

(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
2017年10月5日(05.10.2017)



(10) 国際公開番号
WO 2017/170300 A1

- (51) 国際特許分類:
C12Q 1/68 (2006.01) *A61P 43/00* (2006.01)
A23L 33/18 (2016.01) *A61Q 19/08* (2006.01)
A61K 8/46 (2006.01) *C12N 15/09* (2006.01)
A61K 31/185 (2006.01) *G01N 33/68* (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2017/012205
- (22) 国際出願日: 2017年3月25日(25.03.2017)
- (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 2016-062910 2016年3月26日(26.03.2016) JP
- (71) 出願人: 学校法人 川崎学園(KAWASAKI GAKUEN EDUCATIONAL FOUNDATION) [JP/JP]; 〒7010192 岡山県倉敷市松島577番地 Okayama (JP).
- (72) 発明者: 砂田 芳秀(SUNADA, Yoshihide); 〒7010192 岡山県倉敷市松島577番地 学校法人 川崎学園 川崎医科大学内 Okayama (JP). 大澤 裕(OHSAWA, Yutaka); 〒7010192 岡山県倉敷市松島577番地 学校法人 川崎学園 川崎医科大学内 Okayama (JP). 西松 伸一郎(NISHIMATSU, Shin-ichiro); 〒7010192 岡山県倉敷市松島577番地 学校法人 川崎学園 川崎医科大学内 Okayama (JP).
- (74) 代理人: 高島 一(TAKASHIMA, Hajime); 〒5410044 大阪府大阪市中央区伏見町四丁目1番1号 明治安田生命大阪御堂筋ビル Osaka (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, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, 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, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (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: MITOCHONDRIAL BIOMARKER REFLECTING AGING

(54) 発明の名称: 老化を反映するミトコンドリアバイオマーカー

(57) Abstract: Provided is a method for measuring the extent of aging in a subject, said method comprising a step for measuring the extent of taurine modification in mitochondrial tRNA^{Leu(UUR)} in a biological sample, which is isolated from the subject, by a reverse transcription reaction starting with a primer using the tRNA^{Leu(UUR)} as a template. Also provided is a medicine for determining aging, said medicine comprising a primer containing a base sequence which consists of 10-25 bases and is complementary to mitochondrial tRNA^{Leu(UUR)}. Further provided is a kit for determining aging, said kit comprising a primer containing a base sequence, which consists of 10-25 bases and is complementary to mitochondrial tRNA^{Leu(UUR)}, and a reverse transcriptase. Furthermore provided is an agent for improving the taurine modification ratio of mitochondrial tRNA^{Leu(UUR)}, said agent comprising taurine as an active ingredient.

(57) 要約: 本発明は、被験者から単離した生体試料におけるミトコンドリア tRNA^{Leu(UUR)}のタウリン修飾の程度を、該 tRNA^{Leu(UUR)}を鋳型としてプライマーからの逆転写反応により測定する工程を含む、被験者の老化の測定方法を提供する。また、本発明は、ミトコンドリア tRNA^{Leu(UUR)}に相補的な10~25塩基からなる塩基配列を含むプライマーを含有する、老化の判定薬も提供する。さらに、本発明は、ミトコンドリア tRNA^{Leu(UUR)}に相補的な10~25塩基からなる塩基配列を含むプライマーおよび逆転写酵素を含有する、老化の判定キットも提供する。その上、本発明は、タウリンを有効成分として含有する、ミトコンドリア tRNA^{Leu(UUR)}のタウリン修飾率の改善剤も提供する。

WO 2017/170300 A1

明 細 書

発明の名称：老化を反映するミトコンドリアバイオマーカー

技術分野

[0001] 本発明は、老化を反映するミトコンドリアバイオマーカーに関し、老化を可視化し、健康寿命の指標を提供する分野に関する。

背景技術

[0002] ミトコンドリアは、体細胞の好気性代謝を担う細胞内小器官で、水素伝達系と酸化的リン酸化によってエネルギーとなるATPを産生する。このミトコンドリア機能は、ゲノムとは独立した複製機構をもつミトコンドリアDNAの変異を原因とするミトコンドリア病ばかりでなく、老化によっても障害されると考えられている。したがって、ミトコンドリア機能障害の早期診断や障害度評価は、ミトコンドリア病患者の治療方針の選択や予後判定に重要な役割を果たすばかりではなく、老化マーカーとしても注目される。

[0003] MELASは、最も頻度の高いミトコンドリア病で、Myopathy、Encephalopathy、Lactic acidosis、Stroke-like episodeで代表される多彩かつ特徴的な症候を呈し、診断からの平均余命は5-10年、世界的に保険適応を獲得した医薬品が皆無の難治性希少疾患である。脳卒中様発作を繰り返し進行するため、その一刻も早い再発抑制療法が待望されている。MELASは、ミトコンドリアDNAのtRNA^{Leu(UUR)}遺伝子コード領域の一塩基置換（A3243G、T3271C、G3244A、T3258C、T3291C）が原因で発症するが、その基本病態は長らく不明であった。日本医科大学の太田らは、MELAS変異tRNA^{Leu(UUR)}では、正常で認められるアンチコドン1文字目のタウリン修飾が欠損して翻訳障害が惹起されるというユニークな基本病態を発見し、「tRNA転写後修飾異常病」という新規疾患概念を世界に先駆け提唱した（非特許文献1）。本発明者らは、太田らとの共同研究により、タウリン大量投与によって、MELASモデル細胞のミトコンドリア機能異常が改善し、2名の患者の頻発していた脳卒中様発作が10年以上完全に抑制されることを発表した（非特許文献2）。そこで、GCP試験薬タウリンのMELAS脳

卒中様発作抑制効果の有効性を検証する多施設オープン3相医師主導治験（厚生労働科学研究費：平成24-26年度難治等（難治）一般-068）を実施して、60%の患者で主要評価項目であるMELAS脳卒中様発作の完全抑制を達成した。

[0004] ヒト疾患におけるtRNA修飾の役割に関する総説が刊行され（非特許文献3）、ヒトミトコンドリア病におけるミトコンドリアtRNAのタウリン修飾欠如に関する測定法（非特許文献4）および総説も刊行されている（非特許文献5）。また、ミトコンドリアtRNAに着目した診断または治療に関していくつかの特許出願がなされている。

1) ミトコンドリアtRNAを含むtRNAの化学修飾、具体的にはリジンをコードするtRNAのチオメチル修飾率を測定することで2型糖尿病を診断する方法が知られている（特許文献1）。

2) 高齢化に伴う代謝の変化、特にミトコンドリアの機能不全に結びつく変化を予防または修復することによって高齢動物の健康状態を改善する方法が知られている（特許文献2）。グルタチオンはミトコンドリアDNA（mtDNA）の酸化的傷害を防止する主要な細胞内抗酸化システムであるが、高齢化に伴いグルタチオン自体の酸化が進んで抗酸化機能が低下する。これに対して、タウリンなどのチオール化合物を供給することでmtDNAの酸化的傷害を防止できることが記載されている。しかし、tRNA^{Leu(UUR)}のタウリン修飾率と老化との関係については記載がない。

3) タウリン、タウリンクロラミンまたはタウリン前駆物質等を有効成分とするミトコンドリア病の治療薬が知られている（特許文献3）。しかし、正常なミトコンドリアtRNA^{Leu(UUR)}のタウリン修飾率が加齢や、遺伝的要因や生活・環境要因などの影響による老化（生体機能の低下）に伴い低下すること、および、その低下がタウリン投与により改善されることは開示も示唆もされていない。

先行技術文献

特許文献

[0005] 特許文献1：国際公開第2014-136870号

特許文献2：特表2004-519241号公報

特許文献3：特開2003-48829号公報

非特許文献

[0006] 非特許文献1：Yasukawa T, Suzuki T, Ueda T, Ohta S, Watanabe K. J Biol Chem. 2000; 275(6):4251-4257

非特許文献2：Rikimaru M, Ohsawa Y, Wolf AM, Nishimaki K, Ichimiya H, Kamimura N, Nishimatsu S, Ohta S, Sunada Y. Intern Med. 2012; 51(24):3351-3357.

非特許文献3：Adrian Gabriel Torres, Eduard Batlle, Lluís Ribas de Poulna, Trends in Molecular Medicine 2014; 20 (6):306-314

非特許文献4：Kirino Y, Goto Y, Campos Y, Arenas J, Suzuki T. Proc Natl Acad Sci U S A. 2005; 102(20):7127-7132.

非特許文献5：Tsutomu Suzuki, Asutaka Nagao, and Takeo Suzuki, WIREs RNA 2011; 2:376-386

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0007] 本発明の第一の目的は、老化に伴う、ミトコンドリア機能障害の早期発見や障害度評価につながる新規バイオマーカーを提供することにある。

本発明の第二の目的は、ミトコンドリアの機能低下を惹起する、老化に伴う、ミトコンドリアtRNA^{Leu(UUR)}のタウリン修飾率低下の改善剤を提供することにある。

課題を解決するための手段

[0008] これまで臨床的にミトコンドリア病マーカーとして使われてきた血液および髄液の乳酸値ならびに乳酸値とピルビン酸値との比は、ミトコンドリア病で嫌気性代謝が亢進する病態によって上昇するばかりでなく、組織低酸素による解糖系代謝の亢進、すなわちショック、呼吸不全、播種性血管内凝固症候群など様々な病態によっても上昇が認められる特異性の低いマーカーであ

る (Kraut JA, Madias NE. Lactic acidosis. N Engl J Med. 2015; 372(11):1078-1079)。本発明者らは、被験者の白血球検体のミトコンドリアtRNA^{Leu(UUR)}のタウリン修飾率を測定し、ミトコンドリア病マーカーとしての有用性について鋭意検討した。具体的には、ミトコンドリア病患者における変異ミトコンドリアtRNA^{Leu(UUR)}のタウリン修飾率の低下のみならず、正常なミトコンドリアtRNA^{Leu(UUR)}のタウリン修飾率の低下も観測され、意外にも、正常なミトコンドリアtRNA^{Leu(UUR)}のタウリン修飾率が老化の指標となり得ることを見出し、ミトコンドリア病患者のみならず健常者への適用が可能であることに想到し、本発明を完成するに至った。さらに、本発明者らは、タウリンの大量投与は、ミトコンドリア病患者における変異ミトコンドリアtRNA^{Leu(UUR)}のタウリン修飾率の増加のみならず、正常なミトコンドリアtRNA^{Leu(UUR)}のタウリン修飾率の増加をももたらすことを見出し、本発明を完成するに至った。

[0009] 本発明は、以下のものを提供する。

〔1〕 被験者から単離した生体試料におけるミトコンドリアtRNA^{Leu(UUR)}のタウリン修飾の程度を、該tRNA^{Leu(UUR)}を鋳型としてプライマーからの逆転写反応により測定する工程を含む、被験者の老化の測定方法。

〔2〕 プライマーが鋳型に相補的な10～25塩基長からなるオリゴヌクレオチドであり、タウリン修飾の有無によるプライマー伸長産物の相違を検出する、〔1〕に記載の方法。

〔3〕 プライマーが配列番号3、4および5で表される塩基配列からなる群より選ばれる塩基配列を含む、少なくとも1種である、〔1〕または〔2〕に記載の方法。

〔4〕 タウリン修飾を有するtRNA^{Leu(UUR)}からのプライマー伸長産物と、タウリン修飾を有しないtRNA^{Leu(UUR)}からのプライマー伸長産物との量比を算出する工程をさらに含む、〔1〕～〔3〕のいずれかに記載の方法。

〔5〕 下記式(1)：

[0010] [数1]

$$\text{総タウリン修飾率} = \frac{\tau \text{ m}^5 \text{ U}}{\text{U} + \tau \text{ m}^5 \text{ U}} \times 100 (\%) \quad (1)$$

[0011] (式中、 $\tau m^5 U$ はタウリン修飾を有する $tRNA^{Leu(UUR)}$ からのプライマー伸長産物の量を示し、 U はタウリン修飾を有しない $tRNA^{Leu(UUR)}$ からのプライマー伸長産物の量を示す)で表される総タウリン修飾率を老化の指標とする、〔1〕～〔4〕のいずれかに記載の方法。

〔6〕 被験者が、 $tRNA^{Leu(UUR)}$ 遺伝子コード領域のA3243G、T3271C、G3244A、T3258CおよびT3291Cからなる群より選ばれる一塩基置換を有する変異ミトコンドリアDNAを有すると疑われる者であり、前記式(1)に続いて、下記式(2)：

[0012] [数2]

$$\text{正常タウリン修飾率} = \text{総タウリン修飾率} / (100 - \text{mtDNA点変異率}) / 100 (\%) \quad (2)$$

[0013] (上記式中、mtDNA点変異率は、配列番号1で表される $tRNA^{Leu(UUR)}$ をコードするDNAにおいて、14位のA (A3243G)、15位のG (G3244A)、29位のT (T3258C)、42位のT (T3271C) および62位のT (T3291C) からなる群より選ばれる点変異の中で最も高い点変異率を示す)により求めた正常タウリン修飾率を老化の指標とする、〔5〕に記載の方法。

