

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2014 年 8 月 14 日(14.08.2014)



(10) 国際公開番号

WO 2014/123151 A1

- (51) 国際特許分類:
C12N 15/09 (2006.01) C12Q 1/02 (2006.01)
A61K 31/122 (2006.01) C12Q 1/68 (2006.01)
A61P 25/00 (2006.01) G01N 33/15 (2006.01)
A61P 25/16 (2006.01) G01N 33/50 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2014/052658
- (22) 国際出願日: 2014 年 2 月 5 日(05.02.2014)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2013-020763 2013 年 2 月 5 日(05.02.2013) JP
- (71) 出願人: 国立大学法人東京大学(THE UNIVERSITY OF TOKYO) [JP/JP]; 〒1138654 東京都文京区本郷七丁目 3 番 1 号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者: 辻 省次(TSUJI, Shoji); 〒1138654 東京都文京区本郷七丁目 3 番 1 号 国立大学法人東京大学内 Tokyo (JP). 三井 純(MITSUI, Jun); 〒1138654 東京都文京区本郷七丁目 3 番 1 号 国立大学法人東京大学内 Tokyo (JP).
- (74) 代理人: 稲葉 良幸, 外(INABA, Yoshiyuki et al.); 〒1066123 東京都港区六本木 6-10-1 六本木ヒルズ森タワー 23 階 TMI 総合法律事務所 Tokyo (JP).

- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーロパ (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

- 国際調査報告 (条約第 21 条(3))
- 明細書の別個の部分として表した配列リスト (規則 5.2(a))

(54) Title: METHOD FOR TESTING RISK OF MULTIPLE SYSTEM ATROPHY, TEST KIT, AND DRUG FOR THE TREATMENT OR PREVENTION OF MULTIPLE SYSTEM ATROPHY

(54) 発明の名称: 多系統萎縮症リスクの検査方法、検査キット、及び多系統萎縮症の治療又は予防薬

(57) Abstract: The purpose of the invention is to elucidate the mechanism of onset of MSA through identifying a causative gene, and then to discover a treatment method. The invention provides a method for testing the risk of multiple system atrophy of a subject, wherein the method includes a step for detecting a mutation that decreases the biosynthesis of coenzyme Q10 in a sample collected from the subject. Examples of mutations that decrease the biosynthesis of coenzyme Q10 include mutations that suppress the expression or function of coenzyme Q2.

(57) 要約: 本発明は、MSA の原因遺伝子の特定を通じて発症のメカニズムを解明し、ひいてはその治療法を見出すことを課題とする。本発明は、被検者の多系統萎縮症リスクの検査方法であって、被検者から採取した試料におけるコエンザイム Q10 の生合成を低下させる変異を検出する工程を含む、方法を提供する。コエンザイム Q10 の生合成を低下させる変異としては、例えば、コエンザイム Q2 の発現又は機能を抑制する変異が挙げられる。

WO 2014/123151 A1

明 細 書

発明の名称：

多系統萎縮症リスクの検査方法、検査キット、及び多系統萎縮症の治療又は予防薬

技術分野

[0001] 本発明は、多系統萎縮症の発症リスクの検査方法等に関する。

背景技術

[0002] 多系統萎縮症 (Multiple System Atrophy; MSA) は、難治性の神経変性疾患の一つである。平均発症年齢は 57.5 ± 7.2 歳で、臨床症候は、小脳性運動失調、パーキンソニズム、自律神経症候、錐体路徴候が様々な組み合わせで出現する。小脳性運動失調が主要症候であるMSA-Cと、パーキンソニズムが主要症候であるMSA-Pの2つの臨床病型が代表的であり、MSA-Cはオリブ橋小脳萎縮症に対応し、MSA-Pは線条体黒質変性症に対応する。この他に、自律神経障害が主要症候であるShy-Drager症候群がある。日本人ではMSA-PよりMSA-Cの頻度が高く、欧米人ではMSA-Pの頻度がより高い。

病理学的には、glial cytoplasmic inclusion (GCI) が特徴で、 α -シヌクレインが主要成分である。

[0003] MSAは代表的な孤発性神経変性疾患であると位置づけられているが、これまでに非常に稀ではあるものの複数のMSA多発家系が見出されおり（非特許文献1－3）、遺伝的要因の関与が示唆されている。

現在までのところMSAの発症機構はまったく不明であり、治療としては症状に応じた対症療法が行われている。

先行技術文献

非特許文献

[0004] 非特許文献1：Hara K, et al. Arch Neurol 2007;64:545-51.

非特許文献2：Wullner U, et al. J Neurol Neurosurg Psychiatry 2009;80:449-50.

非特許文献3 : Hohler AD and Singh VJ. J Clin Neurosci 2012;19:479-80.

発明の概要

発明が解決しようとする課題

- [0005] 本発明は、MSAの原因遺伝子の特定を通じて発症のメカニズムを解明し、ひいてはその治療法を見出すことを課題とする。

課題を解決するための手段

- [0006] 本発明者らは、上記課題を解決するために研究を重ねた結果、MSA多発家系にPara-hydroxybenzoate-polyprenyltransferase遺伝子（以下、Para-hydroxybenzoate-polyprenyltransferase (EC 2.5.1.39) を「コエンザイムQ2」又は「CoQ2」と表し、その遺伝子を「C0Q2」又は「C0Q2遺伝子」と表す場合もある。）の変異の保因者がいることを見出し、家族性多系統萎縮症の一部では、C0Q2変異のホモ接合性変異又は複合ヘテロ接合性変異があれば、それが十分条件で発症することを確認した。また、孤発性MSAにおいても、ヘテロ接合性のC0Q2変異がMSA発症の大きなリスクファクターとなることを明らかにした。さらに、C0Q2はCoQ10の生合成に関与していることから、家族性及び孤発性MSA患者の組織におけるCoQ10量を測定したところ、これが低下していることを実証し、CoQ10投与による治療効果が論理的に強く示唆されることを確認して、本発明を完成するに至った。

即ち、本発明は、

〔1〕被検者の多系統萎縮症リスクの検査方法であって、被検者から採取した試料におけるコエンザイムQ10の生合成を低下させる変異を検出する工程を含む、方法；

〔2〕前記コエンザイムQ10の生合成を低下させる変異は、Para-hydroxybenzoate-polyprenyltransferase（コエンザイムQ2）の発現又は機能を抑制する変異である、上記〔1〕に記載の方法；

〔3〕前記コエンザイムQ2の発現又は機能を抑制する変異は、配列番号：1におけるP49H、S57T、R69H、M78V、I97T、P107S、S113F、T267A、S297C、R337Q、R337X、及びV343Aからなる群より選択される、上記〔2〕に記載の方法

;

〔４〕前記コエンザイムQ2の発現又は機能を抑制する変異は、V343Aである、
上記〔２〕に記載の方法；

〔５〕多系統萎縮症リスクの検査キットであって、以下の(i)から(iii)の少なくとも1つを含むキット；

(i) コエンザイムQ2遺伝子における、コエンザイムQ2タンパク質（配列番号：1）の49位、57位、69位、78位、97位、107位、113位、267位、297位、337位、及び343位からなる群より選択される部位のアミノ酸をコードする核酸を含む領域にハイブリダイズする核酸；

(ii) コエンザイムQ2遺伝子における、コエンザイムQ2タンパク質（配列番号：1）の49位、57位、69位、78位、97位、107位、113位、267位、297位、337位、及び343位からなる群より選択される部位のアミノ酸をコードする核酸を含む領域を増幅可能なプライマーセット；及び

(iii) 配列番号：1において、P49H、S57T、R69H、M78V、I97T、P107S、S113F、T267A、S297C、R337Q、R337X、及びV343Aからなる群より選択される少なくとも1つの変異を有するコエンザイムQ2タンパク質と、野生型コエンザイムQ2タンパク質のいずれかのみに交差性なく結合する抗体；

〔６〕コエンザイムQ10を含む多系統萎縮症の予防又は治療剤；

〔７〕コエンザイムQ10を投与する工程を含む、多系統萎縮症の予防又は治療方法；

〔８〕多系統萎縮症の予防又は治療剤のスクリーニング方法であって、

候補化合物と細胞とを接触させてインキュベートする工程と、

細胞内のコエンザイムQ10量を上昇させる候補化合物を選択する工程と、を含む方法；

及び、

〔９〕V343A変異を含むコエンザイムQ2タンパク質をコードする核酸、に関する。

発明の効果

[0007] 本発明によれば、被検者におけるC0Q2遺伝子の所定の変異の有無を検出するという簡便な方法により、MSA発症リスクを評価することができる。

MSA発症リスクが高いと判断された場合には、CoQ10の補充により発症が抑制されることが期待され、またCoQ10の補充はMSAの治療にも有効である可能性が強く示唆される。

図面の簡単な説明

[0008] [図1A]図1 Aは、6つのMSA多発家系の家系図を示す。FMSA_1の両親は血族婚（first degree cousin）であった。FMSA_1の患者（II-4及びII-8）は二人とも網膜色素変性症にも罹患していたが、他の兄弟MSAでも網膜色素変性症でもなかった。FMSA_1のII-4及びII-8と、FMSA_8のII-6のMSAの確定診断は生検により行った。FMSA_8の他の2人の兄弟はPD患者であった。□は男性、○は女性、黒色はMSA患者、灰色はPD患者、白色はいずれにも罹患していない者を示し、黒点はゲノムDNAが入手できたことを示す。MSA-Cは小脳性運動失調が主要症候であるMSA、MSA-Pはパーキンソニズムが主要症候であるMSA、PDはパーキンソン病を示す。

[図1B]図1 Bは、FMSA_1の多点パラメトリック連鎖解析を示す。パイプラインソフトウェアSNPHITLinkを用い、Hardy-Weinberg検定で p 値 >0.05 、call rate >0.95 、ジェノタイピングの信頼スコア <0.1 、対照者のマイナーアレル頻度 >0 、及び連鎖解析のためのマーカー間距離が80kbから120kbであるSNPを選択した。多点パラメトリック連鎖解析（完全浸透度をもつ常染色体劣性遺伝）及びハプロタイプの再構築をAllegro version 2で行った。LODスコアの最高値は1.93であり、染色体4上の領域（NCBI36/hg18アセンブリの72.795 Mbから89.616 Mb at）、5上の領域（149.50 Mbから168.32 Mb）、6上の領域（85.499 Mbから87.382 Mb）、7上の領域（62.754 Mbから64.907 Mb）、9上の領域（99.781 Mbから115.484 Mb）、及び13上の領域（75.849 Mbから98.253 Mb）を含む約80Mbの領域にわたっていた。

[図1C]図1 Cは、候補となる変異の絞り込みの過程を説明した図である。ホールゲノムシーケンスにより合計3,492,929のSNVとindelが見出され、そのう

ち54,306は候補領域に位置した。このうち342がエクソン又はスプライス領域をコードし、78が非同義又はスプライス領域変異であった。この中でdbSNP130に登録されていない新規なSNVは4つのみであった。

[図1D]図1Dは、FMSA_1の患者（II-4。上のパネル）及び非罹患者（II-7。下のパネル）のダイレクトシーケンスの結果を示す。患者は、M78V-V343Aのホモ接合体を有した。

[図2A]図2Aは、COQ2変異体のyeast complementation assayの結果を示す。野生型（wt）ヒトCOQ2遺伝子cDNAを含むpAUR123ベクター、又はmockベクターで形質転換した酵母coq2ヌル変異体の増殖曲線を左のパネルに示す。様々な変異を有するヒトCOQ2 cDNA（L16V、P22L、F29L、N336H、V343A、I97T、T267A、又はS297C）を含むpAUR123ベクターで形質転換した酵母coq2ヌル変異体の増殖曲線を中央のパネルに示す。I97T、T267A、及びS297Cは、野生型COQ2と比較して増殖率がかなり低下したが、coq2ヌル株よりは高い増殖率を示した（中等度に有害な変異）。L16V、P22L、F29L、N336H、及びV343Aは、野生型COQ2と同程度の増殖率を示した。様々な変異を有するヒトCOQ2 cDNA（P49H、S57T、R69H、M78V、M78V-V343A、P107S、S113F、R337X、又はR337Q）を含むpAUR123ベクターで形質転換したcoq2ヌル変異体の増殖曲線を右のパネルに示す。これらは、coq2ヌル株と同様に呼吸依存性増殖率の著しい低下を示した（非常に有害な変異）。それぞれの酵母株は、YPD培地で前培養し、OD600が0.1となるように希釈し、酵素エキス・ペプトン・グリセロール（YPG）培地中で1分間200回振とうしながら23℃で4日間インキュベートした。OD600は10分毎に測定し、インキュベーションタイムにしたがってプロットした。CoQ2活性は、放射性パラヒドロキシベンゾエート（PHB）のデカプレニルPHBへの取り込みを測定して求めた。

[図2B]図2Bは、CoQ2変異体の酵素活性の測定結果を示す。COQ2遺伝子のいずれかの変異（R337Q/V343A、R337X/V343A、V343A/V343A、又はV343A/wt）を有するMSA患者、及び変異を有しない対照者から得たリンパ芽球様細胞におけるCoQ2活性を測定した。各対象の酵素活性（pmol/mg-protein/minute）は、9

回の独立した実験の中央値 (column) と標準偏差 (bar) で示されている。群比較はKruskal-Wallis検定で行い、多重検定にSteel法を用いた。1人の対照者 (野生型C0Q2ジェノタイプ) に対して* $p < 0.05$ 。

[図2C]図2Cは、MSA患者の凍結小脳サンプルにおけるCoQ10濃度を測定した結果を示す。3人のMSA患者 (1人のM78V-V343A/M78V-V343Aと2人のV343A/wt) と3人の対照者 (wt/wt) の凍結小脳サンプルにおけるCoQ10濃度を測定した。約100mgの脳組織を10倍量 (v/wt) の0.32 Mスクロース、1 mM EDTA、及び20% SDSを含む10mM TrisHCl (pH7.4) でホモジナイズした。続いて、ヘキサン/エタノール (5:2 v/v) でCoQ10を抽出し、抽出物中のCoQ10濃度をHPLCで測定し、遊離コレステロール濃度で調整した。

[図3]図3は、Andrew J. et al., The American Journal of Human Genetics 84, 558-566, May 15, 2009のFigure 1である。CoQ10の生合成の概要を示す。

[図4]図4は、MSA患者を対象としたユビキノールの臨床試験のアウトラインを示す。

[図5]図5は、各用量でユビキノールを投与した後の血漿CoQ10濃度 ($\mu\text{g/ml}$) の測定結果を示す。

[図6]図6は、各用量でユビキノールを投与した後の単核球中の全CoQ10/遊離コレステロール (nM/ μM) の測定結果を示す。

[図7]図7は、各用量でユビキノールを投与した後の髄液CoQ10濃度 ($\mu\text{g/ml}$) の測定結果を示す。

[図8]図8は、各用量でユビキノールを投与した後の尿中8-OHdG (ng/mg-Cre) の測定結果を示す。

[図9]図9は、ユビキノールの臨床評価スケールを示す。

[図10]図10は、ユビキノール投与前後の脳血流量と酸素代謝量の測定結果を示す。

発明を実施するための形態

[0009] [MSAリスクの検査方法]

本発明に係るMSAリスクの検査方法は、被検者から採取した試料における、コエンザイムQ10の生合成を低下させる変異を検出する工程を含む。

本明細書において、MSAリスクの検査方法とは、被検者がMSAを発症する可能性の高さを判定したり、被検者にMSA様の症状が見られる場合に実際にMSAであるか否かを判定したりするために必要な情報を収集するために行う検査の方法をいう。本発明に係る検査方法は、検査会社等で実施されうる。

MSAの臨床病型は特に限定されないが、後述するとおり、本発明に係る方法のうち特定の態様は、MSA-Cの特異的な検出に適している。

[0010] 本明細書において、CoQ10とは、ユビキノンとも呼ばれるベンゾキノン誘導体を意味する。酸化型がユビキノン、還元型がユビキノールと呼ばれることもあるが、本明細書においてCoQ10は酸化型、還元型のいずれであってもよい。

