGGGCGACCCCTGGACTGTGGCTGGCGTCTGCTGTGAGGT GGCCTGTGGGT	45
chr14:368735-368737	$-1 < x < 0$	2. 43E-08	GTGAGACCCAGCAGCCCCCTGCCACCCGTTTGACCCCCCA CGTGGGAGCTGC	46
chr14:5949013-5949015	> 1	1. 78E-30	AAGTTTCTCGGACTCCGCCGGACACCGCGCTGGCGGAGGA CCAGCGGGGCGCG	47

10

20

30

40

50

(表3の続き)

部位	係数	単変量解析 (p値)	配列	配列番号:
chr14: 5949450-5949452	$0 < x < 1$	4. 24E-65	CCGGCGGTGCCAGCATGTCGGCGCGCGGTGGCGTGCCTGGA	48
			CTACTTCGCCGC	
chr14: 26285429-26285431	$0 < x < 1$	2. 51E-11	TCGGTGTTGTGATTATCTGTAAGCGCGGCTTCTGAATT	49
			ACTTTATGTGG	
chr14: 39846247-39846249	$0 < x < 1$	2. 23E-34	TGTTCCAGGCGCTCCGCGGGCCGCGGACTTCACTCCCT	50
			TGCGAATTAC	
chr14: 39735273-39735275	$-1 < x < 0$	1. 58E-08	TGGTAGCTGGGCCCCCGCCCTGGGCGCGCTCTCCGCGGC	51
			CGGGCGCGCTGT	
chr14: 58424689-58424691	$-1 < x < 0$	1. 92E-61	TTCTAGGACTACGTCTGTGCACCTCGTGTGGCAATAAAA	52
			CTATGCTAACA	
chr15: 2611795-2611797	$0 < x < 1$	3. 97E-27	CCTCTAGACCCCAACCTTCGAGGTCGGTCTCAGGTCGGG	53
			TCTCAGTCTCG	
chr15: 7297280-7297282	$0 < x < 1$	2. 78E-64	AATAACTGCTCAAGTCCCTGGGCTCCGAGGCAGCCTGCCT	54
			CCCCACAGCCC	
chr15: 10856498-10856500	> 1	7. 98E-14	CCCGAGCGGGCCGGCTCGGGTTTCCGACGGAGGGCCGG	55
			GCTGCGCGCGCTC	
chr15: 10856620-10856622	$0 < x < 1$	1. 84E-40	GGCAGCGGGAGGGCGTGCAGCGCGCGGCGAGGAGGACC	56
			CGCGCCAGCAGGT	
chr15: 18190829-18190831	$0 < x < 1$	0. 019356242	CACCGCTGAGCTTCCCGCCGCCCTGCGCAGCGCAGCCCTC	57
			TCGCCGCTTATA	
chr15: 20380665-20380667	$-1 < x < 0$	1. 19E-06	AGTTTCTTTTGGGAAGATGAACCCCGACGGAGGCAGCTG	58
			CGCGGGGTGTGT	
chr15: 51319029-51319031	$-1 < x < 0$	1. 01E-30	GAGTTTCTGTGCACGAGGTCACTCCTCGGTCAAGTATTATC	59
			CCACCCGTCTC	
chr15: 51319050-51319052	$-1 < x < 0$	1. 03E-19	TCCTCGGTCAAGTATTATTCACCGCGTCTCCCTTCTCTCC	60
			ATGCATCTTG	
chr16: 8886545-8886547	> 1	8. 35E-87	GGCGGGCTCCCGGTGCGCGCACGGCCGCGCGCCGACCTCT	61
			CCGCGCGGGCTCC	
chr16: 15770977-15770979	$0 < x < 1$	1. 59E-51	GGTCCGTGCGCCCGCGCCCGCGCCCGCCCTGGGCCCA	62
			GCGCGCGCGCCCT	
chr17: 33851462-33851464	$0 < x < 1$	5. 12E-101	ACAGCAGGATGAAGCCGAAAGCCTCCGAGTGCCGGTGGAA	63
			GAAGTACTCGTT	
chr17: 34115428-34115430	$-1 < x < 0$	6. 79E-40	TCCTGGGCGCGCGCTGGCCCTCGGGCCTCGCTGAAA	64
			GCCCCCTGTTCC	

10

20

30

40

50

(表3の続き)

部位	係数	単変量解析 (p値)	配列	配列番号:
chr17:39172251-39172253	$0 < x < 1$	0. 004509682	TCCTCAAGCGGCTCGGGCCTGGCGGCGGAGACTCCCTC GTGTGTTTCCTC	65
chr17:48274513-48274515	$0 < x < 1$	1. 48E-38	ATGCTACTGCAGGGCACTGGCTGCTTCGGCGTGGCCTGTG CGGTAGTGTCTC	66
chr17:48369176-48369178	$-1 < x < 0$	5. 43E-12	AAAAAGCCAAATGCCATTACGTACGTTTGTGTTAATTA CACTCCCATCG	67
chr17:48538075-48538077	$0 < x < 1$	1. 58E-35	AGATGCTCAGCCGAACGTCCTCGGCGCCCCCGGGAGCC GGGGCGCCCCC	68
chr17:49222883-49222885	> 1	1. 31E-26	GAAGCAGGAGCGCCCTCCGAGGCGGTCCTCGGCGAGC AAGGCGCTCGG	69
chr17:58961294-58961296	$0 < x < 1$	2. 10E-19	AAATATGCACCTCAGCGAGTGTACCGCTAATGAAGCCTTC ATCTGCCATGA	70
chr17:60022289-60022291	$-1 < x < 0$	1. 02E-57	ACAATCCTTTTAAGGCAACGTGTCCCGCCTCTCTAAGCAT ATAAGTGCAAC	71
chr17:60438944-60438946	$-1 < x < 0$	2. 77E-33	AACTGTGTTTCTAGTGAATGCATCGCGTTTCCCTCCTCCTC CCATTATTTT	72
chr17:62156690-62156692	> 1	0. 086414775	CGGCAGAGGAGCTGGGCTTGGGTGCCGGTGACCTTGGGA AGTAGCGTTTC	73
chr18:5425112-5425114	$0 < x < 1$	5. 52E-53	CAGACGCGAGCGAGGCCGGTGGAGCGGGGTGGCTGGGT TGSACGGGACGGG	74
chr18:31999739-31999741	$0 < x < 1$	1. 62E-17	GGTGCCTGTCGGCGAAGCGGGCCAGCCGGTTGGAGCTGCG CCCGCAGCCGCCG	75
chr18:38129770-38129772	$-1 < x < 0$	3. 08E-63	GGGGAAGCTTGGTCTGATAAAGCCGCGAGAGCCCAAAC TGTGCTCCAGGG	76
chr18:44686312-44686314	$-1 < x < 0$	1. 01E-30	GAAGGCGAGCAGCGCCGGGCCCTGCCGGGCGAGCCAGGCA GGCCCGAGGCCCC	77
chr18:45473750-45473752	$-1 < x < 0$	0. 008692376	GGGACCGGGTGCAGACACCTCTCCCGCCTCCGCTTGGCC ACTCCAGGCTTG	78
chr18:47074292-47074294	$0 < x < 1$	3. 88E-20	GGAGCCGAGGCGAGGGGCGGGGACGCGTTGTCTCCTTT ATTGCTTTATAA	79
chr18:46990963-46990965	$0 < x < 1$	3. 35E-38	GGCGCATCGGGCGGGCGGGCGGGCTACGAGCACC TCGGCGGGGCGGCC	80

10

20

30

40

50

(表3の続き)

