

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2009-159954

(P2009-159954A)

(43) 公開日 平成21年7月23日(2009.7.23)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68 Z N A A	4 B O 2 4
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 A	4 B O 2 9
C 1 2 M 1/00 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 F	4 B O 6 3
G O 1 N 37/00 (2006.01)	C 1 2 M 1/00 A	
G O 1 N 33/53 (2006.01)	G O 1 N 37/00 1 O 2	
審査請求 未請求 請求項の数 14 O L (全 19 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2008-313092 (P2008-313092)	(71) 出願人	899000057 学校法人日本大学
(22) 出願日	平成20年12月9日 (2008.12.9)		東京都千代田区九段南四丁目8番24号
(31) 優先権主張番号	特願2007-321333 (P2007-321333)	(74) 代理人	110000774 特許業務法人 もえぎ特許事務所
(32) 優先日	平成19年12月12日 (2007.12.12)	(72) 発明者	中山 智祥 東京都千代田区九段南四丁目8番24号 学校法人日本大学内
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)	(72) 発明者	水谷 吉宏 東京都千代田区九段南四丁目8番24号 学校法人日本大学内
		(72) 発明者	湯澤 美都子 東京都千代田区九段南四丁目8番24号 学校法人日本大学内
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 網膜色素線条症の原因変異を判定するための方法及びこれに使用されるオリゴヌクレオチド

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 網膜色素線条症 (A S) の判定方法を提供する。

【解決手段】 弾力線維性仮性黄色腫の原因遺伝子である A B C C 6 遺伝子のバリエーションと A S の関連を確認し、A B C C 6 遺伝子のバリエーションを調べることで、59.3%という高確率で発症前の A S の確定的な判定が可能な判定方法を得た。この A S の判定方法を用いることで、A S に対する早期発見、早期治療が可能となる。本発明の判定方法を用いる A S 判定キット、A S 発症予測キット、A S 診療指導キット等の提供は、研究や臨床において有用である。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

判定対象における A B C C 6 遺伝子のバリエントを調べる網膜色素線条症の判定方法。

【請求項 2】

A B C C 6 遺伝子のバリエントが、エキソン 10 に位置する p . R 4 1 9 Q、エキソン 10 に位置する p . E 4 2 2 K、エキソン 19 に位置する c . 2 5 4 2 d e l G、エキソン 23 の欠落である D E L _ エキソン 23、エキソン 27 に位置する c . 3 7 7 4 - 3 7 7 5 i n s C、エキソン 30 に位置する p . E 1 4 2 7 K の 1 以上である請求項 1 に記載の網膜色素線条症の判定方法。

【請求項 3】

A B C C 6 遺伝子のバリエントが、次の 1) ~ 6) のいずれかである請求項 1 又は 2 に記載の網膜色素線条症の判定方法、

1) A B C C 6 遺伝子のエキソン 10 に位置する 4 1 9 番目のアミノ酸が R (アルギニン) から Q (グルタミン) に変わる変異又はエキソン 10 に位置する 1 2 5 6 番目の塩基 (以下、いずれもスタートコドンの A T G の A を 1 番目とした) が G から A に変わる変異、

2) A B C C 6 遺伝子のエキソン 10 に位置する 4 2 2 番目のアミノ酸が E (グルタミン酸) から K (リジン) に変わる変異又はエキソン 10 に位置する 1 2 6 4 番目の塩基が G から A に変わる変異、

3) A B C C 6 遺伝子のエキソン 19 に位置する 2 5 4 2 番目の塩基である G が欠失し、フレームシフトが起こる変異、

4) A B C C 6 遺伝子のイントロン 22 の 5' 端から 6 2 0 番目の塩基対からイントロン 23 の 4 9 3 番目の塩基対までの 3 8 9 7 塩基対が欠失する変異、

5) A B C C 6 遺伝子のエキソン 27 に位置する 3 7 7 4 番目と 3 7 7 5 番目の塩基の間の場所に 1 個新たな C という塩基が挿入 (インサージョン) されてフレームシフトが起こる変異、

6) A B C C 6 遺伝子のエキソン 30 に位置する 1 4 2 7 番目のアミノ酸が E (グルタミン酸) から K (リジン) に変わる変異又はエキソン 30 に位置する 4 2 7 9 番目の塩基が G から A に変わる変異。

【請求項 4】

A B C C 6 遺伝子のバリエントを認識するオリゴヌクレオチド。

【請求項 5】

A B C C 6 遺伝子のバリエントが、p . R 4 1 9 Q、p . E 4 2 2 K、c . 2 5 4 2 d e l G、c . 3 7 7 4 - 3 7 7 5 i n s C 又は p . E 1 4 2 7 K のいずれかである請求項 4 に記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項 6】

オリゴヌクレオチドが、次の 1) ~ 5) のいずれかである請求項 4 又は 5 に記載のオリゴヌクレオチド、

1) A B C C 6 遺伝子のエキソン 10 に位置する 1 2 5 6 番目の塩基が A である塩基配列に結合するオリゴヌクレオチド又はこれに相補的に結合するオリゴヌクレオチド、

2) A B C C 6 遺伝子のエキソン 10 に位置する 1 2 6 4 番目の塩基が A である塩基配列に結合するオリゴヌクレオチド又はこれに相補的に結合するオリゴヌクレオチド、

3) A B C C 6 遺伝子のエキソン 19 に位置する 2 5 4 2 番目の塩基である G が欠失した塩基配列に結合するオリゴヌクレオチド又はこれに相補的に結合するオリゴヌクレオチド、

4) A B C C 6 遺伝子のエキソン 27 に位置する 3 7 7 4 番目と 3 7 7 5 番目の塩基の間の場所に 1 個新たな C という塩基が挿入された塩基配列に結合するオリゴヌクレオチド又はこれに相補的に結合するオリゴヌクレオチド、

5) A B C C 6 遺伝子のエキソン 30 に位置する 4 2 7 9 番目の塩基が A である塩基配列に結合するオリゴヌクレオチド又はこれに相補的に結合するオリゴヌクレオチド。

【請求項 7】

A B C C 6 遺伝子のバリエントを認識するオリゴヌクレオチド。

10

20

30

40

50

オリゴヌクレオチドが、次の 1) ~ 5) のいずれかである請求項 4 ~ 6 のいずれかに記載のオリゴヌクレオチド、

- 1) A B C C 6 遺伝子のエキソン 10 に位置する 1 2 5 6 番目の塩基が A である塩基配列に結合する配列表配列番号 1 1 に記載の全部又は一部のオリゴヌクレオチド、
- 2) A B C C 6 遺伝子のエキソン 10 に位置する 1 2 6 4 番目の塩基が A である塩基配列に結合する配列表配列番号 1 2 に記載の全部又は一部のオリゴヌクレオチド、
- 3) A B C C 6 遺伝子のエキソン 19 に位置する 2 5 4 2 番目の塩基である G が欠失した塩基配列に結合する配列表配列番号 1 3 に記載の全部又は一部のオリゴヌクレオチド、
- 4) A B C C 6 遺伝子のエキソン 27 に位置する 3 7 7 4 番目と 3 7 7 5 番目の塩基の間の場所に 1 個新たな C という塩基が挿入された塩基配列に結合する配列表配列番号 1 4 に記載の全部又は一部のオリゴヌクレオチド、
- 5) A B C C 6 遺伝子のエキソン 30 に位置する 4 2 7 9 番目の塩基が A である塩基配列に結合する配列表配列番号 1 5 に記載の全部又は一部のオリゴヌクレオチド。