CoQ10の生合成経路の概略を図3に示す。CoQ2が触媒してパラヒドロキシベンゾエート（PHB）がプレニル化されると、デカプレニルPHBが生じる。このデカプレニルPHBが、さらに多くの補酵素によって様々な修飾を受けてCoQ10が生合成される。

[0011] 後述する実施例に示されるとおり、本発明者らは、CoQ10の生合成に関連するCOQ2遺伝子の変異がMSAリスクに関与することを解明した。したがって、COQ2の変異に限らず、CoQ10の生合成を低下させる変異は、MSAリスクを増大させる可能性があるものと理解される。CoQ10の生合成を低下させる変異としては、以下で説明するCOQ2の変異に加え、例えばCoQ10の生合成に関与する様々な酵素の変異が挙げられるがこれらに限定されない。当業者は、CoQ10の生合成を低下させる公知の変異や新たに発見された変異を適宜選択して、かかる変異を検出することができる。

[0012] 本明細書において、被検者から採取した試料は、CoQ10の生合成を低下させる変異を検出できる限りどのような試料であってもよいが、例えば、血液その他の体液、皮膚、組織、細胞等が挙げられる。

[0013] CoQ10の生合成を低下させる変異の一例として、CoQ2の発現又は機能を抑制

する変異があげられる。

本明細書において、CoQ2は、以下のアミノ酸配列を有する酵素であり、COQ2遺伝子によってコードされる。Para-hydroxybenzoate-polyprenyltransferaseとも呼ばれ、CoQ10の生合成において、デカプレニルピロリン酸からPHBにデカプレニル基を転移する反応を触媒する。

MLGSRAAGFARGLRALALAWLPGWRGRSFALARAAGAPHGGDLQPPACPEPRGRQLSLAAAVVDSAPR
PLQPYLRMLRLDKPIGTWLLYLPCTWSIGLAAEPGCFPDWYMLSLFGTGAILMRGAGCTINDMWDQDYD
KKVTRTANRPIAAGDISTFQSFVFLGGQLTLALGVLLCLNYYSIALGAGSLLLIVITYPLMKRISYWPQL
ALGLTFNWGALLGWSAIGSCDPSVCLPLYFSGVMWTLIYDTIYAHQDKRDDVLIGLKSTALRFGENTK
PWLSGFSVAMLGALSLVGVNSGQTAPYYAALGAVGAHLTHQIYTLDIHRPEDCWNKFISNRTLGLIVFL
GIVLGNLWKEKKTDKTKKGIENKIEN (配列番号：1)

[0014] CoQ10の生合成を低下させるCoQ2の変異としては、例えば、P49H、S57T、R69H、M78V、I97T、P107S、S113F、T267A、S297C、R337Q、R337X、及びV343Aが挙げられる。ここで、49、57等の数字は、配列番号：1で表されるアミノ酸配列の49位、57位等をそれぞれ表し、数字の左に一文字で表記されたアミノ酸は野生型のアミノ酸残基を、数字の右に一文字で表記されたアミノ酸は変異型のアミノ酸残基を示す。R337Xのように、数字の右にアルファベットがない場合、又は数字の右のアルファベットがXである場合は、変異型において当該アミノ酸部分にストップコドンが生じて以降のアミノ酸配列が欠失することを意味する。

[0015] これらの変異の中で、V343Aは日本人に特有の変異であった。日本人は、欧米人に比較して、MSA-Cが多いため、V343Aの変異はMSA-Cに関連が高いと考えられる。

[0016] なお、ヒトCOQ2遺伝子は、第一エクソンに4つのATGコドンを含む。配列番号：1は、
この4つのATGコドンのうち、4番目を翻訳開始コドンとしたUniProt database

(Q96H96, <http://www.uniprot.org/uniprot/Q96H96>) に従ったものである。

1番目のATGコドン翻訳開始コドンとするNCBI Reference SequenceのNM_015697.7及びNG_015825.1と、GenBankのBC008804.2のそれぞれを用いて各変異をアノテーションした場合の比較を下表に示す。

[0017] [表1]

	アミノ酸配列		mRNA 配列		ゲノム DNA 配列	
	UniProt	NCBI Reference Sequence	GenBank	NCBI Reference Sequence	NCBI Reference Sequence	Genome Reference Consortium
rs ID	Q96H96-1 (4 th ATG codon)	NM_015697.7 (1 st ATG codon)	BC008804.2 (4 th ATG codon)	NM_015697.7 (1 st ATG codon)	NG_015825.1	hg19/GRCh37
rs112033303	5' UTR	R22X	N.A.	c.64A>T	g.64A>T	chr4:84,206,004
rs6818847	L16V	V66L	c.46T>G	c.196G>T	g.196G>T	chr4:84,205,872
N.A.	P22L	P72L	c.65C>T	c.215C>T	g.215C>T	chr4:84,205,853
N.A.	F29L	F79L	c.85T>C	c.235T>C	g.235T>C	chr4:84,205,833
N.A.	P49H	P99H	c.146C>A	c.296C>A	g.296C>A	chr4:84,205,772
N.A.	S57T	S107T	c.170G>C	c.320G>C	g.320G>C	chr4:84,205,748
N.A.	R69H	R119H	c.206G>A	c.356G>A	g.356G>A	chr4:84,205,712
N.A.	M78V	M128V	c.232A>G	c.382A>G	g.382A>G	chr4:84,205,686
N.A.	I97T	I147T	c.290T>C	c.440T>C	g.583T>C	chr4:84,200,231
N.A.	P107S	P157S	c.319C>T	c.469C>T	g.586C>T	chr4:84,200,202
N.A.	S113F	S163F	c.338C>T	c.488C>T	g.588C>T	chr4:84,200,183
rs369627290	T267A	T317A	c.799A>G	c.949A>G	g.1717T>A>G	chr4:84,188,891
N.A.	S297C	S347C	c.889A>T	c.1039A>T	g.1726T>A>T	chr4:84,188,801
N.A.	N336H	N386H	c.1006A>C	c.1156A>C	g.2060G>A>C	chr4:84,185,462
N.A.	R337X	R387X	c.1009C>T	c.1159C>T	g.2060G>C>T	chr4:84,185,459
N.A.	R337Q	R387Q	c.1010G>A	c.1160G>A	g.20610G>A	chr4:84,185,458
rs148156462	V343A	V393A	c.1028T>C	c.1178T>C	g.20628T>C	chr4:84,185,440

[0018] これらのアミノ酸の変異は、核酸の変異に基づくものと考えられるので、変異の検出は、ゲノムDNA上の変異を検出することによって行ってもよいし、RNAレベルやタンパク質レベル行ってもよい。被検者の試料に由来するRNAからcDNAを調製して、cDNAにおける変異を検出してもよい。DNAやRNAを単離する方法は特に限定されず、当業者に公知の方法で染色体DNA又はRNAを抽出、単離することが可能である。

核酸の変異を検出する場合、当業者は上述したアミノ酸の変異から、核酸レベルではどのような変異を検出すればよいか容易に特定することができる。

[0019] DNAレベルで変異を検出する方法としては、例えば、以下のような方法が用いられる。

(i) PCR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)

特定の変異を有する遺伝子は制限酵素による切断によって生じる断片の長さが異なることを利用して、変異を検出する方法であり、例えば以下の手順により行うことができる。被検者から得たゲノムDNAについて、検出しようとする変異を含む領域をPCR法により増幅する。増幅産物に変異部位を認識する制限酵素を作用させ、断片を電気泳動法等により分離、同定する。生じた断片の長さから制限酵素による切断の有無、ひいては変異の有無を確認できる。本方法は、被検者の試料からRNAを抽出し、逆転写酵素によりcDNAを調製して行ってもよい。

[0020] (ii) 対立遺伝子特異的PCR

変異を含む領域にハイブリダイズするプライマー (allele-specific oligonucleotide: ASO) を用いてPCRを行い、変異を有する場合、当該プライマーと鋳型DNAとの間にミスマッチが生じるため、アニール温度が高い場合に伸長反応が起こらないことを利用する方法である。増幅産物を電気泳動法等により分離、同定し、増幅の有無を確認することによって、試料DNAの変異の有無を知ることができる。

[0021] (iii) 一本鎖DNA高次構造多型 (SSCP) 法

DNAをPCRで増幅した後、一本鎖に解離させると、一本鎖DNAは塩基対形成をはじめとする種々の分子内相互作用で塩基配列に依存した固有の高次構造をとる。安定な二重らせん構造をとる二本鎖DNAに比べ、一本鎖DNAの高次構造は、一塩基の違いが存在しても変化することがある。そのため一本鎖DNAをポリアクリルアミド中で電気泳動すると、高次構造の違いに応じて移動度も異なり、この移動度の違いを検出することによって変異の有無を判定することができる。

具体的には、例えば、被検者から得られた染色体DNAを、³²P等で標識したプライマーを用いてPCRにより増幅する。得られた標識DNA断片を加熱変性して一本鎖DNAとし、これをポリアクリルアミドゲル電気泳動で分離して、オートラジオグラフィーによりバンドの位置変化を検出する。

[0022] (iv) 変性剤濃度勾配ゲル電気泳動 (denaturing gradient gel electrophoresis: DGGE) 法

変性剤による変性は二本鎖DNAにミスマッチが存在すると起こりやすくなること、二本鎖DNAが部分的に融解した状態では電気泳動の移動度が著しく低下することを利用して、変異の有無を検出する方法である。

具体的には、尿素、ホルムアミド等の変性剤の濃度に勾配をつけたポリアクリルアミドゲル上で、必要に応じて制限酵素等で処理した被検者のDNAサンプルと、正常DNA断片と、これらに相補的なプローブ核酸との混合物の電気泳動を行ってサンプルを分離する。変異に起因するミスマッチが存在すると、より低い濃度の変性剤で一本鎖に解離するため、変性剤濃度が低いゲル領域で泳動速度が遅くなる。従って、正常DNAサンプルのバンドと比較することによって、ミスマッチの存在の有無を検出することが可能となり、結果として変異の有無を検出することができる。

変性剤の濃度勾配は、垂直につけてもよいし（垂直勾配法）と平行につけてもよい（平行勾配法）。また、DGGEと類似の原理を利用した温度勾配ゲル電気泳動法 (temperature gradient gel electrophoresis: TGGE) も開発さ

れている。

[0023] (v) マイクロアレイを用いる方法

マイクロアレイ上に固定されたプローブDNAと、DNA又はRNAサンプルとの特異的なハイブリダイゼーションを検出して、変異の有無を解析する方法である。ハイブリダイゼーションの有無を検出する方法や、プローブDNAの3'末端を変異の予想される部位にあわせてハイブリダイゼーションさせ、標識したジデオキシヌクレオチドとDNAポリメラーゼを添加して、伸長反応の有無を検出する方法等がある。標識は、蛍光色素、放射性物質、電気化学的に検出できる化合物等各種選択することができる。

なお、特異的なハイブリダイゼーションとは、通常のハイブリダイゼーション条件で、好ましくは高ストリンジेंटなハイブリダイゼーション条件下における特異的なハイブリダイゼーションを意味する。本明細書において高ストリンジेंटな条件とは、例えば、少なくとも約6×SSC及び1%SDSの65℃溶液中でハイブリダイゼーションを行い、最初の洗浄を42℃の20%(v/v)ホルムアミド(0.1×SSC中)で10分、次の洗浄を65℃の0.2×SSC及び0.1%SDSで行う条件とすることができるが、これに限定されず、当業者は適宜条件を選択することができる。

[0024] (vi) Pyrosequencing法

シーケンス反応を化学発光で検出する方法である。被検者由来のDNAをPCRで増幅した後、一本鎖DNAを精製し、適当なプライマーをハイブリダイズさせてからデオキシヌクレオチドを一塩基ずつ添加する。伸長反応に伴って発生するピロリン酸がカスケード反応を開始させ、生じたATPによりルシフェリンを基質としてルシフェラーゼが発光する。この発光を検出することにより被検DNAの塩基配列を決定することができ、高精度に変異を検出できる (Alderborn, A. et al.: Genome Res. (2000) 28:1249-1258)。

[0025] (vii) Sanger法

標的DNAとプライマーを用いてDNAを合成する際、4種のデオキシリボヌクレオチド(dNTP)とともに1種のジデオキシリボヌクレオチド(ddNTP)のい

ずれかを加えておき、ddNTPが取り込まれたときに合成が止まるようにして、様々な長さのDNAを合成する。この反応を4種のジデオキシリボヌクレオチドのそれぞれについて行った後、様々な長さを、ポリアクリルアミドゲルによる電気泳動にかけて分離する。ポリアクリルアミドゲルによる電気泳動では1塩基の違いも道程できるので、どの位置で合成が止まったかを検出することにより、標的DNAの塩基配列がわかる。具体的には、各DNAは種々の方法で標識し、サーマルサイクラーを用いたサイクルシーケンス反応等で塩基配列を決定する。DNAの標識方法としては、プライマーを蛍光標識するDye Primer法、ddNTPを蛍光標識するDye Terminator法、基質dNTPを標識するInternal-label法がある。

本発明においては、被検者から得たゲノムDNAを鋳型として、検出しようとする変異を含む領域をPCR法により増幅して標的DNAとすることができる。

[0026] (viii) 次世代シーケンサーによる方法

本発明では、被検者から得たゲノムDNAを鋳型として、検出しようとする変異を含む領域をPCR法により増幅し、次世代シーケンサーを用いて配列を解析する方法も用いることができる。次世代シーケンサーは、Sanger法を用いるシーケンサーを「第1世代シーケンサー」とし、これと対比して用いられる用語である。原理は様々なものがあるが、超並列的な処理によって、低コストかつ短時間で大量の塩基配列を解析することができる（例えば、Holt R.A. and Jones S.J.: Genome Res., Vol.18 (6):839-864, 2008）。

[0027] 変異を検出するためのその他の方法としては、質量分析計（MALDI TOF-MS等）を用いて、質量の違いにより多型を検出する方法；クエンチャーと蛍光色素によって標識されたアレル特異的オリゴと、Taq DNAポリメラーゼを用いたPCR反応を行ってタイピングするTaqMan PCR法；いわゆるインベーター法；ローリングサークル法；シーケンサーを使用して試料DNAの配列を解析する方法、denatured HPLC法、Melting Temperature解析、PCR-SSOP(sequence-specific oligonucleotide probe)法、PCR-PHFA(preferential homoduplex formation assay)法、PCR-RSCA(reference strand conformation assay)法等も挙

げられるがこれらに限定されない。

[0028] RNAレベルで変異を検出する方法としては、例えば、以下のような方法が用いられる。

(i) ノーザンブロット法

被検者に由来する試料から常法に従ってmRNAを取り出し、これをグリオキサル、ホルムアミド、ホルマリン、メチル水銀などを含む溶液中で加熱し、分子内の水素結合をはずして、高次構造を壊して線状にする。その後、ホルマリンを含むアガロースゲルで電気泳動する。ゲルを15~20×SSCの高塩溶液でナイロンメンブレンやニトロセルロースメンブレンにトランスファーする。ニトロセルロースメンブレンの場合は、80℃で約2時間真空オーブンで処理し、RNAを固定する。ナイロンメンブレンの場合は、たとえば紫外線を照射して架橋によりRNAを固定する。

次に、メンブレン上の特定のmRNAを同定するために、クローン化したcDNAからプローブを作製して標識し、プローブとメンブレンを特定条件下で接触させた後、cDNAプローブが結合したmRNAのみを検出できる。ハイブリダイゼーションの条件は、塩濃度、温度、塩基の長さ、組成等によって、当業者が適宜選択することができる。

標的mRNAが微量の場合は、RT-PCR法を組み合わせることもできる。RNA試料に対して、逆転写酵素とオリゴ(dT)プライマーを用いて逆転写反応を行い、得られたcDNAをPCR法により増幅した後、標識した相補的核酸を使用してcDNAを検出する。