部位	係数	単変量解析 (p値)	配列	配列番号:
chr18:44679236-44679238	$-1 < x < 0$	7. 48E-29	TCCGGGAAGTCCTGCTCAACTAGCCCGGCTGGCGGCCCGG TGTCACCCGCTG	81
chr18:44686394-44686396	$-1 < x < 0$	1. 73E-66	GTGCCACCATCCCCGGGTTGAAGGACGGGTTCCGAGTGAG CCAGGAACCAAC	82
chr18:48681702-48681704	$-1 < x < 0$	9. 82E-09	GGATCCGTCATTGACCCCTTGAGAACGGAAGATTCTGGGG GCTCAAAAGAGT	83
chr18:50257730-50257732	$-1 < x < 0$	1. 96E-27	CCTTCGAGCTGCACGCCCCCTCCTCCCGGCTGTAGCCTGG GAAGGGGGCCAG	84
chr18:50259206-50259208	$-1 < x < 0$	2. 83E-46	CCAACATGACGCTCATCGGAGAGAAAGGCCACAGCACCGA CACGCTCACGGG	85
chr18:51374197-51374199	$0 < x < 1$	6. 02E-85	CCCACAGCCCTCGCGTCCCGGAGCGCGCACGCCCGCA GCGGTGCAAACTG	86
chr19:44679975-44679977	> 1	2. 92E-14	GCCCATCGCTGCGGCCCTCGGTCTCCGGGGAGAGGGAAA GTAATCCGGAGC	87
chr2:25678434-25678436	$-1 < x < 0$	0. 818276235	GGGAAGGTGGGTGGAGTTGCCAGAGCGCGGAGGCCCGG GGCGCACGGTCCT	88
chr2:32494387-32494389	> 1	0. 049615576	TTGGAAGCTGGGGGGCGGAGATCCCGCGCCGCCCGGCC GGCTCGGGGCGG	89
chr2:31655107-31655109	$-1 < x < 0$	4. 80E-39	CTGCACAGCCCTGCTCCGCCCTCGCGGCCCTGCACGGTG CTGCTGGTGCT	90
chr2:51831832-51831834	$0 < x < 1$	2. 84E-32	TCCGGCCGCTGACCCCTCCTGGGTGCCGCCCTGCTCTTGCT GCTGCCCTGCT	91
chr2:64665545-64665547	$-1 < x < 0$	4. 33E-08	GTTCAAGTAAGCCTAAAGAGTAGGCGTTATCTCCGTTTAT GGTGAACCTGG	92
chr2:72450823-72450825	$0 < x < 1$	3. 75E-51	GCCTGTCCGAACGCAGCCTGGCCATCGCGCGCGGGCGCG GCAAGGGCCCGGC	93
chr20:905463-905465	$-1 < x < 0$	0. 259671131	CTGCAGGGCATCCCGGTGAGCGGGCCCGCGCCCGCGCGCG ACGAGCGAGCGCG	94
chr20:3395529-3395531	$-1 < x < 0$	1. 93E-16	AAAAGCCAGGGGAGAGGGGAGGCGCCGGCTCCACAGGC CACGTAAAGTCCC	95
chr20:3833805-3833807	$-1 < x < 0$	7. 58E-41	AGTAAGGAGCTGCTCTCATGACTGTCGTTGCTGTGCTAAG TGGCCCTTTTC	96

10

20

30

40

50

(表3の続き)

部位	係数	単変量検定 (p値)	配列	配列番号
chr20:32463049-32463051	$-1 < x < 0$	3. 95E-24	TTTACTATTTGTATTTCATTAAAGCTCGGAGCATGTATTGAGT GCCTACTGTG	97
chr20:37906191-37906193	$0 < x < 1$	1. 04E-24	GCCGGGGCGCGCAGGGTTCCAGCTCTCGCTCAGTGGCTTGC TCCTCGCTCAG	98
chr20:40194554-40194556	$-1 < x < 0$	2. 50E-11	CTGTAGTAGCTGCTCTGCCAGGGCCTCGGAGTCAGCCCTGAA TGTACCCCTT	99
chr20:43366718-43366720	$0 < x < 1$	0. 013883014	GCCGGCATCGCGCGCGGCTGGAGGTGCGGGGGGAACCTCG CGCGGGCTCGGG	100
chr20:44942213-44942215	> 1	6. 74E-26	GGCAGGGCGCCAGCGCGCGGCCCGCTGAAGAACTCC TCGGCGCTGCGCT	101
chr20:46098568-46098570	$0 < x < 1$	5. 41E-54	TCGGTGCCGCGCGCTCGGGCTCTGCGCGCGGCCAGCGCT GCGGGTGACAGA	102
chr20:49086890-49086892	$-1 < x < 0$	1. 65E-84	CTGGCACACACAGCCACACGACCCACGCGTTGACAGGCACAC GGGCCACCGTC	103
chr20:49844561-49844563	$-1 < x < 0$	3. 24E-27	TGAAATTTTCGAGTCTCGGAGACGGCGTGGATGCTGGGG TCCTGAAAGCCT	104
chr20:49940551-49940553	$-1 < x < 0$	9. 74E-50	ACCTGCCCATGGGGGATAATAATAACGTTAATGAAACCCCTT GCAGAGTACTC	105
chr20:49972926-49972928	$-1 < x < 0$	4. 55E-08	CAGCACCGTCCTCACTTAATCCTCACGCGACCCCTACGT AGTACTATTAT	106
chr20:54301453-54301455	$0 < x < 1$	7. 23E-89	ACCACGCCCCGGGGCCGAGCGTCGCGGGGGTCGGACGC CGAGCAGTGCCG	107
chr20:53921003-53921005	$-1 < x < 0$	1. 50E-09	CCCTCAGGAACCTCCTCCAGGTCCAGCGTCCCGCTGCCATC ACGGTCCCAGCG	108
chr20:57347921-57347923	$-1 < x < 0$	1. 02E-54	ACCAGCGCCCGCAGCCCGTGACCTTCGGGGCCTGTTCCCTGC GGCTCTGGGGCG	109
chr20:57621119-57621121	$-1 < x < 0$	8. 85E-13	AGGCGAGACACCCCTGCACGTGCGCGCCGCGGGCGGGTG CCAAAGTCCTGGG	110
chr21:31923268-31923270	$0 < x < 1$	4. 88E-17	GGCGGAGGGCCGGCTGGAAACCTGCGGGTCAGCTAGGG CTGCGGAAGGCGA	111
chr21:43490796-43490798	$0 < x < 1$	1. 07E-75	ACGCGCTGGCCCGCGCTGCCCGCCGCGCTCGGGGAGAGCA TCCTGCCGCTGC	112

10

20

30

40

50

(表3の続き)

染色体	係数	単変量解析 (p値)	配列	配列番号:
chr22: 46374563-46374565	>1	9. 37E-07	TTGGACGGGAGGCGCTCCGGGGCCGAGCAACGAGCAG CACAGCACGGTGG	113
chr23: 4004092-4004094	0<x<1	2. 33E-19	TTAGGTGTACCCGCCGCCGCTCCGGCGGAGCCGTCGTGC AATGCTATCCGA	114
chr23: 29966538-29966540	-1<x<0	2. 55E-29	AGGGGAGGTGACATGGGAATTAAACGCCCTTTCCCTCAG CCAGTGCCAAAT	115
chr23: 31144202-31144204	-1<x<0	7. 13E-08	GAACCCCACTGCTCTCAGCGCCAGCGGCCACCCCTTGAAT TGCCCTGTTATT	116
chr23: 31144337-31144339	-1<x<0	1. 68E-29	GAGCCACCGAACTACTTGAATCACCCGCGGCGAGGGCGCTC TGTCACCAATT	117
chr23: 37987526-37987528	-1<x<0	0. 102124346	CGGGGCGGGAATCCGCCCGCCCGCTCGCCCCCGGCGCCT AGACCCGGGGCGC	118
chr23: 50123623-50123625	0<x<1	2. 15E-99	CCAGAAACTACGGCAAACTCGGCCCGGGTCCGCGCTGGA AGGGGAGTCCG	119
chr24: 12518910-12518912	0<x<1	9. 79E-97	CTCTCCTCGGAGATCCATGCTCGCCGTGCAGCGAAGGAG GCCAGATGTGCT	120
chr24: 17354043-17354045	-1<x<0	5. 21E-41	TGGGTAGGTGAGAGCAGGGCAGGGGCGGCCAAGTTCGGGCT GCCAGACTGCT	121
chr24: 21051024-21051026	>1	1. 16E-98	ACGTTGCTCTTCGTGCTCCTGCCCTCGTGGTCTGTCAGCT GCTCAGCTTC	122
chr24: 24968751-24968753	-1<x<0	9. 40E-88	GTCTCTGGCGAGGGGAAGTTACAGACGCCAAGCCCGAGAGT CTGGGGTGCCCA	123
chr24: 43790837-43790839	0<x<1	2. 77E-39	CGCCGGGCCCAAGAGCCGCCGCTCAGCACCGCGCGCTCG CGTAGCGCTCCG	124
chr24: 45869679-45869681	0<x<1	1. 98E-82	AACAAAGCGACGTCGCGCCGCGCACGGGTCCTCAACACT GCTTTTGTGTT	125
chr24: 46167206-46167208	-1<x<0	4. 99E-21	CTAATGGTGACCCGATGGCGGTGGCCGCCCGGGGGTGCAT CCGTACAGTCAT	126
chr25: 16764068-16764070	-1<x<0	6. 84E-40	CGCTCGAGCATCTACTCTACTGCGGCGAATTATCCACAT TTCCCTCTGCAT	127
chr25: 18016409-18016411	0<x<1	1. 39E-49	AGAGCCAGGCGCGGCCCGCGGAGGCCGGGTGCACGTGCA CACGAGGGGGCGC	128