10

【請求項 8】

請求項 4 ~ 7 のいずれかに記載のオリゴヌクレオチドをプローブとして有するマイクロアレイ。

【請求項 9】

請求項 8 に記載のマイクロアレイを用いて判定対象における A B C C 6 遺伝子のバリエーションを調べる網膜色素線条症の判定方法。

20

【請求項 10】

A B C C 6 遺伝子のバリエーションが、エキソン 23 の欠落である請求項 4 に記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項 11】

オリゴヌクレオチドが、次の 1) ~ 3) のいずれかである請求項 10 に記載の A B C C 6 遺伝子のバリエーションを認識するオリゴヌクレオチド、

- 1) 配列表配列番号 16 に記載のオリゴヌクレオチド、
- 2) 配列表配列番号 17 に記載のオリゴヌクレオチド、
- 3) 配列表配列番号 18 に記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項 12】

請求項 10 又は 11 に記載のオリゴヌクレオチドを W T __エキソン 23 検出用プライマー又は D E L __エキソン 23 検出用プライマーとして用いて、判定対象における A B C C 6 遺伝子のバリエーションを調べる網膜色素線条症の判定方法。

30

【請求項 13】

判定対象がアジア人である請求項 1 ~ 3、9 又は 12 のいずれかに記載の網膜色素線条症の判定方法。

【請求項 14】

請求項 4 ~ 7、10 又は 11 のいずれかに記載のオリゴヌクレオチドを含む網膜色素線条症判定キット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

40

【0001】

本発明は網膜色素線条症 (Angioid streaks; 以下 AS とする) の判定方法に関する。さらに詳しくは、A B C C 6 遺伝子のバリエーションを調べることによる AS の判定方法に関する。また、この判定方法に用いられる網膜色素線条症判定キットやこれに用いられるオリゴヌクレオチドに関する。

【背景技術】

【0002】

AS は色素線条と呼ばれるブルッフ膜の弾力線維の断裂を生じる疾患であり、AS の症状の進行によって脈絡膜新生血管 (choroidal neovascularization; CNV) が発生すると、高度の視力低下を起こすことが知られている。この発

50

生を避けるべく、ASの早期発見、早期治療が望まれているが、ASは原因不明であるため、従来は発症後に眼底検査や造影検査で判定することしかできず、患者の負担が重いという問題があった。また、軽症のASは無症状であることが多く、通常は眼底検査を受けることがないため、早期発見は困難であった。

【0003】

AS患者は皮膚疾患である弾力線維性仮性黄色腫(Pseudoxanthoma elasticum;以下PXEとする)を高頻度で合併することが知られている(例えば、非特許文献1、参照)。そして、PXEの原因遺伝子として、染色体16p13.1に存在するABCC6遺伝子が報告されている(例えば、非特許文献2参照)。

【0004】

そこで、本発明者らはAS患者とABCC6遺伝子変異の関係をCase-control studyによって調べたところ、rs2239324、rs212620、rs2238470、rs2238472、rs212097と名付けた5個の一塩基多型(single nucleotide polymorphism:以下、SNPとする)において、顕著な有意差を示すことを確認した。

さらに、rs2238472を除くこれらのSNPについてのハプロタイプを用いたCase-control studyにおいても全体の有意差が $p < 0.0001$ と有意であったことから、ABCC6遺伝子がAS原因遺伝子であるとの予測を発表している。

このうち、最も頻度の多いハプロタイプを含めて、この4つのハプロタイプがAS群に占める割合は88.9%であり、Control群に占める割合は44%であったことから、この4つのハプロタイプを持つASサンプルについて塩基配列決定法にて変異検索をすることで、AS群のかなりの量の変異が予測できると考えられた(例えば、非特許文献3参照)。

【0005】

しかし、このようなSNPやハプロタイプを用いた関連解析(case-control study)において単にそれらの頻度分布を統計的に処理し、有意差を出す作業のみでは確定的な判定ができない。すなわち、常染色体劣性遺伝形式の疾患を確定診断するためには、少なくとも変異をホモ接合体で持つ者がControl群には存在しないことを確認するという作業が必要であり、実際、前記SNPやハプロタイプを用いた関連解析では原因SNP等の特定は不可能であった。

従って、現段階において、発症前を含むASの確定的な判定を高い確率で行う方法は得られておらず、臨床において有用なASの判定方法の提供が望まれていた。

【非特許文献1】Clarkson JG, Altman RD. Angioid streaks. Surv Ophthalmol. 1982; 26: 235-246.

【非特許文献2】Struk B, Cai L, Zach S, et al. J Mol Med. 2000; 78: 282-286.

【非特許文献3】水谷吉宏、中山智祥、浅井聡、湯沢美都子、島田宏之、日大医学雑誌、61: 314-318, 2002. 9

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

本発明は、ASの判定方法の提供を課題とする。さらに詳しくは、ABCC6遺伝子のバリエーションを調べることによるASの判定方法の提供を課題とする。

【課題を解決するための手段】

【0007】

本発明者は、上記課題を解決するために鋭意研究を行った結果、ABCC6遺伝子においてアミノ酸配列の変換又はフレームシフトを伴う複数のバリエーション(p.R419Q、p.E422K、c.2542delG、エキソン23の欠落、c.3774-3775insC又はp.E1427K)を調べることで、ASの判定を行うことができることを見出し、本発明を完成するに至った。

10

20

30

40

50

これらのバリエーションを用いる本発明の判定方法は、59.3%という高い確率で発症前のASの確定的な判定が可能であり、臨床における価値が極めて大きく有用である。また、判定対象において、AS患者のみ両染色体に変異が見られている「p.R419Q」、「p.E422K」、「p.E1427K」のバリエーションのいずれかにおいて変異がホモで見つければ、100%に近い確率でASの発症前判定が可能である。

さらに本発明者らはこれらのバリエーションを認識するオリゴヌクレオチドを得て、これを有するAS判定キットを得た。このキットを用いることにより、ASの確定的な判定を容易に行うことができる。

【0008】

すなわち、本発明は次の(1)～(14)の網膜色素線条症の判定方法、網膜色素線条症判定キット等に関する。

(1) 判定対象におけるABCC6遺伝子のバリエーションを調べる網膜色素線条症の判定方法。

(2) ABCC6遺伝子のバリエーションが、p.R419Q、p.E422K、c.2542delG、DEL__エキソン23、c.3774-3775insC又はp.E1427Kの1以上である上記(1)に記載の網膜色素線条症の判定方法。