〔7〕 ミトコンドリア $tRNA^{Leu(UUR)}$ に相補的な10～25塩基からなる塩基配列を含むプライマーを含有する、老化の判定薬。

〔8〕 プライマーが配列番号3、4および5で表される塩基配列からなる群より選ばれる塩基配列を含む、少なくとも1種である、〔7〕に記載の判定薬。

〔9〕 ミトコンドリア $tRNA^{Leu(UUR)}$ に相補的な10～25塩基からなる塩基配列を含むプライマーおよび逆転写酵素を含有する、老化の判定キット。

〔10〕 プライマーが配列番号3、4および5で表される塩基配列からなる群より選ばれる塩基配列を含む、少なくとも1種である、〔9〕に記載のキット。

〔11〕 タウリンを有効成分として含有する、ミトコンドリア $tRNA^{Leu(UUR)}$ のタウリン修飾率の改善剤。

〔12〕 ミトコンドリア $tRNA^{Leu(UUR)}$ が正常なミトコンドリア $tRNA^{Leu(UUR)}$ である

、〔11〕に記載の改善剤。

〔13〕 タウリン修飾率の改善が下記式（1）：

[0014] [数3]

$$\text{総タウリン修飾率} = \tau m^5 U / (U + \tau m^5 U) \times 100 (\%) \quad (1)$$

[0015] (式中、 $\tau m^5 U$ はタウリン修飾を有するtRNA^{Leu(UUR)}からのプライマー伸長産物の量を示し、Uはタウリン修飾を有しないtRNA^{Leu(UUR)}からのプライマー伸長産物の量を示す)により求めた総タウリン修飾率、および/または下記式（2）：

[0016] [数4]

$$\text{正常タウリン修飾率} = \text{総タウリン修飾率} / (100 - \text{mtDNA点変異率}) / 100 (\%) \quad (2)$$

[0017] (上記式中、mtDNA点変異率は、配列番号1で表されるtRNA^{Leu(UUR)}をコードするDNAにおいて、14位のA (A3243G)、15位のG (G3244A)、29位のT (T3258C)、42位のT (T3271C) および62位のT (T3291C) からなる群より選ばれる点変異の中で最も高い点変異率を示す)により求めた正常タウリン修飾率の改善である、〔11〕に記載の改善剤。

〔14〕 医薬または化粧品である、〔11〕または〔12〕に記載の改善剤。

〔15〕 保健機能食品または食品添加物である、〔11〕または〔12〕に記載の改善剤。

〔16〕 ミトコンドリア病を発症した患者、および/または発症リスクを有する対象のミトコンドリアtRNA^{Leu(UUR)}のタウリン修飾率の改善用である、〔11〕～〔15〕のいずれかに記載の改善剤。

〔17〕 ミトコンドリア病がミトコンドリアtRNA^{Leu(UUR)}のタウリン修飾の欠損遺伝子変異に起因する、〔16〕に記載の改善剤。

〔18〕 ミトコンドリアtRNA^{Leu(UUR)}のタウリン修飾の欠損遺伝子変異が、配列番号1で表されるtRNA^{Leu(UUR)}をコードするDNAにおいて、14位のA (A3243G)、15位のG (G3244A)、29位のT (T3258C)、42位のT (T3271C) および62位の

T (T3291C) からなる群より選ばれる点変異である、〔17〕に記載の改善剤。

〔19〕 ミトコンドリア病が、MELASあるいは糖尿病である、〔16〕～〔18〕のいずれかに記載の改善剤。

発明の効果

[0018] 本発明者らは、ミトコンドリアtRNAの中でも、正常なtRNA^{Leu(UUR)}のタウリン修飾率が、従来のミトコンドリア病のマーカーである、血中乳酸値、血中乳酸値とピルビン酸値との比、髄液乳酸値、髄液乳酸値とピルビン酸値とは異なり、加齢と相関することを見出した。したがって、正常なtRNA^{Leu(UUR)}のタウリン修飾率は、ミトコンドリア病患者のみならず健常人の生理機能の状態を把握することのできるユニバーサルマーカーである。

図面の簡単な説明

[0019] [図1]プライマー伸長法によるミトコンドリアtRNA^{Leu(UUR)}のタウリン修飾測定法の概略を示す。

[図2]MELAS患者の総タウリン修飾率、ならびに正常なミトコンドリアtRNA^{Leu(UUR)}のタウリン修飾率と年齢との相関を示す。

[図3]血中乳酸値と、MELAS患者の正常なミトコンドリアtRNA^{Leu(UUR)}のタウリン修飾率または年齢との関連を調べた図である。

[図4]血中乳酸/ピルビン酸比と、MELAS患者の正常なミトコンドリアtRNA^{Leu(UUR)}のタウリン修飾率または年齢との関連を調べた図である。

[図5]髄液乳酸/ピルビン酸比と、MELAS患者の正常なミトコンドリアtRNA^{Leu(UUR)}のタウリン修飾率または年齢との関連を調べた図である。

[図6]髄液乳酸値と、MELAS患者の正常なミトコンドリアtRNA^{Leu(UUR)}のタウリン修飾率または年齢との関連を調べた図である。

[図7]MELAS患者へのタウリン投与による総タウリン修飾率の変化、ならびに正常tRNA^{Leu(UUR)}のタウリン修飾率の改善を示す図である。

[図8]若年(10代)および老年(80代)健常人のミトコンドリアtRNA^{Leu(UUR)}のタウリン修飾率を調べた図である。

発明を実施するための形態

[0020] 本明細書において、アミノ酸、(ポリ)ペプチド、(ポリ)ヌクレオチドなどの略号による表示は、IUPAC-IUBの規定〔IUPAC-IUB Communication on Biological Nomenclature, Eur. J. Biochem., 138: 9 (1984)〕、「塩基配列またはアミノ酸配列を含む明細書等の作成のためのガイドライン」(日本国特許庁編)、および当該分野における慣用記号に従う。

[0021] 定義

本発明において「老化」とは、加齢や、遺伝的要因や生活・環境要因などのその他の内的または外的な要因の影響により生体機能が低下することをいう。加齢とは、生まれてから死までの物理的な時間経過であり、暦年齢と同義である。その他の内的な要因とは、例えば、ミトコンドリア機能、過酸化ラジカル濃度、およびテロメア長などの細胞老化に係わるものなどがあげられる。また、その他の外的な要因とは、例えば、個々の運動量、喫煙の有無、食事習慣、および栄養状態などがあげられる。生体機能とは、例えば筋力、神経伝導速度、肺活量、病気に対する抵抗力などがあげられる。加齢による老化は、一般に生殖年齢に達した後に始まり、個体差があるが、ヒトでは20歳から30歳以降に始まる。老化は、環境要因や遺伝的素因が複雑に絡み合って関与していると考えられ、かかる機能低下の速さはすべてのヒトが同じではなく、必ずしも加齢という要因のみで規定できるものではなく、従来は明確な老化の指標がなかった。本発明が提供する老化の指標は、健康寿命の観点からも指標とすることができる。

本発明の「老化」は、身長や体重の減少、皮膚や頭髪の変化などの外的変化、運動機能の低下、感覚機能の低下、或いは、生理機能の低下などの所謂加齢に伴う身体機能の低下のみでなく、生体を構成する細胞の老化(細胞老化)、さらに呼吸・エネルギー代謝に重要な機能を果たすミトコンドリアの老化が含まれる。老化に伴いミトコンドリアtRNA^{Leu(UUR)}のタウリン修飾率が低下すれば、当然、UUGコドン特異的な翻訳能が律速となって、UUGコドンを含むタンパク質の合成が低下する。ひいてはミトコンドリアの機能が低下し、

生体やそれを構成する器官等の機能が低下するのは明らかであり、さらに修飾率の低下が進行すれば、例えば、高齢者に認められる呼吸困難や骨格筋の減弱のような重篤な症状を発症するに至る場合もあると考えられる。従って、正常なミトコンドリアtRNA^{Leu(UUR)}のタウリン修飾率は、ミトコンドリア自体の老化や機能低下の指標として用いることができることは言うに及ばず、生体、器官(臓器)、組織、細胞、或は、細胞内小器官の機能、とりわけ、生体やエネルギー需要の高い器官(臓器)、組織、細胞、或いは、細胞内小器官の老化や機能低下の指標としても有用である。

また、上記指標は、現在開発が進行中のミトコンドリア病患者に対するタウリン療法の対象者の選定や、その治療効果判定に用いるコンパニオン診断用途やその補助にも有用である。

[0022] ここで健康寿命とは、厚生労働省が定義する、健康上の問題で日常生活が制限されることなく生活できる期間をいう。世界保健機関を始めとして、各国が健康寿命を伸ばすことを目標としており、究極的には、健康寿命と平均寿命との差をゼロに近づけることが望まれている。

[0023] 本発明においてミトコンドリアtRNA^{Leu(UUR)}は、ミトコンドリアDNAから転写され、ロイシンのコドンUUR (RはAまたはGである)を認識するtRNAである。ミトコンドリアtRNA^{Leu(UUR)}は、動物種によって17位、20位、47位の塩基が増減するため、アンチコドンに相当するヌクレオチド(UAA)の位置を統一して34位～36位と定めている。ヒトミトコンドリアtRNA^{Leu(UUR)}をコードするDNAは、NCBIに登録されており、GenBankアクセッション番号AB026838 (バージョンAB026838.1) (配列番号1)で公表されている。また、配列番号1で公表されているDNAから転写されるミトコンドリアtRNA^{Leu(UUR)}は、配列番号2で表される。配列番号2の36番目(上記定義によると34位)のウリジン(U)は、タウリン修飾されている場合と修飾されていない場合とがある。

本願明細書においては、「ミトコンドリアtRNA^{Leu(UUR)}」を単に「tRNA^{Leu(UUR)}」と省略する場合がある。

[0024] tRNA^{Leu(UUR)}には様々な変異が見出されている。本発明においては、配列番号

2で表されるtRNA^{Leu(UUR)}のみならず、現在までに知られている変異tRNA^{Leu(UUR)}および将来見出される変異tRNA^{Leu(UUR)}をも測定対象とする。変異tRNA^{Leu(UUR)}の具体例は、配列番号1で表されるtRNA^{Leu(UUR)}をコードするDNAにおいて、14位のA (A3243G)、15位のG (G3244A)、29位のT (T3258C)、42位のT (T3271C)、62位のT (T3291C)の点変異：これらの変異はタウリン修飾の欠損を生じさせ、MELAS患者で見出されている変異である；13位のG (A3242A)、21位のT (T3250C)、25位のC (C3254T)、51位のA (A3280G)の点変異：これらの変異はタウリン修飾に影響はなく、MELAS以外のミトコンドリア病で見出されている変異である；などがあげられる。その他の変異については、MITOMAP (www.mitomap.org/MITOMAP)を参照することができる。

本発明において変異tRNA^{Leu(UUR)}とは、タウリン修飾の欠損を生じさせる変異を有するmtDNAより転写されたtRNA^{Leu(UUR)}をいい、タウリン修飾に影響しない変異を有するtRNA^{Leu(UUR)}を含まないものとする。

また、正常tRNA^{Leu(UUR)}とは、上記変異tRNA^{Leu(UUR)}を除くtRNA^{Leu(UUR)}をいう。ヒトの場合、配列番号2で表されるtRNA^{Leu(UUR)}と同一の塩基配列を有するtRNA^{Leu(UUR)}および配列番号2で表されるtRNA^{Leu(UUR)}と異なる塩基配列を有するtRNA^{Leu(UUR)}であっても、該塩基配列の相違がtRNA^{Leu(UUR)}のタウリン修飾に影響しないtRNA^{Leu(UUR)}が含まれるが、タウリン修飾の有無にかかわらず正常なtRNA^{Leu(UUR)}の機能を有さないものは含まない。

ここで、上記14位のA、15位のG、29位のT、42位のTおよび62位のTは、ヒト以外に、ゴリラ、ウシ、ブタ、イヌ、ネコ等においても保存されており、ラットおよびマウスの場合も、42位がCである以外は同様に保存されているため、tRNA^{Leu(UUR)}のタウリン修飾の欠損を生じさせる変異は、ヒトに限定されるものではなく、後述する霊長類、ペット、家畜、実験動物等の哺乳動物も対象となりうる。

[0025] 本発明においてミトコンドリアtRNA^{Leu(UUR)}のタウリン修飾とは、tRNA^{Leu(UUR)}のアンチコドン (UAA) 1文字目 (上記定義によると34位のwobble位) のウラシル塩基の5位にタウリノメチル基が結合した転写後修飾をいう。このように

タウリン修飾されたウリジンを τm^5U の略号で示す場合がある。

[0026] ミトコンドリアDNA (mtDNA) とヘテロプラスミーについて

細胞あたり数百のミトコンドリアが存在し、そのひとつひとつのミトコンドリアに5~10個のミトコンドリアDNA (mtDNA) が含まれている。単一のmtDNAで構成されている状態を「ホモプラスミー」、正常と変異mtDNAが混在している状態を「ヘテロプラスミー」と呼ぶ。変異mtDNAの比率（ヘテロプラスミーの度合い）が高くなると、ミトコンドリアの呼吸機能に異常を来し、ミトコンドリア病を発症する。ヘテロプラスミーの度合いは、骨格筋、血管、皮膚などの組織ごと、または細胞ごとに異なる。また、健常者の組織または細胞においても、変異mtDNAが微量に含まれていることが最近報告された (Brendan A. I. Payne et al.: Universal heteroplasmy of human mitochondrial DNA, Hum Mol Gent 22: 384 - 390 (2013))。そこで、本発明においては、ミトコンドリアtRNA^{Leu(UUR)}のタウリン修飾の度合いを以下のように定義し、実質的に正常なmtDNAを有する被験者（健常者）と、変異mtDNAを一定の割合で含む被験者（例、MELAS患者、糖尿病患者）とに区別して、tRNA^{Leu(UUR)}のタウリン修飾率を測定する。