10

20

30

40

50

(表3の続き)

部位	係数	単変量解析 (p値)	配列	配列番号:
chr25: 47511184-47511186	$0 < x < 1$	4. 90E-64	CCGGACCCGGGAACGACGGCGCGCGCCGACCCCTCAGTCCC GGCCCGCGTGCGAT	129
chr26: 1578502-1578504	$-1 < x < 0$	7. 75E-09	TCCGATGCTCCCCCGCCAGCACCCCTCGAGCTCAGAGTGAA TGTCAGAAAGG	130
chr26: 5490242-5490244	$-1 < x < 0$	1. 62E-87	TCCCAGCGTTTCAGCTCCTGAGTGTGGGCTGGAAGCCCGC CAGGGTTACCAT	131
chr26: 6348316-6348318	$-1 < x < 0$	2. 12E-06	GGAGGTGCAGACGCTTGCCGAAGGGCGCACAACTAGAAAG CGATGGGATCAA	132
chr26: 6353216-6353218	$-1 < x < 0$	2. 32E-10	ATCCAAACTAGCTGGCACAGCTACCGACTAAATGGATCA GAGGATGAACCT	133
chr26: 9207175-9207177	$-1 < x < 0$	1. 03E-07	CCCGGCAGTACTGGCTCTTCGCCCGGAGCACCCGACCCA CGCGCGCTGCG	134
chr26: 10691576-10691578	$-1 < x < 0$	1. 57E-17	TGATTAACCTCCATAAATGTATATACGGGATAGAAGGACCT GCCCTGCTCC	135
chr26: 16852803-16852805	$-1 < x < 0$	7. 42E-21	CGGTGGGGCTGCAGCCACTGAGCCACGAAGGAGTCCAGCT TGAGGCGAGGGG	136
chr26: 22918623-22918625	$-1 < x < 0$	3. 70E-22	TAATTCCATTCTGGTTGTAGAATTGCTCTGCAGGCTATTGT GGATAGGATA	137
chr26: 30413129-30413131	$-1 < x < 0$	5. 47E-11	AGAGGCCAGGTGGCTGACTGGTTGACGCCAGGGCAGCAG AGCCCTCCTGT	138
chr27: 1856425-1856427	$0 < x < 1$	1. 16E-19	CTCAGAGGCACGGTCTGAGGCCACCCGGTTGCTAAGGCTT CAGCGGTTACGC	139
chr27: 9830220-9830222	$-1 < x < 0$	0. 000162475	TTGGAGTCTGGCCCTTCCTAGAACTCGGTTCAAATGCTTTT GCTCCTGGGAG	140
chr27: 28156834-28156836	$0 < x < 1$	9. 27E-45	GAAGTCGTTGCTGAAGATGCTCCAGCGGAGCGGGCGCCG GGCCGCACGTGC	141
chr27: 29250528-29250530	$0 < x < 1$	4. 00E-55	AGGGACCCCGCGCGCGCGCTGCGCGGCTTACCGGCGC AGCTCGTCGGGCT	142
chr27: 29307058-29307060	$-1 < x < 0$	1. 72E-26	CTCGCCCTTCTGTCTCCGCACTGGCGTCCCCCCAGGCAC AACATGCAACTC	143
chr27: 29307097-29307099	$-1 < x < 0$	2. 72E-25	CAACATGCAACTCGGGGTTGTTCTGCGGATGTGTTAAGGC CAATGTAATTC	144

10

20

30

40

50

(表3の続き)

部位	係数	単変量解析 (p値)	配列	配列番号:
chr27:41569781-41569783	$-1 < x < 0$	3. 06E-39	TCTCGCTGTTCAATAGGAAGAATTCCGGGAAGGAGATAGAAC AGCAGTCAATT	145
chr27:45037864-45037866	$0 < x < 1$	2. 77E-85	CCAGCGCGCGCAGCCCTGCGCGCGCGGACACACAAAGAG TGGGGCGGATTCC	146
chr28:5936067-5936069	$-1 < x < 0$	6. 92E-08	CCTGGATGGCAACTTTGAACGCTGCGTGAGGACAGAAAA CAATCGGAGAGG	147
chr28:8994532-8994534	$0 < x < 1$	6. 45E-45	GAGCCCGCAAGTTAGAAAGACTGGTCGGTCGGGCGCACAC GGCTGGTCCGGG	148
chr28:13976453-13976455	$-1 < x < 0$	3. 48E-34	GCTCTGCTCCACCTCCTTGGGTCCGCTCTGTTATGTTTC TCTGGGAATGG	149
chr29:9541477-9541479	$-1 < x < 0$	3. 89E-12	ACTAGATTTTGAATCTATGATGACCGGGACTACTACT TCTACCTTTGC	150
chr29:19479611-19479613	$0 < x < 1$	3. 87E-66	TGGGGAGGTGGGGAATCGCGTACCACCGGTGGCAGCTTGCT GTACCAGGGCAG	151
chr29:32189910-32189912	$-1 < x < 0$	2. 42E-54	GCAGGTGGTGGGACAGCCATTGGGGCGGTGTAGAACCGGAGG TTCCACGTTTG	152
chr29:35629270-35629272	$-1 < x < 0$	1. 54E-14	TGCGGTCAATCCCTTTGTAGGAATCCCGATGATGGTGATTGA TCATTACGAGG	153
chr29:35629292-35629294	$-1 < x < 0$	4. 54E-41	TCCGATGATGGTGATTGATCATTACGAGGACGGTAATAAG ATTGTTACCCG	154
chr3:31677748-31677750	$0 < x < 1$	1. 40E-89	GCTGAGCCCGCAGCTGCGGGCGGACGCCGGTCGCACGC CCGGCGGGGCTGG	155
chr3:46852141-46852143	$0 < x < 1$	7. 92E-18	CTATGGCGCGATATTGCAAAAGCAAGACGACCCGAGGCGACAG CCAAATCCACT	156
chr3:46852146-46852148	$0 < x < 1$	3. 80E-11	GGCGATATTGCAAAAGCAAGACGACCCGAGGCGACAGCCAAA TTCCACTGTTTG	157
chr3:46843750-46843752	> 1	1. 05E-109	CCAGGGCCACAGACCTGGAAGTCGCCGGAGCCCGGCGAG CACTCCTCTCAAG	158
chr3:61539374-61539376	$-1 < x < 0$	0. 000110942	AGATTCAAGGCCCTTAGCCTGGGCCGAGTCATCTCTGAA CTTATGTGTC	159
chr3:70831746-70831748	> 1	5. 57E-17	CTACCTGTCGGGGGAGGCGAGACCCGGGCGCCCGCACG TCGGCGCGGCGGGG	160

10

20

30

40

50

(表3の続き)