(3) ABCC6遺伝子のバリエーションが、次の1)～6)のいずれかである上記(1)又は(2)に記載の網膜色素線条症の判定方法、

1) ABCC6遺伝子のエキソン10に位置する419番目のアミノ酸がR(アルギニン)からQ(グルタミン)に変わる変異又はエキソン10に位置する1256番目(以下、いずれもスタートコドンのATGのAを1番目とした)の塩基がGからAに変わる変異、
2) ABCC6遺伝子のエキソン10に位置する422番目のアミノ酸がE(グルタミン酸)からK(リジン)に変わる変異又はエキソン10に位置する1264番目の塩基がGからAに変わる変異、

3) ABCC6遺伝子のエキソン19に位置する2542番目の塩基であるGが欠失し、フレームシフトが起こる変異、

4) ABCC6遺伝子のイントロン22の5'端から620番目の塩基対からイントロン23の493番目の塩基対までの3897塩基対が欠失する変異、

5) ABCC6遺伝子のエキソン27に位置する3774番目と3775番目の塩基の間の場所に1個新たなCという塩基が挿入(インサージョン)されてフレームシフトが起こる変異、

6) ABCC6遺伝子のエキソン30に位置する1427番目のアミノ酸がE(グルタミン酸)からK(リジン)に変わる変異又はエキソン30に位置する4279番目の塩基がGからAに変わる変異。

(4) ABCC6遺伝子のバリエーションを認識するオリゴヌクレオチド。

(5) ABCC6遺伝子のバリエーションが、p.R419Q、p.E422K、c.2542delG、DEL__エキソン23、c.3774-3775insC又はp.E1427Kのいずれかである上記(4)に記載のオリゴヌクレオチド。

(6) オリゴヌクレオチドが、次の1)～5)のいずれかである上記(4)又は(5)に記載のオリゴヌクレオチド、

1) ABCC6遺伝子のエキソン10に位置する1256番目の塩基がAである塩基配列に結合するオリゴヌクレオチド又はこれに相補的に結合するオリゴヌクレオチド、

2) ABCC6遺伝子のエキソン10に位置する1264番目の塩基がAである塩基配列に結合するオリゴヌクレオチド又はこれに相補的に結合するオリゴヌクレオチド、

3) ABCC6遺伝子のエキソン19に位置する2542番目の塩基であるGが欠失した塩基配列に結合するオリゴヌクレオチド又はこれに相補的に結合するオリゴヌクレオチド、

4) ABCC6遺伝子のエキソン27に位置する3774番目と3775番目の塩基の間の場所に1個新たなCという塩基が挿入された塩基配列に結合するオリゴヌクレオチド又はこれに相補的に結合するオリゴヌクレオチド、

10

20

30

40

50

5) A B C C 6 遺伝子のエキソン 30 に位置する 4 2 7 9 番目の塩基が A である塩基配列に結合するオリゴヌクレオチド又はこれに相補的に結合するオリゴヌクレオチド。

(7) オリゴヌクレオチドが、次の 1) ~ 5) のいずれかである上記 (4) ~ (6) のいずれかに記載のオリゴヌクレオチド、

1) A B C C 6 遺伝子のエキソン 10 に位置する 1 2 5 6 番目の塩基が A である塩基配列に結合する配列表配列番号 11 に記載の全部又は一部のオリゴヌクレオチド、

2) A B C C 6 遺伝子のエキソン 10 に位置する 1 2 6 4 番目の塩基が A である塩基配列に結合する配列表配列番号 12 に記載の全部又は一部のオリゴヌクレオチド、

3) A B C C 6 遺伝子のエキソン 19 に位置する 2 5 4 2 番目の塩基である G が欠失した塩基配列に結合する配列表配列番号 13 に記載の全部又は一部のオリゴヌクレオチド、

4) A B C C 6 遺伝子のエキソン 27 に位置する 3 7 7 4 番目と 3 7 7 5 番目の塩基の間の場所に 1 個新たな C という塩基が挿入された塩基配列に結合する配列表配列番号 14 に記載の全部又は一部のオリゴヌクレオチド、

5) A B C C 6 遺伝子のエキソン 30 に位置する 4 2 7 9 番目の塩基が A である塩基配列に結合する配列表配列番号 15 に記載の全部又は一部のオリゴヌクレオチド。

(8) 上記 (4) ~ (7) のいずれかに記載のオリゴヌクレオチドをプローブとして有するマイクロアレイ。

(9) 上記 (8) に記載のマイクロアレイを用いて判定対象における A B C C 6 遺伝子のバリエントを調べる網膜色素線条症の判定方法。

(10) A B C C 6 遺伝子のバリエントが、エキソン 23 の欠落である上記 (4) に記載のオリゴヌクレオチド。

(11) オリゴヌクレオチドが、次の 1) ~ 3) のいずれかである上記 (10) に記載の A B C C 6 遺伝子のバリエントを認識するオリゴヌクレオチド、

1) 配列表配列番号 16 に記載のオリゴヌクレオチド、

2) 配列表配列番号 17 に記載のオリゴヌクレオチド、

3) 配列表配列番号 18 に記載のオリゴヌクレオチド。

(12) 上記 (10) 又は (11) に記載のオリゴヌクレオチドを W T __ エキソン 23 検出用プライマー又は D E L __ エキソン 23 検出用プライマーとして用いて、判定対象における A B C C 6 遺伝子のバリエントを調べる網膜色素線条症の判定方法。

(13) 判定対象がアジア人である上記 (1) ~ (3)、(9) 又は (12) のいずれかに記載の網膜色素線条症の判定方法。

(14) 上記 (4) ~ (7)、(10) 又は (11) のいずれかに記載のオリゴヌクレオチドを含む網膜色素線条症判定キット。

【発明の効果】

【0009】

本発明の A S の判定方法により、A S に対する早期発見ができる。臨床においては臨床像から A S の判定をさらに確かに行うことができ、確診率が高められる。さらに判定後の治療として定期的に診断を受けるという方針を立てることができる。

また、本発明の判定方法に用いられる A S 判定キット、A S 発症予測キット、A S 診療指導キット等の提供により、簡便に A S に対する早期発見を行うことが可能となる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0010】

本発明の「A S の判定方法」とは、判定対象において A B C C 6 遺伝子のバリエントを調べることによって A S の判定を行うことをいう。

A B C C 6 遺伝子のバリエントとしては、A S の判定を行うことができるバリエントであればいずれのものでも良いが、p . R 4 1 9 Q、p . E 4 2 2 K、c . 2 5 4 2 d e l G、D E L __ エキソン 23、c . 3 7 7 4 - 3 7 7 5 i n s C 又は p . E 1 4 2 7 K のいずれかであることが好ましく、これらの 1 以上又はこれらを組み合わせて調べるのが好ましい。判定対象において、これらのバリエントを調べることにより、A S の早期発見を行うことができる。

10

20

30

40

50

【0011】

本発明のA B C C 6 遺伝子のバリエーションを図1に示した。このうち、「p.R 4 1 9 Q」とは、A B C C 6 遺伝子のエキソン10に位置する4 1 9番目のアミノ酸がR（アルギニン）からQ（グルタミン）に変わる変異である。これはエキソン10に位置する1 2 5 6番目の塩基がGからAに変わることによる変異である。