[0027] ミトコンドリア病患者のタウリン修飾率について

MELAS患者の細胞のミトコンドリアは、ヘテロプラスミーであるため、変異mtDNAと正常なmtDNAが含まれている。したがって、変異mtDNAより転写されたtRNA^{Leu(UUR)}のアンチコドン1番目のウラシルはタウリン修飾が欠損しているとしても、正常なmtDNAより転写されたtRNA^{Leu(UUR)}はタウリン修飾されていると考えられる。

MELAS患者を始めとする変異mtDNAを含む被験者由来の細胞に含まれる正常なmtDNAより転写されたtRNA^{Leu(UUR)}のタウリン修飾率を「正常タウリン修飾率」と定義し、下記式(1)により求めた「総タウリン修飾率」に基づいて、下記式(2)により求めることができる。

[0028] 本発明において総タウリン修飾率とは、被験者由来の検体中のミトコンドリアtRNA^{Leu(UUR)}におけるタウリン修飾tRNA^{Leu(UUR)}を、タウリン修飾tRNA^{Leu(UUR)}と

タウリン非修飾tRNA^{Leu(UUR)}との総和で除した値をいう。

[0029] ここで被験者とは、ヒトを始めとする哺乳動物であり、哺乳動物としては、例えば、マウス、ラット、ハムスター、モルモット等のげっ歯類やウサギ等の実験動物、ブタ、ウシ、ヤギ、ウマ、ヒツジ、ミンク等の家畜、イヌ、ネコ等のペット、ヒト、サル、カニクイザル、アカゲザル、マーモセット、オランウータン、チンパンジー、ゴリラなどの霊長類等をあげることができる。被験者由来の検体とは、哺乳動物、好ましくはヒトから採取可能なものであれば特に限定されるものではなく、血液、リンパ液、尿などの体液試料、毛髪、頬粘膜、胃、大腸、肺、肝臓、脳などの生検組織をあげることができる。好ましくは血液試料であり、血液試料中の白血球がより好ましい。

[0030] 総タウリン修飾率は、タウリン修飾tRNA^{Leu(UUR)}およびタウリン非修飾tRNA^{Leu(UUR)}の量を、プライマーを用いた逆転写反応（プライマー伸長法）によるプライマー伸長産物の量を測定することによって間接的に求め、下記式（1）：

[0031] [数5]

$$\text{総タウリン修飾率} = \tau m^5 U / (U + \tau m^5 U) \times 100 (\%) \quad (1)$$

[0032] （上記式中、 $\tau m^5 U$ はタウリン修飾を有するtRNA^{Leu(UUR)}からのプライマー伸長産物の量を示し、 U はタウリン修飾を有しないtRNA^{Leu(UUR)}からのプライマー伸長産物の量を示す）に代入して計算した値である。

[0033] ここで、被験者が、tRNA^{Leu(UUR)}遺伝子コード領域のA3243G、T3271C、G3244A、T3258CおよびT3291Cからなる群より選ばれる一塩基置換を有する変異ミトコンドリアDNAを有すると疑われる者である場合、前記式（1）に続いて、下記式（2）：

[0034] [数6]

$$\text{正常タウリン修飾率} = \text{総タウリン修飾率} / (100 - \text{mtDNA点変異率}) / 100 (\%) \quad (2)$$

[0035] （上記式中、mtDNA点変異率（%）は、配列番号1で表されるtRNA^{Leu(UUR)}をコードするDNAにおいて、14位のA（A3243G）、15位のG（G3244A）、29位のT（T3258C）、42位のT（T3271C）および62位のT（T3291C）からなる群より選ばれる

点変異の中で最も高い変異率を示す)により、正常タウリン修飾率を求め、該数値を老化の指標とすることが望ましい。

[0036] mtDNAの点変異率の解析については、DNAシーケンス法、PCR-RFLP法、PCR-SSCP法、denaturing high-performance liquid chromatography(DHPLC)法、BiPlex Invader法、SnaP shot法、high-resolution melt(HRM)プロファイリング法、temporal temperature gradient gel electrophoresis (TTGE)法のほか、現在開発されている次世代シーケンサーを用いた方法などがあげられる。

[0037] 総タウリン修飾率は、理論上0~100%の範囲内にある。しかし、MELAS患者の病態を考察すると、総タウリン修飾率が低下すると、重篤な症状を発症する場合がある。一方、正常タウリン修飾率については、健常者ではmtDNA点変異率がほぼ0%であるため、前記[数6]の計算式を用いて計算すると、総タウリン修飾率とほぼ同値となる。しかし、ミトコンドリア病患者の正常タウリン修飾率は、mtDNA点変異率により、計算上100%を超えることがあり得る。

医師主導治験において、tRNA^{Leu(UUR)}の正常タウリン修飾率を縦軸に、被験者年齢を横軸にプロットしたところ、被験者年齢が高くなるに従って正常タウリン修飾率が減少していることを発見した(図2)。また、MELAS患者のタウリン内服により、正常タウリン修飾率が回復し、変異mtDNAに由来するtRNA^{Leu(UUR)}のタウリン修飾も改善することが明らかとなった(図7、表1)。有効量のタウリン投与により、老化の進行を遅延させることが期待できる。

正常タウリン修飾率が低いほど、老化が進行していると判断することができる。すなわち、正常タウリン修飾率を用いて、老化の尺度を「タウリン年齢」として示すことができる。また、健常者においては、総タウリン修飾率と正常タウリン修飾率とが近似しており、便宜的に総タウリン修飾率を用いて、老化の尺度を「タウリン年齢」として示すことができる。

[0038] 老化の測定方法

(1) 被験者から単離した生体試料におけるミトコンドリアtRNA^{Leu(UUR)}のタウリ

ン修飾の程度を、該tRNA^{Leu(UUR)}を鋳型としてプライマーからの逆転写反応により測定する工程

測定対象の生体試料としては、毛髪、頬粘膜、胃、大腸、肺、肝臓、脳などの生検組織や、血液、リンパ液、尿などの体液試料が限定なくあげられる。採取が容易な点から血液が好ましく、血液より得られる白血球がより好ましい。以下、白血球を例にして、老化の測定方法を説明するが、他の生体試料も同様に測定することができる。

[0039] 測定に供する白血球は、被験者から血液を採取し、常法により白血球画分を回収することにより得ることができる。この目的のために、市販の試薬を好適に使用することができる。市販の試薬としては、Lymphoprep（登録商標）、Ficoll（登録商標）-Paqueなどがあげられる。白血球画分は、試薬の製造業者の指示書に従って、密度勾配遠心分離法を実施し、リンパ球や単球を含む血球層（末梢血単核球：PBMC）を分離することにより得られる。

[0040] 被験者は、典型的には、ヒトであるが、ヒトを除く哺乳動物であってもよい。ヒトを除く哺乳動物としては、例えば、マウス、ラット、ハムスター、モルモット等のげっ歯類やウサギ等の実験動物、ブタ、ウシ、ヤギ、ウマ、ヒツジ、ミンク等の家畜、イヌ、ネコ等のペット、サル、カニクイザル、アカゲザル、マーモセット、オランウータン、チンパンジー、ゴリラなどの霊長類等をあげることができる。

[0041] 被験者由来の白血球画分から、常法によりRNAを含む試料を調製する。細胞からRNAを抽出する方法は、細胞破碎とRNaseの不活化を同時に行う方法を採用することが望ましく、細胞を破碎して可溶化剤によって可溶化した後、変性剤によってタンパク質を除去し、エタノール等で遺伝子を沈殿させることで、白血球からRNAを調製することができる。該操作には、市販の抽出キットを好適に使用することができる。例えば、Isogen（ニッポンジーン製）、Trizol（Ambion製）などがあげられる。

[0042] 得られたRNAは、それ以上精製することなく逆転写反応に供することができる。得られたRNAに含まれるtRNA^{Leu(UUR)}を鋳型とするためには、該tRNA^{Leu(UUR)}に

特異的にハイブリダイズするプライマーを用いる。本発明においては、プライマーは、該鋳型に相補的なオリゴヌクレオチドである。オリゴヌクレオチドとしては、DNA、RNA、DNAとRNAのハイブリッドであってもよいが、操作性の観点から、DNAが好ましい。オリゴヌクレオチドを構成するヌクレオチドは、天然のヌクレオチドであっても人工のヌクレオチドであってもよい。

[0043] プライマーの長さは、tRNA^{Leu(UUR)}に特異的にハイブリダイズできる機能を保持できる限り特に限定されないが、8～30塩基長、好ましくは10～25塩基長、より好ましくは10～22塩基長である。

[0044] プライマーの具体的な塩基配列は、tRNA^{Leu(UUR)}のタウリン修飾の有無により、プライマー伸長産物の長さが相違する、あるいは、プライマー伸長産物の長さや塩基配列が相違するように設計される。好適な塩基配列は、配列番号2で表されるtRNA^{Leu(UUR)}の3'から5'の向き(56位→41位)にハイブリダイズするように設計された、下記：

5' -acctctgactgtaaag-3' (配列番号3) で表される塩基配列を含むDNAである。

プライマーは、本発明の目的の範囲内で、配列番号3に示される塩基配列において、5'末端および/または3'末端に1または複数個(例えば、2個)の塩基が付加されていてもよく、5'末端および/または3'末端から1または複数個(例えば、2個)の塩基が欠失してもよい。

さらに、プライマーとハイブリダイズする位置に、測定対象のtRNA^{Leu(UUR)}が変異した塩基配列を有することが想定される場合は、変異tRNA^{Leu(UUR)}の塩基配列と相補的となるように、配列番号3に示される塩基配列の任意の塩基を他の塩基に置換してもよい。具体的には、下記：

5' -acctctgactgtaagg-3' (配列番号4) : 3271変異の場合、または

5' -acctctgactgcaaag-3' (配列番号5) : 3280変異の場合

で表される塩基配列を含むDNAがあげられる。このようにして設計したプライマーは、1種のみならず、2種以上を組み合わせ使用してもよい。

[0045] 前記プライマーは、直接的または間接的に標識物質により標識されていて

もよい。標識物質としては、蛍光物質（例、F I T C、ローダミン、FAM™、VIC™、NED™、PET™、前記4種はApplied Biosystems社の商品名である）、放射性物質（例、³²P、³⁵S、¹⁴C、³H）、酵素（例、アルカリホスファターゼ、ペルオキシダーゼ）、着色粒子（例、金属コロイド粒子、着色ラテックス）、ビオチンなどがあげられる。好ましくは、蛍光物質または放射性物質であり、標識される部位は、プライマーの5'末端が望ましい。

[0046] 逆転写反応は、Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Fourth Edition (2012)等を参照して、公知の方法で行うことができる。逆転写酵素、上記プライマーおよびdNTP（ヌクレオチド混合物）を用いて、必要によりRNase阻害剤の共存下、得られたRNA中に含まれるtRNA^{Leu(UUR)}を鋳型として、逆転写反応を行う。

逆転写酵素は市販されており、tRNA^{Leu(UUR)}を鋳型として、逆転写反応を行える酵素であれば、市販の酵素キットを使用することができる。例えば、AMV逆転写酵素、M-MuLV逆転写酵素などがあげられるが、SuperscriptIII(Thermo Fisher Scientific Inc. 製)のような変異型の逆転写酵素はタウリン修飾部位で反応が停止しないため使用できない。

鋳型RNAは、総RNAとして1pg~1μg程度を用いる。

プライマーは、0.1~1μg程度を用いる。

dNTPは、4種のヌクレオチド（例、dATP、dGTP、dCTP、dTTP）の混合物を用いてもよく、鋳型の塩基配列に相補的な1~3種のヌクレオチドを用いてもよい。dNTPは、通常、各ヌクレオチドあたり1-500μM程度の濃度で使用する。

RNase阻害剤は、逆転写反応の条件下でRNaseを阻害できる限り限定なく使用することができる。種々のRNase阻害剤が市販されており、市販品としては、RNaseOUT(Thermo Fisher Scientific Inc. 製)、RNasin(Promega製)等があげられる。