[0029] (ii) ドットブロット法

ノーザンブロット法の変法であり、被検者に由来する試料から取り出したmRNAを水酸化メチル水銀法等で変成させた後、様々な濃度でニトロセルロース等のフィルターに点（ドット）としてスポッティングし、放射性標識等で標識したプローブとハイブリダイゼーションさせ、シグナルの強さを検出する。プローブに相同性を有する別のmRNAや、目的mRNAとは長さの異なるものを検出する可能性もあるが、ノーザンブロット法よりも簡便である。

[0030] (iii) RNase保護アッセイ

RNaseが標的RNAと完全に一致してハイブリダイズした二本鎖RNAは分解しないが、ミスマッチがあるとそこで切断するという性質を利用する方法である。まず、³²P等で標識したmRNAをプローブとして試料RNAとハイブリダイズさせたのち、RNaseによって消化する。反応産物をアガロースゲル又はポリアクリルアミドゲル等で電気泳動し、サイズを測定する。転写産物がプローブRNAと完全に相補的であれば、大きな一つのバンドを示すが、ミスマッチが存在する場合、バンドのサイズが小さくなったり、2本以上のバンドが生じたりするので、目的とするRNAの有無を確認できる。

[0031] (iv) in situ ハイブリダイゼーション

被検者から得た試料をタンパク質分解酵素や塩酸などで前処理した後、プローブの非特異的な結合を抑えるためにサケ精子DNAやアルブミンなどでブロッキングする。その後、標識物質でラベルしたプローブRNAと組織標本とを約24時間かけてハイブリダイズさせ、その後組織標本を洗浄して、オートラジオグラフィーや免疫組織化学的方法により標的部位を検出する。また、標的mRNAが微量の場合には、in situ RT-PCR法が用いられる。逆転写酵素とオリゴ(dT)プライマーを用いて逆転写反応を行い、得られたcDNAをPCR法により増幅した後、標識した相補的の核酸を使用してcDNAを検出する。

[0032] (v) リアルタイムPCR法

リアルタイムPCR法は、PCR増幅産物を蛍光で検出する方法である。SYBR Greenに代表される二本鎖核酸に特異的に挿入する蛍光標識を用いるインターカレート法と、TaqManプローブに代表される蛍光標識した変異配列特異的なプローブを用いる方法がある。リアルタイムPCR法を用いる場合も、試料中のRNAから逆転写酵素でcDNAを得て、これを鋳型とすることができる。

[0033] (vi) DNAマイクロアレイ

その他、RNAレベルでの検出は、DNAマイクロアレイを用いた方法によっても行うことができる。被検者の試料から全RNAを抽出し、目的とする複数の変異を有するRNAのそれぞれと相補的なDNAを固定したDNAマイクロアレイを用い

れば、複数の変異を一度に検出することができる。

[0034] タンパク質レベルで変異を検出する方法としては、例えば、変異を有するCoQ2と変異を有しないCoQ2のいずれかのみに交差性なく結合する抗体を用いて、抗体との結合の有無を確認するイムノアッセイが挙げられる。かかる抗体は、当業者が公知の方法によって作製することが可能である。抗体との結合の検出は、公知の方法により抗体や二次抗体を標識しておくことによって行うことができる。標識するための物質としては、例えば、ペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ等の酵素；¹²⁵I、¹³¹I、³⁵S、³H等の放射性物質；フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、ダンシルクロリド、フィコエリトリン、テトラメチルローダミンイソチオシアネート、近赤外蛍光材料等の蛍光物質；ルシフェラーゼ、ルシフェリン、エクオリン等の発光物質；その他、金コロイド、量子ドットなどのナノ粒子が挙げられる。

[0035] タンパク質レベルでの変異の検出方法としては、ウエスタンブロッティングも挙げられる。被検者から得た試料をSDSなどで処理し、タンパク質の高次構造を破壊して変成させた後、SDS-PAGEによりタンパク質を分子量に従って分離する。泳動後、ゲルをメンブレン（ニトロセルロース、ナイロン、PVDF等）と重ねて転写装置にセットし、ゲル内に展開したタンパク質のバンドを電氣的にメンブレン上に転写（ブロッティング）する。タンパク質への非特異的吸着を防ぐためのブロッキングを行った後、変異を有する又は有しないCoQ2に特異的に結合する抗体と一次反応させる。続いて、発色酵素等で標識した一次抗体分子を特異的に認識する二次抗体を一次抗体と反応させ、二次抗体の検出を介して、標的タンパク質を検出する。

[0036] また、本発明において、CoQ10の生合成を低下させる変異の検出として、CoQ2タンパク質の機能の低下を検出してもよい。

CoQ2の機能の低下は、例えば、パラヒドロキシベンゾエートのプレニル化活性の低下を測定して確認することができる。実施例に記載するとおり、CoQ2活性の測定は、PHBを放射性物質で標識し、デカプレニルPHBを検出して行うことができる。

[0037] [MSAリスクの検査キット]

本発明に係るMSAリスクの検査キットは、以下の(i)から(iii)の少なくとも1つを含む。(i) コエンザイムQ2遺伝子における、コエンザイムQ2タンパク質の49位、57位、69位、78位、97位、107位、113位、267位、297位、337位、及び343位からなる群より選択される部位のアミノ酸をコードする核酸を含む領域にハイブリダイズする核酸；

(ii) コエンザイムQ2遺伝子における、コエンザイムQ2タンパク質の49位、57位、69位、78位、97位、107位、113位、267位、297位、337位、及び343位からなる群より選択される部位のアミノ酸をコードする核酸を含む領域を増幅可能なプライマーセット；及び

(iii) P49H、S57T、R69H、M78V、I97T、P107S、S113F、T267A、S297C、R337Q、及びR337X、V343Aからなる群より選択される少なくとも1つの変異を有するコエンザイムQ2タンパク質と、野生型コエンザイムQ2タンパク質のいずれかのみに交差性なく結合する抗体。

[0038] これらの核酸や抗体は、本発明に係るMSAリスクの検査方法に用いることができる。

上記(i)の核酸は、核酸における変異部位に特異的に結合させて、変異の有無を検出することができる。核酸は、例えば5～100塩基長、10～50塩基長、15～30塩基長等とすることができる。核酸の配列は、検出配列に応じて、当業者が適宜設計可能である。

これらの核酸は、固相担体に固定されていてもよい。本明細書において固相担体とは、DNAを固定できる担体であれば特に限定されず、ガラス製、金属製、樹脂製等のマイクロタイタープレート、基板、ビーズ、ニトロセルロースメンブレン、ナイロンメンブレン、PVDFメンブレン等が挙げられる。DNAは、これらの固相担体に公知の方法で固定することが可能である。

[0039] 上記(ii)の核酸は、PCR法により変異を有する核酸を特異的に増幅することにより、変異の検出を可能にする。各プライマーは、例えば5～100塩基長、10～50塩基長、15～30塩基長等とすることができる。プライマーの配列は、検

出配列に応じて、当業者が適宜設計可能である。

[0040] 上記(iii)の抗体は、変異を有するタンパク質と野生型タンパク質のいずれかに交差性なく結合することにより、CoQ2タンパク質の変異を検出可能にする。抗体は、当業者が公知の方法にしたがって作製できる。抗体は標識してあってもよいし、固相担体に固定されていてもよい。本発明に係るキットは、必要に応じて二次抗体を含んでいてもよい。

なお、当該抗体は、モノクローナル抗体であっても、ポリクローナル抗体であってもよい。モノクローナル抗体は、抗原で免疫した動物から抗体産生細胞を単離し、これを骨髓腫細胞等と融合させてハイブリドーマを作製し、このハイブリドーマに産生させることができる。ポリクローナル抗体は、抗原で免疫した動物の血清等から得ることができる。本発明に係る検査キットに含まれる抗体は、蛍光物質、放射性物質等で標識しておくこともできる。

このようなキットは、例えば、検出用プローブ、逆転写酵素、各種反応・検出試薬、緩衝液、取扱説明書、二次抗体等をさらに備えていてもよい。

[0041] [MSAの診断方法]

本発明は、被検者から採取した試料におけるCoQ10の生合成を低下させる変異を検出するMSAの診断方法も包含する。CoQ10の生合成を低下させる変異の検出は、本発明に係る検査方法と同様に行うことができるので、ここでは説明を省略する。

[0042] [MSAの予防又は治療剤、並びに予防又は治療方法]

本発明に係るMSAの治療剤は、有効成分としてCoQ10を含む。また、本発明に係るMSAの予防又は治療方法は、CoQ10を投与する工程を含む。上述のとおり、MSAの一部では、CoQ10の生合成に関与する酵素の変異によりCoQ10量が減少することが発症に関与する。

MSAの投与形態は特に限定されず、経口的投与でも非経口的投与でもよい。非経口投与としては、例えば、筋肉内注射、静脈内注射、皮下注射等の注射投与、経皮投与、経粘膜投与（経鼻、経口腔、経眼、経肺、経膈、経直腸）投与等が上げられる。

CoQ10は、そのまま投与してもよいし、薬学的に許容できる担体、賦形剤、添加剤等を加えて製剤化してもよい。剤形としては、例えば、液剤（例えば注射剤）、分散剤、懸濁剤、錠剤、丸剤、粉末剤、坐剤、散剤、細粒剤、顆粒剤、カプセル剤、シロップ剤、トローチ剤、吸入剤、軟膏剤、点眼剤、点鼻剤、点耳剤、パップ剤等が挙げられる。

製剤化は、例えば、賦形剤、結合剤、崩壊剤、滑沢剤、溶解剤、溶解補助剤、着色剤、矯味矯臭剤、安定化剤、乳化剤、吸収促進剤、界面活性剤、pH調整剤、防腐剤、抗酸化剤などを適宜使用し、常法により行うことができる。

製剤化に用いられる成分の例としては、精製水、食塩水、リン酸緩衝液、デキストロース、グリセロール、エタノール等薬学的に許容される有機溶剤、動植物油、乳糖、マンニトール、ブドウ糖、ソルビトール、結晶セルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、デンプン、コーンスターチ、無水ケイ酸、ケイ酸アルミニウムマグネシウム、コラーゲン、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、カルボキシビニルポリマー、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ポリアクリル酸ナトリウム、アルギン酸ナトリウム、水溶性デキストラン、カルボキシメチルスターチナトリウム、ペクチン、メチルセルロース、エチルセルロース、キサントガム、アラビアゴム、トラガント、カゼイン、寒天、ポリエチレングリコール、ジグリセリン、グリセリン、プロピレングリコール、ワセリン、パラフィン、ミリスチン酸オクチルドデシル、ミリスチン酸イソプロピル、高級アルコール、ステアリルアルコール、ステアリン酸、ヒト血清アルブミン、等が挙げられるがこれらに限定されない。

[0043] 丸剤又は錠剤は、糖衣、胃溶性、腸溶性物質で被覆することもできる。

注射剤は、注射用蒸留水、生理食塩水、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、植物油、アルコール類等を含むことができる。さらに、湿潤剤、乳化剤、分散剤、安定化剤、溶解剤、溶解補助剤、防腐剤等を加えることができる。

[0044] CoQ10は、MSAに有用な他の医薬や治療法と併用投与してもよい。例えば、現在対症療法に用いられている医薬と組み合わせることができる。

CoQ10は、MSAの予防にも有用である。本発明に係る検査方法でMSAリスクが高いと判断された場合、発症していなくてもCoQ10を補充することによって、発症を防止したり、発症を遅らせたりすることが可能である。CoQ10は、いわゆる健康食品にも用いられており、安全性が高く副作用も少ないので、継続的に服用することが可能である。

[0045] CoQ10をヒトに投与する場合、投与量は、患者の年齢、性別、体重、感受性差、投与方法、投与間隔、有効成分の種類、製剤の種類によって異なり、特に限定されないが、例えば、30MG～2000MG、40MG～1500MG、100MG～1200MGを1回又は数回に分けて投与することができる。

[0046] [MSAの予防又は治療薬のスクリーニング方法]

本発明に係るMSAの予防又は治療薬のスクリーニング方法は、多系統萎縮症の予防又は治療剤のスクリーニング方法であって、候補化合物と細胞とを接触させる工程と、細胞内のコエンザイムQ10量を上昇させる候補化合物を選択する工程と、を含む。

スクリーニング方法に用いられる細胞は、CoQ10が生合成される細胞であれば特に限定されないが、例えば、リンパ芽球様細胞などが挙げられる。

候補化合物も特に限定されず、低分子化合物、高分子化合物、核酸、タンパク質等でありうる。これらの候補化合物と細胞とを接触させてインキュベートする際の温度や時間を含む実験条件は、当業者が適宜決定することができる。例えば、CoQ10の生合成に関与する物質の機能を亢進させる候補化合物や、CoQ10の生合成に関与する物質の機能を低下させる物質の機能を阻害する候補化合物などが考えられる。

細胞内のCoQ10量が上昇するか否かも、当業者が公知の方法にしたがって行うことができる。CoQ10活性を測定して、量を評価してもよい。

[0047] [CoQ2タンパク質をコードする核酸]

V343A変異は日本人に特有のものであり、これを研究することにより、さら

に発症のメカニズムを解明し、MSAの治療又は予防方法の研究開発に資すると考えられる。V343A変異を含む核酸は、かかる研究開発に有用である。本発明は、さらに、かかる核酸を含む組換えベクター、当該ベクターを含む形質転換体等も包含する。

[0048] 本明細書において引用されるすべての特許文献及び非特許文献の開示は、全体として本明細書に参照により組み込まれる。

実施例

[0049] 以下、本発明を実施例に基づいて具体的に説明するが、本発明は何らこれに限定されるものではない。当業者は、本発明の意義を逸脱することなく様々な態様に本発明を変更することができ、かかる変更も本発明の範囲に含まれる。

[0050] 1. 対象と方法

1-1. ヒトを対象とする研究の承認

被検者は、東京大学及び他の研究参加機関の審査委員会に承認された研究計画に登録された。全ての被検者から書面によるインフォームドコンセントを得た。

[0051] 1-2. MSA多発家系

MSAの診断は、現在コンセンサスの得られているMSAの診断基準に基づいて行った (Gilman S, et al. Neurology 2008;71:670-6.)。

本発明者らは、これまでに4つの日本のMSA多発家系 (FMSA_1からFMSA_4) について報告した (文献12)。MSAを罹患する2組の兄弟がいる2つの新たな日本のMSA家系 (FMSA_8及びFMSA_12) を含めて6つのMSA多発家系が本研究に登録された (図1 A)。FMSA_1には血族婚があり (両親がfirst degree cousins)、常染色体劣性遺伝の可能性が示唆された。6つのMSA多発家系の臨床所見を表2に示す。FMSA_1のII-4及びII-8とFMSA_8のII-6に生検を実施し、MSAの確定診断とした。

[表2]

	FMSA 1		FMSA 2		FMSA 3		FMSA 4		FMSA 8		FMSA 12	
	II-4	II-8	II-2	II-9	II-4	II-5	II-3	II-7	II-2	II-6	II-3	II-4
Sex	Female	Male	Male	Male	Female	Male	Female	Male	Female	Male	Female	Male
Age at onset, year	68	62	72	63	68	67	69	58	53	52	50	44
Age at examination, year	71	66	73	66	72	68	72	63	76	63	61	?
Initial symptoms	Tremor	Ataxia	Tremor	Tremor	Tremor	Ataxia	Akinesia	Impotence	Akinesia	Akinesia	Ataxia	Ataxia
Parkinsonism	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Cerebellar sign	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+	+
Enhanced muscle stretch reflexes	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+
Babinski sign	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
Urinary dysfunction	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
Orthostatic hypotension	-	-	+	+	+	+	+	+	N.E.	+	+	-
Response to levodopa	Poor	Poor	Poor	Poor	Poor	Poor	Poor	Poor	Poor	Poor	N.E.	N.E.
Cerebellar atrophy on brain MRI	?	+	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+
Pontine atrophy on brain MRI	?	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+
Cross sign on brain MRI	?	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+
Slitlike signal change at the putaminal margin on brain MRI	?	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+	-
Criteria by Gilman ⁴	Definite	Definite	Probable	Probable	Probable	Probable	Probable	Probable	Probable	Definite	Probable	Probable
Phenotypes	MSA-P	MSA-P	MSA-P	MSA-P	MSA-P+C	MSA-P+C	MSA-P	MSA-C	MSA-P	MSA-P	MSA-C	MSA-C
Complication	Retinitis Pigmentosa	Retinitis Pigmentosa	-	-	Rheumatoid arthritis	-	-	-	Cerebral infarction	-	-	-

Abbreviations: +, present; -, absent; ?, unknown; N.E., not evaluated; MRI, magnetic resonance imaging; MSA-C, multiple system atrophy of the cerebellar type; MSA-P, multiple system atrophy with predominant parkinsonism.