「p.E 4 2 2 K」とは、エキソン10に位置する4 2 2番目のアミノ酸がE（グルタミン酸）からK（リジン）に変わる変異である。これはエキソン10に位置する1 2 6 4番目の塩基がGからAに変わることによる変異である。

「c. 2 5 4 2 del G」とは、エキソン19に位置する2 5 4 2番目の塩基であるGが欠失し、フレームシフトが起こる変異である。

「DEL__エキソン23」とは、イントロン22の一部からエキソン23を含み、イントロン23の一部までを含む一続きの塩基配列が欠失する変異である。具体的にはイントロン22の5'端から6 2 0番目の塩基対からイントロン23の4 9 3番目の塩基対までの3 8 9 7塩基対の欠失という変異である。

「c. 3 7 7 4 - 3 7 7 5 ins C」とは、エキソン27に位置する3 7 7 4番目と3 7 7 5番目の塩基の間の場所に1個新たなCという塩基が挿入されてフレームシフトが起こる変異である。

「p.E 1 4 2 7 K」とは、エキソン30に位置する1 4 2 7番目のアミノ酸がE（グルタミン酸）からK（リジン）に変わる変異である。これはエキソン30に位置する4 2 7 9番目の塩基がGからAに変わることによる変異である。

これらのバリエーションはNational Center for Biotechnology of Information (NCBI)を始めとするOnline databaseには見当たらない新たなバリエーションである。

【0012】

本発明の「A B C C 6 遺伝子のバリエーションを認識するオリゴヌクレオチド」としては、A B C C 6 遺伝子のバリエーションを認識できるオリゴヌクレオチドであればいずれのものも含まれる。

このA B C C 6 遺伝子のバリエーションとしては、p.R 4 1 9 Q、p.E 4 2 2 K、c. 2 5 4 2 del G、c. 3 7 7 4 - 3 7 7 5 ins C又はp.E 1 4 2 7 K等が挙げられる。これらのバリエーションを認識するオリゴヌクレオチドとしては、1) A B C C 6 遺伝子のエキソン10に位置する1 2 5 6番目の塩基がAである塩基配列に結合するオリゴヌクレオチド又はこれに相補的に結合するオリゴヌクレオチド、2) A B C C 6 遺伝子のエキソン10に位置する1 2 6 4番目の塩基がAである塩基配列に結合するオリゴヌクレオチド又はこれに相補的に結合するオリゴヌクレオチド、3) A B C C 6 遺伝子のエキソン19に位置する2 5 4 2番目の塩基であるGが欠失した塩基配列に結合するオリゴヌクレオチド又はこれに相補的に結合するオリゴヌクレオチド又は4) A B C C 6 遺伝子のエキソン27に位置する3 7 7 4番目と3 7 7 5番目の塩基の間の場所に1個新たなCという塩基が挿入された塩基配列に結合するオリゴヌクレオチド又は5) A B C C 6 遺伝子のエキソン30に位置する4 2 7 9番目の塩基がAである塩基配列に結合するオリゴヌクレオチド又はこれに相補的に結合するオリゴヌクレオチド等が挙げられる。

これらの「A B C C 6 遺伝子のバリエーションを認識するオリゴヌクレオチド」をプローブとして有するマイクロアレイを得て、本発明のASの判定方法に用いることができる。

【0013】

さらに、これらのバリエーションを認識するオリゴヌクレオチドとして、1) A B C C 6 遺伝子のエキソン10に位置する1 2 5 6番目の塩基がAである塩基配列に結合する配列表配列番号11に記載のオリゴヌクレオチド、2) A B C C 6 遺伝子のエキソン10に位置する1 2 6 4番目の塩基がAである塩基配列に結合する配列表配列番号12に記載のオリゴヌクレオチド、3) A B C C 6 遺伝子のエキソン19に位置する2 5 4 2番目の塩基であるGが欠失した塩基配列に結合する配列表配列番号13に記載のオリゴヌクレオチド、4) A B C C 6 遺伝子のエキソン27に位置する3 7 7 4番目と3 7 7 5番目の塩基の間

10

20

30

40

50

の場所に1個新たなCという塩基が挿入された塩基配列に結合する配列表配列番号14に記載のオリゴヌクレオチド、5) ABC C6 遺伝子のエキソン30に位置する4279番目の塩基がAである塩基配列に結合する配列表配列番号15に記載のオリゴヌクレオチド等も挙げられる。これらの「ABC C6 遺伝子のバリエーションを認識するオリゴヌクレオチド」の全部又は一部をプローブとして有するマイクロアレイを得て、本発明のASの判定方法に用いることができる。このオリゴヌクレオチドの「一部」として、例えば、各変異部分の塩基とその前後6-15塩基程度の配列を含むオリゴヌクレオチド等が挙げられる。

【0014】

また、本発明の「ABC C6 遺伝子のバリエーションを認識するオリゴヌクレオチド」の対象とするバリエーションとしては、エキソン23の欠落が挙げられる。このバリエーションを認識するオリゴヌクレオチドとしては、1) 配列表配列番号16に記載のオリゴヌクレオチド、2) 配列表配列番号17に記載のオリゴヌクレオチド、3) 配列表配列番号18に記載のオリゴヌクレオチド等が挙げられる。

これらの「ABC C6 遺伝子のバリエーションを認識するオリゴヌクレオチド」をWT__エキソン23検出用プライマー又はDEL__エキソン23検出用プライマーとして用いることで、本発明のASの判定方法に用いることができる。ここで、WT__エキソン23検出用プライマーとは、これを用いてPCRを行うことで、エキソン23の欠落が起きていないWild TypeにおいてはPCRによる増幅が起こるが、エキソン23の欠落が起きているDeletion TypeではPCRによる増幅が起こらないように設定されたプライマーのことをいう。また、DEL__エキソン23検出用プライマーとはエキソン23の欠落が起きていないWild TypeにおいてはPCRによる増幅が起こらず、エキソン23の欠落が起きているDeletion TypeではPCRによる増幅が起こるように設定されたプライマーのことをいう。

【0015】

本発明の判定方法として、判定対象よりDNAを得て、塩基配列決定法、TaqMan (登録商標) PCR法、Invader法やOligo-specific PCR法等の一般に用いられている方法を用いる事でABC C6 遺伝子のバリエーションを調べ、ASの判定を行うことができる。このうち特に塩基配列決定法は、各エキソンについて別々に行うことによって、エキソン内に存在する未知の変異を見出せるために有用である。さらにその変異が既知となった後も各患者がその変異を持つか否かの確認(Genotyping)にも利用できる。

また、TaqMan (登録商標) PCR法によるGenotypingは既知となった変異のみをターゲットとしているが、塩基配列決定法と比べて大量の患者を同時に解析することができるため、時間的、経済的に有用である。