逆転写反応溶液の組成は、用いる逆転写酵素により適宜設定することができる。また、市販の酵素キットに添付されている反応緩衝液を希釈して使用することができる。

[0047] 逆転写反応は、鋳型とプライマーのアニーリング反応およびそれに続くプライマーからの伸長反応とに分けられる。

アニーリング反応の一例として、例えば、約80℃で1～5分間インキュベートした後、37℃以下、通常は室温（25℃前後）にて10分～数時間静置する条件があげられる。

プライマー伸長反応の一例として、例えば、42℃～60℃で15分間～2時間行い、反応終了後は95℃で1～5分間熱処理することにより逆転写酵素を失活させる。

[0048] 逆転写反応終了後、タウリン修飾の有無によるプライマー伸長産物の相違を検出する。例えば、プライマー伸長産物を電気泳動によりアガロースゲルまたはポリアクリルアミドゲルで展開した後、サイズの相違によって検出する方法があげられる。この場合、プライマーの5'末端を予め蛍光標識または放射線標識しておき、電気泳動後、イメージングプレートにシグナルを取り込み、適当な検出装置を用いて検出することができる。

[0049] ここで、タウリン修飾を有するtRNA^{Leu(UUR)}は、配列番号3で表される塩基配列を含むプライマーを用いて逆転写反応を実施すると、 τ m⁵U修飾が伸長反応に対してバリエードとして作用することにより、35位のUで伸長反応が停止する。タウリン修飾を有しないtRNA^{Leu(UUR)}の場合は、伸長反応に対する立体障害がなく伸長反応が進み、ジデオキシヌクレオチド（例、ddA、ddG、ddC、ddT）を反応液中に共存させておくことで、所望の位置で伸長反応を停止させることができる。例えば、ddGを用いた場合、図1に示すように、タウリン修飾を有するtRNA^{Leu(UUR)}とタウリン修飾を有しないtRNA^{Leu(UUR)}との相違は、1塩基の長さが相違するプライマー伸長産物として表される。

[0050] さらに、電気泳動により分離したバンドを切り出し、常法により塩基配列を決定して、タウリン修飾の有無によるプライマー伸長産物の塩基配列の相違を測定することによって、バンドを同定してもよい。

[0051] (2) タウリン修飾を有するtRNA^{Leu(UUR)}からのプライマー伸長産物と、タウリン修飾を有しないtRNA^{Leu(UUR)}からのプライマー伸長産物との量比を算出する工程

前記工程で、プライマー伸長産物を電気泳動後、イメージングプレートに取り込んだシグナルを、BAS 2000イメージアナライザー（GEヘルスケア製）等のデンシトメトリーを用いて定量する。

[0052] タウリン修飾を有するtRNA^{Leu(UUR)}からのプライマー伸長産物およびタウリン修飾を有しないtRNA^{Leu(UUR)}からのプライマー伸長産物の量は、任意の単位で表すことができ、あるいは、量比で表してもよい。これらの値を、下記式（1）：

[0053] [数7]

$$\text{総タウリン修飾率} = \tau m^5 U / (U + \tau m^5 U) \times 100 (\%) \quad (1)$$

[0054] （式中、 $\tau m^5 U$ はタウリン修飾を有するtRNA^{Leu(UUR)}からのプライマー伸長産物の量を示し、 U はタウリン修飾を有しないtRNA^{Leu(UUR)}からのプライマー伸長産物の量を示す）に代入し、総タウリン修飾率を算出する。

[0055] ここで、被験者が変異mtDNAを有すると疑われる場合、下記式（2）：

[0056] [数8]

$$\text{正常タウリン修飾率} = \text{総タウリン修飾率} / (100 - \text{mtDNA点変異率}) / 100 (\%) \quad (2)$$

[0057] （上記式中、mtDNA点変異率（%）は、配列番号1で表されるtRNA^{Leu(UUR)}をコードするDNAにおいて、14位のA（A3243G）、15位のG（G3244A）、29位のT（T3258C）、42位のT（T3271C）および62位のT（T3291C）からなる群より選ばれる点変異の中で最も高い変異率を示す）により、正常タウリン修飾率を求め、該数値を老化の指標とすることが望ましい。

[0058] mtDNAの点変異率は、DNAシーケンス法、PCR-RFLP法、PCR-SSCP法、denaturing high-performance liquid chromatography(DHPLC)法、BiPlex Invader法、SnaP shot法、high-resolution melt(HRM)プロファイリング法、temporal temperature gradient gel electrophoresis (TTGE)法のほか、現在開発されている次世代シーケンサーを用いた方法を用いて測定することができる。

例えば、A3243Gを有するMELAS患者の場合、PCR-RFLP法を用いて増幅したPCR産物を、制限酵素ApaIの切断部位の有無（変異のあるPCR産物は切断部位を

有し、変異のないPCR産物は切断部位を有しない)により得られるバンドの長さの相違を定量し、A3243Gの点変異率を測定することができる。T3271Cを有するMELAS患者の場合、PCR-RFLP法を用いて増幅したPCR産物を、制限酵素Afl IIの切断部位の有無(変異のあるPCR産物は切断部位を有し、変異のないPCR産物は切断部位を有しない)により得られるバンドの長さの相違を定量し、T3271Cの点変異率を測定することができる。

[0059] このようにして得られた総タウリン修飾率および正常タウリン修飾率は、本発明において老化の指標とすることができる。健常者は、総タウリン修飾率と正常タウリン修飾率がほぼ同一であるので、総タウリン修飾率を老化の指標とすることができる。

総タウリン修飾率100%は、タウリン年齢の観点からは若年と判断することができる。

[0060] MELAS患者の解析結果では、正常なミトコンドリアtRNA^{Leu(UUR)}のタウリン修飾率の低下は、患者の暦年齢と一定の相関関係を有することが今回新たに示された(図2)。また、健常者の解析結果においても、正常なミトコンドリアtRNA^{Leu(UUR)}のタウリン修飾率の低下が、患者の暦年齢や、遺伝的要因や生活・環境要因などの影響による生体機能の状態と一定の相関関係を有することが今回新たに示された(図8)。上記結果は、tRNA^{Leu(UUR)}のタウリン修飾率は、健常者、ミトコンドリア病者を問わず、ミトコンドリアの老化のバイオマーカーとして用いることができることを示している。さらに、正常なミトコンドリアtRNA^{Leu(UUR)}のタウリン修飾率は、ミトコンドリア自体の老化や機能低下の指標として用いることができることは言うに及ばず、生体、器官(臓器)、組織、細胞、或いは、細胞内小器官の機能、とりわけ、生体やエネルギー需要の高い器官(臓器)、組織、細胞、或いは、細胞内小器官の老化や機能低下の指標としても有用であることを示している。

加えて、稀に、健常者、MELAS患者のいずれにおいても暦年齢と相関しない正常なミトコンドリアtRNA^{Leu(UUR)}のタウリン修飾率の例が認められることから、正常なミトコンドリアtRNA^{Leu(UUR)}のタウリン修飾率は、単に、被験者の加齢

に伴う老化の指標となるだけでなく、栄養状態や代謝異常など疾患の有無なども含めた被験者の健康状態を反映した身体機能全般の老化の指標、或いは、健康寿命、とりわけ、特定死因を含まない健康寿命の指標としても利用できることを示している。

また、正常なミトコンドリアtRNA^{Leu(UUR)}のタウリン修飾率は、被験者が健常か未病の状態かの判定や被験者の生活改善や治療の要否の判定、それらの補助方法において用いるバイオマーカーとしても有用である。

また、MELAS患者のみでなく、ミトコンドリアtRNA^{Leu(UUR)}の一塩基置換(A3243G)を有する糖尿病患者でもタウリン投与の有効性が確認されており、正常なミトコンドリアtRNA^{Leu(UUR)}のタウリン修飾率が、革新的な新規バイオマーカーとして、現在開発が進行中のこれらミトコンドリア病患者に対するタウリン療法の対象者の選定やその治療効果判定に用いるコンパニオン診断用途やその補助にも有用であることを示している。

[0061] 老化の判定薬

本発明の老化の判定薬に含まれる、ミトコンドリアtRNA^{Leu(UUR)}に相補的な10～25塩基からなる塩基配列を含むプライマーは、「老化の測定方法」に記載のプライマーと同様である。

[0062] プライマーは、凍結乾燥した状態で含まれてもよく、医薬上許容されうる担体とともに溶液状で含まれていてもよい。

医薬上許容されうる担体としては、本発明の判定薬を液剤として調製する場合、製剤素材として慣用されている各種担体、例えば希釈剤、溶剤、溶解補助剤、等張化剤、緩衝剤などを含んでもよい。

希釈剤としては、水、生理用食塩水などがあげられる。

溶剤としては、水、生理用食塩水、エタノールなどがあげられる。

溶解補助剤としては、シクロデキストリン類などがあげられる。

等張化剤としては、塩化ナトリウム、塩化カリウムなどの無機塩類、グリセリン、マンニトール、ソルビトールなどの炭水化物などがあげられる。

緩衝剤としては、リン酸緩衝液、酢酸緩衝液、ホウ酸緩衝液、炭酸緩衝液

、クエン酸緩衝液、トリス緩衝液などがあげられる。

これらの担体の配合比は、当業者が適宜決定することができる。

プライマーは、使用直前まで凍結または氷上で保管しておくことが望ましい。

[0063] 老化の判定キット

本発明の老化の判定キットは、ミトコンドリアtRNA^{Leu(UUR)}に相補的な10～25塩基からなる塩基配列を含むプライマーおよび逆転写酵素を含有する。

[0064] 本発明の老化の判定キットに含まれる、ミトコンドリアtRNA^{Leu(UUR)}に相補的な10～25塩基からなる塩基配列を含むプライマーは、「老化の測定方法」に記載のプライマーと同様である。

[0065] 上記逆転写酵素の好ましい態様および具体例は、「老化の測定方法」において説明した通りである。

[0066] 本発明のキットはさらに、ヌクレオシド三リン酸、プライマー伸長反応用緩衝液、RNase阻害剤を含んでいてもよい。

[0067] ヌクレオシド三リン酸は、プライマーに組み込まれてプライマー伸長産物を構成する基質であり、通常dNTP混合物として使用される。dNTP混合物は、典型的には、dATP、dTTP、dCTPおよびdGTPからなる。

必要に応じて、プライマー伸長を所望の部位で停止させるためのジデオキシヌクレオチド (ddATP、ddTTP、ddCTP、ddGTP) を少なくとも1種含んでいてもよい。

[0068] 前記緩衝液としては、例えば、トリス緩衝液、リン酸緩衝液、ペロナール緩衝液、ホウ酸緩衝液、グッド緩衝液等、通常のハイブリダイゼーション反応を実施する場合に用いられる緩衝液があげられ、そのpHも特に限定されないが、通常5～9の範囲が好ましい。

[0069] 前記RNase阻害剤は、「老化の測定方法」に記載のRNase阻害剤と同様である。

[0070] 本発明のキットには、上記プライマー等に加えて、反応容器、プライマーを希釈するための緩衝液、陽性対照（例、正常人由来サイブリッド細胞RNA：

Proc Natl Acad Sci U S A. 2005;102(20):7127-7132参照)、陰性対照(例、MELAS患者由来サイブリッド細胞RNA: Proc Natl Acad Sci U S A. 2005;102(20):7127-7132参照)、プロトコールを記載した指示書などをさらに含んでもよい。

[0071] ミトコンドリアtRNA^{Leu(UUR)}のタウリン修飾率の改善剤

加齢による正常なミトコンドリアtRNA^{Leu(UUR)}のタウリン修飾率の低下がタウリンの投与により改善できることから、試験例2の結果は、タウリンおよびそれを含有する組成物が、ミトコンドリアtRNA^{Leu(UUR)}のタウリン修飾率の改善用、ミトコンドリアtRNA^{Leu(UUR)}のタウリン修飾率低下の予防用、とりわけ、正常なミトコンドリアtRNA^{Leu(UUR)}の加齢により低下したタウリン修飾率の改善用の医薬品、医薬部外品、化粧品、或いは、食品として有用であることを示している。

本発明の改善剤は、タウリンを有効成分として含有する。タウリンは、アミノエチルスルホン酸または2-アミノエタンスルホン酸ともいう。タウリンは、常法に従って有機合成されたものであってもよく、動植物から抽出分離された天然物であってもよい。

[0072] タウリンは、生体内でタウリンとして作用する限りにおいては、タウリン誘導体の形態であってもよい。タウリン誘導体としては、N-メチルタウリン、N、N-ジメチルタウリン、N、N、N-トリメチルタウリン、グアニジノエタンスルホン酸、グアニジノエタンスルフィン酸、N-(2-アセタミド)-2-アミノエタンスルホン酸、ピペラジノ-N,N'-ビス(2-エタンスルホン酸)、N-[1'-アザ-シクロヘプタン-2'-イル]-2-アミノエタンスルホン酸、N-[1'-アザ-シクロペンタン-2'-イル]-2-アミノエタンスルホン酸、N-[1'-アザ-シクロヘプタン-2'-イル]-3-アミノプロパンスルホン酸、N-[1'-アザ-シクロペンタン-2'-イル]-3-アミノプロパンスルホン酸、2-アミノエチルスルホン酸、3-アミノプロピオン酸、エタノールアミン-O-サルフェート、アミノメタンスルホン酸、ホモタウリン、ピリジン-3-スルホン酸、ピペリジ