部位	係数	単変量検所(p値)	配列	配列番号:
chr3: 72353348-72353350	$-1 < x < 0$	3. 36E-46	GGACACCTACTCTGGGCCCCGGCACGGCCGAGACAGAC AGGTGCCTGCAAA	161
chr30: 8031058-8031060	$0 < x < 1$	8. 37E-45	GGCCGTCGGGCGGGGGCCGGCTCACCCGCGCGCGTGG GAGGCCCGGGCCG	162
chr30: 8031060-8031062	$0 < x < 1$	4. 70E-34	CCGTCGGGCGGGGGCCGGCTCACCGCGCGCGCGTGGGA GGCCCGGGCCGGC	163
chr30: 8640557-8640559	$-1 < x < 0$	1. 10E-14	CGGGGACCGGATTGTGGCATCACACGCTGGACGAAAGTT GGGTGCGGTAG	164
chr32: 10044870-10044872	$-1 < x < 0$	3. 77E-08	GTGAGACGGAATGTGTAGTATGTACGTAAACAGTTTAAAG AAATTGTGTAC	165
chr32: 17605966-17605968	$-1 < x < 0$	2. 27E-18	TAAAGATTAAATATCAGAAAGCCACCGTTTCCTTTAGCCTC CCGTGCAGGAA	166
chr32: 35345144-35345146	$0 < x < 1$	5. 23E-46	GTGAAACGAGGCCCTTCCACCCCCCGGATGAAGAATGG CAGTTGTCTGA	167
chr32: 29642986-29642988	$-1 < x < 0$	4. 41E-42	CCTCCTGGTTGGGATGAGATGTTGACGGGATTTCTGTTTTA CTTCTGGAG	168
chr32: 39585142-39585144	$-1 < x < 0$	0. 108871384	GAGGCTGTGCGAGGTGAGGCTGTGGCGGGCGGGAGGCG GCCGGGGACCCG	169
chr32: 40571018-40571020	$-1 < x < 0$	1. 37E-64	TTTGGGTCTTAGCCCAAGGTACACATCGGCGTTTGTTTGCA TTTGTGATCTA	170
chr33: 18234603-18234605	$0 < x < 1$	0. 04858715	GAGGAGCCGCGATGGAGGGCGCCCGCGCCCGCCAG GTAAAGCGGCGCTC	171
chr33: 23247947-23247949	$-1 < x < 0$	8. 71E-28	GACAAGGGTATGGAAATACCTACAAACGGTGATTCTGATTCT TTCAAAGGTG	172
chr33: 23473772-23473774	$0 < x < 1$	5. 14E-07	ACAGGCAACATCGTGGGCCCTTCTACCGGGCACTTCCTTCTT CTCTGCCCGCA	173
chr33: 23473856-23473858	$0 < x < 1$	1. 85E-12	GCCAGAGGTATGCACAGCCCAAGCTCGCTGTGGTCTCACA CACAGCGTCTCA	174
chr33: 26512692-26512694	> 1	3. 95E-49	CGGCTGCCGCGCCCGCAGTCGTCGCCGCGCGCTCCTGC CAGGCCGACCTGG	175
chr33: 26512695-26512697	$0 < x < 1$	2. 71E-54	CTGCCGCGCCCGCAGTGTGCGCCGCGCGCTCCTGCCAG GCCGACCTGGAGC	176

10

20

30

40

50

(表3の続き)

部位	係数	単変量解析(p値)	配列	配列番号:
chr33:26512711-26512713	>1	7.18E-24	CGTCGCCGCCGCGCTCCTGCCAGGCCGACCTGGAGCGGA	177
			AGCTGAAGCCGAA	
chr33:19810904-19810906	$0 < x < 1$	3.02E-58	CGGCTCCTCGCCGCTCTCGGTGGCCCGGAGAACAAAAGCC	178
			CCGGGCTTGCC	
chr33:28241609-28241611	$-1 < x < 0$	7.57E-60	CGAGGGCAGCTGGGAGTACTTCCACGCCCCACATGAGCCT	179
			TTGTGTGAAAT	
chr33:28241833-28241835	$-1 < x < 0$	1.89E-67	AATTACTTTCACCTTTGTGTGAGGTGGTCTGTCTTCTGTG	180
			TCACCCGAGG	
chr33:29201592-29201594	$-1 < x < 0$	8.73E-65	CTGGTGCCCGACGGAATAGGAGGCCGCGAGCCTGCCAG	181
			AGTGGGACAGTCC	
chr33:29201578-29201580	$-1 < x < 0$	7.87E-56	GTGGCCCTGTACCCCTGGTGCCCGACGGAAATAGGAGGCC	182
			GGCAGCCTGCCA	
chr34:20742132-20742134	$-1 < x < 0$	1.32E-18	TCATCTACGCTGGGAGAATGAATATCGGTCTGTGAGACCG	183
			GAGGCTGGAAT	
chr35:23852932-23852934	$0 < x < 1$	7.91E-33	ACACGCCGCTGCGCTCCTTGGACGACGACACGGCCTGGAC	184
			GATCAGCTCCGA	
chr35:23853673-23853675	$0 < x < 1$	1.12E-17	CCACCTTCCCGGCGACGCCAGGACGCGGGCGCGGGGT	185
			CCATAGCTCTGAC	
chr35:23853863-23853865	>1	1.01E-15	CGCCTCACGGCCTCCTGCTGCCCTCCGCGGCCCTCCCAGCG	186
			CAGCCACAGCAG	
chr35:23853763-23853765	$0 < x < 1$	1.66E-57	GCTGACGCCGTCCCTTCACGCGCGGGGCGGCACGTGTGAAA	187
			ACGCAGCGCGCA	
chr36:641903-641905	$-1 < x < 0$	2.02E-46	GAGAAAGGGGAAGAATGTGGTCCCTCGAGTTCCTTTTGA	188
			TTCTAGTTCTA	
chr36:8405088-8405090	$0 < x < 1$	1.18E-47	CGGCTCCGCGGCGCGGACGCGGGGACCGCCAGCGCGCCG	189
			TCCGAGCGGAGAG	
chr36:18662589-18662591	$-1 < x < 0$	1.78E-29	CCGGTGGTCTCCAAACACAGCCAGGCGTCGGGTTTGTGC	190
			GGATGGTGCAG	
chr37:2007181-2007183	$-1 < x < 0$	4.37E-40	TTCATCATTTGGATGATAGTTTTTCACGACCTTGAGAGTCTC	191
			CTTGTAACAACT	
chr37:26349705-26349707	$0 < x < 1$	2.71E-23	GCAACGCAATCGCGAGAACCTTCTCCGCAAGGGCCGGGAC	192
			CCCCCGACGCGC	

10

20

30

40

50

(表3の続き)

部位	係数	単変量解析(p値)	配列	配列番号
chr37:26735403-26735405	$-1 < x < 0$	2. 68E-24	CCCTTTTACACATGAACAAACGGCGCTACAGAGGGAAT	193
			AACCTCCCAAG	
chr38:14762928-14762930	$0 < x < 1$	7. 07E-51	GCCACGCGCGCCCGCCAGCCCCACGCACAGCGACAGC	194
			AGTCCGACAGCA	
chr38:21317970-21317972	$-1 < x < 0$	4. 36E-17	GGAGCTAGGATGGCAGTGTGACTCCGAGAAAGGTAGGACA	195
			GCGCGGGAGAGG	
chr4:8252080-8252082	$0 < x < 1$	7. 58E-11	CGGGCTCCAGCGCGGCGCCCGGCTGCGGGCGGGGACGCG	196
			GCGGCCGTACTG	
chr4:23880514-23880516	$-1 < x < 0$	0. 034364027	CGCCCGACCCCGGAACCCCGGTGGCGTCACTGCTGCGC	197
			GTCGCGCGGAGCA	
chr4:25509815-25509817	$-1 < x < 0$	9. 11E-34	ATGGCTCTCTGTCTATCCTGGGACCGCTCTCCACCCGCATC	198
			AGAGCCAATGA	
chr4:36661557-36661559	$-1 < x < 0$	2. 89E-22	TATTACAGTGTGTCGAGTCAAAACGGCTTTTCACTCAATG	199
			GAAATTCCTCT	
chr4:36180013-36180015	$0 < x < 1$	2. 94E-96	GCGGGCTGGGGGCCCGGAGGGGGCCGCGCTCGCACCGCG	200
			GACGCTGCAGTTC	
chr4:43217432-43217434	$0 < x < 1$	2. 41E-62	GTGTCGTGCACGTTAGCGTGGCCGACGGCGTGGTGGGCCC	201
			TGGCCGCAAGC	
chr5:21480151-21480153	$0 < x < 1$	2. 64E-26	TTGAGCTGCTGGAGCAGCAGCCGTCGGCCACCTAGCAGG	202
			AGTGTCTCGCA	
chr5:32347978-32347980	$-1 < x < 0$	0. 375939729	ACACGATAGCCCTTGCCCGGTCGCCGGCCACCCCGGCC	203
			AGCAGCCCGATGC	
chr5:32711703-32711705	$0 < x < 1$	0. 161513412	GGTATCCGTCGCCCTCGGCTCGGCTCGGCTCGGCTCGGCT	204
			CGGCGGGCCCGG	
chr5:32884319-32884321	$-1 < x < 0$	1. 10E-34	CCAGCTTTGTTGGGTCTCCACACCGCCTGTGTATGAATG	205
			GGACTAAATTT	
chr5:55848493-55848495	$-1 < x < 0$	8. 10E-13	GACCCTGTGCCCTCAGCTGGCCTCACGTGCATGGAATGGT	206
			GCTGTGCCCTGT	
chr5:56981423-56981425	$-1 < x < 0$	3. 11E-54	CTGCCGGGCTGGCCGGGCGGCTTCGTGGTCTGCACCTTA	207
			CCCCACGTGCCA	
chr5:61645225-61645227	> 1	4. 38E-60	TAAAGGGCGGATGCCGCGACCCAGGCGCTGGCGTGGGGT	208
			CCACCGGGGTCCG	