【0016】

塩基配列決定法を用いる検出法としては、ジデオキシ法に基づく塩基配列決定法により本発明のバリエーションを検出することが好ましい。塩基配列決定に用いるシーケンサーキットには、市販のABIシリーズやGEヘルスケアバイオサイエンス社製等を用いることができる。

【0017】

TaqMan (登録商標) PCR法を用いる検出法としては、蛍光標識したアレル特異的オリゴ(TaqMan (登録商標) プローブ)とTaq DNAポリメラーゼによるPCR反応とを利用した方法を用いることが好ましい。まず、TaqMan (登録商標) プローブが鋳型DNAとハイブリダイゼーションし、その後、PCRプライマーからの伸長反応が起こる。これによってTaq DNAポリメラーゼの5'ヌクレアーゼ活性により蛍光色素結合部分が切断されて、蛍光色素が遊離する。この蛍光を検出することで特定のバリエーションを同定し、ゲノムタイプを判定することができる。TaqMan (登録商標) PCR法で用いるアレル特異的オリゴ(TaqMan (登録商標) プローブ)というは、対象とするバリエーションの遺伝子情報に基づいて設定できる。

10

20

30

40

50

【0018】

PCR法を用いる検出法としては、Fidelityの高いDNAポリメラーゼ、例えば、Ex Taq DNAポリメラーゼ（タカラバイオ社）、KOD Dashポリメラーゼ（TOYOBO社）等を用いて判定対象者のゲノムDNAを増幅することが好ましい。用いるプライマーは、対象とするバリエーションを増幅できるようにプライマーの任意の位置にそのバリエーションの塩基配列が含まれるように設定し合成することが好ましい。増幅反応終了後増幅産物の検出を行い、多型の有無を判定する。

数キロ塩基対の長い領域を増幅するにはLong PCR法（タカラバイオ社等）を用いることが好ましい。対象とするバリエーションを増幅できるように設定したプライマーを用いて増幅したPCR産物や、Long PCR法で増幅したPCR産物をアガロースゲル電気泳動することで、多型の有無を判定することもできる。対象とするバリエーションを増幅できるように設定したプライマーとしては、WT_エキソン23検出用プライマーやDEL_エキソン23検出用プライマーを挙げることができる。

10

【0019】

マイクロアレイを用いる検出法としては、支持体上にヌクレオチドプローブが固定されたDNAマイクロアレイを用いることが好ましい。このマイクロアレイには、DNAチップ、Geneチップ、マイクロチップ、ビーズアレイなどを含む。

マイクロアレイを用いる検出法として、まず、判定対象者の染色体DNAのオリゴヌクレオチドを単離し、PCRにより増幅し、蛍光レポーター基により標識する。続いて、標識化DNA/mRNA, total RNAをアレイと共にインキュベートする。次にこのアレイをスキャナーに差し込み、ハイブリダイゼーションパターンを検出する。ハイブリダイゼーションのデータは、プローブアレイに結合した（すなわち標的配列に取り込まれた）蛍光レポーター基からの発光として採集する。標的配列と完全に一致したプローブは、標的配列と一致していない部分を有するものよりも強いシグナルを生じる。アレイ上の各プローブの配列及び位置は分かっているため、相補性によって、プローブアレイと反応させた標的オリゴヌクレオチドの配列を決定することができる。

20

【0020】

インベーター法を用いる検出法としては、アレル特異的オリゴと鋳型とをハイブリダイゼーションすることによりバリエーションを検出することが好ましい。インベーター・オリゴがターゲットDNAとプローブ間の二重鎖に少なくとも1塩基の浸入（インバージョン）を起こして部分的な三重鎖構造を形成すると、構造特異的な5'-ヌクレアーゼがプローブ5'末端部分を切断する。そして、対象とするバリエーションの塩基配列に対応してインバージョンを発生させるインベーター・オリゴを利用することで特定のバリエーションを同定し、ゲノムタイプを判定することができる。インベーター法を行うためのキットは市販されており、この方法により容易にバリエーションを検出することが可能である。

30

【0021】

本発明の「判定対象」は、ABCC6遺伝子のバリエーションを調べることによってASの判定を行うことができるものであればいずれのものでも良いが、アジア人であることが好ましく、日本人であることが特に好ましい。

【0022】

本発明の「AS判定キット」は、本発明の判定方法に用いられることで判定対象におけるASの判定を行うことができるものであれば、いずれのものも含むことができる。例えば、ABCC6遺伝子のバリエーションを認識するオリゴヌクレオチドと、本発明を実施するために必要な1種以上の成分を含むもの等を組み合わせてキットとして用いることもできる。

40

ABCC6遺伝子のバリエーションを認識するオリゴヌクレオチドとしては、ABCC6遺伝子のバリエーションを認識できるオリゴヌクレオチドであればいずれのものも含まれるが、上記のようなオリゴヌクレオチドを用いることができる。

また、本発明を実施するために必要な1種以上の成分としては、例えば、酵素を保存若しくは供給するためのもの、及び/又はバリエーションの検出を実施するために必要な反応成

50

分が挙げられる。具体的には、酵素緩衝液、dNTP、コントロール用試薬（例えば、組織サンプル、ポジティブ及びネガティブコントロール用標的オリゴヌクレオチドなど）、標識用及び/又は検出用試薬、固相支持体、説明書などが挙げられる。また本発明のキットは、必要な成分のうちの一部のみを含む部分的キットであってもよく、その場合には、ユーザーが他の成分を用意することができる。

【0023】

本発明のキットは、上記のA B C C 6 遺伝子のバリエーションを認識するオリゴヌクレオチドを支持体に固定したマイクロアレイを含むこともできる。マイクロアレイは、支持体上に本発明のオリゴヌクレオチドが固定されたものであればよく、DNAチップ、Geneチップ、マイクロチップ、ビーズアレイなどが含まれる。

本発明のA B C C 6 遺伝子のバリエーションを認識するオリゴヌクレオチドを有するキットを用いることにより、治療用の薬物を患者等に使用する前、又は使用後の段階で、判定対象から得たA B C C 6 遺伝子をキット中のオリゴヌクレオチドと反応させることができる。この反応の結果より判定対象の遺伝子型を同定し、同定された遺伝子型によってASの確定的な判定をすることができる。

本発明の「AS判定キット」には、ASが疑われるような患者に対して本発明のA B C C 6 遺伝子のバリエーションを認識するオリゴヌクレオチド等を用いて確定診断の判定に用いる「AS判定キット」、ASを発症していない者に対して行う「AS発症予測キット」、ASを発症した後に遺伝学的な確定診断の判定に用いる「AS診療指導キット」等を含むこともできる。

以下、試験例、実施例をあげて本発明をさらに詳細に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

【実施例1】

【0024】

ASの判定方法

1. DNAの抽出

判定対象者から採血を行った。各対象者においての末梢血全血を用いてゲノムDNAを標準的なフェノール・クロロホルム法で抽出した（例えば、参考文献1参照）。

これらの判定対象者は駿河台日本大学病院眼科を受診した日本人であり、片眼あるいは両眼にCNVを有するAS患者（AS群）54人及びボランティア（コントロール群）150人でインフォームドコンセントを得た者であった。

AS患者（AS群）の年齢は19～78歳、 60.9 ± 10.0 歳（平均±標準偏差）、男性34人、女性20人であった。全ての患者に視力測定、倒像鏡による眼底検査、フルオレセイン蛍光眼底造影（fluorescein angiography；以下FA）を行った。CNVの有無は眼底検査とFAで判断した。54人中41人は当院皮膚科を受診し、PXEの有無は皮膚生検又は視診で判定された。PXEは34人（82.9%）で認められ、7人（17.1%）では認められなかった。

コントロール群の年齢50～81歳、 57.5 ± 6.4 歳（平均±標準偏差）、男性107人、女性43人で血縁関係がない日本人であり、日本大学医学部総合健診センター受診者の中からボランティアを募って行った。

参考文献：Nakayama T, Soma M, Rahmutula D, et al. Med Sci Monit. 2001; 7: 345-349.