ン-3-スルホン酸、アニリン-2-スルホン酸、(±)-2-アミノシクロヘキサンスルホン酸、2-アミノシクロペンタンスルホン酸、キノリン-8-スルホン酸、1,2,3,4-テトラヒドロキノリン-8-スルホン酸、3-アミノ-β-シクロ[2.2.1]ヘプタン-2-スルホン酸、6-アミノメチル-3-メチル-4-1,2,4-ベンゾチアジアジン-1-ジオキサイド(TAG)、グリシン、レチニリデンタウリン(TAURET)3-アセタミド-1-プロパンスルホン酸Ca塩(ACAMPROSATE)、5-タウリノメチルウリジン、5-タウリノメチル-2-チオウリジン、イセチオン酸、システインスルホン酸、リトラロン、2-アミノ-3-ヒドロキシ-1-プロパンスルホン酸、N-(2,3-ジヒドロキシ-n-プロピル)タウリン、デカノイルサルコシルタウリンなどがあげられる。

[0073] 本発明の改善剤を被験者に投与または摂取させることによって、投与または摂取前と比べて、該被験者におけるタウリン修飾率が改善される。ここで、改善されるタウリン修飾率とは、上述した式(1)で表される総タウリン修飾率および/または、上述した式(2)で表される正常タウリン修飾率である。

[0074] かかる目的のため、本発明の改善剤は、タウリン単独で、あるいは賦形剤(例えば、乳糖、ショ糖、デンプン、シクロデキストリン等)、場合によっては、香料、色素、調味料、安定剤、保存剤等も含有し、錠剤、丸剤、顆粒、細粒、粉末、ペレット、カプセル、溶液、乳液、懸濁液、シロップおよびトローチ等に製剤化して、医薬、医薬部外品、化粧品または食品(好ましくは、保健機能食品)もしくは食品添加物として用いることができる。また、本発明の改善剤は、研究用試薬として用いることもできる。

[0075] 本発明の改善剤に含まれるタウリンの量は、本発明の効果を奏する限り特に限定されるものではないが、通常0.0001~100重量%であり、好ましくは0.001~99.0重量%である。

[0076] タウリンの有効量は、1日当たり体重1kg当たりのタウリンの量として表すことができる。推奨される有効量としては、0.01~1.0g/kg体

重/日であり、好ましくは0.02~0.5g/kg体重/日である。

- [0077] 本発明の改善剤を医薬として用いる場合、有効量のタウリンおよび医薬として許容されうる担体を含有することが好ましい。
- [0078] 医薬として許容されうる担体としては、例えば、賦形剤（例えば、乳糖、ショ糖、デキストリン、ヒドロキシプロピルセルロース、ポリビニルピロリドン、軽質無水ケイ酸等）、崩壊剤（例えば、デンプン、カルボキシメチルセルロース等）、滑沢剤（例えば、ステアリン酸マグネシウム、タルク等）、界面活性剤（例えば、ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油、モノステアリン酸グリセリン、ラウリル硫酸ナトリウム、マクロゴール類、ショ糖脂肪酸エステル等）、溶剤（例えば、水、食塩水、大豆油等）、保存剤（例えば、p-ヒドロキシ安息香酸エステル等）などがあげられるが、これらに限定されるものではない。
- [0079] 本発明の改善剤は、動物（例、哺乳動物、鳥類、魚類等）に対して、経口的あるいは非経口的に安全に投与することができる。
- [0080] 本発明の改善剤は、食品としてまたは食品添加物として、摂取することもできる。本発明の「食品」は、食品全般を意味するが、いわゆる健康食品を含む一般食品の他、厚生労働省の保健機能食品制度に規定される特定保健用食品や栄養機能食品等の保健機能食品をも含むものであり、ヘルスクレームや健康強調表示をした食品であってもよく、さらにサプリメント、飼料・餌料等も本発明の食品に包含される。
- [0081] 食品用途の場合、タウリンを、例えば、清涼飲料、パン、菓子等の一般食品（いわゆる健康食品を含む）に含有させて用いることもできる。また、タウリンを、賦形剤（例えば、乳糖、ショ糖、デンプン等）、場合によっては、香料、色素等と共に、錠剤、丸剤、顆粒、細粒、粉末、ペレット、カプセル、溶液、乳液、懸濁液、シロップおよびトローチ等に製剤化して、特定保健用食品や栄養機能食品等の保健機能食品、サプリメントとして用いることができる。また、本発明の食品および食品添加物は、飼料・餌料用途にも適用することができ、家禽や家畜等には、通常の飼料・餌料に添加して摂取ま

たは投与することができる。

[0082] 食品または飼料・餌料として摂取する場合、食品または飼料・餌料の1日当たりの摂取回数および1回当たりの摂取量の目安を概算し、1日摂取量を規定した上で1日摂取量の食品または飼料・餌料に含まれるタウリンの量を決定する。タウリンの含有量は、後述する用量に基づいて決定することができる。

[0083] 本発明の改善剤の摂取または投与量は、摂取または投与対象の年齢、体重、健康状態によって異なり、一概に決定することはできない。例えば、健康の維持、増進または改善を目的とする場合は、通常、ドリンク剤などの医薬部外品、食品または化粧品の形態にして、一方、タウリン修飾率の低下に起因する障害の治療や健康回復を目的とする場合には、通常、医薬品、医薬部外品または食品の形態にして、タウリンとして、成人1日当たり0.4~40g、好ましくは0.8g~20g、より好ましくは4.0~15gを1日1回から数回に分けて摂取または投与することが好ましい。なお、体重が40kg以下の場合には、通常、1日当たり0.3~30g、好ましくは0.6g~15g、より好ましくは3.0~12gを1日1回から数回に分けて摂取または投与することが好ましい。

[0084] 本発明の改善剤（医薬）の投与方法としては、タウリン修飾率の低下に対する予防的および治療的な効果が得られる経路であれば特に限定されない。例えば、非経口的投与（静脈内投与、筋肉内投与、組織内直接投与、鼻腔内投与、皮内投与、経皮投与、腹腔内投与、胃瘻、経管投与、経腸栄養投与など）または経口投与により投与することができ、特に、該医薬をヒトに適用するには、静脈内、筋肉内または経口投与によって投与することができる。また、剤型としても特に制限されることなく、各種投与剤型、例えば、経口剤（顆粒剤、散剤、錠剤、カプセル剤、シロップ剤、乳剤、懸濁剤、ドリンク剤など）、注射剤、点滴剤、外用剤（経鼻投与製剤、経皮製剤、軟膏剤など）として投与することが可能である。外用剤（経皮製剤、軟膏剤など）は、医薬部外品または化粧品として投与することも可能である。

[0085] 本発明のミトコンドリアtRNA^{Leu(UUR)}のタウリン修飾率の改善剤は、ミトコンドリア病を発症した患者、好ましくは、ミトコンドリアtRNA^{Leu(UUR)}のタウリン修飾の欠損遺伝子変異によりミトコンドリア病を発症した患者、より好ましくは、配列番号1で表されるtRNA^{Leu(UUR)}をコードするDNAにおいて、14位のA (A3243G)、15位のG (G3244A)、29位のT (T3258C)、42位のT (T3271C) および62位のT (T3291C) からなる群より選ばれるいずれかの点変異に起因するミトコンドリア病を発症した患者、特に好ましくは、配列番号1で表されるtRNA^{Leu(UUR)}をコードするDNAにおいて、14位のA (A3243G) の点変異に起因するミトコンドリア病を発症した患者、とりわけ、MELASや糖尿病を発症した患者において、またはそれらの発症リスクを有する対象において、加齢や、遺伝的要因や生活・環境要因などの影響による生体機能の状態などにより低下したミトコンドリアtRNA^{Leu(UUR)}のタウリン修飾率の改善剤として用いられてもよい。さらに、本発明の改善剤は、これらの対象や患者において、加齢や、遺伝的要因や生活・環境要因などの影響による生体機能の状態などによるミトコンドリアtRNA^{Leu(UUR)}のタウリン修飾率低下の予防剤として用いられてもよい。また、本発明のミトコンドリアtRNA^{Leu(UUR)}のタウリン修飾の改善剤は、異常なミトコンドリアtRNA^{Leu(UUR)}のタウリン修飾率の改善のみでなく、タウリン修飾率が低下した正常なミトコンドリアtRNA^{Leu(UUR)}のタウリン修飾率の改善ができる点がとりわけ有用である。

実施例

[0086] 以下、実施例により本発明をさらに説明するが、本発明はいかなる意味においてもこれらに限定されるものではない。

[0087] 血液試料

治験に参加したMELAS患者から書面によるインフォームドコンセントを得て、患者血液を採取した。採取した血液から、Isogen (ニッポンジーン製) を用いて、製造業者の指示書に従って粗RNAを得た。

患者血液の取り扱いについては、川崎医科大学での倫理規定にも従った。

[0088] 実施例1 逆転写反応によるミトコンドリアtRNA^{Leu(UUR)}のタウリン修飾の検出

基本的には、桐野らの方法 (Proc Natl Acad Sci U S A, 2005; 102(20): 7127-7132) に準じて行った。桐野らによるプライマー伸長法の原理を図1に示す。

使用したプライマーの塩基配列は、以下の通りである。

5' -acctctgactgtaaag-3' (配列番号3)

予想される2種のプライマー伸長産物の塩基配列は、以下の通りである。

5' -acctctgactgtaaagTTTTAAG-3' (配列番号6: プライマーから伸長した配列を大文字で示す)

5' -acctctgactgtaaagTTTTAG-3' (配列番号7: プライマーから伸長した配列を大文字で示す)

上記プライマーおよびプライマー伸長産物の5'末端は、本実施例においては³²Pで標識されている。

[0089] (逆転写反応)

被験者白血球から得たRNA (0.2~1 μg) を鋳型として、tRNA^{Leu(UUR)}のアンチコドンの3'側に相当する³²P標識プライマー (配列番号3、0.1 pmol) と80°Cで2分間インキュベートした後、室温で1時間静置することにより、プライマーをアニーリングさせた。その後、逆転写酵素用反応緩衝液 (Invitrogen製) 中、dATP、dTTP、ddGTP (各1.5 mM、Amersham Pharmacia製) を添加し (最終濃度37.5 μM)、M-MuLV Reverse transcriptase (RNase H-) 1 μL (40 units/μL、Invitrogen製) を混合し、42°Cで1時間逆転写反応を行なった。T3271C変異を有するMELAS患者の場合は、配列番号3および配列番号4で示される³²P標識プライマー (混合プライマー、0.1 pmol) を用いた。

反応終了後、反応混合物を、7M尿素を含む15%ポリアクリルアミド電気泳動に供した。RIで標識されたバンドを、BAS5000バイオイメーキングアナライザー (富士フィルム製) で可視化した。

[0090] アンチコドン (1文字目U: 図1中、下線で示す) にタウリン修飾が欠損する(⁵U₃₄)と反応はAAGまで、タウリン修飾が存在する(εm⁵U₃₄)と反応はAGで停止する。このRI標識反応物を電気泳動で分離してBAS5000バイオイメーキングア

ナライザー（富士フィルム製）で定量し、総タウリン修飾率を求めた。結果を図2に示す。

[0091] 医師主導治験に参加したMELAS患者はA3243G変異またはT3271C変異を有するため、これらの点変異率を以下のようにして求めた。後藤らのPCR-RFLP法を一部改変して行った（Goto Y. et al.: A new mtDNA mutation associated with mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis and stroke-like episodes (MELAS). *Biochimica et Biophysica Acta* 1097: 238-240 (1991)）。A3243G変異の検出については、

For: 5' -gcccttccccgtaaatgatat-3'（配列番号8）および

Rev: 5' -gaagaggaattgaacctctgactg-3'（配列番号9）の2本のプライマー

でPCRを行い、増幅したPCR産物を制限酵素のApaIで切断した。正常mtDNAでは、制限酵素ApaIの切断部位がないため136 bpのバンドが1本であるのに対し、A3243G変異では、ApaIの切断部位があるため、切断されて84 bp、52 bpの2本のバンドが現れる。T3271C変異については、

For: 5' -taagaagaggaattgaacctctgaccttaa-3'（配列番号10）および

Rev: 5' -aggacaagagaaataaggcc-3'（配列番号11）の2本のプライマーでP

CRを行い、増幅したPCR産物を制限酵素のAflIIIで切断した。正常mtDNAでは、制限酵素AflIIIの切断部位がないため170 bpのバンドが1本であるのに対し、T3271C変異では、AflIIIの切断部位があるため、切断されて140 bp、30 bpの2本のバンドが現れる。

上記制限酵素で切断したPCR産物を、15%ポリアクリルアミド電気泳動に供し、分離したバンドを臭化エチジウムで染色し、デンシトメーターを用いてバンドの強度を定量し、点変異率を求めた（表1）。

[0092] 上記総タウリン修飾率および点変異率を用いて、MELAS患者の正常タウリン修飾率を求めた。結果を図2に示す。

[0093] 試験例1 血中および髄液中の乳酸値およびピルビン酸値の測定

血液中および髄液中の乳酸値の測定は、L-乳酸に乳酸オキシダーゼを作用させ、生じた過酸化水素を、パーオキシダーゼの存在下で生じる色素を比色

測定することにより定量した。

ピルビン酸値の測定は、ピルビン酸にピルビン酸オキシダーゼを作用させ、生じた過酸化水素を、パーオキシダーゼの存在下で生じる色素を比色測定することにより定量した。

[0094] 結果

治験参加MELAS患者の血中白血球におけるミトコンドリアtRNA^{Leu(UUR)}のタウリン修飾率を測定し、被験者の年齢を横軸にプロットしてグラフ化した。その結果、総タウリン修飾率と年齢とは相関がなかったのに対し、正常タウリン修飾率は、年齢依存性に低下した（図2）。一方、正常タウリン修飾率は、従来のミトコンドリア病マーカーとされる、血中および髄液乳酸値、乳酸/ピルビン酸比とは相関しなかったし、被験者の年齢と従来のミトコンドリア病マーカーとも相関しなかった（図3-6）。