10

20

30

40

50

(表3の続き)

部位	係数	単変量解析(p値)	配列	配列番号:
chr5:67427228-67427230	$0 < x < 1$	3. 63E-14	CGCGCCCCCGCGAGCGCGCGCGCGCGCGCGCGGACCCCGG	209
			CCGCGCGCGCCC	
chr5:81484511-81484513	$-1 < x < 0$	3. 60E-10	GGTTGCCTGAGAGAGAATGCTGACCGGATCTTCTATATTC	210
			ATTCTAACTTG	
chr6:8915114-8915116	$-1 < x < 0$	5. 73E-49	TCAGACCCCTAGCAGTTGGAGGATCCGAGTTCGAATTCTGT	211
			CTTGGCATTG	
chr6:9019848-9019850	$-1 < x < 0$	3. 88E-05	CGTATCCTAACTGATCCCAAGCCTGCGCTGACTGGAAAGT	212
			CCTTGTTCCTCA	
chr6:10398666-10398668	$0 < x < 1$	1. 45E-24	GGAGCGAGCGAGTGCCTCCAGAGCCGCGGAGCCGAGCTG	213
			AGCCCAACCCACT	
chr6:12827818-12827820	$-1 < x < 0$	6. 58E-07	GGCTCTCCCTCACACCCACTGACTGGCTCCTGAACCTCA	214
			GGATGGTCCCTT	
chr6:26928260-26928262	$-1 < x < 0$	0. 100532489	ACGCGGTCTCTCAGTCTCTCACGAGACGACCGCGAGATTTC	215
			AAAGGAGCTTTT	
chr6:29756505-29756507	$0 < x < 1$	7. 43E-20	TGCACGACCAACCGCAGCGTCCCAACCGTGGTCTCTGGCCCC	216
			TGGCTCCCTGCT	
chr6:38452376-38452378	$-1 < x < 0$	3. 46E-13	CAGGGTCTGCGCTGCTTCCCCATCAGTCCACCCAGTTGC	217
			CCTAGTGACTGT	
chr6:40186467-40186469	$0 < x < 1$	1. 66E-20	TGGACCCCTCCCTGTGACCCCCCTCCGTGCCGCCGGCCTC	218
			TCCTGAAGAGGG	
chr6:41080691-41080693	$-1 < x < 0$	3. 21E-15	CAGCGGTACAAGTGCTTCAAGGAGCGSGCTGTCAACCAAG	219
			GCCTATCTGGCT	
chr6:41485415-41485417	$-1 < x < 0$	1. 57E-05	GGCCGTCCATGGCAGTGCCGGCCCCACGAGGCAGGGGGSCA	220
			GATAAGGGGGCCG	
chr6:41661247-41661249	$-1 < x < 0$	2. 79E-41	TCTCTGGCGCAATAAAAGAGACCCCGGTGAGGAAGCCCCC	221
			CCAGCACTATA	
chr6:45773846-45773848	> 1	3. 10E-187	GAGAAGGACGTCCTGTGCGGAAGCCGTTGCGCAGCGCGCG	222
			GCCCTGGGGGGG	
chr6:60675998-60676000	> 1	1. 33E-31	GATAGCTTCTCGGCTCGGTCCGGGGCGGCTGCTGAGCGGC	223
			GGAGCGCGCGGG	
chr7:8160746-8160748	$-1 < x < 0$	6. 40E-06	TGTCAGATCCTCAGAGTAACCAAAACGAAGTTGTGAGTTGG	224
			GTAATGGTTG	

10

20

30

40

50

(表3の続き)

部位	係数	単変量解析 (p値)	配列	配列番号:
chr7:9749742-9749744	$-1 < x < 0$	7. 07E-22	GATGAATAGCAACCAAGGTTGTTGGCGACCATGAAGGCAA ACCTCACCGGG	225
chr7:29867181-29867183	$-1 < x < 0$	7. 92E-16	TTGAGAGGTCCAGCACCAAAATGTTACGTGATTGAGAAAGTGG ACATCTAACAA	226
chr7:38420583-38420585	$0 < x < 1$	6. 92E-09	CAGGACCTCGGGCCCTCCCTCCAGGGGCGGGACCCAGA CTCCGGGTGCGT	227
chr7:38136719-38136721	$-1 < x < 0$	1. 80E-10	GCGTCCCGGAGGTGTTACGGACCCGCGGCACACACACCC CGTACGTGCCA	228
chr7:41785316-41785318	$-1 < x < 0$	5. 87E-19	AGGCTGGGAAGATTGGCAGCCCTTCGGAGTTTATGCGTG AAGGGAGTCCAT	229
chr7:41980137-41980139	$-1 < x < 0$	1. 81E-39	CCACAGCATCAGCCCCAGGAGGACCGGTTATTGACAGG TTACACCCAGG	230
chr8:14259939-14259941	$-1 < x < 0$	9. 05E-30	ATTTAGATGCCAAATTCTTTGAAGGCGTTGGATGTAACACC CCTTCATTTC	231
chr8:4122009-4122011	$0 < x < 1$	2. 05E-33	CTCAGGAACGGGGTGCGGACCGGGCGAGCACAAAGGGGG TCACAGTCGGAG	232
chr8:15508656-15508658	$-1 < x < 0$	7. 24E-09	ACCCTTGCCCTCCTTGGCAGGCCACGGCTCCGGGAGGCC TAAAGAACGGAC	233
chr8:17226001-17226003	$-1 < x < 0$	6. 70E-31	AAGCATCTGCTGCTTCTTTTCGTGTCGCTCTGCTAAGGGCT TGTAGGAGGCC	234
chr8:33509086-33509088	$0 < x < 1$	2. 46E-82	GGCCAGTGAGTGCGGCTGCGGCGCGGAGGGCGGCGG GCGGCCCGCGGGC	235
chr8:67527837-67527839	$0 < x < 1$	2. 39E-96	GCGTGGCGCCCGAAGCGCTGCCACTCGCGCGGCCAGCTTG CGCCCTTCTGCC	236
chr8:67627712-67627714	$-1 < x < 0$	9. 60E-76	ATTTCTGAGTGCCCACTCTGTGCCCCACATGGGTCACACA GCTCCCCCAGG	237
chr9:933885-933887	$-1 < x < 0$	9. 12E-21	CACCTGTGCTAGTCCAGCCCTGATGCGCGAGGTGCAGCCCA ACACTCAGGGGG	238
chr9:1046331-1046333	$-1 < x < 0$	1. 35E-20	AGGAAGGGGGGCGGAGGGCATGCTTCGAGTTTGGATCCGA GGTCTTCAGGGG	239
chr9:2360284-2360286	$0 < x < 1$	1. 95E-08	CGGAGCCCAAGCGACCCCGGGGAAACCGATGTTAAGATGAA GGTATTTTCATT	240

10

20

30

40

50

(表3の続き)