[0052] 1 - 3. 孤発性MSA患者と対照者

MSAの診断は、現在コンセンサスが得られている基準に従って行った (Gilman)

an S, et al. Neurology 2008;71:670-6.)。日本人コホートは、Japan Multiple System Atrophy Research Consortium (JAMSAC)から試料提供された195人のMSA患者と113人の健常者を含んだ。さらに、東京大学、高齢者ブレインバンク、東京都健康長寿医療センター、新潟大学脳研究所、北海道大学大学院医学研究科、及び鹿児島大学大学院医歯学総合研究科における168人のMSA患者と407人の対照者を、対象とした。

[0053] 独立したMSAのコホートとして、ヨーロッパと北米のコホートを用いた。ヨーロッパ人のゲノムDNAのサンプルには、ピティエ・サルペトリエール病院（フランス）の138人のMSA患者と281人の対照者、フェデリコ2世大学（イタリア）の34人のMSA患者と34人の対照者、ボン大学（ドイツ）の46人のMSA患者のものが含まれていた。ヨーロッパ人コホートには、シドニー大学の5人のMSA患者のサンプルも含まれた。北米人のゲノムDNAのサンプルには、北米多系統萎縮症研究グループ（North American Multiple System Atrophy Study Group; NAMS-SG）から試料提供された172人のMSA患者と294人の対照者のものが含まれていた。参加者の統計を表3に示す。

[表3]

	Ethnic series	Number	Age at sampling	Age at onset	Male/Female	Phenotype (MSA-C/ MSA-P/ Unclassified)
MSA patients	Japan	363	61.4 (8.5)	59.5, 8.6	211/152	259/85/19
	Europe	223	60.0 (7.9)	55.4, 8.3	138/85	191/22/10
	North America	172	N.D.	58.4, 9.5	103/69	52/107/13
Control Subjects	Japan	520	68.7 (11.0)	N.A.	255/265	N.A.
	Europe	315	58.9 (6.1)	N.A.	150/165	N.A.
	North America	294	65.2 (9.0)	N.A.	156/138	N.A.

Abbreviations: MSA-C, multiple system atrophy of the cerebellar type; MSA-P, multiple system atrophy with predominant parkinsonism; N.A., not applicable; N.D., not described.

Age at sampling and age at onset are presented as mean, standard deviation.

[0054] 1－4. 対照者の独立コホートと他の神経変性疾患コホート

レプリケーションスタディのための対照者の独立コホート（n=2,383）は、Japanese Genetic Study Consortium for Alzheimer Disease (JGSCAD) 及び

Japanese Consortium for Amyotrophic Lateral Sclerosis research (JaCAL S)から提供された。CoQ2変異体とMSAの関連の特異性を調べるために、他の神経変性疾患（アルツハイマー病（AD）、パーキンソン病（PD）、及び筋萎縮性側索硬化症（ALS）患者；JGSCADから2,728人のAD患者、東京大学及びJapanese Parkinson Disease Susceptibility Gene Consortiumから659人のPD患者、東京大学及びJaCALSから634人のALS患者）も調査対象とした。

[0055] 1－5. 関連解析とホールゲノムシーケンス

関連解析は、Affymetrix SNP 6.0 arraysを用いて、FMSA_1に対して行った。FMSA_1のII-4のゲノムDNAサンプルを、Illumina Genome Analyzer IIX (100-bp-long paired ends)で4回分析した。ヒトゲノム参照配列（NCBI36/hg18 assembly）に対するアライメント及び変異の検出には、Burrows Wheeler Aligner (BWA)及びSmatoolsを用いた。

[0056] 1－6. COQ2遺伝子の変異解析

COQ2遺伝子の各エクソンを増幅するプライマーペア表4を用いてPCRを行い、続いてヌクレオチド配列解析を行った。

[表4]

Primer	Forward primer sequence	Reverse primer sequence
Exon 1	5'-TGAAGGAGGGCCACGAGAA-3'	5'-CCTAGAGTAAGCGACCACGATG-3'
Exon 2	5'-GGGGTCCTTTGTGATTTGAG-3'	5'-TTCCATGCTGGATTTCTGTG-3'
Exon 3	5'-TACCATGGGCCAGTCTCTTC-3'	5'-TGTGTGGTGAGTTACTTACACTTGC-3'
Exon 4	5'-TTGCTTAAAGTATTTCTGTTTC-3'	5'-ATCTCTCCATAAAAGTGTAGTTTGC-3'
Exon 5	5'-CACTGAACACACTCCGATGC-3'	5'-TGCTTTCTCCTTAATTTGGTTC-3'
Exon 6	5'-TCACCGCTTATGGTATATCTGC-3'	5'-TGCCAGGTAAACACAGAGGG-3'
Exon 7	5'-TTTGCTGTTTCTCCTCCG-3'	5'-AAATCTTCATCTTCAGGTTCTTAATTC-3'

Polymerase chain reaction (PCR) was performed using primer pairs to amplify each exon of *COQ2* with LATAq (TaKaRa). Direct nucleotide sequence analysis was performed using ExoSAP-IT (USB, OH, USA), a BigDye Terminator v3.1 kit, and XTerminator using ABI 3130 and 3730 Genetic Analyzers (Life Technologies, CA, USA).

[0057] Exon 1 Forward primer sequence 配列番号：2

Exon 1 Reverse primer sequence 配列番号：3

Exon 2 Forward primer sequence 配列番号：4

Exon 2 Reverse primer sequence 配列番号：5

Exon 3 Forward primer sequence 配列番号：6

Exon 3 Reverse primer sequence 配列番号 : 7
Exon 4 Forward primer sequence 配列番号 : 8
Exon 4 Reverse primer sequence 配列番号 : 9
Exon 5 Forward primer sequence 配列番号 : 10
Exon 5 Reverse primer sequence 配列番号 : 11
Exon 6 Forward primer sequence 配列番号 : 12
Exon 6 Reverse primer sequence 配列番号 : 13
Exon 7 Forward primer sequence 配列番号 : 14
Exon 7 Reverse primer sequence 配列番号 : 15

[0058] 1-7. Yeast Complementation SystemによるCOQ2遺伝子の機能解析

野生型ヒトCOQ2遺伝子に対し、表5のプライマー（上から順に、配列番号 : 16~47）を用いてPCRによる部位特異的変異導入を行った。続いて野生型と変異型のヒトCOQ2遺伝子cDNAを酵母発現型pAUR123ベクター（Takara社）に挿入した。酵母coq2遺伝子ヌル変異体であるBY4741 Δ coq2株を、野生型又は変異型ヒトCOQ2遺伝子cDNAを含むpAUR123ベクターで、Yeastmaker Yeast Transformation System 2（Clontech社）を使って形質転換した。非発酵性炭素源を含む培地（酵母エキス・ペプトン・グリセロール培地）中での増殖を、OD monitor（Titech社）で培地の600nmの吸光度（OD600）をモニターすることにより測定した。

[表5]

Primer	Sequence
L16V-F	5'-TCGCGCGGGGCTGCGGGCTGTGGCACTGGC-3'
L16V-R	5'-AGCCCGCAGGCCCCGCGCGAACCCCGCGG-3'
P22L-F	5'-TGTGGCACTGGCGTGGCTGCTGGGCTGGCGGG-3'
P22L-R	5'-GCAGCCACGCCAGTGCCACAGCCCGCAGGC-3'
F29L-F	5'-CGGGCTGGCGGGGCGCTCCCTCGCCCTGGCG-3'
F29L-R	5'-GGAGCGGCCCCGCCAGCCCGGCAGCCACGC-3'
P49H-F	5'-TTGCAGCCCCCGCCTGTCACGAGCCGCGC-3'
P49H-R	5'-GACAGGCGGGGGGCTGCAAGTCACCACGT-3'
S57T-F	5'-GCCGCGCGGGGCGCCAGCTCACTTTGTCCGCGG-3'
S57T-R	5'-TGAGCTGGCGCCCGCGCGGCTCGGGACAGG-3'
R69H-F	5'-GGTGGTGGACTCTGCGCCCCACCCCTGCAG-3'
R69H-R	5'-GGGCGCAGAGTCCACCACCGCCGCGCGG-3'
M78V-F	5'-TGCAGCCGTAATTGCGCCTCGTGCGGTTGGAC-3'
M78V-R	5'-GAGGCGCAAGTACGGCTGCAGGGGGCGGGG-3'
I97T-F	5'-TTTACCATGTACCTGGAGCACTGGTTTGGCAG-3'
I97T-R	5'-TGCTCCAGGTACATGGTAAATACAGAAGCC-3'
P107S-F	5'-CAGCTGAACCAGGTTGTTTTTCAGATTGGTAC-3'
P107S-R	5'-AAAACAACCTGGTTCAGCTGCCAAACCAT-3'
S113F-F	5'-TCCAGATTGGTACATGCTCTTCTCTTTGGCA-3'
S113F-R	5'-AGAGCATGTACCAATCTGGAAAACAACCT-3'
T267A-F	5'-TTTTGATTGGTCTTAAGTCAGCGGCTCTGCGG-3'
T267A-R	5'-TGACTTAAGACCAATCAAAACATCATCTCT-3'
S297C-F	5'-TGAGCCTAGTGGGTGTGAAGTGTGGACAGACT-3'
S297C-R	5'-GTTACACCCACTAGGCTCAGTGCCCCCAG-3'
N336H-F	5'-GTTGGAATAAATTTATCTCCCACCGAACACTG-3'
N336H-R	5'-GGAGATAAATTTATTCCAACAATCCTCAGG-3'
R337Q-F	5'-GAATAAATTTATCTCCAACCAAACTGGGAC-3'
R337Q-R	5'-GGTTGGAGATAAATTTATTCCAACAATCCT-3'
R337X-F	5'-GGAATAAATTTATCTCCAAGTGAACACTGGGA-3'
R337X-R	5'-GTTGGAGATAAATTTATTCCAACAATCCTC-3'
V343A-F	5'-CCGAACACTGGGACTAATAGCTTTTTTAGGG-3'
V343A-R	5'-CTATTAGTCCCAGTGTTCGGTTGGAGATAA-3'

PCR-based site-directed mutagenesis of wild-type human *COQ2* was carried out using the primers with a QuickChange Site-Directed Mutagenesis kit (Stratagene, CA, USA).

[0059] 1 – 8. CoQ2活性の測定

CoQ2 (EC 2.5.1.39) の活性は、放射性パラヒドロキシベンゾエート (PHB) のデカプレニルPHBへの取り込みを測定することによりアッセイした。具体的には、QProteome Mitochondria Isolation kit (Qiagen社) を用いてリンパ芽球様細胞から調製したミトコンドリア画分を酵素源とした。Lopez-Martinらの方法 (Lopez-Martin JM, et al. Hum Mol Genet 2007;16:1091-7.) に従い、500 μ gのミトコンドリアリッチ画分、1000 μ M [^{14} C]PHB (1.85 MBq/ μ

mol)、及び5 μ Mデカプレニルピロリン酸を含む100 μ Lのアッセイ用バッファ (0.05% 3-[(3-クロルアミドプロピル)ジメチルアンモニオ]-1-プロパンスルホネート(CHAPS)を含む) からなる反応液を調製した。反応は37°Cで60分行い、1000 μ Lのヘキサンで抽出した。ヘキサン相の放射性物質を液体シンチレーションカウンターTri-Carb 2000CA (PerkinElmer社) で測定した。結果は、9つの独立した実験の平均値で示した。

[0060] 1-9. 組織中のCoQ10レベルの測定

152人のMSA患者と76人の対照者から樹立したEBウイルス不死化リンパ芽球様細胞 (JAMSACより提供を受けた) を、10%ウシ胎児血清を含むRPMI-1640培地で培養した。遊離コレステロールとCoQ10を、約 10^7 から 10^8 個のリンパ芽球様細胞から4倍量の2プロパノールで抽出するか、3人のMSA患者及び3人の対照者の生検によって調製した小脳の凍結サンプルから9倍量の2プロパノールで抽出した。

抽出物中の遊離コレステロールと総CoQ10濃度 (ユビキノン10及びユビキノール10) は、高速液体クロマトグラフィーで測定した。

[0061] 1-10. 統計解析

すべての結果は、平均±標準偏差で示した。キャリアと非キャリアの発症年齢の平均値の有意差は、student t検定で；アレル頻度と分割表の有意差はYates補正カイ2乗検定又はFisherの直接確率検定で、オッズ比と対応する95%信頼区間 (CI) はFisherの直接確率検定でそれぞれ評価した。群比較は、Kruskal-Wallis検定とSteel法を用いた。すべての統計は両側検定とし、有意水準は $p=0.05$ とした。

[0062] 2. 結果

2-1. 家族性MSAの原因遺伝子の同定

常染色体劣性遺伝様式の遺伝モデルを使ったFMSA_1のパラメトリックな多点連鎖解析によれば、染色体4、5、6、7、9及び13を含む約80Mbにわたる領域におけるLODスコアの最高値は1.93であった (図1B)。

FMSA_1における患者 (II-4) について、ホールゲノムシーケンスを行った

ところ、合計で187.5Gbのshort readが得られた。参照ゲノムの平均カバレッジは58倍であった。候補領域に位置する47,830の一塩基変異 (SNVs) 又は挿入／欠失 (indels) から始めて、この家族の変異候補を4つの新規な非同義SNVに絞り込んだ (図1C)。

4つのSNVは、SHR00M3遺伝子 (NM_020859, Q8TF72) のc.2120A>G, p.K707R in、C0Q2遺伝子 (NM_015697, Q96H96) のc.1178T>C, p.V343A、C0Q2遺伝子のc.382A>G, p.M78V、及びSCEL遺伝子 (NM_144777, 095171) のc.691A>G, p.R231Gであった。

[0063] 180人の日本人対照者をスクリーニングしたところ、C0Q2遺伝子のM78Vのみが対照者には見られず、SHR00M3遺伝子のK706R、C0Q2遺伝子のV343A及びSCEL遺伝子のR231Gのアレル頻度は、それぞれ3/360、5/360、及び98/360であった。家族性MSAが非常に珍しいことから、CoQ10の生合成に関与するパラヒドロキシベンゾエート・ポリプレニルトランスフェラーゼをコードするC0Q2遺伝子の変異であるM78Vが、家族性MSAの常染色体劣性遺伝の原因である可能性が高いと考えた。FMSA_1の同時分離解析により、2人の患者 (II-4及びII-8) はC0Q2遺伝子におけるM78VとV343Aのホモ接合体を有し、罹患していない兄弟 (II-7) は野生型配列を有することがわかった (図1D)。