【0025】

2. 塩基配列の決定

各対象者におけるA B C C 6 遺伝子の配列情報を次のような手法によって調べた。

即ち、A B C C 6 遺伝子の全31エキソンのそれぞれをはさむようなプライマー対をイントロン領域に設定し、対象者末梢血から抽出したゲノムDNAを鋳型にしてPCRを行い、各領域を増幅した。PCR産物を精製後、ジデオキシ法にて塩基配列決定を行った。エキソン1から、エキソン9までは偽遺伝子と重複するため、既知のアレル特異的プライマーを使用した。

【0026】

1) PCR法

50 ngの上記ゲノムDNA 1 μl、濃度10 pmol/μlの表1に示した配列表配列番号1~10のFプライマー(Forwardプライマー)及びRプライマー(Reverseプライマー)の溶液各々0.2 μl、ヌクレオチド三リン酸(タカラバイオ社製)各々2.5 mMの混合溶液を0.8 μl、10倍緩衝液(20 mMのMgCl₂含有、タカラバイオ社製)1 μl、Ex Taq DNAポリメラーゼ(タカラバイオ社製)5 units/μlを0.05 μl、そして滅菌超純水6.75 μlの混合物、計10 μlの系にて、PCR装置(Applied Biosystems GeneAmp 9700)を用いて増幅した。PCR条件は、95 - 96 で3分間、続いて95 で30秒間(デネチャー)、55 - 66 で30秒間(アニーリング)、72 で1分間(エクステンション)のサイクルを35サイクル、その後、72 で10分間の後、4 に保温とした。

10

エキソン23の欠落に対してはLong PCRを行い増幅した。Long PCRでは、ヌクレオチド三リン酸各々2.5 mMの混合溶液を1.6 μl、DNAポリメラーゼとしてLA Taq DNAポリメラーゼ(タカラバイオ社製)を用い、エクステンションを72 で10分間とした。

【0027】

【表1】

用途	配列番号	プライマー名	塩基配列
エキソン10 増幅用	1	Forward: ABCC6_EX10F2	ctcaaagagccctgag aggttggcc
	2	Reverse: ABCC6_EX10R2	tggttctcccacagcc tcagacttg
エキソン19 増幅用	3	Forward: ABCC6ex19F1	ggcctcaagtgatcca catgctttggc
	4	Reverse: ABCC6ex19R1	attcatgccagtagga cccttcgagcc
エキソン23 Long P CR増幅用	5	Forward: ABCC6ex22F1	ttttctgggagcctcg cctggcctt
	6	Reverse: ABCC6ex24-2R	gacctcaggtctcacc ctctaagg
エキソン27 増幅用	7	Forward: PXEx27SPF1	ctgaagctgatagagg tgggccatc
	8	Reverse: PXEx27SPR2	cctggagttcctttggc ctaaactcc
エキソン30 増幅用	9	Forward: ABCC6_EX30F1	cacacccacacatcac catgtgccg
	10	Reverse: ABCC6_EX30R1	ctccagctctaaccg aagcccagt

20

30

40

【0028】

2) PCR産物の精製

上記1)にて得られたPCR産物内に残存する過剰なプライマー等の一本鎖DNAを大腸菌由来のエキソヌクレアーゼI(ExoI)を用いて特異的に消化した。またシュリンブ由来アルカリホスファターゼ(SAP)によって未反応dNTPsのリン酸基を除去してdNTPsを不活性化した。

この2つの酵素を同時に含むExoSAP-IT(GEヘルスケアバイオサイエンス社製)を用い、先のPCR産物溶液10 μlに2 μl加え計12 μlとして、ヒートプロッ

50

クにて37 で30分で反応を行った後80 で15分にて酵素を失活させた。

【0029】

3) 塩基配列決定法

上記2)にて精製したPCR産物のうち1 μ lを別のチューブにとりわけ、Applied Biosystems社製シーケンシングキット(BigDye(R) Terminators v1.1 Cycle Sequencing Kit)のMix Reaction溶液を8 μ l、PCR法に用いたプライマー(片側)(1pmol/ μ l)を3.2 μ l加え、さらに水を加え20 μ lとした。

シーケンシング条件は95 で10秒間、55 で5秒、60 で2分間のサイクルを25サイクルとした。これをCentricep columns(Princeton Separations社製)で精製後、Applied Biosystems社製ジェネティックアナライザ3700にて解析した。

10

【0030】

3. Genotyping

上記3)で調べたABCC6遺伝子の配列情報についてGenotypingを行った。5個すべては塩基配列決定法で決定した。また、p.R419Q、p.E422K、c.2542delG、c.3774-3775insC及びp.E1427KのGenotypingにおいて、その変異のみをより簡便に検出する方法としてTaqMan(登録商標)PCR法に用いるプローブを設定した。

エキソン23の欠落については、その変異をより簡便に検出する方法のために設定したWild TypeとDeletion Typeとで増幅が異なるプライマー対(WT__エキソン23検出用プライマー対及びDEL__エキソン23検出用プライマー対)を用いて、得られたPCR産物をアガロースゲル電気泳動することで、Genotypingを行った。

20

【0031】

1) p.R419Q、p.E422K、c.2542delG、c.3774-3775insC及びp.E1427Kについて

TaqMan(登録商標)PCR法に用いるプローブの設定

TaqMan(登録商標)PCR法に用いるプローブは、各バリエーションの遺伝子情報に基づいて、各変異部分の塩基とその前後6-15塩基程度の配列をもとに設定できる。プローブ配列を含む周辺の配列を表2(配列表配列番号11~15)に示した。

30

このように設定したTaqMan(登録商標)プローブを用い、TaqMan(登録商標)PCR法を行うことができる。例えば、鋳型DNAとしてヒトゲノムDNA 50ngを用い、各プライマー 900nM、5'側に蛍光プライマーが標識されたTaqManプローブ 200nM(TaqMan(登録商標)SNP Genotyping Assays)、緩衝液とMgCl₂とDNAポリメラーゼとを含んだPCRカクテル(TaqMan Universal Master Mixm)を全体量の半量(12.5 μ l)を入れ、水で満たした全体量25 μ l系にてPCRを行うことで、TaqMan(登録商標)PCR法を行うことができる(PCR条件: 1. 95 10分間、2. 92 15秒間(デネチャー)、3. 60 1分間(アニーリング及びエクステンション)を40サイクル)。