部位	係数	単変量解析(p値)	配列	配列番号:
chr9:3516451-3516453	$-1 < x < 0$	6. 18E-49	CGACGCCGTGCCCCGGCTTCGACTGCGTGCTCAAGCTGGT	241
			GCATCACTACAT	
chr9:4719064-4719066	$0 < x < 1$	5. 92E-33	TTCTCGCTGAACCCGCGCGCGCTGGCGGTGAGTGGGCCGG	242
			GGTCGCGGGCAC	
chr9:5338779-5338781	$-1 < x < 0$	0. 159924272	TCCGGCCCCCTTCCTCACTTCTCGCCGACCTGTCAAGGCG	243
			TGCGGGCGGCGCT	
chr9:5481047-5481049	$-1 < x < 0$	0. 359052165	GCCTTCCCCACTCAGCGGCGCGCGCGCTTCCCCGCC	244
			ACGGCCCCGGCA	
chr9:10371698-10371700	$-1 < x < 0$	1. 46E-18	GGAAGTGCCTGAGAGCATCTGGCGGGGGCTGGGCTGT	245
			CCCCAAGCTGGT	
chr9:12522577-12522579	$0 < x < 1$	0. 261625965	TACGGGAGGAGATTAGGGTGATTCCCGTTGGCTCTGGCCA	246
			GGCCGTCAGGCC	
chr9:12642800-12642802	$0 < x < 1$	1. 38E-29	GCGAGGCTGCGAGGCTGCGAGGCTGCGAGGCGCGCGCG	247
			CCGTGGTGTAC	
chr9:18277673-18277675	$0 < x < 1$	2. 12E-34	GCCTCGCAGCCCTGGCGCGCGCTCGCAGATGGAGCGG	248
			CACGGGGGATGG	
chr9:19654152-19654154	$0 < x < 1$	0. 005118485	AAGTGTGAGTCCACCACGTCGCGGAGGTCTCCTCGG	249
			GGATCTCCACCA	
chr9:19703027-19703029	$-1 < x < 0$	4. 28E-20	AAGCCCTCCCCCAAGCCAAAGGACCCGGTCACCCATCCCC	250
			TCCACCTCCCTA	
chr9:25415871-25415873	$0 < x < 1$	2. 46E-50	GTGAGGATGCTGCTGAGCTTGGGATCGAAGGAGCCACTCA	251
			TCCTGGCGAGCG	
chr9:24344496-24344498	$0 < x < 1$	1. 12E-83	AATTAAAGGGTTATGGGACAGACAGCGTGC GCGGGTCTCA	252
			GAAGGAAATTG	
chr9:34421146-34421148	$0 < x < 1$	3. 96E-39	GACTCGGCGGCGCCCTGCAGACAGACCGACGCGCCCGAC	253
			CTCTGCCCCGACGG	
chr9:35986072-35986074	$0 < x < 1$	7. 61E-27	CAGCAGGAGCAGTACCCGAGCCATCGGAGCTGGGGAGA	254
			GACGCGCCAGGGC	
chr9:35999030-35999032	$0 < x < 1$	0. 109805996	GGGCAGCGCGACAGCGGCGCGGCCACCGGGCTCGCCGCC	255
			TGGCCACTCGGC	
chr9:47196375-47196377	$0 < x < 1$	4. 17E-30	CCATAGCGGCTGCCCCAGCTCGTCCCCGAAAGCGGACCATGG	256
			TTCCCGGGCGCC	

10

20

30

40

50

(表3の続き)

部位	係数	単量量解析 (p値)	配列	配列番号:
chr9:47612682-47612684	$-1 < x < 0$	5. 29E-27	GCTCTGGGGCCTGGGGACTCAGCAGACGCGCTCCCCACCCGC	257
chr9:50976682-50976684	$0 < x < 1$	1. 00E-43	TAGCAGGACCCCT CCGGAGTGATGACGCTGATTGGCTCCGGCCGATTTTGGGG GTGATGTCACGG	258
chr9:49248845-49248847	$-1 < x < 0$	2. 14E-28	GGTCACTGAGCTCTGGTTTCATCAGCGAGGGGAACCTACTCA GCTCGAGGGAA	259
chr9:54685917-54685919	$-1 < x < 0$	1. 65E-21	CTCTGGCCGCTGTGGCCCTCCTCTGGCGTCTCCGAGACAAG CAGGCTCGCATT	260
chr9:54993941-54993943	$-1 < x < 0$	1. 24E-27	CTGCCCTGTCCCAACAAGCTACCTCCCGAGTGAATACCCA TGCGCTGAGCCC	261

10

20

30

40

50

【表 5】

表 4 上位3個の時計

部位	時計係数	p値($P_r(> t)$)	配列	配列番号:
(切片項)	-0.737834998	0.000221316		
chr2. 32494387. 32494389	37.1425602	1.55E-05	TTGGAAGCTCGGGGGGGGGAGATCCCGCGCCGCC CGGCCGGCCTCGGGGCGG	89
chr22. 46374563. 46374565	25.17478169	1.08E-09	TTGGACGCGGAGGCCGTCCGGGCGCCGAGCAACG AGCAGCACAGCACGGTGG	113
chr6. 45773846. 45773848	20.26108043	1.13E-193	GAGAAGGACGTCCCTGTCCGGAAGCCGTTCCGAG CGCGCGGCCCTGGGGGCG	222

10

20

30

40

50

表5 上位5個の時計

部位 (切片項)	時計係数	p値 (Pr(> t))	配列	配列番号:
chr2. 32494387. 32494389	-0. 727254445 37. 1612328	0. 000153021 6. 43E-06	TTGGAAGCTCGGGGGGGCGGAGATCCCGCGCGC CCGGCCGGCCCTCGGGGCGG	89
chr22. 46374563. 46374565	22. 39755562	1. 62E-08	TTGGACGCGGAGGCCGTCGGGGCGCCGAGCAAC GAGCAGCACAGCACGGTGG	113
chr6. 45773846. 45773848	17. 93314936	1. 51E-140	GAGAAGGACGTCCCTGTGCGGAGGCCGTTGCA GCGCGCGGCCCTGGGGCGG	222
chr5. 61645225. 61645227	13. 1422123	3. 10E-09	TAAAGGGCGGATGCCGCGACCCAGGCGCTGGCG TGGGGTCCACCGGCGTCGC	208
chr3. 70831746. 70831748	16. 98136108	3. 58E-06	CTACCTGTGCGCGGGAAGCGAGCACCGGGCGCC CGCACGTGCGCGCGCGGGG	160

【表 7】

表6 上位10個の時計

部位 (切片項)	時計係数	p値(Pr(> t))	配列	配列番号:
chr2. 32494387. 32494389	3. 098969668 43. 24386632	1. 79E-15 3. 39E-12	TTGGAAGCTCGGGGGCGGAGATCCCGCGCCGC CCGGCCGGCCTCGGGGCGG	89
chr22. 46374563. 46374565	18. 0837229	1. 05E-09	TTGGACGCGGAGGCCGTCGGGGCGCCGAGCAAC GAGCAGCACAGCACGGTGG	113
chr6. 45773846. 45773848	9. 927654715	6. 75E-58	GAGAAAGGACGTCCCTGTGCGGAAGCCGTTGCA GCGCGCGGCCCTGGGGGCG	222
chr5. 61645225. 61645227	8. 930766415	7. 00E-08	TAAAGGGCGGATGCCGCGACCCAGGCGCTGGCG TGGGGTCCACCGGCGCTCGC	208
chr3. 70831746. 70831748	13. 04994007	1. 98E-06	CTACCTGTGCGCGGGAGGCGAGACCGGGCGCC CGCACGTGCGCGCGCGCGG	160
chr15. 10856498. 10856500	16. 51970306	4. 70E-10	CCCCAGCCGGCGCGGCTCGGGTTTCCGACGGAG GGCCGGGCTGCGCGGCGTC	55
chr16. 8886545. 8886547	9. 736863844	1. 16E-14	GGCGGGCTCCCGGTGCGCGCACGGCCCGGCGCG ACCTCTCCGCGCGGGCTCC	61
chr3. 46843750. 46843752	6. 421789458	7. 38E-22	CCAGGGCCACAGACCTGGAAGTCGCCGGGAGCC CGGCAGCACTCCTCTCAAG	158
chr20. 44942213. 44942215	6. 783887287	8. 61E-09	GGCAGGGCCGCCAGCGCGCGCCCGCGGTGAAG AAGTCTCGGCGCTGCGCT	101
chr20. 57347921. 57347923	-10. 03483995	3. 52E-40	ACCAGCCGCCAGCCGTGACCTTTCCGGGCGCTGT TCCTGCGGCTCTGGGCGC	109