[0064] これらの知見に基づき、他の複数のMSA家系においてC0Q2遺伝子のコード領域とそれに接するスプライス領域のヌクレオチド配列の直接解析を行った。さらに、FMSA_12における患者の兄弟 (II-3及びII-4) において、C0Q2遺伝子のナンセンス変異 (c.1159C>T, p.R337X) 及びミスセンス変異 (c.1178T>C, p.V343A) のヘテロ接合体を発見した。FMSA_12の同時分離解析により、彼らの母親 (I-2) がV343Aのヘテロ接合体を有すること、罹患していない兄弟 (II-1) が野生型配列を有していたこと、別の罹患していない兄弟 (II-2) がR337Xのヘテロ接合体を有していたことを発見し、2人の患者である兄弟 (II-3及びII-4) が、R337XとV343Aの複合ヘテロ接合体を有していることを確認した。R337Xは、180人の日本人の対照者には見られなかった。他の4つのMSA家系 (FMSA_2、FMSA_3、FMSA_4、及びFMSA_8) では、C0Q2遺伝子の変異は見出

されなかった。

以上の結果から、FMSA_1及びFMSA_12の2家系の家族性MSAでは、M78VとV343Aのホモ接合体、又はR337XとV343Aの複合ヘテロ接合体を有すると、これが十分条件となってMSAが発症することがわかった。

[0065] 2-2. CoQ2変異体と孤発性MSAとの関連

孤発性MSAに対するCOQ2遺伝子変異の関与を調べるため、より大きな日本人コホート（363人のMSA患者と520人の対照者）について、COQ2遺伝子のリシーケンスを行った。dbSNP130に登録された非同義COQ2遺伝子変異体は一つだけであった（L16V、rs6818847）が、本発明者らは、L16Vのアレル頻度が日本人のMSA患者においては0.90、日本人の対照者においては0.88であることを確認したため、この変異体をその後の解析に含めなかった。

COQ2遺伝子のリシーケンスにより、4人のMSA患者が2つの変異を同時に有していたが（1人はI97T/V343A、1人はR337Q/V343A、2人はV343A/V343A）、対照者には2つの変異をCOQ2遺伝子に有する者は存在しないことが明らかとなった（表6）。

[表6]

Genotypes	Japanese series		European series		North American series	
	MSA Patients n = 363	Control Subjects n = 520	MSA Patients n = 223	Control Subjects n = 315	MSA Patients n = 172	Control Subjects n = 294
P22L/wt	0	1	0	0	0	0
F29L/wt	0	0	1	0	0	0
P49H**/wt	0	0	0	0	1	0
S57I**/wt	0	0	1	0	0	0
R69H**/wt	0	0	0	0	0	1
I97I*, V343A§	1	0	0	0	0	0
P107S**/wt	1	0	0	0	0	0
S113F**/wt	1	0	0	0	0	0
T267A*/wt	0	0	1	0	0	0
S297C*/wt	0	0	1	0	0	0
N336H/wt	0	1	0	0	0	0
R337Q**/V343A§	1	0	0	0	0	0
V343A§/wt	29	17	0	0	0	0
V343A§/V343A§	2	0	0	0	0	0

Abbreviations: wt, wild-type sequence; MSA, multiple system atrophy; * mildly or ** severely deleterious variants identified using the yeast complementation system; §, decreased COQ2 activity determined by enzyme assay.

[0066] サブクローニングされた変異アレルのヌクレオチド配列解析により、R337Q

/V343Aは複合ヘテロ接合体であることがわかった。I97TとV343Aは距離が大きすぎてPCRで増幅できず、両親からのゲノムDNAサンプルも入手できなかったため、I97T/V343Aの相を決定することはできなかった。29人のMSA患者がV343Aのヘテロ接合体を有し、2人のMSA患者が別のヘテロ接合変異（P107S及びS113F）を有していることを確認したが、17人の対照者もV343Aのヘテロ接合体を含み、2人の対照者が別のヘテロ接合体変異（P22L及びN336H）を有することも確認した。

[0067] C0Q2遺伝子変異体のうちV343Aは、日本人では比較的良好に見られる変異であった。表7に示されるとおり、V343Aのアレル頻度は、日本人のMSA患者においては35/726（4.8%）であり、日本人の対照者においては17/1,040（1.6%）であること、また、対照者と比較したMSA患者のオッズ比は3.05（95% C.I.、1.65～5.85）で有意（ $p=1.5 \times 10^{-4}$ ）であることを確認した。さらに、日本人の対照者の第二コホート（ $n=2,383$ ）においてさらにV343Aのジェノタイピングを行ったところ、対照者におけるV343Aのアレル頻度は106/4,766（2.2%）であり、対照者の第二コホートと比較したMSA患者のオッズ比は、2.23（95% C.I.、1.46～3.32、 $p=6.0 \times 10^{-5}$ ）となった。

[表7]

Association of V343A with MSA in Japanese series						
Genotype	MSA patients and control subjects		Patients with other neurological diseases			
	Japanese series		Japanese series			
	MSA patients	Control subjects (Tier 1)	AD patients	PD patients	ALS patients	Control subjects (Tier 2)
	n = 363	n = 520	n = 2,728	n = 659	n = 634	n = 2,383
Heterozygous V343A	31	17	105	33	31	106
Homozygous V343A	2	0	2	0	0	0
Allele frequency of V343A	35/726 (4.8%)	17/1040 (1.6%)	109/5,456 (2.0%)	33/1,318 (2.5%)	31/1,268 (2.4%)	106/4,766 (2.2%)
Odds ratio (95% C.I.) compared with tier 1	3.05 (1.65-5.85) $p=1.5\times10^{-4}$					
Odds ratio (95% C.I.) compared with tier 2	2.23 (1.46-3.32) $p=6.0\times10^{-5}$					
Association of functionally deleterious variants* with MSA in combined series						
	Number of MSA patients	Number of controls subjects	Allele frequency of functionally deleterious variants in MSA patients	Allele frequency of functionally deleterious variants in control subjects	Odds ratio (95% C.I.)	Fisher exact test
Combined series (Japanese, European and North American)	758	1,129	8/1,516 (0.53%)	1/2,258 (0.05%)	11.97 (1.60-531.5)	$p = 0.0039$

Abbreviations: wt, wild-type sequence; MSA, multiple system atrophy; AD, Alzheimer disease; PD, Parkinson disease; ALS, amyotrophic lateral sclerosis; C.I., confidence interval.

* Functionally deleterious variants are P49H, S57T, R69H, I97T, P107S, S113F, T267A, S297C, and R337Q as determined by the yeast complementation assay.

AD、PD及びALSを含む他の神経変性疾患のジェノタイピングにより、V343Aのアレル頻度はAD患者において109/5,456 (2.0%) (うち2人はV343Aのホモ接合体を有した)、PD患者において33/1,318 (2.5%)、ALS患者において31/1268 (2.4 %)であった。これらのアレル頻度は、対照者の第一及び第二コホートにおいては有意差が見られず、COQ2遺伝子のV343A変異のMSAに対する特異性が確認できた。

[0068] 次に、我々は、欧米人のMSAコホートを解析した。ヨーロッパ人コホートにおいては、各MSA患者で4つのシングルトン変異 (F29L、S57T、T267A、及びS297C) を見出したが、CoQ2の変異を有する対照者はいなかった (表6)。北米コホートにおいては、1人のMSA患者に1つのシングルトン変異 (P49H) を見出し、1人の対照者においても1つのシングルトン変異 (R69H) を見出した (表6)。興味深いことに、日本人群では比較的によく見られる変異であるV343Aは、欧米人ではMSA患者群にも対照者群にも見られなかった。いずれのコホートでもV343A以外の変異体は稀であったことから (表6)、次に、コホートを組み合わせて、COQ2遺伝子変異と機能障害との関連に着目してこれらの変異体とMSAとの関係を調べた。

[0069] 2-3. yeast complementary assayによるCOQ2遺伝子変異体の機能解析

CoQ10の生合成と好氣的エネルギー産生に対する、各変異の機能への影響を調べるために、酵母coq2遺伝子ヌル変異体を、野生型又は変異型ヒトCOQ2遺伝子cDNAで形質転換して、機能相補性解析を行った (図2A)。BY4741 Δ coq2酵母株の変異COQ2遺伝子 (P49H、S57T、R69H、M78V、M78V-V343A、P107S、S113F、R337Q及びR337Xを含む) による形質転換体においては、coq2ヌル株に見られるのと同様に、呼吸依存性増殖が著しく低下した (非常に有害な変異)。さらに、変異型COQ2 cDNA (I97T、T267A及びS297Cを含む) による形質転換体は、野生型CoQ2を発現する形質転換体に比べてかなり低いが、coq2ヌル株よりは高い増殖率を示した (中等度に有害な変異)。変異型COQ2 cDNA (L16V、P22L、F29L、N336H及びV343Aを含む) による形質転換体は、野生型CoQ2

を発現する形質転換体と同等の増殖率を示した。

[0070] 患者－対照者コホートで同定された稀な変異体に着目すると、yeast complementation assayにおいて、9つ変異体（P49H、S57T、R69H、I97T、P107S、S113F、T267A、S297C及びR337Q）が中等度から重度に有害なものと認められた。これらの機能的に有害な稀な変異体について、3つのコホートを併せて解析したところ、8つの変異（P49H、S57T、I97T、P107S、S113F、T267A、S297C及びR337Q）がMSAコホート（n=758）において同定され、対照者コホート（n=927）では1つだけ変異が同定された（R69H）。MSA患者における、対照者と比較した、有害な変異体のアレル頻度のオッズ比は9.83（95% C.I., 1.31～436.4）で、有意であった（p=0.014）（表7）。

[0071] 2－4. リンパ芽球様細胞におけるCoQ2活性

次に、CoQ2変異を有するリンパ芽球様細胞が入手できるものについて、V343A変異体との関連でCoQ2活性を測定した。V343Aは、MSAによく関連する変異であり、この変異体がyeast complementation assayにおいて通常の増殖を示したので選択した。CoQ2変異（R337Q/V343A、R337X/V343A、V343A/V343A、またはV343A/wt）のいずれかを有するMSA患者から得たリンパ芽球様細胞と、変異を有しない対照者から得たリンパ芽球様細胞におけるCoQ2活性を測定した。これらの患者におけるCoQ2活性は、変異を有しない対照者と比較して著しく低かった（図2B）。V343A変異体におけるCoQ2活性は、yeast complementation analysisにおいて、V343A変異CoQ2 cDNAで形質転換した酵母coq2ヌル株が通常の増殖速度を示したにもかかわらず、著しく減少していた。

[0072] 2－5. ジェノタイプとフェノタイプの関連

CoQ2遺伝子変異（yeast complementation assay及びCoQ2活性測定において確認された機能損失したCoQ2）のキャリアである孤発性MSA患者と、非キャリアの孤発性MSA患者の臨床的特徴を表8に示す。

[表8]

Category	Genotype	Number	Cohort	Age at onset	Male/Female	Phenotype (MSA-C/ MSA-P/ Unclassified)
Carriers	All variants	39	All	61.7, 8.2	27/12	34/5/0*
	P49H/wt	1	North America	61	1/0	0/1/0
	S57I/wt	1	Europe	50	0/1	1/0/0
	I97T, V343A	1	Japan	57	1/0	1/0/0
	P107S/wt	1	Japan	57	1/0	1/0/0
	S113F/wt	1	Japan	60	1/0	1/0/0
	T267A/wt	1	Europe	66	1/0	1/0/0
	S297C/wt	1	Europe	54	1/0	1/0/0
	R337Q/V343A	1	Japan	61	1/0	1/0/0
	V343A/wt	29	Japan	62.8, 9.0	20/9	25/4/0
	V343A/V343A	2	Japan	61.0, 1.4	0/2	2/0/0
Noncarriers	wt/wt	719	All	57.3, 8.7	425/294	468/209/42

Abbreviations: wt, wild-type sequence; MSA-C, multiple system atrophy of the cerebellar type; MSA-P, multiple system atrophy with predominant parkinsonism.

Age at sampling and age at onset are presented as mean, standard deviation.

* The ratio of MSA-C to MSA-P was significantly higher in carriers of *COQ2* variants than in noncarriers, as determined by the Fisher exact test using the 2×2 contingency table.

キャリア群のMSA発症年齢の平均は非キャリア群より高く、その差は有意であった。 $(p=0.0021)$ 。臨床病型は、34人のキャリアがMSA-C、5人のキャリアがMSA-P、1人のキャリアがいずれにも分類されない型であり、468人の非キャリアがMSA-C、209人の非キャリアがMSA-P、42人の非キャリアがいずれにも分類されない型であった。MSA-Pに対するMSA-Cの比は、2×2分割表を用いたFisherの直接確率検定で求めたところ、*CoQ2*変異のキャリアにおいて非キャリアより有意に高かった $(p=0.018)$ （表8）。

[0073] 2-6. リンパ芽球様細胞における細胞内CoQ10濃度

V343AキャリアのMSA患者から得たリンパ芽球様細胞、変異を有しないMSA患者から得たリンパ芽球様細胞、及び変異を有しない対照者から得たリンパ芽球様細胞における細胞内CoQ10濃度を測定した。対象者は（1）2つの変異アレル（R337Q/V343A、R337X/V343A、及びV343A/V343A）のキャリアであるMSA患者、（2）V343Aのヘテロ接合体のキャリアである16人のMSA患者、（3）変異を有しない133人のMSA患者、及び（4）変異を有しない76人の対照者に分けた（表9）。

[表9]

	MSA patients					Control subjects
Variants	R337Q/ V343A	R337X/ V343A	V343A/ V343A	V343A/wt	wt/wt	wt/wt
Number	1	1	1	16	133	76
Total CoQ ₁₀ / free cholesterol	2.19	2.58	1.86	3.38 (0.53)	3.41 (0.74)	3.48 (0.75)
Percent of control mean	62.9	74.1	53.4	97.1	98.0	100.0

Abbreviations: MSA, multiple system atrophy; CoQ₁₀, coenzyme q10.

Results on total CoQ₁₀/free cholesterol are presented as mean and standard deviation (nmol/mol) in parenthesis.