[0095] 試験例2 MELAS患者へのタウリン投与によるタウリン修飾率の改善

上記医師主導治験において、MELAS患者にタウリンを投与した。投与量は、体重40kg以上の被験者の場合12g/日、25kg以上40kg未満の場合9g/日で、投薬期間は52週（1年間）であった。タウリン投与終了日（52週）に被験者から血液を採取し、実施例1に記載の方法に従って総タウリン修飾率および正常タウリン修飾率を測定した。結果を実施例1で求めた投与開始日（開始前0週）のデータと併せて図7に示す。また、個々のMELAS患者の、タウリン投与開始日および投与終了後の総タウリン修飾率、正常タウリン修飾率および点変異率をまとめて表1に示す。総タウリン修飾率をタウリン投与前と投与後とで比較した結果、有意差傾向があった（ $P=0.0546$ ）。タウリン内服により、正常タウリン修飾率が回復し、変異mtDNAに由来するtRNA^{Leu(UUR)}のタウリン修飾も改善することが明らかとなった。

[0096]

[表1]

被験者年齢	投与前(0歳)			投与後(52歳)		
	mtDNA点変異率 (%)	総タウリン修飾率 (%)	正常タウリン修飾率 (%)	mtDNA点変異率 (%)	総タウリン修飾率 (%)	正常タウリン修飾率 (%)
14	57.8	38.5	91.2	56.9	28.4	65.8
15	65.8	33.3	97.4	66.2	34.5	102.1
19	53.0	30.0	83.7	54.3	67.2	147.0
23	39.4	29.7	48.9	38.6	58.1	94.7
30	43.4	31.5	55.7	44.0	33.7	50.3
31	30.9	25.5	37.0	29.2	46.4	55.6
38	21.5	32.5	49.1	19.1	56.9	70.3
45	29.5	34.3	48.6	26.7	30.7	41.8
46	28.7	31.0	49.4	33.8	42.3	63.9

[0097] 実施例1および試験例2の結果は、ミトコンドリアの正常tRNA^{Leu(UUR)}のタウリン修飾率が加齢に伴い低下し、タウリン内服によりその低下したタウリン修飾率が上昇することを示している。さらに、正常tRNA^{Leu(UUR)}のタウリン修飾率が100%を超える症例があることは、タウリン内服により変異tRNA^{Leu(UUR)}のタウリン修飾率も改善していることを示している。

これまで、MELASの発症原因は変異tRNA^{Leu(UUR)}のタウリン修飾の欠損にあると考えられてきたが、この結果は、MELASの発症に加齢に伴う正常tRNA^{Leu(UUR)}のタウリン修飾率の低下が関与していることを示している。

周知のようにMELAS患者においてtRNA^{Leu(UUR)}のタウリン修飾機能自体に欠損はない。

実施例1で認められた現象は、MELAS患者の解析結果ではあるが、健常者でも同様に発生する現象を反映していると言える。つまりtRNA^{Leu(UUR)}のタウリン修飾率はミトコンドリアの老化のバイオマーカーとして用いることができることを示している。

また、老化に伴いミトコンドリアtRNA^{Leu(UUR)}のタウリン修飾率が低下すれば、当然、UUGコドン特異的な翻訳能が律速と成って、UUGコドンを含むタンパク質全般の合成が低下する。それに伴い、呼吸・エネルギー代謝に重要な機能を果たすミトコンドリアの機能が低下し、生体やそれを構成する器官等の機能が低下するのは明らかであり、さらに修飾率の低下が進行すれば、例えば、高齢者に認められる呼吸困難や骨格筋の減弱のような重篤な症状を発症

するに至る場合もあると考えられる。

従って、実施例1および試験例の結果は、正常なミトコンドリアtRNA^{Leu(UUR)}のタウリン修飾率は、ミトコンドリア自体の老化や機能低下の指標として用いることができることは言うに及ばず、生体、器官(臓器)、組織、細胞、或いは、細胞内小器官の機能、とりわけ、生体やエネルギー需要の高い器官(臓器)、組織、細胞、或いは、細胞内小器官の老化や機能低下の指標としても有用であることを示している。加えて、試験例2の被験者年齢14の患者のように暦年齢に比して正常タウリン修飾率の低い例や被験者年齢46の患者のように暦年齢が比較的高いにも関わらず正常タウリン修飾率が比較的高い例が認められることや、後述の試験例4の若年健常者の正常タウリン修飾率にかなりの幅があることから、正常タウリン修飾率は、単に、被験者の加齢に伴う老化の指標となるだけでなく、栄養状態や代謝異常など疾患の有無なども含めた被験者の健康状態を反映した老化の指標、或いは、健康寿命、とりわけ、特定死因を含まない健康寿命の指標としても利用できることを示している。

さらに、加齢などによる老化に伴う正常なミトコンドリアtRNA^{Leu(UUR)}のタウリン修飾率の低下がタウリンの投与により改善できることから、試験例2および後述の試験例3の結果は、タウリンおよびそれを含有する組成物が、ミトコンドリアtRNA^{Leu(UUR)}のタウリン修飾率の改善用、ミトコンドリアtRNA^{Leu(UUR)}のタウリン修飾率低下の予防用、とりわけ、正常なミトコンドリアtRNA^{Leu(UUR)}の加齢により低下したタウリン修飾率の改善用の医薬品、医薬部外品、化粧品、或いは、食品として有用であることを示している。

[0098] 試験例3 糖尿病患者へのタウリン投与による糖尿病マーカーの改善

試験例2では、ミトコンドリア遺伝子の一塩基変異(A3243G)によるMELAS患者において、タウリン投与により病状の改善が認められたので、同じミトコンドリア遺伝子の一塩基変異(A3243G)に起因する糖尿病に対するタウリン投与の治療効果を確認した。具体的には、ミトコンドリア遺伝子の一塩基変異(A3243G)による糖尿病と診断され、心筋症を併発した患者(49歳 女性)に、タ

ウリン(商品名 タウリン散98%「大正」、大正製薬株式会社製)を、毎日経口投与した。投与は、タウリンとして4g/回、3回/日(12g/日)で、投薬期間は約1年間であった。当該患者より、タウリン投与開始から終了まで経時的に血液を採取し、糖尿病マーカーであるヘモグロビンA1c(HbA1c)の値を測定したところ、開始時には7.7%あった値が、投与開始23週目(約5カ月目)には6.9%に低下し、投与終了時には6.8%になった。上記結果が示すように、当該患者のHbA1cの値を、タウリン投与期間中を通じて、糖尿病の合併症を予防するための目標値である7%未満にコントロールした。さらに、タウリン投与開始時には12単位必要であったインスリン投与を、投与終了時には9単位にまで低減することができ、タウリン内服により、ミトコンドリア遺伝子変異による糖尿病患者の症状改善が出来ることを確認した。

後述の試験例4から明らかなように、正常なミトコンドリアtRNA^{Leu(UUR)}のタウリン修飾率の加齢や、遺伝的要因や生活・環境要因などの影響による生体機能の状態による低下は、MELASに限定されるものではなく健常者においても普遍的な現象であるので、ミトコンドリア遺伝子変異による糖尿病発症のメカニズムは、MELASの場合と同様に、異常ミトコンドリアtRNA^{Leu(UUR)}に加えて、正常なミトコンドリアtRNA^{Leu(UUR)}のタウリン修飾率の低下によるものと考えられる。従って、当該糖尿病の場合でも、タウリンの投与による異常ミトコンドリアtRNA^{Leu(UUR)}のタウリン修飾率の改善に加えて、正常なミトコンドリアtRNA^{Leu(UUR)}のタウリン修飾率が改善したことにより、臨床症状が改善したものと考えられることができる。

[0099] 試験例4 健常者における正常なミトコンドリアtRNA^{Leu(UUR)}のタウリン修飾率の測定

試験例2において、MELAS患者で確認された正常なミトコンドリアtRNA^{Leu(UUR)}のタウリン修飾率が加齢に伴い低下することが確認されたので、健常者でも同様に、正常なミトコンドリアtRNA^{Leu(UUR)}のタウリン修飾率が加齢に伴い低下することを、試験例2と同様の方法により確認した。その結果を図8に示す。実施例1に記載の方法に従った、若年(10代)および老年(80代)健常人

各々3名の末梢血白血球検体を用いた解析では、正常なミトコンドリアtRNA^{Leu(UUR)}修飾率は、若年者(10代)平均 $56.7 \pm 12.6\%$ (Mean \pm SE)と比較して、高齢者(80代)では $35.8 \pm 3.0\%$ と、加齢による有意な低下が認められた。また、若年者間で比較した場合、かかる修飾率は約80%~約40%と約2倍程度の幅が認められることから、正常なミトコンドリアtRNA^{Leu(UUR)}のタウリン修飾率の低下は、加齢のみでなく、遺伝的要因や生活・環境要因などの影響による生体機能の低下をも反映していると考えられる。この結果は、正常なミトコンドリアtRNA^{Leu(UUR)}のタウリン修飾率は、MELAS患者のみでなく健常者においても、有用な老化のバイオマーカーとして用いることができることを示している。

[0100] 上記試験例は、正常なミトコンドリアtRNA^{Leu(UUR)}のタウリン修飾率が、ミトコンドリア病患者、健常者を問わず、普遍的に、加齢あるいは遺伝的要因や生活・環境要因などの影響による老化に伴い低下することを示している。

また、前記タウリン修飾率の低下が、タウリン投与により改善することが確認されたため、本発明のミトコンドリアtRNA^{Leu(UUR)}のタウリン修飾改善剤は、健常者はもとより、未病の対象や何らかの疾患を発症するリスクを有する対象、さらには、何らかの疾患を有する患者、とりわけ、ミトコンドリア病患者やその発症リスクを有する対象における、老化に伴うミトコンドリアtRNA^{Leu(UUR)}のタウリン修飾率低下、特に、正常なミトコンドリアtRNA^{Leu(UUR)}のタウリン修飾率低下の改善や予防に有用である。

さらに、正常なミトコンドリアtRNA^{Leu(UUR)}のタウリン修飾率は、バイオマーカーとして、現在開発が進行中のミトコンドリア病患者に対するタウリン療法の対象者の選定や、その治療効果判定に用いるコンパニオン診断用途やその補助にも有用である。

[0101] 処方例1 顆粒剤(1包中)

タウリン	3000mg
アスパルテーム	9mg
タルク	20mg
低置換ヒドロキシプロピルセルロース	60mg

常法により、上記処方からなる顆粒剤を調製した。

[0102] 処方例2 内服用液剤（1剤中）

ケイヒ	100mg
ローヤルゼリー	100mg
タウリン	5000mg
70%ソルビトール液	1000mg
エリスリトール	1000mg
pH調整剤	適量

精製水を加えて全量を180mLとする。

常法により、上記処方からなる内服用の液剤を調製した。

[0103] 処方例3 ドリンク剤（1剤中）

ビタミンB1硝酸塩	10mg
ビタミンB2	2mg
塩化カルニチン	50mg
タウリン	4000mg
パントテン酸ナトリウム	10mg
安息香酸	20mg
パラオキシ安息香酸ブチル	2.5mg
アスパルテーム	6mg
クエン酸	100mg
グリシン	300mg

精製水を加え全量を50mLとする。

常法により、上記処方からなるドリンク剤を調製した。

産業上の利用可能性

- [0104] 本発明者らは、ミトコンドリアtRNAの中でも、正常なtRNA^{Leu(UUR)}のタウリン修飾率が老化の指標となることを見出した。正常なtRNA^{Leu(UUR)}のタウリン修飾率は、ミトコンドリア病患者のみならず健常人の状態を把握することのできるユニバーサルマーカーである。タウリンは、ミトコンドリアtRNA^{Leu(UUR)}の加

齢や、例えば、強度疲労などの生活・環境要因や遺伝的要因などの影響等により低下したタウリン修飾率の改善用の医薬品、医薬部外品、化粧品、或いは、食品として有用である。

[0105] 以上、本発明の具体的な態様のいくつかを詳細に説明したが、当業者であれば示された特定の態様には、本発明の教示と利点から実質的に逸脱しない範囲で様々な修正と変更をなすことは可能である。従って、そのような修正および変更も、すべて後記の特許請求の範囲で請求される本発明の精神と範囲内に含まれるものである。

[0106] 本発明は、日本で出願された特願2016-062910（出願日：2016年3月26日）を基礎としており、その内容はすべて本明細書に含まれるものとする。