10

20

30

40

50

表7 上位20個の時計

部位	時計係数	p値(Pr(> t))	配列	配列番号:
(切片項)	1. 705577846	9. 79E-05		
chr2. 32494387. 32494389	41. 01314123	1. 17E-12	TTGGAAGCTCGGGGGGGGAGATCCCGCGCCGC CCGCGCGCCTCGGGGCGG	89
chr22. 46374563. 46374565	14. 42030898	1. 59E-07	TTGACGCGGAGGCCGTCCGGGCGCGGAGCAAC GAGCAGCACACCGTGG	113
chr6. 45773846. 45773848	8. 210986049	9. 42E-44	GAGAAGGACGTCCCTGTGCGGAAAGCCGTTGCA GCGCGCGCCCTGGGGCGG	222
chr5. 61645225. 61645227	6. 475736938	3. 13E-05	TAAAGGGCGATGCCGACCCAGCGCGCTGGCG TGGGTCCACCGCGCTCGC	208
chr3. 70831746. 70831748	9. 913046295	0. 000100547	CTACCTGTCGGCGGAGCGAGCACCGGGCGCC CGACGTCGCGCGCGCGGG	160
chr15. 10856498. 10856500	12. 95145963	1. 72E-07	CCCCAGCGGCGCGGCTCGGGTTCCGACGGAG GGCGGGCTGCGCGGCGTC	55
chr16. 8886545. 8886547	7. 761075839	4. 37E-11	GGCGGCTCCCCGTGCGGCGACGGGCGCGGCGG ACCTCTCGCGCGGGCTCG	61
chr3. 46843750. 46843752	5. 373772366	5. 08E-17	CCAGGCCACAGACCTGGAAGTCGCCGGGAGCC CGCAGCACTCCTCTCAAG	158
chr20. 44942213. 44942215	4. 217839864	0. 000131313	GGCAGGCGCGCCAGGCGCGGCCCCCGGTGAAG AAGTCCTCGGGGCTGCGCT	101
chr20. 57347921. 57347923	-9. 131635543	3. 73E-38	ACCAGCGCCCAAGCGGTGACCTTCCGGGCGCTGT TCCTGCGGCTCTGGGCGC	109
chr24. 21051024. 21051026	2. 892412963	3. 58E-05	ACGTTGCTCTTGTGCTCCTGCGCTCGCTGCTGCTG TGCAGCTGCTCAGCTTC	122
chr33. 26512711. 26512713	3. 736067928	0. 052011151	CGTCGCGCGCGCGCTCCTGCGGCGGCGACCTGG AGCGGAAGCTGAAGCCGAA	177
chr23. 37987526. 37987528	-9. 998502923	0. 005079137	CGGGCGGGGAATCCGCCCCCGCGCTCGCCCCCG GCGCCTAGACCCCGGGGCGC	118
chr5. 32347978. 32347980	-7. 154140717	0. 034125216	ACACGATAGCCCCCTGGCCCGGTCGCCGGCCACC CCCGCCAGCAGCCCGATGC	203
chr6. 60675998. 60676000	4. 070607232	0. 00085343	GATAGCTTCTCGGCTCGGTCGGGCGGCGCTGCTG AGCGGCGGAGCGGCGCGG	223

10

20

30

40

50

(表7の続き)

部位	時計係数	p値(Pr(> t))	配列	配列番号:
chr19. 44679975..44679977	5. 332567614	0. 01743534	GCCCCATCGCCTGCGGCCTCGGTCTCCGGGGAGA GGGAAAGTAACTCCGGAGC	87
chr10. 7411293..7411295	2. 93908127	2. 87E-07	CAGCACCGGGCATCTGGACAGCAACCGGAGAGC GAGGCGTGTCTCTCTGGT	14
chr33. 26512692..26512694	2. 029402014	0. 057498714	CGGCTGCCGCGCCCGCAGTCTCGCCCGCCGCGC TCCTGCCAGGCCGACCTGG	175
chr1. 121182146..121182148	5. 132841728	6. 00E-05	CTGGCCCCGGAAGCGCAGGGCATCTCGATGTCG TCTCCCTCCCGGACTGTCA	6
chr17. 62156690..62156692	13. 76171543	0. 02258792	CGGCAGAGGAGCTGGGCTTGGGTGCCGGTGACC TTGGGGAAGTAGCGTTCC	7