[0074] 2つの変異アレルのキャリアであるMSA患者から得たリンパ芽球様細胞内CoQ10濃度は、変異を有しない対照者よりかなり低かった。V343Aのヘテロ接合体を有するMSA患者では、変異を有しない対照者に比較して、細胞内CoQ10濃度が低下している傾向が見られたが、有意な差ではなかった。C0Q2変異を有しないMSA患者のリンパ芽球様細胞内CoQ10濃度は、C0Q2変異を有しない対照者と同等であった。

[0075] 2-7. 脳組織における細胞内CoQ10濃度

C0Q2変異を有するMSA患者から得られる脳組織の数は限られているが、C0Q2変異を有する3人の患者（1人はM78V-V343A/M78V-V343A、2人はV343A/wt）の凍結脳組織と、変異を有しない対照者の凍結脳組織におけるCoQ10濃度を測定した（図2C）。M78V-V343Aのホモ接合体を有するMSA患者におけるCoQ10濃度は、変異を有しない対照者と比較して有意に低かった。

[0076] 3. MSA患者を対象としたユビキノールの臨床試験

3-1. 試験薬と投与方法

家族性MSAの発症者で、C0Q2遺伝子のR337X/V343A複合ヘテロ接合性変異を

有する患者1例（図1に示すFMSA_12のII-4）を対象として、ユビキノールの臨床試験を行った。

カネカから提供を受けたユビキノール（2-[(2E, 6E, 10E, 14E, 18E, 22E, 26E, 30E, 34E)-3, 7, 11, 15, 19, 23, 27, 31, 35, 39-decamethyltetraconta-2, 6, 10, 14, 18, 22, 26, 30, 34, 38-decaenyl]-5, 6-dimethoxy-3-methylcyclohexa-2, 5-diene-1, 4-diol）として、120mg含有する安定粉末を、規定の用量（600mg、840mg、1200mg）に従い、胃瘻チューブから朝一回投与した。

[0077] 3-2. 試験のデザイン・目的

対象1例で対照を設定しない非盲検の探索的臨床試験であり、以下の事項の検討を目的として行った。

1. 高用量投与の安全性を確認する
2. 薬物動態を調べる
3. 薬物動態から長期投与の用量を判断する
4. 臨床指標を検討する

[0078] 3-3. 試験の評価項目

試験の評価項目は以下のとおりである。

(1) 主要評価項目 (Primary endpoint)

- ・血漿および白血球中、髄液中コエンザイムQ10濃度
- ・有害事象の有無

(2) 副次的評価項目 (Secondary endpoint)

- ・UMSARS Part II（運動機能の評価）
- ・尿中8-OHdG
- ・150-PETによる酸素代謝能の評価

(3) 安全性評価項目

- ・肝機能検査（AST, ALT, γ -GTP, ALP, T.Bil）

ラットにコエンザイムQ10を300mg/kg投与したところ、AST, ALTが軽度上昇したという報告があるため。

- ・自覚症状、身体診察・神経学的診察による他覚所見

- ・ 施行される各種検査値の異常

[0079] 3-4. 試験のアウトライン

試験のアウトラインを図4に示す。

[0080] 3-5. 短期投与試験の結果

- ・ 有害事象について

試験期間中、自覚症状・他覚症状の有無、臨床検査（血算、生化学的検査：AST, ALT, γ -GTP, ALP, T.Bil, BUN, Cre, Na, K, Cl, Glu, CK）について経時的な観察をした。

試験薬に関連すると判断される有害事象は生じなかった。

[0081] 3-6. 血漿CoQ10濃度

血漿CoQ10濃度の測定結果を図5に示す。

ベースの血漿CoQ10濃度は低いレベルであった。1200mg投与で、既報告におけるプラトーに達した。ユビキノンの高用量投与の既報告では、ユビキノンとして2400mg以上の投与によって、7.5~8.0 μ g/mlでプラトーに達している。本試験では、ユビキノール1200mgで7.9 μ g/mlに達しており、既報告のデータに照らしてプラトーと判断された。

[0082] 3-7. 単核球中の遊離コレステロールに対する全CoQ10量

単核球中の全CoQ10/遊離コレステロール（nM/ μ M）の測定結果を図6に示す。ユビキノール投与により、用量依存的に、単核球中の全CoQ10/遊離コレステロールが上昇していることが確認された。

[0083] 3-8. 髄液CoQ10濃度

髄液CoQ10濃度（ μ g/ml）を測定した結果を図7に示す。ユビキノン・ユビキノール投与時の髄液CoQ10濃度の変化は報告がない。ベースの髄液CoQ10濃度は低いレベルであったが、840mg, 1200mg投与群でプラトーに達しているように見えた。

[0084] 3-9. 尿中8-OHdG

尿中8-OHdG（ng/mg-Cre）の測定結果を図8に示す。ベースの尿中8-OHdGは高いレベル（平均8.4, n=500）であったが、ユビキノール投与により低下

した。用量依存性は明確には見られなかった。

[0085] 3-10. 臨床評価スケール

臨床評価スケールを図9に示す。軽微な変動はあったが、統計的に有意と判断できる変化は認められなかった。担当医、家族（妻）からの呼びかけに対する反応の改善、上肢の拳上の改善、四肢の震えの軽減との感想が得られた。但し、主観的なバイアス、入院中のリハビリ効果など複合的な要素があり、判断は困難であった。

[0086] 3-11. 脳血流量・酵素代謝量

脳血流量と酵素代謝量の測定結果を図10に示す。いずれも投与後に上昇する傾向が見られた。

[0087] 3-12. まとめ

今回の試験で以下の点が初めて明らかになった。

1. 高用量投与においても、ユビキノールはユビキノンに比べ、bioavailabilityが高い。
2. ユビキノール1200mgで、血漿CoQ10はプラトーに達すること。先行研究で観察されている血漿CoQ10のプラトーに一致する結果が観察された。このことは、投与されたCoQ10が血漿へ移行することを示す。
3. ユビキノール投与により、末梢血単核球のCoQ10含量が上昇することが確認できた。このことは、投与されたCoQ10が細胞内に移行することを示す。
4. ユビキノール投与により、髄液CoQ10濃度、正常コントロールの髄液CoQ10濃度を超える値まで上昇することが確認された。このことは、投与されたCoQ10が髄液へ移行することを示す。
5. 2～4. より、投与されたCoQ10が、CoQ10の低下を補うことができることが示された。
5. ユビキノール1200mgの2週間投与で、有害事象は観察されなかった。
6. [^{15}O] O_2 PETの評価によって、脳酸素消費量が投与前に比べて明らかに改善した。CoQ10補充により、中枢神経系の機能改善を評価するサロゲートマーカーになる可能性が示唆された。

請求の範囲

- [請求項1] 被検者の多系統萎縮症リスクの検査方法であって、被検者から採取した試料におけるコエンザイムQ10の生合成を低下させる変異を検出する工程を含む、方法。
- [請求項2] 前記コエンザイムQ10の生合成を低下させる変異は、Para-hydroxybenzoate-polyprenyltransferase（コエンザイムQ2）の発現又は機能を抑制する変異である、請求項1に記載の方法。
- [請求項3] 前記コエンザイムQ2の発現又は機能を抑制する変異は、配列番号：1におけるP49H、S57T、R69H、M78V、I97T、P107S、S113F、T267A、S297C、R337Q、R337X、及びV343Aからなる群より選択される、請求項2に記載の方法。
- [請求項4] 前記コエンザイムQ2の発現又は機能を抑制する変異は、V343Aである、請求項2に記載の方法。
- [請求項5] 多系統萎縮症リスクの検査キットであって、以下の(i)から(iii)の少なくとも1つを含むキット：
- (i) コエンザイムQ2遺伝子における、コエンザイムQ2タンパク質（配列番号：1）の49位、57位、69位、78位、97位、107位、113位、267位、297位、337位、及び343位からなる群より選択される部位のアミノ酸をコードする核酸を含む領域にハイブリダイズする核酸；
 - (ii) コエンザイムQ2遺伝子における、コエンザイムQ2タンパク質（配列番号：1）の49位、57位、69位、78位、97位、107位、113位、267位、297位、337位、及び343位からなる群より選択される部位のアミノ酸をコードする核酸を含む領域を増幅可能なプライマーセット；及び
 - (iii) 配列番号：1において、P49H、S57T、R69H、M78V、I97T、P107S、S113F、T267A、S297C、R337Q、R337X、及びV343Aからなる群より選択される少なくとも1つの変異を有するコエンザイムQ2タンパク質と、野生型コエンザイムQ2タンパク質のいずれかのみに交差性なく結

合する抗体。

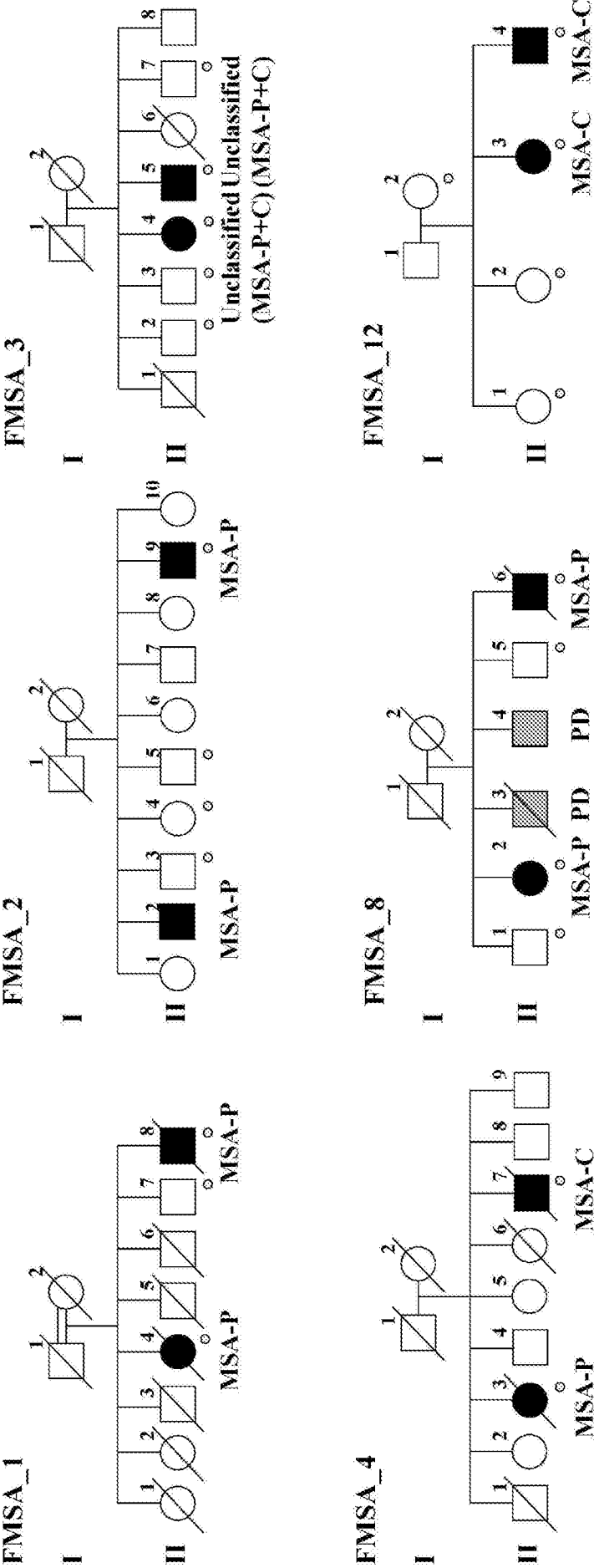
[請求項6] コエンザイムQ10を含む多系統萎縮症の予防又は治療剤。

[請求項7] コエンザイムQ10を投与する工程を含む、多系統萎縮症の予防又は治療方法；

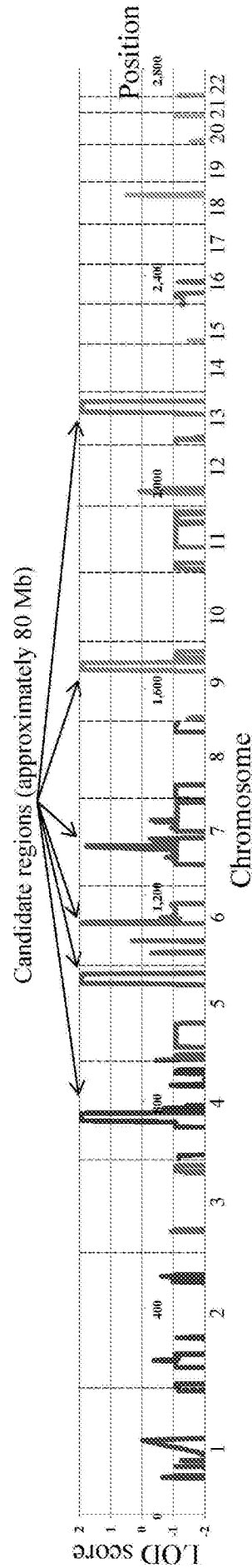
[請求項8] 多系統萎縮症の予防又は治療剤のスクリーニング方法であって、候補化合物と細胞とを接触させてインキュベートする工程と、細胞内のコエンザイムQ10量を上昇させる候補化合物を選択する工程と、を含む方法。

[請求項9] V343A変異を含むコエンザイムQ2タンパク質をコードする核酸。

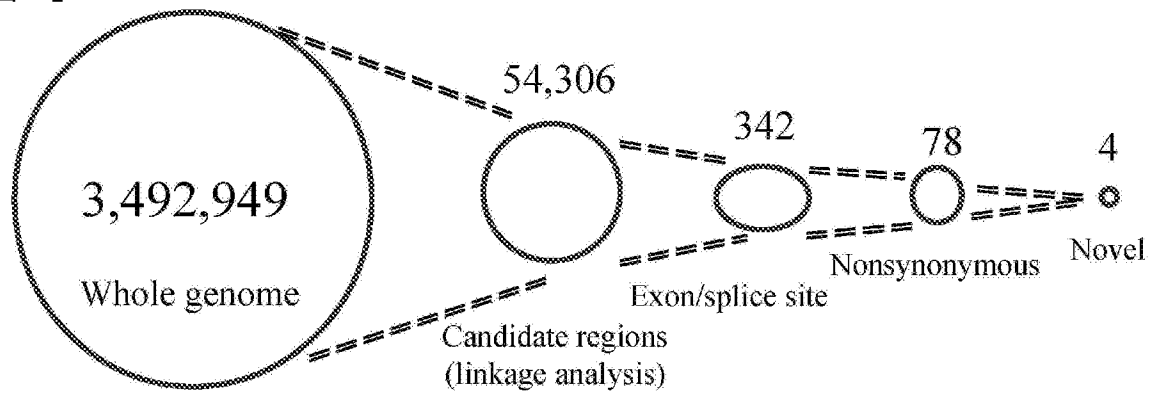
[図1A]



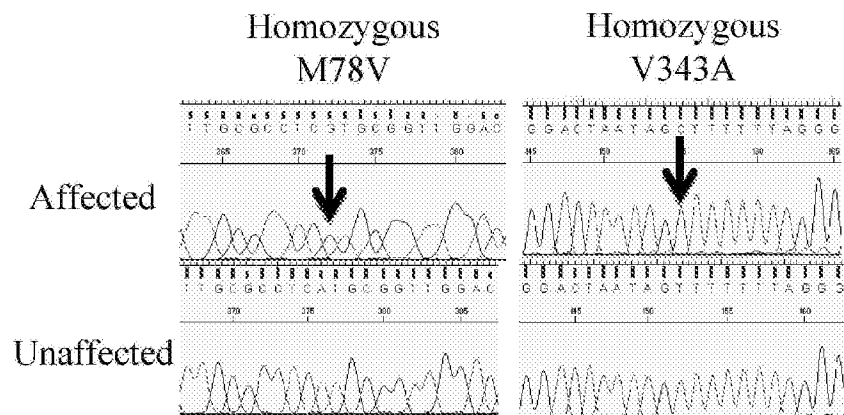
[図1B]



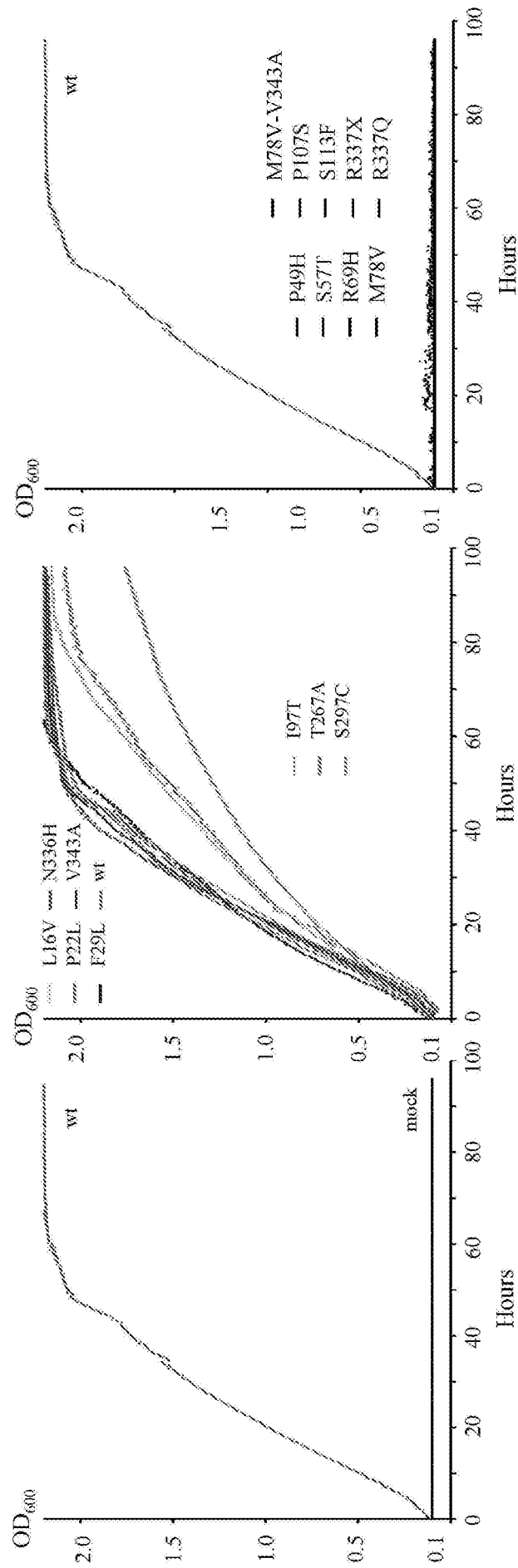
[図1C]