40

【0032】

【表2】

バリエント	配列番号	塩基配列
c. G1256A (p. R419Q)	11	a a t c t g g t g t c c g t g g a c g t g c a g c <u>g g</u> c t g a c c g a g a g c g t c c t c t a c c t c
c. G1264A (p. E422K)	12	g t c c g t g g a c g t g c a g c g g c t g a c c <u>g a</u> g a g c g t c c t c t a c c t c a a c g g g c t
c. 2542delG	13	g c t t c t g c a g a g g a a g g g g g c c c t c <u>g t</u> g t g t c t t c t g g a t c a a g c c a g a c a
c. 3774-3775insC	14	t g c c c a c a t g t g c a g c t c a g c c c c c c <u>c</u> t g g c c t c a g g g c g g g c a g a t c g a g t t
c. G4279A (p. E1427K)	15	g a a g a c c c a g a t c c t c a t c c t g g a c <u>g a</u> g g c t a c t g c t g c c g t g g a c c c t g g

10

【0033】

2) エキソン23の欠落について

PCR法による検出

Long PCR法を用いずに一般的なPCRで判定できるように新たなWT__エキソン23検出用プライマー、DEL__エキソン23検出用プライマーを設定してPCRを行った。PCRとして、50ngのヒトゲノムDNA1μl、濃度10pmol/μlの表3に示した配列表配列番号16~18のFプライマー及びRプライマーの溶液各々0.2μl、ヌクレオチド三リン酸(タカラバイオ社製)各々2.5mMの混合溶液を0.8μl、25mMのMgCl₂ 1μl、10倍緩衝液(20mMのMgCl₂ 含有、タカラバイオ社製)1μl、Ex Taq DNAポリメラーゼ(タカラバイオ社製)5units/μlを0.05μl、そして滅菌超純水6.75μlの混合物、計10μlの系にて、PCR装置(Applied Biosystems GeneAmp9700)を用いて増幅した。PCR条件は、95-96で3分間、続いて95で30秒間(デネチャー)、55-66で30秒間(アニーリング)、72で1分間(エクステンション)のサイクルを35サイクル、その後、72で10分間の後、4に保温とした。

20

30

【0034】

【表3】

用途	配列番号	プライマー名	塩基配列
WT__エキソン23検出用	16	Forward: ABCC6D23F1	a c a c a a a g g a t c c t g a c a c c c a t c
	17	Reverse: ABCC6D23R1	a g a g a c t g a a c a g g g g a t a c g a c t
DEL__エキソン23検出用	16	Forward: ABCC6D23F1	a c a c a a a g g a t c c t g a c a c c c a t c
	18	Reverse: ABCC6D23R3	c c c a g g t g a t a c t a c t g c t g g t c

40

【0035】

その結果、図2で示すように、Wild Typeにおいては、WT__エキソン23検出用プライマー対によって449bpの増幅産物が得られた。また、DEL__エキソン23検出用プライマー対ではプライマー間の距離があるので72 1分間の伸長条件では増幅しなかった。

一方、図3で示すように、Deletion TypeではWT__エキソン23検出用

50

プライマー対ではイントロン22の一部からエキソン23を含み、イントロン23の一部までを含む一続きの塩基配列が欠失しているため、増幅しなかった。また、DEL__エキソン23検出用プライマー対ではこの欠失によりプライマー間の距離が縮み442bpの増幅産物が得られた。

【0036】

4. ASの確定的な判定

上記1～3の工程によって得られた結果より各判定者におけるASの確定的な判定を行った。その結果、表4に示すように、p.R419Q、p.E422K、c.2542delG、DEL__エキソン23、c.3774-3775insC又はp.E1427Kの6種類のバリエーションについて変異を調べたところ、これら6種類のバリエーションの変異はAS 54人中32人に見出され、59.3%という高い頻度でこの6種類のバリエーションの変異がASの原因として関与していることが示された。32人の内訳は両染色体17人(31.5%)、片染色体15人(27.8%)であり、この結果によってAS患者の31.5%がこの5種類によって完全に説明可能となった。従って、これら5種類のバリエーションの変異を示すもののうち、57.4%がAS患者として確定的な判定がされることが示された。

10

【0037】

【表4】

疾患の原因変異 (AS54人 Control150人)

エキソン	変異名	AS			Control		
		W/W	W/M	M/M	W/W	W/M	M/M
Ex10	c. G1256A (p. R419Q)	45	3	6	150	0	0
Ex10	c. G1264A (p. E422K)	53	1	0	150	0	0
Ex19	c. 2542delG	34	13	7	149	1	0
EX23	DEL__エキソン23	52	0	2	150	0	0
Ex27	c. 3774-3775insC	53	1	0	147	0	0
EX30	c. G4279A (p. E1427K)	53	1	0	150	0	0

20

W: Wild (野生型)

M: Mutation (変異型)

30

【実施例2】

【0038】

AS判定キットの作製

ABCC6遺伝子のバリエーションを認識するオリゴヌクレオチド、酵素緩衝液、dNTP、コントロール用試薬、標識用及び/又は検出用試薬、固相支持体、説明書を組み合わせてキットとした。

40

ABCC6遺伝子変異部位を含むオリゴヌクレオチドとして、次の1)～5)の1以上のオリゴヌクレオチドを用いた。

1) ABCC6遺伝子のエキソン10に位置する1256番目の塩基がAである塩基配列に結合するオリゴヌクレオチド又はこれに相補的に結合するオリゴヌクレオチド、

2) ABCC6遺伝子のエキソン10に位置する1264番目の塩基がAである塩基配列に結合するオリゴヌクレオチド又はこれに相補的に結合するオリゴヌクレオチド、

3) ABCC6遺伝子のエキソン19に位置する2542番目の塩基であるGが欠失した塩基配列に結合するオリゴヌクレオチド又はこれに相補的に結合するオリゴヌクレオチド

50

4) ABC C6 遺伝子のエキソン 27 に位置する 3774 番目と 3775 番目の塩基の間の場所に 1 個新たな C という塩基が挿入された塩基配列に結合するオリゴヌクレオチド又はこれに相補的に結合するオリゴヌクレオチド、

5) ABC C6 遺伝子のエキソン 30 に位置する 4279 番目の塩基が A である塩基配列に結合するオリゴヌクレオチド又はこれに相補的に結合するオリゴヌクレオチド。

【産業上の利用可能性】

【0039】

本発明の AS の判定方法を用いることで、AS に対する早期発見、早期治療が可能となる。本発明の判定方法を用いる AS 判定キット、AS 発症予測キット、AS 診療指導キット等の提供は、研究や臨床において有用である。