請求の範囲

- [請求項1] 被験者から単離した生体試料におけるミトコンドリアtRNA^{Leu(UUR)}のタウリン修飾の程度を、該tRNA^{Leu(UUR)}を鋳型としてプライマーからの逆転写反応により測定する工程を含む、被験者の老化の測定方法。
- [請求項2] プライマーが鋳型に相補的な10～25塩基長からなるオリゴヌクレオチドであり、タウリン修飾の有無によるプライマー伸長産物の相違を検出する、請求項1に記載の方法。
- [請求項3] プライマーが配列番号3、4および5で表される塩基配列からなる群より選ばれる塩基配列を含む、少なくとも1種である、請求項1または2に記載の方法。
- [請求項4] タウリン修飾を有するtRNA^{Leu(UUR)}からのプライマー伸長産物と、タウリン修飾を有しないtRNA^{Leu(UUR)}からのプライマー伸長産物との量比を算出する工程をさらに含む、請求項1～3のいずれか1項に記載の方法。
- [請求項5] 下記式(1)：

[数1]

$$\text{総タウリン修飾率} = \tau m^5 U / (U + \tau m^5 U) \times 100 (\%) \quad (1)$$

(式中、 $\tau m^5 U$ はタウリン修飾を有するtRNA^{Leu(UUR)}からのプライマー伸長産物の量を示し、 U はタウリン修飾を有しないtRNA^{Leu(UUR)}からのプライマー伸長産物の量を示す)で表される総タウリン修飾率を老化の指標とする、請求項1～4のいずれか1項に記載の方法。

- [請求項6] 被験者が、tRNA^{Leu(UUR)}遺伝子コード領域のA3243G、T3271C、G3244A、T3258CおよびT3291Cからなる群より選ばれる一塩基置換を有する変異ミトコンドリアDNAを有すると疑われる者であり、前記式(1)に続いて、下記式(2)：

[数2]

$$\text{正常タウリン修飾率} = \text{総タウリン修飾率} / (100 - \text{mtDNA点変異率}) / 100 (\%) \quad (2)$$

(上記式中、mtDNA点変異率は、配列番号1で表されるtRNA^{Leu(UUR)}をコードするDNAにおいて、14位のA (A3243G)、15位のG (G3244A)、29位のT (T3258C)、42位のT (T3271C) および62位のT (T3291C) からなる群より選ばれる点変異の中で最も高い点変異率を示す) により求めた正常タウリン修飾率を老化の指標とする、請求項5に記載の方法。

- [請求項7] ミトコンドリアtRNA^{Leu(UUR)}に相補的な10～25塩基からなる塩基配列を含むプライマーを含有する、老化の判定薬。
- [請求項8] プライマーが配列番号3、4および5で表される塩基配列からなる群より選ばれる塩基配列を含む、少なくとも1種である、請求項7に記載の判定薬。
- [請求項9] ミトコンドリアtRNA^{Leu(UUR)}に相補的な10～25塩基からなる塩基配列を含むプライマーおよび逆転写酵素を含有する、老化の判定キット。
- [請求項10] プライマーが配列番号3、4および5で表される塩基配列からなる群より選ばれる塩基配列を含む、少なくとも1種である、請求項9に記載のキット。
- [請求項11] タウリンを有効成分として含有する、ミトコンドリアtRNA^{Leu(UUR)}のタウリン修飾率の改善剤。
- [請求項12] ミトコンドリアtRNA^{Leu(UUR)}が正常なミトコンドリアtRNA^{Leu(UUR)}である、請求項11に記載の改善剤。
- [請求項13] タウリン修飾率の改善が下記式(1)：

[数3]

$$\text{総タウリン修飾率} = \tau m^5 U / (U + \tau m^5 U) \times 100 (\%) \quad (1)$$

(式中、 $\tau m^5 U$ はタウリン修飾を有するtRNA^{Leu(UUR)}からのプライマー伸長産物の量を示し、Uはタウリン修飾を有しないtRNA^{Leu(UUR)}からのプライマー伸長産物の量を示す) により求めた総タウリン修飾率、および/または

下記式（２）：

[数4]

$$\text{正常列の修飾率} = \text{総列の修飾率} / (100 - \text{mtDNA点変異率}) / 100 (\%) \quad (2)$$

（上記式中、mtDNA点変異率は、配列番号1で表されるtRNA^{Leu(UUR)}をコードするDNAにおいて、14位のA（A3243G）、15位のG（G3244A）、29位のT（T3258C）、42位のT（T3271C）および62位のT（T3291C）からなる群より選ばれる点変異の中で最も高い点変異率を示す）により求めた正常タウリン修飾率の改善である、請求項11または12に記載の改善剤。

- [請求項14] 医薬または化粧品である、請求項11または12に記載の改善剤。
- [請求項15] 保健機能食品または食品添加物である、請求項11または12に記載の改善剤。
- [請求項16] ミトコンドリア病を発症した患者、および／または発症リスクを有する対象のミトコンドリアtRNA^{Leu(UUR)}のタウリン修飾率の改善用である、請求項11～15のいずれか1項に記載の改善剤。
- [請求項17] ミトコンドリア病がミトコンドリアtRNA^{Leu(UUR)}のタウリン修飾の欠損遺伝子変異に起因する、請求項16に記載の改善剤。
- [請求項18] ミトコンドリアtRNA^{Leu(UUR)}のタウリン修飾の欠損遺伝子変異が、配列番号1で表されるtRNA^{Leu(UUR)}をコードするDNAにおいて、14位のA（A3243G）、15位のG（G3244A）、29位のT（T3258C）、42位のT（T3271C）および62位のT（T3291C）からなる群より選ばれる点変異である、請求項17に記載の改善剤。
- [請求項19] ミトコンドリア病が、MELASあるいは糖尿病である、請求項16～18のいずれか1項に記載の改善剤。

[1]

Template : mt tRNA^{Leu(UUR)}
Reverse transcription: 5' primer+ dATP+ dTTP+ ddGTP

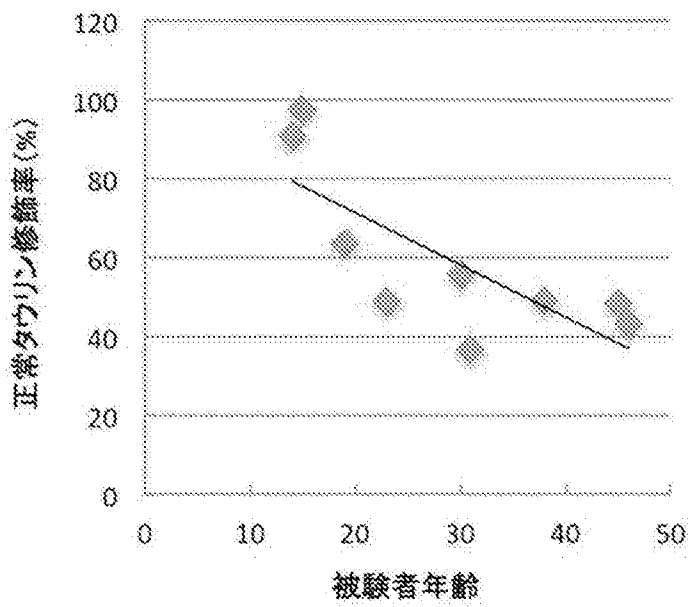
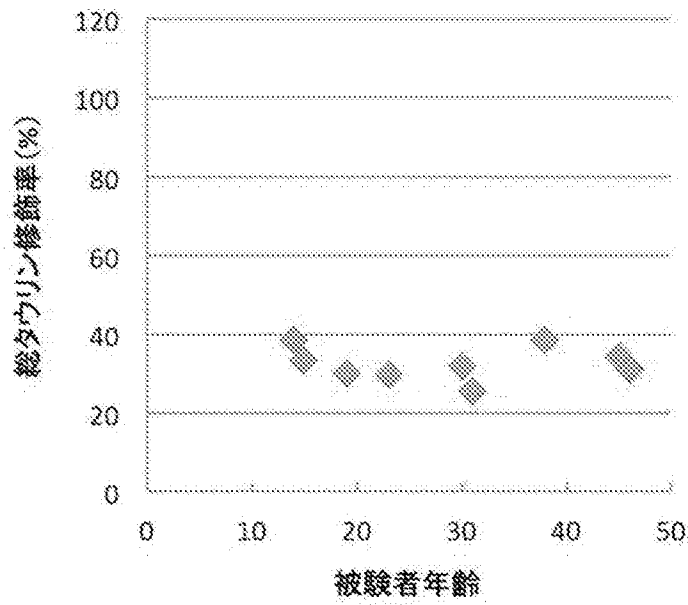
Taurine
(-)

³²P--ACCTCTGACTGTAAAGTTTTAAG
UGGAGACUGACAUUUCAAAAUUCAA* *

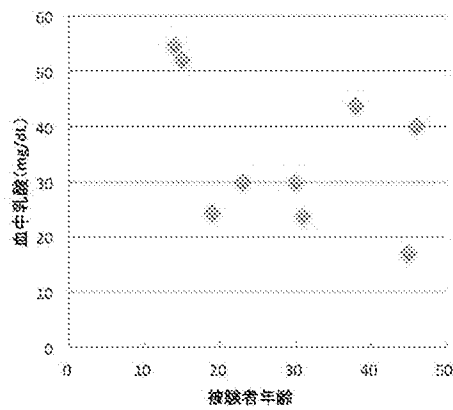
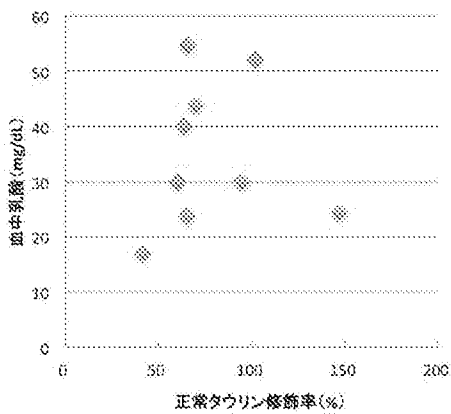
Taurine
(+)

³²P--ACCTCTGACTGTAAAGTTTTAAG
UGGAGACUGACAUUUCAAAAUUCAA* *

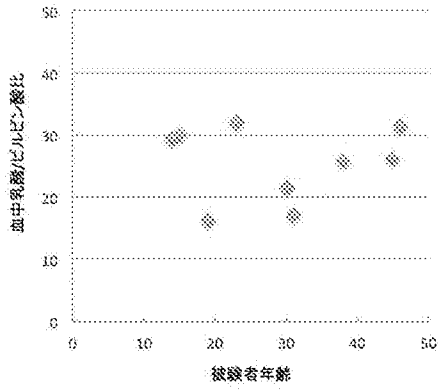
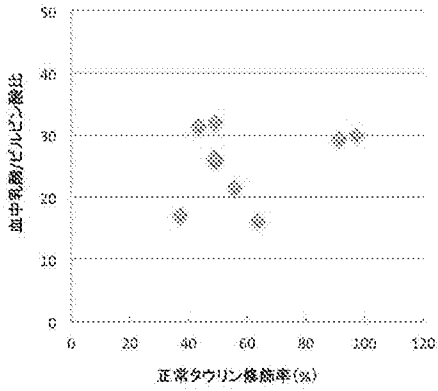
[図2]



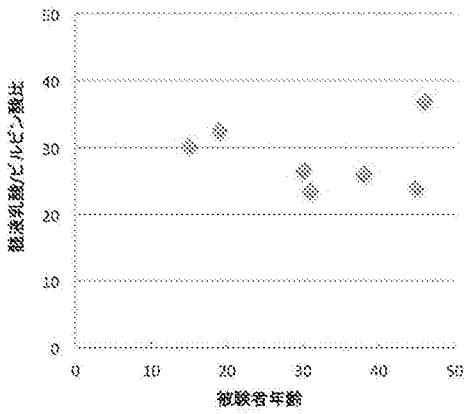
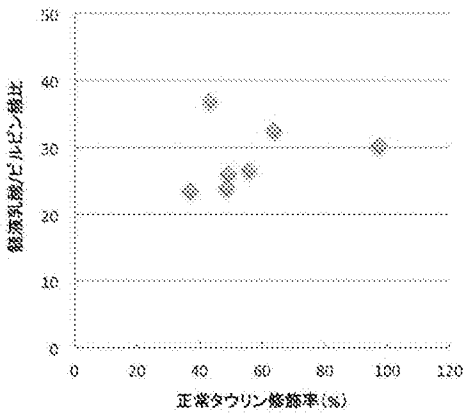
[図3]



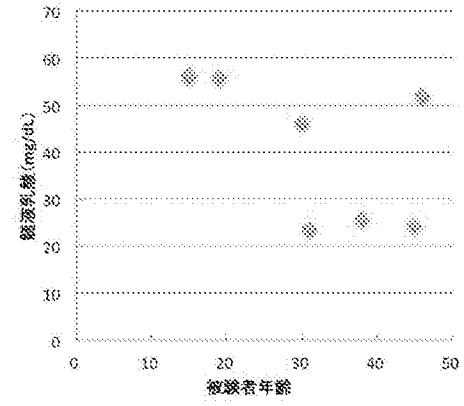
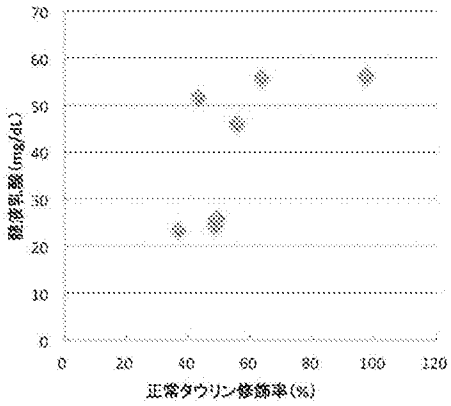
[図4]