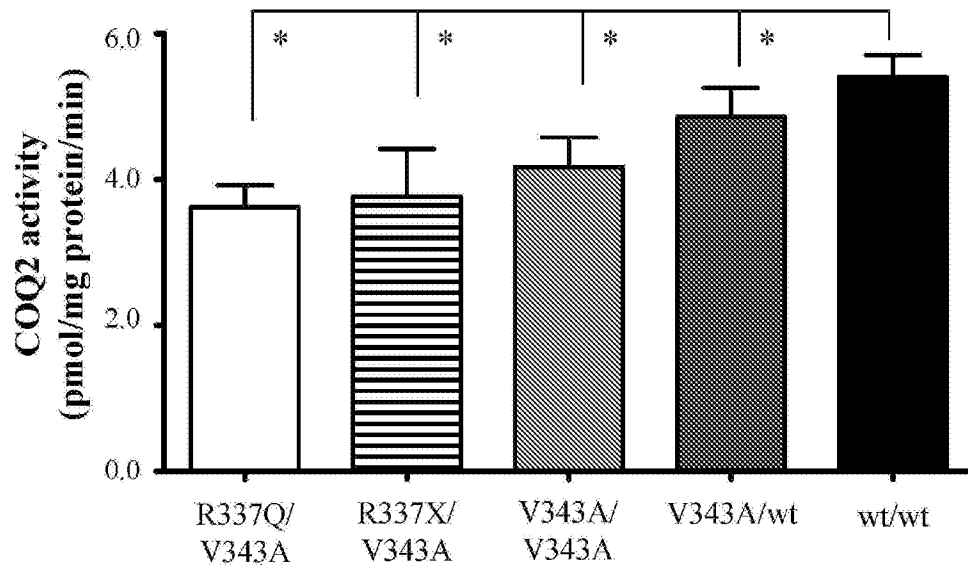
[図1D]



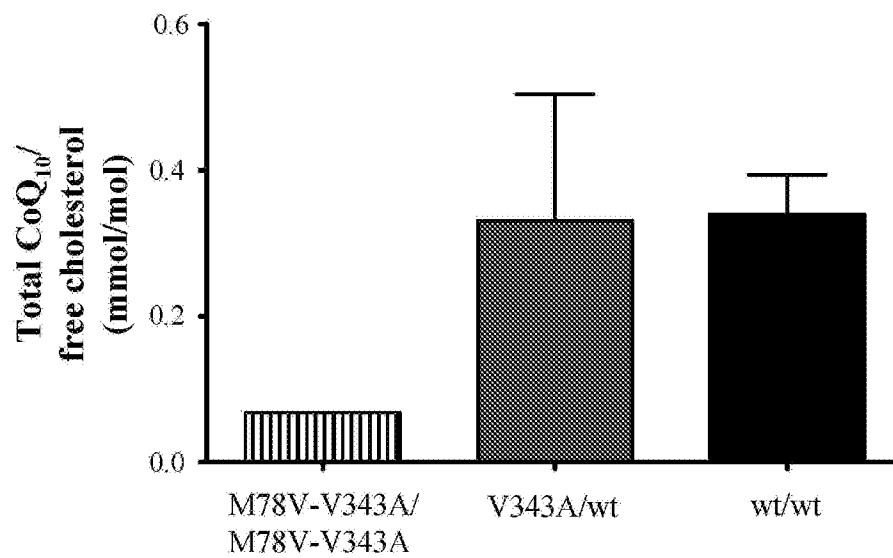
[図2A]



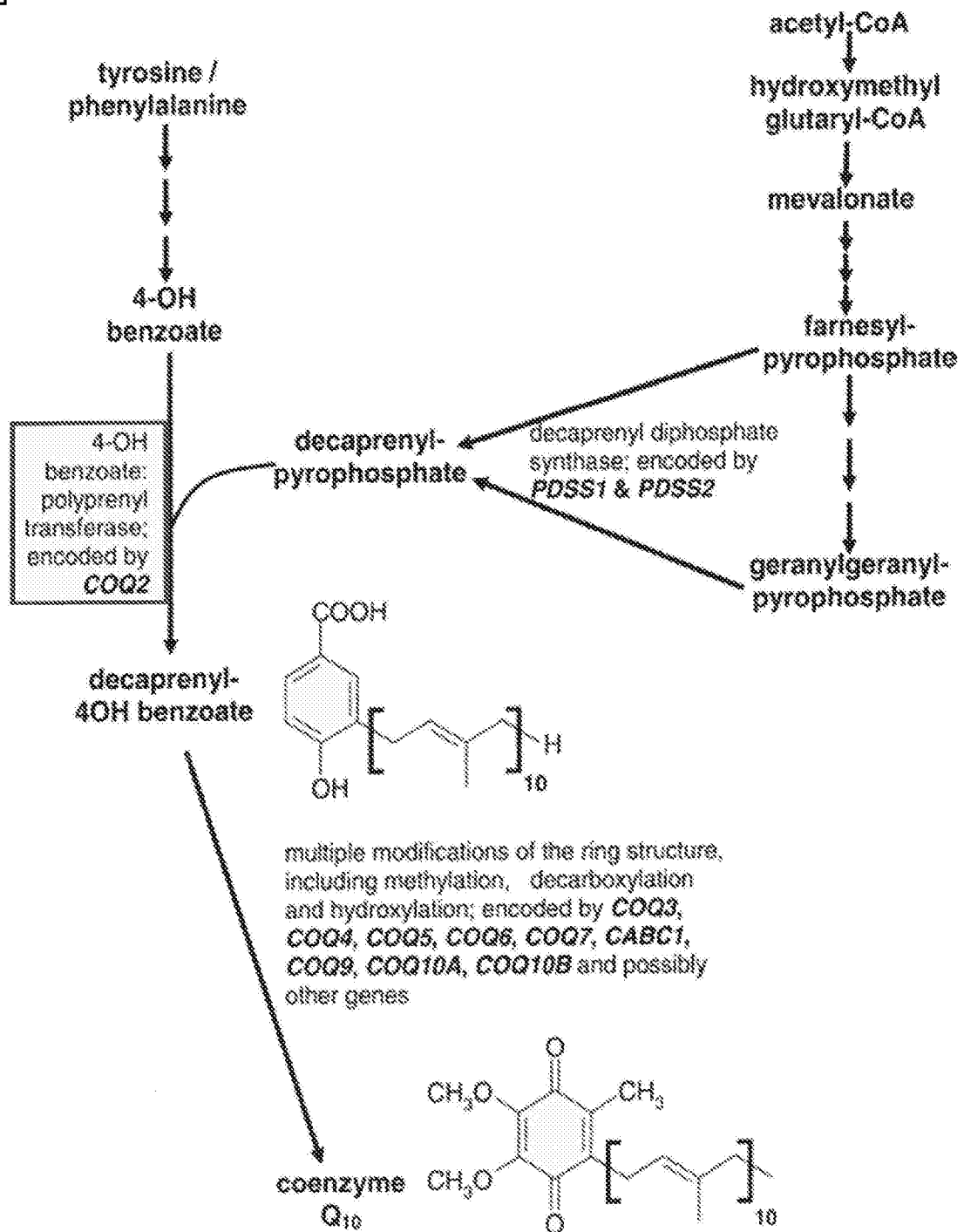
[図2B]



[図2C]

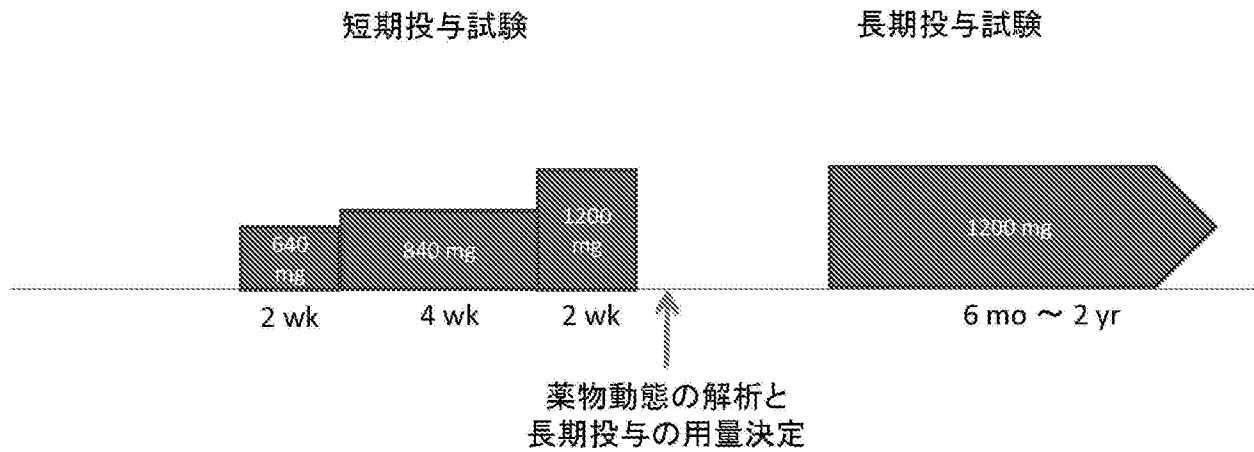


[図3]



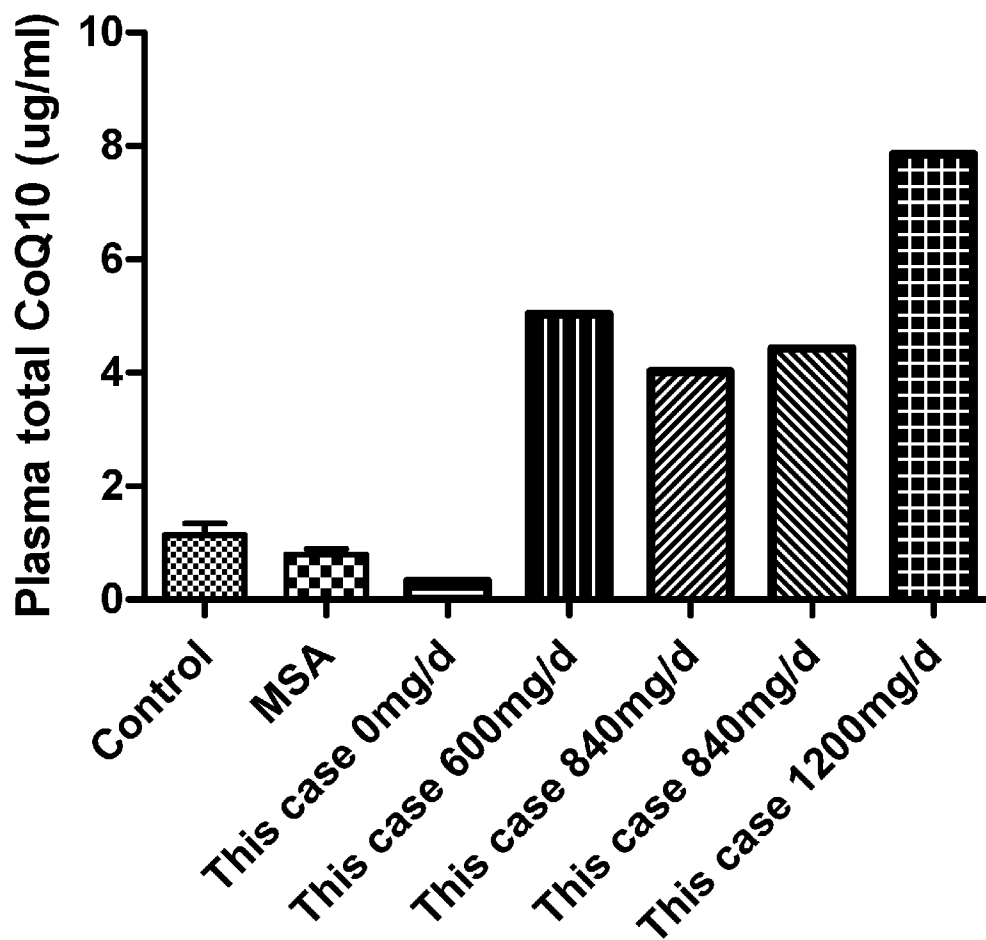
[図4]

試験のアウトライン



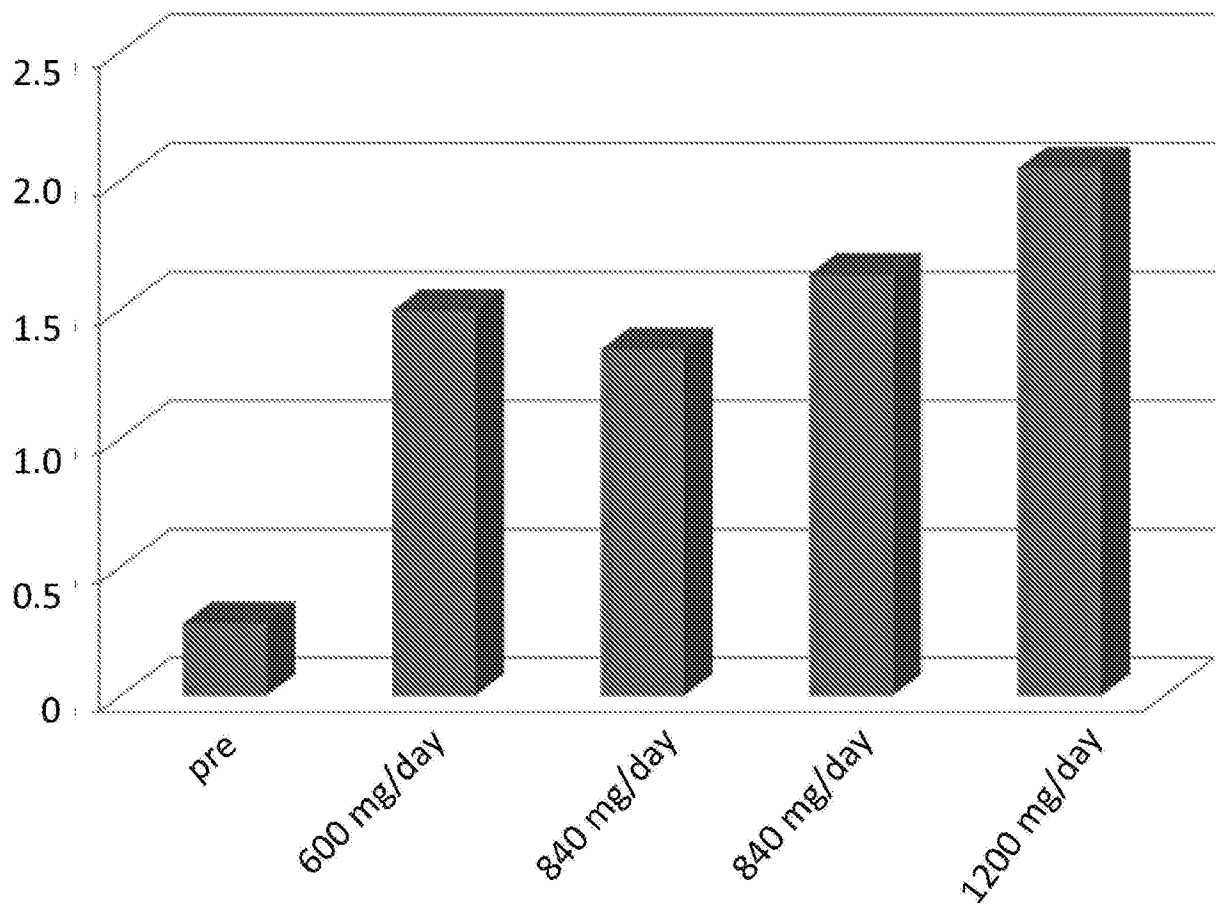
[図5]