10

20

30

40

50

【図面】
【図 1】

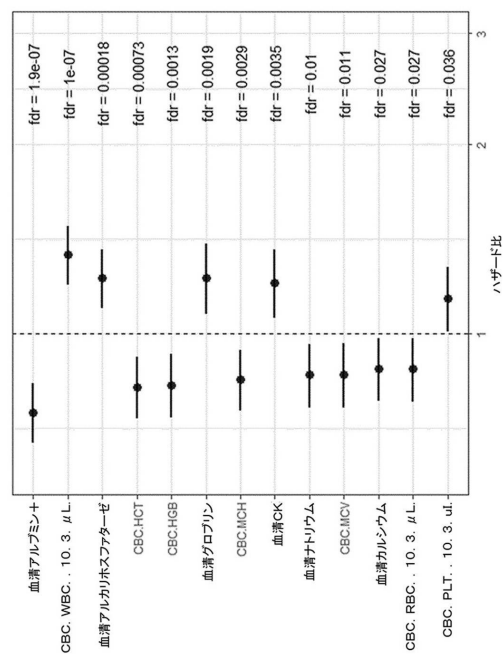


Figure 1

【図 2】

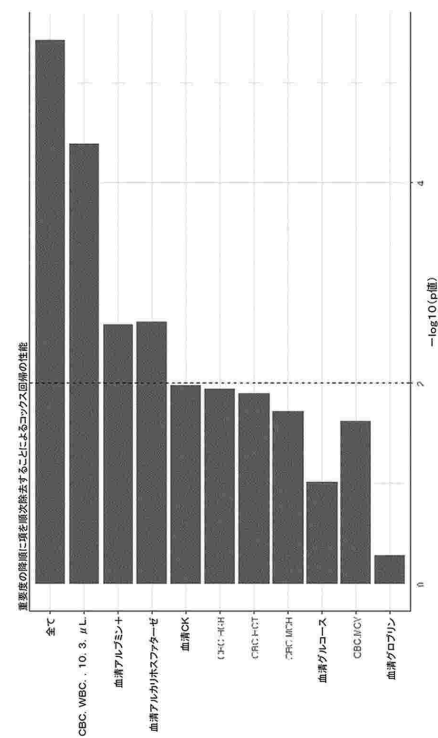


Figure 2

【図 3】

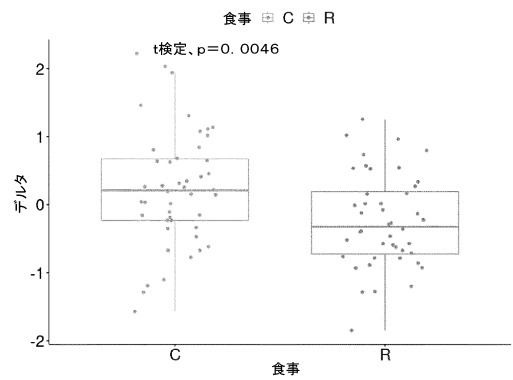


Figure 3

【図 4】

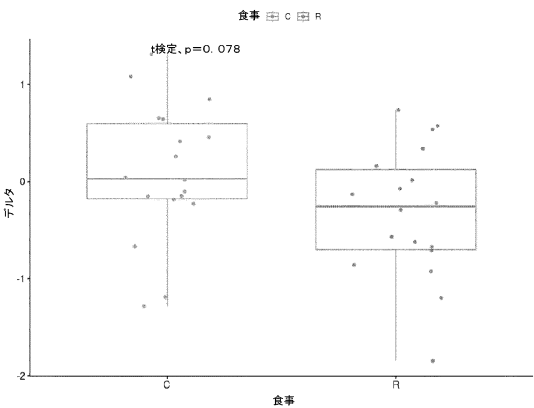


Figure 4

10

20

30

40

50

【図 5】

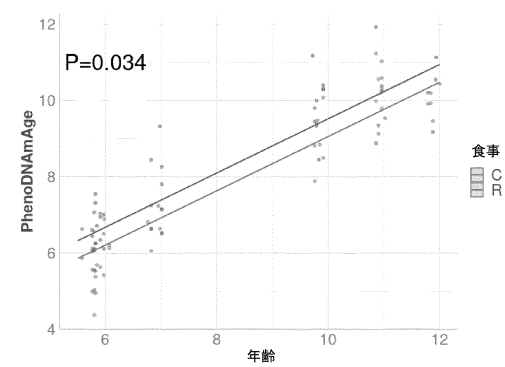


Figure 5

【図 6】

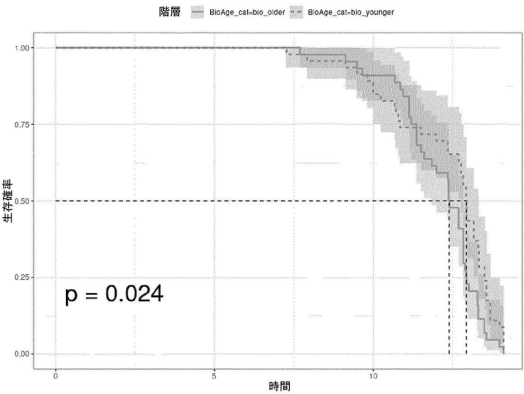


Figure 6

【図 7】

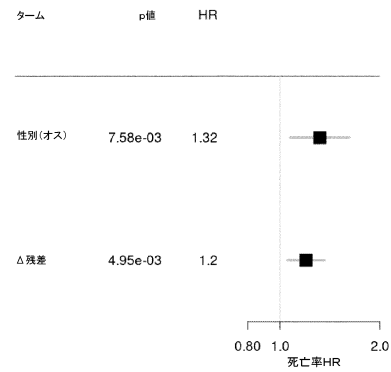


Figure 7

【図 8】

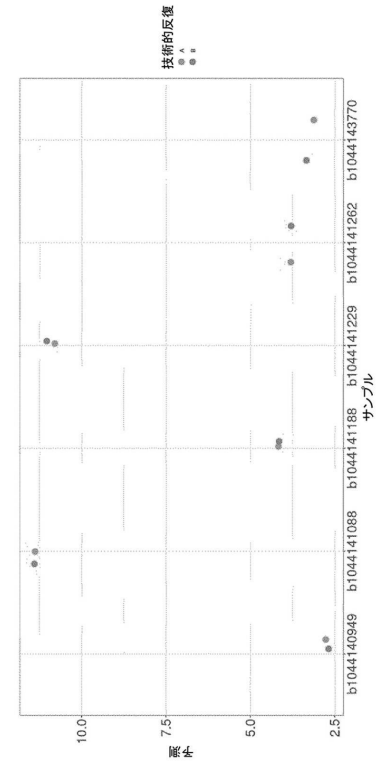


Figure 8

【図 9】

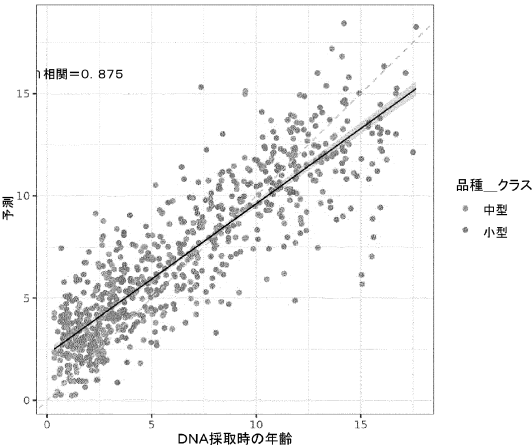


Figure 9

【図 10】

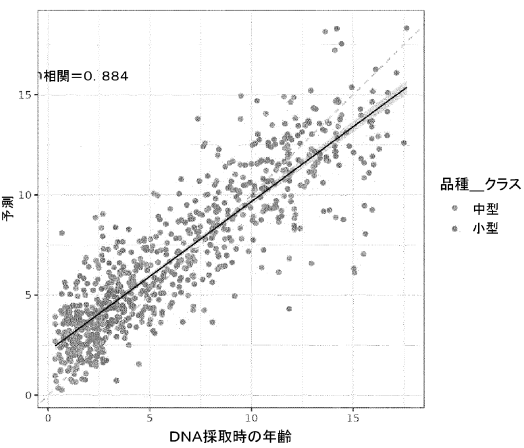


Figure 10

10

20

【図 11】

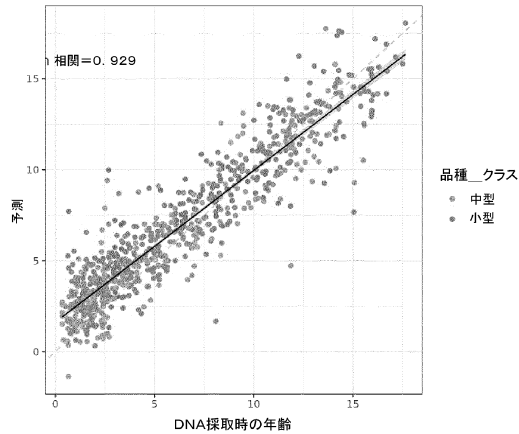


Figure 11

【図 12】

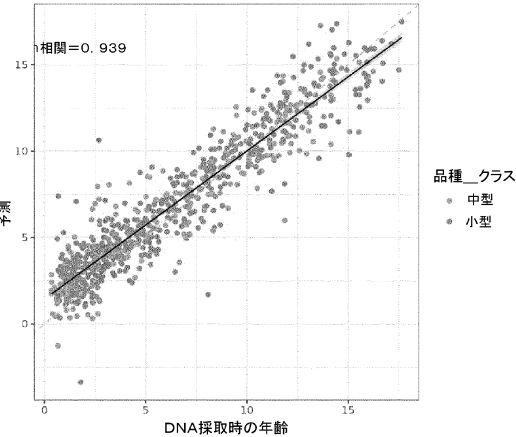


Figure 12

30

40

50

【図 13】

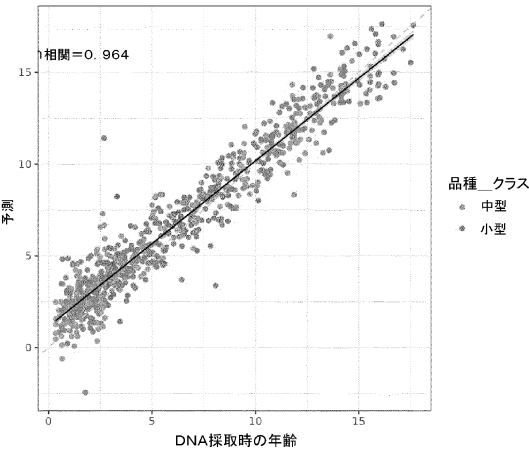


Figure 13

10

20

【配列表】

2025518014000001.xml

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2023/064443

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]	1-16, 21-34, 36, 38-41
Y	abstract; p. 4, 2nd para.; p. 5, 2nd-3rd para.; p. 10, 4th para.; p. 11, 3rd para.; p. 12, 2nd-3rd para.	35
A	-----	17-20
	-/--	

☒ 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/EP2023/064443

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>	1-16, 21-34, 36,38-41
Y A	abstract; p. 1056, left-hand col., 2nd para.; 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.; fig. 3 -----	35 17-20
X	EP 3 162 899 A1 (RHEINISCH-WESTFÄLISCHE TECHNISCHE HOCHSCHULE AACHEN [DE]) 3 May 2017 (2017-05-03) para. 34, 83, 94, 95, 99 -----	37
Y	Morgane Levine ET AL: "An epigenetic biomarker of aging for lifespan and healthspan", AGING, vol. 10 17 April 2018 (2018-04-17), pages 573-591, 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] abstract; p. 574, right-hand col., last para. - p. 575, left-hand col., 1st para.; p. 585, right-hand col., last para. -----	35
Y	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> abstract; p. 5, 3rd para.; p. 6, last para - p. 8, 1st para. ----- -/--	35

1

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

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2023/064443

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2019/046725 A1 (THE REGENT OF THE UNIV OF CALIFORNIA [US]) 7 March 2019 (2019-03-07) cited in the application the whole document -----	1-41
A	WO 2018/150042 A1 (DEUTSCHES KREBSFORSCH [DE]) 23 August 2018 (2018-08-23) the whole document -----	1-41

1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP2023/064443

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/EP2023/064443

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) 4B029 AA07 AA23 BB20 FA15

4B063 QA05 QA19 QQ02 QQ03 QQ42 QR32 QS39 QX02