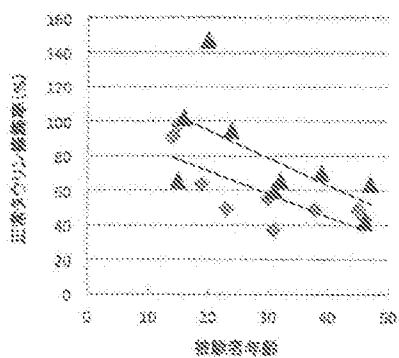
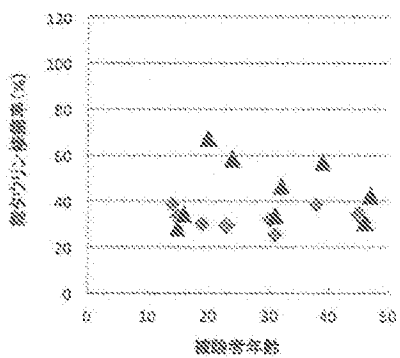
[図5]



[図6]

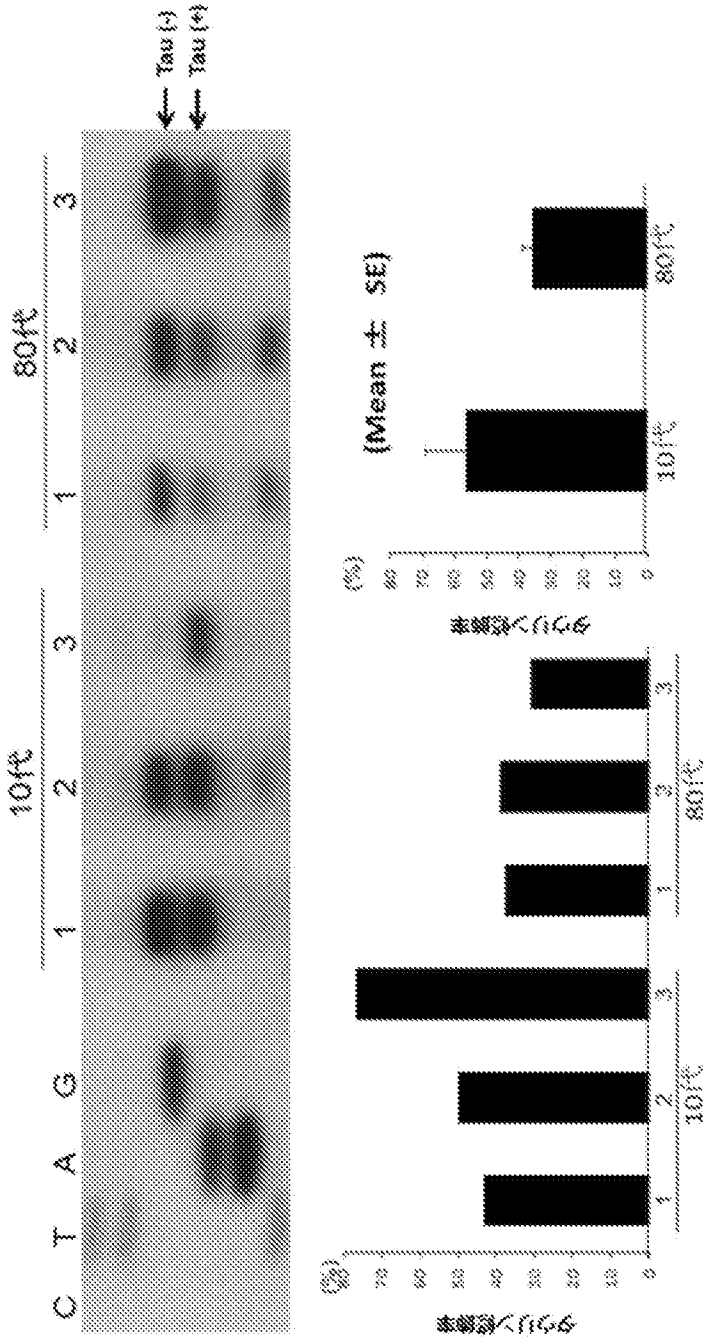


[図7]



タウリン内服前 (◆)、タウリン内服後 (▲)

[図8]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2017/012205

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER <i>C12Q1/68(2006.01)i, A23L33/18(2016.01)i, A61K8/46(2006.01)i, A61K31/185(2006.01)i, A61P43/00(2006.01)i, A61Q19/08(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i, G01N33/68(2006.01)i</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) <i>C12Q1/68, A23L33/18, A61K8/46, A61K31/185, A61P43/00, A61Q19/08, C12N15/09, G01N33/68</i>		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched <i>Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2017 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2017 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2017</i>		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) <i>JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII), CAPlus/MEDLINE/BIOSIS/WPIDS(STN), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq</i>		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/Y/A	RIKIMARU M. et al., Taurine Ameliorates Impaired the Mitochondrial Function and Prevents Stroke-like Episodes in Patients with MELAS, Internal Medicine, 2012, No.51, pp.3351-3357, ISSN 0918-2918, particularly, p.3351, left column, line 1 to p.3352, left column, line 9, p.3355, right column, line 15 to p.3356, right column, line 5	11-19/19/ 1-10
X/Y/A	Yoshihide SUNADA et al., "Taurine supplemental therapy for MELAS", Japanese Journal of Taurin Research, 2015, vol.1, no.1, pages 30 to 32, ISSN 2189-6232, page 31, right column, lines 8 to 21	11-19/19/ 1-10
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 23 May 2017 (23.05.17)		Date of mailing of the international search report 06 June 2017 (06.06.17)
Name and mailing address of the ISA/ Japan Patent Office 3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915, Japan		Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2017/012205

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Shigeo OTA et al., "Mitochondrial tRNA diseases: Defect of modification in anticodon in mutant tRNA molecules", Protein, nucleic acid and enzyme, 2003, vol.48, no.4, pages 493 to 500, ISSN 0039-9450, page 499, right column, lines 10 to 34	19
A	Shigeo OTA, "Mitochondria Ijoshō no Chiryō Senryaku", Japanese Journal for Inherited Metabolic Diseases, 2005, vol.21, no.1, pages 52 to 61, ISSN 0912-0122, particularly, Summary	1-19
A	SUZUKI T. et al., Taurine as a constituent of mitochondrial tRNAs: new insights into the functions of taurine and human mitochondrial diseases, The EMBO Journal, 2002, Vol.21, No.23, pp.6581-6589, ISSN 2460-2075, particularly, Abstract	1-19
A	KIRINO Y. et al., Specific correlation between the wobble modification deficiency in mutant tRNAs and the clinical features of a human mitochondrial disease, PNAS, 2005, Vol.102, No.20, pp.7127-7132, ISSN 1091-6490, p.7128, right column, line 43 to p.7129, left column, line 15	1-19

<p>A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（I P C））</p> <p>Int.Cl. C12Q1/68(2006.01)i, A23L33/18(2016.01)i, A61K8/46(2006.01)i, A61K31/185(2006.01)i, A61P43/00(2006.01)i, A61Q19/08(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i, G01N33/68(2006.01)i</p>												
<p>B. 調査を行った分野</p> <p>調査を行った最小限資料（国際特許分類（I P C））</p> <p>Int.Cl. C12Q1/68, A23L33/18, A61K8/46, A61K31/185, A61P43/00, A61Q19/08, C12N15/09, G01N33/68</p>												
<p>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</p> <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1 9 2 2 - 1 9 9 6 年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1 9 7 1 - 2 0 1 7 年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1 9 9 6 - 2 0 1 7 年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1 9 9 4 - 2 0 1 7 年</td> </tr> </table>			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 7 年	日本国実用新案登録公報	1 9 9 6 - 2 0 1 7 年	日本国登録実用新案公報	1 9 9 4 - 2 0 1 7 年		
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 7 年											
日本国実用新案登録公報	1 9 9 6 - 2 0 1 7 年											
日本国登録実用新案公報	1 9 9 4 - 2 0 1 7 年											
<p>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）</p> <p>JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), Cplus/MEDLINE/BIOSIS/WPIDS (STN), GenBank/EMBL/DBJ/GeneSeq</p>												
<p>C. 関連すると認められる文献</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>引用文献の カテゴリー*</th> <th>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</th> <th>関連する 請求項の番号</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X/Y/ A</td> <td>RIKIMARU M. et al., Taurine Ameliorates Impaired the Mitochondrial Function and Prevents Stroke-like Episodes in Patients with MELAS, Internal Medicine, 2012, No.51, pp.3351-3357, ISSN 0918-2918, 特に p.3351 左欄 1.1-p.3352 左欄 1.9, p.3355 右欄 1.15-p.3356 右欄 1.5</td> <td>11-19/19/ 1-10</td> </tr> <tr> <td>X/Y/ A</td> <td>砂田芳秀 他, ミトコンドリア病MELASに対するタウリン補充療法, タウリンリサーチ, 2015, Vol.1, No.1, pp.30-32, ISSN 2189-6232, p.31 右欄 1.8-21</td> <td>11-19/19/ 1-10</td> </tr> </tbody> </table>			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/Y/ A	RIKIMARU M. et al., Taurine Ameliorates Impaired the Mitochondrial Function and Prevents Stroke-like Episodes in Patients with MELAS, Internal Medicine, 2012, No.51, pp.3351-3357, ISSN 0918-2918, 特に p.3351 左欄 1.1-p.3352 左欄 1.9, p.3355 右欄 1.15-p.3356 右欄 1.5	11-19/19/ 1-10	X/Y/ A	砂田芳秀 他, ミトコンドリア病MELASに対するタウリン補充療法, タウリンリサーチ, 2015, Vol.1, No.1, pp.30-32, ISSN 2189-6232, p.31 右欄 1.8-21	11-19/19/ 1-10	
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/Y/ A	RIKIMARU M. et al., Taurine Ameliorates Impaired the Mitochondrial Function and Prevents Stroke-like Episodes in Patients with MELAS, Internal Medicine, 2012, No.51, pp.3351-3357, ISSN 0918-2918, 特に p.3351 左欄 1.1-p.3352 左欄 1.9, p.3355 右欄 1.15-p.3356 右欄 1.5	11-19/19/ 1-10										
X/Y/ A	砂田芳秀 他, ミトコンドリア病MELASに対するタウリン補充療法, タウリンリサーチ, 2015, Vol.1, No.1, pp.30-32, ISSN 2189-6232, p.31 右欄 1.8-21	11-19/19/ 1-10										
<p><input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。</p>												
<p>* 引用文献のカテゴリー</p> <table border="0"> <tr> <td>「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</td> <td>「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</td> </tr> <tr> <td>「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</td> <td>「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</td> </tr> <tr> <td>「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）</td> <td>「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</td> </tr> <tr> <td>「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献</td> <td>「&」 同一パテントファミリー文献</td> </tr> <tr> <td>「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願</td> <td></td> </tr> </table>			「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	「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	「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	「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	「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）	「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	「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献	「&」 同一パテントファミリー文献	「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願	
「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	「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											
「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	「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											
「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）	「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											
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献	「&」 同一パテントファミリー文献											
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願												
<p>国際調査を完了した日</p> <p>2 3 . 0 5 . 2 0 1 7</p>	<p>国際調査報告の発送日</p> <p>0 6 . 0 6 . 2 0 1 7</p>											
<p>国際調査機関の名称及びあて先</p> <p>日本国特許庁（I S A / J P）</p> <p>郵便番号100-8915</p> <p>東京都千代田区霞が関三丁目4番3号</p>	<p>特許庁審査官（権限のある職員）</p> <p>藤井 美穂</p> <p>電話番号 03-3581-1101 内線 3488</p>	<p>4 N</p> <p>4 4 3 4</p>										

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
Y	太田成男 他, ミトコンドリア tRNA 病 変異 tRNA におけるアンチコドン塩基修飾欠損, 蛋白質核酸酵素, 2003, Vol. 48, No. 4, pp. 493-500, ISSN 0039-9450, p. 499 右欄 1.10-34	19
A	太田成男, ミトコンドリア異常症の治療戦略, 日本先天代謝異常学会雑誌, 2005, Vol. 21, No. 1, pp. 52-61, ISSN 0912-0122, 特に要旨	1-19
A	SUZUKI T. et al., Taurine as a constituent of mitochondrial tRNAs: new insights into the functions of taurine and human mitochondrial diseases, The EMBO Journal, 2002, Vol. 21, No. 23, pp. 6581-6589, ISSN 2460-2075, 特に Abstract	1-19
A	KIRINO Y. et al., Specific correlation between the wobble modification deficiency in mutant tRNAs and the clinical features of a human mitochondrial disease, PNAS, 2005, Vol. 102, No. 20, pp. 7127-7132, ISSN 1091-6490, p. 7128 右欄 1.43-p. 7129 左欄 1.15	1-19