10

【図面の簡単な説明】

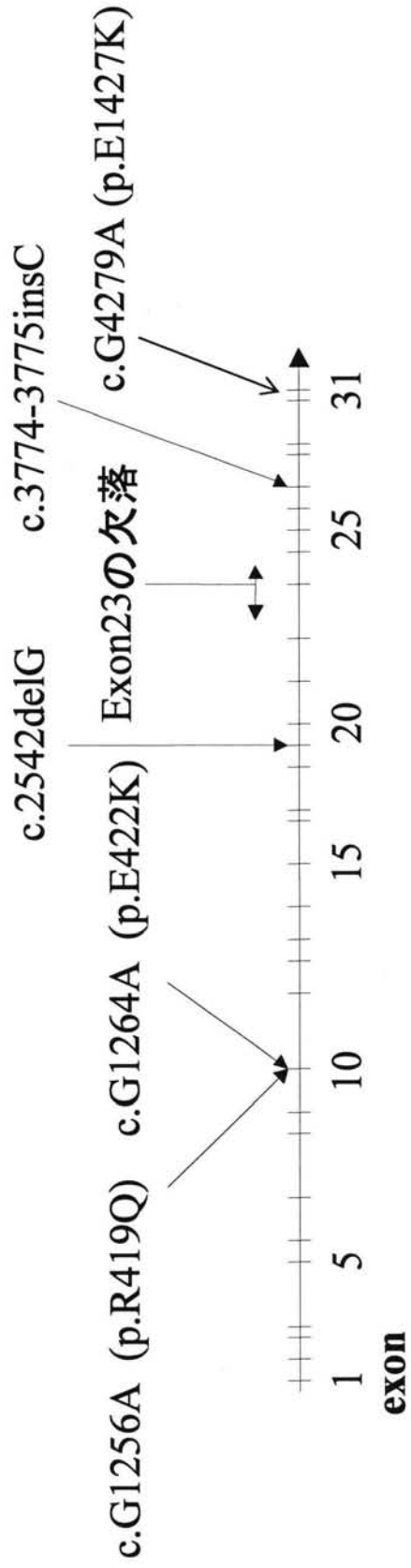
【0040】

【図 1】ABC C6 遺伝子のバリエーションを示した図である。

【図 2】エキソン 23 の欠落部位を Wild type (健常者) での増幅で示した図である (実施例 1)。

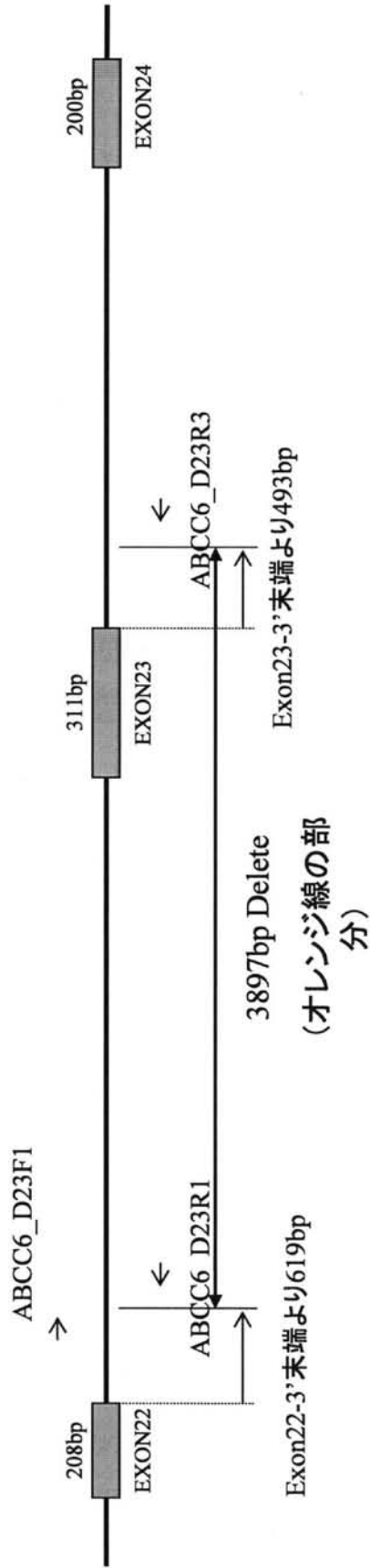
【図 3】エキソン 23 の欠落部位を Deletion type (患者) での増幅で示した図である (実施例 1)。

【 図 1 】



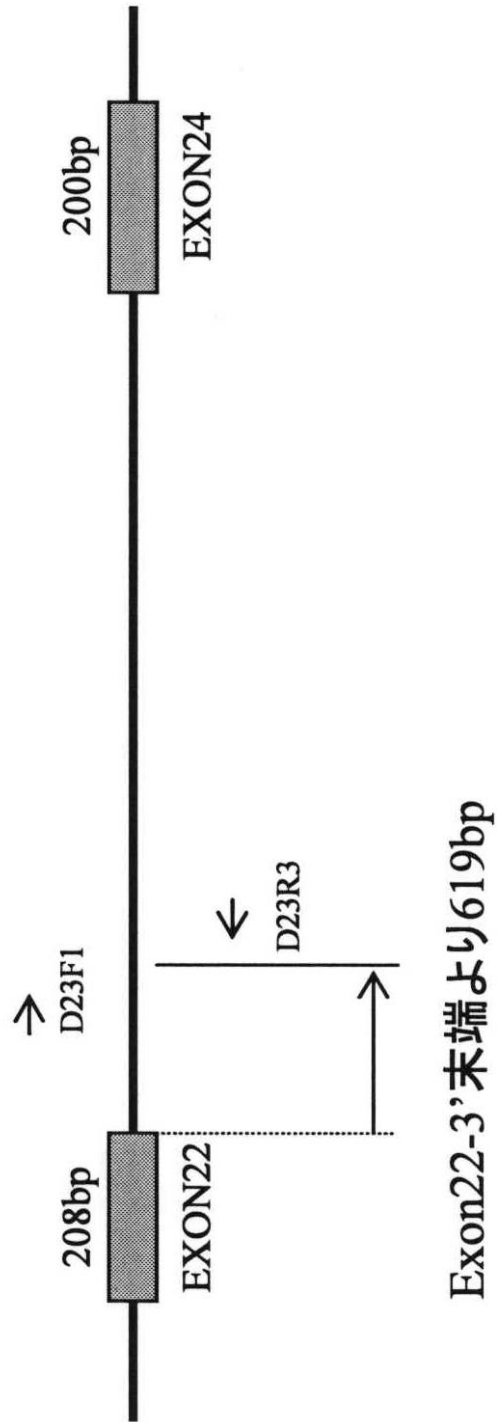
【 図 2 】

Wild Typeの増幅



【 図 3 】

Deletion Type の増幅



【 配列表 】

2009159954000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I テーマコード(参考)
G 0 1 N 33/53 M

(72)発明者 佐藤 直之

東京都千代田区九段南四丁目 8 番 2 4 号 学校法人日本大学内

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA11 CA01 CA09 HA14

4B029 AA07 FA15

4B063 QA08 QA19 QQ08 QQ28 QQ42 QR08 QR32 QR55 QR62 QR77

QS25 QS34 QX01