血漿CoQ10濃度



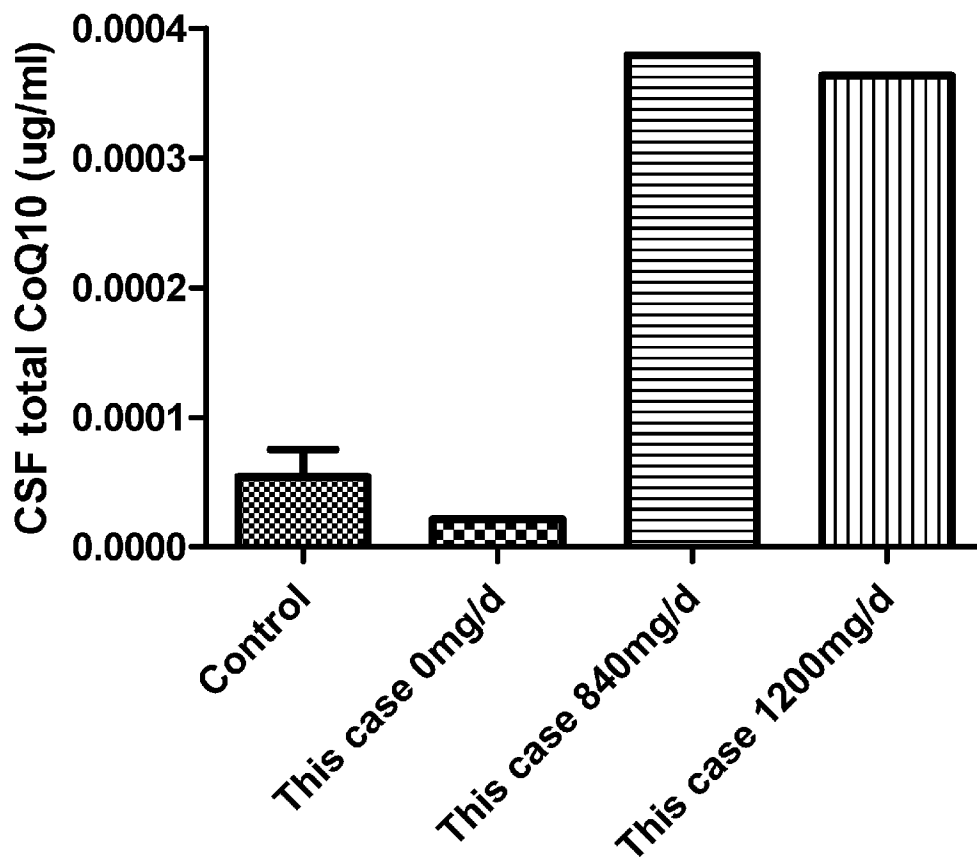
[図6]

単核球中の total coenzyme Q10/free cholesterol

Total Q10/FC (nM/ μ M)

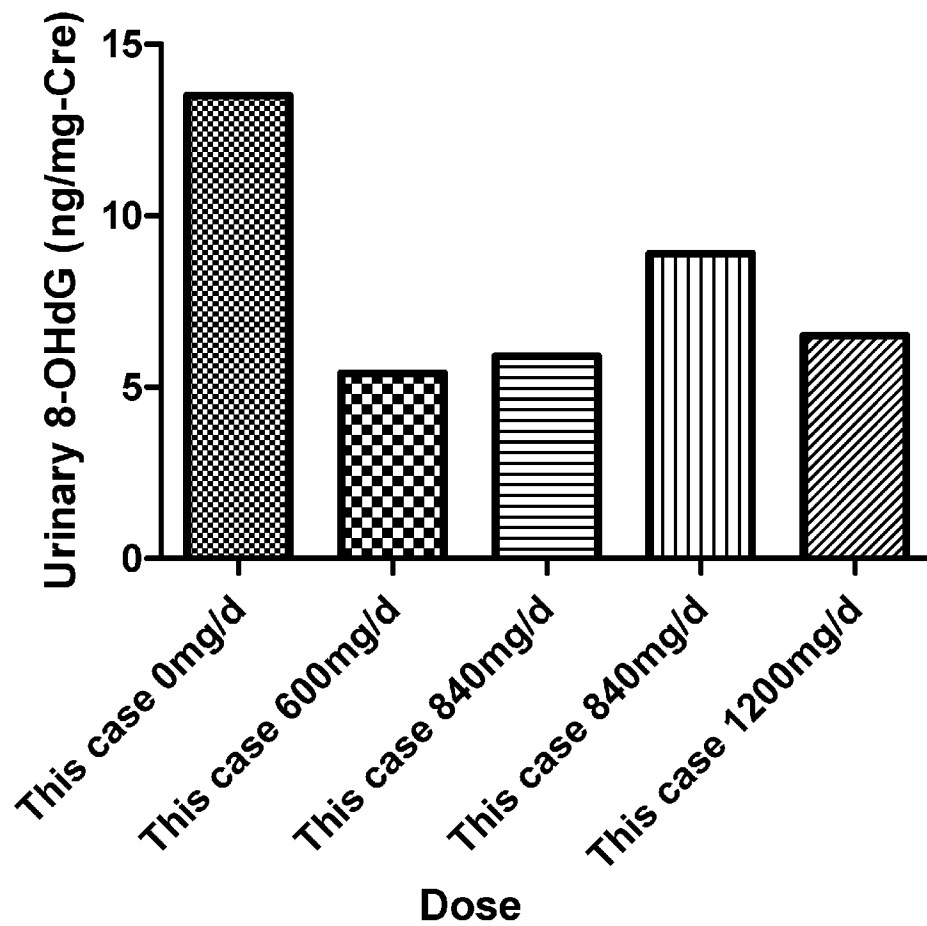
[図7]

髄液CoQ10濃度



[図8]

尿中8-OHdG



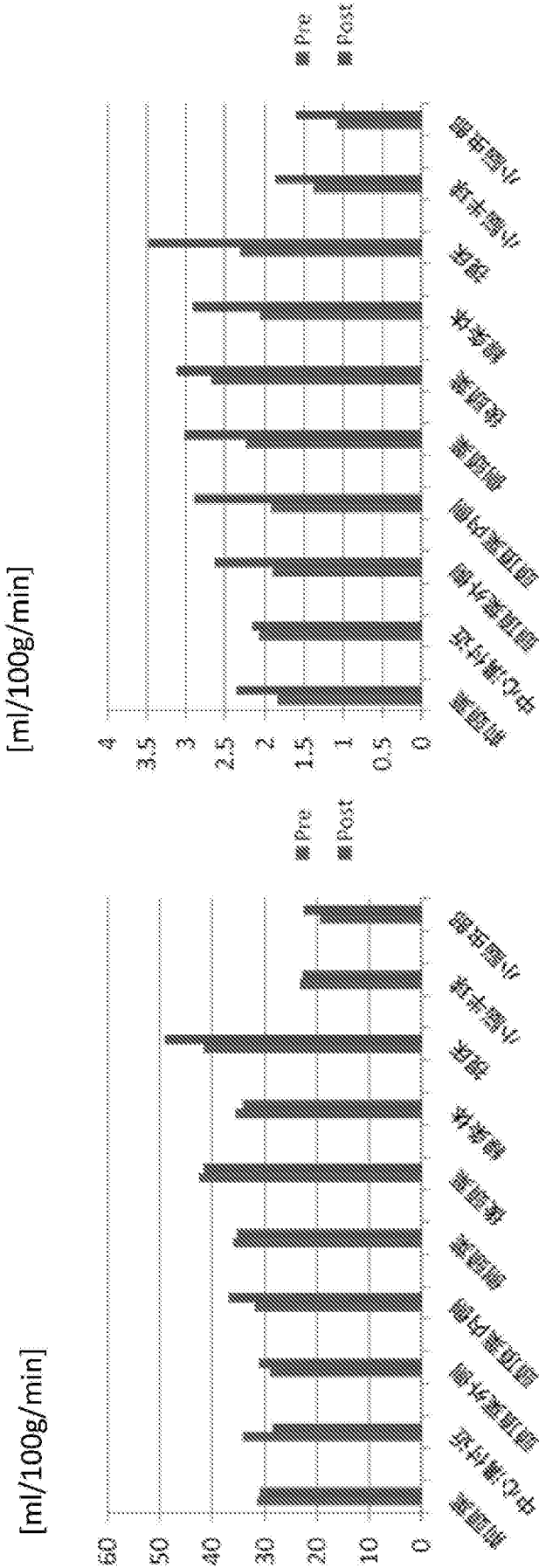
[図9]

臨床評価スケール

	Barthel Index	SARA	ICARS 動的	ICARS 静的	UMSAR S I	UMSAR S II	UMSAR S III	UMSAR S IV
5月16日 (入院時)	0	40	50	34	45	49	-	5
5月24日 (投与直前)	0	40	50	34	45	49	-	5
6月12日 (600mg2wk)	0	40	50	34	45	47	-	5
6月26日 (600mg2wk+840mg2wk)	0	40	50	34	45	47	-	5
7月10日 (600mg2wk+840mg4wk)	0	40	50	34	45	51	-	5
7月22日 (600mg2wk+840mg2wk+1200mg2wk)	0	39	50	34	45	49	-	5

[図10]

Original画像（左右平均）



脳血流量 (CBF)

酸素代謝量 (CMRO2)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2014/052658

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N15/09(2006.01)i, A61K31/122(2006.01)i, A61P25/00(2006.01)i, A61P25/16(2006.01)i, C12Q1/02(2006.01)i, C12Q1/68(2006.01)i, G01N33/15(2006.01)i, G01N33/50(2006.01)i

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N15/09, A61K31/122, A61P25/00, A61P25/16, C12Q1/02, C12Q1/68, G01N33/15, G01N33/50

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

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2014
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2014	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2014

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

CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN), JSTPLUS/JMEDPLUS/JST7580(JDREAMIII), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, UniProt/GeneSeq, Science Direct

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/A	JP 2007-528367 A (Alnylam Pharmaceuticals, Inc.), 11 October 2007 (11.10.2007), paragraph [0484] & JP 2011-105761 A & US 2005/0186591 A1 & US 2007/0161595 A1 & US 2011/0092565 A1 & EP 1635763 A & EP 2508608 A1 & WO 2005/004794 A2	1, 6, 8/2-5
X/A	4-hydroxybenzoate polyprenyltransferase, mitochondrial., Database DDBJ/EMBL/GenBank [online], 2012.11.28, Accession No. Q96H96 [retrieved on 2014.04.17]	9/2-5

☒ 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
18 April, 2014 (18.04.14)

Date of mailing of the international search report
28 April, 2014 (28.04.14)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2014/052658

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Yasuo NAKAHARA et al., "Genome Wide Kanren Kaiseki ni Motozuku Takeito Ishukusho (MSA) no Shikkan Kanjusei Idenshi no Tansaku", Clinical Neurology, 2010.12, vol.50, no.12, page 1155 (A22-1132)	2-5
A	QUINZII, C., et al., A mutation in para-hydroxybenzoate-polyprenyl transferase (COQ2) causes primary coenzyme Q10 deficiency., Am. J. Hum. Genet., 2006.02, vol.78, p.345-349	2-5
A	LOPEZ-MARTIN, J.M., et al., Missense mutation of the COQ2 gene causes defects of bioenergetics and de novo pyrimidine synthesis., Hum. Mol. Genet., 2007, vol.16, no.9, p.1091-1097	2-5
A	DIOMEDI-CAMASSEI, F. et al., COQ2 nephropathy: a newly described inherited mitochondriopathy with primary renal involvement., J. Am. Soc. Nephrol., 2007, vol.18, p.2773-2780	2-5
P,X	The Multiple-System Atrophy Research Collaboration., Mutations in COQ2 in familial and sporadic multiple-system atrophy., N. Engl. J. Med., 2013.07.18, vol.369, no.3, p.233-244	1-6,8,9

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2014/052658

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 7
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
(See extra sheet)
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

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

Remark on Protest

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2014/052658

Continuation of Box No.II-1 of continuation of first sheet(2)

The invention of claim 7 pertains to a method for treatment of the human body by surgery or therapy or to a diagnostic method therefor and thus relates to a subject matter on which this International Searching Authority is not required to carry out a search under the provisions of PCT Article 17(2)(a)(i) and PCT Rule 39.1.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. C12N15/09(2006.01)i, A61K31/122(2006.01)i, A61P25/00(2006.01)i, A61P25/16(2006.01)i,
C12Q1/02(2006.01)i, C12Q1/68(2006.01)i, G01N33/15(2006.01)i, G01N33/50(2006.01)i

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. C12N15/09, A61K31/122, A61P25/00, A61P25/16, C12Q1/02, C12Q1/68, G01N33/15, G01N33/50

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1 9 2 2 - 1 9 9 6 年
日本国公開実用新案公報	1 9 7 1 - 2 0 1 4 年
日本国実用新案登録公報	1 9 9 6 - 2 0 1 4 年
日本国登録実用新案公報	1 9 9 4 - 2 0 1 4 年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN), JSTplus/JMEDplus/JST7580(JDreamIII), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq,
UniProt/GeneSeq, Science Direct

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X/A	JP 2007-528367 A (アルナイラム ファーマシューティカルズ インコーポレイテッド) 2007.10.11, 段落【0484】 & JP 2011-105761 A & US 2005/0186591 A1 & US 2007/0161595 A1 & US 2011/0092565 A1 & EP 1635763 A & EP 2508608 A1 & WO 2005/004794 A2	1, 6, 8/2-5
X/A	4-hydroxybenzoate polyprenyltransferase, mitochondrial. , Database DDBJ/EMBL/GenBank [online], 2012.11.28, Accession No. Q96H96 [retrieved on 2014.04.17]	9/2-5

☒ C 欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

1 8 . 0 4 . 2 0 1 4

国際調査報告の発送日

2 8 . 0 4 . 2 0 1 4

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (I S A / J P)
郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

小暮 道明

電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 4 8 8

4 N

9 3 5 8

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	中原康雄, 外, ゲノムワイド関連解析に基づく多系統萎縮症 (MSA) の疾患感受性遺伝子の探索, 臨床神経学, 2010.12, vol.50, no.12, p.1155 (A22-1132)	2-5
A	QUINZII, C., et al., A mutation in para-hydroxybenzoate-polyprenyl transferase (COQ2) causes primary coenzyme Q10 deficiency., Am. J. Hum. Genet., 2006.02, vol.78, p.345-349	2-5
A	LOPEZ-MARTIN, J.M., et al., Missense mutation of the COQ2 gene causes defects of bioenergetics and de novo pyrimidine synthesis., Hum. Mol. Genet., 2007, vol.16, no.9, p.1091-1097	2-5
A	DIOMEDI-CAMASSEI, F. et al., COQ2 nephropathy: a newly described inherited mitochondriopathy with primary renal involvement., J. Am. Soc. Nephrol., 2007, vol.18, p.2773-2780	2-5
P, X	The Multiple-System Atrophy Research Collaboration., Mutations in COQ2 in familial and sporadic multiple-system atrophy., N. Engl. J. Med., 2013.07.18, vol.369, no.3, p.233-244	1-6, 8, 9

第Ⅱ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求項 7 は、この国際調査機関が調査することを要しない対象に係るものである。
つまり、
請求項7に係る発明は、人の身体の手術若しくは治療による処置又は診断方法に係るものであり、PCT第17条(2)(a)(i)及びPCT規則39.1の規定により、この国際調査機関が調査することを要しない対象に係るものである。
2. ☐ 請求項 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求項 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅲ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

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

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

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

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